

Biofyzika – laboratorní cvičení

Cvičení z biofyziky

1. A) Stanovení koncentrace glukosy polarimetricky
B) Mutarotace glukosy
C) Refraktometrie
2. A) Potenciometrické stanovení disociační konstanty
B) Kapacita pufru
3. A) Stanovení viskozity tlačným viskozimetrem
B) Laserová difrakce + Nefelometrie
4. A) Kritická micelární koncentrace
B) Konduktometrické hodnocení kvality vody
5. A) Stanovení izoelektrického bodu kaseinu
B) Měření teploty těla
C) Stanovení rychlostní konstanty rozpouštění pevné látky
6. Adsorpce na aktivním uhlí

Laboratorní technika

Vážení



Předvážky; přesnost ca 0,01 g

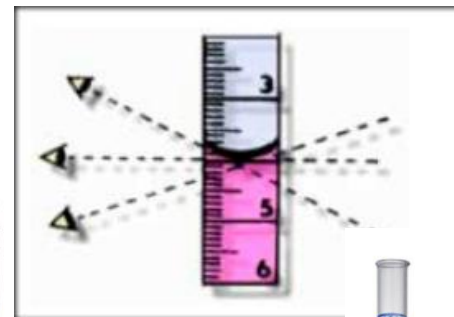


Analytické váhy; přesnost 0,0001 g

Odměrování roztoků orientační

přibližné

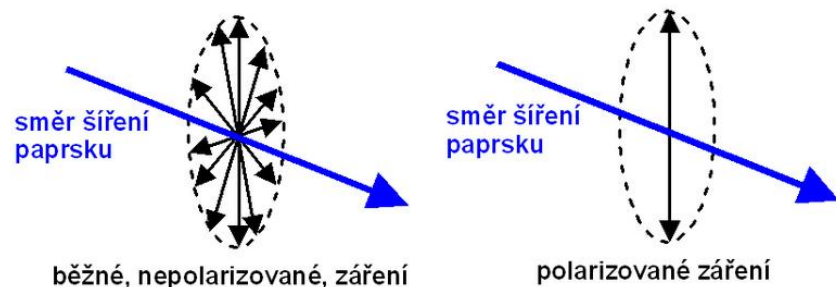
přesné



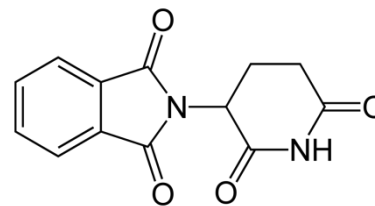
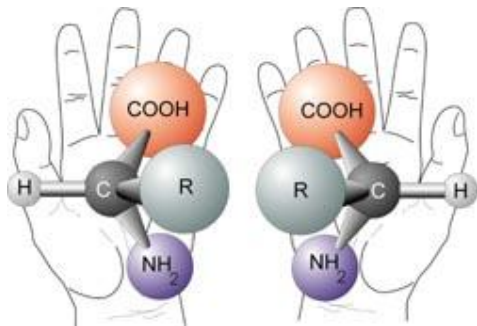
Polarimetrie

Optická otáčivost

- je schopnost **chirálních látek** stáčet rovinu polarizovaného světla.



- jako optické izomery se označují skupiny látek, které mají stejný sumární vzorec (tzn. jejich atomární složení je shodné), liší se prostorovým uspořádáním atomů, uspořádáním skupin na tzv. **chirálním atomu**.
- dvojice optických antipodů se rozlišují symboly **R** a **S**, v případě sacharidů a aminokyselin pak **L** a **D**.
- rozdílné optické izomery mohou rozdílně interagovat s enzymy, **jejich účinky na živý organismus mohou být odlišné**



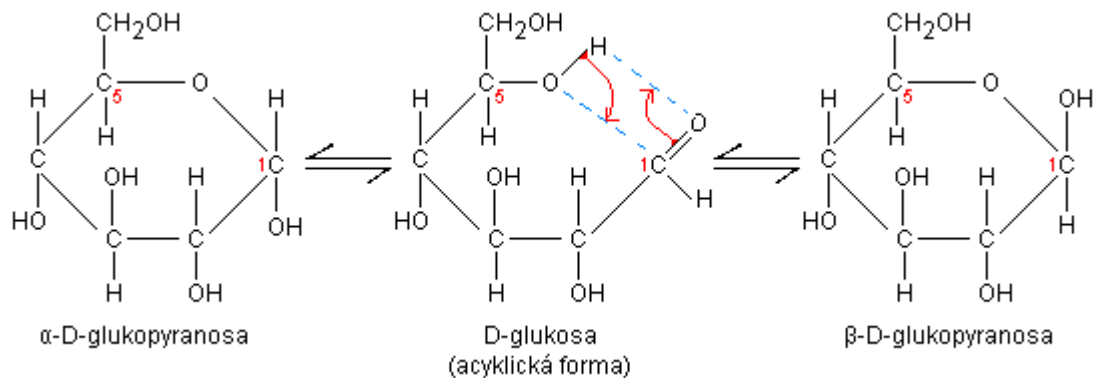
Thalidomid



Polarimetrie

Mutarotace

- změna optické rotace redukujícího sacharidu ve vodném prostředí, vyvolaná změnou absolutní konfigurace na poloacetalovém uhlíku (C1 u aldosa, C2 u ketosa). V roztoku sacharidů k ní dochází samovolně. Dosažení rovnováhy mezi anomery (α - a β -formou) může být urychleno.
- V roztoku přechází glukóza do cyklické hemiacetalové formy s šestičlenným kruhem (pyranóza), která v rovnovážném stavu za laboratorní teploty 20 °C obsahuje dva anomery, lišící se orientací hemiacetalového hydroxyly: 36 % α -glukopyranózy a 64 % β -glukopyranózy.

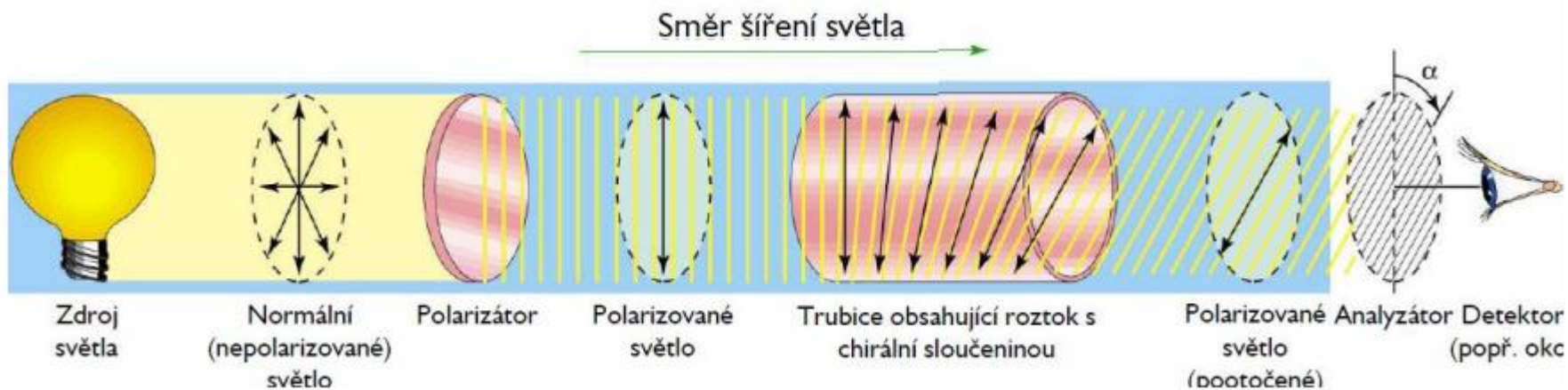


Polarimetrie

Měření optické aktivity (otáčivosti) látek

Některé krystaly a některé kapaliny mají schopnost stáčet polarizační rovinu lineárně polarizovaného světla. Tento jev se nazývá rotační polarizace a příslušné látky se nazývají **opticky aktivní**.

V důsledku optické aktivity látky vzorku dojde ke stočení roviny polarizace o úhel α , který obecně závisí na fyzikálně-chemických vlastnostech dané látky, koncentraci měřené látky v roztoku a délce trubice s roztokem. Pro stanovení tohoto úhlu slouží tzv. analyzátor (druhý lineární polarizátor), jehož natočením můžeme stanovit úhel α .



Refraktometrie

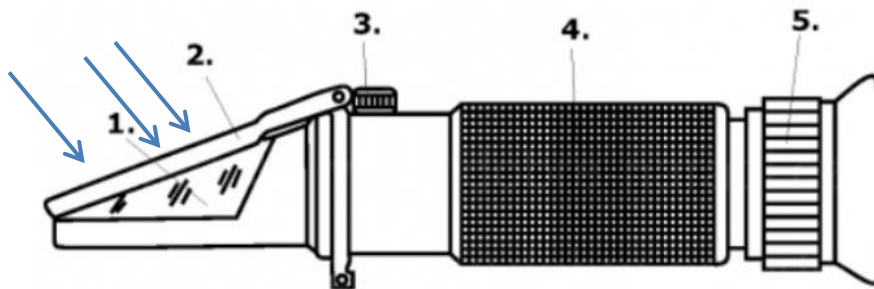
Monochromatické světlo, které prochází z jednoho prostředí do druhého, mění svou rychlost. Poměr rychlosti světla ve vakuu ku rychlosti světla v dalším prostředí se nazývá absolutní index lomu.

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

Relativní index lomu představuje poměr rychlosti světla ve vzduchu ku rychlosti světla v dalším prostředí a odpovídá poměru sinusu úhlu dopadu a sinusu úhlu lomu na rozhraní prostředí.

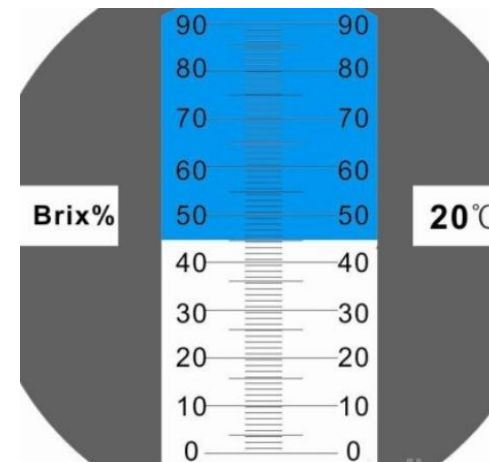
$$n = \frac{v_1}{v_2} = \frac{\sin\alpha_1}{\sin\alpha_2}$$

Rychlost světla ve vzduchu a ve vakuu se liší poměrně málo, proto lze index lomu na rozhraní zkoumané látky a vzduchu považovat prakticky za absolutní index lomu.



Popis jednotlivých částí refraktometru:

1. podložka se stupnicí
2. odklápěcí uzávěr
3. šroub na nastavení nulové hodnoty
4. zrcadlová komora
5. okulár



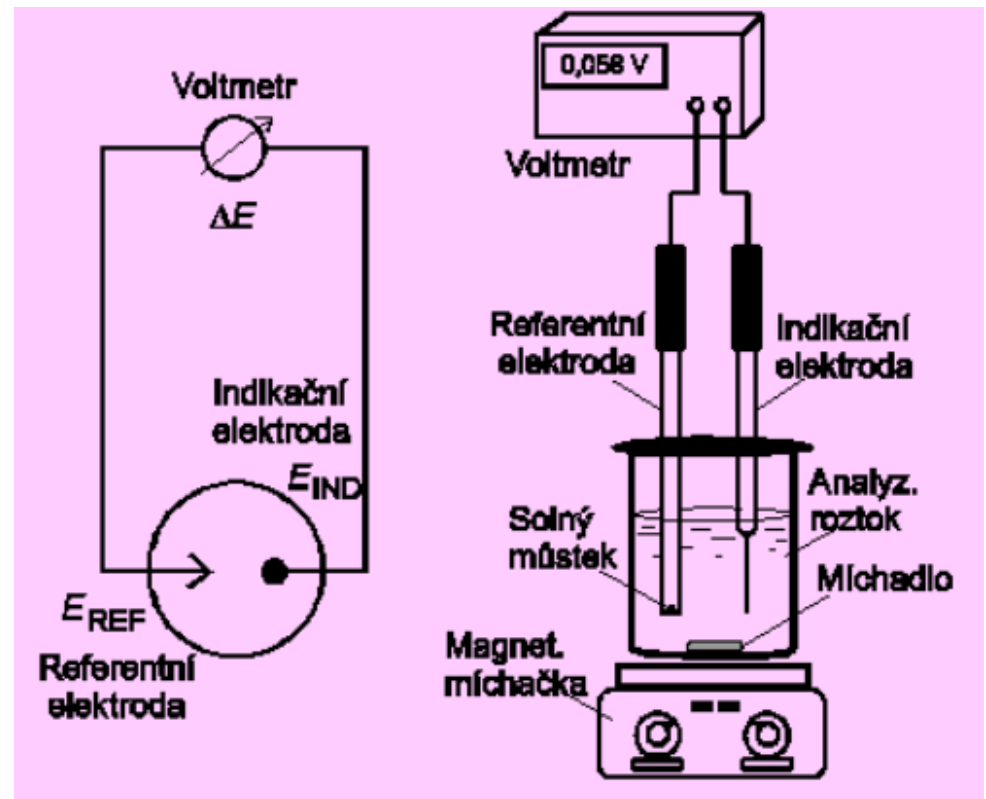
Potenciometrie

Stanovení disociační konstanty

Disociační konstanta je jednou ze základních charakteristik léčivé látky (ovlivnění rozpustnosti a vstřebatelnosti v různých částech GITu).

Stanovení kapacity pufry

Přesná regulace pH v organismu je nezbytná (ovlivnění vlastností bílkovin včetně aktivity enzymů, transportních mechanismů, vlastností membránových kanálů, apod.)

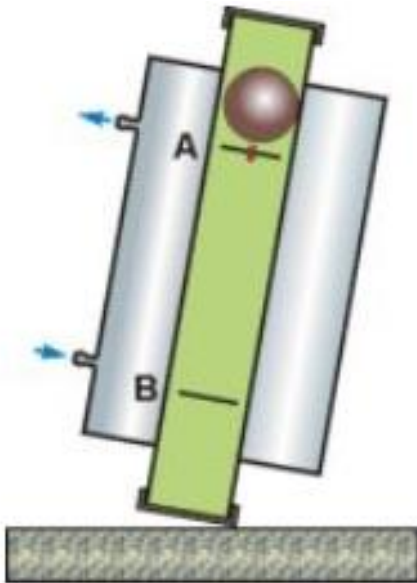


Viskozita

Všechny kapaliny jsou nedokonale tekuté, protože při vzájemném pohybu jejich částí překonávají určité vnitřní tření. To je závislé na teplotě, chemické povaze látky a koncentraci roztoku. **Dynamická viskozita η** (éta) tedy udává odpor, který kladou dvě sousední vrstvy kapaliny při vzájemném pohybu.

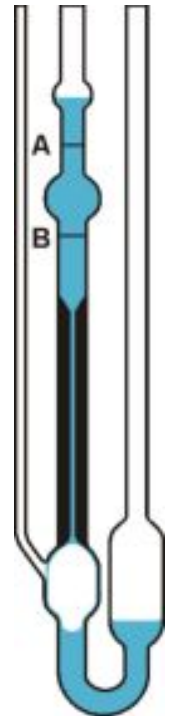
$\tau = \eta * D$ τ – tečné napětí; D – gradient rychlosti dv/dy

$\eta = k (\rho_{kulička} - \rho_{vzorek}) t$ [Pa . s]



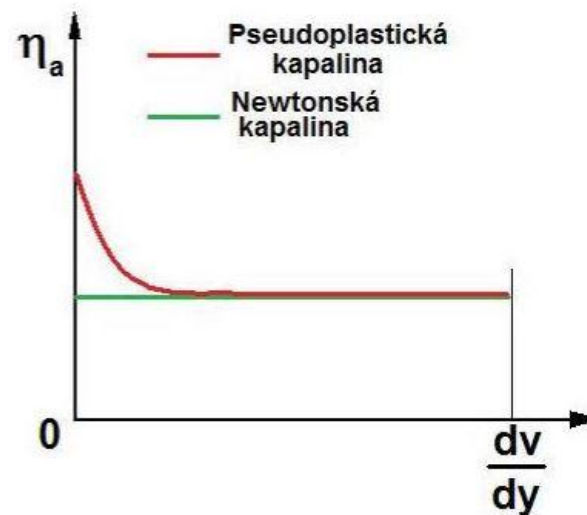
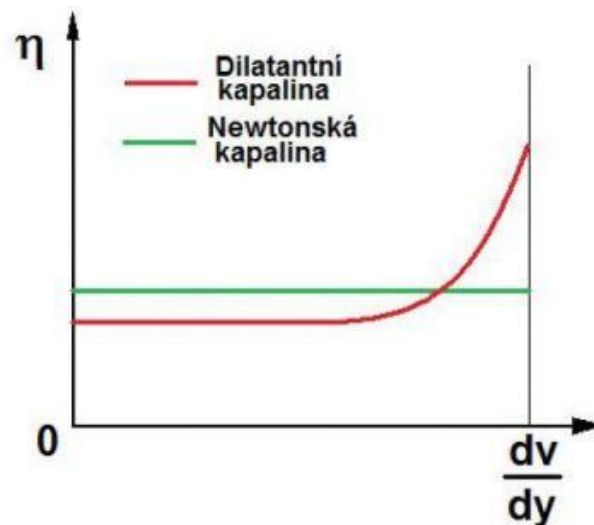
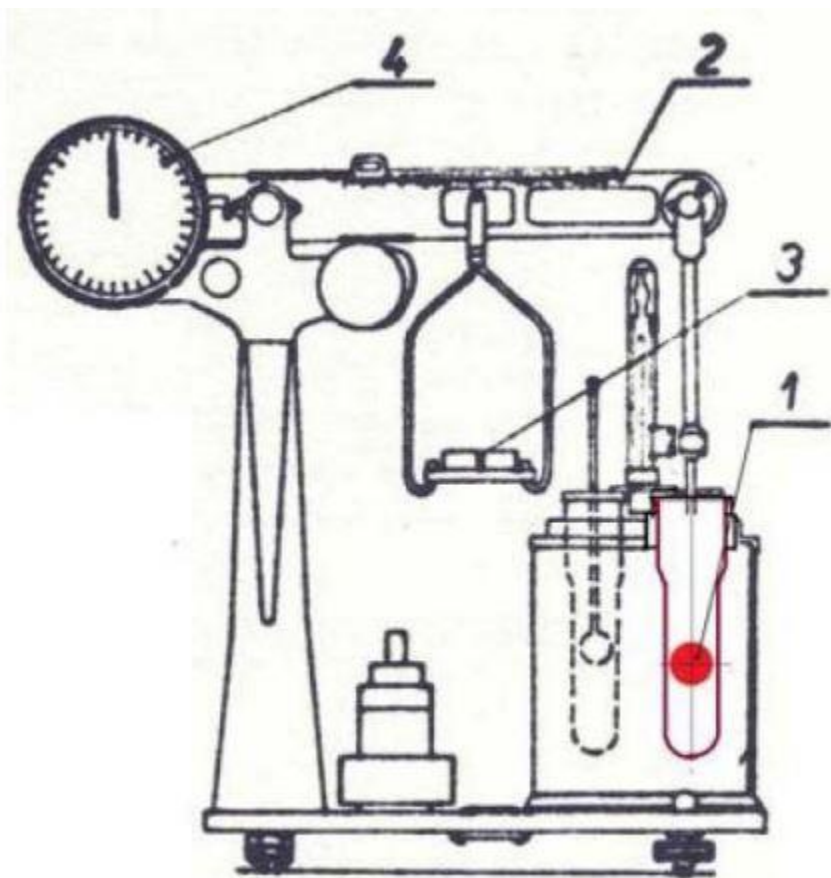
Kinematická viskozita $\nu = \eta/\rho$

$$\nu = A . t . 10^{-6} \text{ [m}^2 . \text{s}^{-1}\text{]}$$

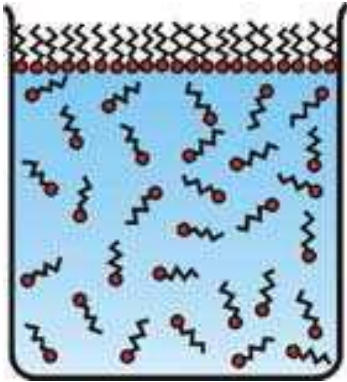


Pro měření pseudoplastických kapalin lze využít tlačný viskozimetr.
Zdánlivá viskozita závisí na velikosti rychlostního gradientu – ovlivněno
hmotností závaží (m)

$$\eta = k \cdot m \cdot t$$



Kritická micelární koncentrace



Spherical Micelle



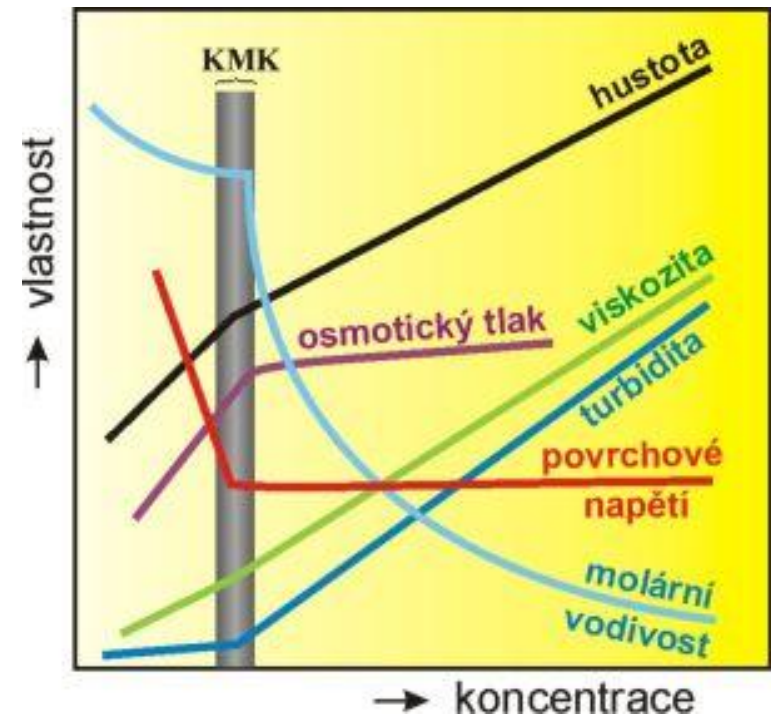
Cylindrical Micelle



Bilayer

Kritická micelární koncentrace závisí

- na délce a struktuře uhlovodíkového řetězce
- na vlastnostech hydrofilní skupiny
- na vlastnostech protiiontů vzniklých disociací (u ionogenních micelárních koloidů)
- na přítomnosti dalších látek v roztoku
- na teplotě a tlaku



Konduktometrie

$$G = \frac{1}{R}; \kappa = G * \frac{A}{l}; \lambda_m = \frac{\kappa}{c}$$

G = vodivost, (S)

R = odpor, (Ω)

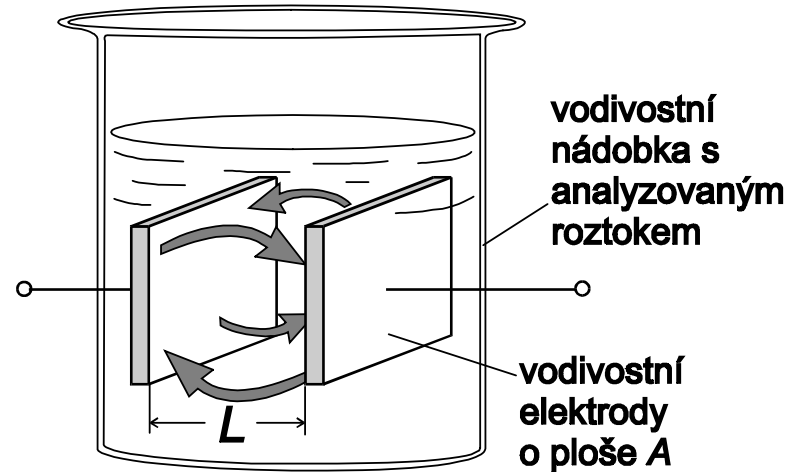
κ = specifická vodivost, ($\text{S} \cdot \text{cm}^{-1}$)

A = plocha elektrod, (cm^2)

l = vzdálenost mezi elektrodami, (cm)

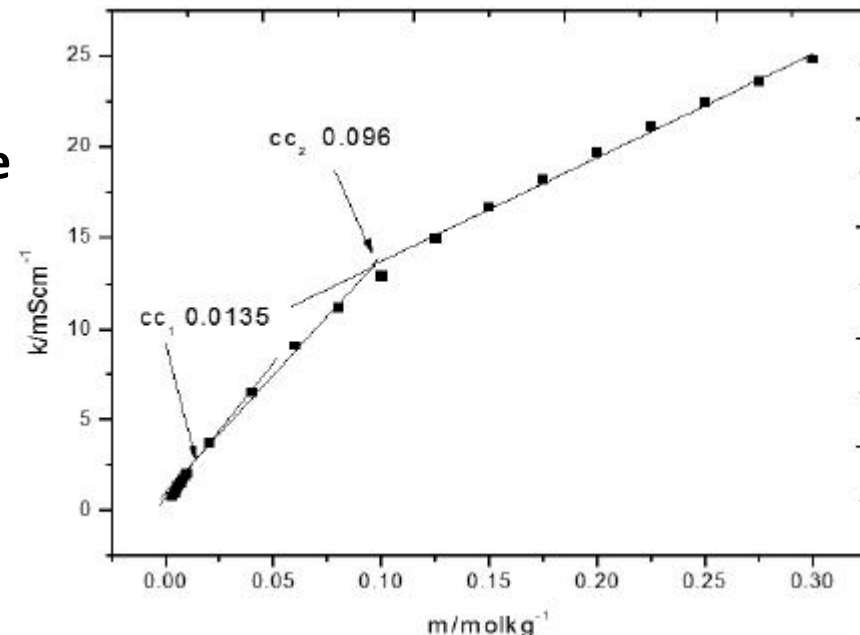
c = koncentrace, ($\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$)

λ_m = molární vodivost ($\Omega^{-1} \cdot \text{m}^2 \cdot \text{mol}^{-1}$)



1. Stanovení kvality vody dle ČL 2009

2. Stanovení kritické micelární koncentrace



Stalagmometrie

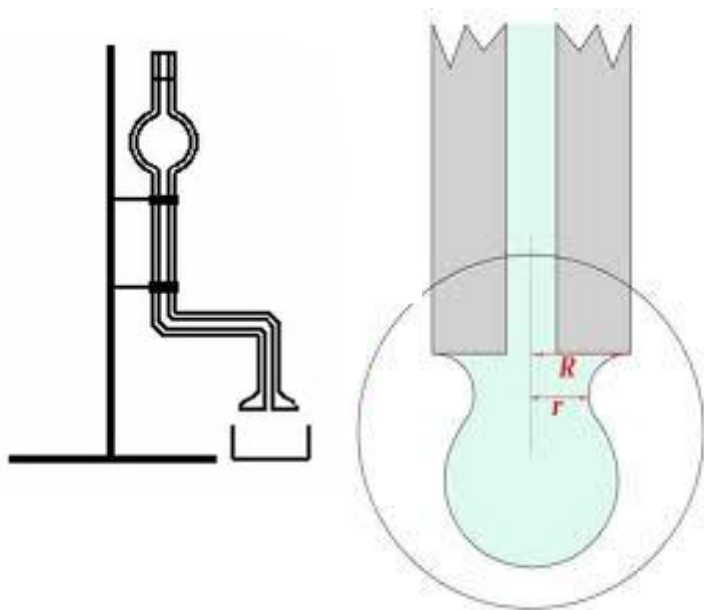
Kritická micelární koncentrace: při určité koncentraci tenzidů (povrchově aktivní látky) dojde ke vzniku micel = **náhlá změna povrchového napětí**.

Stalagmometrie spočívá ve zjištění hmotnosti kapky, která se utvoří na konci kapiláry. **V okamžiku odtržení kapky od ústí stalagmometru je síla povrchového napětí rovná tíhové síle kapky:**

$$mg = 2\pi r\sigma$$

$$\begin{aligned} m_1 g &= 2\pi r\sigma_1 \\ m_2 g &= 2\pi r\sigma_2 \end{aligned} \Rightarrow \frac{m_1}{\sigma_1} = \frac{m_2}{\sigma_2}$$

$$\sigma = \sigma_{H_2O} \times \frac{m}{m_{H_2O}}$$



Adsorpce

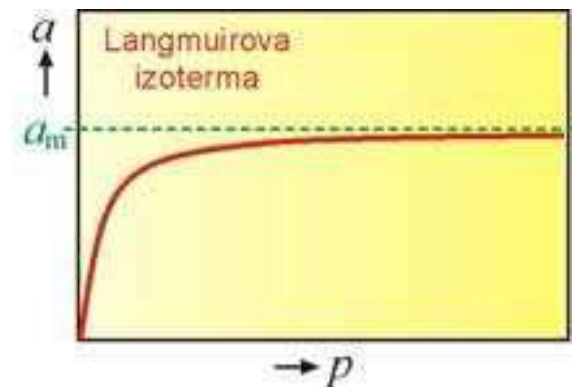
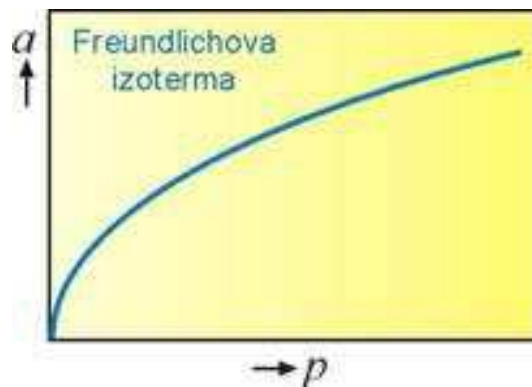
Adsorpce je samovolný děj (snížení energie systému => exotermický děj). Dochází k adsorpci na kapalný nebo pevný povrch (porézní látky mají velký vnitřní povrch) .

Adsorbent - pevná látka s velkou adsorpční kapacitou (velký specifický povrch).

Fyzikální adsorpce - molekuly jsou k povrchu pevné látky vázány fyzikálními silami (nespecifická).

Chemisorpce - molekuly jsou vázány s molekulami povrchu adsorbentu chemickou vazbou (specifická).

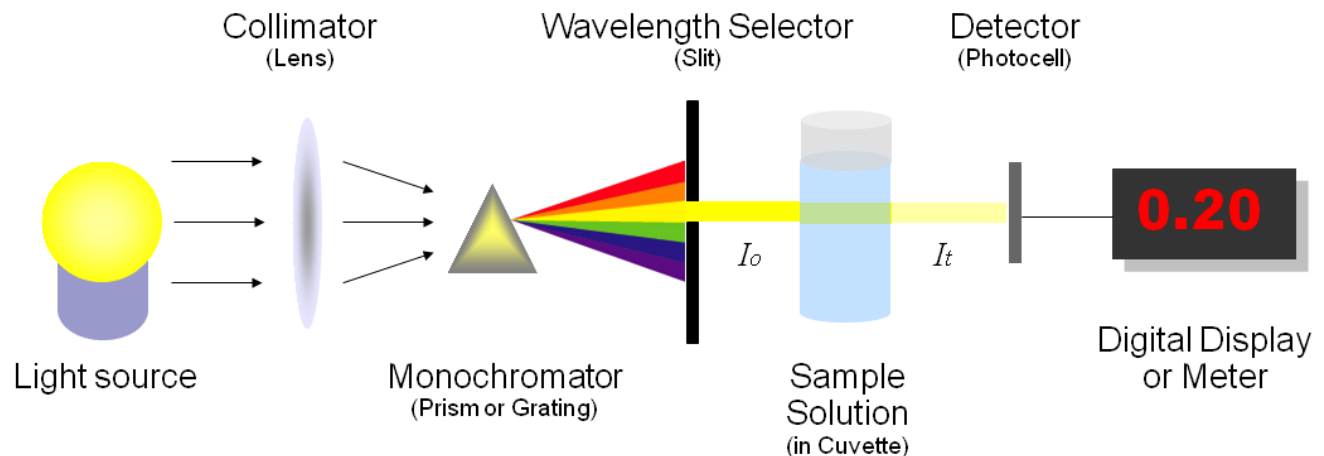
Adsorpční izoterma - závislost adsorbovaného množství látky na parciálním tlaku adsorbující se složky v plynné fázi (nebo koncentrace v kapalně fázi).



Adsorpce

Adsorpci z roztoku lze pozorovat např. u organických barviv. Přidá-li se k jejich roztoku aktivní uhlí, dojde po protřepání k adsorpci části barviva na jeho povrch a po odfiltrování je proto zabarvení roztoku méně intenzivní. Po dostatečně dlouhé době styku barviva s povrchem adsorbentu se ustaví adsorpční rovnováha. Poté je možné při konstantní teplotě vyjádřit závislost adsorbovaného množství barviva a na jeho rovnovážné koncentraci c v roztoku Langmuirovou adsorpční izotermou.

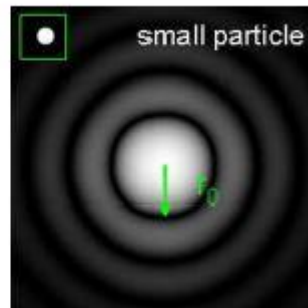
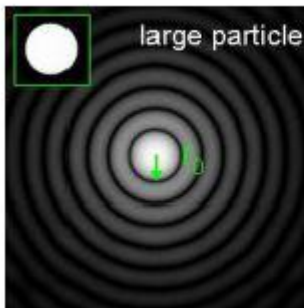
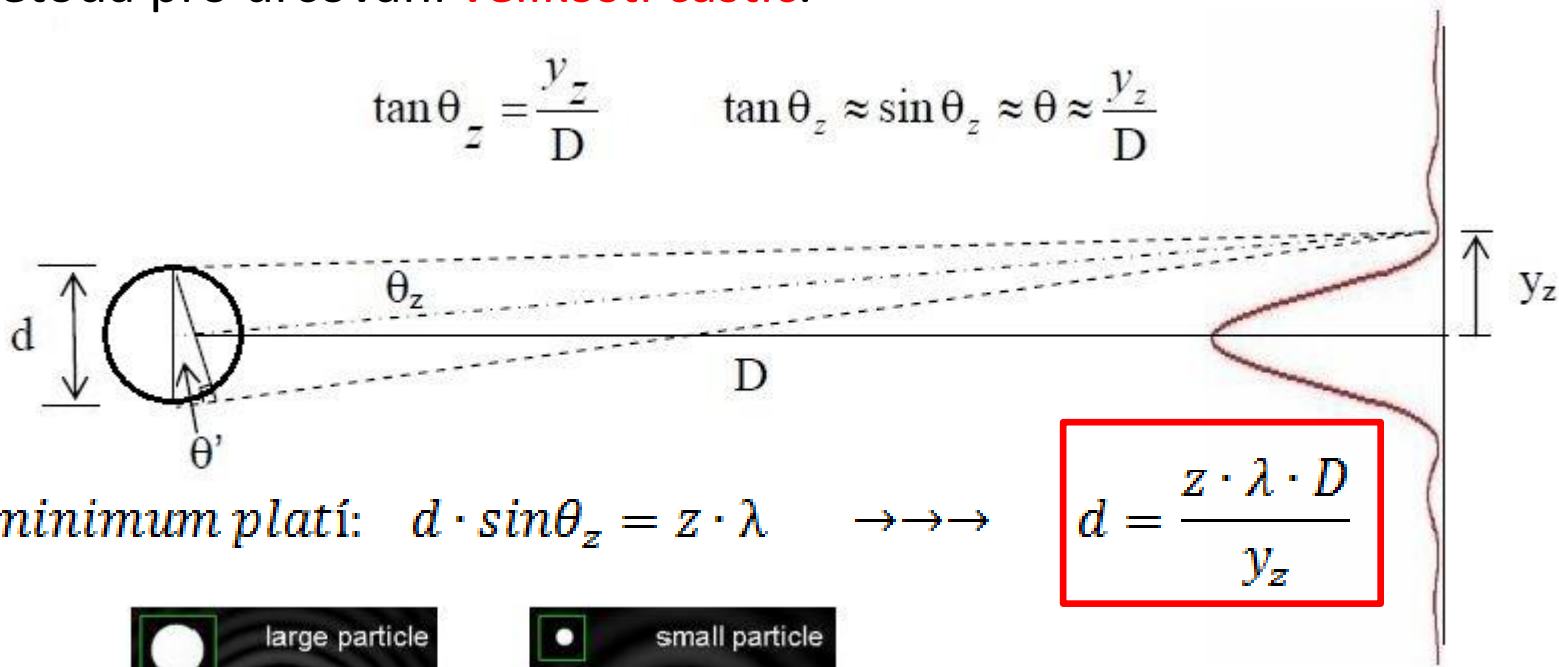
Hodnocení adsorbce na základě měření absorbance.



Laserová difrakce

Využívá jevu šíření světla do geometrického stínu částice, kde dochází k vytvoření difrakčního obrazce s typickými **maximy a minimy intenzity**. Metoda pro určování **velikosti částic**.

$$\tan \theta_z = \frac{y_z}{D} \quad \tan \theta_z \approx \sin \theta_z \approx \theta \approx \frac{y_z}{D}$$

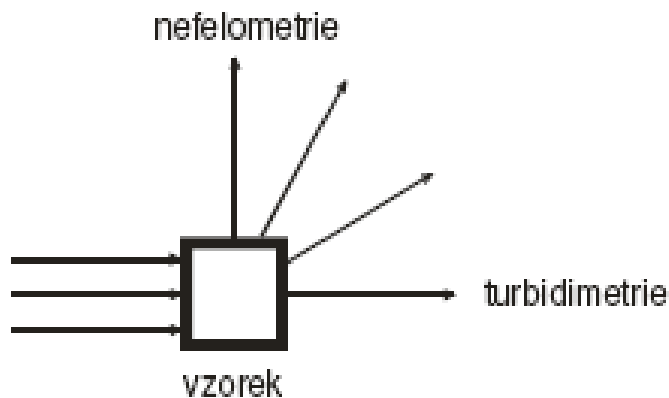


Nefelometrie

Využívá rozptylu světla při průchodu **koloidní** nebo **disperzní** soustavou a měří jeho intenzitu v **kolmém směru** na původní směr záření. Inverzní metodou k nefelometrii je **turbidimetrie** (měří úbytek intenzity záření v **přímém směru**). Intenzita rozptýleného světla závisí na vlnové délce světla, velikosti a koncentraci částic.

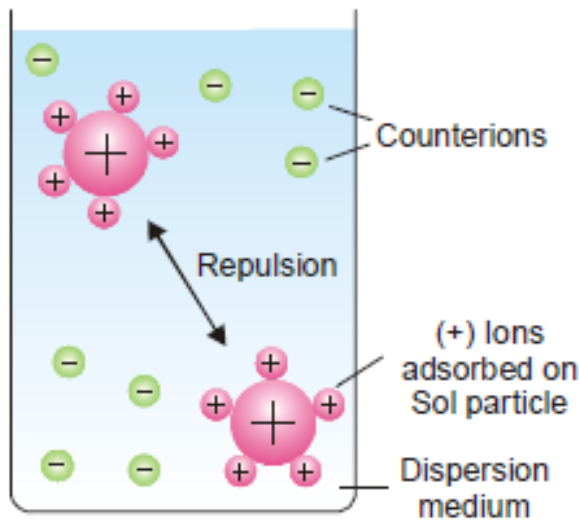
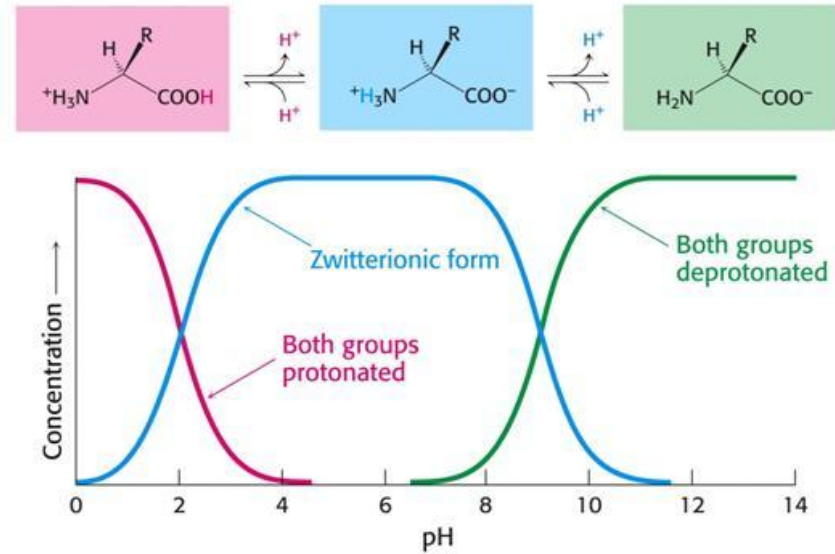
Turbidita se obvykle vyjadřuje v NTU (nephelometric turbidity units).

Metody se uplatňují například při hodnocení čistoty vody nebo vyhodnocování imunoprecipitačních reakcí v **imunochemických metodách** (komplex antigen-protilátka)



Stanovení izoelektrického bodu

V izoelektrickém bodě je koloidní systém nejméně stabilní – dochází ke **koagulaci** (kladné a záporné náboje se vyrovnají; elektrická dvojvrstva se zruší).



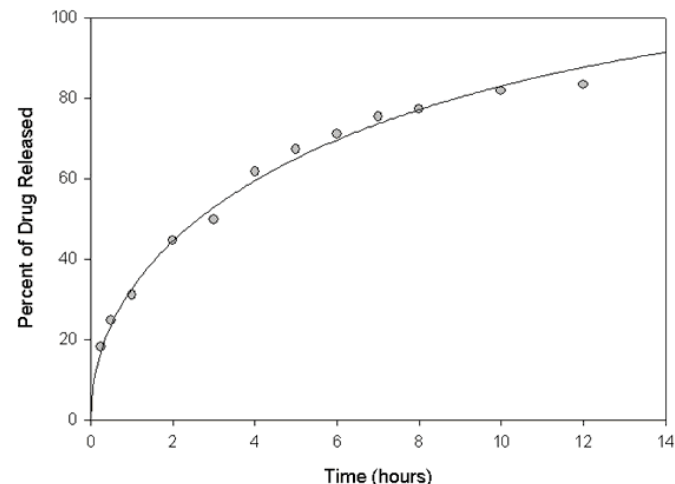
Vzájemné odpuzování mezi podobně nabitými částicemi zabraňuje vzniku agregátů – **důležité pro stabilitu koloidních systémů**.

Stanovení rychlosti rozpouštění

Rozpouštění (disoluce) pevných substancí – disoluční profil.

Rychlost rozpouštění ovlivňuje vstřebávání a biodostupnost léčivé látky.

Řízené uvolňování léčiv – hodnocení kinetiky uvolňování.



Disoluce je nezbytný test při vývoji pevné lékové formy a je používána:

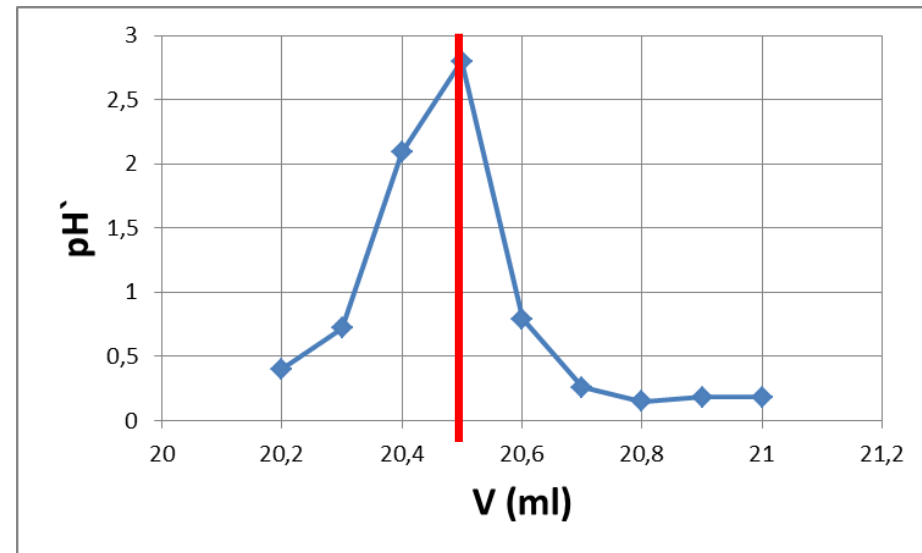
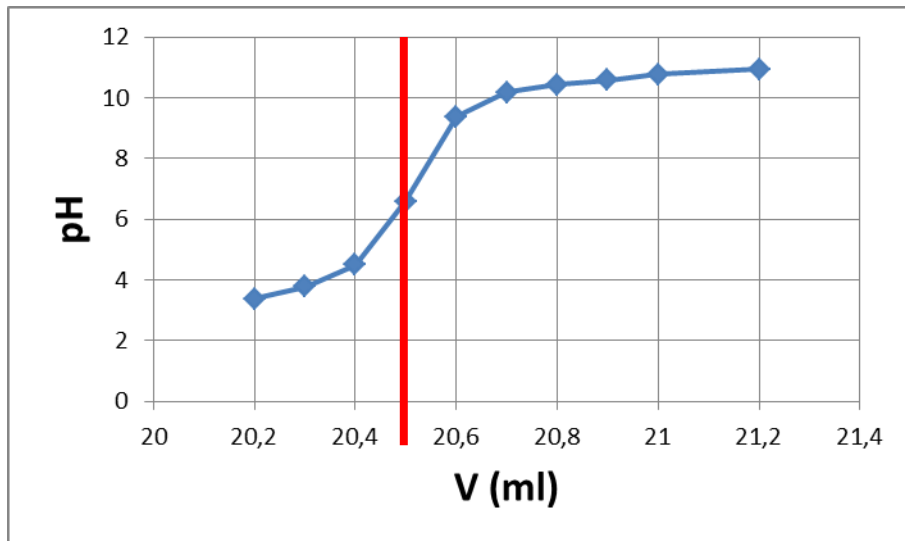
- ▶ Pro **optimalizaci výrobních podmínek** (koncentrace, technologické parametry výroby, výběr nejvhodnějších pomocných látek).
- ▶ Pro **ověření kvality přípravků** a výběr vhodných vzorků na další testování (např. klinické testy, bioekvivalence).
- ▶ Pro odhad **mechanismu uvolňování** z lékové formy
- ▶ Při **stabilitních studiích** (např. přípravky s řízeným uvolňováním)

Vyhodnocení – titrační křivka

Derivace funkce a její využití

Př. Určení bodu ekvivalence (inflexního bodu)

V [ml]	20,2	20,3	20,4	20,5	20,6	20,7	20,8	20,9	21	21,2
pH	3,37	3,77	4,49	6,58	9,38	10,17	10,43	10,58	10,76	10,94
pH'	0,4	0,72	2,09	2,8	0,79	0,26	0,15	0,18	0,18	
pH''	0,32	1,37	0,71	-2,01	-0,53	-0,11	0,03	0		



Vyhodnocení – titrační křivka

Derivace funkce a její využití

Př. Určení bodu ekvivalence

V [ml]	20,2	20,3	20,4	20,5	20,6	20,7	20,8	20,9	21	21,2
pH	3,37	3,77	4,49	6,58	9,38	10,17	10,43	10,58	10,76	10,94
pH'	0,4	0,72	2,09	2,8	0,79	0,26	0,15	0,18	0,18	
pH''	0,32	1,37	0,71	-2,01	-0,53	-0,11	0,03	0		

