

## Wyznaczenie wartości współczynnika van't Hoffa - Q10

### Cel ćwiczenia

Celem ćwiczenia jest wyznaczenie wartości współczynnika van't Hoffa (Q10) dla procesów: fizycznego (dyfuzja), chemicznego (inwersja sacharozy) i enzymatycznego.

Aby wyliczyć wartości współczynników Q10 należy wyznaczyć doświadczalnie stosunek szybkości opisanych niżej trzech procesów w dwóch temperaturach: pokojowej oraz pokojowej + 10 K.

### Zakres wymaganych wiadomości:

Zjawisko dyfuzji, I i II prawo Ficka, światło spolaryzowane, substancje optycznie czynne, skręcalność właściwa, prawo Lamberta Beera, absorbancja (ekstynkcja), szybkość procesu, inwersja sacharozy, trypsyna (własności i znaczenie)

### Tabela wyników pomiarów

	Dyfuzja		Inwersja sacharozy		Reakcja enzymatyczna	
Temperatura [K]	A <sub>1</sub>	A <sub>3</sub>	α <sub>20</sub>	α <sub>50</sub>	A <sub>20</sub>	A <sub>35</sub>
T <sub>p</sub> =						
T <sub>p+10</sub> =						
	Q <sub>10</sub>	ΔQ <sub>10</sub> /Q <sub>10</sub>	Q <sub>10</sub>	ΔQ <sub>10</sub> /Q <sub>10</sub>	Q <sub>10</sub>	ΔQ <sub>10</sub> /Q <sub>10</sub>

Pierwszą czynnością jest pomiar temperatury pokojowej T<sub>p</sub> oraz ustawienie termostatu łaźni wodnej na temperaturę wyższą o 10 stopni (T<sub>p+10</sub>)

### DYFUZJA

Materiały:

Roztwór błękitu bromofenolowego

Roztwór HCl

Aparatura:

Spekol 11

Łaźnia wodna

Termometr

Cylinder miarowy

Pipety

Naczynie z przegrodą ze spieku szklanego

Obserwacja dyfuzji w temperaturze pokojowej.

#### Przebieg ćwiczenia:

1. Do zlewki z wklejoną pionową przegrodą ze spieku szklanego wlać do jednej części (komory) 19 ml wody destylowanej a do drugiej komory 20 ml wody destylowanej.

2. Do obu komór wlać po 0,5 ml roztworu błękitu bromofenolowego.
3. Do probówki wlać 20 ml wody destylowanej oraz 0,5 ml roztworu błękitu bromofenolowego. Po wymieszaniu napęlić tym roztworem jedną z kuwetek pomiarowych (około 2 ml - będzie to roztwór odniesienia w stosunku do którego należy kalibrować Spekol 11)
4. Do komory zawierającej 19ml wody dodać 1ml roztworu HCl. Od tego momentu należy mierzyć czas.
5. Po upływie 1 minuty (mieszając roztwór zabarwiony początkowo na niebiesko pobrać 2ml roztworu wlać do kuwетки pomiarowej i odczytać absorbancję dla  $\lambda = 430 \text{ nm}$  (względem roztworu błękitu bromofenolowego – punkt 3)  
**UWAGA – przed każdym pomiarem sprawdzić ustawienie  $\lambda$  ze względu na inne ustawienia konieczne w innych pomiarach.**
6. Po dokonaniu pomiaru wlać z powrotem pobrane 2ml roztworu do tej samej komory. Po czasie 3 minut (od momentu wiania HCl) powtórnie pobrać 2 ml roztworu z tej samej komory i powtórzyć pomiar.

Obserwacja dyfuzji w temperaturze pokojowej + 10 stopni.

1. Odmierzyć 19 i 20 ml wody destylowanej do dwóch probówek i umieścić je w łaźni wodnej utrzymującej temperaturę o 10 stopni wyższą od temperatury otoczenia.
2. Po 10 minutowej inkubacji powtórzyć czynności z punktu 1 trzymając zlewkę z komorami w łaźni wodnej.

Uwaga - przygotowany wcześniej roztwór odniesienia błękitu bromofenolowego (p. 3) przechowywany w temperaturze pokojowej może być stosowany do pomiarów w temperaturze o 10 stopni wyższej (dlaczego?)

### Opracowanie wyników.

Ze względu na prawo Lamberta-Beera wartość parametru  $Q_{10}$  dla badanego procesu może być wyrażona za pomocą odpowiednich wartości ekstynkcji (absorbancji):

$$Q_{10} = \frac{A_1(T_{p+10}) - A_3(T_{p+10})}{A_1(T_p) - A_3(T_p)}$$

gdzie:

- $A_1(T_{p+10})$  – absorbancja po czasie 1 minuty w temperaturze pokojowej ( $T_p$ ) + 10K,
- $A_3(T_{p+10})$ ,  $A_1(T_p)$ ,  $A_3(T_p)$  – absorbancje po 3, 1 i 3 minutach w temperaturach  $T_{p+10}$ ,  $T_p$

### INWERSJA SACHAROZY

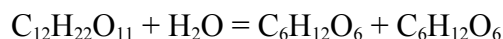
Materiały:

- Sacharoza
- Roztwór HCl

Aparatura:

- Waga
- Sacharymetr
- Łaźnia wodna
- Termometr
- Cylinder miarowy
- Kolby stożkowe
- Probówki

Inwersja sacharozy jest reakcją hydrolizy dwucukru na dwa monocukry: glukozę i fruktozę:



Katalizatorem tej reakcji są protony. Wszystkie wymienione cukry są optycznie czynne. Skręcalności właściwe wynoszą:

Sacharoza  $66,5^\circ$

glukoza  $52,5^\circ$

fruktoza  $-91,9^\circ$ .

Podczas tej reakcji zmiana kąta skręcania płaszczyzny polaryzacji światła jest miarą postępu reakcji.

### Przebieg ćwiczenia:

1. Odważyć 5g sacharozy i rozpuścić w 20ml  $H_2O$  destylowanej.
2. Po rozpuszczeniu roztwór sacharozy podzielić na dwie równe objętości po 10ml (w opisanych probówkach)
3. Jedną probówkę z 10 ml roztworu sacharozy umieścić w łaźni wodnej.
4. Do drugiej probówki z 10ml roztworu sacharozy (w temperaturze pokojowej) dodać 10 ml HCl - wymieszać i od tego momentu mierzyć czas.
5. Tak przygotowany roztwór przelać do jednej z rurek sacharymetru, tak aby nie było w niej pęcherzyków powietrza. (napełnianie rurki należy wcześniej przeciwżyć napełniając ją wodą).
6. Napełnioną prawidłowo rurkę sacharymetru roztworem sacharozy należy ostrożnie zakręcić nakrętkami dociskającymi okrągłe płytki szklane (z wyczuciem aby nie uszkodzić płytek szklanych)
7. Przed umieszczeniem napełnionej rurki do sacharymetru należy ją opłukać wodą i osuszyć ręcznikiem papierowym.
8. Umieścić rurkę w sacharymetrze i odczytywać kąt skręcenia płaszczyzny polaryzacji światła spolaryzowanego przechodzącego przez rurkę z sacharozą po 20 oraz 50 minutach od momentu dodania HCl.
9. Po pierwszym pomiarze można dodać 10 ml HCl (przechowywanego w łaźni wodnej) do drugiej probówki z 10 ml roztworu sacharozy ( w łaźni wodnej)
10. Po wymieszaniu napełnić drugą rurkę sacharymetru postępując analogicznie jak wcześniej (dla każdej rurki należy mierzyć czas oddzielnie).
11. Po 20 i 50 minutach od momentu dodania HCl należy dokonać odczytu kąta skręcenia analogicznie jak w p.8. W czasie między pomiarami rurka ta powinna być umieszczona w łaźni wodnej.

Pomiar kąta skręcenia płaszczyzny polaryzacji światła za pomocą sacharymetru.

Przed przystąpieniem do pomiaru należy odpowiednio ustawić lustro sacharymetru tak aby dobrze oświetlić pole widzenia obserwowane przez lunetę.

Po umieszczeniu w rurce badanego roztworu z substancją optycznie czynną należy obracać tarczę analizatora o taki kąt aby uzyskać równomierne (jak najsłabsze) oświetlenie trzech części obserwowanego przez lunetkę pola. Kąt skręcenia należy odczytać na skali kątowej (20 działek dodatnich – na lewo od zera oraz 20 działek ujemnych – na prawo do zera).

Posługując się skalą noniusza dziesiętnego możemy odczytać kąt z dokładnością do 0,1 stopnia.

## Opracowanie wyników

Kąt skręcenia płaszczyzny polaryzacji światła przechodzącego przez rurkę wypełnioną roztworem sacharozy zakwaszonej kwasem solnym jest miarą postępu reakcji inwersji sacharozy. Zatem parametr  $Q_{10}$  dla tej reakcji można zapisać w postaci wzoru:

$$Q_{10} = \frac{\alpha_{t1}(T_{p+10}) - \alpha_{t2}(T_{p+10})}{\alpha_{t1}(T_p) - \alpha_{t2}(T_p)}$$

gdzie:

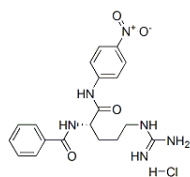
-  $\alpha_{t1}(T_{p+10})$  – kąt skręcenia płaszczyzny światła przez roztwór sacharozy inkubowanej w łaźni wodnej o temperaturze  $T_{p+10}$  (temperaturze pokojowej + 10K) po czasie  $t1$  od momentu dodania kwasu solnego

-  $\alpha_{t2}(T_{p+10})$ ,  $\alpha_{t1}(T_p)$ ,  $\alpha_{t2}(T_p)$  – analogiczne kąty skręcenia po czasie ( $t2, t1$  oraz  $t2$ ) w temperaturach:  $T_{p+10}$  oraz  $T_p$

## REAKCJA ENZYMATYCZNA

Materiały:

Trypsyna  
BAPNA



PABNA

N-ALPHA-BENZOYL-L-ARGININE P-NITROANILIDE HYDROCHLORIDE

TRIS-HCl  
HCl 0,01M

Aparatura:

Spekol 11  
Łaźnia wodna  
Pehametr  
Termometr  
Probówki  
Pipety

Przygotowanie roztworu enzymu (sporządzić świeży roztwór).

Odważyć 10mg trypsyny i rozpuścić w 10ml 0,01M HCl (przechowywać w probówce).

Przygotowanie roztworu substratu (trwałość około 2 tygodni).

Odważyć 50mg BAPNA i rozpuścić w 50 ml wody destylowanej ogrzewając do ok. 90°C. Po rozpuszczeniu schłodzić od temperatury pokojowej.

Przygotowanie buforu TRIS-HCl pH 7,8

1. Odważyć 18,6 g TRIS-HCl i rozpuścić w 450 ml wody destylowanej.

2. Doprowadzić do pH 7,8 i uzupełnić wodą destylowaną do 500 ml

#### **Przebieg ćwiczenia:**

1. Przygotować 5 probówek i oznaczyć numerami od 1 do 5.
2. Pobrać do cylindra miarowego 15 ml buforu TRIS-HCl. (aby dalej nie pobierać buforu bezpośrednio z butelki).
3. Do probówek nr 1 i 2 dodać po 3,8 ml buforu TRIS-HCl (pobrać z cylindra - p.2) oraz po 0,2ml roztworu trypsyny.
  - probówkę nr 1 umieścić w łaźni wodnej,
  - probówkę nr 2 pozostawić w temperaturze pokojowej.
4. Do probówek nr 3, 4 i 5 dodać po 1,8ml buforu TRIS-HCl oraz po 1,0 ml roztworu substratu (BAPNA).
  - Probówkę nr 3 umieścić w łaźni wodnej.
  - Do probówki nr 4 dodać 0,2 ml wody destylowanej – wymieszać i pobrać ok. 2ml do kuwety pomiarowej (kuweta odniesienia dla której należy kalibrować Spekol 11).
  - Do probówki nr 5 dodać 0,2ml (z probówki nr 2) roztworu trypsyny przechowywanej w temperaturze pokojowej – od tej pory jest to probówka z mieszaniną reakcyjną). Energicznie wymieszać i od tego momentu rozpocząć pomiar czasu zachodzącej reakcji.
5. Po upływie 20 minut pobrać ok. 2 ml mieszaniny reakcyjnej (enzym+substrat – probówka nr 5) do kuwety pomiarowej i zmierzyć absorbancję przy długości fali  $\lambda=405\text{nm}$  względem roztworu samego substratu (p. 4)

#### **UWAGA – przed każdym pomiarem sprawdzić ustawienie $\lambda$ ze względu na inne ustawienia konieczne w innych pomiarach.**

6. Ze względu na to, że reakcja ta jest prowadzona w temperaturze pokojowej, można pozostawić mieszaninę reakcyjną w kuwecie pomiarowej i po 35 minutach, od chwili utworzenia mieszaniny reakcyjnej, powtórnie zmierzyć absorbancję.

**Uwaga** – kuwety pomiarowe przed użyciem należy przemyć strumieniem wody destylowanej. Uwaga ta nie dotyczy kuwet, w których pozostawiamy roztwory do dalszych pomiarów.

#### **Przeprowadzenie reakcji w temperaturze łaźni wodnej ( $T_p+10$ ).**

1. Postępować jak wcześniej, dodając do probówki nr 3 (z substratem) 0,2ml (z probówki nr 1) roztworu enzymu. Mieszaninę reakcyjną (probówka nr 3) należy także umieścić w łaźni wodnej.
2. Pomiary absorbancji mieszaniny reakcyjnej (probówka nr 3) wykonać po upływie 20 i 35 minut licząc od chwili wymieszania roztworów substratu i enzymu.
3. Ze względu na pomiar absorbancji w temperaturze pokojowej, **po każdym pomiarze przelać zawartość kuwety pomiarowej do probówki nr 3 z mieszaniną reakcyjną przechowywaną w łaźni wodnej.**

#### **Opracowanie wyników**

Wartość  $Q_{10}$  dla tej reakcji możemy obliczyć analogicznie jak dla procesu dyfuzji.

## RACHUNEK BŁĘDÓW

We wszystkich wykonanych pomiarach miarą szybkości badanych procesów jest zmiana stężenia dzielona przez czas tej zmiany (co ma sens tylko dla odpowiednio dobranych czasów dla poszczególnych procesów – Dlaczego?).

Zatem, ogólnie  $Q_{10}$  można wyrazić za pomocą wzoru:

$$Q_{10} = \frac{\frac{\Delta c(T_{p+10})}{\Delta t}}{\frac{\Delta c(T_p)}{\Delta t'}}$$

Przyjmując:

$\Delta t = \Delta t'$  oraz taką samą niepewność pomiaru obu przedziałów czasowych tj.  $\Delta(\Delta t)$  i  $\Delta(\Delta t')$  a także taką samą niepewność pomiarową zmian stężeń w obu temperaturach:  $\Delta(\Delta c(T_{p+10})) = \Delta(\Delta c(T_p))$

można wykazać, że **błąd względny** wyznaczenia  $Q_{10}$  wyraża się równaniem:

$$\frac{\Delta Q_{10}}{Q_{10}} = \Delta(\Delta c(T_p)) \left( \frac{1}{\Delta c(T_p)} + \frac{1}{\Delta c(T_{p+10})} \right) + 2 \frac{\Delta(\Delta t)}{\Delta t}$$

gdzie

$\Delta(\Delta t)$  – to niepewność pomiarowa przedziału czasu  $\Delta t$

$\Delta(\Delta c(T_p))$  – to niepewność pomiaru różnicy stężeń (odpowiednich absorbancji) w temperaturze pokojowej  $T_p$ .

Niepewność pomiaru stężenia za pomocą Spekola 11.

Można przyjąć dwukrotną różnicę wskazań wartości absorbancji dla próby odniesienia przed pomiarem (kalibracja przyrządu przed pomiarem – powinna się pojawić wartość 0.000) oraz bezpośrednio po pomiarze próbki badanej.

Niepewność pomiarowa sacharymetru.

Można przyjąć dwukrotną wartość niepewności pojedynczego pomiaru. Niepewność pojedynczego pomiaru można wyznaczyć poprzez kilkakrotny pomiar kąta skręcenia tej samej próbki roztworu (postęp badanej reakcji jest na tyle wolny, że można go zaniedbać) i przyjąć różnicę pomiędzy skrajnymi wartościami. W przypadku odczytu identycznych wartości przyjąć  $0,1^\circ$ .

Literatura:

Podstawy biofizyki, podręcznik dla studentów medycyny, red. A. Pilawski, PZWL

Opracował dr hab. Krystian Kubica

Zapotrzebowanie odczynników na cały semestr (x50)

HCl 22ml x 50=1100ml

Tris-HCl 15ml x 50=750ml

Roztwór BAPNA 3ml/ćwiczenieX4=12ml /tydzień\*2=24ml /2 tygodnie

0,01M HCl 10mlx50=500ml