

Piotr POBORSKI

Instytut Podstaw Inżynierii

Środowiska PAN

WSPÓŁCZESNE METODY BADAŃ BIOFIZYCZNYCH MATERII ORGANICZNEJ

Streszczenie. Przedstawiono podział i możliwości pomiarowe metod służących określeniu składu i wielkości makrocząsteczek. Otrzymane różnymi metodami wyniki różnią się między sobą, co jest niezmiernie istotne przy wzajemnym ich porównywaniu. Szczęgólnego znaczenia nabiera interpretacja. Dokonano podziału metod według zasady pomiaru i podstawowych założeń działania aparatury na następujące grupy: metody spektroskopowe, dyfrakcyjne, radiometryczne, termiczne, atomów znaczonych, immunologiczne, rozdziału, pomiaru parametrów transportu, elektryczne oraz modelowania matematycznego. Szczęgólnie atrakcyjnymi i dającymi duże nadzieje na przyszłość wydają się być: symulacja komputerowa, niektóre rodzaje chromatografii w połączeniu z metodą atomów znaczonych lub spektrometrem masowym, metody rozdziału na jonitach, a także mikroskopia scanningowa w połączeniu z fluorescencją rentgenowską.

Artykuł niniejszy nie jest systematycznym przeglądem literaturowym - ma na celu jedynie zainteresować Czytelnika niektórymi możliwościami współczesnych metod pomiarowych.

Biofizyka zajmuje się głównie obiektami żywymi. Przedmiotem badań są procesy życiowe czy też mniej lub bardziej z życiem związane. Obejmuje również pewien zakres badań strukturalnych. Ze względu na różnorodność i liczne ciekawe rozwiązania koncepcyjne czy techniczne warte są one uwagi.

Nie istnieje jakaś wyodrębniona grupa metod właściwych biofizyce. W jej ramach stosuje się zarówno pewne sposoby znane z biologii, jak i fizyki. Tutaj zajmiemy się tymi drugimi, to znaczy fizycznymi metodami badania materii organicznej, stosowanymi w biofizyce. Artykuł ten nie stanowi przeglądu literaturowego metod biofizycznych, a jedynie przedstawia ważniejsze metody i odwołuje się do nielicznej, arbitralnie wybranej literatury. Celem jest więc nie tyle przedstawienie stanu wiedzy w tej dziedzinie, co zaciekawienie Czytelnika pewnymi możliwościami badawczymi oferowanymi przez biofizykę.

Podstawowymi parametrami cząsteczek materii organicznej są: rozmiar, kształt i ciężar cząsteczkowy. Przegląd metod służących ich oznaczeniu daje tabela. Wiele z metod dostarcza informacji o tych samych parametrach, jednak z różną dokładnością. Istotne jest też dokładne zdefiniowanie, jaką wielkość chcemy zmierzyć, a także staranna interpretacja otrzymanych wyników. Makrocząsteczki często nie mają dokładnie jednakowej masy, a tylko

ciężary cząsteczkowe mieszczące się w określonym zakresie. Poszczególne metody pomiarowe dają średnie masy cząsteczek różniące się w istotny sposób i tak pomiar masy dokonany za pośrednictwem pomiaru ciśnienia osmotycznego daje wynik mniejszy niż otrzymany z dyfuzji czy lepkości. Na przykładzie tym widać, jak istotna jest interpretacja wyników i to szczególnie przy porównywaniu wielkości otrzymanych przy użyciu różnych metod pomiarowych.

Ze względu na zasadę pomiaru i działania aparatury można by wprowadzić np. następujący podział:

1. Metody spektroskopowe. Trzeba tu zaliczyć jądrowy rezonans magnetyczny (NMR), elektronowy rezonans paramagnetyczny (EPR), jądrowy rezonans kwadrupolowy, rezonans ferro- i antyferromagnetyczny (FMR i AFMR) [17], spektrofotometrię i mikrospektrofotometrię w widzialnym zakresie światła, w ultrafiolecie (UV-vis), w podczerwieni (IR), promieniach Roentgena, a także fotometrię płomieniową (SAA), spektrometrię masową i wiele innych, mniej powszechnie stosowanych [3, 14, 18, 25].

2. Metody dyfrakcyjne, a wśród nich dyfrakcja promieni X, dyfrakcja neutronowa, promieniowania synchrotronowego i in. [12, 17]. W grupie tej znajduje się również dyfrakcja elektronów i opierająca się na niej mikroskopia elektronowa (do tej ostatniej wrócimy jeszcze w dalszej części artykułu). Można tu też zaliczyć mikroskopia: świetlną, polaryzacyjną, interferencyjną (kontrastowo-fazową), fluorescencyjną, rentgenowską itp. [3, 12].

3. Metody radiometryczne, takie, jak: rentgenowska analiza fluorescencyjna, analiza aktywacyjna [17, 22].

4. Metody termiczne - wśród nich największe triumfy święci różnicowa analiza termiczna i różnicowa kalorymetria skaningowa [17].

5. Metody atomów znaczonych, w których śledzi się ruchy i właściwości cząsteczek z wbudowanym radioaktywnym izotopem któregoś pierwiastka. W badaniach błon biologicznych i polimerów stosuje się też cząstki o określonym spinie (spin label) [3, 12].

6. Metody immunologiczne - służące do wykrywania śladowych ilości pewnych substancji. Jest to jedna z najczulszych metod analitycznych. Zastosowanie przeciwciał z wbudowanym izotopem promieniotwórczym daje metodę zwaną radio-immuno-assay.

7. Metody rozdzielania - różnego rodzaju metody chromatograficzne, rozdzielanie na jonitach i in. metody zagełszczania [2, 1, 4, 7, 10, 13, 16, 20, 24], a także procesy rozdzielania, takie, jak: elektroforeza, elektrodializa, ogniskowanie izoelektryczne i in. [2, 11, 14, 21].

8. Pomiar parametrów procesu transportu - współczynniki dyfuzji, lepkości, tarcia (molekularnego) [11, 12, 14].

9. Pomiarы elektryczne, jak: kulometria, polarografia, konduktometria, pomiary potencjałów elektrodowych i membranowych, pomiary oporu, potencjałów czynnościowych, prądów jonowych [8, 11, 12, 14, 15, 25].

10. Do metod badania materii organicznej trzeba również zaliczyć modelowanie matematyczne procesów, sterowanie procesów pomiarowych komputerami i obróbkę danych. Zastosowanie komputerów stworzyło bardzo dużo nowych możliwości pomiarowych, natomiast spośród metod modelowania matematycznego najatrakcyjniejsza wydaje się być symulacja komputerowa [5, 19, 23]. Wiele z wyżej wymienionych metod jest ze sobą powiązanych, a inne często wzajemnie się uzupełniają. Przykładem może tu być np. zastosowanie spektrometrii masowej jako uzupełnienie chromatografii czy wspomniane już połączenie reakcji immunologicznej z metodą atomów znaczonych. Metody badania materii organicznej rozwijają się i mnożą bardzo szybko, tak że nie sposób śledzić ich postępy we wszystkich dziedzinach. Omówimy teraz nieco bliżej wybrane metody, które zyskały dużą popularność w badaniach biologicznych.

Biofizyka i biochemia wiele zawdzięczają różnym metodom chromatograficznym, pozwalającym na rozdzielanie mieszanin związków chemicznych a wykorzystującym różnice we własnościach sorpcyjnych podłoża w odniesieniu do różnych związków i wynikającą stąd różną prędkość transportu ze strumieniem nośnika. Po chromatografii bibułowej rozwinęło się szereg innych odmian, jak chromatografie: gazowa, cienkowarstwowa, kapilarna, cieczerwowa, jonowymienna itd. Metodą nieco zbliżoną jest elektroforeza - tutaj molekuly poruszają się pod wpływem przyłożonego pola elektrycznego. Jest to metoda, która szczególne usługi oddała medycynie, gdyż pozwala na rozdzielanie mieszanin białek i albumin. Elektroforeza ma szereg odmian różniących się używanym napięciem (e. wysoko- i niskonapięciowa) oraz podłożem (bibuła, żel skrobiowy, żel poliakryloamidowy). Innym rozwiązaniem jest ogniskowanie izoelektryczne; w gradiencie pH polielektrolity (do których należą białka) ustawiają się w miejscach odpowiadających ich punktom izoelektrycznym [10, 13, 14, 20].

Przy omawianiu metod rozdzielania nie sposób pominąć bardzo powszechnych w biologii i medycynie różnych metod wirowania. Rozwój techniczny pozwolił na uzyskanie bardzo dużych przyspieszeń we współcześnie używanych wirówkach, co w połączeniu z zastosowaniem gradientu nośnika (np. roztwór sacharozy) pozwoliło na uzyskanie zaskakująco dobrych rezultatów.

Bardzo skuteczną i coraz częściej stosowaną metodą jest rozdział substancji za pomocą wymiennicy jonowych [1, 11, 16, 24]. Jonity stosuje się najczęściej w postaci małych kuleczek lub błon jonowymiennych. Na polimerowym szkielecie mają one umieszczone dysocjujące grupy funkcyjne (np. sulfonowe lub COOH). Zasada działania jest w przybliżeniu następująca: jony, którymi są podstawione grupy funkcyjne, są wypierane przez przeciwjony z roztworu zgodnie z szeregiem jonowym zapewniającym odpowiednią hierarchię podstawiania [11]. Błony jonowymiennie wykazują zwykle silną specyficzność w stosunku do jakiegoś jonu, co z kolei powoduje dużą

selektywność w przepuszczalności. Wymuszanie transportu jonów przez błonę za pomocą przepływu prądu elektrycznego (elektrodializa) lub elektrolitu przez zastosowanie ciśnienia hydraulicznego (elektroosmoza i osmoza) prowadzi do odseparowania wybranych substancji, jest od dawna stosowane na skalę przemysłową do odsalania wody morskiej [2,21] i wzbogacania materiałów jądrowych [1]. Dużą popularność ze względu na szybkość i prostotę pomiaru uzyskują elektrody jonoselektywne. Większość z nich udało się skonstruować dzięki wykorzystaniu właściwości syntetycznych błon jonowymiennych.

Nieocenione usługi w badaniu niektórych właściwości struktur biologicznych oddała metoda atomów znaczonych. Jest ona niezastąpiona przy badaniach zjawisk transportu, przemian biochemicznych i akumulacji niektórych związków chemicznych. Badania transportu stanowią jednocześnie metodę pośrednią w poznawaniu funkcji niektórych układów biologicznych, czy też struktur o znanym składzie chemicznym (np. błony biologiczne). Stosuje się związki chemiczne z wbudowanym radioaktywnym izotopem, co można uzyskać bądź drogą syntezy, bądź przez aktywację danego związku w reaktorze. Badań dokonuje się najczęściej przez określenia w próbce substancji znakowanej, przez zmierzenie ilości rozpadów w jednostce czasu (cpm) przypadającej na jednostkę objętości (metoda rozcieńczeń). W zależności od potrzeby stosuje się izotopy krótko- lub długożyciowe. W zależności od rodzaju promieniowania (α, β, γ) stosuje się odpowiednie metody pomiarowe. Główną wadą tej metody jest istnienie ograniczonej liczby izotopów promieniotwórczych mających dostatecznie duży okres półroczny, pozwalający na transport i przeprowadzenie nieraz długotrwałych doświadczeń oraz szkodliwość promieniowania. W przypadku występowania "czystego" promieniowania β (jak np. w przypadku węgla C^{14} , siarki S^{35} i trytu H^3) możliwe jest wykonanie autoradiogramów lub mikroautoradiogramów przez umieszczenie odpowiednio przygotowanych preparatów na płycie pokrytej światłoczułą emulsją, bądź przez bezpośrednie pokrycie preparatu (skrawków mikroskopowych) emulsją, a następnie po odpowiednim czasie - wywołanie błony. Miejsca najsilniej zaczernione odpowiadają wówczas największemu nagromadzeniu substancji radioaktywnej (a co za tym idzie również związku, w którym izotop promieniotwórczy występuje). Szereg firm światowych oferuje do sprzedaży sporą ilość związków znakowanych; również krajowy "Polon" dostarcza niektóre z nich.

Bardzo spektakularną metodą badania powierzchni jest mikroskopia scaningowa. Skolimowana wiązka elektronów rozprasza się na powierzchni próbki przemiatając ją podobnie jak w kineskopie telewizyjnym. Dzięki takiemu rozwiązaniu uzyskano nie tylko zdolność rozdzielczą znacznie większą niż przy zastosowaniu mikroskopu świetlnego, ale przede wszystkim bardzo dużą głębię ostrości, nieporównywalnie większą niż w jakimkolwiek układzie optycznym opartym na świetle widzialnym. Przygotowanie próbek jest tu stosunkowo proste: próbki suche wystarczy napylić metalem (najczęściej złotem)

lub węglem, aby zapewnić odprowadzenie ładunku elektrycznego. Próbkę można umieszczać pod mikroskopem pod różnym kątem w stosunku do wiązki przemieszczającej otrzymując obrazy "widziane" z różnych stron. Stosując napylenie pod różnym kątem uzyskujemy obrazy różnie "oświetlone". Dzięki mikroskopowi scanningowemu poznano np. strukturę wosków pokrywających nadziemne części roślin wyższych [6,9].

Bardzo cenne informacje możemy uzyskać analizując widma energetyczne promieniowania X wzbudzonego wiązką elektronów w poszczególnych miejscach próbki. Obrabiając otrzymane wyniki za pomocą komputera, będącego zwykle częścią wyposażenia (np. system EDAX) możemy otrzymać mapy rozkładu pierwiastków na powierzchni badanej próbki. Możemy też określić skład pierwiastkowy dowolnie wybranych tworów na badanej powierzchni. Ograniczenia tej metody są takie same jak i normalnej fluorescencji rentgenowskiej i wynikają głównie z efektu maskowania pików przez materiał matrycy oraz nakładanie się sygnałów pochodzących od różnych pierwiastków.

Wiele innych metod zasługuje również na uwagę - nie sposób jednak zająć się wszystkimi.

Tabela

Przegląd metod stosowanych do określania wielkości, formy i masy cząsteczkowej M makrocząsteczek (A_1 - ciężar atomowy) Wg [12]

Nr	Metoda	Uzyskiwana informacja	Zakres M	U w a g i
1	2	3	4	5
1	Pełna analiza chem.	$M = \sum A_1$	dowolny	-
2	Ilościowa analiza grup, których liczba jest proporcjonalna do M	M	niemal dowolny	Konieczna znajomość organizacji struktury
3a	Ugięcie promieni X	Wielkość, forma, struktura wewn.	niemal dowolny	Konieczna forma krystaliczna
3b	Ugięcie fali neutronowej			
4	Mikroskopia elektro-nowa	Wielkość, forma	> 5000	
5	Ciśnienie osmotyczne	M_n	< 10^6	Nowa technika: osmometr na ciśn. pary.
6	Drugi składnik rozw. wirialnego-wsp. B	(M), kształt		Wpływ ładunku elektrycznego makrocząsteczki
7	Lepkość roztworów	M_v		Zależność od kształtu

tabela cd.

1	2	3	4	5
8 _r	Dyfuzja	Wielkość, M_w	$< 10^6$	Wpływ kształtu, solwatacji stężenia.
9 _r	Kombinacja 7+8	M_w , kształt	$< 10^6$	Jak 7 i 8
10 _r	Szybkość osadzania	Rozmiar, M_w	$< 5 \cdot 10^7$	Zależność od kształtu
11 _r	Kombinacja 8+10	M_w	$5 \cdot 10^7$	Wyeliminowana zależność od kształtu
12 _r	Elektroforeza jonów	M		Teoria złożona niedokładność
13 _r	Dyfuzja rotacyjna	Rozmiar, kształt M_w	niemal dowolny	Zależność od kształtu, związana z lepkością
14 _r	Dwójkomność wywołana polem el. (efekt Kerr'a)	Rozmiar (kształt)	niemal dowolny	Tylko dla roztworów nieprzewodzących, moment dipolowy musi być znany
15 _r	Dyspersja dielektryczna	Rozmiar (kształt)	niemal dowolny	jak w 14
16 _r	Równowaga sedymentacyjna	M_w , M_z	$< 5 \cdot 10^6$	Niezależność od kształtu, metoda zgrubna
17 _r	Rozproszenie światła (500nm)	Rozmiar, M_w	$\geq 10^4$	Metoda zgrubna wrażliwa na asocjację cząstek
18 _r	Rozproszenie promieni X (1nm)	Rozmiar	stosunkowo małe czas- teczki	Trudna technika.

LITERATURA

- [1] Baran T., Bujdosó E. (wyd.): Radiochemical Separation Methods; Proceedings of the 7-th Radiochemical Conference. Marianskie Lazne, kwiecień 24-28, 1973. Akadémiai Kiadó, Budapest 1975.
- [2] Buczyło E.: Selekttywne membrany jonitowe w procesach elektrochemicznych. WNT, Warszawa 1967.
- [3] Chayen J., Denby E.P.: Techniki biofizyczne w zastosowaniu do biologii komórkowej. PZWL, Warszawa 1973.
- [4] Coomber D.I. (wyd.): Radiochemical Method in Analysis. Plenum Press, New York 1975.

- [5] Czernawski D.S., Romanowski J.M., Stiepanowa N.W.: Modelowanie matematyczne w biofizyce. PWN, Warszawa 1979.
- [6] Davis D.G.: Scanning electron microscopic studies of wax formations on leaves of higher plants. *Can. J. Bot.* 49: 543-546 (1971).
- [7] Determann H.: Gelchromatographie; Gelfiltration, Gelpermeation, Molekülsiebe. Springer - Verlag, Berlin 1967.
- [8] Galus Z. (red): Elektroanalityczne metody wyznaczania stałych fizykochemicznych. PWN, Warszawa 1979.
- [9] Grill D.: Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen an Wachsstrukturen der Nadeln von Picea abies (L) Karsten. *Micron*, 4:146-154 (1973).
- [10] Guichon G., Pommier C.: Gas Chromatography in Inorganic and Organometallics. Ann Arbor, Michigan 1973.
- [11] Helfferich F.: Ion exchange. New York 1962.
- [12] Hoppe W. i in.: Biophysik. Springer-Verlag, Berlin 1978.
- [13] Kirkland J.J. (red.): Współczesna chromatografia cieczowa. PWN, Warszawa 1976.
- [14] Leyko W. (red.): Biofizyka dla biologów. PWN, Warszawa 1981.
- [15] Meyer-Waarden K.: Wprowadzenie do biologicznej i medycznej techniki pomiarowej. WKiŁ, Warszawa 1980.
- [16] Minczewski J., Chwastowska J., Dybczyński R.: Analiza śladowa. Metody rozdzielania i zagęszczania. WNT, Warszawa 1973.
- [17] Oleś A.: Metody eksperymentalne fizyki ciała stałego. WNT, Warszawa 1983.
- [18] Połuektow N.S.: Analiza metodą fotometrii płomieniowej. WNT, Warszawa 1969.
- [19] Potter D.: Metody obliczeniowe fizyki. Fizyka komputerowa. PWN, Warszawa 1982.
- [20] Roberts T.R.: Radiochromatography. Elsevier, Amsterdam 1978.
- [21] Sałdadze K.M. (red.): Jonoobmiennicze membrany w elektrodializie. Chimja, Leningrad 1970.
- [22] Szepke R.: Radiometria stosowana. WNT, Warszawa 1967.
- [23] Szűcs E.: Modelowanie matematyczne w fizyce i technice. WNT, Warszawa 1977.
- [24] Treillon B.: Jonity w procesach rozdzielczych. PWN, Warszawa 1970.
- [25] Szczepaniak W.: Metody instrumentalne w analizie chemicznej. PWN, Warszawa 1979.

Recenzent: Prof. dr hab. inż. Wiesław Gabdył

Wpłynęło do Redakcji w maju 1985.

СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ БИОФИЗИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ НЕОРГАНИЧЕСКОЙ МАТЕРИИ

Р е з ю м е

В работе дана классификация и измерительные возможности методов для определения состава и размера макрочастиц. Полученные результаты с применением различных методов отличаются между собой, что является очень важным обстоятельством при их сравнении. Особенно важна в этом случае интерпретация результатов измерений. Проведена классификация измерительных методов по измерительному принципу и принципу действия на следующие методы: спектральные, дифракционные, радиометрические, термические, значенных атомов, иммунологические, разделения, измерения параметров транспорта, электрические и математического моделирования. Особенно перспективными кажутся нам следующие методы: машинного эксперимента, некоторые виды хроматографии в соединении с методом значенных атомов или спектрометром массы, методы разделения на ионитах а также сканирующая микроскопия в соединении с рентгеновской флуоресценцией.

Оговариваемая работа не является систематическим обзором литературных источников - её цель заинтересовать читателя некоторыми возможностями современных измерительных методов.

CONTEMPORARY METHODS OF BIOPHYSICAL STUDIES OF ORGANIC SUBSTANCE

S u m m a r y

The division and measuring possibilities of the methods for the determination of composition and macroparticle size have been presented. The results obtained by various methods differ from each other which fact is essential for comparing them. Of particular importance is the interpretation. A division of the methods has been made, according to the measurement principle and the basic assumptions on the operation of the apparatus, into the following groups: spectroscopic, diffraction, radiometric, thermic methods, the method of labelled atoms, immunological, division method, transport parameter measurement method, electric method and the method of mathematical modelling. Specially attractive and promising seem the following methods: computer simulation, some kinds of chromatography, together with the method of labelled atoms or mass spectrometer, method of division on ionites, as well as scanning microscopy together with X-ray fluorescence. The paper is not a systematic review of literature - its aim is to arouse the reader's interest in some possibilities of contemporary measuring methods.