آزمایشگاه

فیزیولوژی گیاهی ۱

دکتر محمدرضا واعظی

Figure 2.6. I Know I Left My Experiment Here Somewhere.

آستینهای آزمایشگاه جداً خودداری فرمایید.

- ✓ در استفاده از وسایل، مرتّب و منظّم باشید.

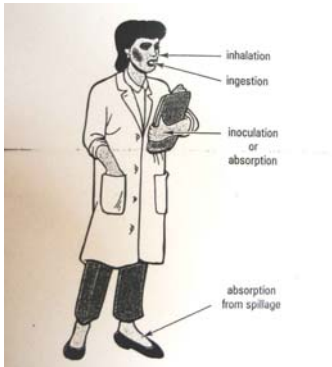


Fig. 21.1 Major routes of entry of harmful substances into the body.

- ✓ روپوش سفید خود را در بدو ورود به آزمایشگاه بپوشید.
- ✓ زخم بدن را با بانداژ استریل بپوشانید.
- ✓ هنگام کارکردن با مواد شیمیایی از عینک ایمنی استفاده نمایید.
- ✓ کفش های خود (نه دمپایی یا کفشهای روباز) را همواره بپوشید.

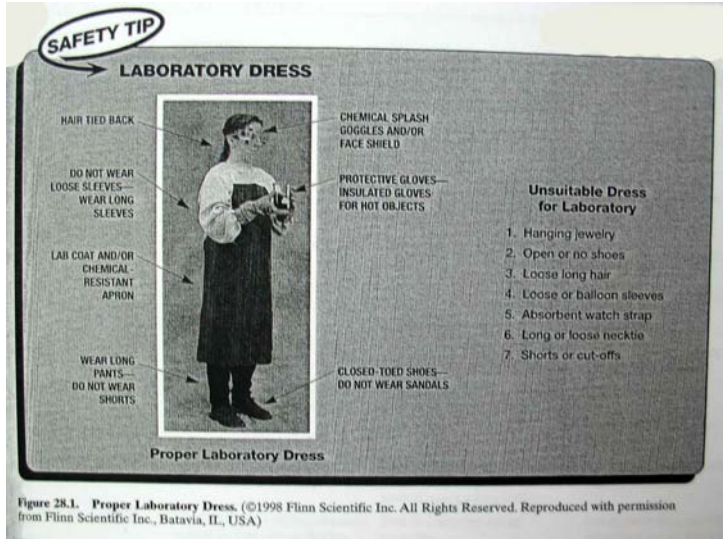


Figure 28.1. Proper Laboratory Dress. (©1998 Flinn Scientific Inc. All Rights Reserved. Reproduced with permission from Flinn Scientific Inc., Batavia, IL, USA)

✓ هنگام کارکردن با مواد شیمیایی خطرناک مثل اسیدهای غلیظ از عینک ایمنی و ماسک (زیر هود) استفاده نمایید.

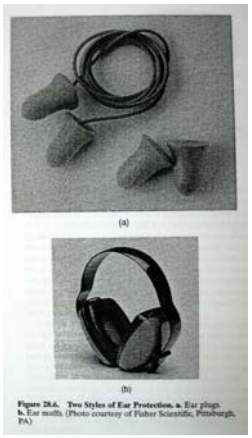


Figure 28.6. Two Styles of Ear Protection. a. Ear plugs. b. Ear muffs. (Photo courtesy of Fisher Scientific, Pittsburgh, PA)

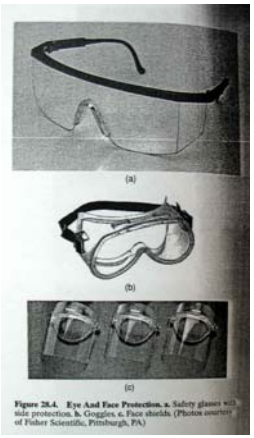


Figure 28.4. Eye And Face Protection. a. Safety glasses with side protection. b. Goggles. c. Face shields. (Photos courtesy of Fisher Scientific, Pittsburgh, PA)

Figure 28.7. Breathing Protection. a. Particle mask. b. Air purifying half-mask. c. Air purifying hood. (Photos courtesy of Fisher Scientific, Pittsburgh, PA.)

✓ با دهان از پیپت استفاده نکنید. از وسایل مکانیکی پیپت کردن استفاده نمایید.

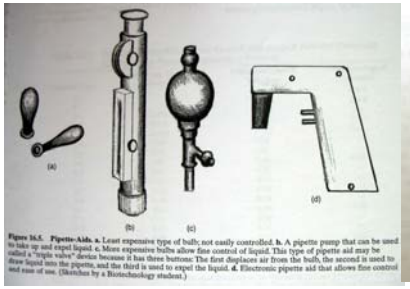


Figure 16.5. Pipette-Aids. a. Least expensive type of bulb; not easily controlled. b. A pipette pump that can be used to take up and expel liquid. c. More expensive bulbs allow fine control of liquid. This type of pipette aid may be called a "triple valve" device because it has three buttons: The first displaces air from the bulb, the second is used to draw liquid into the pipette, and the third is used to expel the liquid. d. Electronic pipette aid that allows fine control and ease of use. (Sketches by a Biotechnology student.)

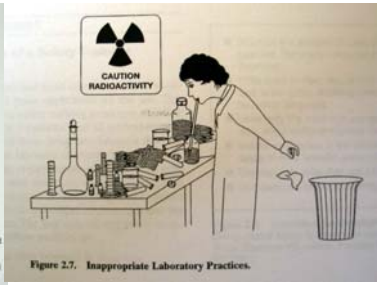


Figure 2.7. Inappropriate Laboratory Practices.

✓ مواد شیمیایی را دور از دسترس نور و حرارت قرار دهید.

✓ ظروف حاوی الکل، استن، و سایر مایعات قابل اشتعال را دور از شعلهٔ آتش نگهدارید.

✓ مواظب باشید که سیمهای برق با هیچ مایعی تماس پیدا نکنند. با دست خیس به سیمهای برق دست نزنید و در صدد تعمیر آنها برنیایید.

✓ در پایان آزمایش تمام مواد و وسایل را در جای خود قرار داده و مواد مصرفی را در ظروف مخصوص دفع زباله های شیمیایی یا پزشکی قرار دهید.

✓ شیشه های شکسته را با دست برندارید و از جاروب و خاک انداز استفاده کنید. سپس آنها را در سطل زبالهٔ مخصوص ظروف شیشه ای بریزید.

✓ اگر پوست شما آلوده به مواد شیمیایی یا میکروارگانیسمها شد آن را به طور کامل بشویید.

✓ از انجام آزمایشاتی که با سرپرست آزمایشگاه هماهنگ نشده خودداری فرمایید.

✓ از استفادهٔ دستگاهها بدون دفترچهٔ راهنما و دستورکار خودداری نمایید.

✓ هر نوع حادثه و پخش شدن مواد را سریعاً گزارش دهید.

✓ هرگز شعلهٔ گاز را بدون یک ناظر رها نکنید.

✓ هنگام کار با هات پلیت متوجه باشید که ممکن است از قبل داغ باشد.

✓ از دستکش یا وسایل مخصوص برای برداشتن وسایل شیشه ای داغ استفاده نمایید.

✓ از وسایل شیشه ای به درستی و با احتیاط استفاده کنید.

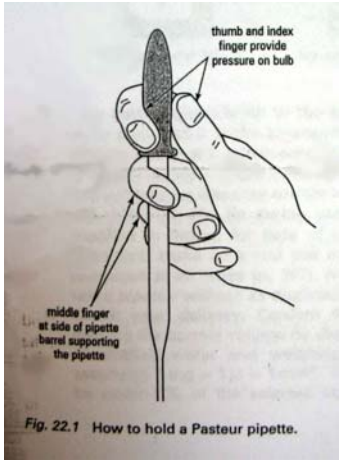


Fig. 22.1 How to hold a Pasteur pipette.

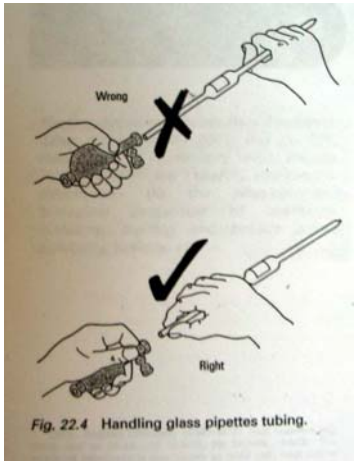


Fig. 22.4 Handling glass pipettes tubing.

✓ علایم اخطار (caution symbol) روی وسایل و مواد شیمیایی را به دقت نگاه کرده و نکات ایمنی لازم برای استفاده از آنها را رعایت کنید.

Explosive	منفجـره
Radioactive	رادیواکتـیتو
Toxic	سـمّی
Oxidising	اکسیـد کننـده
Corrosive	خورنـده
Harmful or Irritant	مضـرّ یـا محـرّک
Flammable	قابل اشتعال
Biohazard	خطـر زیستی

Fig. 21.2 Warning labels for specific chemical hazards. These appear on suppliers' containers and on tape used to label working vessels.

✓ هنگام کار با خون، ومشتقات آن و غشاهای مخاطی از دستکش استفاده نمایید و در پایان آنها را در سطل زبالهٔ مخصوص نخاله های پزشکی انداخته، دست خود را سریعاً بشویید.

✓ علایم مربوط به دفع هر نوع زباله بیانگر آن است که آنها به روشهای خاص دفع می شوند و در مواد شیمیایی را نباید در درون ظرف شویی ریخت زیرا برای سلامتی انسان و محیط زیست حایز اهمیت است.

✓ آزمایشگاه را تمیز و مرتب ترک کنید تا برای دانشجویان گروه بعدی آماده باشد.

✓ دست خود را قبل از ترک آزمایشگاه بشویید.

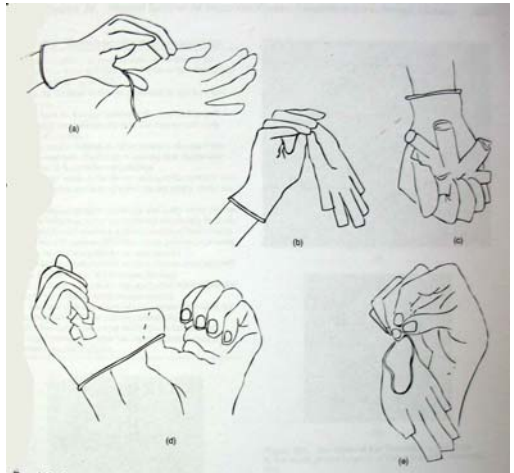
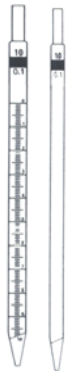


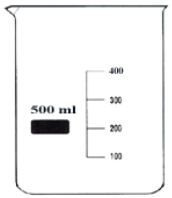
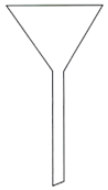
Figure 28.3. Proper Glove Removal Technique. a. Hook a finger on the cuff of one glove, being careful not to contact the skin of the wrist. **b.** Pull the glove from the hand inside out. **c.** Roll up the removed glove in the palm of the remaining gloved hand. **d.** Use an ungloved finger to hook the inside of the glove cuff. **e.** Pull off the glove inside out and discard properly. (Artist: Dana Benedicktus)

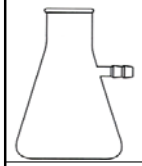
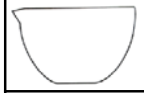
برگه های اطلاعات ایمنی مواد
Material Safety Data Sheets (MSDS)

- آنها توسط کمپانی سازندهٔ مواد تهیه شده و حاوی نکات مهم ایمنی است که باید توسط فرد آزمایشگر رعایت شوند و شامل موارد زیر است:
- نام مادهٔ شیمیایی
- ترکیب (composition)
- خواص (properties)
- خطرات (hazards)
- فرایند پاکسازی مادهٔ مورد نظر در صورتی که به طور اتفاقی در محیط کار ریخته شوند.
- سازندهٔ مادّه و ...

لوازم آزمایشگاهی شیشه ای
Laboratory Glassware

Burettes بورت 	Pipettes Graduated for partial out flow پیپت مدرّج 	Pipettes Volumetric Transfer پیپت حجمی

Round Bottom Flasks فلاسک ته گرد 	Erlenmeyer Flasks ارلن مایر 	Beakers بشر 
Petri Dish پتری دیش 	Desiccator خشک کن 	Funnel قیف 

Test Tube لولهٔ آزمایش 	Dropping قطره چکان 	ارلن خلاء 
Measuring Cylinder استوانهٔ مدرّج (مزوز) 	Volumetric Flask بالن ژوژه 	Mortar هاون 

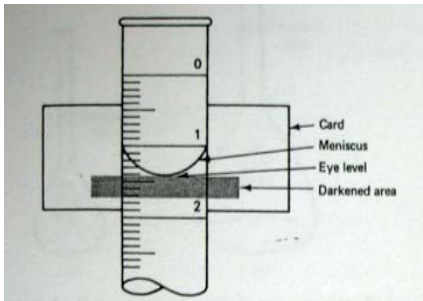


Figure 16.1. The Meniscus. A dark card may be placed behind the meniscus to make it more visible. When reading volume, the eye should be level with the bottom of the meniscus.

Balance

Figure 15.2. Balances. a. A simple single-beam, double pan balance where a sample on the left pan is balanced by objects of established weight on the right pan. b. A double pan balance has been used to symbolize justice since ancient times. In Greek mythology Themis is the goddess of justice. She is usually represented wearing a crown of stars and holding a balance in her hand. (Double pan balance sketch by a Biotechnology student.)

Figure 15.3. Balance Sensitivity, Capacity, and Range. The balances illustrated in a–c are increasingly sensitive but their range becomes more limited and their capacity is lower as their sensitivity improves. a. A balance intended for heavier samples; readability is "0.1 g," range is "0–2200 g." b. Readability is "0.01 g" and range is "0–500 g." c. Analytical balance. Readability is "0.1 mg," range is "0–40 g." (Sketches by a Biotechnology student.)

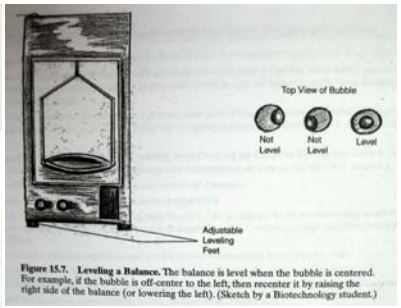


Figure 15.7. Leveling a Balance. The balance is level when the bubble is centered. For example, if the bubble is off-center to the left, then recenter it by raising the right side of the balance (or lowering the left). (Sketch by a Biotechnology student.)

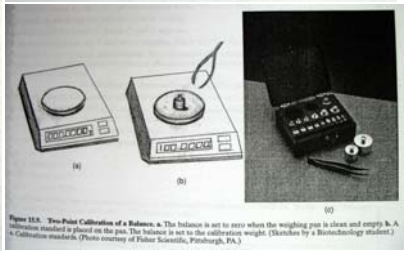


Figure 15.8. Two-Point Calibration of a Balance. a. The balance is set to zero when the weighing pan is clean and empty. b. A calibration standard is placed on the pan. The balance is set to the calibration weight. (Sketches by a Biotechnology student.) c. Calibration standards. (Photo courtesy of Fisher Scientific, Pittsburgh, PA.)

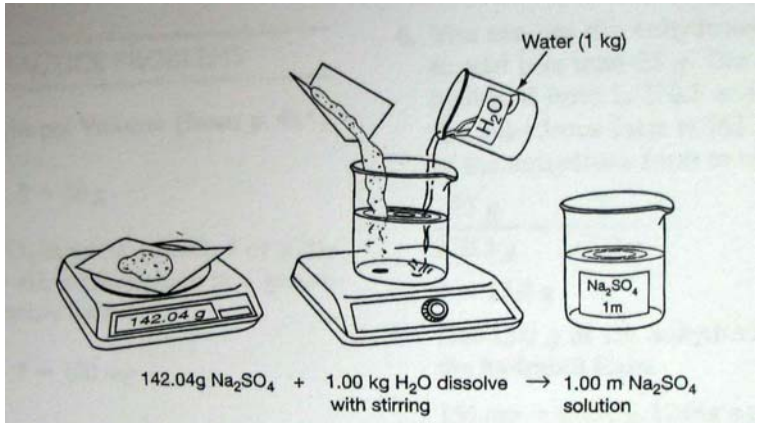


Figure 21.6. A 1 *m* (1 molal) Solution of Sodium Sulfate (Na_2SO_4). 142.04 *g* of Na_2SO_4 is dissolved in 1 *kg* of water.

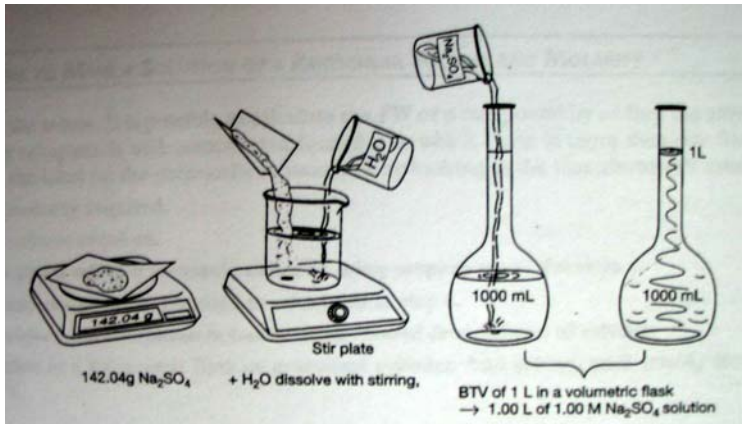


Figure 21.4. A 1 *M* Solution of Sodium Sulfate (Na_2SO_4). The *FW* of Na_2SO_4 is 142.04. This amount is dissolved in water so that the total volume is 1.00 *L*.

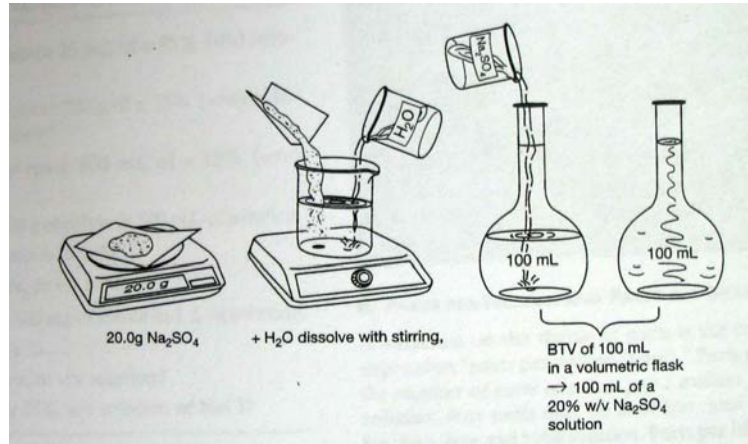


Figure 21.5. A 20% Weight per Volume Percent Solution of Sodium Sulfate (Na_2SO_4). Twenty grams of Na_2SO_4 is dissolved in water and brought to a volume of 100 *mL*.

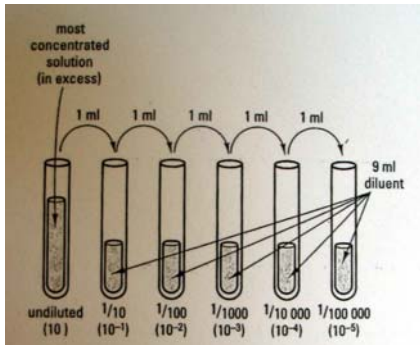


Fig. 23.2 Preparation of a dilution series. The example shown is a decimal dilution series, down to 1/100 000 (10^{-5}) of the solution in the first (left-hand) tube. Note that all solutions must be mixed thoroughly before transferring the volume to the next in the series. In microbiology and cell culture, sterile solutions and appropriate aseptic technique will be required (p. 197).

Centrifuge

Micro-Centrifuge

Water Bath
حمام آب گرم

Oven

Hood / Fume Cupboard

Autoclave

Spectrophotometer

Incubator

Electrical Oven

۱. تغذیهٔ گیاه و کمبود موادمعدنی(دو جلسه)

عناصر معدنی موردنیاز گیاهان را می‌توان در دو دسته قرار داد: یکی عناصر ماکرو (شامل: N، K، P، S، Ca و Mg) و دیگر عناصر میکرو (شامل: Fe، Cu، Zn، B، Co، Ma، Mo)

عناصر معدنی مختلف هرکدام نقش خاصی در گیاهان دارند و کمبود یا فقدان آن‌ها باعث اختلال‌هایی در اعمال فیزیولوژیکی و متابولیزی گیاهان می‌شود و عوارض کمبود آن‌ها در گیاه به صورت‌های مختلفی ظاهر می‌شوند.

مواد و وسایل:

۱- گلدان

۲- جوانهٔ گندم

۳- محلول‌های غذایی

٤- اتاق مخصوص رویش گیاه (فیتوترون)

روش‌کار:

محلول‌های غذایی به این ترتیب تهیه خواهند شد که یکی به عنوان محلول غذایی کنترل باشد (دارای تمام عناصر معدنی موردنیاز گیاه) و محلول‌های دیگر هریک فاقد یکی از عناصر موردنیاز گیاه باشند. لذا هفت نوع محلول غذایی بایستی تهیه شوند: ۱) محلول کامل غذایی ۲) محلول فاقد ازت ۳) محلول فاقد فسفر ٤) محلول فاقد آهن ٥) محلول فاقد منیزیم ٦) محلول فاقد کلسیم ۷) محلول فاقد پتانسیم.

برای کشت، ۳ عدد جوانهٔ چهار روزهٔ جو را اختیار کرده، ریشهٔ آن‌ها را وارد محلول موادغذایی درون گلدان بکنید. گیاهان بایستی یکنواخت انتخاب شوند. برای ثابت باقی ماندن جوانه‌ها در گلدان، دور جوانه‌ها را با پنبه پر کرده و در منفذ گلدان قرار می‌دهیم. گیاهان باید در محلی قرار گیرند که از نظر رطوبت و نور مناسب باشند و علاوه بر این با یک شلنگ و پمپ هواساز، هوادهی شوند. پس از یک هفته، محلول غذایی را تعویض کنید و در هفتهٔ دوم مشاهدات خود را بنویسید.

توجه: گیاهان مذکور را از محلول غذایی خارج کرده، ریشهٔ آن‌ها را با آب‌مقطر شستشو دهید، سپس گیاهان را (هر جداگانه) وزن کرده، به درون آون $۸۰^{\circ}c$ منتقل کنید و برای خشک شدن آن‌ها

۲٤ ساعت صبر کنید. نمونه‌های خشک شده را وزن کنید و برای آزمایش‌های تعیین عناصر معدنی در بافت گیاهی نگهداری کنید.

شکل ص ۱۱

طرز تهیهٔ محلول غذایی: ابتدا ۲۵۰*ml* آب‌مقطر درون ارلن ریخته، سپس هریک از محلول‌های پایهٔ ذکر شده در جدول زیر را به مقدار مشخص شده به آن بیفزایید. آن‌گاه حجم محلول را با آب‌مقطر به ۵۰۰*ml* برسانید.

نوع محلول پایه	محلول کامل (کنترل)	بدون *N*	بدون *P*	بدون *K*	بدون *Mg*	بدون *Fe*	بدون *Ca*
$Ca(No_3)_2$ ۱*M*	۵	–	۵	۵	۵	۵	–
$K\,No_3$ ۱*M*	۵	–	۵	–	۵	۵	۵
$Mg\,So_4$ ۱*M*	۲	۲	۲	۲	–	۲	۲
$KH_2\,Po_4$ ۱*M*	۱	۱	–	–	۱	۱	۱
Fe-EDTA ۱۹/۷۱٦ *gr/lit*	۱	۱	۱	۱	۱	–	۱
Micro Elements (*Fe free*)	۱	۱	۱	۱	۱	۱	۱
$Na\,No_3$ ۱*M*	–	–	–	۵	–	–	۲
$Na\,So_4$ ۱*M*	–	–	–	–	۲	–	–
$Na\,H_2\,Po_4$ ۱*M*	–	–	–	۱	–	–	–
$Ca\,Cl_2$ ۱*M*	–	۵	–	–	–	–	–
$K\,Cl$ ۱*M*	–	۵	۱	–	–	–	–

مقدار محلول‌ها برحسب *ml* است.

۲. پتانسیل اسمزی و پتانسیل آب

حیات گیاهان به حفظ تعادلی آب آن‌ها مرتبط می‌شود و به همین دلیل گیاهان به روش‌های مختلف سعی در حفظ این تعادل دارند و به دنبال آن، آب موردنیاز خود را از محیط اطراف خود تأمین می‌کنند. سلول‌ها هنگامی آب را به درون خود جذب می‌کنند که پتانسیل آب آن‌ها کمتر از محیط اطرافشان باشد.

به طورکلی داریم:

$$\psi_W = \psi_S + \psi_P + \psi_m$$

$\psi_W =$ پتانسیل آب (مثبت یا منفی)

$\psi_S =$ پتانسیل اسمزی (همیشه منفی)

$\psi_m =$ پتانسیل ماتریک (تقریباً صفر یا کمی منفی)

$\psi_P =$ پتانسیل فشار (تورگر) (صفر، مثبت یا منفی)

پتانسیل اسمزی نیز براساس قانون وانت‌هوف برابر است با:

$$\psi_S = -miRT$$

$\psi_S =$ پتانسیل اسمزی

$m =$ مولاریته محلول (مولکول گرم در یک لیتر مادهٔ حل شده)

$I =$ درجهٔ یونیزاسیون مادهٔ حل شده

$R =$ ثابت گازها (۰/۰۸۲)

$T =$ دما (برحسب درجهٔ کلوین)

در آزمایش حاضر به بررسی پتانسیل اسمزی و پتانسیل آب سلول‌های گیاهی پرداخته، آن‌ها را با روش‌های ساده‌ای اندازه‌گیری می‌کنیم.

مواد و وسایل:

۱- لولهٔ آزمایش

۲- چوب‌پنبه سوراخ‌کن

۳- محلول ساکارز به غلظت‌های $۰/۲M$، $۰/٤M$، $۰/٦M$، $۰/۸M$ و $۱M$

٤- خط‌کش

٥- تیغ

٦- شیشه ساعت

۷- سیب‌زمینی

۸- پیاز قرمز

۹- میکروسکوپ

۱۰- پتری‌دیش

۱۱- لولهٔ موئین همراه چوب‌پنبه سوراخ‌دار

روش‌کار:

۱- نشان دادن اسمز به وسیلهٔ اسمومتر سیب‌زمینی

پوست سیب‌زمینی را جدا کرده، یک قسمت آن را برش بزنید تا سطح آن صاف شود و در سطح پتری حاوی آب به خوبی بایستد. حفرهٔ عمیقی در سیب‌زمینی با کمک چوب‌پنبه سوراخ‌کن ایجاد کنید. این حفره را با محلول ساکارز $۱M$ پر کنید. چوب‌پنبهٔ سوراخ‌دار دارای لولهٔ موئینه را در دهانهٔ حفره قرار داده و دهانه را خوب مسدود کنید. چند لحظه منتظر شوید و سپس سطح محلول درون لوهٔ موئینه را با ماژیک علامت بزنید. تغییرات مشاهده شده را در طول زمان بررسی کرده، دلیل آن را توضیح دهند.

شکل ص ۷

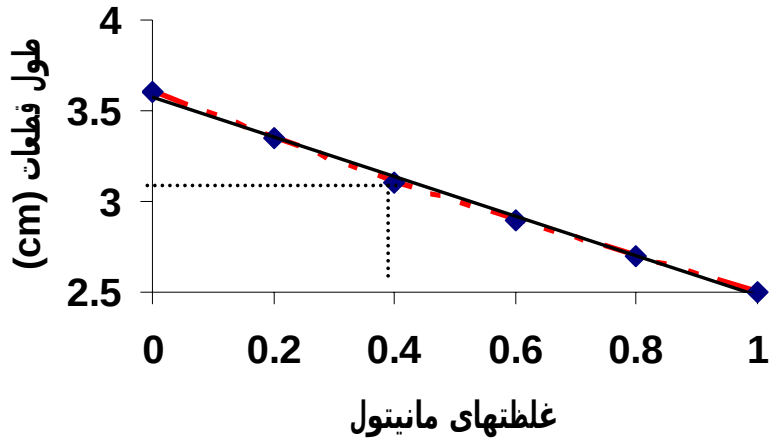
۲- اندازه‌گیری پتانسیل آب سلول‌های سیب‌زمینی

قطعات هم‌شکل و هم‌اندازهٔ بافت‌های سیب‌زمینی را در یک‌سری از محلول‌های ساکارز (یا مانیتول) قرار می‌دهیم. هدف آن است که محلول یافت شود که در آن بافت، وزن و یا حجم آن تغییر نکند، یعنی اینکه بافت نه آب بگیرد و نه آب از دست بدهد: در چنین محلولی بافت و محلول در تعادل اسمزی هستند، یعنی پتانسیل آب بافت‌ها و محلول خارجی باهم برابرند؛ لذا اگر پتانسیل آب این محلول خارجی را محاسبه کنیم، پتانسیل آب سلول‌ها بدست خواهند آمد.

براساس توضیح فوق، ابتدا شش عدد لولهٔ آزمایش را برداشته و مقدار ۲۰ میلی‌لیتر از محلول‌های ساکارز از قبل تهیه شده را به ترتیب در آن‌ها بریزید و غلظت آن‌ها را روی لولهٔ آزمایش بنویسید. (غلظت‌های صفر، ۰/۲، ۰/٤، ۰/٦، ۰/۸ و $1M$).

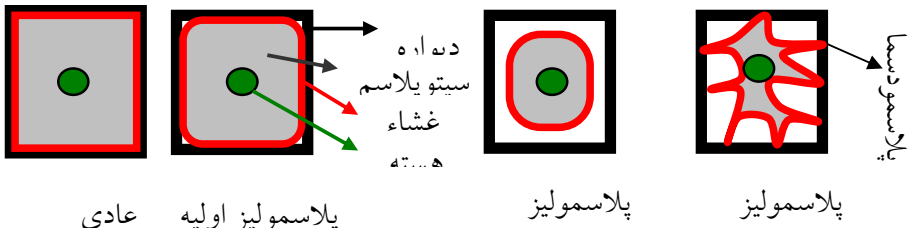
آن‌گاه ۱۸ قطعه سیب‌زمینی به طول $3cm$ با کمک چوب‌پنبه سورخ‌کن تهیه کنید. در هر لولهٔ آزمایش، ۳ قطعه سیب‌زمینی انداخته، مدت ۱/۵ ساعت به حال خود رها می‌کنیم. سپس آن‌ها را از محلول خارج کرده، طول قطعات را به طور دقیق اندازه‌گیری کنید. میانگین سه قطعهٔ هر لولهٔ آزمایش را محاسبه کرده، با کمک منحنی تغییرات طول قطعات برحسب غلظت ساکارز پتانسیل آب بافت‌ها را محاسبه کنید. این عمل را می‌توان براساس تغییرات وزن قطعات نیز انجام داد.

نتایج حاصل را ذکر کرده، دلایل تغییر حجم یا وزن بافت‌ها را بیان نمایید.



۳- اندازه‌گیری پتانسیل آب سلول‌های بشره پیاز

هرگاه سلول‌ها در محلولی با پتانسیل اسمزی کمتر و یا پتانسیل آب کمتری قرار داده شوند، سلولها مقداری از آب خود را از دست داده و به محیط وارد خواهند کرد. اگر پتانسیل اسمزی محلول خارجی به حدی باشد که حدود نیمی از سلول‌ها در مرحلهٔ پلاسمولیز اولیه باشند، پتانسیل فشار سلول‌ها برابر صفر خواهد بود، لذا پتانسیل آب و پتانسیل اسمزی سلول‌ها با یکدیگر برابر خواهند شد و با کمک قانون وانت‌هوف می‌توان پتانسیل آب و اسمز را بدست آورد.



براساس توضیحات داده شده، شش عدد شیشه ساعت اختیار کنید و در هر کدام ۱۰ میلی‌لیتر از محلول‌های ساکارز از قبل تهیه شده بریزید (با غلظت‌های صفر، ۰/۲، ۰/٤، ۰/٦، ۰/۸ و $1M$). سپس در هر شیشه ساعت یک قطعه از بشرهٔ پیاز قرار دهید و یک ربع ساعت به حال خود رها کنید. آن‌گاه یک لام میکروسکوپی تمیز برداشته، یک قطره از محلول موردنظر روی آن قرار دهید و روی آن نیز بشرهٔ موردنظر و سپس یک لامل قرار دهید.

هر شش قطعهٔ بشرهٔ پیاز را با میکروسکوپ مطالعه کرده، نتایج خود را بنویسید و مقدار پتانسیل اسمزی و پتانسیل آب سلول‌های گیاهی را بدست آورید.

۳. تهیه خاکستر تر و خاکستر خشک گیاهی برای تعیین مقدار عناصر معدنی در آن‌ها

برای تجزیه بافت‌های گیاهی و تعیین موادمعدنی در آن، ابتدا باید با حرارت یا اکسیداسیون با اسیدهای غلیظ، ترکیبات آلی کربن‌دار گیاه را اکسید و خاکستر گیاهی را تهیه کرد. باتوجه به روش اکسیداسیون کربن آلی در بافت گیاه، می‌توان به دو روش زیر عمل کرد:

الف ـ تهیه خاکستر تر گیاهی ب ـ تهیه خاکستر خشک گیاهی

الف: تهیهٔ خاکستر تر گیاهی

در این روش می‌توان از یک اسید غلیظ و یا مخلوطی از چند اسید غلیظ معدنی استفاده کرد و بافت خشک شده گیاهی را درون محلولی اسیدی قرار داد و پس از مدت زمان معلوم با حرارت دادن محلول، مواد آلی کربن‌دار را به صورت گازکربنیک از محیط خارج کرد. تمام موادمعدنی گیاه به صورت محلول در درون اسید باقی می‌ماند که این عمل را *Digestion* و محلول حاصل را *Digest* می‌گویند.

محلول فوق را با آب‌مقطر رقیق کرده، به حجم معین می‌رسانند و برحسب این که چه عنصر معدنی مورد مطالعه باشد، آن را با دستگاه‌های مخصوص تجزیه می‌کنند. مثلاً برای تعیین فسفر از روش برای تعیین مقدار پتاسیم و سایر فلزات قلیایی نظیر کلسیم و سدیم از دستگاه فلم فتومتری، و برای تعیین غلظت فلزات سنگین نظیر آهن و منگنز از دستگاه جذب اتمی استفاده می‌شود.

مراحل تهیهٔ خاکستر تر گیاهی به قرار زیر است:

۱- مقداری بافت تازه گیاهی را وزن کرده و در آون $۸۰^{\circ}c$ برای مدت ۲٤ ساعت بگذارید تا خشک شود.

۲- مقدار ۰/۵ گرم از بافت خشک شده را وزن کرده، درون یک ارلن $۱۰۰ml$ قرار دهید.

۳- مقدار ۱۰ml اسیدنیتریک غلیظ درون همان ارلن بریزید و سر آن را گذاشته، به مدت ۲٤ ساعت به حال خود قرار دهید.

٤- مقدار ۱۰ml اسیدنیتریک غلیظ درون ارلن شیشه‌ای ریخته و آن را به عنوان شاهد نگهدارید.

٥- پس از گذشت ۲٤ ساعت درب ارلن‌ها را برداشته و در زیر هود بگذارید تا بخارات اسیدی خارج شود.

٦- ارلن‌ها را روی اجاق‌برقی ترموستات‌دار بگذارید و به مدت ۲٤ ساعت با ملایمت حرارت دهید.

۷- پس از اینکه تمام بخاری‌های اسیدی از ارلن خارج شد، محلول بیرنگی بدست خواهد آمد. محلول را به دو بالن ژوژهٔ ۱۰۰ml منتقل کنید و با آب‌مقطر به حجم صد برسانید. محلول آزمایش (*Digest*) آماده را برای سنجش موادمعدنی موجود در آن به روش‌های مختلف مورد لزوم است درب بالن ژوژه را ببندید و آن‌ها را در جای مناسبی برای آزمایش‌های بعدی نگهدارید.

ب: تهیهٔ خاکستر خشک گیاهی

۱- مقدار ۰/۵ گرم بافت خشک گیاه را وزن کرده و درون یک بوتهٔ چینی قرار دهید و سپس آن را به یک کورهٔ الکتریکی منتقل کنید.

۲- درجهٔ کوره را روی ٤٥۰$^{\circ}c$ برای مدت ۱۲ ساعت تنظیم کنید. ماده گیاهی در حرارت‌های ٤٥۰$^{\circ}c$ و بیشتر می‌سوزد و بدین ترتیب، اکسیداسیون کربن آلی در بافت گیاهی انجام شده، حاصل عمل (co_2) خارج می‌شود و خاکستر گیاهی که شامل تمام نمک‌های معدنی موجود در بافت گیاهی است بجا می‌ماند.

این خاکستر را نیز نگهداری کنید و در موقع لزوم آن را در ۱۰۰ml اسید رقیق (۰/۱ $H\ Cl$ نرمال) حل کنید و محلول را وارد مرحلهٔ تجزیه کنید تا غلظت یون‌های معدنی محلول، تعیین شود. این روش برای تجزیهٔ عناصری که در درجه حرارت‌های زیاد تبخیر می‌شوند (مثل فسفر، ازت و ارسنیک) مناسب نیست.

۴. تعیین کیفی عناصر غذایی پرمصرف در خاکستر خشک گیاهی با روش‌های معمول شیمیایی

بعضی از عناصر غذایی را می‌توان با روش‌های رایج شیمیایی بـه سـادگی در خاکـستر خـشک گیاهی تعیین کرد. مقدار عناصر را در این روش‌ها نمی‌توان مشخص کرد و لذا بـه عنـوان روش‌هـای تعیین کیفی عناصر به حساب می‌آیند.

مواد و وسایل:

۱- بافت گیاهی تازه
۲- کورهٔ الکتریکی
۳- ترازوی حساس
٤- آون (اتو)
۵- بوتهٔ چینی
٦- شیشه‌های قطره‌چکان‌دار
۷- میکروسکوپ
۸- لام و لامل
۹- معرف منیزیم
۱۰- معرف مولیبدات آمونیوم
۱۱- معرف دی‌فنیل آمین در اسیدسولفوریک غلیظ

روش‌کار:

مقدار ۱۵ گرم بافت تازهٔ گیاهی را به طور دقیق وزن کنید و سپس درون ظرفـی کـه قـبلاً وزن کرده‌اید بریزید. نمونه‌ها را درون آون ۱۰۰^{oc} به مدت ٢٤ ساعت قرار دهید تا آب آن‌ها خـشک شـود. آن‌گاه وزن مادهٔ خشک گیاهی را بدست آورید.

کلسیم: یک قطره محلول ۵ درصد $CaCl_2$ و یک قطره محلـول ۵۰ درصـد H_2SO_4 را بـاهم مخلوط کنید. تشکیل بلورهای $CaSO_4$ را مشاهده و ترسیم کنید. خاکـستر محلـول را نیـز آزمـایش کنید.

ازت: حدود پنج قطره خاکستر محلول را روی شیشه سـاعت تمیـزی قـرار دهیـد. یـک قطـره معرف ۱ درصد اسید دی‌فنیل آمین ـ سولفوریک به آن اضافه کنید. ظهور رنگ حاصـل را کـه بیـانگر وجود نیترات است مشاهده کنید. شاهد، ۵ قطره محلول KNO_3 ۵ درصد است.

آهن: پنج قطره خاکستر محلول را روی یک شیشه ساعت قرار دهید و به آن سه قطره محلـول ۵ درصد $KSCN$ اضافه کنید. تشکیل رنگ قرمز، معرف وجود آهن است.

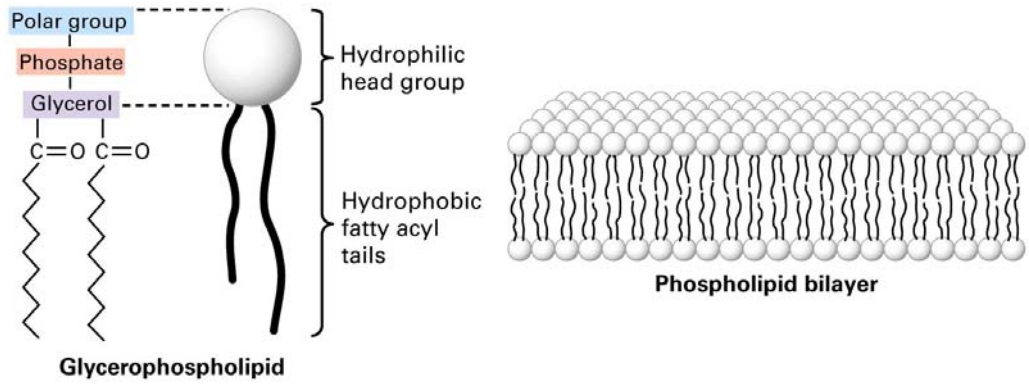
نتایج:

با کمک از نتیجهٔ تجزیهٔ خاکستر، جدولی شامل عناصر آزمایش شده، مواد گیاهی و روش مورد استفاده تهیه کنید. همچنین مثبت یا منفی بودن آزمایش را از لحاظ رنگ، رسوب یا تشکیل بلور نشان دهید.

برداشت‌هایتان باید براساس مشاهدات و پرسش‌های زیر باشد: فرایند خاکـستر کـردن موجـب فرّار شدن و در نتیجه ناپدید شدن چه عناصری می‌شود؛ آیا خاکستر کـردن بـه روش خـشک کـه در آزمایش به کار رفت برای تعیین کمّی فسفر و گوگرد مناسب است؟ آیا وجود مقـدار زیـادی از یـک عنصر خاص بیانگر نیاز غذایی گیاه است؟ مفهوم بالا بودن مقدار عناصر غذایی در دانه‌ها چیست؟

۵. غشاء و نفوذپذیری

براساس مدل موزائیک سیّال، غشاء سلولی از دو لایهٔ فسفولیپیدی تشکیل شده است که در لابه‌لای این مولکول‌های دوقطبی، پروتئین‌ها قرار می‌گیرند که این‌ها نیز انواع مختلفی دارند.



این غشاء ورود و خروج تمام ترکیبات را کنترل می‌کند که برای تمامی سلول ضروری است.

تا زمانی که سلول زنده است، غشاء نیز اعمال خود را انجام می‌دهد و در صورت به مخاطره افتادن حیات سلول، غشاء نیز کار خود را از دست می‌دهد و بالعکس. مواد مختلف اثرات متفاوتی بر خاصیت نفوذپذیری غشاء دارند که در این آزمایش بررسی خواهند شد.

مواد و وسایل:

۱- چغندر قرمز

۲- پروپانول نرمال ۲۲ درصد

۳- اجاق برقی

٤- کلرورکلسیم ($۰/٤\ M$)

۵- اسید کلریدریک ($۰/۲\ N$)

٦- اسپکتروفتومتر

۷- چوب‌پنبه سوراخ‌کن

روش‌کار:

با چوب‌پنبه سوراخ‌کن شمارهٔ ۸ (قطر داخلی $\frac{۱}{۲}$) قطعات استوانه‌ای از چغندر تهیه کرده، سپس با تیغ تیزی، دیسک‌هایی به ضخامت $۲mm$ تهیه کنید (۲۱ عدد). این قطعات باید با آب جاری خوب شسته شوند تا رنگ‌های قرمز موجود در سطح بافت‌های بریده شده کاملاً پاک شوند. سپس

الف ـ سه قطعه را در فریزر قرار دهید تا منجمد شود؛

ب ـ سه قطعه را به مدت دو دقیقه در آب گرم $۷۰^{\circ}c$ قرار دهید؛

ج ـ بقیهٔ قطعات را در حالت عادی حفظ کنید.

محلول‌های زیر را تهیه کرده و هریک را در یک لولهٔ آزمایش تمیز بریزید. آن‌گاه در هر لولهٔ آزمایش، سه قطعه از قطعات چغندر آماده شده بیندازید:

شمارهٔ لولهٔ آزمایش	نوع محلول	نوع قطعهٔ چغندرقند
۱	آب $(۱۰ml)$	معمولی
۲	آب $(۵ml)$ + پروپانول $۳M$ $(۵ml)$	معمولی
۳	پروپانول $۳M$ $(۵ml)$ + کلریدکلسیم $۰/٤M$ $(۵ml)$	معمولی
٤	آب $(۵ml)$ + اسید کلریدریک $۰/۲N$ $(۵ml)$	معمولی
۵	اسید کلریدریک $۰/۲N$ $(۵ml)$ + کلریدکلسیم $۰/٤M$ $(۵ml)$	معمولی
٦	آب $(۱۰ml)$	منجمد شده
۷	آب $(۱۰ml)$	گرم شده

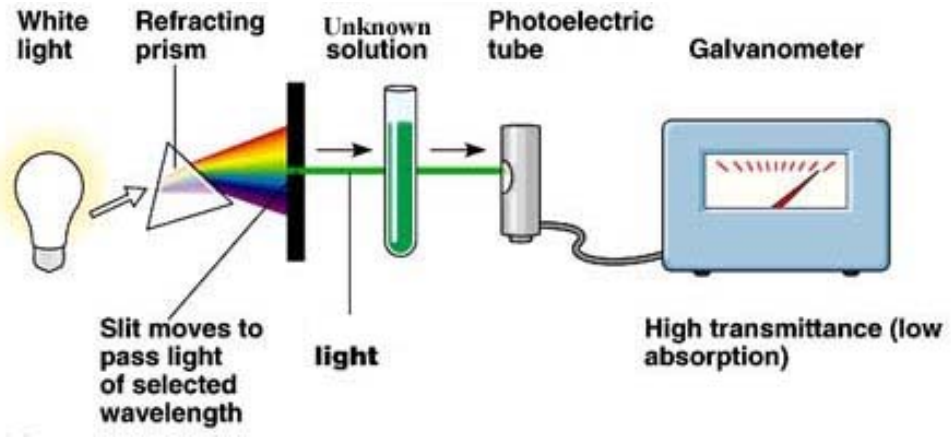
سپس هر یک ربع ساعت جذب نوی محلول هر لولهٔ آزمایش را با کمک اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری کرده، در جدولی بنویسید. این عمل را در طول موج $۵٤۰nm$ انجام دهید و برای محلول شاهد از آب‌مقطر استفاده کنید. نتایج حاصل را با ارائه نمودارهای لازم و دلایل مربوط به هر نتیجه، بنویسید.

تئوری اسپکتروفتومتری (الکتروفتومتری): Spectrophotometer

یکی از جدیدترین مطالعاتی که اخیراً صورت گرفته است، مطالعه و شناسایی رنگ مواد و در نتیجه پی بردن به ماهیت شیمیایی آن‌ها است، زیرا هر محلول با هر رنگ مشخص، بعضی از طیف‌های نورسفید را جذب می‌کند. مقدار این جذب می‌تواند اطلاعاتی در مورد نوع ماده به ما بدهد.

پس از تاباندن یک شعاع نورانی تکرنگ (منوکروماتیک) به یک محلول رنگی به طوری که از آن عبور کند، مقداری از آن نور جذب محلول رنگی می‌شود که به آن مقدار جذب (*Absorbance* = *A*) گویند. مقدار جذب با غلظت محلول رنگی نسبت مستقیم دارد. این کار توسط اسپکتروفتومتر (الکتروفتومتر) انجام می‌شود. شکل زیر، قسمت‌های مختلف این دستگاه را نشان می‌دهد:

SPECTROPHOTOMETER, SPECTRONIC 20



در دستگاه اسپکتروفتومتر معمولاً از نورهایی با طول موج ۲۰۰–۸۰۰*nm* استفاده می‌شود که ۴۰۰–۸۰۰*nm* مرئی و ۲۰۰–۴۰۰*nm* ماوراءبنفش است.

برای اندازه‌گیری غلظت یک محلول به دو روش می‌توان عمل کرد:

۱) اندازه‌گیری مقدار نوری که جذب محلول رنگی می‌شود (*Absorbance=Optical density=A=OD*)

۲) اندازه‌گیری مقدار نوری که از محلول رنگی خارج می‌شود. (*Transmition=T*)

ـ مقدار جذب (*A*): نوری که از یک محلول رنگی عبور می‌کند، مقداری از آن جذب محلول رنگی می‌شود. اگر I_0 شدت نور اولیه و I شدت نور خارج‌شده از محلول باشد، لذا I_a شدت نور جذب‌شده به محلو رنگی می‌باشد و داریم:

$$A = OD = \frac{\log I_0}{\log I} \quad \Rightarrow \quad A = \log \frac{I_0}{I}$$

طبق قانون بیر و لامبرت (*Beer & Lambert*)، مقدار نور جذب‌شده به محلول، به غلظت محلول رنگی و قطر لولهٔ آزمایش (لولهٔ نمونه) بستگی دارد لذا:

$$\log \frac{I_0}{I} = K.C.l$$

l = قطر لوله نمونه (غالباً $1cm$)

C = غلظت محلول

K = ضریب جذب مادهٔ موردنظر

ـ مقدار عبور نور (T): ترانسیتانس مقدار نوری است که از محلول رنگی خارج می‌شود.

$$T = \frac{I}{I_0} \quad \Rightarrow \quad \log \frac{I_0}{I} = \log \frac{1}{T} = A \quad \Rightarrow \quad A = -\log T$$

حال اگر شدت نور اصلی را ۱۰۰ فرض کنیم و شدت نور عبور کرده از محلول را برحسب درصد نور اصلی درنظر بگیریم و با $\%T$ نمایش دهیم، رابطهٔ زیر بدست می‌آید.

$$A = \log \frac{100}{\%T} = \log 100 - \log \%T \Rightarrow A = 2 - \log \%T$$

از آن‌جایی که در عمل نمی‌توان نور جذب‌شده (A) را مستقیماً اندازه گرفت، آن را به طور غیرمستقیم از روی مقدار نور عبور کرده (T) اندازه می‌گیرند.

طرزکار با اسپکتروفتومتر مدل Spectronic 20:

۱) دستگاه را با پیچ شمارهٔ یک روشن کرده، حدود ده دقیقه به حال خود بگذارید تا گرم شود.

۲) طول موج موردنظر را (در محدودهٔ ۳۲۵–۹۷۵nm) با پیچ شمارهٔ سه مشخص و تنظیم کنید.

۳) در حالی که محل مخصوص لولهٔ نمونه (شمارهٔ چهار) خالی است. دریچهٔ مخصوصی مسیر نور را می‌بندد، و لذا هیچ نوری به فتوسل نمی‌رسد. در این حالت $\%T$ برابر صفر خواهد بود. اگر عقربه روی صفر $\%T$ نباشد، با پیچ یک، عقربه را روی صفر $\%T$ قرار دهید. (در این حالت $A=\infty$)

٤) محلول شاهد (*Blank*) را در لولهٔ نمونه ریخته و درون دستگاه قرار دهید. در این حالت بایستی مقدار جذب (A) صفر باشد ($\%T=100$) زیرا حلال مورد آزمایش مقداری از نور را جذب می‌کند و بنابراین برای آن‌که برمقدار جذب افزوده نشود باید آن را روی صفر تنظیم کنیم. این عمل با پیچ شمارهٔ دو انجام می‌شود.

۵) محلول رنگی موردنظر را در جای مخصوص خود در دستگاه قرار دهید و بدون دست زدن به پیچ‌های تنظیم، مقدار $\%T$ و A را یادداشت کنید.

شکل ص ۵

* توجه * هنگام خواندن A و $\%T$ حتماً درب جای لولهٔ نمونه بسته باشد.

٦. تعرّق و تعریق

خروج آب از گیاه را به صورت بخار، تعرّق گویند. شدت تعرق در گیاهان مختلف و در حالات مختلف فرق می‌کند و حدود ٩٦-٩٠ درصد تعرّق از طریق روزنه‌ها انجام می‌شوند.

خروج آب از گیاه را به صورت مایع، تعریق می‌گویند که از راه روزنه‌های آبی که در نوک برگ‌ها قرار گرفته‌اند انجام می‌شود. تعریق در اثر فشار ریشه‌ای و غالباً در شب و یا در هوای اشباع از بخار آب صورت می‌پذیرد.

مواد و وسایل:

١- ارلن با لولهٔ جانبی	٦- لامپ
٢- چوب‌پنبه سوراخ‌دار	٧- پنکه
٣- پیپت یک میلی‌لیتری	٨- پلاستیک
٤- گیاه شمعدانی (یا هرگیاه مناسب دیگر)	٩- میکروسکوپ
٥- شلنگ رابط	١٠- پایهٔ گیره‌دار

روش‌کار:

١- تعیین شدّت تعرّق:

مطابق شکل، ابتدا ارلن را پر از آب کرده، پیپت را با یک قطعه لولهٔ لاستیکی به شاخهٔ جانبی ارلن وصل کنید. شاخهٔ برگداری از گیاه را جدا کرده، مجدداً زیر شیرآب قسمت پایین آن را قطع کنید تا هوا وارد آوندها نشوند در غیر این صورت در تعرق اختلال حاصل خواهد شد. گیاه را روی ارلن مذکور نصب کنید و دقت کنید در ارلن نیز حباب هوا وجود نداشته باشد. برای جلوگیری از ورود هوا از چوب‌پنبهٔ ارلن، مقداری وازلین به اطراف ساقه و چوب‌پنبه بمالید. سطح آب را در پیپت با علامت مشخص کنید و سیستم را یک ساعت به حال خود بگذارید و در پایان یک ساعت مقدار آب دفع شده از طریق تعرق را از روی درجات پیپت خوانده، یادداشت کنیدو این عمل را در سه حالت زیر انجام دهید و در هر حالت نتایج را بنویسید و تفسیر کنید.

١) در حالت عادی ٢) در مقابل باد (با کمک پنکه) ٣) در مقابل نور شدید.

شکل ص ۱۳

در پایان، مقدار آب دفع شده از 1^{cm^2} سطح برگ را در یک ساعت برای هرکی از حالت‌های مختلف محاسبه کنید. به این منظور، شکل برگ‌ها را روی کاغذ رسم کرده، و سپس آن را ببرید و وزن کنید. وزن یک سانتی‌مترمربع از کاغذ را نیز تعیین کنید و وزن کل را بر وزن یک سانتی‌مترمربع از کاغذ تقسیم کرده، سطح برگ را بدست آورید.

$$\text{سطح برگ} = \frac{\text{وزن کل کاغذ}}{\text{وزن } 1^{cm^2} \text{ کاغذ}}$$

۲- تعیین تعداد روزنه‌ها:

بشرهٔ فوقانی و تحتانی برگ شمعدانی را جدا کرده، تعداد روزنه‌ها را در هر نمونه در میدان دید میکروسکوپ بشمارید. برای هر بشره، در سه مرحله این عمل را انجام داده و میانگین حاصل را یادداشت کنید.

برای اندازه‌گیری سطح میدان دید می‌توانید از خط‌کش میکرومتری استفاده کنید. نتایج حاصل را یادداشت کرده، تفسیر نمایید.

	تعداد روزنه در میدان دید	تعداد روزنه در 1^{cm^2}
بشره فوقانی		
بشره تحتانی		

۳- مشاهدهٔ تعریق:

یک گلدان حاوی گیاه را خوب آبیاری کنید و سپس با یک پلاستیک آن را بپوشانید. قطرات آب ناشی از تعریق در نوک برگ‌ها مشاهده خواهند شد.

۷. تعیین غلظت فسفر به روش رنگ‌سنجی

فسفات موجود در محلول مورد آزمایش را می‌توان با استفاده از روش رنگ‌سنجی (*colourornetry*) تعیین کرد. اساس تجزیه براین استوار است که از ترکیب اسیدمولیبدیک با فسفات موجود در محلول، کمپلکس اسیدفسفومولبیدیک بدست می‌آید که احیای این کمپلکس باعث ایجاد رنگ آبی در محلول می‌شود. شدت رنگ تشکیل شده متناسب با غلظت فسفر موجود در محلول است و با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۷۳۰*nm* اندازه‌گیری می‌شود.

با کمک منحنی استاندارد، می‌توان غلظت فسفر محلول را محاسبه کرد. رنگ ایجاد شده نسبت به *PH* و غلظت‌های زیاد فسفات در محلول حساس است و بنابراین دو عامل باید در محیط آزمایش کنترل شود.

مواد و وسایل:

۱- محلول فسفر با غلظت ۱ *gr/lit*
۲- معرف فنل فتالئین
۳- محلول سود ۵ درصد
٤- محلول اسیدکلریدریک ۵ درصد نرمال
۵- اسید آسکوربیک
٦- محلول اسیدی مولیبدات
۷- بشر
۸- پیپت
۹- اسپکتروفتومتر
۱۰- اجاق‌برقی

روش کار:

۰/۵ میلی‌لیتر از محلول (*Digest*) را که در آزمایش قبل تهیه کرده‌اید داخل بشر شیشه‌ای بریزید و دو قطره محلول فنل فنالئین به آن اضافه کنید. با کمک محلول‌های سود و اسیدکلریدریک، محلول را خنثی کنید.

با افزودن آب‌مقطر محلول را به ۳۰*ml* برسانید و سپس ٤*ml* محلول اسیدی مولبیدات به آن اضافه کنید و هم بزنید. پس از اضافه کردن ۰/۱ گرم اسیدآسکوریک، محلول را به مدت یک دقیقه بجوشانید و سپس آن را سرد کرده، به یک بالن ژوژه ۱۰۰*ml* منتقل کرده و سپس به حجم برسانید. پس از هم‌زدن، محلول را درون لولهٔ شیشه‌ای مخصوص ریخته و شدت جذب را با کمک

اسپکتروفتومتر در طول موج ۷۳۰*nm* اندازه‌گیری کنید. محلول شاهد شامل مخلوط همهٔ ترکیبات بالا با همان حجم‌ها می‌باشد. با این تفاوت که به جای ۰/۵*ml* محلول *Digest* اولیه از آب‌مقطر استفاده می‌شود.

رسم منحنی استاندارد:

محلولی بسازید که غلظت فسفر در آن ۱۰۰*gr/lit* باشد. آن‌گاه با استفاده از آب‌مقطر و رقیق کردن محلول، به مقادیر معین پنج محلول استاندارد تهیه کنید که غلظت فسفر در هریک از آن‌ها به ترتیب ۱۰، ۲۰، ۵۰، ۸۰ و ۱۰۰ باشد. هریک از محلول‌های اخیر را وارد تمام مراحل آزمایش کنید و شدت رنگ هر محلول را با اسپکتروفتومتر اندازه بگیرید و با در دست داشتن دو متغیر غلظت فسفر و جذب (شدت رنگ) یک منحنی استاندارد رسم کنید. با کمک این منحنی و جواب بدست آمده برای جذب فسفر در محلول *Digest* ، غلظت فسفر را در محلول مورد آزمایش و مقدار درصد فسفر در بافت خشک گیاه را تعیین کنید.

۸. اندازه‌گیری مقدار پتاسیم و سدیم به روش فلم فتومتری

مقدمه

الکترون‌های عناصر در حالت معمولی در حالت پایهٔ انرژی (*ground state*) هستند. هرگاه مقدار زیادی انرژی (با حرارت) به عناصر برسد، الکترون‌ها به مدار بالاتر انرژی یعنی سطح برانگیخته، (*excited state*) می‌روند. حال این انرژی دریافت شده توسط الکترون‌ها باعث می‌شود که حالت ناپایدار در اتم‌ها ایجاد شود، لذا سریعاً الکترون‌ها به سطح پایه برمی‌گردند و انرژی نهفته شده در خود را به صورت انرژی نورانی با طول موج‌های خاص هر عنصر منعکس می‌کنند مثلاً کلرورسدیم مجموعاً رنگ زرد ایجاد می‌کند که برای تفکیک نورها و اینکه کدام نور مربوط به سدیم و کدام‌یک مربوط به کلر است بایستی از فیلترهای مخصوص استفاده شود. هر فیلتر مخصوص یک عنصر است و تمام نورها به جز نور مربوط به همان عنصر را جذب می‌کند و نور عنصر موردنظر از آن عبور می‌کند. این نور عبور کرده به یک فتوسل رسیده و به انرژی الکتریکی تبدیل می‌شود و مقدار الکتریسیته با گالوانومتر اندازه‌گیری می‌شود. با این روش عناصر مختلفی همچون سدیم، پتاسیم، کلسیم، لیتیم، باریم قابل اندازه‌گیری هستند.

دستگاه فلم فتومتر برای این اندازه‌گیری‌ها می‌باشد. در این دستگاه پمپ هوا، هم گاز و هم هوای لازم برای سوختن را به درون دستگاه پمپ می‌کند. قبل از هر سنجشی از آب‌مقطر برای تمیز شدن بخش‌های داخلی دستگاه استفاده کنید. به این منظور بشر آب‌مقطر را زیر لولهٔ موثینهٔ مکنده قرار دهید.

گیاه خشک شده را آسیاب کرده، به یک بوتهٔ چینی که قبلاً دقیق وزن شده است منتقل کنید. بوته را درون کورهٔ الکتریکی قرار داده و دمای آن را روی $۵۰۰^{\circ}c$ تنظیم کنید. اجازه دهید تا گیاه خشک‌شده، ظرف مدت ۲/۵ ساعت، خاکستر شود. آن‌گاه بوتهٔ چینی را به همراه خاکستر درون آن وزن کرده، وزن خاکستر را محاسبه کنید.

باتوجه به اطلاعاتی که بدست آورده‌اید، درصد آب، درصد وزن خشک نمونهٔ تازهٔ، درصد خاکستر وزن خشک و درصد خاکستر وزن تر گیاه را محاسبه کنید.

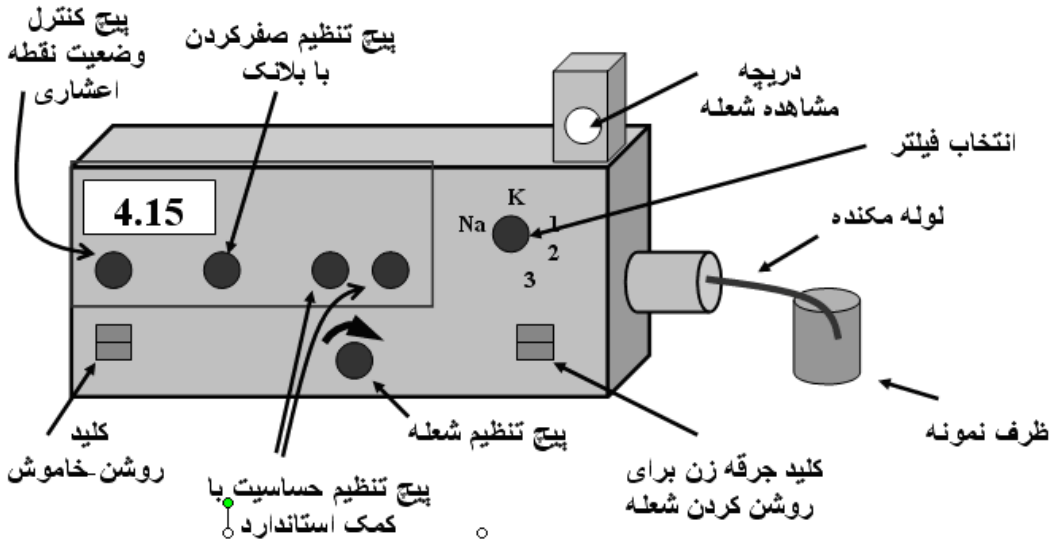
در مرحلهٔ بعدی، خاکستر حاصل را در $5ml$ آب‌مقطر حل کنید و ۳-۲ قطره HCl غلیظ بـه آن اضافه کنید. محلول بدست آمده را در آزمایش‌های زیر به کار ببرید.

فسفر: روی یک لام تمیز یک قطره محلول ۵ درصد KH_2PO_4 و در کنار آن قطـره‌ای معـرف مولیبدات آمونیوم قرار دهید. دو قطره را با گوشهٔ لام دیگری مخلوط کنید و چنـد دقیقـه صـبر کنیـد رنگ و شکل بلورها را با کمک میکروسکوپ مشاهده و ترسیم کنید. آزمایش را بـا خاکـستر محلـول نیز انجام دهید.

پتاسیم: یک قطـره محلـول ۵ درصـد K_2HPO_4 روی لام گذاشـته و در کنـار آن قطـره‌ای از محلول ۱۵ درصد $HClO_4$ (با احتیاط) قرار دهید. قطره‌ها را باهم مخلوط کرده، به تشکیل بلورهـای $KClO_4$ توجه کنید. رنگ و شکل بلورها را مـشاهده و ترسـیم کنیـد. آزمـایش را بـا یـک قطـره از خاکستر محلول انجام دهید.

منیزیم: یک قطره از محلول ۵ درصد $MgSO_4$ را با قطـره‌ای معـرف منیـزیم مخلـوط کنیـد و بلورهای فسفات آمونیوم ـ منیزیم را مشاهده و ترسیم کنید. خاکستر محلول را نیز آزمایش کنید.

گوگرد: یک قطره محلول ۵ درصـد K_2SO_4 و یـک قطـره محلـول ۱۰ درصـد $BaCl_2$ را در سطح لامی قرار دهید. پس از مخلوط کردن قطره‌ها، تشکیل بلورهـای $BaSO_4$ را کـه بیـانگر وجـود گوگرد است ملاحظه کنید. این آزمایش را با خاکستر محلول تکرار کنید.



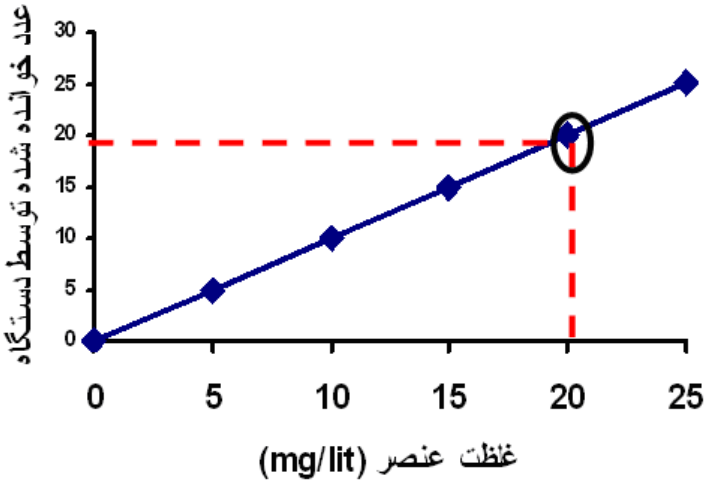
مشاهده بلانک را برای صفر کردن دستگاه استفاده کنید. برای بدست آوردن غلظت محلول‌های مورد آزمایش، ابتدا از محلول‌های استاندارد استفاده می‌کنیم تا منحنی استاندارد بدست آید و آن‌گاه براساس منحنی، غلظت نمونهٔ مجهول را بدست می‌آوریم.

لازم به ذکر است که دستگاه براساس غلظت مادهٔ موردنظر و کاربرد فیلتر اختصاصی، عددی را نمایش می‌دهد که متناسب با غلظت ماده است. هر چه غلظت بیشتر باشد عدد نشان داده شده بیشتر خواهد بود. لذا برای منحنی استاندارد، محور X مربوط به غلظت صفر و محور Y مربوط به عدد نشان داده شده توسط دستگاه می‌باشد.

نکته: حساسیت دستگاه در غلظت‌های کم عنصر بیشتر است و بهتر است از غلظت‌های کم برای تهیهٔ استانداردها و نیز مجهول استفاده شود. اگر مجهول در خارج محدودهٔ عدد مربوط به استانداردها باشد آن را با نسبت معین رقیق کنید و سپس با دستگاه عدد مربوط به آن را بخوانید و سپس نسبت رقیق کردن را در محاسبات تعیین غلظت عنصر دخالت دهید.

الف ـ تهیهٔ منحنی استاندارد سدیم و سنجش سدیم:

محلولی از سدیم با غلظت ۱۰۰*mg/lit* بسازید و با رقیق کردن آن محلول‌های استانداردبا غلظت‌های ۵، ۱۰، ۲۰ و ۳۰ *mg/lit* را هریک به مقدار ۲۰*ml* تهیه کنید. آن‌گاه با کمک دستگاه فلم فتومتر، عدد مربوط به هر غلظت را خوانده و منحنی استاندارد را مطابق شکل بالا ترسیم کنید. قابل ذکر است بعد از هر سنجش، با آب‌مقطر دستگاه را شستشو دهید تا دستگاه صفر شود.



۵۸/٤٦ = وزن مولکولی *NaCl* ۲۳/۰ = وزن اتمی سدیم

۷٤/٥٦ = وزن مولکولی *KCl* ۳۹/۱ = وزن اتمی پتاسیم

Sodium	*Na*	*lppm* = 0.0435 *mmol/l*	*lmmol/l* = 23 *ppm*
Potassium	*K*	*lppm* = 0.0256 *mmol/l*	*lmmol/l* = 39 *ppm*
Lithium	*Li*	*lppm* = 0.1441 *mmol/l*	
Calcium	*Ca*	*lppm* = 0.0250 *mmol/l*	

پس از ترسیم منحنی استاندارد، عدد محلول مجهول (دایجست) را خوانده و غلظت سدیم را تعیین کنید. پس از تعیین غلظت در محلول دایجست، درصد گرم سدیم در بافت خشک و تازهٔ گیاهی را بدست آورید.

ب ـ تهیهٔ منحنی استاندارد پتاسیم و سنجش پتاسیم:

محلولی از پتاسیم با غلظت ۱۰۰*mg/lit* بسازید و غلظت‌های ۱۰، ۲۰، ۳۰ و ٤۰ *mg/lit* از آن تهیه کنید و مطابق روش قبل، پتاسیم را اندازه‌گیری نمایید.

۹. اندازه‌گیری کلسیم و منیزیم به روش کمپلکسومتری:

الف ـ اندازه‌گیری مقدار کلسیم:

روش‌کار:

۱۰ گرم ماده گیاهی مورد آزمایش را به وسیله کوره خاکستر و یا آن را در مجاورت اسیدنیتریک و اسید پرکلریک هضم کنید. خاکستر را وزن کرده در مقدار کمی اسیداستیک حل و به حجم ۱۰۰^{cc} برسانید.

۲۰^{cc} از این محلول را در ارلن کوچکی ریخته و به وسیله سود محیط را خنثی کنید. سپس ۳^{cc} سود ۲/۵ نرمال و مقدار کمی ($۰/۱\ g$) منوکسید به آن بیفزایید. بلافاصله با $EDTA$ (محلول کمپلکسون) آن را تیتر کنید. خاتمهٔ عمل را از تغییر رنگ محلول به دقت تشخیص داده و حجم محلول $EDTA$ مصرفی را از روی بورت یادداشت کنید. باتوجه به این حجم و رابطهٔ زیر مقدار کلسیم در صد گرم ماده را حساب نمایید.

$$V_۱ \times ۰/٤ \times \frac{a}{b} \times \frac{۱۰۰}{c} = mg\ ca/۱۰۰g$$

$V_۱$ = حجم کمپلکسون مصرفی

a = حجم نهایی محلول خاکستر یا مادهٔ گیاهی هضم شده

b = مقدار مصرف شده از نمونه‌های محلول خاکستر یا مادهٔ گیاهی هضم شده

c = مقدار ماده هضم شده یا خاکستر شده

۱۰۰ = صد گرم ماده

۰/٤ = هر میلی‌لیتر محلول کمپلکسون هم‌ارز ۰/٤ میلی‌گرم کلسیم می‌باشد.

ب ـ اندازه‌گیری مقدار کلسیم و منیزیم:

روش‌کار

۲۰^{cc} از محلول خاکستر یا محلول هضم شده را در یک ارلن کوچک ریخته و آن را با سود خنثی کنید. سپس ۲^{cc} تامپون و مقدار کمی ( ) معرف اریوکروم به آن اضافه و بلافاصله با محلول

کمپلکسون آن را تیتره نمایید. حجم محلول $EDTA$ مصرفی برای سنجش کلسیم و منیزیم را به دقـت یادداشت و از روی فرمول زیر مقدار منیزیم را در صد گرم وزن ماده محاسبه کنید.

$$V_{۲} - V_{۱} \times ۰/۲٤ \times \frac{a}{b} \times \frac{۱۰۰}{c} = mg\ Mg/۱۰۰gr$$

$V_{۲}$ = حجم مصرفی کمپلکسون در سنجش کلسیم و منیزیم

$V_{۱}$ = حجم مصرفی کمپلکسون در سنجش کلسیم.