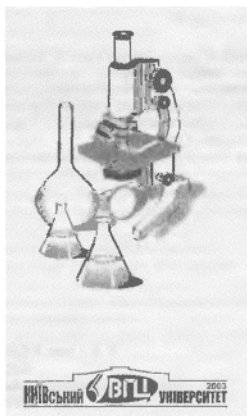


КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА

В.А.ЗИМА
М.С.МІРОШНИЧЕНКО
Т.А.ДАВИДОВСЬКА
В.В.ГАНЧУРІН
Ю.І.ПРИЛУЦЬКИЙ

БІОФІЗИКА

ПРАКТИКУМ



УДК 577.3
ББК 28.071я73
Б 63

Рецензент д-р мед. наук, акад. НАН України М.Ф. Шуба

За редакцією В.Л.Зими, М.С.Мірошниченка

*Рекомендовано до друку вченою радою біологічного факультету
(протокол № 1 від 18 вересня 2002 року)*

Зима В.Л. та ін.

Б 63 Біофізика. Практикум: Навчальний посібник / Зима В.Л., Мірошниченко М.С., Давидовська Т.Л., Ганчурін В.П., Прилуцький Ю.І. – К.: Видавничо-оліграфічний центр "Київський університет", 2003. – 139 с.

ISBN 966-594-358-8

Описано виконання лабораторних робіт з основних розділів біофізики, а також фізико-хімічні методи визначення основних характеристик живих систем, термодинаміку й кінетику біологічних процесів, вимірювання окисно-відновних та біоелектричних потенціалів, визначення електричних і транспортних характеристик мембран, метод спектрофотометрії та флуоресцентний аналіз, вимірювання радіоактивності препаратів.

Для студентів біологічних факультетів університетів.

УДК 577.3
ББК 28.071я73

ISBN 966-594-358-8

© В.Л.Зима, М.С.Мірошниченко, Т.Л.Давидовська,
В.П.Ганчурін, Ю.І.Прилуцький, 2003
© Київський національний університет імені Тараса Шевченка,
ВПЦ "Київський університет", 2003

ЗМІСТ

Вступ.....	4
Розділ 1. Фізико-хімічні методи.....	5
Робота 1. Поверхневий натяг розчинів і клітин.....	5
Лабораторна робота.	
Визначення поверхневого натягу розчинів методом відриву кільця (метод Дю Нуї).....	9
Робота 2. рН-метрія. Визначення концентрації водневих іонів і рК амінокислот.....	11
Робота 3. Осмотичний тиск.....	18
Лабораторна робота 1.	
Визначення осмотичного тиску розчинів методом Барджера – Раства.....	24
Лабораторна робота 2.	
Плазмолітичний метод визначення осмотичного тиску клітинного соку.....	27
Робота 4. Гель-хроматографія.....	29
Робота 5. Дифузія та хаотичний рух молекул у розчині.....	33
Лабораторна робота.	
Визначення розміру частинок туші та в'язкості розчину.....	37
Розділ 2. Термодинаміка та кінетика біологічних процесів.....	39
Робота 1. Стандартна вільна енергія і константа рівноваги хімічної реакції.....	39
Робота 2. Кінетика гідролітичного розщеплення сахарози.....	47
Розділ 3. Біомембрани та мембранний транспорт речовин.....	57
Робота 1. Фізико-хімічні характеристики ліпідних моношарів.....	57
Робота 2. Електричні параметри бішарових ліпідних мембран.....	62
Робота 3. Гемоліз еритроцитів.....	69
Розділ 4. Електробіофізика.....	75
Робота 1. Вимірювання потенціалів кінцевих пластинок скелетного м'яза жаби.....	75
Робота 2. Електрофоретична швидкість і ξ -потенціал дріжджових клітин.....	83
Робота 3. Визначення стандартних редокс-потенціалів потенціометричним методом.....	89
Розділ 5. Спектральні методи дослідження.....	97
Робота 1. Спектрофотометрія білків і нуклеїнових кислот.....	97
Робота 2. Флуоресцентний аналіз у біологічних дослідженнях.....	107
Розділ 6. Радіаційна біофізика.....	117
Робота 1. Визначення активності природних радіоактивних препаратів та поглинання γ -квантів різними матеріалами.....	117
Розділ 7. Статистична обробка результатів вимірювань (теорія похибок).....	125
Додатки.....	133

ВСТУП

Серед біологічних наук важливу роль відіграє біофізика, яка вивчає фізичні й фізико-хімічні закономірності, що лежать в основі життєдіяльності, а також первинні механізми дії фізичних факторів на живі об'єкти. Успіхи сучасної біології в розкритті молекулярних механізмів багатьох явищ і процесів (ферментативний каталіз, передача генетичної інформації, функція плазматичних мембран та інших субклітинних структур, фотосинтез, м'язове скорочення тощо) значною мірою зумовлені застосуванням ідей і підходів сучасної біофізики, які дозволяють отримувати кількісну інформацію про процеси в живих об'єктах. У загальному курсі біофізики викладаються основні розділи біофізики: термодинаміка та кінетика біологічних процесів, молекулярна біофізика білків і нуклеїнових кислот, біофізика мембран, транспорт речовин у клітинах, біоелектричні потенціали та механізми збудження в нервових і м'язових клітинах, молекулярні механізми рухливості клітин і м'язового скорочення, фітобіологічні процеси й механізми фотосинтезу, радіаційна біофізика, математичне моделювання та аналіз складних систем.

Засвоєння основних розділів курсу біофізики є неможливим без практичних навичок, без виконання лабораторних робіт, які дозволяють проілюструвати ті чи інші положення теоретичного курсу та глибше зрозуміти їх, без знайомства з арсеналом апаратури й методів, що застосовуються в біологічних дослідженнях. Посібник "Біофізика. Практикум" допоможе студентам ознайомитися з різними біофізичними, фізико-хімічними методами дослідження, а також з електронними приладами, спектральними установками й радіобіологічною апаратурою.

Це навчальне видання буде корисним не тільки для студентів біологічних факультетів університетів, але й для тих, хто навчається в медичних, педагогічних і сільськогосподарських інститутах.

Розділ 1

ФІЗИКО-ХІМІЧНІ МЕТОДИ

Робота 1. Поверхневий натяг розчинів і клітин

Кожна молекула в розчині перебуває у полі молекулярної дії радіусом 10^{-8} м. На межі рідина – повітря сили міжмолекулярного притягання та відштовхування не врівноважуються, унаслідок чого з'являється надлишок вільної енергії, який намагається зменшити до мінімуму поверхню поділу. Тому поверхня рідини виступає як пружна мембрана. Сили, що зумовлюють такий стан, називаються силами поверхневого натягу. З позиції термодинаміки зміна вільної енергії ΔG , що витрачається на зміну одиниці площі поверхні ΔS , називається коефіцієнтом поверхневого натягу

$$\sigma = \frac{\Delta G}{\Delta S}. \quad (1.1)$$

Коли сила поверхневого натягу F діє на межу поділу рідина – повітря з периметром l , тоді коефіцієнт поверхневого натягу буде

$$\sigma = \frac{F}{l}. \quad (1.2)$$

Коефіцієнт σ вимірюється в Дж·м⁻² або Н·м⁻¹. Сила поверхневого натягу зменшується з підвищенням температури й наближається до нуля за критичної температури. Коефіцієнт поверхневого натягу води при $T = 291$ К дорівнює $72,75 \cdot 10^{-3}$ Н·м⁻¹.

Поверхневий натяг розчинів відрізняється від чистих розчинників. Наприклад, цукор підвищує поверхневий натяг води, а солі знижують його. Існують речовини, які значно знижують поверхневий натяг, їх називають поверхнево-активними речовинами. Вони можуть адсорбуватись на поверхні води, утворюючи мономолекулярні шари. Така властивість поверхнево-активних речовин зумовлена особливостями їх структури, що складається з неполярної (гідрофобної) і полярної частин. Полярні групи поверхнево-активної речовини взаємодіють з молекулами води, а гідрофобні виступають у повітряний простір. Завдяки такій будові мономолекулярного шару коефіцієнт поверхневого натягу води знижується.

Для ліпідних молекул є характерним утворення мономолекулярних шарів. У 1925 р. Гортнер і Грендель екстрагували з еритроцитів ліпіди, які розчиняли в бензолі й декілька крапель цього розчину наносили на поверхню води у ванні Ленгмюра. Після випаровування бензолу на поверхні води залишався моношар ліпідів. Після вимірювання його площі виявилось, що вона у два рази більша за площу поверхні еритроцитів, з яких були екстраговані ліпіди. Ця робота була першою спробою зобразити молекулярну організацію клітинних мембран у вигляді бімолекулярного ліпідного шару. Але з'ясувалось, що мембрана не може утворюватись таким способом. Виявилось, що поверхневий натяг клітинних мембран набагато менший, ніж поверхневий натяг водно-ліпідних систем. При адсорбції білків на ліпідному шарі його поверхневий натяг значно зменшується та наближається до поверхневого натягу клітин і становить $(0,8-1,3) \cdot 10^{-3} \text{ Н} \cdot \text{м}^{-1}$, тобто він у 60-90 разів менший, ніж коефіцієнт поверхневого натягу води.

Сироватка та плазма крові відновлюють початкову величину поверхневого натягу після додавання поверхнево-активних речовин. Буферні властивості крові визначаються іонами Ca^{2+} і білками, які зв'язують поверхнево-активні речовини й відновлюють поверхневий натяг крові. Завдяки таким властивостям крові останній залишається постійним і може значно змінюватись тільки при деяких тяжких захворюваннях. Вимірювання поверхневого натягу плазми, сироватки, ліквору має сенс у клінічній діагностиці. Це вимірювання використовується при вивченні дії поверхнево-активних речовин на мембрани клітин і на фізико-хімічні характеристики біологічно важливих рідин.

Сили поверхневого натягу зумовлюють властивість рідин підніматися або опускатися в капілярних трубках. У зв'язку з цим капілярні явища мають велике значення для життєдіяльності рослин, оскільки сприяють підніманню води й поживних речовин з ґрунту вздовж стовбура рослини.

Використовується низка методів вимірювання коефіцієнта поверхневого натягу рідин і клітин.

Капілярний метод. Піднімання рідини в капілярі (рис. 1.1) радіусом r зумовлено поверхневим натягом. Тиск p_n за рахунок сил поверхневого натягу записується так:

$$p_n = \frac{2\sigma \cos \theta}{r}, \quad (1.3)$$

де θ – крайовий кут; r – радіус капіляра; σ – коефіцієнт поверхневого натягу. У випадку, коли капіляр достатньо тонкий і рідина добре змочує стінки, тоді $\theta = 0$ і вираз (1.3) буде

$$p_n = \frac{2\sigma}{r}. \quad (1.4)$$

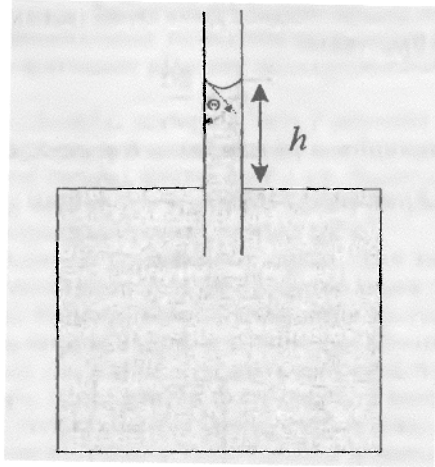


Рис. 1.1. Підняття рідини в капілярі за рахунок поверхневого натягу:
 h – висота підняття рідини; θ – крайовий кут

З іншого боку, підняття рідини за рахунок поверхневого натягу врівноважується вагою P стовпця рідини

$$P = mg = \rho_0 Sh, \quad (1.5)$$

де m – маса рідини; g – прискорення земного тяжіння; ρ_0 – питома густина рідини; S – площа поперечного перерізу капіляра; h – висота підняття рідини. Тиск, який створює цей стовпець рідини, дорівнює

$$p_0 = \frac{P}{S} = \rho_0 hg. \quad (1.6)$$

Порівнявши вирази (1.4) і (1.6), отримуємо величину коефіцієнта поверхневого натягу

$$\sigma = \frac{1}{2} \rho_0 g r h. \quad (1.7)$$

Метод стискування клітини. Цей метод дозволяє вимірювати поверхневий натяг великих клітин – яйцеклітин, клітин найпростіших (рис. 1.2).

Сферична клітина 1 знаходиться на склі 2. Вона стискується зверху дуже тонкою платиновою пластинкою 3 масою m і набуває форми еліпсоїда з радіусами r_1 і r_2 . Визначаючи за допомогою мікроскопа площу S стикання клітини зі скельцем, можна визначити тиск $p = mg / S$, який діє на поверхню клітини.

Вигнута поверхня завжди створює допоміжний надлишковий тиск, який за формулою Лапласа буде таким:

$$p_l = \frac{2\sigma}{r} \quad (1.8)$$

У зв'язку з тим, що клітина не сферична, а еліпсоїдна, замість r підставляють у формулу (1.8) середній радіус $r_{cp} = \frac{r_1 + r_2}{2}$ і тоді

$$p_l = \frac{4\sigma}{r_1 + r_2} . \quad (1.9)$$

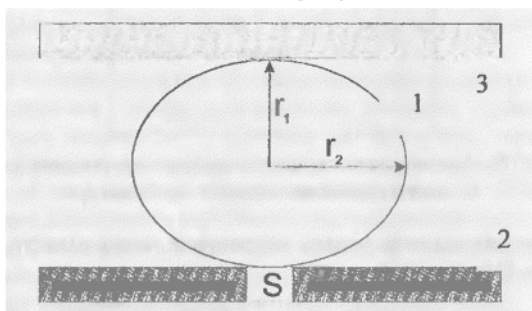


Рис. 1.2. Метод стиснення клітини:
1 – клітина; 2 – скляна пластинка; 3 – платинова пластинка (фольга);
 r_1 і r_2 – малий і великий радіуси клітини; S – площа стикування

Оскільки тиск платинової пластинки p урівноважується надлишковим тиском p_l , отримуємо

$$\frac{mg}{S} = \frac{4\sigma}{r_1 + r_2} . \quad (1.10)$$

З виразу (1.10) знаходимо коефіцієнт поверхневого натягу клітини

$$\sigma = \frac{mg(r_1 + r_2)}{4S} . \quad (1.11)$$

Значення r_1 , r_2 і S знаходимо при вимірюванні розмірів клітини під мікроскопом.

Лабораторна робота
Визначення поверхневого натягу
розчинів методом відриву кільця (метод Дю Нуї)

Матеріали та прилади: крутильні ваги, підйомний столик з кремальєрою, годинникове скельце, платинове кільце, анатомічний пінцет, спиртовий пальник, фарфоровий тигель, піпетки на 1-2 мл, бюкси на 10 мл, фізіологічний розчин хлориду натрію, 0,1 % розчин олеату натрію, розчин сахарози, етиловий спирт, рінгерівський розчин, плазма крові.

Методика роботи на крутильних вагах. Ваги виставляються опорними гвинтами на рівній горизонтальній поверхні таким чином, щоб бульбашка рівня вагів була відцентрована. Стрілку вагів виставляють на позначку "0" шкали, зміщують аретир вправо в положення "Вільно". Після звільнення аретира стрілку точно виставляють на рисці рівноваги, повертаючи спеціальний гвинт знизу вагів. Потім аретир виставляють у положення "Затиснуто". До гачка коромисла чіпляють вантаж і звільнюють аретир. Важіль натягу обертають проти годинникової стрілки, поки показник рівноваги не повернеться в нульове положення. Після досягнення рівноваги аретир слід перевести у стан "Затиснуто". Отримані результати записують, а вантаж знімають із гачка.

Визначення поверхневого натягу води. Спочатку платинове кільце очищують, прожарюючи його над полум'ям пальника, потім беруть анатомічним пінцетом і чіпляють на гачок крутильних вагів. Після зважування кільця ваги аретирують, не повертаючи стрілку до нуля. Наливають 0,5-1 см³ води на сухе годинникове скельце, яке розміщують на підйомному столику (рис. 1.3).

За допомогою кремальєри піднімають годинникове скельце, поки поверхня рідини не торкнеться кільця (не слід занурювати кільце в рідину). Потім звільняють коромисло вагів і повільно обертають важіль натягу, поки кільце не відірветься від рідини. На шкалі крутильних вагів знаходять масу m_k , яка визначає силу відриву кільця від води. Потім швидко опускають столик зі скельцем і зважують кільце з рідиною, яка залишилась на ньому після відриву. Істинна сила відриву кільця визначається масою m_g :

$$m_g = m_k - m_0, \quad (1.12)$$

де m_0 – маса кільця з рідиною, яка прилипла до нього. Коефіцієнт поверхневого натягу розраховується за формулою

$$\sigma_g = \frac{m_g \cdot 9,81}{2\pi r}, \quad (1.13)$$

де m_g у кілограмах, r – радіус кільця в м ($r \cong 0,0025$ м).

Визначення коефіцієнта поверхневого натягу різних рідин. Коефіцієнт поверхневого натягу різних рідин σ_x (крім води) визначається за формулою

$$\sigma_x = \sigma_g \cdot Q, \quad (1.14)$$

де Q – відносний коефіцієнт поверхневого натягу даної рідини. Розрахунки відносного коефіцієнта поверхневого натягу Q проводиться за формулою

$$Q = Q_x K - K + 1, \quad (1.15)$$

де $Q_x = m_x / m_0$ – відношення мас, які визначають сили відриву кільця від даної рідини і від води; K – константа кільця. Для визначення останньої використовують еталонну рідину, коефіцієнт поверхневого натягу якої відомий з таблиці. Часто беруть 96 % етиловий спирт з $\sigma_c = 22,27 \cdot 10^{-3} \text{ Н} \cdot \text{м}^{-1}$.

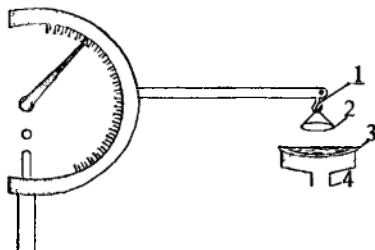


Рис. 1.3. Метод відриву кільця: 1 – гачок крутильних вагів; 2 – платинове кільце; 3 – годинникове скельце з досліджуванним розчином; 4 – підйомний столик

Тоді розрахунок константи кільця буде такий:

$$K = \frac{\sigma_c - 1}{m_c - 1} \cdot \frac{m_0}{\sigma_0} \quad (1.16)$$

Підставивши K у формулу (1.15), знаходимо відносний коефіцієнт поверхневого натягу Q і за ним визначаємо σ_x за формулою (1.14).

Завдання 1. Визначення коефіцієнта поверхневого натягу води й константи кільця

Визначити коефіцієнт поверхневого натягу води за формулою (1.13), розрахувати за допомогою формули (1.16) константу кільця. Для цього використати дистильовану воду й етиловий спирт.

Завдання 2. Вивчення впливу поверхнево-активних речовин на поверхневий натяг розчину Рінгера

Налити 0,5 мл розчину Рінгера на годинникове скельце й визначити два рази з інтервалом у 5 хв коефіцієнт поверхневого натягу розчину. Потім навести на розчин одну краплину 0,1 % розчину олеату натрію і виміряти силу відриву відразу ж після додавання поверхнево-активної речовини, далі – через 1, 5, 10, 15 і 20 хв. Розрахувати коефіцієнт поверхневого натягу за формулою (1.14) і побудувати графік зміни в часі σ_x .

Завдання 3. Визначення поверхневого натягу розчину сахарози

Приготувати чотири водні розчини сахарози з концентраціями 20, 30, 40 і 50 %. Виміряти коефіцієнти поверхневого натягу цих розчинів і побудувати графічну залежність σ_x від концентрації сахарози.

Рекомендована література

Биофизика. Практикум / Под ред. П.Г.Богача. – К., 1983.

Давид Р. Введение в биофизику. – М., 1982.

Робота 2. рН-метрія. Визначення концентрації водневих іонів і рК амінокислот

Концентрація водневих іонів має великий вплив на протікання різних біологічних процесів. Швидкість, а інколи й напрямок, окиснення та відновлення органічних речовин в організмі залежать від концентрації водневих іонів. Визначення концентрації іонів водню є необхідним, оскільки вона впливає на ступінь іонізації молекул, які беруть участь у багатьох біохімічних процесах. До таких процесів належать ферментативні реакції, конформаційні зміни білків і нуклеїнових кислот, поведінка молекул при електрофоретичному та хроматографічному розділенні тощо.

Розглянемо коротко дисоціацію води й кислот, а також способи обчислення концентрації водневих іонів у електролітах різної концентрації. Слід відмітити, що вільні протони (ядра водню) у водних розчинах не існують і позначення H^+ слід розглядати лише як спрощене зображення гідратованого протона – іона гідроксонію H_3O^+ .

Електролітичну дисоціацію води можна записати таким чином:



Константа дисоціації води записується так:

$$K = \frac{[H^+][OH^-]}{[H_2O]}. \quad (1.17)$$

У розбавлених розчинах концентрація молекул води стала й дорівнює числу грамів води в 1 л розчину, поділеному на молекулярну масу води, тобто $1000/18 = 55,5$ моль/л. Можна знайти іонний добуток води (K_w): $K_w = [H^+][OH^-]$.

Величина іонною добутку води значною мірою залежить від температури (дисоціація води збільшується при підвищенні температури). За кімнатної температури $K_w = 10^{-14}$.

Величина K_∞ дозволяє характеризувати всі розчини (нейтральні, кислі, лужні) за концентрацією водневих іонів. Для зручності запису концентрації іонів водню Соренсен у 1920 р. увів так звану шкалу pH:

$$\text{pH} = -\lg[\text{H}^+] \text{ або } [\text{H}^+] = 10^{-\text{pH}}. \quad (1.18)$$

Якщо концентрації іонів $[\text{H}^+] = [\text{OH}^-] = 10^{-7}$ моль, такий розчин називається нейтральним ($\text{pH} = -\lg[10^{-7}] = 7$). Коли $[\text{H}^+] > [\text{OH}^-]$, тобто $\text{pH} < 7$, розчин називається кислим, і, навпаки, якщо $[\text{H}^+] < [\text{OH}^-]$, тобто $\text{pH} > 7$, розчин буде лужним.

За теорією електролітичної дисоціації Арреніуса, кислоти, основи й солі у водних розчинах тією або іншою мірою дисоціюють. Це призводить до збільшення кількості іонів у розчині, що у свою чергу зумовлює підвищення осмотичного тиску, температури кипіння і, відповідно, зниженню температури замерзання, а також зміні інших спряжених властивостей. Кількісна оцінка ступеня дисоціації вимагає різних математичних підходів залежно від того, яким є електроліт – сильним чи слабким.

Сила притягання F між іонами може бути розрахована за законом Кулона

$$F = \frac{1}{4\pi\epsilon_0} \frac{q_1 q_2}{r^2}, \quad (1.19)$$

де q_1 і q_2 – заряди іонів; r – відстань між іонами; ϵ – діелектрична стала розчинника; $\epsilon_0 = 8,85 \cdot 10^{-12}$ Кл·В⁻¹·м⁻¹. Цю силу переборюють іони, щоб відокремитись один від одного. Енергія взаємодії іонів записується так

$$W_e = \frac{1}{4\pi\epsilon_0} \frac{q_1 q_2}{\epsilon r}. \quad (1.20)$$

Оскільки діелектрична стала в (1.19) і (1.20) знаходиться у знаменнику, то високі значення діелектричної сталої води (78,6 при 25 °С) помітно зменшують і енергію, і силу взаємодії іонів. Енергія, необхідна для розділення іонів у воді, значно менша, ніж енергія розділення іонів практично в усіх органічних розчинниках, в яких ϵ знаходиться в інтервалі від 2 до 25.

Слабкі електроліти. До слабких електролітів належать сполуки, що дисоціюють у воді лише частково, залежно від ступеня поляризації ковалентного зв'язку. Наочним прикладом є хлороцтові кислоти. Послідовна заміна атомів водню в метиловій групі оцтової кислоти на атоми хлору веде до зміщення електронів у напрямку атомів хлору й до посилення поляризації зв'язку C = O. Порівняння констант дисоціації показує, що величина K для трихлороцтової кислоти дорівнює 0,2 моль/л, а для оцтової кислоти – лише $2 \cdot 10^{-5}$ моль/л. Кількісно ступінь дисоціації слабких електролітів оцінюють таким чином. Якщо виходити з одного моля речовини в літрі розчину, в якому дисоціює тільки α моль/л, тоді концентрація недисоційованих молекул буде $(1 - \alpha)$ моль/л. Нехай при дисоціації однієї молекули утворюється n іонів, тоді загальне число іонів буде $n\alpha$. Відповідно сумарна кількість частинок (іонів і молекул) в одному

літрі розчину буде $n\alpha + (1 - \alpha)$. У слабких електролітах навіть при нескінченному розбавленні $\alpha < 1$, тобто дисоціація не буває 100 %.

Сильні електроліти. До сильних електролітів належать сполуки, які повністю дисоціюють на іони у водному розчині. Разом з тим, деякі експериментальні дані (зниження температури замерзання розчину й тиску пари розчинника над розчином) відхиляються від теоретичних величин. У 1923 р. Дебай і Гюккель дали таке пояснення цим фактам. Незважаючи на те, що іони розділені один від одного шаром розчинника, кожний іон виявляється оточеним "хмаркою" з іонів протилежного знаку, що веде до послаблення притягання між протилежно зарядженими іонами. Чим вище концентрація електроліту, тим ближче іони розміщені один до одного, і тим більша в них обмеженість руху. Тому введено поняття ефективної концентрації речовини в розчині, яка виражається через її активність a . Остання зв'язана з концентрацією таким чином: $a = f c$, де f – коефіцієнт активності. При нескінченному розбавленні f прямує до одиниці.

Кислотно-основна рівновага. Кислоти – це донори протонів, а основи – акцептори протонів. Рівняння дисоціації молекули може бути зображено у вигляді



У цьому разі говорять, що HA і A^- складають спряжену пару; HA є спряженою кислотою (донор протонів), а A^- – спряженою основою (акцептор протонів). Константа дисоціації речовини записується як $K = \frac{[\text{H}^+][\text{A}^-]}{[\text{HA}]}$. Звідси

$$\text{знаходимо } [\text{H}^+] = K \frac{[\text{HA}]}{[\text{A}^-]}.$$

Прологарифмувавши цей вираз, отримуємо рівняння Гендерсона – Хасельбаха для розрахунку рН

$$\text{pH} = \text{pK} + \lg \frac{[\text{A}^-]}{[\text{HA}]}. \quad (1.21)$$

З цього рівняння видно, що pK – це те значення рН, за якого концентрація кислоти дорівнює концентрації основи, $[\text{HA}] = [\text{A}^-]$. "Силу" кислоти характеризують величиною pK . Для сильних кислот величини pK від'ємні. Наприклад, для HCl $K = 10^3$ і $\text{pK} = -3$. Ми будемо розглядати досить слабкі кислоти й основи, для яких $K \ll 1$. Наприклад, для HNO_2 $K = 4 \cdot 10^{-4}$ і $\text{pK} = 3,4$.

До біологічно активних електролітів відносяться, в основному, три класи сполук – органічні фосфати, поліфосфати та їх похідні; амінокислоти та їх похідні; ди- і трикарбонові кислоти, що беруть участь у циклі лимонної кислоти. Розглянемо детальніше амінокислоти, які включають різноманітні дисоціюючі групи. Усі групи амінокислот, що здатні до іонізації, можуть бути подані в протонованій формі, тобто їх дисоціацію можна розглядати як кислотну (рис. 1.4).



Рис. 1.4. Дисоціація гліцину

Оскільки всі амінокислоти містять принаймні дві групи, що здатні до дисоціації, то крива титрування має вигляд, наведений на рис. 1.5.

Як видно з рис. 1.5, два значення pK знаходяться порівняно далеко одне від одного. Значення pH ізоелектричної точки знаходять за формулою

$$pH_i = \frac{1}{2}(pK_1 + pK_2).$$

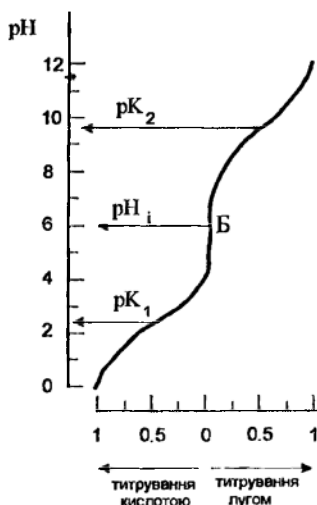


Рис. 1.5. Крива титрування амінокислот (пояснення в тексті)

Точці Б відповідає pH_i , що характеризує нейтральний розчин амінокислоти,
 n – кількість еквівалентів доданої кислоти чи лугу

На рис. 1.5 pK_1 відповідає дисоціації карбоксильної групи, коли є рівновага двох форм цієї групи А і Б (рис. 1.4), їх співвідношення таке:

$$\frac{[A]}{[B]} = 1, \text{ а } pK_2 - \text{дисоціації аміногрупи, коли є рівновага двох форм Б і В}$$

(рис. 1.4) зі співвідношенням $\frac{[B]}{[B]} = 1$.

Матеріали та прилади: 0,1 н розчини гліцину, КОН і НСІ; мірні піпетки; скляночки на 50 мл; рН-метр.

Методика роботи на рН-метрі. Для вимірювання величини рН використовується електродна система зі скляним електродом, електрорушійна сила якого залежить від активності іонів водню в розчині (рис. 1.6).

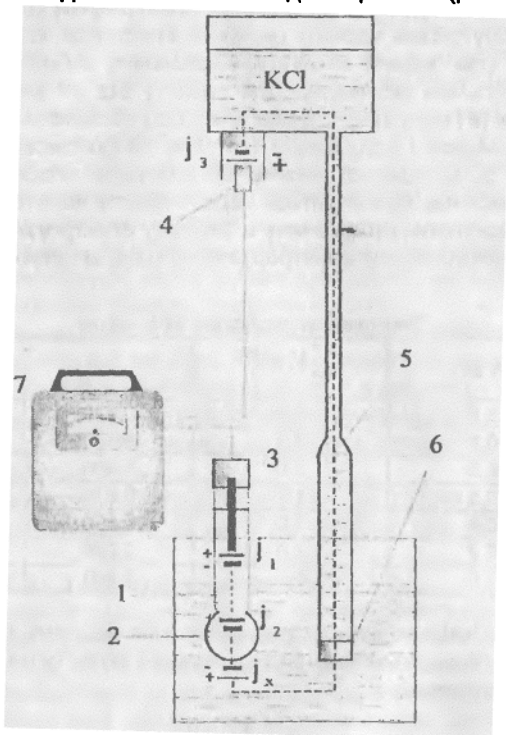


Рис. 1.6. Електронна схема рН-метра: 1 – скляний електрод; 2 – порожниста кулька з літійового скла; 3 – внутрішній контактний електрод; 4 – електрод порівняння; 5 – електролітичний контакт; 6 – пориста перегородка; 7 – рН-метр

Штрихами зображено електричне коло та різниці потенціалів на електродах – вимірювального φ_x , внутрішнього контактного φ_1 , внутрішнього контактного й скляного φ_2 і порівняння φ_3 .

Скляний електрод 1 – це трубка з припаяною до корпусу кулькою 2 з літєвого скла. При опусканні електрода в розчин між поверхнею кульки та розчином відбувається обмін іонами, унаслідок якого іони літію в поверхневих шарах скла заміщуються іонами водню і скляний електрод набуває властивості водневого електрода.

Між поверхнею скла й розчином виникає різниця потенціалів φ_x , величина якої визначається активністю іонів водню в розчині. Для створення електричного ланцюга при вимірюванні використовують контактні електроди. Внутрішній контактний електрод 3 забезпечує електричний контакт з розчином, який заповнює внутрішню частину скляного електрода, а зовнішній контактний електрод 4 (так званий електрод порівняння) забезпечує електричний контакт з контрольним розчином. Для захисту від дії високих температур (при вимірюванні pH гарячих розчинів) електрод порівняння розміщують поза контрольним розчином і з'єднують з останнім за допомогою електролітного контакту трубки 5, заповненої насиченим розчином хлориду калію. Розчин хлориду калію весь час просочується через пористу перетинку 6, заважаючи проникненню з контрольного розчину в систему електрода 4 сторонніх іонів, які могли б змінити величину електрорушійної сили електрода.

Таблиця 1.1

Титрування кислотою або лугом

№	V_b , мл	$\sum V_i$, мл	n	pH розчину
1	0,0	0,0	0,000	
2	0,5	0,5	0,025	
3	0,5	1,0	0,050	
4	0,5	1,5	0,075	
5	0,5	2,0	0,100	
6	2,0	4,0	0,200	
7	2,0	6,0	0,300	

Зауваження. Оскільки концентрація розчинів кислоти, луку і гліцину виражені в г-екв./л, то число еквівалентів n доданої кислоти чи луку визначають з простого співвідношення

$$n = \frac{\sum V_i}{V}, \quad (1.22)$$

де n – еквівалент доданої кислоти чи лугу; V – початковий об'єм амінокислоти; V_i – об'єм доданої кислоти чи лугу; $\sum V_i$ – сума об'ємів доданих кислоти чи лугу.

Послідовність операцій при роботі на рН-метрі

1. Перемикач виду роботи поставити в положення "0".
2. Увімкнути прилад в електромережу.
3. Після 15-хвилинного прогрівання приладу перевести перемикач у положення, що відповідає необхідному вимірюванню. Установити стрілку приладу на початкову (-2 рН) відмітку верхньої шкали.
4. Налаштувати прилад за стандартним буферним розчином. Для цього електроди помістити у стандартний буферний розчин 1,68 рН. Перемикач меж вимірювань установити в положення "-2-2 рН". Показник температурної компенсації встановити на значення температури буферного розчину (за ручної температурної компенсації). Упевнитись, що в нульовому положенні перемикача виду роботи положення стрілки відповідає початковій відмітці верхньої шкали. За необхідності встановити її на початкову відмітку ручкою "Початок шкали". Перевести перемикач у положення "рНср". Ручкою "Налаштування по буферу" встановити стрілку на значення 1,68 рН верхньої шкали. Закріпити ручку цанговим затискачем. Після цього прилад готовий до вимірювань.

Завдання 1. Титрування гліцину

1. Підготувати прилад до роботи за методикою, наведеною вище.
2. У скляночку ємністю 50 мл за допомогою піпетки набрати 20 мл (початковий об'єм) 0,1 н розчину гліцину. Виміряти його рН.
3. Протитрувати цей розчин 0,1 н КОН. Для цього в скляночку з розчином гліцину піпеткою додати 0,5 мл лугу. Суміш перемішати склянкою паличкою і виміряти рН. Операцію повторити, кожного разу додаючи до розчину гліцину порцію лугу об'ємом 0,5 мл. Після четвертого вимірювання об'єм лугу збільшити до 2 мл. Титрування припинити, коли об'єм внесеного в скляночку розчину лугу дорівнюватиме 20 мл.
4. Старанно промити електроди дистильованою водою.
5. Аналогічно протитрувати 20 мл 0,1 н розчину гліцину розчином 0,1 н соляної кислоти.
6. Результати двох титрувань занести в табл. 1.1.
7. Після закінчення титрування старанно промити електроди дистильованою водою. Електроди не повинні довгий час залишатись сухими, тому їх тримають у дистильованій воді, яка, за умови, що електроди добре відмиті, має рН 5,6 – 6,0.

Завдання 2. Визначення константи дисоціації гліцину

1. Використовуючи дані таблиць, побудувати графік, аналогічний наведеному на рис. 1.5.
2. Знайти на графіку значення pK_1 і pK_2 .
3. Розрахувати константи дисоціації гліцину за формулою (1.21).

Рекомендована література

Давид Р Введение в биофизику. – М., 1982.

Уильямс В., Уильямс Х. Физическая химия для биологов. – М., 1976.

Робота 3. Осмотичний тиск

Хаотичний рух молекул, що зумовлює броунівський рух і дифузію, призводить до рівномірного розподілу компонентів у системі. Якщо між розчинником і розчином або між двома розчинами різної концентрації помістити напівпроникну перегородку, через яку не проникають молекули розчиненої речовини, то розчинник проходить через неї з розбавленого розчину в більш концентрований, що вперше спостерігав у 1748 р. А.Нолле. Така одностороння дифузія розчинника через напівпроникну мембрану, що відокремлює розчин від чистого розчинника або розчину більш низької концентрації, називається **осмосом** (грец. *ostmos* – поштовх, тиск). Осмос завжди направлений від чистого розчинника до розчину або від розбавленого розчину до концентрованого. Осмос характеризується величиною осмотичного тиску. **Осмотичним тиском** розчину називається той додатковий тиск, який, окрім тиску самого розчинника, слід прикласти до мембрани з боку розчину, щоб запобігти переміщенню через мембрану розчинника до розчину.

Якщо вода відокремлена від розчину напівпроникною мембраною, то вона проходить через мембрану й піднімає розчин у трубці на висоту h до встановлення рівноваги (рис. 1.7, а). Цьому можна запобігти, якщо у верхній частині трубки прикласти додатковий тиск поршнем (рис. 1.7, б). Саме цей тиск, який слід прикласти до розчину, щоб зупинити надходження води, називається осмотичним тиском π .

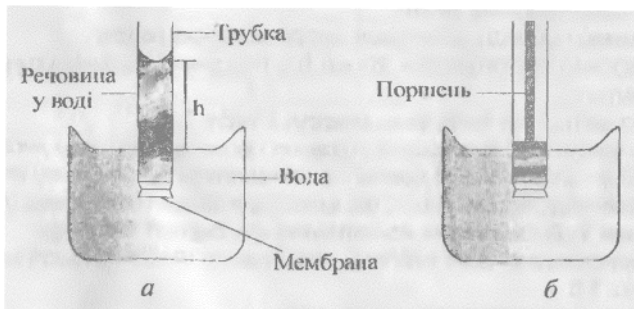


Рис. 1.7. Пристрій для спостереження і вимірювання осмотичного тиску (пояснення в тексті)

У 1877 р. В.Пфеффер виміряв осмотичний тиск π декількох розчинів однієї й тієї самої маси речовини в різних об'ємах розчинника. При цьому він показав, якщо підтримувати температуру постійною, то добуток осмотичного тиску π на об'єм V завжди буде постійним: $\pi V = \text{const}$. Для даного розчину з підвищенням температури осмотичний тиск збільшується, причому відношення π/T залишається постійним. Вант-Гофф узагальнив ці результати й запропонував емпіричну формулу для осмотичного тиску розчинів:

$$\pi = 10^3 CRT, \quad (1.23)$$

де C – молярна концентрація розчину в [моль/л]; T – температура, R – газова стала ($R = 8,31 \text{ Дж} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{К}^{-1}$).

Лінійна залежність осмотичного тиску від концентрації розчину та від температури має місце тільки для ідеальних розчинів, в яких розчинена речовина не дисоціює на дві або більше складових часток і не зазнає асоціації, що призводить до зменшення загального числа розчинених часток. Тому формулу (1.23) можна застосовувати тільки для розбавлених розчинів. Якщо розчинена речовина АВ дисоціює, як $AB = A^+ + B^-$, і має ступінь дисоціації α , тоді число недисоційованих молекул в 1 молі дорівнює $(1 - \alpha)$ і число продуктів дисоціації дорівнює 2α , а всього молекул чи іонів в 1 молі буде $1 - \alpha + 2\alpha = 1 + \alpha$. Коефіцієнт $i = 1 + \alpha$ називають **ізотонічним коефіцієнтом Вант-Гоффа**. Тоді осмотичний тиск за формулою Вант-Гоффа буде

$$\pi = 10^3 i CRT \quad (1.24)$$

Незважаючи на те, що формула Вант-Гоффа справджується тільки для ідеальних або розбавлених розчинів, з певним наближенням її можна використовувати й при розгляді колоїдних розчинів і розчинів високомолекулярних сполук (ВМС). Оскільки значення осмотичного тиску пропорційне числу часток розчиненої речовини, при переході від істинних розчинів до колоїдних, де розмір часток набагато більший (число часток за тієї самої концентрації набагато менше), відбудеться різка зміна осмотичного тиску. Для колоїдних розчинів осмотичний тиск невеликий і не завжди піддається вимірюванню. Причиною цього є велика маса й невисока концентрація колоїдних часток. Розмір часток у колоїдних розчинах може коливатися в досить широких межах, тому для різних колоїдних розчинів значення осмотичного тиску будуть різко відрізнятися, що зумовлено різною дисперсністю колоїдних систем. Простий підрахунок дозволяє встановити кількісну залежність між осмотичним тиском, числом часток n в одиниці об'єму розчину, середнім радіусом r часток, а отже, і ступенем дисперсності z . Осмотичний тиск обернено про-

порційний кубу радіуса часток r^3 і, відповідно, прямо пропорційний кубу ступеня дисперсності z^3 . Це означає, що навіть невеликі зміни в розмірах часток дисперсних систем мають призвести до досить значних змін в осмотичному тиску. Наприклад, при збільшенні розміру часток у два рази осмотичний тиск повинен зменшитись у вісім разів за тієї самої концентрації розчину.

Для розчинів високомолекулярних сполук (ВМС) експеримент показує, що осмотичний тиск значно вищий, ніж це вимагається за законом Вант-Гоффа, і у своїй звичайній формі для таких розчинів цей закон не справджується. На рис. 1.8 схематично порівнюються концентраційні залежності осмотичного тиску для розчинів високомолекулярної (крива 1), низькомолекулярної (крива 2) речовин і слабкого електроліту (крива 3). Як видно з рисунка, осмотичний тиск розчину низькомолекулярної речовини зростає прямо пропорційно концентрації. Для слабкого електроліту осмотичний тиск розчину зумовлений не тільки числом молекул, але й кількістю іонів. А оскільки ступінь іонізації α зменшується з підвищенням концентрації, осмотичний тиск зростає повільніше, ніж концентрація. Нарешті, осмотичний тиск розчину високомолекулярної речовини зростає швидше, ніж збільшується концентрація. Це відбувається через те, що макромолекула, завдяки великим розмірам та гнучкості, поводить себе в розчині як декілька коротших молекул. Чим гнучкіша молекула,

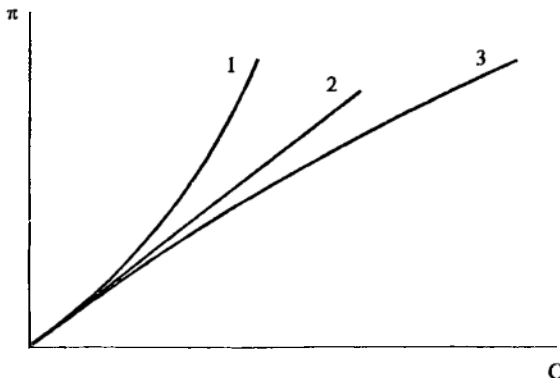


Рис. 1.8. Залежність осмотичного тиску від концентрації розчину ВМС:

1 – високомолекулярна речовина; 2 – низькомолекулярна речовина; 3 – слабкий електроліт

тим за інших однакових умов осмотичний тиск вище, і тим більше він відхиляється від значення, розривованого за формулою Вант-Гоффа (1.24). На підставі таких уявлень для опису залежності осмотичного тиску від концентрації полімерів було запропоновано вираз

$$\pi = \frac{CRT}{M} + BC^2 \quad \text{або} \quad \frac{\pi}{C} = \frac{RT}{M} + BC, \quad (1.25)$$

де C – концентрація; M – відносна молекулярна маса полімеру; B – коефіцієнт, що характеризує відхилення від формули Вант-Гоффа. У такому вигляді вираз (1.25) є рівнянням прямої, за допомогою якої графічним шляхом можна легко знайти відносну молекулярну масу полімеру.

Під осмотичним тиском розчину розуміють такий тиск, який спричиняли б молекули розчиненої речовини в тому разі, якби вони в газоподібному середовищі займали такий самий об'єм, як і сам розчин.

У медицині осмотичний тиск виражають або в міліметрах ртутного стовпчика, або в атмосферах ($1 \text{ атм} = 1,01325 \cdot 10^5 \text{ Па}$). Теоретично одномолярний водний розчин недисоціюючої речовини, наприклад глюкози, повинен мати осмотичний тиск 22,4 атм (2262 кПа) (у порівнянні з чистою водою). Осмотичний тиск розчину, що містить декілька компонентів, пропорційний загальній концентрації всіх його часток. Так, 0,5-молярний розчин NaCl за повної дисоціації цієї речовини при $t = 17^\circ \text{C}$ створює осмотичний тиск 24 атм. Оскільки до складу біологічних рідин завжди входить декілька компонентів, їх осмотично активну концентрацію (осмолярність) виражають у осмоль/л. У нормі осмолярність крові становить близько 300 мосмоль/л.

Явище осмосу й зумовлений ним осмотичний тиск відіграють велику роль у життєдіяльності окремих клітин і організму в цілому. Якщо рослинну клітину перенести в концентрований розчин речовини, молярна концентрація якої буде вища за концентрацію розчинених речовин у клітині, то спостерігається осмотичне витікання води з клітини в оточуючий її зовнішній розчин (екзоосмос). Клітина зменшується в об'ємі. Це явище називається **плазмолізмом**. Якщо плазмолізовану клітину помістити знову в розчин звичайної для неї концентрації або в дистильовану воду, клітина, завдяки осмотичному всмоктуванню розчинника, збільшує свій об'єм, повертаючись у початковий стан. Плазмоліз є оборотним процесом.

Якщо нормальну рослинну клітину помістити в розчин, концентрація якого буде нижча, ніж концентрація розчинених речовин у самій клітині, або просто в дистильовану воду, то під впливом більш високого осмотичного тиску всередині клітини відбувається осмотичне всмоктування води в клітину (ендоосмос). Об'єм клітини при цьому збільшується, розтягуючи стінки целюлозної оболонки; клітина в цих умовах знаходиться в стані напруження. Стан осмотичного напруження клітини, зумовлений підвищеним осмотичним тиском, називається **тургором**.

Клітини залишатимуться незмінними, якщо їх помістити в середовище, осмотичний тиск якого однаковий із внутрішньоклітинним осмотичним тиском. Усі згадані осмотичні процеси мають місце також для тваринних тканин і клітин.

Розчини, осмотичний тиск яких однаковий з осмотичним тиском клітини, називаються **ізотонічними**, а такі, молярна концентрація яких і відповідно осмотичний тиск вищі, ніж усередині клітин і тканин, називаються **гіпертонічними**. Розчини, молярна концентрація і відповідно осмотичний тиск яких нижчі, ніж у клітинах і тканинах, називаються **гіпотонічними**.

Нормальні рослинні клітини завжди тургоризовані. Іншими словами, концентрація розчинених речовин клітини вища за концентрацію розчинених речовин в оточуючому середовищі. Тургор рослинних клітин є необхідною умовою для росту та нормальної життєдіяльності. У рослинах спостерігається значний осмотичний тиск, який досягає 0,5-2,0 МПа. Особливо високий він у точках росту. Так, у клітин вузлів стебла зернових він досягає 5 МПа. Коріння також має більш високий осмотичний тиск, ніж ґрунтовий розчин, звідки воно всмоктує воду й поживні речовини.

Осмотичний тиск крові людини становить $7,7 \cdot 10^5$, $8,0 \cdot 10^5$ Па, але різниця між осмотичними тисками крові й лімфи, яка визначає перерозподіл води між ними, дорівнює тільки $(0,3-0,4) \cdot 10^5$ Па. Еритроцити діють як осмометри: при зменшенні об'єму з втратою води зростає густина еритроцитів, і навпаки, поглинаючи воду, об'єм їх збільшується, а концентрація речовин знижується.

Існують прямі й непрямі методи вимірювання осмотичного тиску. Його можна визначати за допомогою двох основних прямих методів: статичного та динамічного.

Статичний метод ґрунтується на тому, що осмотичний тиск розчину врівноважується тиском стовпця рідини, що виникає в результаті проникнення розчинника в розчин.

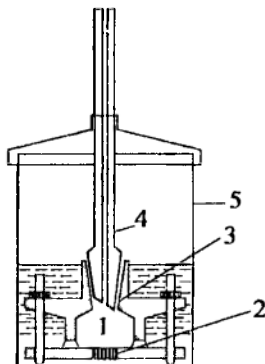


Рис. 1.9. Осмометр для визначення осмотичного тиску статичним методом

Осмометр (рис. 1.9) складається з осмотичної комірки 1 (об'ємом 10 мл) зі скла або хромованої латуні. Осмотичну комірку 1 заповнюють досліджуванним розчином. Комірка приєднується за допомогою гвинтів до пластинки 2, у середині якої є отвори діаметром 1 мм. Нижня її частина щільно притискує мембрану до пластинки-сітки, товщина якої має бути не більше 0,5 мм. Розчин наливається в комірку через верхній отвір 3, куди для визначення тиску вставляється пришліфований градуйований капіляр 4 діаметром 1 мм і довжиною 50 см. Нижня пришліфована частина капіляра входить у камеру на 0,5-1 мм для запобігання від проникнення пухирців повітря під час заповнення. Камера з розчином вставляється в циліндр 5, заповнений чистим розчинником. Циліндр закривається пришліфованою кришкою для запобігання випаровуванню розчинника. При вимірюванні осмотичного тиску осмометр розміщують у термостат.

Динамічний метод ґрунтується на тому, що осмотичний тиск компенсується дією на розчин перемінним протитиском. Осмотичний тиск визначається на основі вимірювання швидкості проникнення розчинника через мембрану. Перевага динамічного методу полягає у швидкості вимірювань.

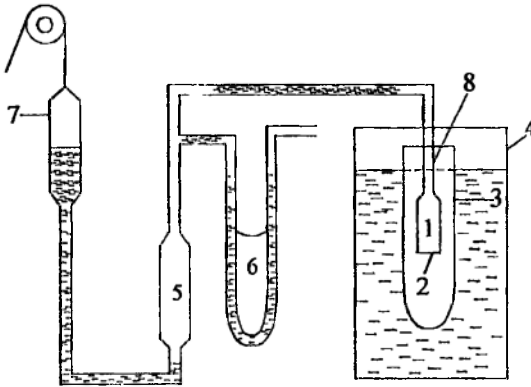


Рис. 1.10. Осмометр для визначення осмотичного тиску динамічним методом

На рис. 1.10 зображено компенсаційний осмометр О.В.Думанського. Нижня частина осмотичної комірки 1, яка закрита мембраною 2, з'єднується з аспіратором 5 і манометром 6. Комірку 1 і циліндр 3 поміщають у термостат 4. Осмотична комірка 1 з'єднана з аспіратором 5 і манометром 6. Підняттям верхньої частини 7 аспілятора 5 регулюється зовнішній тиск p таким чином, щоб він був більше або менше осмотичного тиску. За надлишкового

зовнішнього тиску меніск у капілярі 8 опускається вниз зі швидкістю v_1 , пропорційною надлишковому тиску $p_1 - \pi$. Якщо зовнішній тиск знижений – меніск піднімається зі швидкістю v_2 , пропорційно різниці $\pi - p_2$. Тоді співвідношення швидкостей переміщення розчинника по капіляру v_1 / v_2 дорівнює відношенню різниць тисків, що зумовлюють підняття або опускання меніска в капілярі, тобто

$$\frac{v_1}{v_2} = \frac{p_1 - \pi}{\pi - p_2},$$

звідси

$$\pi = \frac{v_1 p_2 + v_2 p_1}{v_1 + v_2}. \quad (1.26)$$

Осмотичний тиск даного розчину може експериментально визначатися за зниженням температури замерзання або за підвищенням температури кипіння розчину. Це непрямі методи визначення осмотичного тиску. Передбачаючи рівність молярної m і молярної концентрації C ($m = C$) для розбавлених розчинів, зміна температури ΔT замерзання чи кипіння розчину записується таким чином:

$$\Delta T = Km = K \cdot C, \quad (1.27)$$

де K – коефіцієнт пропорційності. Підставивши у формулу (1.23) значення C із виразу (1.27), отримуємо осмотичний тиск через величину ΔT , яку визначають експериментально:

$$\pi = 10^3 \cdot \frac{RT\Delta T}{K}. \quad (1.28)$$

Лабораторна робота 1 **Визначення осмотичного** **тиску розчинів методом Барджера – Раста**

У даній роботі розглядається один із непрямих методів визначення осмотичного тиску, що базується на зниженні пружності пару розчину відносно чистого розчинника, а саме метод Барджера – Раста. За його допомогою можна виконувати вимірювання в дуже малих об'ємах рідини при звичайних температурах, що не змінюють властивостей біологічних. За методом Барджера – Раста осмотичний тиск досліджуваного розчину порівнюють з наперед відомою величиною осмотичного тиску контрольних розчинів.

Матеріали та прилади: мікроскоп Р-16, окуляр-мікрометр, скляні капіляри, предметне скельце, годинникове скельце, менделєєвська замазка, розчини хлористого натрію різної концентрації.

Хід роботи: Готують набір контрольних розчинів хлористого натрію таких концентрацій, які дозволяють визначати осмотичний тиск більшості біологічних рідин безхребетних, холоднокровних і теплокровних хребетних. Заздалегідь запасають скляні капіляри діаметром 1 мм і довжиною 6-7 см.

Досліджуваний і один із контрольних розчинів наливають на годинникові скельця. Далі занурюють капіляр у досліджуваний розчин і дають рідині піднятися по ньому до середини, потім перевертають капіляр, опускаючи рідину до його другого кінця. Коли між меніском і краєм капіляра залишається проміжок у декілька міліметрів, занурюють капіляр у контрольний розчин з відомою концентрацією NaCl. Останній піднімається по ньому так, що пухирець повітря буде приблизно на його середині. Кінці капіляра швидко витирають ватою і закривають з обох кінців менделєєвською замазкою, яку упродовж усього часу роботи підігрівають на полум'ї газового пальника.

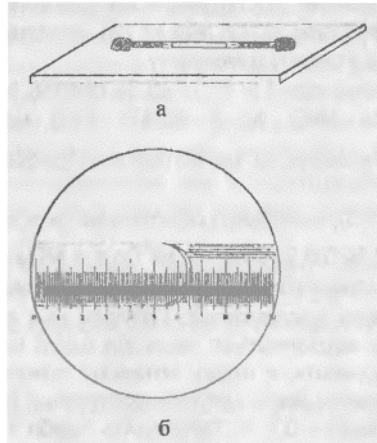


Рис. 1.11. Метод Барджера – Раства:
 а – вигляд капіляра на предметному склі;
 б – вигляд меніска на фоні шкали окуляр-мікрометра

Капіляр розміщують на предметне скельце, до якого його прикріплюють краплиною замазки (рис. 1.11). Кладуть скельце з капіляром у поле мікроскопа, де є окуляр-мікрометр (збільшення: окуляр 7х, об'єктив 8х), наводять фокус на один або на обидва меніски, якщо пухирець повітря такий маленький, що цілком

уміщується в полі зору. Спостерігають за рухом меніска. На поверхні того розчину, осмотичний тиск якого менший, а пружність пари відповідно більша, вода випаровується. Одночасно пара конденсується на поверхні розчину з більш високим осмотичним тиском і більш низькою пружністю пари. Через це об'єм першої з двох краплин зменшується, тоді як об'єм другої збільшується.

У результаті меніск рухається в бік розчину з меншою концентрацією.

Для визначення концентрації та осмотичного тиску досліджуваного розчину інші капіляри заповнюють, як було описано вище, досліджуваним і контрольним розчином з відомими концентраціями NaCl. Послідовно порівнюють досліджуваний розчин з рядом контрольних і знаходять такий контрольний розчин, при якому об'єми обох краплин залишаються без змін, тобто меніски не рухаються. У цьому випадку концентрація та осмотичний тиск досліджуваного й контрольного розчинів рівні між собою.

Для зручності роботи слід спостерігати в усіх пробах меніск або контрольного, або досліджуваного розчинів і розміщувати даний розчин на предметний столик завжди з одного й того самого боку.

Визначивши концентрацію досліджуваного розчину, розраховують його осмотичний тиск за формулою (1.23) або (1.24), попередньо перерахувавши процентну концентрацію розчину в молярну.

Приклад. Нехай маємо при $t = 17^\circ \text{C}$ 6 % розчин NaCl (60 г NaCl у 1 л розчину). Атомна маса NaCl $M = 58,47$. Тоді молярна концентрація $C = \frac{60\text{г}}{58,47} = 1,026 \frac{\text{моль}}{\text{л}}$. Ураховуючи, що ізотонічний коефіцієнт i для 1 моля роз-

чину NaCl $i = 1,62$ (табл. 1.3), знаходимо осмотичний тиск за формулою (1.24):

$$\pi = 10^3 \cdot 1,62 \cdot 1,026 \cdot 8,31 \cdot 290 = 4 \cdot 10^6 \text{Па} = 4 \text{ МПа} (39,5 \text{ атм}).$$

Завдання 1. Визначення концентрації невідомого розчину

Отримують розчин для дослідження. Готують ряд контрольних розчинів NaCl, концентрація яких відрізняється одна від одної на 0,5 %. За методом Барджера – Раства визначають, в якому інтервалі лежить концентрація невідомого розчину. Знайшовши його, готують контрольні розчини, що відрізняються один від одного вже на 0,1 %. Проводять проби з новим набором контрольних розчинів і точно визначають концентрацію невідомого розчину. Дані експерименту оформляють у вигляді таблиці (див. табл. 1.2).

Таблиця 1.2

Контрольний розчин	Досліджуваний розчин	Напрямок руху меніска
0,5% NaCl	X	←
0,6% NaCl	X	←
0,7% NaCl	X	0
0,8% NaCl	X	→

Завдання 2. Визначення осмотичного тиску біологічної рідини

Отримують від викладача біологічну рідину. Готують контрольні розчини NaCl у діапазоні концентрацій від 0,5 до 1,3 % з інтервалом 0,1 %. Після визначення концентрації досліджуваної рідини описаним вище способом розраховують її осмотичний тиск за формулою (1.24).

Лабораторна робота 2
Плазмолітичний метод визначення
осмотичного тиску клітинного соку

Найпростіший метод визначення осмотичного тиску клітинного соку – плазмолітичний. Відомо, що плазмоліз спричиняють тільки гіпертонічні розчини, тоді як у ізо- і гіпотонічних розчинах плазмоліз не спостерігається.

Для визначення осмотичного тиску клітинного соку плазмолітичним методом зрізи тканини, які досліджуються, занурюють у ряд розчинів відомої концентрації. Як плазмолітик використовують сахарозу або розчини хлористого натрію. Підбирають такий розчин, який викликає початковий плазмоліз не менше ніж у 50 % клітин зануреного в розчин шматочка досліджуваної тканини.

Ізотонічним розчином буде такий, який знаходиться між розчином, що викликає 50 % плазмоліз і менш концентрованим, що не викликає плазмоліз. Тоді концентрація ізотонічного розчину визначається (з відомою часткою похибки) як середнє арифметичне між концентраціями вказаних розчинів. Визначивши концентрацію ізотонічного розчину, осмотичний тиск розраховується за формулою (1.24).

Для неелектролітів (наприклад, для сахарози) ізотонічний коефіцієнт $i = 1$. Для розчинів електролітів величина i залежить від числа іонів, на які розділяється молекула, і від ступеня дисоціації. Значення i для розчинів NaCl наведено в табл. 1.3.

Таблиця 1.3

Концентрація NaCl, моль/л	Ізотонічний коефіцієнт, i
1,00	1,62
0,80	1,64
0,70	1,66
0,60	1,68
0,50	1,70
0,40	1,73
0,30	1,75
0,20	1,78
0,10	1,83
0,01	1,93

Матеріали та прилади: 1) синя цибуля; 2) розчин NaCl або сахарози концентрацією 1 моль/л; 3) дистильована вода; 4) бюретки з лійками (2 шт.); 5) годинникове скло; 6) баночки для розчинів (7 шт.); 7) кришки для закривання баночок (7 шт.); 8) мікроскоп; 9) предметні та покривні скельця; 10) скальпель; 11) лезо бритви; 12) препарувальна голка; 13) пензлик; 14) скляна паличка; 15) стакан з кип'яченою водою; 16) шматочки фільтрувального паперу; 17) олівець для скла; 18) термометр кімнатний.

Хід роботи. Приготувати розчини NaCl або сахарози концентрацій, моль/л: 0,7; 0,6; 0,5; 0,4; 0,3; 0,2 і 0,1. Для приготування розчинів з такими концентраціями береться певний об'єм розчину речовини і він розбавляється певним об'ємом дистильованої води. Наприклад, для приготування 10 мл розчину 0,7 моль/л потрібно взяти 7 мл вихідного розчину і 3 мл води, для 0,6 моль/л – 6 мл вихідного розчину і 4 мл води і т. д. Ретельно перемішати розчини. Закрити баночки кришками для захисту від випарування.

Приготувати за допомогою леза 14 зрізів досліджуваної тканини, наприклад, шкірки синьої цибулі, і помістити їх у воду на годинникове скло (вода має бути кип'яченою, щоб не було пухирців повітря). При зануренні у воду видалається сік, що витікає з пошкоджених клітин, і досягається однаковий стан усіх зрізів. Через декілька хвилин витягнути зрізи пензликом з води, обсушити їх фільтрувальним папером і занурити по 2 зрізи в кожний розчин, починаючи із самого концентрованого. При цьому необхідно спостерігати за тим, щоб зрізи не плавали на поверхні, а були занурені в розчини (якщо зріз плаває, його слід "утопити" за допомогою препарувальної голки). Через 20-30 хв розглянути зрізи в мікроскоп у краплині відповідного розчину в тій самій послідовності. Скляну паличку, якою наносилась крапля розчину, пензлик, скельця після кожного розчину необхідно промивати водою і витирати фільтрувальним папером. Результати дослідів оформити, заповнюючи табл. 1.4.

Таблиця 1.4

Концентрація розчину, моль/л	0,7	0,6	0,5	0,4	0,3	0,2	0,1
Ступінь плазмолізу							
Малюнок клітини							

У другому рядку зазначити, в якому стані знаходяться більшість клітин зрізу, у третьому схематично замалювати одну клітину, характерну для даного зрізу.

Знайти ізотонічну концентрацію та розрахувати осмотичний тиск клітинного соку за формулою (1.24). Зробити висновки про зв'язок між концентрацією зовнішнього розчину та ступенем плазмолізу клітин.

Рекомендована література

- Хмельницький Р.А. Физическая и коллоидная химия. — М., 1988.
- Усков И.А., Еременко Б.В., Пелишенко С.С., Нижник В.В. Коллоидная химия. — К., 1988. — С. 49-52.
- Рейвн П., Эверт Р., Айкхорн С. Современная ботаника: В 2 т. — М., 1990.
- Словарь физиологических терминов / Под ред. О.Г.Газенко. — М., 1987.
- Физиология человека: В 4 т. / Под ред. Р.Шмидта и Г.Тевса. — М. 1986. — С. 207-210.

Робота 4. Гель-хроматографія

Розділити суміш сполук згідно з молекулярними масами останніх можна методами дробного діалізу, ультрафільтрації та ультрацентрифугування. Деякі з цих методів потребують багато часу, малопродуктивні, для інших необхідне спеціальне обладнання. Відносно легко здійснити таке розділення за допомогою молекулярних сит, тобто гель-проникаючої хроматографії — це особливого виду розподільної хроматографії. Основа її достатньо проста (рис. 1.12).

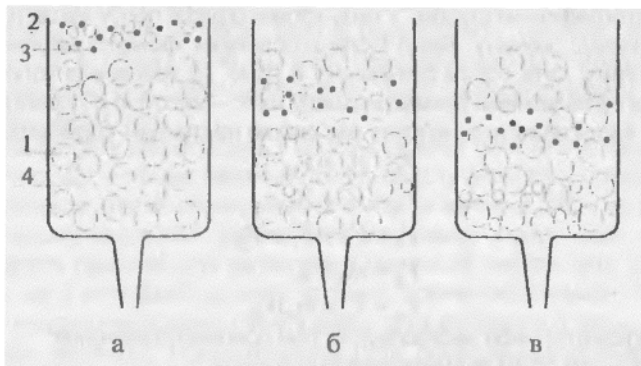


Рис. 1.12. Принцип розділення речовин за молекулярною масою в гель-хроматографії на прикладі суміші високомолекулярного голубого декстрану й низькомолекулярного хромату калію: 1 – гранули сефадексу; 2 – голубий декстран; 3 – хромат калію; 4 – простір між гранулами сефадексу, заповнений розчинником (буфером). а – вихідне положення; б – початкова стадія хроматографії, після нанесення суміші речовин; в – повне розділення речовин за допомогою гель-хроматографії (початок виходу з колонки високомолекулярної сполуки)

Гель утворює нерухому фазу, це – насичена рідиною (як правило, вода) хімічно інертна нерозчинна полімерна матриця. Та сама рідина служить рухомою фазою. У полімерній матриці є пори, розмір яких залежить від типу гелю. Сполуки, що аналізуються, можна розділити на групи відповідно до їх молекулярних розмірів: високомолекулярні сполуки, сполуки з меншою молекулярною масою та низькомолекулярні, наприклад, солі.

Розчин суміші сполук наносять у заповнену гелем колонку, та елюють чистим розчинником. Великі молекули не можуть проникнути в пори гелю. Вони проходять по колонці разом з потоком розчинника, обтікаючи частинки гелю, у зовнішньому об'ємі. Малі молекули дифундують у пори гелю, рівномірно розподіляються в рідкій фазі як зовні, так і всередині гелю. Молекули, які знаходяться всередині нерухомої фази, елюються значно повільніше при пропусканні через шар гелю такого об'єму розчинника, який приблизно дорівнює об'єму шару гелю. Молекули середніх розмірів лише частково дифундують усередину гелю і концентрація їх у гелі менша за концентрацію малих молекул. Тому сполуки середнього розміру елюються пізніше високомолекулярних і раніше низькомолекулярних компонентів. Таким чином, сполуки виходять з колонки, заповненої гелем, у порядку, що відповідає зменшенню їх молекулярних мас.

Хроматографічна колонка – це трубка зі скла чи іншого матеріалу, заповнена хроматографічним шаром. У гель-хроматографії пробу вводять у колонку завжди у вигляді розчину. Якщо після заповнення хроматографічної колонки суспензією гелю дати осісти розчиннику й гелю, то заповнена колонка характеризується залишковими розмірами шару гелю – висотою h і діаметром d .

Указані характеристики зв'язані між собою наступним співвідношенням:

$$\begin{aligned} V_t &= V_o + V_x, \\ V_x &= V_i + V_g, \\ V_t &= V_o + V_i + V_g, \\ V_g &= m_g W_R, \\ V_i &= V_x - m_g W_R. \end{aligned} \quad (1.29)$$

У гель-хроматографії застосовують такі основні позначення:

V_t – загальний об'єм хроматографічного шару;

V_o – зовнішній об'єм або виключений об'єм, вільний об'єм, затриманий об'єм, мертвий об'єм (тобто об'єм рідини (води), що заповнює простір між набухлими частинками гелю);

V_x – об'єм набухлого гелю в хроматографічному шарі;

V_i – внутрішній об'єм (та частина об'єму гелю, який заповнений рідиною);

V_g – гідратаційний об'єм (об'єм води, яка міцно зв'язана з гелем, ця вода не може виконувати функцію розчинника);

V_g – об'єм матриці гелю;

m_g – маса матриці гелю в шарі;

W_R – водомісткість гелю (здатність його утримувати воду), мл/г.

Загальний об'єм шару V_t розраховується за формулою об'єму циліндра, якщо відомий внутрішній діаметр і довжина колонки. Оскільки об'єм пропорційний квадрату діаметра, то останній необхідно визначити якомога точніше. V_t більш точно можна визначити, якщо заповнити колонку водою і ретельно виміряти об'єм води. Вільний об'єм V_o можна визначити експериментально за допомогою хроматографії високомолекулярної сполуки, яка не може проникнути всередину частинок гелю. Не утримані гелем сполуки, як правило, елюються у вигляді чітких зон. Для такого визначення придатний, наприклад, синій декстран 200 ($M = 2 \cdot 10^6$ Да). Величину V_t розраховують за (1.29), а величину W_R , як правило, указує фірма, що виробляє гелі.

Матеріали та прилади: спектрофотометр, хроматографічна колонка, мірний циліндр на 200 мл, секундомір, розчини суміші голубого декстрану і хромату калію, білка, АТФ.

Методика. Заповнення колонки – одна з найважливіших операцій у гелі-хроматографії, оскільки саме вона визначає в першу чергу якість розділення. Колонку заповнюють суспензією набухлого стабілізованого гелю. За оптимальної густини цієї суспензії об'єм світлої рідини після осідання гелю становить близько 50 % об'єму гелю, що зсів. Надлишок рідини декантують. Гель обережно перемішують і при пониженому тиску (використовують водоструминний насос) дегазують.

Порожню колонку закріплюють у вертикальному положенні, вивідну трубку і донну частину колонки заповнюють на висоту до 6 см дегазованим буферним розчином, потім перекривають вивід із колонки. Під підтримуючим шаром при цьому не повинно залишатися бульбашок повітря. Далі над колонкою розміщують пристрій для заповнення (зручніше використати трубку того ж діаметра, що й внутрішній діаметр колонки, довжиною близько 2/3 довжини колонки чи подовжену конічну лійку з діаметром вивідного отвору, що дорівнює діаметру колонки). Приготовлений гель обережно перемішують, щоб одержати однорідну суспензію, і обережно виливають у трубку чи лійку. Після введення у колонку всієї суспензії, деякий час чекають, слідкуючи за осіданням гелю. Коли висота шару, що зсів, досягне приблизно 5 см (через 5-10 хв), відкривають вивідний отвір колонки і пропускають через неї потік розчинника. Швидкість витікання розчинника з колонки має бути менша, ніж швидкість потоку при хроматографуванні. При заповненні колонок "твердими" гелями труднощів не виникає. Одержати рівномірний однорідний шар "м'якого" гелю складніше. Після того, як весь гель осяде, пристрій для запов-

нення знімають з колонки і промивають хроматографічний шар з метою його стабілізації таким об'ємом розчинника, який принаймні дорівнює об'єму шару.

Перевірка правильності заповнення колонки і визначення V_0 .

Правильність заповнення колонки найкраще перевірити, хроматографуючи на ній які-небудь зафарбовані сполуки. З цією метою, наприклад, зручно використовувати синій декстран 200 ($M = 2 \cdot 10^6$ Да), високомолекулярний декстран з хімічно зв'язаним синім хромофором. Цим способом можна в ході одного досліду перевірити якість заповненої колонки й визначити вільний об'єм V_0 . Для цього в колонку вводять 0,2 % розчин синього декстрану 200 (1/100 об'єму шару). Іонна сила елюенту має бути не менше 0,02. Правильне заповнення колонки є важливою умовою ефективного розділення. Якщо під час пробного хроматографування з використанням синього декстрану спостерігають незадовільну форму зони, це означає, що колонку заповнено не вірно, тому необхідне повторне її заповнення.

Завдання 1

1) За правильної форми хроматографічної зони визначити виключений об'єм колонки V_0 як об'єм елюату, що витікає до моменту появи піка синього декстрану. Якщо використовуються "тверді" сефадекси, то на їхній матриці іноді відбувається часткова адсорбція синього декстрану. Адсорбований синій декстран можна елювати з колонки невеликими об'ємами розчину альбуміну.

2) Визначити об'єм рідини, в якій знаходиться синій декстран.

3) Визначити об'єм рідини між двома речовинами (синьою та жовтою).

4) Визначити об'єм рідини, в якому знаходиться жовта речовина (хромат капію).

5) Визначити час, необхідний для розділення речовин.

Завдання 2

Використовуючи одержані параметри роботи колонки, провести розділення безбарвних речовин, визначених викладачем (наприклад, білка і нуклеотиду).

Зняти спектри поглинання суміші речовин до розділення і після хроматографування.

Рекомендована література

Лабораторное руководство по хроматографическим и смежным методам
/ Под ред. О.Микеш. — М., 1982.

Фрайфелдер Д. Физическая биохимия. — М., 1980.

Робота 5. Дифузія та хаотичний рух молекул у розчині

При русі частинок, зокрема біомакромолекул, у розчині виникає сила тертя

$$F_c = -fv, \quad (1.30)$$

де f – коефіцієнт внутрішнього тертя (фрикційний коефіцієнт); v – швидкість руху. Фрикційний коефіцієнт f залежить від розмірів і форми біомакромолекул, зокрема для сферичних макромолекул радіусом r за формулою Стокса

$$f = 6\pi\eta r, \quad (1.31)$$

де η – в'язкість розчину.

На характер руху біомакромолекул у розчині значною мірою впливають зіткнення з молекулами розчинника, що зумовлено їх тепловим рухом. За повної хаотичності молекулярних рухів можна чекати, що кількість ударів на великі за розміром частинки з одного боку має дорівнювати числу ударів з протилежного, а отже, частинка повинна залишатись нерухомою. Але якщо маємо справу з мікроскопічними частинками, розмір яких наближається до розміру біомакромолекул, то загальна кількість ударів з боку молекул розчинника буде невеликою, тобто перевага числа ударів то з одного, то з іншого боку стане помітною. Завдяки таким флуктуаціям створюється хаотичний рух макромолекул. Простежити хаотичний рух макромолекул неможливо, враховуючи дуже малий їх розмір. Але можна легко спостерігати в оптичному мікроскопі хаотичний рух частинок мікронного розміру (наприклад, частинок пилу чи туші у воді) відомий як **броунівський рух**. Отже, броунівський рух пояснюється тим, що завдяки випадковій неоднаковості числа ударів по частинці з різних напрямків виникає деяка рівнодіюча сила певного напрямку. Оскільки флуктуації відбуваються миттєво, то через короткий проміжок часу напрямок рівнодіючої змінюється, а з нею змінюється і напрямок зміщення частинки.

Під зміщенням частинки розуміють прямолінійний відрізок, який з'єднує точки початкового й кінцевого моменту за вибраний проміжок часу τ , наприклад, 5 с (на рис. 1.13 відрізок між точками 1 і 2, між 2 і 3 тощо). Проекція зміщення Δx на горизонтальну вісь x носить назву горизонтального зміщення.

Середньоквадратичне зміщення $\overline{\Delta x^2}$ розраховується за формулою

$$\overline{\Delta x^2} = \frac{\Delta x_1^2 + \Delta x_2^2 + \dots + \Delta x_n^2}{n}, \quad (1.32)$$

де Δx – горизонтальні зміщення частинки за рівні проміжки часу τ ; n – кількість вимірів горизонтального зміщення. Кількісну теорію броунівського руху

вперше було розроблено Ейнштейном і, незалежно, Смолюховським. Зв'язок між $\overline{\Delta x^2}$ і фрикційним коефіцієнтом f виражається формулою Ейнштейна – Смолюховського:

$$\overline{\Delta x^2} = 2 \frac{kT\tau}{f}, \quad (1.33)$$

де k – стала Больцмана ($k = 1,38 \cdot 10^{-23}$ Дж·моль⁻¹·К⁻¹), T – температура в К.

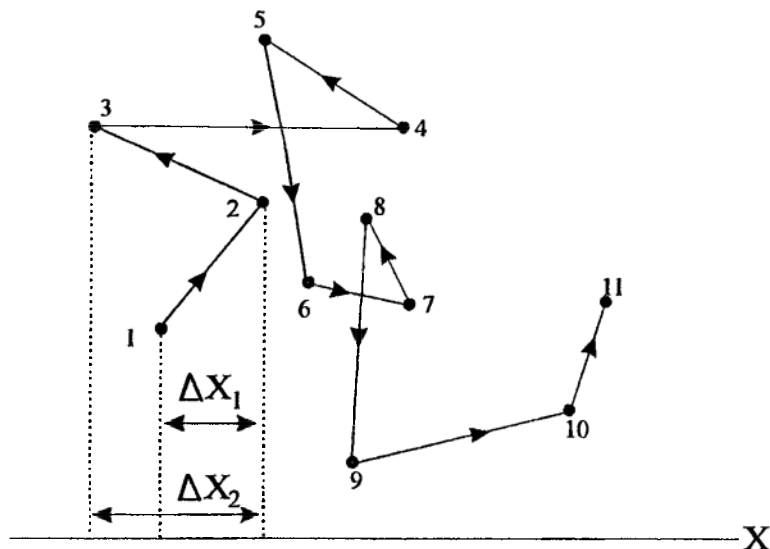


Рис. 1.13. Знаходження горизонтального зміщення частинки при броунівському русі

Існує певний зв'язок між хаотичним рухом і дифузією частинок (молекул) у розчині. На рис. 1.14 зображено трубку з площею поперечного перерізу A трубки, яка заповнена розчином. Виділимо умовно в цій трубці два об'єми розчину 1 і 2 із середніми концентраціями розчиненої речовини c_1 і c_2 ($c_1 > c_2$). У точці $x=0$ розчини з різними концентраціями розділяє перегородку П. Коли раптово зняти перегородку П, тоді зліва направо буде відбуватися дифузія молекул. Явище дифузії супроводжуватиметься хаотичним рухом молекул з середньоквадратичним зміщенням $\overline{\Delta x^2}$ за фіксований час τ . Унаслідок ха-

тичності руху зміщення будь-якої молекули розчиненої речовини вправо має таку саму вірогідність, як і зміщення вліво. За невеликий час τ молекула буде зміщуватись на відстань Δx зліва і справа, яка буде визначатися через середньоквадратичне зміщення і дорівнювати $\Delta x = \sqrt{\Delta x^2}$. Тоді кількість речовини, що переноситься вправо на межі поділу $x=0$, буде

$$m_1 = \frac{1}{2} c_1 \Delta x A,$$

а кількість речовини, яка переноситься вліво, –

$$m_2 = \frac{1}{2} c_2 \Delta x A,$$

де A – площа поперечного перерізу трубки.

Швидкість дифузії буде являти собою різницеве перенесення кількості речовини за одиницю часу внаслідок дифузії в напрямку x :

$$\frac{\Delta m}{\Delta t} = \frac{m_1 - m_2}{\tau} = \frac{1}{2} \frac{c_1 \Delta x A}{\tau} - \frac{1}{2} \frac{c_2 \Delta x A}{\tau} = \frac{1}{2} \frac{\Delta x A}{\tau} (c_1 - c_2). \quad (1.34)$$

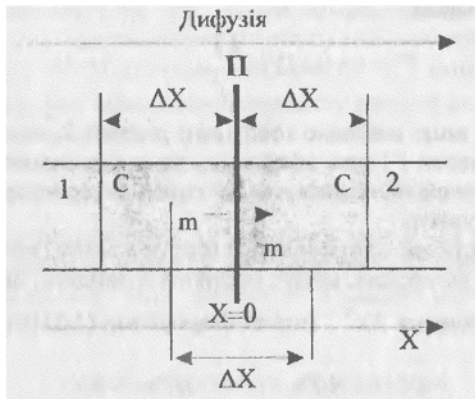


Рис. 1.14. Дифузія і хаотичний рух частинок на межі поділу ($x=0$) розчину; П – перегородка

Як видно з рис. 1.14, через певний період τ на межі поділу $x=0$ встановлюється середній градієнт концентрацій dc/dx

$$\frac{dc}{dx} = \frac{c_2 - c_1}{\Delta x}, \text{ або } c_1 - c_2 = -\Delta x \frac{dc}{dx}. \quad (1.35)$$

Підставимо вираз (1.35) у рівняння (1.34), а також використаємо $\Delta x = \sqrt{\Delta x^2}$. Тоді

$$\frac{\Delta m}{\Delta t} = -\frac{1}{2\tau} \overline{\Delta x^2} A \frac{dc}{dx}. \quad (1.36)$$

За формулою Фіка швидкість дифузії так записується:

$$\frac{\Delta m}{\Delta t} = -DA \frac{dc}{dx}, \quad (1.37)$$

де D – коефіцієнт дифузії.

Порівнявши рівняння (1.36) і (1.37), знаходимо коефіцієнт дифузії

$$D = \frac{\overline{\Delta x^2}}{2\tau} \quad (1.38)$$

Якщо підставити $\overline{\Delta x^2}$ (1.33) у вираз (1.38), то коефіцієнт дифузії D буде зв'язаний з f таким чином:

$$D = \frac{kT}{f} \quad (1.39)$$

Це означає, що якщо виміряно коефіцієнт дифузії D , то можна за формулою (1.39) розрахувати f і для сферичних частинок оцінити за формулою (1.31) радіус r частинки. Цей методичний підхід використовують для оцінки розміру біомакромолекул.

Для великих частинок, хаотичний рух (броунівський), яких можна спостерігати в оптичному мікроскопі, радіус частинки знаходять, вимірюючи середньоквадратичне зміщення $\overline{\Delta x^2}$. Тоді за формулами (1.31) і (1.33) радіус частинки буде такий:

$$r = \frac{kT\tau}{3\pi\eta\overline{\Delta x^2}} = \frac{RT\tau}{3\pi\eta\overline{\Delta x^2}N}, \quad (1.40)$$

де R – газова постійна, N – число Авогадро.

Лабораторна робота

Визначення розміру частинок туші та в'язкості розчину

Матеріали та прилади: мікроскоп з апаратом для малювання; об'єкт-мікромір; окуляр-мікромір; предметне та покрівне скельця; туш; міліметровий папір; розчини сахарози.

Завдання 1. Визначення середнього розміру частинок туші

Методика. Звичайну чорну туш розбавити водою у співвідношенні 1:20. Краплю суспензії нанести на предметне скельце, накрити покрівним скельцем так, щоб не було пухирців повітря. Розташувати препарат на предметному столику мікроскопу і знайти частинки туші. На столику за допомогою кнопок закріпити міліметровий папір. Вибрати одну з частинок і відмітити крапкою вихідне положення частинки. Відмітки робити через кожні 5 с. Для експерименту слід брати частинку, яка здійснює хаотичний рух у різних напрямках (якщо її рух має виражений напрямок, то результати досліду будуть помилковими). Далі потрібно знайти горизонтальні зміщення частинки Δx у метрах (рис. 1.13). Розрахувати середньоквадратичне зміщення $\overline{\Delta x^2}$ за формулою (1.32). Оскільки мікроскоп дає збільшення в 1000 разів, необхідно значення $\overline{\Delta x^2}$ помножити на 10^6 . Потім за формулою (1.40) розрахувати радіус частинок туші, підставивши у формулу значення кімнатної температури (y К), а також $R=8,31$ Дж·моль⁻¹·К⁻¹; $N=6,02 \cdot 10^{23}$ моль⁻¹ і в'язкість води $\eta=1,0057 \cdot 10^{-3}$ Па·с. Такі вимірювання провести ще для двох частинок і знайти середній розмір r_{cp} частинок туші.

Завдання 2. Визначення в'язкості розчину

Приготувати розчин сахарози у воді в концентраціях 20 і 40 %. Виміряти середньоквадратичне зміщення $\overline{\Delta x^2}$ частинок туші в цих розчинах. Використавши середній розмір r_{cp} частинок туші (завдання 1), знайти в'язкість даних розчинів (за формулою (1.40)) і визначити у скільки разів зростає в'язкість 40 % розчину сахарози, ніж 20 % розчину

Рекомендована література

- Воюцкий С.С. Курс коллоидной химии. – М., 1964.
Костюк П.Г., Зима В.Л., Магура І.С., Мірошніченко М.С., Шуба М.Ф. Біофізика. – К., 2001.

Задачі

1. Визначити іонну силу розчину, який містить 10^{-3} моль/л CaCl_2 і 10^{-3} моль/л KCl .
2. Розрахувати коефіцієнт дифузії сферичної макромолекули радіусом 1 нм у воді при 27°C (в'язкість води $\eta = 0,001 \text{ Н}\cdot\text{с}\cdot\text{м}^{-2}$).
3. Коефіцієнт дифузії глюкози при 20°C становить $4,6\cdot 10^{-10} \text{ м}^2\cdot\text{с}^{-1}$. За який час молекули глюкози продифундують на відстань 2 мкм?
4. Коефіцієнти дифузії міоглобіну та гемоглобіну у воді при 27°C становлять відповідно $0,113\cdot 10^{-9}$ і $0,069\cdot 10^{-9} \text{ м}^2\cdot\text{с}^{-1}$. Оцінити радіуси й молекулярні об'єми цих білків, узявши в'язкість води $\eta = 0,001 \text{ Н}\cdot\text{с}\cdot\text{м}^{-2}$.

Розділ 2

ТЕРМОДИНАМІКА ТА КІНЕТИКА БІОЛОГІЧНИХ ПРОЦЕСІВ

Робота 1. Стандартна вільна енергія і константа рівноваги хімічної реакції

Біологічні об'єкти підпорядковуються законам термодинаміки, тому це дозволяє оцінювати енергетичний баланс у системі, а також напрямок біологічних процесів. У біологічних об'єктах більшість хімічних реакцій протікає при постійних температурах і тисках, тому робота, яка виконується, визначається через зміну вільної енергії Гіббса (ΔG). Об'єднання першого та другого закону термодинаміки дозволяє визначити ΔG як

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S, \quad (2.1)$$

де ΔH – зміна ентальпії, ΔS – зміна ентропії, T – температура.

Вільна енергія має ряд важливих властивостей, які можна використовувати для характеристики хімічних перетворень у клітині. Якщо зміна вільної енергії для певної реакції від'ємна ($\Delta G < 0$), то така реакція перебігає довільно. У даному разі спостерігається виділення вільної енергії, і такий процес називається **екзергонічним**. Якщо перебіг реакції відбувається зі збільшенням вільної енергії ($\Delta G > 0$), тобто для її проходження необхідна додаткова енергія, то така реакція називається **ендергонічною**. У біологічних об'єктах, як правило, перебіг ендергонічних реакцій поєднаний у проміжних стадіях з екзергонічними реакціями.

За величиною зміни вільної енергії Гіббса можна визначити наближення реакції до стану рівноваги (у рівноважному стані $\Delta G=0$). Положення рівноважної термодинаміки застосовуються для вивчення хімічних перетворень. Нехай відбувається проста хімічна реакція типу



Вільна енергія G_A для речовини А залежить від концентрації [А] цієї речовини (за умови розбавленого розчину) за такою формулою:

$$G_A = G_A^0 + RT \ln[A], \quad (2.3)$$

де G_A^0 – стандартна вільна енергія речовини А, яка визначена за стандартних умов (концентрація $C = 1$ моль/л, тиск $p = 10^5$ Па (1 атм), $T = 298$ К; рН7). Тоді зміна вільної енергії ΔG для реакції (2.2) буде

$$\Delta G = G_C - (G_A + G_B) = G_C^0 + RT \ln [C] - (G_A^0 + RT \ln [A] + G_B^0 + RT \ln [B]) = (G_C^0 - G_A^0 - G_B^0) + RT \ln \frac{[C]}{[A][B]}.$$

Різниця стандартних вільних енергій продуктів реакції G_C^0 і початкових речовин G_A^0 і G_B^0 є зміна стандартної вільної енергії ΔG^0 усієї реакції (2.2). Тоді отримаємо такий вираз для зміни вільної енергії реакції (2.2):

$$\Delta G = \Delta G^0 + RT \ln \frac{[C]}{[A][B]}. \quad (2.4)$$

З часом хімічна реакція досягає стану рівноваги і $\Delta G = 0$. За цієї умови з виразу (2.4) визначається зміна стандартної вільної енергії:

$$\Delta G^0 = -RT \ln \frac{[C]_p}{[A]_p [B]_p}, \quad (2.5)$$

де $[A]_p$, $[B]_p$ і $[C]_p$ – концентрація речовин у стані рівноваги реакції (2.2). У хімічній кінетиці константа рівноваги K_p визначається таким співвідношенням:

$$K_p = \frac{[C]_p}{[A]_p [B]_p}. \quad (2.6)$$

Тоді зв'язок зміни стандартної вільної енергії ΔG^0 , з константою рівноваги K_p буде таким:

$$\Delta G^0 = -RT \ln K_p. \quad (2.7)$$

Це – формула Вант-Гоффа.

З даної формули видно: чим більша константа рівноваги, тим більше від'ємне значення стандартної вільної енергії. У табл. 2.1 наведено співвідношення між стандартною вільною енергією ΔG^0 та константою рівноваги K_p .

Таблиця 2.1

Зв'язок між K_p і ΔG^0 (Дж/моль)

K_p	ΔG^0 при 298 К	K_p	ΔG^0 при 298 К
0,001	17133	1,0	0
0,01	11422	10,0	-5711
0,1	5711	100,0	-11422
		1000,0	-17133

Якщо в реакції (2.2) у початковий момент є 1 моль/л речовини А і 1 моль/л речовини В, а $\Delta G^0 = -17133$ Дж/моль, тоді можна зробити висновок, що рівновага значно зміщена в напрямку утворення речовини С. Таким чином, у хімічних реакціях з великим від'ємним значенням ΔG^0 рівноважна концентрація продуктів реакції значно переважає концентрацію реагентів.

У даній роботі на прикладі однієї з простих реакцій наведено спосіб визначення константи рівноваги K_p і розрахунок за її величиною зміни стандартної вільної енергії ΔG^0 . Вибрано реакцію молочної кислоти $\text{CH}_3\text{—CH(OH)—COOH}$ ($\text{H}_2\text{Лакт}$) з тривалентним залізом Fe^{3+} , оскільки в результаті такої реакції утворюється забарвлений продукт, який просто реєструється на фотоколориметрі. Реакція записується так:



Константа рівноваги

$$K_p = \frac{[\text{Fe}(\text{HЛакт})_n^{3-n}] [\text{H}^+]^n}{[\text{Fe}^{3+}] [\text{H}_2\text{Лакт}]^n} \quad (2.9)$$

Щоб знайти K_p необхідно знати n , $[\text{H}^+]$, $[\text{Fe}(\text{HЛакт})_n^{3-n}]$, $[\text{Fe}^{3+}]$, $[\text{H}_2\text{Лакт}]$, тобто рівноважні концентрації вільної $\text{H}_2\text{Лакт}$, комплексу $\text{Fe}(\text{HЛакт})_n^{3-n}$, незакомплексованого заліза та координаційне число n .

Координаційне число n визначається, виходячи з константи нестійкості комплексу $\text{Fe}(\text{HЛакт})_n^{3-n}$, $K_{\text{нестойкості}}$

$$K_{\text{нестойкості}} = \frac{[\text{Fe}^{3+}] [\text{HЛакт}^-]^n}{[\text{Fe}(\text{HЛакт})_n^{3-n}]} \quad (2.10)$$

Далі логарифмуємо формулу (2.10)

$$\lg K_{\text{нестойкості}} = \lg \frac{[\text{Fe}^{3+}]}{[\text{Fe}(\text{HЛакт})_n^{3-n}]} + n \lg [\text{HЛакт}^-]$$

або

$$\lg \frac{[\text{Fe}^{3+}]}{[\text{Fe}(\text{HЛакт})_n^{3-n}]} = \lg K_{\text{нестойкості}} - n \lg [\text{HЛакт}^-] \quad (2.11)$$

Якщо на осі ординат відкласти $\lg \frac{[\text{Fe}(\text{HЛакт})_n^{3-n}]}{[\text{Fe}^{3+}]}$, а на осі абсцис – $\lg [\text{HЛакт}^-]$, тоді тангенс кута нахилу одержаної прямої при однаковому масштабі чисельно буде дорівнювати n . Концентрація речовин визначається за допомогою фотоколориметра або спектрофотометра.

Матеріали та прилади: фотоколориметр МКМФ-1 або спектрофотометр, розчини молочної кислоти і $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$.

Приготування буферного розчину, pH 2. Розчин № 1 – 0,1 н соляна кислота. Розчин № 2 – 7,507 г гліцину, 5,85 г хлориду натрію розчиняють у воді й доводять об'єм до 1 л. 519 мл розчину № 2 доводять до 1 л розчином № 1.

Методика роботи на фотоколориметрі МКМФ-1

Фотоколориметр вимірює оптичну густину D (або світлопропускання T) розчину відносно розчинника, оптична густина якого береться за нуль. Робочий діапазон вимірювання: за довжиною хвиль – від 400 до 720 нм; за оптичною густиною – від 0 до 1,8; за світлопропусканням – від 5 до 100 %. Прилад має оптичний і електронний блоки, які об'єднані загальним корпусом. Оптичну схему фотоколориметра МКМФ-1 наведено на рис. 2.1. Світловий потік від джерела світла 1 направляється конденсором 2 через світлофільтр 3. Колімаційну лінзу 4, кювети 5 або 6, захисне скельце 8 нв фотоелемент 9. Перед фотоелементом встановлено шторку-перемикач 7. На рис. 2.2 зображено конструкцію фотоколориметра МКМФ-1.

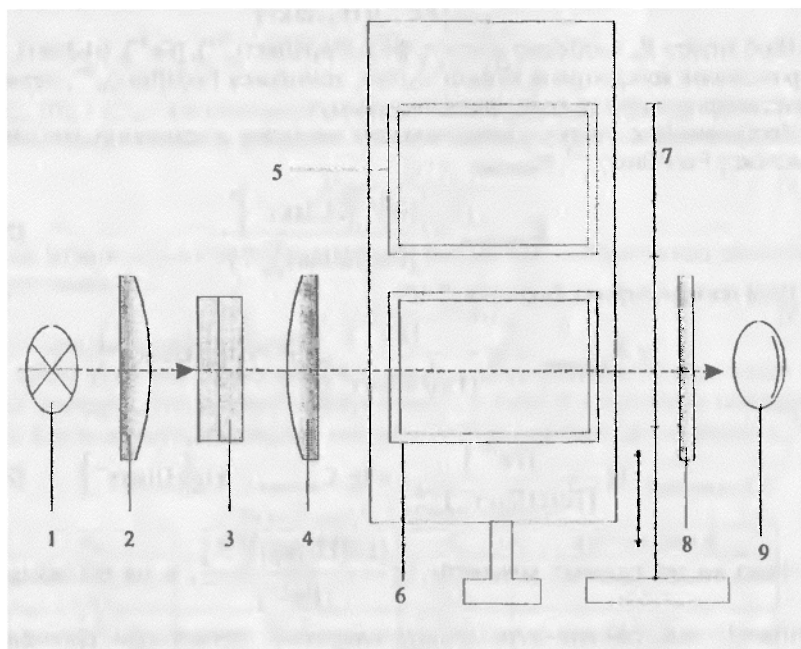


Рис. 2.1. Оптична схема фотоколориметра МКМФ-1 (позначення в тексті)

Порядок роботи на приладі

1. Увімкнути фотоколориметр перемикачем мережі 3. При цьому засвітиться світловипромінювальний діод 2. Прогріти прилад 1 год.

Розмістити в утримувачі 7 робочий світлофільтр (рис. 2.2). Наповнити кювету дистильованою водою (або відповідним розчинником), розмістити кювету в кюветному відділенні 8 і зачинити кришку кюветного відділення.

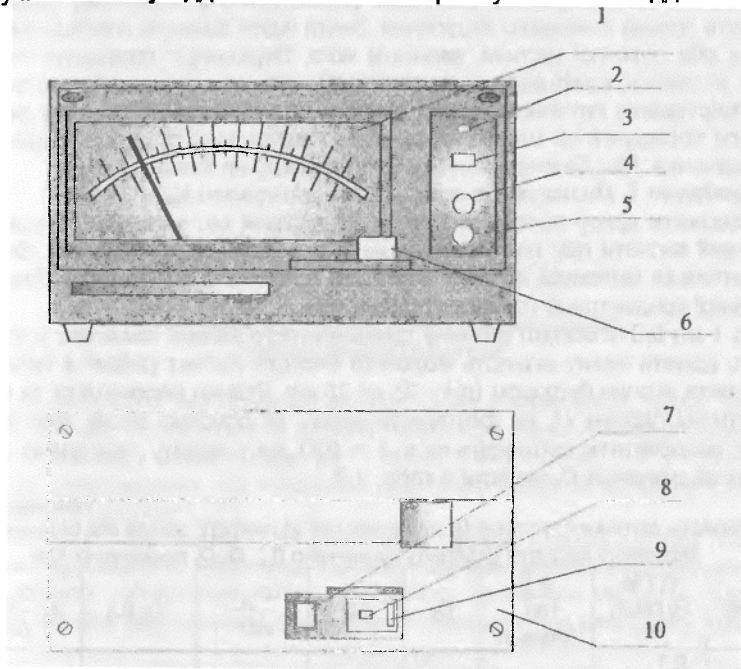


Рис. 2.2. Фотоколориметр МКМФ-1: 1 – мікроамперметр; 2 – світловипромінювальний діод; 3 – перемикач мережі; 4 – рукоятка установки нуля; 5 – рукоятка установки 100 % T ; 6 – світлозахисна кришка кюветного відділення; 7 – утримувач робочих світлофільтрів; 8 – кюветне відділення; 9 – утримувач контрольних світлофільтрів; 10 – кришка

2. Настроювання фотоколориметра. Обертанням рукоятки установки нуля 4 привести стрілку мікроамперметра 1 на нульову відмітку шкали коефіцієнта пропускання T так, щоб положення стрілки збіглося з її дзеркальним відображенням і зі штрихом відмітки. При цьому світловий потік необхідно перекрити шторкою або заглушкою світлового потоку. Потім відчинити шторку або зняти заглушку і обертаючи рукоятку установки 100 % T , добитися зміщення стрілки

мікроамперметра на відмітку "100" шкали коефіцієнта пропускання так, щоб положення стрілки збіглося з її дзеркальним відображенням і зі штрихом відмітки, яке відповідає нульовому значенню оптичної густини (або 100 % T).

3. Визначення коефіцієнта пропускання T або оптичної густини D досліджуваних розчинів. Відчинити кришку кюветного відділення, вилити воду, заповнити кювету досліджуваним розчином, розмістити її в кюветному відділенні й зачинити кришку кюветного відділення. Зняти відлік зі шкали коефіцієнта пропускання або оптичної густини, записати його. Періодично проводити перевірку 100 % за шкалою коефіцієнта пропускання або нуль за шкалою оптичної густини.

Вимірювання оптичної густини кожного досліджуваного розчину рекомендується проводити не менше трьох разів і вираховувати середнє арифметичне значення. Час безперервної роботи приладу не більше 8 год.

Завдання 1. Визначення константи рівноваги K_p

Одержати криву залежності оптичної густини від загальної концентрації молочної кислоти при постійній концентрації Fe^{+3} і постійному pH. Загальна концентрація молочної кислоти має бути приблизно у 100 разів більша від загальної концентрації тривалентного заліза.

До 1 мл 0,012 моль/л розчину тривалентного заліза, налитого в колбу на 25 мл, додати певну кількість молочної кислоти $\text{H}_2\text{Лакт}$ (згідно з табл. 2.2) і розбавити розчин буфером (pH = 2) до 25 мл. Розчин перемішати та виміряти оптичну густину D_x на фотоколориметрі, як описано вище. Для вимірювання використати світлофільтр з $\lambda = 520$ нм і кювету товщиною 20 мм. Отримані значення D_x занести в табл. 2.2.

Таблиця 2.2

Залежність оптичної густини D_x розчинів (pH 2) лактату заліза від концентрації молочної кислоти ($[\text{H}_2\text{Лакт}]$ позначено $[L]$, D_0 - D_x позначено ΔD)

№	0,1 М $\text{H}_2\text{Лакт}$, мл	$\frac{[L]}{100}$, Моль/л	D_x	ΔD	$\frac{D_x}{\Delta D}$	$-\lg [L]$	$\lg \frac{D_x}{\Delta D}$
1	0,1						
2	0,5						
3	1,0						
4	2,0						
5	5,0						
6	6,0						
7	10,0						
8	15,0						
9	17,0						
10	20,0						

На базі даних табл. 2.2 побудувати графік залежності оптичної густини D від концентрації молочної кислоти $[\text{H}_2\text{Лакт}]/100$ (рис. 2.3).

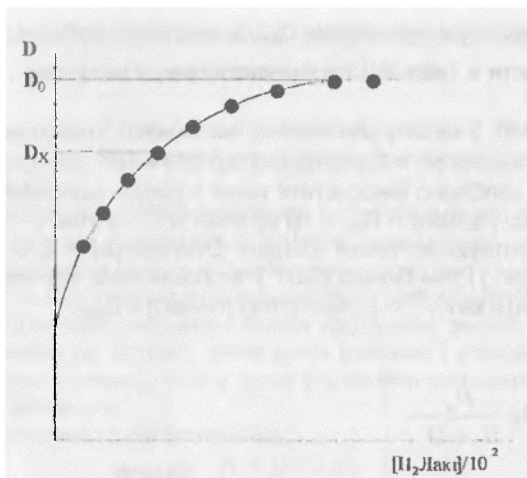


Рис. 2.3. Залежність оптичної густини D від концентрації молочної кислоти $[H_2Lact]/100$

З рисунка видно, що крива залежності D від концентрації H_2Lact досягає насичення і має горизонтальну ділянку. Наявність горизонтальної ділянки на кривій, отриманій у даних умовах ($pH = \text{const}$, $[Fe^{+3}] = \text{const}$, $[Fe^{+3}] \ll [H_2Lact]$), дозволяє стверджувати, що відбулося практично повне зв'язування іона Fe^{+3} у комплексі $[Fe(HLact)_n]^{3-n}$.

Оптичну густину розчину при досягненні горизонтальної ділянки позначити через D_0 , а оптичну густину за тієї або іншої концентрації H_2Lact , коли ще немає повного зв'язування заліза в комплекс, позначити через D_x . Оскільки оптична густина пропорційна концентрації забарвленого комплексу, тоді

$$\frac{D_x}{D_0 - D_x} = \frac{[Fe(HLact^-)_n]^{3-n}}{[Fe^{3+}]} \quad (2.12.)$$

Провести заміну у формулі (2.11), підставивши вираз (2.12.), де концентрації речовин виражені через оптичні густини.

Отримаємо такий вираз:

$$-\lg \frac{D_x}{D_0 - D_x} = \lg K_{\text{нескомп}} - n \lg [HLact^-] \quad (2.13.)$$

або

$$\lg \frac{D_x}{D_0 - D_x} = n \lg [HLact^-] - \lg K_{\text{нескомп}}$$

Далі за отриманими значеннями D_x і D_0 виконати необхідні обчислення, одержані дані занести в табл. 2.2 і побудувати графік залежності $\lg \frac{D_x}{D_0 - D_x}$ від $\lg [\text{H}_2\text{Лакт}]$ (рис. 2.4). З нахилу цієї лінійної залежності знаходимо величину n , де $n = \lg \alpha$. За значенням $\text{pH} = 2$ знаходимо, що $[\text{H}^+] = 10^{-2}$. Для розрахунку константи рівноваги K_p необхідно використати такий розподіл молочної кислоти в різних хімічних формах: $[\text{H}_2\text{Лакт}] = C_{\text{заг}} - n[\text{Fe}(\text{НЛакт})_n^{3-n} - [\text{НЛакт}] - [\text{Лакт}^2]$, де $C_{\text{заг}}$ – загальна концентрація молочної кислоти. Оскільки $\text{pH} = 2$, а $\text{H}_2\text{Лакт}$ – слабка кислота, то $[\text{НЛакт}]$ і тим більше $[\text{Лакт}^2]$ настільки малі, що ними можна знехтувати. Якщо $n[\text{Fe}(\text{НЛакт})_n^{3-n}] < [\text{H}_2\text{Лакт}]$, тоді $[\text{H}_2\text{Лакт}] \approx C_{\text{заг}}$.

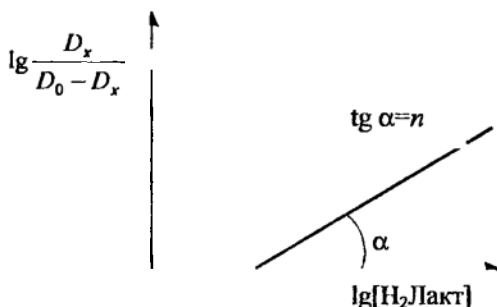


Рис. 2.4. Графічне знаходження координаційного числа n

Підставивши у формулу (2.9) відповідні значення, отримаємо

$$K_p = \frac{D_x [\text{H}^+]^{lg \alpha}}{(D_0 - D_x)(C_{\text{заг}})^{lg \alpha}} = \frac{D_x (10^{-2})^{lg \alpha}}{(D_0 - D_x)(C_{\text{заг}})^{lg \alpha}}, \quad (2.14.)$$

де $C_{\text{заг}}$ – загальна концентрація молочної кислоти для даної величини D_x .

Завдання 2. Визначення зміни стандартної вільної енергії за константою рівноваги

Визначити константу рівноваги лактатного комплексу заліза (завдання 1). Для розрахунку зміни стандартної вільної енергії використати формулу (2.7).

Рекомендована література

Костюк П.Г., Зима В.Л., Магура І.С., Мірошниченко М.С., Шуба М.Ф. Біофізика. – К., 2001.

Певзнер Л. Основы биоэнергетики. – М., 1977.

Робота 2. Кінетика гідролітичного розщеплення сахарози

Усі біологічні процеси проходять і розвиваються в часі. Важливою кількісною характеристикою для опису часових процесів є швидкість процесу або швидкість реакції.

Кінетика вивчає швидкості реакцій та їх залежності від різних факторів (температури, тиску, pH, концентрації речовин, активаторів, інгібіторів тощо). У теоретичному аспекті кінетика дозволяє визначити особливості протікання того чи іншого процесу, вивчити його механізм і передбачити направленість процесу. Цілеспрямовано змінюючи умови протікання реакції, дослідник може активно впливати на витрату початкових речовин і утворення проміжних та кінцевих продуктів реакції, тобто може управляти реакціями, що має важливе практичне значення.

Для простого хімічного перетворення



швидкість реакції v є швидкість накопичення за одиницю часу молекул продукту $\frac{d[P]}{dt}$. Кінетика базується на положенні Гульдберга і Вааге, згідно з

яким швидкість реакції пропорційна концентрації реагуючих речовин. Це положення визначає вплив концентрації реагуючих речовин на швидкість реакції і називається **основним законом кінетики**. Для хімічної реакції (2.15) швидкість реакції v відповідно до основного закону кінетики матиме такий вигляд:

$$v = \frac{d[P]}{dt} = k[A][B], \quad (2.16)$$

де k – стала або константа швидкості реакції.

Реакції класифікують за багатьма ознаками, але в першу чергу за молекулярністю і загальним (сумарним) порядком. **Молекулярність реакції** має безпосереднє відношення до механізму реакції та характеризується числом молекул, які беруть участь у елементарному акті хімічного перетворення. Молекулярність реакції може набувати тільки цілочисельних значень, тобто реакції можуть бути моно-, бі- та тримолекулярні. Реакції більшої молекулярності практично не зустрічаються, тому що ймовірність одночасного зіткнення чотирьох або більшої кількості молекул надзвичайно мала. Отже, якщо стехіометричні коефіцієнти в рівнянні реакції великі, то така реакція не буде елементарною, вона проходить у декілька стадій.

Порядок реакції визначають за більш формальною ознакою, ніж її молекулярність, а саме за видом рівняння, яке передає залежність швидкості реакції від концентрації реагуючих речовин. Загальний порядок реакції дорів-

ную сумі показників ступенів, в яких концентрації всіх початкових речовин входять у кінетичне рівняння. Реакції можуть бути нульового, першого, другого, третього та інших порядків. Рівняння (2.16) характеризує реакцію другого порядку, оскільки сума показників ступенів дорівнює 2.

У простому хімічному перетворенні коли $A \rightarrow P$, швидкість реакції залежить від концентрації в першому ступені

$$v = -\frac{d[A]}{dt} = k[A]. \quad (2.17)$$

Це – реакція першого порядку. Знак "мінус" свідчить про витрату речовини А.

Для знаходження сталих швидкостей реакцій, диференціальне рівняння (2.17) інтегрують. Для цього розподіляють у ньому змінні таким чином:

$$\frac{d[A]}{[A]} = -k dt. \quad (2.18)$$

Нехай у початковий момент часу $t = 0$ концентрація речовини А становить $[A]_0$. Після початку реакції відбувається витрата речовини А і на момент часу t вона досягає $[A]$. Використовуючи ці обмежувальні умови, проінтегруємо рівняння (2.18)

$$\int_{[A]_0}^{[A]} \frac{d[A]}{[A]} = -k \int_0^t dt \quad \text{і} \quad \ln[A] \Big|_{[A]_0}^{[A]} = -kt \Big|_0^t \quad (2.19)$$

Звідси

$$\ln[A] - \ln[A]_0 = -kt, \quad \text{або} \quad \ln \frac{[A]}{[A]_0} = -kt. \quad (2.20)$$

Тоді концентрація речовини А буде так змінюватись з часом:

$$[A] = [A]_0 e^{-kt}. \quad (2.21)$$

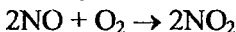
Якщо перейти до десяткових логарифмів, тоді з рівняння (2.20) стала швидкості реакції запишеться так:

$$k = \frac{2,303 \lg \frac{[A]_0}{[A]}}{t}. \quad (2.22)$$

Прикладами реакцій першого порядку є радіоактивний розпад, розклад деяких сполук (прості ефіри та інші), процеси ізомеризації. Велика кількість реакцій гідролізу, в яких бере участь розчинник, відносять до реакцій першого порядку. Прикладом може бути процес гідролізу сахарози з утворенням глюкози й фруктози, який проходить у розбавлених розчинах за каталітичної дії кислот.

Якщо швидкість реакції не залежить від концентрації, тобто $v = k$, тоді це – **реакція нульового порядку**. Наприклад, коли концентрація ферменту підтримується постійною, а концентрація субстрату настільки перевершує її, що фермент повністю "насичений" субстратом, ферментативна реакція перебігає з постійною максимальною швидкістю, яка не залежить від подальшого збільшення концентрації субстрату.

Слід відмітити, що тільки в деяких випадках порядок реакції та її молекулярність збігаються. Але якщо такий збіг і буває, то не виключена його випадковість. Тому перед тим як робити висновок про порядок і молекулярність реакції, необхідно провести ретельні дослідження. У складних процесах реакція певного порядку може складатися з декількох стадій різної молекулярності. Наприклад, на перший погляд реакція



є тримолекулярною, але насправді вона проходить у дві стадії



Таким чином, порядок реакції характеризує формально кінетичну залежність швидкості реакції від концентрації реагуючих речовин, а молекулярність – елементарний механізм окремих стадій більш складного процесу. Порядок і молекулярність збігаються тільки для простих за механізмом реакцій.

Швидкість хімічної реакції зростає з підвищенням температури. Найсуттєвішим фактором, який визначає характер впливу температури на швидкість реакції, є кінетична енергія реагентів. Добре відоме емпіричне **правило Вант-Гоффа**, згідно з яким при підвищенні температури на 10° швидкість реакції зростає у 2-3 рази. Відношення сталих швидкостей реакцій при двох температурах, які відрізняються на 10° , позначають Q_{10} і називають **температурним коефіцієнтом швидкості реакції**

$$Q_{10} = \frac{k_{(T+10)}}{k_T}. \quad (2.23)$$

Правило Вант-Гоффа наближене, оскільки температурний коефіцієнт Q_{10} змінюється разом зі зміною температури. Більш точну залежність швидкості реакції або константи швидкості від температури дає **рівняння Арреніуса**

$$k = A e^{-E_a / RT}, \quad (2.24)$$

де A – передескпоненціальний множник, який характеризує частоту зіткнень молекул; E_a – енергія активації; T – температура; R – універсальна газова стала. **Енергія активації E_a** – це той енергетичний потенціальний бар'єр, який молекули переборюють за взаємодії (рис. 2.5).

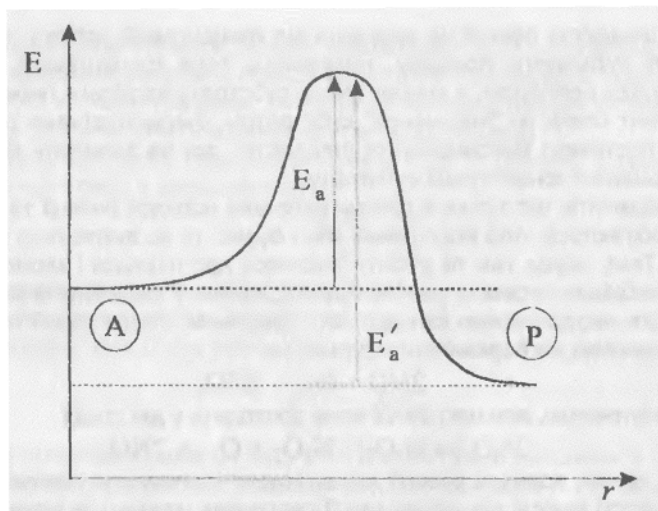


Рис. 2.5. Енергетична схема хімічного перетворення:

A – вільна енергія початкових речовин; P – вільна енергія продуктів реакції; E_a – енергія активації прямої реакції; E'_a – енергія активації зворотної реакції; r – координата реакції

Прологарифмувавши рівняння Арреніуса, отримуємо

$$\ln k = \ln A - \frac{E_a}{RT}. \quad (2.25)$$

З виразу (2.25) видно, що $\ln k$ (або $\ln v$) лінійно залежить від оберненої температури $\frac{1}{T}$. Якщо по осі ординат відкласти $\ln k$, а по осі абсцис – $1/T$, це буде графічне зображення експериментальних даних у координатах Арреніуса (рис. 2.6). З нахилу лінії легко визнається енергія активації E_a .

З графіка (рис. 2.6) знаходимо

$$\operatorname{tg} \alpha = \frac{\ln k_1 - \ln k_2}{\frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_2}} = -\frac{E_a}{R}; \quad E_a = -R \operatorname{tg} \alpha; \quad E_a = R \frac{T_1 T_2 (\ln k_1 - \ln k_2)}{T_1 - T_2}. \quad (2.26)$$

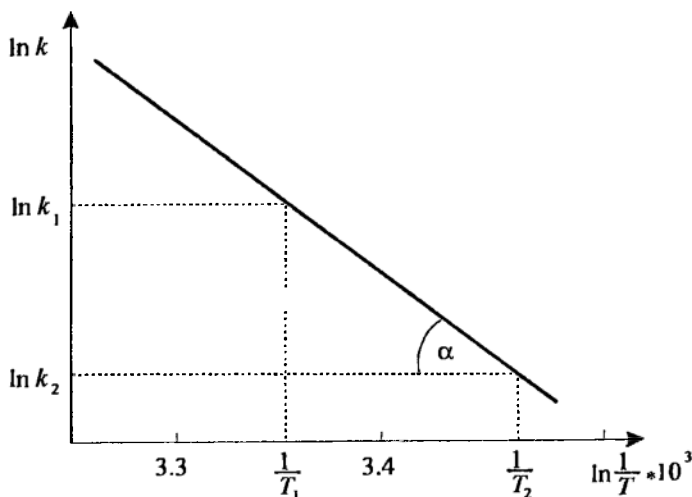


Рис. 2.6. Логарифмічне представлення експериментальних даних у координатах Арреніуса

Найточніше залежність константи швидкості реакції від температури визначається відповідно до теорії абсолютних швидкостей реакцій (теорія перехідного стану), яку розробив Х.Ейрінг. Формула Ейрінга згідно з цією теорією записується так:

$$k = \frac{k_0 T}{h} e^{\frac{\Delta S}{R}} e^{-\frac{E_a}{RT}}, \quad (2.27)$$

де k_0 – стала Больцмана ($k_0 = 1,38 \cdot 10^{-23}$ Дж·К⁻¹); h – стала Планка ($h = 6,626 \cdot 10^{-34}$ Дж·с); ΔS – зміна ентропії під час хімічного перетворення.

Мета роботи – на прикладі однієї з простих реакцій навчитися визначати кінетичні параметри й енергію активації процесу. У роботі на лабораторному поляриметрі вивчається гідролітичне розщеплення сахарози на глюкозу і фруктозу.

Матеріали та прилади: напівтіньовий поляриметр, ультратермостат, 4 колби на 100 мл, вимірювальний циліндр на 50 мл, фільтрувальний папір, соляна кислота, сахароза.

Методика. Відомо, що значна кількість речовин є оптично активними і мають властивість обертати на певний кут α площину поляризації лінійно

поляризованого світла. Оптично активними є білки, нуклеїнові кислоти, вуглеводи та інші речовини.

Обертання площини поляризації лінійно поляризованого світла вимірюється поляриметром. На рис. 2.7, а наведено оптичну схему приладу. Світловий потік від джерела світла 1 проходить через світлофільтр і поляризатор 3, у результаті чого на кювету 4 падає монохроматичне лінійно поляризоване світло, яке аналізується аналізатором 5. Поляризатор та аналізатор – це призми Ніколя або Волластона. Обертаючи аналізатор, можна досягти такого положення, коли площини поляризації аналізатора й поляризатора будуть схрещені. При цьому світло не проходить, воно гаситься. Якщо між поляризатором і аналізатором знаходиться оптично активний розчин, який обертає площину поляризації лінійно поляризованого світла на певний кут, тоді світло не буде погашене схрещеними призми й для досягнення темного поля необхідно обернути аналізатор на цей кут.

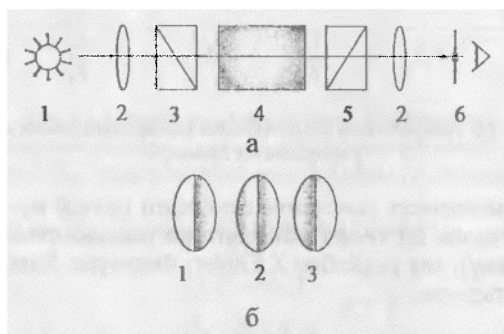


Рис. 2.7. Схема поляриметра:

- а) оптична схема поляриметра: 1 – джерело світла; 2 – лінзи; 3 – поляризатор;
4 – кювета з досліджуваним розчином; 5 – аналізатор; 6 – окуляр;
- б) вигляд в окулярі напівтіньового поля при різних положеннях аналізатора 5

Для більш точного вимірювання кута обертання α в поляриметрах використовується напівтіньовий метод, за допомогою якого визначається неповне затемнення в окулярі всього поля зору, а поява рівномірно та слабо освітлених (напівтіней) двох сусідніх полів (рис. 2.7, б, положення 2). Якщо напівтіньове положення знайдено, тоді найменший оберт аналізатора вправо або вліво порушує рівномірність освітлення аж до різкого контрасту в освітленості обох половин поля зору (на рис. 2.7, б, положення 1 і 3). Кут обертання аналізатора відраховується по лімбі з точністю до десятих часток градуса. Відлік проводять таким чином. Цілі градуси визначають на основній

шкалі 0 лімба (рис. 2.8) за останньою поділкою, яка знаходиться ліворуч від нуля ноніуса. Десяті частки градуса визначають на правій частині шкали ноніуса за поділкою, яка збігається в даному положенні з якою-небудь поділкою основної шкали лімба. Так відраховують додатні кути обертання. Наприклад, на рис. 2.8 кут обертання становить $10,3^\circ$. При обертанні аналізатора в протилежний бік відраховують від'ємні кути обертання. Десяті частки градуса визначають за поділками у лівій частині шкали ноніуса.

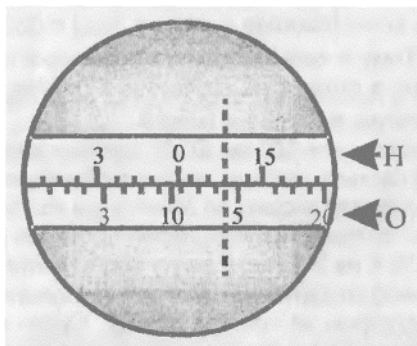
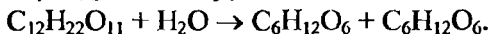


Рис. 2.8. Зображення шкали лімба: О – основна шкала; Н – ноніус. Вертикальна лінія показує збіг поділки основної шкали з поділкою шкали ноніуса

Вивчення швидкості гідролітичного розщеплення сахарози. Процес інверсії сахарози виникає при гідролітичному розщепленні її на глюкозу та фруктозу



Що стосується механізму, то ця реакція є бімолекулярною, а її швидкість може розраховуватись за рівнянням

$$v = -\frac{dc}{dt} = k \cdot c \cdot c_1, \quad (2.28)$$

де c – концентрація $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$; c_1 – концентрація H_2O . Оскільки гідроліз проходить у воді, концентрація якої набагато більша від концентрації сахарози, то без великої похибки можна вважати $c_1 = \text{const}$. У результаті рівняння (2.28) набуває такого вигляду:

$$v = -\frac{dc}{dt} = k' \cdot c, \quad (2.29)$$

тобто швидкість гідролізу залежить практично лише від концентрації сахарози. Ця реакція проходить як реакція першого порядку. Такого типу реакції називаються псевдомономолекулярними.

Швидкість гідролітичного розщеплення сахарози в лужному або нейтральному середовищі дуже мала. При підвищенні концентрації водневих іонів ($\text{pH} < 7,0$) швидкість гідролізу зростає, стає доступною для спостереження. Оскільки сахароза й продукти її гідролізу належать до оптично активних речовин, тобто речовин, які змінюють положення площини поляризації світла, то за ходом реакції можна спостерігати за допомогою напівтіньового поляриметра.

Сахароза обертає площину поляризації вправо ($[\alpha]_D = 66,55^\circ$), а суміш продуктів гідролізу – вліво (глюкоза – вправо, $[\alpha_{gl}] = 52,5^\circ$, а фруктоза – вліво, $[\alpha_{fr}] = -91,9^\circ$). Тому в ході інверсії кут обертання площини поляризації зменшується до нуля, а потім стає від'ємним. Постійне в часі від'ємне значення кута (α_∞) відповідає закінченню реакції.

Хід роботи. Приготувати 100 мл 20 % розчину сахарози. Якщо розчин після 10-15 хв залишається мутним, то його фільтрують через паперовий фільтр. Далі розчин розлити порівну по 50 мл у дві колби на 100 мл. В одну з колб влити 50 мл 6 н. соляної кислоти, перемішати цей розчин і поставити в термостат при $T = 313 \text{ K}$ на 3-4 год. У другу колбу влити розчин соляної кислоти заданої (довільної) концентрації. Момент змішування сахарози з кислотою відмітити секундоміром як початок реакції. Суміш перемішати, швидко залити в чисту поляриметричну кювету, попередньо промивши її кілька разів дистильованою водою і невеликою кількістю досліджуваного розчину. Щоб не утворились пухирці повітря в кюветі, її необхідно заповнити до краю (рідина утворює випуклий меніск), а потім обережно збоку насунути покривне скельце та загвинтити притискне кільце таким чином, щоб скельце було тісно притиснуте до торця кювети і з неї не витікав розчин. Ззовні кювету витерти чистою салфеткою або фільтрувальним папером і розмістити в жолобку поляриметра в ближньому до окуляра положенні. Шляхом обертання муфти на окулярі поляриметра необхідно добитися чіткого зображення шкали приладу і після цього проводити відлік. Кут обертання площини поляризації визначається, як показано на рис. 2.8, через кожні 3 або 5 хв. Усього необхідно в 20-25 вимірів. Визначення необхідно виконувати швидко, записуючи при цьому показання шкали приладу й час за допомогою секундоміра.

Після закінчення вимірювань визначити кут обертання α_∞ , який відповідає закінченню реакції. Для цього в поляриметричну кювету залити 20 % розчин сахарози в 6 н. соляній кислоті, яка знаходилась у термостаті протягом 4 год, і довести його температуру до температури досліду. Відлік зробити зразу ж після заповнення та через 30 хв. Якщо кут обертання протягом цього часу не змінився, тоді узяти його за α_∞ . Кут обертання на початку реакції позначити α_0 . Тоді кути обертання за фіксовані інтервали часу t будуть α_t . Результати експерименту заносяться в журнал за формою, наведеною в табл. 2.3.

Таблиця 2.3

№	Температура дослідів, К	Час вимірювання, с	інтервал часу від початку реакції, с	α_t	$\alpha_0 - \alpha_\infty$	$\alpha_t - \alpha_\infty$	k
1							
2							
3							
4							
5							

Завдання 1. Визначення константи швидкості інверсії сахарози

З експерименту розрахувати константу швидкості реакції (константу швидкості інверсії сахарози) за даної температури для кожного моменту часу t за формулою

$$k = \frac{2,303 \lg \frac{c_0}{c_t}}{t}, \quad (2.30)$$

де c_0 – початкова концентрація сахарози; c_t – концентрація сахарози в момент t . У зв'язку з тим, що кут обертання площини поляризації пропорційний концентрації речовини, у формулі (2.30) концентрації c_0 і c_t замінюємо через різницю кутів обертання.

$$k = \frac{2,303}{t} \lg \frac{\alpha_0 - \alpha_\infty}{\alpha_t - \alpha_\infty}. \quad (2.31)$$

Кут α_0 важко визначити, оскільки від початку реакції до першого виміру проходить значний час. У цьому випадку потрібно використовувати такий спосіб. На міліметровому папері побудувати графік у координатах $\lg(\alpha_t - \alpha_\infty) = f(t)$ (рис. 2.9). Зробити екстраполяцію лінії до $t = 0$ і тоді відрізок на осі ординат буде $\lg(\alpha_0 - \alpha_\infty)$.

Розрахувавши значення констант швидкості реакції k для кожного моменту часу, знайти середнє значення $k_{\text{ср}}$.

Завдання 2. Визначення енергії активації процесу

Дослід провести при двох температурах і визначити енергію активації за середніми значеннями $k_{\text{ср}}$ із формули (2.26).

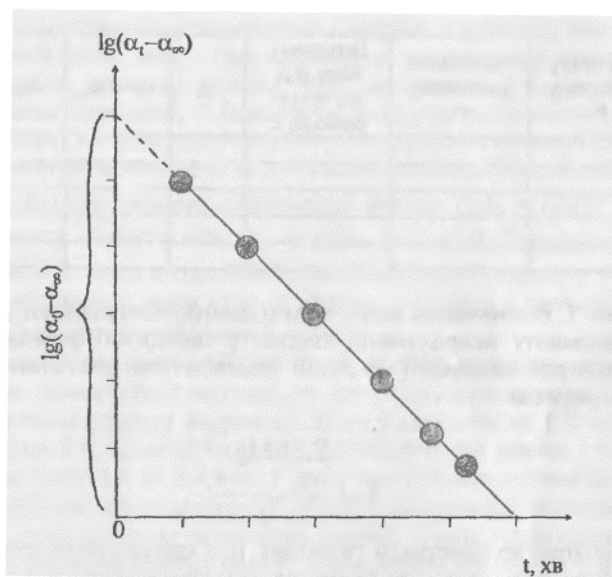


Рис. 2.9. Напівлогарифмічне представлення кінетики інверсії сахарози

Рекомендована література

Биофизика. Практикум / Под ред. П.Г.Богача. – К., 1983.

Костюк П.Г., Зима В.Л., Магура І.С., Мірошніченко М.С., Шуба М.Ф. Біофізика. – К., 2001.

Паттон А. Энергетика и кинетика биологических процессов. – М., 1968.

Розділ 3

БІОМЕМБРАНИ ТА МЕМБРАННИЙ ТРАНСПОРТ РЕЧОВИН

Робота 1. Фізико-хімічні характеристики ліпідних моношарів

Усі молекули, як органічних, так і неорганічних речовин залежно від розподілу їх зарядів діляться на полярні й неполярні. Якщо центри додатних і від'ємних зарядів збігаються, то такі молекули називаються неполярними. Вони погано розчиняються у воді, проте добре – у неполярних розчинниках. У полярних молекул центри додатних і від'ємних зарядів не збігаються. Полярні речовини, як правило, добре розчиняються у полярних розчинниках, наприклад у воді. Полярні молекули можуть мати одну або декілька полярних груп, які мають виражену спорідненість до води або інших полярних розчинників. Полярними групами у складних молекулах можуть бути гідроксильні, карбоксильні, амініні групи та інші. Молекули складних органічних речовин мають чітко виражену неполярну будову. Молекули речовин, які одночасно наділені описаними вище властивостями, належать до поверхнево-активних речовин. Іноді такі речовини зі змішаними властивостями називаються біфільними. Якщо молекула такої будови знаходиться на межі двох фаз (рідина – повітря), то вона орієнтується своїми полярними (гідрофільними) групами до розчинника (води), а неполярними (гідрофобними) групами в протилежному напрямку – до повітря. Отже, молекули поверхнево-активних речовин на межі поділу двох фаз утворюють насичений адсорбційний шар, а в разі їх поганої розчинності утворюють добре сформовану плівку.

Якщо поверхнево-активна речовина розтікається по поверхні рідкої фази, то товщина утвореної плівки досягає деякого граничного значення при максимальній величині поверхневого натягу. За таких умов товщина плівки відповідає довжині молекули поверхнево-активної речовини. Такі плівки називають мономолекулярними, або скорочено – моношарами. Молекули в насичених мономолекулярних шарах розташовані на дуже близькій відстані одна від одної, тому мономолекулярні шари не піддаються стиснанню. Опір стискання, так званий поверхневий тиск шарів, дуже значний.

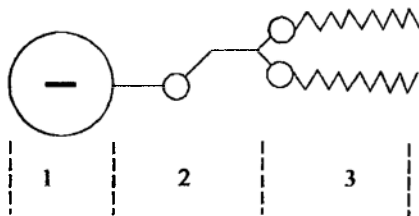
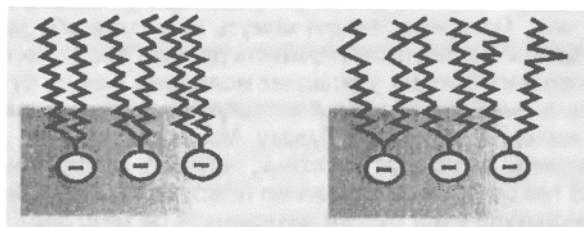


Рис. 3.1. Будова молекули фосфоліпиду:
1 – від'ємно заряджені голівки; 2 – гліцерин; 3 – гідрофобні хвости

Метод адсорбційних моношарів широко застосовується в біології при вивченні будови клітинних мембран. Багато процесів, які відбуваються в біологічних мембранах, вивчаються за допомогою штучних моношарів. У більшості випадків для виготовлення штучних моношарів використовують основні складові частини біологічних мембран – ліпідні молекули, що складаються з полярної голівки й неполярних, гідрофобних, довгих хвостів (рис. 3.1). Така будова ліпідних молекул визначає їхню можливість утворювати штучні моношари на поверхні води.



а

б

Рис. 3.2. Утворення моношару ліпідних молекул на поверхні води:
сильностиснутий (а) і слабкостиснутий (б) мономолекулярний шар

Що стосується розташування ліпідів, то термодинамічно найвигіднішим є мономолекулярний шар на поверхні води (рис. 3.2). У цьому разі заряджені голівки занурені у воду, а хвости направлені в повітря. На поверхні води утворюється мономолекулярна плівка, яка займає певну площу S . Якщо дуже обережно стиснути ліпідну плівку, то площа її зменшиться. У стані максимального стиснення гідрофобні хвости розташовуються паралельно, як показано на рис. 3.2, а. У цьому випадку рухливість хвостів фосфоліпідів значно зменшується і ліпідний моношар переходить у твердий стан (L_f -фаза).

Коли плівка слабо стиснута, хвости ліпідних молекул стають рухливими і можуть гнутися в різних місцях (рис. 3.2, б). Цей стан ліпідного моношару моделює рідинно-кристалічний стан мембрани (L_α -фаза). Якраз у такому рухливому рідинно-кристалічному стані знаходиться бімолекулярний ліпідний шар природних мембран, в якому спостерігається (уздовж мембрани) латеральна дифузія та явище фліп-флоп (зміщення перпендикулярно до мембрани ліпідних молекул між шарами).

На простих ліпідних штучних мембранах вивчається проникність незаряджених і заряджених молекул. Для утворення штучних мембран готується розчин із ліпідів, крапля якого наноситься мікропіпеткою на отвір діаметром 1-2 мм, зроблений у пластинці з ізолятора (тефлон або плексиглас). Після нанесення краплі ліпиду (рис. 3.3, а) через певний час формується штучний біліпідний шар, який повністю перекриває отвір (рис. 3.3, б). Така штучна мембрана має товщину 7-8 нм.

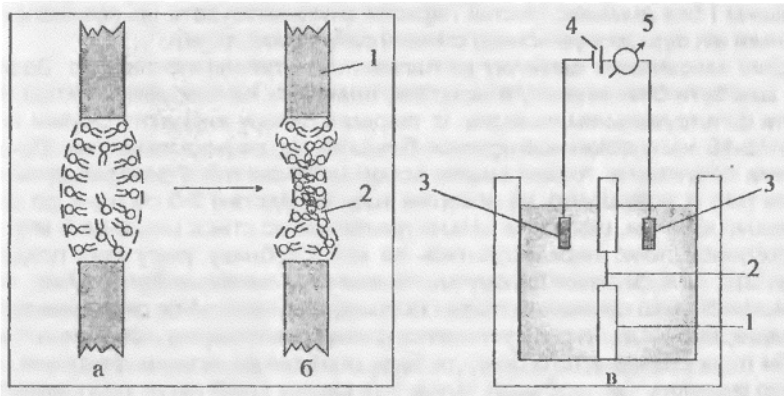


Рис. 3.3. Схема утворення штучної ліпідної мембрани (а і б) і вимірювання електропровідності цієї мембрани (в): 1 – пластинка ізолятора, 2 – штучна мембрана, 3 – електроди, 4 – джерело живлення, 5 – мікроамперметр

Якщо пластинкою зі штучною мембраною розділити об'єм розчину в посудині на дві частини, то отримуємо дуже простий метод для вивчення електричної провідності штучних мембран (рис. 3.3, в). Експериментально було встановлено, що за проникністю води та невеликих незаряджених молекул, за поверхневим зарядом і електричною ємністю штучні мембрани дуже близькі до біологічних мембран. У той же час проникність іонів і електропровідність штучних мембран на 6-7 порядків нижча, ніж нативних мембран. Було показано, що провідність штучних мембран значно збільшується до іонів K^+ , якщо додавати в розчин дуже малі концентрації антибіотику валіноміцину.

Отже, на простих мембранних моделях – штучних мембранах – вивчають деякі особливості вибіркової проникності через мембрани іонів та їх модифікацію за допомогою переносників, що важливо для розуміння функцій біологічних мембран.

У лабораторній роботі проводиться отримання моношарів на поверхні води й оцінка молекулярних розмірів олеїнової кислоти, з якої утворюється моношар.

Матеріали та прилади: пластмасова або емальована ванночка з гладенькими стінками, віск і ванночка для його плавлення, тальк і густе сито для його просіювання, мікробюретки, бензол, мірні колби на 50-100 см³, олеїнова кислота, лінійка. (У дослідах можна використовувати будь-яку поверхнево-активну речовину з відомою молекулярною масою).

Методика. Воском або його сумішшю з парафіном покривають бокові стінки ванночки. Для цього по черзі опускають бокові стінки в розплавлений віск. Потрібно добиватися, щоб боковий шар на стінках ванночки був якомога рівнішим і без домішок. Чистий парафін використовувати не рекомендують, оскільки він відшаровується від стінки й забруднює розчин.

Далі заповнюють ванночку до половини дистильованою водою. Вода також має бути без пилинок, а якщо такі плавають на поверхні, їх потрібно зібрати фільтрувальним папером. Із твердого паперу вирізають смужки шириною 10-15 мм і довжиною трошки більшою від ширини ванночки. Потім ці смужки покривають тонким шаром воску, занурюючи їх у розплавлений віск. Після того їх розміщують на поверхні води на відстані 3-5 см одна від одної, згинаючи кінці так, щоб вони щільно прилягали до стінок ванночки й могли за необхідності легко переміщуватись по ній. Особливу увагу слід приділити тому, щоб між смужкою паперу та стінкою на вигинах не було щілин, через які могли б легко проникати тальк і моношар речовини. Між смужками паперу на поверхню води через густе сито рівномірним шаром насипають тальк. Потім одну смужку з того боку, де буде поверхнево-активна речовина, обережно знімають так, щоб край тальку був рівним і щоб він не розпливався по воді та не піднімався за смужкою паперу.

Для мономолекулярної плівки речовини тальк є перепоною для проникнення її в незаповнену частину ванночки. Біля краю ванночки на протилежному боці від смужки тальку встановлюють мікробюретку з досліджуваною речовиною і на поверхню рідини виливають певну кількість розчину олеїнової кислоти в бензолі. Через певний час бензол випарується, а на поверхні води утвориться мономолекулярна плівка досліджуваної речовини. Після цього дуже обережно беруть руками з двох кінців смужку паперу й рухають уздовж ванночки. У певний момент, коли ми відпустимо руками смужку, вона почне рухатись назад і зупиниться в певному положенні. Це означає, що стиснутий моношар штовхає назад тальк та смужку, щоб зайняти максимальну поверхню води між тальком і вільним кінцем ванночки. У цей момент і потрібно виміряти площу S , яку займає моношар (рис. 3.4). Тоді $S = ld$, де l – довжина моношару, d – його ширина.

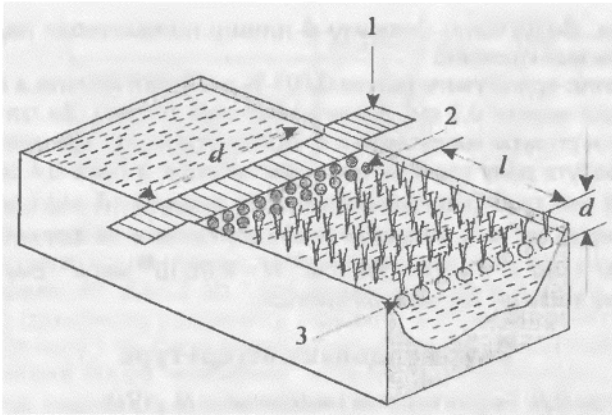


Рис. 3.4. Схема розташування молекул у моношарі:
1 – смужка паперу; 2 – тальк; 3 – молекули олеїнової кислоти;
 l – довжина моношару; d – ширина моношару; δ – ефективна товщина моношару

Оскільки товщина моношару δ відповідає довжині молекули, точніше, довжині її гідрофобної частини, то можна записати

$$\delta = \frac{V}{S}, \quad (3.1)$$

де V – об'єм, який займає моношар, фактично об'єм вилитої на поверхню води поверхнево-активної речовини. У зв'язку з тим, що молекули в моношарі наближені одна до одної на відстань міжмолекулярної взаємодії та розташовані в ряд, площа поперечного перерізу (g) однієї молекули буде

$$g = \frac{S}{n}, \quad (3.2)$$

де n – кількість молекул у моношарі. Кількість молекул $n = m/m_0$, де m – маса олеїнової кислоти, з якої утворився моношар; $m_0 = M/N$ – маса однієї молекули (M – молекулярна маса олеїнової кислоти, N – число Авогадро). Маса речовини знаходиться як $m = V \cdot \rho$, де ρ – питома густина поверхнево-активної речовини. Підставляємо значення m , m_0 і отримуємо $n = m/m_0 = V \cdot \rho \cdot N/M$. Далі значення n підставляємо в (3.2) та отримуємо вираз для розрахунку площі поперечного перерізу молекули олеїнової кислоти

$$g = \frac{S \cdot M}{V \cdot \rho \cdot N}. \quad (3.3)$$

Завдання. Визначити довжину й площу поперечного перерізу молекули олеїнової кислоти

Хід роботи: приготувати розчин 0,001 % олеїнової кислоти в бензолі. На поверхню води налити 0,3 см³ розчину олеїнової кислоти. За допомогою лінійки виміряти розміри моношару l і d . Дослід повторити ще двічі з тією різницею, що беруть різну кількість олеїнової кислоти, а саме 0,4 см³ і 0,5 см³ відповідно. З цих трьох дослідів розрахувати довжину (δ , нм) і площу поперечного перерізу (g , нм²) молекули олеїнової кислоти за формулами (3.1) і (3.3). Узяти $M = 282,27$ Да; $\rho = 698$ кг/м³, $N = 6,02 \cdot 10^{23}$ моль⁻¹. Визначити відносну похибку величин, що розраховуються.

Рекомендована література

- Бергельсон Л.Д. Биологические мембраны. – М., 1975.
Костюк П.Г., Зима В.Л., Магура І.С., Мірошніченко М.С., Шуба М.Ф. Біофізика. – К., 2001
Финеан Дж., Мичелл Р. Мембраны и их функция в клетке. – М., 1977.

Робота 2. Електричні параметри бішарових ліпідних мембран

Дуже важливо знати фізико-хімічну природу змін властивостей біологічних мембран. Тому моделями біологічних мембран використовують бішарові ліпідні мембрани (БЛМ), позбавлені активних процесів, що мають місце у плазматичних мембранах. БЛМ отримують у вигляді ліпосом або плоских бішарових ліпідних мембран – бішари. Сферичні ліпосоми придатні для вивчення дифузії речовин, тоді як ліпідні бішари найбільше підходять для вивчення електричних параметрів, таких як опір і ємність мембрани, мембранний потенціал.

Плоскі ліпідні бішари формуються у водних розчинах з ліпідів головного мозку рогатих тварин, з чистих фосфоліпідів, лецитину, окисненого холестерину, штучних поверхнево-активних речовин, фрагментів хлоропластів тощо. Товщина таких БЛМ не перебільшує 10 нм.

Немодифіковані БЛМ з ліпідів мозку або яєчного лецитину подібні до шарів з рідких вуглеводів. Відомо, що БЛМ модифікуються рядом речовин, які можна розділити за їх властивостями на модифікатори пасивних електричних та механічних властивостей, іонної селективності, електричної збудливості, а також такі, що індукують фотоелектричні ефекти. На таких спеціально модифікованих БЛМ моделюються провідність, збудливість, іонна селективність і транспорт іонів, робота поодиноких іонних каналів та іонних pomp.

Деякі пасивні властивості БЛМ і біологічних мембран дуже близькі між собою (табл. 3.1).

Таблиця 3.1

	Біомембрани	БЛМ
Товщина (нм)	8-13	4-10
Опір питомий (Ом·см ²)	10 ² -10 ⁵	10 ³ -10 ⁶
Напруга пробою (мВ)	80-300	100-550
Ємність (мкФ·см ⁻²)	0,5-1,3	0,3-1,3

Це свідчить про наукову обґрунтованість вивчення фізико-хімічних властивостей біомембран, коли використовуються для цього модельні мембрани.

БЛМ формуються на отворі в тefлоновому циліндрі (див. розд. 3, робота 1). На отвір діаметром від 0,2 до 1 мм наноситься певна кількість розчину фосфолипідів у органічному розчиннику. Протягом ≈ 20 хв відбувається випаровування розчинника й на отворі утворюється плоска бішарова ліпідна мембрана.

Визначення опору мембрани. Блок-схему установки для вимірювання електричних параметрів БЛМ показано на рис. 3.5, а. Вихідна напруга $U_{вих}$ реєструється мілівольтметром. Еквівалентну електричну схему установки зображено на рис. 3.5, б.

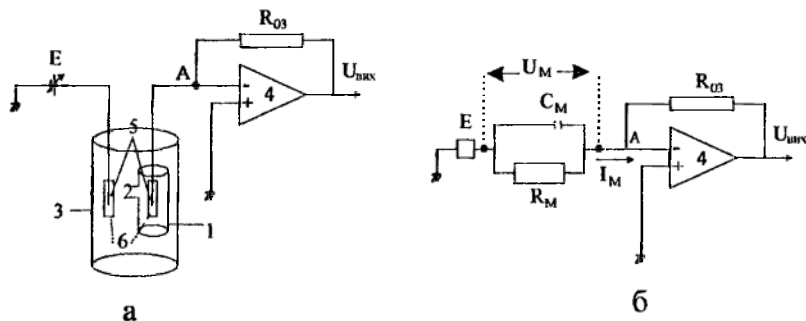


Рис. 3.5. Блок-схема установки для вимірювання електричного опору БЛМ:

а) 1 – тefлоновий циліндр; 2 – отвір ($d=0,8$ мм) для штучної мембрани; 3 – ювета з електролітом; 4 – операційний підсилювач (ОП); 5 – хлоровані срібні електроди; 6 – поліхлорвінілові трубочки; Е – джерело напруги; R_{03} – опір оберненого зв'язку; б) еквівалентна електрична схема

Знаючи напругу U_m , що подається на мембрану, і $U_{вих}$, а також опір оберненого зв'язку R_{03} , можна розрахувати опір мембрани R_m . Операційний підсилювач має дуже великий вхідний опір, тому струм, який проходить через R_m , майже не розгалужується в точці А і буде, в основному, проходити через R_{03} . Постійний струм через мембрану I_m (рис. 3.5, б) буде таким: $I_m = U_m/R_m$. Оскільки операційний підсилювач підключений зі 100 % оберненим зв'язком і мембранний струм I_m переважно проходить через R_{03} , цей струм легко розрахувати за формулою $I_m \approx U_{вих}/R_{03}$

Використовуючи рівність $\frac{U_m}{R_m} = \frac{U_{вих}}{R_{оз}}$, опір мембрани R_m визначається за такою формулою:

$$R_m = \frac{U_m R_{оз}}{U_{вих}}. \quad (3.4)$$

Провідність мембрани g (См, сіменс) є обернена величина опору мембрани

$$g = \frac{1}{R_m} = \frac{U_{вих}}{U_m R_{оз}}. \quad (3.5)$$

Розраховується також питомий опір мембрани: $\rho = R_m \cdot S$ (в Ом·м²), де S – площа отвору в тefлоновому циліндрі (у м²).

Визначення ємності БЛМ. Для визначення ємності мембран використовують два способи. Перший полягає в тому, що від джерела напруги E подається на мембрану прямокутний сигнал напруги (рис. 3.6, А). Проходячи через БЛМ, сигнал змінює свою форму і на виході операційного підсилювача (ОП) має вигляд, як показано на рис. 3.6, Б. Оскільки затягування переднього фронту сигналу на виході ОП зумовлено ємністю та опором, у цьому випадку затримка сигналу в часі буде визначатися постійною часу τ мембрани: $\tau = R_m \cdot C_m$, де R_m – опір мембрани (визначається, як це було показано вище); C_m – ємність мембрани.

Постійна часу τ визначається в такий спосіб. Змінена форма сигналу (рис. 3.6, Б) зумовлена зарядом і розрядом ємності C_m . Заряд ємності відбувається за законом

$$U_{вих} = U_{вих}^m (1 - e^{-\frac{t}{\tau}}), \quad (3.6)$$

де $U_{вих}^m$ – максимальна величина сигналу після проходження БЛМ.

Постійна часу τ – це такий час t , за який ємність заряджається до величини $U_{вих} = 0,63 \cdot U_{вих}^m$, тобто при $t = \tau$, $U_{вих} = U_{вих}^m \left(1 - \frac{1}{e}\right) = 0,63 \cdot U_{вих}^m$ (рис. 3.6, Б).

Підставивши вираз (3.4) у τ , знаходимо ємність мембрани за формулою

$$C_m = \frac{\tau}{R_m} = \frac{\tau U_{вих}}{U_m R_{оз}}. \quad (3.7)$$

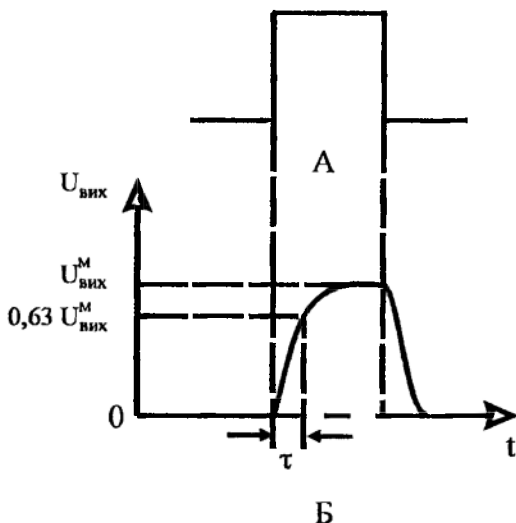


Рис. 3.6. Прямокутний електричний сигнал (А), який подається на БЛМ, і зміна його форми (Б) після проходження БЛМ

У формулі (3.7) τ виражається в секундах, U_m і $U_{\text{вих}}$ – у вольтах, $R_{\text{оз}}$ – в омах, а C_m – у фарадах.

У другому випадку використовуються пилкоподібні імпульси напруги. Тоді струм у ланцюгу мембрана – операційний підсилювач буде складатися з двох компонент – омичної та ємнісної, а саме: $I = I_m + I_c = \frac{U_m}{R_m} + C_m \frac{dU_m}{dt}$.

Якщо швидкість наростання U_m буде дуже великою, тоді $I_c > I_m$. А це означає, що загальний струм буде $I \approx I_c = C_m \frac{dU_m}{dt}$. З останнього рівняння визнача-

ється C_m : $C_m = \frac{I}{\frac{dU_m}{dt}}$. Загальний струм I знаходять таким чином: $I = \frac{U_{\text{вих}}}{2k}$,

де k – коефіцієнт підсилення ОП. dU_m/dt визначають через амплітудне значення пилкоподібної напруги, як $dU_m/dt = 4A f$, де A – амплітудне значення напруги, f – частота пилкоподібної напруги в герцах.

Приклад розрахунку. Нехай на БЛМ подається пілкоподібна напруга 100 мВ з частотою 50 Гц. Тоді $dU_m/dt = 4A \cdot f = 4 \cdot 0,1 \cdot 50 = 20$ В/с. Якщо, наприклад, напруга на виході підсилювача дорівнює $U_{вих} = 0,5$ В при $k = 10^6$ В/А, тоді струм I у вимірювальному ланцюзі буде $I = 0,5/2 \cdot 10^6 = 2,5 \cdot 10^{-7}$ А. Ємність мембрани C_m буде дорівнювати $C_m = I/(dU/dt) = 2,5 \cdot 10^{-7}/20 = 1,25 \cdot 10^{-8}$ Ф.

Коли швидкість росту напруги на ємності не велика, а $I \approx I_m$, краще користуватись для визначення C_m першим способом.

Вимірювання мембранного потенціалу на модифікованих БЛМ

Якщо по обидва боки штучної мембрани буде розчин, який відрізняється концентрацією, виникне різниця потенціалів. У випадку бінарного електроліту й різних концентрацій, дифузійний потенціал E_d буде визначатись за формулою

$$E_d = \frac{u^+ - u^-}{u^+ + u^-} \frac{RT}{nF} \ln \frac{C_1}{C_2}, \quad (3.8)$$

де C_1 і C_2 – концентрації електроліту по обидва боки мембрани; u^+ і u^- – рухомості катіону й аніону в мембрані; n – валентність іонів; F – стала Фарадея; R – газова стала; T – температура. За формулою (3.8) можна розрахувати мембранний потенціал для відомого електроліту (наприклад, KCl, NaCl тощо), якщо відомі рухомості катіона (K^+) і аніона (Cl^-) у мембрані. Для вимірювання мембранного потенціалу необхідно занурити в розчин по обидва боки мембрани електроди, що не поляризуються, і до них підключити мілівольтметр, який покаже різницю потенціалів. Якщо БЛМ модифікувати каналутворюючою речовиною, наприклад ністатином (полієновий антибіотик) з холестеринном, що утворює напівпори, які заповнені водою і виявляють добру провідність для Cl^- і значно гіршу для Na^+ , тоді по обидва боки такої БЛМ буде створюватись доннанівський розподіл іонів, а отже, і електричний потенціал, який визначається за формулою Нернста:

$$E = \frac{RT}{nF} \ln \frac{C_1}{C_2}, \quad (3.9)$$

де C_1 і C_2 – концентрація електроліту NaCl з одного і другого боку мембрани відповідно. Необхідно зауважити, що чисті бішари не наділені іонною селективністю, але якщо такі бішари модифікувати речовинами білкової природи, вони набувають властивостей, що нагадують властивості природних мембран. Такі штучні мембрани зменшують електричний опір на декілька порядків і на мембрані реєструється рівноважний електричний потенціал. Модифікатором БЛМ часто використовують деякі антибіотики (валіноміцин, ністатин тощо).

Уводиться таке поняття, як **числа переносу іонів** (катіонів і аніонів) через БЛМ:

$$t_+ = u^+/(u^+ + u^-) \text{ і } t_- = u^-/(u^+ + u^-). \quad (3.10)$$

З виразів (3.10) видно, що $t_+ + t_- = 1$. Використовуючи числа переносу іонів (3.10), формула (3.8) видозміниться таким чином:

$$E = (2t_+ - 1) \frac{RT}{nF} \ln \frac{C_1}{C_2}. \quad (3.11)$$

Цей вираз дає можливість розрахувати числа переносу катіонів або аніонів через мембрану, якщо відомі C_1 і C_2 , а також вимірний мембранний потенціал.

Для визначення коефіцієнта специфічності проникнення катіонів через БЛМ (наприклад, до катіонів K^+ або Na^+) необхідно виконати такий дослід. Розділити камеру штучною мембраною на два відсіки, один з яких заповнити розчином KCl, а другий – NaCl тієї самої концентрації. Унаслідок різної рухомості катіонів, завдяки різній специфічності проникнення виникне різниця потенціалів E , яку вимірюють експериментально. Коефіцієнт специфічності потім розраховують за формулою $E = (RT/nF) \cdot \ln K_c$, де K_c – коефіцієнт специфічності.

Методика. Підготовка розчинів і електродів

1. Приготувати розчини NaCl або KCl необхідної молярності.
2. Підготувати електроди, що не поляризуються. Для цього необхідно взяти дві поліхлорвінілові трубочки 6 (рис. 3.5, а) діаметром 1,5 мм і довжиною 15 см, промити їх декілька разів дистильованою водою, потім заповнити їх свіжоприготовленим агар-агаром на 3 моль/л KCl до рівня 12 см. Оскільки ці електроди в експериментальній установці будуть розташовані вертикально, необхідно незаповнену частину трубочок заповнити розчином KCl концентрацією 3 моль/л. Якраз у ці об'єми будуть вставлятися хлоровані срібні електроди 5 (рис. 3.5, а).

3. Підготувати фосфоліпіди для формування штучних мембран (БЛМ). Беруть білу речовину з мозку бика й гомогенізують у суміші хлороформу й метанолу у співвідношенні 2:1. На 20 мл суміші потрібно взяти 1 мл білої речовини. На кожні 20 мл гомогенату додається 4 мл метанолу, тобто 0,2 об'ємні частини. Буде отримано суміш складу 20 мл + 4 мл = 24 мл, в якій хлороформу 12,66, метанолу 10,34 і білої речовини мозку 1 мл. Цю суміш центрифугують при швидкості 3200 об/хв протягом 25 хв. Після цього супернатант відокремлюють від нижньої фази шляхом відсмоктування шприцом. У супернатант додається хлороформ і дистильована вода в таких співвідношеннях, щоб отримати в ньому пропорцію вмісту хлороформу, метанолу й води відповідно 8:4:3. Ретельно перемішати отриману суміш молочного кольору, а потім центрифугувати її при 5000 об/хв протягом 50 хв. Тоді утвориться чітка межа поділу двох фаз (приблизно 40 і 60 %). Ретельно, щоб не розмішати суміш, відсмоктати шприцом нижню фазу, передбачаючи, що вона багата на ліпіди та є хлороформ-метанольною сумішшю у відношенні 2:1. Потім додають 0,2 об'ємні частини води в цю фазу і стільки хлороформ-метанолу, щоб знову отримати пропорцію 8:4:3. Процедуру з центрифугуванням (5000 об/хв протягом 50 хв) повторюють 3–4 рази для кращого очищення ліпідів від білкових фракцій та інших домішок неліпідної природи.

Ефективність процедури промивання ліпідів поліпшується, якщо використовувати не чисту воду, а водні розчини мінеральних солей.

Вибравши попередньо шприцом після останнього центрифугування домішки з поверхні у вигляді білого нальоту, випаровують отриманий прозорий розчин жовтуватого відтінку на роторному випаровувачі при 20-30 °С. Щоб краще випарити розчин, у воду іноді додають бензол. Після закінчення просушування через колбу пропускають азот, щоб ліпіди не окиснювалися на повітрі. Отриманий осад розчиняють в ацетоні, який розчиняє нейтральні ліпіди, які ще потрібно видалити. Для кращого розподілу кислих і нейтральних ліпідів суміш центрифугують при 5000 об/хв протягом 15 хв, після чого ацетон з розчиненими в ньому нейтральними ліпідами зливають. Осад просушують 20 хв у атмосфері азоту, після чого залишається порошок білого кольору. Отримані ліпіди далі розчиняють у хлороформ-метаноловій суміші (2:1) з розрахунку 0,02 г ліпідів на 1 мл суміші. У такому стані ліпіди можуть зберігатися дуже довго (бажано в темному місці й температурі ~ 4 °С).

Приготування мембран. Беруть 0,2 мл розчину ліпідів концентрацією 20 мг/мл у хлороформ-метаноловій суміші (2:1) і за допомогою ліофільної сушки висушують до стану сухого білого порошку. Потім додають гептан (розчинник ліпідів) у кількості 0,2 мл і додають у цей розчин холестерин у гептані з розрахунку 2 мг/мл. У цьому випадку додають чистого гептану стільки, щоб загальна кількість суміші ліпідів з холестерином у гептані не перевищувала об'єм 0,2 мл. Потім цю суміш продувають азотом для того, щоб ліпіди не окиснювалися. Підготовлена таким чином суміш ліпідів з холестерином готова до роботи. Спеціальною піпеткою цей розчин ліпідів наносять на отвір у тефлоновому циліндрі. Після того в електроді по обидва боки мембрани додають необхідну кількість антибіотика (ністатину), ретельно розмішують і підігрівають до потрібної температури.

Через нетривалий час, коли гептан майже повністю випарується, а антибіотик увійде в ліпідну мембрану, вважається, що модифікована мембрана сформована і на ній можна проводити досліді.

Завдання

1. Підготувати експериментальну установку до роботи, як було описано вище.
2. Зняти вольт-амперні характеристики штучних мембран, модифікованих ністатином, залежно від концентрації антибіотика та концентрації солі.
3. Знайти опір БЛМ залежно від модифікації і типу модифікатора. Розрахувати провідність мембран для різних типів переносників.
4. Знайти ємність БЛМ за зміною напруги й трансмембранного струму, використовуючи швидконаростаючі амплітуди пилоподібної напруги чи за затримкою (τ) прямокутного сигналу.
5. Виміряти мембранний потенціал для бінарного електроліту, а також знайти числа переносу для різних іонів (з різною рухомістю). Розрахувати рівноважний потенціал за формулою Нернста (3.9).
6. Визначити експериментально напругу електричного пробоя.

Рекомендована література

Практикум по биофизике / Под ред. А.Б.Рубина, И.И.Иванова. – М., 1984. – С. 1-13.

Итоги науки и техники: Биофизика мембран. Ионные каналы и их модели / Под ред. П.Г. Костюка. – М., 1982. – Т. 2.

Робота 3. Гемоліз еритроцитів

Гемолізом називають руйнування оболонки еритроцитів, що супроводжується виходом з них гемоглобіну в плазму крові, яка при цьому забарвлюється в червоний колір і стає прозорою ("лакова кров"). Руйнування еритроцитів може бути спричинено зменшенням осмотичного тиску, що спочатку призводить до набухання, а потім до руйнування еритроцитів – це осмотичний гемоліз. Мірою осмотичної стійкості (резистентності) еритроцитів є концентрація NaCl, при якій починається гемоліз. У розчині 0,34 % NaCl руйнуються всі еритроцити. Під час деяких захворювань осмотична стійкість еритроцитів зменшується і гемоліз відбувається при великих концентраціях NaCl у плазмі.

Хімічний гемоліз відбувається під впливом речовин (ефір, хлороформ, спирти, бензол, жовчні кислоти, сапонін тощо), що руйнують білково-ліпідну оболонку еритроцитів, механічний виникає при сильних механічних впливах на кров, термічний спостерігається при заморожуванні й розморожуванні крові, біологічний розвивається при переливанні несумісної крові, при укусах деяких змій, під впливом імунних гемолізинів тощо. Внутрішньоклітинний гемоліз відбувається всередині клітин ретикулоендотеліальної системи, головним чином у селезінці, а внутрішньосудинний – у циркулюючій крові.

Еритроцити – це не зовсім повноцінні, рудиментарні клітини, що не здатні до самовідтворення. Вони утворюються з клітин-попередників, які називаються ретикулоцитами. У процесі дозрівання останні втрачають звичайні внутрішньоклітинні органели й синтезують велику кількість гемоглобіну, що має велику спорідненість з киснем, чим врешті-решт і зумовлюється фізіологічне призначення еритроцитів. Еритроцити є зручною моделлю для вивчення транспорту речовин через клітинні мембрани, для дослідження стійкості мембран під впливом зовнішніх факторів (іонний склад, температура, поверхнево-активні речовини, іонізуюче випромінювання тощо). Вивчення білків, що містяться в плазматичній мембрані еритроцитів, дозволило сформулювати нові уявлення про будову мембран. Виникло, зокрема, припущення, що принаймні деякі мембрани мають "скелет", який забезпечує стійкість клітин до зовнішніх впливів.

Експериментальними дослідженнями показано, що стійкість еритроцитів визначається віком. Молоді еритроцити, які виходять з кісткового мозку, ма-

кими (1 група стійкості). Дозрівання та старіння еритроцитів у кров'яному руслі виражається поступовим зменшенням їхньої стійкості щодо гемолітичних речовин. Крива розподілу еритроцитів за стійкістю називається **еритрограмою** (рис. 3.7). Форма еритрограми дозволяє визначити кількість еритроцитів кожного віку (певної стійкості) у момент дослідження. Побудова її шляхом фотоколориметричної реєстрації є інформативним методом, з мінімальними статистичними похибками.

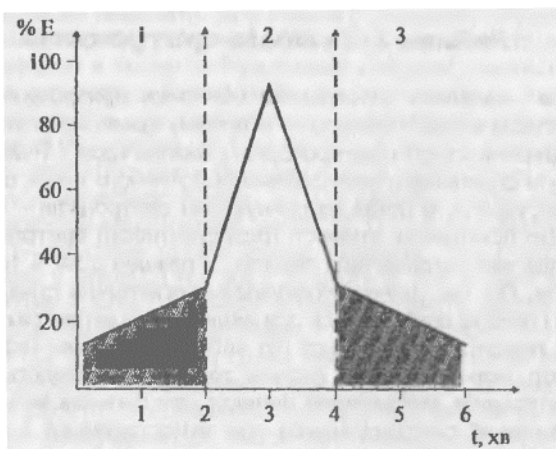


Рис. 3.7. Еритрограма здорової тварини: 1 – перша група стійкості; 2 – друга група; 3 – третя група. % Е – процент гемолізованих еритроцитів

Метод еритрограм. Суть методу полягає у фотоколориметричному вимірюванні динаміки руйнування еритроцитів під впливом гемолітичної речовини (соляної кислоти). Критерієм стану еритроцитів слугує їхня здатність до гемолізу. Час дії соляної кислоти є виміром стійкості еритроцитів. Реакція гемолізу протікає при постійній температурі та постійній концентрації соляної кислоти.

Під час руйнування еритроцитів у процесі гемолізу відбувається зменшення мутності суспензії, а відповідно і збільшення світлопропускання. Розчин стає прозорішим. Зміна пропускання світла суспензією еритроцитів або зміна оптичної густини є міра гемолізу. Щоб поглинання гемоглобіну не заважало вимірюванню світлорозсіювання, визначення гемолізу проводять із червоним світлофільтром, тобто у спектральній області, де гемоглобін не поглинає, і всі зміни світлопропускання зв'язані виключно зі зміною прозорості розчину суспензії. У результаті буде отримано ряд значень оптичної густини, які зменшуються, і кожне з них відповідає ступеню гемолізу в момент вимірювання. Це зменшення оптичної густини в часі характеризує зменшен-

ня кількості еритроцитів під впливом гемолітичної речовини. Зменшення спостерігається, поки не зруйнуються останні еритроцити. Тривалість гемолізу еритроцитів крові ссавців у даних умовах дослідіу досягає, як правило, 10-20 хв. За різних впливів на еритроцити будуть спостерігатися зсуви еритрограм, що певним чином характеризуватиме ці впливи.

Матеріали та прилади: колориметр фотоелектричний концентраційний КФК-2МП, циліндри на 100 мл, дозаторні піпетки, пастерівські піпетки, пробірки, фізіологічний розчин (0,9 % NaCl), соляна кислота (з фіксаналів) готується в концентрації 0,004 н на фізіологічному розчині.

Завдання 1. Реєстрація еритрограм

Приготувати еритроцити у фізіологічному розчині. Для цього з вушної вени морської свинки беруть кров з розрахунку 0,1 мл $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ (розчин концентрацією 0,1 моль/л) на 0,9 мл крові. Відібрану кров перемішують з оксалатом і швидко зливають у пробірку. Оксалат зв'язує іони кальцію і кров втрачає здатність утворювати фібриновий згусток. Оксалатну кров центрифугують протягом 2 хв при швидкості 3000 об/хв. Потім за допомогою пастерівської піпетки відокремлюють осад (еритроцити) від плазми крові, що знаходиться в надосадовій рідині. Отримані еритроцити промивають фізіологічним розчином. Для цього до об'єму еритроцитів додають подвійний або потрійний об'єм фізіологічного розчину, знову центрифугують (2 хв при 3000 об/хв) і відокремлюють їх від розчину. Еритроцити готові до фотоколориметричного вимірювання гемолізу, який ініціюється гемолітичною речовиною.

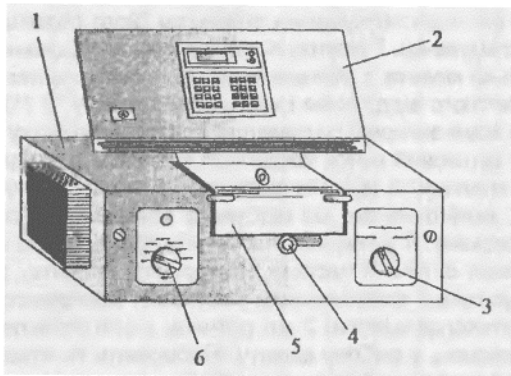


Рис. 3.8. Фотоколориметр КФК-2МП:

- 1 – колориметричний блок; 2 – обчислювальний блок; 3 – фотоприймач;
4 – рукоятка зміщення кювет; 5 – кришка кюветного відділення; 6 – рукоятка світлофільтрів

Фотоелектричний колориметр КФК-2МП зображено на рис. 3.8. Він складається з колориметричного 1 та обчислювального 2 блоків і блока живлен-

ня. Колориметричний блок складається з джерела світла, оптичного вузла, світлофільтрів, кюветного відділення, кюветоутримувача, пристрою фотометричного з підсилювачем постійного струму й елементами регулювання. Світлофільтри вмонтовано в диск. У світловий пучок вони вводяться рукояткою 6. Поворотом рукоятки 4 здійснюється введення у світловий пучок кювети з розчинником (положення "1") або з досліджуванним розчином (положення "2"). Кюветне відділення закривається кришкою 5. При відкритій кришці кюветного відділення шторка перекидає світловий пучок. В обчислювальний блок 2 входить мікропроцесорна система (МПС), "Електроніка МС 2703". Клавіші "К (1)", "т (2)", "Д (5)", "С (4)" призначені відповідно для виконання калібрування приладу, вимірювання коефіцієнта пропускання, оптичної густини досліджуваної речовини, концентрації речовини в розчині. Клавіша "Ш (0)" МПС призначена для перевірки (вимірювання) "нульового відліку" n_0 .

Порядок роботи на фотоелектричному концентраційному колориметрі КФК-2МП

Перед кожним вимірюванням проводиться перевірка "нульового відліку". Для цього перед вимірюванням n_0 кришку кюветного відділення слід відкрити. Через 5 с натиснути клавішу "Ш (0)". На цифровому табло праворуч коми засвітиться значення n_0 , а ліворуч – символ "0". Значення n_0 має бути в межах від 0,001 до 1,000.

Для вимірювання оптичної густини D у кюветне відділення слід встановити кювету з розчинником або контрольним розчином, відносно якого проводиться вимірювання, і досліджуванним розчином (його розмішують у ближній комірці кюветоутримувача). Рукоятку 4 встановити в положення "1" (у світловий пучок вводиться кювета з розчинником або контрольним розчином). Закрити кришку кюветного відділення і натиснути клавішу "К (1)". На цифровому табло ліворуч коми загориться символ "1". Потім рукоятку 4 встановити в положення "2" (у світловий пучок вводиться кювета з досліджуванним розчином) і натиснути клавішу "Д (5)". На цифровому табло ліворуч від коми з'явиться символ "5", який означає, що відбулося вимірювання оптичної густини досліджуваного розчину. Її значення зчитується праворуч від коми.

Для вимірювання оптичної густини еритроцитів спочатку розводять їх до стандартної концентрації фізіологічним розчином, контролюючи розведення за допомогою фотоколориметра. 2 мл розчину з еритроцитами стандартної концентрації наливають у робочу кювету. Набирають піпеткою 2 мл соляної кислоти і вносять у робочу кювету, швидко перемішуючи скляною паличкою її вміст, і включають секундомір. Через кожні 30 с реєструють значення оптичної густини розчину з еритроцитами, що зазнають руйнування внаслідок гемолізу під впливом соляної кислоти. Спостерігається поступове зменшення оптичної густини D розчину. Якщо протягом двох 30-секундних інтервалів значення D на цифровому табло фотоколориметра не змінюється, то це сві-

дчить про завершення гемолізу. Значення оптичної густини заносять у графу 3 табл. 3.2. За початкову оптичну густину D_0 беруть ту, якій відповідає мінімальне значення ΔD . Цій D_0 відповідає початок гемолізу еритроцитів (з табл. 3.2 видно, що $D_0 = 0,400$). Різницю оптичної густини ΔD за 30-секундний інтервал відмічають у графі 4.

Таблиця 3.2

	Час гемолізу t , хв	Оптична густина D	Різниця ΔD	ΔD , %	ΔD , Σ %
1	2	3	4	5	6
Перед- гемолітична стадія	0	0,700			
	0,5	0,420			
	1,0	0,418			
	1,5	0,412			
	2,0	0,412			
	2,5	0,410			
	3,0	0,408			
	3,5	0,408			
Стадія гемолізу	4,0	0,402			
	4,5	0,400	0,002	0,6	0,6
	5,0	0,398	0,004	1,1	1,7
	5,5	0,394	0,006	1,7	3,4
	6,0	0,388	0,012	3,4	6,8
	6,5	0,376	0,012	3,4	10,2
	7,0	0,364	0,013	3,7	13,9
	7,5	0,351	0,014	4,0	17,9
	8,0	0,337	0,019	5,4	23,3
	8,5	0,318	0,022	6,3	29,6
	9,0	0,296	0,027	7,7	37,3
	9,5	0,269	0,036	10,3	47,6
	10,0	0,233	0,022	6,3	53,9
	10,5	0,211	0,023	6,6	60,5
	11,0	0,188	0,022	6,3	66,8
	11,5	0,166	0,022	6,3	73,1
	12,0	0,144	0,021	6,0	79,1
	12,5	0,123	0,020	5,7	84,8
	13,0	0,103	0,020	5,7	90,5
	13,5	0,083	0,018	5,1	95,6
	14,0	0,065	0,009	2,6	98,2
	14,5	0,056	0,006	1,7	99,9
	15,0	0,050	0,000	0,0	

Розподіл еритроцитів за стійкістю подається у відсотках (графа 5). За 100 % береться різниця $\Delta D_{\max}$ між оптичною густиною D_0 і оптичною густиною D_T

Розподіл еритроцитів за стійкістю подається у відсотках (граф 5). За 100 % береться різниця $\Delta D_{\max}$ між оптичною густиною D_0 і оптичною густиною D_t після закінчення гемолізу (у табл. 3.2. $\Delta D_{\max}=0,400-0,050=0,350$). Відсотковий розподіл еритроцитів за їх стійкістю зображають графічно у відсотках різниці оптичної густини $\% \Delta D = \frac{\Delta D}{\Delta D_{\max}} \cdot 100\%$ або відсотках еритроцитів (%E)

залежно від часу t гемолізу. Ця крива називається еритрограмою (рис. 3.7).

Еритрограма (граф 5 табл. 3.2) є диференціальною кривою залежності $D = f(t)$ (граф 3). Зростаючі відсотки гемолізу розраховують, знаходячи суму відсотків ΔD ($\Sigma \% \Delta D$) (граф 6). До кінця гемолізу $\Sigma \% \Delta D$ досягає 100 % з допустимим відхиленням 100 ± 1 %.

Завдання 2. Вивчення впливу на еритрограми ЕГТА і CaCl_2

Дослідити стійкість еритроцитів у присутності двовалентних іонів Ca^{2+} . Для цього слід додати 10 ммоль/л CaCl_2 і зняти еритрограму. Далі зв'язати іони Ca^{2+} за допомогою 4 ммоль/л ЕГТА і в таких умовах отримати еритрограму.

Рекомендована література

- Физиология человека / Под ред. Г.И.Косицкого. – М., 1985. – С. 231-232.
Бурлакова Е.В., Владимиров Ю.А., Кольс О.Р. и др. Малый практикум по биофизике. – М., 1964.
Словарь физиологических терминов / Под ред. О.Г.Газенко. – М., 1987.
Ленинджер А. Основы биохимии. – М., 1985. – С. 205-206, 347-348.

Розділ 4

ЕЛЕКТРОБІОФІЗИКА

Робота 1. Вимірювання потенціалів кінцевих пластинок скелетного м'яза жаби

Поперечносмугасте м'язове волокно жаби є багатоядерною клітиною циліндричної форми довжиною від декількох міліметрів до декількох сантиметрів. Потенціал спокою (ПС) м'язового волокна створюється завдяки асиметрії іонів K^+ , Na^+ , Cl^- по обидва боки мембрани. Розрізняють фазні й тонічні поперечно-смугасті (скелетні) м'язові волокна. ПС фазних волокон становить -90 мВ. У стані спокою мембрана цих волокон добре проникна для K^+ та Cl^- , що в основному і визначає їх електричні властивості. Величина рівноважного потенціалу E_{Cl^-} , що створюється іонами хлору в м'язах, має такий же порядок, як і потенціал спокою (-90 мВ). Відхилення ПС супроводжується зміною внутріклітинної концентрації Cl^- , що вказує на те, що іони хлору перерозподіляються пасивно. Це продовжується, поки їх концентраційний градієнт не буде врівноважений з мембранним потенціалом. На відміну від фазних, ПС тонічних волокон становить -60 мВ. Це пов'язано з відносно високою натрієвою проникністю мембрани в стані спокою. Зміна ж зовнішньої концентрації іонів хлору практично не впливає на величину ПС мембрани цих волокон. Іони Na^+ знаходяться далеко від електрохімічної рівноваги, їх рівноважний потенціал становить $E_{Na} = 65$ мВ.

Синапси скелетних м'язів хребетних є найбільш дослідженими. Процес передачі збудження з рухового нерва на м'язове волокно в синапсі відбувається в такій послідовності: нервовий імпульс, який підходить до рухливого нервового закінчення, деполяризує його, що супроводжується входом Ca^{2+} до нервових закінчень. У свою чергу Ca^{2+} стимулює секрецію ацетилхоліну (АХ) із синаптичних везикул. АХ, що виділився, дифундує крізь синаптичну щілину до поверхні кінцевої пластинки та взаємодіє з холінорецепторами, внаслідок чого в мембрані кінцевої пластинки збільшується проникність іонів Na^+ та K^+ . Описані зміни супроводжуються деполяризацією мембрани у вигляді потенціалу кінцевої пластинки (ПКП) (рис. 4.1)

Ступінь ацетилхолінової деполяризації безпосередньо залежить від вихідної величини ПС м'язового волокна та рівноважного потенціалу при дії АХ,

який досягає близько 15 мВ. Можливо, що медіатор при взаємодії з хеморецепторами мембрани м'язового волокна активує їх, завдяки чому в мембрані відкриваються додаткові іонні канали. Активність цих каналів контролюється тільки хеморецепторами, не чутливими до величини потенціалу на мембрані, і тому їх провідність потенціалнезалежна на відміну від іонних каналів, які беруть участь у генерації потенціалу дії (ПД).

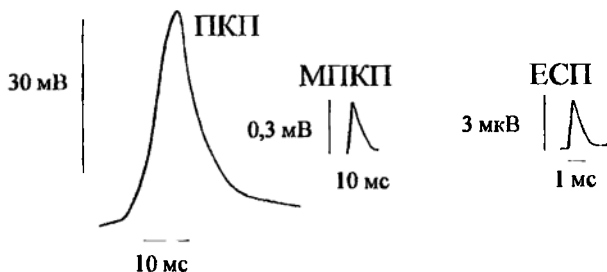


Рис. 4.1. Синаптичні потенціали кінцевої пластинки скелетного м'язу жаби:
ПКП – потенціал кінцевої пластинки; МПКП – мініатюрний потенціал кінцевої пластинки;
ЕСП – елементарний синаптичний потенціал

Синаптична затримка, яка визначається як час з моменту виникнення нервового імпульсу в нервових закінченнях до появи ПКП, коливається в межах 0,25–0,3 мс. Більша частина цього часу припадає на секрецію медіатора з нервових закінчень і дифузію його до мембрани кінцевої пластинки. Коли ПКП досягає порогової величини (20–30 мВ), починається генерація ПД, який, поширюючись по м'язовому волокну, і викликає збільшення концентрації Ca^{2+} у волокні, унаслідок чого відбувається активація скоротливого апарату м'язу.

У стані спокою в кінцевій пластинці періодично виникають спонтанні деполяризаційні потенціали амплітудою 0,3–1,0 мВ – мініатюрні потенціали кінцевої пластинки (МПКП), які зумовлені спонтанним вивільненням АХ із везикул пресинаптичних мембран нервових закінчень (рис. 4.2).

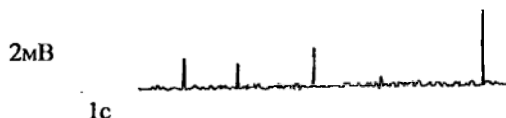


Рис. 4.2. Мініатюрні потенціали кінцевих пластинок скелетного волокна m.extensor longus digiti IV жаби

ПКП складається з 100-200 МПКП унаслідок синхронного вивільнення ацетилхоліну з багатьох синаптичних везикул під впливом нервового імпульсу, а МПКП – зі 100 елементарних синаптичних потенціалів (ЕСП) амплітудою порядку 3 мкВ (рис. 4.1). Вважається, що приблизно 100 молекул (АХ), які виділяються з однієї синаптичної везикули, взаємодіють з відповідною кількістю холінорецепторів.

ПКП скелетного волокна реєструється за допомогою мікроелектродної техніки. Електричні параметри мембран збудливих клітин реєструють шляхом уведення всередину клітини металевого електрода (діаметр кінчика 5-10 мкм), що не поляризується, або скляного мікроелектрода (діаметр кінчика 0,5-0,05 мкм). Вибір електрода для досліджень визначається розмірами клітин. Так, гігантські аксони кальмара, що досягають у діаметрі 1 мм, можуть бути досліджені за допомогою тонких металевих електродів. Як такі найчастіше застосовуються хлорсрібні електроди – срібний дріт, покритий шаром хлориду срібла AgCl . На електроді протікає реакція: $\text{Ag} + \text{Cl}^- = \text{AgCl} + \text{e}^-$ й електрод покривається тонким шаром AgCl . Такі електроди використовуються не тільки для відведення електричних потенціалів нервових або м'язових клітин, а й для електричного подразнення.

Товщина скелетного волокна коливається в межах від 10 до 80 мкм, тому для реєстрації досліджуваних потенціалів (ПС, ПКП, МПКП) найзручніше використовувати скляний мікроелектрод, розміри кінчика якого значно менші за об'єкт.

Матеріали та прилади: фізіологічний розчин Рінгера такого складу: NaCl – 116, KCl – 2,5, CaCl – 1,8, NaHCO_3^- – 1,8 ммоль/л, Д-тубокурарін у концентрації $2 \cdot 10^{-6}$ моль/л, вазелінове масло, скляні мікропіпетки, препарувальні голки, ножиці, скальпель, хлорсрібні електроди, скляні мікроелектроди з опором 10-20 МОм, 3 моль/л KCl для заповнення мікропіпеток, чашка Петрі з воском, обладнання реєструючої системи установки.

Завдання 1. Виготовлення скляних мікропіпеток

Скляний мікроелектрод – це мікропіпетка, заповнена електролітом. Мікропіпетки виготовляють в автоматичних установках (рис. 4.3) шляхом витягування із трубочок-заготовок з пірексу – тугоплавкого й хімічно стійкого скла.

За допомогою верхнього 1 і нижнього 4 затискачів скляна трубочка 2 закріплюється у пристрої. До нижньої частини затискача 4 прикріплений металевий стрижень 5, що створює попереднє навантаження на скляну трубочку 2. Через понижуючий трансформатор 6 відбувається накаливання вольфрамової нитки 3. Через деякий період часу t , який визначається роботою реле, включається соленоїд S , який різко втягує металевий стрижень 5, чим забезпечує розрив розігрітої скляної трубки. Реле вимикає розігрів нитки 3 за декілька мілісекунд до розриву. Установка дозволяє отримувати мікропіпетки з кінчиком діаметром від 0,5 до 0,05 мкм. Електрод буде виявляти пошкоджу-

ючу дію на клітину, якщо його кінчик буде дуже коротким. Але він не повинен бути занадто довгим, оскільки електрод буде дуже гнучким і не проколе клітину. Найзручнішою є багатоступінчаста форма тонкої частини мікроелектрода.

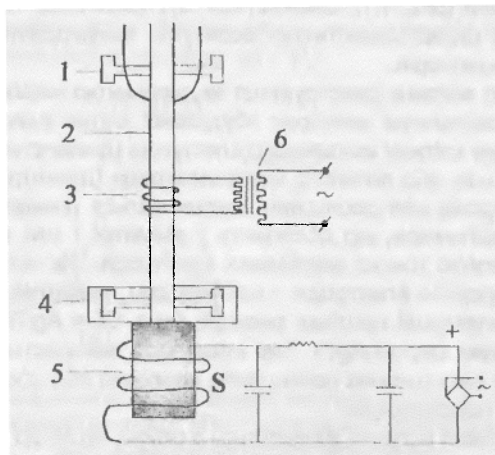


Рис. 4.3. Схема установки для аитягування скляних мікропіпеток (пояснення в тексті)

Для дослідження електричних потенціалів мембрани скелетного волокна слід використовувати мікропіпетки, діаметр кінчика яких близько 0,5 мкм.

Завдання 2. Заповнення скляних мікропіпеток електролітом

Мікропіпетки заповнюються розчином KCl концентрацією 3 моль/л. Розчин хлориду калію зручний тим, що дифузійний потенціал E_d (розд. 3, формула (3.8.)), який створюється на кінчику електрода в цитоплазмі, невеликий, оскільки рухомість K^+ та Cl^- майже однакова і становить відповідно $7,64 \cdot 10^{-7}$ та $7,91 \cdot 10^{-7}$ ($m^2/c \cdot B$), тоді як для іонів Na^+ вона дорівнює $5,2 \cdot 10^{-7}$ ($m^2/c \cdot B$). Це дозволяє звести до мінімуму похибку результатів вимірювань, що вносяться самими електродами.

Появі потенціалу кінчика мікроелектрода також сприяють негативно заряджені атоми кисню, що входять до структури скла. Усередині капіляра поблизу від'ємно зарядженої поверхні створюється надлишок рухливих катіонів, тоді як концентрація аніонів понижена. А це означає, що основними носіями зарядів у ділянці подвійного шару стають катіони, унаслідок чого на кінчику мікроелектрода виникає дифузійна різниця потенціалів зі знаком мінус усередині нього. Щоб уникнути помилки у визначенні абсолютних значень параметрів мембрани клітини відбирають мікроелектроди, потенціал кінчика

яких не перевищує 5 мВ. Для цього застосовують електричну схему Едріана. Слід указати, що використання розчину хлориду калію пов'язано також з тим, що завдяки високій концентрації іонів калію в клітині буде відбуватися незначна дифузія (0,12-0,14 моль/л) електроліту з кінчика мікроелектрода всередину клітини. Дифузію можна зменшити, якщо заповнювати мікроелектрод 1 % агар-агаром. Однак слід пам'ятати, що концентрація іонів хлору в клітині досить мала, але проникнення цих іонів з мікроелектродів може впливати специфічно на клітину. Враховуючи це, можна зробити висновок, що тривале використання мікроелектродів для відведення електричних потенціалів мембран клітин є небажаним. При відведенні гальмівних потенціалів від центральних нейронів, механізм формування яких пов'язаний зі зміною проникності мембрани переважно до іонів хлору, використання мікроелектродів, заповнених KCl, недопустимо. Цей електроліт можна замінити розчином цитрату калію концентрацією 1-2 моль/л.

Завдання 3. Вимірювання опору мікроелектрода

Опір мікроелектродів вимірюється за допомогою електричної схеми, зображеної на рис. 4.4.

Надійним показником, що дозволяє зробити висновок про придатність скляних мікроелектродів до роботи, є їх опір R_e . Опір мікроелектрода, який зумовлений опором основної маси розчину електроліту й опором на межі скло – розчин, залежить також від геометрії кінчика мікропіпетки:

$$R_e = \frac{l}{\pi \theta \sigma r} \quad (4.1.)$$

де σ – провідність заповнюючого електроліту (26 См/м для розчину KCl концентрацією 3 моль/л), θ – кут сходження кінчика мікропіпетки (радіан/2), r – радіус отвору кінчика мікропіпетки. У формулі (4.1.) не враховується неоднорідність провідності розчину внаслідок дифузії в кінчику мікропіпетки по довжині. Мікроелектроди, що використовуються в експерименті для відведення електричних потенціалів скелетних м'язових волокон, як було вже відмічено, повинні мати діаметр кінчика порядку 0,5 мкм. Такі мікроелектроди будуть мати опір не більше 10-15 МОм. Мікроелектроди з опором, що перевищує 45-50 МОм, мають великий та нестабільний власний потенціал, погано пропускають струми, погіршують часові розділення системи.

У силу різних причин опір мікроелектродів може змінюватися в процесі підготовки до експерименту та під час його проведення. Наприклад, він збільшується при запайці кінчика мікроелектрода в процесі його витяжки, утворенні в кінчику кристаликів солі, при занадто довгому кінчику та малому його діаметрі (менше 0,5 мкм) або опір зменшується при поломці кінчика мікроелектрода, уведеного до середини клітини. Виходячи з цього, стає зрозумі-

лим, що в процесі проведення експериментів необхідний постійний контроль за опором мікроелектрода. Це важливо, оскільки при внутрішньоклітинному відведенні електричних потенціалів від м'язових волокон, що скорочуються, кожне скорочення може стати причиною поломки мікроелектрода, а отже, збільшення дифузії електроліту до клітини. Відсутність же надійного контролю може призвести до помилкових висновків.

Для вимірювання опору скляного мікроелектрода спочатку необхідно в електричний ланцюг реєструючої системи включити низькоомний калібратор (рис. 4.4), який дає калібровані різниці потенціалів таких величин: від 1 до 100 мкВ і від 1 до 100 мВ. Для оцінки опору мікроелектрода в електричний ланцюг установки замість електрода включають калібрувальний опір R ,

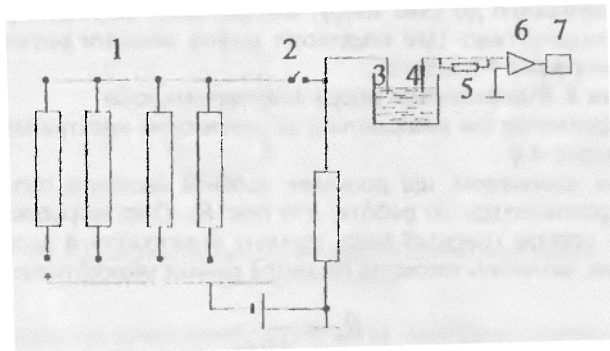


Рис. 4.4. Вимірювання опору скляних мікроелектродів:

1 – калібратор; 2 – перемикач; 3 – індиферентний електрод; 4 – мікроелектрод;
5 – калібрувальний опір; 6 – попередній підсилювач; 7 – реєструюча установка

величина якого 10 МОм. Далі при визначеному підсиленні сигнал з калібратора подають на вхід реєструючої системи. На екрані реєструють відхилення променя. Не змінюючи підсилення в електричний ланцюг включають другий калібрувальний опір R величиною тепер уже 20 МОм і повторюють всю процедуру. На екрані осцилографа знову отримують відхилення променя відповідної величини. Потім підключають мікроелектрод. Якщо в момент подачі сигналу від калібратора (при обраному підсиленні) під час підключення мікроелектрода відмітка від калібратора знаходиться між отриманими раніше відхиленнями променя осцилографа, то мікроелектрод можна вважати придатним для роботи.

Завдання 4. Приготування нервово-м'язового препарату (*m. sartorius* – *n. ichiaticus*) жаби й розміщення його в робочій камері для реєстрації ПКП

Помістити нервово-м'язовий препарат у робочу камеру, заповнивши перший відсік камери нормальним розчином Рінгера, а другий – вазеліновим маслом (рис. 4.5).

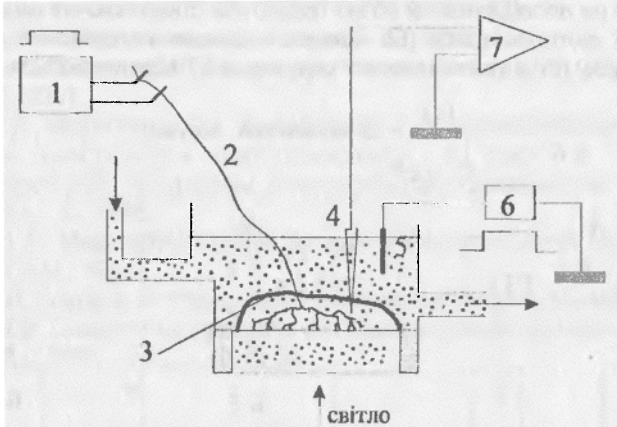


Рис. 4.5. Схематичне зображення відведення потенціалів кінцевих пластинок нервово-м'язового препарату *n. ichiaticus* – *m. sartorius* жаби: 1 – електронний стимулятор; 2 – сиднічний нерв; 3 – м'яз; 4 – мікроелектрод; 5 – індиферентний електрод; 6 – калібратор; 7 – попередній підсилювач

За допомогою довгофокусного мікроскопа знайти локалізацію нервових закінчень у м'язових волокнах нервово-м'язового препарату. Підключити мікроелектрод, індиферентний електрод і подразнюючі електроди в реєструючу систему електрофізіологічної установки (рис. 4.6).

Реєструюча система складається з таких блоків: Б1 – попередній підсилювач, який використовується, як вхідний високоомний пристрій; Б2 – електро-механічний перетворювач, що використовується для дослідження механічної активності об'єкта; Б3 і Б4 – двопроменеві осцилографи; Ік та ІІк – канали реєстрації. Підсилювачі вертикального відхилення Б4 відключені, а вертикально відхилюючі пластини Б4 підключені паралельно відповідним пластинам Б3. Для синхронізації розгортки використовується синхроімпульс (а) від генератора розгортки Б3. Усе це дозволяє отримати на екранах Б3 і Б4 тотожні зображення. З екрана Б4 зображення фотографується за допомогою фото-оптичної приставки типу ФОР-2 (Б5), що працює у двох режимах реєстрації:

1 – покадрової, 2 – неперервної. Для одночасної реєстрації трьох та більше сигналів замість Б4 і Б5 може використовуватися шлейфний осцилограф. Б6 – електронний стимулятор. Імпульс (б) надходить на електронне реле Б7, яке замикає ланцюг керування фотозатвором Б5. Фотозатвор відкривається на час, що дорівнює тривалості імпульсу (б). Одночасно на Б3 надходить імпульс запуску (в) з Б6 і генераторів розгортки Б1 і Б2. Одночасно з імпульсами (б) і (в) на досліджуваний об'єкт подається стимулюючий імпульс (с). За неперервної фотореєстрації (Б5 працює в режимі неперервної реєстрації) імпульс запуску (в), а також і ланцюг керування Б7 відключаються.

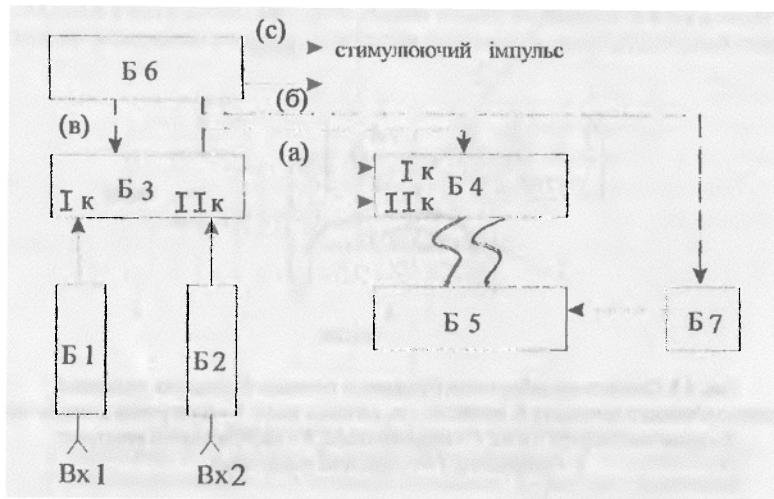


Рис. 4.6. Блок-схема реєструючої системи електрофізіологічної установки:
— ланцюги сигналів, що досліджуються; — — ланцюги синхронізації та керування

Завдання 5. Проведення кураризації нервово-м'язового препарату

Кураризація препарату дозволяє приблизно впродовж 2 год відводити потенціали від однієї і тієї самої пластинки за різних впливів на неї. Кураризація зменшує амплітуду ПКП нижче критичного рівня (ПКП становить при кураризації менше 30 % ПД) так, що в цьому випадку ПД м'язового волокна не виникає і залишаються лише локальні підпорогові потенціали, які не супроводжуються скороченням. Тому перед відведенням ПКП необхідно до розчину Рінгера додати Д-тубокурарин концентрацією $2 \cdot 10^{-6}$ моль/л. Д-тубокурарин блокує передачу імпульсів з нерва на м'яз протягом 15-20 хв, після чого цей розчин замінюють на нормальний розчин Рінгера.

Завдання 6. Регстрація ПКП

Під контролем довгофокусного мікроскопа в ділянці локалізації нервових закінчень ввести скляний мікроелектрод для вимірювання електричного ПКП. Через електроди від електронного стимулятора універсального (ЕСУ-2) подати імпульс подразнення прямокутної форми на нерв.

Рекомендована література

- Костюк П.Г.* Мікроелектродна техніка. – К., 1960.
- Костюк П.Г., Зима В.Л., Магура І.С., Мірошніченко М.С., Шуба М.Ф.* Біофізика. – К., 2001.
- Зима В.Л., Мирутенко В.І., Давидовская Т.Л.* Биофизические методы исследований. Электроника и электробиофизика. – К., 1990.
- Комиссаров И.В.* Механизмы химической чувствительности синаптических мембран. – К., 1986.
- Первис. Р.* Микроелектродные методы внутриклеточной регистрации и ионофорез. – М., 1983.
- Скок В.И., Шуба М.Ф.* Нервно-мышечная физиология. – К., 1986.
- Шуба М.Ф.* Синаптична передача в м'язах і механізм дії медіаторів // Вісн. АН України. – 1977. – № 2. – С. 44-56.

Робота 2. Електрофоретична швидкість і ξ -потенціал дріжджових клітин

Електрофоретичні методи відіграють важливу роль у сучасній біофізиці. Явище **електрофорезу** – це рух вискодисперсних заряджених частинок (клітин, макромолекул) у рідині під впливом зовнішнього електричного поля. Електрокінетичні явища зумовлені різницею потенціалів на межі поділу двох фаз, які зміщуються одна відносно другої.

Електрофорез широко застосовується для розділення суміші білків у розчині. Суть електрофорезу білків полягає в тому, що різні білки за певних рН відрізняються електрофоретичною рухомістю. Використовують два основні способи електрофоретичного розділення білків – вільний електрофорез, або електрофорез за методом рухомої межі, і зональний. Суть **вільного електрофорезу** полягає в тому, що білок під дією зовнішнього електричного поля зміщується з розчину у вільний від білка буфер. За цих умов утворюється межа, яка рухається в бік електрода. Електрофорез за методом рухомої межі протягом багатьох років залишався основним методом, що застосовувався при кількісному аналізі складних білкових сумішей, наприклад, білків плазми

крові. Другий метод – **зональний електрофорез** – значно потіснив перший завдяки своїй простоті та більшій роздільній здатності. Його проводять на носіях (фільтрувальному папері, крохмальному або поліакриламідному гелі) за умови сталого значення рН. При створенні градієнта рН отримують різновид зонального електрофорезу – **диск-електрофорез**. Електрофорез у гелях зараз успішно застосовується для розділення нуклеїнових кислот. При цьому нуклеїнові кислоти розділяються не стільки за різницею електричного заряду молекул, як за розміром, тому що структура гелю виступає в ролі "молекулярного сита".

Потенціал, що виникає на межі між дисперсною фазою і дисперсним середовищем, називається **електрокінетичним**, або ξ -потенціалом. Поява електричного заряду на поверхні частинки зумовлена властивостями цієї поверхні. Вона може мати як іоногенні групи, так і певну спорідненість з деякими іонами, які будуть адсорбуватись на її поверхні. У результаті такого перерозподілу іонів навколо поверхні частинки утворюється подвійний електричний шар. Іони, що прилягають до поверхні, називаються потенціалвизначальними іонами, а іони, які орієнтуються навколо них, – протиіонами. У подвійному електричному шарі частина протиіонів адсорбується, а частина розподіляється дифузно. Якщо концентрація протиіонів не дуже велика, тоді частина їх, що характеризується невеликою енергією руху, залишається на поверхні, а інша, яка має велику енергію, залишає її і входить до складу дифузного шару. Таким чином, подвійний електричний шар складається з двох частин – адсорбованого й дифузного шарів протиіонів. Електрокінетичні явища залежать, в основному, від наявності дифузного шару протиіонів. Ці уявлення дозволяють встановити кількісні закономірності для подвійного електричного шару.

Відомо, що різниця потенціалів V на провіднику довільної форми пропорційна величині заряду q

$$V = \frac{q}{C}, \quad (4.2)$$

де C – ємність провідника, яка залежить від його розмірів. Ємність з двох паралельних провідних пластин (плоский конденсатор) визначається як

$$C = \frac{\epsilon_0 \epsilon S}{d}, \quad (4.3)$$

де S – площа пластин; d – відстань між пластинами; ϵ – відносна діелектрична стала; стала $\epsilon_0 = 8,85 \cdot 10^{-12} \text{ Кл}^2 \cdot \text{Н}^{-1} \cdot \text{м}^{-2}$. Після підстановки C (4.3) у формулу (4.2) різниця потенціалів на плоскому конденсаторі буде

$$V = \frac{qd}{\epsilon_0 \epsilon S}. \quad (4.4)$$

Тепер візьмемо капіляр (рис. 4.7), стінки якого позитивно заряджені відносно рідини, що заповнює капіляр. Якщо до капіляра тангенсійно прикласти зовнішнє електричне поле за допомогою електродів 3, то спостерігається зміщення рідини між електродами – **явище електроосмосу**.

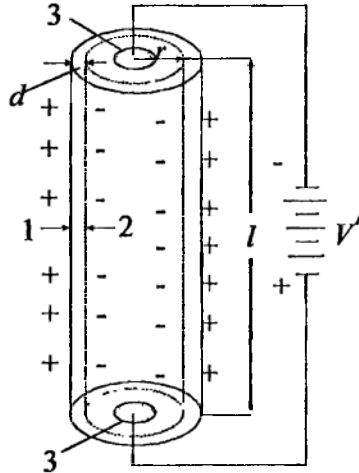


Рис. 4.7. Схема електроосмотичного руху рідини в капілярі:

1 – поверхня капіляра; 2 – рідина; 3 – електроди; d – товщина подвійного електричного шару; r – радіус капіляра; l – довжина капіляра; V' – різниця потенціалів на електродах 3

Швидкість зміщення рідини в капілярі визначається такими факторами: різницею потенціалів V' , віднесеною до довжини капіляра l , тобто напруженістю електричного поля

$$E = \frac{V'}{l} \quad (4.5)$$

і величиною заряду q рідини. Якщо товщина подвійного шару d значно менша, ніж радіус капіляра r ($d \ll r$), тоді подвійний електричний шар подібний до плоского конденсатора, а електрокінетичний потенціал ξ дорівнює потенціалу V такого конденсатора. Використовуючи $\xi = V$ та формулу (4.4), отримуємо

$$V = \xi = \frac{dq}{\epsilon\epsilon_0 S}. \quad (4.6)$$

У цій формулі відстань між пластинами конденсатора d є товщина подвійного електричного шару. Заряд q , розділений на площу поверхні капіляра S , дорівнює густині заряду σ . Тому формула (4.6) замінюється так:

$$\xi = \frac{d\sigma}{\epsilon\epsilon_0}. \quad (4.7)$$

Визначимо силу f , за допомогою якої зміщується рідина в капілярі. Із законів електростатики відомо, що сила дорівнює добутку напруженості електричного поля E на густину заряду σ

$$f = \sigma E. \quad (4.8)$$

Цій силі протидіє сила опору F зміщення рідини в капілярі, яка за законом Ньютона записується як

$$F = \eta \frac{du}{dx}, \quad (4.9)$$

де η – в'язкість рідини, u – швидкість зміщення рідини в капілярі; du/dx – градієнт швидкості. Якщо швидкість зміщення рідини змінюється лінійно з відстанню в межах подвійного шару, то градієнт du/dx можна взяти рівним u/d . Звідси сила опору F (4.9) запишеться так:

$$F = \eta \frac{u}{d}. \quad (4.10)$$

При електроосмотичному зміщенні рідини з постійною швидкістю u діюча сила f дорівнює силі опору F :

$$\sigma E = \eta \frac{u}{d}. \quad (4.11)$$

З виразу (4.11) знаходимо густину заряду

$$\sigma = \frac{\eta u}{Ed}. \quad (4.12)$$

Підставивши σ у формулу (4.7), отримуємо вираз для електрокінетичного потенціалу:

$$\xi = \frac{d\sigma}{\epsilon\epsilon_0} = \frac{d}{\epsilon\epsilon_0} \frac{\eta u}{Ed} = \frac{\eta}{\epsilon\epsilon_0} \frac{u}{E}. \quad (4.13)$$

Ця формула Смолюховського. Відношення лінійної швидкості u до напруженості електричного поля E називається **електрофоретичною швидкістю** $\bar{W}$. Тоді ξ -потенціал запишемо через електрофоретичну швидкість так:

$$\xi = \frac{\eta}{\epsilon \epsilon_0} \cdot \bar{W} \quad (4.14)$$

Величина ξ -потенціалу в нормі постійна для клітин даного типу, але може змінюватися, якщо на клітину діють різні пошкоджуючі фактори, поверхнево-активні речовини тощо. Тому метод електрофорезу застосовується для оцінки функціонального або патологічного стану клітин.

Завдання 1. Визначення електрофоретичної швидкості дріжджових клітин

Матеріали та прилади: мікроскоп, окуляр-мікрометр, об'єкт-мікрометр, камера для електрофорезу, стабілізатор напруги БПУ-1, насичені розчини CuSO_4 і KC1 , 10 % розчин KCl , суспензія дріжджів у буфері.

Підготовка установки до роботи. Установка для електрофорезу складається з електричної частини, яка створює електричне поле, і мікроскопа для спостереження за рухом дріжджових клітин (рис. 4.8). Перш ніж почати виконувати завдання, необхідно ознайомитись з установкою, упевнитись, що вона готова до роботи. Подвійні скляночки, розміщені на предметному столику мікроскопа, з'єднати між собою скляними електродами, як показано на рис. 4.8. Г- і U-подібні скляні трубки 6 заповнюються агар-агаром, що виготовляється на насиченому розчині KC1 .

Напруга від стабілізатора 1 подається через перемикач 4 за допомогою металевих провідників 5 на камеру 7. Для передачі напруги до суспензії дріжджових клітин у крайні скляночки з металевими провідниками 5, за допомогою груші заливають насичений розчин CuSO_4 . В інші дві скляночки, які передають напругу на камеру 7 через Г-подібні трубки, заливають 10 % KCl . За допомогою піпетки заповнюють камеру 7 суспензією дріжджових клітин і накривають покривним скельцем так, щоб не було пухирців повітря. Кількість суспензії має бути достатньою, а кінці електродів 6 потрібно обов'язково змочити нею.

Хід роботи. Встановити камеру 7 на столику мікроскопа 9 таким чином, щоб її середина знаходилась у центрі поля зору. Дочекатися, поки рух дріжджових клітин зупиниться, після чого замкнути електричне коло. За допомогою стабілізатора напруги 1 виставити силу струму в межах 3-4 мА і виміряти швидкість руху дріжджових клітин. Швидкість руху дріжджових клітин вимірюють таким чином. За допомогою секундоміру визначають час t , за який клітина пройшла відстань між двома поділками сітки окуляр-мікрометра, ціна поділки якого відома або вимірюється за допомогою об'єкт-мікрометра. Про-

водять 10 вимірювань швидкості руху клітин в одному напрямку при включеному електричному полі.

Після цього змінюють полярність електричного поля перемикачем 4 і роблять 10 вимірювань швидкості руху клітин у протилежному напрямку. Швидкість руху визначають за формулою

$$u = \frac{L}{t}, \quad (4.15)$$

де L – відстань, яку проходить клітина за час t . Електрофоретична швидкість дріжджових клітин буде

$$\bar{W} = \frac{u}{E} = \frac{L}{tE} \quad (4.16)$$

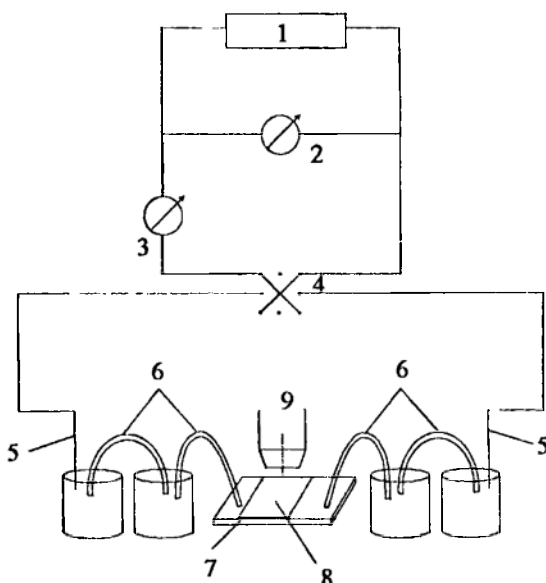


Рис. 4.8. Схема пристрою для проведення електрофорезу:

- 1 – стабілізатор напруги; 2 – вольтметр; 3 – міліамперметр; 4 – перемикач струму;
5 – металеві електроди; 6 – скляні електроди; 7 – камера для електрофорезу;
8 – покривне скельце; 9 – мікроскоп

Якщо підставити напруженість електричного поля з формули (4.5), то електрофоретична швидкість буде розраховуватись так:

$$\bar{W} = \frac{L \cdot I}{tV'} (\text{м}^2 \cdot \text{с}^{-1} \cdot \text{В}^{-1}). \quad (4.17)$$

Напругу V' фіксують вольтметром 2 (рис. 4.8), а відстань l між Γ -подібними електродами вимірюють лінійкою. З 20 вимірювань визначають середню електрофоретичну швидкість.

Завдання 2. Визначення ξ -потенціалу дріжджових клітин

Для визначення ξ -потенціалу дріжджових клітин аикористати формулу (4.14). При кімнатній температурі 293 К узяти $\eta = 10^{-3} \text{ Н} \cdot \text{с} \cdot \text{м}^{-2}$ і $\epsilon = 80$. Тоді

$$\xi = \frac{\eta}{\epsilon \epsilon_0} \bar{W} = \frac{10^{-3}}{8,85 \cdot 10^{-12} \cdot 80} \bar{W} = 1,41 \cdot 10^6 \bar{W} \quad (4.18)$$

Величина ξ -потенціалу визначається у вольтах або мілівольтах.

Рекомендована література

Биофизика. Практикум / Под ред. П.Г.Богача. – К., 1983.

Давид Р. Введение в биофизику. – М., 1982.

Костюк П.Г., Зима В.Л., Магура І.С., Мірошніченко М.С., Шуба М.Ф. Біофізика. – К., 2001.

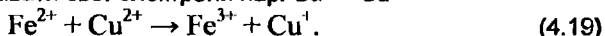
Робота 3. Визначення стандартних редокс-потенціалів потенціометричним методом

Основним джерелом енергії, необхідної для підтримання життєдіяльності організмів, є процеси біологічного окиснення, які зумовлюються сукупністю окисно-відновних перетворень різних речовин під впливом ферментів. Результатом біологічного окиснення є накопичення енергії в доступній для використання організмом формі у вигляді молекул АТФ. В основі біологічного окиснення лежать окисно-відновні реакції, у процесі яких відбувається перенесення електронів від однієї молекули до іншої. Сполуки, що віддають електрони в таких реакціях, називаються донорами електронів, або відновниками, а ті, що приєднують, – акцепторами електронів, або окисниками. Окисники й відновники завжди функціонують як спряжені окисно-відновні пари (редокс-пари), а процес окиснення – відновлення в загальному вигляді – це перенесення електронів від однієї окисно-відновної пари (системи) до іншої. Окисно-відновні системи з великим спорідненням з електронами (акцептори електронів) мають схильність приймати електрони (наприклад, $1/2 \text{ O}_2 + 2\text{e}^- = \text{O}^{2-}$), а з малим спорідненням (донори електронів) – віддавати їх ($\text{H}_2 = 2\text{H}^+ + 2\text{e}^-$).

Перехід електронів від речовини з більш низькою спорідненістю до речовини з більш високою спорідненістю (від донора до акцептора електродів) проходить довільно з виділенням енергії, і це є екзергонічний процес. Перенесення електронів у протилежному напрямку – ендергонічний процес.

Існує чотири способи передачі електронів від однієї молекули до іншої:

1. Пряме перенесення електронів. Наприклад, окисно- і відновна пара $\text{Fe}^{2+} - \text{Fe}^{3+}$ може передавати свої електрони парі $\text{Cu}^+ - \text{Cu}^{2+}$



2. Перенесення електронів за участю атомів водню. Атом водню складається з протона (H^+) і електрона (e^-). У цьому разі рівняння матиме вигляд

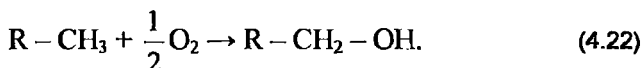


де AH_2 – донор водню (або електронів); A – акцептор водню. Разом A і H складають спряжену окисно-відновну пару, здатну відновлювати B шляхом перенесення атомів водню:



3. Перенесення електронів від донора до акцептора у формі гідрид-іона (H^-), що несе два електрони.

4. Перенесення шляхом прямої взаємодії органічного відновника з киснем, що приводить до утворення продукту, в якому міститься ковалентно зв'язаний кисень. Прикладом такої реакції може бути окиснення вуглеводу до спирту:



У цій реакції донором електронів є вуглевод, а атом кисню відіграє роль акцептора.

Усі чотири способи перенесення електронів мають місце в живих клітинах. Під час ферментативного окиснення молекул відщеплюється, як правило, по два відновні еквіваленти, і кожний атом кисню приєднує також два таких. Через це одиницю біологічного окиснення вважається перенесення однієї пари відновних еквівалентів від субстрату на кисень.

Спорідненість з електронами визначається через окисно-відновний потенціал (або редокс-потенціал). Окисно-відновний потенціал цитоплазми можна визначити шляхом уведення деяких індикаторних барвників, які змінюють свій колір залежно від концентрації водневих іонів у середовищі, або знебарвлюються при відновленні. Індикаторами найчастіше використовують водорозчинені солі сульфокислот, які після мікроін'єкції їх у клітину дифузно забарвлюють водну фазу цитоплазми. Як правило, цитоплазматичний матрикс дає слабокислу реакцію (pH близько 6,8). Ця колірна реакція має велике значення, оскільки залежить від парціального тиску кисню в середовищі і від концентрації ферментних систем і метаболітів в клітині та, відповідно, є їх

показником. Крім того, вона дозволяє передбачувати шляхи використання хімічної енергії в клітині. Наприклад, окисно-відновний потенціал цитоплазми амеби в умовах анаеробіозу становить приблизно $-0,275$ В, а при аеробіозі $+0,070$ В. Це різниця потенціалів, яка створюється в процесі окисно-відновної реакції перенесення електронів від відновника до окисника й характеризує дане електролітичне середовище. Від'ємний редокс-потенціал означає низьку спорідненість з електронами, додатний – високу. Редокс-потенціал виникає на інертному електроді (золото, платина), зануреному в оборотну окисно-відновну систему, і не має характерного стрибка потенціалу. **Окисно-відновним електродом** називається система, що складається з інертного металу, зануреного в розчин двох солей, які містять однойменні катіони або аніони змінного ступеня окиснення. **Оборотна окисно-відновна система** – це система, що містить одночасно речовину в окисненій і відновленій формах, які легко переходять одна в одну. Якщо занурити платиновий електрод у розчин, який містить дво- і тризарядні іони заліза, то іони Fe^{3+} можуть відновитися до Fe^{2+} за рахунок електронів, отриманих від платини ($\text{Fe}^{3+} + e^- \rightarrow \text{Fe}^{2+}$). Атоми самої платини не беруть участі в електродному процесі, тобто вона служить лише переносником електронів. У результаті електрод отримує позитивний заряд і притягує аніони з розчину. На поверхні електрода утворюється подвійний електричний шар з певним стрибком потенціалу. Цей електродний потенціал залежить від концентрації іонів Fe^{2+} і Fe^{3+} .

Редокс-потенціал, що виникає на електроді, зануреному в окисно-відновну систему, залежить від природи системи і співвідношення окисненої та відновленої форм. Кожна окисно-відновна система, або редокс-система, характеризується відповідним співвідношенням активностей окисненої та відновленої форм (**окиснена/відновлена, або *ox-red***). При високих співвідношеннях ***ox-red*** система буде функціонувати як окисник, або акцептор, а при низьких – як відновник, або донор електронів.

Здатність будь-якої спряженої окисно-відновної пари оборотно віддавати електрони кількісно характеризується за допомогою **стандартного окисно-відновного потенціалу E_0** . Його величина характеризує окисно-відновні властивості системи, визначає її здатність приймати або віддавати електрони й застосовується для порівняння окисно-відновних систем. Системи з більш високим додатним потенціалом будуть окиснювати системи з нижчим окисно-відновним потенціалом. Стандартний редокс-потенціал за визначенням дорівнює **електрорушійній силі (е.р.с.)** у вольтах, що виникає в напівелементі, в якому донор електронів і спряжений з ним акцептор електронів у концентраціях $1,0$ моль/л при 25°C і $\text{pH } 7,0$ перебувають у рівновазі з електродом, здатним приймати електрони від донора й передавати їх акцептору.

Для того, щоб виміряти величину е.р.с., яка виникає в такому напівелементі, його приєднують до стандартного напівелемента, е.р.с. якого відома (рис. 4.9).

Для отримання шкали окисно-відновних потенціалів вибирають загальний стандарт, потенціал якого довільно дорівнює нулю і відносно якого можна відраховувати інші потенціали. Таким стандартом (стандартним напівелементом)

служить водневий електрод $[\frac{1}{2} \text{H}_2 \rightarrow \text{H}^+ + \text{e}^-]$, е.р.с. якого вважати рівною нулю при тиску газоподібного водню 1 атм., концентрації H^+ 1,0 моль/л (що відповідає $\text{pH} = 0$) і температурі 25 °С. За тих самих умов, але при $\text{pH} = 7,0$ окисно-відновні системи характеризуються величиною E_x , в якій так ураховано значення pH : $E_x = E_0 - 0,06 \text{ pH}$. Якщо $E_0 = 0$, тоді $E_x = \text{pH} \cdot (-0,06)$.

Скорегований для $\text{pH} 7$ стандартний окисно-відновний потенціал водневого електроду дорівнює $E_x = 7 \cdot (-0,06) = -0,42 \text{ В}$, а потенціал пари вода – кисень дорівнює $+0,81 \text{ В}$. У цих межах (від $-0,42$ до $+0,81 \text{ В}$) знаходяться редокс-потенціали всіх біологічно важливих окисно-відновних систем. Різниця потенціалів між водневим і кисневим електродами становить $1,23 \text{ В}$. Процес біологічного окиснення зводиться до окиснення водню субстрату до води завдяки молекулярному кисню.

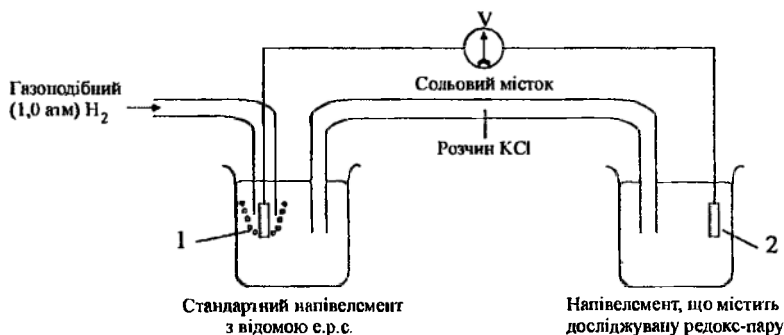
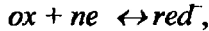


Рис. 4.9. Пристрій для вимірювання редокс-потенціалів:

V – мілівольтметр; 1 – стандартний електрод порівняння; 2 – вимірювальний електрод

Завдяки наявності ряду біологічних окисно-відновних систем, стрибок потенціалу під час окиснення субстратів здійснюється поступово з відносно невеликим перепадом вільної енергії. Це забезпечує більш повне перетворення енергії, що звільнюється, в енергію макроергічних сполук, які використовуються організмом для різноманітних фізіологічних сполук.

Знайдемо аналітичний вираз для кількісного визначення окисно-відновного потенціалу E . Нехай є окисник (ox) і відновник (red), для яких характерна така редокс-реакція:



де n – число електронів, які переносяться під час реакції. За умови рівноваги електрохімічні потенціали окисника і відновника дорівнюють один одному,

$$\tilde{\mu}_{ox} = \tilde{\mu}_{red}:$$

$$\mu_{ox}^0 + RT \ln [ox] + nFE_{ox} = \mu_{red}^0 + RT \ln [red] + nFE_{red}, \quad (4.23)$$

де μ_{ox}^0 і μ_{red}^0 – стандартні хімічні потенціали ox і red; E_{ox} і E_{red} – електродні потенціали окисника і відновника; R – газова стала; F – число Фарадея. Різниця електродних потенціалів – це окисно-відновний потенціал E :

$$E = E_{red} - E_{ox} = \frac{\mu_{ox}^0 - \mu_{red}^0}{nF} + \frac{RT}{nF} \ln \frac{[ox]}{[red]}. \quad (4.24)$$

Позначивши $E_0 = \frac{\mu_{ox}^0 - \mu_{red}^0}{nF}$ як стандартний окисно-відновний потенціал,

отримуємо аналітичний вираз для кількісного визначення окисно-відновного потенціалу:

$$E = E_0 + \frac{RT}{nF} \ln \frac{[ox]}{[red]}. \quad (4.25)$$

В експерименті величину редокс-потенціалу E визначають потенціометричним методом (рис. 4.9). При цьому вимірюється електрорушійна сила ланцюга, що складається з електрода вимірювання і електрода порівняння.

Припустимо, що є дві окисно-відновні системи, для яких вимірювані редокс-потенціали записуються так:

$$E_1 = E_{01} + \frac{RT}{nF} \ln \frac{[ox_1]}{[red_1]}, \quad E_2 = E_{02} + \frac{RT}{nF} \ln \frac{[ox_2]}{[red_2]}. \quad (4.26)$$

У стані рівноваги, тобто за рівності вимірюваних редокс-потенціалів $E_1 = E_2$, будемо мати:

$$E_{01} + \frac{RT}{nF} \ln \frac{[ox_1]}{[red_1]} = E_{02} + \frac{RT}{nF} \ln \frac{[ox_2]}{[red_2]}.$$

З цього рівняння знаходимо зміну стандартного окисно-відновного потенціалу.

$$\Delta E_0 = E_{02} - E_{01} \quad \Delta E_0 = \frac{RT}{nF} \left(\ln \frac{[ox_1]}{[red_1]} - \ln \frac{[ox_2]}{[red_2]} \right) = \frac{RT}{nF} \ln \left(\frac{[ox_1]/[red_1]}{[ox_2]/[red_2]} \right) \quad (4.27)$$

Відношення концентрацій окиснених і відновлених форм є константа рівноваги K_p :

$$K_p = \frac{[ox_1]/[red_1]}{[ox_2]/[red_2]} \quad (4.28)$$

Підставивши (4.28) у (4.27), отримуємо вираз

$$\Delta E_0 = \frac{RT}{nF} \ln K_p \quad (4.29)$$

Константа рівноваги K_p зв'язана зі зміною стандартної вільної енергії ΔG° таким співвідношенням (розділ II):

$$\Delta G^\circ = -RT \cdot \ln K_p \quad (4.30)$$

Здатність електронів переходити від редокс-системи з від'ємним редокс-потенціалом до систем з додатним редокс-потенціалом пов'язана з тим, що потік електронів направлений завжди таким чином, щоб вільна енергія системи зменшувалась. Чим більша різниця стандартних редокс-потенціалів ΔE_0 двох окисно-відновних пар, тим більшим виявляється зменшення вільної енергії під час перенесення електронів від електровід'ємної пари до електрододатної.

З рівнянь (4.29) і (4.30) знаходимо, що

$$\Delta G^\circ = -nF \Delta E_0, \quad (4.31)$$

де ΔG° у Дж; ΔE° у В.

Для визначення стандартних редокс-потенціалів використовується потенціометричне титрування. За цією методикою всякій різкій зміні концентрації титруючого розчину буде відповідати різка зміна потенціалу електрода. Залежність редокс-потенціалу від кількості титруючого розчину можна зобразити графічно (рис. 4.10). На рисунку видно точки перегинання кривої, котрим відповідають величини стандартних редокс-потенціалів E_{01} і E_{02} .

Матеріали та прилади. рН-метр; 0,1 н розчин $FeCl_2$; 2 н розчин HCl ; 0,1 н розчин перманганату калію.

Хід роботи. У хімічний стакан налити 10 мл 0,1 н розчину $FeCl_2$. Додати 20 мл 2 н розчину HCl і за допомогою платинового електрода виміряти потенціал цього розчину. Протитрувати цей розчин 0,1 н розчином перманганату калію. Для цього, користуючись автоматичним дозатором, внести в хімічний стакан кожен раз по 0,1 мл перманганату калію і виміряти при цьому окисно-відновний потенціал системи E .

Титрування припиняють, коли редокс-потенціал при додаванні титранту не зростає. Отримані результати заносять в табл. 4.1.

Таблиця 4.1

Редокс- потенціал E , мВ	Об'єм титранту V , мл									
	0,0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	...

На міліметровому папері побудувати потенціометричну криву титрування, як на рис. 4.10, даної окисно-відновної системи і графічним шляхом визначити стандартні окисно-відновні потенціали.

Використовуючи дані потенціометричного титрування, за допомогою формул (4.29) і (4.30) розрахувати константу рівноваги та зміну стандартної вільної енергії.

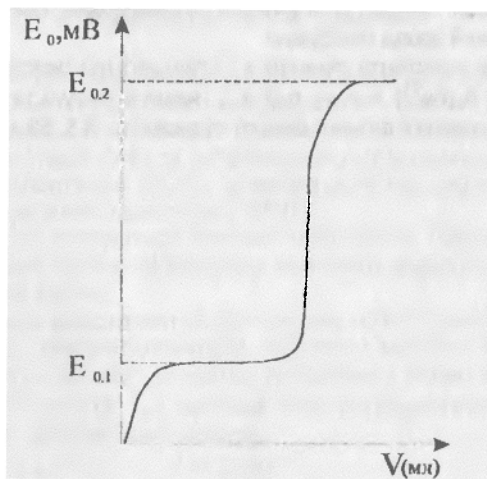


Рис. 4.10. Потенціометрична крива титрування окисно-відновної системи

Рекомендована література

- Основаы общей биологии / Под. ред. Э.Либберта. – М., 1982. – С. 155-169.
 Ленинджер А. Основы биохимии. – М., 1985. – С. 511-516.
 Хмельницкий Р.А. Физическая и коллоидная химия. – М., 1988. – С. 238-260.
 Словарь физиологических терминов / Под. ред. О.Г.Газенко. – М., 1987.
 Кучеренко Н.Е. и др. Биохимический справочник. – К., 1979. – С. 191-192.
 Рейвен П., Эверт Р., Айкхорн С. Современная ботаника. – М., 1990.
 Николс Д.Дж. Биоэнергетика. Введение в хемиосмотическую теорию. – М., 1985.

Задачі

1. Розрахувати мембранний потенціал спокою аксона кальмара при $t = 27^\circ\text{C}$, який перебуває в морській воді. При розрахунках використати такі концентрації іонів (ммоль/л): в аксоплазмі кальмара $[K^+] = 400$; $[Na^+] = 50$ і $[Cl^-] = 100$; у морській воді $[K^+] = 10$; $[Na^+] = 460$ і $[Cl^-] = 540$. Узяти коефіцієнти проникності іонів крізь мембрану $P_K : P_{Na} : P_{Cl} = 1 : 0,04 : 0,045$.

2. У тефлоновій пластинці, яка розділяє систему на два відсіки, зроблено отвір радіусом 1 мм і цей отвір затягнутий бішаровою ліпідною мембраною. При 27°C іони Na^+ розподілились так: з одного боку мембрани – $5 \cdot 10^{-2}$ моль/л, а з іншого – 10^{-3} моль/л. Питома електроємність мембрани становить $5 \cdot 10^4$ мкф/м². Знайти електричний заряд мембрани.

3. Визначити константу рівноваги і стандартний окисно-відновний потенціал реакції $b_2(Fe^{3+}) + e^- \leftrightarrow b_2(Fe^{2+})$, якщо в результаті такої реакції при 27°C зміна стандартної вільної енергії становить $-13,58$ кДж/моль.

Розділ 5

СПЕКТРАЛЬНІ МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Робота 1. Спектрофотометрія білків і нуклеїнових кислот

Спектральні методи широко застосовуються при дослідженні структурних особливостей біологічних об'єктів і макромолекул. Важливу інформацію про структурні особливості біополімерів одержують при використанні флуоресценції, ультрафіолетової (УФ) та інфрачервоної (ІЧ) спектрофотометрії, дисперсії оптичного обертання (ДОО), електронного парамагнітного резонансу (ЕПР), ядерного магнітного резонансу (ЯМР).

У роботі коротко описуються загальні положення УФ-спектрофотометрії, даються деякі прості практичні завдання вивчення ароматичних амінокислот, білків і нуклеїнових кислот.

Для дослідження властивостей біологічних об'єктів широко використовується абсорбційна спектрофотометрія, основним законом якої є закон Ламберта – Бера. Якщо на шар речовини товщиною l падає монохроматичний пучок світла інтенсивністю I_0 і частина його поглинається, тоді світло, що пройшло цей шар, матиме інтенсивність

$$I = I_0 \cdot 10^{-\varepsilon Cl}, \quad (5.1)$$

де C – концентрація речовини, (моль/л); ε – коефіцієнт молярної екстинції, $M^{-1} \cdot m^{-1}$. Логарифм відношення I_0/I називається оптичною густиною D речовини

$$D = \lg \frac{I_0}{I} = \varepsilon Cl. \quad (5.2)$$

Пропускання розчину $T = \frac{I}{I_0} 100\%$. Тоді $D = \lg \frac{1}{T}$.

Світло з різною довжиною хвилі λ поглинається речовиною по-різному. Залежність оптичної густини D або коефіцієнта молярної екстинції ε від λ називається спектром поглинання речовини: $D = f(\lambda)$ або $\varepsilon = f(\lambda)$. Спектр поглинання залежить від властивостей речовини і є паспортною характеристикою. Прилади, на яких реєструють спектри поглинання, називаються спектрофотометрами.

Речовини можуть поглинати світло в різних областях спектра. Умовно весь спектральний діапазон складається з УФ, видимої та ІЧ областей. УФ-область спектра лежить у інтервалі довжин хвиль від 100 до 400 нм і поділяється на вакуумну (100-200 нм), далеку (200-300 нм) і близьку (300-400 нм) області (1 нм = 10^{-9} м). Видима область спектра займає інтервал від 400 до 750 нм. ІЧ-область спектра поділяється на близьку (0,75-2,5 мкм), середню (2,5-15 мкм) і далеку (15-300 мкм).

Спектри поглинання білків та нуклеїнових кислот знаходяться у далекій УФ-області (рис. 5.1). Чисто емпірично знайдені кореляції між хімічною будовою молекул та їх спектрами. Наявність структур з делокалізованими π -електронами зумовлює поглинання УФ-світла. Для білків і нуклеїнових кислот характерні два максимуми поглинання. Один – на межі вакуумної УФ-області (190-210 нм), а другий – у далекій УФ-області спектра (довгохвильовий максимум поглинання). Довгохвильовий максимум ($\lambda = 280$ нм) спектра білків зумовлений поглинанням трьох ароматичних амінокислот – триптофану, тирозину, фенілаланіну. Поглинання зумовлено π - π^* -електронними переходами в площині ароматичного кільця. У нуклеїнових кислотах максимум 260 нм зумовлений поглинанням пуринових і піримідинових основ. Основна частка поглинання зумовлена π - π^* переходами; невелике поглинання дають також n - π^* переходи.

У лабораторній практиці використовують співвідношення D_{280}/D_{260} для оцінки чистоти білкових препаратів і відсутності нуклеїнових кислот. Якщо воно більше 1,6-1,7, то це свідчить про відсутність нуклеїнових кислот у білкових препаратах.

УФ-поглинання білків. В області 190-210 нм світло поглинають пептидні зв'язки і бокові радикали багатьох амінокислотних залишків білків. В області 240-300 нм поглинають тільки ароматичні амінокислоти – триптофан, тирозин, фенілаланін (слабке поглинання дають гістидин і цистеїн). У табл. 5.1 наведено спектральні параметри ароматичних амінокислот при нейтральних рН.

Включення амінокислот у структуру білка не дуже впливає на зміну їх спектрів поглинання. Тому оптична густина білка (D) дорівнює сумі оптичних густин триптофану (D^{trp}), тирозину (D^{tyr}) і фенілаланіну (D^{phen}):

$$D = D^{trp} + D^{tyr} + D^{phen} \quad (5.3)$$

Таблиця 5.1

Амінокислота	λ , нм	$\epsilon_{\max} \cdot 10^{-5}, \text{М}^{-1} \cdot \text{м}^{-1}$
Триптофан	280,0	5,60
Тирозин	275,0	1,25
Фенілаланін	257,0	0,19

Зміна рН розчину найсильніше впливає на спектр поглинання тирозину. У лужній ділянці рН ($\text{pH} > 11$) тирозин переходить в іонізовану форму – тирозинат. За рахунок іонізації гідроксильної групи фенольного кільця тирозину змінюється електронна структура хромофора, що веде до зсуву максимуму погли-

нання в довгохвильову область на 19 нм (рис. 5.2). Стрілкою показано зміщення максимуму спектра при переході тирозину із нейтральної в іонізовану форму.

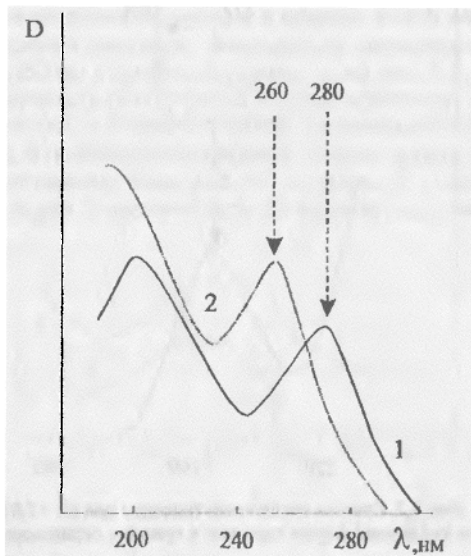


Рис. 5.1. Спектри поглинання білка (1) та нуклеїнової кислоти (2)

Спектрофотометрія дозволяє визначити кількість тирозинових і триптофанових залишків у білках. У нейтральних розчинах поглинання білка при 280 нм є сума оптичних густин тирозину і триптофану. У зв'язку з тим, що максимуми поглинання цих амінокислот майже збігаються, визначити їх вміст у білку, якщо рН нейтральні, важко. У лужному середовищі (при рН > 11) спостерігається спектральне розділення триптофанового й тирозинового поглинання (рис. 5.2). На цій основі Гудвін і Мортон запропонували метод визначення вмісту тирозинових і триптофанових залишків у білку. Береться розчин білка з відомою молярною концентрацією C у 0,1 н лузі. За допомогою спектрофотометра знаходиться оптична густина білка на двох довжинах хвиль 280 нм і 294 нм. Далі визначаються коефіцієнти молярної екстинції (ϵ)

$$\epsilon_{280} = \frac{D_{280}}{C \cdot l} \quad \text{і} \quad \epsilon_{294} = \frac{D_{294}}{C \cdot l}, \quad (5.4)$$

де l – товщина кювети. За методом Гудвіна і Мортон кількість молей тирозину ($M^{туп}$) і триптофану ($M^{тпу}$) на моль білка буде визначатися так:

$$M^{туп} = 10^{-3} (0,592 \cdot \epsilon_{294} - 0,263 \cdot \epsilon_{280}), \quad M^{тпу} = 10^{-3} (0,263 \cdot \epsilon_{280} - 0,170 \cdot \epsilon_{294}). \quad (5.5)$$

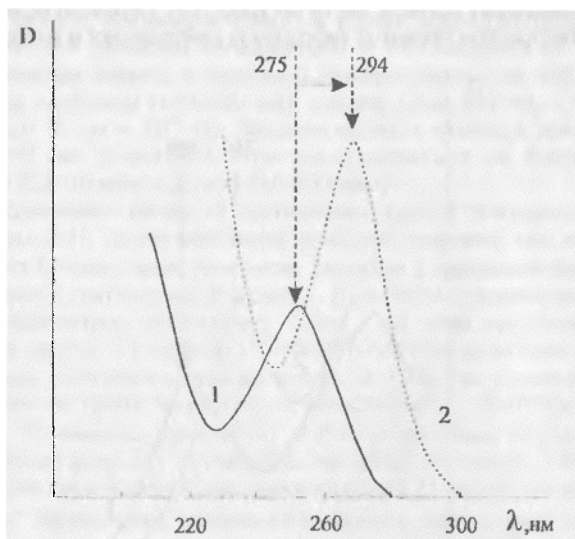


Рис. 5.2. Спектри поглинання тирозину при pH = 7,0 (1) та іонізованої форми тирозину в лужному середовищі (2)

Для спектрів поглинання білків характерно, що в області довжин хвиль більше 310 нм оптичне поглинання відсутнє. Наявність поглинання в цій спектральній області свідчить про існування світлорозсіюючих агрегатів білкових молекул. Особливо це характерно для білків, які у фізіологічних умовах агрегують (міозин, тропоміозин тощо). За наявності розсіюючого компонента спектр поглинання білка змінюється. Тому необхідно знати метод урахування розсіювання та виправлення спектра поглинання.

У загальному випадку оптична густина є сума внесків істинного поглинання (D_n) і розсіювання (D_p):

$$D = D_n + D_p \quad (5.6)$$

Теорія розсіювання світла для випадку, коли розсіюючі частинки мають розмір близький до довжини хвилі світла (λ) або більший, була розроблена Релеєм. Тому таке розсіювання називається релєївським і описується виразом

$$D_p = \frac{B}{\lambda^n}, \quad (5.7)$$

де B і n – постійні. Постійна n залежить від розміру і форми розсіюючих частинок і змінюється в межах від 2 до 4. Після логарифмування (5.7) отримуємо лінійну залежність між $\lg D_p$ та $\lg \lambda$:

$$\lg D_p = \lg B - n \lg \lambda. \quad (5.8)$$

Практично урахування світлорозсіювання проводять таким чином. Знімається спектр поглинання білка в широкій спектральній області (рис. 5.3, а, крива 1). Значна величина оптичної густини в області $\lambda > 310$ нм свідчить про наявність світлорозсіюючих частинок. Знаходиться залежність $\lg D_p$ від $\lg \lambda$ в області від 310 до 360 нм і будується графік, як на рис. 5.3, б. Лінійна залежність свідчить про наявність релєївського світлорозсіювання. Проводиться екстраполяція цієї залежності в область спектра, де знаходиться спектр поглинання білка. На рис. 5.3, б це показано штрихами. Антилогарифм від $\lg D_p$ дає величину D_p в області поглинання білка (рис. 5.3, а, крива 2). Істинний спектр поглинання даного білка (крива 3) визначається відніманням від кривої 1 кривої 2.

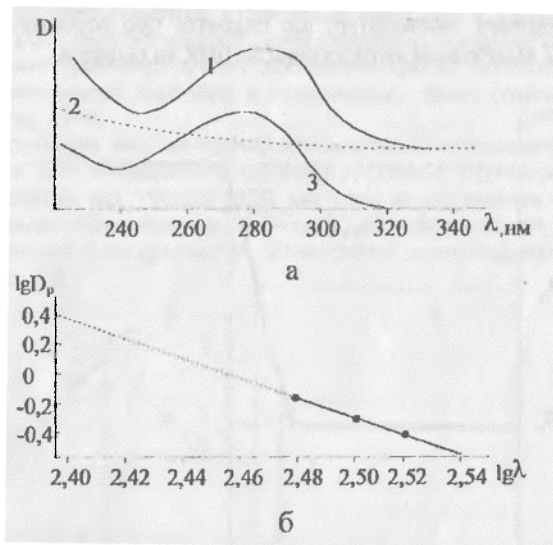


Рис. 5.3. Графічний метод урахування світлорозсіювання в спектрах поглинання білкових розчинів: а – сумарний спектр поглинання (1), світлорозсіювання (2) та істинний спектр поглинання білка (3); б – залежність оптичної густини від довжини хвилі в логарифмічному масштабі

УФ-поглинання нуклеїнових кислот. Поглинання нуклеїнових кислот зумовлено пуриновими й піримідиновими основами. Значення ϵ_{max} при 260 нм для аденіну, урацилу, тиміну, гуаніну і цитозину дорівнює відповідно $(13,4; 8,2; 7,4; 7,2; 5,55) \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{м}^{-1}$.

Денатурація ДНК супроводжується різким зростанням оптичної густини при 260 нм. Це явище називається гіперхромним ефектом. Крива залежності оптичної густини D_{260} від температури називається кривою плавлення ДНК (рис. 5.4).

З кривої плавлення ДНК визначається гіперхромний ефект Γ (у відсотках):

$$\Gamma = \frac{D_{\partial} - D_n}{D_n} \cdot 100\%, \quad (5.9)$$

де D_{∂} і D_n – оптичні густини денатурованої та нативної ДНК.

Гіперхромний ефект посилюється при збільшенні довжини ланцюга ДНК. Особливо це помітно на коротких полінуклеотидах. Залежно від препаратів ДНК гіперхромний ефект дає збільшення оптичної густини від 20 до 40 %. З кривої плавлення визначається інтервал плавлення (ΔT) і температура плавлення (T_n) ДНК (рис. 5.4). Денатурація ДНК спостерігається досить у вузькому інтервалі температур, що свідчить про кооперативність процесу. Величина ΔT відображає гетерогенність ДНК за складом.

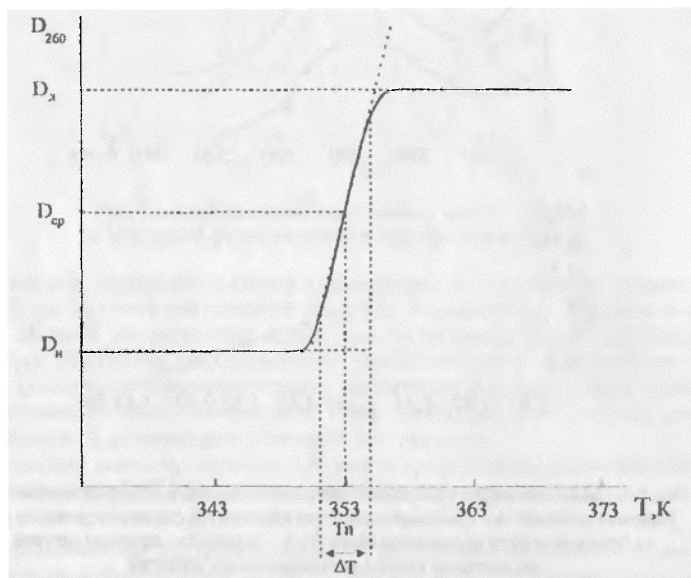


Рис. 5.4. Температурна залежність оптичної густини D_{260} для ДНК:
 D_n – оптична густина нативної ДНК; D_{∂} – оптична густина денатурованої ДНК;

$$D_{cp} = \frac{D_{\partial} - D_n}{2}; T_n \text{ – температура плавлення ДНК}$$

Препарати ДНК різного походження характеризуються різною температурою плавлення. Експериментально було показано, що T_n лінійно залежить від кількості Г-Ц пар у ДНК. Мармур і Доті запропонували формулу, яка зв'я-

зує вміст у ДНК Г-Ц пар δ (у відсотках) з T_n (T_n , як правило, не залежить від молекулярної маси ДНК):

$$\delta = 2,44 T_n - 834. \quad (5.10)$$

При охолодженні нагрітих зразків ДНК оптична густина зменшується, тобто спостерігається гіпохромний ефект. Відновлення комплементарної спіральної структури ДНК називається ренатурацією. Щоб перевірити, чи відбулась повна ренатурація ДНК, розчин нагрівають повторно. Якщо гіперхромний ефект такий же різкий, з тим самим інтервалом плавлення, ренатурація була повною. Якщо перехід розмитий у більшшому інтервалі температур, то відбулось неспецифічне спарювання основ.

Отже, УФ-спектрофотометрія в багатьох випадках є простим методом для вивчення структурної організації білків і нуклеїнових кислот.

Матеріали та прилади: спектрофотометр СФ-26 або СФ-46; розчини ароматичних амінокислот тирозину й триптофану, білки (трипсин, рибонуклеаза, актоміозин), ДНК.

Методика роботи на спектрофотометрі. Спектрофотометр СФ-46 використовується для вимірювання оптичної густини D і пропускання T у широкій області спектра від 190 до 1100 нм. При дослідженнях в УФ-області спектра як джерело світла використовується дейтерієва лампа, у видимій та ІЧ-областях – лампа розжарювання. Блок-схему спектрофотометра СФ-46 наведено на рис. 5.5.

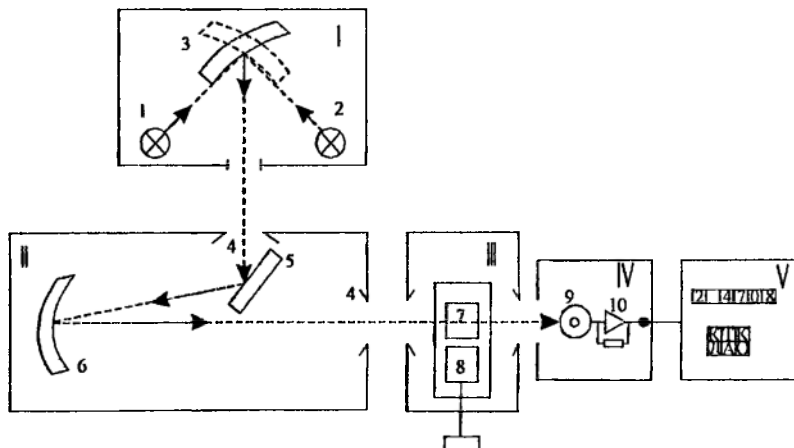


Рис. 5.5. Блок-схема спектрофотометра СФ-46: І – освітлювач; ІІ – монохроматор; ІІІ – кюветна камера; ІV – приймально-підсилювальний блок; V – мікропроцесор; 1 – дейтерієва лампа; 2 – лампа розжарювання; 3 – дзеркальний конденсор; 4 – оптичні щілини монохроматора; 5 – плоске поворотне дзеркало; 6 – увігнута дифракційна ґратка; 7 і 8 – кювета з розчинником і розчином відповідно; 9 – фотоелемент; 10 – електронний підсилювач

У спектрофотометрі використовуються два джерела світлового випромінювання: дейтерієва лампа (1) (для роботи в області спектра від 190 до 350 нм) і лампа розжарювання (2) (у спектральній області від 350 до 1100 нм). Пучок світла падає на дзеркальний конденсор 3, який направляє його через вхідну щілину 4 монохроматора на поворотне дзеркало 5 і далі на увігнуту дифракційну ґратку 6. Монохроматичний світловий пучок проходить через вихідну щілину 4 у кюветну камеру III і падає на кювети з розчинником 7 чи з розчином 8. Світло сприймається фотоелементом 9: сур'яно-цезієвий фотоелемент використовується для вимірювання спектрів від 190 до 700 нм і киснево-цезієвий – від 600 до 1100 нм. Фотострум фотоелемента підсилюється підсилювачем постійного струму 10 і далі подається на вхід мікропроцесорної системи (МПС) V. МПС за командою оператора по черзі вимірює і запам'ятовує напругу V_T , яка пропорційна темновому струму фотоелемента 9, та напруги V_0 і V , які пропорційні, в одному випадку, світловому потоку, який пройшов через розчинник, а в іншому – світловому потоку, який пройшов через досліджуваний розчин. Далі МПС розраховує оптичне пропускання T розчину:

$$T = \frac{V - V_T}{V_0 - V_T} \cdot 100\% \quad (5.11)$$

Принцип вимірювання на спектрофотометрі СФ-46. Для вимірювання спектрів поглинання в УФ-області спектра рукояткою 10 увімкнути (положення "Ф") сур'яно-цезієвий фотоелемент (рис. 5.6). Поставивши рукоятку шторки 8 у положення "ЗАКР", закривають фотоелемент і перемикачем щілини 6 установлюють ширину щілини 0,5 нм.

Після вмикання кнопки "Мережа" 4 загоряється індикаторна лампочка. Виставити важіль 1 у положення "Д" і дейтерієва лампа загориться автоматично після хвилинного прогріву. Стабільна робота спектрофотометра забезпечується через 30 хв після його вмикання. Вимикається спектрофотометр натисканням кнопки "Мережа" 4.

Клавіатура 5 МПС (V) призначена для управління системою та ручного введення даних. Клавіша "Пуск" вмикає МПС, про що сигналізує значок коми, яка висвічується на табло. Коли натиснути клавіші "Ш(0)" і "К(1)", на табло висвічуються напруги у вольтах неосвітленого фотоелемента ("Ш(0)") та освітленого фотоелемента світловим потоком, який пройшов через розчинник (контрольний зразок) ("К(1)"). Якщо натиснути клавішу "τ(2)" – відбувається обчислення і на табло висвічується оптичне пропускання T (у відсотках), клавішу "D(5)" – оптичної густини D . Клавіша "Ц/Р" переводить МПС з разового режиму в циклічний і навпаки, про що сигналізує індикатор "Р" чи "Ц". За циклічного режиму обчислення і висвічування вимірних величин відбувається кожні 5 с без допоміжного натискування клавіш. Клавіші "С(4)" і "А(3)" призначені для роботи спектрофотометра в режимі визначення концентрації та швидкості зміни оптичної густини. Клавіші "СБР", "УТВ", "І" і "Ь" використо-

вуються для скидання й введення в МПС значень коефіцієнтів у режимах "С" і "А". Вони вводяться в пам'ять МПС клавішами "0"-"9". При натисканні клавіші у лівій частині табло висвічується символ, що відповідає режиму роботи МПС. При проведенні вимірювань усі клавіші нажимати не частіше ніж раз за 2 с.

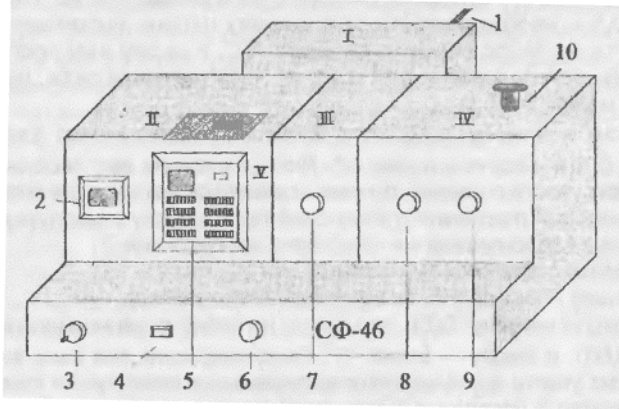


Рис. 5.6. Спектрофотометр СФ-46:

- 1 – важіль для зміни дейтерієвої лампи або лампи розжарювання; 2 – шкала довжин хвиль;
- 3 – рукоятка для встановлення необхідної довжини хвилі; 4 – кнопка "Мережа"; 5 – клавіатура МПС;
- 6 – перемикач ширини щілини монохроматора; 7 – рукоятка для введення у світловий пучок кювет з розчином та розчинником; 8 – рукоятка для відкривання та закривання шторки;
- 9 – рукоятка установки нуля; 10 – рукоятка зміни фотоелементів

Підготовка спектрофотометра до вимірювань. Включити спектрофотометр СФ-46, як було зазначено раніше. Відкрити кришку кюветної камери III (рис. 5.6) і розмістити кювети з розчинником (контрольний зразок) і досліджуванним розчином. Відкривати кришку кюветної камери тільки за умови, якщо рукоятка шторки 8 знаходиться в положенні "ЗАКР". Обертаючи рукоятку 3, виставити необхідну довжину хвилі. Знімати показники необхідно тільки при щільно закритій кришці кюветної камери.

Вимірювання коефіцієнта пропускання Т

1. Поставити рукоятку 8 у положення "ЗАКР".
2. Натиснути клавішу "Ш(0)" і на табло висвітлиться темновий струм фотоелемента.
3. Виставити рукояткою 9 "Нуль" на табло число в діапазоні від 0,05 до 0,1. Показання з табло належить знімати, натискаючи клавішу "Ш(0)" до появи показання, яке дорівнює попередньому або відрізняється від нього не більш як на 0,001. Останнє показання заноситься в пам'ять МПС і залишається там до наступного натискання клавіші "Ш(0)".

4. Переміщуючи рукояткою 7 каретку з кюветами, поставити у світловий пучок кювету з розчинником (контрольний зразок).

5. Поставити рукоятку 8 у положення "ОТКР".

6. Натиснути клавішу "К(1)" і зняти показання на табло. Зліва на табло висвітиться індекс "1". Показання мають бути в межах 0,5-5,0. Якщо показання менше 0,5 – необхідно збільшити ширину щілини перемикачем 6, якщо більше 5,0, то на табло висвітиться індекс "П". У цьому разі необхідно зменшити ширину щілини й натиснути клавішу "К(1)" декілька разів, поки показання будуть у межах 0,5-5,0.

7. Натиснути клавішу "т (2)", при цьому на табло повинно з'явитися показання $100 \pm 0,1$, а ліворуч – індекс "2". Якщо показання має інше значення, необхідно ще раз увести значення сигналу порівняння, натиснувши клавішу "К(1)".

8. Рукояткою 7 поставити у світловий потік кювету з досліджуванним розчином і зняти з табло показання оптичного пропускання T .

Визначення оптичної густини D

1. Виконати операції 1-6, як було зазначено раніше.

2. Натиснути клавішу "D(5)", при цьому на табло повинно з'явитися показання $0,000 \pm 0,001$, а ліворуч – індекс "5". Якщо показання має інше значення, необхідно ще раз увести значення сигналу порівняння, натиснувши клавішу "К(1)".

3. Рукояткою 7 поставити у світловий потік кювету з досліджуванним розчином і зняти з табло показання оптичної густини D .

4. Натиснути клавішу "Ц/Р", при цьому має спостерігатися свічення індикатора в режимі "Ц", потім – клавішу "D(5)". Спектрофотометр переходить у циклічний режим вимірювання, виконує вимірювання зразка кожні 5 с і висвічує результат вимірювання.

Завдання 1. Вимірювання спектрів поглинання ароматичних амінокислот

Приготувати розчин у воді триптофану 0,0147 мг/мл, тирозину 0,053 мг/мл і фенілаланіну 0,352 мг/мл і зняти їх спектри поглинання в області від 200 до 320 нм через 5 нм. За одержаними значеннями оптичної густини D знайти молярні коефіцієнти екстинції триптофану, тирозину, фенілаланіну на 250 і 280 нм. Молекулярні маси триптофану – 204,2, тирозину – 181,2 і фенілаланіну – 165,2 Да.

Приготувати розчини триптофану у воді в концентраціях 0,00735; 0,0147; 0,22 і 0,249 мг/мл і перевірити справедливість закону Ламберта – Бера.

Приготувати розчин триптофану й тирозину в 0,1 н NaOH, зареєструвати спектри поглинання і порівняти зі спектрами поглинання нейтральних розчинів у воді.

Завдання 2. Вимірювання спектрів поглинання білків

Приготувати розчини з концентраціями 0,1; 0,2; 0,4 і 0,6 мг/мл таких білків: сироваткового альбуміну бика (САБ), рибонуклеази і актоміозину (білкового комплексу, що розсіює світло). Зареєструвати спектри цих білків, провести їх порівняння. Перевірити справедливість закону Ламберта – Бера для розчинів САБ. Знайти співвідношення D_{280}/D_{260} .

Для САБ визначити кількість триптофанових і тирозинових залишків за формулою (5.5). Молекулярна маса САБ – 66,5 кДа. Урахувати внесок релєвського розсіювання у спектрі поглинання актоміозину за допомогою формули (5.8). Знайти істинний спектр поглинання актоміозину.

Завдання 3. Вимірювання спектрів поглинання нуклеїнових кислот

Приготувати 3-4 мл розчину ДНК у 0,15 М NaCl розведенням концентрованого розчину або розчиненням сухого препарату комерційної ДНК. Добитися, щоб D_{260} становило 0,5-0,6 (концентрація ДНК 0,20-0,25 мкг/мл). Виміряти спектр поглинання в області 200-300 нм. Визначити D_{280}/D_{260} .

Завдання 4. Визначення гіперхромного ефекту ДНК

Приготувати 6-7 мл розчину ДНК з концентрацією 0,2-0,25 мкг/мл у 0,15 моль/л NaCl. Виміряти D при 260 нм. Розчин розлити порівну у дві пробірки з притертими пробками. Потім опустити пробірки в гарячу водяну баню при 368 К на 10-15 хв). Після цього одну пробірку занурити в лід, а другу залишити у водяній бані, яка поступово охолоджується до кімнатної температури. Виміряти D_{260} денатурованої ДНК (швидко охолодженої) і ренатурованої. Порівняти значення. Вирахувати гіперхромний ефект за формулою (5.9).

Рекомендована література

- Биофизика: Практикум / Под ред. П.Г.Богача. – К., 1983.
 Зима В.Л., Мирутенко В.И., Давидовская Т.Л. Биофизические методы исследований. Электроника и электробиофизика. – К., 1990.
 Кантор Ч., Шиммель П. Биофизическая химия. – М., 1984. – Т. 2.
 Фрайфелдер Д. Физическая биохимия. – М., 1980.

Робота 2. Флуоресцентний аналіз у біологічних дослідженнях

Флуоресцентний аналіз широко використовується в біологічних лабораторіях для дослідження білків, нуклеїнових кислот, клітин і субклітинних структур, вітамінів, лікарських речовин та ін.

Розглянемо коротко фізичні основи флуоресцентного методу. Відповідно до законів квантової механіки, енергетичні стани електронів у молекулі зображуються у вигляді дискретних рівнів (рис. 5.7). Поглинання світла відбувається квантами, енергія E яких за формулою Планка буде

$$E = h\nu = h \frac{c}{\lambda}, \quad (5.12)$$

де $h = 6,626 \cdot 10^{-34}$ Дж·с – стала Планка; ν – частота кванта світла; λ – довжина хвилі кванта світла; $c = 2,9979 \cdot 10^8$ м·с⁻¹ – швидкість світла у вакуумі. При поглинанні квантів світла електрони переходять із основного, незбудженого

рівня S_0 на більш високі, збуджені рівні S^* . Залежно від величини енергії квантів (або довжини хвилі λ), які поглинаються речовиною, електрони можуть займати декілька збуджених рівнів (S_1^* , S_2^* , S_3^* тощо).

Збуджені стани молекули є нерівноважними і молекули намагаються ліквідувати їх різними шляхами. Ці шляхи показані на рис. 5.7 стрілками вниз. Один із шляхів – це безвипромінювальна дисипація енергії у вигляді теплових коливань, який називається **внутрішньою конверсією (в)** (зображено хвилястими стрілками). Другий шлях може супроводжуватися випромінюванням квантів світла. Це явище називається **люмінесценцією**. Залежно від природи збуджених станів і характеру переходу збудженого електрона в нормальний стан люмінесценція поділяється на флуоресценцію і фосфоресценцію. **Флуоресценція (f)** спостерігається при випромінюванні кванта світла між синглетними рівнями $S_1^* \rightarrow S_0$. Одна з характерних особливостей флуоресценції полягає в тому, що тривалість життя збудженого синглетного рівня становить усього 10^{-9} с. При зіткненні збуджених молекул із сусідніми молекулами можлива переорієнтація спіну збудженого електрона, тоді збуджена молекула переходить у триплетний збуджений стан T . Перехід у триплетний стан називається **інтеркомбінаційною конверсією (k)**. На відміну від збудженого синглетного стану в триплетному стані збуджений електрон може перебувати значний час – від 10^{-7} с до декількох годин. Перехід електрона з триплетного стану на основний синглетний рівень $T_1 \rightarrow S_0$ супроводжується випромінюванням кванта **фосфоресценції (F)**. Фосфоресценція особливо добре виявляється в заморожених розчинах.

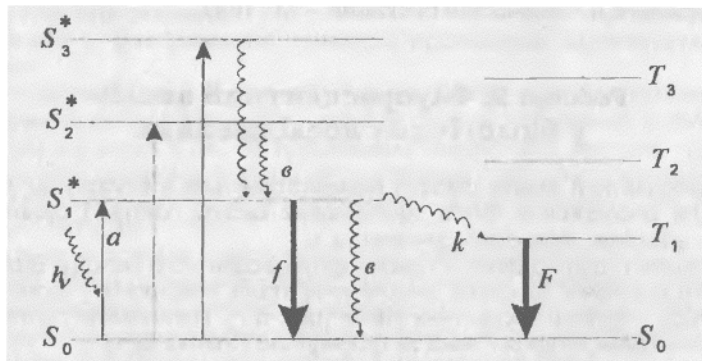


Рис. 5.7. Енергетичні рівні молекули й переходи електрона між ними: S_0 – основний, незбуджений стан; S_1^* , S_2^* , S_3^* – збуджені синглетні рівні; T_1 , T_2 , T_3 – триплетні рівні; a – поглинання; f – флуоресценція; F – фосфоресценція; v – безвипромінювальні переходи; k – інтеркомбінаційна конверсія

Залежно від характеру збудження молекул розрізняється декілька типів люмінесценції. Власне випромінювання молекул, яке спричиняється поглинанням УФ або видимого світла, називається **фотолюмінесценцією**. У багатьох випадках хімічні реакції супроводжуються слабким світленням – **хемілюмінесценцією**. Давно відома **біоломінесценція**, тобто хемілюмінесценція біологічних об'єктів (світляків, деяких грибів, мікроорганізмів і т. д.). При терті, механічних діях виникає світлення – **триболюмінесценція**, а при опроміненні розчинів іонізуючою радіацією спостерігається **радіолюмінесценція**.

При експериментальному вивченні флуоресценції вимірюють ряд важливих характеристик. При збудженні речовина випромінює потік **квантів** (інтенсивність флуоресценції I_f), який вимірюється в квантах $\cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$. Прилади, за допомогою яких вимірюють інтенсивність флуоресценції, називають **флуориметрами**. Залежність інтенсивності флуоресценції від довжини хвилі випромінюваного світла λ_f називається **спектром флуоресценції** $I_f = f(\lambda_f)$. Відповідно до закону Стокса, спектр флуоресценції завжди зміщений у довгохвилову область відносно спектра поглинання. Залежність інтенсивності флуоресценції (при фіксованій довжині хвилі флуоресценції $\lambda_f = \text{const}$) від довжини хвилі збуджуючого світла λ_a називається **спектром збудження флуоресценції** $I_f = f(\lambda_a)$. Спектр збудження спектрально збігається зі спектром поглинання речовини. Спектри флуоресценції і збудження реєструються на **спектрофлуориметрах**.

Важливою характеристикою речовини є **квантовий вихід флуоресценції** φ – відношення кількості випромінюваних квантів n_f до кількості поглинутих квантів n_a

$$\varphi = \frac{n_f}{n_a} \quad (5.13)$$

Фактично квантовий вихід визначає ефективність випромінювання світла даною речовиною. Достатньо просто відносний квантовий вихід визначається за методом Паркера й Ріса. Вимірюється на одному і тому самому спектрофлуориметрі, в однакових умовах збудження, спектр флуоресценції невідомої речовини та еталона з відомим квантовим виходом φ_e . Визначається площа S під спектрами флуоресценції невідомої речовини й еталона за однакової довжини хвилі збудження. Тоді квантовий вихід досліджуваної речовини буде

$$\varphi = \varphi_e \frac{S \cdot D_e}{S_e \cdot D} \quad (5.14)$$

де S і S_e – площі під спектрами флуоресценції досліджуваної речовини й еталона відповідно; D і D_e – оптична густина досліджуваної речовини та еталона відповідно. Як еталон використовують розчин хініну бісульфату в 1 н H_2SO_4 з

$\varphi_b = 0,55$ або розчин флуоресцеїну в 0,1 н NaOH з $\varphi_b = 0,92$, чи водний розчин триптофану з $\varphi_b = 0,14$. Відомий закон Вавилова, за яким спектр флуоресценції та квантовий вихід речовини не залежать від довжини хвилі збуджуючого світла.

Якщо за допомогою спеціального пристрою швидко перекрыти (приблизно за 1 нс) збудження флуоресценції, тоді її інтенсивність I_f зменшується (затухає) відповідно до експоненційного закону

$$I_f = I_f^0 e^{-\frac{t}{\tau}}, \quad (5.15)$$

де I_f^0 – стаціонарна інтенсивність флуоресценції на час перекривання збуджуючого світла; τ – час життя збудженого стану. Це – такий час t , коли інтенсивність флуоресценції I_f зменшується (затухає) в e раз. Спеціальні прилади, на яких вимірюють τ , називаються тауметрами.

При збудженні лінійно поляризованим світлом розчинених молекул флуоресціюючої речовини виникає поляризація флуоресценції. Це зумовлено тим, що молекула, яка розглядається як елементарний осцилятор, поглинає і випромінює кванти не тільки певної частоти, але й у певній площині. У цьому випадку вимірюють важливий параметр – ступінь поляризації P , або анізотропію A флуоресценції:

$$P = \frac{I_f'' - I_f'}{I_f'' + I_f'} \quad \text{і} \quad A = \frac{I_f'' - I_f'}{I_f'' + 2I_f'}, \quad (5.16)$$

де I_f'' і I_f' – інтенсивність флуоресценції при паралельному і перпендикулярному відповідно розміщенні площин поляризації поляризатора й аналізатора. Вимірювання P або A використовується для оцінки динаміки хромофорних груп у структурі білків або мембран. Динаміка хромофорної флуоресціюючої групи визначається часом обертальної релаксації ρ . Для цього використовується формула Перрена:

$$\frac{1}{P} - \frac{1}{3} = \left(\frac{1}{P_0} - \frac{1}{3} \right) \left(1 + \frac{3\tau}{\rho} \right), \quad (5.17)$$

де P_0 – гранична ступінь поляризації.

Флуоресцентний метод виявився високоспецифічним, тому що спектри збудження та флуоресценції у різних біологічно важливих сполук значно відрізняються. Це дозволяє при вдалому виборі спектральної ділянки збудження достатньо точно визначати концентрацію того чи іншого компонента в складній суміші речовин. Інтенсивність флуоресценції I_f досліджуваного розчину буде пропорційна інтенсивності збуджуючого світла I_3 , частці поглиненого світла в кюветі $(1-T)$ і квантовому виходу φ

$$I_f = kI_3(1-T)\varphi, \quad (5.18)$$

де T – пропускання речовини; k – коефіцієнт. Добуток $I_3(1-T)$ являє собою інтенсивність поглиненого світла. За формулою (5.2), оптична густина розчину

$D = \lg \frac{1}{T} = \varepsilon l C$. Звідси $T = 10^{-D} = 10^{-\varepsilon l C}$. Якщо підставити цей вираз у формулу (5.18), отримуємо

$$I_f = kI_3(1 - 10^{-\varepsilon l C})\varphi. \quad (5.19)$$

Для дуже розбавлених розчинів добуток $\varepsilon l C$ малий, тому експоненту можна розкласти в ряд ($10^{-\varepsilon l C} \approx 1 - \varepsilon l C + \dots$) і знехтувати членами другого і вищого порядків. Унаслідок цього формула (5.19) змінюється так:

$$I_f = kI_3\varphi\varepsilon l C. \quad (5.20)$$

Таким чином, у певній області концентрацій буде спостерігатись лінійна залежність між інтенсивністю флуоресценції I_f і концентрацією речовини C . В експериментах було виявлено, що лінійна залежність спостерігається в усіх випадках, якщо оптична густина досліджуваного розчину $D = \varepsilon l C < 0,1$. При збільшенні концентрації речовини, коли $D > 0,2$, спостерігається відхилення від лінійної залежності. При кількісному вивченні флуоресценції необхідно працювати з розбавленими розчинами, перебуваючи на лінійній ділянці залежності інтенсивності флуоресценції від концентрації.

Коротко розглянемо флуоресценцію біологічних речовин. **Власна флуоресценція білків** спостерігається в ультрафіолетовій області спектра й зумовлена наявністю в їх структурі природних хромофорів – триптофану й тирозину. Флуоресценція фенілаланіну в білках, в яких відсутні триптофанові й тирозинові залишки, зустрічається дуже рідко (у парвальбуміні м'язів риб, гепатокупреїні коня, супероксидисмугазі зеленого горошку). У білках (інсулін, зеїн, рибонуклеаза, овомукоїд, гістони, тропоміозин тощо), в яких є тирозин і відсутній триптофан, спектри флуоресценції характеризуються тирозиною флуоресценцією з максимумом 304 нм. Якщо в білках є і триптофанові залишки (рибонуклеаза T_1 , альдолаза, хімотрипсин, трипсин, лізоцим, пепсин, сироватковий альбумін, папаїн тощо), спектри флуоресценції характеризуються триптофановою флуоресценцією з різними положеннями максимуму, який для різних білків займає положення від 325 нм до 343 нм.

Коферменти й вітаміни характеризуються своїми спектрами флуоресценції, завдяки чому проводиться їх аналіз. Піридиннуклеотиди (нікотинамід-аденіндинуклеотид НАД або НАДФ), коли вони переходять з окисненої форми у відновлену, мають у воді спектр поглинання з максимумом 340 нм і флуоресценцією з $\lambda_{\max} = 470$ нм. Коли НАДН, як кофермент, зв'язується з білком, спектр флуоресценції зсувається в короткохвильову область з $\lambda_{\max} = 440$ нм. Серед флавінів, які часто зустрічаються у природі, найважливішим є вітамін

B_2 (рибофлавін), коферменти флавінмононуклеотид ФМН і флавінаденіндинуклеотид ФАД. У воді флавіни в окисненій формі характеризуються спектрами флуоресценції з $\lambda_{\text{max}} = 530$ нм. При зв'язуванні флавінів з білками їх флуоресценція значно гаситься.

Вітамін А (ретинол) в етанолі має спектр флуоресценції з $\lambda_{\text{max}} = 510$ нм. Вітамін B_6 (піридоксин) у біологічних системах перетворюється на такі форми, як піридоксаль, піридоксамін і піридоксилікову кислоту, які флуоресціюють з максимумами 400, 395 і 425 нм відповідно. Вітамін Е (токоферол) в етанолі збуджується 295 нм і при цьому випромінює спектр флуоресценції при 440 нм.

Якщо природна макромолекула або мембрана не флуоресціює, тоді використовують флуоресцентні хромофори (барвники), які називають **флуоресцентними зондами** (зв'язуються нековалентними слабкими зв'язками з білками й нуклеїновими кислотами) або **флуоресцентними мітками** (зв'язуються сильними ковалентними зв'язками).

Мітки нуклеїнових кислот. Найпоширенішими мітками є акридин оранжевий (АО), профлавін, акрифлавін і етидйібромід. При зв'язуванні АО з двоспіральною ДНК спостерігається зелена флуоресценція з $\lambda_{\text{max}} = 530$ нм (мономерна форма АО), а з односпіральною РНК – оранжева флуоресценція з $\lambda_{\text{max}} = 640$ нм (димерна форма АО). Отже, за кольором флуоресценції АО судять про спіралізацію і деспіралізацію ДНК. Зв'язування етидйіброміду відбувається шляхом вбудови молекул планарного барвника між комплементарними парами основ подвійної спіралі ДНК. У комплексі з ДНК етидйібромід має спектр поглинання з $\lambda_{\text{max}} = 520$ нм і спектр флуоресценції близько 590-610 нм.

Мітки й зонди білків. Найпоширенішими мітками білків є флуоресцеїн-5-ізотіоціанат (ФІТЦ), родамін-С-ізотіоціанат (РІТЦ), флуоресцеїнмеркурацетат і дансилхлорид. ФІТЦ і РІТЦ переважно зв'язуються ковалентно з лізін-овими й цистеїновими залишками білків і мають максимум спектра поглинання близько 480-490 нм і спектра флуоресценції близько 520 нм. Флуоресцеїнмеркурацетат взаємодіє з SH-групами і його флуоресценція гаситься залежно від кількості таких груп. Дансилхлорид реагує з аміногрупами білків: положення максимуму поглинання 310 нм і флуоресценції 470 нм. Флуоресцентними зондами білків використовують 1-аніліно-8-нафталін-сульфову кислоту (1,8-АНС) і 2-*n*-толуїдиннафталін-6-сульфову кислоту (2,6-ТНС). Ці флуоресцентні зонди у воді дуже слабо флуоресціюють, а при зв'язуванні з білками нековалентними зв'язками їх інтенсивність флуоресценції значно зростає, максимум спектра флуоресценції зсувається в короткохвильову область спектра. Так, у воді флуоресценція АНС дуже слабка з квантовим виходом $\varphi = 0,004$ і зеленим світінням з $\lambda_{\text{max}} = 514$ нм, а при зв'язуванні з апоміоглобіном флуоресценція значно зростає з $\varphi = 0,98$, а світіння стає синім з $\lambda_{\text{max}} = 454$ нм. Спектр поглинання ТНС має $\lambda_{\text{max}} = 340$ нм і спектр флуоресценції $\lambda_{\text{max}} = 440$ нм.

Флуоресцентні зонди для вимірювання мембранних потенціалів. Мембранний потенціал спокою і повільні зміни (у секундному інтервалі) мембранного потенціалу вимірюють такими флуоресцентними зондами, як ціаніновий барвник **dis-C₃(5)** (спектр поглинання $\lambda_{\text{max}} = 622$ нм і флуоресценції $\lambda_{\text{max}} = 670$ нм) і оксооловий барвник **OX-УІ** (спектр поглинання $\lambda_{\text{max}} = 600$ нм і флуоресценції $\lambda_{\text{max}} = 630$ нм). Зміна інтенсивності флуоресценції корелює зі зміною мембранного потенціалу. Потенціали дії реєструють у разі використання флуоресцентних зондів швидкої відповіді (у мікро- та мілісекундному інтервалі). Таким зондом є мероціанін **540** (спектр поглинання $\lambda_{\text{max}} = 540$ нм і флуоресценції $\lambda_{\text{max}} = 580$ нм).

Флуоресцентні зонди для вимірювання вільного цитозольного кальцію. З цією метою застосовують флуоресцентні зонди квін-2, фура-2 та індо-1. При використанні зондів квін 2 і фура-2 аналіз концентрації Ca^{2+} проводять за зміною спектрів збудження флуоресценції. Для квін 2 флуоресценція вимірюється на $\lambda = 492$ нм. Тоді у відсутності в розчині іонів кальцію спектр збудження флуоресценції має $\lambda_{\text{max}} = 365$ нм, а за наявності 10^{-4} моль/л іонів кальцію $\lambda_{\text{max}} = 339$ нм. Для фура-2 флуоресценція вимірюється на $\lambda = 510$ нм: у відсутності іонів кальцію спектр збудження має $\lambda_{\text{max}} = 362$ нм, а за наявності іонів кальцію $\lambda_{\text{max}} = 335$ нм. У випадку індо-1 вимірювання концентрації вільного кальцію проводять за зміною спектрів флуоресценції. Збудження флуоресценції індо-1 проводиться на $\lambda = 340$ нм. Тоді у відсутності іонів кальцію спектр флуоресценції індо-1 має $\lambda_{\text{max}} = 485$ нм, а за наявності кальцію $\lambda_{\text{max}} = 410$ нм. Найуживанішим для визначення концентрації вільного цитозольного кальцію є метод двоххвильової флуоресцентної спектроскопії.

Флуоресценція хлорофілу. Розчинений у ефірі або ацетоні хлорофіл флуоресцює в червоній області спектра: хлорофіл *a* має $\lambda_{\text{max}} = 668\text{--}669$ нм і хлорофіл *b* - $\lambda_{\text{max}} = 650\text{--}652$ нм.

У даній роботі показано використання флуоресцентного методу для вимірювання флуоресценції ароматичних амінокислот, білків, флуоресцеїну, вітаміну B_2 (рибофлавіну).

Матеріали та прилади: спектрофлуориметр, розчини триптофану та сироваткового альбуміну, розчин флуоресцеїну, екстракти з моркви.

Методика роботи на спектрофлуориметрі. На рис. 5.8 зображено оптичну схему спектрофлуориметра: пучок світла лампи 1 фокусується сферичним дзеркалом 2 на вхідній щілині 4 монохроматора збудження M_1 . Монохроматичний пучок збуджуючого світла падає на кювету K і флуоресцентне випромінювання розкладається в спектр монохроматором флуоресценції M_2 . Розгортка спектра флуоресценції проводиться автоматично електродвигуном 5 або ручним способом рукояткою 6. Спектр флуоресценції реєстру-

ється фотопомножувачем ФП і системою реєстрації 9, яка включає імпульсний підсилювач і частотомір

Підготовка спектрофлуориметра до роботи включає такі операції:

а) пропустити воду через спеціальні камери, які охолоджують лампу 1 та фотопомножувач ФП;

б) увімкнути блок живлення 8 лампи й за допомогою спеціального пристрою запустити розжарювання лампи, яке триває близько 30 хв.

в) увімкнути високовольтний блок живлення 7 фотопомножувача ФП, імпульсний підсилювач і частотомір. Дати прогрітисся блокам протягом 30 хв;

г) рукояткою 6 монохроматора збудження M_1 виставити необхідну ділянку збудження флуоресценції досліджуваної речовини;

д) промити кварцову кювету, залити в неї досліджуваний розчин і розмістити кювету К у кюветну камеру.

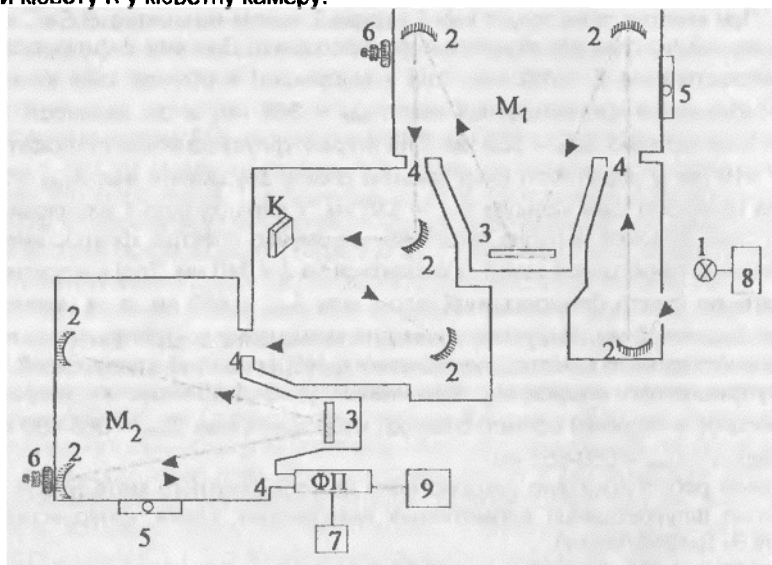


Рис. 5.8. Оптична схема спектрофлуориметра:

M_1 – монохроматор збудження; M_2 – монохроматор флуоресценції; К – кювета з розчином;

ФП – фотопомножувач; 1 – джерело світла (ртутно-кварцова лампа); 2 – дзеркала;

3 – дифракційні ґратки; 4 – оптичні щілини монохроматорів; 5 – електродвигуни, які обертають

дифракційні ґратки; 6 – рукоятки обертання дифракційних ґраток; 7 – блок живлення

фотопомножувача; 8 – блок живлення ртутно-кварцової лампи; 9 – реєструючий пристрій

(частотомір Ф-5 або самозаписуючий потенціометр)

Вимірювання спектра флуоресценції

Перекрыти шторкою (Ш) фотопомножувач і виміряти на частотомірі кількість темнових імпульсів (шумові сигнали ФП). Виставивши рукояткою 6 монохроматора флуоресценції M_2 довжину хвилі λ , відкрити шторку, виміряти інтенсивність флуоресценції (імпульси за 1 с). Повторити декілька разів таке вимірювання на вибраній λ . Поступово змінюючи λ , зняти спектр флуоресценції досліджуваної речовини.

Завдання 1. Калібрування спектрофлуориметра

Виставити ширину щілини монохроматорів 20 мкм. Вивести на вхідну щілину монохроматора збудження спектральну лінію λ ртутно-кварцової лампи, а на монохроматорі флуоресценції, обертаючи незначно вліво та вправо рукоятку 6, знайти максимальне випромінювання цієї лінії. Записати відповідно до цієї лінії λ значення показників n на шкалах 6 для монохроматора збудження M_1 і флуоресценції M_2 . Використати такі лінії випромінювання ртуті: 313; 366; 404,7; 435,8; 546,1 і 577 нм. Побудувати калібрувальні графіки $n = f(\lambda)$ для монохроматорів збудження і флуоресценції.

Завдання 2. Вимірювання спектріє флуоресценції тирозину й триптофану

Приготувати водні розчини тирозину й триптофану, щоб їх оптична густина на $\lambda = 280$ нм становила $D_{280} = 0,3$. Рукояткою 6 на монохроматорі збудження виставити довжину хвилі 280 нм. Розкрити щілини в монохроматорах до 300 мкм і виміряти спектри флуоресценції тирозину від 290 до 380 нм і триптофану від 300 до 420 нм.

Завдання 3. Вимірювання спектрів флуоресценції білків

Приготувати водні розчини триптофану й сироваткового альбуміну людини або сироваткового альбуміну бика (можна використовувати будь-який ліофілізований білок), щоб їх оптична густина на $\lambda = 280$ нм становила $D_{280} = 0,3$. Виставити на монохроматорі збудження $\lambda = 280$ нм. Виміряти в однакових умовах в області 300–420 нм спектри флуоресценції триптофану й сироваткового альбуміну. Використовуючи формулу Паркера – Ріса (5.14), знайти квантовий вихід флуоресценції сироваткового альбуміну. Узяти квантовий вихід флуоресценції триптофану $\phi_e = 0,14$.

Завдання 4. Вимірювання спектрів флуоресценції флуоресцеїну

Приготувати водний розчин флуоресцеїну об'ємом 2 мл з оптичною густиною $D_{436} = 0,1$. Використовуючи 0,1 н КОН і H_2SO_4 , довести величину рН цих розчинів до таких значень: 3; 5; 6; 7; 8; 10. Виставити на монохроматорі флуоресценції довжину хвилі $\lambda_\phi = 535$ нм. Почергово виставляючи на монохроматорі збудження $\lambda_1 = 436$ нм і $\lambda_2 = 488$ нм, виміряти інтенсивність флуоресценції I_ϕ^{436} і I_ϕ^{488} . Побудувати графічну калібрувальну залежність

$I_{\phi}^{488}/I_{\phi}^{436} = f(\text{pH})$. Використати розчин флуоресцеїну з невідомим значенням pH і з калібрувальної кривої, знайти pH цього розчину.

Завдання 5. Вимірювання спектрів поглинання та флуоресценції рибофлавіну

Приготувати екстракт з моркви таким способом. Розтерти у фарфоровій ступці 10 г моркви і залити 40 мл дистильованої води. Через 40 хв екстракт профільтрувати через паперовий фільтр (або відцентрифугувати на лабораторній центрифугі). Залити розчин у кювету і зняти спектр поглинання на спектрофотометрі СФ-46 в області 300-500 нм.

Розбавити дистильованою водою екстрагований розчин таким чином, щоб оптична густина на $\lambda = 366$ нм становила $D_{366} = 0,3$. Виставити на монохроматорі збудження $\lambda = 366$ нм. Виміряти спектр флуоресценції рибофлавіну від 500 до 650 нм.

Рекомендована література

Биофизика. Практикум / Под ред. П.Г.Богача . – К., 1983.

Зима В.Л., Мирутенко В.И., Давидовская Т.Л. Биофизические методы исследований. Электроника и электробиофизика. – К., 1990.

Костюк П.Г., Зима В.Л., Магура І.С., Мірошніченко М.С., Шуба М.Ф. Біофізика. – К., 2001.

Фрайфелдер Д. Физическая биохимия. – М., 1980.

Задачі

1. Розчин пігментних молекул концентрацією 72 мкмоль/л у кюветі 1 см завтовшки має оптичну густину 0,6. Який коефіцієнт молярної екстинкції пігментних молекул?

2. Для розриву хімічного зв'язку молекули у фотохімічній реакції необхідна енергія 430 кДж/моль. Світло з якою довжиною хвилі необхідно використати для цієї фотохімічної реакції?

Розділ 6

РАДІАЦІЙНА БІОФІЗИКА

**Робота 1. Визначення активності природних
радіоактивних препаратів та поглинання
γ-квантів різними матеріалами**

Явище радіоактивності. *Радіоактивність* – це явище довільного (спонтанного) перетворення шляхом розпаду одних атомних ядер на інші з випромінюванням як елементарних частинок, так і електромагнітних хвиль дуже малої довжини. Ядра, які здатні до такого розпаду, називаються **радіоактивними**. Зазначимо, що з відомих нині в природі 1300 різновидів ядер більш як 1000 є радіоактивними (інші ядра **стабільні**).

Природною радіоактивністю називають довільний розпад ядер у природних умовах (її відкрив у 1896 р. французький фізик Беккерель при дослідженні урану). Радіоактивні ядра, отримані в результаті ядерних реакцій, називають **штучними**.

Ядра позначають символом A_ZX , де X – хімічний символ даного елемента, A – масове число (загальна кількість протонів і нейтронів у ядрі) і Z – зарядове число (дорівнює кількості протонів у ядрі й визначає порядковий номер даного хімічного елемента в періодичній таблиці Менделєєва). Ядра з однаковим атомним номером Z , але різними масовими числами ядра A називаються **ізотопами**.

Основні характеристики різних типів радіоактивних випромінювань

α-частинки – це ядра атомів гелію ${}^4_2\text{He}$. При ядерному розпаді α-частинки виплітають із ядер зі швидкістю $\sim 2 \cdot 10^7$ м/с і мають енергію близько $2 \div 9$ МеВ. При взаємодії α-частинок з електронними оболонками інших атомів вони втрачають частину своєї енергії. Шлях у повітрі, на якому α-частинка повністю втрачає свою енергію, становить 10 см, а у воді чи тканинах – 0,1-0,15 мм. Отже, α-частинки мають достатньо малий шлях пробігу і вони швидко поглинаються тканинами.

β-частинки – це потік дуже швидких (близько швидкості світла) від'ємно (електрони) чи додатно (позитрони) заряджених частинок. При розпаді ра-

діоактивних ядер β -частинки мають енергію близько 10^{-13} Дж (~ 1 МеВ). Шлях пробігу β -частинок значно більший, ніж α -частинок, і становить у повітрі до 1 м, а у воді чи тканинах 10-12 см. Оскільки β -частинки мають малу масу і заряд електрона, то густина іонізації їх порівняно з α -частинками невелика.

Нейтрони (1_0n) – нейтральні частинки ядер. Нейтронне випромінювання залежно від енергії частинок поділяють на швидкі й повільні (теплові) нейтрони. Швидкі, енергія яких становить декілька МеВ, вільно проникають через електронні оболонки атомів і безпосередньо взаємодіють з ядрами (пружне розсіювання), у результаті чого утворюються ядра віддачі, які далі спричиняють іонізацію біологічних об'єктів. Повільні нейтрони з енергією до 10 кеВ захоплюються ядрами і тоді утворюються короткоживучі збуджені ядра, які переходять у стабільний стан з випромінюванням γ -квантів, протонів або α -частинок.

Рентгенівське випромінювання – високоенергетичне електромагнітне випромінювання, яке виникає при гальмуванні швидких електронів атомами речовини. Довжина хвилі рентгенівського випромінювання знаходиться в межах 0,1-1 нм. Енергія квантів рентгенівського випромінювання – у межах 1÷10 кеВ. Кванти такої енергії поглинаються атомами, у результаті чого випромінюються швидкі електрони. Це явище називається **фотоелектом**.

γ -випромінювання – високоенергетичне електромагнітне випромінювання ядер з довжиною хвилі $\lambda < 0,1$ нм. Можливі три типи взаємодії γ -квантів з речовиною. Коли енергія γ -квантів знаходиться в межах 10-100 кеВ, вони взаємодіють з атомами, спричиняючи явище фотоелекту. При взаємодії з атомами γ -квантів середньої енергії (від 300 кеВ до декількох МеВ) спостерігається **ефект Комптона**, у результаті якого утворюється вибитий електрон і розсіяний γ -квант меншої енергії. За енергій більше 1 МеВ γ -кванти викликають появу електрон-позитронної пари, яка анігілюючи, створює γ -випромінювання, що поглинається шляхом Комптонівського розсіювання або фотоелекту.

Шлях пробігу γ -квантів у повітрі може досягати сотні кілометрів, а у воді – десятки метрів.

Закон радіоактивного розпаду. Розпад окремих радіоактивних ядер відбувається незалежно один від одного. Тому можна вважати, що кількість ядер dN , які розпадаються за невеликий проміжок часу dt , пропорційна як числу наявних ядер N , так і проміжку часу dt

$$dN = -\lambda N dt, \quad (6.1)$$

де λ – стала розпаду, характерна для кожного радіоактивного ядра (вимірюється в с^{-1}).

Інтегрування виразу (6.1) приводить до такого співвідношення

$$N = N_0 e^{-\lambda t}, \quad (6.2)$$

де N_0 – кількість ядер у початковий момент часу, N – кількість ядер, що не розпалася за час t . Формула (6.2) виражає **закон радіоактивного розпаду**: кількість ядер, які не розпалися, зменшується з часом за експонентою.

Кількість ядер, які розпалися за час t , визначається так:

$$N_0 - N = N_0(1 - e^{-\lambda t}). \quad (6.3)$$

Час, за який розпадається половина від початкової кількості ядер, називається **періодом напіврозпаду** $T_{1/2}$. Тоді з формули (6.2) отримуємо:

$$\frac{N_0}{N} = 2 = e^{\lambda T_{1/2}}. \quad (6.4)$$

Прологарифмувавши (6.4), знаходимо $T_{1/2}$:

$$T_{1/2} = \frac{\ln 2}{\lambda} = \frac{0,693}{\lambda}. \quad (6.5)$$

Період напіврозпаду для відомих нині радіоактивних ядер знаходиться в межах від $3 \cdot 10^{-7}$ с до $5 \cdot 10^{15}$ років.

Середній час життя радіоактивного ядра визначається за формулою:

$$\tau = \frac{1}{\lambda}. \quad (6.6)$$

Зазначимо, що середній час життя для таких природних радіоактивних елементів, як, наприклад, ізотопи урану, торію, калію та інших (усього їх близько 20) перевищує 10^8 років. Ось чому вони не встигли повністю розпастися за час існування видимої частини Всесвіту.

Активність радіоактивного препарату. Активністю радіоактивного препарату називається число розпадів ядер, яке відбувається в препараті за одиницю часу. За законом радіоактивного розпаду (6.1) активність препарату визначається так:

$$\frac{dN_{\text{розп}}}{dt} = \left| \frac{dN}{dt} \right| = \lambda N. \quad (6.7)$$

Одиницею активності в системі СІ є 1 Бк (Беккерель) – один розпад ядра за секунду. Однак це дуже мала величина. Тому на практиці часто використовують таку одиницю активності, як 1 Кі (Кюрі), що дорівнює $3,7 \cdot 10^{10}$ Бк.

Для кількісної реєстрації активності радіоактивних препаратів користуються лічильними приладами, наприклад, бета-радіометром РУБ-ОІП (див. нижче).

Біологічна дія іонізуючого випромінювання. Радіоактивні випромінювання, взаємодіючи з атомами й молекулами живого організму, витрачають свою енергію на їх іонізацію (тобто на відрив електронів із зовнішніх орбіт цих атомів і молекул) та збудження (тобто на переведення електронів цих атомів і молекул на вищі орбіти). Унаслідок цього відбувається ряд фізико-хімічних перетворень у біологічно важливих молекулах організму, які викликають не-

зворотні зміни у фізіологічних процесах. Чим більша маса радіоактивної частинки, тим більша інтенсивність її взаємодії з атомами середовища. У зв'язку з цим α -частинки іонізують інтенсивніше, ніж β -частинки. З іншого боку, оскільки величина пробігу γ -променів значно більша, ніж α - і навіть β -частинок, сумарна іонізуюча здатність у γ -променів найвища, тому найнебезпечнішими для живого організму є γ - і β -випромінювання. Крім того, γ -промені поглинаються в багатовеличезній кількості, ніж α - і β -частинки, і тому захист від них є найскладнішим.

Кількісна характеристика іонізації речовини під дією радіоактивного випромінювання (радіації) виражається в одиницях дози радіоактивного випромінювання.

У системі СІ одиницею експозиційної дози ($D_{\text{екс}}$) є Кл/кг. Це така доза, за якої радіоактивне випромінювання в 1 кг сухого повітря створює іони, що несуть електричний заряд в 1 Кл. Позасистемна одиниця експозиційної дози – рентген (Р): $R = 2,58 \cdot 10^{-4}$ Кл/кг. Потужність експозиційної дози є відношення приросту експозиційної дози до інтервалу часу:

$$P_{\text{екс}} = dD_{\text{екс}}/dt.$$

Проте біологічний ефект дії радіоактивного випромінювання залежить не від кількості падаючої енергії, а від поглиненої енергії, і тому важливо знати поглинену дозу ($D_{\text{пог}}$). Це кількість енергії іонізуючого випромінювання, яка поглинена одиницею маси опроміненого об'єкта. Її одиницею є грей: $\text{Гр} = \text{Дж/кг}$. Позасистемна одиниця поглиненої дози – рад: $\text{рад} = 10^{-2}$ Гр. Потужність поглиненої дози: $P_{\text{пог}} = D_{\text{пог}}/t$. Зв'язок поглиненої та експозиційної дози визначається за формулою: $D_{\text{пог}} = fD_{\text{екс}}$, де f – перехідний коефіцієнт (наприклад, для води і м'яких тканин людини $f=1$).

Експозиційна і поглинена доза вимірюється за допомогою дозиметрів, робота яких базується на таких методах реєстрації, як метод іонізаційної камери та сцинтиляційний, калориметрія, хімічні методи.

Для порівняння дії різних видів іонізуючого випромінювання на біологічний об'єкт було введено еквівалентну дозу ($D_{\text{екв}}$). Це кількість поглиненої біологічним об'єктом енергії будь-якого виду іонізуючого випромінювання, біологічна дія якої еквівалентна дії 1 Р. Її одиницею є бер. Зв'язок еквівалентної та поглиненої дози визначається за формулою: $D_{\text{екв}} = kD_{\text{пог}}$, де k – коефіцієнт якості.

Для біофізики найбільш цікавим є розуміння первинних механізмів взаємодії радіоактивного випромінювання з живим організмом. Експериментально було встановлено, що при опроміненні клітин живих організмів γ -променями, β -частинками виконується закон

$$N = N_0 e^{-kD}, \quad (6.8)$$

де N – число клітин, які вижили, N_0 – загальне число опромінених клітин, D – доза радіоактивного випромінювання і k – коефіцієнт, що характеризує радіочутливість клітин. Залежність (6.8) називають дозовою кривою.

Для пояснення дозових кривих існує ряд теорій, одна з яких називається **теорією прямої дії радіації**. Згідно з нею процес інактивації біомолекул полягає в пошкодженні їх "чутливої" ділянки (наприклад, активного центру ферменту), тобто "мішені". Тому теорію прямої дії радіації інколи називають теорією мішені. Однак існує значна кількість експериментальних фактів, які вона не в змозі пояснити. Це, зокрема, радіаційні ефекти, які спостерігаються у водних розчинах, на рівні клітинних суспензій та ін. Для пояснення цих ефектів було запропоновано теорію **непрямої дії радіації**. Оскільки у тканинах (клітинах) живого організму знаходиться близько 70-80 % води, дослідники звернули увагу на значну роль радикалів води в радіаційно-хімічних перетвореннях у біологічних об'єктах. Наприклад, при дії γ -квантів або β -частинок можливе таке перетворення в молекулі води: $\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{H}_2\text{O}^+ + \text{e}^-$. Потім відбувається дисоціація H_2O^+ з утворенням вільного радикала $\text{OH}^\bullet$ і протона: $\text{H}_2\text{O}^+ \rightarrow \text{H}^+ + \text{OH}^\bullet$. У свою чергу, електрон e^- також може взаємодіяти з молекулою води: $\text{H}_2\text{O} + \text{e}^- \rightarrow \text{H}_2\text{O}^-$. Дисоціація цього іона призводить до утворення другого вільного радикала – атомарного водню $\text{H}^\bullet$: $\text{H}_2\text{O}^- \rightarrow \text{H}^\bullet + \text{OH}^-$. Крім цього, у присутності кисню може утворюватись ряд інших вільних радикалів, які є дуже реакційними та інтенсивно окиснюють біологічно активні молекули: $\text{H}^\bullet + \text{O}_2 \rightarrow \text{HO}_2^\bullet$; $2\text{HO}_2^\bullet \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$; $\text{OH}^\bullet + \text{OH}^\bullet \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2$; $\text{HO}_2^\bullet + \text{H}^\bullet \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2$. Таким чином, хімічні продукти **радіолізу води** (іони, радикали, перекиси), вступаючи у взаємодію з органічними молекулами живого організму, можуть викликати їх зміну.

Необхідно зазначити, що в реальних умовах дуже важко відокремити механізми чисто прямої та непрямої дії радіації. Мабуть, обидва ці механізми тією чи іншою мірою виявляються одночасно і викликають порушення нормального функціонування організму.

У біологічних дослідженнях джерела іонізуючого випромінювання (радіоактивні ізотопи, γ -джерела, рентгенівські установки тощо) використовують:

1) для опромінення живих організмів з метою вивчення променевого пошкодження і знаходження шляхів боротьби з цими пошкодженнями, а також для цілеспрямованого впливу радіоактивного випромінювання на перебіг деяких фізіологічних процесів у живих організмах (фотодинамічна терапія);

2) з метою діагностики певних захворювань.

Матеріали та прилади: бета-радіометр РУБ-ОІП, препарати КСІ і попіл.

Принцип роботи бета-радіометра РУБ-ОІП. Бета-радіометр РУБ-ОІП призначений для вимірювання питомої та об'ємної активності β -випромінюючих радіонуклідів (радіоактивних елементів, які розпадаються через β^+ -розпад), які знаходяться у твердому, рідкому чи газоподібному станах. За допомогою цього приладу можна виконувати експресні вимірювання об'ємної активності проб рідини з $\text{pH} = 6 \pm 3$, питомої активності сипучих харчових про-

дуктів з ефективним атомним номером $Z_{\text{эф}} = 7 \pm 1$, густиною $\rho = (0,8 \pm 0,1) \text{ г/см}^3$ і вологістю $\sim 14\%$, питомої активності ґрунту з $\rho = (1,2 \pm 0,2) \text{ г/см}^3$, $Z_{\text{эф}} = 13 \pm 2$ і вологістю $\sim 10\%$. Блок детектування (БДЖБ-05ПІ) має бути розміщений у свинцевій камері для захисту його активних і чутливих елементів від додаткового опромінення зовнішніми γ -джерелами.

Активність радіоактивної речовини визначають в імпульсах за секунду.

Діапазон вимірювань активності проб, у яких джерелами випромінювання є ізотопи ^{90}Sr , ^{90}Y тощо, знаходиться в межах від 13 до $1,3 \cdot 10^3$ Бк при чутливості $4 \cdot 10^{-5} \text{ кг/(с·Бк)}$, л/(с·Бк) або $\text{с}^{-1}\text{Бк}^{-1}$ для таких рідин, як молоко, кефір, вода, фруктовий або овочевий сік і сипучих речовин, як суха земля, пісок, крупи та ін. Таблетовані проби з указаних сипучих речовин мають чутливість $3,3 \cdot 10^{-5} \text{ с}^{-1}\text{Бк}^{-1}$. Якщо β^+ -розпад супроводжується γ -фоном, наприклад ізотопом ^{137}Cs , то створюється додаткова доза опромінення, яка впливає на роботу приладу. Значення потужності дози, викликане γ -фоном, не повинно перевищувати $3,6 \cdot 10^{-5} \text{ Р/с}$.

Порядок роботи. Препаратом заповнюють вимірювальну камеру й розміщують її у прилад. Натисненням кнопки "Експоз" установлюють потрібний час підрахунку. Кнопкою "Пуск" на приладі вмикають вимірювання активності препарату або фону (лічильник відкалібрований за контрольним джерелом ^{137}Cs). Виконують 10 вимірювань. Середнє значення активності обчислюють за формулою

$$\bar{N} = \frac{\sum_{i=1}^{10} N_i}{10t}, \quad (6.9)$$

де N_i – кількість імпульсів при i -тому вимірюванні; t – тривалість одного вимірювання (с). Для ефективності підрахунку імпульсів з наперед заданою точністю необхідно визначити тривалість підрахунку імпульсів зразка T_c і фону T_ϕ за такими формулами

$$\begin{aligned} T_c &= (1,96)^2 \frac{\bar{N} + \sqrt{\bar{N} \cdot \bar{N}_\phi}}{0,01 \bar{N}_0^2} \quad \text{при } \frac{\bar{N}_0}{\bar{N}_\phi} \geq 0,5, \\ \text{або } T_c &= 1800 \text{ с} \quad \text{при } \frac{\bar{N}_0}{\bar{N}_\phi} \leq 0,5, \\ T_\phi &= (1,96)^2 \frac{1000}{\bar{N}_\phi}, \end{aligned} \quad (6.10)$$

де $\bar{N}_\phi$ – кількість імпульсів за секунду для фону; $\bar{N}_0$ – кількість імпульсів за секунду для препарату; $\bar{N} = \bar{N}_0 + \bar{N}_\phi$ – сумарне середнє значення в імпл/с для фону й препарату.

Величину фонового випромінювання $\bar{N}_\phi$ необхідно вимірювати не менше як 10 разів протягом 100 секунд. Час випромінювання контрольної проби вибирається залежно від умов (6.10).

Завдання 1. Визначення активності природних радіоактивних препаратів (^{40}K та попіл)

Виконати 10 вимірювань фону N_ϕ і підрахувати його середнє значення $\bar{N}_\phi$ за формулою (6.9).

Далі у спеціальну камеру насипати сіль KCl , беручи до уваги, що в ній є певний відсоток радіоактивного ^{40}K , який, як відомо, розпадається через β -радіоактивний розпад з періодом напіврозпаду $12,1 \cdot 10^8$ років. Камеру з KCl розташовують навпроти віконця торцевого лічильника у свинцевому корпусі.

Виконати 10 вимірювань кількості імпульсів для ^{40}K за 100 с і підрахувати $\bar{N}$ за формулою (6.9). Різниця між $\bar{N}$ і $\bar{N}_\phi$ дає значення активності від ^{40}K ($\bar{N}_0$).

Необхідно знайти відношення $\bar{N} / \bar{N}_\phi$. Залежно від цієї величини знаходять тривалість підрахунку імпульсів контрольного зразка (T_c) та фону (T_ϕ) за відповідними формулами (6.10).

Розрахувавши величини T_c і T_ϕ , визначають фон і радіоактивність препарату ^{40}K разом з фоном. Істинна активність радіоактивного препарату ^{40}K буде дорівнювати $\bar{N}_0 = \bar{N}(T_c) - \bar{N}(T_\phi)$.

Аналогічні вимірювання та розрахунки провести для попелу.

Завдання 2. Визначення поглинання γ -квантів різними матеріалами

Поглинання γ -квантів відбувається за законом

$$N = N_0 e^{-\mu d}, \quad (6.11)$$

де N_0 – кількість імпульсів радіоактивного препарату у відсутності поглинаючої речовини; N – кількість імпульсів після проходження через речовину товщиною d (м); μ – лінійний коефіцієнт поглинання γ -квантів (м^{-1}). Знаючи μ , можна оцінити масовий коефіцієнт поглинання μ_m ($\text{м}^2/\text{кг}$)

$$\mu_m = \frac{\mu}{\rho}, \quad (6.12)$$

де ρ – питома густина речовини.

Виміряти залежність кількості імпульсів препарату KCl від товщини d алюмінієвої фольги. Спочатку потрібно виміряти активність препарату

(кількість імпульсів) без фольги і знайти середнє значення. Потім покласти одну пластинку фольги ($d=14$ мкм) на препарат, виміряти активність і знайти її середнє значення. Після цього покласти разом уже дві пластинки і провести вимірювання, потім 3 пластинки і т. д., поки активність препарату не зменшиться до фонового значення. Використовуючи отримані результати, побудувати графік $\ln(N_0/N) = f(d)$. З цього графіка визначають величину μ . на графіку знаходять таку товщину фольги d_0 , при якій активність препарату (кількість імпульсів) зменшиться в e раз. Тоді

$$\mu = \frac{1}{d_0}. \quad (6.13)$$

Знайшовши μ , розрахувати масовий коефіцієнт поглинання алюмінію (узяти $\rho = 2700$ кг/м³).

Провести такі ж вимірювання для паперових смужок і оцінити лінійний та масовий коефіцієнти поглинання для паперу ($\rho = 500$ кг/м³).

Рекомендована література

Ярмоненко С.П. Радиобиология человека и животных. – М., 1984.

Кудряшов Ю.Б., Беренфельд Б.С. Основы радиационной биофизики. – М., 1982

Кучеренко М.Є., Мирутенко В.І. Основы молекулярної радіобіології. – К., 1977.

Задачі

1. Пластинка алюмінію у 2 рази ослаблює інтенсивність рентгенівського проміння. Знайти товщину цієї пластинки, якщо масовий коефіцієнт поглинання становить $\mu_m = 5,3$ м²/кг. (Питома щільність алюмінію $\rho = 2700$ кг/м³).

2. Активність радіоактивного ⁴⁵Са становила $A = 2 \cdot 10^9$ Бк. Знайти масу радіоактивного препарату, якщо $T_{1/2} = 165$ діб.

3. Тіло масою $m = 70$ кг протягом $t = 24$ год поглинуло енергію іонізуючого випромінювання $E = 10$ Дж. Яка поглинена доза і потужність поглиненої дози?

Розділ 7

СТАТИСТИЧНА ОБРОБКА РЕЗУЛЬТАТІВ ВИМІРЮВАНЬ (ТЕОРІЯ ПОХИБОК)

При проведенні експериментальних досліджень фізичні величини можна отримувати через прямі та непрямі вимірювання.

Прямі вимірювання – це вимірювання, коли шукане значення фізичної величини отримують безпосередньо в результаті проведеного експерименту. Наприклад, вимірювання довжини предмета лінійкою, вимірювання сили струму в електричному колі за допомогою амперметра тощо.

Непрямі вимірювання – це вимірювання, коли шукане значення фізичної величини знаходять на основі відомої залежності між цією величиною та величинами, які отримують за допомогою прямих вимірювань. Наприклад, знаходження площі тіла (S) за результатами вимірювань його довжини (a) і ширини (b): $S=ab$; знаходження опору резистора (R) за результатами вимірювань напруги (U) і сили струму (I) в електричному колі: $R=U/I$.

Досвід показує, що довільні вимірювання фізичної величини завжди супроводжуються відхиленнями від істинного значення величини, що вимірюється. Отже, **похибка вимірювання** фізичної величини – це відхилення результату вимірювання від істинного значення вимірюваної фізичної величини.

За способом вираження розрізняють абсолютні та відносні похибки.

Абсолютною похибкою називають похибку, виражену в одиницях вимірюваної величини

$$\Delta X = X - X_{\text{іст}}, \quad (7.1)$$

де X – істинне значення вимірюваної фізичної величини, $X_{\text{іст}}$ – значення, одержане в результаті проведеного вимірювання.

Відносною похибкою називають похибку, яка дорівнює відношенню абсолютної похибки до істинного значення вимірюваної величини:

$$\delta = \frac{\Delta X}{X}. \quad (7.2)$$

Точність вимірювань визначає якість вимірювання і відображає близькість результатів до істинного значення X . Висока точність вимірювання означає, що

фізичні величини обчислюються з малими похибками. Кількісно точність вимірювання визначається величиною, яка обернена до відносної похибки ($1/\delta$)

Похибка вимірювання обраного методу складається із систематичної та випадкової складових.

Систематична складова похибки вимірювання – це така її частина, яка при повторних вимірах однієї і тієї самої величини, що виконуються за незмінних умов, залишається постійною або закономірно змінюється. Систематична складова прямого вимірювання зумовлена, головним чином, похибками засобів вимірювання (інструментальними похибками), а непрямого – як інструментальними похибками, так і недоліками методів вимірювання (похибки методу) та похибками обчислень. Наприклад, вимірювання розмірів тіла проводяться за допомогою міліметрової лінійки. Похибка вимірювання визначається процедурою відліку, тобто абсолютна похибка дорівнює ціні поділки лінійки: $\Delta X = 1 \text{ мм}$.

Випадкова складова похибки вимірювання – це така частина похибки вимірювання, яка змінюється випадковим чином при проведенні повторних вимірювань однієї й тієї самої величини. Випадкова складова зумовлена такими змінами умов експерименту, які не контролюються. Для оцінки випадкової складової похибки вимірювання використовують результати теорії випадкових величин.

З позиції математичної статистики будь-яка серія з n вимірювань являє собою набір випадкових величин (вибірку). Дуже важливим параметром, що характеризує випадкову величину, є її середнє арифметичне значення (або математичне сподівання). Наприклад, у випадку, коли дискретна випадкова величина X набуває різних випадкових значень, математичне сподівання $M(X)$ визначається за формулою

$$x_c = M(X) = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}, \quad (7.3)$$

де x_i – значення випадкової величини у i -тому вимірюванні.

Середнє значення неперервної випадкової величини є важливим, але недостатнім для її повної характеристики. Важливо знати "розсіювання" випадкової величини відносно її середнього значення. Для його визначення використовують дисперсію випадкової величини $D(X)$ (середнє значення квадрата відхилення випадкової величини від її середнього значення):

$$D(X) = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - x_c)^2}{n-1} \quad (7.4)$$

Поряд із дисперсією найчастіше використовують середньоквадратичну (стандартну) похибку методу визначення випадкової величини:

$$\sigma = \sqrt{D(X)} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - x_c)^2}{n-1}} \quad (7.5)$$

Середньоквадратична похибка результату визначається за формулою

$$\sigma_{x_c} = \frac{\sigma}{\sqrt{n}} \quad (7.6)$$

Довірчий інтервал вимірювання, який визначає випадкову складову похибки вимірювання фізичної величини, розраховують таким чином:

$$\Delta X = t_{p,n} \cdot \sigma_{x_c} = \frac{t_{p,n} \cdot \sigma}{\sqrt{n}}, \quad (7.7)$$

де $t_{p,n}$ – коефіцієнт Стюдента (P – значення довірчої ймовірності в серії з n вимірів, яке береться з табл. 7.1).

Тоді істинне (шукане) значення фізичної величини буде

$$X = x_c \pm \Delta X. \quad (7.8)$$

При проведенні прямих вимірювань можуть виникнути три ситуації:

1. Систематична складова набагато більша за випадкову: $\Delta X_{\text{сист}} \gg \Delta X_{\text{вип}}$. Тут довірчий інтервал вимірювання визначається більшою з них, тобто систематичною складовою. У результаті маємо: $X = x_c \pm \Delta X_{\text{сист}}$;

2. Випадкова складова набагато більша за систематичну: $\Delta X_{\text{сист}} \ll \Delta X_{\text{вип}}$. У цьому випадку довірчий інтервал вимірювання визначається лише випадковою складовою. Він розраховується за формулою (7.7). Результат записується у вигляді: $X = x_c \pm \Delta X_{\text{вип}}$

Таблиця 7.1

Коефіцієнти Стюдента $t_{p,n}$

$n P$	$t_{p,n}$						
	0,7	0,8	0,9	0,96	0,98	0,99	0,999
2	2,0	3,1	6,3	12,70	31,8	63,7	636,6
3	1,3	1,9	2,9	4,30	7,0	9,9	31,6
4	1,3	1,6	2,4	3,20	4,5	5,8	12,9
5	1,2	1,5	2,1	2,80	3,7	4,6	8,7
6	1,2	1,5	2,0	2,60	3,4	4,0	6,9
7	1,1	1,4	1,9	2,40	3,1	3,7	6,0
8	1,1	1,4	1,9	2,40	3,0	3,5	5,4
9	1,1	1,4	1,9	2,30	2,9	3,4	5,0
10	1,1	1,4	1,8	2,30	2,8	3,3	4,8

3. Систематична й випадкова складові одного порядку: $\Delta X_{\text{сист}} \sim \Delta X_{\text{вип}}$. Тут довірчий інтервал вимірювання визначається за формулою

$$\Delta X = \sqrt{\Delta X_{\text{сист}}^2 + \Delta X_{\text{вип}}^2} \quad (7.9)$$

Зауважимо, що за формулою (7.7) випадкова складова зі збільшенням кількості вимірів зменшується.

Як приклад статистичної обробки результатів вимірювань розглянемо таке завдання.

Завдання. Визначити характеристичну в'язкість розчину сахарози

1. За допомогою віскозиметра визначити час t_0 витікання дистильованої води (контроль). Провести вимірювання три рази.

2. Визначити час t витікання розчинів сахарози за різної концентрації: $C = 20, 30, 40$ і 50 %. Провести вимірювання три рази для кожної концентрації.

3. Визначити відносну $\eta_{\text{від}} = \frac{t}{t_0}$, питому $\eta_{\text{пит}} = \frac{t}{t_0} - 1$ і приведену

$\eta_{\text{прив}} = \frac{\eta_{\text{пит}}}{C}$ в'язкості.

4. Використовуючи пакет програми "Origin" (або метод найменших квадратів), побудувати графік залежності приведеної в'язкості від концентрації $\eta_{\text{прив}}(C)$. Апроксимувати її прямою лінією і визначити значення характеристичної в'язкості $[\eta] = \lim_{C \rightarrow 0} \eta_{\text{прив}}(C)$.

5. Результати проведених експериментів 1 і 2 занести в таблицю. Знайти похибки вимірювань фізичних величин.

Експериментальна частина

1. Результати експерименту 1 занесемо у табл. 7.2:

Таблиця 7.2
Час витікання дистильованої води

№	t_0 , с
1.	11
2.	10
3	11

Визначимо середнє значення вимірюваної величини:

$t_{0c} = \frac{t_1 + t_2 + t_3}{3} = 10,7$ с, потім середньоквадратичну похибку методу

$\sigma = \sqrt{\frac{(t_{0c} - t_1)^2 + (t_{0c} - t_2)^2 + (t_{0c} - t_3)^2}{2}} = \sqrt{\frac{\Delta t_{0c1}^2 + \Delta t_{0c2}^2 + \Delta t_{0c3}^2}{2}} = 0,58$ с, далі серед-

ньоквадратичну похибку результату $\sigma_{t_c} = \frac{\sigma}{\sqrt{n}} = \frac{0,58}{\sqrt{3}} = 0,33$ с і, нарешті, довірчий

інтервал вимірювання $\Delta t_{\text{вип.}} = t_{P,n} \cdot \sigma_{t_c} = 1,42$ с (коефіцієнт Стюдента $t_{P,n} = 4,3$ беремо з табл. 7.1 за умови $P = 0,96$ з $n=3$ вимірів), який визначає випадкову складову похибки вимірювання фізичної величини. Оскільки випадкова і систематична складові ($\Delta t_{\text{сисм.}} = 1$ с) одного порядку, то в цьому випадку довірчий інтервал вимірювання (абсолютна похибка) визначається за формулою $\Delta t = \sqrt{\Delta t_{\text{сисм.}}^2 + \Delta t_{\text{вип.}}^2} = 1,7$ с. Тоді шукана величина буде $t_0 = t_{0c} \pm \Delta t = (10,7 \pm 1,7)$ с.

2. Результати експерименту 2 та їх статистичну обробку занесямо у табл. 7.3:

Таблиця 7.3

Час витікання розчинів сахарози

№ та результати статистичної обробки вимірювань	t , с ($C_1=20\%$)	t , с ($C_2=30\%$)	t , с ($C_3=40\%$)	t , с ($C_4=50\%$)
1	20	36	48	69
2	25	37	45	67
3	24	36	50	70
t_c	23	36,3	47,7	68,7
σ_{t_c}	1,53	0,33	0,81	0,88
$\Delta t_{\text{вип.}}$	6,6	1,4	3,5	3,8
Δt	6,7	1,7	3,6	3,9
t	$23,0 \pm 6,7$	$36,3 \pm 1,7$	$47,7 \pm 3,6$	$68,7 \pm 3,9$

Теоретична частина

3. За відповідними формулами визначимо відносну $\left(\eta_{\text{від}} = \frac{t}{t_0} \right)$, питому

$\left(\eta_{\text{пит}} = \frac{t}{t_0} - 1 \right)$ і приведену $\left(\eta_{\text{прив}} = \frac{\eta_{\text{пит}}}{C} \right)$ в'язкості розчинів сахарози.

1. Відносна в'язкість розчину сахарози за концентрації $C_1 = 20\%$:

$$\eta_{\text{від},c}(C_1) = \frac{t_c(C_1)}{t_{0c}} = 2,1, \quad \Delta \eta_{\text{від},c}(C_1) = \eta_{\text{від},c}(C_1) \cdot \beta(C_1) = 0,6, \quad \text{де}$$

$$\beta(C_1) = \sqrt{\left(\frac{\Delta t(C_1)}{t_c(C_1)} \right)^2 + \left(\frac{\Delta t_0}{t_{0c}} \right)^2} = 0,3, \quad \eta_{\text{від}}(C_1) = \eta_{\text{від},c}(C_1) \pm \Delta \eta_{\text{від}}(C_1) = 2,1 \pm 0,6;$$

Відносна в'язкість розчину сахарози за концентрації $C_2 = 30\%$:

$$\eta_{\text{від},c}(C_2) = 3,4, \quad \Delta \eta_{\text{від},c}(C_2) = \eta_{\text{від},c}(C_2) \cdot \beta(C_2) = 0,7, \quad \text{де } \beta(C_2) = 0,2,$$

$$\eta_{\text{від}}(C_2) = \eta_{\text{від},c}(C_2) \pm \Delta \eta_{\text{від}}(C_2) = 3,4 \pm 0,7;$$

Відносна в'язкість розчину сахарози за концентрації $C_3 = 40\%$:

$$\eta_{\text{від},c}(C_3) = 4,5, \Delta\eta_{\text{від}}(C_3) = \eta_{\text{від},c}(C_3) \cdot \beta(C_3) = 1,4, \text{ де } \beta(C_3) = 0,3,$$

$$\eta_{\text{від}}(C_3) = \eta_{\text{від},c}(C_3) \pm \Delta\eta_{\text{від}}(C_3) = 4,5 \pm 1,4;$$

Відносна в'язкість розчину сахарози за концентрації $C_4 = 50\%$:

$$\eta_{\text{від},c}(C_4) = 6,4, \Delta\eta_{\text{від}}(C_4) = \eta_{\text{від},c}(C_4) \cdot \beta(C_4) = 1,3, \text{ де } \beta(C_4) = 0,2,$$

$$\eta_{\text{від}}(C_4) = \eta_{\text{від},c}(C_4) \pm \Delta\eta_{\text{від}}(C_4) = 6,4 \pm 1,3.$$

Зауваження. Якщо шукана функція має вигляд $f(x,y)$, то довірчий інтервал вимірювання (абсолютна похибка) визначається за такою формулою:

$$\Delta f = \sqrt{\left(\frac{\partial f}{\partial x} \Delta x\right)^2 + \left(\frac{\partial f}{\partial y} \Delta y\right)^2} \quad \text{При її обчисленні підставляються середні значення величин, отриманих в результаті експерименту.}$$

2) Питоме в'язкість досліджуваних розчинів:

$$\eta_{\text{пит},c}(C_1) = \frac{t_c(C_1)}{t_{0,c}} - 1 = \eta_{\text{від},c}(C_1) - 1 = 1,1,$$

$$\Delta\eta_{\text{пит}}(C_1) = \eta_{\text{пит},c}(C_1) \cdot \beta(C_1) = 0,3 \text{ та}$$

$$\eta_{\text{пит}}(C_1) = \eta_{\text{пит},c}(C_1) \pm \Delta\eta_{\text{пит}}(C_1) = 1,1 \pm 0,3;$$

$$\eta_{\text{пит},c}(C_2) = 2,4, \Delta\eta_{\text{пит}}(C_2) = \eta_{\text{пит},c}(C_2) \cdot \beta(C_2) = 0,5 \text{ і}$$

$$\eta_{\text{пит}}(C_2) = \eta_{\text{пит},c}(C_2) \pm \Delta\eta_{\text{пит}}(C_2) = 2,4 \pm 0,5;$$

$$\eta_{\text{пит},c}(C_3) = 3,5, \Delta\eta_{\text{пит}}(C_3) = \eta_{\text{пит},c}(C_3) \cdot \beta(C_3) = 1,1 \text{ і}$$

$$\eta_{\text{пит}}(C_3) = \eta_{\text{пит},c}(C_3) \pm \Delta\eta_{\text{пит}}(C_3) = 3,5 \pm 1,1;$$

$$\eta_{\text{пит},c}(C_4) = 5,4, \Delta\eta_{\text{пит}}(C_4) = \eta_{\text{пит},c}(C_4) \cdot \beta(C_4) = 1,1 \text{ і}$$

$$\eta_{\text{пит}}(C_4) = \eta_{\text{пит},c}(C_4) \pm \Delta\eta_{\text{пит}}(C_4) = 5,4 \pm 1,1.$$

3) Приведена в'язкість досліджуваних розчинів:

$$\eta_{\text{прив},c}(C_1) = \frac{\eta_{\text{пит},c}(C_1)}{C_1} \times 100\% = 5,5,$$

$$\Delta\eta_{\text{прив}}(C_1) = \frac{\Delta\eta_{\text{пит}}(C_1)}{C_1} \times 100\% = 1,5 \text{ і}$$

$$\eta_{\text{прив}}(C_1) = \eta_{\text{прив},c}(C_1) \pm \Delta\eta_{\text{прив}}(C_1) = 5,5 \pm 1,5;$$

$$\eta_{\text{прив},c}(C_2) = 8,0, \Delta\eta_{\text{прив}}(C_2) = 1,7 \text{ і}$$

$$\eta_{прив}(C_2) = \eta_{прив,с}(C_2) \pm \Delta\eta_{прив}(C_2) = 8,0 \pm 1,7;$$

$$\eta_{прив,с}(C_3) = 8,8, \Delta\eta_{прив}(C_3) = 2,8 \text{ і}$$

$$\eta_{прив}(C_3) = \eta_{прив,с}(C_3) \pm \Delta\eta_{прив}(C_3) = 8,8 \pm 2,8;$$

$$\eta_{прив,с}(C_4) = 10,8, \Delta\eta_{прив}(C_4) = 2,2 \text{ і}$$

$$\eta_{прив}(C_4) = \eta_{прив,с}(C_4) \pm \Delta\eta_{прив}(C_4) = 10,8 \pm 2,2.$$

4. Отримані результати у попередньому пункті 3 занесемо у табл. 7.4:

Таблиця 7.4
Приведена в'язкість розчинів сахарози

C, %	20	30	40	50
$\eta_{прив}$	5,5	8,0	8,8	10,8

Будемо шукати функціональну залежність між C і $\eta_{прив}$ у вигляді лінійної функції $\eta_{прив} = kC + b$.

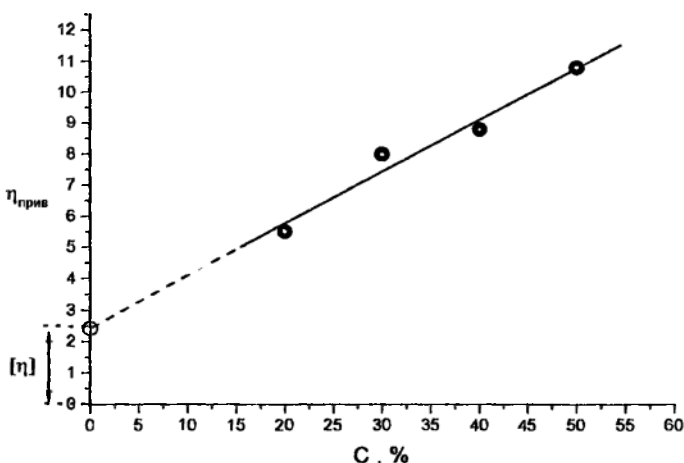


Рис. 7.1. Побудована залежність $\eta_{прив}(C)$ у пакеті програми "Origin"

За методом найменших квадратів маємо лінійну систему двох рівнянь з двома невідомими k і b :

$$\begin{cases} \sum_{i=1}^4 \eta_{\text{прив}} C_i = 1242 = k \sum_{i=1}^4 C_i^2 + b \sum_{i=1}^4 C_i = 5400k + 140b, \\ \sum_{i=1}^4 \eta_{\text{прив}} = 33,1 = 140k + 4b. \end{cases}$$

Розв'язуючи цю систему, знаходимо: $k = 0,167$ і $b = 2,430$. Отже, $\eta_{\text{прив}} = 0,167C + 2,430$ – рівняння шуканої апроксимуючої прямої, яку зображено на рис. 7.1.

Нарешті, значення характеристичної в'язкості $[\eta] = \lim_{C \rightarrow 0} \eta_{\text{прив}}(C) = b \approx 2,43$.

Рекомендована література

- Зайдель А.Н. Погрешности измерений физических величин. – Л., 1985.
 Куликовский К.Л., Купер В.Я. Методы и средства измерений. – М., 1986.
 Лакин Г.Ф. Биометрия. – М., 1990.
 Конділенко О.І., Міщенко М.І. Похибки вимірювань фізичних величин: Методичні рекомендації до лабораторного практикуму з курсу загальної фізики. – Житомир, 2000.
 Прилуцький Ю.І., Богущька К.І., Залойло І.А. та ін. Інформатика. – К., 2002.
 Прилуцький Ю.І., Оглобля О.В., Богущька К.І. Основи вищої математики. – К., 2002.

Запитання та задачі

1. Що таке похибка вимірювання фізичної величини? Які Ви знаєте похибки?
2. Яка різниця між систематичною та випадковою складовою похибки вимірювання фізичної величини?
3. Визначте математичне сподівання випадкової величини, її дисперсію, середньоквадратичну похибку методу та результату, довірчий інтервал вимірювання фізичної величини.
4. Нехай у результаті експерименту отримано п'ять значень шуканої функції Y при п'яти значеннях її аргументу X :

X	-2	0	1	2	4
Y	0.5	1	1.5	2	3

Використовуючи метод найменших квадратів, знайдіть функціональну залежність між X та Y у вигляді квадратичної функції $Y = aX^2 + b$.

Порівняйте результат, отриманий аналітично, зі змодельованим у пакеті програми "Origin".

ДОДАТКИ

Таблиця 1

Словотворчі префікси та множники для утворення кратних і часткових одиниць

Словотворчий префікс	Позначення префікса	Множник	Найменування множника
тера	T	$1000000000000 = 10^{12}$	трильйон
гіга	G	$1000000000 = 10^9$	мільярд
мега	M	$1000000 = 10^6$	мільйон
кіло	k	$1000 = 10^3$	тисяча
гекто	h	$100 = 10^2$	сто
дека	da	$10 = 10^1$	десять
деци	d	$0,1 = 10^{-1}$	одна десята
санти	c	$0,01 = 10^{-2}$	одна сота
мілі	m	$0,001 = 10^{-3}$	одна тисячна
мікро	μk	$0,000001 = 10^{-6}$	одна мільйонна
нано	n	$0,000000001 = 10^{-9}$	одна мільярдна
піко	p	$0,000000000001 = 10^{-12}$	одна трильйонна
фемто	f	$0,000000000000001 = 10^{-15}$	одна квадрильйонна
атто	a	$0,000000000000000001 = 10^{-18}$	одна квінтильйонна

Приклади: 1 ТГц (1 терагерц) = 10^{12} Гц (трильйон герців)
 1 МВт (1 мегават) = 10^6 Вт (мільйон ватів)
 1 мкА (1 мікроампер) = 10^{-6} А (мільйонна ампера)
 1 пФ (1 пікофарада) = 10^{-12} Ф (трильйонна фаради)
 1 фс (1 фемтосекунда) = 10^{-15} с (квадрильйонна секунди)

Таблиця 2

Фізичні константи

Назва константи	Символ	Значення
Стала Больцмана	k	$1,3806 \cdot 10^{-23}$ ДжК ⁻¹
Газова стала	r	$8,3146$ ДжК ⁻¹ моль ⁻¹
Постійна Планка	h	$6,63 \cdot 10^{-34}$ Джс
Число Авогадро	n	$6,022 \cdot 10^{23}$ моль ⁻¹
Об'єм, що займає 1 моль ідеального газу (за стандартних умов)		$22,415$ л ($22,415 \cdot 10^{-3}$ м ³)
Маса спокою нейтрона	m_n	$1,67496 \cdot 10^{-27}$ кг
Маса спокою протона	m_p	$1,67264 \cdot 10^{-27}$ кг
Маса спокою електрона	m_e	$9,10955 \cdot 10^{-31}$ кг
Швидкість світла у вакуумі	c_0	$2,99792 \cdot 10^8$ м·с ⁻¹
Електрична стала у вакуумі	ϵ_0	$8,85418 \cdot 10^{-12}$ Ф·м ⁻¹
Стала Фарадея	F	$9,64846 \cdot 10^4$ Кл·моль ⁻¹

Таблиця 3

Щільність (питома густина) речовин ρ [кг·м⁻³]

Речовина	ρ	Речовина	ρ
Алюміній	2700	Кров	1050
Сталь	7700	Молоко	1030
Залізо	7870	Морська вода	1030
Латунь	8400	Лід (0 °C)	917
Мідь	8600	Вода (1 °C)	999,90
Срібло	10500	-«- (2 °C)	999,94
Свинець	11300	-«- (4 °C)	999,97
Золото	19300	-«- (6 °C)	999,94
Платина	21400	-«- (8 °C)	999,85
Повітря	1,29	-«- (10 °C)	999,71
Гліцерин	1260	-«- (15 °C)	999,10
Рицинова олія	960	-«- (20 °C)	998,20
Шкіра суха	860	-«- (25 °C)	997,05
Тканина кісткова	1700–2000	-«- (30 °C)	995,65

Таблиця 4

Коефіцієнт поверхневого натягу σ води
при температурах від 0 до + 75 °C

$t, ^\circ\text{C}$	$\sigma \cdot 10^{-3}, \text{Н/м}$	$t, ^\circ\text{C}$	$\sigma \cdot 10^{-3}, \text{Н/м}$
0	75,49	40	69,54
5	74,75	45	68,60
10	74,01	50	67,80
15	73,26	55	66,90
20	72,53	60	66,00
25	71,78	65	65,10
30	71,03	70	64,20
35	70,29	75	63,30

Таблиця 5

Коефіцієнт поверхневого натягу σ
деяких рідин при +20 °C

Речовина	Формула	$\sigma \cdot 10^{-3} \text{ Н/м}$
Ацетон	$(\text{CH}_3)_2\text{CO}$	23,30
Білок (курячий)		52,69
Бензол	C_6H_6	28,88
Вода	H_2O	72,53
Гліцерин	$\text{C}_3\text{H}_5(\text{OH})_3$	63,40
Метилловий спирт	CH_3OH	23,00
Етиловий спирт	$\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$	22,27

Таблиця 6

Динамічна в'язкість η деяких речовин

Речовина	η [Па·с]				
	0 °C	20 °C	30 °C	40 °C	50 °C
Вода	0,001786	0,001002	0,000798	0,000654	0,000548
Оцтова кислота		0,001219	0,001037	0,000902	0,000794
Ацетон	0,000397	0,000324	0,000295	0,000272	0,000251
Бензол		0,000647	0,000560	0,000491	0,000435
Бромбензол	0,001556	0,001148	0,001007	0,000889	0,000792
Хлороформ	0,000704	0,000569	0,000518	0,000473	0,000434
Етанол	0,001767	0,001197	0,001000	0,000830	0,000700
Метанол	0,000814	0,000594	0,000518	0,000456	0,000402
Ртуть	0,001681	0,001552	0,001499	0,001450	0,001407
Рицинова олія	—	0,000986	0,000451	0,000231	0,000125
Маслинова олія	—	0,000008	0,000005	0,000004	0,000002
Гліцерин	12,1	1,48	—	—	—
Кров	—	0,0050	—	—	—
Плазма крові	—	0,0015	—	—	—
Молоко	—	0,0018	—	—	—
Повітря	0,0000018	—	—	—	—

Таблиця 7

Коефіцієнти дифузії D [м²·с⁻¹] деяких молекул при 25° C

Речовина	$D \cdot 10^6$	Речовина	$D \cdot 10^6$
Вода (H ₂ O)	2,299	Бензол	2,21
Важка вода (D ₂ O)	1,872	Хлороформ	2,35
Метанол	2,415	Циклогексан	1,43
Етанол	1,08	Сахароза	0,46
Формамід	0,55	Глюкоза	0,57
Диметилсульфоксид	0,73	Сечовина	1,18
Діоксан	1,08	Гліцин	1,06
Ацетон	4,57	Дигліцин	0,79
Піридин	1,54	Тригліцин	0,67

Таблиця 8

Стандартні окисно-відновні потенціали E°_{OR} компонентів дихального ланцюга (n – кількість електронів)

Окисник	Відновник	n	$E^{\circ}_{OR} [В]$
Ферредоксин (Fe^{3+}) + $e^- \leftrightarrow$	Ферредоксин (Fe^{2+})	1	-0,432
$H^+ + e^- \leftrightarrow$	$(1/2) H_2$	1	-0,421
$НАДФ^+ + 2H^+ + 2e^- \leftrightarrow$	$НАДФ \cdot H + H^+$	2	-0,324
$НАД^+ + 2H^+ + 2e^- \leftrightarrow$	$НАД \cdot H + H^+$	2	-0,320
Піруват + $2H^+ + 2e^- \leftrightarrow$	Лактат	2	-0,185
Цитохром b (Fe^{3+}) + $e^- \leftrightarrow$	Цитохром b (Fe^{2+})	1	+0,030
Цитохром c (Fe^{3+}) + $e^- \leftrightarrow$	Цитохром c (Fe^{2+})	1	+0,254
Цитохром a (Fe^{3+}) + $e^- \leftrightarrow$	Цитохром a (Fe^{2+})	1	+0,290
Цитохром f (Fe^{3+}) + $e^- \leftrightarrow$	Цитохром f (Fe^{2+})	1	+0,365
Цитохром a ₃ (Fe^{3+}) + $e^- \leftrightarrow$	Цитохром a ₃ (Fe^{2+})	1	+0,385
$Fe^{3+} + e^- \leftrightarrow$	Fe^{2+}	1	+0,771
$(1/2)O_2 + 2H^+ + e^- \leftrightarrow$	H_2O	2	+0,816

Таблиця 9

Деякі характеристики біологічних і штучних мембран

Характеристика	Біологічна мембрана	Штучна мембрана
Товщина [нм]	6–13	6–8
Опір [Ом·м ²]	10^2 – 10	10^2 – 10^5
Ємність [мкФ·м ²]	$5 \cdot 10^3$ – $1,3 \cdot 10^4$	$3,8 \cdot 10^3$ – 10^4
Потенціал спокою [мВ]	10–200	0–140
Напруга пробою [мВ]	100	150–200
Показник заломлення	1,55	1,37
Поверхневий натяг [Н·м ⁻¹]	$3 \cdot 10^5$ – $3 \cdot 10^3$	$2 \cdot 10^4$ – $6 \cdot 10^{-3}$
Проникність для води [м·с ⁻¹]	$3 \cdot 10^{-5}$	$(5 \cdot 10^{-4}) \cdot 10^{-6}$
Енергія активації процесу проникності води [кДж·моль ⁻¹]	40,2	53,3

Таблиця 10

Рухомість іонів (при нескінченному розведенні, + 18 °С)

Іон	Рухомість, ($\text{см}^2 \text{ Ом}^{-1} \text{ г-екв}^{-1}$)	Іон	Рухомість ($\text{см}^2 \text{ Ом}^{-1} \text{ г-екв}^{-1}$)
H^+	315,0	OH^-	174,0
Li^+	33,4	F^-	46,6
Na^+	43,5	Cl^-	65,6
K^+	64,6	Br^-	67,6
Rb^+	67,5	I^-	66,5
Cs^+	68,0	CH_3COO^-	34,0
NH_4^+	64,0	NO_3^-	62,0
Mg^{++}	45,5	SO_4^{--}	68,5
Ca^{++}	51,5	CO_3^{--}	60,0

Таблиця 11

Фізіологічні розчини

	Розчин Кребса, ммоль/л	Розчин Локка, ммоль/л	Розчин Рінгера, ммоль/л
NaCl	120,4	157,40	116,0
KCl	5,9	5,63	2,5
NaHCO_3	15,5	1,78	1,8
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1,2	—	—
$\text{MgCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	1,2	—	—
глюкоза	11,5	5,50	—
CaCl_2	—	2,09	1,8
$\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	2,5	—	—

Гіперкальцевий розчин Кребса

(80 ммоль, 8 ммоль/л):

NaCl	8,85
KCl	80,00
NaHCO_3	15,50
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1,20
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1,20
Глюкоза	11,50
$\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	2,50

Таблиця 12

Період напіврозпаду $T_{1/2}$ і маса радіоактивного препарату (M_0), якій відповідає активність 10^9 Бк

Речовина	$T_{1/2}$	$M_0[\text{кг}]$
^{218}Po (полоній-218)	3,05 хв	$10 \cdot 9,56^{-14}$
^{130}I	12,3 год	$10 \cdot 1,38^{-11}$
^{42}K	12,4 год	$10 \cdot 4,49^{-12}$
^{24}Na	15,5 год	$10 \cdot 3,2^{-12}$
^{28}Mg	21,4 год	$10 \cdot 5,17^{-12}$
^{82}Br	35,9 год	$10 \cdot 3,54^{-11}$
^{222}Rn (радон-222)	3,82 доби	$10 \cdot 1,75^{-10}$
^{131}I	8,05 доби	$10 \cdot 2,18^{-10}$
^{32}P	14,3 доби	$10 \cdot 9,47^{-11}$
^{234}Th (торій-234)	24,1 доби	$10 \cdot 1,17^{-9}$
^{210}Po (полоній-210)	138,4 доби	$10 \cdot 6,02^{-8}$
^{45}Ca	165 діб	$10 \cdot 1,54^{-9}$
^{60}Co	5,263 року	$10 \cdot 2,39^{-6}$
^3H	12,262 року	$10 \cdot 2,78^{-9}$
^{90}Sr	28 років	$10 \cdot 1,9^{-7}$
^{137}Cs	30 років	$10 \cdot 3,1^{-7}$
^{226}Ra (радій-226)	1600 років	$10 \cdot 2,73^{-5}$
^{14}C	5730 років	$10 \cdot 6,06^{-8}$
^{230}Th (торій-230)	8000 років	$10 \cdot 1,39^{-4}$
^{234}U	245000 років	$10 \cdot 4,33^{-3}$
^{40}K	$10 \cdot 1,25^6$ років	3,78
^{238}U	$10 \cdot 4,51^8$ років	81,1

1

Навчальне видання

ЗИМА Валентин Леонідович
МІРОШНИЧЕНКО Микола Степанович
ДАВИДОВСЬКА Тамара Леонідівна
ГАНЧУРІН Валерій Валентинович
ПРИЛУЦЬКИЙ Юрій Іванович

БІОФІЗИКА ПРАКТИКУМ

Навчальний посібник

Редактор *В.Р.Філь*
Технічний редактор *Д.С.Ананьївський*

Оригінал-макет виготовлено Видавничо-поліграфічним центром "Київський університет"



Підписано до друку 14.02.03. Формат 60х84^{1/8}. Вид. № 14. Гарнітура Arial. Папір офсетний.
Друк офсетний. Наклад 100. Обл.-вид. арк. 11,0. Ум. друк. арк. 8,7. Зам. № 23-1105.

Видавничо-поліграфічний центр "Київський університет"
01033, Київ, б-р Т. Шевченка, 14, кімн. 43,
☎ (38044) 239-3222; (38044) 239-3172, факс (38044) 239-3120.
Свідоцтво внесено до державного реєстру ДК № 1103 від 31.10.02.