

آزمایشگاه آموزشی
بیست و دومین المپیاد
زیست‌شناسی ایران

نیمه‌سنجشی

فیزیولوژی.

روز هفتم
۹۸/۵/۱۵

● گیاهی. استخراج کافئین از برگ گیاه (۱۲ نمره) | اندازه‌گیری کمی رنگیزه‌ها با اسپکتروفتومتر (۱۴ نمره) | اندازه‌گیری غلظت آنزیم آلfa آمیلاز (۲۴ نمره) | شناسایی کیفی رنگیزه‌ها با استفاده از TLC (۱۵ نمره)

● جانوری. تیتراسیون آسپیرین (۳۵ نمره)



این فایل به منظور آموزش عملی دانش پژوهان المپیاد زیست‌شناسی ایران گردآوری شده است.

به نکات زیر دقت کنید.

- تمامی پاسخ های خود را در پاخ نامه بنویسید. به هیچ وجه پاسخ های مندرج در برگه سوالات بررسی نخواهد شد.
- تمامی پاسخ های خود را تا سه رقم اعشار گرد کنید.
- مواد و وسایل خود را چک کنید. در صورت نقص در هر یک از مواد یا وسایل، تا 15 دقیقه پس از شروع تسک مهلت دارید تا با بالا بردن نشان قرمز، به مسئول آزمایشگاه اطلاع دهید.
- پس از به صدا در آمدن زنگ، بلافاصله خودکار خود را روی میز گذاشته و پروتوکل و پاسخ نامه خود را ببندید.
- به هیچ یک از سوالات شما پاسخ داده نخواهد شد. تنها در صورت بروز مشکل حاد، با بالا بردن نشان قرمز، به مسئول آزمایشگاه اطلاع دهید.
- در صورت ننوشتن نام یا شماره میز خود بر روی نمونه هایی که باید تحویل دهید، نمره آن برای شما محاسبه نخواهد شد.
- مسئول آزمایشگاه از جذب های شما عکس خواهد گرفت. تنها در صورتی نمره بخش جذب را خواهید گرفت که پاسخ شما همان عددی باشد که مسئول آزمایشگاه ثبت کرده است.

لیست مواد و وسایل

گیاهی

۱. دی کلرومتان (فالكون DCM)
۲. عصاره A (ویال A)
۳. عصاره B (ویال B)
۴. عصاره C1 (ویال C1)
۵. عصاره C2 (ویال C2)
۶. عصاره M (ویال M)
۷. عصاره N (ویال N)
۸. بافر (ویال بافر)
۹. نشاسته (ویال p)
۱۰. لوگول (ویال n)
۱۱. اتر نفت (ویال EN)
۱۲. استون (ویال استن)
۱۳. چای کیسه‌ای ۵ عدد
۱۴. هیتر
۱۵. بشر
۱۶. میکروپیپت ۱۰۰ - ۱۰۰۰
۱۷. رک تیپس آبی
۱۸. کاغذ صافی
۱۹. دکانتور
۲۰. پایه و گیره
۲۱. تیپس زرد ۲ عدد
۲۲. ارلن مایر کوچک
۲۳. کووت ۶ عدد
۲۴. رک کووت
۲۵. دستمال کاغذی ۳ عدد
۲۶. قیف
۲۷. تانک کروماتوگرافی
۲۸. کاغذ TLC
۲۹. پیست آب مقطر
۳۰. دستکش
۳۱. کرنومتر
۳۲. مارکر
۳۳. نشان زرد و قرمز و سبز
۳۴. Waste تر
۳۵. Waste خشک
۳۶. ماشین حساب
۳۷. مداد
۳۸. خط‌مش

جانوری

۱. محلول ۰.۱ مولار NaOH (فالكون ۵۰ میلی‌لیتری)
۲. نشانگر فنیل فتالئین (ویال ۱۰.۵ l)
۳. پایه و گیره
۴. بورت
۵. پیپت ۲۵ میلی‌لیتری
۶. ارلن مایر بزرگ
۷. بالن ژوژه ۱۰۰ میلی‌لیتری
۸. پوار
۹. قطره‌چکان
۱۰. قرص آسپیرین ۲ عدد (در ظرف بسته دور از رطوبت قرار داده شده است)
۱۱. نشان آبی

استخراج کافئین از برگ چای (۱۲ نمره)

کافئین یک ماده طبیعی است که در بعضی گیاهان یافت می‌شود. این ماده بیشتر به عنوان محرک و اعتیادآور شناخته شده و در پزشکی نیز کاربرد دارویی دارد. از منابع کافئین چای و قهوه است. در این بخش قصد داریم کافئین موجود در برگ چای را استخراج کنیم. مطابق مراحل زیر آزمایش را انجام داده و در فاصله‌های زمانی ایجاد شده، بقیه بخش‌های پروتوکول را انجام دهید.

۱. ابتدا ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر درون بشر ریخته و بر روی هیتر قرار دهید تا شروع به جوشیدن کند.
 ۲. ۵ عدد چای کیسه‌ای را در آب در حال جوش قرار دهید و حداکثر ۵ دقیقه صبر کنید تا آب کاملاً قهوه‌ای رنگ شود. (گهگاهی آن را با استفاده از تیپس تمیز هم بزنید.) مواظب باشید که تمامی آب درون بشر تبخیر نشود.
 ۳. بشر را از روی هیتر بردارید و بعد از مقداری سرد شدن، شماره میز خود را روی آن نوشته و با بالا بردن نشان سبز آن را به مسئول مربوطه تحویل دهید تا درون یخچال بگذارد. با گذشت ۵ دقیقه به مسئول مربوطه اعلام کنید که بشر را به شما برگرداند. توجه داشته باشید که چای کیسه‌ای را تا این مرحله نباید دور بریزید.
 ۴. مطمئن شوید که دمای محلول تقریباً برابر با دمای اتاق است. سپس با فشار دادن کیسه‌های چای، آب‌های جذب شده‌ی آن را نیز به طور کامل درون بشر ریخته و سپس چای‌ها را دور بریزید (تا جایی که می‌توانید کیسه چای‌ها را پاره نکنید و محتویات آن‌ها را داخل بشر نریزید).
 ۵. محلول را با عبور از کاغذ صافی، داخل دکانتور ریخته و به آرامی ۱۰ میلی لیتر دی کلرومتان (فالكون DCM) به آن اضافه کنید و به مدت ۲ دقیقه آن را هم بزنید. هر ۳۰ ثانیه یک بار در دکانتور را باز کنید تا بخارهای ایجاد شده خارج شوند.
- دکانتور را حدود ۳ دقیقه ثابت بگذارید تا دو فاز از هم به طور کامل جدا شوند. می‌توانید به آرامی دکانتور را تکان دهید تا دو فاز سریع‌تر از هم جدا شوند. سپس تمامی فاز پایینی را درون ارلن کوچک بریزید و فاز بالایی را در دکانتور نگه دارید. فاز پایینی‌ای که جدا می‌کنید باید کاملاً شفاف و زیتونی رنگ باشد و هیچ ماده‌ای از فاز بالایی نباید درون آن وجود داشته باشد.
- سوال ۱.۱:** فاز ارگانیکی که درون ارلن جمع‌آوری کرده‌اید را با بالا بردن نشان سبز به مسئول مربوطه تحویل دهید (شماره میز خود را روی آن بنویسید). پس از انجام آنالیزهای لازم بر روی عصاره‌ای که استخراج کرده‌اید، با توجه به استانداردهای مد نظر مسئولین، جدول زیر پس از پایان زمان آزمایشگاه توسط مسئول مربوطه پر می‌شود. به همین دلیل لطفاً در جدول زیر چیزی ننویسید. (۱۲ نمره)

| استاندارد | A (۶ نمره) | B (۳ نمره) | C (۳ نمره) |
|-----------|------------|------------|------------|
| وضعیت | | | |

اندازه گیری کمی رنگیزه ها با استفاده از اسپکتروفوتومتر (۱۴ نمره)

یکی از راه‌های تفکیک بین گیاه سالم و آفت‌زده، مقایسه محتوای کلروفیلی آن‌هاست. در این بخش شما محتوای کلروفیلی دو گیاه A و B را بررسی خواهید کرد و مشخص می‌کنید که کدام گیاه آفت زده است. عصاره‌های گیاهان A و B در اختیار شما قرار گرفته است.

۱. با بالابردن نشان زرد از مسئولین آزمایشگاه بخواهید تا برای استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر به شما نوبت دهد (وقت شما در این ایستگاه ۳ دقیقه خواهد بود) (کووت و اتانول و تیپس در ایستگاه وجود دارد).
۲. نیم میلی‌لیتر از هر عصاره را به کووت‌هایی که در ایستگاه به شما داده می‌شود، انتقال دهید.
۳. به هر کووت ۱.۵ میلی لیتر اتانول اضافه کرده و خوب پیپتاژ کنید.
۴. جذب نمونه ها را در دو طول موج ۶۴۹ و ۶۶۵ نانومتر اندازه گیری کنید.

سوال ۲.۱: جدول زیر را کامل کنید (غلظت‌های کلروفیل کل و کلروفیل a, b را با استفاده از معادله های زیر بدست آورید) (۱۰.۵ نمره. جذب ها ۱.۵ نمره. غلظت ها ۰.۷۵ نمره)

$$\text{Total chlorophyll (mg/L)} = 20.0 (A_{649}) + 6.1 (A_{665})$$

$$\text{Chlorophyll a (mg/L)} = -5.76 (A_{649}) + 13.7 (A_{665})$$

$$\text{Chlorophyll b (mg/L)} = 25.8 (A_{649}) - 7.7 (A_{665})$$

| عصاره | جذب در ۶۴۹ نانومتر | جذب در ۶۶۵ نانومتر | کلروفیل کل | کلروفیل a | کلروفیل b |
|-------|--------------------|--------------------|------------|-----------|-----------|
| A | | | | | |
| B | | | | | |

سوال ۲.۲: نسبت غلظت کلروفیل a به b را برای عصاره های A و B محاسبه کنید (۰.۵ نمره).

| عصاره | نسبت کلروفیل a به b |
|-------|---------------------|
| A | |
| B | |

سوال ۲.۳: با توجه به نتایج به دست آمده در این بخش، درستی یا نادرستی گزاره های زیر را مشخص کنید (۳ نمره. هر گزاره ۱ نمره. نمره منفی برابر با نمره گزاره).

الف. گیاه A تحت حمله آفت قرار گرفته است.

ب. هنگام آلودگی به آفت تجزیه کلروفیل a بیشتر از کلروفیل b است.

ج. نرخ فتوسنتزی گیاه B از گیاه A بیشتر است.

اندازه گیری غلظت آنزیم آلفا آمیلاز (۲۴ نمره)

نمونه های C1 و C2 عصاره های دانه های دو گیاه هستند. می خواهیم غلظت آنزیم آلفا آمیلاز را در آن ها مقایسه کنیم و تشخیص دهیم که کدام یک مربوط به گیاه گزروفیت است. نمونه های C1 و C2 در اختیار شما قرار دارد.

۱. با رقیق کردن عصاره ها، غلظت های مناسب آنزیم را در کووت مطابق جدول زیر بسازید.

| کووت ۱ | کووت ۲ | کووت ۳ | |
|--------|--------|--------|-------------|
| 500 | 200 | 100 | آلفا آمیلاز |
| 500 | 650 | 700 | بافر |
| 500 | 650 | 700 | آب مقطر |

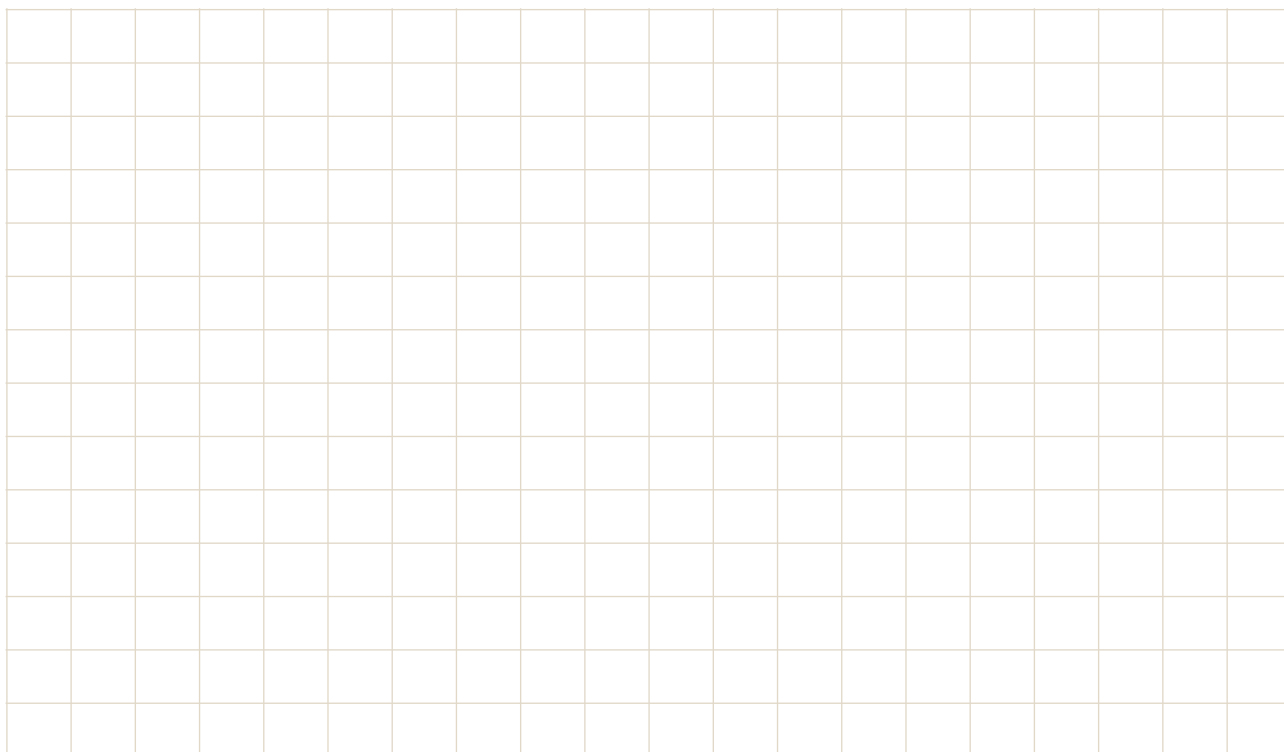
۲. ۵۰۰ میکرولیتر چسب نشاسته (ویال p) را به کووت ها اضافه کرده و پس از ۵ دقیقه ۱۰۰ میکرولیتر لوگول (ویال n) به آن اضافه کنید.

۳. با بالا بردن نشان زرد جذب محلول ها را در طول موج ۶۴۰ نانومتر خوانش کنید (وقت شما در این ایستگاه ۱ دقیقه خواهد بود).

سوال ۳.۱: جذب اصلاح شده محلول ها را در جدول زیر وارد کنید (۱۸ نمره).

| کووت ۱ از نمونه C1 | کووت ۲ از نمونه C1 | کووت ۳ از نمونه C1 | کووت ۱ از نمونه C2 | کووت ۲ از نمونه C2 | کووت ۳ از نمونه C2 | جذب |
|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----|
| | | | | | | |

سوال ۳.۲: با استفاده از نتایج بدست آمده، نمودار جذب (محور y) به غلظت آنزیم (محور x) را برای هر دو نمونه رسم کنید (۳ نمره).



سوال ۳.۳: با توجه به نتایج بدست آمده تعیین کنید کدام یک از نمونه‌ها مربوط به گیاهی مزوفیت است؟ (در کادر مربوطه ضربدر بزنید) (۳ نمره. نمره منفی دو برابر سوال)

| | |
|--|----|
| | C1 |
| | C2 |

شناسایی کیفی رنگیزه ها با استفاده از TLC (۱۵ نمره)

یکی از راه‌های تفکیک بین گیاه سالم و آفت زده، مقایسه میزان کیفی هر کدام از رنگیزه‌هایش است. در این بخش شما به بررسی کیفی رنگیزه‌ها در دو گیاه M و N توسط تکنیک TLC خواهید پرداخت و مشخص می‌کنید که کدام گیاه آفت‌زده است. عصاره‌های گیاهان M و N در اختیار شما قرار گرفته است.

- ۱۰ میلی لیتر اترنفت و استون (با نسبت ۳ اترنفت: ۲ استون) را به تانک کروماتوگرافی خود اضافه کنید و درب آن را ببندید و حداقل ۵ دقیقه صبر کنید.
۲. به آرامی با یک مداد در حاشیه‌های کاغذ TLC خود (۱ سانتی متر از سطح بالا برای نقطه پایان و ۱ سانتی متر از پایین برای نقطه شروع) خط بکشید. همچنین کاغذ خود را با کشیدن خطی عمودی در وسط به دو بخش راست و چپ تقسیم کنید.
۳. با تیپس زرد مقداری از عصاره M را برداشته و آن را به صورت نقطه ای در وسط خط پایین بخش راست کاغذ TLC لود کنید.
۴. همین کار را برای عصاره N در وسط خط پایین بخش چپ کاغذ TLC انجام دهید.
۵. پس از خشک شدن کاغذ TLC، آن را درون تانک قرار دهید.
۶. پس از اتمام فرایند، نام خود را در پشت کاغذ بنویسید.
۷. با بالا بردن نشان قرمز، کاغذ TLC خود را به مسئولین آزمایشگاه تحویل دهید.

سوال ۴.۱: مسئول آزمایشگاه با توجه به کیفیت کاغذ TLC شما، نمره شما از این بخش را در این قسمت وارد خواهد کرد. لطفا در آن چیزی ننویسید (۷ نمره).

سوال ۴.۲: مقدار R_f را برای ۳ باند بالایی هر کدام از عصاره‌ها محاسبه کنید و نام هر کدام را بنویسید (بالاترین باند، باند ۱ است) (دقت کنید که تنها رنگیزه‌های فتوسنتزی اصلی مد نظر است) (۴.۵ نمره. نمره منفی برای رنگیزه‌ها برابر با نمره هر خانه).

| شماره باند | مقدار R_f برای باندهای بخش راست | مقدار R_f برای باندهای بخش چپ | نام رنگیزه |
|------------|-----------------------------------|---------------------------------|------------|
| ۱ | | | |
| ۲ | | | |
| ۳ | | | |

سوال ۴.۳: با توجه به نتایج این بخش و همچنین دانسته های خود، درستی یا نادرستی گزاره های زیر را تعیین کنید (۳.۵ نمره. نمره منفی برابر با نمره گزاره).

- الف. تفاوت مقدار R_f کلروفیل a و b به دلیل تفاوت وزن مولکولی آنهاست.
- ب. آفت بر روی غلظت گزانتوفیل تاثیر می گذارد.
- ج. آفت بر روی غلظت بتا-کروتین تاثیر می گذارد.
- د. می توان گفت که گیاه M تحت حمله آفت قرار گرفته است.
- ه. اگر محلول تانک قطبی تر باشد، رنگیزه ها به خوبی جدا نمی شوند.
- و. برای مقایسه غلظت رنگیزه های گیاهان N و M ، باید تعداد نقطه گذاری ها یکسان باشد.
- ز. اگر گیاه M همان گیاه A در بخش دوم و گیاه N همان گیاه B در بخش دوم باشد، با توجه به نتایج این بخش و بخش دوم، تفاوت معناداری در غلظت کلروفیل های این دو گیاه به چشم نمی خورد.

تیتراسیون آسپرین (۳۵ نمره)

استیل سالیسیلیک اسید (Aspirin) با فرمول مولکولی $C_9H_8O_4$ یک ترکیب آروماتیک به حساب می‌آید زیرا در ساختار آن یک حلقه بنزنی وجود دارد. آسپرین به‌طور طبیعی در پوست درخت بید یافت می‌شود. آسپرین به رده درمانی داروهای ضد التهاب غیر استروئیدی تعلق دارد و به شکل قرص در دسترس است.

پیشینه استفاده از ترکیبات دارویی حاوی سالیسیلیک اسید به دوران باستان بازمی‌گردد. بیش از ۳۵۰۰ سال پیش بشر این پودر را می‌شناخت. در سال ۱۸۰۰ یک باستان‌شناس آلمانی که در مصر تحقیق می‌کرد، با ترجمه یکی از پاپیروس‌های مصری متوجه شد که بیش از ۸۷۷ نوع مواد دارویی برای مصارف مختلف در مصر باستان شناخته شده بود که یکی از آن‌ها سالیسیلیک اسید بود که برای برطرف کردن درد از آن استفاده می‌شد. در نوشته‌های دیگری که در یونان بدست آمده‌است نیز مشخص شده که بشر حدود ۴۰۰ سال پیش از میلاد از شیره پوست درخت بید برای درمان تب و درد استفاده می‌کرده‌است. همچنین آن‌ها هنگام زایمان زنان از این ماده برای کاهش درد استفاده می‌کردند. امروزه مشخص شده که ماده موجود در این شیره اسید سالیسیلیک است. در سال ۱۷۶۳ یک کشیش انگلیسی به نام ادوارد استون مقاله‌ای در جلسه سلطنتی انگلستان ارائه داد که در آن استفاده از برگ درخت بید را حتی در درمان مالاریا نیز مؤثر معرفی کرده بود. ۱۰۰ سال بعد یک پزشک اسکاتلندی با همین ترکیب توانست عوارض ناشی از رماتیسم را به طرز معجزه آسایی کاهش دهد. بعدها چارلز فردریک گرهارت در سال ۱۸۵۹ موفق به تهیه استیل سالیسیلیک اسید ناخالص شد؛ و در ماه مارس ۱۸۹۹ شرکت بایر محصول خود بنام آسپرین را به ثبت رساند. در آزمایشی به منظور محاسبه کلیرانس کلیوی آسپرین در فردی مشکوک به نارسایی کلیوی، یک عدد قرص آسپرین به او داده شد.

فرمول محاسبه کلیرانس به صورت زیر است :

$$Ca = \frac{Ua \cdot V}{Pa}$$

Ca = کلیرانس کلیوی آسپرین (min/ml)

Ua = غلظت آسپرین در ادرار (lit/mol)

Pa = غلظت پلاسمایی آسپرین (lit/mol)

V = مقدار تولید ادرار در واحد زمان (min/ml)

مقادیر اندازه گیری شده برای $V = 2$ ، $Ua = 0.01$ است .

و مقدار Pa به علت تجزیه و دفع تابعی از زمان و مقدار اولیه آسپرین در قرص بوده که توسط فرمول زیر محاسبه می شود :

$$Pa = (A0 \cdot e^{-T}) - 0.01 / 2$$

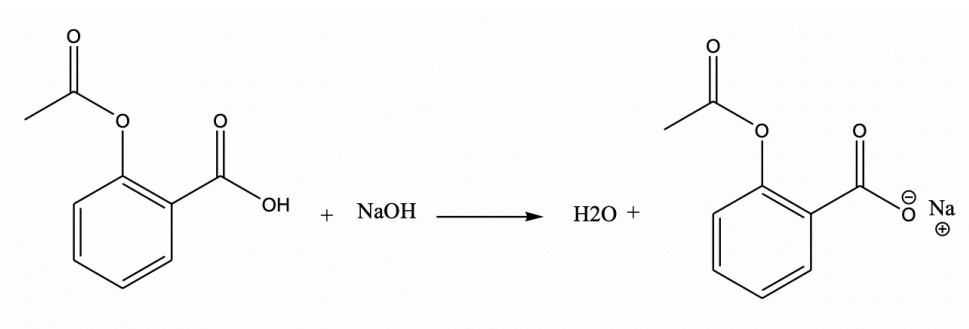
$A0$ = مقدار آسپرین موجود در یک قرص به مول

T = زمان گذشته از وقتی که قرص بلعیده شده است به دقیقه

e = عدد نپر 2.178

برای محاسبه مقدار مول آسپرین موجود در قرص از تیتراسیون استفاده می‌کنیم . مراحل انجام این کار به شرح زیر می باشد :

واکنش انجام شده در هنگام تیتراسیون:



این تیتراسیون، یک تیتراسیون اسید و باز است. شناساگر نقطه‌ی پایانی این تیتراسیون فنل‌فتالئین است. این شناساگر در pH های خنثی و اسیدی بی‌رنگ است، ولی در pH های بازی به رنگ ارغوانی است. محلول آسپرین اسیدی است و هنگامی تمام پروتون‌های آسپرین با سود واکنش بدهد، سود اضافی موجب می‌شود محلول بازی می‌شود و رنگ محلول ارغوانی می‌شود.

توجه کنید که هر وقت هر قطره سود را درون محلول می‌اندازیم، به طور موقت رنگ محلول صورتی می‌شود، ولی با هم زدن محلول دوباره محلول بی‌رنگ می‌شود. توجه کنید که نقطه ی پایانی رنگ صورتی پایدار دارد.

حل کردن قرص ها:

قرص های آسپرین در محلول آب و الکل به راحتی حل می‌شود. به هر کدام از شماها یک بالن ژوژه داده شده است که درون آن محلول آب و الکل ریخته شده است. شما کافی است دو عدد قرص را درون بالن ژوژه بیندازید و به مدت ۱ دقیقه بالن ژوژه خود را به صورت دورانی تکان دهید. پس از حل شدن قرص به مدت ۲ تا ۳ دقیقه ساکن بماند سپس با استفاده از آب مقطر بالن ژوژه خود را به حجم برسانید.

توجه کنید که محلول کاملاً شفاف نخواهید داشت.

روش کار:

۱. بالن ژوژه را مطابق دستوری که در قبل توضیح داده شده است، به حجم برسانید.
۲. با کمک پیپت، ۲۵cc از محلول مجهول خود را درون ارلن مایر منتقل کنید.
۳. ۳ قطره محلول فنل‌فتالئین درون ارلن مایر بریزید.
۴. بورت خود را با محلول سود پر کنید (توجه کنید که بورت شما از قبل با سود کر داده شده است و نیازی نیست شما آن را کر بدهید. البته حواستان باشد که حبابی زیر پیچ بورت نباشد).
۵. ابتدا به محلول مجهول خود که درون ارلن مایر است ، ۵ میلی لیتر از سود درون بورت اضافه کنید.
۶. ارلن خود را به مدت ۱ دقیقه روی هیتر با درجه حرارت ۱۵۰ قرار دهید .
۷. ادامه تیتراسیون را تا رسیدن به نقطه پایانی ادامه دهید .
۸. این آزمایش را تا دوبار دیگر انجام بدهید .

جدول تیتراسیون

| اول | دوم | سوم |
|-----|-----|------------|
| | | حجم آغازی |
| | | حجم پایانی |
| | | حجم مصرفی |

| | |
|-----------------------------------|--|
| حجم نهایی (V_{tit}) (۱۵ نمره) | |
|-----------------------------------|--|

محاسبات (جرم مولی آسپرین = 180.158g/mole)

| | |
|-------------------------------|--|
| مول آسپرین در هر قرص (۳ نمره) | |
|-------------------------------|--|

| | |
|------------------------------------|--|
| میلی گرم آسپرین در هر قرص (۷ نمره) | |
|------------------------------------|--|

پس از انجام تیتراسیون مقدار مول آسپرین در هر قرص را با بلند کردن **sign** آبی از مسئول آزمایشگاه تحویل بگیرید.
 توجه : این مقدار الزاما با جواب درست بخش قبل برابر نمی باشد .
 توجه : ادامه محاسبات این بخش را با داده‌ای که به شما تحویل داده شده انجام دهید .
 حال با توجه به اینکه اندازه گیری‌های بخش قبل 3 دقیقه بعد از بلعیدن قرص انجام شده باشد ، Ca را محاسبه کنید.
 (۱۰ نمره)

| | |
|----|--|
| Ca | |
|----|--|