

ПРЕЧИСТУВАЊЕ И ИДЕНТИФИКАЦИЈА НА БИОМОЛЕКУЛИТЕ СО ХРОМАТОГРАФИЈА

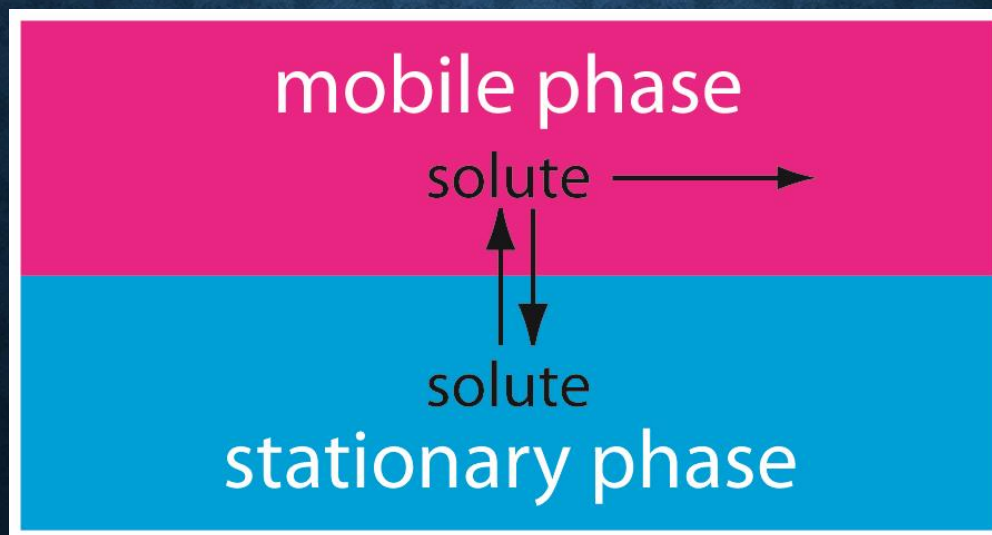
ПЛАНАРНА ХРОМАТОГРАФИЈА

ВОВЕД ВО ХРОМАТОГРАФИЈАТА

Хроматографија: постапка за разделување на смеси на составните компоненти.

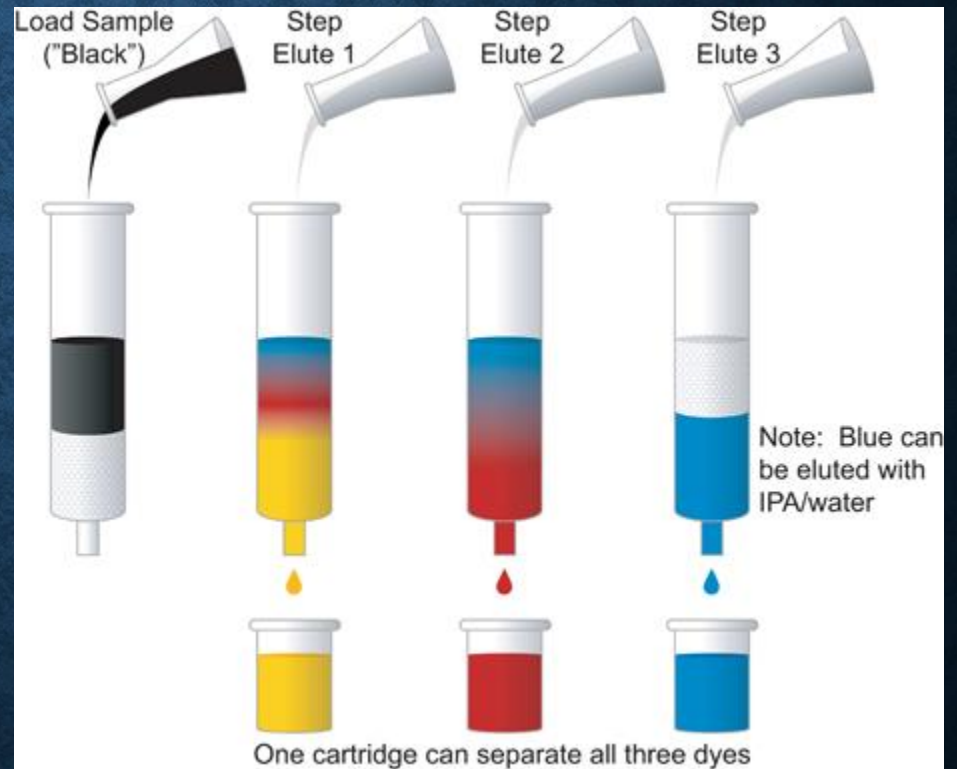
Интеракција на солвентот со два различни физички ентитети:

- Мобилна фаза: гас или течност (флуид)
- Стационарна фаза: цврста или течна (сорбент).



ХРОМАТОГРАФСКИ ПОИМИ

- **Елуирање:** движење на смесата од растворени супстанции низ хроматографскиот систем (развивање).
- **Елуат:** фракција во која мобилната фаза содржи одделна растворена супстанца.



ХРОМАТОГРАФСКИ ТЕХНИКИ ВО БИОХЕМИЈАТА

- **Препаративна:** пречистување на поголемо количество биолошки материјал.



ХРОМАТОГРАФСКИ ТЕХНИКИ ВО БИОХЕМИЈАТА

- **Аналитички:** определување на чистота на биолошки материјал, проценка на физички, биолошки и хемиски својства на биомолекулите.



ХРОМАТОГРАФСКИ МЕТОДИ

- Во зависност од начините на интеракција на растворените супстанции со стационарната фаза, разликуваме:
 - **Распределителна хроматографија:** супстанцата се распределува меѓу две течни фази
 - **Атсорпциона хроматографија:** стационарната фаза има конечен број специфични центри за сврзување на молекулите од растворената супстанца.

РАСПРЕДЕЛИТЕЛНА ХРОМАТОГРАФИЈА

- **Мобилна фаза:** течност или гас
- **Стационарна фаза:** течност имобилизирана на инертни цврсти честички.
- Применливост на методот: разлики во коефициентот на распределба (дифузија) на компонентите од пробата меѓу двете фази.

$$K_D(A) = \frac{c(A)_{\text{стационарна фаза}}}{c(A)_{\text{мобилна фаза}}}$$

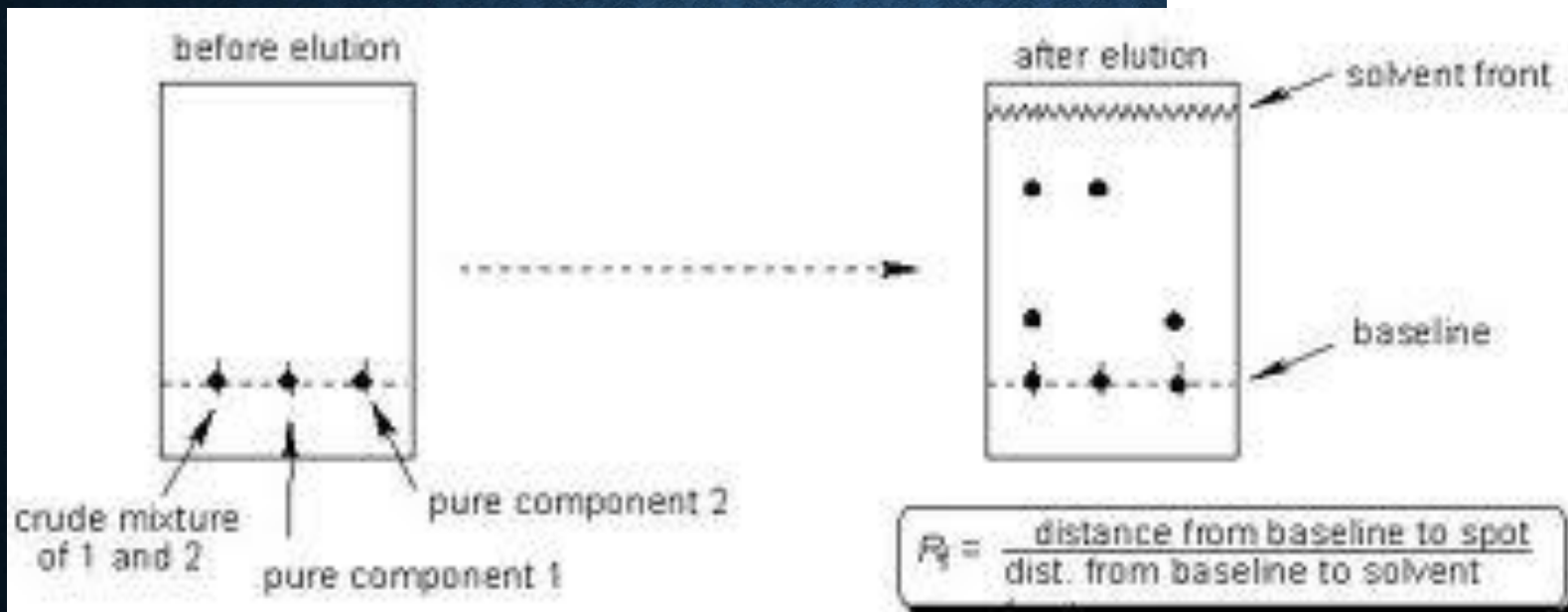
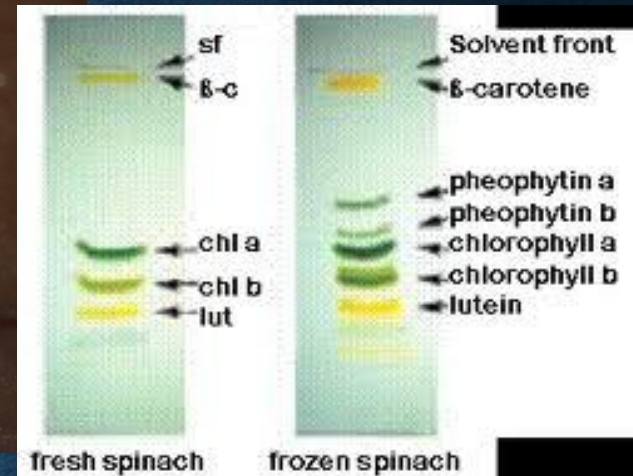
- Директна екстракција, течност-течност распределба
- Планарна хроматографија: хартиена и тенкослојна
- Гасна хроматографија

АТСОРПЦИОНА ХРОМАТОГРАФИЈА

- **Мобилна фаза:** течност или гас
- **Стационарна фаза:** активни центри за сврзување на површината
- **Применливост на методот:** специфични реверзибилни интеракции меѓу солвентот и специфичните центри за сврзување од стационарната фаза.
- **Видови интеракции:** јонски и водородни врски, хидрофобни интеракции.
- **Пример:** јонско-изменувачка хроматографија

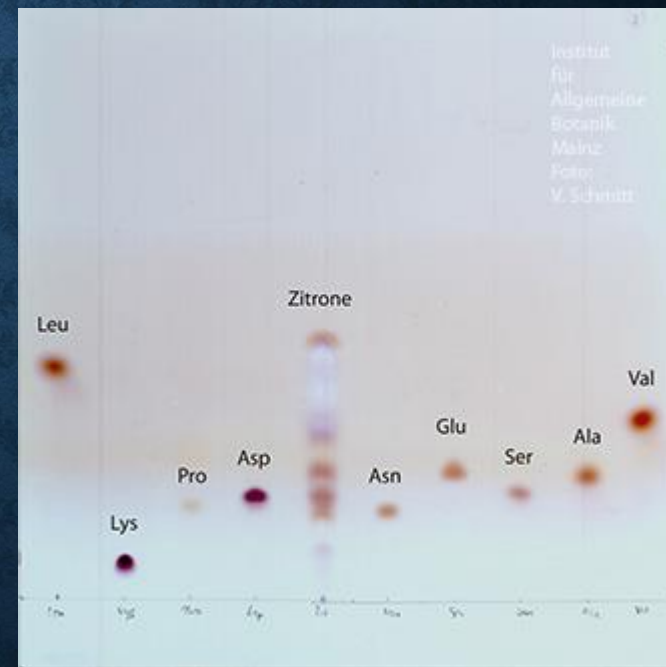
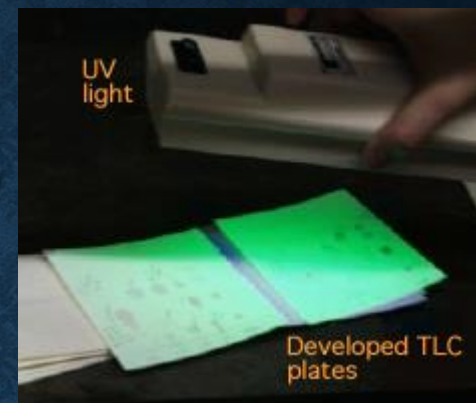
ПЛАНАРНА ХРОМАТОГРАФИЈА

- **Стационарна фаза:**
 - Целулозна лента (хартлена хроматографија)
 - Тенок слој од силика гел, алумина или целулоза нанесени на стаклена, пластична плоча или алуминиумска фолија (тенкослојна хроматографија).
- **Подготовка на стационарна фаза**
- **Нанесување на проба**
- **Избор на мобилна фаза**
- **Развивање на хроматограм**



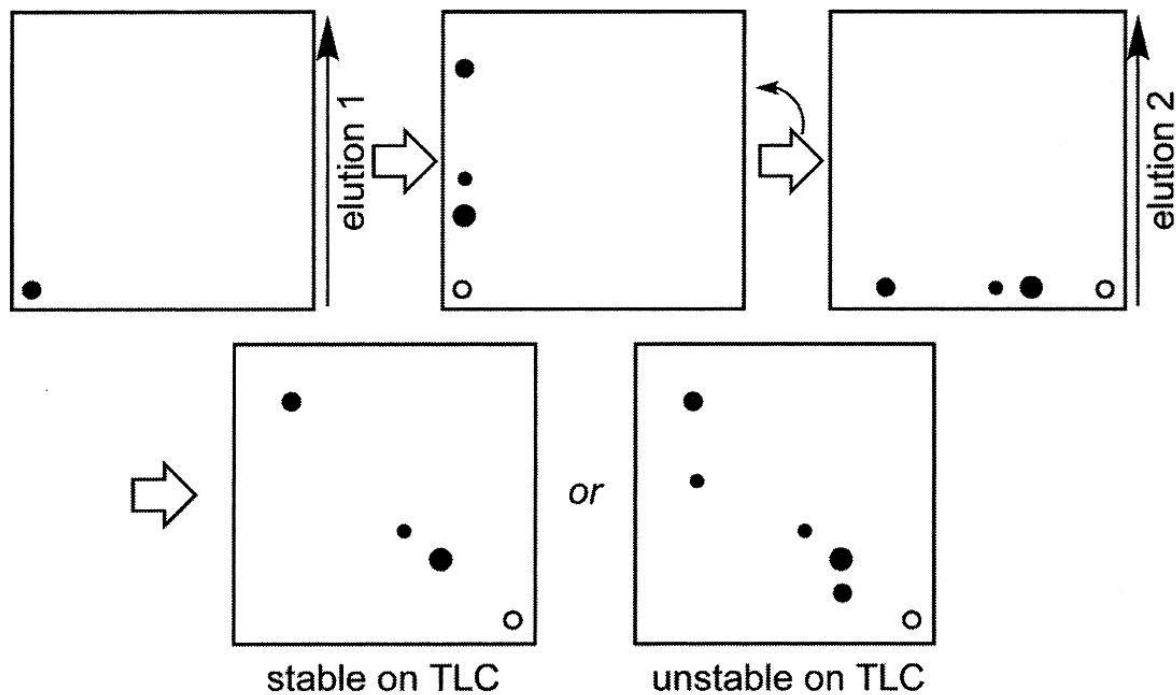
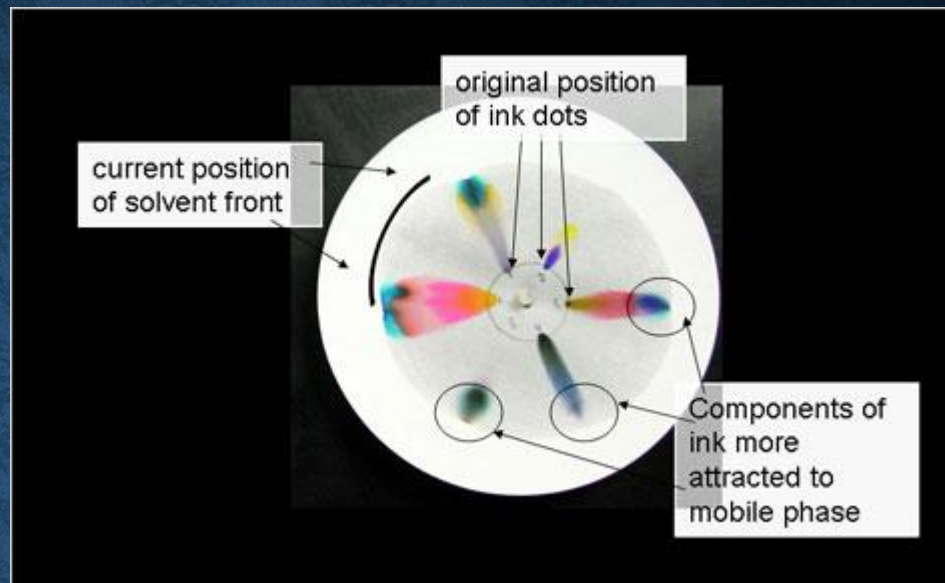
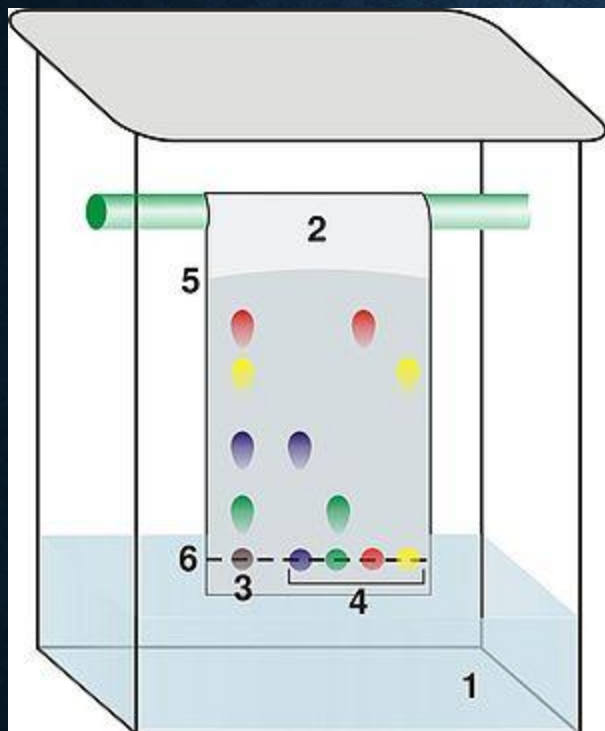
ДЕТЕКЦИЈА НА БИОМОЛЕКУЛИТЕ

- УВ ламба за силно конјугирани супстанции кои флуоресцираат.
- Третирање со хемиски агенси:
 - Со конц. H_2SO_4 , загревање неколку мин. на $100\text{ }^\circ\text{C}$
 - Комора со кристали од I_2
- Специфични реагенси:
 - Родамин В за детекција на липиди
 - Нинхидрин за аминокиселини
 - Анилин фталат за детекција на јаглевихидрати



ПРИМЕНА НА ПЛАНАРНА ХРОМАТОГРАФИЈА

- Идентификација на непознат примерок;
 - Брза и ефтина анализа,
 - Потребни се мали количества примерок
 - Детекција во однос на стандарди
- Изолација на компоненти од смеса (препаративна)



ХАРТИЕНА ХРОМАТОГРАФИЈА НА РАСТИТЕЛНИ ПИГМЕНТИ

- Магданос или спанаќ
- Етанол
- Мобилна фаза: 90% ацетон : петролетер (фракција 80-100 °C) = $V : V = 1 : 9$



ПОДГОТОВКА НА РАСТИТЕЛЕН МАТЕРИЈАЛ

- Обарување на растителниот материјал во врела вода
- Постапката се изведува брзо.
- Цел: разорување на клеточниот сид на растителните клетки и достапност кон компонентите на цитосолот.



ПОДГОТОВКА НА ЕКСТРАКТ

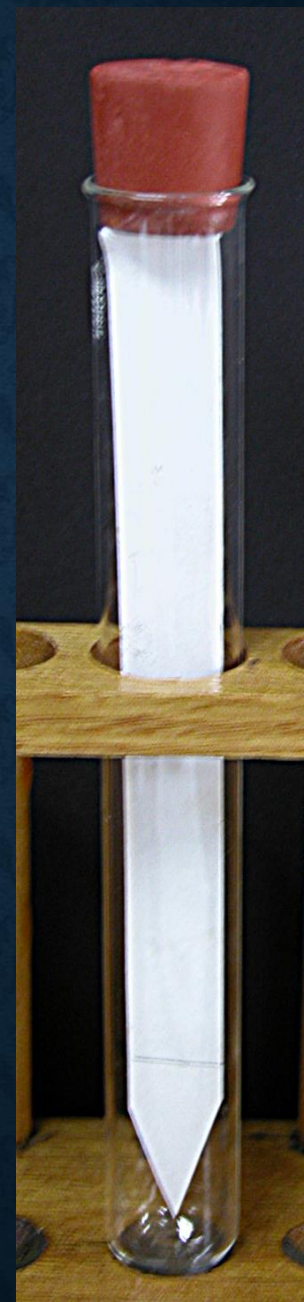
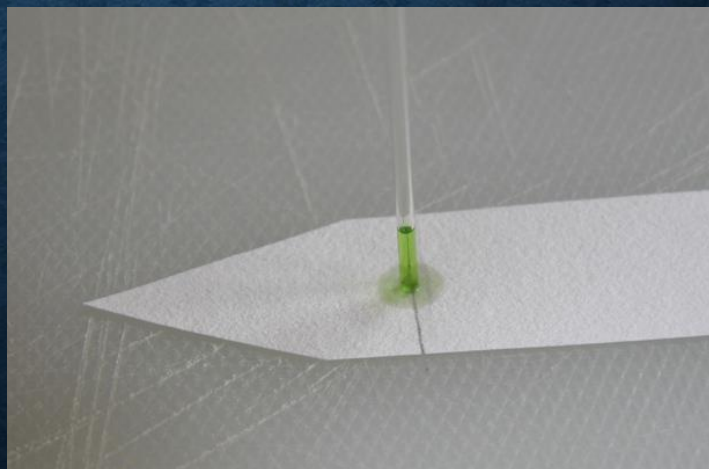
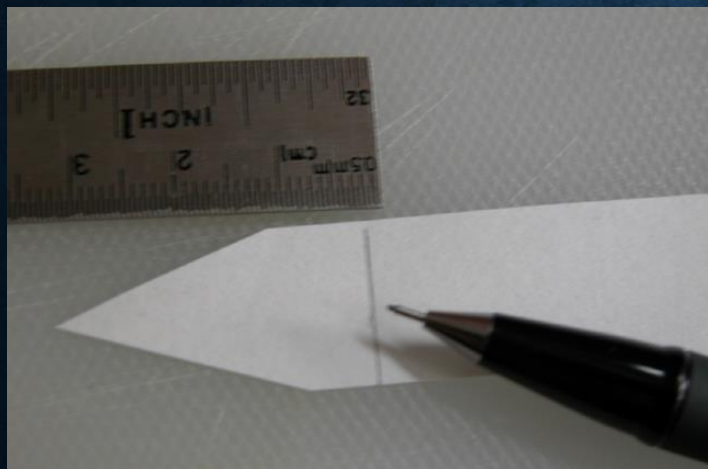


- Кон растителниот материјал се додава мало количество етанол.
- Зошто етанол?
- Триење во аванче до темно зелено-сина боја
- Деканатција во кивета за центрифугирање
- Центрифугирање



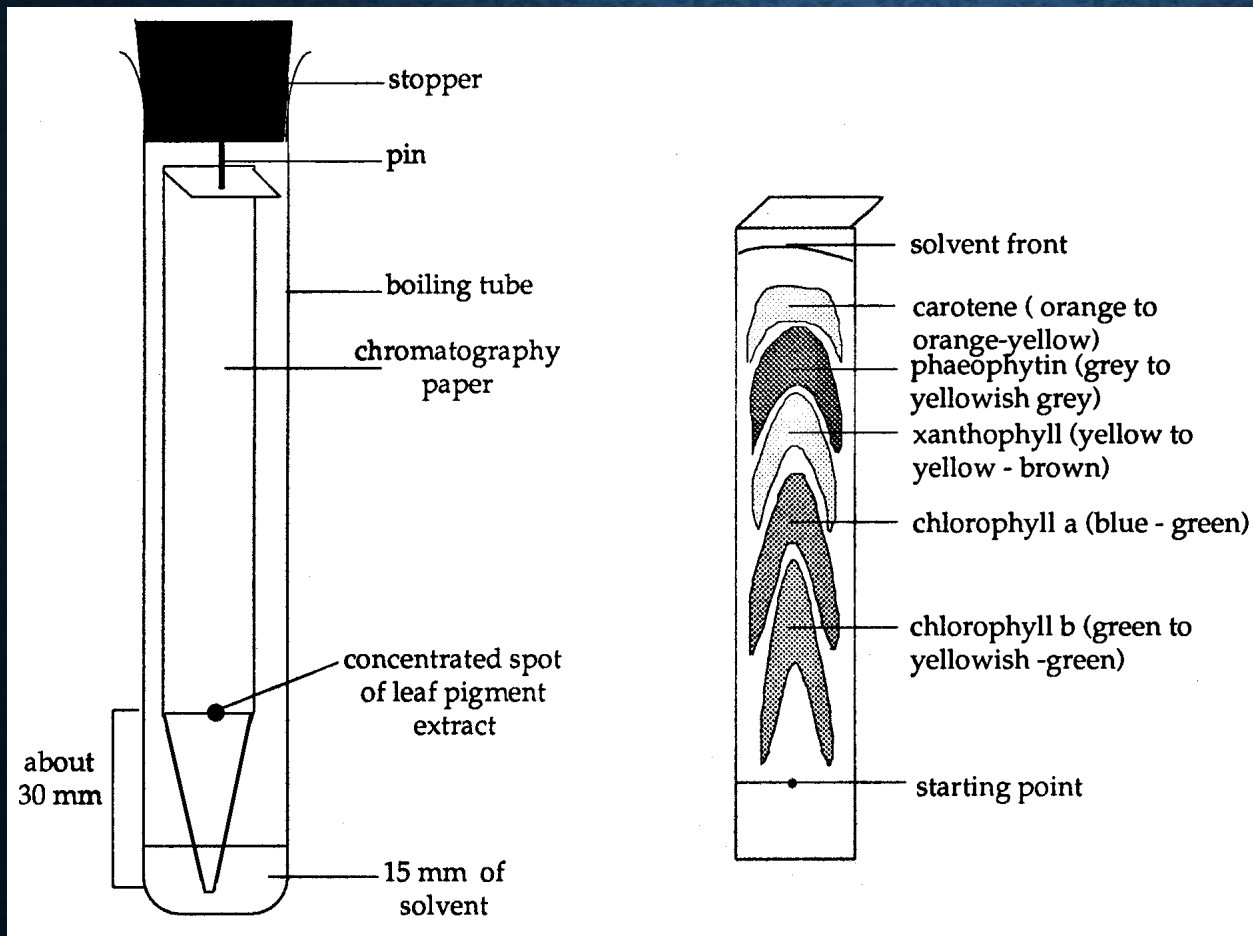
ПОДГОТОВКА ЗА ХАРТИЕНА ХРОМАТОГРАФИЈА

- Стационарна фаза: Watman целулозна хартија
- Стартната линија се повлекува со молив, на околу 3 см од ролниот раб.
- Хартијата не смее да ги допира сидовите на епруватата во кое се врши развивањето.
- Мобилна фаза: (ацетон : петролетер) епруветката се исполнува до 15 мм од нејзината висина.
- Екстрактот се наносува со капилара (20 пати) во една точка (истата мора да се исуши)



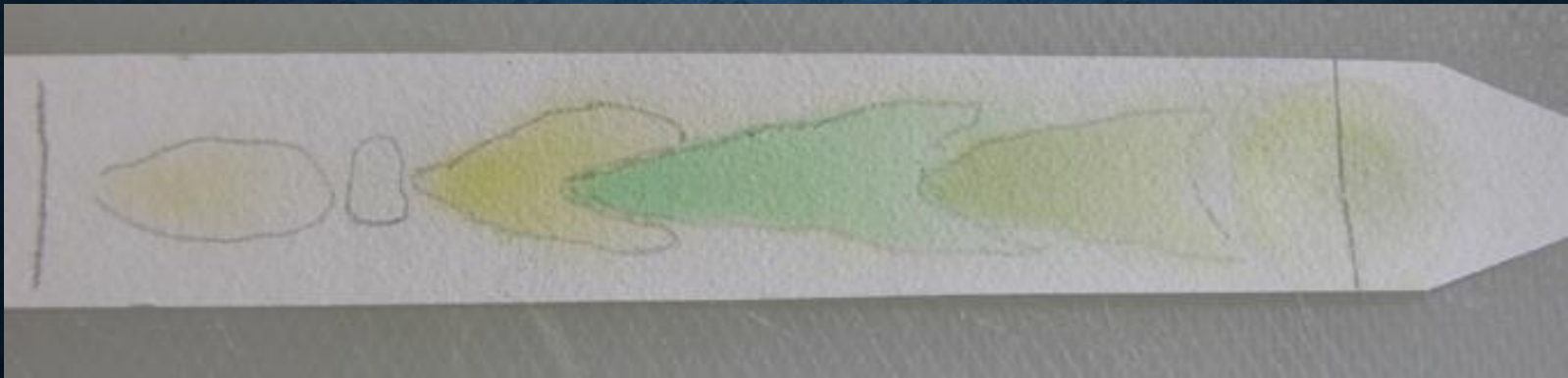
РАЗВИВАЊЕ НА ХРОМАТОГРАМ

- Разделување на компонентите од екстрактот во текот на 15 мин (растворувачот достасал до фронтот.)



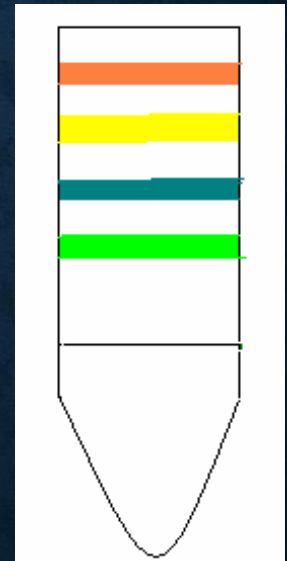
АНАЛИЗА НА ХРОМАТОГРАМ

- Забележување на фронтот на растворувачот.
- Одбележување на секоја од одделните фракции – различен пигмент (различно обојување)
- Мерење на растојанието на секој од пигментите (точката до која најдалеку отпатувал)
- Забележување и пресметки на R_f .



ИНТЕРПРЕТАЦИЈА НА РЕЗУЛТАТИ

- Идентификација на пигментите според нивната боја:
 - Каротенот е жолто-портокалов
 - Феофитин е маслинесто-зелен.
 - Ксантофилите се светло-жолти.
 - Хлорофил а е сино-зелен.
 - Хлорофил б е жолто-зелен.



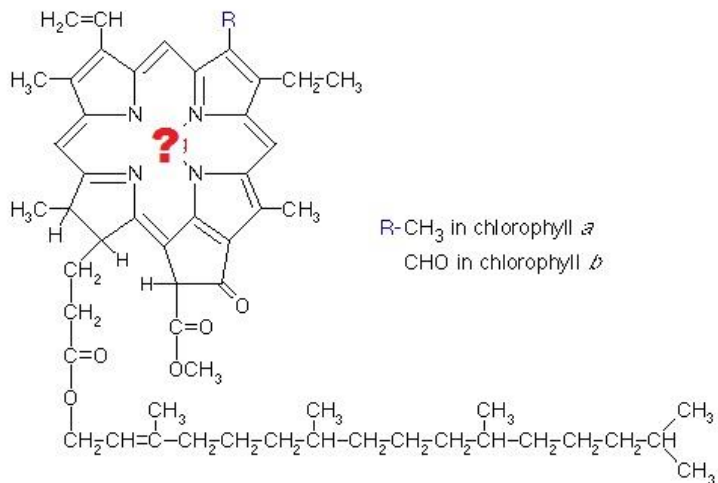
ИНТЕРПРЕТАЦИЈА НА РЕЗУЛТАТИ

- Пресметување на R_f :
- $R_f(A) = \frac{\text{изминато растојание на компонентата A}}{\text{изминато растојание на мобилната фаза}}$

пигмент	боја	R_f
Каротен	Жолто-портокалова	0.95
Феофитин	Маслинесто зелена	0.83
Ксантофил	Жолта	0.71
Хлорофил а	Сино-зелена	0.65
Хлорофил б	Жолто-зелена	0.45

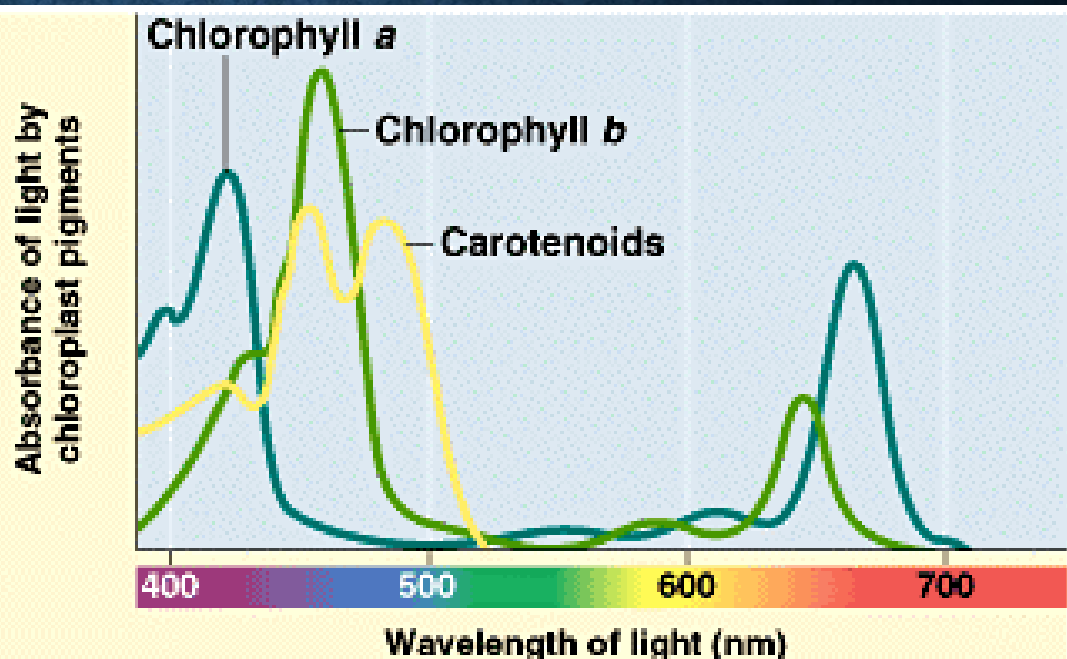
ДИСКУСИЈА

- Растителните пигменти се обоени супстанции, чии молекули апсорбираат светлина.
- Различни пигменти апсорбираат на различни бранови должини.
- Хлорофилот апсорбира енергија во виолетово-сината и црвената област, а рефлектира зелена од каде потекнува бојата на листовите.



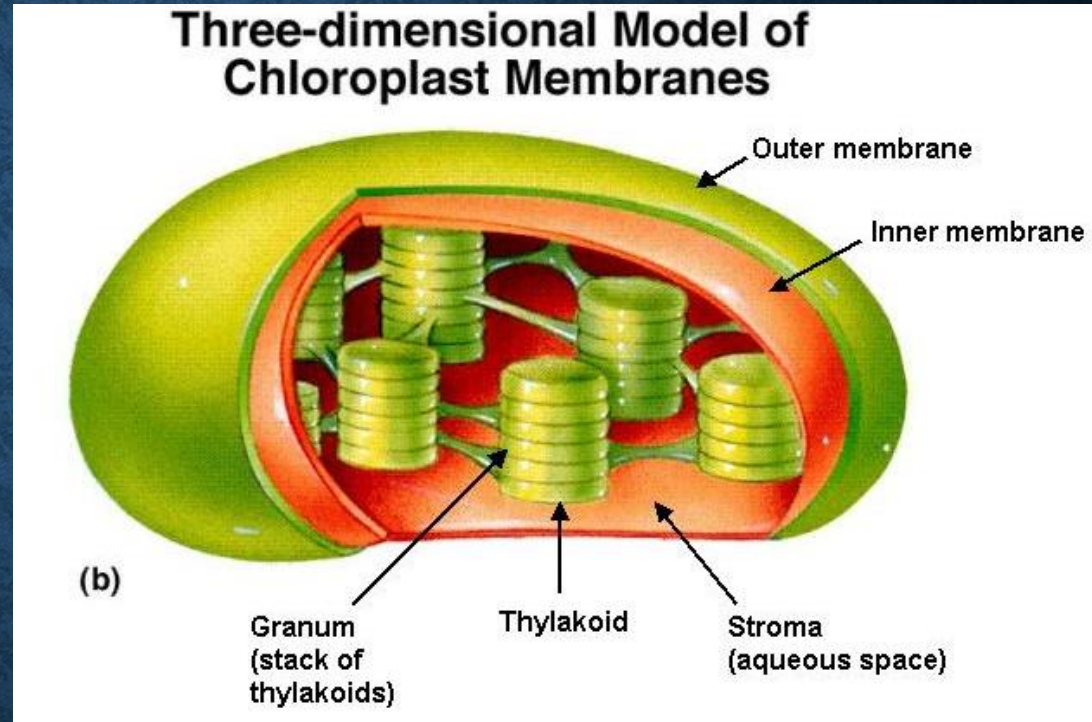
R-CH₃ in chlorophyll *a*
CHO in chlorophyll *b*

The structure of chlorophyll



УЛОГА НА ПИГМЕНТИТЕ

- Апсорбираат светлина, неопходна за процесот на фотосинтеза.
- Поголемо количество пигменти, повеќе синтетизирани глюкозни единици



- Пигменти кои покрај хлорофилот придонесуваат за фотосинтезата:
- Каротеноиди: рефлектираат жолта, портокалова и црвена светлина.
- Антоцијани: рефлектираат црвена, сина и виолетова светлина.
- Ксантофили: рефлектираат жолта светлина.

ФАКТОРИ ШТО ВЛИЈААТ ВРЗ РАЗВИВАЊЕТО НА ХРОМАТОГРАМОТ

- Природата на растителните пигменти и составот на мобилната фаза влијаат врз развивањето на хроматограмот.
1. _____**растворливост**_____на молекулите од пигментите во избраниот растворувач
(пигментите чии интеракции се подобри со растворувачот /смесата од мобилната фаза, подобро се растворуваат и подалеку ќе “отпатуваат”)
 2. _____**големина**_____на молекулите
(молекулите со поголема молекулска маса побавно се придвижуваат при развивање на хроматограмот)
 3. _____**површина**_____на употребената хартија
(интеракција на молекулите од растителни пигменти со стационарната фаза)
 4. _____**време**_____потребно за развивање на хроматограмот.