

C6200–Biochemické metody

12E_DIFUSIMETRIE

Petr Zbořil

Princip metody

- Pohyb částic
 - Translační
 - Rotační
- Vliv
 - Velikosti a tvaru (symetrie, hydratace apod.)
 - Prostředí – viskozita (T)

Translační difuze

- Parametry – D a f
 - $f = RT/D$, $f_0 = 6\pi\eta_0 r N_A$ – 1 mol, koule
 - $v_M = 4\pi r^3/3 = M_r \nabla / N_A =$ objem 1 molekuly
 - $r = \sqrt[3]{(3M_r \nabla / 4\pi N_A)}$, $\nabla =$ parciální specifický objem
- reálná molekula – určení f měřením
- F (frikční poměr asym. konst.) = $f/f_0 \in 1 - 3$
 - umožňuje odhad a:b, vliv hydratace – nejednoznačné
 - $F_{kor} = F \cdot \sqrt[3]{(\nabla / (\nabla + H))}$, $H =$ objem hydratace

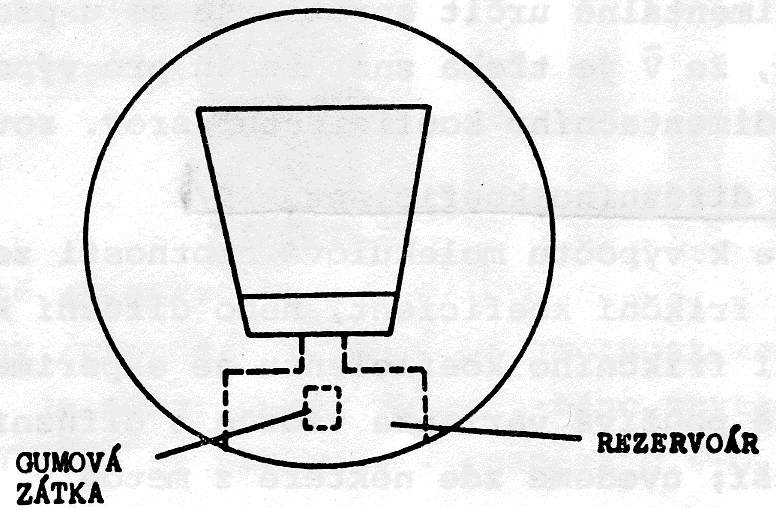
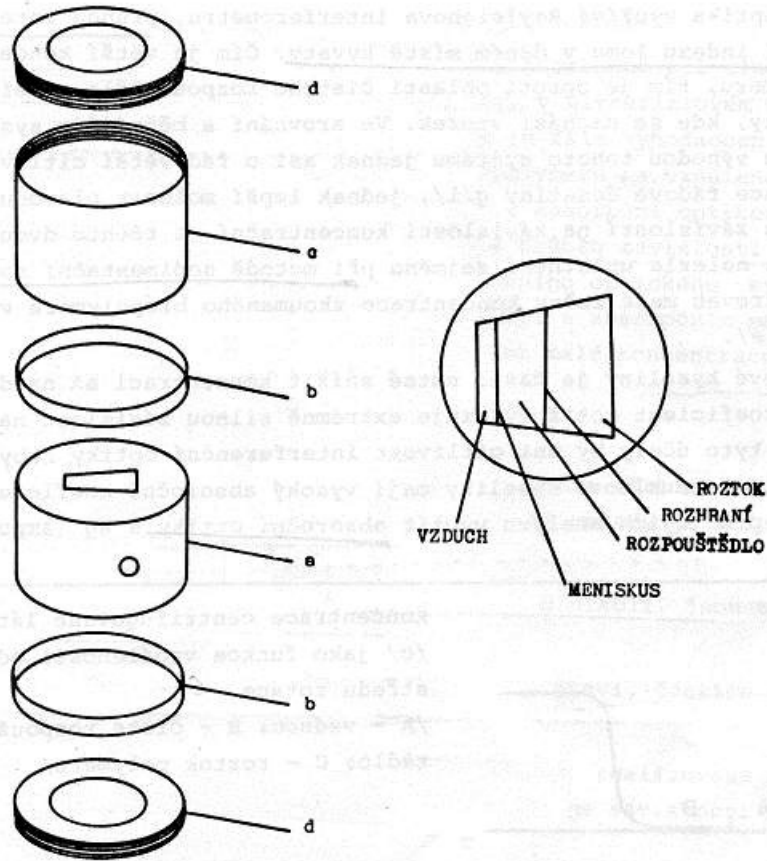
Translační difuze

Měření

- Metoda porezní stěny – řádově dny
 - Nádobka rozdělená diafragmou – neselektivní
 - Měření koncentrace v čase – dc/dt - dm/dt
- Fickův zákon – **$dm/dt = -D \cdot dc/dx \cdot A$**
- Centrifugací – řádově hodiny
 - Rozšiřování rozhraní mezi c_1 a c_2
 - $4\pi \cdot D \cdot t = (A/Y)^2$ kde A je plocha a Y výška píku

Translační difuze

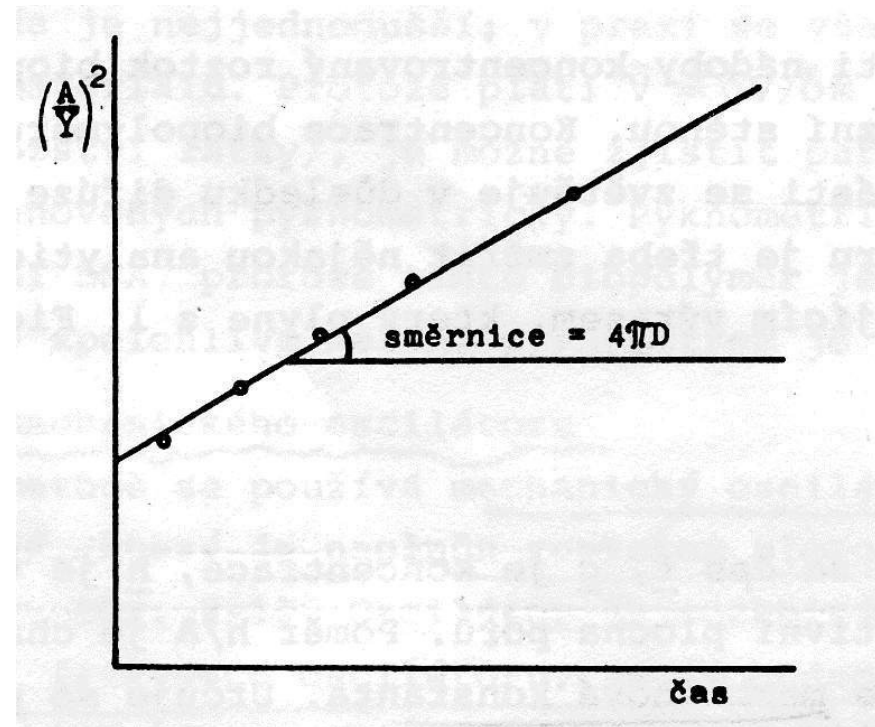
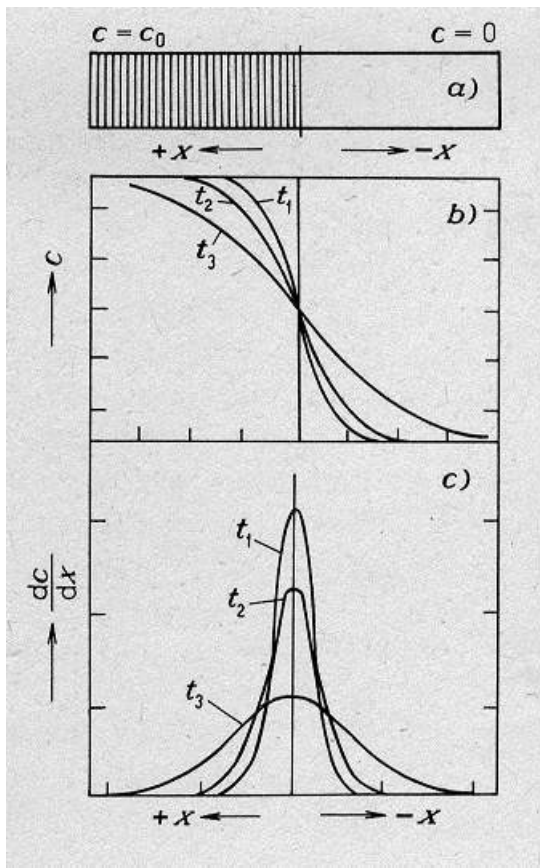
Centrifugací



Translační difuze

Centrifugací – řád hodin

- Rozšiřování rozhraní mezi c_1 a c_2
- $4\pi \cdot D \cdot t = (A/Y)^2$ kde A je plocha a Y výška píku



Rotační difuze

- Parametry
- koeficient rotační difuze Θ
 - kulovitá nehydratovaná částice
 - $\Theta_0 = RT/8\pi\eta_0 N_A r^3$ Perrin
- relaxační čas τ_r $\Theta = f(1/\tau_r)$
 - pohyblivost kolem 3 os (obvykle stačí 2)
 - pro asymetrickou částici Θ_a, Θ_b (ev. Θ_c) a τ_{ra}, τ_{rb} (ev. τ_{rc})
 - $1/\tau_{rh} = (1/\tau_{ra} + 1/\tau_{rb} + 1/\tau_{rc})/3$

Rotační difuze

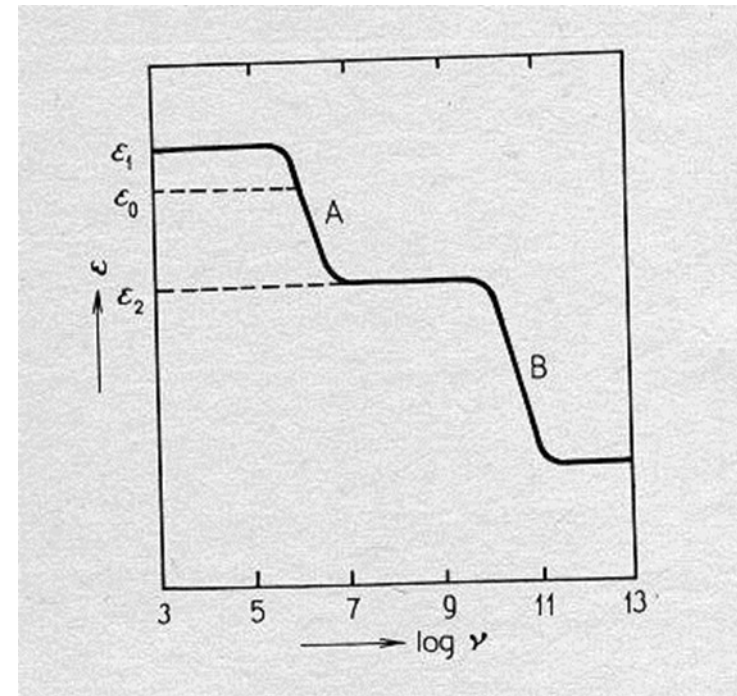
- Měření τ_r
- relaxační techniky: jednotná orientace se rozvolňuje
- **orientace vnější silou**
 - dvojlom za toku - tečná síla v rychlostním gradientu
 - dielektrická disperse - dipóly orientovány v el. poli
- **výběr stejně orientovaných molekul**
 - polarisace fluorescence

Dielektrická disperze

- Dielektrická disperze
 - Určení permitivity ε
 - $\varepsilon_{\text{rel}} = C/C_0$ (vakuum, prakt. vzduch)
 - Měření impedance $Z = 1/i.\omega.\varepsilon.C_0$
 - $\varepsilon_{\text{rel}} = f(\log \omega)$
- $\tau = f(1/\omega)$ pro půlvlnu

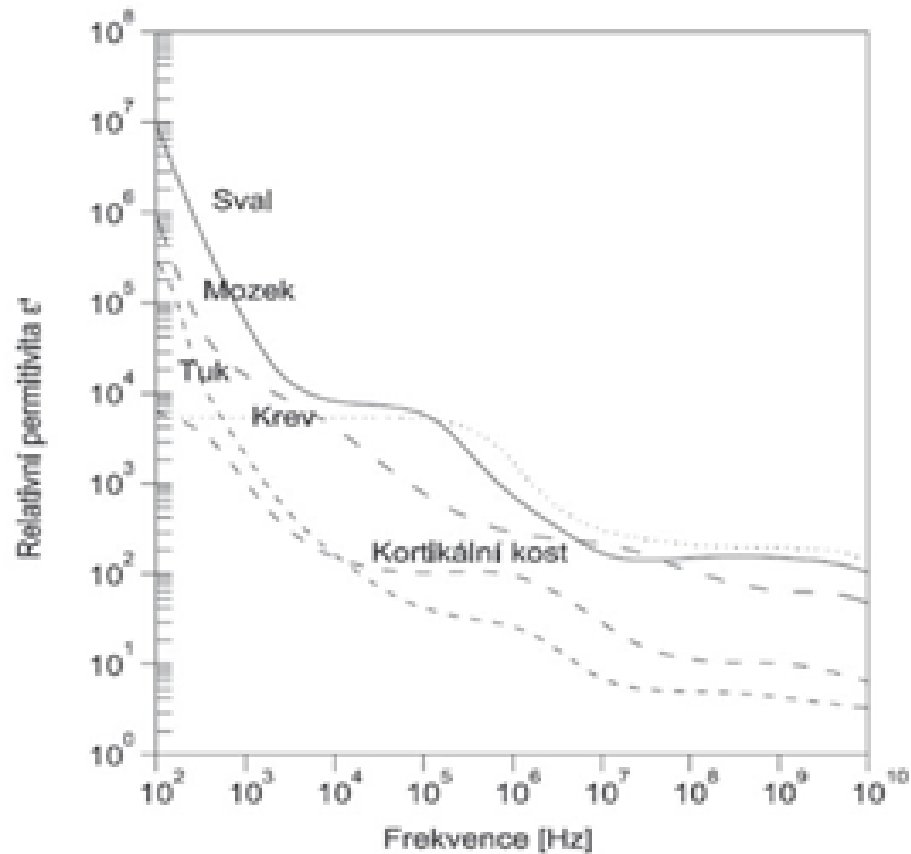
Dielektrická disperze

- Dielektrická disperze
 - Obecný popis $\epsilon_{\text{rel}} = f(\log \omega)$
 - ϵ_0 – rozpouštědlo (voda) – resonance
 - ϵ_1 – rozpouštědlo + sol
 - ϵ_2 – rozpouštědlo
 - B – voda se nestačí reorientovat
- $\tau = f(1/\omega)$ pro půlvlnu



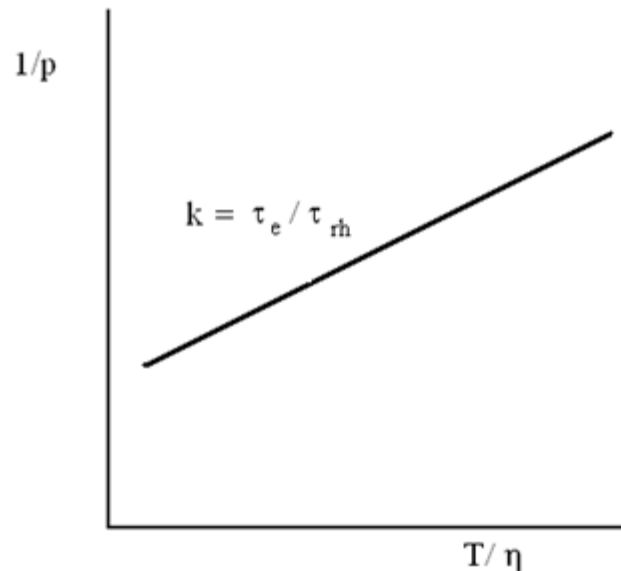
Dielektrická disperze

- Dielektrická disperze tkání



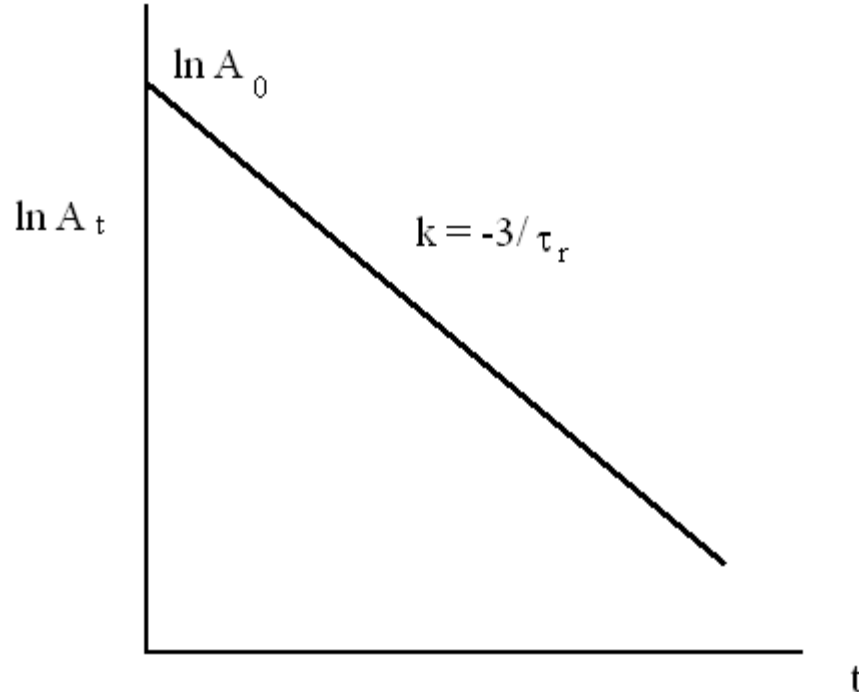
Polarizace fluorescence

- $p = (F_{\parallel} - F_{\perp}) / (F_{\parallel} + F_{\perp})$
 - Měření při různých teplotách
 - Vynesení $1/p = f(T/\eta_0)$ $k = \tau_{\text{exc}} / \tau_{\text{rh}}$



Polarizace fluorescence

- $A = (F_{\perp} - F_{\parallel}) / (F_{\perp} + 2F_{\parallel})$
 - nanosekundová pulsní technika
 - $A_t = A_0 \cdot e^{-3t/\tau}$ $\ln A_t = -3t/\tau + \ln A_0$



Zpracování - vynesení

- Využití pro popis tvaru molekuly
 - Kombinace s viskosimetrií
 - **Harding** $\Lambda = 3 [\eta] \cdot \eta_0 \cdot M_r / \tau_{rh} R T$

