آزمایشگاه بیوشیمی پزشکی

دکتر محمد دیلمقانی

آشنائی با آزمایشگاه بیوشیمی

- آزمایشگاه بیوشیمی جزئی از آزمایشگاه پزشکی است. در این آزمایشگاه با انجام آزمایش بر نمونه‌های بیماران؛ قند، چربی، آنزیم و یا هورمون‌های بیمار شناسائی یا اندازه‌گیری می‌شود.
- لوازم مورد استفاده در آزمایشگاه را می‌توان به دو دستهٔ عمدهٔ لوازم شیشه‌ای و لوازم غیر شیشه‌ای تقسیم کرد.
- ظروفِ شیشه‌ای از دیر باز به دلیل خنثی یا inert بودن، شفافیت و همچنین مقاومت به حرارت در آزمایشگاه‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرند. استفاده از مادهٔ بوروسیلیکات یا پیرکس این ظروف را در مقابل تغییرات ناگهانی حرارت مقاوم می‌کند.

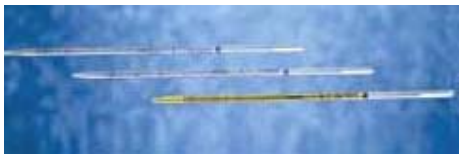
برخی از لوازم شیشه‌ای که کاربرد زیادی در آزمایشگاه دارند عبارتند از:

۱- بشر (Beaker): استوانه‌ای شکل بوده و برای مخلوط کردن مواد به کار برده می‌شود.

۲- ارلن (Erlenmeyer flask): مخروطی شکل بوده و برای مخلوط کردن و نگهداریِ مواد به کار برده می‌شود.

۳- بالن (Flask): دارای یک بدنهٔ کروی و یک گردن است و برای محلول‌سازی و حرارت دادن استفاده می‌شود. نوع خاصی از آن گردن باریک و درازی داشته و برای به حجم رساندن مورد استفاده قرار می‌گیرد که به آن بالن ژوژه (volumetric flask) می‌گویند. یک خط در بخش گردنی، حجم آن را مشخص می‌کند. هنگام به حجم رسانی دقت کنید تا سطحِ محلول درست روی خط قرار گیرد.

۴- استوانهٔ مدرج (Measuring cylinder): استوانه‌ای شکل و مدرج بوده و برای اندازه‌گیری و جابجائیِ حجم‌های مختلف به کار می‌رود.



۵- پیپت (Pipette): لوله‌ای دراز و نازک با درجه‌بندی دقیق است و برای جابجائیِ حجم‌های دقیق استفاده می‌شود. حجم و دقت پیپت روی آن درج شده است. کار با پیپت نیاز به تمرین دارد. **هرگز از دهان برای مکش محلول به داخل پیپت استفاده نکنید** و برای این کار از وسیله‌ای به نام پوار استفاده کنید.

۶- بورت (Burette): مانند پیپت است با این فرق که یک شیر در قسمت پائین آن وجود دارد. برای اندازه‌گیریِ دقیقِ حجم خروجی استفاده می‌شود، مانند تیتراسیون.

۷- لولهٔ آزمایش (Test tube): استوانه‌ای و معمولا ته گرد است و برای نمونه‌گیری، انجام آزمایش و نگهداری نمونه به کار می‌رود.

- لوازم غیر شیشه‌ای از ابزار ساده مانند سه پایه، گیره، اسپاتول (کاردک) تا دستگاه‌هائی مانند ترازو، pH متر، اسپکتروفتومتر، فلیم‌فتومتر و ... را شامل می‌گردد. از مهمترین آنها می‌توان به میکروپیپت یا سمپلر که برای جابجائی حجم‌های کم (زیر 1000 میکرولیتر) استفاده می‌شود، اشاره کرد.

نکات ایمنی در آزمایشگاه بیوشیمی

۱- لباس مناسب (دست و پا گیر نباشد) و کفش روبسته بپوشید. از کنتاکت لنز استفاده نکنید.

۲- تمام افراد حاضر در آزمایشگاه ملزم به پوشیدنِ روپوش مناسب هستند. در تمامی مراحل آزمایش از دستکش و عینک محافظ استفاده کنید.

۳- هیچ‌کس اجازه ندارد به تنهائی در آزمایشگاه کار کند و یا آزمایش غیر مجاز انجام دهد.

۴- خوردن، نوشیدن، جویدن و استعمال دخانیات در آزمایشگاه مطلقا ممنوع است.

۵- اکثرِ مواد شیمیائی آزمایشگاه سمی هستند و نباید چشیده شوند. در صورت نیاز به بوئیدن، هرگز بینی خود را روی ظرف نگیرید. هرگز از دهانهٔ ظروف آزمایشگاهی به آن نگاه نکنید.

۶- کلیه آسیب‌ها، حساسیت‌ها و مشکلات پزشکی را بلافاصله به مسئول آزمایشگاه گزارش دهید.

۷- در صورت پاشیده شدن یک مادهٔ شیمیائی آن را پاک کنید.

۸- پس از اتمام آزمایش، همچنین تماس دست‌ها با هر نوع مادهٔ شیمیائی بلافاصله آنها را بشوئید.

۹- هرگز مواد شیمیائی مازاد را به ظرف اصلی باز نگردانید و آنها را با نظر مسئول آزمایشگاه به صورت درست دفع کنید.

۱۰- برچسب‌ها و دستورالعمل دستگاه‌ها را قبل از استفاده مطالعه کنید.

۱۱- در تمام طول آزمایش، آن را زیرِ نظر داشته باشید و میزِ کار خود را ترک نکنید.

۱۲- میزِ کار خود را همیشه تمیز و مرتب نگهدارید.

۱۳- هرگز از دهان برای مکش محلول به داخل پیپت استفاده نکنید.

محلول‌ها:

- یک محلول (solution)، مخلوط همگنی است که از دو یا چند ماده تشکیل شده و در آن مادهٔ حل شونده را حل‌شو (solute) و مادهٔ حل کننده را حل‌گر (حلال، solvent) می‌نامند.

غلظت:

- معیاری برای نشان دادن مقدار حل‌شو در حل‌گر یا محلول است.
- روش‌های متفاوتی برای بیانِ کمی غلظت وجود دارد که بر اساس جِرم، حجم و یا هر دو بنا شده‌اند.

مولاریته:

- این واحد بر اساس جرم و حجم بنا شده و با واحدهای mol/L، مولار یا M عنوان می‌شود که نشان دهندهٔ تعداد مول‌های یک حل‌شو در یک لیتر از محلول است.
- برای غلظت‌های کم از واحدهای میلی‌مولار (mmol/L یا mM)، میکرومولار (µmol/L یا µM) و نانومولار (nmol/L یا nM) استفاده می‌شود.
- هر چند مولاریته متداول‌ترین واحد اندازه‌گیری غلظت، خصوصا برای محلول‌های رقیق است، با این حال عاری از عیب نیست. تعیین جرم به دلیل دقت ترازوهای آزمایشگاهی معمولا دقیق است. ولی تعیین حجم اغلب دقیق نبوده و حجم محلول با تغییر دما و فشار دستخوش تغییر می‌شود.

مولالیته:

- این واحد بر اساس جرم بنا شده و با واحدهای mol/kg یا مولال عنوان می‌شود که نشان دهندهٔ تعداد مول‌های یک حل‌شو در یک کیلوگرم از حل‌گر است.

- منظور از محلولِ مولال «محلول یک مولال» است یعنی محلولی که در آن یک مول حل‌شو، در 1000 گرم حل‌گر حل شده است.
- به دلیل امکان تعیین وزن دقیق جرم به وسیلهٔ ترازو، این واحد برای بیان غلظت دقیق‌تر از مولاریته است.

- در یک محلول رقیق و در دمای اطاق و فشار جو، مقدار عددی مولاریته و مولالیته بسیار نزدیک خواهند بود زیرا 1 کیلوگرم آب 1 لیتر حجم دارد و چون محلول رقیق است، افزودن حل‌شو تغییر چندانی در حجم محلول به وجود نمی‌آورد.

درصدِ جرم- جرم:

- درصد جرم حل‌شو در یک مخلوط، به کل جرم مخلوط را درصدِ جرم- جرم می‌گویند که درصد وزن- وزن نیز نامیده شده و به صورت w/w نشان داده می‌شود.
- محلولِ اتانول 40٪ w/w یعنی 40 گرم اتانول در 60 گرم آب (جرم حجمی اتانول تقریبا 0٫8 گرم در سانتیمتر مکعب است، بنابراین برای تهیهٔ محلول اتانول 40٪ w/w باید 50 میلی‌لیتر اتانول را با 60 میلی‌لیتر آب مخلوط کرد).

درصدِ جرم- حجم:

- درصدِ وزن- حجم نیز نامیده شده و به صورت w/v نشان داده می‌شود. درصد جرم- حجم بیان‌گر جرمِ حل‌شو با واحد گرم در 100 میلی‌لیتر از محلولِ نهائی است. معمولا درصدِ جرم- حجم را برای محلول‌هائی که از حل شدن یک حل‌شو جامد در حل‌گر مایع درست می‌شود استفاده می‌کنند.
- محلولِ اتانول 40٪ w/v، حاوی 40 گرم اتانول در هر 100 میلی‌لیتر محلول نهائی است (جرم حجمی اتانول تقریبا 0٫8 گرم در سانتیمتر مکعب است، بنابراین برای تهیهٔ محلول اتانول 40٪ w/v باید 50 میلی‌لیتر اتانول را با 50 میلی‌لیتر آب مخلوط کرد).

درصدِ حجم- حجم:

- به صورت v/v نشان داده شده و عبارت است از حجم حل‌شو بر اساس میلی‌لیتر به ازای هر 100 میلی‌لیتر از محلول نهائی.
- محلولِ اتانول 40٪ v/v دارای 40 میلی‌لیتر اتانول در هر 100 میلی‌لیتر محلول نهائی است (جرم حجمی اتانول تقریبا 0٫8 گرم در سانتیمتر مکعب است، بنابراین برای تهیهٔ محلول اتانول 40٪ v/v باید 40 میلی‌لیتر اتانول را با 60 میلی‌لیتر آب مخلوط کرد).

نرمالیته:

- نرمالیته بیان‌گرِ هر گونه تفاوت بین غلظت یون‌های مختلف در یک محلول است و فقط اندازهٔ یک یون را مشخص می‌کند.
- طبق تعریف، محلولِ یک نرمال به معنی وجود یک گرم اکی‌والان از حل‌شو به ازای هر لیتر محلول است.
- اکی‌والان مقداری از یک ماده بر اساس مول است که با $6٫02 \times 10^{23}$ الکترون واکنش می‌دهد.
- کاربرد نرمالیته بیشتر در مورد اسید و باز بوده و به ترتیب نشان دهندهٔ تعداد اکی‌والان گرم یون‌های H^+ و OH^- است. به عنوان مثال در محلول 1 مولارِ اسید سولفوریک (H_2SO_4)، 2 یون H^+ وجود دارد، بنابراین نرمالیتهٔ محلول اسید سولفوریکِ 1 مولار، 2 است.
- استفاده از نرمالیته در انجام تیتراسیون بسیار مفید است.

کربوهیدرات‌ها

- کربوهیدرات‌ها جزو فراوان‌ترین بیومولکول‌های طبیعت هستند که نقش‌های گوناگونی از قبیل ذخیره و انتقال انرژی (نشاسته و گلیکوژن) و اجزاء ساختمانی (سلولز در گیاهان، کیتین و غضروف در جانوران) در موجودات زنده داشته و خود و یا یکی از مشتقات آن در بسیاری از فرآیندهای دیگر مانند سیستم ایمنی، انعقاد خون، نمو و ... نقش دارند.
- از لحاظ شیمیائی، کربوهیدرات‌ها ترکیباتِ آلی سادهٔ آلدئیدی ( ) یا کتونی ( ) هستند که در کربن‌های غیر از گروه‌های فعال آلدئیدی و کتونیِ خود (گروه کربونیل)، دارای گروه‌های هیدروکسیل می‌باشند.
- این واحدهای ساده را که به دلیل وجود این گروه کربونیل خاصیت احیاگری دارند، مونوساکارید می‌گویند و می‌توان آنها را با فرمولِ $(C{\cdot}H_2O)_n$ نشان داد.
- مونوساکاریدها با توجه به نوع گروه کربونیل و تعداد اتمِ کربن نامگذاری می‌شوند.
  - نوع گروه کربونیل (آلدئید ⟵ آلدوز، کتون ⟵ کتوز)
  - تعداد اتمِ کربن (تریوز، تتروز، پنتوز، هگزوز، هپتوز)

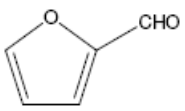
  معمولا این دو نوع نامگذاری ترکیب می‌شوند؛ آلدوتریوز، کتوتریوز، آلدوتتروز، ... ...
- از اتصال دو مونوساکارید، یک دی‌ساکارید به وجود می‌آید که می‌تواند احیاگر (مالتوز، لاکتوز، سلوبیوز) و یا غیراحیاگر (ساکاروز، ترهالوز) باشد.
- از اتصال 3 تا 10 مونوساکارید، الیگوساکاریدها (تری‌ساکاریدهای رافینوز و ملزیتوز) به وجود می‌آیند.
- اتصال بیش از 10 مونوساکارید، پلی‌ساکاریدها را به وجود می‌آورد (سلولز، نشاسته، گلیکوژن).

شناسائی کربوهیدرات‌ها:

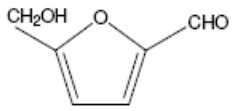
چند آزمایش ساده وجود دارد که بر اساس دو خاصیت شیمیائی مونوساکاریدها ابداع شده‌اند و اطلاعات مفیدی برای شناسائیِ قندها به دست می‌دهند.

۱- اثر اسید بر قندها:

- مونوساکاریدها در شرایط اسیدی دهیدراته شده و به فورفورال و یا مشتقات آن تبدیل می‌شوند.



furfural



5-hydroxymethylfurfural

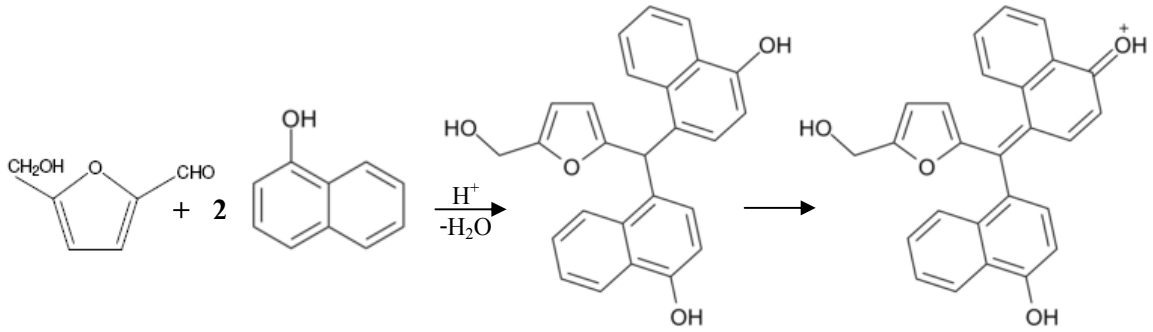
- دی‌ساکاریدها و پلی‌ساکاریدها در شرایط اسیدی ابتدا به مونوساکاریدها تجزیه شده و سپس به فورفورال و یا مشتقات آن تبدیل می‌شوند.
- آزمایش‌های مولیش، بیال و سلیوانف بر این اساس انجام می‌شوند.

توجه: کلیهٔ معرف‌ها و محلول‌های قندی (0/2٪) از قبل توسط مسئول آزمایشگاه تهیه شده‌اند.

توجه: در آزمایش‌های بخشِ کربوهیدرات‌ها، از محلول‌های قندی گزیلوز (پنتوز)، گلوکز (آلدوهگزوز)، فروکتوز (کتوهگزوز)، مالتوز (دی‌ساکارید احیا کننده) ساکاروز (دی‌ساکارید غیر احیا کننده)، نشاسته و گلیکوژن (پلی‌ساکارید) استفاده می‌شود.

آزمایش مولیش (Molisch's Test):

- آزمایش مولیش یک آزمایش حساس برای نشان دادن حضور قند در یک محلول بوده و نتیجهٔ آن برای همهٔ قندها مثبت است.
- فورفورال و مشتقات آن با آلفا نفتول (الکل بنزنی) تولید یک کمپلکس به رنگِ قرمز- بنفش می‌کنند.



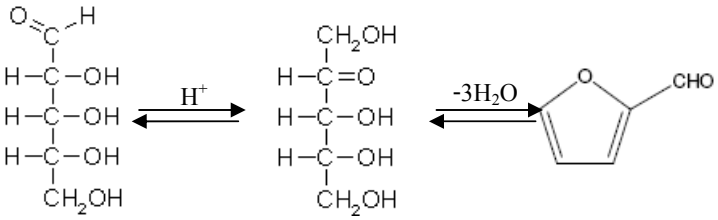
5-hydroxymethylfurfural α-naphthol کمپلکس قرمز- بنفش

روش آزمایش:

- 2 میلی‌لیتر محلول قندی را در یک لولهٔ آزمایش بریزید.
- 2 قطره معرف آلفانفتول (تازه تهیه شده) به آن اضافه کنید.
- 2-3 میلی‌لیتر اسید سولفوریک غلیظ از کنارهٔ لوله و به آرامی اضافه کنید. دقت کنید محلول به هم نخورد و اسید به تهِ لوله برسد.
- تشکیل حلقهٔ قرمز- بنفش نشان دهندهٔ حضور قند در محلول است.

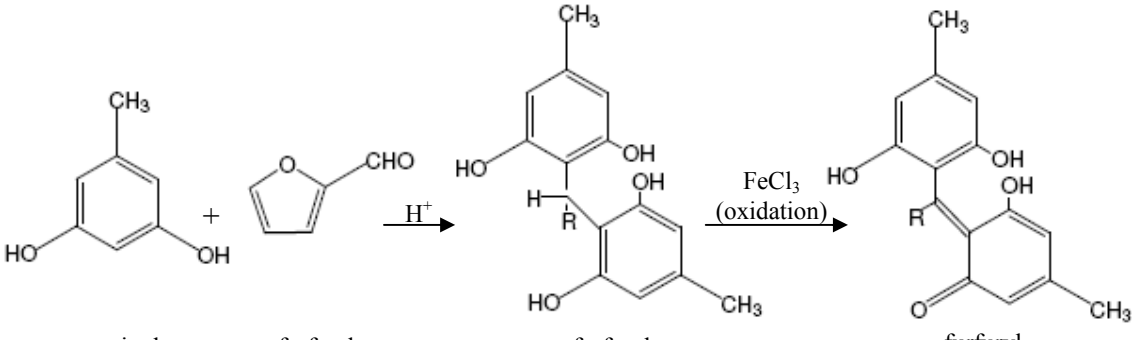
آزمایش بیال (Bial's Test):

- تست بیال برای تمایز قندهای پنتوز از هگزوز به کار می‌رود.
- در شرایط اسیدی، قندهای پنج کربنی (آلدوپنتوز و کتوپنتوز) با از دست دادن آب به سرعت به فورفورال تبدیل می‌شوند.



D-ribose (آلدوپنتوز) D-ribulose (کتوپنتوز) furfural

- فورفورال با معرف اورسینول (الکل بنزنی) و کلرید آهن یک محلول آبی- سبز به وجود می‌آورد.



orcinol furfural furfuryl furfuryl

- قندهای (آبی-سبز) نیز دهیدراته می‌شوند، ولی (قرمز) دهیدراسیون به 5- هیدروکسی متیل فورفورال (بی رنگ) کندتر بعدی با اورسینول و کلرید آهن کندتر انجام می‌گیرد.
- از سرعت تشکیل محلول و رنگ آن می‌توان به پنتوز یا هگزوز بودن قند پی برد.

- رنگ حاصل از پنتوزها ← محلول آبی- سبز؛ رنگ حاصل از هگزوزها ← قهوه‌ای مایل به قرمز.
- دی‌ساکاریدها در محیط اسیدی به مونوساکاریدها شکسته شده و به صورت فورفورال یا 5- هیدروکسی متیل فورفورال با معرف بیال واکنش نشان می‌دهند.

طرز تهیهٔ معرف بیال:

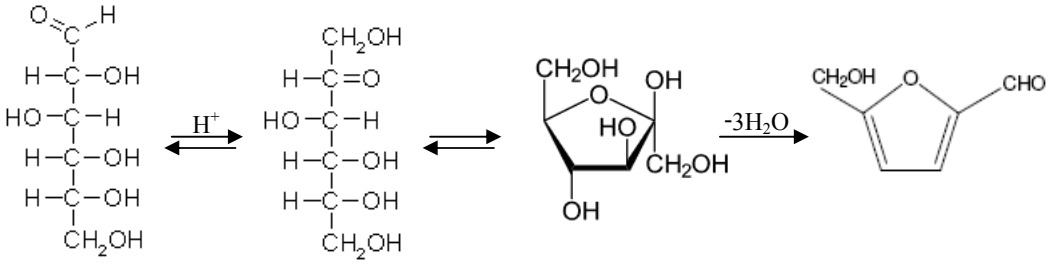
- 3 گرم اورسینول را در 1 لیتر اسید کلریدریک غلیظ حل کرده و به آن 2/5 میلی‌لیتر کلرید آهن 10٪ اضافه کنید.

روش آزمایش:

- 2 میلی‌لیتر معرف بیال را در یک لولهٔ آزمایش بریزید.
- 1 میلی‌لیتر محلول قندی به آن اضافه کنید.
- لوله را به مدت 1 دقیقه در حمام آب جوش قرار دهید.
- رنگ سبز نشان دهندهٔ وجود پنتوز است.
- افزایش غلظت پنتوز، سبز را پررنگ‌تر کرده و به رنگ آبیِ تیره سوق می‌دهد.

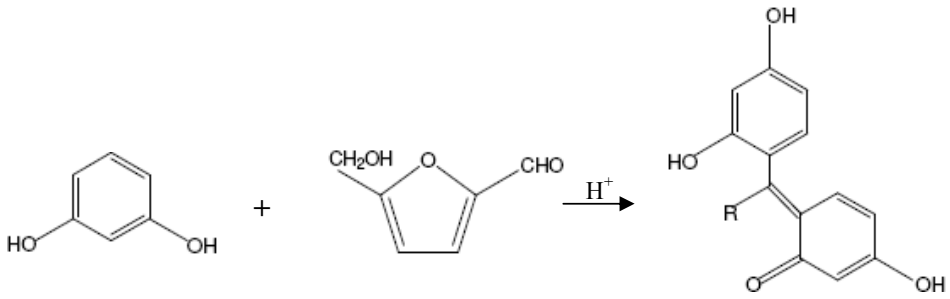
آزمایش سلیوانف (Seliwanoff's Test):

- آزمایش سلیوانف برای تمایز گروه آلدئیدی از گروه کتونی در قندهای هگزوز مورد استفاده قرار می‌گیرد. این آزمایش بر اساس سرعت متفاوتِ دهیدراسیون در آلدوهگزوزها و کتوهگزوزها ابداع شده است.



D-glucose D-fructose β-D-fructofuranose 5-hydroxymethylfurfural

- 5- هیدروکسی متیل فورفورال با الکل بنزنیِ رزورسینول یک محلول قرمز تیره به وجود می‌آورد.



resorcinol (بی‌رنگ) 5-hydroxymethylfurfural (بی‌رنگ) 5-hydroxyfurfuryl (قرمز)

- سرعت واکنش کتوهگزوزها بسیار بیشتر از سرعت واکنش آلدوهگزوزها است. کتوزها در 60 ثانیه و آلدوزها در 5- 2 دقیقه واکنش می‌دهند. از این اختلاف سرعت برای تمایز کتوهگزوزها از آلدوهگزوزها استفاده می‌شود.
- این واکنش برای قندهای پنج کربنی سودمند نیست.

طرز تهیهٔ معرف سلیوانف:

- 0/5 گرم رزورسینول را در 1 لیتر اسید کلریدریک 6N حل کنید.

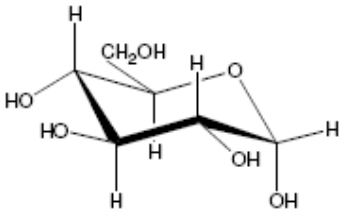
- در صورت تغییر رنگ قابل استفاده نیست.

روش آزمایش:

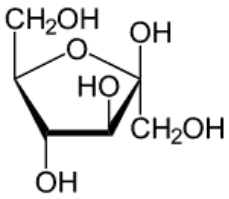
- 3 میلی‌لیتر از معرف سلیوانف را در یک لولهٔ آزمایش بریزید.
- 1 میلی‌لیتر محلول قندی به آن اضافه کنید.
- 2 دقیقه در بن‌ماری قرار دهید.
- تغییر رنگ یا رسوب قرمز دلیل بر وجود کتوهگزوز است.

۲- احیاگری

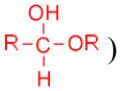
- قندها در محلول به ترتیب حلقه‌های پنج و شش کربنی به نام‌های فورانوز و پیرانوز تشکیل می‌دهند.



α-D-glucopyranose

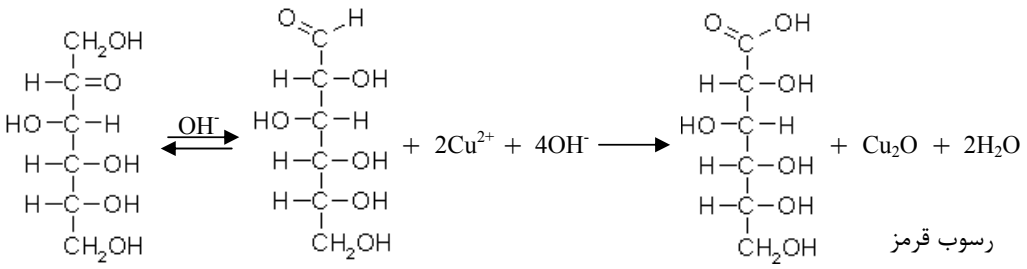


β-D-fructofuranose

- این حلقوی شدن یک گروه همی‌استال () با یک کربن نامتقارنِ جدید، به دو شکل α یا β ایجاد می‌کند.
- قندهائی که همی‌استال‌های حلقوی به وجود می‌آورند با عوامل اکسید کننده مانند یون مس واکنش نشان می‌دهند. این قندها را **قندهای احیاگر** می‌گویند چون یون مس را احیا می‌کنند.
- دو آزمایشِ بندیکت و بارفود بر این اساس انجام می‌شوند.
- دی‌ساکاریدهای احیاگر همین خاصیت را به صورت ضعیف‌تری از خود نشان می‌دهند.

آزمایش بندیکت (Benedict's Test):

- آزمایش بندیکت برای تمایز قندهای احیاگر از قندهای غیراحیاگر و با استفاده از املاح مسِ دو ظرفیتی انجام می‌شود. در این آزمایش Cu^{2+} به Cu^{+} احیا شده و مونوساکارید به یک اسید کربوسیلیک تبدیل می‌شود.
- رنگ قرمز آجری دلیل بر احیا شدن یون مس و حضور یک قند احیاگر در محلول است.
- هم کتوزها و هم آلدوزها می‌توانند احیاگر باشند. در شرایط آزمایش، قندهای کتونی در حضور قلیا به صورت آلدوز درآمده و با معرف بندیکت واکنش می‌دهند.



D-fructose D-glucose D-gluconic acid

- معرف بندیکت از ترکیبِ کربنات سدیم (برای قلیائی کردن محیط)، سیترات سدیم (برای جلوگیری از رسوب $Cu(OH)_2$ و سولفات مس به وجود می‌آید.

طرز تهیهٔ معرف بندیکت:

- 173 گرم سیترات سدیم و 100 گرم کربنات سدیم را در 800 میلی‌لیتر آبِ گرم حل کنید.
- در صورت لزوم محلول را از صافی عبور دهید.
- 17٫2 گرم سولفات مسِ متبلور را در 100 میلی‌لیتر آب حل کرده و آن را به آرامی به محلول فوق اضافه کنید.
- حجم را به یک لیتر برسانید.

روش آزمایش:

- 2 میلی‌لیتر محلول قندی را در یک لولهٔ آزمایش بریزید.
- 3 میلی‌لیتر معرف بندیکت به آن اضافه کنید.
- لولهٔ آزمایش را به مدت 10 دقیقه در حمام آب جوش قرار دهید.
- صبر کنید تا لوله سرد شود.
- رسوب قرمزِ نشان دهندهٔ وجود یک قند احیاگر است. غلظت قند باعث می‌شود تا رنگ رسوب از زرد پررنگ تا قرمز آجری فرق کند.

آزمایش بارفود (Barfoed's Test):

- آزمایش بارفود نیز برای تمایز قندهای احیاگر از قندهای غیراحیاگر انجام می‌شود. ولی به دلیل حساسیت بیشتر، از آن برای تمایز مونوساکاریدهای احیاگر از دی‌ساکاریدهای احیاگر استفاده می‌شود.
- احیاء مسِ دو ظرفیتی به مسِ یک ظرفیتی توسط مونوساکاریدها سریع‌تر از دی‌ساکاریدها اتفاق می‌افتد. سرعت ظاهر شدن رسوب قرمز رنگ، مونوساکاریدهای احیاگر را از دی‌ساکاریدهای احیاگر متمایز می‌کند.

طرز تهیهٔ معرف بارفود:

- 66٫7 گرم استات مس را در 900 میلی‌لیتر آب جوش حل کنید.
- 9 میلی‌لیتر اسید استیک گلاسیال به آن اضافه کنید.
- حجم را به یک لیتر برسانید.

روش آزمایش:

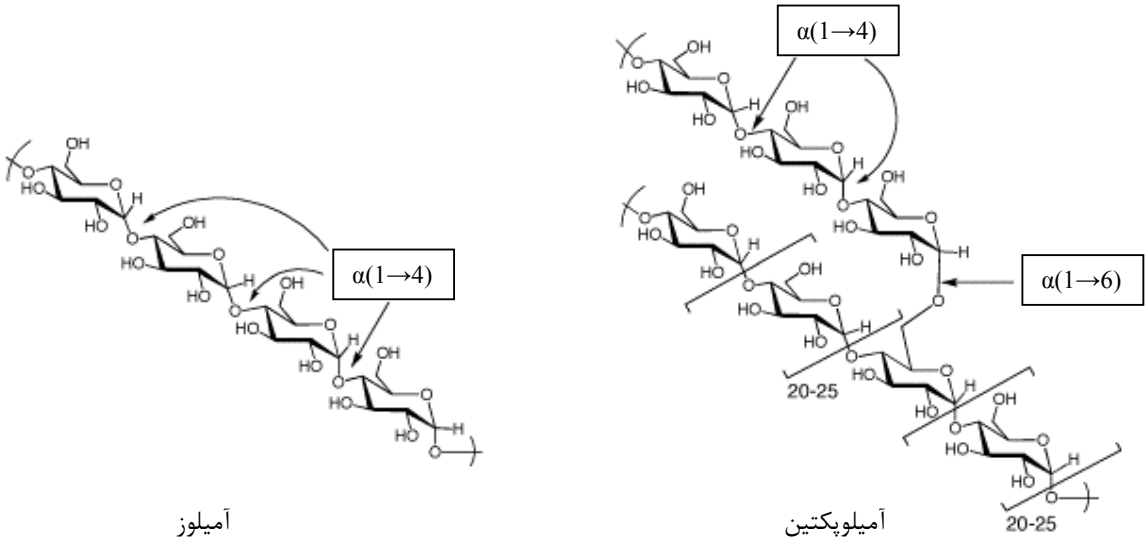
- 1 میلی‌لیتر معرف بارفود را در یک لولهٔ آزمایش بریزید.
- 2 میلی‌لیتر محلول قندی به آن اضافه کنید.
- لولهٔ آزمایش را به مدت 5 دقیقه در حمام آب جوش قرار دهید.
- صبر کنید تا لوله سرد و رسوب قرمز رنگ ته نشین شود.

توجه شود که:

- در مورد مونوساکاریدها رسوب قرمز رنگ در عرض 5- 2 دقیقه ظاهر می‌شود.
- در مورد دی‌ساکاریدها زمان جوشیدن باید به 10 دقیقه برسد تا رسوب قرمز رنگ به وجود آید.

آزمایش ید (Iodine Test):

- آزمایش ید برای تمایز نشاسته (starch) و گلیکوژن از دی‌ساکاریدهای غیراحیاگر به کار می‌رود.
- نشاسته از اتصال واحدهای گلوکز با پیوندهای α(1→4) (آمیلوز) و α(1→6) (آمیلوپکتین) درست شده است.



آمیلوز آمیلوپکتین

- آمیلوز که ساختار مارپیچ دارد، حدود 25٪ از نشاسته را تشکیل می‌دهد. ید با این مارپیچ واکنش کرده و کمپلکس آبی- بنفش ایجاد می‌کند.
- آمیلوپکتین ساختارِ شاخه‌ای داشته و در حضور ید رنگ قرمز مایل به قهوه‌ای تولید می‌کند.
- گلیکوژن نیز همانند آمیلوپکتین ساختارِ شاخه‌ای دارد و افزودن ید، رنگ آن را قهوه‌ای می‌کند.

طرز تهیهٔ محلول ید:

- 0٫2 گرم ید و 2 گرم یدور پتاسیم را در 100 میلی‌لیتر آب مقطر حل کنید.

روش آزمایش:

- 2 میلی‌لیتر محلول قندی را در یک لولهٔ آزمایش بریزید.
- 2 قطره محلول ید به آن اضافه کنید.
- رنگ سیاه مایل به آبی ← نشاسته، رنگ قهوه‌ای ← گلیکوژن.

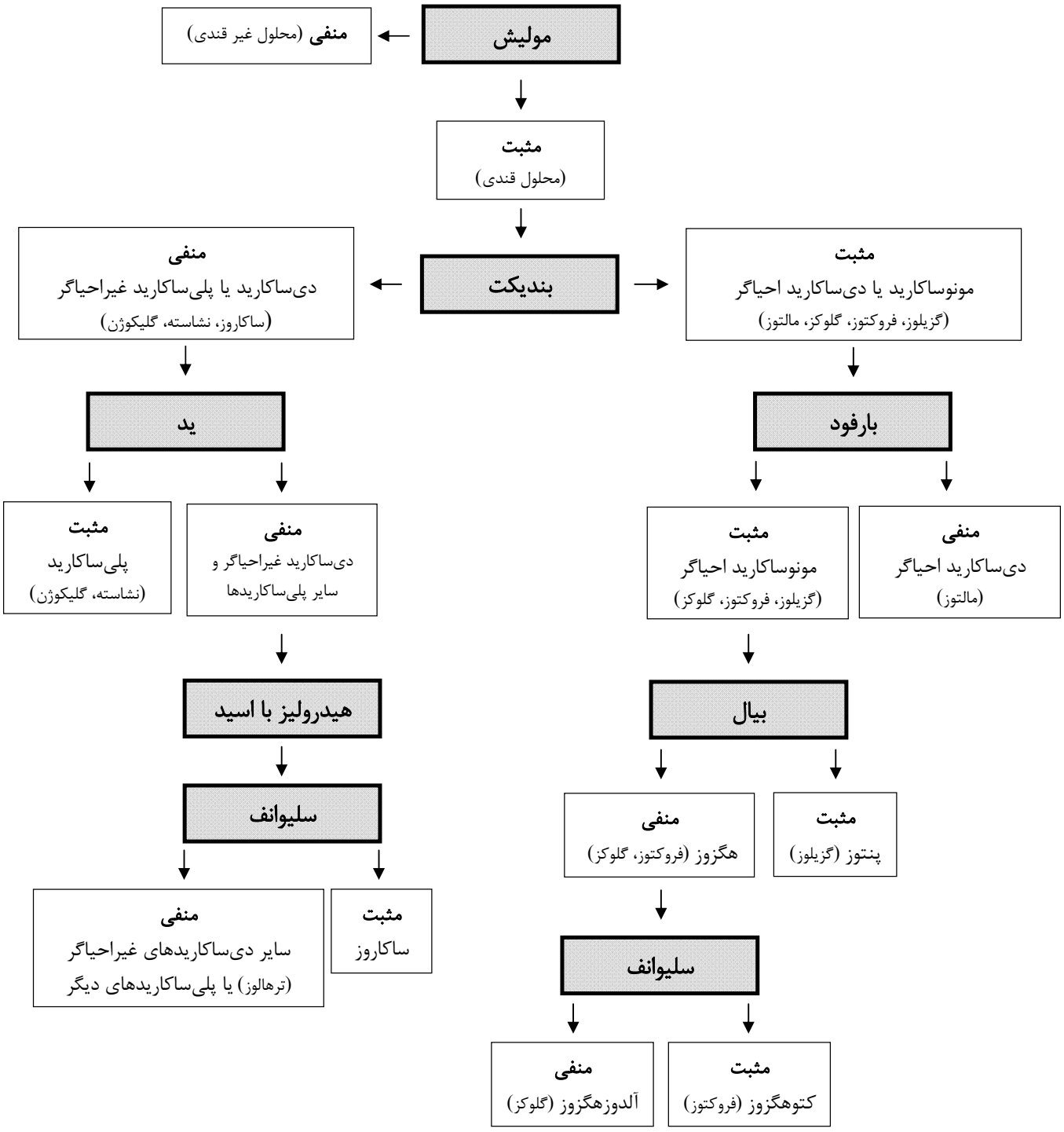
هیدرولیزِ با اسید:

- برای تمایز ساکاروز از دیگر دی‌ساکاریدهای غیراحیاگر (ترهالوز)، محلول قندی را تحت تاثیر اسید و حرارت قرار می‌دهند.
- با جوشاندن محلول ساکاروز (sucrose) در اسید کلریدریک، این دی‌ساکارید غیراحیاگر به مونوساکاریدهای گلوکز و فروکتوز شکسته می‌شود.
- آزمایشِ سلیوانف پس از هیدرولیز با اسید و تائیدِ وجود فروکتوز در محلولِ هیدرولیز، نشان می‌دهد که دی‌ساکارید غیراحیاگر، ساکاروز است.

روش آزمایش:

- 5 میلی‌لیتر محلول ساکاروز را در یک لولهٔ آزمایش بریزید.
- 5- 4 قطره اسید کلریدریکِ غلیظ به آن اضافه کنید.
- لولهٔ آزمایش را به مدت 5 دقیقه در حمام آب جوش قرار دهید.
- پس از سرد شدن آزمایش سلیوانف را انجام دهید.

فلوچارت شناسائی محلول قندی ناشناس



کروماتوگرافی کاغذی قندها

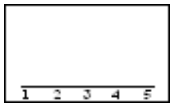
- کروماتوگرافی (chromatography؛ نوشتن با رنگ) یک روش جداسازی اجزا مخلوط‌ها بوده و انواع گوناگونی دارد که اساس فیزیکیِ یکسانی دارند.
- همهٔ آنها دارای یک **فاز ثابت** (stationary phase؛ جامد یا مایع) و یک **فاز متحرک** (mobile phase؛ مایع یا گاز) هستند. فاز متحرک از میان فاز ثابت عبور کرده و اجزا مخلوط را با خود حمل می‌کند. سرعت حرکت اجزا مختلف یک مخلوط، متفاوت بوده و باعث جدا شدن آنها از هم می‌شود.
- کروماتوگرافی کاغذی برای جداسازی و شناسائیِ اجزا رنگی یا قابلِ رنگ شدنِ یک مخلوط مورد استفاده قرار می‌گیرد.
- در کروماتوگرافی کاغذی، فاز ثابت یک کاغذ جاذبِ کاملا یکدست (مانند کاغذ صافیِ واتمن) است و فاز متحرک یک محلولِ مایعِ مناسب می‌باشد.
- در نوع بالارونده (ascending) کروماتوگرافی کاغذی، کاغذ صافی (فاز ثابت) بعد از لکه‌گذاریِ نمونه‌ها، در یک ظرفِ مناسب که حاوی یک حلال (فاز متحرک) است طوری قرار می‌گیرد که سطح حلال از محل قرارگیریِ نمونه‌ها پائین‌تر باشد. با گذشت زمان، حلال به دلیل خاصیت موئینگی و بر خلاف نیروی جاذبه به سمتِ بالا حرکت کرده و اجزا نمونه‌ها را با خود همراه می‌کند. تفاوت‌های ساختـاریِ این اجزا باعثِ اختلاف در سرعتِ حرکت آنها می‌شود. پس از گذشت زمان معینی، با رنگ‌آمیزیِ کاغذ (که اکنون **کروماتوگرام** نامیده می‌شود)، مکان اجزا جدا شده مشخص گردیده و فاصلهٔ طی شده توسط حلال و این ترکیبات اندازه‌گیری می‌شود.
- سرعت حرکتِ حلال در نوع پائین روندهٔ (descending) کروماتوگرافی کاغذی، به دلیل نیروی جاذبه، بیشتر از نوع بالارونده بوده، با این حال نیاز به ظرفِ مخصوصی دارد تا حلال در بالا قرار گیرد.
- در یک کروماتوگرام نسبت مسافت طی شده توسط یک ترکیب، به مسافت طی شده توسط حلال را retention factor **(عامل تاخیر)** گفته و آن را با R_f نشان می‌دهند. R_f هیچ ترکیبی از عدد 1 بیشتر نیست.
- برای شناسائیِ یک ترکیب نامشخص، می‌توان R_f آن را با R_f ترکیبات مشخصی که تحت شرایط یکسان با ترکیبِ نامشخص، کروماتوگرافی شده‌اند مقایسه کرد.

مواد مورد نیاز:

- حلال:

- ایزوپروپیل الکل، اسید استیک و آب با نسبت 1/1/3. برای تهیهٔ 500 میلی‌لیتر حلال به ترتیب 300، 100 و 100 میلی‌لیتر ایزوپروپیل الکل، اسید استیک و آب را در یک بشر مخلوط کنید.

- کاغذ صافی واتمن در ابعادِ 13 × 22 سانتی‌متر. در فاصلهٔ 2 سانتی‌متریِ ضلع 22 و به موازاتِ آن یک خط با مدادِ سیاه رسم کرده و مکان لکه‌ها را زیر خط شماره‌گذاری کنید. دقت کنید تا دست با کاغذ تماس نداشته باشد.



- محلول رنگ‌آمیزی:

- 1 میلی‌لیتر آنیلین و 1 گرم دی‌فنیل‌آمین را در 100 میلی‌لیتر استون حل کنید.
- هنگام مصرف 10 حجم از محلولِ فوق را با 1 حجم اسید فسفریک 85٪ مخلوط کنید.

توجه: در این آزمایش از محلول‌های قندی گزیلوز، فروکتوز، گلوکز و مالتوز با غلظت 0/5٪ استفاده می‌شود.

روش آزمایش:

۱- 50 میلی‌لیتر حلال را در یک بشرِ 1 لیتری بریزید.

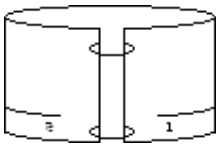
۲- دهانهٔ بشر را با پارافیلم بپوشانید و چند دقیقه صبر کنید تا هوای داخل بشر با بخارِ حلال اشباع شود (این کار از بخار شدن حلال از کاغذ صافی و خشک شدن آن در طول آزمایش جلوگیری می‌کند).

۳- کاغذ واتمنِ آماده شده را روی یک صفحهٔ کاغذ دیگر قرار دهید.

۴- به وسیلهٔ پیپتِ پاستور 0/02 میلی‌لیتر از محلول قندیِ مجهول و 0/02 میلی‌لیتر از هر یک از 4 محلولِ قندی معلوم را در فواصل مناسب روی خطِ کشیده شده قرار دهید. برای انجام این کار نوک پیپتِ پاستور را روی کاغذ تماس داده و بلافاصله آن را کنار بکشید. دقت کنید که قطرِ لکه‌ها از 5 میلی‌متر بیشتر نشود.

۵- صبر کنید تا لکه‌ها خشک شوند.

۶- کاغذ واتمن را با محور قرار دادنِ ضلعِ 13 سانتی‌متری به صورت استوانه درآورده و بدون آنکه لبه‌های کاغذ روی هم قرار گیرند، آنها را با 2 عدد پنس در کنار هم ثابت نگه دارید.



۷- کاغذ استوانه‌ای شده را درون بشر حاوی حلال بگذارید، به طوری که خطِ نمونه‌ها در سمت پائین قرار گیرد. سطح حلال باید زیر خطِ لکه‌ها باشد.

۸- بلافاصله دهانهٔ بشر را بپوشانید.

۹- حلال شروع به بالا آمدن از کاغذ می‌کند. صبر کنید تا حلال به 1 سانتی‌متریِ انتهای فوقانی کاغذ برسد (حدود 80 دقیقه).

۱۰- کاغذ را از بشر خارج کرده و بلافاصله محل پیشرفتِ حلال را روی کاغذ، با مدادِ سیاه مشخص کنید.

۱۱- صبر کنید تا کاغذ کاملا خشک شود. برای تسریع این مرحله می‌توان از فورِ 100 درجه استفاده کرد.

۱۲- کاغذ را در محلول رنگ‌آمیزی فرو ببرید و یا محلول رنگ‌آمیزی را روی کاغذ بی‌افشانید.

۱۳- کاغذ را به مدت چند دقیقه درونِ فور 100 الی 105 درجه قرار دهید و پس از ظاهر شدن لکه‌ها آن را از فور خارج کنید.

۱۴- R_f لکه‌ها را مشخص کنید و با مقایسهٔ محل لکهٔ حاصل از محلولِ قندیِ مجهول با لکه‌های حاصل از محلول‌های قندیِ معلوم، نوع قندِ مجهول را پیدا کنید.

لیپیدها

- لیپیدها گروه ناهمگونی از بیومولکول‌ها هستند که وجه مشترک آنها نامحلول بودن در آب و محلول بودن در حلال‌های آلیِ غیرقطبی مانند کلروفرم، اتر و بنزن است.

- لیپیدها ساختار شیمیائی گوناگونی دارند و به همین دلیل عملکردهای آنها نیز بسیار متنوع است و می‌توان آنها را با توجه به عملکردشان در سه گروه مختلف بررسی کرد:

۱- **لیپیدهای ذخیره‌ای** شامل چربی‌ها (fat) و روغن‌ها (oil) که اصلی‌ترین شکل ذخیرهٔ انرژی در بسیاری از موجودات بوده و حاویِ اسیدهای چرب هستند. چربی‌ها از پیوندِ استریِ گروهِ هیدروکسیلِ (-OH) یک الکـل و یا پیوند آمیدیِ گروهِ آمینِ ($-NH_2$) یک آمین‌الکل با گروه کربوکسیلیِ (-COOH) یک اسید چرب به وجود می‌آیند.

۲- **لیپیدهای غشائی** که حاوی مولکول‌های اسید چرب بوده و با ایجاد یک دولایهٔ لیپیدی، یک سد مولکولی بین داخل و خارج سلول به وجود می‌آورند.

۳- **لیپیدهائی که نقش سیگنال، کوفاکتور یا رنگدانه دارند.**

- **اسیدهای چرب** با فرمول عمومیِ R—COOH، بخش هیدروکربنیِ بسیاری از لیپیدها هستند. تعداد اتم‌های کربنِ در این زنجیرِ هیدروکربنی بین 4 تا 36 اتم و (معمولا بین 12 تا 24 اتم) بوده و به دلیل روش ساخت، همیشه تعداد آنها زوج است. مهمترین اسیدهای چرب در انسان 16 و 18 کربنه هستند. چند اسید چرب دارای گروه‌های هیدروکسیلی یا شاخه‌های متیلیِ جانبی هستند.

- اسیدهای چرب به دلیل وجودِ گروه کربوکسیلی خواص هیدروفیلی (آب‌دوستی) از خود نشان می‌دهد با این حال خاصیت هیدروفوبی (آب‌گریزی) آنها به دلیل وجود گروه‌های متیلن (-CH_2-) در زنجیر هیدروکربنی، غالب است. به همین دلیل اسیدهای چرب در خون به صورت آزاد وجود نداشته و با اتصال به **آلبومین** جابجا می‌شوند.

- اسیدهای چرب را می‌توان بر اساس داشتن پیوند دوگانه در دو گروه تقسیم‌بندی کرد:

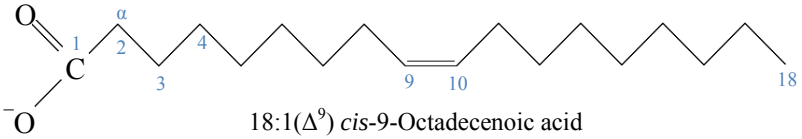
۱- **اسیدهای چربِ اشباع** که هیچ پیوندِ دو گانه‌ای بین اتم‌های کربن در زنجیرِ هیدروکربنی ندارند.

۲- **اسیدهای چربِ غیر اشباع** که یک یا چند پیوند دوگانه بین اتم‌های کربن در زنجیرِ هیدروکربنی دارند. به اسیدهای چربی که دارای چند پیوند دوگانه باشند اسیدهای چربِ polyunsaturated یا **(PUFAs)** نیز می‌گویند.

- اسیدهای چرب غیر اشباع به دلیل وجود پیوندهای دوگانه خواص ایزومری داشته و می‌توانند به دو شکل سیس و یا ترانس باشند. در تقریبا تمام اسیدهای چرب غیر اشباعِ طبیعی، پیوندهای دوگانه شکل سیس دارند.

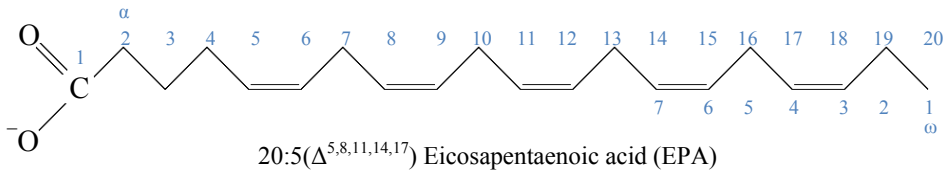
- دو روش معمول برای نام‌گذاریِ اسیدهای چرب عبارتند از:

۱- در روش استاندارد، کربنِ گروهِ کربوکسیل، کربنِ شمارهٔ 1 (C-1) و کربن بعد از آن کربنِ α نام‌گذاری می‌شود. مکان هر پیوند دوگانه با علامتِ Δ (دلتا) مشخص شده و شمارهٔ اتمِ کربنی که در پیوندِ دوگانه کمتر است در بالا و سمتِ راست علامتِ Δ نوشته می‌شود.



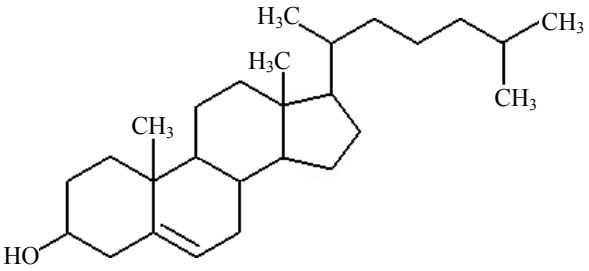
18:1(Δ^9) *cis*-9-Octadecenoic acid

۲- در نام‌گذاری PUFAs کربنِ انتهای متیلی، کربن شمارهٔ 1 یا ω (اُمگا) نامیده شده و مکانِ پیوند دوگانه نسبت به ω مشخص می‌شود. اسید چرب زیر، یک اسید چرب امگا 3 است.



20:5($\Delta^{5,8,11,14,17}$) Eicosapentaenoic acid (EPA)

- **کلسترول** یک الکل حلقویِ غیر اشباعِ 27 کربنی بوده و همانند سایر **استرول**ها یک هستهٔ **سیکلو پنتانو پِر هیدرو فنانترن** دارد.
- کلسترول جزو فراوان‌ترین و مهم‌ترین استرول‌ها در بافت‌های حیوانی بوده و به دو صورت آزاد و استریفیه وجود دارد.



تشخیص کیفی لیپیدها:

۱- آزمایش حلالیت

روش آزمایش:

- در 4 لولهٔ آزمایش 3 میلی‌لیتر آب، الکل، اتر و کلروفرم بریزید.
- 5 قطره روغن زیتون به هر کدام از لوله‌ها اضافه کنید.
- لوله‌ها را به خوبی تکان داده و حلالیت چربی را در هر کدام از لوله‌ها بررسی کنید.

۲- آزمایش امولسیون

- افزودنِ سود به مخلوطِ آب و روغن، باعث انتشار مولکول‌های روغن در آب شده و یک محلولِ کلوئیدی به وجود می‌آورد. اضافه کردنِ بیشترِ روغن به کلوئید باعث می‌شود تا مولکول‌های روغنِ اضافه به صورت قطرات ریز در محلول پراکنده شوند. این پدیده را امولسیون می‌گویند.

روش آزمایش:

- 2/5 میلی‌لیتر روغن زیتون و 2/5 میلی‌لیتر آب را در یک لولهٔ آزمایش بریزید و خوب مخلوط کنید.
- چند قطره اسید اولئیک به لوله اضافه کنید.
- 1 میلی‌لیتر سود 0/1 نرمال به آن اضافه کرده و لوله را به خوبی تکان دهید.

۳- آزمایش صابونی شدن

- اسیدهای چرب با بیش از 10 اتم کربن در محلول‌های قلیائی حل شده و صابون‌های سدیم و یا پتاسیم به وجود می‌آورند.

روش آزمایش:

- 1- 0/5 میلی‌لیتر روغن زیتون را در یک لولهٔ آزمایش بریزید.
- 1 میلی‌لیتر سودِ الکلی به آن اضافه کنید.

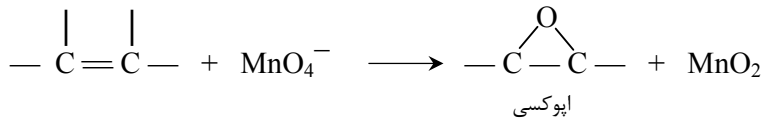
- لولهٔ آزمایش را به مدت 10 دقیقه در حمام آب جوش قرار دهید.
- صبر کنید تا سرد شود.
- 2-1 میلی‌لیتر آب به آن اضافه کنید.
- به خوبی مخلوط کرده و تشکیلِ کف را ملاحظه کنید.

- برای تهیهٔ سودِ الکلی 15 میلی‌لیتر آب را با 15 میلی‌لیتر الکل و 5 گرم سود مخلوط کنید.

شناسائیِ اسیدهای چرب غیراشباع

۴- آزمایش زایل شدنِ رنگِ پرمنگنات

- پیوندهای دوگانهٔ چربی‌های غیر اشباع، توسط محلول‌های اکسید کننده مانند پرمنگناتِ پتاسیم اکسید می‌شوند. منگنز احیا شده و تغییر رنگ می‌دهد. این عمل تا اکسید شدن تمام پیونهای دوگانه ادامه پیدا می‌کند.



روش آزمایش:
- 2 میلی‌لیتر کربنات سدیمِ 5٪ را در یک لولهٔ آزمایش بریزید.
- 5 قطره روغن زیتون به آن اضافه کـرده و به خوبی مخلوط کنیـد. کربنات سدیم با ایجاد pH قلیائی باعث حل شدن روغن می‌شود.
- چند قطره پرمنگنات پتاسیمِ 0/5٪ را به مخلوط بچکانید و این کار را تا زمانی که رنگ پرمنگنات تغییر کند ادامه دهید.

- اسید اُسمیک نیز می‌تواند با اکسیداسیونِ اسیدهای چربِ غیر اشباع، رنگ سیاه تولید کند. برای انجام این آزمایش چند قطره روغن زیتون را با 2 قطره اسید اسمیک 2٪ ترکیب کنید.

۵- آزمایش بی‌رنگ شدن هالوژن‌ها

- هالوژن‌ها در محلِ پیوند دوگانه به اسیدهای چرب غیراشباع وصل می‌شوند.

روش آزمایش:
- چند قطره روغن زیتون را در 3 میلی‌لیتر کلروفرم حل کنید.
- 5 قطره محلولِ الکلیِ کلرید جیوهٔ 5٪ ($HgCl_2$) به آن اضافه کنید. کلرید جیوه به عنوان کاتالیزور عمل می‌کند.
- چند قطره محلول الکلیِ یدِ رقیق به آن بیافزائید. محلول بی‌رنگ می‌شود.

- این آزمایش را می‌توان با برم نیز انجام داد. برای انجام این آزمایش:

- چند قطره روغن زیتون را در اتانلِ گرم حل کنید.
- قطره قطره آبِ برم به آن اضافه کنید.

۶- شناسائی کلسترول

- محلول‌های اسیدی غلیظ باعث جدا شدن یک مولکول آب از کربن شمارهٔ 3 مولکول کلسترول و اکسیده شدن آن به □,□-کلستادِین می‌شوند. تداوم حضور اسید باعث تولید یک دیمر به نام بیس □,□-کلستادِین از دو مولکول □,□-کلستادِین می‌شود.

- این دیمر در حضورِ اسید سولفوریک به بیس کلستادینیل مونوسولفونیک اسیدِ سبز رنگ و بیس کلستادینیل دی‌سولفونیک اسیدِ قرمز رنگ تبدیل می‌گردد. افزودن یون‌های آهن و کبالت، واکنش را به سمت تولید اسید دی‌سولفونیک پیش می‌برند.

الف- روش Liebermann-Buchard

- در این روش ابتدا انیدرید استیک باعث اکسید شدن کلسترول شده سپس اسید سولفوریک آن را به اسید مونو سولفونیکِ سبز رنگ تبدیل می‌کند.

روش آزمایش:

- 2 میلی‌لیتر محلول کلروفرمیِ کلسترولِ 0/2٪ را در یک لولهٔ آزمایش بریزید.
- 15 قطره انیدرید استیک به آن اضافه کرده و خوب مخلوط کنید.
- 5 قطره اسید سولفوریک غلیظ به آن افزوده و تغییر رنگ را مشاهده کنید.

ب- روش Salkovski

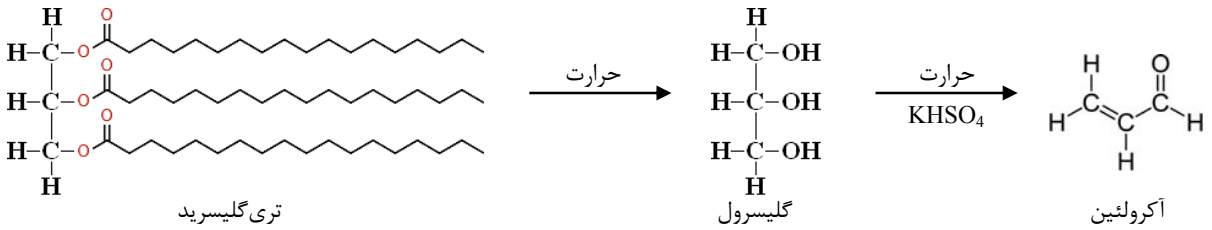
- در این روش اسید سولفوریک غلیظ با ایجاد بیس کلستادینیل دی‌سولفونیک اسید، رنگ محلول کلسترول را قرمز می‌کند.

روش آزمایش:

- 3 میلی‌لیتر محلول کلروفرمیِ کلسترولِ 0/1٪ را در یک لولهٔ آزمایش بریزید.
- 3 میلی‌لیتر اسید سولفوریک غلیظ به ان اضافه کنید.
- صبر کنید تا دو فاز (اسید سولفوریک در پائینِ لوله و کلروفرم در بالای لوله) جدا شوند. بیس کلستادینیل دی‌سولفونیک اسید به رنگ آجری بین دو فاز قرار می‌گیرد.

۷- شناسائی گلیسرول

- چربی‌های خنثی مانند تری‌گلیسریدها در اثر حرارت هیدرولیز شده و به اسید چرب و گلیسرول تبدیل می‌شوند. گلیسرول در مجاورت یک جسم آب‌گیر مانند بی‌سولفات پتاسیم، یک مولکول آب از دست داده و به یک آلدئید غیراشباع به نام آکرولئین تبدیل می‌گردد که بوئی تند و زننده و بخاری سمی دارد.



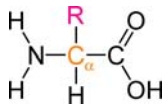
تری‌گلیسرید — گلیسرول — آکرولئین

روش آزمایش:

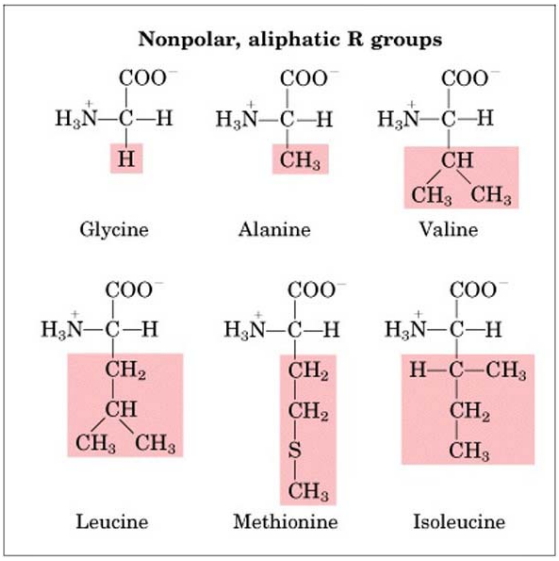
- چند قطره گلیسرول و یا روغن زیتون را در یک لولهٔ آزمایش بریزید.
- کمی پودر بی‌سولفات پتاسیم را به آن اضافه کنید.
- لوله را حرارت دهید.

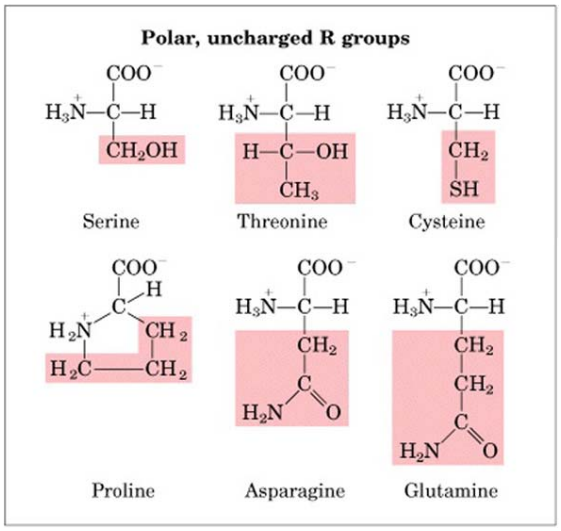
اسیدهای آمینه

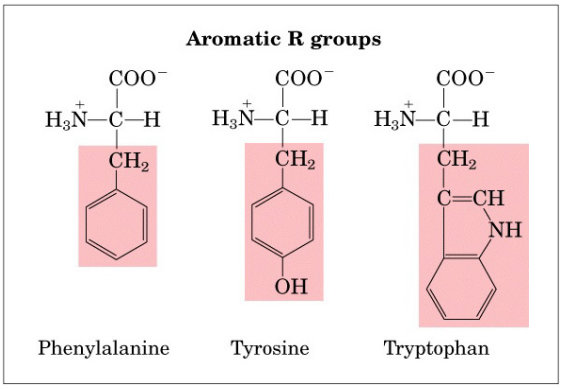
- یک اسید آمینه مولکولی است که دارای هر دو گروهِ آمین و کربوکسیل در ساختمانِ شیمیائیِ خود باشد.
- اسیدهای آمینهٔ تشکیل دهندهٔ پروتئین‌ها همگی از نوع α هستند به این معنی که در همهٔ آنها دو گروهِ آمینی و کربوکسیلی به کربنِ α وصل شده‌اند.

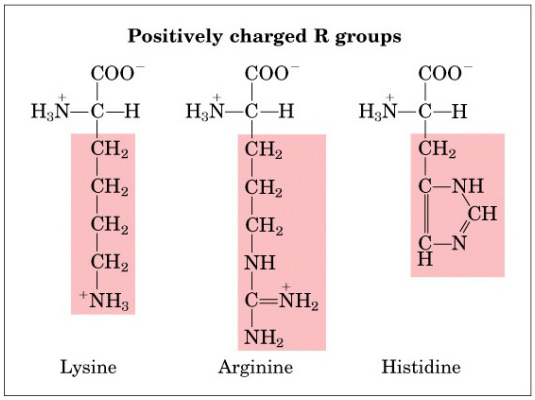


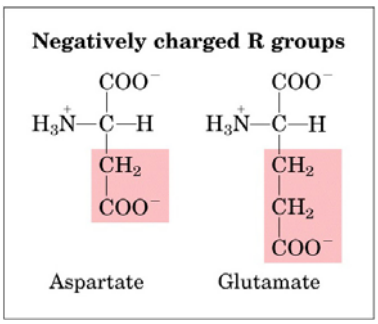
- فرمول عمومیِ اسیدهای آمینهٔ α، $H_2NCHRCOOH$ است که در آن گروهِ R یک زنجیر جانبی بوده و ساختار آن، خصوصیات شیمیائی اسید آمینه را تعیین می‌کند. اسیدهای آمینه را بر اساس نوع گروه R در 5 گروه تقسیم‌بندی می‌کنند.









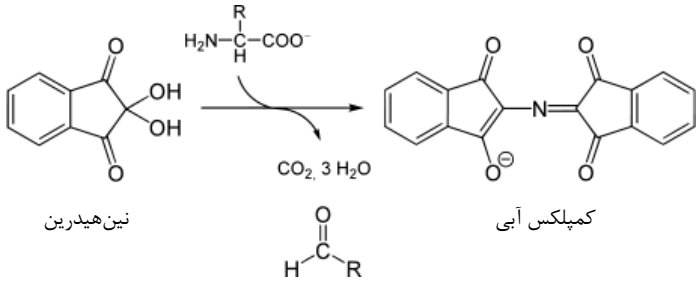


توجه: در آزمایش‌های مربوط به اسیدهای آمینه از محلول‌های 1 گرم در لیترِ اسیدهای آمینهٔ آرژینین (Arg)، سیستئین (Cys)، تریپتوفان (Trp) و تیروزین (Tyr) استفاده می‌شود.

تشخیص کیفی اسیدهای آمینه

۱- آزمایش نین‌هیدرین (Ninhydrin test)

- نین‌هیدرین یک ترکیب شیمیائی است که در مواجهه با گروه‌های آمینیِ آزاد در اسیدهای آمینه و پروتئین‌ها، کمپلکس آبی رنگ تولید می‌کند. اسید آمینهٔ پرولین با نین‌هیدرین کمپلکس زرد رنگ به وجود می‌آورد.



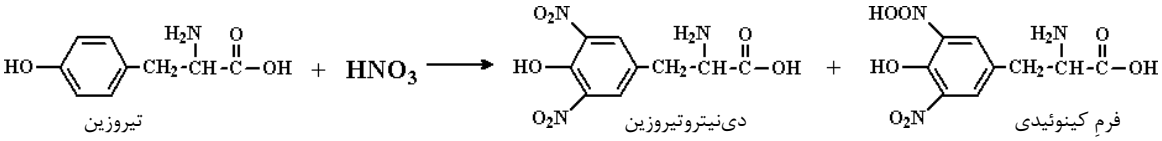
- این آزمایش برای همهٔ اسیدهای آمینه مثبت است.

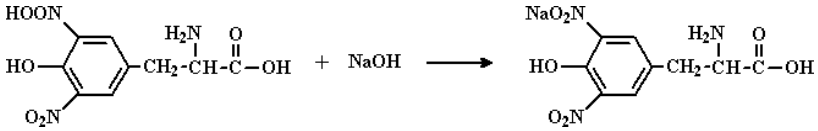
روشِ آزمایش:

- 3 میلی لیتر از محلولِ یک اسید آمینه را در یک لولهٔ آزمایش بریزید.
- چند قطره نین‌هیدرین (0/1٪ در استون) را توسط پیپتور به لوله اضافه کنید.
- خوب مخلوط کنید.
- به مدت 10 دقیقه در حمام آب جوش قرار دهید. رنگ آبی نشان دهندهٔ هیدرولیزِ اسید آمینه است.

۲- آزمایش زانتوپروتئیک (Xanthoproteic test)

- این آزمایش برای تمایز اسیدهای آمینهٔ آروماتیک از دیگر اسیدهای آمینه مورد استفاده قرار می‌گیرد.
- حلقه‌های بنزنیِ اسیدهای آمینهٔ آروماتیک (فنیل‌آلانین، تریپتوفان و تیروزین) در مجاورت اسید نیتریک، کمپلکسِ زرد رنگِ نیتروبنزن تولید می‌کنند. اضافه کردن سود، فرمِ کینوئیدیِ آن را به نمک تبدیل کرده و رنگ نارنجی به وجود می‌آورد.



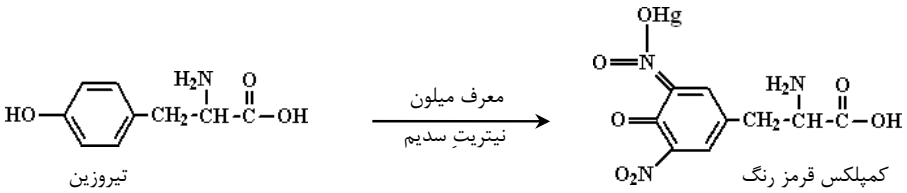


روشِ آزمایش:

- 1 میلی لیتر از یکی محلول‌های اسیدهای آمینهٔ تریپتوفان (Trp) یا تیروزین (Tyr) را در یک لولهٔ آزمایش بریزید.
- 1 میلی‌لیتر اسید نیتریکِ غلیظ را (زیر هود) به آن اضافه کنید.
- لولهٔ آزمایش را به مدت 2 دقیقه در حمام آب جوش قرار دهید. رنگ محلول زرد می‌شود.
- صبر کنید تا لوله سرد شده به دمای اطاق برسد.
- 1/5 میلی‌لیتر سود 40٪ به لولهٔ آزمایش اضافه کنید. رنگ نارنجی نشان دهندهٔ نمکِ نیتروبنزنِ اسید آمینهٔ آروماتیک است.

۳- آزمایش میلون (Millon's test)

- این آزمایش برای تمایزِ اسیدهای آمینهٔ تیروزین از فنیل‌آلانین و تریپتوفان انجام می‌گیرد.
- حلقهٔ فنلیِ اسید آمینهٔ تیروزین در مجاورتِ معرف میلون (حاوی اسید نیتریک و نیتراتِ جیوه)، یک کمپلکس به رنگ قرمز آجری به وجود می‌آورد.



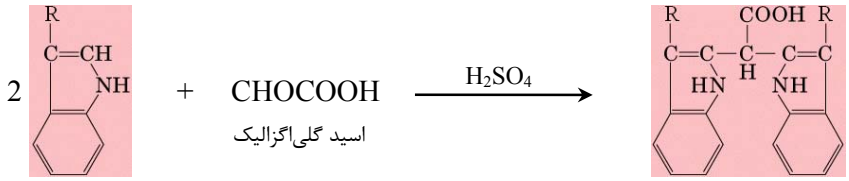
تیروزین — کمپلکس قرمز رنگ

روشِ آزمایش:

- 1 میلی لیتر از محلول اسید آمینهٔ تیروزین (Tyr) را در یک لولهٔ آزمایش بریزید.
- 5 قطره معرف میلون به آن اضافه کنید.
- به مدت 1 دقیقه در حمام آب جوش قرار دهید.
- برای تهیهٔ معرفِ میلون 100 گرم جیوه را در 140 میلی‌لیتر اسید نیتریکِ غلیظ حل کرده و حجم را دو برابر کنید.

۴- آزمایش هاپکینز- کول (Hopkins-Cole test)

- این آزمایش برای تمایز دو اسید آمینهٔ تریپتوفان و فنیل‌آلانین انجام می‌شود.
- هستهٔ ایندولیِ اسید آمینهٔ تریپتوفان در مجاورتِ اسید گلی‌اُگزالیک (معرف هاپکینز-کول) و اسید سولفوریک، یک ترکیبِ ارغوانی رنگ ایجاد می‌کند.



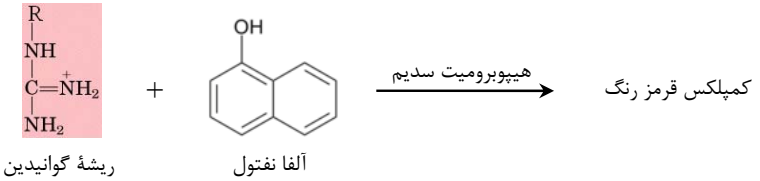
هستهٔ ایندول — اسید گلی‌اگزالیک — کمپلکسِ ارغوانی رنگ

روشِ آزمایش:

- 3 میلی‌لیتر از محلولِ اسید آمینهٔ تریپتوفان (Trp) را در یک لولهٔ آزمایش بریزید.
- 2 میلی‌لیتر معرف هاپکینز-کول به آن اضافه کنید.
- ترکیب را مخلوط کنید.
- 2 میلی‌لیتر اسید سولفوریکِ غلیظ را به آرامی از جدار لوله و زیر هود به ترکیب اضافه کنید. رنگ ارغوانی به دلیل واکنشِ معرف هاپکینز-کول با هستهٔ ایندولیِ اسید آمینهٔ تریپتوفان می‌باشد.

۵- آزمایش ساکاگوچی (Sakaguchi test)

- این آزمایش برای شناسائی اسید آمینهٔ آرژینین انجام می‌گیرد.
- گروهِ گوانیدینِ اسید آمینهٔ آرژینین در مجاورتِ آلفا نفتل (الکلِ بنزنی) و هیپوبرومیتِ سدیم، یک کمپلکس قرمز رنگ ایجاد می‌کند.

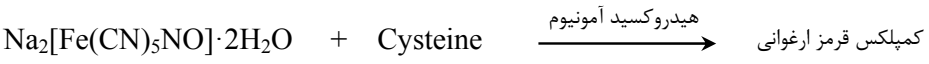


روشِ آزمایش:

- 3 میلی‌لیتر از محلولِ اسید آمینهٔ آرژینین (Arg) را در یک لولهٔ آزمایش بریزید.
- 1 میلی‌لیتر سودِ 40٪ به آن اضافه کنید.
- 2 قطره آلفا نفتولِ (10 گرم در لیتر) به مخلوط بچکانید.
- ترکیب را مخلوط کنید.
- 4-5 قطره محلولِ برم (آبِ برم) را به مخلوط اضافه کنید (زیر هود). رنگ قرمز ناشی از ریشهٔ گوانیدینِ اسید آمینهٔ آرژینین است.

۶- آزمایش نیتروپروسید سدیم (Sodium Nitroprusside test)

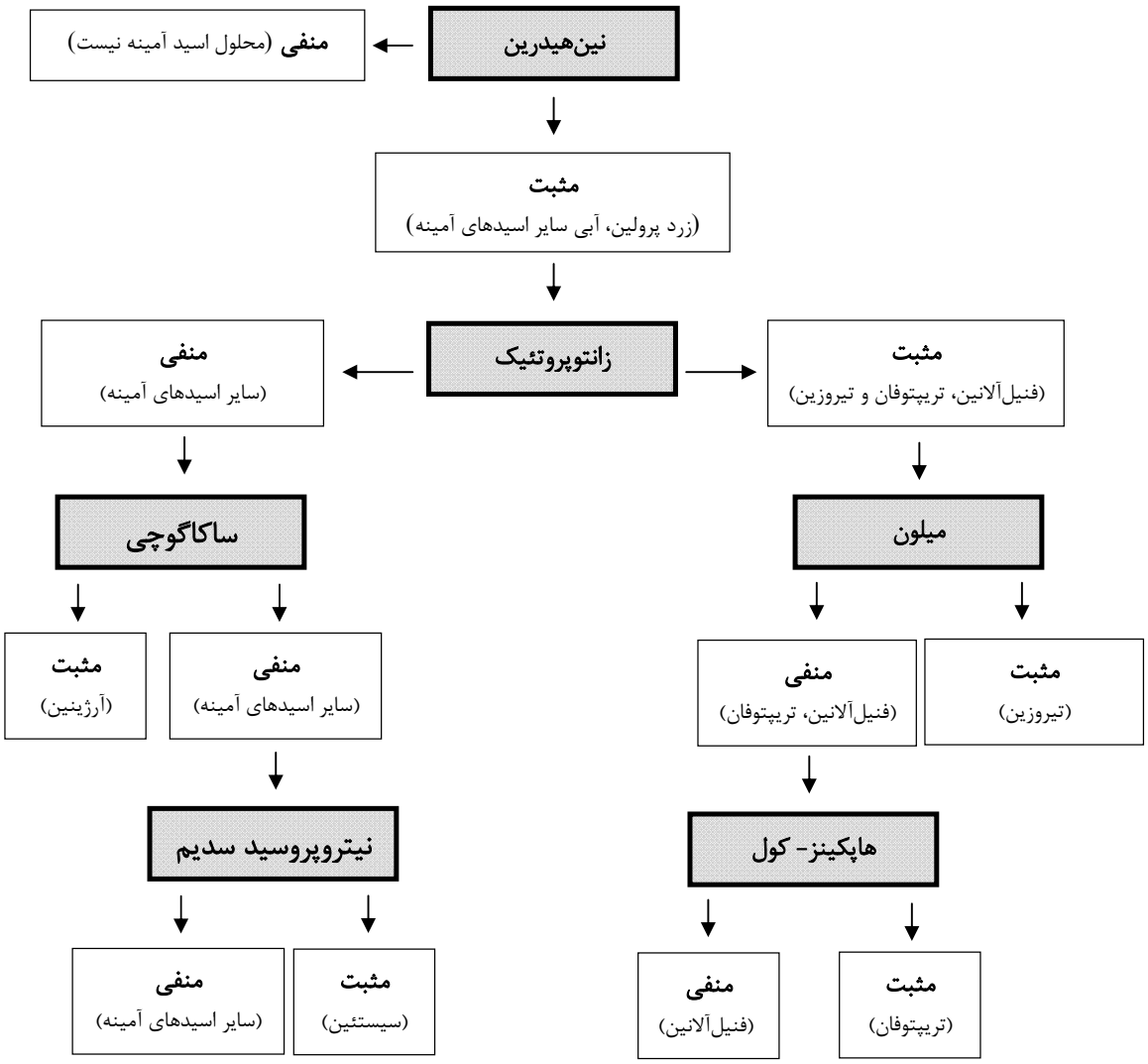
- این آزمایش برای شناسائی اسید آمینهٔ سیستئین که در ساختمان شیمیائی خود دارای عنصرِ گوگرد است، انجام می‌گیرد.
- اسید آمینهٔ سیستئین در مجاورت نیتروپروسید سدیم و هیدروکسید آمونیوم یک کمپلکس به رنگ قرمزِ ارغوانی به وجود می‌آورد.



روشِ آزمایش:

- 0/5 میلی‌لیتر از محلولِ اسید آمینهٔ سیستئین (Cys) را در یک لولهٔ آزمایش بریزید.
- 2 میلی‌لیتر نیتروپروسید سدیم (20 گرم در لیتر و تازه تهیه شده) به آن اضافه کنید.
- 0/5 میلی‌لیتر هیدروکسید آمونیوم به مخلوط بیافزایید. رنگ ارغوانی ناشی از وجود عامل گوگرد در اسید آمینهٔ سیستئین است.

فلوچارت شناسائی اسیدهای آمینهٔ آرژینین، سیستئین، تریپتوفان، تیروزین و فنیل‌آلانین



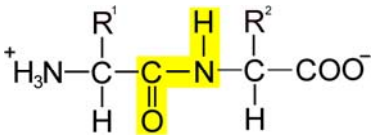
پروتئین‌ها

- پروتئین‌ها فراوان‌ترین بیومولکول‌ها در موجودات زنده بوده و در تمامی سلول‌ها و همه جای آنها وجود دارند. تمامی فرآیندهائی که در سلول اتفاق می‌افتد با واسطهٔ پروتئین‌ها ممکن می‌شود.

- پروتئین‌ها نقش‌های زیستیِ متنوعی دارند؛ اکثر آنها آنزیم بوده و واکنش‌های بیوشیمیائی را کاتالیز می‌کنند، برخی عملکرد ساختاری دارند و بقیه در علامت‌دهیِ سلولی، پاسخ ایمنی، اتصال سلولی و سیکل سلولی دخالت دارند.

- پروتئین‌ها تنوع بسیار زیادی داشته و از اتصالِ فقط 20 نوع اسید آمینه به وجود می‌آیند که با چینش‌های بسیار متنوع و با یک پیوندِ پپتیدی به هم وصل شده‌اند.

- پیوند پپتیدی از اتصال گروه کربوکسیل یک اسید آمینهٔ α، به گروه آمینیِ اسید آمینهٔ α مجاور تشکیل می‌شود. تکرار این پیوندها، ستون فقرات پروتئین‌ها را به وجود می‌آورد.



- برای درک ساختار پروتئین‌ها، آنها را در چهار سطح مورد بررسی قرار می‌دهند؛

۱- **ساختمان اول** یا توالیِ اسیدهای آمینه که از سمتِ گروه آمینی شروع و به سمتِ گروه کربوکسیلی ادامه می‌یابد. نحوهٔ تاخوردنِ پروتئین (ساختمان‌های دوم، سوم و چهارم)، به ساختمان اولیهٔ آن بستگی دارد.
۲- **ساختمان دوم** به بررسی بخش‌هائی از ساختمانِ پروتئین می‌پردازد که توسط پیوندهای هیدروژنی، ساختارهای منظمی مانند مارپیچ α یا صفحات β را ایجاد می‌کنند.
۳- **ساختمان سوم**، نشان دهندهٔ چینشِ سه بعدیِ تمام اتم‌های مولکول پروتئین است. زنجیر پلی‌پپتیدی در فواصلِ بین ساختمان‌های دوم، خمیده شده و گاها باعث نزدیکیِ اسیدهای آمینهٔ دور از هم می‌گردد. معمولا این خمیدگی‌ها به دلیلِ وجود اسید آمینهٔ پرولین در مکانِ تاخوردگی به وجود می‌آیند.
۴- **ساختمان چهارم**، در مورد پروتئین‌هائی با بیش از یک واحدِ پلی‌پپتیدی مصداق دارد و چگونگی ارتباط این زیرواحدها را نشان می‌دهد.

- پروتئین‌ها در شکل بومی یا native خود (مطلوب‌ترین شکلِ فضائی)، بهترین عملکرد را دارند. تغییر این ساختار (به دلیل تغییر شرایط محیطی) را که به آن دناتوره شدن (denaturation) می‌گویند، منجر به از بین رفتن فعالیتِ زیستیِ پروتئین می‌شود. دناتوره شدن به دلیلِ از بین رفتن پیوندهای ضعیفی است که ساختمان‌های دوم، سوم و چهارم را به وجود می‌آورند، به همین علت در صورتی که ساختمان اول دچار تغییر نشده باشد، با بهبود شرایط محیطی، پروتئین مجددا به شکل بومیِ خود، تا خواهد خورد.

- پروتئین‌ها در آب محلول هستند. قدرت یونی و pH محلول، این حلالیت را تحت تاثیر قرار می‌دهند.

- هرچند پروتئین‌ها به بسیاری از آزمایش‌های اسیدهای آمینه پاسخ می‌دهند، ولی آزمایش‌های شناسائیِ پروتئین‌ها بر اساس وجود پیوند پپتیدی و نیز دناتوره شدنِ پروتئین‌ها ابداع شده‌اند.

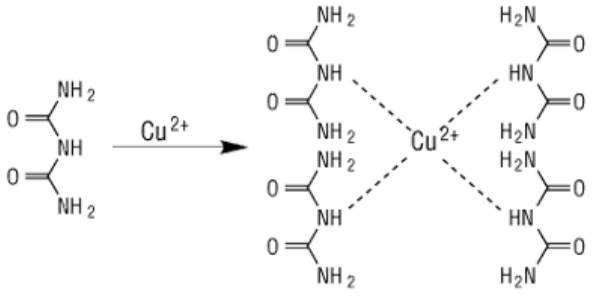
توجه: در آزمایش‌های پروتئین‌ها از محلول 2٪ آلبومینِ تخم مرغ استفاده می‌شود.

تشخیص کیفی پروتئین‌ها

1- آزمایش بیوره (Biuret test)

- آزمایش بیوره برای شناسائی پیوندهای پپتیدی مورد استفاده قرار می‌گیرد. در این آزمایش یون‌های مس دوظرفیتی در یک محیط قلیائی، به اتم‌های اکسیژنِ گروه‌های کربونیل و یا اتم‌های نیتروژنِ گروه‌های آمینی وصل شده و کمپلکس بنفش رنگ ایجاد می‌کنند.

- علت نام‌گذاری این آزمایش، نه به دلیل وجود مولکولِ بیوره در معرف، بلکه واکنش مشابه مولکولِ بیوره به یون‌های مس و ایجاد کمپلکس بنفش است.



بیوره　　کمپلکس بنفش رنگ

روشِ آزمایش:

- 2 میلی‌لیتر از محلول پروتئینی را در یک لولهٔ آزمایش بریزید.
- 2 میلی‌لیتر سود 10٪ به آن اضافه کنید.
- 5 قطره سولفات مس 1٪ را به آرامی به لولهٔ آزمایش اضافه کنید.

- ایجاد حلقهٔ بنفش به دلیل وجود پیوند پپتیدی در محلول است. با به هم زدن محلول، رنگ آن بنفش خواهد شد.

2- اثر حرارت

- پروتئین‌ها در اثر حرارت، به دلیل گسستِ پیوندهای ضعیف، دناتوره می‌شوند. در صورتیکه میزانِ حرارت کم باشد، پس از سرد شدنِ محلول، پروتئین به شکل بومیِ خود تا می‌خورد. ولی اگر میزانِ حرارت بالا باشد، پیوندهای پپتیدی شکسته شده و پروتئین نمی‌تواند به شکل اولیهٔ خود بازگردد.

روشِ آزمایش:

- 10 میلی‌لیتر محلول پروتئین را در یک لولهٔ آزمایش بریزید.
- 2-1 قطره اسید استیک 10٪ به آن اضافه کنید. از خاصیت بافری اسید استیک برای پیش‌گیری از تغییرات pH استفاده می‌شود.
- لوله را به مدت 5 دقیقه در بن ماریِ جوش قرار دهید. کدر شدنِ محلول نشان دهندهٔ وجود پروتئین در محلول است.

3- اثر حلال‌های آلی

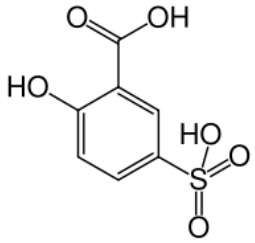
- حلال‌های آلی با مختل کردن تعاملات آب‌گریز بین گروه‌های جانبیِ غیر قطبیِ اسیدهای آمینه، پروتئین‌ها را دناتوره می‌کنند.

روشِ آزمایش:

- 2 میلی‌لیتر محلول پروتئین را در یک لولهٔ آزمایش بریزید.
- 2 میلی‌لیتر الکل (یا یک حلال دیگر) به آن اضافه کنید. کدر شدنِ محلول نشان دهندهٔ وجود پروتئین در محلول است.

4- اثر اسید سولفوسالیسیلیک (Sulfosalicylic acid)

- پروتئین‌ها در مجاورت اسید سولفوسالیسیلیک، دناتوره شده و رسوب می‌کنند.

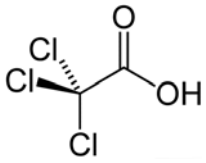


روشِ آزمایش:

- 2 میلی‌لیتر محلول پروتئین را در یک لولهٔ آزمایش بریزید.
- 5 قطره اسید سولفوسالیسیلیک (20٪) را به آرامی و از جدار لوله به آن اضافه کنید. تشکیل رسوبِ سفید نشان دهندهٔ وجود پروتئین در محلول است.

5- اثر تری‌کلرواستیک اسید (TCA)

- پروتئین‌ها در مجاورتِ ترکیبِ تری‌کلرواستیک اسید، رسوب می‌کنند.



روشِ آزمایش:

- 2 میلی‌لیتر محلول پروتئین را در یک لولهٔ آزمایش بریزید.
- 2 میلی‌لیتر تری‌کلرواستیک اسید (15٪) به آن اضافه کنید. تشکیل رسوب سفید دلیل بر وجود پروتئین در محلول است.

6- اثر فلزات سنگین

- پروتئین‌ها در مجاورتِ فلزات سنگین، کمپلکس‌های نامحلول به وجود آورده و رسوب می‌کنند.

روشِ آزمایش:

- 2 میلی‌لیتر محلول پروتئین را در یک لولهٔ آزمایش بریزید.
- 1 میلی‌لیتر کلرید جیوه (5٪) را روی محلول بچکانید. کدر شدنِ محلول نشان دهندهٔ وجود پروتئین در محلول است.

ادرار

- متابولیسم پروتئین‌ها به تولید ضایعات نیتروژنیِ متعددی منجر می‌شود که باید از جریان خون خارج شوند.
- در انسان این ضایعاتِ محلول به صورت ادرار از کلیه‌ها ترشح شده و از طریق حالب‌ها، مثانه و مجرای ادرار دفع می‌شود.
- کلیه‌ها علاوه بر این ضایعات محلول، آب، قند و طیفی از سایر ترکیباتِ اضافی را نیز دفع می‌کنند.
- تجزیهٔ ادرار یا urinalysis (UA) یک روش ساده، غیرتهاجمی و ارزان بوده و بهترین زمانِ نمونه‌گیری اولین ادرار صبحگاهی است. در یک آزمایش UA معمولا موارد زیر بررسی می‌شوند:

۱- **رنگ و ظاهر:** رنگ ادرار، زردِ روشن بوده ولی بسته به مقدار رنگدانهٔ اوروکروم، می‌تواند بی‌رنگ تا کهربائی رنگ باشد. ظاهر ادرار شفاف است و باید بتوان از پشت یک شیشهٔ محتوی ادرار، نوشته‌های یک متن را خواند.

۲- **وزن مخصوص:** وزن مخصوص ادرار به طور طبیعی 1/005 تا 1/030 گرم در لیتر بوده و نشان دهندهٔ غلظت اجزای مختلف ادرار شامل مواد دفعی و املاح است.

۳- **pH**: به طور طبیعی 5 تا 8.

۴- **اجسام کتونی**: به طور طبیعی در ادرار وجود ندارد.

۵- **پروتئین**: به طور طبیعی در ادرار وجود ندارد.

۶- **نیتریت‌ها**: به طور طبیعی در ادرار وجود ندارد.

۷- **اوروبیلی‌نوژن**: کمتر از 17 میکرومول در لیتر.

۸- **بیلی‌روبین**: حداکثر 3 میکرومول در لیتر.

۹- **گلوکز:** به طور طبیعی در ادرار وجود ندارد.

۱۰- **گلبول قرمز**: به طور طبیعی در ادرار وجود ندارد.

۱۱- **گلبول سفید**: به طور طبیعی در ادرار وجود ندارد.

- علاوه بر روش‌های بیوشیمیائی برای انجام آزمایش ادرار، نوارهائی پلاستیکی تحت عنوان dipstick نیز ابداع شده‌اند که در طول خود دارای معرف‌های شناسائیِ پروتئین، قند، خون، کتون و سایر مواد مورد آزمایش در ادرار بوده و به صورت نیمه‌کمی، وجود مواد را با تغییر رنگ نشان می‌دهند.

توجه: در آزمایش‌های ادرار، قند با روش بندیکت، پروتئین با روش اسید سولفوسالیسیلیک، خون با روش پیرامیدون و کتون با روش روترا شناسائی خواهند شد.

1- آزمایش بندیکت (Benedict's Test):

- منوساکاریدها در حضور معرف بندیکت رنگ قرمز آجری ایجاد می‌کنند.

روش آزمایش:

- 0/5 میلی‌لیتر ادرار را در یک لولهٔ آزمایش بریزید.
- 3 میلی‌لیتر معرف بندیکت به آن اضافه کنید.
- لولهٔ آزمایش را به مدت 10- 5 دقیقه در حمام آب جوش قرار دهید.
- صبر کنید تا لوله سرد شود.
- تغییر رنگ ادرار نشان دهندهٔ وجود قند در آن است.

2- آزمایشِ اسید سولفوسالیسیلیک (Sulfosalicylic acid)

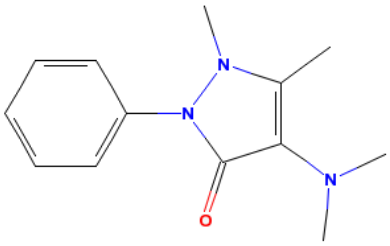
- پروتئین‌ها در مجاورت اسید سولفوسالیسیلیک، دناتوره شده و رسوب می‌کنند.

روشِ آزمایش:

- 2 میلی‌لیتر محلول ادرار را در یک لولهٔ آزمایش بریزید.
- 1 میلی‌لیتر اسید سولفوسالیسیلیک (20٪) را به آرامی و از جدار لوله به آن اضافه کنید. تشکیل رسوبِ سفید نشان دهندهٔ وجود پروتئین در ادرار است.

3- آزمایشِ پیرامیدون

- گروهِ پروستتیکِ هِم (heme) در هموگلوبینِ موجود در گلبول‌های قرمز، خاصیت پراکسیدازی داشته و قادر است آب اکسیژنه را تجزیه کند. رادیکال آزاد شده از پراکسید هیدروژن، پیرامیدون را اکسیده کرده و رنگ آن را به آبیِ تیره عوض می‌کند.



- محلول الکلیِ پیرامیدون را تازه تهیه کنید.

روشِ آزمایش:

- 2 میلی‌لیتر محلول ادرار را در یک لولهٔ آزمایش بریزید.
- 2 میلی‌لیتر محلول الکلیِ پیرامیدونِ (10٪) به آن اضافه کنید.
- 5 قطره اسید استیک به آن بیافزائید.
- 3 قطره آب اکسیژنه (20٪) به آن اضافه کنید.
- محلولِ درون لوله را مخلوط کنید. رنگ آبی مایل به بنفش، نشان دهندهٔ وجود خون در ادرار است.

4- آزمایشِ روترا (Rothra test)

- اجسام کتونی (محصول متابولیسم چربی‌ها) در مجاورت نیتروپروسید سدیم و در محیطِ قلیائی رنگ ارغوانی به وجود می‌آورند.

طرز تهیهٔ معرف روترا:

- 1 گرم نیتروپروسید سدیم را با 20 گرم کربنات سدیم و 20 گرم سولفات آمونیوم مخلوط کرده و در هاون بسابید. این مخلوط را در یک شیشهٔ در بستهٔ رنگی نگه‌داری کنید.

روشِ آزمایش:

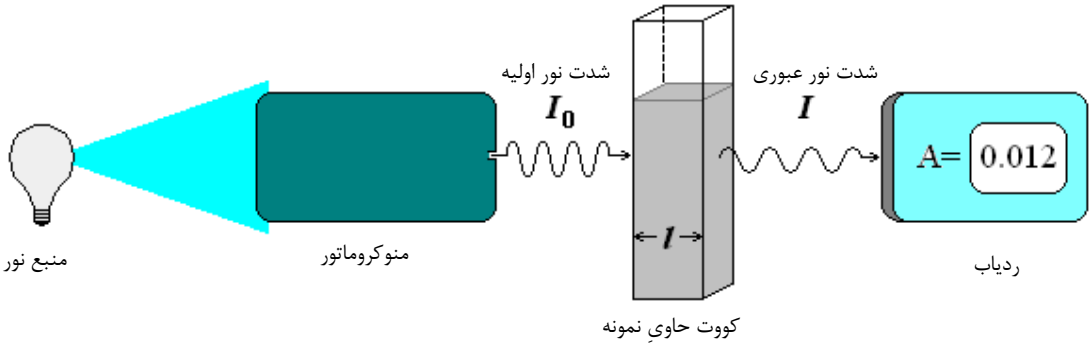
- 0/5 گرم معرف روترا را روی یک شیشهٔ ساعت یا روی یک تکه کاغذ ریخته و 2-1 قطره ادرار روی آن بچکانید. رنگ صورتی مایل به بنفش نشان دهندهٔ وجود کتون در ادرار است.

اسپکتروفتومتری

- اسپکتروفتومتری یکی از روش‌های متداول برای شناسائی و اندازه‌گیری ترکیبات شیمیائی در آزمایشگاه است که بر اساس جذب نور توسط مولکول‌ها در طول موج مشخصی ابداع شده است.

- اجزا اصلیِ یک اسپکتروفتومتر عبارتند از:

۱- منبع نور که طیف گسترده‌ای از نور را ساتع می‌کند.
۲- منوکروماتور که طول موج مشخصی از نور را انتخاب و عبور می‌دهد.
۳- سلولِ حاوی نمونه یا کووت (cuvette) با ضخامت معین.
۴- دتکتور یا ردیاب که مقدار نور عبوری را می‌سنجد.



- بر اساس قانون لامبرت- بیر (Lambert-Beer)، بخشی از نور اولیه که در یک طول موج مشخص، توسط یک محلول جذب می‌شود، با ضخامت لایهٔ عبوری و غلظت گونه‌های جذب کننده ارتباط دارد و آن را با معادلهٔ زیر نشان می‌دهند:

$$A=\log\frac{I_0}{I}=\varepsilon cl$$

که در آن I_0 شدت نور اولیه، I شدت نور عبوری، نسبت I/I_0 (معکوس نسبت در معادله) **ترانس‌میتانس** یا **عبور**، ε ضریب جذب نور (لیتر به مول‌سانتیمتر)، c غلظت گونه‌های جاذب (مول در لیتر) و l ضخامت نمونهٔ جاذب نور (سانتیمتر) هستند.

- $\log\frac{I_0}{I}$ را **جذب** یا **absorbance** گفته و آن را با **A** نشان می‌دهند.
- هر ترکیب بر اساس ساختار شیمیائیِ خود، در طول موج خاصی، بیشترین جذب را دارد. این طول موج را λ_{max} می‌نامند.

- به عنوان مثال λ_{max} نیترات کبالت (5٪) به صورت زیر اندازه‌گیری می‌شود.

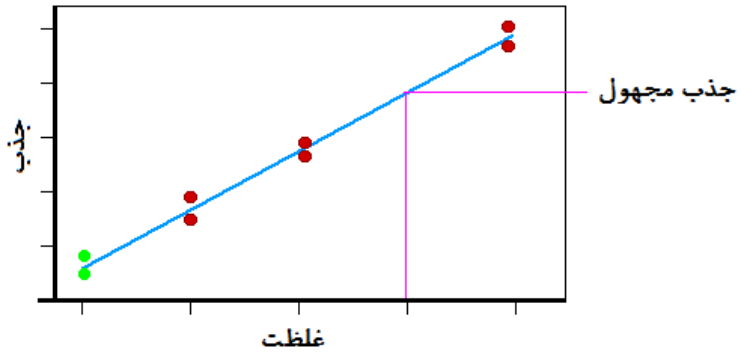
نکته: در تهیهٔ هر نوع محلول، مقدار معینی از حل‌شو را در مقدار معینی از حل‌گر حل می‌کنند (در مورد این آزمایش 5 گرم نیترات کبالت در 100 میلی‌لیتر آب حل شده است). با توجه به اینکه حل‌گر مورد استفاده نیز نور را جذب می‌کند، برای حذفِ اثر جذب حل‌گر در جذب مادهٔ حل‌شو، جذب حل‌گر (در این مورد آب خالص) را در اسپکتروفتومتر صفر در نظر گرفته و آن را **بلانک** می‌نامند.

- جذب نوری نیترات کبالت را در طول موج 460 نانومتر تا 560 نانومتر و به روش زیر اندازه‌گیری کنید.

روشِ آزمایش:

۱- در طول موج 460 نانومتر، جذب نوری را با استفاده از بلانک روی صفر تنظیم کنید.
۲- جذب نیترات نقره را در 460 نانومتر اندازه‌گیری کرده و عدد جذب را ثبت کنید.
۳- مراحل قبل را در طول موج‌های 480، 500، 520، 540 و 560 نانومتر تکرار کنید.
۴- λ_{max} نیترات نقره، طول موجی است که بیشترین عدد جذب (A) را دارد.

- معمولا برای تعیین غلظت محلول‌ها از **منحنی‌های استاندارد** استفاده می‌شود. در اسپکتروفتومتری جذب نوری غلظت‌های مشخصی از نمونهٔ مورد آزمایش اندازه‌گیری شده و منحنی استاندارد آن رسم می‌شود. حال با اندازه‌گیری جذب نوری نمونه‌ای با غلظت نامشخص، می‌توان با استناد به منحنی استاندارد غلظت نمونه را به دست آورد.



اندازه‌گیری گلوکز خون

غلظت قند خون یا سطح گلوکز خون به مقدار گلوکز (قند) موجود در خون انسان گفته می‌شود. در حالت طبیعی بدن به عنوان بخشی از هموستاز متابولیک، غلظت گلوکز خون را به شدت تنظیم می‌کند.

متوسط سطح گلوکز خون طبیعی در انسان 5٫5 mM یا 100 mg/dL است ولی این مقدار در طول روز تغییر می‌کند. سطح گلوکز معمولا صبح‌ها و پیش از اولین وعدهٔ غذائی (ناشتا) در کمترین مقدار خود است و در یک تا دو ساعت پس از غذا چند میلی‌مولار افزایش می‌یابد. سطح گلوکز خون طبیعی در افراد غیردیابتی ناشتا باید بین 70 تا 100 میلی‌گرم در دسی‌لیتر بوده و در صورت ناشتا نبودن باید کمتر از 125 mg/dL باشد. انجمن دیابت آمریکا، این مقدار را در بیماران دیابتی ناشتا 70-130 mg/dL و غیرناشتا کمتر از 180 mg/dL اعلام کرده است.

به افزایش قند خون هیپرگلیسمی گفته می‌شود که شایع‌ترین علت آن دیابت می‌باشد. به کاهش سطح گلوکز خون هیپوگلیسمی می‌گویند که وضعیت بالقوه خطرناکی است.

انواع آزمایش‌هائی که برای سنجش گلوکز درخواست می‌شوند عبارت هستند از؛ قند خون ناشتا (FBS)، گلوکز ادرار، قند خون دو ساعت پس از غذا (2-h PPBS)، آزمایش تحمل گلوکز خوراکی (OGTT)، آزمایش تحمل گلوکز درون‌وریدی (IVGTT)، هموگلوبین گلیکوزیله (HbA_{1c}) و قند خون اتفاقی (RBS).

اندازه‌گیری گلوکز

برای اندازه‌گیری سطح گلوکز خون از سرم خون وریدی بیمار ناشتا استفاده می‌گردد. روش‌های متعددی برای اندازه‌گیری گلوکز وجود دارند که به دو گروه روش‌های **شیمیائی** و **آنزیمی** تقسیم می‌شوند.

در روش اول که هنوز در برخی از آزمایشگاه‌ها به کار می‌رود و شامل انواعی از روش‌های گوناگون است، از ویژگی احیاگری غیراختصاصی گلوکز استفاده می‌شود تا یک مادهٔ نشان‌گر احیاء شده و تغییر رنگ دهد. با توجه به اینکه سایر ترکیبات خون (مانند اوره) نیز توان احیاگری دارند بنابراین این روش با خطا همراه است.

روش آنزیمی اختصاص به گلوکز دارد بنابراین از این نوع خطا به دور است. دو آنزیمی که به صورت متداول برای اندازه‌گیری آنزیم استفاده می‌شوند عبارت هستند از **گلوکز اکسیداز** و **هگزوکیناز**.

اندازه‌گیری قند خون به روش گلوکز اکسیداز

آنزیم گلوکز اکسیداز، گلوکز را با استفاده از اکسیژن به اسید گلوکونیک اکسید کرده و آب اکسیژنه تولید می‌کند

$$\text{D-Glucose} + O_2 \xrightarrow{\textit{Glucose oxidase}} \text{D-Gluconic acid} + H_2O_2$$

آب اکسیژنه در مجاورت فنل و 4-آمینوآنتی‌پیرین توسط آنزیم پراکسیداز، کمپلکس رنگی کینون‌ایمین را تشکیل می‌دهد

$$H_2O_2 + \text{Phenol} + \text{4-Aminoantipyrine} \xrightarrow{Peroxidase} \text{Quinoneimine} + H_2O$$

مقدار جذب نوری این کمپلکس رنگی در طول موج 510-490 نانومتر متناسب با غلظت گلوکز است.

در حال حاضر کلیهٔ ترکیبات لازم برای این آزمایش به صورت کیت آزمایشگاهی از شرکت‌های سازنده خریداری شده و بر اساس دستورالعمل سازنده به کار می‌روند. کیت مورد استفاده در این آزمایشگاه حاوی یک معرف و یک نمونهٔ استاندارد با غلظت گلوکز 100 mg/dL می‌باشد.

روش آزمایش

- سه لولهٔ آزمایش برای بلانک، استاندارد و سرم آماده کنید.
- به لولهٔ استاندارد 20 میکرولیتر نمونهٔ استاندارد و به لولهٔ سرم 20 میکرولیتر سرم بریزید.
- به هر سه لوله 2000 میکرولیتر معرف اضافه کنید.
- لوله‌ها را مخلوط کرده و به مدت 10 دقیقه در داخل حمام آب گرم 37 °C قرار دهید.
- طول موج دستگاه طیف‌نورسنج را روی 500 نانومتر تنظیم کرده و جذب نوری آن را با بلانک صفر کنید.
- جذب‌های نوری استاندارد و سرم را بخوانید.
- غلظت گلوکز سرم را با فرمول زیر محاسبه کنید

$$\text{Glucose (mg/dL)} = (A_{Serum} \div A_{Standard}) \times 100$$

اندازه‌گیری اورهٔ خون

کاتابولیسم پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک به تولید اوره و آمونیاک منجر می‌شود که تحت عنوان ترکیبات نیتروژن‌دار غیرپروتئینی شناخته می‌شوند. اوره یا کاربامید ($CO(NH_2)_2$) اصلی‌ترین محصول کاتابولیسم پروتئین در انسان بوده و بیش از 75٪ از نیتروژن غیرپروتئینی دفعی را به خود اختصاص می‌دهد. اوره در سلول‌های کبد از اکسیداسیون اسیدهای آمینه طی چرخهٔ اوره تولید می‌شود و بیش از 90٪ آن از طریق کلیه‌ها و باقی آن از دستگاه گوارش و پوست دفع می‌گردد. افزایش اورهٔ خون را ازوتمی می‌گویند.

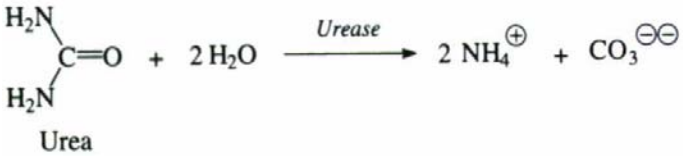
در شرایط ویژه اندازه‌گیری اورهٔ پلاسما اطلاعات بالینی مفیدی در مورد عملکرد کلیه‌ها به دست می‌دهد. با این حال عوامل خارج کلیوی بر غلظت اورهٔ خون تاثیر می‌گذارند به همین دلیل معمولا همزمان با اوره، کراتینین خون نیز اندازه‌گیری شده و نسبت آن دو بررسی می‌گردد. مقدار اورهٔ خون در یک فرد طبیعی □□-□□ mg/dL است

اگرچه نیتروژن اورهٔ خون (BUN) هنوز به عنوان شاخصی برای بیان مقدار اورهٔ خون به کار می‌رود اما این آزمون نادرست و منسوخ می‌باشد. با این حال برای تبدیل اوره به نیتروژن اوره باید مقدار اوره را در 0/467 و برای تبدیل نیتروژن اوره به اوره باید مقدار نیتروژن اوره را در 2/14 ضرب کرد.

اندازه‌گیری اورهٔ خون با روش برتلوت

برای اندازه‌گیری سطح گلوکز خون از سرم خون وریدی بیمار ناشتا استفاده می‌گردد. روش‌های اندازه‌گیری اورهٔ خون به دو گروه شیمیائی و آنزیمی تقسیم می‌شوند. اکثر روش‌های شیمیائی بر اساس واکنش فیرون می‌باشند که طی آن دی‌استیل با اوره ترکیب شده و مولکلول رنگی دیازین را به وجود می‌آورد که جذب نوری آن در 540 نانومتر اندازه‌گیری می‌شود.

روش‌های آنزیمی برای اندازه‌گیری اوره بر اساس هیدرولیز اوره توسط آنزیم اوره‌آز و تولید یون آمونیوم و اندازه‌گیری آن بنا شده‌اند.



برای اندازه‌گیری یون آمونیوم می‌توان از واکنش آنزیم گلوتامات دهیدروژناز (به عنوان روش استاندارد) و واکنش بِرتِلُوت استفاده کرد. در آزمایش برتلوت یون آمونیوم در مجاورت اسید سالیسیلیک و هیپوکلریت سدیم به ترکیب سبز رنگ دی‌کربوکسیل ایندوفنل تبدیل شده و جذب نوری آن در 630-578 نانومتر اندازه‌گیری می‌شود. مقدار جذب نوری با غلظت اوره متناسب است.

$$NH_4^+ + \text{Salicylic acid} + NaOCl \rightarrow \text{Dicarboxyl indophenol}$$

برای اندازه‌گیری اوره به روش برتلوت از کیت آماده‌ای استفاده می‌شود که حاوی سه معرف (R1، R2 و R3) و یک محلول استاندارد اوره با غلظت □□ mg/dL می‌باشد.

روش آزمایش

- سه لولهٔ آزمایش برای بلانک، استاندارد و سرم آماده کنید.
- درون هر یک از سه لوله 20 میکرولیتر معرف R1 بریزید.
- به لولهٔ استاندارد 10 میکرولیتر نمونهٔ استاندارد و به لولهٔ سرم 10 میکرولیتر سرم اضافه کنید.
- به هر سه لوله 1000 میکرولیتر معرف R2 اضافه کنید.
- لوله‌ها را مخلوط کرده و به مدت 10 دقیقه در داخل حمام آب گرم 37 °C قرار دهید.
- به هر سه لوله 1000 میکرولیتر معرف R3 اضافه کنید.
- طول موج دستگاه طیف‌نورسنج را روی 578 نانومتر تنظیم کرده و جذب نوری آن را با بلانک صفر کنید.
- جذب‌های نوری استاندارد و سرم را بخوانید.
- غلظت اوره را با فرمول زیر محاسبه کنید

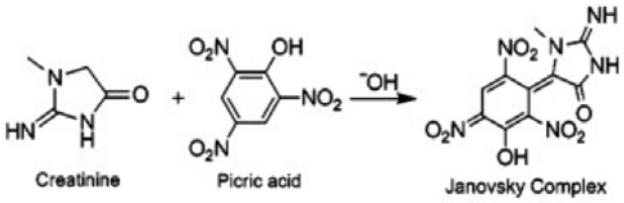
$$\text{Urea (mg/dL)} = (A_{\text{Serum}} \div A_{\text{Standard}}) \times 60$$

اندازه‌گیری کراتینین

کراتینین محصول شکست فسفات کراتین در عضلات است و معمولا متناسب با حجم عضلانی، با سرعت نسبتا ثابتی در بدن تولید می‌شود. کراتین در کبد به وجود آمده و از طریق جریان خون به سایر اندام‌ها از جمله عضله و مغز منتقل می‌شود و در آنجا توسط کراتین کیناز به ترکیب پرانرژی فسفوکراتین تبدیل می‌گردد. طی این واکنش مقداری کراتینین (روزانه حدود 1 تا 2 درصد از کراتین عضله) به صورت خود به خود به وجود می‌آید.

کراتینین توسط کلیه‌ها دفع می‌شود به همین دلیل سطح خونی یا ادراری آن شاخصی برای عملکرد کلیه‌ها می‌باشد. مقادیر طبیعی کراتینین سرمی 0/7 تا 1/2 میلی‌گرم در دسی‌لیتر برای مردان و 0/5 تا 1/0 میلی‌گرم در دسی‌لیتر برای زنان تعیین شده است.

واکنش ژافه اساس اندازه‌گیری کراتینین است و در آن کراتینین در مجاورت اسید پیکریک در یک محیط قلیائی به یک مجموعهٔ نارنجی رنگ تبدیل می‌شود. جذب نوری این مجموعه در 500 نانومتر با مقدار کراتینین متناسب می‌باشد.



برای اندازه‌گیری کراتینین از یک کیت آماده استفاده می‌شود که حاوی دو معرف (R1 و R2) و یک محلول استاندارد با غلظت میلی‌گرم در دسی‌لیتر است. معرف‌های R1 و R2 با نسبت 4 به 1 از قبل آماده شده و محلول آمادهٔ کار نامیده شده است.

روش آزمایش

- سه لولهٔ آزمایش برای بلانک، استاندارد و سرم آماده کنید.
- درون لولهٔ بلانک 2 میلی‌لیتر آب مقطر بریزید.
- به لولهٔ استاندارد 200 میکرولیتر نمونهٔ استاندارد و به لولهٔ سرم 200 میکرولیتر سرم اضافه کنید.
- به لوله‌های استاندارد و سرم 2 میلی‌لیتر محلول آمادهٔ کار اضافه کنید.
- طول موج دستگاه طیف‌نورسنج را روی 500 نانومتر تنظیم کرده و جذب نوری آن را با بلانک صفر کنید.
- جذب نوری استاندارد و سرم را 30 ثانیه پس از اضافه کردن محلول آمادهٔ کار بخوانید (A1)، سپس 2 دقیقه صبر کرده و دوباره جذب نوری استاندارد و سرم را بخوانید (A2).
- تفاضل جذب نوری را برای استاندارد و سرم محاسبه کنید ($\Delta A = A2 - A1$).
- غلظت کراتینین را با فرمول زیر محاسبه کنید

$$\text{Creatinine (mg/dL)} = (\Delta A_{\text{Sample}} \div \Delta A_{\text{Standard}}) \times 2$$

اندازه‌گیری کلسترول

کلسترول یک لیپید حلقویِ غیراشباعِ 27 کربنی است که به دو شکل آزاد و استریفیه در خون توسط ترکیباتی به نام لیپوپروتئین انتقال می‌یابد؛ ترکیبات میسل مانندی که حاوی پروتئین و فسفولیپید در بخش بیرونی و کلسترول، استر کلسترول و تری‌گلیسیرید در قسمت داخلی خود هستند و بر اساس اندازه و اجزاء به چهار گروه مختلف تقسیم می‌شوند؛ شیلومیکرون‌ها، لیپوپروتئین بسیار کم چگالی (VLDL)، لیپوپروتئین کم چگالی (LDL) و لیپوپروتئین چگالی زیاد (HDL).

شیلومیکرون‌ها و VLDL دارای بیشترین تری‌گلیسیرید هستند در حالیکه کلسترول بیشترین لیپید سازندهٔ LDL و HDL می‌باشد. افزایش غلظت LDL و کاهش غلظت HDL می‌تواند به ایجاد تصلب شراین و در نتیجه انفارکتوس قلبی، سکتهٔ مغزی و بیماری عروق محیطی بی‌انجامد.

به مجموع کلسترول‌های HDL، LDL و VLDL کلسترول تام می‌گویند. معمولا برای صرفه‌جوئی، غلظت کلسترول VLDL را یک پنجم HDL در نظر گرفته و فقط غلظت کلسترول HDL را اندازه‌گیری می‌کنند و غلظت LDL را با استفاده از فرمول فریدوالد محاسبه می‌کنند ([VLDL تخمینی] – [کلسترول HDL] – [کلسترول تام] = LDL تخمینی). غلظت طبیعی کلسترول تام کمتر از 200 میلی‌گرم در دسی‌لیتر و LDL-C کمتر از 130 میلی‌گرم در دسی‌لیتر تعیین شده‌اند.

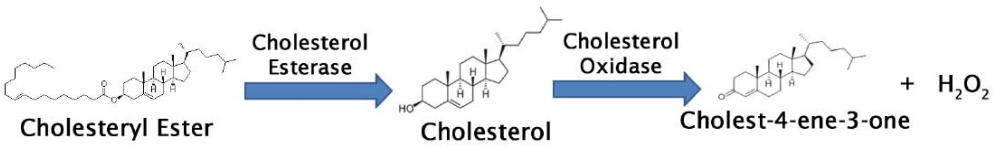
اندازه‌گیری کلسترول معمولا به صورت مجموعه‌ای شامل Total Cholesterol, LDL-C, HDL-C, TG درخواست می‌گردد.

برای اندازه‌گیری کلسترول از نمونهٔ سرم یا پلاسمای خون ناشتا (به مدت 12 ساعت) استفاده می‌شود.

هر چند روش‌های شیمیائی متعددی مانند روش سالکوفسکی و لیبرمن-بوشارد برای اندازه‌گیری کلسترول وجود دارند ولی روش‌های آنزیمی دقیق‌تر و حساس‌تر هستند.

اندازه‌گیری کلسترول با روش کلسترول اکسیداز

در این روش ابتدا استرهای کلسترول توسط آنزیم کلسترول استراز هیدرولیز شده و کلسترول آزاد توسط آنزیم کلسترول اکسیداز به کُلِست-4-اِن-3-اون و آب اکسیژنه تبدیل می‌شود.



آب اکسیژنه در مجاورت فنل و 4-آمینوآنتی‌پیرین توسط آنزیم پراکسیداز، کمپلکس رنگی کینون‌ایمین را به وجود می‌آورد که مقدار جذب نوری آن در طول موج 510-490 نانومتر متناسب با غلظت کلسترول است.

$$H_2O_2 + \text{Phenol} + \text{4-Aminoantipyrine} \xrightarrow{Peroxidase} \text{Quinoneimine} + H_2O$$

در حال حاضر کلیهٔ ترکیبات لازم برای این آزمایش به صورت کیت آزمایشگاهی از شرکت‌های سازنده خریداری شده و بر اساس دستورالعمل سازنده به کار می‌روند. کیت مورد استفاده در این آزمایشگاه حاوی یک معرف و یک نمونهٔ استاندارد با غلظت کلسترول 200 mg/dL می‌باشد.

روش آزمایش

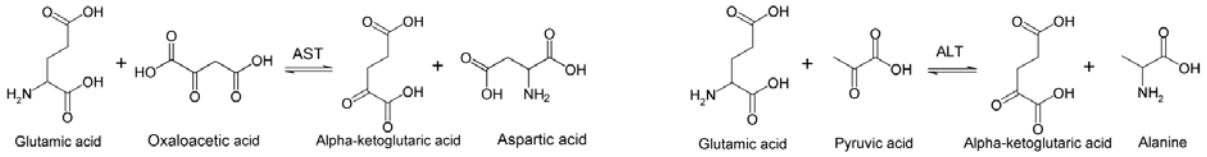
- سه لولهٔ آزمایش برای بلانک، استاندارد و سرم آماده کنید.
- به لولهٔ استاندارد 20 میکرولیتر نمونهٔ استاندارد و به لولهٔ سرم 20 میکرولیتر سرم بریزید.
- به هر سه لوله 2000 میکرولیتر معرف اضافه کنید.
- لوله‌ها را مخلوط کرده و به مدت 10 دقیقه در داخل حمام آب گرم 37 °C قرار دهید.
- طول موج دستگاه طیف‌نورسنج را روی 500 نانومتر تنظیم کرده و جذب نوری آن را با بلانک صفر کنید.
- جذب‌های نوری استاندارد و سرم را بخوانید.
- غلظت کلسترول را با فرمول زیر محاسبه کنید

$$\text{Total Cholesterol (mg/dL)} = (A_{\text{Serum}} \div A_{\text{Standard}}) \times 200$$

اندازه‌گیری ترانس‌آمینازها

پلاسما حاوی آنزیم‌های متعددی است. برخی از آنها مانند لیپوپروتئین لیپاز و آنزیم‌های دخیل در انعقاد خون در پلاسما فعال هستند، اما بسیاری از آنزیم‌ها فقط هنگام نشت از بافت‌ها در پلاسما دیده می‌شوند که می‌توان از آنها به عنوان ابزارهای تشخیصی سودمند استفاده کرد. اندازه‌گیری فعالیت پلاسمائی این آنزیم‌ها اطلاعات ارزشمندی را در بارهٔ بیماری‌های بافت منشاء آنها به دست می‌دهد. اندازه‌گیری فعالیت آنزیم از طریق اندازه‌گیری غلظت یا محصول آنها در مایعات بدن ساده‌تر از اندازه‌گیری مستقیم غلظت پروتئین است.

آمینوترانس‌آمینازها: آنزیم‌هائی هستند که در انتقال گروه آمینی از یک اسید آمینه به یک اسید α-کتو شرکت می‌کنند. دو آمینوترانس‌آمیناز معروف عبارت هستند از آسپارتات ترانس‌آمیناز (AST) و آلانین ترانس‌آمیناز (ALT) که به ترتیب سرم گلوتامیک اگزالواستیک ترانس‌آمیناز (SGOT) و سرم گلوتامیک پیرورویک ترانس‌آمیناز (SGPT) نیز نامیده می‌شود.



هرچند این دو آنزیم در اکثر بافت‌های بدن وجود دارند اما فعالیت آنها در بافت‌های مختلف متفاوت است. فعالیت AST در قلب و کبد و ALT در کبد بیشتر از بقیهٔ بافت‌ها است. مقدار فعالیت طبیعی AST سرمی در مردان کمتر از U/L □□ و در زنان کمتر از □□ U/L می‌باشد. مقدار فعالیت طبیعی ALT سرمی در مردان کمتر از U/L □□ و در زنان کمتر از U/L □□ می‌باشد. در آسیب کبدی هر دو آنزیم افزایش می‌یابند اما ALT کمی بیشتر. در انفارکتوس میوکارد AST افزایش می‌یابد اما ALT فقط کمی یا اصلا افزایش پیدا نمی‌کند.

روش اندازه‌گیری AST

اندازه‌گیری این آنزیم به روش رنگ‌سنجی رِیتمَن و فرانکِل انجام می‌گیرد. با توجه به واکنش آنزیم AST

$$\text{L-Aspartate} + \alpha\text{-Ketoglutarate} \rightarrow \text{Oxaloacetate} + \text{L-Glutamate}$$

از دو ترکیب آسپارتات و α-کتوگلوتارات به عنوان سوبستراهای آنزیم استفاده می‌شود. افزودن 2،4-دی‌نیتروفنیل‌هیدرازین به واکنش فوق یک مجموعهٔ قرمز قهوه‌ای به وجود می‌آورد که جذب آن در طول موج 505 نانومتر اندازه‌گیری می‌گردد.

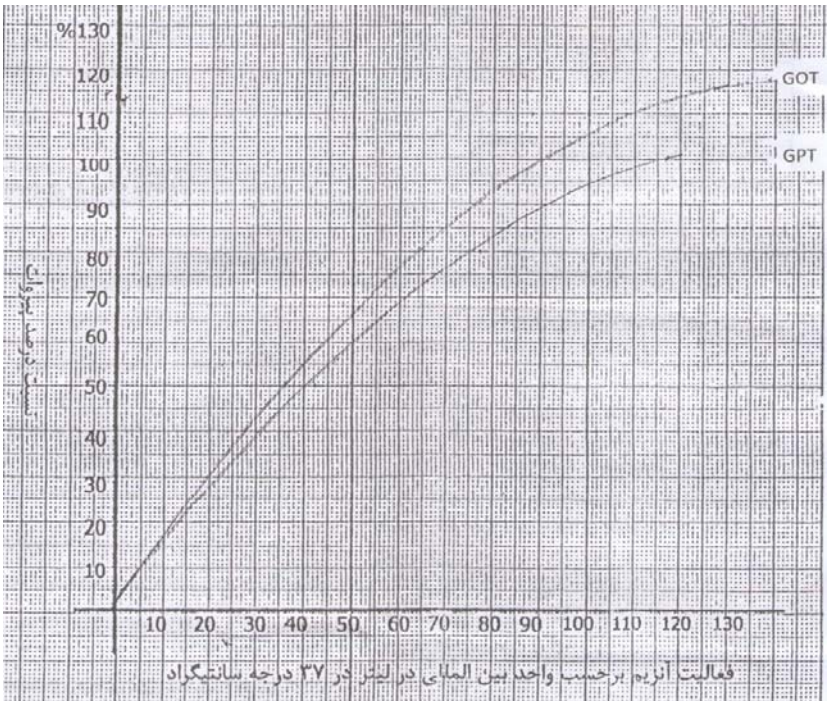
روش آزمایش

- چهار لولهٔ آزمایش برای بلانک معرف (RB)، بلانک سرم (SB)، استاندارد (S) و سرم (T) آماده کنید.
- درون تمامی لوله‌ها 500 میکرولیتر معرف A بریزید.

- به لولهٔ استاندارد 100 میکرولیتر معرف D اضافه کنید.
- به لولهٔ بلانک معرف 100 میکرولیتر معرف E اضافه کنید.
- لوله‌ها را به مدت 5 دقیقه در داخل حمام آب گرم 37 °C قرار دهید.
- به لولهٔ سرم 100 میکرولیتر سرم اضافه نمایید.
- لوله‌ها را به مدت 30 دقیقه در داخل حمام آب گرم 37 °C قرار دهید.
- به درون همهٔ لوله‌ها 500 میکرولیتر معرف C اضافه کنید.
- به لولهٔ بلانک سرم 100 میکرولیتر سرم اضافه کنید.
- لوله‌ها را به مدت 10 دقیقه در دمای اطاق نگه دارید.
- درون همهٔ لوله‌ها 5 میلی‌لیتر سود بریزید.
- لوله‌ها را به آرامی هم زده و 5 دقیقه صبر کنید.
- طول موج دستگاه طیف‌نورسنج را روی 505 نانومتر تنظیم کرده و جذب نوری آن را با استفاده از آب مقطر صفر کنید.
- جذب‌های نوری هر چهار لوله را بخوانید.
- درصد نسبت تفاضل جذب نوری AST سرم و استاندارد را با فرمول زیر محاسبه کنید

$$AST\% = (A_{Serum} - A_{Blank\ Serum})/(A_{Standard} - A_{Blank\ Reagent}) \times 100$$

- با استفاده از منحنی استاندارد، فعالیت آنزیم را با واحد بین‌المللی (IU) به دست آورید.



پروتئین‌های پلاسما

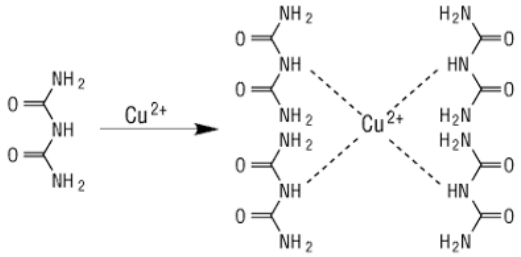
پروتئین‌های پلاسما به پروتئین‌های موجود در خون پس از جدا کردن پلاکت‌ها، گلبول‌های قرمز و سفید گفته می‌شود که در شرایط طبیعی حدود 7٪ از حجم پلاسما را به خود اختصاص می‌دهند. این پروتئین‌ها انواع و عملکردهای مختلفی دارند از جمله انتقال لیپیدها، هورمون‌ها، ویتامین‌ها و فلزات در جریان خون، تنظیم فعالیت غیرسلولی، نقش در سیستم ایمنی و فعالیت کاتالیتیک.

آلبومین فراوان‌ترین پروتئین پلاسما است (55٪) که مهمترین عامل ایجاد فشار اسمزی پلاسما بوده و در انتقال لیپیدها و هورمون‌های استروئیدی نقش دارد. حدود 38٪ از پروتئین‌های پلاسما از گلوبولین‌ها به وجود آمده‌اند که یون‌ها، هورمون‌ها و لیپیدهای دخیل در عملکرد ایمنی را منتقل می‌کنند. فیبرینوژن 7٪ از پروتئین‌های پلاسما را تشکیل می‌دهد که جزو پروتئین‌های انعقادی بوده و با تبدیل به فیبرین باعث ایجاد لخته می‌گردد. فیبرینوژن در سرم خون وجود ندارد. بقیهٔ پروتیئن‌های پلاسما (1٪) شامل پروتئین‌های تنظیمی برای آنزیم‌ها، پیش‌آنزیم‌ها و هورمون‌ها هستند. به استثناء گاما گلوبولین‌ها، سایر پروتئین‌های خون در کبد تولید می‌شوند.

افزایش یا کاهش غلظت پروتئین‌های پلاسما می‌تواند ناشی از شرایط بالینی فرد باشد. معمولا پیش از اندازه‌گیری یک پروتئین خاص که با روش الکتروفورز انجام می‌گیرد، مقدار پروتئین تام و آلبومین پلاسما یا سرم اندازه‌گیری می‌شود. غلظت طبیعی پروتئین تام سرم 6٫4-8٫3 g/dl است و در پلاسما حدود 0٫2-0٫4 g/dl افزایش می‌یابد. به کاهش غلظت پروتئین پلاسما هیپوپروتئینمی گفته می‌شود که در سندرم نفروتیک، سیروز کبدی، خونریزی داخلی، سوختگی، اختلالات گوارشی و سوءتغذیه دیده می‌شود. هیپرپروتئینمی یا افزایش غلظت پروتئین پلاسما شیوع کمتری داشته و می‌تواند به دنبال دهیدراتاسیون شدید (ناشی از اسهال و استفراغ شدید) یا افزایش پروتئین‌های اختصاصی سرم (مانند ایمونوگلوبولین‌ها) به وجود آید.

اندازه‌گیری پروتئین تام سرم

روش مرسوم اندازه‌گیری پروتئین تام سرم روش بیوره است. در این آزمایش یون‌های مس دوظرفیتی در یک محیط قلیائی، به اتم‌های دخیل در پیوندهای پپتیدی وصل شده و کمپلکس بنفش رنگ ایجاد می‌کنند که در طول موج 546 نانومتر بیشترین جذب نوری را دارد. مولکلول بیوره نیز همانند پروتئین‌ها در مجاورت یون‌های مس دوظرفیتی کمپلکس بنفش به وجود می‌آورد.



برای اندازه‌گیری پروتئین تام سرم در این آزمایشگاه از یک کیت آماده حاوی یک معرف و یک محلول استاندارد با غلظت پروتئین 6٫0 g/dl استفاده می‌شود.

روش آزمایش

- سه لولهٔ آزمایش برای بلانک، استاندارد و سرم آماده کنید.
- به لولهٔ استاندارد 20 میکرولیتر نمونهٔ استاندارد و به لولهٔ سرم 20 میکرولیتر نمونهٔ سرم بریزید.
- به هر سه لوله 2000 میکرولیتر معرف اضافه کنید.
- لوله‌ها را مخلوط کرده و به مدت 10 دقیقه در داخل حمام آب گرم 37 °C قرار دهید.
- طول موج دستگاه طیف‌نورسنج را روی 546 نانومتر تنظیم کرده و جذب نوری آن را با بلانک صفر کنید.
- جذب‌های نوری استاندارد و سرم را بخوانید.
- غلظت پروتئین تام سرم را با فرمول زیر محاسبه کنید

$$\text{Total protein (mg/dL)} = (A_{\text{Serum}} \div A_{\text{Standard}}) \times 6$$

آلکالین فسفاتاز

آلکالین فسفاتاز (ALP، ALKP) یک آنزیم هیدرولاز است که مسئول برداشت گروه‌های فسفات از بسیاری از انواع مولکول‌ها از جمله نوکلئوتیدها و پروتئین‌ها می‌باشد. آنگونه که از نام آنزیم مشخص می‌شود، آلکالین فسفاتاز در شرایط قلیائی کارآمدتر است.

این آنزیم در بسیاری از بافت‌های انسان به ویژه کبد، مجرای صفراوی، کلیه، استخوان و جفت وجود دارد. آلکالین فسفاتاز سه ایزوآنزیم مختلف دارد؛ ALPI در روده، ALPL در کبد، استخوان و کلیه و ALPP در جفت. محدودهٔ فعالیت طبیعی آلکالین فسفاتاز 20 تا 140 واحد بین‌المللی در لیتر (IU/L) است که در کودکان و زنان باردار میزان آن به صورت چشمگیری افزایش می‌یابد. مقدار آن در انسداد مجاری صفراوی و نیز طی تشکیل فعال استخوان (مثلا در بیماری پاژه) بالا می‌رود.

اندازه گیری فعالیت آلکالین فسفاتاز

چون این آنزیم یک سوبسترای اختصاصی ندارد بنابراین برای اندازه‌گیری آن روش‌های مختلفی ابداع شده است. تفاوت اصلی در این روش‌ها در نوع و غلظت سوبسترا، بافر و pH محیط می‌باشد. در اکثر این روش‌ها از پارانیتروفنیل‌فسفات به عنوان سوبسترا استفاده می‌گردد.

$$p\text{-Nitrophenylphosphate} + \text{Buffer} \rightarrow \text{Phosphate} + p\text{-Nitrophenole}$$

برای اندازه‌گیری فعالیت آلکالین فسفاتاز در این آزمایشگاه از یک کیت آماده استفاده می‌شود که بافر مورد استفاده در آن حاوی دی‌اتانول‌آمین (DEA) به عنوان گیرندهٔ گروه فسفات است. همچنین این کیت حاوی دو معرف R1 و R2 است که با نسبت 4 به 1 و با عنوان محلول آمادهٔ کار از قبل آماده شده است.

روش آزمایش

- دو لولهٔ آزمایش برای بلانک سرم (SB)، و سرم (T) آماده کنید.
- درون هر دو لوله 500 میکرولیتر محلول آمادهٔ کار بریزید.
- لوله‌ها را به مدت 5 دقیقه در داخل حمام آب گرم 37 °C قرار دهید.
- به لولهٔ سرم 20 میکرولیتر سرم اضافه نمایید.
- لوله را هم زده و به مدت 15 دقیقه در داخل حمام آب گرم 37 °C قرار دهید.
- درون هر دو لوله 5 میلی‌لیتر سود بریزید (تا واکنش را متوقف کنید).
- به لولهٔ بلانک سرم 20 میکرولیتر سرم اضافه کنید.
- جذب نوری دستگاه طیف‌نورسنج را با آب مقطر در 405 نانومتر صفر کنید.
- هر دو لوله را هم زده و جذب نوری آنها را بخوانید.
- میزان فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز را با استفاده از فرمول زیر محاسبه کنید

$$\text{ALP activity (IU/L)} = (A_{\text{Serum}} - A_{\text{Blank Serum}}) \times 1000$$

بیلی‌روبین

بیلی‌روبین محصول زردرنگ کاتابولیسم هِم است. هم در هِم‌پروتئین‌ها از جمله هموگلوبین، میوگلوبین، سیتوکروم و کاتالاز وجود دارد. حدود 85-80 درصد از تولید روزانهٔ بیلی‌روبین از هموگلوبین منشا می‌گیرد. بیلی‌روبین از طریق صفرا و ادرار دفع می‌شود و مقادیر بالای آن نشان دهندهٔ بیماری است. زردی ناشی از کوفتگی‌ها، بخشی از رنگ ادرار، رنگ قهوه‌ای مدفوع و تغییر رنگی که در یرقان به وجود می‌آید ناشی از بیلی‌روبین یا مشتقات آن است.

از لحاظ شیمیایی بیلی‌روبین از یک زنجیر باز شامل چهار حلقهٔ شبه‌پیرول (تتراپیرول) به وجود آمده است. در هِم این چهار حلقه به هَم وصل می‌شوند و یک حلقهٔ پورفیرین بزرگتر را به وجود می‌آورند.

پس از اتمام عمر، گلبول‌های قرمز توسط طحال برداشته می‌شوند. هموگلوبین آزاد می‌شود، گلوبین آن به اسیدهای آمینه تجزیه می‌گردد و هم توسط منوسیت‌های طحال به **بیلی‌روبین غیرکنژوگه (غیرمستقیم)** تبدیل می‌شود. بیلی‌روبین غیرکنژوگه در آب نامحلول است، بنابراین با اتصال به آلبومین به کبد منتقل می‌گردد و در آنجا با **اسید گلوکورونیک** کنژوگه می‌شود (**بیلی‌روبین کنژوگه یا مستقیم**). این ترکیب محلول در آب است و از طریق صفرا وارد روده می‌شود. بخشی از آن توسط باکتری‌های رودهٔ بزرگ به اوروبیلینوژن تبدیل می‌گردد که مقدار اندکی از آن جذب می‌شود و از طریق ادرار دفع می‌گردد.

به افزایش سطح خونی بیلی‌روبین **هیپربیلی‌روبینمی** می‌گویند که در مورد بزرگسالان 17 میکرومول در لیتر و در نوزادان 340 میکرومول در لیتر ذکر شده است. با توجه به متابولیسم پیچیدهٔ بیلی‌روبین، هیپربیلی‌روبینمی انواع مختلفی دارد که آنها را به صورت **پیش‌کبدی** (مانند همولیز؛ هیپربیلی‌روبینمی غیرکنژوگه)، **کبدی** (مانند هپاتیت، سیروز؛ هیپربیلی‌روبینمی کنژوگه) و **پس‌کبدی** (مانند انسداد صفراوی؛ هیپربیلی‌روبینمی کنژوگه) تقسیم‌بندی می‌کنند.

متداول‌ترین روش اندازه‌گیری بیلی‌روبین استفاده از **اسید سولفانیلیکِ دی‌ازته** و تولید رنگ **آزوبیلی‌روبین** است. جذب نوری رنگ حاصل در 546 نانومتر اندازه‌گیری می‌شود. در آزمایشگاه، بیلی‌روبین تام (شامل بیلی‌روبین مستقیم و غیرمستقیم) و بیلی‌روبین مستقیم اندازه‌گیری می‌شوند. برای اندازه‌گیری بیلی‌روبین مستقیم افزودن اسید سولفانیلیک کافی است، اما اندازه‌گیری بیلی‌روبین غیرمستقیم (غیرکنژوگه) نیاز به یک تسریع کننده دارد. کیت اندازه‌گیری بیلی‌روبین حاوی دو معرف R1 و R2 و یک محلول استاندارد با غلظت 20 میلی‌گرم در دسی‌لیتر است.

روش آزمایش

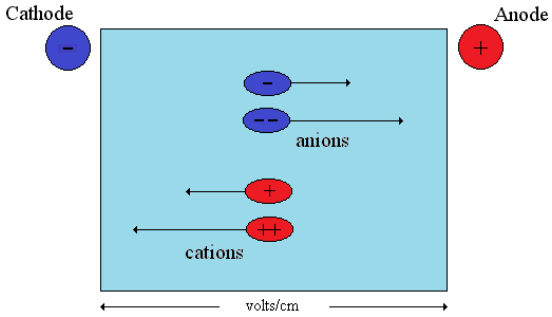
- سه لولهٔ آزمایش برای بلانک، استاندارد و سرم آماده کنید.
- به لولهٔ استاندارد 150 میکرولیتر نمونهٔ استاندارد و به لولهٔ سرم 150 میکرولیتر نمونهٔ سرم بریزید.
- به هر سه لوله 2000 میکرولیتر معرف R1 اضافه کنید.
- لوله‌ها را هم بزنید و به مدت 5 دقیقه در داخل حمام آب گرم 37 °C قرار دهید.

- طول موج دستگاه طیف‌نورسنج را روی 546 نانومتر تنظیم کرده و جذب نوری آن را با بلانک صفر کنید.
- جذب‌های نوری اول استاندارد و سرم را بخوانید (A1).
- به هر سه لوله 500 میکرولیتر معرف R2 اضافه کنید.
- لوله‌ها را هم بزنید و به مدت 5 دقیقه در داخل حمام آب گرم 37 °C قرار دهید.
- جذب‌های نوری دوم استاندارد و سرم را بخوانید (A2).
- تفاضل جذب نوری را برای استاندارد و سرم محاسبه کنید ($\Delta A = A2 - A1$).
- غلظت بیلی‌روبین سرم را با فرمول زیر محاسبه کنید.

$$\text{Bilirubin (mg/dL)} = (\Delta A_{\text{Sample}} \div \Delta A_{\text{Standard}}) \times 20$$

الکتروفورز

به حرکت ذرات باردار از میان الکترولیتی که تحت تاثیر میدان الکتریکی است الکتروفورز می‌گویند. کاتیون‌ها به سمت قطب کاتد و آنیون‌ها به سمت قطب آند حرکت می‌کنند. با این فناوری می‌توان ترکیباتی را که با سرعت‌های مختلف از میان الکترولیت حرکت می‌کنند جدا کرد. الکتروفورز معمولا در بررسی‌های زیستی به ویژه جداسازی پروتئین‌ها، پپتیدها و اسیدهای نوکلئیک به کار می‌رود.

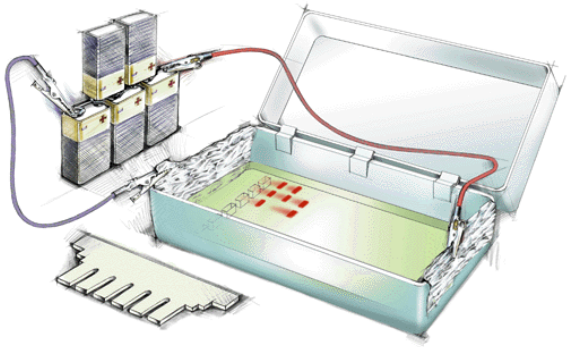


سرعت مهاجرت یک حل‌شو در میدان الکتریکی به عوامل زیر بستگی دارد؛ **بار خالص ذره**، **جرم** و **شکل ذره**، **pH محیط**، **قدرت میدان الکتریکی**، **ویژگی‌های بستر پشتیبان** و **حرارت**.

طبق تعریف به سرعت مهاجرت حل‌شو (سانتی‌متر بر ثانیه) به ازای هر واحد قدرت میدان (ولت بر سانتی‌متر) **تحرک الکتروفورزی** می‌گویند و آن را به صورت $\mu = Q/6\pi r\eta$ نشان می‌دهند که در آن μ حرکت الکتروفورزی، Q بار خالص یون، r شعاع یونی حل‌شو و η گرانروی (ویسکوزیتهٔ) بستر هستند. حرکت الکتروفورزی به طور مستقیم با بار خالص و به طور معکوس با اندازهٔ مولکولی و گرانروی بستر الکتروفورز ارتباط دارد. pH محلول با تاثیر بر مقدار و نوع بار الکتریکی بر حرکت تاثیر می‌گذارد.

پروتئین‌ها، اسیدهای نوکلئیک، نوکلئوتیدها و اسیدهای آمینه به دلیل وجود گروه‌های باردار مولکول‌های مناسبی برای الکتروفورز هستند. کربوهیدرات‌ها که فاقد بار الکتریکی هستند ابتدا به یون‌های بورات و سولفیت متصل و سپس الکتروفورز می‌شوند. لیپیدها قابل الکتروفورز شدن نیستند زیرا جریان الکتروفورز نیازمند حل‌گرهای قطبی است که لیپیدها در آنها نامحلول هستند.

دستگاه الکتروفورز شامل اجزاء زیر است؛ **مخزن** برای نگه داشتن بافر، **بافر**، **الکترودها** که از پلاتین یا کربن ساخته می‌شوند، **منبع تغذیه** و **بستر پشتیبان**.

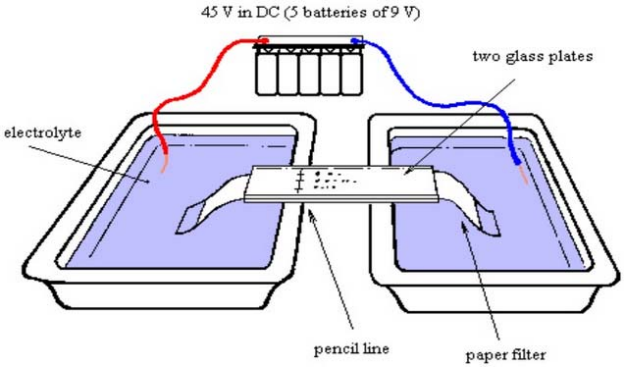


انتخاب بافر به ماهیت ماده‌ای که باید جدا شود بستگی دارد، در ضمن الکتریسیته با جریان و سرعت ثابتی اعمال می‌شود.

بستری که الکتروفورز بر آن انجام می‌گیرد یا مستقیما و یا از طریق فتیله با بافر در تماس است. از مواد زیر به عنوان بستر پشیبان برای الکتروفورز استفاده می‌شود؛ کاغذ صافی، غشاء استات سلولز، آگار یا ژل آگاروز، ژل نشاسته و ژل پلی‌آکریل‌آمید

الکتروفورز کاغذی

بستر پشتیبان یک کاغذ صافی است و معمولا برای جداسازی پروتئین‌ها، اسیدهای آمینه و الیگوپپتیدها به کار می‌رود. نوار درازی از کاغذ صافی با محلول بافر مناسب و pH دلخواه خیسانده می‌شود و نمونه به صورت عرضی در بخش مرکزی نوار قرار می‌گیرد. دو انتهای نوار در عمق محلول بافری که در دو تشتک ریخته شده‌اند و به الکترودها وصل هستند قرار می‌گیرند. میدان الکتریکی با قدرت 20 ولت بر سانتی‌متر اعمال می‌شود. ذرات باردار نمونه متناسب با بار خالص، اندازه و تعامل با ماتریکس جامد، در طول نوار به سمت الکترودهای مربوطه با بار مخالف حرکت می‌کنند. گروه‌های ذرات همگن به صورت یک باند جداگانه مهاجرت می‌کنند. الکتروفورز به مدت 18-16 ساعت انجام می‌گیرد. پروتئین‌های جدا شده با استفاده از ثابت کننده‌هایی مانند استون و متانول بر یک پشتیبان جامد ثابت می‌گردند. پروتئین‌ها رنگ می‌شوند تا قابل مشاهده گردند. پروتئین‌های جدا شده به صورت باندهای جداگانه ظاهر می‌شوند. اشکال این روش زمان طولانی آن است.



الکتروفورز غشاء استات سلولزی

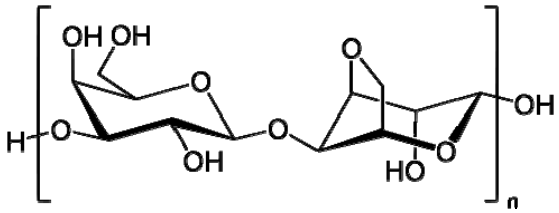
این بستر پشتیبان نسبت به بقیهٔ بسترهای جامد ترجیح داده می‌شود، زمان اتلاف کمتری دارد، جداسازی آن فوق‌العاده است، می‌توان غشاها را برای مدت طولانی نگه داشت، به طور متداول برای جداسازی لیپوپروتئین‌ها، ایزوآنزیم‌ها و انواع هموگوبین به کار می‌رود.

ژل الکتروفورز

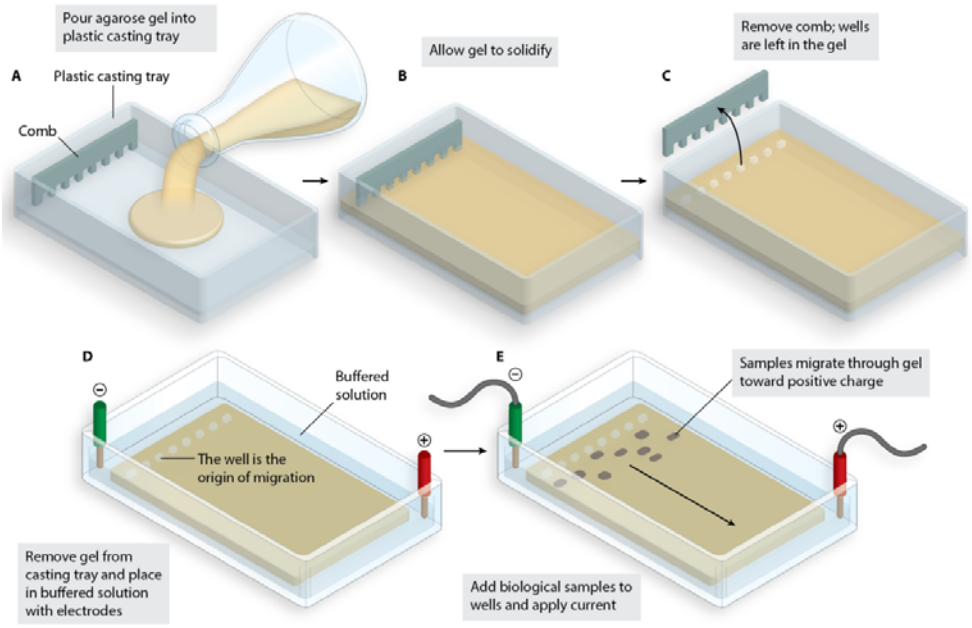
ژل به ماتریکسی گفته می‌شود که برای نگهداری و سپس جداسازی مولکول‌های هدف به کار برده می‌شود. در اکثر موارد ژل یک پلیمر درهم تنیده است که ترکیب و تخلل آن بر اساس وزن مخصوص و مولکول هدف تنظیم می‌شود. ژل از جنس پلی‌آکریل‌آمید، آگاروز یا نشاسته است.

الکتروفورز ژل آگاروز

الکتروفورز ژل آگاروز برای جداسازی انواع مختلف مخلوط‌های پروتئینی همچنین اسیدهای نوکلئیک به کار می‌روند و همانند اکثر انواع الکتروفورز به صورت افقی انجام می‌گیرد. آگاروز یک پلیمر پلی‌ساکاریدی خطی است که از تکرارهای دی‌ساکاریدِ **آرابینوز** (D-گالاکتوز و 3،6-آنهیدرو-L-گالاکتوپیرانوز) به وجود آمده است. آگاروز یکی از دو ترکیب اصلی آگار است و از تخلیص آگار به دست می‌آید. آگار یک مادهٔ ژلاتینی است که در دیوارهٔ سلولی برخی از جلبک‌ها وجود دارد و مخلوطی از آگاروز و آگاروپکتین (مجموعه‌ای از مولکول‌های کوچک) است.



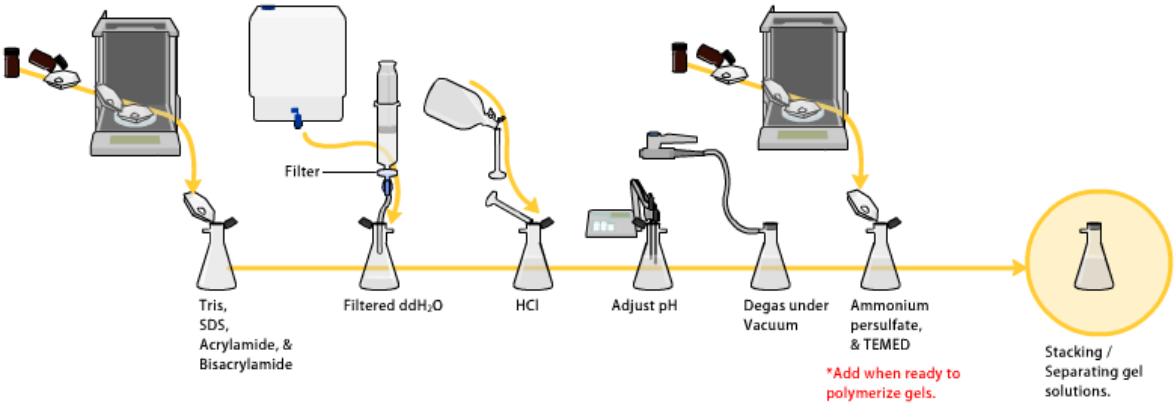
آگاروز متداول‌ترین بستری است که به کار می‌رود و به صورت پودر سفید عرضه می‌شود. متناسب با نوع ژلی که باید تهیه گردد، و به صورت درصد بیان می‌شود (مثلا آگاروز 2 درصد)، مقدار مشخصی پودر آگاروز در یک بافر مناسب مانند TAE یا TBE حل می‌گردد. سپس محلول تا دمای نزدیک به جوش (از جوشاندن اجتناب شود) حرارت داده می‌شود، و پس از کمی سرد شدن درون قالب مخصوصی ریخته می‌شود. از وسیله‌ای به اسم شانه برای ایجاد چاهک‌هایی که باید نمونهٔ مورد آزمایش درون آنها قرار گیرد استفاده می‌شود. پس از سفت شدن ژل آن را درون مخزن بافر قرار می‌دهند و سطح آن را با بافر می‌پوشانند. در ادامه نمونه‌های مورد آزمایش توسط میکروپیپت درون چاهک‌ها ریخته می‌شوند و جریان برق برقرار می‌شود. معمولا زمان الکتروفورز حدود 90 دقیقه است.



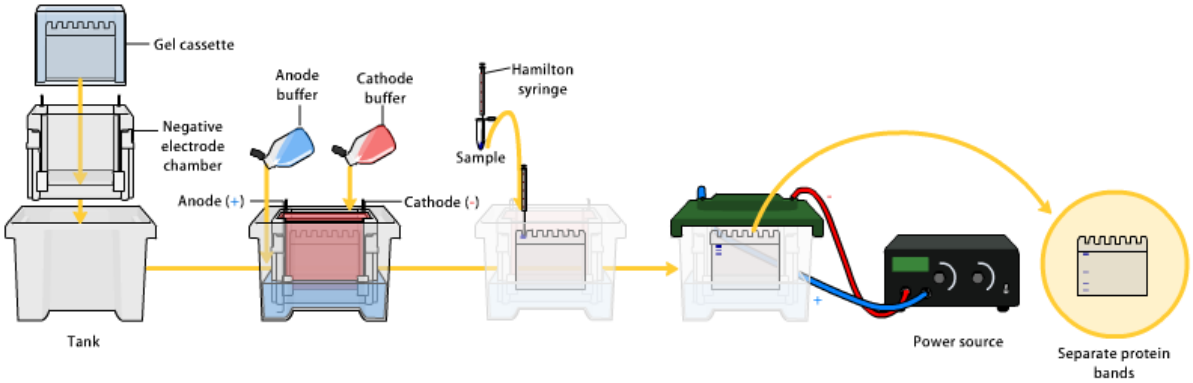
الکتروفورز ژل پلی‌آکریل‌آمید (PAGE)

از این نوع الکتروفورز برای جداسازی پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک استفاده می‌شود و برخلاف انواع دیگر الکتروفورز به صورت عمودی انجام می‌گیرد. مانند اکثر انواع ژل الکتروفورز، مولکول مورد بررسی پیکربندی بومی خود را حفظ می‌کند و یا یک واسرشت‌گر شیمیایی به ژل اضافه می‌شود تا آن را به حالت خطی بی‌شکل درآورد. برای اسیدهای نوکلئیک از اوره و برای پروتئین‌های از سدیم دودسیل سولفات (SDS) به عنوان عوامل واسرشت‌گر استفاده می‌شود. بر این اساس دو نوع PAGE وجود دارد؛ بومی و واسرشتی. در نوع بومی، جداسازی بر اساس بار، اندازه و شکل ماکرومولکول‌ها است و در نوع واسرشتی بر اساس طول و نسبت جرم به بار.

ژل پلی‌آکریل‌آمید معمولا از آکریل‌آمید، بیس‌آکریل‌آمید، مادهٔ واسرشت‌گر (در صورت نیاز) و یک بافر با pH تنظیم شده تهیه می‌شود. برای شروع پلیمریزاسیون رادیکال‌های آزاد و یک پایدار کننده مانند آمونیوم پِرسولفات به محلول اضافه می‌شود. بیس‌آکریل‌آمید با ایجاد پیوندهای متقاطع بین مولکول‌های پلی‌آکریل‌آمید ساختار آن را متخلخل می‌کند. بسته به اهداف مورد نظر، نسبت بیس‌آکریل-آمید به آکریل‌آمید (معمولا 1 به 35) و غلظت آکریل‌آمید (5 تا 25 درصد) تفاوت دارند. در ضمن هنگام پلیمریزاسیون ژل باید از ایجاد حباب‌های هوا جلوگیری کرد که برای این کار ژل را با خلاء گاززدایی می‌کنند.

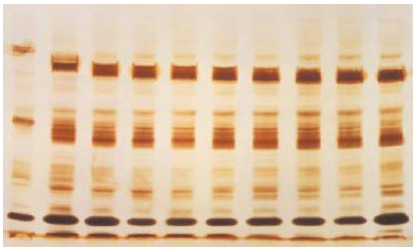


پس از آماده شدن ژل آن را در یک قالب میان دو شیشه می‌ریزند و یک شانه در بالای قالب قرار می‌گیرد تا چاهک‌ها را به وجود آورد. سپس کاست ژل درون مخزن بافر قرار می‌گیرد. بافرهای مختلفی برای PAGE استفاده می‌شوند و بافرهای آند و کاتد می‌توانند یکسان و یا متفاوت باشند. نمونه‌ها توسط میکروپیپت درون چاهک‌ها ریخته می‌شوند و در نهایت میدان الکتریکی اعمال می‌گردد.



آنچه که در انتهای یک ژل الکتروفورز به دست می‌آید، ژلی است که در آن نمونه‌های مورد بررسی (پروتئین یا اسیدهای نوکلئیک) از هم جدا شده‌اند و به صورت باندهایی در طول ژل قرار گرفته‌اند که قابل مشاهده نیستند. برای مشاهدهٔ این باندها از رنگ‌های مختلف استفاده می‌شود. به عنوان مثال در الکتروفورز ژل آگاروز برای مشاهدهٔ اسیدهای نوکلئیک از ترکیب سمی و سرطان‌زای اتیدیوم بروماید استفاده می‌شود که وارد شیار بزرگ DNA شده و زیر نور UV می‌درخشد. و یا در الکتروفورز ژل پلی‌آکریل‌آمید می‌توان پروتئین‌ها را با نقره رنگ‌آمیزی استفاده کرد.

ژل آگاروز با رنگ‌آمیزی اتیدیوم بروماید

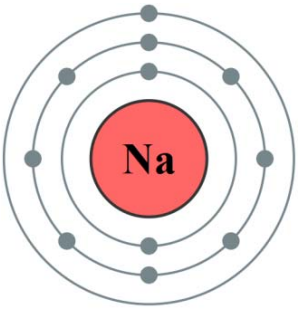


ژل پلی‌آکریل‌آمید با رنگ‌آمیزی نقره

نورسنجی شعله (فلیم فتومتری)

نورسنجی فوتوالکتریک شعله (فوتوالکتریک فلیم فوتومتری) شاخه‌ای از طیف‌بینی (اسپکتروسکوپی) اتمی است که در شیمی تجزیهٔ معدنی برای تعیین غلظت برخی از یون‌های فلزی مانند سدیم، پتاسیم، لیتیوم، کلسیم، سزیوم و ... به کار می‌رود. این فناوری بر این اساس ابداع شده است که اشعهٔ ساتع شده از شعله به ویژگی عنصر موجود در آن بستگی دارد.

الکترون‌های اتم‌ها در کره‌های هم‌مرکزی به نام **لایه‌های انرژی** ساکن هستند و در آن دور هستهٔ اتم می‌چرخند.



هر لایه یک عدد کوانتومی دارد که با n نشان داده می‌شود. مقدار n همیشه یک عدد صحیح است، 1، 2، 3، .... عدد کوانتومیِ نزدیک‌ترین لایه به هسته 1 است. هرچه عدد کوچک‌تر باشد، انرژی الکترون کمتر و الکترون به هسته نزدیک‌تر است. به حالتی که یک سامانه (در اینجا اتم) کمترین انرژی را داشته باشد **حالت پایه** می‌گویند. تمامی الکترون‌ها با حداقل انرژی در لایه‌ها قرار گرفته‌اند. در صورتی که به اتمی انرژی اعمال شود، یک الکترون از حالت پایهٔ خود به لایهٔ انرژی بالاتر یا **حالت برانگیخته** می‌رود. حالت برانگیخته عدد n بیشتر و در نتیجه انرژی بالاتری دارد و کمتر پایدار است. افزودن انرژی الکترون‌های ماده را از حالت پایه به حالت برانگیخته می‌برد. با بازگشت از حالت برانگیخته به حالت پایه، الکترون‌ها انرژی را که جذب کرده بودند به شکل اشعهٔ الکترومغناطیس (گرما، نور و غیره) ساتع می‌کنند.

در نورسنجی شعله گونه‌های (یون‌های فلزی) مورد استفاده در طیف به شکل اتم هستند. اساس طیف‌سنجی شعله این است که گونه‌های فلزات قلیایی (گروه 1) و فلزات قلیایی خاکی (گروه 2) به دلیل انرژی حرارتیِ ناشی از شعله به سطح انرژی بالاتری می‌روند که در آن پایدار نیستند. می‌توان با استفاده از فناوری‌های جذب مستقیم، جذب نور ناشی از تحریک الکترون‌ها را اندازه‌گیری کرد. در ادامه، کاهش انرژی اتم‌های تحریک شده را به وضعیت کم‌انرژی بازمی‌گرداند و کمی اشعه منتشر می‌کند که می‌توان آن را در بخش مرئی طیف مشاهده کرد. طول موج نور منتشر شده برای هر عنصر خاص است.

قطعات یک نورسنج شعله

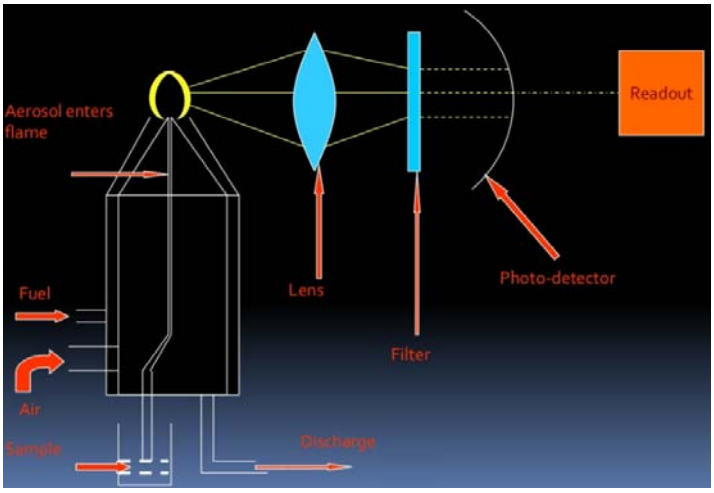
1. منبع شعله: چراغی است که شعله را تولید می‌کند و می‌توان آن را در یک شکل ثابت و در دمای ثابت نگه داشت. نورسنجی شعله از انواعی از سوخت‌ها مانند گاز و اکسیدگرهایی مانند هوا، اکسیژن یا اکسید نیترو (N_2O) استفاده می‌کند. دمای شعله به نسبت سوخت به اکسیدگر بستگی دارد.

2. مه‌ساز (نِبولایزر) و محفظهٔ اختلاط: به انتقال محلولِ همگن ماده به شعله با یک نرخ ثابت کمک می‌کند.

3. سامانهٔ نوری (صافی نوری): سامانهٔ نوری شامل سه قطعه است: آینهٔ محدب، عدسی و صافی. آینهٔ محدب به انتقال نور منتشر شده از اتم‌ها و تمرکز تابش‌ها بر عدسی کمک می‌کند. عدسی محدب نور را بر نقطه‌ای به نام شکاف متمرکز می‌نماید. بازتاب‌های آینه از شکاف عبور می‌کنند و به صافی‌ها می‌رسند. به این ترتیب می‌توان طول موجی را که باید اندازه‌گیری شود از سایر تابش‌های خارجی جدا می‌کرد.

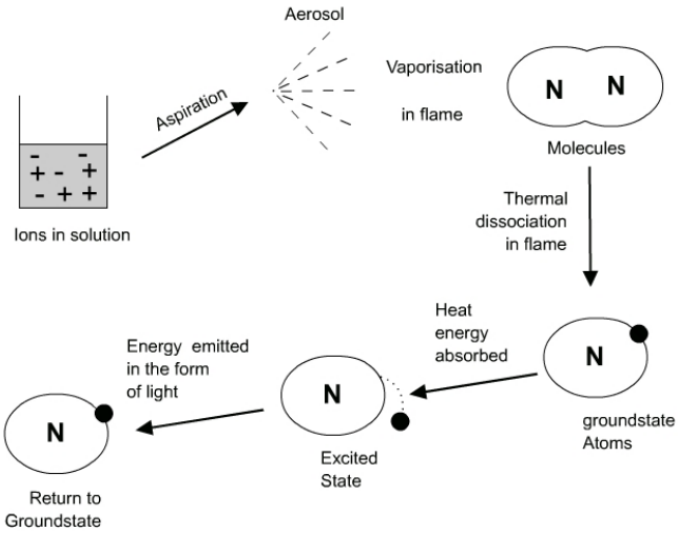
4. نوریاب: این قطعه نور منتشر شده را شناسایی و شدت اشعهٔ تابیده شده از شعله را اندازه‌گیری می‌کند. علائم الکتریکی تولید شده با شدت نور رابطهٔ مستقیم دارند.

الگویی از قطعات تشکیل دهندهٔ یک نورسنج شعله در شکل زیر دیده می‌شود.



روش کار

عملکرد یک نورسنج شعله شامل مراحل مختلفی است؛ ابتدا محلولِ ترکیب مورد آزمایش به درون اجاق مکیده می‌شود و پس از آن به صورت ذرات ریز به شعله افشانده می‌شود. شعله ذرات فلز را دهیدارته و حل‌گر را بخار می‌کند و یون‌های گازی تولید می‌کند. یون‌های فلزی توسط حرارت به اتم‌های فلزی احیاء می‌شوند. نیروی الکترواستاتیک جاذبه بین الکترون‌ها و هستهٔ اتم باعث جذب مقدار مشخصی انرژی می‌شود. سپس اتم‌ها برانگیخته شده و به حالت بالاتری از انرژی می‌جهند. با توجه به اینکه حالت بالای انرژی ناپایدار است، اتم‌ها به حالت کم انرژی بازمی‌گردند و در این زمان اشعهٔ عنصر مشخص را منتشر می‌کنند. شدت نور منتشر شده با غلظت عنصر ارتباط دارد.



مقایسهٔ شدت نورهای نمونه‌های نامعلوم با شدت نور محلول‌های استاندارد (رسم منحنی کالیبراسیون) به بررسی کمی فلز مورد نظر در محلول نمونه کمک می‌کند.

طول موج و رنگ خاص تابش‌های فلزات قلیایی و قلیایی خاکی در جدول زیر نشان داده شده است.

نام عنصر	طول موج ساتع شده (نانومتر)	رنگ شعله
پتاسیم (K)	766	بنفش
لیتیوم (Li)	670	قرمز
کلسیم (Ca)	622	نارنجی
سدیم (Na)	589	زرد
باریم (Ba)	554	سبز لیمویی