کاوش ۱: مطالعه رنگیزه کلروپلاستی و تعیین طیف جذبی آنها

کلروپلاست گیاهان دارای دو نوع رنگیزه مهم است که می توانند انرژی مؤثر در فتوسنتز را جذب کنند. این رنگیزه‌ها عبارت اند از کلروفیل a و b و کاروتنوئیدهای قرمز، نارنجی و یا زرد. در این کاوش، استخراج رنگیزه‌های کلروفیل a و b و کاروتنوئیدها را به چند طریق بررسی و طیف جذبی آنها را تعیین می کنیم.

هدف های آموزشی: انتظار می‌رود که پس از مطالعه این کاوش و انجام فعالیت های عملی مربوط به آن بتوانید:

۱ -رنگیزه های مهم گروههای مختلف گیاهی را نام ببرید.

۲ -ساختار مولکولی رنگیزههای مهم گیاهی را توضیح دهید.

۳ -با انجام آزمایشهای مناسب، رنگیزه‌های مختلف کلروپلاست‌های موجود در برگ خشک شده را توسط حلال های آلی جدا کنید.

۴ -با انجام آزمایش‌های مناسب، مواد رنگی کلروپلاست را استخراج کنید و آنها را با روش کروماتوگرافی بر روی : ستون پودر شکر، ستون پودر سلولز، لایه نازک (سیلکاژل یا ژل سیلیس) و کاغذ، از یکدیگر جدا کنید.

۵ -ضمن انجام آزمایش‌های مربوط، حلالهای مناسب رنگیزههای مختلف را شناسایی کنید و طیف رنگیزه ها را توسط طیف – نورسنج (اسپکتروفتومتر) مشخص سازید.

مفاهیم نظری

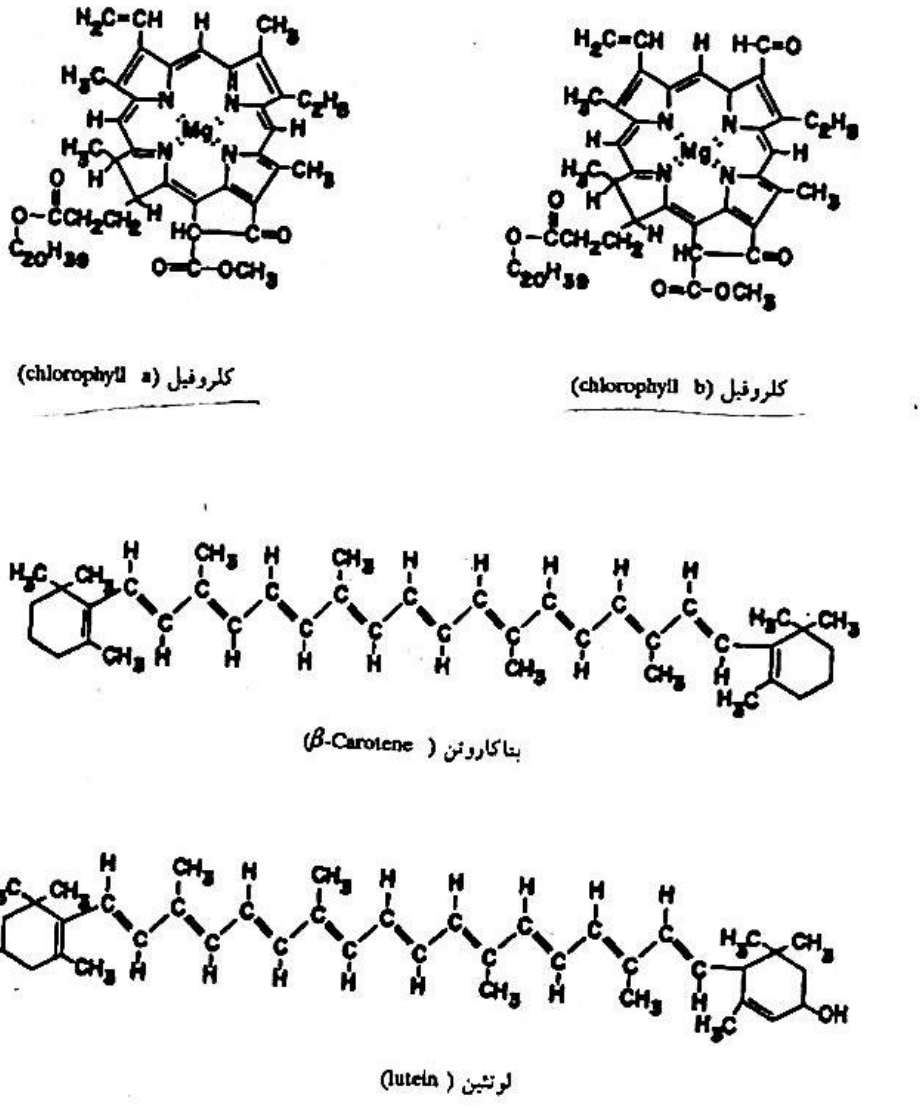
کلروپلاست‌های تمام گیاهان عالی دارای دو نوع رنگیزه مهم اند که می توانند انرژی نورانی مؤثر در فتوسنتز را جذب کنند. این رنگیزه ها شامل کلروفیلb ، a و کاروتنوئیدها هستند. کلروفیل a برای انجام فتوسنتز در تمام گیاهان عالی و جلبک‌ها ضروری است.
باکتری‌های فتوسنتزکننده فاقد کلروفیل a هستند ولی ماده مشابه‌ای به نام باکتریوکلروفیل[1] دارند. کلروفیل b نیز تقریباً در همه گیاهان سبز، به جز سیانوباکتری‌ها (جلبک‌های سبز – آبی) و جلبک‌های سرخ و قهوه ای، یافت می شود؛ جلبک های قهوه ای کلروفیل c و جلبک‌های سرخ کلروفیل d دارند. جلبک‌های قرمز و سبز آبی فیکوبیلین نیز دارند.

در ساختار شیمیایی همه کلروفیل ها چهار حلقه پیرول[2] وجود دارد که اتم منیزیم را در مرکز "کی لیت[3]" کرده اند (شکل ۱-۱). پنجمین حلقه ۵ کربنی و عامل ۲۰ کربنی فیتول[4] به یکی از حلقه های پیرول متصل اند.

فرمول خام کلروفیلa، $C_{55}H_{72}O_5N_4Mg$ و فرمول خام کلروفیل b، $C_{55}H_{70}O_6N_4Mg$ است. تنها تفاوت آنها در جایگزینی روی حلقه ۳ است که در کلروفیل a در این موقعیت عامل متیل CH_3 قرار دارد، در حالی که در کلروفیل b عامل آلدهیدی CHO قرار می‌گیرد. در بیشتر گیاهان عالی و جلبک‌های سبز، کلروفیل a، bبه نسبت ۲:۱ و یا ۳:۱ است.

[1] bacteriochloropyll
[2] tetrapyrolle
[3] . chelate
[4] Phytol

کاروتنوئیدها ترکیبات ۴۰ کربنی هستند و تعداد زیادی از انواع آنها شناخته شده است. کاروتن‌ها کربوهیدرات‌های خالص اند. به عنوان مثال، بتاکاروتن به فرمول خام $C_{40}H_{56}$ است. گزانتوفیل‌ها در انتهای حلقه ها دارای اکسیژن هستند و فرمول خام بسیاری از آنها $C_{40}H_{56}O_6$ است. کاروتنوئیدها نه تنها به رنگ‌های متفاوت قرمز، نارنجی و زرد وجود دارند، بلکه بعضی از آنها سبزند و حتی ممکن است صورتی و یا اندکی سیاه رنگ به نظر برسند. کاروتنوئیدها نه فقط در گیاهان بلکه در شاخه هایی از جانوران نیز دیده می شوند. در گیاهان عالی، کاروتنوئیدها محدود به کلروپلاست نیستند بلکه ممکن است در سایر پلاستیدها مانند کروموپلاست‌های میوه ها و قسمت‌هایی از گل نیز یافت شوند. کلروفیل‌ها و کاروتنوئیدها از یک سو با یکدیگر و از سوی دیگر با پروتئین و لیپید موجود در غشای گرانای کلروپلاست ارتباط نزدیک دارند. در حالی که قبلاً بر این باور بودند که رنگیزه‌های فتوسنتزی منحصراً در گرانا وجود دارند. مدارک جدید نشان دهنده این واقعیت اند که کلروفیل در استرومای لاملاً نیز وجود دارد. فرمول کلروفیل a و b و بتا-کاروتن به عنوان نماینده کاروتن، و لوتئین به عنوان نماینده گرانتوفیل در شکل ۱-۱ آمده است.



شکل ۱-۱ ـ ساختار شیمیایی (فرمول گسترده) چهار رنگیزهٔ کلروپلاستی.

برای جداسازی رنگیزه‌ها به منظور مطالعه آنها از روش‌های گوناگون از جمله کروماتوگرافی استفاده می‌شود که به صور گوناگون روی ستون، کاغذ و یا روی لایه های نازک و غیر صورت می‌گیرد. کروماتوگرافی لایه های نازک روش نسبتاً تازه ای مبتنی بر جذب و تفکیک کروماتوگرافی در حد میکرو است که روش‌های پیشین کروماتوگرافی ستونی، کاغذی، تبادل یونی و رسوبی را تکمیل می کند. در این روش، صفحه شیشه ای با لایه نازکی از جاذب پوشانده می شود. لایه نازک جاذب در واقع همان ستون آزاد است. نمونه را روی قسمت جاذب به عنوان محلول قرار می دهیم و آن را در ظرفی که حاوی مقدار کمی از حلال مناسب است می‌گذاریم. حلال، ضمن حرکت به سمت بالا، ماده قابل حل را از روی سطح لایه نازک می شوید و با خود به بالا می‌برد، فقط کافی است که مسافت کمی در حدود ۱۰ تا ۱۵ سانتیمتر حرکت کند.

روش کروماتوگرافی روی لایه نازک هر روزه در حال تکامل است و مرتباً کاربرد تازه ای پیدا می کند. مهمترین تکاملی که در این زمینه حاصل شده شامل موارد زیر است:

۱. تولید تجارتی جاذب‌های متنوع
۲. تولید تجارتی دستگاه‌ها برای تهیه لایه نازک جاذب روی شیشه.
۳. همراه کردن دستگاه‌های رادیوگرام باکروماتوگرافی روی لایه نازک

فعالیتهای عملی

آزمایش ۱ – استخراج شیمیایی رنگیزه های برگی

مواد و وسایل لازم:

اسغناج به صورت پودر خشک - استون - اتر نفت - الکل متیلیک - اتراتیلیک - پتاس الکلی – دکانتور (قیف جداکننده)–استوانه مدرج – بشر

یادآوری: چون این آزمایش به حلال‌های قابل اشتغال نیاز دارد، بنابراین باید از روشن کردن کبریت و آتش در آزمایشگاه مطلقاً خودداری شود.

روش کار در جریان این عملیات، با استفاده از قابلیت انحلال کلروفیل a، کلروفیل b، گزانتوفیل و کاروتن در حلال‌های مختلف، آنها را جدا می‌کنند.

۱– ۲,۵ گرم پودر برگ‌های خشک شده اسفناج (یا گزنه) را با ۴۰ میلی لیتر استون ۸۰٪ مخلوط کنید.

۲– وقتی استون به رنگ سبز تیره درآمد، آن را بر روی پنبه صاف کنید و محلول را برای استفاده در مراحل بعدی نگه دارید.

الف – نخستین جداسازی

۱– در یک دکانتور، ۵۰ میلی لیتر اتر نفت بریزید و به آن محلول رنگیزه های کلروفیلی استون را بیفزایید.

۲– آمپول دکانتور را با حرکات چرخش تکان دهید.

۳- ۷۰ میلی لیتر آب مقطر را از روی دیواره آمپول به آن اضافه کنید.

۴- دکانتور را با چند حرکت چرخشی تکان دهید.

۵ - لایه زیرین باید کمرنگ‌تر باشد، بگذارید دو لایه از هم جدا شوند. لایه زیرین را که حاوی استون - آب است، دور بریزید.

۶- محلول اتر نفت را با ۵۰ میلی لیتر آب مقطر بشویید. آب را دور بریزید. بار دیگر این کار را تکرار کنید.

۷- به محلول شسته شده اتر نفت، ۵۰ میلی لیتر الکل متیلیک ۹۲٪ اضافه کنید. دکانتور را با چند حرکت چرخشی تکان دهید (از تنفس بخارات سمی الکل متیلیک احتراز کنید).

۸- بگذارید جداسازی صورت گیرد.

۹- محلول زیرین حاوی الکل متیلیک را در یک بشر و محلول بالایی اتر نفت را در بشر دیگر جمع کنید. کلروفیل a و کاروتن، در محلول اتر نفت؛ و گزانتوفیل و کلروفیل b در محلول الکل متیلیک وجود دارند.

ب - دومین جداسازی

۱- ۵۰ میلی لیتر محلول الکل متیلیک محتوی کلروفیل b و گزانتوفیل را در دکانتور بریزید.

۲- ۵۰ میلی لیتر اتر اتیلیک به آن اضافه کنید (در پوش شیشه حاوی اتر را بلافاصله پس از مصرف بر دهانه آن بگذارید).

۳- با حرکات چرخشی آن را مخلوط کنید.

۴- جداسازی صورت نمی‌گیرد، ۵ میلی لیتر آب مقطر از طول دیواره دکانتور به محلول اضافه کنید. پس از هر بار افزودن آب، آن را تکان دهید. برای ظاهر شدن دو لایه، تقریباً ۲۵ میلی لیتر آب لازم است.

۵- محلول زیرین الکل متیلیک را دور بریزید، بنابراین دو محلول باقی می‌ماند: یکی محلول اتر نفت حاوی کلروفیل a و کاروتن که قبلاً در بشر ریخته شده است، و دیگری محلول اتر اتیلیک که حاوی کلروفیل b و گزانتوفیل که در دکانتور باقی مانده است.

ج -آخرین جداسازی

I – محلول اتراتیلیک

۱- در یک استوانه مدرج ۲۵۰ میلی لیتری، ۳۰ میلی لیتر محلول اتر اتیلیک بریزید.

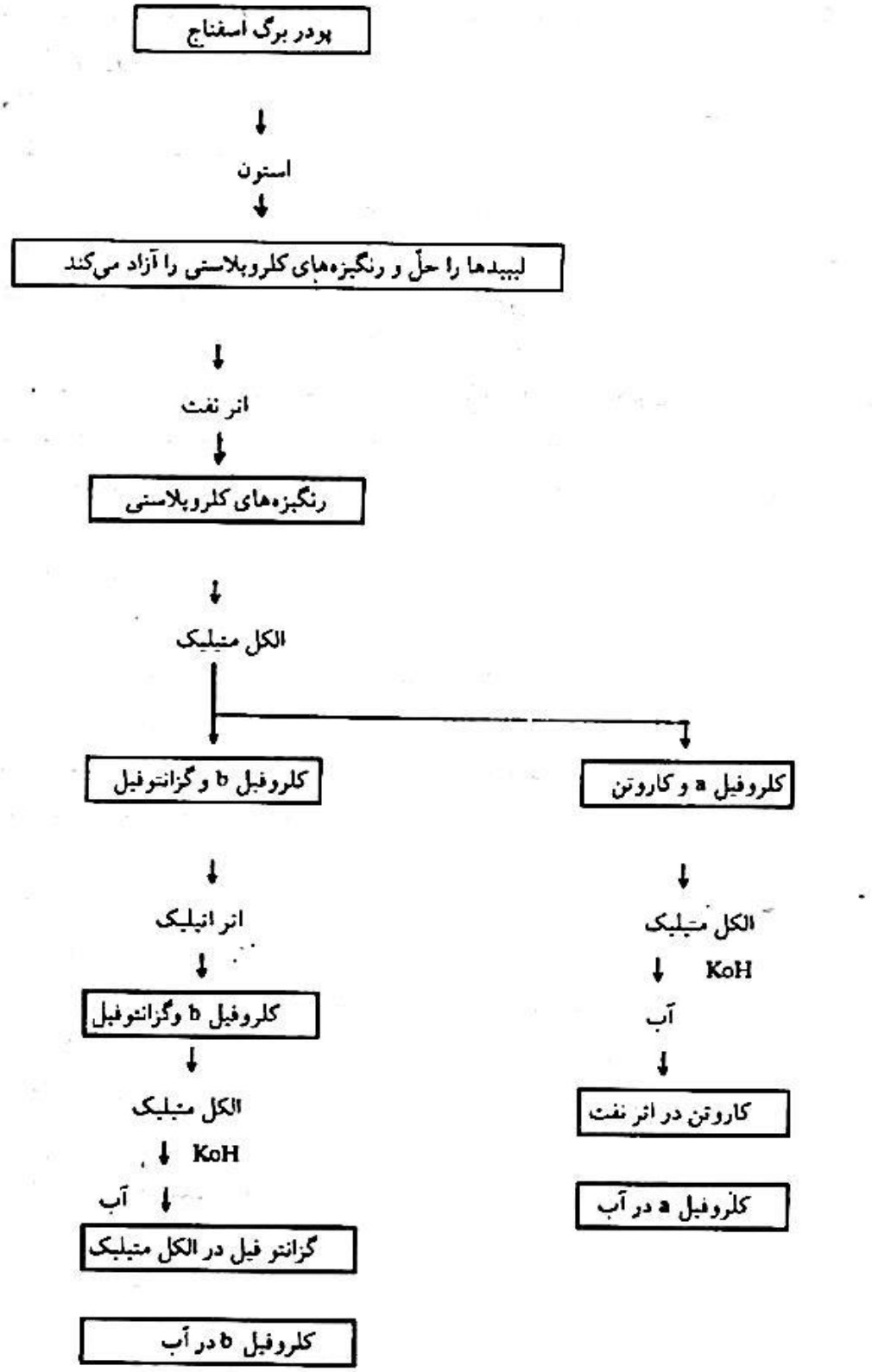
۲- به کمک استوانه مدرج دیگر ، ۱۰ میلی لیتر محلول پتاس الکلی تازه تهیه شده را از کناره ظرف در محلول اتر اتیلیک بریزید.

۳- آن را تکان دهید و پس از ده دقیقه به آن توجه کنید. تغییر رنگی را که ایجاد می شود، یادداشت کنید.

۴- سپس ۳۰ میلی لیتر آب مقطر اضافه کنید و تکان دهید. دو لایه جدا می شوند. کلروفیل b در آب و گزانتوفیل در الکل اتیلیک وجود دارد.

II محلول اتر نفت

عمل را به همان طریق فوق برای محلول اتر نفت با همان حجم‌ها انجام دهید. در اینجا نیز دو لایه ظاهر می دارد که در لایه آب، کلروفیل a در لایه اتر نفت، کاروتن وجود دارد. در طرح زیر، مراحل جداسازی رنگیزه های کلروپلاستی خلاصه می شود:



توضیحات زیر دلایل انجام مراحل ۱ تا ۶ ذکر شده در طرح را برای جداسازی رنگیزه‌های کلروپلاستی روشن می‌کند:

مرحله۱: رنگیزه ها باید با حل شدن در استون از سایر مواد یاخته ای جدا شوند.

مرحله۲: به علت اختلاف قابلیت انحلال رنگیزه ها در اتر نفت، ترجیحا از استون که حلال بهتری است استفاده می شود. استون را می‌توان با آب شست و خارج کرد.

مرحله۳: کلروفیل b و گزانتوفیل، نسبت به کلروفیل a و کاروتن، در الکل متیلیک بهتر حل می شوند. کلروفیل a و کاروتن در اتر نفت از هم جدا می‌شوند.

مرحله۴: به علت اختلاف قابلیت انحلال کلروفیل b و گزانتوفیل در اتراتیلیک، ترجیحاً از متانول که حلال بهتری است استفاده می‌شود. متانول در آب محلول است که در حالی که اتر اتیلیک در آب حل نمی شود و متانول را می‌توان با آب شست.

مرحله۵: محلول پتاس الکلی، گلروفیل b وگزانتوفیل را که در الکل اتیلیک وجود دارند حل می کند.

مرحله۶: کلروفیل b در پتاس الکلی حل می شود. اگر آب اضافه شود کلروفیل a در آب می ماند.

آزمایش ۲– تقسیم رنگیزه‌ها بین حلالهای مختلف

مواد و وسایل لازم:

کربنات کلسیم – اسفناج تازه – استون – اتر نفت – سولفات سدیم بی آب – دکانتور (قیف جدا کننده)– قیف بوخنر – فیول تخلیه.

روش کار

الف – استخراج رنگیزه ها

۱– ۵ گرم برگ اسفناج را که قبلاً خرد کرده اید با کمی شن و کربنات کلسیم در هاون بسایید.

۲– ۲۵ میلی لیتر استون به آن اضافه کنید و مدت ۵ دقیقه بسایید.

۳– چند لحظه آن را به حال استراحت بگذارید و سپس مایع تولید شده را در قیف بوخنر که به فیول تخلیه متصل است بریزید. سعی کنید قسمت جامد را در قیف نریزید.

۴– بر روی قسمت جامد مانده در هاون، دوباره ۱۵ میلی لیتر استون بریزید و مانند قبل عمل کنید دوباره مایع تولید شده را در قیف بوخنر بریزید. این عمل را برای بار دوم (با ۱۵ میلی لیتر استون) نیز انجام دهید.

ب – جداسازی رنگیزه ها

۱– تمام عصاره محلول در استون را که به دست آمده است در دکانتور بریزید.

۲- ۱۲ میلی لیتر اتر نفت در آن بریزید و درپوش دکانتور را ببندید و مایع را به آرامی ولی به طور مداوم به مدت ۵ دقیقه با حرکات چرخشی تکان دهید در حالی که دکانتور را برمی‌گردانید و شیر را باز می گذارید تا فشار درون دکانتور زیاد نشود. دوباره شیر را ببندید و دکانتور را در درون پایه خود قرار دهید.

۳- درپوش دکانتور را بردارید و از کناره ظرف ۱۵ میلی لیتر آب مقطر به آرامی به آن وارد کنید و آن را مانند قبل با احتیاط تکان دهید و سپس در جای خود بگذارید.

۴- ۱۵ دقیقه صبر کنید تا در ظرف دو لایه ایجاد شود.

۵- لایه بالایی به رنگ سبز تیره (اتر نفت) دارای کلروفیل و کاروتن، و لایه زیرین به رنگ زرد مایل به سبز (استون مایع) شامل گزانتوفیل است.

۶- لایه زیرین را در یک ارلن بریزید.

۷- لایه بالایی را که در دکانتور باقی مانده است پنج بار پیاپی و هر بار تقریباً با ۳۰ میلی لیتر آب مقطر شستشو دهید. در هر شستشو، آب را به آرامی از کناره دکانتور به درون آن بریزید و ظرف را آهسته تکان دهید و بگذارید به حال استراحت باقی بماند.

۸- لایه زیرین آن را با دقت از دکانتور خارج کنید.

۹- تمام اتر نفت موجود در دکانتور را بر روی یک صافی که دارای ۲۰ گرم سولفات سدیم بی آب (Na_2SO_4) است و محلول را خشک می‌کند، بریزید.

۱۰- اتر نفت را به آرامی در یک صافی که به فیول تخلیه مربوط است بریزید و به این ترتیب تمام محلول حاوی رنگیزه مورد مطالعه را به دست آورید.

۱۱- ۳ میلی لیتر از این محلول فوراً به مصرف کروماتوگرافی ستونی می رسد و بقیه (لاقل ۴ میلی لیتر) بعدا برای جداسازی حلال‌های مختلف به کار خواهد رفت.

ج - ادامه جداسازی به وسیله تقسیم بین حلال‌های مختلف

۱- باقیمانده محلول رنگیزه در اتر نفت (لاقل ۴ میلی لیتر) را در یک دکانتور تمیز و خشک بریزید.

۲- ۵ میلی لیتر پتاس ۵٪ محلول در متانول به آن بیفزایید و مانند قبل آن را به مدت ۵ دقیقه تکان دهید. سپس دکانتور را در پایه خود بگذارید.

۳- پس از چند دقیقه، یک میلی لیتر آب مقطر و سپس ۳ میلی لیتر اتر نفت به آرامی اضافه نمایید و مدت ۵ دقیقه آن را تکان دهید.

۴- محلول را به مدت ۱۰ دقیقه روی پایه قرار دهید تا دو لایه به شرح زیر تشکیل شود:

- لایه بالایی زرد (اتر نفت) شامل کاروتن و گزانتوفیل هاست.

-لایه زیرین سبز (پتاس محلول در متانول) شامل کلروفیل هاست که صابونی شده اند.

آزمایش ۳– استخراج مواد رنگی درون کلروپلاست و جدا کردن آنها به روش کروماتوگرافی ستونی

مواد و وسایل لازم: ۲۰ گرم برگ اسفناج یا هر گیاه دیگر – استون–اتر نفت – آب مقطر – شکر – سولفات سدیم بی آب – متانول ۸۰٪ – کلرور سدیم – محلول پروپانول نرمال – لوله شیشه ای به طول ۲۵ سانتیمتر و قطر ۲ سانتیمتر – پایه مخصوص نصب لوله شیشه ای – کاغذ صافی – ترازو – هاون چینی – پارچه تنزیب – دکانتور – قیچی – ارلن – لوله آزمایش.

روش کار

الف – آماده سازی ستون کروماتوگرافی

۱– ستون مخصوص کروماتوگرافی را که از یک لوله شیشه ای به طول ۲۵ سانتیمتر و قطر ۲ سانتیمتر تشکیل شده، به پایه مخصوص آن وصل کنید.

۲– مقدار کمی پودر شکر به ارتفاع تقریبی ۳ سانتی متر در آن بریزید و به وسیله میله شیشه ای مخصوص آن را به آهستگی بکوبید به طوری که موجب شکستگی ستون نگردد و خوب فشرده شود.

۳–سطح شکر فشرده شده را با سوزن مخصوص خوب خراش دهید تا با پودر شکر بعدی که کوبیده می‌شود به صورت یکنواخت در آید و سطح جداگانه ای را ایجاد نکند.

۴– اعمال فوق را چند بار تکرار کنید تا ارتفاع پودر شکر فشرده شده به ۱۴ سانتیمتر برسد.

۵– روی ستون شکر را به ارتفاع ۰,۵ سانتیمتر از پودر سولفات سدیم بی آب بپوشانید.

۶– در پایان، یک لایه کاغذ صافی را که قطر آن مساوی قطر درونی استوانه ستون است روی سولفات سدیم بگذارید؛ در این حالت ستون آماده است.

ب – استخراج مواد رنگی از کلروپلاست‌های برگ

یادآوری: چون در این آزمایش با اتر نفت کار می‌کنیم و از طرفی اتر ماده آتش گیر و گاز آن قابل انفجار است، لذا دانشجویان باید توجه داشته باشند که این اعمال دور از شعله و هرگونه جرقه صورت گیرد.

۱– مقدار ۵ تا ۲۰ گرم از برگ‌های سبز اسفناج (یا هر گیاه دیگر) را با ترازو وزن کنید و آنها را با قیچی خرد کرده درون هاون چینی بریزید.

۲– ۵۰ میلی لیتر استون به آن اضافه کنید و آن را بکوبید تا خوب نرم شده و یاخته های آن متلاشی شوند و در عین حال مواد رنگی کلروپلاست‌ها در استون حل گردد (عمل کوبیدن را طوری انجام دهید که محتویات هاون به خارج نریزد).

۳– محتویات هاون را با گذراندن از ۴ لایه پارچه تنزیب صاف کنید.

۴- محلول را که از پارچه تنزیب عبور کرده به دکانتور (قیف جداکننده) منتقل کنید.

۵- ۵۰ میلی لیتر اتر نفت و ۵۰ میلی لیتر آب مقطر به آن اضافه کنید.

۶- دکانتور را طوری در دست بگیرید که سر آن در کف دست چپ و انتهای آن که دارای شیر است در دست راست و به طرف بالا باشد به طوریکه با دست راست بتوان شیر را باز کرد و بست

۷- دکانتور را به آرامی تکان دهید ولی توجه داشته باشید که پس از هر حرکت، انتهای شیر دارد کانتور را به سمت بالاگرفته و شیر آن را به آهستگی باز کنید تا گاز اتر خارج شود. عمل تکان دادن را به مدت ۱۰ دقیقه ادامه دهید تا تمام مواد رنگی به اتر نفت منتقل گردد.

۸- پس از مدتی، دکانتور را به حال خود بگذارید تا تمام مواد رنگی که در اتر نفت حل شده است فاز جداگانه ای را تشکیل دهد و در قسمت بالا قرار گیرد.

۹- قسمت زیرین را جدا کرده و دور بریزید.

۱۰- ۳۰ میلی لیتر متانول ۸۰٪ به دکانتور اضافه کنید، تا تمام مواد رنگی به فاز اتر نفت منتقل شود.

۱۱- قسمت زیرین را جدا کرده دور بریزید.

۱۲- برای اینکه تمام استون از اتر نفت جدا شود، به اندازه ۳۰ میلی لیتر از محلول ۱۰٪ نمک طعام به دکانتور اضافه کنید و خوب تکان دهید.

۱۳- قسمت زیرین را جدا کرده و دور بریزید. عمل فوق را تکرار کنید.

۱۴- محلول باقیمانده در دکانتور (اتر نفت + مواد رنگی کلروپلاست) را به یک ارلن حاوی ۴ گرم سولفات سدیم بی آب انتقال دهید و ۵ دقیقه صبر کنید تا تمام مولکول‌های آب باقیمانده توسط سولفات سدیم بی آب جذب شود.

۱۵- محلول اتر نفت را در ارلن بریزید.

ج - تفکیک رنگ‌های مختلف کلروپلاست به روش کروماتوگرافی ستونی

۱- مقداری اتر نفت خالص را در داخل ستون کروماتوگرافی که قبلاً تهیه کرده اید بریزید و از پایین خلا ایجاد کنید تا اتر نفت به طرف پایین ستون کشیده شود. ولی توجه داشته باشید که مقدار اتر تفت باید آن قدر باشد که وقتی 2/3 ارتفاع ستون را طی کرد، هنوز مقدار کمی از آن در بالای سطح کاغذ صافی وجود داشته باشد؛ چون در غیر این صورت هوا به داخل ستون کشیده می شود و ستون خاصیت جداکنندگی خود را از دست می‌دهد.

۲- پس از اینکه اتر نفت 2/3 ستون را طی کرد، ۱۰ میلی لیتر از مواد رنگی را که استخراج کرده اید داخل ستون اضافه کنید.

۳- پیش از اینکه تمام مواد رنگی ستون جذب شود، از بالا اتر تفت خالص به ستون اضافه کنید و عمل ایجاد خلاً را ادامه دهید و توجه داشته باشید که ستون نباید خشک شود و دایماً با اضافه کردن ۳ میلی لیتر اتر نفت، آن را مرطوب نگه دارید.

۴- اکنون، مواد رنگی مختلف به تدریج از هم تفکیک و جدا می شوند. نخستین ماده رنگی که باید جدا شود کاروتن است. وقتی کاروتن به پایین ستون رسید، یک لوله آزمایش درون ارلن خلاً قرار دهید و کاروتن را در آن جمع آوری کنید.

۵ -پس از تمام شدن کاروتن، لوله آزمایش دیگری را درون ارلن خلاً قرار داده، از بالا محلول پروپانول نرمال در اتر نفت را اضافه کنید و عمل مکیدن را ادامه دهید. کلروفیل a به رنگ سبز مایل به آبی جدا می‌گردد.

۶- لوله آزمایش درون ارلن خلاً را عوض کرده و عمل ریختن محلول ۰٫۵٪ پروپانول نرمال در اتر نفت را ادامه دهید تا کلروفیل b به رنگ سبز مایل به زرد جدا شود.

یادآوری: اگر کلروفیل b خیلی کند حرکت کند، می توانید از محلول ۱۰٪ پروپانول نرمال در اتر نفت به ستون اضافه کنید.

۷- دهانه لوله های آزمایش حاوی مواد رنگی را به وسیله چوب پنبه بندید و آنها را در تاریکی قرار دهید تا در جلسه آینده طیف جذبی آنها را اندازه بگیرید.

۸- در بعضی از برگ‌ها، گزانتوفیل یافت می شود که بعداً از کلروفیل b خارج می‌گردد.

آزمایش ۴- جدا کردن رنگیزه ها به وسیله کروماتوگرافی ستونی

الف - تهیه ستون کروماتوگرافی

ستون مخصوص کروماتوگرافی را با ریختن پودر سلولز واتمن[5] که در یک ستون شیشه ای به قطر ۱۵ میلیمتر و ارتفاع ۱۵ سانتیمتر به شدت فشرده شده است، تهیه کنید. پودر سلولز با اتر نفت شسته می‌شود.

ب - کروماتوگرافی رنگیزه ها

۱- درست پیش از آغاز کروماتوگرافی، اتر نفت اضافی ستون را خارج سازید.

۲- وقتی که تمام اتر نفت را به درون پودر سلولز نفوذ کرد، با احتیاط به وسیله پیپت از قسمت بالای ستون ۳ میلی لیتر از رنگیزه موجود در اتر را به درون ستون بریزید. بگذارید اتر نفت به آرامی جریان یابد (یک قطره در هر دو ثانیه).

۳- وقتی که تمام محلول رنگیزه در پودر سلولز نفوذ کرد، حدود ۱۰ میلی لیتر اتر نفت بر روی ستون بریزید به طوری که رنگیزه را با خود به سمت پایین ببرد. برای اینکه مطمئن شوید مهاجرت رنگیزه به خوبی انجام شده است، باز هم اتر نفت اضافه کنید. نتیجه: رنگیزه ها از هم جدا می شوند و چهار لایه رنگین مختلف تشکیل می‌گردد. در بالا، نوار سبز رنگ مربوط به کلروفیل b است. نوار دوم به رنگ سبز مایل به آبی مربوط به کلروفیل a است. در زیر کلروفیل a یک لایه زرد محتوی گزانتوفیل و بالاخره در قسمت زیرین یک لایه نارنجی مربوط به کاروتن دیده می شود. نوار دیگری را که کم و بیش مشخص و مربوط به فئوفیتین است نیز می توان در زیر آنها مشاهده کرد.

[5] Watman

آزمایش ۵– جدا کردن رنگیزه ها به وسیله کروماتوگرافی روی لایه نازک۶ (ژل سیلیس یا سیلیکاژل)

مواد و وسایل لازم:

برگ تازه اسفناج-استون – سولفات – کلروفرم – هگزان – دی اتیل اتر – ژل سیلیس یا سیلیکاژل – قیف بوخنر – صفحه شیشه ای – پیپت پاستور – مخزن شیشه ای.

روش کار

۱– رنگیزه های کلروپلاستی را با ساییدن ۲,۵ گرم برگ‌های تازه اسفناج در ۱۰۰ میلی لیتر استون استخراج کنید. اگر برگ‌های خشک به کار می برید، ۲,۵ گرم برگ خشک را در ۱۰۰ میلی لیتر استون ۸۰٪ در مخلوط کن خوب بسایید.

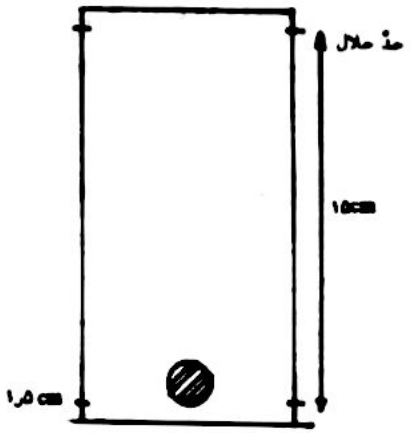
۲– وقتی استون رنگ سبز تیره به خود گرفت، چند گرم Na_2SO_2, را به آن بیفزایید تا آب حاصل از استخراج گرفته شود، بعد عصاره را با استفاده از قیف بوخنر صاف کنید.

۳– عصاره محلول در استون را در دستگاه خشک کننده دوار قرار دهید تا استون آن تبخیر شود.

۴– رنگیزه خشک شده را در ۱۰ میلی لیتر کلروفرم حل کنید.

۵– صفحه شیشه ای (۲۰×۵ سانتیمتر) را که با جاذب پرشانده شده انتخاب کنید. مطابق شکل، درست پایین صفحه شیشه ای، ۱,۵سانتیمتری انتهای آن، یعنی در جایی که می‌خواهید نمونه را قرار دهید، در دو لبه عرض شیشه خراش‌های کوچکی ایجاد کنید و در فاصله ۱۵ سانتیمتری بالای خراش اولیه نیز خراش‌های دیگری به وجود آورید. خراش بالا برای مشخص کردن محلی است که حلال باید تا انجا مهاجرت کند.

۶– در مرحله بعدی، با استفاده از پیپت ۰,۰۱ یا ۰,۱ میلی لیتر و یا پیپت پاستور، مقدار کمی از عصاره استخراج شده را به صورت نقطه ای به قطر یک سانتیمتر بین دو علامتی که قبلاً در پایین صفحه شیشه ای با خراش مشخص کرده اید، قرار دهید. نمونه باید در وسط این دو علامت فرار گیرد و پیپت نیز نباید با جاذب صفحه شیشه ای تماس پیدا کند.



[6] Thin - Layer chromatography

کروماتوگرام R_f رنگیزه ها

۷- نمونه را که به صورت نقطه ای روی جاذب شیشه ای قرار دارد، با استفاده از پنکه خشک کنید. در صورت لزوم، مجددا روی این نقطه عصاره‌ی استخراج نشده‌ی حل شده در حلال اضافه کنید و آن را خشک نمایید.

۸- صفحه‌ی شیشه ای جاذب را در محفظه ای که حاوی حلال (هگزان – دی اتیل اتر – استون به نسبت ۲۰: ۳۰: ۶۰ حجمی) است قرار دهید، عمق حلال خیلی اهمیت دارد و نقطه ای که نمونه روی آن قرار گرفته هرگز نباید زیر سطح حلال قرار گیرد.

۹- به چگونگی جدا شدن و مهاجرت حلال خوب توجه کنید. وقتی که حلال به ۱۵ سانتیمتری بالای علامت اولیه‌ی پایینی رسید، شیشه را از محفظه خارج کنید و بگذارید تا خشک شود.

۱۰-ارزش $Rf^{۷}$ را برای هر کدام از رنگیزه ها محاسبه کنید.

۱۱- پس از مشاهده‌ی کروماتوگرام و یادداشت کردن اطلاعات لازم، نوارهای تشکیل شده روی سیلیکاژل را که حاوی یک نوع رنگیزه است با تیغ تیز و تمیز جدا کنید.

۱۲- بلافاصله، این قسمت‌های جدا شده را جداگانه در لوله‌ی سانتریفوژ قرار دهید و به آن ۵ میلی لیتر استون اضافه کنید و لوله را به شدت تکان دهید تا رنگیزه در حلال حل شود و از سیلیکاژل یا هر جاذب دیگر جدا گردد.

۱۳- سپس آن را سانتریفوژ کنید تا جاذب ته‌نشین شود. محلول رویی را که حاوی رنگیزه است با پیپت از لوله‌ی سانتریفوژ خارج کرده آن را در لوله‌ی آزمایش قرار دهید و در یخچال نگه دارید تا بعداً مورد استفاده قرار گیرد.

۱۴- در مرحله‌ی بعد، غلظت هر رنگیزه را با رقیق یا غلیظ کردن تنظیم کنید و طیف جذبی رنگیزه هایی چون کلروفیل a، b ، بتاکاروتن، نئوگزانتین یا لوتئین را با استفاده از اسپکتروفتومتر اندازه بگیرید. جذب (چگالی اپتیکی[۸]) و یا درصد جذب هرکدام از محلول‌های رنگیزه را در طول موج ۴۰۰ تا ۷۰۰ نانومتر اندازه بگیرید. اگر اسپکتروفتومتری که در اختیار دارید به دستگاه یادداشت کننده(ریکوردر) متصل نیست، درصد جذب را در هر ۱۰ نانومتر با دست اندازه بگیرید و یادداشت کنید.

۱۵- منحنی جذبی را رسم کنید و آن را به گزارش خود ضمیمه نمایید.

آزمایش ۶– جدا کردن رنگیزه های فتوسنتزی به وسیله‌ی کروماتوگرافی کاغذی

مواد و وسایل لازم:

برگ اسفناج یا هر گیاه دیگر- استون- آب مقطر -اتر نفت - سولفات سدیم بی آب - قیچی- کاغذ کروماتوگرافی (کاغذ صافی) – مخلوط کن یا هاون چینی – دکانتور (قیف جداکننده)

---

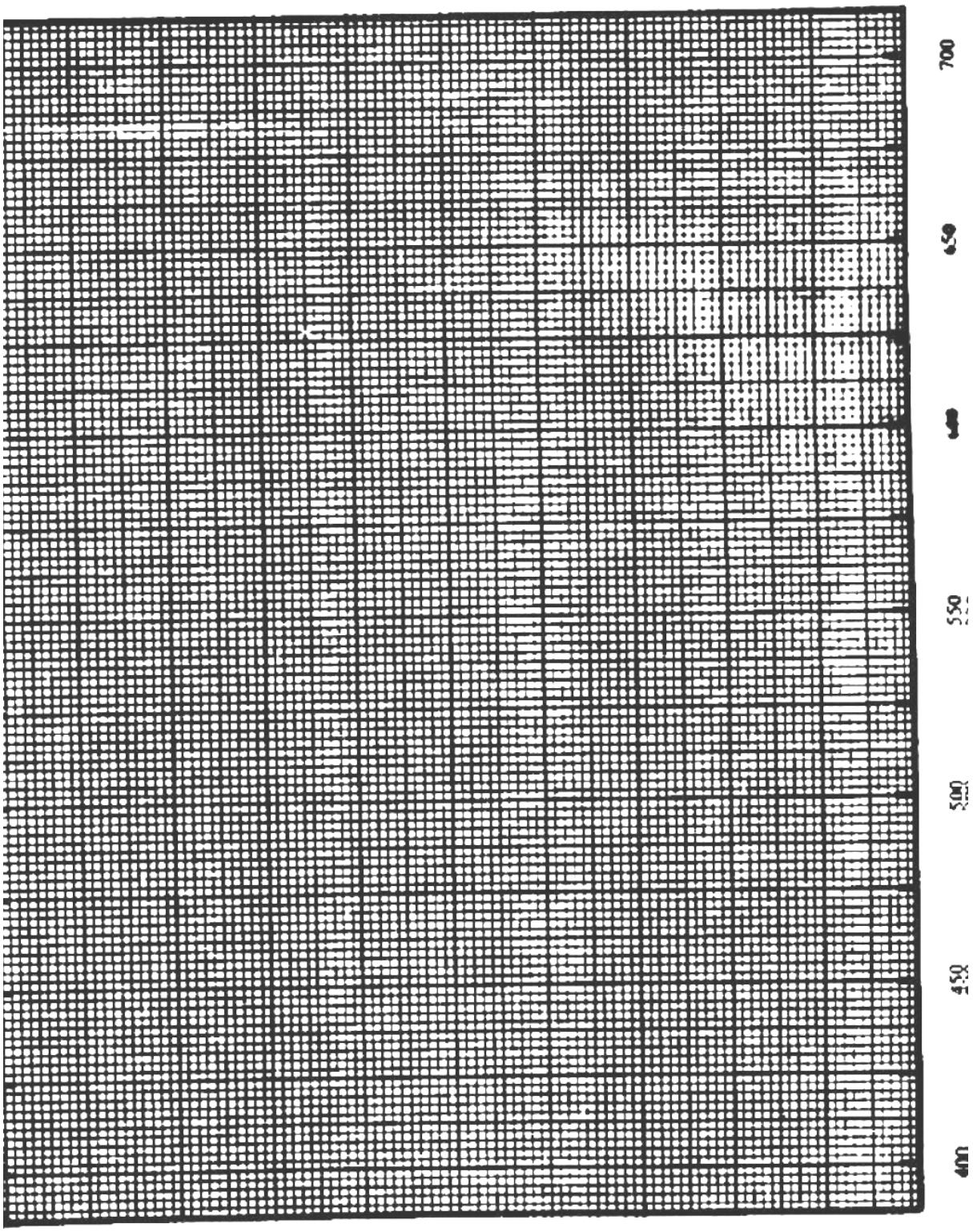
[۷] R_F فاصله‌ی نقطه‌ای است که نمونه روی صفحه فرار داده شده تا نقطه ای که محلول طی کرده است.

[8] Optical density (OD)

گزارش مربوط به کروماتوگرافی روی لایهٔ نازک

نام.....تاریخ..... گروه.....

طیف جذبی



روش کار

الف – استخراج رنگیزه ها

برگها را با قیچی خرد کرده و در استون ۹۰٪ بریزید و آن را به مدت ۲ دقیقه در مخلوط کن بسایید و یا این عمل را در هاون انجام دهید. عصاره را با استفاده از قیف بوخنر در قیف جدا کننده صاف کنید. به همان حجم به آن اتر نفت اضافه نمایید و خوب تکان دهید. سه مرتبه با آب بشویید و هر مرتبه محلول مایع را چند دقیقه به حال خود بگذارید. این روش عصاره گیری وقتی به نتیجه‌ی مطلوب می‌رسد که برگ در استون خوب ساییده شود و صاف گردد.

ب – جداسازی

۱– حلال مناسبی با این نسبت‌ها تهیه کنید: ۱۰۰ قسمت اتر نفت، ۱۲ قسمت استون ۹۰٪.

۲– کروماتوگرافی را به اندازه‌ی ۲۵×۲۵ سانتیمتر (مناسبترین اندازه) ببرید، چون می توان روی آن چند نقطه قرار داد و آنها را همزمان با یکدیگر به پیش راند:

۳– چند قطره از محلول رنگیزه‌ی استخراج شده را بر روی کاغذ کروماتوگرافی قرار دهید.

۴– مدت ۶ ساعت صبر کنید تا رنگیزه ها از هم جدا شوند (همچنین می‌توان کاغذ را به مدت یک شب در حلال قرار داد).

۵– ظاهر کردن رنگیزه‌ها – در این مدت ماده‌ی ظاهرکننده لازم نیست، چون رنگیزه‌ها در نور فرابنفش از خود فلوئورسانس ساطع می‌کنند و با استفاده از این نور به آسانی می توان آنها را مشاهده کرد.

نتایج

رنگیزه‌ها به رنگ‌های مختلف و در فاصله های متفاوت، به شرح زیر، بر روی کروماتوگرام ظاهر می شوند:

نام رنگیزه	Rf رنگیزه	رنگ نوار
ـ کاروتن[1]	۰/۹۵	زرد
ـ فئوفیتین[2]	۰/۸۳	زرد ـ خاکستری
ـ (فئوفیتین فرآورده تجزیه کلروفیل است که همیشه به خوبی دیده نمی‌شود)		
ـ گزانتوفیل (غالباً به صورت ۲ نوار ظاهر می‌شود)	۰/۷۱	زرد ـ قهوه‌ای
ـ کلروفیل a	۰/۶۵	آبی ـ سبز
کلروفیل b	۰/۴۵	سبز

خودآزمایی کتاب

۱- چه رنگیزه‌هایی در اتر نفت محلول اند؟

۲- کلروفیل b در چه ماده‌ای بهتر حل می شود؟

۳- محلول پتاس الکلی، کدامیک از رنگیزه‌ها را در خود حل می‌کند؟

۴- از دو رنگیزه‌ی کاروتن و کلروفیل به کدامیک در آب و کدامیک در اتر نفت باقی می‌ماند؟

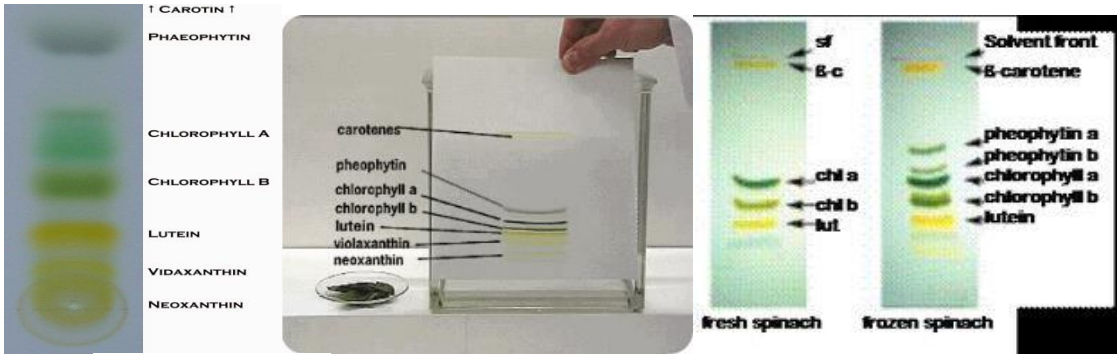
سوالات

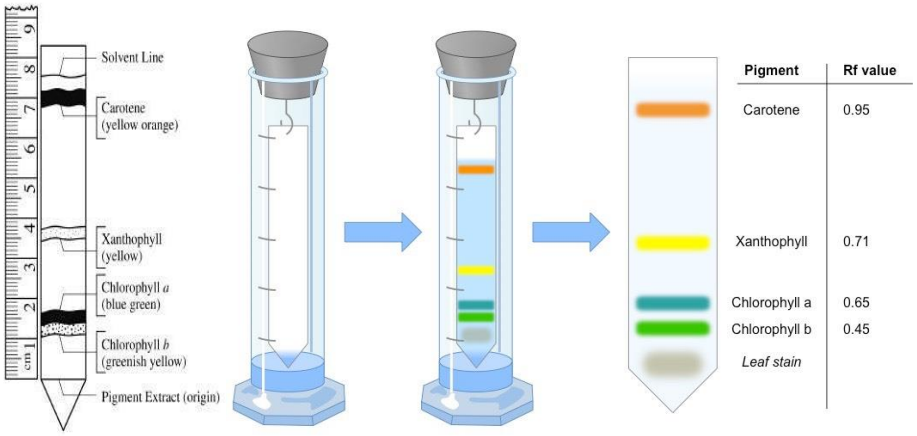
۱- در کروماتوگرافیTLC که در آزمایشگاه انجام دادید، چه تفاوتی در مسیر انجام آزمایش با متن این کتاب وجود داشت؟

۲- در قسمت پایانی جداسازی(آخرین مرحله جداسازی) ایرادی در متن کتاب وجود دارد. این ایران مربوط به یکی از حلال هاست. آن را پیدا کنید و حلال درست را در متن بنویسید!

۳- نقش دقیق پتاس الکلی و صابونی کردن را توضیح دهید!

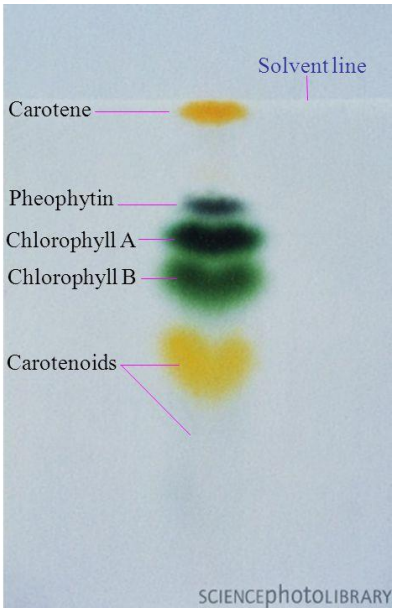
۴- با توجه به تصاویر زیر توضیح دهید چرا در منابع نتیجه‌های مختلف برای کروماتوگرافی ذکر شده است؟





Plant Pigments and Chromatography

Thin layer chromatogram (TLC) of an extract of thylakoid membranes from the leaf of annual meadow grass *Poa annua*. TLC plastic sheets are coated with a 60 F254 silica gel which measures 0. 2 millimetres thick. A drop of extract, corresponding to the column here, was laid at the bottom of the sheet. The sheet was then placed in a beaker of solvent (75% acetone & 25% petroleum ether). The picture shows the solubility of the extract in solvent. Six bands are seen; top (orange) is carotene; 2 (green) pheophytin; 3 (green) chlorophyll A; 4 (green) chlorophyll B; 5 (yellow) & 6 (mere trace) are carotenoids. The line across the top of image is the solvent line



اسپکترومتر

اسپکتروفتومتر برگرفته از واژه لاتین *spectrum* به معنای «تصویر» و واژه یونانی *phos* یا *photos* به معنای «نور» است. اسپکتروفتومتر یکی از دستگاه‌های اصلی طراحی‌شده برای پژوهش و تشخیص است که در آن از ویژگی‌های نور و تداخل آن با سایر مواد استفاده‌می‌شود. به‌طور کلی نور یک لامپ با مشخصات خاص از ابـزاری عبورمی‌کند کـه طول مـوج مشخصی را جـدا و از نمونه عبور می‌دهد. شدت نـور خروجی با شدت نور ورودی مقایسه‌شده و میزان عبور نور[1] که بـه عواملی مانند غلظت نمونه بستگی‌دارد، محاسبه‌می‌شود.

تصویر اسپکتروفتومتر

یک اسپکتروفتومتر معمولی

موارد استفاده از دستگاه

در آزمایشگاه اسپکتروفتومتر برای تعیین و میزان غلظت یک ماده در محلول کاربرد دارد و بنابراین با روش‌های اسپکتروفتومتری می‌توان نمونه را مورد تجزیه و تحلیل کمی و کیفی قرارداد.

اصول عملکرد

به‌عنوان یک اصل پایه، نور نوعی از انرژی الکترومغناطیسی درنظر گرفته‌می‌شوند. سرعت ثابت نور در فضا [C]، تقریباً $۳\times۱۰^{۸}m/s$ است. سرعت نور درصورت عبور از هر محیط شفاف دیگر، کمی کاهش‌می‌یابد و از معادلهٔ زیر می‌توان سرعت آن را به‌دست آورد:

$$v_{۰} = \frac{C}{n}$$

به‌طوری که:

$v_{۰}$ = سرعت نور ورودی از هر محیط یا وسیله

n = شاخص بازتاب: که مقدار عددی آن معمولاً بین ۱/۰ تا ۲/۵ باشد.

انرژی الکترومغناطیسی طیف وسیعی از طول موج‌ها را دارد که در جدول ذیل به برخی از آنها اشاره شده‌است:

نوع انرژی الکترو مغناطیس	گسترهٔ طول موج
امواج رادیویی	از چند مترتا چند کیلومتر
امواج رادار	از ۱ تا ۱۰ سانتی‌متر
امواج مادون قرمز	از ۱ تا ۱۰ میکرون(10^{-6}m)
نور مرئی	از ۳۰۰ تا ۷۰۰ نانومتر
پرتوهای X	از ۰/۱ تا ۰/۵ آنگستروم
پرتوهای گاما	تقریباً ۰/۰۰۱۲ آنگستروم

درنتیجهٔ عبور یا برخورد نور با محیط‌های مختلف یکی از پدیده‌های زیر اتفاق‌می‌افتد: بازتاب[1]، انکسار(شکست)[2]، تجزیه[3]، جذب[4]، پخش[5]، پلاریزه‌شدن[6]، و پدیده‌های دیگری که با دستگاه‌ها و وسایل مختلف اندازه‌گیری می‌شود.

جدول زیر محدودهٔ طول موج‌های دیگر را نشان‌می‌دهد که در آزمایش‌های اسپکتروفتومتری استفاده‌می‌شوند.

طیف نور	گسترهٔ طول موج
ماوراء بنفش	۱۰–۲۰۰ نانومتر
ماوراء بنفش نزدیک	۲۰۰–۲۸۰ نانومتر
نور مرئی	۳۸۰–۷۸۰ نانومتر
مادون قرمز نزدیک	۷۸۰–۳۰۰۰ نانومتر
مادون قرمز میانی	۳۰۰۰–۲۰۰۰۰ نانومتر
مادون قرمز دور	۳۰۰۰۰–۳۰۰۰۰۰ نانومتر

با توجه به برخورد نور و ماده، شکل ۲۷ در توضیح پیچیدگی پدیده‌ای که رخ‌می‌دهد، کمک می‌کند.

شکل ۲۷ نشان‌می‌دهد که نور ورودی [Io] می‌تواند تغییر حالت‌های متعددی پیداکند؛ می‌تواند منعکس(بازتاب) شود [Ir]، عبور[7] کند [It]، پخش‌شود یا جذب شود و یا مستقیماً به‌صورت فلوئورسانس[8] ساطع‌شود [If]. اساس کار اسپکتروفتومترها اصولاً بر جذب و عبور نور استوار است. برای درک این موضوع قانون بیر ـ لامبرت را مرورمی‌کنیم.

قانون بیرـلامبرت به‌عنوان «قانون بیر» و یا «قانون بیرـلامبرت بوگر[9]» نیز معروف است. این قانون رابطهٔ بین غلظت نمونه و شدت نوری که از آن عبورمی‌کند را نشان‌می‌دهد. باتوجه به این قانون، دو حالت وجوددارد: عبورکردن [T][10] و جذب‌کردن [A][11].

عبور [T]: بخشی از نور ورودی با طول موج مشخص است که از داخل نمونه عبورمی‌کند.

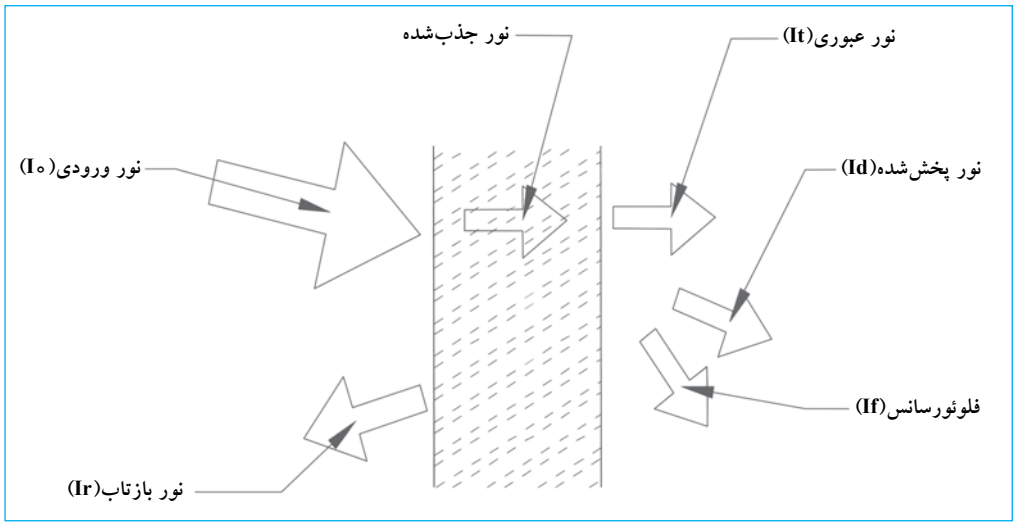
$$T=\frac{I_t}{I_o}$$

به‌طوری که:

I_t = شدت نور عبورکرده(خروجی)

I_o = شدت نور اولیه(ورودی)

شکل ۲۷. برخورد نور با ماده



1. Reflection
2. Refraction
3. Diffraction
4. Absorption
5. Diffusion
6. Polarization
7. Transmitt
8. Fluorescence
9. Beer Lambert Bouguer's law
10. Transmitance
11. Absorbance

درصد میزان عبور نور [T٪] از فرمول زیر محاسبه‌می‌شود:

$$\%T = \frac{I_t}{I_o} \times ۱۰۰$$

تعداد مولکول‌های جاذب نور در یک نمونه متناسب با میزان جذب آن در نمونه است و به‌صورت رابطهٔ ریاضی زیر بیان‌می‌شود:

$$A = \varepsilon \times l \times c$$

به‌طوری که:

A = جذب قابل اندازه‌گیری نور

ε = ضریب جذب [Litres/ mol. cm]

l = طول مسیر عبور نور در نمونه

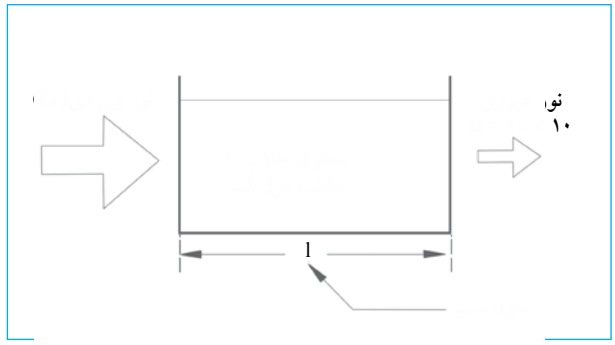
c = غلظت نمونه [mol/ Litres]

رابطهٔ بین جذب نور [A] و عبور [T] آن با معادلهٔ زیر نشان داده‌می‌شود:

$$A = \log_{۱۰}\frac{1}{T} = \log_{۱۰}\frac{I_o}{I_t} = \log_{۱۰}۱۰^{\varepsilon \times c \times l} = \varepsilon \times c \times l$$

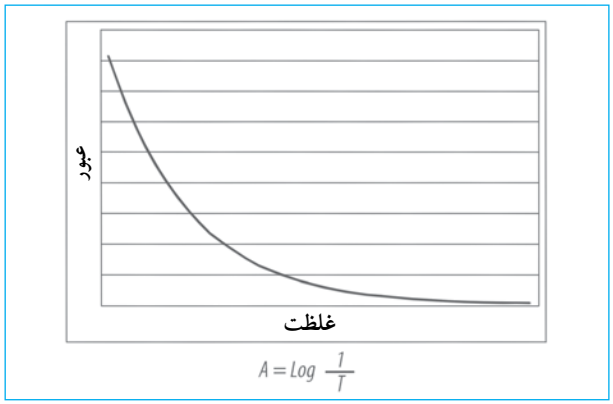
طرح زیر پدیده جذب را توضیح‌می‌دهد:

شکل ۲۸. پدیدهٔ جذب

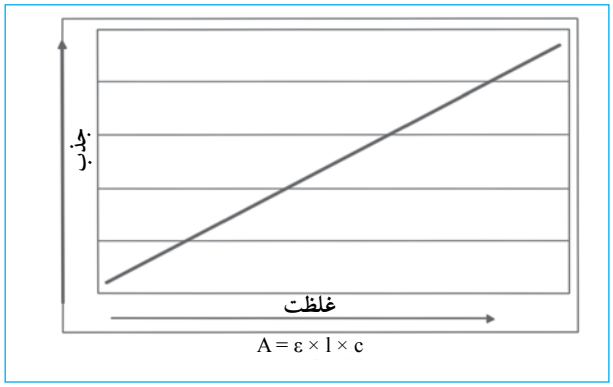


منحنی‌های ارائه‌شده در زیر نمایانگر مدلی است که چطور مقدار جذب [A] و عبور نور [T] در اثر غلظت [C] براساس قانون بیر تغییر می‌کند.

منحنی عبور نور



منحنی جذب



به‌طور خلاصه، با افزایش غلظت نمونه، میزان عبور نور کم و جذب بیشتر می‌شود.

خطی‌بودن قانون بیر ـ لامبرت تحت تاثیر شرایط زیر قرارمی‌گیرد:

۱. تغییرتعادل شیمیایی نمونه در نتیجه تغییر غلظت.

۲. تغییر ضریب جذب، در غلظت‌های بالاتر از ۰/۰۱ مول در ماده به دلیل تداخل الکتروستاتیکی بین مولکول‌های مجاور.

۳. تغییر ضریب انکسار در غلظت‌های بالای نمونه.

٤. پخش نور به علت وجود ذرات در نمونه.

۵. فلوئورسانس یا فسفرسانس[1] نمونه.

٦. تابش غیر تک‌رنگ[2].

1. Phosphorescence 2. Non-monochromatic

اجزای اسپکتروفتومتر

شکل ۲۹ ارتباط بین اجزای مختلف یک اسپکتروفتومتر را نشان می‌دهد. مهم‌ترین آنها عبارت است از:

۱. منبع نور
۲. منوکروماتور یا تک‌رنگ‌ساز
۳. محفظه نمونه
٤. سیستم آشکارساز
۵. سیستم خوانشگر

موارد فوق قسمت‌های اساسی یک اسپکتروفتومتر هستند و تکنولوژی پیشرفته مدل‌های جدید اسپکتروفتومترها را شامل نمی‌شوند. خلاصه‌ای از این موارد در شکل ۲۹ نشان‌داده شده‌است.

منبع نور

منبع نور با توجه به نوع اسپکتروفتومتر می‌تواند لامپ تنگستن برای نور مرئی یا لامپ دئوتریم[1] برای نور ماوراء بنفش باشد. بعضی سازندگان اسپکتروفتومترهایی با لامپ نئون طراحی‌کرده‌اند که توانایی ساطع‌کردن نور از طیف مرئی تا ماوراء بنفش را دارد. این لامپ‌ها طوری طراحی‌شده‌اند که در زمان کاربری و یا تعویض لامپ تنظیمات نوری و کانون آنها تغییرنمی‌کند. انرژی تابشی که به‌وسیلهٔ یک لامپ تنگستن ساطع می‌شود، بین ۲۶۰۰ تا ۳۰۰۰ درجهٔ کلوین است.

مونوکروماتور یا تک رنگ‌ساز

مونوکروماتور یک مجموعه متشکل از چند ماده است که نور سفید را به موج‌هایی با طول موج متفاوت تبدیل‌می‌کند. یک طول موج برای قرائت غلظت نمونه کاربرد دارد. مونوکروماتور معمولاً متشکل از اجزای زیر است: یک شکاف که نور تولیدشده به‌وسیلهٔ منبع نور را به یک سطح معین محدود می‌کند، مجموعه‌ای از آینه‌ها برای عبور نور از سیستم نوری، یک جز برای جداسازی طول موج‌های پرتو نور(ممکن‌است منشور و یا شبکهٔ انکسار یا انتقال[2] باشد) و یک خروجی برای انتخاب طول موجی که به نمونه تابیده می‌شود. شبکهٔ انکسار این مزیت را دارد که انوار غیرخطی را حذف می‌کند و به تغییرات دما نیز حساس نیست.

محفظه نمونه

این قسمت برای نگهداری نمونهٔ مورد آزمایش است، مدل‌های مختلفی در شکل و حجم‌های متفاوت برای انواع اسپکتروفتومترها و به نام‌های کووت، میکروسل، میکروپلیت، لولهٔ آزمایش و غیره موجود است. در اسپکتروفتومترهای معمولی، محفظهٔ نگهدارندهٔ نمونه، کووت به شکل مکعب مستطیل است. کووت‌های شیشه‌ای در محدودهٔ ۳٤۰ نانومتر تا ۱۰۰۰ نانومتر و انواع دیگر که از سیلیس ساخته‌شدند در محدودهٔ نور مرئی ۲۲۰ نانومتر تا ۳٤۰ نانومتر قابل استفاده هستند. همچنین، نوع پلاستیکی و یک‌بار مصرف این کووت‌ها از جنس استایرن[3] یا پلی‌استایرن[4](مانند میکروپلیت) نیز وجوددارد.

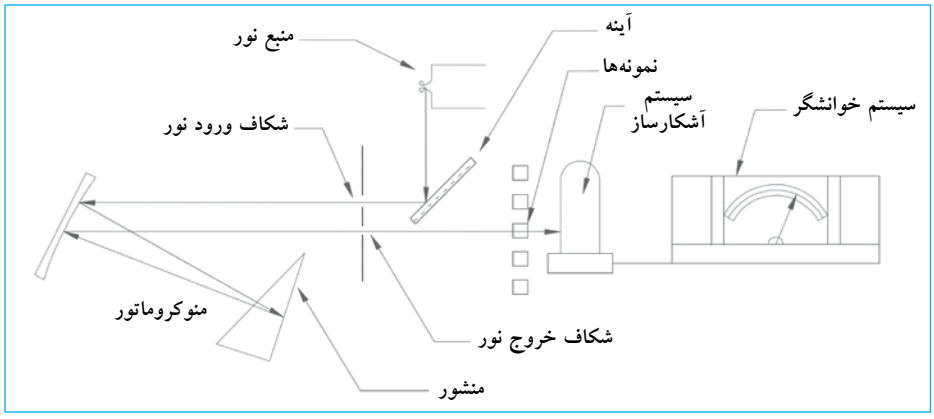
سیستم آشکارساز

این سیستم می‌تواند با استفاده از تقویت‌کننده‌هایی مانند فتوسل‌ها[5]، فتوتیوب‌ها[6] و فتودایودها[7] یا فتوملتی‌پیلرها[8] بسته به گسترهٔ طول موج، حساسیت و سرعت لازم طراحی‌شود. سیستم آشکارساز آن بخشی از نور که از نمونه ساطع می‌شود و جذب نشده‌است را به سیگنال الکتریکی متناسب با انرژی دریافت‌شده تبدیل‌می‌کند. این سیگنال الکتریکی تقویت‌شده و در صفحه نمایش به‌صورت عددی آشکارمی‌شود. در جدول صفحهٔ بعد خلاصه‌ای از معایب و مزایای سیستم‌های آشکارساز ذکر شده‌است.

سیستم خوانشگر

سیگنالی که از آشکارساز خارج‌می‌شود، تا زمانی که شدت آن متناسب با درصدی از نسبت مقدار عبور/جذب است تقویت شده و انتقال‌می‌یابد. دو نوع سیستم خوانشگر وجوددارد:

شکل ۲۹: اجزای اسپکتروفتومتر



1. Deuterium
2. Diffraction or Transmission Grating
3. Styrene
4. Polystyrene
5. Photocells
6. Phototubes
7. Photodiodes
8. Photomultipliers

امتحان‌ها-۳

به نـام خدا

آزمون پایانی نیمسال دوم
سال تـحـصیلی ۹۴-۱۳۹۳
درس: آز و تکنیکِ زیست

مدّت آزمون: ۱۲۰ دقیقه **صفحه ۱ از ۶**

نام و نام‌خانوادگی:

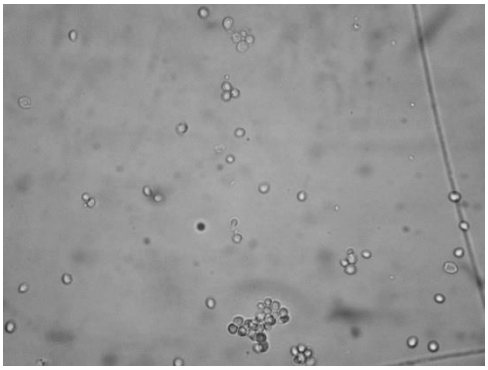
کلاس: **شماره صندلی:**

نام دبیر: جنابِ آقای نوحی

پایه: دوم «تجربی» **تاریخ: ۱۲ خرداد ۹۴**

«پاسخِ پرسش‌ها را فقط در پاسخ‌نامه خوش خط و خوانا بنویسید.»

سوال۱- تصویر روبرو مربوط به قسمتی از یک مربع بزرگ(۱/۱۶ میلی‌متر مربع) لام نئوبار می‌باشد، دو اشکال اساسی برای محاسبه کردن تراکم مخمرها با توجه به این مربع وجود دارد:



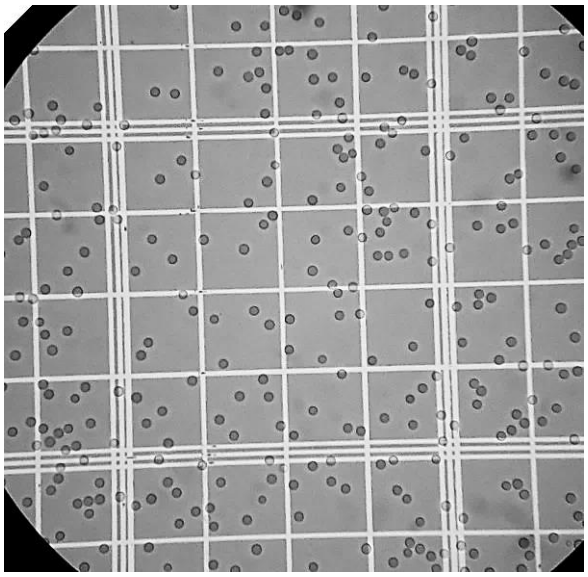
اولاً اینکه تعداد سلول‌ها خیلی زیاد است.

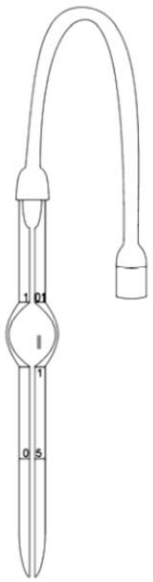
دوماً اینکه...

الف- مشکل اول را چگونه برطرف کنیم؟(۰,۵ نمره)

ب- مشکل دوم چیست؟ چگونه آنرا حل کنیم؟(۱نمره)

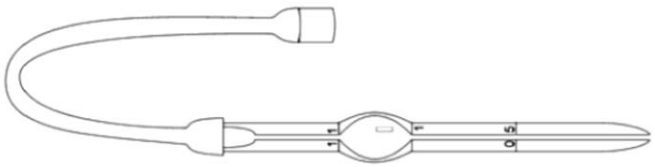
سوال۲-





الف- تصویر روبرو مربوط به سلول‌های خونی می‌باشد. اگر با استفاده از ملانژور زیر خون را رقیق کرده باشیم(تا ۰,۵ میکرولیتر را خون و بقیه ملانژور را تا ۱۰۱ با سرم فیزیولوژیک پر کرده‌ایم) و با توجه به اینکه مساحت هر مربع ۱/۴۰۰ میلی‌متر مربع است. تراکم گلبول قرمز را با واحد تعداد در میلی‌لیتر محاسبه کنید.(۲نمره)

ب- چرا برای تراکم سنجی گلبول‌های سفید از ملانژور دیگری که در شکل زیر مشاهده می‌کنید، برای رقیق‌سازی خون استفاده می‌شود؟(۰,۵نمره)



به نام خدا

آزمون پایانی نیمسال دوم
سال تحصیلی ۹۴-۱۳۹۳
درس: آز و تکنیکِ زیست

مدّت آزمون: ۱۲۰ دقیقه صفحه ۲ از ۶

نام و نام‌خانوادگی:

کلاس: **شماره صندلی:**

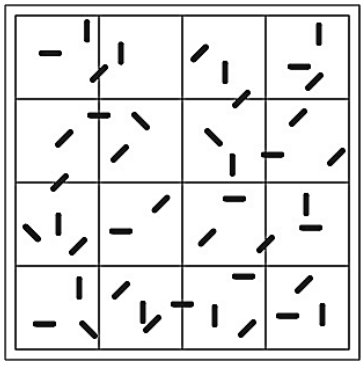
نام دبیر: جنابِ آقای نوحی

پایه: دوم «تجربی» **تاریخ: ۱۲ خرداد ۹۴**

دبیرستان علامه حلی تهران

سازمان ملی پرورش استعدادهای درخشان

سوال۳- تراکم باسیل روبرو در نمونه‌ی اولیه را با واحد تعداد بر میلی‌لیتر محاسبه کنید. مربع‌های سوال۲ و این سوال یکسان هستند. نمونه مورد استفاده در این سوال، قبل از شمارش ۲۰ برابر رقیق شده است(۱نمره) نمونه‌ی باسیل بالا از یک بیمار گرفته شده بود و تخمین بالا نمی‌توانست تخمین درستی از تعداد باسیل‌های زنده و فعال باشد. به همین دلیل دو راه زیر برای تخمین تعداد باسیل‌های زنده ابداع شد:

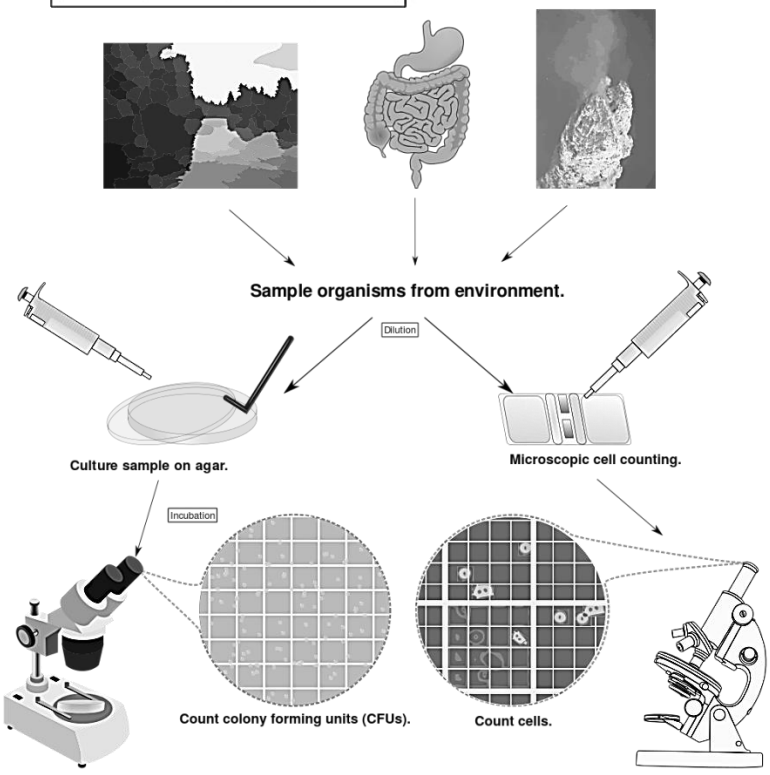


راه اول(در شکل روبرو سمت راست):

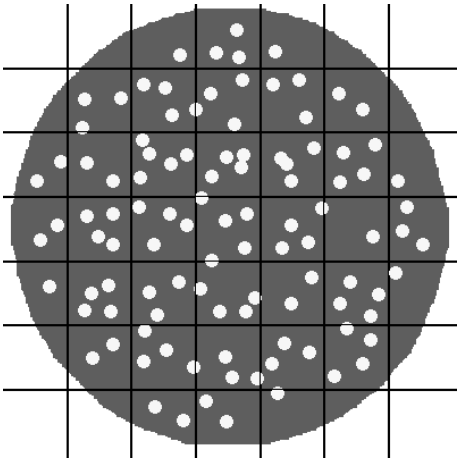
رنگ متیلن بلو تنها سلول‌های زنده را رنگ‌آمیزی می‌کند و نمی‌تواند وارد سلول‌های مرده شود. در نتیجه اگر مقداری رنگ وارد نمونه‌ی خود در لام نئوبار کنیم، برخی سلول‌های آبی و برخی دیگر بی‌رنگ باقی می‌مانند. از این راه می‌توانیم تعداد سلول‌های زنده را پیدا کنیم.

راه دوم(در شکل روبرو سمت چپ)

نمونه‌ی محیطی خود را به مقدار معین در محیط کشتی که مناسب اکثر باکتری‌ها باشد، کشت می‌دهیم. هر کلنی نشان‌دهنده‌ی یک سلول می‌باشد. زیرا سلول‌ها به قدری رقیق هستند که از هم جدا بیفتند و یک سلول بعد از تقسیم‌های متوالی یک کلنی را ایجاد کند. سپس پلیت مذکور را زیر لوپ می‌گذاریم. درون چشمی لوپ یک صفحه‌ی مدرج مانند نئوبار قرار داده‌ایم تا بدون شمردن همه‌ی کلنی‌ها، تعداد کل کلنی‌های بدست آمده از آن نمونه را تخمین بزنیم. درنهایت می‌توانیم بفهمیم تراکم سلول‌های زنده در نمونه‌ی اولیه چقدر بوده است.



سوال۴- پلیت زیر بعد از کشت دادن ۱میلی‌لیتر نمونه‌ی گرفته شده از بدن بیمار فوق‌الذکر و انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه بدست آمده است. تصویر زیر با استفاده از لوپ مدرج بدست آمده است. با توجه به سوال۳، مشخص کنید چند درصد از سلول‌ها زنده بوده‌اند؟(۱نمره)



قطر کف پلیت ۶ سانتی‌متر است-حدود ۶ مربع روی قطر جا می‌شود.

سوال۵- اگر از روش اول(متیلن‌بلو) استفاده می‌کردیم، انتظار می‌رفت چند سلول در هر مربع رنگی شوند؟(۱نمره)

به نـام خدا

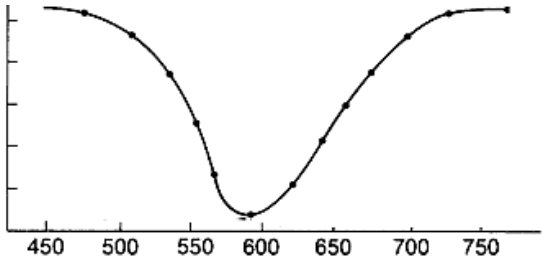
آزمون پایانی نیمسال دوم
سال تـحـصیلی ۹۴-۱۳۹۳
درس: آز و تکنیکِ زیست

نام و نام‌خانوادگی:

کلاس: **شماره صندلی:**

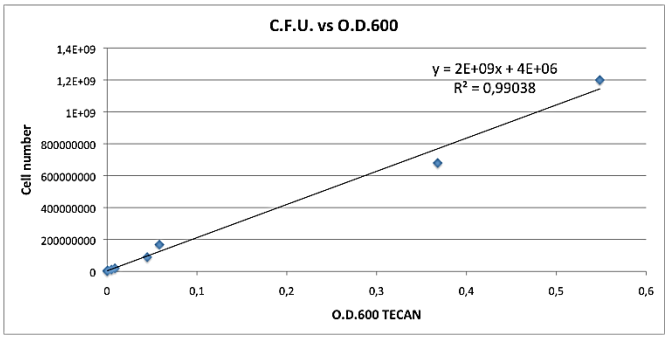
نام دبیر: جنابِ آقای نوحی

مدّت آزمون: ۱۲۰ دقیقه **صفحه ۳ از ۶** **پایه: دوم «تجربی»** **تاریخ: ۱۲ خرداد ۹۴**



روش سوم دیگری برای تخمین زدن تعداد باکتری وجود دارد. در این روش با توجه به میزان نوری که محلول باکتری‌ها جذب می‌کنند(باکتری‌ها در ۶۰۰ نانومتر جذب دارند) و بدست آوردن A و گذاشتن آن روی نمودار استاندارد، تعداد سلول را بدست می‌آورند.

در زیر دو نمودار مربوطه را مشاهده می‌کنید:



سوال۶- محور X و محورY نمودار اول مربوط به چه پارامترهایی است؟(۱نمره- آب خوردن!)

سوال۷- اگر نمونه‌ای که در سوال ۵ کشت دادید را اسپکت می‌کردید، با توجه به نمودار دوم چه جذبی بدست می‌آمد؟ محور عرض‌ها تعداد سلول در میلی‌لیتر نمونه است و OD همان A است. (۱نمره)

دوران ماقبل اسپکتروفتومتری...

شکل روبرو یک کالریمتر(colorimeter) است. این وسیله دارای یک آینه در قسمت پایین و دو لوله که هر یک در لیوان شفافی قرار گرفته‌اند، می‌باشد. امکان جابه‌جایی(بالا و پایین رفتن) لوله‌ها توسط پیچ‌هایی که به آنها متصل است، وجود دارد. در قسمت بالای دستگاه یک عدد چشمی تعبیه شده است که نور عبوری از لوله‌ها را در یک میدان دید نشان می‌دهد؛ در واقع نیمی از میدان‌دید چشمی را نور عبوری از یکی از لوله‌ها و نیم دیگر را نور عبوری از دیگری، روشن می‌سازد.

سوال۸- محلول زنگی شفافی با غلظت مجهول به ما داده شده است. با توجه به اینکه ماده‌ی خشک محلول را داریم، با کمک دستگاه روشی طراحی کنید که غلظت نمونه را بدست آوریم.(۲نمره)

به نام خدا

سازمان ملی پرورش استعدادهای درخشان	**آزمون پایانی نیمسال دوم** **سال تحصیلی ۹۴-۱۳۹۳** **درس: آز و تکنیکِ زیست** **مدّت آزمون: ۱۲۰ دقیقه** **صفحه ۴ از ۶**	**نام و نام‌خانوادگی:** **کلاس:** **شماره صندلی:** **نام دبیر: جنابِ آقای نوحی** **پایه: دوم «تجربی»** **تاریخ: ۱۲ خرداد ۹۴**

دبیرستان علامه حلی تهران

با احترام به شعور و علاقه‌ی بسیار زیاد بچه‌ها، سوالی اهدایی از طرف دکتر تقدیم می‌گردد:

دکتر پ پ پ در حال آزمایش بود که مردی وارد آزمایشگاه شد همینطور که مرد نزدیک‌تر می‌شد محموله‌ای از لوله‌های آزمایش که در دستش بود آشکارتر می‌شد. مرد بعد از سلام علیک گفت که در مراحل آزمایش خود به کمک نیاز دارد. او می‌گفت: ((بعد از انجام آخرین واکنش به محصولاتی رسیدم که بلافاصله بعد از اینکه در معرض نور قرار می‌گرفتند بی‌رنگ می‌شدند؛ یعنی فقط یک لحظه رنگی بودند و بلافاصله بی‌رنگ می‌شدند. یکی از این محصولات محلول آبی رنگ شفاف و دیگری محلول سبز رنگ شفاف و دیگری محلولی بود که آنقدر سریع بی‌رنگ می‌شد که نمی‌شد رنگ آنرا مشاهده کرد، بود. من از ۲ مسیر متفاوت و با واکنش‌های متفاوت به این ۳ محصول رسیدم)) دکتر جون می‌خوام که شما با دستگاه اسپکت خودتون به من بگید که کدوم یکی از این محلول‌ها غلیظ‌تره تا من بتونم همیشه واکنشی رو برای تولید ماده انتخاب کنم که به صرفه‌تر باشه فقط اینو بگم که الان این لوله‌ها رو توی پارچه پیچیدم تا بی‌رنگ نشن، ببینم چی کار می‌کنی‌ها!

دکتر سر تکون دارد وگفت باشه حتماً انجامش می‌دم!

دکتر پ پ پ چراغ‌ها رو خاموش کرد و در درون محموله ۷ تا لوله آزمایش پر از نمونه را مشاهده کرد. یکی حاوی حلال بود و ۶ تای بقیه محصولات بودند ولی این محصولات متأسفانه نامگذاری نشده بودند که کدامشان چه رنگی هستند با این حال ۳ لوله آزمایش در یک پارچه و ۳ تای دیگر در یک پارچه دیگر پیچیده شده بودند که نشان می‌داد یک گروه در یک مسیر واکنشی و گروه دیگر در مسیر جداگانه‌ای تهیه شده‌اند.

دکتر پ پ پ کمی فکر کرد و بدون نگرانی کارش را شروع کرد. او می‌دانست که حداقل برای هریک از رنگ‌های طیف یک بار باید میزان جذب را اندازه‌گیری کند تا متوجه شود ماده‌ی موجود در لوله چه رنگی است. برای این کار او هر لوله را هفت قسمت کرد و میزان جذب‌شان را اندازه گرفت. دکتر بعد از انجام اسپکت به جدول زیر رسید:

طول موج(nm)	گروه اول			گروه دوم		
	لوله۱	لوله۲	لوله۳	لوله۱	لوله۲	لوله۳
بنفش-۴۰۰	A=0.5	A=0.2	A=1	A=0.3	A=0.4	A=1
آبی-۴۵۰	A=0.2	A=0.1	A=1	A=0.2	A=0.1	A=1
نیلی-۵۰۰	A=0.5	A=0.2	A=0.9	A=0.3	A=0.4	A=1
سبز-۵۵۰	A=1	A=0.8	A=0.3	A=0.9	A=1	A=0.4
زرد-۶۰۰	A=1	A=1	A=0.1	A=1	A=1	A=0.2
نارنجی-۶۵۰	A=1	A=1	A=0.3	A=1	A=1	A=0.4
قرمز-۷۰۰	A=0.2	A=1	A=0.9	A=1	A=0.1	A=1

سوال۹- رنگ محلول‌های گروه اول و دوم به ترتیب چه می‌باشد؟(۱نمره)

دکتر پ پ پ بعد از کمی فکر توانست بگوید که غلظت کدام یک از دو لوله‌ی همرنگ غلیظ تر است. او به این نتیجه رسید که برای تولید بیشتر ماده سبز از واکنش ۲ باید استفاده کرد.

سوال۱۰-آیا برای ماده آبی نیز واکنش ۲ به تولید بیشتر می‌انجامد، چرا؟(۱نمره)

به نـام خدا

سازمان ملی پرورش استعدادهای درخشان	**آزمون پایانی نیمسال دوم** **سال تـحـصیلی ۹۴-۱۳۹۳** **درس: آز و تکنیکِ زیست**	**نام و نام‌خانوادگی:** **کلاس:** **شماره صندلی:** **نام دبیر: جنابِ آقای نوحی**
	مدّت آزمون: ۱۲۰ دقیقه **صفحه ۵ از ۶**	**پایه: دوم «تجربی»** **تاریخ: ۱۲ خرداد ۹۴**

دبیرستان علامه حلی تهران

گیاهی- قبل از سؤال‌ها دوره می‌کنم! انتظار ندارم چیزی بلد باشید!

زمانی که کل پیکره گیاه را براساس عملکرد دسته بندی کنیم، سه ناحیه کلّی قابل تشخیص است: قسمت‌هایی در انتقالات مواد، قسمت‌هایی در پوشش و محافظت گیاه در برابر محیط خارج و قسمت‌هایی در ذخیره مواد غذایی و فرم دادن و پر کردن بقیه قسمت‌های گیاه دخیل هستند، این سه قسمت به ترتیب سه بافت هادی، روپوست و زمینه‌ای نامیده می‌شوند.

اگر بخواهیم خیلی دقیق‌تر نگاه کنیم و براساس تفاوت‌های بین سلول‌ها، مجموعه‌ای از سلول‌های یکسان که در کنار هم قرار گرفته‌اند را یک بافت تعریف کنیم، به دسته‌بندی‌های زیر خواهیم رسید: بافت پارانشیمی (یک مجموعه از سلول‌های پارانشیمی)، بافت کلانشیمی، بافت اسکلرانشیمی، بافت چوبی و ... . هر کدام از این‌ها را نیز می‌توان تقسیم کرد مثلا پارانشیم مغزی، پارانشیم پوست (براساس مکان)، پارانشیم فتوسنتزی (کلرانشیم)، پارانشیم هوایی (یا آیرانشیم: حفرات بین سلولی(mea) خیلی بزرگ؛ براساس تمایز و تخصص بیشتر)

در نامگذاری‌های گیاهی، برای برخی مکان‌ها نیز نام‌های مشخصی وجود دارد که نباید این نام‌ها را با بافت‌ها قاطی کنیم؛ برای مثال پوست، مریستم، مغز و ...

چیزی که غالباً گمراه کننده است این می‌باشد که برخی اوقات در یک جمله از هر سه دسته بالا کلماتی باهم به‌کار برده می‌شوند.

برای مثال جملات پایین را ببینید:

- بافت هادی شامل بافت چوبی و بافت پارانشیمی است.
- گاهی در کنار دسته‌جات آوندی دسته‌هایی از بافت اسکلرانشیمی مشاهده می‌شود.
- بافت (موجود در) روپوست عمدتاً پارانشیم است.

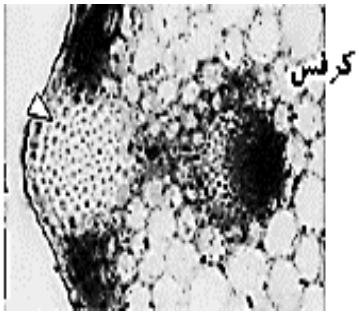
برای تکمیل بحث لازم است که بدانید برای بافت‌های کلانشیمی، پارانشیمی و اسکلرانشیمی تعاریف دقیق و مناسبی وجود دارد:

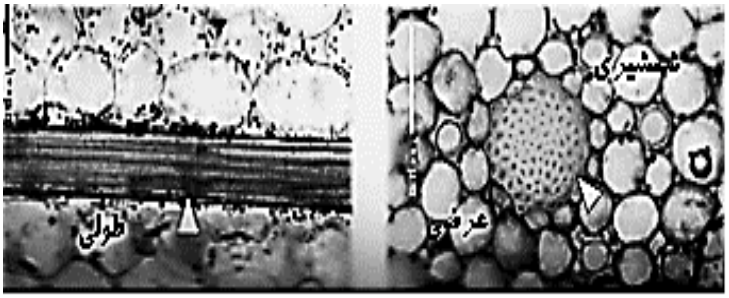
- ✓ پارانشیم : دیواره نخستینِ نازک و سلولزی - زنده و فعال
- ✓ کلانشیم : دیواره نخستینِ ضخیم و سلولزی - ضخامت گاهی به طور نامنظم و گاهی منظم در تمام دیواره - زنده و فعال
- ✓ اسکرانشیم: دیواره ثانویهِ کلفت وچوبی - ضخامت یکنواخت در تمام دیواره - مرده

سؤال۱۱- یکی از رنگ‌های مورد استفاده برای رنگ‌آمیزی بافت‌های گیاهی، رنگ TBO است. TBO که متشکل از چند ماده‌ی رنگی می‌باشد (polychromatic)، دیواره‌های سلولی غیر چوبی را قرمز- صورتی و دیواره‌های چوبی را سبز یا سبزآبی رنگ می‌کند.

الف- بعد از رنگ آمیزی برشِ عرضی ساقه‌ی گیاهِ مجهولی، دیواره‌های سلول‌های روپوست قرمز رنگ مشاهده می‌شوند. چه بافتی در روپوست وجود دارد؟ چرا؟ هل نکن! با توجه به اطلاعات سؤال باید جواب بدی!(۰,۵نمره)

ب- بعد از برش‌گیری دمبرگِ کرفس و برگِ گیاه شمشیری، همانطور که در شکل‌های زیر می‌بینید، دسته‌هایی از سلول‌های با دیواره یکنواخت و ضخیم یافت شدند که نقش استحکامی داشتند. آیا قبل از رنگ‌آمیزی می‌توان متوجه شد که چه بافتی این دسته‌ها را می‌سازد؟ انتظار دارید پس بعد از رنگ‌آمیزی باTBO چه رنگی شوند؟(۱,۵نمره)





به نام خدا

آزمون پایانی نیمسال دوم
سال تحصیلی ۹۴-۱۳۹۳
درس: آز و تکنیکِ زیست

مدّت آزمون: ۱۲۰ دقیقه **صفحه ۶ از ۶**

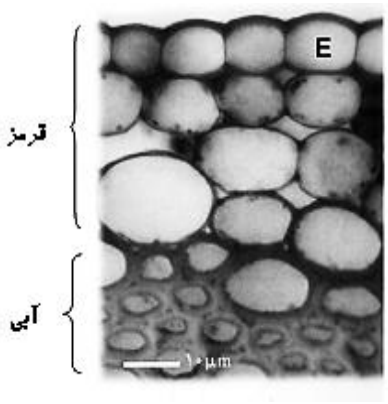
نام و نام‌خانوادگی:

کلاس: **شماره صندلی:**

نام دبیر: جنابِ آقای نوحی

پایه: دوم «تجربی» **تاریخ: ۱۲ خرداد ۹۴**

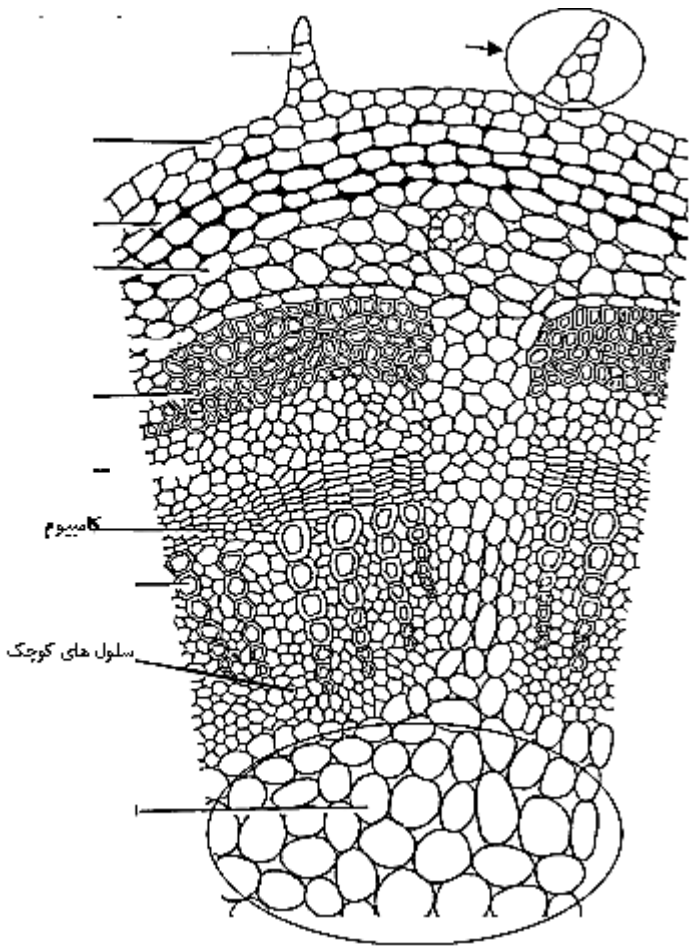
ج- در برش‌های زیر که با TBO رنگ‌آمیزی شده‌اند، چه بافت‌هایی را مشاهده می‌کنید؟ (* حفره‌ی هوا است!) (۱,۵ نمره)



سؤال۱۲- الف- در تصویر زیر در مقابل هر فلشی که مربوط به یکی از بافت‌ها از لحاظ شکل سلول بود (نه همه‌ی فلش‌ها)، نام بافت مربوطه را بنویسید. سپس دور فلش‌هایی که در یک بافت از لحاظ عملکرد قرار می‌گیرند، دایره بکشید. باز هم هل نکن توی توضیحات قبل سوال همه چی رو توضیح دادم! اگه جواب ندی واقعاً نمره منفی داره! (اطلاعات اضافه: کامبیوم: سلول‌های تمایزنیافته میان بافت چوب و آبکش که در گیاهان مسن تقسیم و تبدیل به آوندهای جدید می‌شوند.)(۲نمره)

ب- انتظار دارید در رنگ آمیزی این برش باTBO فلش مربوط به سلول های کوچک وفلش بالای آن چه رنگی شوند؟ چرا؟(۱نمره)

ج-گیاه چند لپه‌ای است؟ چرا؟(۰,۵ نمره)



موفق باشید.

سوال۱-

الف-(۰٫۵نمره)

ب-(۱نمره)

سوال۲-الف- عدد آخر: راه حل در کادر پایین: (۲نمره)

سوال۲-ب-(۰٫۵نمره)

سوال۳-عدد آخر: راه حل در کادر پایین: (۱نمره)

سوال۴-عدد آخر: راه حل در کادر پایین: (۱نمره)

سوال۵-عدد آخر: راه حل در کادر پایین: (۱نمره)

سوال۶-(۱نمره) محورX- محورY-

سوال۷-(۱نمره)

سوال۸-(۲نمره)

سوال۹-(۱نمره)

گروه اول به ترتیب: - - -

گروه دوم به ترتیب: - - -

سوال۱۰-(۱نمره)

سوال۱۱-بیشتر از یک خط نمی‌شه!

الف-(۰,۵نمره)

ب-(۱,۵نمره)

ج-(۱,۵نمره)

سوال۱۲-

الف-(۱نمره)

۱- ۲- ۳- ۴- ۵- ۶- ۷- ۸- ۹- ۱۰-

ب-(۱نمره)

A={ } B={ } C={ }

ج-(۱نمره)

د-(۰,۵نمره)

کامنت‌ها:

کلید سوالات

-۱

الف- رقیق می‌کنیم و بعد ضریب رقت را تأثیر می‌دهیم

ب- غیر یکنواخت بودن نمونه، باید خوب هم بزنیم و دوباره نمونه‌برداری کنیم.

-۲

الف- سلول‌هایی که روی خط‌ها قرار می‌گیرند را اینگونه می‌شماریم(قرارداد من درآوردی): سلول‌های خط‌های بالا و چپ را نمی‌شماریم و راست و پایین را می‌شماریم تا در پایان برخی از سلول‌ها را دوبار نشماریم!

به جدول زیر می‌رسیم:

۵	۷	۴	۳
۸	۳	۴	۳
۳	۷	۴	۴
۵	۵	۶	۵

در مجموع ۷۶ سلول که تقسیم بر ۱۶ می‌کنیم=۱۹

حجم روی هر مربع برابر است با:

$$\frac{1}{400^{mm2}} \times \frac{1}{10^{mm}} \times \left(\frac{10^{mm}}{1^{cm}}\right)^3 = \frac{1}{4^{cm3}} = \left(\frac{1}{4}\right)^{ml}$$

تراکم به خاطر رقیق‌سازی اولیه، برابر است با:

$$\frac{19}{0.25^{ml}} \times \frac{101}{0.5} = 15352$$

این تعداد سلول در هر میلی‌لیتر خون

ب- از آنجایی که تراکم گلبول‌های سفید معمولاً خیلی کمتر است، پس لازم نیست ۲۰۲ برابر رقیق کنیم. با ملانژور دیگری که حجم نهایی‌اش ۱۱ است، ۲۲ برابر رقیق می‌کنیم.

سوال۳-

۳	۳	۱	۳
۲	۳	۲	۳
۲	۳	۲	۳
۳	۳	۴	۳

۴۳ تا در ۱۶ مربع=۲,۶۸ در ۰,۲۵ میلی‌لیتر

در نتیجه ۱۰,۷۵ باسیل در میلی‌لیتر نمونه رقیق شده- در نمونه اصلی ۲۰ برابر بوده یعنی: ۲۱۵

سوال۴-

مساحت کل کف پلیت:π ۹=۲۸,۲ سانتی‌متر مربع

به جای اینکه کل کلنی‌ها را بشماریم تعدادی را انتخاب و تناسب می‌بندیم: ۹ مربع وسط:

۵	۵	۴
۴	۴	۴
۳	۴	۲

در ۱ سانتی‌متر مربع ۳۵/۹=۳,۸

در نتیجه در کل مساحت: $\frac{3.8}{x} = \frac{1}{28.2}$ پس :x=۱۰۷

۱۰۷ سلول در یک میلی‌لیتر نمونه

سوال۵-

با مقایسه عدد سوال ۴ با ۳ متوجه می‌شویم، تنها نیمی از سلول‌ها زنده بوده‌اند. پس اگر از رنگ متیلن بلو استفاده می‌کردیم نیمی از سلول‌ها رنگی می‌شدند: ۱,۵ سلول در هر مربع

سوال۶-

به ترتیب- عبور و طول‌موج

سوال۷-

اصلا با این روش نمی‌توان عدد خاصی بدست آورد! دقت نمودار برای تراکم‌های بالا مناسب است- اصلاً روش برای تراکم‌های بالا که جذب قابل‌توجه و قابل اندازه‌گیری دارند بدست آمده و مناسب است، هرچند که می‌توان با برون‌یابی کردن نمودار در غلظت‌های پایین نیز به نتیجه رسید.

سوال۸-

خیلی آسونه!

سوال۹-

بنفش/آبی/سبز- و گروه دوم به ترتیب آبی/بنفش/سبز رنگ اند.

سوال ۱۰–

بله زیرا جذب بیشتر نشان‌دهنده‌ی غلظت بیشتر است.

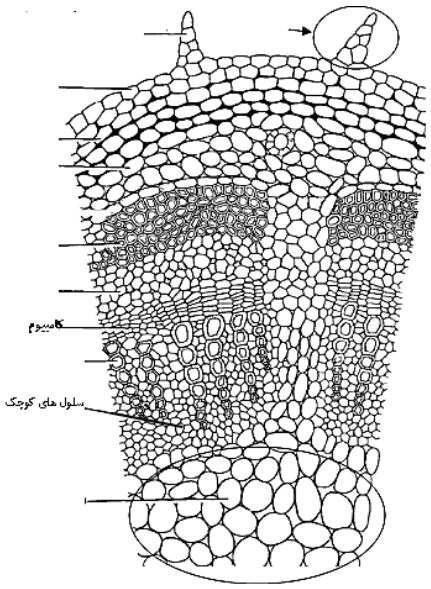
سوال ۱۱–

الف– بافت پارانشیمی، از آنجایی که دیواره‌ها قرمز شده‌اند بنابرین دیواره‌ها سلولزی‌اند و احتمال زیاد پارانشیمی و به احتمال کم کلانشیمی

ب– خیر، با توجه به برش عرضی بین کلانشیم و اسکلرانشیم شک می‌کنیم، ولی برش طولی شمشیری نشان می‌دهد که فیبر هستند که بعد از رنگ آمیزی باید سبز یا سبزآبی شوند ولی کرفس ممکن است کلانشیمی باشد.

ج– اسکلرانشیم، پارانشیم در بافت زمینه ای و پارانشیم در اپی‌درم– پارانشیم هوایی یا آیرانشیم–کلرانشیم هم نصف نمره می‌گیره! به دلیل مشابهت در داشتن حفره هوایی!

سوال ۱۲–



الف– از بالا راست به پایین به ترتیب: ۱–خالی۲– پارانشیمی۳– پارانشیمی۴– کلانشیمی۵– پارانشیمی۶– اسکلرانشیمی۷– آبکش۸– کامبیوم۹– چوب(عنصر آوندی)۱۰– سلول‌های کوچک: تراکئید۱۱– خالی

۱ و۲و۳: اپی‌درم – ۴و۵و۶و۱۱: زمینه‌ای – ۷و۸و۹و۱۰: هادی.

ب– سبز یا سبزآبی چون چوبی اند.

ج– دولپه‌ای؛ دسته‌جات آوندی در یک دایره قرار دارند.

به نام خدا

آزمون پایان ترم دوم

« سال تحصیلی ۹۵ – ۱۳۹۴ »

درس: آز و تکنیکِ زیست

مدّت آزمون: ۹۰ دقیقه | صفحهٔ ۱ از ۳

نام و نام خانوادگی:

کلاس: | شمارهٔ صندلی:

نام دبیر: جنابِ آقای نوحی

پایهٔ: دوم«تجربی» | تاریخ: ۲۹ اُردیبهشت ۹۵

دبیرستان علامه حلی تهران

«پاسخِ پرسش‌ها را فقط در پاسخ‌نامه خوش خط و خوانا بنویسید.»

سوالات یادآوری(۱۰نمره)

اسپکتروفتومتری

۱- تهیه رقت از محلول معلوم در غلظت‌سنجی محلول مجهول با اسپکتروفتومتر به چه خاطر است؟(۰/۵نمره)

۲- رابطه ریاضیاتی بین A و T چیست؟(۰/۵نمره)

۳- در چه طول موجی باید غلظت‌سنجی کنیم؟ چرا؟(۱نمره)

۴- برای غلظت‌سنجی از T استفاده می‌کنیم یا A؟ چرا؟(۱نمره)

۵- برای غلظت‌سنجی یک محلول قرمز رنگ از چه طول‌موج‌هایی می‌توان بهره برد؟(۰/۵نمره)

۶- یک کاربرد برای اسپکتروفتومتر در زیست‌شناسی مثال بزنید. (۰/۵نمره)

۷- نقش کووت بلنک در غلظت‌سنجی چیست؟ محتوی این کووت چیست؟(۱نمره)

گیاهی

۸- رنگ‌آمیزی افتراقی چه کاربردی در گیاه‌شناسی دارد؟(۰/۵نمره)

۹- آیا می‌توان از سه رنگ در رنگ آمیزی گیاهی استفاده کرد؟ چرا؟(۱نمره)

۱۰- بافت کلانشیمی چه تفاوتی با کلرانشیمی دارد؟(۱نمره)

۱۱- وجود بافت اسکلرانشیمی در دستجات آوندی به چه خاطر است؟(۰/۵نمره)

۱۲- چه تفاوتی در نقش بافت اسکلرانشیمی و کلانشیمی وجود دارد؟(۰/۵نمره)

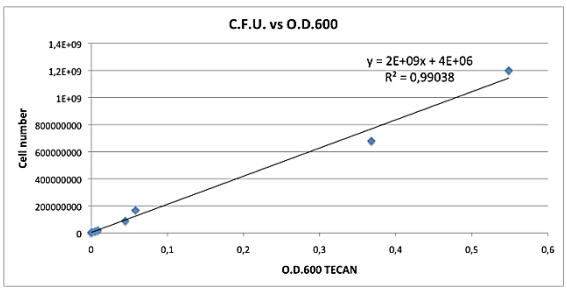
۱۳- یک کاربرد برای حفره‌های هوایی در گیاهان بگویید. (۰/۵نمره)

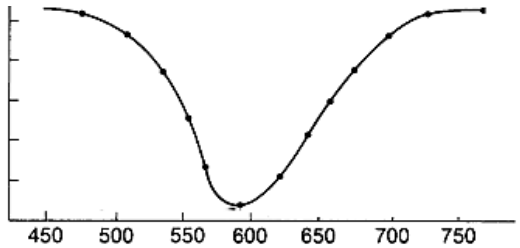
۱۴- آوندهای چوبی در دمبرگ گیاهان در چه سطحی قرار می‌گیرند، زیر یا رو؟ چرا؟(۱نمره)

سوالات تحلیلی(۱۰نمره)

روشی برای تخمین زدن تعداد باکتری‌های موجود در یک محیط کشت مایع با استفاده از اسپکتروفتومتر وجود دارد. در برخی شرکت‌های صنعتی و غذایی که باکتری‌ها را در مقیاس وسیع کشت می‌کنند تا از فرآورده‌های تولید شده توسط آنها بهره‌برداری کنند، این روش سنجش تعداد باکتری به کار می‌آید. در این روش با توجه به میزان نوری که محلول باکتری‌ها جذب می‌کنند و بدست آوردن A و گذاشتن آن روی نمودار استاندارد، تعداد سلول را بدست می‌آورند. دقت کنید که باکتری‌ها طول موج ۶۰۰ نانومتر را بیشتر از بقیه طول موج‌ها جذب می‌کنند.

در زیر دو نمودار مربوطه را مشاهده می‌کنید:





۱۵- محور X و محورY نمودار سمت راست و نمودار سمت چپ مربوط به چه پارامترهایی است؟(۲نمره-آب خوردن!)

۱۶- اگر یک نمونه محیط کشت حاوی باکتری، دارای A=۰,۳ داشته باشیم، چه تعدادی باکتری در آن وجود خواهد داشت؟(۱نمره)

۱۷- برای کالیبراسیون اسپکتروفتومتر در روش فوق از چه محلولی استفاده کنیم؟ در چه طول موجی؟(۱نمره)

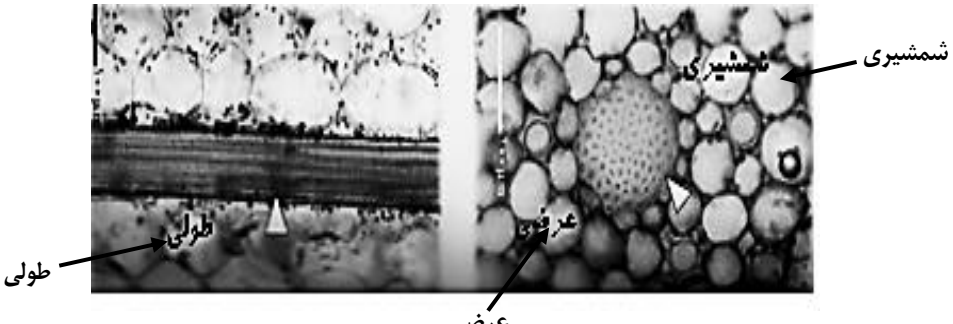
شکل روبرو یک کالریمتر(colorimeter) است. این وسیله دارای یک آینه در قسمت پایین و دو لوله که هر یک در لیوان شفافی قرار گرفته‌اند، می‌باشد. امکان جابه‌جایی(بالا و پایین رفتن) لوله‌ها توسط پیچ‌هایی که به آنها متصل است، وجود دارد. در قسمت بالای دستگاه یک عدد چشمی تعبیه شده است که نور عبوری از لوله‌ها را در یک میدان دید نشان می‌دهد؛ در واقع نیمی از میدان‌دید چشمی را نور عبوری از یکی از لوله‌ها و نیم دیگر را نور عبوری از دیگری، روشن می‌سازد.

۱۸- دو محلول رنگی شفاف یکی با غلظت معلوم و دیگری مجهول به ما داده شده است. با توجه به توضیحاتی که در مورد دستگاه بیان شد، روشی طراحی کنید که غلظت محلول مجهول را بدست آوریم. دقت کنید که حق نداریم محلول معلوم را رقیق کنیم یا از فرمول استفاده کنیم.(۱نمره)

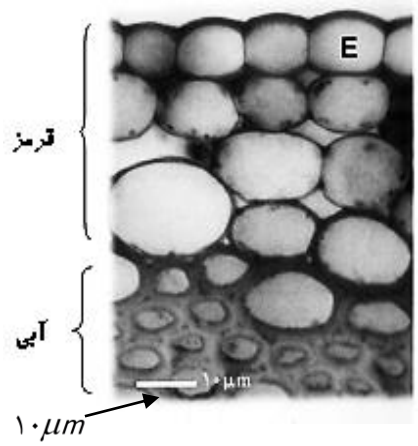
۱۹- یکی از رنگ‌های مورد استفاده برای رنگ‌آمیزی بافت‌های گیاهی، رنگ TBO است. TBO که متشکل از چند ماده‌ی رنگی می‌باشد (polychromatic)، دیواره‌های سلولی غیر چوبی را قرمز- صورتی و دیواره‌های چوبی را سبز یا سبزآبی رنگ می‌کند.

الف- بعد از رنگ آمیزی برشِ عرضی ساقه‌ی گیاهِ مجهولی، دیواره‌های سلول‌های روپوست قرمز رنگ مشاهده می‌شوند. چه بافتی در روپوست وجود دارد؟ چرا؟ (۰/۵نمره)

ب- بعد از برش‌گیری برگِ گیاه شمشیری، همانطور که در شکل‌های زیر می‌بینید، دسته‌هایی از سلول‌های با دیواره یکنواخت ضخیم یافت شدند که نقش استحکامی داشتند. آیا قبل از رنگ‌آمیزی می‌توان متوجه شد که چه بافتی این دسته‌ها را می‌سازد؟ انتظار دارید پس بعد از رنگ‌آمیزی باTBO چه رنگی شوند؟(۱نمره)



ج- در برش زیر که با TBO رنگ‌آمیزی شده‌است، چه بافت‌هایی را مشاهده می‌کنید؟ (۰/۵نمره)



به نام خدا

آزمون پایان ترم دوم

« سال تحصیلی ۹۵ – ۱۳۹۴ »

درس: آز و تکنیکِ زیست

مدّت آزمون: ۹۰ دقیقه **صفحهٔ ۳ از ۳**

نام و نام خانوادگی:

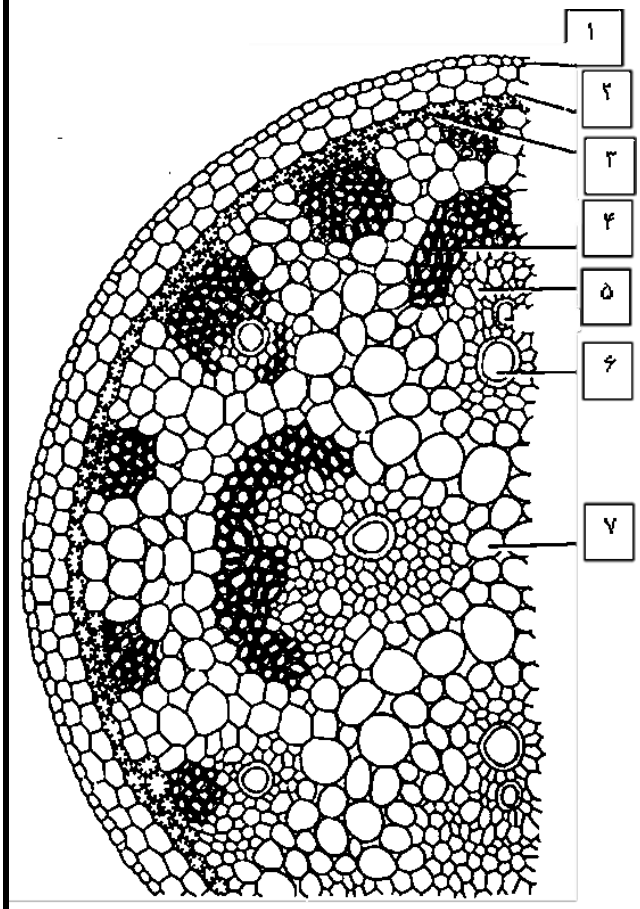
کلاس: **شمارهٔ صندلی:**

نام دبیر: جنابِ آقای نوحی

پایهٔ: دوم«تجربی» **تاریخ: ۲۹ اُردیبهشت ۹۵**

دبیرستان علامه حلّی تهران

۲۰- الف- در تصویر روبرو تعدادی فلش مشاهده می‌کنید. نام بافت مربوطه را جلوی شماره‌ی فلش در پاسخ‌نامه بنویسید. (فلش ۳ به سلول‌های کلروپلاست‌دار اشاره می‌کند.)(۱نمره) در اینجا منظور نام بافت از لحاظ شکل سلول است؛ پارانشیم، کلانشیم و...

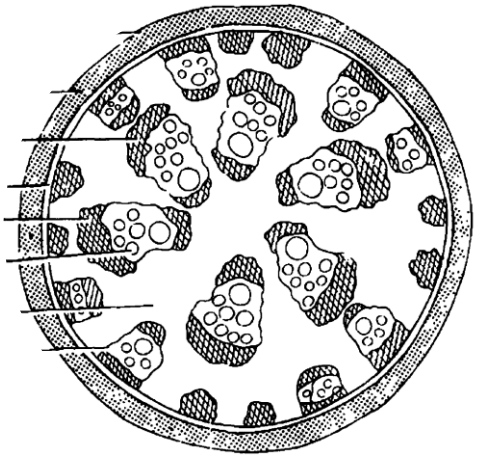


ب-عدد و شماره‌ی فلش‌های مربوط به بافت روپوست، بافت زمینه‌ای و بافت آوندی را به ترتیب در مجموعه‌های A، B، C قرار دهید. (۰,۷۵نمره)

ج- انتظار دارید در رنگ آمیزی این برش باTBO فلش‌های ۴،۵ و۶ چه رنگی شوند؟ (۰,۷۵نمره)

د-گیاه چند لپه‌ای است؟ چرا؟(۰/۵نمره)

دقت کنید، تصویر پایین، ساقه همان گیاه بالا در بزرگنمایی کمتر است.



کامنت‌ها

خب بالاخره می‌تونید حرف‌های خاصِ خودتون رو راجع به امتحان و کلاس‌هایی که داشتیم، بنویسید.

موفق باشید.

به نام خدا

آزمون پایان‌ترم دوم

« سال تحصیلی ۹۵ – ۱۳۹۴ »

درس: آز و تکنیکِ زیست|پاسخنامه

مدّت آزمون: ۹۰ دقیقه **صفحهٔ ۱ از ۲**

نام و نام خانوادگی:

کلاس: **شمارهٔ صندلی:**

نام دبیر: جنابِ آقای نوحی

پایهٔ: دوم«تجربی» **تاریخ: ۲۹ اُردی‌بهشت ۹۴**

دبیرستان علامه حلّی تهران

|| پاسخ هر پرسش را، با دقّت، خوش‌خط و خوانا، در جای مشخّص شده بنویسید.||

۱-

۲-

۳-

۴-

۵-

۶-

۷-

۸-

۹-

۱۰-

۱۱-

۱۲-

۱۳-

۱۴-

۱۵- نمودار راست:محورX-

۱۵- نمودار راست: محورY-

۱۵- نمودار چپ: محورX -

۱۵- نمودار چپ: محورY -

۱۶-

۱۷-

به نام خدا

آزمون پایان‌ترم دوم

«سال تحصیلی ۹۵ – ۱۳۹۴»

درس: آز و تکنیکِ زیست|پاسخنامه

مدّت آزمون: ۹۰ دقیقه

نام و نام خانوادگی:

کلاس: **شمارهٔ صندلی:**

نام دبیر: جنابِ آقای نوحی

پایهٔ: دوم«تجربی» **تاریخ: ۲۹ اُردی‌بهشت ۹۴**

دبیرستان علامه حلّی تهران

۱۸-

۱۹-الف)

۱۹-ب)

۱۹-ج)

۲۰-الف۱)	۲۰-الف۲)	۲۰-الف۳)
۲۰-الف۴)	۲۰-الف۵)	۲۰-الف۶)
۲۰-الف۷)		
۲۰-ب) C=	۲۰-ب) B=	۲۰-ب) A=
۲۰-ج۴)	۲۰-ج۵)	۲۰-ج۶)

۲۰-د)

و کامنت:

کلید سوالات

۱- بدست آوردن نمودار استاندارد

۲- $-\log T = A$

۳- طول موج حداکثر جذب- اینجاست که نور بیشترین برهمکنش با ماده مورد نظر را دارد بنابرین تغییر غلظت ماده روی آن بیشترین تاثیر را دارد و بنابرین نقطه خوبی برای سنجش است. هرچند که دلایل دیگری نیز برای این کار وجود دارد.

۴- A زیرا نمودار استاندارد آن خطی است و کار ساده تر. زیرا با داشتن دو نقطه می‌توانیم نمودار را تهیه کنیم.

۵- از طول موج هایی غیر از ۷۰۰- مثلا آبی و سبز

۶- بررسی عصاره های گیاهی- تخمین کمی پروتئین ها و DNA – هر جا غلظت سنجی لازم باشد.

۷- کالیبراسیون- ۱۰۰ کردن T یا صفر کردنA – محتوی حلالی است که ماده‌ی مورد نظر با غلظت مجهول در آن حل شده است.

۸- تفکیک و تشخیص نوع بافت‌ها در برش گیاهی

۹- بله، به شرطی که رنگ‌ها قسمت‌های مختلفی را رنگ کنند.

۱۰- در دیواره و در وظیفه- کلرانشیم فتوسنتزی است ولی کلانشیم استحکامی

۱۱- استحکام

۱۲- هیچ!

۱۳- رفع پدیده‌ی حباب دار شدگی با استفاده از حفرات نزدیک آوندهای چوب- سبک شدن ساقه جهت شناوری در گیاهان آبزی- در شرایط

غرقابی که کمبود اکسیژن وجود دارد: رفع بی‌هوازی شدن محیط

۱۴- سطح رویی. زیرا در ساقه داخل تر و مرکزی تر اند و در نتیجه در دمبرگ رو قرار می‌گیرند.

۱۵- نمودار سمت راست: A و تعداد سلول

نمودار سمت چپ: طول موج و عبور

۱۶- ۶۰۰۰۰۰۰۰۰

۱۷- از محلول محیط کشت تازه تهیه شده و استریل-طول موج ۶۰۰

۱۸- خیلی آسونه! ☺

۱۹-

الف- بافت پارانشیمی، از آنجایی که دیواره‌ها قرمز شده‌اند بنابرین دیواره‌ها سلولزی‌اند و سلول‌ها پارانشیمی

ب- چون دیواره‌ها یکنواخت ضخیم‌اند پس اسکرانشیمی اند- سبز آبی

ج- اسکلرانشیم و پارانشیم

۲۰-

الف-

۱–پارانشیمی ۲– پارانشیمی۳– کلرانشیمی۴– اسکلرانشیمی ۵– آبکش۶ – چوب ۷– پارانشیم

۱ و۲و۳: روپوست – ۴و۵و۶: هادی. ۷ زمینه‌ای

ب–

۴–سبز آبی

۵–قرمز

۶–سبز آبی

ج– تک لپه‌ای؛ دسته‌جات آوندی در بیش از یک دایره قرار دارند.