آزمایشگاه آموزشی
بیست‌ودومین المپیاد
زیست‌شناسی ایران

فیزیولوژی گیاهی

محتوای تکمیلی. کلید

روز دوم
۹۸/۴/۲۷

جداسازی رنگیزه با دکانتور | جداسازی رنگیزه با کاغذ TLC | کلید پروتوکل

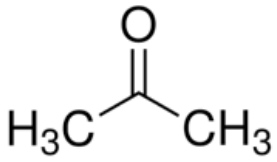
جداسازی رنگیزه با دکانتور

در این آزمایشگاه می خواهیم محلول رنگیزه های مختلف را از یک دیگر جداسازی کنیم. هدف از این جداسازی می تواند بررسی شدت جذب رنگیزه ها در طول موج های مختلف و یا به دست آوردن غلظت آن ها در محلول باشد. همانطور که توضیح دادیم ۴ رنگیزه گیاهی اصلی از نظر ساختاری با یکدیگر متفاوت هستند. نتیجه این تفاوت ساختار تفاوت در قطبیت و میزان انحلال پذیری است. از بین این چهار مولکول، کاروتن از همه ناقطبی تر و گزانتوفیل از همه قطبی تر است. از بین دو کلروفیل نیز نوع a نسبت به نوع b ناقطبی‌تر است. پس ترتیب مقدار انحلال پذیری این ۴ مولکول در یک محلول ناقطبی برابر است با:

کاروتن > کلروفیل a > کلروفیل b > گزانتوفیل

ما می توانیم در آزمایشگاه بر اساس همین تفاوت در مقدار انحلال پذیری ۴ رنگیزه را از یکدیگر جدا کنیم. از طرفی با متفاوت بودن چگالی حلال ها ، می توانیم حلال ها را از یکدیگر تفکیک کرده و در نتیجه محلول هایی محتوی ۴ رنگیزه متفاوت خواهیم داشت. پس اساس جداسازی در این آزمایشگاه اختلاف انحلال پذیری رنگیزه ها و تفاوت چگالی حلال ها می باشد.

برای جداسازی رنگیزه ها مراحل زیر را به ترتیب انجام می دهیم:

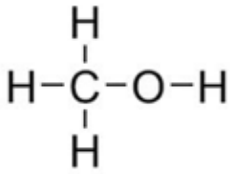


۱. در قدم اول باید تمامای رنگیزه هایی که داخل سلول های گیاه هستند رو استخراج کنیم. برای این کار باید از ماده ای استفاده کنیم که بتواندمولکول های رنگیزه که جز لیپیدها هستند را در خودش حل کند. بهترین ماده برای دستیابی به این هدف استون (با چگالی= ۰.۷۹۱g/mL) است.

۲.به عصاره گیاهی هم اندازه خودش اترنفت (چگالی= ۰.۶۵۳g/mL-) اضافه می کنیم.

اترنفت از هیدروکربن های آلیفاتیک مختلف تشکیل شده است. بدیهتا فاز بالایی اترنفت و فاز پایینی استون است(چگالی استون از اترنفت بیش‌تر است). اترنفت رنگیزه های داخل استون را در خودش حل می کند و در نتیجه

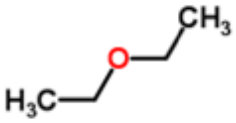
آنچه در داخل فاز استون می ماند، ناخالصی های مربوط به عصاره گیاهی است. حال فاز استونی رادور می ریزیم دور و فاز اترنفت را نگه می داریم.



۳. به محلول اترنفت ، متانول(چگالی= ۰.۷۹۲g/mL) اضافه می کنیم و محلول را هم می زنیم. متانول نسبت به اترنفت قطبی تر است و می تواند اجزای قطبی را در خود حل کند. پس از ۴ رنگیزه ۲ رنگیزه قطبی تر (کلروفیل b و گزانتوفیل) داخل متانول حل می شوند و ۲ رنگیزه غیرقطبی تر (کلروفیل a و کاروتن) داخل اترنفت باقی می مانند. پس از هم زدن محلول صبر می کنیم تا دو فاز شود. بدیهتا متانول فاز پایینی و اترنفت فاز بالایی را تشکیل می دهند. دو فاز رااز یک دیگر جدا می کنیم و در دو ظرف مختلف می ریزیم. (نکته:گاهی اوقات دو فاز به خوبی از یکدیگر جدا نمی شوند و مرز مشخصی تشکیل نمی دهند. تو این مواقع چند میلی لیتر آب مقطر به محلول اضافه می کنیم تا قطبیت محلول بیشتر شود و دو فاز بهتر از یکدیگر جدا شوند) فاز اترنفت جداشده را فاز A و فاز متانول اضافه شده را فاز B می نامیم.

۴. فاز A مرحله قبل را داخل دکانتور ریخته و به آن پتاس متانولی اضافه می کنیم. پتاس متانولی همان متانول است که در آن پتاسیم هیدروکسید (KOH) حل کرده ایم. وظیفه پتاس متانولی حل کردن کلروفیل است و چگالی آن تقریبا همان چگالی متانول خالص است. فاز A حالا به دو فاز تقسیم می شود. فاز بالایی از اترنفت تشکیل شده که آن را فاز Cمی نامیم و فاز پایینی از پتاس متانولی تشکیل شده که آن را فاز D می نامیم.

همانطور که بالاتر گفته شد، پتاس متانولی کلروفیل ها را حل کرده و از بقیه اجزا جدا می کند. پس در فاز D کلروفیل a و در فاز C کاروتن دیده می شود. رنگ محلول کلروفیل a سبزآبی و رنگ محلول کاروتن زرد است. تا اینجا دو مورد از رنگیزه ها را کامل جدا کردیم.



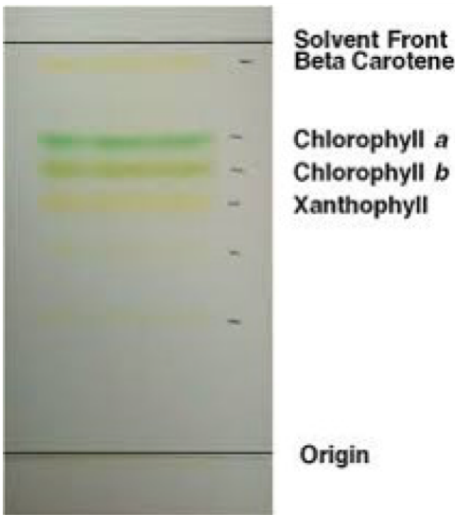
۵. فاز B را داخل دکانتور می ریزیم و به آن دی اتیل اتر (چگالی=۷۱۳/۰/g mL) اضافه می کنیم و خوب هم می زنیم و صبر می کنیم تا دوفاز جدا شوند. دی اتیل اتر هر آنچه درون متانول هست را داخل خودش حل می کند. منطقا دی اتیل اتر فاز بالایی و متانول فاز پایینی را تشکیل میدهند. فاز متانولی که مقدار خوبی از مواد حل شده داخلش به دی اتیل اتر منتقل شده است را دور می ریزیم و فاز بالایی را نگه می داریم و نامش را E می گذاریم.

۶. به فاز E پتاس متانولی اضافه می کنیم و محلول را هم می زنیم و صبر می کنیم تا دو فاز جدا شوند. با توجه به چگالی ها دو فاز بالایی و پایینی به ترتیب دی اتیل اتر و پتاس متانولی هستند. در مرحله قبل این نکته ذکر شد که وظیفه پتاس متانولی حل کردن کلروفیل هاست. همچنین اگر یک بار دیگر مراحل را مرور کنید میبینید که در فاز E کلروفیل b و گزانتوفیل داشتیم. پس با تقسیم شدن فاز E ، فاز بالایی دارای گزانتوفیل بوده (که آن را فاز F می نامیم) و فاز پایینی دارای کلروفیل b (که آن را فاز G می نامیم) است. رنگ محلول کلروفیل b سبز زیتونی و محلول گزانتوفیل زرد است.

نکاتی که حین انجام آزمایش باید به آن ها توجه کنید:

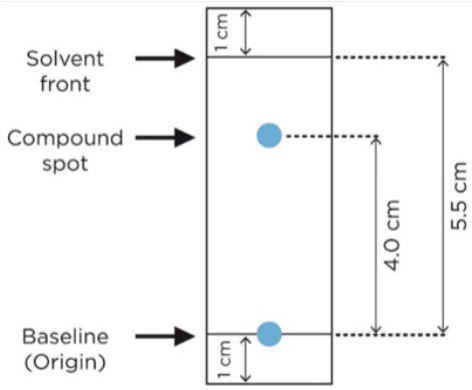
- برای هم زدن مایع در دکانتور را بگذارید و دکانتور را برداشته و خوب هم بزنید. در صورتیکه حجم مایع خیلی زیاد نباشد، میتوانید در حالیکه دکانتور روی گیره است آرام مایع را هم بزنید. روش اول دقیق تر بوده ولی روش دوم سریع تر است.
- برای خارج شدن مایع علاوه بر باز کردن شیر باید در را هم بردارید تا فشار هوا بتواند مایع را خالی کند.
- حواستان باشد که به خاطر حضور مقادیر کم استون درون محلول های نهایی ، این محلول ها با گذشت زمان کووت پلاستیکی را حل می کنند و جداره های کووت مات می شوند. پس بعد از ریختن محلول ها درون کووت پلاستیکی باید هرچه سریعتر مقدار جذب آن ها را با دستگاه اسپکتروفوتومتر به دست آورید.

جداسازی رنگیزه با کاغذ TLC



همانطور که مشاهده می‌کنید رنگیزه های مختلف مقادیر مختلفی بر روی کاغذ حرکت کرده اند. کاروتن که از همه رنگیزه ها ناقطبی تر است، در فاز مایع حل شده ولی با فاز ثابت برهمکنشی برقرار نمی کند، پس سریع تر از همه بالا میرود. برعکس گزانتوفیل که از همه قطبی تر است بعد از حل شدن در فاز مایع با فاز ثابت قطبی هم پیوند برقرار می کند و کندتر از همه بالا می رود. اگه دقت کنید رنگ های رنگیزه های جدا شده مشابه با رنگ هایی است که در توضیحات آزمایش جداسازی رنگیزه ذکر کردیم.

RF: هر مولکول با توجه به خاصیت شیمیایی خود مقدار متفاوتی روی کاغذ TLC حرکت می کند. برای کمی کردن و مقایسه کردن تفاوت های حرکت مولکول ها از مقیاس Rf استفاده می کنیم. R_f یا Retardation Factor برای هر مولکول برابر است با نسبت میزان حرکت آن مولکول به میزان حرکت فاز مایع بر روی کاغذ TLC (فاز ثابت).



$$Rf = \frac{\text{فاصله ای که نقطه طی کرده است}}{\text{فاصله ای که حلال طی کرده است}}$$

نکاتی که حین انجام آزمایش باید به آن ها توجه کنید:

- برای کشیدن نقطه و خط و علامت گذاری از خودکار استفاده نکنید. جوهر خودکار همراه با حلال حرکت می کند و نمونه به رنگ خودکار در می آید.
- برای خشک شدن نمونه به آن فوت نکنید و بگذارید خودش خشک شود.
- هر دو روش نقطه گذاری با لوله مویین و سمپلر را بلد باشید.

کلید پروتکل

۱. شن دارای یون های مختلفی است که جذب مولکول های آب می‌شوند (آب پوشیده می شوند) و اصطلاحا آب را می دزدند! در نتیجه استون بهتر می تواند رنگیزه ها را استخراج کند. یا به قولی، این کار باعث می شود که حتی در صورت وجود آب در بافت های گیاهی یا هاون، باز هم استخراج به خوبی صورت بگیرد.

۲. استون بسیار فرّار است و به راحتی تبخیر می شود.

۳.

	جذب در ۶۸۰nm	جذب در ۴۶۰nm	محتوای محلول blank
محلول F	X	Y	پتاس متانولی
محلول D	Z	W	پتاس متانولی

با توجه به این که غلظت رنگیزه ها در نمونه های افراد مختلف یکسان نیست، پس نمیتوان جواب قطعی به سوال داد اما چیزی که مسلم است، این است که محلول F که دارای کلروفیل b است، ماکزیمم جذبش در حدود ۴۶۰ نانومتر و محلول D که دارای کلروفیل a است، ماکزیمم جذبش در حدود ۶۸۰ نانومتر است. پس قطعا Y بزرگتر از W و Z بزرگتر از X خواهد بود.

۴.

	A	B	C	D	E	F
حلال	اتر نفت	متانول	اتر نفت	پتاس متانولی	دی‌اتیل‌اتیر	پتاس متانولی
رنگیزه(ها)	کلروفیل a و کاروتن	کلروفیل b و گزانتوفیل	کاروتن	کلروفیل a	گزانتوفیل	کلروفیل b

۵. آب در متانول حل می شود و آن را قطبی تر می کند. در نتیجه متانول از محلول های ناقطبی تر مثل اترنفت بهتر جدا خواهد شد. همچنین حجم کل نیز افزایش پیدا می کند که به جداسازی بهتر کمک می کند.

۶. زیرا باید در مرحله بعد از آن با اضافه کردن پتاس متانولی، کلروفیل b را از گزانتوفیل جدا کنیم. اما پتاس متانولی و متانول در هم حل می شوند. پس باید رنگیزه ها را به حدواسط بدهیم تا بتوانیم کلروفیل b را از گزانتوفیل جدا کنیم.

۷.به دو دلیل:

۱.کلروفیل ها در اثر بعضی شرایط مثل اسیدی شدن و یا گذر زمان، با از دست دادن منیزیم خود به فئوفیتین تبدیل می شوند که جزء رنگیزه های فتوسنتزی نیست. ما با منیزیم سولفات سعی می کنیم از این کار جلوگیری کنیم.

۲. همان بحث مطرح شده در جواب سوال ۱. یون ها آب را می دزدند و به حل شدن بهتر رنگیزه ها در استون کمک می کنند.

.۸

	میزان R_f در لکه‌گذاری نقطه‌ای	میزان R_f در لکه‌گذاری خطی	نام رنگیزه فتوسنتزی
۱	0.97 ± 0.03	0.97 ± 0.03	کاروتن
۲	0.65 ± 0.03	0.65 ± 0.03	کلروفیل a
۳	0.58 ± 0.03	0.58 ± 0.03	کلروفیل b
۴	0.29 ± 0.03	0.29 ± 0.03	گزانتوفیل

۹. کلروفیل‌ها در اثر بعضی شرایط مثل اسیدی شدن و یا گذر زمان، با از دست دادن منیزیم خود به فئوفیتین تبدیل می شوند که جزء رنگیزه های فتوسنتزی نیست. فئوفیتین ها دارای R_f بیشتری نسبت به کلروفیل متناظرشان هستند.

۱۰. در مواقعی که نور باید از کاغذ عبور کند مانند هنگامی که قرار است باند های روی کاغذ پس از run شدن توسط UV مشاهده شوند،از کاغذ هایی استفاده می شود که پشتشان از جنس شیشه یا پلاستیک است. در غیر این صورت از آلومینیوم به علت به صرفه تر بودن استفاده می شود.

.۱۱

فایده: تفکیک باند ها بیشتر و بهتر صورت می گیرد.

مشکل: از آنجا که بالا آمدن محلول درون تانک بر اساس خاصیت مویینگی است، لذا میزان بالا آمدن و حرکت محلول بر روی کاغذ محدود است

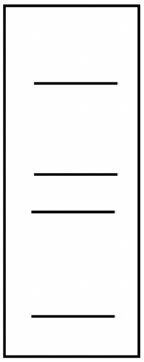
.۱۲

زیاد بودن: رنگیزه ها به علت غلظت بالا به خوبی از هم جدا نمی شوند و هاله تشکیل می دهند و همه رنگیزه ها با هم بالا می آیند.

کم بودن: باند ها به خوبی دیده نمی شوند و یا ممکن است اصلا باندی تشکیل نشود.

۱۳. از آنجا که فاز گازی و مایع به تعادل نرسیده است، مایعی که در حال بالا آمدن از کاغذ است، تبخیر شده و در نتیجه دیرتر به بالا می آید و کل روند کند می ود. همچنین امکان دارد باند ها به خوبی تفکیک نشوند.

.۱۴



از بالا به پایین: گزانتوفیل/ کلروفیل b/ کلروفیل a/ کاروتن

زیرا حلال قطبی است. پس هر چه مولکول قطبی تر باشد، بیشتر در حلال حل می شود و به بالا صعود می کند.

۱۵.

الف. paired t test

ب. با توجه به داده ها می توان اعداد مختلفی به دست آورد.

ج. ۳

د. با توجه به داده ها، ممکن است آماره‌های متفاوتی بدست بیاید که معانی متفاوتی دارند.