

Ćwiczenie 13. Wyznaczanie ładunku koloidu metodą elektroforezy swobodnej.

Układy koloidalne to mieszaniny fizycznie niejednorodne składające się z dwóch faz (rozproszonej i rozpraszającej), w których średnica cząsteczek rozproszonych jest rzędu 1 – 200 nm (10\AA – 2000\AA), a nawet do 1 μm (cząstki większe niż 500 nm występują w zawiesinach). Koloidy są bardzo powszechne w przyrodzie. Należą do nich m.in.: wszelkiego rodzaju zanieczyszczenia znajdujące się w wodzie, mleko (kropelki białka i tłuszczu w wodzie), masło (koloid wody w tłuszczu), roztwory białek, galarety, dymy uwalniane podczas spalania, mgły (zawiesina kropel wody lub lodu w powietrzu), itp. Biorąc pod uwagę rozpowszechnienie koloidów w organizmie człowieka, można także stwierdzić, że „organizm ludzki rozpatrywany z punktu widzenia pewnych jego właściwości jest roztworem koloidalnym o różnych stanach skupienia”. Do koloidów należą bowiem różnego rodzaju substancje białkowe, włosy, paznokcie, skóra, wiązadła, itd. Również krew jest układem koloidalnym, bowiem mamy mnóstwo elementów morfotycznych (komórek) zawieszonych w fazie płynnej określanej mianem osocza. Samo osocze krwi, które jest mieszaniną kilkunastu rozpuszczonych białek, jest również roztworem koloidowym (zol).

Substancje będące koloidami wykorzystywane są też w farmacji. Przykładowo koloidalny chlorek srebra czy koloidalny protargol (organiczny kompleks srebra z białkiem) mają efektywniejsze właściwości bakteriobójcze oraz grzybobójcze, a ponadto wykazują mniej działań niepożądanych niż inne związki zawierające rozpuszczalne sole srebra. Wiele leków dostarczanych jest do organizmu za pomocą inhalatorów, a powszechnie stosowane w leczeniu astmy czy przewlekłego zapalenia oskrzeli - aerozole są przecież układami koloidalnymi. Kolejną grupę substancji koloidalnych wykorzystywanych w farmacji stanowią emulsje, związki wielkocząsteczkowe czy polimery. Naturalnie występujące makrocząsteczki pochodzenia roślinnego, takie jak skrobia czy celuloza są stosowane jako substancje pomocnicze, a syntetyczne polimery stosuje się jako powłoczki dla stałych postaci leków (w celu ochrony substancji leczniczej, która może być podatna na wpływ wilgoci z powietrza lub degradację pod wpływem kwasowych warunków żołądka).

Znanych jest wiele sposobów podziału koloidów, ze względu na stan skupienia obu tworzących je składników, układy koloidalne zostały podzielone w sposób przedstawiony w tabeli 1.

Tabela 1. Podział koloidów wg Ostwalda.

faza rozproszona	faza rozpraszająca	rodzaj koloidu	przykłady
gaz	gaz	nie istnieje	-----
ciecz	gaz	aerozole ciekłe	mgła, leki w postaci aerozolu
ciało stałe	gaz	aerozole stałe	leki w postaci aerozoli, pył mikrokryształów
gaz	ciecz	piana	piana mydlana
ciecz	ciecz	emulsja	mleko
ciało stałe	ciecz	zole	koloidalne srebro w wodzie
gaz	ciało stałe	piany trwałe	pumeks
ciecz	ciało stałe	emulsja stała	minerały z zaokludowanymi cieczami, opale
ciało stałe	ciało stałe	zole stałe	szkło rubinowe

Najbardziej rozpowszechnione są układy koloidalne o ciekłym ośrodku dyspersyjnym, zwane roztworami koloidalnymi, liozolami lub zolami. Jeżeli ośrodek dyspersyjny jest wodą, zwane są hydrozolami, jeżeli alkoholem - alkozolami, jeżeli benzenem - benzenozolami itd.

Ze względu na powinowactwo fazy rozpraszającej do rozpraszanej, układy koloidalne dzieli się na:

- **liofilowe** (hydrofilowe jeśli fazą rozpraszającą jest woda), w których cząstki fazy rozproszonej wykazują powinowactwo do fazy rozpraszającej, łączą się z cząsteczkami ośrodka dyspersyjnego w procesie solwatacji i zostają przez to utrwalone np.: białka (żelatyna, insulina), guma arabska. Gdy cząsteczki liofilowego zolu zwiążą całą fazę rozpraszającą, powstaje półsztywna, galaretowata masa zwana *zelem* (cząstki koloidalne stykają się lub łączą się ze sobą w wielu punktach, tworząc strukturę sieci przestrzennej, która rozprzestrzenia się w całej objętości substancji uniemożliwiając swobodne przemieszczanie się cząsteczek fazy rozpraszającej).

- **liofobowe** (hydrofobowe jeśli ośrodkiem rozpraszającym jest woda), w których cząstki fazy rozproszonej nie otaczają się cząstkami fazy rozpraszającej, a czynnikiem stabilizującym jest ładunek elektryczny zaadsorbowany na ich powierzchni np.: hydrozole metali oraz ich siarczków i wodorotlenków. Różnice pomiędzy koloidami liofilowymi a liofobowymi przedstawiono w tabeli 2.

Z kolei Zsigmondy dokonał podziału koloidów obserwując pozostałość po usunięciu ośrodka rozpraszającego. W klasyfikacji tej wyróżniamy *koloidy odwracalne* (sucha pozostałość przechodzi z powrotem do roztworu pod działaniem fazy rozpraszającej) oraz *nieodwracalne* (nie tworzą roztworu po zetknięciu wysuszonej fazy rozproszonej z ośrodkiem rozpraszającym). Z reguły odwracalnymi są wszystkie koloidy liofilowe, a nieodwracalnymi liofobowe.

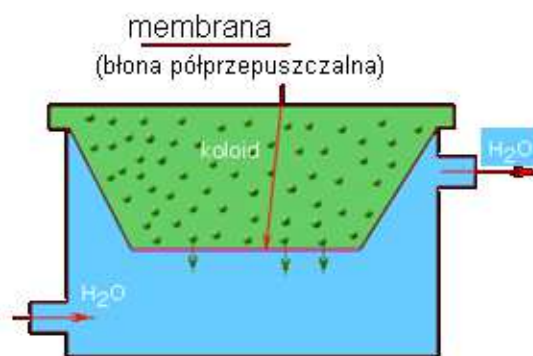
Tabela 2. Właściwości koloidów liofilowych i liofobowych.

Właściwości	Koloidy liofobowe	Koloidy liofilowe
otrzymywanie	metodami dyspersji lub kondensacji	przez rozpuszczanie
struktura cząsteczek	przeważnie zespoły zwykłych cząstek	makrocząsteczki
stężenia fazy rozproszonej	na ogół nieznaczne	może być duże
ruchy Browna	występują wyraźnie	często bardzo niewyraźne
efekt Tyndalla	wyraźny	niewyraźny
barwa układu	często zabarwione	najczęściej bezbarwne
ładunek elektryczny	cząstki zawsze naładowane	ładunek nieznaczny lub jego brak
lepkość	nieznaczna	znaczna
tworzenie piany	nie tworzą piany	łatwo tworzą pianę
wrażliwość na działanie elektrolitu	koagulują pod wpływem małych stężeń elektrolitu	mała drażliwość, pod wpływem dużych stężeń ulegają wysalaniu
wrażliwość na działanie środków dehydratujących	nieznaczna, występuje dopiero przy dużych stężeniach	przy dużych stężeniach znaczna
koagulacja	nieodwracalna	odwracalna
czynnik determinujący trwałość koloidów	siły oddziaływania elektrostatycznego (ładunek)	otoczka solwatacyjna

Otrzymywanie układów koloidalnych może być prowadzone na różne sposoby, które możemy podzielić na dwie grupy metod. *Metody dyspersyjne* polegają na rozdrobnieniu cząstek określonej fazy, aż do osiągnięcia wielkości charakterystycznej dla koloidów. Stosuje się w tym celu rozdrobnienie mechaniczne w szybkoobrotowych młynach koloidalnych, rozpylanie w łuku elektrycznym, działanie fal ultradźwiękowych itp. Natomiast *metody kondensacyjne* sprowadzają się do łączenia cząstek w zespoły koloidalne. Można to osiągnąć poprzez zmniejszenie rozpuszczalności np.: powolne wlewanie do wody nasyconego roztworu siarki w alkoholu daje hydrozol siarki, lub przeprowadzając reakcję polimeryzacji.

Oczyszczanie koloidów ma na celu uwolnienie tych układów od domieszek elektrolitów. Jedną z metod oczyszczania koloidów jest *dializa*, polegająca na tym, iż do naczynia z czystym rozpuszczalnikiem wprowadza się zol umieszczony w worku dializacyjnym wykonanym z błony półprzepuszczalnej. Substancje o rozdrobnieniu cząsteczkowym (elektrolity) przechodzą swobodnie przez membranę (błonę) do zewnętrznej cieczy i mogą być w ten sposób usunięte z koloidu, zwłaszcza gdy ciecz zewnętrzna będzie wymieniana w sposób ciągły.

Ponieważ cząsteczki koloidów są znacznie większe nie mogą przenikać przez błonę i pozostają wewnątrz worka dializacyjnego. Proces przechodzenia cząsteczek odbywa się do momentu wyrównania się ich stężeń po obu stronach membrany. Aby więc dializa zachodziła efektywnie – co pewien czas rozpuszczalnik zewnętrzny powinien być wymieniany.



Dializę można też prowadzić w polu elektrycznym (*elektrodializa*), gdzie jony mogą być usuwane przez półprzepuszczalne membrany jonowymiennie zaś siłą napędową jest różnica potencjału elektrycznego (przyłożone napięcie). Oczyszczanie koloidów można też przeprowadzić stosując filtrację w warunkach obniżonego ciśnienia (*ultrasączenie*), gdzie stosuje się sączi o odpowiednich porach lub prowadząc wymianę jonową z udziałem jonitów.

Układy koloidalne mogą być poddawane pewnym procesom, do których należą:

- - koagulacja – skupianie się cząstek koloidalnych w większe agregaty widoczne gołym okiem, co prowadzi do wytrącania się ich z roztworu. Koagulacja polega na zmniejszeniu się stopnia dyspersji układów koloidalnych, a więc na łączeniu się cząstek fazy rozproszonej w większe zespoły w wyniku obniżania ładunku elektrycznego powierzchni cząstki koloidalnej (lub niszczenia otoczki solwatacyjnej). Podczas koagulacji zole przechodzą w żele (usieciowane koloidy) lub osady. Koagulacja może być odwracalna i nieodwracalna. Odwracalna jest wówczas, gdy żel można z powrotem przeprowadzić w zol (określamy to zjawisko mianem peptyzacji).
- - peptyzacja – zjawisko przechodzenia skoagulowanego osadu ponownie w stan roztworu koloidalnego. Peptyzacja polega na usunięciu z osadu zaadsorbowanych jonów koagulujących (cząstki

koloidalne odzyskują swój pierwotny ładunek i ponownie zaczynają się odpychać) na skutek dodania rozpuszczalnika lub elektrolitu, wstrząsów mechanicznych (tikotropia) lub podgrzania.

- - wysalanie – wywołanie koagulacji poprzez działanie na koloidy stężonymi roztworami soli (mocnych elektrolitów). Do wysalania koloidów szczególnie dobrze nadają się sole o jonach ulegających silnej hydratacji, łatwo rozpuszczalne i o wyższej wartościowości, np. $MgSO_4$, ale także $(NH)_2SO_4$ i Na_2SO_4 . Zdolność wysalająca zależy od charakteru zarówno kationu jak i anionu a także od ich promieni jonowych

- - denaturacja białka – zmiana struktury cząsteczkowej białka, przy której trwale zmieniają się jego właściwości biologiczne, chemiczne i fizyczne. Zachodzi ona pod wpływem podwyższonej temperatury, kwasów, zasad, metali ciężkich czy promieniowania jonizującego (nieodwracalna koagulacja),

Właściwości koloidów można podzielić w następujący sposób:

a) właściwości mechaniczne

- ruchy Browna – bezładne ruchy wykonywane przez cząstki koloidalne. Są one niezależne od czynników zewnętrznych, są wynikiem termicznych ruchów cząstek fazy rozpraszającej, które zderzając się na swej drodze z większymi od siebie cząsteczkami fazy rozproszonej, wprawiają je w chaotyczny ruch postępowy lub obrotowy,

- dyfuzja – ruch cząstek od stężenia większego do mniejszego w celu wyrównania stężeń. Współczynnik dyfuzji określa szybkość dyfuzji przez jednostkową płaszczyznę przekroju i przy jednostkowym gradiencie stężenia. Jego wielkość zależy od promienia dyfundującej cząstki oraz od lepkości środowiska i temperatury, przy założeniu, że cząstka ma kształt kulisty. Współczynnik dyfuzji układów koloidalnych jest mały, niewielka jest więc także szybkość dyfuzji. Badania dyfuzji w roztworach koloidalnych pozwalają na określenie promienia ich cząstek i masy molowej koloidu,

- sedymentacja – opadanie cząstek koloidalnych pod wpływem siły ciężkości. Szybkość sedymentacji zależy od rozmiarów cząstek oraz różnicy gęstości ośrodka rozpraszającego i rozproszonego, przy czym cząstki większe opadają szybciej niż mniejsze,

- ciśnienie osmotyczne – wielkość ciśnienia osmotycznego roztworów koloidalnych jest mała, ponieważ ilość cząstek koloidalnych w jednostce objętości jest mała. Pomiar ciśnienia osmotycznego w roztworach koloidalnych można wykorzystać do wyznaczania masy molowej fazy rozproszonej,

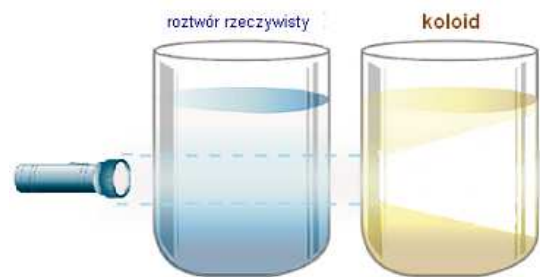
- równowaga Donnana – stan równowagi pomiędzy dwoma roztworami elektrolitów

$(NaR \rightarrow Na^+ + R^-)$ oraz $(NaCl \rightarrow Na^+ + Cl^-)$ przedzielonymi błoną półprzepuszczalną jest inny w obecności koloidu niż w nieobecności. Obecność koloidu zmienia rozkład stężenia elektrolitu po obu stronach błony, mimo że jony elektrolitu mogą swobodnie wędrować przez błonę. W obecności koloidu błona zachowuje się tak, jakby przepuszczała jony tylko w jednym kierunku,

a przeszkadzała ich przepływowi w przeciwnym kierunku. Zjawisko równowagi Donnana występuje w komórkach i tkankach roślin i zwierząt. Koloidy dysocjujące na jony wywierają wpływ na wędrówkę jonów soli wbrew ciśnieniu osmotycznemu. Sole nie posiadające wspólnego jonu z koloidami również ulegają jego wpływowi i dyfundują przez błonę silniej w jednym kierunku, gromadząc się nierównomiernie po obu stronach błony.

b) właściwości optyczne

- efekt Tyndalla – rozmiary cząstek koloidowych powodują, że światło przepuszczone przez układ koloidalny ulega ugięciu i częściowemu rozproszeniu na cząstkach koloidalnych. Występuje wówczas zjawisko Tyndalla, polegające na tym, że przepuszczony przez roztwór koloidu strumień światła obserwowany z boku tworzy jasną opalizującą smugę zwaną stożkiem Tyndalla. Pomiar natężenia światła rozproszonego przez układ koloidalny wykorzystuje się do oznaczania liczby cząstek danego układu koloidalnego (jego stężenia). Wykonuje się je przy pomocy nefelometrów. Metody te należą do metod turbidymetrycznych (bazujących na pomiarze zmętnienia próbki). Rozproszoną część promieniowania można tu uważać za zaabsorbowaną przez roztwór, zatem do zjawiska tego można stosować prawo Lamberta-Beera.



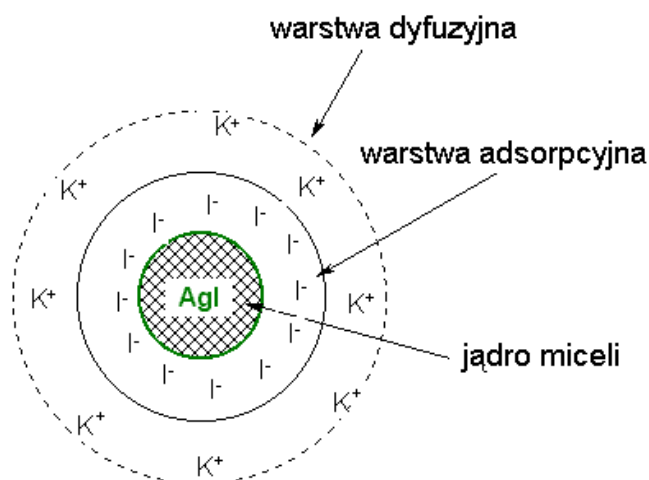
c) właściwości elektryczne

- ładunek – cząstki koloidów liofobowych adsorbują jony dodatnie i ujemne z fazy rozpraszającej, w wyniku czego uzyskują odpowiedni ładunek zapewniający ich trwałość. Ilość zaadsorbowanych jonów może się zmieniać w zależności od sposobu otrzymywania koloidu. Cząstki koloidów liofilowych (np.: białka, skrobia) są także obdarzone ładunkiem elektrycznym. Jego źródłem jest kwasowa lub zasadowa dysocjacja cząsteczki, o czym świadczy zmiana ładunku takiej cząstki pod wpływem zmian pH środowiska,

Istnienie ładunku elektrycznego cząstki koloidalnej jest bezpośrednią przyczyną charakterystycznych zjawisk (elektroforeza, elektroosmoza) zachodzących w układzie koloidalnym umieszczonym w polu elektrycznym. *Elektroforeza* polega na ruchu cząstek koloidalnych w polu elektrycznym ku jednej z elektrod. Kierunek poruszania się cząstek jest zależny od znaku ich ładunku, a szybkość od rozmiarów cząstek. Natomiast *elektroosmoza* związana jest z ruchem cząsteczek ośrodka dyspersyjnego (cieczy) pod wpływem przyłożonego pola elektrycznego.

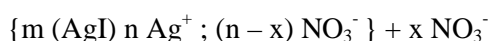
Jak wspomniano wcześniej cząstki koloidalne posiadają *ładunek elektryczny*. W niniejszym ćwiczeniu można zaobserwować jak odpowiednie dodawanie odczynników powoduje wytwarzanie odpowiednio naładowanych cząstek. Uwidacznia się to wyraźnie na przykładzie otrzymywania hydrozoli jodku srebra. Jeżeli do nadmiaru rozcieńczonego roztworu KI dodaje się roztwór AgNO_3 , to otrzymuje się ujemnie naładowany hydrozol AgI , stabilizowany przez jony

jodkowe (I⁻) tworzące warstwę adsorpcyjną (wewnętrzną). W warstwie adsorpcyjnej znajdzie się również niewielka liczba jonów potasu. Jony jodkowe są bardzo dobrze adsorbowane, gdyż jony te występują w sieci krystalicznej wytrącanej soli, natomiast jony potasu są adsorbowane wskutek występowania dużego ujemnego ładunku elektrycznego cząstki. Niewielka liczba zaadsorbowanych jonów potasu nie zmienia wypadkowego znaku ładunku cząstki. Część miceli złożoną z jądra (rdzenia), które stanowi w omawianym przykładzie aglomerat krystalicznego AgI oraz warstwy adsorpcyjnej nosi nazwę granuli. Ujemny ładunek granuli powoduje powstanie przestrzennego ładunku o przeciwnym znaku (warstwy dyfuzyjnej), zawierającej przede wszystkim jony potasu. Budowę miceli hydrozolu jodku srebrnego otrzymanej w wyniku wytrącenia AgI w nadmiarze KI przedstawiono schematycznie na rys. 1. Tak otrzymana cząstka koloidalna będzie wędrować w polu elektrycznym do elektrody dodatniej. Warstwa dyfuzyjna ulega deformacji, a w skrajnych przypadkach całkowitemu zniszczeniu w trakcie ruchu miceli w polu elektrycznym. Granula zaś jest formacją trwałą.



Rys. 1. Budowa miceli koloidalnej. Jądro miceli jest otoczone trwale związaną warstwą adsorpcyjną (głównie zawierająca jony I^- i niewielką ilość K^+) nadającą cząsteczce koloidalnej ładunek, którą otacza dalej rozmyta warstwa dyfuzyjna (jony K^+ i niewielka ilość I^-).

Jeżeli natomiast do nadmiaru $AgNO_3$ dodawać roztworu KI, to powstanie hydrozól o dodatnio naładowanych cząstkach. Mechanizm ich powstania można wytłumaczyć tworzeniem się na jądrze warstwy adsorpcyjnej złożonej w przeważającej liczbie z jonów srebra (Ag^+) oraz mniejszej liczby jonów azotanowych, potasu i jodkowych. Warstwę dyfuzyjną stanowią będą jony azotanowe znajdujące się w obszarze oddziaływania elektrostatycznego dodatnio naładowanej granuli. Omawiany hydrozól przedstawia następujący wzór:

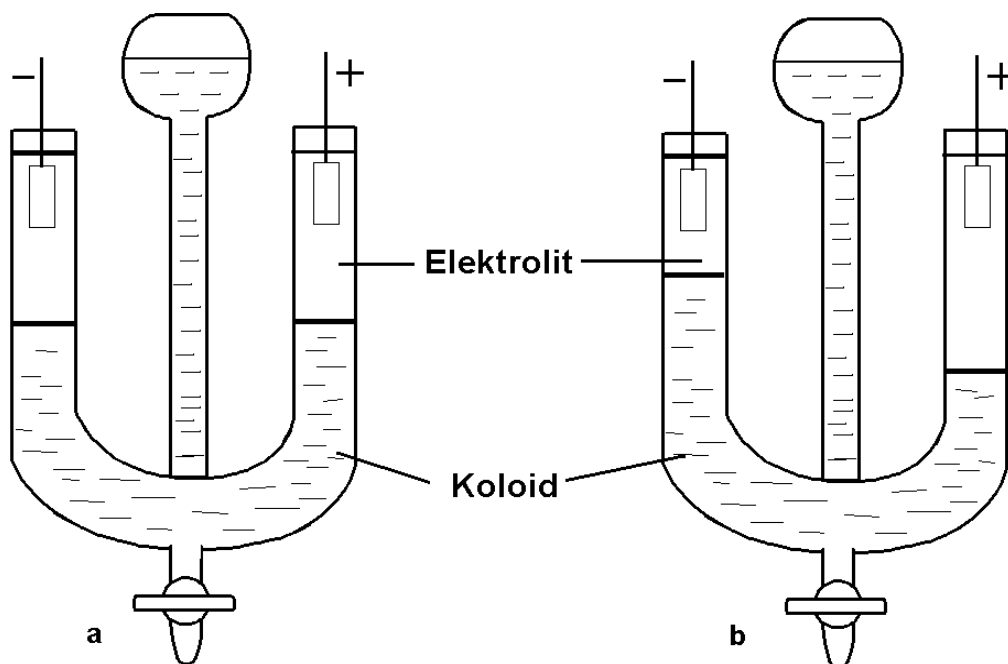


Dodatnio naładowany hydrozól jodu srebra jest mniej trwały aniżeli hydrozól naładowany ujemnie.

Innym przykładem koloidu wykorzystywanym w ćwiczeniu jest wodorotlenek żelaza (III). Dodając powoli, kroplami roztwór $FeCl_3$ do wrzącej wody otrzymuje się dodatnio naładowany

hydrozolu $\text{Fe}(\text{OH})_3$. Jądro miceli stanowi konglomerat powstających w wyniku hydrolizy cząsteczek wodorotlenku żelaza (III) pochodzących z niezhydrolizowanego chlorku żelaza (III). Warstwa dyfuzyjna tworzona jest przez jony chlorkowe. W praktyce budowa i skład warstw adsorpcyjnej i dyfuzyjnej w przypadku hydrozolu wodorotlenku żelaza (III) są bardziej złożone. Niektórzy badacze twierdzą, że micela jest stabilizowana przez produkty hydrolizy soli żelaza (III): FeO^+ lub $\text{FeOCl}\cdot\text{FeO}^+$.

Dzięki ładunkowi cząstki koloidalne mogą poruszać się w polu elektrycznym (elektroforeza). Przykładowo cząstki koloidalne As_2S_3 przesuwały się powoli w kierunku elektrody dodatniej, co świadczy o tym, że micelle As_2S_3 mają na powierzchni ładunek ujemny. Elektroforezę swobodną obserwować można w aparacie przedstawionym na rys. 2. Zasadniczą jego część aparatu stanowi U-rurka z dospawaną w dolnej części trzecią rurką posiadającą zbiorniczek na hydrozól. Rurka ta jest wyposażona w zawór, którym można dozować badany hydrozól. Urządzenie jest przymocowane do odpowiedniego statywu zapewniającego jego stabilne ustawienie. W obydwu ramionach U-rurki wstawia się elektrody podłączone do zasilacza prądu stałego. Przepływ prądu (włączenie zasilania) powoduje że cząsteczki obdarzone ładunkiem zaczynają się przemieszczać (ładunki dodatnie wędrują do elektrody ujemnej, a ujemne do elektrody dodatniej).



Rys. 2 Aparat do elektroforezy swobodnej: a) po napełnieniu, przed włączeniem prądu, b) po przepływie prądu.

Zjawisko elektroforezy znalazło zastosowanie w analityce, zwłaszcza do rozdzielania i identyfikacji różnego rodzaju białek. Białka w zależności od pH mogą bowiem uzyskiwać ładunki i w zależności od posiadanego ładunku mogą wędrować w kierunku elektrody dodatniej, czy ujemnej. Pierwszą elektroforezę białek wykonano w aparacie o schemacie przedstawionym na ryc. 2. Obecnie

w laboratoriach korzysta się raczej z chromatografii bibułowej lub proces ten prowadzi się na pokrytych żelem płytkach.

Obok zjawiska elektroforezy możemy prowadzić też zjawisko *elektroosmozy*, polegające na ruchu ośrodka dyspersyjnego względem nieruchomej fazy stałej (rozproszonej). Najczęściej obserwuje się ją wtedy gdy faza stała jest zwarta i w niewielkim stopniu zdyspergowana. Można więc powiedzieć, że pełni ona rolę kapilary/sączka przez którą są przeciskane cząstki fazy rozpraszającej (domyślnie cieczy) posiadające ładunek (czyli kationy i aniony).

Wykonanie ćwiczenia (*)**

Ćwiczenie polega na otrzymaniu hydrozolu jodku srebrowego oraz wodorotlenku żelaza (III), dla których następnie będzie określany znak ładunku elektrycznego otrzymanych miceli.

Wyznaczanie znaku ładunków elektrycznych koloidów

A. Napełnianie U-rurki.

1. Do środkowej rurki ze zbiorniczkiem (przy zamkniętym przepływie do ramion U-rurki) wlać około 50 cm^3 wcześniej przygotowanego roztworu koloidalnego wodorotlenku żelaza (III). Jeżeli w rurce znajduje się powietrze należy je usunąć tak aby roztwór koloidalny znajdował się tuż obok kurka regulującego przepływ. W tym celu przekręcić kranik, aby zgromadzone powietrze zostało wypchnięte przez ciśnienie hydrostatyczne wywierane przez słup cieczy znajdującej się powyżej. Jeżeli poziom roztworu koloidalnego dochodzi do kranu – ustawiamy go w pozycji zamkniętej, zwracając uwagę aby w bocznych ramionach u-rurki nie było roztworu koloidalnego.

Następnie przygotować $15\text{-}20\text{ cm}^3$ wody destylowanej do której należy dodać parę kropeł $0,1\text{ M}$ roztworu HCl. Zakwaszoną wodę wlewamy przez jedno z bocznych ramion U-rurki.

1. **Powoli** otwierać kran, tak aby roztwór koloidalny wolno zaczął wpływać do ramion U-rurki, powodując jednocześnie wypieranie wody. **UWAGA:** *Gwałtowne wprowadzenie koloidu powoduje wymieszanie się tego roztworu z elektrolitem i uniemożliwia uzyskanie wyraźnej granicy międzyfazowej.* Odczekać do momentu aż poziom cieczy w obu ramionach U-rurki podniesie się na wysokość 2-3 cm od wylotu obu ramion. Następnie wprowadzić elektrody (blaszki z podłączonymi przewodami) do elektrolitu znajdującego się w obu ramionach U-rurki.

2. Połączyć elektrody z zasilaczem prądu stałego. Zaleca się podłączenie przewodów do kanału II (jeden przewodów podłączamy do gniazda oznaczonego „+”, drugi do „-”). Pokrętkiem zasilacza ustawić napięcie na wartość wyznaczoną przez osobę prowadzącą ćwiczenia (w zakresie 40-120 V).

3. Obserwować kierunek przesuwania się granicy układu koloidalnego. Na podstawie przesuwania się fazy granicznej określić czy cząstki koloidalne mają ładunek dodatni czy ujemny.

4. Wyłączyć prąd po 10 minutach. Używając papieru milimetrowego określić drogę przebytą przez migrujące czoło roztworu koloidalnego (h). Na podstawie określonej drogi przebytej przez czoło roztworu obliczyć ruchliwość cząsteczek koloidalnych w polu elektrycznym.

Znając napięcie (U) oraz odległość pomiędzy elektrodami (odległość, jaką pokonują naładowane cząstki, pomiędzy elektrodami wynosi $l=30$ cm) wyliczyć natężenie pola elektrycznego (E):

$$E = U/l \quad \text{gdzie:}$$

U – różnica potencjału pomiędzy elektrodami [V]
 l – odległość między elektrodami w [cm]

Wartość natężenia pola elektrycznego pozwoli na obliczenie ruchliwości elektroforetycznej (μ) cząstek koloidalnych:

$$\mu = v/E$$

μ – efektywna ruchliwość cząstek naładowanych w strefie [$\text{cm}^2 \times \text{V}^{-1} \times \text{s}^{-1}$]
 v – szybkość poruszania się strefy w [cm/s]

Szybkość poruszania się cząstek koloidalnych wyliczamy dzieląc zmierzoną różnicę wysokości pomiędzy czołami warstw (h , wyrażona w cm) koloidów w obu ramionach U-rurki i dzieląc ją przez czas (t , wyrażony w sekundach):

$$v = h / t$$

5. Po wyłączeniu zasilacza rozmontować zestaw i przepłukać u-rurkę wodą destylowaną. Następnie identyczne oznaczenie przeprowadzić dla koloidalnego roztworu jodku srebra, który należy samodzielnie przygotować.

B. Otrzymywanie koloidalnego roztworu jodku srebra

Do 50cm^3 wody destylowanej dodać 10cm^3 roztworu jodku potasu (KI) lub AgNO_3 – azotanu (V) srebra (uzgodnić z asystentem prowadzącym ćwiczenie), a następnie powoli wkrapłając dodać 5cm^3 $0,1\text{mol/dm}^3$ roztworu wytrącającego (odpowiednio AgNO_3 lub KI). W zależności od sposobu otrzymywania koloidalna powstające cząstki jodku srebra przyjmują ładunek dodatni lub ujemny.

W sprawozdaniu zaznaczyć w jaki sposób przygotowano koloid jodku srebra (I).

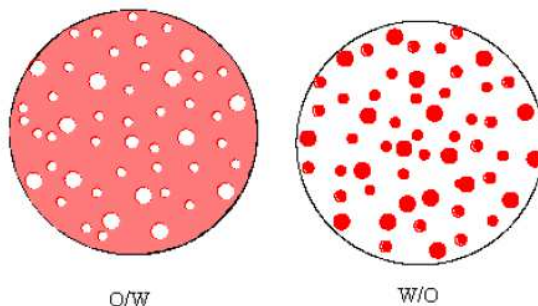
Ćwiczenie 14. Emulsje – otrzymywanie, rozpoznawanie ich typu i ocena trwałości.

Budowa i znaczenie emulsji

Emulsjami nazywamy układy dyspersyjne, w których zarówno faza rozproszona, jak i ośrodek dyspersyjny są cieczami. Typ emulsji zależy od tego, która z dwóch cieczy stanowi fazę rozproszoną, a która rozpraszającą. Jeżeli fazą rozproszoną jest ciecz organiczna (niepolarna), natomiast fazą ciągłą woda lub inna ciecz polarna, mówimy o emulsji typu olej-woda (O/W). Odwrotny typ emulsji to emulsja woda - olej (W/O). Fazę rozproszoną nazywamy też fazą *wewnętrzną*, a ośrodek dyspersyjny stanowi fazę *zewnętrzną*.

Najprostszą **metodą określania typu emulsji** jest metoda rozcieńczania. Kroplę emulsji umieszcza się na płytce szklanej obok kropli wody. Gdy obydwie krople zetkniemy bagietką szklaną, wówczas albo kropelki emulsji O/W wymieszają się z wodą, albo też, gdy chodzi o emulsję W/O, wytworzy się granica faz (krople nie mieszają się). Typ emulsji można również określić metodą barwienia stosując barwniki rozpuszczalne w fazie niepolarnej ("olejowej", np. Sudan IV) lub w fazie polarnej ("wodnej", np. oranż metylowy). W przypadku emulsji O/W wybarwione Sudanem krople fazy rozproszonej, obserwowane pod mikroskopem, będą widoczne na niezabarwionym tle. Stosując w przypadku tej emulsji oranż metylowy, zobaczymy bezbarwne krople fazy rozproszonej na barwnym tle. Emulsje O/W różnią się od emulsji W/O także przewodnictwem elektrycznym, można więc wykorzystać pomiary konduktometryczne do określenia typu emulsji - wyższe przewodnictwo elektryczne mają zawsze emulsje typu O/W (co wynika z przewagi fazy polarnej, która przewodzi prąd).

Emulsja zabarwiona barwnikiem rozpuszczalnym w wodzie
(obraz mikroskopowy)



Emulsje są układami często spotykanymi w przyrodzie np. ropa naftowa (emulsja typu W/O), mleko zwierzęce (emulsja tłuszczu w wodzie), lateks kauczuku naturalnego, tzw. sok kauczukowy (emulsja poliizoprenu w wodzie), a także w życiu codziennym w postaci szeregu środków spożywczych: śmietana, masło, margaryna, majonez. Ważną dziedziną zastosowań emulsji jest produkcja kosmetyków, środków ochrony roślin i farb (farby emulsyjne). Wielkie znaczenie ma zastosowanie farmaceutyczne emulsji. Preparaty lecznicze doustne są zwykle emulsjami typu O/W, natomiast preparaty zewnętrzne (maści, kremy) są zarówno typu W/O, jak i O/W. W postaci emulsji do użytku zewnętrznego stosuje się maści, kremy, czy też niektóre krople do nosa. W ostatnich latach

prorowadzone były prace nad emulsjami cieczy fluoroorganicznych typu O/W wykazujących wysoką rozpuszczalność tlenu cząsteczkowego, w kierunku zastosowania ich jako preparatów krwiozastępczych. Zastosowanie praktyczne takich preparatów nie jest jeszcze całkiem bezpieczne ze względu na możliwość agregacji cząstek i blokowania drożności mikronaczyń przez większe zespoły cząstek.

Emulgowanie

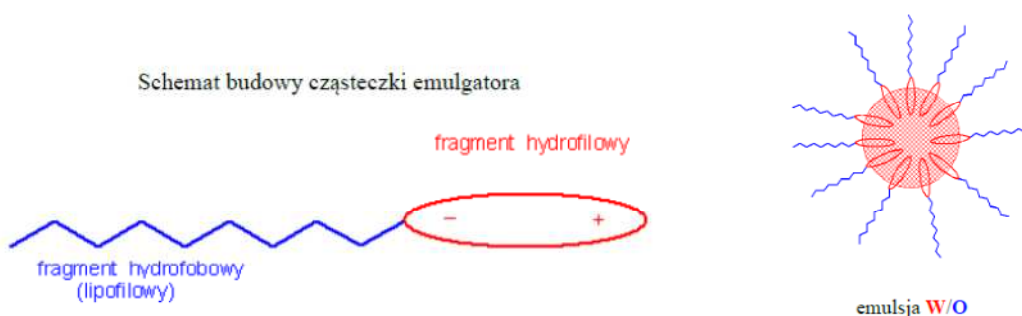
Proces powstawania emulsji nazywamy emulgowaniem. Powstawanie emulsji zależy od wielu czynników: rodzaju cieczy i emulgatora, ciśnienia, temperatury, stosunku objętościowego faz, kolejności wprowadzania cieczy itp. Na ogół łatwiej powstają emulsje typu O/W, które też są emulsjami trwalszymi. Dodatkowo powstawanie emulsji oraz jej trwałość może zwiększyć dodatek *emulgatora* - substancji obniżającej napięcie międzyfazowe σ_{ow} i/lub wytwarzającej, w wyniku adsorpcji błonki stabilizujące dookoła rozproszonych kropelek. Proces emulgowania związany jest ze znacznym wzrostem powierzchni fazy rozproszonej, a tym samym ze wzrostem swobodnej energii powierzchniowej:

$$\Delta E_{pow} = \sigma_{ow} \cdot \Delta A \quad (1)$$

gdzie: σ_{ow} - graniczne napięcie powierzchniowe (napięcie międzyfazowe) pomiędzy fazą olejową i wodną

ΔA - wzrost powierzchni fazy rozproszonej.

W wyniku tego wzrostu energii układ staje się termodynamicznie nietrwały - krople mają tendencję do *koalescencji* (nieodwracalnego łączenia się). Wprowadzenie emulgatora powoduje obniżenie napięcia międzyfazowego i tym samym zapewnia większą trwałość utworzonej emulsji. Wynika to z faktu, że w cząsteczce emulgatora możemy wyróżnić 2 części: hydrofilową i hydrofobową.



Na granicy fazy wodnej i olejowej cząstki emulgatora układają się w ten sposób że część hydrofilowa skierowana jest ku wodzie, podczas gdy hydrofobowa w kierunku fazy oleistej, co wpływa na obniżanie napięcia międzyfazowego. Emulgatory możemy podzielić na trzy grupy:

a) substancje powierzchniowo czynne (*tenzydy*), które zaadsorbowane na powierzchni granicznej olej - woda tworzą błonki monomolekularne;

b) koloidy hydrofilowe, które tworzą błonki multimolekularne dookoła rozproszonych kropelek oleju w emulsji O/W;

c) drobnoziarniste cząstki stałe, adsorbowane na powierzchni granicznej dwóch nie mieszających się cieczy.

Z względu na charakter chemiczny emulgatory często też dzieli się na: anionowe (np. mydła), kationowe, niejonowe i amfoteryczne.

Mechanizm obniżania napięcia powierzchniowego przez emulgatory polega na tworzeniu cienkiej (zwykle jednowarstwowej) warstewki na granicy faz. Zatem emulgator dodany do emulsji tylko do pewnego stężenia wspomaga tworzenie i utrzymanie emulsji, dodany w nadmiernej ilości nie powoduje już obniżenia napięcia powierzchniowego i zaczyna tworzyć skupiska swych cząsteczek (tzw. micelle) w fazie ciągłej.

Istnieje wiele sposobów otrzymywania emulsji, podczas których stosuje się różne metody mieszania faz:

- fazę wewnętrzną stopniowo wprowadza się do fazy zewnętrznej,
- obie fazy dodaje się naprzemiennie,
- fazę zewnętrzną stopniowo dodaje się do fazy wewnętrznej,
- jednocześnie miesza się całe objętości faz.

Różne są także sposoby mechanicznego mieszania wprowadzonych faz. Stosuje się mieszanie ciągłe bądź okresowe, wstrząsanie, rozcieranie, wirowanie itp. W najprostszym przypadku polega on na mechanicznym, intensywnym wytrząsaniu cieczy (np. w moździerzu lub mikserze). Stosowane są także szybkoobrotowe młyny koloidalne i homogenizatory. W homogenizatorach cieczy są przeciskane pod wysokim ciśnieniem przez małe otwory (o powierzchni ok. 10^{-4} cm²). Zaletą tej metody jest homodispersyjność otrzymanych kropelek. Jedną z nowszych metod emulgowania polega na zastosowaniu fal ultradźwiękowych w tzw. dezintegratorach ultradźwiękowych. Fale dźwiękowe wykazują silne działanie dyspergujące w środowisku ciekłym. W wyniku rozchodzenia się ultradźwięków powstają okresowe zagęszczenia i rozrzedzenia cieczy związane z gwałtownymi zmianami ciśnienia. Dochodzi do miejscowego powstawania fazy gazowej - pary nasyconej i gazów rozpuszczonych w cieczy. Zjawisko to, zwane kawitacją, ułatwia rozpraszanie faz. Stabilność powstającej emulsji zależy od częstości drgań ultradźwiękowych czy temperatury. Dlatego też dla każdego procesu emulgowania za pomocą ultradźwięków dopiera się optymalne częstości drgań (czasami ultradźwięki wywierają działanie niszczące na emulsje), a próby często umieszcza się w lodzie. Podczas generowania ultradźwięków końcówka dezintegratora nagrzewa się dość intensywnie co stwarza niekorzystne warunki dla powstawania emulsji. Bardzo wysokie i bardzo niskie temperatury działają bowiem niszcząco na emulsje. Należy jednak zaznaczyć, że niewielkie podwyższenie temperatury na ogół ułatwia emulgowanie. Wzrost temperatury przyczynia się do obniżenia napięcia powierzchniowego i lepkości ośrodka, a także przyspiesza dyfuzję cząstek emulgatora.

Fizyczna trwałość emulsji

Stosując omówione poprzednio metody otrzymywania emulsji uzyskuje się na ogół emulsje o dość dużych cząstkach (1-5 μ m). Pod wpływem sił ciężkości następuje więc opadanie lub unoszenie się cząsteczek fazy rozproszonej zwane *sedymencją* (lub jak w przypadku emulsji "śmietankowaniem"). Oddziaływanie między cząsteczkami, a więc możliwość koalescencji (nieodwracalnej), spadek energii powierzchniowej w wyniku zlewania się kropeł itd., rozpoczynają się dopiero wówczas, gdy podczas sedymencji cząstki zderzają się ze sobą, albo gdy w osadzie lub "śmietanie" stężenie cząstek staje się dostatecznie duże. Dopóki nie nastąpiło zniszczenie otoczek ochronnych złożonych z cząsteczek emulgatora, proces śmietankowania jest procesem odwracalnym - emulsję można odtworzyć w formie wyjściowej przez ponowne zmieszanie (wstrząsanie).

W rozcieńczonych emulsjach, a więc takich, dla których można przyjąć, że cząsteczki fazy wewnętrznej opadają pojedynczo i nie łączą się w większe zespoły o różnych rozmiarach (nie występuje tzw. flokulacja, czyli kłaczkowanie), szybkość śmietankowania dobrze opisuje prawo Stokes'a:

$$V = \frac{d^2 \cdot (\rho_w - \rho_z) \cdot g}{18\eta} \quad (2)$$

gdzie: d - średnica cząstki

g - przyspieszenie grawitacyjne

ρ_w - gęstość fazy wewnętrznej

η - lepkość fazy zewnętrznej

ρ_z - gęstość fazy zewnętrznej

Analiza równania Stokes'a wskazuje, że jeśli faza rozproszona ma mniejszą gęstość niż faza rozpraszająca (co ma na ogół miejsce w emulsjach O/W), to prędkość sedymencji jest ujemna, tzn. śmietankowanie zachodzi pionowo w górę - np. kuleczki tłuszczu w mleku. Jeżeli natomiast faza wewnętrzna ma większą gęstość od fazy zewnętrznej, to cząstki emulsji opadają w dół - występuje to głównie w emulsjach W/O. Im większa jest różnica gęstości dwóch faz, im większa jest średnica cząstek oraz im mniejsza jest lepkość fazy zewnętrznej, tym większa jest szybkość śmietankowania. Najistotniejszy jest wpływ średnicy cząstek - można zauważyć, że w wzorze (2) przy parametrze „d” znajduje się potęga. Zatem dwukrotne zwiększenie średnicy kuleczek emulsji zwiększa szybkość śmietankowania czterokrotnie.

Wielkości występujące w równaniu mogą być zmieniane w celu zmniejszenia szybkości śmietankowania emulsji - np. zwiększanie gęstości fazy zewnętrznej do wartości optymalnej przez dodanie środka zagęszczającego (metyloceluloza, tragakanta itp.), zmniejszenie średnicy cząsteczek przez homogenizację, dostosowanie gęstości obu faz.

O ile śmietankowanie jest procesem odwracalnym, o tyle następny etap rozkładu emulsji - łamanie przebiega nieodwracalnie. Łamanie emulsji jest wynikiem koalescencji kropeł emulsji.

Emulsje o zawartości jednej z faz powyżej 74% obj. są nietrwałe, występuje silna tendencja do koalescencji i łamania emulsji. Takie emulsje nazywamy *stężonymi*, często występuje w nich zjawisko *inwersji* (odwrócenia) faz, ponieważ emulsja odwrotnego typu jest bardziej stabilna. Emulsje o stężeniu fazy wewnętrznej poniżej 26% obj. nazywamy emulsjami *rozcieńczonymi*.

Z powyższych powodów stężenie fazy wewnętrznej równe 74% obj. nazywamy *punktem krytycznym*. Ogólnie, punktem krytycznym emulsji nazywamy stężenie fazy wewnętrznej, powyżej którego emulgator nie może wytworzyć stabilnej emulsji określonego typu. W pewnych przypadkach (nieregularne kształty i rozmiary cząsteczek) może ono przekroczyć wartość 74%.

Na ogół najtrwalsze emulsje powstają przy stosunku objętości faz 50/50, który jest zbliżony do warunków luźnego upakowania cząstek. Fakt ten został ustalony empirycznie przez farmaceutów wiele lat temu, stąd większość preparatów leczniczych zawiera 50 części obj. fazy olejowej na 50 części obj. wody.

Wpływ temperatury na trwałość emulsji jest pośredni. Wraz ze wzrostem temperatury obniża się bowiem napięcie międzyfazowe i lepkość fazy ciągłej. Dlatego niewielkie podwyższenie temperatury sprzyja na ogół powstawaniu emulsji, natomiast zwiększenie lepkości układu wywiera działanie stabilizujące na emulsje. Zbyt wysokie lub niskie temperatury działają jednak niszcząco na emulsje.

Wykonanie ćwiczenia (*****)

1) Do probówek odmierzyć odpowiednie objętości 1% roztworu dezoksyholanu sodowego (SDC - *sodium deoxycholate*) lub laurylosiarczanu sodu (SLS – *sodium lauryl sulfate*) i oleju wg tabeli:
(SDC lub SLS stanowi fazę wodną gdyż 99 % stanowi woda).

nr próby	1	2	3
obj. fazy wodnej (ml)	1,9	1	0,1
obj. fazy olejowej (ml)	0,1	1	1,9
% obj. oleju	5,0	50	95

2) Każdą probówkę umieścić w lodzie i za pomocą dezintegratora ultradźwiękowego utworzyć emulsje w kolejnych probówkach (50 kHz, 2×10 sek). Emulsje są na ogół nieprzezroczyste i posiadają mleczną barwę – więc należy sprawdzić czy za każdym razem uzyskaliśmy emulsję.

3) Po sporządzeniu każdej emulsji zbadać jej typ metodą barwienia, używając dichromianu potasowego ($K_2Cr_2O_7$) jako substancji barwiącej. Do każdej probówki dodać po 3-5 kropeł $K_2Cr_2O_7$ i wymieszać. Przeprowadzić obserwacje pod mikroskopem - określić typy emulsji.

4) Probówki odstawić i po upływie godziny określić trwałość emulsji (czy doszło do rozwarstwienia?) w poszczególnych probówkach. Wyciągnąć wnioski dotyczące trwałości emulsji.

Otrzymywanie i oczyszczanie preparatu białka poprzez wysalanie i dializę

Białka to ogromne biocząsteczki występujące w każdym żywym organizmie, które spełniają wiele różnych funkcji biologicznych. Niezależnie od ich funkcji, wszystkie białka zbudowane są ze znacznej liczby reszt aminokwasowych połączonych ze sobą wiązaniami peptydowymi (-C(O)NH-) w długi łańcuch. Często liczba reszt aminokwasowych pojedynczego łańcucha polipeptydowego jest większa niż 100, a cała cząsteczka może być zbudowana z wielu łańcuchów polipeptydowych (podjednostek) tworząc wielkocząsteczkowe biopolimery o masie cząsteczkowej nawet do kilku milionów jednostek masy (w przypadku białek używaną jednostką masy jest Dalton (1Da = 1 u), ale z względu na ich masę najczęściej posługujemy się kilodaltonami (kDa)). Białka dzielą się zależnie od ich składu na dwie grupy: na białka proste (proteiny) i złożone (proteidy). Białka proste (np. albumina) to te, które w wyniku hydrolizy dają jedynie aminokwasy, natomiast białka złożone, które częściej występują w przyrodzie, dają po hydrolizie oprócz aminokwasów także inne związki, takie jak węglowodany, tłuszcze czy kwasy nukleinowe.

Białka są na ogół rozpuszczalne w wodzie. Do białek nierozpuszczalnych w wodzie należą tzw. białka fibrylarne, występujące w skórze, ścięgnach, włosach (kolagen, keratyna) lub mięśniach (miozyna). Niektóre z białek mogą rozpuszczać się w rozcieńczonych kwasach lub zasadach, jeszcze inne w rozpuszczalnikach organicznych. Białka posiadają zdolność wiązania cząsteczek wody. Efekt ten nazywamy hydratacją i jest on jednym z czynników stabilizujących rozpuszczone białko (solvatacja cząsteczkami rozpuszczalnika, charakterystyczna dla kolodiiów hydrofilowych, którymi są białka).

Wykorzystując charakterystyczne właściwości białek, a w szczególności różne ich powinowactwo do wody, można doprowadzić do ich wytrącenia z roztworu. Rozpuszczalność białek zależy od ich pH oraz siły jonowej czy stężenia i wartościowości jonów w roztworze. Po dodaniu elektrolitu do roztworu zawierającego różne białka zmieniają się warunki hydratacji ich cząsteczek. „Odwadniające” oddziaływanie jonów jest proporcjonalne do siły jonowej roztworu, stąd rozpuszczalność białek maleje wraz ze wzrostem stężenia soli. Wysalanie jako proces polegający na „odwadnianiu” cząsteczek białek i wytrąceniu ich z roztworu w postaci osadu, wymaga odpowiedniego czasu działania soli o większym niż białka powinowactwie do wody. Konieczne też jest oddzielenie wytrąconych białek przez sączenie lub wirowanie, oraz usunięcie wysalającej soli, na przykład przez dializę. Przeważnie wysalanie nie zmienia właściwości biologicznych białek. Najczęściej wysolenie prowadzi się w obecności takich soli jak: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NaCl, MgSO_4 (jony tych soli silniej niż cząsteczki białka oddziałują z cząsteczkami wody – w wyniku czego są one zdolne do

niszczenia otoczki hydratacyjnej stabilizującej białko). Na rozpuszczalność białek w wodzie ma także wpływ temperatura, przy której przeprowadza się wysalanie. Dodanie rozpuszczalnika podczas wysalania spowoduje przejście białka w stan koloidu, czyli peptyzację.

Innym procesem jest denaturacja białka, czyli nieodwracalny proces polegający na niszczeniu przestrzennej struktury (II, III, i IV -rzędowej) białek pod wpływem czynników fizycznych i chemicznych. Do czynników fizycznych zaliczamy: ogrzewanie, silne mieszanie, wytrząsanie, promieniowanie nadfioletowe, rentgenowskie i jonizujące lub działanie ultradźwiękami. Natomiast denaturacja chemiczna zachodzi w obecności mocznika, chlorku guanidyny, na skutek działania kwasów, zasad czy soli metali ciężkich. Wszystkie te czynniki powodują rozerwanie wiązań wodorowych, jonowych, mostków disiarczkowych, czyli niszczą te wiązania, które stabilizują przestrzenną strukturę łańcuchów polipeptydowych.

Wykonanie ćwiczenia

1. Przygotowanie roztworu białka jaja kurzego

Oddzielić białko od żółtka, a następnie pobrać 2 ml białka i dobrze wymieszać (nie wytrząsać) z 18 ml wody. Można w tym celu użyć bagietki. Uzyskany roztwór zawiesiny koloidalnej podzielić na dwie części (jedna wykorzystana będzie w punkcie 2 (wysalanie białka), a druga w punkcie 4 (denaturacja).

2. Wysalanie białka

Naważyć 3,9 g stałego siarczanu amonowego $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ i dodawać go małymi porcjami do 10 ml roztworu białka uzyskanego w poprzednim punkcie. Roztwór białka powinien być stale mieszany. Dodanie całej ilości soli powinno spowodować strącenie białka, w wyniku 60 % wysycenia siarczanem amonu.

Powstały w wyniku wysalania, zmętniały roztwór podzielić na dwie równe części (po 5 ml każda) i przenieść je do osobnych probówek wirówkowych. Probówki umieścić w uprzednio schłodzonej wirówce K-24 i odwirować przy obrotach 14 000 rpm (obrotów na minutę – *rotate per minute*) przez 10 minut. Należy pamiętać, że probówki w rotorze wirówki powinny być ustawione naprzeciw siebie - równomierne obciążenie wirówki.

Znad uzyskanego osadu, należy zlać ostrożnie supernatant (przechylając probówkę). Pozostały na dnie probówki osad zawiesić w wodzie destylowanej (po 5 ml do każdej z probówek). Zawieszając osad należy mechanicznie (przy pomocy końcówki pipety automatycznej) oddzielić od ścianki probówki poprzez wielokrotne zaciąganie i wypuszczanie płynu z końcówki pipety. Zaleca się prowadzić zawieszanie w 1 ml wody – ciągle

zaciągając/wypuszczając płyn, starając się przy tym unikać spienienia roztworu (dobrym sposobem na uniknięcie pienienia jest „wypuszczanie” płynu wciskając tłoczek pipety tylko do pierwszego oporu). Dopiero po całkowitym rozpuszczeniu osadu (brak widocznych „grudek”) dodajemy 4 ml wody i kilkakrotnie jeszcze zaciągamy płyn aż do uzyskania homogenicznego roztworu.

Uzyskane z dwóch próbek roztwory białek połączyć ze sobą i przenieść ostrożnie do przygotowanego wcześniej worka dializacyjnego (najlepiej za pomocą pipety automatycznej).

3. Dializa roztworu (koloidalnego) białka

Woreczki dializacyjne, które zostały uprzednio przygotowane do dializy, należy wyciągnąć z wody (z dodatkiem substancji konserwującej) i ściskając palcami usunąć z nich płyn. Jeden koniec woreczka składamy kilkakrotnie „w harmonijkę”, tak aby szczelnie zamknąć wylot i za pomocą gumki recepturkowej mocujemy do niego korek (np. gumowy). Osoba prowadząca zajęcia powinna zademonstrować, jak należy prawidłowo przygotować woreczek, aby był on szczelny. Do tak przygotowanego woreczka wprowadzamy roztwór białka uzyskany w poprzednim punkcie. Z niewypełnionej części woreczka usunąć powietrze ściskając delikatnie woreczek nad płynem. Następnie w podobny sposób jak wcześniej zamknąć drugi koniec woreczka i zamocować drugi korek (np. wykonany z korka/drewna). **(UWAGA: woreczek powinien posiadać 2 różne korki na swoich końcach: gumowy i drewniany).**

Do wysokiej zlewki wlać wody destylowanej, tak aby wypełniona ona była przynajmniej do 80 % wysokości (Zaleca się użycie zlewek o pojemności powyżej 1 litra). Umieścić w wodzie czujnik konduktometryczny i odczytać przewodnictwo czystej wody. Zlewkę umieścić na mieszadle magnetycznym – roztwór powinien być mieszany cały czas.

Następnie woreczek z roztworem białka wkładamy do zlewki z wodą i przez kilka minut oceniamy zmianę przewodnictwa wody. Na podstawie zmian przewodnictwa elektrycznego wody wyciągnąć wniosek o procesach zachodzących podczas dializy.

4. Denaturacja białka

Przygotować 4 próbówki, do których należy dodać po 2 cm³ roztworu białka, uzyskanego w podpunkcie 1. Do pierwszej próbówki dodać 5-8 kropli 1% roztworu CuSO₄, do drugiej 5-6 kropli 1% roztworu FeCl₃, do trzeciej 5-8 kropli 20 % kwasu sulfosalicylowego (lub 2 ml 10 % roztworu kwasu trichlorooctowego (TCA)), a czwartą wstawić do gorącej łaźni wodnej i ogrzewać przez ok. 10-20 minut. Na koniec do każdej z próbek dodać po 6 cm³ wody destylowanej i wstrząsnąć. Zapisać obserwacje i wnioski.