



ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ

ΜΑΡΙΑ ΤΡΑΠΑΛΗ
ΓΕΩΡΓΙΟΣ ΑΛΒΕΡΤΟΣ ΚΑΡΙΚΑΣ
ΠΕΤΡΟΣ ΚΑΡΚΑΛΟΥΣΟΣ
ΧΡΙΣΤΙΝΑ ΦΟΥΝΤΖΟΥΛΑ

ΚΑΛΛΙΠΟΣ
ανοικτές
εξδόσεις
ακαδημαϊκές



Εθνικό
Πρόγραμμα
Ανάπτυξης
2021-2025

ΜΑΡΙΑ ΤΡΑΠΑΛΗ

Λέκτορας

Τμήμα Βιοϊατρικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής

ΓΕΩΡΓΙΟΣ ΑΛΒΕΡΤΟΣ ΚΑΡΙΚΑΣ

Ομότιμος Καθηγητής

Τμήμα Βιοϊατρικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής

ΠΕΤΡΟΣ ΚΑΡΚΑΛΟΥΣΟΣ

Αναπληρωτής Καθηγητής

Τμήμα Βιοϊατρικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής

ΧΡΙΣΤΙΝΑ ΦΟΥΝΤΖΟΥΛΑ

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια

Τμήμα Βιοϊατρικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ



ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ

Συγγραφή

ΜΑΡΙΑ ΤΡΑΠΑΛΗ

ΓΕΩΡΓΙΟΣ ΑΛΒΕΡΤΟΣ ΚΑΡΙΚΑΣ

ΠΕΤΡΟΣ ΚΑΡΚΑΛΟΥΣΟΣ

ΧΡΙΣΤΙΝΑ ΦΟΥΝΤΖΟΥΛΑ

Κριτικός αναγνώστης

ΓΕΩΡΓΙΟΣ ΑΛΒΕΡΤΟΣ ΚΑΡΙΚΑΣ

Συντελεστές έκδοσης

Γλωσσική Επιμέλεια: Όνομα (style: Sintelestes)

Γραφιστική Επιμέλεια: ΕΥΘΥΜΙΑ ΣΤΑΘΗ



Το παρόν έργο αδειοδοτείται υπό τους όρους της άδειας Creative Commons Αναφορά Δημιουργού - Μη Εμπορική Χρήση - Παρόμοια Διανομή 4.0. Για να δείτε ένα αντίγραφο της άδειας αυτής επισκεφτείτε τον ιστότοπο <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/deed.el>

Αν τυχόν κάποιο τμήμα του έργου διατίθεται με διαφορετικό καθεστώς αδειοδότησης, αυτό αναφέρεται ρητά και ειδικώς στην οικεία θέση.

ΚΑΛΛΙΠΟΣ

Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο

Ηρώων Πολυτεχνείου 9, 15780 Ζωγράφου

www.kallipos.gr

ISBN:

Βιβλιογραφική Αναφορά: Τράπαλη, Μ., Καρίκας, Γ.Α., Καρκαλούσος, Γ. & Φούντζουλα, Χ. (2022). *Πειραματική Βιοχημεία* [Προπτυχιακό εγχειρίδιο]. Κάλλιπος, Ανοικτές Ακαδημαϊκές Εκδόσεις. <http://hdl.handle.net/>(συμπληρώνεται από την ΚΟΥ)

Αφιερώνεται στους φοιτητές μας

Πίνακας περιεχομένων

Πίνακας περιεχομένων	6
Πίνακας συντομεύσεων-ακρωνυμίων	14
Πρόλογος.....	17
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1	19
ΣΚΕΥΗ ΚΑΙ ΣΥΣΚΕΥΕΣ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟΥ – ΑΣΦΑΛΕΙΑ ΣΤΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ – ΑΞΙΟΠΙΣΤΙΑ ΑΝΑΛΥΤΙΚΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ	19
ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	19
1.1 Σκεύη και όργανα εργαστηρίου – Χρήση αυτών	19
1.1.1 Ογκομετρικά σκεύη.....	19
1.1.2 Μη ογκομετρικά σκεύη	20
1.1.3 Γυάλινα σκεύη.....	20
1.1.3.1 Τρόπος ανάγνωσης ένδειξης αυτόματης πιπέττας.....	23
1.1.4 Από πορσελάνη	28
1.1.5 Πλαστικά	28
1.1.6 Μεταλλικά	30
1.2 Οδηγίες χρήσης εργαστηριακών συσκευών	31
1.2.1 Ηλεκτρονικός Ζυγός.....	31
1.2.2 Φυγόκεντρος.....	33
1.2.3 pH-μετρο	34
1.2.4 Φωτόμετρο Bausch & Lomb	35
1.3. Κανόνες ασφάλειας του εργαστηρίου	35
1.4 Αξιοπιστία των αναλυτικών μεθόδων	36
1.5 Σφάλματα στις μετρήσεις.....	38
1.5.1 Συστηματικά σφάλματα	38
1.5.2 Τυχαία σφάλματα	39
1.5.3 Ορθότητα – Πιστότητα – Ολικό σφάλμα αναλυτικής μεθόδου	39
1.6 Ενδεικτικές ασκήσεις	41
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	41
1.7 Εργαστηριακή άσκηση: Εσωτερικός έλεγχος λειτουργίας πιπέττας.....	41
Βιβλιογραφικές Αναφορές	44
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2	45
ΘΕΩΡΙΑ ΚΑΙ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΑΣΚΗΣΕΙΣ ΣΤΑ ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ	45
ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	45
2.1 Κυριότερες εκφράσεις περιεκτικότητας διαλυμάτων – Νόμος αραίωσης – Επίλυση προβλημάτων.....	45
2.1.1 Κυριότερες εκφράσεις περιεκτικότητας διαλυμάτων.....	46
2.1.2 Νόμος αραίωσης και ανάμιξης διαλυμάτων.....	47
2.1.3 Επίλυση προβλημάτων	48

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	52
2.2 Εργαστηριακή άσκηση: Πειραματικές διαδικασίες παρασκευής διαλύματος: 1. από στερεό και 2. από πυκνότερο διάλυμα – Στάδια παρασκευής.....	52
2.2.1 Από στερεό.....	52
2.2.2 Από πυκνότερο διάλυμα.....	53
2.3 Εργαστηριακή άσκηση: Διαδοχικές αραιώσεις.....	54
2.3.1 Μικροβιακή σύσταση του παστεριωμένου γάλακτος με τη μέθοδο των διαδοχικών αραιώσεων και της διασποράς σε τρυβλίο.....	55
2.4 Εργαστηριακή άσκηση: Παρασκευή διαλυμάτων.....	56
Βιβλιογραφικές Αναφορές.....	58
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3.....	59
ΘΕΩΡΙΑ ΚΑΙ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΑΣΚΗΣΕΙΣ ΣΤΑ ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΑ ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ.....	59
ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	59
3.1 Νερό, ιοντισμός και ιδιότητες.....	59
3.2 Τύποι υπολογισμού pH ισχυρού οξέος, ισχυρής βάσης, ασθενούς οξέος, ασθενούς βάσεως. Ρυθμιστικά διαλύματα (ρυθμιστικά διαλύματα ανθρώπινου οργανισμού) – Ρυθμιστική ικανότητα – Μέτρηση pH – Εξίσωση Henderson-Hasselbach – Επίλυση ασκήσεων.....	62
3.2.1 Το pH.....	62
3.2.2 Υπολογισμός pH υδατικών διαλυμάτων.....	62
3.2.3 Ρυθμιστικά διαλύματα.....	65
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	67
3.3 Εργαστηριακή άσκηση: Διαδικασία και αναλυτικοί υπολογισμοί εργαστηριακής άσκησης προσδιορισμού pH ρυθμιστικού διαλύματος (αρχικά και μετά την προσθήκη ισχυρού οξέος ή ισχυρής βάσεως).....	67
3.4 Εργαστηριακή άσκηση: Εύρεση αρχικής συγκέντρωσης ασθενούς οξέος και άλατος αυτού με γνωστή την τελική συγκέντρωση και το pH του ρυθμιστικού διαλύματος.....	70
3.5 Εργαστηριακή άσκηση: Μέτρηση pH με τη χρήση pH-μέτρου (πεχαμέτρου).....	71
3.5.1 Το pH-μετρο.....	71
3.5.2 Μέτρηση του pH με τη χρήση pH-μέτρου.....	72
Βιβλιογραφικές Αναφορές.....	76
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4.....	77
ΘΕΩΡΙΑ ΚΑΙ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΑΣΚΗΣΕΙΣ ΣΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΠΕΠΤΙΔΙΩΝ, ΔΙΑΔΙΚΤΥΟ ΚΑΙ ΒΑΣΕΙΣ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ.....	77
ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	77
4.1 Ταξινόμηση αμινοξέων – Διαλυτότητα – Οξεοβασική συμπεριφορά – Ισοηλεκτρικό σημείο – Οπτική ισομέρεια.....	77
4.1.1 Είδη αμινοξέων.....	78
4.1.2 Πεπτιδικός δεσμός.....	79
4.1.3 Διαλυτότητα, οξεοβασική συμπεριφορά.....	80
4.1.4 Ισοηλεκτρικό σημείο (pI).....	81
4.1.5 Οπτική ισομέρεια.....	82
4.1.6 Κατάταξη πρωτεϊνών.....	82
4.2 Μέθοδοι προσδιορισμού συνολικών πρωτεϊνών.....	84

4.2.1	Δομές πρωτεϊνών - Μέθοδοι προσδιορισμού επιμέρους δομών πρωτεϊνών - Πρωτεϊνικές δομές.....	84
4.2.2	Πρωτοταγής δομή (Ala ¹ , Ser ² , Leu ¹³⁰ , Tyr ¹³¹ , Lys ¹³²)	85
4.2.3	Δευτεροταγής δομή (α-έλικα, β-δομή)	85
4.2.4	Τριτοταγής δομή.....	86
4.2.5	Τεταρτοταγής δομή	87
4.2.6	Πεμπτοταγής δομή	87
4.2.7	Προσδιορισμός των επιμέρους δομών μιας πρωτεΐνης	87
4.2.8	Προσδιορισμός της πρωτοταγούς δομής μιας πρωτεΐνης.....	88
4.3.	Μετουσίωση πρωτεϊνών	89
4.4	Απομόνωση – Διαχωρισμός πρωτεϊνών	89
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟ ΜΕΡΟΣ		90
4.5	Εργαστηριακή άσκηση: Ανίχνευση αμινοξέων: Αντίδραση νινυδρίνης – Αντίδραση ξανθοπρωτεΐνης.....	90
4.5.1	Αντίδραση νινυδρίνης	90
4.5.2	Ποιοτική πιστοποίηση αμινοξέων, με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας	91
4.5.3	Αντίδραση ξανθοπρωτεΐνης	92
4.5.4	Εργαστηριακή άσκηση: Αντίδραση διουρίας – Ανίχνευση πρωτεϊνών/πεπτιδίων.....	92
4.5.5	Εργαστηριακή άσκηση: Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών - Μέθοδος Bradford	93
4.6	Εργαστηριακή άσκηση: Προσδιορισμός ισοηλεκτρικού σημείου (pI) πρωτεϊνών	95
4.7	Εργαστηριακή άσκηση: Καθίζηση πρωτεϊνών	96
4.8	Εργαστηριακή άσκηση: Διαδίκτυο και βάσεις δεδομένων πρωτεϊνών	97
Βιβλιογραφικές Αναφορές		103
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5		104
ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΗΣ ΟΡΑΤΟΥ-ΥΠΕΡΙΩΔΟΥΣ.....		104
ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....		104
5.1	Ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία - Ηλεκτρομαγνητικό φάσμα.....	104
5.2	Αλληλεπίδραση ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας - ύλης.....	105
5.3	Απορρόφηση και διαπερατότητα.....	108
5.3.1	Νόμος της bert-Beer	108
5.3.2	Αποκλίσεις από τον Νόμο Lambert-Beer.....	109
5.4	Εφαρμογές φασματοφωτομετρίας.....	111
5.4.1	Ποιοτική ανάλυση- Φάσμα Απορρόφησης	111
5.4.2	Ποσοτική ανάλυση - Χάραξη πρότυπης καμπύλης.....	111
5.5	Οργανολογία στη φασματοφωτομετρία	111
5.5.1	Τύποι φασματοφωτομέτρων UV-vis	111
5.5.2	Πηγές ακτινοβολίας.....	112
5.5.3	Επιλογή μήκους κύματος.....	113
5.5.4	Κυψελίδες δείγματος.....	113
5.5.5	Ανιχνευτές	114
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟ ΜΕΡΟΣ.....		114

5.6 Εκμάθηση φωτομετρικού προσδιορισμού.....	114
5.6.1 Πειραματική πορεία	114
5.7 Εκμάθηση φωτομετρικού προσδιορισμού.....	116
5.7.1 Χρησιμοποιούμενα διαλύματα/αντιδραστήρια	116
5.7.2 Πειραματική πορεία	116
5.8 Ποσοτικός προσδιορισμός ολικών πρωτεϊνών σε ορό αίματος με τη μέθοδο της διουρίας (Biuret test)..	118
5.8.1 Όργανα-Αντιδραστήρια.....	119
5.8.2 Πειραματική πορεία	119
5.9 FRAP-Αντιοξειδωτική ικανότητα πλάσματος.....	120
5.9.1 Αρχή μεθόδου.....	120
5.9.2 Υλικά αντιδραστήρια.....	120
5.9.3 Πειραματική διαδικασία.....	120
5.9.3.1 Μέτρηση επιπέδων ουρικού οξέος πλάσματος.....	121
5.10 In vitro αντιοξειδωτική δράση – Μέθοδος DPPH.....	121
5.10.1 Αρχή μεθόδου.....	121
5.10.2 Υλικά αντιδραστήρια.....	121
5.10.3	121
Πειραματική διαδικασία.....	121
Βιβλιογραφικές Αναφορές	124
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6	125
ΘΕΩΡΙΑ ΚΑΙ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΑΣΚΗΣΕΙΣ ΣΤΑ ENZYMA.....	125
ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	125
6.1 Δομή, λειτουργία, ποσοτικοποίηση των ενζύμων	125
6.2 Παράγοντες που επηρεάζουν τους ρυθμούς των ενζυμικών αντιδράσεων	128
6.3 Κινητική ενζυμικής αντίδρασης: α) Εξίσωση Michaelis-Menten, β) Εξίσωση Lineweaver-Burk	133
6.4 Τα ένζυμα στην κλινική διάγνωση και τη φαρμακολογία.....	139
6.5 Φωτομετρικές μεθοδολογίες στην κλινική ανάλυση: α) μέθοδος τελικού σημείου, β) κινητική μέθοδος	141
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	144
6.6 Εργαστηριακή άσκηση: Προσδιορισμός της αρχικής ταχύτητας μιας ενζυμικής αντίδρασης και μελέτη της επίδρασης της συγκέντρωσης του υποστρώματος σε αυτήν	144
6.7. Εργαστηριακή άσκηση: Η επίδραση του pH στην ενζυμική αντίδραση	146
6.8 Εργαστηριακή άσκηση: Η επίδραση της θερμοκρασίας στην ενζυμική αντίδραση	147
6.9 Εργαστηριακή άσκηση: Προσδιορισμός γλυκόζης μέσω ενζύμων.....	148
6.10 Εργαστηριακή άσκηση: Ημιποσοτικός προσδιορισμός αμυλάσης σε δείγμα ούρων.....	149
Βιβλιογραφικές Αναφορές	151
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7	152
ΘΕΩΡΙΑ ΚΑΙ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΑΣΚΗΣΕΙΣ ΣΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΥΔΑΤΑΝΘΡΑΚΩΝ	152
ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	152
7.1 Γενικά περί υδατανθράκων – Ταξινόμηση.....	152
7.1.1 Ανάγοντα Σάκχαρα.....	157

7.1.2 Αντιδράσεις μονοσακχαριτών	157
7.1.2.1 Αντιδράσεις σχηματισμού γλυκοζιτών/αιθέρων	158
7.1.2.2 Αντιδράσεις εστεροποίησης	159
7.1.2.3 Αντιδράσεις αναγωγής/οξειδωσης.....	159
7.1.3 Δισακχαρίτες -Πολυσακχαρίτες	160
7.1.3.1 Υδατάνθρακες και παράγωγά τους, σε σημαντικά βιολογικά μόρια.....	161
7.1.4 Γλυκόλυση (καταβολισμός γλυκόζης)	162
7.1.5 Ανίχνευση υδατανθράκων - Δοκιμασίες: Molisch, Benedict, Fehling, Barfoed, Seliwanoff, Ιωδίου	163
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	166
7.2 Εργαστηριακή άσκηση: Προσδιορισμός ανάγοντων σακχάρων-Δοκιμασία Benedict	166
7.3 Εργαστηριακή άσκηση: Δοκιμασίες Molisch, Fehling, Barfoed, Seliwanoff	166
7.3.1 Δοκιμασία Molisch.....	166
7.3.2 Δοκιμασία Fehling.....	167
7.3.3 Δοκιμασία Barfoed	167
7.3.4 Δοκιμασία Seliwanoff	168
7.4 Εργαστηριακή άσκηση: Ανίχνευση μεταβολικού ενδιάμεσου (πυροσταφυλικού) με αναστολή του ενζύμου πυροσταφυλική αποκαρβοξυλάση (σε κύτταρα ζυμομύκητα)	168
7.4.1 Ανίχνευση πυροσταφυλικού σε κύτταρα ζυμομύκητα.....	169
7.5 Εργαστηριακή άσκηση: Προσδιορισμός ενεργότητας πυροσταφυλικής αποκαρβοξυλάσης με συζευγμένη αντίδραση αλκοολικής αφυδρογονάσης.....	170
Βιβλιογραφικές Αναφορές	175
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8	176
8 ΘΕΩΡΙΑ ΚΑΙ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΑΣΚΗΣΕΙΣ ΣΤΙΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ	176
ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	176
8.1 Γενικά περί χρωματογραφίας, διαχωρισμού, πολικότητας.....	176
8.2 Είδη χρωματογραφικών τεχνικών	177
8.2.1 Με βάση τη φύση της κινητής (αέρια ή υγρή) και στατικής φάσεως.....	177
8.2.2 Με βάση τον μηχανισμό διαχωρισμού	177
8.2.3 Με βάση τη φυσική μορφή της στατικής φάσης.....	178
8.2.4 Με βάση τον τρόπο εισαγωγής και κίνησης του δείγματος	178
8.3 Πειραματική διάταξη χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας (TLC)	179
8.4 Ποιοτικός και ημιοσοτικός προσδιορισμός με TLC (Συντελεστής επιβράδυνσης, R _f) – 2D-TLC.....	181
8.5 Κλινικές εφαρμογές TLC	182
8.6. Υγρή χρωματογραφία υψηλής ανάπτυξης (HPLC).....	182
8.6.1 Ποιοτικές και ποσοτικές πληροφορίες χρωματογραφήματος	187
8.6.2 Παράδειγμα εφαρμογής.....	187
8.7 Χρωματογραφία μοριακής διήθησης.....	188
8.7.1 Εφαρμογές της χρωματογραφίας διήθησης σε πηκτή	189
8.8 Υγρή Χρωματογραφία Υπερυψηλής Απόδοσης (UPLC).....	189
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	190

8.9 Εργαστηριακή άσκηση: Πιστοποίηση αμινοξέων με TLC.....	190
8.9.1 Εργαστηριακή άσκηση 1	190
8.9.2 Εργαστηριακή άσκηση 2	191
8.9.3 Εργαστηριακή άσκηση 3	191
8.10 Εργαστηριακή άσκηση: Διαχωρισμός σακχάρων με TLC	191
8.11 Εργαστηριακή άσκηση: Διαχωρισμός υδατοδιαλυτών βιταμινών και αναλγητικών φαρμάκων με TLC	192
8.12 Εργαστηριακή άσκηση: Προσδιορισμός καφεΐνης με μέθοδο HPLC	192
8.12.1 Προσδιορισμός α-λιποϊκού οξέος (LA) σε ανθρώπινο πλάσμα	193
8.13 Εργαστηριακή άσκηση: Διαχωρισμός κυανής δεξτράνης, κυτοχρώματος c, ριβοφλαβίνης.....	193
8.14 Εργαστηριακή άσκηση: Χρωματογραφική αφάλατωση διαλύματος αιμοσφαιρίνης.....	194
8.15 Εργαστηριακή άσκηση: Διαχωρισμός 25-OH-βιταμινών D2/D3 με HPLC.....	195
8.16 Εργαστηριακή άσκηση: Διαχωρισμός β-καροτένιου με HPLC	196
8.17 Εργαστηριακή άσκηση: Προσδιορισμός Coenzyme Q10 με HPLC	197
Βιβλιογραφικές Αναφορές	200
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9	201
ΘΕΩΡΙΑ ΚΑΙ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΑΣΚΗΣΕΙΣ ΣΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΛΙΠΙΔΙΩΝ	201
ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	201
9.1 Γενικά περί λιπιδίων, ρόλος, ταξινόμηση.....	201
9.1.1 Ο φυσιολογικός ρόλος των λιπιδίων στον οργανισμό.....	201
9.1.2 Λιπαρά οξέα	202
9.1.3 Ταξινόμηση λιπιδίων	202
9.1.4 Κυριότερα ουδέτερα λιπίδια.....	203
9.1.5 Κυριότερα πολικά λιπίδια	204
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	206
9.2 Εργαστηριακή άσκηση: Προσδιορισμός σύστασης λιπιδίων σε λιπαρά οξέα με αέρια χρωματογραφία .	206
9.2.1 Αέρια χρωματογραφία.....	207
9.3 Εργαστηριακή άσκηση: Εκχύλιση λιπιδίων με διαλύτες	208
9.3.1 Απομόνωση λιπιδίων I	208
9.3.2 Απομόνωση λιπιδίων II	208
9.3.3 Απομόνωση μεμβρανικών λιπιδίων από ερυθρά αιμοσφαίρια.....	209
9.4 Εργαστηριακή άσκηση: Διαχωρισμός λιπιδίων με TLC	209
9.4.1 Απομόνωση του PAF με TLC	210
9.4.2 Εκχύλιση κατά Bligh – Dyer	211
9.5 Εργαστηριακή άσκηση: Προσδιορισμός λιπιδίων με εγγύς υπέρυθρη φασματοσκοπία.....	211
9.6 Εργαστηριακή άσκηση: Ποσοτικός προσδιορισμός φωσφολιπιδίων	212
9.7 Εργαστηριακή άσκηση: Ποσοτικός προσδιορισμός ολικής χοληστερόλης ορού αίματος.....	212
9.8 Εργαστηριακή άσκηση: Ποσοτικός προσδιορισμός τριγλυκεριδίων ορού αίματος.....	214
9.9 Εργαστηριακή άσκηση: Ποσοτικός προσδιορισμός HDL-χοληστερόλης ορού αίματος.....	215
9.9.1 Διαχωρισμός των λιποπρωτεϊνών.....	217

Βιβλιογραφικές Αναφορές	220
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 10	221
ΘΕΩΡΙΑ ΚΑΙ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΑΣΚΗΣΕΙΣ ΣΤΗΝ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΣΤΗΝ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ DNA	221
ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	221
10.1 Χημική δομή των νουκλεϊκών οξέων	221
10.1.1 Χημική δομή των νουκλεοτιδίων	222
10.1.2 Τύποι διπλής έλικας και λειτουργίες του DNA	224
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	227
10.2 Εργαστηριακή άσκηση: Απομόνωση χρωμοσωμικού DNA από ήπαρ επίμοος.....	227
10.2.1 Απομόνωση DNA από ολικό αίμα	228
10.3 Εργαστηριακή άσκηση: Απομόνωση DNA από φυτικό ιστό.....	229
10.3.1 Απομόνωση DNA από φράουλα	229
10.4 Εργαστηριακή άσκηση: Φωτομετρικός προσδιορισμός της συγκέντρωσης DNA.....	230
10.4.1 Φωτομέτρηση σε ειδική πλάκα	231
10.5 Εργαστηριακή άσκηση: Φάσματα απορρόφησης νουκλεϊκών οξέων στο υπεριώδες.....	232
10.6 Εργαστηριακή άσκηση: Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR, Polymerase Chain Reaction) για τη γονιδιοματική περιοχή του TNF-α -308G/A.....	233
10.6.1 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)	233
10.6.2 Πειραματικό μέρος.....	235
10.6.3 Εργαστηριακή άσκηση: Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) για τη γονιδιοματική περιοχή του LEPR Gln223Arg	235
10.7 Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης	237
Βιβλιογραφικές Αναφορές	241
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 11	242
Η ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ	242
ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	242
11.1 Οι βασικές αρχές της ηλεκτροφόρησης.....	242
11.2 Η ηλεκτροφόρηση γέλης	242
11.2.1 Αρχή της μεθόδου	243
11.3 Η ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών	244
11.4 Η τριχοειδική ηλεκτροφόρηση	249
11.4.1 Τριχοειδής ισοηλεκτρική εστίαση (CIEF).....	251
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	251
11.5 Ηλεκτροφόρηση λευκωμάτων.....	251
11.5.1 Σκοπός της άσκησης - Αρχή της μεθόδου.....	251
11.5.2 Απαιτούμενα υλικά και εξοπλισμός.....	251
11.5.2.1 Υλικά που περιέχονται στο kit	251
11.5.2.2 Πρόσθετα αντιδραστήρια που απαιτούνται.....	252
11.5.2.3 Απαιτούμενος εξοπλισμός.....	252

11.5.3 Διαδικασία.....	252
11.5.3.1 Προετοιμασία των δειγμάτων.....	252
11.5.3.2 Άνοιγμα της συσκευασίας του kit	253
11.5.3.3 Τοποθέτηση των δειγμάτων στο πήκτωμα αγαρόζης.....	254
11.5.3.4 Η ανάπτυξη του ηλεκτροφορητικού διαγράμματος (τρέξιμο/μετανάστευση των πρωτεϊνών) .	258
11.5.3.5 Μονιμοποίηση, χρώση και αποχρωματισμός του πηκτώματος.....	258
11.5.3.6 Υπολογισμός της πυκνότητας των κλασμάτων ηλεκτροφόρησης.....	259
Βιβλιογραφικές Αναφορές	262

Πίνακας συντομεύσεων-ακρωνυμίων

A	Adenine	Αδενίνη
AC2O	Acetic anhydride	Οξικός ανυδρίτης
ACN	Acetonitrile	Ακετονιτρίλιο
ALA	linolenic acid	λινολενικό οξύ
ANSA	amino-naphthol-sulfonic acid	αμινο-ναφθολο-σουλφονικό οξύ
ATP	Adenosine triphosphate	Τριφωσφορική αδενοσίνη
BHT	Butylated hydroxytoluene	Βουτυλιωμένο υδροξυτολουόλιο
BSA	Bovine serum albumin	Βόεια αλβουμίνη ορού
CE	Cholesterol esterase	Εστεράση της χοληστερόλης
CEP	Congenital Erythropoietic Porphyria	Συγγενής Ερυθροποιητική Πορφυρία
CH	Cholesterol	Χοληστερόλη
CH3CH2NH2	Ethylamine	Αιθυλαμίνη
CH3COOH	Acetic acid	Αιθανικό (οξικό) οξύ
CH3COONa	Sodium acetate	Οξικό νάτριο
CM	Chylomicron	Χυλομικρά
CO	Cholesterol oxidase	Οξειδάση της χοληστερόλης
CO2	Carbon dioxide	Διοξείδιο του άνθρακα
CoA	Coenzyme A	Συνένζυμο A
Cu(OH)2	Divalent copper hydroxide	Υδροξείδιο του δισθενούς χαλκού
Cu2O	Copper oxide	Υποξείδιο του χαλκού
CuSO4	Copper sulfate	Θεικός χαλκός
CVR	Coefficient of variability	Συντελεστής μεταβλητότητας
CVr	Coefficient of repeatability	Συντελεστής επαναληψιμότητας
DAD	Diode Array Detector	Ανιχνευτής συστοιχίας φωτοδιόδων
DAG	Diglycerides	Διγλυκερίδια
DNA	Deoxyribonucleic acid	Δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ
dNTPs	Deoxyribonucleotide triphosphate	Τριφωσφορικό δεοξυριβονουκλεοτίδιο
EPP	Erythropoietic Protoporphy	Ερυθροποιητική Πρωτοπορφυρία
FAD	Flavin adenine dinucleotide	Δινουκλεοτίδιο αδενίνης φλαβίνης
FFA	Free fatty acids	Ελεύθερα λιπαρά οξέα
GC	Gas chromatography	Αέρια χρωματογραφία
GK	Glycerol kinase	Κινάση της γλυκερόλης
GLC	Gas Liquid chromatography	Αέρια Υγρή Χρωματογραφία
GSC	Gas Solid chromatography	Αέρια στερεά χρωματογραφία
H2CO3	Carbonic acid	Ανθρακικό οξύ
HCl	Hydrochloric acid	Υδροχλωρικό οξύ
HClO4	Perchloric acid	Υπερχλωρικό οξύ
HDL	High density lipoprotein	Λιποπρωτεΐνη υψηλής πυκνότητας
HEP	Hepatocellular Porphyria	Ηπατοερυθροποιητική Πορφυρία
HNO3	Nitric acid	Νιτρικό οξύ

HPLC	High pressure liquid chromatography	Υγρή χρωματογραφία υψηλής ανάπτυξης (πίεσης)
IC	Ion Exchange chromatography	Χρωματογραφία ανταλλαγής ιόντων
IR	Infrared spectroscopy	Υπέρυθρη φασματοσκοπία
k'	Retention rate	Συντελεστής κατακράτησης
Ka	Σταθερά ιοντισμού οξέος	Acid ionization constant
Kb	Σταθερά ιοντισμού βάσης	Base ionization constant
KH ₂ PO ₄	Potassium dihydrogen phosphate	Δισόξινο φωσφορικό κάλιο
KNaC ₄ H ₄ O ₆	Potassium sodium tartrate	Τρυγικό καλιονάτριο
LA	Lipoic Acid	Λιποϊκό οξύ
LA	Linoleic acid	Λινολεϊκό οξύ
LC-MS	Liquid chromatography–mass spectrometry	Υγρή χρωματογραφία – φασματομετρία μάζας
LDL	Low density lipoprotein	Λιποπρωτεΐνη χαμηλής πυκνότητας
LLC	Liquid chromatography	Υγρή χρωματογραφία
LSC	Liquid Solid chromatography	Υγρή Στερεά Χρωματογραφία
MUFA	Monounsaturated Fatty Acid	Μονοακόρεστο Λιπαρό Οξύ
Na ₂ CO ₃	Sodium Carbonate	Ανθρακικό νάτριο
NAD ⁺	Nicotinamide adenine dinucleotide	Νικοτιναμιδο-αδενο-δινουκλεοτίδιο
NaH ₂ PO ₄	Sodium dihydrogen phosphate	Δισόξινο φωσφορικό νάτριο
NaHSO ₃	Sodium bisulfite	Όξινο θειώδες νάτριο
NH ₃	Ammonia	Αμμωνία
NIR	Near-infrared spectroscopy	Εγγύς υπέρυθη φασματοσκοπία
OA	Oleic acid	Ελαιικό οξύ
OD	Optical Density	Οπτική πυκνότητα
PA	Palmitic acid	Παλμιτικό οξύ
PC	Phosphatidylcholine	Φωσφατιδυλοχολίνη
PCT	Slow Dermal Porphyria	Βραδεία Δερματική Πορφυρία
PE	Phosphatidylethanolamine	Φωσφατιδυλ-αιθανολαμίνη
POD	Peroxidase	Υπεροξειδάση
PTA	Phospholobramic acid	φωσφοβολφραμικό οξύ
PUFA	Polyunsaturated fatty acid	Πολυακόρεστο λιπαρό οξύ
R	Reproducibility	Αναπαραγωγιμότητα
Rf	Ratio of fronts	Αναλογία μετώπων
Rs	Resolution	Διαχωριστική ικανότητα
SD	Standard deviation	Τυπική απόκλιση
SE	Standard error	Τυπικό σφάλμα
SEC	Exclusion chromatography	Χρωματογραφία αποκλεισμού
SEC	Size exclusion chromatography	Χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού
SFA	Saturated fatty acids	Κορεσμένα λιπαρά οξέα
t ₀	Dead time	Νεκρός χρόνος
TAG	Triacyl glycerol	Τριακυλο γλυκερόλη
TCA	Trichloroacetic acid	Τριχλωροξικό οξύ
TFA	Trifluoroacetic acid	Τριφθοροξικό οξύ
TLC	Thin layer chromatography	Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας
t _R	Retention time	Χρόνος κατακράτησης
UPLC	Ultra-Performance Liquid	Υγρή Χρωματογραφία Υπερυψηλής

	Chromatography	Απόδοσης
VLDL	Very low density lipoprotein	Λιποπρωτεΐνη πολύ χαμηλής πυκνότητας
W	Peak width	Εύρος κορυφής

Πρόλογος

Η κύρια αποστολή του Εργαστηρίου της Κλινικής Βιοχημείας είναι η παροχή των απαραίτητων πληροφοριών για την ορθολογική αντιμετώπιση της ασθένειας με σκοπό την άμεση και εξατομικευμένη κατά το δυνατόν χορήγηση της ενδεικνυόμενης θεραπευτικής αγωγής.

Μια τέτοια πληροφόρηση είναι ιδιαίτερα πολύτιμη μόνο εάν είναι αξιόπιστη (από το εργαστήριο) και αξιοποιήσιμη (από τον κλινικό γιατρό). Οι βιοχημικοί έλεγχοι, οι οποίοι σκοπό έχουν την εξαγωγή αυτών των πληροφοριών, χρησιμοποιούνται τόσο στην καθημερινή κλινική πράξη όσο και στην έρευνα των Επιστημών Υγείας.

Σε ό,τι αφορά την κλινική πρακτική, οι έλεγχοι αυτοί πραγματοποιούνται αφενός σε σχέση με ασθένειες που έχουν μια προφανή μεταβολική βάση (διαβήτης, υποθυρεοειδισμός) αφετέρου σε περιπτώσεις που οι βιοχημικές μεταβολές είναι συνέπεια της ασθένειας (νεφρική ανεπάρκεια, δυσσπορρόφηση).

Έτσι, οι βιοχημικοί έλεγχοι χρησιμοποιούνται για:

- Διάγνωση (επιβεβαίωση ή απόρριψη της κλινικής διάγνωσης).
- Πρόγνωση (πληροφορία για την πιθανή κατάληξη της ασθένειας, π.χ. έλεγχος κρεατινίνης).
- Παρακολούθηση (ιστορικό ή ανταπόκριση στη θεραπεία, π.χ. γλυκόζη, κάλιο).
- Πληθυσμιακός έλεγχος (ανίχνευση της υποκλινικής ασθένειας, π.χ. φαινολοκετονουρία).

Μια σύντομη επισκόπηση του εύρους των κλινικοβιοχημικών αναλύσεων οι οποίες πραγματοποιούνται σήμερα σε νοσοκομειακά ή ιδιωτικά εργαστήρια περιγράφεται παρακάτω:

1. Ηλεκτρολύτες. Για τη ρύθμιση της ισορροπίας οξέων-βάσεων του οργανισμού μας.
2. Ένζυμα. Για τη ρύθμιση των βιοχημικών αντιδράσεων κατά τη διάρκεια της ασθένειας.
3. Πρωτεΐνες. Για να διαπιστωθεί τόσο η διατροφική κατάσταση (status) όσο και η ανοσολογική ανταπόκριση του ασθενούς.
4. Προϊόντα μεταβολισμού, δείκτες, ορμόνες, φάρμακα.

Για να έχει τη δυνατότητα ένα τέτοιο εργαστήριο να καλύψει με επάρκεια όλο το φάσμα των υποχρεώσεων του τόσο σε επίπεδο ρουτίνας όσο και σε επίπεδο επειγόντων περιστατικών, πρέπει να έχει την ευχέρεια να χρησιμοποιεί τα υλικά, τις συσκευές, την τεχνολογία και, κυρίως, να στηρίζεται σε κατάλληλα εκπαιδευμένο επιστημονικό προσωπικό με βαθιές γνώσεις οι οποίες θα τους εφοδιάσουν με ξεχωριστή ετοιμότητα και κριτική ικανότητα για επιμέρους και συνολική αξιολόγηση των όποιων εργαστηριακών ευρημάτων.

Η σημερινή βιοτεχνολογική ανάπτυξη, ο εξοπλισμός και η πλήρης αυτοματοποίηση των εργαστηρίων με προχωρημένα πληροφορικά συστήματα και σύγχρονες αναλυτικές και φασματομετρικές τεχνικές έχει μειώσει σημαντικά τις παλαιές χρονοβόρες διαδικασίες και έχει περιορίσει σημαντικά στο εργαστήριο τα ανθρώπινα λάθη.

Η Κλινική Βιοχημεία έχει ως θεωρητικό υπόβαθρο τη Βιοχημεία, η οποία προϋποθέτει και την καλή γνώση της Γενικής Χημείας (ανόργανης-οργανικής), της Φυσιολογίας, της Ανατομικής και της Παθολογίας.

Έτσι, η θεωρητική και πρακτική κατάρτιση στη Βιοχημεία, η οποία θεωρείται μάθημα ειδικής υποδομής και προαπαιτούμενο αντικείμενο, συνιστά έναν από τους βασικούς πυλώνες στην κατανόηση των δραστηριοτήτων και δυνατοτήτων της σύγχρονης Κλινικής Βιοχημείας. Αυτός είναι και ο εκπαιδευτικός στόχος της διδασκαλίας και πρακτικής των θεμελιωδών βιοχημικών τεχνικών, ο οποίος έρχεται να καλύψει το παρόν εργαστηριακό μάθημα.

Μέσα στα πλαίσια αυτά, τα κεφάλαια που πρόκειται να εκθέσει η παρούσα πειραματική Βιοχημεία, μπορούν να διακριθούν σε πέντε αλληλοεμπλεκόμενες θεματικές ενότητες:

1. Γενική και ειδική θεωρητική υποστήριξη

- Γνώσεις γενικής χημείας και βιολογίας (οργανολογία, διαλύματα, pH, ρυθμιστικά διαλύματα).
Επιμέρους θεωρητικά βιοχημικά θέματα (κανόνες ασφάλειας, αξιοπιστία αναλυτικών μεθόδων).
2. Τις μεθόδους κλασικών αναλυτικών προσδιορισμών για κάθε κατηγορία ενώσεων βιοχημικού και διαγνωστικού ενδιαφέροντος (αμινοξέα, πεπτίδια/πρωτεΐνες, ένζυμα, υδατάνθρακες, λιπίδια, DNA).
 3. Υπολογιστικές ασκήσεις, υποδειγματικά λυμένες για πρακτική εξάσκηση.
 4. Αρχές και μεθοδολογίες ενόργανης ανάλυσης (φασματοφωτομετρία, χρωματογραφία, ηλεκτροφόρηση).
 5. Ομάδα αντιπροσωπευτικών ασκήσεων για την πρακτική εξάσκηση των φοιτητών στο εργαστήριο, οι οποίες θα ανανεώνονται σε συνάρτηση με την αναβάθμιση του εργαστηριακού εξοπλισμού.

Κλείνοντας, θα θέλαμε να ευχαριστήσουμε το πρόγραμμα ΚΑΛΛΙΠΟΣ για τη χρηματοδότηση και για την ιδιαίτερα καλή συνεργασία,

την Ευγενία Κώνστα, Χημικό, για τη συμβολή της στα Κεφάλαια 1,2
τη Βασιλική Τράπαλη, Χημικό, για τη συμβολή της στο Κεφάλαιο 7
τη Δήμητρα Χούχουλα, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια στο Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής, για τη συμβολή της στο Κεφάλαιο 10

Οι συγγραφείς

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΣΚΕΥΗ ΚΑΙ ΣΥΣΚΕΥΕΣ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟΥ – ΑΣΦΑΛΕΙΑ ΣΤΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ – ΑΞΙΟΠΙΣΤΙΑ ΑΝΑΛΥΤΙΚΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ

Συγγραφέας: Μαρία Τράπαλη

Σύνοψη

Η γνώση και η χρήση όλων των σκευών και των συσκευών ενός εργαστηρίου, καθώς και η εφαρμογή όλων των κανόνων ασφαλείας σε ένα εργαστήριο είναι απαραίτητες για τη διενέργεια όλων των απαιτούμενων αναλύσεων για την παροχή των απαραίτητων πληροφοριών. Μια τέτοια πληροφόρηση είναι ιδιαίτερα πολύτιμη μόνο, εάν είναι αξιόπιστη (από το εργαστήριο) και αξιοποιήσιμη (από τον κλινικό γιατρό). Γι' αυτό και είναι απαραίτητος ο τρόπος ελέγχου της αξιοπιστίας των χρησιμοποιούμενων αναλυτικών μεθόδων.

Προαπαιτούμενη γνώση

Απαιτούνται βασικές εργαστηριακές γνώσεις Γενικής Χημείας.

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.1 Σκεύη και όργανα εργαστηρίου – Χρήση αυτών

Αν και η πρόοδος της τεχνολογίας που αντανάκλα και στον εκσυγχρονισμό της υποδομής ενός σημερινού Βιοχημικού εργαστηρίου (αυτόματοι αναλυτές, σύγχρονες φασματοσκοπικές τεχνικές, χρήση H/Y) έχει αντικαταστήσει σε μεγάλο βαθμό τα κλασικά χημικά σκεύη, η γνώση τους, όπως θα δούμε αναλυτικότερα στη συνέχεια, είναι απαραίτητη και θεμελιώδης για την κατανόηση του εύρους όλων των βιοχημικών διεργασιών, που επιτελούνται στο εργαστήριο. Επειδή η πρώτη ουσιαστική γνωριμία του φοιτητή Βιοιατρικών επιστημών με τα συνήθη εργαστηριακά σκεύη και συσκευές έχει ήδη πραγματοποιηθεί στα εργαστήρια Ανόργανης Χημείας, η αναφορά τους σε αυτά θα έχει περισσότερο τον χαρακτήρα σύντομης καταγραφής.

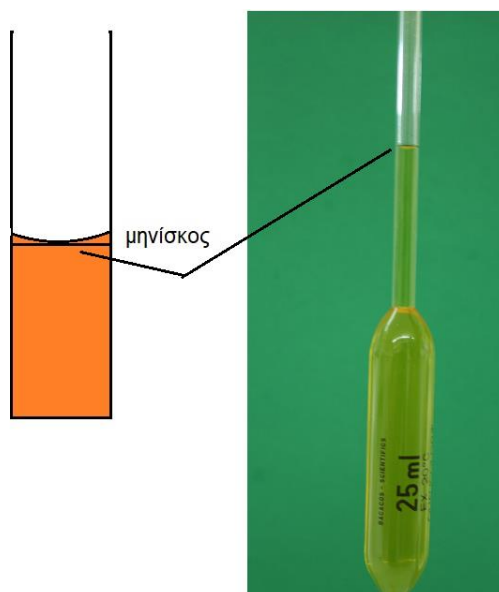
Τα σκεύη ενός αναλυτικού εργαστηρίου διακρίνονται ανάλογα με το υλικό της κατασκευής τους σε τέσσερις μεγάλες κατηγορίες (γυάλινα, πορσελάνινα, πλαστικά, μεταλλικά). Τα γυάλινα και τα πλαστικά σκεύη χωρίζονται σε δύο επιμέρους κατηγορίες, τα ογκομετρικά και τα μη ογκομετρικά σκεύη.

1.1.1 Ογκομετρικά σκεύη

Τα ογκομετρικά σκεύη είναι σκεύη μέτρησης όγκου μεγάλης ακρίβειας. Αν και μπορούν να χρησιμοποιηθούν και για την αποθήκευση υγρών, η βασική τους χρήση είναι ο προσδιορισμός όγκου με σημαντική ακρίβεια. Το μέγεθος της ακρίβειας αυτής εξαρτάται κυρίως από τη διάμετρο του λεγόμενου «μηνίσκου» που σχηματίζεται από το περιεχόμενο υγρό ακριβώς πάνω στο νοητό επίπεδο που ορίζεται από τη σήμανση του συγκεκριμένου όγκου (Εικόνα 1.1).

Τέτοια όργανα είναι:

- τα ογκομετρικά σιφώνια μονού όγκου,
- τα ογκομετρικά σιφώνια πολλαπλού όγκου,
- οι ογκομετρικές φιάλες,
- οι ογκομετρικοί κύλινδροι.



Εικόνα 1.1 Αναπαράσταση του μηνίσκου των ογκομετρικών οργάνων πάνω από τη χαραγή.

Τα ογκομετρικά σιφώνια μονού όγκου έχουν την πιο μικρή διάμετρο από όλα τα ογκομετρικά όργανα και θεωρούνται ότι εξασφαλίζουν μέγιστη ακρίβεια. Ακολουθούν οι ογκομετρικές φιάλες και οι ογκομετρικοί κύλινδροι. Υπάρχουν διάφορων μεγεθών ογκομετρικά σκεύη και προφανώς από κάθε κατηγορία αυτά με τη μικρότερη διάμετρο έχουν και τη μεγαλύτερη ακρίβεια.

Χαρακτηριστικό των ογκομετρικών σκευών είναι ότι μπορούν να εξασφαλίσουν τη μέτρηση στους όγκους που καταγράφουν μόνο σε συγκεκριμένη θερμοκρασία η οποία είναι η θερμοκρασία δωματίου (20°C). Η θερμοκρασία αυτή αναγράφεται επάνω στο σκεύος. Κατά συνέπεια, τα ογκομετρικά σκεύη δεν επιτρέπεται να θερμανθούν ή να αποθηκεύσουν υγρά υψηλής θερμοκρασίας. Σε αυτήν την περίπτωση, όχι μόνο δεν θα μπορούν να μετρήσουν με ακρίβεια, αλλά και το γυαλί τους θα διασταλεί και δεν θα μπορούν και στο μέλλον να μετρούν με ακρίβεια τους όγκους που καταγράφουν.

1.1.2 Μη ογκομετρικά σκεύη

Πρόκειται για γυάλινα ή πλαστικά σκεύη τα οποία, αν και έχουν υποδιαιρέσεις όγκων, δεν μπορούν να τους μετρήσουν με ακρίβεια. Σε αυτά τα σκεύη δεν υπάρχει λόγος να δημιουργείται με ακρίβεια ο «μηνίσκος» προσδιορισμού όγκου, αφού ούτως ή άλλως η μέτρηση των όγκων είναι σχετική. Από τα σκεύη αυτά, τα γυάλινα είναι και θερμοάντοχα. Μπορούν δηλαδή να χρησιμοποιηθούν για τη θέρμανση υγρών (π.χ. διάλυση διαλυμάτων) χωρίς να αλλοιώνεται η δομή τους. Τέτοια σκεύη είναι τα:

- ποτήρια ζέσεως,
- κωνικές φιάλες,
- στρογγυλές φιάλες,
- σταγονόμετρα.

1.1.3 Γυάλινα σκεύη

- Ποτήρια ζέσεως (χωρητικότητας 50-2000 mL). Το ποτήρι ζέσεως είναι ένα απλό δοχείο το οποίο χρησιμοποιείται στα χημικά εργαστήρια για την ανάδευση, ανάμιξη και θέρμανση υγρών, συνήθως, χημικών ουσιών. Έχουν κυλινδρικό σχήμα, με επίπεδο πυθμένα και ειδικό στόμιο. Είναι κατασκευασμένα από ειδικό γυαλί για να αντέχουν στις μεταβολές της θερμοκρασίας και στα χημικά αντιδραστήρια ή σπανιότερα από μέταλλο ή πλαστικό (κυρίως πολυαιθυλένιο, πολυπροπυλένιο). Στις περισσότερες περιπτώσεις το γυαλί είναι βιοπυριτικό γυαλί (Pyrex) με ομοιόμορφο συντελεστή θερμικής διαστολής. Αυτός είναι ο λόγος που το

γυαλί δεν σπάει, όταν μεταβάλλουμε απότομα τη θερμοκρασία του. Επιπλέον, το γυαλί αυτό αντέχει στα χημικά αντιδραστήρια.

- Κωνικές φιάλες (10-2000 mL). Οι κωνικές φιάλες είναι κατασκευασμένες από γυαλί και τις χρησιμοποιούμε ως δοχεία αντιδράσεων, κυρίως σε ογκομετρήσεις. Υπάρχουν σε στενόλαιμη και ευρύλαιμη μορφή, με ή χωρίς εσμύρισμα (Εικόνα 1.2).



Εικόνα 1.2 Κωνικές φιάλες.

- Σφαιρικές φιάλες με εσμυρισμένο πόμα. Οι σφαιρικές φιάλες χρησιμοποιούνται, κυρίως, ως δοχεία αντιδράσεων. Υπάρχουν σε πολλά μεγέθη, ως ευρύλαιμες ή στενόλαιμες, συνήθως με εσμύρισμα.
- Ογκομετρικοί κύλινδροι (10-1000 mL). Ο ογκομετρικός κύλινδρος είναι όργανο του εργαστηριακού εξοπλισμού χημείας που χρησιμοποιείται, για να μετρηθεί με ακρίβεια ο όγκος ενός αντικειμένου. Οι ογκομετρικοί κύλινδροι είναι γενικά πιο ακριβείς και αξιόπιστοι από τις κωνικές φιάλες και τα ποτήρια ζέσεως. Συχνά, οι μεγαλύτεροι ογκομετρικοί κύλινδροι κατασκευάζονται από πολυπροπυλένιο λόγω της εξαιρετικής χημικής αντοχής ή από πολυμεθυλοπεντένιο λόγω της διαύγειάς του, καθιστώντας τους ελαφρύτερους κατά τη μεταφορά και λιγότερο εύθραυστους από τους γυάλινους.
- Ογκομετρικές φιάλες (50-1000 mL). Οι ογκομετρικές φιάλες χρησιμοποιούνται για τη μέτρηση ορισμένου όγκου υγρού και ιδιαίτερα για την παρασκευή διαλυμάτων ορισμένης συγκέντρωσης. Είναι ογκομετρικά όργανα ακριβείας. Η πλήρωση γίνεται μέχρι τη χαραγή. Υπάρχουν σε διάφορα μεγέθη, των 10, των 50, των 100, των 250, των 500 και των 1000 mL με ή χωρίς εσμύρισμα (Εικόνα 1.3).



Εικόνα 1.3 Κωνικές φιάλες.

- Σταγονόμετρα. Τα σταγονόμετρα χρησιμοποιούνται για την προσθήκη υγρών κατά σταγόνες σε δοχεία αντιδράσεων, καθώς και για την αφαίρεση και μεταφορά μικρών ποσοτήτων υγρών. Αποτελούνται από ένα μικρό γυάλινο ή πλαστικό σωλήνα, ο οποίος στο ένα άκρο του καταλήγει σε στένωση. Το άλλο άκρο του κλείνεται με ελαστική προέκταση με τη βοήθεια της οποίας αναρροφάται το υγρό μέσα στον σωλήνα και στη συνέχεια με μικρή πίεση της προέκτασης το υγρό ρέει κατά σταγόνες (Εικόνα 1.4).



Εικόνα 1.4 Πλαστικά και γυάλινα σταγονόμετρα, καθώς και αυτόματες πιπέτες.

- Αυτόματες πιπέτες. Η αυτόματη πιπέττα αναρροφά ορισμένο όγκο υγρού, το οποίο μπορούμε στη συνέχεια να το προσθέσουμε κατά σταγόνες σε κάποιο δοχείο αντίδρασης. Περιστρέφοντας το κουμπί επιλογής όγκου επιλέγουμε τον απαιτούμενο όγκο υγρού. Για αναρρόφηση, βυθίζουμε το άκρο του σταγονόμετρου στο υγρό και πιέζουμε το έμβολο μέχρι το πρώτο σημείο αντίστασης. Για εκροή του υγρού, πιέζουμε το έμβολο μέχρι το τέρμα (Εικόνα 1.4).

1.1.3.1 Τρόπος ανάγνωσης ένδειξης αυτόματης πιπέτας

P1000 είναι η πιπέττα με την οποία μετριοούνται όγκοι 100-1000 μL , P200 είναι η πιπέττα με την οποία μετριοούνται όγκοι 20-200 μL και P20 είναι η πιπέττα με την οποία μετριοούνται όγκοι 5-20 μL .



P 20	P 1000	P 200
5 - 20 μL	100 - 1000	20 - 200
2 μL	69 μL	41 μL
(όχι αξιόπιστα)		
Δεκάδες Μονάδες	Χιλιάδες Εκατοντάδες Δεκάδες	Εκατοντάδες Δεκάδες Μονάδες
Η κόκκινη ένδειξη δεν μετράει		

Εικόνα 1.5 Τρόποι ανάγνωσης ένδειξης αυτόματων πιπεττών διάφορων όγκων.

Για τη μέγιστη ακρίβεια επιλέγουμε πάντοτε τη μικρότερη πιπέττα που μπορεί να παραλάβει τον όγκο που επιθυμούμε. Π.χ. για να παραλάβουμε όγκο 140 μL θα προτιμήσουμε την πιπέττα P200 κι όχι την P1000 (Εικόνες 1.6, 1.7).



A. Φάση σταθερού κατεβάσματος του εμβόλου

B. Κατώτερο σημείο στάσης

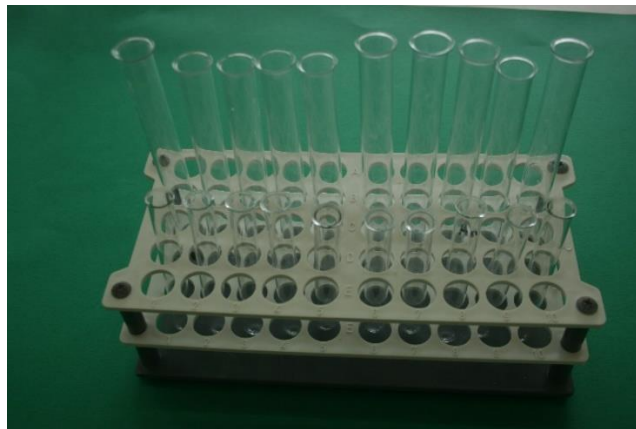
Γ. Επαναφορά του εμβόλου και συγκράτηση του υγρού στο ρύγχος

Εικόνα 1.6 Τα διαδοχικά στάδια χειρισμού της αυτόματης πιπέτας για την αναρρόφηση του όγκου. Ακολουθεί η απελευθέρωση του όγκου, όπου ο χρήστης πατάει το πλήκτρο μέχρι τερματισμού, λίγο πιο κάτω δηλαδή από τη θέση B της εικόνας.



Εικόνα 1.7 Η αναρρόφηση όγκου με αυτόματη πιπέτα από ποτήρι ζέσεως. Το ρύγχος δεν πρέπει να ακουμπά στον πυθμένα του περιέκτη του υγρού ούτε όμως να είναι και κοντά στην επιφάνειά του.

- Δοκιμαστικοί σωλήνες, κωνικά φιαλίδια φυγόκεντρου(ή πλαστικά). Είναι σωλήνες κλειστοί κατά το ένα άκρο τους. Χρησιμοποιούνται σε χημικά και βιοχημικά εργαστήρια, ως σκεύη διεξαγωγής δοκιμασιών, περιορισμένης κλίμακας πειραμάτων ή επιδείξεων. Κατασκευάζονται σε διάφορα μεγέθη από γυαλί ανθεκτικό στις μεταβολές της θερμοκρασίας (Εικόνα 1.8).



Εικόνα 1.8 Στατό με διάφορα μεγέθη δοκιμαστικών σωλήνων.

- Ύαλος ωρολογίου. Οι ύαλοι ωρολογίου είναι διάφορων διαμέτρων με σφαιρικό πυθμένα και χρησιμοποιούνται για να καλύπτουμε κάψες και ποτήρια ζέσεως, για την παραλαβή και ζύγιση μη υγροσκοπικών ουσιών, καθώς και για την εκτέλεση σταγονοδοκιμασιών (Εικόνα 1.9).



Εικόνα 1.9 Ύαλος ωρολογίου. Χρησιμοποιείται για τη ζύγιση στέρεων ουσιών πάνω σε ζυγό.

- Υδρόλουτρο. Πρόκειται για ένα δοχείο, συνήθως, ένα ποτήρι ζέσεως των 400 mL μέσα στο οποίο θερμαίνουμε νερό. Το χρησιμοποιούμε για τη θέρμανση υδατικών διαλυμάτων σε θερμοκρασίες μέχρι 100°C, καθώς και για μια βραδεία και ομαλή εξάτμιση διαλυμάτων. Εάν η εξάτμιση συνοδεύεται από έκλυση επιβλαβών ή δύσοσμων αερίων, τότε αυτή πρέπει να εκτελείται στον απαγωγό (Εικόνα 1.10).



Εικόνα 1.10 Διάταξη υδρόλουτρου.

- Ράβδοι. Οι ράβδοι χρησιμοποιούνται για την ανάδευση και τη μεταφορά διαλυμάτων, καθώς και για τη μεταφορά και έκπλυση ιζημάτων. Για τη μεταφορά ιζημάτων, η ράβδος έχει στο ένα της άκρο πτερύγιο από καουτσούκ (Εικόνα 1.11).



Εικόνα 1.11 Ράβδος και ύαλος ωρολογίου.

- Χωνιά. Τα απλά χωνιά χρησιμοποιούνται για διηθήσεις, μεταγγίσεις υγρών, γέμισμα φιαλών, προχοϊδων. Υπάρχουν σε διάφορους τύπους και μεγέθη. Τα σταγονομετρικά χωνιά είναι απαραίτητα σε περιπτώσεις που θέλουμε να προσθέσουμε ένα αντιδραστήριο ή ένα διάλυμα κατά σταγόνες. Υπάρχουν σε κυλινδρική και αποιεϊδή μορφή. Προκειμένου για τέλεια εφαρμογή πάνω σε φιάλες αντιδράσεων, θα πρέπει να φέρουν στο κάτω μέρος εσμύρισμα. Σταγονομετρικά χωνιά (διαχωριστικές χοάνες) χρησιμοποιούμε και σε παρασκευαστικές εργασίες ως διαχωριστικές χοάνες, προκειμένου να διαχωρίσουμε δύο υγρά που δεν αναμειγνύονται. Το πράσινο υγρό που βρίσκεται στο κάτω μέρος της χοάνης έχει μεγαλύτερη πυκνότητα (βαρύτερο) από το καστανόχρωμο υγρό που βρίσκεται υψηλότερα (Εικόνα 1.12).



Εικόνα 1.12 Πλαστικό και γυάλινο χωνί.

- Τρυβλίο Petri. Το τρυβλίο Petri είναι μια γυάλινη ή πλαστική κάψα, διαμέτρου συνήθως 10 cm με επίσης γυάλινο ή πλαστικό κάλυμμα. Χρησιμεύει στην εξάτμιση μικρών ποσοτήτων διαλυμάτων και στη φύλαξη ταινιών διηθητικού χαρτιού εμποτισμένων με αντιδραστήρια ποιοτικής ανάλυσης. Επίσης, χρησιμοποιείται στη Βιοχημεία και στη Βιολογία-Μικροβιολογία για καλλιέργεια κυττάρων/μικροοργανισμών (Εικόνα 1.13).



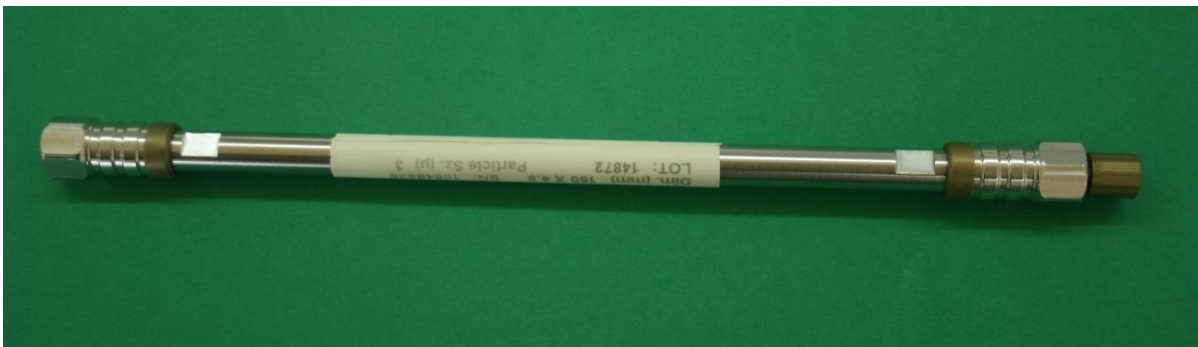
Εικόνα 1.13 Χρησιμοποιημένο και κενό τρυβλίο Petri.

- Προχοΐδες. Η προχοΐδα είναι ένα κυλινδρικό όργανο με ογκομετρική βαθμολόγηση σε όλο της το μήκος και στρόφιγγα στο κάτω μέρος. Χρησιμοποιείται σε πειράματα τιτλοδότησης. Οι προχοΐδες μετρούν από το επάνω μέρος, καθώς χρησιμοποιούνται για να μετράμε υγρά τα οποία ρέουν από το κάτω μέρος. Η διαφορά μεταξύ του τελικού και αρχικού όγκου είναι το ποσό του υγρού το οποίο αποχύθηκε (Εικόνα 1.14).



Εικόνα 1.14 Τιτλοδότηση με χρήση προχοϊδας στην οποία τοποθετείται κάποια βάση, π.χ. NaOH και στο ποτήρι ζέσεως ένα οξύ, π.χ. HCl .

- Κολώνες χρωματογραφίας στήλης. Η στήλη (κολώνα) είναι γεμάτη με κατάλληλο για τον επιθυμητό διαχωρισμό προσροφητικό υλικό (τα συνηθέστερα είναι η γέλη πυριτίου και η αλουμίνα), τοποθετημένη κάθετα. Στο άνω μέρος της στήλης τοποθετείται το δείγμα και ακολουθεί έκλυση, όπου κατάλληλα επιλεγμένος διαλύτης τοποθετείται στο πάνω μέρος της στήλης και, όπως ρέει προς τα κάτω, εκκλύει το δείγμα. Έτσι, μέσα στη στήλη επιτελείται διαχωρισμός των συστατικών του δείγματος, τα οποία είναι ορατά σε χρωματιστές ζώνες (χρωματογραφία), εφόσον βέβαια τα συστατικά είναι έγχρωμα (Εικόνα 1.15).



Εικόνα 1.15 Στήλη χρωματογραφίας που τοποθετείται σε συσκευή HPLC.

1.1.4 Από πορσελάνη

- Ηθμοί διήθησης. Οι ηθμοί είναι κατασκευασμένοι από ύφασμα, χαρτί, πορώδες γυαλί, υαλοβάμβακα. Μέσω του ηθμού γίνεται η μέθοδος της διήθησης. Διήθηση καλείται η διεργασία διαχωρισμού στερεών αιωρούμενων σωματιδίων σε ένα ρευστό, συνήθως υγρό, κατά τη διαβίβαση του αιωρήματος μέσα από στρώμα πορώδους υλικού (διάφραγμα ή ηθμός), που συγκρατεί τα στερεά και επιτρέπει τη διέλευση μόνο του ρευστού.
- Κάψα θέρμανσης. Η κάψα πορσελάνης είναι μικρό λεπτό δοχείο από πυρίμαχη πορσελάνη, υαλωμένη εσωτερικά και εξωτερικά, γνωστή και ως «χωνευτήριο».

1.1.5 Πλαστικά

- Δοκιμαστικοί σωλήνες. Ο δοκιμαστικός σωλήνας είναι ένας γυάλινος ή πλαστικός σωλήνας στο μέγεθος ενός δακτύλου συνήθως, ο οποίος είναι ανοικτός στο επάνω μέρος και κλειστός σε υοειδές σχήμα στο κάτω. Χρησιμοποιείται για να τοποθετήσουμε, αναμίξουμε ή θερμάνουμε μικρές ποσότητες στερεών ή υγρών χημικών ουσιών, κυρίως για ποιοτικά πειράματα και δοκιμασίες. Ο στρογγυλευμένος πυθμένας και οι ευθείες πλευρές ελαχιστοποιούν τις απώλειες κατά την απόχυση, διευκολύνουν το καθάρισμα και επιτρέπουν την εύκολη παρακολούθηση του περιεχομένου. Ο μακρύς, στενός λαιμός επιβραδύνει τη διάδοση των ατμών και αερίων στο περιβάλλον (Εικόνα 1.8).
- Σωλήνες Eppendorf. Πλαστικά σωληνάκια όγκου 1,5 και 2 mL (Εικόνα 1.16).



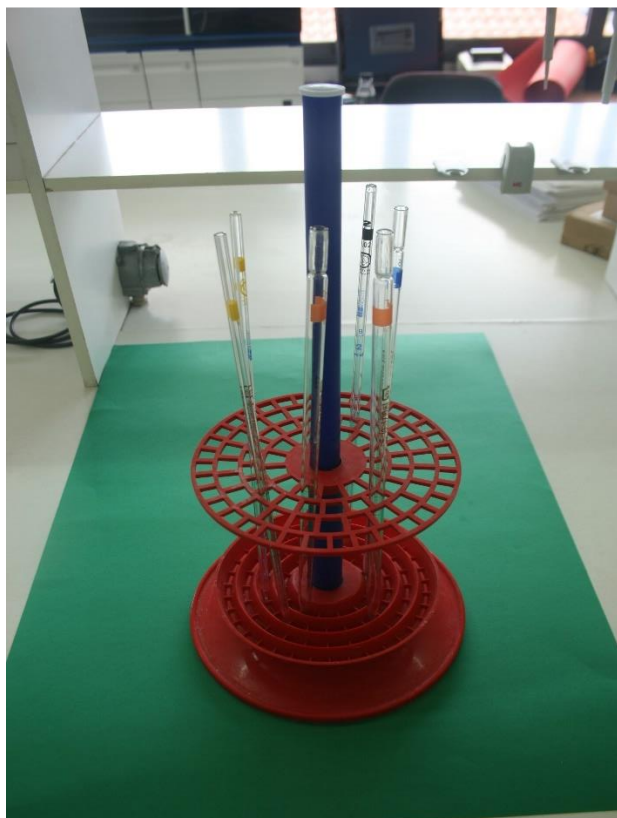
Εικόνα 1.16 Σωληνάκια Eppendorf.

- Σιφώνια. Τα σιφώνια χρησιμοποιούνται για την ακριβή μέτρηση όγκου υγρών. Αποτελούνται από έναν σωλήνα κατασκευασμένο από πλαστικό ή λεπτό γυαλί, ανοικτό και κατά τα δύο άκρα του. Ο σωλήνας είναι στενότερος στο κατώτερο άκρο του. Για τη λήψη δείγματος υγρού, βυθίζεται το κατώτερο άκρο του σιφωνίου μέσα στο υγρό και ταυτόχρονα αφαιρείται με ειδική συσκευή ο περιεχόμενος αέρας. Υπάρχουν σιφώνια μιας χαραγής (μονού όγκου) που χρησιμοποιούνται για τη μέτρηση ενός μόνο σταθερού όγκου υγρού, ο οποίος αναγράφεται πάνω στο σιφώνιο. Ο σωλήνας αυτού του τύπου σιφωνίων είναι διογκωμένος στο μέσον του για να μπορεί να χωρέσει τον προβλεπόμενο όγκο υγρού. Έτσι, έχουμε σιφώνια του ενός, των δύο, των πέντε, των δέκα, των εικοσιπέντε και των πενήντα mL (Εικόνα 1.17, 1.18).



Εικόνα 1.17 Σιφώνιο (πιπέττα) μιας χαραγής (μονού όγκου).

Τα σιφώνια μετρήσεως είναι βαθμονομημένα και χρησιμοποιούνται για τη μέτρηση διάφορων όγκων υγρού.



Εικόνα 1.18 Βάση στήριξης σιφωνίων (πιπετών) πολλαπλών όγκων διάφορων όγκων (1, 2, 5 και 10 mL).

- **Τύποι αναρρόφησης**

Τύπος Α: Αφαιρούμε τον αέρα από τον ελαστικό βολβό (πουάρ) πιέζοντας τη βαλβίδα Α στο άνω μέρος του βολβού και τον ίδιο τον βολβό με το άλλο χέρι. Εισάγουμε το άνω άκρο του σιφωνίου στο κάτω στέλεχος του βολβού. Πιέζουμε τη βαλβίδα S που βρίσκεται ακριβώς πάνω από το άκρο του σιφωνίου, οπότε ο βολβός αναρροφά τον αέρα που βρίσκεται στο σιφώνιο και το υγρό μέσα στο σιφώνιο αρχίζει να ανέρχεται. Όταν το υγρό ξεπεράσει λίγο τη χαραγή, σταματούμε να πιέζουμε τη βαλβίδα S και αρχίζουμε να πιέζουμε τη βαλβίδα E που επιτρέπει την είσοδο αέρα, ο οποίος κατεβάζει τη στάθμη του υγρού. Σταματούμε να πιέζουμε, όταν το υγρό φθάσει στο ύψος της χαραγής (Εικόνα 1.19).



Εικόνα 1.19 Πλαστικό πουάρ (τύπος A), όπου φαίνονται τα τρία διαφορετικά πλήκτρα A, S, E.

Τύπος B: Αφού στερεώσουμε κατάλληλα το σифώνιο στο κάτω μέρος της συσκευής, όπως φαίνεται στη φωτογραφία, περιστρέφουμε τον τροχό προς τα κάτω με τον αντίχειρα. Έτσι, δημιουργούμε υποπίεση μέσα στο σифώνιο και το υγρό ανέρχεται. Για να εκρεύσει ποσότητα υγρού ή όλο το υγρό, πιέζουμε το έμβολο που βρίσκεται κάτω από τον τροχό (Εικόνα 1.20).



Εικόνα 1.20 Μηχανικά πουάρ (τύπος B) για τρεις διαφορετικούς όγκους σιφωνίων.

- Υδροβολείς. Οι υδροβολείς χρησιμοποιούνται, κυρίως, ως φιάλες για απεσταγμένο ή απιονισμένο νερό. Μπορούμε, βέβαια, να τους χρησιμοποιήσουμε και για άλλα υγρά, όπως ακετόνη, αιθυλική αλκοόλη. Σε μια τέτοια περίπτωση, όμως, θα πρέπει να γράψουμε ανεξίτηλα πάνω στη φιάλη το περιεχόμενο αυτής.

1.1.6 Μεταλλικά

- Στηρίγματα σωληναρίων. Χρησιμεύουν για τη στήριξη των δοκιμαστικών σωλήνων. Συνήθως, μπορούμε να τοποθετήσουμε 12 ή 24 δοκιμαστικούς σωλήνες σε δύο ή τρεις σειρές.
- Σπάτουλες. Οι σπάτουλες χρησιμοποιούνται για τη λήψη στερεών ουσιών από τα δοχεία των αντιδραστηρίων και πρέπει να τις διατηρούμε σε πολύ καθαρή κατάσταση (Εικόνα 1.21).



Εικόνα 1.21 Εργαστηριακή σπάτουλα.

- Ψήκτρες. Οι ψήκτρες καθαρισμού είναι κυλινδρικά βουρτσάκια από ίνες Nylon προσαρμοσμένα κατά μήκος μεταλλικού σύρματος. Χρησιμοποιούνται για τον καθαρισμό δοκιμαστικών σωλήνων.

Οι συνήθεις ηλεκτρικές και ηλεκτρονικές συσκευές τις οποίες θα συναντήσουμε στο βιοχημικό εργαστήριο είναι:

- Υδατόλουτρο. Το υδατόλουτρο χρησιμοποιείται για τη διατήρηση υλικών και σκευών σε νερό σταθερής θερμοκρασίας για συγκεκριμένο χρονικό διάστημα.
- Φούρνοι ξήρανσης. Οι φούρνοι ξήρανσης ή πυριαντήρια χρησιμοποιούνται για την ξήρανση ουσιών, το στέγνωμα γυάλινων οργάνων ή τη διατήρηση μιας ουσίας για αρκετό χρόνο σε κάποια σταθερή θερμοκρασία. Η θερμοκρασία μπορεί να ρυθμίζεται αυτόματα (συνήθως μέχρι 200°C). Στους φούρνους δεν τοποθετούμε ουσίες οι οποίες κατά τη θέρμανση ελευθερώνουν διαβρωτικούς ατμούς, καθώς και ενώσεις του υδραργύρου, επειδή προσβάλλουν την εσωτερική επιφάνεια του φούρνου.
- pH-μετρο. Η μέτρηση του pH γίνεται με ειδικά ηλεκτρόδια που βρίσκονται σε κάθε πεχάμετρο. Τα pH-μετρα χρησιμοποιούν την αρχή της ποτενσιομετρικής μέτρησης του pH, η οποία προσδιορίζει την ενεργότητα των ιόντων υδρογόνου σε ένα διάλυμα. Η μέτρηση γίνεται με τη χρήση ενός ενδεικτικού ηλεκτροδίου και ενός ηλεκτροδίου αναφοράς. Το δυναμικό του ενδεικτικού ηλεκτροδίου εξαρτάται εκλεκτικά από την ενεργότητα των ιόντων υδρογόνου στο διάλυμα. Η διαφορά δυναμικού ανάμεσα στα δύο ηλεκτρόδια, έπειτα από βαθμονόμηση, δίνει την τιμή pH.
- Ζυγός.
- Φυγόκεντρος.
- Ανακινητής.
- Φασματοφωτόμετρο.
- Συσκευές χρωματογραφίας, ηλεκτροφόρησης (βλέπε κεφάλαια 8 και 11).
- Αυτόματος αναλυτής.

1.2 Οδηγίες χρήσης εργαστηριακών συσκευών

1.2.1 Ηλεκτρονικός Ζυγός

- Μηδενίζουμε το όργανο πριν από κάθε ζύγιση.
- Τοποθετούμε τον περιέκτη (κάψα, ύαλο ωρολογίου) στον δίσκο ζύγισης.
- Μηδενίζουμε πάλι τον ζυγό.
- Προσθέτουμε την προς ζύγιση ουσία με την ειδική σπάτουλα σε μικρές ποσότητες στον περιέκτη.
- Αναμένουμε να τερματιστεί η ηλεκτρονική καταγραφή των ενδείξεων της μάζας μέχρι σταθεροποίησης.
- Μετά την τελική καταγραφή της μάζας απομακρύνουμε με προσοχή τον περιέκτη με την ουσία.

- Σε περίπτωση διασποράς μέρους της ουσίας είτε στον ζυγό είτε στον εργαστηριακό πάγκο καθαρίζουμε άμεσα κάθε ίχνος της (Εικόνα 1.22).



Εικόνα 1.22 Ηλεκτρονικός ζυγός δύο ψηφίων κατά τη διάρκεια της ζύγισης υγρού διαλύματος.

Σφάλματα ζύγισης

- Μη συχνή βαθμονόμηση και πειραματικά σφάλματα από την κακή χρήση του ζυγού.
- Η ουσία που ζυγίζουμε είναι υγροσκοπική και δεν ζυγίζεται σε κλειστό φιαλίδιο.
- Η ζυγιζόμενη ουσία έχει μεγαλύτερη ή μικρότερη θερμοκρασία από τη θερμοκρασία περιβάλλοντος, ενώ ο ζυγός βρίσκεται κοντά σε θερμαντική πηγή.
- Η άνωση που μπορεί να προκαλέσει ο αέρας στην προς ζύγιση ουσία και πιθανώς η ανάπτυξη στατικού ηλεκτρισμού με τον δίσκο ζύγισης.



Μηδενισμός του ζυγού

Ζύγιση

Εικόνα 1.23 Η διαδικασία ζύγισης σε ηλεκτρονικό ζυγό.

Προφυλάξεις κατά τη χρήση των ζυγών:

- Ο ζυγός πρέπει να είναι πάνω σε μια αρκετά σταθερή επιφάνεια.
- Το δωμάτιο που βρίσκεται ο ζυγός θα πρέπει να έχει σταθερή θερμοκρασία και υγρασία και να μην έχει ρεύματα αέρα.
- Το επίπεδο του ζυγού πρέπει να είναι πάντα οριζόντιο.
- Το κάλυμμα του ζυγού, εάν έχει, πρέπει να είναι κλειστό.
- Τα προς ζύγιση αντικείμενα πρέπει να τοποθετούνται με λαβίδες στον δίσκο ζύγισης.
- Τα προς ζύγιση αντικείμενα πρέπει να μην διαβρώνουν τον ζυγό.
- Δεν πρέπει να υπερφορτώνεται ο ζυγός.

- Μετά τη ζύγιση πρέπει να αφαιρούνται όλα τα βάρη και να καλύπτεται ο ζυγός.
- Ο ζυγός πρέπει να διατηρείται καθαρός.



Εικόνα 1.24 Αναλυτικός ζυγός τεσσάρων ψηφίων.

1.2.2 Φυγόκεντρος

- Μετά την πλήρωση των σωληναρίων της φυγόκεντρου από το βιολογικό υγρό, τα σωληνάκια τοποθετούνται στους υποδοχείς της κεφαλής αντιδιαμετρικά και ισοβαρή.
- Τα σωληνάκια που περιέχουν μολυσματική ουσία (δείγματα AIDS, ηπατίτιδα) πρέπει να είναι κλειστά.
- Αφού κλείσουμε το κάλυμμα της φυγόκεντρου, το ασφαλίζουμε με προσοχή.
- Ρυθμίζουμε τον χρόνο και τις στροφές/λεπτό που απαιτεί ο διαχωρισμός υπερκείμενου υγρού/ιζήματος.
- Απομακρύνουμε με προσοχή το υπερκείμενο διάλυμα χωρίς ανατάραξη του ιζήματος.
- Σε περίπτωση θραύσης των σωληναρίων απομακρύνονται άμεσα με ταυτόχρονο καθαρισμό και απολύμανση του θαλάμου.
- Δεν ανοίγουμε ποτέ το κάλυμμα της φυγόκεντρου εν ώρα λειτουργίας (Εικόνα 1.25).



Εικόνα 1.25 Φυγόκεντρος.

1.2.3 pH-μετρο

- Ανοίγουμε το όργανο. Επιλέγουμε τη μέτρηση του pH και στη συνέχεια την πορεία της βαθμονόμησης (Calibration) με το κουμπί: Cal.
- Βυθίζουμε το ηλεκτρόδιο στο πρώτο πρότυπο διάλυμα pH. Πιέζουμε το κουμπί Run-Enter. Αναμένουμε τη σταθεροποίηση της τιμής. Ξεπλένουμε το ηλεκτρόδιο.
- Βυθίζουμε το ηλεκτρόδιο στο δεύτερο πρότυπο διάλυμα pH. Πιέζουμε το κουμπί Run-Enter (η λυχνία ανάβει). Αναμένουμε σταθεροποίηση της τιμής.
- Επιστρέφουμε στη μέτρηση του δείγματος. Βυθίζουμε το ηλεκτρόδιο στο δείγμα.
- Πιέζουμε το κουμπί M, για να μας δείξει την τιμή του pH ή του δυναμικού (σε mV) (Εικόνα 1.26).



Εικόνα 1.26 pH-μετρο.

1.2.4 Φωτόμετρο Bausch & Lomb

- Τίθεται το όργανο σε λειτουργία με τον διακόπτη λειτουργίας και το αφήνουμε για θερμική εξισορρόπηση για λίγα λεπτά (20 min). Το όργανο έχει εσωτερικά ειδικό κυκλοφορητή - ανεμιστήρα για την ταχύτερη θερμική εξισορρόπηση.
- Στρέφουμε τον διακόπτη ρυθμίσεως μήκους κύματος στο επιθυμητό μήκος κύματος.
- Με τον υποδοχέα κυψελίδας κενό, οπότε διακόπτεται αυτομάτως η φωτεινή δέσμη, και το κάλυμμα κλειστό στρέφουμε τον διακόπτη λειτουργίας, ώστε η βελόνα του μετρητή να δείχνει 0% διαπερατότητα (T) στην πάνω κλίμακα ή άπειρο απορρόφηση (A) στην κάτω.
- Πληρούται η κυψελίδα περίπου κατά το ήμισυ με απεσταγμένο νερό ή με το διάλυμα του τυφλού, τίθεται στον υποδοχέα, κλείνεται το κάλυμμα και στρέφετε τον διακόπτη ρυθμίσεως του 100% T, ώστε να δείχνει 100% T ή απορρόφηση 0 A.
- Απομακρύνεται η κυψελίδα και ελέγχουμε και πάλι το μηδέν της κλίμακας % T. Πληρούται η κυψελίδα με το προς μέτρηση διάλυμα και αναγιγνώσκεται η απορρόφηση (Εικόνα 1.16).
- Η άγνωστη συγκέντρωση του διαλύματος υπολογίζεται από τη σχέση:

$$\Sigma \text{ δείγματος} = A \text{ δείγματος} / A \text{ προτύπου} \times \Sigma \text{ προτύπου} \quad (1.1)$$

όπου,

Σ = Συγκέντρωση,

A = Απορρόφηση.

1.3. Κανόνες ασφάλειας του εργαστηρίου

- Απαγορεύεται αυστηρά στους χώρους του εργαστηρίου το κάπνισμα, η λήψη τροφής και ποτών.
- Η χρήση καθαρής και σε καλή κατάσταση εργαστηριακής μπλούζας θεωρείται υποχρεωτική για την παρουσία μας στο εργαστήριο.
- Σε περίπτωση εκτέλεσης επικίνδυνων διαδικασιών οι οποίες προβλέπουν χειρισμό τοξικών ουσιών, είναι απαραίτητη η χρήση ειδικών προστατευτικών γυαλιών, γαντιών ή μάσκας.
- Τα προσωπικά αντικείμενα (ρούχα, τσάντες) πρέπει να φυλάσσονται μακράν των εργαστηριακών πάγκων.
- Τοξικά ή/και διαβρωτικά υλικά θα πρέπει να μεταφέρονται πάντα μόνο με σιφόνια εφοδιασμένα με ειδικό ελαστικό «πουάρι» και ποτέ σε άμεση επαφή με βλεννογόνους ή το δέρμα.
- Αποφεύγεται η χρήση ραγισμένων γυάλινων σκευών. Τέτοια σκεύη απορρίπτονται σε ειδικά καλάθια ή σε σάκουσ απορριμμάτων με ιδιαίτερη προσοχή.
- Το δάπεδο και οι πάγκοι του εργαστηρίου θα πρέπει να παραμένουν πάντα στεγνοί και καθαροί.
- Ο λύχνος Bunsen χρησιμοποιείται μόνο, εάν ζητείται από το πρωτόκολλο της εργαστηριακής άσκησης. Εάν ο λύχνος πρέπει να χρησιμοποιηθεί, απομακρύνετε όλα τα εύφλεκτα υλικά (διαλύτες) από τη θερμική εστία.
- Οι περισσότεροι διαλύτες είναι εύφλεκτοι ή/και τοξικοί. Ο οποιοσδήποτε χειρισμός με τέτοια υλικά θα πρέπει να γίνεται στον ειδικό θάλαμο απαγωγού αερίων, τον οποίο διαθέτει το εργαστήριο.
- Μην χρησιμοποιείτε συσκευές των οποίων δεν γνωρίζετε τη λειτουργία. Απευθυνθείτε στον επιβλέποντα καθηγητή για κάθε σας απορία.
- Μην εργάζεστε με βιασύνη και σε χώρους, όπου δουλεύουν την ίδια στιγμή πολλοί συνάδελφοί σας (ζυγός, απαγωγός, φωτόμετρο).
- Εάν νιώσετε οποιαδήποτε προσωπική αδιαθεσία, οφείλετε να το αναφέρετε άμεσα στον επιβλέποντα καθηγητή.

- Το εργαστήριο πρέπει να διαθέτει μικρό φαρμακείο με τα απαραίτητα (αντισηπτικά, γάζες κλπ.) για την παροχή πρώτων βοηθειών σε περίπτωση μικροατυχήματος. Η κάθε περίπτωση (κοπή, κατάποση υγρού, έγκαυμα) να αναφέρεται στον επιβλέποντα άμεσα.
- Σε περίπτωση πυρκαγιάς απομακρυνθείτε το συντομότερο δυνατόν από τον χώρο του εργαστηρίου σε ασφαλή χώρο και μακριά από σκάλες και εξόδους. Επιτρέψτε στους επιβλέποντες καθηγητές να αντιμετωπίσουν απρόσκοπτα το πρόβλημα.
- Όταν χρησιμοποιείτε φυγόκεντρο πάγκου βεβαιωθείτε ότι τοποθετήσατε σωστά τους κατάλληλους σωλήνες σε αντιδιαμετρικά ισοβαρείς θέσεις.
- Ειδοποιήστε για οποιαδήποτε ηλεκτρική βλάβη συσκευής.

Δεδομένου ότι σχεδόν κάθε εργαστήριο χρησιμοποιεί χημικές ουσίες κάποιου είδους, οι κανόνες χημικής ασφάλειας είναι επιβεβλημένοι. Σύμφωνα με αυτές τις οδηγίες, οι εργαζόμενοι και οι φοιτητές πρέπει να αποφεύγουν τις διαρροές χημικών στο περιβάλλον εργασίας (εργαστηριακός πάγκος, δάπεδο, απαγωγός) και άλλα ατυχήματα, καθώς και ζημιές στο περιβάλλον έξω από το εργαστήριο. Οι κανόνες ορίζουν, επίσης, σαφείς διαδικασίες που πρέπει να ακολουθηθούν σε περίπτωση που προκύψει διαρροή (π.χ. χημική κηλίδα), προκειμένου να διασφαλιστεί ότι αντιμετωπίζεται σωστά και ότι αποφεύγονται οι κίνδυνοι ή τραυματισμοί.

Ειδικότερα:

- Κάθε χημική ουσία πρέπει να αντιμετωπίζεται ως επικίνδυνη.
- Μην επιτρέπετε σε διαλύτες να έρθουν σε επαφή με το δέρμα σας.
- Όλες οι χημικές ουσίες θα πρέπει να φέρουν σαφή επισήμανση με την ονομασία της ουσίας, τη συγκέντρωσή της, την ημερομηνία λήξης της και την ονομασία του υπεύθυνου για την ουσία.
- Πριν αφαιρέσετε οποιοδήποτε από τα περιεχόμενα μιας χημικής φιάλης, διαβάστε την ετικέτα δύο φορές.
- Ποτέ μην παίρνετε περισσότερη ποσότητα χημικού αντιδραστηρίου από έναν περιέκτη από όση χρειάζεστε για την εργασία σας.
- Μην τοποθετείτε τις χρησιμοποιημένες χημικές ουσίες στο αρχικό τους δοχείο.
- Χημικά ή άλλα υλικά δεν πρέπει ποτέ να αφαιρούνται από το εργαστήριο.
- Οι χημικές ουσίες δεν πρέπει ποτέ να αναμειγνύονται σε αποχετεύσεις και στον νεροχύτη.
- Οι εύφλεκτες και πτητικές χημικές ουσίες πρέπει να χρησιμοποιούνται μόνο μέσα σε απαγωγό.

1.4 Αξιοπιστία των αναλυτικών μεθόδων

Η ανακάλυψη του φασματοσκοπίου στα τέλη του 19^{ου} αιώνα συνετέλεσε στην ανάπτυξη των οπτικών αναλυτικών τεχνικών (φωτομετρία, φθορισμομετρία, νεφελομετρία), οι οποίες αποδείχτηκαν ιδιαίτερα χρήσιμες στη χημική ανάλυση.

Στη συνέχεια, το γεγονός ότι η εύρεση του τελικού σημείου στις κλασικές ογκομετρήσεις ήταν δυνατόν να επιτευχθεί με ηλεκτρική μέτρηση, αποτέλεσε το έναυσμα για την ανάπτυξη των ηλεκτροχημικών αναλυτικών μετρήσεων. Η αλματώδης ανάπτυξη της ηλεκτρονικής από το 1930, συνετέλεσε σε μια επανάσταση στην αναλυτική οργανολογία, η οποία έγινε περισσότερο εμφανής με την εισαγωγή τα τελευταία χρόνια των ψηφιακών ηλεκτρονικών και των μικροϋπολογιστών. Σχεδόν κάθε φυσικοχημική ιδιότητα στοιχείου, ιόντος ή ενώσεως, των οποίων το μέγεθος είναι συνάρτηση της μάζας, μπορεί να αποτελέσει τη βάση μιας μεθόδου προσδιορισμού τους. Οι τεχνικές αυτές ονομάζονται *φυσικοχημικές* ή *ενόργανες* και αφορούν, κυρίως, την ενέργεια, εν αντιθέσει με τις λεγόμενες *χημικές* ή *κλασικές* (σταθμικές και ογκομετρικές) οι οποίες ασχολούνται με τη μάζα.

Γενικά, οι κλασικές και οι ενόργανες τεχνικές ανάλυσης δεν δρουν ανταγωνιστικά, αλλά αλληλοσυμπληρώνονται και επιβάλλεται η γνώση αμφοτέρων, ώστε σε κάθε συγκεκριμένο αναλυτικό πρόβλημα, να είναι δυνατή η επιλογή της καταλληλότερης για την περίπτωση τεχνικής. Αυτή θα είναι και η φιλοσοφία του εργαστηρίου μας, που θα προσπαθήσει μέσα στα περιορισμένα χρονικά πλαίσια ενός προπτυχιακού προγράμματος να περιγράψει και να καταρτίσει επαρκώς τον φοιτητή τεχνολόγο και στις δύο ανωτέρω κατηγορίες αναλυτικών τεχνικών.

Είναι χρήσιμο να αναφέρουμε στο σημείο αυτό ότι οι φυσικοχημικές τεχνικές έχουν ως κύρια πλεονεκτήματα έναντι των κλασικών την ταχύτητα, τη μεγάλη ευαισθησία (προσδιορισμός μικροποσοτήτων) και την αυτοματοποίηση. Μειονεκτούν, όμως, έναντι των κλασικών ως προς το κόστος των απαιτούμενων

οργάνων, την ακρίβεια (για ποσότητες που μπορεί να προσδιορίσει η κλασική μέθοδος) και την ανάγκη βαθμονόμησης με πρότυπες ουσίες ή διαλύματα.

Όπως ήδη τονίστηκε, ο κύριος στόχος ενός κλινικο-βιοχημικού εργαστηρίου είναι να δίνει αξιόπιστα αποτελέσματα για τον προσδιορισμό των συστατικών από τα βιολογικά δείγματα του ασθενούς. Ατυχώς, και παρόλη την τεχνολογική πρόοδο, κατά τη διεξαγωγή οποιασδήποτε μέτρησης υπεισέρχονται αναπόφευκτα σφάλματα και συνακόλουθα τα αποτελέσματα χαρακτηρίζονται από έναν βαθμό αβεβαιότητας, ο οποίος μπορεί μεν να περιοριστεί σε αποδεκτά επίπεδα, όχι όμως και να μηδενιστεί. Τούτο καθορίζεται τις περισσότερες φορές από τον έμπειρο και επαρκώς καταρτισμένο αναλυτή.

Στον χώρο, όμως, της υγείας και στον βαθμό που παρατηρούνται συχνά επικίνδυνες αποκλίσεις μετρήσεων του ίδιου δείγματος από διαφορετικά εργαστήρια, αυτοί οι έλεγχοι αξιοπιστίας (quality assurance) πρέπει να γίνονται σε τακτική και συστηματική βάση. Αυτές οι διαδικασίες συνιστούν πλέον ένα υποχρεωτικό πλήρες σύστημα ελέγχου και αξιολόγησης όλων των φάσεων λειτουργίας ενός εργαστηρίου από τη συλλογή, διακίνηση, ανάλυση του δείγματος μέχρι τη διοίκηση του εργαστηρίου και τις σχέσεις του προσωπικού. Στην ποσοτική κατανόηση αυτών των διαδικασιών συμβάλλει αποφασιστικά η Βιοστατιστική.

Το μέτρο της αξιοπιστίας ενός αναλυτικού αποτελέσματος συνιστούν δύο βασικοί παράμετροι, η ακρίβεια (accuracy) και η επαναληψιμότητα (precision), που ορίζονται μαθηματικά εν συντομία ως κάτωθι:

Η πραγματική τιμή μιας μέτρησης (μ) είναι σπάνια γνωστή. Αντί αυτής χρησιμοποιείται μια παραδεκτή τιμή, με την οποία μπορούν να συγκριθούν όλες οι πειραματικές τιμές. Έτσι, μετά την εκτέλεση N αριθμού επαναλαμβανόμενων μετρήσεων του ίδιου μεγέθους και τη λήψη x_i (x_1, x_2, x_3, \dots) αριθμητικών τιμών, ως αντιπροσωπευτικότερη τιμή της μ θεωρείται ο αριθμητικός μέσος όρος ή μέση τιμή \bar{x} (mean) των αριθμητικών μετρήσεων.

$$\bar{x} = (x_1 + x_2 + x_3 + \dots + x_n) / N \quad (1.2)$$

Μερικές φορές ως πιο αντιπροσωπευτική τιμή της μ χρησιμοποιείται η διάμεση τιμή (M) (median), που ορίζεται ως η μεσαία κατά μέγεθος τιμή (για N περιττό) ή το ημίαθροισμα των δύο μεσαίων (για N άρτιο).

Επομένως, η ακρίβεια μιας μεθόδου που εκφράζεται με το απόλυτο σφάλμα (E) ορίζεται ως η διαφορά της μέσης τιμής από την πραγματική.

$$E = \bar{x} - \mu \quad (1.3)$$

Είναι προφανές ότι όσο μικρότερο είναι το σφάλμα τόσο μεγαλύτερη είναι και η ακρίβεια της μεθόδου.

Η επαναληψιμότητα μιας σειράς μετρήσεων χαρακτηρίζει τη συμφωνία των αποτελεσμάτων μεταξύ τους και είναι τόσο μεγαλύτερη, όσο μικρότερη είναι η διασπορά των αποτελεσμάτων. Ως μέτρα της επαναληψιμότητας μιας σειράς μετρήσεων χρησιμοποιούνται κύρια η μέση απόκλιση, η τυπική απόκλιση (Standard Deviation, SD) και το εύρος (R).

Η απόκλιση μιας τιμής (d_i) ορίζεται ως η διαφορά της μέσης τιμής (\bar{x}) από αυτή την τιμή (x_i).

$$d_i = x_i - \bar{x} \quad (1.4)$$

Η τυπική απόκλιση (SD), για μικρό αριθμό μετρήσεων, ορίζεται από τη σχέση.

$$SD^2 = \frac{\sum x_i^2 - (\sum x_i)^2 / N}{N - 1} \quad (1.5)$$

Η τυπική απόκλιση (SD) εκφράζει στην πραγματικότητα την τυπική απόκλιση μιας μεμονωμένης τιμής. Επειδή η μέση τιμή των μετρήσεων (\bar{x}) παρουσιάζει ιδιαίτερο αναλυτικό ενδιαφέρον, είναι επιθυμητή πολλές φορές η γνώση της επαναληψιμότητας της μέσης τιμής. Αυτή εκφράζεται με την τυπική απόκλιση της μέσης τιμής (σταθερό σφάλμα μέσης τιμής, Standard Error ή SE).

$$SE = SD / \sqrt{N} \quad (1.6)$$

Ένα χρήσιμο τέλος μέτρο της επαναληψιμότητας για μικρό αριθμό μετρήσεων είναι το εύρος (R), που ορίζεται ως η διαφορά της ελάχιστης από τη μέση τιμή.

$$R = X_{\max} - X_{\min} \quad (1.7)$$

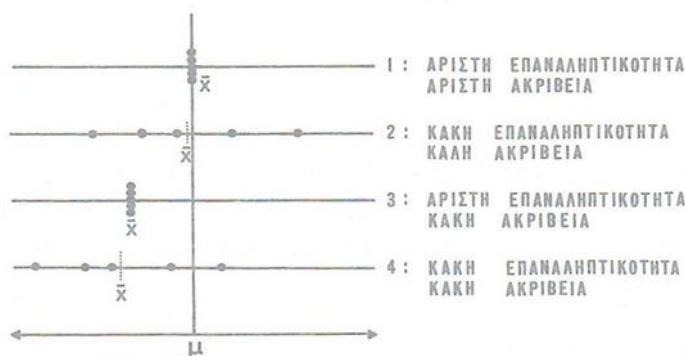
Όπως προκύπτει από τους παραπάνω ορισμούς, τα μεγέθη που περιγράφηκαν είναι καθαροί αριθμοί. Έτσι, εάν πολλαπλασιαστούν επί 100 (ή 1000 κλπ.), δίνουν τον συχνά χρησιμοποιούμενο συντελεστή μεταβλητότητας (coefficient of variation ή CV).

$$CV = SD \times 100 / \text{μέση τιμή} \quad (1.8)$$

Αυτό σημαίνει απλά ότι όσο μικρότερο το SD, τόσο μικρότερο προκύπτει το CV, δηλαδή η μέθοδός μας στην περίπτωση αυτή είναι πιο ακριβής, γιατί εμφανίζει τη μικρότερη διακύμανση.

Εδώ θα πρέπει να τονιστεί ότι η καλή επαναληψιμότητα δεν συνεπάγεται αναγκαστικά και καλή ακρίβεια, γιατί είναι δυνατόν να υπεισέρχεται στις μετρήσεις ένα καθορισμένο σφάλμα.

Κακή επαναληψιμότητα συνεπάγεται συνήθως κακή ακρίβεια, ενώ καλή ακρίβεια προϋποθέτει συνήθως και καλή επαναληψιμότητα (Σχήμα 1.1).



Σχήμα 1.1 Τα σημεία στους άξονες αντιπροσωπεύουν διαφορετικές μετρήσεις. Η περίπτωση 3 του διαγράμματος 1 είναι σπάνια και υποδηλώνει την ύπαρξη συστηματικού σφάλματος.

1.5 Σφάλματα στις μετρήσεις

Τα σφάλματα στην ποσοτική ανάλυση ενός δείγματος, ανάλογα της προέλευσής τους, μπορούν να διακριθούν σε δύο μεγάλες κατηγορίες. Στα συστηματικά από συγκεκριμένες αιτίες και τα τυχαία από μη ελεγχόμενες αιτίες.

1.5.1 Συστηματικά σφάλματα

Είναι μονοκατευθυνόμενα, επιδρούν δηλαδή στο αποτέλεσμα μιας μέτρησης πάντοτε κατά την ίδια φορά (είτε θετικά είτε αρνητικά) και παραμένουν σταθερά (είτε αναλογικά) για μια σειρά μετρήσεων. Μπορεί να οφείλονται σε διάφορες αιτίες, όπως:

- Αναλυτή (οφθαλμού-θέσεως μνήσκου στην ογκομέτρηση, κακή εκτέλεση πειράματος, κατάλληλα αντιδραστήρια, αχρωματοψία, αμέλεια)
- Μεθόδου (ατελής αντίδραση, προσμίξεις)
- Οργάνου (μη ορθή βαθμονόμηση, παραμορφωμένα υάλινα σκεύη)

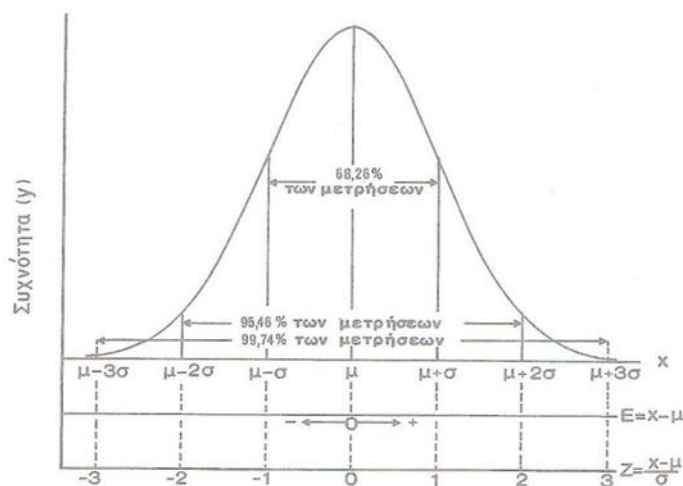
Η διόρθωση ενός συστηματικού σφάλματος μπορεί να γίνει με διάφορους τρόπους κατά περίπτωση, όπως με:

- Θεωρητικό υπολογισμό του λάθους
- Βαθμονόμηση
- Μέτρηση τυφλού δείγματος
- Ανάλυση προτύπων διαλυμάτων

1.5.2 Τυχαία σφάλματα

Τέτοια σφάλματα προέρχονται από μη μόνιμες αιτίες, όπως διαταραχές που παρενοχλούν τις μετρήσεις, διακυμάνσεις εξωτερικών επιδράσεων (ηλεκτρική τάση, θερμοκρασία, πίεση ύδατος), ατέλειες αισθητικών οργάνων και άλλους αστάθμητους παράγοντες. Η επίδραση στη μέτρηση είναι δικατευθυνόμενη (πότε θετική, πότε αρνητική), γι' αυτό και δρα ακανόνιστα στο τελικό αποτέλεσμα. Τα τυχαία σφάλματα εξουδετερώνονται σε κάποιο βαθμό, με αύξηση του αριθμού των μετρήσεων.

Η μέθοδος αυτή, που εφαρμόζεται πάντα στην έρευνα, αναφέρεται στην κατανομή των τυχαίων σφαλμάτων, που ακολουθεί τον νόμο της κανονικής κατανομής του και περιγράφεται διαγραμματικά στον γνωστό κώδωνα του Gauss (Σχήμα 1.2).



Σχήμα 1.2 Το πλάτος της καμπύλης αντιπροσωπεύει την επαναληψιμότητα των μετρήσεων. Όσο μικρότερο είναι αυτό το πλάτος, τόσο καλύτερη είναι η επαναληψιμότητα. Η αληθινή τιμή μ αντιστοιχεί στο μέγιστο της καμπύλης. Η τυπική απόκλιση (σ ή SD), παρίσταται ως η οριζόντια απόσταση από την τιμή μ σε σχέση με κάποιο από τα δύο σημεία καμπής της καμπύλης με τη μέγιστη κλίση.

Από το Σχήμα 1.4 παρατηρούμε ότι στο διάστημα, που ορίζεται από το $\mu \pm \sigma$ υπάρχει το 68.26% των μετρήσεων, δηλαδή υπάρχει πιθανότητα $P = 0.68$ οι μετρήσεις να βρίσκονται μέσα σ αυτά τα όρια, ενώ υπάρχει μια πιθανότητα 0,38 να βρίσκονται έξω από αυτή τη σειρά. Στην περιοχή $\mu \pm 2\sigma$, οι πιθανότητες να βρίσκονται έξω από αυτά τα όρια είναι 0,05. Στη σειρά $\mu \pm 3\sigma$, που καλύπτει το 99% των μετρήσεων, η πιθανότητα να βρίσκονται μετρήσεις έξω από αυτό το όριο μειώνονται σε $P = 0,01$.

1.5.3 Ορθότητα – Πιστότητα – Ολικό σφάλμα αναλυτικής μεθόδου

Δύο σημαντικά μεγέθη που επηρεάζουν την ποιότητα των μετρήσεων είναι η πιστότητα και η ορθότητα. Η ορθότητα ή αλλιώς η έλλειψη ακρίβειας ισούνται με το συστηματικό σφάλμα της μεθόδου και η πιστότητα με το τυχαίο σφάλμα της μεθόδου.

Η ορθότητα (trueness) ορίζεται ως ανάκτηση (recovery) ή μεροληψία (bias) ανάλογα με τον τρόπο υπολογισμού. Η ορθότητα δείχνει την έλλειψη ακρίβειας (inaccuracy %). Στην πράξη, είναι η διαφορά κάθε μέτρησης (x_i) από την αληθή τιμή (μ):

$$\text{Bias} = x_i - \mu \quad (1.9)$$

Επειδή όμως η αληθής τιμή είναι πολλές φορές άγνωστη - εκτός και εάν είναι δυνατόν να γίνει προσδιορισμός με πρότυπες μεθόδους - η ορθότητα ορίζεται συνήθως ως η διαφορά μιας τιμής από τη μέση τιμή όσο το δυνατόν πιο σωστών μετρήσεων.

Υπολογισμός μεροληψίας με πείραμα: Χρησιμοποιείται η τιμή του βαθμονομητή (calibrator) η οποία έτσι και αλλιώς έχει υπολογιστεί από την παρασκευάστρια εταιρεία με πρότυπες μεθόδους. Η τιμή αυτή συμβολίζεται με C_b . Παράλληλα προσδιορίζεται η τιμή ενός δείγματος εις τριπλούν και υπολογίζεται ο μέσος όρος τους (C_0). Αναμειγνύεται σε ίσα μέρη (1:1) βαθμονομητής και δείγμα και μετριέται το νέο δείγμα πάλι τρεις φορές (C_T). Η ανάκτηση bias υπολογίζεται από την παρακάτω εξίσωση:

$$1 - \frac{C_T - \frac{C_0}{2}}{\frac{C_b}{2}} \quad (1.10)$$

Προηγουμένως αναφέρθηκε η έλλειψη επαναληψιμότητας ως το τυχαίο σφάλμα μιας αναλυτικής μεθόδου. Η πιστότητα (precision) είναι ένας γενικότερος όρος και περιλαμβάνει τόσο την επαναληψιμότητα όσο και την αναπαραγωγιμότητα. Σε γενικές γραμμές οι όροι αυτοί σημαίνουν τα εξής:

Η επαναληψιμότητα (repeatability ή r) είναι διασπορά των τιμών διαδοχικών μετρήσεων που έγιναν στον ίδιο αναλυτή, με τα ίδια αντιδραστήρια, με την ίδια βαθμονόμηση και τις ίδιες εξωτερικές περιβαλλοντικές συνθήκες και μέσα στην ίδια ημέρα. Η επαναληψιμότητα προσδιορίζεται από διαδοχικές μετρήσεις του ίδιου δείγματος που πραγματοποιούνται μέσα στην ίδια ημέρα (intra-assay) με τις συνθήκες που περιγράψαμε. Κάθε μέτρηση θα πρέπει να διαφέρει από την άλλη τουλάχιστον 15 λεπτά. Το δείγμα που χρησιμοποιείται στις μετρήσεις μπορεί να είναι μεμονωμένο δείγμα ή ανάμιξη (pooled sample) διαφορετικών δειγμάτων. Μέτρο της επαναληψιμότητας είναι ο συντελεστής επαναληψιμότητας CV_r ή αλλιώς η σχετική τυπική απόκλιση R_{SDr} που υπολογίζεται από τη μέση τιμή και την τυπική απόκλιση των διαδοχικών μετρήσεων.

Η ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα (interlaboratory reproducibility ή R) ή ενδιάμεση πιστότητα είναι η διασπορά των τιμών διαδοχικών μετρήσεων διαφορετικών ημερών (inter-assay). Οι μετρήσεις αυτές γίνονται υπό διαφορετικές συνθήκες, αφού μεταξύ των διαφορετικών ημερών πολλές συνθήκες της ανάλυσης έχουν αλλάξει, π.χ. αντιδραστήριο, βαθμονόμηση, περιβαλλοντικές συνθήκες κ.ά. Μέτρο της αναπαραγωγιμότητας είναι ο συντελεστής μεταβλητότητας CV_R ή η σχετική τυπική απόκλιση R_{SDR} . Προσδιορίζεται από τη μέση τιμή και την τυπική απόκλιση των μετρήσεων διαδοχικών ημερών.

Υπολογισμός της πιστότητας: Η πιστότητα είναι το αλγεβρικό άθροισμα της R_{SDr} και R_{SDR} . Κατά κανόνα η αναπαραγωγιμότητα είναι μεγαλύτερη από την επαναληψιμότητα ($R_{SDR} > R_{SDr}$ π.χ. 4,5% > 2,35%).

Το άθροισμα της πιστότητας και της ορθότητας ισούται με το ολικό σφάλμα της αναλυτικής μεθόδου (Total Error ή TE):

$$TE = \text{Bias\%} + 1,65 \text{ Precision\%} \quad (1.11)$$

Τα όρια ανοχής των τιμών ορθότητας και πιστότητας

Οι τιμές πιστότητας (επαναληψιμότητας και αναπαραγωγιμότητας) καθώς και ορθότητας (ανάκτησης ή μεροληψίας) θα πρέπει να ελέγχονται για το εάν τηρούνται συγκεκριμένες προδιαγραφές.

Συγκεκριμένα:

- Το εργαστήριο συγκρίνει τις τιμές πιστότητας και ορθότητας με αυτές που δίνει η κατασκευάστρια εταιρεία των αντιδραστηρίων. Σύμφωνα με την Ευρωπαϊκή οδηγία 2017/746, όλα τα αντιδραστήρια που κυκλοφορούν στην Ευρωπαϊκή Ένωση θα πρέπει να συνοδεύονται από εσώκλειστο φυλλάδιο που περιέχει όλες τις πληροφορίες επικύρωσης της αναλυτικής μεθόδου, μεταξύ αυτών και της πιστότητας και ορθότητας. Θα πρέπει οι τιμές που υπολόγισε το εργαστήριο στο πλαίσιο της επαλήθευσης της μεθόδου να είναι μικρότερες ή ίσες από αυτές που δίνει η εταιρεία.
- Τα τελευταία χρόνια έχει γίνει μια διεθνής προσπάθεια να υπολογιστούν συγκεκριμένα όρια πιστότητας, ορθότητας και ολικού σφάλματος κοινά αποδεκτά από όλη την επιστημονική κοινότητα. Η συλλογή όλων αυτών των δεδομένων από τη διεθνή βιβλιογραφία έγινε από μία Ισπανική ομάδα κλινικών χημικών υπό την Dr. Carmen Ricos. Τα όρια που υπολόγισε αυτή η

επιστημονική ομάδα βασίζονταν κυρίως στη μέση βιολογική μεταβλητότητα των ουσιών εντός του ίδιου ανθρώπου (CV_{BW}%) και εντός διαφορετικών ημερών (CV_{Bb}%).

Το ανώτερο όριο πιστότητας έχει οριστεί ως: Πιστότητα < 0,5 CV_{BW}%

Το ανώτερο όριο για την ορθότητα έχει οριστεί ως: Bias % < 0,25 $\sqrt{CV_{BW\%}^2 + CV_{Bb\%}^2}$.

1.6 Ενδεικτικές ασκήσεις

Παράδειγμα 1

Για τον έλεγχο μιας αναλυτικής μεθόδου προσδιορισμού ενδογενούς ουσίας στον ορό αίματος, ένα γνωστό πρότυπο διάλυμα περιεκτικότητας 2.000 µg/mL αναλύθηκε 5 φορές και λήφθηκαν οι κάτωθι μετρήσεις (µg / mL) 1,986, 2,013, 2,007, 1,973 και 1,981. Να υπολογισθούν η μέση τιμή, το εύρος, η τυπική απόκλιση, η σχετική τυπική απόκλιση και το σφάλμα της μεθόδου.

Επίλυση

$$X = 1,986 + 2,013 + 2,007 + 1,973 + 1,981 / 5 = 1,992 \text{ µg/mL}$$

$$R = 2,013 - 1,973 = 0,040 \text{ µg/mL}$$

$$SD \text{ (ή } \sigma \text{) (εξίσωση 4) = 0,017 µg/mL}$$

$$\text{Σχετική τυπική απόκλιση (\%): } R_{SD(\%)} = (0,017 / 1,992) / 100 = 0,9 \%$$

$$\text{Σφάλμα (Εξίσωση 2), } E = 1,992 - 2,000 = - 0,008 \text{ µg/mL}$$

Παράδειγμα 2

Έστω ότι για τη χοληστερόλη η τιμή του βαθμονομητή είναι 200 mg/dL. Λάβαμε ένα δείγμα και το μετρήσαμε 3 φορές με τιμές 240, 243, 238 mg/dL. Αναμείξαμε σε ίσα μέρη δείγμα και βαθμονομητή και το μετρήσαμε για χοληστερόλη πάλι επί τρεις φορές και λάβαμε τις τιμές 221, 223, 218 mg/dL.

Επίλυση

$$\text{Έχουμε: } C_o = 240,3 \text{ mg/dL, } C_b = 200 \text{ mg/dL και } C_r = 220,6 \text{ mg/dL}$$

$$\text{Οπότε: } \text{bias} = 1,0045 \text{ ή } 100,45 \%$$

$$\text{Αυτό πρακτικά σημαίνει ότι η ανάκτηση είναι } 100 - 100,45 = 0,45\%.$$

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.7 Εργαστηριακή άσκηση: Εσωτερικός έλεγχος λειτουργίας πιπέττας

Χρησιμοποιούμε διακριβωμένο ζυγό στον οποίο ζυγίζουμε υπερκαθαρό νερό, το οποίο έχουμε αναρροφήσει με την πιπέττα. Γίνονται πολλαπλές μετρήσεις του όγκου νερού της πιπέττας σε όλους τους πιθανούς όγκους που μπορεί να αναρροφήσει. Στο τέλος της διαδικασίας υπολογίζεται η έλλειψη επαναληψιμότητας (imprecision) η οποία ισούνται με τον συντελεστή μεταβλητότητας (CV% = 100 SD/μ), καθώς και η έλλειψη ακρίβειας (inaccuracy% ή bias%). Η έλλειψη ακρίβειας ισούται με τη διαφορά της μέσης τιμής των μετρήσεων (μ) από το θεωρητικό βάρος του νερού στο οποίο ρυθμίστηκε η πιπέττα.

Εάν οι τιμές της έλλειψης πιστότητας και επαναληψιμότητας είναι έξω από τα όρια ανοχής του κατασκευαστή, τότε θα πρέπει να βαθμονομηθεί η πιπέττα σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Αμέσως μετά επαναλαμβάνεται ο έλεγχος μέχρις ότου ο μέσος όγκος των τριπλών τιμών να βρεθεί μέσα στα όρια ανοχής του κατασκευαστή.

Διαδικασία εσωτερικού ελέγχου λειτουργίας πιπέττας

Η διακρίβωση θα πρέπει να γίνεται σε δωμάτιο στους 15-30°C, με απόκλιση +/- 0,5°C και υγρασία πάνω από 50%. Η πιπέττα, τα tips (ρύγχη) και το νερό ελέγχου θα πρέπει να παραμείνουν στο δωμάτιο αρκετό χρόνο (τουλάχιστον 2 ώρες) για να φτάσουν σε ισορροπία με τις συνθήκες του δωματίου.

- Ρυθμίζεται στην πιπέτα ο επιθυμητός όγκος (Vs).

- Τοποθετήστε προσεκτικά το tip στο ρύγχος της πιπέτας.
- Γεμίζεται το tip με υπερκαθαρό νερό και αποβάλλεται πέντε φορές ώστε να φτάσει σε ισορροπία με τον νεκρό όγκο αέρα στο εσωτερικό του.
- Το tip αντικαθίσταται. Το νέο tip βρέχεται μία φορά με το νερό ελέγχου (γεμίζει και αδειάζει μία φορά).
- Αναρροφάται το υπερκαθαρό νερό βυθίζοντας το tip μόλις 2-3 mm κάτω από την επιφάνεια του νερού το οποίο βρίσκεται μέσα σε ένα ποτήρι ζέσεως. Η πιπέτα κρατείται κάθετα.
- Απομακρύνεται η πιπέτα από το νερό καθέτως και οδηγείται στον διακριβωμένο ζυγό μέσα στο οποίο έχει τοποθετηθεί ένα ποτήρι ζέσεως.
- Απορρίπτεται το νερό από την πιπέτα στο ποτήρι ζέσεως του διακριβωμένου ζυγού. Η απόρριψη γίνεται ακριβώς πάνω από την υγρή επιφάνεια σε γωνία 30° έως 45°.
- Διαβάζεται το βάρος του νερού σε mg (m_i).
- Επαναλαμβάνονται τα προηγούμενα στάδια τρεις φορές. Εάν η πιπέτα είναι πολλαπλού όγκου, η διαδικασία επαναλαμβάνεται σε διαφορετικούς όγκους σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.
- Μετατρέπονται οι καταγεγραμμένες μάζες (m_i) σε όγκους (V_i). Αυτό γίνεται με την τύπο:

$$V_i = (m_i + e) Z$$

όπου,

Z: ο «συντελεστής διόρθωσης» (correction factor) σε $\mu\text{L}/\text{mg}$,

m_i : το βάρος (mass) του νερού σε mg,

e: η εξάτμιση (evaporation) σε mg,

Ο συντελεστής διόρθωσης εξαρτάται από τη θερμοκρασία της ατμόσφαιρας και την ατμοσφαιρική πίεση. Η θερμοκρασία κανονικά μετρείται με διακριβωμένο θερμόμετρο και η ατμοσφαιρική πίεση με διακριβωμένο θερμόμετρο. Η απώλεια λόγω της εξάτμισης μπορεί να είναι σημαντική σε μικρά βάρη. Θα πρέπει πάντως να προσδιοριστεί γιατί μπορεί να είναι σημαντική. Κανονικά η απώλεια νερού λόγω εξάτμισης για πιπεττάρισμα 10 δευτερολέπτων είναι 2 mg. Για να υπολογιστεί βάζουμε μία ποσότητα νερού σε ποτήρι ζέσεως και μετράμε το βάρος του νερού πριν και μετά χρόνου 30 δευτερολέπτων. Η εξάτμιση εξαρτάται πάντως από την υγρασία και εάν αυτή είναι πάνω από 50% είναι πολύ μικρή.

- Υπολογίζεται ο μέσος όγκος.
- Από τον μέσο όγκο υπολογίζεται το συστηματικό σφάλμα σε μL :

$$\text{Bias} = \bar{V} - V_s \text{ ή } \text{Bias \%} = (100(V - V_s))/V_s \quad (1.12)$$

- Υπολογίστε το τυχαίο σφάλμα. Αρχικά ως τυπική απόκλιση στο πρόγραμμα excel με την επιλογή STDEV.S και τελικά ως συντελεστή μεταβλητότητας $CV = 100 \text{SD}/\bar{V}$. Ο συντελεστής μεταβλητότητας εκφράζεται ως ποσοστό (%).
- Συγκρίνονται το συστηματικό και το τυχαίο σφάλμα με τα όρια ανοχής του κατασκευαστή ή τις προδιαγραφές του δικού μας εργαστηρίου. Εάν τα αποτελέσματα βρίσκονται εντός των προδιαγραφών, η πιπέτα είναι έτοιμη για χρήση. Διαφορετικά γίνεται επαναβαθμονόμηση.

Προκειμένου να βρούμε τις περιβαλλοντικές συνθήκες στην περιοχή όπου κάνουμε τον εσωτερικό έλεγχο λειτουργίας μπορούμε ακόμα και να καταφύγουμε σε ιστοσελίδες που δίνουν την ατμοσφαιρική πίεση και υγρασία στην περιοχή που εργαζόμαστε.

Προσοχή: Στη διακρίβωση των πιπετών απαιτείται πρώτα να μετατραπούν τα βάρη σε όγκους και μετά να γίνουν οι υπολογισμοί bias, imprecision και uncertainty.

Δραστηριότητα: Διαδικασία εσωτερικού ελέγχου λειτουργίας πιπέτας 1000 μL

Ακολουθώντας τα παραπάνω πραγματοποιήθηκε η διαδικασία εσωτερικού ελέγχου λειτουργίας πιπέτας 1000 μL χρησιμοποιώντας διακριβωμένο ζυγό και υπερκαθαρό νερό και ελήφθησαν οι ακόλουθες 20 ζυγίσεις:

1 ^η ζύγιση	990 mg	6 ^η ζύγιση	1000 mg	11 ^η ζύγιση	990 mg	16 ^η ζύγιση	1010 mg
2 ^η ζύγιση	1000 mg	7 ^η ζύγιση	990 mg	12 ^η ζύγιση	990 mg	17 ^η ζύγιση	1000 mg
3 ^η ζύγιση	990 mg	8 ^η ζύγιση	990 mg	13 ^η ζύγιση	1000 mg	18 ^η ζύγιση	990 mg
4 ^η ζύγιση	990 mg	9 ^η ζύγιση	1000 mg	14 ^η ζύγιση	1000 mg	19 ^η ζύγιση	990 mg
5 ^η ζύγιση	1000 mg	10 ^η ζύγιση	990 mg	15 ^η ζύγιση	1010 mg	20 ^η ζύγιση	990 mg

Κατά τη διάρκεια της διαδικασίας βρέθηκε ότι ο συντελεστής διόρθωσης (Z) με βάση τη θερμοκρασία της ατμόσφαιρας και την ατμοσφαιρική πίεση είναι 1010 $\mu\text{L}/\text{mg}$ και η εξάτμιση (e) είναι 5 mg.

Σύμφωνα με τις προδιαγραφές του κατασκευαστή της πιπέτας των 1000 μL (CV < 0,6% και Bias < + 0,3%), οι μετρήσεις με την πιπέτα των 1000 μL είναι αξιόπιστες;

Βιβλιογραφικές Αναφορές

- Miller, J. & Miller, I. (2005). *Statistics and chemometrics for analytical chemistry*. Pearson, Prentice Hall.
- Γεωργίου, Ζ. και συν., 2015. *Εργαστηριακές Ασκήσεις Κλινικής Χημείας*. Αθήνα: Κάλιππος.
- Καρίκας, Γ. (2018). *Εφαρμοσμένη Βιοχημεία Θεωρία Ασκήσεις*. Αθήνα: Βιβλιόπολις.
- Κορνήλιος, Σ., & Αποστολάκη, Μ. (2018). *Κανόνες ασφάλειας και συμπεριφοράς στο χημικό εργαστήριο*. Ηράκλειο Κρήτης: Πανεπιστήμιο Κρήτης.
- Κουπάρης, Μ. (2005). *Στατιστική-Χημειομετρία*. Αθήνα: Τμήμα Χημείας ΕΚΠΑ.
- Λάλια-Καντούρη, Μ., Παπαστεφάνου, Σ., & Χατζηκώστας, Χ. (2001). *Εργαστηριακές ασκήσεις Γενικής και Ανόργανης Χημείας*. Αθήνα: Ζήτη.
- Μαρκόπουλος, Μ, Μητσοπούλου, Χ., Καραλιώτα, Α., Μεθενίτης, Κ., Παπαρηγοπούλου, Μ., Σταμπάκη, Δ., Ψαρουδάκης, Ν., Καλατζής, Γ., & Κυρίτσης, Π. (2005). *Εργαστηριακές ασκήσεις Γενικής και Ανόργανης Χημείας*. Αθήνα: Σταμούλης.
- Χατζηϊωάννου, Θ., & Κουπάρης, Μ. (2003). *Ενόργανη Ανάλυση*. Αθήνα. ISBN 9789602207505

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΘΕΩΡΙΑ ΚΑΙ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΑΣΚΗΣΕΙΣ ΣΤΑ ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ

Συγγραφέας: Μαρία Τράπαλη

Σύνοψη

Τα διαλύματα είναι ομοιογενή μείγματα τα οποία συναντώνται σε πολλά πεδία. Κάθε διάλυμα αποτελείται από το μέσο διασποράς, που ονομάζεται διαλύτης και από την ουσία (ή τις ουσίες) που διαλύεται σε αυτό και λέγεται διαλυμένη ουσία. Κάθε διάλυμα χαρακτηρίζεται από ένα μέγεθος (μορφή περιεκτικότητας) που δείχνει πόση ποσότητα διαλυμένης ουσίας περιέχει το διάλυμα. Ένα διάλυμα μπορεί να παρασκευαστεί από τη διάλυση ποσότητας στερεάς ουσίας σε ποσότητα διαλύτη ή μπορεί να αραιωθεί προς ένα πιο αραιό διάλυμα με προσθήκη διαλύτη ή μπορεί να συμπυκνωθεί ή να αναμειχθεί με άλλο διάλυμα. Στη Βιοχημεία, όπως και στον ανθρώπινο οργανισμό τα διαλύματα είναι υδατικά.

Προαπαιτούμενη γνώση

Απαιτούνται βασικές γνώσεις του 1ου Κεφαλαίου. Από την ανάμειξη δύο ή περισσότερων υγρών, στερεών ή αερίων, μπορεί να προκύψουν ένα πραγματικό διάλυμα, ένα κολλοειδές διάλυμα ή ένα αδρομερές σύστημα διασποράς.

Πραγματικό διάλυμα είναι ένα μείγμα δύο ή περισσότερων συστατικών που σχηματίζουν μια ομοιογενή μοριακή διασπορά, δηλαδή ένα μονοφασικό σύστημα, η σύνθεση του οποίου μπορεί να ποικίλλει σε μεγάλο βαθμό.

Ο όρος «ομοιογενές» σημαίνει πως όλα τα μέρη του μείγματος, εάν αναλυθούν με τις συνήθεις χημικές ή φυσικοχημικές μεθόδους ανάλυσης, είναι απολύτως όμοια. Ο όρος «ετερογενές» αφορά σε συστήματα διασποράς τα οποία αποτελούνται από περισσότερες από μία φάσεις, που μεταξύ τους υπάρχει διαχωριστική επιφάνεια.

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1 Κυριότερες εκφράσεις περιεκτικότητας διαλυμάτων – Νόμος αραιώσης – Επίλυση προβλημάτων

Πίνακας 2.1 Συνήθεις μονάδες μέτρησης στη βιοχημική ανάλυση (S.I).

Σύμβολο	Όνομα	Μετατρέπόμενες σε δυνάμεις του 10	Παραδείγματα
m	milli	1/1000 ή 10^{-3}	mmol, mg, mL
μ	micro	10^{-6}	μmol, μg, μL
N	nano	10^{-9}	nmol, ng
P	pico	10^{-12}	pmol, pg
F	femto	10^{-15}	fmol, fg
K	kilo	1000 φορές ή 10^3	kg
M	mega	10^6	MPa

2.1.1 Κυριότερες εκφράσεις περιεκτικότητας διαλυμάτων

Τα διαλύματα χωρίζονται σε διάφορες κατηγορίες αναλόγως της φυσικής κατάστασης του διαλύτη και της διαλυμένης ουσίας. Επειδή οι καταστάσεις της ύλης είναι τρεις (στερεά, υγρά και αέρια) είναι δυνατή η ύπαρξη εννέα τύπων - συνδυασμών διαλυμάτων (Πίνακας 2.2):

Πίνακας 2.2 Τύποι διαλυμάτων.

a/a	Διαλυμένη ουσία	Διαλύτης	Παραδείγματα
1	Αέριο	Αέριο	Μείγματα αναισθητικών αερίων
2	Υγρό	Αέριο	Υδωρ σε οξυγόνο
3	Στερεό	Αέριο	Ατμοί ιωδίου στον αέρα
4	Αέριο	Υγρό	Διοξείδιο του άνθρακα σε ύδωρ
5	Υγρό	Υγρό	Αλκοόλη σε ύδωρ
6	Στερεό	Υγρό	NaCl σε ύδωρ, σακχαρόζη σε ύδωρ
7	Αέριο	Στερεό	Υδρογόνο σε παλλάδιο
8	Υγρό	Στερεό	Παραφινέλαιο σε παραφίνη
9	Στερεό	Στερεό	Κράματα

Οι παραπάνω εννέα τύποι διαλυμάτων, ανάλογα με την τελική φυσική κατάσταση του διαλύματος, συνοψίζονται σε τρεις κατηγορίες:

- Τα αέρια διαλύματα (1, 2 και 3)
- Τα υγρά διαλύματα (4, 5 και 6)
- Τα στερεά διαλύματα (7, 8 και 9)

Τα πιο συνήθη διαλύματα είναι τα υγρά διαλύματα, στα οποία ο διαλύτης είναι υγρό και η διαλυμένη ουσία αέριο, υγρό ή στερεό. Συχνά είναι πολυπλοκότερα. Μπορεί δηλαδή να αποτελούνται από μείγμα διαλυτών και δύο ή περισσότερες διαλυμένες ουσίες.

Οι διαλυμένες ουσίες ενός διαλύματος μπορεί να βρίσκονται υπό μορφή μορίων «μοριακά διαλύματα», υπό μορφή ιόντων «ιονικά διαλύματα» ή υπό μορφή μικυλίων μεγέθους 0,5 μ στα «κολλοειδή διαλύματα».

Στον Πίνακα 2.3. παρουσιάζονται οι συνήθειες εκφράσεις περιεκτικότητας ενός διαλύματος.

Πίνακας 2.3 Συνήθειες εκφράσεις περιεκτικότητας ενός διαλύματος.

Έκφραση	Συμβολισμός	Ορισμός
Μοριακότητα	M (molarity)	Γραμμομόρια (moles) διαλυμένης ουσίας σε 1 L διαλύματος
Γραμμομοριακότητα	m (molality)	Γραμμομόρια (moles) διαλυμένης ουσίας σε 1000 g διαλύματος
% κατά βάρος	% w/w	Γραμμάρια (g) διαλυμένης ουσίας σε 1 L διαλύματος
% κατ'όγκο	% v/v	Χιλιοστόλιτρα (mL) διαλυμένης ουσίας σε 100 mL διαλύματος
% βάρος κατ'όγκο	% w/v	Γραμμάρια (g) διαλυμένης ουσίας σε 100 mL διαλύματος

Σημείωση: Να θυμάστε ότι ένα mol ουσίας αντιστοιχεί σε ποσότητα ουσίας ίση με το μοριακό της βάρος.

Παραδείγματα μετατροπής μονάδων

$$1 \text{ mg/mL} = 1 \text{ }\mu\text{g}/\mu\text{L} = 1 \text{ g/L} = 0,1 \text{ g}/100 \text{ mL} = 0,1\% \text{ w/v}$$

$$10 \text{ mg/mL} = 1000 \text{ mg}/100 \text{ mL} = 1 \text{ g}/100 \text{ mL} = 1\% \text{ w/v}$$

$$1 \text{ mmol/L} = 1 \text{ mol/L} = 1 \text{ M}$$

Οι ακόλουθες συγκεντρώσεις αντιπροσωπεύουν την ίδια ποσότητα διαλυμένης ουσίας.
0,5 M, 0,5 mol/L, 0,5 mmol/mL, 0,5 μmol/μl, 0,5 pmol/ρL.

Το ίδιο ισχύει και με άλλο τρόπο μαθηματικής έκφρασης
 $0,5 \text{ mol/L} = 0,5 \text{ mmol/mL} = 500 \text{ μmol/mL} = 500,000 \text{ pmol/μL}$

2.1.2 Νόμος αραιώσης και ανάμιξης διαλυμάτων

Διάλυση είναι η μεταφορά της προς διάλυσης ουσίας, μέσα στον διαλύτη προς σχηματισμό ομογενούς μείγματος. Η μεταφορά αυτή μπορεί να θεωρηθεί ότι λαμβάνει χώρα σε δύο στάδια. Το πρώτο είναι μια αντίδραση στην ενδοεπιφάνεια, η οποία έχει ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση διαλυτών μορίων από την προς διάλυση ουσία και, το δεύτερο στάδιο είναι η μεταφορά των μορίων αυτών μακριά από την ενδοεπιφάνεια διά διαχύσεως ή μεταγωγής. Η τελική ταχύτητα διάλυσης εξαρτάται πάντοτε από την ταχύτητα του βραδύτερου σταδίου.

Ένα διάλυμα ανάλογο με την ποσότητα της διαλυμένης ουσίας σε ορισμένη ποσότητα διαλύτη και σε ορισμένη θερμοκρασία χαρακτηρίζεται ως:

- **Ακόρεστο**, όταν μπορεί να διαλυθεί σε αυτό και άλλη ποσότητα ουσίας.
- **Κεκορεσμένο**, όταν περιέχει διαλυμένη τη μεγαλύτερη δυνατή ποσότητα ουσίας και ισχύει η ισοροπία:
[μη διαλυμένη ουσία] ↔ [διαλυμένη ουσία]
- **Υπέρκορο**, όταν περιέχει ποσότητα διαλυμένης ουσίας μεγαλύτερη από αυτή που χρειάζεται για να είναι το διάλυμα κεκορεσμένο.

Ως **διαλυτότητα** μιας ουσίας ορίζεται η συγκέντρωση κεκορεσμένου διαλύματός της, δηλαδή η μέγιστη ποσότητα της ουσίας που μπορεί να διαλυθεί σε ορισμένη ποσότητα διαλύτη κάτω από ορισμένες συνθήκες (θερμοκρασία, πίεση). Η διαλυτότητα μπορεί να εκφραστεί με τις ίδιες μονάδες που εκφράζεται η συγκέντρωση. Επίσης, όμως, έχει καθιερωθεί η έκφραση της διαλυτότητας με τον αριθμό των κυβικών εκατοστών του διαλύτη που χρειάζονται ώστε να διαλυθεί 1 γραμμάριο της προς διάλυση ουσίας και να δώσει κεκορεσμένο διάλυμα σε θερμοκρασία 20°C, (εκτός εάν αναγράφεται άλλη θερμοκρασία κατά περίπτωση). Υπάρχουν πολλοί παράγοντες που επηρεάζουν τον βαθμό διαλυτοποίησης, όπως η θερμοκρασία, η ανάδευση, το μέγεθος σωματιδίων, ο πολυμορφισμός, το ιξώδες και η επιφανειακή τάση.

Η αραιώση βιολογικών υγρών ή διαλυμάτων συνιστά μια συχνή πρακτική του βιοχημικού εργαστηρίου. Οι αραιώσεις πραγματοποιούνται για τους παρακάτω λόγους:

- Για την κατασκευή πρότυπης καμπύλης.
- Για τον προσδιορισμό ουσίας που η συγκέντρωσή της είναι υψηλότερη από εκείνη της μεθόδου προσδιορισμού της.
- Για την απομάκρυνση ανεπιθύμητων ουσιών (απολευκωμάτωση). Οι αραιώσεις συνήθως εκφράζονται σε αναλογίες του 10.

Για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης του αραιωμένου διαλύματος χρησιμοποιούμε τη σχέση:

$$V_1 \times C_1 = V_2 \times C_2 \quad (2.1)$$

όπου,

V_1, C_1 = όγκος και συγκέντρωση του διαλύματος που διαθέτω [το μητρικό (stock) διάλυμα],

V_2, C_2 = όγκος και συγκέντρωση του διαλύματος που θα παρασκευάσω (το αραιωμένο διάλυμα)

Αραίωση (ορού ή διαλύματος) σε αναλογία 1/10 σημαίνει ότι σε ένα μέρος (ορού ή διαλύματος) θα προσθέσουμε 9 μέρη (διαλύτη ή άλλου διαλύματος) και όχι 10 μέρη. Ομοίως, όταν σε 100 mL διαλύματος

προσθέσουμε 900 mL διαλύτη ή όταν σε 100 μ L διαλύματος προσθέσουμε 0,9 mL διαλύτη. Σε κάθε περίπτωση λέμε ότι αραιώσαμε το διάλυμά μας 10 φορές.

Ομοίως, αραιώση (ορού ή διαλύματος) 1/2 σημαίνει ότι σε ένα μέρος (ορού ή διαλύματος) θα προσθέσουμε 1 μέρος (διαλύτη ή άλλου διαλύματος). Για παράδειγμα, όταν σε 10 mL διαλύματος προσθέσουμε 10 mL διαλύτη, τότε λέμε ότι κάναμε 1/2 αραιώση του διαλύματος. Ομοίως, όταν σε 100 mL διαλύματος προσθέσουμε 100mL διαλύτη ή όταν σε 100 μ L διαλύματος προσθέσουμε 100 μ L διαλύτη. Σε κάθε περίπτωση λέμε ότι αραιώσαμε το διάλυμά μας 2 φορές. Για τον υπολογισμό της τελικής συγκέντρωσης διαιρούμε την αρχική συγκέντρωση με την αραιώση (δηλαδή με το 10 ή με το 2 στις παραπάνω περιπτώσεις). Αυτό είναι ισοδύναμο με τη χρήση του τύπου: $V_1 \times C_1 = V_2 \times C_2$.

Σημείωση: Σε πολύ παλαιότερα συγγράμματα, θα βρείτε την αραιώση 1/2 να σημαίνει ότι 1 μέρος stock διαλύματος αναμειγνύεται με 2 μέρη διαλύτη. Είναι προτιμότερη η έκφραση που αναπτύχθηκε παραπάνω.

Ανάμειξη διαλυμάτων

Για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης του διαλύματος που προκύπτει από την ανάμειξη διαλυμάτων (της ίδιας διαλυμένης ουσίας) χρησιμοποιούμε τη σχέση

$$V_1 \times C_1 + V_2 \times C_2 = V_{ολ} \times C_{ολ} \quad (2.2)$$

όπου,

V_1, C_1 = όγκος και συγκέντρωση του 1^{ου} διαλύματος που διαθέτω,

V_2, C_2 = όγκος και συγκέντρωση του 2^{ου} διαλύματος που διαθέτω,

$V_{ολ}, C_{ολ}$ = όγκος και συγκέντρωση του διαλύματος που επιθυμώ να ετοιμάσω.

2.1.3 Επίλυση προβλημάτων

Παράδειγμα 1

Το Μοριακό Βάρος του χλωριούχου νατρίου είναι 58. Πόσα mg βρίσκονται σε 50 μ mol NaCl;

Λύση

1 mol NaCl ισούται με 58 g, έτσι 1 μ mol ισούται με 58 μ g,

Άρα 50 μ mol είναι 2.900 μ g ή 2,9 mg.

Παράδειγμα 2

Πόσα μ mol ουσίας είναι διαλυμένα σε διάλυμα 2 L συγκεντρώσεως 20 mM;

Λύση

20 mM = 20 mmol/L,

Έτσι, τα 2 L περιέχουν 40 mmol, 40 mmol = 40.000 μ mol.

Παράδειγμα 3

Ποια είναι η κανονικότητα διαλύματος θειικού οξέος μοριακότητας 2 M;

Λύση

Το ερώτημα επιλύεται με τη σχέση:

$$M \times \alpha = N \quad (2.3)$$

όπου,

M = μοριακότητα, N = κανονικότητα,

α = αριθμός θετικών ή αρνητικών ιόντων.

Από τη διάσταση του $\text{H}_2\text{SO}_4 \rightarrow 2\text{H}^+ + \text{SO}_4^-$, το $\alpha = 2$

Άρα, $N = 2 \times 2$, $N = 4$.

Παράδειγμα 4

Ποια είναι η μοριακότητα διαλύματος γλυκόζης 1% (w/v); (ΜΒ γλυκόζης = 180).

Λύση

1% διαλύματος κατ' όγκο περιέχει 1 g σε 100 mL, άρα 10 g περιέχονται σε 1 L. Ένα διάλυμα γλυκόζης 1 M περιέχει 180 g/L,

Έτσι, 10 g/L αντιπροσωπεύουν μοριακότητα $10 / 180 = 0,056 \text{ M}$ (ή 5,6 mM)

Παράδειγμα 5

Διατίθενται διάλυμα HNO_3 18,7% w/v και πυκνότητας 1,1 g/mL. Να εκφραστεί η περιεκτικότητα του διαλύματος σε % w/w.

Λύση

18,7% w/v: Στα 100 mL διαλύματος περιέχονται 18,7 g διαλυμένης ουσίας

%w/w: Στα 100 g διαλύματος περιέχονται x g διαλυμένης ουσίας

$d = m/V \rightarrow m = d \times V = 1,1 \times 100 = 110 \text{ g}$

18,7% w/v: Στα 110 g διαλύματος περιέχονται 18,7 g διαλυμένης ουσίας

%w/w: Στα 100 g διαλύματος περιέχονται x g διαλυμένης ουσίας

Επομένως, $x = 100 \times 18,7 / 110 = 17 \text{ g}$ διαλυμένης ουσίας, άρα 17% w/w

Παράδειγμα 6

Να παρασκευαστεί διάλυμα H_2SO_4 1 N από πυκνό διάλυμα θεικού οξέος περιεκτικότητας 96% w/w και πυκνότητας 1,84 g/mL. Η σχέση που συνδέει τη Μοριακότητα και την Κανονικότητα είναι:

$$M \times \alpha = N$$

όπου,

α = αριθμός θετικών ή αρνητικών ιόντων.

Λύση

$$V = 100 \times MW \times N / C \times d \times H^+ \quad (2.4)$$

όπου,

MW = μοριακό βάρος ένωσης,

N = κανονικότητα διαλύματος,

C = συγκέντρωση διαλύματος,

d = πυκνότητα διαλύματος,

H^+ = αριθμός υδρογονοκατιόντων (H^+) που ελευθερώνονται στο διάλυμα (σθένος).

Άρα, $V = 27,78 \text{ mL}$

Ο ευρεθείς όγκος συμπληρώνεται μέχρι τα 100 mL με απεσταγμένο νερό (μέχρι τη χαραγή).

Παράδειγμα 7

Να παρασκευαστεί διάλυμα NaOH όγκου 200 mL και μοριακότητας 0,2 M.

Λύση

Επιλύεται με τη σχέση:

$$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2 \quad (2.5)$$

όπου,

M_1 , V_1 , κανονικότητα, όγκος αρχικού διαλύματος,

M_2 , V_2 διαλύματος μετά την αραίωση.

Έτσι, λύνοντας ως προς V_1 :

$$V_1 = V_2 M_2 / M_1 \rightarrow V_1 = 0,2 \times 200 / 1 = 40 \text{ mL}$$

Άρα, το ζητούμενο διάλυμα παρασκευάζεται, αφού αραιωθούν τα 40 mL του αρχικού διαλύματος μέχρι τα 100 mL με απεσταγμένο νερό (δηλαδή 40 + 60 μέχρι τη χαραγή της ογκομετρικής φιάλης).

Παράδειγμα 8

Τι είδους αραίωση θα πρέπει να κάνω προκειμένου να παρασκευάσω 100 mL διαλύματος NaOH 0,2 M από ένα διάλυμα 5 M NaOH;

Λύση

Υπολογίζω τον όγκο V_1 που θα πάρω από το αρχικό (μητρικό ή stock) ώστε να δημιουργήσω διάλυμα όγκου 100 mL με συγκέντρωση 0,20 M NaOH από τη σχέση:

$$V_1 \times C_1 = V_2 \times C_2$$

Δηλαδή $V_1 \times 5,0 = 100 \times 0,2$ και $V_1 = 4,0$ mL. Θα πάρω λοιπόν 4,0 mL από το μητρικό 5,0 M NaOH και θα συμπληρώσω σε ογκομετρική φιάλη μέχρι 100 mL με νερό. Η αραίωση επομένως είναι 1:25 (4 mL μητρικού + 96 mL νερό).

Παράδειγμα 9

Πώς θα παρασκευάσετε 1 L διαλύματος HCl 0,1M από πυκνό διάλυμα HCl περιεκτικότητας 37% w/w και πυκνότητας 1,1 g/mL; Δίνονται τα ατομικά βάρη: H = 1, Cl = 35,5.

Λύση

37% w/w: Στα 100 g διαλύματος περιέχονται 37 g διαλυμένης ουσίας

M: Στα 1000 mL διαλύματος περιέχονται x mol διαλυμένης ουσίας

$$d = m/V \rightarrow V = m/d = 100/1,1 = 90,9 \text{ mL}$$

$$n = m / MB = 37/36,5 = 1,01 \text{ mol}$$

37% w/w: Στα 90,9 mL διαλύματος περιέχονται 1,01 mol διαλυμένης ουσίας

M: Στα 1000 mL διαλύματος περιέχονται x mol διαλυμένης ουσίας

Επομένως: $x = 1000 \times 1,01/90,9 = 11,15$ mol διαλυμένης ουσίας Άρα $C_1 = 11,15$ M

Για την παρασκευή του διαλύματος θα χρησιμοποιήσουμε τον τύπο της αραίωσης:

$$V_1 \times 11,15 = 1000 \times 0,1 \rightarrow V_1 = 8,97 \text{ mL}$$

Παράδειγμα 10

Να παρασκευαστούν 50 mL αιθανόλης συγκέντρωσης 70% από αιθανόλη περιεκτικότητας 95%.

Λύση

$$V_1 \times C_1(\%) = V_2 \times C_2(\%), \quad V_2 = 36,9 \text{ mL}$$

$$V_1 - 36,9 \text{ mL} = 13,1 \text{ mL}$$

Άρα, θα προσθέσουμε 13,1 mL ύδατος σε 36,9 mL αιθανόλης 95% για να προκύψει η αραίωση του διαλύματος αιθανόλης 70%.

Παράδειγμα 11

Να συμπληρωθεί ο παρακάτω πίνακας που χρησιμοποιείται για την παρασκευή όγκου 10 mL σειράς προτύπων διαλυμάτων ουσίας, από stock διάλυμα αυτής 20 mg/mL, κατά τη διαδικασία ποσοτικού προσδιορισμού αυτής:

Τελική επιθυμητή συγκέντρωση προτύπου (mg/mL)	mL stock που πρέπει να χρησιμοποιηθούν	mL διαλύτη που πρέπει να προστεθούν στο stock
20	10	0
15	7,5	2,5
10	5	5
7,5	3,75	6,25
5	2,5	7,5
2,5	1,25	8,75
0	0	10

Πρακτική άσκηση 1

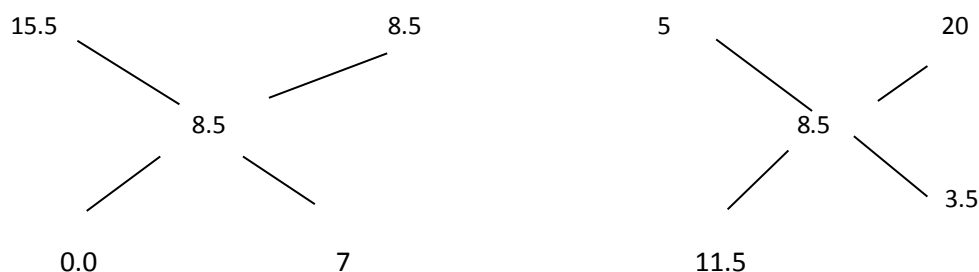
Υπολογίστε αναλυτικά τις τελικές συγκεντρώσεις των διαλυμάτων που προκύπτουν με αραιώση πυκνότερου διαλύματος συγκέντρωσης 0,5 M και επίσης τους όγκους του πυκνότερου διαλύματος και του νερού που πρέπει να αναμειχθούν, ώστε να παρασκευαστούν διαλύματα τελικού όγκου 20 mL σύμφωνα με τον πίνακα:

	Αραιώση πυκνότερου διαλύματος	Απαιτούμενος όγκος πυκνότερου διαλύματος (mL)	Απαιτούμενος όγκος H ₂ O, (mL)	C αραιωμένου διαλύματος
Διάλυμα 1	1:2			
Διάλυμα 2	1:4			
Διάλυμα 4	1:5			
Διάλυμα 5	1:10			
Διάλυμα 6	1:100			

Παράδειγμα 12

Να παρασκευαστεί διάλυμα HCL 8,5% από διάλυμα περιεκτικότητας 15,5%. Το ίδιο διάλυμα (8,5%) να παρασκευαστεί από διαλύματα με περιεκτικότητες 5% και 20%.

Επιλύεται με τη χρήση του κανόνα Bretey (Σχήμα 2.1)



Σχήμα 2.1 Κανόνας Bretey.

Όπως προκύπτει από τις διαγώνιες διαφορές, στην πρώτη περίπτωση θα λάβουμε 8,5 mL από το διάλυμα του 15,5% και 7 mL από το νερό (0%).

Ανάλογα και στη δεύτερη περίπτωση, θα ληφθούν 11.5 mL από το διάλυμα 5% και 3.5 mL από εκείνο του 20%.

Παράδειγμα 13

Ρυθμιστικό διάλυμα 20% w/v αραιώνεται κατά 1/5 και 1/10 διαδοχικά. Ποια θα είναι η τελική συγκέντρωση του διαλύματος;

Η συνολική αραιώση είναι το γινόμενο των επιμέρους αραιώσεων, δηλαδή η συνολική αραιώση είναι 1/50. Επομένως, η τελική συγκέντρωση του διαλύματος θα είναι (20/50)% w/v, δηλαδή 0,4% w/v.

Παράδειγμα 14

1000 mg/100 mL ρυθμιστικού διαλύματος αραιώνεται κατά 1/10 και 1/100 διαδοχικά. Ποια θα είναι η τελική συγκέντρωση του διαλύματος;

$$1000\text{mg} \times 1/10 \times 1/100 = 1\text{mg}/100\text{mL}$$

Πρακτική άσκηση 2

Η τομπραμυκίνη είναι μια φαρμακολογικά δραστική ουσία (αντιβιοτικό) σε εμπορικό σκεύασμα οφθαλμικών σταγόνων με περιεκτικότητα 0,3% w/v.

Να μετατρέψετε την περιεκτικότητα αυτή σε:

α) g/mL, β) mg/mL, γ) μg/mL, δ) g/L και ε) μg/μL.

Πρακτική άσκηση 3

Σε 500 mL νερού προστίθενται 0,8 g NaOH. Να υπολογιστεί η περιεκτικότητα του διαλύματος NaOH σε:

α) mg/mL, β) mg/L και γ) μg/mL.

Να θεωρηθεί ότι κατά την προσθήκη του στερεού NaOH δεν μεταβάλλεται ο όγκος του διαλύματος.

Πρακτική άσκηση 4

Ένας τρόπος, για να κατασκευάσει κανείς ξίδι (σαφώς κι όχι ο καλύτερος), είναι να ετοιμάσει ένα διάλυμα οξικού οξέος (το μοναδικό όξινο συστατικό του ξιδιού) σε κατάλληλο pH και να προσθέσει κατάλληλους αρωματικούς παράγοντες. Το οξικό οξύ (MB = 60) είναι υγρό στους 25°C με πυκνότητα 1,052 g/mL. Να υπολογίσετε τον όγκο που πρέπει να προστεθεί σε απεσταγμένο νερό, ώστε να παρασκευάσετε 1L υποκατάστατου ξιδιού.

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟ ΜΕΡΟΣ

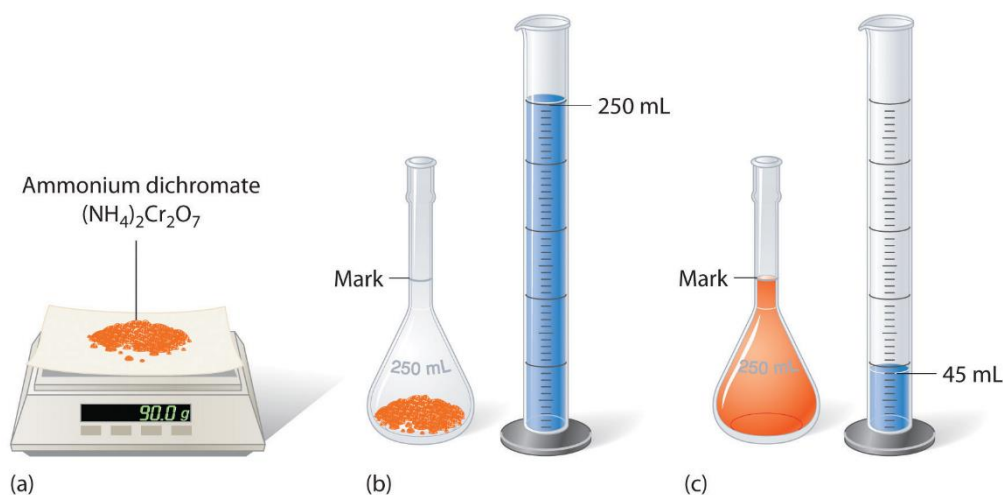
2.2 Εργαστηριακή άσκηση: Πειραματικές διαδικασίες παρασκευής διαλύματος:

1. από στερεό και 2. από πυκνότερο διάλυμα – Στάδια παρασκευής

2.2.1 Από στερεό

- Αρχικά υπολογίζουμε την ποσότητα (g) της στερεάς ουσίας για τη δημιουργία του ζητούμενου διαλύματος και ζύγιση αυτής σε ζυγό.
- Σε ογκομετρική φιάλη κατάλληλου όγκου προσθέτουμε λίγη ποσότητα απιονισμένου νερού.
- Διάλυση της ποσότητας της στερεάς ουσίας σε λίγη ποσότητα απιονισμένου νερού σε ποτήρι ζέσεως και μεταφορά αυτής στην ογκομετρική φιάλη. Διαδοχικές εκπλύσεις των σκευών που χρησιμοποιήθηκαν για τη διάλυση της στερεάς ουσίας (ποτήρι ζέσεως, χωνί, ράβδο).
- Προσθήκη απιονισμένου νερού στην ογκομετρική φιάλη μέχρι τη χαραγή χρησιμοποιώντας υδροβολέα και σταγονόμετρο.
- Πωματισμός και ανακίνηση της ογκομετρικής φιάλης.

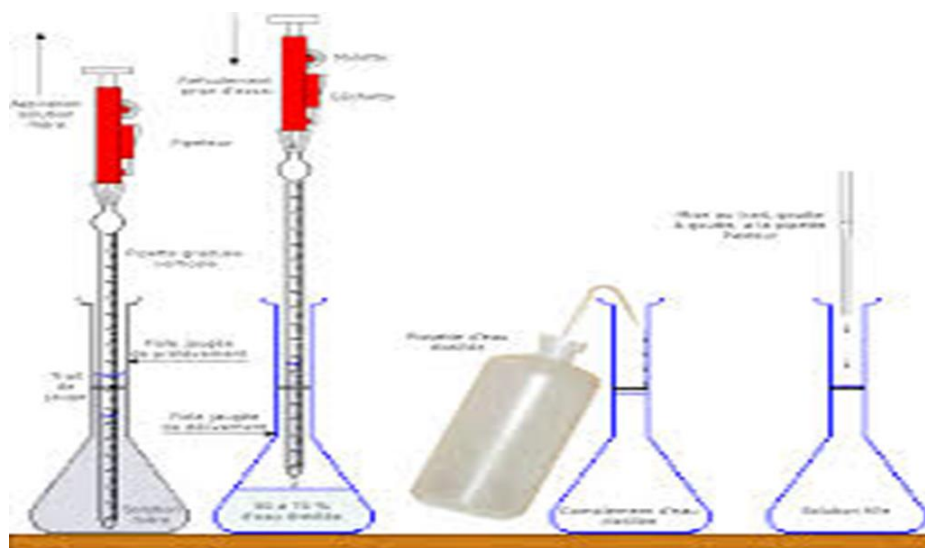
- Τοποθέτηση ετικέτας με τα στοιχεία του διαλύματος (ονομασία, περιεκτικότητα, ημερομηνία παρασκευής) (Εικόνα 2.1.).



Εικόνα 2.1 Πειραματική διαδικασία παρασκευής διαλύματος από στερεά ουσία.

2.2.2 Από πυκνότερο διάλυμα

- Αρχικά υπολογίζουμε την ποσότητα του πυκνότερου διαλύματος που θα χρησιμοποιηθεί για τη δημιουργία του ζητούμενου διαλύματος (νόμος αραιώσης).
- Σε ογκομετρική φιάλη κατάλληλου όγκου προσθέτουμε λίγη ποσότητα απιονισμένου νερού.
- Χρησιμοποιώντας σιφόνιο μεταφοράς και πουάρ ασφαλείας γίνεται μεταφορά του υπολογισμένου όγκου του πυκνού διαλύματος στην ογκομετρική φιάλη.
- Προσθήκη απιονισμένου νερού στην ογκομετρική φιάλη μέχρι τη χαραγή χρησιμοποιώντας υδροβολέα και σταγονόμετρο.
- Πωματισμός και ανακίνηση της ογκομετρικής φιάλης.
- Τοποθέτηση ετικέτας με τα στοιχεία του διαλύματος (ονομασία, περιεκτικότητα, ημερομηνία παρασκευής) (Εικόνα 2.2.).



Αρχικό διάλυμα (stock) αραιωμένο διάλυμα πλήρωση με διαλύτη πλήρωση μέχρι τη χαραγή με σταγονόμετρο

Εικόνα 2.2 Πειραματική διαδικασία παρασκευής διαλύματος από πυκνότερο διάλυμα (δηλαδή με αραιώση).

Παράδειγμα 15

Διαθέτουμε πρότυπο διάλυμα NaOH 1 M. Πώς θα παρασκευάσουμε διάλυμα NaOH 0,05 M; Περιγράψτε τη διαδικασία.

Διαδικασία:

Έστω ότι θα παρασκευάσουμε 100 mL αραιού διαλύματος.

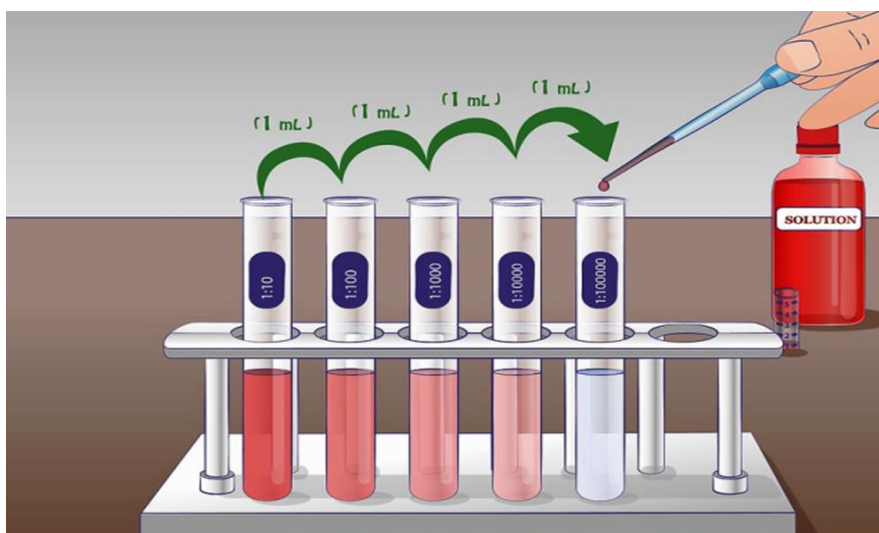
Ισχύει ο νόμος της αραιώσης: $M(\text{πυκνό}) \times V(\text{πυκνό}) = M(\text{αραιό}) \times V(\text{αραιό})$

$V_{\pi} = 0,05 \times 100/1 = 5 \text{ mL}$ πυκνού διαλύματος NaOH 1N

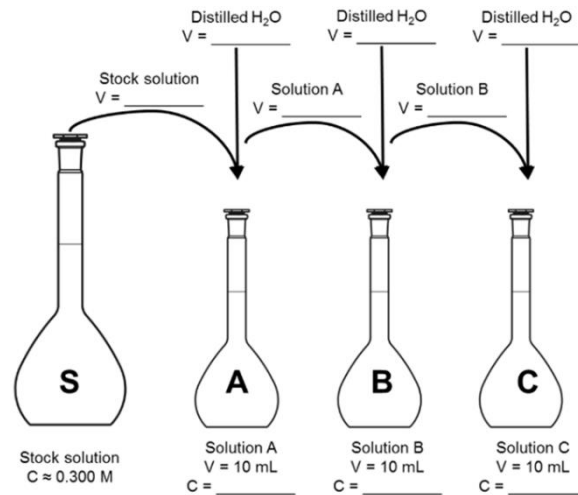
Με τη βοήθεια ενός σιφωνίου πλήρωσης παίρνουμε 5 mL από το πυκνό διάλυμα (NaOH 1 M). Η ποσότητα αυτή μεταφέρεται σε καθαρή και στεγνή ογκομετρική φιάλη των 100 mL, η οποία περιέχει μικρή ποσότητα απιονισμένου νερού. Κατόπιν συμπληρώνουμε με τον υδροβολέα απιονισμένο νερό μέχρι τη χαραγή της ογκομετρικής φιάλης. Πωματίζουμε τη φιάλη και ανακινούμε καλά. Καταγράφουμε σε αυτοκόλλητη ετικέτα τον τίτλο του παρασκευασθέντος αραιού διαλύματος (NaOH 0,05 M) και την επικολλούμε στην ογκομετρική φιάλη.

2.3 Εργαστηριακή άσκηση: Διαδοχικές αραιώσεις

Η τελική αραιώση του σχηματιζόμενου διαλύματος υπολογίζεται ως το γινόμενο των επιμέρους αραιώσεων (Εικόνες 2.3., 2.4., 2.5.).



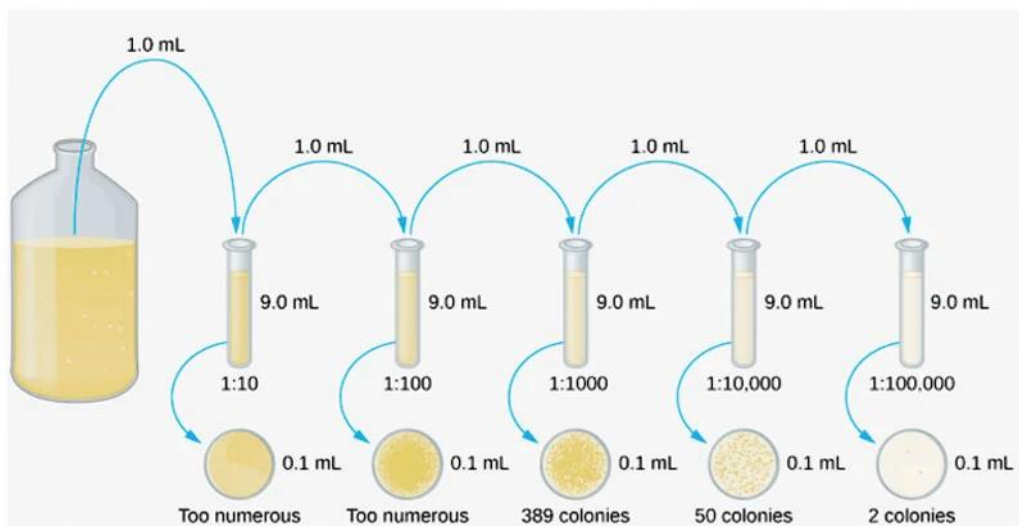
Εικόνα 2.3 Διαδοχικές αραιώσεις.



Εικόνα 2.4 Διαδοχικές αραιώσεις.

2.3.1 Μικροβιακή σύσταση του παστεριωμένου γάλακτος με τη μέθοδο των διαδοχικών αραιώσεων και της διασποράς σε τρυβλίο

- Ετοιμάζουμε έξι διαδοχικές αραιώσεις του υπό εξέταση δείγματος ως εξής: σε έξι δοκιμαστικούς σωλήνες προσθέτουμε από 9 mL απεσταγμένου νερού.
- Με τη χρήση αποστειρωμένου σιφονίου μεταφέρουμε 1 mL γάλακτος στον πρώτο δοκιμαστικό σωλήνα. Έτσι, η αραιώση θα είναι 10^{-1} . Προσέχουμε το σιφόνιο να μην ακουμπήσει με το νερό και αναδεύουμε καλά το διάλυμα.
- Με τη χρήση νέου αποστειρωμένου σιφονίου παίρνουμε 1mL από την πρώτη αραιώση και το προσθέτουμε στον δεύτερο δοκιμαστικό σωλήνα. Αναταράσσουμε καλά το δεύτερο διάλυμα και έχουμε επιτύχει αραιώση 10^{-2} .
- Συνεχίζουμε το στάδιο 3, στον τρίτο δοκιμαστικό σωλήνα, πετυχαίνοντας αραιώση 10^{-3} .
- Συνεχίζουμε το στάδιο 4, στον τέταρτο δοκιμαστικό σωλήνα, πετυχαίνοντας αραιώση 10^{-4} .
- Συνεχίζουμε το στάδιο 5, στον πέμπτο δοκιμαστικό σωλήνα, πετυχαίνοντας αραιώση 10^{-5} .
- Συνεχίζουμε το στάδιο 6, στον πέμπτο δοκιμαστικό σωλήνα, πετυχαίνοντας αραιώση 10^{-6} .
- Στη συνέχεια, μεταφέρουμε 0,1 mL δείγματος από κάθε αραιώση σε τρυβλία petri που περιέχουν θρεπτικό υπόστρωμα PCA (τρυπτόνη, γλυκόζη, yeast agar).
- Τα τρυβλία επωάζονται στους 37°C για 48 h και στη συνέχεια γίνεται η καταμέτρηση των αποικιών από κάθε τρυβλίο και από κάθε αραιώση.
- Υπολογίζουμε τον μέσο όρο αποικιών (colonies) κάθε αραιώσης, αξιολογώντας τα τρυβλία που αριθμούν 30 – 300 αποικίες. Ο αριθμός αυτός επί τον συντελεστή αραιώσης μας δίνει τη μικροβιακή σύσταση ανά mL δείγματος.



Εικόνα 2.5 Διαδοχικές αραιώσεις.

2.4 Εργαστηριακή άσκηση: Παρασκευή διαλυμάτων

Μέρος 1ο: Παρασκευή διαλύματος

Δραστηριότητα 1η: Να παρασκευάσετε διάλυμα αναμειγνύοντας 50,0 g νερό με 10,0 g ζάχαρης.

Να περιγράψετε τα στάδια εργασίας παρασκευής του διαλύματος και να υπολογίσετε την % w/w περιεκτικότητα του παραπάνω διαλύματος.

Να προσδιορίσετε με ακρίβεια τη συγκέντρωση του παραπάνω διαλύματος (Ατομικά βάρη: H = 1, C = 12 και O = 16).

Δραστηριότητα 2η: Να παρασκευάσετε 100 mL διαλύματος NaOH 1M από στερεή ουσία NaOH.

- Υπολογισμοί.
- Ζύγιση (στερεού NaOH, αποφυγή επαφής με το δέρμα).
- Διάλυση (σε κωνική φιάλη).
- Αραίωση (σε ογκομετρική φιάλη).

Παρατηρήσεις:

Δραστηριότητα 3η: Να παρασκευάσετε 5mL διαλύματος 62,5 mM θεικού χαλκού (CuSO_4).

Καταγράψτε τη διαδικασία ζύγισης, τα σκεύη με τα οποία θα εργαστείτε για την παρασκευή του διαλύματος και τι σκεύος θα χρησιμοποιήσετε για τον υπολογισμό του τελικού όγκου του διαλύματος. Αναφέρετε τους υπολογισμούς αναγράφοντας το μοριακό βάρος της ουσίας που εργαστήκατε και τα γραμμάρια της ουσίας που ζυγίσατε.

Μέρος 2ο: Παρασκευή διαλύματος με αραιώση

Δραστηριότητα 4η: Με αραιώση κατάλληλης ποσότητας του διαλύματος της 1ης δραστηριότητας να παρασκευάσετε 100 mL ενός δεύτερου διαλύματος (B), το οποίο να έχει συγκέντρωση $C_B = C_A / 10$. Να περιγράψετε τα στάδια εργασίας για την παρασκευή του διαλύματος B.

Δραστηριότητα 5η: Να παρασκευάσετε 4mL διαλύματος 30 mM θεικού χαλκού από διάλυμα 62,5mM θεικού χαλκού.

Υπολογίζουμε τον όγκο CuSO_4 που θα χρειαστούμε από το 1^ο διάλυμα για το δεύτερο.

Αραιώνουμε με διαλύτη (απεσταγμένο νερό) για την παρασκευή του τελικού διαλύματος.

Σχετικό οπτικό υλικό στο διαδίκτυο

Εικονική αναπαράσταση για τις διαδικασίες παρασκευής διαλύματος από στερεό και από πυκνότερο διάλυμα:

Α. Παρασκευή διαλύματος από στερεό:

<https://www.youtube.com/watch?v=MWq9aLs70wk> (Προσοχή!! Να έχει ήδη προστεθεί λίγη ποσότητα απιονισμένου νερού στην ογκομετρική φιάλη)

<https://www.youtube.com/watch?v=A2YyIo8vSCA> (Προσοχή!! Πρώτα διαλύουμε τη στερεά ουσία και ακολούθως τη μεταφέρουμε στην ογκομετρική φιάλη)

Β. Παρασκευή διαλύματος από πυκνότερο διάλυμα (αραίωση):

<https://www.youtube.com/watch?v=IG88XAVhUCo>

<https://www.youtube.com/watch?v=tAgmKC18dRI> (Παρακολούθηση από τα 4 λεπτά και 22 δευτερόλεπτα και μέχρι τέλος!– Προσοχή!! Χρήση σιφωνιού κατά τη διάρκεια της διαδικασίας μεταφοράς ποσότητας διαλύματος (όχι χρήση δακτύλου) και να έχει ήδη προστεθεί λίγη ποσότητα απιονισμένου νερού στην ογκομετρική φιάλη)

https://www.youtube.com/watch?v=MG86IFZi_XM (Προσοχή!! Χρήση σιφωνιού κατά τη διάρκεια της διαδικασίας μεταφοράς ποσότητας διαλύματος (όχι χρήση δακτύλου) και να έχει ήδη προστεθεί λίγη ποσότητα απιονισμένου νερού στην ογκομετρική φιάλη).

Πηγές φωτογραφιών με προέλευση το διαδίκτυο

Εικόνα 2.1.

<https://chem.libretexts.org/@api/deki/files/33237/3d3c33730a0c1644e3166fa6be1a8b38.jpg?revision=3&size=bestfit&width=706&height=340>

Εικόνα 2.2

<http://e.m.c.2.free.fr/prot-pipette3.gif>

Εικόνα 2.3

https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/5/53/Logarithmic_dilution.png

Εικόνα 2.4

<https://media.cheggcdn.com/media/427/427225ef-1a0b-4c50-99cd-2e9a7b5cb83b/phpPAHvMo>

Εικόνα 2.5

<https://microbenotes.com/wp-content/uploads/2020/05/Serial-dilution-procedure.jpg>

Βιβλιογραφικές Αναφορές

- Burns, R. (2002). *Fundamentals of chemistry*. Prentice Hall.
- Chang, R. (2007). *Chemistry*. McGraw Hill Education India.
- Ebbing, D., & Gammon, S. (2014). *Σύγχρονη Γενική Χημεία Αρχές και Εφαρμογές*. Αθήνα: Τραυλός.
- Nelson, D., & Cox, M. (2018). *Lehningers Βασικές αρχές Βιοχημείας*. Αθήνα: Broken.
- Zumdahl, S., & Decost, D. (2010). *Introductory chemistry: A Foundation*. Belmont Brooks/Cole Cengage Learning.
- Καρίκας, Γ. (2018). *Εφαρμοσμένη Βιοχημεία Θεωρία Ασκήσεις*. Αθήνα: Βιβλιόπολις.
- Πνευματικάκης, Γ., Μητσοπούλου, Χ., & Μεθενίτης, Κ. (2006). *Ανόργανη Χημεία Βασικές αρχές*. Αθήνα: Σταμούλης.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΘΕΩΡΙΑ ΚΑΙ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΑΣΚΗΣΕΙΣ ΣΤΑ ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΑ ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ

Συγγραφέας: Μαρία Τράπαλη

Σύνοψη

Στο παρόν κεφάλαιο θα μελετηθούν ο ιοντισμός και οι ιδιότητες του νερού, η έννοια του pH και θα επιλυθούν χαρακτηριστικά παραδείγματα υπολογισμού των pH ισχυρού οξέος, ισχυρής βάσης, ασθενούς οξέος, ασθενούς βάσεως. Επεξηγείται, επίσης, η έννοια των ρυθμιστικών διαλυμάτων και επιλύονται αντιπροσωπευτικά παραδείγματα υπολογισμού του pH υδατικών διαλυμάτων.

Προαπαιτούμενη γνώση

Απαιτούνται βασικές γνώσεις των κεφαλαίων 1 και 2.

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

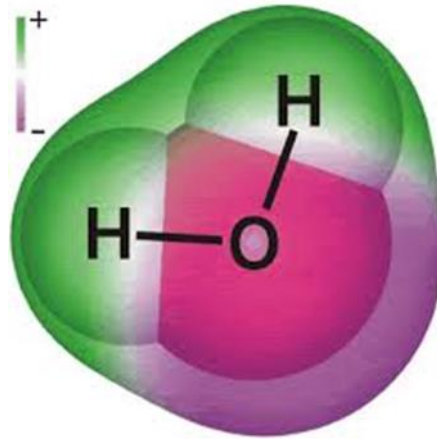
3.1 Νερό, ιοντισμός και ιδιότητες

Το νερό είναι ο διαλύτης στον οποίο πραγματοποιούνται οι μεταβολικές αντιδράσεις, όπως επίσης και δραστική ένωση με πολλές βιοσυνθετικές διεργασίες, μεταξύ των οποίων η υδρόλυση, η συμπύκνωση και οι οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις.

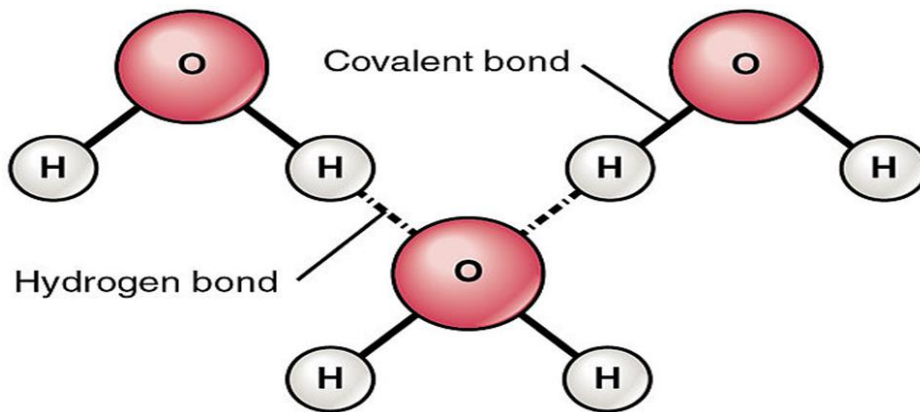
Όλες οι βιολογικές αντιδράσεις πραγματοποιούνται μέσα σε υδατικό περιβάλλον. Το 60% του ανθρώπινου σώματος και το 80% του συνόλου των μυών αποτελείται από νερό. Στα βιολογικά συστήματα, είναι η ένωση η οποία συνήθως δέχεται πρωτόνια. Η ενυδατωμένη τριυδρική μορφή του (H_9O_4^+), το ιόν οξωνίου και το υδροξύλιο συμμετέχουν ενεργά στη διαμόρφωση της δομής των πρωτεϊνών, των νουκλεϊνικών οξέων, της κυτταρικής μεμβράνης και των οργανιδίων του κυττάρου.

Η μεγάλη συγκέντρωσή του (55,6 M) στα βιολογικά συστήματα επηρεάζει την κατεύθυνση πολλών αντιδράσεων.

Η εξέχουσα θέση του νερού ως διαλύτη οφείλεται στη μεγάλη του πολικότητα (σχηματισμός ηλεκτροστατικών δεσμών με ιοντικές ομάδες). Τούτο ερμηνεύεται από την τάση του οξυγόνου να αποσπά ηλεκτρόνια από τα υδρογόνα, με συνέπεια την ηλεκτροθετική τους φόρτιση. Έτσι, ο συνδυασμός -O-H σχηματίζει ένα ηλεκτρικό δίπολο: $-\text{O}^{\delta-} - \text{H}^{\delta+}$, όπου το O έλκει, χωρίς όμως να αποσπά, τα ηλεκτρόνια του υδρογόνου. Οι ηλεκτροστατικές αυτές δυνάμεις, που είναι ασθενέστερες του ιοντικού δεσμού, συνιστούν τον δεσμό υδρογόνου, που είναι ιδιαίτερης βιολογικής αξίας. Τα 2 άτομα H έτσι απωθούνται, ώστε να έχουμε γωνία δεσμού ίση προς 103° αντί της αναμενόμενης των 90° (p-τροχιακά). Ο προσανατολισμός και η γεωμετρία παίζουν μεγάλο ρόλο στο υδατικό δίπολο. Οι ενέργειες των δεσμών H (10-40 KJ/mol) είναι πολύ μικρότερες, εκείνων των ομοιοπολικών δεσμών (>400 KJ/mol). Στο μόριο του H_2O έχουμε σχηματισμό δύο μοριακών τροχιακών με επικάλυψη των p-τροχιακών του O και των s-τροχιακών των H (Εικόνα 3.1.).



Εικόνα 3.1 Το μόριο του νερού.

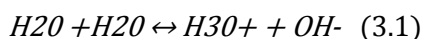


Εικόνα 3.2 Σχηματισμός δεσμών υδρογόνου στο μόριο του νερού.

Παραδείγματα δεσμών υδρογόνου (Εικόνα 3.2.) στη Βιοχημεία:

- Μεταξύ υδροξυλομάδος – νερού.
- Καρβονυλομάδος – νερού.
- Δύο πεπτιδικών αλυσίδων.
- Συμπληρωματικών ζευγών βάσεων στο DNA.
- Στη θερμοκρασία του ανθρώπινου σώματος, 30 περίπου μόρια νερού είναι συνδεδεμένα με δεσμό υδρογόνου. Σε υψηλές θερμοκρασίες, οι δεσμοί αυτοί εξασθενίζουν ή καταργούνται. Ενώσεις, που διασπείρονται στο νερό, ως συσσωματώματα μορίων, σχηματίζουν μικκύλια (κολλοειδή διαλύματα).
- Άλλες σημαντικές ιδιότητες του νερού είναι:
- Υψηλή ειδική θερμότητα, που οφείλεται στον δεσμό υδρογόνου. Ανθίσταται στις μεταβολές της θερμοκρασίας. Ιδιαίτερα σημαντική ιδιότητα για την εξέλιξη των βιολογικών αντιδράσεων.
- Επιφανειακή τάση-συνοχή. Συμβάλλει στην ομαλή κυκλοφορία, στα τριχοειδή και στον εξωκυττάριο χώρο.
- Υψηλή γλοιότητα (λόγω δεσμού H) για την ομαλή κυκλοφορία του αίματος. Η γλοιότητα επηρεάζεται και από τις διαλυμένες στο νερό ουσίες, που ρυθμίζουν και την πήξη του.
- Υψηλή θερμότητα εξάτμισης (ρυθμιστής θερμοκρασίας, απαγωγός θερμότητας).
- Το νερό συμπεριφέρεται και ως οξύ και ως βάση.
- Σχηματισμός εφυδατωμένων ιόντων και μεγάλη κινητικότητα ιόντων (ρυθμιστικό μόριο pH).

Η αμφίδρομη αντίδραση ιοντισμού του νερού:



έχει μια σταθερά χημικής ισορροπίας, η οποία ονομάζεται *σταθερά ιοντισμού* ή *γινόμενο ιόντων του νερού*, συμβολίζεται με K_w και δίνεται από τη σχέση:

$$K_w = [H_3O^+] [OH^-] \quad (3.2)$$

Στη σχέση αυτή δεν αναγράφεται η συγκέντρωση του νερού, όπως γενικώς συμβαίνει σε όλους τους νόμους χημικής ισορροπίας αραιών υδατικών ηλεκτρολυτικών διαλυμάτων.

Η K_w , όπως γενικώς συμβαίνει στις σταθερές ισορροπίας αραιών υδατικών διαλυμάτων, μεταβάλλεται μόνο με τη θερμοκρασία. Μάλιστα, αυξάνεται με την αύξηση της θερμοκρασίας, καθώς οι αντιδράσεις ιοντισμού είναι ενδόθερμες. Στους 25°C ισχύει:

$$K_w = 10^{-14} \quad (25^\circ\text{C}) \quad (3.3)$$

Η ισορροπία ιοντισμού του νερού γίνεται σε όλα τα υδατικά διαλύματα, ως εκ τούτου σε κάθε υδατικό διάλυμα ισχύει η σχέση:

$$[H_3O^+] [OH^-] = 10^{-14} \quad (\text{στους } 25^\circ\text{C}) \quad (3.4)$$

Στο καθαρό νερό: εάν θέσουμε $[H_3O^+] = [OH^-] = x$ M, τότε $x^2 = 10^{-14}$ ή $x = 10^{-7}$ M. Δηλαδή, στο καθαρό νερό στους 25°C έχουμε:

$$[H_3O^+] = [OH^-] = 10^{-7} \text{ M} \quad (3.5)$$

Σε ένα υδατικό διάλυμα στους 25°C που περιέχει οξύ έχουμε:

$$[H_3O^+] > 10^{-7} \text{ M} \text{ και } [OH^-] < 10^{-7} \text{ M} \quad (3.6)$$

Για παράδειγμα, εάν $[H_3O^+] = 10^{-5}$ M, τότε από τη σχέση $[H_3O^+] [OH^-] = 10^{-14}$ προκύπτει ότι $[OH^-] = 10^{-9}$ M. Παρατηρούμε δηλαδή ότι στα όξινα υδατικά διαλύματα υπάρχουν και ιόντα OH^- που προκύπτουν από τον αυτοϊοντισμό του νερού. Αντίστοιχα, σε ένα βασικό υδατικό διάλυμα στους 25°C έχουμε:

$[OH^-] > 10^{-7}$ M και $[H_3O^+] < 10^{-7}$ M (Πίνακας 3.1).

Πίνακας 3.1 Ιοντισμός του νερού.

Σε όλα τα υδατικά διαλύματα/25°C	$[H_3O^+] [OH^-] = K_w = 10^{-14}$
Σε ουδέτερα διαλύματα και στο νερό/25°C	$[H_3O^+] = 10^{-7} \text{ M} = [OH^-]$
Σε όξινα διαλύματα/25°C	$[H_3O^+] > 10^{-7} \text{ M} > [OH^-]$
Σε βασικά (αλκαλικά) διαλύματα/25°C	$[H_3O^+] < 10^{-7} \text{ M} < [OH^-]$

3.2 Τύποι υπολογισμού pH ισχυρού οξέος, ισχυρής βάσης, ασθενούς οξέος, ασθενούς βάσεως. Ρυθμιστικά διαλύματα (ρυθμιστικά διαλύματα ανθρώπινου οργανισμού) – Ρυθμιστική ικανότητα – Μέτρηση pH – Εξίσωση Henderson-Hasselbach – Επίλυση ασκήσεων

3.2.1 Το pH

Το pH (πε-χά, ή πε-οχά) ορίζεται ως ο αρνητικός δεκαδικός λογάριθμος της αριθμητικής συγκέντρωσης των ιόντων H_3O^+ σε ένα υδατικό διάλυμα και δίδεται από τη σχέση 7:

$$pH = -\log [H_3O^+] \quad (3.7)$$

δηλαδή, εάν $[H_3O^+] = 10^{-3} M$, τότε $pH = -\log 10^{-3} = 3$.
Ομοίως ορίστηκε το pOH (πε-οχά):

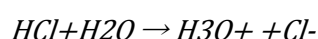
$$pOH = -\log [OH^-] \quad (3.8)$$

Στον Πίνακα 3.2 παρουσιάζονται οι τιμές pH σε υδατικά διαλύματα.

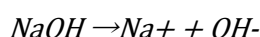
Πίνακας 3.2 Τιμές pH σε υδατικά διαλύματα.

Σε όλα τα υδατικά διαλύματα/25°C	$pH + pOH = 14$
Σε ουδέτερα διαλύματα και στο νερό/25°C	$pH = 7 = pOH$
Σε όξινα διαλύματα/25°C	$pH < 7 < pOH$
Σε βασικά (αλκαλικά) διαλύματα/25°C	$pH > 7 > pOH$

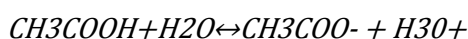
Ισχυρά οξέα είναι τα οξέα που ιοντίζονται πλήρως σε υδατικά διαλύματα, π.χ.



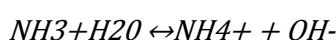
και ισχυρές βάσεις είναι οι βάσεις που ιοντίζονται πλήρως σε υδατικά διαλύματα, π.χ.



Ασθενές οξύ ή ασθενής βάση είναι τα οξέα ή βάσεις που δεν ιοντίζονται πλήρως σε υδατικά διαλύματα και ο ιοντισμός τους εκφράζεται με τη σταθερά ιοντισμού του οξέος (Ka) ή της βάσεως (Kb), π.χ. για το ασθενές οξύ CH_3COOH ισχύει:



και για την ασθενή βάση NH_3 ισχύει:



3.2.2 Υπολογισμός pH υδατικών διαλυμάτων

Παράδειγμα 1: Υπολογισμός pH διαλύματος ισχυρού οξέος

Να βρεθεί το pH διαλύματος που έχει όγκο 10 L και περιέχει 0,1 mol HCl.

Βρίσκουμε την αρχική συγκέντρωση HCl.

$$c = n/v \Rightarrow c = 0,1 \text{ mol} / 10 \text{ L} \Rightarrow c = 0,01 \text{ M HCl.}$$

ιοντισμός	HCl	+	H ₂ O	→	H ₃ O ⁺	+ Cl ⁻
αρχικά / M	0,01					
ιοντίζονται - παράγονται / M	0,01				0,01	0,01
τελικά / M	0				0,01	0,01

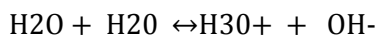
Το νερό ιοντίζεται μερικώς, αλλά επειδή $[H_3O^+][HCl] > 10^{-6} \text{ M}$ δεν λαμβάνουμε υπόψη τα οξόνια, που παράγονται από τον ιοντισμό του νερού.

$$\text{Άρα, } pH = -\log 0,01 \Rightarrow pH = -\log 10^{-2} \Rightarrow pH = 2 \cdot \log 10 \Rightarrow pH = 2.$$

Παράδειγμα 2: Υπολογισμός pH διαλύματος ισχυρού οξέος

Ποια είναι η συγκέντρωση H₃O⁺ σε διάλυμα HCl 10⁻⁷ M;

ιοντισμός	HCl	+	H ₂ O	→	H ₃ O ⁺	+ Cl ⁻
αρχικά/M	10 ⁻⁷					
ιοντίζονται - παράγονται / M	10 ⁻⁷				10 ⁻⁷	10 ⁻⁷
τελικά/M	0				10 ⁻⁷	10 ⁻⁷



Ο αυτοϊοντισμός του νερού αποδίδει $[H_3O^+] = x \text{ M}$ και $[OH^-] = x \text{ M}$,

$$[H_3O^+] = 10^{-7} + x \text{ M} \quad \text{και} \quad [OH^-] = x \text{ M}$$

Αφού το διάλυμα είναι όξινο το $x < 10^{-7} \text{ M}$. Δεν μπορούμε να θεωρήσουμε, όμως, ότι $10^{-7} + x \approx 10^{-7} \text{ M}$, καθώς το x δεν είναι πολύ μικρότερο του 10^{-7} . Για τον υπολογισμό του x χρησιμοποιούμε τη σταθερά K_w , $[H_3O^+] = 10^{-7} + 0,62 \cdot 10^{-7} = 1,62 \cdot 10^{-7} \text{ M}$.

Παράδειγμα 3: Υπολογισμός pH διαλύματος ασθενούς οξέος

Διάλυμα ασθενούς μονοπρωτικού οξέος HA συγκέντρωσης 0,01 M, έχει βαθμό ιοντισμού $\alpha = 0,01$. Να βρεθεί η K_a του οξέος και το pH του διαλύματος.

ιοντισμός	HA	+	H ₂ O	⇌	H ₃ O ⁺	+ A ⁻
αρχικά / M	0,01					
ιοντίζονται - παράγονται / M	0,01	0,01			10 ⁻⁴	10 ⁻⁴
ισοροπία / M	0,01(1 - 0,01)				10 ⁻⁴	10 ⁻⁴

Με τη χρήση της εξίσωσης σταθεράς διαστάσεως:

$$K_a = \frac{[H_3O^+][A^-]}{[HA]}$$

Θεωρούμε ότι $0,99 \approx 1$, οπότε προκύπτει $K_a = 10^{-6}$. Επίσης, $[H_3O^+] = 10^{-4} \text{ M}$. Συνεπώς, $pH = 4$.

Παράδειγμα 4: Υπολογισμός pH διαλύματος ασθενούς βάσεως

Διάλυμα NH_3 , 0,1 M έχει $K_b = 10^{-5}$. Να βρεθεί ο βαθμός ιοντισμού της NH_3 στο διάλυμα αυτό και το pH του διαλύματος.

ιοντισμός	$\text{NH}_3 + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{NH}_4^+ + \text{OH}^-$
αρχικά / M	0,1
ιοντίζονται - παράγονται / M	0,1 α 0,1 α 0,1 α
ισορροπία / M	0,1(1 - α) 0,1 α 0,1 α

Από τους υπολογισμούς προκύπτει ότι $\alpha = 10^{-2}$ και $\text{pH} = 11$.

Παράδειγμα 5: Υπολογισμός pH διαλύματος άλατος

Να βρεθεί το pH διαλύματος NH_4Cl 0,1 M, εάν $K_b \text{NH}_3 = 10^{-5}$ και $K_w = 10^{-14}$.

Το NH_4Cl ως ιοντική ένωση δίσταται πλήρως:



αντίδραση	$\text{NH}_4^+ + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{NH}_3 + \text{H}_3\text{O}^+$
αρχικά/M	0,1
ιοντίζονται - παράγονται/M	x x x
ισορροπία/M	0,01-x x x

$$K_{\text{NH}_4^+} = \frac{K_w}{K_{\text{NH}_3}} = \frac{x \cdot x}{0,01 - x}$$

Θεωρούμε ότι $0,1 - x \approx 0,1$ και βρίσκουμε $x = 10^{-5} = [\text{H}_3\text{O}^+]$ και $\text{pH} = 5$.

Εφαρμογές προς επίλυση:

Εφαρμογή 1: Ποια είναι η συγκέντρωση OH^- σε διαλύματα: α. KOH 10^{-3} M και β. KOH 10^{-7} M;

Εφαρμογή 2: Σε 1 L διαλύματος HNO_3 με $\text{pH} = 2$ προσθέτουμε 0,09 mol HNO_3 . Ποιο είναι το pH του τελικού διαλύματος;

Εφαρμογή 3: Ποιες είναι οι συγκεντρώσεις των ιόντων οξωνίου και υδροξειδίου και πόσο είναι το pH σε διάλυμα υδροξειδίου του ασβεστίου συγκέντρωσης 0,25 M στους 25°C;

Εφαρμογή 4: Υπολογίστε τις συγκεντρώσεις όλων των χημικών ειδών που υπάρχουν σε υδατικό διάλυμα συγκέντρωσης 0,15 M της ασθενούς βάσεως αιθυλαμίνης, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{NH}_2$, εάν γνωρίζετε, ότι το pH του διαλύματος είναι 11,34. Πόση είναι η K_b της αιθυλαμίνης;

Εφαρμογή 5: Το ανθρακικό οξύ, H_2CO_3 , ανευρίσκεται σε πολλά σωματικά υγρά (από το διαλυμένο CO_2).

(α) Υπολογίστε τη συγκέντρωση των οξωνίων σε διάλυμα H_2CO_3 10^{-4} M.

(β) Πόση είναι η συγκέντρωση του CO_3^{2-} ;

Εφαρμογή 6: Να υπολογίσετε το pH του υδατικού διαλύματος και τις συγκεντρώσεις όλων των ιόντων σε διάλυμα μείγματος αμμωνίας NH_3 1 M και αιθυλαμίνης $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{NH}_2$ 1 M. Δίνονται η σταθερά ιοντισμού (ή ιονισμού) της αμμωνίας $K_{b1} = 1,81 \times 10^{-5}$, η σταθερά ιοντισμού της αιθυλαμίνης $K_{b2} = 4,7 \times 10^{-4}$ και η σταθερά ιοντισμού του νερού $K_w = 10^{-14}$.

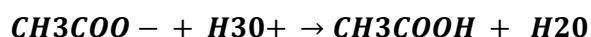
Εφαρμογή 7: Υπολογίστε το pH διαλύματος του άλατος χλωριδίου του μεθυλαμμωνίου, $\text{CH}_3\text{NH}_4\text{Cl}$, συγκεντρώσεως 0,25 M στους 25°C.

3.2.3 Ρυθμιστικά διαλύματα

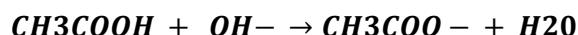
Αποτελούνται από ένα ασθενές οξύ HA π.χ. CH_3COOH με το αντίστοιχο του άλας με ισχυρή βάση, π.χ. CH_3COONa (δηλαδή με τη συζυγή του βάση A- π.χ. CH_3COO^-) ή από μια ασθενή βάση με το συζυγές της οξύ (BOH / BH⁺, π.χ. NH_3 / NH_4^+). Τα ρυθμιστικά διαλύματα ανθίστανται στις μεταβολές του pH όταν σ' αυτά προστεθεί μικρή αλλά υπολογίσιμη ποσότητα ισχυρού οξέος ή βάσης ή όταν αυτά αραιώνονται (εντός ορίων). Η ιδιότητα αυτή είναι συνέπεια της αρχής Le Chatelier και της επίδρασης κοινού ιόντος στην ισορροπία διάστασης ενός ασθενούς ηλεκτρολύτη.

Τα περισσότερα διαλύματα των ζωικών και φυτικών οργανισμών είναι ρυθμιστικά κι έτσι ανθίστανται σε μεταβολές του pH από εξωτερικούς παράγοντες.

Εάν στο διάλυμα προσθέσουμε ισχυρό οξύ σε συγκέντρωση σημαντικά μικρότερη αυτής του συζυγούς οξέος και βάσης [π.χ. εάν προσθέσουμε HCl (ισχυρό οξύ)], τότε τα H⁺ (H_3O^+) που προκύπτουν από τον πλήρη ιοντισμό του HCl δεσμεύονται πρακτικά πλήρως από τη βάση CH_3COO^- , οπότε το ρυθμιστικό διάλυμα διατηρεί πρακτικά σταθερό το pH του, δηλαδή:



Αντίστοιχα, εάν προσθέτουμε μια ισχυρή βάση, π.χ. NaOH, τα OH⁻ που προκύπτουν από την πλήρη διάσταση του NaOH δεσμεύονται πρακτικά πλήρως από το CH_3COOH , οπότε και πάλι το ρυθμιστικό διάλυμα διατηρεί πρακτικά σταθερό το pH του:



Σε κάθε ρυθμιστικό διάλυμα ισχύει η σχέση Henderson-Hasselbalch:

$$\text{pH} = \text{pKa} + \log_{10} \frac{[\text{A}^-]}{[\text{HA}]}$$

Η αντίσταση στην αλλαγή του pH ονομάζεται *ρυθμιστική ικανότητα* και διατηρείται εντός του διαστήματος $\text{pH} = \text{pKa} \pm 1$, δηλαδή όταν ο λόγος $[\text{A}^-]/[\text{HA}]$ κυμαίνεται από 1/10 μέχρι 10.

Για το CH_3COOH είναι pKa (σταθερά διάστασης οξέος) = 4,74

Όπως αναφέρθηκε, εάν οι συγκεντρώσεις του διαλύματος ασθενούς οξέος με τη συζυγή του βάση είναι αρκετά υψηλές, τότε το διάλυμα είναι ανθεκτικό σε αλλαγές στη συγκέντρωση ιόντων υδρογόνου (επομένως σε προσθήκη οξέος και βάσεως εντός κάποιων ορίων). Είναι δυνατό να υπολογιστεί πώς θα αλλάξει το pH ενός τέτοιου ρυθμιστικού διαλύματος κατά την προσθήκη ενός οξέος ή μιας βάσης.

Η pKa είναι ο αρνητικός λογάριθμος της K_a . Κατά συνέπεια, όσο μικρότερη είναι η pKa , τόσο ισχυρότερο είναι το οξύ. Οι σταθερές ιοντισμού των κυριότερων ασθενών οξέων και ασθενών βάσεων παρουσιάζονται στα Σχήματα 3.1. και 3.2.

Πρακτικές εφαρμογές της εξίσωσης:

- Χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό του pH σε μείγματα άλατος και οξέων
- Χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό των σχετικών αναλογιών των όξινων και βασικών μορφών μιας ουσίας, σε ένα δεδομένο pH.

Ένα χαμηλό pH αναστέλλει τον ιονισμό ενός ασθενούς οξέος. Τούτο διευκολύνει παραπέρα την απορρόφησή του διαμέσου της κυτταρικής μεμβράνης.

Ένα χαμηλό pH προωθεί τον ιονισμό μιας ασθενούς βάσης. Αναστέλλει έτσι την απορρόφησή της διαμέσου της κυτταρικής μεμβράνης.

Όταν $\text{pH} < \text{pKa}$, κυριαρχούν οι πρωτονιωμένες μορφές HA, BH⁺

Όταν $\text{pH} = \text{pKa}$, τότε $\text{HA} = \text{A}^-$ και $\text{BH}^+ = \text{B}$

Όταν $pH > pK_a$, κυριαρχούν οι μη πρωτονιωμένες μορφές A^- και B . Συμπερασματικά, η pK_a αποτελεί ένα μέτρο της ισχύος της αλληλεπίδρασης μιας χημικής ένωσης με ένα H^+ .

Τα κύρια συστήματα ρυθμιστικών διαλυμάτων του οργανισμού που συμβάλλουν στην οξεοβασική ισορροπία είναι:

- Σύστημα πρωτεϊνών (αλβουμίνη, σφαιρίνες),
- Σύστημα αιμοσφαιρίνης,
- Σύστημα δικαρβονικών.

Το σπουδαιότερο μικρομοριακό ρυθμιστικό σύστημα του αίματος, συνίσταται από CO_2 , H_2O και HCO_3^- με τιμή $pK_a = 6,3$. Στα ζώα με πνεύμονες, το ρυθμιστικό σύστημα των δικαρβονικών είναι αποτελεσματικό φυσιολογικό ρυθμιστικό διάλυμα κοντά σε $pH 7,4$, επειδή το H_2CO_3 του πλάσματος του αίματος βρίσκεται σε ισορροπία μ' ένα μεγάλο απόθεμα CO_2 στους αεροχώρους (κυψελίδες) των πνευμόνων. Αυτό το ρυθμιστικό σύστημα περιλαμβάνει τρεις αντιστρεπτές ισορροπίες μεταξύ του αέριου CO_2 στους πνεύμονες και του δικαρβονικού ιόντος (HCO_3^-) στο πλάσμα του αίματος.

Όταν το αίμα περνά από τους ιστούς, αποκτά ιόντα H^+ (που παράγονται, π.χ. από το γαλακτικό οξύ του μυϊκού ιστού μετά από έντονη σωματική άσκηση). Σε αυτή την περίπτωση, η συγκέντρωση του H_2CO_3 αυξάνει. Αυτό αυξάνει τη συγκέντρωση του CO_2 στο πλάσμα του αίματος κι έτσι αυξάνει η πίεση του CO_2 στους αεροχώρους των πνευμόνων (κυψελίδες): η περίσσεια CO_2 εκπνέεται. Αντιστρόφως, όταν το pH του πλάσματος του αίματος αυξάνει (π.χ. με παραγωγή NH_3 κατά τον καταβολισμό των πρωτεϊνών), συμβαίνει το αντίθετο: μειώνεται η συγκέντρωση των ιόντων H^+ στο πλάσμα του αίματος, προκαλώντας τη διάσταση περισσότερου H_2CO_3 σε H^+ και HCO_3^- . Αυτό με τη σειρά του προκαλεί τη διάλυση περισσότερου CO_2 από τους πνεύμονες στο πλάσμα του αίματος. Η ταχύτητα της αναπνοής – δηλαδή η ταχύτητα εισπνοής και εκπνοής CO_2 – μπορεί να προσαρμόσει γρήγορα αυτές τις ισορροπίες, διατηρώντας το pH του αίματος σχεδόν σταθερό.

Άλλο ρυθμιστικό σύστημα του αίματος είναι το $H_2PO_4^- / HPO_4^{2-}$ με $pK_a = 7,2$. Το φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα έχει μέγιστη αποτελεσματικότητα σε pH κοντά στο pK_a κι έτσι τείνει ν' αντιστέκεται στις αλλαγές στο pH σε εύρος μεταξύ 5,9 και 7,9. Είναι ένα αποτελεσματικό ρυθμιστικό διάλυμα σε βιολογικά υγρά. Στα θηλαστικά, τα εξωκυτταρικά υγρά και τα περισσότερα κυτταροπλασματικά διαμερίσματα έχουν pH που κυμαίνεται από 6,9 έως 7,4.

Το σπουδαιότερο ρυθμιστικό των ούρων, αποτελείται από NH_4^+ / NH_3 . Η ελάττωση του pH , κατά 0,03 μονάδες κάτω του 7,40, ονομάζεται *οξέωση* ενώ η αύξησή του, χαρακτηρίζεται ως *αλκάλωση*.

Οι εργαστηριακές εξετάσεις που είναι χρήσιμες για την παρακολούθηση της οξεοβασικής ισορροπίας ή για τη διάγνωση μιας ηλεκτρολυτικής διαταραχής, πραγματοποιούνται σε αρτηριακό αίμα και αφορούν τις μετρήσεις:

- του pH ,
- των αερίων αίματος,
- του ολικού διοξειδίου του άνθρακα,
- της συγκέντρωσης των διττανθρακικών ιόντων,
- της περίσσειας ή έλλειψης βάσεων,
- του χάσματος ανιόντων.

Τιμές K_a μονοπρωτικών οξέων

Formula	Name	Value of K_a
HSO_4^-	Hydrogen sulfate ion	1.2×10^{-2}
HClO_2	Chlorous acid	1.2×10^{-2}
$\text{HC}_2\text{H}_2\text{ClO}_2$	Monochloroacetic acid	1.35×10^{-3}
HF	Hydrofluoric acid	7.2×10^{-4}
HNO_2	Nitrous acid	4.0×10^{-4}
$\text{HC}_2\text{H}_3\text{O}_2$	Acetic acid	1.8×10^{-5}
$[\text{Al}(\text{H}_2\text{O})_6]^{3+}$	Hydrated aluminum(III) ion	1.4×10^{-5}
HOCl	Hypochlorous acid	3.5×10^{-8}
HCN	Hydrocyanic acid	6.2×10^{-10}
NH_4^+	Ammonium ion	5.6×10^{-10}
HOC_6H_5	Phenol	1.6×10^{-10}

↑ Increasing acid strength

Σχήμα 3.1 Σταθερές ιοντισμού ασθενών οξέων.

Τιμές K_b ασθενών βάσεων

Name	Formula	Conjugate Acid	K_b
Ammonia	NH_3	NH_4^+	1.8×10^{-5}
Methylamine	CH_3NH_2	CH_3NH_3^+	4.38×10^{-4}
Ethylamine	$\text{C}_2\text{H}_5\text{NH}_2$	$\text{C}_2\text{H}_5\text{NH}_3^+$	5.6×10^{-4}
Aniline	$\text{C}_6\text{H}_5\text{NH}_2$	$\text{C}_6\text{H}_5\text{NH}_3^+$	3.8×10^{-10}
Pyridine	$\text{C}_5\text{H}_5\text{N}$	$\text{C}_5\text{H}_5\text{NH}^+$	1.7×10^{-9}

Σχήμα 3.2 Σταθερές ιοντισμού ασθενών βάσεων.

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟ ΜΕΡΟΣ

3.3 Εργαστηριακή άσκηση: Διαδικασία και αναλυτικοί υπολογισμοί εργαστηριακής άσκησης προσδιορισμού pH ρυθμιστικού διαλύματος (αρχικά και μετά την προσθήκη ισχυρού οξέος ή ισχυρής βάσεως)

Πειραματική πορεία:

- Παρασκευή διαλ. 10 mL CH_3COOH 0,1 M (I). Από πυκνό διάλυμα συγκέντρωσης 17,5 M.
- Παρασκευή διαλ. 10 mL CH_3COONa 0,1 M (II) (ζύγιση στερεάς ουσίας).
- Ανάμιξη 10 mL διαλ. I + 10 mL διαλ. II (ρυθμιστικό διάλυμα).
- Μέτρηση pH υπολογιστικά
- Προσθήκη 2 mL διαλ. NaOH 0,1 M στο 50% του ρυθμιστικού διαλύματος (III)
- Προσθήκη 2 mL διαλ. HCl 0,1 M στο υπόλοιπο ρυθμιστικό διάλυμα (IV)
- Μέτρηση pH στα διαλ. III, IV υπολογιστικά

Στάδιο 1ο: Για την παρασκευή του διαλύματος θα χρησιμοποιήσουμε τον τύπο της αραιώσης:
 $V_1 \times C_1 = V_2 \times C_2 \Rightarrow V_1 \times 17,5 = 10 \times 0,1 \Rightarrow V_1 = 0,057 \text{ mL}$,
 και θα ακολουθήσουμε τα στάδια παρασκευής διαλύματος από πυκνότερο διάλυμα.

Στάδιο 2ο: Για την παρασκευή του διαλύματος πραγματοποιούνται οι ακόλουθοι υπολογισμοί:
 $C = n / V \Rightarrow n = C \times V = 0,1 \times 0,01 = 0,001 \text{ mol}$
 $n = m / Mr \Rightarrow m = 0,001 \times 82 \Rightarrow m = 0,082 \text{ g}$ και θα ακολουθήσουμε τα στάδια παρασκευής διαλύματος από στερεό.

Στάδιο 3ο & 4ο: Εφαρμόζοντας τη σχέση Henderson–Hasselbalch:

$$pH = pKa + \log_{10} \frac{[A^-]}{[HA]}$$

όπου pKa είναι η σταθερά ιοντισμού του οξικού οξέος (4,74) και αντικαθιστώντας όπου $[A^-] = [CH_3COO^-] = 0,05 \text{ M}$

Τύπος της αραιώσης: $V_1 \times [CH_3COO^-]_1 = V_2 \times [CH_3COO^-]_2 \Rightarrow 10 \times 0,1 = 20 \times [CH_3COO^-]_2 \Rightarrow [CH_3COO^-]_2 = 0,05 \text{ M}$

$[HA] = [CH_3COOH]_2 = 0,05 \text{ M}$

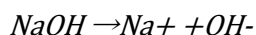
Τύπος της αραιώσης: $V_1 \times [CH_3COOH]_1 = V_2 \times [CH_3COOH]_2 \Rightarrow 10 \times 0,1 = 20 \times [CH_3COOH]_2 \Rightarrow [CH_3COOH]_2 = 0,05 \text{ M}$. Προκύπτει ότι στο αρχικό διάλυμά μας $pH = pka = 4,74$.

Στάδιο 5ο & 7ο: Υπολογίζουμε την αναμενόμενη αλλαγή στο pH, όταν στο παραπάνω διάλυμα προστεθούν 2 mL 0,1 M καυστικού νατρίου (NaOH). Επίσης, θα συγκρίνουμε αυτήν την αλλαγή με την αναμενόμενη αλλαγή στο pH, όταν ο ίδιος όγκος του συγκεκριμένου διαλύματος NaOH προστίθεται σε 10 mL καθαρού νερού. Εφόσον προστίθενται 2 mL 0,1 M NaOH σε 10 mL ρυθμιστικού (ή νερού στην άλλη περίπτωση), ο συνολικός όγκος του διαλύματος γίνεται $10+2 = 12 \text{ mL}$.

Η συγκέντρωση του NaOH στο νέο διάλυμα, εφαρμόζοντας τον νόμο της αραιώσης, γίνεται:

$$V_1 \times [NaOH]_1 = V_2 \times [NaOH]_2 \Rightarrow 2 \times 0,1 = 12 \times [NaOH]_2 \Rightarrow [NaOH]_2 = 0,017 \text{ M}$$

Το NaOH είναι ισχυρή βάση, δηλαδή διίσταται πλήρως:

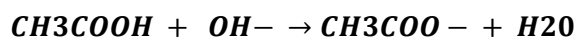


Η συγκέντρωση των OH^- θα είναι 0,017 M.

Στην περίπτωση της προσθήκης του NaOH στο νερό το τελικό pH θα είναι:

$$pH = 14 + \log [OH^-] = 14 + \log (0,017) = 14 + (-1,77) \Rightarrow pH = 12,23$$

Στην περίπτωση της προσθήκης του NaOH στο ρυθμιστικό, τα επιπλέον OH^- από την προσθήκη του NaOH (που προκύπτουν από την πλήρη διάσταση του NaOH) δεσμεύονται πρακτικά πλήρως από το CH_3COOH κατά την αντίδραση:



Όπως φαίνεται στην παραπάνω αντίδραση η μοριακή αναλογία μεταξύ CH_3COOH : OH^- : CH_3COO^- είναι 1:1:1.

Χρησιμοποιώντας τον παρακάτω πίνακα, υπολογίζουμε τη μεταβολή των mol των διάφορων μοριακών ειδών στο διάλυμα.

Για το CH_3COOH ισχύει:

$$n = C \times V$$

όπου,
 n ο αριθμός των mol,
 C η συγκέντρωσή του,
 V ο όγκος του.

Επομένως $n = 0,05 \text{ M} (= \text{mmol mL}) \times 10 \text{ mL} = 0,5 \text{ mmol}$.

Ο ίδιος αριθμός mol υπολογίζεται για το CH_3COO^- .

Τέλος, για το OH^- ισχύει $n = C \times V = 0,017 \text{ mmol/mL} \times 12 \text{ mL} = 0,2 \text{ mmol}$.

	CH_3COO^-	H^+	CH_3COOH
Αρχικά	0,5 mmol		0,5 mmol
Μεταβολή	-0,2 mmol	(+0,2 -0,2) mmol	+0,2 mmol
Τελικά	0,3 mmol	0 mmol	0,7 mmol

Επομένως, η νέα συγκέντρωση του οξικού οξέος είναι $[\text{CH}_3\text{COOH}] = 0,3 \text{ mmol}/12 \text{ mL}$ και η νέα συγκέντρωση του οξικού ανιόντος είναι $[\text{CH}_3\text{COO}^-] = 0,7 \text{ mmol}/12 \text{ mL}$.

Από τη σχέση Henderson–Hasselbalch:

$$pH = pKa + \log_{10} \frac{[A^-]}{[HA]}$$

προκύπτει ότι $pH = 4,74 + \log([0,7] / [0,3]) = 4,74 + 0,36 \Rightarrow pH = 5,1$

Έτσι και υπολογιστικά το ρυθμιστικό διάλυμα διατηρεί πρακτικά σταθερό το pH του (αφού η συγκέντρωση των ελεύθερων OH^- παραμένει σχεδόν αμετάβλητη σε σχέση με πριν την προσθήκη).

Στάδιο 6ο & 7ο: Υπολογίζουμε την αναμενόμενη αλλαγή στο pH, όταν στο παραπάνω διάλυμα προστεθούν 2 mL 0,1 M υδροχλωρικού οξέος (HCl). Επίσης, θα συγκρίνουμε αυτή την αλλαγή με την αναμενόμενη αλλαγή στο pH, όταν ο ίδιος όγκος του συγκεκριμένου διαλύματος HCl προστίθεται σε 10 mL καθαρού νερού.

Εφόσον προστίθενται 2 mL 0,1 M HCl σε 10 mL ρυθμιστικού (ή νερού στην άλλη περίπτωση), ο συνολικός όγκος του διαλύματος γίνεται $10+2 = 12 \text{ mL}$.

Η συγκέντρωση του HCl στο νέο διάλυμα, εφαρμόζοντας τον νόμο της αραιώσης, υπολογίζεται: $V_1 \times [\text{HCl}]_1 = V_2 \times [\text{HCl}]_2 \Rightarrow 2 \times 0,1 = 12 \times [\text{HCl}]_2 \Rightarrow [\text{HCl}]_2 = 0,017 \text{ M}$.

Το HCl είναι ένα ισχυρό οξύ, δηλαδή δίδεται πλήρως και συνεπώς απελευθερώνει ισοδύναμη ποσότητα ιόντων υδρογόνου:

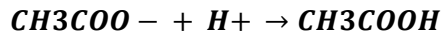


Η συγκέντρωση των H^+ θα είναι 0,017 M.

Στην περίπτωση της προσθήκης του HCl στο νερό το τελικό pH θα είναι:

$$pH = -\log[\text{H}^+] = -\log(0,017) = -(-1,77) \Rightarrow pH = 1,77$$

Στην περίπτωση της προσθήκης του HCl στο ρυθμιστικό διάλυμα, τα επιπλέον πρωτόνια από την προσθήκη του HCl (που προκύπτουν από τον πλήρη ιοντισμό του HCl) δεσμεύονται πρακτικά πλήρως από τη βάση CH_3COO^- και σχηματίζουν περισσότερο οξικό οξύ κατά την αντίδραση:



Όπως φαίνεται στην παραπάνω αντίδραση η μοριακή αναλογία μεταξύ CH_3COO^- : H^+ : CH_3COOH είναι 1:1:1.

Χρησιμοποιώντας τον παρακάτω πίνακα, υπολογίζουμε τη μεταβολή των mmol των διάφορων μοριακών ειδών στο διάλυμα.

	CH_3COO^-	H^+	CH_3COOH
Αρχικά	0,5 mmol		0,5 mmol
Μεταβολή	-0,2 mmol	(+0,2 -0,2) mmol	+0,2 mmol
Τελικά	0,3 mmol	0 mmol	0,7 mmol

Για το CH_3COO^- ισχύει

$$n = C \times V,$$

όπου,

n ο αριθμός των mols,

C η συγκέντρωσή του,

V ο όγκος του.

Επομένως, $n = 0,05 \text{ M (= mmol/mL)} \times 10 \text{ mL} = 0,5 \text{ mmol}$.

Ο ίδιος αριθμός mols υπολογίζεται για το CH_3COOH .

Τέλος, για το H^+ ισχύει $n = C \times V = 0,017 \text{ mmol/mL} \times 12 \text{ mL} = 0,2 \text{ mmol}$.

Επομένως, η νέα συγκέντρωση του οξικού οξέος είναι $[\text{CH}_3\text{COOH}] = 0,7 \text{ mmol}/12 \text{ mL}$ και η νέα συγκέντρωση του οξικού ανιόντος είναι $[\text{CH}_3\text{COO}^-] = 0,3 \text{ mmol}/12 \text{ mL}$.

Από τη σχέση Henderson–Hasselbalch:

$$\text{pH} = \text{pKa} + \log_{10} \frac{[\text{A}^-]}{[\text{HA}]}$$

προκύπτει ότι $\text{pH} = 4,74 + \log ([0,3] / [0,7]) = 4,74 + (-0,36) \Rightarrow \text{pH} = 4,38$

Αποδεικνύεται υπολογιστικά ότι το ρυθμιστικό διάλυμα διατηρεί πρακτικά σταθερό το pH του (αφού η συγκέντρωση των ελεύθερων H^+ παραμένει σχεδόν αμετάβλητη σε σχέση με πριν την προσθήκη).

3.4 Εργαστηριακή άσκηση: Εύρεση αρχικής συγκέντρωσης ασθενούς οξέος και άλατος αυτού με γνωστή την τελική συγκέντρωση και το pH του ρυθμιστικού διαλύματος

Χρησιμοποιώντας τη σχέση Henderson–Hasselbalch:

$$\text{pH} = \text{pKa} + \log_{10} \frac{[\text{A}^-]}{[\text{HA}]}$$

να υπολογιστεί η συγκέντρωση οξικού οξέος ($\text{pKa} = 4,74$) και οξικού νατρίου που απαιτείται για την παρασκευή 0,4M ρυθμιστικού διαλύματος $\text{pH} = 4,0$.

Αρχικά, υπολογίζουμε την απαιτούμενη σχέση βάσης προς οξύ:

$\text{pH} = \text{pKa} + \log ([\text{οξικό νάτριο}] / [\text{οξικό οξύ}]) \Rightarrow \log ([\text{οξικό νάτριο}] / [\text{οξικό οξύ}]) = \text{pH} - \text{pKa} \Rightarrow$

$\log ([\text{οξικό νάτριο}] / [\text{οξικό οξύ}]) = 4,0 - 4,74 \Rightarrow \log ([\text{οξικό νάτριο}] / [\text{οξικό οξύ}]) = -0,74 \Rightarrow$

$([\text{οξικό νάτριο}] / [\text{οξικό οξύ}]) = 10^{-0,74} \Rightarrow [\text{οξικό νάτριο}] / [\text{οξικό οξύ}] = 0,182$

ή οξικό νάτριο = 0,182 x οξικό οξύ.

Επομένως, $[\text{οξικό νάτριο}] / [\text{οξικό οξύ}] + [\text{οξικό νάτριο}] = 0,182 \times [\text{οξικό οξύ}] / [\text{οξικό οξύ}] + 0,182 \times [\text{οξικό οξύ}] = 0,182 / 1 + 0,182 = 0,182 / 1,182 = 0,15$

Έτσι, λοιπόν, περίπου 15% από 0,4 M του ρυθμιστικού διαλύματος είναι [οξικό νάτριο] και το υπόλοιπο 85% είναι [οξικό οξύ].

Άρα, $[\text{οξικό νάτριο}] = 15\% \times 0,4 \text{ M} \Rightarrow [\text{οξικό νάτριο}] = 0,06 \text{ M}$

και $[\text{οξικό οξύ}] = 85\% \times 0,4 \text{ M} \Rightarrow [\text{οξικό οξύ}] = 0,34 \text{ M}$

3.5 Εργαστηριακή άσκηση: Μέτρηση pH με τη χρήση pH-μέτρου (πεχαμέτρου)

3.5.1 Το pH-μετρο

Η ακριβής μέτρηση του pH απαιτεί ένα σύστημα ηλεκτροδίου pH και έναν μετρητή pH. Το πιο κοινό πλέον σύστημα ηλεκτροδίου pH αποτελείται από δύο μέρη συνδυασμένα σε ένα σύστημα ηλεκτροδίων, το ιοντοεπιλεκτικό ηλεκτρόδιο για τη μέτρηση του pH που συνίσταται από υάλινη μεμβράνη που περιέχει διάλυμα γνωστού pH και το εσωτερικό ηλεκτρόδιο αναφοράς. Όταν οι ενεργότητες των ιόντων H^+ είναι διαφορετικές στις δύο πλευρές του ηλεκτροδίου, θα αναπτυχθεί ένα δυναμικό δια μέσου της μεμβράνης, το οποίο είναι ανάλογο του pH του διαλύματος.

Όλα τα συστήματα μέτρησης pH πρέπει να είναι βαθμονομημένα έναντι προτύπων ρυθμιστικών διαλυμάτων, ώστε να εξασφαλίζεται η ακρίβεια των μετρήσεων. Αυτά τα ρυθμιστικά διαλύματα είναι διαθέσιμα με τιμές σε όλη την κλίμακα pH (0 έως 14), αλλά αυτά που χρησιμοποιούνται συνηθέστερα είναι τιμές pH 4,0, 7,0 και 10,0. Επειδή οι τιμές pH ενός ρυθμιστικού διαλύματος είναι συνάρτηση και της θερμοκρασίας πρέπει να λαμβάνεται υπόψη η διορθωμένη τιμή του pH του ρυθμιστικού διαλύματος, ανάλογα με τη θερμοκρασία. Για τον ίδιο λόγο τα πρότυπα ρυθμιστικά διαλύματα και το μετρούμενο διάλυμα (με άγνωστο pH) πρέπει να βρίσκονται στην ίδια θερμοκρασία.

Ως γνωστόν, η ακριβής μέτρηση του pH εξαρτάται από την ακριβή βαθμονόμηση του pH-μέτρου και η ακρίβεια της βαθμονόμησης εξαρτάται από την ακρίβεια του pH των προτύπων διαλυμάτων που χρησιμοποιούνται. Τα ρυθμιστικά διαλύματα δεν είναι για πάντα σταθερά. Το pH τους μεταβάλλεται, π.χ. με τη θερμοκρασία, όταν απορροφούν CO_2 από την ατμόσφαιρα και λόγω μείωσης όγκου μέσω της εξάτμισης. Γι' αυτόν τον λόγο και προτείνεται να χρησιμοποιούνται τακτικά νέα ρυθμιστικά πρότυπα διαλύματα.



Εικόνα 3.3 Ένα τυπικό εργαστηριακό πεχάμετρο.



Εικόνα 3.4 Ταινίες μέτρησης pH.

3.5.2 Μέτρηση του pH με τη χρήση pH-μέτρου

Η ακριβής μέτρηση του pH των διαλυμάτων της εργαστηριακής άσκησης 3.3 γίνεται με τη χρήση του pH-μέτρου (Εικόνα 3.3).

Η διαδικασία της μέτρησης του pH με pH-μετρο είναι η εξής:

- Βγάζουμε το ηλεκτρόδιο από το νερό, το πλένουμε με απιονισμένο νερό χρησιμοποιώντας τον υδροβολέα και το σκουπίζουμε.
- Πριν από κάθε μέτρηση γίνεται ρύθμιση του pH-μέτρου με ρυθμιστικά διαλύματα σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή
- Βυθίζουμε το ηλεκτρόδιο στο διάλυμα που θέλουμε να μετρήσουμε το pH.
- Γυρίζουμε τον διακόπτη του ηλεκτρονικού μέρους του πεχαμέτρου στη θέση pH. Μετά από λίγο στην οθόνη του οργάνου εμφανίζεται η τιμή του pH.
- Πλένουμε το ηλεκτρόδιο με απιονισμένο νερό, το τοποθετούμε μέσα στο απιονισμένο νερό και καθαρίζουμε τον χώρο γύρω από το pH-μετρο.

Συγκρίνετε τις τιμές pH που προκύπτουν από τη μέτρηση με το pH-μετρο, με αυτές που προέκυψαν με τις ταινίες μέτρησης pH (Εικόνα 3.4) και με αυτές που υπολογίσατε θεωρητικά και συμπληρώστε τον παρακάτω πίνακα.

ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΟ ΔΙΑΛΥΜΑ (ΡΔ)	Τιμή pH με pH-μετρο	Τιμή pH με ταινίες μέτρησης pH	Τιμή pH υπολογιστικά
ΡΔ (στάδιο 3°)			
ΡΔ III (στάδιο 5°)			
ΡΔ IV (στάδιο 6°)			

Εφαρμογή 1: 800 mL ρυθμιστικού διαλύματος 0,80 M CH_3COOH /0,40 M CH_3COO να αραιώνονται με απεσταγμένο νερό σε αναλογία 1:9 (v/v) ($\text{pK}_a \text{CH}_3\text{COOH} = 4,74$).

Ποια θα είναι η συγκέντρωση των συστατικών του ΡΔ μετά την αραιώση;

Να υπολογίσετε την τιμή του pH του ΡΔ πριν και μετά την αραιώση, όπως και την επί τοις εκατό μεταβολή αυτής.

Να υπολογίσετε την αντίστοιχη μεταβολή που αναμένεται στο pH μετά την αραιώση με απεσταγμένο νερό σε αναλογία 1:9 (v/v) διαλύματος 0,01 mM HCl.

Εφαρμογή 2: 750 mL ρυθμιστικού διαλύματος 0,8 M CH_3COOH / 0,4 M CH_3COONa αραιώνεται κατά 1:20.

Ποια θα είναι η τελική συγκέντρωση του διαλύματος και ποιο το αρχικό και τελικό pH του; Δίνεται $\text{pK}_a \text{CH}_3\text{COOH} = 4,74$.

Να υπολογίσετε την αντίστοιχη μεταβολή που αναμένεται στο pH κατά την αραίωση 1:20 διαλύματος 0,02 mM HCl.

Εφαρμογή 3: Από ένα διάλυμα CH₃COOH 0,5 M θέλουμε να παρασκευάσουμε διάλυμα (Α) 0,1 M σε CH₃COOH που να έχει όγκο 100 mL.

Πόσα mL από το αρχικό διάλυμα θα χρησιμοποιήσουμε;

Προσθέτουμε στα 100 mL του (Α) 50 mL διαλύματος CH₃COONa 0,2 M και παίρνουμε διάλυμα (Β). Ποιο το pH του (Β);

Πόσα mL διαλύματος NaOH 0,1 M πρέπει να προσθέσουμε σε 10 mL του (Α), για να πάρουμε διάλυμα (Γ) με pH = 5; Δίνεται: $K_a = 10^{-5}$

Εφαρμογή 4: Δίνεται ρυθμιστικό διάλυμα Α που περιέχει CH₃COOH 0,1 M και CH₃COONa 0,1 M και έχει pH = 5.

Ποια είναι η τιμή της K_a του CH₃COOH;

Σε 2 L του Α προσθέτουμε 18 L H₂O και παίρνουμε διάλυμα Β. Ποιο είναι το pH του Β;

Σε 2 L του Α προσθέτουμε 0,003 mol NaOH και παίρνουμε διάλυμα Γ. Ποιο είναι το pH του Γ;

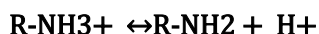
Σε 2 L του Α προσθέτουμε 8 L διαλύματος HCl 0,001 M και παίρνουμε 10 L διαλύματος Δ. Ποιο είναι το pH του Δ;

Εφαρμογή 5: Σε 400 mL ρυθμιστικού διαλύματος NH₃ 0,1 M και NH₄Cl 0,1 M που έχει pH = 9, προσθέτουμε 400 mL διαλύματος NaOH 0,1 M. Ποιο είναι το pH του νέου διαλύματος; Πώς εξηγείτε αυτή τη μεταβολή του pH; Δίνεται $K_w = 10^{-14}$.

Εφαρμογή 6: Να υπολογίσετε το pK_a του γαλακτικού οξέος με δεδομένο ότι, όταν η συγκέντρωση του γαλακτικού οξέος είναι 0,010 M και η συγκέντρωση του γαλακτικού ιόντος 0,087 M, το pH είναι 4,8.

Εφαρμογή 7: Οξύτητα του γαστρικού HCl. Στο εργαστήριο ενός νοσοκομείου, ένα δείγμα γαστρικού υγρού 10 mL που απομονώθηκε αρκετές ώρες μετά από γεύμα, στοιχειομετρήθηκε με 0,1 M NaOH, ώστε να εξουδετερωθεί. Χρειάστηκαν 7,2 mL NaOH. Το στομάχι του ασθενούς δεν περιείχε τροφή ή υγρά. Συνεπώς, υποθέστε ότι δεν υπήρχαν ρυθμιστικά διαλύματα. Ποιο ήταν το pH του γαστρικού υγρού;

Εφαρμογή 8: Το αμινοξύ γλυκίνη χρησιμοποιείται συχνά ως κύριο συστατικό ενός ρυθμιστικού διαλύματος σε βιοχημικά πειράματα. Η αμινομάδα της γλυκίνης, που έχει pK_a = 9,6, υφίσταται είτε στην πρωτονιωμένη μορφή (-NH₃⁺) είτε ως ελεύθερη βάση (-NH₂) εξαιτίας της αντιστρεπτής ισορροπίας:



Σε ποιο εύρος του pH μπορεί να χρησιμοποιηθεί η γλυκίνη ως αποτελεσματικό ρυθμιστικό διάλυμα εξαιτίας της αμινομάδας της;

Σε διάλυμα γλυκίνης 0,1 M σε pH = 9, ποιο ποσοστό γλυκίνης έχει την αμινομάδα στην πρωτονιωμένη μορφή;

Πόση ποσότητα KOH 5 M πρέπει να προστεθεί σε 1 L γλυκίνης 0,1 M σε pH = 9, ώστε το pH του διαλύματος να γίνει ακριβώς 10;

Όταν το 99% της γλυκίνης είναι στην πρωτονιωμένη μορφή, ποια είναι η αριθμητική σχέση μεταξύ του pH του διαλύματος και του pK_a της αμινομάδας;

Εφαρμογή 9: Η ασπιρίνη είναι ασθενές οξύ με pK_a = 3,5. Απορροφάται από τα κύτταρα του στομάχου και του λεπτού εντέρου και εισέρχεται στην κυκλοφορία του αίματος. Η απορρόφηση προϋποθέτει διόδο διαμέσου της κυτταρικής μεμβράνης, η ταχύτητα της οποίας καθορίζεται από την πολικότητα του μορίου: τα φορτισμένα και πολύ πολικά μόρια διέρχονται αργά, ενώ τα ουδέτερα υδρόφοβα μόρια διαπερνούν γρήγορα τη μεμβράνη. Το pH του γαστρικού περιεχομένου είναι περίπου 1,5, ενώ το pH του περιεχομένου του λεπτού εντέρου είναι περίπου 6. Περισσότερη ασπιρίνη απορροφάται από το στομάχι ή από το λεπτό έντερο; Να δικαιολογήσετε με σαφήνεια την απάντησή σας.

Εφαρμογή 10: Μέτρηση των επιπέδων της ακετυλοχολίνης με αλλαγές στο pH. Η συγκέντρωση της ακετυλοχολίνης (νευροδιαβιβαστής) σε ένα δείγμα μπορεί να προσδιοριστεί από τις αλλαγές στο pH που συνοδεύουν την υδρόλυσή της. Όταν το δείγμα επωάζεται με το ένζυμο ακετυλοχολινεστεράση, η ακετυλοχολίνη μετατρέπεται ποσοτικά σε χολίνη κι οξικό οξύ, που δίσταται και παράγει οξικό ιόν και ιόν υδρογόνου: ακετυλοχολίνη – χολίνη + οξικό ιόν.

Σε μια τυπική ανάλυση, 15 mL ενός υδατικού διαλύματος που περιέχει μια άγνωστη ποσότητα ακετυλοχολίνης είχε pH 7,65. Όταν επώαστηκε με ακετυλοχολινεστεράση, το pH του διαλύματος μειώθηκε σε 6,87. Υποθέτοντας ότι στο μείγμα δεν υπήρχε ρυθμιστικό διάλυμα, να προσδιορίσετε τον αριθμό των γραμμομορίων της ακετυλοχολίνης στα 15 mL του δείγματος.

Σχετικό οπτικό υλικό στο διαδίκτυο

1. Εικονική αναπαράσταση για τη μέτρηση του pH και σχετικό video μπορείτε να βρείτε στα:

<http://www.wikihow.com/Calibrate-and-Use-a-pH-Meter>

<http://www.youtube.com/watch?v=UfdKhja6u2I>

<https://www.youtube.com/watch?v=6nwJtIvnt4>

<https://www.youtube.com/watch?v=Ptvx3COcQck>

2. Εικονική αναπαράσταση για την παρασκευή και τις ιδιότητες των ρυθμιστικών διαλυμάτων και σχετικό video μπορείτε να βρείτε στα:

<https://www.youtube.com/watch?v=mmeTelWXvhk>

<https://www.khanacademy.org/test-prep/mcat/chemical-processes/acid-base-equilibria/v/buffer-solutions>

<https://www.toppr.com/guides/chemistry/equilibrium/buffer-solutions/>

<https://www.youtube.com/watch?v=yEqug-4-NMo>

<https://www.youtube.com/watch?v=8amEGfHoBB4>

Πηγές φωτογραφιών με προέλευση το διαδίκτυο

Εικόνα 3.1.

https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/8/89/Dipoli_acqua.png

Εικόνα 3.2.

https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/0/0f/210_Hydrogen_Bonds_Between_Water_Molecules-01.jpg

Σχήμα 3.1

<https://slideplayer.gr/slide/2642548/9/images/2/%CE%A4%CE%B9%CE%BC%CE%AD%CF%82+%CE%9A%CE%B1+%CE%BC%CE%BF%CE%BD%CE%BF%CF%80%CF%81%CF%89%CF%84%CE%B9%CE%BA%CF%8E%CE%BD+%CE%BF%CE%BE%CE%AD%CF%89%CE%BD.jpg>

Σχήμα

3.2

https://www.google.com/url?sa=i&url=https%3A%2F%2Fslideplayer.gr%2Fslide%2F2642548%2F&psig=AOvVaw0ZkKntg-LV0cRGdnbDtnLs&ust=1649311557875000&source=images&cd=vfe&ved=0CAoQjRxqFwoTCPi4rsni_vYCFQAAAAAdAAAAABAO

Βιβλιογραφικές Αναφορές

- Brown, T. (2020). *Βιοχημεία*. Αθήνα: Utopia.
- Ebbing, D., & Darell, G. (2014). *Σύγχρονη Γενική Χημεία Αρχές και Εφαρμογές*. Αθήνα: Τραυλός.
- Nelson, D., & Cox, M. (2018). *Lehningers Βασικές αρχές Βιοχημείας*. Αθήνα: Broken.
- Tymoczko, J., Berg, J., & Stryer, L. (2018). *Βιοχημεία Βασικές αρχές*. Αθήνα: Broken.
- Βάκρος, Ι. (2015). *Γεωργική Χημεία*. Αθήνα: Κάλιπος.
- Δημόπουλος, Κ., & Αντωνοπούλου, Σ. (2020). *Βασική Βιοχημεία*. Αθήνα: Νέον.
- Καρίκας, Γ. (2018). *Εφαρμοσμένη Βιοχημεία Θεωρία Ασκήσεις*. Αθήνα: Βιβλιόπολις.
- Κουσίσης, Σ., Χούχουλα, Δ., & Αντωνόπουλος, Δ. (2020). *Εργαστηριακή Βιοχημεία*. Αθήνα: Τσότρας.
- Μανουσάκης, Γ. και συν. (2000). *Εργαστηριακές Ασκήσεις Γενικής Ανόργανης Χημείας*. Αθήνα: Ζήτη.
- Πέτρου, Χ., Ελευθερίου, Φ., & Λυμπεράκη, Ε. (2010). *Μέθοδοι Βιοχημείας*. Αθήνα: University Studio Press.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΘΕΩΡΙΑ ΚΑΙ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΑΣΚΗΣΕΙΣ ΣΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΠΕΠΤΙΔΙΩΝ, ΔΙΑΔΙΚΤΥΟ ΚΑΙ ΒΑΣΕΙΣ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

Συγγραφέας: Γεώργιος Αλβέρτος Καρίκας

Σύνοψη

Τα πεπτίδια και οι πρωτεΐνες αποτελούν είτε δομικά συστατικά των μεμβρανών του κυττάρου είτε συνεργούν σε κάποια συγκεκριμένη λειτουργία, όπως η δημιουργία πρωτεϊνικών συμπλόκων. Είναι μεγάλα σύνθετα βιομόρια, με MB από 10.000 μέχρι πάνω από 1.000.000, αποτελούμενα από αμινοξέα, τα οποία ενώνονται μεταξύ τους με πεπτιδικούς δεσμούς σχηματίζοντας μια γραμμική αλυσίδα, καλούμενη αλυσίδα πολυπεπτιδίων. Στο παρόν κεφάλαιο, θα επικεντρωθούμε στους δομικούς λίθους (αμινοξέα), τον σχηματισμό, τις ιδιότητες, τις δομές την απομόνωση/διαχωρισμό, τις βάσεις δεδομένων καθώς και μια σειρά μεθόδων εργαστηριακού προσδιορισμού των αμινοξέων, πεπτιδίων και πρωτεϊνών.

Προαπαιτούμενη γνώση

Απαιτούνται γνώσεις του Κεφαλαίου 3.

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

4.1 Ταξινόμηση αμινοξέων – Διαλυτότητα – Οξεοβασική συμπεριφορά – Ισοηλεκτρικό σημείο – Οπτική ισομέρεια

Τα πεπτίδια είναι ολιγομερή παράγωγα αμινοξέων μικρού MB (<10000) και μπορεί να αποτελούνται από πρωτεϊνικά ή μη πρωτεϊνικά αμινοξέα. Οι πρωτεΐνες είναι μεγαλύτερου MB (5000-6.000.000). Στις πρωτεΐνες ανήκουν και τα ένζυμα.

Δομικές μονάδες των πεπτιδίων και πρωτεϊνών είναι τα αμινοξέα (AO) με L-στεreoχημική διάταξη. Τα D- AO ανευρίσκονται σε βακτήρια.

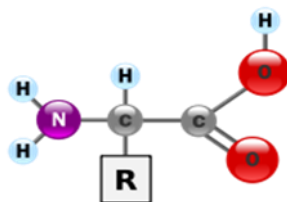
Από τα 300 περίπου αμινοξέα που υπάρχουν στη φύση, μόνο τα 20 χρησιμοποιούνται για τη βιοσύνθεση των πρωτεϊνών (πρωτεϊνογόνα AO). Τα τελευταία κωδικοποιούνται από τα νουκλεϊνικά οξέα. Εάν προστεθούν και τα παράγωγα υδροξυ-προλίνη και υδροξυ-λυσίνη, που απαντούν σε πολλές πρωτεΐνες, τότε τα πρωτεϊνικά αμινοξέα ανέρχονται σε 22.

Η ακολουθία αμινοξέων σε μια πρωτεΐνη καθορίζεται από ένα γονίδιο και κωδικοποιείται κατά τον γενετικό κώδικα DNA. Παρόλο που ο γενετικός κώδικας κωδικοποιεί 20 αμινοξέα, τα αμινοξέα που συνιστούν την πρωτεΐνη συχνά υφίστανται χημικές αλλαγές, προτού η πρωτεΐνη να μπορέσει να λειτουργήσει είτε στο κύτταρο είτε ως τμήμα των μηχανισμών ελέγχου.

Εκτός από τα 22 πρωτεϊνικά υπάρχουν και άλλα παράγωγα αμινοξέων όπως: η 6-N-μεθυλολυσίνη, το γ-καρβοξυ-γλουταμινικό οξύ, η κυστίνη, η δεσμοσίνη. Από τα 300 μη πρωτεϊνικά, αλλά με σημαντικές βιολογικές δράσεις είναι ο νευρομεταβιβαστής γ-αμινοβουτυρικό οξύ, η ορνιθίνη, η κιτρουλίνη, η ομοκυστεΐνη και η βεταΐνη.

Σε φυσιολογικό pH, όλα τα αμινοξέα έχουν θετικό και αρνητικό φορτίο (πλησίον του 7).

Όλα τα αμινοξέα που συνθέτουν τις πρωτεΐνες είναι α-αμινοξέα (δηλαδή έχουν μια NH₂ στο α-άτομο C). Με το α-άτομο C συνδέεται το υπόλειμμα, η ρίζα R, που προσδίδει την «προσωπικότητα» σε κάθε αμινοξύ (Εικόνα 4.1).



Εικόνα 4.1 Δομή αμινοξέος.

4.1.1 Είδη αμινοξέων

Τα ΑΟ ταξινομούνται ανάλογα με την πολικότητα του υπολείμματος (ρίζα R) στις εξής κατηγορίες (σε παρένθεση αναγράφεται η κύρια βιολογική τους δράση):

I. ΑΟ με άπολες R $-(CH_2)_n-CH_3$

- Αλανίνη (υπόστρωμα της αμινοτρανφεράσης, ALT),
- Βαλίνη (απαραίτητο αμινοξύ =A),
- Λευκίνη (A),
- Ισολευκίνη (A),
- Προλίνη (συστατικό κολλαγόνου, ελαστίνης),
- Φαινυλαλανίνη (A, αυξημένο στη φαινυλοκετονουρία),
- Τρυπτοφάνη (A, πρόδρομη ουσία σεροτονίνης, μελατονίνης, μεταβολίτες της είναι αυξημένοι σε καρκίνο).
- Μεθειονίνη (A, μεταφορά μεθυλομάδων, προμηθευτής θείου).

II. ΑΟ με πολικές R (μη ιονισμένες) (Δημιουργούν δεσμούς H)

- Γλυκίνη (στη βιοσύνθεση πουρινών, πορφυρινών και ως ρυθμιστικό διάλυμα in vitro),
- Σερίνη (συστατικό ενεργού κέντρου πολλών ενζύμων),
- Θρεονίνη (A),
- Κυστεΐνη (μοριακή γέφυρα πεπτιδίων, έχει έναν άνθρακα λιγότερο της ομοκυστεΐνης, παράγοντα αγγειοπάθειας κλπ.),
- Τυροσίνη (ενδιάμεσο στη σύνθεση κατεχολαμινών, θυροξίνης, μελανίνης),
- Ιστιδίνη (σημαντικό ρυθμιστικό σε φυσιολογικές τιμές pH),
- Ασπαραγίνη (απαραίτητη δομή για την αποθήκευση αμμωνίας στους ιστούς),
- Γλουταμίνη (ομοίως, για τη βιοσύνθεση πουρίνης, πυριμιδίνης).

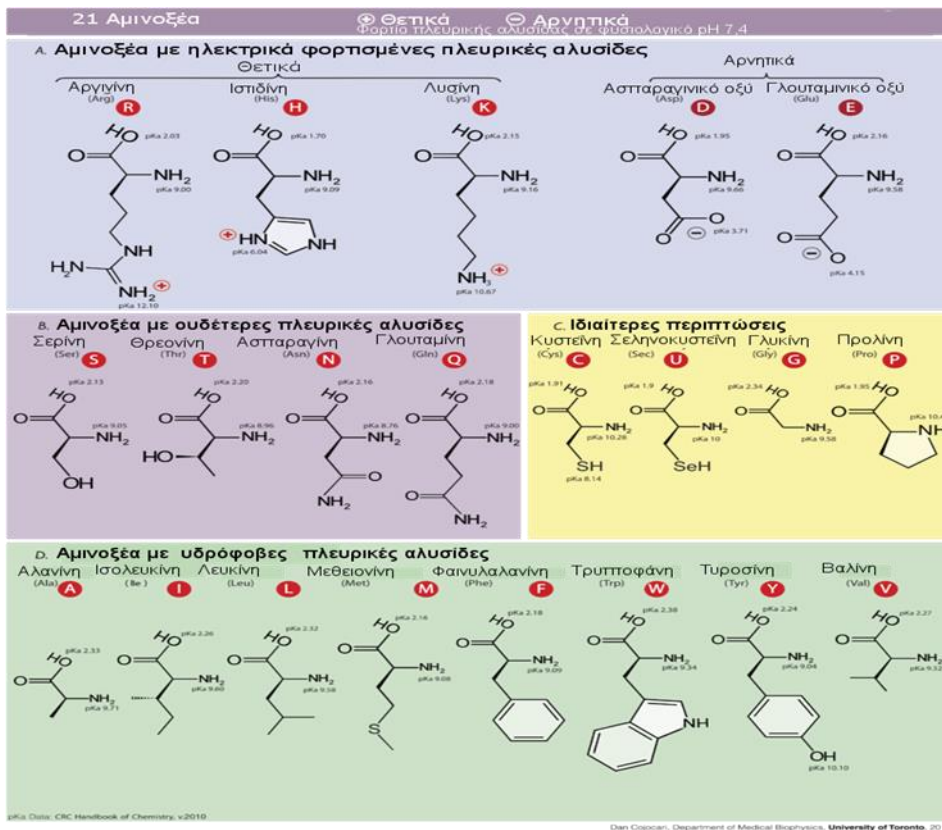
III. ΑΟ με πολικές αρνητικά φορτισμένες R

- Ασπαρτικό (υπόστρωμα με γλυκόζη για ασπαρτική τρανσαμινάση, AST),
- Γλουταμικό (υπόστρωμα με αλανίνη για ALT).

IV. ΑΟ με πολικές θετικά φορτισμένες R

- Λυσίνη (A, με ακραία αμινομάδα)
- Αργινίνη (στη σύνθεση ουρίας)

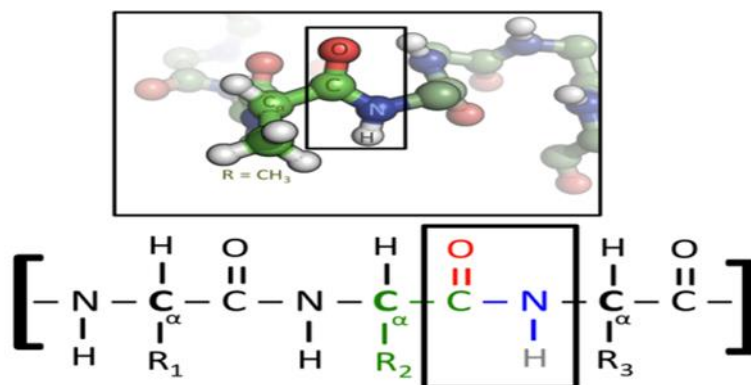
Τα 10 απαραίτητα (θεμελιώδη) ΑΟ δεν μπορεί να τα συνθέσει ο οργανισμός. Στην Εικόνα 4.2 φαίνονται οι συντακτικοί χημικοί τύποι 21 πρωτεϊνικών αμινοξέων:



Εικόνα 4.2 Χημικές δομές αμινοξέων ανά κατηγορία.

4.1.2 Πεπτιδικός δεσμός

Η σημαντικότερη ιδιότητά τους είναι ότι σχηματίζουν τον λεγόμενο πεπτιδικό δεσμό, που οδηγεί στον σχηματισμό πεπτιδίων-πρωτεϊνών. Ο πεπτιδικός δεσμός δημιουργείται μεταξύ δύο αμινοξέων με συμπύκνωση των αμινοξέων και απόσπαση ενός μορίου νερού το οποίο προέρχεται από το υδροξύλιο της καρβοξυλομάδας του ενός αμινοξέος και το ένα υδρογόνο της αμινομάδας ενός άλλου αμινοξέος (Εικόνα 4.3).



Εικόνα 4.3 Πεπτιδικός δεσμός.

Όπως όλοι οι αμιδικοί δεσμοί, έτσι και ο πεπτιδικός, σταθεροποιείται λόγω μεσομέρειας και είναι ως εκ τούτου επίπεδος. Έχει, επίσης, χαρακτήρα διπλού δεσμού και είναι άκαμπτος. Μια περιστροφή γύρω από τον C-N είναι δυνατή μόνο με προσφορά ενέργειας. Η ημιακαμψία του πεπτιδικού δεσμού επηρεάζει σημαντικά τον τρόπο αναδίπλωσης των πεπτιδίων και πρωτεϊνών, που προκύπτουν.

Ο πεπτιδικός δεσμός λύεται κάτω από κατάλληλες συνθήκες, οπότε με την προσθήκη ενός μορίου νερού το υδροξύλιο και το υδρογόνο επανέρχονται αντίστοιχα στο καρβοξύλιο και στην αμινομάδα από όπου

και αποσπάστηκαν. Η λύση αυτή του πεπτιδικού δεσμού, η υδρόλυση, γίνεται στον βιολογικό κόσμο με τη δράση, κυρίως, ενζύμων και γενικά με την επίδραση αραιών διαλυμάτων οξέων ή βάσεων.

4.1.3 Διαλυτότητα, οξεοβασική συμπεριφορά

Οι πρωτεΐνες, όπως και τα αμινοξέα, είναι αμφολύτες και έχουν καθορισμένα ισοηλεκτρικά σημεία (pI). Όταν στα διαλύματα των πρωτεϊνών με pH διαφορετικό από το pI εφαρμοστεί διαφορά δυναμικού, τα φορτισμένα σωματίδια οδεύουν προς τον πόλο που είναι αντίθετου ηλεκτρικού φορτίου. Στην αρχή αυτήν στηρίζεται η μέθοδος της ηλεκτροφόρησης των πρωτεϊνών η οποία αποτελεί μία από τις κύριες μεθόδους διαχωρισμού τους. Η γνώση του ισοηλεκτρικού σημείου κατευθύνει το κλινικοβιοχημικό εργαστήριο στην επιλογή των απαραίτητων συνθηκών για τον ηλεκτροφορητικό διαχωρισμό των πρωτεϊνών, π.χ. η ηλεκτροφόρηση σε pH 7.0 θα διαχωρίσει 2 μόρια με τιμές ισοηλεκτρικού σημείου (pI) 6.0 και 8.0, αφού στη συγκεκριμένη τιμή pH, το μόριο με pI 6.0 φέρει θετικό καθαρό φορτίο και το μόριο με pI 8.0 φέρει αρνητικό καθαρό αρνητικό φορτίο.

Η μέση πυκνότητα των πρωτεϊνών είναι 1.33g/mL και το μοριακό βάρος τους κυμαίνεται από λίγες χιλιάδες μέχρι μερικά εκατομμύρια daltons. Το ιξώδες των πρωτεϊνικών διαλυμάτων είναι πολύ υψηλό σε διαλύματα ινωδών πρωτεϊνών, όπως είναι το κολλαγόνο και πολύ μικρότερο σε διαλύματα σφαιρικών πρωτεϊνικών μορίων.

Η διαλυτότητα των πρωτεϊνών εξαρτάται από το είδος της πρωτεΐνης, το διαλυτικό μέσο, την περιεκτικότητά του σε άλατα και το pH του. Στο ισοηλεκτρικό σημείο της πρωτεΐνης, η διαλυτότητά της είναι η ελάχιστη και αρχίζει να αυξάνεται όσο απομακρύνεται από αυτό η οξύτητα ή η αλκαλικότητα του διαλύματος. Η διαλυτότητα επηρεάζεται από την παρουσία ουδέτερων αλάτων και με τη χρήση αλάτων όπως το θειικό νάτριο ή το θειικό αμμώνιο, οι πρωτεΐνες μπορούν να καταβυθιστούν από το διάλυμα. Η τεχνική αυτή λέγεται *εξαλάτωση των πρωτεϊνών* και βοηθά στον διαχωρισμό τους.

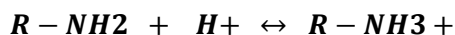
Οι πρωτεΐνες σε όξινο περιβάλλον συμπεριφέρονται ως κατιόντα και κατ' αυτόν τον τρόπο μπορούν να σχηματίσουν άλατα, π.χ. με τριχλωροξικό οξύ (χρησιμοποιείται για τη καταβύθιση πρωτεϊνών σε βιολογικά υγρά). Στο ανιόν του τριχλωροξικού οξέος (CCl_3COO^-) η πρωτεΐνη ως θετικά φορτισμένη σχηματίζει το αντίστοιχο άλας.

Επειδή το μέγεθος των πρωτεϊνικών μορίων είναι μεγάλο, η διέλευσή τους δεν είναι ελεύθερη μέσα από ημιπερατές μεμβράνες, όπως είναι σχεδόν το σύνολο των βιολογικών μεμβρανών που επιτρέπουν την ελεύθερη διέλευση μικρών μορίων όπως είναι το νερό, τα ιόντα και μερικές άλλες ενώσεις.

Όταν ένα πρωτεϊνικό διάλυμα διαχωρίζεται από καθαρό νερό με μία τέτοια μεμβράνη, επειδή η συγκέντρωση του νερού είναι διαφορετική στις δύο πλευρές της μεμβράνης, τα μόρια του νερού θα κινηθούν προς την κατεύθυνση εξίσωσης των συγκεντρώσεών του. Η τάση που πρέπει να εφαρμοστεί στο διάλυμα ώστε να σταματήσει αυτή η μετακίνηση είναι η ωσμωτική πίεση. Η ωσμωτική πίεση ενός διαλύματος είναι συνάρτηση του αριθμού των σωματιδίων που υπάρχουν μέσα σε αυτό και η μέτρηση της ωσμωτικής πίεσης που προκαλείται από ορισμένη ποσότητα διαλυμένης ουσίας μπορεί να οδηγήσει στον προσδιορισμό του μοριακού βάρους της ουσίας. Τα διαλύματα που διαχωρίζονται από μία ημιπερατή μεμβράνη και έχουν την ίδια ωσμωτική πίεση σε κάθε πλευρά της μεμβράνης ονομάζονται *ισοτονικά διαλύματα*.

Σε όξινα διαλύματα, όταν το pH είναι μικρότερο από 4, οι ομάδες $-\text{COO}^-$ συνδυάζονται με ιόντα υδρογόνου (H^+) και έτσι μετατρέπονται σε μη φορτισμένη μορφή ($-\text{COOH}$). Σε αλκαλικά διαλύματα, σε pH άνω του 9, οι ομάδες αμμωνίου ($-\text{NH}_3^+$) χάνουν ένα ιόν υδρογόνου και μετατρέπονται σε αμινομάδες ($-\text{NH}_2$). Στην περιοχή pH μεταξύ 4 και 8, τα αμινοξέα μεταφέρουν τόσο θετικό όσο και αρνητικό φορτίο και ως εκ τούτου δεν μεταναστεύουν σε ηλεκτρικό πεδίο. Τέτοιες δομές έχουν χαρακτηριστεί ως διπολικά ιόντα ή διπολικά (δηλαδή υβριδικά ιόντα).

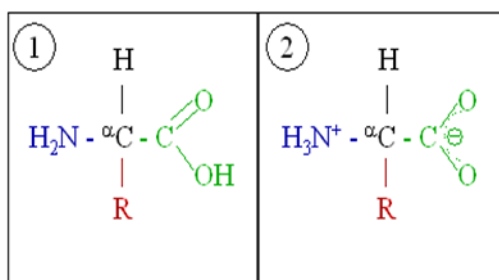
Η καρβοξυλομάδα είναι δότης πρωτονίων και η αμινομάδα είναι δέκτης πρωτονίων, δηλαδή η καρβοξυλομάδα συμπεριφέρεται ως οξύ και η αμινομάδα ως βάση. Το γεγονός αυτό έχει μεγάλη σημασία για τον διαχωρισμό και την πιστοποίηση των αμινοξέων.



Στο pH του αίματος που είναι 7.40, οι καρβοξυλομάδες έχουν εξιοντιστεί σχεδόν όλες προς COO⁻ και οι περισσότερες αμινομάδες είναι πρωτονιομένες ως NH₃⁺. Έτσι, το αμινοξύ εμφανίζεται με τις πολικές ομάδες του φορτισμένες και όχι ως RCH(NH₂)COOH, όπως συνήθως γράφεται ο τύπος για την ευκολία στη γραφή και τη γενική αναφορά στα αμινοξέα.

Η σύγχρονη αυτή ύπαρξη όξινων και βασικών ομάδων που ιοντίζονται εύκολα, δίνει την ιδιότητα του αμφολύτου στα αμινοξέα, δηλαδή συμπεριφέρονται και ως οξέα και ως βάσεις στα διαλύματά τους. Στην περίπτωση, όπου και οι δύο ομάδες είναι φορτισμένες, στο μόριο ενός αμινοξέος, όπου η R δεν είναι πολική, τότε το μόριο έχει συνολικό φορτίο μηδέν και συνιστά ένα δίπολο. Αυτό συμβαίνει, όταν το pH του διαλύματος έχει τέτοια τιμή που να επιτρέπει τον ίδιο εξιοντισμό των όξινων και των βασικών ομάδων του αμινοξέος.

Τα α-αμινοξέα, όταν βρίσκονται σε στερεή κατάσταση, απαντούν υπό τη μορφή εσωτερικών αλάτων (επαμφοτερίζον ιόν, μορφή αμφολύτου, Zwitterion) (Εικόνα 4.4).

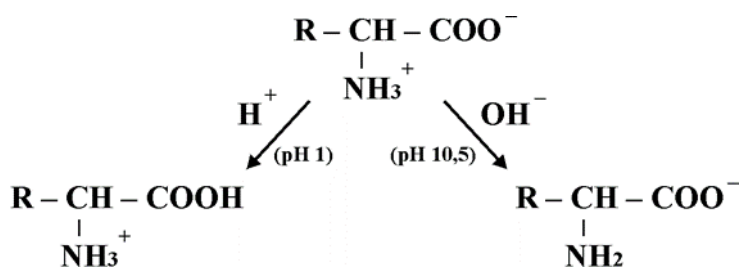


Εικόνα 4.4 Μορφές Zwitterion.

Η ίδια μορφή απαντά και σε υδατικό διάλυμα. Αν η ομάδα R είναι και αυτή ιονιζόμενη, συμβάλλει στο συνολικό φορτίο του ΑΟ.

4.1.4 Ισοηλεκτρικό σημείο (pI)

Είναι το pH στο οποίο το ΑΟ συμπεριφέρεται ως δίπολο ιόν, δεν μετακινείται δηλαδή ούτε προς το θετικό ούτε προς το αρνητικό ηλεκτρόδιο. Στην περίπτωση αυτήν, η μορφή Zwitterion απαντά σχεδόν εξολοκλήρου με ελάχιστες αλλά ακριβώς ίσες ποσότητες των δύο μορφών (Εικόνα 4.5).



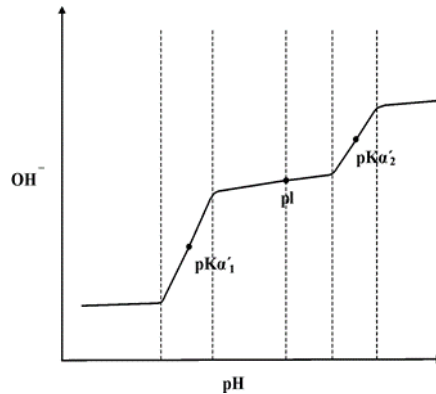
Εικόνα 4.5 Μορφή Zwitterion.

Στην περίπτωση αυτήν, επειδή υπάρχουν 2 τιμές pKa, όπως φαίνεται και στο Σχήμα 4.1, το ισοηλεκτρικό σημείο ισούται με:

$$pH = \frac{pKa_1 + pKa_2}{2} \quad (4.1)$$

όπου,
pKa₁ = α-καρβοξυλομάδας, pKa₂ = α-αμινομάδας.

Στο pI: PH = pKa



Σχήμα 4.1 Υπολογισμός του ισοηλεκτρικού σημείου.

4.1.5 Οπτική ισομέρεια

Σε όλα τα αμινοξέα εκτός της γλυκίνης, το άτομο του άνθρακα στη θέση-2 ως ασύμμετρο έχει τέσσερις διαφορετικούς υποκαταστάτες. Σε ένα τέτοιο χειραλικό κέντρο, είναι δυνατές δύο διαφορετικές στερεοδιαμορφώσεις των υποκαταστατών, που συμπεριφέρονται μεταξύ τους ως εικόνα και είδωλο (εναντιομερή).

Οι συνέπειες ενός τέτοιου μορίου είναι ότι:

- Στρέφουν το επίπεδο του πολωμένου φωτός.
- Ύπαρξη οπτικής ισομέρειας (εναντιομερείς μορφές).
- Δυνατότητα ή όχι αντίδρασης μεταξύ εναντιομερών (οπτικοί αντίποδες).

Ρακεμικό μείγμα (δεν στρέφει το φως) είναι το ισομοριακό μείγμα 2 οπτικών αντιπόδων. Το φαινόμενο της εναντιομέρειας οφείλεται στην τετραεδρική διάταξη του C.

4.1.6 Κατάταξη πρωτεϊνών

A. Δομική

Οι πρωτεΐνες με βάση τη δομή τους διακρίνονται σε:

- Ινώδεις (δομικές - τριτοταγής δομή).
- Σκληρές αδιάλυτες στο H₂O (κολλαγόνο, α-κερατίνες).
- Σφαιρικές (λειτουργικές - τεταρτοταγής δομή). Χαρακτηρίζονται από πλαστικότητα λόγω ασθενών δεσμών, π.χ. ένζυμα, πρωτεΐνες μεμβράνης, αιμοσφαιρίνη.

B. Χημική

1. Απλές πρωτεΐνες

- Ινώδεις ή σκληροπρωτεΐνες (κερατίνες, κολλαγόνα, ελαστίνη).
- Σφαιρικές (αλβουμίνες, σφαιρίνες, ιστόνες, πρωταμίνες κ.ά.).

2. Συνδεδεμένες πρωτεΐνες

- Νουκλεοπρωτεΐνες (με RNA και DNA, απαντούν στους ιούς και τα χρωμοσώματα).
- Λιποπρωτεΐνες (με λιπίδια, φορέας των λιπιδίων στο αίμα).
- Βλεννοπρωτεΐνες (με υδατάνθρακες, γ-σφαιρίνη, πρωτοταγών ομάδων αίματος, χοριακή γοναδοτροπίνη, ωχρινोटρόπος-θυρεοειδότροπος ορμόνη, πεψίνη κ.ά.).
- Φωσφοπρωτεΐνες (με φωσφορικές ομάδες, καζεΐνη).
- Φλαβοπρωτεΐνες (φλαβινο-αδενινονουκλεοτίδια).
- Μεταλλοπρωτεΐνες (χηλικές ενώσεις*, παραπρωτεΐνη, καρβονική ανυδράση, μεταλλοθειονίνη).

- Αιμοπρωτεΐνες (με Fe, αιμοσφαιρίνη, μιοσφαιρίνη, κυτόχρωμα C, καταλάση, φερίτινη κ.ά.).

*Για να σχηματιστεί μια χηλική ένωση με ένα πεπτίδιο, πρέπει το μέταλλο να «χάσει» ένα μεγάλο τμήμα από την ενυδάτωσή του. Η ενυδάτωση είναι μεγαλύτερη στα μικρότερα ιόντα, που έχουν στο περιβάλλον τους τουλάχιστον 6 μόρια H₂O, π.χ. Na⁺(16) K⁺(10).

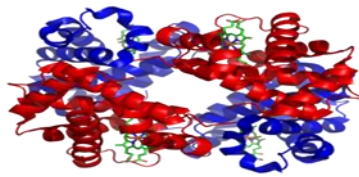
Ο σίδηρος της αιμοσφαιρίνης συνδέεται με τα άζωτα των πυρρολικών δακτυλίων, με το ιμιδαζόλιο μιας ιστιδίνης και το οξυγόνο στην οξυ-μιοσφαιρίνη.

Οι πρωτοταγείς δομές μιοσφαιρίνης-αιμοσφαιρίνης έχουν διαφορές, ενώ έχουν παρόμοιες τριτοταγείς και τεταρτοταγείς δομές.

Ο ανθρώπινος οργανισμός έχει 5-6 λίτρα αίμα με το 1/3-1/2 του όγκου του να αποτελείται από ερυθρά αιμοσφαίρια που δεν ζουν πάνω από 120 μέρες.

Κάθε mL αίματος μπορεί να μεταφέρει 20mL O₂, το 1/3 του οποίου παραμένει στους ιστούς.

Όταν η αιμοσφαιρίνη (Εικόνα 4.6) δεσμεύει το οξυγόνο, προκαλούνται αλλαγές στις τριτοταγείς και τεταρτοταγείς δομές της.



Εικόνα 4.6 Μόριο αιμοσφαιρίνης.

Γ. Λειτουργική

- 1Καταλυτικές πρωτεΐνες (ένζυμα, προένζυμα)
- Δομικές (κολλαγόνα, κερατίνες κλπ.)
Όταν οι τρίχες (κερατίνη) τεντωθούν ή υποστούν κατεργασία με θερμό ατμό επιμηκύνονται στο διπλάσιο μήκος λόγω θραύσης των δεσμών S-S. Στην περίπτωση αυτή μεταπίπτουν από α-έλικα σε β-διαμόρφωση (permanent μαλλιών). Στη συνέχεια, με το στέγνωμα (sechoir) προκαλείται εκ νέου θραύση-επαναδημιουργία δεσμών θείου με αποτέλεσμα η τρίχα να επανέρχεται στην αρχική της μορφή.
- Συσταλτικές (μιοσίνη, ακτίνη μυών).
- Πρωτεΐνες μεταφοράς (αιμοσφαιρίνη, πρωτεΐνες ορού κ.ά.).
- Γενετικές (νουκλεοπρωτεΐνες).
- Ορμονικές ή ρυθμιστικές (ινσουλίνη, FSH, ACTH κ.ά.).
- Αποθηκευτικές (αποφερίτινη, μεταλλοθειονίνη κ.ά.).
- Ανοσοπρωτεΐνες* (αμυντικές) (IgG, IgA κλπ., που περιέχονται στις γ-σφαιρίνες (ανοσοσφαιρίνες). Η IgG, καλείται συχνά και γάμμα σφαιρίνη.

Το ανθρώπινο ανοσοποιητικό σύστημα (ΑΣΣ), που αποτελεί την άμυνα του οργανισμού στα βακτήρια, ιούς κ.ά. ουσίες (αντιγόνα), υποστηρίζεται από τα κυκλοφορούντα στο αίμα αντισώματα.

Αντιγόνο. Κάθε ουσία που διεγείρει την παραγωγή αντισωμάτων.

Αντίσωμα. Οι πρωτεΐνες (ανοσοσφαιρίνες), που παράγονται από το ΑΣΣ.

Πεπτίδια με βιολογική-τοξική δράση

Αγγειοτασίνη I και II (ο ισχυρότερος πρωτεϊνικής προέλευσης υπερτασικός παράγοντας).

Αντιβιοτικά: πενικιλίνη, ακτινομυκίνη, γραμισιδίνη S, πολυμυξίνη B1.

Ορμόνες: ωκυτοκίνη, πιτρεσσίνη (αντιδιουρητική), ACTH (αδρενοκορτικοτρόπος).

Δηλητήρια: αμανιτίνη, φαλλοιδίνη (μανιτάρια), δηλητήριο μελισσών, φιδιών, ενεργές ουσίες μεδουσών.

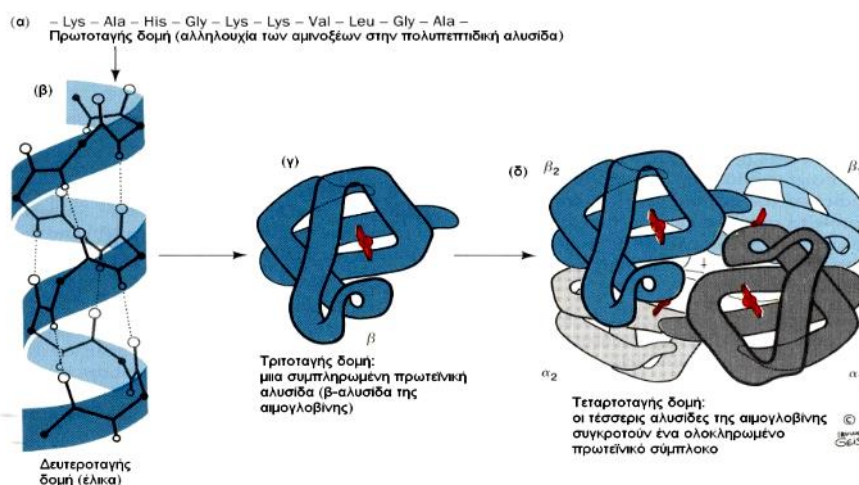
4.2 Μέθοδοι προσδιορισμού συνολικών πρωτεϊνών

1. Η μάζα των συνολικών περιεχομένων πρωτεϊνών σε στερεά δείγματα φυσικών προϊόντων, π.χ. σε διάφορα τρόφιμα, όπως αλεύρι, σκόνη γάλακτος κ.ά. γίνεται συνήθως με τη μέθοδο Kjeldhal κατά την οποία οι πρωτεΐνες υπολογίζονται έμμεσα μετά από πλήρη “καύση” τους και με υπολογισμό του περιεχόμενου αζώτου σ' αυτές με ογκομέτρηση ενός προκύπτοντος αμμωνιακού διαλύματος. Η μέθοδος είναι γενική, ακριβής και σχετικά ταχεία, αλλά έχει το μειονέκτημα ότι απαιτούνται σχετικά μεγάλες ποσότητες δείγματος, περίπου 1 g, το οποίο καταστρέφεται τελείως.
2. Άλλος τρόπος προσδιορισμού γίνεται με φασματοφωτομετρικές μεθόδους με τις οποίες ανιχνεύονται από 1-10 mg έως και 5-10 μg πρωτεϊνών. Οι μέθοδοι αυτές εφαρμόζονται σε διαλύματα καθαρών δειγμάτων πρωτεϊνών ή για ξηρά καθαρά δείγματα τα οποία μπορούν να διαλυτοποιηθούν. Οι πρωτεΐνες στο διάλυμα μετατρέπονται με κατάλληλες αντιδράσεις σε έγχρωμα παράγωγα τα οποία στη συνέχεια φωτομετρούνται σε καθορισμένα μήκη κύματος, π.χ. 255, 280 nm και η συγκέντρωση προκύπτει από τη σύγκριση των τιμών απορρόφησης με αυτές προτύπων διαλυμάτων πρωτεϊνών, βάσει των οποίων έχουν κατασκευαστεί πρότυπες καμπύλες αναφοράς. Οι πλέον εν χρήσει μέθοδοι φωτομέτρησης με τις αντίστοιχες χρωστικές αντιδράσεις τους είναι η μέθοδος “διουρίας” (“biuret”), η μέθοδος Lowry (αντίδραση Folin-Ciocalteu) και η μέθοδος σουλφουσαλικυλικού οξέος (διαζωχρώματος).
3. Οι πρωτεΐνες στα ούρα προσδιορίζονται με το λευκωματόμετρο Esbach με το οποίο προσδιορίζεται το νεφέλωμα που προκαλούν στα ούρα οι νιφάδες των πρωτεϊνών (της αλβουμίνης) που δημιουργούνται κατά την προσθήκη στα ούρα, μέσα από οξίνισή τους με οξικό οξύ, του αντιδραστήριου Esbach (διάλυμα μείγματος πικρικού και κιτρικού οξέος)

Για ακριβείς προσδιορισμούς πρέπει τα πρότυπα διαλύματα να έχουν παρασκευαστεί με απολύτως καθαρές, απαλλαγμένες από άλατα, πρωτεΐνες και ζυγισμένες επακριβώς στη στερεή τους μορφή. Το βάρος του ξηρού δείγματος μιας πρότυπης πρωτεΐνης λαμβάνεται μετά από ξήρανσή της υπό κενό, σε 50-1000°C, μέσα σε ξηραντήρα με το κατάλληλο ξηραντικό.

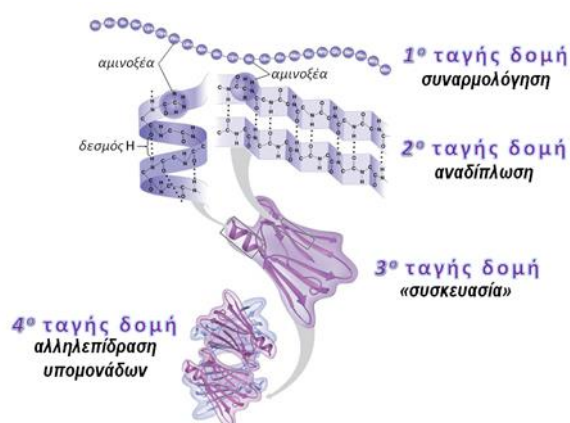
4.2.1 Δομές πρωτεϊνών - Μέθοδοι προσδιορισμού επιμέρους δομών πρωτεϊνών - Πρωτεϊνικές δομές

Επειδή στη φύση η δομή έπεται της λειτουργίας, ένα νέο πολυπεπτιδίο, που συντίθεται, για να μεταμορφωθεί (ωρίμανση) σε μια βιολογικά λειτουργική πρωτεΐνη (οστά, τένοντες, οδόντες), πρέπει να αναδιπλώνεται σε μια τριδιάστατη διαμόρφωση. Εκτός αυτής της ωρίμανσης κάποιες μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις μπορούν να προσθέσουν νέες χημικές ομάδες ή αφαίρεση πεπτιδικών τμημάτων. Οι κύριες πρωτεϊνικές δομές (δομική ιεραρχία), που περιγράφονται στη συνέχεια, φαίνονται στην Εικόνα 4.7.



Εικόνα 4.7 Δομική ιεραρχία πρωτεϊνών.

Η μελέτη των πεπτιδίων και των πρωτεϊνών είχε αρχίσει από τον 19ο αιώνα. Στις αρχές του 20ού έγινε δυνατή η εργαστηριακή σύνθεση πεπτιδίου με λίγα αμινοξέα από τον Emil Fischer, αλλά η πρώτη εργαστηριακή σύνθεση φυσικών πολυπεπτιδίων έγινε μόλις στις αρχές της δεκαετίας του 1950. Συγκεκριμένα, το 1953 ο V. Du Vigneaud και οι συνεργάτες του, συνέθεσαν τις πεπτιδικές ορμόνες βασοπρεσσίνη και ωκυτοκίνη. Στην Εικόνα 4.8. παρουσιάζονται οι δομές των πρωτεϊνών.



Εικόνα 4.8 Δομές πρωτεϊνών.

4.2.2 Πρωτοταγής δομή (Ala¹, Ser², Leu¹³⁰, Tyr¹³¹, Lys¹³²)

Ομοιοπολική δομή που χαρακτηρίζεται από τον αριθμό, το είδος και την αλληλουχία των αμινοξέων στην πεπτιδική αλυσίδα. Αρχίζει από την αμινομάδα (N - τελικό άκρο) του πρώτου και καταλήγει στην καρβοξυλική ομάδα του τελευταίου αμινοξέος στο C - τελικό άκρο (β-λακτοσφαιρίνη).

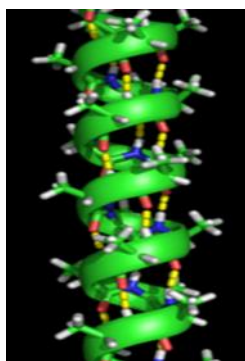
Αποτελεί το πρώτο επίπεδο οργάνωσης της πρωτεΐνης. Η ινσουλίνη αποτελείται από 2 πεπτιδικές αλυσίδες, υπήρξε η πρώτη πρωτεΐνη της οποίας αποκαλύφθηκε πλήρως η ακολουθία (1954).

Για να καθοριστεί η πρωτοταγής δομή ενός πεπτιδίου, χρειάζεται να γίνει η ταυτοποίηση των αμινοξέων του και να καθοριστεί η σειρά σύνδεσής τους στο μόριο. Αφού το πεπτίδιο υδρολυθεί με ένζυμα, οξέα ή αλκάλια, για να προκύψει μείγμα αμινοξέων, η ταυτοποίησή τους γίνεται με ποσοτική ανάλυση και με άλλες τεχνικές, όπως είναι η χρωματογραφία επί χάρτου, η χρωματογραφία στήλης, η αέριος χρωματογραφία.

4.2.3 Δευτεροταγής δομή (α-έλικα, β-δομή)

Οι αλυσίδες των πρωτεϊνών (στο H₂O, δηλαδή στον οργανισμό) μετά από μελέτες κρυσταλλογραφίας (ακτίνες X) βρέθηκε ότι απαντούν σε δύο μορφές:

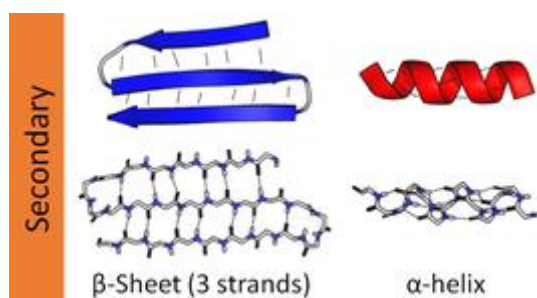
α-έλικα: (L. Pauling-J.W.Gibbs). Είναι η πιο διαδεδομένη δευτεροταγής δομή (α-κερατίνη, κολλαγόνο), σταθεροποιείται με δεσμούς Η μεταξύ -COOH και NH₂ παράλληλους με τον άξονα της έλικας. Η α-έλικα διακόπτεται από προλίνη, τρυπτοφάνη κ.ά. Εμφανίζεται υπό μορφή ελατηρίου ή κλίμακας (Εικόνα 4.9). Η πλήρης περιστροφή της έλικας αντιστοιχεί σε 3.6 αμινοξέα (δηλαδή κάθε ΑΟ αντιστοιχεί σε περιστροφή 100°). Η κάθετη απόσταση μεταξύ δύο διαδοχικών περιελίξεων είναι 5.1 Å. Οι δεσμοί Η γίνονται μεταξύ ομάδων της ίδιας πολυπεπτιδικής αλυσίδας. Στον σχηματισμό της α-έλικας σημαντικό ρόλο παίζουν οι πλευρικές αλυσίδες, το μέγεθος και η πολικότητά τους. Η απουσία τέτοιων αλυσίδων ευνοεί την πλήρη περιστροφή του πεπτιδικού δεσμού, η οποία οδηγεί σε αδυναμία σταθεροποίησης της α-έλικας.



Εικόνα 4.9 Δεσμοί υδρογόνου για τη διαμόρφωση της α-έλικας.

β-δομή ή β-διαμόρφωση: Εμφανίζεται υπό πριονωτή μορφή (λόγω τετραεδρικής διάταξης των C και N) ή β-έλασμα ή πεπτιδική σχάρα ή πτυχωτή επιφάνεια ή φύλλο (Εικόνα 4.10).

Εδώ οι δεσμοί H σχηματίζονται μεταξύ >NH και >C=O με >C=O και >NH άλλης αλυσίδας. Ο πεπτιδικός δεσμός βρίσκεται στο επίπεδο, ενώ τα α-άτομα C βρίσκονται στις γωνίες και οι ομάδες R κάθετα προς τις γωνίες εκτεινόμενες προς τα άνω, εναλλάξ κατά τη διαδρομή της αλυσίδας.



Εικόνα 4.10 β – δομή.

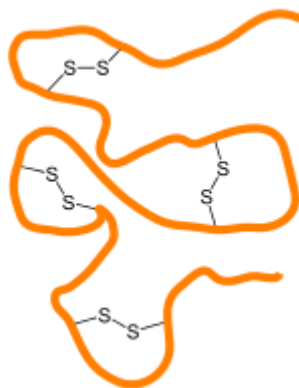
Η διαμόρφωση του εάν θα έχουμε α-έλικα ή β-δομή εξαρτάται από τον χαρακτήρα της ομάδας R (πολική, μη πολική, θετικά ή αρνητικά φορτισμένη). Άλλες διαμορφώσεις της δευτεροταγούς δομής είναι η β-καμπή και η Ω-καμπή.

4.2.4 Τριτοταγής δομή

Χαρακτηρίζεται από αναδίπλωση ολόκληρης της πεπτιδικής αλυσίδας στον χώρο και είναι γενετικά προκαθορισμένη. Σήμερα, είναι γνωστή η στερεοδιαμόρφωση εκατοντάδων πρωτεϊνών. Στη διάταξη αυτή συμβάλλουν οι διθειογέφυρες (S-S), η σουλφυδρυλομάδα -SH της κυστεΐνης, οι δεσμοί H και οι ετεροπολικοί δεσμοί (Εικόνα 4.11). Ακόμη, οι δυνάμεις Van der Waals και οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις παίζουν σημαντικό ρόλο στην υπέρμετρα άκαμπτη δομή της.

Οι υδρόφιλες R των ΑΟ συνήθως βρίσκονται στην εξωτερική «επιφάνεια» των πρωτεϊνών, ενώ οι υδρόφοβες R (λιπόφιλες) προς τα μέσα.

Αντίθετα, οι πρωτεΐνες που συμμετέχουν στον σχηματισμό των βιολογικών μεμβρανών φέρουν τις υδρόφοβες ομάδες τους προς τα έξω, σχηματίζοντας έτσι υδρόφοβους δεσμούς με τα λιπίδια της μεμβράνης και με τον τρόπο αυτόν οι πρωτεΐνες «γαντζώνονται» στη μεμβράνη. Οι αναδιπλώσεις έχουν ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό των σφαιρικών πρωτεϊνών.



Εικόνα 4.11 Δεσμοί θείου στην πρωτεϊνική αλυσίδα.

Για τον καθορισμό της τρισδιάστατης πρωτεϊνικής δομής, χρησιμοποιούνται συνήθως η κρυσταλλογραφία με ακτίνες X και η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (Nuclear Magnetic Resonance, NMR).

4.2.5 Τεταρτοταγής δομή

Χαρακτηρίζεται από τη συνένωση όμοιων ή ανόμοιων πρωτεϊνικών υπομονάδων για τον σχηματισμό ολιγομερών ή και πολυμερών με μεγαλύτερο αριθμό υπομονάδων (π.χ. αιμοσφαιρίνη) και θεωρείται ως υψηλότερο επίπεδο οργάνωσης μιας πρωτεΐνης.

Οι ιδιαιτερότητες που απαντούν στην τεταρτοταγή δομή είναι:

- Οι υπομονάδες δεν συνδέονται συνήθως με ομοιοπολικούς δεσμούς αλλά με ασθενείς δεσμούς (υδρόφοβες ή ηλεκτροστατικές).
- Η βιολογική σημασία της πρωτεΐνης εξαρτάται από την κατάλληλη σύνδεση, χωροδιάταξη αλλά και την παρουσία όλων των υπομονάδων, που την αποτελούν. Σε αυτή τη δομή οφείλονται ο αλλοστερισμός και η ύπαρξη ισοενζύμων.

Οι ασθενείς δεσμοί έχουν την τάση να διασπώνται σε χαμηλές θερμοκρασίες. Έτσι, το ένζυμο ΑΤΡάση, ενώ στους 20°C έχει MB περ. 280.000, στους 5°C διασπάται σε μικρότερες υπομονάδες μέσου MB 47.000. Η ινσουλίνη σχηματίζει, επίσης, τεταρτοταγείς δομές.

Ορισμένα πρωτεϊνικά μόρια που είναι πολύπλοκα και περιέχουν περισσότερες από δύο πρωτεϊνικές αλυσίδες, έχουν ανώτερο επίπεδο οργάνωσης που καλείται *τεταρτοταγής δομή της πρωτεΐνης* και αναφέρεται στον τρόπο με τον οποίο το πολυμερές μόριο συντίθεται από όμοια ή διαφορετικά μονομερή ή ολιγομερή.

4.2.6 Πεμπτοταγής δομή

Μείγματα πρωτεϊνικών μορίων (ενζύμων) άλλων σε τριτοταγή και άλλων σε τεταρτοταγή δομή, που έχουν διαφορετική ενζυμική δράση το καθένα, είναι δυνατόν να σχηματίσουν σύμπλεγμα, που εξυπηρετεί συγκεκριμένο στόχο με ελεγχόμενο ρυθμό, π.χ. πολυενζυμικά συστήματα για την κατάλυση διαδοχικών υποστρωμάτων.

Η σύνδεση των μορίων στο σύμπλεγμα γίνεται με ασθενείς δεσμούς, όπως στην τεταρτοταγή δομή. Συνιστά σημαντικό συντελεστή της κανονικής πορείας του μεταβολισμού.

4.2.7 Προσδιορισμός των επιμέρους δομών μιας πρωτεΐνης

Ο άμεσος προσδιορισμός των υπομονάδων μιας πρωτεΐνης μπορεί να γίνει με δύο μεθόδους. Πρώτον, με κρυσταλλογραφική ανάλυση με ακτίνες X (Eisenberg, 1970) και δεύτερον με ηλεκτρονική μικροσκοπία των μορίων της πρωτεΐνης με χρήση αρνητικής χρώσης (Haschemeyer, 1970).

Οι πρωτεϊνικές υπομονάδες, επίσης, προσδιορίζονται και έμμεσα με προσεκτικό προσδιορισμό του συνολικού MB και στη συνέχεια γίνεται διάσπαση της πρωτεΐνης στις επιμέρους υπομονάδες της με ειδικά αντιδραστήρια αποδιάταξης (denaturation). Τέτοια αντιδραστήρια αποδιάταξης είναι η ουρία και η

υδροχλωρική γουανιδίνη τα οποία καλούνται χαοτροπικά (chaotropic), επειδή θεωρείται ότι καταστρέφουν τους εσωτερικούς δεσμούς υδρογόνου της πρωτεΐνης σχηματίζοντας τα ίδια παρόμοιους ανταγωνιστικούς δεσμούς, δημιουργώντας ένα είδος εσωτερικού “χάους” στην πρωτεϊνική δομή, το οποίο τελικά οδηγεί στην αποδιάταξη των ανώτερων δομών, 3οταγούς και 4οταγούς. Στη συνέχεια, προσδιορίζεται επακριβώς και το MB των υπομονάδων και έτσι εξάγονται συμπεράσματα για τη συνολική δομή, π.χ. την τεταρτοταγή, της πρωτεΐνης. Ο αριθμός των υπομονάδων είναι συνήθως ένας μικρός και ζυγός αριθμός και ο συνδυασμός τους δίνει τη συνολική 4οταγή δομή.

Άλλα αντιδραστήρια αποδιάταξης είναι διάφορα αντιδραστήρια απορρυπαντικής δράσης με κυριότερο το δωδεκανοϊκό θειικό νάτριο (sodium dodecyl sulfate, SDS), το οποίο δεσμεύεται ισχυρά με το υδρόφοβο άκρο του στα τελικά άκρα της πεπτιδικής αλυσίδας και τις μετατρέπει σε ισχυρά αρνητικά φορτισμένες ραβδοειδείς δομές με προφανή καταστροφή της 2οταγούς δομής. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την πλήρη αποδιάταξη της πρωτεΐνης και τον διαχωρισμό της σε πολυπεπτιδικές αλυσίδες δεσμευμένες στο SDS. Στη συνέχεια, τα SDS-παράγωγα μπορούν να προσδιοριστούν κατά είδη ανάλογα με το MB τους με την τεχνική της ηλεκτροφόρησης και έτσι αποκαλύπτονται οι εσωτερικοί δεσμοί και το είδος των υπομονάδων μιας πρωτεΐνης.

4.2.8 Προσδιορισμός της πρωτοταγούς δομής μιας πρωτεΐνης

Για την πλήρη διευκρίνιση της δομής μιας πρωτεΐνης πρέπει να καθοριστεί και η πρωτοταγής δομή της, δηλαδή η ακριβής αλληλουχία των αμινοξέων στα πεπτίδια της μονάδας της ή των υπομονάδων της που έχουν προκύψει από την αποδιάταξη μιας ανώτερης δομής.

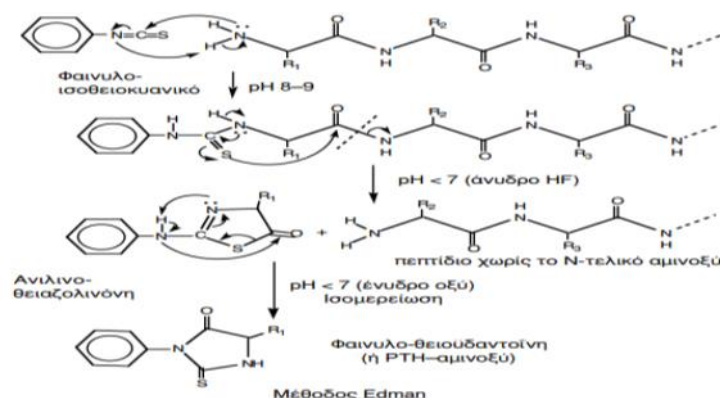
Η εργαστηριακή αποκωδόμηση μιας πρωτεΐνης ή ενός πεπτιδίου γίνεται με διάφορες χημικές μεθόδους από τις οποίες αναφέρεται μία χαρακτηριστική, η μέθοδος Edman.

Η πλήρης αλληλουχία των αμινοξέων μιας πρωτεΐνης γίνεται με τη μέθοδο Edman, η οποία περιγράφεται στην Εικόνα 4.12.

Το φαινυλο-ισοθειοκυανικό σε pH 8-9 δεσμεύεται στην τελική αμινομάδα και σε όξινο pH αποσπάται το τελικό αμινοξύ ως υποκατεστημένη θειοϋδαντοΐνη η οποία ισομερίζεται προς φαινυλοθειοϋδαντοΐνη η οποία μπορεί να απομονωθεί με χρωματογραφία και έτσι να ταυτοποιηθεί το δεσμευμένο αμινοξύ. Στη συνέχεια, επαναλαμβάνεται η αντίδραση και αποσπάται ως παράγωγο το προτελευταίο αμινοξύ κ.ο.κ. μέχρις ότου ταυτοποιηθούν όλα τα αμινοξέα του πεπτιδίου.

Με τη μέθοδο Edman δεν απαιτείται υδρόλυση, όπως στη μέθοδο Sanger, για την απόσπαση του παραγώγου από την πεπτιδική αλυσίδα και έτσι το υπόλοιπο πεπτίδιο παραμένει ακέραιο για τη συνέχιση της αντίδρασης.

Η μέθοδος Edman αυτοματοποιημένη εφαρμόζεται με όργανα υψηλής τεχνολογίας, τους αυτόματους αναλυτές αμινοξέων με τους οποίους προσδιορίζεται με πιστότητα και ταχύτητα η αλληλουχία των αμινοξέων.



Εικόνα 4.12 Μέθοδος Edman.

4.3. Μετουσίωση πρωτεϊνών

Η μεταβολή των δομών μιας πρωτεΐνης (εκτός της πρωτοταγούς) κατά την οποία χάνονται οι βιολογικές της ιδιότητες (ενζυμικές, ή ορμονικές) ονομάζεται *μετουσίωση* (π.χ. πήξιμο αυγού με το βράσιμο). Το φαινόμενο αυτό αντιστοιχεί στη μετάβαση από μια κατάσταση υψηλής τάξης στην κατάσταση αταξίας, στο καλούμενο *τυχαίο σπείραμα* (random coil).

Η παροχή ενέργειας με τη μορφή θερμότητας, ακτινοβολίας, υπερήχων, κρούσεων, καθώς και διάφοροι χημικοί παράγοντες, όπως τα οξέα, οι βάσεις, τα άλατα, οι δεσικές ύλες, οι οργανικοί διαλύτες, τα πυκνά διαλύματα ουρίας, τα απορρυπαντικά και άλλες ενώσεις, είναι παράγοντες που προκαλούν μετουσίωση. Οι τροφές με μετουσιωμένες πρωτεΐνες πέπτονται ευκολότερα και ταχύτερα υδρολύομενες από τα πρωτεολυτικά ένζυμα του πεπτικού συστήματος.

Συμπερασματικά, κατά τη μετουσίωση έχουμε μετάπτωση από μια οργανωμένη κατάσταση (χαμηλής εντροπίας, S) σε μια λιγότερο οργανωμένη ($\Delta S > 0$). Το φαινόμενο είναι ανάλογο της τήξης ενός κρυστάλλου.

Η μετουσίωση δεν είναι πάντα μη αντιστρεπτή (π.χ ριβονουκλεάση), απόδειξη ότι οι δευτεροταγείς-τριτοταγείς δομές εξαρτώνται από την πρωτοταγή.

Οι μεταλλάξεις είναι θανατηφόρες, όταν υπάρχει αλλαγή, τόσο στην πρωτοταγή όσο και στην τριτοταγή δομή, ενώ, όταν οι μεταλλάξεις είναι διαιωνιζόμενες, υπάρχει αλλαγή μόνο στην πρωτοταγή.

Όλες οι δομές στηρίζονται στην πρωτοταγή, κατά κύριο λόγο, δομή. Συχνά η αντικατάσταση ενός μόνο ΑΟ σε ορισμένες θέσεις μιας πεπτιδικής αλυσίδας, μπορεί να προκαλέσει γενικότερες δομικές μεταβολές. Π.χ. στη δρεπανοκυτταρική αναιμία (συχνά θανατηφόρος νόσος στους ομοζυγώτες) στη θέση-6 της β-αλυσίδας της αιμοσφαιρίνης αντί γλουταμικού, έχει την υδρόφοβο βαλίνη. Αυτή η αλλαγή προκαλεί ελάττωση της διαλυτότητας, με τάση για κρυστάλλωση, μέσα στο ερυθρό αιμοσφαίριο και συνεπώς την καταστροφή του. Γενετικές ή διατροφικές ανεπάρκειες ενδέχεται να εμποδίσουν την ωρίμανση των πρωτεϊνών, όπως για παράδειγμα στις νόσους Creutzfeldt-Jacob, Alzheimer, στην τρομώδη νόσο των προβάτων. Το σκορβούτο (από έλλειψη βιταμίνης C) αντιπροσωπεύει διατροφική ανεπάρκεια, που διαταράσσει την ωρίμανση των πρωτεϊνών.

Νόσος Creutzfeldt-Jacob (πολύμορφη εγκεφαλοπάθεια των βοοειδών, νόσος τρελών αγελάδων). Ως αιτία της νευροεκφυλιστικής αυτής νόσου αναγνωρίστηκε πρόσφατα μια ομάδα πρωτεϊνών με την ονομασία *πρίονια*. Σε ένα ποσοστό των φορέων διαπιστώθηκαν μεταλλάξεις σε γονίδια περιοχών του εγκεφάλου πολλών σπονδυλωτών (ποντικού, ανθρώπου), που σχετίζονται με τον σχηματισμό αυτών των πρωτεϊνών.

4.4 Απομόνωση – Διαχωρισμός πρωτεϊνών

Οι κυριότερες μέθοδοι που εφαρμόζονται για την απομάκρυνση ή την παραλαβή ή τον καθαρισμό ή και τον διαχωρισμό των πρωτεϊνών από τα διάφορα φυσικά προϊόντα είναι οι ακόλουθες:

- Με θέρμανση των κολλοειδών διαλυμάτων τους ή με προσθήκη αλάτων βαρέων μετάλλων (π.χ. CuSO_4 , HgCl_2), οπότε οι πρωτεΐνες θρομβώνονται και καθιζάνουν και μετουσιώνονται, δηλαδή η ανώτερη δομή τους αποδιατάσσεται και καταστρέφεται και έτσι διαχωρίζονται από τις άλλες τάξεις των θρεπτικών υλών.
- Μέθοδοι καταβύθισης των πρωτεϊνών από διαλύματά τους με προσθήκη αντιδραστηρίων που μεταβάλλουν τη διαλυτότητά τους με επίδραση στη διηλεκτρική σταθερά ή την ιονική ισχύ τους, όπως π.χ. ρύθμιση του pH στο ισοηλεκτρικό σημείο με ρυθμιστικά διαλύματα ή αραιά οξέα. Τα οξέα που χρησιμοποιούνται συνήθως για τον σκοπό αυτόν είναι το τριχλωροξικό, το φωσφοροβολφραμικό ή το υπερχλωρικό, τα οποία σε μέτριες συγκεντρώσεις δίνουν πλήρη αποδιάταξη και καταβύθιση μιας πρωτεΐνης. Για τον λόγο αυτόν χρησιμοποιούνται στη Βιοχημεία, για να σταματούν διάφορες ενζυμικές δράσεις και στην κλινική χημεία, για να απομακρύνουν τις πρωτεΐνες από τα βιολογικά υγρά (π.χ. αίμα) προκειμένου να εξεταστούν αυτά για τα άλλα συστατικά τους.
- Μέθοδοι καταβύθισης με προσθήκη ανόργανων ουδετέρων αλάτων, π.χ. NaCl (μέθοδος εξαλάτωσης) ή με προσθήκη διαλυτών (αλκοόλης, ακετόνης) οι οποίες οδηγούν συνήθως στην αποδιάταξη των πρωτεϊνών αλλά μετά από απομάκρυνση του μέσου που προκάλεσε την καταβύθιση, οι πρωτεΐνες συνήθως επαναδιαλύονται και επαναδιατάσσονται.

- Μέθοδοι φυγοκέντρωσης και υπερφυγοκέντρωσης οι οποίες διαχωρίζουν τις πρωτεΐνες ανάλογα με το σχετικό MB τους.
- Μέθοδοι χρωματογραφίας στήλης μοριακής διήθησης ή ιοντοανταλλαγής ή χημικής συγγένειας.
- Για τις ιοντοανταλλαγές χρησιμοποιούνται ως υλικά πλήρωσης των στηλών παράγωγα της κυπαρίνης, δεξτράνης, αγαρόζης και πολυκρυλαμιδίου (π.χ. Sephadex, Sepharose, Biogel κ.ά), καθώς και διαιθυλαμινο-αιθυλο-(DEAE) υποκατεστημένες ομάδες για ανιοανταλλαγή, καθώς και σουλφοαιθυλο-υποκαταστάτες για κατιοανταλλαγή. Η μοριακή διήθηση αποκλεισμού (exclusion) γίνεται με πηκτές (gel) αγαρόζης, δεξτράνης ή πολυακρυλαμιδίου. Η χρωματογραφία χημικής συγγένειας γίνεται συνήθως σε υπόστρωμα αγαρόζης επί αδρανούς μέσου επάνω στα οποία δεσμεύονται διάφορα ένζυμα από ένα πρωτεϊνικό μείγμα τα οποία εκλύονται μετά εκλεκτικά με διάφορα ρυθμιστικά διαλύματα.
- Μέθοδοι ηλεκτροφόρησης με τις οποίες διαχωρίζονται ανάλογα με το MB και με το είδος τους. π.χ. ο διαχωρισμός των αιμοσφαιρινών για την εργαστηριακή διάγνωση της μεσογειακής αναιμίας.
- Μέθοδοι με γρήγη χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) παρασκευαστικού τύπου με τις οποίες διαχωρίζονται διάφορες τάξεις πρωτεϊνών στις επιμέρους υποτάξεις τους, π.χ. ο διαχωρισμός διάφορων ανοσοσφαιρινών.

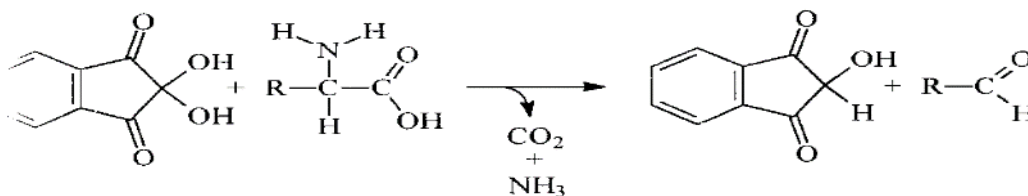
Γενικά, η επιλογή μιας μεθόδου απομόνωσης μιας πρωτεΐνης εξαρτάται από τη φύση της και από τη φύση του φυσικού προϊόντος στο οποίο περιέχεται και μπορεί να είναι σχετικά απλή, όπως π.χ. η παραλαβή της αλβουμίνης του ασπαραδιού του αυγού μέχρι πολύ πολύπλοκη, όπως π.χ. η παραλαβή ενός συγκεκριμένου είδους ανοσοσφαιρίνης.

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟ ΜΕΡΟΣ

4.5 Εργαστηριακή άσκηση: Ανίχνευση αμινοξέων: Αντίδραση νινυδρίνης – Αντίδραση ξανθοπρωτεΐνης

4.5.1 Αντίδραση νινυδρίνης

Όλα τα α-αμινοξέα αντιδρούν σε pH 4-8 με τη νινυδρίνη, μια ισχυρή οξειδωτική ένωση και σχηματίζει παράγωγο χρώματος βιολετί (αντίδραση Εικόνας 4.13). Με νινυδρίνη αντιδρούν αμίνες και αμμωνία, αλλά χωρίς την απελευθέρωση CO₂. Η αντίδραση λόγω ευαισθησίας είναι κατάλληλη και για ποσοτικό προσδιορισμό με τη χρήση φασματομετρικών ή/και χρωματογραφικών μεθόδων.



Εικόνα 4.13 Αντίδραση νινυδρίνης.

Πορεία άσκησης νινυδρίνης:

ΣΩΛΗΝΑΣ 1	ΣΩΛΗΝΑΣ 2	ΣΩΛΗΝΑΣ 3	ΣΩΛΗΝΑΣ 4	ΣΩΛΗΝΑΣ 5
15 Σταγόνες (γλυκίνη) 2% w/v	15 Σταγόνες (Ωοαλβουμίνη) 2% w/v	15 Σταγόνες (καζεΐνη) 2% w/v	15 Σταγόνες (τυροσίνη) 2% w/v	15 Σταγόνες (ζελατίνη) 2% w/v
5 Σταγόνες Αντίδραση νινυδρίνης 1% w/v	5 Σταγόνες Αντίδραση νινυδρίνης 1% w/v	5 Σταγόνες Αντίδραση νινυδρίνης 1% w/v	5 Σταγόνες Αντίδραση νινυδρίνης 1% w/v	5 Σταγόνες Αντίδραση νινυδρίνης 1% w/v
ΒΡΑΣΜΟΣ				
5'	5'	5'	5'	5'
ΧΡΩΜΑ				

Ποια από τις ανωτέρω ουσίες δίνει θετικό αποτέλεσμα (βιολετί χρώμα); _____

Παρατηρήσεις:

4.5.2 Ποιοτική πιστοποίηση αμινοξέων, με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας

Για την πιστοποίηση των κηλίδων (αμινοξέων) μπορεί να χρησιμοποιηθεί το αντιδραστήριο της νινυδρίνης. Τα αμινοξέα είναι αρκετά πολικά και τείνουν να κινηθούν στην πλάκα πηκτωμάτων πυριτίου (silica gel) με πολικούς διαλύτες. Έχουν τιμές Rf κοντά στο 1, όταν χρησιμοποιείται το ύδωρ ή πυκνή αμμωνία ως διαλύτης ανάπτυξης. Η αραίωση ενός πολικού διαλύτη με λιγότερο πολικό οδηγεί σε μικρότερες τιμές Rf. Έτσι, τα αμινοξέα, αλανίνη, γλυκίνη, θρεονίνη και προλίνη έχουν τιμές περίπου 0.60, όταν αναπτύσσονται σε μείγμα 50/50 ύδατος και κ-προπανόλης, και περίπου 0.40 όταν αναπτύσσονται με μείγμα 30/70 πυκνής NH₃ και κ-προπανόλης. Η ακόλουθη διαδικασία προϋποθέτει τη χρήση του 50/50 ύδατος/της κ-προπανόλης.

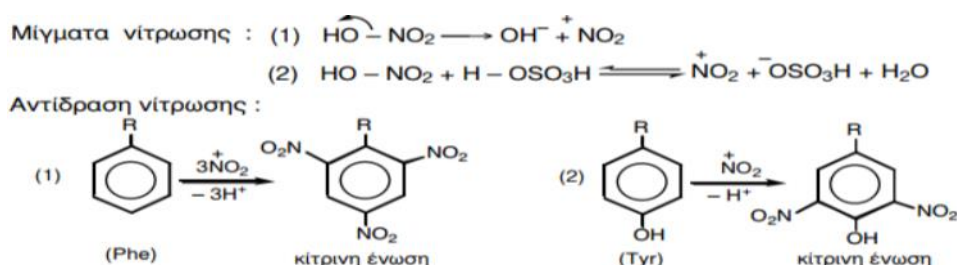
Πορεία:

- Στον απαγωγό, ετοιμάστε 10 mL μείγματος κ-προπανόλης και ύδατος σε αναλογία 50/50 (1/1).
- Μεταγγίστε αυτόν τον όγκο σε καθαρό θάλαμο ανάπτυξης.
- Παρασκευάστε αλκοολικό διάλυμα νινυδρίνης 5%.
- Μεταγγίστε 0.5-1.0 mL του διαλύματος νινυδρίνης στον θάλαμο ανάπτυξης, όπου και το μείγμα ανάπτυξης.
- Σε δοκιμαστικούς σωλήνες, παρασκευάστε διαλύματα των ανωτέρω αμινοξέων σε συγκέντρωση 50-100mg/mL ύδατος.
- Τοποθετήστε μικρή ποσότητα (2-3 σταγόνες) του διαλύματος αυτού με τη βοήθεια τριχοειδούς αγγείου στην ενεργοποιημένη πλάκα silica gel της χρωματογραφίας.
- Βυθίστε την πλάκα με προσοχή, κάθετα στον θάλαμο ανάπτυξης.
- Κλείστε το καπάκι του θαλάμου και αφήστε την πλάκα να αναπτυχθεί, έως ότου ανέλθει ο διαλύτης σε απόσταση 2/3 από την κορυφή της πλάκας.
- Αφαιρέστε την πλάκα από τον θάλαμο και τοποθετήστε τη σε κλίβανο θερμοκρασίας 1100 προς ξήρανση και εμφάνιση των κηλίδων.
- Σημειώστε το περίγραμμα των κηλίδων με το μολύβι και υπολογίστε τις τιμές Rf.
- Συγκρίνετε τις τιμές αυτές με τις πρότυπες τιμές από τη βιβλιογραφία για τη πιστοποίηση των αντίστοιχων αμινοξέων.

Παρατηρήσεις:.....

4.5.3 Αντίδραση ξανθοπρωτεΐνης

Την αντίδραση αυτή δίνουν μόνον τα αρωματικά αμινοξέα, τυροσίνη (TYR) και θρυπτοφάνη (Trp), καθώς και οι πρωτεΐνες που περιέχουν αυτά τα αμινοξέα. Η αντίδραση γίνεται με την προσθήκη πυκνού HNO₃ σε διάλυμα αμινοξέος ή πρωτεΐνης, οπότε μετά από θέρμανση παράγεται μια κίτρινη χρώση λόγω του σχηματισμού νιτροπαραγώγων (Εικόνα 4.14). Το χρώμα της αντίδρασης ενισχύεται με την προσθήκη NaOH. Η φαινυλαλανίνη (Phe), επίσης, δίνει την αντίδραση ξανθοπρωτεΐνης αλλά με προσθήκη H₂SO₄ μετά την προσθήκη του HNO₃.



Εικόνα 4.14 Αντίδραση ξανθοπρωτεΐνης.

Σε ισχυρό αλκαλικό περιβάλλον (με την προσθήκη καυστικού νατρίου και τον σχηματισμό αλάτων) το διάλυμα χρωματίζεται πορτοκαλί.

Άλλες ειδικές χρωμοαντιδράσεις των αμινοξέων (μικρότερης εφαρμογής) είναι οι κάτωθι:

- Αντίδραση Millon (τυροσίνη- κεραμιδί χρώμα).
- Αντίδραση γλυκοξυλικής τρυπτοφάνης (τυροσίνη, τρυπτοφάνη- βιολετί δακτύλιος).
- Αντίδραση Ehrlich (ινδολικές ενώσεις, ουρείδια, έγχρωμα σύμπλοκα).
- Αντίδραση νιτροπρωσικού (Arnold) (θειούχα αμινοξέα).
- Αντίδραση Sakaguchi (αργινίνη-ερυθρό χρώμα).

Πορεία άσκησης:

ΣΩΛΗΝΑΣ 1	ΣΩΛΗΝΑΣ 2	ΣΩΛΗΝΑΣ 3	ΣΩΛΗΝΑΣ 4	ΣΩΛΗΝΑΣ 5
15 Σταγόνες	15 Σταγόνες	15 Σταγόνες	15 Σταγόνες	15 Σταγόνες
(γλυκίνη)	(ωοαλβουμίνη)	(καζεΐνη)	(τυροσίνη)	(ζελατίνη)
2% w/v	2% w/v	2% w/v	2% w/v	2% w/v
ΘΕΡΜΑΝΣΗ				
ΧΡΩΜΑ				

Παρατηρήσεις:.....

4.5.4 Εργαστηριακή άσκηση: Αντίδραση διουρίας – Ανίχνευση πρωτεϊνών/πεπτιδίων

Με την αντίδραση διουρίας (BIURET) επιτυγχάνεται ο προσδιορισμός των πεπτιδικών δεσμών και ο βαθμός υδρόλυσης μιας πρωτεΐνης.

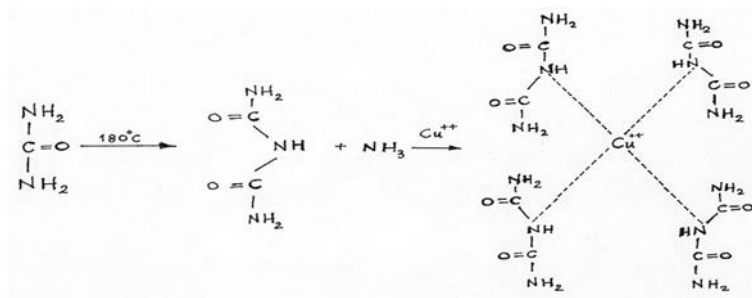
Η αντίδραση μιας πρωτεΐνης με ιόντα Cu⁺⁺ σε ήπιο αλκαλικό περιβάλλον οδηγεί σε έγχρωμο σύμπλοκο (chelate) που σχηματίζεται από τη σύνδεση του ιόντος με το καρβονυλικό οξυγόνο και τα αμιδικά άζωτα του πεπτιδικού δεσμού.

Η αντίδραση λαμβάνει χώρα και με κάθε ένωση που περιέχει τουλάχιστον δύο ομάδες εκ των H_2N-C- , H_2N-CH_2- , CH_2- , H_2N-CS- . Στην αντίδραση αυτή ένα ιόν χαλκού συνδέεται πιθανά με 4 γειτονικούς πεπτιδικούς δεσμούς (Εικόνα 4.15).

Τα αμινοξέα και τα διπεπίδια δεν δίνουν την αντίδραση διουρίας. Θετικά στην αντίδραση είναι τα τρι-πολυ-πεπίδια, που σχηματίζουν κυανοιώδη χροιά.

Η ένταση του χρώματος είναι ανάλογο του αριθμού των πεπτιδικών δεσμών και κατά συνέπεια ανάλογο του αριθμού των πρωτεϊνικών μορίων που είναι παρόντα στο συγκεκριμένο διάλυμα.

Έτσι ο ποσοτικός προσδιορισμός των ολικών πρωτεϊνών σε ένα βιολογικό υγρό μπορεί να γίνει φωτομετρικά (555nm).



Εικόνα 4.15 Αντίδραση διουρίας.

Πορεία άσκησης:

ΣΩΛΗΝΑΣ 1	ΣΩΛΗΝΑΣ 2	ΣΩΛΗΝΑΣ 3	ΣΩΛΗΝΑΣ 4	ΣΩΛΗΝΑΣ 5
15 Σταγόνες (γλυκίνη) 2% w/v	15 Σταγόνες (Ωοαλβουμίνη) 2% w/v	15 Σταγόνες (καζεΐνη) 2% w/v	15 Σταγόνες (τυροσίνη) 2% w/v	15 Σταγόνες (ζελατίνη) 2% w/v
5 Σταγόνες 10% NaOH w/v	5 Σταγόνες 10% NaOH w/v	5 Σταγόνες 10% NaOH w/v	5 Σταγόνες 10% NaOH w/v	5 Σταγόνες 10% NaOH w/v
3 Σταγόνες 10% CuSO ₄ w/v	3 Σταγόνες 10% CuSO ₄ w/v	3 Σταγόνες 10% CuSO ₄ w/v	3 Σταγόνες 10% CuSO ₄ w/v	3 Σταγόνες 10% CuSO ₄ w/v
ΧΡΩΜΑ				

Ποια από τις ουσίες αυτές δίνει θετικό αποτέλεσμα; _____

Παρατηρήσεις:

4.5.5 Εργαστηριακή άσκηση: Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών - Μέθοδος Bradford

Σύντομη και αξιόπιστη μέθοδος για τον προσδιορισμό της πρωτεΐνης που περιέχεται σε ένα διάλυμα, η οποία βασίζεται στη χρήση χρωστικής. Αν και υπάρχουν σχετικά λίγες παρεμποδιστικές ουσίες, οι οποίες πιθανόν να αλλοιώνουν το αποτέλεσμα, η χρωστική αλληλοεπιδρά με τις διάφορες πρωτεΐνες σε διάφορα σημεία και έτσι δεν είναι αυστηρά ποσοτική (Bradford, 1976).

Τεχνικά χαρακτηριστικά

- Απαιτούμενος χρόνος: 10 λεπτά.

- Πλεονεκτήματα: Σύντομη, ευαίσθητη (χρησιμοποιούνται μικρές ποσότητες πρωτεΐνης).
- Μειονεκτήματα: Διαφορετικά καθαρισμένες πρωτεΐνες εμφανίζουν διαφορές κατά την αντίδραση με τη χρωστική. Οι πρωτεΐνες που ποσοτικοποιούνται με αυτήν τη μέθοδο είναι πλήρως αποδιαταγμένες.
- Κλίμακα ευαισθησίας: 25 - 200 µg/mL πρωτεϊνικού διαλύματος, ελάχιστος όγκος 0,1 mL, μέτρηση μέχρι και 2,5 µg πρωτεΐνης.

Όργανα

- Φασματοφωτόμετρο.
- Πλαστικοί σωλήνες (πολυστυρένιο).
- Πιπέτες Pasteur και ακρορύγχια αυτόματων πιπετών.
- Αυτόματες πιπέτες.
- Μικροί δοκιμαστικοί σωλήνες μιας χρήσης ή σωλήνες Eppendorf.
- Αναδευτήρας στροβιλισμού (Vortex).

Αντιδραστήρια

- Πρότυπο διάλυμα βόειας αλβουμίνης (bovine serum albumin, BSA), 1 mg/mL σε H₂O.
- Αιθανόλη 95%.
- Χρωστική Serva Blue G Dye.
- Φωσφορικό οξύ 85% v/v.
- Η αντιδραστήριο Bradford, διαθέσιμο μείγμα, με τη χρωστική Brilliant Blue G-250, φωσφορικό οξύ και μεθανόλη.

Πορεία/Διαλύματα/Διάλυμα αποθήκευσης (μητρικό διάλυμα) Bradford

- 100 mL 95% v/v αιθανόλη.
- 200 mL 88% v/v φωσφορικό οξύ.
- 350 mg χρωστικής Serva Blue G.

Σταθερό για μεγάλο χρονικό διάστημα σε θερμοκρασία δωματίου.

Διάλυμα εργασίας Bradford

- 425 mL απεσταγμένου νερού.
- 15 mL 95% v/v αιθανόλη.
- 30 mL 88% v/v φωσφορικό οξύ.
- 30 mL μητρικού διαλύματος Bradford.

Φιλτράρουμε σε χαρτί Whatman No.1, αποθηκεύουμε σε θερμοκρασία δωματίου σε σκούρο γυάλινο μπουκάλι. Διαθέσιμο για αρκετές εβδομάδες, αλλά ίσως χρειαστεί να επαναφιλτραριστεί.

Πορεία

- Μεταφέρουμε με πιπέτα το διάλυμα της πρωτεΐνης (μέγιστος όγκος 100 µL) στην κυβέτα δείγματος (βλ. το παράδειγμα που ακολουθεί για την πρότυπη καμπύλη).
- Προσθέτουμε το ρυθμιστικό διάλυμα του πειράματος, για να φτάσουμε στον τελικό όγκο των 100 µL.
- Προσθέτουμε 1 mL διαλύματος εργασίας Bradford και αναδεύουμε ισχυρά (vortex).
- Μετά από 5 λεπτά, αλλά πριν περάσει μία ώρα μετρούμε την απορρόφηση (A₅₉₅).

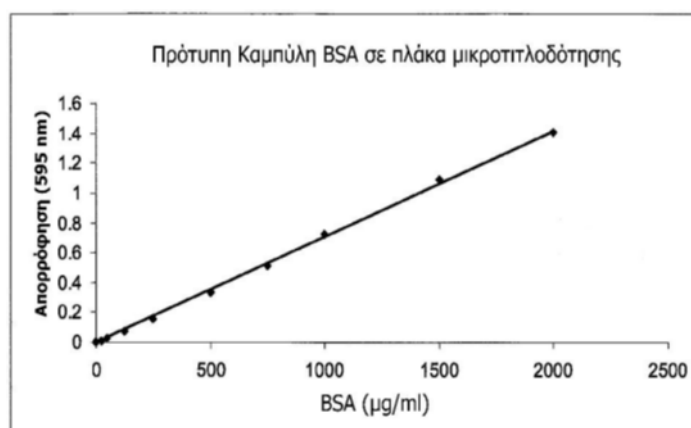
Κατασκευή πρότυπης καμπύλης

Μια πρότυπη καμπύλη απορρόφησης δειγμάτων γνωστής πρωτεϊνικής συγκέντρωσης είναι απαραίτητη για την ποσοτική εκτίμηση της πρωτεϊνικής συγκέντρωσης σε άγνωστα δείγματα. Επιπροσθέτως, τα δείγματα θα πρέπει να είναι σε διπλές ή τριπλές για την αύξηση της αξιοπιστίας του αποτελέσματος. Εάν χρησιμοποιείται η ίδια κυψελίδα για τη μέτρηση των δειγμάτων, συνίσταται να ελέγχονται πρώτα τα δείγματα με τη μικρότερη συγκέντρωση πρωτεΐνης, ώστε να μειώνεται το σφάλμα που προέρχεται από τη χρωστική Bradford που παραμένει στην κυψελίδα ως αποτέλεσμα μη επαρκούς καθαρισμού αυτής από μέτρηση σε μέτρηση.

Εξαιτίας της εξελισσόμενης πορείας ανάπτυξης του χρώματος του συμπλόκου πρωτεΐνης - χρωστικής, το διάλυμα Bradford θα πρέπει να προστίθεται στα πρότυπα και άγνωστα πρωτεϊνικά διαλύματα ταυτόχρονα.

Επίσης, όλα τα δείγματα θα πρέπει να μετριοούνται διαδοχικά ακολουθώντας την ανάπτυξη της αντίδρασης του χρώματος. Για κάθε μέτρηση πρωτεϊνικών διαλυμάτων άγνωστων συγκεντρώσεων πρέπει πάντα να σχεδιάζεται μια νέα πρότυπη καμπύλη.

Η πρότυπη καμπύλη για τη μέθοδο Bradford (Σχήμα 4.2) παραμένει ευθεία σε μια κλίμακα ποσοτήτων πρωτεΐνης από περίπου 2,5 μg έως 15 μg του BSA (ή αντίστοιχη κλίμακα συγκεντρώσεων). Εάν οι απορροφήσεις των άγνωστων πρωτεϊνικών δειγμάτων αντιστοιχούν σε ποσότητες (δηλαδή συγκεντρώσεις) που βρίσκονται έξω από αυτήν την κλίμακα, το περιθώριο λάθους γίνεται πάρα πολύ μεγάλο. Είναι επίσης πιθανό το ποσό του BSA που μετρήθηκε να εκφραστεί ως συγκέντρωση κατά μήκος του άξονα x.



Σχήμα 4.2 Πρότυπη καμπύλη Bradford με τη χρήση βόειας αλβουμίνης (BSA).

4.6 Εργαστηριακή άσκηση: Προσδιορισμός ισοηλεκτρικού σημείου (pI) πρωτεϊνών

Η βαθμιαία μεταβολή του pH του διαλύματος στο οποίο είναι διαλυμένος ο αμφολύτης από την όξινη περιοχή στην αλκαλική και αντίστροφα έχει ως συνέπεια διαδοχικά τη διάλυση, καταβύθιση και επαναδιάλυση του αμφολύτη (της πρωτεΐνης). Συνεπώς στο ισοηλεκτρικό τους σημείο οι πρωτεΐνες παρουσιάζουν τη μικρότερη διαλυτότητα. Ισχυροί ηλεκτρολύτες, που είναι τα άλατα ισχυρών οξέων ή βάσεων, επηρεάζουν τις ηλεκτροστατικές έλξεις της πρωτεΐνης με τα μόρια νερού που την περιβάλλουν, σε σημείο που αυτά να απομακρύνονται από την πρωτεΐνη με συνέπεια αυτή να καθίσταται αδιάλυτη και να πέφτει ως ίζημα. Το φαινόμενο αυτό ονομάζεται *εξαλάτωση*.

Παράδειγμα υπολογιστικής εφαρμογής: Να βρεθεί το pI ασπαρτικού οξέος, όταν το $\text{pK}_{\text{a}1'}$ (α -καρβοξυλίου) = 2.09, $\text{pK}_{\text{a}2'}$ (β -καρβοξυλίου) = 3.86 και $\text{pK}_{\text{a}3'}$ (αμινομάδας) = 9.82.

Στον τύπο θα χρησιμοποιήσουμε τα πλησιέστερα pK_{a} , έτσι:

$$\text{pI} = \frac{2.09 + 3.86}{2} = 2.97$$

Αντιδραστήρια/πορεία:

Διάλυμα καζεΐνης 0.25% w/w

Από αρχικά διαλύματα CH_3COOH , CH_3COONa συγκέντρωσης 1M, παρασκευάζονται στον απαγωγό, τα αντίστοιχα διαλύματα συγκέντρωσης 0.5M. Τα τελευταία διαλύματα εισάγονται σε τελικό όγκο 8.0 ml, σε 5 διαφορετικούς σωλήνες με σχέση όγκων, σύμφωνα με τον παρακάτω πίνακα:

Διάλυμα/σωλήνα	1 (8.0 ml)	2 (8.0 ml)	3 (8.0 ml)	4 (8.0 ml)	5 (8.0 ml)
CH_3COOH 0.5M	7.8	7.2	5.0	1.8	0.8
CH_3COONa 0.5M	0.2	0.8	3.0	6.2	7.2

Στη συνέχεια προστίθεται σε κάθε σωληνάριο (1-5) από 2 ml καζεΐνης 0.25%

Με τη χρήση της εξίσωσης Henderson-Hasselbach, να υπολογισθούν οι νέες συγκεντρώσεις και το pH, όταν η τιμή pK_a CH_3COOH =4.75, εκάστου σωλήνα και να συμπληρωθούν οι τιμές στον πίνακα.

Μετρήσεις	1	2	3	4	5
Συγκέντρωση (M) CH_3COOH					
Συγκέντρωση (M) CH_3COONa					
Τιμή pH					

Επιλέξτε τον σωλήνα, όπου διαπιστώθηκε καταβύθιση της καζεΐνης. Η τιμή του pH αντιστοιχεί στο ισοηλεκτρικό σημείο της πρωτεΐνης.

4.7 Εργαστηριακή άσκηση: Καθίζηση πρωτεϊνών

Η απομάκρυνση των πρωτεϊνών από τα βιολογικά υγρά είναι συχνά κεφαλαιώδους σημασίας για την ακρίβεια της μέτρησης των άλλων βιοχημικών παραμέτρων και τούτο, διότι η παρουσία τους προκαλεί:

- Αφρισμό
- Θολερότητα
- Ιζήματα
- Κροκίδες
- Παρεμπόδιση χρωματικών αντιδράσεων

Η απολευκωμάτωση χρησιμοποιείται και για τον προσδιορισμό των πρωτεϊνών και επιτυγχάνεται με τις παρακάτω μεθόδους:

Η καθίζηση, λόγω της παρουσίας θετικών και αρνητικών φορτίων εξαρτάται από το pH του διαλύματος.

Έτσι, σε όξινο pH οι πρωτεΐνες (όπως τα αμινοξέα) είναι φορτισμένες θετικά (+).

Σε αλκαλικό pH είναι φορτισμένες αρνητικά (-).

Στο ισοηλεκτρικό σημείο (pI) όπου η πρωτεΐνη συμπεριφέρεται ως δίπολο, σε αυτό το pH που είναι ηλεκτρικά ουδέτερες, καθιζάνουν ευκολότερα.

Όσο οι πρωτεΐνες απομακρύνονται από το pI αυξάνει η διαλυτότητά τους και μειώνεται η καθίζηση (pI σφαιρινών σε $\text{pH} > 7$, pI αλβουμίνης σε $\text{pH} < 5$).

Κατά συνέπεια, η καθίζηση επιτυγχάνεται με μεταβολή του pH και άλλων ιδιοτήτων, με τα παρακάτω μέσα:

- Φυσικά (θέρμανση, πίεση, ψύξη, ακτινοβολία X)
- Βιολογικά (ένζυμα)

- Χημικά (μεταβολή του pH, προσθήκη οργανικών διαλυτών, αλάτων, οξέων, βαρέων μετάλλων)

Για την αποφυγή της μετουσίωσης των πρωτεϊνών, η κατεργασία γίνεται σε θερμοκρασίες 0-40°C.

Χημικά μέσα

- Οργανικοί διαλύτες, που αναμειγνύονται με το ύδωρ, (μεθανόλη, αιθανόλη, ακετόνη, αιθέρας) μειώνουν τη διαλυτότητα, μειώνοντας την υψηλή διηλεκτρική σταθερά (D) του ύδατος
- Προσθήκη αλάτων (NH₄)₂SO₄. Σε χαμηλές συγκεντρώσεις άλατος αυξάνεται η διαλυτότητα πολλών πρωτεϊνών, σε χαμηλές μειώνεται (φαινόμενο salting-in).
- Σχηματισμός αδιάλυτων αλάτων (η πιο συνήθης μέθοδος) με τριχλωροξικό, περχλωρικό οξύ και ιόντα Zn⁺⁺, Hg⁺⁺, Fe⁺⁺⁺, Pb⁺⁺, Cu⁺⁺.

Αντιστρόφως κοινές και προσβάσιμες πρωτεΐνες (γάλα, ωμό ασπράδι αυγού) δύνανται να χρησιμοποιηθούν ως χρήσιμα προκαταρτικά αντίδοτα από τη δηλητηρίαση βαρέων μετάλλων.

Πορεία καθίζησης με ανάμιξη χλωροφορμίου

Η καθίζηση επιτυγχάνεται με την προσθήκη 0.25 όγκου CHCl₃ και 0.1 όγκου αμυλικής αλκοόλης η οποία εμποδίζει την εμφάνιση αφρού.

Εμφανίζονται 2 στιβάδες – πάνω (υδατική), κάτω (CHCl₃ – πρωτεΐνη – gel) – πιο κάτω (όταν έχουμε πολύ χλωροφόρμιο).

ΣΩΛΗΝΑΣ 1	ΣΩΛΗΝΑΣ 2	ΣΩΛΗΝΑΣ 3	ΣΩΛΗΝΑΣ 4	ΣΩΛΗΝΑΣ 5
Προσθήκη Αναμειξμών Διαλυτών	Προσθήκη Ουδέτερων Αλάτων	Προσθήκη Αδιάλυτων Αλάτων	Καθίζηση με Ανάμιξη Χλωροφορμίου	Καθίζηση με Θέρμανση
2 ml πρωτεΐνη	5 ml πρωτεΐνη	5 ml πρωτεΐνη	5 ml πρωτεΐνη	5 ml πρωτεΐνη
3 ml Αλκοόλη 95%	5 ml θειικό αμμώνιο (κεκόρ)	1 ml TCA (τριχλωρο οξικό οξύ)	0.5 ml Χλωροφόρμιο	Θέρμανση
ΙΖΗΜΑ (ΝΑΙ/ΟΧΙ)				

Πού οφείλεται το ίζημα;

Σωλήνας 1: _____

Σωλήνας 2: _____

Σωλήνας 3: _____

Σωλήνας 4: _____

Σωλήνας 5: _____

Παρατηρήσεις:

4.8 Εργαστηριακή άσκηση: Διαδίκτυο και βάσεις δεδομένων πρωτεϊνών

A. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Οι βάσεις δεδομένων πρωτεϊνών και νουκλεϊκών οξέων περιέχουν στοιχεία και πληροφορίες σχετικά με την ομολογία, τις συντηρημένες περιοχές και τα βιολογικά χαρακτηριστικά που αφορούν τη δομή-λειτουργία τους και τις φυσικοχημικές παραμέτρους τους.

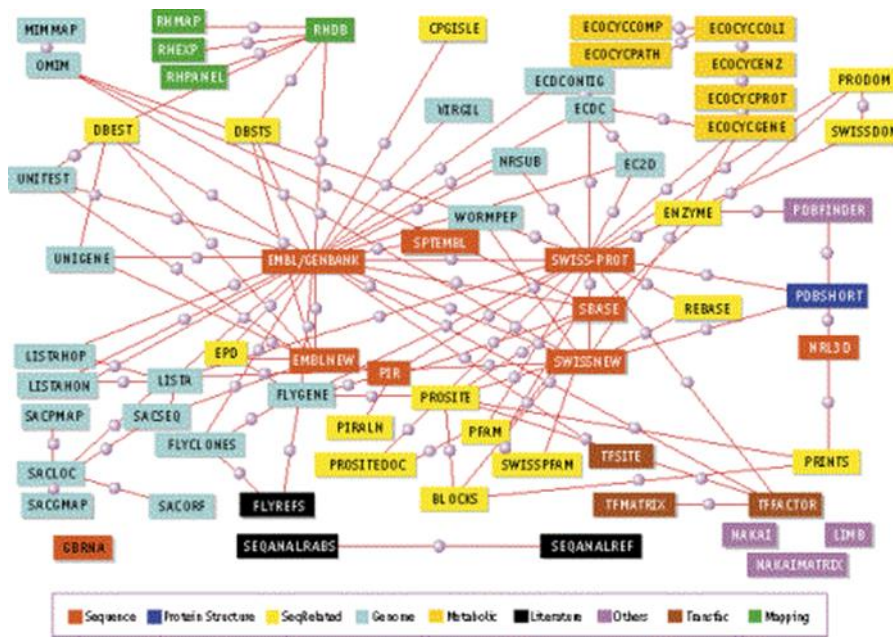
Όπως είναι ήδη γνωστό, το αρχείο πληροφοριών κάθε οργανισμού εντοπίζεται στο γενετικό του υλικό, δηλαδή το DNA ή το RNA σε μερικούς ιούς. Οι πληροφορίες αυτές μεταφράζονται σε δομικές και λειτουργικές μονάδες, τις πρωτεΐνες, ο ρόλος των οποίων είναι αναμφισβήτητης σημασίας από τους μύες, τα

ένζυμα, τους υποδοχείς και τα αντισώματα. Παρά το ενιαίο και την ομοιομορφία των οργανισμών κατά προσέγγιση, η ποικιλότητα των πρωτεϊνών αποτυπώνεται τόσο στην αλληλουχία των αμινοξέων (1ταγής δομή) όσο και στην τρισδιάστατη διαμόρφωσή τους (3ταγής δομή). Αυτό οφείλεται στο ότι η αμινοξική ακολουθία είναι αυτή που υπαγορεύει τη διάταξη αυτών στον χώρο δημιουργώντας τη μια ενιαία φυσιολογική κατάσταση δομής (native state), η οποία λαμβάνεται αυθόρμητα κάτω από φυσιολογικές συνθήκες.

Η λογική εξήγηση αυτής της σχέσης προκύπτει από τη μετάφραση των ακολουθιών του DNA βάσης του, σχεδόν καθολικού, γενετικού κώδικα ο οποίος αντιστοιχεί τριπλέτες βάσεων του DNA με αμινοξέα. Παρόλα αυτά, η αυθόρμητη διαμόρφωση των πρωτεϊνών στον χώρο είναι ακόμη ένα υπό μελέτη φαινόμενο, με πιθανό έναν δρόμο στον οποίο οι σωστά επιτευχθείσες δομικές περιοχές να κρατούνται, ενώ οι λανθασμένες να επαναδιατάσσονται έως ότου επιτευχθεί η απόλυτα λειτουργική, σε χρόνους πολύ μικρούς σε σύγκριση με μια αντίθετη πορεία (παράδοξο του Levinthal). Η δημιουργία του, ακριβών διαστάσεων, ενεργού κέντρου των ενζύμων είναι το κομβικό σημείο της εξειδικευμένης επαφής τους με τα αντίστοιχα υποστρώματα.

Βάσεις δεδομένων

Πρόκειται για ένα αρχείο πληροφοριών οργανωμένο και δομημένο με τέτοιο τρόπο ώστε με τη χρήση των κατάλληλων εργαλείων να εξασφαλίζεται η πρόσβαση για μελέτη και άντληση πληροφοριών τόσο από ερευνητές όσο και από κάθε ενδιαφερόμενο για το αντικείμενο αυτό. Στον τομέα μας οι βάσεις δεδομένων καλύπτουν τα σημαντικότερα βιομόρια, δηλαδή τα νουκλεϊκά οξέα, τις πρωτεϊνικές ακολουθίες, μακρομοριακές δομές και λειτουργίες. Οι τρεις μεγαλύτερες βάσεις δεδομένων νουκλεοτιδικών ακολουθιών που είναι διαθέσιμες στους χρήστες είναι οι: GENBANK (NCBI), DNA Data Bank of Japan (DDBJ) και EMBL Nucleotide Sequence Data Base (EBI) (Εικόνα 4.16).



Εικόνα 4.16 Βάσεις δεδομένων πρωτεϊνών και νουκλεϊκών οξέων.

Οι ηλεκτρονικές διευθύνσεις αυτών είναι: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/> <http://www.ebi.ac.uk/embl/> <http://www.ddbj.nig.ac.jp/>

B. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Εύρεση πρωτοταγούς ακολουθίας

Έχοντας στη διάθεσή σας την αμινοξική ακολουθία συγκεκριμένου πεπτιδίου καλείστε με τη βοήθεια των εργαλείων της βιοπληροφορικής, που είναι διαθέσιμα τόσο στις βάσεις δεδομένων όσο και στα ολοκληρωμένα συστήματα ανάκτησης πληροφοριών από τις βάσεις να αντλήσετε πληροφορίες σχετικά με: α) την ακολουθία του δεδομένου ενζύμου, β) τις χημικές αντιδράσεις που καταλύει, γ) την εύρεση της DNA

ακολουθίας που το κωδικοποιεί, δ) πιθανές λειτουργίες, ε) χαρακτηριστικά δομής, στ) φυσικοχημικές παραμέτρους.

I. Αναζήτηση πρωτεϊνικής ακολουθίας και εύρεση ομολογίας στους δικτυακούς τόπους: <http://www.uniprot.org/> <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>

Ακολουθήστε τα ακόλουθα βήματα αφού επιτύχετε πρόσβαση στον παγκόσμιο ιστό (World Wide Web) με τη βοήθεια ενός φυλλομετρητή (Browser), π.χ. Internet Explorer ή Mozilla Firefox. 109.

Μέρος Α

- Στο πεδίο εισαγωγής διευθύνσεων του φυλλομετρητή πληκτρολογείτε τη διεύθυνση <http://www.uniprot.org/> και πιέζετε Enter.
- Επιλογή τράπεζας δεδομένων (πάνω αριστερά) – Protein Knowledgebase (UniProtKB) και πληκτρολογείτε στο πάνω δεξιά παράθυρο “Query” το όνομα της κινάσης (πρωτεΐνης) σερίνης/θρεονίνης για την οποία αναζητούμε πληροφορίες “SIK1_MOUSE” (διαμορφώνει την εκλεκτικότητα και καταλυτική ενεργότητα του υποστρώματος, όπως επίσης και κατευθύνει το καταλυτικό ένζυμο σε συγκεκριμένο υποκυτταρικό χώρο). Στη συγκεκριμένη σελίδα μπορούμε να βρούμε πληροφορίες σχετικά με τη βιολογική δράση και λειτουργία της πρωτεΐνης, τη φυσική πηγή (σε ποιους ιστούς υπάρχει) καθώς και άλλες χρήσιμες πληροφορίες σχετικά με την πρωτεΐνη.
- “Blast” στη τρίτη σειρά
- “Clusters with 100%, 90%, 50% identity” μπορούμε να βρούμε συγκριτικό κατάλογο πρωτοταγούς ακολουθίας της SIK1_MOUSE με άλλες όμοιες ή ομόλογες σε διαφορετικά ποσοστά κάθε φορά πρωτεΐνες.
- Επιστροφή στην αρχική σελίδα της (ένα πίσω).
- Προς το τέλος της ιστοσελίδας στο πεδίο Sequences Κάντε «κλικ» (κάτω δεξιά) στην ένδειξη «FASTA».
- Εμφανίζεται σε μορφή γραμμάτων η πρωτοταγής ακολουθία της πρωτεΐνης. Αποθήκευση και διατήρηση της ακολουθίας (στο word) για την αναζήτηση πληροφοριών και σε άλλες βάσεις δεδομένων.

Μέρος Β

- Στο πεδίο εισαγωγής διευθύνσεων του φυλλομετρητή πληκτρολογείτε τη διεύθυνση <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/> και επιλέγετε protein blast (Search protein database using a protein query)
- Επικολλάτε την ακολουθία της SIK1_MOUSE σε FASTA format στο κενό πεδίο του προγράμματος.
- Επιλέγετε στο Choose Search Set το nr (no redundant) και στο Program Selection το blastp και πατάτε το εικονίδιο BLAST
- Show results in a new window
- Κάνετε «κλικ» στη ράβδο με ένδειξη “Putative conserved domains have been detected, click on the image below for detailed results”.
- “Formatting options ” (αρχική ράβδος πάνω δεξιά) σας οδηγεί σε σελίδα με σχηματική απεικόνιση ομόλογων πρωτεϊνών όσο και σε συγκρίσεις που έγιναν σε επίπεδο αμινοξέων.
- Στην αρχική σελίδα με τα αποτελέσματα βρίσκονται όλες οι πρωτεΐνες προς τα Άντληση πληροφοριών. Η πρώτη πρωτεΐνη είναι αυτή με τη μεγαλύτερη ομοιότητα (100%) ακολουθούμενη από τη δεύτερη (99%) κ.ο.κ. Επικεφαλίδες στην αριστερή πλευρά της σελίδας της, π.χ. όνομα, οργανισμός απομόνωσης κλπ. Πρωτεΐνες με μεγάλη ταυτότητα και ομοιότητα θα παρουσιάζουν και παρόμοιες ιδιότητες και δράση. Αυτές οι όμοιες πρωτεΐνες, εφόσον έχουν μελετηθεί, μπορούν τα δεδομένα τους να χρησιμοποιηθούν ως πρότυπα για ιδιότητες και δράση στη δική σας υπό μελέτη πρωτεΐνη.

Π. Ανάλυση πρωτοταγούς ακολουθίας και άντληση στοιχείων (ισοηλεκτρικό σημείο, φορτίο αμινοξέων, απορρόφηση διαλύματος πρωτεΐνης).

- Πληκτρολογήστε στο πεδίο εισαγωγής διευθύνσεων του φυλλομετρητή τη διεύθυνση: <http://www.expasy.ch/tools/> (είναι ένα ολοκληρωμένο σύστημα ανάκτησης πληροφοριών από βάσεις δεδομένων sequence analysis tools).
- Επιλέγεται από το Other prediction or characterization tools το «ProtParam».
- Αφού επικολλήσετε την ακολουθία SIK1_MOUSE σε FASTA format όπως την Αποθηκεύσατε παραπάνω «Compute Parameters» Προσοχή! Εισάγετε μόνο την αμινοξική ακολουθία χωρίς τις αρχικές ενδείξεις που τη συνοδεύουν >Q15...., δηλαδή τους έντονους χαρακτήρες: >sp|Q60670|SIK1_MOUSE Serine/threonine-protein kinase SIK1 OS=Mus musculus GN=Sik1 PE=1 SV=3

Οι πληροφορίες που παρέχονται από το «ProtParam» είναι πολύ χρήσιμες για εργαστηριακές μελέτες της πρωτεΐνης. Παρέχουν πληροφορίες για τη σταθερότητα (χρόνος αντοχής της πρωτεΐνης) το φορτίο (χρήσιμο για την καθίζηση και την ηλεκτροφόρηση) καθώς και τιμές που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης.

Μέρος Γ. Παρατηρήσεις-ερωτήσεις-αποτελέσματα

Θα δοθεί σε κάθε ομάδα το όνομα μιας πρωτεΐνης και θα πρέπει να βρείτε τις παρακάτω πληροφορίες.

- Την ταξινόμησή της, τη λειτουργία της, ποιος ο βιολογικός ρόλος της (function), πού τη συναντάμε (οργανισμό, ιστό).
- Ποια πρωτεΐνη έχει τη μεγαλύτερη ταυτότητα και ομοιότητα καταλοίπων (αμινοξέων με την πρωτεΐνη σας;
- Να αναφέρετε το ισοηλεκτρικό σημείο και το M.B. της πρωτεΐνης.
- Να αναφέρετε πόσο σταθερή είναι η πρωτεΐνη (Estimated half-life);
- Να αναφέρετε τα ολικά θετικά και αρνητικά φορτισμένα αμινοξικά κατάλοιπα.
- Ποια η συγκέντρωση διαλύματός με απορρόφηση 0.24 στα 280nm, σε κυψελίδα του 1cm;

Σχετικό οπτικό υλικό στο διαδίκτυο

<https://image.slidesharecdn.com/biomolecules-121218120440-phpapp01/95/biomolecules-23-638.jpg?cb=1355832430>
https://files.askiitians.com/cdn1/cms-content/biologybiomoleculesproteins-and-amino-acids_4.jpg
https://slidetodoc.com/presentation_image_h/b0f80d4249cbd0ab186884f82deed47f/image-2.jpg
<https://microbenotes.com/wp-content/uploads/2018/08/Proteins-Properties-Structure-Classification-and-Functions.jpg>
https://www.otsuka.co.jp/en/nutraceutical/about/nutrition/sports-nutrition/essential-nutrients/img/proteins_im02.png
<https://www.researchgate.net/profile/Damodaran-Vasudevan/publication/327245570/figure/fig3/AS:716461240770566@1547829079815/Levels-of-organizations-of-proteins.png>
<https://www.researchgate.net/profile/Ateeq-Alzahrani-2/publication/308261034/figure/fig1/AS:407852276568070@1474250968651/The-two-main-biomolecules-proteins-and-lipids-found-in-the-plasma-membranes.png>
<https://d3jlfscsyc6yvi.cloudfront.net/image/mw:1024/q:85/https%3A%2F%2Fhaygot.s3.amazonaws.com%3A443%2Fcheatsheet%2F14522.gif>
<https://cdn.britannica.com/80/780-004-BB3E8762/Synthesis-protein.jpg>
<https://www.clinisciences.com/upload/covid-19-qkujcp.jpg>
https://slideplayer.com/7738249/25/images/slide_1.jpg
https://imagevars.gulfnews.com/2020/07/22/antigens-vs-antibodies-pathogens-epitopes-_173774f824d_large.jpg
https://www.news-medical.net/image.axd?picture=2019%2F5%2Fshutterstock_1040732464.jpg
<https://www.britannica.com/science/protein#:~:text=A%20protein%20molecule,that%20compose%20proteins>
<http://hdl.handle.net/11419/4696>
https://repository.kallipos.gr/bitstream/11419/2578/2/00_master_document.pdf
https://media.springernature.com/original/springer-static/image/chp%3A10.1007%2F978-3-319-50542-8_17/MediaObjects/318297_1_En_17_Fig1_HTML.gif
<https://cmapspublic2.ihmc.us/rid=1JZRP8FZW-10QFS0R-2L53/biochemistry.cmap?rid=1JZRP8FZW-10QFS0R-2L53&partName=htmljpeg>

Πηγές φωτογραφιών με προέλευση το διαδίκτυο

Εικόνα 4.1. <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:AminoAcidball.svg>

Εικόνα 4.2.

<https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/8/80/%CE%91%CE%BC%CE%B9%CE%BD%CE%BF%CE%BE%CE%AD%CE%B1.png>

Εικόνα 4.3. <https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/b/b8/PEPTIDE-BOND-FIGURE.png>

Εικόνα 4.4.

https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/d/de/Amino_acid_zwitterions.svg/1280px-Amino_acid_zwitterions.svg.png

Εικόνα 4.6. https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/3/3d/1GZX_Haemoglobin.png/1200px-1GZX_Haemoglobin.png

Εικόνα 4.8. <https://blogs.sch.gr/geortsolbio/files/2016/09/Proteins-Tsolakis.png>

Εικόνα 4.9. http://en.wikipedia.org/wiki/File:Alpha_helix.png

Εικόνα 4.10.

[https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/c/c5/Alpha_beta_structure %28full%29.png/270px-Alpha_beta_structure %28full%29.png](https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/c/c5/Alpha_beta_structure_%28full%29.png/270px-Alpha_beta_structure_%28full%29.png)

Εικόνα 4.11.

[https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/8/8c/Disulfide Bridges %28SCHEMATIC%29 V.1.svg/150px-Disulfide Bridges %28SCHEMATIC%29 V.1.svg.png](https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/8/8c/Disulfide_Bridges_%28SCHEMATIC%29_V.1.svg/150px-Disulfide_Bridges_%28SCHEMATIC%29_V.1.svg.png)

Εικόνα 4.12. <https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/e/e4/EdmanDegradation.png/400px-EdmanDegradation.png>

Βιβλιογραφικές Αναφορές

- Campbell, N., & Reece, J., (2010). *Βιολογία*. Ηράκλειο: Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης.
- Cooper, G., & Hausman, R. (2011). *Το κύτταρο- μία μοριακή προσέγγιση*. Αλεξανδρούπολη: Ακαδημαϊκές εκδόσεις Μπάσδρα. Harpers, 2011. *Βιολογική Χημεία*. Αθήνα: Πασχαλίδης.
- Jamil, K., 2017. TNF-alpha 308G/A and 238G/A polymorphisms and its protein network associated with type 2 diabetes mellitus. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 24, 1195–1203.
- Koolman, J., & Roehm, K. (2007). *Εγχειρίδιο Βιοχημείας*. Αθήνα: Πασχαλίδης.
- Κατσώρης, Π., & Τσάκας, Σ. (2020). *Εργαστηριακές Ασκήσεις Μοριακής Βιολογίας*. Πάτρα: Πανεπιστήμιο Πατρών. Ανακτήθηκε, 19 Απριλίου 2022, από <https://eclass.upatras.gr/modules/document/file.php/BIO303/%CE%91%CF%83%CE%BA%CE%AE%CF%83%CE%B5%CE%B9%CF%82%20%CE%9C%CE%92%201%202020.pdf>
- Lofler, G. (2007). *Βασικές αρχές Βιοχημείας, με στοιχεία Παθοβιοχημείας*. Αθήνα: Πασχαλίδης.
- Nelson, D., & Cox, M. (2018). *Lehningers Βασικές αρχές Βιοχημείας*. Αθήνα: Broken.
- Suriyaprom, K., Tungtrongchitr, R., & Thawnasom, K., 2014. Measurement of the levels of leptin, BDNF associated with polymorphisms LEP G2548A, LEPR Gln223Arg and BDNF Val66Met in Thai with metabolic syndrome. *Diabetology & Metabolic Syndrome* 6,6.
- Tymoczko, J., Berg, J., & Stryer, L. (2018). *Βιοχημεία Βασικές αρχές*. Broken.
- Watson, D. (2011). *Φαρμακευτική Ανάλυση*. Αθήνα: Παρισιάνος.
- Ανδρικόπουλος, Ν. (2015). *Τροφογονωσία. Περιγραφική Χημεία και Τεχνολογία τροφίμων*. Αθήνα: Κάλιππος.
- Δημόπουλος, Κ., & Αντωνοπούλου, Σ. (2020). *Βασική Βιοχημεία*. Νέον.
- Καρίκας, Γ. (2018). *Εφαρμοσμένη Βιοχημεία Θεωρία Ασκήσεις*. Αθήνα: Βιβλιόπολις.
- Κουσίσης, Σ., Χούχουλα, Δ., & Αντωνόπουλος, Δ. (2020). *Εργαστηριακή Βιοχημεία*. Αθήνα: Τσότρας.
- Σούμπλης, Π. (2005). *Εργαστηριακές Σημειώσεις Βιοχημείας*. Αθήνα: ΤΕΙ Αθήνας.
- Χαϊτογλου, Κ. (2019). *Ασκήσεις Βιοχημείας. Εργαστηριακός Οδηγός*. Αθήνα: Κάλιππος.
- Χούχουλα, Δ., & Χαρβάλου, Α. (2020). *Εισαγωγή στις αρχές της Μοριακής Βιολογίας και Διαγνωστική πρακτική*. Αθήνα: Τσότρας.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΗΣ ΟΡΑΤΟΥ-ΥΠΕΡΙΩΔΟΥΣ

Συγγραφείς: Χριστίνα Φούντζουλα, Μαρία Τράπαλη

Σύνοψη

Η φασματοσκοπία απορρόφησης υπεριώδους-ορατού (UV-Vis absorption spectroscopy) είναι μία ευρέως χρησιμοποιούμενη τεχνική ενόργανης ανάλυσης σε γνωστικά αντικείμενα της Χημείας. Στη φασματοσκοπία απορρόφησης υπεριώδους-ορατού μελετάται η αλληλεπίδρατης της ακτινοβολίας, με μήκος κύματος στην περιοχή 200-900 nm του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος, με χημικά είδη, για την αποσαφήνιση της δομής αλλά και του τρόπου λειτουργίας αυτών των ειδών. Στο πεδίο της Βιοχημείας, η φασματοσκοπία απορρόφησης υπεριώδους-ορατού χρησιμοποιείται για την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό χρωμοφώρων, καθώς το σχήμα των φασμάτων απορρόφησης, το μήκος κύματος του μεγίστου της απορρόφησης αλλά και η έντασή της είναι χαρακτηριστικά συγκεκριμένων χρωμοφώρων. Μία άλλη εφαρμογή αφορά την παρακολούθηση βιοχημικών διεργασιών, όπως οι ενζυμικές αντιδράσεις.

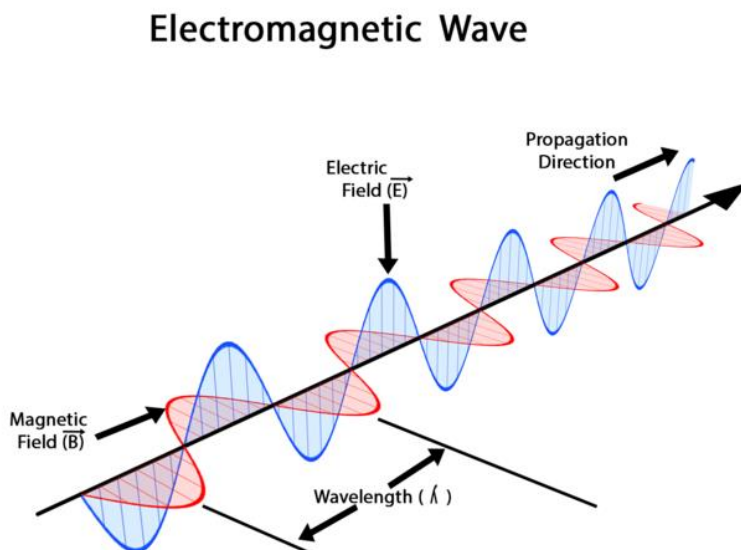
Προαπαιτούμενη γνώση

Απαιτούνται γνώσεις ενόργανης ανάλυσης.

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

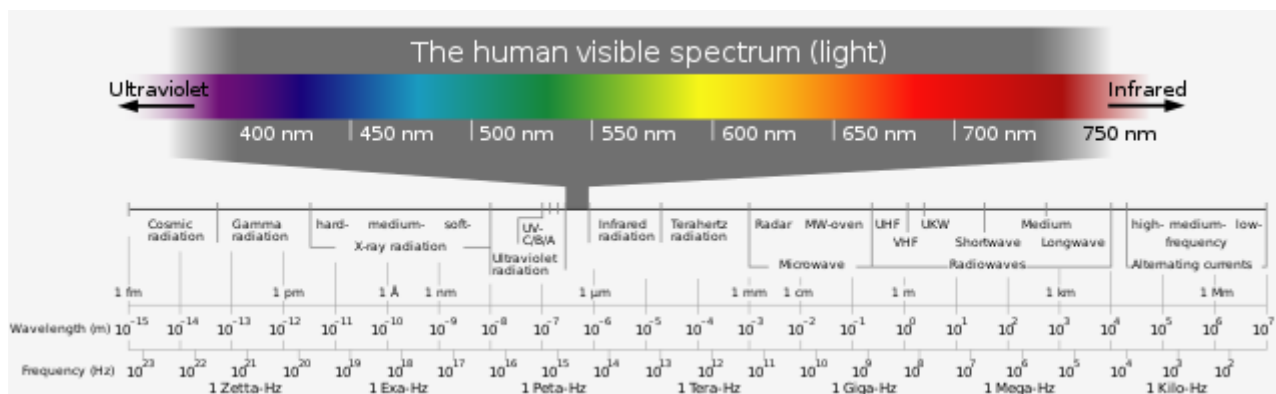
5.1 Ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία - Ηλεκτρομαγνητικό φάσμα

Η ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία (Duplancic D., 2011) (electromagnetic radiation) είναι η εκπομπή στον χώρο ηλεκτρομαγνητικής ενέργειας υπό μορφή κυμάτων που ονομάζονται *ηλεκτρομαγνητικά κύματα* (electromagnetic waves). Τα ηλεκτρομαγνητικά κύματα είναι συγχρονισμένα ταλαντούμενα ηλεκτρικά και μαγνητικά πεδία, τα οποία ταλαντώνονται σε κάθετα επίπεδα μεταξύ τους και κάθετα προς τη διεύθυνση διάδοσης. Διαδίδονται στο κενό με ταχύτητα ίση με την ταχύτητα του φωτός ($c=299.792.458$ m/s) αλλά και μέσα στην ύλη με ταχύτητα λίγο μικρότερη από την ταχύτητα του φωτός. Στην Εικόνα 5.1 δίνεται μία γραφική αναπαράσταση ενός ηλεκτρομαγνητικού κύματος.



Εικόνα 5.1 Γραφική αναπαράσταση ηλεκτρομαγνητικού κύματος.

Η ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία ανάλογα με τη συχνότητα των κυμάτων της και επομένως την ενέργεια που μεταφέρει, χωρίζεται σε περιοχές. Αυτές οι περιοχές είναι τα ραδιοκύματα, τα μικροκύματα, οι υπέρυθρες ακτίνες, το ορατό φως, οι υπεριώδεις ακτίνες, οι ακτίνες X και οι ακτίνες γάμμα. Το εύρος της περιοχής συχνοτήτων, που καλύπτουν τα ηλεκτρομαγνητικά κύματα, ονομάζεται *ηλεκτρομαγνητικό φάσμα*, *ΗΜΦ* (*electromagnetic spectrum, EMS*). Στην Εικόνα 5.2 παρουσιάζονται οι διάφοροι τύποι ακτινοβολίας του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος.



Εικόνα 5.2 Το ηλεκτρομαγνητικό φάσμα.

5.2 Αλληλεπίδραση ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας - ύλης

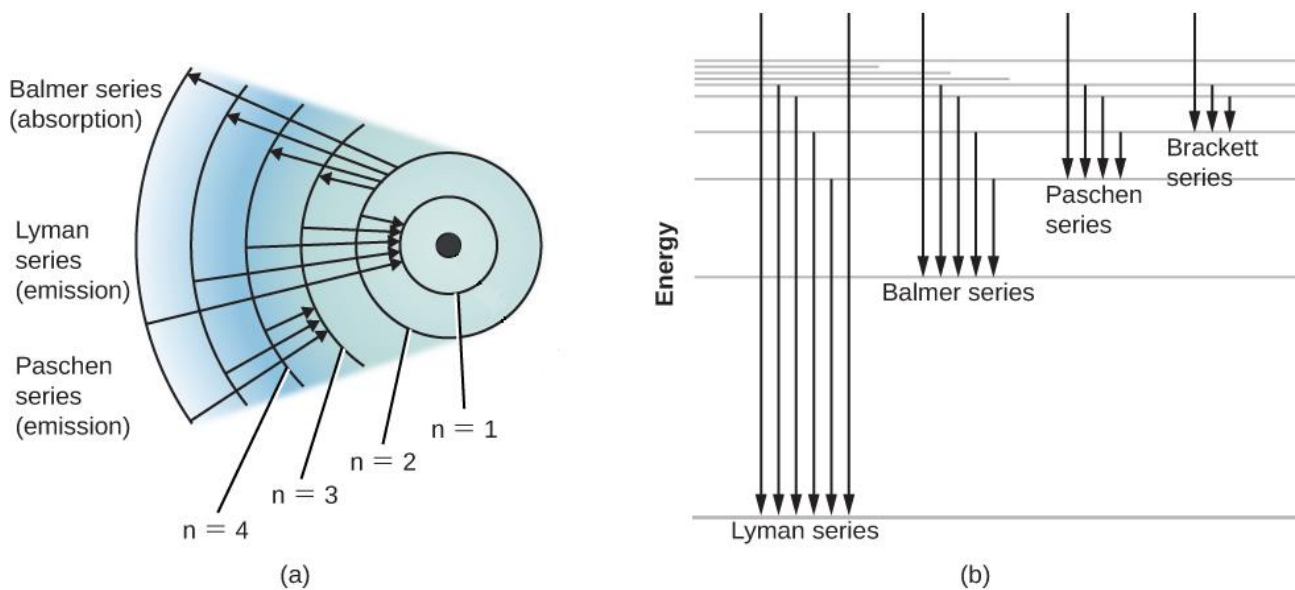
Ο πυρήνας πολλών πειραματικών προσεγγίσεων στη φασματοσκοπία είναι η ιδέα ότι τα άτομα και τα μόρια υπάρχουν σε καλά καθορισμένες ενεργειακές καταστάσεις. Η φασματοσκοπική ανάλυση είναι ένας τρόπος ανίχνευσης των βασικών κβαντικών καταστάσεων του εξεταζόμενου ατόμου ή μτησου και η χρησιμοποίηση των συμπερασμάτων της κβαντομηχανικής για την κατανόηση των αποτελεσμάτων. Ο επιστήμονας αντιστοιχεί τα φασματοσκοπικά δεδομένα στις μεταβολές των κβαντισμένων καταστάσεων και χρησιμοποιεί την κατανόηση της κβαντομηχανικής για την εξαγωγή συμπερασμάτων. Είναι η μοναδικότητα της ιδιότητας των κβαντισμένων ενεργειακών καταστάσεων ενός τησμου ή ενόςτησρίου που της επιτρέπει να κάνουμε προσδιορισμούς της ταυτότητας, της ενέργειας, της δομής και των ιδιοτήτων άγνωστων ενώσεων.

Στην Εικόνα 5.3 φαίνονται τα ενεργειακά επίπεδα του ηλεκτρονίου του ατόμου υδρογόνου. Το άτομο του υδρογόνου, που διαθέτει μόνο ένα πρωτόνιο και ένα ηλεκτρόνιο, αποτελεί τη βασική μελέτη περίπτωσης, για την επίδειξη των αρχών των κβαντισμένων ενεργειακών καταστάσεων και τη σύνδεσή τους με τη φασματοσκοπία. Για το υδρογόνο, η ενέργεια μιας δεδομένης ενεργειακής κατάστασης ή στάθμης δίνεται από την εξίσωση 5.1:

$$E_n = \frac{-13,6 \text{ eV}}{n^2} = \frac{-2,179 \times 10^{-18} \text{ J}}{n^2} \quad (5.1)$$

όπου,

n είναι ο κύριος κβαντικός αριθμός και μπορεί να πάρει θετικές ακέραιες τιμές από 1 έως, θεωρητικά, άπειρο.



Εικόνα 5.3 Ενεργειακά επίπεδα του ηλεκτρονίου του ατόμου υδρογόνου.

Αυτές οι σαφώς προσδιορισμένες ή κβαντισμένες καταστάσεις μπορούν να υπολογιστούν με την επίλυση της εξίσωσης *Schrödinger* για μια δεδομένη δυναμική ενέργεια ενός ατόμου ή μορίου.

Η επίλυση της εξίσωσης του *Schrödinger* για πολυηλεκτρονιακά άτομα περιλαμβάνει αρκετές προσεγγίσεις και τεχνικές με υπολογιστή. Με άλλα λόγια, δεν υπάρχει καμία διακριτή εξίσωση για τα ενεργειακά επίπεδα αυτών των ατόμων, αλλά αυτή η προσέγγιση με το μοντέλο του ατόμου του υδρογόνου οδηγεί σε μία αυξημένη κατανόηση των πολυηλεκτρονιακών ατόμων.

Αναφορικά με τα μόρια, η εικόνα είναι πιο πολύπλοκη, καθώς, επιπλέον των ηλεκτρονιακών καταστάσεων, υπάρχουν και δονητικές και περιστροφικές καταστάσεις, που συμμετέχουν στις μεταπτώσεις. Το ενεργειακό χάσμα των δονητικών και περιστροφικών μεταπτώσεων είναι μικρότερο από αυτό των ηλεκτρονιακών μεταπτώσεων.

Η φασματοσκοπία είναι μία μέτρηση της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας (είτε εκπομπής είτε απορρόφησης), καθώς τα άτομα ή τα μόρια υφίστανται αλλαγές στις κβαντικές καταστάσεις.

Ένα φωτόνιο μπορεί να απορροφήσει ή να εκπεμφθεί μόνο, όταν η ενέργειά του, $E_{\text{φωτονίου}}$, είναι ίδια με τη διαφορά ενέργειας μεταξύ δύο κβαντισμένων καταστάσεων ενός ατόμου ή ενός μορίου, ΔE . Μαθηματικά, αυτό σημαίνει ότι η απορρόφηση ή η εκπομπή μπορεί να συμβεί αν:

$$\Delta E = E_{\text{φωτονίου}} \quad (5.2)$$

όπου,

$$\Delta E = E_{\text{τελ}} - E_{\text{αρχ}} \quad (5.3)$$

και

$$E_{\text{φωτονίου}} = \frac{hc}{\lambda} = \frac{1,99 \times 10^{-25} \text{ Jm}}{\lambda} = h\nu \quad (5.4)$$

όπου,

$E_{\text{τελ}}$ και $E_{\text{αρχ}}$ είναι οι ενέργειες των τελικών και αρχικών καταστάσεων του ατόμου ή του μορίου αντίστοιχα,

λ είναι το μήκος κύματος του απορροφούμενου φωτονίου,

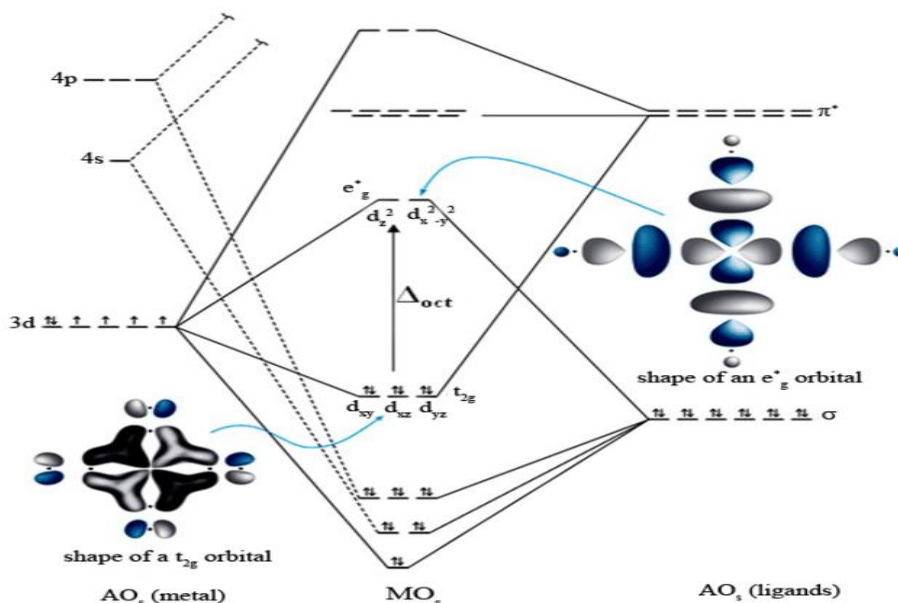
h είναι η σταθερά του Planck,

c είναι η ταχύτητα του φωτός,
 ν είναι η συχνότητα του απορροφούμενου φωτονίου.

Όταν ένα μόριο απορροφά ενέργεια με τη μορφή φωτονίου, η ενέργεια αυτή προωθεί ένα ηλεκτρόνιο από μια χαμηλότερη ενεργειακή κατάσταση (θεμελιώδης στάθμη) σε μια υψηλότερη ενεργειακή κατάσταση (διεγερμένη στάθμη). Προκειμένου το μόριο να είναι ικανό να απορροφήσει φωτόνιο, η ενέργεια του φωτονίου θα πρέπει να ταιριάζει με τη διαφορά ενέργειας μεταξύ των δύο ηλεκτρονικών καταστάσεων.

Τα ηλεκτρόνια ενός μορίου χαρακτηρίζονται ως σ -ηλεκτρόνια (όταν συμμετέχουν σε σ δεσμούς), π -ηλεκτρόνια (όταν συμμετέχουν σε π δεσμούς) και n -ηλεκτρόνια (όταν πρόκειται για μη δεσμικά ηλεκτρόνια).

Στην Εικόνα 5.4 παρουσιάζεται ένα γενικό ενεργειακό διάγραμμα κατειλημμένων δεσμικών και μη κατειλημμένων αντιδεσμικών μοριακών τροχιακών και οι σχετικές ενέργειες μετάπτωσης.



Εικόνα 5.4 Ενεργειακό διάγραμμα μοριακών τροχιακών.

Μια γρήγορη εξέταση της Εικόνας 5.4 μας επιτρέπει να κάνουμε τη γενίκευση ότι οι $\sigma \rightarrow \sigma^*$ μεταπτώσεις απαιτούν σημαντικά μεγαλύτερη ενέργεια από μια $\pi \rightarrow \pi^*$ της $\rightarrow \pi^*$ μετάπτωση. Γενικά, η σειρά, κατά φθίνουσα διαφορά ενέργειας, είναι:

$$\sigma\text{-}\sigma^* > n\text{-}\sigma^* > \pi\text{-}\pi^* > n\text{-}\pi^*$$

Οι ενέργειες της υπεριώδους-ορατής (UV-vis) ακτινοβολίας βρίσκονται στην περιοχή $\sim 1,50\text{-}6,20$ eV και αντιστοιχούν στο ενεργειακό χάσμα των μεταπτώσεων $\pi\text{-}\pi^*$ και $n\text{-}\pi^*$. Από την παρατήρηση αυτήν βγαίνει το συμπέρασμα ότι οι κορεσμένοι υδρογονάνθρακες, που εμφανίζουν μόνο $\sigma \rightarrow \sigma^*$ μεταπτώσεις, δεν μπορούν να διερευνηθούν με φασματοσκοπία υπεριώδους-ορατού. Οργανικές ενώσεις με έναν ή περισσότερους ακόρεστους δεσμούς (διπλούς δεσμούς ή τριπλούς δεσμούς) είναι πιθανότερο να είναι έγχρωμες. Γενικά, οργανικές λειτουργικές ομάδες με μη δεσμικά ζεύγη ηλεκτρονίων και διπλούς δεσμούς είναι τα χρωμοφόρα (chromophores).

Η σύζευξη των π δεσμών έχει πολύ σημαντικό ρόλο στο χρώμα του μορίου. Όταν ένα μόριο είναι συζευγμένο, το π -σύστημα εμφανίζει τη μορφή ενός μεγάλου τροχιακού, απεντοπισμένου από τα ατομικά κέντρα. Όσο ο βαθμός σύζευξης αυξάνεται, το ενεργειακό χάσμα $\pi \rightarrow \pi^*$ μειώνεται. Καθώς το ενεργειακό χάσμα μειώνεται, η απορρόφηση μετακινείται από την υπεριώδη περιοχή (υψηλότερη ενέργεια) στην ορατή περιοχή (χαμηλότερη ενέργεια) του ΗΜΦ. Αυτό σημαίνει ότι, καθώς ο βαθμός σύζευξης αυξάνει, το λ_{max} μετατοπίζεται σε μεγαλύτερα μήκη κύματος (ερυθρά μετατόπιση). Ο φασματοσκοπικός όρος για μετατόπιση σε μεγαλύτερα μήκη κύματος είναι *βαθυχρωμική μετατόπιση* (bathochromic shift).

Στη φασματομετρία UV-vis, η αναλύομενη ουσία βρίσκεται σχεδόν πάντα σε μορφή διαλύματος και πρέπει να εξετάζονται οι τρόποι με τους οποίους ο διαλύτης μπορεί να διαταράξει τα ενεργειακά επίπεδα του

χρωμοφόρου. Αναγνωρίζοντας ότι η γεωμετρία των τροχιακών των μη δεσμικών ηλεκτρονίων οδηγεί σε αλληλεπίδραση με τον διαλύτη, φαίνεται λογικό τα μη δεσμικά ηλεκτρόνια να αλληλεπιδρούν ισχυρά με πολικούς διαλύτες. Τα δίπολα των μορίων των διαλυτών συντάσσονται γύρω από τα ηλεκτρόνια αυτά και μειώνουν την ενέργεια των τροχιακών του μη δεσμικού ζεύγους ηλεκτρονίων. Εάν η ενέργεια του n -τροχιακού μειωθεί, τότε το ενεργειακό χάσμα $n \rightarrow \pi^*$ θα αυξηθεί και η μετάπτωση μεταξύ των δύο καταστάσεων θα απαιτεί μεγαλύτερη ενέργεια, οδηγώντας σε μια μετατόπιση σε χαμηλότερο λ_{\max} για αυτές τις κορυφές απορρόφησης σε πολικούς διαλύτες. Η μετατόπιση αυτή χαρακτηρίζεται ως *υποχρωμική μετατόπιση (hypsochromic shift, γνωστή ως «κυανή μετατόπιση»)*. Με παρόμοιο τρόπο, η γεωμετρία του π^* τροχιακού του επιτρέπει ασθενή αλληλεπίδραση με τα μόρια του διαλύτη, έτσι ώστε οι πολικοί διαλύτες να μειώνουν ελαφρώς την ενέργεια του π^* τροχιακού. Εάν η ενέργεια μειωθεί, τότε το χάσμα $\pi \rightarrow \pi^*$ μικραίνει, η μετάπτωση μεταξύ των δύο καταστάσεων απαιτεί μικρότερη ενέργεια και παρατηρείται μια μετατόπιση σε μεγαλύτερο λ_{\max} για αυτές τις κορυφές απορρόφησης σε πολικούς διαλύτες. Η μετατόπιση αυτή χαρακτηρίζεται ως *βαθυχρωμική μετατόπιση, (bathochromic shift, γνωστή ως «ερυθρά μετατόπιση»)*.

Πολλές σύμπλοκες ενώσεις μετάλλων μετάπτωσης είναι έγχρωμες. Από φασματοσκοπική άποψη, αυτό σημαίνει ότι αυτές οι σύμπλοκες ενώσεις απορροφούν ακτινοβολία από 400 nm έως 700 nm. Σε αντίθεση με τις απορροφήσεις των καθαρών οργανικών ενώσεων ($\sigma \rightarrow \sigma^*$, $\pi \rightarrow \pi^*$ ή $n \rightarrow \pi^*$), το χρώμα που παρατηρείται στις σύμπλοκες ενώσεις οφείλεται, κατά κανόνα, σε διεγέρσεις $d \rightarrow d^*$. Ωστόσο, επειδή οι ίδιοι οι υποκαταστάτες είναι συχνά οργανικά μόρια, είναι σημαντικό να αντιληφτούμε ότι μπορούν να συμβούν και μεταπτώσεις $\sigma \rightarrow \sigma^*$, $\pi \rightarrow \pi^*$ ή $n \rightarrow \pi^*$, οφειλόμενες στους υποκαταστάτες. Οι δεσμοί των υποκαταστατών με το μέταλλο προκαλούν σχάση της ενέργειας των d τροχιακών και δημιουργούν ένα, χαμηλής ενέργειας, HOMO – LUMO ενεργειακό χάσμα, που απορροφά στην ορατή περιοχή του ΗΜΦ. Το μέγεθος του ενεργειακού χάσματος είναι αποτέλεσμα των αλληλεπιδράσεων των ζευγών μη δεσμικών ηλεκτρονίων του υποκαταστάτη και των d -τροχιακών του μετάλλου. Πλήρης κατανόηση των ιδιοτήτων απορρόφησης των συμπλόκων ενώσεων των μετάλλων μετάπτωσης παρέχεται από τη θεωρία πεδίου υποκαταστατών (ligand field theory) και των διαγραμμάτων Tanabe Sugano (Tanabe Sugano diagrams).

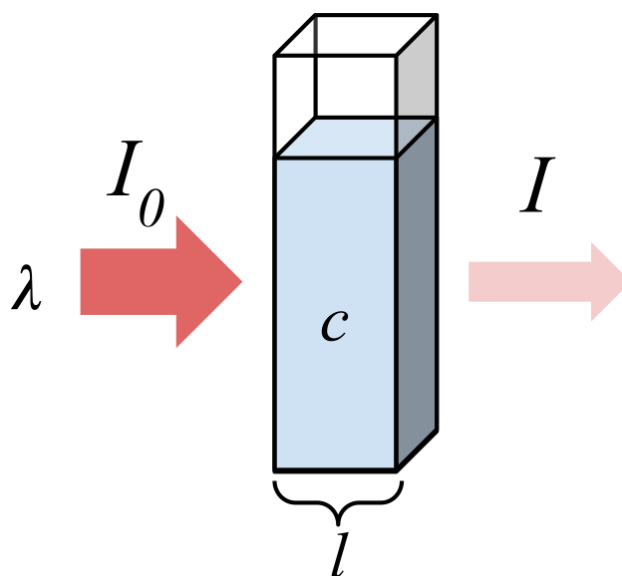
5.3 Απορρόφηση και διαπερατότητα

5.3.1 Νόμος της bert-Beer

Το 1852 ο Ελβετός επιστήμονας της Beer δημοσίευσε ένα ολοκληρωμένο έργο για την απορρόφηση του φωτός και απέδειξε τη λογαριθμική σχέση μεταξύ της μετάδοσης του φωτός μέσα από ένα υλικό και της απόστασης που διανύει το φως μέσα στο υλικό. Σήμερα, η σχέση αυτή συνοψίζεται στον νόμο του Beer. Αναφέρεται, επίσης, και ως νόμος Beer-Lambert και, σε ορισμένα βιβλία, ως νόμος της Beer-Lambert-Bouguer.

Στη φασματοσκοπία απορρόφησης υπεριώδους-ορατού μετريέται η *διαφορά* της ισχύος της πηγής, που φτάνει στον ανιχνευτή, όταν δεν υπάρχει δείγμα (I_0), και της ισχύος της πηγής που φτάνει στον ανιχνευτή, καθώς το φως περνά μέσα από ένα δείγμα (I). Η αναλογία των δύο μετρήσεων ισχύος ονομάζεται *διαπερατότητα (Transmittance, T)* και μπορεί να κυμαίνεται από 0 έως 1 (ή από 0 έως 100%) (Εικόνα 5.5):

$$T = \frac{I}{I_0} \quad (5.5)$$



Εικόνα 5.5 Σχήμα που περιγράφει τη διαπερατότητα και την απορρόφηση που οδηγεί στη χρήση τους στον νόμο Beer-Lambert.

Ως απορρόφηση (*Absorbance*, A) ορίζεται ο αρνητικός δεκαδικός λογάριθμος της διαπερατότητας

$$A = -\log T = -\log \tau \quad \eta \quad \zeta = \epsilon bc \quad (5.6)$$

όπου

A : απορρόφηση (χωρίς μονάδες),

T : διαπερατότητα (χωρίς μονάδες),

I_0 : ισχύς της ακτινοβολίας που φτάνει στον ανιχνευτή, όταν δεν υπάρχει δείγμα,

I : ισχύς της ακτινοβολίας που φτάνει στον ανιχνευτή, καθώς το φως περνά μέσα από ένα δείγμα,

ϵ : γραμμομοριακή απορροφητικότητα (molar absorptivity) σε $L/mol \cdot cm$,

b : μήκος διαδρομής της ακτινοβολίας μέσα από το δείγμα σε cm ,

c : συγκέντρωση αναλύτη σε M .

Ο νόμος του Beer σε μια πιο σύντομη εκδοχή διατυπώνεται ως:

$$A = \epsilon bc \quad (5.7)$$

όπου,

ϵ έχει μονάδες $cm^{-1} \cdot M^{-1}$,

c έχει μονάδες σε M .

Η γραμμομοριακή ή μοριακή απορροφητικότητα είναι η σταθερά αναλογίας, που συνδέει την απορρόφηση με τη συγκέντρωση. Η γραμμομοριακή απορροφητικότητα, ϵ , εξαρτάται από το μήκος κύματος και αναφέρεται για κάθε κορυφή του φάσματος.

5.3.2 Αποκλίσεις από τον Νόμο Lambert-Beer

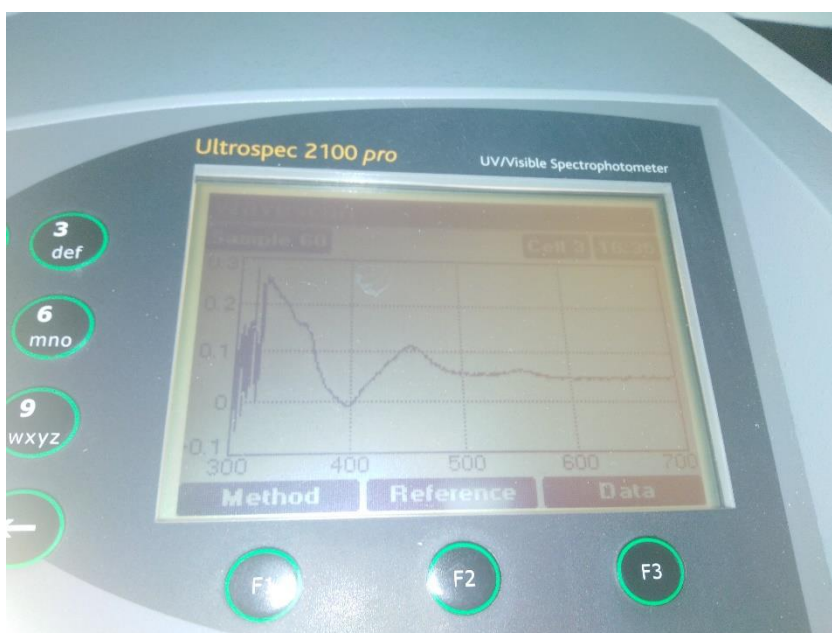
Σύμφωνα με τον νόμο Lambert-Beer, η γραφική παράσταση της απορρόφησης, A , έναντι της συγκέντρωσης c είναι ευθεία γραμμή, με κλίση ϵb . Στην πραγματικότητα, αυτό ισχύει μόνο, όταν οι τιμές της απορρόφησης είναι μικρότερες από 1. Όταν οι τιμές της απορρόφησης υπερβούν την τιμή 1, παρατηρούνται αποκλίσεις, οι οποίες χαρακτηρίζονται ως **θετικές αποκλίσεις** ή **αρνητικές αποκλίσεις**. Οι αποκλίσεις αυτές, ανάλογα με

την προέλευσή τους, ομαδοποιούνται σε τρεις κατηγορίες: τις *πραγματικές αποκλίσεις*, τις *χημικές αποκλίσεις* και τις *οργανολογικές αποκλίσεις*.

Οι πραγματικές αποκλίσεις εμφανίζονται, γιατί ο νόμος Lambert-Beer έχει εφαρμογή σε διαλύματα μικρής συγκέντρωσης διαλυμένων αναλυτών ($<10^{-3}M$). Όταν η συγκέντρωση ενός αναλύτη στο διάλυμα είναι μεγαλύτερη από $10^{-3}M$, η συμπεριφορά του διαφοροποιείται λόγω αλληλεπιδράσεων με τον διαλύτη και τα μόρια των άλλων αναλυτών. Σε πολύ μεγάλες δε συγκεντρώσεις αναλυτών, λαμβάνει χώρα το φαινόμενο της *εσωτερικής προάσπισης (internal screening)*. Πολλά μόρια αναλυτών βρίσκονται στη «σκιά» άλλων και επομένως δεν αλληλεπιδρούν με την προσπίπτουσα ακτινοβολία. Σε αυτές τις περιπτώσεις, η γραφική παράσταση της απορρόφησης, A , έναντι της συγκέντρωσης c καμπυλώνει προς τα κάτω (αρνητική απόκλιση).

Οι χημικές αποκλίσεις εμφανίζονται λόγω χημικών φαινομένων, όπως είναι οι αλληλεπιδράσεις αναλυτών- διαλύτη. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι η ένωση *ερυθρό της φαινόλης (phenol red)*, η οποία έχει διαφορετικό χρώμα στην όξινη (κίτρινο) και τη βασική (κόκκινο) μορφή. Λόγω των δομών συντονισμού της ένωσης, μεταβάλλεται η ηλεκτρονική κατανομή των δεσμών στην ένωση με το pH του διαλύματος.

Μία αιτία των οργανολογικών αποκλίσεων είναι η πολυχρωματική και όχι η μονοχρωματική φύση της προσπίπτουσας ακτινοβολίας. Ο νόμος Lambert-Beer ισχύει αποκλειστικά για μονοχρωματική ακτινοβολία. Οι διατάξεις, που απομονώνουν τμήματα από συνεχή φάσματα διάφορων πηγών, παράγουν συνήθως συμμετρικές ζώνες μηκών κύματος γύρω από μία επιλεγόμενη τιμή. Στα άκρα αυτών των ζωνών, οι τιμές του συντελεστή γραμμομοριακής απορροφητικότητας, ϵ , είναι διαφορετικές (ο ϵ εξαρτάται από το λ). Όσο μεγαλύτερη είναι η διαφορά μεταξύ των δύο τιμών ϵ τόσο μεγαλύτερη είναι η απόκλιση από τον νόμο του Beer. Για τον λόγο αυτόν, είναι σημαντικό η ποσοτική ανάλυση να γίνεται στο λ_{\max} . (Εικόνα 5.6).



Εικόνα 5.6 Φάσμα απορρόφησης.

Μια δεύτερη αιτία οργανολογικών αποκλίσεων είναι η παρουσία παράσιτης ακτινοβολίας (*stray radiation*). Η παράσιτη ακτινοβολία (ή αλλιώς σκεδαζόμενη ακτινοβολία) είναι η ακτινοβολία εκτός της επιλεγμένης ζώνης μηκών κύματος και είναι αποτέλεσμα της ανάκλασης ή σκέδασης σε εσωτερικές επιφάνειες του οργάνου (κάτοπτρα, φακοί, φράγματα, φίλτρα, παράθυρα). Εάν ο αναλύτης απορροφά στα μήκη κύματος της παράσιτης ακτινοβολίας, τότε παρατηρείται απόκλιση από τον νόμο Lambert-Beer, παρόμοια με αυτή της πολυχρωματικής ακτινοβολίας. Τέλος, διαφορές στις κυψελίδες δείγματος και αναφοράς έχουν ως αποτέλεσμα διαφορά στο μήκος της διαδρομής της ακτινοβολίας μέσα από το δείγμα και επιφέρουν αποκλίσεις από τον νόμο Lambert- Beer.

5.4 Εφαρμογές φασματοφωτομετρίας

5.4.1 Ποιοτική ανάλυση- Φάσμα Απορρόφησης

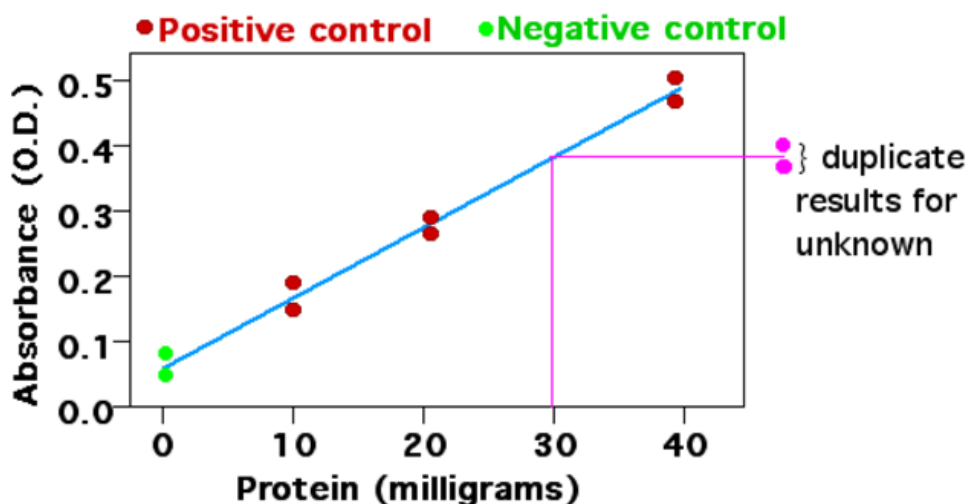
Η γραφική παράσταση της απορρόφησης ενός διαλύματος αναλύτη ως συνάρτηση του μήκους κύματος της ακτινοβολίας δίνει το **φάσμα απορρόφησης** του αναλύτη.

Το μήκος κύματος, στο οποίο παρατηρείται το μεγαλύτερο ποσοστό απορρόφησης ονομάζεται *μήκος κύματος μέγιστης απορρόφησης* και συμβολίζεται με λ_{\max} . Από την τιμή του λ_{\max} , η οποία είναι χαρακτηριστική του αναλύτη, λαμβάνονται ποιοτικές πληροφορίες. Στην Εικόνα 5.6 απεικονίζεται ένα χαρακτηριστικό φάσμα απορρόφησης.

5.4.2 Ποσοτική ανάλυση - Χάραξη πρότυπης καμπύλης

Ενώ το λ_{\max} δίνει ποιοτικές πληροφορίες για τη φύση του αναλύτη, τηςεμβადό της κορυφής του τμήματος σχετίζεται με την ποσότητα του αναλύτη στο δείγμα και άρα δίνει ποσοτική πληροφορία.

Για τη διεξαγωγή ποσοτικής ανάλυσης, θα πρέπει να προηγηθεί η χάραξη της *καμπύλης βαθμονόμησης* ή *πρότυπης καμπύλης*. Η καμπύλη βαθμονόμησης είναι η γραφική παράσταση της απορρόφησης ως συνάρτηση της συγκέντρωσης για διαλύματα αναλύτη γνωστής συγκέντρωσης. Σύμφωνα με τον νόμο Lambert-Beer, η εξάρτηση είναι γραμμική με κλίση της ευθείας ίση με eb (Εικόνα 5.7). Με δεδομένη την καμπύλη βαθμονόμησης, η άγνωστη συγκέντρωση ενός αναλύτη μπορεί να προσδιοριστεί.



Εικόνα 5.7 Πρότυπη καμπύλη βαθμονόμησης.

5.5 Οργανολογία στη φασματοφωτομετρία

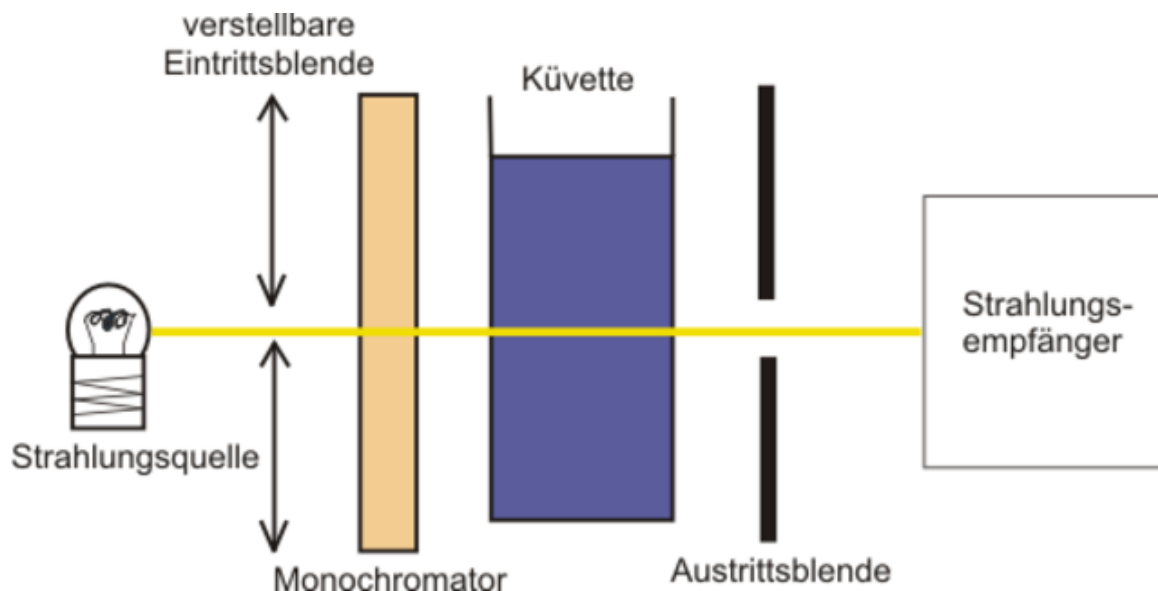
5.5.1 Τύποι φασματοφωτομέτρων UV-vis

Υπάρχουν τρεις γενικοί τύποι φασματοφωτομέτρων UV-vis, το φασματοφωτόμετρο σταθερού μήκους κύματος (fixed spectrophotometer), το φασματοφωτόμετρο σάρωσης (scanning spectrophotometer) και το φασματοφωτόμετρο συστοιχίας (array spectrophotometer).

Το *φασματοφωτόμετρο σταθερού μήκους κύματος* έχει χαμηλό κόστος, εξειδικευμένη χρήση και θεωρείται ως φασματοφωτόμετρο ορατού. Η πηγή και τα οπτικά μέρη που χρησιμοποιούνται σε τέτοιου είδους φασματοφωτόμετρα βασικού εξοπλισμού αποκλείουν τη χρήση τους για ανάλυση στην περιοχή του υπεριώδους. Διαθέτει μία απλή πηγή ακτινοβολίας, έναν απλό υποδοχέα δείγματος και ελέγχει ένα μήκος κύματος κάθε φορά. Το *φασματοφωτόμετρο σάρωσης* είναι παρόμοιο με το προηγούμενο, αλλά μπορεί να σαρώνει εύρος μηκών κύματος, μετρώντας την απορρόφηση σε όλη την περιοχή σάρωσης. Τα φασματοφωτόμετρα σάρωσης κατηγοριοποιούνται, επιπλέον, σε απλής και διπλής δέσμης. Η τρίτη κατηγορία, το *φασματοφωτόμετρο συστοιχίας*, αν και εξωτερικά μοιάζει με το φασματοφωτόμετρο σάρωσης,

διτηρεί από τα προηγούμενα, καθώς δεν εκτελεί *σάρωση*. Αντ' αυτού, μετρά την απορρόφηση ακτινοβολίας πολλών μηκών κύματος ταυτόχρονα, διασπείροντας το φως σε πολλούς ανιχνευτές.

Το βασικό σχηματικό διάγραμμα ενός φασματοφωτομέτρου υπεριώδους-ορατού απεικονίζεται στην Εικόνα 5.8. Αποτελείται από την πηγή της ακτινοβολίας μονοχρωμάτορα, την κυβελίδα του δείγματος και τον ανιχνευτή. Η Εικόνα 5.9 αναπαριστά το φασματοφωτόμετρο Hach Lange DR3900 VIS Spectral Photometer.



Εικόνα 5.8 Σχηματικό διάγραμμα ενός φασματοφωτομέτρου ορατού-υπεριώδους.



Εικόνα 5.9 Φασματοφωτόμετρος Hach Lange DR3900 VIS Spectral Photometer.

5.5.2 Πηγές ακτινοβολίας

Υπάρχουν αρκετές **πηγές ακτινοβολίας**, που μπορεί να χρησιμοποιήσει κανείς στη φασματοσκοπία UV-vis. Οι πιο κοινές πηγές, στα εμπορικά διαθέσιμα όργανα, είναι συνδυασμός δύο πηγών, της *λυχνίας εκκένωσης δευτερίου* (*deuterium discharge lamp*) και της *λυχνίας βολφραμίου-αλογόνου* (*tungsten halogen bulb*). Το υπεριώδες τμήμα της ακτινοβολίας παρέχεται από μια λυχνία εκκένωσης δευτερίου, ενώ η ορατή και η ακτινοβολία κοντά στην υπέρυθρη περιοχή παρέχεται από τη λυχνία βολφραμίου-αλογόνου.

Η *λυχνία βολφραμίου* είναι ένας εκπομπός μέλανος σώματος, του οποίου το προφίλ εκπομπής σχετίζεται άμεσα με την τάση που εφαρμόζεται στο νήμα βολφρατησυ. Η λυχνία βολφραμίου εκπττει φωσ από μήκος κύμττηςμικρότερο από 400 nm έως κοντά στο υπέρυθρο. Δυστυχώς, η τάση που απαιτείται, για ικανοποιητική ένταση εκπομπής στην περιοχή UV-vis, μειώνει σημαντικά τη διάρκεια ζωής του νήματος

βολφραμίου. Η προσθήκη μικρής ποσότητας ιωδίου στη λυχνία επεκτείνει τη διάρκεια ζωής της και επιτρέπει τη λειτουργία της σε υψηλότερες τάσεις. Αυτός ο τύπος λυχνιών ονομάζεται *λυχνία αλογόνου*.

Η *λυχνία εκκένωσης δευτερίου* λειτουργεί σε χαμηλή πίεση και παράγει συνεχή ακτινοβολία από 165 έως 460 nm. Αν και η λυχνία παράγει ακτινοβολία μικρότερη από 200 nm, τα οπτικά υλικά (κυρίως η τηγμένη πυριτία ή ο χαλαζίας), που χρησιμοποιούνται για την καθοδήγηση της ακτινοβολίας στο εσωτερικό του φασματομέτρου περιορίζουν το κάτω όριο του μήκους σε περίπου 200 nm.

Πολλά όργανα υψηλής ποιότητας χρησιμοποιούν ως πηγή λυχνία τόξου ξένου (τηση arc lamp). Αυτές οι πηγές αποτελούνται από λυχνία χαλαζία, που περιέχει αέριο ξένο σε πολύ υψηλή πίεση. Χρησιμοποιείται ηλεκτρικό τόξο για τη διέγερση του αερίου και παράγεται έντονη, συνεχής ακτινοβολία στην περιοχή 250 - 700 nm.

5.5.3 Επιλογή μήκους κύματος

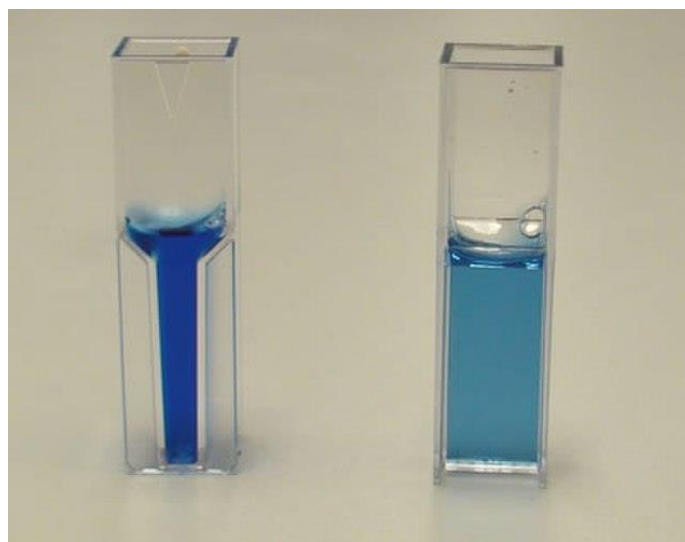
Ιδανικά, η επιλογή μήκους κύματος θα έπρεπε να εξασφαλίζει ακτινοβολία ενός μόνο μήκους κύματος. Στην πραγματικότητα, αυτό που λαμβάνεται είναι μία περιοχή ή ζώνη μηκών κύματος. Η επιλογή μήκους κύματος επιτυγχάνεται είτε με *φίλτρα* είτε με *μονοχρωμάτορα*.

Τα φίλτρα διακρίνονται σε *φίλτρα συμβολής*, *φίλτρα απορρόφησης* και *φίλτρα αποκοπής περιοχής*. Η λειτουργία των φίλτρων συμβολής βασίζεται σε φαινόμενα συμβολής και ανάκλασης της ακτινοβολίας τα οποία επιτρέπουν τη διέλευση στενών ζωνών ακτινοβολίας. Αποτελούνται από ένα διαφανές διηλεκτρικό μέσο (το πάχος του οποίου καθορίζει και το μήκος κύματος), τοποθετημένο ανάμεσα σε δύο ημιερατές μεταλλικές μεμβράνες, οι οποίες με τη σειρά τους βρίσκονται ανάμεσα σε δύο, συνήθως, γυάλινες, πλάκες. Η λειτουργία των φίλτρων απορρόφησης βασίζεται στην απορρόφηση συγκεκριμένων περιοχών του φάσματος της ακτινοβολίας. Είναι συνήθως κατασκευασμένα από έγχρωμο γυαλί. Τα φίλτρα αποκοπής περιοχής (cut-off filters) έχουν μεγάλη διαπερατότητα (σχεδόν 100%) σε ένα τμήμα του ορατού φάσματος και αποκόπτουν το υπόλοιπο. Συνδυάζοντας κατάλληλα φίλτρα αποκοπής περιοχής και απορρόφησης μπορεί να απομονωθεί μια στενή φασματική ζώνη.

Οι μονοχρωμάτορες είναι διατάξεις που διαχωρίζουν την ακτινοβολία της πηγής σε επιμέρους μήκη κύματος και επιλέγουν ένα μικρό εύρος μηκών κύματος, τα οποία αφήνουν να περάσουν προς το δείγμα. Ανάλογα με το στοιχείο διασποράς της ακτινοβολίας διακρίνονται σε μονοχρωμάτορες πρίσματος και μονοχρωμάτορες φράγματος. Το πρίσμα (χαλαζίας, κρυσταλλικό πυρίτιο) αναλύει την ακτινοβολία σε επιμέρους μήκη κύματος, γιατί ο δείκτης διάθλασης του υλικού, n , μεταβάλλεται με το μήκος κύματος. Το φράγμα περίθλασης είναι ένα οπτικό εξάρτημα αποτελούμενο από χαραγές. Κάθε χαραγή εκτρέπει το φως, λειτουργώντας ως ξεχωριστή πηγή ακτινοβολίας χαρακτηριστικού μήκους κύματος. Όσες περισσότερες χαραγές φέρει το φράγμα περίθλασης, τόσο μεγαλύτερη είναι η διακριτική ικανότητα του μονοχρωμάτορα.

5.5.4 Κυψελίδες δείγματος

Οι υποδοχείς των δειγμάτων (κυψελίδες) είναι κατασκευασμένες από γυαλί ή πλαστικό για την ορατή περιοχή και από κρυσταλλικό πυρίτιο (χαλαζία, quartz) για την υπεριώδη περιοχή του φάσματος (Εικόνα 5.10).



Εικόνα 5.10 Κυβελίδες που χρησιμοποιούνται στους φωτομετρικούς προσδιορισμούς.

5.5.5 Ανιχνευτές

Οι ανιχνευτές είναι διατάξεις, οι οποίες παράγουν ηλεκτρικό σήμα, όταν σε αυτές προσπίπτουν φωτόνια. Οι συνηθέστεροι τύποι ανιχνευτών είναι οι *φωτολυχνίες (phototubes)*, οι *φωτοπολλαπλασιαστές (photomultiplier tubes)* και οι *φωτοдиодοι (photodiode arrays)*.

Η λειτουργία των φωτολυχνιών στηρίζεται στην εκπομπή ηλεκτρονίων από μία φωτοευαίσθητη επιφάνεια, όταν σε αυτή προσπίπτει φωτεινή ακτινοβολία. Στους φωτοπολλαπλασιαστές πραγματοποιείται συνεχής ενίσχυση (πολλαπλασιασμός) των ηλεκτρονίων που παράγονται από μια φωτοευαίσθητη επιφάνεια. Οι φωτοдиодοι πλεονεκτούν στην ταυτόχρονη καταγραφή ολόκληρου του φάσματος.

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟ ΜΕΡΟΣ

5.6 Εκμάθηση φωτομετρικού προσδιορισμού

5.6.1 Πειραματική πορεία

1. Ζυγίστε περίπου 0.93 g $K_2Cr_2O_7$.
2. Μεταφέρετε το $K_2Cr_2O_7$ σε μια ογκομετρική φιάλη του 1 L η οποία περιέχει 100 mL διαλύματος H_2SO_4 0.1N. Προσθέστε απιονισμένο νερό μέχρι τη χαραγή της φιάλης ανακατεύοντας συνεχώς.
3. Η συγκέντρωση του διαλύματος είναι mol/l.
4. Στη συνέχεια αραιώστε το παραπάνω διάλυμα ως εξής:

0.5 ml διάλυμα	+ 4.5 ml απιονισμένο νερό
1.5 ml διάλυμα	+ 3.5 ml απιονισμένο νερό
2.5 ml διάλυμα	+ 2.5 ml απιονισμένο νερό
3.5 ml διάλυμα	+ 1.5 ml απιονισμένο νερό
4.5 ml διάλυμα	+ 0.5 ml απιονισμένο νερό

5. Υπολογίστε τη συγκέντρωση των αραιώσεων:

ΑΡΑΙΩΣΗ	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ (mol/L)
A	
B	
Γ	
Δ	
E	

6. Μεταφέρετε 3 ml από την αραιώση A σε ένα σωληνάριο φωτομέτρου.
7. Ρυθμίστε το μήκος κύματος του φωτομέτρου στο $\lambda=325$ και χωρίς σωληνάριο ρυθμίστε το όργανο.
8. Τοποθετήστε το σωληνάριο με το διάλυμα στον υποδοχέα του φωτομέτρου.
9. Σημειώστε την απορρόφηση και τη διαπερατότητα στον πίνακα που ακολουθεί.
10. Επαναλάβετε τα στάδια 7 και 8 αυξάνοντας το λ ανά 5 nm μέχρι το 405 nm και σημειώστε την απορρόφηση και διαπερατότητα του καθενός στον παρακάτω πίνακα:

ΜΗΚΟΣ ΚΥΜΑΤος(λ)	ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΗ (A)	ΔΙΑΠΕΡΑΤΟΤΗΤΑ (%T)
325		
330		
335		
340		
345		
350		
355		
360		
365		
370		
375		
380		
385		
390		
395		
400		
405		

Κατασκευάστε την καμπύλη απορρόφησης. Από τη γραφική αυτή παράσταση σημειώστε το λ της μέγιστης απορρόφησης (λ_{max}) γι' αυτό το διάλυμα.

Στο λ_{max} μετρήστε και σημειώστε τις A και %T όλων των αραιώσεων. Κατασκευάστε τις καμπύλες A και %T.

ΑΡΑΙΩΣΗ	A	%T
A		
B		
Γ		
Δ		
E		

Παρατηρήσεις:

5.7 Εκμάθηση φωτομετρικού προσδιορισμού

5.7.1 Χρησιμοποιούμενα διαλύματα/αντιδραστήρια

- Διάλυμα I₂: 2 % v/v- Αραίωση 1:100
- Ρυθμιστικό διάλυμα με pH = 7,2 (buffer) ή Απιονισμένο νερό
- Διάλυμα αμύλου 1 % w/v

5.7.2 Πειραματική πορεία

1. Δημιουργήστε τα ακόλουθα διαλύματα και υπολογίστε τη συγκέντρωσή τους:
 - 1^ο: 1500 μl buffer + 750 μl διαλύματος I₂ + 50 μl διαλύματος αμύλου
 - 2^ο: 1500 μl buffer + 750 μl διαλύματος I₂ + 25 μl διαλύματος αμύλου
 - 3^ο: 1500 μl buffer + 750 μl διαλύματος I₂ + 15 μl διαλύματος αμύλου
 - 4^ο: 1500 μl buffer + 750 μl διαλύματος I₂ + 10 μl διαλύματος αμύλου 5^ο: 1500 μl buffer + 750 μl διαλύματος I₂ + 5 μl διαλύματος αμύλου
2. Μεταφέρετε 2 ml από το 1^ο διάλυμα σε μία κυψελίδα φωτομέτρου.
3. Ρυθμίστε το μήκος κύματος του φωτομέτρου στο λ=325 και με κενή κυψελίδα ρυθμίστε το όργανο.
4. Τοποθετήστε την κυψελίδα με το διάλυμα στον υποδοχέα του φωτομέτρου.
5. Σημειώστε την απορρόφηση στον πίνακα που ακολουθεί.
6. Επαναλάβετε τα στάδια 3 και 4 αυξάνοντας το λ ανά 5 nm μέχρι το 670 nm και σημειώστε την απορρόφηση του καθενός στον παρακάτω πίνακα:

ΜΗΚΟΣ ΚΥΜΑΤΟΣ (λ)	ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΗ (A)
325	
330	
335	
340	
345	
350	
355	
360	

365	
370	
375	
380	
385	
390	
395	
400	
405	
410	
415	
420	
425	
430	
435	
440	
445	
450	
455	
460	
465	
470	
475	
480	
485	
490	
495	
500	
505	
510	
515	
520	
525	
530	
535	
540	
545	
550	
555	
560	
565	
570	
575	
580	
585	
590	
595	

600	
605	
610	
615	
620	
625	
630	
635	
640	
645	
650	
655	
660	
665	
670	

Κατασκευάστε την καμπύλη απορρόφησης. Από τη γραφική αυτή παράσταση σημειώστε το λ της μέγιστης απορρόφησης (λ_{\max}) γι' αυτό το διάλυμα.

Στο λ_{\max} μετρήστε και σημειώστε τις Α όλων των διαλυμάτων που παρασκευάσατε:

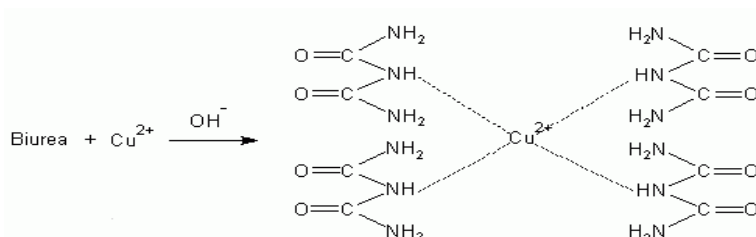
ΔΙΑΛΥΜΑ	ΑΠΟΡΡΟΦΗΣΗ
1 ^ο	
2 ^ο	
3 ^ο	
4 ^ο	
5 ^ο	

Παρατηρήσεις:

5.8 Ποσοτικός προσδιορισμός ολικών πρωτεϊνών σε ορό αίματος με τη μέθοδο της διουρίας (Biuret test)

Η συγκέντρωση πρωτεϊνών στον ορό είναι ένας δείκτης της κατάστασης ενυδάτωσης του σώματος. Αυξημένες συγκεντρώσεις παρατηρούνται στην αφυδάτωση και χαμηλότερες συγκεντρώσεις όταν υπάρχει οίδημα. Η παρατεταμένη κατάκλιση έχει ως αποτέλεσμα μειωμένη συγκέντρωση ολικής πρωτεΐνης. Ως συνέπεια παθολογικών καταστάσεων, τα μειωμένα επίπεδα λευκωματίνης ορού θα έχουν ως αποτέλεσμα χαμηλότερες συγκεντρώσεις ολικής πρωτεΐνης.

Ουσίες που περιέχουν τουλάχιστον δύο πεπτιδικούς δεσμούς σχηματίζουν σε αλκαλικό περιβάλλον σύμπλοκα με ιόντα χαλκού (Cu^{2+}), που έχουν έντονη ιώδη ή ερυθροϊώδη χροιά και απορροφούν με $\lambda_{\max} \sim 540$ nm. Η αντίδραση αυτή ονομάζεται *αντίδραση διουρίας*, γιατί η απλούστερη ουσία που τη δίνει θετική είναι η διουρία:



Να σημειωθεί ότι η διουρία δεν βρίσκεται στους ζωντανούς οργανισμούς, αλλά απλώς δίνει την ίδια αντίδραση, όπως και ένα απλό πεπτίδιο.

Τα φάσματα απορρόφησης των συμπλόκων διάφορων πρωτεϊνών με χαλκό είναι παρόμοια, αλλά όχι πανομοιότυπα. Έτσι, μπορούμε να χρησιμοποιήσουμε οποιαδήποτε πρωτεΐνη ως πρότυπο για όλες τις συνηθισμένες πρωτεΐνες, χωρίς να έχουμε σφάλμα μεγαλύτερο του 10% κατά τον ποσοτικό προσδιορισμό της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών.

Εάν δείγμα αίματος συλλεχθεί σε δοκιμαστικούς σωλήνες χωρίς αντιπηκτικό και αφεθεί να πήξει, της η υδατική άνω φάση της λαμβάνεται με φυγοκέντριση στηςται ορός. Ο ορός λαμβάνεται από το ολικό αίμα με φυγοκέντριση σε 3000-3500 rpm για 10 min, αφού το ολικό αίμα αφεθεί να πήξει για 30 min, χωρίς να προστεθεί αντιπηκτικό. Η κύρια διαφοροποίηση μεταξύ ορού και πλάσματος είναι ότι ο ορός στερείται ινωδογόνου, καθώς το ινωδογόνο –μετατρέπεται σε ινώδες κατά την πήξη του αίματος, ως αποτέλεσμα της πρωτεολυτικής δράσης της θρομβίνης. Για τεχνικούς λόγους, πολλές βιοχημικές μετρήσεις εκτελούνται στον ορό, οι συγκεντρώσεις όμως των περισσοτέρων ουσιών είναι ίσες και στα δύο υγρά (ορό, πλάσμα). Η σταθερότητα των πρωτεϊνών στο δείγμα είναι 6 ημέρες σε θερμοκρασία 2-10°C.

Οι φυσιολογικές τιμές ολικών πρωτεϊνών σε g/dL είναι:

- Ενήλικες 6.6 - 8.7
- Νεογνά (μέχρι 4 εβδομάδων) 4.6 - 6.8
- Βρέφη (2 - 12 μηνών) 4.8 - 7.6
- Παιδιά (πάνω από 12 μηνών) 6.0 - 8.0

5.8.1 Όργανα-Αντιδραστήρια

- Φασματοφωτόμετρο Hach Lange DR3900 VIS Spectral Photometer (Εικόνα 5.9).
- Διάλυμα διουρίας. Για την παρασκευή του διαλύματος της διουρίας, ζυγίζονται 1,5 g ένυδρου θειικού χαλκού (cupric sulfate pentahydrate, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) και 6,0 g ένυδρου τρυγικού καλίου - νατρίου (sodium potassium tartrate tetrahydrate, $\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) και διαλύονται σε 500 mL H_2O . Στο διάλυμα προστίθενται 300 ml 10% NaOH και συμπληρώνεται με H_2O μέχρι όγκου 1L. Το τελικό διάλυμα φυλάσσεται σε πλαστική φιάλη προστατευμένο από το φως.
- Διάλυμα 4 mM NaOH.
- Διάλυμα καζεΐνης 2,5 mg/mL σε 4 mM NaOH.

5.8.2 Πειραματική πορεία

Ετοιμάστε μια σειρά από 5 δοκιμαστικούς σωλήνες με αυξανόμενες ποσότητες διαλύματος καζεΐνης (2,5 mg/mL σε 4 mM NaOH), 4mM NaOH και αντιδραστήριο διουρίας σύμφωνα με τον πίνακα:

Αριθμός σωλήνα	Καζεΐνη 2,5mg/mL (mL)	4mM NaOH (mL)	Αντιδραστήριο διουρίας (mL)
1	0,0	5,0	3,0
2	1,0	4,0	3,0
3	2,0	3,0	3,0
4	4,0	1,0	3,0
5	5,0	0,0	3,0

Προσθέστε τελευταίο το αντιδραστήριο της διουρίας και ανακατέψτε καλά το περιεχόμενο των σωλήνων. Το χρώμα αναπτύσσεται στη μεγαλύτερη του ένταση μέσα σε 20 λεπτά και είναι σταθερό για 1 ώρα. Ο σωλήνας 1 είναι το τυφλό (το δείγμα αναφοράς που περιέχει όλα τα αντιδραστήρια εκτός από την πρωτεΐνη).

Τοποθετήστε στο φασματοφωτόμετρο τον επιλογέα μήκους κύματος σε $\lambda = 540 \text{ nm}$ και μηδενίστε την κλίμακα της διαπερατότητας με το τυφλό στη θέση μέτρησης. Μετρήστε τη διαπερατότητα των διαλυμάτων των σωλήνων 2-5 και προσδιορίστε την αντίστοιχη απορρόφηση.

Κατασκευάστε πρότυπη καμπύλη από τη γνωστή περιεκτικότητα των σωλήνων σε πρωτεΐνη και τις αντίστοιχες απορροφήσεις.

Με βάση την καμπύλη αυτήν θα μπορέσετε να προσδιορίσετε τη συγκέντρωση σε πρωτεΐνη οποιουδήποτε διαλύματος με άγνωστη συγκέντρωση πρωτεΐνης.

5.9 FRAP-Αντιοξειδωτική ικανότητα πλάσματος

5.9.1 Αρχή μεθόδου

Για τη μέτρηση των επιπέδων συνολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας πλάσματος πραγματοποιείται μέτρηση της ικανότητας αναγωγής του συμπλόκου Fe^{3+} -TPTZ σε Fe^{2+} -TPTZ από τα αντιοξειδωτικά του πλάσματος. Σε χαμηλό pH, η αναγωγή του συμπλόκου τρισθενούς σιδήρου-τριπυριδυλοτριαζίνης (Fe^{3+} -TriPyridyltriaZine) σε σύμπλοκο δισθενούς σιδήρου-TPTZ (Fe^{2+} -TPTZ) (η οποία έχει ένα έντονο μπλε χρώμα) μπορεί να μετρηθεί από την αλλαγή στην απορρόφηση σε μήκος κύματος 593nm. Για τη μέτρηση του ποσοστού συμμετοχής του ουρικού οξέος και των υπόλοιπων αντιοξειδωτικών συστατικών, στην αναγωγική ικανότητα του πλάσματος, χρησιμοποιείται το ένζυμο ουρικήαση, το οποίο υδρολύει το ουρικό οξύ. Η αντίδραση είναι μη ειδική, στο ότι οποιαδήποτε ημιαντίδραση έχει χαμηλότερο οξειδοαναγωγικό δυναμικό υπό τις αναγωγικές συνθήκες της αντίδρασης, από την αντίδραση τρισθενούς-δισθενούς σιδήρου θα οδηγήσει στη δημιουργία ιόντων Fe^{2+} . Η αλλαγή στην απορρόφηση είναι ως εκ τούτου αυτή που σχετίζεται άμεσα με "συνολική" αναγωγική ικανότητα των αντιοξειδωτικών (ως δότες ηλεκτρονίων), αντιοξειδωτικά τα οποία υπάρχουν στο μείγμα της αντίδρασης.

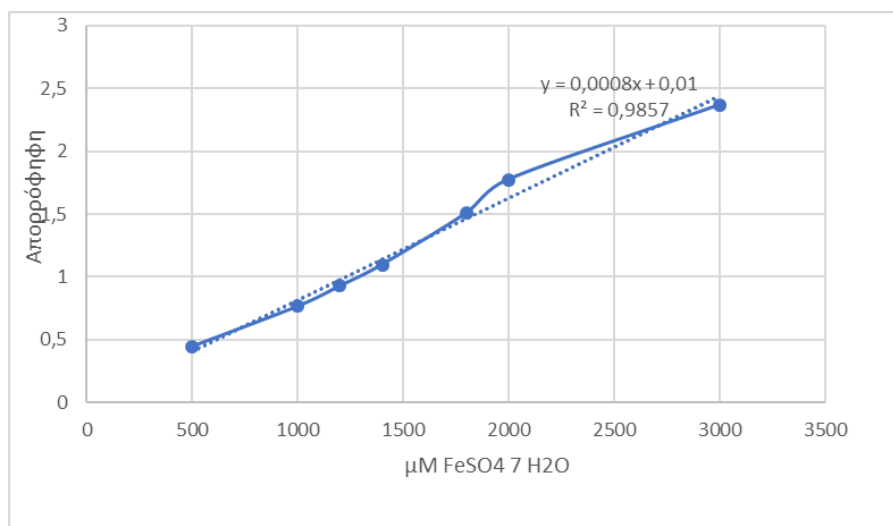
5.9.2 Υλικά αντιδραστήρια

- Διάλυτησικού 300 mM pH 3.6
- Διάλυμα TPTZ (10x) (2,4,6-tripyridyl-s-triazine) 100 mM - Διάλυμα HCl 400 mM σε αραιώση 1:10.
- Διάλυμα $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 200mM σε αραιώση 1:10. Το αντιδραστήριο FRAP είναι έτοιμο μετά από ανάμειξη των παραπάνω διαλυμάτων (1x) σε αναλογία 10:1:1 αντίστοιχα. *** (η ανάμειξη γίνεται αυθημερόν!!!)
- Uricase 10 U/mL.

5.9.3 Πειραματική διαδικασία

- Σε 1,2 mL αντιδραστηρίου FRAP προστίθενται 40μL πλάσματος
- Επώση για 4min στους 37°C
- Φωτομέτρηση στα 593nm

Η απορρόφηση του άγνωστου δείγματος υπολογίζεται με τη χρήση πρότυπης καμπύλης $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ σε συγκέντρωση (μM). Στην Εικόνα 5.11 φαίνεται η πρότυπη καμπύλη για τον προσδιορισμό με τη μέθοδο FRAP.



Εικόνα 5.11 Πρότυπη καμπύλη.

5.9.3.1 Μέτρηση επιπέδων ουρικού οξέος πλάσματος

- Σε 40μL πλάσματος προστίθενται 0,5μL ουρικής stock.
- Επώαση για 20-25min, σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.
- Σε 1,2mL αντιδραστήριου FRAP προστίθενται 40,5μL πλάσματος με ουρική.
- Επώαση για 4min στους 37°C.
- Φωτομέτρηση στα 593nm.

5.10 In vitro αντιοξειδωτική δράση – Μέθοδος DPPH

5.10.1 Αρχή μεθόδου

Η μέθοδος βασίζεται στην αδρανοποίηση της ελεύθερης ρίζας του 1,1-διφαινυλο-2-πικρυλυδραζυλίου (DPPH). Είναι μια μέθοδος αποχρωματισμού που μετράει την ικανότητα των αντιοξειδωτικών να αντιδρούν απευθείας με τη ρίζα του DPPH, υπολογίζοντας την απορρόφηση στο UV-Vis στα 517 nm με χρήση φασματοφωτομέτρου. Αποτελεί μια γρήγορη και αξιόπιστη μέθοδο προσδιορισμού αντιοξειδωτικών, ενώ το μειονέκτημά της είναι ότι χρησιμοποιείται μόνο για τον προσδιορισμό των ολικών αντιοξειδωτικών και δεν περιορίζεται στην μέτρηση ενός συγκεκριμένου συστατικού.

Το διάλυμα του DPPH έχει χαρακτηριστικό μωβ χρώμα, όταν αντιδράσει με μια αντιοξειδωτική ουσία η ελεύθερη ρίζα, σχηματίζει δεσμό με ένα πρωτόνιο του αντιοξειδωτικού μειώνοντας τη μέγιστη απορρόφηση κάτω από τα 517 nm. Το διάλυμα DPPH με την αντιοξειδωτική ουσία έχουν αντιδράσει πλήρως, όταν το μείγμα αποκτήσει υποκίτρινο χρώμα.

5.10.2 Υλικά αντιδραστήρια

- Διάλυμα DPPH 0,60 mM σε μεθανόλη
- Διάλυμα γαλλικού οξέος για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης.

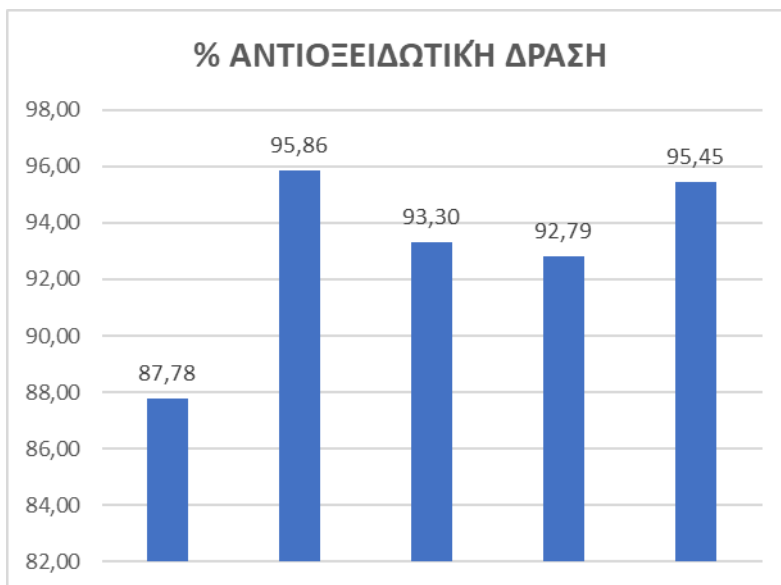
5.10.3 Πειραματική διαδικασία

Αφού γίνουν οι κατάλληλες αραιώσεις 33 μl δείγματος αναμειγνύονται με 967 μl διαλύματος DPPH και μετριέται η απορρόφηση στον χρόνο 0. Το φασματοφωτόμετρο ρυθμίζεται στα 515 nm και μηδενίζεται με μεθανόλη. Το control παρασκευάζεται με ανάμειξη 33 μl μεθανόλης και 967 μl διαλύματος DPPH και μετριέται στο φασματοφωτόμετρο πριν από τα δείγματα. Χρησιμοποιείται καμπύλη αναφοράς με διάλυμα γαλλικού οξέος. Η γραμμική ευθεία της καμπύλης αναφοράς βρίσκεται μεταξύ 40 μM και 300 μM. Τα

αποτελέσματα εκφράζονται σε mM (mmol/L) ισοδύναμα γαλλικού οξέος. Η διαφορά απορρόφησης (ΔA) υπολογίζεται βάσει της εξίσωσης:

$$\% \text{ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΔΡΑΣΗ (AA)} = [\text{Ac}(0) - \text{As}(t) / \text{Ac}(0)] \times 100.$$

Στην Εικόνα 5.12 παρουσιάζεται η % αντιοξειδωτική δράση φυτικών εκχυλισμάτων με τη μέθοδο DPPH.



Εικόνα 5.12 % Αντιοξειδωτική δράση φυτικών εκχυλισμάτων με τη μέθοδο DPPH.

Σχετικό οπτικό υλικό στο διαδίκτυο

<https://www.youtube.com/watch?v=V2lkVFUBsX8>

https://www.youtube.com/watch?v= oT77aq_ qGw

<https://www.youtube.com/watch?v=JaO7hrZ7b4Y>

<https://www.youtube.com/watch?v=9Om0G35H1oM>

<https://www.youtube.com/watch?v=bi2LtNh5h50>

<https://www.youtube.com/watch?v=iNmmkZXgbf0>

<https://www.youtube.com/watch?v=JaO7hrZ7b4Y>

https://www.youtube.com/watch?v= oT77aq_ qGw

Πηγές φωτογραφιών με προέλευση το διαδίκτυο

https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/2/25/Electromagnetic_waves.png/640px-Electromagnetic_waves.png

https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/3/3c/Electromagnetic_spectrum_-eng.svg/640px-Electromagnetic_spectrum_-eng.svg.png

https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/b/b0/Energy-Level_Diagrams_for_Hydrogen.png

https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/3/3c/Adding_a_diagram_about_molecular_orbitals_which_make_all_explanation_more_clear.png/640px-Adding_a_diagram_about_molecular_orbitals_which_make_all_explanation_more_clear.png

<https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/a/ae/Transmittance.svg/640px-Transmittance.svg.png>

<https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/a/ae/Transmittance.svg/640px-Transmittance.svg.png>

https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/9/9c/Standard_curve.png/640px-Standard_curve.png

https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/e/ec/Photometrische_messung.png/640px-Photometrische_messung.png

https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/f/f8/Cuvettes_Front_Side.jpg/640px-Cuvettes_Front_Side.jpg

Βιβλιογραφικές Αναφορές

- Crouch, S. H. (2021). *Αρχές Ενόργανης Ανάλυσης*, (Επιμ. Σπ. Κωσταράκης). Αθήνα: Σπυρίδων Κωσταράκης.
- Duplancic D. (2011). Simple and rapid method for the determination of uric acid-independent antioxidant capacity. *Molecules*, 16(8), 7058-68.
- Granger N. J., Granger II M. R., Yochum M. H., & Sienerth D. K. (2020). *Ενόργανη Ανάλυση*. Broken Hill Publishers Ltd.
- Nelson, D., & Cox, M. (2018). *Lehningers Βασικές αρχές Βιοχημείας*. Αθήνα: Broken.
- Sirivibulkovit, K. (2018). Paper-based DPPH Assay for Antioxidant Activity Analysis. *Anal Sci*, 34(7), 795-800.
- Tymoczko, J., Berg, J. & Stryer, L. (2018). *Βιοχημεία Βασικές αρχές*. Αθήνα: Broken.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

ΘΕΩΡΙΑ ΚΑΙ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΑΣΚΗΣΕΙΣ ΣΤΑ ΕΝΖΥΜΑ

Συγγραφέας: Μαρία Τράπαλη

Σύνοψη

Τα ένζυμα έχουν κεντρική θέση σε κάθε βιοχημική διεργασία. Δρουν σε οργανωμένες ακολουθίες και καταλύουν εκατοντάδες αντιδράσεις οι οποίες αποικοδομούν τα μόρια των τροφών, διατηρούν και μετατρέπουν τη χημική ενέργεια και παράγουν βιολογικά μακρομόρια από απλά πρόδρομα μόρια. Τα ένζυμα αυξάνουν πάρα πολύ την ταχύτητα των αντιδράσεων και παρουσιάζουν μεγάλη εξειδίκευση ως προς την αντίδραση ή το υπόστρωμα. Οι παράγοντες που ρυθμίζουν τον ρυθμό των ενζυμικών αντιδράσεων είναι η θερμοκρασία, το pH, η συγκέντρωση του ενζύμου και του υποστρώματος και η παρουσία ή μη αναστολέων, ενεργοποιητών και συμπαραγόντων. Για τον ποσοτικό φωτομετρικό προσδιορισμό ενός ενζυμικού ή μη κλινικού αναλύτη βασιζόμενο σε μία συγκεκριμένη αντίδραση είναι δυνατόν να εφαρμοστούν δύο εναλλακτικές μεθοδολογίες, η μέθοδος τελικού σημείου και η κινητική μέθοδος.

Προαπαιτούμενη γνώση

Απαιτούνται γνώσεις των κεφαλαίων 4 και 5.

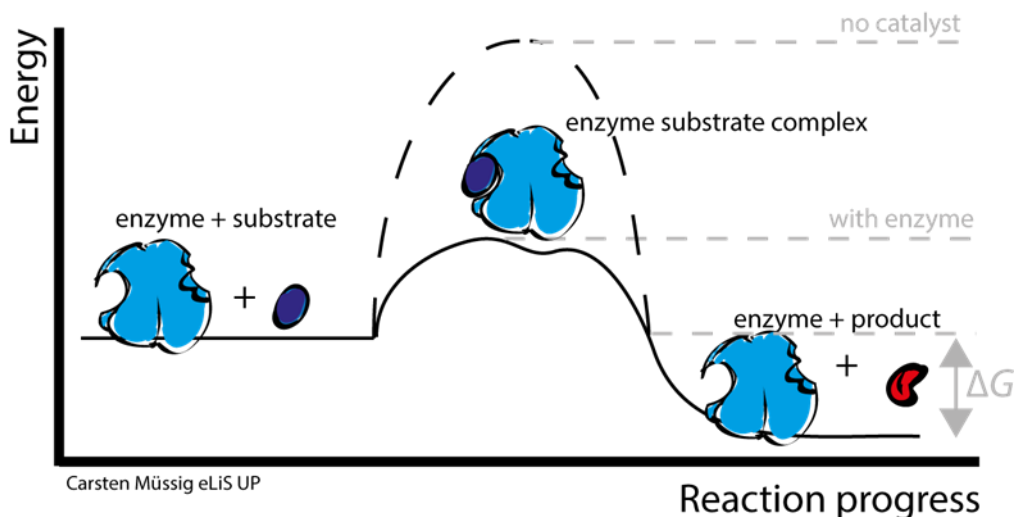
ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

6.1 Δομή, λειτουργία, ποσοτικοποίηση των ενζύμων

Σε αυτό το κεφάλαιο θα επικεντρωθούμε στους καταλύτες των αντιδράσεων των βιολογικών συστημάτων, δηλαδή στα ένζυμα, από τις πιο σημαντικές και εξειδικευμένες πρωτεΐνες.

Το 1878 ο W. Kuehne εισήγαγε τον όρο «ένζυμο», για να προσδιορίσει τις ουσίες αυτές που ήταν υπεύθυνες για τις ζυμώσεις. Η λέξη ένζυμο προέρχεται από τον όρο «εν ζύμη» (αυτό που ευρίσκεται στη ζύμη). Προς το τέλος του 19^{ου} αιώνα οι αδελφοί Buchner απομόνωσαν ένζυμο από κύτταρα ζύμης αποδεικνύοντας τη δράση τους εκτός των κυττάρων. Το 1926 ο J. B. Sumner απομόνωσε το πρώτο ένζυμο σε κρυσταλλική κατάσταση, την ουρεάση, και έτσι άνοιξε ο μεγάλος δρόμος της μελέτης των ενζύμων. Από τη δεκαετία του 1930 και μετά, πάρα πολλά ένζυμα έχουν ληφθεί σε καθαρή κρυσταλλική κατάσταση και έχουν μελετηθεί πλήρως. Τα ένζυμα, εκτός του RNA και των ριβοενζύμων, είναι ουσίες πρωτεϊνικής φύσης, οι οποίες παράγονται στα ζώντα κύτταρα και καταλύουν θερμοδυναμικά δυνατές αντιδράσεις, χωρίς να μεταβάλλουν τη σταθερά ισορροπίας της αντίδρασης.

Αυτό που επιτυγχάνουν τα ένζυμα είναι να επιταχύνουν την αποκατάσταση της ισορροπίας μιας χημικής αντίδρασης, μειώνοντας την ενέργεια ενεργοποίησης (ΔG^\ddagger), δηλαδή το ποσό ενέργειας που θα απαιτούσε η αντίδραση χωρίς την παρουσία τους (Σχήμα 6.1.).



Σχήμα 6.1 Δράση των ενζύμων.

Τα ένζυμα κατέχουν αυξημένη καταλυτική ισχύ, συχνά πολύ μεγαλύτερη από την ισχύ των συνθετικών ή ανόργανων καταλυτών. Εμφανίζουν υψηλή εξειδίκευση για τα υποστρώματά τους, επιταχύνουν τις χημικές αντιδράσεις και δρουν σε υδατικά διαλύματα υπό πολύ ήπιες συνθήκες θερμοκρασίας και pH. Ελάχιστοι μη βιολογικοί καταλύτες εμφανίζουν όλες αυτές τις ιδιότητες. Στους ζωντανούς οργανισμούς σχεδόν όλες οι χημικές αντιδράσεις και διαδικασίες υπόκεινται σε ενζυμική κατάλυση, γεγονός που καθιστά πολύ σημαντική τη συγκεκριμένη κατηγορία πρωτεϊνών. Τόσο η λειτουργία τους όσο και η παρουσία τους μέσα στον οργανισμό σχετίζεται άμεσα με το είδος της χημικής αντίδρασης που καταλύουν, αλλά και με το σημείο όπου αυτή λαμβάνει χώρα.

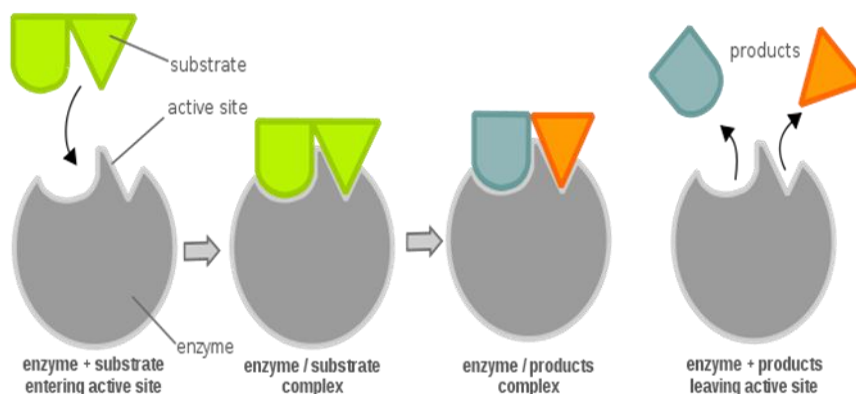
Τα ένζυμα δρουν σε οργανωμένες ακολουθίες και επιταχύνουν εκατοντάδες αντιδράσεις που αποικοδομούν τα μόρια των τροφών, διατηρούν και μετατρέπουν τη χημική ενέργεια και παράγουν βιολογικά μακρομόρια από απλά πρόδρομα μόρια. Χάρη στη δράση των ρυθμιστικών ενζύμων, οι μεταβολικές οδοί συντονίζονται έτσι ώστε να εξασφαλίζεται αρμονική αλληλεπίδραση μεταξύ των πολλών δραστηριοτήτων που είναι απαραίτητες για τη ζωή μας.

Η μελέτη των ενζύμων έχει τεράστια πρακτική σημασία. Μερικά νοσήματα, ιδίως κληρονομικές γενετικές διαταραχές, οφείλονται σε ανεπάρκεια ή πλήρη έλλειψη ενός ή περισσότερων ενζύμων. Άλλοτε, το αίτιο ενός νοσήματος μπορεί να είναι η υπέρμετρη ενεργότητα ενός ενζύμου. Η μέτρηση της ενεργότητας των ενζύμων στο πλάσμα του αίματος, στα ερυθροκύτταρα ή σε ιστικά δείγματα συμβάλλει στη διάγνωση πολλών νοσημάτων. Πολλά φάρμακα ασκούν τις βιολογικές δράσεις τους αλληλεπιδρώντας με ένζυμα. Επίσης, τα ένζυμα είναι σημαντικά πρακτικά εργαλεία όχι μόνο στην ιατρική αλλά και στη χημική βιομηχανία, στην επεξεργασία των τροφίμων και στη γεωργία.

Υπό συνθήκες συμβατές με τη ζωή, οι μη καταλυόμενες αντιδράσεις συνήθως είναι βραδείες: τα περισσότερα βιομόρια είναι σταθερά στο υδατικό ενδοκυτταρικό περιβάλλον που χαρακτηρίζεται από ουδέτερο pH και ήπια θερμοκρασία. Επίσης, πολλές κοινές αντιδράσεις στη βιοχημεία περιλαμβάνουν χημικά συμβάντα μη ευνοϊκά ή απίθανα στο ενδοκυτταρικό περιβάλλον, π.χ. τον παροδικό σχηματισμό ασταθών φορτισμένων ενδιάμεσων ή τη σύγκρουση δύο ή περισσότερων μορίων στον ακριβή προσανατολισμό που απαιτείται για την αντίδραση. Εάν δεν υπήρχαν ένζυμα, οι αναγκαίες αντιδράσεις για την πέψη της τροφής, τη μεταγωγή των νευρικών ώσεων ή τη μυϊκή συστολή απλώς δεν θα συνέβαιναν.

Ένα ένζυμο παρακάμπτει αυτά τα προβλήματα παρέχοντας ένα ειδικό περιβάλλον μέσα στο οποίο μια ορισμένη αντίδραση μπορεί να συμβεί πιο γρήγορα. Το χαρακτηριστικό γνώρισμα μιας ενζυμικά καταλυόμενης αντίδρασης είναι ότι συμβαίνει μέσα σε έναν θύλακο πάνω στο ένζυμο, ο οποίος καλείται ενεργό κέντρο (active site) (Εικόνα 6.1). Το μόριο που προσδένεται στο ενεργό κέντρο κι αποτελεί στόχο για τη δράση του ενζύμου καλείται υπόστρωμα (substrate). Η επιφάνεια του ενεργού κέντρου επενδύεται από αμινοξέα με χημικές ομάδες οι οποίες προσδένουν το υπόστρωμα και καταλύουν τον χημικό μετασχηματισμό του. Συχνά, το ενεργό κέντρο περικλείει το υπόστρωμα, απομονώνοντάς το πλήρως από το διάλυμα. Το σύμπλοκο ενζύμου-υποστρώματος, η ύπαρξη του οποίου προτάθηκε για πρώτη φορά το 1880 από τον Charles-Adolphe Wurtz, έχει κεντρικό ρόλο στη δράση των ενζύμων. Είναι, επίσης, η αφετηρία για

μαθηματικούς υπολογισμούς που καθορίζουν την κινητική συμπεριφορά των ενζυμικά καταλυόμενων αντιδράσεων και για θεωρητικές περιγραφές των ενζυμικών μηχανισμών.



Εικόνα 6.1 Ενεργό κέντρο του ενζύμου.

Σε αυτή τη χαρακτηριστική δομή των ενζύμων, οφείλονται δύο ιδιότητες που παρουσιάζουν και που κάνουν τα ένζυμα να ξεχωρίζουν από τους ανόργανους καταλύτες:

- Αυξάνουν πάρα πολύ την ταχύτητα των αντιδράσεων μέχρι και 10¹² φορές.
- Παρουσιάζουν μεγάλη εξειδίκευση ως προς την αντίδραση ή το υπόστρωμα σε σημείο που υπάρχει ένζυμο το οποίο καταλύει μία και μόνο χημική αντίδραση, π.χ. η ουρεάση τη διάσπαση της ουρίας.

Για την εξήγηση του μηχανισμού δράσεως των ενζύμων υπάρχουν δύο κυρίως θεωρίες. Η μια του κλειδιού με την αντίστοιχη κλειδαριά θεωρεί ότι το ενεργό κέντρο έχει μια συγκεκριμένη μορφή η οποία ταιριάζει ακριβώς με τη δομή του υποστρώματος, όπως το κλειδί στην κλειδαριά. Μόνο, όταν υπάρχει το κατάλληλο υπόστρωμα, αυτό συνδέεται με το ενεργό κέντρο και πραγματοποιείται η αντίδραση. Έτσι, εξηγείται η μεγάλη εξειδίκευση των ενζύμων. Αυτό προϋποθέτει ένα άκαμπτο ενεργό κέντρο. Περισσότερο χρήσιμη είναι η θεωρία του Koshland της επαγόμενης προσαρμογής (induced fit). Σύμφωνα με τον Koshland, το ενεργό κέντρο είναι εύπλαστο, έτσι, όταν πλησιάζει το υπόστρωμα και έλθει στην ενεργό περιοχή, τότε το ενεργό κέντρο διαμορφώνεται, ούτως ώστε να ταιριάζει ακριβώς με τη συγκεκριμένη δομή του υποστρώματος και να γίνεται δυνατή η κατάλυση.

Συνήθως τα ένζυμα καταλύουν αντιδράσεις ενός τύπου, π.χ. οι εστεράσες υδρολύουν εστερικούς δεσμούς, οι τρανσφεράσες μεταφέρουν ομάδες. Υπάρχει δηλαδή εξειδίκευση ως προς την αντίδραση. Υπάρχει, όμως, και εξειδίκευση και ως προς το υπόστρωμα, δηλαδή οι αλκοολο-δεϋδρογονάσες δρουν στις αλκοόλες, οι γλυκοζιδάσες στους γλυκοζίτες (Πίνακας 6.1.).

Τα ένζυμα παρουσιάζουν, επίσης, απόλυτη στερεο-εξειδίκευση, π.χ. η μαλτάση καταλύει την υδρόλυση των α-γλυκοζιτών αλλά όχι των β. Ανάλογα υπάρχουν ένζυμα τα οποία αντιδρούν με τα L- αμινοξέα αλλά όχι με τα D- ή με το trans-ισομερές και όχι με το cis-ισομερές.

Στην ιδιαίτερη δομή των ενζύμων οφείλεται και η τόσο μεγάλη αύξηση της ταχύτητας των αντιδράσεων. Για παράδειγμα, είναι δυνατόν αντίδραση με χρόνο ημιζωής 300 χρόνια, παρουσία ενζυμικού καταλύτη να επιταχυνθεί 10¹⁰ φορές και άρα ο χρόνος ημιζωής της να φθάσει το 1 δευτερόλεπτο. Αυτό οφείλεται στην παρουσία του ενεργού κέντρου, το οποίο δεσμεύοντας το υπόστρωμα, το συγκρατεί σ'έναν περιορισμένο χώρο, το ενεργό κέντρο, με διάφορους δεσμούς, δεσμούς υδρογόνου, ιοντικούς δεσμούς, ακόμα και με ομοιοπολικούς δεσμούς. Έτσι, προσεγγίζουν τα αντιδρώντα ζεύγη και μπορεί να έχουμε μια επαγωγική παραμόρφωση του υποστρώματος. Γενικά, διευκολύνεται και γίνεται ταχύτερα ο σχηματισμός των επιθυμητών δεσμών και η διάσπαση κάποιων άλλων.

Οι δραστικές ομάδες του καταλυτικού κέντρου προέρχονται από υπολείμματα αμινοξέων ή από συνένζυμα, αλλά συμμετέχουν και ιόντα μετάλλων. Αυτές συνήθως είναι καρβοξυλικές ομάδες του γλουταμινικού και του ασπαργινικού οξέος, αμινο – ιμινο ομάδες από τη λυσίνη. Η –SH ομάδα της

κυστεΐνης, η ομάδα ιμιδαζολίου από την ιστιδίνη, η υδροξυλομάδα της σερίνης και της θρεονίνης, η γουανιδίνο ομάδα της αργινίνης και η φαινυλική ομάδα της τυροσίνης.

Παραδείγματα ενζύμων (με τους αντιστοίχους κωδικούς τους, στο σύστημα της IUB).

- EC3.1.3.1 αλκαλική φωσφατάση
- EC3.1.3.2. όξινη φωσφατάση
- EC3.2.1.1. αμυλάση
- EC3.2.1.20. μαλτάση
- EC3.2.1.108. λακτάση
- EC3.4. πεπτιδάση
- EC3.4. πρωτεάση
- EC2.6.1.2. τρανσαμινάση της αλανίνης
- EC2.7.1.1. εξοκινάση
- EC2.7.7.6. RNA πολυμεράση
- EC2.7.7.7. DNA πολυμεράση

Πίνακας 6.1 Κυριότεροι τύποι ενζύμων.

Οξειδοαναγωγάσες	Καταλύουν αντιδράσεις οξείδωσης και αναγωγής
Τρανσφεράσες	Καταλύουν τη μεταφορά ομάδων που περιέχουν C,N,P
Υδρολάσες	Καταλύουν τη σχάση δεσμών με προσθήκη νερού
Λυάσες	Καταλύουν σχάση / δημιουργία δεσμών
Ισομεράσες	Καταλύουν αντιδράσεις ισομερείωσης
Λιγάσες	Καταλύουν τη δημιουργία δεσμών μεταξύ C και O, S ή P με υδρόλυση φωσφορικών ομάδων υψηλής ενέργειας

6.2 Παράγοντες που επηρεάζουν τους ρυθμούς των ενζυμικών αντιδράσεων

Η ενζυμική κινητική μελετά τους παράγοντες που επηρεάζουν την ταχύτητα των ενζυμικών αντιδράσεων. Γνωρίζουμε ότι ως ταχύτητα μιας αντίδρασης ορίζεται η μεταβολή της συγκέντρωσης ενός των αντιδρώντων ή των προϊόντων στη μονάδα του χρόνου. Ξέρουμε, επίσης, ότι η ταχύτητα οποιασδήποτε αντίδρασης επηρεάζεται από τη συγκέντρωση των αντιδρώντων, τη φύση των αντιδρώντων, τη θερμοκρασία, την πίεση, την ύπαρξη ή όχι καταλυτών, την ακτινοβολία κλπ.

Ειδικά, για τις ενζυμικές αντιδράσεις εστιάζουμε την προσοχή μας στη συγκέντρωση του υποστρώματος, στη συγκέντρωση του ενζύμου, στην ενδεχόμενη παρουσία και συγκέντρωση αναστολέων ή ενεργοποιητών, καθώς και στις συνθήκες της αντίδρασης, όπως είναι το pH και η θερμοκρασία.

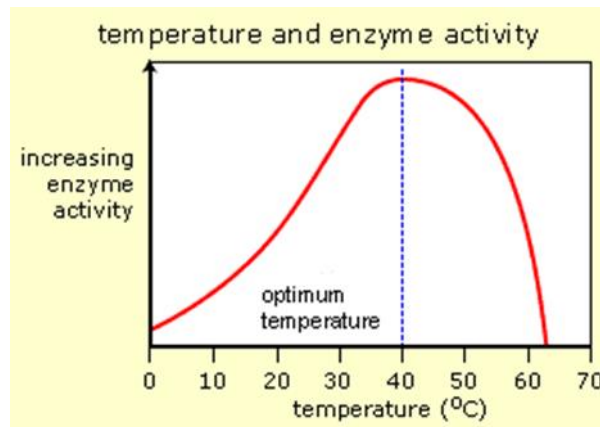
Επίδραση θερμοκρασίας

Η ταχύτητα όλων των χημικών αντιδράσεων αυξάνει με την αύξηση της θερμοκρασίας. Γνωρίζουμε ότι σύμφωνα με το νόμο Vant Hoff αύξηση της θερμοκρασίας κατά 10°C διπλασιάζει την ταχύτητα της αντίδρασης. Αυτό ισχύει και για τις ενζυμικές αντιδράσεις αλλά μέχρι ενός σημείου. Αφού τα ένζυμα είναι πρωτεΐνες, καταστρέφονται σε υψηλές θερμοκρασίες. Γι' αυτό μετά από μια ορισμένη αύξηση της θερμοκρασίας αρχίζει η ελάττωση της ταχύτητας της ενζυμικής αντίδρασης, μέχρι που τελικά αναστέλλεται πλήρως λόγω καταστροφής του ενζύμου.

Η θερμοκρασία στην οποία το ένζυμο εμφανίζει τη μεγαλύτερη δραστηριότητά του ονομάζεται *άριστη θερμοκρασία*. Για τα περισσότερα ένζυμα αυτή είναι μεταξύ 30 - 45°C. Συνήθως, σε θερμοκρασία πάνω από 40°C τα περισσότερα ένζυμα αρχίζουν να αδρανοποιούνται λόγω μετουσίωσης. Πάνω από τους 50°C η καταστροφή συνήθως είναι μη αντιστρεπτή και είναι ελάχιστα τα ένζυμα που διατηρούν τη δραστηριότητά τους πάνω από τους 60°C.

Η ελάττωση, όμως, της θερμοκρασίας αυξάνει τη σταθερότητα του ενζύμου, πράγμα που ισοδυναμεί με αύξηση του χρόνου ζωής των ενζύμων. Γι' αυτό είναι σκόπιμο να τα διατηρούμε στο ψυγείο.

Σε πολλά ένζυμα η δραστηριότητά τους, όταν διατηρούνται σε θερμοκρασία δωματίου, ακόμη και στους 40°C, πέφτει με την πάροδο του χρόνου. Υπάρχουν άλλα ένζυμα που είναι ανθεκτικά. Γενικά, η παραμονή του δείγματος προκαλεί ελάττωση στη δραστηριότητα του ενζύμου, γιατί είναι δυνατόν να γίνει πρωτεόλυση και καταστροφή της τεταρτοταγούς του δομής (Σχήμα 6.2).



Σχήμα 6.2 Επίδραση της θερμοκρασίας στην ενζυμική δραστηριότητα.

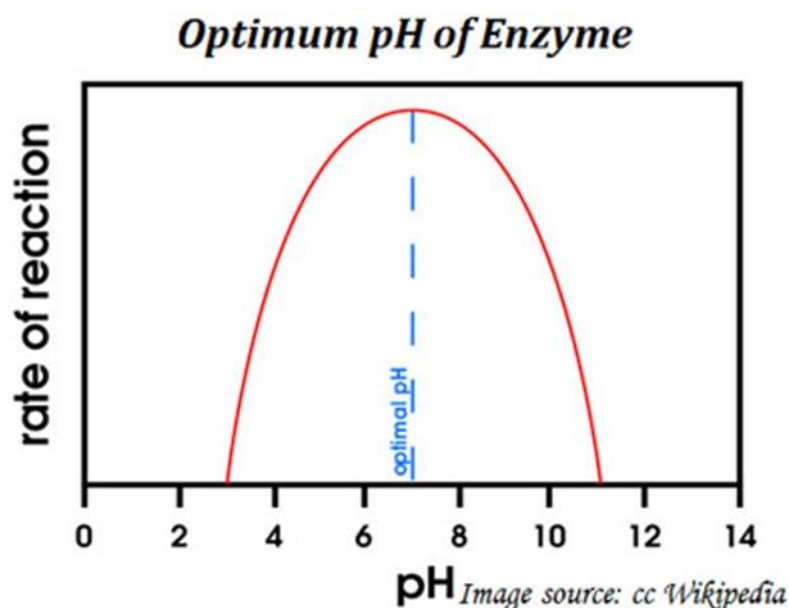
Επίδραση pH

Επειδή, τα ένζυμα είναι πρωτεΐνες οι οποίες φέρουν όξινες και βασικές ομάδες των οποίων η διάσταση επηρεάζεται από το pH του διαλύματος. Αυτό έχει επίδραση στην καταλυτική δραστηριότητα του ενζύμου, αφού, όπως αναφέραμε, διάφορες τέτοιες ομάδες βρίσκονται στο ενεργό κέντρο του ενζύμου και συμμετέχουν στη δέσμευση του υποστρώματος και γενικά στην καταλυτική δραστηριότητα του ενζύμου.

Κάθε ένζυμο εκδηλώνει την καταλυτική του δράση σε μια περιορισμένη περιοχή pH. Το pH στο οποίο το ένζυμο εκδηλώνει τη μεγαλύτερη δραστηριότητά του ονομάζεται *άριστο pH*. Το pH αυτό για τα περισσότερα ένζυμα είναι το ουδέτερο ή το ελαφρά όξινο. Υπάρχουν, όμως, και ένζυμα, όπως τα πεπτικά ένζυμα, που εμφανίζουν ακραίες τιμές άριστου pH, π.χ. της πεψίνης είναι το 1,5-9,5, της θρυψίνης 8-10 και της παγκρεατικής λιπάσης το 8,0 (Σχήμα 6.3.).

Η εξάρτηση της δραστηριότητας του ενζύμου από το pH εκφράζεται με τη μορφή μιας καμπύλης, η κορυφή της οποίας αντιστοιχεί στο άριστο pH.

Σε ακραίες τιμές pH μειώνεται η δραστηριότητα του ενζύμου και μπορεί να μετουσιωθεί και να έχουμε πλήρη αναστολή της δραστηριότητάς του.



Σχήμα 6.3 Επίδραση του pH στην ενζυμική δραστηριότητα.

Η ταχύτητα της ενζυμικής αντίδρασης εκφράζεται με τη δραστηριότητα του ενζύμου, που αντιστοιχεί στο ποσό του υποστρώματος, σε mol, που μετατρέπεται σε προϊόν, στη μονάδα του χρόνου, το δευτερόλεπτο.

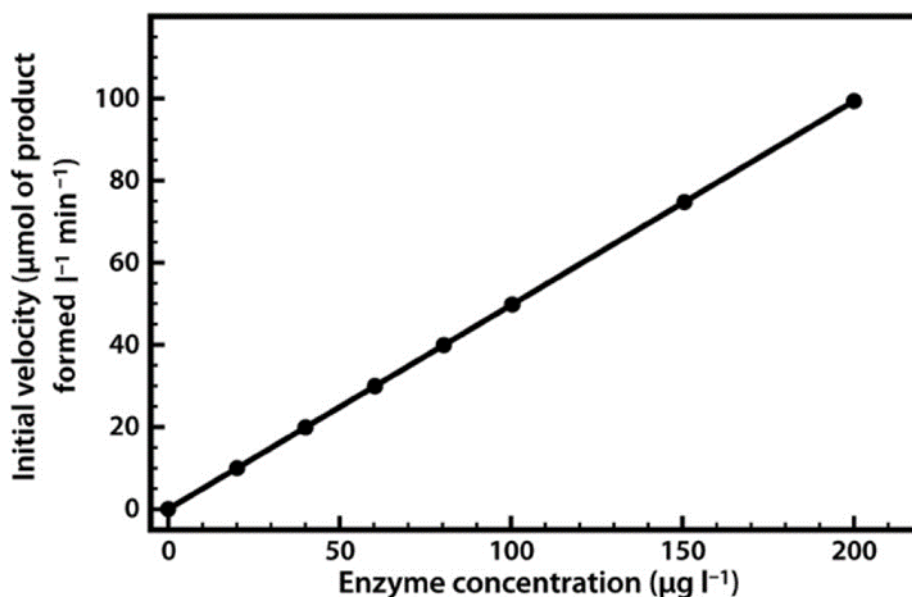
Στο διεθνές σύστημα, η μονάδα ενζυμικής ενεργότητας είναι το katal: 1 katal (ή 1 kat) προκαλεί υπό ορισμένες συνθήκες της αντίδρασης τη μετατροπή 1 mol υποστρώματος σε ένα δευτερόλεπτο. Για πρακτικούς λόγους χρησιμοποιείται το μικροκατάλ (μkatal) ή το νανοκατάλ (nkatal). Παλαιότερα αλλά και μέχρι σήμερα χρησιμοποιούνταν ως μονάδα ενζυμικής δραστηριότητας η Διεθνής μονάδα, η οποία αντιστοιχεί στη μετατροπή 1 μmol υποστρώματος/λεπτό (min).

1 Διεθνής μονάδα (Unit = U) ισούται με 16,67 nkat ή 1 nkat = 0,06 U, 1 μkat = 60 U.

Σε περιπτώσεις σταθερών ενζύμων, χρησιμοποιούμε τη μοριακή ενεργότητα η οποία ορίζεται ως ο αριθμός των μορίων του υποστρώματος που μετασχηματίζεται ανά λεπτό (ή ανά sec) και ανά μόριο ενζύμου ή ο αριθμός των μικρομορίων του υποστρώματος ανά μικρομόριο ενζύμου, δηλαδή ο αριθμός των ενζυμικών μονάδων ανά μmol ενζύμου (U/μmol). Είναι προφανές ότι για τον υπολογισμό της μοριακής ενεργότητας πρέπει να γνωρίζουμε και το MB του ενζύμου.

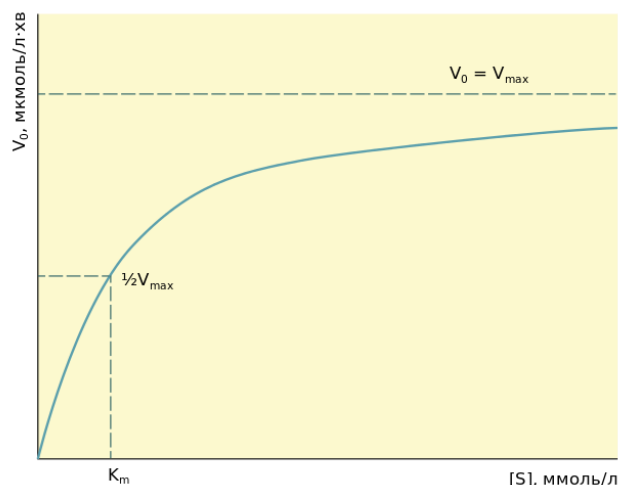
Επίδραση συγκέντρωσης υποστρώματος και ενζύμου

Όπως φαίνεται στο Σχήμα 6.4., η ταχύτητα της ενζυμικής αντίδρασης αυξάνει γραμμικά με την αύξηση της συγκέντρωσης του ενζύμου αντίστοιχα, τριπλασιασμός της συγκέντρωσης του ενζύμου προκαλεί τριπλασιασμό της ταχύτητας της αντίδρασης.



Σχήμα 6.4 Επίδραση της συγκέντρωσης του ενζύμου στην ταχύτητα της ενζυμικής αντίδρασης.

Τα παραπάνω δεν ισχύουν με την αύξηση της συγκέντρωσης του υποστρώματος. Όπως φαίνεται στο Σχήμα 6.5, αρχικά όσο αυξάνεται η συγκέντρωση του υποστρώματος τόσο η ταχύτητα της ενζυμικής αντίδρασης αυξάνεται. Από μία τιμή συγκέντρωσης υποστρώματος και πάνω, η ταχύτητα της αντίδρασης φτάνει σε μέγιστη τιμή και παραμένει σταθερή, όσο και εάν αυξηθεί η συγκέντρωση του υποστρώματος. Αυτό συμβαίνει, διότι όσο αυξάνεται η συγκέντρωση του υποστρώματος τόσο περισσότερα μόρια του συνδέονται στα ενεργά κέντρα των μορίων του ενζύμου και έτσι η ταχύτητα της αντίδρασης αυξάνεται. Όταν σε όλα τα μόρια του ενζύμου έχει συνδεθεί υπόστρωμα (σημείο κορεσμού), η αντίδραση γίνεται με μέγιστη ταχύτητα. Από το σημείο κορεσμού και μετά, η αύξηση της συγκέντρωσης του υποστρώματος δεν οδηγεί σε αύξηση της ταχύτητας της ενζυμικής αντίδρασης, διότι δεν υπάρχουν άλλα ελεύθερα μόρια ενζύμου, για να συνδεθούν με τα επιπλέον μόρια υποστρώματος.

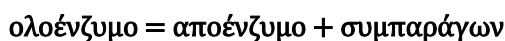


Σχήμα 6.5 Επίδραση της συγκέντρωσης του υποστρώματος στην ταχύτητα της ενζυμικής αντίδρασης.

Συνένζυμα

Πολλές φορές, για να εκφραστεί η ενζυμική δραστηριότητα, είναι απαραίτητη η παρουσία ορισμένων άλλων μορίων ή ιόντων τα οποία μετέχουν στη δημιουργία ενός συμπλέγματος με το ένζυμο.

Το ολοένζυμο είναι το ενζυμικό σύμπλεγμα που αποτελεί ένα πλήρες σύστημα. Το ολοένζυμο αποτελείται από το πρωτεϊνικό του τμήμα, το οποίο καλείται *αποένζυμο* και από το μη πρωτεϊνικό τμήμα που καλείται *συμπαράγων* και το οποίο είναι συνδεδεμένο με το αποένζυμο.



Όταν ο συμπαράγων είναι οργανικό μόριο, τότε λέγεται συνένζυμο.

Τα συνένζυμα είναι μη πρωτεϊνικές οργανικές ενώσεις οι οποίες συχνά περιέχουν βιταμίνες τους συμπλέγματος Β, όπως είναι το νικοτιναμίδιο, η θειαμίνη, η ριβοφλαβίνη, το παντοθενικό οξύ που χρειάζονται για αντιδράσεις οξειδωσης και αναγωγής, το φυλλικό οξύ το οποίο χρησιμεύει ως συνένζυμο για τον μεταβολισμό των ενώσεων ανά ένα άτομο άνθρακα και άλλες. Τα συνένζυμα φαίνεται ότι εξυπηρετούν την απομάκρυνση ή τη μεταφορά προϊόντων της ενζυμικής αντίδρασης μέσω της προσωρινής σύνδεσής τους με αυτό. Σε άλλες περιπτώσεις το συνένζυμο φαίνεται να δρα ως ένα άλλο υπόστρωμα, ως συνυπόστρωμα, όπως συμβαίνει στις αντιδράσεις τρανσαμίνωσης με τη φωσφορική πυριδοξάλη.

Όπως θα δούμε στο κεφάλαιο του μεταβολισμού, σε όλα τα αερόβια κύτταρα υπάρχει μια αλυσίδα οξειδοαναγωγικών καταλυτών που σκοπό έχει τη μεταφορά ηλεκτρονίων (e^-) στο μοριακό οξυγόνο με αποτέλεσμα την αναγωγή του προς νερό (αναπνευστική αλυσίδα). Η αντίδραση αυτή είναι ιδιαίτερα εξώθερμη και η ελεύθερη ενέργειά της χρησιμοποιείται για τη σύνθεση του ATP-ενεργειακό νόμισμα του οργανισμού. Έτσι, η αποθηκευμένη χημική ενέργεια στο μόριο του ATP χρησιμοποιείται για πολλές βιοχημικές διεργασίες, όπως τη μυϊκή σύσπαση και το οσμωτικό έργο. Καθοριστικό ρόλο στην αναπνευστική αλυσίδα διαδραματίζουν τα συνένζυμα.

Τα συνένζυμα συνδέονται με ένζυμα και καταλύουν εκτός από αντιδράσεις οξειδοαναγωγής, αλλά και αντιδράσεις μεταφοράς ομάδας, ισομερείωσης και σχηματισμού ομοιοπολικών δεσμών, ενώ οι αντιδράσεις λύσης δεσμών δεν απαιτούν συνένζυμα.

Όπως θα δούμε παρακάτω, άλλα ένζυμα ενεργοποιούνται από την παρουσία, κυρίως, μεταλλικών ιόντων. Τα ιόντα είναι απαραίτητα για τη λειτουργία του ενζύμου και συνδέονται συνήθως στο ενεργό κέντρο. Σε ορισμένες περιπτώσεις τα μεταλλικά ιόντα συνδέονται στο υπόστρωμα (Πίνακας 6.2.).

Πίνακας 6.2 Συμπαράγοντες ενζύμων.

Συμπαράγοντας	Ένζυμο
ΣΥΝΕΝΖΥΜΟ	
Πυροφωσφορική θειαμίνη TPP	Πυροσταφυλική αφυδρογονάση
Φλαβινο-αδενο-νουκλεοτίδιο FAD	Οξάλαση των μονοαμινών
Νικοτιναμίδο-αδενο-νουκλεοτίδιο NAD +	Γαλακτική αφυδρογονάση
Φωσφορική πυριδοξάλη PLP	Φωσφορύλαση του γλυκογόνου
Συνένζυμο A CoA	Καρβοξυλάση του ακετυλο- CoA
Βιοτίνη	Καρβοξυλάση του πυροσταφυλικού
ΜΕΤΑΛΛΟ	
Zn ⁺²	Ανθρακική ανυδράση
Mg ⁺²	Περιοριστική ενδονουκλεάση τύπου II ECoRV
Ni ⁺²	Ουρεάση
Mo	Αναγωγή του νιτρικού
Se	Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης

Προένζυμα-Ισοένζυμα

Μία ειδική κατηγορία ενζύμων είναι ορισμένα πεπτικά υδρολυτικά ένζυμα, τα οποία παραγόμενα σε ειδικά κύτταρα, παραμένουν μέσα εκεί σε ανενεργό μορφή και όταν χρειαστεί να δράσουν, μετατρέπονται στην ενζυμικά ενεργό μορφή τους έξω από τα κύτταρα παραγωγής τους με την επίδραση άλλων πρωτεολυτικών ενζύμων. Οι ανενεργές αυτές μορφές καλούνται προένζυμα ή ζυμογόνα και οι ενζυμικά ενεργές μορφές ζυμάσες. Τα προένζυμα που μετατρέπονται σε ένζυμα είναι, π.χ. το γαστρικής επιθηλιακής προέλευσης πεψινογόνο το οποίο δίνει πεψίνη και το παγκρεατικής προέλευσης τρυψινογόνο για την τρυψίνη και χυμοτρυψινογόνο για τη χυμοτρυψίνη.

Τα ισοένζυμα, ως διαφοροποιημένες πολλαπλές μορφές του ενζύμου, είναι προσαρμοσμένες στα διάφορα είδη κυττάρων του οργανισμού. Για παράδειγμα, η γαλακτική δεϋδρογενάση (LDH), η προερχόμενη από τον καρδιακό μυ και η προερχόμενη από τους σκελετικούς μύες, φαίνονται να είναι διαφορετικές και να συνίστανται από δύο ειδών αλυσίδες χαρακτηριζόμενες κατά την προέλευσή τους ως H (heart) και M (muscle) σε διαφορετικές ποσότητες η καθεμία. Τελικά, απομονώθηκαν πέντε ισοένζυμα της LDH με διαφορετικές περιεκτικότητες σε H και M αλυσίδες, τα H₄, H₃M, H₂M₂, HM₃ και M₄ τα οποία και υπάρχουν σε διάφορους ιστούς, όπως είναι η καρδιά, το ήπαρ, οι πνεύμονες και άλλοι.

Αρκετά άλλα ένζυμα έχουν ισοένζυμα, όπως είναι η κρεατίνη κινάση (CK), η οποία έχει δύο υποομάδες, τις B (brain) και M (muscle). Η κρεατίνη κινάση υπάρχει στους σκελετικούς μύες, στην καρδιά και στον εγκέφαλο, το μόνο μη μυϊκό όργανο στο οποίο ανευρίσκεται. Κατά κύριο λόγο τα ισοένζυμα της κρεατίνης κινάσης κατανέμονται ως εξής: το BB ή CK₁ ευρίσκεται στον εγκέφαλο, το MB ή CK₂ ευρίσκεται στο μυοκάρδιο και το MM ή CK₃ ευρίσκεται στους σκελετικούς μύες και το μυοκάρδιο. Ισοένζυμα, επίσης, έχουν η αλκαλική φωσφατάση, η αλδολάση, η αμιλάση και άλλα.

Τα ισοένζυμα μπορούν να διαχωριστούν με την κλασική μέθοδο πρωτεϊνικής ανάλυσης την ηλεκτροφόρηση.

Κανονιστικά ένζυμα

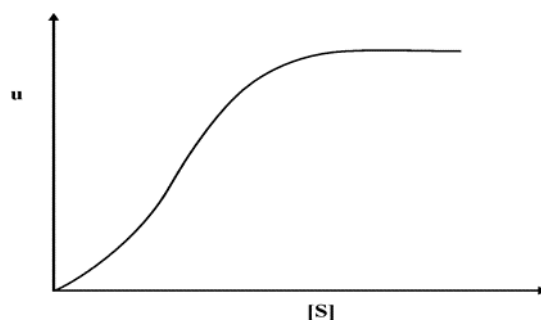
Πολλά ένζυμα δεν έχουν απλή μονομερή μοριακή υπόσταση, δηλαδή δεν αποτελούνται από μία απλή πρωτεϊνική αλυσίδα αλλά από περισσότερες υποομάδες, κατάλληλα διευθετημένες στον χώρο, ώστε να συνδέονται μεταξύ τους σε ένα πολλαπλό ενζυμικό σύστημα το οποίο με τη διευθέτηση αυτή έχει μεγαλύτερη δραστηριότητα από ότι θα είχαν οι υποομάδες μόνες τους (κατέχουν δηλαδή και 2^ο ενεργό κέντρο). Οι μορφές αυτές των ενζυμικών συστημάτων που μπορούν να συμπεριλαμβάνουν και ενεργοποιητές, όπως και επιβραδυντές, είναι δυνατόν να ελέγχουν στενότερα την ενζυμική δράση.

Τα ένζυμα αυτά ονομάζονται *κανονιστικά ένζυμα* και συνήθως εμφανίζουν ιδιότητες κανονιστικές ή ελεγκτικές επί του μεταβολισμού, δρώντα ως «διακόπτες», για να αρχίσει ή να σταματήσει μία αντίδραση. Μπορούν, όμως, και να δράσουν ως «ροοστάτες», δηλαδή να κανονίζουν τη ροή των αντιδρώντων ή των

προϊόντων ανάλογα με τις μεταβολικές απαιτήσεις τις αντίδρασης για την κάλυψη των αναγκών του ιστού ή του οργάνου στο οποίο γίνεται η αντίδραση. Τα κανονιστικά ένζυμα κατατάσσονται σε δύο κατηγορίες, τα αλλοστερικά και τα συνδυαστικά επηρεαζόμενα ένζυμα.

Τα αλλοστερικά ένζυμα έχουν στο πολλαπλό σύστημα τους, εκτός από το ενεργό τους κέντρο, και έναν ειδικό τόπο που βρίσκεται μακριά από το ενεργό κέντρο, από το οποίο ελέγχουν στερεοχημικά την ενζυμική δραστηριότητα.

Καταλύουν μη αντιστρεπτές αντιδράσεις. Με μικρές συγκεντρώσεις [S] δίνουν μικρή κλίση στη καμπύλη Michaelis-Menten. Αυξανόμενης της [S], η κλίση αυξάνει απότομα. Η συμπεριφορά αυτή παριστάνεται διαγραμματικά με μια σιγμοειδή καμπύλη (Σχήμα 6.6.).



Σχήμα 6.6 Δράση ενός αλλοστερικού ενζύμου.

Τα αλλοστερικά ένζυμα παίζουν σημαντικό βαθμό στη ρύθμιση της ταχύτητας των χημικών αντιδράσεων του οργανισμού, διότι με μικρές μεταβολές της [S] ή ενός ενεργοποιητή, αλλάζουν αισθητά την πορεία μιας αντίδρασης. Ο μηχανισμός της δράσης των αλλοστερικών ενζύμων προϋποθέτει τη διαφορετική ενεργειακή κατάσταση των υποομάδων μεταξύ των μορφών δράσης του ενζύμου, που ερμηνεύεται με διάφορες θεωρίες για την αλληλεπίδραση των υποομάδων, όταν αρχίσει η προσέγγιση του υποστρώματος.

Τα συνδυαστικά επηρεαζόμενα ένζυμα μετατρέπονται σε ενζυμικά ενεργές (active, R) και ανενεργές μορφές (inactive, T) με την επίδραση σε αυτά άλλων ενζύμων.

Τα συνδυαστικά επηρεαζόμενα ένζυμα συνήθως είναι μορφές που αλληλομετατρέπονται από φωσφορυλιωμένα σε μη φωσφορυλιωμένα παράγωγα.

Γενικά, η δράση των κανονιστικών ενζύμων για τον μεταβολισμό είναι πολύτιμη, επειδή τα ένζυμα αυτά αντιδρούν άμεσα με μεγάλη ευαισθησία, στις έστω και μικρές, αλλαγές των συνθηκών της αντίδρασης με απόλυτη εξειδίκευση και εκλεκτικότητα και έχουν ως αποτέλεσμα τον πλήρη έλεγχο και συντονισμό των πάρα πολλών και διαφορετικών ενζυμικών αντιδράσεων ενός οργανισμού. Η εξήγηση της δράσης των κανονιστικών ενζύμων στηρίζεται σε πολλές υποθέσεις (μοντέλα Hill, Rabin, Ferdinand, τελεολογική εξήγηση Whitehead) για την ικανοποιητική παρουσίαση της λύσης των προβλημάτων αυτών.

6.3 Κινητική ενζυμικής αντίδρασης: α) Εξίσωση Michaelis-Menten, β) Εξίσωση Lineweaver-Burk

Πρώτος ο Henri, το 1903, κατέληξε στο συμπέρασμα ότι απαραίτητη προϋπόθεση για την κατάλυση είναι ο σχηματισμός συμπλόκου ενζύμου-υποστρώματος, του ES, και μπορούμε να γράψουμε τον μηχανισμό μιας ενζυμικής αντίδρασης με ένα υπόστρωμα ως εξής:



ενώ K_1 , K_2 είναι αντίστοιχα οι σταθερές σχηματισμού και διάσπασης του συμπλόκου ES και K_3, K_4 οι σταθερές διάσπασης του ES σε E, P και σχηματισμού του ES από E, P.

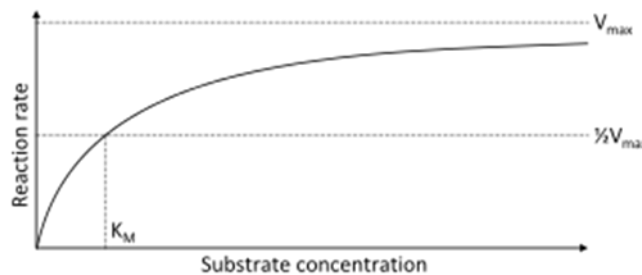
Ο νόμος της ταχύτητας αυτής της αντίδρασης δίδεται από την εξίσωση Michaelis – Menten:

$$V = \frac{V_{max} [S]}{K_m + [S]} \quad (6.1)$$

όπου,

V είναι η ταχύτητα της ενζυμικής αντίδρασης, V_{max} η μέγιστη ταχύτητα που μπορεί να φθάσει η αντίδραση για τη δεδομένη συγκέντρωση ενζύμου,
[S] η συγκέντρωση του υποστρώματος,
K_m η σταθερά Michaelis-Menten.

Η γραφική παράσταση της μεταβολής της ταχύτητας (V) μιας ενζυμικής αντίδρασης σε σχέση με τη μεταβολή της συγκέντρωσης του υποστρώματος (S) είναι, όπως ειπώθηκε, μία υπερβολική καμπύλη (Σχήμα 6.7.).



Σχήμα 6.7 Γραφική παράσταση της μεταβολής της ταχύτητας (V) μιας ενζυμικής αντίδρασης σε σχέση με τη μεταβολή της συγκέντρωσης του υποστρώματος (S).

Ο νόμος ταχύτητας και η σταθερά K_m φέρουν το όνομα των ερευνητών Michaelis-Menten που μετά τον Henri μελέτησαν εκτενώς την κινητική των ενζυμικών αντιδράσεων και κατέληξαν σε αξιόλογα συμπεράσματα.

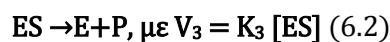
Για να αποδείξουμε τον νόμο ταχύτητας, κάνουμε κάποιες παραδοχές:

α) Εξετάζουμε αρχικές ταχύτητες και θεωρούμε τη συγκέντρωση του προϊόντος P αμελητέα και συνεπώς και την ταχύτητα της τέταρτης ημιαντίδρασης σχεδόν μηδέν.

β) Κατά τους Briggs και Haldane, αμέσως με την έναρξη της αντίδρασης, δημιουργείται κατάσταση δυναμικής ισορροπίας (Steady State), όπου η συγκέντρωση του ES παραμένει σταθερή.

Γνωρίζουμε ότι η ταχύτητα μιας αντίδρασης καθορίζεται από το βραδύτερο στάδιο της αντίδρασης. Στη συγκεκριμένη αντίδραση το βραδύτερο στάδιο είναι το (3).

Δηλαδή το:



όπου,

K₃ είναι η σταθερά διάστασης του συμπλόκου ES.

Εάν εκφράσουμε την ES συναρτήσει των γνωστών μεγεθών της συγκέντρωσης του ενζύμου και του υποστρώματος, τότε θα έχουμε τον νόμο της ταχύτητας της αντίδρασης.

Δεχθήκαμε ότι η συγκέντρωση του [ES] είναι σταθερή. Για να συμβαίνει αυτό, πρέπει η ταχύτητα σχηματισμού του ES να είναι ίση με την ταχύτητα διάσπασής του.

Δηλαδή:

$$V_1 = V_2 + V_3$$

όπου $V_1 = K_1 [E] [S]$ και $V_2 = K_2 [ES]$,

άρα:

$$\begin{aligned}K_1 [E] [S] &= K_2 [ES] + K_3 [ES] \\ \rightarrow K_1 [E] [S] &= [K_2 + K_3] [ES] \\ \rightarrow Km &= \frac{[E][S]}{[ES]} = \frac{K_2 + K_3}{K_1} \quad (6.3)\end{aligned}$$

Η σταθερά Michaelis – Menten, Km, είναι ο συνδυασμός των τριών κινητικών σταθερών των στοιχειωδών αντιδράσεων που απαρτίζουν τον μηχανισμό της ενζυμικής αντίδρασης ($K_2 + K_3 / K_1$).

Όπως θα δούμε στη συνέχεια, η μεγάλη συγγένεια ενός ενζύμου με το υπόστρωμά του, αντιστοιχεί σε χαμηλή τιμή Km και αντίστροφα.

Τα [E] και [S] παριστάνουν τις δραστικές συγκεντρώσεις ενζύμου και υποστρώματος.

Εάν Et είναι η ολική (αρχική) συγκέντρωση του ενζύμου, αυτή θα ισούται με:

$$Et = [ES] + [E]$$

όπου,

[ES] η συγκέντρωση του ενζύμου που είναι δεσμευμένο με τη μορφή του συμπλόκου,

[E] το ένζυμο που υπάρχει ελεύθερο για δράση.

Άρα:

$$[E] = Et - [ES] \quad (6.4)$$

Ανάλογα και για τις συγκεντρώσεις υποστρώματος:

$$St = [ES] + [S] \quad (6.5)$$

Γνωρίζουμε ότι η συγκέντρωση του ενζύμου είναι πάρα πολύ μικρή ως προς τη συγκέντρωση του υποστρώματος. Άρα, το [ES] είναι αμελητέο ως προς το [S], αλλά όχι ως προς το [E].

Συνεπώς, η εξίσωση

$$Km = \frac{[E][S]}{[ES]}$$

μπορεί να γραφτεί:

$$\begin{aligned}(Et - ES) [S] &= Km [ES] \\ \rightarrow Et [S] &= Km [ES] + [ES] [S] \\ \rightarrow Et [S] &= [Km + S] [ES] \\ \rightarrow [ES] &= \frac{Et [S]}{Km + [S]} \quad (6.6)\end{aligned}$$

Αντικαθιστώντας το [ES] στην εξίσωση της ταχύτητας της αντίδρασης $V_3 = K_3 \times [ES]$ έχουμε την εξίσωση Michaelis – Menten:

$$V = \frac{K_3 E_t [S]}{K_m + [S]} \quad (6.7)$$

Όταν η συγκέντρωση του υποστρώματος αυξηθεί αρκετά, όλο το ένζυμο δεσμεύεται με το υπόστρωμα και η συγκέντρωση του συμπλόκου ES ισούται με την αρχική συγκέντρωση του ενζύμου E_t , $[ES] = E_t$. Αυτό σημαίνει ότι η ταχύτητα της αντίδρασης μετασχηματίζεται στην:

$$V_{max} = K_3 \times E_t \quad (6.8)$$

Εάν αντικαταστήσουμε τη σχέση (8) στην εξίσωση (7), παίρνουμε τη γνωστή εξίσωση Michaelis-Menten:

$$V = \frac{V_{max} [S]}{K_m + [S]} \quad (6.9)$$

Εάν στην εξίσωση (1) αντικαταστήσουμε το

$$V = \frac{V_{max}}{2}$$

έχουμε:

$$\frac{V_{max}}{2} = \frac{V_{max}[S]}{K_m + [S]}$$

δηλαδή $K_m + [S] = 2 [S]$

$$K_m = [S] \quad (6.10)$$

Από την εξίσωση (10) βλέπουμε ότι η K_m ισούται αριθμητικά με εκείνη τη συγκέντρωση υποστρώματος, που απαιτείται, για να είναι η ταχύτητα της αντίδρασης ίση με το μισό της μέγιστης.

Μεγάλη τιμή K_m σημαίνει μεγάλη συγκέντρωση υποστρώματος, για να έχουμε ταχύτητα της αντίδρασης ίση με το μισό της μέγιστης. Άρα, ένα ένζυμο που καταλύει δύο διαφορετικές αντιδράσεις (δύο διαφορετικά υποστρώματα), θα προτιμήσει να δεσμεύσει το υπόστρωμα με τη μικρότερη σταθερά K_m .

Η K_m είναι ένα είδος ταυτότητας για τα ένζυμα, γιατί είναι χαρακτηριστική για κάθε ένζυμο.

Παράλληλα, η V_{max} είναι δείκτης της συγκεντρώσεως του ενζύμου. Εάν θέλουμε να υπολογίσουμε την ποσότητα του ενζύμου, πρέπει να χρησιμοποιήσουμε τέτοιες συγκεντρώσεις υποστρώματος, όπου το ένζυμο να είναι κορεσμένο. Τότε η ταχύτητα της αντίδρασης θα είναι ανάλογη της συγκέντρωσης του ενζύμου.

Διερεύνηση της εξίσωσης Michaelis – Menten

Παρατηρώντας τη γραφική παράσταση στο Σχήμα 6.5, το πρώτο τμήμα αντιστοιχεί σε μικρές συγκεντρώσεις υποστρώματος. Εάν η $[S]$ διαφέρει κατά 100 από την K_m του ενζύμου, μπορούμε να θεωρήσουμε αμελητέο τον έναν παράγοντα ως προς τον άλλο στη σχέση $K_m + S$.

Εάν λοιπόν $K_m > 100 [S]$, τότε θεωρούμε ότι πρακτικά η αριθμητική τιμή του $K_m + [S] = K_m$

Άρα:

$$v = \frac{V_{max}[S]}{K_m} \quad (6.11)$$

Σε αυτές τις τιμές του [S] η ταχύτητα της αντιδράσεως είναι α τάξεως ως προς τη συγκέντρωση του υποστρώματος.

Όταν η [S] > 100 K_m, παραλείπουμε την K_m ως προς την [S], τότε η εξίσωση (6.9), γίνεται:

$$V = \frac{V_{max}[S]}{[S]}$$

$$\rightarrow V = V_{max} \quad (6.12)$$

Δηλαδή σε μεγάλες συγκεντρώσεις υποστρώματος, όπου [S] > 100 K_m, το ένζυμο είναι κορεσμένο και η ταχύτητα της αντίδρασης είναι μέγιστη. Η αντίδραση είναι μηδενικής τάξεως ως προς το υπόστρωμα, δηλαδή ανεξάρτητη από τη συγκέντρωση του υποστρώματος.

Αυτό αντιστοιχεί στο τμήμα της καμπύλης που τείνει ασυμπτωματικά προς την ευθεία.

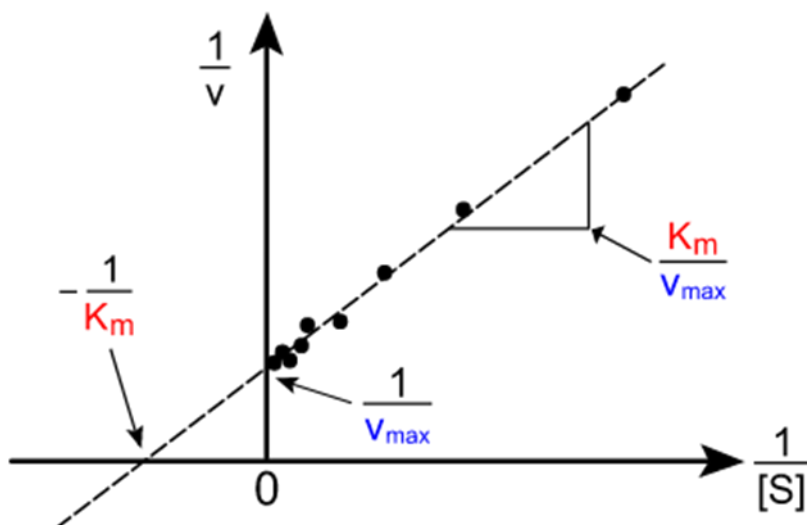
Για τις άλλες τιμές της συγκέντρωσης του υποστρώματος, η αντίδραση είναι μεικτής τάξεως ως προς το υπόστρωμα και εκφράζεται γραφικά από το καμπύλο τμήμα της ορθογώνιας υπερβολής.

Εάν λάβουμε το αντίστροφο της εξίσωσης (9), προκύπτει η εξίσωση Lineweaver – Burk:

$$\frac{1}{V} = \frac{1}{V_{max}} + \frac{K_m}{V_{max}} \times \frac{1}{[S]} \quad (6.13)$$

Η εξίσωση αυτή παριστά μια συνάρτηση α' βαθμού του αντιστρόφου της ταχύτητας (1/v) συναρτήσει του αντιστρόφου του υποστρώματος 1/[S]. Η γραφική της παράσταση είναι μια ευθεία γραμμή που φαίνεται στο Σχήμα 6.8.

Από τη γραφική παράσταση αυτής της εξίσωσης μπορούμε ευκολότερα να προσδιορίσουμε το 1/V_{max} και το 1/k_m, ως σημεία, με μεγαλύτερη ακρίβεια.

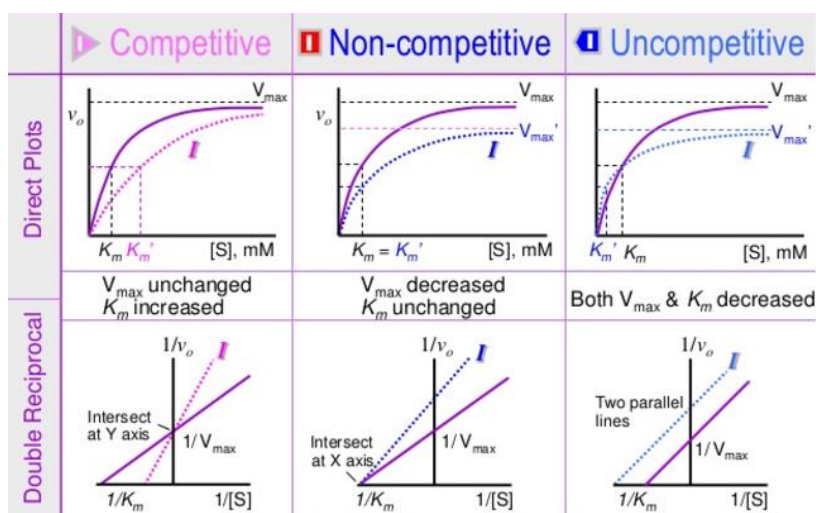


Σχήμα 6.8 Γραφική παράσταση 1/v συναρτήσει του 1/[S].

Αναστολή και ενεργοποίηση ενζύμων

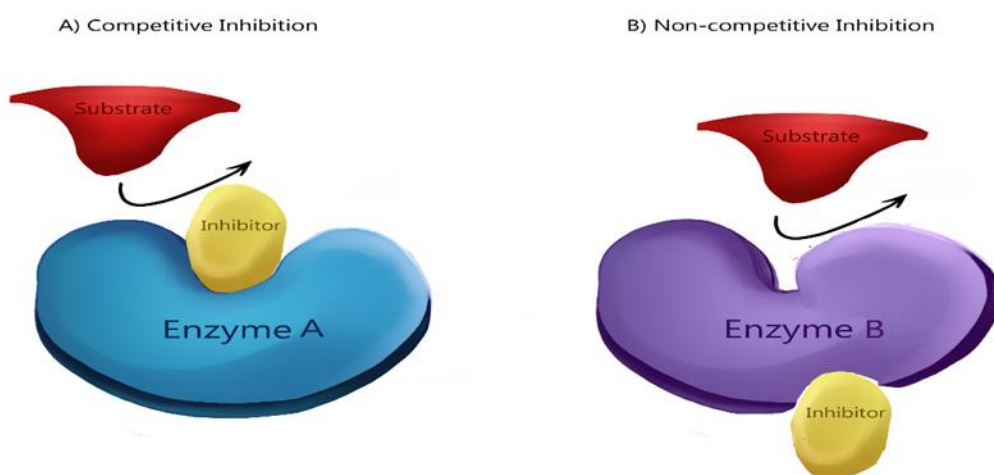
Η ταχύτητα των ενζυμικών αντιδράσεων μειώνεται ή αυξάνεται παρουσία διάφορων χημικών ενώσεων. Οι αναστολείς των ενζύμων είναι ενώσεις που συνδέονται με το ένζυμο και επιβραδύνουν ή καταργούν την ενζυμική αντίδραση. Υπάρχουν δύο διαφορετικοί μηχανισμοί αναστολής των ενζύμων, η αντιστρεπτή αναστολή και η μη αντιστρεπτή αναστολή. Στην αντιστρεπτή αναστολή, το ένζυμο μπορεί να ανακτήσει τη δραστηριότητά του και η ενζυμική αντίδραση να ξαναρχίσει. Αυτό συμβαίνει, διότι ο αναστολέας συνδέεται αντιστρεπτά στο ένζυμο με ασθενείς δυνάμεις, οπότε μπορεί να αποδεσμευτεί εύκολα. Αντίθετα, αναστολείς που συνδέονται με το ένζυμο με ισχυρούς ομοιοπολικούς δεσμούς απενεργοποιούν μόνιμα το ένζυμο και προκαλούν τη μη αντιστρεπτή αναστολή (Εικόνα 6.2). Η αντιστρεπτή αναστολή διακρίνεται σε:

- Ανταγωνιστική (competitive), όπου με την προσθήκη αναστολέα μεταβάλλεται το K_m , ενώ δεν επηρεάζεται το V_{max} (Σχήμα 6.9.).
- Μη ανταγωνιστική (noncompetitive), όπου συμβαίνει το αντίθετο (Σχήμα 6.9.).



Σχήμα 6.9 Είδη ενζυμικής αναστολής.

- Συναγωνιστική (uncompetitive), όπου τα K_m , V_{max} μεταβάλλονται κατά τον ίδιο παράγοντα.



Εικόνα 6.2 Ανταγωνιστική και μη ανταγωνιστική αναστολή.

Ενεργοποιητές είναι συνήθως ορισμένα μέταλλα (ιόντα), όπως Ca^{++} , Mg^{++} , που αντιδρούν με πλευρικές αλυσίδες των αμινοξέων του ενεργού κέντρου, καθιστώντας το ένζυμο δραστηκότερο.

Μη αντιστρεπτή αναστολή

Οι αναστολείς αυτοί συνδέονται με το ένζυμο με ισχυρούς ομοιοπολικούς δεσμούς, αλλάζοντας μόνιμα τη δομή της ενεργούς περιοχής (π.χ. CN⁻, CO, στα κυτοχρώματα της αναπνοής, που οδηγεί σε ασφυξία) οργανοφωσφορικοί εστέρες, όπως το παραθειό, εντομοκτόνα κ.ά. Τα δηλητήρια είναι συνήθως ιόντα ορισμένων βαρέων μετάλλων, όπως Ag⁺, Hg⁺⁺, Pb⁺⁺ καθιστώντας το ένζυμο ανενεργό λόγω ολικής καταστροφής της δομής του. Αυτού του τύπου η αναστολή δεν υπακούει στην εξίσωση Michaelis-Menten.

6.4 Τα ένζυμα στην κλινική διάγνωση και τη φαρμακολογία

Τα ένζυμα είναι βιοκαταλύτες και λόγω των αξιοσημείωτων ιδιοτήτων τους, χρησιμοποιούνται ευρέως στην ιατρική διάγνωση. Έρευνες των τελευταίων δύο δεκαετιών έχουν επικεντρωθεί περισσότερο σε ένζυμα, όπως η κρεατίνη κινάση-MB, η τρανσαμινάση της αλανίνης, η ασπαρτική τρανσαμινάση, η όξινη φωσφατάση και η αλκαλική φωσφατάση για κλινικές εφαρμογές. Τα ένζυμα είναι οι προτιμώμενοι δείκτες σε διάφορες καταστάσεις ασθένειας, όπως έμφραγμα του μυοκαρδίου, ίκτερος, παγκρεατίτιδα, καρκίνος, νευροεκφυλιστικές διαταραχές. Παρέχουν πληροφορίες σχετικά με τη διαδικασία της νόσου, με τη διάγνωση, την πρόγνωση και την αξιολόγηση της θεραπείας απόκρισης.

Π.χ. τα υψηλά επίπεδα δραστηριότητας αλκαλικής φωσφατάσης είναι χαρακτηριστικά της οστικής νόσου με αυξημένη οστεοβλαστική δραστηριότητα, ηπατική νόσο με μερική ή πλήρη απόφραξη της χολής και παροδική υπερφωσφαταιμία στα παιδιά. Ο προσδιορισμός της γάμμα-γλουταμυλ τρανσπεπτιδάση είναι συχνά χρήσιμος, για να διαφοροποιηθεί, εάν η αυξημένη αλκαλική φωσφατάση προέρχεται από τα οστά ή το ήπαρ. Φυσιολογική γ-γλουταμυλ τρανσπεπτιδάση υποδηλώνει οστική προέλευση. Η ηλεκτροφόρηση αλκαλικής φωσφατάσης στον ορό μπορεί να οδηγήσει σε διαφοροποίηση διάφορων παθολογικών καταστάσεων.

Τα επίπεδα της τρανσαμινάσης της αλανίνης (ALT) και της ασπαρτικής τρανσαμινάσης (AST) αμινοτρανσφερασών στον ορό θεωρούνται δείκτες ηπατικής βλάβης, συμπεριλαμβανομένου ενός ευρέος φάσματος αιτιολογιών από ιική ηπατίτιδα έως λιπώδες ήπαρ. Ο αυξανόμενος παγκόσμιος επιπολασμός του μεταβολικού συνδρόμου και των καρδιαγγειακών παθήσεων αποκάλυψε ότι οι τρανσαμινάσες είναι ισχυροί προγνωστικοί παράγοντες του διαβήτη τύπου 2, στεφανιαίας νόσου, προφίλ κινδύνου αθηροθρομβωτικού και συνολικού κινδύνου μεταβολικής νόσου. Επομένως, οι αμινοτρανσφεράσες μπορεί να είναι βιοδείκτες της «μεταβολικής λειτουργίας του ήπατος» πέρα από την κλασική έννοια της ηπατικής βλάβης του ήπατος, καθώς η ενζυμική τους δράση μπορεί στην πραγματικότητα να αντανάκλα βασικές πτυχές της φυσιολογίας και της παθοφυσιολογίας της ηπατικής λειτουργίας (Πίνακες 6.3, 6.4.).

Έναν αριθμό ενζύμων που συμβάλλουν στη διάγνωση περιλαμβάνουν οι Πίνακες 6.3. και 6.4.

Πίνακας 6.3 Ένζυμα και οργανική βλάβη που προκαλούν.

ΕΝΖΥΜΟ	ΒΙΟΛΟΓΙΚΟ ΥΓΡΟ (Δείγμα)	ΟΡΓΑΝΟ Ή ΑΣΘΕΝΕΙΑ
Αλκαλική φωσφατάση	O(ορός), OY (ούρα); Λ (λευκά)	ήπαρ, οστά
Όξινη φωσφατάση	O	ένδειξη κακοήθειας
Αμυλάση	O, OY, Y (υγρό ιστών)	Παγκρεατική βλάβη
Γλουταμινική οξυαλοξείκη τρανσαμινάση (GOT)	O, Y, E.N.Y.	καρδιά, ήπαρ
Γλουταμινική πυροσταφυλική τρανσαμινάση (GTP)	O, Y, E.N.Y.	καρδιά, ήπαρ
Γαλακτική δεϋδρογενάση (LDH)	O, Y, E:N.Y.	καρδιά, ήπαρ, ερυθρά
Κινάση της φωσφοκρεατινίνης (CPK)	O	καρδιά, μυς, εγκέφαλος
ΛΙΓΟΤΕΡΟ ΣΥΧΝΑ		
Αλδολάση (ALD)	O	καρδιά, μυς
Ισοκιτρική δεϋδρογενάση	O	ήπαρ
G-6-PD (Γλυκόζη-6-Φωσφορική δεϋδρογενάση)	E ερυθρά	ερυθρά(γενετικό ελάττωμα)
CHS (ψευδοχολινεστεράση)	O	ήπαρ, πάγκρεας
Λιποπρωτεϊνική λιπάση	O, Y, Δ (δωδεκαδακτυλικό υγρό)	υπερλιπιδωπρωτεϊναιμία
Πλασμίνη	O	πήξως του αίματος
Μηλική δεϋδρογενάση	O	ήπαρ

Ορισμένα ένζυμα μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως καρκινικοί δείκτες, δηλαδή είναι βιολογικά προϊόντα που προέρχονται από καρκινικά κύτταρα και επειδή εισέρχονται στην κυκλοφορία, η παρουσία τους στο αίμα σε συνάρτηση με τις τιμές των συγκεντρώσεών τους δείχνει την παρουσία ογκοκυττάρων. Ο προσδιορισμός, γενικά, των καρκινικών δεικτών χρησιμεύει:

- για τη διάγνωση του καρκίνου,
- για το στάδιο της εξέλιξής του,
- για την παρακολούθηση της θεραπείας,
- για την πιστοποίηση της ίασης ή της πιθανής επιδείνωσης.

Ορισμένοι παράγοντες είναι ανασταλτικοί για την ευρεία χρήση των καρκινικών δεικτών και μεταξύ των άλλων είναι και το γεγονός ότι σε πολλές περιπτώσεις η έκκριση των δεικτών αυτών μπορεί να είναι τόσο μικρή που να μην ανιχνεύεται αμέσως στο αίμα.

Μερικά από τα ένζυμα που χρησιμοποιούνται συχνά για τη διάγνωση ή την παρακολούθηση διάφορων τύπων νεοπλασιών καταγράφονται στον Πίνακα 6.4.

Πίνακας 6.4 Ένζυμα στην κλινική διάγνωση.

ENZYMATA	ΝΕΟΠΛΑΣΙΑ	ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ
Προστατική όξινη φωσφατάση, PAP	Προστάτου	RIA, ενζυματικές
Ισοένζυμα γαλακτικής δεϋδρογενάσης, LDH	Ορισμένων λευχαιμικών κυττάρων	Ηλεκτροφόρηση
Κρεατίνη φωσφοκινάση, CK BB ισοένζυμο	Προστάτου Πνευμόνων	Ηλεκτροφόρηση
Γάμμα-γλουταμυλ Τρανσφεράση, γ-GT	Ήπατος από μετάσταση	Ενζυματικές
Παγκρεατικά ένζυμα	Παγκρέατος	RIA, ενζυματικές

Τα ένζυμα ως πρωτεΐνες υπάγονται σε κατ' ευθεία γενετικό έλεγχο, επομένως μία γενετική αλλοίωση θα έχει ως αποτέλεσμα τη σύνθεση ενζύμου με αλλαγμένη αλληλουχία αμινοξέων ως προς την αυθεντική πρωτεϊνοσύνθεση, οπότε μπορεί να προκληθεί μερική ή ολική απώλεια της ενζυμικής δραστηριότητας. Αυτό θα έχει ως αποτέλεσμα τη μη φυσιολογική δράση του ενζύμου στη μεταβολική οδό στην οποία μετέχει, δηλαδή την εμφάνιση δυσλειτουργίας μέσω κάποιου συνδρόμου ή νόσου.

Η αλλοιωμένη αυτή πληροφορία στην παραγωγή του ενζύμου μεταφέρεται στους απογόνους και καλείται *μοριακή ασθένεια* ή εκ γενετής *μεταβολικό ελάττωμα*. Ως παραδείγματα αναφέρουμε τον αλβινισμό που οφείλεται στην έλλειψη του ενζύμου τυροσινάση, τη φαινυλκετονουρία, που οφείλεται στην έλλειψη της υδροξυλάσης της φαινυλαλανίνης και τη φρουκτοζουρία, που οφείλεται σε έλλειψη της φρουκτοκινάσης.

Στην ιδιότητα της αναστολής της ενζυμικής δραστηριότητας στηρίζεται η δράση πολλών φαρμάκων, τα οποία αναστέλλουν τη δράση διάφορων ενζύμων, που δρουν στη μεταβολική αλυσίδα της ανάπτυξης, της φλεγμονής, της νευρικής λειτουργίας του πολλαπλασιασμού μικροοργανισμών ή κακοήθων κυτταρικών σχηματισμών.

Πολλά φάρμακα, είναι αναστολείς ή ενεργοποιητές ενζύμων. Τα ένζυμα, επίσης, μεταβολίζουν και αποτοξινώνουν τον οργανισμό από τα φάρμακα (κυτόχρωμα P450). Η εφαρμοσμένη ενζυμική κινητική συμβάλλει καθοριστικά στην ταυτοποίηση και στον χαρακτηρισμό των φαρμάκων, που τα περισσότερα αναστέλλουν εκλεκτικά ειδικά ένζυμα (κυκλοοξυγενάσες, αγγειοτενσίνη-μετατρεπτικό ένζυμο, κινάσες, φωσφοδιεστεράσες, ΑΤΡαση, ΗΜG-CoA αναγωγή, τοποϊσομεράσες, πρωτεάσες), που σχετίζονται με την εκδήλωση πολλών ασθενειών-παθήσεων.

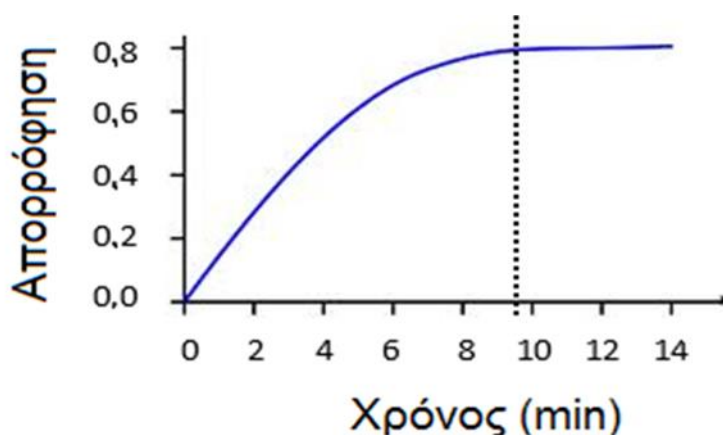
Τέλος, τα ένζυμα διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο στην ανακάλυψη νέων φαρμακοδραστικών μορίων, στη συγκριτική φαρμακοδυναμική και στον ποσοτικό προσδιορισμό του μηχανισμού δράσης τους.

6.5 Φωτομετρικές μεθοδολογίες στην κλινική ανάλυση: α) μέθοδος τελικού σημείου, β) κινητική μέθοδος

Για τον ποσοτικό φωτομετρικό προσδιορισμό ενός κλινικού αναλύτη βασιζόμενο σε μία συγκεκριμένη αντίδραση, είναι δυνατόν να εφαρμοστούν δύο εναλλακτικές μεθοδολογίες, η μέθοδος τελικού σημείου και η κινητική μέθοδος.

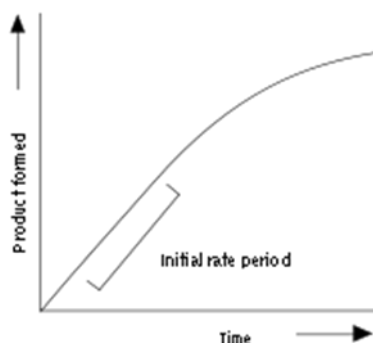
Στη μέθοδο τελικού σημείου (end point method) (προσδιορισμοί μη ενζυμικών κλινικών αναλυτών), η απορρόφηση του έγχρωμου προϊόντος μετρείται μόνο σε μία συγκεκριμένη χρονική στιγμή μετά την έναρξη της αντίδρασης. Η μέτρηση γίνεται κατά κανόνα στο τέλος της αντίδρασης, δηλαδή αφού έχει παραχθεί η μέγιστη ποσότητα προϊόντος (και πρακτικά η αντίδραση προχωράει πλέον με σχεδόν μηδενική ταχύτητα) (Σχήμα 6.10). Η συγκέντρωση του παραγόμενου προϊόντος είναι ανάλογη της συγκέντρωσης του αναλύτη.

Δείγμα + χρωμογόνο σε περίσσεια → προϊόν που απορροφά στο vis



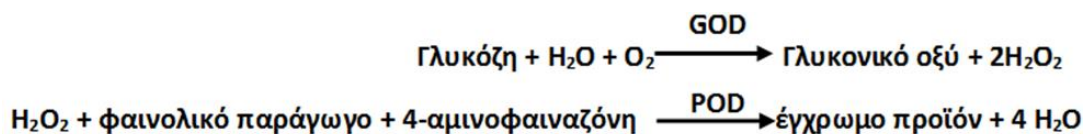
Σχήμα 6.10 Διάγραμμα μεταβολής της απορρόφησης συναρτήσει του χρόνου. Η μέτρηση στη μέθοδο τελικού σημείου γίνεται, όταν η τιμή της απορρόφησης έχει σταθεροποιηθεί. Η κάθετη διακεκομμένη γραμμή υποδεικνύει τη χρονική στιγμή πέραν της οποίας η καμπύλη επιπεδοποιείται.

Στην κινητική μέθοδο (kinetic method) (προσδιορισμοί ενζυμικών και μη ενζυμικών αναλυτών), λαμβάνεται σειρά μετρήσεων και υπολογίζεται ο ρυθμός εξέλιξης μιας αντίδρασης για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης ενός αναλύτη. Υπολογίζεται δηλαδή ο ρυθμός μεταβολής της απορρόφησης του έγχρωμου προϊόντος με τον χρόνο στα πολύ αρχικά στάδια της αντίδρασης, εκεί όπου η συγκέντρωση του προϊόντος που σχηματίζεται εξαρτάται από τη συγκέντρωση του ενζύμου και όχι από τη συγκέντρωση του υποστρώματος (Σχήμα 6.11).

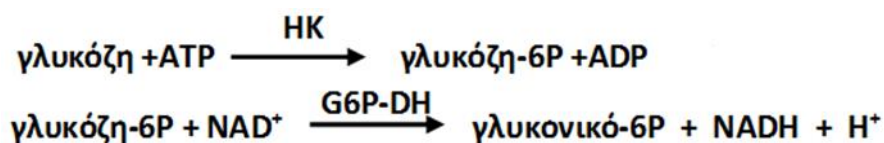


Σχήμα 6.11 Διάγραμμα μεταβολής της απορρόφησης συναρτήσει του χρόνου.

Οι αντιδράσεις προσδιορισμού της γλυκόζης με μέθοδο τελικού σημείου μέσω ενζύμων (GOD, POD) και μέτρηση στα 510 nm είναι:



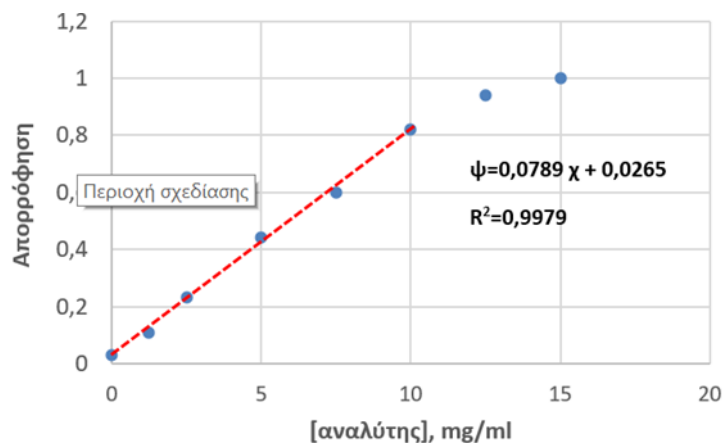
ενώ οι αντιδράσεις προσδιορισμού της γλυκόζης με κινητική μέθοδο μέσω του ενζύμου εξοκινάση (HK) και μέτρηση στα 340 nm είναι:



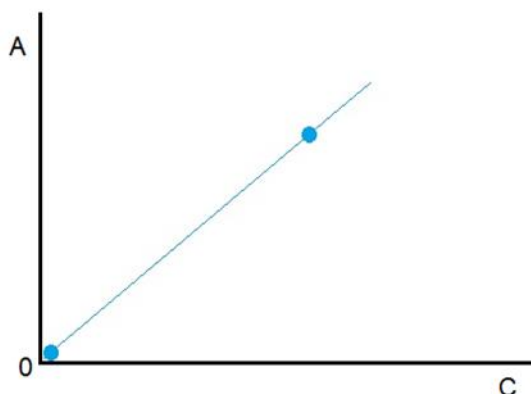
Πέραν αυτής της βασικής διαφοράς τους, οι δύο κατηγορίες κλινικών προσδιορισμών διαφέρουν, επίσης, ως προς τη βαθμονόμηση, όπως κι ως προς τον τρόπο με τον οποίο τα αποτελέσματα επεξεργάζονται για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης του συγκεκριμένου αναλύτη.

Η βαθμονόμηση στη μέθοδο τελικού σημείου μπορεί να γίνει:

- Με χρήση πολλαπλών εξωτερικών προτύπων και κατασκευή καμπύλης αναφοράς (Σχήμα 6.12).
- Βαθμονόμηση με χρήση ενός μόνο εξωτερικού προτύπου, που προϋποθέτει γραμμική και αναλογική σχέση μεταξύ μετρούμενου σήματος/συγκέντρωσης, δηλαδή η ευθεία συσχέτισης θα πρέπει να διέρχεται από την αρχή των αξόνων ($A_T = 0$). Χαρακτηρίζεται με μικρότερη ακρίβεια από τη μέθοδο της καμπύλης αναφοράς (Σχήμα 6.13).



Σχήμα 6.12 Βαθμονόμηση με μέθοδο καμπύλης αναφοράς. Σημεία εκτός γραμμικής περιοχής δεν χρησιμοποιούνται στον ορισμό της καμπύλης αναφοράς.



Σχήμα 6.13 Βαθμονόμηση με χρήση ενός μόνο εξωτερικού προτύπου.

Η συγκέντρωση μιας ουσίας στο δείγμα με χρήση ενός μόνο εξωτερικού προτύπου πειραματικά υπολογίζεται ως εξής:

Η μέτρηση αρχίζει πάντοτε με τη φωτομέτρηση του «τυφλού» - ΑΤ, όπως ονομάζεται το διάλυμα που περιέχει όλα τα αντιδραστήρια εκτός της ουσίας. Το «τυφλό» επομένως έχει συγκέντρωση ουσίας (0) μηδέν.

Ακολουθεί φωτομέτρηση του προτύπου - ΑΠ και του δείγματος - ΑΔ

Προσοχή!! Σε όλα τα διαλύματα (Τ, Π, Δ) έχει προστεθεί διάλυμα εργασίας!

Με βάση τον νόμο Beer-Lambert: $A = \epsilon C l$ και αφού η ουσία είναι ίδια και όλα τα διαλύματα (Τ, Π, Δ) μετριούνται στην ίδια κυψελίδα θα είναι $\epsilon = \text{σταθερό}$, $l = \text{σταθερό}$.

Διαιρώντας κατά μέλη:

$$A\Delta = \epsilon \times C_{\Delta} \times l$$

$$A\Pi = \epsilon \times C_{\Pi} \times l$$

$$[\text{άγνωστο}] = \frac{A \text{ αγνώστου} - A \text{ τυφλού}}{A \text{ πρότυπου} - A \text{ τυφλού}} \chi [\text{πρότυπο}]$$

$$[\text{άγνωστο}] = \text{Factor} (A \text{ αγνώστου} - A \text{ τυφλού})$$

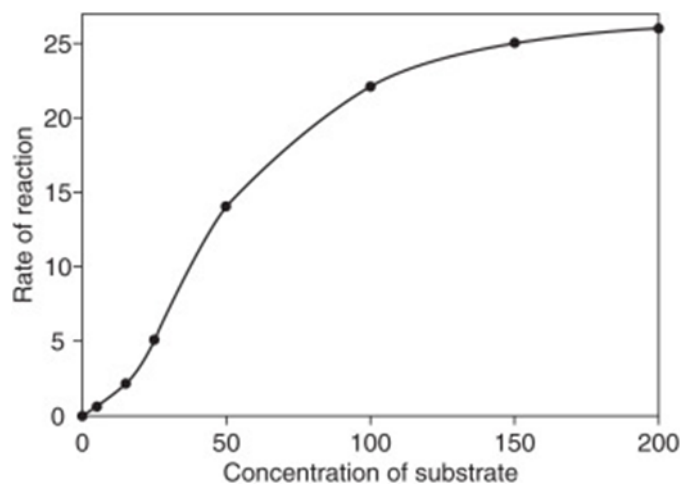
Εάν η μέτρηση του τυφλού δεν είναι μηδέν, η τιμή του θα πρέπει να αφαιρεθεί από τη μέτρηση του προτύπου και του δείγματος. Σε κάθε περίπτωση, η μέτρηση του τυφλού πρέπει να είναι πολύ μικρότερη από του προτύπου. Αυτό, διότι μία υψηλή τιμή για το τυφλό είναι ενδεικτική αλλοίωσης των αντιδραστηρίων εργασίας, π.χ. λόγω επιμόλυνσής τους με τον προσδιοριζόμενο αναλύτη.

Στην κινητική μέθοδο, όπως ήδη αναφέραμε, λαμβάνεται σειρά μετρήσεων και υπολογίζεται ο ρυθμός μεταβολής της απορρόφησης στη γραμμική περιοχή της αντίδρασης, ο οποίος είναι ανάλογος του ρυθμού μεταβολής της συγκέντρωσης του έγχρωμου προϊόντος, δηλαδή της αρχικής ταχύτητας της αντίδρασης και της ενζυμικής συγκέντρωσης.

Ισχύει ότι:

$$\text{Ενζυμική δραστητικότητα (U/L)} = \Delta A / \text{min} \times \text{factor}$$

Όπως φαίνεται στο Σχήμα 6.14., η γραμμική περιοχή δεν ξεκινά αμέσως με την έναρξη της αντίδρασης, αλλά μετά από πολύ σύντομο διάστημα κατόπιν αυτής (φάση έναρξης-έως λίγα sec). Τότε σχηματίζεται το σύμπλοκο ενζύμου-υποστρώματος κατά την ενζυμική αντίδραση. Η κλίση της εφαπτομένης σε οποιοδήποτε σημείο της καμπύλης ισούται με την ταχύτητα της αντίδρασης στο σημείο αυτό. Εάν στην κινητική μέθοδο παραμένει σταθερή η συγκέντρωση του ενζύμου, υπολογίζεται η συγκέντρωση του υποστρώματος. Εάν, όμως, παραμένει σταθερή η συγκέντρωση του υποστρώματος, προσδιορίζεται η ενζυμική δραστητικότητα.



Σχήμα 6.14 Ρυθμός της ενζυμικής αντίδρασης και σχηματισμός του συμπλόκου ενζύμου – υποστρώματος.

Τα πλεονεκτήματα της κινητικής μεθόδου σε σύγκριση με τη μέθοδο τελικού σημείου είναι:

- ταχύτερη
- μη ανάγκη χρήσης τυφλού και προτύπων
- προτιμώμενη σε προσδιορισμούς σε δείγματα, όπου υπάρχει ενδογενής ουσία που παρεμβάλλεται. Η επίδραση των παρεμβολών αυτών λαμβάνεται υπόψη μέσω της φωτομέτρησης τυφλού (blank) και αφαίρεσης της συνεισφοράς του στην απορρόφηση του δείγματος. Το τυφλό υποβάλλεται στους ακριβείς πειραματικούς χειρισμούς που υποβάλλεται το προς ανάλυση δείγμα. Επομένως, περιέχει τη μήτρα του δείγματος και τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται στην αναλυτική μέθοδο. Στην καθημερινή εργαστηριακή πράξη, όμως, δεν είναι πάντοτε διαθέσιμο τυφλό που να αντιστοιχεί απολύτως στη μήτρα. Συχνά ως τυφλό χρησιμοποιείται είτε το πρότυπο 0, είτε φυσιολογικός ορός, είτε απιονισμένο νερό, το οποίο υποβάλλεται στους ακριβείς πειραματικούς χειρισμούς που υποβάλλεται το προς ανάλυση δείγμα. Είναι κατανοητό ότι ένα τέτοιο τυφλό, όμως, δεν αντικατοπτρίζει επακριβώς τη συνεισφορά της μήτρας. Αυτή η συνεισφορά μπορεί να είναι ιδιαίτερα σημαντική, π.χ. στην περίπτωση αιμολυμένων ή ικτερικών δειγμάτων λόγω της απορρόφησης της αιμοσφαιρίνης και χολερυθρίνης αντίστοιχα, στο ορατό φάσμα (Vis). Η απορρόφηση της αιμοσφαιρίνης ή χολερυθρίνης, καθώς και η θολερότητα σε λιπαιμικά δείγματα είναι οι πιο κοινές παρεμβολές σε κλινικούς φωτομετρικούς προσδιορισμούς. Επίσης μπορεί συστατικά της μήτρας να παρεμβάλλονται στον ποσοτικό προσδιορισμό λόγω αντίδρασης με το χρωμογόνο. Στις περιπτώσεις αυτές είναι δυνατόν να ελαχιστοποιηθεί η συνεισφορά του συστατικού της μήτρας στην ανάπτυξη του μετρούμενου σήματος με την εφαρμογή διχρωματικής ανάλυσης (bichromatic analysis), όπου η απορρόφηση δειγμάτων και τυφλού μετρείται σε δύο μήκη κύματος.

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟ ΜΕΡΟΣ

6.6 Εργαστηριακή άσκηση: Προσδιορισμός της αρχικής ταχύτητας μιας ενζυμικής αντίδρασης και μελέτη της επίδρασης της συγκέντρωσης του υποστρώματος σε αυτήν

Τίτλος: Παρακολούθηση της ταχύτητας μεταβολισμού του αμύλου από την αμυλάση και υπολογισμός K_m

Πορεία εργασίας:

Χρησιμοποιούμε τα εξής διαλύματα και αντιδραστήρια:

A. Διάλυμα I_2 : 2% w/v.

Β. Διάλυμα αμυλάσης 0,1 mg/mL σε ρυθμιστικό διάλυμα Γ.

Γ. Ρυθμιστικό διάλυμα (buffer) φωσφορικών 50 mM, pH = 7,2: διαλύουμε 141 g Na₂HPO₄ σε 950 mL νερό. Προσθέτουμε οξύ (HCl) ή βάση (NaOH) ανάλογα για να ρυθμίσουμε το pH σε 7,2. Συμπληρώνουμε με νερό μέχρι τα 1000 mL.

Δ. 100 mL διάλυμα αμύλου 1% w/v, όπου το παρασκευάζουμε διαλύοντας το άμυλο σε 80mL νερό σε θερμοκρασία βαθμού με έντονη ανάδευση επί 3 min. Στη συνέχεια, προσθέτουμε παγωμένο νερό μέχρι συμπλήρωσης των 100 mL.

- Ρυθμίζουμε το μήκος κύματος του φωτομέτρου σε $\lambda = 600$ nm και με κυψελίδα που περιέχει νερό ρυθμίζουμε το μηδέν του φωτομέτρου.
- Παρασκευάζουμε σειρά διαλυμάτων σύμφωνα με τον παρακάτω πίνακα προσθέτοντας τα επιμέρους συστατικά με τη σειρά που φαίνεται στον πίνακα.
- Ανακινούμε αμέσως το μείγμα. Η χρονική στιγμή της ανακίνησης ορίζεται ως χρόνος $t = 0$.
- Σε χρόνο $t = 3$ min προσθέτουμε 100 μ L ιωδίου για να επιβραδύνουμε πολύ σημαντικά τη δράση της αμυλάσης και να αναπτύξουμε το έγχρωμο προϊόν κατά τη συμπλοκοποίηση αμύλου και ιωδίου.
- Αραιώνουμε καθένα από τα δείγματα και controls 1:50.
- Μετρούμε την απορρόφηση των αραιωμένων δειγμάτων στα 600 nm.
- Σημειώνουμε την απορρόφηση στον πίνακα που ακολουθεί, διορθώνουμε για την αραιώση και υπολογίζουμε τον ρυθμό κατανάλωσης του αμύλου $V = \Delta A / \Delta t$.

A/A	μ L buffer	μ L διαλύματος αμύλου	μ L διαλύματος αμυλάσης	A (600nm)	A'=Ax 50	$V = \Delta A / \Delta t$ (min ⁻¹) = (A control - A δείγμα) / 3
Δείγμα 1	1100	400	40			
Control 1	1100	400	0			
Δείγμα 2	900	600	40			
Control 2	900	600	0			
Δείγμα 3	750	750	40			
Control 3	750	750	0			
Δείγμα 4	650	850	40			
Control 4	650	850	0			

Υπολογίζουμε το 1/v και 1/[άμυλο] και συμπληρώνουμε τον παρακάτω πίνακα:

A/A	1/V (min)	1/[άμυλο], (1/(% w/v))
1		
2		
3		
4		

1% w/v -> Σε 100 mL διαλύματος περιέχονται 1 g αμύλου, όπου η συγκέντρωση είναι (1/100) g/mL = 10 mg/mL.

Ο τελικός όγκος των δειγμάτων ισούται με το άθροισμα του όγκου του ιωδίου, του buffer, του αμύλου και της αμυλάσης.

Άρα, για τα δείγματα έχουμε:

Πρώτο δείγμα: $V_{\text{τελικό}} = 100 \mu\text{L} + 1100 \mu\text{L} + 400 \mu\text{L} + 40 \mu\text{L} = 1640 \mu\text{L}$.

Δεύτερο δείγμα: $V_{\text{τελικό}} = 100 \mu\text{L} + 900 \mu\text{L} + 600 \mu\text{L} + 40 \mu\text{L} = 1640 \mu\text{L}$.

Τρίτο δείγμα: $V_{\text{τελικό}} = 100 \mu\text{L} + 750 \mu\text{L} + 750 \mu\text{L} + 40 \mu\text{L} = 1640 \mu\text{L}$.

Τέταρτο δείγμα: $V_{\text{τελικό}} = 100 \mu\text{L} + 650 \mu\text{L} + 850 \mu\text{L} + 40 \mu\text{L} = 1640 \mu\text{L}$.

Από τον νόμο της αραιώσης έχουμε: $C_{\text{αρχικό}} \times V_{\text{αρχικό}} = C_{\text{τελικό}} \times V_{\text{τελικό}}$.

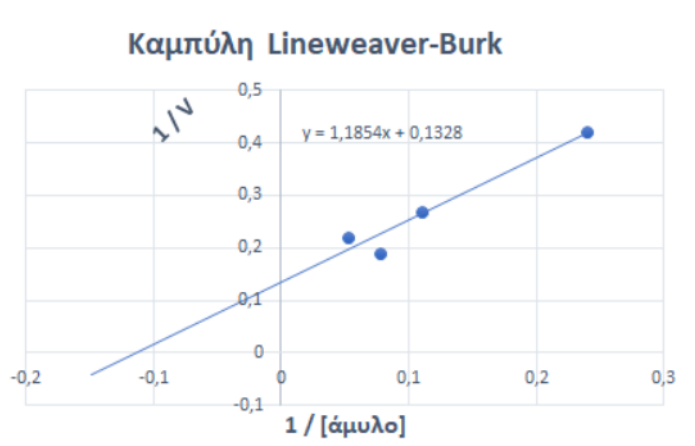
Για το πρώτο δείγμα: $(10 \text{ mg/mL}) (400 \text{ }\mu\text{L}) = (C_{\text{τελικό}}) (1640 \text{ }\mu\text{L}) \Rightarrow$
 $\Rightarrow (C_{\text{τελικό}}) = (10 \text{ mg/mL})(0,24) = 2,4 \text{ mg/mL}$
 $1/[\text{άμυλο}] = 1/(2,4 \text{ mg/mL}) = 0,42 \text{ mL/mg}$

Για το δεύτερο δείγμα: $(10 \text{ mg/mL}) (600 \text{ }\mu\text{L}) = (C_{\text{τελικό}}) (1640 \text{ }\mu\text{L}) \Rightarrow (C_{\text{τελικό}}) = (10 \text{ mg/mL}) (0,37) = 3,7 \text{ mg/mL}$
 $1/[\text{άμυλο}] = 1/(3,7 \text{ mg/mL}) = 0,27 \text{ mL/mg}$

Για το τρίτο δείγμα: $(10 \text{ mg/mL}) (750 \text{ }\mu\text{L}) = (C_{\text{τελικό}}) (1640 \text{ }\mu\text{L}) \Rightarrow$
 $\Rightarrow (C_{\text{τελικό}}) = (10 \text{ mg/mL}) (0,46) = 4,6 \text{ mg/mL}$
 $1/[\text{άμυλο}] = 1/(4,6 \text{ mg/mL}) = 0,22 \text{ mL/mg}$

Για το τέταρτο δείγμα: $(10 \text{ mg/mL}) (850 \text{ }\mu\text{L}) = (C_{\text{τελικό}}) (1640 \text{ }\mu\text{L}) \Rightarrow$
 $\Rightarrow (C_{\text{τελικό}}) = (10 \text{ mg/mL}) (0,52) = 5,2 \text{ mg/mL}$
 $1/[\text{άμυλο}] = 1/(5,2 \text{ mg/mL}) = 0,19 \text{ mL/mg}$

Κατασκευάζουμε την καμπύλη Lineweaver-Burk και υπολογίζουμε τις παραμέτρους K_m και V_{max} .



Σχήμα 6.15 Παράδειγμα εξίσωσης της πειραματικής ευθείας.

Αποτελέσματα που προκύπτουν από το Σχήμα 6.15.

$$y = 1,1854 x + 0,1328 \Rightarrow (1/V_{max}) = 1,1854 (0) + 0,1328 \Rightarrow V_{max} = 1 / (0,1328) = 7,53 \text{ min}$$

$$K_m / V_{max} = 1,1854 \Rightarrow K_m = (1,1854) (7,53) = 8,93 \text{ mg/mL}$$

Το ίδιο σχεδόν αποτέλεσμα βγαίνει από το διάγραμμα, όπου η προέκταση της ευθείας τέμνει τον άξονα x στο σημείο $-0,12$ περίπου, το οποίο σημείο ισούται με $-(1/K_m)$.

$$\text{Άρα, } -(1/K_m) = -0,12 \Rightarrow K_m = 1/(0,12) = 8,33 \text{ mg / mL.}$$

6.7. Εργαστηριακή άσκηση: Η επίδραση του pH στην ενζυμική αντίδραση

Σε οκτώ δοκιμαστικούς σωλήνες παρασκευάζουμε τα διαλύματα που φαίνονται στον Πίνακα 6.5.

Πίνακας 6.5 Επίδραση του pH στην ενζυμική αντίδραση.

A/A	1	2	3	4	5	6	7	Τυφλό
pH	2	3	5	6	7	8	10	7
Υπόστρωμα μL	400	400	400	400	400	400	400	400
Ένζυμο μL	40	40	40	40	40	40	40	40
Buffer μL	1100	1100	1100	1100	1100	1100	1100	1200

Προσθέτουμε 100 μL ιωδίου στους δοκιμαστικούς σωλήνες 1-7, για να επιβραδύνουμε πολύ σημαντικά τη δράση της αμυλάσης και να αναπτύξουμε το έγχρωμο προϊόν κατά τη συμπλοκοποίηση αμύλου και ιωδίου.

Αραιώνουμε καθένα από τα δείγματα 1:50 και μετρούμε την απορρόφηση των αραιωμένων δειγμάτων ανά 5 sec έως 1,5 min στα 600 nm, αφού πρώτα έχουμε μηδενίσει με το τυφλό.

Όπως είναι ήδη γνωστό, η απορρόφηση είναι γραμμική συγκέντρωση της συγκέντρωσης (νόμος Beer-Lambert), δηλαδή

$$A = \epsilon \times l \times c$$

όπου,

ϵ : μοριακός συντελεστής απορρόφησης,

l : οπτική διαδρομή,

c : συγκέντρωση ουσίας.

Βρίσκουμε τις αρχικές τιμές ταχύτητας και φτιάχνουμε το διάγραμμα $V = f(\theta)$ και προσδιορίζεται η βέλτιστη θερμοκρασία ενζυμικής δράσης.

6.8 Εργαστηριακή άσκηση: Η επίδραση της θερμοκρασίας στην ενζυμική αντίδραση

Σε οκτώ δοκιμαστικούς σωλήνες παρασκευάζουμε τα διαλύματα που φαίνονται στον πίνακα 6.6. Μετά από ανάδευση τοποθετούνται για 3 min σε υδρόλουτρο ή ψυγείο σε θερμοκρασία 0°C, 10°C, 25°C, 40°C, 55°C, 70°C, 85°C.

Πίνακας 6.6 Επίδραση της θερμοκρασίας στην ενζυμική αντίδραση.

A/A	1	2	3	4	5	6	7	Τυφλό
Θερμοκρασία °C	0	10	25	40	55	70	85	25
Υπόστρωμα μL	400	400	400	400	400	400	400	400
Ένζυμο μL	40	40	40	40	40	40	40	40
Buffer μL	1100	1100	1100	1100	1100	1100	1100	1200

Σε χρόνο $t = 3 \text{ min}$ προσθέτουμε 100 μL ιωδίου στους δοκιμαστικούς σωλήνες 1-7, για να επιβραδύνουμε πολύ σημαντικά τη δράση της αμυλάσης και να αναπτύξουμε το έγχρωμο προϊόν κατά τη συμπλοκοποίηση αμύλου και ιωδίου.

Αραιώνουμε καθένα από τα δείγματα 1:50 και μετρούμε την απορρόφηση των αραιωμένων δειγμάτων ανά 5 sec έως 1,5 min στα 600nm, αφού πρώτα έχουμε μηδενίσει με το τυφλό.

Όπως είναι ήδη γνωστό, η απορρόφηση είναι γραμμική συγκέντρωση της συγκέντρωσης (νόμος Beer-Lambert), δηλαδή

$$A = \epsilon \times l \times c$$

όπου,

ϵ : μοριακός συντελεστής απορρόφησης,

l : οπτική διαδρομή,

c : συγκέντρωση ουσίας.

Βρίσκουμε τις αρχικές τιμές ταχύτητας και φτιάχνουμε το διάγραμμα $V = f(\theta)$ και προσδιορίζεται η βέλτιστη θερμοκρασία ενζυμικής δράσης.

6.9 Εργαστηριακή άσκηση: Προσδιορισμός γλυκόζης μέσω ενζύμων

Το πρωτόκολλο ανάλυσης (analytical protocol) αποτελεί μια λεπτομερή περιγραφή της πορείας ενός συγκεκριμένου προσδιορισμού που είναι πλήρως προδιαγεγραμμένη και εγκεκριμένη. Η περιγραφή αυτή περιλαμβάνει μια σειρά πληροφοριών που αναφέρονται παρακάτω.

Το πρωτόκολλο για τον προσδιορισμό της γλυκόζης στον ορό περιέχει:

- Ένζυμα (GOD και POD): Μπορεί να είναι φυτικής, ζωικής ή βακτηριακής προέλευσης, φυσικά ή γενετικά τροποποιημένα.
- Συμπαράγοντες, ενεργοποιητές, ιόντα: Δεν καταναλώνονται κατά την αντίδραση, όμως, την επιταχύνουν πολύ σημαντικά, π.χ. ιόντα Mg^{+2}
- Άλλα αντιδρώντα: H_2O , O_2 Αυτό σημαίνει ότι η αντίδραση οξειδωσης της γλυκόζης προς γλυκονικό οξύ πρέπει να γίνει υπό αερόβιες συνθήκες και σε υδατικό περιβάλλον.
- Χρωμογόνο: Η ουσία η οποία κατά την αντίδραση θα μετατραπεί σε έγχρωμο προϊόν, το ζεύγος φαινολικό παράγωγο και 4-αμινοφαιναζόνη.
- Ρυθμιστικό διάλυμα: Με σκοπό τη διατήρηση σταθερού pH και ιοντικής ισχύος, ώστε η ενζυματική μετατροπή να διεξάγεται υπό τις βέλτιστες συνθήκες. Στο συγκεκριμένο πρωτόκολλο χρησιμοποιείται ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 0,2 M pH 8,0. Τα χρωμογόνο, ένζυμο, ρυθμιστικό διάλυμα, συμπαράγοντες και άλλα τυχόν απαιτούμενα αντιδρώντα αποτελούν τα συστατικά του αντιδραστήριου εργασίας (Working Reagent ή WR) (https://repository.kallipos.gr/bitstream/11419/915/1/02_chapter_23.pdf, 2015).

Σε τρεις δοκιμαστικούς σωλήνες προσθέτουμε τα εξής:

	T	Δ	Π
Αντιδραστήριο εργασίας	2mL	2mL	2mL
Γλυκόζη 100 mg /dL			20 μL
Απεσταγμένο νερό	20 μL		
Δείγμα (ορός)		20 μL	

Οι σωλήνες πωματίζονται και ακολουθεί ανάμειξη. Οι τρεις δοκιμαστικοί σωλήνες επωάζονται σε υδρόλουτρο στους 37°C για 10 min. Οι σωλήνες αποσύρονται από το υδρόλουτρο, επαναφέρονται σε

θερμοκρασία δωματίου και φωτομετρείται το περιεχόμενό τους στα 510 nm. Ο μηδενισμός του φωτομέτρου γίνεται με το τυφλό αντιδραστήριο.

Με βάση τον νόμο Beer-Lambert: $A = \epsilon C l$ και αφού η ουσία είναι ίδια και όλα τα διαλύματα (Τ,Π,Δ) μετριοούνται στην ίδια κυψελίδα θα είναι $\epsilon =$ σταθερό, $l =$ σταθερό.

Διαιρώντας κατά μέλη:

$$A_{\Delta} = \epsilon \times C_{\Delta} \times l$$

$$A_{\Pi} = \epsilon \times C_{\Pi} \times l$$

προκύπτει ότι:

$$C_{\Delta} = \frac{A_{\Delta}}{A_{\Pi}} \times C_{\Pi}$$

Οι τιμές αναφοράς της γλυκόζης στον ορό σύμφωνα με το πρωτόκολλο είναι 70 - 120 mg/dL

6.10 Εργαστηριακή άσκηση: Ημιποσοτικός προσδιορισμός αμυλάσης σε δείγμα ούρων

Μέθοδος Wohlgemuth

Σε διαδοχικές αραιώσεις δείγματος ούρων προστίθεται ποσότητα διαλύματος αμύλου γνωστής περιεκτικότητας και επωάζονται στους 37°C. Όσο λιγότερη αμυλάση υπάρχει στο άγνωστο δείγμα τόσο αδιάσπαστο άμυλο θα υπάρχει σε μεγαλύτερες αραιώσεις. Προσθήκη σταγόνων διαλύματος ιωδίου δημιουργεί σύμπλοκο με το άμυλο και σχηματίζεται το μπλε-ιώδες σύμπλοκο του αμύλου. Έτσι, χρωματίζονται εκείνα τα αραιωμένα δείγματα στα οποία μέρος του αμύλου δεν έχει διασπαστεί πλήρως από την αμυλάση των ούρων. Η τελευταία -μη χρωματισμένη- αραιώση δίνει τις μονάδες δραστηριότητας Wohlgemuth του ενζύμου.

Σε οκτώ (8) αριθμημένους δοκιμαστικούς σωλήνες πραγματοποιούνται οι ακόλουθες αραιώσεις του υπό εξέταση δείγματος:

Σε όλα τα σωληνάκια (εκτός από το 1ο) μεταφέρεται 1 mL διαλύματος NaCl 0.9%

Στα σωληνάκια 1 (τυφλό) και 2 μεταφέρεται 1 mL δείγματος ούρων.

Μετά από ανάδευση του σωλήνα 2 (αραιώσης 1:2) μεταφέρεται 1mL από αυτόν στον σωλήνα 3 (αραιώση 1:4).

Από τον σωλήνα 3 μεταφέρεται 1 mL στον σωλήνα 4 (αραιώσης 1:8) κ.ο.κ., μέχρι τον σωλήνα 8 (αραιώσης 1:128) από τον οποίο 1 mL απορρίπτεται έτσι ώστε όλοι οι σωλήνες να έχουν τον ίδιο όγκο και το ίδιο μέγεθος αραιώσης.

Τέλος, σε όλα τα σωληνάκια (εκτός το 1) προστίθενται 2 mL διαλύματος αμύλου και μεταφέρονται σε υδατόλουτρο 37°C για 30 min ακριβώς.

Μετά το πέρας του χρόνου επώασης, τα σωληνάκια ψύχονται σε νερό βρύσης. Σε όλα τα σωληνάκια προστίθενται 1-2 σταγόνες διαλύματος ιωδίου. Παρατηρήστε τις πιθανές χρώσεις των διαλυμάτων.

Στον σωλήνα 2 το άμυλο θα έχει διασπαστεί από τα φυσιολογικά ποσά αμυλάσης των ούρων και επομένως δεν θα εμφανίσει χρώμα. Όσο λιγότερη αμυλάση υπάρχει στο άγνωστο δείγμα τόσο μη διασπασθέν άμυλο θα υπάρξει στις μεγαλύτερες αραιώσεις, αφού, όπως είναι γνωστό, σχηματίζεται το μπλε-ιώδες σύμπλοκο του αμύλου.

Ο τελευταίος σωλήνας που δεν χρωματίζεται με μπλε-ιώδες το δείγμα που περιέχει, περιέχει την αραιώση των ούρων που εκφράζει το ποσό της αμυλάσης σε μονάδες Wohlgemuth. Έτσι, εάν το σωληνάκι αυτό είναι το 5 (αραιώση 1:16), τότε θα έχουμε 16 μονάδες Wohlgemuth ή 1600 IU/L.

Τιμές αναφοράς για:

Ορό αίματος: < 32 μονάδες Wohlgemuth ή 3200 U/L.

Ούρα: 8-64 μονάδες Wohlgemuth ή 800-6400 U/L.

Σχετικό οπτικό υλικό στο διαδίκτυο

Μέθοδος φωτομετρίας τελικού σημείου. Επιδεικνύεται ο προσδιορισμός της γλυκόζης με τη μέθοδο οξειδάσης της γλυκόζης, <https://youtu.be/V2lkVFUBsX8>

Ενζυμική κινητική, https://www.youtube.com/watch?v=6cGdWi_DSGk

Πώς δρουν τα ένζυμα, <https://www.youtube.com/watch?v=yk14dOOvwMk>

Τύποι ενζύμων, <https://www.khanacademy.org/test-prep/mcat/biomoLecules/enzyme-structure-and-function/v/the-six-types-of-enzymes>

Συμπαράγοντες ενζύμων, <https://www.khanacademy.org/test-prep/mcat/biomoLecules/enzyme-structure-and-function/v/cofactors-coenzymes-and-vitamins>

Πηγές φωτογραφιών με προέλευση το διαδίκτυο

Εικόνα 6.1.

https://chem.libretexts.org/@api/deki/files/54229/685px-Two_substrates.svg.png?revision=1

Σχήμα 6.1. https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/1/1f/Enzyme_action.png

Σχήμα 6.2.

http://3.bp.blogspot.com/_d1nJkEY180o/R8KIWdEd6aI/AAAAAAAAABi8/bLppbEzIzcU/s400/gcsechem_18p_art2.gif

Σχήμα 6.3.

<https://www.easybiologyclass.com/wp-content/uploads/2019/02/Effect-of-pH-on-Enzymes.jpg>

Σχήμα 6.4. <https://wou.edu/chemistry/files/2019/10/Figure-6.5.jpg>

Σχήμα 6.5

https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/f/ff/Dependence_of_velocity_on_substrate_concentration.svg/640px-Dependence_of_velocity_on_substrate_concentration.svg.png

Σχήμα 6.6.

<https://ars.els-cdn.com/content/image/3-s2.0-B9780128002179000022-f02-09-9780128002179.jpg>

Σχήμα 6.7.

https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/8/83/Michaelis_Menten_curve_2.svg/325px-Michaelis_Menten_curve_2.svg.png

Σχήμα 6.8. https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/7/70/Lineweaver-Burke_plot.svg

Σχήμα 6.9

https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/9/95/Enzyme_inhibition_curves_LB.png/640px-Enzyme_inhibition_curves_LB.png

Εικόνα 6.2.

https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/a/af/Competitive%26NonCompetitive_Enzyme_Inhibition.jpg

Σχήμα 6.11.

https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/8/86/Enzyme_progress_curve.svg/250px-Enzyme_progress_curve.svg.png

Σχήμα 6.14.

<https://ars.els-cdn.com/content/image/3-s2.0-B9780128002179000022-f02-09-9780128002179.jpg>

Βιβλιογραφικές Αναφορές

- Hemalatha, T., Umamaheswari, T., Krithiga, G., Sankaranarayanan, P., & Puvanakrishnan, R. (2013). Enzymes in clinical medicine: an overview. *Indian J Exp Biol*, 51(10) 777-788.
- Metzler, D., & Metzler, C. (2001). *Biochemistry, the chemical reactions of living cells*. Academic Press.
- Nelson, D., & Cox, M. (2018). *Βασικές αρχές Βιοχημείας*. Αθήνα: Broken.
- Palmer, T., & Bonner, P. (2007). *Enzymes Biochemistry, Biotechnology, Clinical Chemistry*. Woodhead Publishing.
- Tymoczko, J., Berg, J., & Stryer, L. (2018). *Βιοχημεία Βασικές αρχές*. Αθήνα: Broken.
- Καρίκας, Γ. (2018). *Εφαρμοσμένη Βιοχημεία Θεωρία Ασκήσεις*. Αθήνα: Βιβλιόπολις ΑΕΒΕ.
- Κοντοπίδης, Γ. (2019). *Εργαστηριακές Ασκήσεις Βιοχημείας*. Θεσσαλονίκη: Τμήμα Κτηνιατρικής ΑΠΘ.
- Χούχουλα, Δ., & Χαρβάλου, Α. (2020). *Εισαγωγή στις αρχές της Μοριακής Βιολογίας και Διαγνωστική πρακτική*. Αθήνα: Τσότρας.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7

ΘΕΩΡΙΑ ΚΑΙ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΑΣΚΗΣΕΙΣ ΣΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΥΔΑΤΑΝΘΡΑΚΩΝ

Συγγραφέας: Μαρία Τράπαλη

Σύνοψη

Οι υδατάνθρακες ή τα σάκχαρα είναι οργανικές χημικές ενώσεις μεγάλης βιολογικής σημασίας και ταξινομούνται σε μονοσακχαρίτες, ολιγοσακχαρίτες και πολυσακχαρίτες. Οι μονοσακχαρίτες είναι πολυαλκοόλες που περιέχουν αλδεϋδομάδα (CH=O) ή κετονομάδα (C=O). Οι μονοσακχαρίτες που έχουν αλδεϋδομάδα ονομάζονται αλδόζες, ενώ όσοι έχουν κετονομάδα ονομάζονται κετόζες. Με τον όρο ανάγοντα σάκχαρα εννοούμε τα σάκχαρα που παρουσιάζουν έντονες αναγωγικές ιδιότητες, στις οποίες βασίζεται και η ανίχνευσή τους. Διαθέτουν στο μόριό τους ελεύθερη αλδεϋδική ομάδα ή αυτή μπορεί να δημιουργηθεί μέσω ισομερείωσης, οπότε μπορούν να ανάγουν ιόντα χαλκού Cu^{+2} του αντιδραστηρίου Fehling, ενώ τα ίδια οξειδώνονται. Η ανίχνευση των υδατανθράκων γίνεται με τις ποιοτικές δοκιμασίες: Molisch, Benedict, Fehling, Barfoed, Seliwanoff και Ιωδίου.

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

7.1 Γενικά περί υδατανθράκων – Ταξινόμηση

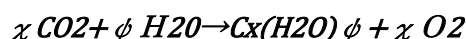
Οι υδατάνθρακες είναι κατεξοχήν προϊόντα, που παράγονται στα φυτά. Είναι τα συστατικά που δομούν τα φυτά, όπως η κυτταρίνη (υποστηρικτική ουσία των κορμών και των φύλλων), ενώ το άμυλο είναι η μορφή υπό την οποία εναποτίθεται η γλυκόζη στις ρίζες, στους καρπούς και στα σπέρματα των φυτών, ώστε να εξυπηρετούνται οι ενεργειακές ανάγκες τους κ.ά.

Στους ζωικούς οργανισμούς (1/100 του ολικού βάρους στον άνθρωπο) η σύνθεση υδατανθράκων είναι περιορισμένη. Προσλαμβάνονται με την τροφή, για να χρησιμεύσουν πριν από όλα ως πηγή ενέργειας, όπως η γλυκόζη ή για άλλες ειδικές μεταβολικές λειτουργίες. Ιδιαίτερα ο νευρικός ιστός έχει ως μοναδική πηγή ενέργειας τη γλυκόζη. Έχουν, όμως, και λειτουργική σημασία, όπως η ριβόζη, δεσοξυριβόζη στα νουκλεϊνικά οξέα, η γαλακτόζη στα γλυκολιπίδια κ.ά.

Οι ασθένειες που σχετίζονται με τον μεταβολισμό των υδατανθράκων περιλαμβάνουν τον σακχαρώδη διαβήτη, τη γαλακτοζαιμία, τη δυσανεξία στη λακτόζη και τα νοσήματα αποθήκευσης του γλυκογόνου.

Οι **υδατάνθρακες** αποτελούνται από C, H και O και αποτελούν μία από τις κυριότερες θρεπτικές ύλες για τον άνθρωπο και τα ζώα. Μπορεί να είναι πολυϋδρόξυ-αλδεϋδες (αλδόζες) ή πολυϋδρόξυ-κετόνες (κετόζες), καθώς και ουσίες που με την υδρόλυσή τους δίνουν τις παραπάνω ενώσεις. Η ονομασία τους **σάκχαρα** οφείλεται στη γλυκιά γεύση που παρουσιάζουν αρκετές από αυτές και η ονομασία τους **υδατάνθρακες** στο ότι περιέχουν στο μόριό τους H και O σε αναλογία ατόμων 2:1, ίδια με την αντίστοιχη στο μόριο του νερού H_2O . Για τον λόγο αυτόν, ο εμπειρικός τους τύπος μπορεί να γραφεί ως: $Cx(H_2O)_y$.

Οι υδατάνθρακες σχηματίζονται στα φυτά μέσω της διαδικασίας της φωτοσύνθεσης, η οποία απαιτεί παρουσία ηλιακού φωτός και καταλύεται από τη χλωροφύλλη σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση:

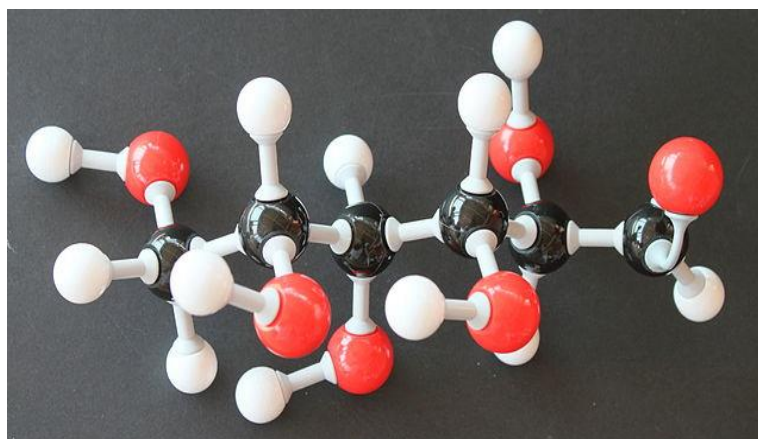


Οι υδατάνθρακες ταξινομούνται σε διάφορες κατηγορίες, όπως φαίνεται στην Εικόνα 7.1



Εικόνα 7.1 Ταξινόμηση των υδατανθράκων.

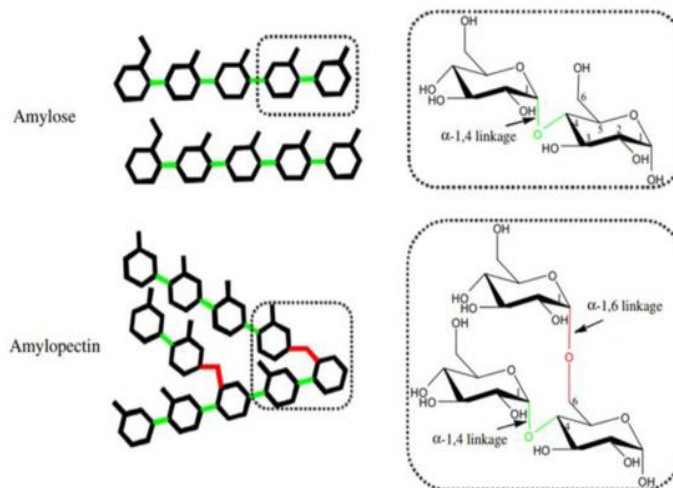
Μονοσακχαρίτες ή **απλά σάκχαρα** (Εικόνα 7.2), είναι οι υδατάνθρακες που δεν μπορούν να διασπαστούν σε απλούστερα σάκχαρα, αποτελούνται δηλαδή από ένα μόριο σακχάρου. Διακρίνονται σε τριόζες, τετρόζες, πεντόζες, εξόζες κλπ., ανάλογα με τον αριθμό ατόμων C που διαθέτουν. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν, π.χ. η γλυκόζη (σταφυλοσάκχαρο, με $M.T.C_6H_{12}O_6$, εξόζη), η φρουκτόζη (οπωροσάκχαρο, $C_6H_{12}O_6$, εξόζη), ριβόζη (συστατικό του νουκλεϊκού οξέος RNA, $C_5H_{10}O_5$, πεντόζη) κ.ά.



Εικόνα 7.2 Το μόριο της γλυκόζης με προσομοιώματα ατόμων.

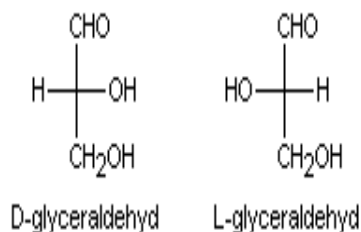
Ολιγοσακχαρίτες, είναι οι υδατάνθρακες που προκύπτουν με συνένωση έως 10 μορίων μονοσακχαριτών που συνδέονται μεταξύ τους με **γλυκοζιτικούς δεσμούς**. Είναι σώματα κρυσταλλικά, άχρωμα με γλυκιά γεύση και ευδιάλυτα στο νερό. Διακρίνονται σε δισακχαρίτες, τρισακχαρίτες κλπ. ανάλογα με τον αριθμό μορίων μονοσακχαριτών που περιέχουν. Οι ολιγοσακχαρίτες διασπώνται είτε σε όξινο περιβάλλον είτε με την παρουσία ενζύμων σε μονοσακχαρίτες, με ταυτόχρονη αφαίρεση μορίων H_2O . Στην κατηγορία αυτή ανήκουν η σακχαρόζη ή καλαμοσάκχαρο (δισακχαρίτης, αποτελείται από 1 μόριο γλυκόζης και 1 μόριο φρουκτόζης), η ραφινόζη (τρισακχαρίτης, με συστατικά γλυκόζη, γαλακτόζη και φρουκτόζη) κ.ά.

Πολυσακχαρίτες, είναι οι υδατάνθρακες που προκύπτουν από τα πολυμερή των μονοσακχαριτών. Είναι σώματα με υψηλή σχετική μοριακή μάζα, άχρωμα, χωρίς γλυκιά γεύση, αδιάλυτα στο νερό ή σχηματίζουν κολλοειδή σε αυτό. Διακρίνονται σε: **ομοπολυσακχαρίτες**, όταν αποτελούνται από ένα είδος μονοσακχαρίτη και **ετεροπολυσακχαρίτες**, όταν περιέχουν διαφορετικά μόρια μονοσακχαριτών ή και παράγωγα αυτών. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν, π.χ. το άμυλο (ομοπολυσακχαρίτης, αποτελείται από αλυσίδα μορίων γλυκόζης, με $M_r=10^4 - 10^7$, Εικόνα 7.3), το υαλουρονικό οξύ (ετεροπολυσακχαρίτης) κ.ά.



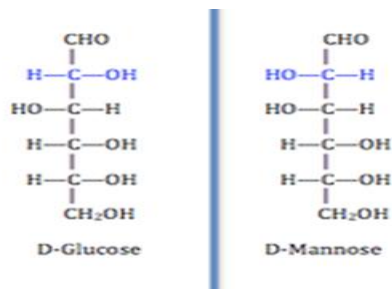
Εικόνα 7.3 Το άμυλο αποτελείται από αμυλόζη και αμυλοπηκτίνη.

Στις βιοχημικές λειτουργίες (αντιδράσεις) των οργανισμών απαιτείται αυστηρά καθορισμένη στεreoχημική διαμόρφωση των βιολογικών μορίων, όπως των υδατανθράκων. Ο πιο απλός υδατάνθρακας είναι η γλυκεραλδεΐδη (τριόζη και αλδόζη) (Εικόνα 7.4). Άτομα άνθρακα με τέσσερις διαφορετικούς υποκαταστάτες ονομάζονται *ασύμμετρα* και συμβολίζονται ως C*. Οι υποκαταστάτες του ασύμμετρου ατόμου άνθρακα τοποθετούνται γύρω του με διαφορετικούς τρόπους. Έτσι, προκύπτουν δύο ισομερή της γλυκεραλδεΐδης, που διαφέρουν μόνο στη στεreoχημική διαμόρφωση η D- και η L- μορφή. Η τοποθέτηση του OH δεξιά ή αριστερά στην προβολή Fischer δείχνει διαφορετική στεreoχημική διαμόρφωση.

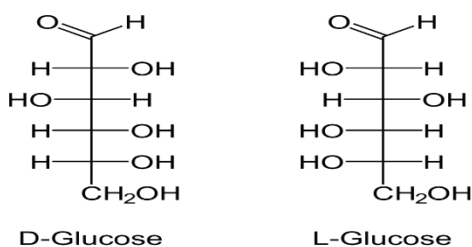


Εικόνα 7.4 Ισομερή της γλυκεραλδεΐδης στην προβολή Fischer.

Στις τετρόζες, πεντόζες και εξόζες υπάρχουν περισσότερα από ένα ασύμμετρα άτομα άνθρακα. Για να προσδιοριστεί, εάν το σάκχαρο έχει D ή L διαμόρφωση εξετάζεται η θέση του OH του ασύμμετρου C του πιο απομακρυσμένου από την αλδεΐδομάδα CHO ή την κετονομάδα C = O. Εάν αυτό το OH είναι δεξιά (όπως στη D-γλυκεραλδεΐδη), ο μονοσακχαρίτης χαρακτηρίζεται ως D, εάν το OH είναι αριστερά (όπως στη L-γλυκεραλδεΐδη) χαρακτηρίζεται ως L. Οι μονοσακχαρίτες που διαφέρουν μόνο στη θέση ενός OH ονομάζονται επιμερή (Εικόνα 7.5).

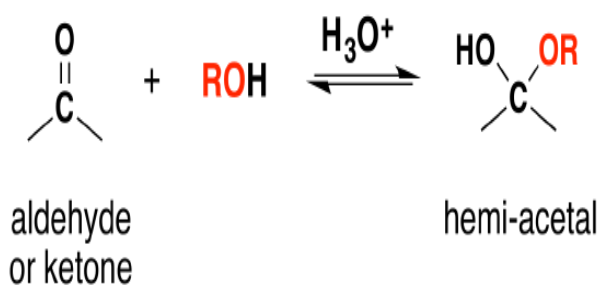


Εικόνα 7.5 Επιμερή σάκχαρα.

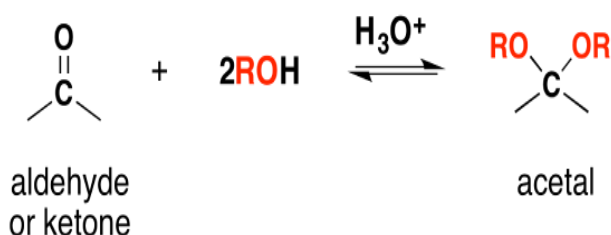


Εικόνα 7.6 Στερεοϊσομερή της γλυκόζης.

Οι μονοσακχαρίτες με πέντε ή έξι άτομα άνθρακα (Εικόνα 7.6) εκτός από τη δομή της γραμμικής αλυσίδας με αλδεϋδομάδα ή κετονομάδα, μπορούν να σχηματίσουν και κυκλική δομή εξαιτίας της παρουσίας στο μόριό τους ταυτόχρονα αλδεϋδομάδας ή κετονομάδας και υδροξυλίων. Η προσθήκη ενός μορίου αλκοόλης σε αλδεϋδες ή κετόνες δημιουργεί τις ημιακετάλες, ενώ η προσθήκη δύο μορίων αλκοόλης δημιουργεί τις κετάλες.



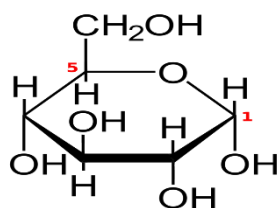
Εικόνα 7.7 Αντίδραση σχηματισμού ημιακετάλης.



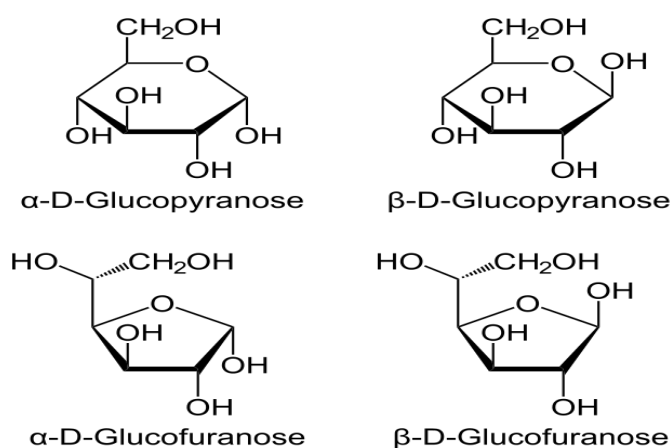
Εικόνα 7.8 Αντίδραση σχηματισμού ακετάλης.

Οι μονοσακχαρίτες μπορούν να σχηματίσουν ημιακετάλη (Εικόνα 7.7) από την ενδομοριακή αντίδραση της αλδεϋδομάδας ή της κετονομάδας με μία ομάδα υδροξυλίου ή ακετάλη με δύο ομάδες υδροξυλίου (Εικόνα 7.8). Αποτέλεσμα είναι ο σχηματισμός κυκλικής δομής (κυκλική ημιακετάλη). Η κυκλική δομή της D-γλυκόζης σχηματίζεται από την αντίδραση του OH του C-5 με την αλδεϋδομάδα CH=O (προβολή κατά Haworth). Κάθε υδροξύλιο που έχει κατεύθυνση δεξιά στην προβολή κατά Fischer, κατευθύνεται προς τα κάτω στην προβολή κατά Haworth και κάθε υδροξύλιο που έχει κατεύθυνση αριστερά στην προβολή κατά

Fischer, κατευθύνεται προς τα πάνω, στην προβολή κατά Haworth. Επίσης, στις προβολές κατά Haworth των D-σακχάρων, η ακραία ομάδα $\text{-CH}_2\text{OH}$ τοποθετείται προς τα πάνω, ενώ στα L- σάκχαρα προς τα κάτω.



Εικόνα 7.9 Προβολή κατά Haworth της α -D-γλυκόζης.



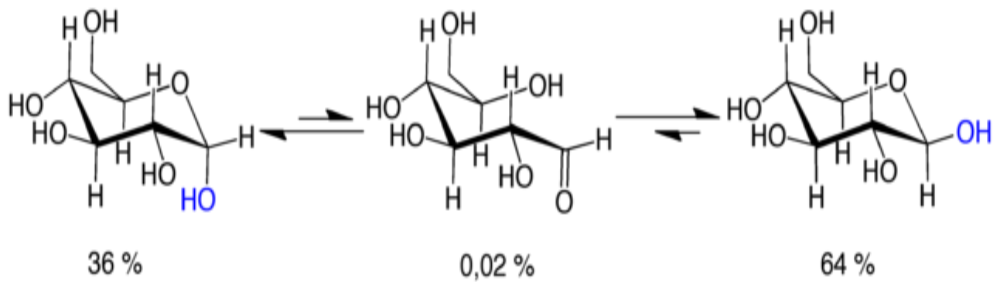
Εικόνα 7.10 Προβολές κατά Haworth των α -D-γλυκοπυρανόζης, β -D-γλυκοπυρανόζης, α -D-γλυκοφουρανόζης και β -D-γλυκοφουρανόζης.

Το νέο υδροξύλιο που δημιουργείται στο κυκλικό μόριο ονομάζεται *ημιακεταλικό υδροξύλιο* και μπορεί να λάβει θέση προς τα πάνω ή προς τα κάτω με αποτέλεσμα τον σχηματισμό δύο κυκλικών μορίων γλυκόζης, την α -D-γλυκόζη και τη β -D-γλυκόζη που είναι στεροϊσομερή (Εικόνα 7.10). Τα ισομερή διαφέρουν μόνο στη θέση του ημιακεταλικού OH και ονομάζονται ανωμερή, αυτό που έχει το OH προς τα κάτω είναι το α -ανωμερές, ενώ αυτό που έχει το OH προς τα πάνω είναι το β -ανωμερές. Ο C1 της κυκλικής δομής ονομάζεται ανωμερικός άνθρακας. Όταν η μία από τις δύο μορφές διαλυθεί στο νερό, σταδιακά μετατρέπεται μερικώς στην άλλη μορφή, μέχρις ότου επέλθει ισορροπία μεταξύ των δύο ανωμερών μορφών. Κατά τη διάρκεια της μετατροπής αυτής, η στροφική ικανότητα του διαλύματος μεταβάλλεται και το φαινόμενο αυτό ονομάζεται *πολυστροφισμός* (mutarotation) (Εικόνα 7.11). Το φαινόμενο αυτό παρατηρήθηκε για πρώτη φορά το 1846 από τον Γάλλο χημικό **Augustin-Pierre Dubrunfaut** (1797-1881).

Παρατήρηση 1: Όταν δεν είναι γνωστό, εάν το ημιακεταλικό OH είναι σε θέση α ή β ή δεν ενδιαφέρει η θέση του, τότε γράφεται στην ευθεία.

Παρατήρηση 2: Οι μονοσακχαρίτες, εκτός από τη διαμόρφωσή τους με την προβολή κατά Haworth, παριστάνονται με τη μορφή του ανάκλιντρου (Εικόνα 7.11). Πιο συγκεκριμένα:

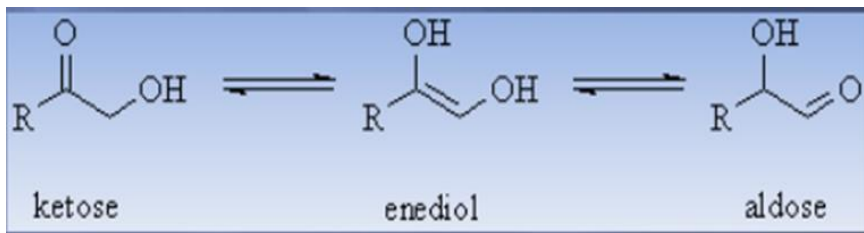
- Σχεδιάζεται η προβολή κατά Haworth με το οξυγόνο του δακτυλίου πάνω δεξιά.
- Υψώνεται το αριστερότερο άτομο άνθρακα (C4) πάνω από το επίπεδο του δακτυλίου.
- Χαμηλώνεται ο ανωμερικός άνθρακας (C1), ώστε να βρεθεί κάτω από το επίπεδο του δακτυλίου.



Εικόνα 7.11 Το φαινόμενο του πολυστροφισμού σε υδατικό διάλυμα γλυκόζης.

7.1.1 Ανάγοντα Σάκχαρα

Με τον όρο ανάγοντα σάκχαρα εννοούμε τα σάκχαρα που παρουσιάζουν έντονες αναγωγικές ιδιότητες, στις οποίες βασίζεται και η αντίχρυσή τους. Διαθέτουν στο μόριό τους ελεύθερη αλδεϋδική ομάδα ή αυτή μπορεί να δημιουργηθεί μέσω ισομερείωσης, οπότε μπορούν να ανάγουν ιόντα χαλκού Cu^{+2} του αντιδραστήριου Fehling, ενώ τα ίδια οξειδώνονται.

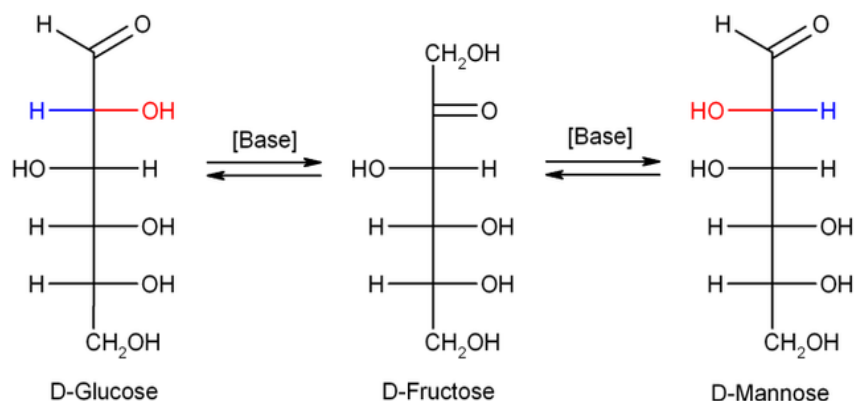


Εικόνα 7.12 Ανάγον σάκχαρο με κετονομάδα (κετόζη), που αποκτά ελεύθερη αλδεϋδική ομάδα μέσω ισομερείωσης.

Σε βασικά διαλύματα οξειδώνονται και οι κετόζες, διότι η κετονομάδα τους ισομερειώνεται προς αλδεϋδομάδα, η οποία στη συνέχεια οξειδώνεται (Εικόνα 7.12).

7.1.2 Αντιδράσεις μονοσακχαριτών

Οι μονοσακχαρίτες βρίσκονται σε μεγάλα ποσά στη φύση και αποτελούν το γλυκό συστατικό των φρούτων. Είναι ενώσεις με πολλά αλκοολικά υδροξύλια ($-\text{OH}$) και μια καρβονυλική ομάδα, είτε αλδεϋδομάδα ($-\text{CH}=\text{O}$), οπότε ονομάζονται αλδόζες είτε κετονομάδα ($-\text{C}=\text{O}$), οπότε ονομάζονται κετόζες (Εικόνα 7.13).



Εικόνα 7.13 Αντιδράσεις αλληλομετατροπής της D-φρουκτόζης σε D-γλυκόζη και D-μαννόζη.

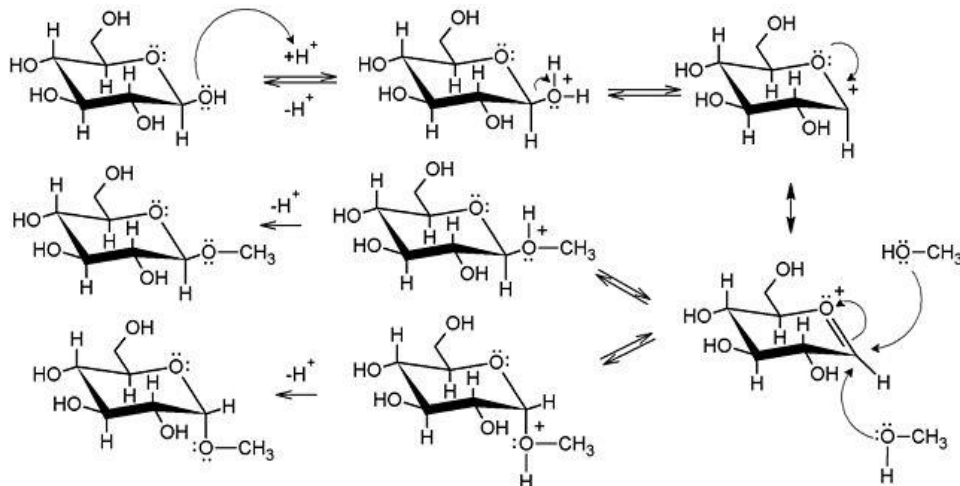
Οι χαρακτηριστικότερες αντιδράσεις των μονοσακχαριτών είναι:

- Αντιδράσεις σχηματισμού γλυκοζιτών/αιθέρων.
- Αντιδράσεις εστεροποίησης.

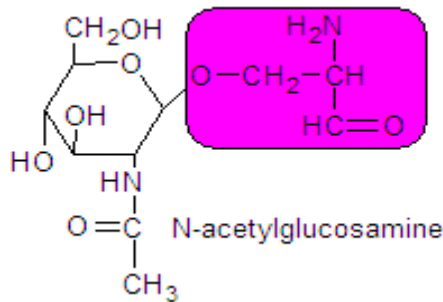
- Αντιδράσεις αναγωγής/οξειδωσης.
- Αντιδράσεις επιμήκυνσης ανθρακικής αλυσίδας.
- Αντιδράσεις αποικοδόμησης.

7.1.2.1 Αντιδράσεις σχηματισμού γλυκοζιτών/αιθέρων

Η διάλυση σε αλκοόλη της ημιακετάλης ενός μονοσακχαρίτη, παρουσία όξινου καταλύτη σχηματίζει ακετάλη, στην οποία το ανωμερικό $-OH$ έχει αντικατασταθεί από την ομάδα $-OR$, (R =το αλκύλιο της αλκοόλης). Οι ακετάλες των υδατανθράκων ονομάζονται *γλυκοζίτες*. Όταν υπάρχει ισορροπία μεταξύ των δομών ανοικτής και κλειστής αλυσίδας, δεν εκδηλώνεται το φαινόμενο του πολυστροφισμού, ενώ ο ελεύθερος μονοσακχαρίτης ανακτάται με υδρόλυση παρουσία αραιού διαλύματος οξέος. Οι γλυκοζίτες εμφανίζουν α και β ανωμερικές μορφές, όπως οι μονοσακχαρίτες (Εικόνα 7.14).



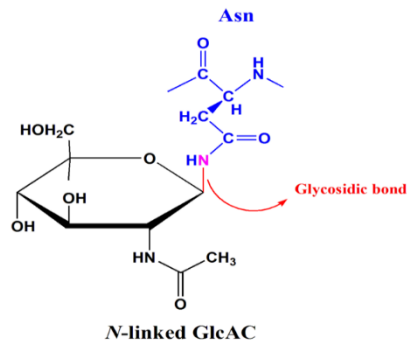
Εικόνα 7.14 Μηχανισμός δημιουργίας γλυκοζίτη.



Εικόνα 7.15 O-γλυκοζίτης.

Το γλυκοζιτικό υδροξύλιο αποτελεί το σημείο σύνδεσης με άλλες ενώσεις προς σχηματισμό των γλυκοζιτών. Το μη σακχαρούχο συστατικό ονομάζεται *άγλυκο*. Ανάλογα με το άγλυκο συστατικό, οι γλυκοζίτες διακρίνονται σε O-γλυκοζίτες (Εικόνα 7.15), N-γλυκοζίτες (Εικόνα 7.16) και S-γλυκοζίτες. Οι γλυκοζίτες με όξινη υδρόλυση διασπώνται σε σάκχαρο και άγλυκο τμήμα.

- O-γλυκοζίτες (φαινόλες, φλαβόνες, ανθοκυάνες, στεροειδή, τερπενοειδή)
- N-γλυκοζίτες (νουκλεοτίδια)
- S-γλυκοζίτες (σινιγρίνη)



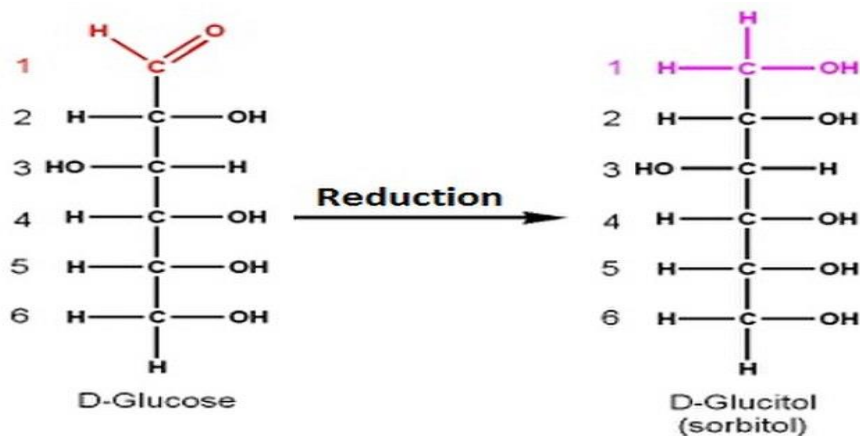
Εικόνα 7.16 N-γλυκοζίτης.

7.1.2.2 Αντιδράσεις εστεροποίησης

Κατά την επίδραση ακετυλιωτικών μέσων, π.χ. οξικού ανυδρίτη (Ac_2O), εστεροποιούνται τα ημιακεταλικά -OH και τα αλκοολικά -OH και σχηματίζονται πολυεστερικά παράγωγα.

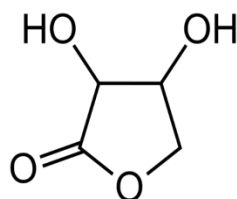
7.1.2.3 Αντιδράσεις αναγωγής/οξειδωσης

Η αλδεϋδομάδα των αλδοζών και η κετονομάδα των κετοζών ανάγονται και δίνουν υδροξύλιο (OH). Η αναγωγή της D-γλυκόζης (Εικόνα 7.17) με προσθήκη υδρογόνου, δίνει τη σορβιτόλη ή γλυκιτόλη. Είναι μια λευκή κρυσταλλική σκόνη με γλυκιά γεύση, άοσμη και καλά διαλυτή στο νερό και χρησιμοποιείται στη βιομηχανία τροφίμων. Βρίσκεται σε διάφορα φρούτα δέντρων και αναφέρεται επίσης ως E 420 στους πίνακες προσθετικών ουσιών στα τρόφιμα.

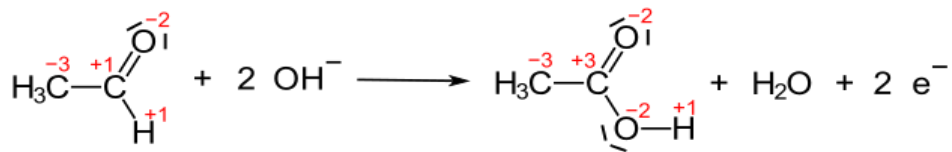


Εικόνα 7.17 Αντίδραση αναγωγής της D-γλυκόζης σε σορβιτόλη.

Οι αλδόζες που έχουν αλδεϋδομάδα (CHO) οξειδώνονται. Η οξείδωση μπορεί να γίνει με ήπια οξειδωτικά, όπως τα αντιδραστήρια Tollens και Fehling και προκύπτει καρβοξυλικό οξύ που ονομάζεται αλδονικό οξύ. Στην Εικόνα 7.18 φαίνεται η χημική δομή ενός αλδονικού οξέος, του ερυθρονικού οξέος, ενώ στην Εικόνα 7.19 παρουσιάζεται ο μηχανισμός οξείδωσης των αλδοζών.



Εικόνα 7.18 Η χημική δομή του ερυθρονικού οξέος.



Εικόνα 7.19 Μηχανισμός οξείδωσης των αλδοζών.

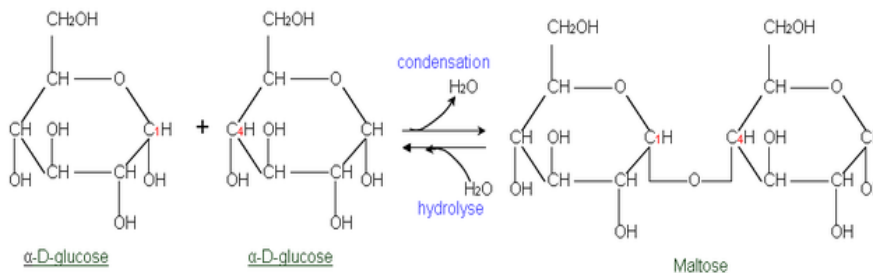
Με ισχυρά οξειδωτικά, όπως το νιτρικό οξύ (HNO₃), εκτός από την CHO, οξειδώνεται και η πρωτοταγής αλκοόλη της ομάδας CH₂OH και λαμβάνονται προϊόντα που ονομάζονται *αλδαρικά οξέα*.

7.1.3 Δισακχαρίτες -Πολυσακχαρίτες

Οι δισακχαρίτες προέρχονται από την ένωση δύο μονοσακχαριτών. Ο σχηματισμός δισακχαρίτη προϋποθέτει την κυκλική διαμόρφωση των μονοσακχαριτών, ενώ ο χημικός δεσμός που σχηματίζεται μεταξύ των δύο μονοσακχαριτών ονομάζεται γλυκοζιτικός δεσμός. Ο γλυκοζιτικός δεσμός δημιουργείται από τη συμπύκνωση δύο υδροξυλίων, ένα από κάθε μονοσακχαρίτη.

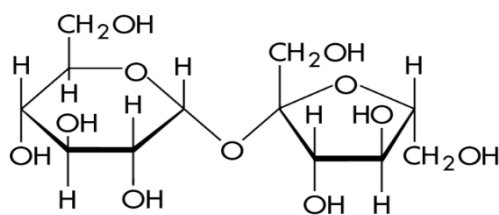
Κυριότεροι δισακχαρίτες:

Μαλτόζη, η οποία προκύπτει από την ένωση δύο μορίων γλυκόζης (Εικόνα 7.20).



Εικόνα 7.20 Σχηματισμός του μορίου της μαλτόζης.

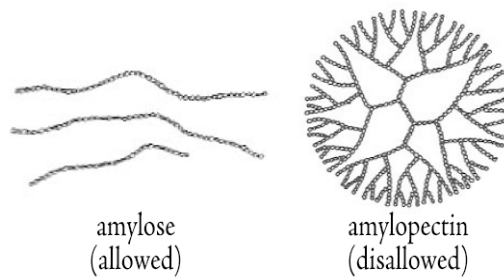
Σακχαρόζη ή σουκρόζη, είναι η κοινή ζάχαρη. Είναι δισακχαρίτης που σχηματίζεται από ένα μόριο α-D-γλυκόζης και ένα μόριο β-D-φρουκτόζης (Εικόνα 7.21). Το μέλι είναι μείγμα σακχαρόζης, φρουκτόζης και γλυκόζης.



Εικόνα 7.21 Σχηματισμός του μορίου της σουκρόζης.

Οι πολυσακχαρίτες αποτελούνται από μεγάλο αριθμό μονοσακχαριτών που συνδέονται με γλυκοζιτικούς δεσμούς. Οι πιο σημαντικοί πολυσακχαρίτες είναι το άμυλο, το γλυκογόνο και η κυτταρίνη.

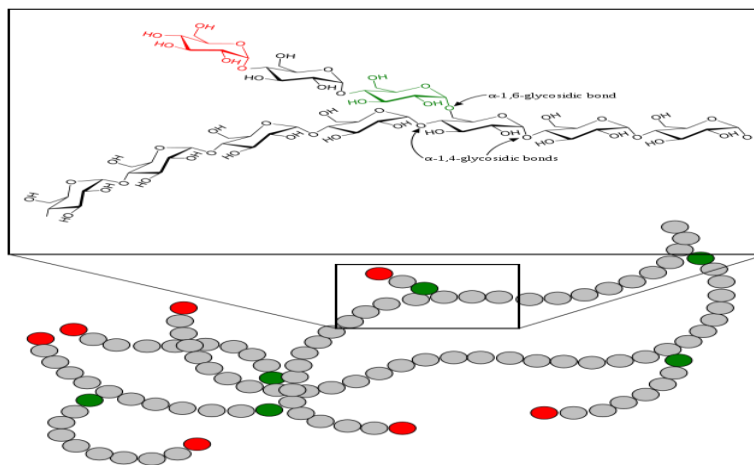
Άμυλο, αποθηκευτικός πολυσακχαρίτης των φυτών. Το άμυλο είναι μείγμα δύο πολυσακχαριτών, της αμυλόζης και της αμυλοπηκτίνης που σχηματίζονται από α-D-γλυκόζη. Ανάλογα με το φυτό, το άμυλο αποτελείται από 20-25% αμυλόζη και 80-85% αμυλοπηκτίνη. Η αμυλόζη είναι γραμμικός πολυσακχαρίτης και η αμυλοπηκτίνη είναι διακλαδισμένος πολυσακχαρίτης (Εικόνα 7.22).



Εικόνα 7.22 Άμυλο, ένας διακλαδισμένος πολυσακχαρίτης.

Γλυκογόνο, αποθηκευτικός πολυσακχαρίτης για τους ζωικούς οργανισμούς, μοιάζει με την αμυλοπηκίνη, αλλά έχει πιο πυκνές διακλαδώσεις κάθε 8-10 μόρια γλυκόζης (Εικόνα 7.23).

Κυτταρίνη, (στηρικτικός πολυσακχαρίτης) σχηματίζεται από β-D-γλυκόζες, που συνδέονται με β-1,4 γλυκοζιτικούς δεσμούς.

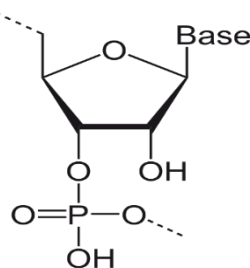


Εικόνα 7.23 Γλυκογόνο, ο αποθηκευτικός πολυσακχαρίτης των ζωικών οργανισμών.

7.1.3.1 Υδατάνθρακες και παράγωγά τους, σε σημαντικά βιολογικά μόρια

2-δεοξυ-D-ριβόζη, είναι ο υδατάνθρακας που συμμετέχει στην αλυσίδα του DNA και η **D-ριβόζη**, ο υδατάνθρακας στην αλυσίδα του RNA. Τα παραπάνω σάκχαρα συνδέονται μεταξύ τους μέσω φωσφορικών ομάδων και συγκροτούν την αλυσίδα του DNA και του RNA (Εικόνα 7.24).

D-γλυκοζαμίνη και N-ακετυλο αμίδιο που είναι παράγωγό της, είναι ο υδατάνθρακας που αποτελείται η χιτίνη, το προστατευτικό υλικό το οποίο περιβάλλει τον σκελετό των εντόμων και των οστρακοειδών.

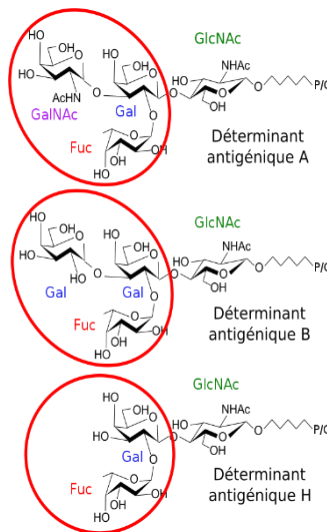


Εικόνα 7.24 Μονομέρες RNA.

Αντιγονικοί καθοριστικοί παράγοντες ABO-Ομάδες αίματος. Τα ανοσοεπικρατούντα σάκχαρα βρίσκονται στα τελικά άκρα των αλυσίδων και δίνουν την ειδικότητα στα ABO αντιγόνα. Η ABO συμβατότητα μεταξύ δότη και λήπτη είναι ο θεμέλιος λίθος του ελέγχου ομάδας αίματος πριν από τη μετάγγιση αίματος.

Οι κόκκινοι κύκλοι υποδεικνύουν τις περιοχές, όπου συνδέονται τα αντισώματα. Οι κυκλικές αναπαραστάσεις των σακχάρων συνοδεύονται από την ταυτότητά τους: GlcNAc, N-Acetyl-D-Glucosamine;

Gal, D-Γαλακτόζη; GalNAc, N-ακετυλο-D-γαλακτοζαμίνη; Fuc, L-Fucose. Το P/C υποδεικνύει ότι οι αλυσίδες υδατανθράκων μεταφέρονται από πρωτεΐνες (P) ή κεραμίδια (Εικόνα 7.25).



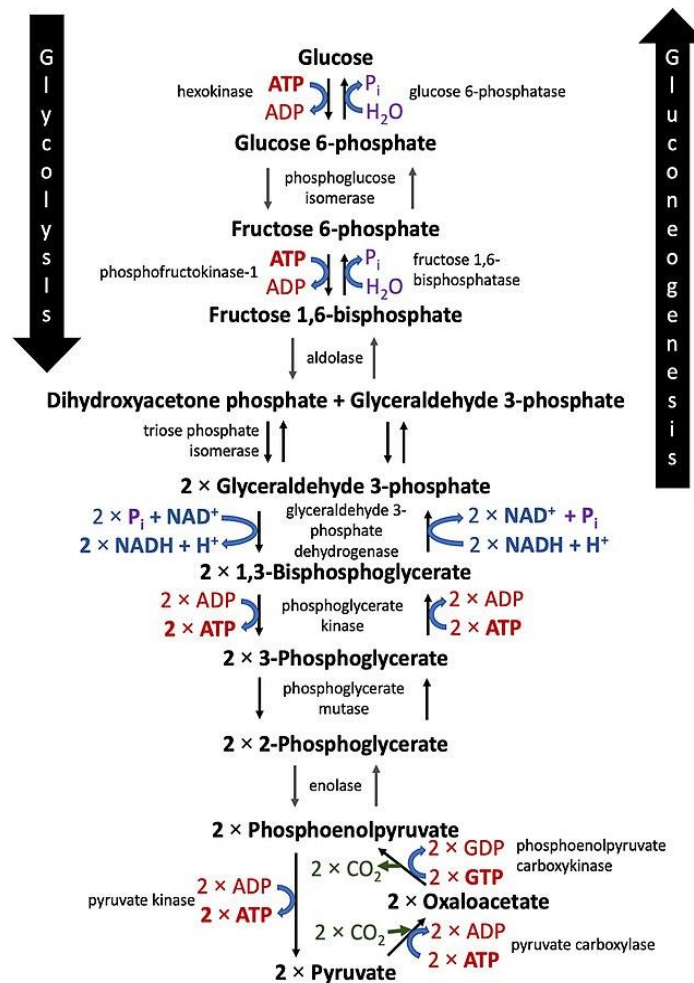
Εικόνα 7.25 Αντιγονικοί καθοριστικοί παράγοντες ABO.

7.1.4 Γλυκόλυση (καταβολισμός γλυκόζης)

Η γλυκόζη κατέχει κεντρική θέση στον μεταβολισμό των φυτών, των ζώων και πολλών μικροοργανισμών. Η πλήρης οξείδωση της γλυκόζης σε διοξείδιο του άνθρακα και νερό συμβαίνει με πρότυπη μεταβολή ελεύθερης ενέργειας $-2,840 \text{ kJ/mol}$. Αποθηκεύοντας τη γλυκόζη υπό μορφή αμύλου (στα φυτά) ή γλυκογόνου (στα θηλαστικά), το κύτταρο συσσωρεύει μεγάλες ποσότητες εξοζών, διατηρώντας την ωσμωμοριακότητα του κυτταρικού διαλύματος σχετικά χαμηλή. Όταν αυξάνουν οι ενεργειακές ανάγκες, απελευθερώνεται γλυκόζη από αυτά τα ενδοκυττάρια αποθηκευτικά πολυμερή και χρησιμοποιείται για παραγωγή ATP είτε υπό αερόβιες είτε υπό αναερόβιες συνθήκες.

Στη μεταβολική διαδικασία της **γλυκόλυσης**, ένα μόριο γλυκόζης αποδομείται σε μια σειρά ενζυμικά καταλυόμενων αντιδράσεων παράγοντας δύο μόρια πυροσταφυλικού, μιας ένωσης με τρία άτομα άνθρακα. Κατά τη διάρκεια των διαδοχικών αντιδράσεων της γλυκόλυσης, ένα μέρος της ελεύθερης ενέργειας που απελευθερώνεται από τη γλυκόλυση διατηρείται υπό μορφή ATP και NADH (Εικόνα 7.26).

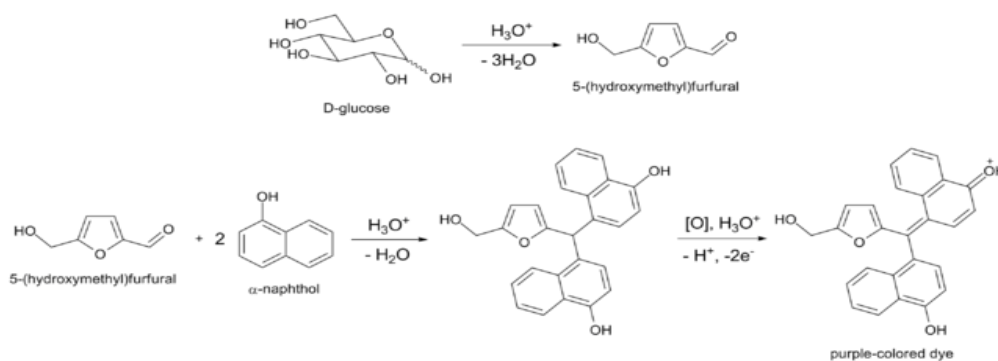
Η γλυκόλυση υπόκειται σε αυστηρή ρύθμιση σε συντονισμό με άλλες οδούς παραγωγής ενέργειας, ώστε να διασφαλίζεται σταθερή παραγωγή ATP. Η εξοκινάση, η φωσφοφρουκτοκινάση και η κινάση του πυροσταφυλικού ρυθμίζονται αλλοστερικά, έτσι ώστε να ελέγχεται η ροή του άνθρακα διαμέσου της γλυκόλυσης και να διατηρούνται σταθερά επίπεδα μεταβολικών ενδιάμεσων.



Εικόνα 7.26 Η βιοχημική πορεία της γλυκόλυσης και της γλυκονεογένεσης.

7.1.5 Ανίχνευση υδατανθράκων - Δοκιμασίες: Molisch, Benedict, Fehling, Barfoed, Seliwanoff, Ιωδίου

Η δοκιμασία **Molisch** αφορά όλους τους υδατάνθρακες, ελεύθερους ή δεσμευμένους σε πρωτεΐνες ή λιπίδια. Συνιστά μια ευαίσθητη δοκιμασία για την ανίχνευση υδατανθράκων. Η δοκιμή είναι θετική για μονοσακχαρίτες, δισακχαρίτες και πολυσακχαρίτες, νουκλεϊκά οξέα και γλυκοπρωτεΐνες. Η αρχή της μεθόδου περιγράφεται στην Εικόνα 7.27.



Εικόνα 7.27 Αρχή μεθόδου της δοκιμασίας Molisch.

Οι τριόζες και οι τετρόζες δεν έχουν τα απαραίτητα πέντε άτομα άνθρακα για τον σχηματισμό της φουρφουράλης, επομένως δεν δίνουν θετικό αποτέλεσμα για αυτήν την αντίδραση.

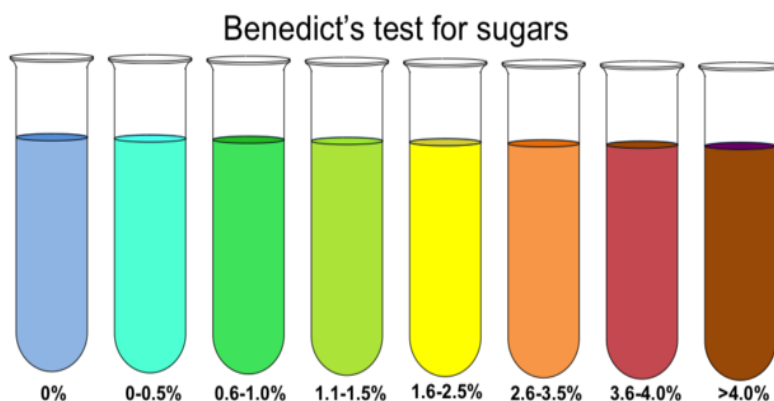
Η δοκιμασία Molisch δεν είναι μια ειδική δοκιμή για υδατάνθρακες. Οι φουρφουράλες οι ίδιες ή η ουσία που παράγει φουρφουράλη, ορισμένα οργανικά οξέα, όπως τα κιτρικά οξέα, το γαλακτικό οξύ, το οξαλικό οξύ, το μυρμηκικό οξύ κλπ. μπορούν να δώσουν θετικό αποτέλεσμα (σχηματισμός μωβ δακτυλίου).

Η δοκιμασία Benedict είναι θετική για μονοσακχαρίτες και ανάγοντες δισακχαρίτες. Εάν σε διάλυμα σακχάρου προστεθεί το αντιδραστήριο Benedict, παράγεται ίζημα υδροξειδίου του χαλκού $\text{Cu}(\text{OH})_2$. Όταν το μείγμα θερμανθεί, το υδροξείδιο του χαλκού ανάγεται σε κίτρινο ή κεραμέρυθρο υποξείδιο του χαλκού Cu_2O . Το τελικό χρώμα του διαλύματος εξαρτάται από την ποσότητα του υποξειδίου του χαλκού που σχηματίστηκε, δηλαδή από την αρχική ποσότητα του ανάγοντος σακχάρου.

Σε αρνητική αντίδραση, δηλαδή όταν το μείγμα δεν περιέχει σάκχαρο, το υδροξείδιο του χαλκού μετατρέπεται σε ένα μελανό οξείδιο CuO .

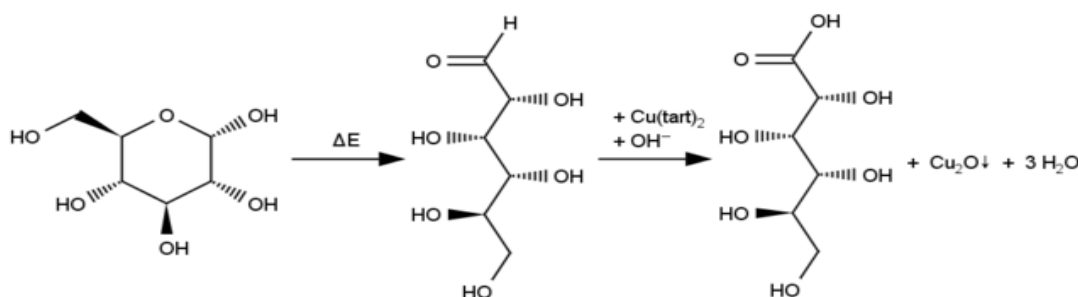


Εικόνα 7.28 Αρχή μεθόδου της δοκιμασίας Benedict.



Εικόνα 7.29 Δοκιμασία Benedict σε διάλυμα γλυκόζης, αυξανόμενης συγκέντρωσης.

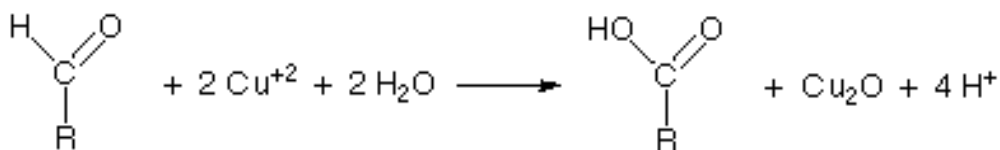
Η δοκιμασία Fehling είναι θετική για μονοσακχαρίτες και ανάγοντες δισακχαρίτες. Εάν σε διάλυμα σακχάρου προστεθεί το αντιδραστήριο Benedict, παράγεται ίζημα υδροξειδίου του χαλκού $\text{Cu}(\text{OH})_2$. Όταν το μείγμα θερμανθεί, το υδροξείδιο του χαλκού ανάγεται σε κίτρινο ή κεραμέρυθρο υποξείδιο του χαλκού Cu_2O . Το τελικό χρώμα του διαλύματος εξαρτάται από την ποσότητα του υποξειδίου του χαλκού που σχηματίστηκε, δηλαδή από την αρχική ποσότητα του ανάγοντος σακχάρου.



Εικόνα 7.30 Αρχή μεθόδου της δοκιμής Fehling.

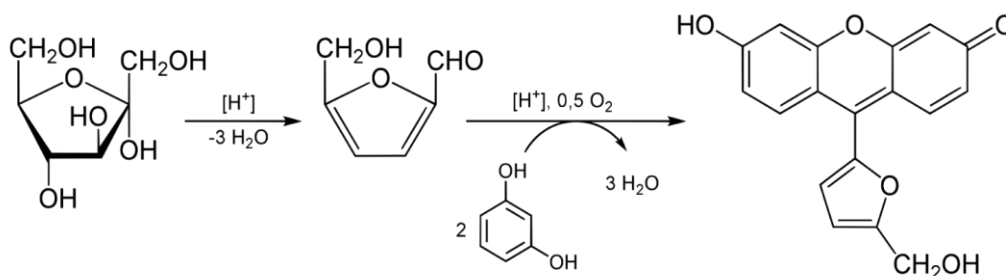
Η δοκιμασία Barfoed χρησιμοποιείται για τη διάκριση των μονοσακχαριτών από τους ανάγοντες δισακχαρίτες. Οι μονοσακχαρίτες οξειδώνονται από διάλυμα που περιέχει ιόντα χαλκού σε διάλυμα προς σχηματισμό καρβοξυλικού οξέος και οξειδίου του χαλκού (κόκκινου χρώματος ίζημα) εντός τριών λεπτών.

Οι ανάγοντες δισακχαρίτες χρειάζονται πολύ περισσότερο χρόνο, ο οποίος κυμαίνεται μεταξύ 7-12 λεπτά, για να αντιδράσουν με το αντιδραστήριο (Εικόνα 7.31).



Εικόνα 7.31 Αρχή μεθόδου της δοκιμασίας Barfoed.

Η **δοκιμασία Seliwanoff** είναι μια χημική δοκιμασία, που επιτυγχάνει τη διάκριση μεταξύ σακχάρων αλδόζης και κετόζης. Εάν το σάκχαρο περιέχει μια ομάδα κετόνης, είναι μια κετόζη. Εάν ένα σάκχαρο περιέχει μια ομάδα αλδεϋδης, είναι αλδόζη. Αυτή η δοκιμασία βασίζεται στην αρχή ότι, όταν θερμαίνονται, οι κετόζες αφυδατώνονται πιο γρήγορα από τις αλδόζες (Εικόνα 7.32). Όταν προστίθεται σε διάλυμα που περιέχει κετόζες, σχηματίζεται γρήγορα ένα κόκκινο χρώμα, που υποδηλώνει θετική δοκιμή. Όταν προστίθεται σε διάλυμα που περιέχει αλδόζες, παρατηρείται ένα πιο αργό ανοιχτό ροζ.



Εικόνα 7.32 Αρχή μεθόδου της δοκιμασίας Seliwanoff.

Η **δοκιμασία Ιωδίου** αποτελεί χαρακτηριστική αντίδραση πολυσακχαριτών και κυρίως του αμύλου. Η αντίδραση των πολυσακχαριτών με το ιώδιο, δίνει προϊόν ένα σύμπλοκο με σκούρο μπλε χρώμα (Εικόνα 7.33). Η δοκιμασία είναι αρνητική για τους μονοσακχαρίτες και τους δισακχαρίτες.



Εικόνα 7.33 Αντίδραση ιωδίου σε σπόρους αμύλου.

Γλυκοζυλιωμένη αιμοσφαιρίνη

Η μέτρηση της γλυκιωμένης (γλυκοζυλιωμένης) **αιμοσφαιρίνης** (glycated hemoglobin, HbA1c) αποτελεί πολύτιμο κλινικό δείκτη της μέσης περιεκτικότητας του αίματος σε γλυκόζη για μεγάλο χρονικό διάστημα (τυπικά θεωρείται ότι υποδεικνύει τη μέση περιεκτικότητα γλυκόζης 3 μηνών). Οι τιμές της γλυκιωμένης αιμοσφαιρίνης αποτελούν πιο αξιόπιστο δείκτη για τη διάγνωση του σακχαρώδους διαβήτη, αλλά και για το πόσο καλά ελέγχεται ο διαβήτης, σε αντίθεση με τις τιμές της συγκέντρωσης της ελεύθερης γλυκόζης στο αίμα, οι οποίες μπορεί να υπόκεινται σε έντονες ημερήσιες διακυμάνσεις.

Τα προϊόντα αυτής της χημικής σύνδεσης των βιομορίων με σάκχαρα ονομάζονται προϊόντα προχωρημένης γλυκίωσης (advanced glycation endproducts, **AGEs**) συσσωματώνονται μεταξύ τους και δρουν σε βάρος της φυσιολογικής λειτουργίας του οργανισμού. Πρωτεϊνικές ίνες συνδέονται μεταξύ τους με

αποτέλεσμα την απώλεια της ελαστικότητας και τη σκλήρυνσή τους, γεγονός που επιδρά αρνητικά στη λειτουργία του μυών της καρδιάς και προκαλεί βλάβες στις αρτηρίες και σε άλλους ιστούς.

Προβλήματα μπορούν να προκύψουν από τη γλυκίωση διάφορων χρήσιμων ενζύμων, η οποία οδηγεί σε αχρήστευσή τους. Η συσσώρευση των AGE εμπλέκεται σε οφθαλμολογικές νόσους, όπως το γλαύκωμα και βλάβες του αμφιβληστροειδούς, στην αρθρίτιδα, στην αρτηριοσκλήρυνση, στη νόσο Alzheimer και στη νόσο του Parkinson, σε νευροπάθειες και νεφροπάθειες, όπως και σε πλήθος άλλων εκφυλιστικών καταστάσεων.

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟ ΜΕΡΟΣ

7.2 Εργαστηριακή άσκηση: Προσδιορισμός ανάγοντων σακχάρων-Δοκιμασία Benedict

Παρασκευή αντιδραστηρίου Benedict

- Διάλυμα Α: Υδατικό διάλυμα $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
- Διάλυμα Β: Υδατικό διάλυμα κιτρικού νατρίου και ανθρακικού νατρίου. 173 g ένυδρου κιτρικού νατρίου και 100 g άνυδρου Na_2CO_3 διαλύονται σε 800 mL H_2O με θέρμανση. Το διάλυμα διηθείται και εν συνεχεία προστίθενται σ' αυτό 17,3 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ διαλυμένα σε 100 mL H_2O . Το προκύπτον διάλυμα αραιώνεται μέχρι όγκου 1 L.

Πειραματική πορεία

- Αναμειγνύονται 5 mL αντιδραστηρίου Benedict και 0.4 mL (8 σταγόνες) διαλύματος δείγματος (γλυκόζης, σακχαρόζης, αμύλου) σε δοκιμαστικό σωλήνα.
- Ανάδευση και βρασμός του δοκιμαστικού σωλήνα για 3 min.
- Εμφάνιση κεραμέρυθρου ιζήματος υποξειδίου του χαλκού, που οφείλεται στην παρουσία ανάγοντος σακχάρου.

7.3 Εργαστηριακή άσκηση: Δοκιμασίες Molisch, Fehling, Barfoed, Seliwanoff

7.3.1 Δοκιμασία Molisch

Αντιδραστήρια

- Αντιδραστήριο Molisch: Διαλύστε 3,75 g α-ναφθόλης σε 25 mL αιθανόλης 99%. Αυτό το αντιδραστήριο πρέπει να παρασκευάζεται την ίδια μέρα.
- Πυκνό θειικό οξύ
- Διαλύματα γλυκόζης, σακχαρόζης, αμύλου 10 mg/mL

Πειραματική πορεία

- Προσθέστε δύο σταγόνες αντιδραστηρίου Molisch σε κάθε σωληνάριο.
- Διατηρήστε τον δοκιμαστικό σωλήνα σε κεκλιμένη θέση και προσθέστε αργά 1 mL πυκνού H_2SO_4 κατά μήκος του τοιχώματος του δοκιμαστικού σωλήνα. Μην αναμειγνύετε το οξύ με το διάλυμα. Ένας μαύρος δακτύλιος μπορεί να σχηματιστεί, εάν το πυκνό οξύ δεν προστεθεί αργά, καθώς η θερμότητα που παράγεται από την αντίδραση μπορεί να απανθρακώσει τους υδατάνθρακες.
- Παρατηρήστε τον δοκιμαστικό σωλήνα για τον σχηματισμό ενός κόκκινου δακτυλίου στο στρώμα μεταξύ του διαλύματος και του οξέος.
- Αραιώστε με 5 mL απεσταγμένο νερό.

- Παρατηρήστε τον δοκιμαστικό σωλήνα για τον σχηματισμό ενός μωβ δακτυλίου στο στρώμα μεταξύ του διαλύματος και του οξέος, που οφείλεται στην παρουσία υδατάνθρακα.

7.3.2 Δοκιμασία Fehling

Παρασκευή αντιδραστηρίου Fehling

- Fehling A: Υδατικό διάλυμα $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
- Fehling B: Υδατικό διάλυμα KOH ή NaOH και τρυγικού καλιονάτριου $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6$.
- Διαλύονται 7g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ σε 100 mL απιονισμένου νερού. Η διάλυση διευκολύνεται με ελαφρά θέρμανση.
- Διαλύονται 35g τρυγικού καλιονατρίου και 10g NaOH σε 100 mL νερού.

Πειραματική πορεία

- Παρασκευάζονται 4 mL αντιδραστηρίου Fehling (αναμειγνύουμε τα διαλύματα 1:1) σε δοκιμαστικό σωλήνα και θερμαίνεται μέχρι ελαφρού βρασμού.
- Προστίθεται διάλυμα δείγματος (0,1 g δείγματος σε 2 mL νερό) και συνεχίζεται ο ελαφρύς βρασμός για 1-2 min.
- Εμφάνιση κεραμέρυθρου ιζήματος υποξειδίου του χαλκού, που οφείλεται στην παρουσία ανάγοντος σακχάρου (Εικόνα 7.34).



Εικόνα 7.34 Δοκιμή Fehling σε διαλύματα υδατανθράκων.

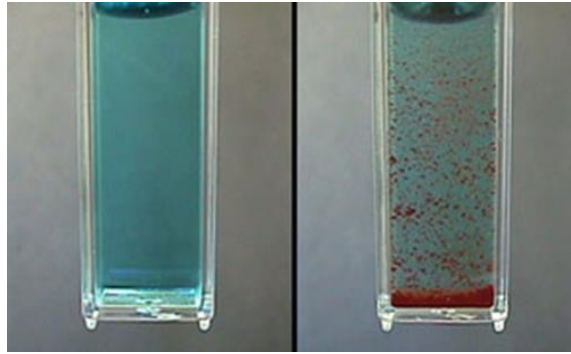
7.3.3 Δοκιμασία Barfoed

Παρασκευή αντιδραστηρίου Barfoed

- Διαλύονται 13,3g ανθρακικού χαλκού σε 200 mL απιονισμένου νερού. Ακολουθεί προσθήκη 1,8 mL διαλύματος κρυσταλλικού οξικού οξέος.

Πειραματική πορεία

- Αναμειγνύονται 1 mL διαλύματος δείγματος και 3 mL αντιδραστηρίου Barfoed σε δοκιμαστικό σωλήνα.
- Ανάδευση και βρασμός του δοκιμαστικού σωλήνα για 3 min.
- Εμφάνιση κόκκινου ιζήματος οξειδίου του χαλκού, που οφείλεται στην παρουσία ανάγοντος μονοσακχαρίτη. παρουσία ανάγοντος μονοσακχαρίτη (Εικόνα 7.35).



Εικόνα 7.35 Δοκιμή Barfoed σε διάλυμα υδατανθράκων.

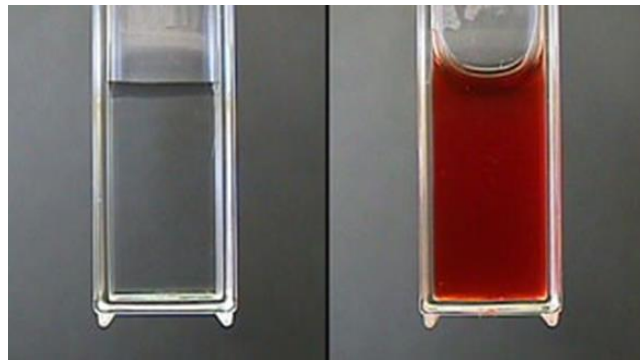
7.3.4 Δοκιμασία Seliwanoff

Παρασκευή αντιδραστηρίου Seliwanoff

- Διαλύονται 0,05 g ρεσορκινόλης σε 100 mL διαλύματος HCl 1 M

Πειραματική πορεία

- Αναμειγνύονται 5 mL αντιδραστηρίου Seliwanoff και 1 mL αραιού διαλύματος δείγματος σε δοκιμαστικό σωλήνα.
- Ανάδευση και βρασμός του δοκιμαστικού σωλήνα για 1 min.
- Εμφάνιση κόκκινου χρώματος, που οφείλεται στην παρουσία κετόζης (Εικόνα 7.36).



Εικόνα 7.36 Δοκιμή Seliwanoff σε διάλυμα υδατανθράκων.

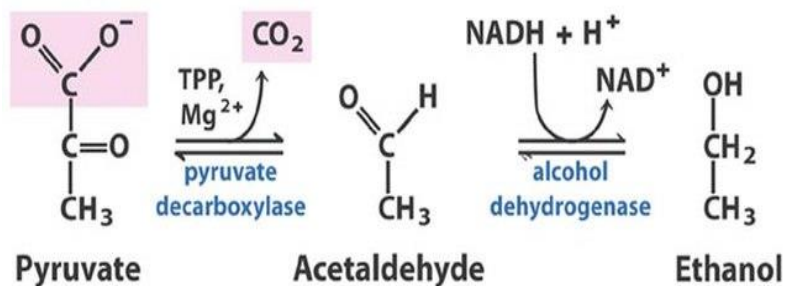
7.4 Εργαστηριακή άσκηση: Ανίχνευση μεταβολικού ενδιάμεσου (πυροσταφυλικού) με αναστολή του ενζύμου πυροσταφυλική αποκαρβοξυλάση (σε κύτταρα ζυμομύκητα)

Η μεταβολική τύχη του πυροσταφυλικού οξέος που παράγεται από την πορεία της γλυκόλυσης διαφέρει ανάλογα με το είδος του οργανισμού και τη διαθεσιμότητα σε οξυγόνο. Πιο συγκεκριμένα, ο μεταβολισμός του συνδέεται με τον μηχανισμό επανοξειδωσης του NADH, ο οποίος διαφέρει.

Σε αερόβιες συνθήκες, το πυροσταφυλικό μετατρέπεται με οξειδωτική αποκαρβοξυλίωση σε ακετυλοσυνένζυμο Α και εισέρχεται στον κύκλο του κιτρικού οξέος (κύκλος του Krebs). Η αντίδραση καταλύεται από το πολυενζυμικό σύμπλεγμα της πυροσταφυλικής αφυδρογονάσης, η οποία ανάγει NAD⁺ και παράγει μόρια NADH. Η επανοξειδωση των μορίων NADH γίνεται μέσω της αναπνευστικής αλυσίδας κατά την οποία τα παραγόμενα ηλεκτρόνια μεταφέρονται στο οξυγόνο, ενώ παράλληλα παράγεται ATP.

Σε αναερόβιες συνθήκες, το πυροσταφυλικό είναι δυνατόν να μετατρέπεται:

- Με αναγωγή προς γαλακτικό (γαλακτική ζύμωση) με το ένζυμο γαλακτική αφυδρογονάση, στα μυϊκά κύτταρα των θηλαστικών.
- Με αποκαρβοξυλίωση και αναγωγή σε αιθανόλη (αλκοολική ζύμωση) μέσω της συζευγμένης ενζυμικής δράσης της πυροσταφυλικής αποκαρβοξυλάσης και της αλκοολικής αφυδρογονάσης, στους ζυμομύκητες και άλλους προαιρετικά ή και υποχρεωτικά αναερόβιους μικροοργανισμούς (Εικόνα 7.37). Και στις δύο περιπτώσεις, η αντίστοιχη αντίδραση αναγωγής είναι συζευγμένη με την επανοξείδωση του NADH για την άμεση επαναλειτουργία της γλυκόλυσης.



Εικόνα 7.37 Αλκοολική ζύμωση.

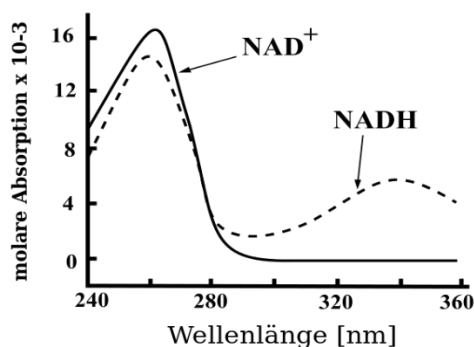
Ο καταβολισμός της γλυκόζης παράγει δύο ATP και NADH, αλλά απαιτεί το NADH να αναγεννηθεί σε NAD⁺ για να συνεχιστεί. Σε έλλειψη οξυγόνου, σε ορισμένα κύτταρα, η αναγέννηση του NAD⁺ και η συνέχιση της διαδικασίας της γλυκόλυσης, γίνεται μέσω της αλκοολικής ζύμωσης. Στην Εικόνα 7.38 παρουσιάζεται η ζύμωση του πυροσταφυλικού για την παραγωγή αιθανόλης και την οξείδωση του NADH σε NAD⁺.

7.4.1 Ανίχνευση πυροσταφυλικού σε κύτταρα ζυμομύκητα

- Σε δύο δοκιμαστικούς σωλήνες τοποθετούνται, αντίστοιχα, 5 mL διαλύματος 0.1 M Na₂HPO₄, pH 8.5 (αλκαλικό περιβάλλον) (σωλήνας Α) και 5 mL διαλύματος 0.1 M NaH₂PO₄ pH 5.5 (όξινο περιβάλλον) (σωλήνας Β).
- Στον κάθε σωλήνα προστίθενται υπό ανάδευση 5 g ζύμης (μαγιάς αρτοποιίας) (δηλαδή κυττάρων *Saccharomyces cerevisiae*, ζυμομύκητα) και, στη συνέχεια, 5 mL υδατικού διαλύματος 1% γλυκόζης (δηλαδή θρεπτικό υλικό).
- Ακολουθεί επώαση της κυτταρικής καλλιέργειας σε θερμό θάλαμο 37 °C για 1 h.
- Προστίθενται 1 mL τριχλωροξικού οξέος (TCA) (20% v/v) και, μετά από έντονη ανάδευση, ακολουθεί φυγοκέντρηση για 10 min στα 2500 rpm.
- Παραλαμβάνονται τα υπερκείμενα της φυγοκέντρησης τα οποία θα χρησιμοποιηθούν για την ανίχνευση του πυροσταφυλικού.
- Σε δύο νέους δοκιμαστικούς σωλήνες οι οποίοι περιέχουν στερεό θειικό αμμώνιο (στιβάδα πάχους > 1 cm) προστίθενται 2 mL από τα υπερκείμενα της φυγοκέντρησης.
- Προστίθενται 5 σταγόνες, πρόσφατα παρασκευασμένου, διαλύματος νιτροπρωσσικού νατρίου (5% w/v), στον απαγωγό. Ακολουθεί έντονη ανάδευση.
- Προστίθενται (μεπροσοχή) 2 mL πυκνής αμμωνίας, ενώ ο σωλήνας κρατείται υπό κλίση, ώστε να σχηματιστούν δύο στιβάδες.
- Παρουσία πυροσταφυλικού, εμφανίζεται δακτύλιος κυανού-πράσινου χρώματος στη μεσεπιφάνεια μεταξύ των δύο στιβάδων σε χρονικό διάστημα 10-15 min.

7.5 Εργαστηριακή άσκηση: Προσδιορισμός ενεργότητας πυροσταφυλικής αποκαρβοξυλάσης με συζευγμένη αντίδραση αλκοολικής αφυδρογονάσης

Η πειραματική δοκιμασία γίνεται σε κυτταρικό εκχύλισμα, με προσθήκη πυροσταφυλικού, NADH και (περίσσειας) αλκοολικής αφυδρογονάσης. Η πρόοδος της αντίδρασης παρακολουθείται φωτομετρικά από τη μείωση της απορρόφησης στα 340 nm, που αντιστοιχεί στην οξείδωση του NADH (Εικόνα 7.39).



Εικόνα 7.38 Διάγραμμα απορρόφησης των NAD⁺ / NADH.

- Κυτταροκαλλιέργεια (50 mL) του βακτηρίου *Zygomonas mobilis* επωάζεται σε αναερόβιες συνθήκες στους 30 °C, σε υγρό θρεπτικό υλικό. Το υγρό θρεπτικό υλικό περιέχει:
 - 0.5% w/v εκχύλισμα ζύμης (yeast extract)
 - 0.1% w/v θειικό αμμώνιο
 - 0.1% w/v δισόξινο φωσφορικό κάλιο
 - 0.05% w/v θειικό μαγνήσιο
 - και 2% (w/v) γλυκόζης.
- Τα κύτταρα συλλέγονται στο μέσο της εκθετικής φάσης ανάπτυξης (σε οπτική πυκνότητα καλλιέργειας 0.3-0.4, στα 600 nm), με φυγοκέντρωση. Το ίζημα των κυττάρων αναδιαλύεται σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού καλίου, 0.02 M, pH 7.5 (1mL).
- Το δείγμα ομογενοποιείται σε σφαιρόμυλο με γυάλινα σφαιρίδια διαμέτρου 0.15 mm. Στη συνέχεια, αραιώνεται σε ίσο όγκο ρυθμιστικού διαλύματος
- Ακολουθεί φυγοκέντρωση στα 14000 rpm για 5 min, ώστε να απομακρυνθούν τα κυτταρικά υπολείμματα και παραλαμβάνεται το υπερκείμενο (κυτταρικό εκχύλισμα).

Για τη μέτρηση της ενεργότητας πυροσταφυλικής αποκαρβοξυλάσης ακολουθείται το πρωτόκολλο που παρουσιάζεται στον Πίνακα 7.1.

Πίνακας 7.1 Πρωτόκολλο μέτρησης της ενεργότητας της πυροσταφυλικής αποκαρβοξυλάσης.

Ρυθμιστικό Διάλυμα K ₂ HPO ₄ /KH ₂ PO ₄ , 0.02 M, pH 7.5	1,87 mL	1,67 mL	1,64 mL
NADH 1.28 mM, σε ρυθμιστικό διάλυμα	0 mL	0,2 mL	0,2 mL
Πυροσταφυλικό νάτριο 0.025 M σε ρυθμιστικό διάλυμα	0,5 mL	0,5 mL	0,5 mL
Διάλυμα MgCl ₂ 0.125 M σε ρυθμιστικό διάλυμα	0,1 mL	0,1 mL	0,1 mL
Αλκοολική αφυδρογονάση 400U/mL σε ρυθμιστικό διάλυμα	0,025 mL	0,025 mL	0,025 mL
Κυτταρικό εκχύλισμα μετά από κατάλληλη αραιώση στο ρυθμιστικό διάλυμα (αραιώση από 1:1 (v/v) ως 1:10 (v/v))	0 mL	0 mL	0,03 mL

- Ακολουθεί επώαση 30 min σε θερμοκρασία δωματίου.

- Στο πρώτο κατά σειρά δείγμα, θα ληφθεί η "μηδενική" μέτρηση (τυφλό) που αντιστοιχεί σε μηδενική συγκέντρωση NADH.

Στο δεύτερο κατά σειρά δείγμα (χωρίς προσθήκη κυτταρικού εκχυλίσματος) θα ληφθεί η "μέγιστη" μέτρηση, που αντιστοιχεί σε 0.15 mM NADH (ολική συγκέντρωση προστιθέμενου NADH).

Για το τρίτο κατά σειρά δείγμα λαμβάνονται διαδοχικές μετρήσεις σε συγκεκριμένους χρόνους επώασης, όπως παρουσιάζεται στον Πίνακα 7.2.

Πίνακας 7.2 Καταγραφή της απορρόφησης και της συγκέντρωσης του NADH σε διαφορετικούς χρόνους επώασης.

Χρόνος επώασης (min)	A340 nm	NADH (mM)
0 (μέγιστη συγκέντρωση NADH)		0,15
0,5		
1		
2		
3		
5		
10		
15		
20		
30		

Οι τιμές της τρίτης στήλης, NADH (mM), θα υπολογιστούν βάσει της τιμής A340 nm χρόνου 0, που αντιστοιχεί στη μέγιστη συγκέντρωση, 0.15 mM.

Κατασκευάστε το διάγραμμα προόδου της αντίδρασης της πυροσταφυλικής αποκαρβοξυλάσης από τη μείωση της οπτικής πυκνότητας στα 340 nm (A340 nm συναρτήσει του χρόνου).

Πίνακας 7.3 Καταγραφή της ποσότητας του παραγόμενου NAD+.

Χρόνος επώασης (min)	NADH (mM)	NADH (μmol)	NAD+ (μmol)
0	0,15	0,375	0
0,5			
1			
2			
3			
5			
10			
15			
20			
30			

Οι τιμές του παραγόμενου NAD+ (μmol) υπολογίζονται βάσει της απόκλισης της εκάστοτε τιμής NADH (μmol) από τη μέγιστη, δηλαδή την 0.375 μmol.

- Κατασκευάστε το διάγραμμα προόδου της αντίδρασης πυροσταφυλικής αποκαρβοξυλάσης από την αύξηση της ποσότητας προϊόντος (μmol NAD+ συναρτήσει του χρόνου).
- Ενεργότητα πυροσταφυλικής αποκαρβοξυλάσης (σε μmol NAD+ ανά min, U).
- Ενεργότητα πυροσταφυλικής αποκαρβοξυλάσης στο κυτταρικό εκχύλισμα (σε U ανά mL εκχυλίσματος).

Σχετικό οπτικό υλικό στο διαδίκτυο

Qualitative Analysis of Carbohydrates

<https://www.youtube.com/watch?v=ojhdTFmkY1c>

<https://www.youtube.com/watch?v=Ewe7i1D9lSQ>

Barfoed Test

<https://www.youtube.com/watch?v=yQfMqvOxPrc>

Seliwanoff Test

https://www.youtube.com/watch?v=TUY7UjOme3g&gl=US&hl=en&has_verified=1&bpctr=9999999999

Fehling Test

<https://www.youtube.com/watch?v=njca-XHqIro>

https://www.youtube.com/watch?v=Xsrpz_ejMhw

Benedict Test

<https://www.youtube.com/watch?v=RZysR3WkOSk>

Πηγές φωτογραφιών με προέλευση το διαδίκτυο

Εικόνα 7.2

https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/d/d5/D-Glucose_Molek%C3%BCIbaukasten_9159.JPG/640px-D-Glucose_Molek%C3%BCIbaukasten_9159.JPG

Εικόνα 7.3

https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/d/de/Starch_Components.png/640px-Starch_Components.png

Εικόνα 7.4

https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Fischer_glyceraldehyd.PNG

Εικόνα 7.5

https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/c/ca/Epimers-Glucose_Mannose.png/640px-Epimers-Glucose_Mannose.png

Εικόνα 7.6

<https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/0/06/DL-Glucose.svg/640px-DL-Glucose.svg.png>

Εικόνα 7.7

https://chem.libretexts.org/@api/deki/files/82323/OrganicCore_AldehydesKetones38.png?revision=1&size=bestfit&width=465&height=141

Εικόνα 7.8

https://chem.libretexts.org/@api/deki/files/82326/OrganicCore_AldehydesKetones41.png?revision=1&size=bestfit&width=414&height=126

Εικόνα 7.9

<https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/b/b1/Alpha-D-Glucopyranose-with-H.png/640px-Alpha-D-Glucopyranose-with-H.png>

Εικόνα 7.10

https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/2/2d/D-Glucose_Haworth.svg/640px-D-Glucose_Haworth.svg.png

Εικόνα 7.11

https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/5/5a/Mutarotation_D-Glucose_V.1.png/640px-Mutarotation_D-Glucose_V.1.png

Εικόνα 7.13

https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/7/79/Glucose_Fructose_Mannose_Gleichgewicht.png/640px-Glucose_Fructose_Mannose_Gleichgewicht.png

Εικόνα 7.14

https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/c/c6/Glycosides_formation.jpg/640px-Glycosides_formation.jpg

Εικόνα 7.15

<https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/5/58/O-linkage.png>

chemical structure of o-linked glycosidic bond

Εικόνα 7.16

https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/e/e4/N-linked_glycosidic_bond.png/640px-N-linked_glycosidic_bond.png

Εικόνα 7.17

https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/1/18/D-Glucose_to_Sorbitol.jpg/640px-D-Glucose_to_Sorbitol.jpg

Εικόνα 7.18

https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/3/3d/Erythronic_Acid.svg/640px-Erythronic_Acid.svg.png

Εικόνα 7.19

<https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/d/d9/Ox-Aldehyd-T1.svg/640px-Ox-Aldehyd-T1.svg.png>

Εικόνα 7.20

https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/8/89/Formation_du_maltose.PNG/640px-Formation_du_maltose.PNG

Εικόνα 7.21

https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/d/d2/Sucrose_structure_formula_inkscape.svg/640px-Sucrose_structure_formula_inkscape.svg.png

Εικόνα 7.22

<https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/6/66/Amylose-amylpectin.gif>

Εικόνα 7.23

<https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/0/0d/Glycogen.png/640px-Glycogen.png>

Εικόνα 7.24

<https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/f/fd/RNA-Monomer.svg/640px-RNA-Monomer.svg.png>

Εικόνα 7.25

https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/7/76/ABO_antigenic_determinants_fr.svg/640px-ABO_antigenic_determinants_fr.svg.png

Εικόνα 7.26

<https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/8/86/Glycolysis%26Gluconeogenesis.jpg/640px-Glycolysis%26Gluconeogenesis.jpg>

Εικόνα 7.27

https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/1/19/Molisch_test.png/640px-Molisch_test.png

Εικόνα 7.29

https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/8/81/Benedict%27s_test_for_Sugars.png/640px-Benedict%27s_test_for_Sugars.png

Εικόνα 7.30

https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/0/01/Fehling-probe_reaktion_glucose.png/640px-Fehling-probe_reaktion_glucose.png

Εικόνα 7.32

<https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/7/7d/Seliwanow.svg/1920px-Seliwanow.svg.png>

Εικόνα 7.33

https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/c/c6/Testing_seed_for_starch.jpg/640px-Testing_seed_for_starch.jpg

Εικόνα 7.37

https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/e/ee/Pyruvate_decarb_1.jpg/640px-Pyruvate_decarb_1.jpg

Εικόνα 7.38

<https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/0/08/NAD-NADH-Absorptionskurven.svg/640px-NAD-NADH-Absorptionskurven.svg.png>

Βιβλιογραφικές Αναφορές

- Φριλίγγος, Ε., Σεφεριάδης, Κ., Παπαμαρκάκη, Θ., & Τσόλας, Ο. (2001). *Εργαστηριακές Ασκήσεις Βιοχημείας Δευτεροετών Φοιτητών* (3^η έκδοση). Ιωάννινα: Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Ιατρική Σχολή, Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας.
- Χαμηλάκης, Στ. (2011). *Βιολογικά Μακρομόρια, Εργαστηριακές Σημειώσεις*. Αθήνα: Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο.
- Nelson, D., & Cox, M. (2018). *Lehningers Βασικές αρχές Βιοχημείας*. Αθήνα: Broken.
- Tymoczko, J., Berg, J., & Stryer, L. (2018). *Βιοχημεία Βασικές αρχές*. Broken.
- Δημόπουλος, Κ., & Αντωνοπούλου, Σ. (2020). *Βασική Βιοχημεία*. Νέον.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8

8 ΘΕΩΡΙΑ ΚΑΙ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΑΣΚΗΣΕΙΣ ΣΤΙΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ

Συγγραφέας: Μαρία Τράπαλη

Σύνοψη

Η χρωματογραφία χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό των συστατικών ενός μείγματος και βασίζεται στις φυσικοχημικές ιδιότητες-διαφορές των ενώσεων του μείγματος, όπως το σημείο ζέσεως, η πολικότητα, το μέγεθος των μορίων, τα ηλεκτρικά φορτία. Μια σύντομη ταξινόμηση των χρωματογραφικών τεχνικών δίνεται με βάση τη φύση της κινητής (αέρια ή υγρή) και στατικής φάσεως και περιλαμβάνει την υγρή και την αέρια χρωματογραφία. Η χρωματογραφία λεπτής στιβάδας συνιστά τεχνική υγρής χρωματογραφίας. Η στατική φάση και ο μηχανισμός διαχωρισμού των συστατικών ενός μείγματος είναι παρόμοιοι με εκείνους της χρωματογραφίας στήλης. Η υγρή χρωματογραφία υψηλής ανάπτυξης επιτρέπει αποδοτικούς διαχωρισμούς και μετρήσεις σε λίγα λεπτά, ενώ ένας μεγάλος αριθμός ενώσεων και νόσων είναι δυνατόν σήμερα να προσδιοριστεί σε βιολογικά υγρά με αυτήν την τεχνική.

Προαπαιτούμενη γνώση

Δεν υπάρχει συγκεκριμένο προαπαιτούμενο κεφάλαιο.

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

8.1 Γενικά περί χρωματογραφίας, διαχωρισμού, πολικότητας

Η χρωματογραφία χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά (1903) από τον βοτανολόγο Tswett για τον διαχωρισμό των χρωστικών από τα φύλλα σε διακριτές έγχρωμες ζώνες. Από αυτό το γεγονός, η τεχνική ονομάστηκε διεθνώς *χρωματογραφία*, αν και ο διαχωρισμός των χρωμάτων δεν έχει καμία σχέση με τις αρχές της τεχνικής αυτής.

Ο διαχωρισμός των συστατικών ενός μείγματος επιτυγχάνεται με την κατανομή των συστατικών μεταξύ δύο φάσεων, μιας στατικής και μιας κινητής και βασίζεται στις φυσικοχημικές ιδιότητες-διαφορές των ενώσεων του μείγματος, όπως το σημείο ζέσεως, η πολικότητα, το μέγεθος των μορίων, τα ηλεκτρικά φορτία.

Πολικά μόρια εμφανίζονται, όταν δύο άτομα δεν μοιράζονται τα ηλεκτρόνια εξίσου σε έναν ομοιοπολικό δεσμό. Ένα δίπολο σχηματίζεται, με μέρος του μορίου να φέρει ελαφρώς θετικό φορτίο και το άλλο μέρος ελαφρώς αρνητικό φορτίο. Αυτό συμβαίνει, όταν υπάρχει διαφορά μεταξύ των τιμών ηλεκτραρνητικότητας κάθε ατόμου. Μια ακραία διαφορά σχηματίζει έναν ιοντικό δεσμό, ενώ μια μικρότερη διαφορά σχηματίζει έναν πολικό ομοιοπολικό δεσμό. Εάν η διαφορά ηλεκτραρνητικότητας μεταξύ των δύο ατόμων είναι μεταξύ 0,5 και 2,0, τα άτομα σχηματίζουν πολικό ομοιοπολικό δεσμό. Εάν η διαφορά ηλεκτραρνητικότητας μεταξύ των ατόμων είναι μεγαλύτερη από 2,0, ο δεσμός είναι ιονικός. Οι ιονικές ενώσεις είναι εξαιρετικά πολικά μόρια. Εάν η διαφορά ηλεκτραρνητικότητας μεταξύ δύο ατόμων είναι μικρότερη από 0,5, ο δεσμός θεωρείται μη πολικός, παρόλο που τα μόνα πραγματικά μη πολικά μόρια είναι εκείνα που σχηματίζονται με πανομοιότυπα άτομα.

Ο βασικός νόμος που διέπει το φαινόμενο της διαλυτότητας είναι: «τα όμοια (από άποψη διαμοριακών δυνάμεων) διαλύουν τα όμοια». Αυτό σημαίνει ότι, εάν το άθροισμα των ασκούμενων δυνάμεων στο μόριο του διαλύτη (δυνάμεις διασποράς/London, ξηρής πολικότητας και δεσμού υδρογόνου) είναι παρόμοιας συγκρότησης και συνολικού μεγέθους με εκείνες ενός διαφορετικού μορίου με το οποίο έρχεται σε «επαφή», τότε θα έχουμε επιτυχή διαλυτοποίηση. Εάν σε έναν διαλύτη η συγκρότηση των διαμοριακών δυνάμεων είναι 30% δυνάμεις διασποράς, 45% δυνάμεις ξηρής πολικότητας και 25% δυνάμεις δεσμού υδρογόνου, τότε θα διαλυτοποιεί ευκολότερα υλικά των οποίων τα μόρια έχουν παρόμοια συγκρότηση δυνάμεων.

Κάποιες χημικές ενώσεις παίρνουν την επωνυμία ‘καλοί’ διαλύτες και άρα χρησιμοποιούνται ευρέως για πρακτικούς σκοπούς, εάν:

- έχουν κατάλληλο εύρος θερμοκρασιών της υγρής περιοχής τους,
- είναι χημικά σταθερές,
- δεν αλληλεπιδρούν χημικά με τις ουσίες προς διαλυτοποίηση,
- έχουν κατάλληλη τάση ατμών (όχι υπερβολικά πτητικοί),
- χαμηλή τοξικότητα (σημαντικό ζήτημα ασφάλειας),
- ένας διαλύτης συχνά χαρακτηρίζεται «ισχυρός», όταν διαλυτοποιεί μεγάλο εύρος και σημαντικές ποσότητες χημικών ενώσεων.

Κάθε χρωματογραφική τεχνική, όπως ήδη αναφέραμε, περιλαμβάνει μία κινητή φάση (mobile phase), η οποία ρέει μεταφέροντας τις διαχωριζόμενες ουσίες -συστατικά ενός μείγματος- μέσω μιας στατικής φάσης (static phase). Η κινητή φάση αποτελείται από έναν διαλύτη ή σύστημα διαλυτών, ενώ η στατική φάση από πορώδες στερεό υλικό ή από υγρό καθηλωμένο σε στερεό υπόστρωμα. Ο διαχωρισμός των συστατικών στη χρωματογραφία βασίζεται στον διαφορετικό βαθμό αλληλεπίδρασης του κάθε συστατικού με τις δύο φάσεις, ο οποίος καθορίζεται από την αγχιστεία (φυσικοχημική συγγένεια) του συστατικού με την κάθε φάση. Κάθε μόριο μιας ουσίας κατά τη μετανάστευσή του μέσω της στήλης μετακινείται πάρα πολλές φορές μεταξύ της κινητής φάσης (όπου διαλύεται) και της στατικής φάσης (όπου προσροφάται ή κατανέμεται ή δεσμεύεται λόγω αγχιστείας) και αντίστροφα.

8.2 Είδη χρωματογραφικών τεχνικών

Μια σύντομη ταξινόμηση των χρωματογραφικών τεχνικών δίνεται παρακάτω:

8.2.1 Με βάση τη φύση της κινητής (αέρια ή υγρή) και στατικής φάσεως

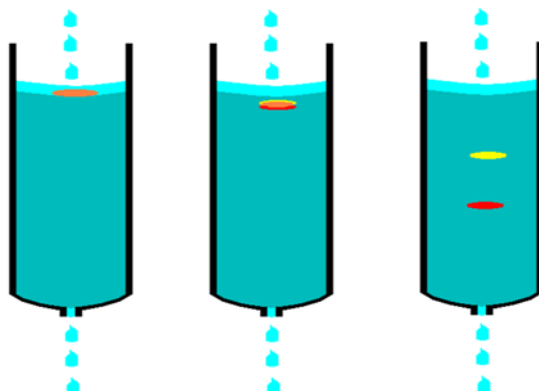
- Υγρή χρωματογραφία (Liquid chromatography ή LC).
- Αέρια χρωματογραφία (Gas chromatography ή GC).

8.2.2 Με βάση τον μηχανισμό διαχωρισμού

- Χρωματογραφία προσροφήσεως (absorption), όπου τα συστατικά του μείγματος προσροφούνται στην επιφάνεια της στατικής φάσης (συνήθως στερεάς).
- Χρωματογραφία ιονανταλλαγής (ion-exchange), όπου τα ιονικά συστατικά συγκρατούνται ηλεκτροστατικά σε διαφορετικό βαθμό στη στατική φάση (συνήθως ρητίνες ή πηκτές).
- Χρωματογραφία κατανομής (partition), όπου τα συστατικά κατανέμονται μεταξύ λεπτής στιβάδας της υγρής στατικής φάσης, η οποία σχηματίζεται στην επιφάνεια στερεού υποστρώματος και μιας υγρής κινητής φάσης. Εάν η υγρή στατική φάση είναι πολικότερη από την κινητή φάση, ονομάζεται *κανονικής φάσεως*, ενώ στην αντίθετη περίπτωση ονομάζεται χρωματογραφία *αντίστροφης φάσεως* (reversed phase).
- Χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού (molecular exclusion), όπου η υγρή ή αέρια κινητή φάση (με τα συστατικά), διέρχεται μέσα από πορώδη πηκτή (gel), το μέγεθος των πόρων της οποίας είναι αρκετά μικρό, ώστε να επιτρέπει την είσοδο στο δίκτυο της πηκτής μόριων μόνο μικρού μεγέθους αποκλείοντας μόρια μεγάλου μεγέθους. Έτσι, τα μόρια μεγάλου μεγέθους διέρχονται ταχέως, χωρίς να εισέρχονται στο δίκτυο της πηκτής, ενώ τα μόρια μικρού μεγέθους «εγκλωβισμένα» στο δίκτυο καθυστερούν να εξέλθουν από τη στήλη, αφού απαιτούν μεγαλύτερο όγκο κινητής φάσης, για να τα παρασύρει στην «έξοδο». Οι τεχνικές είναι γνωστές ως *χρωματογραφία διηθήσεως πηκτής* (gel filtration) ή *χρωματογραφία διαπερατότητας πηκτής* (gel permeation), συνήθως Sephadex G 25.
- Χρωματογραφία συγγένειας (affinity), βασίζεται στην εξαιρετικά εξειδικευμένη αλληλεπίδραση ενός μορίου του μείγματος με ένα μόριο, που έχει «ακινητοποιηθεί» στη στερεή στατική φάση. Οι παραπάνω μηχανισμοί διαχωρισμού απεικονίζονται στην Εικόνα 8.2.

8.2.3 Με βάση τη φυσική μορφή της στατικής φάσης

Χρωματογραφία στήλης. Διακρίνεται σε δύο είδη. Σε εκείνη των πληρωμένων στηλών (packed column) και στη χρωματογραφία ανοικτών τριχοειδών στηλών (open capillary) (Εικόνα 8.1).



Εικόνα 8.1 Χρωματογραφία στήλης.

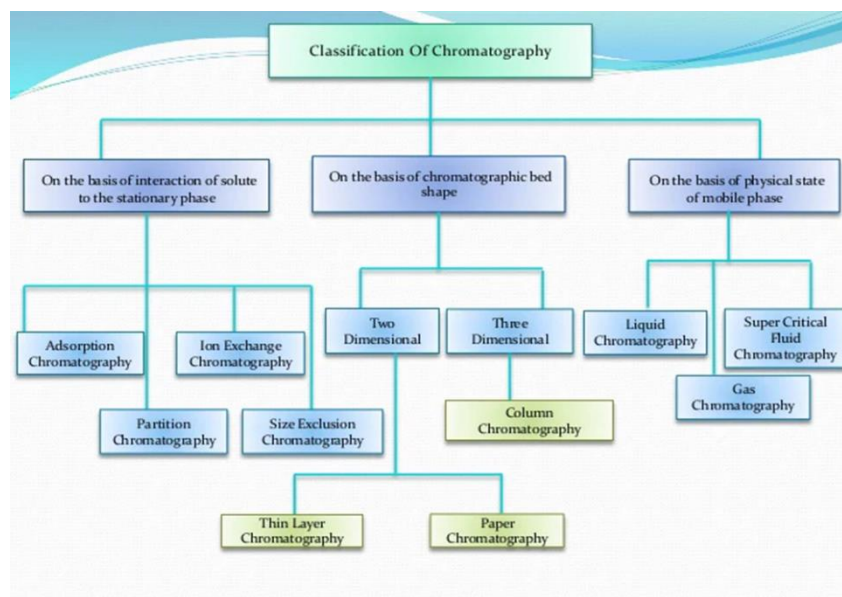
- Επίπεδη χρωματογραφία, (planar-flat) όπου η στατική φάση είναι μια λωρίδα χάρτη (χρωματογραφία χάρτη) ή μια στιβάδα στερεού υλικού (silica-alumina gel, cellulose) επιστρωμένη σε γυάλινη πλάκα (χρωματογραφία λεπτής στιβάδας, TLC).

8.2.4 Με βάση τον τρόπο εισαγωγής και κίνησης του δείγματος

- Μετωπική
Το διάλυμα του δείγματος εισάγεται στη στήλη συνεχώς
 - Ο διαλύτης του δείγματος δρα ως κινητή φάση.
 - Τα συστατικά του δείγματος εξέρχονται από τη στήλη με τη μορφή μετώπων.
 - Στο πρώτο μέτωπο περιέχεται το λιγότερο συγκρατούμενο συστατικό, π.χ. το Α
 - Στο δεύτερο, μείγμα του Α με το αμέσως περισσότερο συγκρατούμενο συστατικό, π.χ. το Β.
 - Δεν επιτυγχάνει πλήρη διαχωρισμό.

Χρησιμοποιείται για προσυγκέντρωση ιχνοποσοτήτων ουσιών ή αέριων δειγμάτων.

- Εκτόπισης. Χρησιμοποιείται κινητή φάση, που συγκρατείται ισχυρά από τη στατική φάση, εκτοπίζοντας σε διαφορετικό βαθμό τα συστατικά του δείγματος μέσα από τη στήλη. Γενικά, επιτυγχάνει ατελείς διαχωρισμούς και χρησιμοποιείται σε παρασκευαστικούς και βιομηχανικής κλίμακας διαχωρισμούς .
- Έκλουσης (elution). Η πλέον χρησιμοποιούμενη, όπου τα συστατικά μεταφέρονται από την κινητή φάση με διαφορετική ταχύτητα κατά μήκος της στατικής φάσης, οπότε εξέρχονται από τη στήλη σε διαφορετικούς χρόνους με τη στήλη έτοιμη για τον επόμενο διαχωρισμό.

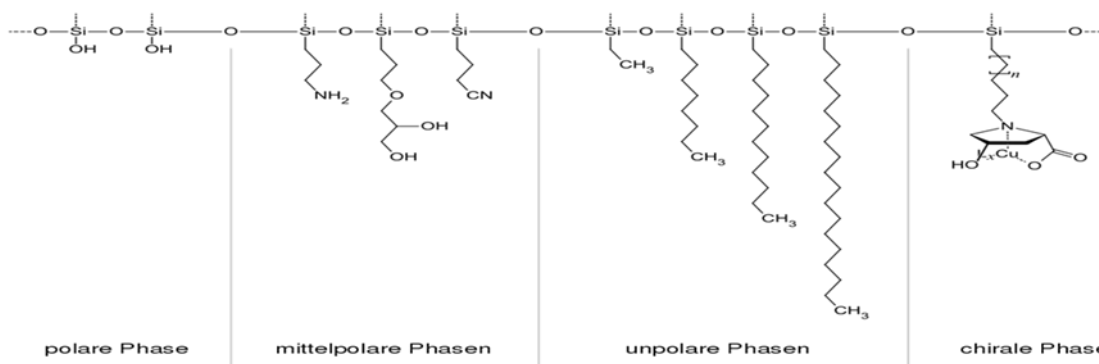


Εικόνα 8.2 Ταξινόμηση των χρωματογραφικών τεχνικών.

8.3 Πειραματική διάταξη χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας (TLC)

Η χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (Thin Layer Chromatography, TLC) συνιστά τεχνική υγρής χρωματογραφίας. Η στατική φάση και ο μηχανισμός διαχωρισμού των συστατικών ενός μείγματος είναι παρόμοιοι με εκείνους της χρωματογραφίας στήλης.

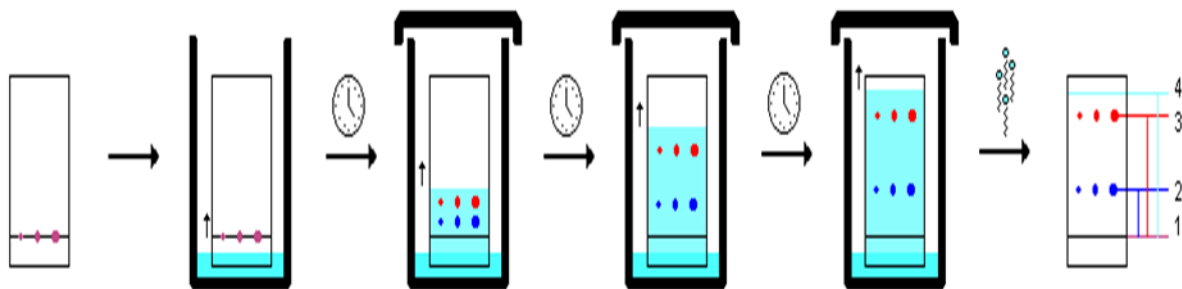
Η στατική φάση αποτελείται από γυάλινη πλάκα (ή φύλλο αργιλίου ή πλαστικού), που είναι επιστρωμένη με λεπτή ομοιόμορφη στιβάδα (πάχους 100-300 μm), ξηρού προσροφητικού υλικού, γέλης πυριτίου/αλουμινίου (silica gel, alumina) ή μικροκρυσταλλικής κυτταρίνης (cellulose powder) (Εικόνα 8.3).



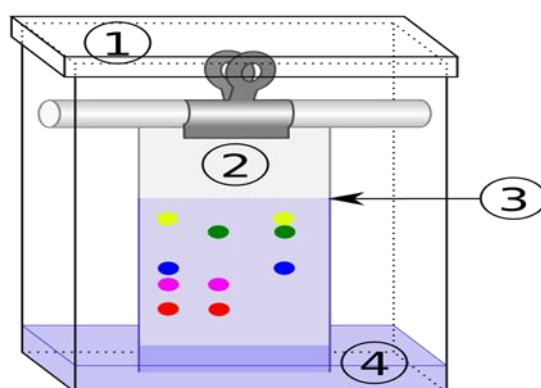
Εικόνα 8.3 Στατικές φάσεις για την TLC.

Η TLC, αν και συνήθως λειτουργεί ως χρωματογραφία προσρόφησης με τη χρησιμοποίηση διαλυτών ανάπτυξης υψηλής πολικότητας (νερό, μεθανόλη), τότε ο μηχανισμός διαχωρισμού είναι συνδυασμός κατανομής-προσρόφησης. Ως κινητές φάσεις χρησιμοποιούνται οι ίδιες με εκείνες της στήλης, όπου η ικανότητα έκλουσης των διαλυτών αυξάνεται με την αύξηση της πολικότητας (π.χ. από εξάνιο σε ακετόνη, αλκοόλη και ύδωρ).

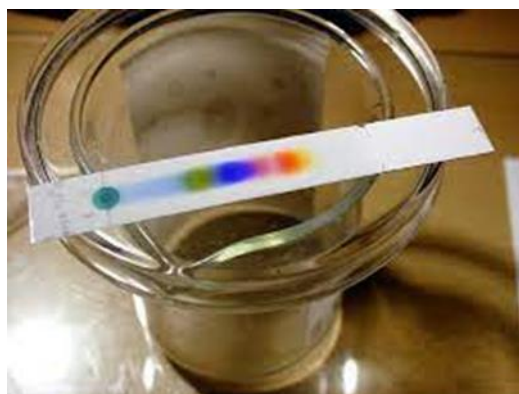
Το προς διαχωρισμό μείγμα τοποθετείται στην πλάκα με μικροσιφώνιο ή μικροσύριγγα (συνήθως 1-10 μL διαλύματος, δηλαδή περίπου 10-100 μg ουσίας) και αυτή στη συνέχεια στον θάλαμο ανάπτυξης (Εικόνες 8.4, 8.5, 8.6).



Εικόνα 8.4 Πορεία ανάπτυξης TLC χρωματογραφίας.



Εικόνα 8.5 Θάλαμος TLC χρωματογραφίας.



Εικόνα 8.6 TLC χρωματογράφημα.

Πλεονεκτήματα της TLC

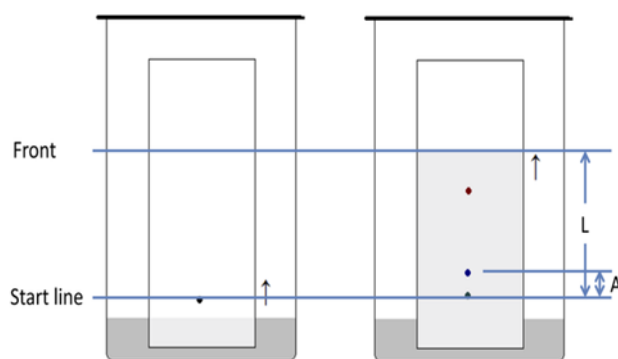
- Απλή στον χειρισμό.
- Ανιχνεύει και ταυτοποιεί ευαίσθητα συστατικά, χωρίς να δρα παρεμποδιστικά η κινητή φάση.
- Δίνει τη δυνατότητα ανάλυσης πολλών δειγμάτων στην ίδια πλάκα.
- Μειώνει το κόστος ανάλυσης.
- Η ίδια πλάκα μπορεί να αναπτύσσεται σε περισσότερα συστήματα διαλυτών για καλύτερο διαχωρισμό συστατικών.

8.4 Ποιοτικός και ημιποσοτικός προσδιορισμός με TLC (Συντελεστής επιβράδυνσης, R_f) – 2D-TLC

Ο λόγος της απόστασης που έχει διανύσει μια ουσία προς την απόσταση που διένυσε το μέτωπο του διαλύτη αποτελεί τον συντελεστή R_f που είναι χαρακτηριστικός (συγκεκριμένος) για κάθε ουσία και για το συγκεκριμένο σύστημα στατικής – υγρής φάσης (Εικόνες 8.4, 8.7).

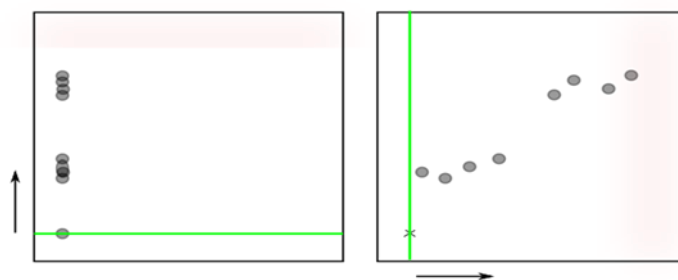
Οι παράγοντες που επηρεάζουν την τιμή R_f είναι:

- ο βαθμός ενεργότητας του προσροφητικού μέσου,
- η απόσταση που διανύει ο διαλύτης,
- το πάχος της στιβάδας,
- η ποσότητα της ουσίας που χρησιμοποιήθηκε,
- η ποιότητα του προσροφητικού υλικού και του διαλύτη,
- η θερμοκρασία και ο βαθμός κορεσμού σε ατμούς διαλύτη του θαλάμου ανάπτυξης.



Εικόνα 8.7 Υπολογισμός της τιμής του R_f .

Στην TLC χρωματογραφία μπορούμε να εφαρμόσουμε διαδοχική ανάπτυξη προς δύο διαστάσεις (2D-TLC). Αφού ολοκληρωθεί η ανάπτυξη σε ένα σύστημα και εξατμιστεί ο διαλύτης, η πλάκα στρέφεται 90° και ακολουθεί νέα ανάπτυξη στο ίδιο ή σε διαφορετικό σύστημα διαλυτών (Εικόνα 8.8).



Εικόνα 8.8 Χρωματογραφία 2 διαστάσεων (2D-TLC).

Όσον αφορά τον ποιοτικό προσδιορισμό με την TLC χρωματογραφία, στην περίπτωση που οι κηλίδες είναι έγχρωμες, δεν παρουσιάζει πρόβλημα η μέτρηση του R_f . Για τον εντοπισμό των άχρωμων κηλίδων χρησιμοποιούνται διάφορες μέθοδοι όπως:

- Θάλαμος ατμών Ιωδίου I_2 . Οι οργανικές ενώσεις αντιδρούν με τους ατμούς ιωδίου και η θέση των κηλίδων χρωματίζεται καφέ.
- Αντιδραστήρια παραγωγής χρώματος. Κατά τη μέθοδο αυτή η χρωματογραφική πλάκα ψεκάζεται με ειδικό αντιδραστήριο το οποίο προκαλεί τον σχηματισμό χρώματος.

- Λυχνία υπεριώδους. Εφαρμόζεται, όταν τα συστατικά του μείγματος φθορίζουν, όταν εκτεθούν σε υπεριώδη ακτινοβολία.

Ο ημιποσοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός γίνεται με τη χρήση ειδικού οργάνου το οποίο μετρά το εμβαδόν και την ένταση χρώματος της κηλίδας και το συγκρίνει με το εμβαδόν και την ένταση χρώματος κηλίδας γνωστής ποσότητας που χρησιμοποιείται ως μάρτυρας. Ένας άλλος τρόπος ποσοτικού προσδιορισμού είναι η εκχύλιση της ουσίας από την κηλίδα με κατάλληλο διαλύτη και ο προσδιορισμός της ουσίας στη συνέχεια με κατάλληλη μέθοδο.

8.5 Κλινικές εφαρμογές TLC

Η χρωματογραφία λεπτής στιβάδας έχει ευρύ πεδίο εφαρμογών που περιλαμβάνουν φαρμακευτικά προϊόντα, τρόφιμα, καλλυντικά και φυτοχημεία. Τα παραδοσιακά φάρμακα που βασίζονται σε φυτά και εκχυλίσματα φυτών χρησιμοποιούνται ευρέως σε πολλές χώρες. Ωστόσο, τα δραστικά συστατικά σε πολλά τέτοια φάρμακα είναι άγνωστα. Σε τέτοιες περιπτώσεις, μπορεί να πραγματοποιηθεί χρωματογραφία λεπτής στιβάδας σε φυτικά εκχυλίσματα για τον διαχωρισμό-πιστοποίηση των συστατικών τους. Διαφορετικά φυτά μπορούν να παράγουν διαφορετικούς μεταβολίτες. Μπορεί, επίσης, να χρησιμοποιηθεί για τη διαφοροποίηση της μεταβολικής κατάστασης ενός φυτού με βάση τη θέση του και τις συνθήκες περιβάλλοντος.

Η TLC μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον έλεγχο της καθαρότητας ενός δείγματος, όπου η ανάλυση μιας ένωσης μπορεί να πραγματοποιηθεί παράλληλα με μια ανάλυση control. Η παρουσία παραπροϊόντων μπορεί να ανιχνευτεί με την παρουσία επιπλέον κηλίδων στην πλάκα.

Μελέτες σταθερότητας απαιτούνται για τη χορήγηση φαρμάκων, όταν πρέπει να ελεγχθεί η σταθερότητα ή η γήρανση των αποθηκευμένων φαρμάκων. Η TLC μπορεί να είναι ιδιαίτερα χρήσιμη σε τέτοιες δοκιμές, καθώς τα αποτελέσματα μπορούν να απεικονιστούν εύκολα και οποιαδήποτε αλλαγή στον αριθμό των κηλίδων μπορεί να υποδηλώνει αλλαγές στη χημική φύση και σταθερότητα ενός φαρμάκου. Επίσης, η TLC χρησιμοποιείται συχνά για τη σύγκριση και τον χαρακτηρισμό των ενώσεων και των μεταβολιτών από το αίμα, τον ορό, τα υγρά του σώματος και τα ούρα.

Μπορεί, επίσης, να χρησιμοποιηθεί σε ιατροδικαστικές μελέτες, όπου τα σωματικά υγρά, όπως σίελος, ιδρώτας, ούρα και αίμα μπορούν να ελεγχθούν για την πιθανή παρουσία φαρμάκων. Τα όξινα και ουδέτερα φάρμακα μπορούν να αναγνωριστούν με τη χρήση οκταδεκυλοπυριτίου στη στατική φάση, ενώ η απλή πυριτία και η οκταδεκυλοπυριτία μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον προσδιορισμό βασικών φαρμάκων.

Η TLC, τέλος, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη μελέτη της πορείας μιας χημικής αντίδρασης στη χημική σύνθεση. Στην αρχή μιας αντίδρασης, ολόκληρη η κηλίδα καταλαμβάνεται από το υλικό έναρξης. Κατά τη διάρκεια της εξέλιξης της αντίδρασης, η κηλίδα της πρώτης ύλης μειώνεται συνεχώς, ενώ η κηλίδα των προϊόντων συνεχίζει να αυξάνεται. Στο τέλος της αντίδρασης, η κηλίδα της πρώτης ύλης έχει σχεδόν εξαφανιστεί και μόνο η κηλίδα του προϊόντος μπορεί να φανεί στην πλάκα. Έτσι, η πλήρης απουσία ή ίχνη του σημείου εκκίνησης μπορεί να σηματοδοτήσουν το τέλος μιας αντίδρασης.

8.6. Υγρή χρωματογραφία υψηλής ανάπτυξης (HPLC)

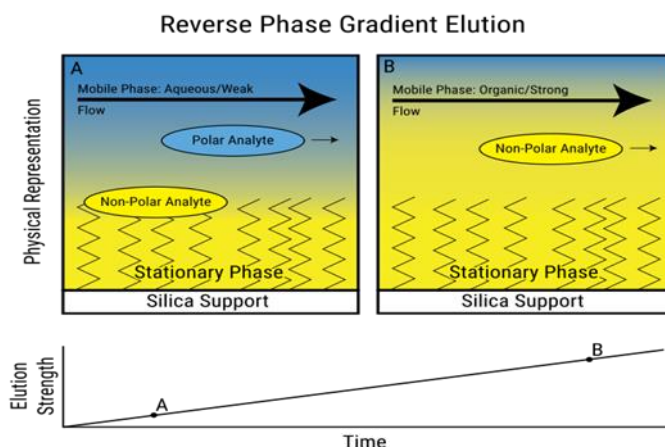
Η ανάπτυξη της θεωρίας της ταχύτητας, που έγινε κυρίως με τη βοήθεια της αέριας χρωματογραφίας, οδήγησε στην ανάπτυξη της τεχνικής και των συστημάτων για υγρή χρωματογραφία υψηλής ανάπτυξης (HPLC), η οποία επιτρέπει αποδοτικούς διαχωρισμούς και μετρήσεις σε λίγα λεπτά.

Η μεγαλύτερη απόδοση στην υγρή χρωματογραφία επιτυγχάνεται με χαμηλές ταχύτητες ροής, που συνεπάγονται μεγάλη διάρκεια διαχωρισμού, με την εφαρμογή υψηλής πίεσης και τη χρήση μικρότερων σωματιδίων ως υλικών πλήρωσης της στήλης. Το εύρος ροής στην υγρή χρωματογραφία είναι από 0,5 έως 5 mL/min και επιτυγχάνεται με αντλίες οι οποίες λειτουργούν σε πιέσεις 300-7500 psi. Οι συνηθισμένες στήλες με υλικό πλήρωσης 5 μm λειτουργούν με ροή 1 mL/min και πιέσεις 1000-2000 psi. Η έκλουση γίνεται είτε ισοκρατικά, όπου η σύσταση της κινητής φάσης δεν μεταβάλλεται κατά τη διάρκεια της ανάλυσης είτε βαθμιδωτά (gradient), όπου η ισχύς της κινητής φάσης μεταβάλλεται επιτυγχάνοντας καλύτερο διαχωρισμό.

Όταν το δείγμα περιέχει πολλά συστατικά, είναι δύσκολο να διαχωριστεί με την ισοκρατική έκλουση, ενώ παράλληλα τα συστατικά του δείγματος τα οποία συγκρατούνται ισχυρά από τη στήλη, εκλούνται πολύ αργά με αποτέλεσμα τη διεύρυνση των χρωματογραφικών κορυφών τους. Με τη βαθμιδωτή έκλουση γίνεται ανάμειξη ενός δείγματος με έναν ισχυρό διαλύτη σε ποσοστά που μπορεί να μεταβάλλονται με τον χρόνο, με

την περιεκτικότητα του ισχυρού διαλύτη διαρκώς αυξανόμενη. Έτσι, διαχωρίζονται στην αρχή οι ουσίες που έχουν μικρό χρόνο συγκράτησης στη στήλη και με την αύξηση της ισχύος εκλούνται καλύτερα και όσες συγκρατούνται για περισσότερο χρόνο.

Η κινητή φάση είναι μείγμα δύο ή περισσότερων διαλυτών (συνήθως μέχρι 4) με ή χωρίς προσθήκη πρόσθετων ουσιών (π.χ. ρυθμιστικά διαλύματα). Οι παράμετροι για την επιλογή των κατάλληλων διαλυτών είναι η πολικότητά τους και η εκλεκτικότητα. Η επιλογή της κινητής φάσης γίνεται έτσι ώστε να διαφέρει η πολικότητά της από αυτή της στατικής φάσης, ώστε να υπάρχει ικανοποιητικός διαχωρισμός στα συστατικά του δείγματος που αναλύεται. Στη χρωματογραφία κανονικής φάσης, η ισχύς της κινητής φάσης αυξάνεται με την αύξηση της πολικότητάς της, ενώ στη χρωματογραφία ανάστροφης φάσης (reversed phase) συμβαίνει το αντίθετο. Η εκλεκτικότητα του διαλύτη εξαρτάται από την ικανότητά του να δρα ως πρωτονιοδέκτης, πρωτονιοδότης ή με ισχυρές διπολικές ροπές σε σχέση με τις διάφορες ουσίες (Εικόνα 8.9).



Εικόνα 8.9 Διαχωρισμός πολικών-μη πολικών ενώσεων σε βαθμιδωτή αντίστροφης φάσης χρωματογραφία.

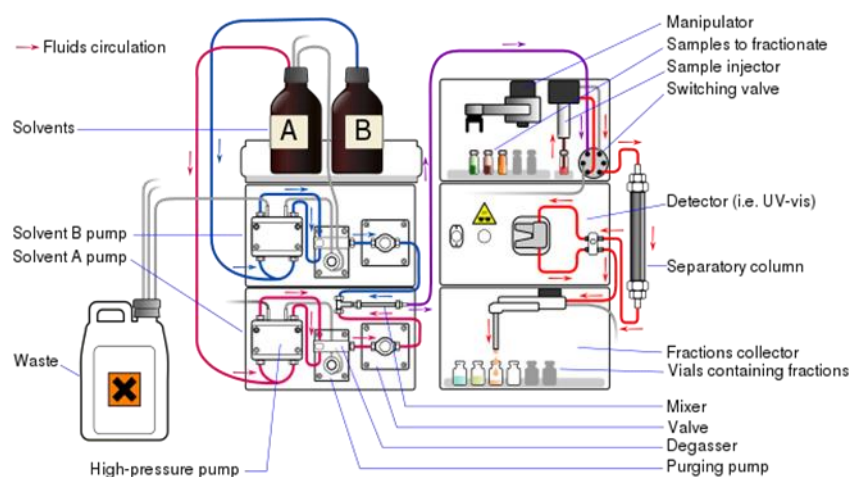
Γενικά, υπάρχουν τρεις τύποι σωματιδίων τα οποία χρησιμοποιούνται ως πληρωτικά υλικά στην HPLC:

- Τα μικροπορώδη σωματίδια (microporous particles), με διάμετρο 5 – 10 μm και σχετικά μικρούς μοριακούς πόρους, που επιτρέπουν τη διόδο και επομένως την αλληλεπίδραση με τη στατική φάση μόνο μικρού μεγέθους συστατικών.
- Τα μακροπορώδη σωματίδια (macroporous particles), τα οποία διαθέτουν εκτός από τους μικρούς μοριακούς πόρους και μεγάλους πόρους (διαμέτρου > 60 μm), που επιτρέπουν τη διόδο τόσο των μικρών όσο και των μεγάλων συστατικών.
- Υμενοειδή σωματίδια (pellicular particles), διαμέτρου 35 – 45 μm, τα οποία διαθέτουν έναν αδρανή πυρήνα καλυμμένο από έναν υμένα υγρής στατικής φάσεως. Εμπορικές μορφές αυτού του τύπου πληρωματικού υλικού είναι τα Zipax, Corasil I και II, Vydac, Perisorb κλπ. Τα υμενοειδή σωματίδια επιτυγχάνουν υψηλή διαχωριστικότητα, αλλά έχουν μικρή χωρητικότητα, και έτσι πρέπει να χρησιμοποιούνται με μικρούς όγκους δείγματος και ανιχνευτές υψηλής ευαισθησίας.

Για την επίτευξη ταχύτερων και αποδοτικότερων διαχωρισμών με τη χρησιμοποίηση λεπτότατα διαμερισμένου πληρωτικού υλικού στηλών, απαιτείται υψηλή πίεση και ειδικές συσκευές για την επίτευξη και αντιμετώπισή της. Έτσι, απαιτούνται συνήθως πιέσεις 7 – 35 MPa (MegaPascal, 1 atm = 101.325 Pa), δηλαδή απαιτούνται 70 – 350 atm, για να επιτευχθεί ταχύτητα ροής 0,5 – 5 mL/min, σε στήλες διαμέτρου 1 – 5 mm και μήκους 10 – 50 cm, ενώ σε ορισμένες περιπτώσεις απαιτούνται πιέσεις μέχρι και 41 MPa. Μια άλλη μονάδα πίεσης που χρησιμοποιείται στην HPLC είναι η psi (pounds per square inch, 1 psi = 0,068 atm = 6,890 Pa). Το 80 – 90% των διαχωρισμών με HPLC γίνεται δυνατό με πιέσεις μικρότερες των 8.3 MPa (1200 psi). Μερικά νέα υλικά πληρώσεως στηλών (πολυουρεθάνες) απαιτούν πολύ χαμηλές πιέσεις.

Μία συσκευή HPLC αποτελείται από πέντε βασικά τμήματα (Σχήμα 8.9):

- **Περιέκτες διαλυτών:** Οι διαλύτες που θα αποτελέσουν την κινητή φάση βρίσκονται αποθηκευμένοι σε ειδικές φιάλες. Η κινητή φάση είναι απαραίτητη για τη μεταφορά των δειγμάτων μέσα από το σύστημα της υγρής χρωματογραφίας.
- **Απαερωτής κενού:** Ο απαερωτής εξασφαλίζει την απαέρωση της κινητής φάσης, ώστε να είναι εφικτός ο έλεγχος της πίεσης στη χρωματογραφική στήλη.
- **Αντλία (pump):** Η αντλία εξασφαλίζει τη συνεχή άντληση και προώθηση της κινητής φάσης διαμέσου του συνόλου του συστήματος από τους περιέκτες των διαλυτών μέχρι το δοχείο συλλογής των αποβλήτων του συστήματος, υπό ρυθμιζόμενη υψηλή πίεση και ροή.
- **Σύστημα εισαγωγής δείγματος (injection system/ injector valve):** Περιλαμβάνει βρόγχο σταθερού όγκου ή αυτόματο σύστημα εισαγωγής, μεταβλητού (προεπιλεγμένου) όγκου έγχυσης. Βρίσκεται πριν τη χρωματογραφική στήλη και επιτρέπει την εισαγωγή του δείγματος στη ροή της κινητής φάσης.
- **Χρωματογραφική στήλη (column):** Στη στήλη επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός του μείγματος στα συστατικά του. Εφόσον ο διαχωρισμός επηρεάζεται και από τη θερμοκρασία, η στήλη εμπεριέχεται σε θερμοστατούμενο κλίβανο (column oven).
- **Ανιχνευτής (detector):** Η ανίχνευση των ουσιών που εξέρχονται της στήλης γίνεται συνεχώς, κυρίως με φασματομετρία UV/Vis, όπου το παραγόμενο από τον ανιχνευτή φως προσπίπτει σε κυψελίδα συνεχούς ροής από χαλαζία και μετριέται η απορρόφηση του φωτός (Εικόνες 8.10, 8.11).



Εικόνα 8.10 Οργανολογία της HPLC.

Ο ανιχνευτής στην HPLC (όπως και στην GC) είναι κρίσιμο τμήμα του συστήματος, γιατί κάνει ορατό τον διαχωρισμό που γίνεται στη στήλη και επιτρέπει την αξιοποίησή του στην ανάλυση. Ένας ιδανικός ανιχνευτής HPLC πρέπει να έχει τα εξής χαρακτηριστικά:

- Να ανταποκρίνεται σε όλα τα συστατικά του μείγματος (γενικός ανιχνευτής) ή να έχει γνωστή εκλεκτικότητα αποκρίσεως (ειδικός ανιχνευτής).
- Να επιτρέπει χαμηλά όρια ανιχνεύσεως στην περιοχή των ng – μg.
- Να μην αποκρίνεται στην κινητή φάση.
- Να παρέχει γραμμική απόκριση στην περιοχή συγκεντρώσεων των διαχωριζόμενων συστατικών, ώστε να μπορεί να χρησιμοποιηθεί στην ποσοτική ανάλυση.
- Να μην επηρεάζεται από μεταβολές της θερμοκρασίας και της ταχύτητας ροής του υγρού έκλουσης
- Να έχει αμελητέο νεκρό όγκο, ώστε να μη συμμετέχει στη διεύρυνση της ζώνης κάθε συστατικού και κατά συνέπεια της κορυφής του.

Αν και κανένας ανιχνευτής δεν διαθέτει όλα τα παραπάνω χαρακτηριστικά, χρησιμοποιείται ένας μεγάλος αριθμός ανιχνευτών, οι κυριότεροι από τους οποίους αναφέρονται παρακάτω:

- ανιχνευτές ορατού-υπεριώδους (UV/Vis Detector),
- ανιχνευτές συστοιχίας φωτοδιόδων (Diode Array Detector, DAD),
- αγωγιμομετρικοί ανιχνευτές (Conductivity Detector),
- ανιχνευτές δείκτη διάθλασης (Refractive Index Detector)
- φασματογράφοι μάζας MS (Mass Spectroscopy Detector, MS Detector),
- ανιχνευτής Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (Nuclear Magnetic Resonance, NMR Detector),
- ηλεκτροχημικοί ανιχνευτές (Electrochemical Detector),
- φθορισμομετρικοί ανιχνευτές (Fluorescence Detector).

Η συνδυασμένη τεχνική υγρής χρωματογραφίας – φασματομετρίας μαζών (LC- MS) χαρακτηρίζεται από εξαιρετική ευαισθησία, εκλεκτικότητα και αξιοπιστία.



Εικόνα 8.11 Σύγχρονη συσκευή HPLC.

Ευθύγραμμοι σωλήνες από χάλυβα αποτελούν ιδανικές στήλες για την HPLC. Η πλήρωση τέτοιων στηλών είναι πολύ δύσκολο να γίνει από τον αναλυτή και γι' αυτό συνήθως οι στήλες αγοράζονται έτοιμες από το εμπόριο. Σχετικά με την επιλογή του καταλληλότερου στήλης-κινητής φάσεως, ισχύουν οι κάτωθι γενικοί κανόνες:

- Συνήθως δεν απαιτείται θερμοστάτηση της στήλης στην υγρή-στερεή χρωματογραφία προσροφήσεως, αλλά πολλές φορές αυτό είναι απαραίτητο σε άλλους τύπους υγρής-υγρής χρωματογραφίας.
- Για την αποφυγή συχνής αλλαγής στήλης, όταν εκτελούνται διάφορες αναλυτικές μέθοδοι με το ίδιο σύστημα HPLC, μπορεί να χρησιμοποιηθεί μια συσκευή που αποτελείται από μια περιστρεφόμενη βαλβίδα έξι διαύλων, στους οποίους μπορούν να συνδεθούν ισάριθμες διαφορετικές στήλες.
- Επειδή η κινητή φάση μπορεί να διαλύει μερικώς την υγρή στατική φάση, με αποτέλεσμα τη βαθμιαία καταστροφή της, συνήθως παρεμβάλλεται μια μικρή στήλη πριν από την κύρια στήλη, πληρωμένη με το ίδιο υλικό (προστήλη). Έτσι η κινητή φάση φτάνει στην κύρια στήλη κορεσμένη με την υγρή στατική φάση. Η προστήλη επίσης προστατεύει την κύρια στήλη από ουσίες που προσροφούνται μη αντιστρεπτά.

Υπάρχουν δύο παραλλαγές της χρήσης της HPLC που σχετίζονται με την πολικότητα του διαλύτη και τη στατική φάση:

- Χρωματογραφία κανονικής φάσης (normal phase). Η στατική φάση είναι πολικότερη από την κινητή, η οποία αποτελείται από μη πολικούς διαλύτες όπως εξάνιο, χλωροφόρμιο.
- Χρωματογραφία αντίστροφης φάσης (reversed phase). Η στατική φάση, η οποία είναι λιγότερο πολική της κινητής, αποτελείται από οξείδιο πυριτίου (SiO_2) συζευγμένο με διάφορες ομάδες

όπως αλκύλια (ακετύλιο, δεκαοκτύλιο), φαινύλιο, διόλες, αμινομάδες, κυανομάδες, ενώ η κινητή φάση αποτελείται από μείγματα οργανικών διαλυτών (μεθανόλη, ακετονιτρίλιο) με υδατικά ρυθμιστικά διαλύματα και νερό (Εικόνα 8.9).

Χρόνος κατακράτησης ή χρόνος ανάσχεσης, t_R

Ο χρόνος κατακράτησης (retention time, t_R), είναι ο χρόνος που απαιτείται, ώστε μία συγκεκριμένη ουσία να διασχίσει τη στήλη μέχρι τον ανιχνευτή. Η εκκίνηση μέτρησης του χρόνου κατακράτησης γίνεται τη στιγμή που το δείγμα εισάγεται με μικροσύριγγα στη στήλη. Το χρονικό διάστημα μετά την εισαγωγή της και μέχρι το μέγιστο της κορυφής έκλουσης μιας ουσίας ονομάζεται *χρόνος κατακράτησης* (Εικόνα 8.12). Ο χρόνος κατακράτησης αποτελεί χαρακτηριστική σταθερά μιας ουσίας, υπό αυστηρά καθορισμένες πειραματικές συνθήκες. Έτσι, για μία συγκεκριμένη ουσία ο χρόνος κατακράτησης καθορίζεται από: την πίεση που ασκείται στη στήλη (η οποία με τη σειρά της καθορίζει την ταχύτητα ροής της κινητής φάσης), τη φύση της στατικής φάσης (υλικό πληρώσεως και μέγεθος σωματιδίων αυτού), την ακριβή σύσταση της κινητής φάσης (διότι η σύσταση καθορίζει τον συντελεστή κατανομής μεταξύ κινητής και στατικής φάσης), τη θερμοκρασία της στήλης (αφού ο συντελεστής κατανομής εξαρτάται από τη θερμοκρασία του διαχωρισμού).

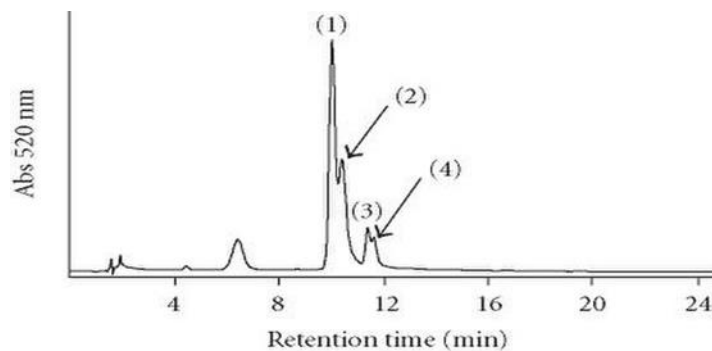
Ο χρόνος παραμονής των μορίων του δείγματος στην κινητή φάση είναι ο ίδιος για όλα τα συστατικά του δείγματος και ονομάζεται *νεκρός χρόνος*, t_0 . Ο νεκρός χρόνος είναι ο χρόνος που απαιτείται για ένα μη κατακρατούμενο από τη στατική φάση συστατικό να περάσει από τη στήλη. Η ταχύτητα μετανάστευσης της μη κατακρατούμενης ουσίας είναι ίση προς τη μέση ταχύτητα των μορίων της κινητής φάσης. Σε ένα χρωματογράφημα, όπως αυτό της Εικόνας 8.12, ένα μη κατακρατούμενο από τη στατική φάση συστατικό φαίνεται ως μία κορυφή, που εξέρχεται πολύ σύντομα μετά την ένεση του δείγματος. Είναι προφανές ότι ο καθαρός χρόνος παραμονής ενός συστατικού στη στατική φάση για ένα συστατικό που αλληλεπιδρά με αυτήν (ανηγμένος χρόνος ανάσχεσης (t_R')) ισούται με τη διαφορά του χρόνου κατακράτησης και του νεκρού χρόνου, δηλαδή:

$$t_R' = t_R - t_0 \quad (8.1)$$

Συντελεστής κατακράτησης ή παράγοντας κατακράτησης (k')

Αποτελεί το μέτρο ανάσχεσης μιας ουσίας από τη στήλη. Αποτελεί ποσοτικό μέτρο της τάσης ενός συγκεκριμένου είδους μορίων να προσροφάται στη στατική φάση. Η χαμηλή τιμή k' δείχνει ότι η ουσία σχεδόν δεν συμμετέχει στη χρωματογραφική διαδικασία, ενώ η υψηλή τιμή k' δείχνει καλό διαχωρισμό αλλά επιβάρυνση της ανάλυσης. Ιδανικά το k' κυμαίνεται από 2-10. Χρησιμοποιείται πολλές φορές αντί του χρόνου ανάσχεσης, διότι εξαρτάται λιγότερο από τις πειραματικές συνθήκες της ανάλυσης. Ισχύει δε:

$$k' = \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad (8.2)$$



(a)

Εικόνα 8.12 Χρόνος κατακράτησης.

Εύρος κορυφής (peak width), W

Η κάθε κορυφή που καταγράφεται από τον ανιχνευτή έχει ένα συγκεκριμένο εύρος, που καλείται *εύρος κορυφής* (peak width ή W). Το εύρος της κορυφής υπολογίζεται γραφικά, όταν οι κορυφές αποδοθούν κατά προσέγγιση ως τρίγωνα.

Διαχωριστική ικανότητα στήλης (Resolution), Rs

Η διαχωριστική ικανότητα (resolution), Rs, αποτελεί ποσοτικό μέτρο της ικανότητας μιας στήλης να διαχωρίσει δύο προσδιοριζόμενες ουσίες (που αναλύονται με ένα συγκεκριμένο πρωτόκολλο). Δύο ουσίες θεωρείται ότι διαχωρίζονται πλήρως, όταν το Rs είναι ίσο τουλάχιστον με 1,5.

Υπολογίζεται από τη σχέση:

$$R_s = \frac{t_{R2} - t_{R1}}{0,5 (W_2 + W_1)} \quad (8.3)$$

όπου,

t_{R2} είναι ο χρόνος κατακράτησης μιας ουσίας και t_{R1} ο χρόνος κατακράτησης της ουσίας που εκλύεται αμέσως πριν στο χρωματογράφημα,

W_2 και W_1 είναι το εύρος της αντίστοιχης κορυφής (προπορευόμενης και επακόλουθης) στη βάση της κορυφής.

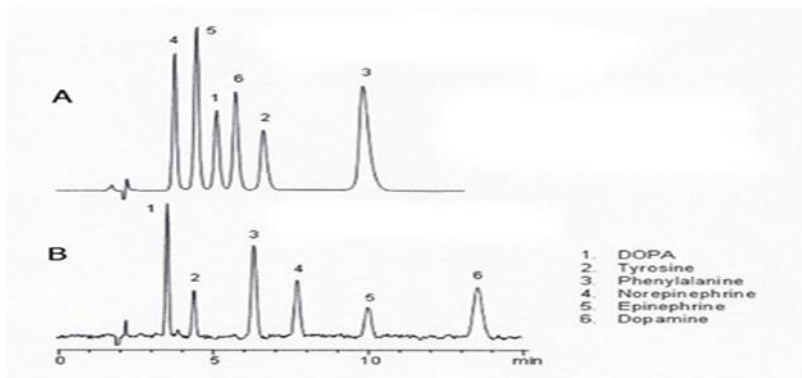
8.6.1 Ποιοτικές και ποσοτικές πληροφορίες χρωματογραφήματος

- Ποιοτικές πληροφορίες: Ο χρόνος συγκράτησης μιας ουσίας και ο παράγοντας συγκράτησης k' , είναι πάντα σταθερός κάτω από τις ίδιες χρωματογραφικές συνθήκες (φύση της κινητής και της στατικής φάσης, θερμοκρασία της στήλης). Με αυτό τον τρόπο παρέχεται η δυνατότητα ταυτοποίησης ουσιών μέσω σύγκρισης του k' της άγνωστης ουσίας με το k' ουσίας αναφοράς. Η ποιοτική ανάλυση συμπληρώνεται με επιπλέον στοιχεία (φάσματα UV-Vis, IR, NMR, MS).
- Ποσοτικές πληροφορίες: Η επιφάνεια μιας χρωματογραφικής κορυφής (εύρος κορυφής) είναι ανάλογη της ποσότητας της ουσίας, με αποτέλεσμα να παρέχεται η δυνατότητα ποσοτικού προσδιορισμού με βάση την επιφάνεια της κορυφής. Το ύψος της κορυφής επηρεάζεται από παραμέτρους όπως η θερμοκρασία, το εύρος κορυφής, τη ροή κινητής φάσης και την ταχύτητα έγχυσης.
- Με τη σύγχρονη τεχνική HPLC ένας μεγάλος αριθμός ενώσεων και νόσων είναι δυνατόν σήμερα να προσδιοριστεί σε βιολογικά υγρά, όπως:
 - βιογενείς αμίνες, κατεχολαμίνες (αδρεναλίνη, νοραδρεναλίνη, ντοπαμίνη) σεροτονίνη και μεταβολίτες,
 - αμινοξέα,
 - υδατάνθρακες (γαλακτόζη, ξυλόζη στα ούρα),
 - νόσοι: Πορφυρίνες (διάγνωση πορφυριών, όπως Βραδεία Δερματική Πορφυρία (PCT), Συγγενής Ερυθροποιητική Πορφυρία [CEP], Ηπατοερυθροποιητική Πορφυρία [HEP] και Ερυθροποιητική Πρωτοπορφυρία [EPP]),
 - βιταμίνες,
 - φάρμακα.

8.6.2 Παράδειγμα εφαρμογής

Στα χρωματογραφήματα που ακολουθούν, φαίνεται ο διαχωρισμός μείγματος αμινοξέων και κατεχολαμινών, με τη χρήση υδρόφοβης και ιονοανταλλακτικής στήλης, διαστάσεων 150 x 4,6 mm. Ο ποσοτικός προσδιορισμός επιτυγχάνεται με τη χρήση εσωτερικού προτύπου (internal standard) και τον υπολογισμό (ολοκλήρωση) του εμβαδού των κορυφών (peak area). Η πιστοποίηση των ενώσεων έγινε στο UV, 250 nm. Στο χρωματογράφημα Α (Σχήμα 8.1) η κινητή φάση αποτελείται από μείγμα νερού: ακετονιτρίλιου (ACN): τριφθοροξικού οξέος (TFA) 90:10:0.1.

Στο χρωματογράφημα Β η προσθήκη στην κινητή φάση φορμικού αμμωνίου (15 mM), αντί του TFA μετέβαλε σημαντικά τόσο τη σειρά όσο και τον χρόνο κατακράτησης των συστατικών. Η ροή ήταν 1.0 mL/min.

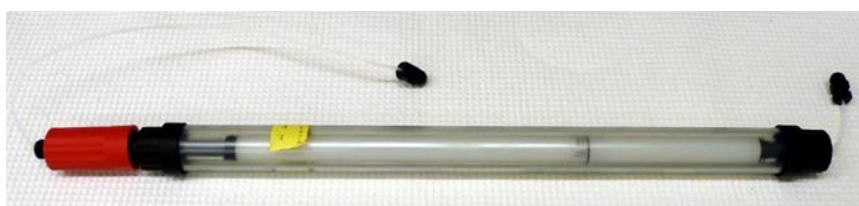


Σχήμα 8.1 Διαχωρισμός μείγματος αμινοξέων και κατεχολαμινών με αλλαγή της σύστασης της κινητής φάσης.

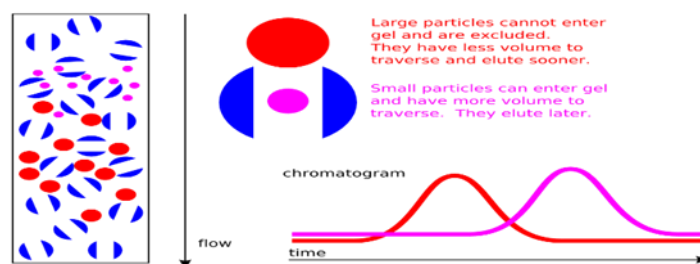
8.7 Χρωματογραφία μοριακής διήθησης

Η χρωματογραφία μοριακή διήθησης ή χρωματογραφία διήθησης σε πηκτή (gel filtration chromatography) αναφέρεται και ως μοριακό κοσκίνισμα (molecular sieving) ή και ως χρωματογραφία μοριακής διάχυσης ή χρωματογραφία διάχυσης σε πηκτή (gel permeation chromatography). Λόγω του μηχανισμού της χρωματογραφίας αυτής, οι δύο προηγούμενες σχεδόν ίδιες τεχνικές αναφέρονται ως χρωματογραφία μοριακής απόκλισης (size exclusion chromatography ή SEC) ή και απλούστερα ως χρωματογραφία πηκτής (gel chromatography).

Ο πρωταρχικός σκοπός της χρωματογραφίας μοριακής διήθησης είναι ο ταχύς διαχωρισμός μορίων ανάλογα με το μέγεθος. Η χρωματογραφία μοριακής διήθησης είναι μια χρωματογραφία στήλης με στερεή στατική φάση (gel) και υγρή κινητή φάση (υδατικό ή άλλο διάλυμα οργανικής ουσίας) (Εικόνα 8.13). Ο διαχωρισμός ενώσεων με μεγάλο μοριακό βάρος γίνεται κυρίως σε στήλες που έχουν ως υλικό πλήρωσης διάφορα gels (πηκτές). Συνήθως στη χρωματογραφία μοριακής διήθησης χρησιμοποιούνται υδατικά διαλύματα, ενώ η προσρόφηση και τα ηλεκτρικά φορτία παίζουν σπουδαίο ρόλο σε αυτούς τους διαχωρισμούς.



Εικόνα 8.13 Στήλη που χρησιμοποιείται στη χρωματογραφία μοριακής διήθησης.



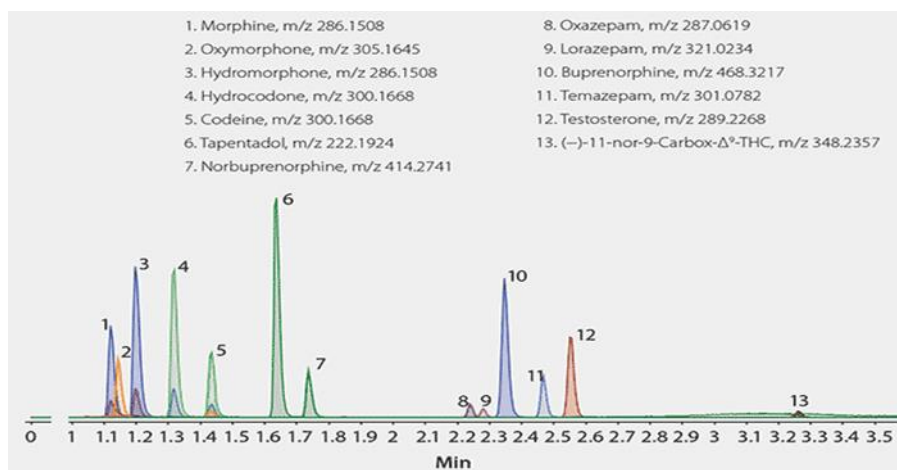
Εικόνα 8.14 Αρχή λειτουργίας της χρωματογραφίας μοριακής διήθησης.

8.7.1 Εφαρμογές της χρωματογραφίας διήθησης σε πηκτή

- Διαχωρίζει τις πρωτεΐνες σύμφωνα με το μέγεθός τους. Το υπόστρωμα διήθησης σε πηκτή διαθέτει πόρους που επιτρέπουν στο ρυθμιστικό διάλυμα και τις μικρότερες πρωτεΐνες να εισαχθούν σε αυτούς, αλλά αποκλείουν μεγαλύτερες πρωτεΐνες και σύμπλοκα ή πολυμερή πρωτεϊνών. Ωστόσο, οι μεγαλύτερες πρωτεΐνες μετακινούνται μεταξύ και γύρω από τα τεμάχια-κόκκους του υλικού του υποστρώματος και εξάγονται από τη στήλη πριν από τις μικρότερες πρωτεΐνες, που καθυστερούν διανύοντας δαιδαλώδεις διαδρομές στο εσωτερικό της στήλης (Εικόνα 8.14).
- Μπορεί να παρέχει μια εκτίμηση για το μοριακό βάρος της πρωτεΐνης, αφού οι πρωτεΐνες περνούν μέσα από τη στήλη χωρίς να αλληλεπιδρούν με το υπόστρωμα. Όμως, κάθε εκτίμηση του μοριακού βάρους βασίζεται στην υπόθεση ότι η πρωτεΐνη είναι σφαιρική. Η επεξεργασία του δείγματος με υδροχλωρική γουανιδίνη ή ουρία πριν τη χρωματογραφία αποδιατάσσει την πρωτεΐνη και απαλείφει τον παράγοντα της πρωτεϊνικής δομής.
- Αφαίρεση ανεπιθύμητων προσμίξεων χαμηλού μοριακού βάρους.
- Αντικατάσταση του ρυθμιστικού διαλύματος μιας πρωτεΐνης, που χρησιμοποιείται για την «αφαλάτωση» μιας πρωτεΐνης: μια πρωτεΐνη σε ρυθμιστικό διάλυμα υψηλού ιοντικού σθένους επαναδιαλύεται σε διαφορετικό ρυθμιστικό διάλυμα χαμηλού ιοντικού σθένους.
- Μελέτη των προσδετών της πρωτεΐνης.

8.8 Υγρή Χρωματογραφία Υπερυψηλής Απόδοσης (UPLC)

Η νεότερη και βελτιωμένη Υγρή Χρωματογραφία Υπερυψηλής Απόδοσης, (Ultra-Performance Liquid Chromatography ή UPLC) παρέχει μία ακριβή, επαναλήψιμη και ανθεκτική μέθοδο τόσο για την ποιοτική, όσο και για την ποσοτική ανάλυση των φαρμακευτικών προϊόντων στη Βιομηχανία-Κρατικούς φορείς ελέγχου, αλλά και τις φαρμακοκινητικές/πρωτεωμικές μελέτες μεταβολιτών των φαρμάκων και άλλων ενδογενών ενώσεων, σε βιολογικά υγρά. (Εικόνα 8.15).



Εικόνα 8.15 UPLC-MS φαρμάκων και μεταβολιτών στα ούρα.

Ειδικές αναλυτικές στήλες UPLC πακετάρονται με μικρότερα πλέον σωματίδια, της τάξης μεγέθους 1,7-1,8 μm , ενώ παράλληλα προσφέρει κινητή φάση σε πιέσεις μεγαλύτερες από αυτές της HPLC, μέχρι 1030 bar (15.000 psi), παρέχοντας έτσι ένα νέο επίπεδο απόδοσης της υγρής χρωματογραφίας.

Το σύστημα UPLC επιτρέπει μείωση του χρόνου ανάλυσης μέχρι και εννέα φορές σε σύγκριση με το συμβατικό σύστημα χρησιμοποιώντας σωματίδια μεγέθους 5 μm σε πακεταρισμένες στήλες (Εικόνα 8.16).



Εικόνα 8.16 Στήλη χρωματογραφίας που τοποθετείται σε συσκευή UPLC.

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟ ΜΕΡΟΣ

8.9 Εργαστηριακή άσκηση: Πιστοποίηση αμινοξέων με TLC

Ο διαχωρισμός των αμινοξέων οφείλεται στη διαφορετική ταχύτητα κίνησής τους διαμέσου της ακίνητης φάσης. Καθώς ο διαλύτης κινείται λόγω τριχοειδών φαινομένων πάνω στο πλακίδιο, τα αμινοξέα συμπαράσύρονται με διαφορετική ταχύτητα. Συγκεκριμένα, τα αμινοξέα τα οποία συγκρατούνται ισχυρότερα από την ακίνητη φάση, κινούνται αργά κατά τη ροή της κινητής φάσης. Αντίθετα, τα αμινοξέα τα οποία συγκρατούνται ασθενέστερα από την ακίνητη φάση, κινούνται ταχύτερα.

8.9.1 Εργαστηριακή άσκηση 1

Σε μικρούς δοκιμαστικούς σωλήνες ετοιμάζονται τα δείγματα Α, Β, Γ και Δ με διάλυση 1 mg αμινοξέος σε 1 mL νερό.

Α: διάλυμα γλυκίνης ($\text{H}_2\text{NCH}_2\text{COOH}$).

Β: διάλυμα αλανίνης ($\text{CH}_3\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$).

Γ: διάλυμα φαινυλαλανίνης ($\text{PhCH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$).

Δ: μείγμα με δύο από τα παραπάνω αμινοξέα.

Στην πλάκα χρωματογραφίας σημειώνονται με μολύβι:

- η γραμμή εκκίνησης (γραμμή παράλληλη προς τη βάση της πλάκας και σε απόσταση 1cm περίπου από τη βάση).
- οι θέσεις τοποθέτησης των δειγμάτων (κηλίδες), οι οποίες θα πρέπει να απέχουν από τα άκρα της πλάκας και μεταξύ τους 1,5-2 cm. Με τριχοειδές σωληνάκι τοποθετούνται τα δείγματα πάνω στο πλακίδιο υπό μορφή κηλίδας διαμέτρου μικρότερης των 5 mm.
- Μόλις ξηρανθούν οι κηλίδες, η πλάκα τοποθετείται με προσοχή στον θάλαμο ανάπτυξης, όπου υπάρχει το υγρό ανάπτυξης (κινητή φάση) μείγμα αιθανόλης - νερού 8:2 (v/v). Το υγρό ανάπτυξης δεν πρέπει να διαβρέχει τη θέση που τοποθετήθηκε η κηλίδα του δείγματος.
- Μόλις το μέτωπο του διαλύτη φθάσει σε ύψος 2/3, η πλάκα απομακρύνεται από τον θάλαμο ανάπτυξης, σημειώνεται το μέτωπο του διαλύτη και ξηραίνεται στο πυριαντήριο στους 1000°C.
- Για την εμφάνιση του χρωματογραφήματος η πλάκα ψεκάζεται με διάλυμα νυνιδρίνης (χημικός τρόπος) και τοποθετείται στο πυριαντήριο στους 1000°C για 5 λεπτά. Τα αμινοξέα αντιδρούν με το διάλυμα νινυδρίνης και δίνουν έγχρωμα (βιολετί) παράγωγα και ανιχνεύονται.
- Σημειώνονται οι κηλίδες και υπολογίζονται τα R_f των αμινοξέων Α, Β, Γ και του μείγματος Δ.

Παρατηρήσεις.....

8.9.2 Εργαστηριακή άσκηση 2

Για την πιστοποίηση των κηλίδων (αμινοξέων) μπορεί να χρησιμοποιηθεί το αντιδραστήριο της νινυδρίνης. Τα αμινοξέα είναι αρκετά πολικά και τείνουν να κινηθούν στην πλάκα πηκτωμάτων πυριτίου (silica gel) με πολικούς διαλύτες. Έχουν τιμές Rf κοντά στο 1, όταν χρησιμοποιείται το νερό ή πυκνή αμμωνία ως διαλύτης ανάπτυξης. Η αραίωση ενός πολικού διαλύτη με λιγότερο πολικό οδηγεί σε μικρότερες τιμές Rf. Έτσι τα αμινοξέα, αλανίνη, γλυκίνη, θρεονίνη, και προλίνη έχουν τιμές περίπου 0,60, όταν αναπτύσσονται σε μείγμα 50/50 ύδατος και κ-προπανόλης και περίπου 0,40 όταν αναπτύσσονται με μείγμα 30/70 πυκνής NH₃ και κ-προπανόλης. Η ακόλουθη διαδικασία προϋποθέτει τη χρήση του μείγματος 50/50 ύδατος/της κ-προπανόλης.

- Στον απαγωγό, ετοιμάστε 10 mL μείγματος κ-προπανόλης και ύδατος σε αναλογία 50/50 (1/1). Αυτό τον όγκο μεταγγίστε σε καθαρό θάλαμο ανάπτυξης.
- Παρασκευάστε αλκοολικό διάλυμα νινυδρίνης 5%.
- Μεταγγίστε 0,5-1,0 mL του διαλύματος νινυδρίνης στον θάλαμο ανάπτυξης, όπου και το μείγμα ανάπτυξης.
- Σε δοκιμαστικούς σωλήνες, παρασκευάστε διαλύματα των ανωτέρω αμινοξέων σε συγκέντρωση 50-100 mg/mL ύδατος.
- Τοποθετήστε μικρή ποσότητα (2-3 σταγόνες) του διαλύματος αυτού με τη βοήθεια τριχοειδούς αγγείου στην ενεργοποιημένη πλάκα silica gel της χρωματογραφίας.
- Βυθίστε την πλάκα με προσοχή, κάθετα, στον θάλαμο ανάπτυξης. Κλείστε το καπάκι του θαλάμου και αφήστε τη πλάκα να αναπτυχθεί, έως ότου ανέλθει ο διαλύτης σε απόσταση 2/3 από την κορυφή της πλάκας.
- Αφαιρέστε την πλάκα από τον θάλαμο και τοποθετήστε τη σε κλίβανο θερμοκρασίας 1100 προς ξήρανση και εμφάνιση των κηλίδων.
- Σημειώστε το περίγραμμα των κηλίδων με το μολύβι, και υπολογίστε τις τιμές Rf. Συγκρίνετε τις τιμές αυτές με τις πρότυπες τιμές από τη βιβλιογραφία για τη πιστοποίηση των αντίστοιχων αμινοξέων.

Παρατηρήσεις.....

8.9.3 Εργαστηριακή άσκηση 3

Διάλυμα ανάπτυξης:

βουτανόλη 35 mL + Ακετόνη 35 mL (διάλυμα 1)

Οξικό οξύ 56 mL + νερό 184 mL(διάλυμα 2).

Παρασκευή τελικού διαλύματος με ανάμειξη 28 mL από το διάλυμα 1 + 12 mL από το διάλυμα 2

- Το τελικό διάλυμα προστίθεται κατά το ήμισυ σε δύο διαφορετικούς θαλάμους.
- Στον δεύτερο θάλαμο προστίθεται επιπλέον 7 mL διαλ. νινυδρίνης 3-5%.
- Στρώση 4 μL δείγματος (ορού) στην πλάκα.
- Ανάπτυξη της πλάκας στους δύο θαλάμους διαδοχικά (διπλή ανάπτυξη).
- Η εμφάνιση των κηλίδων των αμινοξέων επιτυγχάνεται με τη θέρμανση της πλάκας σε κλίβανο στους 500°C.
- Σύγκριση των τιμών Rf με την παράλληλη ανάπτυξη προτύπων διαλυμάτων αμινοξέων.

Παρατηρήσεις.....

8.10 Εργαστηριακή άσκηση: Διαχωρισμός σακχάρων με TLC

- Πρότυπα διαλύματα σακχάρων 0,1-1% (γλυκόζη, φρουκτόζη, γαλακτόζη).
- Φυγοκέντρηση δείγματος αίματος (3000 στροφές/10 λεπτά) και παραλαβή υπερκείμενου ορού.
- Κατεργασία ορού: σε 200 μL ορού προσθέτουμε 200μL σουλφοσαλικυλικού οξέος (για καταβύθιση πρωτεϊνών). Μετά από παραμονή 10 min σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, το

δείγμα φυγοκεντρείται στις 3000 στροφές/ 10 min και λαμβάνεται το υπερκείμενο για την TLC.

- Στατική φάση: Silica gel 60 F254 Merck.
- Διάλυμα ανάπτυξης 1: μεθανόλη: οξικός αιθυλεστέρας = 70:30.
- Διάλυμα ανάπτυξης 2: βουτανόλη: αιθανόλη: νερό = 10:8:6.
- Για την εμφάνιση των κηλίδων των σακχάρων στις πλάκες της χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας χρησιμοποιούμε χρωστικό διάλυμα συγκέντρωσης 6,5 mM N-(1-Naphthyl) ethylenediamine Dihydrochloride σε μεθανόλη που περιέχει 3% πυκνό θειικό οξύ (99,5%). Το φύλλο TLC ψεκάζεται και αφήνεται για περίπου 5-10 min στους 100°C. Η εμφάνιση χρώματος είναι αποτέλεσμα της αντίδρασης της ενεργής ουσίας του χρωστικού διαλύματος και των σακχάρων.
- Ταυτοποίηση σακχάρων με βάση τις τιμές Rf προτύπων ενώσεων υδατανθράκων.

Παρατηρήσεις.....

8.11 Εργαστηριακή άσκηση: Διαχωρισμός υδατοδιαλυτών βιταμινών και αναλγητικών φαρμάκων με TLC

- Υδατοδιαλυτές βιταμίνες (B1, B2, B3, B6, B12, C, φυλλικό οξύ).
- Πλάκα: Silica gel.
- Διαλύματα ανάπτυξης:
 - ο βουτανόλη: χλωροφόρμιο: οξικό οξύ: αμμωνία: ύδωρ = 7: 4: 5: 1: 1,
 - ο χλωροφόρμιο: αιθανόλη: ακετόνη: αμμωνία = 2: 2: 2: 1,
 - ο προπανόλη: βουτανόλη: νερό: αμμωνία = 7: 5: 0.75: 2.
- Οι κηλίδες των βιταμινών εντοπίζονται εκθέτοντας το χρωματογράφημα σε ατμούς ιωδίου. Ακόμη πιστοποιούνται από το χρώμα τους στο ορατό φως ή κάτω από λάμπα φθορισμού.
- Ταυτοποίηση των βιταμινών με βάση τις τιμές Rf προτύπων ενώσεων βιταμινών.

8.12 Εργαστηριακή άσκηση: Προσδιορισμός καφεΐνης με μέθοδο HPLC

Τα κύρια φυτοσυστατικά του *C. arabica* είναι η καφεΐνη, ένα αλκαλοειδές, το χλωρογενικό οξύ, μια πολυφαινολική ένωση, τα καροτενοειδή και τα ένζυμα.

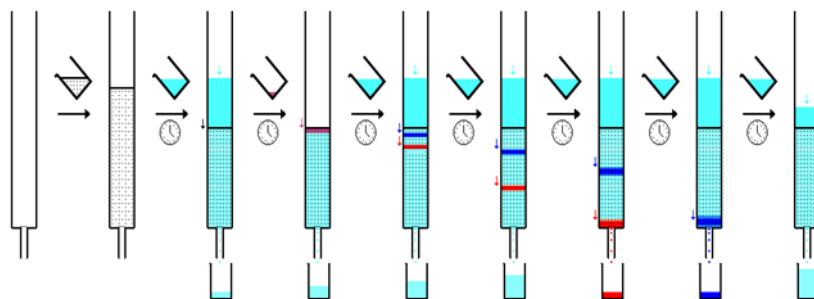
- Ζυγίζονται με ακρίβεια γνωστές ποσότητες προτύπου αναφοράς καφεΐνης και διαλύονται σε μεθανόλη 70% σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL, για να ληφθεί ένα στοκ διάλυμα 100 ppm. Πριν από την ανάλυση, το διάλυμα διηθείται μέσω φίλτρων μεμβράνης νάιλον 0,20 μm. Παρασκευάζονται πρότυπα διαλύματα συγκεντρώσεων 20, 40, 60, 80 και 100 ppm.
- 50 g κονιοποιημένου υλικού κόκκων καφέ *C. arabica* εκχυλίζεται με 100 mL αιθανόλης 70% στους 75°C για 3 ώρες. Μετά την ολοκλήρωση της εκχύλισης, το εκχυλισμένο υγρό συμπυκνώνεται με εξάτμιση σε περιστροφικό εξάτμιστήρα και αναδιαλύεται σε μεθανόλη 70% με τελική συγκέντρωση περίπου 100 ppm.
- Ο διαχωρισμός πραγματοποιείται με στήλη Kinetex C18 (100A0, 150 × 4,6 mm, μέγεθος πόρου 5 μm). Η κινητή φάση αποτελείται από νερό:μεθανόλη = 50:50, η έκλουση είναι ισοκρατική, ο ρυθμός ροής είναι 1,0 mL / min και ο όγκος έγχυσης 5 μL. Όλα τα διαλύματα απαερώνονται πριν την ανάλυση. Η στήλη διατηρείται στους 26°C σε όλη τη διάρκεια της ανάλυσης και ο ανιχνευτής υπεριώδους ορίζεται στα 272 nm.
- Η κορυφή του πρότυπου και του άγνωστου δείγματος εμφανίζεται στα 2,5 min. Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης της καφεΐνης στο δείγμα γίνεται μέσω πρότυπης καμπύλης αναφοράς.

8.12.1 Προσδιορισμός α-λιποϊκού οξέος (LA) σε ανθρώπινο πλάσμα

Το α- λιποϊκό οξύ (LA) (1, 2-διθειολάν-3-βαλερικό οξύ, 1, 2-διθειολάνιο- 3-πεντανοϊκό οξύ, 6, 8-διθειοκτανικό οξύ, θειοκτικό οξύ) είναι ένας σημαντικός συμπαράγοντας στην πυροσταφυλική αφυδρογονάση (PDH) και στο πολυενζυμικό σύμπλεγμα της α-κετογλουταρικής αφυδρογονάσης το οποίο είναι υπεύθυνο για την παραγωγή ακετυλ-CoA σε μεταβολικές οδούς.

- Πρότυπο διάλυμα (1 mg/mL) LA παρασκευάζεται από διάλυση της καθαρής σκόνης σε μεθανόλη. Τα διαλύματα εργασίας LA παρασκευάζονται σε ανθρώπινο πλάσμα, σε συγκεντρώσεις 0,78, 1,56, 3,125, 6,25, 12,5, 25 και 50 μg/ mL.
- 300 μL του τυφλού/πρότυπου/ορού αναμειγνύονται με 300 μL αιθανόλης και 1,8 mL χλωροφορμίου. Το δείγμα φυγοκεντρείται για 5 λεπτά στις 2500 rpm. 600 μL του υπερκείμενου εξατμίζεται σε άζωτο για 10 λεπτά. Το στερεό υπόλειμμα **ανασυνδιαλύεται** σε 100 μL κινητής φάσης και 20 μL του δείγματος εγχέονται απευθείας στη στήλη HPLC.
- Η αναλυτική στήλη είναι C18, 250 × 4,6 mm, μέγεθος σωματιδίων 5 μ (Lichrospher 100 RP-18e, Merck, Γερμανία). Η κινητή φάση αποτελείται από 50 mM ρυθμιστικό διάλυμα όξινου φωσφορικού νατρίου (pH 2,7 με 1N HCl): ακετονιτρίλιο: μεθανόλη σε αναλογία 50:30:20. Πριν από την προετοιμασία της κινητής φάσης, οι διαλύτες απαερώνονται. Ο ανιχνευτής UV ορίζεται στα 201 nm, ο ρυθμός ροής είναι 1 mL / min και η θερμοκρασία του φούρνου στήλης διατηρείται στους 40°C.
- Η κορυφή του πρότυπου και του άγνωστου δείγματος εμφανίζεται στα 3,5 min. Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης της καφεΐνης στο δείγμα γίνεται μέσω πρότυπης καμπύλης αναφοράς.

8.13 Εργαστηριακή άσκηση: Διαχωρισμός κυανής δεξτράνης, κυτόχρωμα c, ριβοφλαβίνης



Εικόνα 8.17 Διαχωρισμός σε στήλη Sephadex.

- Μείγμα (0,6 mL) περιέχει κυανό της δεξτράνης (0,4 mg), κυτόχρωμα c (0,8 mg) και ριβοφλαβίνη (βιταμίνη B2) (0,02 mg) (Εικόνα 8.17).
- Η Sephadex G-75 εμφανίζει διάμετρο (ξηρών) σφαιριδίων 20-50 μm, συντελεστή διόγκωσης 12-15 (δηλαδή 1 g ξηρού βάρους % δίνει ενυδατούμενο 12-15 mL πήγματος) και μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως μοριακός ηθμός στην περιοχή μοριακών βαρών 3-70 kDa (για διαχωρισμό «σφαιρικών» πρωτεϊνών) ή 1-50 kDa (για διαχωρισμό δεξτρανών) (η μονάδα Da (Dalton) ισοδυναμεί με g ανά mol, δηλαδή g ανά $6,023 \times 10^{23}$ μόρια).
- Προσθέστε περίπου 10 μέρη ρυθμιστικού διαλύματος οξικού καλίου 0,1 M pH: 6.0 προς ένα μέρος άνυδρου υλικού υποστρώματος και αναδεύσατε το εναιώρημα.
- Για τον έλεγχο της στήλης, διάλυμα 2 mg/mL της χρωστικής κυανής της δεξτράνης (dextran blue) θα εφαρμοστεί στη στήλη. Ο προστιθέμενος όγκος θα πρέπει να είναι 1% του όγκου του επιπέδου στήλης και η χρωστική θα πρέπει να απομακρύνεται πλήρως σε όγκο όχι μεγαλύτερο από το διπλάσιο του όγκου προσθήκης. Εάν η στήλη έχει στοιβαχτεί καλά, η χρωστική θα είναι εύκολα ορατή και θα πρέπει να διέλθει τη στήλη ως ενιαίο μέτωπο χωρίς λωρίδες.

- Το διάλυμα δεξτράνης μπορεί να χρησιμοποιηθεί, για να καθορίσει τον «νεκρό όγκο» της στήλης. Ο νεκρός όγκος αναφέρεται στον όγκο του ρυθμιστικού διαλύματος (κινητή φάση) μέσα από τον οποίο διέρχεται συστατικό του δείγματος το οποίο δεν εμφανίζει καμιά αλληλεπίδραση με το υλικό του υποστρώματος. Έτσι, ο νεκρός όγκος εκφράζει τον ελάχιστο όγκο έκλουσης στον οποίο η ζητούμενη πρωτεΐνη θα μπορούσε πιθανώς να εξαχθεί από τη στήλη. Ο όγκος που απαιτείται για την εξαγωγή άλλων πρωτεϊνών μπορεί να μετρηθεί σε σχέση με αυτό το πρότυπο.
- Σε στήλη (10 cm x 1 cm) πήγματος Sephadex G-75, ολικού όγκου 9 mL, εξισορροπημένη με ρυθμιστικό διάλυμα οξικού καλίου, 0,1 M, pH 6.0, τοποθετούμε το μείγμα για διαχωρισμό. Θα παρατηρηθεί ο διαχωρισμός των 3 έγχρωμων μορίων βάσει του μοριακού τους μεγέθους. Δίνονται τα αντίστοιχα μοριακά βάρη (MB) και χαρακτηριστικά βέλτιστα απορρόφησης στην περιοχή του ορατού (λ) (Πίνακας 8.1).

Πίνακας 8.1 Μοριακά βάρη (MB) και χαρακτηριστικά βέλτιστα απορρόφησης στην περιοχή του ορατού (λ).

ΜΟΡΙΟ	ΧΡΩΜΑ	λ (nm)	MB (kDa)
κυανή δεξτράνης	κυανό	620	>500
κυτόχρωμα c	ερυθρό	530	12.4
ριβοφλαβίνη	κίτρινο	445	12.4

- Θα συλλεχθούν 10 κλάσματα εκλουόμενου υγρού (του 1 mL) τα οποία, μετά από αραιώση 1:10, φωτομετρούνται στα τρία αντίστοιχα μήκη κύματος (Πίνακας 8.2).

Πίνακας 8.2 Φωτομέτρηση των κλασμάτων 1 – 10.

ΚΛΑΣΜΑ	A 620 nm	A 530 nm	A 445 nm
1			
2			
3			
4			
5			
6			
7			
8			
9			
10			

Παρατηρήσεις.....

8.14 Εργαστηριακή άσκηση: Χρωματογραφική αφαλάτωση διαλύματος αιμοσφαιρίνης

Η εφαρμογή αυτή περιλαμβάνει απομάκρυνση NaCl από ένα διάλυμα αιμοσφαιρίνης και προσδιορισμό της συγκέντρωσης πρωτεΐνης (αιμοσφαιρίνης) στο αφαλατωμένο δείγμα.

- Σε στήλη (10 cm x 1 cm) πήγματος Sephadex G-25, ολικού όγκου 9 mL, εφαρμόζεται προς διαχωρισμό υδατικό διάλυμα (0.8 mL) το οποίο περιέχει αιμοσφαιρίνη (Hb) και NaCl (0.1 M). Θα συλλεχθούν 10 κλάσματα όγκου 1 mL. Στα κλάσματα αυτά (μετά από αραιώση 1:20)

μετρίεται η συγκέντρωση αιμοσφαιρίνης (με άμεση φωτομέτρηση στα 550 nm) και η συγκέντρωση άλατος (με αγωγιμομέτρηση).

- Η Sephadex G-25 εμφανίζει διάμετρο (ξηρών) σφαιριδίων 50-100 μm, συντελεστή διόγκωσης 4-6 (δηλαδή 1 g ξηρού βάρους δίνει ενυδατούμενο 4-6 mL πήγματος) και μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως μοριακός ηθμός στην περιοχή μοριακών βαρών 1-5 kDa (για διαχωρισμό πεπτιδίων ή μικρών «σφαιρικών» πρωτεϊνών) ή 0,1-5 kDa (για διαχωρισμό δεξτρανών). Συνήθης εφαρμογή της χρωματογραφίας Sephadex G-25 είναι ο καθαρισμός μακρομοριακών δειγμάτων από προσμίξεις μικρού μοριακού βάρους, π.χ. αφαλάτωση πρωτεϊνικών δειγμάτων.
- Αγωγιμομετρικός προσδιορισμός Na^+ στα κλάσματα έκλουσης.
- Η αγωγιμότητα (conductivity) ενός υδατικού διαλύματος είναι ανάλογη με τη συγκέντρωση ηλεκτρολυτών και συσχετίζεται με την ιοντική ισχύ. Εκφράζει την ευχέρεια διέλευσης του ηλεκτρικού ρεύματος μέσω του διαλύματος και η τιμή της είναι αντίστροφη της τιμής ηλεκτρικής αντίστασης. Μετρίεται με ειδικά όργανα, τα αγωγιμόμετρα, σε τιμές S ($1/\Omega$) και οι τιμές αυτές αντιστοιχούν στις τιμές συγκέντρωσης ιόντων Na^+ . Εναλλακτικά, η μέτρηση ιόντων Na^+ μπορεί να γίνει με την τεχνική της φλογομετρίας (Πίνακας 8.3).

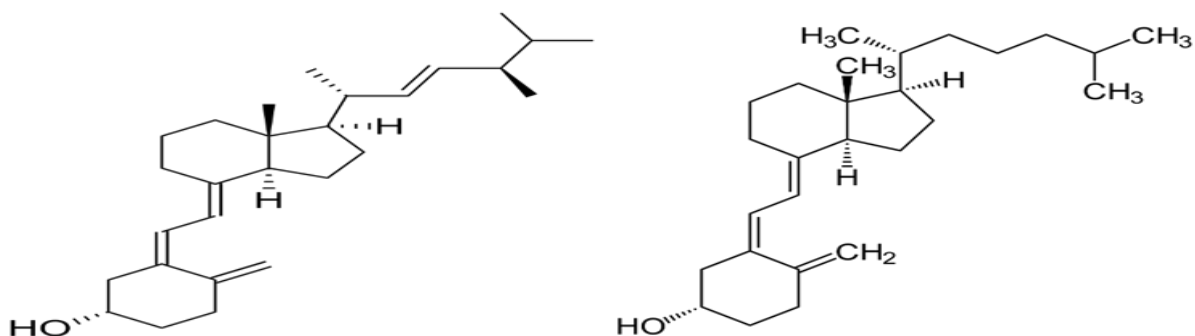
Πίνακας 8.3 Φωτομέτρηση των κλασμάτων 1 – 10.

ΚΛΑΣΜΑ	A 550 nm	Αγωγιμομέτρηση Λ (Na^+) [S, X103]
1		
2		
3		
4		
5		
6		
7		
8		
9		
10		

- Από τις τιμές φωτομέτρησης και αγωγιμομέτρησης κατασκευάζονται στο ίδιο σχήμα δύο διαγράμματα έκλουσης, ένα για την αιμοσφαιρίνη (A550 nm έναντι αριθμού κλάσματος) και ένα για το Na^+ [A (σε S, x103) έναντι αριθμού κλάσματος]. Τα κλάσματα έκλουσης τα οποία περιέχουν αιμοσφαιρίνη αλλά όχι Na^+ , δηλαδή κλάσματα καθαρής (αφαλατωμένης) αιμοσφαιρίνης ενώνονται, προσδιορίζεται ο συνολικός τους όγκος (σε mL) και ορίζονται ως δείγμα αιμοσφαιρίνης.
- Η συγκέντρωση πρωτεΐνης στο δείγμα της αφαλατωμένης αιμοσφαιρίνης (σε mg/mL) προσδιορίζεται με τη μέθοδο Lowry με πρότυπη καμπύλη (ως προς BSA).

8.15 Εργαστηριακή άσκηση: Διαχωρισμός 25-OH-βιταμινών D2/D3 με HPLC

Ο όρος «Βιταμίνη D» αποτελεί μια ομάδα στεροειδών με σημαντικότερα μέλη αυτής της ομάδας τη βιταμίνη D₂ (εργοκαλσιφερόλη) και τη βιταμίνη D₃ (χοληκαλσιφερόλη). Σε επαρκή ηλιακή ακτινοβολία (UV-B), η βιταμίνη D₃ μπορεί να παραχθεί από το δέρμα και επομένως δεν πληροί τον κλασικό ορισμό της βιταμίνης (Εικόνα 8.18). Η βιταμίνη D που λαμβάνεται με τη διατροφή (δηλαδή η D₂ και η D³) ή σχηματίζεται ενδογενώς (δηλαδή D₃) ή μεταβολίζεται στο ήπαρ σε 25-OH-βιταμίνη D. Με περαιτέρω υδροξυλίωση στο νεφρό σχηματίζεται η βιολογικά ενεργή μορφή της βιταμίνης, 1,25-(OH)₂ βιταμίνη. Στο πλάσμα/ορό οι συγκεντρώσεις της 25-OH-βιταμίνης D είναι περίπου 1000 φορές μεγαλύτερες από την 1,25-(OH)₂ βιταμίνη D.



Εικόνα 8.18 Χημικοί τύποι των βιταμινών D2 (α) και D3 (β).

Ενδεικτικό πειραματικό πρωτόκολλο εταιρείας

- Προετοιμασία δειγμάτων: Φυγοκεντρήστε το πλήρες αίμα με EDTA και αποθηκεύστε το στους -20°C (αποφύγετε την κατάψυξη και την απόψυξη επανειλημμένα).
- Προσθέστε 3,0 mL νερού HPLC στο φιαλίδιο με το πρότυπο και αναμείξτε για 15 λεπτά. Όταν διαλυθεί όλο το υλικό, το διάλυμα είναι έτοιμο για χρήση.
- Σε 400 μL προτύπου ή πλάσματος προσθέστε 500 μL αντιδραστηρίου καταβύθισης και 400 μL εσωτερικού προτύπου. Φυγοκεντρήστε το δείγμα για 5 λεπτά σε 10000 g. Μετά τη φυγοκέντρωση, το υπερκείμενο αποτελείται από δύο υγρές φάσεις. Για την ανάλυση HPLC πρέπει να χρησιμοποιηθεί η άνω υγρή φάση του υπερκειμένου.
- Συνθήκες HPLC:
 - Κινητή φάση: μεθανόλη:νερό = 67:33.
 - Αντλία: 1,0 mL/min ρυθμός ροής.
 - Όγκος έγχυσης δείγματος: 50 μL .
 - Χρόνος έγχυσης: 8,0 min.
 - Στήλη: Οι αναλύσεις πραγματοποιούνται στους 30°C .
 - Ανιχνευτής: Προγραμματίστε τον ανιχνευτή UV στα 264 nm.
 - Χρόνοι κατακράτησης:
 - 25-OH-βιταμίνη D3: περίπου 6,4 min.
 - 25-OH-βιταμίνη D2: περίπου 7,3 min.
 - Εσωτερικό πρότυπο: περίπου 8,3 λεπτά.

8.16 Εργαστηριακή άσκηση: Διαχωρισμός β-καροτένιου με HPLC

Η βιταμίνη Α (ρετινόλη) και η βιταμίνη Ε (τοκοφερόλη) ανήκουν στη λιποδιαλυτή κατηγορία των βιταμινών. Οι λιποδιαλυτές βιταμίνες παρέχονται ως επί το πλείστον ως προβιταμίνες από τα τρόφιμα και μετατρέπονται στον οργανισμό στην ενεργή μορφή βιταμίνης. Οι πιο σημαντικές προβιταμίνες της βιταμίνης Α είναι τα καροτενοειδή. Η απορρόφηση της βιταμίνης Α και των καροτενοειδών μπορεί να διαταραχτεί στην ηπατική νόσο και στον σακχαρώδη διαβήτη.

Ενδεικτικό πειραματικό πρωτόκολλο εταιρείας

- Προετοιμασία δειγμάτων: Φυγοκεντρήστε το πλήρες αίμα με EDTA και αποθηκεύστε το στους -20°C (αποφύγετε την κατάψυξη και την απόψυξη επανειλημμένα). Σε κάθε περίπτωση προστατεύστε το δείγμα από το φως.
- Προσθέστε 3,0 mL νερού HPLC στο φιαλίδιο με το πρότυπο και αναμείξτε για 15 λεπτά. Όταν διαλυθεί όλο το υλικό, το διάλυμα είναι έτοιμο για χρήση.
- Σε 150 μL προτύπου ή πλάσματος προσθέστε 150 μL αντιδραστηρίου καταβύθισης (περιέχει 3 μg εσωτερικού προτύπου) και φυγοκεντρήστε το δείγμα για 5 λεπτά σε 10000 g.
- Σε 100 μL του φυγοκεντρημένου υπερκειμένου προσθέστε 100 μL ψυχρού αντιδραστηρίου σταθεροποίησης και φυγοκεντρήστε για 5 λεπτά στα 10000 g.
- Συνθήκες HPLC:
 - Κινητή φάση: Ακετονιτρίλιο:μεθανόλη = 50:50.

- Αντλία: 1,5 mL / min ρυθμός ροής.
- Όγκος έγχυσης δείγματος: 50 µL.
- Χρόνος έγχυσης: 8,0 min.
- Στήλη: Οι αναλύσεις πραγματοποιούνται στους 30°C.
- Ανιχνευτής: Προγραμματίστε τον ανιχνευτή UV σε 325 nm και σε 295 nm.
- Χρόνοι κατακράτησης:
 - Βιταμίνη Α: περίπου. 1,9 λεπτά.
 - Εσωτερικό πρότυπο: περίπου 4,9 λεπτά
 - Βιταμίνη Ε: περίπου. 7,1 λεπτά.

8.17 Εργαστηριακή άσκηση: Προσδιορισμός Coenzyme Q10 με HPLC

Το συνένζυμο Q10 (CoQ10) είναι η κυρίαρχη μορφή ουβικινόνης στον άνθρωπο και κατέχει θεμελιώδη ρόλο στην παραγωγή κυτταρικής ενέργειας στην αναπνευστική αλυσίδα. Το CoQ10 υπάρχει ως ένα οξειδοαναγωγικό ζεύγος «ubiquinol (UQH₂)/ubiquinone (UQ)» και επιτρέπει τη μεταφορά ηλεκτρονίων και πρωτονίων στο οξυγόνο, παράγοντας ATP ως βιοχημικό ισοδύναμο ενέργειας. Εκτός από την κύρια λειτουργία του ως φορέα ηλεκτρονίων, το CoQ10 παίζει σημαντικό ρόλο στον αντιοξειδωτικό μηχανισμό άμυνας των κυττάρων.

Ενδεικτικό πειραματικό πρωτόκολλο εταιρείας

- Προσθέστε 2,0 mL νερού HPLC στο φιαλίδιο με το πρότυπο και αναμείξτε για 15 λεπτά. Όταν διαλυθεί όλο το υλικό, το διάλυμα είναι έτοιμο για χρήση.
- Σε 400 µL προτύπου ή πλάσματος προσθέστε 500 µL αντιδραστηρίου καταβύθισης και 50 µL οξειδωτικού αντιδραστηρίου. Στη συνέχεια προσθέστε 400 µL εσωτερικού προτύπου και φυγοκεντρήστε το δείγμα για 5 λεπτά σε 10000 g. Μετά τη φυγοκέντρηση, το υπερκείμενο αποτελείται από δύο υγρές φάσεις. Για την ανάλυση HPLC, πρέπει να χρησιμοποιηθεί η άνω υγρή φάση του υπερκειμένου.
- Συνθήκες HPLC:
 - Κινητή φάση: μεθανόλη:2-προπανόλη = 90:10.
 - Αντλία: 1,4 mL / min ρυθμός ροής.
 - Όγκος έγχυσης δείγματος: 30 µL.
 - Χρόνος έγχυσης: 8,0 min.
 - Στήλη: Οι αναλύσεις πραγματοποιούνται στους 30°C.
 - Ανιχνευτής: Προγραμματίστε τον ανιχνευτή UV στα 275 nm.
 - Χρόνοι κατακράτησης:
 - CoQ10: περίπου. 7,3 λεπτά.
 - Εσωτερικό πρότυπο: περίπου 11,5 λεπτά.

Σχετικό οπτικό υλικό στο διαδίκτυο

1. Εικονική αναπαράσταση της HPLC χρωματογραφίας

<https://www.youtube.com/watch?v=g7YoD2mmnCU> (Παρουσιάζεται ο προσδιορισμός της συμβαστατίνης με γρήγη χρωματογραφία υψηλής πίεσης. Η βιντεοσκόπηση έγινε στο τμήμα Ιατρικών Εργαστηρίων στο ΤΕΙ Αθήνας, νυν Πανεπιστήμιο Δυτ. Αττικής).

<https://www.youtube.com/watch?v=Vr5t-cgHHG4>

<https://www.youtube.com/watch?v=IUwRWn9pEdg>

<https://www.youtube.com/watch?v=ZN7euA1fS4Y>

https://www.youtube.com/watch?v=kz_egMtdnL4

2. Εικονική αναπαράσταση της TLC χρωματογραφίας

<https://www.khanacademy.org/science/class-11-chemistry-india/xbbb6cb8fc2bd00c8:in-in-organic-chemistry-some-basic-principles-and-techniques/xbbb6cb8fc2bd00c8:in-in-methods-of-purification-of-organic>

<https://www.youtube.com/watch?v=lj5OWzhZSac>

https://www.youtube.com/watch?v=I4u_1ST7Ezk

3. Εικονική αναπαράσταση της χρωματογραφίας μοριακής διήθησης

<https://www.youtube.com/watch?v=qrUaZWUM9uw>

<https://www.youtube.com/watch?v=ZA6rgm8wnXE>

<https://www.youtube.com/watch?v=S89mAYh6yHU>

<https://www.youtube.com/watch?v=111ypMOrEWg>

4. Εικονική αναπαράσταση των βασικών ειδών χρωματογραφίας

<https://www.khanacademy.org/science/class-11-chemistry-india/xbbb6cb8fc2bd00c8:in-in-organic-chemistry-some-basic-principles-and-techniques/xbbb6cb8fc2bd00c8:in-in-methods-of-purification-of-organic-compounds/v/basics-of-chromatography>

Πηγές φωτογραφιών με προέλευση το διαδίκτυο

Εικόνα 8.1

https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/3/3f/Chromatography_column.PNG/640px-Chromatography_column.PNG

Εικόνα 8.2

<https://image.slidesharecdn.com/classificationofchromatography-150512174619-lva1-app6891/95/classification-of-chromatography-11-638.jpg?cb=1431452991>

Εικόνα 8.3

https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/9/92/Overview_silica_gel_stationary_phases_for_TLC.svg/1200px-Overview_silica_gel_stationary_phases_for_TLC.svg.png

Εικόνα 8.4

https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/5/58/Tlc_sequence.svg/langar-1000px-Tlc_sequence.svg.png

Εικόνα 8.5

https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/d/d6/Chromatography_tank.svg/640px-Chromatography_tank.svg.png

Εικόνα 8.6

https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/4/41/TLC_black_ink.jpg/1200px-TLC_black_ink.jpg

Εικόνα 8.7

https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/e/ea/TLC_Rf_value.png/640px-TLC_Rf_value.png

Εικόνα 8.8

https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/f/fa/Two_dimensional_TLC.svg/640px-Two_dimensional_TLC.svg.png

Εικόνα 8.9

https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/f/f8/Reverse_Phase_Gradient_Elution_Schematic.svg/640px-Reverse_Phase_Gradient_Elution_Schematic.svg.png

Εικόνα 8.10

https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/6/63/Preparative_HPLC.svg/640px-Preparative_HPLC.svg.png

Εικόνα 8.11

https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/9/99/UltiMate_3000_HPLC.jpg/640px-UltiMate_3000_HPLC.jpg

Εικόνα 8.12

<https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/2/29/New-Family-of-Bluish-Pyranoanthocyanins-40403.fig.006a.jpg/640px-New-Family-of-Bluish-Pyranoanthocyanins-40403.fig.006a.jpg>

Εικόνα 8.13

https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/4/49/Superdex_200HR_gel_filtration_column.jpg/1920px-Superdex_200HR_gel_filtration_column.jpg

Εικόνα 8.14

<https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/2/2a/SizeExChrom.png>

Εικόνα 8.16

https://img.medicaexpo.es/images_me/photo-g/77598-8111987.jpg

Εικόνα 8.17

https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/3/3f/Column_chromatography_sequence.png

Εικόνα 8.18

<https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/1/15/Cholecalciferol2.svg/1024px-Cholecalciferol2.svg.png>

Βιβλιογραφικές Αναφορές

- Γεωργίου, Ζ., Καρκαλούσος, Π., Κρούπης, Χ., Παπαϊωάννου, Α., Πλαγεράς, Π., Σπυρόπουλος, Β., Τσότσου, Γ. Ε., & Φούντζουλα, Χ. (2015). *Εργαστηριακές Ασκήσεις Κλινικής Χημείας*. Αθήνα: Κάλιπος.
- Μπογιατζής, Στ. (2018). *Η διαλυτότητα των οργανικών ενώσεων*. Αθήνα: ΤΕΙ Αθήνας. Ανακτήθηκε, 19 Απριλίου 2022, από <https://slideplayer.gr/slide/2867645/>
- Μπουρδάκου, Α. (2015). *Ακυλίωση σακχάρων με χρήση της εστεράσης του οξικού της γλυκομαννάνης από το Clostridium thermocellum*, (Διπλωματική Εργασία). Αθήνα: Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο.
- Ezhilarasi, K., Sudha, V., Ramachandran, G., Umamathy, D., Rajaram, R., Padmalayam, I., Viswanathan, V., & Kumar, H. (2014). A Simple and Specific Method for Estimation of Lipoic Acid in Human. *J Chromatograph Separat Techniq.*, 5, 6.
- Surat, P. (2018). *Applications of Thin Layer Chromatography*. Ανακτήθηκε, 19 Απριλίου 2022 από <https://www.news-medical.net/life-sciences/Applications-of-Thin-Layer-Chromatography.aspx>
- Tymoczko, J., Berg, J., & Stryer, L. (2018). *Βιοχημεία Βασικές αρχές*. Αθήνα: Broken.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9

ΘΕΩΡΙΑ ΚΑΙ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΑΣΚΗΣΕΙΣ ΣΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΛΙΠΙΔΙΩΝ

Συγγραφέας: Μαρία Τράπαλη

Σύνοψη

Στο παρόν κεφάλαιο μελετώνται τα λιπίδια που απαντώνται σε όλους τους ζωντανούς οργανισμούς από τους διάφορους μικροοργανισμούς, όπως τα βακτήρια και τους μύκητες, μέχρι τα ανώτερα φυτά και τα ζώα και περιγράφεται ένας αριθμός μεθόδων αναλυτικού προσδιορισμού τους. Τα ζωικά λιπίδια μπορούν να διαχωριστούν σε δύο μεγάλες ομάδες, τα ουδέτερα λιπίδια που διαλύονται εξολοκλήρου σε μη πολικούς διαλύτες και τα πολικά λιπίδια που είναι αδιάλυτα στους συγκεκριμένους διαλύτες. Τα κυριότερα ουδέτερα λιπίδια είναι τα τριγλυκερίδια, οι κηροί και οι στερόλες, ενώ τα σημαντικότερα πολικά λιπίδια είναι τα φωσφογλυκερίδια και τα σφιγγολιπίδια.

Προαπαιτούμενη γνώση

Απαιτούνται βασικές γνώσεις οργανικής χημείας.

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

9.1 Γενικά περί λιπιδίων, ρόλος, ταξινόμηση

Με τον όρο λιπίδια ή λίπη νοείται μια ευρεία και χημικά ετερογενή ομάδα ενώσεων, αποτελούμενες κατά βάση από άνθρακα (C), οξυγόνο (O) και υδρογόνο (H), οι οποίες έχουν ως κοινό γνώρισμα τη μη διαλυτότητά τους στο νερό, ενώ αντίθετα εκχυλίζονται με διαλύτες χαμηλής πολικότητας, όπως το χλωροφόρμιο, το βενζόλιο, ο αιθέρας και η αιθανόλη. Τα λιπίδια απαντώνται σε όλους τους ζωντανούς οργανισμούς από τους διάφορους μικροοργανισμούς, όπως τα βακτήρια και τους μύκητες, μέχρι τα ανώτερα φυτά και τα ζώα.

Τα ζωικά λιπίδια μπορούν να διαχωριστούν σε δύο μεγάλες ομάδες, τα ουδέτερα λιπίδια που διαλύονται εξολοκλήρου σε μη πολικούς διαλύτες (αιθέρας, αιθανόλη, χλωροφόρμιο) και τα πολικά λιπίδια που είναι αδιάλυτα στους συγκεκριμένους διαλύτες.

9.1.1 Ο φυσιολογικός ρόλος των λιπιδίων στον οργανισμό

- Κύριο δομικό συστατικό των κυτταρικών μεμβρανών (διαταραχές στη δομή των μεμβρανών, π.χ. από ισχαιμία, μπορούν να επηρεάσουν αρνητικά το ισοζύγιο του ύδατος και τη ροή των ιόντων).
- Αποθήκευση των σακχάρων και ως λιπίδια στις λεγόμενες «λιποποθήκες» (ενεργειακές αποθήκες), 30-35% της προσφοράς ενέργειας στον άνθρωπο.
- Συμμετέχουν στα προστατευτικά περιβλήματα οργάνων (μονωτές).
- Συστατικά της κυτταρικής επιφάνειας (ανοσία).
- Οι Βιταμίνες A, E, K, οι σεξουαλικές ορμόνες και οι ορμόνες του φλοιού των επινεφριδίων ανήκουν στην κατηγορία των λιπιδίων. Υπό την ευρεία έννοια, στην κατηγορία των ορμονών υπάγονται και οι προσταγλανδίνες.
- Κάποια λιπίδια σχηματίζουν ενώσεις μεγάλης βιολογικής σημασίας με πρωτεΐνες (λιποπρωτεΐνες) και σάκχαρα (γλυκολιπίδια).

9.1.2 Λιπαρά οξέα

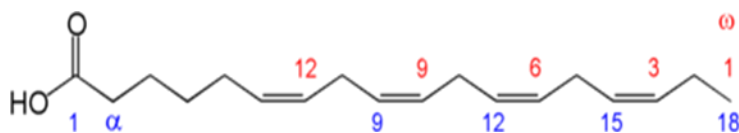
Τα λιπαρά οξέα (ΛΟ) και οι ενώσεις που προέρχονται από αυτά είναι πολύ σημαντικές για τον ανθρώπινο οργανισμό. Επιτελούν κύριες λειτουργίες, όπως: παράγουν μεταβολική ενέργεια με την οξείδωσή τους ή αποταμιεύονται με τη μορφή των τριγλυκεριδίων στον λιπώδη ιστό με σκοπό την παροχή ενέργειας, όταν εξαντλούνται τα άμεσα ενεργειακά αποθέματα. Τα λιπαρά οξέα του οργανισμού των θηλαστικών ευρίσκονται σε ποσοστό πάνω από 95% συνδεδεμένα σε διάφορα είδη ενώσεων. Για να μεταβολιστούν, πρέπει να προηγηθεί η κατανομή τους σε ιστούς και όργανα και να υπάρξουν συγχρόνως και οι κατάλληλοι μηχανισμοί.

Τα ΛΟ είναι οργανικά οξέα που υπάρχουν στη φύση ελευθέρα ή ενωμένα με άλλες ενώσεις, ανευρίσκονται δε πάνω από εκατό λιπαρά οξέα σε λιπίδια προερχόμενα από ζωικούς και φυτικούς οργανισμούς ή μικροοργανισμούς.

Σχεδόν όλα έχουν ευθεία υδρογονανθρακική αλυσίδα με τον τερματικό άνθρακα να ανήκει σε καρβοξυλομάδα. Η πλειονότητά τους έχει ζυγό αριθμό ατόμων άνθρακα, τα δε ΛΟ με μονό αριθμό ανθράκων είναι σπανιότατα.

Τα συνήθη ονόματά τους είναι παραδοσιακά και σχετίζονται με την προέλευσή τους, όπως για παράδειγμα το βουτυρικό από το βούτυρο, το στεατικό από το στέαρ (στέαρ =λίπος), το ελαιϊκό από το ελαιόλαδο, το παλμιτικό από palm trees, το αραχιδονικό, το λινολεϊκό, το λινολενικό.

Ο συνήθης αριθμός ατόμων άνθρακα των ΛΟ κυμαίνεται από 4 έως 26 και η αρίθμηση των ανθράκων αυτών αρχίζει από τον άνθρακα του καρβοξυλίου. Η αρίθμηση των ανθράκων στο μόριο του λιπαρού οξέος φαίνεται στην Εικόνα 9.1.



Εικόνα 9.1 Αρίθμηση των ανθράκων στο μόριο λιπαρού οξέος.

Ένας ευρύτατα χρησιμοποιούμενος τρόπος διάκρισης των ακόρεστων (κυρίως των πολυακόρεστων) λιπαρών οξέων βασίζεται στη θέση του πρώτου διπλού δεσμού ξεκινώντας από το πιο απόμακρο άτομο άνθρακα (άνθρακα της μεθυλομάδας, CH₃-) σε σχέση με την καρβοξυλική ομάδα. Ο άνθρακας αυτός ονομάζεται «ωμέγα» (ω-άνθρακας). Έτσι, ως ω-3 και ω-6 χαρακτηρίζονται τα ακόρεστα λιπαρά οξέα των οποίων ο πρώτος διπλός δεσμός βρίσκεται στο 3ο και το 6ο άτομο άνθρακα ξεκινώντας την αρίθμηση από τον ωμέγα-άνθρακα (δηλαδή το τελευταίο άτομο άνθρακα με βάση την κανονική αρίθμηση). Τα σημαντικότερα ωμέγα-3 λιπαρά οξέα είναι: το α-λινολενικό οξύ (9,12,15-δεκαοκτα-τρι-εν-οϊκό οξύ, α-linolenic acid ή ALA), το 5,8,11,14,17-εικοσα-πεντα-εν-οϊκό οξύ (eicosapentaenoic acid, EPA), το 4,7,10,13,16,19-εικοσιδυα-εξα-εν-οϊκό οξύ (docosahexaenoic acid ή DHA). Τα ωμέγα-6 λιπαρά οξέα βρίσκονται (με εξαιρέσεις) σε φυτικά έλαια από τα οποία προσλαμβάνονται σε ικανοποιητικές ποσότητες (σε αντίθεση με τα ωμέγα-3). Αντιπροσωπευτικά ω-6 λιπαρά οξέα είναι το λινελαϊκό (8,12-δεκαοκτα-δι-εν-οϊκό οξύ, linoleic acid ή LA) και το αραχιδονικό οξύ (5,8,11,14-εικοσα-πεντα-εν-οϊκό οξύ ή arachidonic acid).

9.1.3 Ταξινόμηση λιπιδίων

Χημικά, κατατάσσονται στις εξής κατηγορίες:

A. Σαπωνοποιήσιμα. Ενώσεις ανωτέρων λιπαρών οξέων με γλυκερόλη ή εστέρα, σφιγγοσίνη και ανώτερες αλκοόλες.

- Ακυλογλυκερόλες (κοινά λίπη ή λάδια).
- Φωσφορογλυκερίδια.
- Σφιγγολιπίδια.
- Κερία.

B. Μη Σαπωνοποιήσιμα

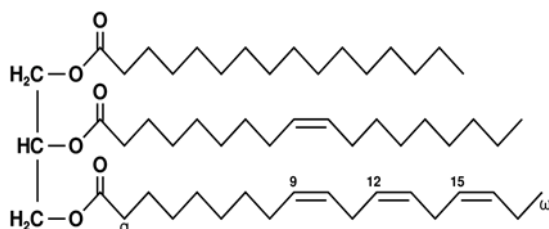
- Παράγωγα Τερπενίου.

- Στεροειδή.
- Προσταγλανδίνες.

9.1.4 Κυριότερα ουδέτερα λιπίδια

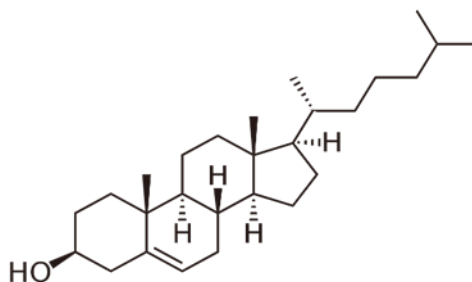
- **Τριγλυκερίδια ή τριακυλογλυκερόλες.** Οι τριακυλογλυκερόλες (Εικόνα 9.2) αποτελούνται από τρία λιπαρά οξέα, καθένα εκ των οποίων συνδέεται με εστερικό δεσμό με ένα μόριο γλυκερόλης. Στα περισσότερα ευκαρυωτικά κύτταρα, οι τριακυλογλυκερόλες σχηματίζουν μια ξεχωριστή φάση μικροσκοπικών λιποσταγονιδίων μέσα στο υδατικό κυτταροδιάλυμα. Τα σταγονίδια αυτά λειτουργούν ως αποθήκες μεταβολικών καυσίμων.

Στα σπονδυλωτά, εξειδικευμένα κύτταρα που ονομάζονται *λιποκύτταρα* αποθηκεύουν μεγάλες ποσότητες τριακυλογλυκερολών υπό μορφή σταγονιδίων λίπους που σχεδόν γεμίζουν το κύτταρο. Οι τριακυλογλυκερόλες αποθηκεύονται ως έλαια στους σπόρους πολλών φυτών παρέχοντας ενέργεια και πρόδρομες βιοσυνθετικές ενώσεις κατά τη διάρκεια της γαμετογένεσης. Τα λιποκύτταρα και οι σπόροι που βλασταίνουν περιέχουν λιπάσες. Οι λιπάσες είναι ένζυμα, τα οποία καταλύουν την υδρόλυση των αποθηκευμένων τριακυλογλυκερολών, απελευθερώνοντας λιπαρά οξέα που κατευθύνονται σε θέσεις, όπου απαιτούνται ως καύσιμα.



Εικόνα 9.2 Χημικός τύπος ακόρεστου τριγλυκεριδίου.

- **Κηροί.** Οι βιολογικοί κηροί είναι εστέρες μακρών κορεσμένων (C14-C36) και ακόρεστων λιπαρών οξέων (C16-C30) με μακριές αλυσίδες αλκοολών. Γενικά, έχουν υψηλότερα σημεία τήξης (60-100°C) από τις τριακυλογλυκερόλες. Στο πλαγκτόν, οι κηροί είναι η κυριότερη μορφή αποθήκευσης μεταβολικών καυσίμων. Οι κηροί έχουν, επίσης, ποικίλες άλλες λειτουργίες οι οποίες συσχετίζονται με τις υδροαπωθητικές ιδιότητες και τη συμπαγή σύστασή τους. Οι βιολογικοί κηροί έχουν πολλές εφαρμογές στη φαρμακευτική τεχνολογία, την κοσμητολογία και σε άλλες βιομηχανίες (λανολίνη, κεριά των μελισσών, κεριά *carnauba*).
- **Στερόλες.** Οι στερόλες είναι δομικά λιπίδια που υπάρχουν στη μεμβράνη των περισσότερων ευκαρυωτικών κυττάρων. Η χοληστερόλη, η κυριότερη στερόλη των ζωικών ιστών, είναι αμφιπολική με μια πολική ομάδα κεφαλής (η υδροξύλομάδα στον C-3) και έναν μη πολικό υδρογονανθρακικό σκελετό (ο στεροειδής πυρήνας και η υδρογονανθρακική πλευρική αλυσίδα στον C-17), με μήκος όσο και το μήκος ενός λιπαρού οξέος 16 ατόμων άνθρακα σε εκτεταμένη μορφή. Οι στερόλες, επίσης, λειτουργούν ως πρόδρομες ενώσεις των στεροειδών ορμονών. Τα χολικά οξέα είναι πολικά παράγωγα της χοληστερόλης που γαλακτωματοποιούν τα λίπη των τροφών καθιστώντας τα στόχους για τις λιπάσες της πέψης. Η χοληστερόλη είναι, επίσης, πρόδρομη ένωση της βιταμίνης D.



Εικόνα 9.3 Χημική δομή της χοληστερόλης.

Η χοληστερόλη και οι εστέρες της μεταφέρονται στο πλάσμα του αίματος υπό μορφή λιποπρωτεϊνών του πλάσματος. Πρόκειται για μακρομοριακά σύμπλοκα από ειδικές πρωτεΐνες φορείς, γνωστές ως *απολιποπρωτεΐνες* και ποικίλους συνδυασμούς φωσφολιπιδίων, χοληστερόλης, εστέρων χοληστερόλης και τριακυλογλυκερών (Εικόνα 9.3).

Οι λιποπρωτεΐνες, ανάλογα με τη σειρά αύξησης της πυκνότητας και αύξησης του μεγέθους, χωρίζονται σε:

- **Χυλομικρά:** Σωματίδια με τη μικρότερη πυκνότητα και το μεγαλύτερο μέγεθος.
- **Υπολείμματα χυλομικρών:** Προϊόντα μεταβολισμού των χυλομικρών που περιέχουν λιγότερα λιπίδια είναι πυκνότερα και μικρότερα από τα χυλομικρά.
- **Πολύ χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες (VLDL):** Έχουν μεγαλύτερη πυκνότητα και μικρότερο μέγεθος από τα χυλομικρά.
- **Ενδιάμεσης πυκνότητας λιποπρωτεΐνες (IDL) ή υπολείμματα VLDL:** Είναι προϊόντα μεταβολισμού των VLDL και είναι πυκνότερες και μικρότερες.
- **Χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες (LDL):** Είναι προϊόντα μεταβολισμού των IDL, είναι πυκνότερες και μικρότερες.
- **Λιποπρωτεΐνη (a):** Αποτελείται από ένα σωματίδιο LDL και ένα μόριο της απολιποπρωτεΐνης (a) και έχει μέγεθος και πυκνότητα ίδια με της LDL. Οι LDL, IDL, τα υπολείμματα χυλομικρών και η Lp(a) είναι αθηρογόνες. Εισέρχονται στον έσω χιτώνα των αρτηριών, οξειδώνονται, προσλαμβάνονται από τα κύτταρα του αρτηριακού τοιχώματος, κυρίως, από τα μακροφάγα και μετατρέπονται σε αφρώδη κύτταρα, τα οποία είναι γεμάτα λίπος. Η οξειδωμένη LDL είναι η πιο αθηρογόνος λιποπρωτεΐνη. Οι εστέρες της χοληστερόλης σχηματίζουν τον λιπώδη πυρήνα της αθηρωματικής πλάκας.
- **Υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες HDL:** Είναι τα σωματίδια με τη μεγαλύτερη πυκνότητα και το μικρότερο μέγεθος. Η HDL έχει πολλές προστατευτικές δράσεις για τα αγγεία και είναι η αντιαθηρωματική λιποπρωτεΐνη. Η HDL εμποδίζει την οξείδωση της LDL, ενώ προσλαμβάνει και χοληστερόλη από τα αφρώδη κύτταρα.

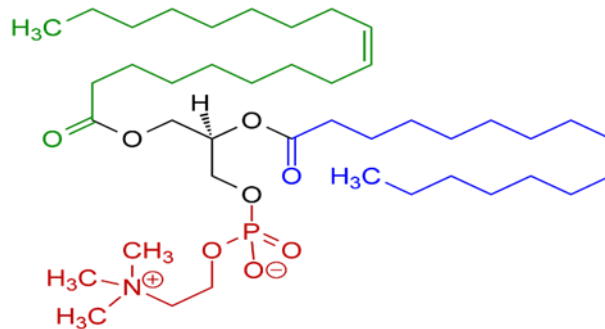
Οι λιποπρωτεΐνες είναι φορτισμένα σωματίδια και με την ηλεκτροφόρηση, ανάλογα με την πυκνότητά τους διαχωρίζονται:

- Στη ζώνη προ-β: κινούνται οι VLDL και μερικές IDL (προ-β-λιποπρωτεΐνες).
- Στη ζώνη β: κινούνται οι LDL και οι υπόλοιπες IDL (β-λιποπρωτεΐνες).
- Στη ζώνη α: κινούνται οι HDL (α-λιποπρωτεΐνες).
- Τα χυλομικρά δεν μετακινούνται.

9.1.5 Κυριότερα πολικά λιπίδια

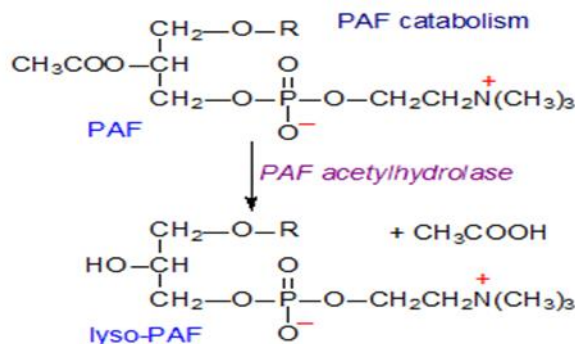
- **Φωσφογλυκερίδια ή γλυκεροφωσφολιπίδια.** Τα φωσφογλυκερίδια είναι μεμβρανικά λιπίδια, στα οποία δύο λιπαρά οξέα συνδέονται με εστερικό δεσμό με το πρώτο και το δεύτερο άτομο άνθρακα της γλυκερόλης, ενώ μια ισχυρά πολική ή φορτισμένη ομάδα είναι συνδεδεμένη μέσω φωσφοδιεστερικού δεσμού με το τρίτο άτομο άνθρακα. Οι αλκοόλες που συναντάμε

συχνότερα στα γλυκεροφωσfolιπίδια είναι η χολίνη, η αιθανολαμίνη, η ινοσιτόλη και η σερίνη. Η πολική αλκοόλη μπορεί να είναι αρνητικά φορτισμένη (όπως στην 4,5-διφωσφορική φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη), ουδέτερη (φωσφατιδυλοσερίνη), ή θετικά φορτισμένη (φωσφατιδυλοχολίνη, φωσφατιδυλαιθανολαμίνη) (Εικόνα 9.4). Στα γλυκεροφωσfolιπίδια, τα λιπαρά οξέα εμφανίζουν μεγάλη ποικιλία. Γενικά, περιέχουν ένα C16 ή C18 κορεσμένο λιπαρό οξύ στο C-1 κι ένα C18-C20 ακόρεστο λιπαρό οξύ στο C-2.



Εικόνα 9.4 1-ελαιο-υλ-2-παλμιτο-υλ-φωσφατιδυλοχολίνη.

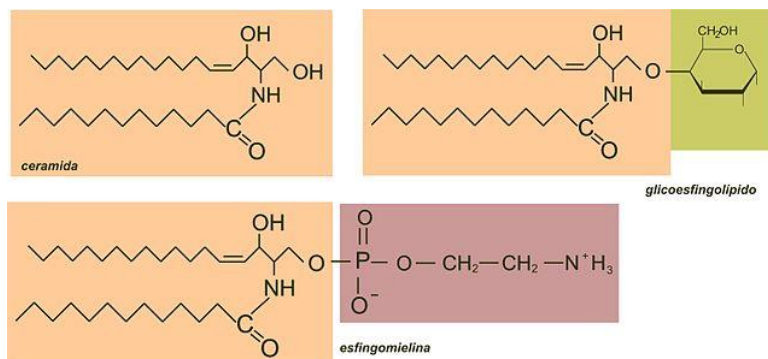
Ορισμένα φωσfolιπίδια έχουν λιπαρά οξέα συνδεδεμένα με αιθερικούς δεσμούς (αιθερικά λιπίδια). Ο καρδιακός ιστός των σπονδυλωτών εμφανίζει ιδιαίτερα υψηλή συγκέντρωση αιθερικών λιπιδίων: περίπου τα μισά φωσfolιπίδια της καρδιάς είναι πλασμαλογόνα (αιθερικά λιπίδια με έναν διπλό δεσμό μεταξύ των C-1 και C-2). Ο παράγοντας ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων (platelet activating factor ή PAF, Εικόνα 9.5) αποτελεί ένα γλυκερλαιθερικό ανάλογο της φωσφατιδυλοχολίνης και η ονομασία της ένωσης κατά IUPAC είναι η 1-O-αλκυλο-2-ακετυλο-sn-γλυκερο-3-φωσφο-χολίνη. Ο PAF μέσω της δέσμευσής του σε έναν καλά χαρακτηρισμένο υποδοχέα ξεκινά μια πληθώρα κυτταρικών προφλεγμονωδών ενεργειών που συμμετέχουν με αυτόν τον τρόπο στην παθολογία των περισσότερων χρόνιων παθήσεων, συμπεριλαμβανομένων των καρδιαγγειακών και νεφρικών παθήσεων, παθήσεων του ΚΝΣ και του καρκίνου. Έχει, επίσης, διαδραματίσει ρόλο σε αρκετές άλλες χρόνιες ασθένειες οι οποίες σχετίζονται με τη φλεγμονή, όπως ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου I και τύπου II, η οξεία παγκρεατίτιδα, η ηπατική βλάβη, οι φλεγμονώδεις οφθαλμικές παθήσεις, η αγγειακή δυσλειτουργία κατά τη διάρκεια οξείας πνευμονικής βλάβης και οι αυτοάνοσες διαταραχές, όπως ρευματοειδής αρθρίτιδα και συστηματικός ερυθματώδης λύκος.



Εικόνα 9.5 Χημικός τύπος του PAF και ο μεταβολισμός του σε lyso – PAF.

- **Σφιγγολιπίδια.** Τα σφιγγολιπίδια είναι μεμβρανικά λιπίδια. Έχουν μια πολική ομάδα κεφαλής και δύο μη πολικές ουρές, όμως, αντίθετα από τα γλυκεροφωσfolιπίδια και τα γαλακτολιπίδια δεν περιέχουν γλυκερόλη. Τα σφιγγολιπίδια συντίθενται από ένα μόριο αμινοαλκοόλης με μακριά αλυσίδα, τη σφιγγοσίνη ή ένα από τα παράγωγά της, ένα μόριο λιπαρού οξέος με μακριά αλυσίδα και μια πολική ομάδα κεφαλής συνδεδεμένη είτε με γλυκοζιτικό δεσμό είτε με φωσφοδιεστερικό δεσμό (Εικόνα 9.6).

Στον άνθρωπο έχουν αναγνωριστεί τουλάχιστον 60 διαφορετικά σφιγγολιπίδια στις κυτταρικές μεμβράνες. Πολλά αφθονούν στην κυτταρική μεμβράνη των νευρώνων και μερικά αποτελούν θέσεις αναγνώρισης στην κυτταρική επιφάνεια. Ωστόσο, για λίγα μόνο σφιγγολιπίδια έχει αναγνωριστεί η ειδική λειτουργία τους. Οι υδρογονανθρακικές μονάδες ορισμένων σφιγγολιπιδίων προσδιορίζουν τις ομάδες αίματος του ανθρώπου κι έτσι καθορίζουν τον τύπο του αίματος που μπορεί να χορηγηθεί με ασφάλεια σε μεταγγίσεις αίματος.



Εικόνα 9.6 Χημικές δομές σφιγγολιπιδίων.

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟ ΜΕΡΟΣ

9.2 Εργαστηριακή άσκηση: Προσδιορισμός σύστασης λιπιδίων σε λιπαρά οξέα με αέρια χρωματογραφία

Η ανάλυση γίνεται με χρωματογραφία αέριας φάσης, συχνά συνδυασμένης με φασματομετρία μάζας, για μοριακή ταυτοποίηση. Επειδή τα λιπίδια δεν είναι πτητικά, προηγείται η υδρόλυση των λιπαρών αλυσίδων των φωσφολιπιδίων με ήπια αλκαλική υδρόλυση και στη συνέχεια τα απελευθερούμενα λιπαρά οξέα καθίστανται πτητικά με παραγωγή μεθυλεστέρων. Και τα δύο βήματα αλκαλικής υδρόλυσης και μετεστεροποίησης γίνονται ταυτόχρονα με την κατεργασία των φωσφολιπιδίων με μεθανολικό τριφθοριούχο βόριο ($\text{BF}_3 - \text{CH}_3\text{OH}$).

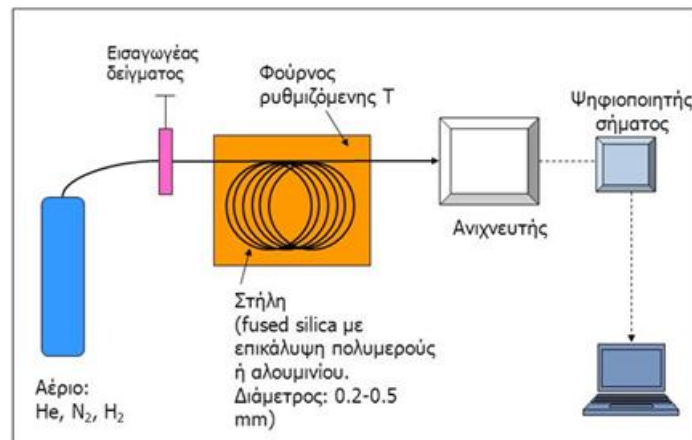
- Δείγμα λιπιδίων περιεκτικότητας 5-20 μmol γλυκεριδίων φέρεται σε βιδωτό δοκιμαστικό σωλήνα και εξατμίζεται ο διαλύτης σε ρεύμα αζώτου.
- Τα λιπίδια αναδιαλύονται σε 1 mL διαλύματος 20 % w/v $\text{BF}_3 - \text{CH}_3\text{OH}$, ο σωλήνας πωματίζεται και θερμαίνεται σε υδατόλουτρο 100 °C επί 90 min.
- Η αντίδραση διακόπτεται με προσθήκη 1 mL νερού. Οι μεθυλεστέρες εκχυλίζονται στον δοκιμαστικό σωλήνα με 2 mL πετρελαϊκού αιθέρα, δύο φορές.
- Τα ενωμένα πετρελαϊκά εκχυλίσματα πλένονται τρεις φορές με 4mL νερού, για πλήρη απομάκρυνση του οξέος, που ελέγχεται με pH- μετρικό χαρτί.
- Στη συνέχεια ξηραίνονται με άνυδρο θειικό νάτριο και μετά από διήθηση και έκπλυση του ηθμού με πετρελαϊκό αιθέρα, ο διαλύτης εξατμίζεται πλήρως.
- Οι μεθυλεστέρες αναδιαλύονται τελικά σε μικρό όγκο πετρελαϊκού αιθέρα (περίπου 30-50 μl) και φυλάσσονται στο ψυγείο για ανάλυση με αέρια χρωματογραφία.
- Συνθήκες χρωματογραφίας:
 - Στήλη: Ατσάλινη, σπειροειδής, μήκους 2 μέτρων και εσωτερικής διαμέτρου 1/8' (= 2,2 mm).
 - Πληρωτικό υλικό: 15% DEGS (ηλεκτρικός εστέρας της διαιθυλενο-γλυκόλης) σε στατική φάση Chromosorb W, AW, 80/100 (γη διατόμων, πλυμένη με οξύ).
 - Ανιχνευτής: Φλόγας ιοντισμού (FID).
 - Θερμοκρασία στήλης, θαλάμου εξαέρωσης και ανιχνευτή: 170, 240 και 270°C αντίστοιχα (ισόθερμη ανάλυση).
 - Ταχύτητα φέροντος αερίου (αζώτου): 30 mL/min.

- ο Ευαισθησία ανιχνευτή $8-64 \times 10^{-11}$.
- Στον αέριο χρωματογράφο γίνονται ενέσεις των δειγμάτων μεθυλεστέρων των λιπαρών οξέων, όγκου 1 μL . Ο ποιοτικός προσδιορισμός των κορυφών του δείγματος γίνεται με σύγκριση των χρόνων κατακράτησής τους, με τους χρόνους κατακράτησης πρότυπων μεθυλεστέρων. Το ισοδύναμο μήκος της αλυσίδας άγνωστου μεθυλεστέρα, υπολογίζεται από τον χρόνο κατακράτησής του. Το εμβαδόν της κάθε κορυφής, που αντιστοιχεί στην ποσότητα του μεθυλεστέρα, υπολογίζεται με ολοκληρωτή-υπολογιστή ή με βάση τον χρόνο κατακράτησης και το ύψος της κορυφής. Σε περίπτωση που ο ανιχνευτής είναι φασματόμετρο μάζας, κάθε κορυφή ταυτοποιείται από βάσεις δεδομένων που περιέχουν τα χαρακτηριστικά θραύσματα των μεθυλεστέρων των λιπαρών οξέων.

9.2.1 Αέρια χρωματογραφία

Η αέρια χρωματογραφία είναι ένα είδος χρωματογραφίας κατανομής, κατά την οποία τα συστατικά ενός μείγματος κατανέμονται ανάμεσα σε μια στατική και μια κινητή φάση. Η στατική φάση είναι υγρή, προσροφημένη στο στερεό υλικό ενός μακρού και στενού σωλήνα, που ονομάζεται *στήλη αέριας χρωματογραφίας*.

Η στήλη είναι τοποθετημένη μέσα σε κλίβανο με ρυθμιζόμενη θερμοκρασία, ο οποίος είναι το κεντρικό μέρος του αέριου χρωματογράφου. Κατά μήκος της στήλης ταξιδεύει η κινητή φάση, η οποία είναι αέρια. Το δείγμα εισάγεται στην αρχή της στήλης και παρασύρεται από την κινητή φάση κατά μήκος της στατικής. Τα συστατικά του δείγματος, λόγω της διαφορετικής χημικής τους δομής, έχουν διαφορετική κατανομή μεταξύ των δύο φάσεων με αποτέλεσμα να κινούνται με διαφορετική ταχύτητα κατά μήκος της στήλης. Η ταχύτητα αυτή εξαρτάται από τη ροή της κινητής φάσης, από τη φύση της στατικής φάσης και από το πρόγραμμα θερμοκρασίας της στήλης (Εικόνα 9.7). Με βάση τις τιμές των χρόνων ανάλυσης των πρότυπων ουσιών επιτυγχάνουμε την ταυτοποίηση των ουσιών αυτών σε άγνωστα μείγματα. Επίσης, μελετάμε τον διαχωρισμό και τη σειρά έκλουσής τους με βάση το σημείο ζέσης, το μοριακό βάρος και την πολικότητα.



Εικόνα 9.7 Διάγραμμα αέριας χρωματογραφίας.

Τύποι αέριας χρωματογραφίας

- Η χρωματογραφία αερίου-στερεού βασίζεται στη χρήση στερεάς στατικής φάσης, όπου η κατακράτηση των αναλυτών είναι αποτέλεσμα φυσικής προσρόφησης.
- Η χρωματογραφία αερίου-υγρού βασίζεται στην κατανομή του αναλύτη μεταξύ της αέριας κινητής και υγρής φάσης, η οποία είναι ακινητοποιημένη στην επιφάνεια ενός αδρανούς στερεού. Η ταυτοποίηση ενός συστατικού που εκλύεται από τη στήλη ενός αεριοχρωματογράφου μπορεί να γίνει με σύγκριση διάφορων παραμέτρων, όπως:
 - ο χρόνος κατακράτησης (t_R),
 - ο συντελεστής κατανομής (K),
 - ο όγκος κατακράτησης (V_R) (ο όγκος της κινητής φάσης που απαιτείται για την πλήρη έκλυση των συστατικών του δείγματος). Η μέτρηση του V_R και όχι του t_R είναι προτιμότερη στην αέρια χρωματογραφία. Η μέση ταχύτητα ροής, F , δεν μπορεί να

μετρηθεί άμεσα, ωστόσο η ταχύτητα ροής του αερίου κατά την έξοδο του από τη στήλη μετριέται εύκολα, συνήθως, χρησιμοποιώντας ροόμετρο φουσαλίδας.

Εάν F_m είναι η μετρούμενη ταχύτητα ροής, T_c η θερμοκρασία της στήλης, T η θερμοκρασία στο ροόμετρο και P η πίεση στην έξοδο της στήλης, ισχύει η σχέση:

$$F = F_m \times \frac{T_c}{T} \times \frac{P - P_{H_2O}}{P}$$

Καθώς το φέρον αέριο διέρχεται από τη στήλη, η πίεσή του ελαττώνεται συνεχώς (αλλά όχι γραμμικά) από την πίεση εισόδου, P_i , στην πίεση εξόδου, P_0 , ενώ ο όγκος του αερίου και η ταχύτητα ροής αυξάνονται αντιστρόφως προς την πίεση.

9.3 Εργαστηριακή άσκηση: Εκχύλιση λιπιδίων με διαλύτες

9.3.1 Απομόνωση λιπιδίων I

- Ζυγίζουμε σε σωλήνα φυγόκεντρου 5g δείγματος.
- Προσθέτουμε 5 mL $CHCl_3$, 10 mL CH_3OH και 0,05 mL υδατικού διαλύματος $MgCl_2$ 0,2 M.
- Αναμειγνύουμε για 2 λεπτά.
- Προσθέτουμε 5 mL $CHCl_3$ και αναμειγνύουμε ξανά για 2 λεπτά.
- Προσθέτουμε τόση ποσότητα απιονισμένου νερού, ώστε η ολική ποσότητα νερού να γίνει 9 mL. Αναμειγνύουμε για 30 δευτερόλεπτα.
- Φυγοκεντρούμε στις 3500 στροφές για 5 λεπτά.
- Λαμβάνουμε τη στιβάδα του $CHCl_3$ (η κάτω) με πιπέττα Pasteur. Τη στιβάδα του $CHCl_3$ την τοποθετούμε σε γυάλινο σωλήνα.
- Στο υπερκείμενο υγρό προσθέτουμε 10 mL $CHCl_3$ και αναμειγνύουμε για 2 λεπτά. Φυγοκεντρούμε στις 3500 στροφές για 5 λεπτά.
- Λαμβάνουμε με καθαρή πιπέττα τη στιβάδα του $CHCl_3$ και το υπερκείμενο υγρό απορρίπτεται. Αναμειγνύουμε τη στιβάδα του $CHCl_3$ με την ποσότητα που έχουμε πάρει στο στάδιο 7.
- Προσθέτουμε 10 mL $NaCl$ 0,1% και αναμειγνύουμε για 1 λεπτό. Φυγοκεντρούμε στις 3500 στροφές για 5 λεπτά και με μια πιπέττα αφαιρούμε την υδατική φάση. Εάν το γαλάκτωμα δεν έχει διαλυθεί με τη φυγοκέντρωση, προσθέτουμε 1-2 mL διαλύματος $MgCl_2$, φυγοκεντρούμε ξανά στις 4000 στροφές για 5 λεπτά και αφαιρούμε με μια πιπέττα την υδατική φάση, όπως παραπάνω.
- Με μια άλλη πιπέττα παίρνουμε τη στιβάδα του $CHCl_3$ σε άλλον σωλήναφυγόκεντρου. Προσθέτουμε 1-2 g σκόνης άνυδρου θεικού νατρίου (Na_2SO_4), αναδεύουμε ισχυρά, για να απομακρύνουμε την υγρασία από το $CHCl_3$. Με πιπέττα λαμβάνουμε όλη την ποσότητα του $CHCl_3$, χωρίς να λάβουμε καθόλου Na_2SO_4 και αδειάζουμε σε μια προζυγισμένη, ξηρή, εσφυρισμένη, σφαιρική φιάλη.
- Θερμαίνουμε ελαφρά υπό ρεύμα αζώτου, για να εξατμιστεί το $CHCl_3$. Η φιάλη φυλάγεται στο ψυγείο, αφού σφραγιστεί με parafilm.

9.3.2 Απομόνωση λιπιδίων II

- 2 – 5 mL ολικού αίματος προστίθενται σε γυάλινο σωλήνα που περιέχει αιθανόλη με αναλογία 1:4 και ακολουθεί φυγοκέντρωση για 30 min στα 1100 x g.
- Στο υπερκείμενο προστίθενται χλωροφόρμιο και νερό, ώστε να προκύψει διφασικό σύστημα με αναλογία χλωροφόρμιο: αιθανόλη:νερό = 1:1:0,9.
- Η χλωροφορμική φάση εξατμίζεται και τα λιπίδια αναδιαλύονται σε διάλυμα χλωροφορμίου:μεθανόλης = 2:1.

9.3.3 Απομόνωση μεμβρανικών λιπιδίων από ερυθρά αιμοσφαίρια

Η πλασματική μεμβράνη του ανθρώπινου ερυθροκυττάρου αποτελείται κυρίως από λιπιδική διπλοστιβάδα. Η διπλοστιβάδα αυτή αποτελείται από χοληστερόλη και φωσφολιπίδια σε παρόμοια αναλογία κατά βάρος. Η λιπιδική σύσταση είναι σημαντική, διότι καθορίζει τη διαπερατότητα και τη ρευστότητα της πλασματικής μεμβράνης. Επιπρόσθετα, η λειτουργία πολλών μεμβρανικών πρωτεϊνών επηρεάζεται από τις αλληλεπιδράσεις τους με τα λιπίδια της διπλοστιβάδας.

Σε αντίθεση με τη χοληστερόλη η οποία βρίσκεται σε παρόμοιες ποσότητες τόσο στην εξωτερική όσο και στην εσωτερική στιβάδα της διπλοστιβάδας, τα πέντε κύρια φωσφολιπίδιά της είναι ασύμμετρα καταναμημένα σε αυτήν.

Εξωτερική στιβάδα. Φωσφατιδυλοχολίνη (PC), Σφιγγομυελίνη (SM).

Εσωτερική στιβάδα. Φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη (PE), Φωσφορική ινοσιτόλη (PI) (σε μικρές ποσότητες) Φωσφατιδυλοσερίνη (PS).

- Απομόνωση ερυθρών αιμοσφαιρίων. Σε 1 mL δείγματος γενικής αίματος προσθέτουμε 5 mL φυσιολογικό ορό και φυγοκεντρούμε για 2 min στα 3000 rpm. Αφαιρούμε το υπερκείμενο και προσθέτουμε στο ίζημα (που περιέχει ερυθρά αιμοσφαίρια) 5 mL φυσιολογικό ορό. Φυγοκεντρούμε για 2 min στα 3000 rpm.
- Απομόνωση μεμβρανών. Αφαιρούμε το υπερκείμενο από το προηγούμενο στάδιο και στο ίζημα προσθέτουμε 5 mL H₂O με 0,1 % βουτυλιωμένο υδροξυ-τολουόλιο (BHT). Φυγοκεντρούμε για 5 min στα 10000 rpm. Αφαιρούμε το υπερκείμενο (που περιέχει το κυτταρόπλασμα) και στο ίζημα προσθέτουμε ξανά 5 mL H₂O με 0,1 % BHT. Φυγοκεντρούμε για 5 min στα 10000 rpm. Στο ίζημα προσθέτουμε 0,4 mL φυσιολογικό ορό.
- Εκχύλιση λιπιδίων. Στο ίζημα από το προηγούμενο στάδιο, προσθέτουμε 0,5 mL μεθανόλης και αναδεύουμε. Στη συνέχεια, προσθέτουμε 1,5 mL διαλύματος χλωροφορμίου: μεθανόλης = 1:2 και αναδεύουμε. Προσθέτουμε 0,5 mL χλωροφόρμιο. Προσθέτουμε 0,5 mL H₂O με 0,1 % BHT και φυγοκεντρούμε για 2 min στα 3000 rpm. Μεταφέρουμε την οργανική κάτω φάση με πιπέττα Pasteur σε καθαρό σωλήνα και συνεχίζουμε με χρωματογραφία TLC.

9.4 Εργαστηριακή άσκηση: Διαχωρισμός λιπιδίων με TLC

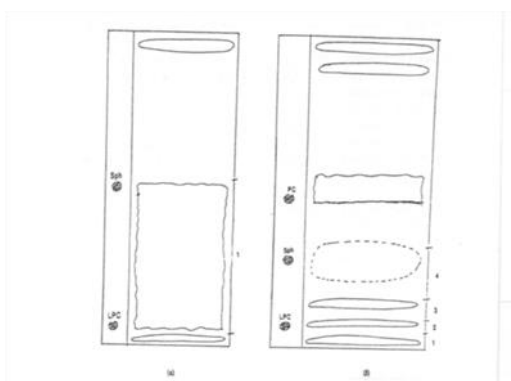
- Διπλά δείγματα του 1mL από την εργαστηριακή άσκηση: Εκχύλιση λιπιδίων με διαλύτες μεταφέρονται σε γυάλινους δοκιμαστικούς σωλήνες και εξατμίζονται μέχρι ξηρού σε ατμόσφαιρα αζώτου.
- Το υπόλειμμα επαναδιαλύεται με περίπου 4 σταγόνες χλωροφορμίου και τοποθετείται ποσοτικά σε μία λωρίδα της πλάκας, με μορφή γραμμής. Στις δύο ακραίες λωρίδες τοποθετούνται πρότυπες ενώσεις φωσφατιδυλαιθανολαμίνης (PE) και φωσφατιδυλοχολίνης (PC) ή εκχύλισμα αυγού, που περιέχει κυρίως PE, PC και σφιγγομυελίνη (Sph).
- Η πλάκα αφήνεται να αναπτυχθεί για μία ώρα σε ερμητικά κλειστό θάλαμο χρωματογραφίας κορεσμένο με μείγμα CHCl₃:CH₃OH:H₂O (65:25:4, v/v/v).
- Μετά το τέλος της χρωματογραφίας, σημειώνουμε με μολύβι το μέτωπο του διαλύτη και η πλάκα στεγνώνεται (σε απαγωγό εστία, με ρεύμα ζεστού αέρα).
- Στη συνέχεια η πλάκα εμφανίζεται σε ατμούς ιωδίου για 2min (σημειώνουμε τις κηλίδες που εμφανίζονται με χρώμα κίτρινο). Μετράμε τα R_f και αντιστοιχίζουμε τα πρότυπα (PE,PC) με τις κηλίδες που εμφανίζονται στα δείγματά μας.
- Κατόπιν, ψεκάζουμε με διάλυμα νινυδρίνης και τοποθετούμε την πλάκα σε φούρνο 100°C για 3min. Τα λιπίδια που περιέχουν ελεύθερη αμινομάδα (π.χ. η PE) εμφανίζονται ροζ, λόγω της χαρακτηριστικής αντίδρασης νινυδρίνης.
- Στη συνέχεια ψεκάζουμε την πλάκα με το διάλυμα κυανού του μολυβδαινίου για την εμφάνιση των φωσφολιπιδίων. Μέσα σε 10 min, σε θερμοκρασία δωματίου, τα φωσφολιπίδια εμφανίζονται ως σκούρες μπλε κηλίδες.
- Παρασκευή του διαλύματος κυανού του μολυβδαινίου:

- Διάλυμα Α: 5,66 g ένυδρου μολυβδαινικού αμμωνίου διαλύονται με θέρμανση σε 35 mL απιονισμένου νερού. Στη συνέχεια, προστίθενται 15 mL πυκνού θειικού οξέος, το διάλυμα βράζεται για 30 min και αραιώνεται σε τελικό όγκο 50 mL.
- Διάλυμα Β: 1,75 g ένυδρου θειικού χαλκού διαλύονται σε 20 mL απιονισμένου νερού. Προστίθενται 20 mL NaOH 1M και 15 mL γλυκόζης 10%. Το διάλυμα (μπλε με ίζημα) θερμαίνεται για 5 min μέχρι να αποκτήσει κεραμιδί χρώμα λόγω σχηματισμού υποξειδίου του χαλκού. Μετά την ψύξη και απόχυση του υπερκείμενου, το ίζημα εκπλένεται με νερό.
- Διάλυμα Ι: Στο ίζημα που σχηματίστηκε στο διάλυμα Β, προστίθενται 10 mL από το διάλυμα Α, θερμαίνονται μέχρι βρασμού και στη συνέχεια προστίθενται 15 mL από το διάλυμα Α και 25 mL πυκνό θειικό οξύ. Το διάλυμα βράζεται για 15 min και αραιώνεται σε τελικό όγκο 50 mL.
- Διάλυμα ΙΙ: Στα υπόλοιπα 25 mL του διαλύματος Α προστίθενται 25 mL πυκνό θειικό οξύ.
- Το αντιδραστήριο κυανού του μολυβδαινίου προκύπτει με την ανάμειξη ίσων όγκων των διαλυμάτων Ι και ΙΙ και αραιώσή του με ίσο όγκο απιονισμένου νερού.

9.4.1 Απομόνωση του PAF με TLC

Για την απομόνωση του PAF γίνονται δύο διαφορετικές χρωματογραφίες: Η πρώτη γίνεται με διαλύτη ανάπτυξης μεθανόλη: νερό = 2:1. Μετά την εμφάνιση των λιπιδίων σε ατμούς ιωδίου, αποξύνεται από την πλάκα η περιοχή με R_f 0,3 – 0,6. Το πυριτικό οξύ της πλάκας μεταφέρεται σε σωλήναφυγόκεντρο, και προστίθεται σε αυτό διάλυμα χλωροφορμίου: μεθανόλης: νερού = 1:2:0,8. Μετά τη φυγοκέντρηση, απομακρύνεται το πυριτικό οξύ και το μονοφασικό σύστημα διαλυτών μετατρέπεται σε διφασικό (χλωροφόρμιο: μεθανόλη: νερό = 1:1:0,9). Η χλωροφορμική φάση εξατμίζεται σε ρεύμα αζώτου, αναδιαλύεται σε μικρή ποσότητα χλωροφορμίου: μεθανόλης = 2:1 και επαναχρωματογραφείται σε διάλυμα ανάπτυξης χλωροφόρμιο: μεθανόλη:νερό = 65:35:6 (Εικόνα 9.8).

Μετά την ανάπτυξη της πλάκας και την εμφάνισή της σε ατμούς ιωδίου αποξύνονται από την πλάκα οι περιοχές που συγχρωματογραφούνται με τα πρότυπα διαλύματα lyso -PC, Sph, PC, καθώς και η περιοχή μεταξύ lyso -PC και Sph που σύμφωνα με τη βιβλιογραφία αντιστοιχεί στον PAF. Ακολουθεί εκχύλιση κατά Bligh – Dyer, η χλωροφορμική φάση παραλαμβάνεται ποσοτικά, ο οργανικός διαλύτης εξατμίζεται ποσοτικά και τα λιπίδια επαναδιαλύονται σε μικρή ποσότητα αιθανόλης.



Εικόνα 9.8 Χρωματογραφικός προσδιορισμός των λιπιδίων του αίματος α) 1η TLC σε μεθανόλη: νερό = 2:1 και β) 2η TLC σε χλωροφόρμιο: μεθανόλη:νερό = 65:35:6.

Εάν χρησιμοποιηθεί ως διάλυμα ανάπτυξης ο πετρελαϊκός αιθέρας: αιθέρας: οξικό οξύ = 70:30:1, διαχωρίζονται τα ουδέτερα λιπίδια.

9.4.2 Εκχύλιση κατά Bligh – Dyer

Αρχή Μεθόδου

Με κατάλληλης πολικότητας μονοφασικό σύστημα διαλυτών επιτυγχάνεται η εκχύλιση όλων των λιποειδών, καθώς επίσης και η εκχύλιση μικρών ποσοτήτων υδατοδιαλυτών ενώσεων, όπως είναι διάφορα άλατα, αμινοξέα και σάκχαρα. Με τη μετατροπή του μονοφασικού συστήματος σε διφασικό σύστημα, αυτό αποτελείται από χλωροφορμική φάση, όπου κατανέμονται όλα τα λιποειδή και υδατική, όπου κατανέμονται τα υδατοδιαλυτά συστατικά.

Αναλυτική πορεία

Το προς εκχύλιση δείγμα κατεργάζεται με μείγμα CHCl_3 : CH_3OH : H_2O (1/2/0,8 v/v/v), αναδεύεται έντονα με τη βοήθεια κυκλοαναδευτήρα. Η έντονη ανάδευση επαναλαμβάνεται περιοδικά για διάστημα 10 min. Στη συνέχεια και εφόσον είναι απαραίτητο, το δείγμα φυγοκεντρείται, ώστε να απομακρυνθούν τα αδιάλυτα συστατικά. Ακολούθως προστίθενται συγκεκριμένες ποσότητες CHCl_3 και H_2O , ώστε η αναλογία των διαλυτών CHCl_3 : CH_3OH : H_2O να γίνει 1/1/0.9 v/v/v, όπου σχηματίζονται δύο φάσεις διαλυτών. Η κάτω φάση που είναι η χλωροφορμική φάση και περιέχει τα λιποειδή μεταφέρεται είτε σε δοκιμαστικό σωλήνα, οπότε το δείγμα εξατμίζεται έως ξηρού σε ρεύμα αζώτου είτε σε σφαιρική φιάλη, οπότε ο διαλύτης εξατμίζεται έως μικρό όγκο σε περιστρεφόμενη συσκευή εξάτμισης υπό ελαττωμένη πίεση και στη συνέχεια γίνεται μεταφορά σε δοκιμαστικό σωλήνα, όπου συνεχίζεται η εξάτμιση έως ξηρού σε ρεύμα αζώτου. Σε όλες τις περιπτώσεις, η θερμοκρασία εξάτμισης κυμαίνεται από 30-35°C. Τα λιποειδή αναδιαλύονται σε μικρή ποσότητα δείγματος CHCl_3 : CH_3OH (1/1, v/v) για περαιτέρω επεξεργασία.

9.5 Εργαστηριακή άσκηση: Προσδιορισμός λιπιδίων με εγγύς υπέρυθρη φασματοσκοπία

Η εγγύς υπέρυθρη φασματοσκοπία (NIR) σε συνδυασμό με χημειομετρικά εργαλεία μπορεί να προσφέρει μια εναλλακτική λύση στις μεθόδους χρωματογραφίας για τον προσδιορισμό κατηγοριών λιπιδίων και λιπαρών οξέων. Οι μετρήσεις NIR είναι γρήγορες και μη καταστρεπτικές για τα δείγματα, δεν απαιτούν κανένα βήμα προεπεξεργασίας δείγματος ούτε χρήση αντιδραστηρίων και διαλυτών και δεν δημιουργούν υπολείμματα, καθιστώντας τις φιλικές προς το περιβάλλον μεθοδολογίες.

Επιπλέον, το NIR επιτρέπει τον ταυτόχρονο προσδιορισμό πολλών διαφορετικών στο ίδιο δείγμα με μία μόνο ανάλυση. Επιπλέον, τα δείγματα τοποθετούνται σε κλειστά γυάλινα φιαλίδια, ώστε να αποφεύγεται η αλλοίωσή τους και η πιθανά διασταυρούμενη μόλυνσή τους. Καταλήγοντας, η φασματοσκοπία NIR αποτελεί μια καλή εναλλακτική λύση των παραδοσιακών μεθόδων φασματοσκοπίας.

- Τα φάσματα NIR των ελαίων σολομού λαμβάνονται μεταξύ 14.000 και 4500 cm^{-1} χρησιμοποιώντας 1 mL συνολικό όγκο δείγματος σε γυάλινα φιαλίδια. Κάθε φάσμα αποτελείται από 50 σαρώσεις με οπτική ανάλυση 4 cm^{-1} .
- Το φάσμα φόντου λαμβάνεται με ένα κενό γυάλινο φιαλίδιο υπό τις ίδιες συνθήκες οργάνου με αυτές που χρησιμοποιούνται για τις μετρήσεις των δειγμάτων.
- Για κάθε δείγμα λαμβάνονται τρεις μετρήσεις περιστρέφοντας τη θέση του φιαλιδίου του δείγματος. Η μέση τιμή των τριπλών φασμάτων κάθε δείγματος χρησιμοποιείται για την κατασκευή μοντέλων βαθμονόμησης (PLS) και για πρόγνωση.
- Οι ζώνες απορρόφησης στα 8560 και 7065 cm^{-1} αντιστοιχούν σε δονήσεις τάσης των CH_3 and CH_2 αντίστοιχα, ενώ στα 7181 και 7065 cm^{-1} αντιστοιχούν στη ζώνη συνδυασμού C – H. Οι κορυφές στα 5792 και 5676 cm^{-1} προκύπτουν από τις δονήσεις τάσης των ομάδων CH_3 , CH_2 και $-\text{HC}=\text{CH}$. Κορυφή στα 4654 cm^{-1} σχετίζεται με ζώνες απορρόφησης δονήσεων τάσης των C-H και C-O.
- Διάφορα μοντέλα PLS-NIR έχουν αναπτυχθεί, για να προβλέψουν:
 - τα κύρια λιπαρά οξέα στο λάδι σολομού, όπως τα οξέα παλμιτικό οξύ (PA), ελαϊκό οξύ (OA), λινολενικό οξύ (ALA) και λινολεϊκό οξύ (LA),
 - τις οικογένειες λιπαρών οξέων, όπως ωμέγα-3, ωμέγα-6, πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFA), μονοακόρεστα λιπαρά οξέα (MUFA) και κορεσμένα λιπαρά οξέα (SFA),

- ο τις κατηγορίες λιπιδίων, όπως τριγλυκερίδια (TAG), διγλυκερίδια (DAG), ελεύθερα λιπαρά οξέα (FFA) και εργοστερόλη.

9.6 Εργαστηριακή άσκηση: Ποσοτικός προσδιορισμός φωσφολιπιδίων

Ο φωτομετρικός προσδιορισμός λιπιδικού φωσφόρου βασίζεται στη μετατροπή του οργανικού φωσφόρου σε ανόργανα φωσφορικά ιόντα μετά από καύση, στον σχηματισμό φωσφορομολυβδαινικών με την προσθήκη μολυβδαινικού αμμωνίου και τέλος αναγωγή αυτού προς κυανού του φωσφορομολυβδαινίου με θέρμανση σε όξινο περιβάλλον. Το μείγμα φωτομετρείται στα 820 nm. Ως αναγωγικό χρησιμοποιείται αμινο-ναφθολο-σουλφονικό οξύ (ANSA).

- Φωσφολιπίδια μετά από TLC από την εργαστηριακή άσκηση: Διαχωρισμός λιπιδίων με TLC. Αποξύνουμε προσεκτικά τις κηλίδες PE και PC από την TLC και τις μεταφέρουμε σε δοκιμαστικούς σωλήνες. Προσθέτουμε σε όλους τους σωλήνες 0,5 mL HClO₄ 70% και ακολουθεί καύση σε αμμόλουτρο 170-180°C για μία ώρα.
- Μετά το τέλος της καύσης, τα δείγματα αφήνονται να ψυχθούν και προστίθενται σε όλους τους σωλήνες από 1 mL H₂O.
- Δημιουργία καμπύλη αναφοράς: Σε έξι δοκιμαστικούς σωλήνες προσθέτουμε από το πρότυπο διάλυμα KH₂PO₄ αντίστοιχα: 0, 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 και 1,0 mL, συμπληρώνουμε με H₂O μέχρι το 1,0 mL και προσθέτουμε σε κάθε σωλήνα 0,5 mL HClO₄.
- Το πρότυπο διάλυμα φωσφορικών KH₂PO₄ περιέχει 4μg φωσφόρου/mL ή 1,7575 mg KH₂PO₄ σε 100 mL. Το KH₂PO₄ ξηραίνεται στους 105°C για μία ώρα, πριν ζυγιστεί.
- Σε όλους τους σωλήνες προτύπων και δειγμάτων προσθέτουμε 3 mL μολυβδαινικού αμμωνίου και μετά από ισχυρή ανάδευση 0,5 mL αντιδραστήριου ANSA. Ακολουθεί ανάδευση και θέρμανση σε υδατόλουτρο 100°C για 15 min ακριβώς.
- Το διάλυμα μολυβδαινικού αμμωνίου 0,4% περιέχει 2,125 g μολυβδαινικό αμμώνιο. 4H₂O σε 500 mL. Το διάλυμα ANSA περιέχει 30g NaHSO₃ (ή 28,5g Na₂S₂O₅) και 6 g Na₂SO₃ σε 250mL νερού. Σ' αυτό το διάλυμα των θειωδών αλάτων διαλύονται 0,5 g, 1,2,4-αμινο-ναφθο-σουλφονικού οξέος (ANSA). Εάν σε 3 ώρες σχηματιστεί ίζημα, διηθείται και διατηρείται σε ψυγείο.
- Το αντιδραστήριο ANSA προκύπτει από ανάμειξη 4 mL διαλύματος ANSA με 6mL νερό. Παρασκευάζεται πριν από την εκτέλεση του πειράματος.
- Μετά το πέρας της θέρμανσης, οπότε έχει ολοκληρωθεί η αντίδραση (κριτήριο πλήρους καύσης είναι ο αποχρωματισμός των δειγμάτων), οι σωλήνες ψύχονται σε λουτρό νερού βρύσης. Τα δείγματα χρωματίζονται μπλε ανάλογα με τη συγκέντρωση σε φωσφορικά. Τα τυφλά δείγματα παραμένουν χωρίς χρώμα.
- Προστίθενται 5 mL οξικού αιθυλεστέρα. Μετά από ισχυρή ανάδευση των σωλήνων, το μπλε σύμπλοκο εκχυλίζεται στην οργανική στιβάδα. Ακολουθεί φωτομέτρηση στα 780 nm της πάνω φάσης στην οποία έχει εκχυλιστεί ποσοτικά το μείγμα κυανού του φωσφορομολυβδενίου.
- Χαράσσουμε την καμπύλη αναφοράς A780, γ φωσφόρου και υπολογίζουμε την περιεκτικότητα κάθε άγνωστου δείγματος σε φωσφόρο με βάση την πρότυπη καμπύλη.

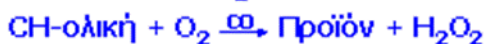
9.7 Εργαστηριακή άσκηση: Ποσοτικός προσδιορισμός ολικής χοληστερόλης ορού αίματος

Το πρωτόκολλο ανάλυσης αποτελεί μια λεπτομερή περιγραφή της πορείας ενός συγκεκριμένου προσδιορισμού που είναι πλήρως προδιαγεγραμμένη και εγκεκριμένη. Η περιγραφή αυτή περιλαμβάνει μια σειρά πληροφοριών που αναφέρονται παρακάτω. Στο Σχήμα 9.7 φαίνονται οι αντιδράσεις προσδιορισμού της χοληστερόλης με μέθοδο τελικού σημείου βασισμένη στο ενζυμικό σύστημα CO/POD (οξειδάση της χοληστερόλης / υπεροξειδάση).

Παρουσία του ενζύμου εστεράση της χοληστερόλης (CE), οι εστέρες της χοληστερόλης υδρολύονται προς χοληστερόλη (CH) και η ολική CH με τη βοήθεια του ενζύμου οξειδάση της χοληστερόλης (CO) οξειδώνεται και παράγει H₂O₂. Η αντίδραση του H₂O₂ με φαινολικό παράγωγο και 4 - αμινοφαιναζόνη

καταλύεται από το ένζυμο υπεροξειδάση (POD) και παράγει έγχρωμο προϊόν ερυθρού χρώματος. Η αύξηση της απορρόφησης στα 510 nm είναι ανάλογη της συγκέντρωσης της χοληστερόλης στο δείγμα.

Οι σχετικές αντιδράσεις είναι:



Το πρωτόκολλο για τον προσδιορισμό της χοληστερόλης στον ορό περιέχει:

Ένζυμα (CO, CE, POD): Μπορεί να είναι φυτικής, ζωικής ή βακτηριακής προέλευσης, φυσικά ή γενετικά τροποποιημένα.

Συμπαράγοντες, ενεργοποιητές, ιόντα: Δεν καταναλώνονται κατά την αντίδραση, όμως, την επιταχύνουν πολύ σημαντικά, π.χ. ιόντα Mg^{+2} .

Άλλα αντιδρώντα: H_2O , O_2 . Αυτό σημαίνει ότι η αντίδραση οξειδωσης της χοληστερόλης πρέπει να γίνει υπό αερόβιες συνθήκες και σε υδατικό περιβάλλον.

Χρωμογόνο: Η ουσία η οποία κατά την αντίδραση θα μετατραπεί σε έγχρωμο προϊόν, το ζεύγος φαινολικό παράγωγο και 4-αμινοφαιναζόνη.

Ρυθμιστικό διάλυμα: Με σκοπό τη διατήρηση σταθερού pH και ιοντικής ισχύος, ώστε η ενζυματική μετατροπή να διεξάγεται υπό τις βέλτιστες συνθήκες. Στο συγκεκριμένο πρωτόκολλο χρησιμοποιείται ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 0,2 M pH 8,0. Τα χρωμογόνο, ένζυμο, ρυθμιστικό διάλυμα, συμπαράγοντες και άλλα τυχόν απαιτούμενα αντιδρώντα αποτελούν τα συστατικά του αντιδραστήριου εργασίας.

Σε τρεις δοκιμαστικούς σωλήνες προσθέτουμε τα εξής:

	Λευκό ή Τυφλό	Δείγμα	Πρότυπο
Αντιδραστήριο εργασίας	2mL	2mL	2mL
Χοληστερόλη 200 mg/dL			20 μL
Απεσταγμένο νερό	20 μL		
Δείγμα (ορός)		20 μL	

Οι σωλήνες πωματίζονται και ακολουθεί ανάμειξη. Οι τρεις δοκιμαστικοί σωλήνες επωάζονται σε υδρόλουτρο στους 37°C για 5 min. Οι σωλήνες αποσύρονται από το υδρόλουτρο, επαναφέρονται σε θερμοκρασία δωματίου και φωτομετρείται το περιεχόμενό τους στα 510 nm. Ο μηδενισμός του φωτομέτρου γίνεται με το τυφλό αντιδραστήριο.

Με βάση τον νόμο Beer-Lambert: $A = \epsilon \cdot C \cdot l$ και αφού η ουσία είναι ίδια και όλα τα διαλύματα μετριούνται στην ίδια κυβελίδα, θα είναι $\epsilon = \text{σταθερό}$, $l = \text{σταθερό}$.

Διαιρώντας κατά μέλη:

$$A_{\Delta} = \epsilon \times C_{\Delta} \times l$$

$$A_{\Pi} = \epsilon \times C_{\Pi} \times l \quad \text{προκύπτει ότι:}$$

$$C_{\Delta} = \frac{A_{\Delta}}{A_{\Pi}} \times C_{\Pi}$$

Οι τιμές αναφοράς της χοληστερόλης στον ορό σύμφωνα με το πρωτόκολλο είναι 140 - 200 mg/dL.

- Εάν το φωτόμετρο απαιτεί μεγαλύτερο όγκο φωτομέτρησης ή εάν δεν διαθέτετε κατάλληλη πιπέττα για τη λήψη του απαιτούμενου όγκου, αυξήστε τους χρησιμοποιούμενους όγκους αναλογικά.

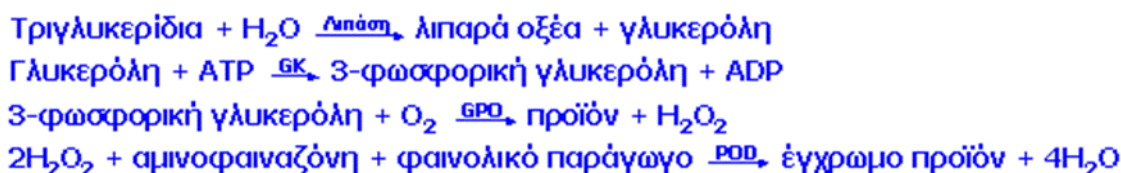
- Η χρήση του πρότυπου διαλύματος στη βαθμονόμηση του αναλυτή δεν συνιστάται λόγω διαφορετικής υφής του φέροντος μείγματος (matrix) ως προς τον ορό. Σε πολλές περιπτώσεις η επίδραση αυτή είναι αμελητέα σε άλλες, όμως, όχι. Γι' αυτόν τον λόγο η χρήση του πρότυπου διαλύματος ως calibrator ή ορός ελέγχου δεν επιτρέπεται.
- Σε περίπτωση που η περιεκτικότητα του δείγματος σε χοληστερόλη είναι εκτός των ορίων γραμμικότητας της μεθόδου, αραιώστε το δείγμα με φυσιολογικό ορό σε αναλογία 1:2 (δηλαδή 0,1 mL δείγματος + 0,2 mL φυσιολογικού ορού). Επαναλάβετε τον προσδιορισμό και πολλαπλασιάστε τα αποτελέσματα επί 3.

9.8 Εργαστηριακή άσκηση: Ποσοτικός προσδιορισμός τριγλυκεριδίων ορού αίματος

Το πρωτόκολλο ανάλυσης αποτελεί μια λεπτομερή περιγραφή της πορείας ενός συγκεκριμένου προσδιορισμού η οποία είναι πλήρως προδιαγεγραμμένη και εγκεκριμένη. Η περιγραφή αυτή περιλαμβάνει μια σειρά πληροφοριών που αναφέρονται παρακάτω.

Η παρουσία του ενζύμου λιποπρωτεϊνική λιπάση καταλύει την υδρόλυση των τριγλυκεριδίων και η παραγόμενη γλυκερόλη με τη βοήθεια του ενζύμου κινάση της γλυκερόλης (GK) φωσφορυλιώνεται. Η 3-φωσφορική γλυκερόλη παρουσία του ενζύμου 3-φωσφορική οξειδάση της γλυκερόλης (GPO) οξειδώνεται με ταυτόχρονη παραγωγή H_2O_2 , η αντίδραση του οποίου με φαινολικό παράγωγο και αμινοφαιναζόνη καταλύεται από το ένζυμο υπεροξειδάση (POD) και παράγει έγχρωμο προϊόν ερυθρού χρώματος. Η αύξηση της απορρόφησης στα 510 nm είναι ανάλογη της συγκέντρωσης των τριγλυκεριδίων στο δείγμα.

Οι σχετικές αντιδράσεις είναι:



Το πρωτόκολλο για τον προσδιορισμό των τριγλυκεριδίων στον ορό περιέχει:

Ένζυμα (λιπάση, GK, GPO, POD): Μπορεί να είναι φυτικής, ζωικής ή βακτηριακής προέλευσης, φυσικά ή γενετικά τροποποιημένα.

Συμπαράγοντες, ενεργοποιητές, ιόντα: Δεν καταναλώνονται κατά την αντίδραση, όμως, την επιταχύνουν πολύ σημαντικά, π.χ. ιόντα Mg^{+2} . Άλλα αντιδρώντα: H_2O , O_2 . Αυτό σημαίνει ότι η αντίδραση οξειδωσης πρέπει να γίνει υπό αερόβιες συνθήκες και σε υδατικό περιβάλλον.

Χρωμογόνο: Η ουσία η οποία κατά την αντίδραση θα μετατραπεί σε έγχρωμο προϊόν, το ζεύγος φαινολικό παράγωγο και 4-αμινοφαιναζόνη.

Ρυθμιστικό διάλυμα: Με σκοπό τη διατήρηση σταθερού pH και ιοντικής ισχύος, ώστε η ενζυματική μετατροπή να διεξάγεται υπό τις βέλτιστες συνθήκες. Στο συγκεκριμένο πρωτόκολλο χρησιμοποιείται ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 0,2 M pH 8,0. Τα χρωμογόνο, ένζυμο, ρυθμιστικό διάλυμα, συμπαράγοντες και άλλα τυχόν απαιτούμενα αντιδρώντα αποτελούν τα συστατικά του αντιδραστήριου εργασίας.

Σε τρεις δοκιμαστικούς σωλήνες προσθέτουμε τα εξής:

	Λευκό	Δείγμα	Πρότυπο
Αντιδραστήριο εργασίας	1 mL	1 mL	1 mL
Τριγλυκερίδια 200 mg/dL			20 μ L
Απεσταγμένο νερό	20 μ L		
Δείγμα (ορός)		20 μ L	

Οι σωλήνες πωματίζονται και ακολουθεί ανάμειξη. Οι τρεις δοκιμαστικοί σωλήνες επωάζονται σε υδρόλουτρο τους 37°C για 5 min. Οι σωλήνες αποσύρονται από το υδρόλουτρο και προστίθεται σε κάθε σωλήνα 1 mL σταθεροποιητικό διάλυμα.

Φωτομετρείται το περιεχόμενός τους στα 510 nm. Ο μηδενισμός του φωτομέτρου γίνεται με το τυφλό αντιδραστήριο.

Με βάση τον νόμο Beer-Lambert: $A = \epsilon C l$ και αφού η ουσία είναι ίδια και όλα τα διαλύματα μετρούνται στην ίδια κυψελίδα, θα είναι $\epsilon = \text{σταθερό}$, $l = \text{σταθερό}$.

Διαιρώντας κατά μέλη:

$$A\Delta = \epsilon \times C_{\Delta} \times l$$

$$A\Pi = \epsilon \times C_{\Pi} \times l \text{ προκύπτει ότι:}$$

$$C\Delta = \frac{A\Delta}{A\Pi} \times C\Pi$$

Οι τιμές αναφοράς των τριγλυκεριδίων στον ορό σύμφωνα με το πρωτόκολλο είναι για τους άνδρες: 40 - 160 mg / dL. Γυναίκες: 35 - 135 mg / dL

- Εάν το φωτόμετρο απαιτεί μεγαλύτερο όγκο φωτομέτρησης ή εάν δεν διαθέτετε κατάλληλη πιπέτα για τη λήψη του απαιτούμενου όγκου, αυξήστε τους χρησιμοποιούμενους όγκους αναλογικά.
- Η χρήση του πρότυπου διαλύματος στη βαθμονόμηση του αναλυτή δεν συνιστάται λόγω διαφορετικής υφής του φέροντος μείγματος (matrix) ως προς τον ορό. Σε πολλές περιπτώσεις η επίδραση αυτή είναι αμελητέα σε άλλες όμως όχι. Γι' αυτό τον λόγο η χρήση του πρότυπου διαλύματος ως calibrator ή ορός ελέγχου δεν επιτρέπεται.
- Σε περίπτωση που η περιεκτικότητα του δείγματος σε τριγλυκερίδια είναι εκτός των ορίων γραμμικότητας της μεθόδου, αραιώστε το δείγμα με ίση ποσότητα φυσιολογικού ορού, επαναλάβετε τη μέθοδο και πολλαπλασιάστε τα αποτελέσματα επί 2.

9.9 Εργαστηριακή άσκηση: Ποσοτικός προσδιορισμός HDL-χοληστερόλης ορού αίματος

Το πρωτόκολλο ανάλυσης αποτελεί μια λεπτομερή περιγραφή της πορείας ενός συγκεκριμένου προσδιορισμού που είναι πλήρως προδιαγεγραμμένη και εγκεκριμένη. Η περιγραφή αυτή περιλαμβάνει μια σειρά πληροφοριών που αναφέρονται παρακάτω.

Ο διαχωρισμός των HDL από το σύνολο των λιποπρωτεϊνών πραγματοποιείται με καταβύθιση των LDL, των VLDL και των χυλομικρών (CM) σε ορό ή πλάσμα. Παρουσία φωσφοβολφραμικού οξέος (PTA) και ιόντων μαγνησίου οι LDL, οι VLDL και τα χυλομικρά καθιζάνουν και απομακρύνονται με διήθηση, ενώ το υπερκείμενο το οποίο περιέχει τις HDL χρησιμοποιείται με τη χρήση του κιτ προσδιορισμού χοληστερόλης, για την εύρεση της περιεκτικότητάς τους σε χοληστερόλη.

Οι σχετικές αντιδράσεις είναι:



Σε δοκιμαστικό σωλήνα, προσθέτουμε 1 mL αντιδραστήριου καταβύθισης (PTA) σε 0,5 mL ορού. Ακολουθεί έντονη ανάδευση, παραμονή σε θερμοκρασία δωματίου για 10 min και φυγοκέντρηση σε 3000 rpm για 10 min.

Στο υπερκείμενο πραγματοποιείται προσδιορισμός χοληστερόλης.

Σε τρεις δοκιμαστικούς σωλήνες προσθέτουμε τα εξής:

	Λευκό	Δείγμα	Πρότυπο
Αντιδραστήριο χοληστερόλης	2 mL	2 mL	2 mL
Χοληστερόλη 200 mg/dL			20 μL
Απεσταγμένο νερό	200 μL		
Δείγμα (υπερκείμενο φυγοκέντρησης)		200 μL	

Οι σωλήνες πωματίζονται και ακολουθεί ανάμειξη. Οι τρεις δοκιμαστικοί σωλήνες επωάζονται σε υδρόλουτρο στους 37°C για 5 min. Οι σωλήνες αποσύρονται από το υδρόλουτρο, επαναφέρονται σε θερμοκρασία δωματίου και φωτομετρείται το περιεχόμενό τους στα 510 nm. Ο μηδενισμός του φωτομέτρου γίνεται με το τυφλό αντιδραστήριο.

Με βάση τον νόμο Beer-Lambert: $A = \epsilon C l$ και αφού η ουσία είναι ίδια και όλα τα διαλύματα μετριοούνται στην ίδια κυψελίδα θα είναι $\epsilon = \text{σταθερό}$, $l = \text{σταθερό}$.

Διαιρώντας κατά μέλη:

$$A_{\Delta} = \epsilon \times C_{\Delta} \times l$$

$$A_{\Pi} = \epsilon \times C_{\Pi} \times l \text{ προκύπτει ότι:}$$

$$C_{\Delta} = \frac{A_{\Delta}}{A_{\Pi}} \times 65,4$$

Τύπος υπολογισμού της LDL χοληστερόλης

$$\text{LDL-CH (mg / dL)} = \text{Ολική-CH (mg / dL)} - \text{TG/5 (mg / dL)} - \text{HDL -CH(mg /dL)}$$

Τύπος υπολογισμού του αθηρωματικού δείκτη:

$$\text{Αθηρωματικός δείκτης} = \frac{\text{ολική χοληστερόλη}}{\text{HDL} - \text{χοληστερόλη}} \quad (9.1)$$

Στον Πίνακα 9.1. φαίνονται οι τιμές αναφοράς της HDL χοληστερόλης και του αθηρωματικού δείκτη.

Πίνακας 9.1 Τιμές αναφοράς HDL χοληστερόλης και αθηρωματικού δείκτη.

		HDL χοληστερόλη	Αθηρωματικός δείκτης
Άνδρες	Ευνοϊκές	> 55 mg/dL	< 3,8
	Συνήθεις	35-55 mg/dL	3,9 - 5,9
	Δυσμενείς	< 35 mg/dL	> 5,9
Γυναίκες	Ευνοϊκές	> 65 mg/dL	< 3,1
	Συνήθεις	45-65 mg/dL	3,1 - 4,6
	Δυσμενείς	< 45 mg/dL	> 4,6

- Εάν το φωτόμετρο απαιτεί μεγαλύτερο όγκο φωτομέτρησης ή εάν δεν διαθέτετε κατάλληλη πιπέττα για την λήψη του απαιτούμενου όγκου, αυξήστε τους χρησιμοποιούμενους όγκους αναλογικά.
- Εάν η περιεκτικότητα του ορού σε τριγλυκερίδια είναι υψηλή, δεν πραγματοποιείται ικανοποιητικός διαχωρισμός του κλάσματος των HDL. Στην περίπτωση αυτήν, αραιώστε το

δείγμα με ίση ποσότητα φυσιολογικού ορού, επαναλάβετε την καταβύθιση και πολλαπλασιάστε τα αποτελέσματα επί 2.

- Οι τιμές των LDL που λαμβάνονται από τον τύπο που αναφέρεται στους υπολογισμούς είναι αξιόπιστες, όταν οι τιμές της ολικής χοληστερόλης είναι 150-300 mg/dl. Για υψηλότερες ή χαμηλότερες τιμές ο τύπος δεν ισχύει.
- Η non-HDL-CH είναι μια νέα παράμετρος που έχει προστεθεί, για να συμπληρώσει τη λιπιδαιμική ταυτότητα ενός ασθενούς με υπερτριγλυκεριδαιμία (TG > 199 mg/dL), ειδικά εκείνων που πάσχουν από αθηρογόνο δυσλιπιδαιμία. Η non-HDL-CH είναι το άθροισμα της συσσωρευμένης ολικής χοληστερόλης (CH) σε όλες τις λιποπρωτεΐνες με εξαίρεση την HDL, όπως: χυλομικρά, πολύ χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες (VLDL) και των υπολειμμάτων τους, διάμεσης πυκνότητας λιποπρωτεΐνες (IDL), χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες (LDL) και λιποπρωτεΐνης (α) (Lp(a)). Η συγκέντρωση της non-HDL-CH υπολογίζεται χρησιμοποιώντας την απλή εξίσωση:

$$\text{non -HDL-CH (mg /dL)} = \text{CH} - \text{HDL-CH} \quad (9.2)$$

Η διαγνωστική αξία της non-HDL-CH, ως πρόδρομου μορίου εμφάνισης καρδιαγγειακών ασθενειών, επιβεβαιώθηκε σε πολλές κλινικές μελέτες μεταξύ υγιών ατόμων και διαβητικών με δυσλιπιδαιμία. Σύμφωνα με τα διαθέσιμα κλινικά δεδομένα, διαπιστώθηκε ότι αύξηση των επιπέδων της μη-HDL-CH κατά 1 mg /dL αυξάνει τον κίνδυνο θανάτου από καρδιαγγειακή νόσο κατά 5% και φαίνεται να είναι ένας δείκτης με καλύτερη προγνωστική αξία από ό,τι οι παραδοσιακοί λιπιδαιμικοί δείκτες. Η έννοια της καλής και της κακής χοληστερόλης εξακολουθεί να είναι σωστή. Ωστόσο, η non-HDL-CH γίνεται η νέα κακή υψηλής πυκνότητας χοληστερόλη (HDL-CH). Στον Πίνακα 9.2. φαίνονται οι τιμές αναφοράς της non - HDL χοληστερόλης

Πίνακας 9.2 Τιμές αναφοράς non - HDL χοληστερόλης.

Άνδρες -Γυναίκες	Ερμηνεία
<100 mg %	Επιθυμητή
100-129	Χαμηλός κίνδυνος
130-159	Οριακά υψηλή
160-189	Υψηλή
≥190	Πολύ υψηλή

9.9.1 Διαχωρισμός των λιποπρωτεϊνών

Ο διαχωρισμός των λιποπρωτεϊνών με ηλεκτροφόρηση γίνεται σε πηκτή αγαρόζης. Οι λιποπρωτεΐνες του πλάσματος (ορού) διαχωρίζονται με βάση το διαφορετικό τους μέγεθος κι επειδή έχουν αρνητικό φορτίο σε pH 8.6, μετακινούνται προς την άνοδο (από τον αρνητικό προς τον θετικό πόλο της πηγής ρεύματος). Με την ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης οι λιποπρωτεΐνες διαχωρίζονται σε 5 λιποπρωτεϊνικά κλάσματα: (-) χυλομικρά, β (LDL), προ-β (VLDL), λιποπρωτεΐνη α (Lpα) και α (HDL) (+). Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης, η εμφάνιση κάθε λιποπρωτεϊνικού κλάσματος επιτυγχάνεται με χρώση του ηλεκτροφορήματος με κατάλληλη χρωστική ουσία, όπως το Fat red.

- Ετοιμάζουμε το διάλυμα του ορού ενός ή περισσότερων δειγμάτων.
- Γεμίζουμε τη συσκευή ηλεκτροφόρησης με το ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης.
- Παίρνουμε μια πλάκα πηκτής αγαρόζης και την τοποθετούμε σε οριζόντια θέση. Τοποθετούμε διηθητικό χαρτί πάνω στην πλάκα αγαρόζης, για να απομακρύνουμε την υγρασία από την επιφάνεια της πηκτής. Τοποθετούμε το εκμαγείο των δειγμάτων πάνω στην πηκτή αγαρόζης.

- Τοποθετούμε 5 μL διαλύματος ορού από κάθε δείγμα σε κάθε σχισμή του εκμαγείου και αφήνουμε να απορροφηθεί από την αгарόζη. Η τοποθέτηση των δειγμάτων πρέπει να γίνει γρήγορα. Μετά από 3-5 min απομακρύνουμε την περίσσεια δείγματος με διηθητικό χαρτί και το εκμαγείο από την πηκτή.
- Τοποθετούμε την πλάκα της πηκτής αгарόζης στη συσκευή ηλεκτροφόρησης με τα δείγματα προς την άνοδο, συνδέουμε τη συσκευή στο τροφοδοτικό και ηλεκτροφορούμε με 100 volt για 25 min.
- Μετά την ηλεκτροφόρηση, στεγνώνουμε την πηκτή με ζεστό αέρα (λιγότερο από 60°C) και τη βάζουμε. Αποχρωματίζουμε την πηκτή και τη στεγνώνουμε με ζεστό αέρα. Η ποσοτικοποίηση των λιποπρωτεϊνικών κλασμάτων μπορεί να γίνει με πυκνομετρία (densitometry) σε μήκος κύματος 520 nm.

Σχετικό οπτικό υλικό στο διαδίκτυο

1. Εικονική αναπαράσταση εκχύλισης λιπιδίων

<https://www.youtube.com/watch?v=pGIPcVwHJcU>

https://www.youtube.com/watch?v=fY_6uJN7hrg

<https://www.aurorabiomed.com/liquid-liquid-extraction/>

2. Εικονική αναπαράσταση απομόνωσης λιπιδίων με χρωματογραφία

<https://www.youtube.com/watch?v=Y4lp5AKs1p4>

<https://www.youtube.com/watch?v=UJC0OECAGK8>

<https://training.ti.com/sampling-techniques-near-infrared-nir-spectroscopy>

<https://training.ti.com/analyzing-food-traits-using-near-infrared-nir-spectroscopy>

Πηγές φωτογραφιών με προέλευση το διαδίκτυο

Εικόνα 9.1

<https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/0/0f/ALAnumbering.svg/500px-ALAnumbering.svg.png>

<https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/0/0f/ALAnumbering.svg/500px-ALAnumbering.svg.png>

Εικόνα 9.2

https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/b/be/Fat_triglyceride_shorthand_formula.PNG

Εικόνα 9.3

<https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/9/9a/Cholesterol.svg/1200px-Cholesterol.svg.png>

Εικόνα 9.4

https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/8/8d/1-Oleoyl-2-palmitoyl-phosphatidylcholine_Structural_Formulae_V.1.png/1280px-1-Oleoyl-2-palmitoyl-phosphatidylcholine_Structural_Formulae_V.1.png

https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/8/8d/1-Oleoyl-2-palmitoyl-phosphatidylcholine_Structural_Formulae_V.1.png/1280px-1-Oleoyl-2-palmitoyl-phosphatidylcholine_Structural_Formulae_V.1.png

https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/8/8d/1-Oleoyl-2-palmitoyl-phosphatidylcholine_Structural_Formulae_V.1.png/1280px-1-Oleoyl-2-palmitoyl-phosphatidylcholine_Structural_Formulae_V.1.png

Εικόνα 9.5.

<https://alchetron.com/cdn/platelet-activating-factor-03a7e509-4e31-49a1-8658-944f457b96d-resize-750.png>

Εικόνα 9.6

https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/3/31/Sphingolipid_types_miguelferig.jpg/640px-Sphingolipid_types_miguelferig.jpg

https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/3/31/Sphingolipid_types_miguelferig.jpg/640px-Sphingolipid_types_miguelferig.jpg

Εικόνα 9.7

https://images.slideplayer.gr/46/11780853/slides/slide_7.jpg

Βιβλιογραφικές Αναφορές

- Bligh, E., & Dyer, W. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol.*, 37(8), 911-917.
- Carr, S., Hooper, A., Sullivan, D. & Burnett, J. (2019). Non-HDL-cholesterol and apolipoprotein B compared with LDL-cholesterol in atherosclerotic cardiovascular disease risk assessment. *Pathology*, 51(2), 148-154.
- Cascant, M., Breil, C., Fabiano-Tixier, A. S., Chemat, F., Garrigues, S., & de la Guardia, M. (2018). Determination of fatty acids and lipid classes in salmon oil by near infrared spectroscopy. *Food Chemistry*, 239, 865-871.
- Kyaw, T., & Woo, N. (2020). *Gas Chromatography*. Ανακτήθηκε, 19 Απριλίου 2022, από [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical_Chemistry/Supplemental_Modules_\(Analytical_Chemistry\)/Instrumental_Analysis/Chromatography/Gas_Chromatography](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical_Chemistry/Supplemental_Modules_(Analytical_Chemistry)/Instrumental_Analysis/Chromatography/Gas_Chromatography)
- Nelson, D., & Cox, M. (2018). *Lehningers Βασικές αρχές Βιοχημείας*. Αθήνα: Broken.
- Γιαννάκη, Ε., & Πουλή, Αικ., (2009). Προσδιορισμός Λιπαρών Οξέων και εκτίμηση της ποιότητας λίπους σε αρτοσκευάσματα (της πόλης της Καβάλας) [πτυχιακή εργασία, ΤΕΙ Θεσσαλονίκης].
- Καρίκας, Γ. (2018). *Εφαρμοσμένη Βιοχημεία Θεωρία Ασκήσεις*. Αθήνα: Βιβλιόπολις.
- Λέκκα, Μ., Γαλανοπούλου, Ν., Λεονταρίτης, Γ., & Κητσιούλη, Ε. (2015). *Βιολογικές μεμβράνες. Από τη δομή στις λειτουργίες. Θεωρία και πειραματικές προσεγγίσεις*. Αθήνα: Σύνδεσμος Ελληνικών Ακαδημαϊκών Βιβλιοθηκών.
- Τράπαλη, Μ. (2021). Η Εμπλοκή του Παράγοντα Ενεργοποίησης αιμοπεταλίων (PAF) σε διαφορές Ασθένειες. *Επιθεώρηση Κλινικής Φαρμακολογίας και Φαρμακοκινητικής*, 39(1), 1-6.
- Χαϊτογλου, Κ. (2019). *Ασκήσεις Βιοχημείας Εργαστηριακός οδηγός*. Θεσσαλονίκη: ΑΠΘ.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 10

ΘΕΩΡΙΑ ΚΑΙ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΑΣΚΗΣΕΙΣ ΣΤΗΝ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΣΤΗΝ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ DNA

Συγγραφέας: Μαρία Τράπαλη

Σύνοψη

Τα νουκλεοτίδια διαδραματίζουν ποικίλους ρόλους στον κυτταρικό μεταβολισμό. Εξίσου σημαντικός είναι ο ρόλος τους και ως δομικά συστατικά των νουκλεϊνικών οξέων, του δεοξυριβονουκλεϊκού οξέος (DNA) και του ριβονουκλεϊκού οξέος (RNA), που συνιστούν τις αποθήκες των γενετικών πληροφοριών. Η δομή κάθε πρωτεΐνης είναι προϊόν πληροφορίας καταγεγραμμένης στη νουκλεοτιδική αλληλουχία των νουκλεϊκών οξέων του κυττάρου. Η ικανότητα αποθήκευσης και μεταβίβασης των γενετικών πληροφοριών αποτελεί απαραίτητη προϋπόθεση για τη ζωή.

Προαπαιτούμενη γνώση

Από το βιβλίο των Campbell, N. A. & Reece, J. B. (2010), Βιολογία (τόμος I), Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, Δομή και λειτουργίες των μεγάλων βιομορίων και Η μοριακή βάση της κληρονομικότητας.

Από το βιβλίο των Cooper, G. M. & Hausman, R. E. (2011), Το Κύτταρο – μία μοριακή προσέγγιση (τόμος I), Ακαδημαϊκές εκδόσεις Μπασάδρα, Αλεξανδρούπολη, Κληρονομικότητα, γονίδια και DNA και Χρωμοσώματα και χρωματίνη.

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

10.1 Χημική δομή των νουκλεϊκών οξέων

Η ανακάλυψη της δομής του DNA από τους Watson και Crick το 1953 ήταν σταθμός στην εξελικτική πορεία της επιστήμης. Μετά την ταυτοποίηση της δομής του DNA, νέες θεωρίες αναπτύχθηκαν, ενώ πολλές καθιερωμένες αντιλήψεις αναθεωρήθηκαν. Οι σύγχρονες απόψεις για την αποθήκευση και τη χρήση των γενετικών πληροφοριών του κυττάρου βασίζονται σε μελέτες οι οποίες στηρίχτηκαν σε αυτήν την ανακάλυψη. Επιπλέον, σε κάθε τομέα της βιοχημείας είναι απαραίτητη προϋπόθεση να γνωρίζουμε πώς επεξεργάζεται το κύτταρο τις γενετικές πληροφορίες του.

Η δομική διερεύνηση του DNA ξεκίνησε από τον Friedrich Miescher, ο οποίος διεξήγαγε τις πρώτες συστηματικές μελέτες στους πυρήνες των κυττάρων. Το 1868 ο Miescher απομόνωσε μια ουσία από λευκοκύτταρα τα οποία απομόνωσε από χρησιμοποιημένες χειρουργικές γάζες οι οποίες περιείχαν φωσφόρο και την ονόμασε νουκλεΐνη. Διαπίστωσε ότι η «νουκλεΐνη» περιείχε ένα όξινο τμήμα, που σήμερα γνωρίζουμε ως DNA, και ένα βασικό τμήμα, τις πρωτεΐνες. Ο Miescher αργότερα ανακάλυψε μια παρόμοια όξινη ουσία στις κεφαλές σπερματοζωαρίων του σολομού. Παρότι, εν μέρει απομόνωσε τη νουκλεΐνη και μελέτησε τις ιδιότητές της, η ομοιοπολική (πρωτοταγής) δομή του DNA δεν ταυτοποιήθηκε με βεβαιότητα πριν τα τέλη της δεκαετίας του 1940.

Η πρώτη άμεση απόδειξη ότι το DNA είναι ο φορέας των γενετικών πληροφοριών δόθηκε το 1944 από τους Oswald T. Avery, Colin MacLeod και Maclyn McCarty. Οι παραπάνω ερευνητές παρατήρησαν ότι το DNA που εκχύλισαν από ένα παθογόνο στέλεχος του βακτηρίου *Streptococcus pneumoniae*, γνωστό ως πνευμονιόκοκκος, μετασχημάτιζε γενετικά ένα μη παθογόνο στέλεχος του ίδιου είδους σε παθογόνο. Ο Avery και οι συνεργάτες του συμπέραναν ότι το DNA που απομονώθηκε από το παθογόνο στέλεχος έφερε το κληρονομικό γενετικό μήνυμα της λοιμογόνου (παθογόνου) δράσης. Τα συμπεράσματα αυτά δεν έγιναν, όμως, αποδεκτά από το σύνολο της επιστημονικής κοινότητας.

Το 1952 οι Alfred D. Hershey και Martha Chase χρησιμοποίησαν ραδιενεργό φωσφόρο (^{32}P) και ραδιενεργό θείο (^{35}S) ως ανιχνευτές. Απέδειξαν ότι, όταν ο ιός των βακτηρίων (βακτηριοφάγος) T2 μολύνει το κύτταρο ξενιστή *Escherichia coli*, τότε μόνο το ικό DNA που περιέχει φωσφόρο κι όχι οι ικές πρωτεΐνες που περιέχουν θείο εισέρχεται στα κύτταρα του ξενιστή και παρέχει τις γενετικές πληροφορίες για την αντιγραφή του ιού. Τα σημαντικά αυτά πειράματα απέδειξαν ότι το DNA των χρωμοσωμάτων είναι ο αποκλειστικός φορέας των γενετικών πληροφοριών των ζωντανών κυττάρων.

Το 1950 οι Rosalind Franklin και Maurice Wilkins απέδειξαν ότι το DNA δημιουργεί ένα χαρακτηριστικό πρότυπο περίθλασης των ακτινών X και συμπέραναν ότι τα μόρια του DNA είναι ελικοειδή με δύο περιοδικότητες κατά μήκος του άξονά τους, μία κύρια ($3,4 \text{ \AA}$) και μία δευτερεύουσα (34 \AA).

Το 1953 οι Watson και Crick διατύπωσαν το αξίωμα ενός τρισδιάστατου μοντέλου της δομής του DNA που αποτελείται από δύο ελικοειδείς αλυσίδες οι οποίες περιελίσσονται γύρω από τον ίδιο άξονα και σχηματίζουν τη δομή διπλής δεξιόστροφης έλικας (Εικόνα 10.3).

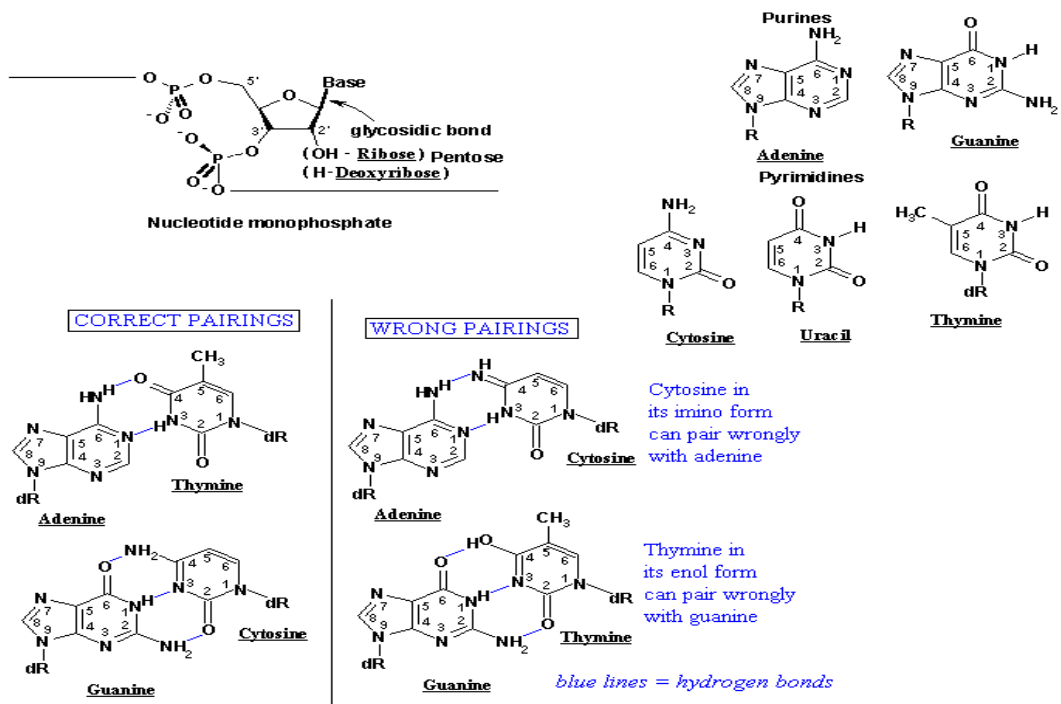
Ο υδρόφιλος σκελετός από εναλλασσόμενες δεοξυριβόζες και φωσφορικές ομάδες βρίσκεται στο εξωτερικό τμήμα της διπλής έλικας σε επαφή με το υδατικό περιβάλλον. Ο δακτύλιος φουρανόζης κάθε δεοξυριβόζης είναι σε C-2' ενδο-διαμόρφωση. Οι βάσεις πουρίνης και πυριμιδίνης των δύο αλυσίδων στοιβάζονται στο εσωτερικό της διπλής έλικας με τους υδρόφοβους και σχεδόν επίπεδους δακτυλίους πολύ κοντά μεταξύ τους και κάθετους στον άξονα. Το συμπληρωματικό ζευγάρωμα των δύο αλυσίδων δημιουργεί μία μεγάλη και μία μικρή αύλακα στη διπλή έλικα (Εικόνα 10.3). Κάθε νουκλεοτιδική βάση στη μία αλυσίδα ζευγαρώνει στο ίδιο επίπεδο με μία βάση της άλλης αλυσίδας. Οι Watson και Crick ανακάλυψαν ότι τα ζεύγη βάσεων είναι G με C και A με T, και εξηγούν τον κανόνα του Chargaff ότι σε οποιοδήποτε μόριο DNA: $G = C$ και $A = T$. Πρέπει να σημειωθεί ότι μεταξύ G και C μπορούν να σχηματιστούν τρεις δεσμοί υδρογόνου, ενώ μεταξύ A και T μόνο δύο (Εικόνα 10.2).

Ένα νουκλεϊκό οξύ με λίγα νουκλεοτίδια καλείται ολιγονουκλεοτίδιο. Ο ορισμός αυτός πολλές φορές είναι αυθαίρετος. Γενικά, όμως, τα πολυμερή που περιέχουν 50 ή λιγότερα νουκλεοτίδια καλούνται ολιγομερή. Ένα πιο μακρύ νουκλεϊκό οξύ καλείται πολυνουκλεοτίδιο.

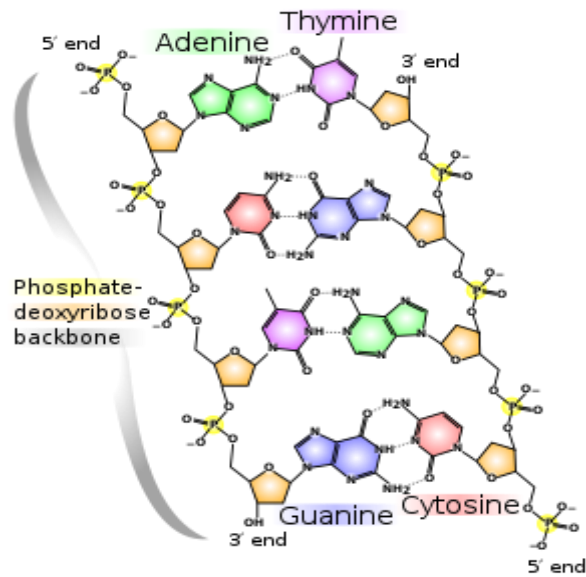
10.1.1 Χημική δομή των νουκλεοτιδίων

Τα νουκλεοτίδια αποτελούνται από τρία χαρακτηριστικά συστατικά: μία αζωτούχο βάση (περιέχει άζωτο), μία πεντόζη και μία φωσφορική ομάδα. Το μόριο χωρίς τη φωσφορική ομάδα ονομάζεται νουκλεοσίδιο. Οι αζωτούχες βάσεις είναι παράγωγα δύο πρόδρομων ενώσεων, της πυριμιδίνης και της πουρίνης.

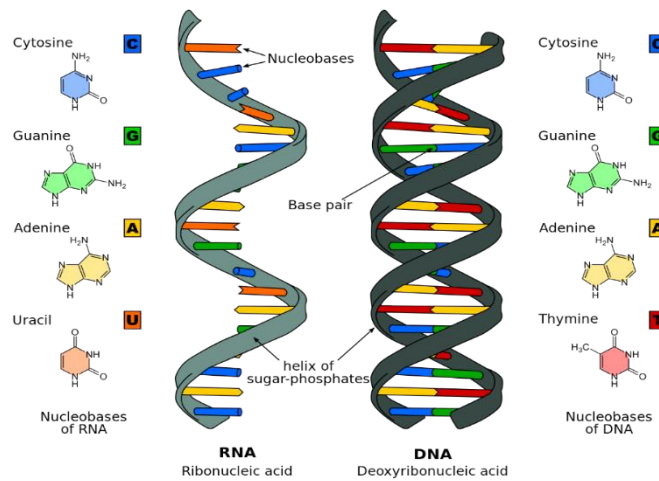
Τόσο το DNA, όσο και το RNA περιέχουν δύο κύριες βάσεις πουρίνης, την αδεΐνη (A) και τη γουανίνη (G) και δύο κύριες βάσεις πυριμιδίνης. Σε αμφότερα, τα DNA (Εικόνα 10.2) και τα RNA (Εικόνα 10.3) η μία κύρια πυριμιδίνη είναι η κυτοσίνη (C), ωστόσο η δεύτερη κύρια πυριμιδίνη δεν είναι κοινή: το DNA περιέχει θυμίνη (T), ενώ το RNA ουρακίλη (U). Σπάνια, μόνο, εντοπίζεται θυμίνη στο RNA ή ουρακίλη στο DNA (Εικόνα 10.1).



Εικόνα 10.1 Χημική δομή των πέντε κυριότερων βάσεων των νουκλεϊκών οξέων.



Εικόνα 10.2 Χημική δομή του DNA.



Εικόνα 10.3 Αζωτούχες βάσεις και χημική αρχιτεκτονική των RNA-DNA.

Τα διαδοχικά νουκλεοτίδια του DNA και του RNA συνδέονται ομοιοπολικά με «γέφυρες» φωσφορικών ομάδων, στις οποίες η 5' φωσφορική ομάδα ενός νουκλεοτιδίου συνδέεται με την 3' υδροξυλομάδα του επόμενου νουκλεοτιδίου σχηματίζοντας έναν φωσφοδιεστερικό δεσμό. Συνολικά, ο ομοιοπολικός σκελετός των νουκλεϊκών οξέων αποτελείται από εναλλασσόμενες φωσφορικές ομάδες και πεντόζες. Οι αζωτούχες βάσεις μπορούν να θεωρηθούν ως πλευρικές ομάδες οι οποίες ενώνονται με τον σκελετό ανά τακτά διαστήματα. Ο σκελετός του DNA και του RNA είναι υδρόφιλος. Οι υδροξυλομάδες των σακχάρων σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου με το νερό. Οι φωσφορικές ομάδες με τιμή pKa σχεδόν μηδενική, είναι πλήρως ιοντισμένες και αρνητικά φορτισμένες σε pH 7. Τα αρνητικά φορτία, γενικά, ουδετεροποιούνται από ιοντικές αλληλεπιδράσεις με θετικά φορτία σε πρωτεΐνες, μεταλλικά ιόντα και πολυαμίνες.

Όλοι οι φωσφοδιεστερικοί δεσμοί έχουν τον ίδιο προσανατολισμό στην αλυσίδα, γεγονός που προσδίδει σε κάθε γραμμική νουκλεοτιδική αλυσίδα μια συγκεκριμένη πολικότητα και διακριτά 5' και 3' άκρα (Εικόνα 10.2). Εξ ορισμού, από το 5' άκρο λείπει ένα νουκλεοτίδιο στη θέση 5', ενώ από το 3' άκρο λείπει ένα νουκλεοτίδιο στη θέση 3'. Άλλες ομάδες (συνήθως μια ή περισσότερες φωσφορικές ομάδες) μπορούν να υπάρχουν στο ένα ή και στα δύο άκρα.

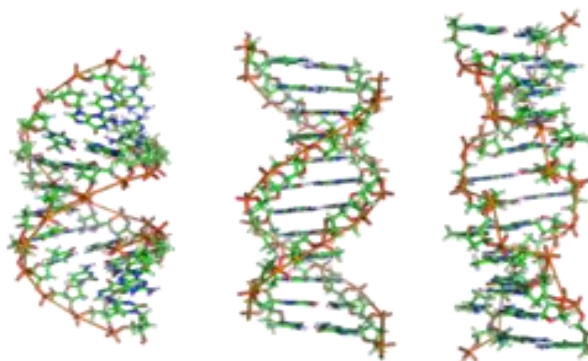
10.1.2 Τύποι διπλής έλικας και λειτουργίες του DNA

Το DNA απαντά σε 3 μορφές: (Εικόνα 10.4):

B-μορφή: Δεξιόστροφη διπλή έλικα, με 10.5 βάσεις/στροφή

A-μορφή: Δεξιόστροφη έλικα, με 11 βάσεις/στροφή (αφυδάτωση B-μορφής)

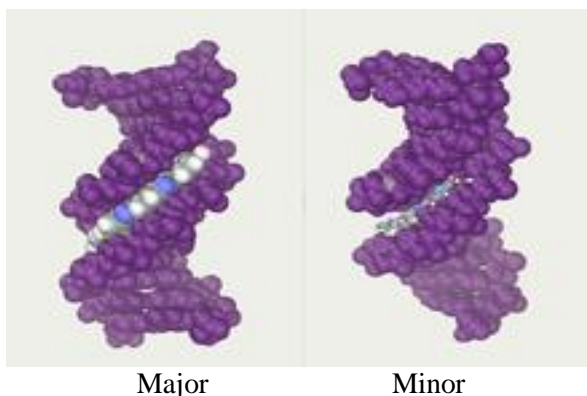
Z-μορφή: Αριστερόστροφη έλικα, με 12 βάσεις/στροφή.



Εικόνα 10.4 Τύποι διπλής έλικας του DNA.

Τα εσωτερικά της διπλής έλικας είναι μη πολικά, ενώ η επιφάνειά της πολική-αρνητικά φορτισμένη, λόγω των κατάλοιπων δεσοξυριβόζης και φωσφορικών του κορμού. Μεταξύ των αλυσίδων σε όλο το μήκος του

DNA απαντούν δύο **εσοχές-αύλακες**, (grooves) οι οποίες χαρακτηρίζονται ως **μικρή (minor)** και **μεγάλη αύλακα (major groove)** (Εικόνα 10.5). Σε αυτές τις αύλακες μπορούν να εισέλθουν μικρά μόρια, όπως τα αντικαρκινικά φάρμακα, με ενδοπαρεμβολή (intercalation), με συνέπεια τη διαταραχή της λειτουργικότητάς τους, που οδηγεί στην αναστολή του πολλαπλασιασμού των καρκινικών κυττάρων.

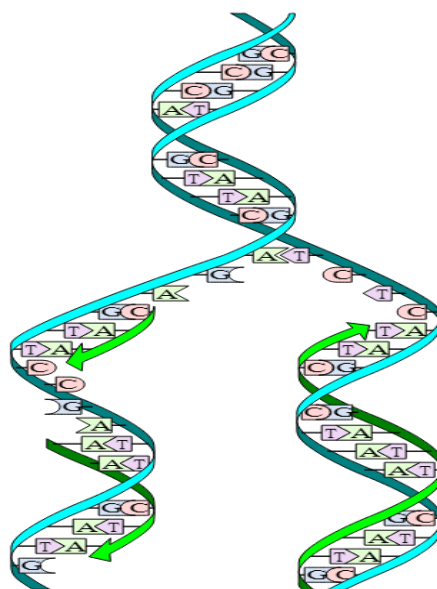


Εικόνα 10.5 Εσοχές – αύλακες στο DNA.

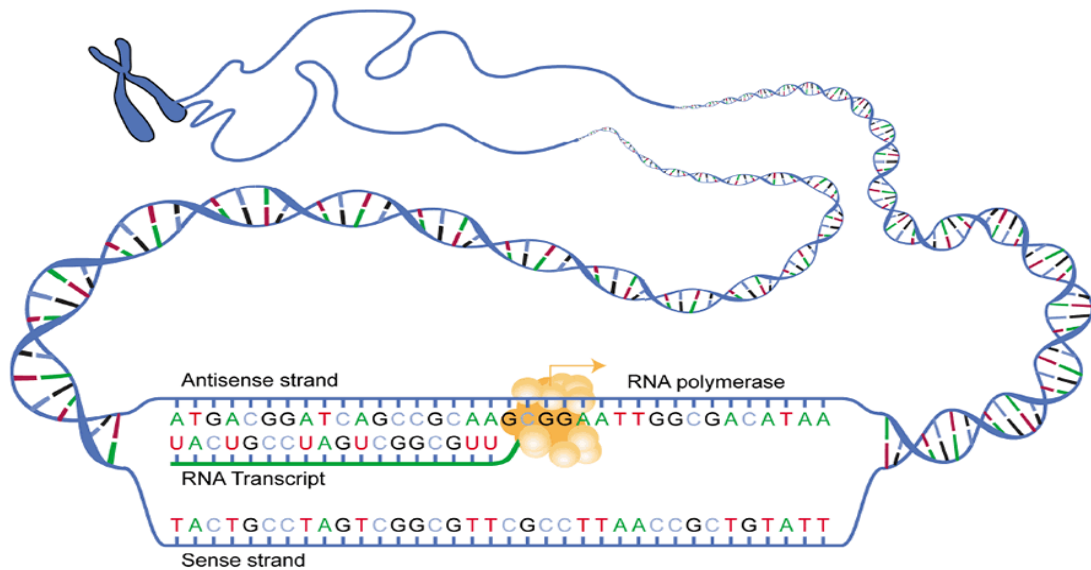
Υπάρχουν 3 τύποι RNA, που παίρνουν μέρος στη σύνθεση των πρωτεϊνών:

- **rRNA** (ριβοσωμικό): (Συνιστά το 80% του RNA. Απαντά στα ριβοσώματα και τους πυρηνίσκους.
- **mRNA** (αγγελοφόρο): (5%). Περιέχει **κωδόνια** (τις 3 νουκλεοτιδικές σειρές που καθορίζουν τα αμινοξέα).
- **tRNA** (μεταφέρον): (15%). Περιέχει τα **αντι-κωδόνια**, συμπληρωματικά των κωδονίων του mRNA.

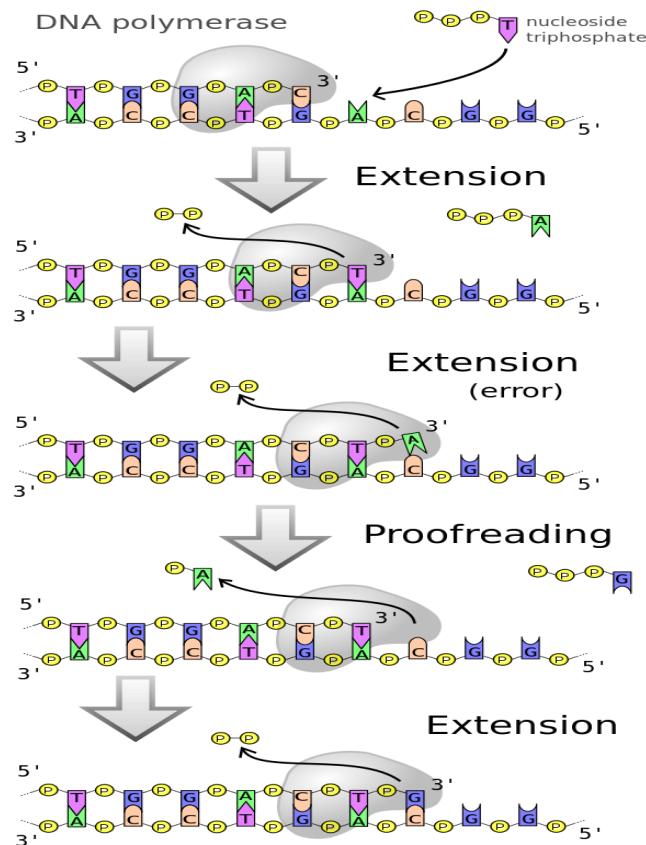
Στις Εικόνες 10.6,10.7 και 10.8 παρουσιάζονται οι βασικές λειτουργίες των νουκλεϊκών οξέων.



Εικόνα 10.6 Αντιγραφή DNA.



Εικόνα 10.7 Μεταγραφή του DNA.



Εικόνα 10.8 Μετάφραση του DNA.

Η μεταγραφή καταλύεται από τις DNA-εξαρτώμενες, RNA-πολυμεράσες.

Στον οργανισμό υπάρχουν και ελεύθερα νουκλεοτίδια, τα οποία δεν συμμετέχουν στον σχηματισμό RNA, DNA.

Εκτός των μονοφωσφορικών εστέρων των νουκλεοτιδίων απαντούν οι δι- και τρι-φωσφορικοί εστέρες, όπως ADP, dADP, GDP, ATP, dATP κ.ά.

Μεγάλη σημασία στις βιοχημικές αντιδράσεις του οργανισμού παίζουν και ορισμένες ενώσεις της αδενοσίνης με βιταμίνες, όπως το NAD, NADP, FAD κ.ά.

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟ ΜΕΡΟΣ

Στο πειραματικό μέρος, θα αναπτυχθούν εργαστηριακές ασκήσεις/τεχνικές που σχετίζονται με:

- Απομόνωση χρωμοσωμικού DNA από διάφορους ζωικούς και φυτικούς ιστούς.
- Φωτομετρικό προσδιορισμό της συγκέντρωσης DNA.
- Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR, Polymerase Chain Reaction).
- Ηλεκτροφόρηση DNA.

10.2 Εργαστηριακή άσκηση: Απομόνωση χρωμοσωμικού DNA από ήπαρ επίμυος

Κατά την εφαρμογή ενός πρωτοκόλλου απομόνωσης γονιδιωματικού DNA ζητούμενα είναι αφενός η ικανοποιητικά μεγάλη απόδοση και καθαρότητα του μακρομοριακού παρασκευάσματος και αφετέρου η αποφυγή της δράσης DNAασων και η διατήρηση, όσο το δυνατόν, μεγαλύτερου μοριακού μεγέθους ινών DNA.

Για την επίτευξη των στόχων αυτών, λαμβάνονται υπόψη πολλές από τις φυσικοχημικές ιδιότητες του μακρομορίου, όπως είναι το μεγάλο ιξώδες διαλυμάτων DNA, η ευχέρεια σχηματισμού ινών αλλά και η ευαισθησία σε μηχανική (ή ενζυμική) θραύση, η ευχέρεια διαλυτοποίησης σε υδατικό διαλύτη αλλά και καταβύθισης του μορίου με αλκοόλη (αιθανόλη, ισοπροπυλική αλκοόλη). Επίσης, η ιδιότητα των μορίων DNA να απορροφούν σε χαρακτηριστικά μήκη κύματος στο υπεριώδες, χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της απόδοσης της μεθόδου και την εκτίμηση της καθαρότητας του παρασκευάσματος.

Αν και οι μέθοδοι που είναι δυνατόν να εφαρμοστούν για την απομόνωση και τον καθαρισμό του γονιδιωματικού (genomic) DNA είναι σήμερα πολλές, όλα τα πρωτόκολλα απομόνωσης απαιτούν δύο κυρίως ομάδες ενεργειών:

(α) λύση των κυττάρων και διαλυτοποίηση του DNA.

(β) απομάκρυνση των προσμειξέων (πρωτεϊνών, RNA, ολιγονουκλεοτιδίων).

- Παραλαμβάνονται δείγματα ήπατος από 2-3 αρσενικούς επίμυς (ποικιλίας Wistar), ηλικίας 120 ημερών. Το ήπαρ τεμαχίζεται, εκπλένεται σε ψυχρό ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικού νατρίου (0.01 M) που περιέχει NaCl, 0.9%, w/v, pH 7.0, και αποθηκεύεται (υπό υγρό άζωτο) σε δείγματα των 200 mg.
- 200 mg του υπό μελέτη δείγματος ομογενοποιείται και το συνολικό ομογενοποίημα μεταφέρεται σε σωλήνα τύπου erppendorf (πλαστικά σωληνάρια με πώμα) 1,7 mL.
- Εν συνεχεία, προστίθενται 550 μ L διαλύματος διάλυσης (Lysis buffer, CF), προθερμασμένο στους 65 °C, με σκοπό τη λύση της κυτταρικής μεμβράνης και ακολουθεί έντονη ανάδευση.
- Προστίθενται 10 μ L πρωτεϊνάσης k (proteinase k) και πραγματοποιείται ανάδευση. Αν ο όγκος του Lysis Buffer (ρυθμιστικό διάλυμα κυτταρικής λύσης) δεν επαρκεί το δείγμα πλήρως, γίνεται προσθήκη περισσότερου Buffer (και πρωτεϊνάσης K ανάλογα) μέχρι το δείγμα να ομογενοποιηθεί πλήρως.
- Τα (erppendorfs) τοποθετούνται σε υδατόλουτρο στους 65°C και πραγματοποιείται επώαση όλη τη νύκτα, ώστε να επιτευχθεί λύση του κυτταρικού τοιχώματος και να απελευθερωθούν τα νουκλεϊκά οξέα.
- Τα προϊόντα της λύσης φυγοκεντρώνται για 10 min στις 10.000 rpm σε θερμοκρασία δωματίου.
- Το καθαρό υπερκείμενο μεταφέρεται σε αποστειρωμένο σωλήνα τύπου erppendorf των 1,7mL, ενώ προστίθεται ίσος όγκος 100% παγωμένης αιθανόλης και ίσος όγκος Buffer C4. Ακολουθεί έντονη ανάδευση. Το C4 περιέχει υδροχλωρική γουανιδίνη 36-50% και ρυθμίζει τη σύνδεση του DNA στη στήλη. Η αιθανόλη βοηθά στην κατακρήμνιση του DNA.
- Αφού τοποθετηθεί η στήλη απομόνωσης (Nucleospin Column) στον ειδικό σωλήνα συλλογής, μεταφέρεται το προϊόν του προηγούμενου βήματος από το erppendorf στη στήλη συλλογής. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 1 min στις 11.000 rpm και απορρίπτεται το υποκείμενο του σωλήνα συλλογής.

- Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται για τον υπόλοιπο όγκο δείγματος που βρίσκεται στον αρχικό σωλήνα erpendorf.
- Μετά τη φυγοκέντρηση, πραγματοποιούνται εκκλύσεις του δείγματος, το οποίο έχει συγκρατηθεί στην στήλη.
- Κατά την 1η έκπλυση προστίθενται 400 μL buffer CQW στη στήλη. Φυγοκεντρείται για 1 min στις 11.000 rpm και απορρίπτεται το υγρό του σωλήνα συλλογής. Το CQW περιέχει υδροχλωρική γουανιδίνη 24-36% και αιθανόλη 35-55% και χρησιμοποιείται για τις εκκλύσεις του DNA.
- Κατά τη 2η έκπλυση προστίθενται 700 μL Wash buffer (διάλυμα έκλυσης) C5 μέσα στη στήλη και αφού φυγοκεντρείται για 1 min στις 11.000 rpm, απορρίπτεται το υγρό του σωλήνα συλλογής. Το C5 χρησιμοποιείται για τις εκκλύσεις του DNA.
- Τέλος, κατά την 3η έκπλυση προστίθενται 200 μL Wash buffer C5 μέσα στη στήλη. Πραγματοποιείται φυγοκέντρηση για 2 min στις 11.000 rpm, με σκοπό να απομακρυνθεί το Buffer C5 τελείως και απορρίπτεται το υγρό του σωλήνα συλλογής.
- Η στήλη τοποθετείται σε νέο σωλήνα τύπου erpendorf και προστίθενται 100 μL Elution Buffer (διάλυμα έκλυσης) CE, προθερμασμένο στους 70°C. Παραμένει σε θερμοκρασία δωματίου (20-25 °C) για επώαση επί 5 min. Φυγοκεντρείται για 1 min στις 11.000 rpm, ώστε να διαλυθεί το DNA. Το CE περιέχει 5mM Tris HCl, pH 8.5 και χρησιμοποιείται για την ανάκτηση του DNA.
- Τα δείγματα φυλάσσονται στην κατάψυξη στους -20 °C.

10.2.1 Απομόνωση DNA από ολικό αίμα

- 200 μL ολικού αίματος μεταφέρονται σε σωλήνα τύπου erpendorf 1,7 mL.
- Εν συνεχεία, προστίθενται 550 μL διαλύματος λύσης (Lysis buffer, CF), προθερμασμένο στους 65 °C, με σκοπό τη λύση της κυτταρικής μεμβράνης και ακολουθεί έντονη ανάδευση.
- Προστίθενται 10 μL πρωτεϊνάσης k (proteinase k) και πραγματοποιείται ανάδευση. Αν ο όγκος του Lysis Buffer δεν επαρκεί το δείγμα πλήρως, γίνεται προσθήκη περισσότερου Buffer (και πρωτεϊνάσης K ανάλογα) μέχρι το δείγμα να ομογενοποιηθεί πλήρως.
- Τα erpendorfs τοποθετούνται σε υδατόλουτρο στους 65°C και πραγματοποιείται επώαση 45 min ώστε να απελευθερωθούν τα νουκλεϊκά οξέα.
- Τα προϊόντα της λύσης φυγοκεντρούνται για 10 min στις 10.000 rpm σε θερμοκρασία δωματίου.
- Το καθαρό υπερκείμενο μεταφέρεται σε αποστειρωμένο σωλήνα τύπου erpendorf των 1,7mL, ενώ προστίθεται ίσος όγκος 100% παγωμένης αιθανόλης και ίσος όγκος Buffer C4. Ακολουθεί έντονη ανάδευση. Το C4 περιέχει υδροχλωρική γουανιδίνη 36-50% και ρυθμίζει τη σύνδεση του DNA στη στήλη.
- Αφού τοποθετηθεί η στήλη απομόνωσης (Nucleospin Column) στον ειδικό σωλήνα συλλογής, μεταφέρεται το προϊόν του προηγούμενου βήματος από το erpendorf στη στήλη συλλογής. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 1 min στις 11.000 rpm και απορρίπτεται το υποκείμενο του σωλήνα συλλογής.
- Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται για τον υπόλοιπο όγκο δείγματος που βρίσκεται στον αρχικό σωλήνα erpendorf.
- Μετά τη φυγοκέντρηση, πραγματοποιούνται εκκλύσεις του δείγματος, το οποίο έχει συγκρατηθεί στην στήλη.
- Κατά την 1η έκπλυση προστίθενται 400 μL buffer CQW στη στήλη. Φυγοκεντρείται για 1 min στις 11.000 rpm και απορρίπτεται το υγρό του σωλήνα συλλογής.
- Κατά τη 2η έκπλυση προστίθενται 700 μL Wash buffer C5 μέσα στη στήλη και αφού φυγοκεντρείται για 1 min στις 11.000 rpm και απορρίπτεται το υγρό του σωλήνα συλλογής.
- Τέλος, κατά την 3η έκπλυση προστίθενται 200 μL Wash buffer C5 μέσα στη στήλη. Πραγματοποιείται φυγοκέντρηση για 2 min στις 11.000 rpm, με σκοπό να απομακρυνθεί το Buffer C5 τελείως και απορρίπτεται το υγρό του σωλήνα συλλογής.

- Η στήλη τοποθετείται σε νέο σωλήνα τύπου erpendorf και προστίθενται 100 μL Elution Buffer CE, προθερμασμένο στους 70°C. Παραμένει σε θερμοκρασία δωματίου (20-25 °C) για επώαση επί 5 min. Φυγοκεντρείται για 1 min στις 11.000 rpm, ώστε να διαλυθεί το DNA.
- Τα δείγματα φυλάσσονται στο ψυγείο στους 4°C.

10.3 Εργαστηριακή άσκηση: Απομόνωση DNA από φυτικό ιστό

Παραλαμβάνεται δείγμα από καλαμπόκι, αλέθεται και ζυγίζεται σε αναλυτικό ζυγό.

100 mg του υπό μελέτη δείγματος μεταφέρονται σε πλαστικό σωλήνα τύπου erpendorf 1,7 mL.

Εν συνεχεία, προστίθενται 550 μL διαλύματος λύσης (Lysis buffer, CF), προθερμασμένο στους 65°C με σκοπό τη λύση του κυτταρικού τοιχώματος και ακολουθεί έντονη ανάδευση.

Προστίθενται 10 μL πρωτεϊνάσης k (proteinase k) και πραγματοποιείται έντονη ανάδευση για 2-3 min..

Τα erpendorfs τοποθετούνται σε υδατόλουτρο στους 65°C και πραγματοποιείται επώαση 2-3 h, ώστε να επιτευχθεί λύση του κυτταρικού τοιχώματος και να απελευθερωθούν τα νουκλεϊκά οξέα.

Τα προϊόντα της λύσης φυγοκεντρώνονται για 10 min στις 10.000 rpm σε θερμοκρασία δωματίου.

Αφαιρείται με μία πιπέττα το υπερκείμενο, το οποίο περιέχει το DNA (μαζί με πρωτεΐνες, λιπίδια, υδατάνθρακες) και τοποθετείται σε καινούριο erpendorf. Προστίθεται με πιπέττα 1:1 Buffer C4 και αιθανόλη ανάλογα με τα μL του δείγματος που έχουν προστεθεί.

Αφού τοποθετηθεί η στήλη απομόνωσης (Nucleospin Column) στον ειδικό σωλήνα συλλογής, μεταφέρεται το προϊόν του προηγούμενου βήματος από το erpendorf στη στήλη συλλογής. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 1 min στις 11.000 rpm και απορρίπτεται το υποκείμενο του σωλήνα συλλογής.

Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται για τον υπόλοιπο όγκο δείγματος που βρίσκεται στον αρχικό σωλήνα erpendorf.

- Μετά τη φυγοκέντρηση, πραγματοποιούνται εκπλύσεις του δείγματος, το οποίο έχει συγκρατηθεί στη στήλη.
- Κατά την 1η έκπλυση προστίθενται 400 μL buffer CQW στη στήλη. Φυγοκεντρείται για 1 min στις 11.000 rpm και απορρίπτεται το υγρό του σωλήνα συλλογής. Το CQW περιέχει υδροχλωρική γουανιδίνη 24-36% και αιθανόλη 35-55% και χρησιμοποιείται για τις εκπλύσεις του DNA.
- Κατά τη 2η έκπλυση προστίθενται 700 μL Wash buffer C5 μέσα στη στήλη και αφού φυγοκεντρείται για 1 min στις 11.000 rpm, απορρίπτεται το υγρό του σωλήνα συλλογής. Το C5 χρησιμοποιείται για τις εκπλύσεις του DNA.
- Τέλος, κατά την 3η έκπλυση προστίθενται 200 μL Wash buffer C5 μέσα στη στήλη. Πραγματοποιείται φυγοκέντρηση για 2 min στις 11.000 rpm, με σκοπό να απομακρυνθεί το Buffer C5 τελείως και απορρίπτεται το υγρό του σωλήνα συλλογής.
- Η στήλη τοποθετείται σε νέο πλαστικό σωλήνα τύπου erpendorf και προστίθενται 100 μL Elution Buffer CE, προθερμασμένο στους 70°C. Παραμένει σε θερμοκρασία δωματίου (20-25 °C) για επώαση επί 5 min. Φυγοκεντρείται για 1 min στις 11.000 rpm, ώστε να διαλυθεί το DNA. Το CE περιέχει 5mM Tris HCl, pH 8.5 και χρησιμοποιείται για την ανάκτηση του DNA.
- Τα δείγματα φυλάσσονται στο ψυγείο στους 4°C.

10.3.1 Απομόνωση DNA από φράουλα

- Τοποθετήστε μία φράουλα μέσα σε ένα καθαρό πλαστικό σακουλάκι τροφίμων και πολτοποιήστε τη ώστε να πάρετε ομοιογενή πολτό. Με αυτό τον τρόπο επιτυγχάνετε το μηχανικό σπάσιμο των κυττάρων ώστε να απελευθερωθεί στη συνέχεια το DNA.
- Τοποθετήστε το σακουλάκι με το ομογενοποίημα σε υδατόλουτρο που έχει ρυθμιστεί στους 55-60°C για 30 λεπτά. Στη θερμοκρασία αυτή επιταχύνεται η λύση των κυττάρων/μεμβρανών και η διαλυτοποίηση του DNA.
- Παρασκευάστε το διάλυμα εκχύλισης του DNA που αποτελείται από 100 mL αποσταγμένο νερό, 2 κουταλάκια (του γλυκού) υγρό καθαρισμού φακών επαφής και 1 κουταλάκι μαγειρικό αλάτι. Ανακατέψτε ελαφρά για να διαλυθούν τα υλικά φροντίζοντας να αποφύγετε τον

σχηματισμό πολλών φυσαλίδων. Τα υγρά αυτό περιέχει ένζυμα που πέπτουν τις πρωτεΐνες και βοηθούν στην απομόνωση πιο “καθαρού” DNA.

- Αδειάστε το διάλυμα εκχύλισης στο σακουλάκι με την πολτοποιημένη φράουλα, κλείστε προσεκτικά το σακουλάκι και ομογενοποιήστε το περιεχόμενο για 1-2 min αποφεύγοντας τη δημιουργία φυσαλίδων. Στο στάδιο αυτό επιτυγχάνετε με χημικό τρόπο τη λύση των μεμβρανών του κυττάρου και τη διαλυτοποίηση του DNA.
- Φιλτράρετε το ομογενοποίημα συλλέγοντας το διαυγές διάλυμα.
- Μεταφέρετε μία ποσότητα από το διήθημα (~5 mL) σε γυάλινο δοκιμαστικό σωλήνα και προσθέστε ίση ποσότητα παγωμένης αιθανόλης, αργά και προσεκτικά από τα τοιχώματα του σωλήνα. Η αιθανόλη πρέπει να είναι παγωμένη, γι' αυτό την τοποθετούμε στην κατάψυξη σε ένα ασφαλές δοχείο αρκετές ώρες πριν από τη διεξαγωγή του πειράματος.
- Αφήστε τον δοκιμαστικό σωλήνα να ηρεμήσει για μερικά λεπτά, προσέχοντας να μην αναμιχθούν οι
- δύο φάσεις (υδατική/αλκοολική). Το DNA αρχίζει να συγκεντρώνεται στη φάση της αλκοόλης.
- Με τη βοήθεια πλαστικής ράβδου απομονώστε το DNA και ξεπλύνετε το, εμβαπτίζοντας τη ράβδο αρκετές φορές σε διάλυμα 70% αιθανόλης.
- Αφήστε το DNA να στεγνώσει σε θερμοκρασία δωματίου για αρκετά λεπτά (>15 min) και στη συνέχεια διαλύστε το σε 1 mL ρυθμιστικού διαλύματος Tris/EDTA, pH 7.4 σε ένα σωληνάριο Eppendorf. Φυλάξτε το DNA στους 4°C.

10.4 Εργαστηριακή άσκηση: Φωτομετρικός προσδιορισμός της συγκέντρωσης DNA

Στις σύγχρονες τεχνικές μοριακής βιολογίας χρησιμοποιούνται κατά κανόνα μικροποσότητες DNA (της τάξεως των μικρο ή νανογραμμαρίων), υψηλού βαθμού καθαρότητας (απαλλαγμένο δηλαδή από πρωτεΐνες ή/και άλλες προσμίξεις) και για τον λόγο αυτόν απαιτείται ακριβής προσδιορισμός της συγκέντρωσης του DNA σε ένα διάλυμα και εκτίμηση της καθαρότητάς του.

Υπάρχουν διάφορες μέθοδοι για την ποσοτικοποίηση των νουκλεϊκών οξέων (DNA, RNA) σε ένα διάλυμα, ενώ η ευρέως χρησιμοποιούμενη είναι η φασματοφωτομετρική ανάλυση.

Φασματοφωτομετρική ανάλυση: Τα νουκλεϊκά οξέα έχουν την ιδιότητα να απορροφούν υπεριώδες φως (UV). Η ποσότητα του DNA (ή του RNA) που περιέχεται σε ένα υδατικό διάλυμα μπορεί επομένως να υπολογιστεί με μέτρηση της οπτικής απορρόφησης OD σε μήκος κύματος 260 nm (OD 260), καθώς τα νουκλεϊκά οξέα έχουν μέγιστο της απορρόφησής τους σ' αυτήν την περιοχή της υπεριώδους ακτινοβολίας. Όσο περισσότερο είναι το φως που απορροφάται από το δείγμα τόσο υψηλότερη είναι η συγκέντρωση νουκλεϊκού οξέος στο δείγμα. Στα 280 nm αξιολογείται η ποσότητα της πρωτεΐνης που εκχυλίζεται μαζί με το DNA.

Γενικά, μία μονάδα απορρόφησης στα 260 nm (OD 260 = 1) αντιστοιχεί σε:

- 50 µg/mL δίκλωνου DNA,
- 40 µg/mL μονόκλωνου DNA ή RNA,
- ~20 µg/mL ολιγονουκλεοτιδίων.

Η αναλογία μπορεί να εκφραστεί ως λόγος A260/A280 και δείχνει την καθαρότητα του DNA που απομονώθηκε, δηλαδή εάν υπάρχει πρόσμιξη με RNA ή με πρωτεΐνες ή άλλες ουσίες. Όταν ο λόγος είναι 1.8-2.0 τότε το DNA που απομονώθηκε είναι καθαρό. Εάν ο λόγος είναι μικρότερος, τότε το DNA είναι «ακάθαρο», δηλαδή περιέχει προσμίξεις με πρωτεΐνες. Εάν ο λόγος είναι μεγαλύτερος, τότε υπάρχει πολύ RNA.

- Με τη βοήθεια μιας αυτόματης μικροπιπέτας τοποθετήστε 1 mL απιονισμένου νερού σε μία καθαρή κυψελίδα χαλαζία. Εισάγετε την κυψελίδα στο φασματοφωτόμετρο μιας δέσμης και αφού διαβάσετε την οπτική απορρόφηση στα 325 nm, μηδενίστε το όργανο.
- Απομακρύνετε την κυψελίδα από το φωτόμετρο, αδειάστε το περιεχόμενό της και τοποθετήστε το διάλυμα του DNA που απομονώσατε. Διαβάστε την οπτική απορρόφηση (OD) του

διαλύματος. Εάν το διάλυμα του DNA είναι πολύ πυκνό, θα χρειαστεί να ετοιμάσετε ένα αραιωμένο δείγμα στο ίδιο μέσο (νερό ή ρυθμιστικό διάλυμα) που χρησιμοποιήσατε ως “τυφλό”.

- Επαναλάβετε τη διαδικασία μετρώντας την OD του δείγματος στα 280, 260 και 230 nm.
- Υπολογίστε τη συγκέντρωση του DNA λαμβάνοντας υπόψη ότι $OD_{260} = 1$ αντιστοιχεί σε 50 $\mu\text{g/mL}$ δίκλωνου DNA.
- Χρησιμοποιήστε τον λόγο OD_{260} / OD_{280} , για να εκτιμήσετε την καθαρότητα του DNA που απομονώσατε. Συμπληρώστε τον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 10.1):

Πίνακας 10.1 Μέτρηση της οπτικής απορρόφησης και εκτίμηση της καθαρότητας του απομονωμένου DNA.

Μήκος κύματος (nm)	Οπική απορρόφηση (OD)	OD_{260} / OD_{280}	Συγκέντρωση ($\mu\text{g/mL}$)
325			
280			
260			
230			

10.4.1 Φωτομέτρηση σε ειδική πλάκα

- Καθαρίζεται η πλάκα (Εικόνα 10.10) με απιονισμένο νερό και σκουπίζεται επιφανειακά ήπια (χωρίς τριβή) με χαρτί.
- Ανοίξτε το φωτόμετρο (Εικόνα 10.9) και τοποθετήστε την κενή πλάκα ώστε να γίνει ρύθμιση (calibration), ρυθμίζοντας την απορρόφηση.
- Με αυτόματη πιπέτα, προσθέστε 5 μL από το δείγμα στην κυψελίδα της πλάκας.
- Τοποθετήστε την πλάκα στο φωτόμετρο και σημειώστε την τιμή καθαρότητας και συγκέντρωσης του DNA.
- Καθαρίστε την πλάκα με απιονισμένο νερό και σκουπίστε την ήπια με χαρτί.



Εικόνα 10.9 Φωτόμετρο Epoch.

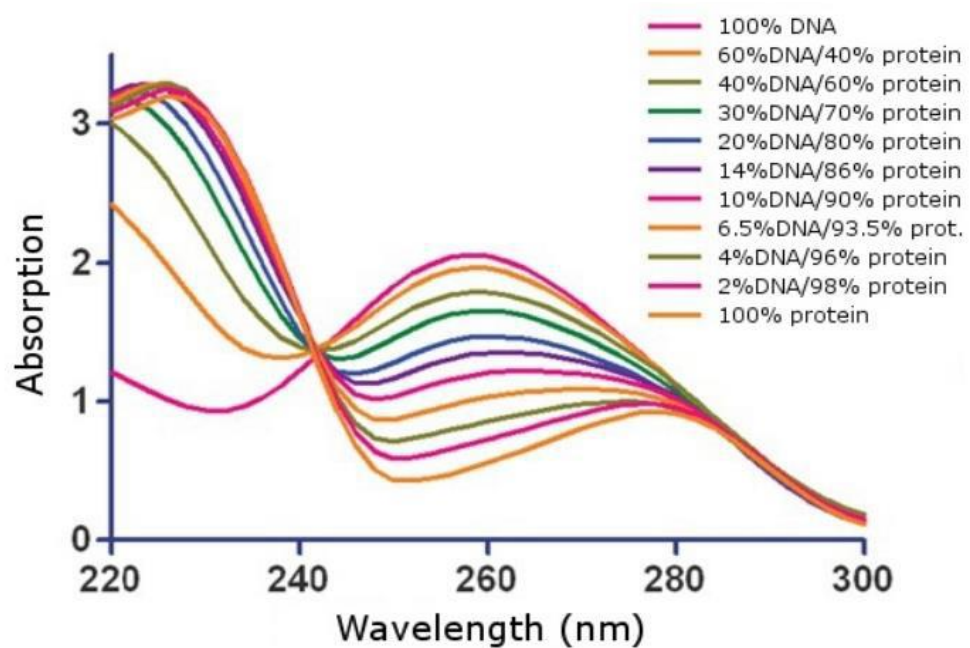


Εικόνα 10.10 Πλάκα φωτομέτρησης.

Για πρακτική εξάσκηση

Από ένα διάλυμα DNA 500 μL λάβετε 2 μL και προσθέστε τα σε κυψελίδα φωτομέτρου του 1mL. Αφού συμπληρώσετε τον υπόλοιπο όγκο με H_2O , υπολογίστε τη συγκέντρωση του DNA στο αρχικό διάλυμα, όταν η απορρόφησή του στην κυψελίδα στα 260nm είναι 0,020 OD με βάση το δεδομένο ότι 1 O.D 260 nm = 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

10.5 Εργαστηριακή άσκηση: Φάσματα απορρόφησης νουκλεϊκών οξέων στο υπεριώδες



Εικόνα 10.11 Φάσματα απορρόφησης διαλυμάτων με διαφορετικούς λόγους DNA προς πρωτεΐνες.

Η αναλογία του DNA πρωτεΐνης σε βιολογικά δείγματα μπορεί να εκτιμηθεί, όπως ήδη αναφέρθηκε από την απορρόφηση του δείγματος στα 260 και 280 nm προκύπτει από την απορρόφηση των νουκλεοτιδικών βάσεων και των αρωματικών αμινοξέων. Στην περίπτωση ενός καθαρού διαλύματος DNA, $OD_{260} / OD_{280} = 1,8 - 2,0$. Η προσθήκη πρωτεΐνης στο διάλυμα θα μειώσει αυτή την τιμή (Εικόνα 10.8).

10.6 Εργαστηριακή άσκηση: Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR, Polymerase Chain Reaction) για τη γονιδιοματική περιοχή του TNF- α –308G/A

10.6.1 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Η Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR) είναι μια απλή και γρήγορη τεχνική βασισμένη στο πρότυπο αντιγραφής του DNA, που επιτρέπει τη δημιουργία απεριόριστων αντιγράφων γενετικού υλικού από ένα μόνο κύτταρο.

Η τεχνολογία PCR αντικαθιστά τον υβριδισμό κατά *Southern* για τη διάγνωση γενετικών ασθενειών και για την ανίχνευση λοιμωδών νόσων ([ιογενών](#) ή [μικροβιακών λοιμώξεων](#) κτλ.) και τη δικαστική - [ιατροδικαστική](#). Επιπρόσθετα, μικροποσότητες [RNA](#) μπορούν να αναλυθούν με τον ίδιο τρόπο, μετά την [αντίστροφη μεταγραφή](#) τους σε DNA από το [ένζυμο](#) της [ανάστροφης τρανσκριπτάσης](#) (RT-PCR – reverse transcription PCR). Πιο πρόσφατα, κατά τη διάρκεια της [πανδημίας του κορωνοϊού 2019-21](#), η παραλλαγή RT-PCR της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως για την ανίχνευση του ιικού γενετικού υλικού (RNA) και θεωρείται πολύ αξιόπιστη μέθοδος.

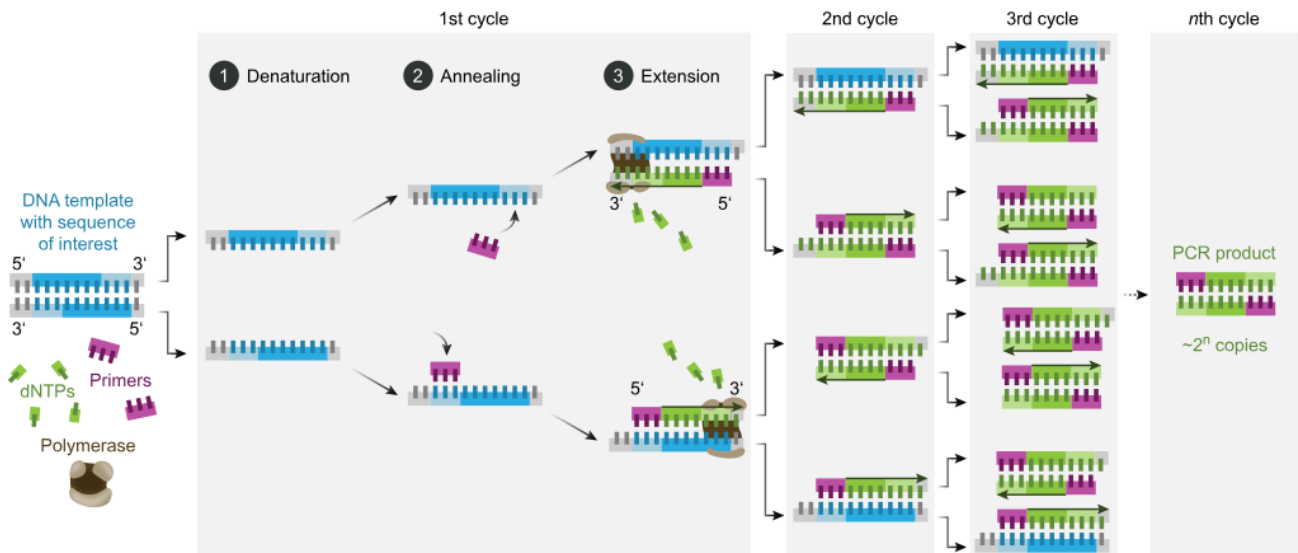
Η PCR είναι in vitro μέθοδος και μπορεί να πραγματοποιηθεί χωρίς περιορισμούς στη μορφή του χρησιμοποιούμενου DNA. Με τη χρήση της συγκεκριμένα θραύσματα DNA μπορούν να κλωνοποιηθούν σε έναν δοκιμαστικό σωλήνα απουσία ζωντανών κυττάρων. Η PCR είναι μια τεχνική τριών βημάτων:

- αποδιάταξη του DNA,
- πρόσδεση των εκκινητών,
- σύνδεση νέου DNA,

που χαρακτηρίζονται ως κύκλοι, με κάθε κύκλο να αποτελείται συνήθως από 2-3 διακριτικά βήματα θερμοκρασίας. Οι θερμοκρασίες που χρησιμοποιούνται και το χρονικό διάστημα που εφαρμόζεται σε κάθε κύκλο εξαρτάται από μια ποικιλία παραμέτρων που περιλαμβάνουν:

- το ένζυμο που χρησιμοποιείται για τη σύνθεση του DNA,
- τη συγκέντρωση των δισθενών ιόντων και τριφωσφορικών δεοξυριβονουκλεοτιδίων (dNTPs) στην αντίδραση,
- τη θερμοκρασία τήξης των εκκινητών.

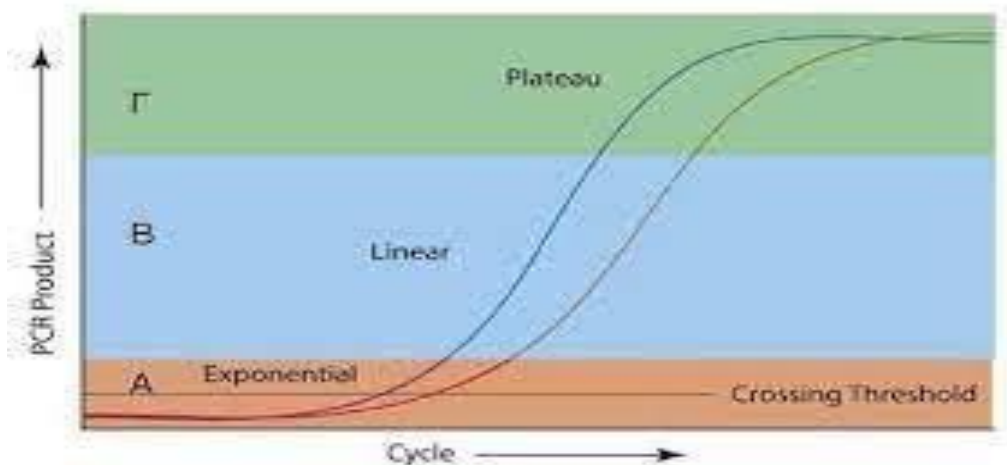
Η PCR δίνει τη δυνατότητα αντιγραφής επιλεγμένων αλληλουχιών DNA με τη χρήση του κατάλληλου ζεύγους εκκινητών, που προσδένονται στα δύο άκρα της αλληλουχίας-στόχου. Η σύνδεση των νέων τμημάτων DNA επιτυγχάνεται με τη χρήση της Taq πολυμεράσης, μιας ανασυνδυασμένης θερμοανθεκτικής DNA πολυμεράσης. Η διαδικασία πραγματοποιείται σε μηχανήμα, με δυνατότητα προγραμματισμού των κύκλων θέρμανσης και μείωσης της θερμοκρασίας, που ονομάζεται θερμοκύκλος (PCR thermalcycler). Ο θερμοκύκλος θερμαίνει και ψύχει τα σωληνάκια της αντίδρασης (όγκου 0,2 – 0,5mL) για την επίτευξη των θερμοκρασιών που απαιτούνται σε κάθε στάδιο της αντίδρασης. Πολλοί σύγχρονοι κυκλοποιητές κάνουν χρήση του φαινομένου Peltier, θερμοηλεκτρικό φαινόμενο, που παρατηρείται, όταν το ηλεκτρικό ρεύμα διαρρέει δύο διαφορετικά υλικά που ενώνονται σε ένα σημείο. Ανάλογα με τη φορά του ηλεκτρικού ρεύματος, αυτό το σημείο μπορεί είτε να θερμαίνεται είτε να ψύχεται. Τα σωληνάκια αντίδρασης με λεπτά τοιχώματα επιτρέπουν την ευνοϊκή θερμική αγωγιμότητα έχοντας ως αποτέλεσμα να καταστεί δυνατή η ταχεία θερμική ισορροπία. Οι περισσότεροι θερμοκύκλοι έχουν θερμαινόμενα καπάκια, ώστε να αποφευχθεί η συμπύκνωση στην κορυφή του σωλήνα αντίδρασης (Εικόνα 10.12).



Εικόνα 10.12 Απεικόνιση των επιμέρους σταδίων της αντίδρασης PCR και ποσοτική απεικόνιση των τελικών προϊόντων.

Η διαδικασία της PCR χωρίζεται σε τρεις φάσεις:

- Εκθετική (exponential) φάση: Είναι η φάση κατά την οποία έχει αρχίσει ο πολλαπλασιασμός της προεπιλεγμένης αλληλουχίας DNA. Σ' αυτή τη φάση η αντίδραση είναι πολύ αποτελεσματική και σε κάθε κύκλο διπλασιάζεται η προεπιλεγμένη αλληλουχία DNA.
- Γραμμική (linear) φάση: Η φάση στην οποία παρατηρείται μειωμένη παραγωγή αντιγράφων της αλληλουχίας DNA εξαιτίας της μείωσης της ενεργότητας των αντιδραστηρίων.
- Φάση Plateau: Στη φάση αυτή έχει σταματήσει η αντίδραση της PCR, καθώς και η παραγωγή νέων αντιγράφων εξαιτίας της εξάντλησης των αντιδραστηρίων (Εικόνα 10.13).



Εικόνα 10.13 Η καμπύλη παρουσιάζει τις τρεις φάσεις στις οποίες χωρίζεται η διαδικασία της PCR. Α) Εκθετική φάση (Exponential phase), Β) Γραμμική φάση (Linear phase) και Γ) Φάση Πλατώ (Plateau).

Εκτός από τη συμβατική PCR, σήμερα έχουν αναπτυχθεί πολλές παραλλαγές της, ορισμένες από τις οποίες είναι: πολυπλεκτική PCR (Multiplex PCR), αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης με αντίστροφη μεταγραφή (Reverse-Transcriptase PCR, rtPCR), ευρέος φάσματος PCR (Broad-spectrum PCR), PCR θερμής έναρξης (Hotstart PCR), η μακρά και ακριβής PCR (Long and Accurate PCR, LA PCR), η αλληλοεξειδικευμένη PCR (Allele-specific PCR), η συναρμολογούμενη PCR ή κυκλική συναρμολόγηση πολυμεράσης (Assembly PCR or Polymerase Cycling Assembly, PCA), η ασύμμετρη PCR (Asymmetric PCR), η εκθετική PCR (Linear-After-The-Exponential-PCR, LATE-PCR), η PCR εξειδικευμένη εν τω μέσω αλληλουχίας (Intersequence-specific PCR, ISSR PCR), η αντίστροφη PCR (Inverse PCR), η PCR μέσω απολίνωσης (Ligation-mediated PCR), η

μεθυλοεξειδικευμένη PCR (Methylation-specific PCR, MSP), In situ PCR, Long PCR, Touchdown PCR, καθώς επίσης και η PCR πραγματικού χρόνου (Real Time PCR, rtPCR).

10.6.2 Πειραματικό μέρος

Τα δείγματα DNA χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση της γονιδιωματικής περιοχής του TNF-α -308G/A με την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης, PCR. Χρησιμοποιούνται εκκινητές που ενισχύουν το DNA-στόχο δίνοντας 107 bp.

Ο forward (προς τα εμπρός) και ο reverse (προς τα πίσω) εκκινητές διαθέτουν την παρακάτω αλληλουχία:

Forward: 5'-AGGCAATAGGTTTTGAGGGCCAT-3'.

Reverse: 5'-TCCTCCCTGCTCCGATTCGG-3'.

Ο συνολικός όγκος του μείγματος αντίδρασης σε κάθε eppendorf είναι 50 μL και περιέχει:

- 25 μL Master Mix Sapphire Amp Fast PCR Master Mix.
 - 1,5 μL forward εκκινητή.
 - 1,5 μL reverse εκκινητή.
 - 12 μL αποστειρωμένου νερού μοριακής βιολογίας, ελεύθερου DNAασης.
 - 10 μL δείγματος DNA.
- Δημιουργείται ένα ολικό διάλυμα για τον αριθμό των αντιδράσεων που θα πραγματοποιηθούν, το οποίο περιέχει όλα τα συστατικά εκτός από το DNA. Από το συγκεκριμένο διάλυμα, αντιστοιχούν 40 μL σε κάθε αντίδραση και ο τελικός όγκος της αντίδρασης είναι 50 μL.
 - Σε πλαστικούς σωλήνες (tube περιεκτικότητας 200 μL, ειδικούς για το όργανο της PCR), προστίθεται η ποσότητα του διαλύματος που αντιστοιχεί σε κάθε αντίδραση και στη συνέχεια σε κάθε σωλήνα τοποθετείται ποσότητα DNA ίση με 10 μL.
 - Για τον έλεγχο της αντίδρασης χρησιμοποιούνται δείγματα-δείκτες, ένα θετικό και ένα αρνητικό. Το θετικό δείγμα εκτός από το διάλυμα περιέχει DNA πρότυπου δείγματος, ενώ το αρνητικό αντί για DNA περιέχει απιονισμένο νερό.
 - Ακολουθεί καλή ανάδευση των σωλήνων, ενώ στη συνέχεια τοποθετούνται στην κεφαλή του θερμικού κυκλοποιητή, που έχει κατάλληλα προγραμματιστεί (Πίνακας 10.2).

Πίνακας 10.2 Πρόγραμμα PCR για τη γονιδιωματική περιοχή του TNF-α -308G/A.

Αριθμός κύκλων	Στάδιο
x1	Αποδιάταξη του DNA μήτρα για 3 min στους 95°C.
x40	Αποδιάταξη του DNA μήτρα για 15 sec στους 95°C. Υβριδισμός εκκινητών για 15 sec στους 60°C. Επιμήκυνση για 60 sec στους 72°C.
x1	Τελική επιμήκυνση του προϊόντος για 10 min στους 72°C
x1	Διατήρηση στους 10°C

- Ο πολυμορφισμός TNF-α -308G/A στο γονίδιο του TNF-α σχετίζεται με την εκδήλωση σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 και στεφανιαίας νόσου.

10.6.3 Εργαστηριακή άσκηση: Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) για τη γονιδιωματική περιοχή του LEPR Gln223Arg

Τα δείγματα DNA χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση της γονιδιωματικής περιοχής του LEPR Gln223Arg με την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης, PCR. Χρησιμοποιούνται εκκινητές που ενισχύουν το DNA-στόχο δίνοντας 421 bp.

Ο forward και ο reverse εκκινητής διαθέτουν την παρακάτω αλληλουχία:

Forward: 5'-ACCCTTTAAGCTGGGTGTCCCAAATAG-3'.

Reverse: 5'-AGCTAGCAAATATTTTTGTAAGCAATT-3'.

Ο συνολικός όγκος του μείγματος αντίδρασης σε κάθε eppendorf είναι 50 μ L και περιέχει:

- 25 μ L Master Mix Sappfire Amp Fast PCR Master Mix.
 - 1,5 μ L forward εκκινητή.
 - 1,5 μ L reverse εκκινητή.
 - 12 μ L αποστειρωμένου νερού μοριακής βιολογίας, ελεύθερου DNAασης.
 - 10 μ L δείγματος DNA.
- Δημιουργείται ένα ολικό διάλυμα για τον αριθμό των αντιδράσεων που θα πραγματοποιηθούν, το οποίο περιέχει όλα τα συστατικά εκτός από το DNA. Από το συγκεκριμένο διάλυμα αντιστοιχούν 40 μ L σε κάθε αντίδραση και ο τελικός όγκος της αντίδρασης είναι 50 μ L.
 - Σε πλαστικούς σωλήνες (tube περιεκτικότητας 200 μ L, ειδικούς για το μηχάνημα της PCR) προστίθεται η ποσότητα του διαλύματος που αντιστοιχεί σε κάθε αντίδραση και στη συνέχεια σε κάθε σωλήνα τοποθετείται ποσότητα DNA ίση με 10 μ L.
 - Για τον έλεγχο της αντίδρασης χρησιμοποιούνται δείγματα-δείκτες, ένα θετικό και ένα αρνητικό. Το θετικό δείγμα εκτός από το διάλυμα περιέχει DNA πρότυπου δείγματος, ενώ το αρνητικό αντί για DNA περιέχει απιονισμένο νερό.
 - Ακολουθεί καλή ανάδευση των σωλήνων, ενώ στη συνέχεια τοποθετούνται στην κεφαλή του θερμικού κυκλοποιητή, που έχει κατάλληλα προγραμματιστεί (Πίνακας 10.3).

Πίνακας 10.3 Πρόγραμμα PCR για τη γονιδιωματική περιοχή του *LEPR Gln223Arg*.

Αριθμός κύκλων	Στάδιο
x1	Αποδιάταξη του DNA μήτρα για 3 min στους 95°C.
x40	Αποδιάταξη του DNA μήτρα για 15 sec στους 95°C. Υβριδισμός εκκινητών για 15 sec στους 60°C. Επιμήκυνση για 60 sec στους 72°C.
x1	Τελική επιμήκυνση του προϊόντος για 10 min στους 72°C.
x1	Διατήρηση στους 10°C.

- Ο πολυμορφισμός Gln223Arg (rs1137101: γλουταμίνη > αργινίνη) στο γονίδιο του ανθρώπινου υποδοχέα της λεπτίνης σχετίζεται με την παχυσαρκία και την εκδήλωση σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2.

Στον Πίνακα 10.4 περιγράφεται ένα γενικό πρωτόκολλο για την PCR.

Πίνακας 10.4 Γενικό πρωτόκολλο για αντιδράσεις PCR.

Συστατικά αντίδρασης	Πυκνό διάλυμα	Τελική Συγκέντρωση
Ρυθμιστικό διάλυμα PCR	10 x	1 x
dNTPs	2 mM	200 μM
Εκκινητής forward	3 μM	300 nM
Εκκινητής reverse	3 μM	300 nM
MgCl ₂	25 mM	1,5 mM
DNA μήτρα	-	pg έως ng DNA
Taq πολυμεράση	5 units/μL	1 unit *
Αποστειρωμένο H ₂ O	-	Μέχρι τελικού όγκου 50 μL

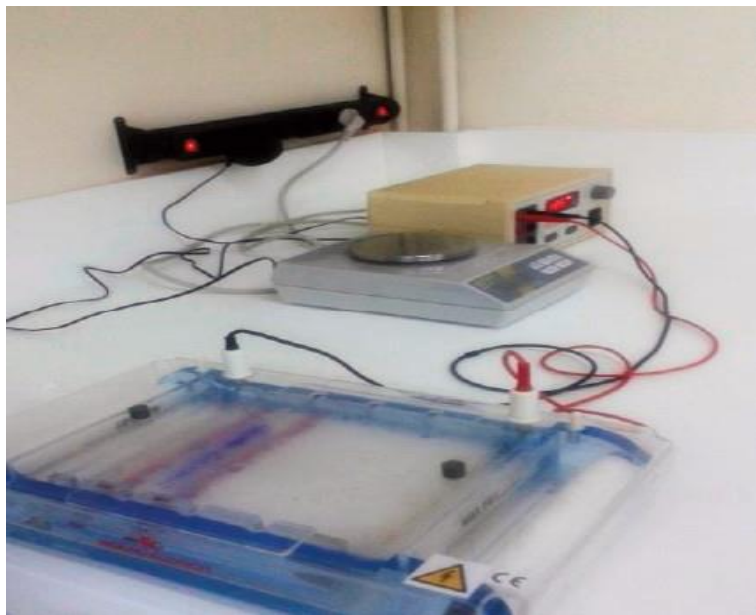
*1U (unit) ενζύμου είναι η ποσότητα που απαιτείται για την πλήρη πέψη 1 μg DNA σε μία ώρα σε κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα, στην ιδανική θερμοκρασία.

10.7 Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης

- Τα δείγματα DNA από το 10.6.2 και 10.6.3 ηλεκτροφορούνται σε πήκτωμα αγαρόζης.
- Σε κωνική φιάλη 250 mL προστίθενται 2 g αγαρόζης και 100 mL διαλύματος TBE 10 x (τελικής συγκέντρωσης: Tris- HCl EDTA 1 mM, pH 8). Η κωνική φιάλη τοποθετείται στον φούρνο μικροκυμάτων και θερμαίνεται, μέχρι να διαλυθεί πλήρως η αγαρόζη. Θερμαίνεται ανά μικρά επαναλαμβανόμενα διαστήματα με ανάδευση της φιάλης για πιο αποτελεσματική διάλυση της αγαρόζης. Με τον τρόπο αυτόν, αποφεύγονται πιθανές εξατμίσεις. Αφού διαλυθεί, αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου να κρυώσει, σε σημείο που να παραμένει ακόμη ρευστή. Στη συνέχεια, προστίθενται βρωμιούχο αιθίδιο, ώστε η τελική συγκέντρωση να είναι 0,5 μg/mL, η φιάλη αναδεύεται καλά και χύνεται στον ήδη συναρμολογημένο δίσκο πηκτώματος. Αφήνεται να πήξει στο ψυγείο και όταν το πήκτωμα είναι έτοιμο, αφαιρείται το «χτενάκι» (Εικόνα 10.14).
- Ο δίσκος με το πήκτωμα τοποθετείται στον θάλαμο της ηλεκτροφόρησης. Προστίθεται αρκετή ποσότητα ρυθμιστικού διαλύματος TBE 1 x μέχρι να καλυφθεί όλο το πήκτωμα.
- Τα δείγματα τοποθετούνται στα «πηγάδια» του πηκτώματος με σειρά, η οποία καταγράφεται. Για την αποφυγή επιμολύνσεων χρησιμοποιείται διαφορετικό tip για κάθε δείγμα. Εάν πρόκειται για δείγματα που προήλθαν από PCR, τοποθετείται είτε στη μεσαία θέση είτε στην άκρη, DNA ladder. Το μέγεθος και η ποσότητα των προϊόντων PCR μπορούν να προσδιοριστούν συγκρίνοντας το μέγεθος και την ποσότητα των ζωνών DNA στο ladder (δείγμα πρότυπων μοριακών βαρών).

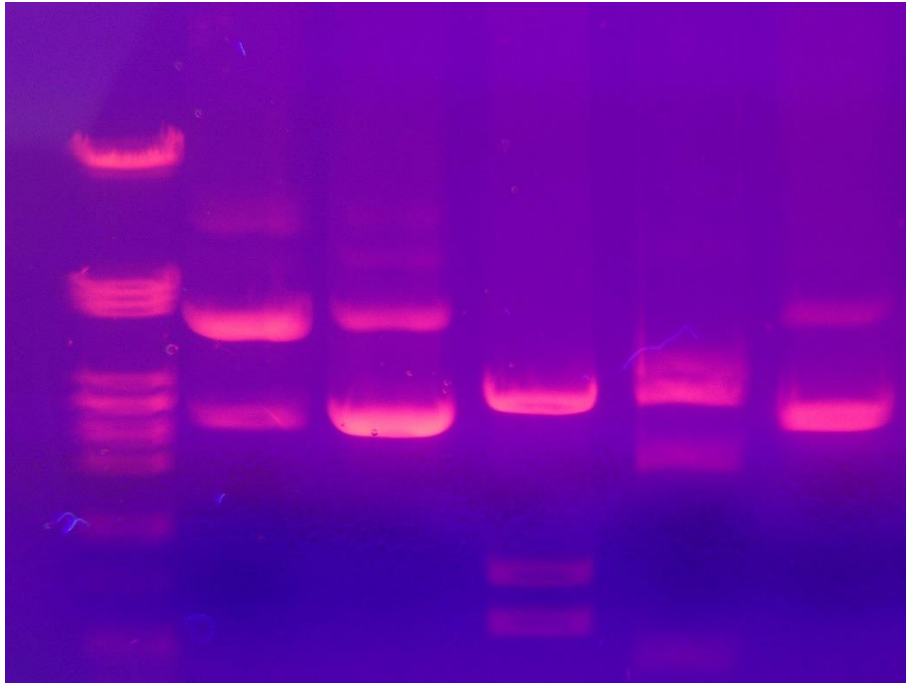


Εικόνα 10.14 Φούρνος μικροκυμάτων και δίσκος πηκτώματος.



Εικόνα 10.15 Συσκευή ηλεκτροφόρησης.

- Η συσκευή ηλεκτροφόρησης (Εικόνα 10.15) συνδέεται με το τροφοδοτικό και εφαρμόζεται σταθερή τάση 2 – 5 V /cm.
- Όταν τα δείγματα μετακινηθούν αρκετά (δείκτη αποτελούν οι χρωστικές του κυανού της βρωμοφαινόλης και του κυανολικού ξυλενίου), το πήκτωμα τοποθετείται σε λάμπα υπεριώδους και φωτογραφίζεται (Εικόνα 10.16).



Εικόνα 10.16 Παρατήρηση πηκτώματος αгарόζης σε τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολίας. Μετά την ηλεκτροφόρηση, το πήκτωμα τοποθετείται σε τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολίας. Λόγω της φθορίζουσας χρωστικής που έχει προστεθεί στο πήκτωμα, τα μόρια DNA φθορίζουν και γίνονται ορατά ως πορτοκαλόχρωμες ζώνες. Στη θέση 1 είναι ο ladder, αποτελεί το δείγμα πρότυπων μοριακών βαρών.

Σχετικό οπτικό υλικό στο διαδίκτυο

1. Εικονική αναπαράσταση πρωτοκόλλου PCR

<https://www.youtube.com/watch?v=QYpX94prb0A>

<https://www.youtube.com/watch?v=y3egwMexSTI>

2. Εικονική αναπαράσταση ηλεκτροφόρησης DNA

<https://www.cleaverscientific.com/applications/agarose-gel-electrophoresis-of-dna/>

<https://www.youtube.com/watch?v=TIZRGt3YAug>

3. Απομόνωση DNA

<https://www.youtube.com/watch?v=gmNw6CWtN5k>

https://www.youtube.com/watch?v=araeHtN_3Lk

<https://www.youtube.com/watch?v=fQo4bqV29Gs>

Πηγές φωτογραφιών με προέλευση το διαδίκτυο

Εικόνα 10.1

<https://www.cs.mcgill.ca/~rwest/wikispeedia/wpcd/images/236/23621.gif>

Εικόνα 10.2

http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/e/e4/DNA_chemical_structure.svg/300px-DNA_chemical_structure.svg.png?w=640

Εικόνα 10.3

https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/3/37/Difference_DNA_RNA-EN.svg/1371px-Difference_DNA_RNA-EN.svg.png

Εικόνα 10.4

https://en.wikipedia.org/wiki/File:A-DNA,_B-DNA_and_Z-DNA.png

Εικόνα 10.5

<https://en.wikipedia.org/wiki/File:DNA-ligand-by-Abalone.png>

Εικόνα 10.6

https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/7/70/DNA_replication_split.svg

Εικόνα 10.7

https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/a/a2/DNA_transcription.png

Εικόνα 10.8

https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/6/6f/DNA_polymerase.svg/600px-DNA_polymerase.svg.png

Εικόνα 10.12

https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/a/ab/Polymerase_chain_reaction-en.svg/1024px-Polymerase_chain_reaction-en.svg.png

Εικόνα 10.13

[https://encrypted-](https://encrypted-tbn0.gstatic.com/images?q=tbn:ANd9GcQpHO5JIDFMxi_fw6uqWjW24kIcix3WIGj2TpI_MbUJpZ8m7usE78AbkFkGxdcOsyxq8a4&usqp=CAU)

[tbn0.gstatic.com/images?q=tbn:ANd9GcQpHO5JIDFMxi_fw6uqWjW24kIcix3WIGj2TpI_MbUJpZ8m7usE78AbkFkGxdcOsyxq8a4&usqp=CAU](https://encrypted-tbn0.gstatic.com/images?q=tbn:ANd9GcQpHO5JIDFMxi_fw6uqWjW24kIcix3WIGj2TpI_MbUJpZ8m7usE78AbkFkGxdcOsyxq8a4&usqp=CAU)

Εικόνα 10.16

https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Gel_electrophoresis_2.jpg

Βιβλιογραφικές Αναφορές

- Campbell, N., & Reece, J. (2010). *Βιολογία*. Ηράκλειο: Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης.
- Cooper, G., & Hausman, R. (2011). *Το κύτταρο- μία μοριακή προσέγγιση*. Αλεξανδρούπολη: Ακαδημαϊκές εκδόσεις Μπάσδρα.
- Jamil, K., Jayaraman, A., Ahmad, J., Joshi, S., & Kumar-Yerra, S. (2017). TNF-alpha 308G/A and 238G/A polymorphisms and its protein network associated with type 2 diabetes mellitus. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 24, 1195–1203.
- Nelson, D., & Cox, M. (2018). *Lehningers Βασικές αρχές Βιοχημείας*. Αθήνα: Broken.
- Suriyaprom, K., Tungtrongchitr, R., & Thawnasom, K. (2014). Measurement of the levels of leptin, BDNF associated with polymorphisms LEP G2548A, LEPR Gln223Arg and BDNF Val66Met in Thai with metabolic syndrome. *Diabetology & Metabolic Syndrome*, 6,6.
- Tymoczko, J., Berg, J., & Stryer, L. (2018). *Βιοχημεία Βασικές αρχές*. Broken.
- Δημόπουλος, Κ., & Αντωνοπούλου, Σ. (2020). *Βασική Βιοχημεία*. Νέον.
- Κατσώρης, Π., & Τσάκας, Σ. (2020). *Εργαστηριακές Ασκήσεις Μοριακής Βιολογίας*. Πάτρα: Πανεπιστήμιο Πατρών. Ανακτήθηκε, 19 Απριλίου 2022, από <https://eclass.upatras.gr/modules/document/file.php/BIO303/%CE%91%CF%83%CE%BA%CE%AE%CF%83%CE%B5%CE%B9%CF%82%20%CE%9C%CE%92%20%202020.pdf>
- Κουσίσης, Σ., Χούχουλα, Δ., & Αντωνόπουλος, Δ. (2020). *Εργαστηριακή Βιοχημεία*. Αθήνα: Τσότρας.
- Χούχουλα, Δ., & Χαρβάλου, Α. (2020). *Εισαγωγή στις αρχές της Μοριακής Βιολογίας και Διαγνωστική πρακτική*. Αθήνα: Τσότρας.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 11

Η ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ

Συγγραφέας: Πέτρος Καρκαλούσος

Σύνοψη

Η ηλεκτροφόρηση αποτελεί μία ηλεκτροχημική μέθοδο διαχωρισμού μακρομορίων με βάση το μοριακό τους βάρος και το φορτίο τους. Έχει πολύ μεγάλη εφαρμογή στα κλινικά βιοχημικά εργαστήρια, όπου με την πιο αυτοματοποιημένη μορφή της, την τριχοειδική ηλεκτροφόρηση, αποτελεί μέθοδο ρουτίνας σε πολλά διαγνωστικά πρωτόκολλα. Σύμφωνα με την μέθοδο αυτήν, τα μακρομόρια μεταναστεύουν προς έναν θετικό ή αρνητικό πόλο ενός ηλεκτρικού πεδίου ανάλογα με το ηλεκτρικό τους φορτίο. Η ταχύτητα αυτής της μετανάστευσης εξαρτάται από το μοριακό τους βάρος. Προφανώς το υλικό μέσα στο οποίο γίνεται αυτή η μετανάστευση και πού εφαρμόζεται το ηλεκτρικό φορτίο παίζει μεγάλο ρόλο στη δυνατότητα εφαρμογής της μεθόδου. Τέτοια υλικά υπάρχουν αρκετά και επιλέγονται ανάλογα με τη δομή των μακρομορίων που θέλουμε να διαχωρίσουμε. Στο παρόν κεφάλαιο θα ασχοληθούμε, κυρίως, με την κλασική ηλεκτροφόρηση και δευτερευόντως με την τριχοειδική ηλεκτροφόρηση.

Προαπαιτούμενη γνώση

Απαιτούνται βασικές γνώσεις φυσικοχημείας.

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

11.1 Οι βασικές αρχές της ηλεκτροφόρησης

Η ηλεκτροφόρηση είναι το φαινόμενο κατά το οποίο μετακινούνται χημικές ενώσεις προς μία κατεύθυνση με την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου. Είναι μια πολύ κοινή μέθοδος διαχωρισμού βιολογικών μακρομορίων τα οποία μπορούν να διαφέρουν μεταξύ τους ως προς το μοριακό τους βάρος και το ηλεκτρικό τους φορτίο. Τέτοια μόρια είναι τα νουκλεϊνικά οξέα DNA, RNA και οι πρωτεΐνες. Τα μακρομόρια που διερευνώνται βρίσκονται κατά κύριο λόγο σε βιολογικά υγρά, όπως ούρα, ορό, ολικό αίμα (ηλεκτροφόρηση αιμοσφαιρίνης), εγκεφαλονωτιαίο υγρό.

11.2 Η ηλεκτροφόρηση γέλης

Ως ηλεκτροφόρηση γέλης χαρακτηρίζουμε κάθε ηλεκτροφόρηση που γίνεται μέσω ενός υλικού που επιτρέπει τη μετανάστευση των μορίων μέσω της επίδρασης αποκλειστικά του ηλεκτρικού φορτίου σε αυτά. Γνωρίζουμε ότι τα μακρομόρια ενδέχεται να διαφέρουν μεταξύ τους ως προς τις φυσικοχημικές τους ιδιότητες και συγκεκριμένα ως προς το μοριακό βάρος και το ηλεκτρικό φορτίο. Η ηλεκτροφόρηση γέλης μπορεί να διαχωρίσει τα μακρομόρια είτε με βάση το μοριακό βάρος και το ηλεκτρικό φορτίο μαζί (δισδιάστατη ηλεκτροφόρηση) είτε με βάση μόνο το μοριακό βάρος.

Η ηλεκτροφορητική κινητικότητα των φορτισμένων μορίων εξαρτάται κυρίως από:

- Το καθαρό φορτίο: αρνητικά φορτισμένα μόρια (ανιόντα) μετακινούνται προς την άνοδο (+), ενώ θετικά φορτισμένα μόρια (κατιόντα) μετακινούνται προς την κάθοδο (-). Τα μόρια που φέρουν υψηλό σθένος μετακινούνται γρηγορότερα προς το ηλεκτρόδιο με το αντίθετο φορτίο από μόρια με μικρότερο σθένος.

- Το μέγεθος: η αντίσταση (λόγω της τριβής) που υφίστανται τα μόρια που κινούνται μέσα σε ένα διάλυμα ή μία πηκτή έχει ως συνέπεια τα μικρά μόρια να κινούνται γρηγορότερα από τα μεγάλα.
- Το σχήμα: η τριβή επηρεάζεται από το σχήμα του μορίου, με αποτέλεσμα η κινητικότητα να είναι διαφορετική ανάμεσα σε σφαιρικές και ινώδεις πρωτεΐνες ή ανάμεσα σε γραμμικό και κυκλικό DNA.
- Την ένταση του ηλεκτρικού πεδίου: όσο αυξάνεται η τάση του πεδίου τόσο αυξάνεται και η κινητικότητα. Όμως, υπάρχουν κάποιοι περιορισμοί στη χρήση υψηλής τάσης, έτσι ώστε να μην αναπτυχθούν θερμικά φαινόμενα.

Στην ηλεκτροφόρηση γέλης που πραγματοποιείται στα ιατρικά βιοχημικά εργαστήρια ο διαχωρισμός των μακρομορίων, π.χ. πρωτεϊνών γίνεται αποκλειστικά με βάση το μοριακό βάρος, αφού όλες οι πρωτεΐνες έχουν προηγουμένως φορτιστεί αρνητικά, έτσι ώστε να κινηθούν όλες προς μία κατεύθυνση. Η κατεύθυνση αυτή ονομάζεται *άνοδος* και αντιστοιχεί στον θετικό πόλο του ηλεκτρικού πεδίου μέσα στον οποίο κινούνται οι πρωτεΐνες.

Το υλικό γέλης μέσα στο οποίο μεταναστεύουν τα μακρομόρια με την επίδραση του ηλεκτρικού φορτίου ονομάζεται *μήτρα* (matrix). Η χημική σύσταση της μήτρας επιτρέπει την κίνηση των μορίων μέσω της δομής της. Από χημικής απόψεως, η μήτρα αποτελείται από ένα πολυμερές υλικό (Πίνακας 11.1) του οποίου η χημική του σύσταση, αλλά και η συγκέντρωση επηρεάζει σημαντικά τη δυνατότητα μετανάστευσης των βιομορίων μέσω αυτής. Όσο πιο αραιή είναι η σύσταση της μήτρας, όσο γρηγορότερα μεταναστεύουν μέσω αυτής τα ηλεκτροφορούμενα μόρια.

Πίνακας 11.1 Υλικά σύστασης της μήτρας.

Agarose	Αγαρόζη	Πρωτεΐνες
Polyacrylamide	Πολυακρυλαμίδιο	Νουκλεϊνικά οξέα
Cellulose Acetate	Οξική κυτταρίνη	Αιμοσφαιρίνη
Porous polyvinylidene difluoride (PVDF)	Πορώδη διφθοριούχο πολυβινυλιδένιο	

11.2.1 Αρχή της μεθόδου

Γνωρίζουμε ότι κάθε πρωτεΐνη έχει χαρακτηριστικό φορτίο που εξαρτάται από το είδος και τον αριθμό των αμινοξέων της, αφού κάθε αμινοξύ σε συγκεκριμένο pH μπορεί να φορτιστεί θετικά, αρνητικά ή να μην έχει φορτίο (δηλαδή να είναι ουδέτερο), ενώ ανάλογα με τον αριθμό των ελεύθερων καρβοξυλομάδων και αμινομάδων που φέρει, το φορτίο ποικίλλει. Επιπλέον, κάθε πρωτεΐνη έχει χαρακτηριστικό μοριακό βάρος. Κατά συνέπεια, όταν φορτισμένες πρωτεΐνες βρεθούν μέσα σε ηλεκτρικό πεδίο θα κινηθούν προς την άνοδο (θετικός πόλος) ή την κάθοδο (αρνητικός πόλος) με μεγαλύτερη ή μικρότερη ταχύτητα και η μετακίνησή τους θα είναι ανάλογη με το φορτίο και το μέγεθός τους.

Όταν ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών γίνεται και ως προς το μοριακό τους βάρος και ως προς το φορτίο τους, η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται σε δύο διαδοχικά στάδια και λέγεται *δισδιάστατη* (two-dimensional ή 2-D) ηλεκτροφόρηση. Συνήθως, όμως, η ηλεκτροφόρηση είναι μιας **διάστασης**, δηλαδή η μετακίνηση των πρωτεϊνών εξαρτάται μόνο από το μοριακό τους βάρος. Για να επιτευχθεί αυτό, πριν την ηλεκτροφόρηση οι πρωτεΐνες του δείγματος φορτίζονται μετά από κατάλληλη επεξεργασία με το ίδιο φορτίο (Εικόνα 11.1).

Η ικανότητα μιας πρωτεΐνης ή οποιουδήποτε άλλου μορίου να κινείται μέσα σε ηλεκτρικό πεδίο εξαρτάται από την ταχύτητα (v) μετακίνησής του και την ηλεκτροφορητική του ικανότητα (μ), που υπολογίζονται από τους τύπους:

$$u = E Q / f$$

όπου,

E = η ένταση του ηλεκτρικού πεδίου,

Q = το καθαρό φορτίο του μορίου,

f = ο συντελεστής τριβής του μορίου (πού εξαρτάται από τη μάζα και το σχήμα του μορίου) και

$$\mu = Q/6\pi r\eta$$

όπου,

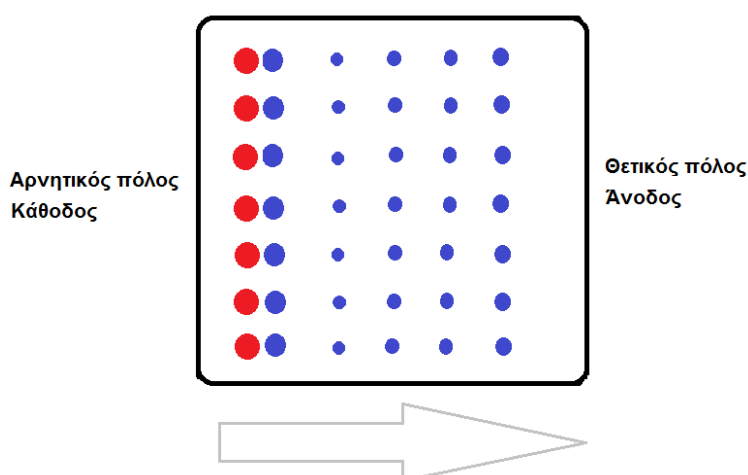
Q = το καθαρό φορτίο του μορίου,

k = συντελεστής,

r = μέγεθος (διάμετρος) του μορίου,

η = η γλοιότητα του ηλεκτροφορητικού μέσου.

Η κίνηση των πρωτεϊνών ενός δείγματος μέσα σε ηλεκτρικό πεδίο εξασφαλίζεται με την τοποθέτηση μικρής ποσότητας δείγματος μέσα σε μικρή οπή ενός λεπτού **πηκτώματος (gel) αγαρόζης**. Οι μεμβράνες αυτές εξασφαλίζουν αφενός τη σταθερότητα της μοριακής δομής των πρωτεϊνών και αφετέρου τη διάβαση του ηλεκτρικού ρεύματος διαμέσου τους. Η μεμβράνη με τα δείγματα τοποθετείται μέσα σε **συσκευή ηλεκτροφόρησης**, στα άκρα της οποίας εφαρμόζεται ηλεκτρικό ρεύμα για συγκεκριμένο χρονικό διάστημα (**Εικόνα 11.1**).



Εικόνα 11.1 Απεικόνιση της κίνησης των πρωτεϊνών σε ηλεκτρικό πεδίο. Όλες οι πρωτεΐνες (μπλε κηλίδες) έχουν αρνητικό φορτίο. Η μεγαλύτερου μοριακού βάρους, η λευκωματίνη, παραμένει κοντά στην αρχική θέση τοποθέτησης των δειγμάτων (κόκκινες κηλίδες), ενώ τα κλάσματα που απομακρύνονται από την κάθοδο είναι, κατά σειρά, οι α1-, α2-, β- και γ-σφαιρίνες.

11.3 Η ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών

Η ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών βιολογικών ή άλλων δειγμάτων μπορεί να γίνει με μεθοδολογίες κλασικής ηλεκτροφόρησης ή με την αυτοματοποιημένη τριχοειδική ηλεκτροφόρηση.

Κατά την ηλεκτροφόρηση ορού ή πλάσματος, το **πρώτο** και μεγαλύτερο κλάσμα που ανιχνεύεται είναι η **λευκωματίνη** (ή αλλιώς αλβουμίνη). Η λευκωματίνη έχει σημαντικότερες βιολογικές δράσεις, όπως είναι η δέσμευση και η μεταφορά διάφορων ουσιών στον ορό, η διατήρηση της κολλοειδωσμοτικής πίεσης στον ενδαγγειακό χώρο και η αύξηση της ρυθμιστικής χωρητικότητας του ορού.

Το **δεύτερο** κλάσμα είναι οι **α1-σφαιρίνες**. Αποτελείται από την α1-αντιθρυψίνη που δεσμεύει και αδρανοποιεί τα πρωτεολυτικά ένζυμα θρυψίνη, χυμοθρυψίνη, ελαστάση κ.ά., που απελευθερώνονται από τα λευκοκύτταρα.

Το **τρίτο** κλάσμα είναι το **α2-σφαιρίνες**. Αποτελείται από τις πρωτεΐνες α2-μακροσφαιρίνη, απτοσφαιρίνη, α2-λιποπρωτεΐνες και σερουλοπλασμίνη. Η α2-μακροσφαιρίνη είναι αναστολέας της θρυψίνης. Η απτοσφαιρίνη μεταφέρει την αιμοσφαιρίνη κατά την ενδαγγειακή αιμόλυση. Η σερουλοπλασμίνη μεταφέρει μόρια χαλκού και δρα ρυθμιστικά στην πρόσληψη των μορίων σιδήρου από την τρανσφερίνη.

Το **τέταρτο** κλάσμα είναι οι **β-σφαιρίνες**. Περιλαμβάνει τη β-λιποπρωτεΐνη, την τρανσφερίνη, την αιμοπηξίνη, τις πρωτεΐνες του συστήματος του συμπληρώματος, τον αναστολέα της C1 εστεράσης, το ινωδογόνο, καθώς και μερικές ανοσοσφαιρίνες. Χρησιμοποιώντας ευαίσθητες μεθόδους υπολογισμού της συγκέντρωσης των κλασμάτων (π.χ. πυκνόμετρα ακριβείας) μπορεί να διακριθούν δύο κλάσματα β-σφαιρινών, τα **β1 και β2** τα οποία αντιστοιχούν σε δύο γειτονικές κορυφές του κλάσματος β. Το κλάσμα των β1-σφαιρινών περιέχει, κυρίως, τρανσφερίνη και το κλάσμα των β2-σφαιρινών περιέχει, κυρίως, τις λιποπρωτεΐνες.

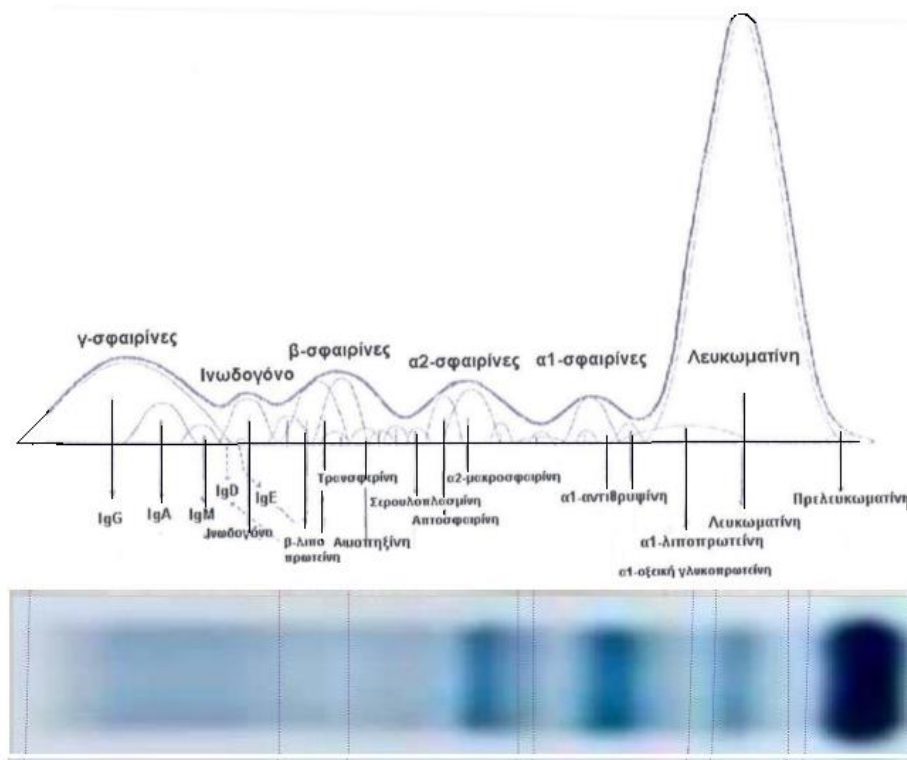
Το **πέμπτο** κλάσμα είναι οι **γ-σφαιρίνες ή ανοσοσφαιρίνες**. Το κλάσμα αυτό περιέχει, κυρίως, τις ανοσοσφαιρίνες τάξης G (IgG), γιατί οι ανοσοσφαιρίνες των άλλων τάξεων και τα επιμέρους τμήματά τους μπορεί να μετακινηθούν στην περιοχή των β- και α2-σφαιρινών. Για παράδειγμα, οι IgA, IgM, IgD και IgE συνήθως εντοπίζονται στην περιοχή των β- ή μεταξύ των β- και γ-σφαιρινών, οι ελεύθερες ελαφριές αλυσίδες στην περιοχή των α2-σφαιρινών και, τέλος, οι βαριές αλυσίδες στην περιοχή μεταξύ των β- και γ-σφαιρινών (**Εικόνες 11.2,11.3,11.4,11.5,11.6**). Στους Πίνακες 11.2 και 11.3 παρουσιάζονται οι σημαντικότερες κλινικές ενδείξεις και οι παθήσεις που συνδέονται με παθολογικές μεταβολές των πρωτεϊνών.

Πίνακας 11.2 Οι σημαντικότερες κλινικές ενδείξεις για την ηλεκτροφόρηση λευκομάτων.

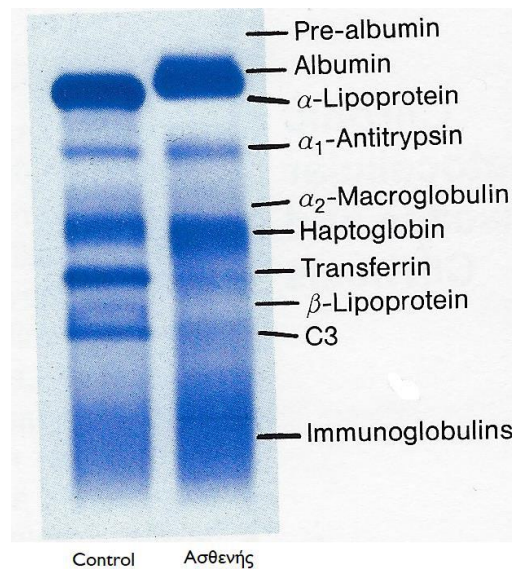
Πολλαπλούν μυέλωμα, μακροσφαιριναιμία Waldenström, πρωτογενής αμυλοείδωση ή σχετικές ανωμαλίες
Ανεξήγητη περιφερειακή νευροπάθεια (μη οφειλόμενη σε μακροχρόνιο διαβήτη, έκθεση σε τοξικούς παράγοντες, χημειοθεραπεία κ.ά.)
Αναιμία σχετιζόμενη με νεφρική ανεπάρκεια και πόνους στα οστά
Πόνους μέσης που πιθανότατα οφείλονται σε πολλαπλούν μυέλωμα
Υπερασβεσταιμία που οφείλεται σε πιθανή κακοήθεια (συνδεδεμένη με απώλεια βάρους, πείνα, πόνο οστών, ανώμαλη αιμορραγία)
Σχηματισμοί Rouleaux σε επίχρισμα περιφερικού αίματος
Νεφρική ανεπάρκεια με συνδυασμό με πρωτεϊναιμία
Ανεξήγητα παθολογικά κατάγματα ή λυτικές αλλοιώσεις που ταυτοποιούνται με ακτινογραφία
Πρωτεϊνουρία Bence Jones

Πίνακας 11.3 Παθήσεις που συνδέονται με παθολογικές μεταβολές των πρωτεϊνών.

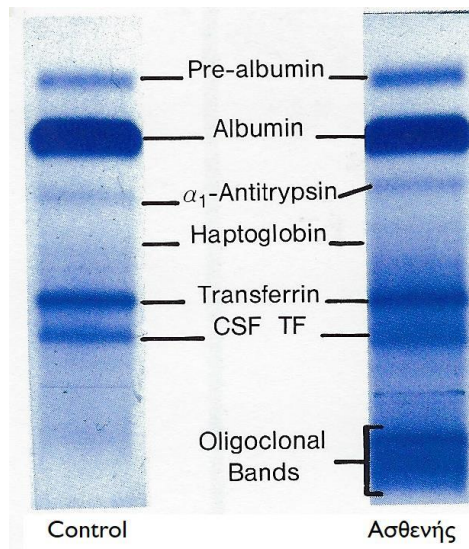
Αυξημένη αλβουμίνη	Αυξημένες σφαιρίνες β1 ή β2
Αφυδάτωση	Χολική κίρρωση
Μειωμένη αλβουμίνη	Καρκίνωμα
Χρόνια καχεξία	Σύνδρομο Cushing
Εξασθηματικές νόσοι	Σακχαρώδης διαβήτης
Χρόνιες λοιμώξεις	Υποθυρεοειδισμός
Αιμορραγία	Σιδηροπενική αναιμία
Εντεροπάθειες με απώλεια πρωτεϊνών	Κακοήθης υπέρταση
Διαταραγμένη ηπατική λειτουργία από μειωμένη σύνθεση λευκωματίνης	Νεφροπολυαρτηρίτιδα
Κακή διατροφή	Αποφρακτικός ίκτερος
Νεφρωσικό σύνδρομο	Εγκυμοσύνη τρίτου τριμήνου
Εγκυμοσύνη	Μειωμένες σφαιρίνες β1 ή β2
Μειωμένες σφαιρίνες α1	Πρωτεϊνικός υποσιτισμός
Ανεπάρκεια α1 αντιθρυψίνης	Αυξημένες ανοσοσφαιρίνες
Αυξημένες σφαιρίνες α1	Αμυλοείδωση
Επινεφριδιακή ανεπάρκεια	Χρόνιες λοιμώξεις (κοκκιωματώδεις νόσοι)
Θεραπεία με αδρενοκορτικοστεροειδή	Χρόνια λεμφοκυτταρική αναιμία
Προχωρημένος σακχαρώδης διαβήτης	Κίρρωση
Νεφρωσικό σύνδρομο	Νόσος Hodgkin
Μειωμένες σφαιρίνες α1	Κακοήθης λέμφωμα
Υποσιτισμός	Πολλαπλό μυέλωμα
Μεγαλοβλαστική αναιμία	Ανωμαλίες συνδετικού ιστού
Απώλεια πρωτεϊνών από εντεροπάθειες	Μακροσφαιριναιμία Waldenström's
Σοβαρή ηπατική νόσος	Μειωμένες σφαιρίνες γ
Νόσος Wilson	Αγαμιασφαιριναιμία
	Υπογαμμασφαιριναιμία



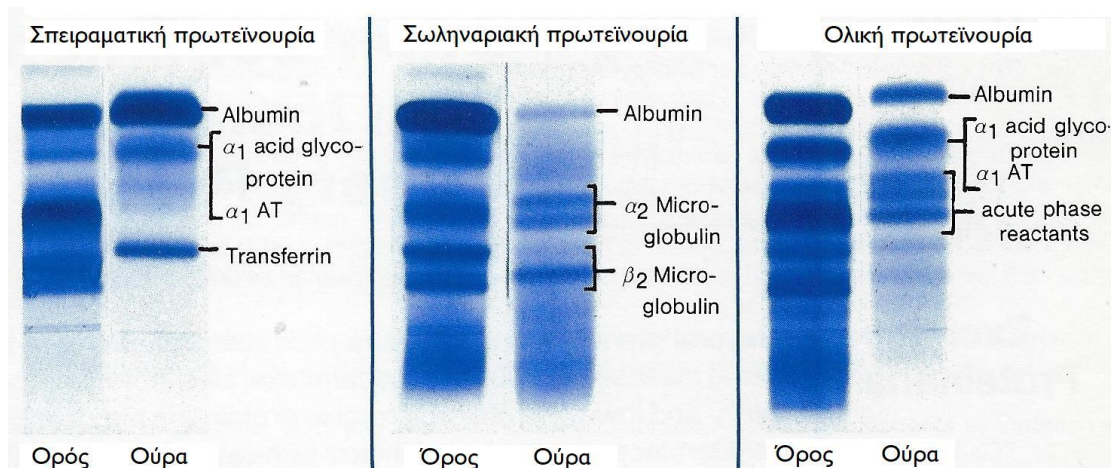
Εικόνα 11.2 Διάκριση των πρωτεϊνών κλασμάτων μετά από ηλεκτροφόρηση ανθρώπινου ορού. Κάτω παρουσιάζεται η μεμβράνη ηλεκτροφόρησης, όπου τα πρωτεϊνικά κλάσματα διακρίνονται ως μπλε ζώνες. Επάνω παρουσιάζεται η καμπύλη ποσοτικοποίησης (πυκνομέτρησης) της μεμβράνης, όπου προσδιορίζεται η θέση του κάθε κλάσματος και αναγράφονται οι πρωτεΐνες που εστιάζονται σε αυτό.



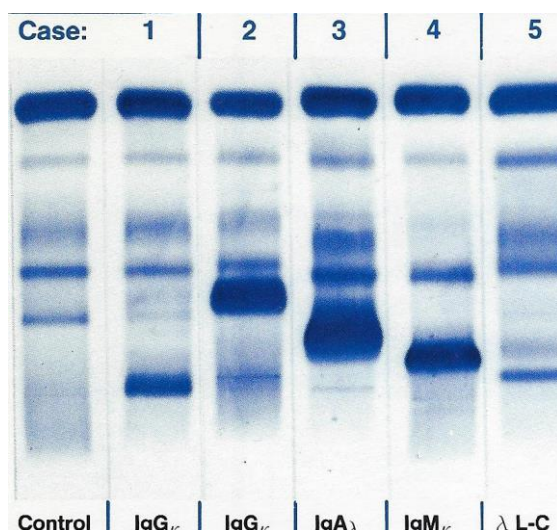
Εικόνα 11.3 Στη φωτογραφία συγκρίνεται μία ηλεκτροφόρηση με φυσιολογικές ζώνες και μία ηλεκτροφόρηση δείγματος ορού από ασθενή με κίρρωση (Killingsworth, L. 1985).



Εικόνα 11.4 Στη φωτογραφία συγκρίνεται μία ηλεκτροφόρηση με φυσιολογικές ζώνες και μία ηλεκτροφόρηση δείγματος εγκεφαλονωτιαίου υγρού. Τα δείγματα εγκεφαλονωτιαίου υγρού περιέχουν πολύ λιγότερη ολική πρωτεΐνη από τον ορό και για αυτό πριν την ηλεκτροφόρηση επιβάλλεται συμπύκνωση (βλ. παρακάτω). Οι πρωτεΐνες στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό είναι παρόμοιες με αυτές του πλάσματος αλλά με διαφορετικές συγκεντρώσεις (Killilngsworth, L. 1985).



Εικόνα 11.5 Στα ούρα κανονικά δεν υπάρχουν πρωτεΐνες, οπότε δεν έχει νόημα και η ηλεκτροφόρηση σε αυτά, εκτός και εάν υπάρχει νεφρική νόσος. Στην Εικόνα φαίνονται ηλεκτροφορήματα σε ορό και ούρα, όταν υπάρχει νεφρική νόσος, όπου η βλάβη των νεφρών μπορεί να είναι σπειραματική, σωληναριακή ή ολική (Killilngsworth, L. 1985).



Εικόνα 11.6 Στη φωτογραφία φαίνονται 5 διαφορετικά ηλεκτροφορήματα τα οποία υποδεικνύουν ότι υπάρχει αύξηση των ανοσοσφαιρινών IgG, IgA, IgM και συγκεκριμένα των ελαφριών και βαριών του πολυπεπτιδικών αλυσίδων. Οι πυκνές ζώνες ηλεκτροφόρησης δείχνουν την αυξημένη συγκέντρωση των ανοσοσφαιρινών. Η ανοσοκαθήλωση είναι συνδυασμός ηλεκτροφόρησης και ανοσοαντίδρασης των δεσμευμένων ανοσοσφαιρινών με αντι-IgG, αντι-IgA και αντι-IgM (Killilngsworth, L. 1985).

11.4 Η τριχοειδική ηλεκτροφόρηση

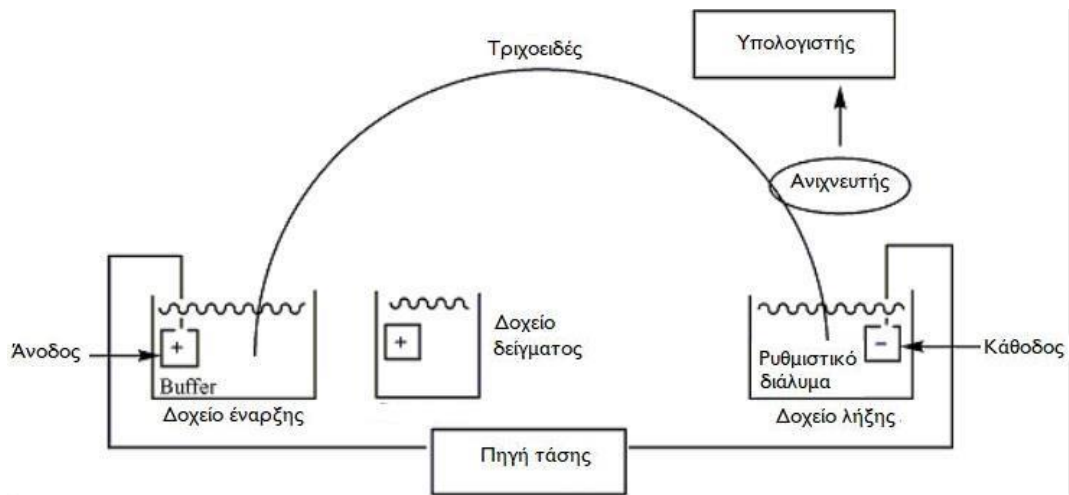
Η τριχοειδική ηλεκτροφόρηση είναι μία αναλυτική τεχνική που διαχωρίζει τα ιόντα με βάση την ηλεκτροφορητική τους κινητικότητα με τη χρήση εφαρμοζόμενης τάσης. Η ηλεκτροφορητική κινητικότητα εξαρτάται από το φορτίο του μορίου, την πυκνότητα και την ακτίνα του ατόμου. Ο ρυθμός με τον οποίο κινείται το σωματίδιο είναι άμεσα ανάλογος προς το εφαρμοζόμενο ηλεκτρικό πεδίο: όσο μεγαλύτερη είναι η ισχύς του πεδίου τόσο πιο γρήγορη είναι η κινητικότητα.

Η εφαρμογή υψηλών τάσεων οδηγεί σε γρήγορη ανάλυση, καθώς η μετακίνηση των μορίων είναι αντιστρόφως ανάλογη με την τάση. Δεδομένου ότι η απόδοση διαχωρισμού είναι αντιστρόφως ανάλογη με τον συντελεστή διάχυσης της διαλυμένης ουσίας, τα μεγάλα βιομόρια θα έχουν μικρούς συντελεστές διάχυσης και θα διαχωρίζονται σε ικανοποιητικό βαθμό.

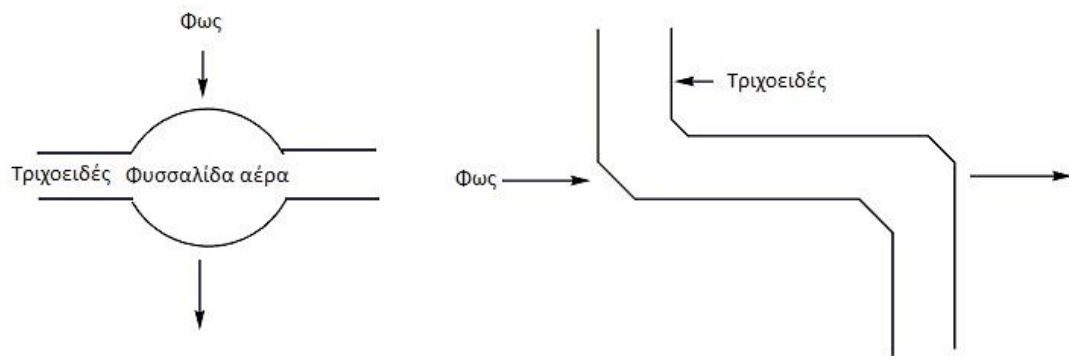
Στην Εικόνα 11.7 παρουσιάζεται η συσκευή τριχοειδικής ηλεκτροφόρησης, ενώ στις Εικόνες 11.8, 11.9, 11.10 και 11.11 αναπαρίσταται η αρχή μεθόδου της.



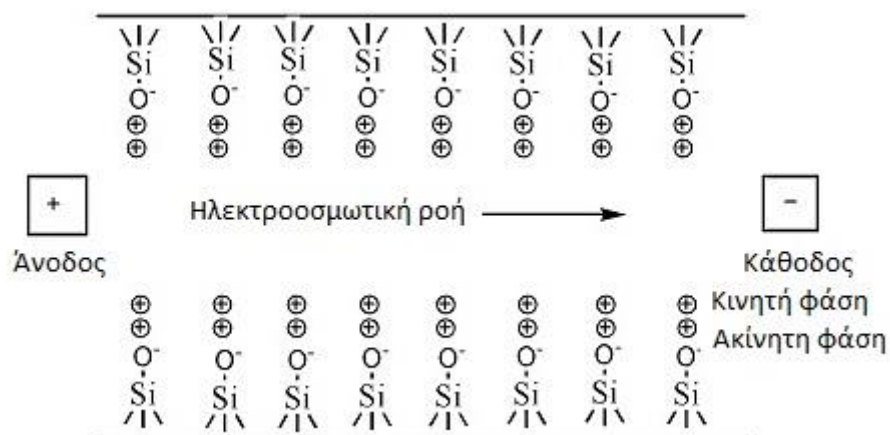
Εικόνα 11.7 Συσκευή τριχοειδικής ηλεκτροφόρησης. Η τριχοειδική ηλεκτροφόρηση είναι πλέον μία 100% αυτοματοποιημένη μέθοδος. Αριστερά φαίνεται ένας αναλυτής τριχοειδικής ηλεκτροφόρησης λευκομάτων και δεξιά ένας αλληλουχητής DNA που χρησιμοποιεί επίσης την τεχνολογία της τριχοειδικής ηλεκτροφόρησης.



Εικόνα 11.8 Αναπαράσταση της αρχής μεθόδου της τριχοειδικής ηλεκτροφόρησης.



Εικόνα 11.9 Αναπαράσταση της αρχής μεθόδου της τριχοειδικής ηλεκτροφόρησης.



Εικόνα 11.10 Αναπαράσταση της αρχής μεθόδου της τριχοειδικής ηλεκτροφόρησης.



Εικόνα 11.11 Αναπαράσταση της αρχής μεθόδου της τριχλωειδικής ηλεκτροφόρησης.

11.4.1 Τριχλωειδής ισοηλεκτρική εστίαση (CIEF)

Η CIEF είναι ένας τρόπος διαχωρισμού τριχλωειδικής ηλεκτροφόρησης που παρέχει διαχωρισμό πρωτεϊνών υψηλής ανάλυσης σύμφωνα με το ισοηλεκτρικό τους σημείο (pI) και έχει εφαρμοστεί, κυρίως, για την ανάλυση της ετερογένειας φορτίου των βιοφαρμακευτικών προϊόντων. Στη CIEF ένα μείγμα αμφολυτών και δείγματος γεμίζει το τριχλωειδές. Τοποθετείται υδροξείδιο του νατρίου στην κάθοδο και φωσφορικό οξύ στην άνοδο. Λόγω των ιδιοτήτων των αμφολυτών, στο τριχλωειδές αναπτύσσεται διαβάθμιση pH υπό την επίδραση του ηλεκτρικού πεδίου. Οι πρωτεΐνες εστιάζονται μέχρι την περιοχή, όπου το pH και το pI της πρωτεΐνης είναι ίσο. Σε αυτό το σημείο, το καθαρό φορτίο της πρωτεΐνης είναι μηδέν και η μετανάστευση σταματά. Στο επόμενο βήμα, τα επιμέρους συστατικά μεταφέρονται στον ανιχνευτή με ηλεκτροφορητική ή υδροδυναμική κινητοποίηση.

Όσον αφορά τους τρόπους ανίχνευσης, η ανίχνευση υπεριώδους στα 280nm αντιπροσωπεύει σχεδόν όλες τις εφαρμογές που περιγράφονται μέχρι σήμερα. Για δομικές πληροφορίες, η ανίχνευση MS σε συνδυασμό με το CIEF επιτρέπει την αναγνώριση με βάση την τιμή μάζας/φορτίο (m/z).

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟ ΜΕΡΟΣ

11.5 Ηλεκτροφόρηση λευκωμάτων

11.5.1 Σκοπός της άσκησης - Αρχή της μεθόδου

Θα περιγραφεί μια κλασική μεθοδολογία ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών βασισμένη σε εμπορικά διαθέσιμες δοκιμασίες, όπως οι εταιρείες Beckman Coulter, Sebia. Binding Site. Και στις δύο δοκιμασίες χρησιμοποιούνται πηκτώματα αгарόζης. Τα δείγματα ορού προς ανάλυση τοποθετούνται σε πήκτωμα αгарόζης και μετακινούνται σε ηλεκτρικό πεδίο, αφού πρώτα διαβραχούν με κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα. Το διάλυμα αυτό είναι καλός αγωγός του ηλεκτρισμού και φορτίζει όλες τις πρωτεΐνες αρνητικά. Αφού η ηλεκτροφόρηση ολοκληρωθεί, οι πρωτεΐνες μονιμοποιούνται στο πήκτωμα χρησιμοποιώντας ειδικό μονιμοποιητικό διάλυμα. Οι πρωτεΐνες θα γίνουν ορατές, όταν χρωσθεί η μεμβράνη με ειδική χρώση πρωτεϊνών. Ακολουθεί πυκνομέτρηση της μεμβράνης για την ποιοτική και ποσοτική ερμηνεία του αποτελέσματος.

Πρέπει να τονιστεί εδώ ότι η παρακάτω διαδικασία αφορά μεθόδους με πιστοποίηση Ιατροδιαγνωστικού Προϊόντος (In Vitro Diagnostics) και πρέπει να γίνεται με τον τρόπο που περιγράφεται εδώ. Παρόλα αυτά, η ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών μπορεί να γίνει και σε ένα εργαστήριο βιοχημείας χρησιμοποιώντας βασικά υλικά (π.χ. αгарόζη, ρυθμιστικό διάλυμα) και παρόμοιο εξοπλισμό. Τα αποτελέσματα τέτοιων in house μεθόδων μπορούν να διαχωρίσουν μείγματα πρωτεϊνών και να βοηθήσουν σε ερευνητικές προσπάθειες, δεν μπορούν, όμως, να χρησιμοποιηθούν για διαγνωστικούς σκοπούς.

Η ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών μπορεί να γίνει σε ορό, ούρα και εγκεφαλονωτιαίο υγρό.

11.5.2 Απαιτούμενα υλικά και εξοπλισμός

11.5.2.1 Υλικά που περιέχονται στο kit

- **Έτοιμα πηκτώματα αгарόζης:** περιέχουν 1,0% αгарόζη και 1,2% βαρβιτάλη. Τα πηκτώματα περιέχουν ως συντηρητικό το αζίδιο του νατρίου και άλλα αδρανή συστατικά. Τα συστατικά

αυτά προκαλούν την παραγωγή αναφλέξιμων αερίων μετά την επαφή τους με μεταλλικούς αγωγούς. Γι' αυτό και μετά τη χρήση τους πρέπει να απορρίπτονται με ειδικό και ασφαλή τρόπο.

- **Ρυθμιστικό διάλυμα βαρβιτάλης:** 5,5 διαιθυλοβαρβιτουρικό οξύ 10 mM. Παρέχεται με μορφή σκόνης άλατος. Πριν τη χρήση γίνεται ανασύσταση με απεσταγμένο νερό και το pH του διαλύματος είναι 8,6.
- **Διάλυμα χρωστικής:** 8-αμινο-7-(3-νιτροφαινυλαζο)-2-(φαινυλαζω)-1-ναφθολ-3,6-δισουλφονικό οξύ δινάτριο άλας (Commassie blue) 0,5%. Παρέχεται σε σκόνη και απαιτείται ανασύσταση πριν τη χρήση. Με το διάλυμα αυτό, οι πρωτεϊνικές ζώνες χρωματίζονται μπλε.
- **Πρότυπος οδηγός τοποθέτησης δειγμάτων (template blotters):** πλαστικές διαφάνειες με μικρές οπές που καλύπτουν τη θέση που θα φορτωθούν τα δείγματα. Χρησιμοποιείται ένα για κάθε πήκτωμα αγαρόζης.
- **Gel blotters, στυπόχαρτα:** μικρά διηθητικά χαρτιά στο μέγεθος του πηκτώματος αγαρόζης που χρησιμοποιούνται για την απομάκρυνση της περίσσειας δειγμάτων και διαλυτών.

11.5.2.2 Πρόσθετα αντιδραστήρια που απαιτούνται

- Παγόμορφο οξικό οξύ: χρησιμοποιείται για τη δημιουργία όξινου διαλύματος για τη μονιμοποίηση των πρωτεϊνών στο πήκτωμα.
- Αιθανόλη: αναμειγνύεται με το οξικό οξύ για τη μονιμοποίηση των πρωτεϊνών στο πήκτωμα (οξική αιθανόλη).
- Απιονισμένο νερό: χρησιμοποιείται για τις αραιώσεις των διαλυμάτων.

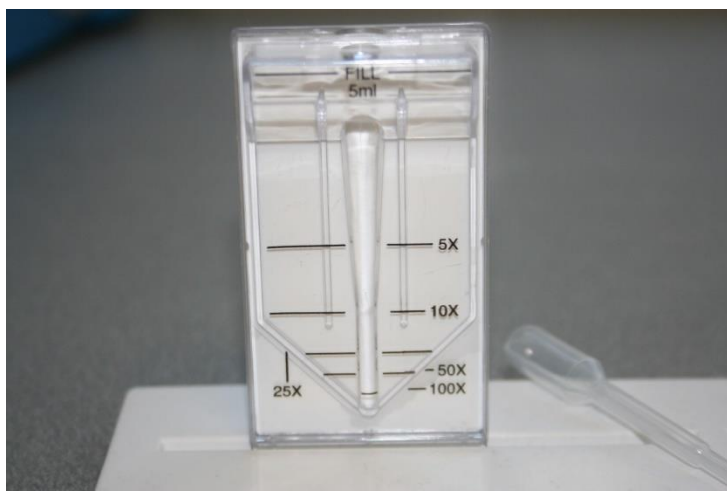
11.5.2.3 Απαιτούμενος εξοπλισμός

- **Φορέας τοποθέτησης δείγματος:** πρόκειται για μια πλαστική συσκευή, όπου ακινητοποιείται η πλάκα αγαρόζης.
- **Συσκευή ηλεκτροφόρησης:** πρόκειται για σύστημα με κοιλότητα που κλείνει αεροστεγώς, έχει ειδικές θέσεις για την τοποθέτηση των μεμβρανών της ηλεκτροφόρησης και στα άκρα του μπορεί να εφαρμοστεί ηλεκτρικό ρεύμα.
- **Τροφοδοτικό:** συσκευή παροχής ρεύματος προς τη συσκευή ηλεκτροφόρησης. Φέρει διακόπτη ρύθμισης του χρόνου και της τάσης του ρεύματος.
- **Στεγνωτήριο:** συσκευή παραγωγής θερμού αέρα για την ξήρανση της μεμβράνης πριν τη σάρωσή της στο πυκνόμετρο.
- **Πυκνόμετρο:** συσκευή σάρωσης των μεμβρανών ηλεκτροφόρησης η οποία μετρά την πυκνότητα κάθε ζώνης πρωτεϊνών, δημιουργώντας διαδοχικές καμπύλες κατανομής. Το εμβαδόν κάθε καμπύλης αντιστοιχεί στην πυκνότητα των πρωτεϊνικών μορίων σε εκείνο το σημείο.
- **Πιπέττες** σταθερού ή ρυθμιζόμενου όγκου με ένα ή πολλαπλά ρύγχη.

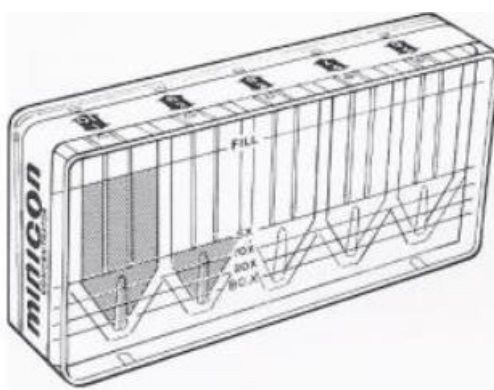
11.5.3 Διαδικασία

11.5.3.1 Προετοιμασία των δειγμάτων

Στην κλασική ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών μπορούν να χρησιμοποιηθούν πολλών ειδών βιολογικά υγρά ή διαλύματα πρωτεϊνών και νουκλεϊνικών οξέων. Όλα τα δείγματα θα πρέπει να αραιωθούν με κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα (εδώ το βαρβιτάλης σε αναλογία 1:4 (v/v)). Το διάλυμα αυτό θα προσδώσει στις πρωτεΐνες αρνητικό φορτίο. Υπάρχουν, όμως, βιολογικά υγρά με μικρή συγκέντρωση πρωτεϊνών, όπως π.χ. τα ούρα (κανονικά δεν έχουν καθόλου πρωτεΐνη ή μόνο ίχνη). Έτσι, στην περίπτωση των ούρων θα πρέπει να μετρηθεί προθύστερα η συνολική πρωτεΐνη έτσι ώστε να εξασφαλιστεί ότι μετά την αραιώση θα παραμείνει ανιχνεύσιμη (συγκεκριμένα η ολική πρωτεΐνη στο δείγμα ούρων θα πρέπει να είναι τουλάχιστον 700 mg/dL). Συνεπώς, ειδικά για τα ούρα, πιθανόν να χρειάζεται να προηγηθεί συμπύκνωση του δείγματος (Εικόνες 11.12, 11.13).



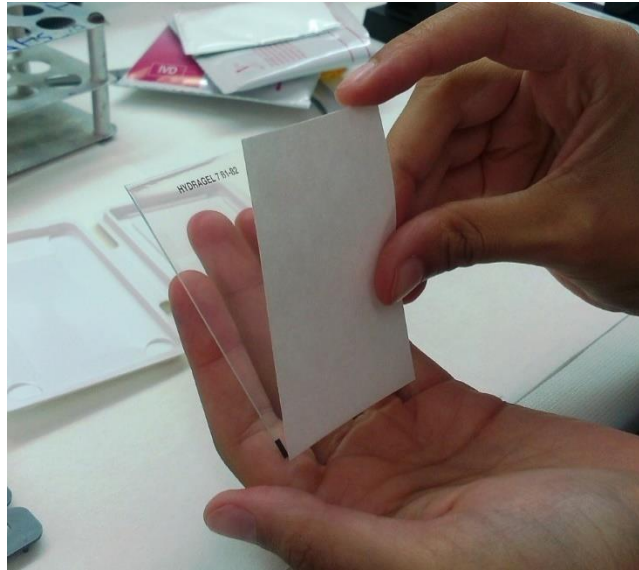
Εικόνα 11.12 Μονή συσκευή συμπύκνωσης βιολογικών υγρών. Χρησιμοποιείται, κυρίως, για τη συμπύκνωση ούρων και εγκεφαλονωτιαίου υγρού σε κλινικά εργαστήρια. Ο κωδικός X συμβολίζει το επίπεδο συμπύκνωσης. Το βιολογικό υγρό, αφού διαβρέξει το διηθητικό χαρτί της συσκευής, το οποίο απορροφά τον διαλύτη, συμπυκνώνεται μέχρι ένα συγκεκριμένο επίπεδο ανάλογα με το ύψος της συσκευής. Στη συνέχεια, με ένα σιφώνιο Pasteur απορροφούμε το υγρό από συγκεκριμένο ύψος που αντιστοιχεί σε συγκεκριμένη συμπύκνωση (5X, 10X, 25X, 50X, 100X).



Εικόνα 11.13 Συσκευή συμπύκνωσης για πολλά δείγματα.

11.5.3.2 Άνοιγμα της συσκευασίας του kit

Τα πηκτώματα αгарόζης βρίσκονται σε πλαστική θήκη βυθισμένα σε ρυθμιστικό διάλυμα, το οποίο διατηρεί την αгарόζη σε ημίρευστη κατάσταση. Μετά το άνοιγμα της συσκευασίας απαιτούνται προσεκτικοί χειρισμοί, για να μην καταστραφεί η αгарόζη. Με ειδικό λεπτό διηθητικό χαρτί (gel blotter ή αλλιώς στυπόχαρτο) απομακρύνεται η περίσσεια του ρυθμιστικού διαλύματος από το πήκτωμα αгарόζης (Εικόνα 11.14).

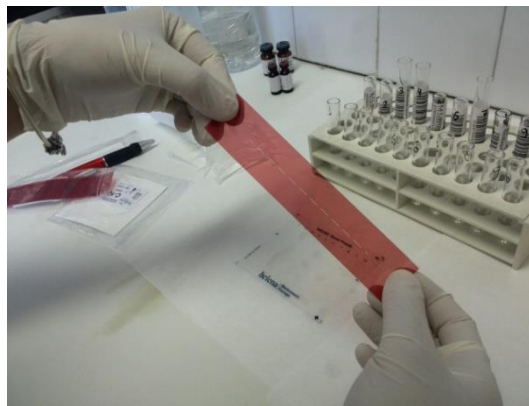


Εικόνα 11.14 Αφαίρεση της περίσσειας του ρυθμιστικού διαλύματος από το πήκτωμα αγαρόζης χρησιμοποιώντας λεπτό στυπόχαρτο (gel blotter).

11.5.3.3 Τοποθέτηση των δειγμάτων στο πήκτωμα αγαρόζης

Η τοποθέτηση των δειγμάτων στο πήκτωμα αγαρόζης μπορεί να γίνει με δύο τρόπους:

- Με τη χρήση ενός πρότυπου οδηγού (template blotter). Πρόκειται για μία πλαστική επιφάνεια η οποία φέρει κατά μήκος τις μικρές οπές μέσα στις οποίες τοποθετούνται τα δείγματα. Η πλαστική αυτή διαφάνεια τοποθετείται προσεκτικά στη θέση που υποδεικνύεται σύμφωνα με τις οδηγίες του kit (Εικόνα 11.15).



Εικόνα 11.15 Τοποθέτηση του πρότυπου οδηγού (template blotter) για τη φόρτωση των δειγμάτων στο πήκτωμα της αγαρόζης.

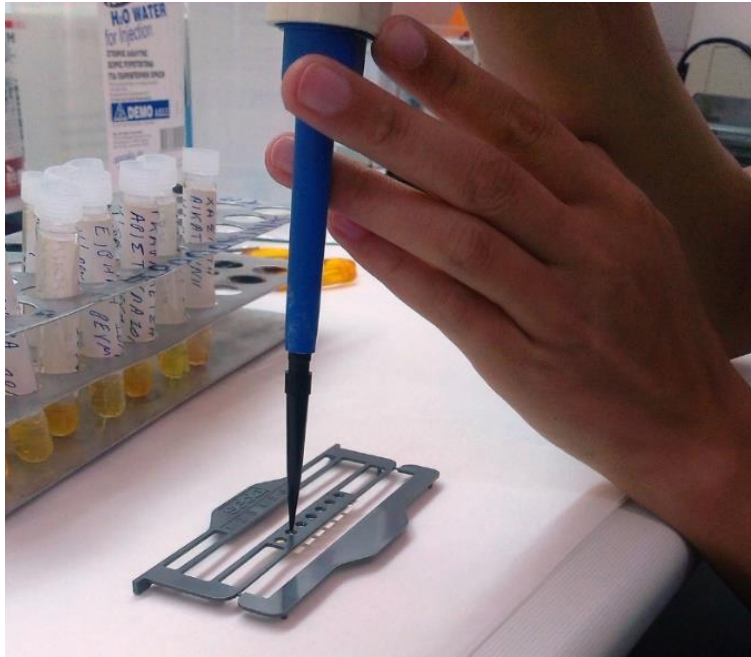
- Με τη χρήση ειδικής συσκευής που ονομάζεται «φορέας» ή applicator (Εικόνα 11.15). Ο φορέας είναι μια πλαστική συσκευή που αφενός ακινητοποιεί το πήκτωμα και αφετέρου επιτρέπει τη φόρτωση των δειγμάτων σε επιλεγμένες θέσεις του πηκτώματος αγαρόζης με τη βοήθεια δεύτερης πλαστικής συσκευής, που ονομάζεται «επιθέτης» (Εικόνες 11.16, 11.17, 11.18, 11.19, 11.20).



Εικόνα 11.16 Τοποθέτηση του πηκτώματος αγαρόζης πάνω στη συσκευή «φορέα».



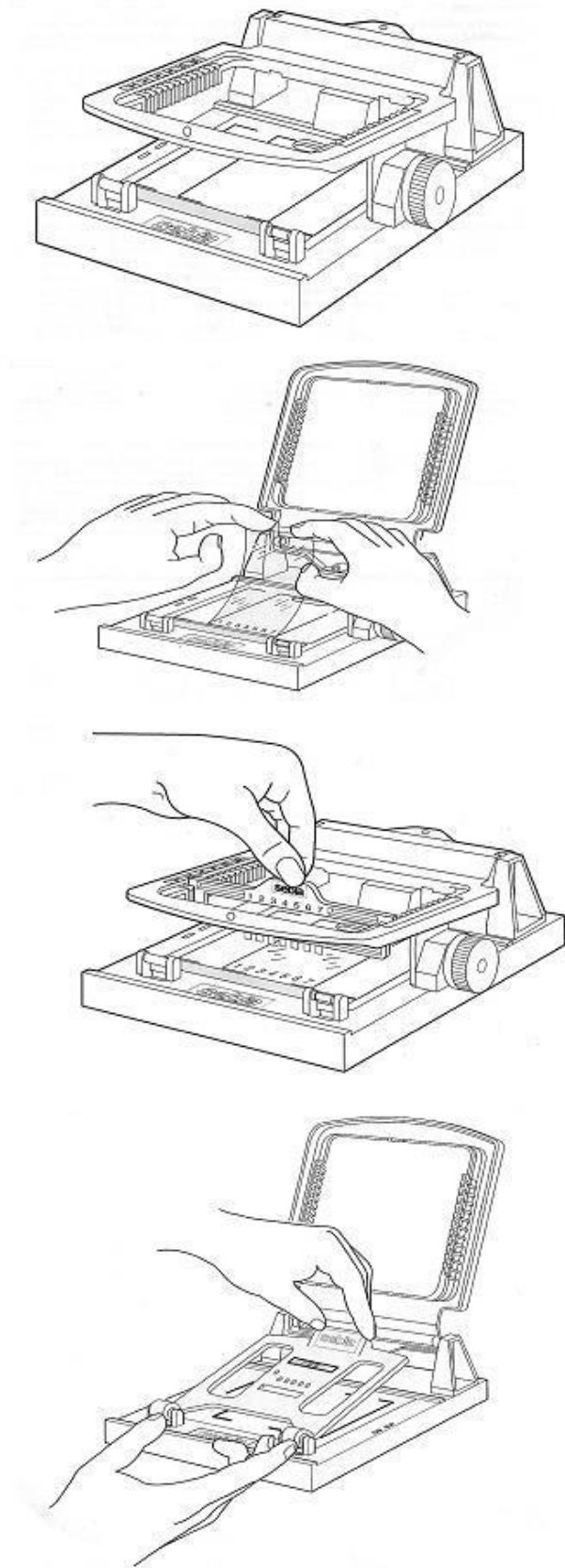
Εικόνα 11.17 Επιθέτης για τη φόρτωση των δειγμάτων στο πήκτωμα αγαρόζης. Κάτω από τις μικρές οπές που βρίσκονται στο κέντρο έχουν τοποθετηθεί μικρά διηθητικά χαρτιά. Τα διαφορετικά δείγματα τοποθετούνται στις οπές και εμποτίζουν τα διηθητικά χαρτιά, ώστε μετά την απόθεση του επιθέτη στο πήκτωμα αγαρόζης, τα δείγματα να περάσουν από τα διηθητικά χαρτιά στο πήκτωμα.



Εικόνα 11.18 Η φόρτωση των δειγμάτων στον επιθέτη.



Εικόνα 11.19 Η τοποθέτηση του επιθέτη μέσα στον φορέα. Στο δάπεδο της συσκευής βρίσκεται τοποθετημένο το πήκτωμα αγαρόζης, στο οποίο διαχέονται σταδιακά τα δείγματα από τις οπές του επιθέτη. Ο φορέας αποτελείται από δύο τυπωμένα πλαίσια με αριθμημένες εγκοπές μέσα στις οποίες τοποθετούνται οι επιθέτες. Δεξιά υπάρχει ένα κομβίο ρύθμισης της θέσης, για να έρχεται σε επαφή ο επιθέτης με το πήκτωμα για την εφαρμογή των δειγμάτων.



Εικόνα 11.20 Αναλυτική αναπαράσταση της χρήσης του φορέα και του επιθέτη από σχετικό εγχειρίδιο της εταιρείας Sebia.

11.5.3.4 Η ανάπτυξη του ηλεκτροφορητικού διαγράμματος (τρέξιμο/μετανάστευση των πρωτεϊνών)

Ως ανάπτυξη ηλεκτροφορητικού διαγράμματος ορίζουμε τη μετακίνηση των πρωτεϊνών σε ηλεκτρικό πεδίο και την εστίασή τους σε συγκεκριμένο σημείο. Για τον λόγο αυτόν, τα πηκτώματα αγαρόζης μεταφέρονται σε συσκευή ηλεκτροφόρησης, στα άκρα της οποίας εφαρμόζεται συγκεκριμένη τάση (π.χ. 100 Volt) για συγκεκριμένο χρονικό διάστημα. Η τάση του ρεύματος παρέχεται από το τροφοδοτικό, που μπορεί να είναι ενσωματωμένο στη συσκευή ηλεκτροφόρησης ή να είναι διαφορετική συσκευή. Η διακριτική ικανότητα (resolution) του ηλεκτροφορητικού διαγράμματος εξαρτάται από:

- Το χρονικό διάστημα που εφαρμόζεται η τάση του ρεύματος στα άκρα της συσκευής ηλεκτροφόρησης και, κατ' επέκταση, και στο πήκτωμα της αγαρόζης. Αυτό το χρονικό διάστημα (συνήθως 10 – 20 λεπτά) πρέπει να είναι επαρκές, ώστε να μετακινηθούν όλες οι πρωτεΐνες διαμέσου του πηκτώματος και να επικαθίσουν σε διαφορετικά σημεία της αγαρόζης ανά ομάδες (που ονομάζονται κλάσματα ή ζώνες) ανάλογα με το μοριακό τους βάρος.
- Την ένταση του ρεύματος (Volt) στα άκρα της συσκευής ηλεκτροφόρησης. Ανάλογα με τη σύσταση του πηκτώματος (π.χ. αγαρόζη, κυτταρίνη), αλλά και το μοριακό βάρος των μακρομορίων που θέλουμε να διαχωρίσουμε, επιλέγεται διαφορετική ένταση ρεύματος.

11.5.3.5 Μονιμοποίηση, χρώση και αποχρωματισμός του πηκτώματος

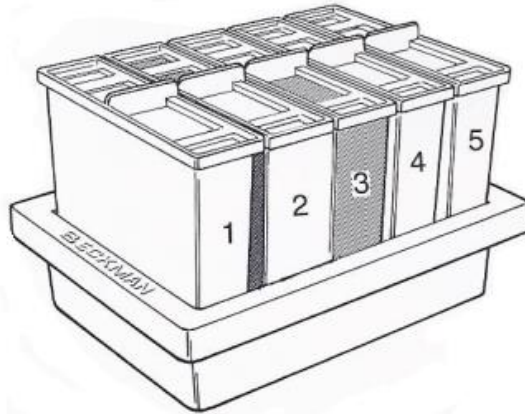
Μετά την απομάκρυνσή τους από το ηλεκτρικό πεδίο, τα πηκτώματα αγαρόζης τοποθετούνται σε ειδικά πλαίσια (Εικ. 11.21 και, στη συνέχεια, εμβαπτίζονται διαδοχικά στα ακόλουθα διαλύματα (Εικόνα 11.22):

- Οξική αλκοόλη. Μονιμοποίηση των πρωτεϊνών.
- Χρωστική. Χρωματισμός των πρωτεϊνών.
- Διάλυμα οξικού οξέος 5%. Αποχρωματισμός.
- Οξική αλκοόλη. Μονιμοποίηση.
- Διάλυμα οξικού οξέος 5%. Αποχρωματισμός.

Αφαιρούμε το πήκτωμα από το τελευταίο διάλυμα και απομακρύνουμε το πλαίσιο. Αφαιρούμε τα σταγονίδια υγρού χρησιμοποιώντας διηθητικό χαρτί (gel blotter) και ξηραίνουμε. Η ξήρανση μπορεί να γίνει είτε σε ειδικό στεγνωτήριο είτε με οποιαδήποτε συσκευή που παράγει θερμό αέρα.



Εικόνα 11.21 Δοχεία με διαλύματα μονιμοποίησης, χρώσης και αποχρωματισμού που χρησιμοποιούνται για την κατεργασία του πηκτώματος αγαρόζης μετά την ηλεκτροφόρηση.



Εικόνα 11.22 Στατώ δοχείων για τη χρώση και τον αποχρωματισμό πηκτωμάτων ηλεκτροφόρησης.

11.5.3.6 Υπολογισμός της πυκνότητας των κλασμάτων ηλεκτροφόρησης

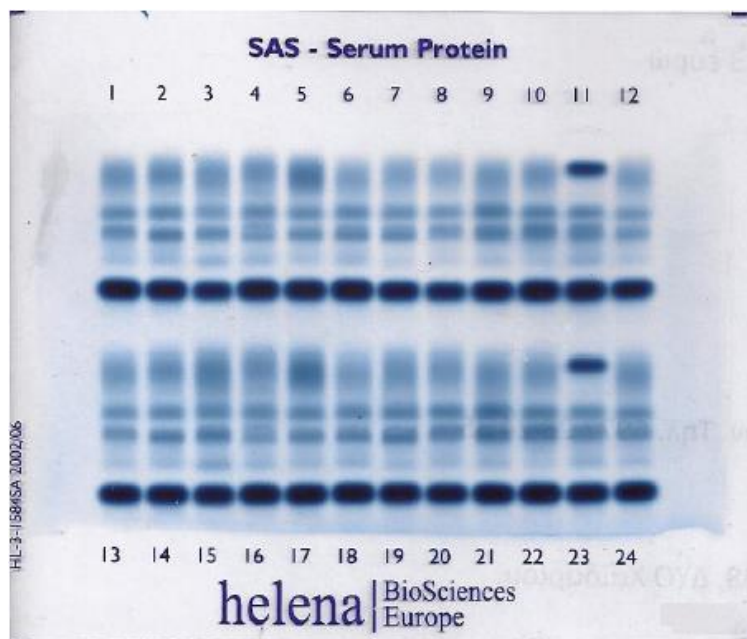
Μετά τη χρώση και ξήρανση, το πήκτωμα αгарόζης σαρώνεται σε ειδικό πυκνόμετρο στα 600 nm (Εικόνες 11.23, 11.24). Αντίπυκνομέτρου μπορεί να χρησιμοποιηθεί κλασικός σαρωτής (scanner) που συνοδεύεται από ειδικό λογισμικό. Στην Εικόνα 11.25 παρουσιάζονται τα ηλεκτροφορήματα ορού 24 διαφορετικών ασθενών.



Εικόνα 11.23 Αριστερά, πυκνόμετρο για την ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνικών κλασμάτων μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης και τη χρώση του πηκτώματος. Δεξιά, συσκευή ηλεκτροφόρησης (άνω) και τροφοδοτικό (κάτω) που εξασφαλίζει τη σταθερή παροχή συνεχούς ρεύματος για το διάστημα της εκτέλεσης της δοκιμασίας.



Εικόνα 11.24 Σύγχρονο πυκνόμετρο.



Εικόνα 11.25 Αποτελέσματα των ηλεκτροφορήσεων ορού 24 διαφορετικών ασθενών (άνω σειρά νούμερα 1-12, κάτω σειρά νούμερα 13-24) μετά από ηλεκτροφόρηση με εμπορικά διαθέσιμη δοκιμασία (kit). Στον ορό των ασθενών με αριθμούς 11 και 23 εμφανίζεται διακριτή πρωτεϊνική ζώνη που παραπέμπει σε παραπρωτεϊναιμία.

Σχετικό οπτικό υλικό

Ηλεκτροφόρηση ορού

<https://www.youtube.com/watch?v=z2D7ZkT3aOo>

Ηλεκτροφόρηση ορού

<https://www.youtube.com/watch?v=nWIWSk9Yz5Q>

Βιβλιογραφικές Αναφορές

- Killilngsworth, L. (1985). *High Resolution Protein Electrophoresis*. Helena laboratories.
- Marhall, W., & Bangert, S. (2008). *Κλινική Χημεία*. Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης.
- O' Connell, T., Horita, T., & Kasrani, B. (2005). Understanding and Interpreting Serum Protein Electrophoresis. *Am Fam Physician*, 71(1), 105-112.
- Διαμαντής, Ε. (1992). *Πρωτεΐνες του ορού, Μαθήματα κλινικής χημείας*. Εκδόσεις Λύχνος,
- Κολιός, Γ. (2004). *Μέθοδοι ανάλυσης πρωτεϊνών*. 6^ο Εκπαιδευτικό σεμινάριο ΕΕΚΧ-ΚΒ.
- Χαΐδος, Α., & Μπουραντάς, Κ. (2004). *Παραπρωτεΐναιμίες και δυσπρωτεΐναιμίες*. 6^ο Εκπαιδευτικό σεμινάριο ΕΕΚΧ-ΚΒ.

*Το παρόν σύγγραμμα χρηματοδοτήθηκε από το Πρόγραμμα Δημοσίων
Επενδύσεων του Υπουργείου Παιδείας*