

Ćwiczenie 19b.

Część 1. Interakcja światła z materią. Absorpcja światła przez molekuly o znaczeniu biologicznym – widmo absorpcji hemoglobiny i jego zmiany pod wpływem czynników chemicznych.

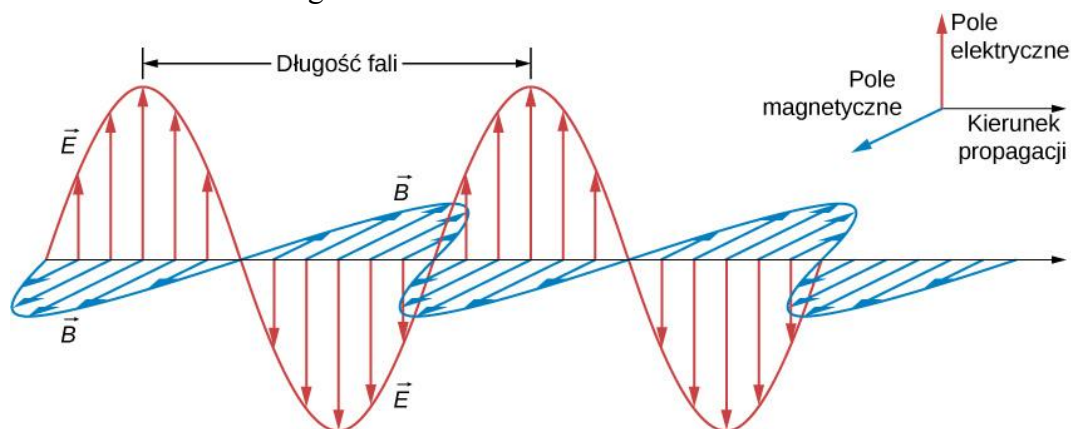
Promieniowanie elektromagnetyczne jest jedną z wielu form rozprzestrzeniania się (propagacji) energii w przestrzeni. Zarówno światło słoneczne, ciepło pochodzące od ogniska, promieniowanie mikrofalowe, fale radiowe czy wykorzystywane w celach medycznych promieniowanie rentgena lub gamma to różne formy promieniowania elektromagnetycznego. Pomimo, że istotnie się różnią to wykazują też pewne podobieństwa – wszystkie mają właściwości falowe. Bardzo często określa się promieniowanie elektromagnetyczne jako podobne do fali, oscylujące pole elektryczne (E) i magnetyczne (B), które rozchodzi się w przestrzeni. Warto zaznaczyć, że wektory linii rozchodzenia się pola elektrycznego i magnetycznego są prostopadłe względem siebie i do kierunku rozchodzenia się fali (Ryc. 1). W opisie kwantowym promieniowanie elektromagnetyczne traktowane jest jako strumień nieposiadających masy cząstek elementarnych określanych fotonami. Energia każdego fotonu opisany jest równaniem: $E = h\nu$ lub $E = h \cdot c / \lambda$,

gdzie h – uniwersalna stała nazwana stałą Plancka ($h = 6,63 \cdot 10^{-34}$ J·s),

ν - częstotliwość,

c - prędkość światła ($c = 299\,792\,458$ m/s w próżni),

λ - długość fali



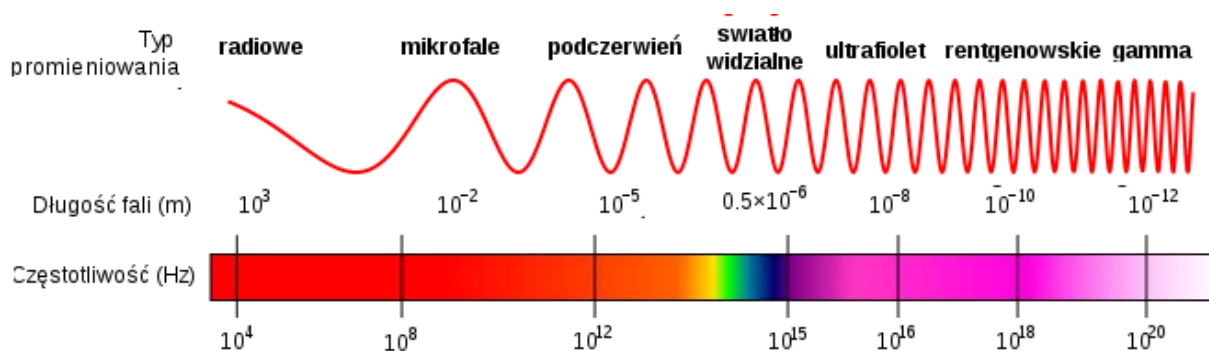
Ryc. 1. Fala elektromagnetyczna z zaznaczonym kierunkiem rozchodzenia się (propagacji) i wektorami linii pola elektrycznego (czerwone) i magnetycznego (niebieskie).

Długość fali (λ) jest to odległość pomiędzy kolejnymi powtórzeniami kształtu fali, co pokazano na Ryc. 1. Na podstawie rysunku możemy też stwierdzić, że jest to odległość pomiędzy sąsiednimi grzbiętami lub dolinami fal i wyraża ona najmniejszą odległość pomiędzy punktami w tej samej fazie drgań. Ponieważ widzimy, że punkty te będą się powtarzać cyklicznie to moglibyśmy określić ile cykli pełnych drgań (powrotu do punktu wyjścia) przypada na jedną jednostkę czasu. W układzie SI jednostką częstotliwości jest Hz (herc) i informuje on ile zdarzeń (cykli) przypada w ciągu 1 s. W przypadku fali, która

wykona 100 pełnych cykli w ciągu 1 sekundy możemy mówić że jej częstotliwość wynosi 100 Hz. Typowe fale świetlne mają częstotliwości rzędu $\sim 10^{14}$ Hz (Ryc. 2) i niosą energię kilku eV (elektronowolt, $1 \text{ eV} \approx 1,602 \cdot 10^{-19} \text{ J}$).

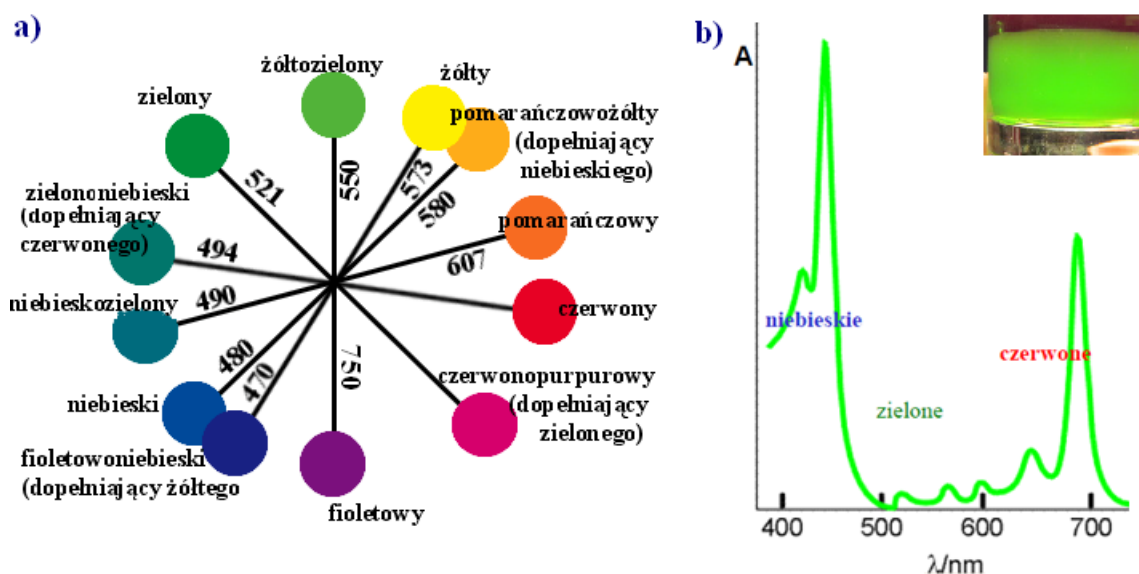
Ponieważ różne formy promieniowania elektromagnetycznego znacząco różnią się energią, bardzo często poszczególne formy klasyfikowane są według częstotliwości lub długości fali. Klasyfikację przedstawiającą spektrum fal elektromagnetycznych pokazano na schemacie 2. Promieniowanie elektromagnetyczne rozchodząc się w dowolnym ośrodku wytraca energię przekazując ją ośrodkowi. W przypadku promieniowania o wysokiej energii, jak promieniowanie gamma lub rentgenowskie może dochodzić do jonizacji cząsteczek (wybijania elektronów i powstawania jonów). Dlatego takie formy promieniowania są określane mianem **promieniowania jonizującego**, które wywołują istotne skutki chemiczne i biologiczne. Promieniowanie jonizujące niekorzystnie wpływa na organizmy, a duże dawki tego promieniowania mogą prowadzić do śmierci lub choroby popromiennej. W przypadku oddziaływania mniejszych dawek takiego promieniowania skutki oddziaływania są odłożone w czasie i mogą prowadzić do chorób nowotworowych lub zmian w materiale genetycznym.

Jeżeli promieniowanie niesie niższą energię i nie powoduje jonizacji mówimy, że jest niejonizujące. Do tego promieniowania zaliczamy promieniowanie optyczne: nadfiolet (UV - *ultraviolet*), światło widzialne (VIS - *visible*) i podczerwone (IR- *infrared*), oraz promieniowanie z zakresu radiowego i mikrofalowego. Fotony promieniowania niejonizującego mogą być absorbowane przez atomy i cząsteczki i przeprowadzać je na wyższe poziomy energetyczne.



Dział nauki zajmujący się badaniem oddziaływań światła (promieniowania optycznego) z materią określany jest mianem spektroskopii. Metody spektroskopowe często są stosowane w badaniach dotyczących analizy struktury pewnych związków, określenia ich ilości czy określania pewnych właściwości badanych cząsteczek, czy w celach diagnostycznych. W wyniku absorpcji światła przez dany związek chemiczny można obserwować przejścia elektronowe zachodzące w cząsteczkach (spektroskopia UV-VIS), czy zmiany oscylacji poszczególnych grup atomów (spektroskopia w podczerwieni, IR). Promieniowanie z zakresu nadfioletu i światła widzialnego (10-770 nm) powoduje bowiem zmiany energii elektronów walencyjnych, podczas gdy fale dłuższe (780 nm-500 μm ,

o niższej energii) przyczyniają się do zmian energii oscylacyjnej cząsteczek. Ponieważ oko przeciętnego człowieka reaguje na promieniowanie o długości fali 380-780 nm (światło widzialne, VIS) skupimy się na omówieniu właśnie tego promieniowania. Każdej długości fali z zakresu VIS możemy przypisać kolor. Ciekawą właściwością światła białego (które zawiera wszystkie długości fal światła widzialnego), jest to że jeśli padnie ona na dowolne ciało to część tego światła jest odbijana/rozpraszana, a część pochłaniana (absorbowana). W zależności od tego jakie długości fal świetlnych zostaną zaabsorbowane, a jakie odbite zależy obserwowany kolor tego przedmiotu.

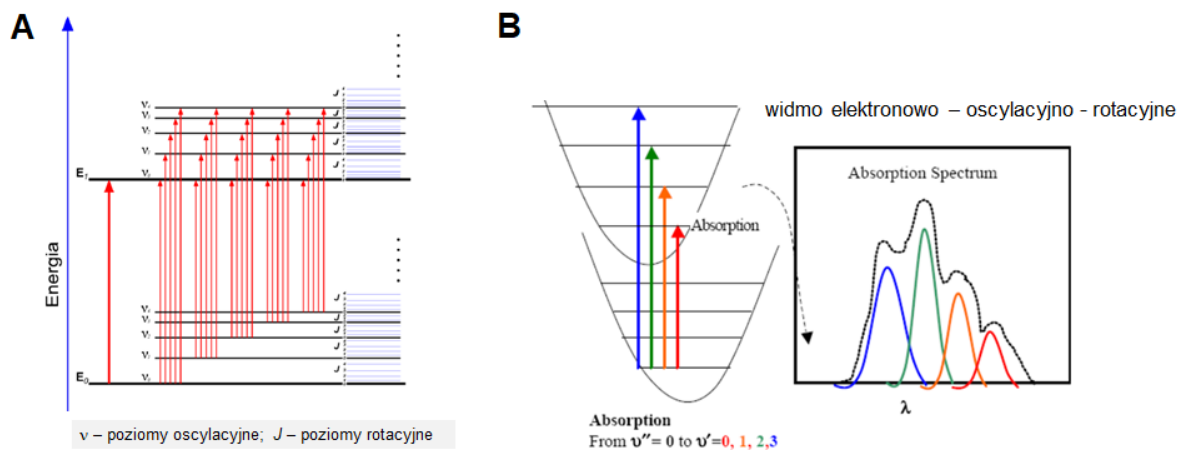


Ryc. 3. a) zestawienie barw dopełniających; **b)** widmo przedstawiające absorpcję (A) poszczególnych długości fal (λ) przez chlorofil (roztwór chlorofilu w prawym górnym rogu).

Podczas przechodzenia światła białego przez barwny roztwór do oczu obserwatora dociera jedynie barwa dopełniająca w stosunku do zaabsorbowanej. Na barwę dopełniającą składają się wszystkie długości fal, które nie zostały pochłonięte przez roztwór. Przykładowo, jeżeli absorbowane jest światło o barwie żółtej (jak ma to miejsce w przypadku roztworów zawierających jony Cu^{2+}), a inne nie - to roztwór wykazuje niebieskie zabarwienie. Typowe zestawienie barw dopełniających pokazano na Ryc. 3a, gdzie możemy zaobserwować, że naprzeciw kolorów o odcieniu żółtego znajdują się odcienie niebieskiego, a naprzeciw czerwonego – zielonego. Dlatego, jeżeli popatrzymy na typowe substancje barwne występujące w przyrodzie, jak chociażby chlorofil, który odpowiada za zieloną barwę liści to okaże się, że pochłania on różne długości fal (różne barwy, poza zieloną). Na Ryc. 3b przedstawiono **widmo absorpcji** chlorofilu (czyli wykres przedstawiający absorpcję światła (A) w zależności od długości fali świetlnej (λ)).

Każda substancja ma swoje charakterystyczne widmo absorpcji, w których występują maksima absorpcyjne dla określonej długości światła (częstości promieniowania; $\nu = 1/\lambda$). Każde maksimum absorpcyjne odpowiada przejściu cząsteczki z określonego poziomu energetycznego na wyższy, co schematycznie przedstawiono na ryc. 4. Jak można zauważyć

w każdej cząsteczce rozróżniamy skwantowane poziomy energetyczne, gdzie na skutek absorpcji energii można obserwować przejścia na wyższy poziom energetyczny. Każdej barwie można przypisać odpowiednie przejścia, w przypadku koloru niebieskiego absorbowana jest większa ilość energii niż ma to miejsce w przypadku koloru zielonego czy czerwonego (Ryc. 4B).

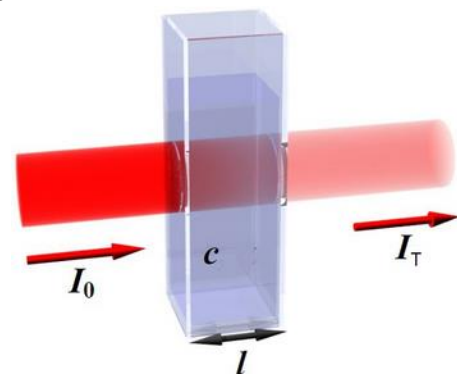


Ryc. 4. Widmo w obszarze UV/VIS nazywane jest elektronowym widmem absorpcyjnym.

Jak zaznaczono, w przypadku chlorofilu absorbowane są głównie zakresy fal odpowiadające barwie niebieskiej i czerwonej (Ryc. 3b), a odpowiadające im kolory dopełniające (Ryc. 3a) to: żółty, żółto-pomarańczowy i niebiesko-zielony, co w wyniku ich nałożenia na siebie pozwoli uzyskać odcień barwy zielonej. Trzeba bowiem mieć świadomość, że poprzez odpowiednie mieszanie barw możemy uzyskać niemal każdy kolor, o odpowiednim odcieniu i intensywności. Wykorzystuje się to w drukarkach kolorowych, które pomimo tego, że mają jedynie pojemniki z 3 kolorami, to na wydrukach pozwalają uzyskać dowolną barwę. Jeśli skierujemy światło białe (zawierające wszystkie długości fal) na taki wydruk, to pochłonięte zostaną te długości fal świetlnych, które stanowią barwę dopełniającą do obserwowanej. W przypadku koloru białego barwą dopełniającą jest czarna – czyli substancja absorbująca wszystkie długości fal świetlnych (światło białe) w naszym odczuciu będzie czarna. Dlatego też wyidealizowane ciało fizyczne, które całkowicie pochłania padające na nie promieniowanie elektromagnetyczne nazywane jest **ciałem doskonale czarnym** (nie istnieją w rzeczywistości bowiem zawsze jakaś nawet niewielka część promieniowania ulega odbiciu, czy rozproszeniu).

Prawa absorpcji

Jeżeli na próbkę pada promieniowanie elektromagnetyczne (światło) o natężeniu I_0 to część tego promieniowania zostanie zaabsorbowana, a część przechodzi przez tę próbkę, co pokazuje rycina 5 (obok). Rejestrując natężenia promieniowania padającego (I_0) i przechodzącego (I_T)



możemy wyznaczyć ilość światła, która ulega pochłonięciu przez roztwór (absorbancja, A), lub która przeszła przez niego (transmitancja, T):

$$T = \frac{I_t}{I_o} \qquad A = \log \frac{I_o}{I_t} = \log \frac{1}{T} = kcl$$

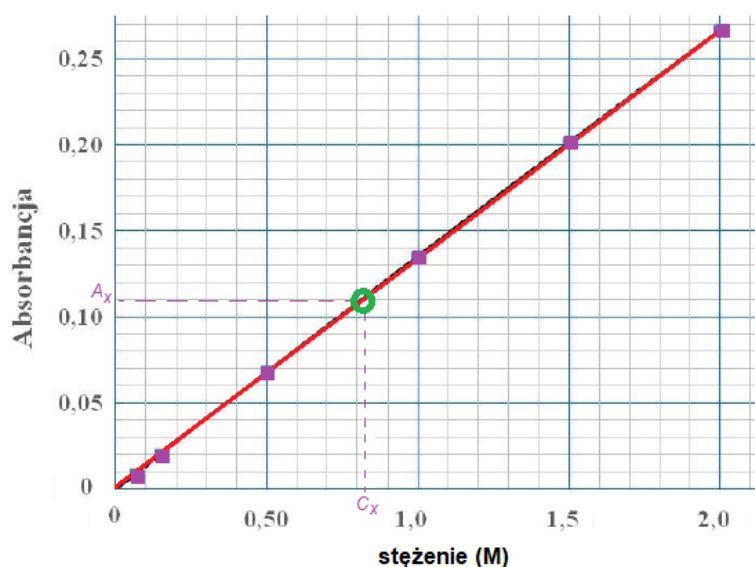
W pomiarach spektrofotometrycznych znacznie częściej korzysta się z pomiaru absorbancji. Absorbancja przy danej długości fali zależy od molowego współczynnika absorpcji (ϵ), grubości warstwy absorbującej (wynoszącej standardowo 1 cm) i stężenia molowego badanego roztworu. Zależność ta matematycznie jest wyrażona przez **prawo Lamberta-Beera** (absorbancja jest wprost proporcjonalna do stężenia roztworu i grubości warstwy absorbującej), co możemy zapisać wzorem:

$$A = \epsilon \cdot l \cdot C$$

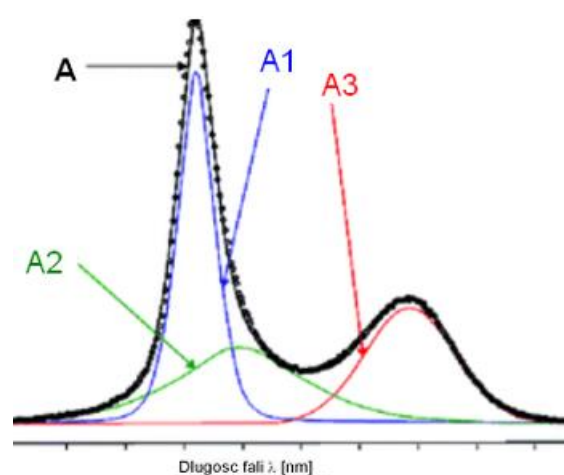
gdzie: A – absorbancja; ϵ – molowy współczynnik absorpcji [cm^2/mol],
 l – grubość warstwy absorpcyjnej [cm]; C – stężenie badanego roztworu [mol/dm^3].

We wzorze Lamberta- Beera pojawia się współczynnik proporcjonalności (ϵ), który nazywany jest **molowym współczynnikiem absorpcji**. Jest on charakterystyczny dla danej substancji i ma stałą wartość przy określonej długości fali. Liczbowo przedstawia on absorbancję wykazywaną przez roztwór o stężeniu $1 \text{ mol}/\text{dm}^3$, przy grubości warstwy 1 cm.

Prawo Lamberta – Beera można też przedstawić w postaci graficznej jako zależność $A = f(c)$. Będzie to linia prosta przechodząca przez początek układu współrzędnych (Ryc. 6), gdzie dla danego stężenia zaznaczono odpowiadającą mu wartość absorbancji.



Ryc. 6. Krzywa wzorcowa nazywana też krzywą kalibracyjną. Przygotowuje się serię roztworów o znanych stężeniach, dla których mierzy się absorbancję i na tej podstawie wyznacza wykres (prostoliniowy, zaczynający się w punkcie 0). Następnie po określeniu absorbancji roztworu (A_x) o nieznanym stężeniu i na podstawie wykresu można wyznaczyć stężenie tej substancji (C_x) w badanej próbce.



Ryc. 7. Widmo roztworu zawierającego trzy barwne składniki. Mierząc absorbancję takiego roztworu uzyskamy sumaryczne widmo, gdzie poszczególne wartości absorpcji przy danej długości fali (A_1 , A_2 , A_3) ulegają zsumowaniu.

Prawo Lamberta – Beera odnosi się do przypadku, gdy w roztworze znajduje się jedna substancja absorbująca. Jeżeli w roztworze będzie kilka składników, które wykazują zdolności absorpcyjne to oznaczanie spektrofotometryczne można wykonać poprawnie tylko wtedy, gdy spełnione jest prawo addytywności absorbancji, według którego całkowita absorbancja (A) jest sumą niezależnych absorpcji poszczególnych składników (A_1, A_2, \dots, A_n): $A = A_1 + A_2 + \dots + A_n$. Na ryc. 7 pokazano sumaryczne widmo absorbancji roztworu (A), który zawierał 3 substancje barwne, z których każda pochłaniała światło o innej długości fali (zaznaczone jako A_1, A_2 i A_3).

Pomiar absorbancji

Przy wykonywaniu pomiarów spektrofotometrycznych należy pamiętać, iż zmierzona wartość absorbancji jest sumą absorbancji naczynia pomiarowego i umieszczonej w nim próbki. Przed wykonaniem pomiaru absorbancji należy wykalibrować spektrofotometr poprzez ustawienie absorbancji na wartość równą zero, gdy w kuwecie znajduje się odnośnik. Jako odnośniki stosuje się: powietrze; roztwory nie absorbujące przy żadnej z używanych długości fali (roztwory buforowe, woda); roztwory absorbujące, ale nie wchodzące w reakcje z badaną substancją lub roztwory o znanym stężeniu, które będzie się zmieniało w wyniku zachodzących reakcji. Jeżeli wykonuje się widmo absorpcji jakiegoś związku, również należy wykonać widmo absorpcji odnośnika, a końcowe widmo związku jest to wówczas zmierzone widmo próbki pomniejszone o widmo odnośnika. Jeżeli roztwór będący odnośnikiem (woda, bufor) nie zawiera badanej substancji w żadnej z możliwych form, wówczas uzyskujemy widmo absolutne, jak ma to miejsce w przedstawionym przykładzie na ryc. 3b (gdzie jako odnośnik zastosowano wodę). Możemy również wykonać widmo różnicowe, gdy roztwór odnośnika zawiera badaną substancję w takim samym stężeniu jak roztwór badany. Przeprowadza się wówczas reakcję w kuwecie z badaną substancją, w wyniku której jej stężenie zmienia się, natomiast w kuwecie z odnośnikiem nie zachodzi żadna reakcja, a zatem stężenie badanej substancji jest stałe. W tego rodzaju badaniach widmo absorpcji przedstawia zmiany absorbancji (Δ absorbancji) w próbce badanej w porównaniu do odnośnika. Oba sposoby pomiaru absorbancji są wykorzystywane w laboratoriach do wyznaczania stężeń czy też kinetyki reakcji chemicznych.

Przy wykonywaniu pomiarów spektrofotometrycznych należy pamiętać, że na uzyskany wynik absorbancji wpływ ma również materiał, z którego wykonana jest kuweta pomiarowa. Przyczyną tego jest fakt, że sama kuweta również może absorbować światło. Jeżeli wiązkę światła przepuścimy przez pustą kuwetę, to po dotarciu do detektora będzie ona miała mniejsze natężenie niż wiązka światła padającego. W związku z tym w zależności od zakresu długości fali, przy jakiej jest wykonywany pomiar należy stosować różnego rodzaju kule pomiarowe. Poniżej podano przepuszczalność światła dla materiałów, z których wykonuje się kule:

- Polistyren: 340-800 nm
- Szkło: 334-2500 nm
- Kwarc: 170-2600 nm
- Polimetakrylan: 280-800 nm

Również przepuszczalność światła przez dwie kuwety (wykonanych nawet z tego samego materiału) może się istotnie różnić. Dlatego należy dobierać kuwety o zbliżonej przepuszczalności światła lub dokonywać pomiaru absorbancji próbki i odnośnika w tej samej kuwecie dokładnie przemywając i osuszając kuwetę pomiędzy mierzonymi próbkami. Powinno się też pamiętać, aby nie dotykać palcami ścianek kuwety, przez które przechodzi wiązka światła, a w przypadku ich zabrudzenia należy je przemyć wodą i delikatnie wytrzeć miękką chusteczką.

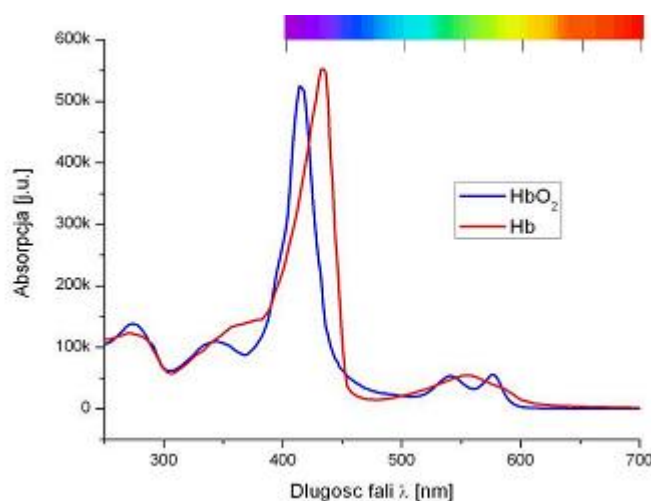
Interakcja światła z wybranymi biomolekułami

Spektrofotometria w zakresie nadfioletu i światła widzialnego z powodzeniem wykorzystywana jest do identyfikacji związków organicznych, które absorbują promieniowanie z zakresu 200-800 nm. Dotyczy to również wielu związków w naszym organizmie, które dzięki temu, że absorbują wybrane zakresy światła pełnią rolę swoistych barwników. Przykładowo skóra zawiera wiele barwników naturalnych (np. melanina, hemoglobina) lub też takich, które wprowadzone z zewnątrz przyczyniają się do zmiany zabarwienia (np. barwniki tatuaży, korektory kosmetyczne, składniki kremów itp.).

Kolor naszej skóry zależy od ukrwienia i grubości naskórka, a przede wszystkim od obecności melaniny - naturalnego barwnika skóry. Jej nazwa wywodzi się z greckiego „melas” (Μέλαν) – co odnosi się określenia koloru czarnego, ciemno - brązowego. Wytwarzanie tego barwnika uzależnione jest od czynników genetycznych i hormonalnych, oraz czynników zewnętrznych (np. promieniowanie ultrafioletowe). Zachodzi ono w melanocytach – komórkach usytuowanych w warstwie podstawnej naskórka. W odpowiedzi na różne bodźce melanina przenoszona jest do bardziej zewnętrznych warstw naskórka. Pod wpływem promieniowania ultrafioletowego ilość melaniny w skórze zwiększa się, co możemy zaobserwować poprzez przejściową zmianę zabarwienia (opaleniznę). Pierwsze i najszybsze przebarwienie skóry jest wynikiem działania długofalowych promieni UVA (320-400 nm). Za późniejszą i trwałą opaleniznę odpowiada promieniowanie UVB (280-320 nm), które ze względu na krótsze długości fal (a przez to większą częstotliwość) niesie ze sobą większą energię. Uwaga: duże dawki promieniowania UVB mogą doprowadzić do poparzenia skóry objawiającego się bolesnymi obrzękami i pęcherzami. Zwiększenie ilości melaniny przyczynia się do zwiększenia absorpcji światła przez co znacznie mniejsze ilości światła będzie docierać do głębiej położonych tkanek (najintensywniej pochłaniane jest promieniowanie UV, ale w mniejszym stopniu także i fale z zakresu światła widzialnego). Dlatego im więcej światła słonecznego (zawierającego UV) dociera do skóry, tym więcej melaniny pojawia się w komórkach naskórka. Komórki naskórka wraz z zawartą w nich melaniną obumierają i złuszcza się, co sprawia że opalenizna po pewnym czasie zanika.

W odróżnieniu od wody, krew cechuje się wyjątkowo silnym pochłanianiem fal o długościach odpowiadających barwie niebieskiej (420-490 nm), zielonej (490-550 nm)

i żółtej (565-590 nm). Dominującą rolę w absorpcji światła przez krew odgrywa hemoglobina - białko w którym hemowa grupa prostetyczna połączona z atomem dwuwartościowego żelaza odpowiada za wiązanie tlenu (W warunkach prawidłowych 1 g hemoglobiny może wiązać 1,34 cm³ tlenu). Na cząsteczkę hemoglobiny przypadają cztery grupy hemu (każda z nich może przyłączyć cząsteczkę tlenu) i cztery globiny (składającej się z 4 łańcuchów: dwóch alfa (α) i dwóch beta (β)). Hemoglobina wiążąca tlen (oksyhemoglobina, HbO₂), gdzie cząsteczka O₂ jest odwracalnie związana z dwuwartościowym żelazem, charakteryzuje się jasnoczerwoną barwą i analizowana w spektrofotometrze wykazuje największą absorpcję przy 414 nm oraz charakterystyczne piki absorpcyjne przy 542 nm i 578 nm (Ryc. 8). Oddając tlen dochodzi do zmiany konformacji cząsteczki i powstaje hemoglobina odtlenowana (deoksyhemoglobina, Hb), o barwie czerwono-fioletowej i w spektrofotometrze obserwuje się piki absorpcyjne w zakresie 400-450 nm i przy długości fali równej 565 nm.



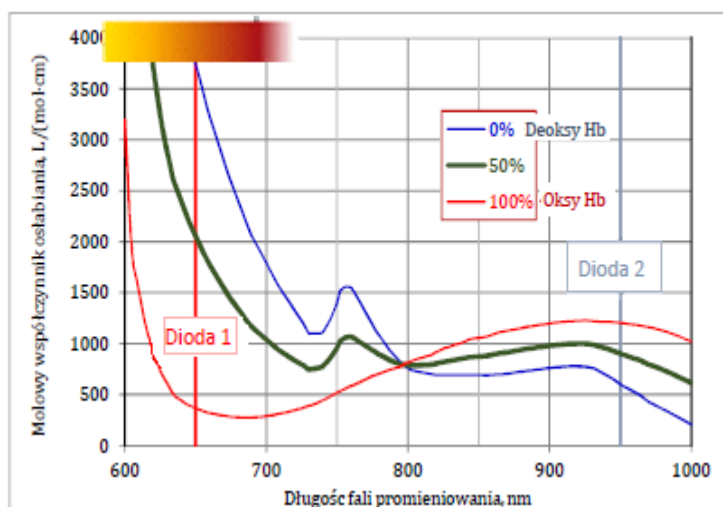
Ryc. 8. Widma absorpcyjne oksyhemoglobiny (HbO₂) i hemoglobiny odtlenowanej (Hb).

W zależności od przyłączonych ligandów, a także stanu elektronowego żelaza hemu obserwuje się różne widma (barwy) hemoglobiny. Jak wspomniano już wcześniej roztwór hemoglobiny, dzięki związaniu się z tlenem obecnym w powietrzu tlenem ma charakterystyczną czerwoną barwę (oksyhemoglobina), natomiast po oddaniu tlenu (deoksyhemoglobina) zmienia się na czerwono-fioletową. Można to zaobserwować dodając do takiego roztworu kilku kryształków ditionianu sodu (zachodzi reakcja: $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4 + \text{O}_2 + \text{H}_2\text{O} \Rightarrow \text{NaHSO}_4 + \text{NaHS}_2\text{O}_3$), czy borowodoru sodowego (NaBH₄). Także wiele innych ligandów (np.: tlenek węgla (CO) czy jon cyjankowy (CN⁻)) może być wiązanych przez żelazo w cząsteczce hemu, co będzie przyczyniać się do zmiany barwy. W odróżnieniu od tlenu, czy dwutlenku węgla powstający addukt hemoglobiny z CO (karboksyhemoglobina) jest trwały i nawet w przypadku użycia Na₂S₂O₄ nie obserwuje się zmiany barwy (z czerwonej na brunatną). Różnice w widmach absorbcyjnych karboksyhemoglobiny i oksyhemoglobiny mogą być wykorzystywane do wyliczenia stężenia tych form Hb we krwi. W stosowanych

metodach analitycznych wykorzystuje się pomiar przy długości fali 588 nm i 574 nm, przy których występuje największa różnica w wartościach absorbancji tych form Hb.

Niektóre ligandy mogą doprowadzać do zmiany stopnia utlenienia tlenu, jak ma to miejsce pod wpływem silnych utleniaczy, czy w wyniku reakcji z żelazicyjankiem potasu ($K_3Fe(CN)_6$), czy nadmiarem $NaNO_2$, które powodują przejście żelaza na 3 stopień utlenienia i powstaje wtedy methemoglobina (metHb) o charakterystycznej brunatnej barwie. Obecność jonu Fe^{3+} powoduje, że taka cząsteczka nie jest w stanie wiązać tlenu i methemoglobina nie jest zdolna do transportu tego gazu do tkanek. Pod wpływem jonów CN^- methemoglobina przechodzi w trwałą cyjanomethoglobinę, z maksimum absorpcji światła przy 540 nm, co znalazło zastosowanie analityczne do ilościowego oznaczania hemoglobiny.

Jak pokazano na Ryc. 8 widoczne różnice w widmie hemoglobiny utlenowanej (oksyhemoglobiny) i nieutlenowanej (deoksyhemoglobina) mogą być wykorzystane do oznaczania stopnia wysycenia hemoglobiny tlenem. Na tej zasadzie działają urządzenia nazywane pulsoksymetrami, które na podstawie pomiaru absorpcji promieniowania elektromagnetycznego (czerwonego i podczerwonego) określają stopień wysycenia hemoglobiny przez tlen. Promieniowanie emitowane przez dwie diody przechodzi przez palec, gdzie jest absorbowane przez tkanki, skórę i krew żylną, i dociera do detektora. Większość światła jest pochłaniana, a element światłoczuły wbudowany w czujnik pulsoksymetru oblicza procent absorpcji fal o długości 660 nm i 940 nm, co pozwala mu na tej podstawie wyliczyć procent saturacji krwi tlenem (Ryc. 9). Układ obliczeniowy pulsoksymetru z całkowitego sygnału wyodrębnia składową zmienną absorpcji przy w/w długościach fal, opisującą absorpcję promieniowania zachodzącą w tętnicy. Pomiar tej składowej umożliwia identyfikację krwi tętnicznej i na podstawie zmiany pulsacyjnego komponentu absorpcji w formie graficznej oblicza wartość tętna. Ponieważ światło czerwone jest silniej absorbowane przez deoksyHb, a podczerwone przez oksyHb to na tej podstawie możliwe jest wyznaczenie saturacji Hb tlenem.



Ryc. 9. Różnice w absorpcji światła o długości fal 660 nm i 940 nm stanowią podstawę analizy saturacji krwi tlenem przez pulsoksymetr.

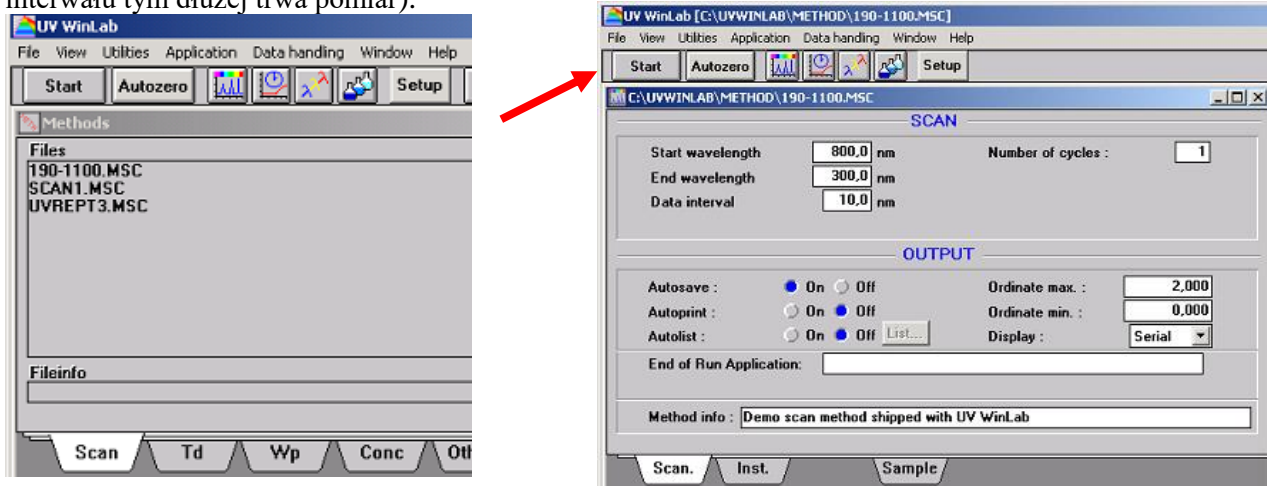
Część eksperymentalna:

1. Wykonanie widm absorpcyjnych roztworów zawierających hemoglobinę

Materiały i odczynniki:

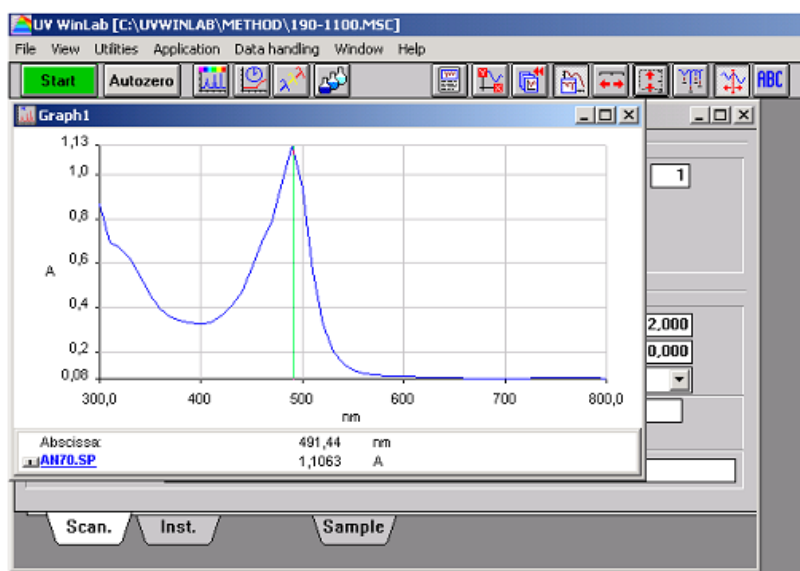
- roztwór hemoglobiny (ok. ~1%, w przypadku wyższych stężeń rozcieńczyć za pomocą 0,9 % NaCl)
- ditionian sodu ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$)
- heksacyjanożelazian (II) potasu ($C = 0,05 \text{ mol/dm}^3 \text{ K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, żelazicyjanek potasu)
- odczynnik Drabkina (zawierający: 0,03% $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, 0,1% NaHCO_3 , 0,005% KCN)




Korzystając z spektrofotometru Elmer-Perkin ustawić zakres badania na 360-640 nm. W tym celu po uruchomieniu programu zarządzającego *UV WinLab* wybieramy metodę (okno METHODS): **190-1100 MSC**. Wybór potwierdzić dwukrotnym kliknięciem na nazwie metody. Pojawia się okno parametrów metody, gdzie podajemy początkową (start wevelenght) i końcową (end wevelenght) długość fali, oraz interwał (data interwał; odstęp pomiędzy poszczególnymi pomiarami). Proszę zwrócić uwagę, że najpierw podajemy wyższą długość fali (jako start), a jako końcową - niższą wartość (co pokazano na rycinie poniżej, po prawej stronie). Wartość interwału (*Data interval*) sugeruje się ustawić na 5 nm (wartość to może być zmieniona przez prowadzącego ćwiczenia – należy jednak pamiętać, że im mniejsza wartość interwału tym dłużej trwa pomiar).



Do komory pomiarowej i referencyjnej spektrofotometru wstawia się dwie kuwety z wodą destylowaną (o pojemności ok. 1 ml). Po zamknięciu pokrywy wciskamy klawisz START (zaznaczony czerwoną strzałką na obrazie powyżej, po prawej stronie). Pojawia się okno informacyjne – przypominające o konieczności wstawienia próby odniesienia (ang. *BLANK* – tzw. ślepa próba). Po zatwierdzeniu poprzez kliknięcie na OK – aparat przeprowadzi automatyczną kalibrację dla podanego zakresu długości fal (wyznaczy tzw. linię bazową). Następnie po kalibracji pojawia się komunikat proszący o wstawienie badanej próby (*SAMPLE* – lub o innej nazwie wyznaczonej przez użytkownika).

Do uchwytu oznaczonego jako „próbna” wstawiamy kuwetę z roztworem badanej substancji. Próba z wodą jako odnośnikiem pozostaje w komorze oznaczonej jako „refer”. Zamykamy pokrywę spektrofotometru i wciskamy OK. Aparat automatycznie dokonuje pomiaru wykreślając widmo, które jest widoczne w oknie „Graph 1” (ryc. poniżej). Na podstawie wykresów należy odczytać w jakim zakresie długości fal absorbują przypadają poszczególne piki absorpcji. Wyznaczyć długości fali (nm), przy której poszczególne piki wykazują najwyższą absorbancję (A). Można skorzystać z funkcji programu:



Klikając na ikonę  umiejscowioną w pasku nad rysunkiem możemy dopasować odpowiednią skalę dla wykreślonego widma. Po kliknięciu na  i wybraniu opcji „Peak” automatycznie zostanie wyznaczona długość fali przy której związek wykazuje maksymalną absorbancję. Po wybraniu  pojawia się zielona linia, którą możemy przesunąć za pomocą znacznika myszki i ustawić w miejscu gdzie związek wykazuje maksymalną absorbancję. Program automatycznie wyświetli długość fali i wartość absorbancji, przy której został ustawiony wskaźnik (ryc. powyżej)

W przypadku gdy stężenie hemoglobiny będzie bardzo wysokie na widmach mogą być niewidoczne maksymalne wartości absorbancji – uzyskuje się piki o długich, płaskich wierzchołkach (spektrofotometry rejestrują zazwyczaj absorbancję do wartości 3-5, ponieważ pomiary prowadzone dla wyższych wartości są mało dokładne – w takiej sytuacji zaleca się rozcieńczenie próbki i wykonanie widma dla roztworu rozcieńczonego, gdzie piki powinny mieć charakterystyczną wartość maksymalną, przy jednej/charakterystycznej długości fali).

1.1. Roztwór oksyhemoglobiny (HbO_2) rozcieńczyć 10 razy (do 1 ml roztworu dodać 9 ml soli fizjologicznej lub wody). Następnie przygotować serię 3 kuwetek zawierających roztwór HbO_2 wykazujący charakterystyczne czerwone zabarwienie i serię 3 kuwetek zawierających roztwór 10 × rozcieńczony („niemal przejrzystych”). Ustawić kuwety w

pary składające się z roztworu czerwonego i rozcieńczonego hemoglobiny. Zarejestrować (zapisać) widma dla jednego z roztworów rozcieńczonych 10× oraz dla jednego roztworu zawierającego nierozcieńczoną hemoglobinę. Zapisać pliki w pamięci komputera – jeżeli w przypadku hemoglobiny nierozcieńczonej nie będzie widać wyraźnych pików (piki będą miały płaskie szczyty) nie będą wymagane pomiary dla roztworów nierozcieńczonych. Będą one służyły jedynie do obserwacji zmiany barwy roztworu hemoglobiny po dodaniu poszczególnych odczynników.

Następnie do pierwszej pary dodać kryształki ditionianu sodu (punkt 1.2), do drugiej $K_3Fe(CN)_6$ (punkt 1.3), a do trzeciej odczynnika Drabkina (punkt 1.4). Zarejestrować (zapisać) widma dla roztworów rozcieńczonych 10× (zwłaszcza w przypadku, gdy dla roztworu nierozcieńczonego obserwowano płaskie wierzchołki pików)..

1.1. Do kuwety z roztworem HbO_2 dodać niewielką ilość (kilka kryształków na szpatułce) $Na_2S_2O_4$, wymieszać i odczekać 5 minut, po czym zmierzyć widmo absorpcji 360-640 nm. Zanotować różnice w porównaniu do widma oksyhemoglobiny. Powstała hemoglobina powinna zmienić barwę

1.2. Do kuwety z roztworem HbO_2 dodać 10 μ l 0,05 M $K_3Fe(CN)_6$ wymieszać, odczekać 5 minut i dokonać pomiaru widma absorpcji. Pod działaniem środka utleniającego oksyhemoglobina powinna przejść w methemoglobinę (metHb), co związane jest z zmianą barwy roztworu.

1.3. Do kuwety z roztworem HbO_2 dodać 10 μ l odczynnika Drabkina wymieszać, odczekać 5 minut i dokonać pomiaru widma absorpcji.

Dla każdego z roztworów hemoglobiny wyznaczyć przy jakich długościach fali świetlnej przypadają maksymalne wartości poszczególnych pików w widmach absorpcyjnych (na podstawie pomiarów dla roztworu hemoglobiny rozcieńczonej). Proszę zwrócić nawet na niewielkie piki – jak pokazano na ryc. 8 powinny być widoczne przynajmniej 2 lub 3 piki. Jaką barwę posiadają poszczególne roztwory? (w roztworach hemoglobiny o wyższym stężeniu barwa będzie lepiej widoczna) .

Z wykresów wykonanych widm absorpcyjnych dokonać odczytu absorpcji z każdej próby przy 630 nm. Wyniki zestawić w tabeli

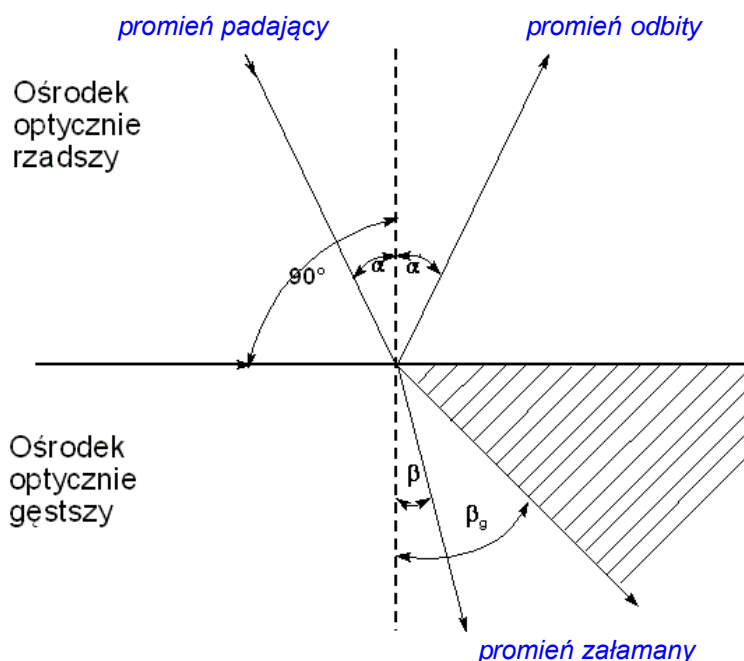
Próba	Hemoglobina (HbO_2)	+ ditionian	+ $K_3Fe(CN)_6$	+ odczynnik Drabkina
A (630 nm)	(Abs1)	(Abs2)	(Abs3)	(Abs4)

Wyznaczyć procentową zawartość methemoglobiny w próbce oksyhemoglobiny wg wzoru:

$$\% \text{MetHb} = \frac{\text{Abs1} - \text{Abs2}}{\text{Abs3} - \text{Abs4}} \times 100$$

Część 2. Współczynnik załamania światła. Sprawdzanie addytywności refrakcji, refraktometryczne oznaczanie zawartości cukrów w syropach lub białek w osoczu.

Prędkość rozchodzenia się promieni świetlnych zależy od gęstości optycznej ośrodka oraz od długości fali promieniowania. Promienie świetlne padając pod pewnym kątem na płaszczyznę graniczącą ze sobą dwóch różnych ośrodków przezroczystych ulegają częściowo odbiciu, a częściowo załamaniu (Ryc. 10). To ostatnie zjawisko związane jest ze zmianą prędkości rozchodzenia się promieni świetlnych w różnych ośrodkach.



Ryc. 10. Zmiana kierunku promieni świetlnych na powierzchni granicznej dwóch ośrodków.

Na rysunku tym, kąt α między promieniem padającym, a prostą prostopadłą do płaszczyzny rozgraniczającej dwa ośrodki nosi nazwę kąta padania. Kąt α' to kąt odbicia, a kąt β to kąt załamania.

Zgodnie z **prawem Snelliusa**, stosunek sinusa kąta padania do sinusa kąta załamania jest dla danej pary ośrodków wielkością stałą, zwaną współczynnikiem załamania i równą stosunkowi prędkości światła w obydwu ośrodkach. Zależność ta jest określona równaniem:

$$\frac{\sin \alpha}{\sin \beta} = n_{1,2} = \frac{v_1}{v_2}$$

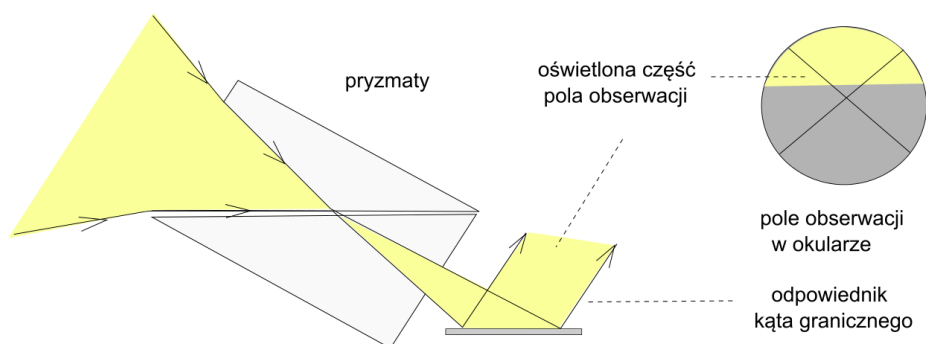
w którym $n_{1,2}$ jest współczynnikiem załamania ośrodka drugiego względem pierwszego, a v_1 i v_2 to prędkości światła w obydwu ośrodkach. Jeżeli załamanie światła następuje w ten sposób, że kąt $\beta < \alpha$, to ośrodek drugi nosi nazwę optycznie gęstszy niż pierwszy. Gdy promień świetlny przechodząc z ośrodka optycznie rzadszego do gęstszy pada na powierzchnię graniczną pod kątem 90° , to załamanie następuje pod kątem β_g , który nazywamy kątem granicznym. Równanie przedstawione wyżej przyjmie wówczas następującą postać:

$$n_{1,2} = \frac{\sin 90^\circ}{\sin \beta} = \frac{1}{\sin \beta}$$

Z zależności przedstawionej tym równaniem wynika możliwość pomiaru współczynnika załamania światła przez zmierzenie wartości kąta granicznego. W stałej temperaturze **współczynnik załamania światła** (n) jest wielkością charakterystyczną dla określonej substancji. Ze wzrostem temperatury wartości n maleją. Na wartość współczynnika załamania wpływ ma także długość fali światła – najczęściej stosuje się światło o długości fali równej linii D widma emisyjnego sodu (589,3 nm), a współczynnik załamania światła odpowiadający tej długości fali oznacza się symbolem n_D . Zastosowanie krótszych długości fali powoduje wzrost n , a przy dłuższych falach wartość współczynnika załamania maleje. Dane dotyczące temperatury i długości fali zaznaczamy przy symbolu współczynnika załamania światła: n_D^{25} (z prawej u góry temperatura, u dołu rodzaj światła).

Przyrządy służące do pomiarów współczynnika załamania światła noszą nazwę refraktometrów. Ich działanie oparte jest na zasadzie pomiaru kąta granicznego. Najpowszechniej używanym tego typu aparatem jest refraktometr Abbego, przy pomocy którego można badać współczynniki załamania cieczy w zakresie od 1,3 do 1,7. Istotną zaletą refraktometru Abbego jest możliwość wykonywania pomiarów zarówno w świetle monochromatycznym, jak i białym (zawierającym wszystkie długości fal zakresu widzialnego – np. światło słoneczne).

Zasadniczą częścią refraktometru Abbego są dwa pryzmaty, pomiędzy które wprowadza się ciekłą warstwę badanej cieczy. Odbite od zwierciadła promienie padają na pierwszy pryzmat załamują się w nim i przechodzą do cieczy. Stykająca się z cieczą powierzchnia pierwszego pryzmatu jest matowa, przez co światło rozprasza się na tej powierzchni i na ciecz padają promienie pod wszystkimi możliwymi kątami. Ponieważ ciecz jest ośrodkiem optycznie rzadszym więc do drugiego pryzmatu przechodzi tylko część światła - promienie padające pod kątem mniejszym lub równym kątowi granicznemu. Promień padający pod kątem granicznym rozdziela przestrzeń oświetloną od nieoświetlonej. Przez odpowiedni obrót pryzmatów i właściwe ich oświetlenie prowadzi się promienie w ten sposób, aby granica pola ciemnego i jasnego wypadła w środku okularu (na skrzyżowaniu „nici pajęczych”, obraz poniżej na ryc. 11). Obrót pryzmatów zsynchronizowany jest ze skalą przyrządu, na której odczytuje się wartość współczynnika załamania. Pomiar wartości współczynnika załamania światła wykorzystuje się od celów analitycznych, do identyfikacji substancji lub badania ich stopnia czystości.



Znając wartość współczynnika załamania światła, można obliczyć refrakcję molową czystej substancji lub wartość refrakcji molowej roztworu. **Refrakcja molowa** (R_M) jest wielkością charakterystyczną i stałą dla danego związku chemicznego, nie zależy od temperatury, ciśnienia i w zasadzie od stanu skupienia substancji. Na jej wielkość wpływ ma natomiast długość fali światła stosowanego przy wyznaczaniu współczynnika załamania światła.

$$R_M = \frac{n^2 - 1}{n^2 + 2} \cdot \frac{M}{d} \quad [R_M] = \text{m}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$$

gdzie: n – współczynnik załamania światła (czystej) substancji

M - masa molowa

d - gęstość

Refrakcja molowa wiąże się głównie z polaryzacją elektronową w cząsteczce, występującą przy przejściu światła przez materię. Polaryzacja ta wynika z zaburzenia rozkładu gęstości elektronowej wokół jąder atomowych. Pod wpływem pola elektrycznego indukowany jest w każdym atomie moment dipolowy, proporcjonalny do natężenia pola.

Refrakcja molowa wykazuje właściwości *addytywne*, tzn. jest sumą udziałów refrakcji atomów i refrakcji wiązań występujących w cząsteczce określonego związku

$$R_M = \sum_{i=1}^i n_i R_a + \sum_{i=1}^i n_i R_w$$

gdzie: R_a , R_w - refrakcja atomów, refrakcja wiązań

n_i - liczba określonych atomów lub wiązań

Na podstawie powyższego wzoru można obliczyć refrakcję molową związku, gdy znana jest jego budowa. Wielkość tę można wyznaczyć również doświadczalnie, mierząc współczynnik załamania i gęstość substancji. Znając doświadczalną wartość refrakcji, można ustalić rozmieszczenie atomów i wiązań występujących w cząsteczce związku.

Refrakcja molowa roztworu także wykazuje właściwości addytywne i równa się sumie udziałów refrakcji molowych poszczególnych składników roztworu. Dla roztworów dwuskładnikowych wielkość tę można wyrazić wzorem:

$$R_{\text{roztw.}} = x_1 R_1 + x_2 R_2$$

gdzie:

x_1 i x_2 - ułamki molowe substancji 1 i 2 w roztworze

R_1 i R_2 - refrakcje molowe czystych substancji

Doświadczalną wartość refrakcji molowej roztworu wyznacza się z równania:

$$R_{\text{roztw.}} = \frac{n_{\text{roztw.}}^2 - 1}{n_{\text{roztw.}}^2 + 2} \cdot \frac{x_1 M_1 + x_2 M_2}{d_{\text{roztw.}}}$$

gdzie: $n_{\text{roztw.}}$ i $d_{\text{roztw.}}$ - współczynnik załamania i gęstość roztworu

x_1 i x_2 oraz M_1 i M_2 - ułamki molowe i masy molowe składników roztworu

Zależność ta może być także wykorzystywana do wyznaczania refrakcji molowej czystego składnika, dla którego pomiar gęstości i współczynnika załamania jest technicznie trudny.

Część eksperymentalna:**Wyznaczanie refrakcji molowej i sprawdzanie jej właściwości addytywnych.****1. Wyznaczanie współczynnika załamania mieszaniny rozpuszczalników**

Sporządzić po 10 g mieszaniny rozpuszczalników A i B (rozpuszczalniki wskaże asystent prowadzący ćwiczenia) wg tabeli 1

% wagowy rozpuszcz A w roztw	Ilość mieszaniny (g)	ilość rozpuszcz A (g)	ilość rozpuszcz B (g)	ilość rozpuszcz A (cm ³)	ilość rozpuszcz B (cm ³)
0	10	-	10		
20	10	2	8		
40	10	4	6		
60	10	6	4		
80	10	8	2		
100	10	10	-		

Aby uniknąć ważenia roztworów należy przeliczyć masę na objętość na podstawie gęstości podanych w tabeli 2.

Nazwa związku	Masa molowa (M)	Gęstość (d) [g/cm ³]
chloroform	119,39	1,49
benzen	78,11	0,88
dioksan	88,11	1,03
propanol	60,09	0,8004
izo-propanol	60,11	0,787
heksan	86,18	0,66
butanol	74,12	0,8066
glikol etylenowy	62,07	1,11
metanol	32,04	0,792
etanol	46,07	0,791
aceton	58,08	0,791
cykloheksan	78,05	0,779

W stałej temperaturze zmierzyć kolejno współczynniki załamania światła przygotowanych roztworów oraz czystych składników. Pomiarów dokonać przy użyciu refraktometru Abbego. W tym celu należy otworzyć (rozchylić) komorę pryzmatu pomiarowego, przetrzeć ją wacikiem zwilżonym alkoholem i delikatnie osuszyć. Następnie za pomocą pipety nanosimy

badany roztwór, tak aby pokrył on całą powierzchnię dolnego pryzmatu. Po zamknięciu komory pryzmatu dokonujemy pomiaru współczynnika załamania światła.

- Kręcąc „dużym” pokrętkiem z lewej strony przyrządu możemy ustawić w polu widzenia linię rozgraniczającą jasną i ciemną część obrazu.
- Obracając „małym” pokrętkiem z prawej strony przyrządu możemy uzyskać ostrą, wyraźną, linię rozgraniczającą jasne i ciemne pole widziane w okularze.

Obracając pokrętkiem z lewej strony refraktometru należy tak ustawić granicę fazy oświetlonej i nieoświetlonej, aby ta granica przechodziła dokładnie przez przecięcie skrzyżowanych linii (nici pajęczych) widocznych w okularze. W drugim okularze można dokonać odczytu współczynnika załamania światła.

*) Zasada działania refraktometru ATAGO DR-A1 jest podobna. Pokrętło do ustawiania pola rozgraniczającego jasną i ciemną część obrazu znajduje się po prawej stronie, a ewentualną korektę obserwowanego pola widzenia (w tym ostrości linii) można zastosować pokręcając pokrętkiem wokół okularu. Po ustawieniu linii aparat dokonuje automatycznego odczytu współczynnika załamania światła i wyświetla go na ekranie aparatu.

Wyniki pomiarów wpisać do tabeli 3.

Tabela 3.

% wag. rozpuszcz. A w roztworze	ułamek molowy A w roztworze	współczynnik załamania światła (n) roztworu	gęstość roztworu (d) [g/cm ³]	refrakcja doświadcz. roztworu [cm ³ /mol]
0				
20				
40				
60				
80				
100				

Wzór na obliczanie ułamków molowych:

$$x_A = \frac{n_A}{n_A + n_B} \quad x_B = \frac{n_B}{n_A + n_B}$$

$$x_A + x_B = 1$$

gdzie: n_A - liczba moli składnika A

n_B - liczba moli składnika B

Na podstawie uzyskanych wyników wykonać wykres funkcji $R = f(x_A)$. Prostoliniowy przebieg funkcji $R = f(x_A)$ potwierdzałby addytywność refrakcji molowej roztworu.

*) gęstość roztworu możemy wyliczyć z zależności m/V (ilość mieszaniny (g)/ sumaryczna objętość roztworów (cm³))

Wykorzystanie pomiarów refraktometrycznych do oznaczania zawartości cukru/białek w roztworach wodnych

Pomiary refraktometryczne znalazły zastosowanie w analizie jakościowej i ilościowej, jak również w celach potwierdzenia struktury danego związku (np. ustalanie równowagi ketonowo-enolowej). Obecnie refraktometry wykorzystuje się w laboratoriach klinicznych, chemicznych, przemysłowych i farmaceutycznych. Refraktometry kliniczne umożliwiają pomiar ciężaru właściwego moczu, stężenia białka w osoczu i surowicy krwi czy całkowitej zawartości substancji stałych w roztworach wodnych. W przemyśle spożywczym i farmaceutycznym służą do określania zawartości cukrów w syropach i sokach, pomiaru zawartości etanolu w napojach alkoholowych. W przemyśle wykorzystuje się je do oceny i kontroli jakości paliw, produktów rafineryjnych, samochodowych płynów eksploatacyjnych (do chłodziw, do spryskiwaczy), emulsji, atramentów i innych środków chemicznych. Celem tej części ćwiczenia jest porównanie zawartości sacharozy w poszczególnych syropach.

Wykonanie:

1. Odchylić oprawę pryzmatu (górnego) i oczyścić powierzchnie pryzmatów zwilżeniem waty zwilżonym alkoholem.
2. Zakraplaczem umieścić na powierzchni pryzmatu refraktometrycznego (dolnego) kilka kropel wody, tak by po przykryciu górnym pryzmatem cała powierzchnia pomiarowa została pokryta badaną cieczą. Nie dotykać palcami powierzchni pomiarowej ani cieczy
3. Zamknąć górny pryzmat i dokonać pomiaru współczynnika załamania światła (n_D). Obracając pokrętkę z prawej strony przyrządu ustawić w polu widzenia linię rozgraniczającą jasną i ciemną część obrazu. Na wyświetlaczy poniżej pojawi się wartość współczynnika światła. Klikając klawiszem SELECT możemy odczytać wartość w skali procentowej (Brix). Zanotować obie wartości. Przełączyć za pomocą klawisza SELECT ponownie w tryb odczytu n_D
4. Powtarzając pkt. 1-3 zmierzyć i zanotować współczynnik załamania (n_D) oraz wartość Brix dla wszystkich badanych roztworów (3 syropy i/lub roztwory sacharozy o podanych stężeniach).

Wyciągnąć wnioski o zawartości sacharozy w poszczególnych syropach. Jaka jest zależność pomiędzy wartością współczynnika załamania światła (lub wartością Brix), a zawartością cukru w syropie?