

**УЧЕБНО - МЕТОДИЧЕСКОЕ ПОСОБИЕ ДЛЯ
БОЛЬШОГО ПРАКТИКУМА
Модуль «Биофизика»**

Саратов 2017

Саратовский государственный университет им. Н.Г.
Чернышевского

**МЕТОДИЧЕСКОЕ ПОСОБИЕ ДЛЯ
БОЛЬШОГО ПРАКТИКУМА**

Модуль «Биофизика»

Издание первое

ИЗДАТЕЛЬСТВО САРАТОВСКОГО УНИВЕРСИТЕТА

2017

УДК 577.3(076.5)
ББК 28.071 Я 73
М54

Составители:

И.К. Миронова, М.В. Каневский

**УЧЕБНО-МЕТОДИЧЕСКОЕ ПОСОБИЕ ДЛЯ
БОЛЬШОГО ПРАКТИКУМА. Модуль «Биофизика».** / Сост.:
И. К. Миронова, М.В. Каневский. – Саратов: Изд-во Саратов. ун-та,
2017. – 45 с.: ил.

ISBN 5-292-02946-7

Пособие посвящено исследованию электропроводности, спектральных свойств и кислотно-основных свойств живых объектов. Практические задачи разработаны на кафедре биофизики биологического факультета МГУ и внедрены с некоторыми модификациями на кафедре биохимии и биофизики СГУ.

Цель практикума – познакомить студентов с методами измерения электропроводности, импеданса, видимой и УФ-спектроскопии, а также рН-метрии, весьма важными для изучения тонкой физико-химической структуры тканей и клеток.

Для студентов биологического факультета.

Рекомендуют к печати:

Кафедра биохимии и биофизики Саратовского государственного университета
Кандидат биологических наук, доцент *Л.Н. Шорина*

Печатается по решению ученого совета биологического факультета
Саратовского государственного университета

УДК 577.3(076.5)
ББК 28.071 Я 73

ISBN 5-292-02946-7

© И. К. Миронова,
М.В. Каневский
составление, 2017

Часть 1. Электрические явления в живых объектах

Проведение электрического тока живыми объектами относится к пассивным электрическим явлениям.

Электропроводность - одна из важнейших характеристик физических свойств живого вещества, являясь величиной постоянной, отражает изменения, связанные с функциональными состояниями биосистемы. Природа электропроводности окончательно не выяснена. Однако имеются все основания полагать, что механизмы, обуславливающие прохождение тока через биологический субстрат, подобны механизмам проведения тока в неживом веществе.

Принято различать два механизма проведения электрического тока через вещество:

- 1) электронный механизм проводимости,
- 2) ионный или электролитический механизм проводимости.

Электронная проводимость

Электронный механизм проводимости имеет место в металлах и осуществляется за счет перемещения электронов. В таких проводниках непрерывный распад молекул на ионы и электроны возможен и без приложения внешнего электрического поля.

При помещении электронного проводника в поле электрического тока на свободный электрон будет действовать сила, равная произведению заряда электрона на напряженность поля, но направленная в противоположную его движению сторону. Под влиянием поля устанавливается непрерывное одностороннее движение электронов, что обеспечивает прохождение тока через проводник.

Ионная проводимость

Ионный (или электролитический) механизм проведения электрического тока характерен жидким и твердым электролитическим проводникам и обусловлен движением ионов.

Удельная электропроводность вещества с электролитической проводимостью будет зависеть от количества ионов, от заряда и скорости движения ионов, степени диссоциации электролитов. Так как ионы имеют различные заряды, передвигаются в определенной среде и вступают во взаимодействие друг с другом и с молекулами растворителя, то скорость передвижения будет зависеть от диэлектрической постоянной растворителя, вязкости, температуры, давления, сил линейного притяжения и отталкивания и образования ионной атмосферы. Подвижность ионов будет уменьшаться за счет электрической силы релаксации, асимметрии ионной атмосферы и электрофоретического эффекта.

С ионной проводимостью непосредственно связан частотный эффект Дебая, который состоит в увеличении

электропроводности при очень высоких частотах переменного тока. Такое увеличение электропроводности носит название дисперсии электропроводности.

Дисперсия электропроводности, таким образом, зависит от частоты переменного тока, а также от валентности, подвижности и концентрации ионов в растворе.

Электропроводность полупроводников и диэлектриков

Проведение токов через жидкие диэлектрики осуществляется за счет ионной проводимости. Свободные ионы жидких диэлектриков находятся в беспорядочном движении и при наложении внешнего электрического поля приобретают добавочную скорость.

Наличие коллоидных частиц часто искажает основные закономерности жидких чистых диэлектриков. Причиной такого искажения служит катафорез коллоидных частиц.

В последние годы для объяснения строения полупроводников и проведения через них электрического тока привлекается квантовая теория. Согласно ей, электронная проводимость вещества определяется возможностью перехода электрона из одного квантового состояния в другое. Электроны, состояние движения которых близко к свободным квантовым состояниям, не занятым другими электронами, носят название "свободных электронов". В металлических полупроводниках имеется достаточное количество свободных, не занятых квантовых состояний и свободных электронов. Это и обеспечивает механизм прохождения тока через металл.

В изоляторах, состоящих из атомов или молекул, обладающих заполненным внешним слоем электронов, все возможные квантовые состояния уже заняты, т.е. электроны связаны.

Помимо нормального состояния электрона возможны и возбужденные состояния его, при которых он обладает большей энергией. Переход электрона из нормального состояния в возбужденное происходит или за счет притока внешней энергии, или за счет собственной энергии теплового движения. Такие электроны могут стать свободными и участвовать в проведении электрического тока. В этом случае в изоляторе электроны как бы переходят из зоны, целиком заполненной электронами нормальных состояний, в зону, свободную от электронов возбужденных состояний. Вещества, в которых осуществляется такое перемещение электронов, называются полупроводниками. Работа, затрачиваемая на переход электрона в свободное состояние, происходит в полупроводниках за счет теплового движения.

Разница между изолятором и проводником состоит в наличии или отсутствии в них электронов с энергией, превышающей среднюю энергию теплового движения не более чем в 30 раз.

При повышении температуры количество атомов, обладающих большой скоростью, увеличивается, вследствие чего появляется возможность для перехода электронов из нормального состояния в возбужденное. Поэтому при

повышении температуры возможен переход изоляторов в полупроводники.

Полупроводник проводит электрический ток одновременно и при помощи электронов, и при помощи положительно заряженных частиц.

Перенос тока положительными зарядами также объясняется квантовой теорией. Когда электронами заняты все квантовые состояния, они не могут изменять свое движение. Но, если при этом часть электронов будет выбита внешним воздействием (светом или тепловым движением), могут появиться свободные квантовые состояния.

Последние называются "дырками". "Дырки" могут быть заняты другими электронами, которые имеют квантовые состояния, близкие к исходным. После ухода этих электронов вновь появляются "дырки". Таким образом, "дырка" будет двигаться, как двигалась бы положительно заряженная частица. Иногда при наличии в полупроводнике или диэлектрике посторонней примеси "дырки" образуются в результате перехода электронов, ставших носителями тока, на примесь и последующего закрепления в ней. Такие полупроводники носят название позитивных.

Негативными полупроводниками называются такие, в которых электрический ток переносится только электронами. Эти электроны освобождаются из примесей, содержащихся в полупроводниках. Они легче, чем электроны основного вещества,

переходят в свободное возбужденное состояние, осуществляя тем самым проведение электрического тока.

Электропроводность живых тканей

Исследования сопротивления живых тканей и органов в поле постоянного тока доказали, что электропроводность меняется во время прохождения через них тока. При включении тока сопротивление в первый момент мало, затем оно быстро повышается до определенной постоянной величины, которая при не повреждающих клетку значениях напряжения держится на одном уровне длительное время.

Отклонение от закона Ома, обнаруженное при прохождении тока через ткань, объяснили поляризацией биологических объектов. Поляризация биологических объектов, обусловленная их сложной структурой, отличается от поляризации чистых растворов электролитов, в которых поляризация происходит на металлических электродах в результате накопления на их поверхности ионов противоположного знака. Поляризация в тканях возникает не только на поверхности, но и по всей толще самой ткани, и в различных ее участках. Поэтому окончательная, суммарная поляризация складывается из поляризации отдельных элементов ткани.

Поляризационная емкость - это как бы конденсатор, заряжающийся в момент прохождения тока через живую клетку или ткань.

Поляризационная емкость является характерным свойством живой неповрежденной клетки.

Существует две теории, объясняющие возникновение поляризационной емкости в живых объектах: мембранная и теория поляризации диэлектриков.

Клеточные мембраны проницаемы для ионов одного знака и непроницаемы для ионов другого знака, которые при прохождении электрического тока накапливаются и вызывают поляризацию. Под мембраной подразумевается не морфологическая структура типа оболочки, а тонкий пограничный слой или молекулярный толщиной 30-50 Å или состоящий из нескольких монослоев с суммарной толщиной 150 Å. Однако наличием одной мембраны невозможно объяснить ряд закономерностей прохождения тока через биологические объекты.

Теория поляризации диэлектриков, предложенная Вагнером, объясняет возможность возникновения поляризации неодинаковыми величинами электропроводности дисперсной фазы и дисперсной среды. В этом случае величина поляризации системы зависит от отношения проводимости среды и электропроводности взвешенных в ней частиц и от соотношения их объемов. При очень большой проводимости среды почти весь ток пройдет через нее и не произойдет адсорбции зарядов. Если же среда обладает большой проводимостью и взвешенные в ней частицы проводят ток, то он частично пройдет через них, а на межфазовых границах произойдет накопление зарядов. В случае

проводника с гетерогенной структурой напряжение при включении тока распределяется так, что большая часть его будет падать в слоях с меньшей проводимостью. При одной и той же силе тока количество ионов одного знака в слое с большей проводимостью на границе двух фаз будет больше количества ионов в слое с меньшей проводимостью.

У границ раздела двух слоев диэлектрика произойдет избыточное накопление зарядов, появится вторичная электродвижущая сила обратного знака. Сила тока в этих случаях определяется величиной вторичной электродвижущей силы, т.е. поляризацией. Такое объяснение поляризации живых систем носит более общий характер, так как биологическая система, состоящая из мембраны и жидкой фазы внутри нее, может рассматриваться как гетерогенный двуслойный диэлектрик.

Сопротивление живой ткани переменному току

Сильная поляризация ткани в поле постоянного тока значительно затрудняет измерение их сопротивления. Чтобы избежать этого, живые объекты помещают в поле переменного тока. При достаточно высокой частоте тока поляризационные явления могут быть совсем элиминированы.

Как правило, кривая изменения силы синусоидального переменного тока за один полупериод совпадает с кривой напряжения. Это справедливо только в том случае, когда ток на своем пути встречает только омическое сопротивление. В живых

объектах кроме омического сопротивления есть еще емкостное, поэтому происходит сдвиг фаз.

Каждая живая клетка имеет сложное соединение структур, соответствующих емкостному и омическому сопротивлению, и не может представлять для тока сопротивления, строго соответствующего какой-либо из приведенных схем.

При прохождении переменного тока через живые объекты учитывается как омическое, так и емкостное сопротивление, причем первое мало зависит от частоты, а последнее значительно уменьшается по мере увеличения частоты, что сказывается на увеличении проводимости всей системы.

Уменьшение общего суммарного сопротивления ткани за счет уменьшения емкостного сопротивления по мере увеличения частоты носит название дисперсии электропроводности. Дисперсия присуща только живой ткани как животного, так и растительного происхождения. При отмирании ткани дисперсия исчезает. Уменьшение общего сопротивления по мере увеличения частоты тока неограничено.

При очень высоких частотах увеличение проводимости становится очень малым и постоянным. Это говорит о том, что в поле высокой частоты емкостное сопротивление отсутствует. При измерениях на высоких частотах, на которых установлен минимум поляризации для любого вещества, имеют дело с чистым химическим сопротивлением.

Измерение электропроводности биологических жидкостей и клеточных взвесей

Упражнение 1. Определение удельной электропроводности сыворотки крови

В этом упражнении определяют величину удельного сопротивления сыворотки крови кролика или собаки, можно также взять сыворотку крови человека. Вначале собирают измерительную схему и проверяют точность работы водяного термостата. Затем определяют константу сосудика при помощи 1/50 н раствора КСl. Далее наливают в сосуд 2-3 см сыворотки так, чтобы электроды были полностью покрыты жидкостью, и проводят определение величины сопротивления сыворотки при температуре 25°C. Величину электропроводности вычисляют по формуле:

$$X = \frac{C}{R}$$

Где R – сопротивление, Ом.

C – константа сосуда, рассчитанная по формуле:

$$C = XR$$

X – удельная электропроводность раствора 1/50 н КСl.

Результаты измерений заносят в таблицу.

Упражнение 2. Определение объемного индекса крови и взвеси эритроцитов

К числу клеток, практически полностью не проводящих электрический ток низкой частоты, относятся безъядерные

эритроциты млекопитающих. Исхода из этого, представляется возможность вычислить объемный индекс крови на основании измерений удельного сопротивления цельной крови и удельного сопротивления плазмы.

Для проверки правильности измерений найденное по формуле значение целесообразно сопоставить с величиной объемного индекса крови, установленного посредством гематокрита.

Проведение работы. Кровь, взятую у крысы из сердца и стабилизированную сухим цитратом натрия (или 3,5% раствором этой соли), наливают в сосудик для измерения электропроводности.

Константа сосудика должна быть предварительно измерена при помощи 1/50 н раствора хлористого калия. Необходимо следить за тем, чтобы уровень крови в сосудике был несколько выше верхнего края электродов.

Небольшую порцию крови отсасывают из сосудика при помощи пастеровской пипетки с длинным оттянутым концом, снабженной резиновой трубкой. Конец пипетки осторожно вводят в просвет трубки гематокрита и медленно сливают в нее кровь. Подобным образом заполняют два гематокрита. Затем гематокриты тщательно уравнивают в центрифужных гильзах и центрифугируют в течение 10 минут при 5.000 об/мии. Определив визуально по линейке высоту столба эритроцитов h_1 и высоту столба всей крови h_2 , вычисляют объемный индекс крови p по формуле

$$p = \frac{h_1}{h_2}$$

где p выражается в виде правильной десятичной дроби.

Параллельно производят измерение удельного сопротивления крови, а затем и плазмы (плазму отсасывают после центрифугирования крови в течение 10 минут при 3.500 об/мин).

Измерение сопротивления крови и плазмы проводят на установках, собранных по принципу мостовой схемы. Плечами моста служат отрезки струны реохорда. Известное сопротивление представлено магазином сопротивлений Р-14 или КМС-6. Источником тока служит индукционная катушка. В диагональ моста в качестве нулевого прибора включают низкоомные телефонные наушники.

Сопротивление вычисляют по формуле:

$$x = R \frac{a}{1000 - a}$$

Где a и $1000-a$ – это плечи реохорда.

Измерив величину сопротивления цельной крови величину сопротивления плазмы, подставляют полученные данные в формулу и вычисляют величину объемного индекса крови. Затем сравниваю величину объемного индекса крови» найденную методом электропроводности, с величиной, установленной при помощи гематокритов. Аналогичные измерения проводят при разведении крови физиологическм раствором в 2 и в 4 раза.

Полученные результаты представляют в виде таблицы и сравнивают данные, полученные при измерении, электропроводности и определённые с помощью гематокрита.

Упражнение 3. Измерение электрического сопротивления взвеси эритроцитов при гемолизе, вызванном дистиллированной водой и сапонином

Эритроциты отделяют от плазмы центрифугированием в мерных центрифужных пробирках при 3500 об/мин и отмывают их (трехкратно по 10 мин.) физиологическим раствором.

К 1 мл отмытых эритроцитов медленно по каплям добавляют из пробирки дистиллированную воду в количестве 4 мл. Взвесь осторожно взбалтывают и быстро выливают в сосудик для измерения электропроводности.

Измерение сопротивления взвеси гемолизированных эритроцитов производят спустя 1, 5, 30, 60 и 90 минут с момента начала опыта. Продолжают измерения до тех пор, пока величина сопротивления не перестанет изменяться. Затем аналогичную работу проделывают с сапонином. Для этого добавляют в сосудик с 1 мл цельной крови несколько крупинок сапонины и измеряют величину сопротивления каждые 5 минут до момента достижения постоянного значения сопротивления.

Полученные результаты представляют в виде графиков, где на оси абсцисс отложено время, а на оси ординат – величина сопротивления в процентах от исходного значения.

Электропроводность тканей на разных частотах

Необходимые принадлежности: мост переменного тока на две частоты; генератор на 10 кГц; магазин сопротивлений МСРБ-48; магазин емкостей МЕ-3; переменная емкость; осциллограф 30-7 с дополнительным усилителем; контактный ключ; монтажный провод; набор инструментов для препаровки; белые мыши.

Живые клетки, органы и ткани имеют определенную физико-химическую структуру, которая нарушается и исчезает при отмирании. Эта структура определяет закономерности проведения тока.

Поэтому при отмирании, когда происходит нарушение структуры, изменяется величина сопротивления ткани, органа или клетки.

Интенсивность и характер обмена веществ в ткани также находят свое выражение в величину сопротивления, так как они обуславливают концентрацию ионов в тканях. При этом величины сопротивления, измеренные на высокой и низкой частотах, изменяются независимо друг от друга. Соотношение этих величин, т.е. отношение низкочастотного сопротивления (импеданса) к высокочастотному, в известной мере отражает состояние структуры и уровень обмена веществ в ткани и является показателем жизнеспособности последней. Отношение сопротивления, измеренного на низкой частоте, к сопротивлению, измеренному на высокой частоте, отражает степень поляризации и носит название коэффициента

поляризации. Поэтому ряд исследователей рассматривают коэффициент поляризации как показатель жизнедеятельности ткани.

В данной работе исследуется сопротивление ткани на частотах 10.000 и 1.000.000 Гц. Соотношение этих сопротивлений представляет собой коэффициент поляризации.

Упражнение 1. Определение коэффициента поляризации тканей и органов мыши

Свежеотпрепарированные ткани и органы мыши (мышцы, нерв, печень, почка, селезенка, головной мозг) помещают на электроды во влажную камеру. Определяют величину сопротивления на двух указанных выше частотах и вычисляют коэффициент поляризации.

Упражнение 2. Изменение коэффициента поляризации - тканей и органов при различных воздействиях

Свежеотпрепарированные ткани и органы мыши (мышцы, почка) помещают на электроды и определяют исходные коэффициенты поляризации.

Затем мышцы помещают в бюксы с изотоническими растворами KCl, CaCl₂, BaCl₂, MgCl₂ и, закрыв бюксы крышками, оставляют в растворах на 15-20 мин. После этого мышцы вынимают из растворов, осторожно подсушивают фильтровальной бумагой и вновь определяют величину

сопротивления на высокой и низкой частоте, вычисляют коэффициент поляризации/

Почки помещают в пары эфира и скипидара. Для этого в крышки бьюксов, где находятся почки, укрепляют тампоны ваты, смоченные этими веществами.

Полученные результаты представляют в виде таблицы.

Упражнение 3. Определение дисперсии электропроводности живых тканей

Необходимые принадлежности: мост переменного тока; безындукционный магазин сопротивлений МСРБ-48; магазин емкостей МЕ-3; гальванометр М-91/ А; генератор питания моста на частоты от 20 Гц до 100 кГц; выпрямитель для питания генератора; электроды; сопротивление 10 кОм; емкость 0,05 мкФ; монтажный провод; водяная баня; термометр от 0 до 100°С; набор инструментов для препаровки; эфир, формалин, лягушки.

При измерении электропроводности клеток и тканей в широком диапазоне частот омическая и емкостная составляющие импеданса меняются в зависимости от частоты тока, на которой ведется измерение. Это явление, известное под названием аномальной дисперсии.

В предлагаемой работе изучается аномальная дисперсия омической и емкостной составляющих импеданса кожи, мышцы, а также других тканей и органов лягушки.

Используемая установка состоит из низкочастотного генератора, дающего частоту от 20 Гц до 100 кГц,

измерительного моста переменного тока с германиевым диодом в нулевой цепи. В качестве эталонного сопротивления включают магазин типа Р-14, КМС-6 или лучше МСРБ-48 в магазине емкостей МЕ-3 с дополнительной переменной емкостью.

Нулевым прибором служит гальванометр типа М-9I/A.

Упражнение 4. Определение дисперсии электропроводности живой и убитой мышцы и кожи лягушки

Первоначально проверяют работу схемы. В плечо Х моста подключают известное сопротивление в 10 кОм и емкость в 0,05 мкФ, поочередным изменением емкости и сопротивления добиваются минимального отклонения указателя гальванометра. Вначале уравнивание моста ведут на минимальном напряжении, получаемом от генератора питания, затем постепенно увеличивают напряжение до 0,5 - 1 В.

После проверки работы моста подключает электроды и на них располагают мышцу или отмытую от слизи кожу лягушки. Измерение электропроводности проводят на частотах: 50; 100; 350; 500 Гц и 2,5; 6; 20; 30; 50; 80 кГц.

В начале работы определяют дисперсию электропроводности мышцы, а затем кожи лягушки. После этого кусочки кожи и мышцу завертывают в станиоль или кладут в бюкс и помещают в водяную баню на 5-15 мин. при температуре от +50 до +60°C. Далее проводят определение величины сопротивления убитых нагреванием тканей на тех же частотах, что и в начале опыта.

Определение дисперсии электропроводности производят также на мышце и коже, обработанных эфиром и формалином. Для обработки эфиром ткань помещают на 15-20 мин. в бюкс, в крышке которого находится ватный тампон, пропитанный эфиром. Для формализирования ткань кладут на 15-20 мин. в 8-процентный раствор формалина в рингеровском растворе.

Часть 2. Спектрофотометрия

Спектроскопия — раздел физики, посвящённый изучению спектров электромагнитного излучения. В более широком смысле — изучение спектров различных видов излучения. Методы спектроскопии используются для исследования энергетической структуры атомов, молекул и макроскопических тел, образованных из них. Они применяются при изучении таких макроскопических свойств тел как температура и плотность, а в аналитической химии — для обнаружения и определения веществ.

Спектрофотометрический анализ является одним из наиболее распространенных методов исследования. Применение этого метода в биологии позволяет судить о качественном составе и количественном содержании веществ, об их состоянии в биологических структурах, о строении молекул.

Принцип спектрофотометрии основан на свойстве веществ поглощать свет. Свет как электромагнитное излучение характеризуется тремя основными параметрами: длиной волны (λ), частотой (ν) и скоростью распространения (c). Между этими параметрами существует взаимосвязь:

$$c = \nu\lambda$$

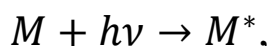
Поглощение света веществом — внутримолекулярный физический процесс. Свет поглощается молекулами (их комплексами, атомами, радикалами, ионами), а не сложными

биологическими структурами, такими, например, как ядра, митохондрии, клетки.

Во взаимодействии вещества со светом, связанном с поглощением, проявляются как квантовые (корпускулярные), так и волновые свойства света.

Квантовая природа света выражается в том, что вся энергия, заключенная в кванте света, поглощается молекулой сразу (за время порядка 10^{-14} секунд) и без остатка. Следовательно, поглощение света веществом представляет собой дискретный, а не непрерывный процесс. Волновая природа света проявляется в том, что поглощение света достигается в результате взаимодействия электронного облака молекулы с электрическим вектором световой волны.

Физическая реакция поглощения света молекулой вещества (M) может быть записана в следующем виде:



где M^* – возбужденное состояние молекулы. Возбужденная молекула M^* не отличается от обычной молекулы M по химическому составу или строению, но имеет несколько деформированное электронное облако и содержит избыточные запасы энергии.

Переходу $M + h\nu \rightarrow M^*$ соответствует переброска на более высокий энергетический уровень (орбиту) лишь одного электрона молекулы (фотоэлектрона). Поглощение света – это одноэлектронный одноквантовый физический процесс.

Чаще всего фотоэлектроном сложных органических молекул является электрон, участвующий в образовании двойных, чаще делокализованных сопряженных связей молекулы.

Для истинных нерассеивающих растворов поглощение света проявляется в ослаблении светового потока после прохождения через объект. Если пропустить через слой вещества (l), монохроматический свет с интенсивностью I_0 , то после прохождения через вещество его интенсивность уменьшается до I . Поглощение света веществом для монохроматического света выражается законом Бугера-Ламберта-Бэра:

$$I = I_0 e^{-\varepsilon c l}, \text{ где}$$

I – интенсивность света прошедшего через объект, I_0 – интенсивность света, падающего на объект, ε – молярный коэффициент экстинкции, c – концентрация вещества, поглощающего свет, l – толщина слоя вещества.

Поглотительную способность вещества характеризуют двумя параметрами – пропусканием и оптической плотностью.

Отношение интенсивности пучка света, прошедшего через кювету с веществом (I) к интенсивности изначального пучка (I_0) характеризует пропускание света веществом и обозначают – T :

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

Эту величину выражают обычно в процентах.

Десятичный логарифм отношения интенсивности изначального пучка (I_0) к интенсивности пучка света,

прошедшего через кювету с веществом (I) называют оптической плотностью (D):

$$D = \lg \frac{I_0}{I}$$

Величина оптической плотности может принимать положительные значения от 0 до ∞ , однако, современные приборы позволяют измерить D в пределах от 0 до 2. При небольших значениях оптической плотности она, как правило, пропорциональна концентрации вещества:

$$D = \varepsilon c l$$

На этом соотношении основан количественный анализ спектрофотометрии, т.е. измерив оптическую плотность в максимуме поглощения (λ_{max}), можно рассчитать концентрацию (c) вещества по формуле:

$$c = D \frac{c_0}{D_0}, \text{ где}$$

D – оптическая плотность вещества с неизвестной концентрацией,

D_0 – оптическая плотность стандартного образца известной концентрации,

c_0 – концентрация стандартного образца.

Свет различных длин волн поглощается веществом в неодинаковой степени. Зависимость оптической плотности от длины волны называют спектром поглощения.

По характеру распределения значений физической величины спектры могут быть дискретными (линейчатыми), непрерывными

(сплошными), а также представлять комбинацию (наложение) дискретных и непрерывных спектров.

Примерами линейчатых спектров могут служить масс-спектры и спектры связанно-связанных электронных переходов атома; примерами непрерывных спектров — спектр электромагнитного излучения нагретого твердого тела и спектр свободно-свободных электронных переходов атома; примерами комбинированных спектров — спектры излучения звёзд, где на сплошной спектр фотосферы накладываются хромосферные линии поглощения или большинство звуковых спектров.

Другим критерием типизации спектров служат физические процессы, лежащие в основе их получения. Так, по типу взаимодействия излучения с материей, спектры делятся на эмиссионные (спектры излучения), абсорбционные (спектры поглощения) и спектры рассеивания.

Электромагнитный спектр — совокупность всех диапазонов частот электромагнитных волн.

Эмиссионный спектр — набор частот электромагнитного излучения, испускаемого атомом или молекулой при переходе на более низкий энергетический уровень.

Спектр масс — набор значений масс элементарных частиц.

Энергетический спектр — зависимость энергии частицы от импульса.

Спектр поглощения характеризуется наличием в нем определенных полос (пиков). Каждая полоса характеризуется:

- а) положением максимума, которое выражается соответствующей длиной волны (λ_{max}),
- б) высотой пика (D_{max}),
- в) полушириной полосы (рис. 1).

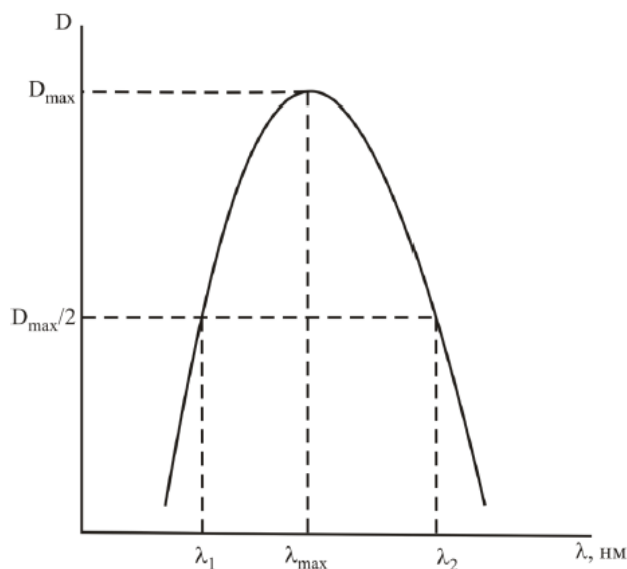


Рис. 1. Спектр поглощения вещества и его основные параметры

Спектр поглощения является индивидуальной характеристикой вещества, т.е. определенному веществу соответствует определенный спектр поглощения. На этом основан качественный анализ спектрофотометрии. Форма спектра поглощения зависит не только от типа вещества, но и от его состояния, характера молекулярного окружения. Восстановление, окисление молекул, их агрегация, комплексообразование, изомеризация, изменение полярности окружения – все эти факторы существенно сказываются на форме спектров поглощения, что позволяет, исходя из анализа спектров поглощения, делать определенные выводы о характере состояния исследуемых веществ.

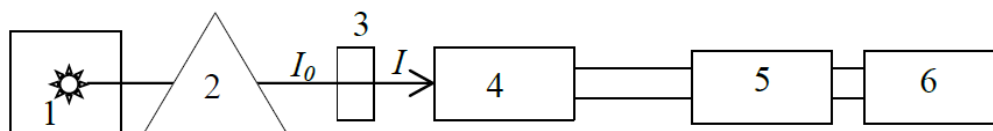


Рис. 2. Оптическая схема однолучевого спектрофотометра. 1 – источник света, 2 – монохроматор (призма или дифракционная решетка), 3 – кювета с образцом, 4 – фотоэлемент или ФЭУ, 5 – усилитель, 6 – регистратор

Упражнение 1. Выбор рабочей концентрации и снятие спектров разных веществ.

Включить прибор и дать ему прогреться в течение получаса.

Подготовить серию разведений исследуемых веществ (генциан фиолетовый, нейтральный красный, метиловый оранжевый, метиленовый синий и бромфеноловый синий). Для этого отобрать 1 мл сток-раствора красителя в первую пробирку и довести его до 10 мл дистиллированной водой. Затем отобрать 1 мл полученного раствора из первой пробирки, перенести во вторую пробирку и довести дистиллированной водой до 10 мл. Далее отобрать 1 мл раствора из второй пробирки в третью и довести дистиллированной водой до 10 мл.

Далее на спектрофотометре построить спектр поглощения растворов исследуемого вещества в видимом диапазоне длин волн (400-700 нм) с шагом 10 нм против дистиллированной воды. Рабочей концентрацией считается такая, высота пика которой в максимуме поглощения лежит в диапазоне от 0,7 до 1,6.

Зарисовать спектры поглощения веществ для рабочих концентраций. В таблице привести длины волн при максимуме поглощения.

Упражнение 2. Определение качественного состава смеси.

На спектрофотометре построить спектр поглощения смеси неизвестных веществ. Опираясь на результаты предыдущего задания, определить по максимумам поглощения качественный состав смеси.

Упражнение 3. Построение калибровочной кривой и определение концентрации вещества.

Построить калибровочную кривую для красителя нейтральный красный.

Для этого отобрать 1 мл сток-раствора красителя перенести его в первую пробирку и довести дистиллированной водой до 10 мл.

Используя полученный раствор готовят растворы красителя различной концентрации в соответствии с таблицей 1.

Полученные значения оптической плотности используют для построения калибровочного графика. Для этого на ось X наносят значения используемых концентраций красителя в %, а на ось Y – соответствующие им значения оптической плотности. График представляет собой прямую, проходящую через начало координат.

Для определения концентрации получают оптическую плотность исследуемого раствора. Определить концентрацию раствора двумя способами:

I) Определяют концентрацию по калибровочной кривой.

II) Используя формулу $c = D \frac{c_0}{D_0}$, находят концентрацию исследуемого раствора. В качестве C_0 и D_0 используют значения для пробирки №4

Таблица 1.

№ пробирки	Раствор красителя, мл	Вода, мл	C, красителя, %	Оптическая плотность
1	0	5	0	
2	0,5	4,5	0,0001	
3	1,0	4	0,0002	
4	1,5	3,5	0,0003	
5	2,0	3	0,0004	
6	2,5	2,5	0,0005	

Упражнение 4. Исследование влияния показателя pH среды на спектры поглощения искусственных красителей

Ход работы:

1. Приготовить не менее 10 мл раствора красителей с рабочей концентрацией (см. упражнение 1)

2. В 4 пробирки внести по 1 мл раствора красителя с рабочей концентрацией и по 1 мл растворов: 1 М HCl, 1 М NaOH, буферные растворы с pH 5, 9.

3. Провести снятие спектров в диапазоне 400-700 нм с шагом 2 нм.

4. Повторить пункты 2 и 3 для второго красителя.

5. Полученные результаты занести в таблицу:

Краситель	pH 7		HCl 1 М		pH 5		pH 9		NaOH 1 М	
	λ , нм	высота пика	λ , нм	высота пика	λ , нм	высота пика	λ , нм	высота пика	λ , нм	высота пика

Сделать вывод о возможности использования красителя в качестве индикатора. В выводе указать, в каких диапазонах pH наблюдается смещение пиков поглощения красителя, а также характер изменения спектров в зависимости от условий среды: если произошло возрастание высоты пика, то такой эффект носит название гиперхромного; если произошло снижение – гипохромного; смещение пика в сторону ультрафиолетовой области носит название гипсохромного эффекта; в сторону инфракрасной области – батохромный эффект.

Упражнение 5. Исследование спектров некоторых природных красителей и влияния на них показателя pH

Ход работы:

1. Приготовить вытяжки природных красителей. Для этого к 1 г биологического материала добавить 50 мл дистиллированной воды и кипятить на водяной бане в течение 15 минут. После этого раствор охладить, отфильтровать и довести до конечного объема 50 мл.

2. Провести анализ. Для этого по 1 мл вытяжки внести в 2 пробирки, затем добавить по 1 мл растворов: 1 М HCl, 1 М NaOH, буферные растворы с рН 5, 9.

3. Провести снятие спектров в диапазоне 300-800 нм с шагом 2 нм.

4. Полученные результаты занести в таблицу:

Объект	рН 7			HCl 1 М			рН 5			рН 9			NaOH 1 М		
	λ, нм	высота пика	цвет	λ, нм	высота пика	цвет	λ, нм	высота пика	цвет	λ, нм	высота пика	цвет	λ, нм	высота пика	цвет

Сделать вывод о возможности использования биологического объекта в качестве индикатора. В выводе указать, в каких диапазонах рН наблюдается смещение пиков поглощения красителя, а также характер изменения спектров в зависимости от условий среды: если произошло возрастание высоты пика, то такой эффект носит название гиперхромного; если произошло снижение – гипохромного; смещение пика в сторону ультрафиолетовой области носит название гипсохромного эффекта; в сторону инфракрасной области – батохромный эффект.

Работа 4. Исследование спектров поглощения протеиногенных аминокислот

Ход работы:

1. Подготовить растворы:

- 1% водный раствор 2 аминокислот

- 0,1% раствор нингидрина в этаноле

2. Провести нингидриновую реакцию. Для этого к 2 мл раствора аминокислоты прилить 1 мл раствора нингидрина. Смесь кипятить на водяной бане 5 минут.

3. Провести снятие спектров в диапазоне 500-700 нм с шагом 0,5 нм.

4. Полученные результаты занести в таблицу:

Аминокислота		
λ , нм пика поглощения		

Сделать вывод о влиянии структуры и свойств радикала аминокислот на сдвиг пика поглощения. В выводе указать, наблюдается ли смещение пиков поглощения красителя от 570 нм: смещение пика в сторону ультрафиолетовой области носит название гипсохромного эффекта; в сторону инфракрасной области – батохромный эффект.

Электролитическая диссоциация и ионное произведение воды

Молекулы воды обладают слабо выраженной способностью к обратимой ионизации, в процессе которой они распадаются на ионы водорода (H^+) и ионы гидроксила (OH^-). Первичный процесс электролитической диссоциации можно представить уравнением:



Обратимая ионизация воды имеет очень важное значение для понимания её свойств и роли в функционировании живой клетки. Количественно процесс ионизации воды можно представить следующим уравнением:

$$K_{H_2O} = \frac{[H^+] \times [OH^-]}{[H_2O]} = 1,821 \times 10^{-16}, \quad (1)$$

где K_{H_2O} – константа электролитической диссоциации воды при 25°C.

Так как K_{H_2O} чрезвычайно мала (из 550 миллионов молекул воды диссоциирует только одна), принято считать концентрацию воды постоянной и равной массе 1 л при 25°C (997,07 г), разделённой на её молекулярную массу, т.е.:

$$[H_2O] = \frac{997,07 \text{ г/л}}{18,01 \text{ г/моль}} = 55,35 \text{ моль/л} \quad (2)$$

Объединяя две постоянные величины в одну, исходя из уравнения, получим:

$$K_{H_2O} \times [H_2O] = [H^+] \times [OH^-], \quad (3)$$

где вода представлена неионизированными молекулами, концентрация которых практически постоянная.

Если произведение $K_{H_2O} \times [H_2O]$ обозначить через K_w , то соотношение можно записать в следующем виде:

$$K_w = [H^+] \times [OH^-] = const = 55,35 \frac{\text{моль}}{\text{л}} \times 1,821 \times 10^{-16} = 1 \times 10^{-14} \quad (4)$$

Величину K_w называют ионным произведением воды. Постоянство этой величины означает, что, как бы не менялись молярные концентрации ионов водорода и ионов гидроксила в водном растворе, их произведение при каждой температуре остаётся неизменным. При 25°C в чистой воде

$$[\text{H}^+] = [\text{HO}^-] = 10^{-7} \text{ моль/л}, \quad (5)$$

следовательно, $K_w = 10^{-7} \times 10^{-7} = 10^{-14}$. При повышении температуры K_w быстро увеличивается.

Добавление к чистой воде кислоты приведёт к увеличению концентрации ионов H^+ , и она будет больше 10^{-7} моль/л (при 25°C), при этом концентрация ионов HO^- уменьшится во столько же раз и будет меньше 10^{-7} моль/л, то есть в растворе с кислой реакцией:

$$[\text{H}^+] > 10^{-7} \text{ моль/л} > [\text{HO}^-]. \quad (6)$$

При добавлении основания наблюдается обратный процесс – увеличивается концентрация гидроксил-ионов и уменьшается концентрация ионов H^+ :

$$[\text{HO}^-] > 10^{-7} \text{ моль/л} > [\text{H}^+] \quad (7)$$

раствор даёт щелочную реакцию.

В нейтральных растворах $[\text{H}^+] = [\text{HO}^-] = 10^{-7}$ моль/л (при 25°C). Следовательно, любой водный раствор независимо от того, какова его реакция (т.е. значение pH), должен содержать как

ионы H^+ , так и ионы HO^- ; произведение их концентраций должно быть постоянной величиной, K_w равной 10^{-14} моль/л.

Водородный и гидроксильный показатели кислотности среды

Вместо молярной концентрации ионов водорода реакцию среды в водных растворах принято характеризовать отрицательным десятичным логарифмом этой величины, что позволяет пользоваться небольшими безразмерными числами от 1 до 14.

Десятичный логарифм молярной концентрации ионов водорода в водном растворе, взятый с обратным знаком, называют водородным показателем - рН (где "р" обозначает отрицательный логарифм):

$$pH = \lg \frac{1}{[H^+]} = -\lg[H^+] \quad (8)$$

В строго нейтральном растворе, в котором концентрация ионов H^+ составляет 1×10^{-7} моль/л, величина рН при 25°C равна 7, т.е:

$$pH = \lg \frac{1}{1 \times 10^{-7}} = -\lg 10^{-7} = 7 \quad (9)$$

следовательно, в кислых растворах $pH < 7$, а в растворах оснований $pH > 7$.

Иногда для промежуточных расчётов, связанных с определением pH среды, используют *гидроксильный показатель pOH , представляющий собой десятичный логарифм молярной концентрации ионов гидроксила, взятый с обратным знаком:*

$$pOH = -\lg[OH^-] \quad (10)$$

При увеличении концентрации сильных кислот или оснований межионные взаимодействия возрастают, а коэффициент активности (γ) уменьшается, следовательно для растворов электролитов с повышенной концентрацией ионов при расчётах pH и pOH следует использовать значения *активности* ионов H^+ и OH^- :

$$pH = -\lg a_{H^+} \quad (11)$$

$$pOH = -\lg a_{OH^-} \quad (12)$$

где a – активность ионов.

Кроме водородного и гидроксильного показателей pH и pOH , при расчётах нередко используют и показатель ионного произведения воды pK_W :

$$pK_W = -\lg K_W \quad (13)$$

Суммируя (4), (8) и (9), получим:

$$pK_W = pH + pOH \quad (14)$$

Поскольку $pK_W = 14$ (при $t = 25 \text{ }^\circ\text{C}$), то $pH = 14 - pOH$, а $pOH = 14 - pH$.

Если измерения проводят при температуре человеческого тела, то:

$$pH + pOH = \lg 2,325 \cdot 10^{-14} \approx 13,6$$

(так как $K_W = 2,325 \cdot 10^{-14}$ при $t = 37 \text{ }^\circ\text{C}$), и кислыми будут считаться растворы, для которых значение $pH < 6,8$, а щелочными с $pH > 6,8$.

При количественной оценке кислотности среды с помощью водородного показателя pH принято указывать значение этой величины с точностью не более чем до двух цифр после запятой (например, $pH 3,58$ или $pH 6,84$). Биологические жидкости, как известно, являются растворами неорганических солей, кислот, оснований и полиэлектролитов с кислой или щелочной реакцией. Измерение pH является одной из наиболее важных и часто используемых в биологических и клинических исследованиях процедур. Это обусловлено тем, что от величины pH зависят очень многие существенные структурные особенности и активность макромолекул, каталитическая функция ферментов и т.п.

Расчет активности ионов H^+ по величине рН. Измерение с помощью стеклянного H^+ -электрода значения рН водных растворов позволяет оценить концентрацию ионов водорода лишь косвенно, что обусловлено самим определением рН; из уравнения 11 следует:

$$[a_{H^+}] = 10^{-pH} \quad (15)$$

Расчет активности H^+ -ионов рассмотрим на следующем примере. Пусть при исследовании кислотности биологической жидкости потенциометрическим методом получили величину рН = 6,84. Согласно (11) и (15):

$$-\lg(a_{H^+}) = 6,84 \quad 10^{-6,84} \text{ моль/л}$$

Следует помнить, что активность ионов H^+ в растворе (т.е. кислотность и щелочность) так же, как и концентрацию, принято выражать в молях кислоты или основания на 1 л.

Упражнение 1. Исследование прямолинейности изменения ЭДС H^+ -электрода от величины рН раствора

Материалы и оборудование: рН-метр, буферные растворы с известными значениями рН, растворы HCl, NaOH (1 моль/л), стеклянные стаканчики, пипетки, фильтровальная бумага.

Цель работы: построить градуировочный график зависимости ЭДС H^+ -электрода от величины рН буферных

растворов и определить абсолютные величины “кислотной и щелочной” ошибок измерения рН в интервале 1 – 13 .

В крайних пределах рН щелочных и кислых растворов электродная функция становится нелинейной и измерения рН растворов могут быть менее точными. Величина ошибки растёт в большей мере при увеличении рН и концентрации солей щелочных металлов (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} и др.) в растворе.

Ход работы.

1. Подготовить прибор к работе, настроить его по буферным растворам и после этого тщательно промыть электроды несколькими порциями дистиллированной воды.

2. Приготовить по 25-30 мл буферных растворов с рН при 25°C, равными 3; 4; 5; 6; 7; 8; 9; 10, а также стандарт-титры кислоты и щелочи 1 моль/л (HCl и NaOH).

3. Переключить рН-метр (или иономер) в режим измерения ЭДС с размахом $+100 \div -1400$ мВ (в случае необходимости переключить на диапазон $-100 \div +1400$ мВ).

4. Провести измерения ЭДС электрода путём замены стаканчиков с последовательным увеличением рН буферных растворов. В последнюю очередь провести измерения рН сильной кислоты и сильного основания известной концентрации.

5. Результаты измерения ЭДС, переведенные в мВ, следует занести в таблицу:

Исследуемые растворы	Значения рН				Среднее значение рН	Значения ЭДС, мВ				Среднее значение ЭДС, мВ
	Измерения					Измерения				
	1	2	3	4		1	2	3	4	
Буферные растворы										
НСl										
NaOH										

6. По результатам измерений построить градуировочный график зависимости ЭДС цепи с H^+ - электродом от величины рН растворов.

7. После построения графика по экспериментальным точкам провести прямую линию, наложенную на среднюю часть графика (пределы 4÷9 рН), и затем определить абсолютные величины отклонения электродной функции от теоретической.

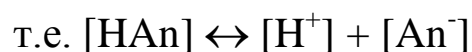
Упражнение 2. Измерение рН водных растворов электролитов и расчёт активности ионов водорода по измеренным величинам рН

Материалы и оборудование: рН-метр, буферные растворы с известными значениями рН, растворы НСl NaOH (1 моль/л),

фруктовый сок, молоко, стеклянные стаканчики, пипетки, фильтровальная бумага.

Цель работы: измерить величины рН неизвестных растворов и рассчитать активности ионов H^+ в анализируемых жидкостях.

Метод прямой потенциометрии позволяет измерять показатели активностей определяемых ионов. Например, изменение рН позволяет найти величину показателя степени с основанием 10, т.е. $a_{H^+} = 10^{-pH}$. В то же время активную концентрацию иона в растворе (а) можно определить, лишь исходя из уравнения диссоциации кислоты или щелочи по величине $[a_{H^+}]$,



$$[a_{An^-}] = [a_{H^+}] \text{ или } [a_{Kt^+}] = [a_{HO^-}] = 1 \cdot 10^{-14} - [a_{H^+}]$$

Ход работы

1. Подготовить прибор и электродную ячейку для измерения рН в соответствии с инструкцией.

2. Получить у преподавателя или лаборанта по 25-30 мл водных растворов для измерения значения их рН. Например, кислый, щелочной растворы, фруктовый сок, молоко, белковый раствор и т.п. Некоторые растворы приготовить самостоятельно.

3. В произвольном порядке провести 3-6 измерений рН каждого из анализируемых растворов.

Очень важным моментом при проведении этой операции является тщательная подготовка электродов к очередному измерению (см. инструкцию). Перед снятием показаний прибора следует помнить, что для установления равновесного электродного потенциала в нейтральной и щелочной областях рН требуется до 10 минут времени.

4. После проведения измерений рН полученных растворов разбавить в 10 и раз биологические жидкости и провести определение рН этих растворов в соответствии с п.3.

5. Полученные результаты занести в таблицу:

№ п/п образца	Исследуемый раствор	Величина рН			Среднее значение рН	Активная концентрация a_{H^+} , моль/л
		Измерения				
		1	2	3		
1	H ₂ O					
2	Сок					
3	Сок (1:10)					
4	Молочная сыворотка					
5	Молочная сыворотка (1:10)					
6	HCl					
7	NaOH					

6. Рассчитать активность ионов водорода по уравнению 15.

Контрольные вопросы:

1. Константа электролитической диссоциации воды при 25°C составляет $1,821 \times 10^{-16}$. Определить активность (концентрацию) ионов водорода в чистой воде.

2. В результате прямого потенциометрирования величина рН раствора составила 3,25. Определите a_{H^+} в этом растворе при 25°C.

3. К чистой воде добавлена сильная кислота (например, HCl), активная концентрация которой в растворе составила 0,01 н. Определить активность ионов H⁺ и рОН в растворе при 25°C.

4. К чистой воде добавлено сильное основание (например, NaOH), активная концентрация которого в растворе составляет 0,02 н при 25°C. Определить активную концентрацию ионов H⁺ и рН раствора.