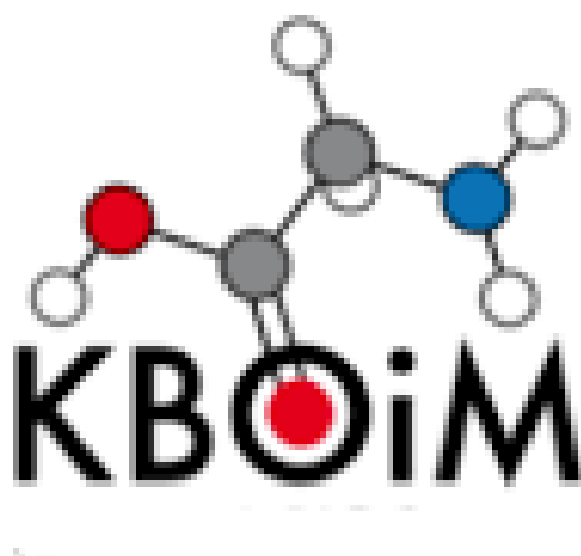


Katedra Biochemii Ogólnej i Medycznej Wydziału Biologii UG



Skrypt do ćwiczeń laboratoryjnych Fizyka z Elementami Biofizyki

SPIS TREŚCI

1. Ćwiczenie I: Fluorescencja.....	3
2. Ćwiczenie II: Wyznaczanie ilości ciepła wydzielanego z organizmu człowieka przy oddychaniu.....	14
3. Ćwiczenie III: Wyznaczanie entalpii swobodnej reakcji dysocjacji <i>p</i> -nitrofenolu.....	17
4. Ćwiczenie IV: Zastosowanie techniki wirowania separacyjnego przy oznaczaniu ilości niezdenaturowanego termicznie białka.....	26
5. Ćwiczenie V: Wyznaczanie zależności między stężeniem a współczynnikiem załamania światła roztworów alkoholu etylowego i alkoholu metylowego.....	33
6. Ćwiczenie VI: Badanie stabilności hemoglobiny z wykorzystaniem spektrofotometrii absorpcyjnej.....	41

Ćwiczenie nr I

Fluorescencja

Celem ćwiczenia jest przedstawienie fluorescencji jako jednego ze zjawisk optycznych występujących w przyrodzie i jego wykorzystania w badaniach naukowych w biologii. W ramach ćwiczenia zostanie przedstawiona zasada działania spektrofluorymetru i zostaną przeprowadzone pomiary widm absorpcyjnych i emisyjnych wybranych fluoroforów w celu wyznaczenia przesunięcia Stokesa, zbadania wpływu polarności rozpuszczalnika na wartości maksimum emisji fluorescencji niektórych fluoroforów oraz zbadania wpływu substancji wygaszających fluorescencję na intensywność emisji fluorescencji.

I. Oddziaływanie promieniowania elektromagnetycznego z materią.

Przez oddziaływanie promieniowania elektromagnetycznego z materią należy rozumieć pochłanianie energii tego promieniowania podczas absorpcji lub oddanie jej w wyniku emisji. Oddziaływanie materia-promieniowanie elektromagnetyczne może nastąpić, gdy zostaną spełnione pewne warunki, wynikające z teorii kwantowej. Podstawowym założeniem tej teorii jest obecność nieciągłych (dyskretnych) poziomów energetycznych atomów i cząsteczek, pomiędzy którymi zachodzą przejścia w wyniku absorpcji lub emisji kwantu.

Energię cząsteczki (E_{mol}) można przedstawić jako sumę energii związanej z konfiguracją elektronów (E_{el}), energii oscylacji jąder wokół położenia równowagi (E_{osc}) oraz energii rotacyjnej, wynikającej z obrotu cząsteczki wokół osi (E_{rot}):

$$E_{\text{mol}} = E_{\text{el}} + E_{\text{osc}} + E_{\text{rot}}$$

W wyniku absorpcji promieniowania cząsteczka przechodzi do jednego ze stanów wzbudzonych, a następnie powraca do stanu podstawowego w różny sposób tracąc energię. Energia świetlna zaabsorbowana przez cząsteczkę może być wyemitowana w postaci fotoluminescencji, zamieniona na ciepło, przekazana do innej cząsteczki lub zużyta na reakcję fotochemiczną lub inne procesy (np. konformacyjne). Fotoluminescencję można podzielić na dwa zjawiska: **fluorescencję** i **fosforescencję**. Z fluorescencją mamy do czynienia, gdy emisja zachodzi w czasie nie dłuższym niż 10^{-8} s i odbywa się bez udziału stanu trypletowego. W przypadku fosforescencji czas pomiędzy pochłonięciem energii a jej emisją jest dłuższy niż 10^{-8} s i w procesie tym ważną rolę odgrywają stany trypletowe.

II. Proces fluorescencji.

Fluorescencja jest wynikiem trzyetapowego procesu zachodzącego w pewnego typu cząsteczkach, zwanych fluoroforami lub barwnikami fluorescencyjnymi.

1. Wzbudzenie (ang. *excitation*).

Cząsteczka może pochłaniać tylko kwanty światła. Zależność absorbancji od długości fali nazywa się **widmem absorpcyjnym**.

2. Stan wzbudzony (ang. *excited state*).

Cząsteczka znajduje się w stanie wzbudzonym przez określony czas (typowo 1-10 nanosekund). W tym czasie we fluoroforze zachodzą zmiany strukturalne, a ponadto mogą zachodzić oddziaływania z cząsteczkami otoczenia. Te procesy mają dwie konsekwencje:

a) dochodzi do bezpromienistej utraty części energii wzbudzonej cząsteczki (energii rotacyjnej i oscylacyjnej) – przejście na poziom zerowy S_1 . Ten proces jest określany jako wewnętrzna konwersja (ang. *internal conversion*).

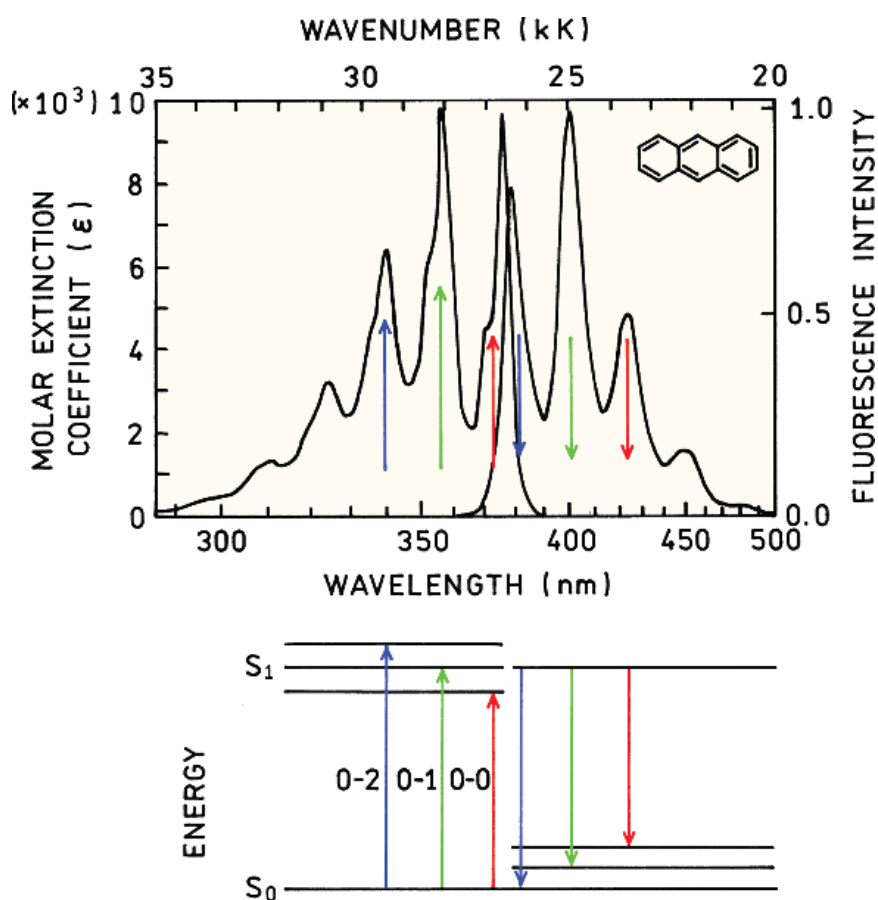
b) nie wszystkie cząsteczki wzbudzone mogą powrócić do stanu podstawowego (S_0) poprzez emisję fluorescencji.

3. Emisja fluorescencji (ang. *emission*).

Energia wzbudzenia elektronowego jest najczęściej oddawana w sposób promienisty. Emisja następuje z zerowego poziomu oscylacyjnego stanu wzbudzonego.

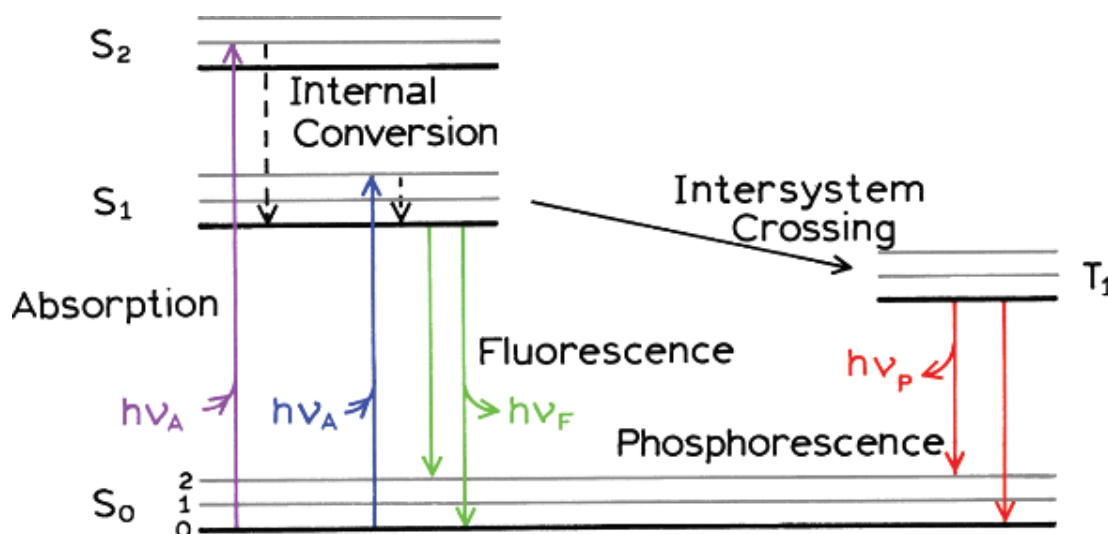
Skutkiem wyżej wymienionych procesów jest emisja światła o mniejszej częstotliwości niż światło wzbudzające cząsteczkę – przesunięcie widma emisyjnego w stronę fal dłuższych w stosunku do widma absorpcyjnego – **przesunięcie Stokesa** (ang. *Stokes shift*). Przesunięcie Stokesa jest kluczowe dla wykorzystania fluorofora w celach analitycznych – umożliwia odróżnienie fotonów emitowanego światła od fotonów wzbudzających.

Powrót do stanu podstawowego zachodzi najczęściej na wyższy poziom oscylacyjny elektronowego stanu podstawowego, a następnie szybko dochodzi do utraty energii i przejścia do zerowego poziomu oscylacyjnego. Jeżeli układ poziomów oscylacyjnych w stanach podstawowym i wzbudzonym S_1 jest podobny, to widmo emisji fluorescencji jest zwierciadlanym odbiciem pasma absorpcyjnego. W przypadku większości fluoroforów poziomy oscylacyjne nie są zaburzone zmianą poziomu elektronowego podczas wzbudzenia. Dobrym przykładem jest antracen (Rycina 1). Widmo wzbudzenia tej cząsteczki cechuje się trzema szczytami związanymi z tranzycjami z zerowego poziomu oscylacyjnego S_0 na wyższe poziomy oscylacyjne w stanie wzbudzonym S_1 . Podczas powrotu do stanu S_0 fluorofor może znaleźć się na dowolnym poziomie oscylacyjnym. Te poziomy oscylacyjne odznaczają się podobnym wzorem do tych występujących na poziomie wzbudzonym S_1 . Widmo emisji charakteryzuje się więc także podobnym wzorem (układem szczytów) jak widmo wzbudzenia, ale w układzie lustrzanym.



Rycina 1. Widmo wzbudzenia i emisji antracenu.

Proces pochłaniania energii świetlnej i jej emisji przedstawia schematycznie **diagram Jabłońskiego** (Rycina 2).



Rycina 2. Diagram Jabłońskiego.

Proces fluorescencji jest cykliczny. Jeżeli fluorofor nie zostanie nieodwracalnie uszkodzony w stanie wzbudzonym (tzw. fotowysychanie – ang. *photobleaching*), ta sama cząsteczka może wielokrotnie pochłaniać i emitować światło. Jest to podstawą czułości technik fluorescencyjnych.

III. Intensywność procesu fluorescencji.

Intensywność fluorescencji zależy od tych samych parametrów, co absorpcja: zdolności cząsteczki do pochłaniania światła wyrażonej molowym współczynnikiem absorpcji, długości optycznej i stężenia fluorofora. Dodatkowymi parametrami są wydajność kwantowa emisji fluorescencji i czas życia fluorescencji.

Wydajność kwantowa emisji fluorescencji to stosunek ilości kwantów wyemitowanych na drodze fluorescencji do ilości kwantów zaabsorbowanych.

Czas życia fluorescencji to średni czas, w jakim cząsteczka przebywa w stanie wzbudzonym. Czas życia określa czas, w którym fluorofor może zmienić swoje oddziaływanie z otoczeniem (oddziaływanie z innymi cząsteczkami, dyfuzja), co ma odzwierciedlenie w widmie emisyjnym.

Intensywność fluorescencji może ulec obniżeniu na wiele sposobów. Proces ten nosi nazwę **wygaszania**. Znane są różne mechanizmy wygaszania:

a) wygaszanie dynamiczne (ang. *collisional quenching*) – zachodzi, gdy fluorofor w stanie wzbudzonym ulegnie dezaktywacji na skutek kontaktu z inną cząsteczką, nazywaną **wygaszaczem** (ang. *quencher*). Proces ten zależy od współczynnika dyfuzji, czyli od lepkości środowiska. Cząsteczki nie ulegają zmianom chemicznym w tym procesie. Dla wygaszenia dynamicznego spadek intensywności fluorescencji jest opisany **równaniem Sterna-Volmera**:

$$F_0/F = 1 + K[Q]$$

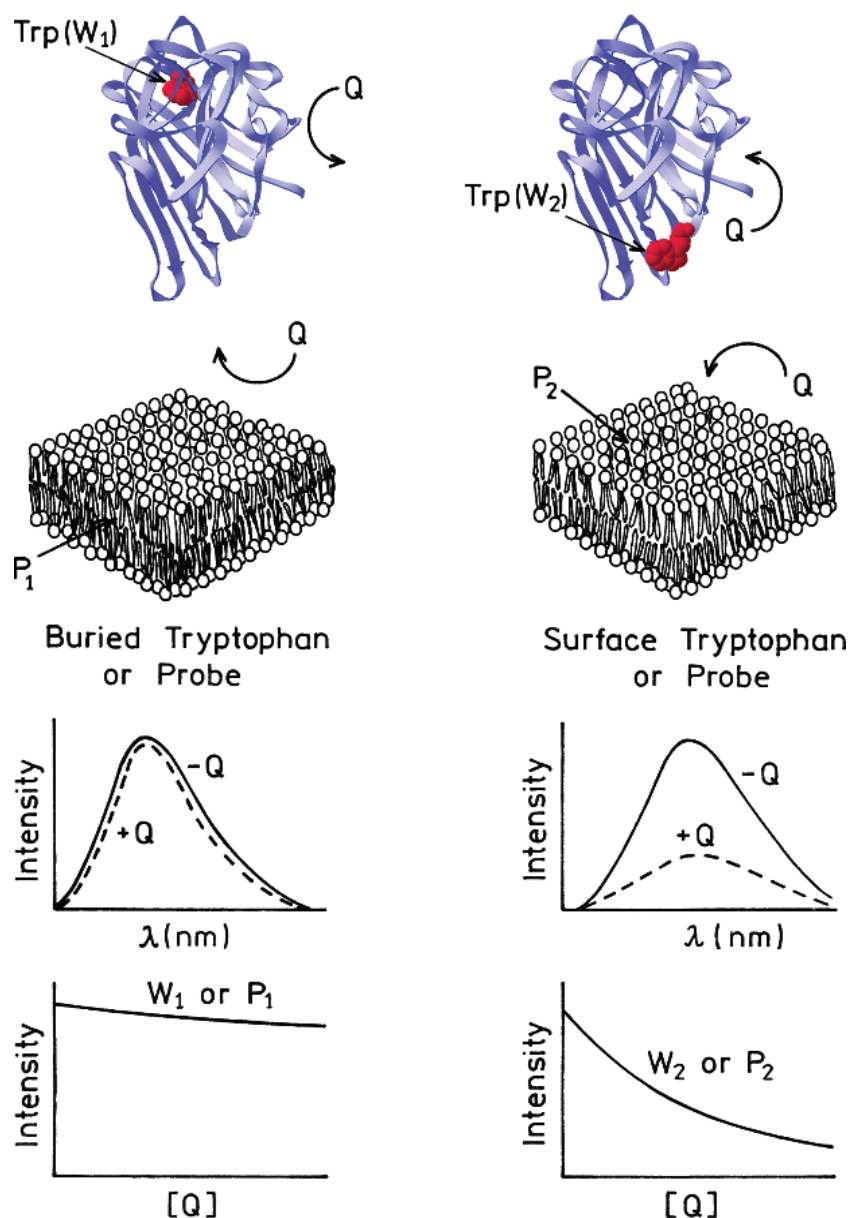
F₀ – intensywność fluorescencji bez wygaszacza; **F** – intensywność fluorescencji z wygaszaczem; **[Q]** – stężenie wygaszacza; **K** – stała Sterna-Volmera – określa wrażliwość fluorofora na wygaszanie wygaszaczem.

Fluorofor schowany w cząsteczce wykazuje o wiele mniejszą wrażliwość na wygaszanie (niskie wartości K) niż fluorofor wolny w roztworze lub znajdujący się na powierzchni cząsteczki (wysokie wartości K).

Wiele cząsteczek może być dynamicznymi wygaszaczami. Zaliczają się do nich substancje paramagnetyczne (tlen), halogeny (J^- , Br^-), aminy, a także akrylamid. Mechanizm wygaszania zależy od pary fluorofor-wygaszacz. Na przykład wygaszanie indoli przez akrylamid zachodzi najprawdopodobniej na skutek przeniesienia elektronu z indolu na akrylamid, przy czym przeniesienie to zachodzi wyłącznie w stanie wzbudzonym fluorofora.

b) wygaszanie statyczne – zachodzi, gdy fluorofor tworzy niefluorescencyjne kompleksy z wygaszaczem. Proces ten zachodzi w stanie podstawowym i nie zależy od ilości zderzeń i lepkości środowiska.

Wygaszanie dynamiczne może dostarczyć informacji o dostępności fluorofora dla wygaszacza (Rycina 3).



Rycina 3. Dostępność reszt tryptofanu dla wygaszacza.

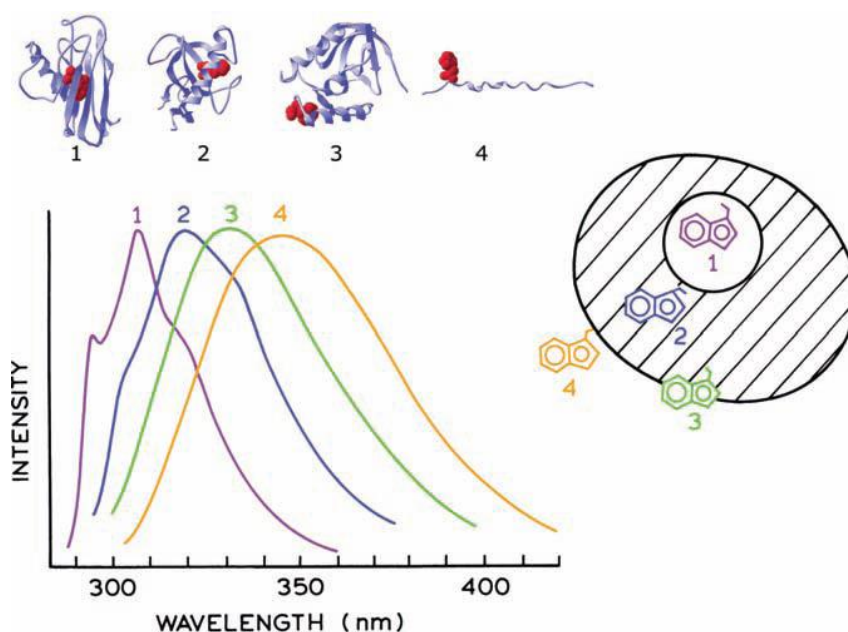
IV. Wpływ polarności środowiska na fluorescencję.

Położenie maksimum fluorescencji znacznika zależy w znacznym stopniu od polarności otoczenia. Ogólnie: **ze wzrostem polarności rośnie długość fali λ_{em}** . Wynika z tego, że wartość przesunięcia Stokesa będzie się zmieniała wraz ze zmianą polarności otoczenia. Z wartości przesunięcia Stokesa można dzięki temu wnioskować o polarności środowiska otaczającego fluorofor.

Przez pojęcie polarności rozumie się w tym przypadku istnienie w pobliżu grupy fluoryzującej ruchliwych cząsteczek dipolowych. Przejściu cząsteczki do stanu wzbudzonego towarzyszy zmiana jej momentu dipolowego. Zmiana momentu dipolowego cząsteczki znacznika wywołuje polaryzację powłok elektronowych otaczających znacznik cząsteczek, przesunięcie indukcyjne ich atomów oraz polaryzację orientacyjną. Strata energii na te procesy powoduje przesunięcie maksimum fluorescencji w stronę fal dłuższych. Wartość przesunięcia zależy od:

- a) różnicy między wartościami momentu dipolowego cząsteczki w stanie podstawowym i wzbudzonym,
- b) polaryzowalności otaczających cząsteczek (im większa polaryzowalność elektronowa cząsteczek otoczenia, tym większe przesunięcie Stokesa),
- c) wartości momentu dipolowego cząsteczek otoczenia (im większy moment dipolowy, tym większe przesunięcie Stokesa),
- d) możliwości zmiany orientacji momentu dipolowego w czasie trwania stanu wzbudzonego znacznika (im dłuższy czas życia stanu wzbudzonego, tym większe przesunięcie Stokesa).

Przesunięcie Stokesa będzie większe w przypadku znaczników o długim czasie życia stanu wzbudzonego i w środowisku o dużej przenikalności elektrycznej i małej lepkości. Tryptofan jest fluoroforem, którego fluorescencja jest bardzo zależna od polarności otoczenia (Rycina 4).



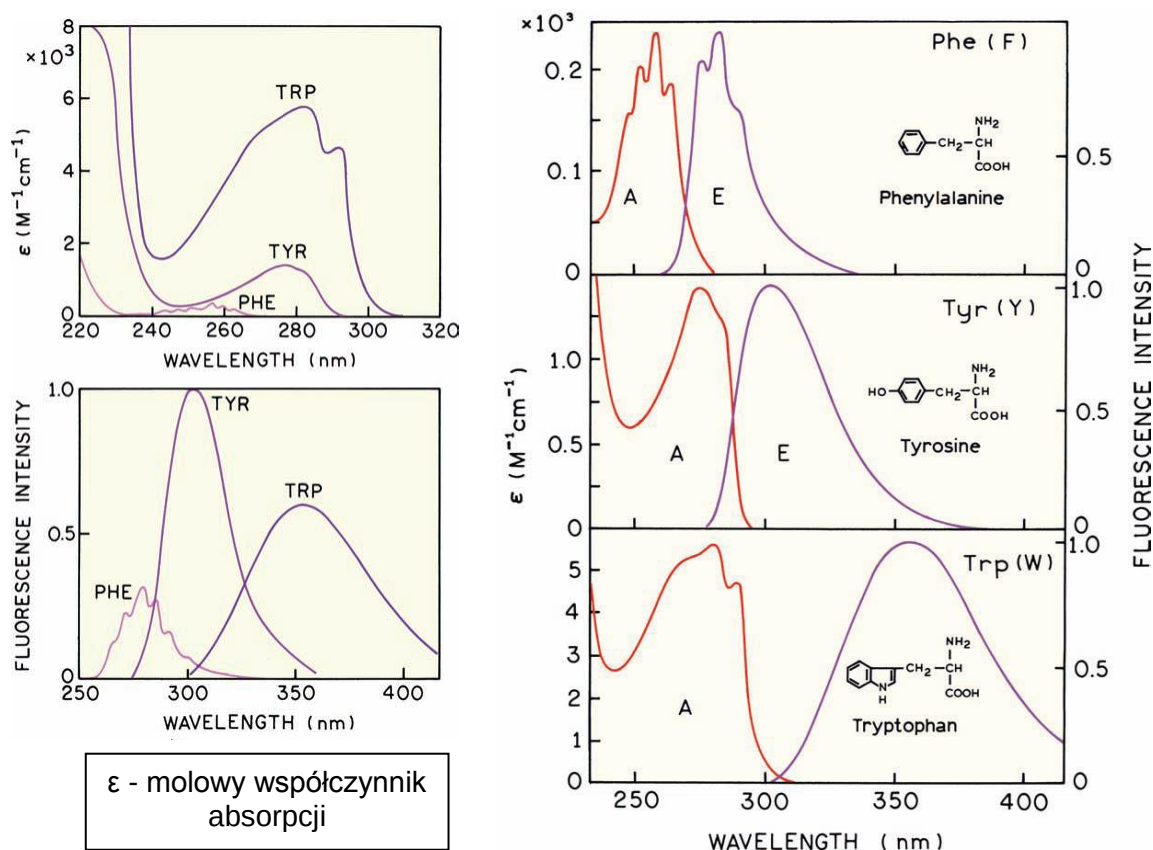
Rycina 4. Widma emisyjne reszt tryptofanu, w różny sposób wyeksponowanych do środowiska.

V. Fluorofory.

Fluorofory dzielą się na dwie główne klasy: wewnętrzne (właściwe; ang. *intrinsic*) i zewnętrzne (niewłaściwe; ang. *extrinsic*).

- a) **Fluorofory wewnętrzne** to takie, które występują w stanie naturalnym (np. w białkach – grupa indolowa tryptofanu, nukleotydy: NADH, FAD, FMN).
- b) **Fluorofory zewnętrzne** to takie, które dodawane są do próbki nie wykazującej fluorescencji (np. DPH dodawany do błon, które same z siebie nie fluoryzują). Czasami są określane jako **znaczniki fluorescencyjne**.

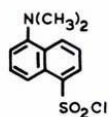
Białka zawierają trzy własne fluorofory wewnętrzne: reszty tryptofanu, fenyloalaniny i tyrozyny. Fluorofory te charakteryzują się różnymi wartościami wydajności kwantowej, a także wartościami fal wzbudzenia i emisji fluorescencji (Rycina 5).



Rycina 5. Widma wzbudzenia i emisji aminokwasów aromatycznych.

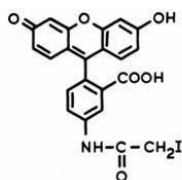
W praktyce bada się głównie fluorescencję tryptofanu, ponieważ fluorescencja tyrozyny jest silnie gaszona, a natężenie fluorescencji fenyloalaniny jest bardzo niskie. Parametry fluorescencji tryptofanu są bardzo czułe na strukturę otoczenia chromoforu, dlatego analiza ich zmian pod wpływem różnych czynników może dostarczyć informacji na temat oddziaływań międzycząsteczkowych, zmian konformacyjnych makrocząsteczek, itp. Pierścień indolowy Trp absorbuje światło o długości fali ok. 280 nm, emituje światło o długości fali ok. 340 nm. Widmo emisyjne indolu jest bardzo wrażliwe na polarność środowiska. Emisja może być przesunięta w stronę fal krótszych, jeśli Trp jest ukryty we wnętrzu białka. W przypadku Trp na powierzchni białka lub podczas denaturacji białka emisja jest przesunięta w stronę fal dłuższych.

Fluorofory zewnętrzne mogą być związane z badaną próbką kowalencyjnie lub niekowalencyjnie. Większość znaczników to cząsteczki uzyskane w wyniku syntezy organicznej, ale mogą być stosowane także znaczniki pochodzenia naturalnego. Większość stosowanych znaczników fluorescencyjnych jest pochodnymi fluoresceiny, rodaminy, kumaryny i Texas red, jednakże jest syntetyzowanych coraz więcej nowych znaczników fluorescencyjnych o korzystniejszych parametrach (Rycina 6 i Rycina 7).



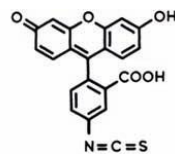
DNS-Cl

chlorek dansylu

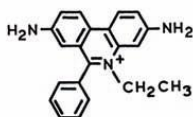


5-IAF

pochodne fluoresceiny

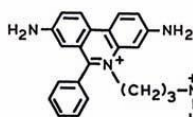


FITC



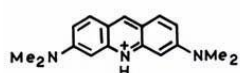
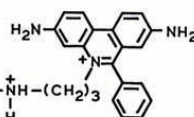
Ethidium Bromide

518/605 nm



Ethidium Homodimer

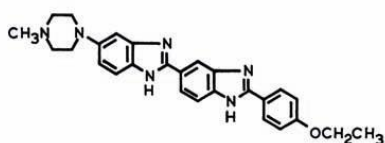
528/617 nm



Acridine Orange

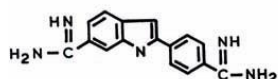
500/526 nm DNA

460/650 nm RNA



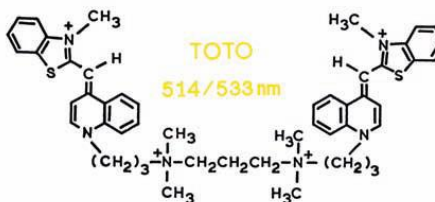
Hoechst 33342

350/460 nm



DAPI

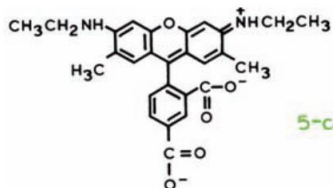
355/461 nm



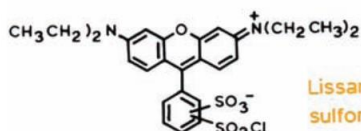
TOTO

514/533 nm

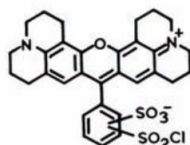
Rycina 6. Znaczniki DNA.



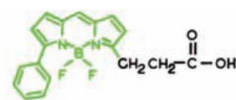
5-carboxyrhodamine 6G hydrochloride



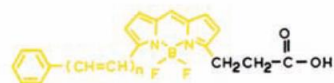
Lissamine rhodamine B sulfonyl chloride



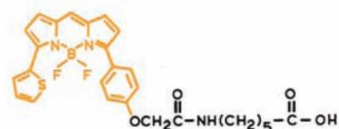
Texas Red sulfonyl chloride



BODIPY-R6G



BODIPY- 581/591



BODIPY- Texas Red

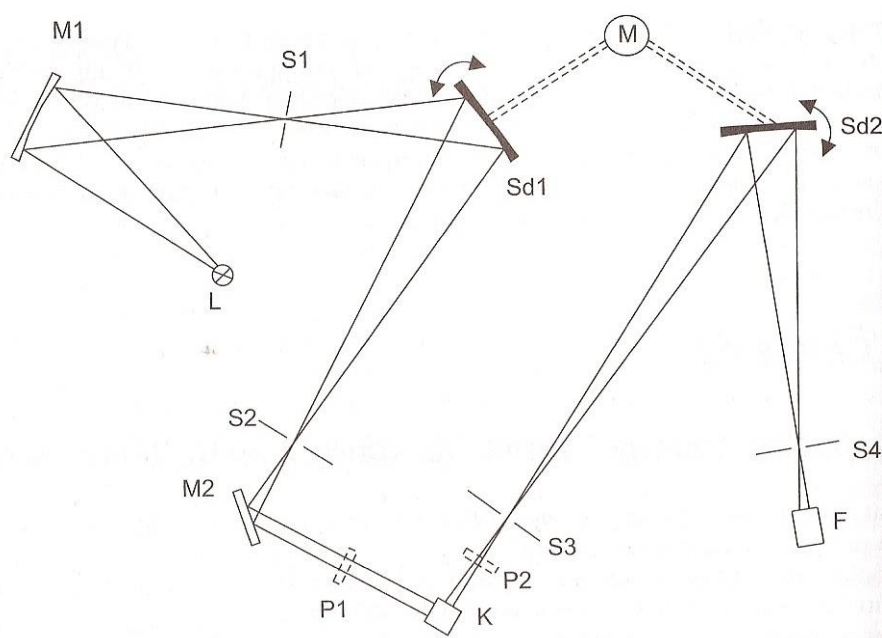
Rycina 7. Znaczniki fluorescencyjne.

VI. Aparatura pomiarowa.

Urządzenia umożliwiające pomiar natężenia fluorescencji najczęściej zawierają:

- a) **źródło promieniowania wzbudzającego** - najczęściej jest to lampa ksenonowa, charakteryzująca się ciągłym widmem emisyjnym w zakresie 200-900 nm,
- b) **monochromator promieniowania wzbudzającego** - umożliwia wyodrębnienie z wiązki światła długości fali potrzebnej do wzbudzenia fluorofora,
- c) **uchwyt próbek**,
- d) **monochromator promieniowania emitowanego** - w spektrofluorymetrach monochromatorami są siatki dyfrakcyjne z odpowiednimi szczelinami i układ mechaniczny służący do zmiany długości fali,
- e) **światłoczuły detektor** - najczęściej fotopowielacz.

Światło wzbudzające przechodzi przez kuwetę z próbką. W standardowych spektrofluorymetrach, kąt między wiązką wzbudzającą a mierzoną emisją fluorescencji wynosi 90° , co pozwala na wyeliminowanie wpływu światła padającego. Schemat spektrofluorymetru przedstawiono na Rycinie 8.



Rycina 8. Schemat spektrofluorymetru. L – źródło światła; M1, M2 – zwierciadła wklęsłe; S1, S2, S3, S4 – szczeliny; Sd1 – siatka dyfrakcyjna, służąca do monochromatyzacji światła wzbudzającego; Sd2 – siatka dyfrakcyjna służąca do monochromatyzacji światła emitowanego; F – detektor (fotopowielacz), M – silnik obracający siatki dyfrakcyjne; P1, P2 – płytki polaryzacyjne; K – kuweta.

Za pomocą spektrofluorymetru można wykreślić dwa rodzaje widm danej substancji:

- a) **Widma wzbudzenia (ekscytacyjne)** – zależność natężenia fluorescencji od długości fali promieniowania wzbudzającego dla określonej stałej długości fali promieniowania emitowanego (z reguły w maksimum emisji). W tym przypadku pierwsza siatka dyfrakcyjna (monochromatora promieniowania wzbudzającego) jest obracana i na kuwetę z roztworem pada promieniowanie o zmieniającej się długości fali. Druga siatka jest ustawiona na określoną długość fali mierzonego promieniowania fluorescencji.
- b) **Widma emisyjne** – zależność natężenia fluorescencji od długości fali promieniowania emitowanego przy określonej stałej długości fali promieniowania wzbudzającego.

Ćwiczenie

Wykreślanie widm wzbudzenia i emisji dla roztworów (a) wolnego tryptofanu, (b) tryptofanu w albuminie bydlęcej (BSA). Wyznaczanie przesunięcia Stokesa dla tych związków.

BSA zawiera dwie reszty Trp (W134 i W212), obie relatywnie schowane we wnętrzu białka.

I. Sprzęt i aparatura:

- Spektrofluorymetr Perkin Elmer LS 55
- Pipety automatyczne
- Tryskawki z wodą destylowaną
- Kuwety pomiarowe
- Rękawiczki

II. Odczynniki:

- Roztwory wyjściowe analizowanych substancji: NATA (N-acetylotryptofanamid, analog tryptofanu) (10 mM w 20 mM Hepes, pH=7,5), BSA (0,1 mM w 20 mM Hepes, pH=7,5),
- 20 mM Hepes, pH=7,5

III. Wykonanie ćwiczenia:

A. Pomiar widm wzbudzenia i emisji rozpuszczalników badanych substancji:

1. 20 mM Hepes, pH=7,5 - do kwarcowej kuwety odpipetować 1997 μ l roztworu.
2. Umieścić kuwetę w uchwycie (pozycja 1).
3. Uruchomić spektrofluorymetr, ustawić parametry:
 - do rejestracji widma wzbudzenia – Ex. 240 – 310 nm, Em. 350 nm, szczeliny 5 nm, napięcie na fotopowielaczu: Volt. 775 (ćw. 3);
 - do rejestracji widma emisyjnego – Ex. 295 nm, Em 310-410 nm, szczeliny 5 nm, napięcie na fotopowielaczu: Volt. 775 (ćw. 4);
4. 20 mM Hepes, pH=7,5 do BSA – odpipetować 1980 μ l roztworu, parametry j.w. z wyjątkiem napięcia na fotopowielaczu. W tym przypadku 900 V.

B. Pomiar widm wzbudzenia i emisji badanych substancji:

NATA – rozcieńczenie 800x

1. Do 1997 μ l 20 mM Hepes, pH=7,5 dodać 2,5 μ l roztworu wyjściowego, wymieszać.
2. Pomiar widm wykonać dokładnie tak samo, jak w przypadku samego rozcieńczalnika.

BSA – rozcieńczenie 100x

1. Do 1980 μ l 20 mM Hepes, pH=7,5 dodać 20 μ l roztworu wyjściowego, wymieszać.
2. Pomiar widm wykonać dokładnie tak samo, jak w przypadku samego rozcieńczalnika.

C. Analiza wyników:

1. Odjąć widma buforów od odpowiednich widm badanych substancji (opcja Arithmetic, arithmetic spectra).
2. Wyznaczyć długości fal odpowiadające maksimum wzbudzenia (λ_{maxex}) i emisji (λ_{maxem}).
3. Obliczyć wartości przesunięcia Stokes'a dla badanych substancji (i je zinterpretować), korzystając ze wzoru:

$$\Delta\lambda = \lambda_{\text{maxem}} - \lambda_{\text{maxex}}$$

Badanie wygaszania fluorescencji tryptofanu akrylamidem.

I. Sprzęt i aparatura:

- o Spektrofluorymetr Perkin Elmer LS 55
- o Pipety automatyczne
- o Tryskawki z wodą destylowaną
- o Kuwety pomiarowe
- o Rękawiczki

II. Odczynniki:

- o Roztwory NATA i BSA użyte do pomiaru widm (poprzednia część ćwiczenia)
- o 6M roztwór akrylamidu w wodzie.

UWAGA!!!! AKRYLAMID JEST NEUROTOKSYNĄ. NALEŻY PRACOWAĆ WYŁĄCZNIE W RĘKAWICZKACH!

III. Wykonanie ćwiczenia:

A. Wygaszanie tryptofanu w BSA (ćw. 7)

1. Wstawić kuwetę z roztworem BSA do uchwytu w spektrofluorymetrze, wrzucić do środka mieszadło magnetyczne.
2. Uruchomić urządzenie. Ustawić parametry jak do pomiaru widma emisyjnego BSA (ćw. 7), włączyć mieszanie.
3. Zmierzyć widmo emisyjne bez wygaszacza.
4. Dodać pierwszą porcję wygaszacza – 3 μ l 6 M akrylamidu i zmierzyć widmo emisyjne.
5. Schemat dodawania został przedstawiony w Tabeli 1. Zmierzyć widma emisyjne po dodaniu kolejnych porcji wygaszacza.

Tabela 1. Stężenie akrylamidu w badanych próbach.

nr próby	objętość dodanego wygaszacza (μ l)	łączna objętość dodanego wygaszacza (μ l)	Stężenie końcowe akrylamidu (mM)
1	0	0	
2	3	3	
3	3	6	
4	4	10	
5	7	17	
6	16	33	

B. Pomiary wygaszania NATA (ćw. 8):

1. Wstawić kuwetę z roztworem NATA do uchwytu w spektrofluorymetrze, wrzucić do środka mieszadło magnetyczne.
2. Uruchomić urządzenie. Ustawić parametry jak do pomiaru widma emisyjnego NATA (ćw. 8), włączyć mieszanie.
3. Wykonać pomiary analogicznie do pomiarów BSA

C. Analiza wyników- wyniki przedstawić w Tabeli 2 i 3:

1. Odczytać natężenie fluorescencji dla $\lambda_{\max}$ em z widma związku bez wygaszacza.
2. Dla tej samej długości fali odczytać wartości natężenia fluorescencji z widm związku z wygaszczem oraz dla samego buforu (poprzednia część ćwiczenia).
3. Odjąć natężenie fluorescencji buforu od wartości natężenia fluorescencji analizowanych związków.
4. Obliczyć stosunek F_0/F , gdzie F_0 - natężenie fluorescencji związku bez wygaszacza, a F - wartości natężenia fluorescencji związku z wygaszczem.

Wyniki proszę przedstawić w formie tabeli oraz wykresu przedstawiającego zależność stosunku F_0/F od stężenia wygaszacza dla obu badanych związków i je zinterpretować.

Tabela 2. Wyniki pomiarów wygaszania tryptofanu w BSA.

numer próby	stężenie wygaszacza w próbce (mM)	natężenie fluorescencji	natężenie fluorescencji po odjęciu buforu	stosunek F_0/F
1	0			
2				
3				
4				
5				
6				

Tabela 3. Wyniki pomiarów wygaszania NATA.

numer próby	stężenie wygaszacza w próbce (mM)	natężenie fluorescencji	natężenie fluorescencji po odjęciu buforu	stosunek F_0/F
1	0			
2				
3				
4				
5				
6				

Literatura:

1. Praca zbiorowa pod redakcją Bryszewskiej, M. i Leyko, W. Biofizyka dla biologów, PWN, 1997;
2. Józwiak, Z., Bartosz, G. Biofizyka. Wybrane zagadnienia wraz z ćwiczeniami. PWN, 2008;
3. Lakowicz, J. Principles of fluorescence spectroscopy. III wydanie. Springer Science, 2006.

Ćwiczenie nr II

Wyznaczanie ilości ciepła wydzielanego z organizmu człowieka przy oddychaniu

Celem ćwiczenia jest wyznaczenie ilości ciepła wydzielanego z organizmu człowieka przy oddychaniu przy użyciu kalorymetru.

Kalorymetria - wybrane zagadnienia.

Kalorymetria zajmuje się metodami pomiaru ciepła wydzielanego bądź pochłanianego w trakcie różnych procesów fizycznych, chemicznych i biologicznych (np. zamiana pracy na ciepło, ciepło reakcji chemicznych) oraz parametrów charakteryzujących termiczne właściwości ciał (np. ciepło właściwe, przewodność cieplna).

W trakcie dostarczania lub oddawania energii w postaci ciepła zmienia się temperatura ciała. Ilość ciepła Q , potrzebną do ogrzania ciała o ΔT można obliczyć ze wzoru:

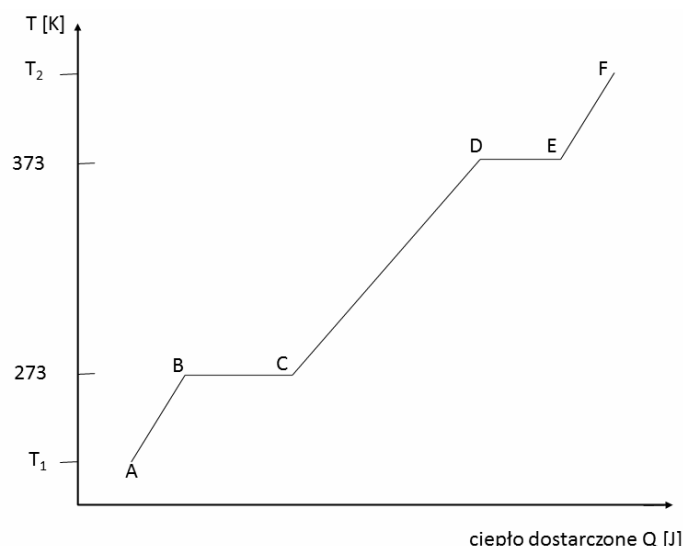
$$Q = m \cdot c_w \cdot \Delta T$$

gdzie: m – masa ciała, c_w – ciepło właściwe, ΔT – różnica temperatur

Ciepło właściwe (c) jest ilością ciepła potrzebną do ogrzania 1 kg dowolnego ciała o jeden Kelwin. Jednostką ciepła właściwego jest $J \cdot kg^{-1} \cdot K^{-1}$. Ciała stałe lub ciecze, które pobierają energię w postaci ciepła nie muszą zwiększać swojej temperatury. Zamiast tego substancja może zmienić swój stan (fazę). Przykładem takiej przemiany fazowej jest topnienie lodu – zmiana stanu stałego na ciekły. Ilość energii, którą w postaci ciepła należy dostarczyć 1 kg substancji aby uległa ona przemianie fazowej jest nazywana **ciepłem przemiany** (ciepłem topnienia c_t lub ciepłem parowania c_p):

$$c_t = Q/m$$

Przy ustalonym ciśnieniu zewnętrznym temperatura podczas topnienia lub parowania nie zmienia się (Rycina 1). Jeśli przeprowadzamy lód w parę wodną, to wykres zależności temperatury od ilości dostarczonego ciepła dla zachodzących procesów ma następujący przebieg:



Rycina 1. Zależność temperatury od ilości ciepła podczas przeprowadzania lodu w parę wodną. A – B- podnoszenie temperatury lodu; B – C- topnienie lodu; C – D- podnoszenie temperatury wody powstałej w procesie topnienia lodu; D – E- parowanie wody; E – F- podnoszenie temperatury pary wodnej.

W wyniku przemiany materii w organizmach żywych powstaje ciepło, które jest zużywane przez organizm na endotermiczne reakcje chemiczne, pracę mechaniczną, energię elektryczną oraz energię fal elektromagnetycznych. Część ciepła zostaje odprowadzona na zewnątrz (m.in. przez oddychanie), dzięki czemu możliwe jest utrzymanie optymalnej temperatury organizmu. Powietrze wdychane ma temperaturę otoczenia, a zawarta w nim para wodna jest najczęściej nienasycona. Wewnątrz dróg oddechowych, powietrze wraz z zawartą w nim parą podgrzewa się do temperatury ciała ludzkiego. Dodatkowo para uzyskuje stan nasycenia w wyniku parowania wody ze ścian przewodów oddechowych. Procesy te odbywają się kosztem ciepła pobranego z organizmu. Ciepło wydzielone z organizmu można wyznaczyć dwiema metodami:

- a) **Kalorymetria bezpośrednia** – polega na umieszczeniu człowieka lub zwierzęcia w odpowiednio przystosowanym kalorymetrze.
- b) **Kalorymetria pośrednia** – polega na badaniu wymiany gazowej, np. przez doświadczenie, w którym powietrze jest wdychane do kalorymetru wypełnionego lodem.

Ciepło wydzielone podczas wydychania powietrza Q_1 jest zużywane na proces topnienia lodu:

$$Q_1 = (m_w[II] - m_w[I]) \cdot c_t$$

$m_w[I]$ – masa wody powstała z lodu w kalorymetrze [I] bez wydychania powietrza

$m_w[II]$ – masa wody powstała z lodu w kalorymetrze [II] podczas wydychania powietrza

c_t – ciepło topnienia lodu

Q_1 jest równe ciepłu, jakie straciłby organizm przez oddychanie, gdyby oddychanie odbywało się w temperaturze topnienia lodu $T_0 = 0^\circ\text{C}$. Ponieważ doświadczenie jest przeprowadzane w temperaturze pokojowej, ciepło Q wydzielone przez organizm poprzez wydychanie w temperaturze pokojowej T_P można obliczyć z proporcji:

$$Q = Q_1 \frac{T_C - T_P}{T_C - T_0}$$

T_C – temperatura normalna ciała ludzkiego ($36,6^\circ\text{C}$)

Ćwiczenie

Wyznaczanie ilości ciepła wydzielanego z organizmu człowieka przy oddychaniu

I. Sprzęt i aparatura:

- 2 kalorymetry, pojemnik z tworzywa sztucznego na lód, wąż gumowy
- waga

II. Materiały i odczynniki:

- lód

III. Wykonanie ćwiczenia:

1. Zważyć puste i wysuszone naczynie wewnętrzne kalorymetrów I i II.
2. Wypełnić pojemnik z tworzywa sztucznego (dziurkowany od spodu) drobno potłuczonym i możliwie suchym lodem i umieścić go w naczyniu wewnętrznym kalorymetru I. Całość umieścić w osłonie i szczelnie zamknąć pokrywą. W otworze w pokrywie umieścić jałowy gumowy wąż. Kalorymetr pozostawić na 10 minut.
3. Po upływie 10 minut szybko wyjąć wewnętrzny pojemnik z tworzywa zawierający lód, otrząsnąć lód z nadmiaru wody do naczynia wewnętrznego kalorymetru i umieścić pojemnik w wewnętrznym naczyniu kalorymetru II. Przez 10 min wydychać powietrze do kalorymetru II przez ustnik. Oddech powinien być jak najbardziej zbliżony do normalnego

a całe powietrze powinno zostać wtłoczone do kalorymetru. Po skończeniu wydychania natychmiast otworzyć kalorymetr i wyjąć z niego pojemnik wraz z pozostałością lodu po uprzednim otrząśnięciu z wody.

4. Zważyć naczynia wewnętrzne kalorymetru I wraz z wodą i odejmując masę pustego naczynia obliczyć masę wody powstałej ze stopienia lodu pod wpływem ciepła zawartego w kalorymetrze oraz dopływającego z zewnątrz.
5. Zważyć naczynie wewnętrzne kalorymetru II wraz z wodą i odejmując masę pustego naczynia, obliczyć masę wody powstałej podczas wydychania powietrza i skraplania się pary wodnej.

IV. Przygotowanie sprawozdania:

1. Wyniki umieścić w Tabeli 1.

Tabela 1. Przedstawienie zbiorcze analizowanych wartości.

kalorymetr I			kalorymetr II			m_{wp}	T_0	T_c	T_p	c_t	Q_1
m_k	m_{kw}	m_w	m_k	m_{kw}	m_w						
						3,3 g	0°C	36,6°C		335 kJ • kg ⁻¹	

m_k – masa pustego kalorymetru,

m_{kw} – masa kalorymetru z wodą,

m_w – masa wody powstałej w kalorymetrze,

m_{wp} – masa wody powstałej na skutek skroplenia się pary wodnej zawartej w wydychanym powietrzu,

c_t – ciepło topnienia lodu,

T_c – temperatura normalna ciała ludzkiego,

T_0 – temperatura topnienia lodu,

T_p – temperatura pokojowa,

Q_1 – całkowite ciepło stracone przez wydychanie powietrza przy ochłodzeniu się do temperatury $T = 0^\circ\text{C}$.

2. Całkowite ciepło Q_1 stracone przez wydychanie powietrza przy ochłodzeniu się do temperatury $T = 0^\circ\text{C}$ obliczyć ze wzoru:

$$Q_1 = (m_w[II] - m_w[I] - m_{wp})c_t$$

3. Obliczyć ciepło wydychania Q , uwzględniając poprawkę według wzoru:

$$Q = Q_1 \frac{T_c - T_p}{T_c - T_0}$$

4. Zapisać obserwacje, zinterpretować wyniki i wyciągnąć wnioski.

Literatura:

1. Józwiak, Z., Bartosz, G. Biofizyka. Wybrane zagadnienia wraz z ćwiczeniami. PWN, Warszawa, 2005.

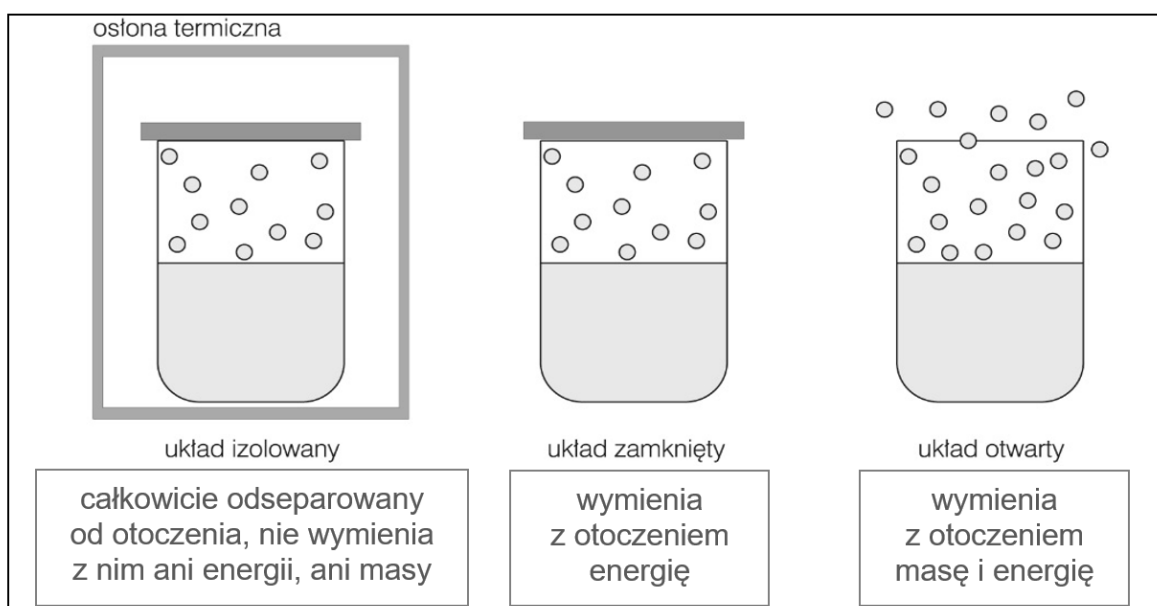
Ćwiczenie nr III

Wyznaczanie entalpii swobodnej reakcji dysocjacji *p*-nitrofenolu

Celem ćwiczenia jest poznanie podstawowych pojęć termodynamiki klasycznej, sposobu wyznaczania parametrów reakcji chemicznych: stopnia dysocjacji, stałej równowagi i entalpii swobodnej oraz kolorymetrycznego oznaczania stężenia substancji w roztworze.

I. Wybrane zagadnienia z termodynamiki klasycznej. Entalpia swobodna reakcji chemicznych.

Termodynamika jest matematycznym opisem ciepła i jego związku z energią mechaniczną i innymi formami pracy. We wszystkich procesach chemicznych i biochemicznych energia jest uwalniana albo zużywana. W układach chemicznych termodynamika pozwala na określenie możliwości przeprowadzenia reakcji, jej kierunku oraz położenia stanu równowagi. W termodynamice rozważa się zależność między **układem** (reakcją, procesem, badanym organizmem) a **otoczeniem** (resztą wszechświata) (Rycina 1).



Rycina 1. Układy termodynamiczne.

Stan **układu termodynamicznego** można opisać za pomocą określonej liczby parametrów zwanych **parametrami stanu** układu. Parametry stanu układu:

- ekstensywne** (np. objętość i masa) – wartości tych parametrów zmieniają się w zależności od ilości substancji w badanej próbce i są addytywne;
- intensywne** (np. temperatura, stężenie, ciśnienie) – wartości parametrów nie zależą od ilości substancji i nie są addytywne.

Wielkości termodynamiczne można podzielić na **funkcje stanu** i **funkcje zależne od drogi**:

- Funkcje stanu** (objętość, ciśnienie, entropia, entalpia, energia wewnętrzna) - ich wartość zależy jedynie od stanu układu w danym momencie.
- Funkcje zależne od drogi** (praca, ciepło) - wartość tych wielkości zależy od drogi na której układ zmienia się od jednego stanu do drugiego.

Energia wewnętrzna (U) – całkowita ilość energii niezależnie od sposobu jej przechowywania. Energia wewnętrzna jest sumą całkowitej energii kinetycznej i potencjalnej układu, składają się na nią m. in. oscylacje wewnętrzne cząsteczek, ruchy rotacyjne, energia jądrowa i elektronowa. Nie jest możliwe określenie jej ilości bezwzględnej. Można określić jedynie jej zmiany (ΔU) przy przejściu układu z jednego stanu do drugiego. Energia

wewnętrzna jest funkcją stanu i zależy od innych funkcji stanu, takich jak temperatura, ciśnienie i skład.

Zgodnie z **pierwszą zasadą termodynamiki** zmianę całkowitej energii wewnętrznej ΔU układu można opisać jako sumę energii oddanej (do otoczenia) lub zyskanej (z otoczenia) w formie pracy (ΔW) i ciepła (ΔQ). Układ nie może stracić lub pozyskać energii w żaden inny sposób.

$$\Delta U = \Delta Q + \Delta W$$

Pierwsza zasada termodynamiki jest konsekwencją **zasady zachowania energii** – energia nie może powstawać ani znikać, energia jest przekształcana z jednej formy w drugą. Gdy układ traci energię do otoczenia, ΔU ma wartość ujemną. Gdy energia wewnętrzna układu wzrasta, ΔU ma wartość dodatnią. Energia układu izolowanego jest stała.

Najczęściej przekazywaną energią w formie pracy jest praca objętościowa. Przykładem takiej pracy jest przesunięcie tłoka zamykającego cylinder wypełniony gazem, który ulega rozprężeniu. Gdy na tłok działa ciśnienie zewnętrzne (p) pracę objętościową można wyrazić wzorem:

$$W = -p\Delta V$$

ΔV - zmiana objętości podczas rozprężania. Praca ma wartość ujemną ponieważ jest wykonywana przeciwko otoczeniu.

Przyjęte konwencje dotyczące znaku pracy i ciepła

Proces	Znak
<i>Praca wykonana przez układ na otoczeniu</i>	-
<i>Praca wykonana przez otoczenie na układzie</i>	+
<i>Ciepło pochłonięte przez układ z otoczenia</i>	+
<i>Ciepło oddane przez układ otoczeniu</i>	-

W przypadku, tzw. **przemiany izochorycznej** (Rycina 2) do układu jest dostarczane ciepło, ale nie jest wykonana żadna praca, układ termodynamiczny zachowuje objętość ($\Delta V = 0$, $\Delta W = 0$), wtedy:

$$\Delta Q = U_2 - U_1 = \Delta U$$

W procesie izochorycznym przyrost energii wewnętrznej ΔU jest więc równy ilości ciepła dostarczonego układowi.

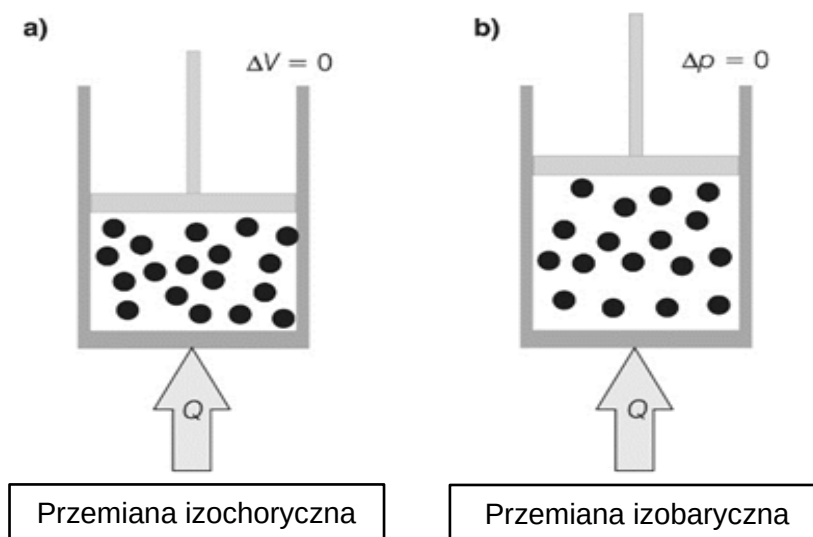
Podczas **przemiany izobarycznej** (Rycina 2.) układ wykonuje pracę objętościową ($p\Delta V$), konieczną do zachowania stałego ciśnienia, wtedy:

$$\Delta Q = U_2 - U_1 + p(V_2 - V_1) = \Delta U + p\Delta V$$

W tym przypadku ciepło dostarczone układowi jest zużywane na zwiększenie jego energii wewnętrznej o ΔU oraz na wykonanie pracy objętościowej $p\Delta V$. Wyrażenie $\Delta U + p\Delta V$ jest definiowane jako zmiana **entalpii** (ΔH):

$$\Delta H = \Delta U + p\Delta V$$

W procesie izobarycznym przyrost entalpii ΔH jest równy przyrostowi ciepła ΔQ .



Rycina 2. Przemiana izochoryczna i izobaryczna.

Zmiany entalpii mogą dotyczyć wielu procesów chemicznych i fizycznych.

Wielkość	Entalpia związana z	Przykład
Entalpia reakcji	określoną reakcją chemiczną	$\text{Fe}_2\text{O}_3 + 3 \text{Zn} \rightarrow 2\text{Fe} + 3\text{ZnO}$
Entalpia jonizacji	utrata elektronu przez cząstkę w fazie gazowej	$\text{Na(g)} \rightarrow \text{Na}^+(\text{g}) + \text{e}^-(\text{g})$
Entalpia parowania	parowaniem substancji	$\text{H}_2\text{O(c)} \rightarrow \text{H}_2\text{O(g)}$
Entalpia spalania	całkowitym spalaniem substancji	$\text{H}_2 + 1/2\text{O}_2 \rightarrow \text{H}_2\text{O}$
Entalpia tworzenia	utworzeniem substancji z pierwiastków w ich stanach standardowych	$2\text{Fe} + 3\text{S} \rightarrow \text{Fe}_2\text{S}_3$
Entalpia rozpuszczania	Rozpuszczaniem substancji w określonej ilości rozpuszczalnika	$\text{NaCl(s)} \rightarrow \text{Na}^+(\text{aq}) + \text{Cl}^-(\text{aq})$
Entalpia sublimacji	Sublimacją substancji	$\text{CO}_2(\text{s}) \rightarrow \text{CO}_2(\text{g})$

Z punktu widzenia termodynamiki nie ma różnic między tymi procesami.

W reakcjach chemicznych zmiana entalpii ΔH (przemiana izobaryczna) lub energii wewnętrznej układu ΔU (przemiana izochoryczna) jest miarą **ciepła reakcji**. Reakcja jest **egzotermiczna** i układ oddaje ciepło do otoczenia, gdy $\Delta H < 0$ lub $\Delta U < 0$. Reakcja jest **endotermiczna**, gdy układ pobiera ciepło z otoczenia i $\Delta H > 0$ lub $\Delta U > 0$. **Należy pamiętać, że znak (-/+)** przed ΔH lub ΔU **nie stanowi kryterium spontaniczności (samorzutności) reakcji**.

Zmiany entalpii związane z reakcją zależą od temperatury oraz od **pojemności cieplnej** C substratów. Wzrost temperatury substancji jest wprost proporcjonalny do ilości dostarczonego ciepła : $\Delta T \approx Q$. Pojemność cieplną można wyrazić wzorem:

$$C = \frac{Q}{\Delta T}$$

Dla przemiany izochorycznej (przy stałej objętości):

$$C = \frac{\Delta U}{\Delta T}$$

Dla przemiany izobarycznej (przy stałym ciśnieniu):

$$C = \frac{\Delta H}{\Delta T}$$

Pierwsza zasada termodynamiki dotyczy zachowania energii podczas przemian. Nie mówi nic o tym, czy rzeczywiście dany proces zajdzie samorzutnie. Odpowiedz na to pytanie jest możliwa po wprowadzeniu dwóch dodatkowych pojęć: **entropii (S)** i **entalpii swobodnej (G)**. **Entropia (S)** różni się od energii tym, że nie ma zasady jej zachowania. Istnieją dwa różne sposoby definiowania zmiany entropii (ΔS) układu:

- 1) W zależności od temperatury układu i energii, którą układ absorbuje lub oddaje w postaci ciepła (definicja termodynamiczna),

w procesie odwracalnym:

$$\Delta S = \frac{Q_{odw}}{T}$$

Q_{odw} – ciepło pochłonięte w czasie procesu odwracalnego

w procesie nieodwracalnym:

$$\Delta S > \frac{Q}{T}$$

zgodnie z **drugą zasadą termodynamiki** entropia układu rośnie podczas procesów nieodwracalnych i pozostaje bez zmian podczas procesów odwracalnych.

- 2) Na drodze liczenia możliwych kombinacji ułożenia atomów lub cząsteczek tworzących układ jest miarą nieuporządkowania układu (definicja statystyczna).

Dla każdego układu wartość entropii podaje równanie Boltzmanna

$$S = k_B \ln W$$

k_B – stała Boltzmana, W – liczba możliwych konfiguracji układu

Na podstawie tej definicji **entropia jest miarą nieuporządkowania układu.**

Druga zasada termodynamiki pomaga przewidzieć, czy dany proces zajdzie samorzutnie. Korzystając z pojęcia entropii należy jednak brać pod uwagę zarówno układ jak i jego otoczenie, co w praktyce nie jest wygodne. Można założyć, że w procesie egzotermicznym niewielka ilość ciepła tracona przez układ i pochłaniana przez otoczenie nie podnosi temperatury otoczenia. Podobnie, ciepło oddane przez otoczenie do układu nie zmienia temperatury otoczenia. Ponieważ ciepło utracone przez układ jest pochłaniane przez otoczenie:

$$\Delta H_{ot} = -\Delta H_{ukl}$$

Zmiana entropii otoczenia (ΔS_{ot}) wynosi w tym przypadku $-\Delta H_{ukl}/T$. A całkowita zmiana entropii wszechświata (ΔS_{wsz}) jest sumą zmian entropii układu i otoczenia:

$$\Delta S_{wsz} = \Delta S_{ukl} - \Delta H_{ukl}/T$$

Aby proces mógł zajść samorzutnie całkowita zmiana entropii nie może być ujemna, więc można zapisać:

$$\Delta S - \Delta H/T \geq 0$$

bez konieczności uwzględniania oddzielnie entropii układu i otoczenia. Po przegrupowaniu tego równania otrzymujemy:

$$\Delta H - T\Delta S \leq 0$$

Wyrażenie $\Delta H - T\Delta S$ definiuje **entalpię swobodną (energię swobodną Gibbsa) - G**

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S$$

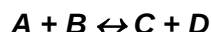
Warunki przebiegu reakcji oraz zależność ΔG od znaku zmiany entalpii i entropii:

ΔH	ΔS	ΔG
+	+	Dodatnie w niskiej temperaturze, ujemne w wysokiej. W wysokiej temperaturze samorzutnie zachodzi reakcja w przód, w niskiej – odwrotnie.
+	-	Dodatnie niezależnie od temperatury. W każdej temperaturze samorzutnie zachodzi reakcja odwrotna.
-	+	Ujemne niezależnie od temperatury. W każdej temperaturze samorzutnie zachodzi reakcja w przód.
-	-	Ujemne w niskiej temperaturze, dodatnie w wysokiej. W niskiej temperaturze samorzutnie zachodzi reakcja w przód, w wysokiej – odwrotnie.

Efekty cieplne towarzyszące różnym reakcjom chemicznym porównuje się w standardowych warunkach reakcji: w temperaturze 298,15 K, przy ciśnieniu 1 bara (101325 Pa). Wszystkie składniki reakcji powinny występować w stanach standardowych, tzn. w stężeniu 1 M oznaczona w tych warunkach zmiana entalpii swobodnej jest nazywana **standardową entalpią swobodną** i jest oznaczona ΔG^0 .

Entalpia swobodna reakcji jest związana ze stałą równowagi (K_{eq}).

Reakcja odwracalna zachodząca w izotermicznym układzie zamkniętym pod stałym ciśnieniem przebiega aż do osiągnięcia przez układ stanu równowagi, charakteryzującego się minimum entalpii swobodnej. Dla reakcji:



stałą równowagi można obliczyć ze wzoru:

$$K_{eq} = \frac{(C)(D)}{(A)(B)}$$

K_{eq} – rzeczywista stała równowagi termodynamicznej reakcji w temperaturze T K, (A), (B), (C), (D) – aktywność składników reakcji w stanie równowagi w temperaturze T .

Stosując zamiast aktywności składników ich stężenia, otrzymuje się stałą równowagi reakcji K_c :

$$K_c = \frac{[C][D]}{[A][B]}$$

gdzie [A], [B], [C], [D] – stężenia molowe składników. Stała K_c jest równa K_{eq} tylko dla roztworów nieskończenie rozcieńczonych. Stała równowagi izotermicznej jest związana ze zmianą standardowej entalpii swobodnej zgodnie ze wzorem:

$$\Delta G^0 = -RT \ln K_{eq}$$

R – stała gazowa równa $8,314 \text{ J} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$, T – temperatura bezwzględna

Dla reakcji zachodzących w roztworach bardzo rozcieńczonych:

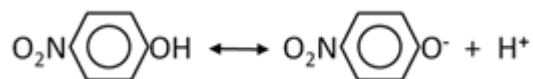
$$\Delta G^0 = -RT \ln K_c$$

Znajomość ΔG^0 reakcji przebiegającej w układzie zamkniętym ($T, p = \text{const}$) pozwala obliczyć stałą równowagi reakcji, ale nie stanowi kryterium jej samorzutności, jeśli choć jeden ze składników występuje w stanie niestandardowym. jedynie wartość zmiany całkowitej entalpii swobodnej ΔG , uwzględniając niestandardowe warunki panujące w układzie może dostarczyć informacji o samorzutności reakcji.

$$\Delta G = \Delta G^0 + RT \ln \frac{[C][D]}{[A][B]}$$

Entalpia swobodna reakcji dysocjacji *p*-nitrofenolu.

W roztworach wodnych *p*-nitrofenol dysocjuje zgodnie z równaniem:



p-nitrofenol dysocjuje całkowicie w środowisku zasadowym. Cząsteczki niezdisocjowane są bezbarwne, a forma anionowa *p*-nitrofenolu jest koloru żółtego.

Standardową entalpię swobodną reakcji dysocjacji *p*-nitrofenolu ΔG° można wyznaczyć z zależności:

$$\Delta G^\circ = -RT \ln K$$

gdzie *R*-stała gazowa, *T*-temperatura, *K*-stała równowagi reakcji dysocjacji

Stała równowagi (**K**) dla reakcji dysocjacji *p*-nitrofenolu wynosi:

$$(1) \quad K = \frac{[A^-][H^+]}{[HA]}$$

[*A*[−]] – stężenie formy zdysocjowanej; [*H*⁺] – stężenie jonów *H*⁺; [*HA*] – stężenie formy niezdisocjowanej

natomiast stopień dysocjacji (α) *p*-nitrofenolu:

$$(2) \quad \alpha = \frac{[A^-]}{[C]}$$

Ponieważ [*C*] – początkowe stężenie *p*-nitrofenolu wynosi:

$$(3) \quad [C] = [A^-] + [HA]$$

stopień dysocjacji można przedstawić równaniem :

$$(4) \quad \alpha = \frac{[A^-]}{[A^-] + [HA]}$$

Po przekształceniu tego równania można wyznaczyć stężenie formy niezdisocjowanej [*HA*]:

$$(5) \quad [HA] = \frac{[A] - \alpha[A]}{\alpha}$$

Podstawiając wzór 5 za [*HA*] do równania 1, po przekształceniu otrzymamy:

$$K = \frac{[H^+]\alpha}{1 - \alpha}$$

Do wyznaczenia entalpii swobodnej reakcji dysocjacji *p*-nitrofenolu konieczna jest więc znajomość stężenia jonów wodorowych w roztworze [*H*⁺] oraz stopień dysocjacji α tego związku. Stężenie jonów wodorowych w roztworze można obliczyć znając pH roztworu. Stopień dysocjacji można określić na podstawie pomiaru absorbancji (patrz punkt II.) roztworu *p*-nitrofenolu. W tym celu należy wyznaczyć zależność absorbancji od stężenia *p*-nitrofenolu w warunkach całkowitej jego dysocjacji. Znaając absorbancję badanych roztworów, z krzywej wzorcowej można wyznaczyć stężenie zdysocjowanej formy *p*-nitrofenolu.

II. Kolorymetria.

Ilość substancji w roztworze można oznaczyć na podstawie zależności między intensywnością zabarwienia roztworu a stężeniem zawartej w nim substancji. Barwa substancji zależy od wchłaniania (absorpcji) światła. W czasie przechodzenia światła przez daną substancję obserwator widzi promienie, które nie zostały przez nią zaabsorbowane. Na przykład, barwa niebieska roztworu oznacza, że substancja pochłania światło żółte. W roztworach bezbarwnych żaden z rodzajów promieni widzialnych nie ulega pochłonięciu przez substancję w roztworze. W trakcie absorpcji światła (części widzialnej widma lub nadfioletu) elektrony w cząsteczce są przenoszone ze stanu podstawowego do jednego ze stanów wzbudzonych. Elementami strukturalnymi cząsteczki odpowiedzialnymi za absorpcję są **grupy chromoforowe** – ugrupowania atomów z wielokrotnymi wiązaniami nienasyconymi, np. C=O, C=C, C=N. Natężenie światła monochromatycznego (jednobarwnego) ulega zmniejszeniu tym bardziej im grubsza jest warstwa, przez którą przechodzi światło oraz im większe jest stężenie substancji w roztworze.

Gdy wiązka światła monochromatycznego o natężeniu I_0 pada na substancję, część światła ulega odbiciu i rozproszeniu, część zostaje pochłonięta, a część przejdzie przez roztwór (I). Przepuszczalność promieniowania zwana **transmitancją** (T) odpowiada stosunkowi natężenia światła przechodzącego do natężenia światła padającego:

$$T = \frac{I}{I_0}$$

Wartość $\log \frac{I_0}{I}$ nazwano **absorbancją** (A):

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

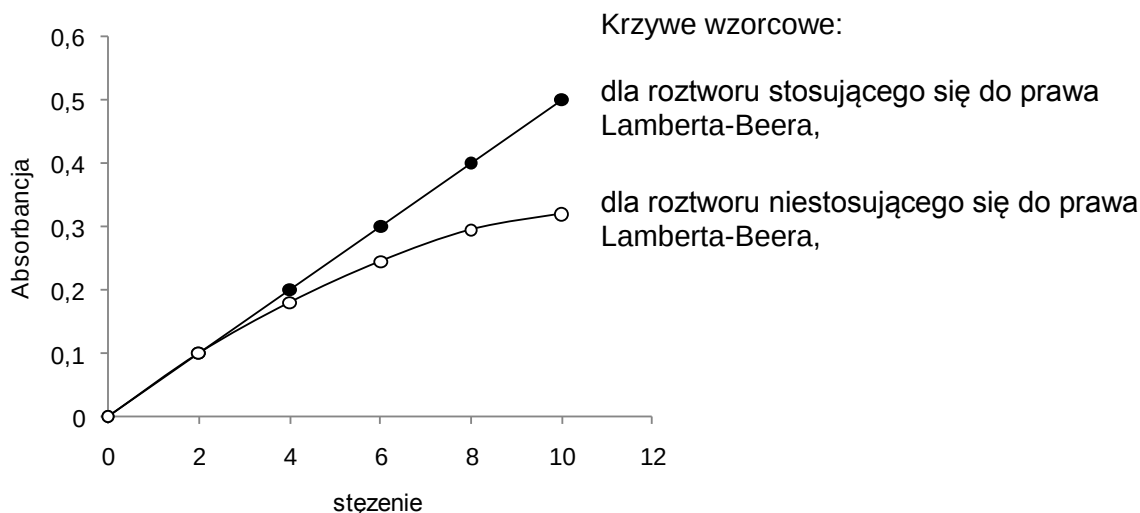
Pomiar stężenia substancji w roztworze wykorzystuje **prawo Lamberta – Beera**. Zgodnie z tym prawem **absorbancja** przy określonej długości fali jest proporcjonalna do stężenia roztworu (c) i grubości warstwy roztworu (l):

$$A = k \cdot c \cdot l$$

k jest współczynnikiem absorpcji, którego wartość dla danej substancji jest stała przy określonej długości fali (λ). Miano współczynnika k zależy od jednostek stężenia i grubości warstwy absorbującej. Jeżeli stężenie wyrażono w mol/l przyjmuje on nazwę **molowego współczynnika absorpcji** (ϵ). Liczbowo ϵ równa się absorbancji roztworu 1-molowego o grubości warstwy 1 cm.

W oznaczeniach kolorymetrycznych należy stosować światło o ściśle określonej długości fali – wybrana długość fali powinna być najsilniej absorbowana przez badaną substancję.

Krzywa wzorcowa (kalibracyjna) (Rycina 3) przedstawia zależność między absorbancją a stężeniem substancji w próbce. Jeżeli roztwór podlega prawu Lamberta-Beera krzywa kalibracyjna jest linią prostą przechodzącą przez punkt przecięcia się osi współrzędnych. Stężenie substancji w próbce badanej odczytuje się z krzywej kalibracyjnej przez interpolację biorąc pod uwagę wartość absorbancji tej próby.



Rycina 3. Przykładowe krzywe wzorcowe (kalibracyjne) roztworów.

Ćwiczenie

Wyznaczanie entalpii swobodnej reakcji dysocjacji *p*-nitrofenolu

I. Sprzęt i aparatura:

- o spektrofotometr
- o zestaw pipet automatycznych

II. Materiały i odczynniki:

- o 10 mM roztwór *p*-nitrofenolu
- o 10 mM roztwór NaOH
- o 0,1 M bufor fosforanowy o pH: 6,0; 6,5; 7,0; 7,5; 8,0
- o probówki typu Eppendorf

III. Wykonanie ćwiczenia:

1. Wyznaczyć krzywą wzorcową zależności absorbancji roztworu *p*-nitrofenolu od jego stężenia w warunkach całkowitej dysocjacji. W tym celu należy sporządzić serię roztworów *p*-nitrofenolu w 10 mM NaOH (po 1 ml w probówkach typu Eppendorf) w zakresie stężeń 0,05-0,5 mM (0,05; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4 i 0,5 mM). Zmierzyć absorbancję tych roztworów przy długości fali 455 nm dla 3 serii rozcieńczeń (powtórzeń). Wykonać wykres $A_{455} = f([A^-])$.
2. Przygotować po 1 ml 0,5 mM roztworów *p*-nitrofenolu w buforach fosforanowych o pH: 6,0; 6,5; 7,0; 7,5 i 8,0 rozcieńczając wyjściowy 10 mM roztwór *p*-nitrofenolu. Sporządzić trzy serie roztworów oraz zmierzyć ich absorbancję.

IV. Przygotowanie sprawozdania:

1. Zapisać obserwacje i wyciągnąć wnioski.
2. Wykreślić krzywą wzorcową zależności absorbancji roztworu *p*-nitrofenolu od jego stężenia w warunkach całkowitej dysocjacji. Z wykresu $A_{455} = f([A^-])$ odczytać stężenie zdysocjowanej formy *p*-nitrofenolu w poszczególnych buforach i obliczyć stopień dysocjacji dla różnych pH.
3. Obliczyć stężenie jonów wodorowych w roztworach o różnym pH.
4. Obliczyć wartości K i ΔG^0 dla roztworów o danym pH i wyciągnąć wnioski.

Uwaga! Temperaturę należy podać w Kelvinach. $T_{[K]} = t_{[^{\circ}C]} + 273,15$

Dane przedstawić w tabeli:

Tabela 1. Przedstawienie zbiorcze analizowanych wartości.

pH	$[H^+]$	$[A^-]$	α	K	ΔG^0

5. Określić zależność α i ΔG^0 od pH.

Literatura:

1. Józwiak, Z., Bartosz, G. Biofizyka. Wybrane zagadnienia wraz z ćwiczeniami. PWN, Warszawa, 2005;
2. Whittaker, A. G., Mount, A. R., Heal, M. R. Chemia fizyczna. Krótkie wykłady. PWN, Warszawa 2003;
3. Fisher, J., Arnold, J. R. P. Chemia dla biologów. Krótkie wykłady. PWN, Warszawa 2008;
4. Ślósarek, G. Biofizyka molekularna. PWN, Warszawa, 2011.

Ćwiczenie nr IV

Zastosowanie techniki wirowania separacyjnego przy oznaczaniu ilości niezdenaturowanego termicznie białka

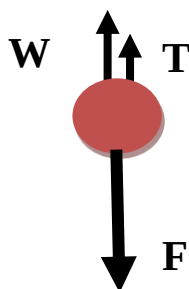
Celem ćwiczenia jest zapoznanie studentów z techniką sedymentacji cząsteczek pod wpływem siły odśrodkowej.

I. Siły działające na cząsteczkę w czasie wirowania.

Ruch makrocząsteczek w cieczy zależy od ich wielkości, masy i kształtu oraz właściwości samego rozpuszczalnika. Roztwory wodne białek, kwasów i węglowodanów mają większą gęstość niż woda dzięki czemu możliwa jest ich analiza i separacja na drodze technik opierających się na wirowaniu. W polu grawitacyjnym różnica gęstości jest jednak zbyt mała żeby dochodziło do sedymentacji makrocząsteczek. Sedymentacja pojawia się dopiero wtedy, gdy siły działające na cząsteczkę przewyższą skierowaną przeciwnie siłę dyfuzji. Wirowanie wykorzystuje siłę odśrodkową, która jest setki lub tysiące razy większa niż siła grawitacji. Wirówki o specjalnej konstrukcji tzw. ultrawirówki umożliwiają uzyskanie sił odśrodkowych nawet 500 000 razy przekraczających siłę grawitacji.

Podczas wirowania na cząsteczkę biopolimeru w roztworze działają 3 siły (Rycina 1):

- siła odśrodkowa F ,
- przeciwnie skierowane: siła wyporu (W) i siła tarcia (T).



Rycina 1. Siły działające na cząsteczkę podczas wirowania.

Siła odśrodkowa działająca na ciało o masie m w odległości r od osi obrotu, wirujące z prędkością kątową ω równa jest:

$$F = ma$$

gdzie a to przyspieszenie dośrodkowe.

Ponieważ przyspieszenie dośrodkowe definiuje wzór:

$$a = r\omega^2$$

to:

$$F = mr\omega^2$$

lub:

$$F = V\rho\omega^2r$$

gdzie V – to objętość cząsteczki, ρ – gęstość cząsteczki.

Jak wynika z powyższych wzorów, przyspieszenie dośrodkowe cząsteczki rośnie proporcjonalnie do odległości cząsteczki od osi obrotu czyli jest różne dla różnych wartości r .

Na poruszającą się wzdłuż promienia obrotu z prędkością v cząsteczkę działa przeciwnie skierowana siła tarcia – T . Jest ona wprost proporcjonalna do prędkości cząsteczki v względem rozpuszczalnika:

$$T = fv$$

gdzie f – to współczynnik tarcia, który zależy od wielkości i kształtu cząsteczki oraz temperatury i lepkości otaczającego roztworu, a v – prędkość definiowana jako przyrost drogi w jednostce czasu dr/dt .

W roztworze szybko dochodzi do ustalenia się stanu równowagi, w którym siła tarcia równoważy siłę odśrodkową (pomniejszoną o siłę wyporu) i cząsteczka porusza się ruchem jednostajnym.

II. Stała sedymentacji.

Ruch danej cząsteczki w konkretnym roztworze charakteryzuje współczynnik sedymentacji S :

$$S = \frac{1}{r\omega^2} \frac{dr}{dt}$$

Współczynnik sedymentacji wyraża się w Svedbergach (S), a jednostką są sekundy. Przyjęto, że $1S = 10^{-13}$ s.

Przekształcając powyższy wzór uzyskujemy:

$$S = v/r\omega^2 = m'/f$$

gdzie m' – to masa pozorna, czyli pomniejszona w skutek działania siły wyporu, masa cząsteczki, a f – współczynnik tarcia.

Prędkość sedymentacji danej cząsteczki zależy od:

- **masy cząsteczki** - cząsteczka o większej masie sedymentuje szybciej niż cząsteczka o mniejszej masie ale tym samym kształcie i gęstości,
- **kształtu cząsteczki**, ponieważ wpływa na lepkość i współczynnik tarcia, dlatego cząsteczki ściśle upakowane sedymentują szybciej niż cząsteczki o rozwiniętej strukturze,
- **gęstości cząsteczki** - cząsteczki o dużej gęstości sedymentują szybciej niż cząstki o mniejszej gęstości,
- Szybkość sedymentacji zależy również od **gęstości roztworu, odległości od osi obrotu, temperatury oraz prędkości kątowej**.

III. Wirówki i rotory.

Wirówki można umownie podzielić ze względu na uzyskiwaną liczbę obrotów na:

- a) **niskoobrotowe** - do 5 000 obr./min,
- b) **średnioobrotowe** - do 20 000 obr./min,
- c) **ultrawirówki** - powyżej 20 000 obr./min.

Natomiast ze względu na przeznaczenie, wirówki można podzielić na:

- a) **analityczne**; zwykle mają bardzo dużą liczbę obrotów i wyposażone są w układ do analizy przemieszczania się cząsteczek podczas wirowania;
- b) **preparatywne**; przystosowane do wirowania względnie dużych objętości roztworów.

Wirówki zaopatrzone są w układy termostatuujące a w przypadku ultrawirówek również w pompy próżniowe. Analizowane próby umieszcza się w odpowiednich probówkach wirowniczych, a te z kolei w rotorach, przymocowanych do osi wirówki.

Podstawowe typy rotorów to:

- a) **rotor horyzontalny** - pojemniki na próbówki są uchylnie, gilzy próbowek wirówkowych zawieszają się na osiach prostopadłych do osi rotora i podczas wirowania ustawiają się wraz z próbowkami pod kątem 90° do osi obrotu. Podczas wirowania cząstki poruszają się wzdłuż promienia obrotu w kierunku dna próbówki. W miarę oddalania się od góry próbówki działa na nie coraz większa siła odśrodkowa.
- b) **rotor kątowy** - wykonany jest z jednolitego bloku metalu w którym znajdują się gniazda do umieszczenia próbowek wirówkowych. W trakcie wirowania próbówki wirówkowe nie zmieniają swego położenia i ustawione są w stosunku do osi obrotu pod kątem innym niż 90°, najczęściej 30°, 45° lub 60°. Cząsteczki poruszają się prostopadle do osi obrotu i osadzają się na bocznej ścianie próbówki.

IV. Parametry wirowania.

Parametry wirowania określa się jednoznacznie podając **promień, liczbę obrotów wirówki w jednostce czasu** (obroty/minutę – stosowany skrót to **rpm** [ang. *revolutions per minute*]) **oraz czas i temperaturę wirowania**. Zamiast promienia – **r** oraz **rpm** podaje się wartość tzw. względnej siły odśrodkowej RCF (ang. *Relative Centrifugal Force*), która jest wielokrotnością przyspieszenia ziemskiego – **g**. Jest to wielkość niemianowana, podaje się ile razy przewyższa ona przyspieszenie ziemskie np. jako 1000g. RCF można swobodnie zamieniać na parametry rpm, należy tylko znać odległość środkowej części próbki od osi rotora w cm – czyli **r**, charakterystyczny dla danego typu rotora.

$$RCF = 1,118 \cdot 10^{-5} r \cdot (rpm)^2$$

$$RCF = 1,118 \cdot 10^{-5} r \cdot v^2$$

gdzie **v** to liczba obrotów na minutę czyli **rpm**.

Podczas wirowania osiągane są bardzo duże siły odśrodkowe – nawet kilkaset razy większe od siły ciężkości. W trakcie wirowania należy więc bezwzględnie przestrzegać następujących zasad:

1. rotory muszą być starannie wyważone a próbówki wraz z próbą należy zrównoważyć, tak aby znajdujące się po przeciwległych osiach obrotu miały identyczną masę,
2. nie należy otwierać pokrywy wirówki przed zatrzymaniem się rotora,
3. należy używać odpowiednich, dopasowanych do typu rotora i trwałych próbowek do wirowania,
4. wirówkę i rotor po zakończonym wirowaniu należy wyczyścić.

V. Zastosowanie wirowania.

Wirowanie jest metodą, w której stosowane pole siły odśrodkowej pozwala na rozdzielenie mieszaniny makrocząsteczek i komórek zawieszonych w roztworze na podstawie ich gęstości.

1. Do oddzielenia od roztworu zawiesiny komórek lub agregatów cząsteczek nierozpuszczalnych w danej cieczy stosuje się wirowanie separacyjne. Po odwirowaniu na dnie lub ścianach próbówki znajdują się komórki lub nierozpuszczalny osad np. agregatów a nad nimi roztwór cieczy.
2. Stosując bardzo duże siły odśrodkowe przy użyciu ultrawirówek, można rozdzielić rozpuszczalne w roztworze makrocząsteczki – białka i kwasy nukleinowe oraz organelle komórkowe. Jest to tzw. wirowanie sedymentacyjne.

3. Metoda ultrawierowania jest również jedną z metod do wyznaczania masy cząsteczkowej biopolimerów poprzez pomiar szybkości sedimentacji lub metodą równowagi sedimentacyjnej.

VI. Wirowanie sedimentacyjne.

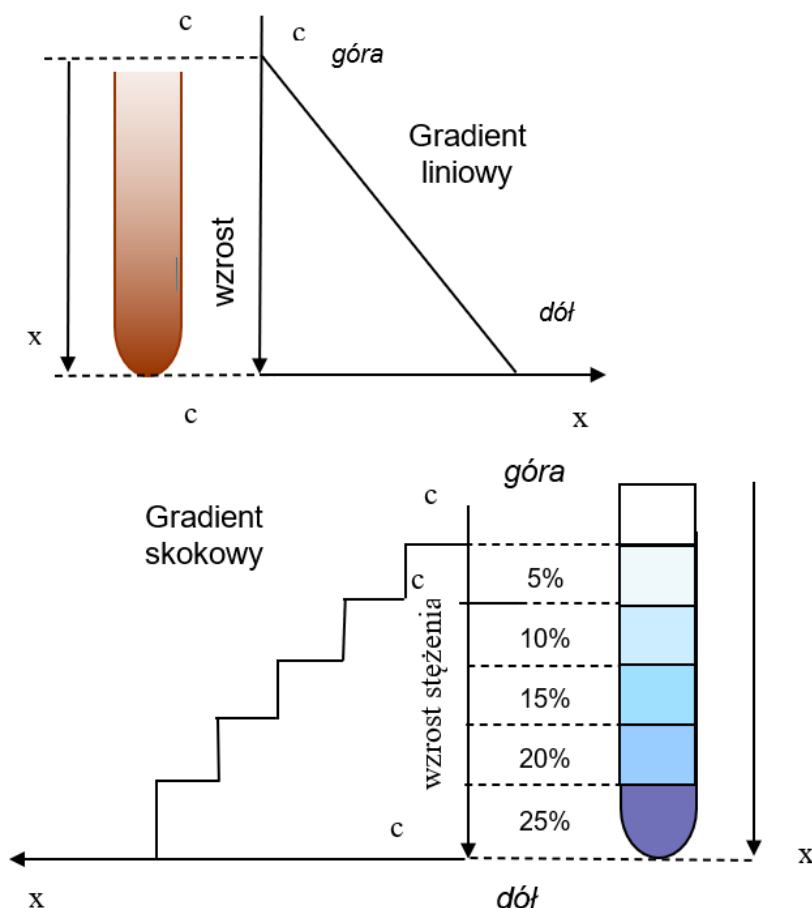
W wirówkach, w których uzyskuje się bardzo duże przyspieszenia odśrodkowe dochodzi do sedimentacji cząstek o nawet małych masach. Efektem takiego wirowania jest rozdział roztworu na frakcje: w polu sił odśrodkowych makrocząsteczki ulegają sedimentacji (jeśli ich gęstość jest większa od gęstości rozpuszczalnika) lub przeciwnie skierowanej flotacji (w przypadku biopolimerów lżejszych).

Do określania masy cząsteczkowej stosuje się dwie techniki sedimentacyjne: **pomiar szybkości sedimentacji** oraz **metodę równowagi sedimentacyjnej**. W metodzie szybkości sedimentacji konieczne jest wytworzenie takiego pola grawitacyjnego, które zapewnia całkowitą sedimentację badanej substancji i umożliwia wyznaczenie współczynnika sedimentacji. Szybkość sedimentacji makrocząsteczki jest wprost proporcjonalna do jej masy cząsteczkowej ale zależy również od kształtu cząsteczki. Umieszczając ją w polu grawitacyjnym 500 000 razy silniejszym od przyciągania ziemskiego obserwuje się za pomocą specjalnego układu optycznego jej przemieszczanie w kuwecie. Znając gęstość roztworu, w którym makrocząsteczka się znajduje można obliczyć jej V , a następnie masę cząsteczkową, jeśli znamy współczynnik dyfuzji. Dla cząsteczek globularnych współczynnik dyfuzji można obliczyć teoretycznie jednak w większości przypadków współczynnik dyfuzji wyznacza się przez wirowanie z mniejszą prędkością i pomiar, spowodowanej dyfuzją, zmiany szerokości pliku sedimentacyjnego.

Metoda równowagi sedimentacyjnej wykorzystuje fakt, że proces sedimentacji makrocząsteczek powoduje powstanie gradientu stężenia w roztworze. Po pewnym czasie wirowania ustala się stan równowagi pomiędzy przeciwnie skierowanymi procesami sedimentacji i dyfuzji, zwany równowagą sedimentacyjną. Stan równowagi sedimentacyjnej występuje przy niewielkiej liczbie obrotów (zwykle poniżej 20 000 obr./min). W stanie równowagi sedimentacyjnej substancja rozpuszczona wypełnia całą kuwetę, a jej stężenie wzrasta od menisku do dna kuwety. Masę cząsteczki wyznacza się określając jej stężenie w dwóch miejscach kuwety. Wadą tej metody jest długi czas wirowania potrzebny do ustalenia się równowagi od kilkunastu godzin do kilku dni.

VII. Sedimentacja w gradiencie gęstości.

Do rozdziału frakcji komórkowych lub oczyszczania białek i kwasów nukleinowych stosuje się często ultrawierowanie w gradiencie gęstości (Rycina 2). W metodzie tej stosuje się gradient roztworu, który stabilizuje pasma sedimentacyjne zapobiegając ich dyfuzji. Substancje stosowane do tworzenia gradientów to najczęściej sole (chlorek cezu, mrówczan cezu, chlorek rubidu), glicerol lub sacharoza. Nie mogą one wykazywać aktywności biologicznej względem rozdzielanych cząsteczek, w przypadku izolacji organelli komórkowych powinny zapewniać odpowiednie warunki osmotyczne, muszą być chemicznie czyste i nie mogą absorbować w świetle UV. Do przygotowania gradientu stosuje się roztwory o stężeniach od 5 – 60%. Przygotowanie gradientu liniowego wymaga stosowania odpowiedniego urządzenia zaopatrzonego w regulowane pompy. Gradient skokowy można przygotować nawarstwiając roztwory o różnej gęstości.



Rycina 2. Gradient gęstości roztworów używanych podczas ultrawierowania- przykłady.

Na przygotowany gradient nawarstwa się analizowaną mieszaninę. W trakcie wirowania w rotorach horyzontalnych cząsteczki sedimentują w kierunku wzrastającego gradientu gęstości z szybkością zależną od ich masy. Po zakończonym wirowaniu roztwór w próbówce rozdziela się na frakcje o żądanej objętości. Najczęściej frakcjonowanie przeprowadza się wbijając w dno próbówki igłę. Uzyskane frakcje poddaje się analizie.

Do rozdzielania cząsteczek na podstawie różnicy ich gęstości stosuje się rozdział izopykniczny, czyli metodę równowagi gęstości. W tym przypadku nie wytwarza się gradientu przed wirowaniem, ale rozdzielane biopolimery zawiesza się w roztworze chlorku cezu. W trakcie ultrawierowania pod wpływem dużej siły odśrodkowej chlorek cezu powoli sedimentuje. Po trwającym zazwyczaj kilkadziesiąt godzin wirowaniu, stężenie chlorku cezu wzrasta liniowo od menisku do dna próbówki. Jednocześnie sedimentacji ulegają makrocząsteczki rozpuszczone w roztworze chlorku cezu i układają się w postaci wąskich pasm w tym miejscu próbówki, gdzie gęstość chlorku cezu równa jest ich gęstości.

VIII. W ćwiczeniu wykorzystane zostaną również zagadnienia z dziedziny kolorymetrii, w związku z tym obowiązuje również znajomość podstaw teoretycznych z tej dziedziny dostępnych w instrukcji do ćwiczenia nr III - Wyznaczanie entalpii swobodnej reakcji dysocjacji p-nitrofenolu (punkt II – Kolorymetria).

Ćwiczenie

Zastosowanie techniki wirowania separacyjnego przy oznaczaniu ilości niezdenaturowanego termicznie białka

I. Materiały i odczynniki:

- 1 ml roztworu hemoglobiny o stężeniu 20 mg/ml - roztwór należy sporządzić z naważki hemoglobiny
- 100 ml 0,02 M buforu fosforanowego pH 7
- pipety nastawne na 1 ml + końcówki
- pipety szklane na 5 i 10 ml
- probówki typu Eppendorf
- 2 kolby szklane o pojemności 100 ml

II. Sprzęt:

- Łaźnia wodna z regulacją temperatury (zakres 50 – 100 °C)
- Wirówka Eppendorf MiniSpin
- Spektrofotometr + kuwety
- Statyw na probówki

III. Wykonanie ćwiczenia:

1. Do 12 ponumerowanych probówek typu Eppendorf odpipetować po 0,6 ml buforu fosforanowego.
2. Do dwóch kolb odpipetować po 15 ml buforu fosforanowego. Do pierwszej kolby dodać 0,5 ml roztworu hemoglobiny – kolbę pozostawić w temperaturze pokojowej.
3. Drugą kolbę z buforem fosforanowym ogrzać wstępnie (przez 2 minuty) w łaźni nastawionej na 56 °C, a następnie dodać do niej 0,5 ml roztworu hemoglobiny. Włączyć stoper, zamieszać i pozostawić w łaźni.
4. Po kolejnych okresach czasu: 1, 2, 4, 6, 8, 10, 14, 18, 24 i 26 minutach inkubacji pobrać do ponumerowanych probówek typu Eppendorf zawierających 0,6 ml buforu fosforanowego po 0,6 ml roztworu z kolby trzymanej w 56 °C i umieścić w pojemniku z lodem.
5. Do dwóch probówek typu Eppendorf dodać po 0,6 ml roztworu hemoglobiny z kolbki trzymanej w temperaturze pokojowej.
6. Odwirować wszystkie próby w wirówce Eppendorf MiniSpin przy 12 tys. rpm przez 10 minut.
7. Po zakończonym wirowaniu przenieść 1 ml supernatantu do nowych, odpowiednio ponumerowanych probówek typu Eppendorf.
8. Ponownie odwirować wszystkie próby w wirówce Eppendorf MiniSpin przy 12 tys. rpm przez 10 minut.
9. Po zakończonym wirowaniu przenieść 0,9 ml supernatantu do nowych, odpowiednio ponumerowanych probówek typu Eppendorf.
10. Zmierzyć absorbancję roztworów hemoglobiny przy długości fali $\lambda = 408 \text{ nm}$, wyniki umieścić w Tabeli 1.
11. Zanotować obserwacje z przebiegu ćwiczenia.

12. Obliczyć procent niezdenaturowanej hemoglobiny:

$$P(\%) = \frac{A_t}{A_0} 100$$

A_t – absorbancja roztworu hemoglobiny inkubowanego w temperaturze 56°C w czasie t .

A_0 – absorbancja roztworu hemoglobiny inkubowanej w temperaturze pokojowej (średnia z dwóch pomiarów).

Tabela 1. Zależność wartości absorbancji A_{408} roztworu hemoglobiny od czasu inkubacji w 56°C.

czas (min)	1	2	4	6	8	10	14	18	24	26	O_I	O_{II}
A_{408}												

13. Sporządzić wykres zależności procentu zdenaturowanej termicznie hemoglobiny (P) od czasu inkubacji (t) i zinterpretować tę zależność.

Literatura:

1. Józwiak Z., Bartosz G. Biofizyka Wybrane zagadnienia wraz z ćwiczeniami PWN, 2008;
2. Cooper A. Chemia biofizyczna. Wprowadzenie do chemii fizycznej w badaniu makrocząsteczek PWN, 2010;
3. Ślósarek G. Biofizyka molekularna PWN, 2011.

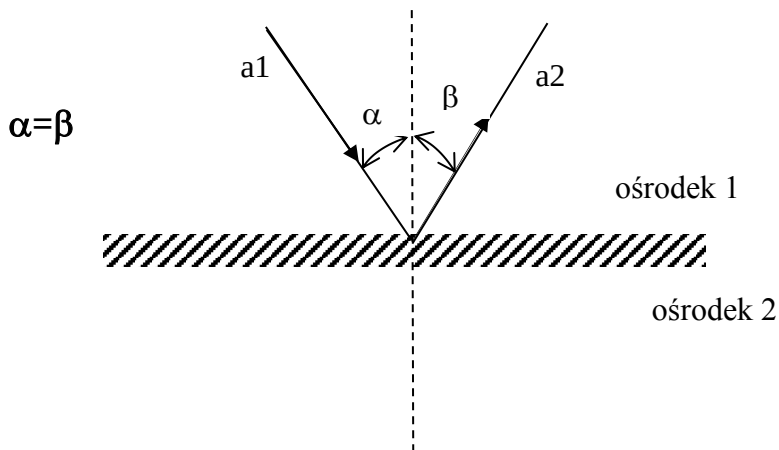
Ćwiczenie nr V

Wyznaczanie zależności między stężeniem a współczynnikiem załamania światła roztworów alkoholu etylowego i alkoholu metylowego

Celem ćwiczenia jest poznanie metody refraktometrycznej jako jednej z optycznych metod stosowanej do badania związków chemicznych, zapoznanie się z budową i działaniem refraktometru Abbego oraz jego wykorzystanie do wyznaczania stężenia i refrakcji molowej roztworów alkoholu etylowego i metylowego.

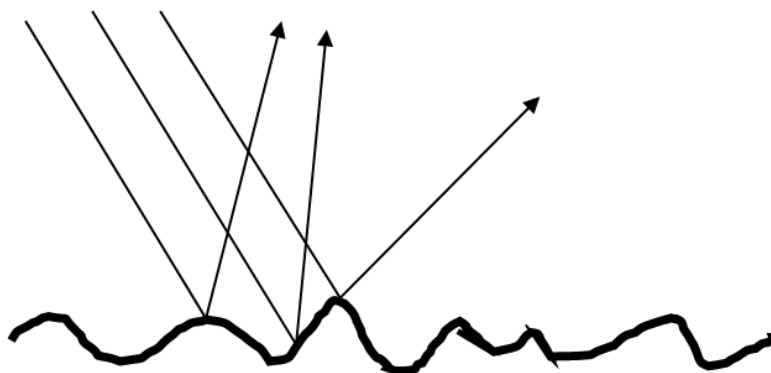
I. Zjawisko odbicia i załamania światła w ośrodkach izotropowych.

Ośrodek izotropowy wykazuje jednakowe właściwości fizyczne (takie jak: właściwości optyczne, rozszerzalność cieplna, przewodnictwo cieplne i elektryczne oraz sprężystość) we wszystkich kierunkach. Ciała mogą być izotropowe pod względem jednych właściwości, a anizotropowe pod względem innych. Światło padając na powierzchnię oddzielającą dwa ośrodki izotropowe, różniące się właściwościami fizycznymi może ulec: odbiciu, rozproszeniu, może zostać pochłonięte lub załamane. Przy odbiciu od płaszczyzny kąt padania (α) i kąt odbicia (β) padającej wiązki światła są równe, a promień padający (a1), odbity (a2) oraz linia (normalna) prostopadła do płaszczyzny odbijającej leżą w jednej płaszczyźnie (Rycina1).



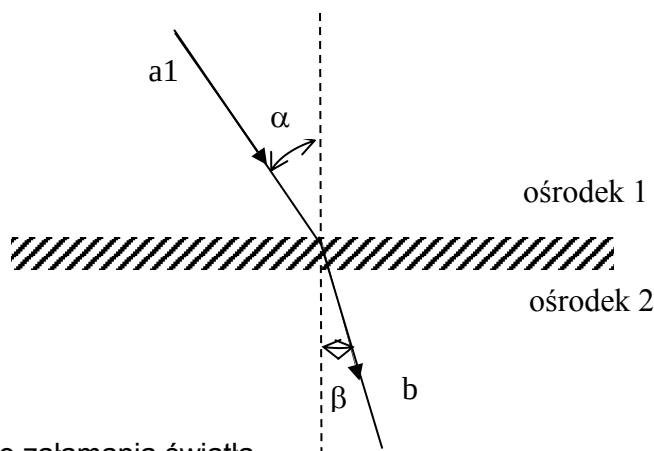
Rycina 1. Zjawisko odbicia i załamania światła.

Różne powierzchnie przepuszczają (a tym samym i odbijają) różnego rodzaju światło, np. szkło przepuszcza światło widzialne, a odbija - podczerwone, natomiast napylona na szkło warstwa srebra (czyli typowe zwierciadło) odbija światło widzialne. Jeśli drugi ośrodek jest nieprzepuszczalny dla światła o danej długości fali i nie pochłania go, to teoretycznie cała wiązka promieni ulega odbiciu. Jest to tzw. zwierciadło idealne. Jeśli wiązka promieni równoległych ulega odbiciu od nierównej powierzchni obserwujemy zjawisko rozpraszania światła (Rycina 2).



Rycina 2. Zjawisko rozpraszania światła.

Innym zjawiskiem jakie zachodzi na granicy dwóch ośrodków izotropowych jest załamanie światła (Rycina 3). Związane jest ono ze zmianą prędkości rozchodzenia się promieni świetlnych w środowiskach o różnych właściwościach, różniących się gęstością optyczną. Zgodnie z prawem Snelliusa, stosunek tych prędkości jest równy współczynnikowi załamania światła i stosunkowi sinusa kąta padania (α) do sinusa kąta załamania (β) światła.



Rycina 3. Zjawisko załamania światła.

Dla dwóch ośrodków i danego rodzaju promieniowania stosunek $\sin\alpha/\sin\beta$ jest wielkością stałą, zależną do warunków fizycznych (temperatura, gęstość), ale niezależną od kąta padania promieniowania i nosi nazwę **współczynnika załamania** lub **współczynnika refrakcji**:

$$\frac{\sin \alpha}{\sin \beta} = n = \text{const}$$

n - względny współczynnik załamania ośrodka drugiego mierzony względem ośrodka pierwszego.

Dla gazów wyznaczany jest **bezwzględny współczynnik załamania światła N**. Podaje się go w odniesieniu do próżni tak więc dla danego materiału jest równy stosunkowi prędkości światła w próżni ($c = 299\,792\,458$ m/s) do prędkości światła w danym materiale (v):

$$N = \frac{c}{v}$$

Różnica prędkości światła w próżni i w powietrzu jest niewielka, dlatego wartości N i n są bardzo zbliżone: $N = 1,00027n$.

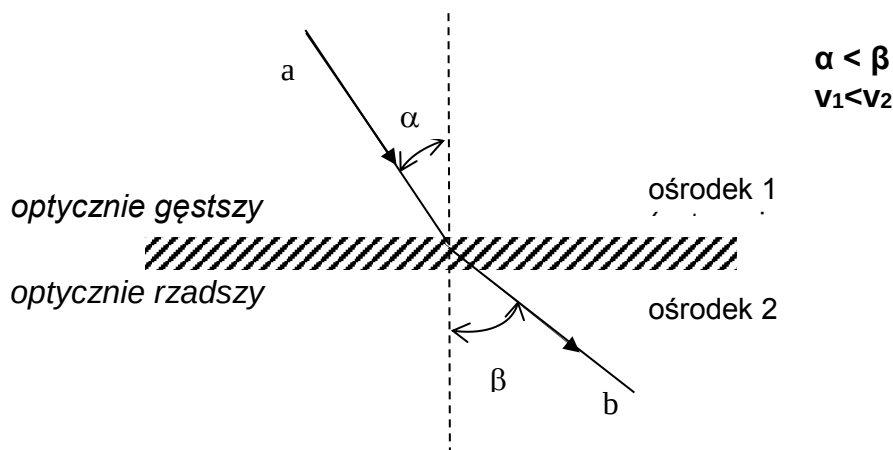
Dla dowolnego ośrodka względny współczynnik załamania światła jest odwrotnie proporcjonalny do prędkości rozchodzenia się światła w tym ośrodku:

$$n = \frac{v_1}{v_2}$$

gdzie v_1 i v_2 są prędkościami światła w ośrodku I i II, przy czym promień przechodzi z ośrodka I do II.

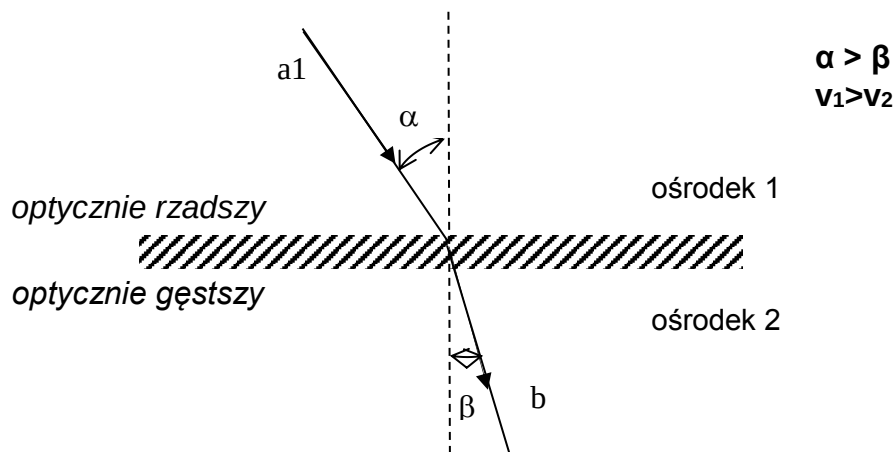
Ośrodek o większym współczynniku załamania i mniejszej prędkości rozchodzenia się światła nazywa się **ośrodkiem optycznie gęstszym** a ośrodek o mniejszym współczynniku załamania i większej prędkości - **ośrodkiem optycznie rzadszym**.

Przy przejściu z ośrodka optycznie gęstszego do ośrodka optycznie rzadszego kąt załamania **jest większy od kąta padania** (Rycina 4).



Rycina 4. Zjawisko załamania światła przy przejściu z ośrodka optycznie gęstszego do ośrodka optycznie rzadszego.

Przy przejściu promieni światła z ośrodka o mniejszej gęstości do ośrodka o większej gęstości – kąt załamania **jest mniejszy od kąta padania** (Rycina 5).



Rycina 5. Zjawisko załamania światła przy przejściu z ośrodka optycznie rzadszego do ośrodka optycznie gęstszego.

Współczynnik załamania tego samego ośrodka zmienia się w zależności od: **długości fali, temperatury i stężenia badanej substancji**:

- a) **Długość fali** – współczynnik załamania maleje wraz ze wzrostem długości fali, co jest związane z różną prędkością rozchodzenia się fal. Zjawisko nosi nazwę dyspersji, czyli rozszczepienia światła, jest charakterystyczne dla konkretnych substancji i pozwala na jej identyfikację. Tzw. dyspersję średnią, czyli różnicę współczynników załamania ośrodka dla niebieskiej linii wodoru (486,1 nm) i czerwonej linii wodoru (656,3 nm) w 15°C przy ciśnieniu 1013,25 hPa można mierzyć za pomocą refraktometru. W warunkach laboratoryjnych, do pomiaru współczynnika załamania światła gazów, cieczy i ciał stałych stosuje się najczęściej światło o długości fali linii D= 589,3 nm widma sodowego i zaznacza się to symbolem n_D .
- b) **Temperatura** – wzrost temperatury o 1K powoduje na ogół zmniejszenie wartości współczynnika załamania od $3,5 \times 10^{-4}$ do $5,5 \times 10^{-4}$.

- c) **Stężenie substancji badanej** – dla cieczy współczynnik załamania światła zmienia się wraz ze wzrostem ich stężenia. Dla niektórych substancji, np. alkoholu etylowego zależność współczynnika załamania substancji od jej stężenia ma charakter liniowy i wówczas można na podstawie krzywej wzorcowej oznaczyć stężenie w nieznanej próbie. Istnieją również gotowe tabele, z których można odczytywać zawartość badanego związku, np. białka w surowicy krwi na podstawie zmierzonego współczynnika refrakcji. Należy jednak pamiętać, że niektóre związki, np. alkohol metylowy nie podlegają takiej zależności.

Na wartość współczynnika załamania największy wpływ ma budowa danej substancji, a zwłaszcza drgania elektronów walencyjnych. Parametrem, który uwzględnia wpływ wiązań na wielkość współczynnika załamania światła jest **refrakcja molowa R_M** , wyrażana w m^3/mol i definiowana wzorem:

$$R_M = \left(\frac{n^2 - 1}{n^2 + 2} \right) \frac{M}{\rho}$$

gdzie M – masa molowa a ρ - gęstość w kg/m^3 .

Refrakcja molowa związków chemicznych jest wielkością addytywną, tzn. że refrakcję molową związku można otrzymać przez zsumowanie refrakcji przypisywanych poszczególnym atomom, grupom atomów i charakterystycznym typom wiązań występujących w danej cząsteczce (Tabela 1):

$$R_M = \sum R_W$$

gdzie R_W to refrakcja poszczególnych atomów, ugrupowań atomowych lub wiązań danej cząsteczki.

Tabela1. Refrakcje molowe ważniejszych wiązań chemicznych R_M ($10^{-6} \text{ m}^3/\text{mol}$).

Wiązanie	R_M ($10^{-6} \text{ m}^3/\text{mol}$)
C-C	1,30
C=C	4,17
C≡C	6,24
C-Br	9,39
C-Cl	6,51
C-F	1,44
C-H	1,68
C-O	1,54
C=O	3,32
O-H	1,66

Każdy typ wiązania wnosi swój udział liczbowy do refrakcji molowej. Dlatego mierząc refrakcję molową bezpośrednio całej cząsteczki i porównując otrzymany wynik z wartością, obliczoną teoretycznie na podstawie danych z odpowiednich tabel, można wyciągnąć wnioski dotyczące budowy cząsteczki danej substancji. Tzw. **egzaltacja refrakcji molowej** to różnica między wartością refrakcji obliczoną teoretycznie R_{Mt} , a refrakcją molową wyznaczoną doświadczalnie R_{Md} :

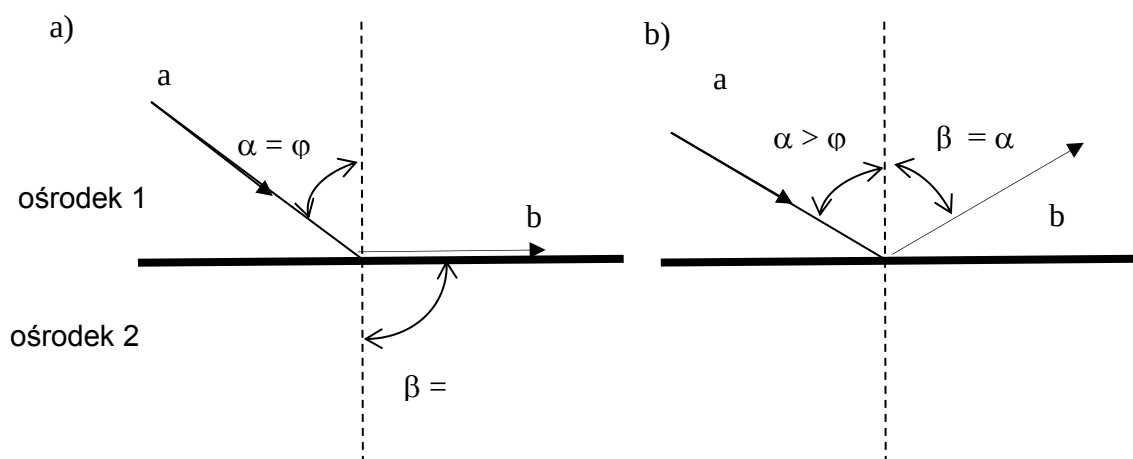
$$\text{egzaltacja refrakcji} = R_{Mt} - R_{Md}$$

Wzrost egzaltacji świadczy o istnieniu oddziaływań między elektronami poszczególnych wiązań, natomiast gdy egzaltacja refrakcji jest bliska zera wiązania są od siebie niezależne.

Pomiarów współczynnika załamania światła nie wykonuje się mierząc kąta padania i załamania, ale wygodniejszą do pomiaru wielkość – kąt graniczny φ_{gran} .

II. Kąt graniczny i zjawisko całkowitego wewnętrznego odbicia światła

Gdy światło przechodzi z ośrodka optycznie gęstszego do ośrodka optycznie rzadszego, kąt załamania promienia świetlnego jest większy od kąta padania. Zwiększanie kąta padania zwiększa wartość kąta załamania, a gdy kąt załamania osiąga 90° promień nie wnika do II ośrodka, ale ślizga się po jego powierzchni. Taką wartość kąta padania, dla której kąt załamania wynosi 90° nazywamy **kątem granicznym**. Dalsze zwiększanie kąta padania powoduje odbicie promieni świetlnych na granicy dwóch ośrodków pod kątem równym kątowi padania (Rycina 6).



Rycina 6. Załamanie światła: a) o kąt graniczny; b) całkowite wewnętrzne odbicie.

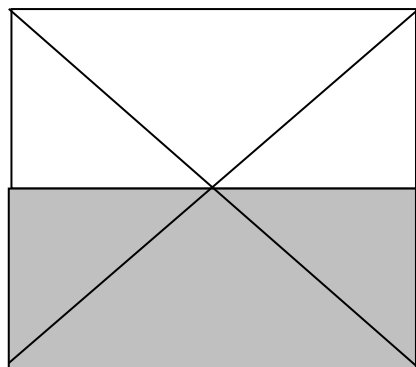
Najczęściej stosowane refraktometry Abbego i Pulfricha wykorzystują pomiar kąta granicznego badanej substancji do wyznaczenia współczynnika załamania światła. Kąt graniczny przy którym następuje zjawisko całkowitego wewnętrznego odbicia jednoznacznie określa wartość współczynnika n zgodnie ze wzorem:

$$n = \frac{1}{\sin \phi}$$

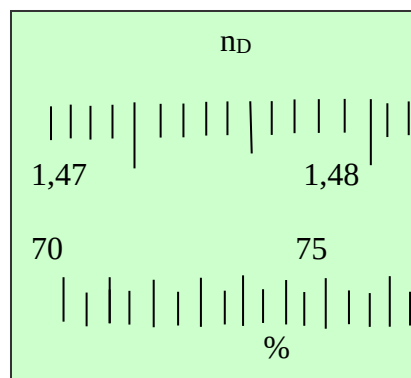
gdzie: ϕ – jest kątem granicznym.

Głównym elementem refraktometru jest kostka składająca się z dwóch pryzmatów o znanych współczynnikach załamania z ciężkiego szkła (flintu), ustawionych przeciwprostokątnymi do siebie, pomiędzy które wpuszcza się kroplę badanej cieczy. Pryzmat dolny o gładkiej powierzchni jest pryzmatem pomiarowym, a pryzmat górny o matowej powierzchni – pryzmatem oświetleniowym. Do oświetlenia stosuje się światło białe rozproszone (naturalne lub sztuczne), które kieruje się na pryzmat oświetlający za pomocą lusterka. Warstwa badanej

cieczy jest rzadszym optycznie ośrodkiem niż pryzmaty, więc te promienie, które padają pod kątem większym od kąta granicznego zostaną odbite i nie dotrą do drugiego pryzmatu, natomiast przedostaną się promienie załamane. Spośród nich, te których kąt padania wynosi 90° załamują się w górnym pryzmacie pod kątem granicznym. Efektem tego będzie pojawienie się jasnej i ciemnej części pola (Rycina 7). Część jasną oświetlają promienie załamane pod kątem mniejszym od granicznego, a granica między tymi polami odpowiada dokładnie kątowi granicznemu. Obracając kostki pryzmatów przy pomocy pokrętła, ustawia się linię graniczną obu pól na środku krzyża widocznego w prawym okularze. W dole pola widzenia okularu odczytuje się ze skali współczynnik załamania badanej cieczy (Rycina 7).



Górna część pola widzenia okularu
– prawidłowe ustawienie linii granicznej.



Dolna część pola widzenia okularu
– miejsce odczytu współczynnika
załamania światła n_D i/lub %.

Rycina 7. Obraz widoczny w okularze refraktometru Abbego.

W pryzmatach refraktometru występuje zjawisko rozszczepienia światła białego. Wówczas linia rozgraniczająca pole widzenia nie jest ostra tylko barwna i rozmyta. Do likwidacji linii podziału wykorzystuje się dodatkowy układ dwóch pryzmatów kompensatora.

Analizę refraktometryczną stosuje się do jakościowych i ilościowych analiz substancji:

- a)** w badaniach klinicznych między innymi do określania ciężaru właściwego moczu, koncentracji białka w osoczu i surowicy krwi oraz całkowitej zawartości substancji stałych w roztworach wodnych,
- b)** w kontroli jakości przy produkcji farmaceutyków, kosmetyków, żywności, napojów, paliw, biopaliw, produktów rafineryjnych, smarów, emulsji przemysłowych i środków chemicznych.
- c)** w branży spożywczej używa się ich do pomiaru i kontroli zawartości cukrów czy stężenia syropów.

Poręczne i przenośne refraktometry pozwalają w szybki sposób wyznaczać stosunki ilościowe oraz stopień koncentracji rozpuszczalnych w wodzie płynów przemysłowych, emulsji, smarów syntetycznych, olejów chłodząco-smarujących (płynów obróbkowych).

Ćwiczenie

Wyznaczanie zależności między stężeniem a współczynnikiem załamania światła roztworów alkoholu etylowego i alkoholu metylowego.

I. Sprzęt i aparatura:

- refraktometr Abbego
- pipety automatyczne na 1000 μ l + zestaw końcówek
- tryskawki z wodą destylowaną
- gaza lub bibuła

II. Odczynniki:

- Roztwory etanolu o stężeniach 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, po 5 ml każdy
- Roztwory metanolu o stężeniach 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% po 5 ml każdy
- Roztwory etanolu i metanolu o nieznanym stężeniu – 5 ml

III. Wykonanie ćwiczenia:

1. Otworzyć refraktometr, ustawić boczne lustro na źródło światła.
2. Na matową ściankę pryzmatu wprowadzić kilka kropel wody destylowanej. Zamknąć pryzmat.
3. Obserwować obraz w górnej części pola widzenia okularu. Przy pomocy mniejszego pokrętki po prawej stronie refraktometru (kompensatora) zlikwidować ewentualne zabarwienie na granicy jasnego i ciemnego pola.
4. Ustawić przy pomocy dużego pokrętki po lewej stronie nie zabarwioną, wyraźnie widoczną granicę obu pól w punkcie przecięcia linii na krzyż.
5. W dolnej części pola widzenia okularu odczytać na skali współczynnik załamania n_D wody destylowanej – powtórzyć pomiar 3-krotnie.
6. Zmierzyć współczynniki załamania światła dla roztworów etanolu i metanolu – na centralną część pryzmatu głównego nanosić po 500 μ l badanych roztworów za pomocą pipety automatycznej. Każdy pomiar powtórzyć 3-krotnie. Wyniki pomiarów umieścić w Tabeli 2 i 3.

UWAGA! Po każdym pomiarze należy wytrzeć pryzmat refraktometru za pomocą wacika i przemyć dokładnie wodą destylowaną.

Tabela 2. Wartości pomiarów współczynnika załamania światła dla roztworów alkoholu etylowego o różnym stężeniu.

Współczynnik załamania światła n	Stężenie alkoholu etylowego									Roztwór badany
	0	10%	20%	30%	40%	50%	60%	70%	80%	
Pomiar I										
Pomiar II										
Pomiar III										
Średnia										

Tabela 3. Wartości pomiarów współczynnika załamania światła dla roztworów alkoholu metylowego o różnym stężeniu.

Współczynnik załamania światła n	Stężenie alkoholu metylowego									Roztwór badany
	0%	10%	20%	30%	40%	50%	60%	70%	80%	
Pomiar I										
Pomiar II										
Pomiar III										
Średnia										

IV. Przygotowanie sprawozdania:

1. Uzupełnić Tabelę 2 i 3.
2. Wykonać wykres zależności $n = f(c)$ dla roztworów alkoholu etylowego i metylowego – zinterpretować obie zależności.
3. Z wykresu odczytać nieznane stężenie alkoholu etylowego i metylowego (roztwór badany).
4. Obliczyć refrakcję molową R_M etanolu dla poszczególnych stężeń oraz wartość średnią R_M i zinterpretować wyniki. Gęstość dla roztworów etanolu o różnym stężeniu przedstawiono w Tabeli 4.

$$R_M = \left(\frac{n^2 - 1}{n^2 + 2} \right) \frac{M}{\rho}$$

gdzie: M- masa molowa etanolu – 46,07 g/mol; ρ – gęstość.

Tabela 4. Gęstość roztworów etanolu o różnym stężeniu.

Stężenie etanolu	Gęstość [g/cm ³]
10%	0,982
20%	0,970
30%	0,955
40%	0,937
50%	0,916
60%	0,893
70%	0,869
80%	0,845

5. Obliczyć refrakcję molową dla etanolu R_M korzystając z reguły addytywności na podstawie danych z Tabeli 1.
6. Obliczyć egzaltację refrakcji molowej 30% i 80 % etanolu. Wynik zinterpretować.

Literatura:

1. Józwiak, Z., Bartosz, G. Biofizyka. Wybrane zagadnienia wraz z ćwiczeniami. PWN, 2008
2. Cooper, A. Chemia biofizyczna. Wprowadzenie do chemii fizycznej w badaniu makrocząsteczek. PWN, 2010
3. Pigoń K., Ruziewicz Z., Chemia fizyczna T2. Fizykochemia molekularna PWN, 2007
4. Ślósarek G., Biofizyka molekularna PWN, 2011

Ćwiczenie nr VI

Badanie stabilności hemoglobiny z wykorzystaniem spektrofotometrii absorpcyjnej

Celem ćwiczenia jest określenie stabilności hemoglobiny w środowisku o różnym stężeniu jonów wodorowych oraz w obecności różnych stężeń mocznika i chlorowodoru guanidyny (GuHCl). Jako kryterium stabilności należy przyjąć wartość absorbancji w paśmie Soreta (405 nm) w roztworze o pH 7.0. Absorbancja w paśmie Soreta przyjmuje ściśle określoną wartość dla hemoglobiny zawierającej niezdenaturowaną globinę. Denaturacja białka powoduje zmianę w oddziaływaniach między hemem a globiną, co z kolei przejawia się obniżeniem milimolowego współczynnika absorpcji.

Na podstawie pomiaru absorbancji roztworu hemoglobiny przy 405 nm należy określić wartość pH roztworu oraz stężenie mocznika i GuHCl, przy których białko traci stabilność i ulega denaturacji.

I. Hemoglobina i jej pochodna methemoglobina.

Hemoglobina (Hb), jest chromoproteina zbudowaną w 94% z części białkowej, globiny, i w 6% z grupy prostetycznej zwanej hemem (Ryc. 1), która w swym centrum zawiera atom dwuwartościowego żelaza, Fe(II). Podstawową strukturą hemu (żelazoporfiryny) jest **szkielet porfirynewy, utworzony z czterech pierścieni pirolowych**. Cztery wiązania koordynacyjne atomu żelaza hemowego wiążą się z 4 azotami pierścieni pirolowych, piąte - z tlenem (w procesie utleniania), zaś szóste - wiązanie koordynacyjne służy do połączenia z globiną, poprzez pierścień imidazolowy reszty histydyny.

Z kolei **globina**, zbudowana jest z czterech łańcuchów polipeptydowych: dwóch alfa i dwóch beta, różniących się ilością aminokwasów. Każdy z tych łańcuchów połączony jest z jedną cząsteczką hemu.

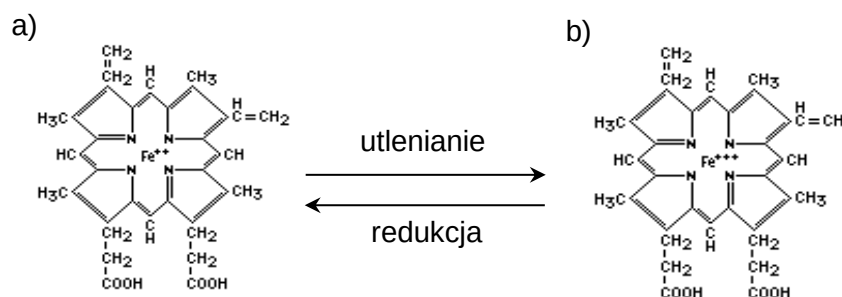
Hemoglobina stanowi składnik krwinek czerwonych, który odgrywa zasadniczą rolę w wymianie gazów. W warunkach fizjologicznych występuje ona częściowo (0,7-1,7%) w formie utlenionej, a tym samym nieczynnej, jako methemoglobina. Czynniki chroniące hemoglobinę przed utlenieniem do methemoglobiny są: zredukowany NADP, kwas L-askorbinowy oraz glutation, a także inne związki zawierające grupę sulfhydrylową.

W kapilarach płuc hemoglobina wiąże tlen tworząc **oksyhemoglobinę (HbO₂)** (krew tętnicza, utlenowana), przy czym cząsteczka O₂ jest odwracalnie związana z żelazem dwuwartościowym (Fe²⁺). Cząsteczka hemoglobiny może przyłączyć 4 cząsteczki tlenu atmosferycznego, a 1 g hemoglobiny wiąże 1,36 ml tlenu. Proces wiązania tlenu przez hemoglobinę prowadzący do powstania oksyhemoglobiny nazywa się utlenowaniem. Nie towarzyszy jemu zmiana stopnia utlenienia żelaza hemowego. Zmienia się kształt cząsteczki hemoglobiny, co jest efektem przemieszczenia się poszczególnych podjednostek względem siebie. Stopień wysycenia hemoglobiny tlenem zależy od kilku czynników:

- ciśnienia cząsteczkowego tlenu** (wraz ze wzrostem ciśnienia cząsteczkowego tlenu we krwi wzrasta wysycenie Hb tlenem),
- temperatury** (wraz ze wzrostem temperatury maleje stopień wysycenia Hb tlenem),
- ciśnienia cząsteczkowego CO₂** (wraz ze wzrostem CO₂ maleje wysycenie tlenem Hb),
- pH** (przy wyższym pH Hb jest lepiej wysycony tlenem).

We krwi, w warunkach wysokiego ciśnienia cząsteczkowego tlenu, niższej temperatury niż w innych tkankach, niskiego ciśnienia cząsteczkowego CO₂ i wyższego pH prawie 100% Hb zostaje wysycone tlenem.

W przypadku utlenienia Hb, żelazo hemowe zmienia swój stopień utlenienia z **Fe(II) do Fe(III)** z jednoczesnym przyłączeniem cząsteczki H₂O. Powstaje wówczas methemoglobina, która traci zdolność transportu tlenu i jego uwalniania. Kompleks Fe²⁺ z protoporfiryną nosi nazwę **hemu**, natomiast kompleks Fe³⁺ z protoporfiryną to **hemina** lub **hematyna**.



Rycina 1. Struktura hemu i hematyny: **a) hem** (Fe²⁺) (barwa jasnoczerwona)/hemoglobina **b) hematyna** (Fe³⁺) (barwa brunatna)/methemoglobina.

II. Denaturacja białek.

Terminem tym obejmuje się **zmiany w strukturze przestrzennej**, czyli w konformacji **białka natywnego**, które prowadzą do **utrąty aktywności biologicznej lub innej indywidualnej cechy** charakterystycznej tego białka przy zachowaniu jego struktury pierwszorzędowej. Podczas denaturacji zostają zniszczone wiązania wodorowe, a w obecności odczynników redukujących rozszczepieniu ulegają wiązania disulfidowe. Denaturacja przeważnie jest procesem nieodwracalnym. Jednak w pewnych wypadkach może on ulec cofnięciu np. wtedy, gdy czynnik denaturujący działał krótko i nie spowodował daleko posuniętych zmian w strukturze cząsteczki białka. Przejście od natywnego, niskoenergetycznego stanu do formy zdenaturowanej związane jest ze wzrostem nieuporządkowania łańcucha, a przemianie tej towarzyszy wzrost entropii. Uporządkowanie najbliższych cząsteczek wody wzrasta jednak w wyniku hydratacji grup hydrofobowych łańcuchów bocznych, uwolnionych podczas denaturacji. Podczas denaturacji zachodzą także zmiany rozpuszczalności i przesunięcie punktu izoelektrycznego. Rozwinięcie łańcucha peptydowego może prowadzić do wzrostu lepkości, a także zmian absorpcji w nadfiolecie. Obserwuje się również często procesy agregacji i wytrącania, co związane jest ze zmianami stopnia hydratacji i rozpuszczalności białek. Najważniejszymi czynnikami fizycznymi wywołującymi denaturację są: ogrzewanie, silne mieszanie, wytrząsanie, naświetlanie promieniowaniem nadfioletowym, rentgenowskim i radioaktywnym lub działanie ultradźwiękami. Z kolei denaturacja chemiczna zachodzi pod wpływem działania związków, które są zdolne do rozerwania wiązań wodorowych stabilizujących przestrzenną strukturę białek. Do chemicznych czynników denaturujących należą, m.in. roztwory mocznika o stężeniu 6-8 mol/dm³ lub chlorowodoru guanidyny o stężeniu 4 mol/dm³, roztwory kwasów lub zasad (wartość pH poniżej 3 lub powyżej 9), a także roztwór 1% SDS. Mocznik i chlorowodorek guanidyny powodują wybiórcze zrywanie wiązań wodorowych w cząsteczce białka, a same łącząc się z uwolnionymi wiązaniami peptydowymi za pomocą wiązań wodorowych, zmieniają rodzimą strukturę molekularną białka.

III. Spektroskopia, prawa absorpcji światła.

Spektroskopia optyczna obejmuje metody badania materii przy użyciu promieniowania elektromagnetycznego z zakresu widzialnego, które może być w danym układzie wytwarzane lub może z układem oddziaływać. Zajmuje się ona interpretacją widm. W jednym ze sposobów pomiarów spektroskopowych, padające promieniowanie elektromagnetyczne może oddziaływać ze składnikami układu (związki chemiczne, jony, ugrupowania atomów, atomy i inne). Jako wynik tych oddziaływań może być obserwowana:

- a) absorpcja promieniowania elektromagnetycznego,
- b) odbicie,
- c) refrakcja,
- d) polaryzacja,
- e) rozproszenie (zjawisko Ramana) lub wtórna emisja (luminescencja, fosforescencja czy fluorescencja).

Zjawisko absorpcji stanowi podstawę spektrofotometrii absorpcyjnej w nadfiolecie i zakresie widzialnym. Podstawowe prawo spektrofotometrii absorpcyjnej to prawo Lamberta-Beera, które wyraża się następująco:

$$A_{\lambda} = \epsilon_{\lambda} c l$$

gdzie A_{λ} - absorpcja lub absorbancja badanego roztworu przy określonej długości fali; ϵ_{λ} - molowy współczynnik absorpcji przy określonej długości fali, jeżeli stężenie roztworu (c) wyrażone jest w molach/dm³; c - stężenie roztworu; l - grubość warstwy absorpcyjnej.

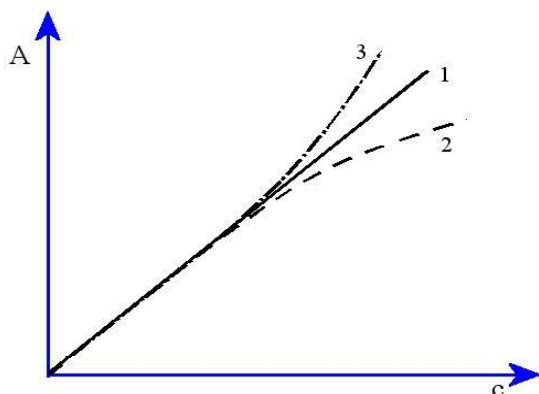
Prawo to mówi o tym, że absorbancja światła monochromatycznego jest proporcjonalna do stężenia c roztworu i do grubości l warstwy absorpcyjnej. Z kolei molowy współczynnik absorpcji (ϵ) można zdefiniować jako absorpcję w warstwie 1 cm roztworu o stężeniu 1 mol/dm³. Prawo Lamberta-Beera odnosi się do przypadku, gdy w roztworze znajduje się jedna substancja absorbująca. Jeżeli w roztworze znajduje się n różnych substancji, które absorbują promieniowanie przy wybranej długości fali i charakteryzujących się stężeniami $c_1, c_2, c_3 \dots, c_n$ oraz molowymi współczynnikami absorpcji $\epsilon_1, \epsilon_2, \epsilon_3 \dots, \epsilon_n$, to absorbancja tego roztworu jest równa sumie absorbancji poszczególnych jego składników:

$$A = A_1 + A_2 + A_3 + \dots + A_n = \epsilon_1 c_1 + \epsilon_2 c_2 + \epsilon_3 c_3 + \dots + \epsilon_n c_n$$

(prawo addytywności absorpcji)

Prawa absorpcji w odniesieniu do roztworów są spełniane tylko wtedy, kiedy w tych roztworach nie zachodzą żadne reakcje między substancją absorbującą a rozpuszczalnikiem oraz między cząsteczkami substancji absorbującej.

Gdy układ absorbujący spełnia prawo Lamberta-Beera, zależność między absorpcją (A) i stężeniem roztworu (c) przedstawia linia prosta, przechodząca przez początek układu współrzędnych (Rycina 2, linia prosta 1). Otrzymanie w wyniku pomiarów krzywych typu 2 lub 3, wskazuje, że układ w danych warunkach pomiarowych nie stosuje się do prawa Lamberta-Beera.



Rycina 2. Krzywe $A = f(c)$ w zależności od stosowania (1) lub niestosowania się (2 i 3) układu do prawa Lamberta-Beera.

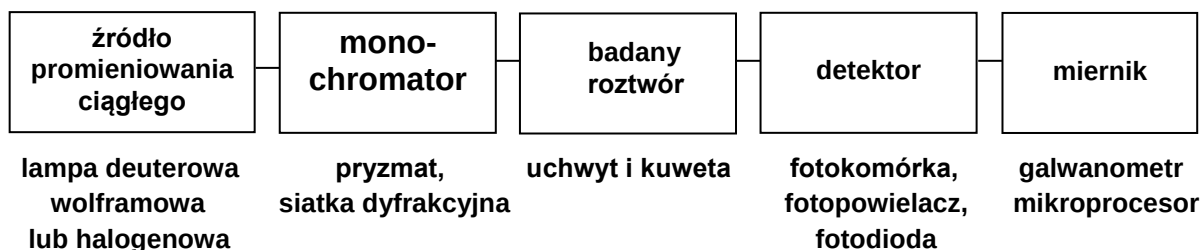
Odstępstwa od tego prawa mogą być spowodowane albo zmianami chemicznymi roztworu, zachodzącymi w miarę zmian stężenia, albo warunkami pomiaru wykonanego za pomocą nieprecyzyjnego przyrządu. Chemiczne odstępstwa wynikają z reakcji przebiegających w roztworze absorbującym w miarę wzrostu stężenia składnika oznaczanego. Zachodzą wtedy reakcje polimeryzacji lub kondensacji cząsteczek lub jonów absorbujących (zmienia się zatem stężenie składnika), reakcje między jonem (cząsteczką) absorbującym i rozpuszczalnikiem albo w przypadku układów wieloskładnikowych, dodatkowe reakcje między poszczególnymi składnikami.

Odstępstwa od prawa Lamberta-Beera wynikające ze sposobu przeprowadzania pomiaru absorpcji są spowodowane stosowaniem nie wystarczająco monochromatycznego promieniowania. Współczynnik ϵ zależy w istotny sposób od monochromatyczności promieniowania, dlatego na ogół pomiary absorpcyjometryczne wykonane za pomocą fotokolorymetrów z filtrami są mniej czułe niż pomiary przeprowadzone przy użyciu spektrofotometrów, w których wykorzystuje się bardzo wąską, praktycznie monochromatyczną wiązkę promieniowania.

Metody spektrofotometryczne stosuje się w widmowej analizie chemicznej, przy wyznaczaniu zdolności emisyjnej, absorpcyjnej i odbijającej ciał, badaniu optycznych własności powierzchni oraz charakterystyk źródeł światła.

IV. Spektrofotometry - budowa i zasada działania.

Są to przyrządy, w których intensywność wiązki świetlnej wychodzącej ze szczeliny monochromatora mierzy się fotometrycznie w funkcji długości fali. Przyrządy te służą głównie do rejestracji widm absorpcyjnych ciał stałych, ciekłych i gazowych. Do badania absorpcji promieniowania elektromagnetycznego w nadfiolecie i w zakresie widzialnym widma służą spektrofotometry UV-VIS. Ogólny schemat blokowy spektrofotometru przedstawia poniższy rysunek (Rycina 3). **Spektrofotometr zbudowany jest ze źródła promieniowania ciągłego** - lampy wodorowej lub deuterowej dla zakresu UV, wolframowej lub halogenowej dla zakresu VIS, **monochromatora**, **kuwety pomiarowej**, w której umieszczona jest badana próbka w postaci ciekłej, **detektora promieniowania optycznego** (np. fotodiody, fotopowielacza) oraz **miernika**. Monochromator zbudowany jest z **kolimatorów** (układów przesłon służących do uzyskania równoległej wiązki promieniowania) na wejściu i wyjściu oraz pryzmatu lub siatki dyfrakcyjnej zastosowanych do rozszczepienia światła. Po przejściu przez monochromator promieniowanie pada na odpowiednio wąską szczelinę wyodrębniającą pożądany zakres promieniowania. Obecnie monochromatory wykonuje się z użyciem siatki dyfrakcyjnej, układu wybierającego odpowiednią długość fali. Zatem monochromator jest przyrządem rozdzielającym widmo ciągłe na poszczególne składniki widma (w monochromatorze otrzymujemy obraz odpowiadający kolorom tęczy).



Rycina 3. Schemat blokowy spektrofotometru.

Głównym problem jest otrzymanie światła o ściśle określonej długości fali (barwie). Problem ten można rozwiązać stosując różnobarwne diody LED (ang. *light-emitting diode*). Wadą diod LED jest dość szerokie widmo emisyjne, szerokość połówkowa widma emisyjnego typowej diody LED wynosi około 25 nm (szerokość w połowie wysokości piksu). W dobrej klasy spektrofotometrach fabrycznych, szerokość widmowa wiązki wynosi obecnie nawet poniżej 0,5 nm. Widma absorpcyjne zdecydowanej większości związków mają zwykle szerokość połówkową na poziomie około 50 nm, dzięki czemu możemy zastosować źródła o szerszym widmie emisyjnym. Pokrycie całego zakresu światła widzialnego wymaga w tym wypadku zastosowania większej ilości diod LED o barwach zmieniających się od czerwieni do barwy niebieskiej (ultrafioletu). Takie rozwiązanie ogranicza liczbę mierzonych związków, z drugiej strony wymaga bardzo małych nakładów finansowych i minimalnej ilości prac mechanicznych. Węższe widmo emisyjne mają lasery półprzewodnikowe, są one jednak znacznie droższe i posiadają znacznie mniejszy wybór długości emitowanych fal. Diody LED w zależności od producenta różnią się długością emitowanej fali świetlnej (barwą), np. czerwień jednego producenta nie jest równa czerwieni innego producenta, dzięki czemu możemy zdobyć większą ilość źródeł o różnej długości fali. Światło widzialne obejmuje zakres od około 400 do 700 nm.

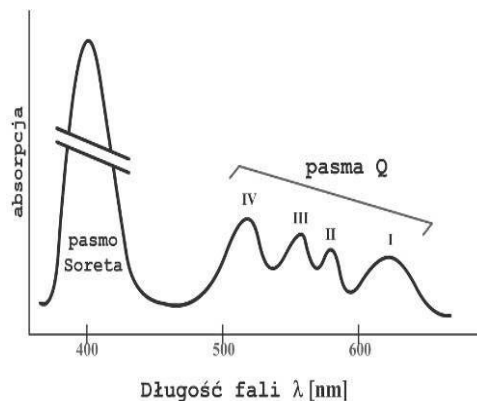
Zasada działania spektrofotometru na przykładzie fotometru SPECOL

Fotometr ten jest przeznaczony do pracy w widzialnym zakresie widma. Urządzeniem monochmatyzującym w tym przyrządzie jest siatka dyfrakcyjna. Źródłem promieniowania jest lampa wolframowa. Miernik jest wyskalowany w jednostkach ekstynkcji oraz transmisji. Promieniowanie wychodzące ze szczeliny wejściowej monochromatora jest przez kolimator kierowane w postaci równoległej wiązki na odbiciową siatkę dyfrakcyjną, gdzie zachodzi rozszczepienie światła. Następny kolimator kieruje promienie odbite od siatki na płaszczyznę szczeliny wyjściowej monochromatora. Wybieranie żądanej długości fali odbywa się przez obrót siatki (zmiana kąta padania) za pomocą odpowiedniego pokrętła. Pokrętło to jest wyskalowane w nanometrach (10^{-9} m), co pozwala na bezpośredni odczyt długości fali. Układ pomiarowy zawiera fotoelement selenowy, którego fotoprąd jest wzmacniany za pomocą wzmacniacza i rejestrowany przez miernik.

V. Pasma absorpcyjne porfiryn.

Porfiryny charakteryzuje złożony układ wiązań sprzężonych. Dzięki temu związki te dobrze absorbują światło z zakresu widzialnego. Wyróżnić można dwa silne pasma absorpcji (Rycina 4):

- pasmo Soreta** (zakres 380-420 nm),
- pasmo Q** (zakres 500-700 nm; ok. 10 razy słabsze, złożone z czterech części składowych).



Rycina 4. Widmo absorpcyjne porfiryń. Hematoporfiryna wykazuje maksimum absorpcji przy długości fali 405 nm.

Ćwiczenie

Badanie stabilności hemoglobiny z wykorzystaniem spektrofotometrii absorpcyjnej. Oznaczanie stabilności hemoglobiny w środowisku kwaśnym oraz w obecności mocznika i chlorowodoru guanidyny

I. Materiały i odczynniki:

- 0,1 M bufor fosforanowy o pH 7,0
- 0,1 M bufor octanowy o pH: 5,0; 4,0; 3,0
- Roztwory mocznika w 0,1 M buforze fosforanowym o stężeniu: 2, 4, 5, 6, 7 M
- Roztwory GuHCl w 0,1 M buforze fosforanowym o stężeniu: 1; 1,7; 4; 6 M
- Wodny roztwór hemoglobiny (25 mg/ml)

II. Sprzęt i aparatura:

- Plastikowe probówki (15 ml) - 26 sztuk
- Końcówki do pipet automatycznych
- Spektrofotometr, kuwety
- Zestaw pipet automatycznych

III. Wykonanie ćwiczenia:

1. Odpipetować do probówek po 2,5 ml roztworów mocznika i chlorowodoru guanidyny oraz buforów o wartościach pH: od 3, 4, 5 oraz 7, każdy w 2 powtórzeniach. Roztworu hemoglobiny dodać do 2,5 ml buforu o pH 7,0, tak aby absorbancja mierzona przy 405 nm wynosiła ok. 1 (A_0)- przeważnie od 50-150 μ l. **Wartość A_0 zanotować**. Następnie dodać taką samą objętość hemoglobiny do poszczególnych buforów, **dokładnie wymieszać zawartość każdej probówki** i zapisać czas. Sporządzone roztwory inkubować w temperaturze pokojowej przez 1 godz., a następnie zmierzyć absorbancję przy 405 nm. W sposób identyczny wykonać oznaczenie z roztworami mocznika o stężeniach od 2 do 7 M i GuHCl o stężeniach od 1 do 6 M. Wyniki zestawzić w Tabeli 1.
2. Obliczyć procent białka natywnego po 1 godzinie inkubacji, przyjmując, że stężenie natywnych cząsteczek hemoglobiny jest proporcjonalne do absorbancji (Tabela 2) i zinterpretować wyniki:

$$\text{hemoglobina nienatywna (\%)} = (A_0 - A_1) / A_0 \times 100$$

gdzie: A_0 - absorbancja początkowa (zmierzona dla hemoglobiny w środowisku niedenaturującym, w buforze o pH 7,0), A_1 - absorbancja zmierzona po 1 godz. inkubacji.

3. Wykreślić zależność ilości natywnej hemoglobiny (%) obliczonej po godzinie inkubacji od pH, od stężenia mocznika i GuHCl. **Odczytać najmniejszą graniczną wartość pH oraz stężenia mocznika i GuHCl, przy których białko ulega maksymalnej denaturacji.**

Tabela 1. Pomiary absorbancji przy długości fali 405 nm (A_{405}).

CZAS INKUBACJI	BUFOR OCTANOWY (pH)			MOCZNIK STĘŻENIE MOŁOWE [M]					CHLOROWODOREK GUANIDYNY [M]			
	3.0	4.0	5.0	2	4	5	6	7	1	1,7	4	6
60 minut	I											
	II											

Tabela 2. Procent natywnej hemoglobiny w roztworach buforu octanowego, mocznika i chlorowodoru guanidyny.

Czynnik denaturujący	A ₁ (średnia z dwóch pomiarów)	(A ₀ - A ₁)/A ₀ x100%	Natywna hemoglobina (%)
Bufor octanowy pH 3			
	pH 4		
	pH 5		
Mocznik [M] 2			
	4		
	5		
	6		
	7		
Chlorowodorek guanidyny [M] 1			
	1,7		
	4		
	6		

Literatura:

1. Kłyszajko-Stefanowicz, L. Ćwiczenia z biochemii. PWN, 2005.
2. Józwiak, Z, Bartosz, G. Biofizyka. Wybrane zagadnienia wraz z ćwiczeniami. PWN, 2008.
3. Praca zbiorowa, Chemia fizyczna, PWN, 2009.