इंदिरा गांधी
राष्ट्रीय मुक्त विश्वविद्यालय
विज्ञान विद्यापीठ

BCHEL-150
जैव अणु: प्रयोगशाला

विषय सूची

प्रयोग 1

कागज वर्णलेखिकी द्वारा ऐमीनो अम्लों के मिश्रण का पृथक्करण 7

प्रयोग 2

फॉर्मिलीकरण विधि से ग्लाइसिन के विलयन की सांद्रता का आकलन 22

प्रयोग 3

pHमिति द्वारा ग्लाइसिन के pK_a का निर्धारण 27

प्रयोग 4

स्टार्च पर लार ऐमिलेस की क्रिया और स्टार्च पर लार ऐमिलेस की क्रिया पर ताप का प्रभाव 38

प्रयोग 5

तेल अथवा वसा के साबुनीकरण के मान का निर्धारण 45

प्रयोग 6

तेल अथवा वसा के आयोडीन मान का निर्धारण 49

प्रयोग 7

अपचायक और अनअपचायक शर्कराओं के बीच अंतर 54

प्रयोग 8

ऐस्पिरिन का संश्लेषण और **TLC** द्वारा एक ऐस्पिरिन की गोली के साथ इसकी तुलना 62

प्रयोग 9

DNA का निष्कर्षण 73

कार्यक्रम अभिकल्प समिति

प्रो. के. के. अरोड़ा
रसायन विज्ञान विभाग
ज़ाकिर हुसैन कॉलेज, दिल्ली विश्वविद्यालय, दिल्ली

डॉ सुनीता जोशी (सेवानिवृत्त)
जैव रसायन विभाग,
दौलत राम कॉलेज, दिल्ली विश्वविद्यालय, दिल्ली

डॉ भूपिंदर मेहता
रसायन विज्ञान विभाग
स्वामी श्रद्धानंद कॉलेज, दिल्ली विश्वविद्यालय, दिल्ली

विज्ञान विद्यापीठ
इग्नू, नई दिल्ली 110068

प्रो. एम नाथावत
प्रो. सुनीता मल्होत्रा
प्रो. भारत इंद्र फौजदार
प्रो. जावेद ए फारूकी
प्रो. संजीव कुमार
प्रो. ललिता एस कुमार
प्रो. कमलिका बनर्जी

खंड निर्माण दल

प्रो. भारत इंद्र फौजदार
विज्ञान विद्यापीठ, इग्नू

प्रो. ललिता एस कुमार
विज्ञान विद्यापीठ, इग्नू

प्रो. जावेद ए फारूकी
विज्ञान विद्यापीठ, इग्नू

पाठ्यक्रम समन्वयक: प्रो. ललिता एस कुमार

अनुवाद

प्रो. भारत इंद्र फौजदार
विज्ञान विद्यापीठ, इग्नू

प्रो. ललिता एस कुमार
विज्ञान विद्यापीठ, इग्नू

सामग्री निर्माण दल

श्री राजीव गिरधर
सहायक कुल सचिव (प्रकाशन)

श्री हेमन्त कुमार परीदा
अनुभाग अधिकारी (प्रकाशन)

आभार::

- श्री सरबजीत सिंह–सी.आर.सी निर्माण हेतु, श्री दीपक कुमार–टंकण कार्य हेतु और, और श्री मुकेश कुमार चित्र निर्माण हेतु
- CHE-12(L) पाठ्यक्रम की कुछ पठन सामग्री के उपयोग के लिए।

मार्च 2022

@ *इंदिरा गांधी राष्ट्रीय मुक्त विश्वविद्यालय, 2020*

ISBN: .....

सर्वाधिकार सुरक्षित। इंदिरा गांधी राष्ट्रीय मुक्त विश्वविद्यालय की लिखित अनुमति के बिना इस पुस्तक के किसी भी अंश को मिमियोग्राफ अथवा किसी अन्य साधन द्वारा पुनः प्रस्तुत करने की अनुमति नहीं है।

इंदिरा गांधी राष्ट्रीय मुक्त विश्वविद्यालय के पाठ्यक्रमों के विषय में अधिक जानकारी विश्वविद्यालय के मैदान गढ़ी, नई दिल्ली स्थित कार्यालय और इग्नू वेब साइट www.ignou.ac.in से प्राप्त की जा सकती है।

इंदिरा गांधी राष्ट्रीय मुक्त विश्वविद्यालय की ओर से कुल सचिव, सामग्री निर्माण एवं वितरण विभाग द्वारा मुद्रित एवं प्रकाशित।

जैव अणु (BCHEL-150)

आपने अपने मूल रसायन विज्ञान पाठ्यक्रमों मे कई प्रयोग किए हैं तथा सम्मिलित तकनीकों से अपने आपको परिचित किया है। आप जानते हैं कि वह पाठ्यक्रम संबंधित सिद्धांत पाठ्यक्रमों से एकीकृत हैं। हम विश्वास है कि प्रयोगशाला कार्य किसी विशिष्ट विषय के विभिन्न पहलुओं के सत्यापन के साथ–साथ प्रयोगशाला कार्य कई तरीकों से लाभकारी रहा होगा। कुछ प्रयोगों को करके इस प्रयोगशालाओं पाठ्यक्रम को संबंधित सिद्धांत पाठ्यक्रम अर्थात् BCHET-149 में दिए गए तथ्यों और संकल्पनाओं को समझने के लिए इस्तेमाल की गई तकनीकों का उपयोग करेंगे जिसमें पारंपरिक और यंत्रीय दोनों तकनीकें सम्मिलित हैं। आप जानते हैं कि सिद्धांत पाठ्यक्रम में मुख्य जैव अणुओं की प्रकृति, संरचना प्रकार्य, वर्गीकरण तथा गुण के विषय में बताया गया था जिसमें कार्बोहाइड्रेट, प्रोटीन, लिपिड, एन्जाइम तथा न्यूक्लीक अम्ल सम्मिलित थे। यद्यपि इस प्रयोगशाला पाठ्यक्रम में हमने केवल जैव अणुओं के गुणात्मक और मात्रात्मक विश्लेषण की ही चर्चा की है।

जैव अणु प्रयोगशाला पाठ्यक्रम् BCHEL-150 में कुल **10 प्रयोग** है। पहले 3 प्रयोग ऐमीनो अम्लों के गुणों पर आधारित हैं। ऐमीनो अम्ल महत्वपूर्ण जैव अणु प्रोटीनों के निर्माण खंड होते हैं। ये प्रयोग ऐमीनो अम्लों के पृथक्करण, सांद्रता तथा pK_a मानों के निर्धारण से संबंधित है। यहाँ वर्णलेखिकी, अनुमापनमिति और pHमिति के बारे में बताया गया है। pHमिति ऐमीनो के pK_a तथा समविभव बिन्दु के निर्धारण की यंत्रीय विधि होती है।

अगले दो प्रयोग एंजाइम के उत्प्रेरी गुण और स्टार्च (एक पॉलीसैकेराइड) के संरचनात्मक गुण पर आधारित है। आप स्टार्च पर ऐमाइलेस की क्रिया और उत्प्रेरी अभिक्रिया पर तापमान का प्रभाव देख सकेंगे।

आप तेलों एवं वसाओं की संरचनाओं से परिचित होंगे। इनकी संतृप्त अथवा असंतृप्त प्रकृति होती है। असंतृप्त में दो या अधिक द्विआबंध हो सकते हैं जिनको रासायनिक अभिक्रियाओं की सहायता से देखा जा सकता है। दो प्रयोग तेलों तथा वसाओं के साबुनीकरण संख्या तथा आयोडीन मान के निर्धारण को समर्पित हैं।

आपने सिद्धांत पाठ्यक्रम BCHET-149 की इकाई 2 में अपचयनकारी शर्कराओं के बीच अंतर के विषय में पढ़ा होगा। जैसा कि उनकी कुछ अभिक्रियाओं से प्रदर्शित होता है, इस पाठ्यक्रम में आप दो प्रकारों के व्यवहारों में अंतर को देखने के लिए एक प्रयोग करेंगे। कुछ अभिकर्मकों का उपयोग करके आप परीक्षण करेंगे और वर्ण परिवर्तन देखेंगे।

आप औषधों और दवाओं के महत्व के अच्छी प्रकार जानते हैं और सिद्धांत पाठ्यक्रम की इकाई 9 में मानव प्रणाली में औषधों की क्रिया का अध्ययन किया है। इसलिए, एक प्रयोग इस वर्ग से संबंधित कार्बनिक अणुओं पर आधारित है। आप एक सामान्य औषध का संश्लेषण कर सकेंगे और पतली परत वर्णलेखी तकनीक का उपयोग करके इसकी तुलना बाजार में उपलब्ध औषध से इसकी तुलना कर सकेंगे।

आपने DNA की संरचना और जीवों की आनुवंशिकता में इसके महत्व का अध्ययन किया है। यहाँ एक प्रयोग में आप प्याज़ से DNA का पृथक्करण कर सकेंगे। यह प्रयोग अन्य की अपेक्षा उच्च श्रेणी का प्रयोग है जो एक अत्यंत सरल रूप से एक महत्वपूर्ण अणु, जिसे जीन कहते हैं, के बारे में जानकारी देता है।

उद्देश्य

इस प्रयोगशाला पाठ्यक्रम में दिए गए प्रयोगों को पढ़ने और करने के बाद आपः

- कागज वर्णलेखिकी के नियम की व्याख्या कर सकेंगे और कागज वर्णलेखिकी द्वारा ऐमीनो अम्लों को पृथक्कृत कर सकेंगे,
- अनुमापनमिति के नियम की व्याख्या कर सकेंगे तथा फॉर्मिलीकरण विधि द्वारा ग्लाइसिन की सांद्रता का निर्धारण कर सकेंगे,
- ऐमीनो अम्लों में अनुमापन वक्रों के नियम की व्याख्या कर सकेंगे और pHमिति का उपयोग करके ग्लाइसिन के pK_a तथा pI का निर्धारण कर सकेंगे,
- ऐमाइलेस तथा स्टार्च के बीच अभिक्रिया का वर्णन कर सकेंगे तथा अभिक्रिया के कारण होने वाले परिवर्तनों को दर्शान के लिए प्रयोग कर सकेंगे,
- ऐमाइलेस की स्टार्च पर क्रिया और तापमान के प्रभाव का निर्वचन कर सकेंगे,
- तेलों और वसाओं के साबुनीकरण और आयोडीन मान को परिभाषित कर सकेंगे और दिए गए नमूने में मानों का परिकलन कर सकेंगे,
- अपचायक और अनअपचायक शर्कराओं के बीच अंतर कर सकेंगे और इसकी पुष्टि करते हुए परीक्षण कर सकेंगे,
- ऐसीटिलिकरण अभिक्रिया की व्याख्या कर सकेंगे, इस अभिक्रिया का उपयोग करके ऐस्पिरिन बना सकेंगे तथा पतली परत वर्णलेखिकी का उपयोग करके एक व्यवसायिक दवा से उत्पाद की तुलना कर सकेंगे और
- वर्णित कार्यविधि द्वारा प्याज से DNA का निष्कर्षण कर सकेंगे।

प्रयोग करने के लिए दिशा–निर्देश

इस प्रयोगशाला पाठ्यक्रम में "जैव अणु" पर BCHET-149 पाठ्यक्रम में दी गई संकल्पनाओं पर आधारित प्रयोगों को सम्मिलित किया गया है। यह वांछनीय है कि आप सिद्धांत पाठ्यक्रम को एक बार पढ लें। यद्यपि जहां कहीं आवश्यक है जरूरी समझ के लिए, उपयुक्त संकल्पनाओं को यथोचित रूप से दोहराया गया है। इस प्रकार, अन्य प्रयोगशाला पाठ्यक्रमों के समान यह पाठ्यक्रम भी एकल पाठ्यक्रम है। यह पाठ्यक्रम 2 क्रेडिट का है जो IGNOU के मानकों के आधार पर 60 घंटे के प्रयोगशाला कार्य के बराबर है। इसमें दिए गए विषय को पढ़ना, प्रयोगों को करना, साथी विद्यार्थियों और परामर्शदाता के साथ अन्योन्यक्रिया में हिस्सा लेना, प्रयोगशाला पुस्तिका बनना, इत्यादि सम्मिलित हैं। यह प्रयोगात्मक कार्य आपको उन अध्ययन केद्रों पर करना होगा जो इस कार्य के लिए आपको नियत किए गए हैं।

प्रयोगशाला की अवधि 7 दिन की होगी, प्रत्येक दिन में 4 घंटे प्रत्येक सत्र के हिसाब से 2 सत्र होंगे। इस प्रकार कुल, मिलाकर 14 सत्र हैं। पहला सत्र परिचय के लिए होता है जहां आपके परामर्शदाता आपको प्रयोगशाला कार्य में अपनाए जाने वाले संपूर्ण प्रयोगात्मक कार्य तथा कोई उपयोग निर्देश का एक अवलोकन कराएंगे। आखिर के दो सत्र सत्रांत मूल्यांकन के लिए होते हैं। शेष सत्रों में आप अपने परामर्शदाता की सहायता से खंड में विस्तार से दिए हुए प्रयोगों को करेंगे। इन प्रयोगों को **निर्देशित प्रयोग** (guided experiments) कहते हैं तथा सतत् आधार पर मूल्यांकित होते हैं। इन प्रयोगों के 70%

अंक लिए जाते हैं। आपको एक प्रयोगशाला पुस्तिका लेने की आवश्यकता होगी जिसमें आप किए गए प्रयोगों को लिखेंगे और नियम से अपने परामर्शदाता से उनकी जांच करवाते रहेंगे। अंतिम दिन आपको परामर्शदाता द्वारा दिया गया एक प्रयोग करना होगा जिसके 30% अंक लिए जाते हैं। इन्हें **"अनिर्देशित प्रयोग"** (unguided experiments) कहते हैं। मूल्यांकन के इन दोनों घटकों में आपको उत्तीर्ण होने के लिए कम से कम 35% प्राप्त करना आवश्यक है।

हम आशा करते हैं कि आपको पाठयक्रम का विषय और अपना प्रयोगशाला अनुभव उत्साहवर्धक और उपयोगी लगेगा। यदि आपको किसी संकल्पना को समझने में कठिनाई होती है, तो आप परामर्श सत्र में इसे स्पष्ट कर सकते हैं या बेझिझक अपने प्रश्न हमें यहां मेल कर सकते हैं:

lalitaskumar@ignou.ac.in / bifozdar@ignou.ac.in / jafarooqi@ignou.ac.in

शुभकामनाओं के साथ!

ignou
THE PEOPLE'S
UNIVERSITY

आवश्यक सूचना

- प्रयोगशाला पाठ्यक्रम में विद्यार्थी की उपस्थिति अनिवार्य है। प्रयोगशाला कार्य आम तौर पर आपके चुने हुए अध्ययन केन्द्र पर आयोजित किया जाता है।
- दो क्रेडिट के पाठ्यक्रमों को 6/7 दिनों (60 घण्टों) की अवधि में पूरा करना होगाः
  - गाइडेड प्रयोगशाला कार्य के लिए 5/6 दिन
  - अनगाइडेड प्रयोगशाला कार्य के लिए 1 दिन।
- प्रयोगशाला पाठ्यक्रम को सफलतापूर्वक करने के लिए आपको दोनों प्रकार के प्रयोगशाला कार्यों यानि कि गाइडेड और अनगाइडेड घटकों में कम से कम **35 %** अंक प्राप्त करने होंगे।

ignou
THE PEOPLE'S
UNIVERSITY

प्रयोग 1

कागज वर्णलेखिकी द्वारा ऐमीनो अम्लों के मिश्रण का पृथक्करण

प्रयोग की रूपरेखा

1.1 प्रस्तावना
उद्देश्य
1.2 वर्णलेखिकी की उत्पत्ति
1.3 वर्णलेखिकी की शब्दावली
1.4 मिश्रण में ऐमीनो अम्लों का पृथक्करण ओर उनका अभिनिर्धारण
कागज वर्णलेखिकी का सिद्धांत
पृथक्करण की क्रियाविधि
आवश्यकताएं
कार्य विधि
प्रेक्षण और परिकलन
परिणाम और विवेचना
1.5 उत्तर

1.1 प्रस्तावना

रसायन विज्ञान में अक्सर जटिल मिश्रणों के घटकों का पृथक्करण, वियोजन, शोधन अथवा अभिनिर्धारण करना आवश्यक होता है। जिन मिश्रण में घटकों के रासायनिक और भौतिक गुण धर्मों में बहुत भिन्नता होती है तथा घटकों की संख्या कम होती है ऐसी स्थिति में साधारण पृथक्करण तकनीकें जैसे कि आसवन (distillation), क्रिस्टलन (crystalisation), निष्कर्षण (extraction) काफी उपयोगी साबित होती है। उदाहरण के लिए, शुद्ध बेन्ज़ीनकार्बोसिलिक अम्ल (बेन्ज़ाइक अम्ल) को अधिक वाष्पशील डाइएथिल ईथर से पृथक करने के लिए आसवन विधि उपयुक्त रहती है। इन दो पदार्थों की रासायनिक संरचनाओं और अंतराअणुक बलों में भिन्नता होती है और इसलिए उनके क्वथनांकों में पर्याप्त भिन्नता होती है जिससे पृथक्करण की इस तकनीक का उपयोग किया जा सकता है। किन्तु जहां मिश्रण के घटकों की संरचना में बहुत समानता होती है वहां साधारण पृथक्करण विधियां उपयोगी नहीं होती। उदाहरण के लिए ऐमीनों अम्ल रासायनिक और भौतिक दृष्टि से समरूप होते हैं। अतः ऊपर वर्णित किसी भी तकनीक द्वारा ऐसे मिश्रणों के घटकों को पृथक नहीं किया जा सकता।

उसी प्रकार से जब हम प्रयोगशाला में अभिक्रिया करते हैं, अधिकतर हमें एकल उत्पाद प्राप्त नहीं होता है, जबकि संरचनात्मक समरूप उत्पाद प्राप्त होते हैं। अतः इस प्रकार की तकनीक की आवश्यकता है जिससे कि संरचनात्मक अतिसंबंधित घटकों को मिश्रण से पृथक कर सकें। इस प्रकार के जटिल पृथक्करण के लिए एक तकनीक उपलब्ध है जिसे वर्णलेखिकी तकनीक (chromatographic technique) कहते हैं। इस प्रयोग में और अगले प्रयोग में आप इस तकनीक के बारे में विस्तार से पढ़ेंगे। आप कागज वर्णलेखिकी जो कि सबसे सरलतम तकनीक है का उपयोग करके इस प्रयोग करेंगे।

उद्देश्य

इस प्रयोग को करने के बाद आप :

- वर्णलेखिकी, स्तम्भ प्रावस्था, गतिशील प्रावस्था आदि शब्दों के अर्थ बता सकेंगे;
- वर्णलेखिकी के संदर्भ में विभाजन (partition) की क्रियाविधि की व्याख्या कर सकेंगे;
- R_f मान परिकलित कर सकेंगे;
- कागज वर्णलेखिकी के लिए प्रायोगिक व्यवस्था तैयार कर सकेंगे; और
- कागज वर्णलेखिकी द्वारा आप दो ऐमीनों अम्लों वाले मिश्रण से ऐमीनों अम्लों को पृथक और अभिनिर्धारित कर सकेंगे।

वर्णलेखिकी शब्द का प्रयोग उस प्रक्रम के लिए किया जाता है जिसमें किसी नमूने का स्थिर प्रावस्था और गतिशील प्रावस्था में वितरण होता है।

ए.जे.पी. मार्टिन और आर.एल. एम. सिन्गे को सन् 1952 में, संयुक्त रूप में, उनके विभाजन वर्णलेखिकी के कार्य के लिए नोबेल पुरस्कार प्रदान किया गया।

1.2 वर्णलेखिकी की उत्पत्ति

वर्णलेखिकी (क्रोमैटोग्राफी) की उत्पत्ति यूनानी शब्द (क्रोमा–रंग, ग्राफ–लेखन) से हुई है। वर्णलेखिकी तकनीक को सर्वप्रथम रंगीन वर्णकों और रंजकों को पृथक करने के लिए प्रयुक्त किया गया था जैसा कि रूसी रसायनज्ञ स्वेट के पुरोगामी कार्य से स्पष्ट है। स्वेट ने सन् 1906 में पत्तियों से प्राप्त वर्णकों को रंगीन पट्टियों में पृथक किया। इसके लिए उन्होंने वर्णकों के विलयन को चूर्णित खडिया से भरी कांच की नली (स्तंभ) में प्रवाहित किया। स्वेट द्वारा किया गया वर्णकों का पृथक्करण उनके रंगों के कारण नहीं बल्कि विभिन्न वर्णकों की खड़िया के साथ संलग्न होने की भिन्न–भिन्न क्षमताओं के कारण होता है जिसे **अधिशोषण (adsorption)** कहते हैं। सर्वाधिक अधिशोषित वर्णक, स्तंभ में शीर्ष पर रहता है और सबसे कम अधिशोषित वर्णक स्तंभ में सबसे निचली पट्टी बनाता है।

जटिल मिश्रणों में घटकों को भली–भांति पृथक करने के लिए सन् 1941 में मार्टिन और सिन्गे ने अवशोषी के द्रव–संसिक्त स्तंभों का उपयोग किया। इसमें पृथक्करण की क्रियाविधि, विभाजन (partition) अथवा वितरण (distribution) परिघटना थी जिसमें मिश्रण का प्रत्येक घटक शामिल था। पृथक्ककरण की इन क्रियाविधियों की विस्तृत चर्चा इस प्रयोग में करेंगे।

स्तंभ वर्णलेखिकी के अतितिरक्त वर्णलेखिकी शीर्षक के अंतर्गत अनेक अन्य प्रायोगिक तकनीकें आती हैं जो इस प्रकार हैं:

1) कागज वर्णलेखिकी

2) पतली परत वर्णलेखिकी (Thin layer chromatography, टी.एल.सी.)

3) स्तम्भ वर्णलेखिकी (coloumn chromatography)

4) गैस वर्णलेखिकी (Gas chromatography, जी. सी.)

5) गैस–द्रव वर्णलेखिकी (Gas-Liquid chromatography, जी.एल.सी.)

6) उच्च वियोजन गैस वर्णलेखिकी (High performance gas chromatography, एच.पी.जी.सी.)

7) उच्च निष्पादन द्रव वर्णलेखिकी (High performance liquid chromatography, एच.पी.एल.सी.)

अंतिम चार विधियों द्वारा उत्तम पृथक्करण अथवा विभेदन किया जा सकता है और उनके लिए उत्कृष्ट और कीमती उपकरणों की आवश्यकता होती है। वर्णलेखिकी का उपयोग किसी मिश्रण के घटकों (सामान्यतया कार्बनिक किन्तु केवल कार्बनिक ही नहीं) को पृथक करने के लिए किया जाता है। पत्तियों में हरे रंग के पदार्थ को उसके घटकों अर्थात् क्लोरोफिल और जैन्थोफिल (पीला वर्णक) में पृथक किया जा सकता है। वर्णलेखिकी का उपयोग मिश्रण के घटकों को पृथक करने, शुद्ध करने अथवा पहचान करने के लिए किया जाता है। इसके लिए कागज वर्णलेखिकी जैसी सरल तकनीक से लेकर एच.पी.एल.सी. और गैस वर्णलेखिकी के समान जटिल तकनीकों, जिनका अनुप्रयोग अनुसंधान प्रयोगशालाओं और उद्योगों में होता है, का प्रयोग किया जा सकता है।

यहां हम सरल प्रयोगशाला वर्णलेखी, कागज वर्णलेखिकी विधि का वर्णन करेंगे जो अपेक्षाकृत सबसे सरल सस्ती होती है। अपितु सबका मूल सिद्धांत समान है और उनके सही उपयोग से उत्तम पृथक्करण प्राप्त किया जा सकता है। इस प्रयोग सत्र में, आप कागज वर्णलेखिकी पर आधारित दो प्रयोग भी करेंगे। आइए अब इन तकनीकों की भाषा का अध्ययन करें, किन्तु उससे पहले आप निम्नलिखित बोध प्रश्न का उत्तर दीजिए।

बोध प्रश्न 1

स्तंभ वर्णलेखिकी किस मिश्रण के घटकों को पृथक करने के लिए निम्नलिखित अभिलक्षणों में से कौन–सा अभिलक्षण उपस्थित होना चाहिए? सही उत्तर पर (√) का निशान लगाइए।

i) मिश्रण रंगीन होना चाहिए। ☐

ii) मिश्रण वाष्पशील होना चाहिए। ☐

iii) घटकों की समान रासायनिक संरचना होनी चाहिए। ☐

iv) स्तंभ में घटकों का विभेदी अधिशोषण होना चाहिए। ☐

1.3 वर्णलेखिकी की शब्दावली

वर्णलेखिकी में अनेक शब्दों का बहुधा उपयोग होता है जो वर्णलेखन तकनीकों की भाषा का निर्माण करते हैं। ऐस शब्दों की व्याख्या नीचे की गई है।

(i) वर्णलेखिकी

वर्णलेखिकी शब्द की ऐतिहासिक उत्पति की चर्चा पहले की जा चुकी है। सभी प्रकार की वर्णलेखिकी के कुछ मूल लक्षण होते हैं। यद्यपि उपकरण के डिजाइन से यह स्पष्ट नहीं होता है। सभी में प्रयुक्त मूल विधि इस प्रकार होती है :

जिस मिश्रण को पृथक करना हो उसे गतिमान 'विलायक' में मिलाया जाता है। यह विलायक, द्रव अथवा गैस हो सकता है। इस गतिमान धारा को, जिसमें घटक होते हैं, स्थिर माध्यम के ऊपर से प्रवाहित किया जाता है। यह स्थिर माध्यम, मूल मिश्रण में घटकों को पृथक करने के लिए विशेष रूप से बनाया जाता है। अपितु अनेक रूपांतर होने के कारण, कई बार विभिन्न वर्णलेखन विधियों के बीच संबंध ज्ञात करना कठिन होता है।

(ii) गतिशील प्रावस्था और स्थिर प्रावस्था

वर्णलेखी तकनीक में चलायमान घटक को **गतिशील प्रावस्था** (mobile phase) कहते हैं। गतिशील प्रावस्था कोई द्रव अथवा द्रवों का मिश्रण होता है। किन्तु गैस वर्णलेखिकी में यह कोई गैस होती है। स्थिर माध्यम को **स्थिर प्रावस्था** (stationary phase) कहते हैं। यदि किसी प्रतिदर्श, जिसे विलेय (solutes) कहते हैं और जो अनेक घटकों का मिश्रण होता है, को गतिशील प्रावस्था में मिलाया जाए तो गतिमान धारा द्वारा विभिन्न भौतिक प्रक्रमों से घटकों का वहन, विभिन्न मात्राओं में होता है।

सारणी 1.1 में कुछ वर्णलेखी विधियों का वर्गीकरण किया गया है। किन्तु जिस प्रक्रिया द्वारा पृथक्करण होता है वह किसी एक क्रियाविधि तक सीमित नहीं रहती है। यद्यपि सारणी में प्रत्येक स्थिति में वितरण प्रक्रम की प्रकृति को व्यक्त किया गया है किन्तु यह सबसे अधिक महत्वपूर्ण कारक मात्र होता है।

सारणी 1.1 : वर्णलेखी विधियों का वर्गीकरण

पृथक्करण प्रक्रम की प्रकृति	गतिशील प्रावस्था	स्थिर प्रावस्था	वर्णलेखिकी का प्रकार
विभाजन	द्रव	द्रव	विभाजन वर्णलेखिकी: कागज वर्णलेखिकी, स्तंभ वर्णलेखिकी
विभाजन	गैस	द्रव	गैस द्रव वर्णलेखिकी
अधिशोषण	द्रव	ठोस	अधिशोषण वर्णलेखिकी: स्तंभ वर्णलेखिकी, पतली परत वर्णलेखिकी, आयन विनिमय वर्णलेखिकी
अधिशोषण	गैस	ठोस	गैस ठोस वर्णलेखिकी

अब आप निम्नलिखित बोध प्रश्न का उत्तर दीजिए।

बोध प्रश्न 2

नीचे दिए गए उदाहरणों के लिए गतिशील प्रावस्था और स्थिर प्रावस्था बताइए:

i) कागज वर्णलेखिकी

ii) पतली परत वर्णलेखिकी

iii) विभाजन स्तंभ वर्णलेखिकी

iv) आयन–विनिमय वर्णलेखिकी

आइए, अब विभाजन वर्णलेखिकी में निहित मूल सिद्धांत को समझने का प्रयास करें।

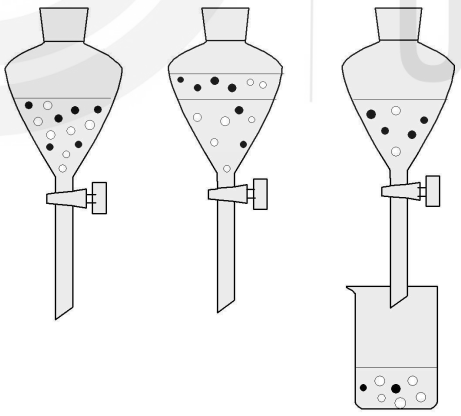
1.4 मिश्रण में ऐमीनो अम्लों का पृथक्करण ओर उनका अभिनिर्धारण

इस प्रयोग में आप ऐमीनों अम्लों को कागज वर्णलेखिकी द्वारा पृथक्करण ओर उनका अभिनिर्धारण करेंगे। यह वर्णलेखिकी तकनीक सबसे साधारण और इसके लिए किसी भी प्रकार के जटिल उपकरणों की आवश्यकता नहीं होते और साथ ही में उत्तम पृथक्करण मिलता है। आइए इस प्रयोग के सिद्धांत और क्रियाविधि को समझें।

1.4.1 कागज वर्णलेखिकी का सिद्धांत

कागज वर्णलेखिकी विभाजन के सिद्धांत पर आधारित है। कागज वर्णलेखिकी (द्रव-द्रव) में घटकों के पृथक्करण को नियंत्रित करने वाले सिद्धांतों को स्थैतिक विभाजन मॉडल (static partitionary mode) द्वारा समझा जा सकता है।

माना जल आदि किसी विलायक को, जिसमें दो विलेय हों, पृथक्कारी कीप में डाला जाता है जैसाकि चित्र 1.1(क) में दिखाया गया है।



चित्र 1.1 : दो अमिश्रणीय विलायकों द्वारा विलेयों का आंशिक पृथक्करण

चित्र 1.1 में दो विलेय, काले और सफेद वृत्तों द्वारा दिखाए गए हैं। यदि पहले विलायक में अमिश्रणीय एक अन्य विलायक मिलाकर, दोनों को हिलाया जाए तो विलेय के कुछ अणु दूसरे विलायक में स्थानांतरित होकर ऊपरी परत बनाएंगे। आप चित्र 1.1(ख) में देखेंगे कि काले अणु दूसरे विलायक में अधिक विलेयशील होते हैं। यदि डाट को हटाकर पहले विलयन को टोंटी से निकलने दें तो आंशिक पृथक्करण हो जाता है

जबकि सफेद अणुओं की पहले विलायक में और काले अणुओं की दूसरे विलायक में अधिकता रहती है। इसे चित्र 1.1(ग) में दिखाया गया है।

ठोस आयोडीन का गहरा बैंगनी रंग होता है किन्तु KI विलयन में उसका भूरा रंग हो जाता है जबकि कार्बनिक परत में उसका रंग पुनः बैंगनी हो जाता है।

आप इस परिघटना को अपनी प्रयोगशाला में प्रदर्शित कर सकते हैं जैसाकि नीचे दिया गया है :

1) एक परखनली में 5 cm^3 जलीय पोटैशियम आयोडाइड विलयन लें और उसमें आयोडीन का छोटा सा क्रिस्टल घोलें। आप देखेंगे कि विलयन का भूरा रंग हो जाता है।

2) एक बिन्दुपाती पिपेट से सावधानी पूर्वक 5 cm^3 टेट्राक्लोरोमेथेन (कार्बन टेट्राक्लोराइड) मिलाएं। परखनली को धीरे–धीरे हिलाते रहें। आप देखेंगे कि टेट्राक्लोरोमेथेन परत जो पहले रंगहीन थी, अब बैंगनी हो जाती है।

3) परखनली पर कार्क लगाएं और सावधानीपूर्वक जोर से हिलाएं। कार्बनिक परत में बैंगनी रंग तीव्र हो जाता है जबकि जलीय परत का रंग फीका हो जाता है।

इस प्रयोग में आपने जो रंग परिवर्तन देखे उनसे ज्ञात होता है कि आयोडीन जो आरंभ में जलीय विलयन में थी, मुख्यतः कार्बनिक परत में स्थानांतरित हो गई है। आप मिश्रण को कितना भी क्यों न हिलाएं, दो परतों में आयोडीन की सान्द्रताएं स्थिर रहेंगी, भले ही दोनों विलायकों के वास्तविक आयतन कुछ भी हों, केवल शर्त यह है कि ताप स्थिर रहे।

जब साम्यावस्था प्राप्त हो जाती है अर्थात् जब आयोडीन की कार्बनिक परत में प्रविष्ट होने की और अधिक प्रवृत्ति नहीं रहती है तब हम इस विभाजन अथवा वितरण प्रक्रम को गणितीयतः निम्नलिखित व्यंजक द्वारा परिभाषित कर सकते हैं।

$$\frac{\text{कार्बनिक परत में विलेय की सान्द्रता}}{\text{जलीय परत में विलेय की सान्द्रता}} = K_D \quad \ldots. (1.1)$$

जिसमें K_D को **विभाजन (partition)** अथवा **वितरण गुणांक (distribution coefficient)** कहते हैं।

K_D का मान विलये की मात्रा अथवा विलायक के आयतन पर निर्भर नहीं करता है, किन्तु ताप पर निर्भर करता है क्योंकि विलेयता ताप पर आश्रित होती है।

हमने अभी जो व्याख्या की है उसका संबंध स्थैतिक निकायों से है जिनमें एक घटक विलेयता की दृष्टि से दो अमिश्रणीय विलायकों के बीच वितरित हो जाता है। परंतु वितरण वर्णलेखिकी में एक अमिश्रणीय विलायक गतिशील होता है। आइए, अब कागज वर्णलेखिकी जो कि विभाजन वर्णलेखिकी का उदाहरण में पृथक्करण की क्रिया विधि का अध्ययन करें।

1.4.2 पृथक्करण की क्रियाविधि

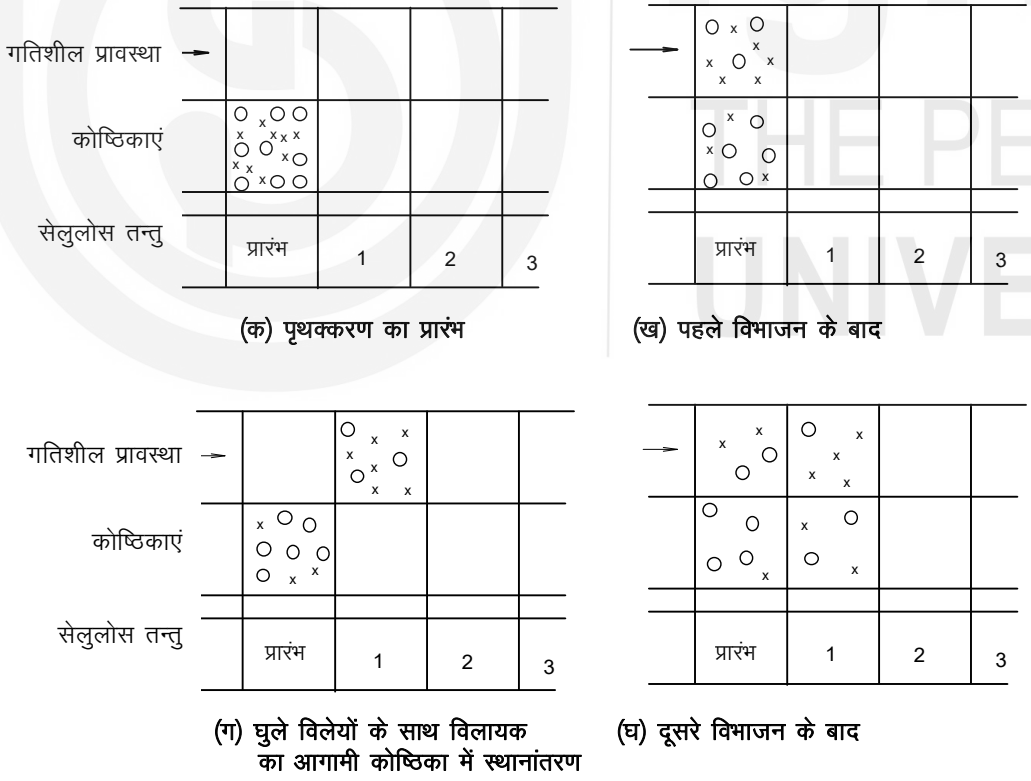
कागज वर्णलेखिकी में कागज में पहले से उपस्थित जल, स्थिर प्रावस्था बनाता है तथा कागज में ऊपर अथवा नीचे धावन करने वाला विलायक, गतिशील प्रावस्था बनाता है।

विलेय पदार्थ, विलायक और जल के बीच अपने वितरण गुणांकों के अनुसार विभाजित हो जाते हैं। जिस विलेय की गतिशील प्रावस्था के प्रति अधिक विलेयता होती है, वह कागज पर अधिक शीघ्र आगे बढ़ता है। यदि विलेय पदार्थ के घटक रंगीन है तो अलग–अलग रंग के क्षेत्रों में पूर्ण रूप से या आंशिक रूप में पृथक हो जाते हैं। यदि रंगीन नहीं है तो उनका स्थान किसी अभिकर्मक अनुप्रयोग से निर्धारित किया जाता है।

निस्पंदक पत्र में जल की मात्रा दर्शाने के लिए गोल निस्पंदक पत्र को वैश्लेषिक तुला में (100 g यथार्थ) तोलें। नियपंदक पत्र को 105 °C पर गर्म किए हुए वायु अवन में एक घंटे तक सुखाएं। उसे जल–शुष्कित्र में ठंडा कर, फिर से तोलें। इससे आप अवशोषित जल का प्रतिशत परिकलित कर सकते हैं।

उपर्युक्त पृथक्करण किस प्रकार होते हैं इसे समझने के लिए हमें निस्यंदक पत्र की संरचना को अधिक निकटता से देखना होगा। हम जानते हैं कि निस्पंदक पत्र में असंख्य सेलुलोस तन्तु होते हैं जो वायुमंडल से जल की निश्चित मात्रा आकर्षित करते हैं। यह माना जा सकता है कि प्रत्येक तन्तु अनेक कोष्ठिकाओं का बना है और प्रत्येक कोष्ठिका में तन्तुमय भाग होता है जिसमें जल संयुक्त हो जाता है। पृथक करने के लिए मिश्रण के घटक, कोष्ठिाकाओं की आर्द्रता और इन कोष्ठिकाओं के ऊपर प्रभावित हो रहे गतिशील विलायक के बीच विभाजन द्वारा पृथक हो जाते हैं। (उस स्थैतिक मॉडल को याद करें जिसका आप पहले अध्ययन कर चुके हैं)। स्थिर प्रावस्था (जल) और गतिशील प्रावस्था (विलायक) में प्रत्येक घटक की आपेक्षिक विलेयता उस दर को निर्धारित करती है जिस दर से घटक गतिशील प्रावस्था में स्थानांतरित होता है। जो घटक गतिशील प्रावस्था में अधिक विलेय होते हैं वे गतिशील प्रावस्था के साथ अधिक दूर जाते हैं और जो घटक जल में अधिक विलेय होते हैं उनकी प्रवृति जल में देर तक रहने की होती है और वे तन्तुओं पर आसंजित रहते हैं। विभाजन प्रक्रम का निरूपण चित्र 1.2 में किया गया है।

यद्यपि मूलरूप में कागज वर्ण लेखिकी को विभाजन सिद्धान्त पर आधारित माना जाता था। अतः पहले इसको विभाजन वर्ण लेखिकी नाम दिया गया। सामान्यत अब यह माना जाता है कागज संयुक्त रूप में विभाजन अधिषोषण और आयन विनिमय क्रियाविधि से काम करता है।



चित्र 1.2 : कागज वर्णलेखिकी में विभाजन प्रक्रम का आरेखी निरूपण

माना A और B दो घटकों को पृथक करना है। घटक A (वृत्तों द्वारा निरूपित) स्थिर प्रावस्था में दुगना विलेय है अर्थात् समीकरण 1.1 के अनुसार उसका विभाजन गुणांक 0. 5 है। घटक B (क्रासों द्वारा निरूपित) गतिशील प्रावस्था में दुगना विलेय है, अर्थात्

उसका विभाजन गुणांक 2 है। चित्र 1.2(क) प्रक्रम के प्रारंभ को निरूपित करता है जिसमें A और B की समान मात्राएं (क्रासों और वृत्तों की समान संख्याएं) जल कोष्ठिका में घुली हैं। चित्र 1.2(ख) में विलायक का समान आयतन पहली परिकल्पित जल कोष्ठिका के सम्पर्क में है और विभाजन (घटकों को उनकी विलेयताओं के अनुसार दो द्रवों में विभाजित करना) इस प्रकार होगा कि B के दुगने अणु गतिशील प्रावस्था में चले जाएंगे। स्मरणीय है कि B गतिमान विलायक में दुगना विलयशील है, अतः चित्र में वृत्तों की अपेक्षा क्रासों की संख्या दुगुनी है। स्थैतिक जल कोष्ठिका में स्थिति इसके विपरीत है। जबकि वहां A के अणुओं की संख्या दुगुनी है।

वर्णलेखिकी एक गतिशील विभाजन (dynamic partition) प्रक्रम है जिसमें गतिशील विलायक उस स्थिति तक गमन करता है जिसे चित्र 1.2(ग) द्वारा निरूपित किया गया है। दूसरे विभाजन से जो स्थिति प्राप्त होगी उसे चित्र 1.2(घ) में निरूपित किया गया है। इसमें दो समंजन होंगे–एक आरंभ में और दूसरा कोष्ठका एक में। प्रारंभ में घटक A और B, B के पक्ष में 2:1 के अनुपात में गतिशील विलायक में पुनः विभाजित होंगे। इस प्रकार, अब गतिशील प्रावस्था में दो क्रास हैं और जल कोष्ठिका में केवल एक है। कोष्ठिका एक में गतिशील और स्थिर प्रावस्थाओं के बीच में दूसरा समंजन भी होगा। इस स्थिति में क्योंकि A जल में अधिक विलयशील है, अतः इस प्रावस्था में A के दुगने अणु होंगे, (दो वृत्त जबकि इसके विपरीत गतिशील प्रावस्था में एक वृत्त है)

इस प्रक्रम के विस्तार से यह समझा जा सकता है कि A की अपेक्षा B गतिशील प्रावस्था में अधिक मात्रा में संवाहित क्यों होता है। व्यवहार में, इस प्रक्रम को अनेक बार दोहराया जाता है जिससे अंततः दोनों घटक पृथक हो जाते हैं और कागज वर्णलेख पर दो स्पष्ट विंदु, A और B बनाते हैं, जैसा कि चित्र 1.3 में दर्शाया हुआ है।

प्रत्येक घटक का परिमाणात्मक माप उसके मंदन कारक (Retardation factor), R_f, के विनिर्देशन द्वारा ज्ञात किया जाता है जिसे निम्नलिखित संबंध द्वारा परिभाषित किया जाता है :

$$R_f = \frac{\text{विलेय बिन्दु के केन्द्र द्वारा तय की गई दूरी}}{\text{विलायक अग्र द्वारा तय की गई दूरी}}$$

अतः चित्र 1.3 में दर्शाए घटकों और के लिए R_f के मान होंगे :

घटक A के लिए मंदन कारक

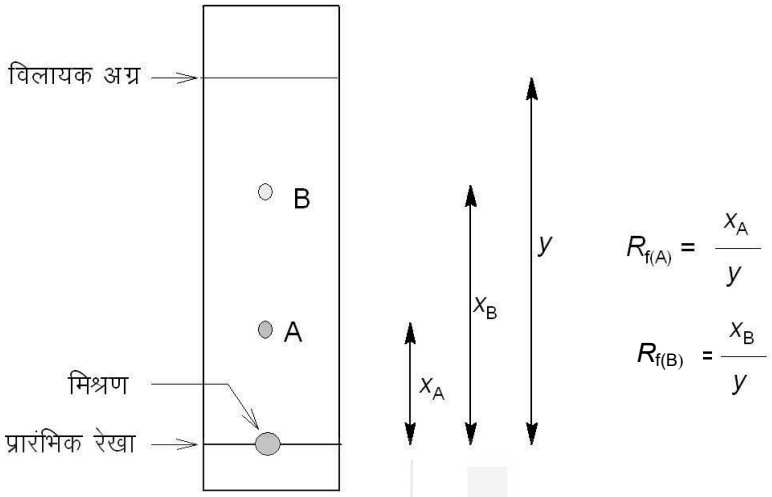
$$R_{f(A)} = \frac{\text{घटक A के बिन्दु के केन्द्र द्वारा तय की गई दूरी}}{\text{विलायक अग्र द्वारा तय की गई दूरी}} = \frac{x_A}{y}$$

उसी प्रकार से घटक B के लिए मंदन कारक

$$R_{f(B)} = \frac{\text{घटक B के बिन्दु के केन्द्र द्वारा तय की गई दूरी}}{\text{विलायक अग्र द्वारा तय की गई दूरी}} = \frac{x_B}{y}$$

यह X_A और X_B बिंदु के केन्द्रों के प्रारंभिक रेखा जहां विलय मिश्रण को प्रयुक्त किया है से दूरीयाँ है और y विलायक अग्र की आधार रेखा से दूरी है जैसा कि चित्र 7.3 में दर्शाया हुआ है।

R_f मानों का परास 0.00 से 1.00 तक होता है। R_f कम मानों से संकेत मिलता है कि उस घटक की स्थिर प्रावस्था में अधिक विलेयता है। अधिक R_f के मान से संकेत मिलता है कि घटक की विलेयता गतिशील प्रावस्था में अधिक है। जहां तक संभव है, अगर हमने सही विलायक और वर्णलेखिकी कागज प्रयुक्त किया है, हम मंदन कारक से घटका की पहचान कर सकते हैं।

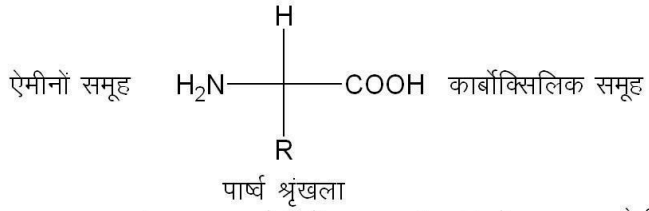


चित्र 1.3 : मंदन कारक R_f के परिकलन की प्रक्रिया

एमीनो अम्लों के पृथक्करण के लिए विलायक तंत्र (गतिशील प्रावस्था) :

जैसा कि हमने ऊपर उल्लेख किया है कि घटकों का पृथक्कन मुख्य तौर पर विलेय के घटकों की गतिशील प्रावस्त में आपेक्षिक विलेयता है। अतः कागज वर्णलेख के परिवर्धन में विलायक तंत्र का स्वभाव की महत्वपूर्ण भूमिका है। विभिन्न विलायक तंत्रों को ऐमीनों अम्ल के पृथकन में प्रयुक्त किया जा सकता है। विलायक तंत्र को चुनने से पहले ऐमीनों अम्लों की संरचनाओं की बुनियादी समझ आवश्यक है।

जैसा कि ऐमीनों अम्ल का नाम सुझाता है कि इसमें एक ऐमीनों समूह ($-NH_2$) और एक कार्बोक्सिलक समूह ($-COOH$) होते हैं। ऐमीनों अम्ल की सामान्य सूत्र से निम्न प्रकार से व्यक्त कर सकते हैं।



ऐमीनों अम्ल अध्रुवीय R के साथ	ऐमीनों अम्ल ध्रुवीय R के साथ	ऐमीनों अम्ल ध्रुवीय आवेशित R के साथ
R = - CH_3 ऐलानिन	R = - CH_2OH सेरीन	R = - CH_2COOH ऐस्पार्टिक अम्ल
R = - $CH(CH_3)CH_3$ वेलीन	R = - CH_2SH सिस्टीन	R = - CH_2CH_2COOH ग्लूटामिक अम्ल
R = - $CH_2CH(CH_3)_2$ ल्यूसिन	R = - -CH_2CONH_2 ऐस्पेराजीन	R = - $(CH_2)_4$ - NH_2 लाइसीन
R = - CH_2Ph फेनिल ऐलानिन		R = - $(CH_2)_3$ - NH(NH) - NH_2 आर्जिनिन

20 विभिन्न प्रकार के ऐमीनों अम्लों से हमारी प्रोटीन की रचना होती है। विभिन्न ऐमीनों अम्लों की एक दूसरे से भिन्नता सिर्फ R समूह अर्थात पार्श्व श्रृंखला के कारण होती है। R समूह प्रकृति ही विभिन्न प्रकार के विलयन तंत्र में इनकी विलेयता निर्धारित करती है।

हम पर्श्व श्रृंखलाओं के गुणों के आधार पर सभी 20 ऐमीनों अम्लों की तीन वर्गों में बॉट सकते हैं। ये है क्रमशः अध्रुवीय (nonpolar), अनावेशित ध्रुवीय (uncharged polar) व आवेशित ध्रुवीय (charged polar) पार्श्व श्रृंखला वाले ऐमीनें अम्ल। अध्रुवी समूह के ऐमीनों अम्लों में सामान्यतः ऐलिफैटिक अथवा ऐरोमैटिक पार्श्व श्रृंखला होती है जैसे कि एलानिन, वेलीन ल्यूसिन, फेनिलऐलानिन, आदि। जबकि अनावेशित ध्रुवीय प्रकार की पार्श्व श्रृंखलाओं में हाइड्रॉक्सिल, ऐमाइड अथवा सल्फइड्रिल समूह (थइऑल) होते हैं जैसे कि सेरीन, सिस्टीन, ऐस्पेराजीन, आदि। इन ऐमीनों अम्ल की विलयता जल जैसे ध्रुवीय विलयन में अधिक होती है। आवेशित ध्रुवीय समूह को अम्लीय या क्षारकीय वर्गों में बांटा जा सकता है। ऐसे पार्श्व श्रृंखला में कार्बोक्सिल अथवा क्षारकी समूहों के आधार पर किया जाता है। इनके उदाहरण है अम्लीय R: ऐस्पर्टिक अम्ल और ग्लूटामिक अम्ल; क्षारकी Rः लाइसीन, अर्जिनिन; आदि। ध्रुवीय पार्श्व श्रृंखलाओं वाले आवेशित और अनावेशित ऐमीनों अम्ल की विलयता जल जैसे ध्रुवीय विलयन में अधिक होती है। अतः ध्रुवी व अध्रुवीय पार्श्व श्रृंखलाओं की ध्रुवीय और अध्रुवीय विलयनों के साथ विलयता का अंतर उनके R_f मानों का निर्धारण करते है और उनके पृथक्करण के लिए उत्तरदाई होता है।

सभी ऐमीनों अम्लों के पृथक्करण के लिए कोई एक व्यापक विलयन तंत्र उपलब्ध नहीं है। हम विभिन्न प्रकार के विलयन तंत्र प्रयोग में लाते हैं जैसे कि अम्लीय (फिनॉल-जल, 1-ब्यूटेनॉल-ऐसीटिक अम्ल-जल), क्षारीय (पिरिडीन-जल, 1-प्रोपेनॉल-जलीय अमोनिया) और उदासीन (1-ब्यूटेनॉल-मेथिल एथिल कीटोन)। ये सभी हमें काफी हद तक ऐमीनों अम्लों का उचित पृथक्करण देते हैं।

कागज वर्णलेख की विभिन्न प्रकार से विकसित कर सकते हैं। आरोही (ascendings) कागज का विकास कागज पर विलायक के ऊपर की ओर गति करने से होता है, अवरोही (descendings): इसमें कागज का विकास कागज पर विलयन के अधोमुख (downward) गति से होता है, क्षैतिज (horizontal) या अरीय (radial): यहां चक्रिय वर्णलेख का विकास पृष्ठ विलयन का केन्द्र से परिधि की ओर गति करने से होता है, दो विमा (two dimension): यह वर्णलेख का विकास दो दिशा में जो एक दूसरे से समकोण पर हो, में होता है। हम अभी के प्रयोग में वर्णलेख के विकास के लिए आरोही विधि का उपयोग करेंगे।

इस प्रयोग में हम 1-ब्यूटेन-ऐसिटीक अम्ल-जल (12:3:5) के अनुपात के विलायक तंत्र का उपयोग करेंगे और अरोही वर्णलेखिकी तकनीक का प्रयोग करेंगे । इस प्रयोग के लिए किसी खास प्रकार के उपकरणों की आवश्यकता नहीं पड़ती।

बोध प्रश्न 3

निम्नलिखित में से कौन से कारक कागज वर्णलेखिकी में गतिशील प्रावस्था में घटकों की गति को निर्दिष्ट करते हैं:

(i) मिश्रण में घटकों की संख्या।

(ii) घटकों की गतिशील और स्थिर प्रावस्था में सापेक्ष विलेयता।

(iii) कितने समय के लिए वर्णलेखिकी को प्रयुक्त किया है?

मूल सिद्धांत जो हमने ऊपर वर्णित किया है उसे साधारण और रासायनों का प्रयोग करके प्रदर्शित कर सकते हैं। इस प्रयोग को आपको अध्ययन केन्द्र पर करना है। यह प्रयोग अधिक समय नहीं लेगा।

1.4.3 आवश्यकताएँ

उपकरण		रासायनिक द्रव्य
वर्णलेखिकी टैंक	1	1–ब्यूटनॉल
क्वथन नलियाँ	4	ऐसीटिक अम्ल
परख नलियां	5	सूचकः निनहाइड्रिन
मापी सिलंडर	2	निम्नलिखित में से कोई 3 एमीनो अम्ल:
बिन्दुक केशिकाएं (spotting capillarises)	5	
फुहार बोतल (spraying bottle)	1	[L-ऐलानिन, L-ल्यूसिन, L-मोथियोनिन, L-सेरीन,
ह्वाटमन नं. 1 निस्यंदक पत्र शीट	1	L-ऐस्पार्टिक अम्ल]

उपलब्ध विलयन

1. **प्रतिदर्श विलयनः** ऊपर बताए गय में से कोई तीन ऐमीनों अम्ल के विलयन बनलें। इन तीन में से किसी दो ऐमीनों अम्ल को मिलाकर अज्ञात प्रतिदर्श विलयन (अज्ञात मिश्रण) तैयार करें। इनके विलयन प्रत्येक ऐमीनो अम्ल के 15 mg को 1 cm^3 जल में घोलकर बना सकते हैं। यदि ऐमीनों अम्ल विलेय नहीं है तो थोड़ा गरम कर लें।

2. **सूचकः निनहाइड्रिन अभिकर्मक (0.2%):** एक पृथक्ककारी कीप में 1 ब्यूटेनॉल से 100 cm^3 और जल के 100 cm^3 लें। धीरे से हिलाकर स्थिर होने दें। दो परत बन जाएंगी। निचली जलीय परत को हटा दें। ऊपरी कार्बनिक परत को एक फुहार बोतल में स्थानांतरित कर उसमें 0.2 g निनहाइड्रिन मिलाएं। भलिभांति हिला लें और प्राप्त अभिकर्मक को ऐमीनों अम्लों के लिए संसूचक की भांति इस्तेमाल करें। अंत में विलयन को स्वच्छ और क्षारकीय बनाने के लिए उसमें अमोनिया विलयन मिलाएं।

1.4.4 कार्य विधि

निम्न पदों के अनुसार कार्यवाही करें।

1. डेवेलपरः मापी सिलिंडर का उपयोग करके आवश्यकता अनुसार 1–ब्यूटनॉल + ऐसीटिक अम्ल + जल को (12:3:5) के अनुपात में मापकर डेवेलपर बना लें। डेवेलपर को वर्णलेखी टैंक में इस प्रकार से स्थानांतरित करें कि डेवेलपर की ऊँचाई 1 cm से कम रहे। ढ़क्कन को ढ़क दें और टैंक को संतृप्त होने दें।

2. वांछित आमाप के वर्णलेखी कागज की पट्टियां काट लें (अधिकांशतः 10 cm × 30 cm चार बिंदुओं के लिए और एकल/बहुल बिंदु के लिए चौड़ाई बिंदुओं की संख्या अनुसार। पट्टी पर सिरे से 1 cm की दूरी पर एक रेखा

खींचे। यह वर्णलेखी का आधार होगा। समान दूरी पर रेखा पर चार बिन्दु बनाएं (इनकी आपस की दूरी करीब 2 cm होनी चाहिए)। प्रतिदर्श विलयनों को इन बिन्दुओं पर ही लगाएं।

3. बिन्दुक केशिकाओं या टूथ पिक का प्रयोग करके कागज पर नियत स्थान पर 3 ज्ञात प्रतिदर्शों के विलयन और एक अज्ञात मिश्रण के विलयन को प्रयुक्त करें चित्र 1.4(क)। प्रत्येक विलयन के लिए नई केशिका/टूथ पीक का उपयोग करें। ज्ञात ऐमीनों अम्ल की स्थिति को ध्यान में रखें। आप कागज के ऊपरी भाग में प्रत्येक ऐमीनों अम्ल के नाम लिख सकते हैं।

4. बिंदुकन (spotting) के उपरांत, बिन्दुओं पर लगे विलय को उद्‌वाष्पित होने दें। आप सुखाने के लिए गर्म शुष्कक (hot dryer) का प्रयोग कर सकते हैं (चित्र 1. 4(ख))। बिंदकन की क्रिया एक से अधिक बार दोहराएं।

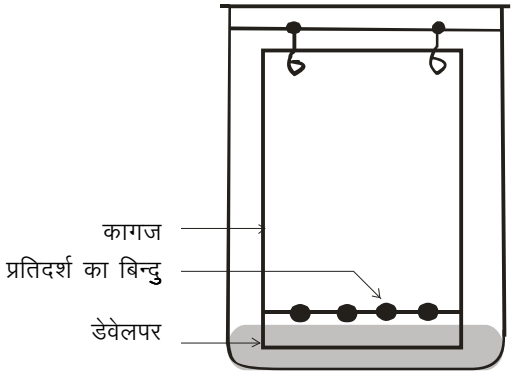
5. आधार दंड या हैंगर की मदद से बिंदुकित कागज की पट्‌टी को टैन्क में इस प्रकार से लटकाएं कि नीचे का सिरा डेवेलपर के सम्पर्क में रहे। इस क्रिया को सावधानीपूर्वक करें और ध्यान रहे कि पट्‌टी ऊर्ध्वाधर रहे। बिंदु हमेशा डेवेलपर के स्तर से ऊपर होने चाहिए। (देखें चित्र 1.5)। वर्णलेखी टैंक को ढक्कन से भलिभांति ढ़क दें।

(क) (ख)

चित्र 1.4: (क) कांच केषिका के उपयोग से नमूने का बिंदुकन (ख) गर्म शुष्कक से सुखाने की प्रक्रिया

7. डेवेलपर को कागज में चढ़ने दें और तब तक प्रतीक्षा करें जब तक डेवेलपर (विलायक अग्र) कागज के ऊपरी सिरें तक न पहुंच जाए।

8. कागज की पट्‌टी को वर्णलेखी टैंक से हटा लें तथा विलायक–अग्र पर पेन्सिल का निशान लगा दें।



चित्र 1.5 : कागज वर्णलेख के विकास के लिए प्ररूपी व्यवस्था।

9. पट्टी पर सुखा लें ताकि ऐसीटिक अम्ल की गंध न रहे।

10. पट्टी पर फुहार बोतल द्वारा निनहाइड्रिन डालें।

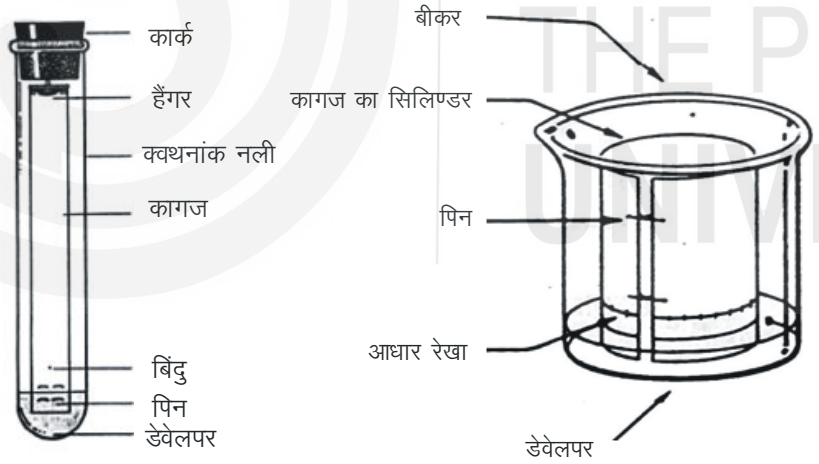
11. पट्टी को अवन में या हॉट प्लेट पर 110 ^{0}C पर तब तक गरम करें जब तक एमीनों अम्लों के क्षेत्र रंगीन बिन्दुओं के रूप में दिखाई दें।

12. रंगीन क्षेत्रों को पेन्सिल से गोल कर दें और प्रत्येक क्षेत्र के केन्द्र पर निशान लगा दें।

13. आरंभिक रेखा से प्रत्येक बिन्दु के केन्द्र की दूरी तथा विलायक अग्र द्वारा तय की गई दूरी माप लें।

14. पट्टी के प्रत्येक बिन्दु के लिए R_f मान परिकलित करें। ज्ञात और अज्ञात नमूनों के R_f मानों तुलना से आप निर्धारित कर सकते हैं कि अज्ञात नमूने में कौन ऐमीनों अम्ल विद्यमान है। अपने परिणाम प्रेक्षण सारणी 1 दर्ज करें।

विकल्पतः आप 500 cm के बीकर में कागज का सिलिण्डर बना कर वर्णलेख का चला सकते हैं जैसा कि चित्र 1.6 में दर्शाया हुआ है। साधारण क्वथनांक नली भी वर्णलेख को चलाने में प्रयुक्त कर सकते हैं (देखें चित्र 1.6)।



चित्र 1.6 : कागज वर्णलेख के विकास के लिए वैकल्पिक व्यवस्था

1.4.5 प्रेक्षण और परिकलन

विभिन्न ऐमीनों अम्लों के लिए प्राप्त बिन्दुओं के रंग की जांच करें। कागज वर्णलेख क्रोमेटोग्राम पर विलेय-क्षेत्र के केन्द्र द्वारा तय की गई दूरी (x) और विलायक अग्र द्वारा तय की गई दूरी (y) माप लें।

$R_f = x/y$ सम्बंध की मदद से प्रत्येक ऐमीनों अम्ल का R_f मान परिकलित करें। प्राप्त आंकड़ों को इस प्रकार रिकार्ड करें :

प्रेक्षण सारणी –1

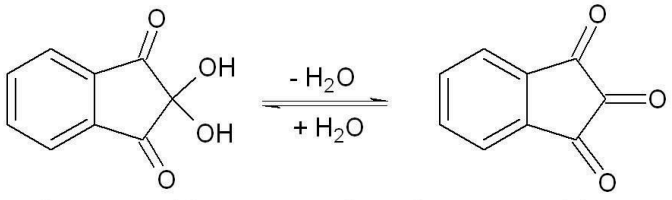
ऐमीनो अम्ल	*x*	*y*	$R_f = \frac{x}{y}$
1.			
2.			
3.			
दिया मिश्रण अज्ञात A अज्ञात B			
अज्ञात A का R_f ..... के सदर्श है। अज्ञात B का R_f ..... के सदर्श है।			

1.4.6 परिणाम और विवेचन

अज्ञात नमूने के विद्यमान ऐमीनों अम्ल A:

B:

गतिशील प्रावस्था केशिका क्रिया द्वारा कागज में ऊपर उठती है। वह पहले तीव्र गति से उठती है और बाद में विलायक अग्र के उठने पर मंद गति से उठती है। कागज वर्णलेखिकी में कागज में स्थित जल, स्तब्द्ध प्रावस्था बनाता है तथा प्रतिदर्श में ऊपर धावन करने वाला विलयन, गतिशील प्रावस्था बनाता है। विलेय पदार्थ (एमीनों अम्ल), विलायक (डेवेलपर) और जल के बीच अपने वितरण गुणांक (आपेक्षिक विलेयता) के अनुसार विभाजित हो जाते हैं। जिस ऐमीनो अम्ल की डेवलापर के प्रति अधिक बंधुता होती है व कागज पर अधिक शीघ्र आगे बढ़ता है। इसलिए कागज पर भिन्न एमीनो अम्ल भिन्न गति से गमन करते हैं और उनके R_f मान भी भिन्न होते हैं। ऐमीनों अम्लों के अभिनिर्धारण के लिए सर्वाधिक प्रयुक्त अभिकर्मक निनहाइड्रिन है। निनहाइड्रिन, इन्डेन–1, 2, 3–ट्राइओन (अथवा ट्राइकीटोहाड्रिन्डीन हाइड्रेट) है। जिसके निम्नलिखित सूत्र होते हैं

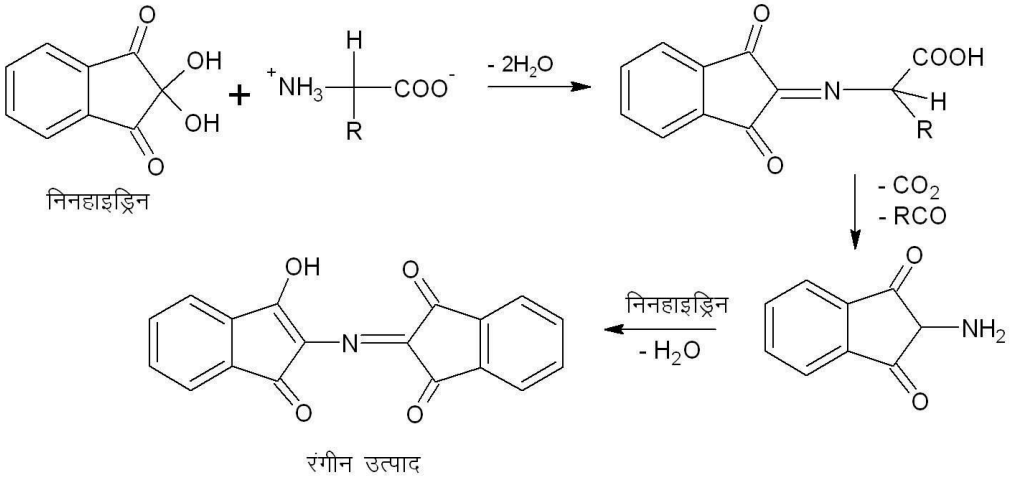


निनहाइड्रिन का जलयोजित रूप निनहाइड्रिन का अजलयोजित रूप

यह ऐमीनो अम्लों के साथ क्रिया कर उत्पन्न रंगीन उत्पाद बनाता है।

एमीनो अम्ल + निनहाइड्रिन $\xrightarrow{\text{गरम करने पर}}$ रंगीन उत्पाद

प्रक्रिया की विस्तार से निम्न पदों में व्यक्त कर सकते हैं।



निनहाइड्रिन के साथ दृश्य रंग के निर्माण की संसूचन सीमा होती है जो अलग–अलग ऐमीनो अम्लों के लिए 0.01 - 0.5 mg के बीच होती है।

1.5 उत्तर

बोध प्रश्न

1) आपका उत्तर (i) होना चाहिए क्योंकि यह स्तंभ में पृथक्करण की प्रमुख क्रियाविधि है। देखा गया है कि इस प्रकार पृथक किए गए घटकों में परस्पर संरचनात्मक समानता होती है। यद्यपि यह कोई अनिवार्य गुण–धर्म नहीं है।

2) i) द्रव–द्रव, ii) द्रव–ठोस, iii) द्रव–द्रव, iv) द्रव–ठोस

3) ii) सही उत्तर है। कागज वर्णलेखिकी पृथक्करण, दो द्रव प्रावस्थाओं के बीच घटकों की भिन्न–भिन्न विलेयताओं द्वारा निर्धारित होता है।

प्रयोग 2

फॉर्मिलीकरण विधि से ग्लाइसिन के विलयन की सांद्रता का आकलन

प्रयोग की रूपरेखा

2.1 प्रस्तावना
उद्देश्य
2.2 सिद्धांत
2.3 आवश्यकताएँ
2.4 क्रियाविधि
2.5 प्रेक्षण
2.6 परिकलन
2.7 परिणाम

2.1 प्रस्तावना

BCHCL-132 और BCHCL-134 पाठ्यक्रमों में आपका परिचय विश्लेषणात्मक और मात्रात्मक विश्लेषण की विभिन्न तकनीकों कराया गया था। उनमें हमनें मात्रात्मक विश्लेषण में प्रयुक्त विभिन्न विधियों का उल्लेख किया था। उदाहरण के लिए भारात्मक विधियों में पदार्थ के भार की माप की जाती है, अनुमापनी विधियों में आयतन की माप की जाती है, और भौतरासायनिक (यंत्रीय) विधियाँ, किसी भौतिक अथवा रासायनिक गुणधर्म की माप पर आधारित होती है। इस प्रयोग में हम अनुमापनी विधि का उपयोग, ग्लाइसिन के आकलन के लिए आप फॉर्मिलीकरण विधियों का उपयोग करेंगे।

उद्देश्य

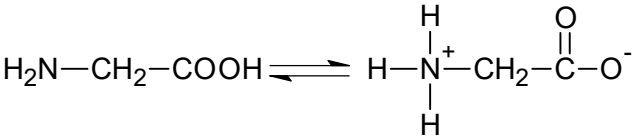
इस प्रयोग को करने के बाद, आप

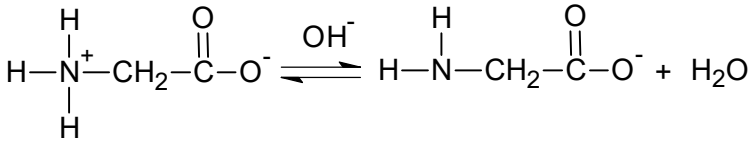
- ❖ दिए गए किसी नमूने में ग्लाइसिस की मात्रा का निर्धारण कर सकेंगे; और
- ❖ फॉर्मिलीकरण अभिक्रिया का उल्लेख कर सकेंगे और मानक क्षार का उपयोग कर अम्ल–क्षारक अनुमापन कर सकेंगे।

2.2 सिद्धांत

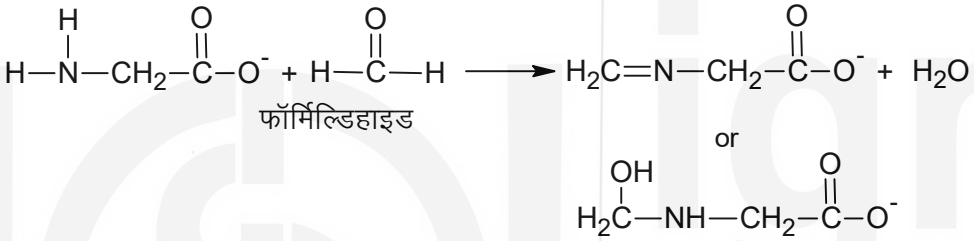
ग्लाइसिन, ऐलानिन आदि ऐमीनों अम्लों की संरचना में एक ऐमीनो समूह और एक कार्बोक्सिलिक समूह होता है। विपरीत स्वभाव के ये समूह होता है। विपरीत स्वभाव के ये समूह अन्तःअणुकतः एक दूसरे को उदासीन कर आंतरिक लवण बनाते हैं जिन्हें उभयाविष्ट आयन (zwitter ion) अथवा द्वि–ध्रुव आयन कहते हैं। ये आयन स्थिर वैद्युत्

आकर्षण द्वारा परस्पर बद्ध रहते हैं। वे उदासीन होते हैं किन्तु क्षारों की उपस्थिति में वियोजन से अम्ल बनाते हैं।





इस प्रकार प्राप्त मुक्त ऐमीनो समूह के फॉर्मिल्डिहाइड के साथ संघनन से मोनो और डाइमेथिल व्युत्पन्न प्राप्त होते हैं। इस संघन्न उत्पादों के बनने से ऐमीनों समूहों का क्षारकीय गुण कम हो जाता है और कार्बोक्सिलिक समूह का मानक क्षार के साथ आसानी से अनुमापन किया जा सकता है।



2.3 आवश्यकताएँ

उपकरण		रासायनिक द्रव्य
ब्यूरेट (50 cm^3)	1	ग्लाइसिन
पिपेट (25 cm^3)	1	सोडियम हाइड्रॉक्साइड
शंक्वाकार फ्लास्क (250 cm^3)	1	फार्मेलिन विलयन
तोल बोतल	1	फीनॉल्फथैलीन सूचक
फनेल (छोटा)	1	
धावन बोतल	1	
(आसुत जल के लिए)		
परख नली	1	
ब्यूरेट स्टैंड	1	

उपलब्ध विलयन

i) **सोडियम हाइड्रॉक्साइड विलयन,** 0.1 *M* : एक 250 cm^3 आयतनमापी फ्लास्क में 1 g सोडियम हाइड्रॉक्साइड घोलें और आसुत जल मिलकार निशान तक बना लें।

ii) **उदासीन 40% फॉर्मिलन विलयनः** एक 250 cm^3 शंक्वाकार फ्लास्क में 40% फॉर्मेलिन के 50 cm^3 लें और उसमें फीनॉल्फथैलीन सूचक की 8-10 बूंदें मिलाएं। एक ब्यूरेट से सावधानी के साथ तनु सोडियम हाइड्रॉक्साइड विलयन (0.1 *M*) मिलाएं ताकि विलयन का रंग ठीक हल्का गुलाबी हो जाए।

iii) **फीनॉल्फथैलीन सूचकः** 10g फीनॉल्फथैलीन को 100 cm^3 में घोंलें और 100 cm^3 जल मिलाकर तनु कर लें।

2.4 क्रियाविधि

i) **ग्लाइसिन का मानक विलयन बनाना :** 2g ग्लाइसिन ठीक–ठीक तोलकर 250 cm^3 आयतनमापी फ्लास्क में स्थानांतरित करें और आसुत जल मिलाकर निशान तक बना लें।

ii) **मानक विलयन के साथ अनुमापनः** एक 250 cm^3 शंक्वाकार फ्लास्क में 25 cm^3 मानक ग्लाइसिन लेकर फीनॉल्फथैलीन सूचक की 3-4 बूँदें मिलाएं। इसमें एक ब्यूरेट से तनु सोडियम हाइड्रॉक्साइड विलयन (0.1 *M*) को बूँदें–बूँदें मिलाएं जब तक कि गुलाबी रंग प्राप्त न हो जाए। अब उसमें उदासीन फॉर्मेलिन विलयन के 10 cm^3 मिलाएं। गुलाबी रंग लुप्त हो जाएगा सोडियम हाइड्रॉक्साइड मिलाते जाएं ताकि गुलाबी रंग पुनः प्राप्त हो जाए। प्रयुक्त सोडियम हाइड्रॉक्साइड का आयतन नेट कर लें। दो सुसंगत पठनांक प्राप्त होने तक प्रयोग को दोहराएं। प्रेक्षणों को सारणी I में रिकार्ड कर लें।

iii) **अज्ञात ग्लाइसिन विलयन के साथ अनुमापनः** उपर्युक्त अनुमापन को 20 cm^3 अज्ञात ग्लाइसिन विलयन के साथ करें और प्रयुक्त सोडिय हाइड्रॉक्साइड के आयतन को नोट कर लें प्रेक्षणों की सारणी II में रिकार्ड कर लें।

2.5 प्रेक्षण

तोल बोतल का द्रव्यमान = m_1 = …….. g

बोतल + ग्लाइसिन का द्रव्यमान = m_1 = …….. g

बोतल का द्रव्यमान = m_1 = …….. g

(यौगिक स्थानांतरण के बाद)

प्रेक्षण सारणी I

मानक ग्लाइसिन विलयन प्रति सोडियम हाइड्रॉक्साइड विलयन

क्र.सं.	ग्लासिन विलयन का आयतन, cm^3 में	ब्यूरेट पाठ्यांक		सोडियम हाइड्रॉक्साइड विलयन का आयतन, cm^3 में (अंतिम–आरंभिक)
		आरंभिक	अंतिम	
1	25			
2	25			
3	25			

प्रेक्षण सारणी II

अज्ञात ग्लाइसिन विलयन प्रति सोडियम हाइड्रॉक्साइड विलयन

क्र.सं.	ग्लासिन विलयन का आयतन, cm^3 में	ब्यूरेट पाठ्यांक		सोडियम हाइड्रॉक्साइड विलयन का आयतन, cm^3 में (अंतिम–आरंभिक)
		आरंभिक	अंतिम	
1	25			
2	25			
3	25			

2.6 परिकलन

25 cm^3 मानक ग्लाइसिन विलयन के लिए प्रयुक्त

सोडियम हाइड्रॉक्साइड विलयन का आयतन V_1 cm^3

25 cm^3 अज्ञात ग्लाइसिन विलयन के लिए प्रयुक्त

सोडियम हाइड्रॉक्साइड विलयन का आयतन $= V_1$ cm^3

दिए गए विलयन में ग्लाइसिन की मात्रा $\frac{m \times V_1}{V_2} = ...g$

अज्ञात ग्लाइसिन विलयन की सांद्रता $\frac{4 \times m \times V_2}{V_1} = ...g dm^{-3}$

$$= \frac{\text{मानक ग्लाइसिन विलयन की सांद्रता} \times V_2}{V_1}$$

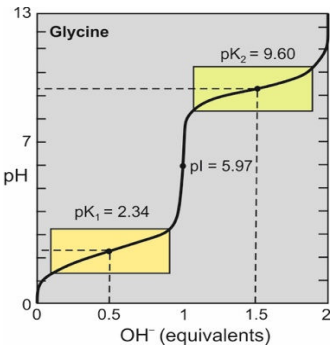
2.7 परिणाम

दिए गए विलयन में ग्लाइसिन की मात्रा =.....g

अज्ञात ग्लाइसिन विलयन की सान्द्रता =.....g dm^3

ignou THE PEOPLE'S UNIVERSITY

प्रयोग 3



pH मिति द्वारा ग्लाइसिन के pK_a का निर्धारण

प्रयोग की रूपरेखा

3.1 प्रस्तावना
उद्देश्य
3.2 सिद्धांत
3.3 आवश्यकताएँ
3.4 कार्य–विधि
3.5 प्रेक्षण
3.6 परिकलन
3.7 परिणाम

3.1 प्रस्तावना

पिछले दो प्रयोगों में आपने ऐमीनो अम्लों के मिश्रण को पृथक करना और दिए गए विलयन में ऐमीनो अम्ल, ग्लाइसिन की सांद्रता का निर्धारण करने के बारे में पढ़ा था। इसमें क्रमशः वर्णलेखिकी (कागज) और अनुमापनमिति की तकनीकें सम्मिलित हैं। आपने इन तकनीकों का प्रयोग पहले पिछले सेमेस्टरों में मूल रसायन विज्ञान वैकल्पिक (चयनात्मक) प्रयोगशाला पाठ्यक्रमों में किया गया था। इस प्रयोग में आप ऐमीनो अम्ल ग्लाइसिन के समविभव बिंदु (pI) के निर्धारण के बारे में पढ़ेंगे और प्रयोग करेंगे। पिछली तकनीकों से ये अन्तर है कि यहां आप यंत्रीय तकनीक जैसे pH मिति का प्रयोग करेंगे जिसके बारे के रूप में आप मूल प्रयोगशाला पाठ्यक्रम BCHCL-134 विस्तार से पढ़ चुके हैं।

आपको याद होगा कि ऐमीनो अम्लों में कम से कम एक कार्बोक्सिल समूह और एक एमीनो समूह होता है। ये दोनों समूह जलीय विलयन में आयनीकरण करने में सक्षम होते हैं। इसलिए, ऐमीनो अम्ल जल में अम्ल और क्षारक दोनों के रूप में कार्य कर सकते हैं और उभयधर्मी (amphoteric) अणु कहलाते हैं। उदासीन या लगभग उदासीन pH पर, ऐमीनो अम्ला द्विध्रुवी आयन (dipolar ion) या **उभयवष्टि आयन** (zwitterion) बनाता है। वह pH जिस पर ऐमीनो अम्ल पर कोई नेट आवेश नहीं होता है, वह उसका समविभव बिंदु (isoelectric point, pI) कहलाता है।

इस प्रयोग में आप ग्लाइसिन के आयननीय समूहों के pK_a मानों का निर्धारण pH मापी के उपयोग द्वारा NaOH के मानक विलयन से अनुमापन करके और अनुमापन वक्र बनाकर करेंगे। आप वक्र से pK_1 (COOH समूह के आयनन के संगत) और pK_2

(NH^+_3 समूह के आयनन के संगत) के मानों का पता लगाऐंगे और ऐमीनो अम्ल के समविभव बिंदु (pI) का परिकलन करेंगे।

अगले परीक्षण में आप किसी एन्ज़ाइम के स्टार्च, एक पॉलीसैकेराइड, पर प्रभाव को दर्शाने वाली अभिक्रिया को करेंगे।

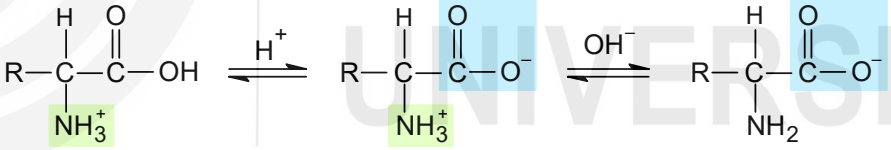
उद्देश्य

इस प्रयोग के अध्ययन और प्रयोग को करने के बाद आपः

- pH मिति द्वारा ग्लाइसिन के pI मान के निर्धारण के सिद्धान्त के समझा सकेंगे;
- प्रयोग के लिए उपयोग किए जाने वाले pH मापी का अंशशोधन कर सकेंगे;
- अम्लीकृत ग्लाइसिन के सोडियम हाइड्रॉक्साइड से pH मितीय अनुमापन को कर सकेंगे और अनुमापन वक्र बना सकेंगे; और
- ग्लाइसिन के pK_1, pK_2 और समविभव बिंदु का निर्धारण कर सकेंगे।

3.2 नियम

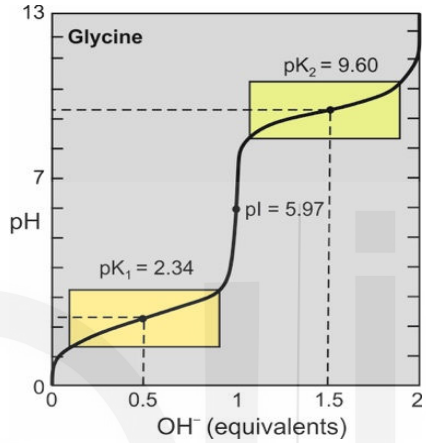
जैसा कि ऊपर बताया गया है, ऐमीनो अम्ल उभयधर्मी अणु होते हैं और जलीय विलयन में ये अम्ल या क्षारक के रूप में कार्य कर सकते हैं। अम्लीय विलयनों में ये प्रोटीनित हो जाते हैं और क्षारीय विलयनों में ये विप्रोटोनित हो जाते हैं। जबकि लगभग उदासीन pH पर अर्थात् उनके समविभव बिंदु (pI) के बराबर pH पर ये उभयविष्ट आयनी हो जाते हैं और इन पर कोई आवेश नहीं होता है।



अम्लीय माध्यम में ऐमीनो अम्ल (जैसे ग्लाइसिन) का विलयन एकल धनायनी होता है। इस स्पीशीज़ की मात्रात्मक मात्राएं ग्लाइसिन विलयन में मानक HCl विलयन की परिकलित मात्रा (1 मोल समतुल्य) को मिलाकर प्राप्त की जा सकती हैं। इस स्पीशीज़ में दो आयननकारी प्रोटोन होते हैंः एक कार्बोक्सिलिक अम्ल समूह पर और दूसरा NH_3^+ समूह पर; पहला वाला अधिक अम्लीय होता है। इनको उत्तरोत्तर रूप से किसी क्षारक जैसे NaOH के मानक विलयन को मिलाने पर इन समूहों का उदासीनीकरण हो जाता है; NaOH को आरंभ में मिलाने पर COOH समूह का उदासीनीकरण हो जाता है। विलयन के pH का निर्धारण हेन्डरसन–हैसलबाल्क समीकरण के अनुसार आयनीकृत और आयनित संरूपों की सांद्रता द्वारा होता है जिसके बारे में आप BCHCT-133 पाठ्यक्रम में पढ़ चुके हैं।

अधिक से अधिक NaOH को मिलाने से अनुपात परिवर्तित हो जाता है और pH धीरे–धीरे बढ़ने लगता है। अर्ध–उदासीनीकरण की अवस्था में अर्थात् जब 50%

ग्लाइसिन अणुओं में COOH समूह आयनित हो जाता है, तो आयनित और अनआयनित संरूपों की सान्द्रता बराबर हो जाती है और विलयन का pH, COOH समूह के p*K*a के बराबर होता है। NaOH के विलयन को लगातार मिलाने पर COOH समूह का आयनन जारी रहता है। पूर्ण उदासीनीकरण के चरण में pH में तेजी से वृद्धि होती है। नतिपरिवर्तन बिंदु (inflection point), pI का मान देता है। और अधिक क्षारक को मिलाने पर NH_3^+ समूह का उदासीनीकरण हो जाता है। पुनः विलयन के pH का निर्धारण हैन्डरसन–हैसलबाल्क समीकरण से किया जाता है और pH में क्रमिक परिवर्तन होता है। जब NH_3^+ समूह का उदासीनीकरण पूर्ण हो जाता है, तो pH पुनः तेजी से वृद्धि करता है। सोडियम हाइड्रॉक्साइड के साथ ग्लाइसिन के अनुमापन वक्र के आरेख को नीचे दिया गया है।



ग्लाइसिन का योजनाबद्ध अनुमापन वक्र

अनुमापन वक्र का उपयोग COOH और NH_3^+ समूह के आयनन के संगत pK_a मानों का निर्धारण करने के लिए किया जा सकता है। ऐसा उनके अर्ध उदासीनीकरण के संगत pH का निर्धारण करके किया जाता है जैसे कि अनुमापन वक्र में दिखाया गया है। pI मान को दो pK_a मानों के गणितीय मान के रूप में प्राप्त किया जा सकता है।

3.3 आवश्यकताएँ

उपकरण	रासायनिक पदार्थ
अनुमापनी फ्लास्क (100 cm^3)	ग्लाइसिन
ब्यूरेट (50 cm^3)	ऑक्सैलिक अम्ल
पिपेट (10 cm^3)	हाइड्रोक्लोरिक अम्ल
तोल बोतल	सोडियम हाइड्रॉक्साइड
क्लैम्प के साथ ब्यूरेट स्टैन्ड	बफर विलयन/गोलियां
शंक्वाकार फ्लास्क	
कीप	
संयोजन इलैक्ट्रोड के साथ pH मापी	
विलोडन छड़ के साथ चुंबकीय विलोडक	

दिए गए विलयन

1. **सोडियम हाइड्रॉक्साइड विलयन** (~0.2 M): इसे लगभग 8 g सोडियम हाइड्रॉक्साइड को लगभग 150-200 cm^3 आसुत जल में घोलकर और उसे 1 लीटर में तनुकृत करके बनाया जाता है।

2. **हाइड्रोक्लोरिक अम्ल विलयन** (~0.1 M): इसे लगभग सान्द्रित हाइड्रोक्लोरिक अम्ल को लगभग 100 cm^3 आसतु जल में घोलकर और उसे 1 लीटर में तनुकृत करके बनाया जाता है।

3. **ग्लाइसिन विलयन** (0.1 M): इसे 7.5 g ग्लाइसिन पाउडर को 1000 cm^3 आसुत जल में घोलकर बनाया जाता है।

4. **फीनॉल्फथेलीन सूचकः** इसे 1 g अभिकर्मक को 100 cm^3 एथानॉल में घोलकर और उसमें 100 cm^3 जल मिलाकर बनाया जाता है। यदि अवक्षेप बन जाता है, तो उसे छान लेते हैं।

3.4 कार्य–विधि

कार्य–विधि में निम्नलिखित चरण सम्मिलित हैंः

क) ऑक्सैलिक अम्ल के मानक विलयन को बनाना।

ख) ऑक्सैलिक अम्ल के मानक विलयन से अनुमापन करके सोडियम हाइड्रॉक्साइड विलयन का मानकीकरण करना।

ग) दिए गए HCl विलयन का सोडियम हाइड्रॉक्साइड के मानक विलयन से अनुमापन द्वारा विलयन का मानकीकरण करना।

घ) pH मापी का अंशशोधन करना

ड़) 0.1 M ग्लाइसिन विलयन का HCl से अम्लीकरण करना और हाइड्रॉक्साइड के मानकीकृत विलयन से pH मितीय अनुमापन करना

च) अनुमापन वक्र को बनाना और ग्लाइसिन के pK_1 और pK_2 मानों का निर्धारण करना।

छ) ग्लाइसिन के pH मान का परिकलन करना।

ग्लाइसिन के pI मान का निर्धारण करने के लिए नीचे दी गई कार्य–विधि का चरणबद्ध तरीके से अनुसरण कीजिए।

क) 0.05 M ऑक्सैलिक अम्ल के 100 cm^3 मानक विलयन को बनाना

आप जानते हैं कि मानक विलयन बनाने के लिए हमें पहले आवश्यक पदार्थ की मात्रा का परिकलन करना चाहिए। 0.05 M ऑक्सैलिक अम्ल के 100 cm^3 विलयन को बनाने के लिए ऑक्सैलिक अम्ल की मात्रा (M_m = 126 g mol^{-1}) की निम्नलिखित आवश्यकता होगीः

$$\text{mass(in g)} = \frac{MVM_m}{1000} = \frac{0.05\,\text{mol dm}^{-3} \times 100\,\text{cm}^3 \times 126\,\text{g mol}^{-1}}{1000\,\text{cm}^3\text{dm}^{-3}} = 0.63\,\text{g}$$

i) एक तुला पर लगभग 0.65 g ऑक्सैलिक अम्ल को तोल लीजिए और उसे एक स्वच्छ, सूखी बोतल में स्थानांतरित कीजिए और ऑक्सैलिक अम्ल के साथ तोल बोतल को यथार्थ तोल कीजिए।

ii) ऑक्सैलिक अम्ल को कीप से एक स्वच्छ 100 cm^3 अनुमापन फ्लास्क में स्थानांतरित कीजिए।

iii) तोल बोतल को पुनः तोलिए (इसमें कुछ ऑक्सैलिक अम्ल हो सकता है) और तोल बोतल + ऑक्सैलिक अम्ल के द्रव्यमान से इस द्रव्यमान को घटाकर स्थानांतरित किए गए ऑक्सैलिक अम्ल का यथार्थ द्रव्यमान ज्ञात कीजिए।

iv) ऑक्सैलिक अम्ल को अनुमापन फ्लास्क में लगभग 30-40 cm^3 आसुत जल लेकर उसमें घोल लीजिए।

ख) मानक ऑक्सैलिक अम्ल विलयन से अनुमापन करके सोडियम हाइड्रॉक्साइड विलयन का मानकीकरण।

i) ब्यूरेट को सोडियम हाइड्रॉक्साइड के दिए गए विलयन से कीप के उपयोग द्वारा भर लीजिए।

ii) ऑक्सैलिक अम्ल के मानक विलयन की 10 cm^3 मात्रा को सावधानी से पिपेट से निकालिए और इसे 100 cm^3 के एक साफ शंक्वाकार फ्लास्क में स्थानांतरित कर दीजिए। इसमें 2–3 बूंदे फीनॉल्फथेलीन सूचक की मिलाइए।

iii) रंगहीन विलयन को NaOH से लगातार हिलाते हुए अनुमापन कीजिए जब तक गुलाबी रंग प्राप्त नहीं हो जाता है। विलयन को हिलाने पर रंग हल्का नहीं होना चाहिए। अपनी रीडिंग को प्रेक्षण सारणी 3.1 में अंतिम रीडिंग वाले खाने में लिखिए।

iv) अनुमापन को दोहराइए जिससे कम से कम दो सुसंगत रीडिंग प्राप्त हो सके उसे प्रेक्षण सारणी 3.1 में रिकॉर्ड कीजिए।

ग) मानकीकृत सोडियम हाइड्रॉक्साइड विलयन के साथ अनुमापन करके दिए गए HCl विलयन का मानकीकरण

i) कीप की सहायता से ब्यूरेट को सोडियम हाइड्रॉक्साइड के दिए गए मानकीकृत विलयन से भरें और इसे ब्यूरेट स्टैंड पर लगा दें। ब्यूरेट पर रीडिंग नोट करें और इसे प्रारंभिक रीडिंग कॉलम के अंतर्गत प्रेक्षण सारणी 3.2 में रिकॉर्ड करें।

ii) HCl के दिए गए विलयन में से 10 cm^3 को सावधानी से पिपेट द्वारा निकालें और इसे एक साफ 10 cm^3 शंक्वाकार फ्लास्क में स्थानांतरित करें। इसमें फीनॉल्फथेलिन सूचक की दो से तीन बूंदें मिलाएं।

iii) रंगहीन विलयन को लगातार हिलाते हुए NaOH के साथ अनुमापन करें जब तक कि एक स्थायी गुलाबी रंग प्राप्त न हो जाए। विलयन को हिलाने पर रंग हल्का

नहीं होना चाहिए। रीडिंग को अंतिम कॉलम के अंतर्गत प्रेक्षण सारणी 3.2 में रिकॉर्ड करें।

iv) कम से कम दो सुसंगत पाठयांक प्राप्त करने के लिए अनुमापन को दोहराएं और इसे प्रेक्षण सारणी 3.2 में दर्ज करें।

pH का मापन करते समय यह सुनिश्चित कर लीजिए कि ग्लास/ संयोजन इलैक्ट्रोड का बल्ब पूरी तरह से विलयन में डूबा हो। यदि वह पूरी तरह डूबा नहीं हो तो कुछ और विलयन डालिए।

घ) pH मापी का अंशशोधन करना

pH मापी के अंशशोधन की सामान्य विधि को नीचे दिया गया है। आप उपयोग किए जा रहे pH मापी को प्रचालन नियमावली (operational manual) को पढ़ सकते हैं। यंत्र के बारे में प्रचालन नियमावली में दिए गए निर्देशों का पालन कीजिए और उपकरण का अंशशोधन कीजिए। (इस चरण में आपके परामर्शदाता आपकी सहायता कर सकते हैं)।

i) संयोजन ग्लास इलैक्ट्रोड को pH मापी से जोड़िए। pH मापी को खोल लीजिए और इसे 15 मिनट तक स्थिरीकृत होने दीजिए।

ii) एक साफ बीकर में pH=7.0 का मानक बफर विलयन लीजिए और pH मीटर से जुड़े कॉम्बिनेशन ग्लास इलैक्ट्रोड को इस लिवलयन में डाल दीजिए। विलयन को धीरे–धीरे हिलाइए और pH मीटर की प्रचालन नियमावली में वर्णित किए गए अनुसार pH को नोट कीजिए।

iii) इसके 7.0. होने ही उम्मीद की जाती है यदि यह सात नहीं है तो pH मापी पर लगी अंशशोधन घुंडी को घुमाकर इसे सात पर समायोजित कीजिए।

iv) इलैक्ट्रोड को आसुत जल से धोइए और टिशू पत्र से इस पर लगे जल को पोंछ दीजिए।

चरण (ii) को pH 4.0 के मानक बफर के साथ दोहराइए।

v) चरण (ii) से (iv) को तब तक दोहराइए जब तक pH 4.0 और 7.0 के मानक बफर विलयनों के साथ संगत मान प्राप्त नहीं हो जाते हैं। इसके लिए आप परामर्शदाता या प्रयोगशाला सहायक की सहायता ले सकते हैं।

अंशशोधन के बाद, pH मापी मापन लेने के लिए तैयार है।

ड़) ग्लाइसिन के 0.1 M विलयन को HCl से अम्लीकृत करना और सोडियम हाइड्रॉक्साइड के मानकीकृत विलयन से pH मितीय अनुमापन करना।

i) अनुमापन आरंभ करने से पहले आपको अपने ब्यूरेट के बिंदु आयतन का निर्धारण कर लेना चाहिए। इसके लिए ब्यूरेट को एक नियत मान पर समायोजित कीजिए (जिसमें NaOH विलयन है) (जैसे 0 पर) और इसे नोट कीजिए। अब ध्यानपूर्वक बीकर में विलयन की 100 बूंदें निकालिए और पुनः ब्यूरेट की रीडिंग को नोट कीजिए। दोनों रीडिंग को अंतर को 100 से विभाजित करके ब्यूरेट का बिंदु आयतन प्राप्त कीजिए।

ii) अनुमापन 0.1 M ग्लाइसिन के दिए गए विलयन के 10.0 cm^3 को पिपेट से निकाल कर 50 cm^3 के बीकर में डालिए; इसे लगभग 10.0 cm^3 आसुत जल से तनुकृत कीजिए और इसमें मानकीकृत HCl विलयन 1 मोल समतुल्य को

मिलाइए। आवश्यक HCl विलयन के आयतन का परिकलन निम्न प्रकार से किया जा सकता है।

HCl का आवश्यक आयतन = (10 cm^3 x 0.1 M) / (HCl की मोलरता)

iii) परीक्षण विलयन युक्त बीकर में चुंबकीय विलोड़क छड़ को डालिए और बीकर को चुंबकीय विलोडक पर रखकर उसमें संयोजन ग्लास इलैक्ट्रोड की डुबो दीजिए। ध्यान दीजिए कि यह बीकर की दीवारों या तली से स्पर्श न करें। यदि इलैक्ट्रोड का बल्ब विलयन में पूरी तरह से नहीं डूबता है तो इसमें थोड़ा और आसतु जल मिलाइए।

iv) ब्यूरेट को NaOH के दिए गए विलयन से भर लीजिए और ब्यूरेट के लोहे को स्टैण्ड पर क्लैम्प लगाकर दीजिए।

v) ग्लाइसिन विलयन में कुछ, जैसे 4–5 बूंदें NaOH विलयन की मिलाइए, उसे चलाइए और स्थिर होने दीजिए। उपकरण में दिए दी गई प्रचालन नियमावली के अनुसार pH को मापिए। अपने प्रेक्षणों को सारणी 3.3 में रिकॉर्ड कीजिए।

vi) इस चरण को दोहराते रहिए और अपने प्रेक्षण सारणी 3.3 में लिखिए। आपको pH मान में क्रमिक परिवर्तन दिखाई देगा। जब आपको pH मान में अधिक वृद्धि दिखाई दे, तो मिलाए जाने वाले NaOH के आयतन को घटाकर 2–3 बूंदे डाल दीजिए। अपने आंकड़ों को रिकॉर्ड करना जारी रखिए।

च) अनुमापन वक्र बनाना और ग्लाइसिन के pK_1 और pK_2 मानों का निर्धारण करना

i) सारणी 3.3 के आंकड़ों का उपयोग अनुमापन वक्र बनाने के लिए कीजिए। x-अक्ष को NaOH की बूंदों की संख्या और y-अक्ष को विलयन के pH के रूप में चिन्हित कीजिए।

ii) pH में सर्वाधिक वृद्धि के संगत बूंदों की संख्या को नोट कीजिए। मान लीजिए कि वह N है। यह COOH के पूर्ण उदासीनीकरण के लिए आवश्यक NaOH के आयतन के समतुल्य होगा।

iii) अनुमापन वक्र से NaOH की N/2 बूंदों के संगत pH को नोट कीजिए। यह pK_1 का मान होगा।

iv) इसी प्रकार NaOH की 3N/2 बूंदों के संगत pH को अनुमापन वक्र से नोट कीजिए। यह pK_2 के मान को बताएगा।

छ) ग्लाइसिन के pH मान का परिकलन

i) pK_1 और pK_2 का औसत लेकर ... मान का परिकलन कीजिए।

ii) परिणामों को रिपोर्ट कीजिए

3.5 प्रेक्षण

क) 100 cm^3 ऑक्सैलिक अम्ल के 0.05 M मानक विलयन को बनाना

तोल बोतल + ऑक्सैलिक अम्ल का द्रव्यमान = m_1 g = ...g

तोल बोतल का द्रव्यमान (ऑक्सैलिक अम्ल के स्थानांतरण के बाद)
= m_2 g = ... g

ख) ऑक्सैलिक अम्ल के मानक विलयन से अनुमापन द्वारा दिए गए सोडियम हाइड्रॉक्साइड विलयन का मानकीकरण

मानक ऑक्सैलिक अम्ल का शंक्वाकार फ्लास्क में लिया गया आयतन
V_o = …cm^3

ब्यूरेट में विलयन : सोडियम हाइड्रॉक्साइड

उपयोग किया गया सूचक : फीनॉल्फथेलिन

प्रेक्षण सारणी 3.1: सोडियम हाइड्रॉक्साइड का मानकीकरण

क्रम संख्या	ऑक्सैलिक अम्ल का आयतन (cm^3)	ब्यूरेट की रीडिंग		अनुमापांक मान (cm^3) (अंतिम–आरंभिक)
		आरंभिक	अंतिम	
1.				
2.				
3.				
		सुसंगत रीडिंग		

ग) सोडियम हाइड्रॉक्साइड के मानकीकृत विलयन से अनुमापन द्वारा दिए गए HCl विलयन का मानकीकरण

शंक्वाकार फ्लास्क में लिए गए HCl विलयन का आयतन V_H = …cm^3

ब्यूरेट में विलयनः सोडियम हाइड्रॉक्साइड

उपयोग किया गया सूचकः फीनॉल्फथेलिन

प्रेक्षण सारणी 3.2: HCl विलयन का मानकीकरण

क्रम संख्या	HCl का आयतन (cm^3)	ब्यूरेट की रीडिंग		अनुमापांक मान (cm^3) (अंतिम–आरंभिक)
		आरंभिक	अंतिम	
1.				
2.				
3.				
		सुसंगत रीडिंग		

घ) सोडियम हाइड्रॉक्साइड विलयन से ग्लाइसिन का pH मितीय अनुमापन

विलयन के बूंद आयतन के परिकलन के लिए निम्नलिखित रीडिंग को रिकॉर्ड करें।

ब्यूरेट की आरंभिक रीडिंग : R_1 =.....

100 बूंद विलयन निकालने के बाद ब्यूरेट की रीडिंग, R_2 = ...

बिंदु आयतन $= \frac{(R_2 - R_1)}{100} = ...cm^3$

बीकर में लिए गए ग्लाइसिन विलयन का आयतन V_H = …cm^3

ब्यूरेट में विलयन : सोडियम हाइड्रॉक्साइड

सोडियम हाइड्रॉक्साइड की मोलरता = M_N=….M

प्रेक्षण सारणी 3.3: 0.1 M ग्लाइसिन का NaOH के साथ pH मितीय अनुमापन

क्रम संख्या	NaOH की बूंदों की कुल संख्या	pH	क्रम संख्या	NaOH की बूंदों की कुल संख्या	pH
1				21	
2				22	
3				23	
4				24	
5				25	
6				26	
7				27	
8				28	
9				29	
10				30	
11				31	
12				32	
13				33	
14				34	
15				35	
16				36	
17				37	
18				38	
19				39	
20				40	

3.6 परिकलन

ऊपर रिकॉर्ड किए गए प्रेक्षणों के आधार पर परिकलन कीजिए। आपको निम्न प्रकार से चरणबद्ध तरीके से परिकलन करने होंगे।

क) 100 cm^3 ऑक्सैलिक अम्ल का 0.05 M मानक विलयन बनानाः

ऑक्सैलिक अम्ल के निर्मित किए गए मानक विलयन की मोलरता क परिकलन निम्न प्रकार से किया जा सकता है।

तोल बोतल का द्रव्यमान + ऑक्सैलिक अम्ल = m_1 g = ...g

तोल बोतल का द्रव्यमान (ऑक्सैलिक अम्ल से स्थानांतरण के बाद)

= m_2 g = ... g

ऑक्सैलिक अम्ल की स्थानांतरित मात्रा = $m_1 - m_2 = m$ g = ... g

ऑक्सैलिक अम्ल का मोलर द्रव्यमान (M_m) = 126 g mol^{-1}

ऑक्सैलिक अम्ल का बनाया गया आयतन = 100 cm^3

ऑक्सैलिक अम्ल विलयन की मोलरता = $M_O = \frac{m \times 1000}{126 \times 100} = \frac{10m}{126} = ...M$

ख) ऑक्सैलिक अम्ल के मानक विलयन से अनुमापन द्वारा सोडियम हाइड्रॉक्साइड के दिए गए विलयन क मानकीकरण

शंक्वाकार फ्लास्क में लिए गए ऑक्सैलिक अम्ल का आयतन, V_O = ...cm^3

NaOH विलयन का इस्तेमाल किया गया आयतन (प्रेक्षण सारणी 3.1 से सुसंगत मान) = V_N = ...cm^3

सोडियम हाइड्रॉक्साइड के दिए गए विलयन की सांद्रता का निर्धारण निम्न प्रकार से किया जा सकता हैः

अनुमापन में सम्मिलित अभिक्रियाः

$$2NaOH + (COOH)_2 \rightarrow (COONa)_2 + H_2O$$

मोलरता समीकरणः $M_N V_N = 2M_O V_O$

सोडियम हाइड्रॉक्साइड की मोलरता $M_N = \frac{2M_O V_O}{V_N} = ...M$

ग) NaOH के मानकीकृत विलयन से अनुमापन करके के दिए गए HCl विलयन का मानकीकरण

शंक्वाकार फ्लास्क में लिए गए HCl के विलयन का आयतन V_H = ...cm^3

उपयोग किए गए NaOH विलयन का आयतन (प्रेक्षणी सारणी 3.2 से सुसंगत रीडिंग) = V_N = ...cm^3

HCl के दिए गए विलयन की सांद्रता का निर्धारण निम्न प्रकार से किया जाता हैः

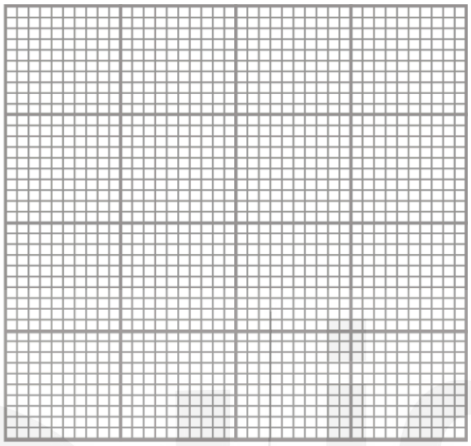
अनुमापन में सम्मिलित अभिक्रियाः $NaOH + HCl \rightarrow NaCl + H_2O$

मोलरता समीकरण : $M_N V_N = M_H V_H$

HCl की मोलरता $= M_H = (M_N V_N) / V_H$

घ) **अनुमापन वक्र बनाना और ग्लाइसिन के pK_1 और pK_2 के मानों का निर्धारण**

i) मापे गए pH (y-अक्ष पर) और NaOH के आयतन (बूंदों की संख्या के रूप में x-अक्ष पर) का प्रेक्षण सारणी 3.3 के डाटा से ग्राफ बनाइए।



ग्लाइसिन और NaOH के बीच अनुमापन वक्र

ii) COOH समूह के पूर्ण उदासीनीकरण के लिए उपयोग की गई NaOH की बूंदों को ऊपर बताए गए अनुसार अर्थात् pH में सर्वाधिक वृद्धि के संगत नोट कीजिए।

iii) NaOH की N और 3N/2 बूंदों के संगत pH मान का निर्धारण करके *K* मानों का निर्धारण कीजिए और उसे रिपोर्ट में लिखिए।

iv) निम्नलिखित परिकलन करके pI मान का परिकलन कीजिए और उसे रिपोर्ट में लिखिए।

$pI = (pK_1 + pK_2) / 2$

3.7 परिणाम

ग्लाइसिन का pK_1 =.....

ग्लाइसिन का pK_2 =.....

ग्लाइसिन का p*I*=.....

प्रयोग 4

स्टार्च पर लार ऐमिलेस की क्रिया और स्टार्च पर लार ऐमिलेस की क्रिया पर ताप का प्रभाव

इकाई की रूपरेखा

4.1 प्रस्तावना
उद्देश्य
4.2 सिद्धांत
4.3 आवश्यकताएँ
4.4 विधि
4.5 प्रेक्षण
4.6 परिणाम

4.1 प्रस्तावना

मनुष्यों की लार में α-ऐमिलेस मुख्य एंजाइम होता है। स्वस्थ मनुष्यों के शरीर में प्रतिदिन 1.5 dm^3 लार निकलती है।

पाठ्यक्रम BCHCT-135 के खंड 4 में हमने प्रोटीनों के रसायन की चर्चा की थी। हमने यह उल्लेख किया था कि एंज़ाइम प्रोटीन उत्प्रेरक होते हैं और वे जैव अभिक्रियाओं के लिए उत्प्रेरकों का कार्य करते हैं। अन्य उत्प्रेरकों की भांति, एंज़ाइम भी स्वयं समाप्त हुए बिना, अभिक्रियाओं की दर में वृद्धि कर देते हैं। ये ऐसा, अभिक्रिया की सक्रियण ऊर्जा को कम करने द्वारा करते हैं। चूंकि एंज़ाइम, प्रोटीन होते हैं, उनका ताप के परिवर्तन द्वारा विकृतीकरण हो सकता है। अधिकांश एंज़ाइमों की स्थैतिक pH और शरीर के ताप दर इस्टतम सक्रियता होती है।

इस प्रयोग में लार ऐमिलेस एंज़ाइम लेकर ताप के प्रभाव का अध्ययन करेंगे। यह एंज़ाइम स्टार्च के जल–अपघटन के लिए उत्तरदायी होता है।

उद्देश्य

इस प्रयोग को करने के बाद, आप

- ❖ एंज़ाइम सक्रियता को प्रभावित करने वाले विभिन्न कारकों की व्याख्या कर सकेंगे;
- ❖ स्टार्च की ऐमिलेस एंजाइम द्वारा पाचन अभिक्रिया का वर्णन कर सकेंगे;
- ❖ स्टार्च और ऐमिलेस की जल–अपघटन अभिक्रिया को ताप किस प्रकार प्रभावित करता है का वर्णन कर सकेंगे है; और

- ❖ सूचक विधि द्वारा लार ऐमिलस की सक्रियता पर ताप के प्रभाव को दर्शा सकेंगे।

4.2 सिद्धांत

उत्प्रेरक के रूप में एंज़ाइम की कार्य करने की क्षमता, प्रोटीन की आकृति पर निर्भर करती है। स्मरण कीजिए कि सभी प्रोटीनों की विशिष्ट आकृति होती है और उनमें विभिन्न सक्रिय बंधन स्थल होते हैं। इन्हीं अभिलक्षणों के कारण ये बहुत विशिष्ट होते हैं– वे केवल एक क्रियाधार या संबंधित क्रियाधारों के एक वर्ग के साथ क्रिया करते हैं। एक विशिष्ट एंज़ाइम उत्प्रेरित अभिक्रिया को निम्नलिखित प्रकार निरूपित किया जा सकता है :

$$\text{एंजाइम} + \text{क्रियाधार} \rightleftharpoons \underset{\text{संकुल}}{\text{एंजाइम - क्रियाधार}} \rightleftharpoons \underset{\text{संकुल}}{\text{एंजाइम - उत्पाद}} \rightleftharpoons \text{एंजाइम} + \text{उत्पाद}$$

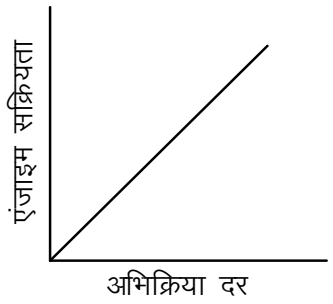
एंज़ाइम सक्रियशीलता को प्रभावित करने वाले कारक

एंज़ाइम सबसे तेजी से कार्य करने वाले उत्प्रेरकों में से एक हैं। किसी क्रियाधार को उत्पाद में परिवर्तित करने की एंज़ाइम की क्षमता, एंजाइम सक्रियता कहलाती हैं।

यह आवश्यक नहीं है कि एंज़ाइम सक्रियता स्थिर हो एंजाइम की सक्रियता को प्रभावित करने वाले कई कारण हो सकते हैं। यहाँ हम एंज़ाइम सक्रियता को प्रभावित कर सकने वाले कुछ सामान्य कारकों पर विचार करेंगे।

1. एंज़ाइम सांद्रता का प्रभाव

एंजाइम उत्प्रेरित अभिक्रियाओं में, प्रत्येक एंज़ाइम अणु में क्रियाधार अणु को उत्पाद में रूपांतरित करने के लिए एक या अधिक सक्रिय बंधन स्थल होते हैं। अतः एंज़ाइम जितना अधिक उपलब्ध होगा, क्रियाधार उतनी तीव्रता से उत्पाद में रूपांतरित होगा। यह मानते हुए कि अन्य सभी कारक स्थिर हों, तो सामान्यतः एंज़ाइम की सांद्रता में वृद्धि के साथ अभिक्रिया दर में आनुपातिक वृद्धि होती है (देखें चित्र 4.1)।

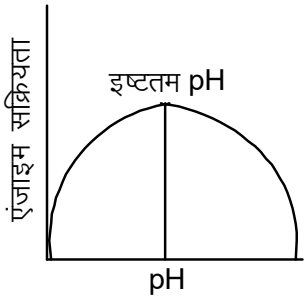


चित्र 4.1: एंज़ाइम सांद्रता और एंजाइम सक्रियशीलता के बीच गणितीय संबंध दिखाते हुए आलेख।

2. pH का प्रभाव

प्रत्येक एंज़ाइम का इस्टतम pH होता है। इस इष्टतम pH से अधिक या कम pH पर एंज़ाइम सक्रियता कम होती है। मानव शरीर में अधिकांशतः एंज़ाइम pH 7 से 8 के बीच इष्टतम रूप से कार्य करते हैं। परंतु कुछ एंज़ाइमों के लिए जैसे कि पाचन–तंत्र

के एंज़ाइमों का इस्टतम pH अधिक अम्लीय (pH 2) या अधिक क्षारीय (pH 8) हो सकता है। इस प्रभाव का कारण वास्तव में एंज़ाइम की, विभिन्न pH मानों पर प्रोटीन संरचना में परिवर्तन होना है जैसा कि अम्ल–क्षार अनुमापनों में सूचक का विभिन्न pH मानों पर रंग में परिवर्तन होता है। दूसरे शब्दों में, इष्टतम pH परिस्थितियों की अपेक्षा भिन्न अम्लीय परिस्थतियों में एंज़ाइमों का विकृतीकरण हो जाता है। एंज़ाइम उत्प्रेरित अभिक्रिया की दर का pH के साथ परिवर्तन को दर्शाता चित्र 4.2 गया है।



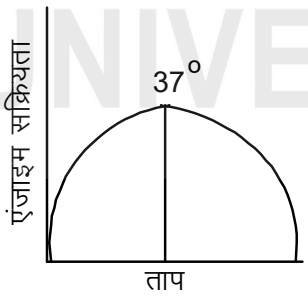
चित्र 4.2: एंज़ाइम उत्प्रेरित अभिक्रिया की दर का pH के साथ परिवर्तन दर्शाता हुआ आलेख।

प्रोटीनो की द्वितीयक, तृतीयक और चतुष्क संरचनाएँ सभी अपेक्षाकृत दुर्बल असहसंयोजी आबंधों जैसे हाइड्रोजन आबंधों, वान डर वाल्स बलों और आयनिक आबंधों पर निर्भर करती हैं जिनके द्वारा प्रोटीन के भिन्न क्षेत्र आपस में बंधित होते हैं। ताप के बढ़ने से प्रोटीन के विभिन्न क्षेत्रों मे यादृच्छिक गति होती है जिससे इन दुर्बल आबंधों का अस्थायीकरण हो जाता है और इस कारण प्रोटीन की आकृति परिवर्तित (विकृतीकरण) हो जाता है।

यदि ये दुर्बल आबंध अधिक संख्या में टूट जाएँ, तो सक्रिय स्थल की आकृति विकृत हो जाएगी और एंजाइम की क्रियाधार के साथ बंधन और अभिक्रिया को उत्प्रेरित करने की क्षमता समाप्त हो जाती है।

ताप का प्रभाव

सामान्यतः किसी रासायनिक अभिक्रिया चाहे वह उत्प्रेरित हो या उत्प्रेरित न हो, की दर में ताप में वृद्धि के साथ वृद्धि होती है। इसका कारण यह है कि निम्न ताप की अपेक्षा उच्च ताप पर अभिक्रिया मिश्रण में उपस्थित अणु तेज गति अग्रसर होते हैं और उनके बीच अधिक ऊर्जा के साथ एक–दूसरे के साथ टकराने (संघट्टन) की प्रवृत्ति बढ़ जाती है। हालांकि यदि ताप बहुत अधिक (70°C से ऊपर) हो जाए तो एंजाइम–उत्प्रेरित अभिक्रियाएँ धीमी हो जाती हैं या रूक भी जाती हैं क्योंकि एंजाइम उच्च ताप पर विकृत हो जाते हैं। चित्र 4.3 एंजाइम सक्रियता पर ताप के प्रभाव को दर्शाया गया है।



चित्र 4.3: अभिक्रिया की दर और ताप के बीच संबंध दर्शाता आलेख

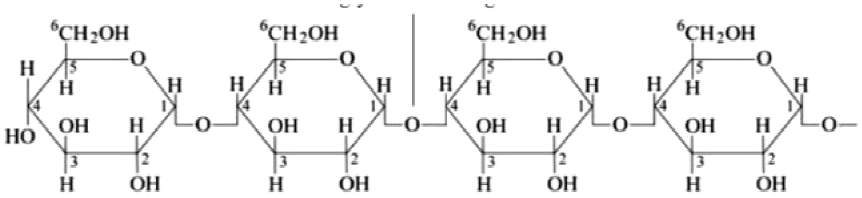
कुछ अन्य कारक भी हैं जो एंजाइम सक्रियता को प्रभावित करते हैं, जैसे कि क्रियाधार सांद्रता का प्रभाव, सहकारक/सहएंजाइम सांद्रता का प्रभाव और संदमक आदि। परंतु यहाँ हम इन कारकों के बारे में विस्तार से चर्चा नही करेंगे।

स्टार्च और लार ऐमिलेस के बीच अभिक्रिया

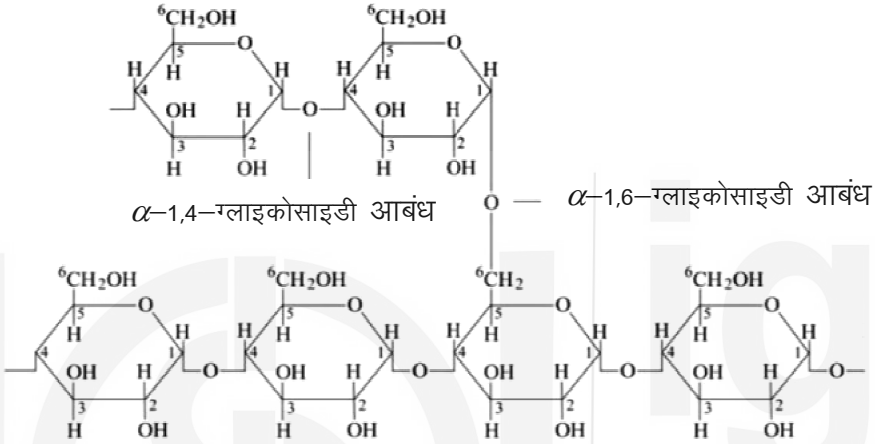
हमारे लार में एक एंजाइम लार ऐमिलेस होता है। यह हमारे भोजन के स्टार्च घटक के साथ अभिक्रिया करता है और उसे मुख्यतः माल्टोस में जल–अपघटित कर देता है। छोटी आंत में, एक बहुत सक्रिय अग्नायशयी (pancreatic) एंजाइम की उपस्थिति में, स्टार्च का ग्लूकोस में पूर्ण जलघटन हो जाता है।

स्टार्च, दो यौगिको–ऐमिलोस और ऐमिलोपेक्टिन द्वारा बना पॉलिसैकेराइड है। ये दोनों बहुलक ग्लाइकोसाइडी आबंधों द्वारा जुड़े ग्लूकोस एकलकों द्वारा बने होते हैं। स्टार्च का पहले डाइसैकेराइड और अंततः ग्लूकोस में टूटना एंजाइम ऐमिलेस द्वारा उत्प्रेरित होता है।

α–1,4–ग्लाइकोसाइडी आबंध



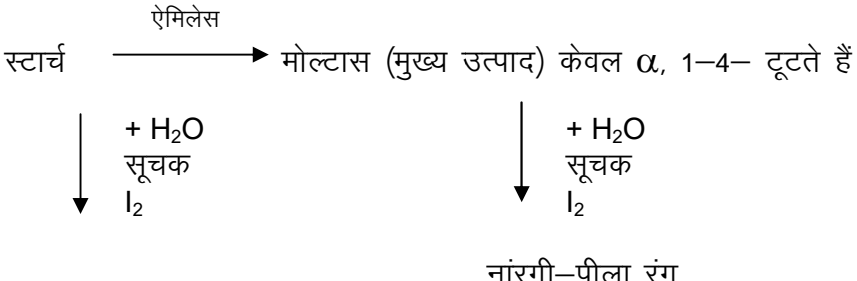
ऐमिलोस



ऐमिलोपेक्टिन

एंजाइम द्वारा उत्प्रेरित किसी अभिक्रिया की दर को जानने का एक सरल तरीका सूचक के उपयोग द्वारा है। यहाँ अध्ययन की जाने वाली इस अभिक्रिया के लिए, स्टार्च के सूचक के लिए आयोडीन विलयन का उपयोग किया जाता है और इससे स्टार्च के ऐमिलेस द्वारा पाचन का अध्ययन किया जा सकता है।

आयोडीन विलयन का विशिष्ट नांरगी–पीला रंग होता है और स्टार्च की उपस्थिति में यह नीला–काला हो जाता है। जलीय विलयन में आयोडीन अणु यादृच्छिक (random) क्रम में व्यवस्थित होते हैं। परंतु, जब आयोडीन विलयन में स्टार्च मिलाई जाती है, तब वह आयोडीन के साथ बंधित हो जाती है और आयोडीन को गैर–यादृच्छिक रूप में व्यवस्थित कर देती है। स्टार्च श्रृंखला द्वारा बनना इस गैर–यादृच्छिक व्यवस्था में आयोडीन नीला रंग देता है। जब स्टार्च ग्लूकोस में टूटता है, तब यह आयोडीन को गैर–यादृच्छिक व्यवस्था में नहीं कर सकता है। अतः विलयन फिर से पीला हो जाता है।



4.3 आवश्यकताएँ

1. विराम घड़ी (stop watch) –1
2. परखनली –20
   (या 6 परखनलियाँ + 3 स्पॉट प्लेटें)
3. ड्रॉपर –3
4. थर्मामीटर –3
5. बीकर –1
6. स्थिर ताप जल ऊष्मक –2

उपलब्ध किए गए विलयन

1. 1% स्टार्च विलयन

   (i) एक 250 cm^3 बीकर में 90 cm^3 आसुत जल लीजिए और उसे हॉट प्लेट पर उबलने तक गर्म कीजिए।

   (ii) आसुत जल के 10 cm^3 में 1 g घुलनशील स्टार्च का चिकना पेस्ट बना लीजिए।

   (iii) एक बार जब जल उबलने लगे तो, उबलते जल वाले बीकर को हॉट प्लेट से नीचे उतार लीजिए। अब स्टार्च के पेस्ट को उबलते जल में डाल दीजिए और तब तक काँच की छड़ से हिलाकर घोलिए जब तक कि स्टार्च पूरी तरह न घुल जाए। प्राप्त विलयन हल्का धुंधला हो सकता है।

   (iv) प्रयोग से पहले स्टार्च विलयन को कक्ष के ताप तक ठंडा होने दें।

2. 1% NaCl विलयन : 100 cm^3 आसुत जल में दृव 1 g NaCl ।
3. आयोडीन विलयन : 100 cm^3 आसुत जल में 1 g आयोडीन, क्रिस्टल और 2 g पोटैशियम आयोडाइड घोल लीजिए।

4.4 कार्य–विधि

1. अगर आपकी प्रयोगशाला में दो बहु छेद जल–ऊष्मक हैं, तो उनमें से एक को 37°C पर और दूसरे को 100°C के लगभग सेट कीजिए। इन दोनों जल–ऊष्मकों को सभी विद्यार्थी बारी–बारी से उपयोग कर सकते हैं आपको कम ताप वाले एक और जल–ऊष्मक की आवश्यकता होगी। आप 250 cm^3 बीकर या कॉपर जल–ऊष्मक को लेकर एक ऐसा जल–ऊष्मक अपने लिए बना सकते हैं। आप इसमें कुछ जल लीजिए और उसमें कुछ बर्फ मिला दीजिए और उसका ताप 0-5°C के बीच स्थिर कर लीजिए। यदि आपके पास बड़ा जल–ऊष्मक न हो तो

आप एक 250 cm^3 बीकर या कॉपर जल–ऊष्मक को लेकर उसका तापमान बुंसेन बर्नर या होट प्लेट द्वारा संचालित कर सकते हैं।

2. एक बीकर में 1% स्टार्च विलयन के 15 cm^3 और NaCl विलयन के 3 cm^3 लीजिए और दूसरे बीकर में आयोडीन विलयन के लगभग 50 cm^3 लीजिए।

3. आप अपने लिए, अपनी लार के 1-2 cm^3 एक छोटे बीकर में लेकर ताज़ा ऐमिलेस विलयन बना सकते हैं (इसके लिए आपको एक बीकर में धीरे से अपनी थूक डालनी होगी)। आप 1 cm^3 लार लीजिए और उसमें जल के 19 cm^3 डालकर अच्छी तरह मिला लीजिए। यदि ऐमिलेस का व्यापारिक विलयन उपलब्ध हो तो आप अपनी लार के स्थान पर उसका उपयोग कर सकते हैं।

4. अब आप परखनलियों के तीन सेट (प्रत्येक सेट में 6–8 परखनलियाँ) तीन अलग–अलग परखनली स्टैंडों में लीजिए। प्रत्येक परखनली स्टैंड को A (5 °C के लिए), B (37 °C के लिए) और C (100 °C के लिए) और प्रत्येक सेट में, परखनलियों को 0,1,2,3..... आदि के रूप में चिन्हित कीजिए।

5. अब तीन परखनलियाँ लेकर, उनमें एक पर प्रयोग परखनली A, दूसरी पर प्रयोग परखनली B और तीसरी पर प्रयोग परखनली C चिहिन्त कीजिए और प्रत्येक में 5 cm^3 स्टार्च विलयन + NaCl विलयन वाले मिश्रण को, ले लीजिए।

6. फिर परखनली A को, बर्फ वाले जल ऊष्मक/बीकर जिसका ताप 5 °C है, में डाल दीजिए। दूसरी परखनली B को 37 °C वाले जल–ऊष्मक में रख दीजिए और तीसरी परखनली, C को 100 °C वाले उबलते जल के बाथा में रख दीजिए।

   इन परखनलियों को इन जल–ऊष्मकों में 10 मिनट के लिए ऐसे ही रखे रहने दीजिए ताकि परखनलियों का ताप जल–ऊष्मक के ताप के समान हो जाए।

7. सभी जल–ऊष्मकों का ताप मापकर उसे रिकार्ड कर लीजिए। अब प्रत्येक परखनली जिसे A, B और C चिहिन्त किया गया था, में लार विलयन का 1 cm^3 डाल दीजिए।

8. इसके बार तुरंत, एक ड्रापर द्वारा परखनली A से कुछ बूंदें लीजिए और उन्हें A श्रेणी की परखनली 0 में डाल दीजिए जिसमें आयोडीन विलयन उपस्थित हैं।

9. इसी प्रकार, नए ड्रॉपर लेकर परखनलियों B और C के लिए दोहराएँ और B तथा C श्रेणियों की परखनलियों जिनमें आयोडीन विलयन लिया हुआ है, उनमें विलयन की कुछ बूंदें डाल लीजिए। आयोडीन में पहली बार अभिक्रिया मिश्रण को डालने को पहले पाठ्यांक के रूप में नोट कर लीजिए।

10. इसी प्रकार, ऊपर दिए चरण को प्रति 2 मिनट के अंतराल पर दोहराएँ और आयोडीन विलयन के रंग में परिवर्तन को नोट कर लीजिए। ऐसा तब तक करते रहिए जब तक कि आयोडीन का रंग न बदलता रहे।

11. भिन्न प्रायोगिक परखनलियों के लिए तब तक लिए गए समय को नोट कीजिए जब तक कि उनमें आयोडीन के साथ कोई रंग न प्राप्त हो जाए।

4.5 प्रेक्षण

समय / मिनट	प्रयोग परखनली A से आयोडीन के साथ अभिक्रिया	प्रयोग परखनली . B से आयोडीन के साथ अभिक्रिया	प्रयोग परखनली C से आयोडीन के साथ अभिक्रिया
0			
2			
4			
6			
8			

4.6 परिणाम

स्टार्च के % विलयन के 5 cm^3 के पूर्ण पाचन के लिए ..... एंजाइम के 5°C पर .... मिनट 37°C पर ..... मिनट और 70°C पर ..... मिनट लगे।

प्रयोग 5

तेल अथवा वसा के साबुनीकरण के मान का निर्धारण

प्रयोग की रूपरेखा

5.1 प्रस्तावना
उद्देश्य
5.2 सिद्धांत
5.3 आवश्यकताएं
5.4 कार्यविधि
5.5 प्रेक्षण
5.6 परिकलन और परिणाम

5.1 प्रस्तावना

तेलों और वसाएं ट्राइग्लिसराइड होते हैं। जिनमें वसा अम्ल समूह की तीन लम्बी श्रृंखलाएँ होती हैं। ये वसा समूह यादृच्छिकतः (randomly) ग्लिसरॉल द्वारा ऐस्टरीकृत रहते हैं। तेलों और वसाओं में यह अंतर है कि सामान्य ताप पर तेल द्रव होते हैं जबकि वसा ठोस होते हैं।

तेल और वसाएं मुख्यतः पादपों के बीच से प्राप्त होते हैं। जानवरों में वे त्वचा के नीच ऊतकों और पेशियों में पाए जाते हैं। लिनोलीक, लिनोलीनिक और ऐराकिडॉनिक अम्ल जैसे कुछ वसा अम्ल हमारे शरीर के लिए बहुत आवश्यक होते हैं। वसाएं और तेल, खाद्य पदार्थों में बहुतायत में पाए जाते हैं जिनका पोषक बहुत अधिक होता है। उनका उपायोग साबुनों, अपमार्जकों, ग्लिसरिन, मोमबत्तियों, मुद्रण स्याही आदि निर्माण में भी होता है।

किसी तेल अथवा वसा का औद्योगिक मान उसके भौतिक अथवा रासायनिक गुणधर्म जैसे गलनांक, विशिष्ट घनत्व, अपवर्तनांक, श्यानता, साबुनीकरण मान, आयोडीन मान, अम्ल मान, ऐसीटिल मान आदि पर निर्भर करता है। इस प्रयोग और प्रयोग 6 में हम इनमें से दो प्राचलों का निर्धारण करेंगे, जो साबुनीकरण मान और आयोडीन मान

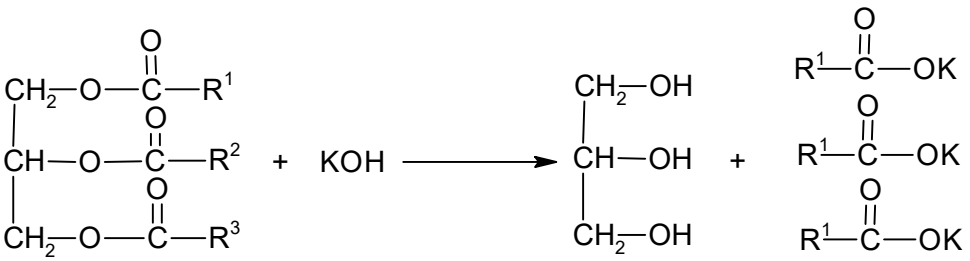
उद्देश्य

इस प्रयोग के अध्ययन करने और निष्पादन के बाद, आपः

- ❖ साबुनीकरण मान की परिभाषा दे सकेंगे; और
- ❖ साबुनीकरण मान का निर्धारण कर सकेंगे।

5.2 सिद्धांत

एस्टरों का जलीय क्षारक अथवा जलीय अम्ल दोनों ही जल–अपघटन करते हैं जिससें घटक अम्ल अथवा ऐल्कोहॉल अंश प्राप्त होते हैं। क्षारीय माध्यम से एस्टर के जल–अपघटन को साबुनीकरण कहते हैं।



सबुनीकरण संख्या अथवा साबनुीकरण मान एक स्वेच्छा मात्रक है जिसे इस प्रकार परिभाषित किया जा सकता है: एक ग्राम तेल अथवा वसा के साबुनीकरण के लिए आवश्यक पोटैशियम हाइड्रॉक्साइड के मिलीग्रामों की संख्या को साबुनीकरण मान कहते हैं। अर्थात् 1 ग्राम वसा अथवा तेल के पूर्ण–जल–अपघटन से प्राप्त वसा अम्ल के पूर्ण उदासीनीकरण के लिए आवश्यक पोटैशियम हाइड्रॉक्साइड के मिलीग्रामों की संख्या साबुनीकरण मान कहलाती है।

साबुनीकरण मान से वसा अथवा तेल के अणुभार का अंदाज मिलता है। साबुनीकरण मान जितना कम होगा, अणुभार उतना ही अधिक होगा। तेल अथवा वसा का औसत अणुभार वसा अम्ल घटकों की कार्बन श्रृंखला की औसत लंबाई का संकेत मिलता है। प्रत्येक तेल का विशिष्ट साबुनीकरण मान होता है।

इस प्रयोग में पहले हम नमूने को पश्चवाही संघनित्र के तहत एथेलॉजी KOH विलयन के साथ उबाला जाता है और पोटैशियम हाइड्रॉक्साइड की अतिरिक्त मात्रा का किसी सूचक की उपस्थिति में मानक HCl के साथ अनुमापन किया जाता है।

5.3 आवश्यकताएँ

उपकरण		**रासायनिक द्रव्य**
शंक्वाकर फ्लास्क (250 cm^3)	1	मानक HCl (*M*/2)
पश्चवाही संघनित्र	1	ऐल्कोहॉल
पिपेट (25 cm^3)	1	पोटैशियम हाइड्रॉक्साइड
ब्यूरेट (25 cm^3)	1	फीनॉल्फथैलीन
जल बाथ		

दिए गये विलयन

2.5 *M* KOH विलयनः इसे तैयार करने के लिए 24.2g KOH को 100 cm^3 जल में घोला जाता है।

***M*/2 HCl विलयन**

5.4 कार्य–विधि

1. एक 250 cm^3 शंक्वाकार फ्लास्क में लगभग 1 g तेल ठीक–ठीक तोलें।
2. तेल को 250 cm^3 ऐल्कोहॉल में घोलं और पिपेट द्वारा 25 cm^3 के 2.5 M KOH मिलाएं।
3. पश्चवाही जल संघनित्र को फ्लास्क के साथ जोड़ें और फ्लास्क में कुछ क्वथन–चिप डाल दें।
4. फ्लास्क को जल–बाथ में लगभग 1 घंटे तक गरम करें बीच–बीच में फ्लास्क को हिलाते रहें।
5. एक घंटे बाद गरम करना रोक दें और गरम विलयन में 0.5 से 1.0 cm^3 फीनॉल्फथैलीन मिलाएं।
6. अतिरिक्त क्षार का मानक *M*/2 HCl के साथ अनुमापन करें ताकि सूचक का रंग बदल जाए। प्रयुक्त HCl का आयतन प्रेक्षण सारणी II में रिकार्ड करें।
7. दो सुसंगत पठनांक प्राप्त करने के लिए पुनः उसी तरह अनुमापन करें।
8. इसी प्रकार KOH विलयन की 25 cm^3 मात्रा के साथ रिक्त परीक्षण करें। प्रयुक्त HCl के आयतन को प्रेक्षण सारणी 1 में रिकार्ड करें।

5.5 प्रेक्षण

शंक्वाकर फ्लास्क का द्रव्यमान = m_1 =.....g

शंक्वाकर फ्लास्क + तेल का द्रव्यमा = m_2 =.....g

स्थानांतरित तेल का द्रव्यमान = $m_2 - m_1 = m$ =.....g

=.....g

प्रेक्षण सारणी I
(रिक्त प्रयोग)
KOH का विलयन प्रति HCl

क्रमांक	KOH विलयन का आयतन, cm^3 में	ब्यूरेट पठनांक		प्रयुक्त HCl का आयतन, cm^3 में (अंतिम–आरंभिक)
		आरंभिक	अंतिम	
1	25			
2	25			
3	25			

प्रेक्षण सारणी II
(मूल प्रयोग)
तेल नमूना + KOH विलयन प्रति HCl

क्रमांक	तेल नमूना + **KOH** विलयन का आयतन, **cm^3** में	ब्यूरेट पठनांक		प्रयुक्त .... का आयतन, **cm^3** में (अंतिम–आरंभिक)
		आरंभिक	अंतिम	
1				
2				
3				

5.6 परिकलन और परिणाम

साबुनीकरण–मान निम्न सूत्र से प्राप्त होता है:

साबनुीकरण मान (S.V.) = $\frac{56.1 \times M_m \times (V_0 - V_1)}{m}$

जिसमें,

V_0 = रिक्त अनुमापन में प्रयुक्त HCl का आयतन, cm^3 में

V_1 = मूल अनुमापन में प्रयुक्त HCl का आयतन, cm^3 में

M_m = HCl की मोलरता

m = तेल का द्रव्यमान, g में

साबनुीकरण मान (S.V.) = = ...

प्रयोग 6

तेल अथवा वसा के आयोडीन मान का निर्धारण

प्रयोग की रूपरेखा

6.1 प्रस्तावना
उद्देश्य
6.2 सिद्धांत
6.3 आवश्यकताएँ
6.4 क्रियाविधि
6.5 प्रेक्षण
6.6 परिकलन और परिणाम

6.1 प्रस्तावना

किसी वसा तेल का आयोडीन मान अथवा संख्या उसमें असंतृप्ति की मात्रा का माप होता है और उससे उसके शुष्कन–गुण का अनुमान लगाया जा सकता है। आयोडीन मान, अणु में मौजूद द्वि–आबंधों की संख्या पर निर्भर करता है। कम आयोडीन मान का यह अर्थ है कि ट्राइग्लिसराइड की कार्बन श्रृंखला में कार्बन–कार्बन द्वि–आबंध बहुत कम हैं जबकि उच्च आयोडीन मान से यह संकेत मिलता है कि अणु में द्वि–आबंधों की संख्या बहुत अधिक है। यदि ट्राइग्लिसराइड में कोई भी द्वि–आबंध न हो तो आयोडीन मान शून्य होगा।

आयोडीन मान की परिभाषा इस प्रकार की दी जा सकती है : यह 100 ग्राम तेल अथवा वसा द्वारा अवशोषित हैलोजन के ग्रामों की संख्या होती है और आयोडीन के भार के रूप में व्यक्त की जाती है।

गुणधर्म की माप पर आधारित होती है। इस प्रयोग में हम अनुमापनी विधि का उपयोग, ग्लाइसिन के आकलन के लिए आप फॉर्मिलीकरण विधियों का उपयोग करेंगे।

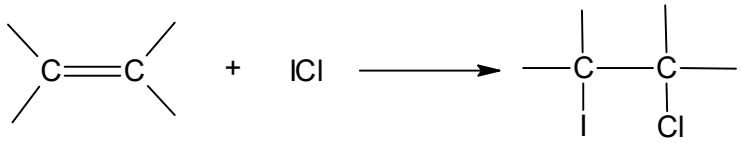
उद्देश्य

इस प्रयोग के अध्ययन करने और निष्पादन के बाद, आपः

- ❖ आयोडीन मान की परिभाषा दे सकेंगे; और
- ❖ आयोडीन का निर्धारण कर सकेंगे।

6.2 सिद्धांत

तेल की ज्ञात मात्रा का, ICl अथवा CCl_4 या $CHCl_3$ में बने ICl के विलयन के साथ उपचार किया जाता है और अवशोषित ICl की मात्रा निर्धारित कर ली जाती है। इस प्रकार आयोडीन संख्या ज्ञात हो जाती है। इस प्रक्रम में निम्नलिखित अभिक्रिया होती है:



अभिक्रिया के पूर्ण होने पर KI विलयन मिलाया जाता है और अनाभिक्रियित ICl द्वारा I_2 में ऑक्सीकृत हो जाता है।

$$ICl + KI \longrightarrow I_2 + KCl$$

(अनभिक्रियत)

मुक्त आयोडीन का स्टार्च सूचक की उपस्थिति में मानक NaS_20_3.विलयन के साथ अनुमापन किया जाता है।

$$I_2 + 2Na_2S_2O_3 \longrightarrow 2\,NaI + Na_2S_4O_6$$

6.3 आवश्यकताएँ

उपकरण		रासायनिक द्रव्य
उपकरण फ्लास्क (250 cm^3)	1	ग्लैशल ऐसीटिक अम्ल
ब्यूरेट (50 cm^3)	1	कार्बन टेट्राक्लोराइड
पिपेट (25 cm^3)	1	आयोडीन ट्राइक्लोराइड
		आयोडीन, शुद्ध और पुनः ऊर्ध्वपातित
		पोटैशियम आयोडाइड
		सोडियम थायोसल्फेट
		स्टार्च विलयन

उपलब्ध विलयन

पोटैशियम आयोडाइड: इसे100 g पोटैशियम आयोडाइड को 1 dm^3 जल में घोलकर बनाया जाता है।

विज विलयन (ICl): इसे बनाने के लिए 9 g आयोडीन मोनोक्लोराइड को 700 cm^3 ग्लैशल ऐसीटिक अम्ल (शुद्ध) और 300 cm^3 कार्बन टेट्राक्लोराइड के मिश्रण में घोला जाता है।

सोडियम थायोसल्फेट (*M*/10): लगभग 25 g सोडियम थायोसल्फेट पेंटाहाइड्रेट ($Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$; FW 248.19) 1 dm^3 आयतनमापी फ्लास्क में जल में घोलकर 0.1 *M* थायोसल्फेट घोल तैयार करें। अधिक सटीक परिणामों के लिए उपयोग करने से पहले पोटैशियम डाइक्रोमेट के साथ सोडियम थायोसल्फेट विलयन को मानकीकृत करना आवश्यक है

6.4 कार्य–विधि

लिए जाने वाले तेल की मात्रा उसके अनुमानित आयोडीन मान के अनुसार भिन्न–भिन्न होती है जैसा कि नीचे सारणी में दिया गया है:

अनुमानित आयोडीन मान	लिया जाने वाला भार (g)
0-5	3.0
6-20	1.0
21-50	0.40
51-100	0.20
101-150	0.15
151-200	0.10

1. एक 250 cm^3 शंक्वाकार फ्लास्क में 15 cm^3 कार्बन टेट्राक्लोराइड लेकर उसमें तेल की समुचित मात्रा घोलें।
2. मिश्रण में ब्यूरेट से 25 cm^3 विज विलयन मिलाएं।
3. फ्लास्क को बंद करके धीरे से हिलाएं और अंधेरे में लगभग 20°C पर स्थित रहने दें।
4. जिन तेलों का आयोडीन मान 150 से कम हो उनके लिए फ्लास्क को 1 घण्टे तक ओर जिन तेलों का आयोडीन मान 150 से अधिक हो उनके लिए फ्लास्क को 2 घण्टे तक अंधेरे में रखें।
5. उसके बाद 25 cm^3 पोटेशियम आयोडाइड विलयन और 150 cm^3 जल मिलाएं।
6. स्टार्च विलयन का सूचक की भांति उपयोग करते हुए मुक्त आयोडीन का मानक *M*/10 सोडियम थायोसल्फेट विलयन के साथ अनुमापन करें। नीले रंग के ठीक लुप्त होने तक अनुमापन जारी रखें। प्रयुक्त of $Na_2S_2O_3$ का मान प्रेक्षण सारणी-II में रिकार्ड करें।
7. दो सुगंगत पठनांक प्राप्त होने तक प्रयोग को दोहराएं।

8. समान परिस्थितियों में तेल के बिना 25 cm^3 विज विलयन लेकर रिक्त परीक्षण करें।

प्रयुक्त $Na_2S_2O_3$ के आयतन को प्रेक्षण सारणी-I में रिकार्ड करें।

6.5 प्रेक्षण

शंक्वाकर फ्लास्क का द्रव्यमान = m_1 =.....g

शंक्वाकर फ्लास्क + तेल का द्रव्यमा = m_2 =.....g

स्थानांतरित तेल का द्रव्यमान = $m_2 - m_1 = m$ =.....g

=.....g

प्रेक्षण सारणी III
(रिक्त प्रयोग)
ICl विलयन प्रति *M*/10 सोडियम थायोसल्फेट विलयन

क्रमांक	**ICl** विलयन का आयतन, **cm^3** में	ब्यूरेट पठनांक		प्रयुक्त थायोसल्फेट का आयतन विलयन का आयतन, **cm^3** में (अंतिम–आरंभिक)
		आरंभिक	अंतिम	
1				
2				
3				

प्रेक्षण सारणी II
(मूल प्रयोग)
तेल नमूना + ICl विलयन प्रति *M*/10 सोडियम थायोसल्फेट का आयतन

क्रमांक	तेल नमूना + **ICl** विलयन का आयतन, **cm^3** में	ब्यूरेट पठनांक		प्रयुक्त थायोसल्फेट का आयतन, **cm^3** में (अंतिम–आरंभिक)
		आरंभिक	अंतिम	
1				
2				
3				

6.6 परिकलन

आयोडीन मान (I.V.) नीचे दिए गए सूत्र द्वारा प्राप्त होता है:

आयोडीन मान (I.V.) = $\frac{12.69 \times M_m \times (V_0 - V_1)}{m}$

जिसमें,

V_0 = रिक्त अनुमापन में प्रयुक्त सोडियम थायोसल्फेट का आयतन

V_1 = मूल अनुमापन में प्रयुक्त सोडियम थायोसल्फेट का आयतन

M_m = सोडियम थायोसल्फेट की मोलरता

m = तेल का द्रव्यमान g में

आयोडीन मान (I.V.) = = ...

आमतौर पर इस्तेमाल होने वाले खाद्य तेलों का आयोडीन मूल्य नीचे दिया गया है।

Type of Oil	**Iodine Value**	**Type of Oil**	**Iodine Value**
Coconut oil	7.5-10.5	Groundnut oil	87-98
Safflower oil	138-146	Soybean oil	125-140
Cottonseed oil	98-115	Mustard oil	98-110
Sunflower oil	100-140	Rice bran oil	90-105
Sesame oil	103-115	Palm oil	44-58

प्रयोग 7

अपचायक और अनअपचायक शर्कराओं के बीच अंतर

प्रयोग की रूपरेखा

7.1 प्रस्तावना

उद्देश्य

7.2 सिद्धांत

7.3 आवश्यकताएं

7.4 कार्यविधि

7.5 प्रेक्षण

7.6 परिणाम

7.1 प्रस्तावना

BCHCT-135 पाठ्यक्रम में आपने कार्बोहाइड्रेट के रसायन के बारे में पढ़ रखा होगा। जैसा कि आप जानते होंगे कार्बोहाइड्रेट कार्बन, हाइड्रोजन और ऑक्सीजन के यौगिक हैं। इसका सामान्य सूत्र $C_n(H_2O)_n$ या $C_n(H_2O)_{n-1}$ है। ये सूत्र दर्शाते हैं कि ये कार्बन के हाइड्रेट हैं। इसी कारण से पहले रसायनज्ञों ने इसका सामान्य नाम कार्बोहाइड्रेट दिया था। जैसा कि आप पहले ही कार्बोहाइड्रेटों के बारे में पढ़ चुके हैं, आम तौर पर कार्बोहाइड्रेट शर्करा कहलाते हैं, इन्हें सैकेराइड से भी जाना जाता है। इस प्रयोग में अपचायक और अनपचायक शर्कराओं के बीच अंतर स्थापित करने के लिए कुछ परीक्षण करेंगे।

उद्देश्य

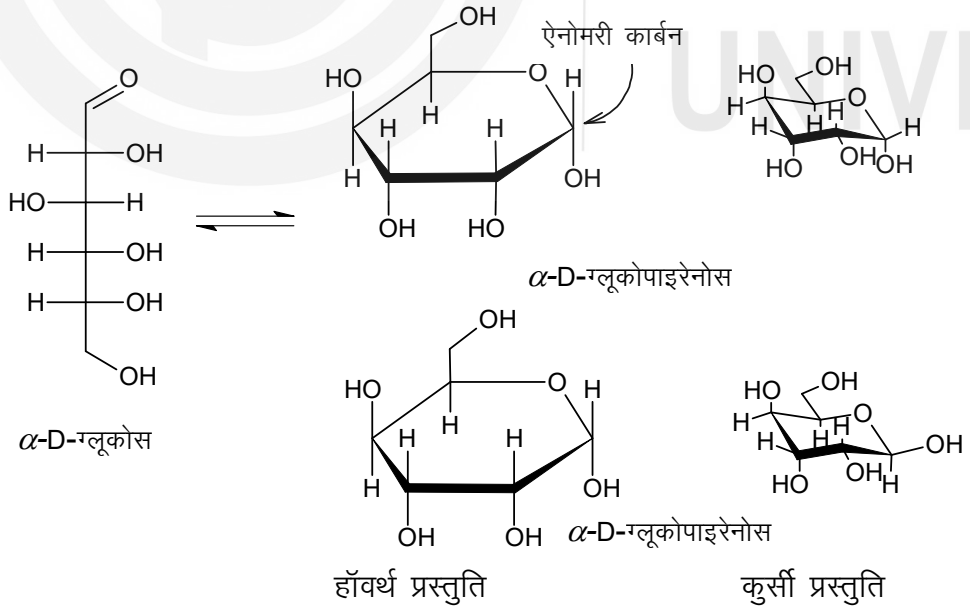
इस प्रयोग के अध्ययन और निष्पादन के बाद

- ❖ मोनोसैकेराइड, ओलिगोसैकेराइड और पॉलिसैकेराइड को परिभाषा दे सकेंगे;
- ❖ अपचायक और अनअपचायक के बीच अंतर करने वाले विभिन्न प्रकार के गुणात्मक परीक्षण के रसायन की व्याख्या कर सकेंगे; और
- ❖ अपचायक और अनअपचायक शर्कराओं के अंतर के लिए विभिन्न परीक्षण जैसे कि फेलिंग, बेनेडिक्ट और बार्फोड परीक्षण कर सकेंगे।

7.2 सिद्धांत

प्रयोग के विवरण में जाने से पहले हम कुछ महत्वपूर्ण बिन्दुओं पर पुनः विचार करते हैं। वास्तव में कार्बोहाइड्रेट पॉलिहाइड्रॉक्सी ऐल्डीहाइड और पॉलिहाइड्रॉक्सी कीटोन होते हैं। अतः यह क्रमशः ऐल्डोस और कीटोस से भी उल्लेखित करते हैं। जैसा कि आपने कार्बोहाइड्रेटों के बारे में पहले के पाठ्यक्रम में अध्ययन किया था, कार्बोहाइड्रेटों को आणविक इकाइयों के आधार पर तीन प्रमुख वर्गों में वर्गीकृत किया जा सकता है। मोनोसैकेराइड वे कार्बोहाइड्रेट होते हैं जिन्हें जल अपघटन द्वारा छोटी इकाइयों में विभक्त नहीं किया जा सकता है। इनमें 3 से 7 तक कार्बन हो सकते हैं। इनके मुख्य उदाहरण ग्लूकोस और फ्रक्टोस हैं। ओलिगोसैकेराइडों के जल अपघटन से 2–6 मोनोसैकेराइड इकाइयां प्राप्त होती हैं और प्राप्त होने वाली मोनोसैकेराइड इकाइयों की संख्या के अनुसार उन्हें डाइसैकेराइड, ट्राइसैकेराइड आदि नामों से जाना जाता है। इनके मुख्य उदाहरण सूक्रोस, लैक्टोस और मोल्टोट हैं। पॉलिसैकेराइडों के जल अपघटन से छ से अधिक मोनोसैकेराइड इकाइयां प्राप्त होती है। इनके मुख्य उदाहरण स्टार्स और सेलुलोस हैं।

छः कार्बन वाले मोनोसैकेराइड जैसे कि ग्लूकोस में हाइड्रॉक्सिल समूह और कार्बोनिक समूह अंतः अणुक अभिक्रिया से चक्रीय **हेमीऐसीटिल** बनाते हैं। अभिक्रिया करने वाले कार्बोक्सिल समूह के कार्बन को **ऐनोमरी कार्बन** (anomeric carbon)कहते हैं। इस कार्बन पर दो अभिक्रिया त्रिविम समावयव सम्भव है अर्थात अल्फा (α-) और बीटा (β-)। इन समावयवों को **एनोमर** (anomer) कहते हैं। अचक्रीय रूप के द्वारा ये अंतर–रूपांतरण हो सकते इस प्रक्रिया को **ध्रुवण घूर्णन** (mutarotation) कहते हैं। (देखें चित्र 7.1) जलीय विलयन में सम्य अवस्था में 36% α–ऐनोमर 64% β–ऐनोमर और (0.02%) अचक्रीय रूप में होते हैं। ग्लूकोस के समान फ्रक्टोस चक्रीय हैमीकीटैल बनाते हैं।



चित्र 7.1: ग्लूकोस के एनोमर

कार्बोहाइड्रेटों का गुणात्मक अभिनिर्धारण निर्जलित अम्ल (H_2SO_4) और फीनॉल के साथ संघनन अभिक्रिया द्वार कर सकते हैं। इसमें सम्मलित मोलिश परीक्षण, सेलिवानॉय परीक्षण हैं। इन परीक्षणों का उपयोग कार्बोहाइड्रेट और अकार्बोहाइड्रेट के अंतर के लिए,

ऐल्डोस और कीटोस अंतर के लिए, पेन्टोस और हैक्सोस के अंतर के लिए करते हैं। दूसरे वर्ग के अभिकारक ऑक्सीकारक अभिकर्मक हैं, जैसे कि कॉपर(II) आयनों का विलयन। इस प्रयोग में हम कार्बोहाइड्रेटों की कॉपर(II) आयनों से बने अभिकर्मकों की ऑक्सीकरण अभिक्रियाओं पर ध्यान देंगे। इस वर्ग में तीन सामान्य अभिकर्मक हैं: फेलिंग, बेनेडिक्ट और बाफोर्ड अभिकर्मक। ये अभिकर्मक एक मृदु ऑक्सीकारक होते हैं। इन अभिकर्मकों में उपस्थित कॉपर(II) आयन कुछ कार्बोहाइड्रेटों का ऑक्सीकरण कर अम्लों में परिवर्तित कर देते हैं। क्षारीय कॉपर(II) आयन (Cu^{2+}) आसानी से मोनोसैकेराइडों और डाइसैकेराइडों का ऑक्सीकरण कर देता है। साथ ही कॉपर आयन(II) (Cu^{2+}) को कॉपर(I) आयन (Cu^{+}) में अपचयन कर देता है। इस अभिक्रिया के परिवर्तन को गहरे नीले रंग के लाल भूरे या ईंट के समान लाल रंग में बदलाव से पहचान लेते हैं।

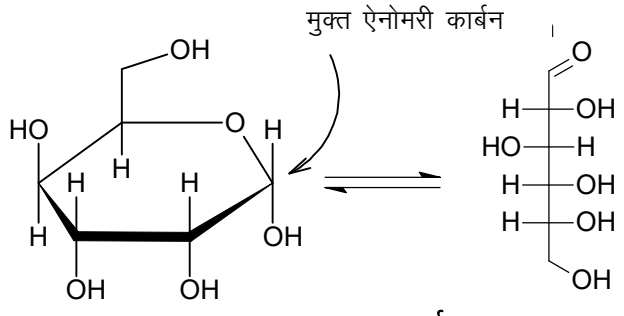
अपचायक और अनअपचायक शर्करा

कोई भी शर्करा जो ऑक्सीकरण करने में सक्षम हैं और ऑक्सीकारक जैसे कि कॉपर(II) आयन (Cu^{2+}) को कॉपर(I) आयन (Cu^{+}) में अपचयन करती है, अपचायक शर्करा कहलाती है। जो शर्करा ऑक्सीकारक का उपचयन नहीं कर पाती है, अनअपचायक शर्करा कहलाती है। सभी मोनोसैकेराइड अपचायक शर्करा हैं। इनमें अभिक्रियाशील कार्बोनिल ऐल्डीहाइड या चक्रीय हेमीऐसीटैल के रूप में होता है। ऐनोमरी कार्बन की उपस्थिति से भी हम अपचायक और अनअपचायक शर्कराओं के बीच अन्तर कर सकते हैं। यदि किसी शर्करा में ऐनोमरी कार्बन की ऑक्सीजन किसी और समूह से नहीं जुड़ी है वह शर्करा आसानी से ऐल्डोस में परिवर्तित हो जाती है और एक अपचायक अभिकर्मक की भांति अभिक्रिया कर सकती है और इस प्रकार की शर्करा को अपचायक शर्करा कहा जाता है।

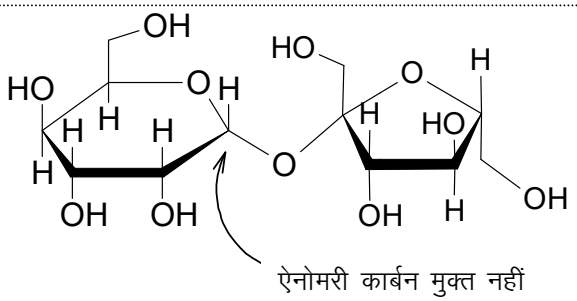
अपचायक शर्करा शर्करा के मामले में क्षार की उपस्थिति विशेष रूप से उच्च पीएच और तापमान ईनॉलीकरण का कारण बनती है। यह ऑक्सीकरण अभिक्रियाओं की अम्लीय पीएच की तुलना में संवेदनशीलता को अधिक कर देता है। इसलिए ये शर्करा कुछ हल्के ऑक्सीकारक जैसे तांबा(II) आयन और Ag आयन का अपचायन करने में सक्षम होते हैं। अपचायक शर्करा का अनअपचायक के बीच अंतर करने के लिए इस श्रेणी के अधिकांश प्रयुक्त अभिकर्मक फेलिंग परीक्षण और बेनेडिक्ट परीक्षण हैं। बारफोएड के परीक्षण में हल्के अम्लीय स्थिति का उपयोग किया जाता है (तांबा(II) ऐसीटेट और ऐसिटिक अम्ल) क्योंकि इसकी वजह से यह बेनेडेट्स अभिकर्मक की तुलना में कम अभिक्रियाशील है।

सभी मोनोसैकेराइड अपचायक शर्करा है क्योंकि उनमें सक्रीय कार्बोनिल समूह (एल्डीहाइड समूह) या हेमीऐसीटैल होता है। कुछ डाइसैकेराइड जिनमें मुक्त या चक्रीय हेमीऐटैल कार्बोनिल होता है वे भी अपचायक शर्करा होते हैं जैसे कि लेक्टोस। कुछ डाइसैकेराइड जैसे कि सूक्रोस अनअपचायक शर्करा है। यह कॉपर(II) के विलयन के साथ अभिक्रिया नहीं करता है।

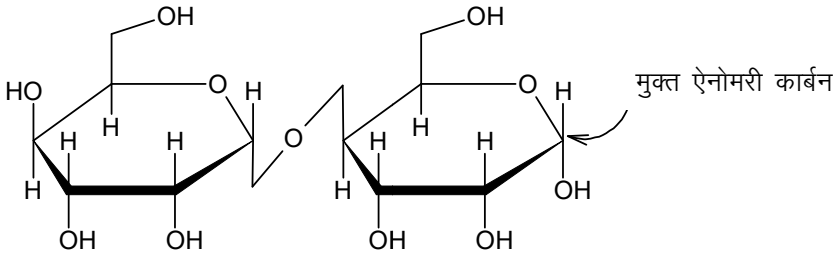
ग्लूकोस के बड़े बहुलक जैसे कि स्टार्च, अपचायक शर्करा नहीं होते है क्योंकि हेमीऐसीटैल समूह के सांद्रता बहुत कम होती है। अपचायक और अनअपचायक शर्कराओं के इस संक्षिप्त विवरण के पश्चात अभीकर्मकों और परीक्षणों की चर्चा करेंगे जिन्हें अपचायक और अनअपचायक शर्कराओं के बीच अंतर स्थापित करने के लिए प्रयोग में लाते हैं।



अपचायक शर्करा

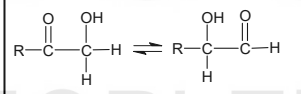


सूक्रोस
अनअपचायक शर्करा



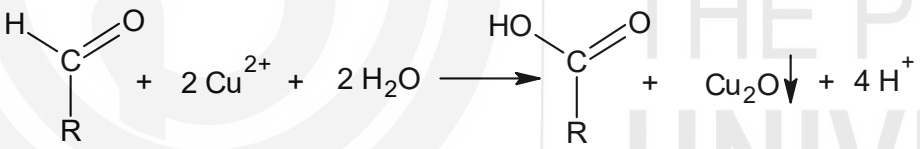
लेक्टोस अपचायक शर्करा

कीटोस शर्करा अपचायक शर्करा हो सकती है। अभिक्रिया अवस्था में कीटोस पुनर्विन्यास अभिक्रिया से ऐल्डोस में परिवर्तित हो जाते हैं जो कि ऑक्सीकारक अभिकर्मक जैसे कि बेनेडिक्ट या फेलिंग का अपचयन कर सकते हैं।



फेलिंग और बेनेडिक्ट परीक्षण

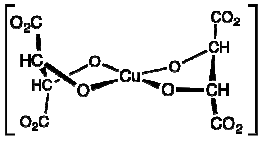
दोनों फेलिंग और बेनेडिक्ट परीक्षण अपचायक और अनअपचायक शर्कराओं में अंतर के लिए प्रयोग में लाते हैं। इन परीक्षणों में कॉपर(II) आयन, Cu^{2+} का अपचयन कॉपर(I) आयन, Cu^{+} में होता है और अपचायक शर्करा ऑक्सीकरण से कार्बोक्सिलिक अम्ल में परिवर्तित हो जाती है।



कॉपर(I) ऑक्साइड का ईंट के समान लाल रंग की उपस्थिति अपचायक शर्करा की पुष्टि करती है। अनअपचायक शर्करा इन अभिकर्मकों से अभिक्रिया नहीं करती हैं।

कॉपर(II) आयन की विलेयता को बढ़ाने के लिए और कॉपर(II) आयन को कॉपर हाइड्रॉक्साइड के अपक्षेप को रोकने के लिए दोनों अभिकर्मकों में संकुलन कर्मक प्रयोग करते हैं। फेलिंग विलयन के लिए टोर्ट्रेट और बेनेडिक्ट विलयन के लिए सिर्ट्रेट प्रयुक्त करते हैं।

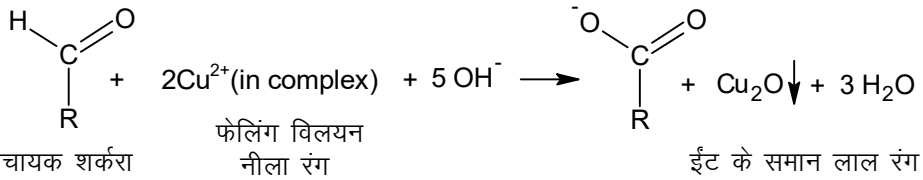
फेलिंग विलयन को प्रयोगशाला में ताजा बनाते हैं। यह दो अलग विलयन से बनता है। फेलिंग A और फेलिंग B, फेलिंग A कॉपर सल्फेट पेटाहाइड्रेट ($CuSO_4$ $5H_2O$) का नीले रंग का जलीय विलयन है और फेलिंग B पोटैशियम सोडियम टार्ट्रेट (रोशेल लवण) और प्रबल क्षारक (NaOH/KOH) का जलीय विलयन होता है।



बिस्टार्ट्रेटोक्यूप्रेट संकुल

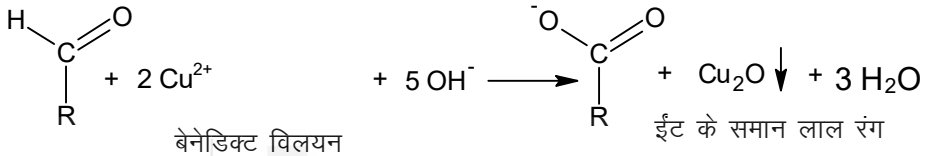
फेलिंग A & B के मिश्रण में टार्ट्रेट आयन Cu^{2+} आयनों से किलेट करते हैं और बिस्टार्ट्रेटोक्यूप्रेट संकुल बनाते हैं, जैसे कि मार्जिन में चित्र द्वारा दर्शाया गया है। टार्ट्रेट आयन कॉपर के साथ संकुलन से $CuSO_4$ $5H_2O$ और NaOH के अभिक्रिया से बनने वाले $Cu(OH)_2$ के अपक्षेप को बनने को रोकता है।

ऐल्डोस शर्करा और कॉपर(II) आयनों के बीच अभिक्रिया को निम्न प्रकार से लिख सकते हैं :



अपचायक शर्करा
फेलिंग विलयन नीला रंग
ईंट के समान लाल रंग

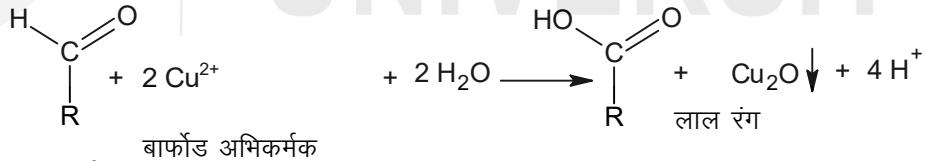
बेनेडिक्ट विलयन एक चमकदार नीले रंग का विलयन है जिसे कॉपर सल्फेट ($CuSO_4$ $5H_2O$), सोडियम सिट्रेट और सोडियम कार्बोनेट के आसुत जल में घोलकर बनाते हैं। सिट्रेट कॉपर(II) आयनों को अधिक स्थायित्व प्रदान करता है ऐल्डोस शर्करा और बेनेडिक्ट विलयन की बीच होने वाल अभिक्रिया को निम्न प्रकार से लिख सकते हैं।



अपचायक शर्करा
बेनेडिक्ट विलयन नीला रंग
ईंट के समान लाल रंग

बार्फोड अभिकर्मक

बार्फोड अभिकर्मक ऐथेनोइक अम्ल (ऐसीटिक अम्ल) का और कॉपर ऐसीटेट का मिश्रण है। इस अभिकर्मक का उपयोग भी अपचायक शर्करा और अनअपचायक शर्करा के बीच अंतर स्थापित करने के लिए करते हैं, लेकिन इसके अधिक सुग्राही होने के कारण इसे मोनोसैकेराइड और डाइसैकेराइड के बीच अंतर स्थापित करने के लिए भी कर सकते हैं। डाइसैकेराइड की तुलना से मोनोसैकेराइड के साथ बार्फोड अभिकर्मक अधिक तीव्रता से अभिक्रिया करता है। लाल रंग के बनने की दर से मोनोसैकेराइड और डाइसैकेराइड के बीच अंतर किया जा सकता है। कुल अभिक्रिया के निम्न प्रकार से व्यक्त कर सकते हैं।



अपचायक शर्करा
बार्फोड अभिकर्मक
लाल रंग

7.3 आवश्यकताएँ

उपकरण		रासायनिक पदार्थ
परखनलियां	6	फेलिंग विलयन A और B
जल बाथ या बीकर 500 cm^3	1	बेनेडिक्ट विलयन
परखनली स्टेंड	1	बार्फोड विलयन
परखनली होल्डर	2	शर्करा : ग्लूकोस, फ्रक्टोस लैक्टोस, माल्टोस, सूक्रोस, स्टार्च

दिए गये विलयन

फेलिंग विलयन

फेलिंग विलयन A : इसे 7 g कॉपर(II) सल्फेट पेटाहाइड्रेट $CuSO_4 . 7H_2O$ को 100 cm^3 जल में घोलकर प्राप्त किया जा सकता है।

फेलिंग विलयन B : इसे 35 g सोडियम पोटेशियम टार्ट्रेट और 10 g NaOH को 100 cm^3 जल में घोलकर प्राप्त किया जा सकता है।

बेनेडिक्ट विलयन

इसे 10 g निर्जलिय सोडियम कार्बोनेट 17 g सोडियम सिर्ट्रेट और 1.7 g कॉपर(II) सल्फेट पेटाहाइड्रेट ($Cu_2SO_4.5H_2O$) को 100 cm^3 जल में घोलकर प्राप्त कर सकते हैं।

बार्फोड विलयन

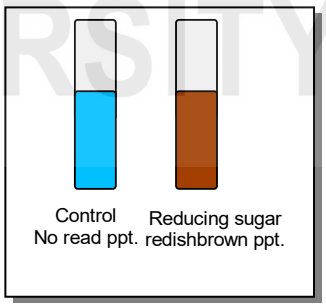
इसे 13.3 g कॉपर ऐसीटेट में 200 cm^3 आसुत जल में घोलकर तथा 1.8 cm ग्लैशल ऐसिटिक अम्ल मिलकर बना सकते हैं।

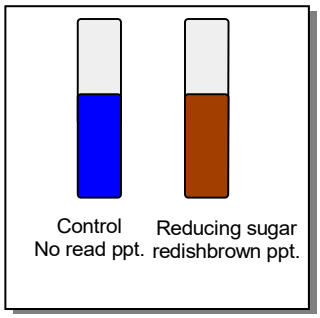
5% शर्करा विलयन (ग्लूकोस, फ्रक्टोस, लैक्टोस, माल्टोस, सूक्रोस और स्टार्च) 5 g प्रत्येक शर्करा लेकर 100 cm^3 जल में घोलकर बना सकते हैं।

7.4 कार्यविधि

फेलिंग परीक्षण के लिए कार्यविधि

1. एक शुष्क परखनली में 1cm^3 परीक्षण विलयन लेते हैं।
2. एक अन्य परखनली में 1cm^3 आसुत जल लेते हैं। इसे एक नियंत्रण प्रयोग के तौर पर तुलना के लिए करते हैं।
3. 2 cm^3 प्रत्येक फेलिंग विलयन A & B एक परखनली में लेते हैं और इस मिश्रण का 2 cm शर्करा के नमूने में और 2 cm^3 आसुत जल में मिलाते हैं।
4. दोनों परीक्षण विलयन और आसुत जल की परखनलियों को परखनली होल्डर की मदद से उबलते जल वाले जल बाथ में 3 से 5 मिनट के लिए रखते हैं।
5. परखनलियों में लाल भूरे या ईंट के समान लाल रंग बनने पर ध्यान देते हैं।
6. रंग परिवर्तन के परीक्षण को प्रेक्षण सारणी I में लिखें।
7. इस प्रक्रिया को और दूसरे शर्कराओं के विलयन और अज्ञात शर्करा के विलयन के लिए दोहराएं।





बेनेडिक्ट परीक्षण के लिए कार्यविधि

1. एक शुष्क परखनली में 1cm^3 परीक्षण विलयन लेते हैं।
2. एक अन्य परखनली में 1cm^3 आसुत जल लेते हैं। इसे एक नियंत्रण प्रयोग के तौर पर तुलना के लिए करते हैं।

3. दोनों परखनलियों में 2 cm^3 बेनेडिक्ट विलयन मिलाते हैं।

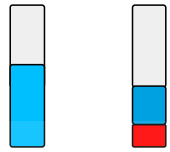
4. परीक्षण विलयन और आसुत जल की दोनों परखनलियों को परखनली होल्डर की मदद से उबलते जल वाले जल बाथ में 3 से 5 मिनट के लिए रखते हैं।

5. परखनलियों में लाल भूरे या ईंट के समान लाल रंग बनने पर ध्यान देते हैं।

6. रंग परिवर्तन के परीक्षण को प्रेक्षण सारणी II में लिखें।

7. इस प्रक्रिया को और दूसरे शर्कराओं के विलयन और अज्ञात शर्करा के विलयन के लिए दोहराएं।

बार्फेड परीक्षण के लिए कार्यविधि



नियंत्रण प्रयोग प्रयोग

1. एक शुष्क परखनली में 1cm^3 परीक्षण विलयन लेते हैं।

2. एक अन्य परखनली में 1cm^3 आसुत जल लेते हैं। इसे एक नियंत्रण प्रयोग के तौर पर तुलना के लिए करते हैं।

3. दोनों परखनलियों में 2 cm^3 बार्फेड विलयन मिलाते हैं।

4. परीक्षण विलयन और आसुत जल की दोनों परखनलियों को परखनली होल्डर की मदद से उबलते जल वाले जल बाथ में रखते हैं।

5. यह जांचने के लिए कि क्या लाल रंग का अपक्षेप को बनता हैं या नहीं, जल बाथ से नियमित रूप से टेस्ट ट्यूब को हटा कर देखें। जल बाथ में बार–बार टेस्ट ट्यूब वापस डालें। लाल रंग विकसित बनने में लगने वाले समय पर ध्यान दें।

6. रंग परिवर्तन के लगने वाले समय को प्रेक्षण सारणी III में लिखें।

7. इस प्रक्रिया को और दूसरे शर्कराओं के विलयन और अज्ञात शर्करा के विलयन के लिए दोहराएं।

शर्करा के विलयन की तुलना में, बार्फेड अभिकर्मक को अधिक मात्रा में मिलाया जाना चाहिए। यह अच्छी प्रतिक्रिया सुनिश्चित करता है और एक सकारात्मक परिणाम अधिक देखने योग्य होगा।

समय का ध्यान रखना बहुत आवश्यक है। सुनिश्चित करें कि परीक्षण करते समय आपके पास एक डिजिटल स्टॉप घड़ी हो। समय इस परीक्षण में सब कुछ है और यदि समय का ध्यान नहीं रखा गया तो आप अपना प्रयोग खो सकते हैं। प्रक्रिया में वर्णित सटीक समय के अनुसार विलयन उबलने दें।

7.5 प्रेक्षण

प्रेक्षण सारणी–I

पदार्थ		परीक्षण मिश्रण का रंग	निष्कर्षः अपचयन/अपचायक शर्करा
1	नियंत्रण	नीला	--
2	ग्लूकोस		
3	फ्रक्टोस		
4	माल्टोस		
5	सूक्रोस		
6	लेक्टोस		
7	स्टार्च विलयन		
8	अज्ञात		

प्रेक्षण सारणी–II

पदार्थ		परीक्षण मिश्रण का रंग	निष्कर्ष: अपचयन / अपचायक शर्करा
1	नियंत्रण		
2	ग्लूकोस		
3	फ्रक्टोस		
4	माल्टोस		
5	सूक्रोस		
6	लेक्टोस		
7	स्टार्च विलयन		
8	अज्ञात		

प्रेक्षण सारणी–III

पदार्थ		परीक्षण मिश्रण का रंग	निष्कर्ष : अपचयन /अपचायक शर्करा	निष्कर्ष : मोनोसैकेराइ/डाइसैकेराइड
1	नियंत्रित	नियंत्रण		
2	ग्लूकोस			
3	फ्रक्टोस			
4	माल्टोस			
5	सूक्रोस			
6	लेक्टोस			
7	अज्ञात			

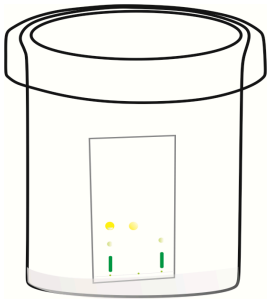
7.6 परिणाम

अज्ञात कार्बोहाइड्रेट की पहचानः

परीक्षण अभिकर्मक

प्रेक्षण **निष्कर्ष**

1. फेलिंग विलयन: _____ _____
2. बेनेडिक्ट विलयन _____ _____
3. बार्फोड विलयन _____ _____



प्रयोग 8

ऐस्पिरिन का संश्लेषण तथा TLC द्वारा एक ऐस्पिरिन की गोली के साथ इसकी तुलना

प्रयोग की रूपरेखा

8.1 प्रस्तावना

उद्देश्य

8.2 ऐस्पिरिन का संश्लेषण

नियम

आवश्यकताएँ

कार्य–विधि

8.3 संश्लेषित ऐस्पिरिन की पतली परत वर्णलेखिकी द्वारा ऐस्पिरिन की गोली के साथ तुलना

नियम

आवश्यकताएँ

कार्य–विधि

प्रेक्षण और परिकलन

8.4 परिणाम

8.1 प्रस्तावना

पिछली 8 प्रयोगों में आपने मात्रात्मक विश्लेषण (मुख्यतः अनुमापनमिति), कागज वर्णलेखिकी और pH मिति पर आधारित प्रयोग किए हैं। अब आप कार्बनिक संश्लेषण में सम्मिलित कुछ तकनीकों जैसे, घोलना, पुनःक्रिस्टलन, निस्यंदन इत्यादि के और पतली परत वर्णलेखिकी द्वारा संश्लेषित उत्पादों के निर्धारण के बारे में जानेंगे। इस प्रयोग में आप एक कार्बनिक अणु का संश्लेषण करेंगे जिसका उपयोग रोजमर्रा की जिन्दगी में एक सामान्य औषध के रूप में होता है। यह दवा है ऐस्पिरिन।

ऐस्पिरिन एक ज्वररोधी (antipyretic), पीड़ाहारी (analgesic) तथा शोथरोधी (anti-inflammatory) दवा होती है। निश्चय ही यह सबसे अधिक उपयोग में आने वाली पीड़ाहारी दवा होती है। एक शोथरोधी के रूप में ऐस्पिरिन का अत्यधिक उपयोग आर्थाइट्रिस (arthritis) नामक रोग के उपचार में होता है। आजकल विश्व स्तर पर हृदय घात निरोधी दवा के रूप में इसका उपयोग किया जाता है। ऐसा यह धमनियों में

रक्त के थक्के बनने के लिए उत्तरदायी पट्टिकाणु (platelets) को प्रभावित करके करती है। नकारात्मक रूप में इसकी अधिक मात्रा, श्लेष्मल झिल्ली (mucous membrane) के उत्तेजन के समान अमाशयी परेशानियाँ भी उत्पन्न करती है। 18 वर्ष से निम्न आयु के व्यक्तियों में यह दिमागी विकार (Reye's syndrome) के लिए उत्तरदायी मानी जाती है।

इस प्रयोग में सैलिसिलिक अम्ल से ऐस्पिरिन के संश्लेषण व पतली परत वर्णलेखी तकनीक द्वारा ऐस्पिरिन के व्यावसायिक नमूने की इस उत्पाद के साथ तुलना करेंगे। यह तकनीक एक पृथक्करण और शुद्धिकरण तकनीक होती है। इस प्रयोग के दो भाग हैं, पहला संश्लेषण तथा दूसरा वर्णलेखिकी से संबंधित है। यद्यपि दोनों भागों का नियम और कार्य–विधि अलग–अलग दिए गए हैं। संश्लेषण संबंधित विरचन संबंधी भाग (भाग 8.2) में आप एक महत्वपूर्ण कार्बनिक अभिक्रिया **"ऐसीटिलीकरण"** (acetylation) के बारे में सीखेंगे। जैसा कि आप देखेंगे, ऐसीटिलीकरण अभिक्रिया को कई प्रकार से किया जा सकता है। हम आपको दो विधियों की कार्य–विधि दे रहे हैं। समय की सुविधा व रसायनों की उपलब्धता के आधार पर आपके परामर्शदाता किसी भी एक विधि का चयन कर सकते हैं। वर्णलेखी भाग (भाग 8.3) को किसी भी ऐसे व्यावसायिक नमूने के साथ किया जा सकता है, जिसमें उभय प्रतिरोधी (buffered) न हो और उसकी तुलना प्रयोगशाला में बनाए गए उत्पाद के साथ कर सकते हैं। अगले प्रयोग में आप एक निष्कर्षण तकनीक के बारे में सीखेंगे और प्याज या केले के फल से DNA निष्किर्षित करेंगे।

उद्देश्य

इस प्रयोग के अध्ययन व इसके करने के बाद आपः

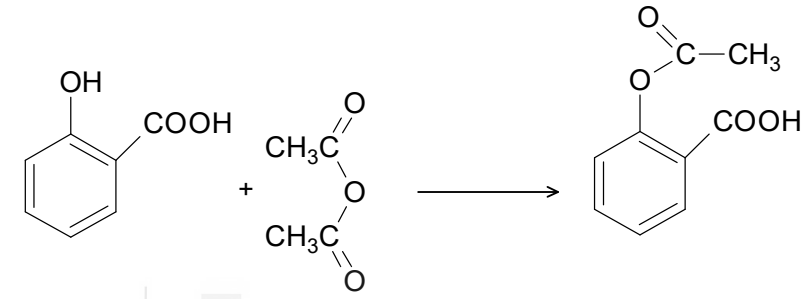
- ऐस्पिरिन के संश्लेषण में सम्मिलित नियम की व्याख्या कर सकेंगे;
- ऐसीटिलीकरण विधि द्वारा सैलिसिलिक अम्ल से ऐस्पिरिन बना सकेंगे;
- सैलिसिलिक अम्ल के ऐसीटिलीककरण की क्रियाविधि की व्याख्या कर सकेंगे;
- ऐस्पिरिन की लब्धि और गलनांक का माप कर सकेंगे;
- पतली परत वर्णलेखिकी के नियम की व्याख्या कर सकेंगे; और
- पतली परत वर्णलेखिकी द्वारा संश्लेषित ऐस्पिरिन की R_f की तुलना ऐस्पिरिन के व्यावसायिक नमूने के साथ कर सकेंगे।

8.2 ऐस्पिरिन का संश्लेषण

जैसा कि ऊपर बताया गया है, इस प्रयोग के दो भाग हैं। ऐस्पिरिन के संश्लेषण से संबंधित इस पहले भाग में आप सैलिसिलिक अम्ल के ऐसीटिलीकरण की क्रियाविधि और संश्लेषण के लिए अपनाए जाने वाली कार्यविधि के बारे में जानेंगे। दूसरे भाग का वर्णन भाग 8.3 में किया जाएगा।

8.2.1 नियम

ऐस्पिरिन का रासायनिक नाम, **ऐसीटिल सैलिसिलेट** (acetyl salicylate) होता है। यह सैलिसिलिक अम्ल का ऐसीटिल व्युत्पन्न होता है और इसे सैलिसिलिक अम्ल की ऐसीटिलीकरण अभिक्रिया द्वारा बनाया जाता है। आप जानते हैं कि सैलिसिलिक अम्ल और ऑर्थो–हाइड्रॉक्सीबेन्ज़ोइक अम्ल होता है। ऐसीटिल सैलिसिलिक अम्ल बनाने के लिए सैलिसिलिक अम्ल और ऐसीटिक ऐनहाइड्राइड के बीच के अभिक्रिया को निम्नलिखित दिया गया है।



Salicylic acid Acetic anhydride Acetysalicylic acid

सामान्यतः ऐसीटिलीकरण अभिक्रिया में हाइड्रॉक्सी (ऐल्कोहॉली अथवा फीनॉल) अथवा ऐमीनो (प्राथमिक अथवा द्वितीयक ऐमीन) अभिलक्षकीय समूहों के सक्रिय हाइड्रोजन को $-COCH_3$ समूह से प्रतिस्थापित किया जाता है। इस अभिक्रिया को निम्नलिखित तरीके से लिखा जा सकता है।

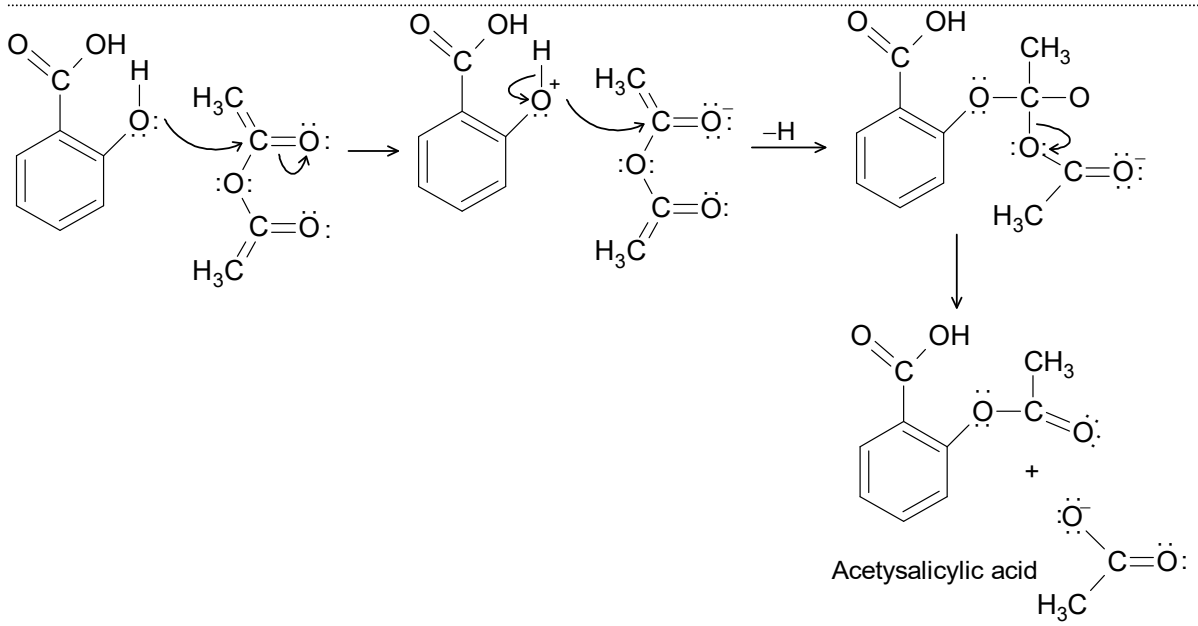
–OH समूह का ऐसीटिलीकरण ऐसीटिक अम्ल के एस्टरीकरण के तुल्य होता है। ऐसा इसलिए है क्योंकि इसमें प्राप्त उत्पाद $R—OCOCH_3$ वास्तव में ऐसीटिक अम्ल का ऐल्किल अथवा ऐरिल एस्टर ही होता है जो इस बात पर निर्भर करता है कि R ऐल्किल समूह है अथवा ऐरिल समूह। ऐसीटिलीकरण अभिक्रिया को कई प्रकार से किया जा सकता है। ये हैं:

i) उत्प्रेरक की उपस्थिति में ऐसीटिक ऐनहाइड्राइड से अभिक्रिया

ii) पिरिडीन जैसे क्षारक की उपस्थिति में ऐसीटिल क्लोराइड से अभिक्रिया

iii) ऐसीटिक अम्ल व ऐसीटिक ऐनहाइड्राइड के मिश्रण से अभिक्रिया

व्यावसायिक तौर पर ऐस्पिरिन को विधि i) द्वारा बनाया जाता है अर्थात् उत्प्रेरक की उपस्थिति में ऐसीटिक ऐनहाइड्राइड के साथ। i) और ii) की क्रियाविधियों की कार्यविधि यहां दी जा रही है। जैसा ऊपर बताया गया है, आप इनमें से किसी एक विधि का उपयोग कर सकते हैं। सैलिसिलिक अम्ल की अम्ल उत्प्रेरित ऐसीटिलीकरण की क्रियाविधि को इस प्रकार दर्शाया जा सकता है।



8.2.2 आवश्यकताएँ

उपकरण	रासायनिक द्रव्य
शंक्वाकार फ्लास्क (100 cm^3)	सैलिसिलिक अम्ल
जल ऊष्मक	ऐसीटिक ऐनहाइड्राइड
बीकर (100 cm^3)	सल्फ्यूरिक अम्ल
कांच की छड़	पिरिडीन ऐल्कोहॉल

8.2.3 कार्य–विधि

विधि I: इस विधि में ऐसीटिलीकारक कर्मक के रूप में ऐसीटिक ऐनहाइड्राइड का उपयोग किया जाता है। निम्न दिए चरणों का अनुसरण करके आप आगे बढ़ सकते हैं।

1. 100 cm^3 के शंक्वाकार फ्लास्क में 2.75 g (0.02 मोल) सैलिसिलिक अम्ल लेकर उसमें लगभग 6 cm^3 (0.06 मोल) ऐसीटिक ऐनहाइड्राइड व सान्द्र सल्फ्यूरिक अम्ल (उत्प्रेरक के समान कार्य करता है) की कुछ बूँदें डालें।

   इस विधि में ऐसीटिक ऐनहाइड्राइड को आधिक्य में लिया जाता है। यह ऐसीटिलीकारक के साथ–साथ विलायक का कार्य भी करता है।

2. इस फ्लास्क को जल ऊष्मक (तापमान = 50 – 60°C) में कुछ मिनट के लिए धीरे–धीरे घुमाएं जिससे ठोस पदार्थ घुल जाए।

3. फ्लास्क को लगभग 10 मिनट तक जल ऊष्मक में ही रहने दें। इसे समय–समय पर घुमाते रहें।

4. इस विलयन को कक्ष–ताप पर आने दें तथा फिर इसमें ठंडे जल का लगभग 50 cm^3 डालें। आप इसमें पिसी हुई बर्फ भी डाल सकते हैं।

ऐसा ऐसीटिक ऐनहाइड्राइड के आधिक्य को खत्म करने के लिए किया जाता है जो जल द्वारा ऐसीटिक अम्ल में परिवर्तित हो जाता है।

5. फ्लास्क की दीवारों को कांच की छड़ से खुरचकर क्रिस्टलीकरण की प्रक्रिया को आरंभ करें व प्राप्त ठोस को फिल्टर कर लें।

6. एक परखनली में लगभग 10 -- 15 mg (एक कण) ऐस्पिरिन लेकर उसे लगभग 1cm^3 ऐल्कोहॉल में घोल लें। इस विलयन में फेरिक क्लोराइड के 1% विलयन की एक बूंद डालें व उत्पन्न रंग को देखें। तीव्र वर्ण का उत्पन्न होना अनभिकृत सैलिसिलिक अम्ल की उपस्थिति को दर्शाता है।

7. ऊपर प्राप्त ऐस्पिरिन के लगभग आधे भाग को ऐल्कोहॉल/जल निकाय द्वारा पुनः क्रिस्टलीकृत कर लें। इसके लिए ऐस्पिरिन को गर्म ऐल्कोहॉल की कम से कम मात्रा में घोल लें। इसे हिलाते हुए इसमें गर्म (50 - 60) जल तब तक डालें जब तक स्थायी आविलता (turbidity) प्राप्त न हो जाए। यदि इस अवस्था में कुछ क्रिस्टल प्राप्त होते हैं, तो विलयन को थोड़ा–सा गर्म करके इन्हें घोल लें।

8. इस विलयन को क्रिस्टलीकरण प्रक्रिया पूरी होने तक धीरे–धीरे ठंडा होने दें। प्राप्त क्रिस्टलों को निर्वात फिल्टर करके ठंडे जल से धो लें। इन क्रिस्टलों को फिल्टर पेपर की तहों में सुखाकर तोल लें।

9. पुनः क्रिस्टलीकृत नमूने का गलनांक ज्ञात करें व इसे अपनी पुस्तिका में नोट कर लें।

10. उत्पाद की लब्धि को लिख लीजिए और % लब्धि का परिकलन कीजिए।

विधि II: इसमें ऐसीटिलीकारक के रूप में ऐसीटिल क्लोराइड का उपयोग किया जाता है। निम्न दिए चरणों का अनुसरण करके आप आगे बढ़ सकते हैं।

1. 100 cm^3 के शंक्वाकार फ्लास्क में 2.75 g सैलिसिलिक अम्ल को लगभग 2 cm^3 शुष्क पिरिडीन में घोल लें।

2. इसमे थोड़ा–थोड़ा करके लगभग 2.5 ml ऐसीटिल क्लोराइड जल्दी से डाल दें। ऐसा करते समय फ्लास्क को लगातार हिलाते रहें।

सावधानी : यह अभिक्रिया अत्यधिक ऊष्माक्षेपी होती है तथा अभिक्रिया मिश्रण का तापमान तेजी से बढ़ जाता है। ध्यान दें कि इसका तापमान लगभग 60°C (छूने में असहनीय) से अधिक न हो। आप फ्लास्क को बीच–बीच में नल के जल द्वारा ठंडा कर सकते हैं।

3. इस मिश्रण को लगभग 5 मिनट के लिए जल ऊष्मक में गर्म कर लें।

4. इसके बाद की विधि ठीस उसी प्रकार है, जैसा कि विधि (i) (चरण 4 व उसके बाद) में है। इस उत्पाद का पुनः क्रिस्टलन करके गलनांक प्राप्त कर लें और परिणाम में लिख लें।

5. प्राप्त उत्पाद की लब्धि और % लब्धि को लिख लें जैसा उपरोक्त विधि में किया गया है।

8.3 संश्लेषित ऐस्पिरिन की पतली परत वर्णलेखिकी द्वारा ऐस्पिरिन की गोली के साथ तुलना

जैसा पहले बताया गया है ये प्रयोग 8 का दूसरा भाग है जिसमें आप संश्लेषित ऐस्पिरिन और बाजार से ली गई ऐस्पिरिन की गोली के **मंदन कारक** (Retardation factor) अथवा **धारण कारक** (Retention factor, R_f) की तुलना करेंगे। आपको यह सलाह दी जाती है कि आप मूल पाठ्यक्रम और प्रयोग 1 में चर्चित वर्णलेखी पृथक्करण तकनीक की संकल्पनाओं को पुनः दोहरा लें। प्रयोग 1 में आपने वर्णलेखिकी की संकल्पनाओं का विस्तृत अध्ययन किया है। आपने उस परीक्षण में कागज़ वर्णलेखिकी का ऐमीनो अम्लों के मिश्रण के पृथक्करण के लिए उपयोग करना सीखा है। इस प्रयोग के लिए आप पतली परत वर्णलेखिकी (TLC) का उपयोग करेंगे। पतली परत वर्णलेखिकी जटिल मिश्रणों को पृथक करने की एक प्रभावी विधि है। लघुस्तरीय प्रयोगों को करने के लिए यह एक संवेदनशील त्वरित सरल और सस्ती विश्लेषण तकनीक है और साथ ही यह छोटी प्रयोगशालाओं के लिए एक उत्कृष्ट तकनीक है और जहां अधिक परिष्कृत वर्णलेखी उपकरणों की पहुंच नहीं होती है। आप इस तकनीक में स्थैतिक प्रावस्था के एक आसान परिवर्तन नहीं होती है। आप इस तकनीक में स्थैतिक प्रावस्था के एक आसान परिवर्तन को कर सकते हैं।

पृथक्करण के अतिरिक्त, वर्णलेखी तकनीकें पहचान करने की तकनीकें भी हैं, जिसे आप यहां पर करने जा रहे है। बाद वाली TLC का एक महत्वपूर्ण अनुप्रयोग है जो नमूने में यदि कोई अशुद्धता उपस्थित हो तो उसकी पहचान करने में सहायक होती है। अतः इस प्रयोग में आप अपने द्वारा प्रयोगशाला में संश्लेषित किए गए यौगिक की शुद्धता को भी देख सकेंगे और ये भी देखेंगे कि बाजार की एस्पिरिन की गोली में कोई अशुद्धि तो नहीं है।

8.3.1 नियम

पतली परत वर्णलेखिकी अधिशोषण प्रकार की वर्णलेखिकी है। यह इस प्रकार कागज वर्णलेखिकी के समान है कि नमूने को कांच या प्लास्टिक अधिशोषी की पतली परत में आलेपित प्लेट के एक सिरे के निकट बिंदुकित किया जाता है। पतली परत वर्णलेखी प्लेट को एक आच्छादित जार में रखा जाता है जिसमें डेवेलपर की एक पतली परत होती है। केशिका क्रिया द्वारा डेवेलपर ऊपर उठता है तथा विलेय, स्थिर प्रावस्था (stationary phase, अवशोषक) और **गतिशील प्रावस्था** (mobile phase) के बीच वितरित हो जाता है। जो विलेय स्थिर प्रावस्था पर अधिक मजबूती के साथ अधिशेाषित रहेगा वह गतिशील प्रावस्था में कम समय लगाएगा और इसलिए वह पतली परत वर्णलेखी प्लेट पर अपेक्षाकृत मंद गति से गमन करेगा। तत्पश्चात् नमूने को परिवर्धन (प्रक्षालन, elution) द्वारा पृथक किया जाता है। संसूचक के साथ उपचार करने से विलेयों के रंगीन क्षेत्र बन जाते हैं। R_f मानों का परिकलन और तुलना करने से मिश्रण के घटकों का अभिनिर्धारण किया जा सकता है।

धारण कारक (R_f) को निम्न रूप में परिभाषित किया जाता है:

"विलेय बिंदु के केन्द्र द्वारा तय की गई दूरी (ds) / विलायक अग्रांत द्वारा तय की कई दूरी (dm)"

जहां **s** स्थिर प्रावस्था को दर्शाता है, **m** गतिशील प्रावस्था को दर्शाता है और **d** मापी गई दूरी होती है।

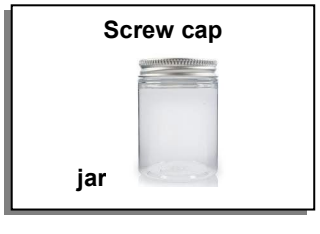
8.3.2 आवश्यकताएँ

उपकरण	रासायनिक पदार्थ
पतली परत वर्णलेखी जार (वैकल्पिक रूप के वॉच ग्लास अथवा ऐलुमिनियम पन्नी से आच्छादित बीकर ले सकते हैं)।	सैलिसिलिक अम्ल
	ऐसीटिक अम्ल
	एथानॉल/मेथैनॉल
बिन्दुक केशिकाएँ	एथिल ऐसीटेट
मापी सिलिंडर 100 cm^3	हैक्सेन
पतली परत वर्णलेखी प्लेटें (निर्मित/प्राप्त की हुई/शाटें)	आयोडीन कक्ष के लिए आयोडीन क्रिस्टल
फुहारण बोतल	सिलिका जेल G
कीप	ऐस्पिरिन की गोली (व्यावसायिक)
निस्यंदन/निर्वात निस्यंदन उपकरण	प्रोपेनॉल
TLC ऐप्लीकेटर	सांद्र अमोनिया विलयन
परखनलियां	क्लोरोफॉर्म

TLC प्लेटों को बनाना

पतली परत वर्णलेखिकी को किसी अक्रिय पदार्थ जैसे कांच, प्लास्टिक या एल्यूमीनियम फॉइल की शीट पर किया जा सकता है, जिसे अधिशोषक पदार्थ से आलेपित किया जाता है, जो सामान्यतः सिलिका जेल, एल्यूमीनियम ऑक्साइड (एलुमिना) या सेलुलोस होता है। एल्यूमीनियम फॉइल शीट्स आजकल सबसे अधिक प्रचलन में है क्योंकि इनका रखरखाव/हस्ताचरण और उपयोग सुविधाजनक है। पहले कांच की प्लेटों को प्रयोग सामान्यतः किया जाता था। यदि अध्ययन केन्द्र पर प्लास्टिक या एल्यूमीनियम फॉइल शीट्स उपलब्ध नह हों, तो आप कांच की प्लेटों का उपयोग कर सकते हैं। प्लेटों को अधिशोषक से आलेपित किया जाता है, जिसकी क्रिया–विधि यहां दी गई है। जहां तक संभावना है, आपके परामर्शदाता आपको निर्मित प्लेटें देंगे।

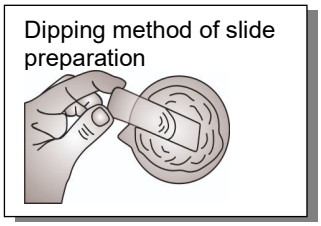
TLC परत प्लेटों को नीचे दी गई विधियों में से किसी एक विधि द्वारा बनाया जा सकता हैः



क) निमज्जन विधि (Dipping Method):

- 125 cm^3 के एक ढक्कन वाले जार में 33cm^3 मेथैनॉल और 67 cm^3 क्लोरोफॉर्म लीजिए (चित्र मार्जिन में दिया गया है)।

- इस जार में 35 g सिलिका जेल G डाल कर 1 मिनट के लिए तेजी से हिलाइए।



- दो सूक्ष्मदर्शी स्लाइडों को इस प्रकार स्थिति करें कि उनके पृष्ठ भाग एक–दूसरे के साथ जुड़े हों।

- तुरंत उन्हें 2 सेकंड के लिए सिलिका–जेल कर्दम (slurry) में डुबोएं। एकत्रित स्लाइडों को बाहर निकाल कर उनके अधस्तल को जार से छुएं ताकि अतिरिक्त कर्दम बह जाए (चित्र मार्जिन में दिया गया है)।

- उन्हें एक मिनट तक हवा में सूखने दें ताकि विलायक उद्वाष्पित हो जाए। स्लाइडों को अलग कर लें और किनारों पर लगे अतिरिक्त अवशोषक को टिशू कागज से पोंछ लें।

- 15 मिनट तक अवन में 110°C पर गरम करके अथवा इसी ताप तक गरम किए गए आच्छादित बीकर में उन्हें रखकर स्लाइडों को सक्रियित करें।

ख) विस्तारण विधि (spreading method):

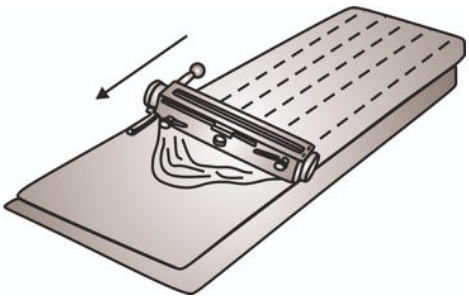
- लगभग 10 g सिलिका जेल को 20 cm^3 जल के साथ मिलाएं (मिश्रण को भली भांति हिलाकर विलोडित कर लें ताकि कोई ढेला न रहे) और एक मुक्त प्रवाही पेस्ट तैयार कीजिए।

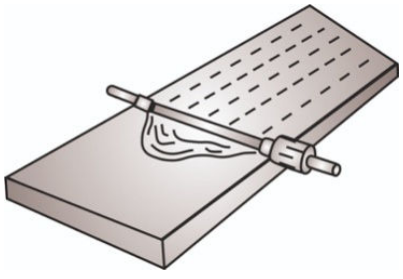
- एक कांच की प्लेट या स्लाइड लीजिए और पहले चरण में बनाए गए पेस्ट को कांच की प्लेट पर डालिए।

- पतली परत वर्णलेखी अनुप्रयोजित्र (applicator) की मदद से उसे कांच की प्लेट पर फैला दें (चित्र 1 में दिया गया है)। प्लेट को 10 मिनट तक हवा में सूखने दें तथा अवशोषक को सक्रियित करने के लिए प्लेट को कम से कम 5 मिनट तक 110°C ताप पर अवन में रखें।

- वैकल्पिक रूप से कर्दम को स्लाइड पर अथवा प्लेट पर सावधानी से सीधे बीकर से ही डाला जा सकता है अथवा इनके लिए चित्र 2 में दिखाए गए प्रयोगशाला में निर्मित अनुप्रयोजित्र का उपयोग किया जा सकता है। प्लेट को सूखने के लिए रख देना चाहिए और फिर पहले वाली की तरह अवन में सुखाना चाहिए

चित्र 1: व्यावसायिक रूप से उपलबध अनुप्रयोजित्र





चित्र 2: प्रयोगशाला में निर्मित अनुप्रयोजित्र

दिए गए विलयन

1. **नमूना विलयन :** अपने द्वारा संश्लेषित ऐस्पिरिन का परखनली में एथानॉल/मेथैनॉल में विलयन बनाइए। बाजार से ली गई गोली का विलयन भी इसी प्रकार बनाया जा सकता है।

2. **दृश्यीकरण अभिकर्मक :** आपको एक आयोडीन कक्ष या जार प्रदान किया जाएगा जिसमें अंदर आयोडीन के क्रिस्टल होंगे और जार ढक्कन से ढका रहेगा जिससे आयोडीन वाष्प बाहर न निकलें। आयोडीन कार्बनिक यौगिकों से बद्ध होकर उनके पीले या नारंगी रंग के धब्बे प्रदान करती है।

8.3.3 कार्य–विधि

निम्नलिखित चरणों के अनुसार आगे बढ़ें:

1. **डेवेलपर बनाना :** हैक्सेन, एथिल ऐसीटेट और ऐसीटिक अम्ल को क्रमशः 60:35:5 के अनुपात में मापी सिलिंडर की सहायता से वांछित आयतनों को मिलाइए।

2. डेवेलपर विलयन को TLC जार में लीजिए और जार को उसके ढक्कन से ढक दीजिए जिससे वाष्पन से बचाव हो सके।

3. अपने परामर्शदाता से चार सिलिक जेल आलेपित प्लेटें लीजिए और प्लेटों को 30 मिनट तक अवन में 100°C पर गर्म कीजिए ताकि वे अधिशोषण वर्णलेखिकी के लिए सक्रियित हो जाएं।

4. एक प्लेट लेकर उसके अधस्तल से 1 cm ऊपर पेन्सिल से एक रेखा खींच लें और खींची गई रेखा पर तीन चिन्ह लगाइए जहां पर यौगिकों की बूंदें डाली जाएंगी।

पतली परत वर्णलेखी प्लेट के किनारे से परत की पतली पट्टी को अंगूठे के नाखून अथवा स्पैचुला द्वारा हटाएं। प्लेटों पर पेंसिल पर बहुत जोर न डालें अन्यथा सिलिका जेल निकल जाएगा।

5. ऊपरी सिरे पर प्लेट को डाले गए यौगिकों की पहचान के लिए प्लेट के ऊपर लेबल कर लें अर्थात्, ऐसीटिल सैलिसिलिक अम्ल, संश्लेषित ऐस्पिरिन और व्यावसायिक ऐस्पिरिन से।

6. प्लेट को बाएं हाथ से सावधानीपूर्वक पकड़ें ताकि उंगलियाँ अवशोषक परत को न छुएं। एक केशिका लें और ऐसीटिल सैलिसिलिक अम्ल के विलयन में रख दें जिसे बिंदुकित करना है। केशिका में विलयन को चढ़ने दें। केशिका को विलयन से निकालकर उससे पतली परत वर्णलेखी प्लेट पर बांयी ओर को किनारे पर अंकित केंद्र को छुएं। अल्प अवधि के लिए विलयन को प्लेट पर प्रवाहित होने दें ताकि विलयन का बिंदु बन जाए। इस बिन्दु का व्यास 2 mm से अधिक नहीं होना चाहिए।

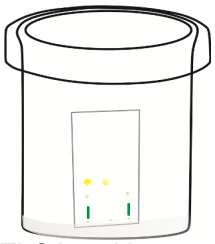
(टिप्पणी : अध्यापक से अपेक्षा की जाती है कि वे इस तकनीक का निर्देशन करें)।

7. बिन्दु को सूखने दें। सुखाने के लिए आप फूंक मार सकते हैं। आवश्यक हो तो आप उस स्थान पर और विलयन प्रयुक्त कर सकते हैं। उद्देश्य यह है कि एक छोटा किन्तु स्पष्ट और सुनिर्मित बिन्दु हो।

8. उसी प्रकार संश्लेषित ऐस्पिरिन विलयन को TLC प्लेट पर प्रयुक्त करें।

9. TLC प्लेट पर चिन्हित दाईं हाथ के कोने में इसी प्रकार से व्यावसायिक ऐस्पिरिन की गोली के विलयन का बिंदु लगाएं।

10. तीनों के बिन्दु बनाने के बाद प्लेटों को डेवेलपर जारों में प्रविष्ट करें जैसे मार्जिन में दर्शाया गया है।


TLC jar with a developing TLC plate

प्रयुक्त बिन्दु यथासंभव छोटा होना चाहिए। बहुत अधिक विलेय का प्रयोग भी नहीं करना चाहिए, क्योंकि उससे लंबा क्षेत्र बनेगा और फलस्वरूप R_f मानों का सही परिकलन नहीं हो सकेगा।

11. गतिशील प्रावस्था विलयन को (चरण 1 में बनाए गए अनुसार) जार में पिपेट की सहायता से तब तक उड़ेलिए जब तक कि डेवेलपर का स्तर प्लेट पर अधिशोषक परत के निचले किनारे की 1 cm ऊंचाई तक न पहुंच जाए।

(याद रखिए बिंदु स्तर से ऊपर रहना चाहिए)।

12. जार को ढक दें और डेवेलपर को प्लेट में चढ़ने दें। विलायक अग्र की स्थिति आसानी से दिखाई देती है क्योंकि प्लेट के शुष्क भाग से उसका नम भाग अधिक गहरा दिखाई देता है।

13. जब डेवेलपर, प्लेट पर वांछित ऊंचाई पर चढ़ जाए, तो प्लेट को डेवेलपिंग कक्ष से बाहर निकाल लीजिए, विलायक अग्रांत को चिन्हित कीजिए और प्लेट को 110°C पर लगभग 1–2 मिनट तक सुखाइए।

14. प्लेट के सूख जाने के बाद आपको उत्पाद की पहचान करनी है, जिसे **बिंदु का दृश्यीकरण** (visualisation of the spots) कहते हैं।

15. बिंदु का दृश्यीकरण विकसित प्लेट को ~100°C पर या तो ओवन में अथवा हॉटप्लेट पर, 1–2 मिनट तक गर्म करके करते हैं।

16. कार्बनिक यौगिकों में, विकसित, शुष्कित और गर्म व TLC प्लेट को आयोडीन जार के अंदर रख देते हैं। आयोडीन जार आयोडीन के कुछ नये क्रिस्टलों को जार में डालकर बनाया जाता है जो एक ढक्कन से ढका रहता है।

17. प्लेट पर रंग के विकास को देखिए। आपको पीले या हल्के नारंगी रंग के धब्बे दिखाई देंगे।

18. ~15 मिनट बाद अथवा सभी तीन बिंदुओं के रंग के ठीक से विकसित हो जाने के बाद प्लेट को बाहर निकाल लीजिए और उसे एक सपाट सतह पर रख दीजिए।

19. प्रत्येक धब्बे की दूरी को आरंभिक रेखा पर उसके धब्बे से और उस दूरी को मापिए जहां तक विलायक अग्रांत आगे बढ़ा है। पहले दिए गए सूत्र से इसके R_f मान का परिकलन कीजिए।

20. दोनों ऐस्पिरिन नमूनों के R_f मानों की तुलना करके आप ये निर्धारण कर सकते हैं कि इनमें से किसी में कोई अशुद्धि तो नहीं है। आपको याद होगा कि शुद्ध नमूना TLC में एक ही धब्बा देता है। यदि अभिक्रिया पूरी नहीं हुई, तो आरंभिक धब्बा उत्पाद के धब्बे में भी प्रकट होगा। ऐसे में आपको संश्लेषित उत्पाद को सावधानी से पुनः क्रिस्टलीकृत करना चाहिए।

UV (पराबैंगनी) लैम्प के नीचे दृश्यीकरण: यदि आपके अध्ययन केन्द्र में UV लैम्प हो तो आप परामर्शदाता से निवेदन कर सकते हैं कि आप अपनी विकसित और शुष्कित TLC प्लेट को UV प्रकाश में देखना चाहते हैं। आपको उसमें बिंदुकित गए यौगिकों के प्रतिदीप्ति धब्बे दिखाई दे सकेंगे। इस में भी शुद्ध यौगिक में सिर्फ एक ही धब्बा दिखाई देगा।

याद रखिए कि UV लैम्प में दृश्यीकरण प्लेट को आयोडीन जार में रखने से पहले करना चाहिए।

8.3.4 प्रेक्षण और परिकलन

तीनों यौगिकों के TLC प्लेट पर धब्बों को देखिए। उस दूरी को मापिए जिस तक ये तीनों यौगिक मूल बिंदु (ds) से आगे बढ़े हैं; और वह दूरी जिस पर विलायक अग्रांत उपयोग किए जाने के बिंदु (dm) से TLC प्लेट पर आगे बढ़ा है।

निम्न सूत्र से R_f मान का परिकलन कीजिए: : $R_f = ds/dm$

तीनों यौगिकों के R_f को टिप्पणियों के साथ नीचे दी गई तालिका में भरिए: $R_f = ds/dm$

प्रेक्षण सारणी

यौगिक	ds	dm	टिप्पणी (धब्बों की संख्या)
1. ऐसीटिल सैलिसिलिक अम्ल			
2. ऐस्पिरिन (निर्मित)			
3. व्यावसायिक एस्पिरिन			

8.4 परिणाम

1. 2.75 g सैलिसिलिक अम्ल से संश्लेषित ऐसीटिल सैलिसिलिक अम्ल प्राप्त हुआ = ……….. g

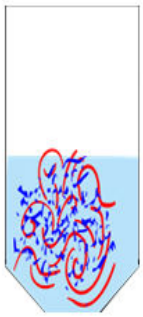
   सैद्धान्तिक लब्धि = 3.6 g

   $$\% \text{ लब्धि} = \frac{\text{प्राप्त लब्धि} \times 100}{\text{सैद्धान्तिक लब्धि}} = \ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots$$

2. ऐस्पिरिन का गलनांक पाया गया = ……….°C

3. प्रयोगशाला में संश्लेषित ऐस्पिरिन की TLC द्वारा R_f ....

4. व्यावसायिक एस्पिरिन की गोली की TLC द्वारा R_f ....



प्रयोग 9

DNA का निष्कर्षण

प्रयोग की रूपरेखा

9.1 प्रस्तावना
उद्देश्य
9.2 सिद्धान्त
9.3 आवश्यकताएँ
9.4 कार्य–विधि
9.5 प्रेक्षण
9.6 परिणाम

9.1 प्रस्तावना

इस पाठ्यक्रम के पूर्व प्रयोगों में, आपने कुछ रासायनिक परीक्षणों और प्रयोगों को किया था जो अनुमापनमिति, (वर्णलेखिकी), pH मिति आदि तकनीकों पर आधारित थे। आपने पिछले प्रयोग में एक सामान्य औषध, ऐस्पिरिन का रासायनिक संश्लेषण भी किया था। ये सभी प्रयोग सजीवों में पाए जाने वाले जैव अणुओं की प्रकृति, संरचना, वर्गीकरण और गुणों पर आधारित थे। इस प्रयोगशाला पाठ्यक्रम के इस अंतिम प्रयोग में आपको परीक्षणातमक कार्य की एक भिन्न अंर्तदृष्टि मिलेगी। इसका संबंध एक महत्वपूर्ण जैव अणु डिऑक्सीडिराइबोन्यूक्लीक अम्ला के निष्कर्षण से है और इसमें मौलिक प्रक्रियाएँ जैसे घोलना, निस्यंदन और निथारना आदि सम्मिलित हैं।

यहां पर आप इस पाठ्यक्रम की इकाई 12 से स्मरण कर सकते हैं कि DNA एक आनुवांशिक पदार्थ होता है, जो सजीव कोशिकाओं में होने वाली सभी घटनाओं का ब्लूप्रिंट है। आपको संभवतः ये भी याद होगा कि संरचनात्मक रूप से DNA एक द्विकुंडलिनी है सिमें दो पॉलीन्यूक्लिओटाइड श्रृंखलाएं एक–दूसरे के इर्द–गिर्द लिपटी रहती हैं। इस प्रयोग में आप प्याज से अपरिष्कृत DNA को निष्कर्षित करने के बारे में जानेंगे और उसे नग्न आंखों से देखेंगे। प्याज आसानी से उपलबध होता है और मुलायम और सहजता से पेस्ट में परिवर्तित किया जा सकता है। साथ ही, प्याज में स्टार्च की मात्रा कम हेाती है जो DNA को नग्न आंखों से स्पष्ट रूप से देखना संभव बनाता है। आप DNA को निष्कर्षित करने के लिए वैकल्पिक रूप से केले का भी प्रयोग कर सकते हैं।

उद्देश्य

इस इकाई को पढ़ने और करने के बादः

- प्याज (या केला) से DNA के निष्कर्षण के सिद्धान्त की व्याख्या कर सकेंगे;

- ❖ DNA के निष्कर्षण के लए निष्कर्षण द्रव को निर्मित कर सकेंगे;
- ❖ प्याज के पेस्ट से अपरिष्कृत DNA को निष्कर्षित कर सकेंगे; और
- ❖ अपरिष्कृत DNA की कुंडलित संरचना को नग्न आंखों से देख सकेंगे।

9.2 सिद्धान्त

आप जानते हैं कि आनुवांशिक पदार्थ, DNA अधिकतर कोशिका के केन्द्रक में पाया जाता है। केन्द्रक, केन्द्रक झिल्ली से घिरा रहता हैं केन्द्रक से DNA को निष्कर्षित करना कठिन होता है। इसलिए, DNA को पृथक करने के लिए हमें केन्द्रक झिल्ली को तोड़ने या विदारित करने की आवश्यकता होती है जिससे विलयन में अक्षुण्ण (intact) DNA आ जाए। यहां, हम इस तथ्य का उपयोग करेंगे कि झिल्लियों को बनाने वाले प्रोटीन और लिपिड लवण विलयन में उपस्थित अपमार्जक (detergent) से अन्योन्यक्रिया द्वारा विकृतिकृत हो सकते हैं। प्याज के पेस्ट को निष्कर्षण विलयन से उपचारित किया जाता है जिसमें अपमार्जक और लवण का जल में विलयन होता है, जो DNA को विलयन में मुक्त कर देता है। यहां, अपमार्जक कोशिका के लिपिडों और प्रोटीनों को घोलकर कोशिका झिल्ली को तोड़ देता है। इस विलयन को निस्यंदित करके DNA का ऐल्कोहॉल से अवक्षेपण कर लेते हैं। लवण DNA के आधारी ढांचे के ऋणात्मक आवेश वाले फॉस्फेट समूहों की रक्षा करता है और ऐल्कोहॉल के ठंडे विलयन में उसका अवक्षेपण संभव बनाता है।

9.3 आवश्यकताएँ

उपकरण	रासायनिक पदार्थ
मापन सिलिंडर (100 cm^3)	परिशुद्ध ऐल्कोहॉल
परखनलियां	NaCl (नमक)
बीकर (100 cm^3)	आसुत जल
कीप	बर्तन धोने का तरल या कोई अन्य द्रव अपमार्जक
खरल–मूसल	प्याज
पेट्री डिश	
तुला और बाट पेटी	

9.4 कार्य–विधि

- एक 100 cm^3 के बीकर में 5 g NaCl को 50 cm^3 आसुत जल में घोलकर और उसमें 9 cm^3 द्रव अपमार्जक मिलाकर **निष्कर्षण द्रव** (extraction liquid) निर्मित कीजिए। धीरे–धीरे चलाते हुए लवण को घोलिए जिससे झाग न बने और मिश्रण को अलग रख दीजिए।

- एक 100 cm^3 के बीकर में लगभग 50 cm^3 परिशुद्ध ऐल्कोहॉल (95% एथानॉल) लीजिए और बीकर को फ्रीजर में रख दीजिए क्योंकि निष्कर्षण के लिए शीतित ऐल्कोहॉल आवश्यक होता है।

- एक छोटी प्याज लीजिए, उसे छीलिए और छोटे टुकड़ों में काट लीजिए। कटी प्याज को खरल में डालकर मूसल से अच्छी तरह पीसिए।

- प्याज के पेस्ट को निष्कर्षण द्रव से आवरित कर दीजिए और इसे कांच की छड़ से लगभग 5 मिनट तक अच्छी तरह मिलाइए। खरल की अंतर्वस्तुओं को छानकर परखनली में डाल दीजिए।

- निस्यंद (filtrate) को पेट्री डिश में स्थानांतरित कर दीजिए और इसमें सावधानी से शीतित ऐल्कोहॉल को मिलाइए। आपको कुछ सफेद रज्जुक या तंतु जैसी संरचनाएं डिश में दिखाई दे सकती हैं। ये DNA अणुओं के गुच्छे होते हैं।

- एक कांच की छड़ से आप DNA को लपेट कर देख सकते हैं।

9.5 प्रेक्षण

शीतित ऐल्कोहॉल को मिलाने पर पर सफेद ठोस द्रव्यमान अवक्षेपित हो जाता है। निकट से देखने पर ये तंतु जैसी संरचना दिखाई देती है।

9.6 परिणाम

प्याज के पेस्ट से DNA के नमूने को सफेद कुंडलित पदार्थ के रूप में निष्कर्षित किया गया है जिसे नग्न आंखों से स्पष्टता से देखा जा सकता है।