دستور کار آزمایشگاه بیوشیمی متابولیسم

گروه زیست شناسی علوم جانوری

تهیه و تنظیم : سیدمحمدسجادسجادی

پاییز ۱۴۰۱ دانشگاه قم

ایمنی در آزمایشگاه

مقدمه

آزمایشگاه محل تجربه عملی آموخته‌های تئوری است که می‌تواند با جذابیت‌ها و شیرینی‌های زیادی همراه باشد. مشروط به اینکه آزمایشگر با بی احتیاطی، بی توجهی و عدم رعایت مقررات ایمنی این شیرینی را به تلخی تبدیل ننماید. بدلیل اهمیت این موضوع همواره مرور نکات ایمنی، بخاطر سپردن آنها و اجرای آنها در حین آزمایش ضروری به نظر می‌رسد .واضح است که در محیط آزمایشگاه بدلیل وجود و استفاده از مواد شیمیایی و خطرناک، خطر همواره شما و همکارانتان را تهدید می‌کند و هرگونه بی احتیاطی و عدم رعایت موارد ایمنی می‌تواند منجر به خسارات جبران ناپذیری گردد. خطرات دیگری که در آزمایشگاه وجود دارند، وضعیت‌های غیر قابل پیشبینی است که همواره در آزمایشگاه و در طول آزمایش به وجود می‌آیند که با هوشیاری و دقت در آزمایشگاه، می توان این خطرات را نیز تا حد مطلوبی کاهش داد . در یک آزمایشگاه ایمن و استاندارد و در صورت رعایت موارد ایمنی حوادث یا جراحات به ندرت اتفاق می‌افتند .در هنگام ورود به آزمایشگاه، باید از خطرات مرتبط با مواد شیمیایی و خطرهای ممکن در آزمایشگاه اطلاعات کافی داشته باشید و در برابر مواد شیمیایی که اثر خاموشی دارند باید اصول ایمنی را مراعات کرد .اهمیت این که فرد بداند چه خطرهایی در آزمایشگاه وجود دارد، چگونه از آن ها دوری جوید و در صورت خارج شدن آزمایش از کنترل چگونه عمل کنند، بر هیچ کس پوشیده نیست. امید است شما عزیزان با رعایت این نکات در آزمایشگاه بیوشیمی لحظات دلپذیری داشته باشید. مقدار و تنوع مواد شیمیایی بسیار زیاد است و هر روز بنا به نیاز یا برحسب پژوهشهای جدید این تعداد افزایش میابد .در نتیجه طرز کار با این مواد و آشنا شدن با خطرهایی که از لحاظ ایمنی ممکن است به وجود آورند، امری ضروری است .کسانی که با مواد شیمیایی سروکار دارند باید بدانند که چه خطرهایی از سوی مواد متوجه آن‌هاست و چگونه از نظر ایمنی، خود را در مقابل آن‌ها مصون نگه‌دارند.

راه‌های تماس مواد سمی و ورود آن‌ها به بدن

راه‌های ورد مواد شیمیایی به بدن شامل تماس پوستی، از راه سیستم تنفسی و گوارشی، و تزریق است. از میان راه‌های مختلفی که بدن در معرض مواد سمی قرار می‌گیرد، تماس پوستی از لحاظ کثرت صدمات حرف‌های مقام اول را دارد .جذب از طریق تنفس و گوارش در مقام دوم است.روشن است که بعضی از مواد از راه‌های متعددی به بدن وارد می‌شوند.

رعایت موارد ایمنی در آزمایشگاه

الف- مواد آتش زا

جهت نگهداری این مواد بایستی آن‌ها را در مکان‌های سرد و مجهز به دستگاه تهویه قرار داده و مقادیر کم آن ها را جهت آزمایش به آزمایشگاه انتقال داد. هرگز دهانه شیشه های محتوی موادی نظیر اتر، الکل ها و ... را در مقابل شعله باز نکرده و هیچ‌گاه این مواد را حرارت ندهید.در صورت بروز آتش سوزی و حادثه با حفظ خونسردی از کارشناس آزمایشگاه کمک بخواهید.

ب- اسیدها و قلیاها

اغلب اسیدهای معدنی اگر با پوست، چشم و حتی لباس شما تماس حاصل کند سبب سوزش، تحریک و خورندگی خواهد شد، پس در هنگام استفاده از این مواد به نکات زیر توجه فرمایید:

- هنگام انتقال آنها از ظرفی به ظرف دیگر مراقب باشید قطرات اسید یا باز به اطراف نپاشد.
- برای رقیق کردن اسیدها و محلولسازی، هرگز آب را روی اسیدغلیظ نریزید، زیرا واکنش انحلال اسید در آب بسیار گرمازاست و گرمای ایجاد شده سبب تبخیر آب و پاشیده شدن همزمان آب و اسید خواهد شد، لذا همیشه اسید را با حساسیت و احتیاط کامل به ظرف آب اضافه نمایید و در نهایت با آب مقطر به حجم رسانید(حتما زیر هود انجام شود).
- اگر از بورت برای برداشتن قلیا استفاده کرده‌اید بورت را بلافاصله با آب فراوان بشویید .در غیر این صورت بورت برای دفعات بعدی غیرقابل استفاده خواهد بود.
- هنگام استفاده از اسیدها و قلیاهای دود کننده مانند HCL, NH_3 دقت کنید صورت شما مقابل بخار حاصل نباشد یا از آن تنفس نکنید.

ج- ترکیبات سمی

برخی ترکیبات مانند متانول بسیار سمی‌اند.گروهی از ترکیبات خصوصا آروماتیک ها(مثل بنزن و فنل) سرطان‌زا هستند و در استفاده از این مواد بایستی به نکات زیر توجه شود:

این مواد با برچسب خاصی مشخص می‌شوند. به علائم هشدار دهنده روی برچسب‌ها و هشدارهای R.S (مخفف کلمات Risk,Safety) که شرکت سازنده بر روی ظرف ثبت می‌کند توجه نمایید .مثلا هرگز از پیپت‌های معمولی برای برداشتن استفاده نکنید و حتما از پوآر یا از پیپتور استفاده نمایید.

شستشوی ظروف شیشه ای:

نتیجه آزمایش شما فقط زمانی اطمینان بخش است که علاوه بر دقت و رعایت دستور کار از وسایل شیشه‌ای تمیز استفاده کرده باشید. لذا لازم است قبل و پس از پایان کارتان وسایل شیشه ای را تمیز بشویید و وسایل کار خود را به همان ترتیب که بوده است برای گروه بعد آماده نمایید.

قوانین کار در آزمایشگاه

❖ استفاده از روپوش

هنگام ورود به آزمایشگاه حتما روپوش سفید بپوشید تا لباس شما به مواد شیمیایی آلوده نشود(دکمه ها بسته باشد). روپوش مانع حفاظتی برای جلوگیری از رسیدن آلودگی‌های شیمیایی به لباس و پوست کاربران است . باید توجه داشت روپوش نباید به طور غیر معمول گشاد و یا آستین‌های آن گشاد باشد .دکمه‌های روپوش نیز باید بسته بوده و بهتر است قد آستین روپوش باید تمام دست تا مچ را پوشش دهد. همانطور که بیان شد روپوش مانع حفاظتی در برابر مواد شیمیایی است و بنابراین آلوده است و هرگز نباید از آزمایشگاه خارج شود و باید دور از وسایل شخصی نگه داشته شود .در ضمن باید توجه داشت روپوش داخل آزمایشگاه باید در مکان قابل دسترسی قرار داشته باشد.

❖ محافظت از دست‌ها

برای محافظت دست‌ها از دستکش استفاده می‌شود، دستکش‌ها مانع عبور بخشی از آلودگی‌های شیمیایی می‌شوند. برای محافظت از دست‌ها در مقابل مواد شیمیایی دستکش‌هایی با جنس متفاوت وجود دارند که هر کدام کابرد خاصی دارد.

دستکش لاتکس: این دستکش‌ها از ترکیبات طبیعی یا مصنوعی لاستیک تولید می‌شوند و در برابر اسیدها، قلیاها و کتون‌ها رقیق مقاومند.

دستکش نیتریلی: این دستکش‌ها ضمن تامین حفاظت لازم در برابر حلال‌های کلره مانند تتراکلرواستیلن و پرکلرواستیلن، مقاومت بیشتری را در برابر سایش خراشیدگی، سوراخ شدن و پاره شدن را نیز دارد .برای انجام کارهای حساس پرتحرک و دستکش‌های نیتریلی سنگین هستند.

دستکش نئوپرنی: این دستکش‌ها با خصوصیاتی نظیر انعطاف پذیری مناسب تامین تحرک کافی برای انگشتان، دانسیته بالا و مقاومت در برابر پارگی، حفاظت لازم را در برابر مایعات هیدرولیکی، بنزن، الکل، اسیدهای آلی و بازها تامین می‌کنند.

دستکش لاستیکی بوتیل: این دستکش دارای قدرت حفاظتی خوب در برابر اسیدهای سولفوریک، فلوئوریک، نیتریک و پراکسیدها می‌باشند .دستکش‌های ساخته شده از لاستیک بوتیل علاوه بر این که در مقابل گازها، مواد شیمیایی و بخارات آب بسیار غیرقابل نفوذ در برابر اکسیداسیون و خورندگی حاصل از گاز ازن نیز مقاومند.
دستکش وینیلی: دستکش‌هایی از جنس PVC هستند که استفاده از این‌ها متداول است .وینیل ترکیب پلاستیکی است که مقاومت خوبی در برابر اسید، الکل و قلیا دارد .اما در مقابل حلال‌ها مقاومت خوبی ندارد. این دستکش‌ها از نظر اقتصادی جایگزین مناسبی برای لاتکس طبیعی هستند.
نکات مهم:

- هرگز از دستکش صدمه دیده استفاده نکنید.
- بسیاری از دستکش‌ها یک‌بار مصرف هستند و نباید مجدداً مورد استفاده قرار بگیرند.
- به هنگام عرق کردن دست به دلیل باز شدن منافذ پوست و امکان ورود آلودگی به بدن باید دستکشهای یکبار مصرف را تعویض کرد.
- برای خارج کردن دستکش از دست از مچ شروع کنید تا آلودگی به دست منتقل نشود.
- به منظور کار با آون حتما از دستکش عایق گرما استفاده کنید و هرگز با دستکش پلاستیکی درب آون را باز ننمایید.
- توجه داشته باشید تمام چیزهایی که با دستکش لمس می‌شوند آلوده خواهند شد، پس مادامی که دستکش به دست دارید به وسایل شخصی خود دست نزنید.

- قبل از استفاده از هر ماده ای* برچسب* شیشه را مطالعه کنید و پس از حصول اطمینان و توجه به نکات درج شده از آن استفاده نمایید.
- هیچگاه محلول ها و حلال های قابل اشتعال (Flammable) از قبیل اتر را در مکانی که شعله وجود دارد تبخیر نکنید و درب این مواد را هیچوقت باز نگذارید.
- تبخیر مایعات سمی و اجسام بدبو باید همیشه در زیر هود صورت گیرد.
- از دهانه لوله یا ظرفی که در حال جوشیدن است هیچگاه به درون لوله نگاه نکنید و دهانه لوله را نیز به طرف خود و سایرین نگه ندارید.
- از جابجا کردن پیپت یا پی پت پاستورو ...داخل محلول ها جدا خودداری کنید .زیرا در نتایج تست های گروه‌های دیگر ایجاد اختلال می‌کند.
- هرگز به حافظه خود اطمینان نکنید و نتایج بدست آمده را فورا یادداشت نمایید.

متابولیسم کربوهیدرات‌ها

هیدرولیز نشاسته

آبکافت (هیدرولیز) یک واکنش شیمیایی است که در آن، ترکیب شیمیایی در واکنش با آب تجزیه می‌شود. در این واکنش، یک مولکول آب به یون‌های (H^+) و (OH^-) تجزیه شده و در واکنش شرکت می‌کند. واکنش هیدرولیز سبب تجزیه پلی‌مرها، پروتئین‌ها، کربوهیدرات‌ها و چربی‌ها می‌شود.

نشاسته

نشاسته (Starch) یا آمیلوم (Amylum) یک کربوهیدرات پلی‌مری و متشکل از واحدهای گلوکز متعددی است که توسط پیوندهای گلیکوزیدی به هم پیوسته‌اند. این پلی ساکارید در گیاهان به عنوان ذخیره انرژی تولید می‌شود. نشاسته، رایج‌ترین کربوهیدرات در رژیم غذایی انسان است و به مقدار زیاد در غذاهای اصلی مانند سیب‌زمینی، ذرت، برنج و گندم وجود دارد.

بر اساس نوع گیاه، نشاسته معمولاً دارای ۲۰ تا ۲۵ درصد آمیلوز و ۷۵ تا ۸۰ درصد آمیلوپکتین از نظر وزنی است. آمیلوز پلی‌ساکاریدی از مونومرهای آلفا-D- گلوکز است و حدود ۲۰ تا ۳۰٪ نشاسته را تشکیل می‌دهد. آمیلوز یک پلی‌مر بدون شاخه و دارای زنجیره‌های خطی گلوکز است. آمیلوپکتین حدود ۷۰ تا ۸۰٪ از نشاسته را تشکیل می‌دهد. یک پلیمر شاخه‌ای از زیرواحدهای آلفا D گلوکز است و مانند آمیلوز، از طریق به هم پیوستن تعداد زیادی گلوکز یا پیوندهای گلیکوزیدی آلفا ٤ ← ١ تشکیل می‌شود. اما آمیلوپکتین همچنین دارای پیوندهای آلفا ٦ ← ١ گلیکوزیدی در محل انشعابات است. آمیلوپکتین تقریبا در هر ٢٤ تا ٣٠ زیر واحد گلوکز، یک انشعاب و هر شاخه تقریباً به همان تعداد زیر واحد گلوکز دارد.

واحد فعالیت آنزیمی(IU) : عبارت است از مقدار آنزیمی که بتواند در شرایط بهینه دما، PH و غلظت سوبسترا، یک میکرومول سوبسترا را در زمان یک دقیقه به محصول تبدیل نماید. این مقدار برای هر آنزیمی می‌تواند متفاوت باشد.

آمیلاز

آنزیم‌هایی که نشاسته را در قندهای سازنده تجزیه یا هیدرولیز می‌کنند آمیلاز نام دارند. آلفا آمیلازها در گیاهان و حیوانات یافت می‌شوند. بزاق انسان غنی از آمیلاز است و همچنین پانکراس این آنزیم را ترشح می‌کند. بتا آمیلاز(BAM) نیز نشاسته را به واحدهای مالتوز تبدیل و می‌تواند به زنجیره گلوکز در انتهای غیراحیای آن حمله کند. مالتوز به عنوان محصول اصلی تخریب نشاسته، آزاد می‌شود. محصولات تخریب نشاسته، عمدتا مالتوز و مقدار کمتری گلوکز هستند. این مولکول‌ها از طریق پلاستید به سیتوزول صادر می‌شوند. این دو قند به عنوان پیش ماده سنتز ساکارز عمل می‌کنند .گیاه از ساکارز در مسیر اکسیداتیو پنتوز فسفات در میتوکندری، برای تولید ATP در شب استفاده می‌کند.نشاسته خالص یک پودر سفید، بدون طعم و بدون بو است که در آب سرد یا الکل محلول نیست. نشاسته، ترکیب اصلی برای ذخیره گلوکز در گیاهان بوده که از هزاران واحد تکرار گلوکز تشکیل شده است. نشاسته، در اصل به گیاهان تعلق دارد و در حیوانات سنتز نمی‌شود اما محصولاتی که سرشار از نشاسته هستند منبع اصلی تغذیه انسان و سایر حیوانات هستند. نشاسته برنج تقریبا کوچک و حدود ۲ میکرومتر قطر دارد در حالی که نشاسته سیب‌زمینی به صورت گرانول‌هایی به بزرگی بیش از ۱۰۰ میکرومتر هستند. نشاسته، از دسته بیوپلی‌مرها و نوعی پلی‌ساکارید است که بر اساس نوع پیوند بین گلوکزها و ساختار پلی‌مری خود دو نوع دارد :

- آمیلوز(Amylose)
- آمیلوپکتین(Amylopectin)

آلفا آمیلاز

با عمل در مکان‌های تصادفی در طول زنجیره نشاسته ، ساکاریدهای زنجیره بلند را تجزیه کرده و در نهایت مالتوتریوز و مالتوز از آمیلوز ، یا مالتوز ، گلوکز و "دکسترین محدود" از آمیلوپکتین تولید می‌کند. در حیوانات نیز از آنزیم‌های اصلی گوارشی بوده و pH مطلوب آن ٦/٧ تا ٧ است. در فیزیولوژی انسان ، هر دو آمیلاز بزاقی و پانکراس از نوع α- آمیلاز هستند.

آلفا آمیلاز در پانکراس، پاراتیروئید، سرم، ادرار، بافت تومور و بزاق پستانداران یافت می‌شود. دو نوع آلفا آمیلاز بزاقی و پانکراسی بسیار شبیه به هم هستند؛ در حالی‌که نوع پانکراسی را می‌توان تقریباً به صورت انحصاری به پانکراس نسبت داد، نوع بزاقی در اشک، عرق، شیر انسان، مایع آمنیوتیک، ریه ها، بیضه ها و اپی‌تلیوم لوله نیز فالوپ مشاهده می‌شود. عمل هضم نشاسته در دهان توسط آلفا آمیلاز های بزاق (پتیالین) شروع شده و در روده کوچک با آلفا آمیلاز های پانکراس ادامه پیدا می‌یابد. α- آمیلاز و β- آمیلاز در دانه ها نیز وجود دارند.

بتا آمیلاز

این آنزیم از انتهای زنجیره پلی‌ساکاریدی عمل می‌کند. در زمان رسیدن میوه ، بتا آمیلاز نشاسته را به مالتوز تبدیل کرده و در نتیجه طعم شیرین میوه رسیده ایجاد می شود. بسیاری از میکروب ها نیز آمیلاز تولید می کنند تا نشاسته های خارج سلولی را تجزیه کنند. بافت‌های حیوانی حاوی β- آمیلاز نیستند ، اگرچه ممکن است در میکروارگانیسم‌های موجود در دستگاه گوارش وجود داشته باشد. pH بهینه برای β- آمیلاز ۵,۰-٤,۰ است.

گاما آمیلاز

پیوندهای گلیکوزیدی α (٦-١) و همچنین آخرین پیوند 1-α،4 گلیکوزیدی را در انتهای غیر کاهنده آمیلوز و آمیلوپکتین شکسته و گلوکز تولید می‌کند. γ- آمیلاز دارای pH مطلوب در حدود۳ است. اشکال باکتریایی، انسانی و قارچی این آنزیم کشف شده است.

کینتیک آنزیمی به عنوان راهی برای شناخت مکانیسم آنزیمی

روش اصلی برای مطالعه مکانیسم یک واکنش آنزیمی، تعیین سرعت واکنش و نحوه تغییر آن در پاسخ به تغییرات پارامترهای آنزیم می‌باشد که به آن کینتیک آنزیمی گفته می‌شود.

آنزیم‌ها می‌توانند تا چندین میلیون واکنش کاتالیزوری را در هر ثانیه انجام دهند. برای تعیین حداکثر سرعت یک واکنش آنزیمی، غلظت سوبسترا افزایش یافته تا تولید محصول با سرعت ثابتی بدست آید. این سرعت در واقع حداکثر سرعت (V_{max}) آنزیم است. در این حالت، تمام سایت‌های فعال آنزیم با سوبسترا اشباع می‌گردند.

به این معنا که تمام آن‌ها در تبدیل سوبسترا به محصول درگیر می‌شوند. بیوشیمیست‌ها همچنین قادر به محاسبه‌ی مقدار سوبسترای مورد نیاز برای دستیابی به یک سرعت مشخصی از واکنش می‌باشند. این مقدار می‌تواند توسط ضریب میکائیلیس- منتن (K_m) بیان شود که نشان می‌دهد برای رسیدن به نصف حداکثر سرعت، چه میزان غلظت سوبسترا برای آنزیم نیاز است. هر آنزیم یک ضریب K_m مشخص برای سوبسترا دارد.

پارامترهای مختلف موثر بر فعالیت آنزیم

- غلظت سوبسترا
- غلظت آنزیم
- دما
- PH

غلظت سوبسترا

از پارامترهای Vmax و K_m به منظور تفسیر یک واکنش آنزیمی استفاده می‌شود. K_m ملاک خوبی برای سنجش آنزیم ها به شمار می‌رود. در واقع هرچه K_m آنزیمی کمتر باشد، آنزیم مذکور فعال‌تر است(مقدار فعالیت آنزیم با میزان K_m نسبت عکس دارد). مقدار Vmax به غلظت آنزیم وابسته است.

یک عامل کلیدی موثر بر روی سرعت واکنش کانالیز شده توسط یک آنزیم خالص در محیط آزمایشگاه، غلظت سوبسترا[S] ، می‌باشد. در آزمایشات کلینیکی، اندازه گیری سرعت ابتدایی، V0 ، در زمانی می‌باشد که [S] عموما بسیار بیشتر از غلظت آنزیم [E] باشد .

در غلظت ثابت آنزیم اثر غلظت های مختلف سوبسترا بر روی سرعت ابتدایی چگونه است؟

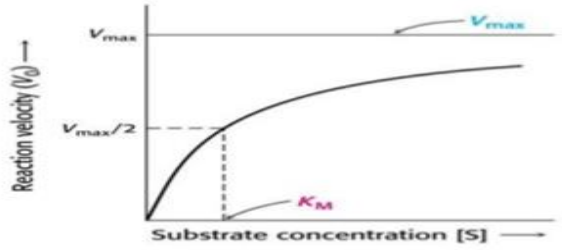
در غلظت نسبتا پایین سوبسترا، V0 تقریبا بطور خطی با افزایش [S] افزایش می‌یابد. در غلظت‌های بالاتر سوبسترا، V0 ، در پاسخ به افزایش [S] دیگر مشاهده نمی‌گردد. این ناحیه کفه مانندV0 ، نزدیک به سرعت حداکثر، Vmax، می‌باشد(با افزایش غلظت سوبسترا سرعت واکنش افزایش یافته تا اینکه تمام مولکول‌های

آنزیم اشباع شوند بعد از آن افزایش غلظت دیگر اثری روی سرعت ندارد و سرعت مستقل از غلظت عمل می کند).

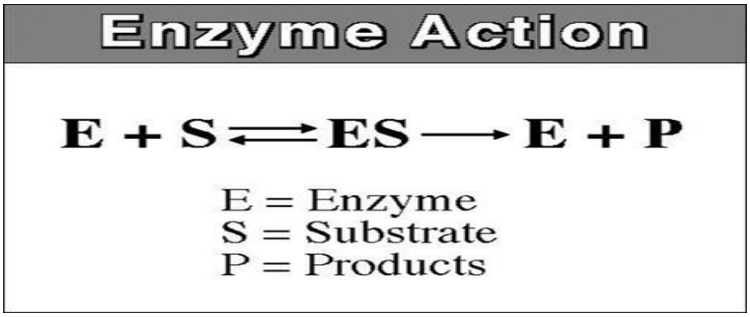
K_m یک ثابت کینتیکی است که همانند [S] دارای واحد غلظت است. اگر در یک واکنش آنزیمی غلظت سوبسترا برابر K_m باشد، به جای[S] ، K_m قرار می‌گیرد. K_m عبارت است از غلظتی از سوبسترا که در آن سرعت واکنش آنزیمی برابر نصف سرعت ماکزیمم است.

سرعت بیشینه و ثابت میکائیلیس

- افزایش غلظت سوبسترا تا یک حد معینی سرعت واکنش را بالا می برد. حدی که تمام جایگاه های فعال توسط سوبستراها اشباع شوند. سرعت واکنش آنزیمی در این نقطه را سرعت بیشینه می نامند.
- ثابت میکائیلیس یا K_m عبارت است از غلظت سوبستراپی که در آن، سرعت واکنش آنزیمی به نصف سرعت حداکثری می رسد و بیانی است از میل ترکیبی آنزیم به سوبستراپش.



این الگوی کینتیکی در سال ۱۹۰۳ ویکتور هنری و ورتز را به این نظریه هدایت نمود که ترکیب یک آنزیم با مولکول سوبسترای خود و ایجاد یک کمپلکسES ، مرحله ضروری در کاتالیز آنزیمی است. این نظریه به یک تئوری کلی در مورد عمل آنزیمی بخصوص توسط لئونور میکائیلیس و ماد منتن در سال ۱۹۱۳ منجر گردید. طبق فرضیه آن‌ها ابتدا آنزیم به طور برگشت پذیر با سوبسترای خود ترکیب شده و در یک مرحله قابل برگشت نسبتا سریع، ایجاد یک کمپلکس آنزیم- سوبسترا می‌نماید و سپس کمپلکس ES در مرحله دوم آهسته‌تر تجزیه شده و تولید آنزیم آزاد و محصول P واکنش را می‌نماید:



چون واکنش آهسته‌تر دوم، سرعت کل واکنش را محدودتر می‌نماید، سرعت کلی واکنش میبایست متناسب با غلظت مواد واکنش دهنده در مرحله دوم یعنی ES باشد.

در هر لحظه از یک واکنش آنزیمی، آنزیم به دو شکل آزاد یا ترکیب نشده E و شکل ترکیب شده ES وجود دارد. در [S] پایین، بیشتر آنزیم به شکل آزاد E وجود دارد. در اینجا سرعت واکنش متناسب با [S] می‌باشد زیرا با افزایش [S] تعادل معادله بیشتر به سمت تشکیل مقدار بیشتری ES کشانده می‌شود.

توجه: حداکثر سرعت ابتدایی واکنش آنزیمی (V_{max}) زمانی ایجاد می‌گردد که تمامی آنزیم به شکل ES بوده و غلظت E آزاد تقریبا صفر باشد. تحت این شرایط آنزیم از سوبسترای خود اشباع شده و افزایش بیشتر [S] تاثیری بر روی سرعت نخواهد داشت. این حالت زمانی وجود دارد که [S] به اندازه کافی بالا بوده تا اساسا تمامی آنزیم آزاد به شکل ES تبدیل گردد.بعد از تجزیه کمپلکس ES و تولید محصول P آنزیم آزاد شده تا واکنش مولکول دیگر سوبسترا را کاتالیز نماید. این اثر اشباع، یک صفت متمایز کننده کاتالیست های آنزیمی بوده و مسئول ایجاد حالت کفه موجود در شکل میباشد.

غلظت آنزیم

سرعت یک واکنش آنزیمی تا زمانی که سوبسترا به مقدار کافی در محلول موجود باشد مستقیما متناسب با غلظت آنزیم می‌باشد ولی در صورتی که افزایش غلظت آنزیم ادامه یابد زمانی می‌رسد که دیگر سرعت واکنش به علت کمبود مقدار سوبسترا افزایش نخواهد یافت. ارتباط بین غلظت سوبسترا و سرعت واکنش را می‌توان به طور کمی بیان نمود:

میکائلیس و منتن این معادله را با فرض اینکه مرحله محدود کننده‌ی سرعت در واکنش‌های آنزیمی، تجزیه کمپلکس ES به محصول و آنزیم آزاد باشد را بدست آوردند:

$$V0=V_{max}[S]/ K_m +[S]$$

وابستگی سرعت واکنش ابتدایی به S و K را می توان با ارزیابی معادله میکائیلیس و منتون در سه حالت بیان نمود :

۱.وقتی [S] بسیار کمتر از K_m باشد در نتیجه میزان K_m+[S] اساسا برابر K_m می باشد که در نتیجه رابطه نام‌برده به صورت مقابل خلاصه می‌گردد:

$$V_{۰}=V_{max}.[S]/ K_m$$

در این شرایط سرعت واکنش آنزیمی نسبت مستقیم یا خطی با غلظت سوبسترا دارد.

۲. وقتی[S] بسیار بیشتر از K_m باشد میزان K_m+[S] اساسا برابر [S] میباشد که رابطه ی مزبور به صورت زیر خلاصه می‌شود :

$$V_{۰}=V_{max}$$

در چنین شرایطی سرعت واکنش به حد ماکزیمم رسیده و ثابت می‌ماند و سرعت واکنش مستقل از غلظت سوبسترا است

(در این رابطه سرعت واکنش ابتدایی حداکثر V_{max} بوده وتحت اثر افزایش غلظت سوبسترا قرار نمی‌گیرد)

۳. وقتی $[S]=K_m$ باشد:

$$V_{۰}= V_{max}/۲$$

که این معادله بیان می‌کند وقتی میزان [S] برابر K_m باشد سرعت ابتدایی نصف میزان حداکثر می‌باشد.

در نتیجه K_m را که ضریب ثابت میکائیلیس می‌باشد را به این صورت تعریف می‌کنند:

K_m مقدار غلظتی است از سوبسترا که موجب پیدایش نصف سرعت حداکثر آنزیمی میگردد.درواقع K_m غلظتی از سوبسترا است که در این غلظت نیمی از نقاط فعال آنزیم توسط سوبسترا اشغال میشود و با میل ترکیبی آنزیم و سوبسترا رابطه ی عکس دارد. یک K_m بزرگ نشان دهنده ی یک پیوند ضعیف بین آنزیم و سوبسترا است .یک K_m کوچک نشان دهنده ی پیوند قوی بین آنزیم و سوبسترا میباشد.یعنی طبق رابطه ی میکائیلیس و منتون میتوان گفت هر چه آنزیمی فعال تر بوده و میل ترکیبی آن با سوبسترا بیشتر باشد ،سرعت واکنش بیشتر و K_m کوچکتر است.

اثر دما بر فعالیت آنزیم

افزایش دما سرعت واکنش‌های شیمیایی را افزایش می‌دهد ولی در مورد واکنش‌های آنزیمی دو اثر مختلف دارد:

- افزایش سرعت واکنش‌های آنزیمی
- بر هم زدن ساختمان پروتئینی آنزیم که موجب از بین رفتن فعالیت آنزیم می‌شود و با افزایش دما بیش از ۵۰ درجه ساختمان پروتئینی آنزیم دگرگون می‌گردد.

اثر PH بر فعالیت آنزیم

آنزیم‌ها دارای یک PH (دامنه PH) مطلوب می‌باشند که در آن حداکثر فعالیت را نشان داده و در PH بالاتر یا پایین‌تر، فعالیت آن‌ها کاهش می‌یابد. PH معمول فعالیت یک آنزیم عموما در نزدیکی PH محیطی است که به‌طور طبیعی آنزیم در آن وجود دارد به‌عنوان مثال:

a. پپسین که بعضی پیوندهای پپتیدی پروتئین ها را درهنگام هضم در معده، هیدرولیز می‌نماید، دارای PH مطلوب حدود ۱/٦ میباشد. PH شیره معده بین ۱و۲ است.

گلوکز٦-فسفاتاز سلول های کبدی با PH مطلوب حدود ۷/۸ ، مسئول رهاسازی گلوکز بداخل گردش خون میباشد. PH طبیعی سیتوزول سلول های کبدی حدود ۷/۲ می‌باشد.

آنزیم ها در معرض مهار هستند

مهار کننده های آنزیمی عواملی مولکولی هستند که با کاتالیز تداخل نموده و واکنش های آنزیمی را آهسته و یا متوقف می‌سازند. آنزیم‌ها تمامی فرایندهای سلولی را کاتالیز می‌نمایند و مهار کننده‌های آنزیمی از جمله مهمترین عوامل فارماکولوژیک شناخته شده می‌باشند. برای مثال آسپرین، آنزیم کاتالیز کننده اولین مرحله سنتز پروستاگلاندین‌ها را مهار می‌کند که در بسیاری از فرایندها از جمله ایجاد درد موثر هستند.دو کلاس بزرگ مهار کننده‌ها شامل قابل برگشت و غیر قابل برگشت می‌باشد.مهار قابل برگشت نیز می‌تواند رقابتی، نارقابتی و یا مخلوط باشد

مهار رقابتی

مهار کننده رقابتی با سوبسترا برای جایگاه فعال آنزیم رقابت میکند. با اشغال جایگاه فعال آنزیم توسط مهار کننده از اتصال سوبسترا به آنزیم ممانعت به عمل می آید. در اغلب موارد، مهارکننده های رقابتی، ترکیباتی هستند که مشابه سوبسترا بوده و با آنزیم ترکیب شده تا ایجاد کمپلکس بنماید، ولی این اتصال منتهی به کاتالیز نمی‌گردد. حتی ترکیبات زودگذر مهار کننده‌های رقابتی دارای اثرات منفی بر روی کارائی آنزیم می‌باشند.

*با در نظر گرفتن هندسه مولکولی مهارکننده‌هایی که مشابه سوبسترا هستند به این نتیجه می‌رسیم که کدام قسمت‌های سوبسترای طبیعی به آنزیم اتصال میابند.

*با استفاده از کینتیک حالت پایدار، مهار رقابتی را میتوان به طور کمی بررسی نمود.

مهارکننده های برگشت پذیر نارقابتی و مخلوط

مهار برگشت پذیر یک وسیله مهم در تحقیق آنزیمی و فارماکولوژی است. این دو نوع مهارکننده اغلب در مورد آنزیم‌های تک سوبسترایی مطرح هستند ولی در عمل تنها در مورد آنزیم هایی دیده می‌شوند که دارای دو یا

چند سوبسترا هستند. (نوعی از مهارکننده مخلوط، مهارکننده غیررقابتی بوده و نباید آن را با مهارکننده نارقابتی اشتباه گرفت). یک مهارکننده نارقابتی در محلی غیر از جایگاه فعال سوبسترا متصل شده و برخلاف مهارکننده رقابتی، تنها به کمپلکس ES اتصال میابد. یک مهارکننده مخلوط نیز به محلی غیر از جایگاه فعال سوبسترا متصل شده ولی میتواند به E یا ES اتصال یابد.

بررسی انواع ترکیب مهارکننده

ترکیباتی که موجب افزایش سرعت واکنش های آنزیمی می‌شوند ،فعال کننده و ترکیباتی که موجب کاهش سرعت یا توقف واکنش های آنزیمی می‌شوند مهارکننده می‌نامند. مهارشدن فعالیت آنزیم به این معنی است که در شرایط مناسب حرارت ، pH،غلظت سوبسترا سرعت واکنش آنزیمی کاهش یابد .این پدیده یک تغییر شیمیایی است و با کم شدن فعالیت آنزیم در اثر دناتوره شدن که یک تغییر فیزیکی است ، تفاوت دارد.

انواع مهارکننده

انواع مهار کننده‌های برگشت پذیر:

۱_مهار کننده رقابتی : با سوبسترا برای اتصال به آنزیم رقابت می‌کند. این مهار کننده تنها به آنزیم آزاد(E) اتصال میابد.لذا افزایش قابل توجه غلظت سوبسترا می‌تواند سبب حذف مهار کننده رقابتی گردد. در این حالت V_{max} ثابت مانده ولی K_m افزایش میابد .اکثر مهار کننده‌های رقابتی ساختمانی مشابه سوبسترای آنزیم دارند.

۲_مهارکننده نارقابتی : تنها زمانی به آنزیم اتصال میابد که حتما از قبل سوبسترا به آن اتصال یافته باشد .این مهار کننده تنها به کمپلکس آنزیم _سوبسترا(ES) متصل می‌شود .در واقع برای اتصال مهار کننده ابتدا لازم است سوبسترا اتصال یافته وبا ایجاد تغییر در ساختمان فضایی آنزیم ،امکان اتصال مهار کننده را فراهم سازد .در این حالت هر دو مقدار V_{max} و V_m کاهش می‌یابد.

۳_مهار کننده غیر رقابتی: اتصال آن کاملا مستقل از اتصال سوبسترا می‌باشد،به طوری که میتواند به E یا ES اتصال یابد در این حالت V_{max} کاهش می یابد،ولی K_m ثابت می‌ماند .

روش انجام آزمایش

مواد مورد نیاز : آمیلاز بزاقی، نشاسته پخته۱٪ ، لوگول، لوله آزمایش،بشر،pH متر، سانتریفیوژ، بن ماری، چراغ الکلی، یخ

توجه: در هنگام کار با لوگول به نکات زیر توجه شود:

معرف لوگول به صورت آماده در بازار وجود دارد، همچنین میتوان آن را در آزمایشگاه ساخت.این معرف بایستی در ظروف تیره و دور از نور نگهداری شود(لوگول به رنگ قهوه ای بود و در اثر تماس با نور بی رنگ میشود) و در صورت ساخت آن توسط فرد بهتر است از یک روز قبل ساخته شود تا ید مورد استفاده به آرامی در آن حل گردد.این معرف به‌جهت این‌که حاوی ید می‌باشد در اثر تماس بیش از حد ممکن است موجب واکنش های آلرژیک، سردرد، حالت تهوع و اختلال در خواب شود (حتما از دستکش استفاده شود.)

تهیه آنزیم آمیلاز از بزاق

دهان خود را با آب معمولی بشویید و به مدت پنج دقیقه آب مقطر را دهان خود نگه دارید و سپس تخلیه کنید. به میزان ۱۰ سی سی بزاق را جمع آوری کرده و با دور 3000rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ نمایید .مایع رویی حاوی آنزیم آمیلاز است.

با توجه به اینکه سوبسترای آمیلاز، نشاسته است در طی آزمایشات زیر از نشاسته ۱٪ پخته شده استفاده و لوگول بعنوان معرف مورد استفاده قرار گرفت.

آزمایش اول : بررسی اثردما

در ٤ لوله آزمایش به میزان ۲,۵ سی سی نشاسته ۱٪ بعلاوه ۱,۵ سی سی محلول آمیلاز بزاقی ریخته و لوله‌ها را در آب دمای۳۷درجه سانتی گراد، آب جوش (۱۰۰ درجه سانتی گراد) ، دمای محیط آزمایشگاه (۲۵ درجه سانتی گراد) و یخ(دمای صفردرجه سانتی گراد) به مدت ۷ دقیقه قرار می‌دهیم. پس از گذشت ۷ دقیقه به هر لوله یک قطره معرف لوگول افزوده، لوله را تکان داده و مخلوط را نگاه می‌کنیم.

تفسیر آزمایش: بی رنگ شدن محلول نشان دهنده بیشترین فعالیت آنزیم است.زیرا ترکیب ید(لوگول) و نشاسته رنگ بنفش را ایجاد می‌نماید. زمانی‌که آنزیم، نشاسته را هیدرولیز کند، واکنشی بین معرف و نشاسته انجام نپذیرفته و در نتیجه رنگ بنفش که در واکنش ید(لوگل) + نشاسته ایجاد شده که مشاهده نمی-گردد.(دمای ۳۷ درجه ، دمای بهینه انجام این واکنش آنزیمی می‌باشد).

آزمایش دوم : بررسی اثر PH

ابتدا در ۳ تا لوله آزمایش میزان۱,۵ سی سی محلول نشاسته ۱ درصد ریخته و ۱,۵ سی سی محلول آمیلاز به آن اضافه می‌کنیم. سپس در لوله های ۱ تا ۳ به ترتیب ۱ سی سی از بافر های با PH اسیدی و خنثی و قلیایی ریخته ولوله را تکان داده و به مدت ۷ دقیقه در بن ماری دمای ۳۷ درجه قرار می دهیم. دقت شود که ۲ قطره معرف لوگل در آخر اضافه شود وبا توجه به تغییرات رنگ، نتایج را بررسی می کنیم. رنگ آبی مایل به بنفش نشان دهنده عدم فعالیت آنزیم، رنگ آبی مایل به سفید نشان دهنده فعالیت ناکافی آنزیم ولوله‌ای که بیشترین تغییر رنگ را داشته باشد، PH نزدیک به اوپتیمم را دارد و آنزیم آمیلاز بیشترین فعالیت را در این محیط داشته است و تمام نشاسته را هیدرولیز کرده است.

آزمایش سوم: اثر غلظت آنزیم

در شرایطی که غلظت سوبسترا ثابت و بسیار زیاد باشد، با افزایش غلظت آنزیم، سرعت واکنش افزایش میابد.
سرعت یک واکنش آنزیمی تا زمانی که سوبسترا به مقدار کافی در محلول موجود باشد مستقیما متناسب با غلظت آنزیم می‌باشد ولی در صورتی که افزایش غلظت آنزیم ادامه یابد زمانی می‌رسد که دیگر سرعت واکنش به علت کمبود مقدار سوبسترا افزایش نمی‌یابد.

ابتدا در ۳ تا لوله آزمایش میزان ۵ سی سی محلول نشاسته ۱ درصد ریخته و در لوله‌ها به ترتیب میزان ۳ و ۱,۵ و ۰,۵ سی سی محلول آمیلاز به آن‌ها اضافه می‌کنیم. سپس ۲ قطره لوگول ریخته و در بن ماری ۳۷ درجه(دمای اپتیمم آنزیم آمیلاز) قرار داده و زمان اتمام واکنش (با مشاهده تغییر رنگ ترکیب داخل لوله های آزمایش از بنفش به سفید) را یادداشت می‌کنیم.

آزمایش چهارم: اثر غلظت سوبسترا

در 4 لوله آزمایش به ترتیب، لوله اول ۰,۵ سی‌سی، لوله دوم ۱ سی‌سی ، لوله سوم ۲ سی‌سی ولوله چهارم ٤ سی‌سی نشاسته می‌ریزیم. به همه لوله‌ها میزان ۱,۵ سی‌سی آمیلاز بزاقی اضافه کرده و ۲ قطره لوگل نیز به تمام لوله ها می‌ریزیم(ترکیبات موجود تمام لوله‌ها در اثر واکنش نشاسته و لوگول به رنگ بنفش در می آیند).لوله‌ها را در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد(دمای اپتیمم این آنزیم)در بن ماری قرارداده و زمان سپری شده برای رسیدن به فعالیت حداکثری آنزیم و بی رنگ شدن مخلوط داخل لوله آزمایش را یادداشت می‌کنیم.

سوالات

سوال۱ : از آنجایی‌که مهار کننده بطور برگشت پذیر به آنزیم اتصال می‌یابد چگونه می‌توان رقابت را به‌نفع سوبسترا تغییر داد؟

جواب : می‌توان تنها با افزودن سوبسترای بیشتر، رقابت را به نفع سوبسترا تغییر داد.

سوال۲ : دو روش بررسی فعالیت آنزیمی را ذکر کنید.(به نظر شما کدام روش ترجیح دارد؟)

جواب :

۱- روش کینتیکی که به بررسی سرعت آنزیم از طریق بررسی سرعت تشکیل محصول یا مصرف سوبسترا در زمان‌های مختلف می‌پردازد.
۲- نقطه پایان (End Point) : در این روش به آنزیم زمان داده می‌شود تا کارش را انجام دهد .در انتها آنزیم عیرفعال می‌شود و مقدار محصول تولید شده یا سوبسترای مصرف شده بررسی می‌گردد.

بنظر می‌رسد روش 1 بهتر باشد چون می‌توان از آن برایند گرفت و فعالیت آنزیم را در زمان‌های مختلف بررسی نمود.

سوال۳ : پزشک در چه مواردی اندازه گیری آمیلاز را درخواست می‌کند؟

جواب : آمیلاز موجود در بزاق، مولکول‌های بزرگ و نامحلول نشاسته را به مولکول‌های کوچکتر و قابل حل و در نهایت به مالتوز و دکسترین تجزیه می‌کند. این شکل از آمیلاز، پتیالین نیز نامیده می‌شود. شرایط بهینه برای فعالیت پتیالین دما بدن انسان و pH معادل7 است .آلفا-آمیلاز موجود در پانکراس، پیوندهای گلیکوزیدی α (1-4) در آمیلوز را به دکسترین، مالتوز و مالتوتریوز می‌شکند. سطح خونی این آنزیم در آسیب سلول‌های پانکراس در بیماری پانکراتیت و سایر بیماری‌های پانکراس مانند انسداد مجاری پانکراس و نیز در تومورهای مربوط به غدد بزاقی افزایش می‌یابد، بنابراین در صورت مشاهده وجود علائم مربوط به بیماری های پانکراس مانند درد شدید شکمی، تب، کاهش اشتها و استفراغ اندازه گیری مقادیر خونی این آنزیم درخواست می‌شود . آسیب سلول‌های آسینار پانکراس، التهاب یا انسداد در بخش‌های مختلف مجاری پانکراس یا صفراوی سبب بازگشت آمیلاز به داخل بافت پانکراس می‌شود.

سپس این آنزیم از طریق سیاهرگ‌های کوچک و عروق لنفاوی جذب خون شده و مقدار آن در خون افزایش می‌یابد .چنین وضعیتی هایپرآمیلازی نام دارد. اندازه گیری آمیلاز در سرم و ادرار آزمون‌های حساسی هستند اما جهت تشخیص اختلالات پانکراس ویژه نیستند؛ زیرا سایر بیماری‌های غیر پانکراسی هم می‌توانند سطح آمیلاز را در سرم و ادرار افزایش دهند. برای مثال در انفارکتوس کلیه، بارداری خارج رحمی، انسداد روده، و اختلالات وخیم روده‌ای هم مقدار آمیلاز افزایش می‌یابد.

سوال٤: تغیرات PH چگونه بر فعالیت های آنزیمی تاثیر می‌گذارد؟

جواب : تغییر در ساختمان آنزیم (مثلا یونیزاسیون اسیدهای آمینه جایگاه فعال آنزیم) – یونیزه شدن سوبسترا

سوال٥ : در شرایطی که غلظت آنزیم ثابت باشد، با افزایش غلظت سوبسترا سرعت واکنش افزایش می‌یابد ولی این افزایش حدی دارد .چرا؟

جواب : به علت پر شدن جایگاه‌های فعال آنزیم برای سوبسترا (نشاسته) می‌باشد.

کروماتوگرافی

اصطلاحی است که به چندین تکنیک جداسازی اطلاق می گردد که اساس این روش ها مهاجرت افتراقی یا اصطلاحا (Defferential Migration) است .کروماتوگرافی را به دلیل اینکه در برگیرنده سیستم‌ها و تکنیک‌های مختلفی است نمی‌توان به طور مشخص تعریف کرد. اغلب جداسازی‌ها بر مبنای کروماتوگرافی بر روی مخلوط‌هایی از مواد بی‌رنگ از جمله گازها صورت می‌گیرد. در کروماتوگرافی یکی از فازها بدون حرکت است و فاز ساکن نامیده می‌شود و دیگری را فاز متحرک می‌نامند. اجزای یک مخلوط به وسیله جریانی از یک فاز متحرک از داخل فاز ساکن عبور داده می‌شود. جداسازی‌ها بر اساس اختلاف در سرعت مهاجرت اجزای مختلف نمونه استوارند.درهر روش مهاجرت افتراقی سه چیز مورد نیاز است.

۱. بایستی یک محیط مهاجرت وجود داشته باشد که محلی است برای این که جدا سازی اتفاق بیافتد.
۲. بایستی یک نیروی جلو برنده(Driving Force) برای حرکت دادن گونه ها جهت جدا شدن در طول محیط مهاجرت وجود داشته باشد.
۳. بایستی یک نیروی مقاوم انتخابی(Selection Resistive Force) وجود داشته باشد.

تعریف نیروی متحرک (Driving Force) : عبارتست از تمایل حل شدن گونه در فاز متحرک که باعث پیشروی سریع تر نمونه می شود.

تعریف نیروی مقاوم انتخابی (Selection Resistive Force) : عبارتست از تمایل حل شدن گونه در فازثابت که باعث عقب ماندن آن از مهاجرت شده، همچنین باعث جدا سازی قابل ملاحظه گونه‌های شیمیایی می‌گردد. اگرمخلوط از گونه‌های شیمیایی روی یک محیط مهاجرت درنقطه‌ای قرارداده شوند ،نیروی جلوبرنده تمایل دارد که مخلوط را به مکانی دور تر از نقطه شروع حرکت دهد .از طرفی نیروی مقاوم انتخابی تمایل به عقب نگه داشتن گونه ها دارد .نیروی مقاوم از این نظر انتخابی است که حرکت هریک از گونه هارا با میزانی متفاوت آهسته‌تر می کند. این اختلاف در سرعت حرکت در جهت دور شدن از مبداء،اساس اصطلاح (Defferential Migration) است.

روش‌های کروماتوگرافی

روش‌های کروماتوگرافی را می‌توان ابتدا بر حسب ماهیت فاز متحرک و سپس بر حسب ماهیت فاز ساکن طبقه‌بندی کرد. فاز متحرک ممکن است گاز یا مایع و فاز ساکن ممکن است جامد یا مایع باشد. بدین ترتیب فرآیند کروماتوگرافی به چهار بخش اصلی تقسیم می شود. اگر فاز ساکن جامد باشد کروماتوگرافی را کروماتوگرافی جذب سطحی (Adsorption Chromatography) و اگر فاز ساکن ، مایع باشد کروماتوگراف تقسیمی (Partition Chromatography) می‌نامند.

هر یک از چهار نوع اصلی کروماتوگرافی انواع مختلف دارد:

- کروماتوگرافی مایع – جامد(Liquid – Solid Chromatography)
- کروماتوگرافی جذب سطحی(Adsorption Chromatography)
- کروماتوگرافی لایه نازک(Thin Layer Chromatography)
- کروماتوگرافی تبادل یونی(Ion-Exchange Chromatography)
- کروماتوگرافی ژلی(Gel Chromatography)
- کروماتوگرافی گاز – جامد(Gas- Solid Chromatography)
- کروماتوگرافی مایع – مایع(Liquid – Liquid Chromatography)
- کروماتوگرافی تقسیمی(Partition Chromatography)
- کروماتوگرافی کاغذی (Paper Chromatography)
- کروماتوگرافی گاز- مایع(Gas- Liquid Chromatography)
- کروماتوگرافی گاز – مایع(Gas- Liquid Chromatography)
- کروماتوگرافی ستون مویین(Capillary Column Chromatography)

یکی از مزایای برجسته روش‌های کروماتوگرافی این است که آن‌ها آرام هستند. به این معنی که احتمال تجزیه مواد جداشونده به وسیله این روش‌ها در مقایسه با سایر روش‌ها کمتر است.مزیت دیگر روش‌های کروماتوگرافی در این است که تنها مقدار بسیار کمی از مخلوط برای تجزیه لازم است به این دلیل روش‌های

تجزیه‌ای مربوط به جداسازی مواد کروماتوگرافی می‌توانند در مقیاس میکرو و نیمه میکرو انجام گیرند.روش‌های کروماتوگرافی ساده سریع و وسایل مورد لزوم آنها ارزان هستند.

انتخاب بهترین روش کروماتوگرافی

انتخاب نوع روش کروماتوگرافی بجز در موارد واضح (مانند کروماتوگرافی گازی در جداسازی مواد گازها) عموما تجربی است. زیرا هنوز هیچ راهی جهت پیش بینی بهترین روش برای جداسازی مواد اجسام مگر در چند مورد ساده وجود ندارد. در ابتدا روش‌های ساده‌تر مانند کروماتوگرافی کاغذی و لایه نازک امتحان می‌شوند. زیرا این روش‌ها در صورتی که مستقیما قادر به جداسازی مواد نباشند نوع سیستم کروماتوگرافی را که جداسازی مواد به‌وسیله آن باید صورت بگیرد، مشخص می‌کنند آنگاه در صورت لزوم از روش‌های پیچیده‌تر استفاده می‌شود.

کروماتوگرافی کاغذی(Paper Chromatography)

انواع جداسازی‌های مختلف و ساده بر روی کاغذ به عنوان پیشروان کروماتوگرافی کاغذی توصیف شده‌اند. این سیستم معمولا به عنوان نمونه بارزی از سیستم تقسیمی در نظر گرفته می‌شود که در آن فاز ساکن آب است و به وسیله جذب سطحی بر روی مولکول‌های سلولز قرار می‌گیرد و مولکول‌های سلولز نیز به نوبه خود به وسیله ساختار الیافی کاغذ در وضعیت‌های ثابت نگه داشته می‌شود. امروزه ، به هر حال ، مشخص شده است که جذب سطحی اجزای فاز متحرک و حل شونده‌ها و اثرات تبادل یون نیز نقش‌هایی را ایفا می‌کنند و کاغذ به هیچ عنوان تنها به صورت تکیه گاه بی اثر نیست.یک خصوصیت ویژه روش کروماتوگرافی کاغذی این است که چیزی مربوط به محلول یا گاز خارج شده از ستون که در سیستم‌های معمول مایع یا گاز با آن برخورد می‌کنیم وجود ندارد. ترکیبات جدا شده روی کاغذ مکان‌یابی و شناسایی می‌شوند در نتیجه ، جداسازی به طور نسبتا دائم در روی کاغذ ثبت می‌شود. در این روش اجزای جدا شده جمع آوری نمی‌شوند و احتیاجی به وسایل پیچیده کنترل پیوسته نیست. اندازه گیری کمی ترکیبات جدا شده را می‌توان روی کاغذ انجام داد ولی اگر بخواهند اجزای را از کاغذ خارج کنند. تنها کار لازم این است که قسمت مربوط به هر یک از اجسام را از کاغذ ببرند و هر یک را به طور جداگانه بشویند.

قطره‌ای از محلول حاوی مخلوطی که باید جدا شود را روی یک صفحه یا نوار کاغذ صافی در محل علامت گذاری شده قرار می‌دهند. در این محل ، قطره به صورت یک لکه حلقوی پخش می‌شود. وقتی که لکه خشک شده کاغذ را در یک ظرف مناسب سربسته طوری قرار دهند که یک سر آن در حلال انتخاب شده به عنوان فاز متحرک فرو رود. حلال از طریق الیاف کاغذ در نتیجه عمل موئینگی نفوذ می‌کند و نکته مهم این است که سطح کاغذ نباید کاملا به وسیله حلال پوشانده شود. زیرا در این صورت ، اصلا جدا سازی صورت نمی‌گیرد یا نواحی خیلی پخش می‌شوند.وقتی که حلال مسافت مناسبی را طی کرد یا بعد از یک زمان از قبل تعیین شده ، کاغذ را از ظرف بیرون آورده ، مقدار حرکت حلال را با علامتی مشخص می‌کنند و می‌گذارند تا صفحه خشک شود. وقتی که محل‌های مناطق جدا شده آشکار شدند لازم است که هر یک از اجسام به طور جداگانه شناسایی شوند. در موارد ایده‌آل ، هر جسم با واکنشگر مکان‌یاب ، رنگ مخصوصی می‌دهد که در مورد مواد معدنی بیشتر و درمورد مواد آلی کمتر مشاهده می‌شود. ساده‌ترین روش شناسایی بر اساس مقدار Rf است(واضح است که برای یک زوج معین از فازهای ساکن ومتحرک ،کسری ازفاصله که گونه شیمیایی طی می کند نسبت به فاصله ای که فاز متحرک طی می کند مقدار Rf (Retention Factor) گونه مورد خواهد بود).

Rf خاصیت مشخصی از ترکیب است برای تعیین این مقدار مسافتی را که جسم از خط شروع تا وسط لکه را طی کرده است اندازه می گیرند و آنرا به مسافتی که حلال پیموده تقسیم می کنند. این فاکتور Rf به طور قابل ملاحظه ای با تغییر حلال ، فاز ساکن، دما وعوامل دیگر تغییر می کند. فاز ساکن متشکل از جامد یا مایعی است که به سطح جامد چسبیده است اجسام موجود در مخلوط به علت داشتن قطبیت های متفاوت با سرعت های مختلف بر روی فاز ساکن حرکت می کند. سرعت حرکت هر جزء در مخلوط با چندین عامل قطبیت تعیین می شود. یک جسم قطبی هم نسبت به حلال و هم نسبت به فاز ساکن جاذبه دارد. دما حرکت اجزا را سریع می کند. زیرا انرژی جنبشی اجزا را افزایش می دهد. انتظار می رود افزایش دما Rf را افزایش دهد.

نوع فاز ساکن بر Rf تاثیر دارد. کاغذهای مورد استفاده در کرو ماتوگرافی کاغذی انواع مختلفی دارند. به عنوان مثال برخی با روغن سیلیکون یا روغن پارافین آغشته‌اند و کروماتوگرافی کاغذی فاز معکوس را امکان پذیر می‌کند که در آن فاز متحرک یک حلال قطبی است. برخی دیگر حاوی مواد جاذب سطحی یا رزین تبادل

یونی می باشد. از این رو کروماتوگرافی جذب سطحی و تبادل یونی را ممکن می سازد. به هر حال کاغذ جزئی از فاز ساکن است ونوع آن بر Rf موثر است.

کروماتوگرافی کاغذی اکثرا به عنوان یک وسیله تحقیقاتی به کار می‌رود، و به طور گسترده‌ای در تجزیه‌های روزمره مخصوصا در جداسازی‌های جدیدی که هیچ روش کلاسیک برای آنها وجود ندارد، نیز مورد استفاده قرار می گیرد. همچنین در مسائل کلینیکی و زیست شیمیایی ، جداسازی اسیدهای آمینه و پپتیدها در بررسی ساختارهای پروتئین کاربرد دارد. آزمایش روزمره ادرار و سایر مایعات بدن برای اسید آمینه و قند ، جداسازی بازهای پورین و نوکلئوتیدها در آزمایش اسیدهای نوکلئیک ، جداسازی استرئیدها ، تجزیه عمومی ، تجزیه بسپارها ، تشخیص و ارزیابی فلزات در خاک ها و نمونه های زمین شناسی Geology، بررسی ترکیبات فنلی در عصاره های گیاهی ، جداسازی آلکالوئیدها ، جداسازی ترکیبات علامت دار به وسیله رادیو ایزوتوپ‌ها ، کروماتوگرافی کاغذی برای جداسازی مواد فرار غیرفعال مانند هیدروکربن‌ها و دیگری جداسازی اسیدهای چرب با فراریت بیشتر مناسب نمی باشد. کاربرد کمی این روش نه تنها احتیاج به یک جداسازی کمی ، بلکه مکان‌یابی و ارزیابی کمی اجسام موجود نیز دارد. یک جداسازی کیفی رضایت بخش ، الزاما برای کار کمی مفید نیست. اندازه گیری کمی را می‌توان یا با سنجش مقدار جسم موجود در لکه روی کاغذ ، یا با خارج کردن جسم از کاغذ و تجزیه اجزای جدا شده به وسیله روش‌های کمی متداول انجام داد. لکه اولیه از نمونه مناسب روی کاغذ قرار می‌دهند، خشک کردن لکه باید تحت شرایط استاندارد زمان و دما صورت گیرد.

در تهیه حلال نیز روی نسبت‌های اجزا باید دقت زیادی شود ، برقرار ساختن تعادل باید به طور استاندارد انجام گیرد، طول عبور حلال در تمامی نوبت‌ها یکسان باشد، در طول آزمایش ، دما باید ثابت بماند، و خشک کردن ورقه باید در یک زمان و دمای استاندارد انجام گیرد. واکنش‌گر مکان‌یاب (در صورت استفاده از لکه‌های رنگی) باید به طریق کاملا تکرارپذیر افزوده شود. و هر عمل بعدی ، مانند خشک کردن یا قراردادن در معرض بخار آمونیاک ، باید در مدت استاندارد انجام گیرد. مقدار جسمی که در یک جداسازی کروماتوگرافی باید روی کاغذ قرار گیرد، متغیر است.

استخراج و جداسازی رنگیزه های گیاهی طریق کروماتوگرافی کاغذی

در تمام روش های کروماتوگرافی ، یک فاز ثابت (Stationary phase) جامد یا مایع و یک فاز متحرک (Mobile phase) مایع یا گاز وجود دارد.فاز متحرک از میان فاز جامد عبور کرده و ترکیبات موجود در مخلوط را با خود حمل می کند.سرعت حرکت اجزا مختلفِ یک محلول برحسب وزن مولکولی و ساختار آن و میزان حلالیت در حلال کروماتوگرافی متفاوت بوده و از یکدیگر جدا شده و در مناطقی از کاغذ برجای میمانند.الگوی ترکیبات ایجاد شده روی کاغذ را کروماتوگرام گویند. همچنین از این روش میتوان برای شناسایی ترکیبات مجهول می‌توان استفاده نمود.

در این آزمایش برای جداسازی و شناسایی رنگیزه های گیاهی عصاره‌ای از گیاه مورد نظر را تهیه کرده، حلال کروماتوگرافی مناسب را انتخاب نموده و با قرار دادن یک نقطه در کاغذ کروماتوگرافی و قرار دادن کاغذ در حلال مورد نظر اجزای موجود در عصاره را با توجه به رنگ آنها شناسایی می‌نماییم.

رنگیزه های فتوسنتزی

رنگیزه های فتوسنتزی به مولکول هایی اطلاق میشوند که توانایی جذب نور و تبدیل آن‌ها به انرژی شیمیایی را دارا باشند.این مولکول ها به سه گروه اصلی تقسیم می‌شوند:

- کلروفیل‌ها
- کارتنوئیدها
- فیکوبیلین‌ها

کلروفیل ها: تاکنون 10 نوع کلروفیل شناسایی شده است که مهم‌ترین آنها کلروفیل a ، کلروفیل b ، کلروفیل c ، کلوفیل d و باکتریوفیل می‌باشد.تمامی این مولکول‌ها از دو قسمت آبدوست و آبگریز تشکیل شده‌اند .

کلروفیل c فاقد این بخش است. این نوع مولکول‌ها در حلال‌های غیرآلی مانند آب به‌راحتی حل نمی‌شوند و برای حل کردن آن‌ها بایستی از حلال آلی استفاده نمود.حلال‌هایی مانند الکل های اتانول و متانول، استون، تتراکلرور کربن مناسب هستند.

کارتنوئیدها: مولکول هایی به‌رنگ زرد، قرمز، قهوه ای، بنفش، نارنجی می‌باشند و در دوگروه کاروتن ها و گزانتوفیل‌ها طبقه بندی می‌گردند.

کاروتن: نوعی ترپنوئید و یک لیپید می‌باشد. این مولکول غیراشباع است و با توجه به محل قرارگیری پیوندهای دوگانه، به انواعα کاروتن،β کاروتن وγ کاروتن تقسیم می‌گردد. برای جداکردن آن از بافت گیاهی باید از حلال اترنفت، الکل، استون استفاده نمود.

گزانتوفیل: مولکول آن نوعی ترپنوئید و در واقع لیپید می‌باشد. برای جداکردن آن از بافت گیاهی بایستی از حلال آلی مانند اترنفت، الکل، استون استفاده نمود .لیکوپن، رنگیزه قرمزرنگ گوجه فرنگی ازاین گروه است.

فیکوبیلین: این به بخش های پروتئینی غشای تلاکوئید اتصال دارد .در این گروه دو نوع رنگیزه اصلی شناسایی شده است: فیکوسیانین به رنگ آبی بوده و جلبک‌هایی نظیر اسپیرولینا وجود دارد و فیکواریترین که به‌رنگ قرمز بوده و در جلبک‌های قرمز دیده می‌شود.

جداسازی رنگیزه های گیاهی

یکی از روش های جداسازی رنگیزه های گیاهی استفاده از تکنیک کروماتوگرافی کاغذی می‌باشد.اجزای موجود در عصاره در فاز متحرک حل شده و همراه حلال در طول کاغذ حرکت کرد برحسب وزن مولکولی و میزان حلالیت در حلال کروماتوگرافی در مناطقی از کاغذ برجای می‌مانند.

مواد مورد نیاز آزمایش

برگ اسفناج، هاون چینی، استون خالص ،حلال کروماتوگرافی(استون و اتر)، لوله هماتوکریت یا پیپت پاستور، ،کاغذ کروماتوگرافی، فالکون،خط کش، مداد، بشر

مراحل آزمایش

دو عدد برگ اسفناج بالغ (حاوی رنگیزه بیشتر)را انتخاب نموده دمبرگ آن‌ها را جدا کرده و سپس آن‌ها را به صورت قطعه قطعه در هاون چینی میساییم. پس از ساییده شدن برگ‌ها برروی آن 5 سی‌سی استون خالص به‌عنوان حلال میریزیم.در پایان بایستی ترکیب را از صافی عبور داده تا اجزای برگ از رنگیزه ها جدا شود . محلول سبزرنگی در حدود 5 میلی لیتر در بشر باقی بماند .این محلول بایستی بر روی کاغذ کروماتوگرافی انتقال یابد. کاغذ کروماتوگرافی را به ابعاد ۲ * ۱۰سانتی متر برش زده و سپس از لبه کاغذ 2 سانتی متر رها کرده و با مداد خط مبدا را به‌صورت بسیار کم‌رنگ رسم می‌کنیم .این خط بایستی از پایین کاغذ دو سانتی متر فاصله داشته باشد. به کمک لوله موئینه (لوله هماتوکریت) حجمی از عصاره را به قطر نیم سانتی متر را برداشته

و برروی خط مبدا انتقال می‌دهیم (به‌نحوی که قطه داخل حلال فرو نرود) پس از خشک شدن، کاغذ را به تانک کروماتوگرافی (فالکون) که درون آن 5 سی‌سی استون خالص به‌همراه 4 سی‌سی اتر ریخته ایم قرار می-دهیم(توصیه می‌شود زیرهود انجام گیرد و ماسک زده شود چون اتر و استون فرار بوده و اتر خاصیت بیهوش کنندگی دارد)در فالکون را پوشانده و مدت 20 دقیقه زمان می‌دهیم. پس از مشخص شدن طیف رنگیزههای مورد نظر برروی کاغذ آن را از تانک خارج کرده و خشک نموده و نتایج را بررسی می‌کنیم.

سوالات

سوال۱: اساس مهاجرت افتراقی یا اصطلاحا (Defferential Migration) چیست؟

جواب : تعریف نیروی مقاوم انتخابی (Selection Resistive Force) : عبارتست از تمایل حل شدن گونه در فازثابت که باعث عقب ماندن آن از مهاجرت شده، همچنین باعث جدا سازی قابل ملاحظه گونه‌های شیمیایی می‌گردد. اگرمخلوط از گونه‌های شیمیایی روی یک محیط مهاجرت درنقطه‌ای قرارداده شوند ،نیروی جلوبرنده تمایل دارد که مخلوط را به مکانی دور تر از نقطه شروع حرکت دهد .از طرفی نیروی مقاوم انتخابی تمایل به عقب نگه داشتن گونه ها دارد .نیروی مقاوم از این نظر انتخابی است که حرکت هریک از گونه هارا با میزانی متفاوت آهسته‌تر می کند. این اختلاف در سرعت حرکت در جهت دور شدن از مبداء،اساس اصطلاح (Defferential Migration) است.

سوال۲: درجه حرارت چه تأثیری بر Rf دارد ؟ چرا ؟

جواب : دما حرکت اجزا را سریع می کند. زیرا انرژی جنبشی اجزا را افزایش می دهد. انتظار می رود افزایش دما Rf را افزایش دهد.

سوال۳: روش مرسوم کروماتوگرافی در آزمایشگاه‌های تشخیص طبی کدام است؟

جواب : کروماتوگرافی لایه نازک (TLC)

سوال ٤ : کدام حلال‌ها برای جدا سازی رنگیزه‌های محلول در چربی و محلول در آب استفاده می‌شود؟

جواب : رنگیزه های محلول در چربی را می‌توان به سهولت توسط حلال های غیر قطبی مانند هگزان، اتر و بنزین از بافت های گیاهی استخراج نمود.

سوال ۵ : خطای ایجاد شده در هنگام کروماتوگرافی و عدم حرکت ترکیب مورد نظر در فاز متحرک بر روی فاز ثابت چیست؟

جواب : قطره گذاشته شده زیر خط مبدا گذاشته شود و این مسئله موجب حل شدن ترکیب موردنظر در حلال کروماتوگرافی می‌گردد.

سوال ٦ : ویژگی های هر کدام از رنگیزه های شناسایی شده را بنویسید؟

جواب : کلروفیل ها: یکی از چند رنگدانه سبزی است که در مزوزوم‌های موجود در سیانوباکترها، جلبک‌ها و سلول‌های گیاهی فتوسنتز کننده وجود دارد. کلمه کلروفیل، از ریشه یونانی «khloros» به معنای رنگ سبز گرفته شده است.کلروفیل، برای انجام انواع فتوسنتز و تولید انرژی ضروری است چون به گیاهان امکان می‌دهد که نور را به دام بیندازند و انرژی را از آن جذب کنند.کلروفیل‌ها قادرند که درصد بالایی از نور را در قسمت آبی طیف الکترومغناطیسی و همچنین در قسمت قرمز جذب کنند. برعکس، جذب کننده ضعیفِ قسمت‌های سبز و نزدیک به سبز طیف نوری هستند و با انعکاس آن باعث تولید رنگ سبز در بافت‌های حاوی خود می‌شوند.

کارتنوئیدها: کاروتنوئیدها، متابولیتهای ثانویه چربیدوست بوده و دومین رنگدانه فراوان در طبیعت می‌باشد. این ترکیبات در اکثر اندام‌ها و بافت‌های گیاهی دیده می‌شوند. کاروتنوئیدها رنگدانه‌های قرمز، نارنجی و زرد محلول در چربی‌اند که در غشای کلروپلاست‌ها وکروموپلاست‌ها قرار گرفته‌اند و در اواخر مراحل تکامل گیاهان، این رنگدانه‌ها منجر به رنگ‌های روشن بسیاری از میوه‌ها و گل‌ها و ریشه هویج می‌شوند. این ترکیبات برای سیستم فتوسنتزی ضروری بوده و نقش اساسی در ممانعت از آسیب ناشی از اکسیداسیون نوری بازی می-کنند.اهمیت کاروتنوئیدها دررشد و تکامل گیاهان ثابت شده زیرا حداقل دو هورمون نوری آبسزیک اسید و استریگولاکتون‌ها از پیش مادههای کاروتن بدست می‌آیند.

فیکوبیلین ها:فیکوبیلین‌ها به عنوان رنگدانه‌های کمکی جذب کننده نور در جلبک قرمز و سیانوباکترها یا به عنوان سیستم تنظیمی حیاتی در گیاهان سبز انجام وظیفه می کنند. پیشوند "فیکو" نشان می‌دهد که این رنگدانه منشا گیاهی دارد. چهار نوع فیکوبیلین شناسایی شده است. سه نوع از این فیکوبیلین‌ها (فیکواریترین، فیکوسیانین و آلوفیکوسیانین) در فتوسنتز نقش دارد و نوع چهارم که فیتوکروموبیلین است، یک گیرنده نوری است که جنبه‌های مختلف رشد و نمو گیاه را تنظیم می‌کند.

شناسایی اسیدآمینه مجهول از طریق کروماتوگرافی کاغذی - تعیین RF و مشخص نمودن نوع اسیدآمینه

اسید آمینه‌ها تمامی پروتئین‌ها شامل پروتئین‌های موجود در قدیمی ترین رده‌های باکتریایی تا پیچیده ترین اشکال حیات، از ۲۰ اسیدآمینه یکسان ساخته شده‌اند. از آنجایی‌که هرکدام از این اسیدآمینه‌ها دارای زنجیر جانبی با خصوصیات شیمیایی متفاوت می‌باشند، این گروه ۲۰ مولکولی پیش ساز را می‌توان به‌عنوان الفبای زبانی دانست که ساختمان پروتئین با آن نوشته می‌شود. چیزی که بیشتر قابل ملاحظه می‌باشد این است که سلول‌ها می‌توانند با اتصال همین ۲۰ اسید آمینه با ترکیبات و توالی‌های بسیار متنوع، پروتئین‌هایی را تولید نمایند که ویژگی‌ها و فعالیت‌های فوق العاده متنوعی دارند. موجودات مختلف با استفاده از این بلوک‌های ساختمانی محصولات بسیار متفاوتی نظیر آنزیم ها، هورمون‌ها، آنتی بادی‌ها، انتقال دهنده‌های عصبی، عضله، پروتئین عدسی چشم، پر، تارعنکبوت، شاخ کرگدن، پروتئین‌های شیر، آنتی بیوتیک‌ها،سموم قارچی و... را ایجاد نمایند.

روش‌های تشخیص افتراقی اسیدهای آمینه:

روش‌های شیمیایی: برخی برای شناسایی انواع اسید آمینه‌ها و برخی به‌صورت اختصاصی برای شناسایی اسیدآمینه خاص مورد استفاده قرار می‌گیرد.

روش‌های فیزیکی :

الف) کروماتوگرافی

ب) الکتروفورز

واکنش نین هیدرین (Ninhydrin) برای شناسایی کلیه اسید آمینه‌ها

اساس: نین هیدرین باعث دآمینه ودکربوکسیله شدن اسیدآمینه شده و درانتها کمپلکس رومان (Rhoman) تشکیل می‌شود.

شناسایی اسیدآمینه‌های مجهول یک محلول با استفاده ازکروماتوگرافی کاغذی

همانطور که می‌دانید در کروماتوگرافی کاغذی دو فاز ثابت(جامد یا مایع) و متحرک (مایع یا گاز) موجود است که برای جداسازی مخلوطی از مواد با خاصیت های متفاوت (جرمی ، رنگی ، ساختاری و...) به‌کار می‌رود. همانطور که قبلا نیز اشاره شده است انواع کروماتوگرافی‌ها بر مبنای همین اصل کار می‌کنند.در کروماتوگرافی کاغذی فاز ثابت را کاغذی جاذب (کاغذ کروماتوگرافی یا کاغذ صافی) و فاز متحرک را حلال و یا مخلوط مناسبی از حلال‌ها تشکیل می‌دهند.

تصور کنید که مخلوطی از اسیدآمینه‌ها در اختیار دارید و می‌خواهید بدانید دقیقا چه نوع اسیدآمینه‌هایی در این مخلوط وجود دارد.برای راحتی توضیحات در اینجا فرض می‌کنیم که از قبل می دانیم در این مخلوط فقط می-توانیم ٤ نوع اسیدآمینه خاص داشته باشیم. قطره ای از مخلوط مجهول و هر کدام از ٤ اسیدآمینه که احتمال حضورشان در مخلوط است را رو ی خط نشانه می ریزیم ، درحلال مناسب قرار داده و تا بالا رفتن کامل حلال از کاغذ صبر می کنیم . در این شکل مخلوط مجهول را با M و اسیدآمینه‌ها را با شماره‌های ١ تا ٤ علامت گذاری کردیم. Rf نمونه مجهول با هر کدام از نمونه اسید آمینه‌ها برابر شد اسید آمینه مجهول همان اسید آمینه با Rf برابر می باشد.

محاسبه RF :

RF= فاصله حرکت حلال از مبدا / فاصله حرکت اسید آمینه از مبدا

اگر ماده ی مورد آزمایش بی رنگ بود چه کنیم ؟

در بیشتر مواقع بهترین کار این است که ماده‌ای را وارد واکنش‌هایی بکنیم که مواد رنگی تولید می‌کنند. مثالی که در این مورد کمک می کند کروماتوگرافی اسیدآمینه‌ها است. بعد از اتمام عمل کروماتوگرافی و خشک شدن کاغذ، آن را با محلول استون و نین هیدرین اسپری می‌نماییم. نین هیدرین با اسیدآمینه‌ها وارد واکنش شده و باعث ایجاد لکه‌های رنگی (اغلب قهوه ای یا بنفش) می‌شود.

روش کار

مواد و وسایل مورد نیاز : کاغذ صافی ، اسیدآمینه مجهول + اسیدآمینه‌هایی با غلظت ۲ ٪ (حل کردن ۰,۲ گرم در ۱۰ سی‌سی آب) ، پارافیلم ، بشر ، حلال (۱۲سی‌سی بوتانول + ۳ سی‌سی استیک اسید + ۵سی‌سی آب) ، معرف رنگ آمیزی (نین هیدرین۰,۲ درصد + ۱۰۰ سی سی استون)

اسید آمینه‌های مورد استفاده : تیروزین،آرژنین،تریپتوفان،سیستئین،گلایسین

برای انجام کروماتوگرافی یک کاغذ صافی به شکل مستطیل با ابعاد ۲۲ * ۱۱ احتیاج داریم. ۲ سانتی‌متر از قسمت پایین کاغذ بالا رفته با مداد یک خط کمرنگ می‌کشیم. از کنارها هم نیم سانتی متر فاصله قرار داده و اسیدآمینه‌های حل شده در آب را به صورت نقطه نقطه روی کاغذ صافی قرار می‌دهیم(فاز ثابت). قطر لکه گذاشته شده نباید از ۵ میلی‌متر بیشتر شود،زیرا اگر لکه بیش از این میزان باشد، فضای بیشتری را اشغال کرده و محاسبه Rf با مشکل مواجه می‌شود . ماده مجهول را نیز با قطر ۵ میلی‌متر روی کاغذ صافی قرار می دهیم .

دورن یک بشر مناسب حلال را ریخته و درب آن را با پارافیلم می‌پوشانیم. حلال که شامل (۱۲سی‌سی بوتانول + ۳ سی‌سی استیک اسید + ۵ سی‌سی آب) است را حتما زیر هود ترکیب می‌کنیم. کاغذ صافی را داخل بشر گذاشته و روی آن را پارافیلم قرارداده تا محیط داخل بشر از بخار حلال اشباع گردد . حلال روی کاغذ صافی تا محدوده خاصی بالا می‌آید(اجازه ندهید حلال تا انتهای کاغذ بالا برود). بعد از مدتی کاغذ را برداشته و داخل آون یا زیر هود قرار می دهیم تا خشک شود . بعد از خشک شدن، محلول رنگ‌زا را روی کاغذ کروماتوگرافی اسپری می‌کنیم و مجدد زیر هود قرار داده تا رنگ اسیدآمینه‌ها مشخص شود. این محلول رنگ‌زا ترکیب رنگ نین هیدرین ۰,۲ ٪ + استون است(حتما زیر هود ترکیب شود) که به اسیدآمینه‌ها رنگ بنفش و قهوه‌ای می‌دهد . مسافت طی شده توسط حلال را اندازه گیری کرده و در فرمول قرار داده و Rf هر کدام از اسیدآمینه‌ها را محاسبه می کنیم .بامقایسه میزانRF می‌توان نام اسیدآمینه مجهول را مشخص کرد.

شناسایی قند مجهول از طریق کروماتوگرافی کاغذی با اندازه گیری میزان RF

بیشتر قندها دارای فرمول $(CH_2O)_n$ هستند و به همین دلیل هیدرات کربن نامیده می شوند.از نظر اندازه، قندها به 3 دسته اصلی تقسیم می شوند: مونو ساکاریدها ، دی ساکاریدها ، پلی ساکاریدها (ساکارید از لغت یونانی Sakcharon به معنی قند گرفته شده است).

مونوساکاریدها

مونوساکاریدها یا قندهای ساده، پلی الکل‌هایی هستند که یکی از عوامل الکلی آن‌ها به عامل آلدهیدی یا کتونی تبدیل شده است.در مونوساکاریدها به جز عامل کربونیل(آلدهیدی یا کتونی) بقیه کربن‌ها به عامل OH متصل هستند.مونوساکاریدها 3 تا 7 کربنی هستند و در اثر هیدرولیز به قندهای ساده‌تر تبدیل نمی‌شوند. تمامی مونوساکاریدها (آلدهید= آلدوز و کتون=کتوز) دارای خاصیت احیا کنندگی هستند که این خصوصیت به دلیل گروه آلدهیدی و کتونی می‌باشد. مونوساکاریدها اگر دارای عامل آلدهیدی باشند، جزو گروه آلدوز و اگر دارای عامل کتونی باشند، جزو گروه کتوزها می شوند . نام‌گذاری گروه مونوساکاریدها به صورت زیر است:

آلدو/کتو + تعداد کربن+ اوز به عنوان مثال: کتوتریوز، آلدوتتروز، آلدوپنتوز

در بین مونوساکاریدها، پنتوزها و هگزوزها مهمتر هستند .مونوساکاریدها ترکیباتی جامد، کریستالی و بی رنگ هستند که به راحتی در آب حل می شوند، ولی در حلال های آلی نامحلول هستند. اکثر مونوساکاریدها شیرین می‌باشند.اسکلت مونوساکاریدها را زنجیره کربنی خطی و غیرمنشعب تشکیل می‌دهد.گلوکز و فروکتوز فراوان-ترین مونوساکاریدهای موجود در طبیعت هستند .ریبوز و دئوکسی ریبوز به دلیل شرکت در ساختمان DNA و RNAبسیار با اهمیت هستند.

دی ساکاریدها

دی ساکاریدها از دو مونوساکارید تشکیل شده که توسط یک پیوند-O گلیکوزیدی به یکدیگر متصل شده‌اند . دی ساکاریدها مانند مونوساکاریدها محلول در آب هستند و تجزیه آن‌ها به دو مونوساکارید توسط هیدرولیز با کمک نو عی آنزیم به نام دی ساکاریداز انجام می‌شود.

پلی ساکاریدها

پلی ساکاریدها اکثر کربوهیدرات های موجود در طبیعت هستند که از نظر نوع واحد مونوساکاریدی تکرار شونده، طول زنجیر، نوع پیوندهای گلیکوزیدی بین واحدها و میزان انشعاب از یکدیگر متفاوتند و به دو نوع همو پلی‌ساکاریدها (مانند نشاسته و گلیکوژن، سلولز و کیتین) و هترو پلی‌ساکاریدها (مانند پپتیدوگلیکان) تقسیم بندی می‌شوند.

آنیلین

مایعی روغنی شکل و بی‌رنگ است که به سرعت در مجاورت هوا قهوه‌ای رنگ می‌شود .بخارات این ماده سمی است و قابلیت اشتعال بالایی دارد .آنیلین ترکیبی آروماتیک و آمین دار با بوی ماهی فاسد شده است.

دی فنیل آمین

در واقع دی فنیل آمین، مشتقی از آنیلین به حساب می‌آید که از یک اتصال آمینی به دو گروه فنیل تشکیل شده است . این ترکیب یک جامد بی‌رنگ است ولی نمونه‌های تجاری اغلب اوقات به دلیل نا خالصی‌ها اکسیده شده و زرد رنگ هستند . این ماده به خوبی در بسیاری از حلال های آلی متداول حل شده و بسیار سمی است.

روش تهیه حلال

برای تهیه حلال باید ایزوپروپیل الکل، استیک اسید و آب مقطر را با نسبت ۱/۱/۳ مخلوط می‌کنیم.مثلا 300 میلی‌لیتر از ایزوپروپیل الکل + ۱۰۰میلی لیتر استیک اسید +۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر را در یک بشرریخته تا حلال آماده شود.

روش تهیه محلول رنگ آمیزی

برای تهیه محلول رنگ آمیزی، 1 میلی لیتر آنیلین + ۱ گرم دی فنیل آمین را در 100 میلی لیتر استون حل کنید. هنگام استفاده، 10 حجم از محلول فوق را با یک حجم از اسیدفسفریک 85 درصد مخلوط کنید. در این آزمایش از محلول های گزیلوز، فروکتوز، گلوکز ، مالتوز،گالاکتوز و یک نمونه مجهول استفاده می‌شود.

۱. یک تکه کاغذ صافی در ابعاد 22 * 11 سانتی متر را برداشته و از فاصله 2 سانتی متر از پایین صفحه خط بکشید . باید لکه گذاری را روی این خط انجام دهید و لکه‌ها نباید بزرگتر از 5 میلی‌متر باشند چون خود لکه‌ها بعداز گذاشتن در تانک حلال پراکنده می‌شوند و اگر لکه‌ها بزرگ و نزدیک به هم باشند باهم ترکیب خواهند شد.
۲. مقداری حلال را در یک بشر ریخته و دهانه بشر را با پارافیلم بپوشانید. چند دقیقه باید درب بشر حلال بسته باشد تا بشر با بخار حلال اشباع شود. این کار از تبخیر حلال روی کاغذ جلوگیری می‌کند.
۳. کاغذ کروماتوگرافی را روی یک سطح صاف گذاشته و با یک سرسمپلر لکه گذاری کنید(با فاصله و کوچک). لکه‌ها باید روی خط کشیده شده، باشد؛تا در اندازه گیری میزان Rf دچار مشکل نشوید . هنگام لکه گذاری دقت کنید که ترتیب لکه‌ها چگونه است و موقعیت هر لکه چیست مثلا لکه اول مربوط به گلوکز است.

٤. صبر کنید لکه ها خشک شوند. بعد از خشک شدن لکه‌ها دو سر کاغذ را به هم نزدیک کنید و با یک یا دو سوزن ته گرد کاغذ را به هم وصل کنید.
٥. کاغذ کروماتوگرافی که استوانه‌ای کرده اید را طوری در تانک حلال قرار دهید که نمونه ها پایین و به سمت حلال باشد و حلال با نمونه‌ها برخورد نکند.
٦. دهانه بشر را بسته و صبر کنید که کاغذ به حلال آغشته شود. این کار باید در ۱سانتی‌متری از سطح بالای کاغذ متوقف شود و کاغذ را از بشر خارج کنید.به محض اینکه کاغذ را از بشر خارج کرده پیشرفت حلال در کاغذ را با مداد خط بکشید.
٧. صبر کنید یک مقدار جزئی کاغذ خشک شود بعد با محلول رنگ آمیزی به میزان مناسب کاغذ را آغشته کنید.در بخش رنگ آمیزی باید دقت کنید که چه میزان باید از محلول رنگ استفاده شود.چون اگرمقدارمحلول رنگ آمیزی زیاد شود کاغذ را وقتی در آون قرار دهیم، می‌سوزد و نتیجه مطلوب نخواهد شد و اگر میزان آن کم باشد لکه ها ایجاد نشده و قابل مشاهده نیستند. هنگام انجام آزمایش متوجه خواهید شد که میزان مناسب چقدر است.
٨. کاغذ را در آون بگذارید(آون را قبلا در دمای 100 درجه تنظیم کرده و روشن کنید) تا لکه ها رنگ شوند.بعد از چند دقیقه (حدود 5 دقیقه) کاغذ را از آون خارج کرده و میزان پیشروی لکه‌ها بر روی کاغذ را با خط کش اندازه گیری نمایید و نمونه مجهول را با آن‌ها مقایسه کنید که با کدام‌یک از نمونه-های شاهد هم سطح است.

برای مشخص کردن قند مجهول بایدمیزان Rf نمونه‌ها را اندازه بگیرید.

برای مثال نتیجه گیری به اینصورت است ؛ چون ما میخواهیم مجهول را مشخص کنیم(از راست بخونید):

Rf فروکتوز= 3.8 ÷ 7 = 0.54 Rf گلوکز= 4 ÷ 7 = 0.57

Rf مالتوز= 2 ÷ 7 = 0.28 Rf گزیلوز= 4.7 ÷ 7 = 0.67

Rf مجهول= 4 ÷ 7 = 0.57

سوالات

سوال ۱ : در آزمایش کروماتوگرافی چرا از مداد برای تعیین نقطه مبدا استفاده می‌شود و نه از خودکار ؟

جواب : مداد یک ترکیب کربنی غیر آلی است و داخل حلال حل نمیشود اما جوهر یا مداد رنگی حاوی ترکیبات آلی ، قطبی و غیر قطبی است که ممکن است در حلال حل شوند و کروماتوگرامهایی مربوط به جوهر یا مداد رنگی ایجاد گردد.

سوال ۲ : نقایص کروماتوگرافی کاغذی را بنویسید 2 (مورد)

جواب : دنباله دار شدن لکه ها : اگر مقدار ذره مورد نظر به مقدار زیادی بر روی کاغذ کروماتوگرافی قرار داده شود و یا اینکه سرعت حرکت حلال متفاوت باشد، در این حالت ذره نمی تواند برای ایجاد یک لکه مجزا و تک به تعادل برسد. در نتیجه در سطح بزرگی از کاغذ کروماتوگرافی پخش می شود.

مشکلات مربوط به اثرات لبه یا کناره : اگر لکه ها خیلی نزدیک به کناره نوار قرار داده شوند، احتمال دارد در امتداد کنار کاغذ پخش شوند. در این صورت عمل نفوذ می تواند به سبب بالا بودن غلظت فاز متحرک در آن ناحیه و یا به دلیل بالاتر بودن سرعت تبخیر حلال در کنار کاغذ کروماتوگرافی، باعث ایجاد اختلال گردد.

سوال ۳ : نام (نام های) موارد زیر چیست؟

۱. دی ساکاریدها : double sugar / biose

۲. پلی ساکاریدها : گلیکان

۳. آنیلین : آمینو بنزن ؛ فنیل آمین

٤. ایزوپروپیل الکل : ایزوپروپانول/۲- پروپانول

سوال ٤ : در آزمایش کروماتوگرافی کاغذی چرا باید خط کمرنگ بالاتر از محلول متحرک باشد (توضیح دهید) ؟

جواب : حلال به طرف بالای صفحه میرود و اجزاء مخلوط را با سرعتهای متفاوت با خود میبرد.حلال باید قبل از رسیدن به لکه به طور یکنواخت به کاغذ برسد سپس هر لکه را با سرعت مناسب خود میبرد.

سوال ۵ : چرا بایستی درب تانک کروماتوگرافی قبل و بعد از گذاشتن کاغذ کرو ماتوگرافی بسته باشد؟

جواب : باید درب محفظه حتما بسته باشد تا درون بشر با بخار حلال اشباع شود چراکه این کار سبب جلوگیری از تبخیر حلال به هنگام بالا رفتن از ستون کاغذی در کروماتوگرافی کاغذی می‌شود.

سوال ٦ : میزان RF را برای هر کدام از قندها محاسبه نمایید و قند مجهول را شناسایی کنید

(قند مجهول: ۵ سانتی متر)

میزان حرکت حلال از خط مبدا: ۸ سانتی متر

میزان حرکت قندها از خط مبدا:

گلوکز: ۵/۵ مالتوز: ٤/۵ فروکتوز: ٦/۵ گالاکتوز: ۵

سوال ۷ : چرا باید لکه گذاشته شده بر روی کاغذ کروماتوگرافی کوچک باشد ؟

جواب : در صورت زیاد بودن غلظت لکه ها میزان مقاومت آن ها در برابر جابجایی توسط حلال افزایش می یابد در نتیجه فاصله طی شده توسط هر یک از لکه ها کمتر شده و تشخیص فاز مواد مختلف از هم سخت می‌شود .

سوال ۸ : چرا در کروماتوگرافی کاغذی از حلال های مختلف برای فاز متحرک استفاده می‌شود ؟

جواب : از حلال‌های متفاوت در کروماتوگرافی استفاده می‌شود تا بهترین حلال برای دست یابی به بهترین بازده به دست آید.

آشنایی با انواع استرول ها و نحوه ی شناسایی آن‌ها

استرول (sterol)

استرول ها زیر گروهی از استروئیدها هستند. آن‌ها به طور طبیعی در اکثر یوکاریوت‌ها، از جمله گیاهان، حیوانات، و قارچ ها وجود دارند و همچنین می‌توانند توسط برخی باکتری‌ها(هر چند به احتمال زیاد با عملکردهای متفاوت) تولید شوند. آشناترین نوع استرول حیوانی کلسترول است که برای ساختار غشای سلولی حیاتی است و به عنوان پیش‌ساز ویتامین‌های محلول در چربی و هورمون‌های استروئیدی عمل می‌کند. استرول‌های گیاهان را فیتواسترول و استرول‌های حیوانات را زئوسترول(zoosterols) می‌نامند. مهم‌ترین زئوسترول، کلسترول(Cholesterol) است. فیتواسترول‌های قابل توجه عبارتند از کامپسترول(campesterol)، سیتوسترول(sitosterol) و استیگماسترول(stigmasterol). ارگوسترول(Ergosterol) یک استرول است که در غشای سلولی قارچ ها وجود دارد، جایی که نقشی مشابه کلسترول در سلول های حیوانی دارد.

کلسترول

کلسترول یک لیپید استروئیدی است که از چهار حلقه هیدروکربنی متصل ساخته شده است .کلسترول یک مولکول آمفی پاتیک است، با یک گروه سر قطبی(گروه هیدروکسیل در C-3) و بدنه هیدروکربنی‌های غیرقطبی(هسته استروئیدی و زنجیره جانبی هیدروکربنی در C-17) ، تقریبا به اندازه یک اسید چرب 16 کربنی در شکل توسعه یافته آن است.

استیگماسترول

استیگماسترول - یک استرول گیاهی (فیتوسترول) - یکی از فراوان‌ترین استرول‌های گیاهی است که نقش مهمی در حفظ ساختار و فیزیولوژی غشای سلولی دارد. استیگماسترول یک فیتواسترول غیراشباع است که در چربی-های گیاهی یا روغن‌های گیاهان متعددی وجود دارد.

ارگوسترول

ارگوسترول یک استرول است که در غشای سلولی قارچ‌ها و تک یاخته‌ها یافت می‌شود و بسیاری از عملکردهای مشابهی را انجام می‌دهد که کلسترول در سلول‌های حیوانی انجام می‌دهد .از آن‌جایی که بسیاری

از قارچ‌ها و تک یاخته‌ها نمی‌توانند بدون ارگوسترول زنده بمانند، آنزیم‌هایی که آن را سنتز می کنند به اهداف مهمی برای کشف دارو تبدیل شده‌اند .در تغذیه انسان، ارگوسترول فرم پرویتامین ویتامین D2 (Ergocalciferol) است.

تست سالکوفسکی

تست سالکوفسکی (Salkowski) ، یک آزمایش شیمیایی کیفی است که در شیمی و بیوشیمی برای تشخیص وجود کلسترول و سایر استرول ها استفاده می شود. این روش بیوشیمیایی نام خود را پس از بیوشیمیدان آلمانی ارنست لئوپولد سالکوفسکی گرفته است. این تست برای تشخیص کلسترول در محلول استفاده می‌شود که می-توان از این روش برای شناسایی تمام استرول ها نیز استفاده کرد.

روش انجام آزمایش

3 لوله آزمایش جداگانه برداشته در لوله اول،مقدار 5 میلی گرم کلسترول و در لوله دوم مقدار 5 تا 10 قطره عصاره قارچ (که از خرد کردن و ساییدن و قرار دادن روی شعله تهیه شده است) و در لوله سوم 4 تا 5 قطره روغن زیتون می‌ریزیم. سپس به هرکدام از لوله‌ها میزان 3 میلی لیتر کلروفرم اضافه کرده و کمی تکان داده تا مخلوط شوند. همچنین به آرامی میزان 2 میلی لیتر H_2SO_4 غلیظ را از کنار لوله ها قطره قطره ریخته و به آرامی تکان می‌دهیم . بعد از آن لوله های آزمایش را در یک مکان ثابت می‌گذاریم. در هریک از لوله‌ها محلول با سه فاز تشکیل می‌شود .یک فاز در بالا، یک حلقه قرمز تا زرشکی رنگ بسته به نوع استرول در وسط و یک فاز در پایین قرار می‌گیرد.

سوالات

سوال ۱ : ساختار شیمیایی استرول ها را رسم کنید.

سوال ۲ : نکته بسیار مهم در پاسخ گرفتن آزمایش سالکوفسکی را ذکر کنید چرا؟.

جواب : خشک بودن مواد و وسایل،زیرا در غیراین صورت واکنش دهیدراتاسیون در طول آزمایش رخ می دهد. چنانکه از معرف‌های دهیدراته کننده نیز در طول آزمایش استفاده می‌گردد.

سوال ۳ : تست سالکوفسکی علاوه بر استرول ها برای تشخیص کدام یک از ترکیبات استفاده می‌شود؟

جواب : تست سالکوفسکی همچنین می‌تواند برای تعیین وجود ایندول‌ها (حاوی تریپتوفان ، آلکالوئیدهای کریستالی که محصول تخریب پروتئین‌ها هستند) استفاده شود. در چنین مواردی یک نمونه با اسید نیتریک و محلول ۲٪ نیتریت پتاسیم تیمار شده که با وجود رنگ قرمز واکنش مثبت نشان داده می‌شود.

سوال ٤ : حلال در واکنش سالکوفسکی چیست؟ چرا از این حلال استفاده می‌کنیم؟

جواب : چون استرول ها از دسته لیپیدها بوده و دارای حلالیت بسیار کمی در آب هستند برای آن ها از حلال های آلی مانند کلروفرم ، اتر، بنزن و... که به خوبی در آن‌ها حل می‌شوند استفاده می‌گردد.

سوال ٥ : علت ایجاد حلقه قرمز استرول ها در تست سالکوفسکی چیست؟

جواب : هنگامی که استروئیدهایی که حاوی پیوندهای غیراشباع هستند در شرایط غیرآبی با اسیدهای قوی تیمارمی شوند،محصول برهمکنش آن‌ها خروجی های رنگی متمایز را بسته به شرایط آزمایش ایجاد می کنند، رنگ‌های حاصل تفاوت‌های معناداری را از یک ترکیب به ترکیب دیگر نشان می‌دهند.

بررسی خاصیت هیدرولیزکنندگی اسیدها بر روی نشاسته (هیدرولیز نشاسته و تبدیل شدن به قندهای ساده)

هیدرولیزکردن به‌وسیله آنزیم یا اسید انجام می‌شود. بعد از هیدرولیز به‌عنوان مثال ساکارز و تبدیل آن به فروکتوز و گلوکز، فروکتوز پایدار نیست و تبدیل به گلوکز می شود. این قابلیت تغییر قندها به یکدیگر را خاصیت موتاروتیشن گویند.

اندازه‌گیری قندهای هیدرولیز کننده از آن جهت مهم است که بررسی کنیم به طورمثال در موادی مانند عسل (حاوی ساکارز) یا گندم (حاوی نشاسته) درصد قندهای احیاکننده چه میزان است، چون اگر درصد قندهای احیا کننده را اندازه گیری نکنیم نمی‌توانیم بفهمیم با هیدرولیز، چه میزان از قندها هیدرولیز شده‌اند. بعد از هیدرولیز، دوباره قندهای احیاکننده اندازه گیری شده و مشخص می شود چه مقدار قندهای دیگردرساختار آن وجود داشته و هیدرولیز شده‌اند. در واقع با کسر کردن مقدار اولیه قندهای احیاکننده از مقدار آن بعد از هیدرولیز کردن، مقدار ساکارز موجود در عسل یا نشاسته در گندم به دست می‌آید. پس این اختلاف، مقدار قندی است که هیدرولیز شده که میزان آن در ۱۰۰ گرم، درصد ساکارز یا نشاسته را نشان می‌دهد.

تست ید

یکی از واکنش‌های کیفی برای شناسایی قندها است.

جهت شناسایی پلی ساکاریدها به‌کار می‌رود. در این تست پلی ساکاریدها باید به رنگ قهوه‌ای دیده شوند. مثلا آمیلوز به رنگ آبی، آمیلوپکتین و گلیکوژن به رنگ قهوه ای و نشاسته که مخلوطی از آمیلوز و آمیلوپکتین است بر حسب درصد اختلاف، آبی تا قهوه‌ای و اکثرا در محدوه بنفش قرار می‌گیرد.

تست بندیکت

این تست هم از تست های کیفی برای مشخص شدن نوع قندهاست.

آزمایش بندیکت تنها به مونو و دی ساکاریدهای کاهنده یا احیا کننده پاسخ مثبت می‌دهد. معمولاً از آزمایش بندیکت برای مشخص کردن حضور آلدهیدها و آلفاهیدروکسی کتون‌ها استفاده می‌گردد. سولفات مس موجود در محلول بندیکت با قندهای احیاگر وارد واکنش می‌شود. محلول بندیکت می‌تواند مورد استفاده قرار گیرد تا اگر قندی مثل گلوکز در ساختار نشاسته هست مشخص شود. معرف بندیکت متشکل از یون مس دو ظرفیتی (آبی رنگ) بوده که به یون مس یک ظرفیتی احیا می‌شود و به صورت اکسید مس (یک ظرفیتی) رسوب قرمز رنگ یا سبز یا زرد (متناسب با غلظت قند مورد آزمایش) بصورت نامحلول در آب ته‌نشین می‌شود.

روش انجام آزمایش

روش اول

پنج لوله آزمایش را برداشته و در هرکدام از آن ها ۱۰ میلی لیتر از محلول نشاسته ۱٪ خام می‌ریزیم. یکی از لوله‌ها را به‌عنوان لوله شاهد در نظر می‌گیریم و فقط در داخل آن محلول نشاسته می‌ریزیم. قبل از ریختن مواد در لوله‌ها دقت کنیم نشاسته در لوله‌ها ته نشین نشده باشد. در ٤ لوله ی دیگر در هر کدام ۲ میلی لیتر HCL 37% ریخته و به ترتیب لوله اول را ۱۵ دقیقه، لوله دوم را ۳۰ دقیقه، لوله سوم را ٤٥ دقیقه و لوله چهارم را ٦۰ دقیقه در بن ماری آب جوش قرار می‌دهیم. پس از بیرون آوردن هر کدام از لوله ها یک قطره لوگل به محلول واکنش اضافه کرده و نتایج را بررسی می‌کنیم.

این کار را با نشاسته پخته ۱٪ هم انجام داده و نتایج را بررسی می‌کنیم.

روش دوم

در یک بشر ۱۰ میلی لیتر نشاسته ۱٪ ریخته و به آن ۳ میلی لیتر اسید سولفوریک ۲۰٪ اضافه می‌کنیم. اسید سولفوریک در آزمایشگاه معمولا بصورت ۹۸٪ است که اگر به طور تقریبی آن را معادل ۱۰۰٪ در نظر بگیریم برای تهیه ۵ میلی لیتر اسید سولفوریک ۲۰٪ نیاز به ٤ میلی لیتر آب مقطر و ۱ میلی لیتر اسید سولفوریک ۱۰۰٪ داریم. محلول حاصل را ۱۰ دقیقه زیر هود حرارت داده سپس سرد می‌کنیم و برای خنثی کردن این محلول به آن ٦ میلی لیتر سود ۱۰٪ اضافه می‌نماییم. سپس محلول را دو قسمت کرده و روی یکی تست ید و روی دیگری تست بندیکت را انجام می‌دهیم.

تست ید: ۳ میلی لیتر از ترکیب + ۱ قطره لوگل (بنفش شده) سپس حرارت می‌دهیم تا بی‌رنگ شود. اگر مخلوط سرد شود مجددا به رنگ بنفش مشاهده می‌گردد.

تست بندیکت: دو برابر محلول مورد آزماش معرف بندیکت را اضافه می‌کنید.(قل قل کرده و حالت جوشیدن دارد). لوله‌ها را به مدت ۵ الی ۱۰ دقیقه در حمام آب جوش قرار دهید. هر لوله که رسوب رنگی تشکیل داد محتوی مونوساکارید کاهنده است.

سوالات

سوال ۱ : در آزمایش هیدرولیز اسیدی قندها استفاده از نشاسته خام را ترجیح می‌دهید یا پخته؟

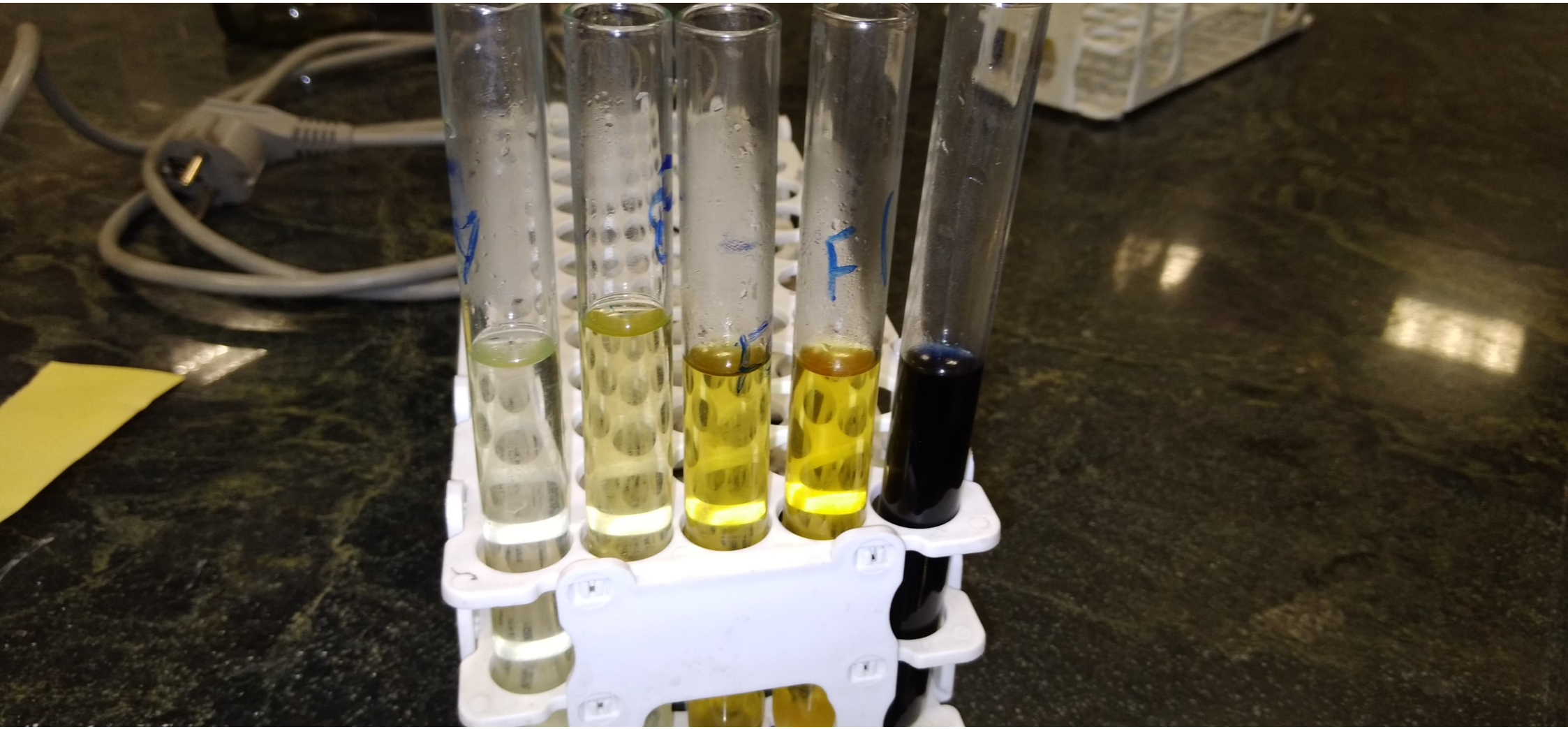
جواب : نشاسته پخته شده. چون همگن‌تر است و مانند نشاسته خام دائما ته نشین نمی‌شود و پاسخ دقیق‌تری خواهد داد

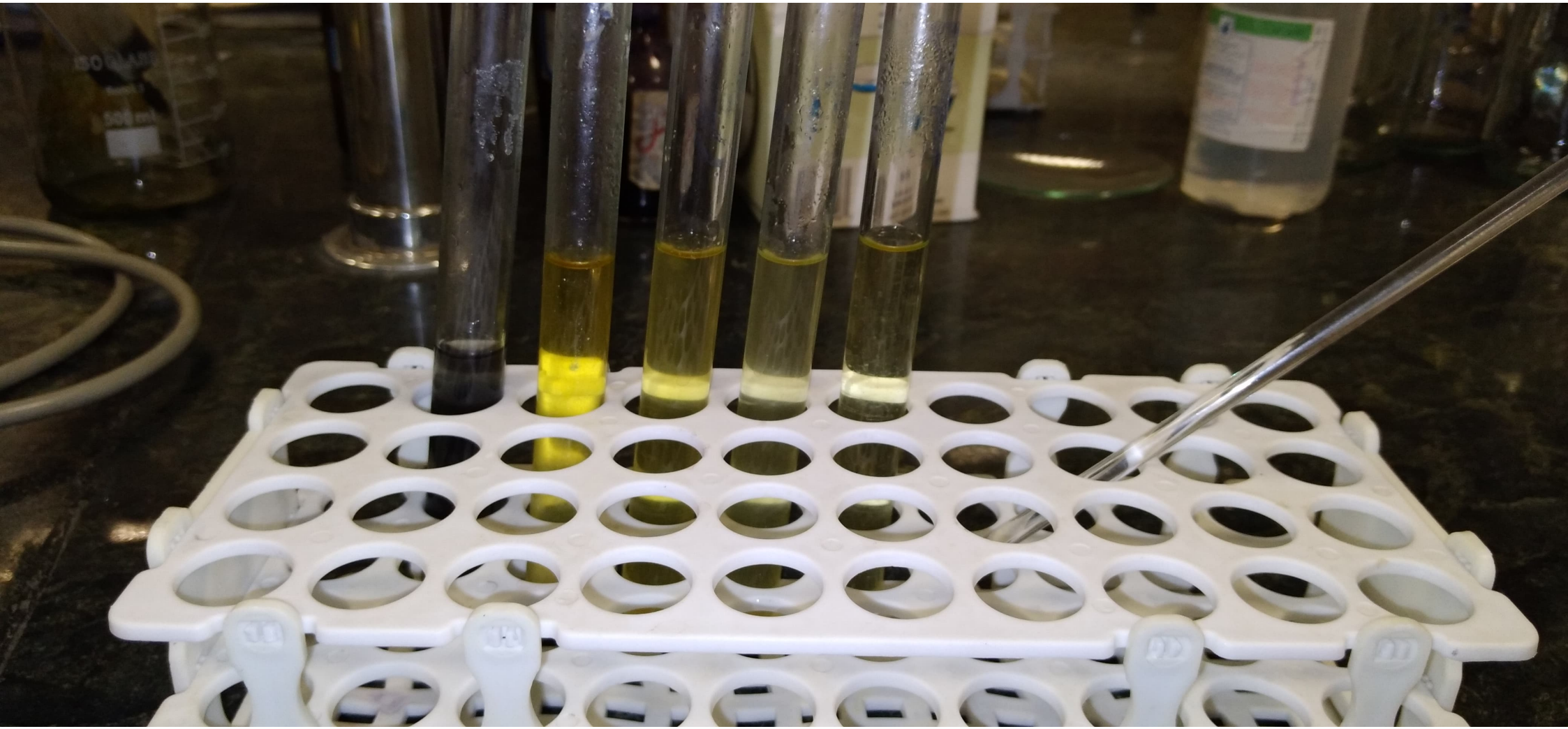
سوال ۲ : چرا رنگ اخرین لوله (۶۰ دقیقه در نشاسته خام و ۴۵ دقیقه در نشاسته پخته) قهوه ای رنگ است؟

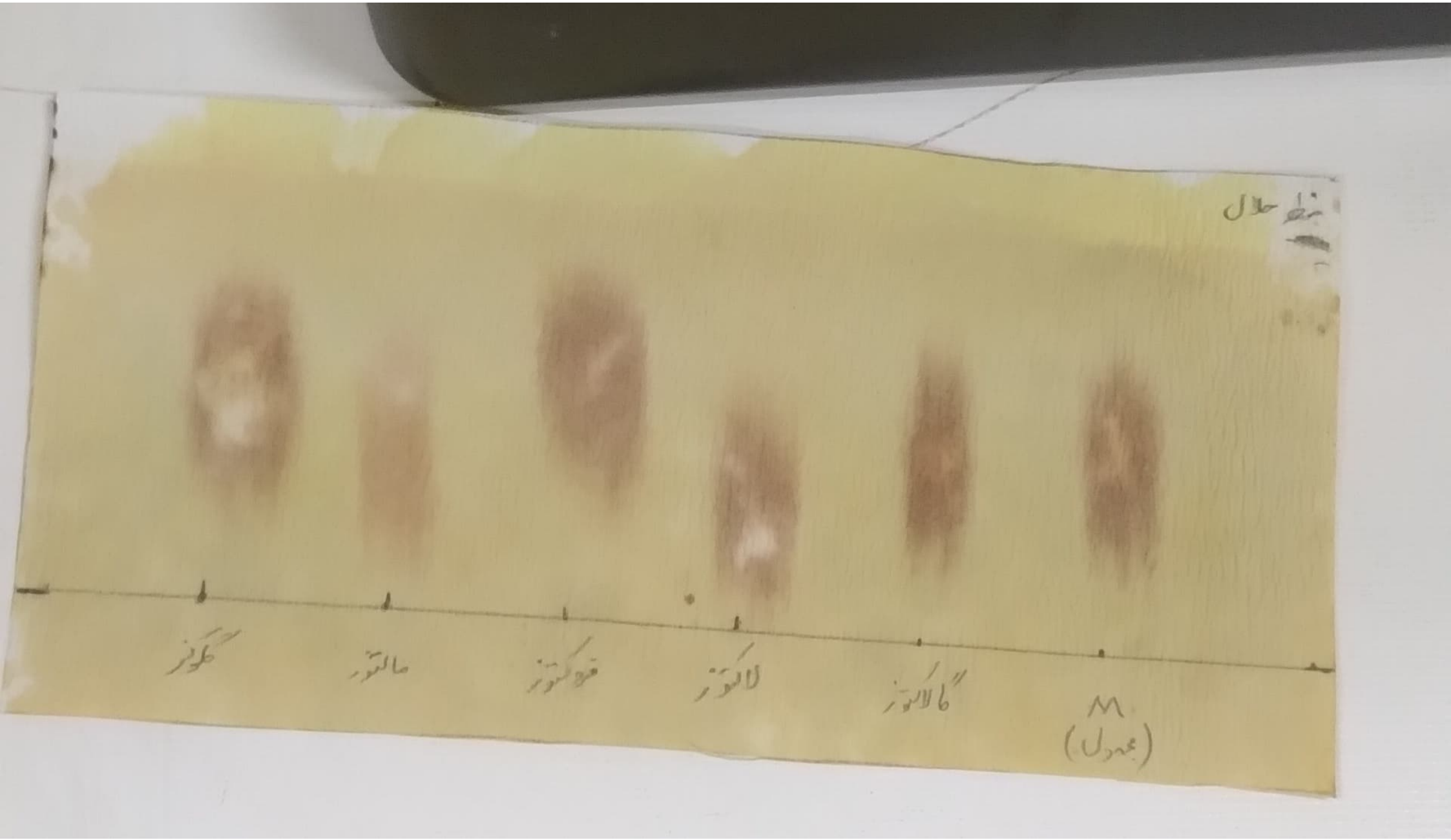
جواب : چون نشاسته به طور کامل هیدرولیز شده و تنها رنگ معرف لوگل (زرد تا قهوه ای) مشاهده می‌شود.

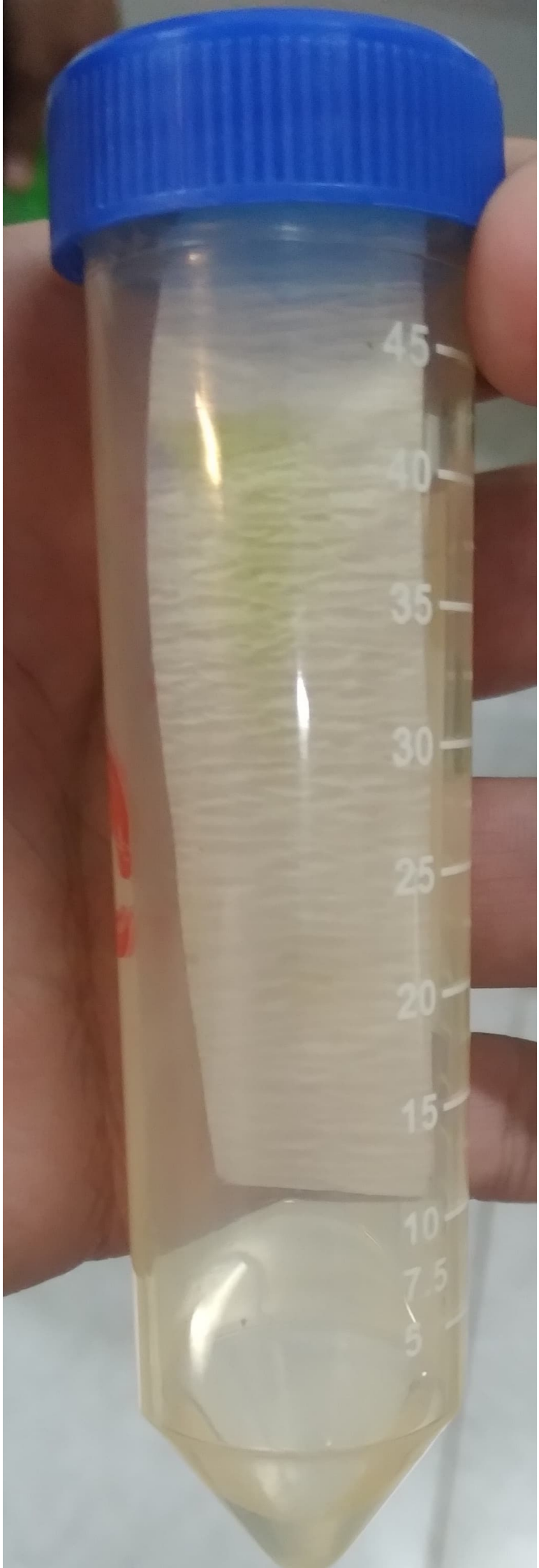
سوال ۳ : آزمایش بندیکت به چه قندهایی واکنش می‌دهد؟ معرف بندیکت از چه تشکیل شده است و واکنشی که در تست بندیکت انجام می‌شود را بنویسید.؟

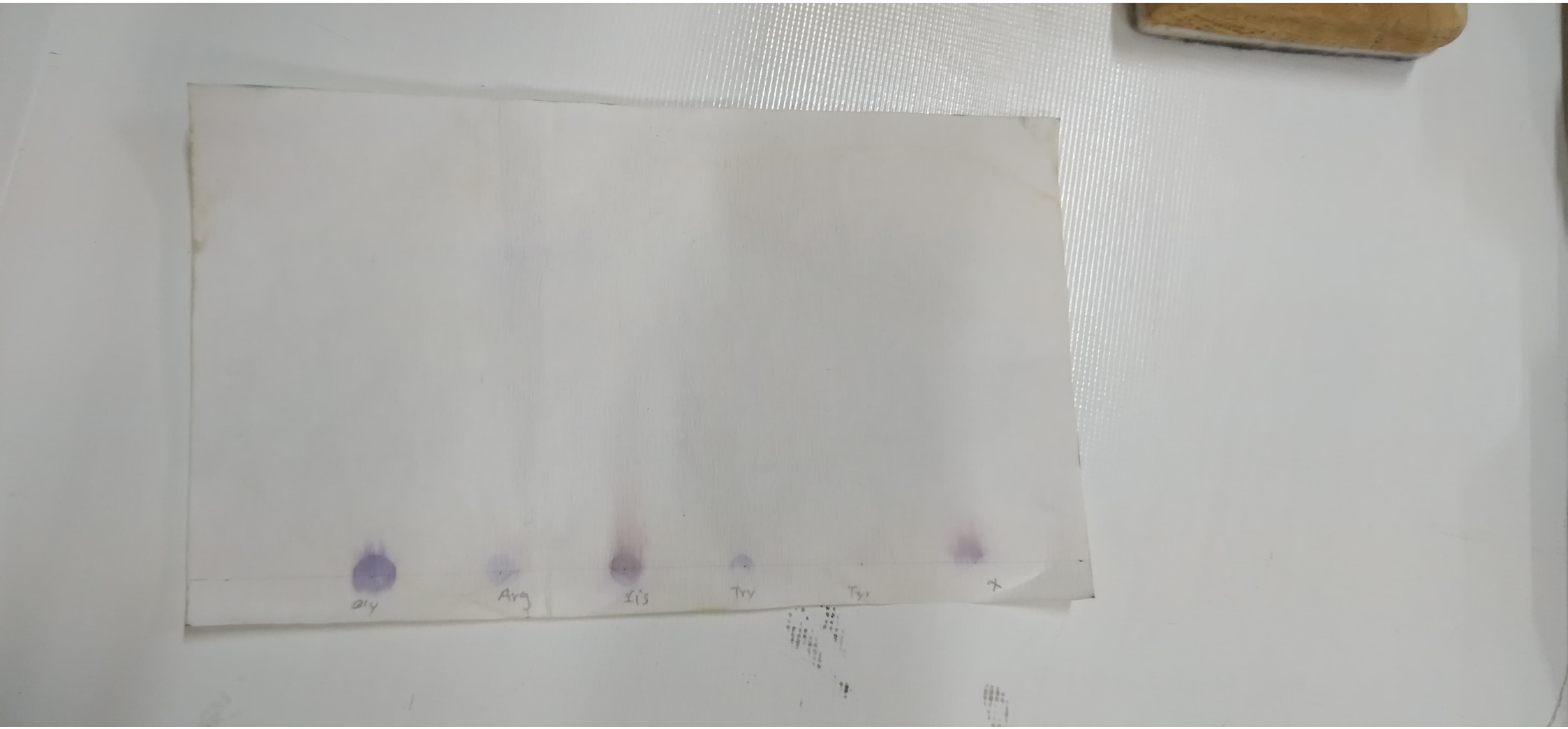
جواب : معرف بندیکت از سدیم کربنات، سدیم سیترات و مس (II) سولفات پنتاهیدرات تشکیل شده است. آزمایش بندیکت تنها به مونو و دی ساکاریدهای کاهنده یا احیا کننده پاسخ مثبت می‌دهد. معمولاً از آزمایش بندیکت برای مشخص کردن حضور آلدهیدها و آلفاهیدروکسی کتون‌ها استفاده می‌گردد. سولفات مس موجود در محلول بندیکت با قندهای احیاگر وارد واکنش می‌شود. محلول بندیکت می‌تواند مورد استفاده قرار گیرد تا اگر قندی مثل گلوکز در ساختار نشاسته هست مشخص شود. معرف بندیکت متشکل از یون مس دو ظرفیتی (آبی رنگ) بوده که به یون مس یک ظرفیتی احیا می‌شود و به صورت اکسید مس (یک ظرفیتی) رسوب قرمز رنگ یا سبز یا زرد (متناسب با غلظت قند مورد آزمایش) بصورت نامحلول در آب ته‌نشین می‌شود.

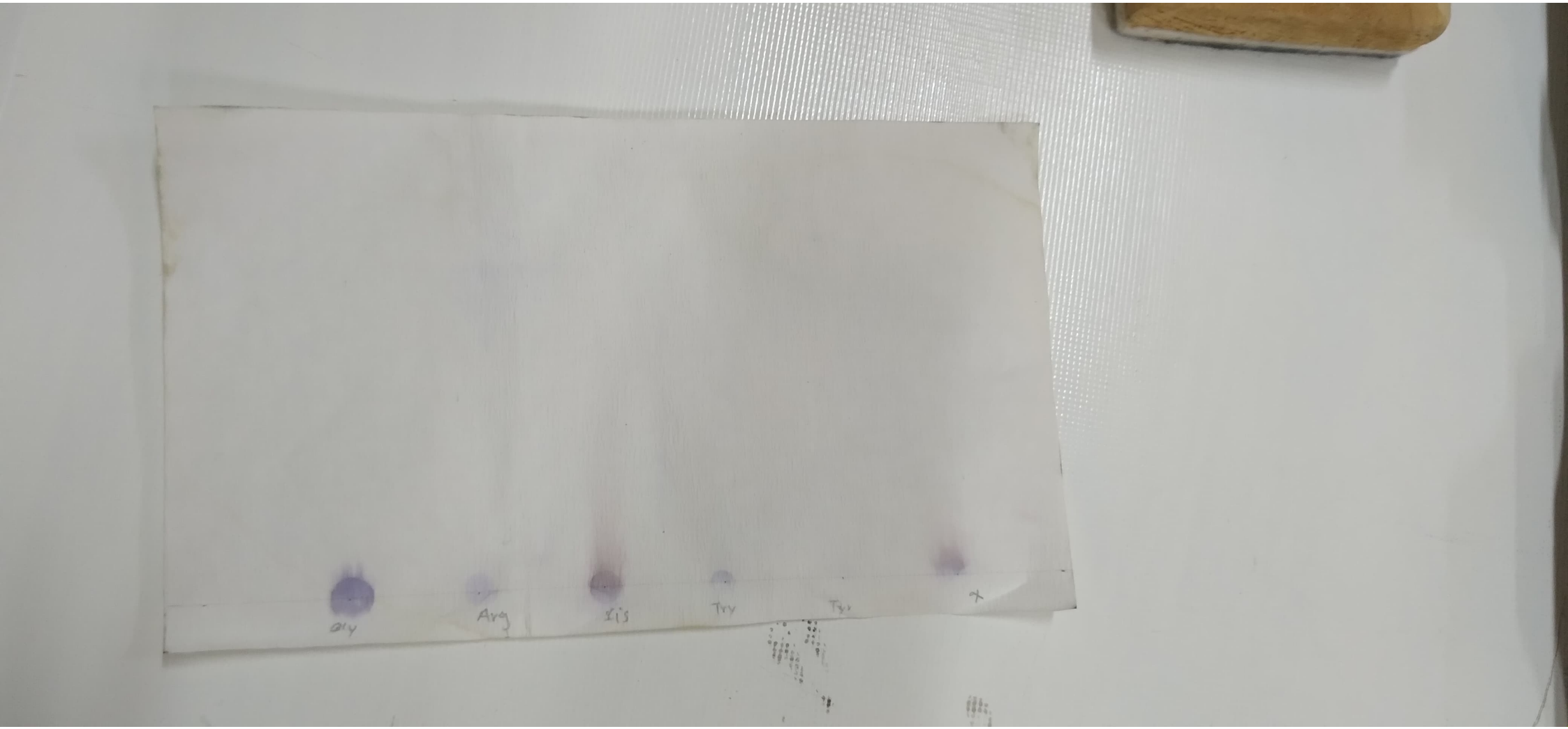





نقطہ حلال
گلوکوز
مالٹوز
فروکٹوز
لاکٹوز
گالاکٹوز
M
(مجہول)


45
40
35
30
25
20
15
10
7.5
5


Gly
Arg
His
Try
Tyr
X


Gly
Arg
His
Try
Tyr
X