

Versuch 9 b – Absorptionsspektroskopie, Beer-Lambert-Gesetz

Einleitung

Das Spektrophotometer ist ein wichtiges Hilfsmittel für den Lebenswissenschaftler. Wenn wir die molekularen Grundlagen biologischer Phänomene untersuchen, entfernen wir die subzellulären Komponenten (Organellen) aus den Zellen und trennen die vorhandenen Moleküle voneinander, sodass wir das Verhalten bestimmter Moleküle messen können. Wir können die Spektroskopie auch klinisch oder vor Ort einsetzen, um die Anwesenheit und Konzentration eines breiten Spektrums von Analyten in Proben wie Blut oder Wasser zu überwachen. Eines der Hauptinstrumente, mit denen wir diese Messungen durchführen, ist das UV-Vis-Spektrophotometer. Diese Instrumente sind empfindlich gegenüber ultravioletten und sichtbaren Lichtbereichen des elektromagnetischen Spektrums. Viele biologische Moleküle absorbieren sichtbares und ultraviolettes Licht bei bestimmten Wellenlängen, wobei der Hauptabsorptionspeak als λ_{\max} bekannt ist. Die Menge an absorbiertem Licht ist proportional zur Menge des vorhandenen spezifischen Moleküls. Wir können die Konzentration eines vorhandenen Moleküls bestimmen, indem wir die Menge an Licht messen, die eine Lösung enthält, die es absorbiert, und ein mathematisches Modell für die Beziehung zwischen absorbiertem Licht und vorhandener Konzentration verwenden (Beer Lambert-Gesetz).

$$\text{Absorption} = \epsilon c l$$

Woher,

Absorption = der Wert, den ein Spektrophotometer für die von der Lösung absorbierte Lichtmenge ergibt, gemessen bei λ_{\max} des Moleküls von Interesse.

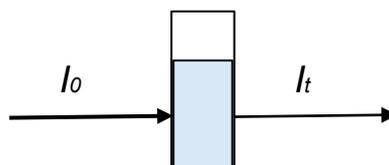
ϵ = der erwartete Spektrophotometer-Wert für 1 M Lösung des Moleküls von Interesse mit einer Weglänge von 1 cm (oft als molarer Absorptionskoeffizient bezeichnet) und mit Einheiten von $M^{-1}cm^{-1}$.

c = Konzentration des in der Lösung vorhandenen Moleküls von Interesse, gemessen in Moleinheiten (M).

l = die Länge des Lichtwegs durch die Lösung, gemessen (cm)

Die Absorption ist eine Messung ohne Einheit, da dies der Logarithmus des Verhältnisses zwischen der Intensität des durch die Probe durchgelassenen Lichts und der Intensität des auf die Probe einfallenden Lichts ist. Normalerweise geben wir dies als Absorption (Einheiten) an, um anzuzeigen, dass wir wissen, dass es ohne Einheiten ist.

$$\text{Absorption} = \log_{10}(I_t/I_0)$$



Bevor Sie den Versuch durchführen, sollten Sie diese Versuchsanleitung sorgfältig durchlesen. Entscheiden Sie, welche Meßwerte Sie benötigen, um alle erforderlichen Tabellen aufzuzeichnen und vorzubereiten, um sie während des Praktikums ausfüllen zu können.

Übungen

Es wurden drei separate Experimente durchgeführt, bei denen die Extinktion von Lösungen von ATP, NADH und NAD⁺ bei Wellenlängen von 220 bis 360 nm in Küvetten mit einem Lichtweg von 1 cm gemessen wurde. Die Ergebnisse sind in Abbildung 1 dargestellt.

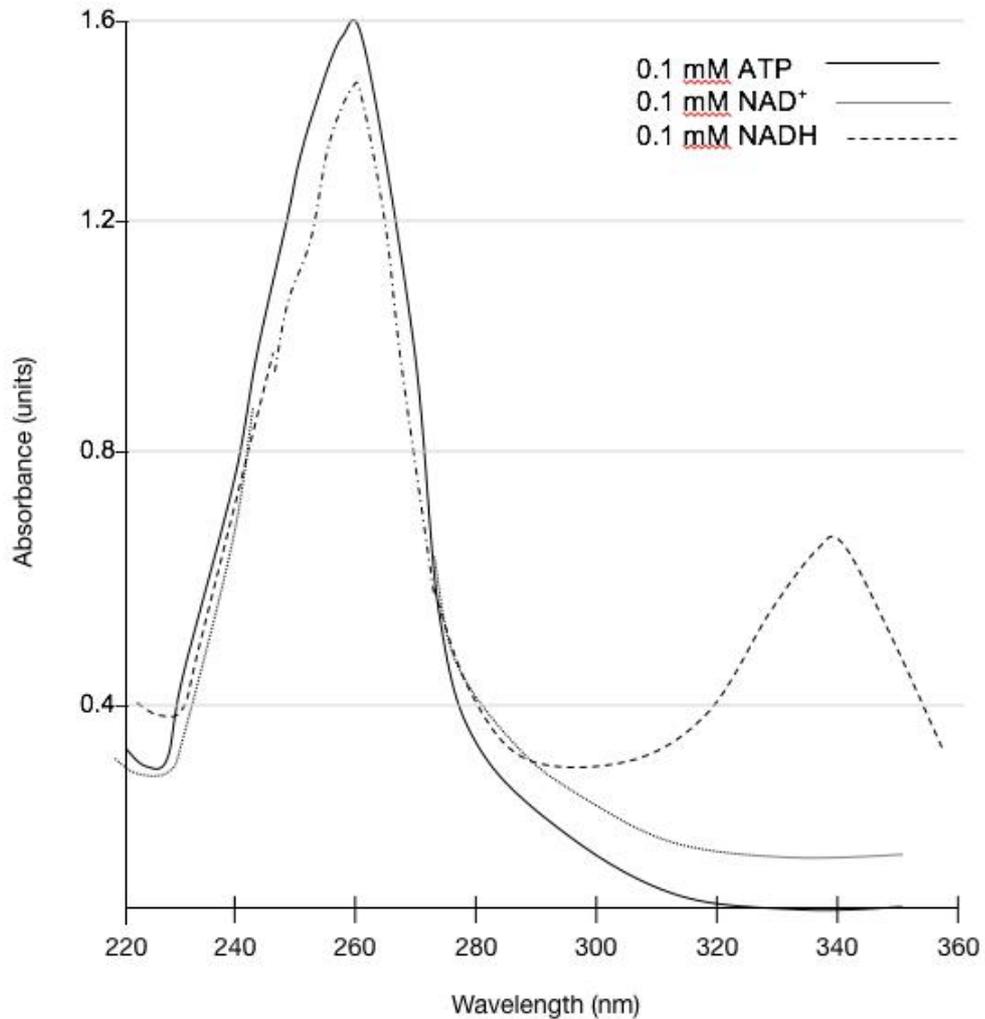


Abbildung 1: Absorption Spektre für ATP, NAD⁺ und NADH

1. Verwenden Sie Abbildung 1 und das Beer-Lambert-Gesetz, um den molaren Absorptionskoeffizienten von ATP, NAD⁺ und NADH zu berechnen (denken Sie daran, die Wellenlänge (λ) anzugeben, bei der dies zutrifft).

ATP

NAD⁺

NADH

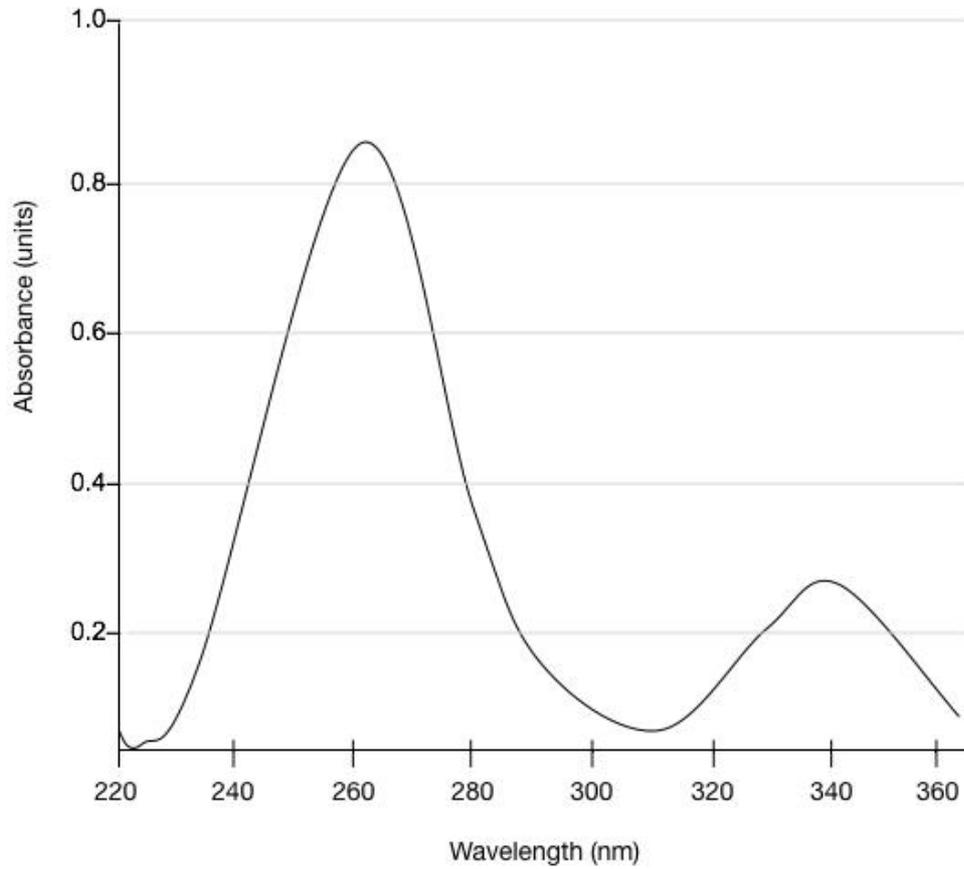


Abbildung 2: Ein Absorptionsspektrum einer Mischung aus ATP und NADH unter Verwendung eines Lichtpfads von 1 cm

2. Bestimmen Sie anhand der zuvor berechneten Absorptionskoeffizienten die molare Konzentration von ATP und NADH in dieser Mischung.

Hinweise zum Versuch

In diesem Versuch werden Sie das Spektrum einer Probe eines Häm-haltigen Proteins messen, untersuchen, unter welchen Bedingungen das Beer-Lambert-Gesetz gilt, und anhand dieser Informationen eine Kalibrierungskurve unter Verwendung bekannter Konzentrationsstandards erstellen. Zum Schluss bestimmen Sie die Konzentration von zwei Proben, die eine unbekannte Menge des Häm-haltigen Proteins enthalten.

Häm ist ein Kofaktor, der aufgrund seiner Fähigkeit, Oxidations- / Reduktionsreaktionen einzugehen, in vielen verschiedenen Proteinen verwendet wird. Eine der bekanntesten Verwendungen von Häm ist der sauerstoffbindende Cofaktor in Hämoglobin, das sauerstofftragende Protein, das in roten Blutkörperchen vorkommt.

Aufgrund seiner chemischen Struktur absorbiert Häm stark Licht im sichtbaren Bereich des Spektrums, meistens im blau / grünen Bereich, weshalb es eine rote Farbe hat.

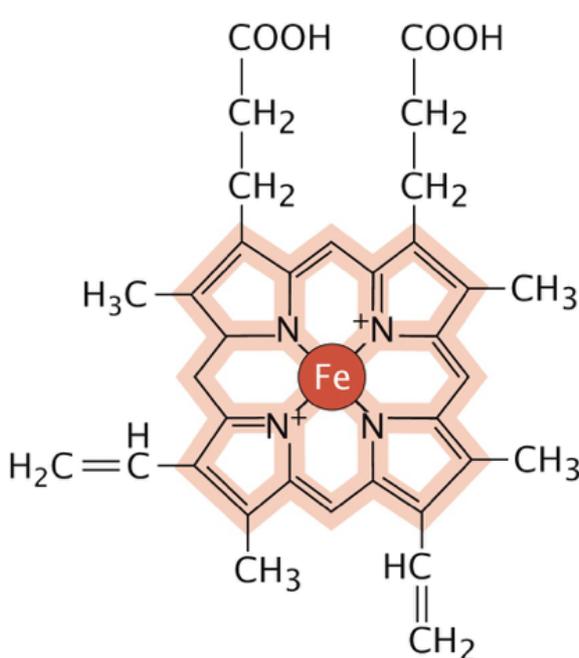


Figure 4.6a Physical Biology of the Cell, 2ed. (© Garland Science 2013)

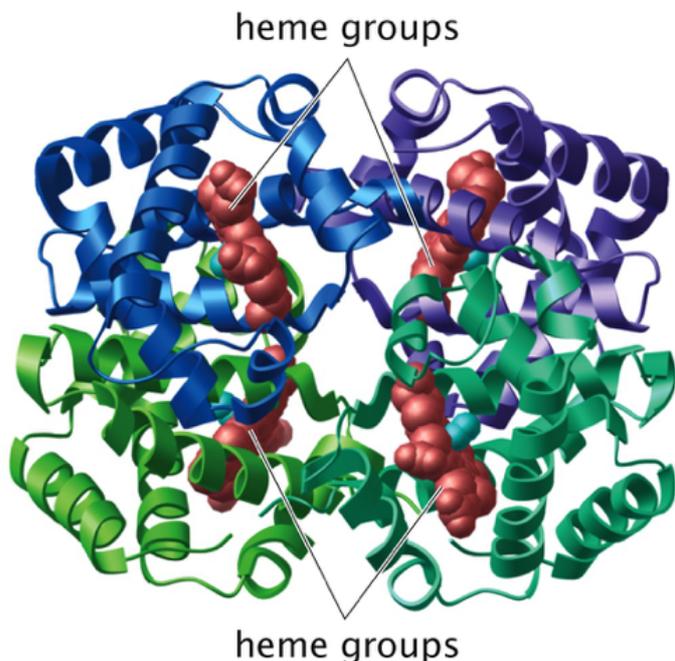


Figure 4.6b Physical Biology of the Cell, 2ed. (© Garland Science 2013)

(LINKS) chemische Struktur von Häm, wobei das konjugierte Bindungssystem hervorgehoben wird, über das Elektronen delokalisiert werden, was zu den charakteristischen Absorptionseigenschaften von sichtbarem Licht führt. (RECHTS) ein Sekundärstruktur-Cartoon, der die Struktur des Hämoglobins zeigt. Hämoglobin ist ein $\alpha_2\beta_2$ -Tetramer, das ein an jedes Monomer gebundenes Häm enthält. Die Proteinmonomere sind in blau, violett, hellgrün und dunkelgrün dargestellt und der Häm ist als raumfüllendes Modell rot dargestellt. (Abbildung von Physical Biology of the Cell, Garland Science).

Die Konzentration von Hämoglobin im Blut wird häufig in einer klinischen Umgebung als diagnostisches Instrument verwendet. Anämie ist ein Begriff, der zur Beschreibung des Zustands eines Patienten verwendet wird, dessen Fähigkeit, Blut zu transportieren, herabgesetzt ist und das Ergebnis eines Mangels an roten Blutkörperchen oder eines Mangels an Hämoglobin ist. Die Anzahl der roten Blutkörperchen kann durch Zählen unter einem Mikroskop quantifiziert werden, die Menge des Hämoglobins kann jedoch spektroskopisch quantifiziert werden. Bei einem gesunden Erwachsenen liegen die erwarteten Werte für Hämoglobin bei Männern bei 13,5-17,5 g/dl und bei Frauen bei 12,0-16,0 g/dL. Werte von weniger als 13-14 g/dl bei Männern und 12-13 g/dL bei Frauen weisen auf Anämie hin und lösen weitere Tests zur Diagnose der Ursache aus.

Im ersten Teil dieses Praktikums messen Sie die Extinktion einer Anzahl von Proben mit bekannter Hämkonzentration und erstellen daraus eine Kalibrierungskurve.

Versuchsdurchführung

1) Schalten Sie Ihr Spektrometer mit dem Netzschalter an der Seite ein. Die Bluetooth-LED oben sollte blinken. Starten Sie auf Ihrem iPad die SpectralAnalysis App. Klicken Sie im Startbildschirm der App auf „connect a spectrometer“. Stellen Sie sicher, dass Sie die richtige Spektrometernummer auswählen - die Nummer Ihres Spektrometers ist darauf geschrieben!

2) Wählen Sie nun die Experimentoption "Absorbance vs. Concentration (Beer's Law)". Die Spektrometerlampe beginnt sich aufzuwärmen. Warten Sie, bis dies abgeschlossen ist.

3) Wenn die Lampe aufgewärmt ist, müssen Sie das Spektrometer kalibrieren. Setzen Sie dazu eine Küvette mit Wasser in das Spektrometer ein.

HINWEIS 1: Die Küvetten haben zwei "klare" und zwei "raue" Seiten. Vermeiden Sie es, die freien Seiten mit den Fingern zu berühren, da Fingerflecken das Licht streuen und falsche Werte liefern. Halten Sie die Küvette stattdessen an den rauen Seiten.

HINWEIS 2: Stellen Sie sicher, dass Sie die Küvette in der richtigen Ausrichtung in das Spektrometer einsetzen. Die durchsichtigen Seiten sollten mit dem Pfeil auf der linken Seite des Küvettenhalters ausgerichtet sein.

Klicken Sie jetzt auf kalibrieren. Das Spektrometer misst das Signal vom Wasser, um es von den Probensignalen abzuziehen, die Sie in den nachfolgenden Schritten messen.

4) Nun bestimmen Sie die Wellenlänge, bei der Sie die Häm-Proteinkonzentration messen, das λ_{\max} . Die Software fordert Sie hier auf. Nehmen Sie das Wasser mit der Küvette heraus und setzen Sie jetzt eine Ihrer Küvetten mit bekannter Konzentration ein. Die Software zeichnet die Extinktion Ihrer Probe über einen breiten Wellenlängenbereich auf. Jetzt können Sie auf die Grafik tippen und die vor- und zurückgelegte Linie verschieben, um den höchsten Punkt des Peaks zu wählen, der bei 400 bis 420 nm liegt.

Was ist der λ_{\max} , den Sie wählen? Notieren Sie sich dies. Wenn Sie Ihre Wellenlänge ausgewählt haben, tippen Sie auf "Fertig".

5) Nun können Sie die Extinktionswerte Ihrer bekannten Proben messen, um die Kalibrierungskurve zu erstellen. Die Software zeigt diese Werte an und zeichnet sie für Sie auf. Sie sollten sie jedoch auch in Ihrem Laborbuch notieren, um sie später in Ihrem Bericht aufzuzeichnen. Im neuen Fenster der Software sehen Sie eine Grafik (in der Ihre Daten angezeigt werden). Daneben befindet sich eine Tabelle, in der Ihre Konzentrations- und Extinktionswerte aufgezeichnet werden. Unten rechts im Fenster wird der Echtzeitmesswert vom Spektrometer angezeigt. Zuerst müssen Sie sicherstellen, dass Sie Daten in den richtigen Einheiten aufzeichnen. Tippen Sie in der Tabelle auf das Feld "Konzentration" oben in der Tabelle. Ändern Sie die Einheiten hier in mg/ml.

6) Nun können Sie Daten aufnehmen. Jede Küvette, die eine bekannte Probe enthält, wird nacheinander in das Spektrometer gestellt. Warten Sie, bis sich der Messwert stabilisiert hat, und klicken Sie oben auf dem Bildschirm auf „keep“. Für jede Messung werden Sie aufgefordert, die Konzentration der Probe einzugeben. Stellen Sie sicher, dass Sie diese Werte auch in einer Tabelle in Ihrem Notizbuch notieren. Wenn Sie alle bekannten Proben gemessen haben, klicken Sie oben in der Grafik auf „Stop“, um den Vorgang abzuschließen. Die Software zeichnet automatisch eine Grafik Ihrer Daten. Sie können eine Linie anpassen, die am besten dazu passt, indem Sie auf die Schaltfläche „graph options“ in der unteren linken Ecke des Diagramms klicken und „apply curve fit“ wählen. Die Extinktion sollte linear mit der Konzentration variieren, daher sollten Sie eine lineare Anpassung wählen. Notieren Sie sich die Gleichung der Linie der besten Anpassung, die gezeichnet wird.

7) Lesen Sie nun die Absorptionen Ihrer zwei unbekannt konzentrierten Proben von Patient A (männlich) und Patient B (weiblich) ab. Verwenden Sie diese und die von Ihnen erstellte Kalibrierungskurve, um die Konzentration des Häm-Proteins in jeder der beiden Proben zu bestimmen.

Die beiden Patientenproben wurden zur Messung in diesem Experiment 5000 x verdünnt. Berechnen Sie die Konzentration des Hämproteins in den unverdünnten Proben. Sind die Patienten anämisch?

Ein nützliches Video, das Ihnen die Verwendung des GoVisPro-Spektrometers zeigt, finden Sie hier: <https://vnr.st/v252/>