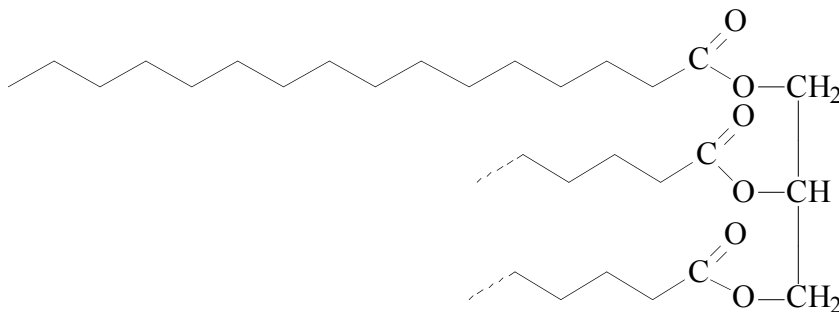


REAKTIONEN BIOORGANISCHER VERBINDUNGEN

Lipide

Triglyceride

Die Fette sind die Ester von langkettigen Fettsäuren und Glycerin (Triglyceride, oder Triacylglycerine). Die Öle enthalten ungesättigte langkettige Fettsäuren, die deswegen niedrigere Viskosität besitzen.



Versuch 1

Verseifung von Fetten

Die Verseifung ist der umgekehrte Vorgang der Esterbildung. Die Reaktion ist eine Basen-Katalysierte Umwandlung.

Durchführung:

a.) Man gebe 3 cm³ 50 % NaOH Lösung (Achtung bei NaOH: Ätzh Gefahr!) zu etwa 2 g Schweinefett und erwärme das Gemisch in einem siedenden Wasserbad. (Das ev. verdunstete Wasser soll ergänzt werden.) Das Reaktionsgemisch soll von Zeit zu Zeit mit einem Glasstab umgerührt werden. Tauche man den, aus dem Reaktionsgemisch herausgenommenen, Glasstab in ein, mit dest. Wasser halbgefülltes Reagenzglas ein. Wenn die entnommene Probe vollständig wasserlöslich ist, beende man die Verseifung. Das Reaktionsgemisch wird mit „Aussalzen“ aufgearbeitet: man gebe konzentrierte NaCl Lösung zu der kolloidalen Lösung.

- Zur welchen Kolloid-Systemen könnte diese Seife-Lösung eingeteilt werden?
- Welche Substanzen befinden sich in der wässrigen Unterphase?

- Formulieren Sie die Reaktions-gleichung!

b.) Man löse eine kleine Menge der Seife von Versuch 1. in Wasser auf. Die Lösung wird dann mit verdünnter H_2SO_4 Lösung angesäuert.

- Was für ein Niederschlag wurde präzipitiert?

c.) Man löse eine kleine Menge der Seife von Versuch 1. in Wasser auf. Füge man Calciumchlorid Lösung zur Seife Lösung.

- Welche Änderung ist zu beobachten?
- Wie können Sie die Änderung erklären?

Versuch 2

Unterscheidung zwischen Fetten und Ölen

In ein trockenes Reagenzglas wird eine kleine Menge Schweinefett und in ein anderes eine kleine Menge Speiseöl gegeben. Zu beiden Lösungen wird Bromlösung (Brom in Chloroform ($CHCl_3$) gelöst) gegeben.

Erläutern Sie die Beobachtungen!

Reaktionen der Kohlenhydrate

Polyhydroxyaldehyde und Polyhydroxyketone mit 3-7 Kohlenstoffatomen und ihre Oligomere und Polymere werden Kohlenhydrate genannt. Diese Verbindungen können am einfachsten über die Reaktionen der Oxo- und Hydroxylgruppen identifiziert werden. Die intramolekulare Wechselwirkungen (die cyclische Hemiacetalform oder Hemiketalform.) sind bei der Analyse zu berücksichtigen.

Die Kondensation der Carbonylgruppe

Diese Reaktionen sind nur bei den Monosacchariden und Disacchariden, die eine freie glykosidische Hydroxylgruppe besitzen, zu finden. In der Praxis verwendet man fast ausschließlich Phenylhydrazin als Reagens, um Phenylhydrazone oder Ossazone herzustellen. Diese schwerlöslichen, kristallinen Produkte dienen für die Identifizierung

und Isolierung von Monosacchariden. Diese Produkte sind auch dann Kristalle, wenn sie aus Zucker die in syrupösen Form vorliegen, (eine häufige Erscheinungsform der Kohlenhydrate) hergestellt werden.

Versuch 3

Herstellung von Glucosazon

Zur 0,5 cm³ 10 % Glucose Lösung wird ca. 0.5 Gramm Natrium-Acetat und 2 cm³ Phenylhydrazin Lösung gegeben. Erwärme das Reaktionsgemisch in einem siedenden Wasserbad. Ein gelber Niederschlag entsteht.

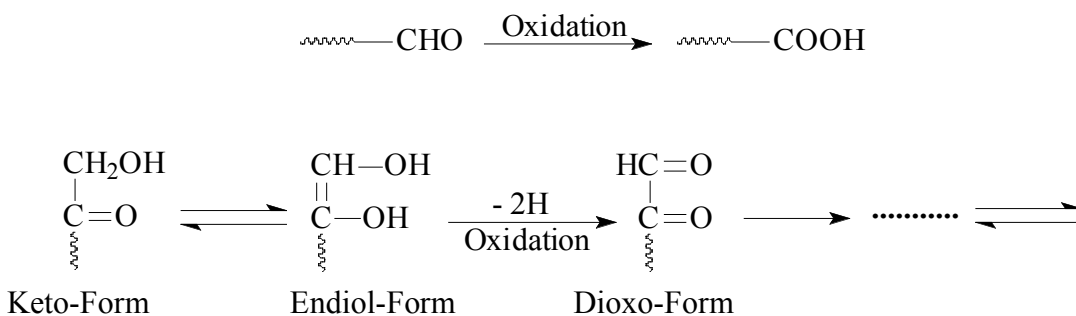
Formuliere die Reaktionsgleichung!

Welche anderen Monosaccharide liefern identisches Derivat?

Sind auch die Phenylhydrazone-Derivate dieser Monosaccharide identisch mit dem Glucose Phenylhydrazon?

Die reduzierende Eigenschaft der Oxogruppe (Oxidation von Monosacchariden)

Sowohl die Aldose, als auch die Ketose (und deren Olygomere mit freier glykosidischer OH Gruppe) verhalten sich als Reduktionsmittel. Die Formylgruppe kann leicht zu Carboxylgruppe oxidiert werden. Die Ketose, als *Endiol*-Tautomere, sind stärkere Oxidationsmittel, als die Aldose.



Versuch 4

Vermische in sechs Reagenzgläser je 1 cm³ Fehlingsche Lösung I mit je 1 cm³ Fehlingscher Lösung II. Gebe 1-1 cm³ Lösung der folgenden Kohlenhydrat-Lösungen zu und erwärme das Reaktionsgemisch auf einem siedenden Wasserbad.

- a.) Glucose (Aldohexose)
- b.) Fructose (Ketohehexose)
- c.) Saccharose (Disaccharid „Speisenzucker“)
- d.) Laktose (Disaccharid)
- e.) Stärke (Polysaccharid)
- f.) Bierwürze (ein Gemisch von Glucose und Oligosaccharide)

Wie kann man die unterschiedlichen Ergebnisse erklären?

Vermerk: Die Fehlingsche Reaktion (und auch die anderen Reduktionen) sind nicht spezifisch für die reduzierende Zucker. Alle Substanzen mit reduzierender Wirkung ergeben eine positive Reaktion.

Reaktionen der Hydroxigruppen

Die schon bekannten Reaktionen der Alkohole können auch bei den Zuckern durchgeführt werden, aber die Durchführung ist oft umständlich. Die Pentose und Hexose können mit konzentrierter Schwefelsäure zu Furfurolderivaten dehydratisiert werden. Diese Furfurol-Derivate liefern farbige Kondensationsprodukte mit α -Naphthol.

Versuch 5

Molisch-Probe

Gebe man zu einigen Kristallen Glucose einige Tröpfchen metanolische α -Naphthol Lösung. (Achtung, giftiges Reagens!). Im Abzug überschichte die Mischung sehr vorsichtig mit einem Tröpfchen konzentrierter Schwefelsäure. Die Grenzfläche wird Rosa gefärbt.

Hydrolyse

Die glykosidische Bindung kann durch Kochen mit verdünnten Säuren hydrolysiert werden. In den lebenden Organismen wird diese Hydrolyse durch Enzyme (z.B. Amylase) katalysiert.

Versuch 6

Herstellung von Invertzucker

Man gebe zu 5 cm³ Saccharose Lösung 4 cm³ 10 % Schwefelsäure Lösung. Erwärme das Reaktionsgemisch auf einem siedenden Wasserbad. Am Anfang und nach 20 Minuten kochen untersuche man einige Tropfen der Lösung mit der Fehling'schen Probe.

Erklären Sie die Ergebnisse!

Versuch 7

Die Hydrolyse von Glykogen (=tierische Stärke) Lösung

Vermische 10 cm³ Glykogen Lösung mit 5 cm³ 10 % Schwefelsäure Lösung und erwärme das Reaktionsgemisch auf einem siedenden Wasserbad. Von Zeit zu Zeit wird eine Probe genommen und der Vorgang der Hydrolyse beobachtet. (Die I₂ Probe dient zur Beobachtung der Zersetzung der Stärke, die Fehling'sche Probe zur Beobachtung der Entwicklung der Monosaccharide.)

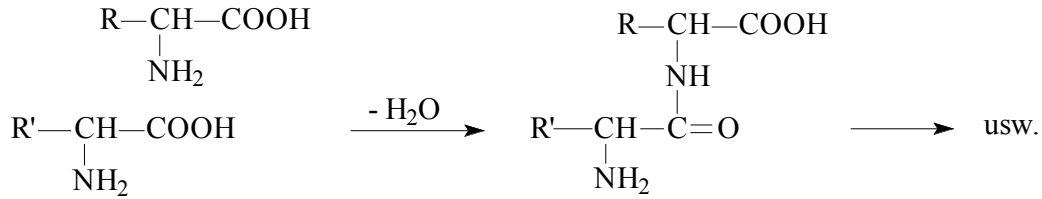
Durchführung:

Nehme von Zeit zu Zeit eine Probe aus dem Reaktionsgemisch und kühle sie ab (zum Beispiel, in der 0-ten, 5-ten, 10-ten und 20-ten Minute)! Untersuche die Proben mit I₂ Lösung und mit der Fehlings'schen Probe. Fasse die Bemerkungen tabellarisch zusammen! Erkläre die Ergebnisse! Verwende die Bezeichnungen -, +, ++, +++, um die relative Intensität der Reaktionen zu bezeichnen.

<i>Zeit</i>	<i>I₂</i>	<i>Fehling</i>	<i>Vermerk</i>
<i>0</i>			
<i>5</i>			
<i>10</i>			
<i>20</i>			

Reaktionen von Proteinen

Die Proteine sind aus Aminosäure-Einheiten aufgebaut und durch eine spezielle Säureamid-Bindung (*Peptidbindung*) miteinander verknüpft (primäre Struktur).

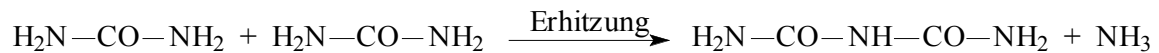


Die $-\text{CO}-\text{NH}-$ Bindung ist für die Raumstruktur von Proteinen hauptsächlich verantwortlich (z.B. auch für die Bildung von wasserstoff-brücken-haltigen Strukturen, oder für die Strukturen der Metallkomplexe). Die Peptidbindung kann mit der *Biuret-Reaktion* einfach nachgewiesen werden. Es wird erst ein „Modellversuch“ durchgeführt: Es wird aus Harnstoff „Biuret“ herstellen und dieses Produkt wird mit Cu^{2+} -Ionen reagiert. Ähnlich wird dann die Anwesenheit der Peptid-Bindung in einem Protein nachgewiesen.

Versuch 8

Die Biuret-Reaktion

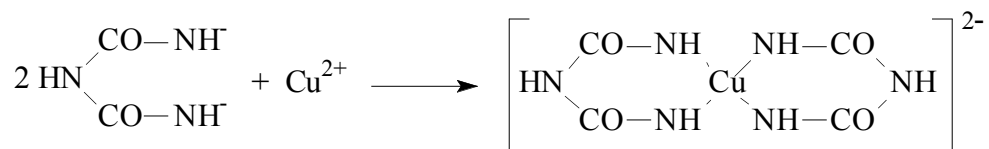
8.1. In einem trockenen Porzellantiegel erhitze man 2-3 Minuten lang ca. 0,5 g Harnstoff. Wenn über den Tiegel einen befeuchteten roten Indikatorpapierstreifen gehalten wird, färbt sich es wegen der Entwicklung von Ammoniak blau. Nach der Abkühlung löst man den Inhalt des Tiegels in 40%-iger NaOH-Lösung auf und gibt man dazu 1 Tröpfchen (*nicht mehr!*) CuSO_4 -Lösung. Es bildet sich ein veilchenblaufarbiger Kupferkomplex.



Harnstoff

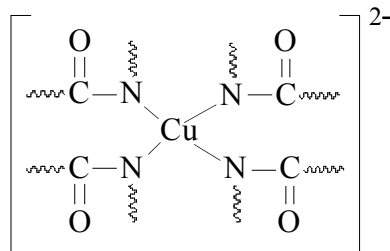
Harnstoff

Biuret



Welche Verbindungen werden Chelat-Komplexe genannt?

8.2. Geben Sie zu einer stark basischen Proteinlösung 1 Tröpfchen (!) CuSO_4 -Lösung.



Was für eine Farbe hat die entstehende Komplex-Verbindung?

Wie groß ist die Koordinationszahl des Cu^{2+} -Ions in dieser Verbindung?

Versuch 9

Die Xanthoprotein-Reaktion

Wenn die Proteine in der Anwesenheit von konzentrierter Salpetersäure gekocht werden, bildet sich in den meisten Fällen ein gelber Niederschlag. Die Bildung dieses gelben Niederschlags ist die Konsequenz der Nitrierung der – in den Proteinen anwesenden – aromatischen Aminosäuren. (Wenn auf die Hautoberfläche des menschlichen Körpers konzentrierte Salpetersäure-Lösung tropft, wird diese dementsprechend auch die Entstehung einer gelben Flecke verursachen.)

Durchführung:

9.1 Man fülle in einem trockenen Reagenzglas eine Spatelspitze Phenylalanin und (*unter Abzug*) $0,5 \text{ cm}^3$ konzentrierte Salpetersäure (konzentrierte Salpetersäure ist ein *ätzendes*, starkes Oxidationsmittel!) und halte das Reaktionsgemisch bis zum Beginn der Reaktion in heißes Wasserbad. *In Kürze beginnt eine heftige, exotherme Reaktion! Das Reagenzglas wird sofort aus dem Wasserbad herausgenommen, abgekühlt, die Farbe des Reaktionsgemischs beobachtet.*

Schreiben Sie die Reaktionsgleichung der Nitrierung von Phenylalanin!

9.2 Erhitze man unter dem Abzug 1 cm^3 Proteinlösung mit dem gleichen Volumen konzentrierter Salpetersäure im Wasserbad. (*Vorsicht!* Das Reaktionsgemisch kann spritzen, auch braune Stickoxid-Dämpfe können entstehen!) Es entsteht ein gelber Niederschlag.

Welche Aminosäuren können nitriert werden?

Kolloide Natur der Proteine

Die Proteine sind sog. *Eukolloide*, „echte Kolloide“ weil die Molekülgröße dieser Verbindungen dem kolloiden Maß (1-500 nm) entspricht. Die wasserlöslichen Proteine werden in der Lösung durch ihre Hydrathüllen stabilisiert. Wenn diese Hydrathülle entfernt wird, bricht die kolloidale Struktur zusammen die Proteine *koagulieren*. Nach der Entfernung des Wasserentzugsmaterials oder nach Verdünnung wird die Hydrathülle spontan wiederhergestellt (*Peptisation*). Diese Art von Präzipitation wird *reversible Ausfällung, reversible Koagulation* genannt.

Auf Einwirkung von Kochen, stärkeren Säuren oder Schwermetall-Salzen werden die Proteinmoleküle nicht nur die Hydrathüllen verlieren, sondern es treten in ihrer Struktur auch eingehende Veränderungen auf. Diese Art von Präzipitation wird *irreversible Ausfällung, irreversible Koagulation* genannt.

Versuch 10

Reversible Koagulation und Peptisation

Zu einer Proteinlösung (2-3 cm³) wird etwa die dreifache Menge einer gesättigten (NH₄)₂SO₄-Lösung gegeben. Das Protein koaguliert. Verteilt wird das Reaktionsgemisch auf zwei Teile. Der erste Teil wird mit destilliertem Wasser verdünnt bis zur Auflösung, der zweite Teil wird mit der gleichen Menge gesättigten (NH₄)₂SO₄-Lösung versetzt.

Vergleichen Sie den Inhalt der beiden Reagenzgläser und erklären Sie die Erscheinung.

Definieren Sie den Begriff der Peptisation.

Versuch 11

Irreversible Koagulation

Zu einer Proteinlösung (1-2 cm³) wird die gleiche Menge einer 20%-igen Sulphosalicylsäure-Lösung gegeben. Das Protein wird irreversibel koagulieren und es kann sich nach der Entfernung des Reagens (z.B. durch Auswaschen mit destilliertem Wasser) nicht aufgelöst werden.

Wie kann erklärt werden, dass die Trichloressigsäure auch eine irreversible Koagulation verursacht?

Versuch 12

Die *thermische Koagulation*

Wenn man eine Proteinlösung (1-2 cm³) kurzzeitig kocht, wird sich das Protein irreversibel ausscheiden (vergleiche: gekochtes Ei).

In welche Art von Kolloid-Systemen können Sie das entstandene Koagulat einteilen?

Versuche die vom Personal vorgeführt werden

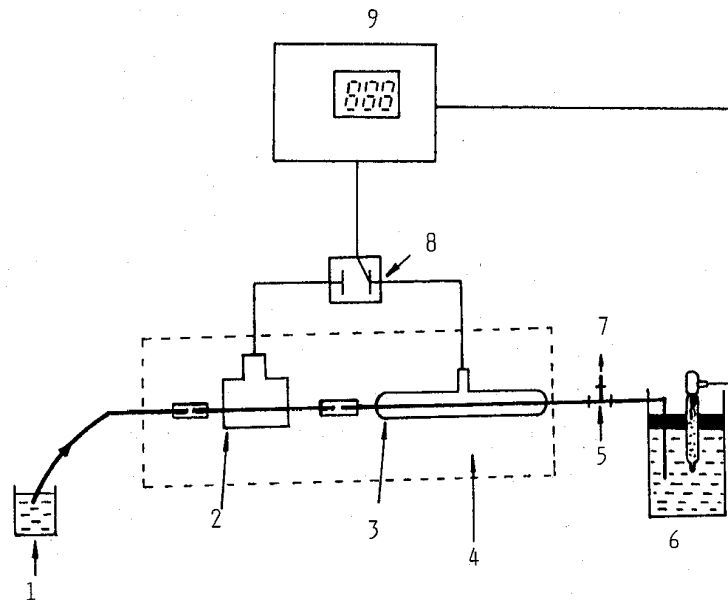
Biologischer Mikroanalysator

Die Bestimmung der Ionen-Gehalt der Körperflüssigkeiten ist eine wichtige und oft durchgeführte Messung. Bei der Bestimmung der Kationen und Anionen der Körperflüssigkeiten haben sich in der Klinisch-Chemischen-Analyse die elektrochemischen (potentiometrischen) Methoden bewährt. (Ist nur das Kationen-Gehalt gefragt, können auch flammenphotometrische (atomabsorptions) Methoden angewendet werden.) Die zeitgemäßen „Biologischen Mikroanalysatoren“ können aus einer kleinen Probenmenge (Blut, Urin etc.) pH und mehrere Kationen und Anionen (z.B. K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , Cl^- , CO_3^{2-} , HCO_3^-) gleichzeitig bestimmen.

Bestimmung des Kalium- und Natrium-Gehalts einer Ringer-Lösung

Die biologischen Mikroanalysatoren können auch für die Kontrolle von Infusions-Lösungen (Ringer Lösungen) angewendet werden. Das Instrument ist ähnlich einem pH Meter aufgebaut, mit dem Unterschied, dass die Mess-Elektroden Kalium- und Natrium-Ionen empfindliche Membranelektroden sind. Die für die Analyse notwendige Probenmenge ist unter $150\mu L$. Die Mess-Fläche der Elektroden ist in der Form von dünner Kapillare aufgebaut. Die Elektroden sind hintereinander (Tandem) geschaltet. Die Probe wird mit der Hilfe einer kleinen Vakuumpumpe in das Kapillar-System eingesaugt. Am Ausgang der Kapillare ist ein „T-förmiger“ Verteiler angebracht. Dieser T-Stück verbindet die Kapillare mit der Referenzelektrode, bzw. mit der Vakuumpumpe. Wenn die Pumpe eingeschaltet wird, wird nicht nur die Probe in den Kapillarelektroden erneuert, sondern eine kleine Menge aus der Referenzelektroden-Flüssigkeit wird auch aufgesaugt. (Dieser Aufbau ist messtechnisch vorteilhaft, weil bei jeder Messung frische, saubere Lösungen miteinander verbunden werden. Besonders proteinhaltige Probenlösungen neigen dazu, sich im System zu präzipitieren.) Vor Gebrauch wird das Gerät mit zwei Eichlösungen geeicht. Die eine Lösung beinhaltet $149\text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}\text{ Na}^+$ Ionen und $5.0\text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}\text{ K}^+$ Ionen, die andere Lösung beinhaltet $41\text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}\text{ Na}^+$ -Ionen und $1.4\text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}\text{ K}^+$ -Ionen. Nachdem das Gerät geeicht wurde, wird die Ringer-

Lösung aufgesaugt, um das Na^+ - und K^+ -Gehalt der Lösung zu bestimmen.
(Zusammensetzung unserer Ringer-Lösung: $147.2 \text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3} \text{ Na}^+$ -Ionen, $4.0 \text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3} \text{ K}^+$ -Ionen, außerdem 2.24 Ca^{2+} -Ionen, 155.7 Cl^- -Ionen.)



- | | | |
|-----------------------|---------------------------|----------------------------|
| 1. Probe | 2. K^+ Elektrode | 3. Na^+ Elektrode |
| 4. Thermostat | 5. T-Verbinder | 6. Referenzelektrode |
| 7. Saugen (zur Pumpe) | 8. Schalter | 9. Elektronik m. Display |

Osmometrie

(siehe auch Mortimer: Kapitel 13.8 und 13.9)

Der osmotische Druck (und damit zusammenhängend die osmotische Konzentration) der Körperflüssigkeiten ist ziemlich stabil (290 ± 10 mOsm). Auch bei minimalen Abweichungen in hypoomotischen oder hyperosmotischen Richtungen versucht der Körper durch komplizierte Regulationsmechanismen den optimalen Zustand wieder herzustellen. Ist die Störung tief greifend, ein dekompensierter Zustand entsteht. Die Bestimmung der osmotischen Verhältnisse von Plasma und Urin gibt wichtige Hinweise über den Ionenhaushalt des menschlichen Organismus.

In der medizinischen Praxis werden die Konzentrationen der Substanzen die den osmotischen Druck zusammen verursachen nicht einzeln in $\text{mol} \times \text{L}^{-1}$ Einheiten, sondern zusammen in $\text{Osmol} \times \text{L}^{-1}$ Einheiten angegeben (oft können die Konzentrationswerte der Substanzen die die Osmose verursachen einzeln gar nicht bestimmt werden!). 1 Osmol (=1000 mOsm) ist die Konzentration einer wässrigen Lösung, deren Osmotischer Druck bei 0°C 2241 kPa ist, unabhängig von der chemischer Zusammensetzung (z.B. gelöste Moleküle, Ione, Assoziate, usw.). Grund für diese Definition ist, dass die Osmose zu den kolligativen Eigenschaften der Lösungen zählt, d.h. die Osmose nur von der Anzahl gelöster Teilchen, nicht aber von deren chemischen Struktur abhängig ist. Die Körperflüssigkeiten sind komplizierte Systeme, die aktuelle Konzentration der zahlreichen Bestandteile genau zu bestimmen ist oft mit erheblichen Schwierigkeiten verbunden. (Die Körperflüssigkeiten haben eine relativ hohe Konzentration, sie sind keine „ideale Lösungen“, d. h. bei der Berechnung der Osmose nicht die Konzentrationen, sondern die Aktivitäten sollen berücksichtigt werden!)

Die direkte Messung der Osmose von Körperflüssigkeiten ist aufwendig. Die Messung einer anderen kolligativen Eigenschaft, der Gefrierpunktniedrigung ist dagegen messtechnisch einfach. Deshalb wird in der Routine fast ausschließlich der Gefrierpunkt der Lösungen gemessen und der osmotische Druck (bzw. die osmotische Konzentration) der Lösung aus dieser Angabe berechnet:

$$\Delta T_G = E_G \times b$$

$\Delta T_G =$ Gefrierpunktserniedrigung [$^{\circ}\text{C}$]

$E_G =$ molale Gefrierpunktserniedrigung [$^{\circ}\text{C kg mol}^{-1}$] (beim Wasser: 1.86°C)

$b =$ Molalität [$\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}$]

Die Konzentration (Molalität, b) der Lösung ist gleich:

$$b = \frac{\Delta T_G}{E_G}$$

Die Osmose ist dagegen mit der Stoffmengenkonzentration (Molkonzentration, c) linear proportional. Deshalb ist die Umrechnung b auf Stoffmengenkonzentration notwendig. Ist die Konzentration der Lösung niedrig, ist die Dichte näherungsweise 1 ($\rho \approx 1$), d.h. die Zahlenwerte für Molalität und Stoffmengenkonzentration sind näherungsweise auch identisch:

$$b \approx c$$

Zum Beispiel, die Dichte der Ringer-Lösung die wir in diesem Versuch anwenden werden hat eine Dichte von $\rho \approx 1.004 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$. Demzufolge kann die Osmotische-Konzentration aus der Gefrierpunktserniedrigung mit ausreichender Genauigkeit bestimmt werden.

Der Versuch wird in einem Kryoskop durchgeführt. Bei der Messung wird die Probe mit konstanter Kühlleistung ständig gekühlt. Zunächst wird die zu messende Flüssigkeit ohne zu rühren unter den Gefrierpunkt abgekühlt. Die Unterkühlung ist erforderlich, damit durch einmaliges Rühren von ca. 1 Sekunde die Kristallisation einwandfrei ausgelöst werden kann. Bei genügend starker Unterkühlung entsteht ein sehr feinkristallines Eis, das eine schnelle Einstellung des Temperaturgleichgewichtes bewirkt. Beim Gefrieren steigt die Temperatur von der Unterkühlungstemperatur bis zur Gefrierpunktstemperatur an. Die höchste sich einstellende Temperatur wird als Gefrierpunkt der Flüssigkeit bezeichnet.

Durchführung

0.15 cm³ Ringer-Lösung wird in die Messröhre gefüllt. Die Messröhre wird in den, mit Nadelrührer und Thermistor (Temperaturfühler) versehenen, Messkopf gesteckt. Der Messkopf wird so auf das Gerät gestellt, damit die Messröhre in das Kühlblock hineinragt. Das Gerät wird an den Schreiber angeschlossen, die Kühlung gestartet. Am Schreiber kann der Kühlvorgang beobachtet werden. Nachdem die Probe sich genügend unterkühlt hat (die Probentemperatur 2-3 Grad unter den erwarteten Gefrierpunkt sank) wird der Nadelrührer kurz durch kurzzeitiges Betätigen des Druckknopfes eingeschaltet. Die innere Struktur der Lösung wird damit gestört – das Gefrieren des Wassergehaltes der Probe wird ausgelöst. Die Gefrierwärme wird freigesetzt, die Temperatur steigt auf den Gefrierpunkt und bleibt bestehen bis die Probe „durchfriert“ (Abb. 1). Wenn die ganze Probe gefroren ist, sinkt die Temperatur schnell wieder ab. Vor Gebrauch soll das Gerät kalibriert werden. Es wird der Gefrierpunkt des Wassers und der Gefrierpunkt einer Eichlösung (400.0 mOsm·dm⁻³) gemessen.

Vermerk:

Die Gesamt-Ionkonzentration der Infusionslösung (Ringer-Lösung) ist 312 mol·dm⁻³.

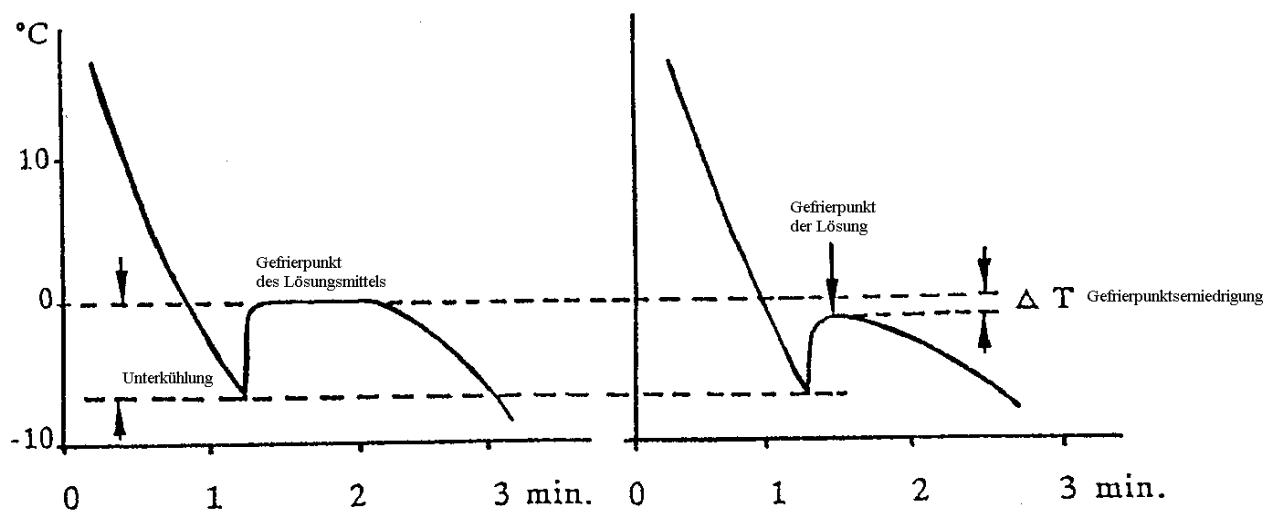


Abb.1 Kühlungskurven

Absorptionsphotometrie

Einführung

Als optische Bestimmungsmethode besitzt die Photometrie einen weiten Anwendungsbereich in der quantitativen Analyse. Durch ihre hohe Empfindlichkeit (es können Mengen in der Größenordnung von einigen Mikrogramm erfasst werden) und ihre schnelle und relativ einfache Durchführbarkeit ist diese Analysenmethode besonders wertvoll.

Die Photometrie liegen folgende Gesetzmäßigkeiten der Lichtabsorption zugrunde:

Fällt ein Lichtstrahl bestimmter Wellenlänge durch die Lösung einer Substanz, die Licht dieser Wellenlänge absorbiert, so hat der austretende Lichtstrahl eine geringere Intensität als der eintretende Lichtstrahl. Diese Intensitätsschwächung wird als Durchlässigkeit D angegeben, die durch den Quotienten aus der Intensität I des austretenden Lichtstrahls und der Intensität I_0 des einfallenden Lichtstrahls definiert ist:

$$D = \frac{I}{I_0} < 1$$

(1)

Die Durchlässigkeit einer Lösung ist umso geringer (mit anderen Worten, die Schwächung der Intensität I_0 ist umso größer), je stärker das Licht von der Lösung absorbiert wird. Das Absorptionsvermögen einer Lösung ist dabei abhängig von der Zahl der absorbierenden Teilchen (Moleküle oder Ionen). Letztere wird bestimmt durch die Konzentration c der Lösung und durch die Dicke d der durchstrahlende Schicht.

Der Abhängigkeit der Durchlässigkeit D von der Konzentration c und der Schichtdicke d der Lösung ist durch eine Exponentialfunktion der Form

$$D = \frac{I}{I_0} = e^{-kcd}$$

(2)

gegeben. Das negative Vorzeichen trägt dabei der Tatsache Rechnung, dass die Lichtabsorption zu einer Abnahme der Intensität führt ($D < I$), k ist ein Proportionalitätsfaktor.

Aus Praktischen Gründen wird die Gleichung (2) umgeformt. Logarithmieren ergibt

$$\ln \frac{I}{I_0} = kcd \quad (3)$$

oder nach Umrechnung in den dekadischen Logarithmus

$$\lg \frac{I}{I_0} = 0.434kcd \quad (4)$$

Das Produkt $0,434 \times k$ wird durch den molaren Extinktionskoeffizient ε ersetzt und der Logarithmus von I_0/I als Extinktion E bezeichnet. So ergibt sich das **Lambert-Beersche** Gesetz:

$$\begin{aligned} E &= \varepsilon \cdot c \cdot d && \text{(alte Form)} \\ A &= \chi_n \cdot c \cdot d && \text{(neue Form)} \end{aligned} \quad (5)$$

- ε = molarer Extinktionskoeffizient (von der Wellenlänge der Strahlung abhängige Stoffkonstante)
- E = Extinktion
- I = nach dem Durchgang durch die Probe gemessene Intensität
- I_0 = vor dem Eintritt in die Probe gemessene Intensität
- χ_n = molarer Absorptionskoeffizient (von der Wellenlänge der Strahlung abhängige Stoffkonstante)
- A = spektrales Absorptionsmaß „Absorption“ (nach DIN)
- c = Konzentration der zu analysierenden Lösung in $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$
- d = Schichtdicke der Probe im Strahlengang in cm

Dieses Gesetz besagt, dass die Absorption einer Lösung ihrer Konzentration und der durchstrahlter Schichtdicke direkt proportional ist. Es besitzt jedoch nur strenge Gültigkeit bei Verwendung von monochromatischem Licht (der molare

Absorptionskoeffizient χ_n ist von der Wellenlänge des Lichtes abhängig) und bei konstanter Temperatur.

Der Aufbau des Photometers

Die Absorption einer Lösung kann unter Verwendung eines Spektrophotometers (Abb. 1) durch die Messung der Intensität eines monochromatischen Lichtstrahls vor und nach dem Durchtritt durch die unbekannte Lösung direkt bestimmt werden. Das zu messende Licht trifft auf einen Photoempfänger, wodurch ein elektrisches Signal erzeugt wird. Dieses Signal ist proportional der Intensität des auf den Photoempfänger fallenden Lichtes und damit proportional der Absorption. Wir benützen ein vollautomatisch registrierendes Zweistrahlenspektrophotometer für Absorptionsmessungen im ultravioletten (UV) und sichtbaren (VIS) Spektralbereich (190-1100 nm).

Das Licht der Strahlungsquelle (Deuteriumlampe im UV Bereich, Glühlampe im sichtbaren Bereich) wird im Monochromator spektral zerlegt. Der zur Messung benutzte monochromatische Strahlungsanteil gelangt durch ein Spiegelsystem in das Probenraum. Die Strahlen werden durch die Vergleichsprobe und die Messprobe geschickt. Im Probenraum befinden sich die Küvettenhalter. Die Probelösungen und Referenzlösungen werden in Küvetten (Abb.2.) gefüllt in die Küvettenhalter gestellt. Im sichtbaren Bereich können Glasküvetten verwendet werden. Wenn auch im UV Bereich gemessen werden soll, werden aus Quarz gefertigte Küvetten verwendet. Als Photoempfänger dienen Silizium-Photodioden. Ist die Signalintensität in beiden Strahlengängen identisch, kompensieren sich die elektrischen Signale. (Z.B. wird in beiden Lichtwegen Lösungsmittel in identisch langen Küvetten (Abb.2) durchstrahlt.) Absorbiert jedoch die Probe das Licht, nimmt die Signalintensität des Mess-Strahles gegenüber dem Vergleichsstrahl ab. Die Abnahme wird in Abhängigkeit der Wellenlänge registriert.

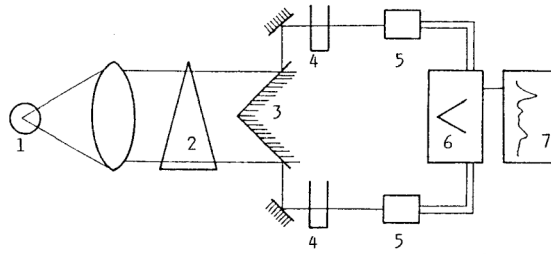


Abb. 1 Schematisches Messprinzip von Photometern

- | | | |
|----------------|------------------|--------------------------|
| 1. Lichtquelle | 2. Monochromator | 3. Spiegel |
| 4. Kuvette | 5. Detektor | 6.-7. Signalverarbeitung |

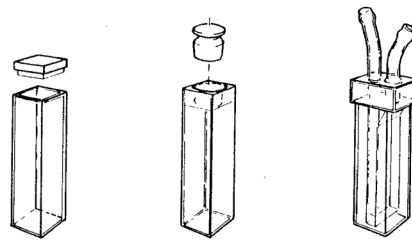


Abb. 2 Kuvetten für die Photometrie

Photometrische Bestimmung von Vitamine B₁₂

Vitamin B₁₂ ist ein Sammelbegriff für verschiedene *Kobalamin-Verbindungen* (Abb. 3). Je nachdem welches Atom bzw. Molekül am zentralen Kobaltatom substituiert ist, heißt die Verbindung z.B. Aqua-, Adenosyl-, Hydroxy-, Cyanokobalamin, etc. Vitamin B₁₂ wurde im Jahr 1926 entdeckt. Der menschliche Körper kann Vitamin B₁₂ nicht selbst produzieren und ist daher auf die Zufuhr von Vitamin B₁₂ über die Nahrung angewiesen. Zur Synthese von Vitamin B₁₂ sind nur bestimmte Mikroorganismen fähig. Solche Bakterien sind zwar in der Darmflora enthalten, das produzierte Vitamin B₁₂ kann der Mensch jedoch nur unzureichend nutzen und reicht zur Deckung des täglichen Bedarfs nicht aus.

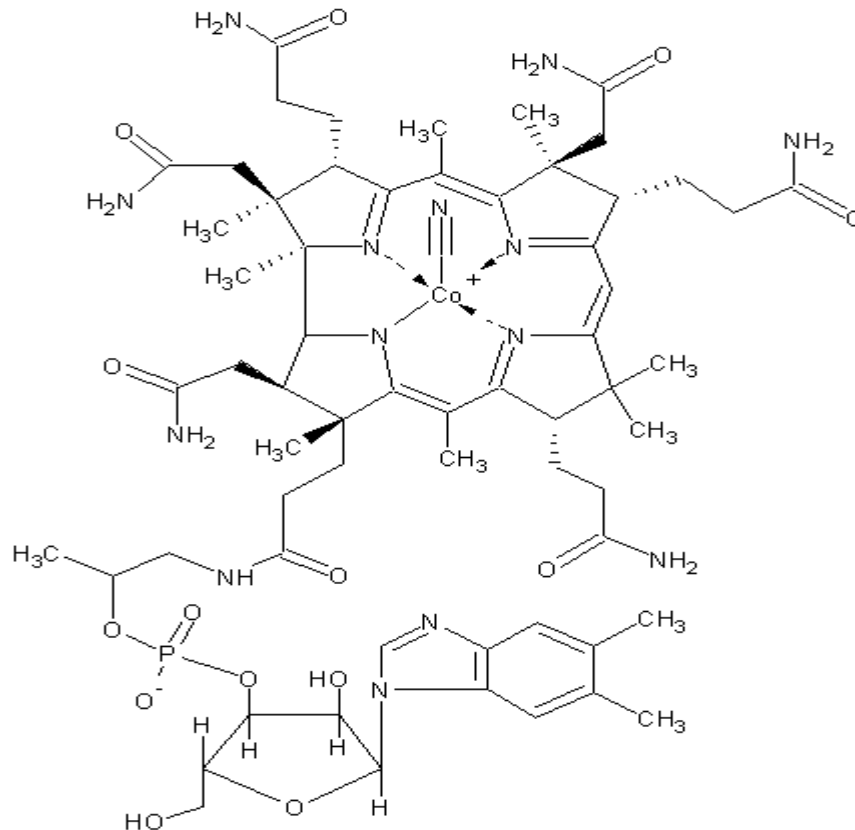


Abbildung 2. Vitamin B₁₂ (Zyanokobalamin)

Für Transport und Speicherung des Vitamins sind bestimmte Vitamin-B₁₂-bindende Proteine erforderlich. In der Leber kommt ein kobalaminbindendes Protein ("Transkobalamin 1") vor, welches die Speicherung größerer Mengen an Vitamin B₁₂ ermöglicht. Vitamin B₁₂ wird hauptsächlich in der Leber, aber auch in Herz, Gehirn und Skelettmuskulatur gespeichert.

Die Absorption durch den Körper erfolgt dosisabhängig. Je mehr Vitamin-B₁₂ zugeführt wird, desto mehr sinkt die Ausnutzungsrate durch Überschreiten der Bindungskapazität. Bestimmte Medikamente (z.B. Omeprazol, Metformin) verringern die Vitamin-B₁₂-Aufnahme. Vitamin B₁₂ ist in Form der Coenzyme 5-Desoxyadenosylcobalamin und Methylcobalamin an verschiedenen Stoffwechselreaktionen beteiligt. Das Vitamin hat wichtige Funktionen im Bereich des Eiweißstoffwechsels, bei der Bildung roter Blutkörperchen und des Nervensystems.

Vitamin B₁₂ wird sehr lange in der Leber gespeichert. Daher treten Symptome des Vitamin-B₁₂-Mangels meist erst mehrere Jahre später auf. Die größte Risikogruppe des Mangels stellen Veganer dar, da sie auf jegliche tierische Produkte verzichten. Vitamin-B₁₂ wird, wie schon erwähnt aber nur von tierischen Organismen synthetisiert, wodurch dem Veganer natürlich die Quelle des lebenswichtigen Vitamins fehlt. Für Vegetarier und vor allem für Veganer sind Vitamin-B₁₂- oder Vitamin-B-Komplex-Nahrungsergänzungsmittel deshalb oft unentbehrlich. Vitamin-B₁₂-Mangel äußert sich in bestimmten Formen der Anämie (Blutbildveränderungen) und Schädigungen des Nervensystems, die sich u.a. als Gedächtnisschwächen, Apathie, Depressionen, etc. bis hin zu Demenz bemerkbar machen können. Außerdem kann ein Mangel zu funikulärer Myelose führen. Zu den typischen Zeichen eines manifesten Vitamin-B₁₂-Mangels gehören weiterhin: Zungenbrennen, Appetitlosigkeit, Obstipation.

Durchführung der spektrofotometrischen Bestimmung von Vitamin B₁₂

Die Bestimmung dient die Reinheitskontrolle und die Wirkstoff-Gehaltbestimmung in Vitamin B₁₂ Injektion nach DAB (Deutsches Arzneimittelbuch). Vitamin B₁₂ kann nur in sehr gut verschlossenen Gefäßen aufbewahrt werden. Das Material soll vor Licht geschützt werden. Vitamin B₁₂ Lösungen zeigen bei den Wellenlängen von 278±1 nm, 361±1 nm und 547–559 nm Absorptionsmaxima. Das Maximum bei 361 nm entspricht den B₁₂ Vitamin, die Maxima bei 278 und 547–559 nm sind den Zersetzungsprodukten zuzuordnen.

Reinheitsprüfung

[d] *Lichtabsorbierende Verunreinigungen*: Die Absorptionen der Lösung [g] werden in einer Schichtdicke von 1 cm bei den Wellenlängen von 278±1 nm, 361±1 nm und 547–559 nm gemessen. Folgende Forderungen sollen Erfüllt sein:

$$\frac{A_{361}}{A_{278}} = 1.70 - 1.90 \qquad \frac{A_{361}}{A_{547-559}} = 3.15 - 3.45$$

Gehaltsbestimmung

[g] 0.0200 g getrocknete Substanz werden in Wasser zu 500.00cm³ gelöst. Die Absorption der Lösung wird in einer Schichtdicke von 1 cm bei der Wellenlänge 361±1 nm gemessen.

Berechnung:

$$\% \text{ Zyanokobalamin} = \frac{A \times 2,415}{E_w}$$

A = Absorption der Lösung

E_w = Einwaage der Substanz in Gramm

Abweichung von der Versuchsbeschreibung des Arzneimittelbuches:

Es werden 300 γ/cm³ Injektionen geprüft (1γ= 1μg=10⁻⁶ Gramm). Ein Injektion wird auf das zehnfache verdünnt (=30γ), um in dem Konzentrationsbereich zu kommen wo die Versuche nach [d] und [g] durchgeführt werden können. Die quantitative Auswertung wird mit Hilfe einer Kalibrierkurve („Eichkurve“) durchgeführt. Die Eichstandards beinhalten 15 γ 30 γ und 60 γ B₁₂ Vitamin per Kubikzentimeter. Der Lichtabsorption der B₁₂ Lösung wird in einer Quarzglassküvette in dem Wellenlängenbereich 250-600 nm gemessen, gegen Wasser als Referenz.