

Absorptionsphotometrie

Eine der wichtigsten Methoden in der Biochemie ist die Absorptionsphotometrie. Sie erlaubt unter anderem die Bestimmung der Konzentrationen von Verbindungen, die Licht einer bestimmten Wellenlänge absorbieren. In der Biochemie liegen diese Verbindungen in der Regel als wäßrige, gepufferte Lösungen vor. Auch die Konzentrationen von Verbindungen, die selbst keine Absorption zeigen, können bestimmt werden, wenn sie mit geeigneten Reaktionen gekoppelt werden.

Die Bestimmungen erfolgen in Küvetten unterschiedlicher Größe. In der Biochemie verwendet man in der Regel Rechteckküvetten mit einer Schichtdicke von 10 mm. Als Material dient, in Abhängigkeit der Lage des Absorptionsmaximums, Spezialglas, Quarzglas oder Kunststoff. Im Praktikum werden aufgrund ihrer Robustheit Kunststoffküvetten verwendet.

Lambert-Beer'sches Gesetz

In einer Küvette der Schichtdicke d (in mm) sei die Lösung einer Substanz (Konzentration c), die bei einer bestimmten Wellenlänge λ absorbiert, enthalten. Aus einer Lichtquelle wird senkrecht zur Küvette monochromatisches Licht mit der konstanten Intensität I_0 eingestrahlt. Ein Teil des Lichtes wird absorbiert, so daß der Lichtstrahl nach Durchgang durch die Küvette noch die Intensität I zeigt. Diese Intensität kann gemessen werden. Man bezeichnet den Quotienten I/I_0 als Transmission T . Setzt man die Intensität des eingestrahltten Lichtes gleich 1, so wird dieser Quotient immer kleiner als 1 sein.

Der Logarithmus der reziproken Transmission wird als Extinktion E (im Englischen als absorbance A) bezeichnet.

$$E = \log \frac{1}{T} = \log \frac{I_0}{I} \quad (1)$$

Die Intensität des austretenden Lichtes, damit auch die Extinktion, ist weiterhin abhängig von

- der Schichtdicke d in mm
- der Konzentration c in mol/L
- und einer Stoffkonstanten, dem molaren dekadischen Extinktionskoeffizienten ϵ in $L \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{mm}^{-1}$

$$E = \epsilon \cdot c \cdot d \quad (2)$$

Bei bekanntem ϵ und der Schichtdicke d ist die Bestimmung von c möglich:

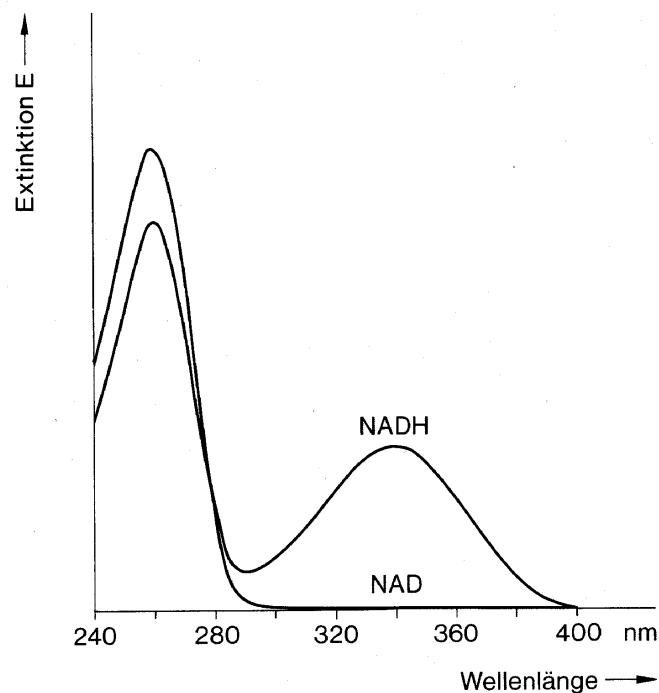
$$c = \frac{E}{\epsilon \cdot d} \quad (3)$$

Ist der Extinktionskoeffizient nicht bekannt, oder ist er stark von den Versuchsbedingungen abhängig, so kann man trotzdem über eine Eichgerade die Konzentration einer unbekanntem Lösung bestimmen. Man stellt Lösungen mit bekannten Konzentrationen her und mißt deren Extinktion bei einer geeigneten Wellenlänge. Durch Vergleich ist so eine Konzentrationsbestimmung möglich.

Achtung: Feste Teilchen (trübe Lösungen) streuen das Licht, das heißt, die Intensität wird geschwächt, das Meßergebnis verfälscht.

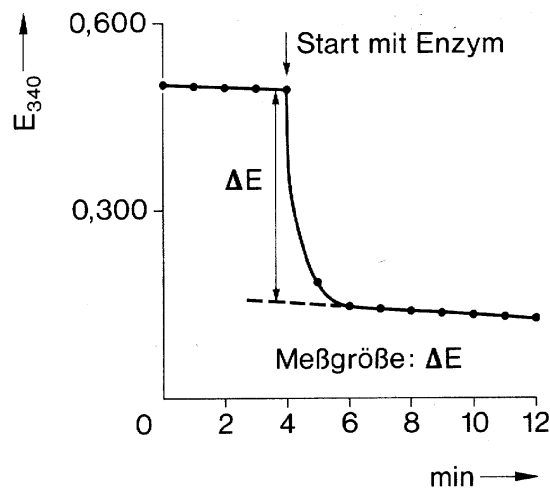
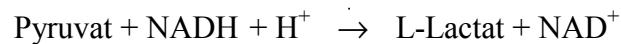
Enzymatische Analyse (Endpunktmethode)

Ein großer Teil der Versuche im Praktikum verwendet NAD(P)H als Chromophor. NAD(P)H zeigt bei 339 nm ein Absorptionsmaximum.



Bei bekanntem Extinktionskoeffizienten kann so im enzymatisch-optischen Test eine Extinktionsänderung für die Substratbestimmung herangezogen werden. Voraussetzung ist, daß das Gleichgewicht der Reaktion "auf einer Seite" liegt.

Beispiel: Bestimmung der Pyruvatkonzentration mit Lactatdehydrogenase (LDH)



Aus dem Lambert-Beer'schen Gesetz folgt für die Konzentration in der Küvette

$$c = \frac{\Delta E}{\epsilon \cdot d} \text{ [mol} \cdot \text{L}^{-1}]$$

Molare Extinktionskoeffizienten ϵ [$\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{mm}^{-1}$] von NADH und NADPH für die Temperaturen 25 °C und 30 °C			
	Hg 334 nm (334,15 nm)	340 nm (339 nm)	Hg 365 nm (365,3 nm)
NADH	$6,18 \cdot 10^2$	$6,3 \cdot 10^2$	$3,4 \cdot 10^2$
NADPH	$6,18 \cdot 10^2$	$6,3 \cdot 10^2$	$3,5 \cdot 10^2$

Für die Praxis bietet sich die Verwendung des "millimolaren Extinktionskoeffizienten" an. Bei einer Schichtdicke von 10 mm wird dann $\epsilon \cdot d$ für NADH bei 339 nm $6,3 \text{ L} \cdot \text{mmol}^{-1}$. Zur Ermittlung der Konzentration in der Probenlösung geht das Verhältnis von Testvolumen V_T (Küvetteninhalt) zu Probenvolumen V_P ein:

$$c = \frac{\Delta E \cdot V_T}{\epsilon \cdot d \cdot V_P} \text{ [mmol} \cdot \text{L}^{-1}] \text{ bzw. } [\mu\text{mol} \cdot \text{mL}^{-1}]$$

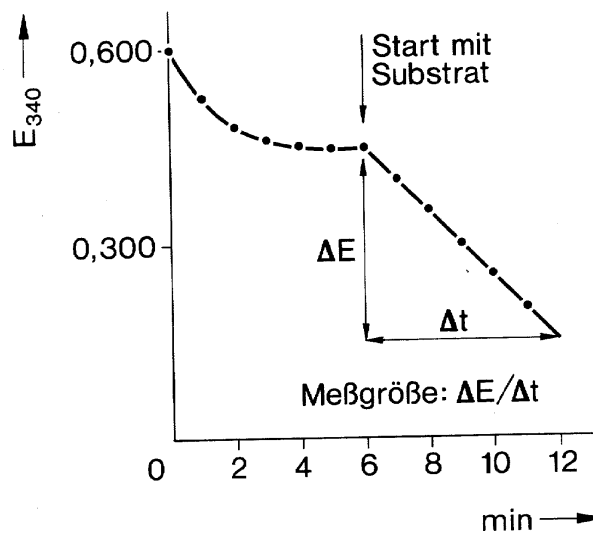
Durch Einbeziehung der molaren Masse M erhält man

$$c = \frac{\Delta E \cdot V_T \cdot M}{\epsilon \cdot d \cdot V_P} \quad [\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}] \text{ bzw. } [\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}]$$

Bestimmung der katalytischen Aktivität von Enzymen

Im Gegensatz zur Substratbestimmung soll bei der Messung der katalytischen Aktivität die Reaktion so ablaufen, daß am Ende der Messung nur ein kleiner Teil des Substrates umgesetzt worden ist.

Bei photometrischen Methoden ist die Änderung der Konzentration mit der Zeit (Reaktionsgeschwindigkeit $(\Delta c/\Delta t)$) direkt proportional der Änderung der Extinktion mit der Zeit $(\Delta E/\Delta t)$.



Die Abbildung zeigt das Beispiel einer fortlaufenden Messung. Bei bekannter linearer Kinetik mißt man häufig nur zu zwei Zeitpunkten (Zweipunktmethode).

$$\frac{\Delta c}{\Delta t} = \frac{\Delta E}{\epsilon \cdot d \cdot V_E} \cdot V_T \quad (V_E = \text{Enzymvolumen})$$

Zur Zeit sind zwei Angaben gebräuchlich:

Katal (kat): Substratumsatz in mol pro Sekunde

Unit (U): Substratumsatz in μmol pro Minute

Geräte

Im Praktikum werden zwei Typen von Photometern eingesetzt.

1. *"Photometer Eppendorf"*: Bei diesem Photometertyp handelt es sich um ein Spektrallinienphotometer. Als Lichtquelle dient eine Hg-Spektrallampe, die ein Linienspektrum zeigt. Durch die Verwendung von Filtern wird die gewünschte Wellenlänge durchgelassen, während die anderen Wellenlängen gesperrt werden.
2. *Spektralphotometer*: Diese Geräte besitzen als Lichtquelle in der Regel eine Wasserstoff(Deuterium)-Lampe (UV-Bereich) und eine Wolframlampe (sichtbarer Bereich). Das Licht wird über einen Monochromator (Gitter oder Prisma) zerlegt und über einen Spalt ausgefiltert.