



Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
Τμήμα Ιατρικής
Εργαστήριο Χημείας / Βιοχημείας



ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΑΣΚΗΣΕΙΣ

ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

Σ. Μπονάνου–Τζεδάκη, Α. Τσακάλωφ, Η.Μυλωνής

Λάρισα 2012

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

	Σελίδα
Πρόγραμμα Διδασκαλίας	
Κανόνες Εργαστηρίου	1
Εργαστήρια Ιατρικής Χημείας	3
Υδατικά διαλύματα	4
Άσκηση 1η	
Φασματοσκοπία - Φασματοφωτομετρία	7
Άσκηση 2η	
Ηλεκτρολύτες - Ρυθμιστικά διαλύματα	15
Άσκηση 3η	
Χρωματογραφία	22
Άσκηση 4η	
Ανάλυση αμινοξέων & πρωτεϊνών	33
Βιβλιογραφία εργαστηριακών ασκήσεων	38
Ευχαριστίες	39
Αναλυτική ύλη μαθήματος	40
Βιβλιογραφία	51

ΙΑΤΡΙΚΗ ΧΗΜΕΙΑ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΔΙΔΑΣΚΑΛΙΑΣ ΧΕΙΜΕΡΙΝΟΥ ΕΞΑΜΗΝΟΥ

Ακαδ. Έτους 2012-2013

Τα Φροντιστήρια και τα Εργαστήρια είναι υποχρεωτικά

Ημερομηνία	Ωρα	Θέμα	Διδάσκων	
1				
Τρίτη	2/10	11-12	<i>ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΟ ΜΑΘΗΜΑ</i>	Α.Τ.
Τρίτη	2/10	12-13	<i>Ενότητα 1. ΠΕΡΙΟΔΙΚΟΣ ΠΙΝΑΚΑΣ - ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΒΙΟΑΝΟΡΓΑΝΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ</i>	Α.Τ.
Τετάρτη	3/10	17-18	<i>Ενότητα 1. ΠΕΡΙΟΔΙΚΟΣ ΠΙΝΑΚΑΣ - ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΒΙΟΑΝΟΡΓΑΝΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ</i>	Α.Τ.
2				
Τρίτη	9/10	11-13	<i>Ενότητα 2. ΧΗΜΙΚΟΣ ΔΕΣΜΟΣ- ΔΙΑΜΟΡΙΑΚΕΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ</i>	Α.Τ.
Τετάρτη	10/10	17-18	<i>Ενότητα 3. ΣΥΜΠΛΟΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ-ΣΥΜΠΛΟΚΟΘΕΡΑΠΕΙΑ</i>	Α.Τ.
3				
Τρίτη	16/10	11-12	<i>Ενότητα 3. ΣΥΜΠΛΟΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ-ΣΥΜΠΛΟΚΟΘΕΡΑΠΕΙΑ</i>	Α.Τ.
Τρίτη	16/10	12-13	<i>Ενότητα 4. ΗΛΕΚΤΡΟΛΥΤΕΣ, ΟΞΕΟΒΑΣΙΚΗ ΙΣΟΡΡΟΠΙΑ, ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΑ ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ</i>	Α.Τ.
Τετάρτη	17/10	17-18	ΦΡΟΝΤΙΣΤΗΡΙΟ: <i>Ενότητα 5. ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ. ΕΝΟΡΓΑΝΗ ΧΗΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ (I)-ΦΑΣΜΑΤΟΦΩΤΟΜΕΤΡΙΑ</i>	Α.Τ.
4				
Δευτέρα	22/10	12-14	ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ 1^ο : ΦΩΤΟΜΕΤΡΙΑ (ΟΜΑΔΑ Α)	Α.Τ., Η.Μ.
Τρίτη	23/10	11-12	<i>Ενότητα 6. ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΔΙΑΣΠΟΡΑΣ</i>	Α.Τ.
Τρίτη	23/10	12-13	<i>Ενότητα 7. ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΗΝ ΟΡΓΑΝΙΚΗ ΧΗΜΕΙΑ</i>	
Τρίτη	23/10	13-15	ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ 1^ο : ΦΩΤΟΜΕΤΡΙΑ (ΟΜΑΔΑ Β)	Α.Τ., Η.Μ.
Τετάρτη	24/10	11-12	<i>Ενότητα 8. ΣΤΕΡΕΟΧΗΜΕΙΑ ΤΩΝ ΟΡΓΑΝΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ</i>	Α.Τ.
5				
Δευτέρα	29/10	12-14	ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ 2^ο : ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΑ ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ, ΜΕΤΡΗΣΗ ΡΗ. (ΟΜΑΔΑ Α)	Α.Τ., Η.Μ.,
Τρίτη	30/10	11-13	<i>Ενότητα 9. ΥΔΡΟΓΟΝΑΝΘΡΑΚΕΣ-ΑΡΩΜΑΤΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ-ΣΤΕΡΟΕΙΔΗ</i>	Α.Τ.
Τρίτη	30/10	13-15	ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ 2^ο : ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΑ ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ, ΜΕΤΡΗΣΗ ΡΗ. (ΟΜΑΔΑ Β)	Α.Τ., Η.Μ.
Τετάρτη	31/10	17-18	<i>Ενότητα 10. ΑΠΛΕΣ ΟΞΥΓΟΝΟΥΧΕΣ ΚΑΙ ΘΕΙΟΥΧΕΣ ΟΡΓΑΝΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ</i>	Α.Τ.
6				
Δευτέρα	5/11	12-14	ΦΡΟΝΤΙΣΤΗΡΙΟ 1-2^ο ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟΥ(ΟΜΑΔΑ Α)	Α.Τ., Η.Μ.
Τρίτη	6/11	11-13	<i>Ενότητα 5. ΦΡΟΝΤΙΣΤΗΡΙΟ 3^ο</i> ΕΝΟΡΓΑΝΗ ΧΗΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ (II)-ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ-ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ (ΟΜΑΔΕΣ Α+Β)	Α.Τ.
Τρίτη	6/11	13-15	ΦΡΟΝΤΙΣΤΗΡΙΟ 1-2^ο ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟΥ(ΟΜΑΔΑ Β)	Α.Τ., Η.Μ.
Τετάρτη	7/11	17-18	<i>Ενότητα 11. ΚΑΡΒΟΝΥΛΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ : ΑΛΛΕΥΔΕΣ – ΚΕΤΟΝΕΣ</i>	Α.Τ.
7				
Τρίτη	13/11	11-13	<i>Ενότητα 12. ΚΑΡΒΟΞΥΛΙΚΑ ΟΞΕΑ ΚΑΙ ΤΑ ΠΑΡΑΓΩΓΑ ΤΟΥΣ</i>	Α.Τ. /Η.Μ
Τετάρτη	14/11	17-18	<i>Ενότητα 13. ΑΠΛΕΣ ΑΖΩΤΟΥΧΕΣ ΟΡΓΑΝΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ</i>	Α.Τ.

8				
Δευτέρα	19/11	12-14	ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ 3^ο : ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ-ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ (ΟΜΑΔΑ Α)	A.T., H.M.
Τρίτη	20/11	11-13	<i>Ενότητα 14. ΕΤΕΡΟΚΥΚΛΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ</i>	A.T.
Τρίτη	20/11	13-15	ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ 3^ο : ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ-ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ (ΟΜΑΔΑ Β)	A.T., H.M.
Τετάρτη	21/11	17-18	<i>Ενότητα 15. ΔΟΜΗ & ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΣ ΡΟΛΟΣ ΑΜΙΝΟΞΕΩΝ ΚΑΙ ΠΕΠΤΙΔΙΩΝ</i>	H.M.
9				
Δευτέρα	26/11	12-14	Σεμινάριο: Ασκήσεις οργανικής χημείας (ομάδα Α)	
Τρίτη	27/11	11-13	<i>Ενότητα 16. ΔΟΜΗ & ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΣ ΡΟΛΟΣ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ</i>	H.M.
Τρίτη	27/11	13-15	Σεμινάριο: Ασκήσεις οργανικής χημείας (ομάδα Β)	
Τετάρτη	28/11	17-18	ΦΡΟΝΤΙΣΤΗΡΙΟ: Ενότητα 16. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ: Χρωματογραφία και ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών, μέθοδοι απομόνωσης & μελέτης πρωτεϊνών	H.M.
10				
Δευτέρα	3/12	12-14	ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ 4^ο : ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΜΙΝΟΞΕΩΝ & ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ (ΟΜΑΔΑ Α)	A.T., H.M.
Τρίτη	4/12	11-13	<i>Ενότητα 16. ΔΟΜΗ & ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΣ ΡΟΛΟΣ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ.</i>	H.M.
Τρίτη	4/12	13-15	ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ 4^ο : ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΜΙΝΟΞΕΩΝ & ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ (ΟΜΑΔΑ Β)	A.T., H.M.
Τετάρτη	5/12	17-18	<i>Ενότητα 17. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ: Χημική & ανοσολογική ανάλυση πρωτεϊνών, προσδιορισμός της αμινοξικής αλληλουχίας</i>	H.M.
11				
Δευτέρα	10/12	12-14	ΦΡΟΝΤΙΣΤΗΡΙΟ 3-4^{οο} ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟΥ(ΟΜΑΔΑ Α)	A.T., H.M.
Τρίτη	11/12	11-13	<i>Ενότητα 18. ΧΗΜΙΚΗ ΘΕΡΜΟΔΥΝΑΜΙΚΗ ΚΑΙ ΧΗΜΙΚΗ ΙΣΟΡΡΟΠΙΑ</i>	A.T.
Τρίτη	11/12	13-15	ΦΡΟΝΤΙΣΤΗΡΙΟ 3-4^{οο} ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟΥ (ΟΜΑΔΑ Β)	A.T., H.M.
Τετάρτη	12/12	11-12	<i>Ενότητα 17. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ: φασματοσκοπία μαζών.</i>	A.T.
12				
Τρίτη	18/12	11-12	<i>Ενότητα 19. ΧΗΜΙΚΗ ΚΙΝΗΤΙΚΗ. ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΧΗΜΙΚΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΩΝ</i>	A.T.
Τρίτη	18/12	12-13	<i>Ενότητα 20.ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΗΝ ΚΙΝΗΤΙΚΗ ΤΩΝ ΕΝΖΥΜΙΚΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΩΝ</i>	H.M.
Τετάρτη	19/12	17-18	<i>Ενότητα 20.ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΗΝ ΚΙΝΗΤΙΚΗ ΤΩΝ ΕΝΖΥΜΙΚΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΩΝ</i>	H.M.
ΔΙΑΚΟΠΕΣ ΧΡΙΣΤΟΥΓΕΝΝΩΝ				
13				
Τρίτη	8/1	11-13	<i>Ενότητα 20. ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΗΝ ΚΙΝΗΤΙΚΗ ΤΩΝ ΕΝΖΥΜΙΚΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΩΝ</i>	H.M.
Τετάρτη	09/1	17-18	<i>Ενότητα 21. ΗΛΕΚΤΡΟΧΗΜΕΙΑ. ΟΞΕΙΔΩΣΗ- ΑΝΑΓΩΓΗ.</i>	A.T.
14				
Τετάρτη	16/1	17-18	<i>ΕΠΙΑΝΑΛΗΠΤΙΚΗ ΣΥΖΗΤΗΣΗ</i>	A.T., H.M.

ΔΙΑΔΑΣΚΟΝΤΕΣ: Α.Τ. –Α.ΤΣΑΚΑΛΩΦ, Η.Μ. – Η. ΜΥΛΩΝΗΣ

Μέλη ΕΤΕΠ που συμμετέχουν στην διεξαγωγή Εργαστηρίων: Δ. Μπούτος, Μ.Βενιέρης
 Διαλέξεις – Μικρό Αμφιθέατρο 1, Νέο κτήριο Ιατρικής Σχολής
 Εργαστήρια – Εργαστήριο Βιοχημείας, Νέο κτήριο Ιατρικής Σχολής
 Φροντιστήρια – Αίθουσα 1, 3^{ος} όροφος, Νέο κτήριο Ιατρικής Σχολής

ΚΑΝΟΝΕΣ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟΥ

Για την ασφάλεια όλων πρέπει να ακολουθούνται πάντοτε οι κάτωθι κανόνες:

- 1) **Κανείς** δεν πρέπει να εργάζεται μόνος του στο εργαστήριο χωρίς την παρουσία κάποιου μέλους του προσωπικού.
- 2) **Αφήστε** εξωτερικά ενδύματα και **ογκώδη αντικείμενα** (π.χ. σάκους) **έξω** από το εργαστήριο ή σε ειδικό χώρο του εργαστηρίου. Σκόρπια πράγματα σε πάγκους και πατώματα μπορεί να προκαλέσουν ατύχημα και υπάρχει κίνδυνος να καταστραφούν και τα ίδια.
- 3) **Φοράτε πάντα ποδιά** μόλις μπειτε στο εργαστήριο.
- 4) **Απαγορεύεται να καπνίζετε**, να τρώτε ή να πίνετε στο εργαστήριο.
- 5) Για δικό σας όφελος διαβάστε το φυλλάδιο που περιγράφει την άσκηση πριν το εργαστήριο και ακολουθήστε προσεκτικά τις οδηγίες που σας δίνονται για την εκτέλεση κάθε άσκησης. Επειδή συχνά δίνονται επιπλέον προφορικές εξηγήσεις στην αρχή του εργαστηρίου **είναι απαραίτητο να έρχεστε ακριβώς στην ώρα σας.**
Γενική αρχή κάθε πειραματικής δουλειάς: Σκεφθείτε και προγραμματίσετε πριν ενεργήσετε.
- 6) **Μην γεμίζεται τις πιπέτες (σιφώνια) ρουφώντας** με το στόμα - χρησιμοποιείτε τις ri-pumps ή roire που σας δίνονται για χρήση με τα σιφώνια. Αν δεν ξέρετε αν κάτι είναι τοξικό ρωτήστε. Ακόμα καλύτερα: Μη ρουφάτε τίποτα με το στόμα.
- 7) **Χρησιμοποιείτε την απαγωγό εστία** και φορέστε γυαλιά ασφαλείας κάθε φορά που χειρίζεστε πολύ καυστικά αντιδραστήρια, π.χ. πυκνά οξέα ή βάσεις, διαλύματα με αποπνικτικούς ατμούς κ.λ.π.
- 8) **Στρέψετε το στόμιο σωλήνων** που θερμαίνονται **μακριά** από σας και άλλα πρόσωπα. Προσοχή πώς πιάνετε θερμά γυαλικά. Μη φέρετε ποτέ εύφλεκτα υλικά (π.χ. αιθανόλη, αιθέρα) κοντά σε γυμνή φλόγα.
- 9) **Αν χύσετε** κάτι σκουπίστε το αμέσως με χαρτοπετσέτα - βρεγμένοι πάγκοι και πατώματα είναι επικίνδυνα. Αν χύσετε κάτι τοξικό αναφέρετέ το αμέσως στον υπεύθυνο του εργαστηρίου.
- 10) **Προσοχή στη χρήση βιολογικών υγρών**, (αίμα, οροί, κ.λ.π.)-μη ρουφάτε τίποτα με το στόμα, φοράτε γάντια και τοποθετείτε τα μεν αναλώσιμα (π.χ. χαρτικά, πλαστικά) που ήρθαν σε επαφή μαζί τους σε ειδικό σάκο απορριμάτων τα δε γυαλικά σε ειδικό δοχείο με απολυμαντικό.
- 11) **Εξοικειωθείτε με την λειτουργία κάθε οργάνου** και ακολουθήστε τις οδηγίες χρήσης του. Αν δεν είστε σίγουροι πως να χρησιμοποιείτε ένα όργανο ή μία συσκευή συμβουλευτείτε ένα μέλος του προσωπικού - έτσι προλαμβάνεται τυχόν βλάβη που μπορεί να προξενηθεί στο όργανο και εσείς έχετε εμπιστοσύνη στα αποτελέσματα που παίρνετε.

- 12) Βεβαιωθείτε ότι ξέρετε πού βρίσκονται στο εργαστήριο και πώς χρησιμοποιούνται ο **πυροσβεστήρας**, το **κουτί πρώτων βοηθειών** και τα **δοχεία για πλύσιμο ματιών**. Γρήγορη αντιμετώπιση ενός μικρού ατυχήματος μπορεί να εμποδίσει την δημιουργία ενός μεγάλου.
- 13) **Στο τέλος** κάθε άσκησης **αφήστε τον πάγκο σας καθαρό και τακτικό**. Ξεπλύνετε όλα τα βρώμικα γυαλικά και τοποθετήστε τα στα δοχεία για πλύσιμο και ακολουθήστε ότι οδηγίες σας δοθούν σχετικά με τα αντιδραστήρια.

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

Οι εργαστηριακές ασκήσεις είναι απαραίτητο συμπλήρωμα των διαλέξεων. Σκοπός τους είναι να σας εξοικειώσουν με την χρήση εργαστηριακών τεχνικών, την χειρισμό οργάνων και την διεξαγωγή διαφόρων δοκιμασιών που χρησιμοποιούνται συχνά στη χημεία, και βιοχημεία καθώς και στο να σας βοηθήσουν να κατανοήσετε μερικές έννοιες που δεν γίνονται σαφώς αντιληπτές θεωρητικά.

Τις ασκήσεις θα τις κάνετε σε ομάδες. Οι ομάδες σχηματίζονται στην αρχή του εξαμήνου και παραμένετε στην ίδια ομάδα όλο το εξάμηνο. Σημειώστε όλοι τα αποτελέσματα καθώς τα παίρνετε σε κάθε άσκηση και δείξτε τα στον υπεύθυνο του εργαστηρίου πριν φύγετε. **Πριν φύγετε υπογράψτε επίσης το παρουσιολόγιο.** Η ευθύνη για να υπογράψετε είναι δική σας αλλιώς θα θεωρηθεί ότι δεν παρακολουθήσατε το εργαστήριο.

Οι παρουσίες στα εργαστήρια, καθώς και η παρουσία και επεξεργασία των αποτελεσμάτων στα φροντιστήρια είναι υποχρεωτικές και η επίδοση σας θα ληφθεί υπόψη στον τελικό βαθμό του μαθήματος, (συνεισφέρει έως ένα 20% στον τελικό βαθμό). Μόνο σε ειδικές περιπτώσεις (λόγοι υγείας) επιτρέπεται έως μία απουσία / εξάμηνο αλλά και τότε πρέπει να γραφεί η εργασία (χρησιμοποιείστε τα αποτελέσματα των άλλων φοιτητών της ομάδας σας).

Δεν επιτρέπεται να εξετασθούν στο μάθημα φοιτητές που δεν έχουν παρακολουθήσει και γράψει όλες τις εργαστηριακές ασκήσεις. Δεν γίνεται εξέταση στο εργαστήριο, αλλά το περιεχόμενο των εργαστηριακών ασκήσεων αποτελεί εξέταστέα ύλη.

Τα **αποτελέσματα** κάθε εργαστηριακής άσκησης τα παρουσιάζετε σε **ειδικά έντυπα** (απαντητικά φυλλάδια) που σας δίνονται στη διάρκεια των **φροντιστηρίων** μετά την γενική συζήτηση των αποτελεσμάτων. Στα έντυπα αναγράφετε το όνομα και τον αριθμό μητρώου σας, τον αριθμό της ομάδας σας, καθώς και τα ονόματα των άλλων δύο φοιτητών και την ημερομηνία διεξαγωγής της άσκησης.

Στη διάρκεια του φροντιστηρίου μεταφέρετε τα πειραματικά δεδομένα που βρήκατε στο προηγούμενο εργαστήριο (παρουσιασμένα σε πίνακες, σχεδιαγράμματα κ.λ.π.) στο απαντητικό φυλλάδιο. Με βάση τα δεδομένα αυτά λύνετε το συγκεκριμένο αναλυτικό πρόβλημα, π.χ. προσδιορισμός άγνωστης συγκέντρωσης και σημειώνετε τα τελικά συμπεράσματα και παρατηρήσεις (π.χ. αν πήρατε τα αναμενόμενα αποτελέσματα, αν όχι γιατί όχι, πηγές πιθανών λαθών στα πειράματα κ.λ.π). Τέλος απαντάτε τυχόν ερωτήσεις που σας ζητούνται. Γενικά στο γράψιμο αποφύγετε πλατειασμούς, επαναλήψεις και ασάφειες. Το ζητούμενο είναι μία συνοπτική παρουσίαση όπου ερμηνεύετε με σαφήνεια τα αποτελέσματά σας.

Τα συμπληρωμένα έντυπα παραδίδονται στο τέλος κάθε φροντιστηρίου. Οι εργασίες θα βαθμολογηθούν με κριτήρια α) ακρίβεια των αποτελεσμάτων, β) κατανόηση του πειράματος και γ) σωστή ερμηνεία των αποτελεσμάτων. **Είναι απαραίτητο ο μέσος όρος της βαθμολογίας των εντύπων να είναι τουλάχιστον πέντε (5) για να θεωρηθεί η παρακολούθηση των εργαστηρίων και φροντιστηρίων επιτυχής.** Τα απαντητικά φυλλάδια δεν επιστρέφονται. Ξεχωριστό φροντιστήριο αφιερώνεται στη συζήτηση των τυπικών πειραματικών σφαλμάτων όπως και των σφαλμάτων στην ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

ΥΔΑΤΙΚΑ ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ

Θεωρητικό μέρος

Διαλύματα ονομάζουμε τα ομογενή συστήματα χημικών ουσιών που έχουν την ίδια χημική σύσταση και τις ίδιες ιδιότητες σε οποιοδήποτε μέρος τους. Συνήθως η ουσία που βρίσκεται στο διάλυμα σε μεγαλύτερη αναλογία ονομάζεται διαλύτης ενώ η άλλη (-ες) ουσία (-ες) διαλυμένη. Ανάλογα με την φάση (στερεά, υγρή ή αέρια) του διαλύτη και της διαλυμένης ουσίας μπορεί να υπάρχουν 9 διαφόρων ειδών διαλύματα (όσοι οι συνδυασμοί των τριών φάσεων μεταξύ τους). Στη Βιοχημεία και Ιατρική μεγαλύτερη σπουδαιότητα έχουν τα υδατικά διαλύματα, δηλαδή διαλύματα όπου μια ουσία είναι διαλυμένη στο νερό.

Σκοπός των σημειώσεων αυτών είναι να εξοικειωθείτε με τους διάφορους τρόπους εκφράσεως της συγκεντρώσεως υδατικών διαλυμάτων και με τις διάφορες ιδιότητες διαλυμάτων που επηρεάζονται από την συγκέντρωση. Οι όροι και έννοιες που αναπτύσσονται παρακάτω χρησιμοποιούνται ευρύτατα στη Χημεία, Βιοχημεία κ.α.

I. Τρόποι εκφράσεως συγκεντρώσεως υδατικών διαλυμάτων

Υπάρχουν διάφοροι τρόποι εκφράσεως της ποσοτικής σύστασης ενός διαλύματος.

1) Μοριακή συγκέντρωση κατ' όγκο (Molarity= $\text{mol/l}=\text{M}$). Αυτή εκφράζει τον αριθμό των γραμμομορίων της διαλυμένης ουσίας σε 1 λίτρο διαλύματος (όχι διαλύτου). Έτσι 1M διάλυμα CaCl_2 περιέχει 111g CaCl_2 σε 1000ml διαλύματος. Η παρασκευή τέτοιων διαλυμάτων είναι εύκολη αλλά έχει το μειονέκτημα ότι η συγκέντρωση εξαρτάται από την θερμοκρασία (μεταβολή του όγκου). Συνήθως αναφέρεται σε θερμοκρασία 25°C , εκτός αν ορίζεται μια άλλη θερμοκρασία. [Υπενθυμίζεται ότι ένα γραμμομόριο (mole)= 6×10^{23} μόρια (αριθμός Avogadro)].

2) Μοριακή συγκέντρωση κατά βάρος (Molality= m). Αυτή εκφράζει τον αριθμό των γραμμομορίων της διαλυμένης ουσίας σε 1kg διαλύτου (όχι διαλύματος). Έτσι 1m διάλυμα CaCl_2 περιέχει 111g CaCl_2 σε 1000g νερό. Η συγκέντρωση τέτοιων διαλυμάτων δεν εξαρτάται από την θερμοκρασία.

3) Κανονικότητα διαλύματος (Normality= $\text{Eq/l}=\text{N}$). Αυτή εκφράζει τον αριθμό των γραμμοϊσοδύναμων της διαλυμένης ουσίας σε 1 λίτρο διαλύματος (όπου γραμμοϊσοδύναμο = μοριακό βάρος ουσίας δια του συνόλου των θετικών ή αρνητικών φορτίων n , $\therefore \text{N} = \text{M}/n$). Έτσι 1N διάλυμα CaCl_2 περιέχει:

$$\frac{111}{2} = 55\text{g } \text{CaCl}_2 \text{ σε } 1000\text{ml διαλύματος.}$$

4) Σύσταση κατά βάρος (w/w). Αυτή εκφράζει την ποσότητα της διαλυμένης ουσίας συνήθως σε γραμμάρια ανά μονάδα βάρους διαλύματος (συνήθως 100g), π.χ. 5%(w/w) διάλυμα NaCl περιέχει 5g NaCl σε 100g διαλύματος.

5) Σύσταση κατά όγκο (v/v). Αυτή εκφράζει τον όγκο της διαλυμένης ουσίας (σε ml) ανά μονάδα όγκου του διαλύματος (συνήθως 100ml), π.χ. ένα 10%(v/v) διάλυμα αιθανόλης περιέχει 10ml αιθανόλης σε 100ml διαλύματος.

6) Σύσταση βάρος προς όγκο (w/v). Αυτή εκφράζει την ποσότητα της διαλυμένης ουσίας (συνήθως σε γραμμάρια) σε μια μονάδα όγκου του διαλύματος

(συνήθως 100ml), π.χ. ένα 5%(w/v) διάλυμα NaCl περιέχει 5g NaCl σε 100ml διαλύματος.

7) % **Κορεσμός** = η συγκέντρωση άλατος στο διάλυμα σαν ένα ποσοστό της μέγιστης δυνατής συγκέντρωσης στη δεδομένη θερμοκρασία. Χρησιμοποιείται για να εκφραστεί η συγκέντρωση ενός άλατος (π.χ. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) που απαιτείται για να επιτευχθεί ο καθαρισμός πρωτεϊνών με διαφορική καθίζηση (εξαλάτωση). Για να αποφευχθούν μεγάλες αλλαγές όγκων που συμβαίνουν με την προσθήκη άλατος χρειάζεται να ξέρουμε και τον ειδικό όγκο του άλατος, v = όγκος (ml) που έχει 1g άλατος (αντίστροφο πυκνότητας).

II. Αλλαγές συγκεντρώσεως - μέθοδος αραιώσεως διαλυμάτων

Μια εύκολη μέθοδος για να αλλάξουμε την συγκέντρωση ενός διαλύματος αποτελεί η αραιώση. Για να μετατρέψουμε ένα πυκνό διάλυμα σε αραιότερο χρησιμοποιούμε την εξίσωση :

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

όπου V_1 = όγκος (συνήθως σε ml) και C_1 = συγκέντρωση (σε mol/l ή Eq/l ή w/v κ.λ.π.) του πυκνού διαλύματος και V_2 και C_2 όγκος και συγκέντρωση του αραιού διαλύματος εκφρασμένες στις ίδιες μονάδες.

Παράδειγμα: Έχετε ένα διάλυμα 5% (w/v) NaCl και θέλετε να παρασκευάσετε 10ml ενός 0,154% (w/v) διαλύματος NaCl. Πόσα ml του αρχικού διαλύματος πρέπει να χρησιμοποιήσετε;

Στην εξίσωση $V_1 \times C_1 = V_2 \times C_2$ αντικαταστήστε τις γνωστές τιμές και λύνετε ως προς V_1 που είναι το άγνωστο:

$$V_1 \text{ (ml)} = \frac{V_2 \text{ (ml)} \times C_2 \text{ (w/v)}}{C_1 \text{ (w/v)}} = \frac{10 \times 0,154}{5} = 0,308 \text{ ml}$$

III. Ωσμωμοριακότητα (OSMOLARITY) διαλυμάτων

Η **ωσμωτική πίεση Π**, που εξασκούν τα μόρια μιας διαλυμένης ουσίας δίνεται από την σχέση

$$\Pi V = nRT = \frac{g}{MB} RT$$

όπου V = ο όγκος του διαλύματος στον οποίο είναι διαλυμένα n moles (= γραμμάρια διάμοριακό βάρος) ουσίας και όπου R = παγκόσμια σταθερά των αερίων και T = η απόλυτη θερμοκρασία. Όπως φαίνεται η ωσμωτική πίεση εξαρτάται από την συγκέντρωση (mol/l) της διαλυμένης ουσίας. Αν όμως η ουσία που διαλύεται είναι ηλεκτρολύτης τότε δίσταται σε δύο ή περισσότερα ιόντα που συμπεριφέρονται σαν ξεχωριστές μονάδες και σαν αποτέλεσμα η ωσμωτική πίεση είναι πολλαπλάσια (ανάλογα με τον αριθμό των ιόντων που προκύπτουν) από αυτήν που θα είχαμε αν διαλύαμε, τον ίδιο αριθμό μορίων μιας ουσίας που δεν είναι ηλεκτρολύτης. Γι' αυτό χρησιμοποιούμε τον όρο **ωσμωμοριακότητα** (osmolarity) = μοριακότητα (molarity) των ξεχωριστών μονάδων που υπάρχουν στο διάλυμα. Για ουσίες που δεν δίστανται ωσμωμοριακότητα = μοριακότητα. Για ηλεκτρολύτες που δίστανται πλήρως (π.χ. άλατα) ωσμωμοριακότητα = μοριακότητα $\times n$ (όπου n = αριθμός των ιόντων που προκύπτουν από το μόριο του ηλεκτρολύτη). Το πλάσμα του αίματος είναι 0,308 Osmolar. **Ισότονα** είναι τα διαλύματα

που έχουν ωσμωμοριακότητα 0,308 Osmolar, διότι όταν τα κύτταρα αιωρούνται σε τέτοια διαλύματα ούτε συρρικνώνονται ούτε διογκώνονται. Διαλύματα με ωσμωμοριακότητα μεγαλύτερη ή μικρότερη του 0,308 Osmolar, καλούνται, αντίστοιχα, υπέρτονα ή υπότονα.

IV) Ενεργότητα (α) διαλυμάτων ηλεκτρολυτών

Παρόλο που οι ισχυροί ηλεκτρολύτες δίστανται πλήρως σε υδατικά διαλύματα, η φαινομενική ή δραστική τους συγκέντρωση είναι μικρότερη από την πραγματική, λόγω διαφόρων ηλεκτροστατικών επιδράσεων ανάμεσα στα ιόντα της διαλυμένης ουσίας. Π.χ. ένα 0,1M διάλυμα HCl συμπεριφέρεται σαν να περιέχει μόνο 0,086M H⁺. Γι' αυτό είναι σωστότερο σε υδατικά διαλύματα αντί για τον όρο συγκέντρωση C (πραγματική μοριακότητα) να χρησιμοποιούμε τον όρο **ενεργότητα α (activity)** όπου $\alpha = \gamma C$ και $\gamma =$ **συντελεστής ενεργότητας (activity coefficient)**. Οι τιμές του γ είναι πάντα μικρότερες από την μονάδα και τείνουν προς το 1 σε πολύ αραιά διαλύματα (π.χ. στο προηγούμενο παράδειγμα $\gamma = 0,86$). Για αραιά υδατικά διαλύματα σε θερμοκρασία 25°C ο συντελεστής ενεργότητας γ ενός ιόντος που έχει φορτίο Z εξαρτάται από μια άλλη παράμετρο, την ιοντική ισχύ (I) του διαλύματος, σύμφωνα με την σχέση: $-\log \gamma = 0,51Z^2 \sqrt{I}$

V) Ιοντική Ισχύς (I) διαλυμάτων

Η **ιοντική ισχύς I (ionic strength)** ενός διαλύματος δίνεται από την σχέση $I = 0,5 \sum M_i Z_i^2$ όπου Σ = άθροισμα, M_i = μοριακότητα ιόντος, Z_i = καθαρό φορτίο ιόντος. Έτσι π.χ. η ιοντική ισχύς ενός 0,1M διαλύματος CaCl₂ είναι:

$$I = 0,5 \Sigma [(0,1 \times 4) + (0,2 \times 1)] = 0,5 \times 0,6 = 0,3$$

Η σχέση ανάμεσα στο είδος (καθαρό φορτίο ιόντων) και στην ιοντική ισχύ αλάτων είναι η εξής:

<u>Είδος</u>	<u>Άλας</u>	<u>Παράδειγμα</u>	<u>Ιοντική Ισχύς</u>
1 : 1		KCl	1xM
2 : 1		CaCl ₂	3xM
2 : 2		MgSO ₄	4xM
3 : 1		FeCl ₃	6xM
3 : 2		Fe ₂ (SO ₄) ₃	15xM

Η ιοντική ισχύς, και επομένως και η ενεργότητα των ηλεκτρολυτών, ενός διαλύματος έχει σημασία διότι επηρεάζει π.χ. την συμπεριφορά των μορίων κατά τον ηλεκτροφορητικό ή χρωματογραφικό διαχωρισμό τους.

ΑΣΚΗΣΗ 1^η

ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ - ΦΑΣΜΑΤΟΦΩΤΟΜΕΤΡΙΑ

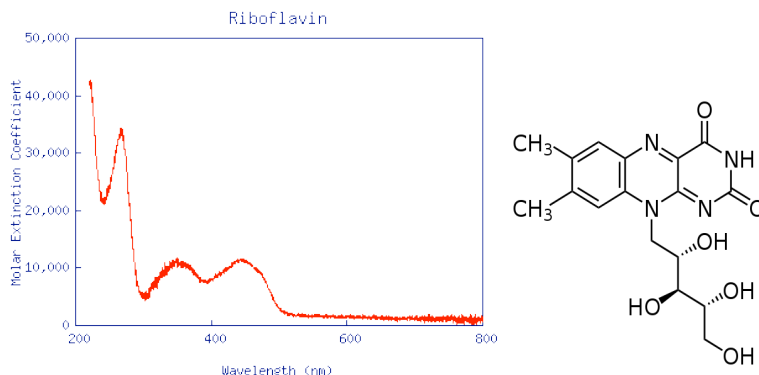
Θεωρητικό μέρος

Όταν ορατό (λευκό) φως περάσει από ένα γυάλινο πρίσμα αναλύεται σε ένα συνεχές φάσμα από φωτεινές ακτινοβολίες που έχουν διαφορετικά μήκη κύματος ($\lambda=390-770$ nm) και διαφορετικά χρώματα (ιώδες - ερυθρό). Αν, πριν περάσει από το πρίσμα, το λευκό φως προσπέσει σε διάλυμα μιας έγχρωμης ουσίας τότε το ορατό φάσμα παρουσιάζει μερικές σκοτεινές γραμμές ή ταινίες που αντιστοιχούν στις ακτινοβολίες που απορροφούνται από την ουσία. Το τροποποιημένο αυτό φάσμα που προκύπτει είναι χαρακτηριστικό της ουσίας και λέγεται φάσμα απορροφήσεως. Από τις διάφορες ακτινοβολίες που απορροφούνται από μια ένωση το μήκος κύματος της ακτινοβολίας που απορροφάται σε μεγαλύτερο ποσοστό καλείται μήκος κύματος μέγιστης απορροφήσεως (λ_{max}) και είναι επίσης χαρακτηριστικό της συγκεκριμένης ένωσης. Το χρώμα μιας ουσίας οφείλεται στις ακτινοβολίες που δεν απορροφούνται, δηλαδή στα παρατηρούμενα (συμπληρωματικά) χρώματα που δίνονται στον πίνακα.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΧΡΩΜΑΤΩΝ

Μήκος κύματος (nm)	Χρώμα που απορροφάται	Χρώμα που παρατηρείται
400	ιώδες	πράσινο-κίτρινο
480	κυανούν	κίτρινο
530	πράσινο	πορφυρούν (magenta)
580	κίτρινο	κυανούν
610	πορτοκαλί	πράσινο-κυανούν
660	κόκκινο	κυανούν-πράσινο
720	πορφυρό-κόκκινο	πράσινο

Στο Σχήμα 1 απεικονίζεται το φάσμα απορροφήσεως της ριβοφλαβίνης(βιταμίνη B2), δηλαδή η γραφική παράσταση που απεικονίζει το ποσοστό της ακτινοβολίας που απορροφάται από το διάλυμα της ουσίας (A) σε διάφορα μήκη κύματος (λ). Η ουσία αυτή στο ορατό φάσμα έχει μέγιστο απορροφήσεως στα 450nm (κυανούν χρώμα) και το υπόλοιπο φάσμα που εξέρχεται έχει κίτρινο χρώμα, γι' αυτό η ουσία είναι κίτρινη.



Σχήμα 1: Φάσμα απορρόφησης της ριβοφλαβίνης (συγκέντρωση 22μΜ σε 0,1Μ φωσφορικού νατρίου pH 7,06 σε μήκος κυψελίδας 1cm).

Εκτός από ορατή ακτινοβολία διάφορες χημικές ενώσεις απορροφούν ακτινοβολίες στην περιοχή του υπεριώδους (200-390nm) και υπερύθρου (770-1000nm) φωτός. Η φασματοφωτομετρία ασχολείται με τη μελέτη απορρόφησης της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας από την ύλη και ανάλογα με την περιοχή του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος που χρησιμοποιείται διακρίνεται σε φασματοσκοπία υπεριώδους (**UV**), ορατού (**Vis**) ή υπερύθρου (**IR**) ακτινοβολίας. Η φασματοφωτομετρία βρίσκει αναλυτικές εφαρμογές (ανίχνευση, ταυτοποίηση και ποσοτικός προσδιορισμός) στη χημεία, κλινική χημεία και άλλα επιστημονική πεδία.

Η ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία που απορροφάται από μία ουσία μπορεί, ανάλογα με την ενέργεια που διαθέτει, να προκαλέσει διάσπαση μοριακών δεσμών (π.χ. ακτίνες X), διέγερση ηλεκτρονίων σθένους από τη θεμελιώδη στάθμη ενέργειας σε άλλη επιτρεπτή στάθμη ανώτερης ενέργειας (π.χ. ακτίνες υπεριώδους και ορατού φωτός), ή δόνηση και περιστροφή των ατόμων στο μόριο (π.χ. ακτινοβολία υπερύθρου, μικροκυμάτων). Τα φωτόνια λευκού φωτός που απορροφούνται από μια συγκεκριμένη ένωση έχουν ενέργεια που αντιστοιχεί στη διαφορά ενέργειας που απαιτείται για να μετακινηθούν ηλεκτρόνια από δεσμικά (ή αδεσμικά) σε αντιδεσμικά μοριακά τροχιακά κατάλληλης ενέργειας. Τέτοια τροχιακά εμφανίζουν κυρίως μόρια που περιέχουν ακόρεστα συστήματα συζευγμένων διπλών δεσμών (χρωματοφόρες ομάδες) και σε αυτά οφείλονται τα χαρακτηριστικά φάσματα απορρόφησης που παρατηρούνται σε μήκος κύματος 200-1000nm.

Το ποσοστό μονοχρωματικής ακτινοβολίας που απορροφάται από το διάλυμα μιας ουσίας είναι συνάρτηση της συγκέντρωσης του διαλύματος, της διαδρομής της ακτινοβολίας μέσα στο διάλυμα, της φύσης της διαλυμένης ουσίας και του μήκους κύματος της ακτινοβολίας και δίνεται από το νόμο των **Lambert-Beer**:

$$\text{Log} \frac{I_0}{I} = KCI$$

όπου: I_0 = η ένταση της ακτινοβολίας που προσπίπτει στο διάλυμα

I = η ένταση της ακτινοβολίας που εξέρχεται από το διάλυμα

K = συντελεστής απορρόφησης (σταθερά χαρακτηριστική της ουσίας, του μήκους κύματος της ακτινοβολίας που χρησιμοποιήθηκε και των συνθηκών της μέτρησης, όπως διαλύτης, pH, κ.λ.π.)

C = η συγκέντρωση της ουσίας στο διάλυμα.

l = το μήκος της διαδρομής που κάνει η ακτινοβολία μέσα στο διάλυμα (το

πάχος της κυψελίδας στην οποία βρίσκεται το διάλυμα).

Ο όρος $\text{Log} \frac{I_0}{I}$ ονομάζεται **απορρόφηση (absorbance - A)** ή **απόσβεση (extinction -E)** ή **οπτική πυκνότητα (optical density -O.D.)**

Στην πράξη η απορρόφηση μιας ουσίας σε διάλυμα δεν υπολογίζεται άμεσα, από το I & I₀, αλλά έμμεσα με την χρήση ενός **τυφλού διαλύματος (blank)**. Φωτομετρούμε δηλαδή, σε μια όμοια κυψελίδα και κάτω από όμοιες συνθήκες, την απορρόφηση του διαλύματος, που περιέχει όλα τα συστατικά εκτός από την ουσία που επιθυμούμε να προσδιορίσουμε και ρυθμίζουμε το όργανο ώστε A (τυφλό) = 0.

Επειδή η απορρόφηση δεν έχει διαστάσεις ο συντελεστής απορρόφησης K εκφράζεται σε lit/moles x μήκος, δηλαδή M⁻¹ cm⁻¹:

$$K = \frac{A}{C \times l}$$

Αν η συγκέντρωση C της ουσίας στο διάλυμα είναι 1 mole ανά λίτρο και το μήκος της διαδρομής, l, είναι 1cm τότε ο συντελεστής απορρόφησης της ουσίας που μετριέται στο λmax

καλείται **συντελεστής μοριακής απορρόφησης** και συμβολίζεται με E^{1M}_{1cm} (ή ε), π.χ. για το NADH E^{1M}_{1cm} = 6200.

Ο όρος **I/I₀** καλείται **διαπερατότητα (transmittance)**, συμβολίζεται με T και συνδέεται με την απορρόφηση με τη σχέση:

$$A = -\log T$$

∴ Όταν δεν παρατηρείται απορρόφηση ακτινοβολίας από ένα διάλυμα τότε I = I₀, A = 0 και T = 1.

Κάθε διάλυμα που απορροφά ακτινοβολία έχει διαπερατότητα μικρότερη από 1 (αν A>0 τότε T<1). Για ευκολία η διαπερατότητα εκφράζεται στα %, οπότε όταν T=1, %T=100%. Αξίζει να σημειωθεί ότι ενώ η απορρόφηση είναι γραμμική συνάρτηση της συγκέντρωσης μιας ουσίας, η διαπερατότητα είναι εκθετική συνάρτηση. Έτσι ενώ η απορρόφηση μιας ουσίας που έχει συγκέντρωση 1C, 3C, nC είναι A₁, 3A₁, nA₁, η διαπερατότητα είναι T₁, T₁³, T₁ⁿ.

Η φωτομετρία είναι πολύτιμη μέθοδος για τους βιοχημικούς γιατί επιτρέπει τον **ποιοτικό (ταυτοποίηση, ανίχνευση)** και τον **ποσοτικό προσδιορισμό** μιας ουσίας σε διάλυμα, με την χρήση της καμπύλης του φάσματος απορροφήσεως και της καμπύλης αναφοράς (πρότυπης καμπύλης).

Όπως έχουμε ήδη δει (Σχήμα 1) η καμπύλη φάσματος απορροφήσεως είναι η συνάρτηση A=f(λ), η οποία χρησιμεύει στην ταυτοποίηση μιας ένωσης και στον προσδιορισμό του λmax (του μήκους κύματος στο οποίο η ένωση έχει την μέγιστη απορρόφηση). Το λmax πρέπει να χρησιμοποιείται στους ποσοτικούς προσδιορισμούς γιατί σ' αυτό το μήκος κύματος μεγιστοποιείται η ευαισθησία της μεθόδου.

Η **καμπύλη αναφοράς (πρότυπη καμπύλη)** είναι η γραφική παράσταση που απεικονίζει το ποσοστό της ακτινοβολίας που απορροφάται από το διάλυμα μιας ουσίας (A) σε μήκος κύματος λmax σε σχέση με την συγκέντρωση της ουσίας (C) (Σχήμα 2). Η

συνάρτηση $A=f(C)$ χρησιμεύει στο να διαπιστώσουμε αν η ουσία που εξετάζουμε ακολουθεί τον νόμο Lambert-Beer και στο να υπολογίσουμε την συγκέντρωση της ουσίας σ' ένα διάλυμα της άγνωστης συγκέντρωσης.

Για να κατασκευάσουμε μια πρότυπη καμπύλη, φωτομετρούμε την απορρόφηση A_1, A_2, A_n , διαφορετικών αλλά γνωστών συγκεντρώσεων διαλυμάτων της ουσίας C_1, C_2, C_n , σημειώνουμε σε χιλιοστομετρικό χαρτί την τιμή της απορρόφησης κάθε δείγματος (τεταγμένη) σε συνάρτηση με τη γνωστή του συγκέντρωση (τετμημένη) και ενώνουμε τα σημεία. (Το τυφλό έχει $A=0, C=0$). Εφ' όσον η ουσία που εξετάζουμε ακολουθεί τον νόμο Lambert-Beer η καμπύλη που προκύπτει είναι μια ευθεία γραμμή ή μια άκρη της οποίας περνά από το μηδέν. Για να προσδιορίσουμε μια άγνωστη συγκέντρωση (χ) της ουσίας φωτομετρούμε το δείγμα με την άγνωστη συγκέντρωση και σημειώνουμε την απορρόφηση του ($A\chi$). Από την τιμή $A\chi$ στον άξονα της απορρόφησης φέρνουμε μια οριζόντια γραμμή η οποία τέμνει την πρότυπη καμπύλη στο σημείο ψ και κατόπιν από το σημείο ψ μια γραμμή κάθετο προς την τετμημένη. Το σημείο $C\chi$ στο οποίο η κάθετος τέμνει τον άξονα της συγκεντρώσεως είναι η συγκέντρωση χ του διαλύματος που φωτομετρήσαμε. Συχνά σε πολύ ψηλές συγκεντρώσεις ουσίας, η σχέση $A=f(C)$ παύει να είναι γραμμική (Σχήμα 3). Η περιοχή αυτή της πρότυπης καμπύλης δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό άγνωστης συγκεντρώσεως ουσίας, διότι δεν ακολουθείται πια ο νόμος των Lambert-Beer.

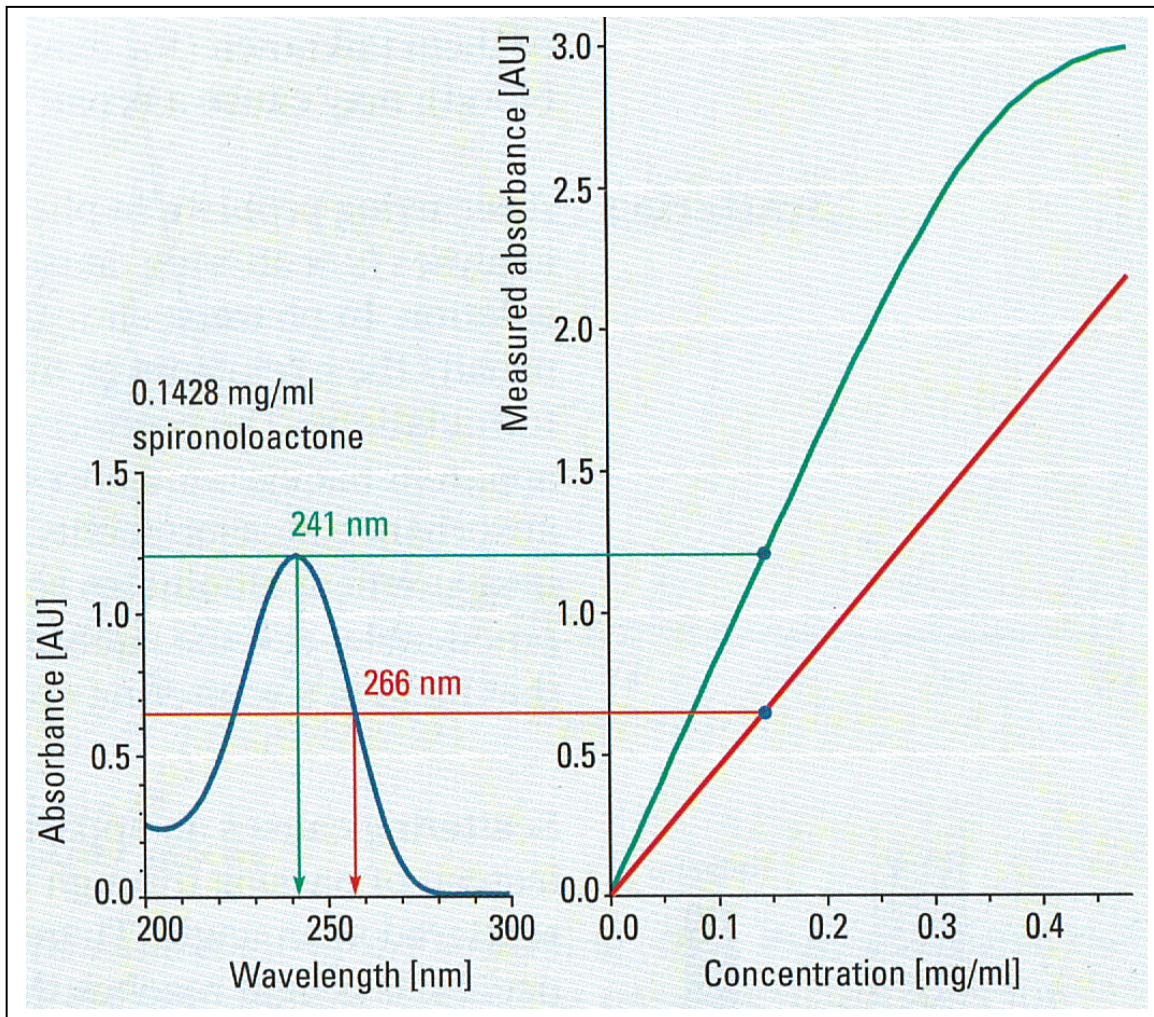
Συχνά αντί για πρότυπη καμπύλη βρίσκουμε την απορρόφηση $A\chi$ του δείγματος ουσίας (άγνωστης συγκέντρωσης $C\chi$) σε σύγκριση με την απορρόφηση $A\pi$ πρότυπου διαλύματος (συχνά αποκαλούμενου μάρτυρα) της ίδιας ουσίας γνωστής συγκέντρωσης $C\pi$ που μετράμε στις ίδιες ακριβώς συνθήκες.

Εφ' όσον η απορρόφηση είναι ευθέως ανάλογη προς την συγκέντρωση η C/A είναι σταθερά:

$$\frac{C\pi}{A\pi} = \frac{C\chi}{A\chi} = K \quad \therefore C\chi = \frac{A\chi}{A\pi} \times C\pi$$

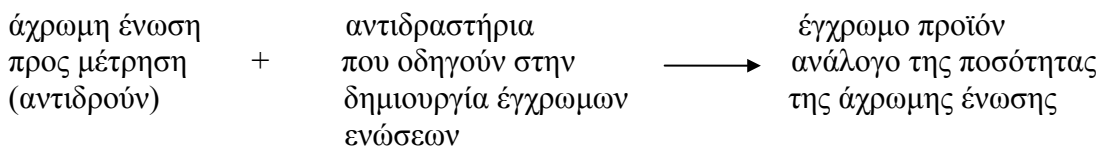
Ο προσδιορισμός της άγνωστης συγκέντρωσης μιας ουσίας με την χρήση καμπύλης αναφοράς είναι πιο ακριβής παρά με τη χρήση πρότυπου διαλύματος της ουσίας, γιατί βασίζεται σε πολλαπλές μετρήσεις κι έτσι ελαχιστοποιούνται τυχόν σφάλματα.

Μερικές φορές παρατηρούνται παρεκλίσεις από τον νόμο Lambert-Beer που μπορεί να οφείλονται στο ότι η ακτινοβολία που προσπίπτει δεν είναι μονοχρωματική, ή το μήκος κύματος δεν είναι το λ_{max} , ή ότι η ουσία αλλάζει απορρόφηση με την αραίωση επειδή διίσταται σε ιόντα ή συσσωματώνεται. Για να αποφευχθεί το τελευταίο είναι προτιμότερο να μετριέται η απορρόφηση σε δύο ή περισσότερες συγκεντρώσεις όταν προσδιορίζουμε τον συντελεστή απορρόφησης.



Σχήμα 3 Φάσμα απορρόφησης μιας ουσίας(δεξιά) και πρότυπες καμπύλες (αριστερά) που παρασκευαστήκαν σε $\lambda_{max} = 241\text{nm}$ και $\lambda = 266\text{nm}$

Εκτός από την άμεση ποσοτική μέτρηση έγχρωμων ουσιών υπάρχει και η έμμεση φωτομετρία για ουσίες που δεν απορροφούν ορατό φως. Στην βιοχημεία χρησιμοποιούμε συχνά δοκιμές όπου από μια αρχικά άχρωμη ουσία σχηματίζεται μια έγχρωμη ουσία σαν αποτέλεσμα χημικής αντίδρασης:

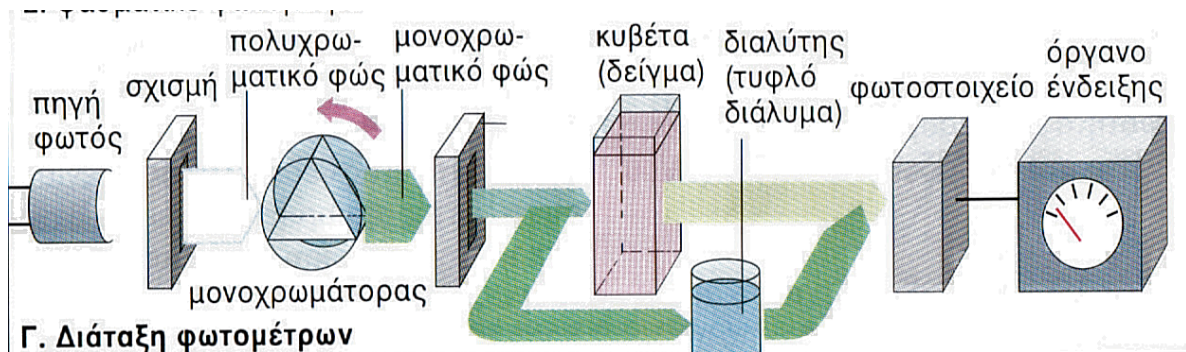


Τέτοιες έμμεσες δοκιμές συχνά δίνουν καμπύλες αναφοράς (Σχήμα 3) που αποτελούνται από μία γραμμική και από μία μη γραμμική περιοχή, που μπορεί να οφείλεται

είτε στην έλλειψη αντιδραστηρίων που δημιουργούν το χρώμα, είτε στην συγκέντρωση της ουσίας. Αντιδράσεις που δίνουν τιμές απορρόφησης εκτός της γραμμικής κλίμακας

πρέπει να επαναληφθούν με μικρότερες ποσότητες ουσίας (περίσσεια αντιδραστηρίων) για να πάρουμε τιμές εντός των ορίων της πρότυπης καμπύλης όπου η σχέση είναι γραμμική.

Το φασματοφωτόμετρο: Τα απλούστερα όργανα τα οποία μετρούν φάσματα της περιοχής ορατού φωτός είναι τα φωτόμετρα, στα οποία η επιλογή μήκους κύματος γίνεται με έγχρωμα φίλτρα και τη μονοχρωματική δέσμη που προκύπτει έχει εύρος δέσμης 5-10nm. Τα φασματοφωτόμετρα είναι πιο ακριβή και ευαίσθητα όργανα. Σε γενικές γραμμές ένα φασματοφωτόμετρο (Σχήμα 4) αποτελείται από 1) **μία πηγή φωτός** που συνήθως είναι μία λυχνία βολφραμίου, για την παροχή ορατής και εγγύς I.R. ακτινοβολίας, ή μια λυχνία δευτερίου, για την εκπομπή υπεριώδους ακτινοβολίας, 2) έναν επιλογέα μήκους κύματος, γνωστό ως **μονοχρωμάτορα** (monochromator), που είναι ένα πρίσμα η παραθλαστική εσχάρα (diffraction grating) στο οποίο το φως της ακτινοβόλου πηγής αναλύεται σε διάφορα μήκη κύματος και επιλέγεται το επιθυμητό μήκος κύματος με ακρίβεια της τάξεως των 1nm, 3) μία **σχισμή** (slit) μεταβλητού εύρους που κανονίζει την ένταση του προσπίπτοντος φωτός (I_0), 4) ένα **σύστημα υποδοχής του δείγματος**, που συνήθως είναι ένας κυλινδρικός σωλήνας ή μία τετράγωνη κυψελίδα γνωστής διαμέτρου, κατασκευασμένου από καθαρό γυαλί ή χαλαζία για να έχει ελάχιστη απορρόφηση στην ορατή και υπεριώδη περιοχή του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος, αντίστοιχα, 5) έναν **ανιχνευτή** (detector) που αποτελείται από ένα φωτοκύτταρο ή φωτοπολλαπλασιαστή (photocell ή photomultiplier), που μετατρέπει την ακτινοβολία που εξέρχεται από το δείγμα σε ηλεκτρική ενέργεια η οποία μετρίεται με 6) ένα **όργανο ένδειξης** που μπορεί να εκφράσει τις μετρήσεις σε τιμές απορρόφησης και διαπερατότητας.



Σχήμα 4. Γενική διάταξη ενός φασματοφωτομέτρου.

Οδηγίες για τη χρήση του φωτόμετρου

- Ακολουθήστε τις οδηγίες που είναι αναρτημένες δίπλα στο όργανο = (Cecil ή Spectronic 20 D).
- Επιπλέον τονίζονται τα ακόλουθα:
- Ρυθμίστε το φωτόμετρο ώστε όταν δεν υπάρχει φως (ρεύμα μέλανος φωτός=dark current) να δείχνει $T = 0\%$ και $A = \infty$
- Χρησιμοποιήστε καθαρές κυψελίδες ή σωλήνες που όταν είναι άδειες έχουν ίση απορρόφηση.
- Ρυθμίστε το φωτόμετρο με την κυψελίδα ή τον σωλήνα που περιέχει το τυφλό ώστε να δείχνει $T = 100\%$ και $A = 0$.
- **Κάθε φορά που επιλέγετε διαφορετικό μήκος κύματος ξαναρυθμίστε το όργανο με το τυφλό.**

Πειραματικό μέρος

Υλικά:

- 1 Φωτόμετρο
 - 1 Στατώ με 8 σωλήνες φωτομέτρου
 - 1 Κωνική φιάλη 100ml με αποσταγμένο νερό
 - 1 Υδροβολέας
 - 1 Μαρκαδόρος
 - 2 Σιφόνια των 2ml
 - 3 Σιφόνια των 5ml,
 - 2 pi-pumps για μικρά και μεγάλα σιφόνια
 - 10ml διάλυμα 1mM KMnO_4
 - 10ml » 1M $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
 - 5ml » άγνωστης συγκέντρωσης KMnO_4
 - 5ml » » » CuSO_4
-] σε δοκιμαστικούς
σωλήνες

1) Προσδιορισμός φάσματος απορρόφσεως υδατικού διαλύματος xmM KMnO_4 (ή CuSO_4)

Σε δύο κυψελίδες, τις οποίες αγγίζετε από τη χαραγμένη επιφάνεια, προσθέσετε στην μια (Τυφλό) 3ml H_2O και στην άλλη (Δείγμα) 3ml υδατικού διαλύματος xmM KMnO_4 . Σκουπίστε ελαφρά το εξωτερικό των κυψελίδων με χαρτομάντηλο, για να αφαιρεθούν τυχόν σταγόνες, δακτυλικά αποτυπώματα κ.λ.π. και τοποθετήστε τις δυο κυψελίδες μέσα στο όργανο.

Ρυθμίστε το φασματοφωτόμετρο σύμφωνα με τις οδηγίες και ορίστε το μήκος κύματος στα 400nm. Τοποθετήστε την κυψελίδα με το τυφλό στην οπτική διαδρομή και ρυθμίστε την απορρόφηση ώστε να είναι 0, πατώντας το πλήκτρο zero. Μετακινήστε την κυψελίδα που περιέχει το δείγμα στην οπτική διαδρομή και σημειώστε την απορρόφηση που δείχνει (A δείγμα στα 400nm). Επαναλάβετε τις φωτομετρήσεις, μεταβάλλοντας κάθε φορά το μήκος κύματος κατά 20nm, έως $\lambda = 700\text{nm}$, και μηδενίζοντας το όργανο με το τυφλό για κάθε μεταβολή του μήκους κύματος. Καταγράψτε σε πίνακα τις τιμές A που αντιστοιχούν σε κάθε μήκος κύματος.

Επαναλάβετε την άσκηση με το υδατικό διάλυμα xM CuSO_4 .

- Στο **Φροντιστήριο** : Κατασκευάστε την καμπύλη του φάσματος απορρόφησης του α) mM KMnO₄ και β) mM CuSO₄ σε χιλιοστομετρικό χαρτί και σημειώστε το λ_{max} που βρήκατε.

2) **Κατασκευή πρότυπης καμπύλης υδατικού διαλύματος KMnO₄ (CuSO₄)**

Σε 6 αριθμημένους δοκιμαστικούς σωλήνες προσθέσετε τα κάτωθι αντιδραστήρια:

Αντιδραστήρια (ml)	σωλ. 1	σωλ. 2	σωλ. 3	σωλ. 4	σωλ. 5	σωλ. 6
H ₂ O	6,0	5,4	5,1	4,8	4,5	4,2
Διάλυμα 1mM KMnO ₄	-	0,6	0,9	1,2	1,5	1,8

Ανακινείστε το περιεχόμενο κάθε φωτομετρικού σωλήνα και, χρησιμοποιώντας τον σωλήνα 1 σαν τυφλό, φωτομετρήστε στο μήκος κύματος της μέγιστης απορρόφησης που προσδιορίσατε προηγουμένως. Σημειώστε την απορρόφηση που δείχνει κάθε σωλήνας.

Επαναλάβετε την άσκηση με το υδατικό διάλυμα 1M CuSO₄ .

- Στο **Φροντιστήριο** : Κατασκευάστε την πρότυπη καμπύλη του υδατικού διαλύματος α) KMnO₄, β) CuSO₄ .
- Προσδιορίστε τη συγκέντρωση των άγνωστων διαλυμάτων.

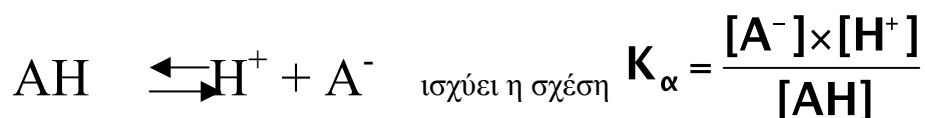
ΑΣΚΗΣΗ 2^η

ΗΛΕΚΤΡΟΛΥΤΕΣ - ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΑ ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ - ΜΕΤΡΗΣΗ pH

Θεωρητικό Μέρος

pK_α και pH

Σύμφωνα με τον ορισμό BRONSTED-LOWRY οξύ είναι μία ουσία που είναι δότης πρωτονίων. Για ένα οξύ που δίδεται σύμφωνα με την εξίσωση



(όπου [AH] – συγκέντρωση του οξέος, [A⁻] - συζυγής βάσης του οξέος και K_α = σταθερά διαστάσεως οξέος). Τα ισχυρά οξέα δίδονται σχεδόν τελείως στο νερό ενώ τα ασθενή οξέα ιονίζονται σε πολύ μικρότερο βαθμό, δηλαδή η K_α ενός ασθενούς οξέος <<1. Για να αποφεύγουμε τους εκθετικούς αριθμούς συνήθως χρησιμοποιούμε τον αρνητικό δεκαδικό λογάριθμο της K_α που συμβολίζουμε σαν pK_α ∴ pK_α = -logK_α. Είναι φανερό ότι όσο ασθενέστερο είναι το οξύ τόσο μεγαλύτερη είναι η pK_α, και αντιστρόφως.

Το νερό συμπεριφέρεται σαν ασθενές οξύ και το γινόμενο ιόντων του ύδατος, K_w, στους 25°C είναι 10⁻¹⁴ (όπου K_w = [H⁺]x[OH⁻]). Ο αρνητικός δεκαδικός λογάριθμος της συγκεντρώσεως ιόντων υδρογόνου ορίζεται ως το pH ενός διαλύματος.

∴ pH = -log [H⁺] και κατά συνέπεια pK_w = pH + pOH = 14. Έπεται ότι όταν το pH = 7, το pOH = 7 και ότι το διάλυμα είναι ουδέτερο. Σε όξινα διαλύματα το pH είναι <7 και σε αλκαλικά διαλύματα το pH είναι >7. Αν έχουμε ένα υδατικό διάλυμα ασθενούς μονοβασικού οξέος, του οποίου ξέρουμε την συγκέντρωση και την pK_α, μπορούμε να υπολογίσουμε το pH του διαλύματος από την σχέση pH = 1/2 pK_α - 1/2 log [AH]

Ρυθμιστικά διαλύματα

Ένα ρυθμιστικό σύστημα (Buffer) αποτελείται συνήθως από ένα οξύ AH και την συζυγή του βάση A⁻ (ή από μία ασθενή βάση και το συζυγές της οξύ) και έχει την ικανότητα να αντιστέκεται μικρές αλλαγές του pH στην περιοχή που αντιστοιχεί στην pK_α του. Τα ρυθμιστικά διαλύματα έχουν μεγάλη σημασία για την διατήρηση του pH των ζωντανών οργανισμών μέσα στα φυσιολογικά όρια. Στον άνθρωπο το κυριότερο ενδοκυτταρικό ρυθμιστικό σύστημα είναι το H₂PO₄⁻ (οξύ) / HPO₄²⁻ (βάση) και το κυριότερο εξωκυτταρικό ρυθμιστικό σύστημα είναι το H₂CO₃ (οξύ) / HCO₃⁻ (βάση). Μια πολύ χρήσιμη εξίσωση που συνδέει το pH, την pK_α και τις συγκεντρώσεις οξέος (και βάσης) σε ένα διάλυμα είναι η εξίσωση HENDERSON - HASSELBALCH

$$pH = pK_{\alpha} + \log \frac{[A^-]}{[AH]}$$

Η εξίσωση αυτή μας επιτρέπει να υπολογίσουμε το pH ενός διαλύματος όταν ξέρουμε την pK_α και την συγκέντρωση οξέος και άλατος (συζυγούς βάσης) που περιέχει, ή την συγκέντρωση οξέος και άλατος που πρέπει να έχουμε για να παρασκευάσουμε ένα ρυθμιστικό διάλυμα ορισμένου pH. Αν π.χ. έχουμε ένα διάλυμα που περιέχει ισομοριακές ποσότητες οξικού οξέος (pK_α = 4,76) και οξικού νατρίου τότε, εφαρμόζοντας την εξίσωση, βρίσκουμε ότι το pH του διαλύματος είναι 4,76. Αν πάλι θέλουμε να παρασκευάσουμε ένα ρυθμιστικό διάλυμα οξικού οξέος / οξικού νατρίου που να έχει π.χ. pH 5,6 εφαρμογή της εξίσωσης

$$pH = pK_{\alpha} + \log \frac{[A^{-}]}{[AH]} \quad \text{μας δίνει} \quad 5,6 = 4,76 + \log \frac{[A^{-}]}{[AH]}$$

$$\therefore \log \frac{[A^{-}]}{[AH]} = 0,84 \quad \text{και με αντιλογαρίθμηση βρίσκουμε ότι}$$

$$\frac{[A^{-}]}{[AH]} = 6,9$$

Μέτρηση του pH

Το pH ενός διαλύματος μπορεί να μετρηθεί με δείκτες (με λιγότερη ακρίβεια) ή με ειδικές συσκευές που λέγονται πεχάμετρα (pH - meters).

α) **Οι δείκτες (Indicators)** είναι συνήθως ασθενή οξέα ή βάσεις που τα αδιάστατα μόριά τους έχουν διαφορετικό χρώμα από τα ιόντα τους. Για ένα δείκτη ΔΗ που δίσταται σαν ασθενές οξύ ($\Delta H \rightleftharpoons H^{+} + \Delta^{-}$) και που έχει pK_α π.χ. 5 είναι φανερό, με εφαρμογή της εξίσωσης

$$pH = pK_{\alpha} + \log \frac{[\Delta^{-}]}{[\Delta H]}, \quad \text{ότι η σχέση} \quad \frac{[\Delta^{-}]}{[\Delta H]} \quad \text{θα μεταβάλλεται με το pH του διαλύματος.}$$

Αν π.χ. pH = 5 = pK_α τότε το ποσοστό του δείκτη που είναι στην αδιάστατη μορφή είναι ίσο με αυτό που είναι στην μορφή ιόντος διότι

$$\log \frac{[\Delta^{-}]}{[\Delta H]} = 0, \quad \therefore \frac{[\Delta^{-}]}{[\Delta H]} = 1. \quad \text{Αν το pH} = 4 \text{ τότε} \quad \frac{[\Delta^{-}]}{[\Delta H]} = \frac{1}{10}$$

$$\text{(υπερισχύει πρωτονιομένη μορφή του δείκτη) ενώ αν το pH} = 6 \text{ τότε} \quad \frac{[\Delta^{-}]}{[\Delta H]} = \frac{10}{1}$$

$$\text{(υπερισχύει η βασική μορφή του δείκτη).}$$

Αν λοιπόν η μορφή του δείκτη ΔΗ έχει χρώμα Α (έστω ερυθρό) και η μορφή Δ' έχει χρώμα Β (έστω κίτρινο), είναι φανερό ότι ένα υδατικό διάλυμα του δείκτη σε pH 5 θα έχει ένα ενδιάμεσο χρώμα (πορτοκαλί), σε pH <4 θα έχει ερυθρό και σε pH > 6 θα έχει κίτρινο χρώμα. Βλέπουμε δηλαδή ότι σε περιοχές του pH = pK_a ± 1 του δείκτη παρατηρούμε μεγάλες αλλαγές στο χρώμα του διαλύματος, κι έτσι είναι δυνατόν να εκτιμήσουμε το pH ενός διαλύματος με χρήση του κατάλληλου δείκτη, δηλαδή εάν το pH < pK_a - 1 ή pH > pK_a + 1

β) Το **πεχάμετρο** είναι μία συσκευή που μετρά το δυναμικό μεταξύ δύο ηλεκτροδίων στο διάλυμα. Το ένα ηλεκτρόδιο είναι το **ηλεκτρόδιο «αναφοράς»** (reference electrode) και συνήθως αποτελείται από Hg-HgCl₂ σε κορεσμένο KCl (ηλεκτρόδιο καλομέλανος). Το δυναμικό του ηλεκτροδίου αυτού δεν εξαρτάται από το pH του διαλύματος. Το άλλο ηλεκτρόδιο είναι ευαίσθητο στο pH του διαλύματος και συνήθως είναι ένα **ηλεκτρόδιο «υάλου»** (glass electrode). Αυτό αποτελείται από μία λεπτή και **εύθραυστη** φούσκα ειδικού γυαλιού, που είναι διαπερατή σε H⁺ και περιέχει Ag-AgCl σε 0,1N HCl ([H⁺] = 10⁻¹M). Όταν το ηλεκτρόδιο αυτό τοποθετείται σ' ένα διάλυμα τα υδρογονοκατιόντα μέσα και έξω από την υάλινη μεμβράνη προσπαθούν να ισορροπήσουν, μετακινούμενα προς την διεύθυνση της χαμηλής συγκεντρώσεως H⁺. Η μετακίνηση αυτή προκαλεί μια διαφορά δυναμικού.

Συνήθως το ηλεκτρόδιο «αναφοράς» και το ηλεκτρόδιο «υάλου» βρίσκονται μαζί στον ίδιο μίσχο και αποτελούν ένα γαλβανικό στοιχείο που είναι συνδεδεμένο με ένα βολτάμετρο. Το δυναμικό που δείχνει το σύστημα αυτό είναι κυρίως η διαφορά δυναμικού ανάμεσα στα δύο ηλεκτρόδια (υάλου-αναφοράς) και δίνεται από την εξίσωση NERNST:

$$\Delta E = \Delta E^{\circ} - \frac{2,303 RT}{F} \text{Log} \frac{[H^+]_{\mu}}{[H^+]_{\epsilon}}$$

όπου :

ΔE= διαφορά δυναμικού που παρατηρείται , ΔE^ο - πρότυπη διαφορά δυναμικού (σταθερά), R=σταθερά αερίων, F= σταθερά FARADAY και [H⁺]_ε και [H⁺]_μ = συγκέντρωση υδρογονοκατιόντων έξω και μέσα από τη μεμβράνη.

Επειδή, όμως, -log [H⁺]_μ = 0 και -log [H⁺]_ε = pH διαλύματος, η εξίσωση αυτή γίνεται

$$\Delta E = \text{σταθερά} - \frac{2,303 RT}{F} \text{pH}$$

Επομένως, το δυναμικό που μετράει το βολτάμετρο σχετίζεται γραμμικά με το pH. Η μέτρηση του pH επηρεάζεται επίσης από την θερμοκρασία, που εμφανίζεται στον όρο RT

Σημείωση: Το ηλεκτρόδιο υάλου είναι εύθραυστο - χρησιμοποιήστε το προσεκτικά. Ανακατώστε καλά τα διαλύματα πριν μετρήσετε το pH τους. Μην αφήνετε το ηλεκτρόδιο υάλου να στεγνώσει αλλά ξεπλύντε το και βυθίστε το σε αποσταγμένο νερό μετά από

κάθε μέτρηση. Επίσης μην το αφήνετε σε αλκαλικά διαλύματα περισσότερο απ' ότι είναι απαραίτητο.

Ογκομέτρηση (τιτλοδότηση)

Η διαδικασία κατά την οποία μετράμε το ποσό ενός αντιδραστηρίου (ενός πρότυπου διαλύματος οξέος ή μιας βάσης) που καταναλώνεται κατά την πλήρη αντίδρασή του με μία ορισμένη ποσότητα διαλύματος μιας ουσίας (βάσης ή οξέος), τη συγκέντρωση της οποίας θέλουμε να προσδιορίσουμε, λέγεται ογκομέτρηση (titration) ή τιτλοδότηση. Αν σ' ένα διάλυμα μιας ουσίας οξέος (AH) προστεθούν βαθμιαία μικρές ποσότητες βάσης (BOH) τότε τα υδρογονοκατιόντα δεσμεύονται από τα υδροξυλιόντα δίνοντας H₂O με τον ταυτόχρονο σχηματισμό άλατος (BA) και μεταβολή του pH του διαλύματος. Το σημείο στο οποίο υπάρχει χημική ισοδυναμία πρότυπου διαλύματος (BOH) και ουσίας (AH), τη συγκέντρωση της οποίας προσδιορίζουμε, λέγεται ισοδύναμο σημείο.

Για την εξουδετέρωση $HA + BOH \rightleftharpoons H_2O + BA$ είναι φανερό ότι απαιτούνται ίσες γραμμομοριακές ποσότητες οξέος και βάσης, άσχετα με το αν ένα οξύ είναι ισχυρό ή ασθενές. Αυτό συμβαίνει διότι καθώς η συγκέντρωση των ιόντων υδρογόνου ελαττώνεται, με τον σχηματισμό H₂O, νέα μόρια ασθενούς οξέος δίστανται. Η βαθμιαία δέσμευση H⁺ του οξέος οδηγεί σε αύξηση του pH, η οποία γίνεται απότομα γύρω από το ισοδύναμο σημείο. Όταν έχουμε εξουδετέρωση ισχυρού οξέος με ισχυρή βάση η τιμή του pH στο ισοδύναμο σημείο είναι περίπου 7, όταν έχουμε εξουδετέρωση ισχυρού οξέος με ασθενή βάση είναι μικρότερη από 7, ενώ όταν έχουμε εξουδετέρωση ασθενούς οξέος με ισχυρή βάση είναι μεγαλύτερη από 7. Επομένως τα διαλύματα αλάτων που προκύπτουν είναι ουδέτερα, όξινα ή βασικά, ανάλογα με την ισχύ του οξέος και της βάσης. (Σχήμα 1).

Στις ογκομετρήσεις εξουδετέρωσης η κανονικότητα ενός αγνώστου διαλύματος προσδιορίζεται με οξύ η βάση γνωστής κανονικότητας. Το pH στο οποίο υπάρχουν ισοδύναμες ποσότητες οξέος και βάσης είναι το σημείο εξουδετέρωσης. Όταν π.χ. ξέρουμε πόσα ml NaOH γνωστής κανονικότητας χρησιμοποιήθηκαν για την εξουδετέρωση γνωστού όγκου HCl άγνωστης κανονικότητας, η κανονικότητα του HCl μπορεί να υπολογισθεί από την σχέση:

$$N \text{ NaOH} \times \text{ml NaOH} = N \text{ HCl} \times \text{ml HCl}$$

$$\therefore N \text{ HCl} = \frac{N \text{ NaOH} \times \text{ml NaOH}}{\text{ml HCl}}$$

Πειραματικό μέρος

Άσκηση 1 - Προσδιορισμός του pH ενός αγνώστου διαλύματος με δείκτες (σε διάλυμα ή σε πεχαμετρικό χαρτί) και με πεχάμετρο

α) Τοποθετήστε από 1ml διαλύματος A σε καθένα από 6 δοκιμαστικούς σωλήνες. Προσθέστε από μία σταγόνα από κάθε δείκτη 1-6 στον αντίστοιχο σωλήνα.

Παρατηρήστε τι χρώμα παίρνει ο δείκτης και σημειώστε σε ποια μορφή (όξινη / αλκαλική) αντιστοιχεί.

Δείκτης	pKa	Περιοχή pH μεταβολής χρ.	Χρώμα	
			HΔ	Δ ⁻
1. Κυανό της θυμόλης	1,5	1,2 – 2,8	Κόκκινο Κίτρινο	
2. Κυανό της βρωμοφαινόλης	4,0	3,0 – 4,6	Κίτρινο	Μπλε
3. Ερυθρό του μεθυλίου	5,6	4,8 – 6,4	Κόκκινο	Κίτρινο
4. Κυανό της βρωμοθυμόλης	7,1	6,0 – 7,6	Κίτρινο	Μπλε
5. Κυανό της φαινόλης	7,9	6,8 – 8,4	Κίτρινο	Κόκκινο
6. Φαινολοφθαλείνη	9,4	8,3 – 10,1	Αχρωμο	Ροζ

β) Τοποθετήστε μία σταγόνα του διαλύματος Α σε κατάλληλο πεχαμετρικό χαρτί και σημειώστε το χρώμα μετά από 30 sec.

γ) Πάρτε 5ml του διαλύματος Α και προσδιορίστε με ακρίβεια το pH με το ηλεκτρόδιο υάλου (θα σας επιδειχθεί η χρήση του πεχάμετρου).

Στο **Φροντιστήριο** θα σχολιάσετε τις 3 τιμές pH που βρήκατε στο α - γ.

Άσκηση 2 - Εξουδετέρωση ισχυρού οξέος με ισχυρή βάση

α) Μετρήστε με ακρίβεια 10ml από ένα διάλυμα 0,1N HCl σε μια μικρή κωνική φιάλη και προσθέστε 5 σταγόνες φαινολοφθαλείνης. Γεμίστε μια προχοίδα με ένα διάλυμα NaOH άγνωστης κανονικότητας. Εξουδετερώστε το διάλυμα οξέος με βάση, προσθέτοντας μικρές ποσότητες NaOH (περίπου 1ml) και ανακατεύοντας το μίγμα κάθε φορά. Καταγράψτε πόσα ml NaOH χρειαστήκατε ώσπου να πρωτοεμφανιστεί ροζ χρώμα που παραμένει 30 sec. Κατά τη διάρκεια της τιτλοδοτήσεως μετράτε κάθε 2-3 προσθήκες NaOH το pH του διαλύματος χρησιμοποιώντας πεχαμετρικό χαρτί.

β) Επαναλάβετε το προηγούμενο πείραμα με ένα άλλο 10ml διάλυμα 0,1N HCl στο οποίο προσθέτετε 5 σταγόνες κυανού της βρωμοφαινόλης, αντί για την φαινολοφθαλείνη, και καταγράψτε πόσα ml NaOH χρειαστήκατε ώσπου να εμφανιστεί μπλε χρώμα.

Στο **Φροντιστήριο** : Θα υπολογίσετε την κανονικότητα του διαλύματος NaOH όπως προκύπτει από τον κάθε ένα δείκτη. Θα σχεδιάσετε την καμπύλη εξουδετέρωσης που προκύπτει από την χρήση πεχαμετρικού χαρτιού και θα σχολιάσετε τα αποτελέσματά σας.

Άσκηση 3 - Παρασκευή και ρυθμιστική δράση οξικού οξέος / οξικού νατρίου

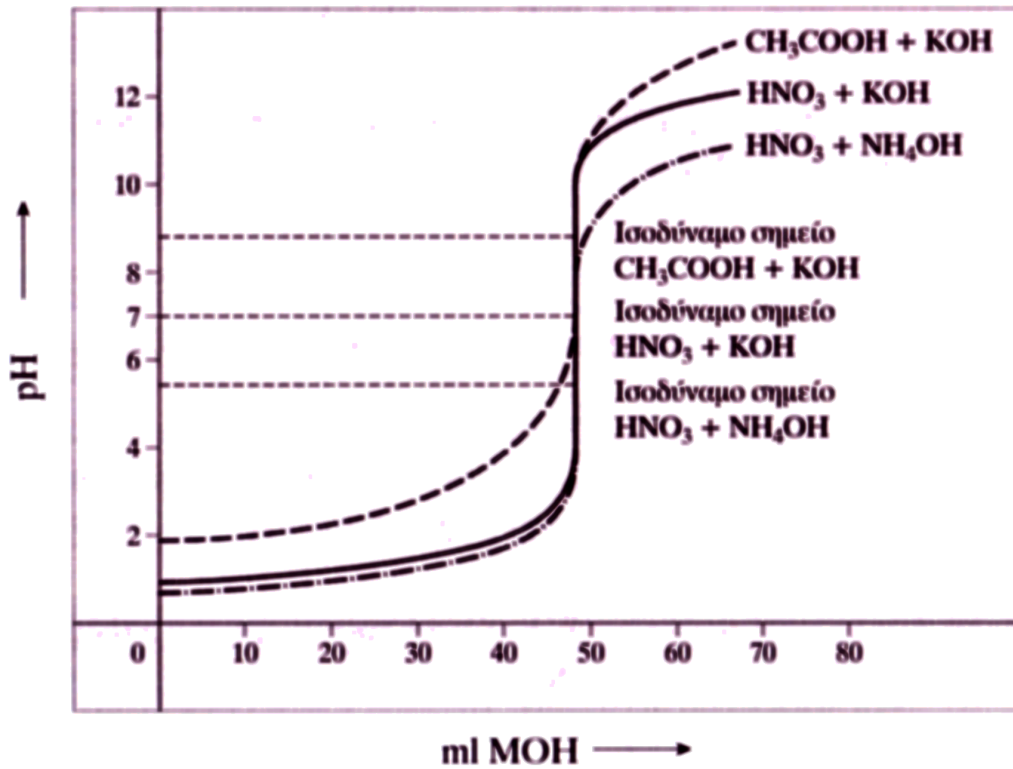
α) Υπολογίστε πόσα ml 0,2N CH_3COOH και 0,2N CH_3COONa θα χρησιμοποιήσετε για να παρασκευάσετε 10ml ρυθμιστικού διαλύματος 0,1N CH_3COOH / CH_3COONa , pH 5 (pK_a οξικού οξέος = 4,76). Παρασκευάστε το διάλυμα αυτό σε μια μικρή κωνική φιάλη και μετρήστε το pH του με το ηλεκτρόδιο υάλου. Προσθέστε 2 σταγόνες φαινολοφθαλείνης και μετρήστε πόσος όγκος διαλύματος 1N NaOH χρειάζεται για να αποκτήσει το διάλυμα ροζ χρώμα.

β) Σε μια δεύτερη φιάλη προσθέστε 10ml αποσταγμένο νερό και 2 σταγόνες φαινολοφθαλείνης, μετρήστε το pH με το ηλεκτρόδιο υάλου και καταγράψτε τον όγκο 1N NaOH που απαιτείται για να αποκτήσει το διάλυμα ροζ χρώμα.

Στο **Φροντιστήριο** : Θα συγκρίνετε την ποσότητα 1N NaOH που χρειαστήκατε για την αλκαλοποίηση του ρυθμιστικού διαλύματος μ' αυτήν που χρειαστήκατε για την αλκαλοποίηση του νερού. Τι συμπεραίνετε;

Καμπύλες τιτλοδότησης (ογκομέτρησης)

Σχήμα 1



ΑΣΚΗΣΗ 3^η

ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ

Θεωρητικό μέρος

Η χρωματογραφία είναι μία διαχωριστική τεχνική που επιτρέπει το διαχωρισμό ενός μείγματος ουσιών στα επί μέρους συστατικά. Η τεχνική αυτή αναπτύχθηκε το 1906 από το Ρώσο βοτανολόγο Michael Tswett και η πρώτη εφαρμογή αφορούσε τον διαχωρισμό των χρωστικών ενώσεων. Με βάση την πρώτη εφαρμογή δόθηκε και η ονομασία της τεχνικής – χρωματογραφία. Η χρωματογραφία περιλαμβάνει μια ποικιλία τεχνικών που όλες βασίζονται στην εκλεκτική δέσμευση και αποδέσμευση των συστατικών του μείγματος από μία στατική φάση (στερεή ή υγρή) με την βοήθεια μιας κινούμενης φάσης (υγρής ή αέριας). Η εκλεκτική αυτή συγγένεια (συνάφεια) των διαφόρων ουσιών για την στάσιμη φάση οφείλεται στις διαφορές ανάμεσα στις βασικές φυσικοχημικές ιδιότητες των μορίων, όπως το μέγεθος, το φορτίο, η διαλυτότητα και η προσροφητικότητα. Οι διάφορες μορφές χρωματογραφίας βασίζονται σε ένα ή περισσότερα από τα παραπάνω φαινόμενα. Οι χρωματογραφικές τεχνικές έχουν μεγάλη ικανότητα διαχωρισμού και χρησιμοποιούνται ευρύτατα για καθαρισμό ουσιών από προσμείξεις, για ποιοτική ή ποσοτική ανάλυση (ανίχνευση και απομόνωση χημικών ενώσεων) και για ταυτοποίηση άγνωστων ενώσεων.

Τα κυριότερα είδη χρωματογραφίας είναι:

1. Χρωματογραφία προσροφήσεως
2. Χρωματογραφία κατανομής
3. Χρωματογραφία ανταλλαγής ιόντων
4. Χρωματογραφία πηκτής ή αποκλεισμού
5. Χρωματογραφία συγγένειας

1. Χρωματογραφία προσρόφησης (adsorption chromatography)

Η προσρόφηση είναι ένα επιφανειακό φαινόμενο κατά το οποίο τα μόρια μιας ουσίας συγκρατούνται στην επιφάνεια ορισμένων στερεών υλικών. Η προσρόφηση οφείλεται στο σύνολο των δυνάμεων (ηλεκτροστατικές, Van der Waals, δεσμοί υδρογόνου) που αναπτύσσονται ανάμεσα στην ουσία και στο στερεό υλικό, καθώς και στην φύση του διαλύτη. Υλικά που χρησιμοποιούνται σαν στερεά προσροφητικά χαρακτηρίζονται από μεγάλο πορώδες και ως συνέπεια αυξημένο λόγο επιφάνεια / βάρος, όπως είναι τα οξείδια του αργιλίου, διοξειδίο του πυριτίου, υδροξυαπατίτης, ενεργοποιημένος άνθρακας, κυτταρίνη, άμυλο κ.α.

Συνήθως ως κινούμενη φάση χρησιμοποιούνται οι οργανικοί διαλύτες, όπως το εξάνιο, αιθέρας, χλωροφόρμιο, αλκοόλες, κετόνες, και διάφοροι συνδυασμοί ύδατος με οργανικούς διαλύτες. Συνήθως το μείγμα των ουσιών που θέλουμε να διαχωρίσουμε προστίθεται στην κορυφή μιας στήλης που περιέχει το προσροφητικό υλικό και με την βοήθεια ενός διαλύτη που ρέει μέσα από την στήλη, οι διάφορες ουσίες μετακινούνται

αργά προς τα κάτω. Η διαδικασία αυτή λέγεται ανάπτυξη της χρωματογραφίας και οδηγεί στην κατά σειρά έκλυση από την στήλη των συστατικών του μείγματος

Είναι φανερό ότι όσο ασθενέστερα προσροφάται μια ουσία στο προσροφητικό υλικό (στάσιμη ή ακίνητη φάση) τόσο ταχύτερα εκλύεται από την στήλη. Η χρωματογραφία προσρόφησης χρησιμοποιείται συχνά για να διαχωρίσουν σύνθετα λιπίδια, στεροειδή, χλωροφύλλες κ.λ.π.

2. Χρωματογραφία κατανομής (partition chromatography)

Όταν μια ουσία προστεθεί σε ένα σύστημα από δύο φάσεις που δεν αναμειγνύονται η κατανομή της ουσίας στις δύο φάσεις εξαρτάται από την διαλυτότητά της σε κάθε φάση. Για ορισμένη θερμοκρασία ο λόγος της συγκέντρωσης C της ουσίας στις δύο φάσεις A και B ενός συστήματος είναι σταθερός και ονομάζεται συντελεστής κατανομής (K_p),

$$K_p = \frac{C_A}{C_B}$$

όπου C_A και C_B - συγκεντρώσεις της ουσίας στην φάση A και B αντιστοίχα.

Δύο ή περισσότερες ενώσεις που έχουν διαφορετικό συντελεστή κατανομής μπορούν να διαχωριστούν όταν η στατική φάση, που αποτελείται από ένα ακινητοποιημένο υγρό, πλένεται από μια κινούμενη φάση, που αποτελείται από άλλο διαλύτη. Η ακινητοποίηση γίνεται η με ισχυρή προσροφητική δέσμευση σε κάποιο υλικό-φορέα η με χημική πρόσδεση στο φορέα. Στην αρχή της χρωματογραφίας κατανομής βασίζεται η χρωματογραφία χάρτου (paper chromatography), η χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (thin layer chromatography) και η χρωματογραφία κατανομής αντίθετου ρεύματος (counter current distribution).

Στις πρώτες δύο περιπτώσεις το μείγμα ουσιών που θέλουμε να διαχωρίσουμε τοποθετείται πάνω σε μία γραμμή βάσης σε ένα φύλλο διηθητικού χαρτιού, ή σε μια λεπτή στιβάδα υλικού απλωμένου σε πλάκα και η άκρη του χαρτιού ή πλάκας τοποθετείται στον διαλύτη που περιέχεται σε ένα αεροστεγή θάλαμο. Συνήθως χρησιμοποιείται ένα κορεσμένο διάλυμα ενός μη πολικού διαλύτη (π.χ. βουτανόλη) σ' ένα πολικό διαλύτη (π.χ. νερό). Το πολικό συστατικό του μείγματος διαλυτών προσκολλάται στο στερεό υλικό (π.χ. κυτταρίνη του χαρτιού) και αποτελεί μέρος της στατικής φάσης. Το μείγμα διαλυτών προχωρεί χάρη στις τριχοειδικές δυνάμεις, παρασύρει προς το διαχωρισμό ουσίες και φτάνει κοντά στην άλλη άκρη του χαρτιού ή πλάκας. Η απόσταση που διατρέχει κάθε ουσία σε σχέση με το μέτωπο του διαλύτη είναι χαρακτηριστική για κάθε ουσία κάτω από καθορισμένες συνθήκες, αντανακλά το K_p και λέγεται R_f όπου:

$$R_f = \frac{\text{απόσταση από την γραμμή βάσης της ουσίας}}{\text{» » » » του διαλύτη}}$$

Η χρωματογραφία κατανομής χρησιμοποιείται ευρύτατα για τον διαχωρισμό σακχάρων, αμινοξέων, νουκλεοτιδίων κ.λ.π.

Στην **αέρια - υγρή χρωματογραφία** (gas - liquid chromatography) μείγμα αεροποιημένων συστατικών διαχωρίζονται με βάση διαφορές στην κατανομή, προσρόφηση και πτητικότητα. Η κινητή φάση είναι συνήθως ένα ρεύμα θερμού αδρανούς αερίου, π.χ. N_2 ή He, και η στάσιμη φάση είναι ακινητοποιημένο υγρό (π.χ. σιλικόνες που επικαλύπτουν ένα κονιορτοποιημένο στερεό υλικό τοποθετημένο σε στήλη). Τα συστατικά προς διαχωρισμό, που πρέπει να μην αποσυντίθενται κατά την θέρμανση, εξέρχονται από την στήλη με μια σειρά που είναι αντίθετη με την συγγενειά τους προς την στατική φάση. Οι περισσότερες οργανικές μη ιοντικές ουσίες είναι πτητικές αλλά και ενώσεις που περιέχουν πολικές ομάδες μπορούν να διαχωρισθούν με την αέρια χρωματογραφία, μετά από την δημιουργία πτητικών παραγώγων τους (π.χ. μεθυλικοί εστέρες λιπαρών οξέων).

3. Χρωματογραφία ανταλλαγής ιόντων (ion exchange chromatography)

Η χρωματογραφία ανταλλαγής ιόντων βασίζεται στις ηλεκτροστατικές έλξεις ετερόνυμα φορτισμένων σωματιδίων που αναπτύσσονται μεταξύ των φορτισμένων ομάδων μιας ρητίνης, που αποτελεί την στάσιμη στερεά φάση και των φορτισμένων ομάδων των μορίων διαφόρων ουσιών, που βρίσκονται στην κινητή φάση. Οι ρητίνες αποτελούνται από αδιάλυτα υλικά (πολυσακχαρίτες όπως η κυτταρίνη, δεξτράνη, αραρόζη, ή πολυστυρένια), που περιέχουν χαρακτηριστικές ομάδες που ιονίζονται (π.χ. την σουλφονική, φωσφορική, καρβοξυμεθυλο-ομάδα για τις κατιοντικές ρητίνες και διαιθυλοαμινοαιθυλο- ή αμινική ομάδα για τις ανιοντικές ρητίνες). Τα φορτισμένα αυτά σωματίδια της ρητίνης δεσμεύουν αντιστρεπτά διάφορα ιόντα από το περιβάλλον (κατιόντα για τις αρνητικά φορτισμένες ρητίνες και ανιόντα για τις θετικά φορτισμένες ρητίνες), τα οποία μπορούν να ανταλλάξουν με άλλα ιόντα, π.χ. των φορτισμένων ομάδων των μορίων προς διαχωρισμό.

Οι ιοντοανταλλάκτες, ανάλογα με την ισχύ των ομάδων που περιέχουν, κατατάσσονται σε ισχυρούς (π.χ. Dowex 50, Dowex 1) ή ασθενείς (π.χ. CM-κυτταρίνη, DEAE-κυτταρίνη).

Η ιοντοανταλλαγή εξαρτάται από το μέγεθος του φορτίου του ιόντος που ανταλλάσσεται (π.χ. το Ca^{2+} εκτοπίζει το Na^+) και, αν το φορτίο είναι ίδιο, από το μέγεθος του ιόντος (π.χ. το Na^+ εκτοπίζει το H^+).

Το **φορτίο** διαφόρων ουσιών **εξαρτάται** από την **pKa** των ομάδων που μπορούν να ιονισθούν, από το **pH** και από την **ιοντική ισχύ** του διαλύτη. Είναι φανερό ότι, τα μόρια ουσιών που κάτω από ορισμένες συνθήκες χρωματογραφίας, είτε δεν έχουν φορτίο ή έχουν ομώνυμο φορτίο με την ρητίνη εκλούνται πρώτα, ενώ ουσίες τα μόρια των οποίων έχουν φορτία αντίθετα μ' αυτά του ανταλλάκτη (ρητίνης) εκλούνται αργότερα. Συνήθως για να πετύχουμε την έκλυση και ισχυρά συνδεδεμένων ουσιών η κινητή φάση μεταβάλλεται με **βαθμίδωση** είτε του **pH** (pH gradient) είτε της **συγκέντρωσης ενός ηλεκτρολύτη** (concentration gradient).

Η χρωματογραφία ανταλλαγής ιόντων χρησιμοποιείται ευρύτατα για τον καθαρισμό μειγμάτων ενώσεων από άλατα καθώς και για τον διαχωρισμό αμινοξέων, πρωτεϊνών κ.λ.π. Επειδή η αντίδραση της ιοντοανταλλαγής είναι αμφίδρομη, αν το προϊόν αυξηθεί πάρα πολύ τότε, σύμφωνα με την αρχή του Le Chatelier, η αντίδραση θα αντιστραφεί. Το φαινόμενο αυτό λέγεται **αναγέννηση** της ρητίνης.

4. Χρωματογραφία (διήθησης μέσω) πηκτής ή αποκλεισμού (gel filtration chromatography ή exclusion chromatography).

Στην χρωματογραφία πηκτής χρησιμοποιούνται μέσα που δρουν σαν μοριακά κόσκινα για να διαχωρίσουν μόρια που έχουν διαφορετικό μέγεθος και σχήμα.

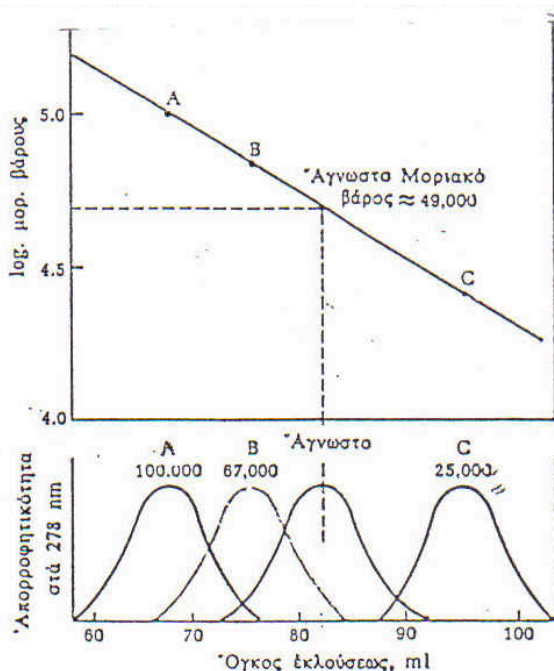
Ορισμένα οργανικά πολυμερή (ειδικά διασυνδεδεμένα παράγωγα δεξτράνης, αγαρόζης ή πολυακρυλαμιδίου, γνωστά με τις εμπορικές ονομασίες Sephadex, Sepharose και Biogel) αποτελούνται από αδιάλυτα υδρόφιλα σωματίδια, τα οποία έχουν την ικανότητα να διογκώνονται στο νερό σχηματίζοντας ένα τρισδιάστατο πλέγμα (πηκτική ή gel) που έχει ένα ορισμένο μέγεθος πόρων.

Όταν ετοιμάσουμε μια στήλη με την πορώδη αυτή πηκτική ο συνολικός όγκος του υγρού της στήλης (V ολικού υγρού) αποτελείται από τον όγκο του υγρού που βρίσκεται έξω από τα σωματίδια της πηκτής (V_0) και από τον όγκο του υγρού που είναι παγιδευμένο μέσα στα σωματίδια της πηκτής (V_i). Αν προσθέσουμε ένα μικρό όγκο διαλύματος ουσιών που θέλουμε να διαχωρίσουμε στην κορυφή της στήλης και αρχίσουμε την έκλυση θα παρατηρήσουμε ότι τα μεγάλα μόρια, που λόγω του μεγέθους τους δεν μπορούν να εισέλθουν στα σωματίδια της πηκτής, εκκλύονται πρώτα ενώ τα μικρά, που έχουν να διανύσουν μεγαλύτερη διαδρομή επειδή διαπερνούν τα σωματίδια της πηκτής, εκκλύονται τελευταία. Ο **όγκος εκλούσεως (V_e)** μιας ουσίας (δηλαδή ο όγκος υγρού που ρέει από την στήλη πριν εμφανισθεί η ουσία) δίνεται από την σχέση: **$V_e = V_0 + KdV_i$** όπου **V_0 = όγκος υγρού εξωτερικού διαμερίσματος, V_i = όγκος υγρού εσωτερικού διαμερίσματος και Kd = συντελεστής κατανομής.** Ο Kd είναι μηδέν για μόρια που δεν μπορούν να εισδύσουν καθόλου μέσα στα σωματίδια της πηκτής (οπότε $V_e = V_0$) και είναι ένα για μόρια στα οποία όλος ο χώρος της στήλης είναι προσιτός (οπότε $V_e = V_0 + V_i$). Ουσίες με Kd ανάμεσα στις δύο αυτές ακραίες περιπτώσεις εκκλύονται ενδιάμεσα. Είναι φανερό ότι κατά πόσο μια ουσία εισέρχεται στα σωματίδια της πηκτής εξαρτάται από το μέγεθος των πόρων, που εξαρτάται από τον τύπο του χρωματογραφικού υλικού που χρησιμοποιήθηκε (π.χ. Sephadex G-25, G-50, G-100 κ.λ.π.). Στο Sephadex G-50 π.χ. το M.B. των μορίων που δεν εισέρχονται στα σωματίδια της πηκτής (το λεγόμενο όριο αποκλεισμού) είναι ίσο ή μεγαλύτερο από 15.000.

Η χρωματογραφία πηκτής μας επιτρέπει τον διαχωρισμό ουσιών M.B. $1.000-3 \times 10^6$ και είναι η πιο εύκολη μέθοδος για τον προσδιορισμό του μοριακού βάρους μιας πρωτεΐνης ($\log MB$ πρωτεΐνης = fV_e), αν προηγουμένως βαθμονομήσουμε την στήλη με πρωτεΐνες γνωστού M.B. (Σχήμα 1).

Ακόμα μεγαλύτερη διαχωριστική ικανότητα προσφέρει τελευταία ο συνδυασμός της χρωματογραφίας πηκτής με την ιονταλλακτική χρωματογραφία (με την χρήση π.χ. CM-Sephadex).

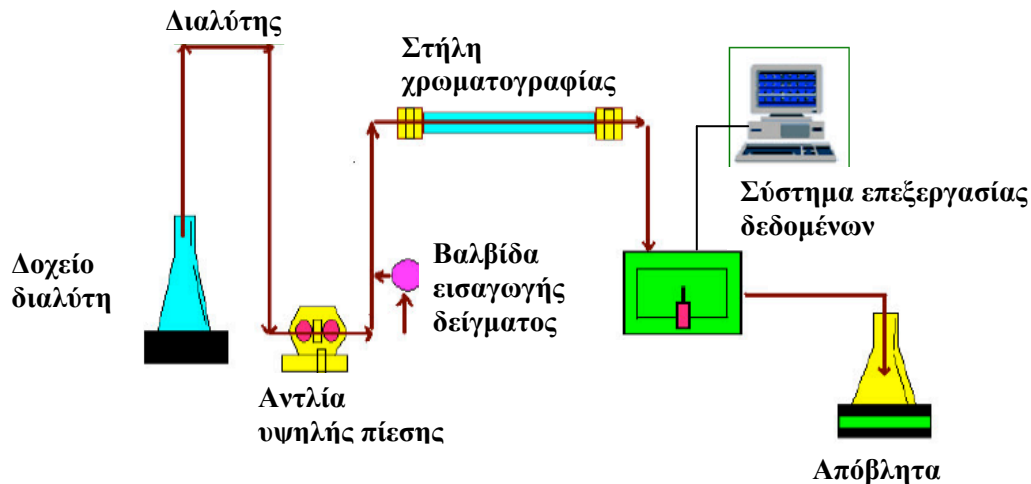
Σχήμα 1. Προσδιορισμός M.B. πρωτεϊνών με χρωματογραφία πηκτής



Τα διάφορα είδη χρωματογραφίας στήλης, είτε αυτή βασίζεται στην αρχή της προσροφήσεως, κατανομής, ανταλλαγής ιόντων ή αποκλεισμού μπορούν να έχουν παρασκευαστική η αναλυτική εφαρμογή. Στην παρασκευαστική χρωματογραφία ο στόχος είναι ποσοτικός διαχωρισμός ενός μείγματος και παραλαβή κάποιας ποσότητας (g η mg) ενός η περισσότερα συστατικών σε καθαρή μορφή για περαιτέρω πειράματα. Σε αναλυτικές εφαρμογές ο στόχος είναι ανίχνευση, ταυτοποίηση και ποσοτικός προσδιορισμός μίας η περισσότερου ουσιών στο δείγμα, χωρίς να τα παραλάβουμε σε καθαρή μορφή. Για αναλυτικούς σκοπούς συνήθως εφαρμόζεται υγρή **χρωματογραφία υψηλής απόδοσης** (high performance liquid chromatography, ή **HPLC**). Στην HPLC η στήλη αντί για γυαλί ή πλαστικό είναι φτιαγμένη από ανοξείδωτο χάλυβα μικρής διαμέτρου, για να ανθίσταται την

υψηλή πίεση (π.χ. μέχρι και 5000 psi ή $3,7 \times 10^7$ Pa) με την οποία προωθείται η υγρή φάση μέσω της στερεάς φάσης που περιέχεται στην στήλη και η έκλουση των ουσιών προσδιορίζεται με ένα ευαίσθητο ανιχνευτή (Σχήμα 2). Τα πλεονεκτήματα της HPLC είναι ότι ο διαχωρισμός πολύ μικρής ποσότητας δείγματος επιτυγχάνεται σε λεπτά, ότι έχει μεγάλη διαχωριστική ικανότητα και μεγάλη ευαισθησία έτσι ώστε απαιτεί ελάχιστο δείγμα και μπορεί να ανιχνεύει ng η pg μίας ουσίας HPLC βρίσκει πολλές εφαρμογές σήμερα στη κλινική χημεία για τον προσδιορισμό αμινοξέων, πρωτεϊνών, λιπαρών οξέων, σακχάρων, ορμονών, βιταμινών, φαρμάκων, τοξικών ουσιών κ.α.

Σχήμα 2. Σχηματική διάταξη συστήματος Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης (HPLC)



5. Χρωματογραφία συγγένειας (affinity chromatography)

Αντίθετα με τις προηγούμενες μορφές χρωματογραφίας η χρωματογραφία συγγένειας ή συνάφειας δεν βασίζεται σε διαφορές στις φυσικές ιδιότητες των ουσιών προς διαχωρισμό αλλά εκμεταλλεύεται τη βιοειδική, μη ομοιοπολική, αντιστρεπτή σύνδεση της μακρομοριακής ουσίας που θέλουμε να απομονώσουμε, που βρίσκεται στην κινητή φάση και ενός μικρού ειδικού μορίου (που λέγεται **σύνδεμα** ή **ligand**) που είναι συνδεδεμένο με την στερεά φάση.

Το ligand μπορεί να είναι το συνένζυμο ή υπόστρωμα, όταν θέλουμε να διαχωρίσουμε ένα ένζυμο, το αντιγόνο, όταν θέλουμε να απομονώσουμε αντισώματα, ή ένα ολιγονουκλεοτίδιο, όταν θέλουμε να απομονώσουμε νουκλεϊκά οξέα. Επειδή το σύνδεμα είναι ειδικό για μια ουσία οι άλλες ενώσεις δεν συγκρατούνται από το χρωματογραφικό υλικό και εκλούνται αμέσως. Η ελευθέρωση της ουσίας που έχει συγκρατηθεί επιτυγχάνεται είτε με μη ειδική είτε με ειδική έκλυση. Στην πρώτη περίπτωση μεταβολή του pH ή της ιοντικής ισχύος της κινητής φάσης καταστρέφει τις ειδικές αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στην μακρομοριακή ουσία και το σύνδεμα. Στη δεύτερη περίπτωση προστίθεται στην κινητή φάση είτε ελεύθερο σύνδεμα ή ένα μόριο για το οποίο το σύνδεμα έχει μεγαλύτερη συγγένεια απ' ό,τι η ουσία με την οποία είναι ήδη συμπλεγμένο και σαν αποτέλεσμα των ανταγωνιστικών αυτών αντιδράσεων εκτοπίζεται η ουσία που θέλουμε να διαχωρίσουμε από την στερεά φάση. Η χρωματογραφία συγγένειας έχει χρησιμοποιηθεί με μεγάλη επιτυχία για την απομόνωση πολλών ενζύμων, γλυκο-, μεταλλο- ή θειο- πρωτεϊνών, υποδοχέων, ορμονών, καθώς και διαφόρων νουκλεϊκών οξέων (mRNA, ssDNA κ.α.)

ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ

Θεωρητικό μέρος

Η ηλεκτροφόρηση είναι μια μέθοδος διαχωρισμού μορίων που φέρουν φορτίο κάτω από την επίδραση ενός ηλεκτρικού πεδίου. Πολλά βιομόρια περιέχουν ομάδες που μπορούν να ιονισθούν και έτσι σε υδατικά διαλύματα βρίσκονται σαν κατιόντα (+ φορτισμένα), ή ανιόντα (- φορτισμένα) ανάλογα με το καθαρό φορτίο που φέρουν. Όταν τα μόρια αυτά βρεθούν σε ένα ηλεκτρικό πεδίο θα μετακινηθούν προς το θετικό ή αρνητικό πόλο με μια ταχύτητα η οποία εξαρτάται από το φορτίο, το μέγεθος και το σχήμα του μορίου, την ένταση του ηλεκτρικού πεδίου, τις ιδιότητες του μέσου στήριξης και την θερμοκρασία.

Τα παραπάνω συνοψίζονται στην εξίσωση:

$$V = \frac{E \times z}{f}$$

όπου: V= ταχύτητα κίνησης του μορίου (cm/sec)

E = τάση ηλεκτρικού πεδίου (volt/cm)

z = καθαρό φορτίο μορίου

f = συντελεστής τριβής

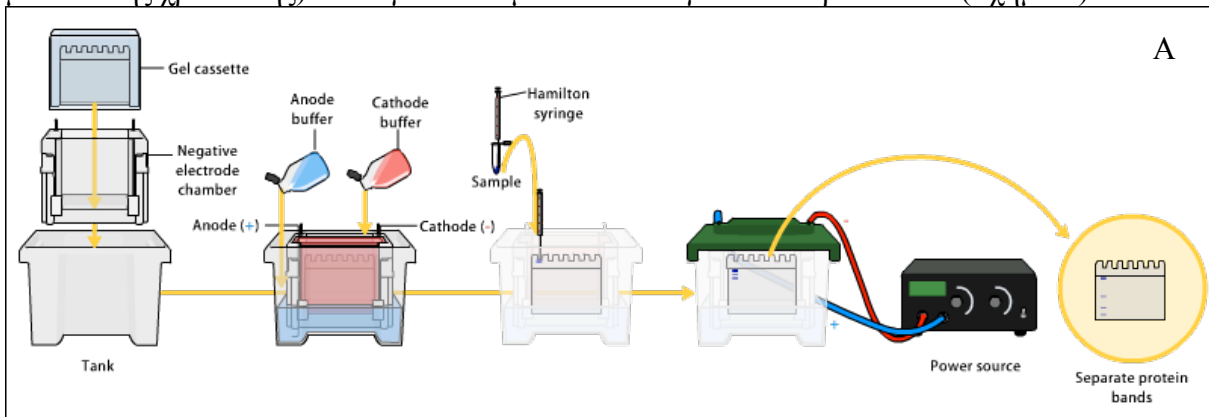
(Η ολική απόσταση d που μετακινείται ένα μόριο εξαρτάται από το χρόνο t που γίνεται η ηλεκτροφόρηση δηλαδή $d = vt$).

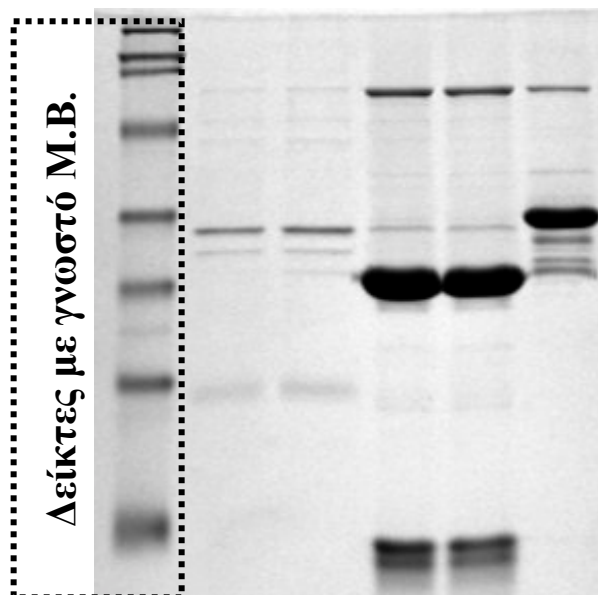
Βλέπουμε ότι η **ηλεκτροφορητική κινητικότητα** ενός μορίου **αυξάνει** με την **τάση, E**, του εφαρμοζόμενου πεδίου, που είναι συνάρτηση ($E=IR$) της έντασης (I) και της αντίστασης (R), οι οποίες εξαρτώνται από την ιοντική ισχύ του ρυθμιστικού διαλύματος, την θερμοκρασία και την φύση του στερεού υλικού που χρησιμοποιείται στην συσκευή ηλεκτροφόρησης. Η ηλεκτροφορητική κινητικότητα **αυξάνει** επίσης με το **καθαρό φορτίο z**, ενός μορίου, το οποίο εξαρτάται από το pH. Για αμφολύτες όπως είναι οι πρωτεΐνες υπάρχει ένα χαρακτηριστικό pH, το ισοηλεκτρικό σημείο (**pI**), όπου ο ολικός αριθμός των θετικών φορτίων είναι ίσος με τον ολικό αριθμό των αρνητικών φορτίων και επομένως δεν παρατηρείται μετακίνηση σε ένα ηλεκτρικό πεδίο. Όταν το pH είναι όξινο, ως προς το pI της πρωτεΐνης, τότε τα μόρια φέρουν καθαρό θετικό φορτίο και οδεύουν προς την κάθοδο, ενώ όταν το pH είναι βασικό, ως προς το pI της πρωτεΐνης, τότε τα μόρια φέρουν καθαρό αρνητικό φορτίο και οδεύουν προς την άνοδο. Βλέπουμε επίσης ότι η ηλεκτροφορητική κινητικότητα ενός μορίου **μειώνεται** με τον **συντελεστή τριβής f**, ο οποίος εξαρτάται από τη μάζα και το σχήμα του μορίου και από το ιξώδες (γλοιότητα) του μέσου.

Οι ηλεκτροφορητικές τεχνικές είναι δύο τύπων: **κινούμενου ορίου ή ζώνης**. Στην δεύτερη περίπτωση, που έχει ευρύτετη εφαρμογή, η συσκευή ηλεκτροφόρησης αποτελείται από μια **πηγή ηλεκτρικού ρεύματος**, που παρέχει συνεχές ρεύμα, με ρυθμιζόμενη τάση (volts) ή ένταση (mA), και από μια **λεκάνη** χωρισμένη σε δυο δεξαμενές, που περιέχει ρυθμιστικό διάλυμα. Στην μια δεξαμενή είναι προσαρμοσμένο το θετικό και στην άλλη το αρνητικό ηλεκτρόδιο. Τα μόρια προς διαχωρισμό τοποθετούνται σαν κηλίδα ή ζώνη σε ένα (ημι) στερεό υπόστρωμα όπως το χαρτί, η οξική κυτταρίνη, ή μια πηκτή. Το στερεό υπόστρωμα, που είναι εμποτισμένο με ρυθμιστικό διάλυμα, τοποθετείται πάνω σ' ένα στήριγμα στην συσκευή ηλεκτροφόρησης

με το ένα άκρο του βυθισμένο στη δεξαμενή που είναι ο θετικός πόλος και το άλλο στη δεξαμενή που είναι ο αρνητικός. Η εφαρμογή του ηλεκτρικού πεδίου προκαλεί την ροή του ηλεκτρικού ρεύματος από το αρνητικό ηλεκτρόδιο - ρυθμιστικό διάλυμα - υλικό ηλεκτροφόρησης - ρυθμιστικό διάλυμα - θετικό ηλεκτρόδιο και τον διαχωρισμό των μορίων σε ζώνες. Στο τέλος της ηλεκτροφόρησης η ποσότητα, η χημική σύσταση ή η ενζυμική δράση των ουσιών καθε ζώνης μπορούν να προσδιοριστούν με χρώση ή άλλες κατάλληλες επεξεργασίες.

Στην ηλεκτροφόρηση πηκτής (gel electrophoresis) ο διαχωρισμός δεν γίνεται μόνο με βάση το φορτίο αλλά και το μέγεθος του μορίου, γιατί η πηκτή δρα σαν μοριακό κόσκινο. Συνήθως χρησιμοποιούνται πηκτές αμύλου, αγαρόζης ή πολυακρυλαμιδίου, που έχουν διαφορετικά μεγέθη πόρων ανάλογα με την συγκέντρωση και τον βαθμό διασταύρωσης της πηκτής. Οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται συνήθως με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου (PAGE), συχνά παρουσία SDS (άλας νατρίου του θειϊκού δωδεκυλίου). Η ηλεκτροφόρηση γίνεται κάθετα, με την πηκτή σε γυάλινους σωλήνες ή ορθογώνιες πλάκες. Η χρήση μη συνεχούς ηλεκτροφόρησης πηκτής (disc gel electrophoresis) αυξάνει ακόμα περισσότερο την διαχωριστική ικανότητα της μεθόδου. Κατά την SDS - PAGE όλες οι πεπτιδικές αλυσίδες είναι ξεδιπλωμένες και αρνητικά φορτισμένες (διότι το SDS συνδέεται με τις πρωτεΐνες με την αναλογία 1,4g SDS/g πρωτεΐνης) και μετακινούνται προς την άνοδο με ταχύτητα που είναι αντιστρόφως ανάλογη του λογαρίθμου του μοριακού τους βάρους. Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό του M_r πρωτεϊνών, με την χρήση πρωτεϊνών αναφοράς γνωστού M_r , και σύγκριση της σχετικής κινητικότητας R_f (μετατόπισης πρωτεΐνης σε σχέση με το μέτωπο της χρωστικής) των αγνώστων με το R_f των γνωστών πρωτεϊνών. (Σχήμα 3)





B.

Σχήμα 3. Διαχωρισμός πρωτεϊνών με SDS-PAGE

A. Γενική διάταξη συσκευής ηλεκτροφόρησης για τον διαχωρισμό πρωτεϊνών με την μέθοδο SDS-PAGE

B. Πηκτική πολυακρυλαμίδιου μετά την ανάλυση των πρωτεϊνικών ζωνών και την χρώση τους με χρωστική Coomassie Brilliant Blue. Στην πρώτη διαδρομή διακρίνονται δείκτες (markers) μοριακών βαρών (kD)

Πειραματικό μέρος

Στην σημερινή άσκηση θα διαχωρίσετε ένα μείγμα ουσιών με χρωματογραφία στήλης σε CM-SephadexG50 και θα σας γίνει επίδειξη συστημάτων υγρής χρωματογραφίας, HPLC και διαχωρισμού πρωτεϊνών με ηλεκτροφόρηση ζώνης σε πηκτική αγαρόζη.

1. Διαχωρισμός ουσιών με CM-Sephadex (G -50)

Σε δύο στήλες (σιφόνια των 10ml) περιέχεται ρητίνη CM-Sephadex (G-50) σε ρυθμιστικό διάλυμα 0,1M οξικού καλίου, pH 6,0 (στήλη A) και 1,0M οξικού καλίου, pH 6,0

(στήλη B). Αφήνουμε το υπερκείμενο υγρό της στήλης να κατέβει στο επίπεδο της ρητίνης, προσθέτουμε 0,2ml του έγχρωμου διαλύματος των ουσιών προς διαχωρισμό (Πίνακας I) και όταν το δείγμα εισχωρήσει μέσα στην ρητίνη, εκλούουμε την κάθε στήλη με το αντίστοιχο ρυθμιστικό διάλυμα. Με ποια σειρά εκλούνται οι έγχρωμες ουσίες από την κάθε στήλη;

Μόλις αρχίσει η έκλυση της πρώτης έγχρωμης ουσίας από την στήλη Α αντικαταστήστε το υγρό έκλυσης με το διάλυμα υψηλής συγκέντρωσης (1,0M οξικό κάλιο, pH 6,0). Τι παρατηρείτε;

Στο **Φροντιστήριο** : Παρουσιάστε και εξηγήστε τα αποτελέσματά σας και συγκεκριμένα α) σειρά έκλυσης των ουσιών, β) επίδραση της συγκέντρωσης του ρυθμιστικού διαλύματος στη σειρά και ταχύτητα έκλυσης .

ΠΙΝΑΚΑΣ Ι

Μείγμα έγχρωμων ουσιών προς διαχωρισμό σε CM-Sephadex

Όνομα	Χρώμα	Μοριακό βάρος	Ιοντικός Χαρακτήρας
Κυανή δεξτράνη	Κυανούν	> 500.000	μη ιοντικός
Κυτόχρωμα C	Ερυθρό	12,400	pI πρωτεΐνης 10,7 (κατιόν σε pH <10,7)
DNP-γλυκίνη	Κίτρινο	241	ανιόν σε pH >3,0

2. Ηλεκτροφορητικός διαχωρισμός πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου κάτω από μετουσιωτικές συνθήκες (SDS-PAGE).

Κατά την πειραματική διαδικασία θα πραγματοποιήσετε ηλεκτροφορητικό διαχωρισμό μίγματος πρωτεϊνών που θα σας δοθεί σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου παρουσία του αποδιατακτικού μέσου SDS. Το σύστημα που θα χρησιμοποιηθεί για τον διαχωρισμό του πρωτεϊνικού παρασκευάσματος αποτελείται από το πήκτωμα διαχωρισμού, ύψους 7 cm και πάχους 1 mm και το πήκτωμα επιστοίβαξης όπου οι πρωτεΐνες διανύουν απόσταση 1 cm πριν εισχωρήσουν στο πήκτωμα διαχωρισμού και περιέχει θέσεις εισαγωγής του δείγματος που έχουν δημιουργηθεί με την βοήθεια οδοντωτής μήτρας. Για την ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων θα χρησιμοποιηθεί η συσκευή κάθετης ηλεκτροφόρησης HOEFER-SE250.

Εκτέλεση του πειράματος: Στο πρωτεϊνικό παρασκεύασμα που θα παραλάβετε (V=20 μl) θα προσθέσετε 5 μl διαλύματος διαλυτοποίησης (4x) και τα δείγματα θα θερμανθούν για 3 min στους 95°C ώστε οι πρωτεΐνες να αποδιαταχθούν πλήρως και να διευκολυνθεί η δημιουργία συμπλόκων SDS-πρωτεΐνης. Η διθειοθρεϊτόλη που χρησιμοποιείται, ανάγει τους τυχόν δισουλφιδικούς δεσμούς που υπάρχουν, ώστε να διαχωριστούν οι πρωτεΐνες στις υπομονάδες τους. Μετά την κατεργασία τα δείγματα τοποθετούνται στις θέσεις εισαγωγής του πηκτώματος επιστοίβαξης. Στην πρώτη θέση του πηκτώματος τοποθετούνται μάρτυρες μοριακών βαρών (5 μl) προκειμένου να είναι εύκολος ο προσδιορισμός του μοριακού βάρους των πρωτεϊνών του δείγματος.

Η ηλεκτροφόρηση γίνεται κάτω από σταθερή ένταση ρεύματος 30 mA έως ότου ο δείκτης (κυανό της βρωμοφαινόλης) να εξέλθει από το πήκτωμα διαχωρισμού. Στο τέλος της ηλεκτροφόρησης η πηκτή εμβαπτίζεται σε μονιμοποιητικό διάλυμα (10% v/v οξικό οξύ, 50% v/v αιθανόλη) που περιέχει μπλέ χρωστική (0.1% Coomassie Brilliant Blue R-250). Ακολουθεί ο αποχρωματισμός της πηκτής (διάλυμα: 10% v/v οξικού οξέος, 10% v/v αιθανόλης) και τέλος αφού οι πρωτεϊνικές ζώνες διακρίνονται καθαρά η πηκτή ξεπλένεται με νερό.

Στο **Φροντιστήριο**: Παρουσιάστε τα αποτελέσματα σας και με βάση την ηλεκτροφορητική κινητικότητα των πρωτεϊνών του μάρτυρα μοριακών βαρών σχεδιάστε καμπύλη αναφοράς (Μάζα πρωτεΐνης / σχετική κινητικότητα). Χρησιμοποιώντας την καμπύλη αποφανθείται για το μοριακό βάρος και το πρωτεϊνικό περιεχόμενο (ποιές πρωτεΐνες περιέχει) του δείγματος σας.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ:

Η σύσταση των επιμέρους στοιχείων του συστήματος είναι:

Διάλυμα δοχείων ηλεκτροφόρησης:

25 mM Tris (Τρις-υδροξυμεθυλ-αμινομεθάνιο)
0.19 M γλυκίνη
0.1% SDS (Άλας νατρίουθειϊκού δωδεκυλίου)
pH 8.9

Πήκτωμα επιστοίβαξης:

5% ακρυλαμίδιο
0.25% bis-ακρυλαμίδιο
0.5% SDS
0.125 M Tris-Cl pH 6.8

για τον πολυμερισμό

0.08% APS (Υπερθειϊκό αμώνιο)
0.04% TEMED (N,N,N,N-τετραμεθυλο-αιθυλενο-
διαμίνη)

Πήκτωμα διαχωρισμού:

10% ακρυλαμίδιο
0.62% bis-ακρυλαμίδιο
0.5% SDS
0.375 M Tris-Cl pH 8.9

για τον πολυμερισμό

0.08% APS
0.04% TEMED

Τα πρωτεϊνικά δείγματα πριν εισαχθούν στο πήκτωμα επιστοίβαξης διαλύονται στο διάλυμα διαλυτοποίησης των δειγμάτων το οποίο αποτελείται από:

0.0625 M Tris-Cl pH 6.8
2% SDS
5 mM DTT (Διθειοθρεϊτόλη)
10% γλυκερόλη
0.02% κυανού της βρωμοφαινόλης

*συνήθως παρασκευάζεται σε 4 φορές πυκνότερο (4x)

ΑΣΚΗΣΗ 4^η

ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΜΙΝΟΞΕΩΝ & ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

Εισαγωγή

Οι πρωτεΐνες έχουν καθοριστικούς ρόλους σε όλες σχεδόν τις βιολογικές διεργασίες και είναι κυρίως υπεύθυνες για τον φαινότυπο των διαφόρων ειδών. Ο ανθρώπινος οργανισμός εκφράζει πάνω από 30.000 διαφορετικές πρωτεΐνες, που είναι πολυμερή των ίδιων 20 L-αμινοξέων σε διαφορετικούς συνδυασμούς.

Στις πρωτεΐνες τα αμινοξέα συνδέονται με πεπτιδικούς δεσμούς, που σχηματίζονται ανάμεσα στην α-αμινομάδα και στην α-καρβοξυλομάδα διαδοχικών αμινοξέων. Τα χαρακτηριστικά των διαφόρων πρωτεϊνών εξαρτώνται από την πρωτοταγή δομή (αλληλουχία αμινοξέων) και τη διαμόρφωση (τριδιάστατη διάταξη) των πολυπεπτιδικών αλυσίδων που τις αποτελούν και που καθορίζονται από την γενετική πληροφορία του οργανισμού.

Τα αμινοξέα κατατάσσονται σε διάφορες κατηγορίες ανάλογα με τις φυσικοχημικές τους ιδιότητες, που σε μεγάλο βαθμό καθορίζονται από τις πλευρικές τους αλυσίδες (υδρόφοβα, υδρόφιλα, φορτισμένα, αφόρτιστα κλπ) και βάσει των οποίων είναι δυνατός ο διαχωρισμός τους. Οι πρωτεΐνες επίσης κατατάσσονται σε διάφορες κατηγορίες ανάλογα με τον βιολογικό ρόλο που επιτελούν (π.χ. ένζυμα, δομικές, μεταφορικές, αποθηκευτικές, αμυντικές, ρυθμιστικές πρωτεΐνες), το σχήμα τους (π.χ. ινώδεις, σφαιρικές), την προσθετική ομάδα που τυχόν περιέχουν (π.χ. λιπο-, γλυκο-, νουκλεο-, φωσφο-, μεταλλο- πρωτεΐνες) και άλλα κριτήρια. Οι πρωτεΐνες επίσης διαφέρουν στο μέγεθος (Μοριακό Βάρος) και στο ισοηλεκτρικό σημείο (pI), ανάλογα με τον αριθμό και το είδος των αμινοξέων που περιέχουν.

Οι μέθοδοι απομόνωσης, διαχωρισμού, ταυτοποίησης και μελέτης των αμινοξέων και των πρωτεϊνών είναι παρόμοιες και έχουν πολύ μεγάλη σημασία στην Βιοχημεία και στην κλινική πράξη. (Βλέπε Stryer, κεφάλαια 3 και 4).

Σκοπός της σημερινής άσκησης είναι να δούμε:

- I) τον διαχωρισμό αμινοξέων με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας και την ανίχνευση τους με την χρωστική δοκιμή της νινυδρίνης
- II) πώς επηρεάζεται η διαλυτότητα πρωτεϊνών από α) το pH και β) τη θερμοκρασία

I. ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΑΜΙΝΟΞΕΩΝ

Διαχωρισμός αμινοξέων με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (Thin Layer Chromatography – TLC) και ταυτοποίηση τους μέσω της τιμής R_f

Στη χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας η *στατική φάση* είναι ένα προσροφητικό όπως ξηροπηκτική του διοξειδίου του πυριτίου, το οξείδιο του αργιλίου ή η γη των διατόμων, που εφαρμόζεται σε λεπτή στρώση πάνω σε γυάλινη πλάκα ή ένα φύλλο αλουμινίου (σαν στατική φάση λειτουργεί και το νερό που ενυδατώνει σε μεγάλο βαθμό τα υλικά αυτά). Μετά την εναπόθεση των δειγμάτων (π.χ. μίγμα αμινοξέων), η πλάκα χρωματογραφίας τοποθετείται σε δοχείο (θάλαμος ανάπτυξης), το οποίο περιέχει ποσότητα μίγματος οργανικών διαλυτών (*κινητή φάση*) και το επίπεδο του οποίου βρίσκεται κάτω από το σημείο εφαρμογής του προς διαχωρισμό μίγματος των ουσιών.

Το δοχείο κλείνει ερμητικά ώστε ο θάλαμος να κορεστεί με τους ατμούς της κινητής φάσης. Ο διαλύτης ανέρχεται με τριχοειδή δράση και συμπαρασύρει τις

εναποθεθείσες ουσίες. Η ταχύτητα κίνησης της κάθε ουσίας εξαρτάται από την συγγένεια της προς τις δυο φάσεις. Δηλαδή, μια ουσία υδρόφιλη κινείται σχετικά αργά (διότι αλληλεπιδρά ισχυρότερα με την πολική-υδρόφιλη στατική φάση) ενώ μια ουσία υδρόφοβη κινείται σχετικά γρήγορα (διότι αλληλεπιδρά ισχυρότερα με την οργανική-υδρόφοβη κινητή φάση).

Η χρωματογραφία σταματά όταν το μέτωπο του διαλύτη φθάσει κοντά στο πάνω άκρο της πλάκας. Μετά από κατάλληλη επεξεργασία ανιχνεύουμε τη θέση των ουσιών επάνω στην πλάκα και προσδιορίζεται η τιμή του Rf που είναι χαρακτηριστική παράμετρος για κάθε ουσία κάτω από τις συγκεκριμένες συνθήκες διαχωρισμού.

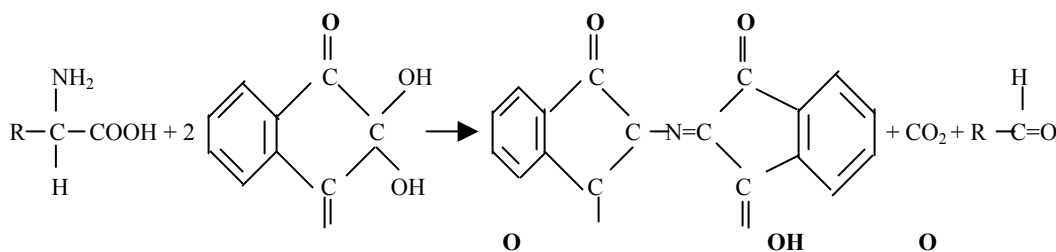
$R_f = (\text{απόσταση της ουσίας από την αρχή}) / (\text{απόσταση μετώπου διαλύτη από την αρχή})$.

Η ταυτοποίηση των αμινοξέων γίνεται με την βοήθεια πρότυπων διαλυμάτων αμινοξέων που χρωματογραφούνται ταυτόχρονα με το δείγμα. Η ανίχνευση των αμινοξέων γίνεται με το αντιδραστήριο νινυδρίνης.

Αντίδραση Νινυδρίνης.

Διάφορες χρωστικές αντιδράσεις χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό των ελευθέρων αμινοξέων ή αυτών που βρίσκονται συνδεδεμένα στις πρωτεΐνες. Αυτές οι αντιδράσεις είναι γενικές ή ειδικές. Γενική αντίδραση είναι η αντίδραση νινυδρίνης (βλέπε παρακάτω) στην οποία είναι δυνατόν να δώσουν σχεδόν όλα τα ελεύθερα αμινοξέα γιατί για την αντίδραση αυτή είναι σημαντική η γενική χημική δομή των αμινοξέων. Οι ειδικές αντιδράσεις αντίθετα γίνονται στην πλάγια αλυσίδα αμινοξέων (R ομάδα) επομένως την δίνουν τόσο τα ελεύθερα όσο και τα συνδεδεμένα στις πρωτεΐνες αντίστοιχα αμινοξέα.

Όλα τα ελεύθερα α-αμινοξέα αντιδρούν με νινυδρίνη και δίνουν CO₂, μία αλδεΐδη που περιέχει ένα άτομο άνθρακα λιγότερο από το αμινοξύ και μια κυανοϊώδη χρωστική.



Νινυδρίνη

Η αντίδραση αυτή είναι γενική και δίνεται σε pH 5-7 από όλα τα α-αμινοξέα που έχουν ελεύθερη αμινομάδα. Η αντίδραση είναι επίσης θετική και για τις πρωτοταγείς αμίνες και την αμμωνία, αλλά χωρίς την παραγωγή CO₂. Τα αμινοξέα προλίνη και υδροξυπρολίνη αντιδρούν με την νινυδρίνη αλλά δίνουν ένα παράγωγο που έχει κίτρινο χρώμα. Η αντίδραση νινυδρίνης είναι πολύ ευαίσθητη και ιδανική για την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό αμινοξέων που βρίσκονται ελεύθερα στο αίμα και στα ούρα ή που προέρχονται από υδρόλυση πρωτεϊνών και διαχωρισμό με χρωματογραφικές μεθόδους. Με την αντίδραση νινυδρίνης ανιχνεύεται έως 1μg αμινοξέος, αλλά ο προσδιορισμός ng ποσοτήτων είναι δυνατός με την αντίδραση της φθορεσκαμίνης που δημιουργεί ένα φθορίζον προϊόν.

Αντιδραστήρια

Πρότυπα διαλύματα αλανίνης, μεθειονίνης και σερίνης (0,25 mg/ml) και μείγμα των τριών αμινοξέων.

Διάλυμα προπανόλης : νερού (7:3) (κινητή φάση)

Διάλυμα νινυδρίνης (2% σε αλκοόλη)

Υλικά-Σκεύη

Πλάκες χρωματογραφίας (Silica gel 60), θάλαμος ανάπτυξης, τριχοειδείς σωλήνες, στεγνωτήρας, θερμαντικός θάλαμος.

Πρακτικό Μέρος

Τοποθετούμε το διάλυμα προπανόλης:νερού μέσα στο γυάλινο δοχείο χρωματογραφίας. Κλείνουμε ερμητικά το δοχείο και περιμένουμε για 30 min ώστε η ατμόσφαιρα του θαλάμου να κορεσθεί από τους ατμούς του διαλύτη. Στην πλάκα χρωματογραφίας και με τη βοήθεια ενός μαλακού μολυβιού χαράσσουμε ελαφρά σε μια απόσταση 1.5 cm από το ένα άκρο της μια γραμμή. Πάνω σε αυτήν την γραμμή και σε κανονικές αποστάσεις σημειώνουμε τις θέσεις εφαρμογής των προτύπων διαλυμάτων των αμινοξέων και του μίγματος. Για την εφαρμογή των διαλυμάτων συνήθως χρησιμοποιούμε τριχοειδείς σωλήνες. Η εφαρμογή γίνεται με μεγάλη προσοχή και σε δυο-τρεις δόσεις, ξηραίνοντας με την βοήθεια του στεγνωτήρα μεταξύ των δόσεων το σημείο εφαρμογής (η διάμετρος της κηλίδας του υγρού πρέπει να παραμείνει μικρή και το στρώμα του υλικού δεν πρέπει να διαταραχθεί).

Στη συνέχεια, με μεγάλη προσοχή, τοποθετούμε την πλάκα λεπτής στιβάδας μέσα στο δοχείο κατά τέτοιο τρόπο, ώστε η σειρά των κηλίδων να είναι παράλληλη προς την επιφάνεια του υγρού, και οπωσδήποτε πάνω από αυτήν.

Όταν το μέτωπο του διαλύτη φθάσει τα 2 εκ. περίπου από το τέλος της πλάκας σταματά η χρωματογράφιση και μεταφέρουμε την πλάκα στον απαγωγό. Σημειώνουμε προσεκτικά με μολύβι το μέτωπο του διαλύτη και ξηραίνουμε την πλάκα με τη βοήθεια του στεγνωτήρα ή την αφήνουμε για λίγα λεπτά στον απαγωγό.

Για να αναγνωριστούν τα σημεία στα οποία βρίσκονται τα αμινοξέα, η πλάκα εμβαπτίζεται στιγμιαία σε διάλυμα νινυδρίνης, στεγνώνεται και τοποθετείται στον θερμαντικό θάλαμο στους 110 °C μέχρι να εμφανιστούν οι σκουρόχρωμες κηλίδες των αμινοξέων. Μετά την εμφάνιση των κηλίδων σημειώνουμε με το μολύβι το κέντρο των κηλίδων και υπολογίζουμε τις αποστάσεις μετακίνησης από την αρχή.

II. ΔΙΑΛΥΤΟΤΗΤΑ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

A. Επίδραση του pH στην διαλυτότητα των πρωτεϊνών

Οι πλευρικές αλυσίδες (R) μερικών αμινοξικών καταλοίπων καθώς και το αμινοτελικό και καρβοξυτελικό κατάλοιπο των πρωτεϊνών φέρουν ομάδες που μπορούν να ιονισθούν (Πίνακας 1).

Η ιονισμένη μορφή προκύπτει είτε από την απώλεια H^+ (για τις όξινες ομάδες), οπότε η πρωτεΐνη αποκτά ένα αρνητικό φορτίο, είτε από την πρόσληψη H^+ (για τις βασικές ομάδες), οπότε η πρωτεΐνη αποκτά ένα θετικό φορτίο. Επειδή οι ομάδες που μπορούν να ιονισθούν έχουν διαφορετική pK_a είναι φανερό ότι αν μια ομάδα είναι ιονισμένη ή όχι, και επομένως αν η πρωτεΐνη φέρει ένα φορτίο ή όχι, εξαρτάται από το pH του διαλύματος σύμφωνα με την εξίσωση Henderson – Hasselbalch.

$$pH = pK_a + \log \frac{\text{μη πρωτονιωμένη μορφή}}{\text{πρωτονιωμένη μορφή}}$$

Από την εξίσωση αυτή προκύπτει ότι η pK_a ισούται με την τιμή του pH, στην οποία η πρωτονιωμένη και μη πρωτονιωμένη μορφή μιας ομάδας βρίσκονται σε ίσα ποσά στο διάλυμα. Σε τιμές pH που ισούνται με $pK_a \pm 1$ μιας ομάδας, η ομάδα αυτή δρα σαν ρυθμιστής του pH του διαλύματος.

Σημειώστε ότι οι όξινες ομάδες είναι ιονισμένες σε $pH >$ από την pK_a τους, ενώ οι βασικές ομάδες είναι ιονισμένες σε $pH <$ από την pK_a τους.

Πίνακας 1. Ομάδες αμινοξέων που ιονίζονται σε πρωτεΐνες

Ομάδα	Οξύ	Βάση	Χαρακτηριστική pK_a
Τελική -COOH	-COOH	-COO ⁻	~ 3,0
-NH ₂	-NH ₃ ⁺	-NH ₂	~ 8,0
Πλευρική -COOH Asp, Glu	-COOH	-COO ⁻	~ 4,0
-SH Cys	-SH	-S ⁻	~ 8,5
-OH Tyr	-OH	-O ⁻	~10,0
=N His	=NH ⁺	=N	~ 6,5
-NH ₂ Lys	-NH ₃ ⁺	-NH ₂	~ 10,0
=NH Arg	=NH ₂ ⁺	=NH	~ 12,0

Οι πρωτεΐνες φέρουν πολλά φορτία αλλά, ανάλογα με το pH, το καθαρό φορτίο τους μπορεί να είναι θετικό ή αρνητικό. Το pH στο οποίο ο ολικός αριθμός θετικών φορτίων μιας πρωτεΐνης είναι ίσος με τον ολικό αριθμό αρνητικών φορτίων (καθαρό φορτίο πρωτεΐνης = 0) ονομάζεται **ισοηλεκτρικό σημείο (pI)**. Σε $pH = pI$, μια πρωτεΐνη έχει την μικρότερη διαλυτότητα γιατί τα μόριά της συσσωματώνονται και καθιζάνουν ευκολότερα.

Παράδειγμα: Στο κανονικό pH του γάλατος (6,3 - 6,6) η καζεΐνη, μια πρωτεΐνη που βρίσκεται στο γάλα, είναι διαλυμένη σε κolloειδή μορφή. Όταν όμως το pH του γάλατος ελαττωθεί, λόγω ανάπτυξης βακτηριδίων που ελευθερώνουν οξέα, και φτάσει γύρω στο 4,7 που είναι το pI της καζεΐνης, τότε η καζεΐνη θρομβώνεται και το γάλα πήζει.

Πρακτικό Μέρος

Καθίζηση στο ισοηλεκτρικό σημείο.

Σε μια σειρά από 5 πλαστικούς σωλήνες φυγοκέντρου τοποθετείστε τα κάτωθι αντιδραστήρια και σημειώστε σε ποιο σωλήνα παρατηρείτε το περισσότερο θόλωμα ή ίζημα:

Αντιδραστήρια (ml)	σωλήνας 1	σωλήνας 2	σωλήνας 3	σωλήνας 4	σωλήνας 5
0,5M CH ₃ COOH	7,8	7,2	5,0	1,8	0,8
0,5M CH ₃ COONa	0,2	0,8	3,0	6,2	7,2
0,5% διάλυμα καζεΐνης	2	2	2	2	2

Υπολογίστε το pH του διαλύματος κάθε σωλήνα από την εξίσωση Henderson-Hasselbalch (pK_a CH₃COOH=4,75).

Σε ποια τιμή pH παρατηρείτε το περισσότερο ίζημα;

Ποια είναι η τιμή pI της καζεΐνης που βρήκατε;

B. Επίδραση της θερμοκρασίας στην διαλυτότητα των πρωτεϊνών

Οι περισσότερες πρωτεΐνες αρχίζουν να μετουσιώνονται σε θερμοκρασίες μεγαλύτερες από 40°C και η μετουσίωση είναι συνήθως πλήρης στους 60-70°C. Με την θέρμανση καταστρέφεται η φυσική διαμόρφωση (δευτεροταγής και τριτοταγής δομή) των πρωτεϊνών και αυτό έχει συνήθως σαν αποτέλεσμα την ελάττωση της διαλυτότητας και την καταβύθισή τους, λόγω της δημιουργίας τυχαίων συσσωματωμάτων που είναι αδιάλυτα (Παράδειγμα η πήξη της λευκωματίνης του αυγού).

Πρακτικό Μέρος

Καθίζηση με θέρμανση.

Σε 3 δοκιμαστικούς σωλήνες βάλετε από 2ml 2% διαλύματος λευκωματίνης και προσθέσετε στον σωλήνα 1, 0,2 ml H₂O, στον σωλήνα 2, 0,2 ml 1N HCl και στο σωλήνα 3, 0,2 ml 1N NaOH. Θερμάνετε τους σωλήνες σε υδατόλουτρο σε 100°C για 10 λεπτά και κρυσώστε σε θερμοκρασία δωματίου.

Τι παρατηρείτε;

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΩΝ ΑΣΚΗΣΕΩΝ

Πειραματική Βιοχημεία
J. M. Clark, Jr & R. L. Switzer
Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, 1992

An Introduction to Practical Biochemistry (2nd edition)
D. T. Plummer
McGraw-Hill, 1978

Analytical Biochemistry (2nd edition)
D. J. Holme & Peck
Longman Scientific & Technical, 1993

Principles and Techniques of Practical Biochemistry (5th edition)
K. Wilson & J. Walher (editors)
Cambridge University Press 2000

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Στη συγγραφή των εργαστηριακών ασκήσεων βοήθησε η πρόσβαση σε παρόμοιες ασκήσεις των κάτωθι εργαστηρίων

Εργ. Βιολογικής Χημείας, Τμήμα Ιατρικής,
Αρ. Παν. Θεσσαλονίκης (Καθ. Α. Τρακατέλλης)

Εργ. Βιολογικής Χημείας, Τμήμα Ιατρικής,
Παν. Ιωαννίνων (Καθ. Ο. Τσόλας)

Εργ. Βιολογικής Χημείας, Τμήμα Ιατρικής,
Κ. Παν. Αθηνών (Δρ. Θ. Κεφαλάς & Δρ. Γ. Παλαιολόγος)

Εργ. Βιοχημείας, Τμήμα Χημείας,
Παν. Πατρών (Καθ. Κ. Τσίγανος)

Dept. of Biochemistry, King's College,
University of London (Profs. H. Arnstein,
M. Scrutton & B. Halliwell)

ΙΑΤΡΙΚΗ ΧΗΜΕΙΑ.

ΑΝΑΛΥΤΙΚΗ ΥΛΗ ΤΟΥ ΜΑΘΗΜΑΤΟΣ.

Στόχοι του μαθήματος:

1. Σε βάθος εκμάθηση επιλεγμένων κεφαλαίων γενικής, φυσικής, οργανικής και βιοοργανικής χημείας με τελικό στόχο την διαμόρφωση μιας γενικής βάσης γνώσεων και αντιλήψεων απαραίτητης για την κατανόηση της βιοχημείας, φυσιολογίας, φαρμακολογίας και κλινικής χημείας.
2. Εκμάθηση, μέσω παραδειγμάτων, της εφαρμογής των χημικών γνώσεων στην ερμηνεία των βιοιατρικών φαινομένων και την κατανόηση των βιοιατρικών εφαρμογών.
3. Εισαγωγή στην βιοχημεία πρωτεϊνών και ενζύμων
4. Εξοικείωση των σπουδαστών με τις αρχές ενόργανης ανάλυσης.
5. Εξοικείωση των σπουδαστών με τις αρχές εργαστηριακών μελετών.

Εκπαιδευτικοί στόχοι των διαλέξεων:

Ενότητα 1. ΠΕΡΙΟΔΙΚΟΣ ΠΙΝΑΚΑΣ – ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΒΙΟΑΝΟΡΓΑΝΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ.

Τι πρέπει να ξέρουν καλά οι φοιτητές:

- Νόμος της περιοδικότητας κατά Mendeleev και κατά Mosley και η σχέση του με την ηλεκτρονιακή δομή του ατόμου. Περιοδικές ιδιότητες των στοιχείων και σχέση των ιδιοτήτων αυτών με την ηλεκτρονιακή διαμόρφωση του ατόμου: ενέργεια ιονισμού, ηλεκτρονιακή συγγένεια, ηλεκτραρνητικότητα, μέγεθος των ατόμων, μέγεθος των ιόντων, οξειδοαναγωγικές ιδιότητες.
- Περιοδικός πίνακας από την άποψη της ιατρικής: βασικά και ιχνοστοιχεία του ανθρώπινου σώματος. Τοξικά ιχνοστοιχεία και παραδείγματα επίδρασης τους στην ανθρώπινη υγεία
- Ζωογόνα στοιχεία και η επιλογή τους από τη φύση. Συνάφεια του βιολογικού ρόλου και των χημικών ιδιοτήτων των ζωογόνων στοιχείων.
- Παραδείγματα εμπλοκής ιχνοστοιχείων σε ορισμένες παθολογικές καταστάσεις. Ανεπάρκεια και υπερεπάρκεια στοιχείου.

Τι πρέπει να έχουν ακούσει οι φοιτητές:

- Τοξικά ιχνοστοιχεία και προβλήματα μόλυνσης του περιβάλλοντος.

Ενότητα 2. ΧΗΜΙΚΟΣ ΔΕΣΜΟΣ ΚΑΙ ΜΗ ΟΜΟΙΟΠΟΛΙΚΕΣ ΔΙΑΜΟΡΙΑΚΕΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ

Τι πρέπει να ξέρουν καλά οι φοιτητές:

- Θεωρία των μοριακών τροχιακών. Σίγμα και πι δεσμοί.

- Υβριδοποίηση των ατομικών τροχιακών (sp , sp^2 , dsp^2 , sp^3 , dsp^3 , d^2sp^3) και η στερεοχημική δομή των μορίων. Πρότυπο ΑΖΗΣΣ (Άπωση Ζευγών Ηλεκτρονίων Στοιβάδας Σθένους)
- Μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις και η φύση τους: δυνάμεις Van der Waals, London, δεσμός υδρογόνου.
- Φυσικο-χημικές ιδιότητες των χημικών ενώσεων και μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις.
- Ο ρόλος μη ομοιοπολικών αλληλεπιδράσεων στην διαμόρφωση της δευτεροταγούς, τριτοταγούς δομής και αλληλεπίδρασης των πρωτεϊνών.

Τι πρέπει να έχουν ακούσει οι φοιτητές:

- Μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις και δρεπανοκυτταρική αναιμία

Ενότητα 3. ΣΥΜΠΛΟΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ ΚΑΙ ΣΥΜΠΛΟΚΟΘΕΡΑΠΕΙΑ

Τι πρέπει να ξέρουν καλά οι φοιτητές:

- Ορισμός των σύμπλοκων ενώσεων ή ενώσεων συναρμογής.
- Υποκαταστάτες (ligands), πολυδραστικός/ μονοδραστικός/ χηλικός υποκαταστάτης και χηλικά σύμπλοκα.
- Σταθερότητα των σύμπλοκων. Σταθερότητα των σύμπλοκων με βάση την θεωρία σκληρών και μαλακών οξέων και βάσεων.
- Σταθερότητα χηλικών ενώσεων.
- Παραδείγματα σύμπλοκων με βιολογική σημασία: συμπλοκοποιημένος σίδηρος στην αίμη, συμπλοκοποιημένος ψευδάργυρος στην καρβοξυπεπτιδάση, ανθρακική ανυδράση. Μεταλλοπρωτεΐνες.
- Συμπλοκοθεραπεία (chelation therapy) και οι παθολογικές καταστάσεις που εφαρμόζονται. Συμπλοκοποιητες που βρίσκουν χρήση στην συμπλοκοθεραπεία και αντίστοιχα φαρμακευτικά σκευάσματα.
- Αιμοσιδήρωση και φαρμακευτική αντιμετώπισή της.

Τι πρέπει να έχουν ακούσει οι φοιτητές:

- Φύση δεσμού στα σύμπλοκα: θεωρία δεσμού-σθένους, θεωρία κρυσταλλικού πεδίου.
- Φασματοσκοπικές και μαγνητικές ιδιότητες των συμπλόκων και ερμηνεία τους με βάση τις θεωρίες δεσμού-σθένους και κρυσταλλικού πεδίου.
- Στερεοχημική δομή των συμπλόκων

Ενότητα 4. ΟΞΕΟΒΑΣΙΚΗ ΙΣΟΡΡΟΠΙΑ ΚΑΙ ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΤΟΥ ΣΩΜΑΤΟΣ. ΗΛΕΚΤΡΟΛΥΤΕΣ ΚΑΙ ΗΛΕΚΤΡΟΛΥΤΙΚΗ ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΑ ΤΩΝ ΑΜΙΝΟΞΕΩΝ.

Τι πρέπει να ξέρουν καλά οι φοιτητές:

- Ιδιότητες των ηλεκτρολυτικών διαλυμάτων. Ηλεκτρολύτες του εξωκυτταρίου - και ενδοκυτταρίου υγρού.
- Οξέα-βάσεις κατά Lewis.
- pH του αίματος
- Ρυθμιστικά διαλύματα, χωρητικότητα του ρυθμιστικού διαλύματος.
- Εξίσωση Henderson-Hasselbalch και παρασκευή των ρυθμιστικών διαλυμάτων.
- Ρυθμιστικά συστήματα του αίματος.
- Ηλεκτρολυτική συμπεριφορά των αμινοξέων.
- Επιδράσεις του CO_2 , των HCO_3^- και του H_2CO_3 στο pH του αίματος.

Ενότητα 5. ΕΝΟΡΓΑΝΗ ΑΝΑΛΥΣΗ (I και II).

Τι πρέπει να ξέρουν καλά οι φοιτητές:

- Φασματοσκοπία ορατού και υπεριώδους – φυσικοχημική βάση της μεθόδου. Νόμος LAMBERT - BEER. Μοριακός συντελεστής απορροφητικότητας. Αρχές ποιοτικής και ποσοτικής ανάλυσης με χρήση φασματοσκοπίας ορατού και υπεριώδους: πρότυπα διαλύματα, βαθμονόμηση του οργάνου, καμπύλη αναφοράς.
- Χρωματογραφία - φυσικοχημική βάση της μεθόδου. Αέρια και υγρή χρωματογραφία . Χρωματογραφία κατανομής, ιονανταλλαγής, πηκτής. Παραδείγματα εφαρμογών στην κλινική χημεία και μελέτη των πρωτεϊνών.
- Ηλεκτροφόρηση- φυσικοχημική βάση της μεθόδου και παραδείγματα εφαρμογών.

Τι πρέπει να έχουν ακούσει οι φοιτητές:

- Χημειομετρία των μετρήσεων: ακρίβεια, επαναληψιμότητα, τυχαία και συστηματικά σφάλματα.
- Φασματοσκοπία μαζών , πυρηνικός συντονισμός και εφαρμογές τους στην μελέτη των πρωτεϊνών

Ενότητα 6. ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΔΙΑΣΠΟΡΑΣ.

Τι πρέπει να ξέρουν καλά. οι φοιτητές:

- Συστήματα διασποράς: μίγματα, κολλοειδή συστήματα, διαλύματα.
- Διαλυτότητα, ακόρεστα, κορεσμένα και υπέρκορα διαλύματα. Τρόποι εκφράσεως της συγκέντρωσης.
- Υδροφιλικότητα/ υδροφοβικότητα/λιποφιλικότητα των χημικών ενώσεων και πρόβλεψη των ιδιοτήτων αυτών από την μελέτη της χημικής δομής της ένωσης. Υδρόφιλες λειτουργικές ομάδες.
- Προσθετικές ιδιότητες των διαλυμάτων: ώσμωση. Υποτονικά, ισοτονικά και υπερτονικά διαλύματα. Πλασμόλυση και αιμόλυση. Φαινόμενο της ώσμωσης ως βάση της λειτουργίας του τεχνητού νεφρού/ αιμοκάθαρσης.
- Κολλοειδή συστήματα: αερόλυμα, γαλάκτωμα, αιώρημα.
- Κολλοειδή συστήματα στο ύδωρ: υδρόφοβα και υδρόφιλα κολλοειδή. Θρόμβωση κολλοειδούς και οι μηχανισμοί της.

Τι πρέπει να έχουν ακούσει οι φοιτητές:

- Αύξηση υδατοδιαλυτότητας μιας ξενοβιοτικής ουσίας ως τρόπος αποτοξίνωσης του οργανισμού.

Ενότητα 7. ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΗΝ ΟΡΓΑΝΙΚΗ ΧΗΜΕΙΑ.

Τι πρέπει να ξέρουν καλά οι φοιτητές:

- Τροχιακά του άνθρακα : sp^3 , sp^2 , sp υβριδισμός.
- Συζυγιακά συστήματα.
- Ηλεκτρονιακά φαινόμενα και κατανομή του ηλεκτρονιακού νέφους στα μόρια: Επαγωγικό (I) και συζυγιακό (R) φαινόμενα. Συντονισμός.
- Ταξινόμηση αντιδράσεων και αντιδραστηρίων στην οργανική χημεία. Πυρινόφιλα και ηλεκτρονιόφιλα αντιδραστήρια, ελεύθερες ρίζες.
- Λειτουργικές ομάδες των οργανικών ενώσεων.
- Μηχανισμοί αντιδράσεων πυρηνόφιλης υποκαταστάσεως SN_1 , SN_2 .

Τι πρέπει να έχουν ακούσει οι φοιτητές:

- Κατάταξη οργανικών ενώσεων.
- Γενικές αρχές ονοματολογίας οργανικών ενώσεων.
- Ομόλογες σειρές.

Καρβανιόντα και καρβοκατιόντα

Ενότητα 8. ΣΤΕΡΕΟΧΗΜΕΙΑ ΤΩΝ ΟΡΓΑΝΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ.

Τι πρέπει να ξέρουν καλά οι φοιτητές:

- Γεωμετρική ισομέρεια : CIS - TRANS, Z-E, προτεραιότητα υποκαταστατών.
- Εναντιομέρεια (οπτική ισομέρεια) : D-L, R-S μορφές. Οπτική ενεργότητα.. (+) δεξιόστροφα και (-) αριστερόστροφα εναντιομερή.
- Προβολές FISCHER.
- Ρακεμικά μείγματα. Απομόνωση εναντιομερών. Ρακεμοποίηση.
- Διαστερεοϊσομέρεια, μεσομορφές. Διαμορφομέρεια - προβολές NEWMAN.

Τι πρέπει να έχουν ακούσει οι φοιτητές:

- Ειδική στροφική ικανότητα.

Ενότητα 9. ΥΔΡΟΓΟΝΑΝΘΡΑΚΕΣ-ΑΡΩΜΑΤΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ-ΣΤΕΡΕΟΕΙΔΗ.

Τι πρέπει να ξέρουν καλά οι φοιτητές:

- Αλειφατικοί Υδρογονάνθρακες: αλκάνια, αλκένια, αλκίνια.

- Αρωματικοί υδρογονάνθρακες: αρωματικός χαρακτήρας, κανόνας του HUCKEL.
- Γενικές ιδιότητες και σπουδαιότερες αντιδράσεις υδρογονανθράκων. Αντιδράσεις ηλεκτρονιόφιλης προσθήκης (πχ. προσθήκη υδραλογόνων σε αλκένια - κανόνας MARKOVNIKOV).
- Στεροειδή: ορισμός, πρόδρομη ένωση, βασικές κατηγορίες και οι βιολογικοί τους ρόλοι;

Τι πρέπει να έχουν ακούσει οι φοιτητές:

- Αντιδράσεις αρωματικής ηλεκτρονιόφιλης υποκαταστάσεως (πχ. νίτρωση βενζολίου).
- Επίδραση υποκαταστατών στην ταχύτητα και στην κατεύθυνση της αντιδράσεως.

Ενότητα 10. ΑΠΛΕΣ ΟΞΥΓΟΝΟΥΧΕΣ ΚΑΙ ΘΕΙΟΥΧΕΣ ΟΡΓΑΝΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ

Τι πρέπει να ξέρουν καλά οι φοιτητές:

- Αλκοόλες, πολυόλες, φαινόλες, διαλκυλαιθέρες, θειόλες, , θειοαιθέρες.
- Μερικές αντιδράσεις των απλών οξυγονούχων και θεούχων οργανικών ενώσεων.
- Σουλφιδικές - δισουλφιδικές ομάδες
- Οι όξινες ιδιότητες του υδρογόνου στις αλκοόλες και τις φαινόλες.

Τι πρέπει να έχουν ακούσει οι φοιτητές:

- Σουλφονικά οξέα και τα παράγωγα του 4-αμινοβενζολοσουλφονικού οξέος - τα φάρμακα των σουλφοναμιδίων.

Ενότητα 11. ΚΑΡΒΟΝΥΛΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ : ΑΛΔΕΥΔΕΣ - ΚΕΤΟΝΕΣ

Τι πρέπει να ξέρουν καλά οι φοιτητές:

- Φυσικοχημικές ιδιότητες του καρβονυλίου.
- Ταυτομέρεια ενόλης - κετόνης.
- Αντιδράσεις πυρηνόφιλης προσθήκης. Ημιακετάλες, ακετάλες, κετάλες.
- Αντιδράσεις συμπυκνώσεως με αμίνες (R-NH₂). Ιμίνες – βάσεις του Schiff.
- Αλδολική συμπύκνωση.
- Αντιδράσεις και προϊόντα οξειδώσεως και αναγωγής των καρβονυλικών ενώσεων.
- Στοιχεία χημείας υδατανθράκων.

Τι πρέπει να έχουν ακούσει οι φοιτητές:

- Αντιδράσεις καρβονυλικών ενώσεων με διαγνωστική αξία.

Ενότητα 12. ΚΑΡΒΟΞΥΛΙΚΑ ΟΞΕΑ ΚΑΙ ΤΑ ΠΑΡΑΓΩΓΑ ΤΟΥΣ.

Τι πρέπει να ξέρουν καλά οι φοιτητές:

- Γενικές ιδιότητες : ιοντισμός οξέων, συντονισμός καρβοξυλικής ομάδας.
- Ακυλοπαράγωγα οξέων : ακυλαλογονίδια, ανυδρίτες, εστέρες, αμίδια.
- Μηχανισμός σχηματισμού και υδρόλυσης εστέρων καρβοξυλικών οξέων.
- Ακυλοπαράγωγα οξέων : ακυλαλογονίδια, ανυδρίτες, εστέρες, αμίδια.
- Δικαρβοξυλικά οξέα, υδροξυ-οξέα, κετονο-οξέα και ακόρεστα οξέα : Ιδιαίτερες ιδιότητες και μέλη με ενδιαφέρον για τη βιοχημεία.
- Λιπαρά οξέα – Τριγλυκερίδια.

Τι πρέπει να έχουν ακούσει οι φοιτητές:

- Ακετυλοχολίνη και φυσιολογική σημασία του.

Ενότητα 13. ΑΠΛΕΣ ΑΖΩΤΟΥΧΕΣ ΟΡΓΑΝΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ.

Τι πρέπει να ξέρουν καλά οι φοιτητές:

- Αλειφατικές αμίνες: πρωτοταγής, δευτεροταγής, τριτοταγής. Γενικές ιδιότητες - βασικός χαρακτήρας τους. Χαρακτηριστικές αντιδράσεις.
- Άλατα του αλειφατικού τεταρτοταγούς αμμωνίου.
- Αμίδια. Ιμίνες, αμινοαλκοόλες.

Ενότητα 14. ΕΤΕΡΟΚΥΚΛΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ - ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΑ.

Τι πρέπει να ξέρουν καλά οι φοιτητές:

- Ορισμός ετεροκυκλικών ενώσεων.
- Πενταμελείς ετεροκυκλικές ενώσεις με ένα ετεροάτομο και τα παράγωγά τους: πυρρόλιο (προλίνη, πορφυρίνη), ιμιδαζόλιο (ιστιδίνη) θειοφαίνιο (βιοτίνη). Χημικές ιδιότητες: αρωματικότητα, συμμετοχή στις αντιδράσεις πυρηνόφιλης ή ηλεκτρονιόφιλης υποκατάστασης, οξεο-βασικές ιδιότητες.
- Πενταμελείς ετεροκυκλικές ενώσεις με δύο ετεροάτομα: ιμιδαζόλιο και τα παράγωγά του ιστιδίνη και ισταμίνη, θειαζόλιο (θειαμίνη – βιταμίνη Β1)
- Εξαμελείς ετεροκυκλικές ενώσεις με ένα ετεροάτομο και τα παράγωγά τους: πυριδίνη (NAD^+ , NADP^+ , πυριδοξάλη). Χημικές ιδιότητες της πυριδίνης: αρωματικότητα, συμμετοχή στις αντιδράσεις πυρηνόφιλης η ηλεκτρονιόφιλης υποκατάστασης, οξεο-βασικές ιδιότητες.
- Εξαμελείς ετεροκυκλικές ενώσεις με δύο ετεροάτομα και τα παράγωγά τους πυριμιδίνη (ουρακίλη, θυμίνη κυτοσίνη).
- Συμπυκνωμένοι ετεροκυκλικοί δακτυλιοί και τα παραγωγά τους: ινδόλιο (τροπτοφάνη), πουρίνη (αδενίνη, γουανίνη), ισαλλοξαζίνη (ριβοφλαβίνη, FAD, FMN), πτεριδίνη (φολικό οξύ).
- Δομή και ιδιότητες των νουκλειοσιζίων και νουκλεοτιδίων

Ενότητα 15. ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΣ ΡΟΛΟΣ ΑΜΙΝΟΞΕΩΝ ΚΑΙ ΠΕΠΤΙΔΙΩΝ

Τι πρέπει να ξέρουν καλά οι φοιτητές:

- Χημική δομή των 20 πρωτεϊνογόνων αμινοξέων . Κατάταξη των αμινοξέων.
- Ιδιότητες αμινοξέων: οξεο-βασικές ιδιότητες και αμφίφιλος χαρακτήρας τους, ιονισμός, καθαρό φορτίο και pH του περιβάλλοντος , ισοηλεκτρικό σημείο.
- Οπτική ισομέρεια των αμινοξέων.
- Πεπτιδικός δεσμός: σχηματισμός, συντονισμός, στερεοχημεία.

Τι πρέπει να έχουν ακούσει οι φοιτητές:

- Αντιδράσεις αμινοξέων: ενζυμική οξείδωση αμινοξέων, αντίδραση νινυδρίνης και χρήση της στην χρωματογραφική ανάλυση των αμινοξέων.
- Διαγνωστική σημασία ανάλυσης αμινοξέων

Ενότητα 16. ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΣ ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

Τι πρέπει να ξέρουν καλά οι φοιτητές:

- τις συμβάσεις για την αναπαράσταση και ονοματολογία ενός πεπτιδίου
- τον βιολογικό ρόλο και τις βασικές ιδιότητες των πρωτεϊνών (αμφολυτικο χαρακτήρα, ισοηλεκτρικό σημείο, διαλυτότητα, οπτική απορρόφηση).
- τις έννοιες της πρωτοταγούς, δευτεροταγούς και τριτοταγούς δομής των πρωτεϊνών
- τους δεσμούς που σταθεροποιούν την τρισδιάστατη διαμόρφωση των πρωτεϊνών
- για τις κύριες δευτεροταγείς δομές: α-έλικα, β-πτυχωτή επιφάνεια
- για τη τριτοταγή και τεταρτοταγή δομή και τη στερεοδιάταξη των πρωτεϊνών
- για τη σχέση πρωτοταγούς δομής και τελικής τρισδιάστατης διαμόρφωσης
- για την αποδιάταξη-μετουσίωση, αναδίπλωση πρωτεϊνών

Ο φοιτητής που θα παρακολουθήσει το μάθημα θα πρέπει να έχει ακούσει

- για το διάγραμμα Ramachandran και τις δυνατές τιμές των γωνιών ϕ και ψ του πεπτιδικού δεσμού
- για τις υπερδευτεροταγείς δομές (μοτίβα) και δομικές επικράτειες των πρωτεϊνών
- για τις δομές των πρωτεϊνών: ινσουλίνη, λυσοζύμη, φερρίνη, κερατίνη, κυτόχρωμα b, μυοσφαιρίνη
- για τις τράπεζες πληροφοριών των πρωτεϊνών
- για τους μοριακούς συνοδούς και τη δράση τους

Ενότητα 17. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ.

Τι πρέπει να ξέρουν καλά οι φοιτητές:

- τις βασικές αρχές των μεθόδων απομόνωσης, καθαρισμού και ανάλυσης πρωτεϊνών: διαφορική φυγόκεντρωση, κλασματική καθίζηση, διαπίδυση, χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας, χρωματογραφία στήλης, ηλεκτροφόρηση, ισοηλεκτρική εστίαση, υπερφυγοκέντρωση, φασματοσκοπία μαζών.
- τις βασικές αρχές της μεθοδολογίας προσδιορισμού της αμινοξικής αλληλουχίας
- τις βασικές αρχές των ανοσολογικών τεχνικών που χρησιμοποιούνται στην ανάλυση πρωτεϊνών (ELISA, ανοσοαποτύπωση, μικροσκοπία ανοσο-φθορισμού).

Ο φοιτητής που θα παρακολουθήσει το μάθημα θα πρέπει να έχει ακούσει

- για τον ορισμό και σημασία του πρωτεώματος και τη σχέση του με το γονιδίωμα
- για την βασική δομή και ιδιότητες των αντισωμάτων
- για την σημασία και τον τρόπο παρασκευής μονοκλωνικών αντισωμάτων
- για την μεθοδολογία σύνθεσης πεπτιδίων
- για την μεθοδολογία προσδιορισμού της δομής με κρυσταλλογραφία μέσω ακτίνων X και NMR.

Ενότητα 18. ΧΗΜΙΚΗ ΘΕΡΜΟΔΥΝΑΜΙΚΗ ΚΑΙ ΧΗΜΙΚΗ ΙΣΟΡΡΟΠΙΑ.

Τι πρέπει να ξέρουν καλά οι φοιτητές:

- Σε ποιές ερωτήσεις απαντάει η χημική θερμοδυναμική.
- Ενθαλπία, εντροπία και ελεύθερη ενέργεια μίας χημικής ή βιοχημικής αντίδρασης. Έργο και ελεύθερη ενέργεια. Πρότυπη ελεύθερη ενέργεια. Εξώθερμη / ενδόθερμη αντίδραση. Εξεργονικές / ενδεργονικές αντιδράσεις
- Σταθερά ισορροπίας μίας αντίδρασης. Παράγοντες που επηρεάζουν την σταθερά ισορροπίας – εξίσωση VAN'T HOFF.
- Ελεύθερη ενεργεία και σταθερά ισορροπίας $\Delta G^{\circ} = - RT \ln K_{ισορ}$
- Νόμος του HESS, αρχή του LE CHATELIER.
- Σύζευξη των χημικών και βιοχημικών αντιδράσεων.

Τι πρέπει να έχουν ακούσει:

- Ανοικτό, κλειστό και απομονωμένο θερμοδυναμικό σύστημα.
- Στατιστική ερμηνεία της εντροπίας.
- Χημικό δυναμικό.
- Πειραματικός προσδιορισμός ενθαλπίας, εντροπίας και ελεύθερης ενέργειας

Ενότητα 19. ΧΗΜΙΚΗ ΚΙΝΗΤΙΚΗ. ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΧΗΜΙΚΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑ-ΣΕΩΝ.

Τι πρέπει να ξέρουν καλά οι φοιτητές:

- Ταχύτητα των χημικών αντιδράσεων, νόμος της ταχύτητας, τάξη της αντίδρασης.
- Αντιδράσεις μηδενικής, πρώτης και δεύτερης τάξεως και μαθηματική περιγραφή τους με διαφορικές ή ολοκληρωμένες εξισώσεις. Χρόνος ημιζωής (υποδιπλασιασμού).
- Μοριακότητα χημικών αντιδράσεων.
- Θεωρία των μοριακών συγκρούσεων. Ενέργεια ενεργοποίησης μιας αντίδρασης. Εξίσωση Arrhenious.

Τι πρέπει να έχουν ακούσει:

- Πειραματικός προσδιορισμός νόμου της ταχύτητας. Σχέση νόμου της ταχύτητας και μηχανισμού μιας χημικής αντίδρασης.
- Πειραματικός προσδιορισμός ενέργειας ενεργοποίησης και σταθεράς ταχύτητας μίας χημικής αντίδρασης.
- Παράλληλισμοί χημικής κινητικής και φαρμακοκινητικής.

Ενότητα 20. ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΗΝ ΚΙΝΗΤΙΚΗ ΤΩΝ ENZYMΙΚΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΩΝ.

- Καταλύτες. Ένζυμα ως καταλύτες, οι διαφορές μεταξύ ενζύμων και τους απλούς καταλύτες ως προς την εξειδίκευση και τους μηχανισμούς κατάλυσης.
- το μοντέλο των Michaelis-Menten και την εξήγηση των κινητικών ιδιοτήτων των ενζύμων

- Εισαγωγή στην κινητική των ενζυμικών αντιδράσεων το μοντέλο των Michaelis-Menten και την εξήγηση των κινητικών ιδιοτήτων των ενζύμων

Ενότητα 21. ΗΛΕΚΤΡΟΧΗΜΕΙΑ. ΟΞΕΙΔΩΣΗ-ΑΝΑΓΩΓΗ.

Τι πρέπει να ξέρουν καλά οι φοιτητές:

- Ηλεκτροχημική σειρά των χημικών στοιχείων. Ηλεκτροδιαλυτική τάση των στοιχείων.
- Ηλεκτροχημικά στοιχεία. Άνοδος και κάθοδος ενός ηλεκτροχημικού στοιχείου.
- Δυναμικό του ηλεκτροδίου, δυναμικό ηλεκτροχημικού στοιχείου. Εξίσωση Nernst.
- Σχέση ελεύθερης ενέργειας και δυναμικού ηλεκτροχημικού στοιχείου.
- Δυναμικό μεμβράνης.

Τι πρέπει να έχουν ακούσει:

- Κυριότερες αντιδράσεις οξειδωσης-αναγωγής στα βιολογικά συστήματα.
- Ισορροπία Donnan και διαμόρφωση δυναμικού της μεμβράνης.

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΑΣΚΗΣΕΙΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ.

Έπειτα από την ολοκλήρωση των εργαστηριακών ασκήσεων ο φοιτητής πρέπει να αποκτήσει ορισμένες γενικές δεξιότητες πειραματικής εργασίας, δηλαδή να μπορεί:

1. να προγραμματίσει και να διεξάγει ένα πείραμα,
2. να παραλαμβάνει και να επεξεργάζεται τα πειραματικά δεδομένα, π.χ. κατασκευάζοντας τις γραφικές παραστάσεις,
3. να κρίνει τα αποτελέσματα και να αποκαλύπτει τα ενδεχόμενα πειραματικά λάθη,
4. να εξάγει τα συμπεράσματα,
5. να χειρίζεται το βασικό εργαστηριακό εξοπλισμό – φασματοφωτόμετρο, pH-μέτρο, συσκευή ηλεκτροφόρησης κ.α.
6. να γνωρίζει και να τηρεί τους κανόνες εργαστηριακής ασφάλειας,
7. να ακολουθεί οδηγίες,
8. να εργάζεται σε ομάδα.

Ειδικές δεξιότητες – πρέπει να είναι σε θέση

- να παραλάβει φάσμα απορρόφησης μίας χημικής ουσίας και να προσδιορίσει μήκος κύματος μέγιστης απορρόφησης,
- να ετοιμάσει τα πρότυπα διαλύματα με ανάλογες αραιώσεις του αρχικού (stock) διαλύματος,
- να κάνει βαθμονόμηση του φασματοφωτόμετρου και να κατασκευάζει την καμπύλη αναφοράς (πρότυπη καμπύλη).
- Να προσδιορίσει την άγνωστη συγκέντρωση με την βοήθεια της καμπύλης αναφοράς.
- να προσδιορίσει το pH ενός αγνώστου διαλύματος,
- να προσδιορίσει άγνωστη συγκέντρωση ενός διαλύματος οξέος (βάσης) με την τιτλοδότησή του.

- να παρασκευάσει ρυθμιστικό διάλυμα ορισμένης συγκέντρωσης και pH.
- να διαχωρίσει τις βιομακρομοριακές ενώσεις με χρωματογραφίας πηκτικής-ιοντοανταλλαγής και να κατανοεί τους παραμέτρους που επηρεάζουν τον διαχωρισμό.
- να διαχωρίσει τις βιομακρομοριακές ενώσεις με την ηλεκτροφόρηση και να κατανοεί τις παραμέτρους που επηρεάζουν τον ηλεκτροφορητικό διαχωρισμό.
- να αναλύσει ένα μίγμα αμινοξέων με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας.
- να βρίσκει το ισοηλεκτρικό σημείο μιας πρωτεΐνης με βάση την διαλυτότητα της σε διαφορετικά pH.

Βιβλιογραφία

- Σημειώσεις από τις παραδόσεις
- **Berg J. M., Tymoczko J. L. & L. Stryer: ΒΙΟΧΗΜΕΙΑ Τόμος Ι, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης**
- **Βάρβογλης Α. Γ. Επίτομη οργανική χημεία, Εκδόσεις Ζήτη**
- **G.A. TAYLOR (εκδόσεις Λίτσα): Οργανική Χημεία για Ιατρικές και Βιολογικές Επιστήμες.**
- **Raymond Chang “Physical Chemistry for the Chemical and Biological Sciences”, University Science Books**
- **Γ.Ε. Μανουσάκη (εκδόσεις Κυριακίδη) : Γενική Χημεία Βιολογικών Επιστημών.**