ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ
ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ
ΙΔΡΥΜΑ
ΤΕΙ ΗΠΕΙΡΟΥ

Γεωργική Χημεία

Εργαστηριακές ασκήσεις

Γεώργιος Παπαδόπουλος, Καθηγητής Τμ. Τεχνολόγων Γεωπόνων Τ.Ε.

Άρτα, 2015

Άδειες Χρήσης

Το παρόν εκπαιδευτικό υλικό υπόκειται σε άδειες χρήσης Creative Commons. Για εκπαιδευτικό υλικό, όπως εικόνες, που υπόκειται σε άλλου τύπου άδειας χρήσης, η άδεια χρήσης αναφέρεται ρητώς.

Χρηματοδότηση

Το παρόν εκπαιδευτικό υλικό έχει αναπτυχθεί στα πλαίσια του εκπαιδευτικού έργου του διδάσκοντα. Το έργο «**Ανοικτά Ακαδημαϊκά Μαθήματα στο ΤΕΙ Ηπείρου**» έχει χρηματοδοτήσει μόνο τη αναδιαμόρφωση του εκπαιδευτικού υλικού.

Το έργο υλοποιείται στο πλαίσιο του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Εκπαίδευση και Δια Βίου Μάθηση» και συγχρηματοδοτείται από την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο) και από εθνικούς πόρους.

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης

6η ΑΣΚΗΣΗ. ΜΕΘΟΔΟΙ ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΥ

Χρωματογραφία σε χαρτί

Βασιλική Καραγιάννη, Αγγελική Ζαρλαχά, Γιώργος Κ. Παπαδόπουλος

Α. Θεωρητικό μέρος

1. Χρήση των μεταβολών των φάσεων στην ανάλυση

Η μελέτη της χημικής ανάλυσης αρχίζει με μια από τις παλιότερες παρατηρήσεις: οι ουσίες λειώνουν και βράζουν σε ορισμένες θερμοκρασίες, αλλάζοντας έτσι μορφή από στερεή σε υγρή ή από υγρή σε αέρια και αντίστροφα. Η μεταβολή μεταξύ αυτών των καταστάσεων της ύλης ή φάσεων μας δίνει πληροφορίες που βοηθούν στην αναγνώριση της ουσίας και στον προσδιορισμό της καθαρότητάς της. Επιπλέον, επειδή ο μηχανικός διαχωρισμός των δύο φάσεων είναι σχετικά απλός, η μελέτη της κατανομής μιας ουσίας μεταξύ δύο φάσεων αποτελεί τη βάση για όλες τις τεχνικές διαχωρισμού.

Η μεταβολή των φάσεων, όπως φαίνεται στο Σχήμα 1 συμβαίνει τόσο με απλές καθαρές ουσίες ή στοιχεία όσο και με μείγματα δύο ή περισσότερων ουσιών.

ΣΤΕΡΕΑ ΦΑΣΗ $\underset{\text{Πήξη}}{\overset{\text{Τήξη}}{\rightleftarrows}}$ ΥΓΡΗ ΦΑΣΗ

ΥΓΡΗ ΦΑΣΗ $\underset{\text{Υγροποίηση}}{\overset{\text{Εξάτμιση}}{\rightleftarrows}}$ ΑΕΡΙΑ ΦΑΣΗ

ΣΤΕΡΕΑ ΦΑΣΗ $\underset{\text{Απόθεση}}{\overset{\text{Εξάχνωση}}{\rightleftarrows}}$ ΑΕΡΙΑ ΦΑΣΗ

Σχήμα 1. Μεταβολές μεταξύ φάσεων

2. **Μέθοδοι διαχωρισμού**

Οι σπουδαιότερες μέθοδοι και τεχνικές διαχωρισμού είναι οι εξής:

- Διήθηση
- Φυγοκέντρηση
- Καταβύθιση
- Εκχύλιση
- Ιοντοανταλλαγή

- Απόσταξη

- Χρωματογραφία

3. Χρωματογραφία

Η χρωματογραφία είναι μέθοδος διαχωρισμού των συστατικών ενός μείγματος χημικών ουσιών (από δύο έως και 30!!) και στηρίζεται στη διαφορετική προσροφητικότητα των διαφόρων σωμάτων. Στη μέθοδο αυτή διακρίνουμε δύο φάσεις:

(α) τη *σταθερή* ή *στατική φάση* που αποτελείται από κατάλληλο αδρανές προσροφητικό μέσο, στερεό ή υγρό, και

β) τη *κινητή φάση* που αποτελείται συνήθως από έναν (αδρανή) διαλύτη και από το μείγμα των συστατικών τα οποία θέλουμε να διαχωρίσουμε. Η κινητή φάση είναι πάντα σε υγρή ή αέρια μορφή.

Ανάλογα με τους συνδυασμούς της στατικής και κινητικής φάσης, διακρίνουμε τους παρακάτω διαφορετικούς τύπους χρωματογραφίας:

Χρωματογραφία στήλης (ή διήθησης σε πηκτή)

Χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας

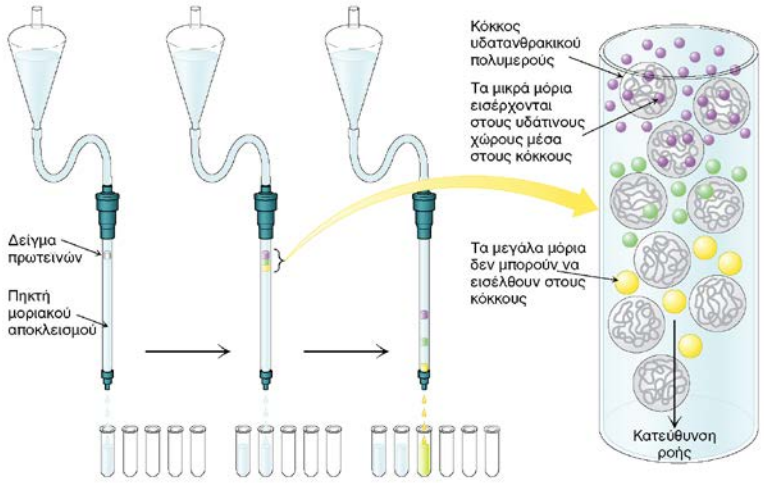
Χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής (πάλι σε στήλη)

Χρωματογραφία συγγένειας (πάλι σε στήλη)

Υγρή χρωματογραφία

Αέρια χρωματογραφία

ΕΙΚΟΝΑ 4.3 Χρωματογραφία διήθησης σε πηκτή. Ένα μείγμα πρωτεϊνών τοποθετείται σε στήλη πορώδους υλικού. Ο όγκος του δείγματος των πρωτεϊνών διατηρείται όσο το δυνατόν μικρότερος. Οι μεγάλες πρωτεΐνες εμφανίζονται στην έξοδο της στήλης πριν από τις μικρές πρωτεΐνες διότι δεν μπορούν να εισχωρήσουν στο εσωτερικό των κόκκων του υλικού.



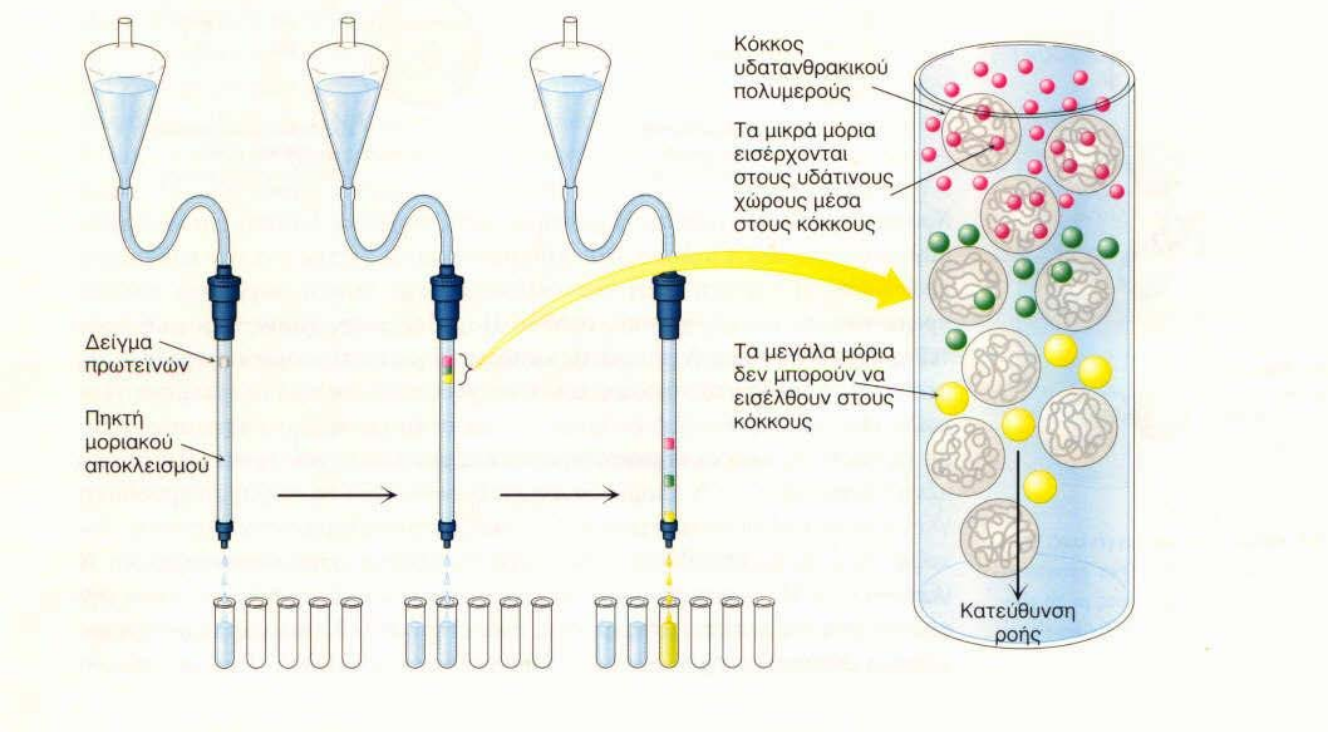
Χρωματογραφία διήθησης σε πηκτή. Ένα μείγμα πρωτεϊνών (σημ. ΜΒ > 5.000), σε πολύ μικρό συγκριτικά όγκο δείγματος, τοποθετείται σε στήλη με πορώδεις κόκκους. Οι μεγάλες πρωτεΐνες εμφανίζονται στην έξοδο της στήλης πριν από τις μικρές πρωτεΐνες διότι δεν μπορούν να εισχωρήσουν στο εσωτερικό των κόκκων του υλικού. *Θα ήταν*

αδύνατον να
μετακίνησή
άδειας του ε

–

(
Mikhael
των φυ
κατόρθω
αποχρω

στήλη, μ
σε θέσι
πρόσδε
χημική



4. Χρωματογραφία σε χαρτί

Η χρωματογραφία σε χαρτί είναι η απλούστερη από όλα τα είδη της χρωματογραφίας, ανήκει στη χρωματογραφία υγρού-υγρού και η σταθερή φάση της είναι ένα λεπτό στρώμα νερού (ή άλλου υγρού) που έχει προσροφηθεί σε ένα κομμάτι χαρτί (δηλαδή στις ίνες κυτταρίνης αυτού). Σημαντικό ρόλο παίζουν επίσης και τα τριχοειδή φαινόμενα που εμφανίζουν οι ίνες της κυτταρίνης.

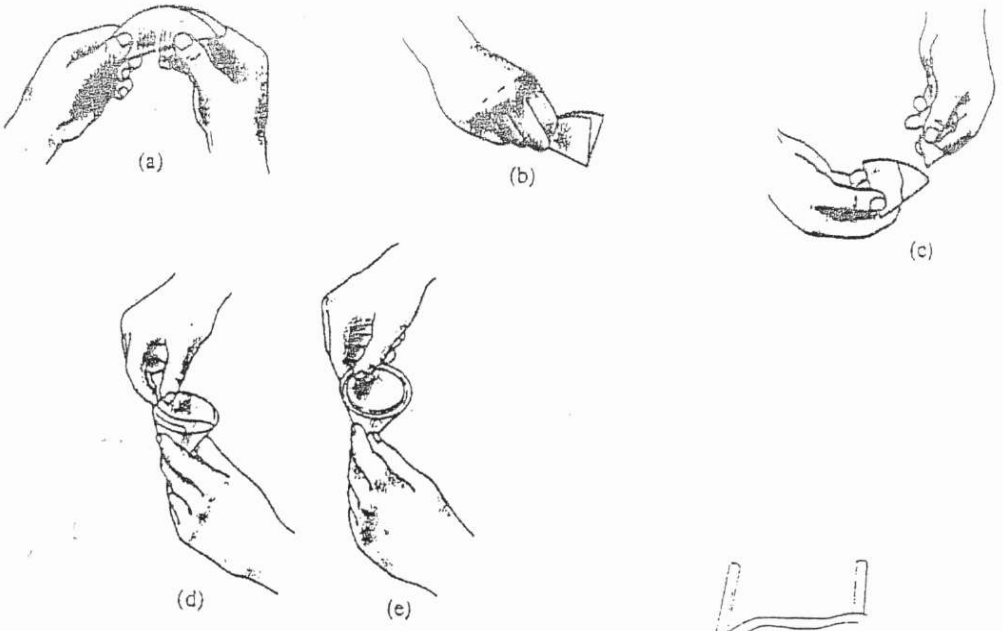
Το χαρτί που χρησιμοποιείται μπορεί να είναι το συνηθισμένο διηθητικό χαρτί αλλά για καλύτερα αποτελέσματα προτιμάται το ειδικά επεξεργασμένο χαρτί Whatman No1.

Σήμερα, με τη πληθώρα μεθόδων (αυτοματοποιημένων κιόλας) που είναι διαθέσιμες για διαχωρισμό ουσιών, η χρωματογραφία σε χαρτί φαντάζει σαν κάτι για μικρά παιδιά. *Υπήρξαν όμως εποχές που ήταν η μόνη απλή και αξιόπιστη μέθοδος για να διαχωριστούν και να ταυτοποιηθούν διάφορες ουσίες σε μείγματα και να εκτιμηθεί η ποσότητά τους με τρόπο αξιόπιστο. Τα πιο σημαντικά παραδείγματα που ήταν καθοριστικά για τη πρόοδο των βιολογικών επιστημών παρατίθενται το τέλος.*

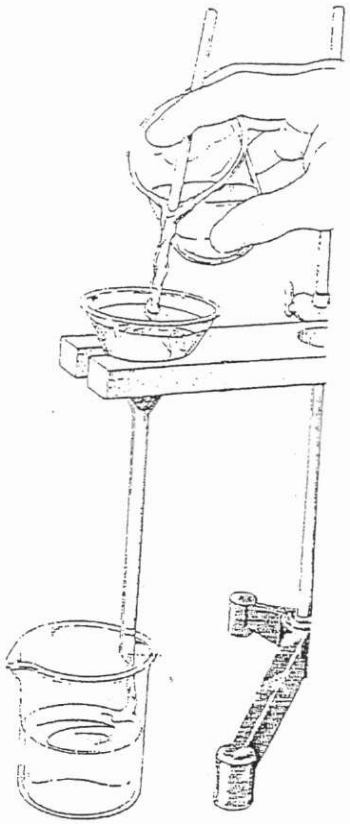
Β. Πειραματικό μέρος

Β1. Διήθηση

Κατασκευάζουμε σύμφωνα με το Σχήμα 3 έναν απλό και έναν πτυχωτό ηθμό ταχείας διήθησης και εκτελούμε διήθηση ενός μίγματος στερεού-υγρού σύμφωνα με το Σχήμα 4.



Σχήμα 3. Κατασκευή ηθμού



Σχήμα 4. Διήθηση

Β2. Φυγοκέντρηση

Εκτελείται φυγοκέντρηση ενός μίγματος στερεού-υγρού στη φυγόκεντρο και διαχωρίζεται το διήθημα (ίζημα) από το υπερκείμενο διάλυμα. *Η φυγοκέντρηση χρησιμοποιείται ευρέως στον διαχωρισμό βιολογικών δειγμάτων (π.χ. κύτταρα αίματος από το πλάσμα αίματος) και θα αφιερώσουμε ολόκληρο εργαστήριο σε αυτήν, στο μάθημα της Βιοχημείας.*

Β3. Χρωματογραφία σε χαρτί

Εκτελείται διαχωρισμός μίγματος δεικτών με χρωματογραφία σε χαρτί.

Υλικά-Σκεύη

1. Δύο ποτήρια ζέσεως των 50 mL και δύο πιο μεγάλα των 250 mL.
2. Παρασκεύασμα για χρωματογραφία: είτε δείκτες pH, είτε εκχύλισμα χρωστικών φύλλων σε αιθανόλη
3. Ηθμός Whatman No 1: προετοιμάζεται όπως φαίνεται στο Σχήμα 5.
4. Γυάλινη ράβδος
5. Πυριαντήριο ή στεγνωτήρας μαλλιών!

Διαλύματα

1. Διάλυμα δεικτών: σε ογκομετρική φιάλη του 1 L φέρονται: 20 mL διαλύματος κυανού του μεθυλενίου 0.05 % vv/v, 30 mL διαλύματος ερυθρού του μεθυλίου 0.05 % w/v ή εκχύλισμα φύλλων σε αιθανόλη και ο όγκος συμπληρώνεται μέχρι τη χαραγή με απεσταγμένο νερό.

Εκτέλεση πειράματος

1. Παίρνουμε τους ηθμούς Whatman No 1 και διαχωρίζουμε μια λωρίδα όπως φαίνεται στο Σχήμα 5.

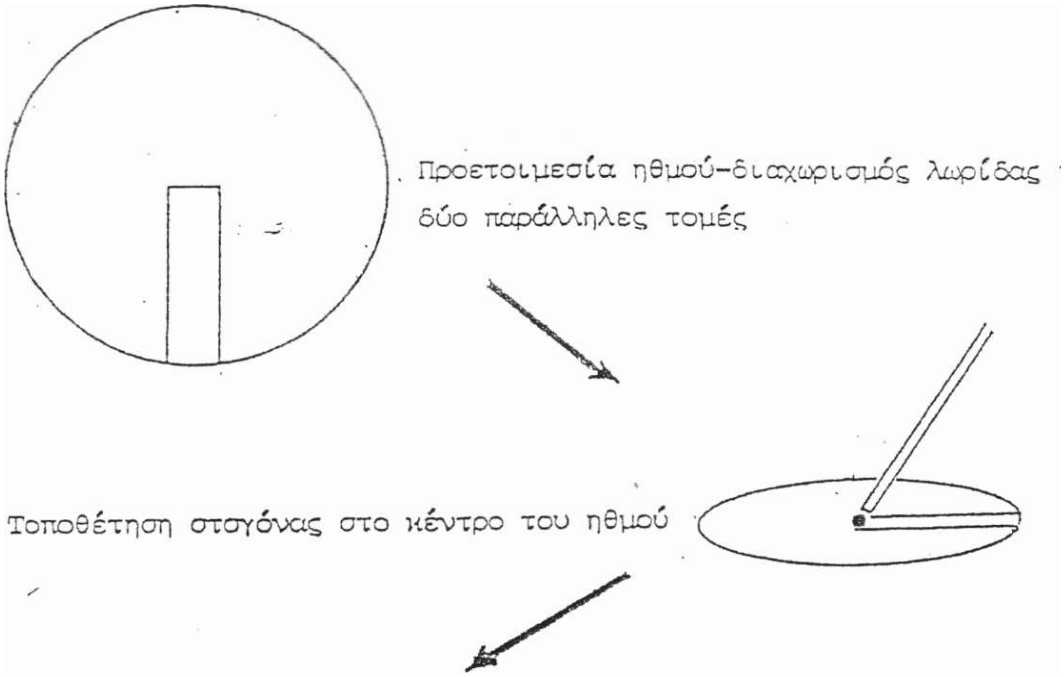
2. Φέρνουμε στο ένα ποτήρι ζέσεως 10 mL διαλύματος δεικτών (ή εκχυλίσματος φύλλων σε αιθανόλη).

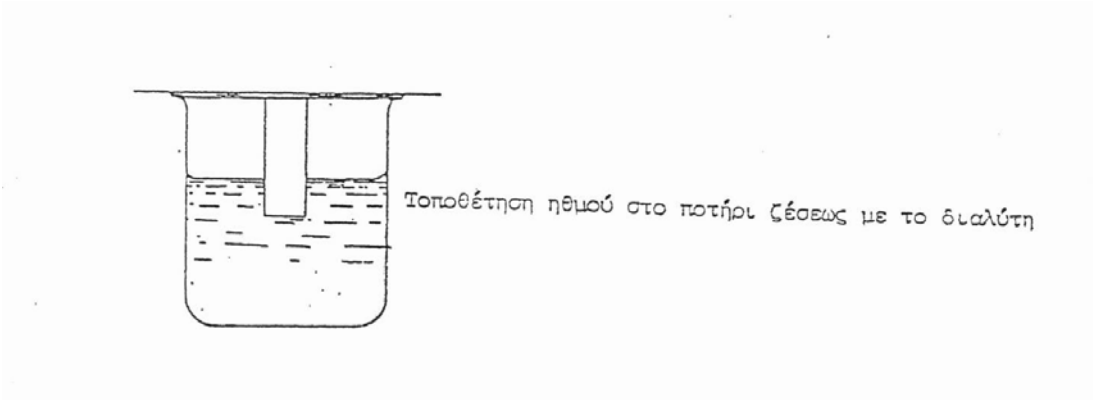
3. Φέρνουμε στο άλλο ποτήρι ζέσεως 20 mL απεσταγμένου νερού (ή αιθανόλης).

4. Σκουπίζουμε προσεκτικά τα χείλη των ποτηριών με μαλακό χαρτί.

5. Τοποθετούμε στο κέντρο του ενός ηθμού μια σταγόνα του διαλύματος δεικτών (ή του εκχυλίσματος φύλλου) και βυθίζουμε το άκρο της λωρίδας μέσα στο ποτήρι με το απεσταγμένο νερό (ή την αιθανόλη). *Η σταγόνα πρέπει να είναι όσο το δυνατόν πιο μικρή. Είναι καλύτερα να προσθέσουμε πολλές μικρές σταγόνες, την επόμενη αφού έχει στεγνώσει η προηγούμενη. Το μυστικό είναι ΝΑ ΜΗΝ ΑΠΛΩΘΕΙ Η ΣΤΑΓΟΝΑ. Πριν μια γενιά, ο καλύτερος τρόπος να γίνει αυτό ήταν να φτειάχναμε ένα γυάλινο τριχοειδές σιφώνιο (constricted pipette), με τη βοήθεια μιας λυχνίας Bunsen. Επειδή όμως δεν θα γίνετε χημικοί, και η τεχνολογία έχει προχωρήσει, θα προσθέσουμε πολύ μικρούς όγκους (1 μL) με τη βοήθεια ενός μικροσιφωνίου.*

6. Τοποθετούμε τον άλλο ηθμό στο ποτήρι με το διάλυμα δεικτών κατά τον ίδιο τρόπο.





Σχήμα 5. Πειραματική πορεία

7. Αποσύρουμε προσεκτικά τον τελευταίο αυτό ηθμό και προσθέτουμε 10 mL απεσταγμένου νερού (ή αιθανόλης αν πρόκειται για εκχύλισμα φύλλου), στο άδειο δοχείο ζέσεως.

8. Επανατοποθετούμε τον ηθμό και προσθέτουμε ανάποδα ένα δοχείο ζέσεως των 250 mL. Αφήνουμε τη διάταξη για 20 λεπτά, *δηλαδή μέχρι να δούμε το μέτωπο του διαλύτη να φτάνει προς την άκρη του ηθμού.*

9. Απομακρύνουμε και ξηραίνουμε για 5 λεπτά τους ηθμούς σε πυριαντήριο θερμοκρασίας 90 °C ή με στεγνώνουμε με στεγνωτήρα μαλλιών.

ΕΡΩΤΗΣΕΙΣ

Να απαντηθούν στο τετράδιο του εργαστηρίου

Ερώτηση 1. *Τι διαφορές εμφανίζουν τα δύο χρωματογραφήματα;*

Ερώτηση 2. Να σχεδιαστούν τα ληφθέντα χρωματογραφήματα και να *αναγνωριστούν οι ουσίες που διαχωρίστηκαν.*

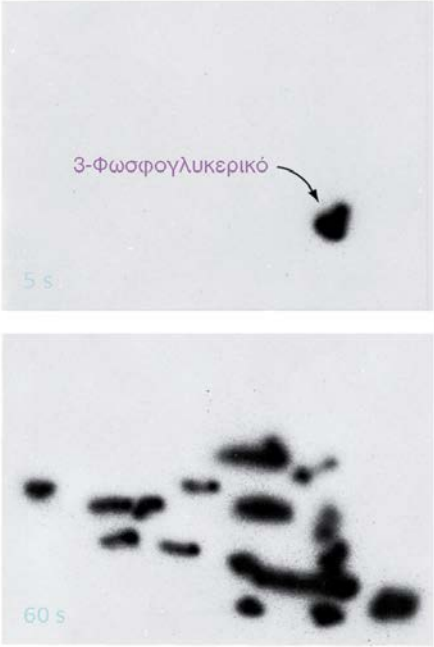
Ερώτηση 3. *Ποιο υλικό χρησιμοποιούσαν ως ηθμό* οι γιαγιάδες μας και οι προγιαγιάδες μας όταν πήγαιναν στο ποτάμι για να προμηθευτούν καθαρό νερό;

Ερώτηση 4. Η λέξη χρωματογραφία πού παραπέμπει;

ΑΠΟ ΤΟ ΠΑΡΕΛΘΟΝ ΣΤΟ ΜΕΛΛΟΝ

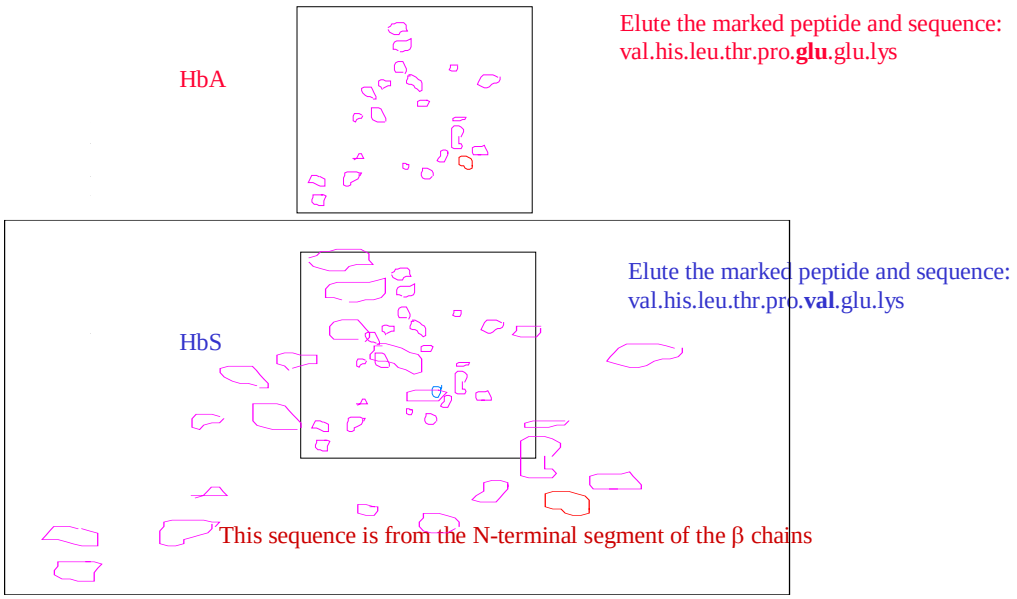
Παρακάτω, παραθέτουμε τρεις σημαντικές χρήσεις της χρωματογραφίας σε χαρτί που χρησιμοποιήθηκαν από το 1945 μέχρι το 1960 για τη λύση μερικών θεμελιωδών ζητημάτων της βιολογίας.

1. *Οι σκοτεινές αντιδράσεις της φωτοσύνθεσης (κύκλος του Calvin), ή η καθήλωση του CO_2 από τα φυτά.*



ΕΙΚΟΝΑ 20.2 Ανιχνεύοντας την τύχη του διοξειδίου του άνθρακα. Σε καλλιέργειες φυκών που έχουν ακτινοβοληθεί, η ραδιενέργεια από το $^{14}CO_2$ ενσωματώνεται στο 3-φωσφογλυκερικό μέσα σε 5 s. Μετά από 60 s η ραδιενέργεια εμφανίζεται σε πολλές ενώσεις, τα ενδιάμεσα στον κύκλο του Calvin. [Ευγενική προσφορά Dr. J. A. Bassham.]

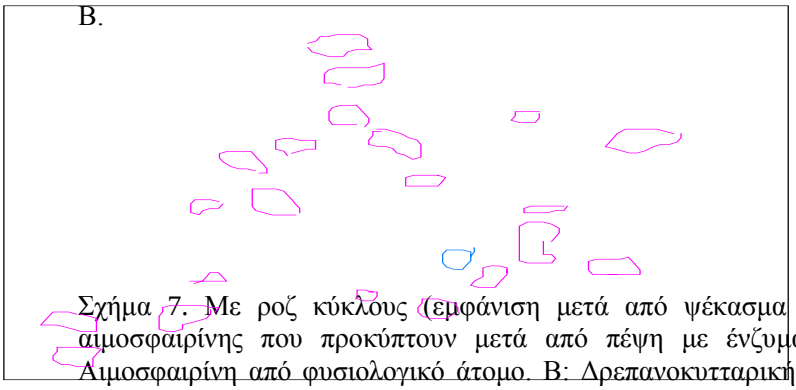
Σχήμα 6. Ο Κύκλος του Calvin όπως αποτυπώθηκε μετά από ένα απλό πείραμα σε φύκη. Τα φύκη επωάστηκαν με ραδιενεργό CO_2, εκτέθηκαν σε παλμό φωτός και απομονώθηκαν μετά από 5 ή 60 s, και στη συνέχεια εκχυλίστηκαν οι οργανικές ουσίες και υπέστησαν χρωματογραφία σε χαρτί σε δύο διαστάσεις. Στο τέλος της χρωματογραφίας, κάθε χαρτί με τα εκχυλίσματα που υπέστησαν χρωματογραφία τοποθετήθηκε κάτω από μια φωτογραφική πλάκα, ώστε να αποτυπωθεί η θέση του κάθε ραδιενεργού μορίου (εικόνα). Στη πρώτη περίπτωση, μετά από 5 s έκθεσης στο φως, ανιχνεύθηκε μια μόνον κηλίδα, η οποία αποδείχθηκε ότι ήταν το 3-φωσφογλυκερικό ανιόν. Αντίθετα, μετά από 60 s, έχουν προκύψει πολλές και διαφορετικές ουσίες, δηλαδή όλα τα ενδιάμεσα του Κύκλο του Calvin. Η πρόκληση, όπως είπε ο τελευταίος, ήταν να βρεθεί τι αντιπροσώπευε η κάθε κηλίδα! *Οι κατευθύνσεις χρωματογραφίας είναι από τα κάτω προς τα πάνω και από τα δεξιά στα αριστερά. Από Berg, Tymoczko, Stryer, Βιοχημεία, 5η έκδοση, ΠΕΚ, 2004. Κατόπιν άδειας του εκδότη.*



ρεπανοκυτταρική αναιμία

πέψη με ένζυμο, όπως θρυψίνη) μοζόμενο ηλεκτρικό πεδίο) στη

B.



Σχήμα 7. Με ροζ κύκλους (εμφάνιση μετά από ψέκασμα με αντιδραστήριο νινυδρίνης) όλων των 22 πεπτιδίων αιμοσφαιρίνης που προκύπτουν μετά από πέψη με ένζυμα που διασπούν πρωτεΐνες, όπως η αιμοσφαιρίνη. Α: Αιμοσφαιρίνη από φυσιολογικό άτομο. Β: Δρεπανοκυτταρική αιμοσφαιρίνη. Στη πάνω εικόνα, υπάρχει ένας κόκκινος κύκλος ο οποίος στη κάτω εικόνα βρίσκεται πιο αριστερά με μπλέ χρώμα (και τα δύο χρώματα επίπλαστα για να τονίζεται η διαφορά). Μεταγενέστερη έρευνα έδειξε ότι η κόκκινη κηλίδα πάνω αφορούσε την αλληλουχία αμινοξέων:

val.his.leu.thr.pro.**glu**.glu.lys (βαλίνη-ιστιδίνη-λευκίνη-θρεονίνη-προλίνη-**γλουταμινικό**-γλουταμινικό-λυσίνη).

Ενώ η μπλε κηλίδα κάτω την αλληλουχία αμινοξέων:

val.his.leu.thr.pro.**val**.glu.lys (βαλίνη-ιστιδίνη-λευκίνη-θρεονίνη-προλίνη-**βαλίνη**-γλουταμινικό-λυσίνη).

Άρα, η διαφορά είναι στο 6° αμινοξύ (βαλίνη αντί γλουταμινικού). Αποδείχθηκε ότι αυτή ήταν η αρχή της αλυσίδας *β* της αιμοσφαιρίνης, και η μετάλλαξη γλουταμινικό → βαλίνη στη θέση *β*6. Από www.cwru.edu/artsci/biol/.../hemoglob3.pp.

Αυτή ήταν η πρώτη περίπτωση στην οποία κατέστη δυνατόν να συνδεθεί άμεσα μια συγκεκριμένη νόσος (η δρεπανοκυτταρική αναιμία) με συγκεκριμένη μετάλλαξη σε ένα και μόνον αμινοξύ της πρωτεΐνης που εμφανίζει την εκ γενετής βλάβη, η οποία βλάβη οδηγεί στη νόσο.

3 Υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης (HPLC). Μέθοδος πολύ υψηλής εμβέλειας με την οποία μπορεί να αναλυθεί ταχύτατα μείγμα με πολλές και διαφορετικές ουσίες. Περισσότερα στο εργαστήριο.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Ευστ. Ταμουτσίδη, *Γεωργική Χημεία*, έκδοση ίδιου, Β έκδοση, 2008

2. Μ. Λάλια – Καντούρη και Στ. Παπαστεφάνου, *Γενική και Ανόργανη Χημεία*, 2η έκδοση, Εκδόσεις Ζήτη, Θεσσαλονίκη, 2012. *Η έκδοση αυτή έχει και πολύ επιμελημένο συμπλήρωμα εργαστηριακών ασκήσεων.*

3. Κ.Δ. Ξένου και Ευγ. Ξένου, *Γενική και Ανόργανη Χημεία*, Μακεδονικές Εκδόσεις, Θεσσαλονίκη, 2009

4. Ν. Λυδάκη-Σημαντήρη. *Γενική χημεία και ενόργανη ανάλυση:* Θέματα και εργαστηριακές ασκήσεις. Εκδόσεις Τζιόλα, 2009.

5. G. Nelson Eby, "*Principles of Environmental Geochemistry*", 2004, Thomson, Brooks/Cole, μετάφραση Νίκος Λυδάκης-Σημαντήρης, 2011, Εκδόσεις Κωσταράκη,

6. J. Clark, R. Switzer. *Πειραματική Βιοχημεία*. 2η έκδοση. Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, Ηράκλειο 2000.

7. Παπαγεωργίου Βασίλειος Π**.** Εργαστηριακές Ασκήσεις Οργανικής Χημείας, Επίκεντρο, Αθήνα 2005 Ασκήσεις Οργανικής Χημείας: http://www.deapt.upatras.gr/files/df1a3747d790ae0d3f402edf5b861af6.pdf

8. https://www.google.gr/search?q=paper+chromatography+of+green+leaves&es_sm=122&tbm=isch&tbo=u&source=univ&sa=X&ei=H_9_VKe2GO2v7AbR8oDYDw&ved=0CCAQsAQ&biw=1280&bih=699#facrc=_&imgdii=_&imgrc=8VQZOrea3ueAEM%253A%3B5dNfGTQqdS_6zM%3Bhttps%253A%252F%252Fwww.msu.edu%252Fcourse%252Flb%252F145%252Fluckie%252Finquiries2002%252Fimage002.jpg%3Bhttps%253A%252F%252Fwww.msu.edu%252Fcourse%252Flb%252F145%252Fluckie%252Finquiries2002%252FVerde.html%3B492%3B268 Πρόσβαση στις 4/12/14, 8.31 π.μ.