

Ćwiczenie nr XVIII

WYZNACZANIE IZOTERM $\pi - A$ MONOWARSTW LANGMUIRA NA GRANICY FAZ CIECZ-GAZ

I. Cel ćwiczenia

Celem ćwiczenia jest wyznaczenie zależności ciśnienia powierzchniowego w funkcji powierzchni przypadającej na cząsteczkę w stałej temperaturze (izoterm $\pi - A$) dla monowarstw Langmuira utworzonych przez wybrane lipidy błonowe na granicy faz woda-powietrze.

II. Zagadnienia wprowadzające

1. Lipidy błonowe – budowa i klasyfikacja.
2. Metody otrzymywania modelowych błon biologicznych.
3. Monowarstwy Langmuira.
4. Wyznaczanie napięcia i ciśnienia powierzchniowego metodą płytki Wilhelmy'ego.
5. Wyznaczanie izoterm $\pi - A$.
6. Określanie stanu fizycznego modelowych błon biologicznych.

Literatura obowiązuca:

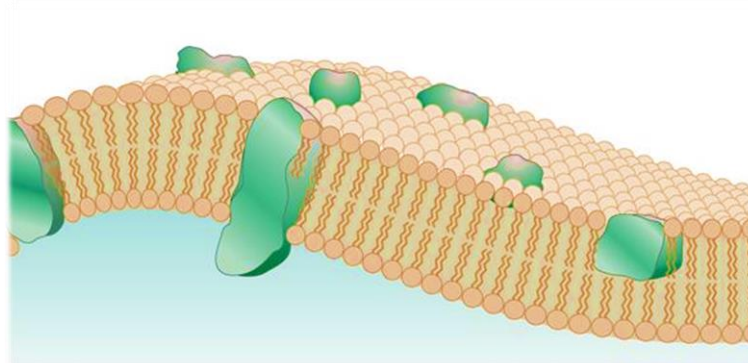
1. Wykład, *Modelowe błony biologiczne. Otrzymywanie, charakterystyka i zastosowania.*
2. A. Chyla, *Warstwy Langmuira-Blodgett i ich zastosowanie w elektronice molekularnej*, Oficyna Wydawnicza Politechniki Wrocławskiej, Wrocław, 2004.
3. M. Bryszewska, W. Leyko, *Biofizyka dla biologów*, PWN Warszawa, 1997.
4. E. T. Dutkiewicz, *Fizykochemia powierzchni*, WNT Warszawa, 1998.
5. Ćwiczenie nr XVII, część teoretyczna, rozdz. III.1. <http://www.katedrachf.umcs.lublin.pl>
6. KSV NIMA LB Software Manual v1.6

III. Część teoretyczna

III. 1. Membrany biologiczne – Wprowadzenie

Błony biologiczne są strukturami budującymi komórki wszystkich organizmów: prokariotów, eukariotów, zwierząt i roślin. Pomimo wielkiego zróżnicowania organizmów i struktur, w których występują, ich funkcje i budowa mają charakter uniwersalny. Membrany ograniczają przedziały komórki i organelli komórkowych, co pozwala na kontrolę ich składu, regulują transport określonych cząsteczek pomiędzy środowiskiem wewnątrz i zewnątrzkomórkowym oraz między cytoplazmą a przedziałami komórkowymi odpowiadając za selektywną przepuszczalność, biorą udział w przepływie informacji poprzez zmiany konformacyjne poszczególnych składników, tworzą optymalne warunki dla działania pomp jonowych, receptorów i wybranych enzymów. Większość procesów biochemicznych przebiega właśnie z udziałem błon.

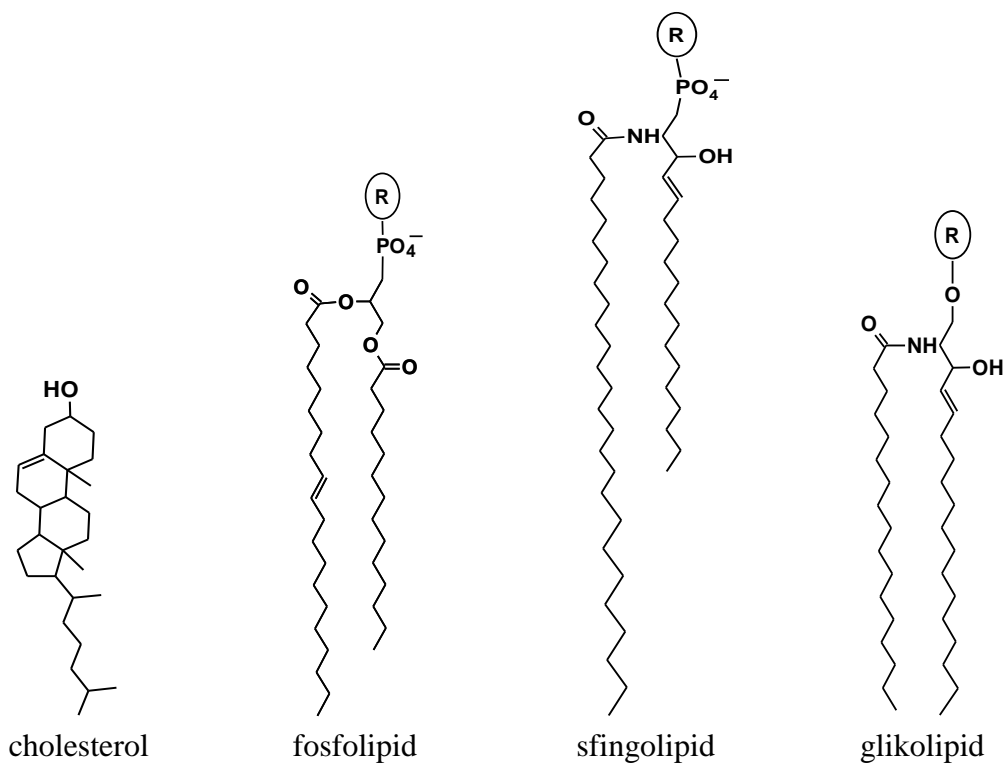
W 1972 r. Singer i Nicolson, w celu zobrazowania budowy membrany biologicznej, zaproponowali model płynnej mozaiki (Rys. 1), który zakłada, że błonę stanowi płynna mozaika lipidów w postaci bimolekularnej warstwy, w której tkwią białka integralne i peryferyczne (powierzchniowe).



Rys. 1. Model płynnej mozaiki białkowo – lipidowej według Singera i Nicolsona.

Bardzo istotną cechą błony komórkowej jest jej płynność (charakteryzowana przez odwrotność lepkości) będąca odzwierciedleniem ruchliwości lipidów i uporządkowania łańcuchów acylowych kwasów tłuszczowych. Zależy ona od fazy, w jakiej znajdują się lipidy błonowe, składu lipidowego i oddziaływań między komponentami. Płynność błony decyduje o podatności na odkształcenia, stabilności osmotycznej i mechanicznej, dyfuzji tlenu i działaniu receptorów błonowych, a także determinuje aktywność enzymów błonowych.

Głównymi budulcami membran są lipidy i białka. Rdzeń błon biologicznych stanowi dwuwarstwa lipidowa zbudowana głównie z fosfolipidów (takich jak fosfatydylocholina (potocznie zwana lecytyną), fosfatydyloseryna, fosfatydyloetanolamina), glikolipidów i steroli (Rys. 2).



Rys. 2. Struktury lipidowe: cholesterolu, fosfolipidu (R – zasada azotowa: cholina, seryna lub etanoloamina), sfingolipidu (R – cholina w sfingomielinie), glikolipidu (R – reszta sacharydowa: glukoza, galaktoza).

Fosfolipidy budując błony komórkowe pełnią znaczącą funkcję w transporcie międzykomórkowym, w sprawowaniu kontroli nad przepływem informacji i w procesach przekształcania energii. Udział poszczególnych lipidów zależy od rodzaju membrany. Dodatkowo obie monowarstwy należące do tej samej błony zawierają różne rodzaje lipidów, powstaje wówczas tzw. asymetria składu lipidowego błony, która warunkuje jej specyficzne funkcjonowanie.

Lipidy błonowe (fosfo- i glikolipidy) charakteryzują się wyraźnie wykształconą częścią hydrofobową, którą stanowią dwa łańcuchy węglowodorowe i częścią hydrofilową (polarną głową). Pozostałe lipidy nie wykazują zdolności do formowania trwałych ciekłokrystalicznych biwarstw w środowisku wodnym i występują jako domieszki lipidów błonowych. Biwarstwa uformowane z mieszaniny lipidów posiada zdolność do lateralnej separacji faz i tworzenia domen (tratw) rozumianych jako obszary uporządkowania cząsteczek, w których dominują lipidy tylko jednego rodzaju.

III. 2. Właściwości fizykochemiczne lipidów

Lipidy należą do związków biochemicznych, które są trudno rozpuszczalne lub nierozpuszczalne w wodzie, co wynika z obecności dużej liczby grup $>CH_2$ w ich cząsteczkach. Jednakże posiadają również grupy polarne lub jonowe (cząsteczki amfifilowe). Dzięki amfifilowości lipidy, zwłaszcza fosfolipidy, są związkami powierzchniowo czynnymi, które adsorbując się na powierzchni wody, zmniejszają jej napięcie powierzchniowe. Ze względu na oddziaływanie z wodą wyróżnia się lipidy **niepolarne** i **polarne**. Lipidy niepolarne nie rozpuszczają się w wodzie nawet w minimalnym stopniu, a naniesione na jej powierzchnię tworzą soczewki – nie rozplývają się, np. woski. W grupie lipidów polarnych wyróżnia się trzy klasy:

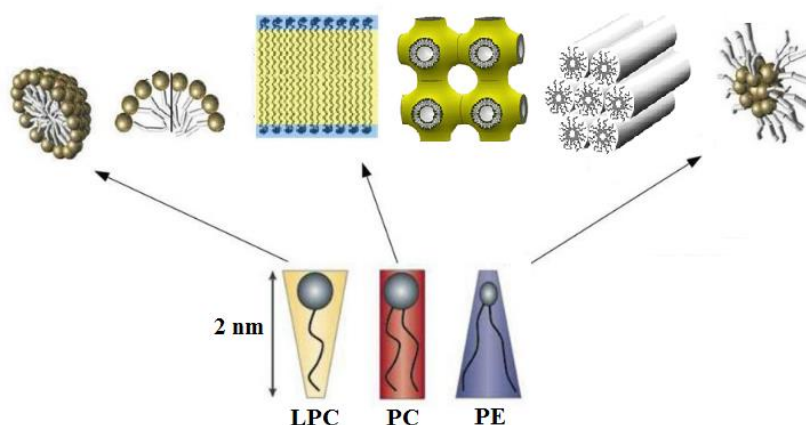
- lipidy nierozpuszczalne i nie pęczniejące w wodzie, tworzą warstwy monomolekularne na powierzchni wody, np. tłuszcze, długołańcuchowe kwasy tłuszczowe, alkohole, aminy, cholesterol;
- lipidy nierozpuszczalne, ale pęczniejące w wodzie (wbudowujące pewne ilości wody w struktury ciekłokrystaliczne), rozplývają się na powierzchni wody tworząc warstwy monomolekularne, a w roztworach objętościowych formują kryształy ciekłe przyjmujące struktury lamelarne lub heksagonalne, np. lecytyny (fosfatydylocholiny), główne składniki membran;
- lipidy rozpuszczalne w wodzie, przy niewielkich stężeniach tworzą roztwory monomerów, a po przekroczeniu pewnego stężenia – roztwory micelarne, np. mydła, lizolecytyna, detergenty.

W roztworach wodnych lipidy wykazują zdolność do tworzenia różnorodnych struktur agregacyjnych (tzw. polimorfizm lipidów) zależnych od rodzaju cząsteczek, stężenia, stopnia uwodnienia oraz temperatury, pH i siły jonowej środowiska zewnętrznego (Rys. 3).

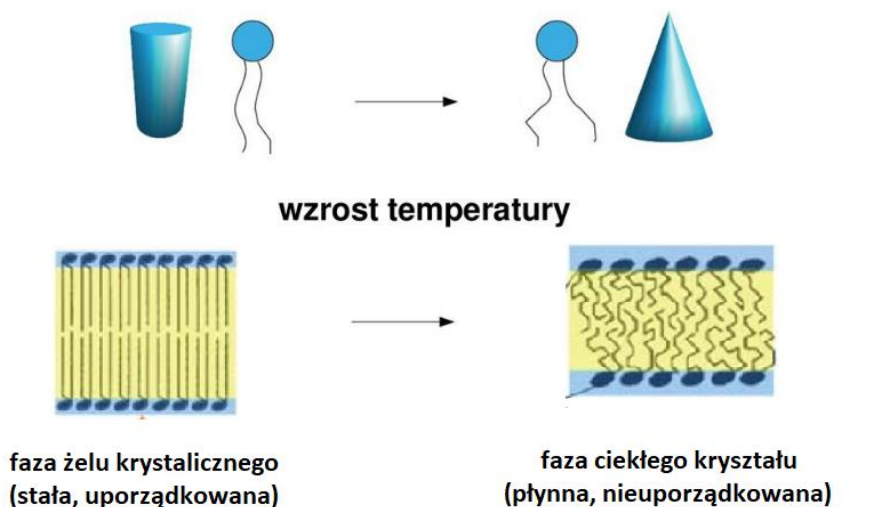
Podążając za koncepcją kształtu molekularnego, według której cząsteczkom lipidowym można przyporządkować różne kształty na podstawie stosunku powierzchni przekroju poprzecznego polarnej głowy, do przekroju hydrofobowych łańcuchów węglowodorowych, fosfatydylocholina (PC) przyjmuje kształt cylindra, a jej preferowaną formą agregacyjną jest płaska biwarstwa. Natomiast lizofosfolipidy (LPC) o strukturze odwróconego stożka organizują się micelle, zaś fosfatydyloetanoloamina (PE) o cząsteczkach w kształcie stożka tworzy micelle odwrócone (Rys. 3).

Duży wpływ na właściwości fizykochemiczne biwarstw lipidowych wywiera temperatura. Większość lipidów posiada zdolność do występowania w fazie żelowej lub ciekłokrystalicznej (Rys. 3). Uważa się, że błony biologiczne występują w fazie ciekłokrystalicznej w temperaturach fizjologicznych dla danego rodzaju komórek.

Wpływ kształtu lipidu na strukturę membrany

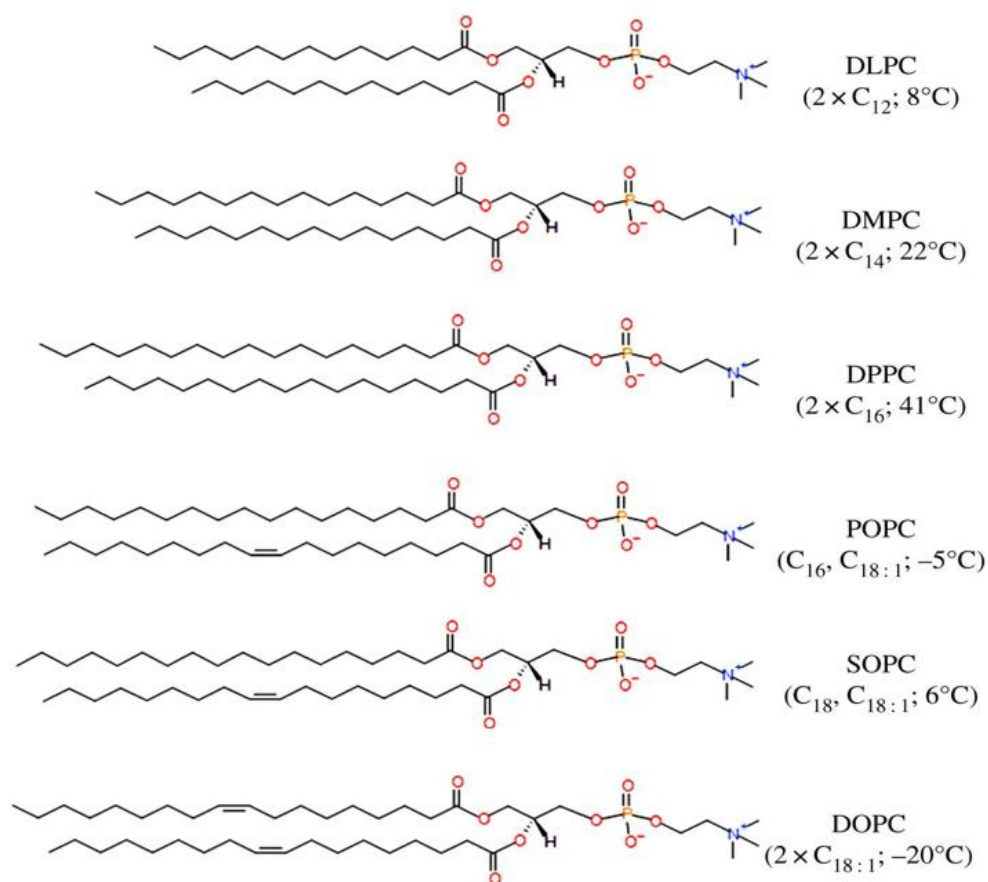


Wpływ temperatury na strukturę membrany



Rys. 3. Wpływ kształtu cząsteczek lipidów oraz temperatury na strukturę membrany.

W niektórych lipidach (fosfatydylocholinie) dodatkowo w wyniku topnienia łańcuchów acylowych pojawia się jedno przejście fazowe (faza połańdowana), w przypadku fosfatydylocholiny dwupalmitynowej (DPPC) w temperaturze ok. 41°C. Na Rysunku 4 zestawiono temperatury przejścia żel-ciekły kryształ dla wybranych fosfatydylocholin wraz ze wzorami strukturalnymi związków.



Rys. 4. Wzory strukturalne oraz temperatury topnienia żel-ciekły kryształ dla fosfatydylocho-
lin (PC) różniących się długością łańcuchów węglowodorowych oraz rodzajem wią-
zań, gdzie: O – łańcuch kwasu oleinowego, L – łańcuch kwasu laurynowego, M –
łańcuch kwasu mirystynowego, P – łańcuch kwasu palmitynowego, S – łańcuch kwa-
su stearynowego.

III. 3. Modelowe układy błon biologicznych

Ze wszystkich lipidów fosfolipidy charakteryzują się najlepszymi właściwościami am-
fifilowymi. Stanowiąc uniwersalny element błon biologicznych stają się jednocześnie najczę-
ściej wykorzystywanymi lipidami w badaniach modelowych membran naśladujących błony
biologiczne.

III. 3.1. Monomolekularne warstwy powierzchniowe

Amfifilowość lipidów, będących głównymi składnikami błon biologicznych, stwarza
możliwość badania ich właściwości na powierzchniach międzyfazowych. Szczególnie często
wykorzystywanym układem są powierzchniowe warstwy Langmuira powstałe na granicy faz
woda-powietrze.

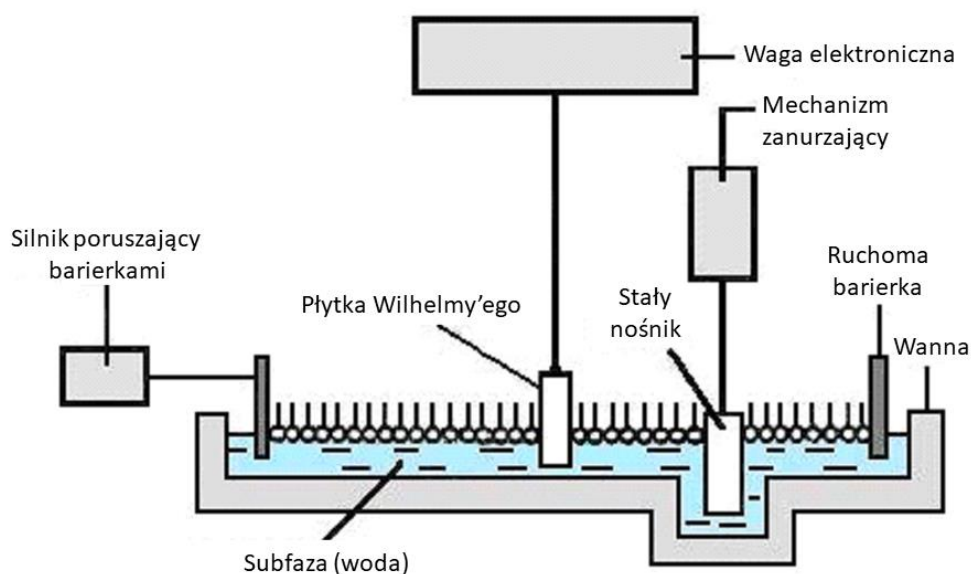
Przykładem zastosowania monomolekularnych warstw powierzchniowych są badania
nad mechanizmem działania antybiotyków, np. filipiny, nystatyny, amfoterycyny B, które
wykazują znaczną toksyczność w stosunku do komórek grzybów i czerwonych krwinek, a nie

działają na komórki bakterii; badania nad działaniem leków anti-nowotworowych; badania nad wyjaśnieniem roli surfaktantu płucnego w pęcherzykach płucnych; opracowanie mechanizmu hydrolizy enzymatycznej przebiegającej w monowarstwach lipidowych. Metoda jednocząsteczkowych membran uformowanych z uporządkowanych i zorientowanych cząsteczek może być pomocna przy porównywaniu wyników badań przeprowadzanych na danej substancji w roztworze objętościowym, zwłaszcza w aspekcie wpływu orientacji cząsteczek na ich aktywność czy właściwości optyczne.

III. 3.2. Formowanie monowarstw Langmuira

Monowarstwa Langmuira to dwuwymiarowy film o grubości jednej cząsteczki utworzony na powierzchni cieczy, najczęściej wody, zwanej subfazą lub fazą nośną, przez związki w niej nierozpuszczalne lub słabo rozpuszczalne.

Stan termodynamiczny oraz jakość monowarstwy Langmuira określa izoterma sprężania, prezentująca zależność ciśnienia powierzchniowego (π) w funkcji powierzchni fazy nośnej przypadającej na pojedynczą cząsteczkę w monowarstwie (A). Izotermy wyznacza się przy pomocy wanny Langmuira lub Langmuira-Blodgett, której schemat przedstawiono na Rysunku 5.



Rys. 5. Schemat wanny Langmuira-Blodgett zawierającej płytkę Wilhelmy'ego do pomiaru ciśnienia powierzchniowego przy użyciu wagi i sondy napięcia powierzchniowego.

W klasycznym eksperymencie otrzymywania monowarstw Langmuira, znaną ilość substancji amfifilowej rozpuszczonej w lotnym rozpuszczalniku organicznym niemieszającym się z wodą, nanosi się za pomocą mikrostrzykawki na powierzchnię subfazy wypełniającej teflonową, termostatowaną waniekę. Po odparowaniu rozpuszczalnika, powstałą warstwę poddaje się kompresji dzięki ruchom barierek w kierunku środka wanny. Bariereki są sterowane silniczkami i przesuwają się z kontrolowaną szybkością. Jednocześnie komputer połączony z wanną rejestruje izotermę sprężania przedstawiającą zależność ciśnienia powierzchniowego

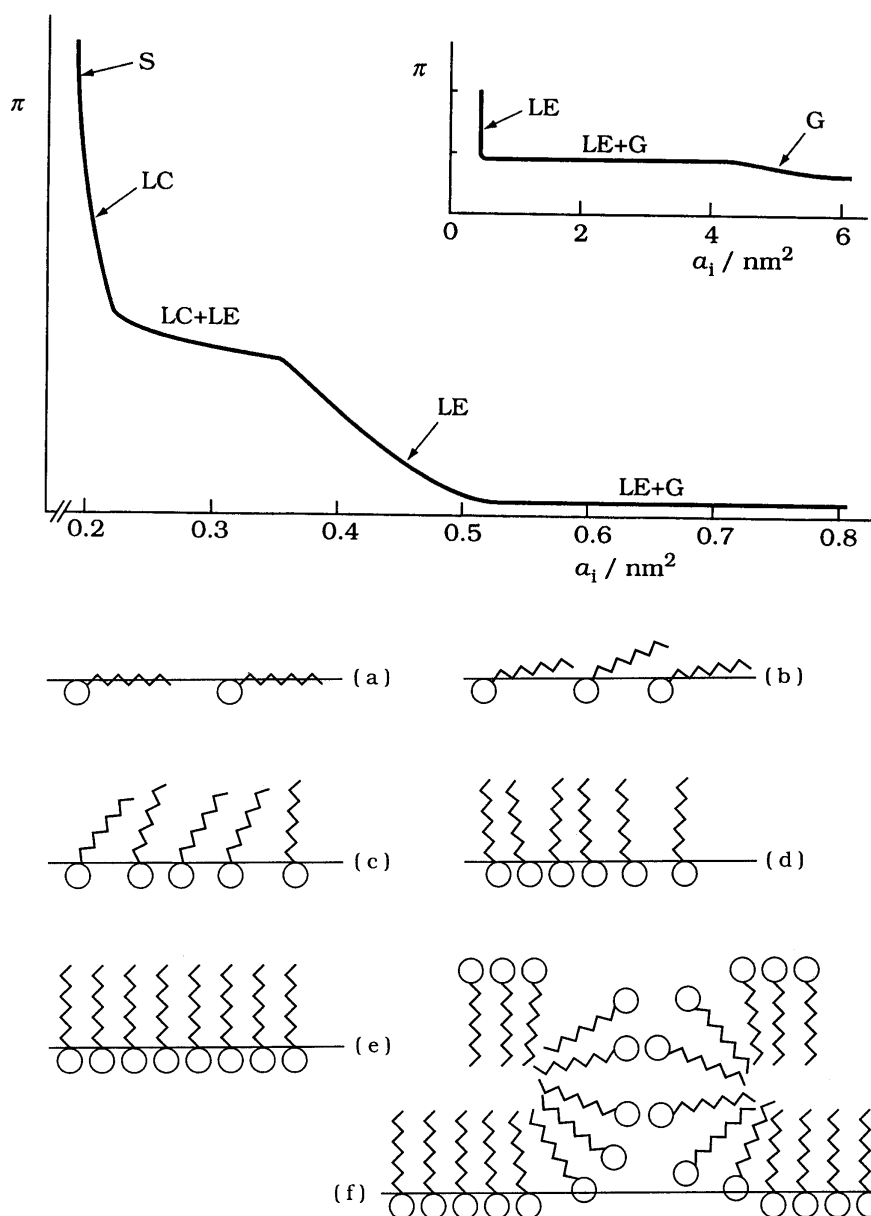
w funkcji powierzchni, przypadającej na jedną cząsteczkę w monowarstwie. Pomiar ciśnienia powierzchniowego odbywa się najczęściej metodą Wilhelmy'ego, w której dobrze zwilżalną płytkę z platyny, miki, kwarcu lub bibuły filtracyjnej umieszcza się prostopadle do powierzchni fazy nośnej. Płytkę wiesza się na haczyku połączonym drutem z urządzeniem mierzącym siłę równoważną napięciu powierzchniowemu.

Powtarzalność izoterm ściśle zależy od doboru odpowiednich warunków eksperymentu, m. in. temperatury, pH fazy nośnej, szybkości sprężania oraz czystości odczynników.

III. 3.3. Izotermy π -A

Warstwy monomolekularne mogą na powierzchni wody znajdować się w różnych fazach, w pewnym sensie analogicznych do stanów skupienia ciał trójwymiarowych: gazowej (G), ciekłej (L) i stałej (S). Odkryto także trzy dodatkowe stany: cieczy rozprężonej (LE), stanu pośredniego (I) pomiędzy fazą cieczy rozprężonej i ciekłą charakteryzującą się mniejszą niż ciecz ściśliwością oraz fazy nadciekłej (LS) pośredniej między stanem cieczy skondensowanej (LC) i ciałem stałym (S) (Rys. 6).

Każda faza monowarstwy jest ściśle określona zależnością ciśnienia powierzchniowego od powierzchni molekularnej i specyficznym ułożeniem cząsteczek. Przy bardzo dużych powierzchniach właściwych ($A > 4 \text{ nm}^2/\text{cząsteczkę}$) monowarstwa zachowuje się jak gaz dwuwymiarowy, cząsteczki tworzącego ją związku znajdują się w znacznych odległościach od siebie, praktycznie ze sobą nie oddziałując, a łańcuchy węglowodorowe są zazwyczaj zwrócone równoległe do powierzchni wody (rys. 6 a). Izoterma ma przebieg horyzontalny ze zmianami ciśnienia powierzchniowego mniejszymi niż 0,5 mN/m. Zmniejszenie powierzchni przypadającej na cząsteczkę w wyniku kompresji monowarstwy prowadzi do ściślejszego upakowania cząsteczek na powierzchni subfazy i przejścia warstwy w stan dwuwymiarowej cieczy rozprężonej (LE). Wówczas odległości międzycząsteczkowe maleją, a hydrofobowe łańcuchy węglowodorowe zaczynają „wstawać” z powierzchni wody (Rys. 6 b). Cząsteczki zachowują jednak dużą swobodę ruchu. Ciśnienie powierzchniowe rośnie i następuje gwałtowna zmiana nachylenia izotermy, informując o przemianie fazowej ze stanu gazowego w stan ciekły rozprężony (LE). W fazie tej występują zarówno przemiany konformacyjne cząsteczek, jak i tworzenie struktur domenowych. Dalsza kompresja monowarstwy przez bariery wanny powoduje kolejną przemianę fazową z fazy ciekłej rozprężonej (LE) do fazy ciekłej skondensowanej (LC), gdzie wszystkie cząsteczki są jednakowo zorientowane i gęsto upakowane (Rys. 6 d). Faza LC charakteryzuje się niską ściśliwością, ponieważ powierzchnia przypadająca na cząsteczkę nieznacznie zależy od ciśnienia powierzchniowego. Obszar LE-LC jest rejonem współistnienia dwóch faz (Rys. 6 c). Dla bardzo wysokich ciśnień powierzchniowych węglowodorowe łańcuchy cząsteczek są ściśle upakowane i warstwa znajduje się w fazie stałej (S) rozważanej jako dwuwymiarowy kryształ (Rys. 6 e). Dalsze sprężanie monowarstwy prowadzi do jej załamania (z ang. *collapse*) wskutek niestabilności mechanicznej i powstawania struktur wielowarstwowych (Rys. 6 f), co przejawia się gwałtownym zmniejszeniem ciśnienia powierzchniowego. Ciśnienie, przy którym następuje załamanie monowarstwy ściśle zależy od temperatury, pH subfazy i szybkości kompresji.

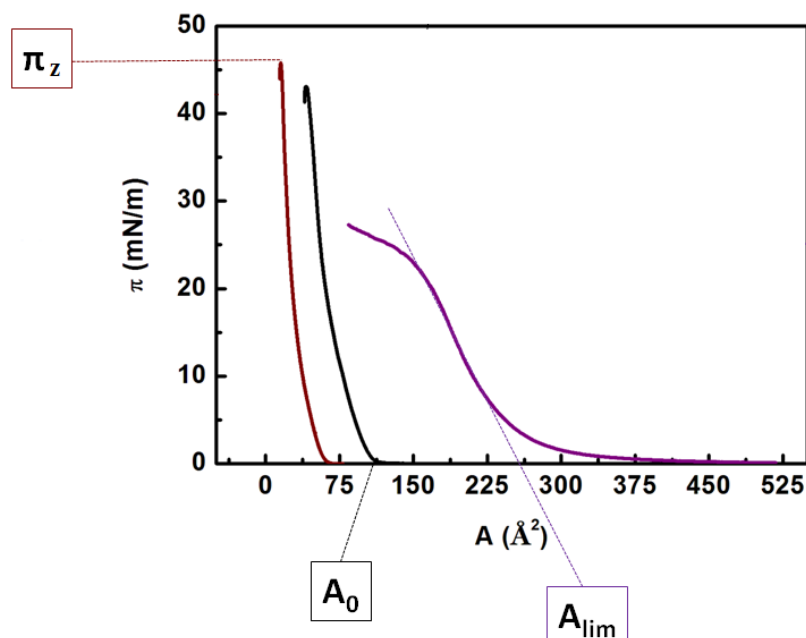


Rys. 6. Uogólniona izoterma $\pi - A$ monowarstwy lipidu wykazująca dwuwymiarowe fazy, które mogą występować w trakcie kompresji monowarstwy: faza gazowa (G), ciełka rozprężona (LE), ciełka skondensowana (LC) i stała (S) wraz z modelową orientacją cząsteczek w poszczególnych fazach: (a) G, (b) LE, (c) LE-LC, (d) LC, (e) S, (f) załamanie monowarstwy.

Izoterma $\pi - A$ dostarcza informacji na temat stabilności monowarstwy na powierzchni fazy nośnej, reorientacji cząsteczek, przejść fazowych i przemian konformacyjnych. Obecność nienasyconych wiązań w cząsteczce wpływa na kształt izotermy. Na skutek zablokowania procesu rotacji w cząsteczkach, monowarstwy są bardziej nieuporządkowane i płynne.

Na podstawie przebiegu izoterm $\pi - A$ można wyznaczyć powierzchnię A_0 , która odpowiada powierzchni na cząsteczkę, przy której da się już wykryć wzrost ciśnienia po-

wierzchniowego, a więc ok. 0,5 mN/m, i koresponduje z przejściem fazowym z fazy gazowej do ciekłej rozprężonej. Najbardziej upakowany stan danej monowarstwy charakteryzuje powierzchnia graniczna A_{lim} , którą wyznacza się przez ekstrapolację liniowej części izotermy do zerowej wartości ciśnienia powierzchniowego. Natomiast ciśnienie załamania, π_z , monowarstw określa się poprzez rzutowanie na oś Y punktu przecięcia linii będących przedłużeniem izotermy poniżej i powyżej jej przegięcia. Graficzny sposób wyznaczania powyższych parametrów pokazano na Rysunku 7.



Rys. 7. Graficzne przedstawienie sposobu wyznaczania wartości powierzchni A_0 i A_{lim} oraz ciśnienia załamania monowarstwy, π_z .

III. 3.4. Ściśliwość monowarstw

Dodatkowym parametrem wykorzystywanym w charakterystyce monowarstw jest ściśliwość, którą można obliczyć bezpośrednio z przebiegu izoterm π - A na podstawie zależności:

$$C_s = -\frac{1}{A} \left(\frac{dA}{d\pi} \right)_T \quad (1)$$

Jednak najczęściej stosuje się odwrotność ściśliwości, tj. **moduł ściśliwości** lub elastyczność wyrażoną jako:

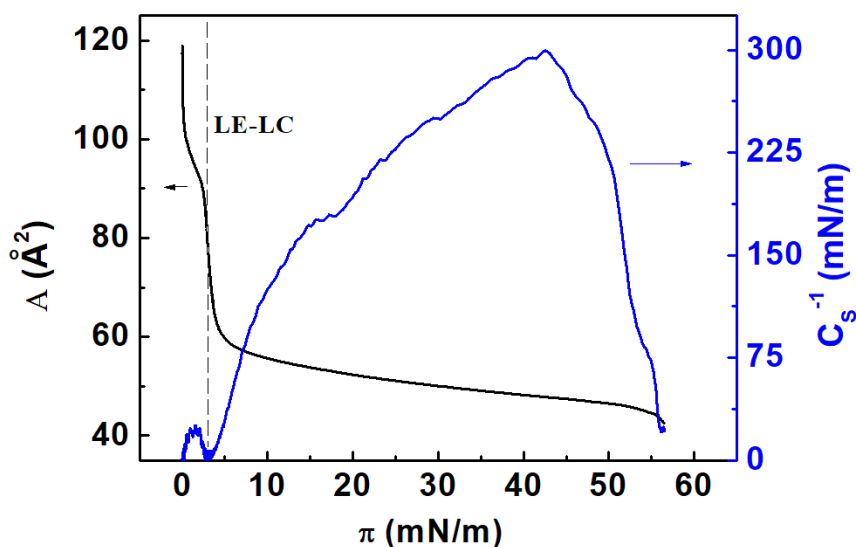
$$C_s^{-1} = -A \left(\frac{d\pi}{dA} \right)_T \quad (2)$$

Zgodnie z kryterium Daviesa i Rideala w zależności od wartości modułu ściśliwości monowarstwom można przypisać określony stan fizyczny (Tabela I). Generalnie, im wyższe wartości przyjmuje moduł ściśliwości, tym monowarstwa jest bardziej skondensowana i uporządkowana.

Tabela I. Stan fizyczny monowarstw według kryterium Daviesa i Rideala.

C_S^{-1} [mN/m]	Stan fizyczny monowarstwy
<12,5	Gaz (G)
12,5-50	Ciecz rozprężona (LE)
50-100	Faza pośrednia LE/LC
100-250	Ciecz skondensowana (LC)
>250	Stały (S)

Zależności $C_S^{-1} = f(\pi)$ umożliwiają prześledzenie zmian upakowania i uporządkowania cząsteczek podczas kompresji filmów oraz wyznaczenie wartości ciśnienia przejścia fazowego LE-LC w przebiegu izoterm $\pi - A$, które pojawia się jako charakterystyczne minimum na wykresie moduł-ciśnienie. W celu lepszego zobrazowania tej relacji obie funkcje zestawiono na wspólnym wykresie (Rys. 8).

**Rys. 8.** Zestawienie zależności $A - \pi$ oraz $C_S^{-1} - \pi$.

IV. Część doświadczalna

A. Aparatura i odczynniki

1. Sprzęt:

- wanna Langmuira-Blodgett KSV 2000 Standard o powierzchni 780 cm^2 , wyposażona w dwie barierki i platynową płytkę Wilhelmy'ego (obwód $39,24 \text{ mm}$) do pomiaru ciśnienia powierzchniowego, sprzężona z komputerem,
- stolik antywibracyjny,
- termostat Lauda,
- pompka wodna Air Liquide,
- palnik gazowy Bunsena, Labrant,
- buteleczki z ciemnego szkła z zakrętkami o pojemności 5 cm^3 – 3 szt.,
- zlewki o pojemności 50 cm^3 – 3 szt.,
- pipeta automatyczna z końcówką o pojemności 1 cm^3 – 1 szt.,
- mikrostrzykawka firmy Hamilton o pojemności $100 \mu\text{L}$ – 1 szt.,
- pęseta – 1 szt.,
- łyżeczko-szpatułka – 3 szt.

2. Odczynniki:

- 1,2-dipalmitoilo-*sn*-glicero-3-fosfocholina (DPPC), $\geq 99 \%$,
- 1,2-dioleoil-*sn*-glicero-3-fosfocholina (DOPC), $\geq 99 \%$,
- cholesterol (Chol), $\geq 99 \%$,
- aceton cz.d.a.,
- metanol cz.d.a.,
- chloroform cz.d.a.,
- woda dejonizowana i demineralizowana z systemu Milli-Q o oporności $18,2 \text{ M}\Omega\text{cm}$ i pH 5,6.

3. Akcesoria:

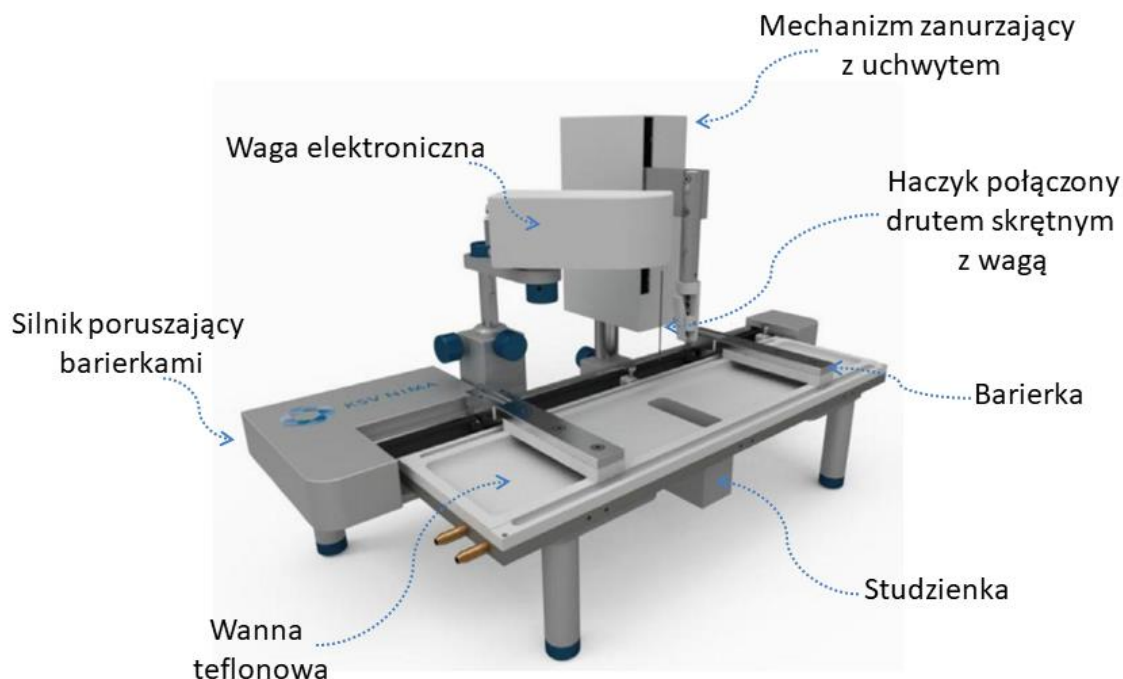
- chusteczki bezpyłowe,
- rękawiczki bezpudrowe nitrylowe,
- bibuła filtracyjna,
- parafilm.

B. Program ćwiczenia


1. Sporządzenie roztworów lipidów w chloroformie.
2. Przygotowanie wanny Langmuira do pomiarów.
3. Utworzenie monowarstw Langmuira badanych lipidów.
4. Wyznaczenie izoterm $\pi - A$ podczas procesu kompresji symetrycznej.

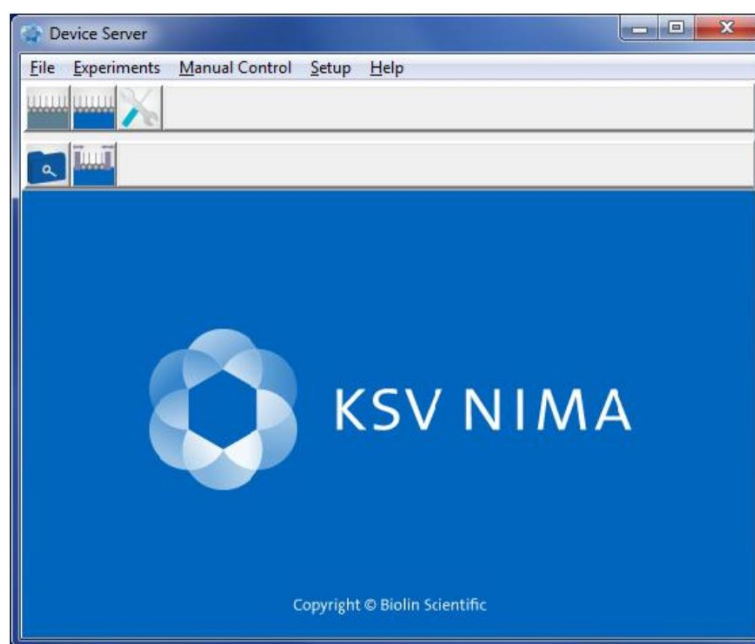
C. Obsługa przyrządów i oprogramowania

Wanna Langmuira-Blodgett (Rys. 9) jest przyrządem sprzężonym z komputerem, sterowanym przy użyciu oprogramowania KSV NIMA LB.



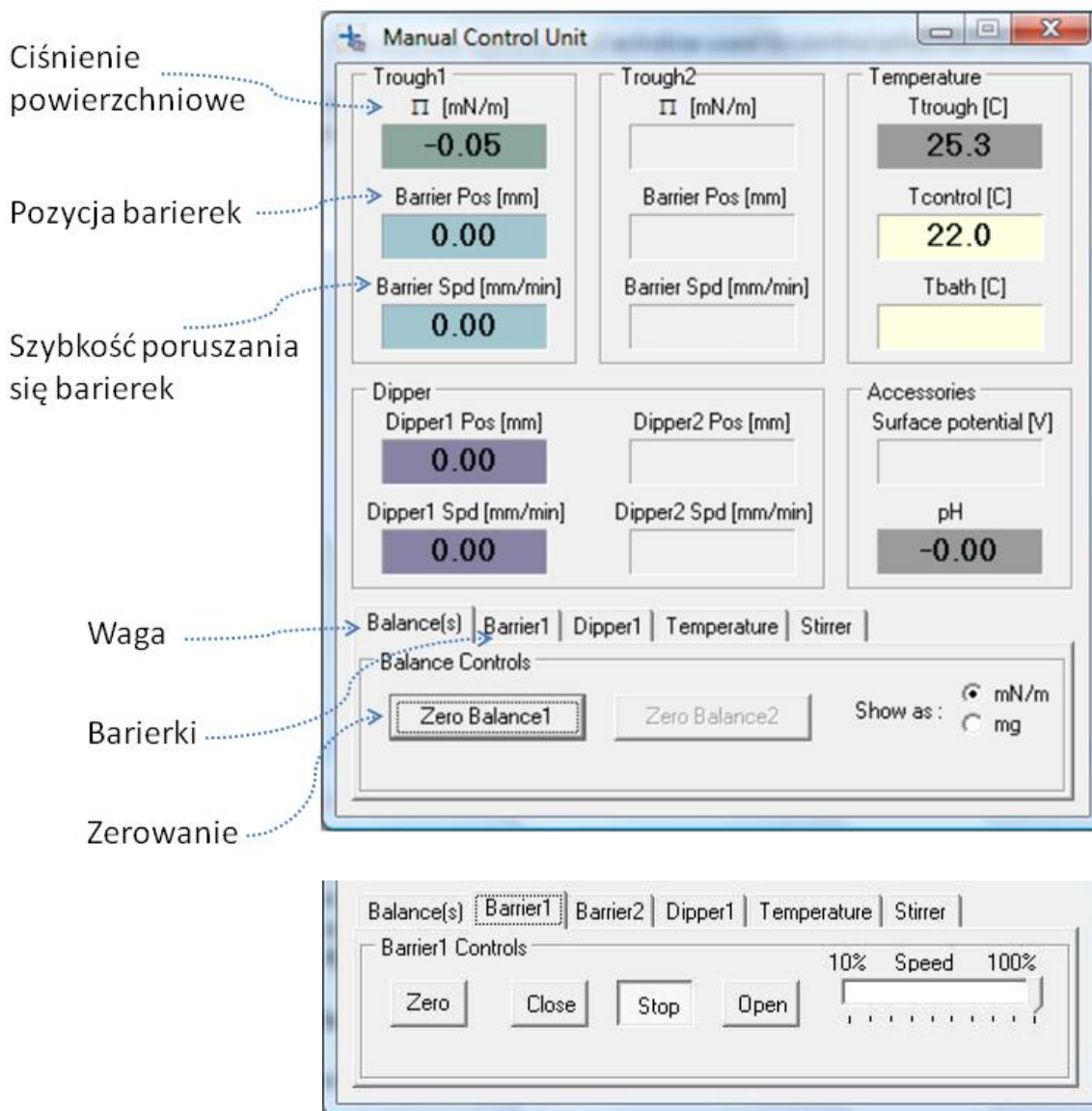
Rys. 9. Wanna Langmuira-Blodgett KSV NIMA.

Po uruchomieniu komputera należy włączyć zasilacz oraz kliknąć ikonę  *Device Server*. Pojawia się okno z głównym menu oprogramowania KSV NIMA LB (Rys. 10):




Rys. 10. Okno *Device Server* z głównym menu oprogramowania KSV NIMA LB.

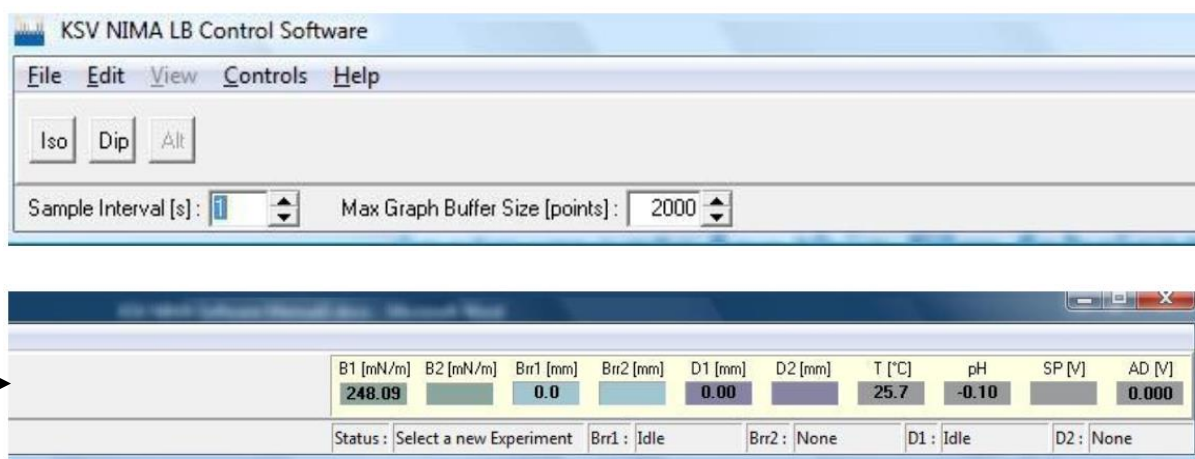
Umieszczono w nim pięć ikon dających możliwość szybkiego dostępu do różnych opcji oprogramowania. Należy wybrać opcję *Manual Control*, aby móc sterować wagą (z ang. *balance*) i barierkami (z ang. *barrier*). Znajduje się tu również podgląd wartości ciśnienia powierzchniowego, pozycji barierek oraz szybkości ich poruszania się (Rys. 11).



Rys. 11. Okno jednostki *Manual Control* używane do sterowania urządzeniami sprzężonymi z komputerem.



Nowy eksperyment należy rozpocząć klikając ikonkę  *LB Control Software* (Rys. 12).

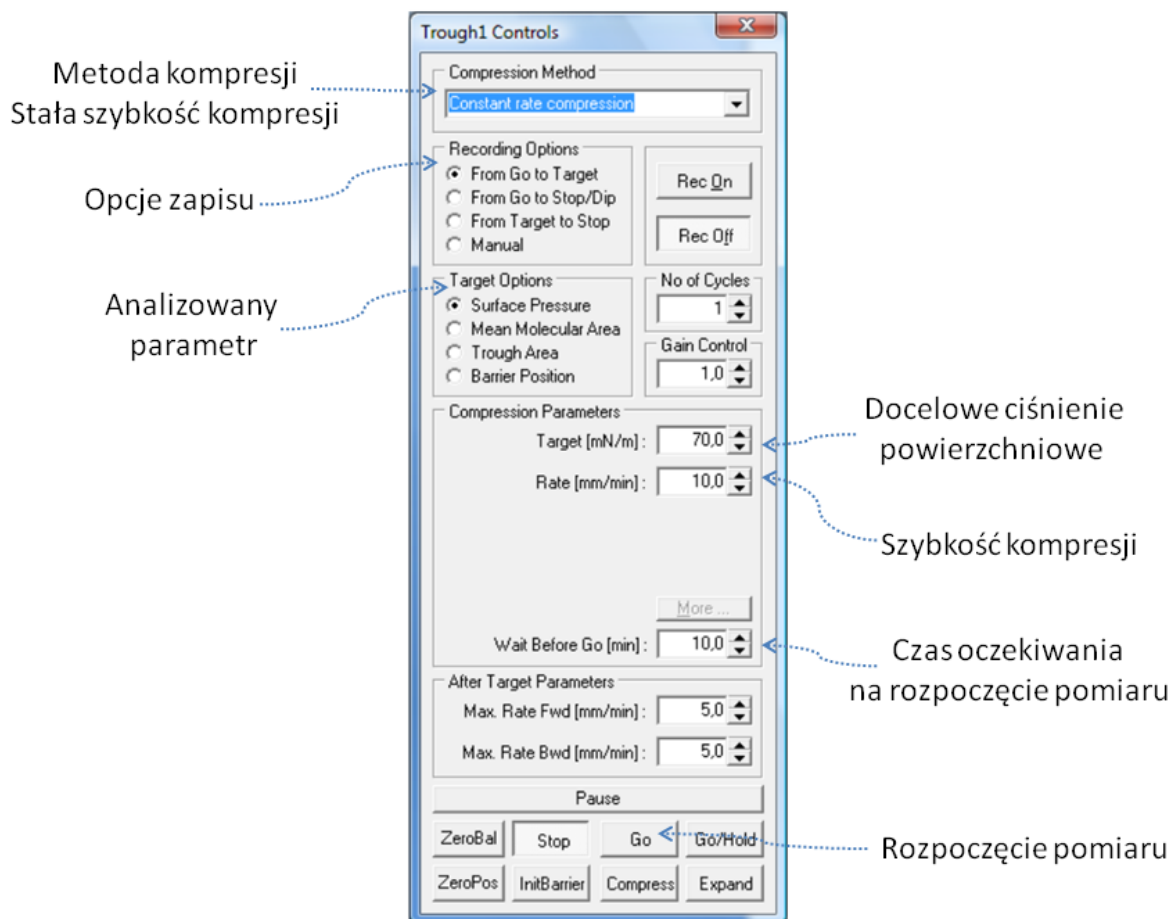


Rys. 12. Okno *KSV NIMA LB Control*.

W pojawiającym się oknie wybrać opcję *Iso*. Wyświetli się okno *Experimental Setup*, które należy wypełnić podając podstawowe informacje dotyczące danego eksperymentu (Rys. 13).

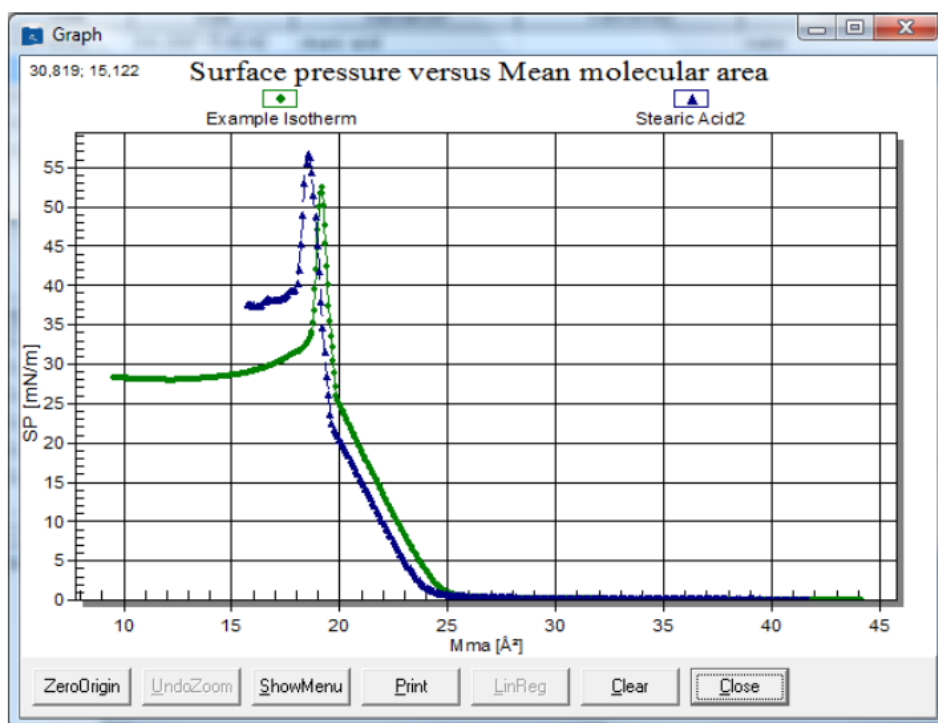
Rys. 13. Okno *Experimental Setup* zawiera podstawowe informacje o prowadzonym eksperymencie.

Naciśnięcie przycisku *Start* automatycznie wygeneruje okno *Trough Control*, które pozwala na ustalenie szczegółowych parametrów pomiaru, w tym metody kompresji, opcji zapisu, parametrów kompresji (docelowego ciśnienia powierzchniowego i szybkości poruszania się barierki), (Rys. 14).



Rys. 14. Okno *Trough Control* pozwala na ustalenie dokładnych parametrów pomiaru.

W trakcie eksperymentu na ekranie monitora można obserwować tworzenie się izoterm $\pi - A$ (Rys. 15). W celu zakończenia pomiaru należy kliknąć *Stop* i zapisać dane.



Rys. 15. Przykładowe izotermy $\pi - A$.



Zapisane wyniki można odnaleźć w folderze *Browse LB measurement* (Rys. 16). Należy podświetlić pomiar, wybrać opcję *Copy Data* i wkleić dane do Notatnika lub pliku Origin/Excel.

C:\ProgramData\KSV\LayerBuilder\MeasuredData\LB20070608154042838.abs

File View Help

Show All Show Isotherm Exp. Show Dipping Exp.

Find Experiment

Name	User	Substance1	Substance2	Subphase
Example Isotherm	KSV	stearic acid		water
SA test	Demo	SA		water
osc test	Demo	SA		water
frress	Demo	SA		water
iso	Demo	SA		water
test	Demo2	SA		water

Experiments

Name	User	Date	Substance1	Substance2	Subphase
Example Isotherm	KSV	8.6.2007 15:40:42	stearic acid		water
SA test	Demo	15.4.2010 10:27:53	SA		water
osc test	Demo	15.4.2010 10:58:54	SA		water
frress	Demo	15.4.2010 14:33:46	SA		water
iso	Demo	15.4.2010 15:43:09	SA		water
test	Demo2	19.5.2010 13:48:59	SA		water

Isotherm1 Data

No	T[s]	Bpos [mm]	Bspd [mm/min]	Area [cm²]	Mma [Å²/molec]	SP [mN/m]	SP2 [mN/m]	T [°C]	SP [V]	Ph	AD [V]
1	0.0	0.0	0.00	243.00	44.1	0.09	0.00	-161.9	0.9	0.000	
2	1.1	0.0	9.99	242.95	44.1	0.08	0.00	-174.1	0.9	0.000	
3	2.2	0.2	9.99	242.67	44.1	0.07	0.00	-152.8	0.9	0.000	
4	3.3	0.4	9.99	242.39	44.0	0.09	0.00	-115.9	0.9	0.000	
5	4.4	0.6	9.99	242.12	44.0	0.06	0.00	-114.3	0.9	0.000	
6	5.5	0.8	9.99	241.84	43.9	0.08	0.00	-140.5	0.9	0.000	

X-axis: Area [cm²]
Y1-axis: SP [mN/m]
Y2-axis: None

Show All Show Before Target Show After Target

Rys. 16. Wykaz uzyskanych danych.

D. Sposób wykonania ćwiczenia

Przygotowanie roztworów. Sporządzić roztwory lipidów w chloroformie. W tym celu w buteleczkach o pojemności 5 cm³, wykonanych z ciemnego szkła, odważyć za pomocą wagi analitycznej (Sartorius) ok. 1 mg danego lipidu, a następnie rozpuścić naważkę w takiej ilości chloroformu, aby uzyskać roztwór o stężeniu 1 mg/mL. W analogiczny sposób przygotować wszystkie roztwory lipidów. Buteleczki z roztworami zamknąć szczelnie zakrętkami i zabezpieczyć przed parowaniem rozpuszczalnika okręcając je parafilmem, a następnie przechowywać pod przykryciem w atmosferze chloroformu.

Przygotowanie wanny do pomiarów. Uruchomić termostat połączony z wanną Langmuira, ustawiając temperaturę na 20°C. Przed pomiarami teflonową wannę wraz z barierkami wykonanymi z poliacetalu oczyścić bezpyłowymi chusteczkami nasączonymi acetonem, a po odparowaniu rozpuszczalnika (ok. 10 minut) chusteczkami nasączonymi metanolem, używając bezpudrowych rękawiczek nitrylowych oraz pęsety. Po upływie 10 minut wannę i barierki przepłukać kilkakrotnie ultraczystą wodą, którą należy usunąć z wanny przy pomocy pompki wodnej zaopatrzonej w plastikową, wymienialną końcówkę. Następnie wlać wodę tak, aby utworzył się menisk wypukły i doczyścić powierzchnię subfazy odsysając ewentualne zanieczyszczenia podczas ruchu barierki w kierunku środka wanny. Poziom wody po doczyszczaniu powinien być równy z krawędziami wanny.

Sprawdzanie czystości powierzchni. W celu sprawdzenia czystości subfazy, należy platynową płytkę Wilhelmy'ego o wymiarach 10x19,62 mm², opłukać w metanolu i wodzie, trzykrotnie wyprażyć w płomieniu palnika i zawiesić na haczyku wagi w taki sposób, aby 1/3 płytki była zanurzona w subfazie. Następnie wyzerować wagę i barierki w pozycji *Open*, po czym rozpocząć kompresję. Pomiar ciśnienia powierzchniowego polega na ważeniu platynowej płytki zanurzonej w fazie nośnej. Jeśli zmiany napięcia powierzchniowego podczas ruchu barierki w kierunku środka wanny nie przekraczają wartości 0,3 mN/m, powierzchnię fazy nośnej uznaje się za czystą i po otworzeniu barierki przystępuje się do pomiaru głównego. W przeciwnym wypadku czyszczenie należy powtórzyć.

Pomiar główny. Na oczyszczonej powierzchni fazy nośnej, po wyzerowaniu ciśnienia powierzchniowego i pozycji barierki, nanosić kroplami odpowiednią objętość roztworu lipidu używając mikrostrzykawki Hamiltona z teflonowym zakończeniem tłoczka. Dozowaną objętość należy dobrać w programie *KSV NIMA LB* w oparciu o masę molową związku i stężenie roztworu. Zazwyczaj objętość mieści się w przedziale od 50 do 100 μ L. Po nanieśieniu roztworu chloroformowego na powierzchnię wody należy odczekać 10 minut w celu odparowania rozpuszczalnika, po czym rozpocząć kompresję z szybkością 10 mm/min. Równocześnie proces jest rejestrowany w postaci zależności ciśnienia powierzchniowego od powierzchni subfazy przypadającej na pojedynczą cząsteczkę w monowarstwie (**izotermie π -A**), widocznej na ekranie połączonego z wanną komputera. Po zakończeniu pomiaru należy usunąć zawartość wanny i oczyścić ją według procedury opisanej powyżej. Czynności powtórzyć dla kolejnych lipidów.

Roztwory organiczne pozostałe po pomiarach wylać do butelki z napisem „**ZLEWKI chloroformu**”. Buteleczki z zakrętkami przepłukać trzykrotnie świeżymi porcjami chloroformu i pozostawić do wyschnięcia.

E. Opracowanie wyników i wnioski

Otrzymane dane doświadczalne przenieść do programu *Origin* lub *Excel* i opracować według zestawionych punktów.

1. Sporządzić wykresy izoterm $\pi - A$, odkładając na osi odciętych powierzchnię przypadającą na cząsteczkę, A , wyrażoną w \AA^2 , a na osi rzędnych odpowiadające wartości ciśnienia powierzchniowego, π . Izotermy monowarstw badanych lipidów zamieścić na jednym wykresie zbiorczym (jak na Rys. 7).
2. Korzystając z krzywych wyznaczyć graficznie powierzchnię A_0 , A_{lim} oraz ciśnienie załamania, π_z , monowarstw (Rys. 7) i zestawić w Tabeli II.

Tabela II. Parametry fizykochemiczne błon określone na podstawie izoterm $\pi - A$.

Rodzaj monowarstwy	A_0 [\AA^2]	A_{lim} [\AA^2]	π_z [mN/m]	$C_S^{-1}(\pi)$ [mN/m]	Stan fizyczny
DPPC					
DOPC					
Chol					

3. Korzystając z danych pomiarowych zarejestrowanych izoterm $\pi - A$ dla poszczególnych monowarstw obliczyć moduł ściśliwości, C_S^{-1} w mN/m, według wzoru 2, gdzie: π – ciśnienie powierzchniowe wyrażone w mN/m, A – powierzchnia na cząsteczkę w \AA^2 , a T – stała temperatura pomiaru.
4. Sporządzić wykresy $C_S^{-1} - \pi$, odkładając na osi odciętych ciśnienie powierzchniowe, π (mN/m), a na osi rzędnych odpowiadające wartości modułu ściśliwości, C_S^{-1} (mN/m), tak jak pokazano na Rysunku 8. Krzywe zamieścić na wspólnym wykresie.
5. Wyznaczyć maksymalną wartość modułu ściśliwości i odpowiadające jej ciśnienie powierzchniowe. Na tej podstawie określić stan fizyczny monowarstw według kryterium Daviesa i Rideala. Wyniki zamieścić w Tabeli II.
6. Określić, w którym przypadku (-ach) zachodzi przejście fazowe LE-LC.
7. Porównać wyznaczone z izoterm $\pi - A$ wartości parametrów dla trzech modelowych membran (Tabela II) i zinterpretować zależności w powiązaniu ze strukturą związków.