

**МЕТОДИЧЕСКОЕ ПОСОБИЕ
К МАЛОМУ ПРАКТИКУМУ
ПО БИОФИЗИКЕ**

САРАТОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н. Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО

Саратовский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского

МЕТОДИЧЕСКОЕ ПОСОБИЕ К МАЛОМУ ПРАКТИКУМУ ПО БИОФИЗИКЕ

Издание шестое

ИЗДАТЕЛЬСТВО САРАТОВСКОГО УНИВЕРСИТЕТА

2016

УДК 577.3(076.5)
ББК 28.071 Я 73
М54

Составители:

И.К. Миронова, М.В. Каневский

Методическое пособие к малому практикуму по биофизике. 6-е изд. /
Сост.: И. К. Миронова, М.В. Каневский. – Саратов: Изд-во Саратов. ун-
та, 2016. – 44 с.: ил.

ISBN 5-292-02946-7

В пособии описываются биофизические и физико-химические методы исследования биологических объектов и модельных систем. Практические задания сопровождаются освещением теоретических вопросов, раскрывающих основы каждого метода и особенности их использования в биологических исследованиях.

Для студентов биологического факультета.

Рекомендуют к печати:

Кафедра биохимии и биофизики Саратовского госуниверситета
Доктор биологических наук, профессор *Л.В. Карпунина*

Печатается по решению ученого совета биологического факультета
Саратовского государственного университета

УДК 577.3(076.5)
ББК 28.071 Я 73

ISBN 5-292-02946-7

© И. К. Миронова, М.В. Каневский
составление, 2016

1. МЕТОДЫ РЕГИСТРАЦИИ РАДИОАКТИВНЫХ ИЗЛУЧЕНИЙ

Радиоактивные излучения могут быть обнаружены и измерены по тем физическим процессам, которые происходят при взаимодействии излучений с веществом. Наиболее распространенным методом регистрации излучений является ионизационный метод, основанный на измерении непосредственно ионизационного эффекта, вызываемого излучением при прохождении через вещество.

Помимо ионизационного используют фоторадиографический, люминесцентный, химический и другие методы измерений, которые основаны на вторичных эффектах, происходящих в результате ионизации.

Камера Вильсона позволяет наблюдать следы отдельных заряженных частиц. Они становятся видны благодаря тому, что на ионах, образованных частицами в камере, пересыщенные пары конденсируются в виде мельчайших капелек. По плотности следа можно судить о плотности ионизации, а, следовательно, и о природе ионизирующей частицы. В камере, помещенной в магнитное поле, по следу частицы можно определить ее заряд, массу и энергию.

Авторадиографический или фоторадиографический метод основан на том, что на фотографическую пленку или пластинку действуют ионизирующие излучения, в результате ионизации в фотоэмульсии происходят фотохимические процессы, вследствие которых после проявления вдоль следов α - и β - частиц выделяются зерна серебра. По числу следов в фотоэмульсии можно судить об интенсивности потока излучений, а по длине следа определяют энергию частиц. Доза γ -излучения измеряется по суммарному почернению фотопластинки.

Метод счета сцинтилляций основан на том, что некоторые вещества, например сернистый цинк, антрацен, светятся (люминесцируют) под влиянием излучения. Слабые световые вспышки, усиленные фотоумножителем, могут быть затем зарегистрированы измерительным прибором. Прибор, состоящий из люминесцентного кристалла и фотоумножителя, называется люминесцентным, или сцинтилляционным счетчиком.

Калориметрический метод основан на измерении энергии излучений и активности препаратов по тому тепловому эффекту, который получается при поглощении излучения веществом. Для этой цели используются специальные калориметры, внутрь которых помещается радиоактивное вещество; излучение этого вещества полностью поглощается стенками калориметра.

Химический метод. Под воздействием излучения химические вещества изменяют свои свойства: изменяется цвет растворов, выделяются газы из соединений, происходит осаждение коллоидов и т. п. Степень этих изменений зависит от дозы излучения. Химические методы дозиметрии являются малочувствительными и используются в основном для измерения больших доз излучения.

Радиометрический, или ионизированный метод является самым точным и наиболее широко применяемым методом регистрации излучений. Он основан на определении ионизационного тока, возникающего под влиянием радиоактивных излучений в ионизационной камере.

Существуют разнообразные типы ионизационных камер, но принцип устройства у всех один. Любая ионизационная камера представляет собой воздушный или газовый конденсатор. Ток, возникающий от ионизации газа радиоактивной частицей будет зависеть от величин приложенного на пластины конденсатора напряжения.

Рассмотрим вольт-амперную характеристику ионизационной камеры (рисунок 1):

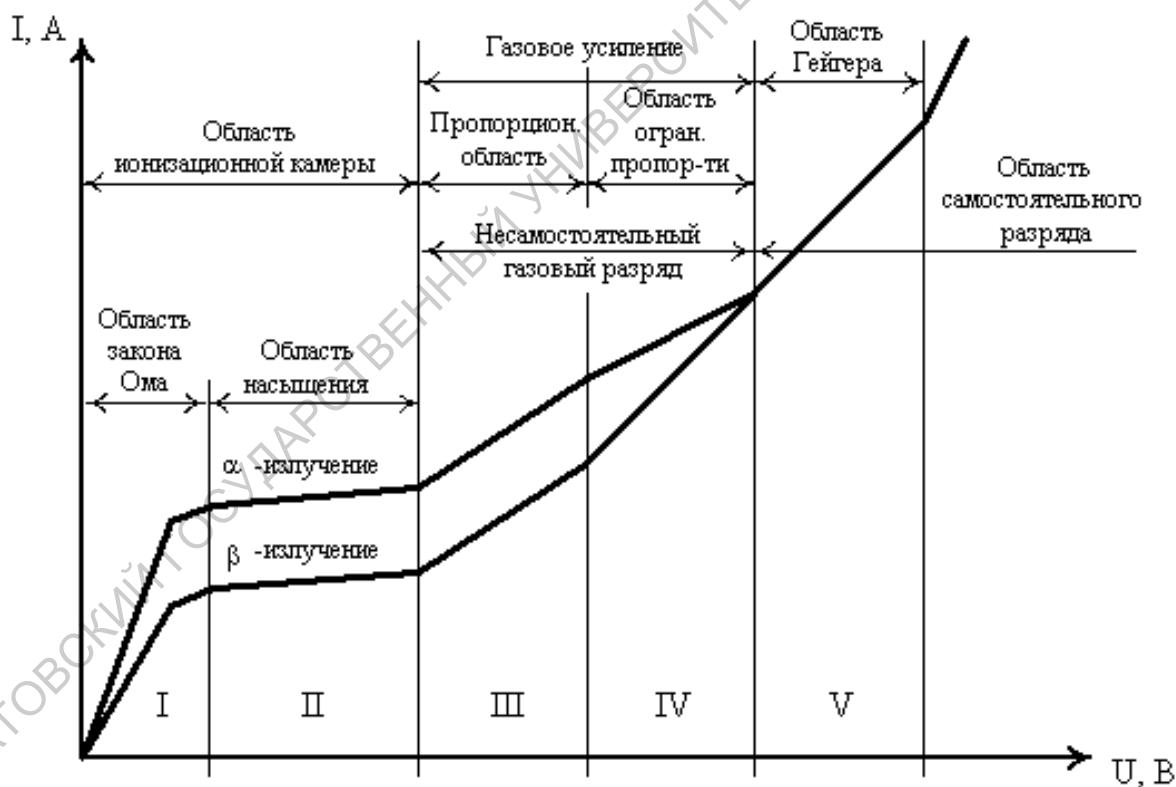


Рисунок 1. Вольт-амперная характеристика ионизационной камеры

I – область первичной ионизации, где идет увеличение силы ионизационного тока i прямолинейно, $i = n \times e$, (где n – число пар ионов; e – заряд одного иона);

II – область тока насыщения;

III – область пропорциональности, где имеется строгая пропорциональность между числом ионов, образованных в области первичной ионизации n , и числом ионов, образованных при вторичной ионизации n_0 , соответственно сила ионизационного тока в этой области увеличивается пропорционально энергии радиоактивных излучений;

IV – область ограниченной пропорциональности, где нарушается пропорциональность между n_0 и n

V – область Гейгера. В области Гейгера сила тока уже совершенно не зависит от первичной ионизации, а определяется только напряжением V .

Область пропорциональности используется в пропорциональных счетчиках. Эти счетчики применяются для измерения энергии частиц или для регистрации в смешанном потоке сильно ионизирующих частиц. Например, если в пропорциональный счетчик попадают α - и β -частицы, то вследствие того, что α -частицы создают на одинаковом пути в счетчике в несколько сот раз большее число пар ионов, чем β -частицы, импульс в счетчике α -частиц также будет в несколько сот раз больше. Регистрируя только большие импульсы и не регистрируя малые, можно производить счет α -частиц на фоне β -частиц.

Область Гейгера применяется в счетчиках Гейгера-Мюллера, отчего она и получила свое название.

1.1. СЧЕТЧИКИ ГЕЙГЕРА-МЮЛЛЕРА

Счетчики Гейгера представляют собой цилиндрические конденсаторы с неравными по площади электродами. Анод изготавливается из тонкой металлической, обычно вольфрамовой или молибденовой, проволоки толщиной 0,1 – 0,2 мм. У катода наружный цилиндр либо металлический, либо стеклянный с нанесенным изнутри металлическим слоем.

Диаметр цилиндра 1 – 3 см. Счетчики наполняются газом при пониженном давлении (50-60 мм рт.ст). Заполняется счетчик обычно аргоном в смеси с другими газами.

Счетчики Гейгера делятся на два типа: несамогасящиеся и самогасящиеся. Для гашения разряда в первых счетчиках требуются специальные устройства. Во

вторых счетчиках разряд гасится с помощью молекул этилового спирта, примесь которого имеется в счетчике.

Счетчики Гейгера различаются по материалу катода и по своей геометрии, а также по своему назначению.

Для регистрации α -частиц применяются торцовые счетчики. Для регистрации β -частиц служат как обычные цилиндрические счетчики, так и торцовые. Чтобы уменьшить поглощение в катоде цилиндрического счетчика, последний стараются сделать по возможности тоньше и для изготовления применяют легкие металлы. Обычно цилиндры β -счетчиков изготавливают из алюминия. Для регистрации γ -лучей применяются счетчики, катод которых сделан из тяжелого металла с большим атомным номером и с толщиной стенок, равной максимальному пробегу вторичных электронов, так как γ -кванты при взаимодействии с веществом непосредственно не создают ионизации, а сначала образуют вторичные электроны.

Стеклянные счетчики различаются по размерам и по материалу катода (алюминиевые, медные, стальные, вольфрамовые и т.д.).

Механизм разряда в счетчике Гейгера

Когда во внутренний объем счетной трубки попадает ядерная частица, она производит первичную ионизацию. Образовавшиеся при этом положительные ионы аргона движутся к катоду, к стенке трубки, а электроны – к аноду, к нити. В области нити густота силовых линий очень велика, так как поверхность нити много меньше поверхности стенки трубки, и именно здесь напряженность электрического поля достигает величины области Гейгера. Под влиянием высокого напряжения движущиеся к нити (аноду) электроны приобретают большие ускорения и производят ударную вторичную ионизацию.

Положительные ионы аргона движутся к катоду. На пути они приобретают довольно большую скорость и, ударяясь о металлический катод, выбивают из него большее число электронов, чем необходимо для нейтрализации положительных ионов. Оказавшиеся свободными электроны направляются к аноду - нити и, попадая в область высоких напряжений, в свою очередь производят ударную ионизацию и т.д.

Кроме того, некоторые атомы аргона при столкновении с ядерными частицами или быстро движущимися электронами не ионизируются, а лишь приходят в возбужденное состояние – переходят на новый, более высокий энергетический уровень. Возвращаясь затем к своему прежнему энергетическому уровню, такие атомы испускают ультрафиолетовые лучи. Кванты УФ-излучения достигают металлического катода и выбивают из него электроны, которые также направ-

ляются к нити, приобретают большие ускорения и производят ударную ионизацию.

Таким образом, ионизация, раз начавшаяся по поводу попадания в счетчик одной ядерной частицы, продолжается со всё большей интенсивностью. Число вторичных ионов лавинообразно нарастает. Счетная установка, в которую включена счетная трубка, отмечает появление ионизационного тока – регистрирует импульс.

Если в это время в счетчик проникает вторая ядерная частица, то произведенная ею ионизация не изменит по существу имевшуюся картину. Для того чтобы можно было зарегистрировать появление в счетчике второй ядерной частицы, ионизацию, возникшую по поводу первой ядерной частицы, надо остановить.

В несамогасящихся счетчиках, чтобы остановить нарастающую вторичную ионизацию, снижается на аноде напряжение. Электроны, не получая больших ускорений, теряют способность производить ударную ионизацию, и новообразование прекращается. Затем подаваемое на нить напряжение вновь повышается, и счетная трубка снова готова к работе. Такой способ гашения разряда требует сравнительно большого времени и сложной электронной аппаратуры. Несамогасящиеся счетчики могут отдельно регистрировать не более 100 – 1000 имп./сек.

В самогасящихся счетчиках, кроме газа аргона, находятся еще пары многоатомных спиртов или других органических соединений, (смесь состоит обычно из 90% аргона и 10% паров спирта). Молекулы спирта выполняют двойную функцию. Во-первых, они имеют слабосвязанный электрон, который может легко отходить от молекулы спирта и присоединяться к положительному иону аргона. Таким образом, ионы аргона превращаются в электрически нейтральные атомы, еще не успев достигнуть катода. К катоду вместо легких ионов движутся тогда тяжелые ионы спирта, они не приобретают больших ускорений и, дойдя до катода, нейтрализуются на нем, не выбивая при этом лишних электронов. Во-вторых, молекулы спирта поглощают кванты УФ-излучения, это в свою очередь также гасит часть разряда, поскольку из катода не выбиваются электроны.

Таким образом, высвобождение электронов прекращается, а вместе с тем прекращается и вторичная ионизация. Счетчик снова готов к регистрации ядерной частицы.

Самогасящиеся счетчики могут регистрировать до 10000 имп./сек. Время, в течение которого счетчик не может зарегистрировать попавшие в него частицы, называется мертвым временем счетчика τ . Обычно мертвое время меньше, чем время протекания газового разряда, так как потенциал нити достигает значения, при котором возможна регистрация частиц, раньше, чем все положительные ионы дойдут до катода. Счетчик не регистрирует те заряженные частицы, которые

попадают в него в мертвые интервалы времени. Значит, счетчик не может зарегистрировать все попавшие в него частицы, число импульсов в счетчике всегда меньше числа попавших в него частиц, т.е. счетчик просчитывает. Очевидно, просчет счетчика тем больше, чем больше мертвое время и чем больше поток падающих на счетчик частиц.

Мертвое время несамогасящихся счетчиков значительно больше (около 10^{-2} с), чем у самогасящихся счетчиков 10^{-4} сек (у них меньше просчет времени). Для оценки величины просчета пользуются не мертвым временем τ , а обратной величиной $1/\tau$, которая называется завершающей силой счетчика. Ошибки на просчет равны примерно мертвому интервалу, выраженному в секундах. Если счет не превышает 10000 имп./мин, то поправку на просчет не вводят, так как она будет мала.

В самогасящихся счетчиках молекулы спирта “разламываются”, поглощая кванты ультрафиолета (диссоциируют на более простые молекулы, уже не пригодные для осуществления процесса гашения разряда). Поэтому, когда запас молекул в трубке будет исчерпан, она выходит из строя. Для того чтобы счетная трубка работала, возможно, дольше, не следует подавать на нее слишком высокое напряжение. Таким образом, счетчик может работать только в определенном интервале напряжений.

Рабочее напряжение счетчика – напряжение, при котором счетчик работает с максимальной эффективностью. Оно определяется экспериментально. Для этого снимают кривую зависимости скорости счета от напряжения на счетчике при одинаковом числе ежесекундно падающих в счетчик частиц. Такая кривая называется счетной характеристикой.

По оси абсцисс откладывают напряжение в вольтах, по оси ординат – скорость счета в имп./мин. Горизонтальный участок кривой II называется плато счетчика. Эта область соответствует области Гейгера. На плато выбирают рабочее напряжение. Рабочее напряжение не рекомендуется брать слишком большим, так как это ведет к снижению срока службы самогасящегося счетчика. Рабочее напряжение зависит от состава газового наполнения счетчика и от давления газа: чем меньше давление в счетчике, тем ниже рабочее напряжение. Обычно давление в счетчике составляет 50 – 150 мм рт.ст., при этом рабочее напряжение бывает равным 800 – 1.100 В.

При изменении активности препарата следует учитывать фон счетчика. Даже в самой чистой лаборатории всегда имеются небольшие количества радиоактивных веществ, присутствующих в виде естественных примесей в различных материалах (стенах, полу, оборудовании и т.д.), в воздухе содержится некоторое количество радиоактивных элементов радия, тория и продуктов их распада. Активные продукты содержатся также в воде и почве. Кроме того, всегда оказывает

действие космическое излучение. Все эти естественные источники излучения регистрируются счетчиком.

Скорость счета (в отсутствие препарата), обусловленная указанными источниками, называется фоном счетчика. Величина фона зависит от поверхности счетчика и возрастает с увеличением последней. В среднем 1см^2 поверхности счетчика соответствует 1 имп./мин.

Если счетчик поместить в свинцовый “домик”, то излучение будет частично экранироваться и фон счетчика уменьшится. При работе счетчики необходимо экранировать также от света, так как фотоны видимого света могут выбивать из металла катода трубки электроны, и возникают ложные импульсы, увеличивающие непрерывный разряд. Величину фона необходимо определять при тех же условиях, при которых производятся сами измерения. Вследствие того, что при измерении активности препарата счетчик регистрирует импульсы и от препарата и от фона, скорость счета равна измеренной скорости счета минус фон.

Каждая счетная установка обладает определенным разрешающим временем, под которым понимают минимальный промежуток времени между соседними регистрируемыми импульсами. Разрешающее время установки определяется разрешающим временем пересчетной схемы, механического счетчика и счетной трубки. Для обычных счетчиков разрешающее время $1/\tau = 3 \times 10^{-4} - 5 \times 10^{-4}$ с. Для механического счетчика $1/\tau = 10^{-2}$ с. При малых кратностях пересчета 1, 4, 16 разрешающее время установки определяется разрешающим временем механического счетчика, так как последнее значительно больше разрешающего времени счетной трубки. При кратности пересчета 64 разрешающее время определяется разрешающим временем счетной трубки.

В этом случае заметный просчет будет наблюдаться при очень больших скоростях счета. Препараты следует приготавливать такими, чтобы скорость счета была невелика, и поправка на разрешающее время в этом случае не учитывается.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА

Упражнение 1. Знакомство с устройством счетных установок типа Б.

Знакомство с устройством счетных установок типа Б необходимо начать с изучения блок-схемы и каждого узла установки. Высоковольтный выпрямитель ВСЭ-2500 питается от сети переменного тока. От него напряжение передается через блок газового счетчика БГС к счетной трубке. Возникающий в счетной трубке импульс усиливается в БГС и передается на пересчетную схему ПС-64, где этот импульс дополнительно усиливается и формируется. От пересчетной

схемы импульс передается на электромеханический счетчик и там регистрируется.

Высоковольтный выпрямитель может питаться от сети переменного тока, имеющей напряжение 110, 127 или 220 В. Переключение выпрямителя на питание от той или иной сети производится соответствующей перестановкой контакта на трансформаторе, стоящем на выходе выпрямителя.

С выхода ВСЭ-2500 можно снимать положительное или отрицательное постоянное напряжение от 100 до 2500 В. Для работы со счетными трубками с выхода выпрямителя снимают, как правило, положительное напряжение, поэтому выходное гнездо, отмеченное знаком соединяют при помощи высоковольтного кабеля с соответствующим гнездом БГС, а гнездо, отмеченное знаком закрывают заглушкой. Оставлять выход выпрямителя открытым ни в коем случае нельзя, так как напряжение порядка 1000 В, с которым обычно приходится работать на счетной установке, весьма опасно. Как и всякий высоковольтный прибор, ВСЭ-2500 необходимо заземлять.

Нужное напряжение на выходе прибора устанавливают, поворачивая вправо рукоятку “регулятор напряжения” и наблюдая при этом за показаниями киловольтметра. В схеме ВСЭ-2500 имеется довольно большая емкость, поэтому напряжение устанавливается медленно, осторожным поворотом “регулятора напряжения”.

Блок газового счетчика предназначен как для подключения счетной трубки и передачи напряжения от выпрямителя к счетной трубке, так и для усиления возникающих в трубке импульсов и передачи их на пересчетную схему. Контакт нити счетчика присоединяют к соответствующему гнезду блока (+), а корпус счетчика соединяют с корпусом блока.

Во время манипуляций со счетными трубками напряжение на выходе выпрямителя надо снижать до нуля. Следует помнить, что одновременное прикосновение к корпусу трубки и контакту нити в то время, когда трубка находится под напряжением, весьма опасно.

Импульсы, возникающие в счетной трубке при попадании в нее ядерных частиц или γ -квантов, усиливаются БГС и передаются на пересчетную схему ПС-64. Пересчетная схема ПС-64 - наиболее сложное звено установки Б. Ее назначение состоит не только в том, чтобы усиливать и формировать поступающие от счетной трубки импульсы, но и в том, чтобы в случае необходимости передавать на механический счетчик не все возникающие в счетной трубке импульсы, а некоторое кратное число от них. Это важно потому, что электромеханический счетчик обладает большей инерцией и может регистрировать в 1 с не более 100 импульсов – в 100 раз меньше, чем счетная трубка. Для

того чтобы более полно использовать возможности счетной трубки, между нею и электромеханическим счетчиком помещают ПС-64.

ПС-64 имеет шесть пересчетных каскадов. Они устроены так, что каждый пересчетный каскад задерживает первый из двух поступивших на него импульсов и передает на следующий каскад только каждый второй импульс. Устройство ПС-64 позволяет регистрировать импульсы без пересчета, используя лишь усилитель, и работать с двумя, четырьмя или всеми шестью каскадами. Очевидно, при работе с двумя каскадами на электромеханический счетчик будет передаваться каждый четвертый из возникающих в счетной трубке импульсов; при работе с четырьмя каскадами - каждый шестнадцатый; при работе с шестью каскадами - каждый шестьдесят четвертый. Включение в работу необходимого числа пересчетных каскадов достигается установкой в рабочее положение соответствующего переключателя в положение “х4”, “х16”, “х64”. Если же он включается в положение “х1”, то на электромеханический счетчик передаются все возникающие в счетной трубке импульсы, минуя пересчетные каскады.

ПС-64 питается от сети переменного тока. Гнездо для включения сетевого шланга расположено на задней панели ПС-64, так же как и входное гнездо для высоковольтного кабеля, соединяющего ПС-64 и БГС, и выходные клеммы для соединения с электромеханическим счетчиком. На задней панели имеются также клеммы, позволяющие подавать в случае необходимости на ПС-64 импульсы не от БГС, а от какого-либо иного генератора или стимулятора. Эти последние клеммы обозначены “Имп.”

На передней панели кроме тумблеров пересчетных каскадов, сетевого тумблера, тумблера включения счета (“Пуск”), расположены шесть индикаторных неоновых лампочек на каждый пересчетный каскад. Зажигание лампочки показывает, что на каскаде задержался импульс. Цифры, расположенные около индикаторных лампочек, показывают, какому числу, поступивших на вход ПС-64 импульсов соответствует присутствие одного импульса на данном каскаде. Перед началом работы “сбрасывают” все присутствующие на пересчетных каскадах импульсы, достигая этого нажатием кнопки “Сброс”.

Включение в положение “Проверка” дает возможность переключать ПС-64 на прием импульсов от сети переменного тока. Это важно потому, что сложная схема нуждается время от времени в проверке. Для этого надо подавать для пересчета строго определенное число импульсов в единицу времени. Для этой цели более всего подходит подача импульсов от сети переменного тока - 50 импульсов в 1с или 3000 импульсов в минуту.

Электромеханический счетчик предназначен для регистрации импульсов, поступающих на него с пересчетной схемы. Важнейшей частью электромеханического счетчика является электромагнит. Он “домагничивается” при поступле-

нии на счетчик импульсов. При поступлении каждого импульса магнит передвигает стрелку-указатель на одно деление. Поэтому при соединении ЭМС с ПС-64 необходимо строго соблюдать полярность - присоединять “+” выхода ПС-64 к “+” счетчика. Неправильное подключение приведет к тому, что при поступлении импульсов магнит будет “размагничиваться”, импульсы не будут зарегистрированы, а сам счетчик скоро выйдет из строя.

На передней панели счетчика имеются два диска циферблата. За время, когда стрелка на первом циферблате проходит полный круг (100 делений), стрелка на втором циферблате проходит (постепенно) одно деление. Поэтому на установку нуля в начале работы надо обратить серьезное внимание: неточная установка может дать при снятии показаний ошибку на 100 отсчетов. Запись результатов отсчетов ведут следующим образом: показания ЭМС умножают на коэффициент пересчета и прибавляют к произведению сумму, показанную цифрами у индикаторных неоновых лампочек. Рассчитать число импульсов в минуту можно по следующей формуле:

$$N = \frac{a \times b + c}{t}, \text{ где}$$

a – показания ЭМС;

b – коэффициент пересчета;

c – показания неоновых лампочек;

t – время счета импульсов.

Стрелки-указатели передвигаются только при поступлении импульсов. Для того чтобы установить нуль перед началом отсчета, передвигают циферблаты.

В установке Б-2 высоковольтный выпрямитель, пересчетная схема и ЭМС смонтированы в одном кожухе. На передней панели этого объединенного блока крепится секундомер. Для получения питания от сети переменного тока для ВСЭ-2500 и ПС-64 служит один сетевой шланг. Отдельно вынесенным остается только блок газового счетчика БГС.

В отличие от установки Б-2 установка Б-3 очень компактна и проста в обращении. Переключение рода работ производится клавишами. Установка Б-3 имеет большой коэффициент пересчета, равный одному миллиону. Это достигается за счет шести пересчетных каскадов на лампах-декатронах, каждая из которых сосчитывает только десятый импульс. К недостаткам установки Б-3 можно отнести отсутствие регулировки напряжения для питания различных типов счетных трубок. На данной установке нельзя провести снятие рабочей характеристики счетной трубки. Установка Б-3 предназначена для счета и регистрации импульсов от газовых низковольтных (стальных) счетчиков, а также для счета периодических импульсов.

Упражнение 2. Проверка пересчетной схемы ПС-64. Незначительная неточность в работе пересчетных каскадов может привести к большим ошибкам в конечном результате счета. Поэтому конструкцией ПС-64 предусмотрена возможность проверки ее работы. Для проверки на ПС-64 подают для счета строго постоянное число импульсов в единицу времени. Для этой цели служат импульсы от сети переменного тока. Для проверки ПС-64 включают в сеть переменного тока, предварительно установив, соответствует ли включение трансформатора схемы напряжению питающей сети. Во время проверки ПС-64 выпрямитель ВСЭ-2500 в сеть не включают, звенья установки Б-2 между собой могут быть не соединены. Включают тумблер “Сеть” и несколько минут ждут, пока прогреется пересчетная схема. О достаточном прогреве свидетельствуют загоревшиеся индикаторные лампочки. Нажимая кнопку “Сброс”, освобождают все пересчетные каскады от находившихся на них импульсов. Переключатель ставят в положение “Проверка”. При работе с установкой Б-2 проверку делают только для коэффициента пересчета “х64”, как это и предусмотрено схемой установки.

В последнюю очередь устанавливают на нуль циферблаты электромеханического счетчика. Делать это раньше не следует, так как при сбросе стрелка-указатель может переместиться. Включают одновременно секундомер и тумблер “Пуск” и считают число колебаний в сети переменного тока в течение трех минут.

По истечении этого времени выключают тумблер “Пуск” и секундомер.

Как известно, частота колебаний в сети переменного тока равна 3000 колебаниям в минуту. Если полученный при отсчете результат отклоняется от 3000 не более чем на 2%, можно считать, что ПС-64 работает исправно.

Обычно отклонения бывают значительно меньше двух процентов - порядка десятых и даже сотых долей процента. Большие ошибки получаются, как правило, при неодновременном включении или выключении тумблера “Пуск” и секундомера, т.е. тогда, когда время проведения отсчета отличалось от заданного.

Проделав указанные выше манипуляции несколько раз, можно легко научиться включать пересчетную схему точно на заданное время и быстро ориентироваться при работе на установке.

Результат заносят в табл. 1.1:

Таблица 1.1

Число отсчетов			Ошибка, %
За 3 минуты	За 1 минуту	В среднем за 1 минуту	

Упражнение 3. Снятие рабочей характеристики счетной трубки. При работе со счетной трубкой надо выяснить, какие напряжения для данной трубки соответствуют области Гейгера. Опытным путем - снятием рабочей характеристики точно устанавливается рабочее напряжение для каждого экземпляра. Для снятия рабочей характеристики счетную трубку присоединяют к блоку газового счетчика. При этом контакт нити присоединяют к контакту БГС, а корпус трубки – к движку ползьев БГС. Включают определенный коэффициент пересчета. Рабочую характеристику можно снимать, поместив под трубку радиоактивный препарат (с нагрузкой), и без радиоактивного препарата (без нагрузки). Включают сетевые тумблеры на передних панелях ВСЭ-2500 и ПС-64 и прогревают установку в течение нескольких минут.

Устанавливают напряжение 200 – 300 В. Включают одновременно секундомер и тумблер “Пуск” и ведут счет в течение одной минуты. Затем выключают секундомер и тумблер “Пуск” и смотрят, не загорелись ли лампочки, что будет свидетельствовать о попадании в пересчетную систему первых импульсов. Затем повышают напряжение на выходе ВСЭ-2500 на 100 В и снова ведут счет в течение одной минуты и так до тех пор, пока установкой не будут зарегистрированы первые отсчеты. После регистрации первых отсчетов надо увеличивать напряжение после каждого измерения не на 100, а на 50 В и считать в течение 3 минут. Начало работы счетной трубки соответствует области пропорциональности; при этих напряжениях не всякая частица вызывает образование лавины ионов, необходимой для возникновения импульса. При дальнейшем повышении напряжения число зарегистрированных в минуту импульсов будет расти.

Затем наступит момент, когда увеличение напряжения не будет приводить к увеличению скорости счета или это увеличение будет незначительным. Область напряжений, в которой значительные изменения напряжения не сказываются на числе зарегистрированных в единицу времени импульсов, соответствует напряжению области Гейгера. В рабочей характеристике счетной трубки эту область называют областью плато. При этих напряжениях попадание в объем счетной трубки каждой ядерной частицы ведет к образованию лавины ионов и возникновению большого ионизационного тока, который и отмечается счетной установкой. У разных экземпляров счетных трубок одного и того же типа плато может иметь большую или меньшую протяженность, быть практически горизонтальным или слегка наклонным. По мере работы трубки и расходования молекул спирта плато уменьшается по протяженности и перемещается в область высоких напряжений. Это связано с тем, что давление во внутреннем объеме счетной трубки повышается, так как число молекул увеличивается за счет того, что место одной большой молекулы спирта замещается обломками. При повышении дав-

ления требуются большие напряжения для того, чтобы электроны и ионы приобретали необходимые ускорения.

При снятии показаний со счетной установки надо обращать внимание на индикаторные лампочки. Это особенно важно в тех случаях, когда работа ведется при большом коэффициенте пересчета — “х16” или “х64”, а число отсчетов в единицу времени невелико (например, при отсчете импульсов естественного фона или при относительно малых напряжениях, когда счетная установка регистрирует не все попадающие во внутренний объем трубки ядерные частицы). При этом часто бывает так, что число зарегистрированных за единицу времени импульсов меньше, чем коэффициент пересчета. Тогда стрелка механического счетчика остается на нуле, а о числе импульсов можно судить только по показаниям индикаторных лампочек. Результаты отсчетов заносят в протокол в виде табл. 1.2:

Таблица 1.2

Напряжение, В	Число отсчетов за 1 минуту	Квадратичная ошибка
300	—	—
400	—	—
500	$0 \times 64 + 5 = 5$	2
600	$0 \times 64 + 27 = 27$	5
700	$14 \times 64 + 18 = 914$	30
800 и т.д.	$15 \times 64 + 40 = 1000$	32

Очевидно, что число импульсов, зарегистрированных счетной установкой от данного препарата, может значительно колебаться даже при работе в области плато, где напряжение не влияет заметным образом на скорость счёта. В ряде случаев при больших напряжениях скорость счета может даже оказаться несколько ниже, чем при меньших напряжениях. Квадратичная ошибка (корень квадратный из числа отсчетов в единицу времени) показывает, в каких пределах может колебаться данная величина, найденная при измерении в пределах плато.

На основании полученных в работе данных строят график. Для того чтобы характеристическая кривая была максимально правильной, на графике следует откладывать и квадратичную ошибку и учитывать эту ошибку при окончательном проведении результирующей линии. При построении графика по оси ординат откладывают скорость счета, но, кроме того, около каждой точки надо откладывать вверх и вниз значение квадратичной ошибки для данной величины. Если соединить между собой все точки, показывающие величины квадратичных ошибок, получается “полоса”, в пределах которой можно строить характеристическую кривую счетной трубки.

Упражнение 4. Выбор рабочей точки и определение уровня фона. После снятия рабочей характеристики счетной трубки выбирают напряжение, при котором будет вестись дальнейшая работа на этой счетной трубке. Такое напряжение называют рабочей точкой трубки.

Находить рабочую точку удобнее всего на графике; выбирать ее рекомендуется в первой половине плато. Для проверки правильности выбора устанавливают рабочее напряжение и определяют уровень естественного радиоактивного фона. Импульсы естественного радиоактивного фона считают 5 – 10 раз.

Продолжительность каждого отсчета три минуты. Определяют среднее арифметическое для полученных отсчетов и находят квадратическую ошибку. Если полученные в работе данные отличаются от среднего арифметического не больше чем на \pm квадратическую ошибку, можно считать, что определение уровня естественного радиоактивного фона сделано правильно.

Поскольку для каждого типа счетных трубок характерен определенный уровень фона, то в случае, если рабочее напряжение для счетной трубки выбрано правильно и работа ведется в незагрязненном помещении, число импульсов фона, отсчитываемых за одну минуту, должно приблизительно соответствовать величинам, приведенным в табл. 1.2.

Контрольные вопросы

1. Устройство радиометрической установки типа Б.
2. Качественные и количественные методы регистрации ионизирующего излучения.
3. Основные различия в устройстве ионизационной камеры и счетчика Гейгера.
4. Принцип работы счетчика Гейгера.
5. В чем отличия альфа и бета частиц.
6. Три эффекта взаимодействия гамма излучения с веществом.

2. БИОЭЛЕКТРИЧЕСКИЕ ПОТЕНЦИАЛЫ

Многие процессы жизнедеятельности, как животных, так и растительных организмов, сопровождаются возникновением электродвижущих сил в клетках и тканях - появлением биоэлектрических потенциалов. Величина биопотенциалов обычно не превышает 50 – 150 мВ. Кажущееся исключение составляют только биопотенциалы электрических органов рыб, разряды которых достигают нескольких сот вольт. Однако разряд электрического органа представляет собой сумму разрядов множества последовательно соединенных элементарных ячеек,

тогда как в каждой отдельной ячейке электродвижущая сила не превышает 100 – 150 мВ.

Биопотенциалы сильно отличаются друг от друга по своей продолжительности. Время, за которое амплитуда биопотенциала нарастает от нуля до максимальной величины, колеблется в разных случаях от долей миллисекунды до многих минут и часов. Следовательно, диапазон частотных характеристик биопотенциалов, выраженных в герцах, простирается приблизительно от 0 до 10 кГц.

Следует помнить, что под частотной характеристикой биопотенциалов понимается не частота их следования (как иногда ошибочно считают), а именно время нарастания данного потенциала. Это можно пояснить примером: потенциалы действия нерва лягушки в зависимости от частоты раздражения могут возникать 10, 50, 100 и т.д. раз в секунду; частотная же характеристика остается при этом неизменной – 100 Гц, так как каждый отдельный потенциал длится 0,001 с. Если потенциал протекает в течение 0,02 с. его частотная характеристика равна 50 Гц и т.д.

2.1. КЛАССИФИКАЦИЯ

Многообразие биоэлектрических потенциалов заставляет стремиться к созданию их четкой классификации. Однако создать такую классификацию очень трудно, и в настоящее время единой общепринятой классификации биопотенциалов еще нет.

Более рациональной представляется сейчас классификация, способная отразить связь биопотенциалов с процессами, протекающими в живых организмах. Такая классификация была предложена советским ученым Д.Л. Рубинштейном. Согласно этой классификации различают три основные группы биоэлектрических потенциалов: 1) метаболические; 2) покоя или повреждения (демаркационные); 3) действия. Каждой из этих групп потенциалов присуща определенная связь с конкретными биологическими процессами.

К группе метаболических потенциалов относятся стационарные, постоянные во времени разности потенциалов, которые устанавливаются между участками тканей, характеризующимися различными уровнями интенсивности обмена веществ. Примерами метаболических потенциалов могут служить разности потенциалов между противоположными поверхностями пластинчатых образований (в коже лягушки, роговице глаз, листе высших растений), разности потенциалов между верхушкой стебля и корнем растений, а также осевой электрический градиент тела некоторых гидрополипов, потенциал фотосинтеза и т.д.

К демаркационным потенциалам относятся потенциалы, возникающие между интактным и поврежденным участками клетки или ткани и разности потенциалов между наружной поверхностью и внутренним содержимым клеток. При этом, как правило, поврежденный участок и внутренняя часть клетки оказываются электроотрицательными по отношению соответственно к неповрежденному участку и наружной поверхности клеток. Частотная характеристика демаркационных потенциалов варьирует от 0 до десятых долей герца. Демаркационные потенциалы называют потенциалами покоя, обычно противопоставляя их потенциалам действия.

Потенциалы действия – это колебания электрической активности, происходящие при возбуждении живой ткани и переходе ее в состояние активной деятельности. При этом разность потенциалов возникает между возбужденным и невозбужденным участками органа или ткани, причем возбужденный участок оказывается электроотрицательным по отношению к невозбужденному. Возникновение потенциала действия всегда сопровождается распространением волны возбуждения и, по представлению ряда авторов, сам потенциал действия служит причиной распространения возбуждения по специализированным возбудимым образованиям – нервам и мышцам. Частотная характеристика потенциалов действия варьирует в широких пределах: от десятых долей герца (у водоросли *Nitella*) до 10 Гц (в мякотных нервах теплокровных животных).

2.2. ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ВОЗНИКНОВЕНИЯ БИОЭЛЕКТРИЧЕСКИХ ПОТЕНЦИАЛОВ

К биоэлектрическим потенциалам, возникающим в клетках и тканях, относятся потенциалы ионной природы – собственно биоэлектрические потенциалы и окислительно-восстановительные потенциалы. Собственно биоэлектрические потенциалы обусловлены неравномерным распределением ионов в различных участках клеток и тканей, т.е. асимметрией распределения ионов.

Характер асимметрии, обуславливающей появление разности потенциалов в биологических системах, соответствует в основном трем типам неравномерного распределения ионов в физико-химических системах. К первому из них относятся диффузионные потенциалы, возникающие при наличии жидкостного контакта между растворами, отличающимися друг от друга разной подвижностью ионов. Ко второму типу принадлежат мембранные потенциалы, появление которых обусловлено наличием мембраны, ограничивающей подвижность некоторых ионов. Третий тип представлен фазовыми потенциалами, возникающими на границе двух фаз, например: на границе водного раствора электролита и не смешивающегося с водой растворителя.

Другую группу потенциалов, отводимых от клеток и тканей, составляют так называемые окислительно-восстановительные потенциалы. Их возникновение обусловлено неравномерным распределением электронов между участками тканей, отличающихся друг от друга в основном интенсивностью дыхательных и гликолитических процессов, при которых происходит присоединение и отдача электронов молекулами биосубстрата.

2.3. РЕГИСТРАЦИЯ

Удобным методом определения электродвижущей силы биологических объектов является компенсационный метод. В этом случае ЭДС биологического объекта уравнивается встречной ЭДС какого-либо физического источника – аккумулятора или батареи.

Компенсационная схема для измерения ЭДС состоит из двух цепей: большой цепи - цепи источника, ЭДС которого известна, и малой цепи – цепи исследуемого источника ЭДС. В малую цепь включают гальванометр (нулевой прибор). Пользуясь магазином сопротивлений, к которому оба источника ЭДС подключены одноименными полюсами, находят такое положение, при котором ток в малой цепи отсутствует. Об отсутствии тока судят по нулевому положению стрелки гальванометра.

Потенциометр представляет собой набор двух магазинов сопротивлений для компенсации. С внешней стороны к потенциометру подключаются аккумулятор (большая цепь), гальванометр (нуль-прибор), нормальный элемент Вестона и источник исследуемой ЭДС (малая цепь).

В начале работы делают компенсацию большой цепи по нормальному элементу Вестона, ЭДС которого равна 1,0183 В, для этого его включают в малую цепь схемы. Стрелка гальванометра приводится к нулю при помощи специального набора сопротивлений в потенциометре. Сначала компенсируют грубо, через сопротивление 430 кОм, а затем на нулевой чувствительности прибора проводят окончательную тонкую компенсацию. После этого вместо элемента Вестона в малую цепь включают исследуемый объект, ЭДС которого надо определить. Компенсируют малую цепь с исследуемым объектом – магазином сопротивлений потенциометра. Установив стрелку гальванометра в нулевое положение, снимают показания в вольтах или милливольтках на потенциометре.

При работе с компенсационными схемами во время измерения ЭДС необходимо строго соблюдать полярность включения исследуемого объекта. Однако иногда расположение и под отводящими электродами удается установить только в ходе опыта. Кроме того, полярность объекта может изменяться во время опыта под влиянием тех или иных воздействий.

2.4. ЭЛЕКТРОДЫ

Применяемые для биоэлектрических измерений электроды не должны оказывать вредного воздействия на объект и менять его свойства. Они не должны сами по себе быть источником потенциалов, сравнимых по своей величине с измеряемыми или отводимыми потенциалами, и не должны изменять свои свойства при прохождении через них тока.

Так как при измерении разности потенциалов (РП) между электродами обычно используют два одинаковых электрода, то значение собственного потенциала электрода не существенно, важно только иметь два идентичных электрода.

Более существенно то, что при прохождении электрического тока на поверхности электродов и в окружающем их электролите происходят электрохимические процессы, в результате которых электроды становятся электрически не симметричны и между ними возникает разность потенциалов, по знаку противоположная приложенному или отводимому потенциалу.

Электроды, изменяющие свои свойства при работе в очень малой степени, или электроды, у которых быстро устанавливается устойчивый по величине потенциал равновесия, принято называть неполяризуемыми. неполяризуемым электродом, по существу, может быть любой металлический электрод, погруженный в насыщенный раствор своей соли. Собственный потенциал такого электрода зависит только от концентрации того иона, относительно которого он работает обратимо. Если концентрация этого иона остается постоянной и на самом электроде не происходит никаких вторичных электродных процессов, то потенциал такого электрода окажется устойчивым.

Для биологических измерений наиболее часто применяют металлические электроды, покрытые слоем труднорастворимой соли этого металла и работающие обратимо относительно аниона. К таким электродам относятся серебряные электроды, покрытые слоем хлористого серебра. Благодаря малой растворимости последнего такие электроды сохраняют свои свойства длительное время. Изготавливают хлорсеребряные электроды следующим образом: для получения чистой серебряной поверхности на серебряный, платиновый, золотой или, в крайнем случае, медный электрод электролитическим путем наносят слой серебра толщиной 0,05 – 0,1 мм (рецепт гальванического серебрения описан в книге А.М. Ямпольского “Гальванопластика”). Посеребренные электроды погружают (два сразу) в ванну, наполненную концентрированным раствором хлористого натрия или хлористого калия, присоединяют к аноду постоянного тока. Катодом служит угольный электрод. Используют источник тока с напряжением 4 – 6 В.

Ток пропускают до тех пор, пока электрод не покроеется достаточно толстым слоем хлористого серебра. Потенциал хлорсеребряного электрода при +25°C равен 0,292 В. Изготовленные электроды следует хранить в темноте в растворе хлористого натрия, не давая электродам подсыхать. Хлорсеребряные электроды можно непосредственно накладывать на биологический объект или присоединять их через солевой мостик.

К широко распространенным неполяризующимся электродам относятся и каломельные электроды. Они очень устойчивы и надежны в работе. Потенциал их при аккуратном изготовлении очень постоянен даже во время прохождения значительного тока через электрод. Каломельные электроды можно изготовить самых малых размеров и удобной формы для любых случаев, где требуются неполяризующиеся электроды. Несомненно, что они заслуживают более широкого применения для отведения биопотенциалов, чем это было до настоящего времени.

В данной работе используются стандартные каломельные электроды, которые погружают в насыщенный раствор КСl для того, чтобы собственный потенциал их был более стабильным. Перед началом работы каломельные полуэлементы необходимо проверить. Для этого оба электрода погружают в один стакан с насыщенным раствором КСl и подключают к потенциометру (клеммы x1 или x2). При таком включении потенциалы полуэлементов направлены навстречу друг другу и сумма их должна быть равна нулю.

Если же какая-либо величина РП в цепи все-таки будет зарегистрирована, надо заметить ее, и при дальнейшей работе из полученных результатов опыта соответственно вычесть эту величину РП. Величина РП должна быть небольшой – не выше 5-6 мВ, т.е. значительно меньше РП, ожидаемой в опытах.

Исследуемый объект соединяют со стаканчиками электродов при помощи трубочек – сифонов. Сифончики изготавливает сам экспериментатор, придавая стеклянным трубочкам форму, наиболее удобную для каждого опыта. Заполняют сифончики, засасывая в них горячий раствор 2%-ного агар-агара, приготовленного на насыщенном растворе КСl. Хранят сифоны в растворе КСl.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА

Упражнение 1. Измерение мембранного потенциала кожуры картофеля или яблока. Необходимые принадлежности: кристаллизатор, пипетка с резиновым наконечником, ножницы, раствор КСl 1/100 н и 1/1000 н, картофель или яблоко.

На дно кристаллизатора наливают раствор КСl 1/100 н. Кожура на погруженной в раствор части картофеля должна быть неповрежденной. При заполне-

нии раствором агар-агара сифончика, надо постараться сделать так, чтобы немного геля (2-3 мм) выступало из стеклянной трубки. Это обеспечит хороший контакт сифончика с мякотью картофеля. Можно даже слегка вдавить сифончик в мякоть.

Измеряют разность потенциалов в системе, отмечают расположение положительного и отрицательного полюсов и прослеживают в течение 30-40 мин, изменяется ли потенциал во времени или остается стабильным. Измерения проводят каждые 5 минут.

Раствор KCl 1/100 н в кристаллизаторе заменяют на раствор KCl 1/1000 н. Для того чтобы не разбирать установку, раствор можно отсосать из кристаллизатора пипеткой. Определяют величину разности потенциалов в системе сразу после замены раствора, затем через 5 и через 10 минут.

После этого вновь заменяют раствор KCl 1/1000 н на раствор KCl 1/100 н и проверяют, вернулась ли величина потенциала к исходному значению.

Результаты опыта наносят на график, откладывая по оси абсцисс время, а по оси ординат – величину потенциала в милливольтках, и отмечают стрелками моменты смены растворов.

Упражнение 2. Измерение мембранной разности потенциала кожицы столетника. Собирают установку, как и в предыдущем упражнении. Лист столетника срезают у основания и помещают в кристаллизатор с раствором KCl 1/100 н. Конец сифончика прикладывают к поперечному срезу листа и слегка вдавливают в мякоть. Определяют величину потенциала и прослеживают ее изменение в течение 10-15 мин, проводя измерение каждые 5 мин. После этого заменяют раствор в кристаллизаторе на раствор KCl 1/1000 н (замену раствора производят тем же порядком, что и в предыдущем упражнении) и прослеживают изменение величины потенциала в течение 10 минут. Затем ножницами или скальпелем делают небольшой надрез на кожице той части листа, которая погружена в раствор. Разрез делают быстро, но осторожно, чтобы не нарушить целостность контактов всей системы. Определяют величину потенциала сразу после нанесения разреза. Далее измеряют величину потенциала каждые 5 мин до тех пор, пока эта величина не вернется к исходной (т.е. до нанесения разреза) или не установится на каком-то определенном уровне.

Результаты опыта наносят на график так же, как и в предыдущем упражнении.

Контрольные вопросы

1. Классификация Бернштейна.
2. Чем отличаются электрохимические и биопотенциалы.
3. Какими электродами пользуются для отведения электрохимических и биопотенциалов.

4. В чем принцип работы компенсационного метода измерения потенциалов.
5. Каким образом связаны потенциал покоя и потенциал действия.
6. Формула Нернста для мембранного потенциала.

3. ОСМОТИЧЕСКОЕ ДАВЛЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЕЙ

Осмотическое давление – это такое давление любого раствора (в том числе и биологической жидкости), которым обладало бы растворенное вещество, если бы, находясь в газообразной фазе при той же температуре, оно занимало тот же объем, который занимает раствор.

Для достаточно разбавленных растворов осмотическое давление при постоянной температуре прямо пропорционально концентрации растворенного вещества и абсолютной температуре:

$$P = C \times R \times T$$

где P – осмотическое давление, атм;

C – его концентрация, моль/л;

T – абсолютная температура, °К;

R – газовая постоянная, равная $0,82 \text{ л} \times \text{атм.} \times \text{град.} \times \text{моль}^{-1}$.

Таким образом, из формулы следует, что осмотическое давление разбавленных растворов прямо пропорционально количеству частиц растворенного вещества.

Формула приложима к любым достаточно разбавленным растворам, кроме растворов электролитов. В последних вследствие электролитической диссоциации происходит образование большого количества частиц растворенного вещества и соответственно – увеличение осмотического давления по сравнению с тем, какого следовало бы ожидать, исходя из наличной молекулярной концентрации.

Для определения осмотического давления существует ряд косвенных методов, основанных на зависимости между концентрацией раствора и давлением (или упругостью) его насыщенного пара. Под упругостью пара понимают то его давление, при котором пар находится в равновесии с жидкостью.

Наиболее распространенными методами определения осмотического давления являются методы криоскопии и эбуллиоскопии. Первый из них основан на определении понижения точки замерзания раствора чистого растворителя. Во втором исходят из повышения точки кипения раствора по отношению к чистому растворителю. Однако применение метода эбуллиоскопии связано с измерения-

ми при высоких температурах, при которых сохранение биокolloидов невозможно. Поэтому для целей биологического исследования метод эбуллиоскопии не пригоден. Существуют и другие методы, также основанные на понижении упругости пара раствора чистого растворителя.

Измерение величины осмотического давления можно производить и прямым путем при помощи приборов, называемых осмометрами. Принцип работы осмометра основан на измерении гидростатического давления столба жидкости, уравнивающего осмотическое давление раствора. При этом раствор отделяют от растворителя специальной мембраной, не проницаемой для молекулы растворенного вещества. Определение осмотического давления вещества прямым путем наталкивается на принципиальные трудности, так как в действительности не существует идеальной полупроницаемой мембраны, пропускающей молекулы растворителя, но полностью задерживающей молекулы растворенного вещества. В настоящее время осмометры употребляют только для измерения коллоидно-осмотического давления.

Осмотическое давление водной среды и внутренней среды ряда низших организмов может колебаться в весьма широких пределах. Колебания осмотического давления в жидкостях и тканях низших организмов выражают степень приспособляемости организмов к постоянно меняющимся условиям внешней среды. У ряда высших организмов приспособление к колебаниям осмотического давления внешней среды связано с наличием сложных регуляторных механизмов, обеспечивающих относительное постоянство осмотического давления крови и тканей. Определяющая роль в этой регуляции принадлежит центральной нервной системе. В настоящее время удалось выявить наличие в соединительной ткани человека и животных специализированных нервных окончаний – интерорецепторов, воспринимающих колебания осмотического давления.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА

Метод Барджера и Раста. При использовании этого метода осмотическое давление исследуемого раствора сравнивается с известным осмотическим давлением контрольных растворов. Методом Барджера и Раста можно улавливать различия концентраций, соответствующих приблизительно 0,1%.

Упражнение. Определение осмотического давления методом Барджера и Раста.

Необходимые принадлежности: микроскоп с малым увеличением, окуляр-микрометр, капилляры, предметные стекла, часовые стекла, фарфоровая чашка с менделеевской замазкой, электрическая плитка с асбестовой сеткой, скальпель, марля, растворы поваренной соли разной концентрации.

Перед началом работы готовят запас стеклянных капилляров диаметром около 1 мм и длиной около 6-7 см (это длина предметного стекла). Готовят набор контрольных растворов (обычно NaCl), осмотическая концентрация которых предположительно близка к концентрации исследуемого раствора, например, растворы концентраций 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,5, 2, 2,5, 3%. Этот набор растворов дает возможность проводить работу с большинством биологических жидкостей (плазмой крови холоднокровных и теплокровных животных и другими изучаемыми объектами).

Один из контрольных и исследуемый растворы наливают на часовые стекла, а из стекол набирают в капилляр. Делают это следующим образом: капилляр погружают в один из растворов и дают жидкости подняться до середины высоты капилляра; перевернув капилляр, опускают жидкость к другому его концу и, когда между мениском и краем капилляра остается промежуток в несколько миллиметров, погружают этот конец капилляра в другой раствор; последний поднимается по капилляру, и пузырек воздуха оказывается приблизительно в середине капилляра. Для удобства запаивания на обоих концах капилляра можно оставить небольшие участки, не заполненные жидкостью.

Капилляр быстро и тщательно замазывают с обеих сторон менделеевской замазкой, которая должна в течение всего времени наполнения капилляров подогреться на малом пламени газовой горелки или на водяной бане. Для того чтобы замазка плотно пристала к наружным стенкам капилляра, они должны быть совершенно сухими. Поэтому перед запаиванием капилляр необходимо обтирать ватой или фильтровальной бумагой. Следует помнить, что большинство ошибок при работе по методу Батджера и Раста происходит именно из-за плохой запайки капилляров, поэтому к данной части работы нужно отнестись особенно внимательно.

Капилляр кладут на предметное стекло и прикрепляют к нему каплей замазки. Стекло с капилляром помещают на предметный столик микроскопа, снабженного окуляр-микрометром, и наводят фокус на один из менисков жидкости или на оба, если пузырек воздуха мал и целиком уместается в поле зрения. Далее наблюдают за движением мениска жидкости.

На поверхности жидкости, имеющей меньшее осмотическое давление (т.е. большую упругость пара), вода испаряется, и пар одновременно осаждается на жидкости, имеющей большее осмотическое давление (меньшую упругость пара), поэтому объем первой из капель уменьшается, а второй увеличивается. Мениск всегда движется в сторону раствора с меньшей концентрацией.

Расположив капилляр в поле зрения так, чтобы один мениск стоял на одном из делений окуляр-микрометра, наблюдают за этим мениском в течение не-

скольких минут. Определив, в каком направлении движется мениск, решают, какой из растворов имеет большую концентрацию.

Если среди изготовленных контрольных растворов не находится такого, при котором объемы обеих капель оставались бы неизменными, определяют, когда изменяется направление движения менисков. Если, например, при сравнении с 0,5%-ным раствором NaCl мениск неизвестного раствора движется к контрольному, а при сравнении с 0,6%-ным раствором – от контрольного, можно сделать вывод, что осмотическая концентрация исследуемого раствора лежит между осмотическими концентрациями растворов 0,5% и 0,6%.

Для удобства работы следует во всех пробах наблюдать за движением мениска исследуемого раствора (или контрольного) и помещать данный раствор на предметный столик микроскопа всегда с одной и той же стороны. Придерживаясь этих правил, результаты наблюдений записывают в табл 3.1.

Таблица 3.1

Контрольный раствор, %	Направление движения мениска исследуемого раствора	Исследуемый раствор
0,5	←	-
0,6	←	-
0,7	0	+
0,8	→	-

Растворы в течение всего опыта надо держать в закрытых сосудах и на часовое стекло наливать только непосредственно перед заполнением капилляра во избежание испарения воды и изменения концентрации раствора.

Прежде чем приступить к определению концентрации неизвестного раствора, необходимо хорошо освоиться с методикой, для чего надо сделать ряд проб с растворами известной концентрации и дистиллированной водой. Только убедившись в том, что направление движения мениска во всех пробах соответствует ожидаемому, можно переходить к выполнению лабораторных работ.

Установив концентрацию исследуемого раствора, вычисляют его осмотическое давление по формуле. При этом необходимо предварительно перевести процентную концентрацию раствора в молярную.

Пример расчета. Согласно данным измерений исследуемый раствор имеет осмотическую концентрацию, соответствующую 0,45%-ному раствору NaCl. Температура во время измерений равнялась +37°.

Молярный раствор NaCl содержит 58,5 г этой соли в 1 л воды. Следовательно, 0,45 %-ный раствор NaCl соответствует $0,45/58,5 = 0,0077$ молярного раствора.

Подставляя вычисленное значение для C в формулу и помня, что каждая молекула NaCl образует два иона, находим

$$P = 2 \times 0,0077 \times 0,82 \times (273 + 37) = 3,9 \text{ атм.}$$

Задание 1. Определить направление движения мениска 2 растворов известной концентрации. Взять для сравнения серию растворов с целью освоения метода. Полученные данные занести в табл. 3.1.

Задание 2. Определить осмотическую концентрацию неизвестного раствора. Полученные результаты занести в табл.3.1. Рассчитать осмотическое давление.

Контрольные вопросы

1. Что может вызвать изменение осмотического давления раствора.
2. Какая связь существует между гидростатическим и осмотическим давлением.
3. Опишите устройство простейшего осмометра.
4. Чем отличаются криоскопия от эбулиоскопии.

4. ПОВЕРХНОСТНОЕ НАТЯЖЕНИЕ

На поверхности раздела двух фаз всегда возникает силовое поле. Причиной его возникновения служит некомпенсированность молекулярных сил в поверхностном слое. Напряженность такого силового поля можно выразить через поверхностное натяжение. Последнее представляет собой избыток свободной энергии, приходящийся на соответствующий 1 см^2 поверхности раздела фаз.

Наличие поверхностного натяжения становится ясным из сопоставления поведения молекул, расположенных на поверхности раздела, и молекул, находящихся в толще жидкой фазы. Молекулы, находящиеся в толще жидкости, испытывают действие сил взаимного притяжения со стороны соседних молекул. Силы взаимного притяжения, действующие между молекулами, таким образом, уравниваются друг друга. Иначе говоря, равнодействующая этих сил равна нулю.

Совершенно иное положение имеет место в отношении молекул, расположенных на поверхности раздела между жидкостью и находящимся с ней в равновесии газом или паром. В этом случае молекулы жидкости испытывают притяжение только со стороны молекул, находящихся под поверхностью раздела. Действием же молекул газообразной фазы ввиду их крайне низкой концентрации можно пренебречь. В итоге равнодействующая межмолекулярных сил на поверхности раздела не равна нулю и оказывается направленной внутрь жидкой фазы. Вот почему для перехода молекул из внутренних слоев жидкости на ее поверхность (т.е. для увеличения поверхности) они должны преодолеть силы взаимного притяжения, действующие и между молекулами поверхностного слоя.

Работа, затрачиваемая на увеличение площади поверхности жидкости, носит название поверхностного натяжения и определяется по формуле

$$A = S \times \sigma, \quad (4.1)$$

где S – площадь поверхности, см^2 ;

σ – коэффициент поверхностного натяжения.

Коэффициентом поверхностного натяжения называется работа, которую нужно произвести, чтобы увеличить площадь поверхности раздела на единицу площади поверхности. Соответственно коэффициент поверхностного натяжения выражают в $\text{эрг} \times \text{см}^2$.

Так как эрг – это $\text{дина} \times \text{см}$, то $\text{эрг} \times \text{см}^{-2} = \text{дина} \times \text{см}^{-1}$, т.е. коэффициент поверхностного натяжения можно так же выразить, как силу, которую нужно приложить к периметру поверхности раздела для увеличения длины периметра на единицу длины.

Принято различать статическое и динамическое поверхностные натяжения.

Динамическое поверхностное натяжение ($\sigma_{\text{дин}}$) характеризует только что образованную поверхность раздела, состав которой тождествен всей толще раствора.

Статическое поверхностное натяжение характеризует поверхность раздела при наступившем адсорбционном равновесии.

У абсолютно чистых жидкостей (воды, бензола, абсолютного спирта и т.д.) поверхностный слой и вся толща жидкой фазы вполне равноценны по своему составу. Поверхностное натяжение подобного рода жидкостей с течением времени соответственно не изменяется. Иначе говоря, у таких жидкостей значение $\sigma_{\text{стат}}$ и $\sigma_{\text{дин}}$ совпадает. Напротив, у растворов поверхностно активных веществ поверхностный слой имеет свойства, близкие к свойствам всей толщи жидкой фазы только в момент формирования поверхности раздела. Тотчас же после образования поверхности начинается адсорбция поверхностно-активных веществ, заканчивающаяся спустя известный промежуток времени адсорбционным равновесием.

Поскольку поверхностно-активные вещества понижают поверхностное натяжение, постольку в растворах таких веществ $\sigma_{\text{стат}}$ всегда ниже, чем $\sigma_{\text{дин}}$. В некоторых биологических жидкостях существуют особые взаимоотношения между динамическим и статическим поверхностным натяжением. Например, плазма и сыворотка крови обладают свойством восстанавливать исходную величину поверхностного натяжения, уменьшившуюся в результате добавления поверхностно-активных веществ. Такая способность растворов восстанавливать исходную величину поверхностного натяжения называется поверхностной буферностью. Как показали Д.Л. Рубинштейн и Ю.Л. Кузьмина (1939), поверх-

ностная буферность сыворотки объясняется наличием в ней ионов кальция. Последние, реагируя с поверхностно-активными жирными кислотами, образуют с ними нерастворимые соли, не способные уже изменять величину поверхностного натяжения. Немалую роль в поддержании постоянства поверхностного натяжения плазмы и сыворотки играют содержащиеся в них белки, которые адсорбируют поверхностно активные вещества.

Таким образом, благодаря наличию белков и ионов кальция плазма и сыворотка крови сохраняют относительное постоянство величины поверхностного натяжения, резко изменяющейся только в случаях тяжелых заболеваний (например, при желтухе вследствие попадания большого количества желчных кислот в кровяное русло).

При изучении поверхностной буферности системы необходимо проследить кинетику перехода динамического поверхностного натяжения в статическое после добавления к раствору поверхностно-активного вещества. Любой раствор, обладающий поверхностной буферностью, должен постепенно восстанавливать исходную величину поверхностного натяжения, понизившегося под влиянием поверхностно-активного вещества. Следовательно, для построения кривой, характеризующей поверхностную буферность раствора, необходимо измерить его поверхностное натяжение до прибавления поверхностно-активного вещества, немедленно после прибавления и через некоторые промежутки времени, вплоть до установления равновесия, т.е. до тех пор, пока значение поверхностного натяжения не перестанет изменяться.

Методы измерения. Измерение поверхностного натяжения плазмы, сыворотки, мочи и спинномозговой жидкости имеет существенное значение для диагностики ряда заболеваний. Существует ряд методов определения поверхностного натяжения жидкостей: капельный или сталагмометрический метод, метод капиллярного поднятия жидкостей, метод пульсирующих струй, метод наибольшего давления пузырька (капли), метод отрыва твердого контура и т.д.

В биологии для определения поверхностного натяжения используют метод наибольшего давления пузырька (метод академика П.А. Ребиндера). Наряду с этим часто применяют метод дю Нуи, основанный на измерении силы, необходимой для отрыва твердого контура (кольца) от поверхностного слоя жидкости. Он отличается простотой и быстротой проведения измерений, не требует больших количеств жидкости и особенно удобен при изучении динамики поверхностного натяжения в растворах, содержащих поверхностно-активные вещества.

Однако метод определения поверхностного натяжения по отрыву кольца обладает известными недостатками. Так, пользуясь этим методом, невозможно учесть влияние смачивания кольца при соприкосновении последнего с раство-

рами белковых и других высокомолекулярных веществ, что влечет за собой появление ошибок.

Определение поверхностного натяжения воды. При определении поверхностного натяжения воды платиновое кольцо, предварительно очищенное прокаливанием в фарфоровом тигле, берут за дужку анатомическим пинцетом и подвешивают на крючок торсионных весов. Кольцо тщательно взвешивают, после чего весы арретируют без возвращения указателя к нулю. Исследуемую жидкость (в данном случае воду) в количестве 0,5 – 1 см³ наливают на тщательно вымытое и сухое часовое стекло, которое помещают на подъемный столик.

С помощью кремальеры подъемного столика часовое стекло поднимают до тех пор, пока поверхность жидкости не соприкоснется с кольцом (“топить” кольцо в жидкости не следует). После этого освобождают коромысло весов и медленно поворачивают рычаг натяжения, пока кольцо не оторвется от жидкости. Во время этой манипуляции надо все время следить за кольцом и прекратить движение рычага натяжения точно в момент отрыва кольца.

Записав полученные данные, быстро опускают подъемный столик и взвешивают кольцо с прилипшей к нему жидкостью. Истинную силу отрыва кольца определяют по формуле:

$$P = P_1 - p \quad (4.2)$$

где P_1 – сила отрыва, определенная в опыте, мг;

p – вес кольца с прилипшей к нему жидкостью, мг.

Поверхностное натяжение воды определяется по формуле:

$$\sigma = \frac{P}{2\pi r} \quad (4.3)$$

где P – истинная сила отрыва, дин ;

r – наружный радиус платинового кольца, см.

Для того чтобы выразить P в динах, следует данные, полученные в опыте и рассчитанные по формуле (4.2), разделить на 1000 для перевода миллиграммов в граммы и умножить на 981 ($1\text{г} = 981$ дин). Поэтому в работе удобно пользоваться формулой (4.3) в несколько измененном виде:

$$\sigma = \frac{P \times 981}{\pi \times D \times 1000} = \frac{P \times 0,981}{\pi \times D} \quad (4.3a)$$

Радиус платинового кольца заменяют его диаметром во избежание лишних арифметических операций, так как непосредственно в опыте приходится измерять именно диаметр кольца. Ввиду того, что маленькие платиновые кольца не всегда имеют идеальную правильную форму, следует измерять диаметр 3-4 раза в разных направлениях и брать для расчета среднюю величину.

Нельзя забывать, что температура оказывает очень большое влияние на величину поверхностного натяжения и что полученные в опыте результаты справедливы для данной температуры. Поэтому при измерениях следует тщательно отмечать температуру.

Определение поверхностного натяжения различных жидкостей. Для определения поверхностного натяжения различных жидкостей опыт проводят тем же порядком, что и при определении поверхностного натяжения воды, однако расчеты при этом имеют значительные отличия.

Уравнение (4.3) справедливо только для воды. Зависимость между силой отрыва и величиной поверхностного натяжения для других жидкостей, в особенности для плохо смачивающих кольцо, оказывается более сложной.

Для того чтобы определить поверхностное натяжение исследуемой жидкости, прежде всего вычисляют отношение силы отрыва кольца от данной жидкости к силе отрыва кольца от воды при данной температуре:

$$Q_{\text{найден}} = \frac{P_x}{P_{H_2O}} \quad (4.4)$$

где P_x – сила отрыва от данной жидкости, мГ;

P_{H_2O} – сила отрыва от воды, мГ.

$Q_{\text{найден}}$ связано с относительным поверхностным натяжением данной жидкости (относительным поверхностным натяжением оказывается отношение поверхностного натяжения данной жидкости к поверхностному натяжению воды) зависимостью, которая (по Томинаго) выражается уравнением:

$$Q_{\text{истин}} = Q_{\text{найден}} \times K - K + 1 \quad (4.5)$$

где K – эмпирическая константа, экспериментально определяемая для каждого кольца.

Способ определения константы K в опыте (см. ниже).

Как уже было показано, $Q_{\text{истин}}$ равно отношению абсолютного поверхностного натяжения данной жидкости к абсолютному поверхностному натяжению воды, т. е.

$$Q_{\text{истин}} = \frac{\sigma_x}{\sigma_{H_2O}}$$

где σ_{H_2O} – коэффициент поверхностного натяжения воды, дин/см;

σ_x – коэффициент поверхностного натяжения исследуемой жидкости.

Из уравнения следует:

$$\sigma_x = \sigma_{H_2O} \times Q_{\text{истин}} \quad (4.6)$$

Определение константы кольца. Для определения константы кольца удобно пользоваться простым экспериментальным методом. Согласно этому методу определяют силу отрыва кольца от воды и от какой-либо другой жидкости, абсолютное поверхностное натяжение которой известно. Чаще всего для этой цели применяется этиловый 96-градусный спирт (22,3 дин/см).

Вывод уравнения для вычисления константы K проводится следующим образом:

Так как:

$$Q_{\text{истин}} = Q_{\text{найден}} \times K - K + 1$$

то, вынося K за скобки, получаем:

$$Q_{\text{истин}} = K(Q_{\text{найден}} - 1) + 1,$$

откуда

$$Q_{\text{истин}} - 1 = K(Q_{\text{найден}} - 1) \quad (4.7)$$

или

$$K = \frac{Q_{\text{истин}} - 1}{Q_{\text{найден}} - 1} \quad (4.8)$$

Подставляя в уравнение (4.8) значения $Q_{\text{истин}}$ и $Q_{\text{найден}}$, получим:

$$K = \frac{\frac{\sigma_x}{R_x} - 1}{\frac{\sigma_{H_2O}}{R_{H_2O}} - 1} \quad (4.9)$$

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА

Необходимые принадлежности: крутильные весы, подъемный столик с кремальерой, часовые стекла, платиновое кольцо, глазной анатомический пинцет, спиртовка, пипетки на 1 - 2 см³, бюксы на 10 см³.

Растворы: физиологический раствор поваренной соли; рингеровский раствор; 0,1%-ный раствор олеата натрия. Дистиллированная вода. Этиловый спирт.

Упражнение 1. Определение коэффициента поверхностного натяжения воды. Определяют поверхностное натяжение дистиллированной воды методом, описанным выше. При работе следует тщательно следить за чистотой ча-

сового стекла и пипетки для набирания воды, так как малейшие загрязнения сильно сказываются на результатах измерений.

Упражнение 2. Определение константы платинового кольца.

Для определения константы платинового кольца описанным экспериментальным методом применяют дистиллированную воду и этиловый 96- градусный спирт. Коэффициент абсолютного поверхностного натяжения спирта равен 22,3 дин/см.

Упражнение 3. Определение коэффициентов поверхностного натяжения различных жидкостей. Описанным выше способом определяют поверхностное натяжение ацетона, бензола, глицерина.

Для каждого определения следует брать чистые часовые стекла, а платиновое кольцо прокалывать для очистки. Все жидкости, как и воду, можно исследовать в количествах 0,5 – 1 см³.

Результаты измерений, относящиеся к упражнениям 1 и 3, заносятся в табл. 4.1.

Таблица 4.1

Жидкость	Сила отрыва кольца	Вес кольца с пленкой жидкости	Истинная сила отрыва	$Q_{\text{найд}}н$	$Q_{\text{истин}}$	σ_x

Упражнение 4. Влияние поверхностно-активных веществ на поверхностное натяжение физиологического и рингеровского растворов. На часовое стекло помещают 0,5 см³ рингеровского раствора для холоднокровных и определяют его поверхностное натяжение описанным выше способом. Определение проводят два раза с интервалом 3-5 мин. После этого к раствору на часовом стекле добавляют одну каплю 0,1%-ного раствора олеата натрия и тотчас же после добавления определяют силу отрыва кольца. Следующие определения отрыва кольца производят через 1, 3, 5, 10, 15, 20 мин после приливания олеата натрия к рингеровскому раствору.

Аналогичным образом проводят опыт с физиологическим раствором для теплокровных. График строят по изменению истинной силы отрыва в течении времени.

На оси абсцисс откладывают время в минутах, на оси ординат – значения истинной силы отрыва в мГ.

Контрольные вопросы

1. Дать определение поверхностному натяжению.
2. Что такое относительное поверхностное натяжение.
3. Какие растворы обладают поверхностной буферностью и почему.

4. Объяснить почему дистиллированная вода имеет высокое поверхностное натяжение.
5. Как определить константу кольца.

5. НАБУХАНИЕ ТКАНЕЙ

Набуханием называется поглощение жидкости гелем, сопровождающееся увеличением его объема и веса. Различные виды гелей обладают способностью избирательно набухать в определенном для каждого из них растворителе.

Начальная стадия набухания сопряжена с образованием вокруг активных групп сольватной оболочки (активные группы находятся на поверхности коллоидных частиц). Образование такого мономолекулярного слоя растворителя вокруг коллоидной частицы сопровождается заметным выделением тепла. Напротив, последняя стадия набухания связана с проникновением воды в межмицеллярные пространства и в известных случаях - с частичным растворением. Вторая стадия набухания заметным тепловым эффектом не сопровождается.

При набухании гель увеличивается в объеме и производит давление, которое называют давлением набухания; оно наиболее значительно в начальной стадии. Во время этого процесса изменяются и механические свойства гелей: модуль упругости набухающей ткани быстро падает. При исследовании набухания геля необходимо четко разграничить два понятия: степень набухания и скорость набухания.

Степень набухания определяется предельным количеством жидкости, которая поглощается единицей веса или объема коллоида (или ткани). Она зависит от сольватации мицелл, от эластичности геля, его прочности и способности к последующему растворению, а также от температуры.

Скорость набухания определяется количеством жидкости, поглощенной при набухании за единицу времени. Она зависит прежде всего от внутреннего трения поглощенной гелем жидкости и практически очень мало - от температуры. Исследование кинетики набухания указывает, что этот процесс протекает по закону мономолекулярной реакции.

Протоплазма клеток и тканей хорошо набухает в воде и в водных растворах. При исследовании набухания тканей следует, однако, иметь в виду, что они содержат большое количество воды, а не являются сухими гелями. Поэтому приведенные выше закономерности могут быть перенесены на жидкую протоплазму лишь с большими оговорками. К тому же и природа сил, удерживающих воду в живом объекте, еще мало изучена и до настоящего времени служит предметом широких дискуссий. Общие закономерности процесса набухания, его сте-

пень и скорость определяются физико-химическими особенностями структуры самих тканей.

В жизнедеятельности организма набухание биокolloидов играет немаловажную роль и служит одним из факторов, регулирующих водный баланс клеток и тканей. Степень набухания тканей зависит от их функционального состояния, но особенно резко меняется при патологических процессах (ожоге, воспалении, злокачественных образованиях). Значительное влияние на процесс набухания оказывает солевой состав среды, концентрация водородных ионов, коллоидно-осмотическое давление и действие многих других физико-химических факторов.

На скорость и на степень набухания гелей и тканей большое влияние оказывают анионы и катионы солей. Решающее значение принадлежит при этом анионам. В зависимости от способности усиливать набухание анионы можно расположить в нижеследующий ряд: $\text{CNS}^- > \text{J}^- > \text{Br}^- > \text{NO}_3^- > \text{ClO}_3^- > \text{Cl}^- > \text{ацетат} > \text{цитрат} > \text{тарtrat} > \text{SO}_4^{2-}$. Наибольшее набухание вызывают ионы CNS^- и наименьшее – ионы SO_4^{2-} .

Концентрация водородных ионов оказывает на набухание тканей очень большое влияние: подкисление или подщелачивание среды (до определенного предела) вызывает увеличение степени набухания, при дальнейшем увеличении кислотности или щелочности среды степень набухания уменьшается. В частности, при воспалительных процессах увеличение концентрации водородных ионов и повышение осмотического давления (происходящее вследствие распада белков и увеличения общего количества молекул) приводят к повышению степени набухания биокolloидов. Наименьшее набухание биологических тканей наблюдается в изоэлектрической и изокolloидно-осмотической точках.

Степень набухания гелей и биологических тканей измеряется различными методами, основанными на измерении длины, объема и веса набухающего геля или ткани. Применяется и ряд косвенных методов. В биологических исследованиях наибольшее распространение имеют весовые методы. Их используют и в настоящем руководстве.

Определение набухания тканей лягушки весовым методом. Лягушку обезвреживают, разрушая зондом спинной и головной мозг, и фиксируют булавками на препаровальной ванночке.

Препарируют кусочки тканей, набухание которых хотят исследовать. Обмывают эти кусочки рингеровским раствором (особенно тщательно нужно отмыть печень от крови и кожу от слизи) и подсушивают фильтровальной бумагой. Бумагу следует прикладывать к ткани осторожно без нажима.

Из препарированных кусочков ткани делают приблизительно одинаковые навески порядка 100 – 200 мг. Навески должны быть из цельных кусочков ткани,

без излишних порезов, так как последние изменяют поверхность набухающей ткани, что может привести к искажению результатов исследования. Для удобства взвешивания кусочки ткани надевают на крючки, сделанные из тонкой проволоки или энтомологических булавок. Эти крючки, предварительно взвешенные, остаются вколотыми в ткань в течение всего опыта.

Взвешенные кусочки ткани помещают в бюксы с жидкостью, в которой должна набухать ткань. Для каждого кусочка ткани следует брать отдельный бюкс, а жидкости наливать в него столько, сколько нужно для того, чтобы кусочек ткани погрузился в нее целиком.

Через 5 мин ткань вынимают из бюкса вместе с крючком, осторожно подсушивают фильтровальной бумагой, взвешивают (не забывая вычестить из полученных данных вес крючка) и снова помещают в бюкс. Еще через 5 мин повторяют взвешивание прежним порядком, и так до тех пор, пока вес ткани не перестанет изменяться. Вес ткани считают не изменяющимся тогда, когда два следующих друг за другом взвешивания дают одинаковый результат. Первые три взвешивания делаются, как указывалось, с интервалом 5 мин. Далее этот интервал можно увеличить до 10 мин.

Весовой метод изучения динамики набухания весьма неточен и в настоящее время уступает место другим методам – объемному методу с применением проекции на экран, титрометрическому методу и др. Однако весовой метод продолжает сохранять свое значение вследствие большой простоты. В частности, он может быть с успехом применен при сравнительном исследовании способности различных тканей к набуханию или для сравнительной оценки действия различных физико-химических агентов на одну и ту же ткань.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА

Необходимые принадлежности: весы торсионные, набор препаровальных инструментов (препаровальная ванночка, ножницы Купера, пинцет зубчатопальчатый, глазные пинцеты – 2 шт), проволочные крючки, фильтровальная бумага, бюксы на 10 - 15 см³, мерные цилиндры на 10 - 15 см³, марля, часы или секундомер.

Растворы: физиологический раствор, 0,4%-ный раствор NaCl, 1%-ный раствор NaCl, 10%-ный раствор CaCl₂. Образцы тканей.

Упражнение 1. Исследование набухания различных тканей лягушки. Для исследования берут кожу, скелетную (икроножную) мышцу и печень. Препарованные кусочки ткани помещают в физиологический раствор NaCl для холоднокровных и проводят опыт описанным выше порядком.

Упражнение 2. Определение влияния pH раствора на величину набухания мышечной ткани. Приготавливают фосфатный буфер по Серенсену с pH 5.2 и 8.0. Буферные растворы приливают к физиологическому раствору NaCl из расчета 1 мл буферного раствора на 10 мл физиологического.

Опыт проводят с тремя кусочками икроножной мышцы, из которых один набухает в физиологическом, а два других – соответственно в физиологическом растворе с добавлением буферных растворов.

Упражнение 3. Изучение влияния ионов кальция на величину набухания скелетной мышцы. Четыре кусочка икроножной мышцы лягушки помещаются для набухания в бюксы, из которых один содержит физиологический раствор, а три других - физиологический раствор с добавлением 10%-ного раствора CaCl₂. Последний добавляют из расчета: 1) 0,1 мл на 5 мл физиологического раствора; 2) 0,2 мл на 5 мл ; 3) 0,3 мл на 5 мл. Опыт проводится описанным выше порядком.

Упражнение 4. Исследование набухания тканей в гипо- и гипертонических растворах. Для работы приготавливают три раствора NaCl: гипотонический - 0,4%-ный, изотонический (физиологический раствор) – 0,9%-ный, гипертонический – 1%-ный. Прослеживают набухание скелетной мышцы и печени лягушки в этих растворах. Работу ведут описанным выше способом. Полученные в опыте данные записывают в табл. 5.1.

Таблица 5.1

Ткань	Вес, мг			
	Исходный	Через 5 минут после начала	Через 10 минут после начала	Через 20 минут после начала

Такая таблица составляется для каждого упражнения. В первый вертикальный столбец вписывается наименование ткани или способ ее обработки, если в опыте исследовалось набухание одной и той же ткани в разных условиях.

Кроме того, результаты каждого упражнения оформляются в виде графиков, на которых по оси абсцисс откладывают время, а на оси ординат – вес ткани в процентах по отношению к исходному весу, который принимается за 100%.

Контрольные вопросы

1. Что понимают под степенью и скоростью набухания.
2. При каких условиях наблюдается наименьшее набухание биологических растворов.
3. Как влияет подкисление и подщелачивание на набухание тканей.
4. Как влияют на набухание тканей двухвалентные ионы.

5. Объяснить как влияет на набухание изменение концентрации раствора.

6. ПРОНИЦАЕМОСТЬ КЛЕТОК И ТКАНЕЙ

Проницаемостью называется способность клеток и тканей пропускать газы, воду и растворимые в ней вещества. Проблема проницаемости имеет важное значение для вопросов обмена веществ, распределения веществ между клеткой и средой, для патологии и фармакологии. В основе проникновения веществ в клетки и ткани лежит явление диффузии, описываемое законом Фика. По этому закону скорость диффузии определяется количеством вещества, продиффундировавшего за единицу времени, она прямо пропорциональна концентрационному градиенту и площади поверхности, перпендикулярной к направлению диффузии, т.е.

$$\frac{dm}{dt} = -D \times S \frac{dc}{dx} \quad (6.1)$$

где m – количество вещества, г;

t – время, сек;

S – площадь поверхности, см^2 ;

D – коэффициент диффузии, $\text{см}^2 \times \text{с}^{-1}$;

c – концентрация вещества, $\text{г} \times \text{см}^{-3}$;

x – расстояние от начальной точки диффузии, см.

Для сферических частиц, превышающих не более чем на два порядка размеры молекул растворителя, коэффициент диффузии, согласно А. Эйнштейну, равен:

$$D = \frac{RT}{6N\pi r \eta} \quad (6.2)$$

По аналогии с формулой (6.1) для характеристики скорости проникновения вещества из внешней среды в клетку была предложена формула:

$$\frac{dm}{dt} = -PS(c - c_1) \quad (6.3)$$

где c – начальная концентрация вещества, $\text{г} \times \text{см}^{-3}$;

c_1 – концентрация вещества в момент наступления диффузионного равновесия, $\text{г} \times \text{см}^{-3}$;

S – площадь поверхности клетки, см^2 ;

P – константа проницаемости, представляющая собой величину, обратную тому сопротивлению, которое встречает диффундирующая частица при переходе из внешней среды в клетку или ткань.

В соответствии с формулами (6.1) и (6.2) скорость диффузии (и соответственно – проникновения) должна экспоненциально уменьшаться по мере падения концентрационного градиента во времени и выравнивания встречных диффузионных потоков. Однако в действительности скорость проникновения в клетку того или иного вещества, как правило, никогда не падает, а поддерживается на постоянном уровне. Последний зависит как от внешних условий (в частности, от концентрации вещества, во внешней среде), так и от интенсивности обмена веществ, вовлекающего в свой круговорот молекулы проникающего вещества. Если какое-либо вещество, проникая в клетку, вступает в химическую реакцию или изменяет свое физико-химическое состояние, то скорость его проникновения в двух взаимно противоположных направлениях окажется неодинаковой. Подобное явление называется односторонней проницаемостью.

Согласно Рубинштейну, неравномерное распределение веществ между клеткой и средой, а также между различными слоями тканевых мембран может быть обусловлено либо движением вещества против концентрационного градиента, но по какому-либо другому градиенту, либо движением вещества по градиенту активности, но с преимущественным прохождением в одном направлении. В основе последнего явления лежит: а) неодинаковое численное значение физико-химических параметров, характеризующее тканевую мембрану в направлении диффузионного потока (рН, редокс-потенциала, адсорбционного уровня), и б) физико-химическая лабильность молекул проникающего вещества. Если различным фазам протоплазмы как микрогетерогенной системы (или различным слоям тканевой мембраны) присущи различные значения тех или иных физико-химических переменных и если этим значениям соответствуют различные физико-химические состояния проникающего вещества (недиссоциированные молекулы – ионы, окисленная – восстановленная форма, адсорбированное – не адсорбированное состояния), то мы вправе ожидать движения веществ преимущественно в одном направлении.

Для экспериментальной проверки сделанных предположений удобным объектом является кожа лягушки, обладающая выраженной односторонней проницаемостью для ряда цветных индикаторов и других слабых органических электролитов и, в частности, для красителей группы тиазинов (метиленовой синей, толуидиновой синей, тионина).

Чтобы выяснить, соответствует ли асимметричное распределение красителя в коже констатированной в опыте односторонней проницаемости в направлении от соединительной ткани к эпителию, проводилось исследование срезов кожи лягушки, полученных при помощи замораживающего микротомы и окрашенных указанными выше красителями. Было установлено асимметричное распределение этих красителей в коже: локализация окраски в эпителиальных слоях и

клетках желез и ее отсутствие в соединительной ткани. Аналогичную картину удалось выявить и при гистологическом анализе нормального (обращенного эпителием наружу) и вывернутых мешков, приготовленных из кожи лягушки и наполненных 0,05%-ным раствором метиленовой синей на физиологическом растворе NaCl. И в этом случае окрашенным оказывался только эпителий, тогда как соединительная ткань оставалась неокрашенной. Очевидно, односторонняя проницаемость кожи лягушки для перечисленных выше красителей обусловлена на различием адсорбционных уровней соединительной ткани и эпителия.

Таким образом, односторонняя проницаемость – прямое следствие физико-химической асимметрии тканевой мембраны, отражающее ее морфологическую и физиологическую дифференцировку. Адсорбционная асимметрия тканевых мембран, по-видимому, не единственная причина односторонней проницаемости: она может быть обусловлена неодинаковым значением других физико-химических переменных, в частности водородного показателя.

Окрашивание поперечных срезов кожи растворами цветных индикаторов (нейтральной красной, феноловой красной, метиловой оранжевой) показало, что различные слои кожи имеют различные значения pH. Соединительная ткань характеризуется слабощелочной реакцией, а эпителий – слабокислой. Кислая реакция наиболее выражена у клеток кожных желез, секрет которых, по-видимому, ответствен и за кислую реакцию клеток эпителия.

Таким образом, деятельность желез активно поддерживает градиент pH вдоль оси кожной мембраны.

Различие активной реакции соединительных и эпителиальных слоев кожи определяет реакцию растворов с наружной и внутренней ее поверхностей. Действительно, если поместить нормальный и вывернутый мешки из кожи лягушки, заполненные физиологическим раствором NaCl, в раствор NaCl, то активная реакция наружного и внутреннего растворов сместится с pH 5,8 до 6,9 у эпителиальной поверхности и до 7,1 – у соединительной ткани. В последнем нетрудно убедиться, добавив к наружному и внутреннему растворам по две капли раствора цветного индикатора (нейтрального красного, фенолового красного, бромтимолового синего, бромкрезол пурпурного). Четкое различие окраски наружного и внутреннего растворов наблюдалось в тех случаях, когда зона перехода индикатора лежала вблизи нейтральной реакции pH 7,0.

Следовательно, физико-химическое состояние молекул слабых электролитов (красителей, солей алкалоидов) различно как в разных слоях кожной мембраны, так и в растворах с разных ее сторон. В частности, в растворе, омывающем соединительную ткань, и в самой соединительной ткани слабые основания должны находиться преимущественно в виде недиссоциированных, а потому и более способных к диффузии молекул. Напротив, в растворе с низким pH, омыва-

вающем эпителий, да и в самих клетках эпителия должны преобладать ионы красителя, неспособные к диффузии, но зато легко связывающиеся внутри клеток.

Таким образом, благодаря градиенту рН в самой коже и между обоими омывающими ее растворами должен возникнуть определенный концентрационный градиент, обеспечивающий направленное движение красителя от соединительной ткани к эпителию.

При проникновении через кожу лягушки нейтрального красного уже спустя 30 мин после начала опыта эпителий нормального мешка окрашивается в ярко-красный цвет, соответствующий ионной форме красителя значительной концентрации. Краситель проникает в эпителий через соединительную ткань, в которой он находился в виде недиссоциированных диффузибельных молекул. Здесь налицо накопление красителя, перешедшего в менее диффузибельную ионную форму. В вывернутом кожном мешке остается окрашенным только эпителий. Однако он окрашен лишь слегка, так как находится в растворе ионов, уступающих по диффузибельности недиссоциированным молекулам.

Через 2 ч распределение красителя в нормальном мешке резко меняется. Окрашивается не только эпителий, но и соединительная ткань и при этом в строгом соответствии с активной реакцией каждого из слоев. В вывернутом мешке, напротив, окрашен только эпителий, так как попавшие в его клетки ионы как бы заперты в ловушку.

Односторонняя проницаемость отнюдь не является раз навсегда заданным искони присущим мембране свойством. Произвольно изменяя активную реакцию раствора красителя, а также и солевого раствора, прилегающего к коже с противоположной стороны, можно усилить, ослабить, подавить одностороннее движение и даже изменить его направление на диаметрально противоположное.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА

Необходимое оборудование: набор препаровальных инструментов; препаровальная ванна; булавки, бюксы, полые стеклянные цилиндры; нитки, 0,65%-ный раствор NaCl; фосфатные буферные растворы (по Серенсену); нейтральный красный, 0,125%-ный на физиологическом растворе; метиленовый синий, 0,5%-ный на физиологическом растворе.

Упражнение 1. Исследование односторонней проницаемости кожи лягушки для метиленового синего. Тщательно отмывают от слизи лягушку (желательно *Rana temporaria*) обезглавливают и обездвиживают, разрушая спинной мозг зондом. Осторожно надрезают кожу вокруг головы и снимают полностью. Кожу в нормальном ее положении (эпителием наружу) и в вывернутом положе-

нии (эпителием вовнутрь) натягивают на полые стеклянные цилиндры диаметром 10 мм. Предварительно перед натягиванием кожу во избежание ее разрыва, вызванного высыханием, смачивают физиологическим раствором NaCl изнутри и водой снаружи. Кожные мешки фиксируют на стеклянных цилиндрах с помощью ниток.

Приготовленные таким образом мешки наполняют физиологическим раствором, чтобы убедиться в их герметичности. После этого физиологический раствор выливают из мешков и наполняют каждый из них $1,5 - 2 \text{ см}^3$ 0,05%-ным раствором красителя.

Каждый из мешков погружают в бюкс, предварительно наполненный 20-25 мл физиологического раствора NaCl. При погружении следят за тем, чтобы уровень физиологического раствора в бюксе и уровень раствора красителя в цилиндре совпали друг с другом. Фиксируют положение цилиндра с прикрепленным к нему кожным мешком на бортах бюкса при помощи кольца, свитого из проволоки.

Бюксы с кожными мешками помещают на два часа в термостат, предварительно отрегулированный на 37°C . По прошествии указанного срока вынимают бюксы из термостата. Записывают результаты (схематично сделать рисунки и стрелкой указать направление проникновения красителя).

Упражнение 2. Влияние активной реакции раствора на одностороннюю проницаемость кожи для нейтрального красного. Буферные смеси с разными рН добавляют к раствору красителя, а также к раствору хлористого натрия из расчета 1 см 3 смеси к 2 см 3 раствора. Заполняют мешки раствором красителя, предварительно забуференного смесью фосфатного буфера (1 объемом фосфатной смеси на 2 объема физиологического раствора). Закрепив кожные мешки на стеклянных цилиндрах, погружают их в налитые бюксы и предварительно забуференные растворы NaCl. Надлежит использовать следующие сочетания значений активной реакции наружного раствора и раствора красителя:

Наружный раствор	Раствор красителя
5,28	5,28
5,28	8,04
8,04	5,28
8,04	8,04

Бюксы с кожными нормальными и вывернутыми мешками, наполненными забуференными растворами красителя и погруженными в забуференные раство-

ры NaCl, помещают в термостат с температурой, равной 37°C. По прошествии 2 ч бюксы вынимают из термостата.

Результат записывают таким же образом, как и в упражнении 1. Анализируют влияние рН на одностороннюю проницаемость.

Контрольные вопросы

1. Чем объясняется односторонняя проницаемость кожи лягушки.
2. Как изменение значений водородного показателя отразится на односторонней проницаемости.
3. Какие физико-химические факторы могут изменить одностороннюю проницаемость мембраны.
4. В чем разница между диффузией и проницаемостью.

7. ЭЛЕКТРОФОРЕЗ БЕЛКОВ СЫВОРОТКИ КРОВИ НА ФИЛЬТРОВАЛЬНОЙ БУМАГЕ

В настоящее время для разделения белков, в частности для разделения белков плазмы крови используется метод электрофореза. Этот метод основан на том, что молекулы белков в растворе несут электрические заряды. Если через раствор пропускать электрический ток, поместив в него электроды, то молекулы в соответствии со своими зарядами будут двигаться к электродам. Под действием электрического тока молекулы различных белков перемещаются с различной скоростью. Пользуясь этим, можно разделять смесь белков на отдельные фракции. Электрофоретическое разделение является более точным по сравнению с химическим, применявшимся ранее.

Явление электрофореза было известно давно. В 1809 г. профессор Московского университета Рейс наблюдал, что частички глины, диспергированной в воде, движутся под действием электрического тока к аноду. Электрофорез или, как его еще называют, катафорез, есть перенос в электрическом поле коллоидных частиц. Передвижение коллоидных частиц под действием тока свидетельствует о том, что они несут определенные электрические заряды. Современная техника электрофореза сложных смесей белков и других веществ была разработана Тизелиусом в 1937 г. В дальнейшем техника электрофореза и сам электрофоретический аппарат все более совершенствовались.

В настоящее время широкое распространение получил метод электрофореза на фильтровальной бумаге. На фильтровальную бумагу, смоченную буферным раствором, наносят каплю сыворотки. Затем через эту полоску бумаги пропускают электрический ток. Белки перемещаются в электрическом поле с различной скоростью и распределяются в течение определенного времени на раз-

ном расстоянии между полюсами электрического поля. Таким образом, смесь белков разделяется на фракции. Известно несколько таких электрофоретических фракций белков кровяной плазмы. Они получили название альбуминов и глобулинов, причем различают α -, β - и γ -глобулины. α -, β -глобулины часто разделяются еще на более мелкие фракции α_1 -, α_2 -, α_3 - и β_1 -, β_2 -глобулины.

Конструкция прибора. Прибор состоит из электрофоретической камеры (ванны) и блока питания. В электрофоретической камере исследуемое вещество разделяется на фракции в электрическом поле, которое создается между угольными электродами, опущенными в буферный раствор.

Электрофоретическая камера представляет собой пластмассовую ванну, в которой имеются кюветы для буферного раствора, с двух сторон ее - контактные планки, на которых установлены угольные электроды и клеммы для подключения ванны к блоку питания. Для соблюдения полярности на штепсельной вилке и штепсельных клеммах поставлены знаки «+» и «-». В ванне есть призмы для поддержания электрофореграмм. Ванна закрывается пластмассовой крышкой с прозрачными окнами из органического стекла. Для установки ее в горизонтальном положении служат регулировочные винты. Конструкция электрофоретической камеры предусматривает отключение напряжения от ванны до снятия крышки.

Блок питания состоит из двух узлов: шасси и корпуса. На шасси расположены основные элементы электрической схемы прибора. К шасси крепится передняя панель, на которой находятся элементы контроля и регулирования тока и напряжения; миллиамперметр на 10 мА с надписью «mA×4»; вольтметр на 10 В с надписью «V×50»; сигнальная лампочка контроля включения прибора с надписью «Сеть»; выключатель с надписью «Включено» для включения прибора; ручка с надписью «Регулировка напряжения» для установки требуемой величины выходного напряжения.

На задней стенке блока питания установлены: клеммы со знаками «+» и «-» для подключения электрофоретической камеры; клемма «Земля»; держатель предохранителя и шнур с вилкой для включения приборов в сеть. Прибор обязательно нужно заземлить.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА

Для подготовки электрофоретической камеры к работе необходимо следующее.

1. Установить кюветы по обоим концам ванны и залить буферным раствором (по 50-60 мл в каждое отделение кюветы).

2. На перегородки кювет повесить полоски хроматографической бумаги длиной 130 мм и шириной 60 мм, желательно не менее двух слоев.

3. Установить призмы в специальные гнезда ванны.

4. Нарезать хроматографическую бумагу вдоль волокон полосками длиной 260 и шириной 25 мм. От концов данной полоски на расстоянии 43 мм наметить простым карандашом линии загиба, с одного конца дополнительно провести линию старта на расстоянии 10 мм от линии загиба. Смочить полоски в буферном растворе и подсушить между листами фильтровальной бумаги. Затем положить бумажные полоски (фореграммы) в ванну таким образом, чтобы концы их (от линии загиба) были погружены в буферный раствор. Рекомендуется вероналомедианоловый буферный раствор с рН – 8,6 и ионной силой 0,1 (мединала 10,32 г, веронала 1,84 г в 1 л дистиллированной воды).

5. Установить контактные планки в ванне так, чтобы угольные электроды опустились во внешние отделения кювет.

6. На специальные штампы микропипеткой нанести препарат в количестве 0,1 – 0,02 мл. Штампы с нанесенным препаратом поместить на линии старта фореграмм. После внесения белкового раствора ванну плотно закрыть крышкой для сохранения постоянной влажности воздуха. При закрывании крышки проследить, чтобы отрицательный полюс приходился на линию старта.

7. Прибор включить в сеть. Установить напряжение 400 В. Белковый раствор в процессе электрофореза с бумажной полоски постепенно переходит на фореграмму. Электрофорез продолжать в течение 3 ч. После окончания его фореграммы вынуть из ванны и поставить в сушильный шкаф, где держать при температуре 105 – 110°C в течение 10 мин. При этой температуре белки коагулируют и фиксируются на том месте, которого достигли в процессе электрофореза.

8. Окрасить фореграммы бромфеноловым синим красителем, приготовленным по такому рецепту: на 1 л дистиллированной воды бромфенолового синего 0,1 г (100 мг), 50 мл уксусной кислоты и 50 г сернокислого цинка. Окрашивать в течение 15 мин, а затем бумажные полоски промыть в 3 – 4 ваннах 5%-ным раствором уксусной кислоты. После этого полоски залить закрепителем (подержав 1 – 2 мин) и просушить на воздухе. Для закрепления использовать состав: 20 г CH_3COONa и 100 г CH_3COOH на 1 л H_2O .

9. Для расшифровки электрофореграмм можно использовать метод экстрагирования красителя щелочью с последующим определением оптической плотности каждой фракции на фотоэлектроколориметре ФЭК-М.

10. Для обеспечения нужной работы прибора необходимо:

11. Не оставлять блок питания включенным без ванны;

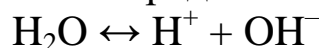
12. По окончании работы с камерой слить буфер из ванночек, промыть и очистить электроды, затем собрать снова всю камеру и закрыть ее крышкой.

Контрольные вопросы

1. В чем заключается принцип метода электрофореза.
2. Нужно ли смачивать фореграммы в буферном растворе или в дистиллированной воде.
3. Какой буфер чаще всего применяют для бумажного электрофореза.
4. Как с помощью электрофореза можно определить молекулярную массу белка.

8. pH-МЕТРИЯ

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



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

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

где K_{H_2O} – константа электролитической диссоциации воды при $25^\circ C$.

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

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

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

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

где вода представлена неионизированными молекулами, концентрация которых практически постоянная.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

раствор даёт щелочную реакцию.

В нейтральных растворах $[H^+] = [HO^-] = 10^{-7}$ моль/л (при 25°C). Следовательно, любой водный раствор независимо от того, какова его реакция (т.е. значение рН), должен содержать как ионы H^+ , так и ионы HO^- ; произведение их концентраций должно быть постоянной величиной, K_w равной 10^{-14} моль/л.

Водородный и гидроксильный показатели кислотности среды

Вместо молярной концентрации ионов водорода реакцию среды в водных растворах принято характеризовать отрицательным деся-

тичным логарифмом этой величины, что позволяет пользоваться небольшими безразмерными числами от 1 до 14.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

где a – активность ионов.

Кроме водородного и гидроксильного показателей рН и рОН, при расчётах нередко используют и показатель ионного произведения воды pK_w :

$$pK_w = -\lg K_w \quad (13)$$

Суммируя (4), (8) и (9), получим:

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

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

Если измерения проводят при температуре человеческого тела, то:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Цель работы: построить градуировочный график зависимости ЭДС H^+ -электрода от величины рН буферных растворов и определить абсолютные величины “кислотной и щелочной” ошибок измерения рН в интервале 1 – 13 .

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

Ход работы.

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

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

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

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

5. Результаты измерения ЭДС, переведенные в мВ, следует занести в таблицу 1.

Таблица 1.

Исследуемые рас-	Значения рН	Среднее значение	Значения ЭДС, мВ	Среднее значение
------------------	-------------	------------------	------------------	------------------

творы	Измерения				рН	Измерения				ЭДС, мВ
	1	2	3	4		1	2	3	4	
Буферные растворы										
HCl										
NaOH										

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

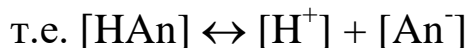
7. После построения графика провести определение ЭДС неизвестного раствора. Используя градуировочный график, определить величину рН раствора. Затем измерить рН при помощи рН метра и определить в процентах величину ошибки.

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

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

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

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



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

Ход работы

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

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

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

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

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

5. Полученные результаты занести в таблицу 2.

Таблица 2

№ п/п об- разца	Исследуемый раствор	Величина рН			Сред- нее значе- ние рН	Активная концен- трация a_{H^+} , моль/л
		Измерения				
		1	2	3		
1	H ₂ O					
2	Сок					
3	Сок (1:10)					
4	Молочная сыворотка					
5	Молочная сыворотка (1:10)					
6	HCl					
7	NaOH					

6. Рассчитать активность ионов водорода по уравнению 15.

Контрольные вопросы:

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

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

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

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

САРАТОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н. Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО

РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Антонов В.Ф. *Биофизика*. – М.: Владос, 2006. – 287 с.
2. Волькенштейн М.В. *Биофизика*. – СПб.: Лань, 2008. – 594 с.
3. Тарусов Б.Н., Антонов В.Ф., Бурлакова Е.В. *Биофизика*. М., 1968. Гл. 4, 5, 6, 8, 9, 12.
4. Рубин А.Б. *Биофизика*. М., 2000.
5. *Биофизика* / Г. А. Плутахин, А. Г. Коцаев. – М.: Лань, 2012. - 240 с.
6. *Ионизирующее излучение в гидросфере. Введение в радиобиологию и радиэкологию гидробионтов: Учебное пособие* / В. Н. Кулепанов. – М.: Издательство "ФОРУМ"; М.: ООО "Научно-издательский центр ИНФРА-М", 2013. – 88 с.

ОГЛАВЛЕНИЕ

1. Методы регистрации радиоактивных излучений	3
2. Биоэлектрические потенциалы	17
3. Осмотическое давление биологических жидкостей	24
4. Поверхностное натяжение	28
5. Набухание тканей	35
6. Проницаемость клеток и тканей	39
7. Электрофорез белков сыворотки крови на фильтровальной бумаге	44
8. рН-метрия	47
Рекомендуемая литература	55

Учебное издание

МЕТОДИЧЕСКОЕ ПОСОБИЕ
К МАЛОМУ ПРАКТИКУМУ ПО БИОФИЗИКЕ

Издание пятое

Составители:

*Миронова Ирина Константиновна,
Каневский Матвей Владимирович*

Редактор В.А. Трушина
Технический редактор Л.В. Агальцова
Корректор Е.А. Малютина

Подписано в печать 17.02.03.

Формат 60 X 84 1/16. Бумага офсетная. Гарнитура Таймс. Печать офсетная.

Усл. печ. л. 2,56 (2,75). Уч.-изд. л. 2,9. Тираж 300. Заказ №3#

Издательство Саратовского университета. 410026, Саратов, Астраханская,83.

Типография Издательства Саратовского университета. 410026, Саратов, Астраханская, 83.