

# **Laboratorium z biochemii**

## **DLA STUDENTÓW BIOLOGII, BIOTECHNOLOGII I OCHRONY ŚRODOWISKA**

Praca zbiorowa pod redakcją *Antoniego Polanowskiego*  
Poprawki do wydania III wprowadzone pod redakcją  
*Justyny Ciuraszkiewicz i Elżbiety Gocek*

### **10. Metody biofizyczne**

Autorzy: Rafał Bartoszewski, Wojciech Białek, Beata Gubernator, Jarosław Króliczewski, Janusz Piechota (ed. Justyna Ciuraszkiewicz)

<b>10.1</b>	<b>Wstęp do opracowania wyników eksperymentalnych</b>	<b>2</b>
<b>10.2</b>	<b>Pipetowanie</b>	<b>12</b>
10.2.1	Nauka prawidłowego i dokładnego pipetowania	13
10.2.2	Sprawdzanie kalibracji pipety automatycznej	14
10.2.3	Pomiar gęstości roztworu sacharozy	14
10.2.4	Wyznaczanie krzywej standardowej związku barwnego metoda najmniejszych kwadratów	15
10.2.5	Wykorzystanie metody najmniejszych kwadratów do sporządzenia krzywej wzorcowej do oznaczania ilości białka metodą Bradforda	17
10.2.6	Rozkład normalny wysokości pedów i ilości siewek grochu	18
<b>10.3</b>	<b>Wirowanie</b>	<b>19</b>
10.3.1	Izolacja chloroplastów	19
10.3.2	Otrzymanie preparatu tylakoidów z materiału roślinnego metodą wirowania różnicowego	21
10.3.3	Skokowy gradient gestosci sacharozy	22
10.3.4	Ciągły gradient gestosci sacharozy	22
10.3.5	Ciągły gradient gestosci perkolu	23
10.3.6	Rozdział preparatu chloroplastów metodą wirowania w gradiencie gęstosci	23
10.3.7	Rozdział preparatu tylakoidów metodą wirowania w skokowym gradiencie gęstosci	24
<b>10.4</b>	<b>Potencjometria</b>	<b>25</b>
10.4.1	Charakterystyka elektrody szklanej	25
10.4.2	Miareczkowanie potencjometryczne aminokwasów	26
10.4.3	Wyznaczanie pojemności buforowej buforu octanowego	27
10.4.4	Wyznaczanie pojemności buforowej dla buforów o różnym pH	28
10.4.5	Wyznaczanie pojemności buforowej dla buforów o różnym stężeniu	29
<b>10.5</b>	<b>Spektroskopia i spektrofluorymetria</b>	<b>31</b>
10.5.1	Wyznaczanie molowego współczynnika absorpcji	31
10.5.2	Wyznaczanie stężenia roztworu na podstawie prawa Lamberta-Beera	32
10.5.3	Wpływ pH oraz potencjału redoks na parametry spektralne związków chemicznych	33
10.5.3.1	Wpływ potencjału redoks na parametry spektralne związków chemicznych	33
10.5.3.2	Wpływ stopnia utlenienia na własności spektralne związków chemicznych	35
	Wpływ pH na parametry spektralne związków chemicznych	36
10.5.4	Spektrofotometryczna analiza jakościowa	38
10.5.5	Spektrofluorymetria	39

## 10.1. WSTĘP DO OPRACOWANIA WYNIKÓW EKSPERYMENTALNYCH

### Niepewność pomiarów i rodzaje błędów popełnianych podczas pomiarów

Każdy eksperyment naukowy składa się z szeregu czynności laboratoryjnych, które powinno się wykonać z należytą starannością. Bardzo często czynnością laboratoryjną jest pomiar określonej wielkości fizycznej, np. ważenie odczynnika, odmierzanie określonej objętości cieczy, pomiar pH, absorbancji itp. **Pomiarem** określa się zbiór czynności wykonanych w celu ustalenia wartości określonej wielkości fizycznej. Zazwyczaj dokonuje się tego poprzez porównanie mierzonej wartości z ustalonym wzorcem. Podczas wykonywania pomiaru może dojść do popełnienia różnego rodzaju błędów, które sprawiają, że zmierzona wartość  $x$  wielkości fizycznej różni się od prawdziwej miary  $x_0$ . Różnicę:

$$\delta = x - x_0 \quad (1)$$

nazywamy **błędem bezwzględnym** zmierzonej wielkości fizycznej lub też **błędem (niepewnością) pomiaru**. Błąd pomiaru można też wyrazić w postaci błędu względnego:

$$\frac{\delta}{x_0}$$

lub błędu procentowego:

$$\frac{\delta}{x_0} \times 100\%$$

Błędy popełniane podczas pomiaru wielkości mają różne przyczyny. Mogą one wynikać z niedoskonałości stosowanych przyrządów, niewłaściwego ich skalibrowania lub obsługi, niedoskonałości zmysłów eksperymentatora, czynników losowych (np. skoki napięcia w sieci elektrycznej). Na odczytywaną wartość mogą mieć wpływ czynniki zewnętrzne, np. temperatura, wilgotność powietrza, jakość stosowanych wzorów itp. Wszystko to sprawia, że uzyskiwane wyniki oscylują (są rozrzucone) wokół pewnej wartości. Na błąd pomiaru mogą się złożyć trzy rodzaje błędów: **błędy przypadkowe**, **błędy systematyczne** i **błędy grube**:

$$\delta = \delta_p + \delta_{sys} + \delta_{gr} \quad (2)$$

**Błędy przypadkowe** wynikają z wpływu czynników losowych, niekontrolowanych przez eksperymentatora, np. skoków napięcia w sieci elektrycznej, dokładności odczytu wartości przez eksperymentatora, drgania podłoża itp. Błędy te nie muszą się pojawiać podczas każdego pomiaru, lub mogą pojawiać się z różną siłą. Błędy przypadkowe mogą mieć różny znak, czyli raz powodować zawyżenie a innym razem zaniżenie mierzonej wielkości fizycznej. Aby zmniejszyć wpływ błędów przypadkowych na wynik pomiaru określonej wielkości fizycznej nie wykonuje się pojedynczego pomiaru lecz wykonuje się serię kilku pomiarów uzyskując serię wyników stanowiących tzw. próby  $x_1, x_2, \dots, x_n$  (gdzie  $n$  to ilość pomiarów). Następnie z uzyskanych wyników oblicza się średnią arytmetyczną, której wartość jest najbardziej zbliżona do wartości prawdziwej.

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^{i=n} x_i$$

(3)

gdzie  $x_i$  to kolejny pomiar.  
Z kolei wyrażenie:

$$s = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^{i=n} (x_i - \bar{x})^2}$$

(4)

nazywane odchyleniem standardowym jest miarą **błędu (niepewności) pojedynczego wyniku pomiaru**. Natomiast miarą **błędu obliczonej średniej arytmetycznej** jest wyrażenie:

$$s_d = \frac{s}{\sqrt{n}}$$

(5)

Jak widać błąd średniej arytmetycznej maleje wraz ze wzrostem ilości dokonanych pomiarów. Zatem, im więcej pomiarów, tym średnia arytmetyczna dokładniej odpowiada wartości prawdziwej. Zwiększenie ilości dokonywanych pomiarów jest najprostszym sposobem na dokładniejsze zmierzenie danej wielkości fizycznej i zmniejszeniem wpływu błędów przypadkowych.

**Błędy systematyczne** mogą wynikać z niedokładności przyrządów pomiarowych, ich niewłaściwej kalibracji lub obsługi (np. spieszący się stoper, odczytywania wartości na mierniku analogowym (tzw. wskazówkowym) pod niewłaściwym kontem, niewłaściwe wyzerowanie spektrofotometru, wytarowanie wagi, itp.). Cechą błędu systematycznego jest to, że się stale powtarza i posiada taki sam znak (tzn. mierzona wartość fizyczna jest stale zawyżana lub zaniżana). Dodawana wartość może być zawsze taka sama (**błąd systematyczny stały**) lub być proporcjonalna do mierzonej wartości (**błąd systematyczny zmienny**). Błąd systematycznie wpływa na uzyskaną wartość mierzonej wielkości fizycznej i nie może być wyeliminowany poprzez zwiększenie ilości pomiarów. Aby sprawdzić, czy dany przyrząd lub metoda analityczna jest obciążona błędem systematycznym należy wykonać serię kilku – kilkunastu pomiarów, obliczyć średnią i odchylenie standardowe, a następnie sprawdzić, czy obliczona średnia w sposób istotny statystycznie różni się od wartości prawdziwej. Do sprawdzenia istotnej różnicy stosuje się test t Studenta (zobacz poniżej).

**Błędy grube** zazwyczaj są spowodowane poważnymi błędami lub niestarannością pracy eksperymentatora lub wadliwym działaniem urządzenia pomiarowego. Przykłady takich błędów to np. nieprawidłowe włożenie kувety do spektrofotometru, złe nastawienie pipety automatycznej (np. odmierzenie 20  $\mu\text{l}$  cieczy zamiast 200  $\mu\text{l}$ ) itp. Zazwyczaj wynik obciążony błędem grubym znacząco różni się od pozostałych wyników. Zatem, najłatwiejszym sposobem na wykrycie błędu grubego jest wykonanie serii kilku-kilkunastu pomiarów, uporządkowanie ich rosnąco (lub malejąco) i poszukanie wśród wyników skrajnych tzw. **wyników wątpliwych** (niepewnych lub podejrzanых). Takie wyniki powinno się odrzucić z analizy. Jednak wyników wątpliwych nie powinno się odrzucać według własnego uznania. Wyniki skrajne mają duży wpływ na wartość średniej i odchylenia standardowego. Uznanie wyniku skrajnego za wątpliwy i jego odrzucenie może się przyczynić do zafałszowania obliczeń i uzyskanych wyników pomiarów. Opracowano kilka metod wykrywania wyników niepewnych. Jedną z nich jest zastosowanie określonego testu statystycznego – testu  $Q$  Dixona lub testu Grubbsa. Ze względu na prostotę najczęściej stosuje się test  $Q$  Dixona (opisany poniżej).

## Wykrywanie wyników wątpliwych – test $Q$ Dixona

Czasami się zdarza, że w uzyskanej serii pomiarów jest jeden lub dwa wyniki, których wartości znacznie odbiegają od pozostałych wyników. Takie wartości mogły się pojawić w wyniku zaistnienia błędów grubych i powinny zostać odrzucone z dalszych obliczeń, jako wyniki wątpliwe. Dlatego też jedną z pierwszych czynności wykonywanych podczas analizy danych eksperymentalnych jest zastosowanie testu statystycznego pozwalającego wykryć i wyeliminować wyniki wątpliwe. Do tego celu służy test  $Q$  Dixona, który sprawdza, czy wynik skrajny (najmniejszy lub największy) jest wynikiem wątpliwym.

W pierwszej kolejności należy uzyskane wyniki uporządkować rosnąco, a następnie policzyć odpowiednie statystyki (tzw. liczby  $Q$ ):

$$Q_l = \frac{x_2 - x_1}{R}$$

oraz:

$$Q_p = \frac{x_n - x_{n-1}}{R}$$

(6)

gdzie  $R$  to tzw. rozstęp (różnica pomiędzy wartością największą i najmniejszą):

$$R = x_{max} - x_{min}$$

$x_1$  – wynik najmniejszy (skrajny)

$x_2$  – wynik drugi w kolejności

$x_n$  – wynik największy (skrajny)

$x_{n-1}$  – wynik przedostatni.

Wynik uznaje się za wątpliwy z określonym prawdopodobieństwem i odrzuca, jeżeli wartość statystyk  $Q_l$  i  $Q_p$  jest większa od tabelarycznej tzw. **wartości krytycznej**. Poniżej w tabeli są podane wartości krytyczne pozwalające odrzucać wyniki wątpliwe na poziomie istotności  $\alpha = 5\%$ . Taki poziom istotności pozwala stwierdzić, że jeżeli wartość statystyki  $Q$  jest większa od wartości krytycznej to z prawdopodobieństwem 95% wynik skrajny jest wynikiem wątpliwym i powinien być wykluczony z dalszych analiz.

**Tab. 10.1. Wartości krytyczne  $Q_l$  dla testu Dixona.  $n$  – ilość pomiarów (wielkość próby)**

N	$Q_T$	N	$Q_T$	N	$Q_T$
3	0,941	11	0,392	21	0,295
4	0,765	12	0,376	22	0,290
5	0,642	13	0,361	23	0,285
6	0,560	14	0,349	24	0,281
7	0,507	15	0,338	25	0,277
8	0,468	16	0,329	26	0,273
9	0,437	17	0,320	27	0,269
10	0,412	18	0,313	28	0,266
		19	0,306	29	0,263
		20	0,300	30	0,260

## Test t Studenta dla jednej średniej

Test t Studenta jest jednym z podstawowych testów statystycznych. Stosowany jest on w celu sprawdzenia, czy pomiędzy dwie średnie arytmetyczne różnią się między sobą w sposób istotny statystycznie. Istnieje kilka odmian testu t Studenta. Poniżej zostanie przedstawiony **dwustronny test t Studenta o średniej arytmetycznej**, który służy do sprawdzenia, czy obliczona na podstawie **próby (zbioru uzyskanych wyników)** średnia arytmetyczna istotnie różni się od wartości teoretycznej. Zdając sobie sprawę, że studenci nie posiadają jeszcze odpowiedniej wiedzy teoretycznej z zakresu statystyki do pełnego zrozumienia idei, założeń testów statystycznych, test t Studenta zostanie przedstawiony w dużym uproszczeniu pozwalającym jednak na jego prawidłowe zastosowanie i wyciągnięcie odpowiedniego wniosku.

Test t-Studenta o średniej arytmetycznej testuje następującą tzw. **hipotezę zerową i hipotezę alternatywną**:

$$H_0: \mu = \mu_0$$

$$H_A: \mu \neq \mu_0$$

gdzie  $\mu$  jest wartością średnią z tzw. badanej **populacji** (w tym przypadku będzie to zbiór wszystkich możliwych do uzyskania wyników). Wartość  $\mu$  jest nieznaną i jest reprezentowana przez średnią  $\bar{x}$  z próby wywodzącej się z populacji (w tym przypadku próbą jest zbiór wyników uzyskanych w trakcie eksperymentu). Natomiast  $\mu_0$  jest spodziewaną **wartością teoretyczną**. W uproszczeniu, test t Studenta o średniej arytmetycznej sprawdza, czy prawdziwa jest hipoteza zerowa (brak istotnej różnicy pomiędzy uzyskaną wartością średniej a wartością teoretyczną), czy alternatywna (uzyskana wartość średniej istotnie różni się od wartości teoretycznej). Postępowanie jest następujące:

- 1) Obliczyć średnią  $\bar{x}$  i odchylenie standardowe  $s$  z uzyskanych wyników według wzorów zamieszczonych powyżej.
- 2) Obliczyć statystykę testu  $t_d$ :

$$t_d = \frac{|\bar{x} - \mu_0|}{s/\sqrt{n}}$$

(7)

- 3) Odczytać wartość krytyczną z poniższej tabeli. Do odczytania wartości krytycznej konieczna jest znajomość tzw. liczby stopni swobody **df**. W przypadku testu t Studenta o średniej arytmetycznej wartość **df** oblicza się ze wzoru:

$$df = n - 1$$

- 4) Porównać uzyskaną wartość statystyki z odczytaną wartością krytyczną. Jeżeli wartość  $t_d$  jest mniejsza od wartości krytycznej uznaje się, że uzyskana średnia nie różni się w sposób istotny od wartości teoretycznej (prawdziwa jest hipoteza zerowa). Jeżeli wartość statystyki  $t_d$  jest większa od wartości krytycznej uznaje się, że z prawdopodobieństwem  $100\% - \alpha$  (gdzie  $\alpha$  to **poziom istotności testu**) hipoteza zerowa jest nieprawdziwa i przyjmuje się hipotezę alternatywną, co jest równe ze stwierdzeniem, że uzyskana średnia istotnie różni się od wartości teoretycznej. Zazwyczaj ustala się wartość  $\alpha$  na 5%.

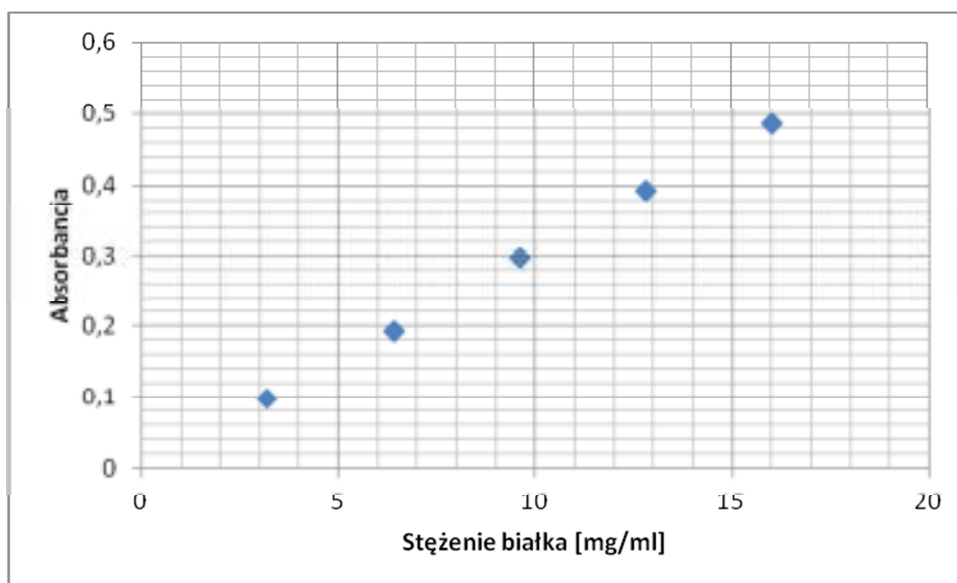
Tab. 10.2. Wartości krytyczne dla dwustronnego testu *t* Studenta dla poziomu istotności  $\alpha=5\%$ , *df* – liczba stopni swobody

df	$t_{kr}$	df	$t_{kr}$
1	12,706	18	2,101
2	4,303	19	2,093
3	3,182	20	2,086
4	2,776	21	2,080
5	2,571	22	2,074
6	2,447	23	2,069
7	2,365	24	2,064
8	2,306	25	2,060
9	2,262	26	2,056
10	2,228	27	2,052
11	2,201	28	2,048
12	2,179	29	2,045
13	2,160	30	2,042
14	2,145	40	2,021
15	2,131	60	2,000
16	2,120	120	1,980
17	2,110	$\infty$	1,960

### Kalibracja metody analitycznej

Podstawą wielu eksperymentów naukowych jest analiza składu i stężenia określonych związków (analitów) zawartych w badanej próbce, którą określa się mianem **analizy chemicznej**. Zależnie od mierzonego parametru analizę chemiczną można podzielić na **analizę jakościową** (badanie składu próbki) oraz **analizę ilościową** (badanie stężenia określonego związku). Sposób, według którego dokonuje się analizy chemicznej nazywa się **metodą analityczną**. Wiele metod analitycznych to tzw. **metody instrumentalne**, wykorzystujące użycie określonego przyrządu pomiarowego, mierzącego określone właściwości fizyko-chemiczne badanej próbki. Do takich przyrządów należą m.in. spektrometr, chromatograf, pH-metr i wiele innych. Metody instrumentalne najczęściej są tzw. metodami porównawczymi, czyli takimi, w których mierzony parametr fizyczny (np. absorbancja) jest funkcją stężenia określonego związku obecnego w badanej próbce. Przed użyciem takiej metody należy dokonać jej **kalibracji**.

**Kalibracja metody analitycznej** to szereg czynności, które mają na celu precyzyjne określenie zależności pomiędzy mierzonymi wartościami wielkości fizycznej na użytym przyrządzie, a stężeniem określonego związku w próbce. Jedną z metod kalibracji jest sporządzenie tzw. **krzywej kalibracyjnej** nazywanej również **krzywą wzorcową**. Sporządzenie krzywej kalibracyjnej zaczyna się od przygotowania szeregu roztworów wzorcowych (zazwyczaj 5-8), których stężenia powinny być tak dobrane, aby pokryć możliwie szeroki zakres możliwych stężeń analitu w badanej próbce. Następnie dokonuje się pomiarów określonej wielkości fizycznej (np. absorbancji, przewodności roztworu, pH itp.). Po wykonaniu pomiarów sporządza się wykres zależności zmierzonych wartości wielkości fizycznej (oś **Y**) od stężenia roztworów wzorcowych (oś **X**). Poniżej podany jest przykładowy wykres zależności absorbancji od stężenia białka w roztworze (Wykres 10.1).



Wykres 10.1. Zależność absorbancji od stężenia białka

Po sporządzeniu wykresu można zobaczyć, jaki charakter zależności występuje pomiędzy dwiema zmiennymi zaznaczonymi na osiach X i Y. W przyrodzie są znane różne **typy zależności** (korelacji), które ogólnie można podzielić na **zależności liniowe** i **nieliniowe**. Znając typ zależności pomiędzy dwiema zmiennymi można dopasować odpowiedni model matematyczny, który umożliwi przewidywanie wartości jednej zmiennej na podstawie wartości drugiej zmiennej. W tym przypadku, na podstawie zmierzonej wartości fizycznej (absorbancji) można obliczyć stężenie analitu (białka) w badanej próbce. Proces ustalania zależności pomiędzy badanymi zmiennymi mający na celu przewidywanie wartości jednej zmiennej na podstawie wartości innych zmiennych określa się mianem **regresji**.

Należy pamiętać, aby danej metody analitycznej używać do pomiaru stężeń analitu tylko w takim zakresie stężeń, dla którego została przygotowana krzywa kalibracyjna. Nie wiadomo bowiem, czy ten sam model matematyczny opisuje zależność pomiędzy zmiennymi w zakresie stężeń, który nie został przebadany. Na przykład, często powyżej określonych stężeń zależność pomiędzy stężeniem a mierzoną wielkością fizyczną przestaje być liniowa. Z kolei poniżej dolnej granicy może się okazać, że stężenie analitu jest zbyt niskie, aby było możliwe do wykrycia daną metodą.

Roztwory wzorcowe powinny być przygotowane w taki sam sposób, jak badana próbka (tzn. przy zastosowaniu tych samych rozpuszczalników, lub ich mieszanek, tych samych stężeń buforów i innych związków pomocniczych), gdyż otoczenie badanej substancji może mieć wpływ na wartość mierzonej wielkości fizycznej. Na przykład, absorbancja danego związku może zależeć od rodzaju rozpuszczalnika, pH roztworu, warunków oksydoredukcyjnych itp. To samo dotyczy tzw. **ślepej próby** lub **próby odniesienia**, czyli próby w której stężenie analitu wynosi 0. Stworzenie takiego samego środowiska dla badanych próbek, roztworów wzorcowych i próby odniesienia jest niezbędnym warunkiem tego, alby uzyskane wyniki były wiarygodne. Należy mieć również na uwadze, że na mierzoną wartość wielkości fizycznej mogą mieć wpływ inne związki występujące w próbce, co może prowadzić do zafałszowania uzyskiwanych wyników. Na przykład, obecność detergentów, lub związków redukujących w próbce silnie zakłóca lub wręcz uniemożliwia pomiar stężenia białka przy użyciu większości metod kolorymetrycznych (np. metody Bradforda).

## Zależności liniowe i równanie regresji liniowej

W przyrodzie bardzo często wartości różnych wielkości fizycznych są ze sobą powiązane, czyli **skorelowane**. Na przykład, absorpcja roztworu zależy od jego stężenia, szybkość fotosyntezy zależy od natężenia światła itp. Istnienie tych korelacji wynika z działania określonych praw fizyki. Zależności pomiędzy różnymi wielkościami fizycznymi często mają bardzo złożony charakter. Jednak w wielu przypadkach w pewnych zakresach wartości zależności złożone (nieliniowe) można **przybliżyć** (dokonać **aproksymacji**) zależnościami prostszymi. Jedną z najczęściej stosowanych aproksymacji jest aproksymacja do zależności liniowej. O zależnościach liniowych mówi się wtedy, gdy wartości dwóch zmiennych (np. absorpcja i stężenie związku) są do siebie proporcjonalne. Zależność liniowa jest opisywana równaniem liniowym:

$$Y = aX + b \quad (8)$$

gdzie  $a$  i  $b$  to współczynniki równania liniowego nazywane odpowiednio współczynnikiem kierunkowym i wyrazem wolnym.

Równanie prostej liniowej i regresja liniowa (sporządzenie modelu liniowego) są bardzo często wykorzystywane przy sporządzaniu krzywych kalibracyjnych. Jest to związane z tym, że zazwyczaj w pewnym zakresie stężeń mierzona wartość fizyczna jest proporcjonalna do stężenia badanego związku. Innymi słowy, pomiędzy tymi dwiema zmiennymi istnieje **zależność liniowa**. W przypadku metody analitycznej wartość współczynnika  $b$  określa wartość mierzonej wielkości fizycznej dla tzw. **próby odniesienia**. W wielu przypadkach wartość współczynnika  $b$  powinna wynosić 0. Przykładowo, absorpcja dla próby odniesienia przy dobrze wyzerowanym spektrofotometrze powinna wynosić 0. Współczynnik kierunkowy  $a$  opisujący nachylenie krzywej wzorcowej jest jednocześnie miarą czułości metody – im metoda jest czulsza, tym większa wartość współczynnika  $a$ .

Znając współczynniki  $a$  i  $b$  można na podstawie zmierzonej wartości fizycznej (np. absorpcji) obliczyć stężenie określonego związku (np. białka) w badanej próbce. Współczynniki  $a$  i  $b$  można obliczyć stosując metodę najmniejszych kwadratów. Poniżej przedstawione są odpowiednie wzory:

$$a = \frac{n \sum_{i=1}^n x_i y_i - \sum_{i=1}^n x_i \sum_{i=1}^n y_i}{n \sum_{i=1}^n x_i^2 - (\sum_{i=1}^n x_i)^2} \quad (9)$$

$$b = \frac{\sum_{i=1}^n y_i \sum_{i=1}^n x_i^2 - \sum_{i=1}^n x_i \sum_{i=1}^n x_i y_i}{n \sum_{i=1}^n x_i^2 - (\sum_{i=1}^n x_i)^2} \quad (10)$$

gdzie

$n$  – ilość sporządzonych wzorców

$x_i$  – stężenie kolejnego wzorca

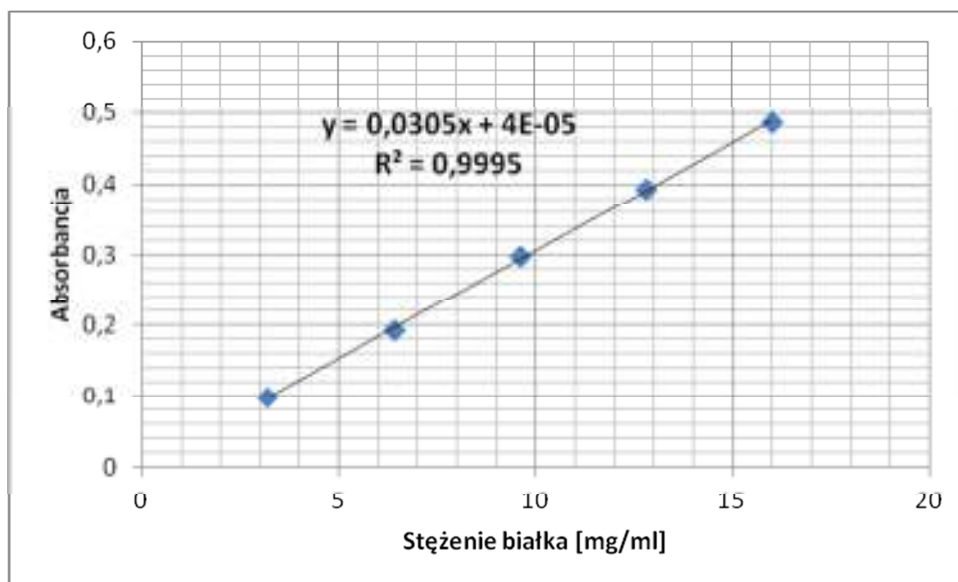
$y_i$  – zmierzona wartość wielkości fizycznej

Po obliczeniu współczynników  $a$  i  $b$  można w łatwy sposób przewidywać wartość jednej zmiennej znając wartość drugiej zmiennej. Przykładowo, po pomiarze absorpcji  $A$  stężenie analitu  $c$  można policzyć ze wzoru:



$$c = \frac{A - b}{a} \quad (11)$$

Wykres 10.2 poniżej przedstawia zmierzoną zależność absorbancji od stężenia białka z dopasowanym równaniem regresji liniowej.



Wykres 10.2. Zależność absorbancji od stężenia białka. Dodano linię równania regresji liniowej (tzw. linia trendu) wraz z obliczonymi współczynnikami równania liniowego i współczynnikiem determinacji  $R^2$ .

### Ocena jakości krzywej kalibracyjnej

Ostatnim etapem kalibracji metody jest ocena jakości przygotowanej krzywej. Istnieje kilka różnych parametrów oceny przygotowanej krzywej kalibracyjnej. W idealnym przypadku wyznaczone eksperymentalnie punkty na wykresie krzywej kalibracyjnej powinny być położone na linii wyznaczonej równaniem regresji. Jednakże w wyniku błędów popełnianych podczas sporządzania krzywej kalibracyjnej często wyznaczone punkty na krzywej odstają w mniejszym lub większym stopniu od równania regresji. Im większe odstępstwa tym większy błąd jest popełniany przy odczytywaniu wartości jednej zmiennej (np. stężenia białka) na podstawie wartości drugiej zmiennej (np. absorbancji). W przypadku regresji liniowej istnieje kilka sposobów na sprawdzenie jakości sporządzonej krzywej kalibracyjnej.

Jednym z parametrów opisujących jakość krzywej kalibracyjnej dla regresji liniowej jest współczynnik determinacji  $R^2$ . Współczynnik ten jest kwadratem współczynnika korelacji liniowej  $R$  liczonego ze wzoru:

$$R = \frac{n \sum_{i=1}^n (x_i \cdot y_i) - (\sum_{i=1}^n x_i \cdot \sum_{i=1}^n y_i)}{\sqrt{(n \sum_{i=1}^n x_i^2 - (\sum_{i=1}^n x_i)^2)(n \sum_{i=1}^n y_i^2 - (\sum_{i=1}^n y_i)^2)}} \quad (12)$$

Współczynnik korelacji liniowej  $R$ , w jakim stopniu wartości dwóch cech lub wielkości fizycznych są ze sobą zależne w sposób liniowy. Zawiera się on w przedziale  $(-1;1)$ , przy czym wartość 0 oznacza całkowity brak zależności, wartość 1 oznacza pełną zależność prostą, a wartość -1 oznacza zależność odwrotną (korelację ujemną lub antykorelację).

Współczynnik determinacji wyrażony w procentach jest miarą dopasowania danych eksperymentalnych do modelu regresji liniowej. Jego wartość określa, jaka część zmienności jednej zmiennej (np. absorbancji) może być wyjaśniona zmiennością drugiej zmiennej (np. stężenia analitu). Przykładowo, wartość  $R^2 = 0,99$  oznacza, że 99% zmienności jednej zmiennej może być wyjaśnione zmiennością drugiej zmiennej. 1% to wpływ innych czynników. W tym przypadku będą to głównie błędy popełnione podczas sporządzania krzywej kalibracyjnej. Dla dobrej jakości krzywej wartość  $R^2$  powinna wynosić przynajmniej 0,999.

Innym parametrem określającym jakość krzywej kalibracyjnej jest odchylenie resztkowe (nazywane również średnim odchyleniem od prostej), które miarą niepewności wyników w krzywej wzorcowej. Średnie odchylenie jest tym większe im większa jest odległość eksperymentalnie wyznaczonych punktów na wykresie od punktów teoretycznych wyznaczonych przez równanie regresji liniowej. Oblicza się je ze wzoru:

$$s_0 = \sqrt{\frac{1}{n-2} \left( \sum_{i=1}^n \varepsilon_i^2 \right)}$$

(13)

gdzie:

$$\varepsilon_i = y_i - ax_i - b$$

Im większa wartość średniego odchylenia od prostej tym gorsza jakość sporządzonej krzywej kalibracyjnej. Stosowanie średniego odchylenia od prostej do szacowania jakości krzywej wzorcowej jest dużo mniej intuicyjne i jest ono używane w głównej mierze do obliczania niepewności (błędów) współczynników  $a$  i  $b$  równania liniowego:

$$s_a = s_0 \cdot \sqrt{\frac{n}{n \cdot \sum_{i=1}^n x_i^2 - (\sum_{i=1}^n x_i)^2}} \quad s_b = s_0 \cdot \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n x_i^2}{n \cdot \sum_{i=1}^n x_i^2 - (\sum_{i=1}^n x_i)^2}}$$

(14)

Wartości  $s_a$  i  $s_b$  wykorzystuje się do sprawdzenia, czy wartości współczynników  $a$  i  $b$  istotnie różnią się od zakładanych wartości teoretycznych (jeśli takie istnieją). Najczęściej sprawdza się, czy współczynnik  $b$  istotnie różni się od 0.

Błąd przypadkowy dla wartości zmiennej  $x$  (tj. stężenia analitu) odczytywanej przy użyciu krzywej kalibracyjnej jest określony wzorem:

$$s = \frac{s_0}{a} \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{n} + \frac{(y_k - y_{sr})^2}{a^2 \cdot (\sum_{i=1}^n x_i^2 - n \cdot x_{sr}^2)}}$$

(15)

gdzie

$n$  – ilość wzorców;

$m$  – ilość pomiarów dla każdego wzorca;  
 $y_{\text{sr}}$  – średnia wartość zmierzonej wielkości fizycznej (np. absorbancji) dla wzorców;  
 $y_{\text{sr}}$  – średnia wartość stężenia wzorców;  
 $y_k$  – średnia wartość zmierzonej wielkości fizycznej (np. absorbancji) dla badanej próbki.

Ze wzoru (15) wynika, że błąd popełniany przy odczycie stężenia analitu jest:

- proporcjonalny do średniego odchylenia od prostej regresji. Zatem, im dokładniej sporządzona krzywa, tym mniejszy błąd wartości stężenia analitu odczytywanego przy jej wykorzystaniu;
- odwrotnie proporcjonalny do współczynnika  $a$ . Zatem, im czulsza metoda, tym dokładniej można zmierzyć stężenie analitu;
- tym mniejszy im więcej wzorców użyto do sporządzenia krzywej kalibracyjnej;
- tym mniejszy im więcej razy była odczytywana wartość wielkości fizycznej (np. absorbancji) dla danego stężenia wzorca.
- błąd odczytywanej wartości stężenia analitu zależy od doboru stężeń wzorcowych. Stężenia wzorcowe powinny być dobrane tak, aby możliwie równomiernie pokrywać dany zakres krzywej wzorcowej;
- przy równomiernie rozłożonych stężeniach wzorcowych najmniejszy błąd odczytu z krzywej kalibracyjnej jest dla wartości  $y_k$  leżącej pośrodku krzywej kalibracyjnej. Im wartość mierzonej wartości fizycznej dla badanej próbki jest bliższa jednemu z końców krzywej, tym większy błąd odczytywanej wartości stężenia analitu.

## 10.2. PIPETOWANIE

Pipeta automatyczna jest urządzeniem, które służy do precyzyjnego odmierzenia określonej objętości cieczy. Jest to jedno z najbardziej podstawowych i najczęściej wykorzystywanych narzędzi w laboratorium biologii molekularnej i biotechnologii. Wyróżnić można dwa typy pipet: pipety o stałej objętości dozowanej cieczy i o zmiennej objętości dozowanej cieczy (pipety nastawne). Pipety nastawne obecnie są znacznie popularniejsze w użyciu, gdyż umożliwiają odmierzenie dowolnej objętości cieczy w obsługiwanym zakresie. Dwa najważniejsze elementy pipety to pokrętko do ustawiania żądanej objętości (w przypadku pipety nastawnej) oraz tłoczek, za pomocą którego pobiera się i wypuszcza określoną objętość cieczy. Pipeta posiada określony zakres pipetowanej objętości (np. 20-200  $\mu\text{l}$ , 100-1000  $\mu\text{l}$ ). Tak więc, do odmierzenia określonej objętości należy dobrać pipetę w odpowiednim zakresie pipetowania. Należy przy tym pamiętać, że bardziej precyzyjnie odmierza objętość przy jej górnym zakresie niż przy dolnym. Jeżeli masz do dyspozycji dwie pipety (np. o zakresie 2-20  $\mu\text{l}$  i 10-100  $\mu\text{l}$ ) to do pobrania np. 15  $\mu\text{l}$  cieczy lepiej użyć pipety o mniejszym zakresie (15  $\mu\text{l}$  jest przy jej górnym zakresie) niż o większym zakresie (15  $\mu\text{l}$  jest przy jej dolnym zakresie).

Prawidłowe korzystanie z pipety automatycznej nie jest takie proste i wymaga pewnej wprawy i znajomości kilku zasad, bez przestrzegania których odmierzone objętości będą obarczone dużym błędem. Stan pipety automatycznej i prawidłowość odmierzanej cieczy należy okresowo sprawdzać i w razie potrzeby pipetę należy kalibrować. Można to zrobić samodzielnie (niezalecane dla początkujących osób) lub skorzystać z usług wyspecjalizowanego serwisu. Poniżej przedstawiono dwa sposoby pipetowania pozwalające na prawidłowe pobranie określonej objętości cieczy: pipetowanie proste i odwrotne (różnicowe). Pipetowanie różnicowe jest zalecany w przypadku pipetowania bardzo małych objętości lub w przypadku pipetowania cieczy o zwiększonej lepkości.

### PIPETOWANIE PROSTE

1. Nałóż odpowiednią końcówkę.
2. Naciśnij tłoczek pipety do **pierwszego** oporu.
3. Zanurz końcówkę pipety pod powierzchnię pipetowanej cieczy na głębokość kilku milimetrów (nie należy wkładać końcówki głęboko pod powierzchnię, gdyż po jej wyjęciu na zewnętrznych ściankach może zostać duża ilość cieczy, która znacząco zwiększy niedokładność pipetowania).
4. Delikatnie zwolnij tłoczek i chwilę odczekaj (2 sekundy).
5. Wyjmij końcówkę dotykając brzegów naczynia (pozwoli to na łatwe usunięcie nadmiaru cieczy, który zgromadził się na zewnętrznych ściankach końcówki).
6. Przenieś pobraną ciecz do naczynia docelowego i naciśnij tłoczek do **pierwszego** oporu. Końcówka pipety powinna dotykać ścianki naczynia.
7. Naciśnij tłoczek do **drugiego** oporu (pozwala na usunięcie resztek cieczy z końcówki i wyjmij pipetę z naczynia).
8. Zwolnij tłoczek i usuń końcówkę.

### ZALECENIA DODATKOWE

- Przed właściwym pipetowaniem zalecane jest kilkukrotne (3-5 razy) przepłukanie końcówki pipetowaną cieczą. Jest to szczególnie ważne przy pipetowaniu cieczy lepkich i mających gęstość inną niż woda;
- W miarę możliwości pipety, końcówki oraz pipetowane ciecze powinny mieć zrównoważone temperatury;
- Pipety używaj wyłącznie z odpowiednio nałożoną końcówką;
- Zawsze używaj końcówek przeznaczonych do danego typu i modelu pipety;

- Podczas pipetowania pipeta powinna być trzymana pionowo;
- Ciecz pobieraj powolnym, płynnym ruchem tłoczka. Gwałtowne puszczenie tłoczka może spowodować zassanie cieczy do wnętrza pipety i jej nieodwracalne uszkodzenie lub konieczność czyszczenia i kalibracji!
- Nigdy nie kładź pipety z nabrałą cieczą poziomo. Ciecz może wlać się do wnętrza pipety!
- Nigdy nie odkładaj pipety na brzegu stołu, tak aby wystawała poza obręb stołu. Taką pipetę można przypadkowo strącić na ziemię, co może doprowadzić do jej nieodwracalnego uszkodzenia!
- Nie trzymaj pipety w ręce bez potrzeby. Powoduje to jej niepotrzebne ogrzewanie. Poza tym taka pipeta może przypadkowo wypaść z rąk.
- Nigdy nie nastawiaj objętości poza wyznaczoną skalę, gdyż może to doprowadzić do rozkalibrowania pipety lub jej uszkodzenia.
- W przypadku pipetowania lepkiej cieczy końcówkę z zewnątrz można delikatnie wytrzeć ręcznikiem papierowym (usunięcie nadmiaru cieczy).
- Nie zanurzaj pipety głęboko w pipetowanej cieczy, gdyż na zewnętrznych ściankach może gromadzić się dodatkowa porcja cieczy, co zwiększa niedokładność pipetowania.
- Pamiętaj o zmianie końcówek przy pipetowaniu różnych odczynników, aby nie spowodować ich zanieczyszczenia.
- Pamiętaj, aby podczas dozowania cieczy nie zanurzać końcówki (nie dotyczy pipetowania małych objętości). W przypadku dozowania małych objętości (kilkadziesiąt mikrolitrów i mniej) można końcówką pipety dotknąć powierzchni cieczy (ale nie zanurzać końcówki głęboko pod powierzchnię).

### 10.2.1. Nauka prawidłowego i dokładnego pipetowania

Celem ćwiczenia jest nauka prawidłowego korzystania z nastawnej pipety automatycznej.

#### *Postępowanie*

Do 5 ependorfeek odpipetować następujące ilości poszczególnych barwników:

nr próby	orańż G [ $\mu$ l]	błękit bromofenolowy [ $\mu$ l]	ksylenocyjanol [ $\mu$ l]
1	20	100	30
2	50	40	60
3	50	100	—
4	90	—	60
5	80	70	—

W każdej ependorfce powinno być 150  $\mu$ l cieczy. Ustaw pipetę na taką objętość i pobierz zawartość ependorfki. Sprawdź, czy w ependorfce pozostała ciecz, czy też jej zabrakło (w końcówce pipety pojawił się bąbel powietrza). Swoje obserwacje skonsultuj z prowadzącym ćwiczenia. W przypadku dużych błędów w pipetowaniu powtórz ćwiczenie.

#### *Materiały i odczynniki*

- Pipeta automatyczna w zakresie 20-200  $\mu$ l
- Probówki typu Eppendorf 1,5 ml (ependorfki)
- Końcówki do pipet
- Roztwory barwników: 0,25% Oranż G, 0,25% błękit bromofenolowy oraz 0,25% ksylenocyjanol

### 10.2.2. Sprawdzanie kalibracji pipety automatycznej

Celem ćwiczenia jest zapoznanie się ze sposobem sprawdzania kalibracji pipety nastawnej.

#### *Postępowanie*

1. Ustaw pipetę na 100  $\mu\text{l}$ .
2. Dziesięć razy dozuj wodę destylowaną do zlewki umieszczonej na wadze za każdym razem zapisując masę wody.
3. Powtórz to samo dla objętości 500  $\mu\text{l}$  i 1000  $\mu\text{l}$ .

#### *Opracowanie wyników*

1. Przelicz masę wody na jej objętość (gęstość wody w temp 20°C wynosi 0,9982 g/cm<sup>3</sup>).
2. Dla każdej serii danych zastosuj test Q-Dixona, aby wyeliminować ewentualne błędy grube.
3. Dla każdego zakresu oblicz:
4. Maksymalny rozrzut
5. Średnią;
6. Odchylenie standardowe (niepewność pojedynczego pomiaru) i błąd standardowy (niepewność średniej 10 pomiarów);
7. Testem t-Studenta sprawdź, czy uzyskane średnie istotnie różnią się od wartości oczekiwanych (ustawionych wartości pipety).
8. Porównaj uzyskane wyniki (maksymalny rozrzut, średnia i odchylenie standardowe) z wynikami uzyskanymi przez inne grupy i wyciągnij wnioski.

#### *Materiały*

- Pipeta automatyczna w zakresie 100-1000  $\mu\text{l}$
- Końcówki do pipet
- Woda
- Naczynie wagowe
- Waga

### 10.2.3. Pomiar gęstości roztworu sacharozy

Celem ćwiczenia jest nauka pipetowania roztworów o dużej gęstości.

#### *Postępowanie*

1. Sporządź 50 g 40% roztworu sacharozy.
2. Ustaw pipetę na 1000  $\mu\text{l}$ .
3. Dziesięć razy dozuj roztwór sacharozy do zlewki umieszczonej na wadze za każdym razem zapisując masę roztworu. Do dozowania zastosuj pipetowanie odwrotne. Pamiętaj, aby przez dozowaniem wytrzeć z zewnątrz końcówkę pipety.

#### *Opracowanie wyników*

1. Dla każdego wyniku oblicz gęstość roztworu sacharozy.
2. Zastosuj test Q-Dixona, aby wyeliminować ewentualne błędy grube.
3. Oblicz:
4. Średnią gęstość;
5. Odchylenie standardowe (niepewność pojedynczego wyniku) i błąd standardowy (niepewność średniej 10 pomiarów);
6. Testem t-Studenta sprawdź, czy uzyskana średnia wartość istotnie różni się od wartości oczekiwanej (gęstość 40% roztworu sacharozy w 20°C wynosi 1176,48 kg/m<sup>3</sup>).

7. Porównaj uzyskane wyniki (średnia i odchylenie standardowe) z wynikami uzyskanymi przez inne grupy i wyciągnij wnioski.

#### *Materiały*

- Pipeta automatyczna w zakresie 100-1000  $\mu\text{l}$
- Końcówki do pipet
- Woda
- Sacharoza
- Naczynie wagowe
- Waga
- Mieszadło magnetyczne

#### *Literatura*

Szczepaniak W. „Metody instrumentalne w analizie chemicznej”. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2002, Rozdziały 1, 2 i 3.

### **10.2.4. Wyznaczanie krzywej standardowej związku barwnego metodą najmniejszych kwadratów**

Ćwiczenie ma na celu wyznaczenie, metodą najmniejszych kwadratów, krzywej standardowej dla DCIP (dichlorofenyloindofenol).

#### *Postępowanie*

1. W probówkach, na podstawie tabeli, sporządzić po 10 ml roztworów DCIP o różnych stężeniach molowych.

nr próby	objętość 100 $\mu\text{M}$ DCIP [ml]	H <sub>2</sub> O [ml]	końcowe teoretyczne stężenie DCIP [ $\mu\text{M}$ ]
1	0,5	9,5	5
2	1,0	9,0	10
3	1,5	8,5	15
4	2,0	8,0	20
5	2,5	7,5	25
6	3,5	6,5	35
7	4,5	5,5	45
8	5,0	5,0	50
9	6,0	4,0	60
10	7,0	3,0	70

2. Przed przystąpieniem do pomiarów należy napełnić kufkę wodą i przy długości fali 600 nm ( $A_{600}$ ) ustawić wartość absorpcji, wskazywaną przez spektrofotometr na 0.
3. Z każdej próbki pobrać kolejno do kufki spektrofotometrycznej (zaczynając od najniższego stężenia) po 1,5 ml roztworu i zmierzyć, za pomocą spektrofotometru, absorpcję przy długości fali 600 nm. Pomiar wartości absorpcji należy powtórzyć pięciokrotnie, po każdym odczycie kufkę należy opłukać wodą i dokładnie osuszyć.

### Opracowanie wyników

1. Wyniki pomiarów należy umieścić w tabeli, wiedząc że  $\epsilon$  dla DCIP przy  $\lambda = 600 \text{ nm}$  wynosi  $16\,100 \text{ dm}^3/\text{mol cm}$ .

końcowe teoretyczne stężenie DCIP [ $\mu\text{M}$ ]	$A_{600}$						końcowe stężenie DCIP wyznaczone na podstawie $A_{600}$ [ $\mu\text{M}$ ]
	$A_1$	$A_2$	$A_3$	$A_4$	$A_5$	$A_{\text{średnia}}$	
5							
10							
15							
20							
25							
35							
45							
50							
60							
70							

2. Na podstawie tabeli wykreślić, na papierze milimetrowym, krzywą dla zależności średniej absorpcji przy  $\lambda = 600 \text{ nm}$  ( $y$ ) od stężenia DCIP ( $x$ ).
3. Wyznaczyć metodą najmniejszych kwadratów prostą (krzywą standardową), podać równanie prostej regresji oraz współczynnik korelacji dla zależności  $A_{600\text{nm}} = f(\text{mM DCIP})$ . Umieścić wyznaczoną krzywą standardową na wykresie przygotowanym w podpunkcie 2. Obliczenia załączyć do sprawozdania.
4. Obliczyć odchylenie standardowe dla wyznaczonej krzywej wzorcowej.

### Materiały i odczynniki

- 100  $\mu\text{M}$  wodny roztwór DCIP (dichlorofenyloindofenol)
- 10 probówek szklanych
- pipeta automatyczna o zakresie od 100 do 1 000  $\mu\text{l}$
- pipeta automatyczna o zakresie od 1 do 5 ml
- plastikowe kuwety spektrofotometryczne o pojemności 1,5 ml
- spektrofotometr VIS



### 10.2.5. Wykorzystanie metody najmniejszych kwadratów do sporządzenia krzywej wzorcowej do oznaczania ilości białka metodą Bradforda

Bradford M.M (1976) Anal. Biochem. 72, 248-250

#### Postępowanie

1. W probówkach, na podstawie tabeli, sporządzić po 9 ml roztworów, zawierających różne ilości BSA z odczynnikiem Bradforda.

nr próby	ilość roztworu BSA [μl]	H <sub>2</sub> O [μl]	odczynnik Bradforda [ml]
1	0	300	2,7
2	15	285	8,7
3	30	270	
4	45	255	
5	60	240	
6	120	180	

2. Przed przystąpieniem do pomiarów należy dodać do kuwety 3 ml roztworu z próbki 1 (próba zerowa) i przy długości fali 595 nm ustawić wartość absorpcji, wskazywaną przez spektrofotometr, na 0.
3. Z każdej próbki pobrać kolejno do kuwety spektrofotometrycznej po 3 ml roztworu (od próbki nr 2 do nr 6) i zmierzyć, za pomocą spektrofotometru, absorpcję przy długości fali 595 nm. Pomiar wartości absorpcji należy powtórzyć trzykrotnie, po każdym odczycie kuwetę należy opłukać wodą i dokładnie osuszyć.

#### Opracowanie wyników

1. Wyniki pomiarów należy umieścić w poniższej tabeli.

μg BSA	A <sub>595</sub>			
	A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>	A <sub>3</sub>	A <sub>średnia</sub>
5				
10				
15				
20				
40				

2. Na podstawie tabeli wykreślić, na papierze milimetrowym, krzywą dla zależności średniej absorpcji przy  $\lambda = 595$  nm ( $y$ ) od ilości BSA ( $x$ ). Uwzględnić, że gdy w mierzonej próbce nie ma białka, w warunkach naszego doświadczenia wartość  $A_{595\text{nm}} = 0$ .
3. Wyznaczyć metodą najmniejszych kwadratów prostą (krzywą standardową), podać równanie prostej regresji oraz współczynnik korelacji dla zależności  $A_{595\text{nm}} = f(\mu\text{g BSA})$ . Umieścić wyznaczoną krzywą standardową na wykresie przygotowanym w podpunkcie 2. Obliczenia załączyć do sprawozdania.
4. Obliczyć odchylenie standardowe dla wyznaczonej krzywej wzorcowej.
5. Na podstawie krzywej wzorcowej wyznaczonej metodą najmniejszych kwadratów wyznaczyć stężenie białka i wyrazić je w mg/ml dla roztworu, którego absorpcja przy  $\lambda = 595$  nm wynosi 0,42. Porównać tą wartość z wartością wyznaczoną graficznie na podstawie krzywej z punktu 2.

#### *Materiały i odczynniki*

- wodny roztwór BSA o stężeniu 1 mg/ml
- odczynnik Bradforda
- 6 probówek szklanych
- pipeta automatyczna o zakresie od 10 do 100  $\mu$ l
- pipeta automatyczna o zakresie od 100 do 1 000  $\mu$ l
- pipeta automatyczna o zakresie od 1 do 5 ml
- kuwety spektrofotometryczne plastikowe o pojemności 3,5 ml
- spektrofotometr VIS

#### **10.2.6. Rozkład normalny wysokości pędów i ilości liści siewek grochu**

Ćwiczenie ma na celu wykonanie rozkładu normalnego cech osobniczych dla populacji siewek grochu.

#### *Postępowanie*

1. Zmierzyć, z dokładnością do 1 mm, wysokość pędów 100 losowo wybranych siewek grochu.
2. Policzyć liczbę liści dla każdej rośliny z puli losowo wybranej przez prowadzącego.

#### *Opracowanie wyników*

1. Na podstawie zebranych danych wykreślić, na papierze milimetrowym, krzywą przedstawiającą zależność liczby roślin o danej wysokości pędu a wysokością pędu.
2. Wykonać, analogiczny do opisanego w punkcie pierwszym, wykres dla zależności liczby liści od liczby roślin posiadających daną liczbę liści.
3. Dla wysokości pędu i liczby liści obliczyć wartość średniej populacji „ $\mu$ ” oraz odchylenia standardowego populacji „ $\sigma$ ”. Na podstawie tych danych zaznaczyć na wykresach z podpunktów 1 i 2 przedział ufności oraz przedziały krytyczne. Obliczyć i wyrazić w % zmienność osobniczą dla obu cech w badanej populacji grochu.

#### *Materiały*

- taca z siewkami grochu
- linijka z dokładnością do 1 mm

## 10.3. WIROWANIE

### 10.3.1. Izolacja chloroplastów

Celem ćwiczenia jest zapoznanie się z podstawowymi metodami frakcjonowania komórki przy użyciu homogenizacji, wirowania oraz wirowania w gradiencie sacharozy. Podczas ćwiczenia studenci wyizolują chloroplasty z liści groszku i sprawdzą ich aktywność.

#### *Postępowanie*

#### **Sporządzanie roztworów**

##### **Bufor do homogenizacji (250 ml)**

Do 200 ml dejonizowanej wody dodaj:

0,35 M Sorbitol	15,95 g
50 mM Tris-HCl (pH 8,0)	12,5 ml 1 M Tris-HCl
5 mM EDTA	2,5 ml 0,5 M EDTA
0.1% BSA	250 mg

Po rozpuszczeniu wszystkich składników uzupełnij dejonizowaną wodą do 250 ml. Przed użyciem dodaj 250  $\mu$ l  $\beta$ -merkaptioetanolu.

##### **Bufor do płukania (150 ml)**

Do 80 ml dejonizowanej wody dodaj:

0,35 M Sorbitol	9,57 g
50 mM Tris-HCl (pH 8,0)	7,5 ml 1 M Tris-HCl
2,5 mM EDTA	0,75 ml 0,5 M EDTA

Po rozpuszczeniu wszystkich składników uzupełnij wodą do 150 ml.

##### **52% roztwór sacharozy (100 ml)**

Do 50 ml dejonizowanej wody dodaj:

Sacharoza	52 g
50 mM Tris-HCl (pH 8,0)	5 ml 1 M Tris-HCl
2,5 mM EDTA	0,5 ml 0,5 M EDTA

Po rozpuszczeniu wszystkich składników uzupełnij wodą do 100 ml. W przypadku niecałkowitego rozpuszczenia sacharozy zlewkę lekko podgrzej.

##### **30% roztwór sacharozy (100 ml)**

Do 50 ml dejonizowanej wody dodaj:

Sacharoza	30 g
50 mM Tris-HCl (pH 8,0)	5 ml 1 M Tris-HCl
2,5 mM EDTA	0,5 ml 0,5 M EDTA

Po rozpuszczeniu wszystkich składników uzupełnij wodą do 100 ml.

Wszystkie roztwory po sporządzeniu należy schłodzić w lodzie.

##### **Przygotowanie gradientu sacharozy**

Do próbówki wirówkowej 28 ml nanieś na dno 10 ml 52% roztworu sacharozy. Następnie ostrożnie nanieś 10 ml 30% roztworu sacharozy. Przygotowane gradienty trzymaj w lodzie do czasu ich użycia.

### **Preparacja chloroplastów**

1. Z siewek grochu zbierz 50 g młodych zdrowych liści.
2. Liście umieść w schłodzonym homogenizatorze.
3. Dodaj 250 ml buforu do homogenizacji i homogenizuj 30s.
4. Homogenizat przefiltruj przez tetrową pieluchę.
5. Homogenizat przenieś do czterech probówek wirówkowych 60 ml.
6. Wiruj przez 5 minut przy 1000g w 4°C.
7. Zlej supernatant, a osad delikatnie zawieś pędzelkiem w 5 ml buforu do płukania.
8. Zawiesinę ostrożnie nanieś na przygotowany gradient sacharozy.
9. Wiruj przez 45 minut przy 5500g w 4°C w rotorze horyzontalnym.
10. Przyjrzyj się rozmieszczeniu zielonych prążków na uzyskanym gradiencie. Używając pipetki pasterowskiej delikatnie zbierz chloroplasty z granicy faz 52%/30% i przenieś do nowej probówki wirówkowej.
11. Dodaj 15 ml buforu płuczącego. Zawartość probówki delikatnie wymieszaj i wiruj przez 15 minut przy 1500g w 4°C.
12. Ostrożnie usuń supernatant.
13. Preparat zawieś w 0,5 ml wody destylowanej.

### **Wyznaczanie widma chlorofilu**

1. Do probówki wlej 6 ml 80% acetonu i zawieś w nim 30  $\mu$ l uzyskanego preparatu chloroplastów.
2. Po 5 minutach inkubacji zawartość probówki przefiltruj przez krążek z bibuły filtracyjnej.
3. Zmierz widmo przygotowanego preparatu w zakresie światła widzialnego.

### *Opracowanie wyników*

1. Narysuj schemat gradientu sacharozy po wirowaniu. Opisz, jakie składniki komórki znajdują się na poszczególnych poziomach gradientu.
2. Narysuj widmo chlorofilu i podaj długości fal, przy których występują maksima absorpcji.
3. Napisz, jaką rolę pełnią poszczególne składniki buforów i roztworów używanych podczas preparacji chloroplastów.
4. Napisz, jakie procesy zachodzą w kolejnych etapach preparacji chloroplastów.

### *Materiały i odczynniki*

- Pipety automatyczne
- Pipety pasterowskie
- Zlewki
- Cylindry miarowe
- Lejek
- Bibuła filtracyjna
- Kuwety szklane lub kwarcowe
- Mieszadła magnetyczne
- Końcówki do pipet
- Sacharoza
- Dwutygodniowe siewki groszku.
- Sacharoza
- Sorbitol
- 1 M Tris-HCl, pH 8,0
- 0,5 M EDTA, pH 8,0
- Bufor DCIP (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 50 mM sacharoza, 50 mM KCl, 0,5 mM DCIP)
- 80% aceton

### *Literatura*

Jóźwiak Z, Bartosz G. „Biofizyka. Wybrane zagadnienia wraz z ćwiczeniami”. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2005, Rozdział 10

### **10.3.2. Otrzymanie preparatu tylakoidów z materiału roślinnego metodą wirowania różnicowego**

#### *Postępowanie*

1. Dwutygodniowe siewki grochu obrać dokładnie z liści. Liście zważyć i umieścić w homogenizatorze kielichowym.
2. Na każde 50 g liści dodać 250 ml zimnego (4°C) buforu **A** (bufor izotoniczny). Liście dobrze zanurzyć w buforze i homogenizować przez 30 s.
3. Uzyskany homogenat przesączyć przez fizelinę lub poczwórnie złożoną tetwę do zlewki umieszczonej w lodzie w celu usunięcia resztek niehomogenizowanego materiału roślinnego.
4. Z przesączu pobrać 5 ml preparatu (zawierającego chloroplasty) do próbówki, umieścić w lodzie i zachować do dalszych ćwiczeń.
5. Uzyskaną zawiesinę materiału komórkowego przenieść do schłodzonych probówek wirówkowych o pojemności 60 ml.
6. Probówki zrównoważyć parami. Tak przygotowany materiał wirować przez 5 minut w rotorze kątowym w temperaturze 4°C przy obrotach zapewniających przyspieszenie rzędu  $1\ 000 \times g$ . W wyniku wirowania uzyskujemy osad chloroplastów oraz supernatant zawierający pozostałe elementy komórki.
7. Supernatant usuwamy a osad chloroplastów zawieszamy bardzo dokładnie w 10 ml zimnego buforu **B** (bufor hipotoniczny), używając do tego pędzelka.
8. Zawieszony osad przenosimy do dwóch czystych probówek wirówkowych o pojemności 60 ml, dodajemy 40 ml buforu **B** a następnie probówki równoważymy.
9. W wyniku 3 minutowej inkubacji następuje pękanie chloroplastów i uwalnianie tylakoidów. Po zrównoważeniu wirujemy 30 sekund w temp. 4°C przy przyspieszeniu wynoszącym  $1\ 000 \times g$ .
10. Ponownie uzyskujemy osad oraz supernatant, który delikatnie i ostrożnie zlewamy do czystych probówek. Probówki równoważymy używając do tego buforu B i wirujemy kolejny raz w temp. 4°C przy przyspieszeniu wynoszącym  $3\ 000 \times g$  przez 10 minut.
11. Uzyskany preparat tylakoidów zachowujemy do następnego ćwiczenia cały czas trzymając go w lodzie.

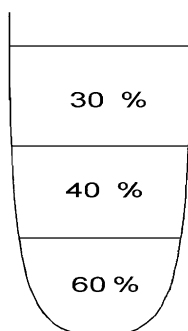
#### *Materiały i odczynniki*

- dwutygodniowe siewki grochu
- bufor **A** do homogenizacji materiału roślinnego: 50 mM Tris-HCl pH 7,5 z 0,3 M sacharozą, 10 mM NaCl
- bufor **B** do przemywania: 50 mM Tris-HCl, pH 7,5 z 50 mM sacharozą, 10 mM NaCl
- probówki wirówkowe o pojemności 60 ml
- pędzel, fizelina lub tetra
- roztwory sacharozy o następujących stężeniach: 10% (w/w), 30% (w/w), 40% (w/w), 60% (w/w)

### 10.3.3. Skokowy gradient gęstości sacharozy

#### Postępowanie

1. Do trzech zlewek odmierzyć po 20 ml roztworów sacharozy o stężeniach 30, 40 i 60%.
2. Za pomocą pipety Pasteur'a nanieść na dno probówki wirówkowej 20 ml roztworu sacharozy o stężeniu 60% tak aby nie zwilżyć ścianek probówki nad roztworem.
3. Następnie na roztwór 60% sacharozy nanieść pipetką 20 ml roztworu 40%. Roztwór nanosić powoli, aby warstwy sacharozy nie zmieszały się.
4. Po naniesieniu 40% sacharozy w identyczny sposób nanosimy 20 ml roztwór 30% sacharozy (Rys. 10.1).



Rys.10.1. Przygotowany skokowy gradient gęstości sacharozy

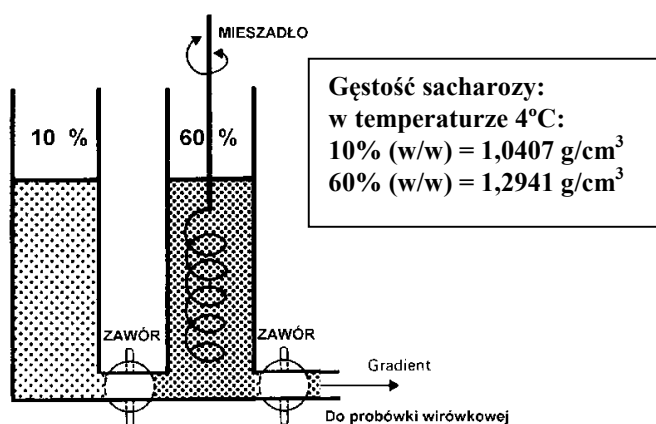
#### Materiały i odczynniki

- roztwory sacharozy o następujących stężeniach: 10% (w/w), 30% (w/w), 40% (w/w), 60% (w/w)
- pipeta Pasteur'a
- cztery probówki szklane o pojemności 80 ml

### 10.3.4. Ciągły gradient gęstości sacharozy

#### Postępowanie

1. Do dwóch zlewek przygotować po 30 ml roztworów sacharozy o stężeniach 10% (w/w) oraz 60% (w/w).
2. Następnie roztwory sacharozy wlać do dwóch cylindrów naczyń połączonych w sposób przedstawiony na schemacie (Rys. 10.2Rys.)



Rys. 10.2 Schemat naczyń połączonych używanych do przygotowania ciągłego gradientu gęstości

3. W celu uzyskania gradientu włączyć mieszanie, delikatnie otworzyć zawór łączący naczynia połączone, następnie rurkę odprowadzającą roztwór z naczyń połączonych umieścić na dnie próbówki wirówkowej.
4. Delikatnie otworzyć zawór naczyń połączonych tak aby wypływ roztworu sacharozy oscylował w granicach 1–1,5 ml/min.
5. Po ustaleniu gradientu próbówki przenosić bardzo delikatnie.

#### *Materiały i odczynniki*

- roztwory sacharozy o następujących stężeniach: 10% (w/w), 60% (w/w)
- cztery próbówki szklane o pojemności 80 ml
- naczynia połączone
- mieszadło

### **10.3.5. Ciągły gradient gęstości perkolu**

#### *Postępowanie*

1. Do dwóch próbek wirówkowych wykonanych z poliwęglanu o pojemności 30 ml wlać 25 ml perkolu.
2. Następnie w celu uzyskania gradientu perkolu wirować w rotorze horyzontalnym przez 60 min przy  $10\ 000\times g$ .
3. W wyniku wirowania otrzymujemy gradient perkolu gotowy do rozdziału i oczyszczania chloroplastów.

#### *Materiały i odczynniki*

- perkol
- próbówki wirówkowe o pojemności 30 ml, wykonane z poliwęglanu

### **10.3.6. Rozdział preparatu chloroplastów metodą wirowania w gradiencie gęstości**

#### *Postępowanie*

1. Na uprzednio przygotowany ciągły gradient gęstości sacharozy lub perkolu (rozdział 10.3.4 i 10.3.5) наносimy delikatnie za pomocą pipety 2 ml preparatu chloroplastów, uzyskanego w doświadczeniu 11.2.4. Następnie próbówki po zrównoważeniu parami umieszczamy w rotorze horyzontalnym i poddajemy wirowaniu w czasie 1 godziny w temperaturze  $4^{\circ}C$  z przyspieszeniem wynoszącym  $5\ 000\times g$ .
2. W wyniku wirowania następuje rozdział preparatu chloroplastów na frakcje zawierające odpowiednio:
  - całe tylakoidy
  - uszkodzone tylakoidy
  - błony tylakoidów
  - agregaty tylakoidów
  - pozostałe zanieczyszczenia

### **10.3.7. Rozdział preparatu tylakoidów metodą wirowania w skokowym gradiencie gęstości**

#### *Postępowanie*

1. Na uprzednio przygotowany skokowy gradient gęstości sacharozy (rozdział 10.3.3) наносimy delikatnie za pomocą pipety 2 ml preparatu tylakoidów, otrzymanego w doświadczeniu 11.2.4.
2. Następnie próbówki po zrównoważeniu parami umieszczamy w rotorze horyzontalnym i poddajemy wirowaniu w czasie 1 godziny w temperaturze 4°C z przyspieszeniem wynoszącym 4 000×g.
3. W wyniku wirowania następuje rozdział preparatu tylakoidów na frakcje zawierające odpowiednio:
  - całe tylakoidy
  - uszkodzone tylakoidy
  - błony tylakoidów
  - agregaty tylakoidów
  - pozostałe zanieczyszczenia

#### *Opracowanie wyników*

1. Przedstawić na schematach wyniki wirowania w gradientach gęstości preparatów chloroplastów oraz tylakoidów.
2. Określić wizualnie czystość oraz jednorodność każdej preparacji.



## 10.4. POTENCJOMETRIA

### 10.4.1. Charakterystyka elektrody szklanej

Celem ćwiczenia jest wyznaczenie zależności siły elektromotorycznej (SEM) od wartości pH dla elektrody szklanej zespolonej, znalezienia współczynnika proporcjonalności  $k$  i porównanie go z wartością teoretyczną.

#### Postępowanie

1. W zlewce 100 ml przygotuj 50 ml roztworu według Brittona-Robinsona (0,04 M  $\text{CH}_3\text{COOH}$ , 0,04 M  $\text{H}_3\text{PO}_4$ , 0,04 M  $\text{H}_3\text{BO}_3$ );
2. Zlewkę umieść na mieszadle magnetycznym, a w roztworze zanurz elektrodę pH-metru.
3. pH-metr przełącz w tryb pomiarów potencjometrycznych [mV].
4. Do zlewki dodawaj 0,2 M NaOH w porcjach po 5 ml. Po każdej dodanej porcji odczytaj i zapisz wartość SEM. Po dodaniu porcji NaOH należy poczekać na ustabilizowanie się wskazań elektrody. Pomiar przerwij po dodaniu 8 porcji (łącznie 40 ml) 0,2 M NaOH).

#### Opracowanie wyników

1. Sporządź wykres zależności SEM (oś  $y$ ) od pH (oś  $x$ ). Wartości pH dla kolejnych porcji 0,2 M przedstawia poniższa tabela.

L.p.	Objętość 0,2 M NaOH	pH
1	5 ml	2,21
2	10 ml	3,29
3	15 ml	4,56
4	20 ml	5,72
5	25 ml	6,80
6	30 ml	7,96
7	35 ml	9,15
8	40 ml	10,38

2. Dla obszaru, w którym zależność jest liniowa wyznacz współczynniki regresji liniowej ( $Y = aX + b$ ). Współczynnik  $a$  jest poszukiwanym molowym współczynnikiem proporcjonalności.
3. Porównaj obliczony współczynnik proporcjonalności z wartością teoretyczną ( $k = 2,303 RT/nF$  dla  $25^\circ\text{C}$  ma wartość 59,1 mV). Uzyskany wynik wyraż w % wartości teoretycznej.

#### Materiały i odczynniki

- Pipeta automatyczna
- pH-metr
- Elektroda szklana zespolona
- Zlewki 100 ml (1 sztuka)
- Cylindry miarowe
- Mieszadło magnetyczne
- 1 M kwas octowy  $\text{CH}_3\text{COOH}$
- 1 M kwas fosforowy  $\text{H}_3\text{PO}_4$
- 0,2 M kwas borowy  $\text{H}_3\text{BO}_3$
- 0,2 M NaOH

### Literatura

Zgirski A, Gondko R. „Obliczenia biochemiczne”. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 1998, Rozdział 4.

Szczepaniak W. „Metody instrumentalne w analizie chemicznej”. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2002, Rozdział 9.

### 10.4.2. Miareczkowanie potencjometryczne aminokwasów

Celem ćwiczenia jest eksperymentalne wyznaczenie metodą graficzną pI aminokwasu oraz stałej dysocjacji (pK) jego grupy aminowej oraz grupy bocznej.

#### Postępowanie

1. Biuretę automatyczną napełnij roztworem 0,2 M NaOH.
2. Do zlewki wlej 20 ml 50 mM roztworu histydyny.
3. Zlewkę umieść na mieszadle magnetycznym, a w roztworze zanurz elektrodę pH-metru.
4. Za pomocą 1 M HCl doprowadź pH roztworu do wartości ok. 2.
5. Za pomocą biurety automatycznej dodawaj po 0,1 ml 0,2 M NaOH. Po ustabilizowaniu się wskazania pH-metru odczytaj i zapisz wartość pH. Miareczkowanie kontynuuj do uzyskania pH o wartości ok. 12.

#### Opracowanie wyników

1. Uzyskane wyniki pomiarów umieść w tabeli:

nr	0,2 M NaOH [ml]	wartość pH
1	0	~2,00
2	0,1	...
...	...	...
n	...	~12

2. Na papierze milimetrowym sporządź wykres zależności pH (oś *y*) od objętości dodanego NaOH (oś *x*).
3. W oparciu o wykonany wykres wyznaczyc metodą graficzną wartości: pI; pK grupy  $\alpha$ -aminowej oraz pK grupy bocznej histydyny.
4. Porównaj uzyskane wartości z wartościami teoretycznymi.
5. Napisz równanie dysocjacji histydyny.

#### Materiały i odczynniki

- Biureta automatyczna
- pH-metr
- elektroda szklana zespolona
- Zlewka 100 ml
- Cylindry miarowe
- Mieszadło magnetyczne
- 50 mM roztwór histydyny
- 1 M HCl
- 0,2 M NaOH

### 10.4.3. Wyznaczanie pojemności buforowej buforu octanowego.

Celem ćwiczenia jest eksperymentalne wyznaczenie metodą graficzną maksymalnej wartości buforowej buforu octowego i stałej dysocjacji pK kwasu octowego.

#### *Postępowanie*

1. Biuretę automatyczną napełnij roztworem 0,2 M NaOH.
2. Do zlewki wlej 20 ml 0,2 M roztworu buforu octowego.
3. Zlewkę umieść na mieszadle magnetycznym, a w roztworze zanurz elektrodę pH-metru.
4. Odczytaj wartość pH. Za pomocą biurety automatycznej dodawaj po 0,5 ml 0,2 M NaOH. Po ustabilizowaniu się wskazania pH-metru odczytaj i zapisz wartość pH. Miareczkowanie kontynuuj do uzyskania pH o wartości ok. 9.

#### *Opracowanie wyników*

1. Dla każdej wartości pH oblicz pojemność buforową. Uzyskane wyniki pomiarów umieść w tabeli:

nr	pH	pojemność buforowa ( $\beta$ )
1	...	...
2	...	...
...	...	...
n	~9	...

1. Sporządź wykres zależności pojemności buforowej  $\beta$  (oś  $y$ ) od wartości pH (oś  $x$ ).
2. W oparciu o wykonany wykres wyznacz metodą graficzną wartość pK grupy kwasu octowego oraz maksymalną pojemność buforową buforu octanowego (podaj jego stężenie).
3. Porównaj uzyskane wartości z wartościami teoretycznymi.

#### *Materiały i odczynniki*

- Biureta automatyczna
- pH-metr
- Elektroda szklana zespolona
- Zlewka 100 ml
- Cylindry miarowe
- Mieszadło magnetyczne
- 50 mM kwas octowy
- 0,2 M NaOH

#### 10.4.4. Wyznaczanie pojemności buforowych dla buforów o różnych wartościach pH

Celem ćwiczenia jest określenie zależności pojemności buforowej od stosunku stężeń składników buforu.

##### Postępowanie

1. Napełnić biuretę automatyczną 0,1 M NaOH lub 0,1 M HCl.
2. Przygotować w cylindrach miarowych, na podstawie tabeli, po 100 ml buforów octanowych. Następnie sprawdzić pehametrycznie wartość pH każdego ze sporządzonych buforów.

bufor nr	0,2 M CH <sub>3</sub> COONa [ml]	0,2 M CH <sub>3</sub> COOH [ml]	H <sub>2</sub> O	pH (wartość teoretyczna)
1	3,75	46,25	uzupełnić do 100ml	3,6
2	13,25	36,75		4,2
3	24,50	25,50		4,6
4	35,00	15,00		5,0
5	45,50	4,50		5,6

3. Przygotowane bufory miareczkować potencjometrycznie za pomocą 0,1 M HCl lub 0,1 M NaOH. W tym celu do zlewki, o pojemności 50 ml, należy pobrać 25 ml danego buforu. Zlewkę z buforem umieścić na mieszadle magnetycznym, zanurzyć w buforze elektrodę szklaną zespoloną i za pomocą biurety automatycznej dodawać po 0,1 ml, 0,1 M NaOH lub 0,1 M HCl. Po każdorazowym dodaniu titranta zanotować wskazania pH-metru. Pomiar należy zakończyć, gdy wartość pH buforu zmieni się o jedną jednostkę. Pomiar należy powtórzyć trzykrotnie dla każdego buforu.

##### Opracowanie wyników

1. Wyniki pomiarów należy umieścić w tabeli:

bufor nr	objętość titranta potrzebna do zmiany wartości pH o jednostkę [ml]			
	V <sub>1</sub>	V <sub>2</sub>	V <sub>3</sub>	V <sub>średnia</sub>
1				
2				
3				
4				
5				

2. Dla każdego miareczkowania sporządzić, na papierze milimetrowym wykres zależności pH ( $y$ ) od objętości dodanego titranta ( $x$ ).
3. W oparciu o tabelę policzyć pojemności buforowe dla badanych buforów, następnie sporządzić wykres zależności pojemności buforowej ( $y$ ) od pH buforu ( $x$ ).
4. Opisać zaobserwowaną zależność między stosunkiem stężeń składników buforu i jego pH a pojemnością buforową.

### *Materiały i odczynniki*

- 0,2 M CH<sub>3</sub>COONa
- 0,2 M CH<sub>3</sub>COOH
- 0,1 M HCl
- 0,1 M NaOH
- mieszadło magnetyczne
- biureta automatyczna
- elektroda szklana zespolona
- pH-metr

### **10.4.5. Wyznaczanie pojemności buforowej dla buforów o różnym stężeniu**

Celem ćwiczenia jest określenie zależności pojemności buforowej od stężenia buforu.

#### *Postępowanie*

1. Napełnić biuretę automatyczną 0,05 M NaOH lub 0,05 M HCl.
2. Przygotować w cylindrze miarowym, na podstawie poniższej tabeli, 100 ml buforu wyjściowego A (0,1 M bufor octanowy).

bufor	0,1 M CH <sub>3</sub> COONa [ml]	0,1 M CH <sub>3</sub> COOH [ml]	stężenie molowe buforu
A	50	50	0,1 M

3. Korzystając z buforu wyjściowego A, na podstawie poniższej tabeli, sporządzić po 100 ml buforów o stężeniu 0,02 M i 0,004 M.

stężenie buforu	bufor A [ml]	H <sub>2</sub> O
0,02 M	20	uzupełnić do 100ml
0,004 M	4	

4. Przygotowane bufory miareczkować potencjometrycznie za pomocą 0,05 M HCl lub 0,05 M NaOH. W tym celu do zlewki o pojemności 50 ml należy pobrać 25 ml danego buforu. Zlewkę z buforem umieścić na mieszadle magnetycznym, zanurzyć w buforze elektrodę szklaną zespoloną i za pomocą biurety automatycznej dodawać po 0,1 ml, 0,05 M NaOH lub 0,05 M HCl. Po każdorazowym dodaniu titranta zanotować wskazania pH-metru. Pomiar należy zakończyć, gdy wartość pH buforu zmieni się o jedną jednostkę. Pomiar należy powtórzyć trzykrotnie dla każdego buforu.

*Opracowanie wyników*

1. Wyniki pomiarów należy umieścić w tabeli:

stężenie buforu	objętość titranta potrzebna do zmiany wartości pH o jednostkę [ml]			
	V <sub>1</sub>	V <sub>2</sub>	V <sub>3</sub>	V <sub>średnia</sub>
0,1 M				
0,02 M				
0,004 M				

2. Dla każdego miareczkowania sporządzić na papierze milimetrowym wykres zależności pH ( $y$ ) od objętości dodanego titranta ( $x$ ).
3. W oparciu o tabelę policzyć pojemności buforowe dla badanych buforów.
4. Opisać zaobserwowaną zależność między stężeniem buforu a pojemnością buforową.

*Materiały i odczynniki*

- 0,1 M CH<sub>3</sub>COONa
- 0,1 M CH<sub>3</sub>COOH
- 0,05 M HCl
- 0,05 M NaOH
- mieszadło magnetyczne
- biureta automatyczna
- elektroda szklana zespolona
- pH-metr

## 10.5. SPEKTROSKOPIA I SPEKTROFLUORYMETRIA

### 10.5.1. Wyznaczanie molowego współczynnika absorpcji

Celem ćwiczenia jest eksperymentalne wyznaczenie molowego współczynnika absorpcji przy wykorzystaniu prawa Lamberta-Beera.

#### *Postępowanie*

1. Przygotuj 200 ml 100  $\mu\text{M}$  DCIP (m.c. DCIP wynosi 268,10 g/mol). Ilość roztworu jest wystarczająca dla całej grupy
2. Przygotuj 10 probówek szklanych i sporządź w nich po 10 ml roztworów DCIP o różnym stężeniu posługując się poniższą tabelą:

Nr probówki	100 $\mu\text{M}$ DCIP [ml]	Woda dejonizowana [ml]
0	0,00	10,00
1	0,25	9,75
2	0,50	9,50
3	0,75	9,25
4	1,00	9,00
5	1,25	8,75
6	1,50	8,50
7	1,75	8,25
8	2,00	8,00
9	2,50	7,50

3. Zmierz absorbancję przygotowanych roztworów DCIP przy długości fali 600 nm stosując probówkę nr 0 jako próbę odniesienia. Pomiarzy zacznij od najniższych stężeń do najwyższych. Dla każdego stężenia wykonaj po trzy pomiary. Po każdej zmianie stężenia kuwetę opłucz wodą dejonizowaną i dokładnie osusz.

#### *Opracowanie wyników*

1. Policz średnią absorbancję dla każdego stężenia DCIP i sporządź wykres zależności absorbancji od stężenia DCIP.
2. Stosując metodę najmniejszych kwadratów wyznacz współczynniki regresji liniowej ( $Y = a X + b$ ). Współczynnik  $a$  jest poszukiwanym molowym współczynnikiem absorpcji  $\epsilon$ .
3. Oceń jakość sporządzonej krzywej wyznaczając współczynnik korelacji liniowej Pearsona ( $r$ ).
4. Porównaj uzyskane wartości  $\epsilon$  i  $r$  z wartościami uzyskanymi przez inne grupy.

#### *Materiały i odczynniki*

- Spektrofotometr
- Kuwety
- Pipety automatyczne
- Końcówki do pipet
- Probówki szklane
- Tryskawka
- DCIP

### 10.5.2. Wyznaczanie stężenia roztworu na podstawie prawa Lamberta-Beera

Ćwiczenie ma na celu zapoznanie się z praktycznym wykorzystaniem prawa Lamberta-Beera do wyznaczania stężenia substancji w roztworze oraz graficznym obrazem widma w funkcji stężenia.

#### Postępowanie

1. Przygotować 50 ml roztworu DCIP o stężeniu 100  $\mu\text{M}$ .
2. W probówkach, na podstawie przedstawionej niżej tabeli, sporządzić po 10 ml roztworów DCIP o różnych stężeniach molowych.

nr próby	ilość 100 $\mu\text{M}$ DCIP [ml]	H <sub>2</sub> O [ml]
1	0,15	9,85
2	0,30	9,70
3	0,50	9,50
4	0,75	9,25
5	1,00	9,00
6	1,25	8,75
7	1,50	8,50
8	1,75	8,25
9	2,00	8,00
10	2,50	7,50

#### Część A

1. Przed przystąpieniem do pomiarów należy napełnić kuwetę wodą do objętości 2/3 i ustawić wartość absorpcji przy długości fali 600 nm ( $A_{600}$ ), wskazywaną przez spektrofotometr na **0** (zerowanie aparatu).
2. Kolejno pobrać do kuwety spektrofotometrycznej, zaczynając od najniższego stężenia, po 1,5 ml roztworu z każdej probówki i zmierzyć, za pomocą spektrofotometru, absorpcję przy długości fali 600 nm. Pomiar wartości absorpcji należy powtórzyć trzykrotnie, po każdej zmianie stężenia kuwetę należy opłukać wodą i dokładnie osuszyć.

#### Opracowanie wyników

1. Wyniki pomiarów należy umieścić w tabeli, molowy współczynnik absorpcji dla DCIP –  $\epsilon$  przy  $\lambda = 600$  nm wynosi 16 100  $\text{dm}^3/\text{mol cm}$ .

końcowe teoretyczne stężenie DCIP [ $\mu\text{M}$ ]	$A_{600}$				końcowe stężenie DCIP wyznaczone na podstawie $A_{600}$ [ $\mu\text{M}$ ]
	$A_1$	$A_2$	$A_3$	$A_{\text{średnia}}$	



2. Na podstawie tabeli wykreślić, na papierze milimetrowym, krzywą dla zależności stężenia DCIP ( $x$ ) od absorpcji średniej przy  $\lambda = 600 \text{ nm}$  ( $y$ ).
3. Obliczyć odchylenie standardowe dla wyznaczonej krzywej wzorcowej i przedstawić je na wykresie.
4. Porównać wyniki teoretyczne z wynikami pomiarowymi, a następnie przeprowadzić dyskusję błędów zwracając uwagę na dokładność i błąd aparatu oraz błędy wynikające z własnej pracy.

### **Część B**

1. Przed przystąpieniem do pomiarów widm należy napęlić kuwetę wodą do objętości 2/3 i wyznaczyć linię podstawową dla wartości absorpcji przy długości fali od 300 do 600 nm, wskazywaną przez spektrofotometr na 0 (zerowanie aparatu).
2. Kolejno pobrać do kuwety spektrofotometrycznej, zaczynając od najniższego stężenia, po 1,5 ml roztworu z każdej probówki i wyznaczyć widmo absorpcji za pomocą spektrofotometru, przy długościach fali od 300 do 600 nm. Pomiarów wykonać tak, aby wszystkie wykresy zależności absorpcji ( $A$ ) od stężenia można było przedstawić na jednym wykresie (technika pomiarów zależy od posiadanego spektrofotometru).
3. Pomiarów wykonać przy kilku czasach odczytu absorpcji (szybkość skanowania widma).
4. Obliczyć stężenia molowe DCIP w poszczególnych probówkach na podstawie prawa Lamberta-Bera.
5. Wyznaczyć współczynnik kalibracji ( $f$ ), wartość absorpcji roztworu 1% ( $A^{1\%}$ ) oraz średnią wartość współczynnika właściwego absorpcji ( $k$ ) dla roztworu DCIP wraz z odchyleniem standardowym.

#### *Materiały i odczynniki*

- 100  $\mu\text{M}$  DCIP
- woda destylowana
- 10 probówek szklanych
- pipeta automatyczna o zakresie od 100 do 1 000  $\mu\text{l}$
- pipeta automatyczna o zakresie od 1 do 5 ml
- kuwety spektrofotometryczne plastikowe o pojemności 1,5 ml i drodze optycznej równej 1 cm
- spektrofotometr VIS do pomiarów punktowych oraz do pomiarów widma w zakresie od 300 do 800 nm

### **10.5.3. Wpływ pH oraz potencjału redoks na parametry spektralne związków chemicznych**

#### **10.5.3.1. Wpływ potencjału redoks na parametry spektralne związków chemicznych**

Ćwiczenie ma na celu przedstawienie przykładów, w jaki sposób związki posiadające właściwości oksydo-redukcyjne mogą wpływać na właściwości spektralne związków chemicznych.

#### *Postępowanie*

1. Przygotować po 25 ml następujących roztworów: 0,5% (w/w) roztwór 2,6 dichlorofluoresceiny, 0,1% (w/w) roztwór manganianu (VII) potasu (nadmanganian potasu) oraz 1% (w/w) roztwór heksacyjanożelazianu (III) potasu (żelazicyjanek potasu), 100 mM roztwór DCIP.
2. W probówkach, na podstawie tabeli sporządzić, po 10 ml różnych rozcieńczeń roztworów wyjściowych.

nr próby	odczynnik	ilość [μl]	H <sub>2</sub> O [ml]	dodatek
1	2,6 dichlorofluoresceina	5	10	brak
2	2,6 dichlorofluoresceina	10		40 μl 1 M HCl
3	manganian (VII) potasu	120		brak
4	manganian (VII) potasu	150		100 μl 1% kwasu askorbinowego
5	heksacyjanożelazian (III) potasu	40		brak
6	heksacyjanożelazian (III) potasu	80		100 μl 1% kwasu askorbinowego
7	DCIP	1000		brak
8	DCIP	1000		10 μl 1 M HCl

- Przed przystąpieniem do pomiarów należy napełnić kufkę wodą do objętości 2/3 i ustawić wartość absorpcji przy długości fali od 300 do 800 nm, wskazywaną przez spektrofotometr na 0 (zerowanie aparatu).
- Zmierzyć za pomocą spektrofotometru absorpcję w zakresie od 300 do 800 nm dla każdej przygotowanej próby.

#### *Opracowanie wyników*

- Opisać za pomocą równań reakcje chemiczne zachodzące w każdej z badanych prób.
- Na podstawie równań reakcji chemicznych określić wpływ dodatku oraz opisać jak zmienia on parametry spektralne danego odczynnika.

#### *Materiały i odczynniki*

- 10 probówek szklanych
- pipeta automatyczna o zakresie od 100 do 1 000 μl
- pipeta automatyczna o zakresie od 1 do 5 ml
- kufki spektrofotometryczne plastikowe o pojemności 1,5 ml i drodze optycznej równej 1 cm
- spektrofotometr VIS do pomiarów widma w zakresie od 300 do 800 nm

### 10.5.3.2. Wpływ stopnia utlenienia na własności spektralne związków chemicznych

Celem ćwiczenia jest pokazanie na przykładzie cytochromu c, że właściwości spektralne związków chemicznych zależą od ich stopnia utlenienia. Podczas eksperymentu studenci przygotowują roztwór cytochromu c w postaci zredukowanej i utlenionej oraz sprawdzą jak, stopień utlenienia wpływa na widmo absorpcyjne tego białka.

#### Postępowanie

1. Przygotuj 3 czyste probówki szklane, a następnie odmierz do nich roztwory według poniższej tabeli:
- 2.

nr próby	roztwór i jego ilość		
	1 ml	1 ml	0,1 ml
1	bufor fosforanowy	roztwór cyt. c	woda dejonizowana
2	bufor fosforanowy	roztwór cyt. c	roztwór $K_3[Fe(CN)_6]$
3	bufor fosforanowy	roztwór cyt. c	roztwór kwasu askorbinowego

3. Odczekaj 10 minut i porównaj kolory każdej z probówek.
4. Zawartość probówek przenieś do kuwet i zmierz widma w zakresie 390-610 nm.

#### Opracowanie wyników

1. Na podstawie sporządzonych widm absorpcji wyznacz maksima absorpcji dla formy utlenionej i zredukowanej cytochromu c.
2. Porównaj wszystkie 3 uzyskane widma absorpcyjnej i zastanów się, czy przygotowany wyjściowy roztwór cytochromu c w większym stopniu składa się z formy utlenionej, czy zredukowanej.

#### Materiały i odczynniki

- Spektrofotometr
- Kuwety
- Pipety automatyczne
- Końcówki do pipet
- Probówki szklane
- Roztwór cytochromu c 0,4 mg/ml
- 0,1 M bufor fosforanowy pH 7,0
- 5 mM roztwór  $K_3[Fe(CN)_6]$
- 10 mM roztwór kwasu askorbinowego

#### Literatura

Szczepaniak W. „Metody instrumentalne w analizie chemicznej”. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2002, Rozdział 6.1.

### 10.5.3.3. Wpływ pH na parametry spektralne związków chemicznych

#### Wersja A

Celem ćwiczenia jest pokazanie na przykładzie błękitu bromofenolowego, że właściwości spektralne związków chemicznych zależą od pH. Podczas eksperymentu studenci będą obserwować, w jaki sposób barwa błękitu bromofenolowego zależy od pH roztworu i zbadają widmo absorpcyjne tego związku przy dwóch różnych wartościach pH.

#### Postępowanie

1. Przygotuj 50 ml 0,1 M kwasu cytrynowego i 50 ml 0,2 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (każda podgrupa przygotowuje własny roztwór). W 40 ml należy rozpuścić odpowiednią ilość kwasu cytrynowego lub  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  i uzupełnić do 50 ml.
2. Przygotuj 9 próbek szklanych i sporządź w nich po 5 ml buforu cytrynianowo-fosforanowego o różnych wartościach pH posługując się poniższą tabelą:

pH	0,1 M kwas cytrynowy [ml]	0,2 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ [ml]
2,6	4,45	0,55
3,2	3,75	1,25
3,8	3,20	1,80
4,4	2,80	2,20
5,0	2,40	2,60
5,6	2,10	2,90
6,2	1,70	3,30
6,8	1,15	3,85
7,4	0,45	4,55

3. Do każdej próbki dodaj po 50  $\mu\text{l}$  0,1% roztworu błękitu bromofenolowego i zawartość próbki wymieszaj.
4. Zaobserwuj, jaki kolor przybrał błękit bromofenolowy w próbkach o różnych wartościach pH.
5. Przygotuj 4 kuwety. Do pierwszej wlej 1,5 ml wody, do drugiej 1,5 ml roztworu z próbki o pH 2,6 (kolor żółty), do trzeciej 1,5 ml roztworu z próbki o pH 7,4 (kolor fioletowy), a do czwartej roztworu z próbki o kolorze przejściowym (zanotuj pH).
6. Ustaw spektrofotometr na długość fali  $\lambda=400$  nm i wyzeruj go względem kuwety z wodą. Zmierz i zanotuj absorbancję kuwet nr 2 i 3. Pomiary absorbancji powtarzaj zmniejszając za każdym razem długość fali o 20 nm. Pomiary przerwij przy długości fali  $\lambda=700$  nm.

#### Opracowanie wyników

1. Sporządź wykresy zależności absorbancji A (oś y) od długości fali  $\lambda$  (oś x) dla roztworów błękitu bromofenolowego o trzech różnych wartościach pH (dane zebrane w punkcie 6).
2. Metodą graficzną wyznacz punkt izobestyczny błękitu bromofenolowego, oraz maksima absorpcji dla jego formy kwasowej i zasadowej.

#### Materiały i odczynniki

- Spektrofotometr
- Kuwety
- Pipety automatyczne
- Końcówki do pipet
- Probówki szklane
- 0,1% roztwór błękitu bromofenolowego
- kwas cytrynowy (m.cz. wynosi 192,12 g/mol)

- wodorofosforam disodu  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (m.cz. wynosi 141,96 g/mol)

### Wersja B

Ćwiczenie ma na celu przedstawienie, w jaki sposób pH może wpływać na właściwości spektralne związków chemicznych, szczególnie dla wskaźników kwasowo-zasadowych, których przykładem jest czerwień fenolowa.

#### Postępowanie

1. Przygotować 10 ml 0,1% (w/w) roztworu czerwieni fenolowej.
2. W probówkach, na podstawie tabeli, sporządzić następujące układy pomiarowe:

nr próby	Odczynnik A	ilość [ml]	Odczynnik B	ilość [ml]	Czerwień fenolowa [ $\mu\text{l}$ ]	pH
1	50 mM $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$	3	0,1 mol KOH	2	150	9,97
2	50 mM $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$	4,25	0,1 mol HCl	0,75	150	9,01
3	50 mM $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$	2,75	0,1 mol HCl	2,25	150	7,94
4	66 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4$	2	66 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4$	3	150	6,98
5	66 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4$	2,5	66 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4$	2,5	150	6,81
6	66 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4$	3,5	66 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4$	1,5	150	6,47
7	66 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4$	4,5	66 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4$	0,5	150	5,91
8	0,2 M $\text{CH}_3\text{COOH}$	1,5	0,2 M $\text{CH}_3\text{COONa}$	3,5	150	5,0

3. Przed przystąpieniem do pomiarów należy ustawić wartość absorpcji przy długości fali od 300 do 800 nm, wskazywaną przez spektrofotometr na 0 (zerowanie aparatu).
4. Zmierzyć za pomocą spektrofotometru absorpcję w zakresie od 300 do 800 nm dla każdej przygotowanej próby.

#### Opracowanie wyników

1. Wyznaczyć długości fali, przy jakich krzywe absorpcji tworzą punkty izobestyczne.
2. Wykreśli krzywą zależności absorbancji przy 615 nm od pH, określ, w jakim punkcie tej krzywej połowa związku występuje w formie zasadowej a jaka w kwasowej.
3. Wyznacz pK dla czerwieni fenolowej.

#### Materiały i odczynniki

- czerwień fenolowa
- 0,2 M  $\text{CH}_3\text{COONa}$
- 0,2 M  $\text{CH}_3\text{COOH}$
- 0,1 M KOH
- 0,1 M HCl
- 50 mM  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$
- 66 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$
- 66 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$
- 8 probówek szklanych

- pipeta automatyczna o zakresie od 100 do 1 000  $\mu\text{l}$
- pipeta automatyczna o zakresie od 1 do 5 ml
- kuwety spektrofotometryczne plastikowe o pojemności 4,0 ml i drodze optycznej równej 1 cm
- spektrofotometr VIS do pomiarów widma w zakresie od 300 do 800 nm

#### 10.5.4. Spektrofotometryczna analiza jakościowa

Ćwiczenie ma na celu zapoznanie się z przykładem spektroskopowej analizy jakościowej związków chemicznych oraz prawem addytywności absorpcji.

##### *Postępowanie*

1. W próbkach, na podstawie tabeli, sporządzić po 10 ml następujących rozcieńczeń roztworów wyjściowych otrzymanych od prowadzącego ćwiczenia.

nr próby	odczynnik	ilość [ $\mu\text{l}$ ]	H <sub>2</sub> O [ml]
1	czerń naftalenowa	60	dopełnić do 10 ml
2	2,6 dichlorofluoresceina	10	
3	rodamina	12	
4	manganian (VII) potasu	150	
5	zieleń malachitowa	25	
6	heksacyjanożelazian (III) potasu	50	
7	tionina	30	
8	DCIP	1000	
9	octan miedzi (II)	3000	
10	indywidualna próba otrzymana od prowadzącego ćwiczenia	ustalić doświadczalnie rozcieńczenie	

2. Do pomiarów odpipetowywać do kuwety po 1,5 ml roztworu.
3. Wyzerować spektrofotometr na wodę.
4. Zarejestrować widmo absorpcji każdej przygotowanej próby w zakresie od 300 do 800 nm.

##### *Opracowanie wyników*

1. Dla próby indywidualnej zarejestrować pomiary w taki sposób, aby wszystkie charakterystyczne maksima absorpcji były widoczne.
2. Na podstawie wszystkich zarejestrowanych widm określić skład próby indywidualnej.
  - w próbce tej może znajdować się także substancja nieoznaczona spektrofotometrycznie podczas ćwiczenia;
  - dla substancji nieznannej określić parametry spektralne (maksimum i minimum absorpcji).

### 10.5.5. Spektrofluorymetria

Ćwiczenie ma na celu przedstawienie zależności pomiędzy widmem absorpcji oraz widmem fluorescencji oraz w jaki sposób wyznacza się i co to jest widmo wzbudzenia fluorescencji.

#### Postępowanie

1. W probówkach, na podstawie tabeli, sporządzić po 5 ml następujących rozcieńczeń roztworów wyjściowych.

nr próby	Odczynnik	ilość [μl]	H <sub>2</sub> O [ml]
1	2,6-dichlorofluoresceina	10	dopełnić do 5 ml
2	2,6-dichlorofluoresceina	150	
3	2,6-dichlorofluoresceina	450	
4	rodamina	20	
5	ekstrakt chlorofili z liści grochu	2000	dopełnić 80% acetonem do 4 ml

2. Dla prób 1, 4, 5 zarejestrować widma absorpcji w zakresie od 300 do 800 nm. Pobierając do kuwet po 1,5 ml roztworu.
3. Określić, przy jakiej długości fali związki te posiadają maksima absorpcji.
4. Wyznaczyć na podstawie widm absorpcji, przy jakiej długości fali należy wzbudzać dany związek, aby uzyskać maksymalną fluorescencję.
5. Zarejestrować widma fluorescencji w zakresie od 400 do 700 nm dla wszystkich prób w kuetach o pojemności 2 ml.
6. Przeprowadzić próbę wygaszania fluorescencji w próbce 1 dodając do niej 20 μl 1N HCl i zarejestrować widmo fluorescencji.

#### Opracowanie wyników

1. Opisać zależność pomiędzy widmem absorpcji i fluorescencji, wyznaczyć maksimum fluorescencji, podać prawo, jakie opisuje te zjawisko.
2. Przedstawić mechanizm wygaszania fluorescencji dla fluoresceiny.
3. Wyjaśnić, dlaczego natężenie fluorescencji mierzone w tych samych warunkach dla prób nr 2 i 3 jest niższe niż dla próby nr 1.

#### Materiały i odczynniki

- 0,5% (w/w) roztwór 2,6-dichlorofluoresceiny
- acetonowy ekstrakt chlorofilu z liści grochu
- 0,25% (w/w) roztwór rodminy
- kuetki do pomiarów spektrofotometrycznych oraz fluorymetrycznych wykonane z metaakrylu
- kuweta kwarcowa
- pipeta automatyczna o zakresie od 20 do 200 μl