

CIACHOVANIE VIZUÁLNEHO PRÍSTROJA NA MERANIE INTENZITY
ROZPTÝLENÉHO SVETLA

FRANTIŠEK SOKOL

Virologický ústav Československej akadémie vied v Bratislave

Prístroje na meranie intenzity rozptýleného svetla treba pred vlastnými meraniami dôkladne overiť. Ciachovanie môže byť absolútne* alebo relatívne. Pri relatívnom ciachovaní používame látky o známych fyzikálnych vlastnostiach, ktoré si zo získaných rozptylových údajov spätne overujeme. V tejto práci opíšeme niektoré jednoduché spôsoby kontroly justácie rozptylového prístroja pomocou dobre definovaných, všeobecne prístupných štandardov.

Materiál a metódy

Polystyrénový latex

Používali sme polystyrénový latex LS-040-A (Dow Chemical Company, Midland, Michigan, USA) v deionizovanej vode. Podľa údajov dodávateľa obsahoval latex okrem častíc polystyrénu aj emulgátory, zvyšky katalyzátorov a soli z tlmivých roztokov. Celkový obsah tuhých látok v latexe bol 10,8 %. Priemerná veľkosť častíc polystyrénu stanovená dodávateľom bola $880 \pm 80 \text{ \AA}$ (počet meraných častíc 1164) a ich špecifická váha 1,05 g/ml. Molekulová váha M polystyrénu počítaná na základe sférického modelu podľa vzťahu

$$M = 4 \cdot \pi \cdot r^3 \cdot N / 3 \cdot v_0 \quad (a)$$

(r = polomer polystyrénovej častice, N = Avogadrovo číslo, v_0 = špecifický objem) je $4,88 \cdot 10^7$.

Sírouhlíkový štandard

Ako rozptylový štandard používame sírouhlík. Sírouhlík p. a. čistíme chemicky a rektifikáciou podľa Pestemera [2], načo ho trikrát predestilujeme za utajeného varu, aby sme ho zbavili prachu. Hodnotu $44,2 \cdot 10^{-6}$ berieme za jeho Rayleighovu konštantu**. Uchováваме ho v tme a po 2 mesiacoch pripravujeme čerstvý.

Konský sérumalbumín

Používali sme konský sérumalbumín viackrát kryštalovaný síranom amónnym. Albumín bol vo fosfátovom tlmivom roztoku*** o pH 7,70 elektroforeticky homogénny. V analytickej ultracentrifúge v acetátovom tlmivom roztoku o pH 5,25 a iónovej sile 0,04 bolo pozorovateľné tak isto len jedno maximum o sedimentačnej konštante $s_{20} = 4,39 \text{ S}$ pri koncentrácii 10^{-2} g/ml .

* Krátky prehľad o metódach absolútneho ciachovania podávajú Doty a Edsall [1].

** Redukovaná intenzita svetla rozptýleného sírouhlíkovým štandardom pod uhlom 90° vo vakuovitej kyvete bez aplikácie korekčných faktorov.

*** Koncentrácia fosfátu v tlmivom roztoku bola 0,02 M, koncentrácia NaCl 0,15 M.

Vírus tabakovej mozaiky

Vírus sme pripravili zo zmrazených listov prirodzene infikovaného tabaku. Normálne bielkoviny z tabakových listov prítomné v surovej šťave sme najprv zrazili pri pH 4,6 [3], načo sme ich spolu s ostatnými balastnými látkami odstránili nízkoobrátkovým odstredením. Vírus prítomný v tekutine nad sedimentom sme vyzrážali pri pH 3,3, zrazeninu sme oddelili odstredením a suspendovali vo vodovodnej vode. Suspenziu sme pri +5 °C dialyzovali dva dni proti vodovodnej a dva dni proti destilovanej vode. V priebehu dialýzy sa vírus rozpustil. Nepatrné množstvo nerozpustných látok sme oddelili odstredením. Vírus sme ďalej čistili dvojnásobným sedimentovaním pri 70 000 g po dobu 90 minút. Jeho roztok v destilovanej vode sme potom zmrazili a roztavili a vyzrážané balastné bielkoviny sme oddelili nízkoobrátkovým odstredením. Nakoniec sme ho ešte raz sedimentovali pri 70 000 g po dobu 90 minút, sediment sme rozpustili v destilovanej vode a roztok sme odstredením vyčírili. Konečný roztok vírusu obsahoval 1,73 mg N/ml. Udržovali sme ho 7 týždňov v chladničke pri +1 °C, než sme ho použili na rozptylové merania.

Stanovenie koncentrácie

Koncentráciu konského sérumalbumínu a vírusu tabakovej mozaiky sme určovali na základe obsahu dusíka vo vzorkách, stanoveného mikrometódou podľa Kjeldahla. Prepočítavací faktor z obsahu dusíka na obsah albumínu je 6,25, kým na obsah vírusu 6,024 ([4], str. 185). Relatívnu koncentráciu vírusu v jednotlivých roztokoch sme kontrolovali aj meraním extinkcie pri 2620 Å na ultrafialovom absorpčnom fotometri „Uncam“.

Elektroforéza

Elektroforézu sme uskutočňovali na Tiseliovom elektroforetickom prístroji „Meopta“.

Ultracentrifugácia

Čistotu a sedimentačnú konštantu konského sérumalbumínu sme určovali na analytickej ultracentrifúge „Phywe“.

Elektrónová mikroskopia

Elektrónové mikrofotografie boli zhotovené mikroskopom Siegbahn-Schönander. Preparáty sa tienili chrómom. Zväčšenie mikroskopu sa kalibrovalo štandardným polystyrénovým latexom, odtlačkom mriežky (576 čiar na 1 mm) a priamym meraním otvorov v sieťke svetelným a elektrónovým mikroskopom. Maximálny rozdiel medzi zväčšovacími faktormi stanovenými jednotlivými metódami bol niečo nad 10 %.

Rozptylové merania

Rozptylové merania sme robili na vizuálnom prístroji vlastnej konštrukcie [5] pri vlnovej dĺžke svetla 547 mμ. Používali sme valcovité kyvety o priemere 40 mm so zábrusovým vrchnáčikom. Objem rozptyľujúceho roztoku bol 20—22 ml. Základný roztok albumínu sme čistili najprv nízkoobrátkovým odstredením a potom trojnásobnou pretlakovou filtráciou cez sklený frit G5 (Schott, Jena) v zábrusovej aparatúre. Základné roztoky vírusu a polystyrénového latexu sme čistili odstredovaním. Pri výpočtoch sme aplikovali len korekčný faktor na rozdielnosť indexu lomu rozptyľujúceho prostredia a prostredia detektora, ktorý sa v našom usporiadaní rovná n , t. j. indexu lomu roztoku pri 547 mμ.

Odstredovanie

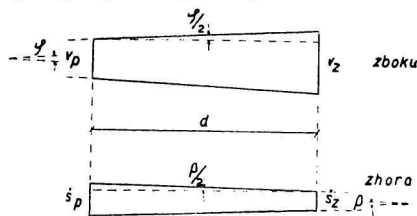
Nízkoobrátkové odstredovanie sme uskutočňovali na uhlovej odstredivke MSE, odprašovanie na uhlovej odstredivke Janetzki. Vírus sme sedimentovali na preparačnej supercentrifúge LKB.

Meranie rozdielu indexu lomu

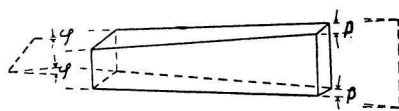
Rozdiel indexu lomu medzi roztokom a rozpúšťadlom sme merali na laboratórnom interferometri Zeiss pri 546 m μ *. Inkrement indexu lomu sme stanovili ako podiel rozdielu indexu lomu a príslušnej koncentrácie.

Experimentálna časť**Prechod zväzku lúčov prostredím kyvety**

Dokonale kolimovať sa dajú len lúče vychádzajúce z bodového zdroja svetla. Pri našom prístroji táto požiadavka nebola splnená, a preto sme prihliadali aspoň na to, aby prechod zväzku lúčov prostredím valcovitej kyvety o priemere 40 mm sa čo najviac približoval podmienkam ideálnej kolimácie. V našom usporiadaní prechádza zväzok lúčov prostredím kyvety tak, že v pohľade zhora sa zbieha pod uhlom β a v pohľade zboku sa rozbieha pod uhlom φ , ako je to schematicky znázornené na obr. 1. Uhly β a φ , ktoré sú mierou dokonalosti kolimácie, sme na základe jednoduchých geometrických vzťahov vypočítali zo známeho priemeru kyvety a z rozmerov obrazov obdĺžnikovej výstupnej štrbiny zdroja svetla na vstupnej a výstupnej stene valcovitej kyvety. Keďže spôsob prechodu zväzku lúčov prostredím kyvety závisí aj od indexu lomu prostredia, uhly β a φ sme určili osobitne pre destilovanú vodu a osobitne pre sírouhlík**. Kyvetu naplnenú rozptyľujúcou tekutinou sme obtočili fotografickým papierom; fotografovali sme obraz výstupnej štrbiny zdroja svetla na vstupnej a výstupnej stene kyvety a zmerali sme ich



Obr. 1. Prechod lúčov zdroja svetla prostredím vo valcovitej kyvete.



Obr. 2. Geometrické znázornenie rozptyľujúceho prostredia vo valcovitej kyvete, osvetleného lúčmi zdroja svetla.

rozmary. Obraz výstupnej štrbiny mal na vstupnej stene kyvety rozmery 7,50 $\times$ 5,75 mm***, kým na výstupnej stene 11,60 $\times$ 3,50 mm pre destilovanú vodu a 11,80 $\times$ 2,50 mm pre sírouhlík. Keďže povrchy valca vymedzené zväzkom lúčov sa dajú aproximovať, bez toho, že by sme sa dopustili znateľnej chyby****, obdĺžnikmi, možno uhol β a φ vy-

* Polychromatické svetlo používané pri tomto prístroji je ekvivalentné svetlu o vlnovej dĺžke 546 m μ . (Oznámenie firmy C. Zeiss, Jena.)

** V našom laboratóriu meriame prevažne intenzitu svetla rozptýleného vodnými makromolekulovými roztokmi a sírouhlíkovým štandardom.

*** Prvý rozmer je výška.

**** Vyplýva to z geometrie kruhového výseku pri daných podmienkach.

počítať z geometrie osemstena vzniknutého zrezaním štvorstena dvoma rovinami kolmými na os štvorstena (obr. 2). Ak je priemer kyvety d , výška obrazu výstupnej štrbiny na vstupnej stene kyvety v_p , na výstupnej stene v_z , ako aj analogicky šírka výstupnej štrbiny δ_p a δ_z , hodnoty uhlov φ a β dostaneme z výrazov:

$$\varphi = 2 \cdot \arctg \frac{v_z - v_p}{2 \cdot d} \quad (b)$$

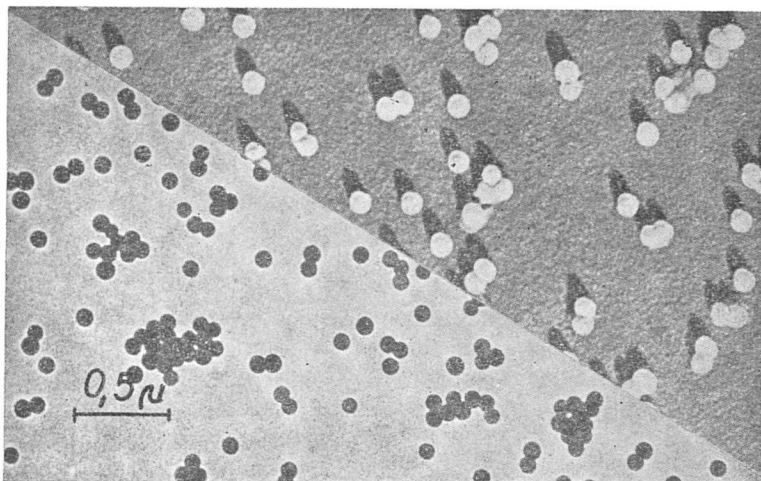
$$\beta = 2 \cdot \arctg \frac{\delta_p - \delta_z}{2 \cdot d} \quad (c)$$

V našom usporiadaní $\varphi = 5^\circ 52'$ a $\beta = 3^\circ 14'$ pre destilovanú vodu. Pre sírouhlík $\varphi = 6^\circ 10'$ a $\beta = 4^\circ 40'$.

Kontrola uhlovej justácie prístroja

Stanovenie veľkosti polystyrénových častíc

Uhlovú justáciu nášho prístroja sme kontrolovali zmeraním disymetrií roztokov štandardného polystyrénového latexu LS-040-A. Ako vidieť z elektrónovej mikrofotografie (obr. 3), častice polystyrénu majú tvar gule. Priemer nepokovených polystyrénových



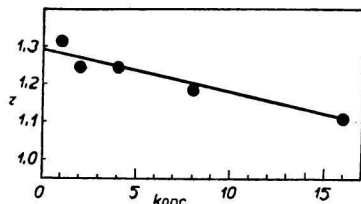
Obr. 3. Elektrónová mikrofotografia polystyrénového latexu LS-040-A. V hornej pravej polovici obrazu latexové častice pokovené chrómom, v dolnej ľavej polovici nepokovené. Zväčšenie 31 800 krát.

vých častíc určený z elektrónovej mikrofotografie je 916 ± 53 Å (počet meraných častíc 607), kým pokovených je 1225 ± 38 Å (počet meraných častíc 110). Distribúcia veľkosti latexových častíc je taká malá, že vzorku latexu možno považovať prakticky za monodisperznú. Základný roztok pre rozptylové merania sme pripravili zriedením 0,2 ml pôvodnej suspenzie latexu 45 ml destilovanej vody. Za účelom odstránenia prachových

častíc sme roztok odstreďovali 90 minút pri 10 000 g, načo sme ho pipetou premytou acetónom filtrovaným trikrát cez frit G4 (Schott, Jena) a chránenou zábrusovým puzdrom preniesli do rozptylovej kyvety. Základný roztok obsahoval asi $4,4 \cdot 10^{-4}$ g/ml polystyrénu. Roztoky o nižšej koncentrácii sme pripravovali postupným riedením základného roztoku v pomere 1 : 1 destilovanou vodou filtrovanou trikrát cez frit G5 pretlakovou filtráciou v zábrusovej aparátúre. Zmerali sme intenzitu svetla rozptýleného jednotlivými roztokmi pri uhloch 45° a 135° . Disymetriu z sme počítali ako podiel týchto dvoch veličín, pričom sme zanedbali rozptyl rozpúšťadla. Vnútorňú disymetriu

$$[z] = \lim_{c \rightarrow 0} z \quad (d)$$

sme určili extrapoláciou hodnôt z na nulovú koncentráciu (obr. 4). Neznalosť absolútnej koncentrácie polystyrénu nie je na závalu, lebo sme pracovali metódou známeho zriadenia. Výsledky meraní sú zhrnuté v tab. 1, pričom v poslednom riadku tabuľky je uvedená extrapolovaná hodnota disymetrie.



Obr. 4. Závislosť disymetrie od koncentrácie polystyrénového latexu. Koncentrácia vyjadrená v relatívnych hodnotách.

Tabuľka 1

Polystyrénový latex. Závislosť disymetrie od koncentrácie

Číslo	Relatívna koncentrácia	z
1	16	1,106
2	8	1,185
3	4	1,249
4	2	1,247
5	1	1,314
6	—	1,297

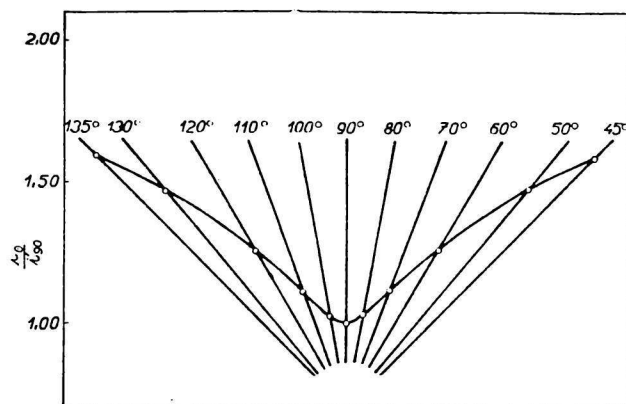
Z obr. 4 vidieť, že namerané hodnoty ležia v rámci experimentálnych chýb na priamke. Hodnota vnútornej disymetrie, počítaná metódou najmenších štvorcov, je 1,297. Na základe vzťahu medzi disymetrickým faktorom rozptylu $P(\theta)$ pre sférické častice, uhlom pozorovania intenzity rozptýleného svetla θ , vlnovou dĺžkou rozptýleného svetla (vo vákuu, v centimetroch) λ_0 , indexom lomu rozpúšťadla n_0 a veľkosťou (priemerom) sférickej častice D [6]:

$$P(\theta) = \left[\frac{3}{x^3} \cdot (\sin x - x \cdot \cos x) \right]^2, \quad (e)$$

kde $x = k \cdot s \cdot D/2$, $k = 2 \cdot \pi \cdot n_0/\lambda_0$, $s = 2 \cdot \sin(\Theta/2)$, možno určiť vzťah medzi z a $D \cdot n_0/\lambda_0$. Pre $[z] = 1,297$ dostávame $D \cdot n_0/\lambda_0 = 0,211$ a $D = 866 \text{ Å}$.

Radiačná obálka sírouhlíkového štandardu

Radiačnú obálku sírouhlíka čisteného spomínaným spôsobom sme zmerali v obore $135^\circ\text{--}45^\circ$ (obr. 5). Správnosť uhlovej justácie nášho prístroja vyplýva z jej symetrie. Tre-

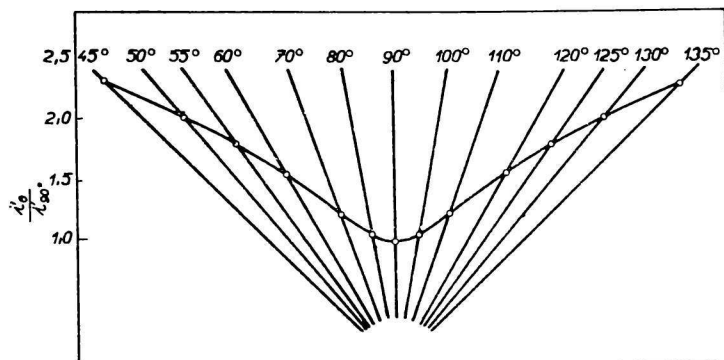


Obr. 5. Radiačná obálka sírouhlíkového rozptylového štandardu.

ba však poznamenať, že sírouhlík vykazuje pomerne značnú depolarizáciu pri uhle 90° [7], takže z experimentálnych výsledkov nie je možné určiť uhlový faktor redukcie osvetleného objemu na podmienky pri uhle 90° .

Radiačná obálka konského sérumalbumínu

Premerali sme radiačnú obálku roztoku konského sérumalbumínu v $0,154 \text{ M}$ roztoku NaCl o koncentrácii $5,78 \cdot 10^{-3} \text{ g/ml}$. Výsledky merania sú znázornené na obr. 6. Ako



Obr. 6. Radiačná obálka konského sérumalbumínu. Koncentrácia $5,78 \cdot 10^{-3} \text{ g/ml}$. Rozpúšťadlo: $0,154 \text{ M}$ roztok NaCl.

vidieť, radiačná obálka je symetrická, disymetria je 1,01. Na poradnici je nanášaný pomer pozorovanej intenzity svetla rozptýleného pri uhle 90° a pri uhle Θ bez odpočítania rozptylu rozpúšťadla.

Relatívna kalibrácia prístroja

Stanovenie molekulovej váhy konského sérumalbumínu

Keďže rozmer molekuly konského sérumalbumínu ([8], str. 520) je menší než $1/20$ vlnovej dĺžky monochromatického svetla, ktoré sme použili, prevrátená hodnota molekulovej váhy tejto látky bude daná výrazom

$$\frac{1}{M} = \lim_{c \rightarrow 0} \frac{K \cdot c}{R_{90}}, \quad (f)$$

kde c = koncentrácia albumínu v g/ml, R_{90} = redukovaná intenzita svetla rozptýleného pod uhlom 90° [1] a

$$K = \frac{2 \cdot \pi^2 \cdot n_0^2 \cdot (\partial n / \partial c)^2}{N \cdot \lambda_0^4}, \quad (g)$$

pričom $\partial n / c$ je inkrement indexu lomu albumínu pri danej vlnovej dĺžke použitého monochromatického svetla a ostatné symboly majú už spomínaný význam. Keďže nami stanovená hodnota inkrementu indexu lomu konského sérumalbumínu pri $546 \text{ m}\mu$ je 0,1858, konštanta K má hodnotu $2,24 \cdot 10^{-7}$.

Základný roztok pre rozptylové merania sme pripravili trojnásobnou filtráciou asi 1,5 %-ného roztoku albumínu v 0,154 M-NaCl cez sklený frit G5. Roztoky o nižšej koncentrácii sme pripravili postupným riedením základného roztoku v pomere 1 : 1 rozpúšťadlom filtrovaným trikrát cez sklený frit G5 tým istým spôsobom, ako sme to robili pri polystyrénovom latexe. Zmerali sme intenzitu svetla rozptýleného týmito roztokmi pri uhloch 135° , 90° a 45° . Rozptyl rozpúšťadla sme odpočítavali. Namerané hodnoty sme vzhľadom na rozptylový štandard prepočítali na redukované intenzity. Výsledky meraní zachycuje tab. 2. V druhom stĺpci tabuľky sú uvedené koncentrácie,

Tabuľka 2

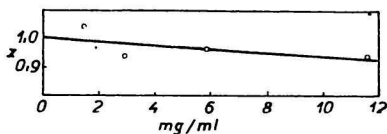
Konský sérumalbumín. Závislosť disymetrie a $K \cdot c / R_{90}$ od koncentrácie

Číslo	Koncentrácia $10^3 \cdot \text{g/ml}$	z	$\frac{10^5 \cdot K \cdot c}{R_{90}}$
1	11,57	0,941	1,573
2	5,78	0,964	1,548
3	2,89	0,940	1,526
4	1,45	1,045	1,446
5	—	1,007	1,467

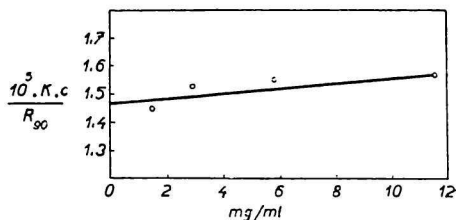
v treťom hodnoty disymetrie a v štvrtom hodnoty $K \cdot c / R_{90}$. V poslednom riadku sú hodnoty z a $K \cdot c / R_{90}$ extrapolované na nulovú koncentráciu.

Na obr. 7 je znázornená závislosť disymetrie od koncentrácie albumínu. Ako vidieť,

závislosť má v rámci experimentálnych chýb lineárny charakter. Hodnota vnútornej disymetrie, určená metódou najmenších štvorcov, je 1,007. Na obr. 8 je závislosť hodnôt



Obr. 7. Závislosť disymetrie roztokov konského sérumalbumínu od koncentrácie. Rozpúšťadlo: 0,154 M roztok NaCl.

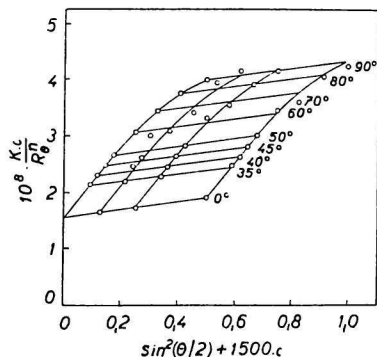


Obr. 8. Závislosť hodnôt $K \cdot c / R_{90}$ roztokov konského sérumalbumínu od koncentrácie. Rozpúšťadlo: 0,154 M roztok NaCl.

$K \cdot c / R_{90}$ od koncentrácie albumínu a je v rámci experimentálnych chýb tak isto lineárna. Prevrátená hodnota molekulovej váhy, počítaná metódou najmenších štvorcov, je $1,47 \cdot 10^{-5}$, z čoho $M = 68\,200$.

Určenie hrúbky vírusu tabakovej mozaiky zo stanovenej molekulovej váhy a dĺžky častíc

Základný roztok pre rozptyľové merania sme pripravili odstredovaním asi 0,03 % roztoku vírusu v destilovanej vode pri 10 000 g po dobu 120 minút, načo sme roztok preniesli pipetou odprášenou acetónom filtrovaným trikrát cez frit G4 a chránenou zábrusovým puzdrom do rozptyľovej kyvety. Roztoky o nižšej koncentrácii sme už opísaným spôsobom pripravili postupným riedením základného roztoku v pomere 1 : 1 destilovanou vodou filtrovanou trikrát cez frit G5. Zmerali sme intenzitu svetla rozptýleného týmito roztokmi v obore uhlov 35° — 135° . Rozptyľ rozpúšťadla sme odpočítavali. Namerané údaje sme korigovali na veľkosť rozptyľujúceho objemu vynásobením faktorom $\sin \Theta$ (pozri nasledujúci odsek). Potom sme zhotovili Zimmovu mriežku [9, 10] pre vírus, znázornenú na obr. 9. Keďže nameraná hodnota $\partial n / \partial c$ je pri vlnovej dĺžke svetla $546 \text{ m}\mu$ 0,163,



Obr. 9. Zimmova mriežka vírusu tabakovej mozaiky. Rozpúšťadlo: destilovaná voda.

konštanta $K = 1,72 \cdot 10^{-7}$. Váhový priemer molekulových váh (M_w) je daný prevrátenou hodnotou interceptu (b) Zimmovej mriežky, čiže výrazom

$$M_w = \frac{1}{b} = \lim_{\substack{c \rightarrow 0 \\ \Theta \rightarrow 0}} \frac{R_{\Theta}^n}{K \cdot c}, \quad (h)$$

kde R_{Θ}^n je redukovaná intenzita svetla rozptýleného pod uhlom Θ , delená polarizačným faktorom $1 + \cos^2\Theta$. Priemerná dĺžka paličkovitých vírusových častíc je daná vzťahom [10]

$$L = \frac{3 \cdot \lambda_0}{2 \cdot \pi \cdot n_0} \cdot \sqrt{\frac{m}{b}}, \quad (i)$$

pričom m je smernica limitnej tyčnice k Zimmovej mriežke, ktorá je určená výrazom

$$m = \lim_{\substack{c \rightarrow 0 \\ \Theta \rightarrow 0}} \frac{d(K \cdot c / R_{\Theta}^n)}{d[\sin^2(\Theta/2)]} \quad (j)$$

Pre L sme dostali hodnotu $395 \text{ m}\mu$. Dĺžka vírusových častíc určená zo Zimmovej mriežky je $\sqrt{z \cdot (z + 1)}$ priemerom, čiže

$$L = \sqrt{\frac{\sum n_i \cdot L_i^4}{\sum n_i \cdot L_i^2}}, \quad (k)$$

kde n_i je počet častíc patriacich do určitej kategórie dĺžok. Ak distribúcia dĺžok nie je príliš široká (kontrola elektrónovým mikroskopom), líši sa tento priemer od váhového priemeru len málo. Z nameranej molekulovej váhy a dĺžky môžeme potom s dostatočnou presnosťou určiť hrúbku vírusu, berúc hodnotu $0,73$ za jeho špecifický objem. Ak predpokladáme, že vírusová častica má tvar valca, jej hrúbka je $159 \text{ \AA}$. Ale ak predpokladáme, že základňou vírusovej častice je rovnostranný šesťuholník [11], dostávame pred dĺžku strany šesťuholníka hodnotu $87 \text{ \AA}$, ktorá je v dobrej zhode s údajmi uvádzanými v literatúre [12, 13].

Určenie uhlového faktora redukcie osvetleného objemu na podmienky pri 90°

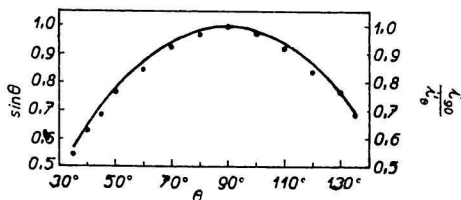
Intenzita rozptýleného svetla závisí okrem iného aj od veľkosti osvetleného objemu, z ktorého detektor zachytáva rozptýlené svetlo. Preto pri rozptylových meraniach treba prihliadať na to, že pri uhloch iných ako 90° pozorujeme svetlo rozptýlené väčším objemom meraného roztoku než pri 90° . Keďže pri výpočte hodnoty redukovanej intenzity svetla rozptýleného pod uhlom Θ

$$R_{\Theta} = i_{\Theta} \cdot r^2 / I_0 \quad (l)$$

(i_{Θ} = intenzita svetla rozptýleného pod uhlom Θ , I_0 = intenzita primárneho lúča, r = vzdialenosť stredu rozptyľujúceho objemu od detektora v cm) vzťahujeme namerané intenzity rozptýleného svetla na intenzitu svetla rozptýleného sírouhlíkom (alebo iným rozptylovým štandardom) pri 90° , treba osvetlený objem redukovať na podmienky pri 90° . Za účelom určenia redukčného faktora premerali sme intenzitu svetla emitovaného asi $0,02 \%$ roztokom fluoresceínu vo fosfátovom tlmivom roztoku (pH $7,00$, iónová sila

0,05) v obore uhlov $35\text{--}135^\circ$. Keďže intenzita svetla emitovaného fluoresceinovým roztokom závisí od veľkosti osvetleného objemu rovnako ako intenzita svetla rozptyľovaného makromolekulovým roztokom, redukčný faktor môžeme získať ako podiel intenzity pozorovanej pod uhlom 90° a pod uhlom Θ .

Na obr. 10 sú znázornené výsledky meraní. Ako vidieť, namerané hodnoty i'_{90}/i'_Θ (i'_Θ je pozorovaná intenzita rozptýleného svetla bez aplikácie korekčných faktorov)



Obr. 10. Porovnanie uhlového faktora redukcie osvetleného objemu na podmienky pri uhle 90° s krivkou $\sin\Theta$. Plné body: experimentálne namerané hodnoty i'_{90}/i'_Θ .

ležia v rámci experimentálnych chýb na krivke $f(\Theta) = \sin\Theta$. Veľkosť pozorovaného osvetleného objemu redukujeme preto v našom usporiadaní na podmienky pri 90° vynásobením príslušnej intenzity faktorom $\sin\Theta$.

Redukčný faktor môžeme určiť aj premeraním radiačnej obálky roztoku makromolekulovej látky, ktorá má disymetriu $z = 1$ (pozri obr. 6, radiačná obálka konského sérumalbumínu). Redukčný faktor f_Θ je v tomto prípade určený výrazom

$$f_\Theta = (i'_{90}/i'_\Theta) \cdot (1 + \cos^2\Theta) \quad (m)$$

Diskusia

Zbiehavosť lúčov zdroja svetla vo vodorovnej rovine a samozrejme aj konečný rozmer šírky vstupnej štrbiny fotometra má za následok, že pri meraniach nepozorujeme intenzitu svetla rozptýleného prísne pod uhlom Θ , ale efektívnu intenzitu v obore uhlov $\Theta_2 = \Theta + \Delta\Theta$ a $\Theta_1 = \Theta - \Delta\Theta$. V dôsledku toho bude pozorovaná intenzita rozptýleného svetla vyššia než teoreticky očakávaná. Odechýlku od teoretickej hodnoty možno jednoducho vyhodnotiť, ak uvažujeme roztok izotropných makromolekúl, ktoré sú menšie než $1/20$ vlnovej dĺžky použitého monochromatického svetla, a ak predpokladáme, že interakčná konštanta sa rovná nule. Ak všetky faktory určujúce pozorovanú intenzitu rozptýleného svetla, okrem faktorov uhlových, udržujeme konštantné, teoreticky očakávaná pozorovaná intenzita svetla rozptýleného pod uhlom Θ bude daná výrazom

$$i'_\Theta = C \cdot (1 + \cos^2\Theta) / \sin\Theta, \quad (n)$$

kde C = konštanta, $1 + \cos^2\Theta$ = faktor určujúci závislosť intenzity rozptýleného svetla od uhla pozorovania, $\sin\Theta$ = faktor vystihujúci zväčšenie

pozorovaného osvetleného objemu vzhľadom na podmienky pri uhle 90° . Efektívna pozorovaná intenzita svetla rozptýleného pod uhlom Θ bude však

$$i'_{\Theta \text{ef}} = \frac{C}{\Theta_2 - \Theta_1} \cdot \int_{\Theta_1}^{\Theta_2} \frac{1 + \cos^2 \Theta}{\sin \Theta} \cdot d\Theta \quad (o)$$

Po jednoduchšej úprave sa uvedený integrál dá rozložiť na integrály typu

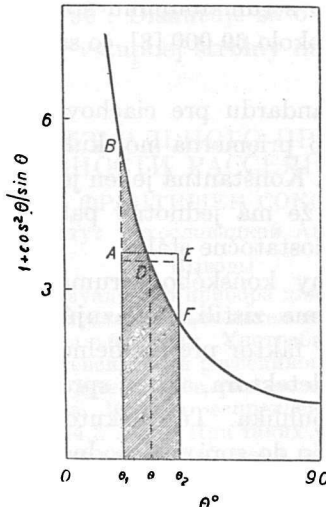
$$\int d\Theta / \sin \Theta \quad \text{a} \quad \int \sin \Theta \cdot d\Theta,$$

z ktorých druhý patrí medzi základné vzťahy integrálneho počtu a prvý možno riešiť substitúciou $\sin(\Theta/2) = x$ a rozkladom na parciálne zlomky. Máme potom

$$i'_{\Theta \text{ef}} = \frac{C}{\Theta_2 - \Theta_1} \cdot \left[2 \cdot \ln \frac{\operatorname{tg}(\Theta_2/2)}{\operatorname{tg}(\Theta_1/2)} + \cos \Theta_2 - \cos \Theta_1 \right] \quad (p)$$

V našom usporiadaní, kde $\Delta\Theta$ je asi 2° , hodnota $i'_{\Theta \text{ef}}$ sa prakticky zhoduje s hodnotou i'_Θ , ak ide o makromolekulový roztok, ktorý nevykazuje dysymetriu a depolarizáciu. Len v prípade zlej kolimácie lúčov zdroja svetla, veľmi asymetrickej radiačnej obálky a nízkych uhlov pozorovania môže byť hodnota $i'_{\Theta \text{ef}}$ o toľko vyššia než i'_Θ , že treba zavádzať korekciu, aby sme sa vyhli vážnejším chybám pri meraniach.

Na obr. 11 je znázornená funkcia $f(\Theta) = (1 + \cos^2 \Theta) / \sin \Theta$ v intervale



Obr. 11. Geometrické znázornenie teoreticky očakávanej (i'_Θ) a efektívnej ($i'_{\Theta \text{ef}}$) pozorovanej intenzity rozptýleného svetla v obore uhlov Θ_1 až Θ_2 ; $C \cdot \overline{\Theta D} = i'_\Theta$; $C \cdot \overline{\Theta E} = i'_{\Theta \text{ef}}$; $C = \text{konšt.}$; $\Theta = (\Theta_1 + \Theta_2)/2$. Vyšrafovaná plocha pod krivkou v intervale $\langle \Theta_1, \Theta_2 \rangle$ sa rovná ploche obdĺžnika $\Theta_1 A E \Theta_2$ (vytiahnutá plnou čiarou).

$0^\circ < \Theta \leq 90^\circ$ a naznačený je rozdiel medzi efektívnou a teoreticky očakávanou hodnotou pozorovanej intenzity rozptýleného svetla.

Správna uhlová justácia rozptylového prístroja je nevyhnutným predpokladom presného merania intenzity rozptýleného svetla. Už napr. odchýlka 1° môže pri nízkych uhloch pozorovania a pri značne asymetrickej radiačnej obálke spôsobiť znateľné chyby. Správnosť uhlovej justácie potvrdzuje predovšetkým symetria radiačnej obálky kvapalinových rozptylových štandardov a roztokov makromolekúl, ktoré vykazujú disymetriu $z = 1$. Najvhodnejším spôsobom kontroly správneho uhlového justovania prístroja je zmeranie vnútornej disymetrie makromolekúl, ktoré majú jednotný známy tvar a pokiaľ možno malú distribúciu veľkosti. Pre tento účel sa výborne hodí polystyrénový latex, ktorý je homogénny čo do veľkosti častíc a má jednotný guľovitý tvar. Ich veľkosť možno metódou elektrónovej mikroskopie stanoviť dosť presne, ak sa premeria dostatočný počet častíc. Pre ciachovanie rozptylového prístroja najvhodnejší je latex, ktorý má častice o priemere 800—1000 Å. Rozmery príliš veľkých latexových častíc sa nedajú určiť z nameranej vnútornej disymetrie [1]. Polystyrénový latex, ktorý má vnútornú disymetriu $z = 1$, môže po zmeraní jeho turbidity na absorpčnom fotometri slúžiť ako rozptylový štandard [14]. Žiaľ, prítomnosť rozličných nízkomolekulových látok v latexe sťažuje stanovenie koncentrácie polystyrénu a tým aj jeho molekulovej váhy priamou rozptylovou metódou. Latex je pri nízkych teplotách nestály, a preto ho treba stále udržiavať pri teplote asi 20°C .

Molekulová váha konského sérumalbumínu stanovená rozličnými fyzikálnymi metódami sa pohybuje okolo 69 000 [8], čo sa dobre zhoduje s hodnotou, ktorú sme namerali.

Pri použití vírusu ako štandardu pre ciachovanie rozptylového prístroja si musíme uvedomiť, že jeho priemerná molekulová váha a dĺžka sa môžu meniť od prípravy k príprave. Konštantná je len jeho hrúbka. Výhodou vírusu tabakovej mozaiky však je, že má jednotný paličkovitý tvar, dá sa ľahko pripraviť v čistej forme a je dostatočne stály.

Hodnoty molekulovej váhy konského sérumalbumínu a hrúbky vírusu tabakovej mozaiky, ktoré sme zistili, dokazujú, že v našom usporiadaní používame správny korekčný faktor pre rozdielnosť indexu lomu rozptyľujúceho prostredia a prostredia detektora, ako aj správnu hodnotu nekorigovanej Rayleighovej konštanty sírouhlika. Túto skutočnosť zdôrazňujeme preto, lebo panuje značná neistota čo do správnej hodnoty Rayleighových konštánt tekutinových rozptylových štandardov, ako aj korekčného faktora pre rozdielnosť indexu lomu prostredia detektora a rozptyľujúcej látky [15, 16].

Znalosť uhlového faktora redukcie osvetleného objemu na podmienky pri uhle 90° je potrebná, ak chceme pozorované intenzity svetla rozptýleného pod uhlom Θ prepočítať na redukované intenzity, ako je to napr. pri Zimmovej

extrapolačnej metóde [9, 10]. Premeranie intenzity svetla emitovaného fluoresceínovým roztokom pod rozličnými uhlami pri osvetlení zeleným svetlom je najvhodnejšou metódou na stanovenie tohto redukčného faktora, i keď si treba uvedomiť, že v našom usporiadaní nie je emitované svetlo prísne monochromatické. Fluoresceínový roztok vysiela totiž pri ožiarení svetlom o vlnovej dĺžke 547 mμ aj svetlo o inej vlnovej dĺžke.

Ďakujem inž. V. Bystrickému z nášho ústavu za zhotovenie a vyhodnotenie elektrónových mikrofotografií a inž. L. Hegedúsovi z „MTA méréstani és műszerügyi intézete, elektronmikroszkóp laboratórium“ v Budapešti za vykonanie meraní na analytickej ultra-centrifúge.

Súhrn

Opisuje sa justácia a kalibrácia vizuálneho rozptylového prístroja štandardným polystyrénovým latexom, purifikátom vírusu tabakovej mozaiky a konškým sérumalbumínom. Používali sa valcovité rozptylové kvety. Pozorované intenzity rozptýleného svetla sa na rozdielnosť indexu lomu prostredia detektora a rozptyľujúceho roztoku korigovali vynásobením indexom lomu roztoku. Za nekorigovanú Rayleighovu konštantu sírouhlíka sa brala hodnota $44,2 \cdot 10^{-6}$. Za týchto podmienok sa získali správne hodnoty pre molekulovú váhu sérumalbumínu, ako aj pre hrúbku vírusu. Veľkosť polystyrénových častíc stanovená metódou elektrónovej mikroskopie je v dobrej zhode s hodnotami získanými z rozptylových údajov.

Opisuje sa i postup pri určovaní uhlového redukčného faktora osvetleného objemu na podmienky pri 90°. Diskutuje sa o vplyve nedokonalkej kolimácie a konečného rozmeru šírky vstupnej štrbiny na efektívnu pozorovanú intenzitu rozptýleného svetla.

КАЛИБРИРОВАНИЕ ВИЗУАЛЬНОГО ПРИБОРА ДЛЯ ИЗМЕРЕНИЯ ИНТЕНСИВНОСТИ РАССЕЯННОГО СВЕТА

ФРАНТИШЕК СОКОЛ

Вирусологический институт Чехословацкой Академии Наук в Братиславе

Выводы

Описано калибрование визуального прибора для измерения интенсивности рассеянного света стандартным полистироновым латексом, пурификатом вируса табачной мозаики и лошадиным сывальбумином. Употреблялись цилиндрические рассеивающие кюветы, наблюдаемые интенсивности рассеянного света исправлялись на разность индекса преломления среды детектора и рассеивающего раствора умножением на индекс преломления раствора. Как не исправленная константа Рейли (Rayleigh) сероуглерода взята величина $44,2 \cdot 10^{-6}$. При таких условиях были получены правильные величины для молекулярного веса альбумина, как и для толщины вируса. Размер полистироновых частиц определен методом электронной микроскопии находится в хорошем согласии с величинами полученными из данных рассеяния.

Тоже описан прием определения углового редуционного фактора освещенного объема на условия при 90°. Дискутируется о влиянии неполной коллимации и конечного размера ширины вступительной щели на эффективную наблюдаемую интенсивность рассеянного света.

Поступило в редакцию 17. 12. 1956 г.

EICHEN EINES VISUELLEN GERÄTES FÜR DIE MESSUNG DER INTENSITÄT DES ZERSTREUTEN LICHTS

FRANTIŠEK SOKOL

Virologisches Institut der Tschechoslowakischen Akademie der Wissenschaften
in Bratislava

Zusammenfassung

Der Autor beschreibt die Justierung und Kalibrierung eines visuellen Messgerätes für zerstreutes Licht mittels eines standardisierten Polystyrolatex, ferner eines Purifikats des Tabakmosaikvirus und eines Pferdeserumalbumins. Es wurden zylinderförmige Zerstreuungsküvetten verwendet und die beobachteten Intensitäten des zerstreuten Lichts wurden nach der Unterschiedlichkeit des Brechungsindex des Detektormilieus und der zerstreuen Lösung durch Multiplizieren mit dem Brechungsindex der Lösung korrigiert. Als nichtkorrigierte Rayleigh-Konstante des Schwefelkohlenstoffs wurde der Wert von $44,2 \cdot 10^{-6}$ genommen. Unter diesen Bedingungen wurden richtige Werte für das Molekulargewicht des Albumins erhalten, ebenso auch für die Dicke des Virus. Die Grösse der Polystyrolteilchen, die nach der Methode der Elektronenmikroskopie gemessen wurde, steht in guter Übereinstimmung mit den durch die Zerstreuungsangaben erhaltenen Werten.

Der Autor beschreibt auch das Verfahren bei der Bestimmung des Winkelreduktionsfaktors des beleuchteten Volumens für die Bedingungen bei einem Winkel von 90° . Es wird schliesslich über den Einfluss einer unvollständigen Kollimation und der endlichen Dimension der Breite des Eintrittspalts auf die beobachtete effektive Intensität des zerstreuten Lichts diskutiert.

In die Redaktion eingelangt den 17. 12. 1956

LITERATÚRA

1. Doty P., Edsall J. T., *Advances in Protein Chem.* 6, 35—121 (1951). —
2. Pestemer M., *Angew. Chem.* 63, 118—122 (1951). — 3. Commoner B., Basler E., jr., *Virology* 2, 477—495 (1956). — 4. Bawden F. C., *Plant viruses and virus diseases*, Waltham 1950. — 5. Sokol F., *Chem. zvesti* 10, 322—329 (1956). — 6. Doty P., Steiner R. F., *J. Chem. Phys.* 18, 1211—1220 (1950). — 7. Sedláček B., *Chem. listy* 47, 908—944 (1953). — 8. Cohn E. J., Edsall J. T., *Proteins, amino acids and peptides as ions and dipolar ions*, New York 1943. — 9. Zimm B. H., *J. Chem. Phys.* 16, 1093—1099 (1948). — 10. Zimm B. H., *J. Chem. Phys.* 16, 1099—1116 (1948).
11. Williams R. C., *Biochim. Biophys. Acta* 8, 227—244 (1952). — 12. Bernal J. D., Fankuchen I., *J. Gen. Physiol.* 25, 147—165 (1941). — 13. Sokol F., *Chem. zvesti* 11, 126—139 (1957). — 14. Oster G., Doty P. M., Zimm B. H., *J. Am. Chem. Soc.* 69, 1193—1197 (1947). — 15. Sedláček B., *Chem. listy* 47, 1591—1597 (1953). — 16. Carpenter D. K., Krigbaum W. R., *J. Chem. Phys.* 24, 1041—1048 (1956).

Došlo do redakcie 17. 12. 1956