



Ευρωπαϊκή Ένωση  
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο



ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ  
ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ ΚΑΙ ΔΙΑ ΒΙΟΥ ΜΑΘΗΣΗ  
*επένδυση στην κοινωνία της γνώσης*

ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΠΑΙΔΕΙΑΣ ΚΑΙ ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ  
ΕΙΔΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



ΕΥΡΩΠΑΪΚΟ ΚΟΙΝΩΝΙΚΟ ΤΑΜΕΙΟ

## ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΔΙΑ ΒΙΟΥ ΜΑΘΗΣΗΣ ΑΕΙ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΠΙΚΑΙΡΟΠΟΙΗΣΗ ΓΝΩΣΕΩΝ ΑΠΟΦΟΙΤΩΝ ΑΕΙ (ΠΕΓΑ)

*«Οι σύγχρονες τεχνικές βιο-ανάλυσης στην υγεία, τη γεωργία, το περιβάλλον και τη διατροφή»*

# **ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ**

**ΕΙΣΗΓΗΤΡΙΑ  
ΜΑΡΙΑ ΚΟΝΤΟΥ**

# ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

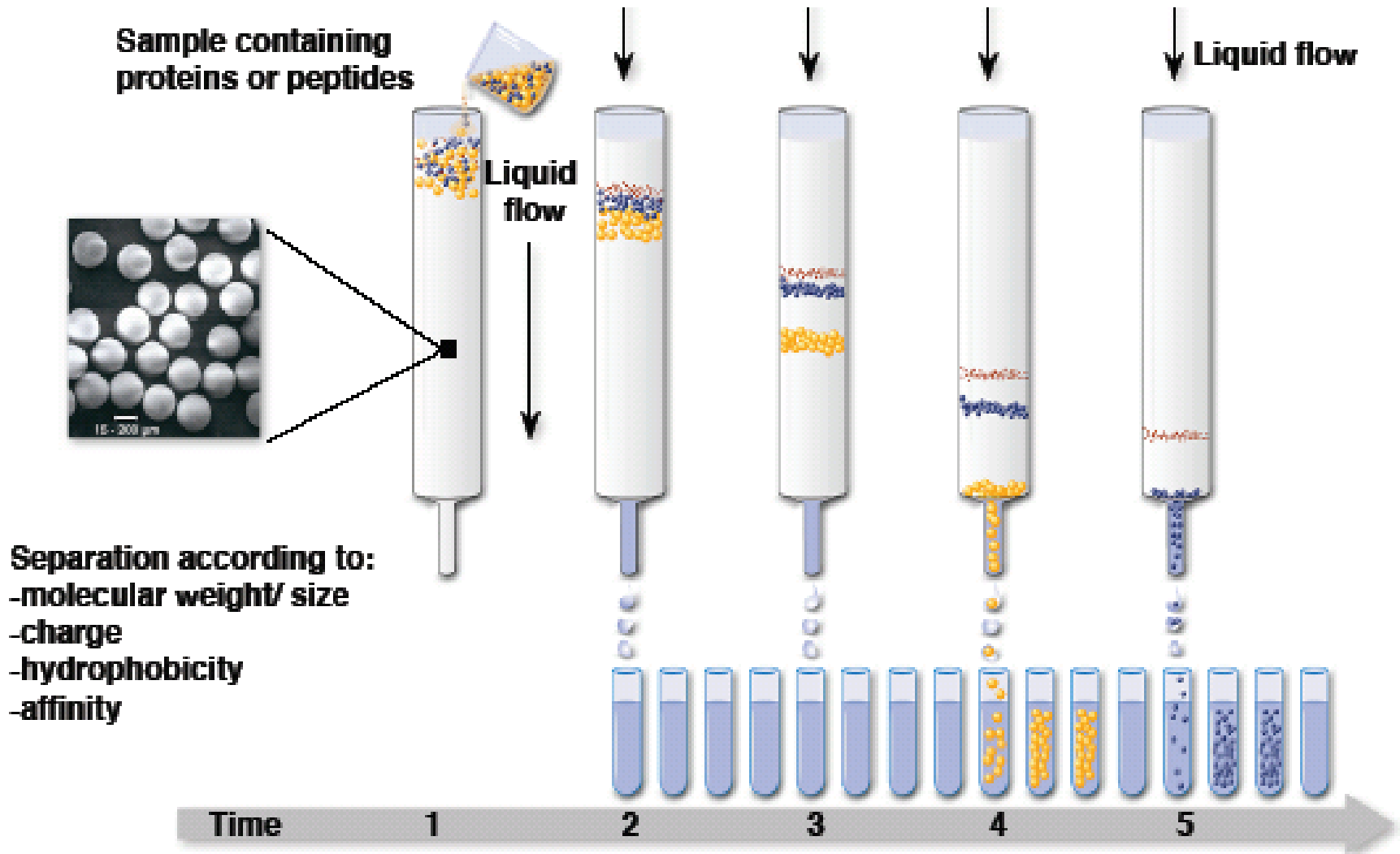
- **Ανάλυση μιγμάτων**
- Η χρωματογραφική ανάλυση περιλαμβάνει μια σειρά μεθόδων **διαχωρισμού** μιγμάτων ανόργανων ή οργανικών ουσιών στις επιμέρους ενώσεις που αποτελούν το μίγμα.

## ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ

- α) Εππυγχάνεται με ΔΙΑΣΠΟΡΑ των συστατικών μεταξύ δύο φάσεων, μιάς ΚΙΝΗΤΗΣ και μιάς ΣΤΑΤΙΚΗΣ.
- β) Βασίζεται σε διαφορές στις φυσικοχημικές ιδιότητες των συστατικών του μίγματος (πολικότητα, μέγεθος μορίων, κ.λ.π.)
- γ) Η κινητή φάση διερχόμενη μέσα από τη στατική προκαλεί διαφορετική μετατόπιση πάνω σε αυτήν των συστατικών του μίγματος τα οποία διαχωρίζονται μεταξύ τους εξερχόμενα από τη στήλη σε διαφορετικές χρονικές στιγμές.



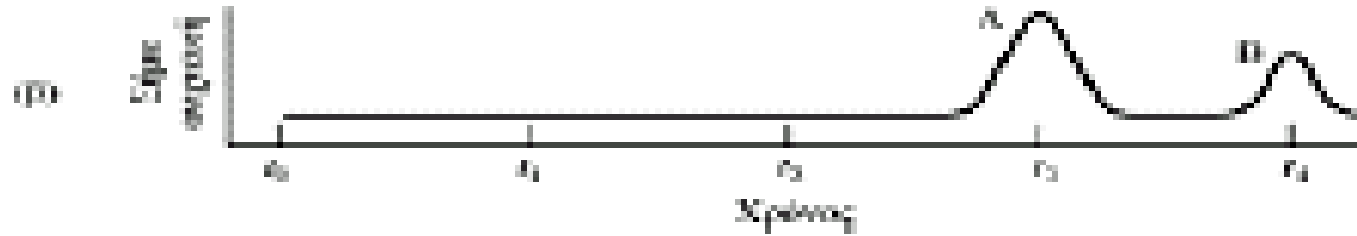
# ΑΡΧΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΟΥ ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΥ



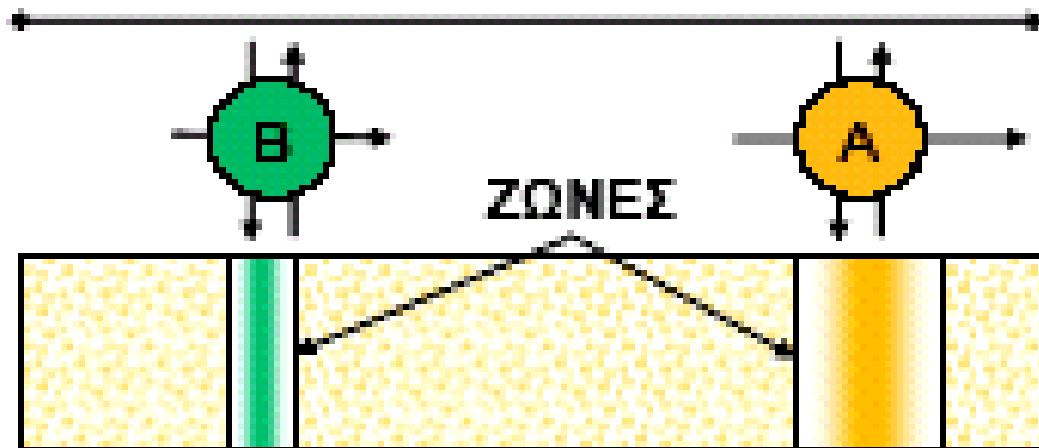
# ΒΑΣΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ

- Ποσότητα δείγματος, δύο συστατικών A και B, προστίθεται στην κορυφή (αρχή) της στήλης.
- Τα συστατικά κατανέμονται μεταξύ στατικής και κινητής φάσης.
- Το κλάσμα κάθε συστατικού που βρίσκεται στην κινητή φάση μετακινείται στη στήλη, έρχεται σε επαφή με νέο τμήμα της στατικής φάσης οπότε και έχουμε νέα κατανομή.
- Το κλάσμα που βρισκόταν στη στατική φάση, έρχεται σε επαφή με την κινητή φάση οπότε και έχουμε νέα κατανομή.
- Η διαδικασία επαναλαμβάνεται καθώς διαβιβάζεται νέα κινητή φάση
- **Τα συστατικά μετακινούνται μόνο όταν βρίσκονται στην κινητή φάση, με ταχύτητα η οποία εξαρτάται από τον χρόνο παραμονής τους σε αυτή**

Η βάση της χρωματογραφίας είναι η κατανομή των συστατικών του μείγματος μεταξύ κινητής και στατικής φάσης. Περιγράφεται με τον συντελεστή κατανομής  $K$



**ΚΙΝΗΤΗ ΦΑΣΗ (m)**  
(ρευστό έκλουσης)



$$K = \frac{C_s}{C_M}$$

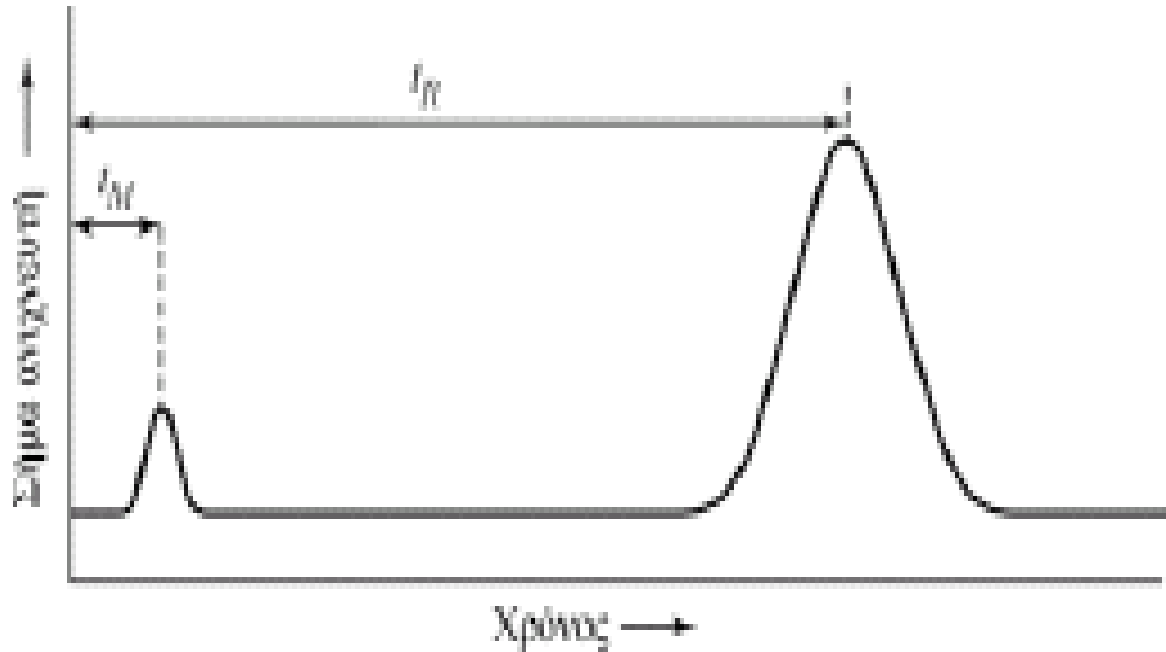
**ΣΤΑΤΙΚΗ ΦΑΣΗ (s)**

# ΟΡΙΣΜΟΙ

- Η κινητή φάση(υγρό η αέριο) ονομάζεται **υγρό εκλούσεως (eluent)**
- Το διάλυμα που εξέρχεται από τη στήλη **έκλουσμα (eluate)**
- Η διαδικασία ονομάζεται έκλουση (elution) και αν η παροχή κινητής φάσης γίνεται με σταθερή ταχύτητα γραμμική έκλουση.
- Στο τέλος της στήλης τοποθετείται ανιχνευτής που παρακολουθεί μια αναλυτική ιδιότητα και παράγει σήμα κάθε φορά που εκλούεται ένα συστατικό **(χρωματογραφική κορυφή - peak)**
- Το διάγραμμα του σήματος συναρτήσει του όγκου η του χρόνου ονομάζεται **χρωματογράφημα**.
- Τα χρωματογραφήματα παρέχουν πληροφορίες σχετικά με την ποιοτική και ποσοτική ανάλυση.



# ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΟΙ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ



**ΧΡΟΝΟΣ ΑΝΑΣΧΕΣΗΣ ή ΚΑΤΑΚΡΑΤΗΣΗΣ ( $t_R$ ):** ο χρόνος που χρειάζεται από τη στιγμή εισαγωγής του δείγματος μέχρι τη στιγμή που η κορυφή της ουσίας φτάνει στον ανιχνευτή  
**ΝΕΚΡΟΣ ΧΡΟΝΟΣ ( $t_M$ ):** ο χρόνος που χρειάζεται μια μη κατακρατούμενη ουσία για να φτάσει στον ανιχνευτή

- **ΑΝΗΓΜΕΝΟΣ ΧΡΟΝΟΣ ΑΝΑΣΧΕΣΗΣ ( $t'_R$ ):**

$$t'_R = t_R - t_M$$

- **ΟΓΚΟΣ ΑΝΑΣΧΕΣΗΣ ( $V_R$ ):  $V_R = t_R F$**
- $V_R$  : όγκος της κινητής φάσης που χρειάζεται να διέλθει από τη στατική φάση για να εκλουστεί μια ουσία
- **ΝΕΚΡΟΣ ΟΓΚΟΣ ( $V_M$ ):  $V_M = t_M F$**
- $V_M$  : όγκος της κινητής φάσης στη στήλη
- **ΑΝΗΓΜΕΝΟΣ ΟΓΚΟΣ ΑΝΑΣΧΕΣΗΣ ( $V'_R$ ):  $V'_R = t'_R F$**
- Όπου  $F$ : η ταχύτητα ροής της κινητής φάσης (mL/min)

- Το μέγεθος της συγκρατήσεως μιας ουσίας εκφράζεται από τον **λόγο συγκρατήσεως η επιβραδύνσεως  $R_F$**  (retention ratio)

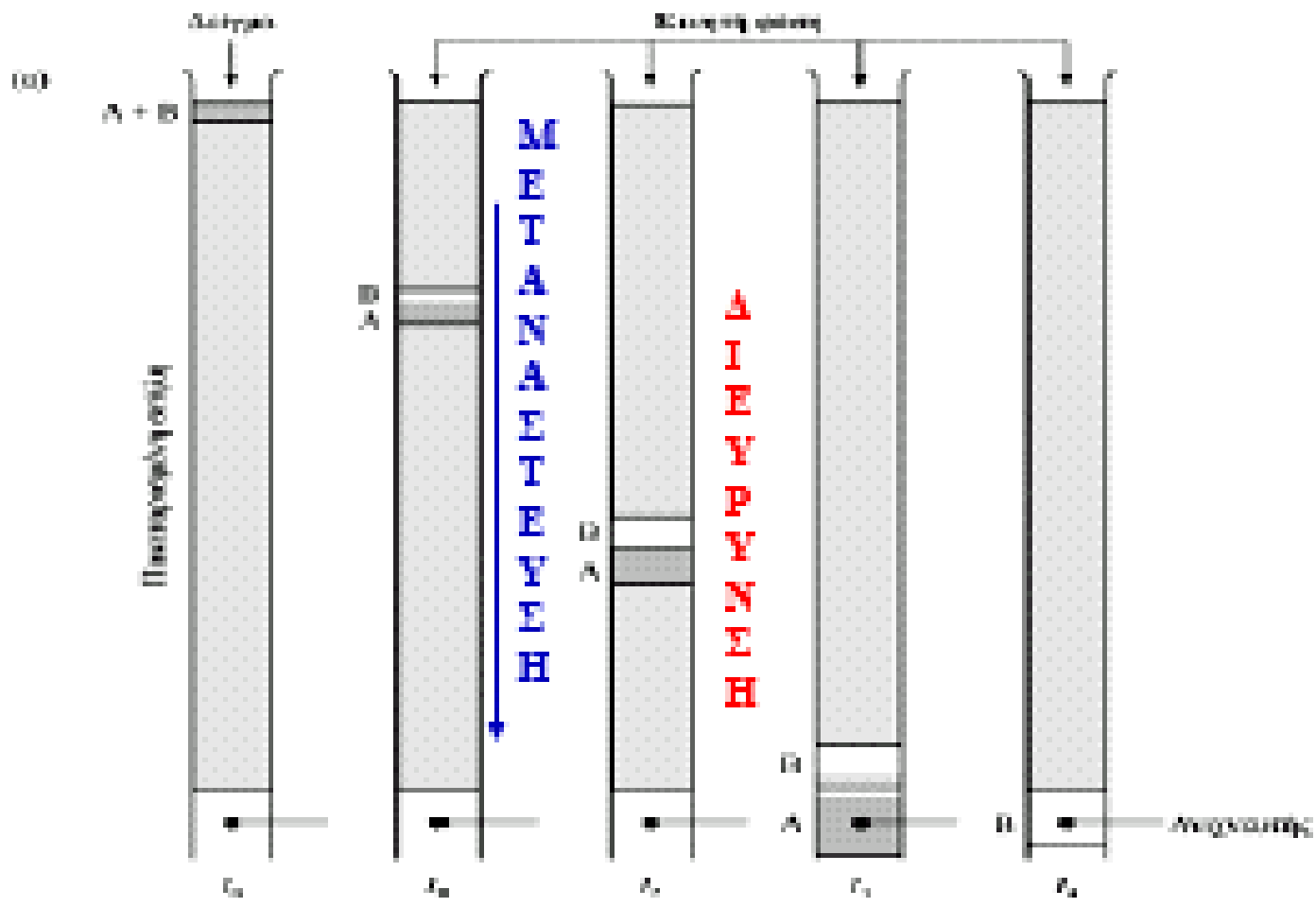
$$R_F = \frac{\text{μέση ταχύτητα ουσίας στη στήλη}}{\text{μέση ταχύτητα υγρού εκλούσεως}}$$

$$R_F = \frac{L/t_R}{L/t_M} = \frac{t_M}{t_R} = \frac{V_M}{V_R}$$

# ΘΕΩΡΙΑ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ

- Αποτελεσματικότητα στήλης
- Κατά τη έκλυση συμβαίνουν 2 διαδικασίες
- Τα συστατικά του μείγματος μετακινούνται στη στήλη με διαφορετική ταχύτητα
- Τα μόρια κάθε συστατικού διασπείρονται από μια λεπτή ζώνη σε μια πιο ευρύτερη

# ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΕΚΔΟΥΣΗΣ ΣΕ ΣΤΗΛΗ



# ΘΕΩΡΙΑ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ

- **Αποτελεσματικότητα στήλης**
- Η πρώτη διαδικασία (μετανάστευση) προκαλεί τον διαχωρισμό, η δεύτερη (διεύρυνση) τείνει να τα κρατήσει αναμειγμένα.
- Για να επιτευχθεί διαχωρισμός πρέπει τα συστατικά να μετακινούνται χωριστά ταχύτερα απ' ότι διαπλάτύνονται.

Η διεύρυνση (παραμόρφωση) ζώνης είναι ανεπιθύμητη γιατί :

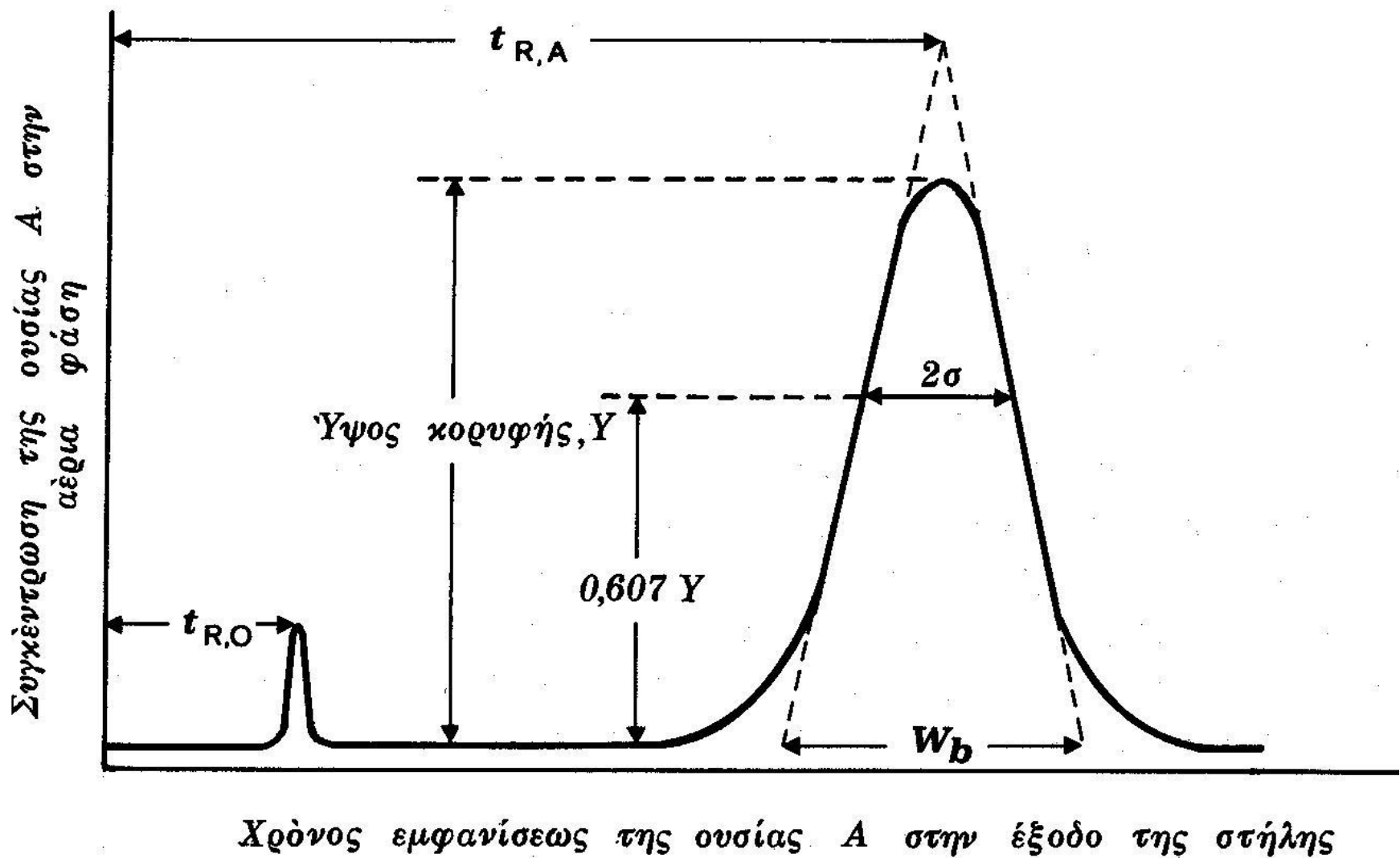
1. Δεν επιτυγχάνεται ικανοποιητικός διαχωρισμός
2. Οι πολύ διευρυμένες κορυφές είναι ακατάλληλες για ποσοτική ανάλυση

- **Θεωρία πλακών**
- **Μια χρωματογραφική στήλη είναι τόσο αποτελεσματικότερη, όσο μικρότερη διαπλάτυνση προκαλεί για δεδομένο χρόνο συγκρατήσεως.**
- Μια θεωρία που συνδυάζει τη διεύρυνση με τη μετακίνηση είναι η **θεωρία των πλακών** όπου η κίνηση μιας ουσίας θεωρείται σαν μετακίνηση μέσω διαδοχικών θαλάμων (ζωνών) εξισορροπήσεως που ονομάζονται **Θεωρητικές πλάκες**.
- Η **θεωρητική πλάκα** είναι μια φανταστική έννοια και **ισοδυναμεί με τον απαιτούμενο όγκο της στήλης**, μέσα στον οποίο αποκαθίσταται **ισορροπία μεταξύ της στατικής και κινητής φάσης**.
- Η αποτελεσματικότητα της στήλης χαρακτηρίζεται από την λεπτότητα μιας θεωρητικής πλάκας η το **ύψος ισοδύναμο με μια θεωρητική πλάκα (ΥΙΘΠ)**.

- ΥΨΟΣ ΙΣΟΔΥΝΑΜΟ ΠΡΟΣ ΜΙΑ ΘΕΩΡΗΤΙΚΗ ΠΛΑΚΑ (ΥΙΘΠ)
- $ΥΙΘΠ = h = L / n$
- Όπου
- L: το μήκος της στήλης και
- n : ο αριθμός των θεωρητικών πλακών
- Ο αριθμός θεωρητικών πλακών μπορεί να υπολογισθεί από τη χρωματογραφική κορυφή μιας ουσίας με βάση την σχέση:

$$n = 16 \left( t_{R,A} / w_b \right)^2$$



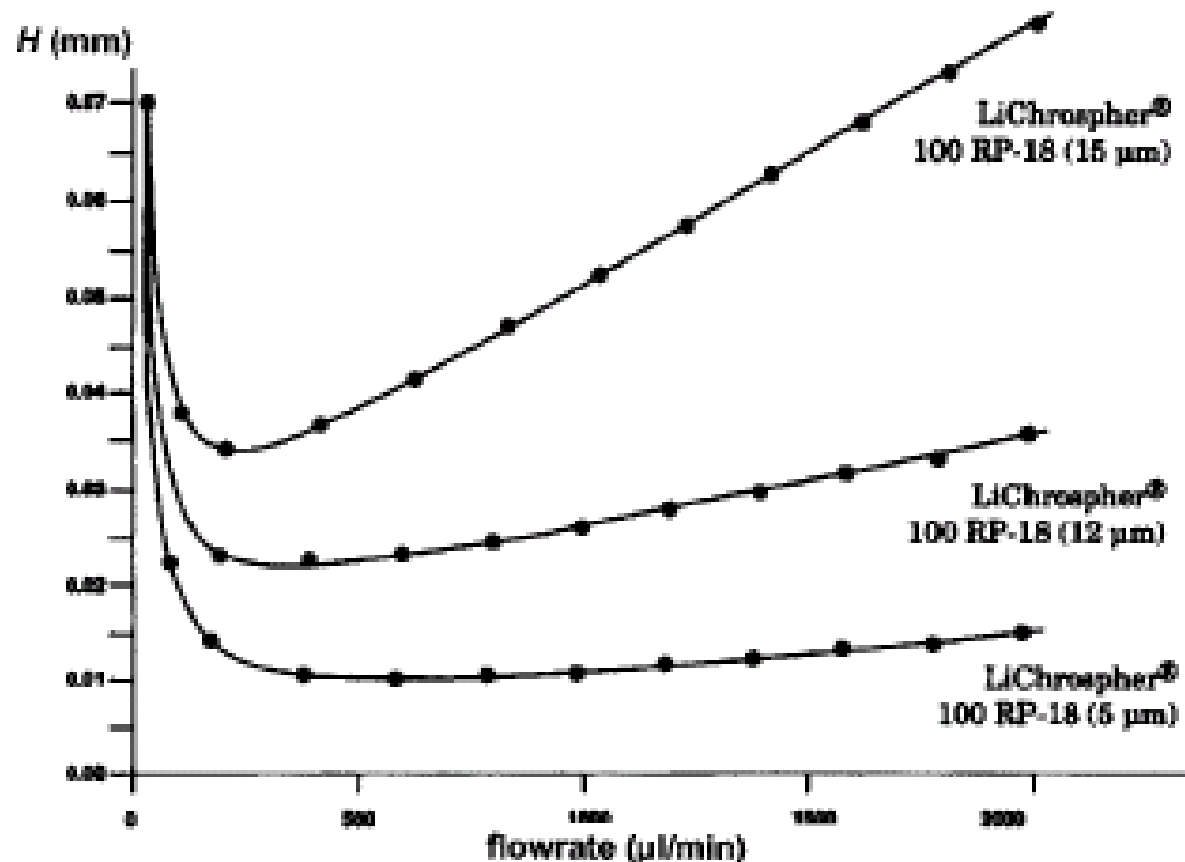


# ΑΠΟΔΟΤΙΚΟΤΗΤΑ ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΥ

- Για ένα καθορισμένο μήκος στήλης, ο διαχωρισμός είναι τόσο αποτελεσματικότερος όσο μικρότερο είναι το ΥΙΘΠ ( $h$ ).
- Δηλαδή από δύο στήλες με ίδιο μήκος εκείνη που έχει μεγαλύτερο αριθμό θεωρητικών πλακών,  $n$ , θα δίνει οξύτερες κορυφές και συνεπώς καλύτερο διαχωρισμό μεταξύ ουσιών που έχουν παραπλήσιους όγκους (χρόνους) ανάσχεσης.
- Για δεδομένη στήλη, το εύρος  $W$  μιας κορυφής είναι ανάλογο με τον όγκο ανάσχεσης  $\rightarrow t_R$ , οι κορυφές συνεχώς θα διευρύνονται από την αρχή έως το τέλος του χρωματογραφήματος.  $\rightarrow$  Παρατεταμένη έκλυση εκφυλίζει την κανονική κατανομή της κορυφής.
- Ο αριθμός των θεωρητικών πλακών  $n$  εξαρτάται κυρίως από:
  - το τρόπο πλήρωσης της στήλης,
  - το μέγεθος των σωματιδίων της στήλης

# Effect of Particle Diameter on Plate Height

Figure 5.4 Effect of Particle Diameter on Plate Height



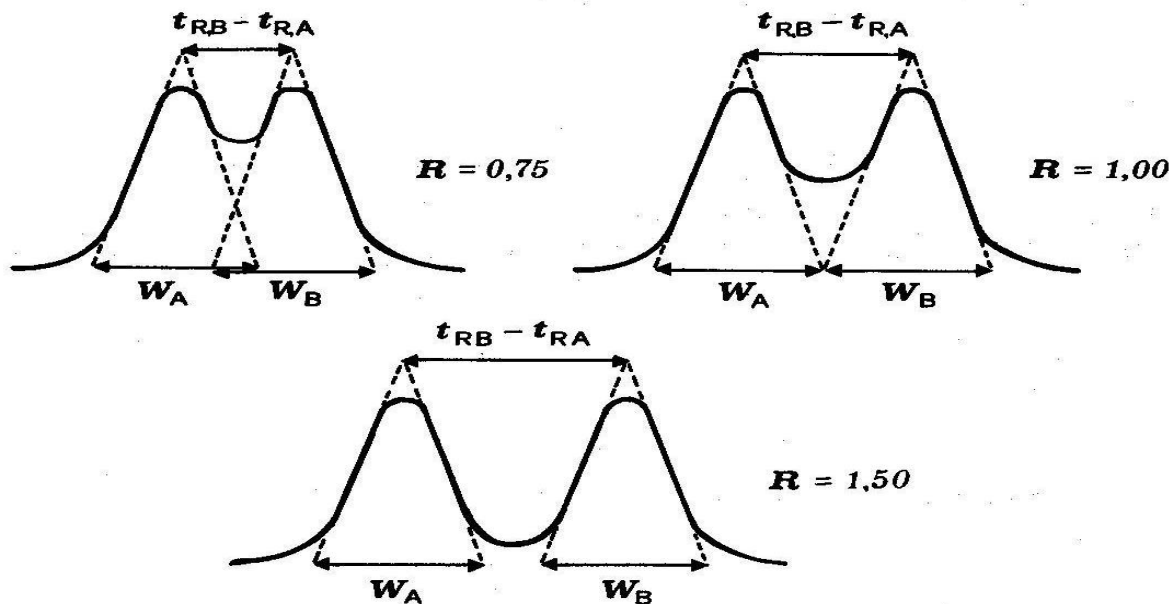
Column: as indicated, 250 x 4mm ID. Mobile phase: acetonitrile/water (75/25). Sample: anthracene. Reprinted from ref. 3 with permission of EM Separations.

# Διαχωριστική Ικανότητα

Ο βαθμός διαχωρισμού δύο ουσιών φαίνεται από τον βαθμό αλληλοεπικάλυψης των κορυφών τους.

Η διαχωριστική ικανότητα **R** ορίζεται από τη σχέση:

$$R = \frac{2(t_{R,B} - t_{R,A})}{W_B + W_B}$$



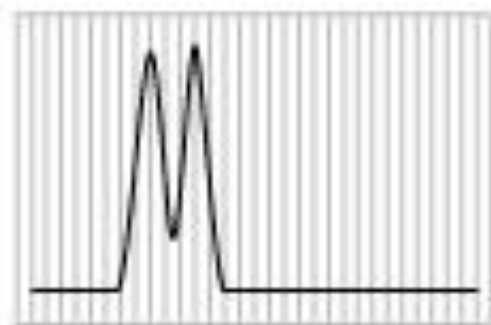
Αύξηση της **διαχωριστικότητας** δυο διαδοχικών κορυφών μπορεί να επιτευχθεί με:

1. Αύξηση της **εκλεκτικότητας** της στήλης ( $t_R$ ) →  
ΜΕΤΑΒΟΛΗ ΤΟΥ ΘΕΡΜΟΔΥΝΑΜΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ

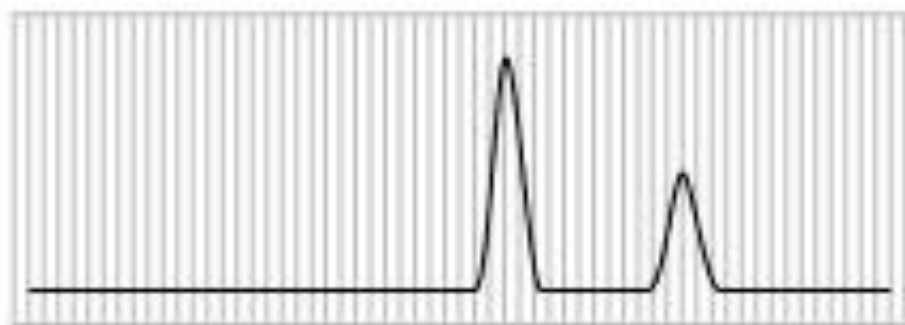
2. Ελάττωση του **εύρους** της κάθε κορυφής, βελτίωση της **αποδοτικότητας** της στήλης →  
ΒΕΛΤΙΩΣΗ της ΚΙΝΗΤΙΚΗΣ ΤΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ →

- μήκος στήλης ( $L$ )
- Υλικό και μέγεθος σωματιδίων
- Ταχύτητα ροής ( $F$ )
- Θερμοκρασία ( $\theta$ )
- Τρόπος εισαγωγής δείγματος

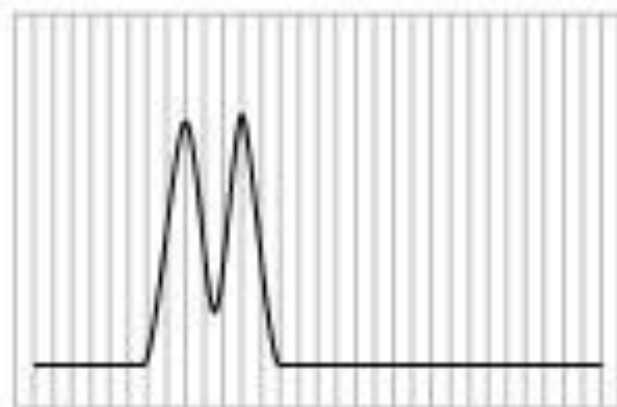
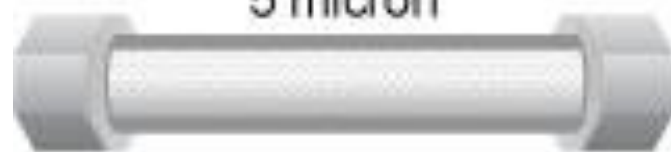
50mm



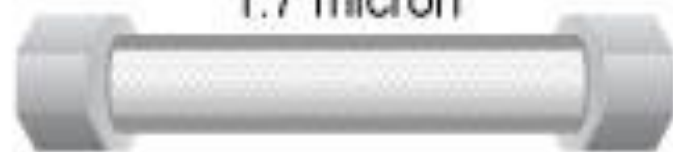
100mm



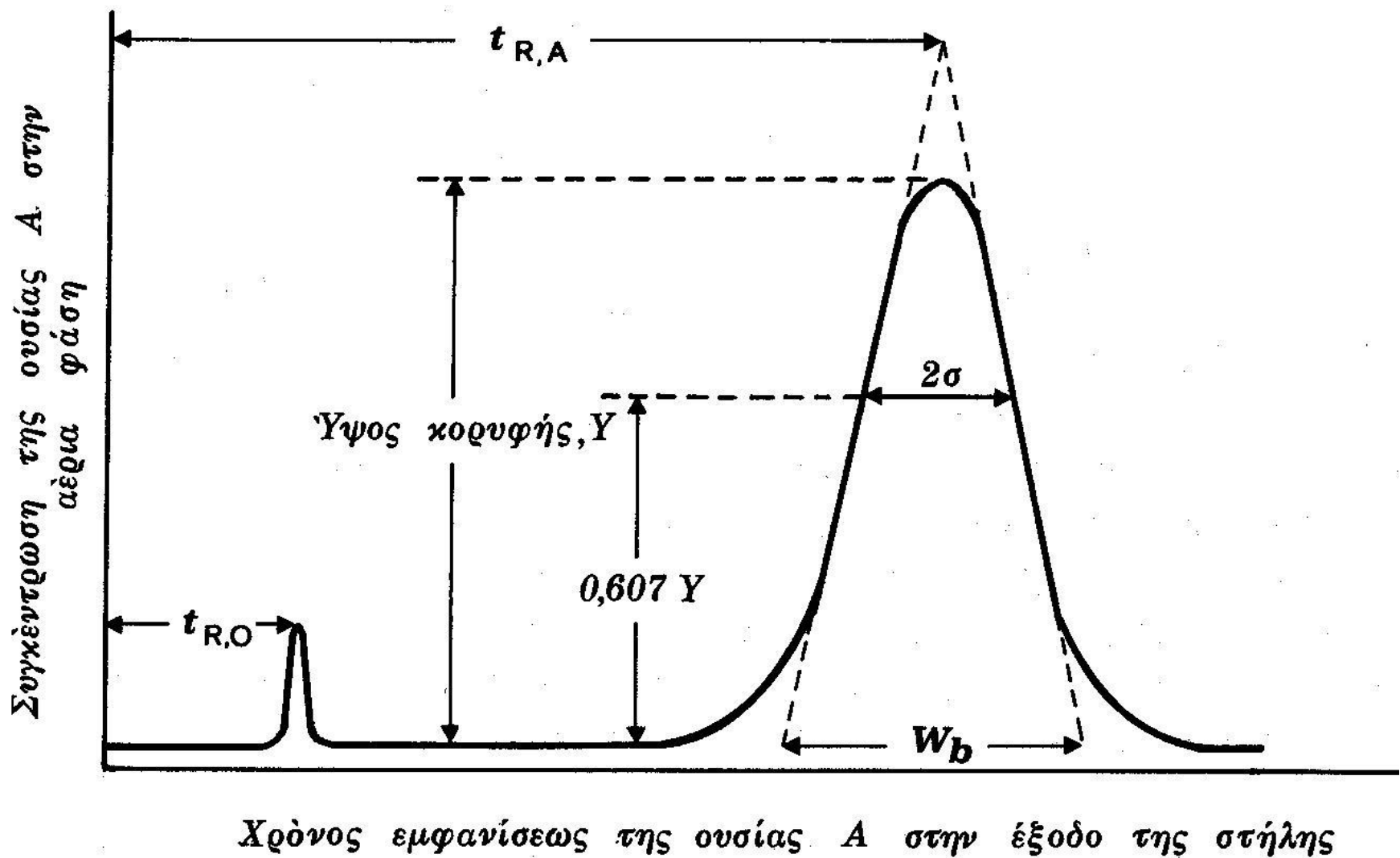
50mm  
5 micron



50mm  
1.7 micron



- **ΧΡΗΣΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΩΝ ΤΕΧΝΙΚΩΝ:**
- **ΠΟΙΟΤΙΚΗ ΚΑΙ ΠΟΣΟΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ**
  - Ποιοτική Ανάλυση:
    - Χρόνος Ανάσχεσης ( $t_R$ )
    - Φασματοσκοπικές τεχνικές (MS, IR, UV/Vis,...)
  - Ποσοτική Ανάλυση:
    - Γραμμική σχέση μεταξύ σήματος και συγκέντρωσης →
    - Ύψος κορυφής: επηρεάζεται από μεταβολή εύρους, θερμοκρασία, ροή, ταχύτητα έγχυσης
    - Εμβαδόν κορυφής: δεν επηρεάζεται από τα παραπάνω.
    - Αυτοματισμός: Ολοκληρωτές – λογισμικά
    - Μέθοδοι βαθμονόμησης:
      - Εξωτερικά πρότυπα –  $C = f(A)$
      - Μέθοδος εσωτερικού προτύπου –  $C_i = f(RF_i)$
- **ΠΑΡΑΣΚΕΥΑΣΤΙΚΗ ΤΕΧΝΙΚΗ**



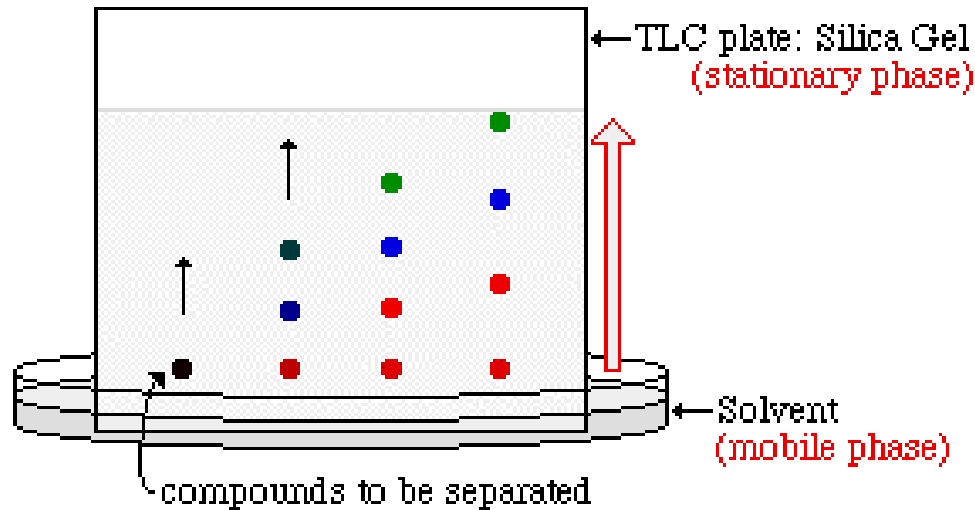


# ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΩΝ ΤΕΧΝΙΚΩΝ

- 1) Με βάση τη φυσική μορφή της στατικής φάσης
  - A) χρωματογραφία στήλης ή
  - B) επίπεδη χρωματογραφία (λεπτής στοιβάδας, TLC ή χάρτου, PC)

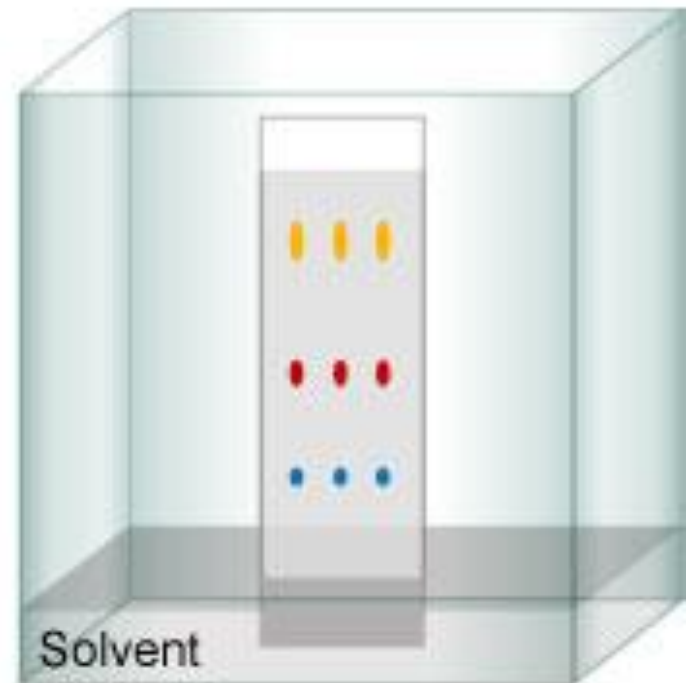
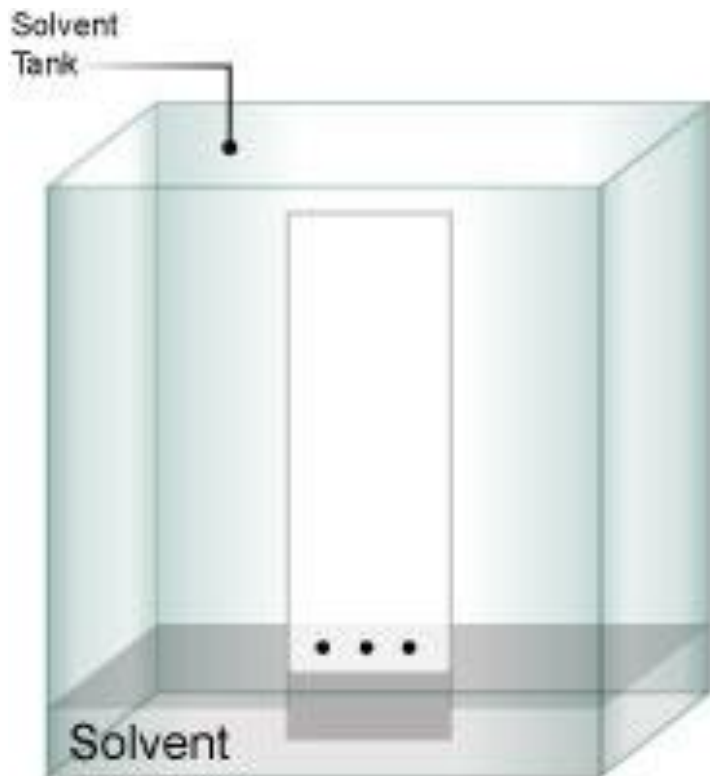
# Επίπεδη χρωματογραφία

- Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας
- Η στατική φάση
  - Διοξείδιο του Πυριτίου (Silicagel,  $\text{SiO}_2$ )
  - Οξείδιο του Αργιλίου (alumina,  $\text{Al}_2\text{O}_3$ )
  - Μικροκρυσταλλική Κυτταρίνη (cellulose)
  - Γη Διατόμων (kieselgur)
  - Πολυαμίδιο
- είναι επιστρωμένη σε πλάκα γυάλινη η πλαστική πάχους 100-300 $\mu\text{m}$  και η οποία προσκολλάται με τη βοήθεια συνδετικών υλικών (γύψος, άμυλο)



- Το προς ανάλυση δείγμα τοποθετείται στο ένα άκρο της πλάκας σε σημείο που έχει προσημειωθεί με μολύβι με σύριγγα ή μικροσιφώνιο.
- Η κηλίδα ξηραίνεται με εξάτμιση του διαλύτη
- Η πλάκα τοποθετείται σε κλειστό δοχείο που περιέχει το διαλύτη έκλουσης
- Ο διαλύτης ανέρχεται, παρασύροντας τα συστατικά του μείγματος
- Όταν ο διαλύτης φθάσει στο άλλο άκρο της πλάκας, η πλάκα ξηραίνεται
- Σημειώνεται με μολύβι το μέτωπο του διαλύτη
- Εμφάνιση των συστατικών με ψεκασμό με κατάλληλα αντιδραστήρια ή με έκθεση της πλάκας σε υπεριώδη ακτινοβολία.

# Επίπεδη χρωματογραφία



# ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΩΝ ΤΕΧΝΙΚΩΝ

## 2) Με βάση τη φύση της κινητής φάσης

- Κινητή φάση αέρια → αέρια χρωματογραφία (Gas Chromatography, GC)
- Κινητή φάση υγρή → υγρή χρωματογραφία (Liquid Chromatography, LC)

- **ΑΕΡΙΑ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ**

- ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΕΙΤΑΙ ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΟΙΟΤΙΚΗ ΚΑΙ ΠΟΣΟΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΠΤΗΤΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ
- **ΚΙΝΗΤΗ ΦΑΣΗ: Αέρια**
- **ΣΤΑΤΙΚΗ ΦΑΣΗ:**
  - 1. Στερεά σωματίδια → Χρωματογραφία αερίου - στερεού (GSC)
  - 2. Μη πτητικό υγρό που συγκρατείται πάνω σε μια αδρανή στερεά επιφάνεια → Χρωματογραφία αερίου - υγρού (GLC)

# Χρωματογραφική στήλη / Στατική φάση

- Το βασικότερο τμήμα της αεριοχρωματογραφικής διάταξης είναι η στήλη
- **Πληρωμένη (packed)**
  - Διάμετρο 3-6mm
  - Μήκος 1-3m
- Περιέχουν ένα στερεό υπόστρωμα διαποτισμένο με κατάλληλο υγρό, που αποτελεί την στατική φάση.

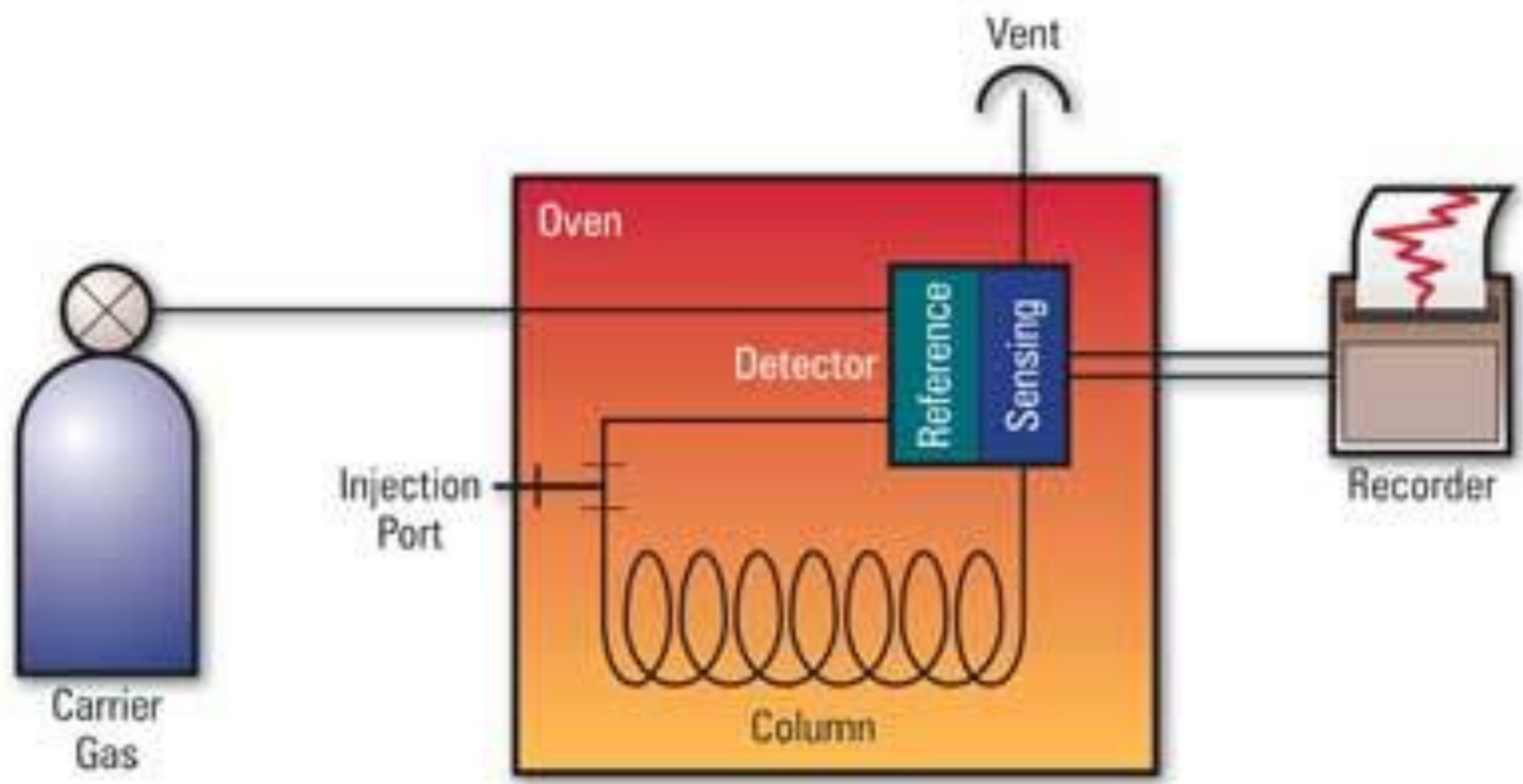
# Χρωματογραφική στήλη / Στατική φάση

- Τριχοειδής (capillary)
- Εσωτερική Διάμετρο: 0.1-1,5mm
- Μήκος : 15-100m
  - **WCOT (wall Coated Open Tubular)**: Στο εσωτερικό τοίχωμα του σωλήνα φέρουν τοποθετημένη, απ' ευθείας, την υγρή στατική φάση
  - **SCOT (Support Coated Open Tubular)**: έχουν την υγρή φάση εμποτισμένη σε υπόστρωμα που καλύπτει την εσωτερική επιφάνεια του σωλήνα
  - **PLOT (Porous Layer Open Tubular)**: φέρουν τη στερεή φάση σε ένα προσροφητικό υλικό στην εσωτερική επιφάνεια του σωλήνα



- Υπάρχουν πάνω από 100 υγρές στατικές φάσεις για τις πληρωμένες στήλες .
- Για τις τριχοειδείς κυρίως χρησιμοποιούνται έλαια **σιλικόνης (polysiloxanes)** και **πολυαιθυλενογλυκόλες**
- Οι στερεές στατικές φάσεις (PLOT) είναι από υλικά **πυριτικής βάσης**
- **Το κριτήριο για την επιλογή της στατικής φάσης αποτελεί η χημική συγγένεια των συστατικών του δείγματος με αυτή.**

- **ΚΙΝΗΤΗ ΦΑΣΗ:**
- **Αδρανή αέρια – Η κινητή φάση δεν αλληλεπιδρά με τα μόρια του αναλύτη.**
- **Ρόλος της, η διακίνηση του αναλύτη κατά μήκος της στήλης: ΦΕΡΟΝ ΑΕΡΙΟ**
- **He, H<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>**
- **1. Μεγάλο συντελεστή θερμικής αγωγιμότητας**
- **2. Μικρή πυκνότητα, εφαρμογή μεγάλης ταχύτητας ροής, άρα μικροί χρόνοι ανάλυσης**

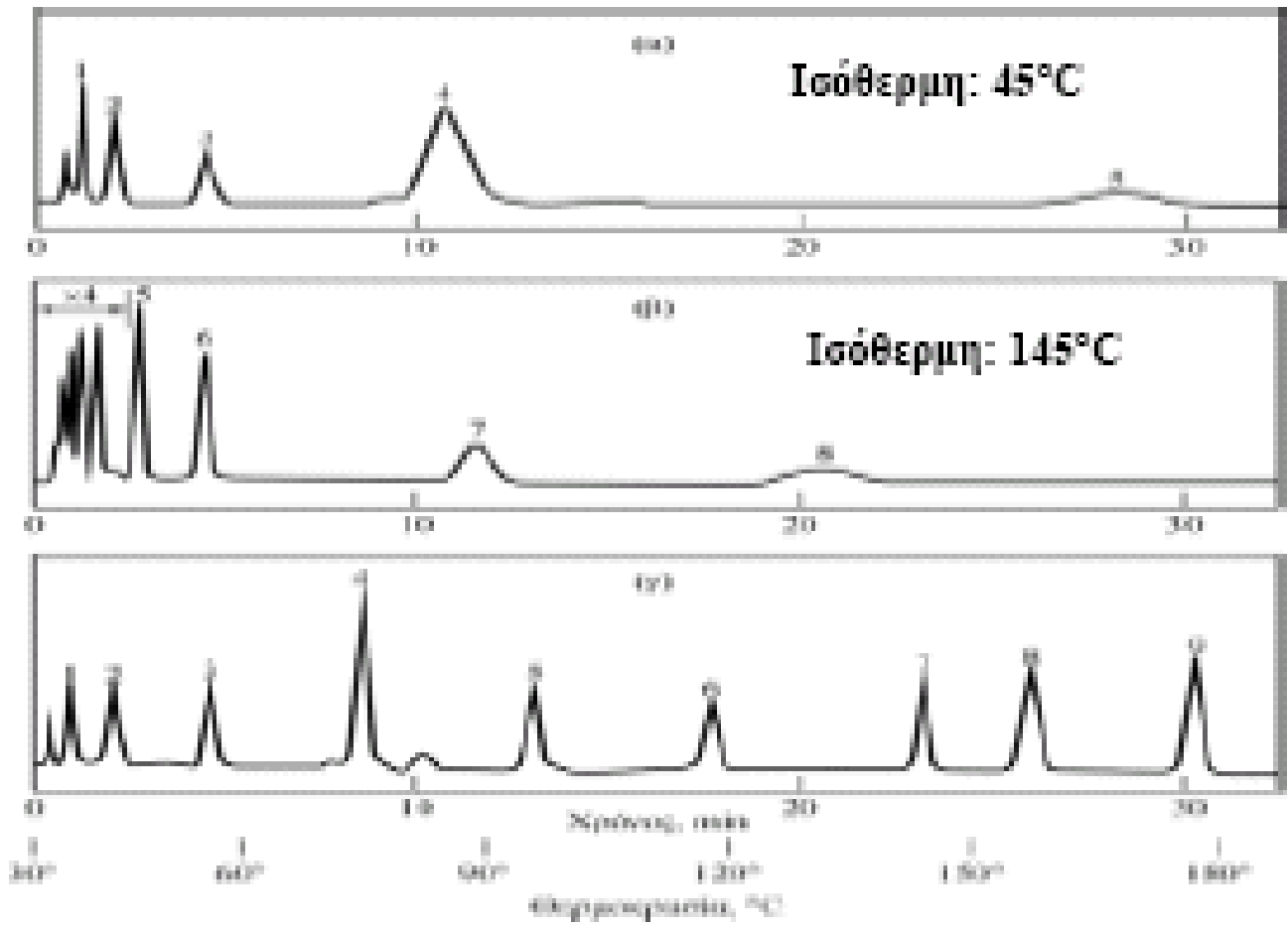


- **Τροφοδοσία φέροντος αερίου:**
- **Φιάλη**
- **Ρυθμιστές πίεσης**
  
- **Πιέσεις :** 10 – 50 psi πάνω από την ατμοσφαιρική πίεση (1 Atm = 14,7psi)
- **Ταχύτητα ροής:** 25-150 mL/min στις πληρωμένες στήλες και 1-25 mL/min στις τριχοειδείς στήλες

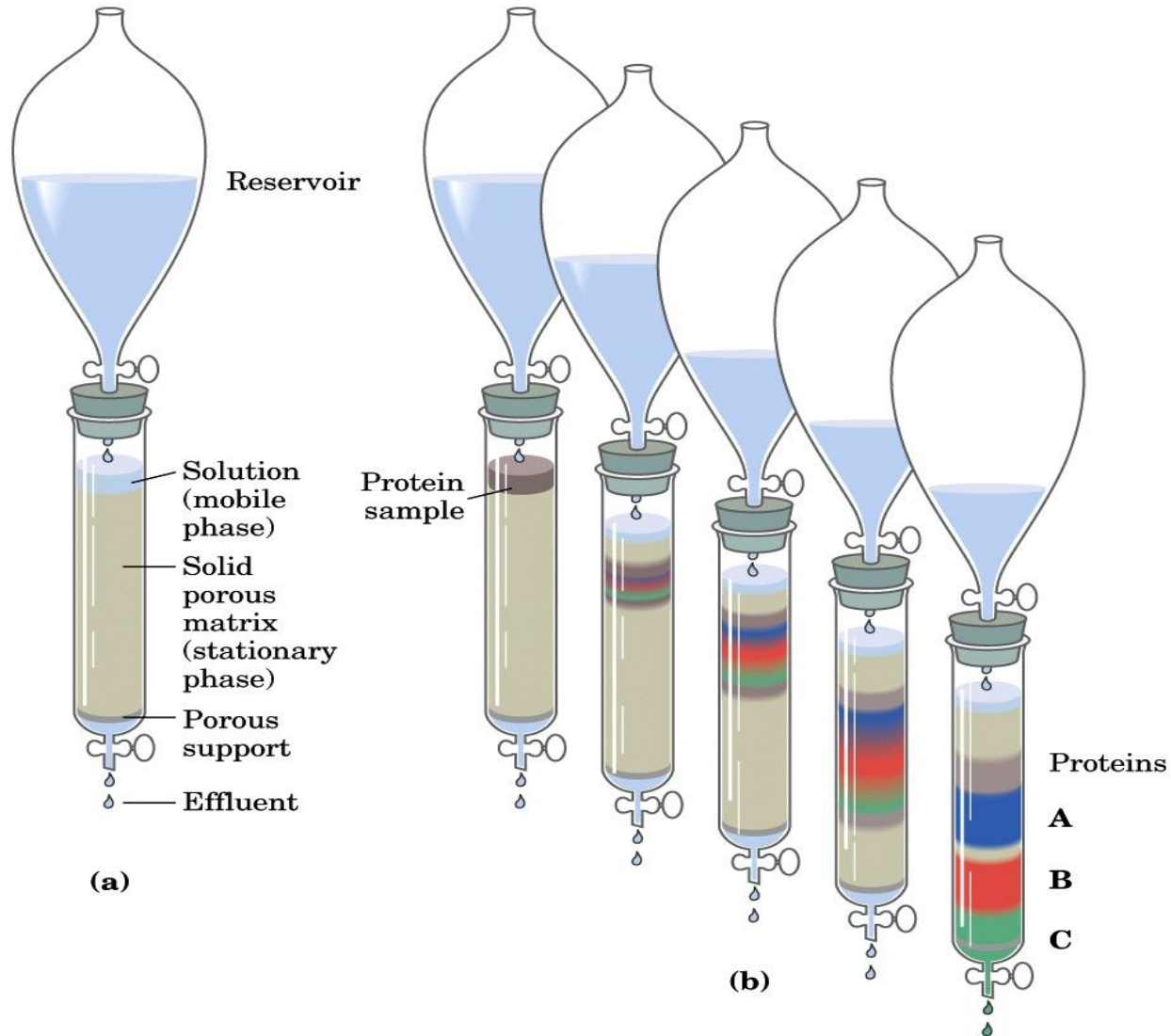
- **Σύστημα εισαγωγής δείγματος:**
- Απαιτείται **ταχεία** εισαγωγή **όλου** του δείγματος (**1-2  $\mu\text{L}$** ) σε
- θερμοκρασία **50°C** πάνω από το σ.ζ. του λιγότερου πτητικού συστατικού του δείγματος
- Ο χώρος εισαγωγής θερμαίνεται σε θερμοκρασίες υψηλότερες από τη θερμοκρασία της στήλης, ώστε να διασφαλιστεί η εξαέρωση του δείγματος

# ΘΕΡΜΟΣΤΑΤΙΣΗ ΣΤΗΛΗΣ

- Η θερμοκρασία της στήλης επηρεάζει σε μεγάλο βαθμό τη διαδικασία διαχωρισμού.
- Η στήλη σε σταθερή θερμοκρασία (**ισόθερμη χρωματογραφία**).
- Η θερμοκρασία μεταβάλλεται με καθορισμένο πρόγραμμα (**θερμοπρογραμματιζόμενη χρωματογραφία**)



# Υγρή Χρωματογραφία στήλης





Fluorescence Detector

Column Chamber

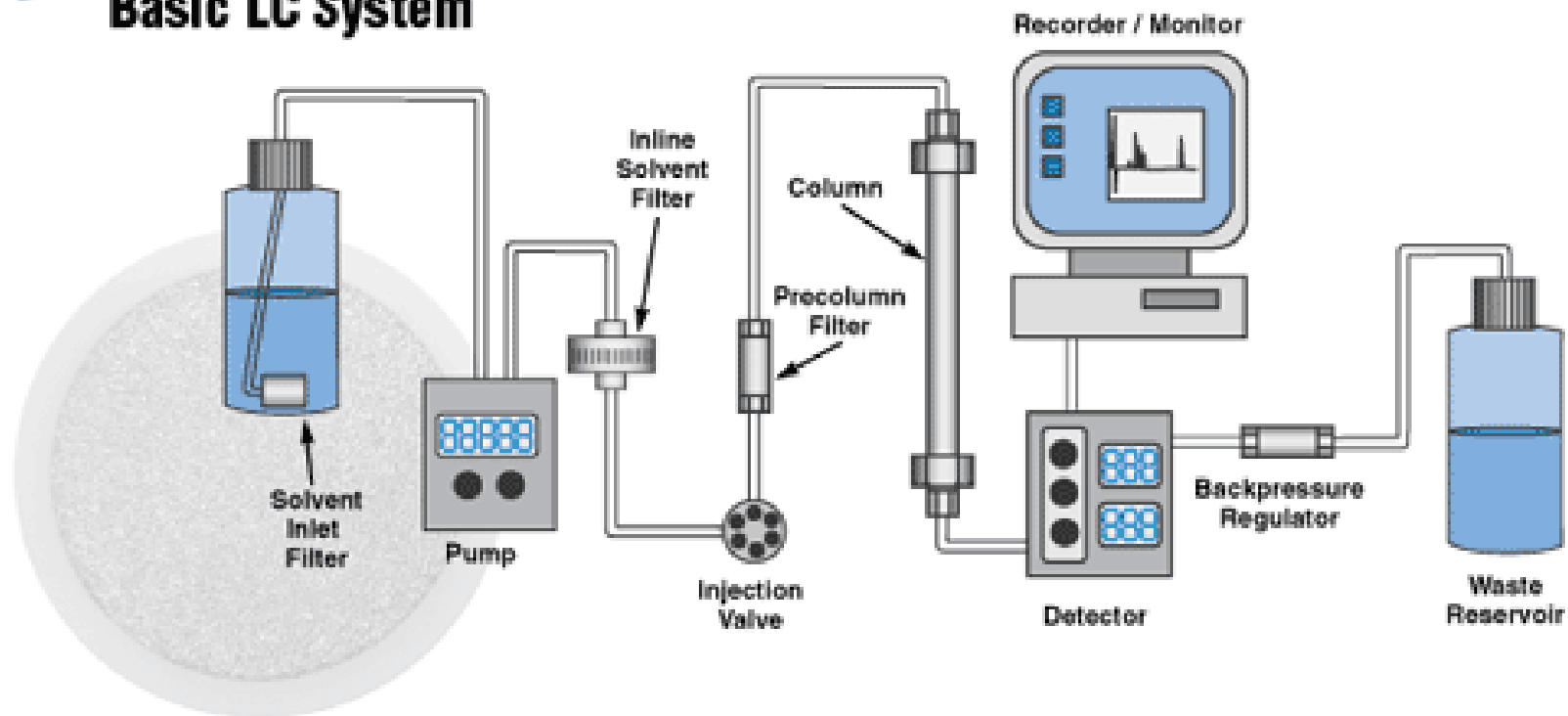
Chromatogram

Sample Manager

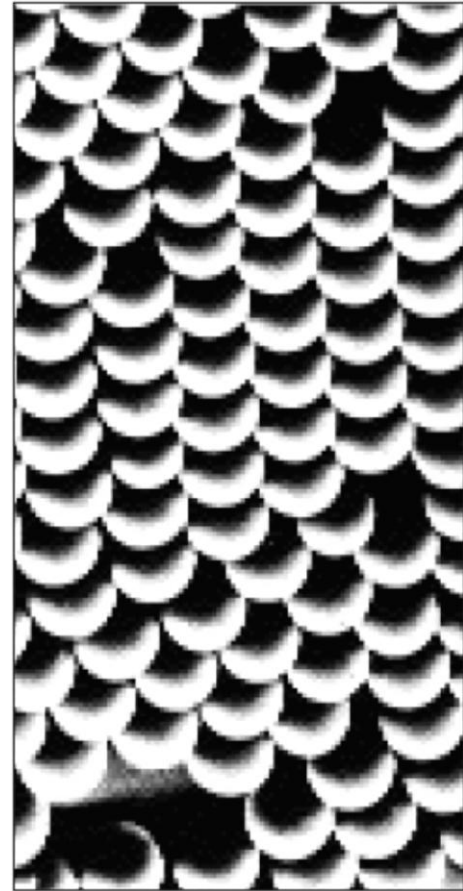
Solvent Manager



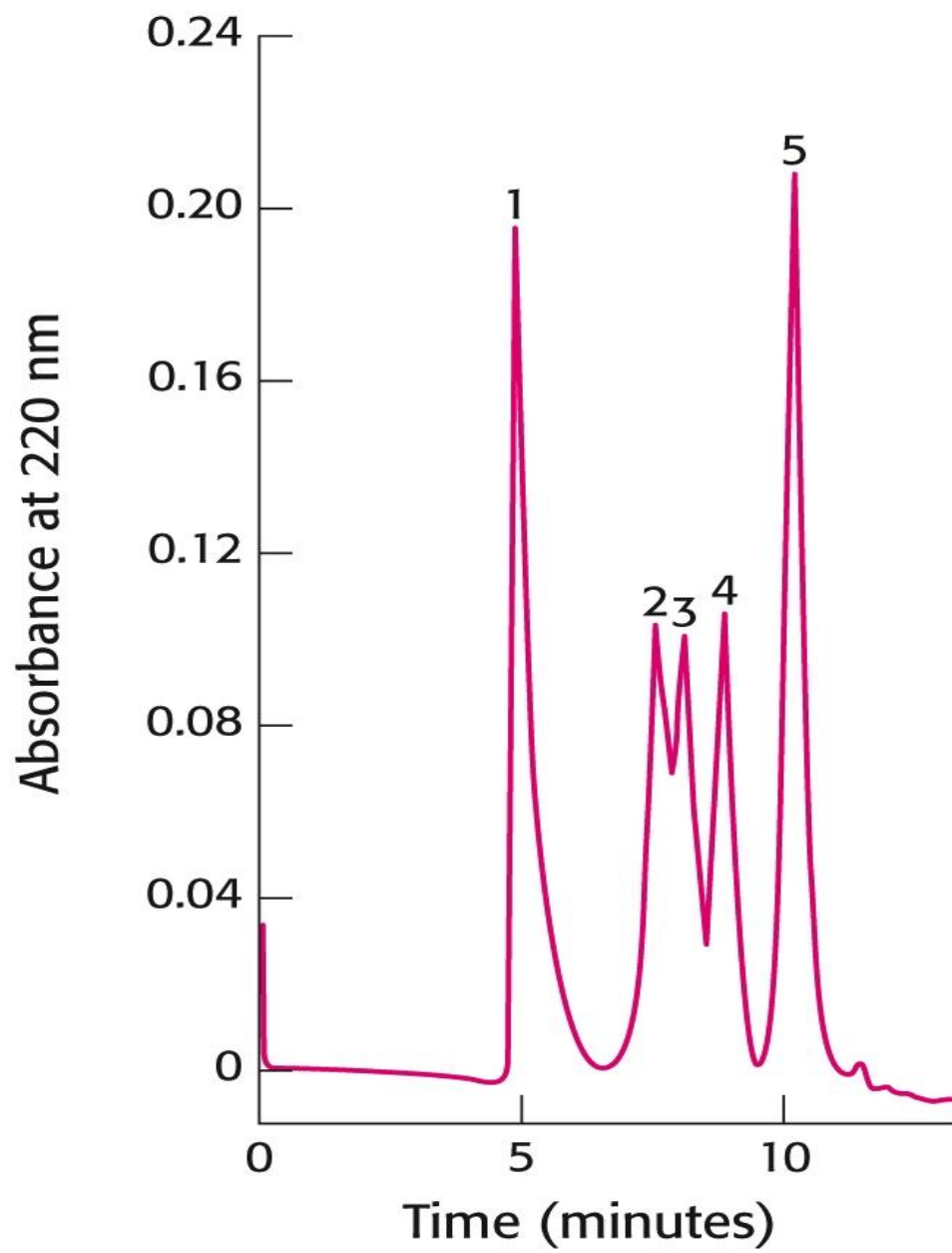
*Schematic:*  
**Basic LC System**



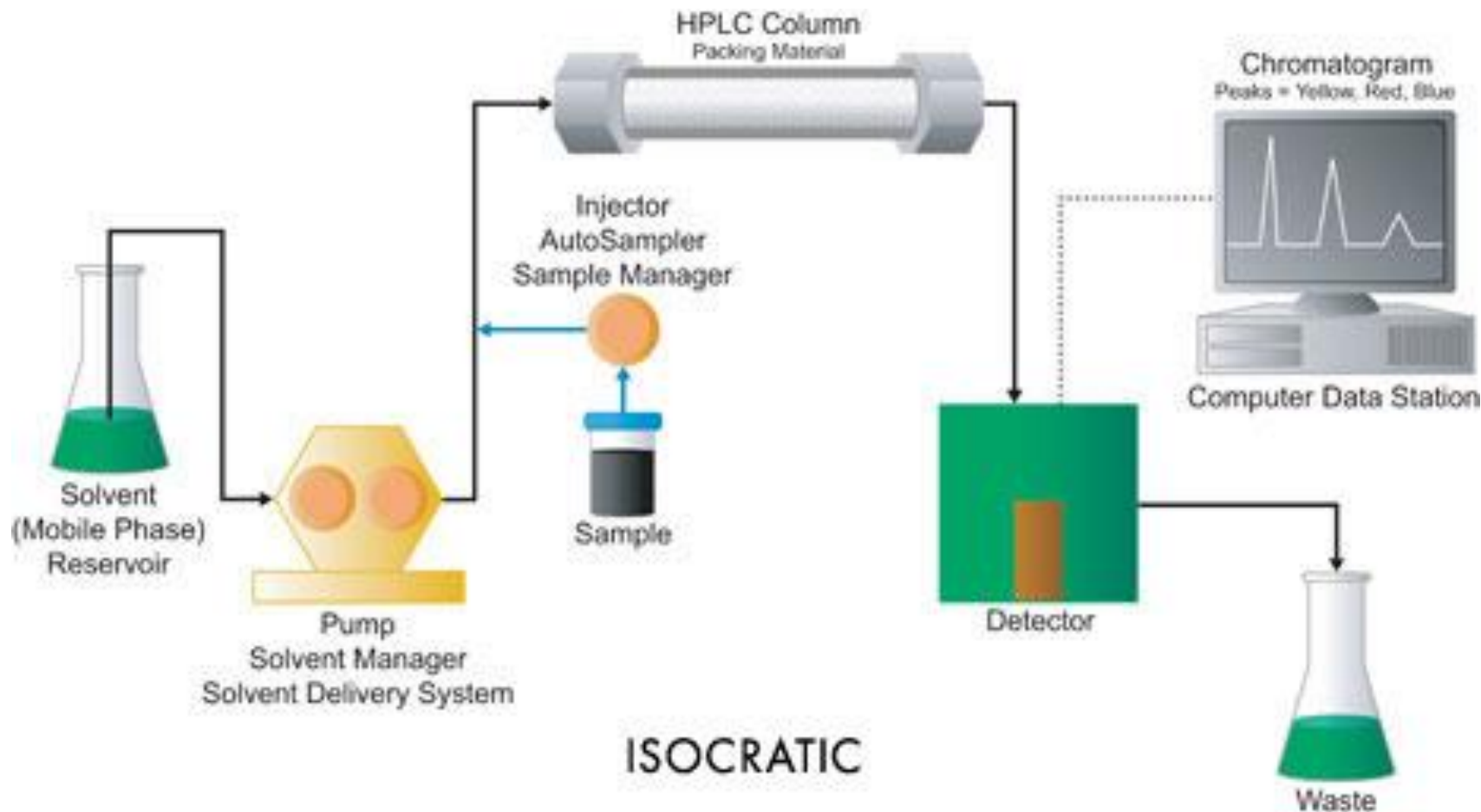
- **HPLC**
- Εξαιρετικά λεπτά διαμερισμένη ρητίνη →
- Περισσότερες θέσεις αλληλεπίδρασης →
- Μεγαλύτερη ικανότητα διαχωρισμού
- Ταχύτερες αναλύσεις
- Απαραίτητες υψηλές πιέσεις



# HPLC

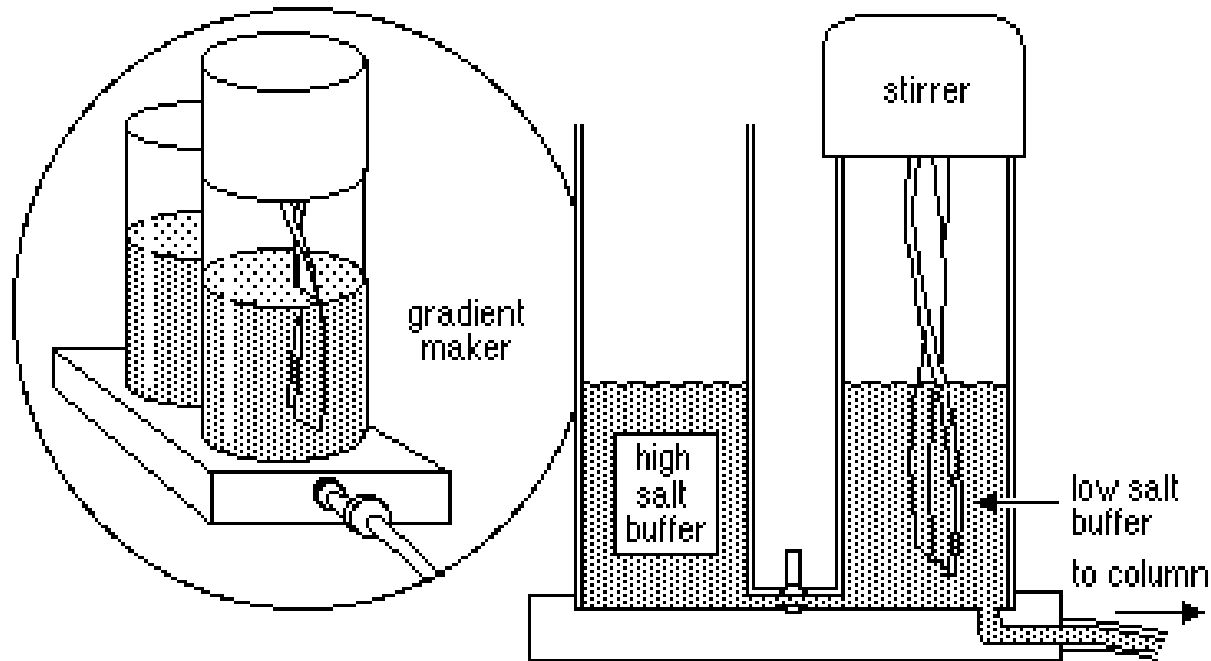


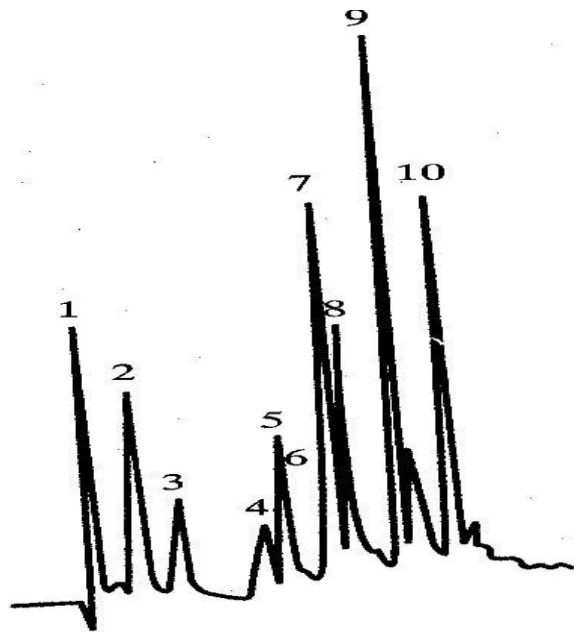
- Το εύρος ροής στην υγρή χρωματογραφία είναι από 0,5 έως 5 ml/min και επιτυγχάνεται με αντλίες που λειτουργούν σε πιέσεις 300-7500psi. Οι συνηθισμένες στήλες με υλικό πλήρωσης 5μm, λειτουργούν με ροή 1ml/min και πιέσεις 1000-2000 psi.
- Η έκλουση γίνεται είτε
- **ισοκρατικά** όπου η σύσταση της κινητής φάσης δεν μεταβάλλεται κατά τη διάρκεια της ανάλυσης, είτε
- **βαθμωτά** όπου η ισχύς της κινητής φάσης μεταβάλλεται επιτυγχάνοντας καλύτερο διαχωρισμό.



Με την ισοκρατική έκλυση, όταν το δείγμα περιέχει πολλά συστατικά είναι δύσκολο να διαχωριστεί, ενώ παράλληλα τα συστατικά του δείγματος που συγκρατούνται ισχυρά από τη στήλη, εκκλύονται πολύ αργά με αποτέλεσμα τη διεύρυνση των χρωματογραφικών κορυφών τους.

- Με τη βαθμωτή έκλυση γίνεται ανάμειξη ενός ασθενούς με έναν ισχυρό διαλύτη σε ποσοστά που μπορεί να μεταβάλλονται με το χρόνο, με την περιεκτικότητα του ισχυρού διαλύτη διαρκώς αυξανόμενη.
- Έτσι διαχωρίζονται στην αρχή οι ουσίες που έχουν μικρό χρόνο συγκράτησης στη στήλη και με την αύξηση της ισχύος εκκλούνται καλύτερα και όσες συγκρατούνται για περισσότερο χρόνο.

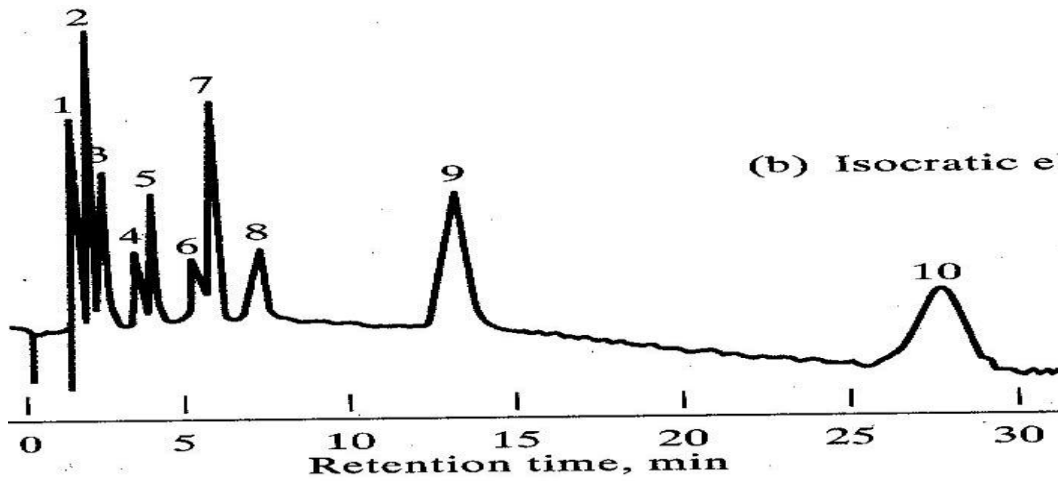




(a) Gradient elution

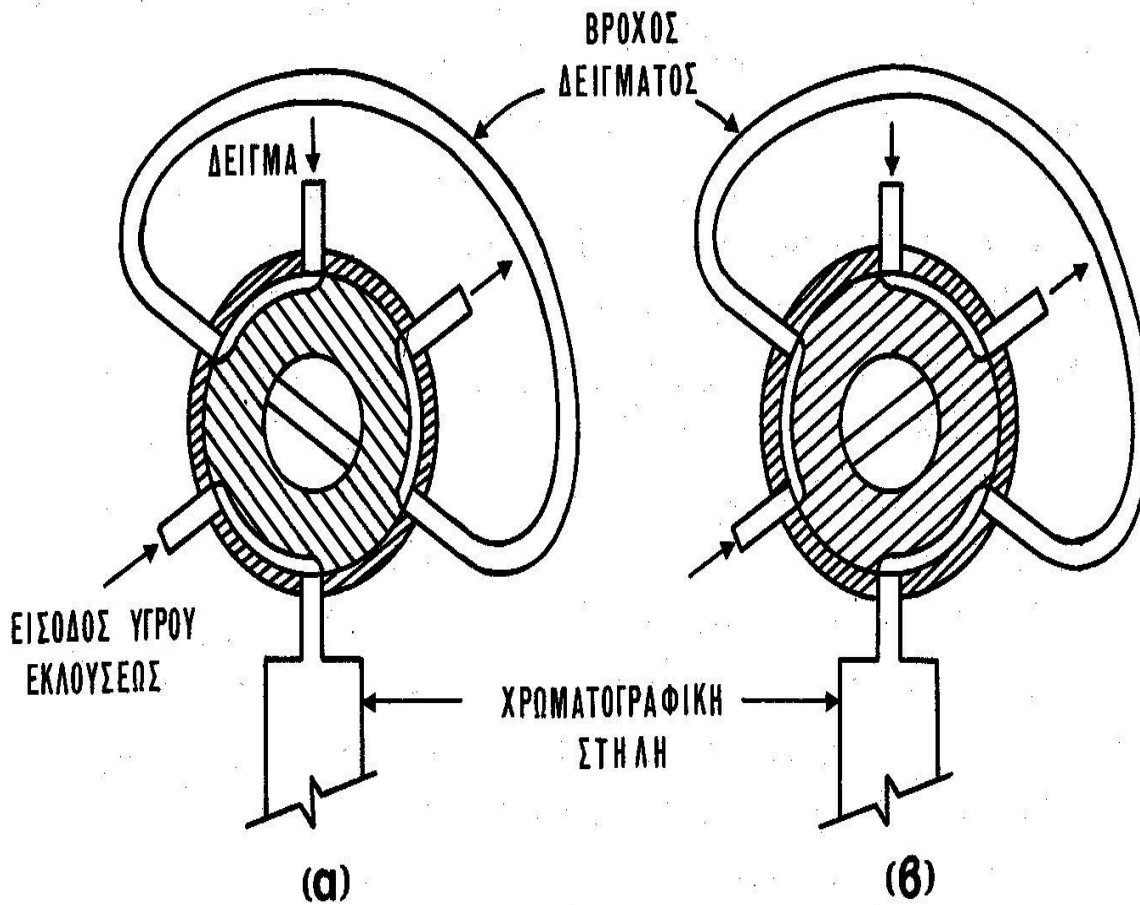
Peak identity

1. Benzene
2. Monochlorobenzene
3. Orthodichlorobenzene
4. 1,2,3-trichlorobenzene
5. 1,3,5-trichlorobenzene
6. 1,2,4-trichlorobenzene
7. 1,2,3,4-tetrachlorobenzene
8. 1,2,4,5-tetrachlorobenzene
9. Pentachlorobenzene
10. Hexachlorobenzene



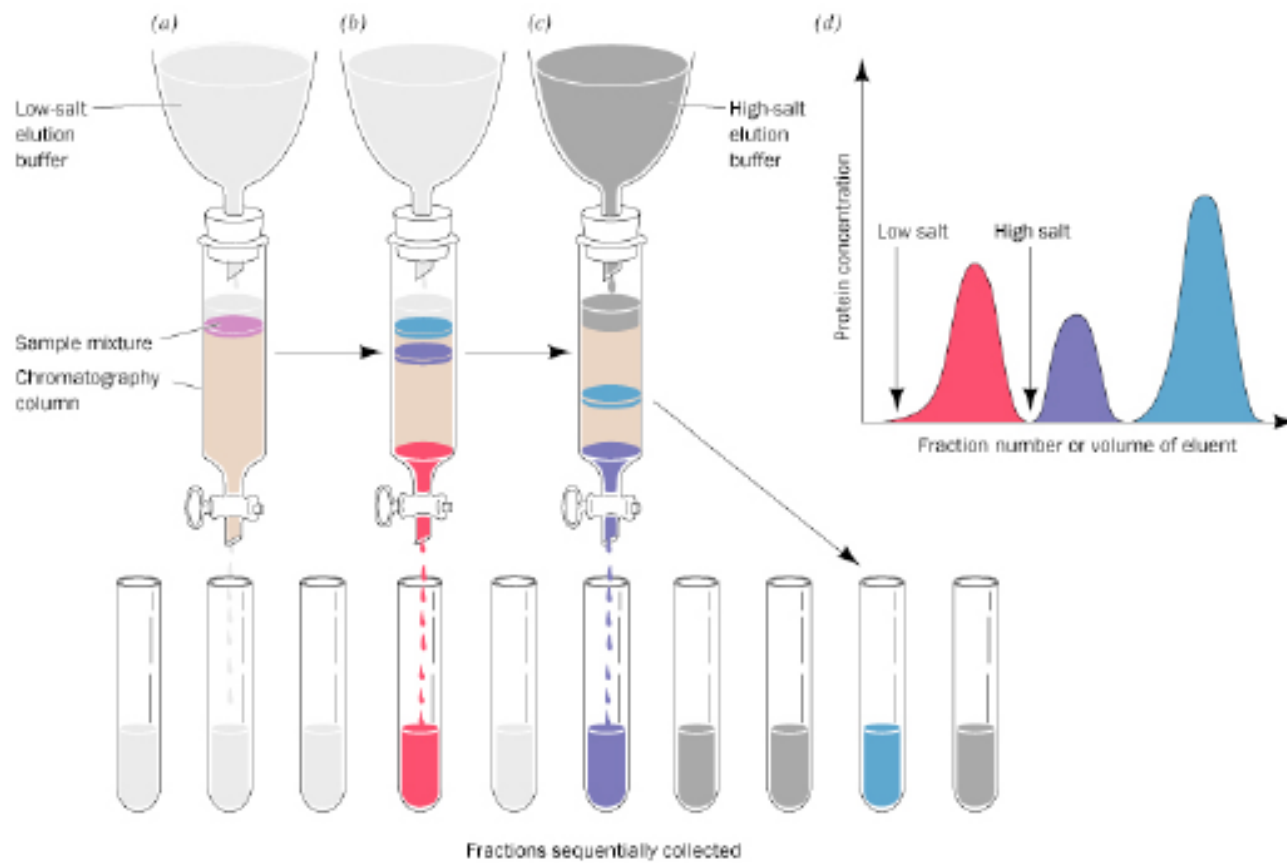
(b) Isocratic elution





Σύστημα εισαγωγής δείγματος. α) Θέση "φορτώσεως", β) θέση εισαγωγής.

**Fig. 5-5: Ion Exchange Chromatography**



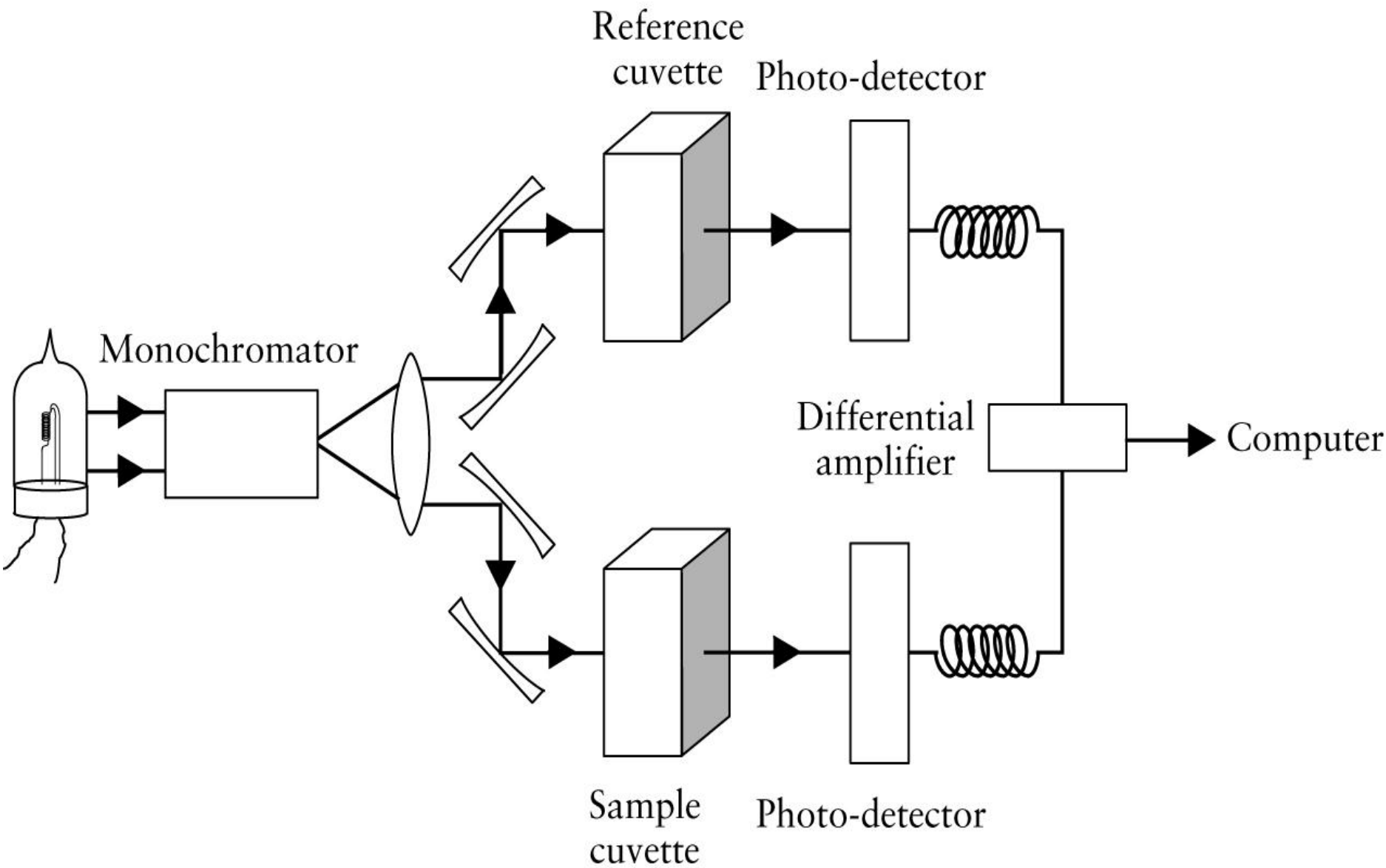


# ΑΝΙΧΝΕΥΤΕΣ

- **Ανιχνευτής δείκτη διαθλάσεως (RI):**  
Ανιχνευτής γενικής χρήσεως ο οποίος βασίζεται στη μέτρηση της διαφοράς του δείκτη διάθλασης, μεταξύ της καθαρής κινητής φάσης και αυτής που περιέχει την ουσία.
- Έχει μεγάλη ευαισθησία στη θερμοκρασία και θερμοστατείται ( $\pm 0,001$  °C).

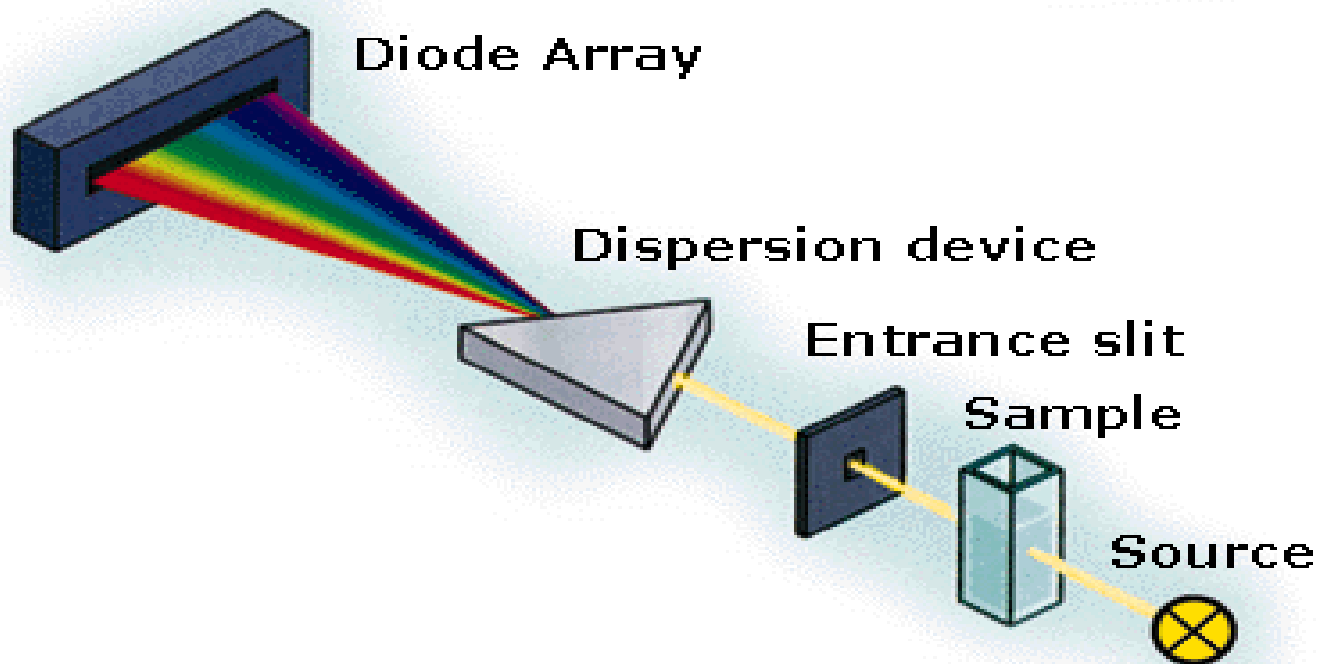
# ΑΝΙΧΝΕΥΤΕΣ

- Ο ανιχνευτής UV-VIS είναι ευαίσθητος στην περιοχή  $10^{-6}$  έως  $10^{-10}$  g/mL για αρκετές ενώσεις.
- Σταθερού μήκους κύματος
- Μεταβαλλόμενου μήκους κύματος



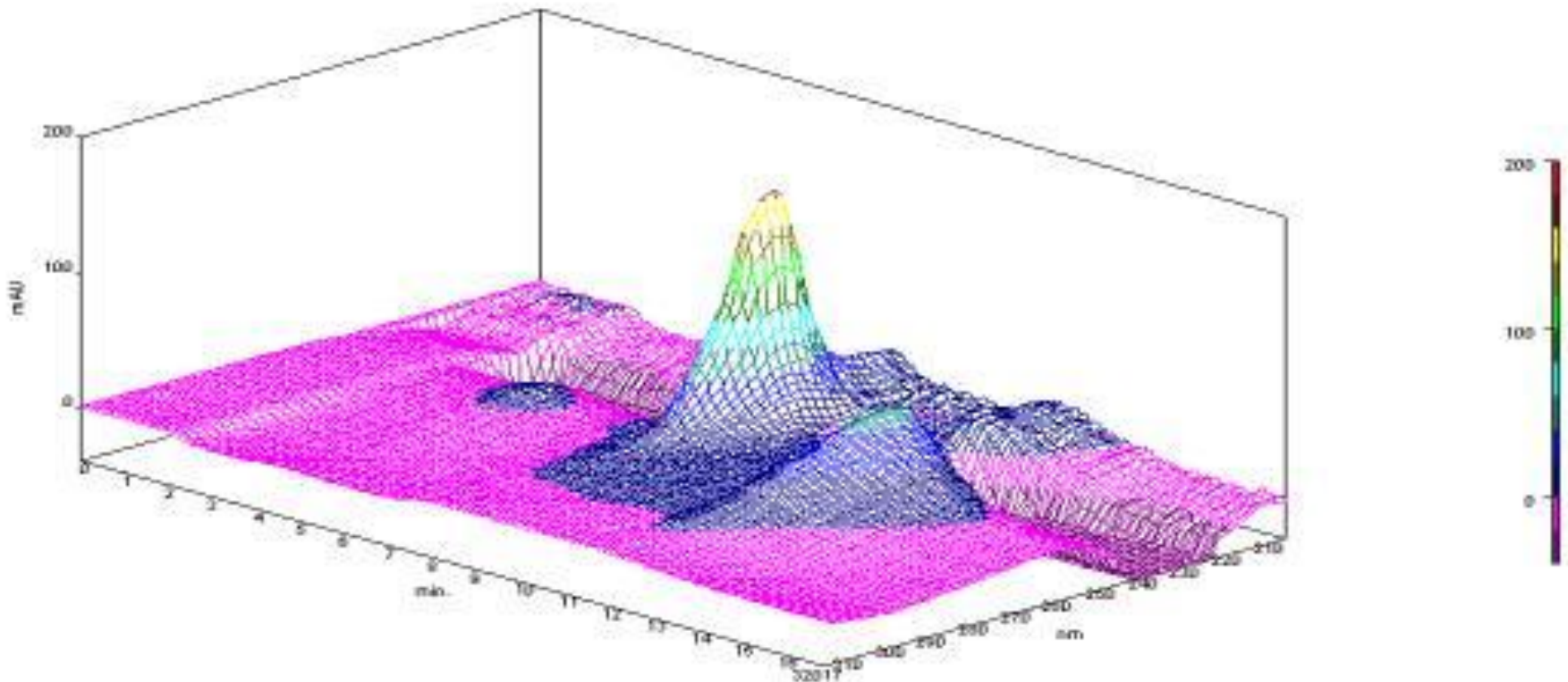
# Ανιχνευτής σειράς φωτοδιοδίων

- Διέρχεται πολυχρωματική ακτινοβολία από την κυψελίδα του ανιχνευτή,
- η προκύπτουσα ακτινοβολία στη συνέχεια προσπίπτει σε σειρά φωτοδιόδων.
- Κάθε μία φωτοδίοδος δέχεται μία διαφορετική δέσμη με μικρό εύρος μήκους κύματος.



# Ανιχνευτής σειράς φωτοδιοδίων

- Όλη η σειρά των διόδων «σαρώνεται» πολλές φορές το δευτερόλεπτο από έναν μικροεπεξεργαστή και το προκύπτον φάσμα προβάλλεται σε οθόνη και ταυτόχρονα αποθηκεύεται στη μνήμη ηλεκτρονικού υπολογιστή για μετέπειτα εκτύπωση σε καταγραφικό.





# Ανιχνευτής σειράς φωτοδιοδίων

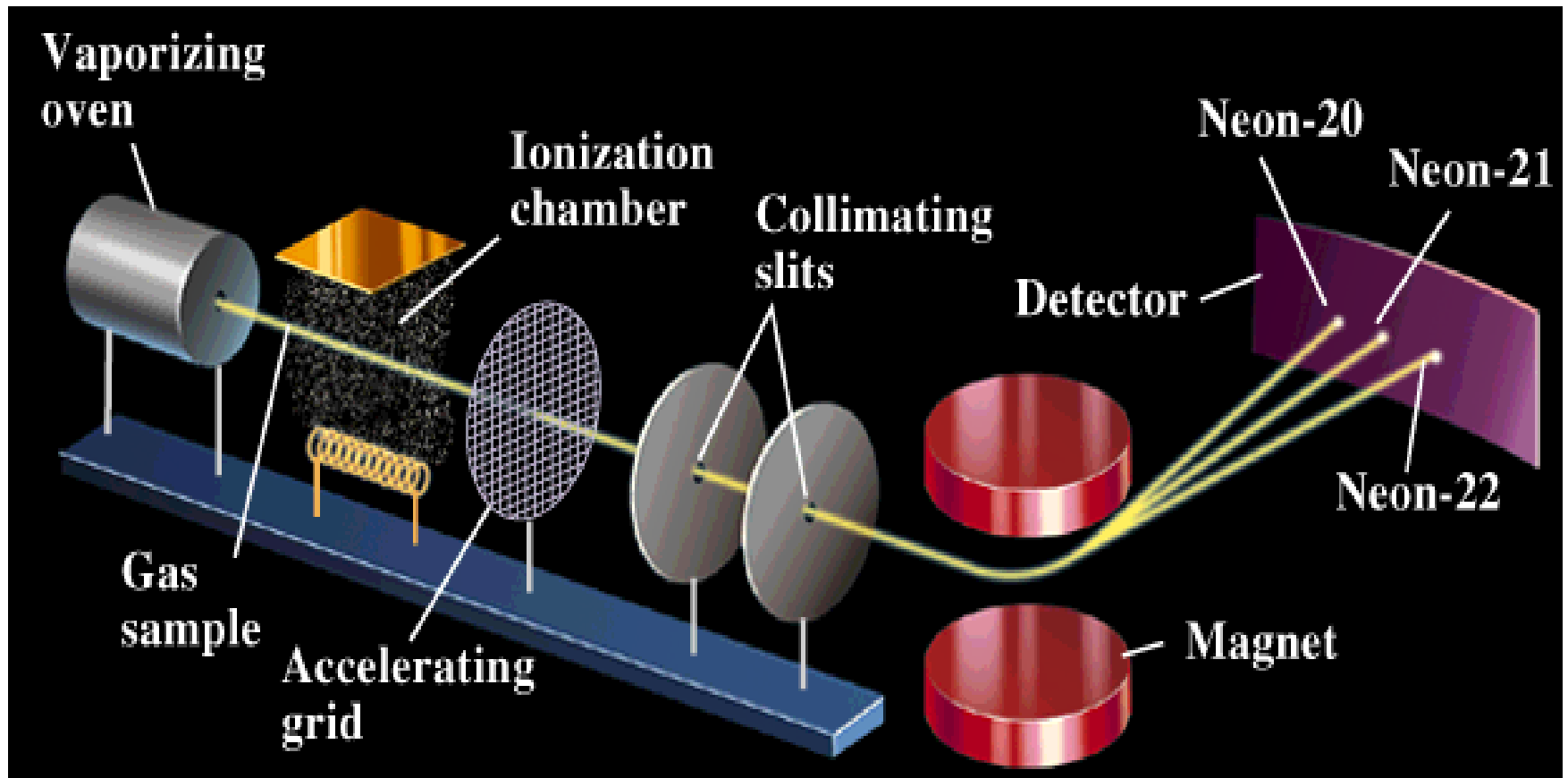
- Ο υπολογιστής επιτρέπει την ταυτοποίηση της ουσίας συγκρίνοντας το φάσμα της με τα φάσματα που διαθέτει σε ειδικά αρχεία-βιβλιοθήκη.
- Η ανίχνευση μπορεί να γίνει σε ένα ή περισσότερα μήκη κύματος ταυτόχρονα,
- Η καθαρότητα μιας χρωματογραφικής κορυφής, δηλαδή το κατά πόσον πρόκειται για μία ουσία ή όχι, μπορεί να ελεγχθεί από τους λόγους των απορροφήσεων σε επιλεγμένα μήκη κύματος (πχ. 254nm και 280nm).

# • Ανιχνευτές φθορισμού

- Φθορισμός είναι η ιδιότητα ορισμένων ουσιών όταν απορροφούν UV ακτινοβολία, αυτομάτως να εκπέμπουν ακτινοβολία
- Οι ανιχνευτές φθορισμού είναι 2 με 3 τάξεις μεγέθους πιο ευαίσθητοι από τους ανιχνευτές UV, ενώ παρουσιάζουν μεγάλη εκλεκτικότητα, αφού οι περισσότερες ουσίες δε φθορίζουν.
- Κατάλληλες για ανίχνευση με φθορισμό είναι ουσίες που εκπέμπουν σημαντικό ποσοστό της ακτινοβολίας που έχουν απορροφήσει. Οι φυσικά φθορίζουσες ουσίες είναι λίγες και είναι αυτές με συζυγή κυκλική δομή, όπως οι πολυπυρηνικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες
- Ουσίες που δε φθορίζουν μπορούν να ανιχνευθούν με φθορισμό αφού πρώτα μετατραπούν με κατάλληλη αντίδραση σε φθορίζον παράγωγο.

- **Ηλεκτροχημικοί ανιχνευτές**
- Μετράνε είτε την αγωγιμότητα της κινητής φάσης (ανιχνευτές αγωγιμότητας) είτε το ρεύμα που σχετίζεται με τη οξείδωση ή την αναγωγή του δείγματος (αμπερομετρικοί ή κουλομετρικοί ανιχνευτές)
- Οι ανιχνευτές αγωγιμότητας βρίσκουν εφαρμογή στην ανίχνευση των ιόντων μετά από διαχωρισμό με χρωματογραφία ανταλλαγής ιόντων.

# Φασματογράφος μάζας (MS)



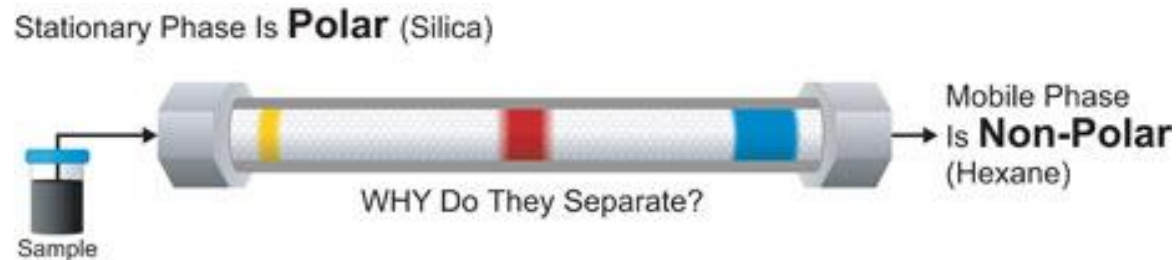
# **ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΩΝ ΤΕΧΝΙΚΩΝ ΜΕ ΒΑΣΗ ΤΟ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟ ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΥ**

- i) Χρωματογραφία Κατανομής (partition η absorption)**
- τα συστατικά του μίγματος κατανέμονται μεταξύ λεπτής στιβάδας υγρής στατικής φάσης, που σχηματίζεται στην επιφάνεια του στερεού υποστρώματος και της υγρής κινητής φάσης.
  - Διαφορά στη διαλυτότητα – **«Τα όμοια διαλύουν όμοια»**

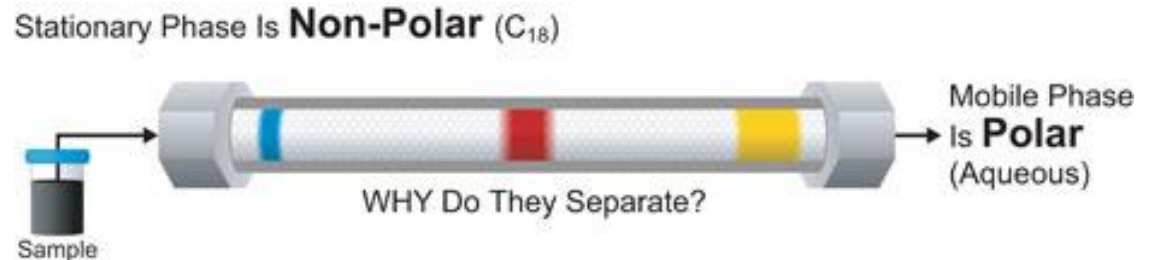
- ΣΤΑΤΙΚΗ ΦΑΣΗ
- Μικροπορώδη σωματίδια πηκτής διοξειδίου του πυριτίου (Silicagel), διαμέτρου 2-10 $\mu$ m. Παρουσιάζει υψηλή πολικότητα και αποτελεί τη βάση της υγρής χρωματογραφίας.
- Μείωση της πολικότητας επιτυγχάνεται με σύνδεση με αλκύλια που φέρουν άμινο-, κύανο-, η φαινύλο ομάδες.



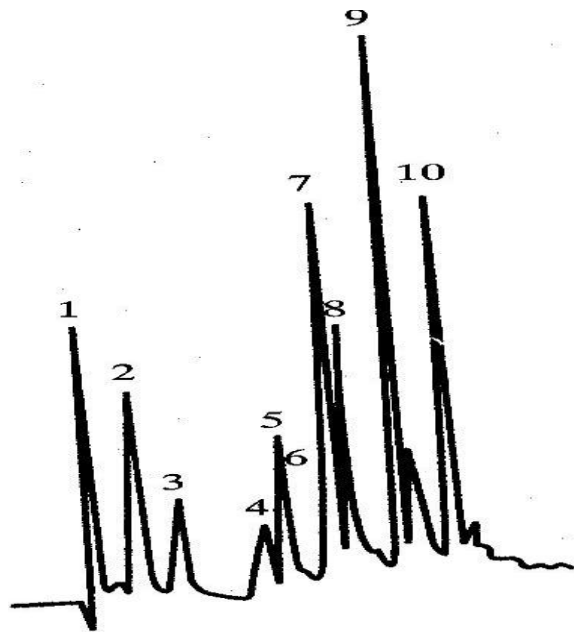
- Αν η στατική φάση είναι πιο πολική από τη κινητή, τότε η HPLC χαρακτηρίζεται ως **κανονικής φάσης**.



- Αν η στατική φάση είναι λιγότερο πολική από τη κινητή, τότε η HPLC χαρακτηρίζεται ως **αντίστροφης φάσης**.



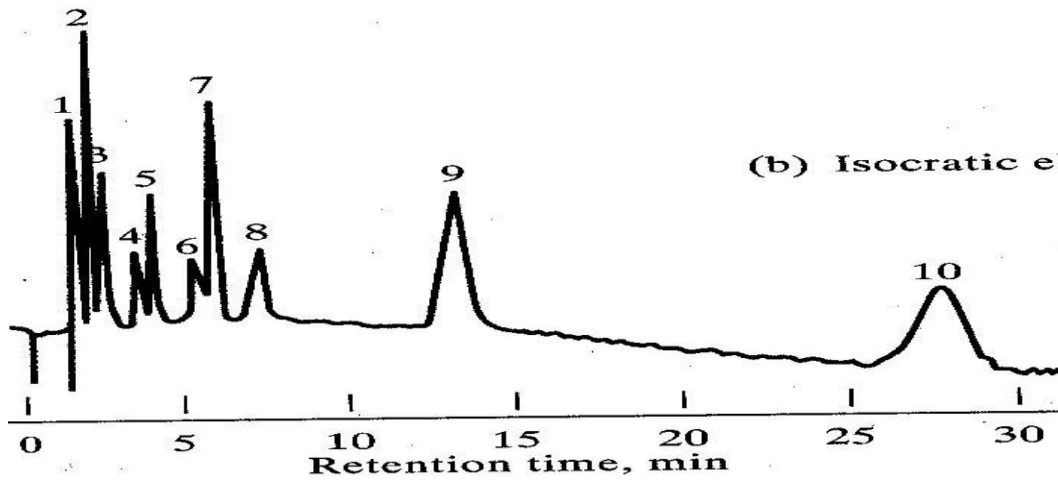




(a) Gradient elution

Peak identity

1. Benzene
2. Monochlorobenzene
3. Orthodichlorobenzene
4. 1,2,3-trichlorobenzene
5. 1,3,5-trichlorobenzene
6. 1,2,4-trichlorobenzene
7. 1,2,3,4-tetrachlorobenzene
8. 1,2,4,5-tetrachlorobenzene
9. Pentachlorobenzene
10. Hexachlorobenzene

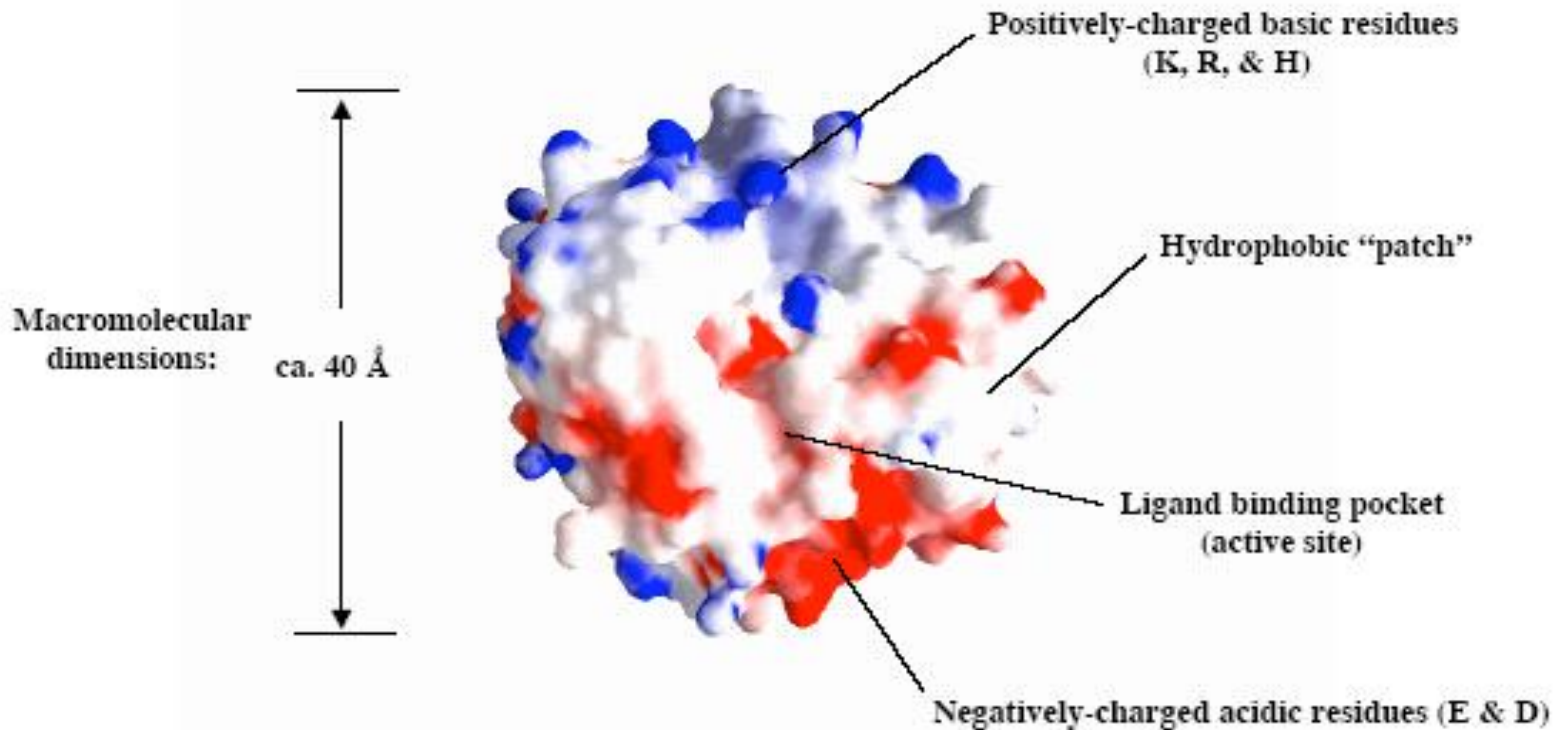


(b) Isocratic elution

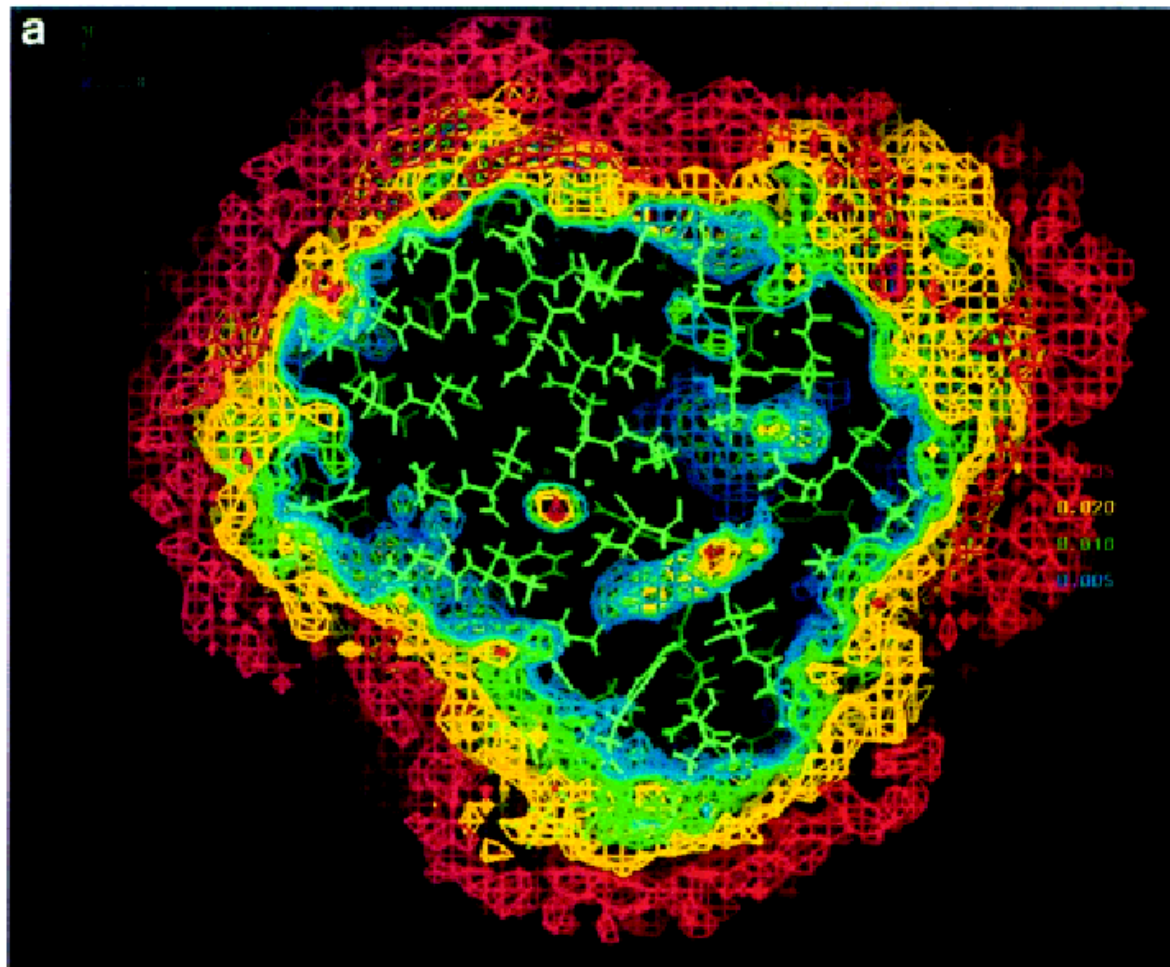
# Χρωματογραφία υδρόφοβης αλληλεπίδρασης Hydrophobic-Interaction Chromatography (HIC)

Proteins are Amphiphilic Macro-Ions

Surface Potential  >-<

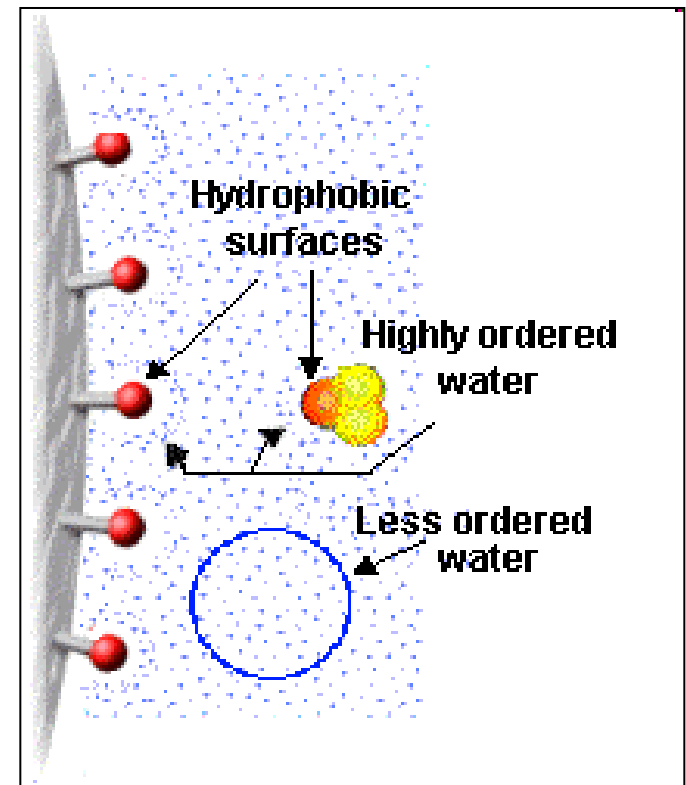
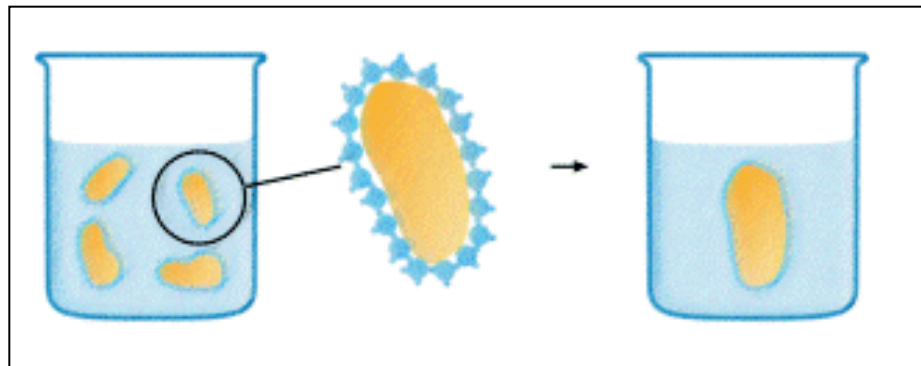
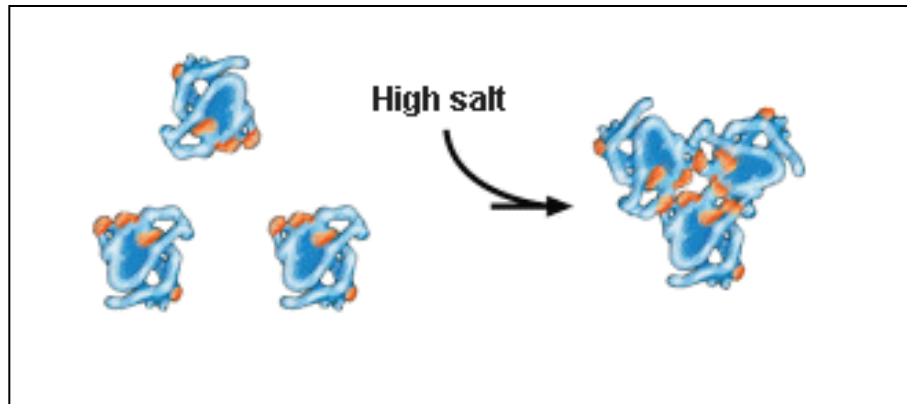


*>>> The charged groups, hydrophobic regions, size, and solvation affect the biophysical properties of the protein and largely determine its purification behavior.*

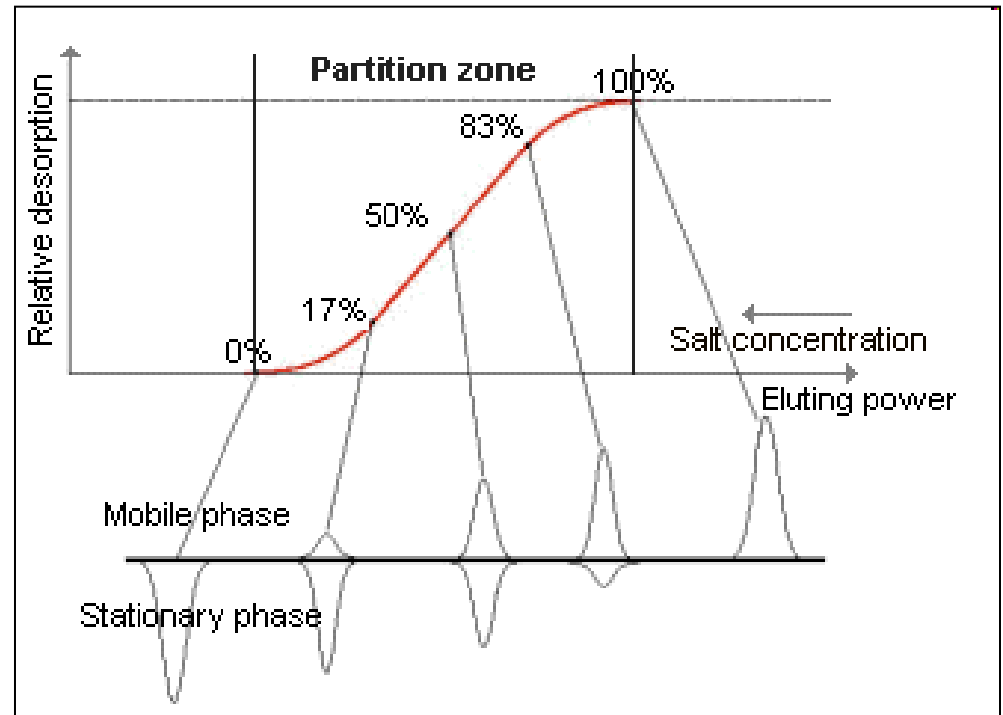
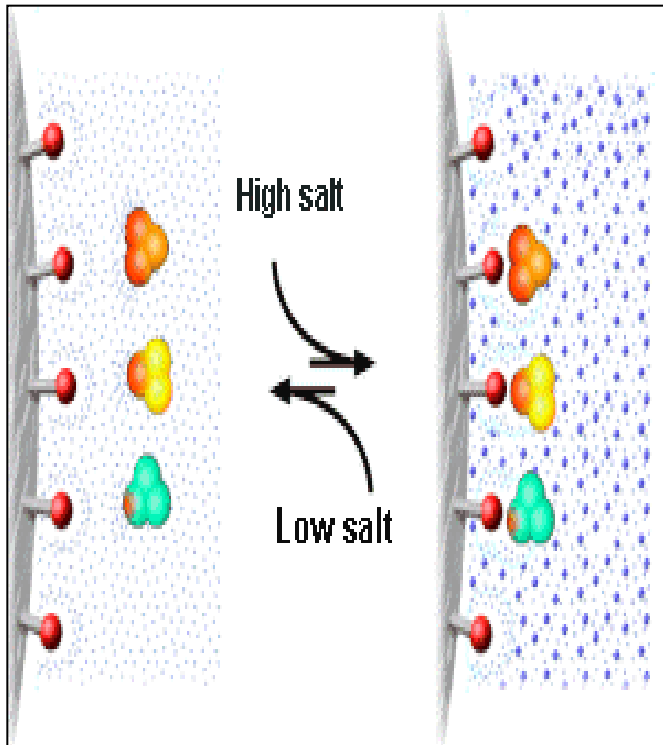


**FIGURE 1.** Three-dimensional density. Three-dimensional solvent number density distribution around myoglobin is shown as a slice computed from a molecular dynamics trajectory. The solvent density is overlaid with an average structure of myoglobin and contoured at  $0.005 \text{ \AA}^{-3}$  (blue),  $0.01 \text{ \AA}^{-3}$  (green),  $0.02 \text{ \AA}^{-3}$  (yellow), and  $0.035 \text{ \AA}^{-3}$  (red). The bulk solvent density is  $0.033 \text{ \AA}^{-3}$ . (a) Density from simulation, (b) density from prediction. Reproduced with permission of the authors from ref 24.

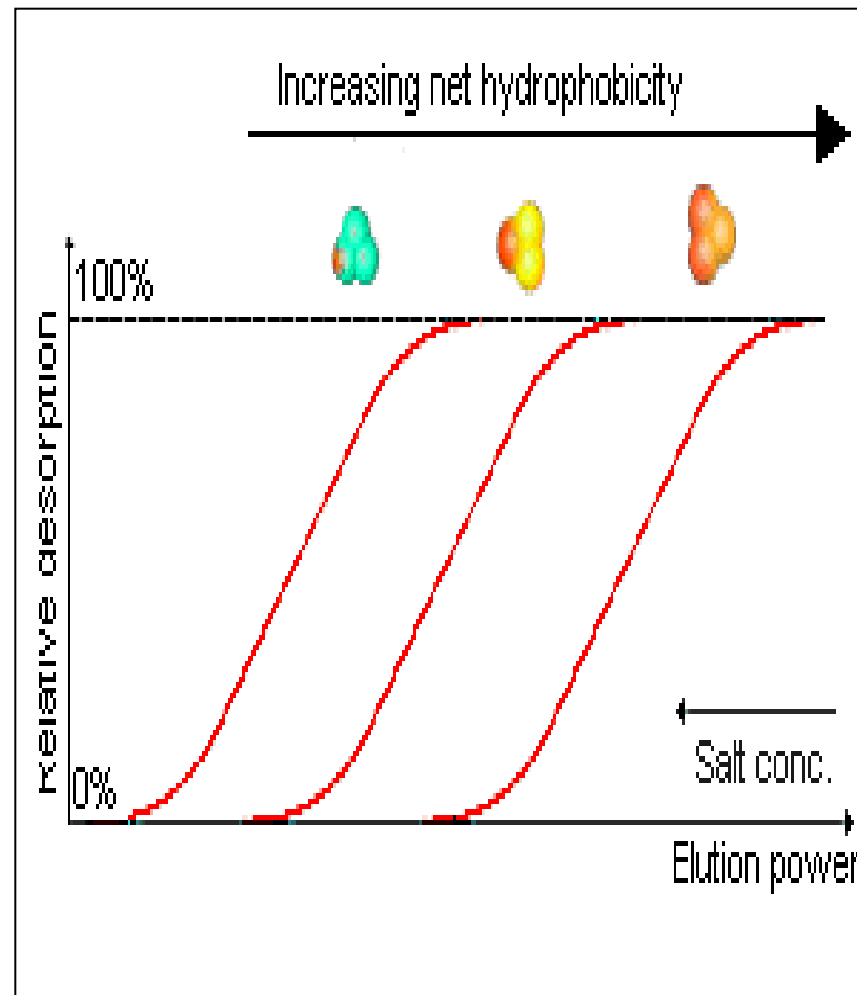
# Χρωματογραφία υδρόφοβης αλληλεπίδρασης



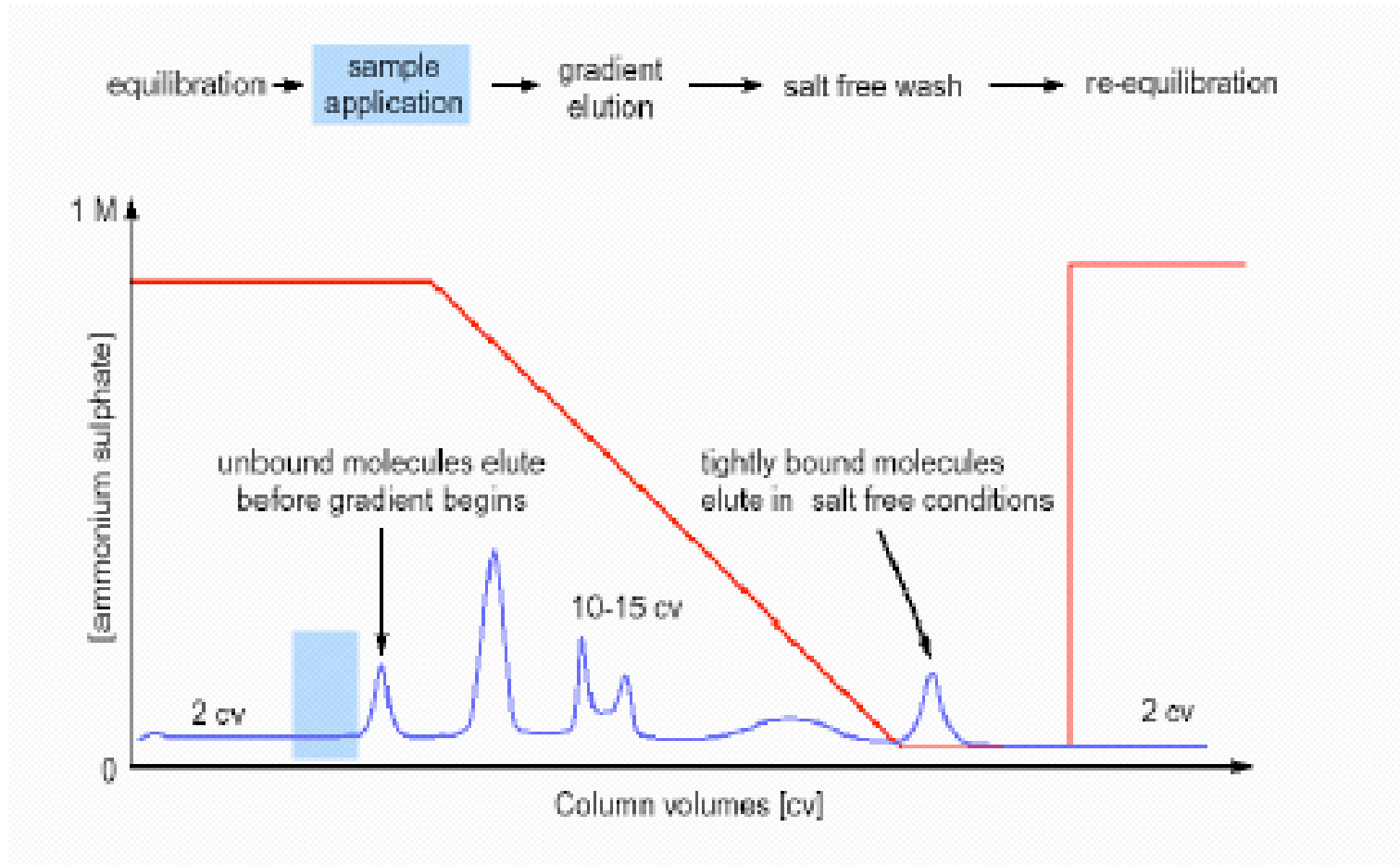
# Χρωματογραφία υδρόφοβης αλληλεπίδρασης



# Χρωματογραφία υδρόφοβης αλληλεπίδρασης



# Χρωματογραφία υδρόφοβης αλληλεπίδρασης



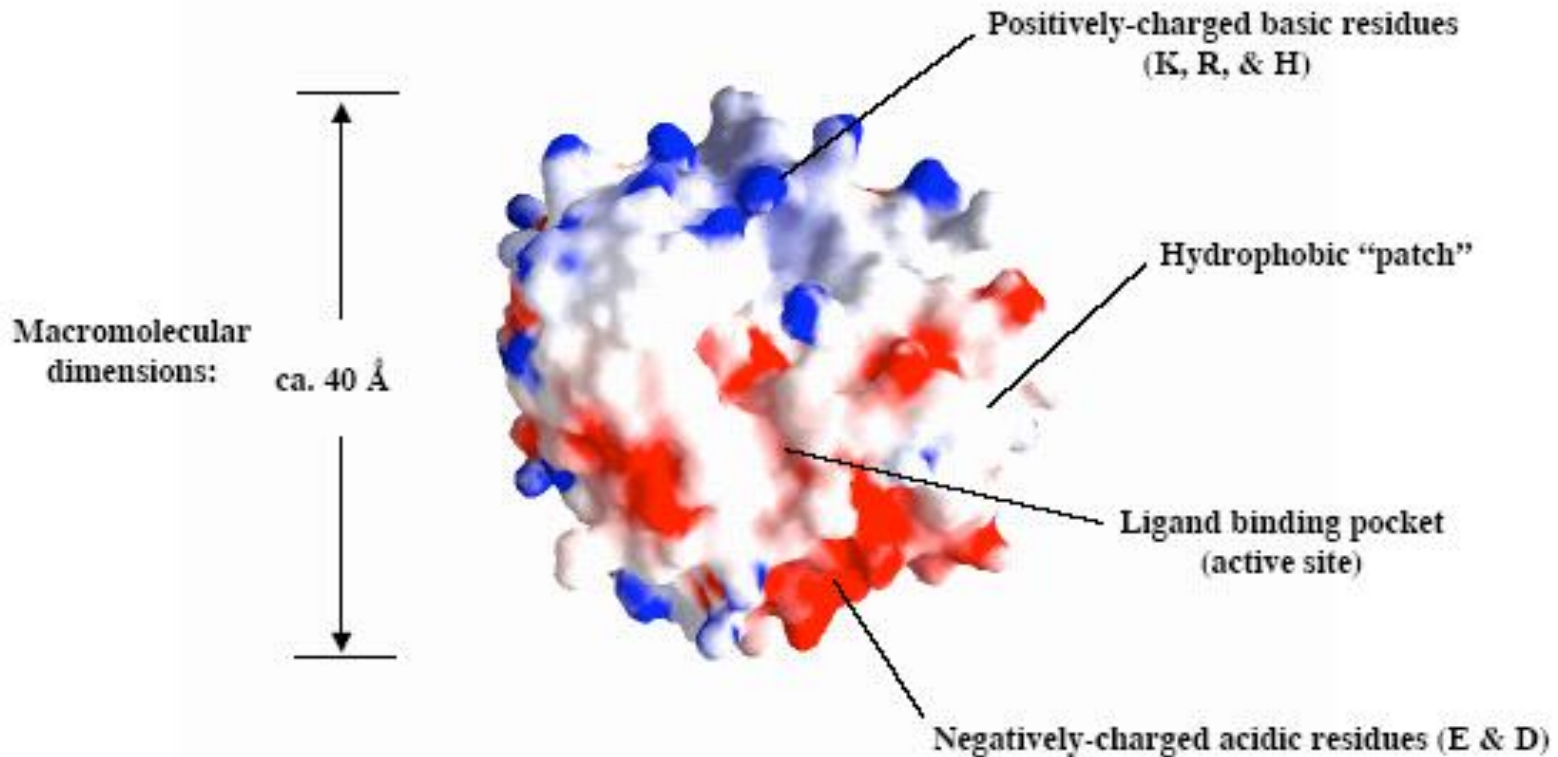
Βίντεο:

<https://www.youtube.com/watch?v=v6SPK6ZovgA>

## ii) Χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής

### Proteins are Amphiphilic Macro-Ions

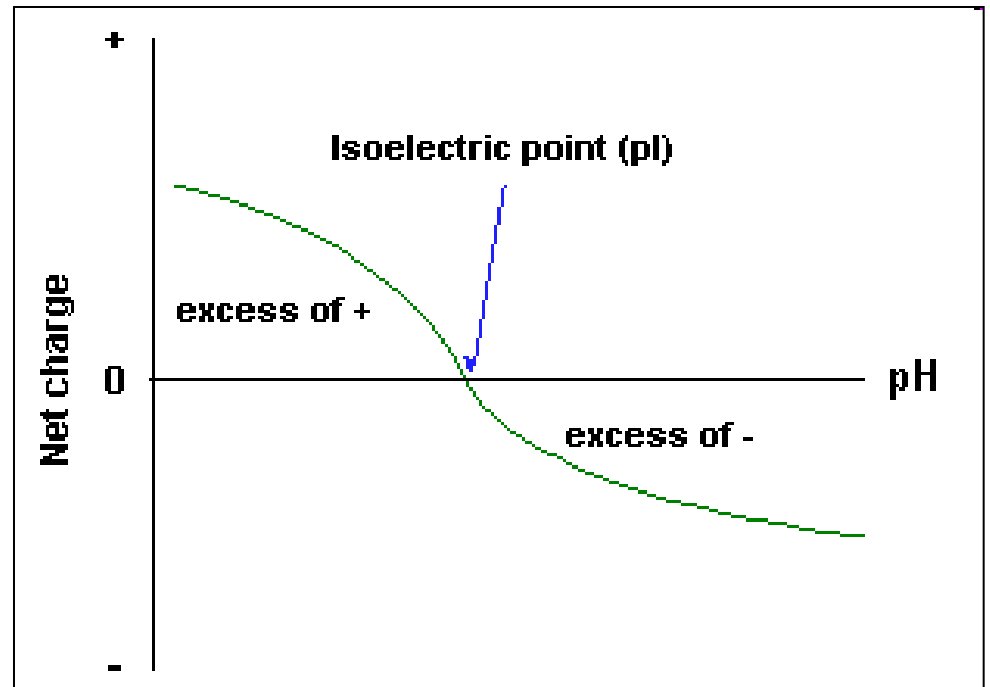
Surface Potential | -10,000 -5,000 0,000 5,000 10,000 >-<



*>>> The charged groups, hydrophobic regions, size, and solvation affect the biophysical properties of the protein and largely determine its purification behavior.*

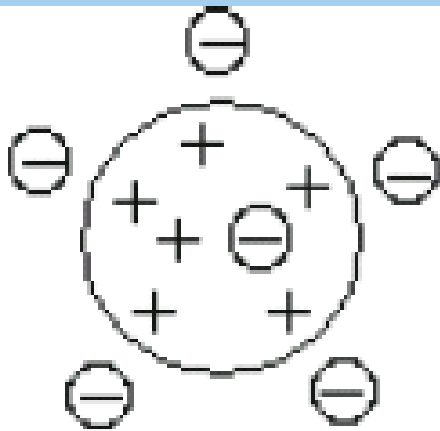


Amino acid	Type of group	Side chain pKa
Aspartic acid	Carboxyl	4.5
Glutamic acid	Carboxyl	4.6
Histidine	Imidazole	6.2
Cysteine	Thiol	9.1 - 9.5
Tyrosine	Phenol	9.7
Lysine	Amino	10.4
Arginine	Guanido	12.0
$\alpha$ -amino group	Amino	6.8 - 7.9
$\alpha$ -carboxylic group	Carboxyl	3.5 - 4.3

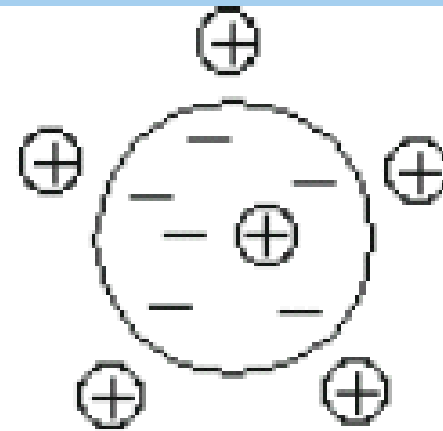


## ii) Χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής

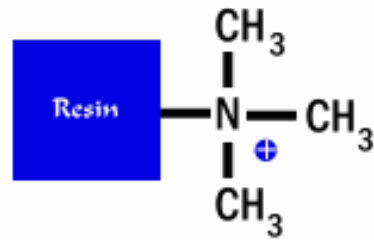
- τα ιόντα του δείγματος εναλλάσσονται με τα ιόντα της κινητής φάσης.



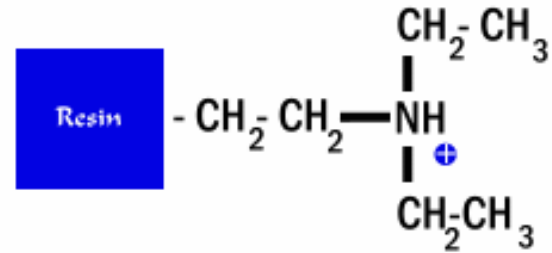
ANION exchanger with  
exchangeable counter-ions



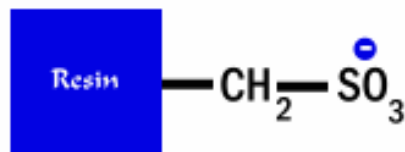
CATION exchanger with  
exchangeable counter-ions



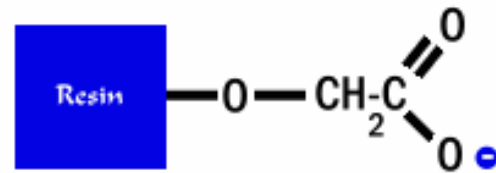
Q-anion exchanger



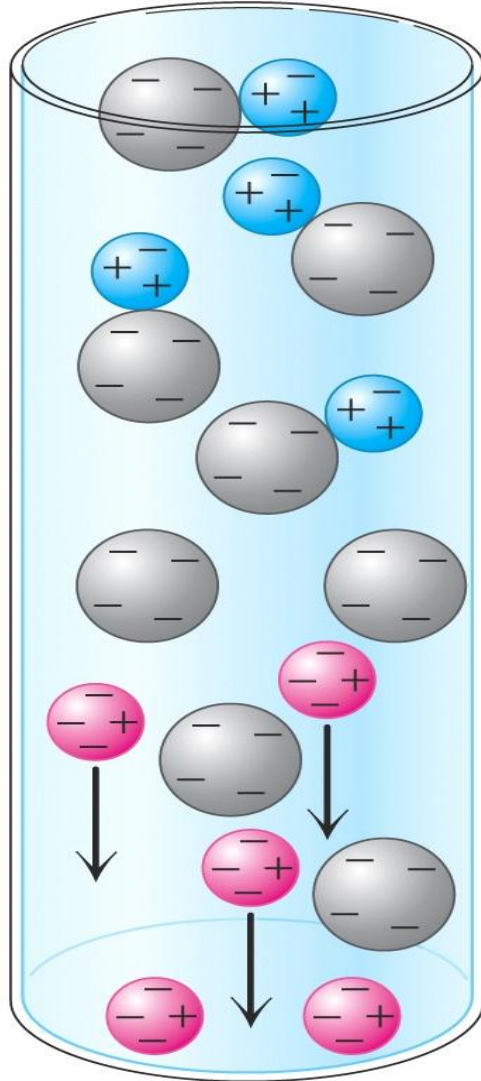
DEAE-anion exchanger



S-cation exchanger

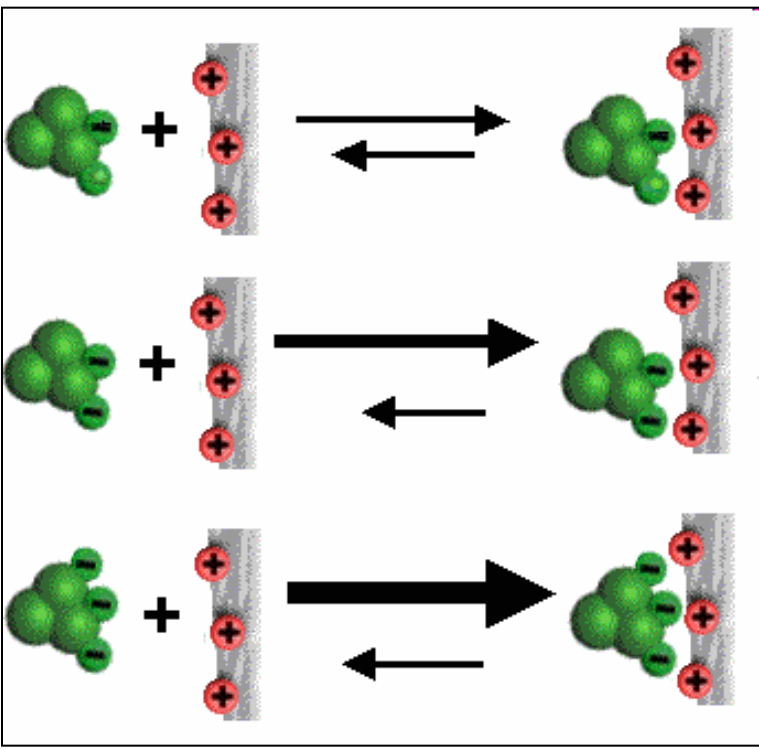
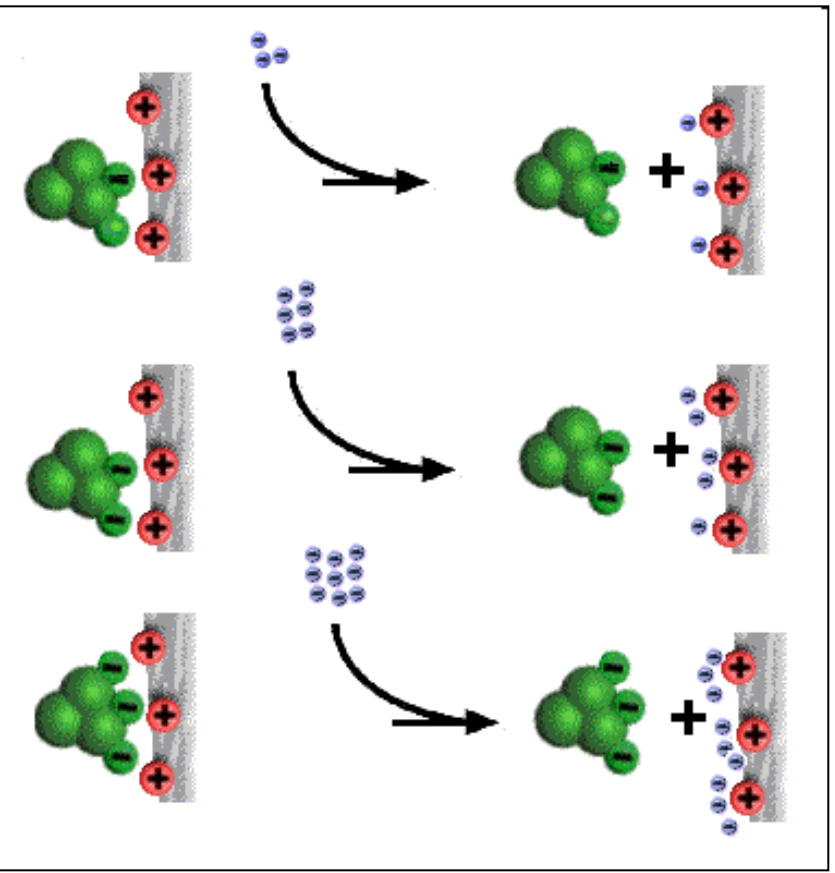


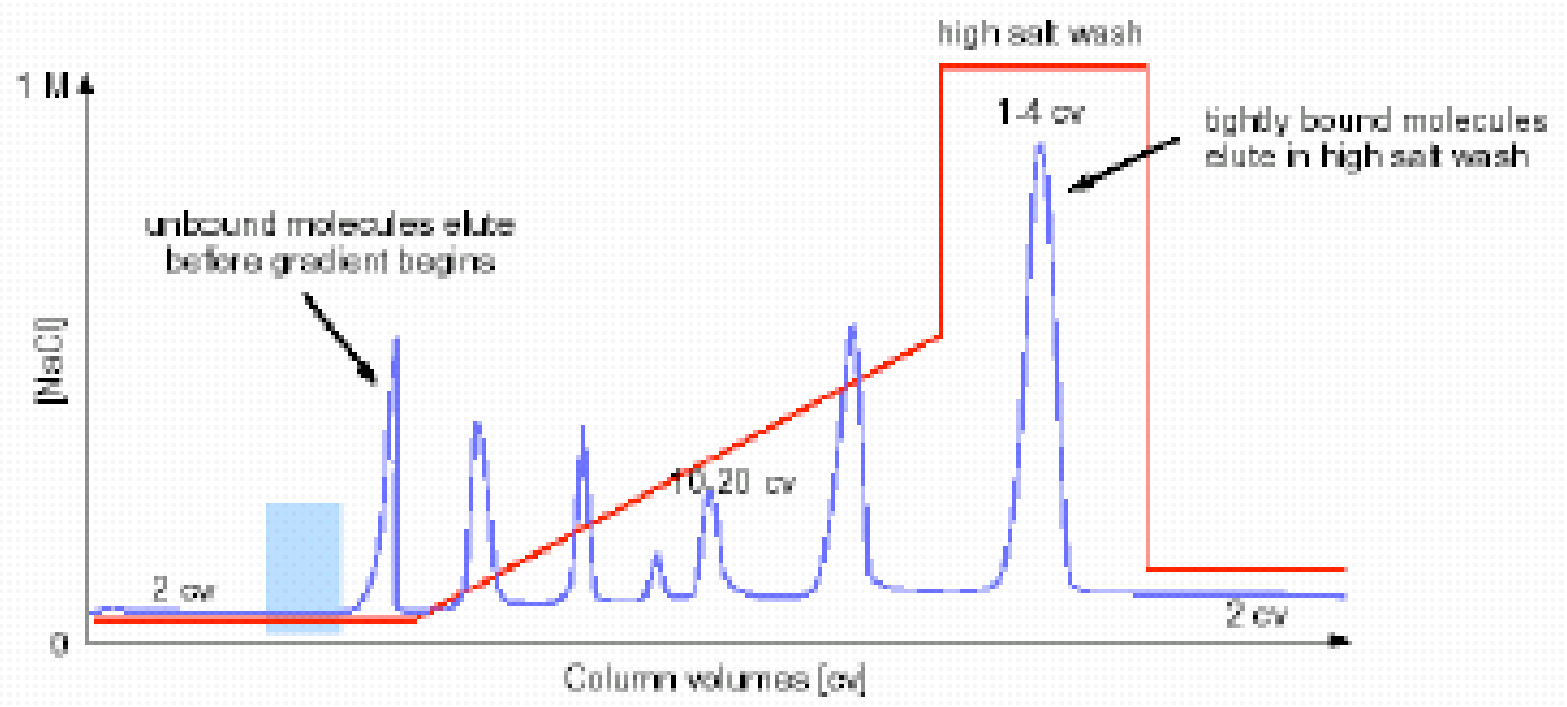
CM-cation exchanger



Θετικά φορτισμένες  
πρωτεΐνες  
δεσμεύονται σε  
αρνητικά  
φορτισμένους  
κόκκους

Αρνητικά  
φορτισμένες  
πρωτεΐνες περνούν  
με τη ροή



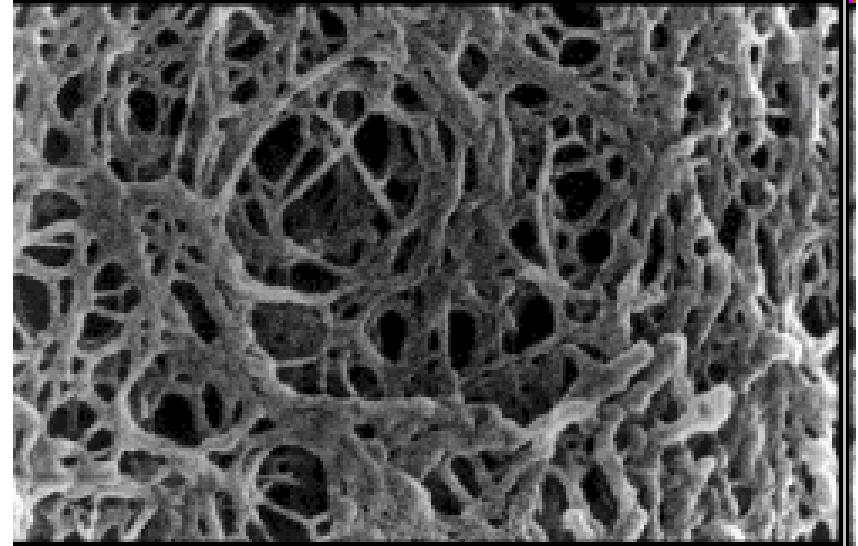


Βίντεο:

<https://www.youtube.com/watch?v=q3fMqgT1do8>

### iii) Χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού (molecular exclusion chromatography),

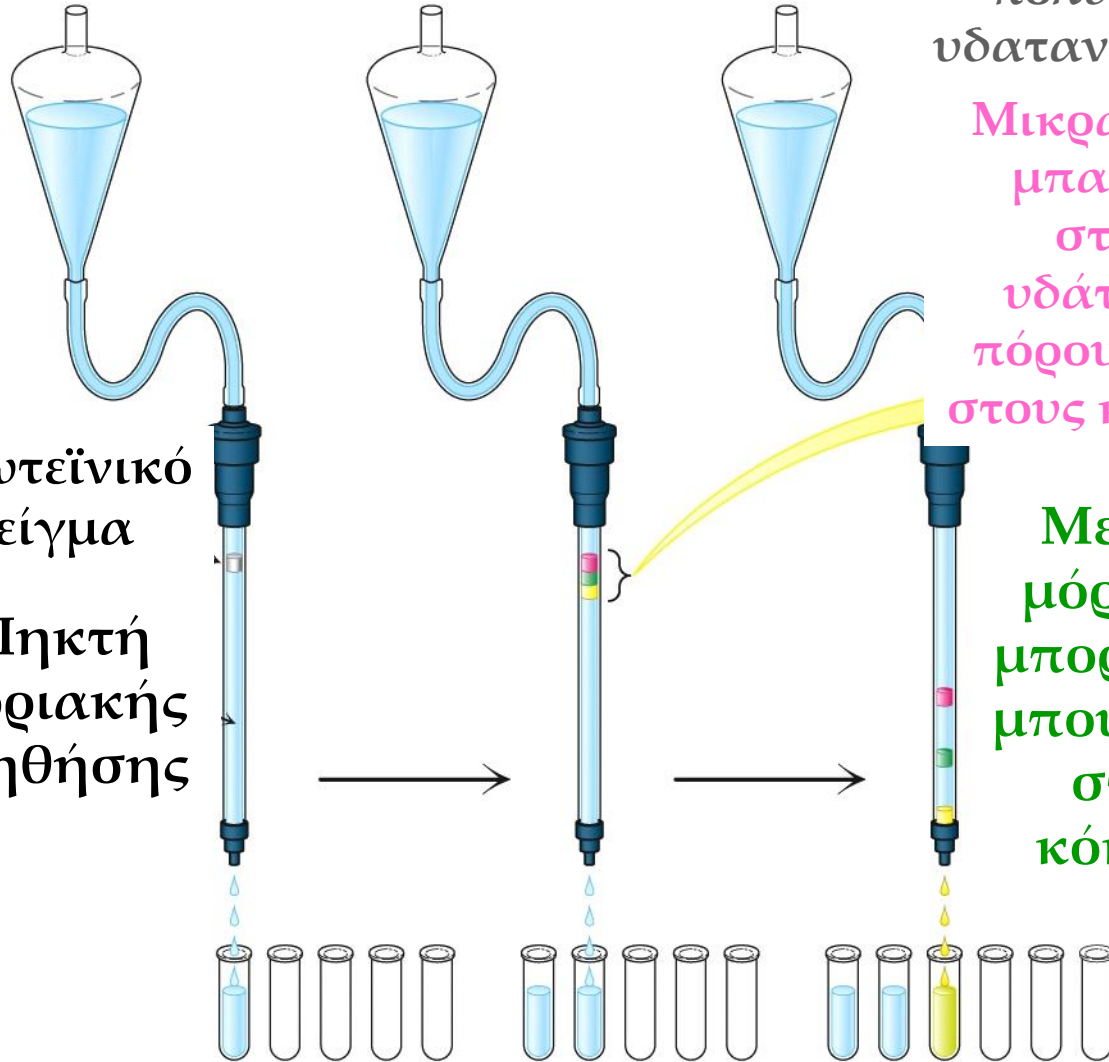
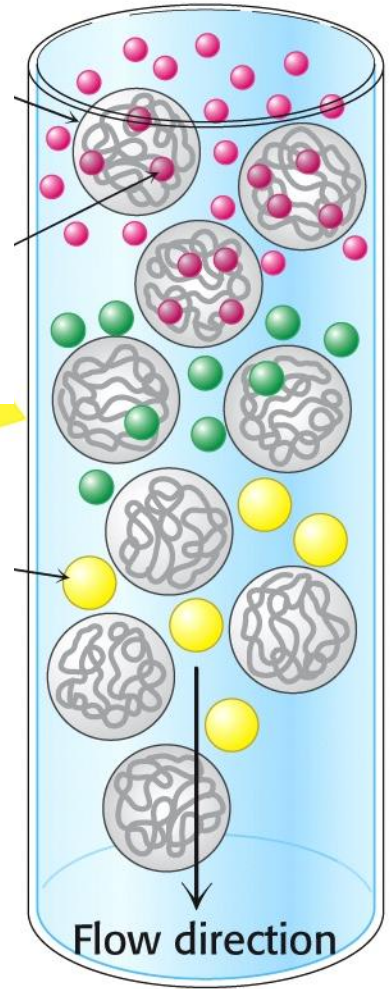
- Τα μόρια του δείγματος διαχωρίζονται με βάση το μέγεθος τους, με τα μεγάλα μόρια να εξέρχονται πρώτα.
- Αντίθετα, τα μικρά μόρια 'περιπλανώνται' στους πόρους του πληρωτικού υλικού και συγκρατούνται περισσότερο



Κόκκοι από  
πολυμερές  
υδατανθράκων

Μικρά μόρια  
μπάνουν  
στους  
υδάτινους  
πόρους μέσα  
στους κόκκους

Μεγάλα  
μόρια δεν  
μπορούν να  
μπουν μέσα  
στους  
κόκκους

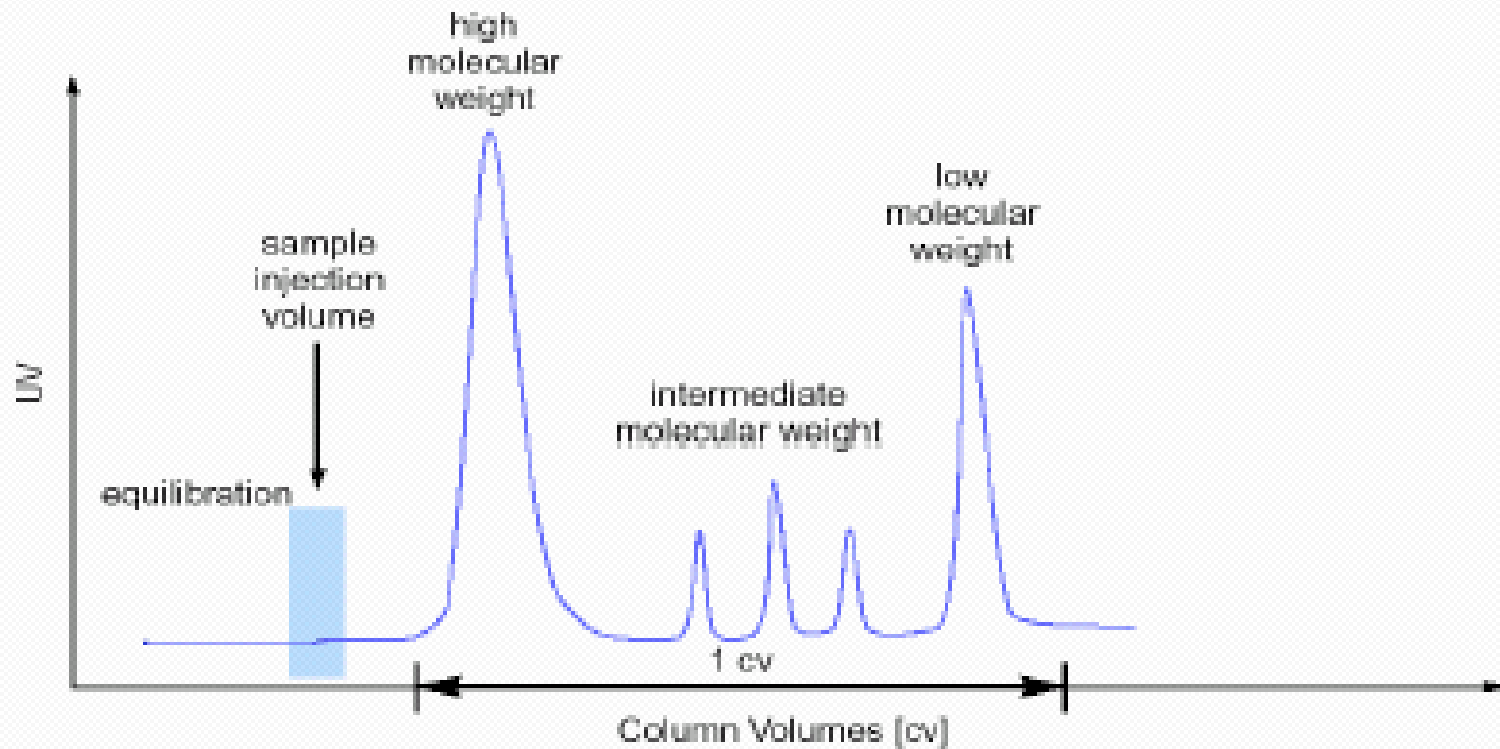


Πρωτεϊνικό  
δείγμα

Πηκτή  
μοριακής  
διηθήσης

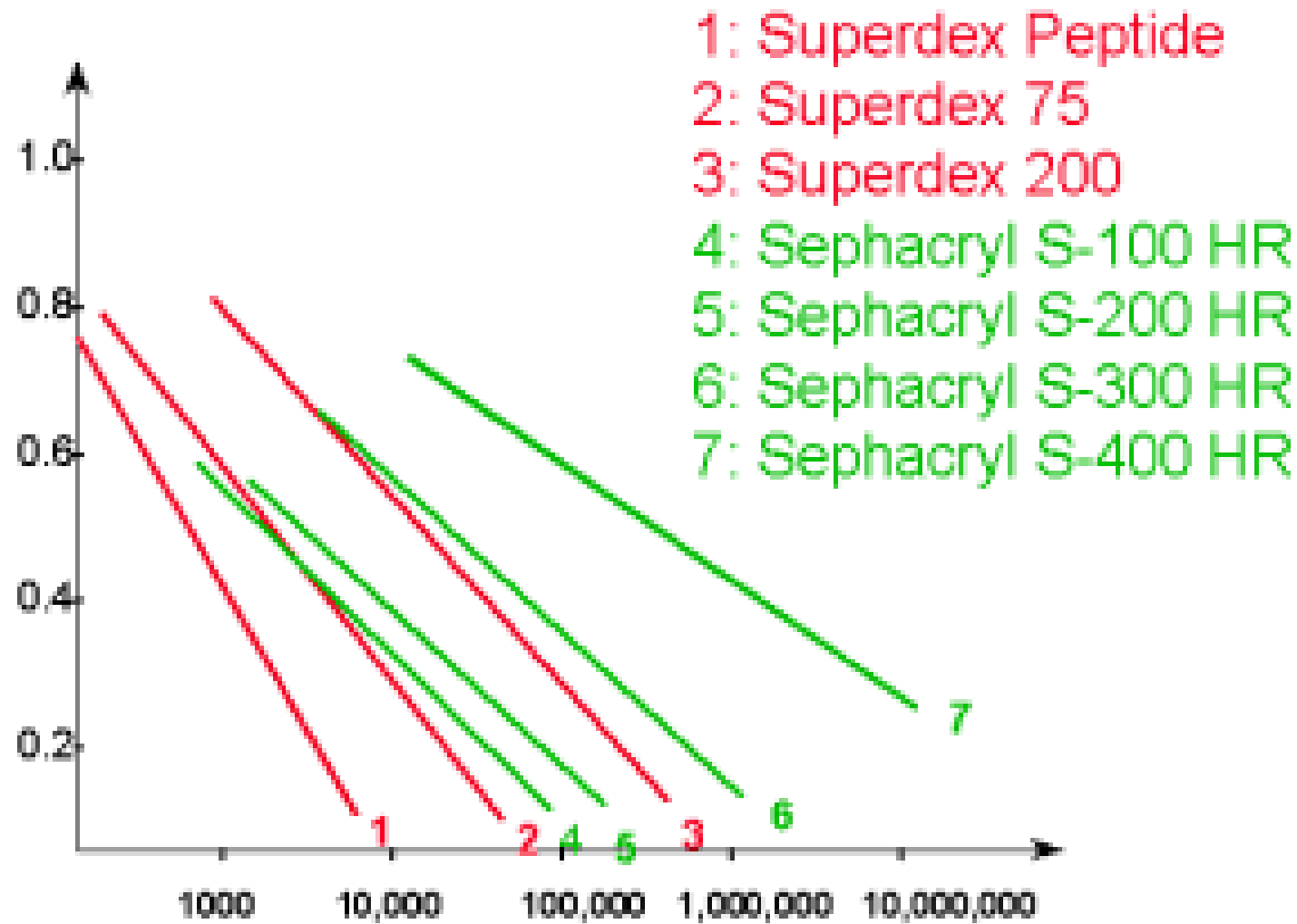
Flow direction





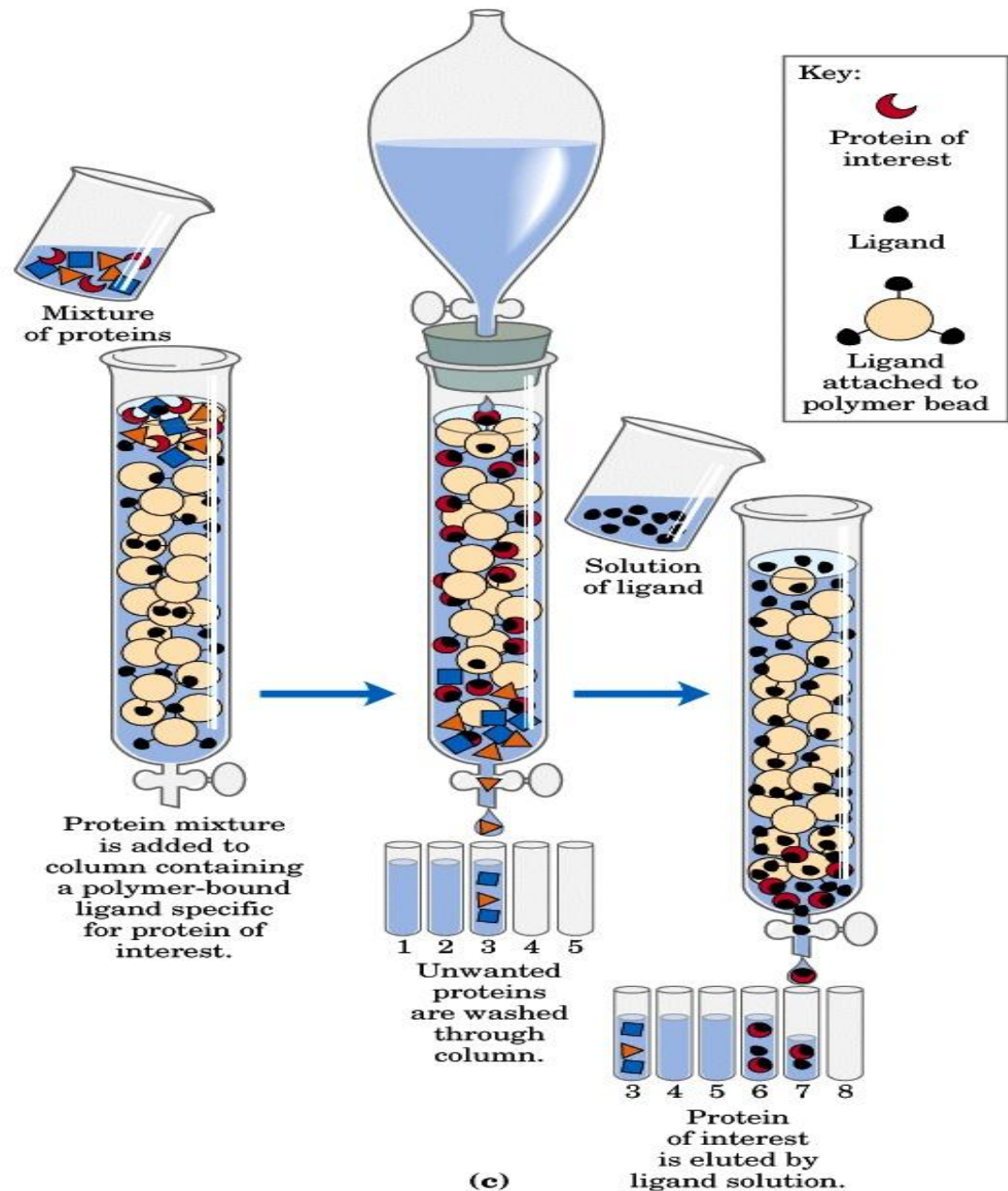
Βίντεο:

<https://www.youtube.com/watch?v=oV5VB5kO3tQ>



## iv) Χρωματογραφία συγγένειας (affinity chromatography)

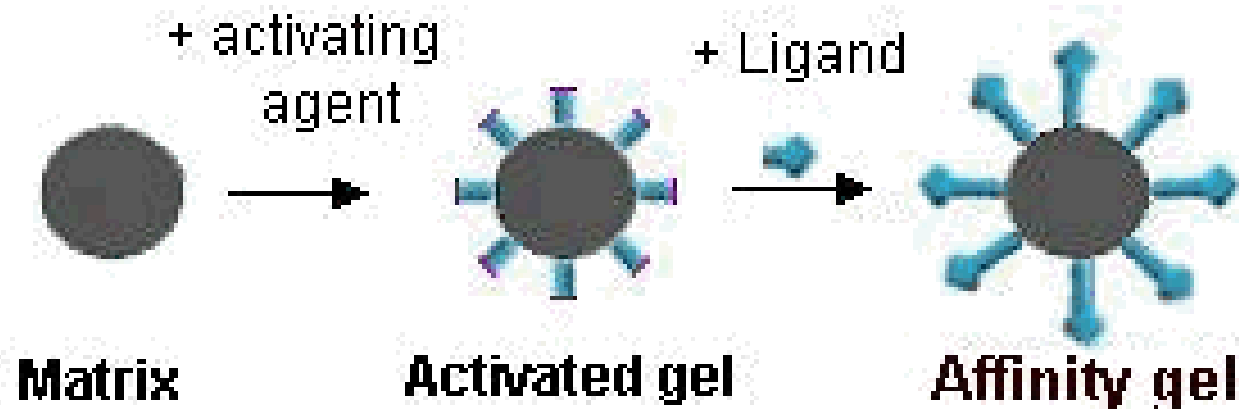
- βασίζεται στην εξαιρετικά εξειδικευμένη αλληλεπίδραση ενός μορίου του μείγματος με ένα μόριο που έχει χημικά δεσμευτεί στην στατική φάση
- “Lock and key”

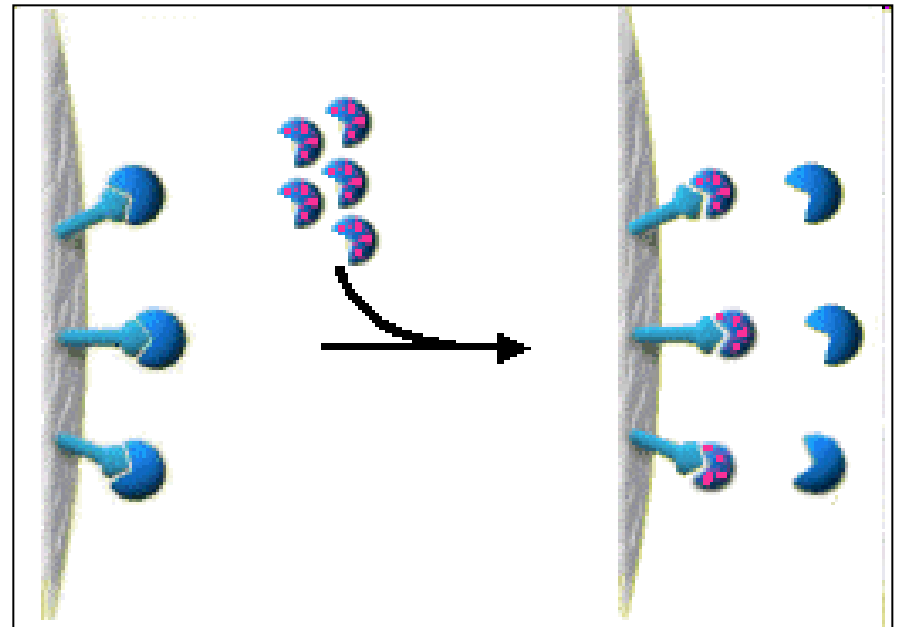
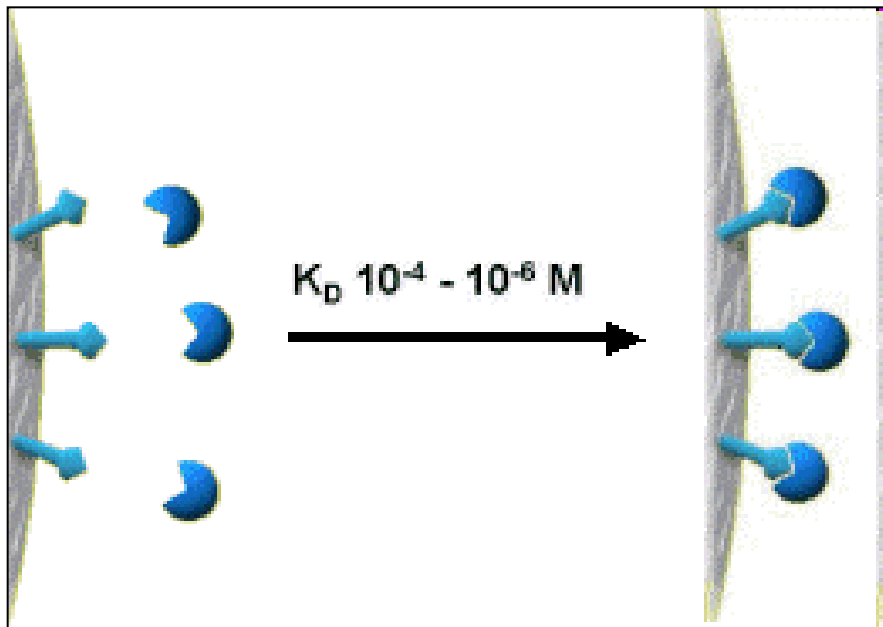
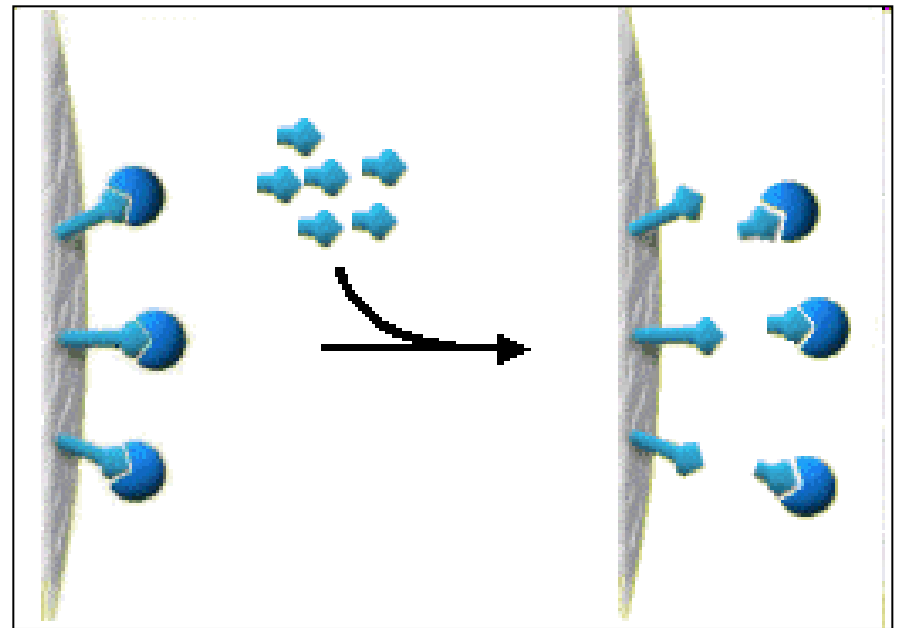
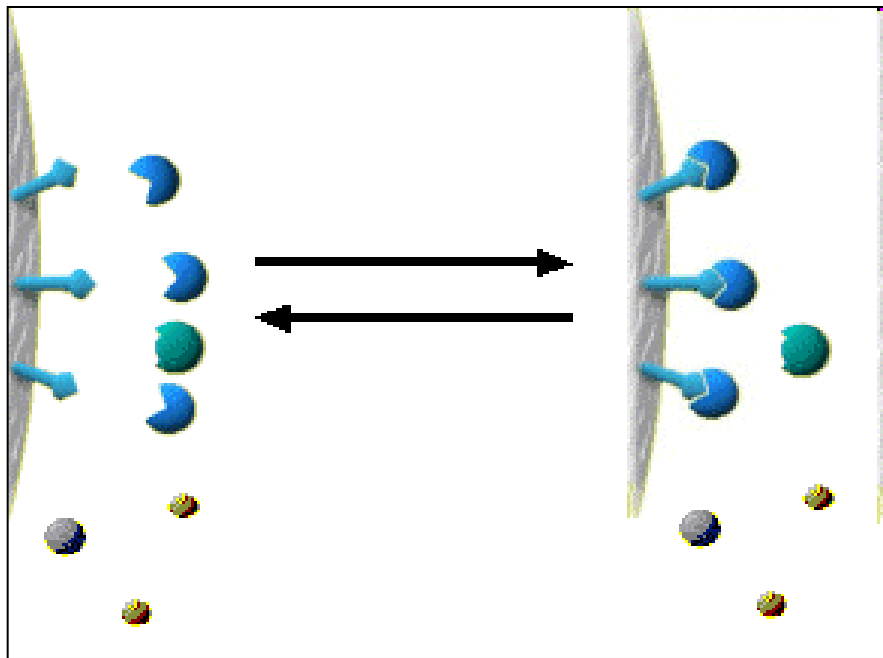


# Βιολογικές αλληλεπιδράσεις

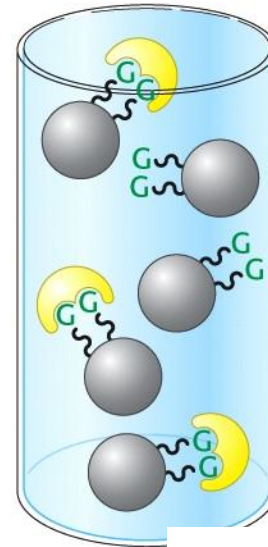
- Ένζυμο  $\leftrightarrow$  υπόστρωμα, ανάλογο, αναστολέας, προσθετική ομάδα
- Αντίσωμα  $\leftrightarrow$  αντιγόνο
- Λεκτίνη  $\leftrightarrow$  πολυσακχαρίτης, γλυκοπρωτεΐνη
- Νουκλεϊκό οξύ  $\leftrightarrow$  συμπληρωματική αλληλουχία, ιστόνες, πολυμεράση
- Ορμόνη, βιταμίνη  $\leftrightarrow$  υποδοχέας
- Γλουταθειόνη  $\leftrightarrow$  Glutathione-S-transferase
- Μεταλλικά ιόντα  $\leftrightarrow$  Ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες με poly(His)-tags

Group-specific ligand	Specificity
Protein A	Fc region of IgG
Protein G	Fc region of IgG
Concanavalin A	Glucopyranosyl and Mannopyranosyl groups
Cibacron Blue	Broad range of enzymes, serum albumin
Procion Red	NADP+ dependent enzymes
Lysine	Plasminogen, ribosomal RNA
Arginine	Serine proteases
Benzamidine	Serine proteases
Calmodulin	Proteins regulated by calmodulin
Heparin	Coagulation factors, lipoproteins, lipases, hormones, steroid receptors, protein synthesis factors, Nucleic acid-binding enzymes
Transition metal ions	Proteins and peptides which contain accessible Histidine





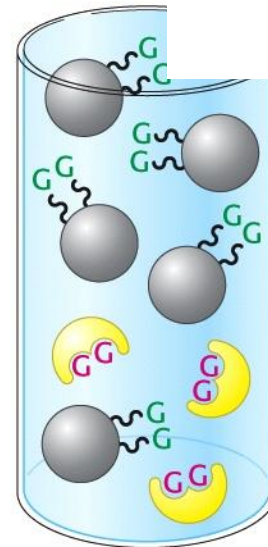
Πρωτεΐνη που  
δεσμεύει γλυκόζη  
(G) (κονκαβαλίνη  
A)



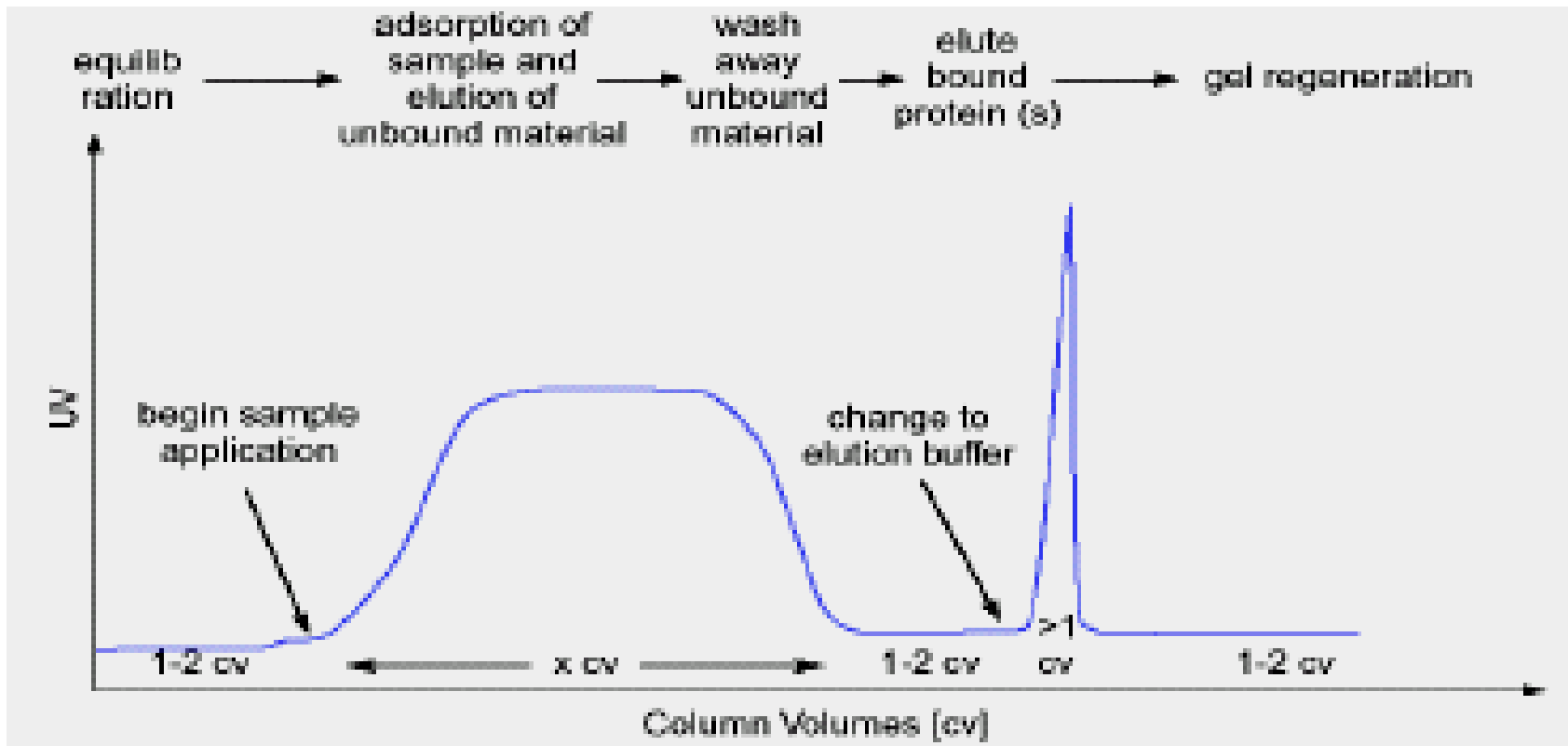
ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ (ΕΝΖΥΜΩΝ)  
ΜΕ ΒΑΣΗ ΤΗ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ ΔΕΣΜΕΥΣΗΣ  
ΕΙΔΙΚΩΝ ΧΗΜΙΚΩΝ ΟΜΑΔΩΝ (ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΩΝ)

Χρωματογραφία συγγένειας  
(affinity chromatography)

Προσθήκη  
γλυκόζης  
(G)



Πρωτεΐνη που  
απελευθερώνεται  
με την προσθήκη  
γλυκόζης (G)



Βίντεο:

<https://www.youtube.com/watch?v=FUAQKjKT99Y>



## The Three “Eras” of Protein Purification

1. **The “Classical” (Pre-Recombinant DNA) Era (pre-1978)**
  - Proteins purified from natural sources only
2. **The Recombinant DNA (Pre-Genomic) Era (~1978 - late ‘90s)**
  - Proteins purified from natural sources\* *and* recombinant cells
3. **The Genomic and Post-Genomic Era(s) (late ‘90s - present)**
  - Nearly all protein purification from recombinant cells, since most information about proteins is now in sequence (and other) databases

# Affinity Purification/Mass spectrometry

