

Universität für Bodenkultur Wien  
Department für Chemie

772112

# Biochemische Übungen I

## Kohlenhydrate und Gelfiltration

Univ.-Ass. Dr. Stefan Böhmdorfer



# QUALITATIVE BESTIMMUNG VON KOHLENHYDRATEN

## AUFGABE & METHODE

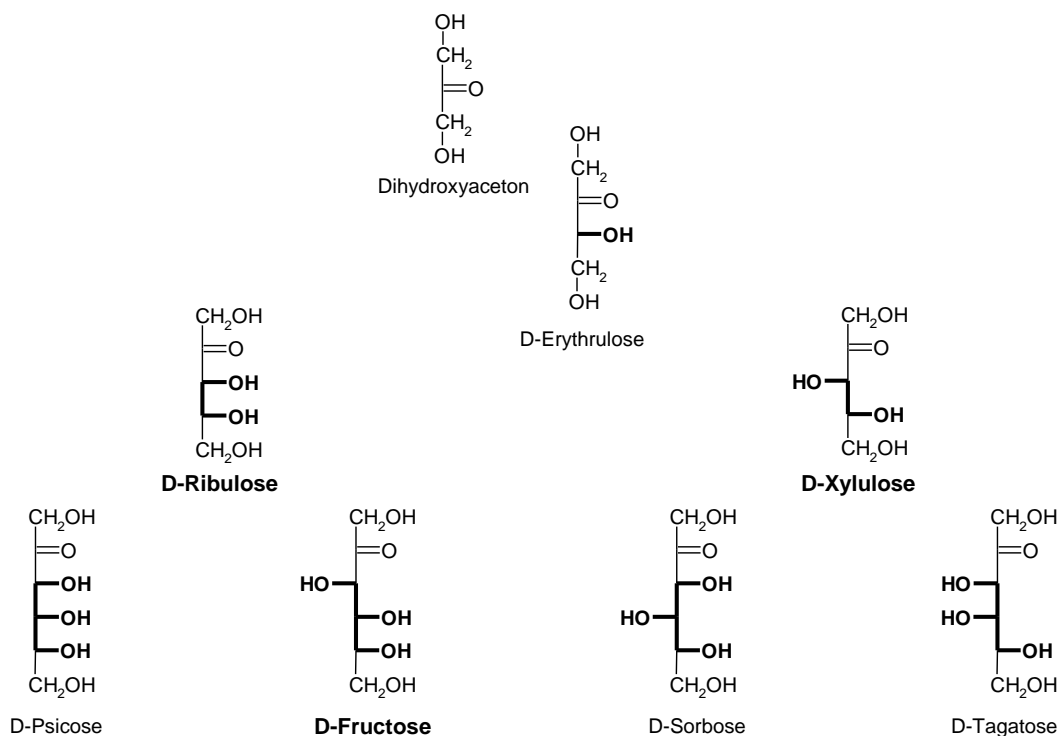
Mit selektiven Nachweisreaktionen wird bestimmt, welche Kohlenhydrate in den erhaltenen Proben sind. Da unterschiedliche Kohlenhydrate unterschiedliche Reaktivitäten haben, können mit selektiven Nachweisreaktionen die Eigenschaften und damit die Art des Kohlenhydrats bestimmt werden.

## THEORIE

Kohlenhydrate (Saccharide, Zucker) sind die massenmäßig häufigste Substanzklasse. Sie werden von lebenden Organismen für eine Vielzahl an Aufgaben eingesetzt, zum Beispiel als Energiespeicher (Stärke), für Festigkeit (Chitin), als Marker an Zellwänden, als Coenzyme (Coenzym A) oder für den Hauptstrang der DNA und RNA.

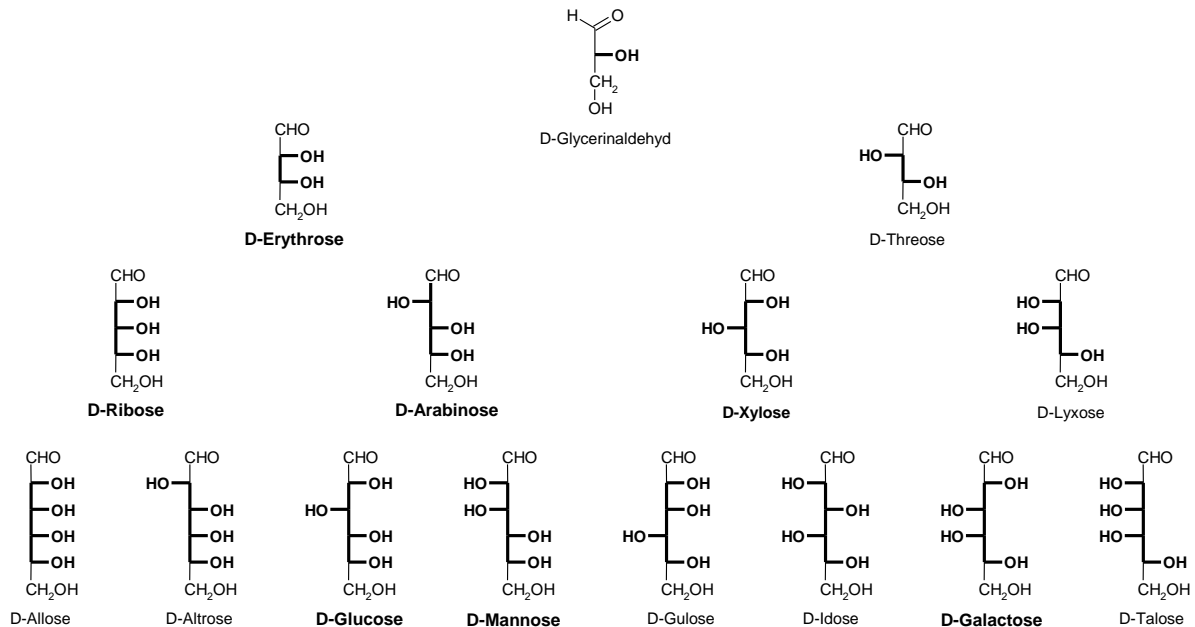
### Struktur

Einfache Kohlenhydrate sind farblose Feststoffe, die sich gut in Wasser lösen. Generell können sie anhand der Anzahl der Kohlenstoffatome im Grundgerüst eingeteilt werden. Je nach Kettenlänge spricht man von Triosen, Tetrosen, Pentosen, Hexosen, Heptosen, Octosen und Nonosen (drei bis neun Kohlenstoffe). Ist das oxidierte Ende der Kette ein Aldehyd, ist der Zucker eine Aldose, ist es ein Carbonyl, ist der Zucker eine Ketose.



Ketosen werden von Dihydroxyacetone durch die Verlängerung mit HCOH-Einheiten abgeleitet.

Die Grundstruktur ist die Triose. Diese kürzeste Aldose heißt Glycerinaldehyd, die kürzeste Ketose heißt Dihydroxacetone. Indem in diese Grundstrukturen HCOH-Fragmente eingefügt werden, entstehen weitere Kohlenhydrate. Da HCOH ein chirales Fragment ist (Bild/Spiegelbild), führt jede Verlängerung zu zwei neuen Zuckern, die sich nur in der Ausrichtung der neuen Hydroxygruppe unterscheiden.



Bei der Verlängerung von Glycerinaldehyd um HCOH-Einheiten werden Aldosen erhalten.

Die meisten Zucker enthalten mehrere HCOH-Fragmente, die jeweils ein Stereozentrum darstellen. Das führt dazu, dass Zucker mit der gleichen Summenformel nicht identisch sind, da sie sich in der *Konfiguration* (Ausrichtung) der Hydroxygruppen unterscheiden. Xylose und Arabinose sind zum Beispiel trotz der gleichen Summenformel von  $C_5H_{10}O_5$  nicht das gleiche Molekül sondern zwei *Diastereomere*. Das heißt, sie unterscheiden sich in der Konfiguration mehrerer Stereozentren. Zwei Zucker, die sich nur durch die Konfiguration in einem Stereozentrum unterscheiden, heißen *Epimere* - zum Beispiel Xylose und Ribose.

Die Konfiguration des HCOH-Fragments, das am weitesten vom Aldehyd bzw. Carbonyl entfernt ist, entscheidet darüber, ob ein Kohlenhydrat D oder L-konfiguriert ist. In der Natur kommen fast ausschließlich D-Kohlenhydrate vor.

Aldosen		Ketosen	
Ribose	Rib	Ribulose	Rul
Arabinose	Ara	Xylulose	Xul
Xylose	Xyl	Psicose	Psi
Lyxose	Lyx	Fructose	Fru
Allose	All	Sorbose	Sor
Altrose	Alt	Tagatose	Tag
Glucose	Glc		
Mannose	Man		
Gulose	Gul		
Idose	Ido		
Galactose	Gal		
Talose	Tal		

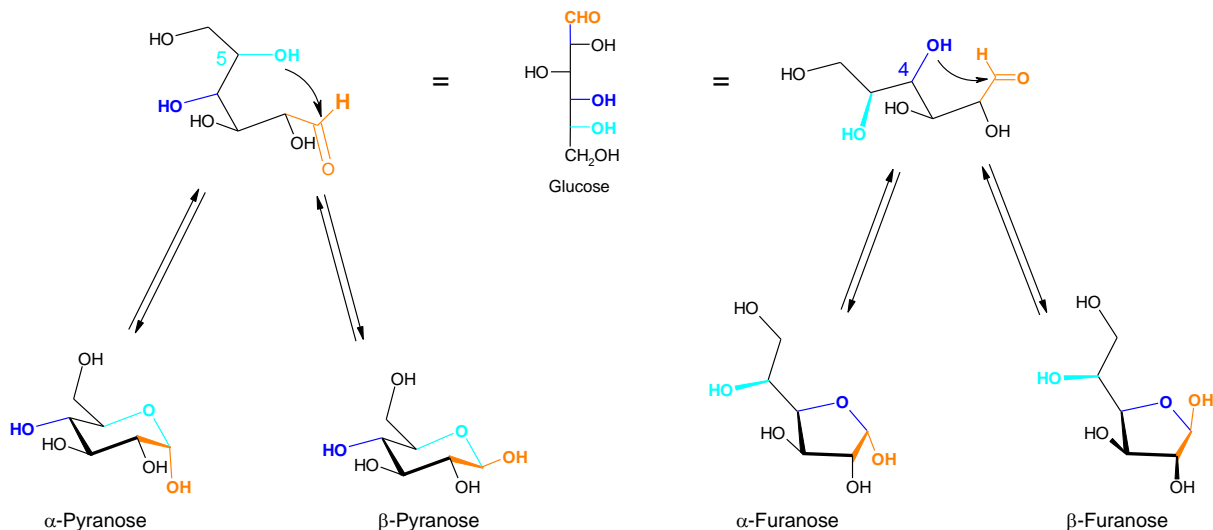
Abkürzungen für Kohlenhydrate

## ZYKLISIERUNG

In wässrigen Lösungen steht die offenkettige Form der Kohlenhydrate im Gleichgewicht mit mehreren zyklischen Formen. Zum Beispiel kann Glucose als Aldose mit sechs Kohlenstoffatomen vier verschiedene Ringe bilden. Dabei reagiert das Molekül mit sich selber, indem eine der Hydroxygruppen am Kohlenstoff des Aldehyds angreift. Geschieht dies mit der Hydroxygruppe an der Position 5, entsteht ein zyklisches Molekül mit sechs ringbildenden Atomen – eine Pyranose. Reagiert die Hydroxygruppe an der Position 4, besteht der Ring aus fünf Atomen – eine Furanose.

Bei dieser Reaktion wird aus der planaren Aldehydgruppe ein tetraedrischer Alkohol. Dabei muss die neuentstandene Hydroxylgruppe in eine von zwei Richtungen klappen. Zur Unterscheidung dieser beiden Konfigurationen verwendet man die Bezeichnungen  $\alpha$  und  $\beta$ . Der Kohlenstoff, an dem diese Umwandlung geschieht ist der *anomere Kohlenstoff* bzw. das anomere Zentrum.

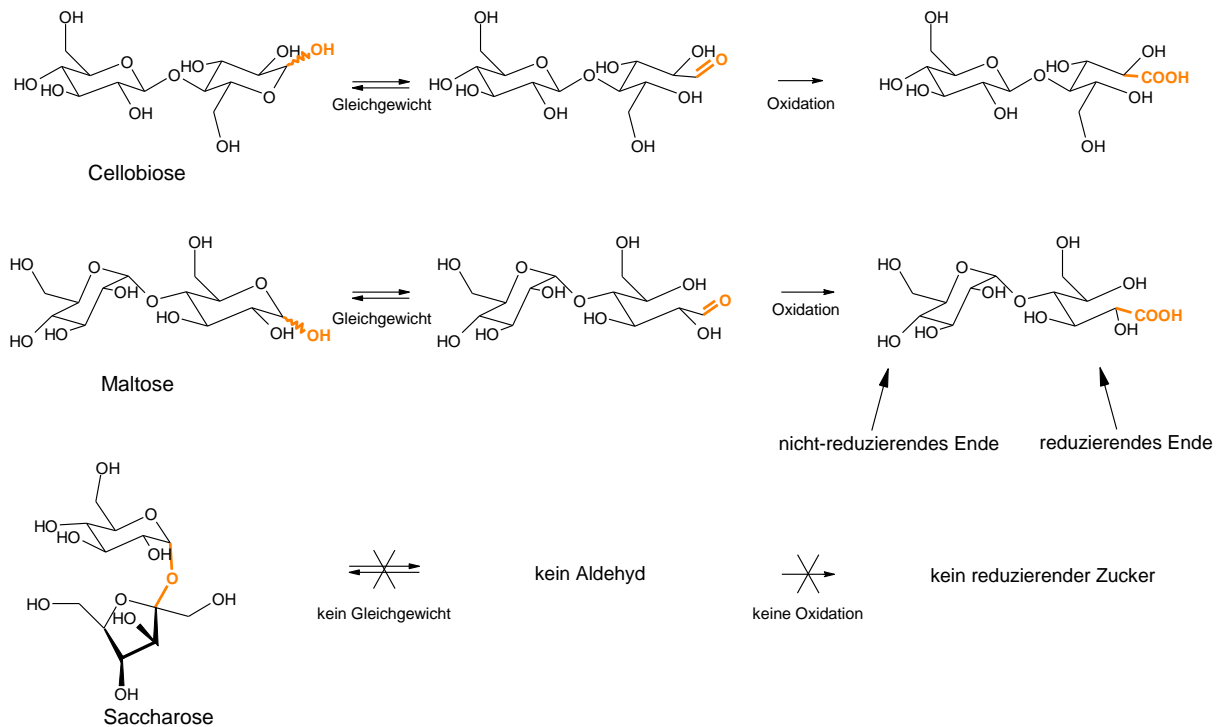
D-Glucose liegt zum Beispiel bei 31°C in Lösung zu 63,3% als  $\beta$ -D-Glucopyranose, 36,4%  $\alpha$ -D-Glucopyranose, und in sehr geringen Mengen als  $\beta$ -D-Glucofuranose,  $\alpha$ -D-Glucofuranose und offenkettige Form vor.



Die offene Form von Aldosen kann in einen Ring mit fünf bzw sechs Ecken umgelagert werden. Reagiert die Hydroxygruppe an der Position 5 (hellblau) mit dem anomeren Zentrum (orange), entsteht eine Pyranose. Findet die Reaktion zwischen der Hydroxygruppe an der Position 4 (blau) und dem anomeren Kohlenstoff (orange) statt, entsteht eine Furanose.

## REDUZIERENDE ZUCKER

Aldosen haben in ihrer offenkettigen Form an ihrem anomeren Zentrum ein Aldehyd. Aldehyde können in einer Redoxreaktion zu einer Carbonsäure oxidiert werden. Wenn etwas oxidiert wird, wird gleichzeitig immer auch ein Reaktionspartner reduziert. Zucker, die diese Reaktion eingehen können, heißen reduzierende Zucker, da sie ihren Reaktionspartner reduzieren. Die Bezeichnung „reduzierender Zucker“ stammt daher, dass das Reduktionsprodukt leichter zu beobachten ist (z.B. als Silberspiegel bei  $\text{Ag}^+ \rightarrow \text{Ag}^0$ ) als der oxidierte Zucker.



Die langen Ketten von Polysaccharide wie Cellulose oder Stärke haben zwei Enden, die als **reduzierendes Ende** und **nicht-reduzierendes Ende** bezeichnet werden. Das offenkettige Aldehyd kann sich nicht ausbilden, wenn das anomere Zentrum durch eine Bindung blockiert ist (z.B. bei Saccharose). Die Oxidation zur Carbonsäure ist dann nicht möglich und der Zucker nicht-reduzierend.

## WICHTIGE MONOSACCHARIDE

Erythrose ist eine Zwischenstufe im Shikimisäureweg.

Ribose bildet das Rückgrat der RNA (Ribonukleinsäure) und ist Teil von Adenosindiphosphat und -triphosphat (ADP, ATP).

Arabinose kommt häufig in Pflanzenpolysacchariden vor, zum Beispiel in Gummi Arabicum  
Xylose ist ebenfalls ein häufiges Monomer in pflanzlichen Polysacchariden, zum Beispiel in Hemicellulosen von Laubhölzern oder in Arabinoxylanen in Kleie.

Glucose entsteht bei der Photosynthese, wird in der Natur allgemein als Energieträger genutzt und ist das Monomer der wichtigsten Polysaccharide (Cellulose, Stärke und Glykogen). Andere Namen sind Traubenzucker und Dextrose. Glucose ist das wirklich wichtigste Kohlenhydrat.

Mannose kommt oft in pflanzlichen Polysacchariden vor.

Galactose ist Teil der Oligosaccharide Lactose (Milchzucker) und Raffinose und kann direkt vom Körper in Energie umgewandelt werden.

Ribulose ist ein häufiges Intermediat im pflanzlichen Stoffwechsel.

Xylulose ist ebenfalls ein Zwischenprodukt im pflanzlichen Stoffwechsel.

Fructose findet sich vor allem in Steinobst und Beeren und kann wie Glucose und Galactose vom Körper direkt genutzt werden. Fructose (Fruchtzucker) bildet gemeinsam mit Glucose das Disaccharid Saccharose (Sucrose, Haushaltszucker).

## DERIVATE

Die Eigenschaften der grundlegenden Zucker werden durch Änderungen an ihrer Struktur noch weiter variiert.

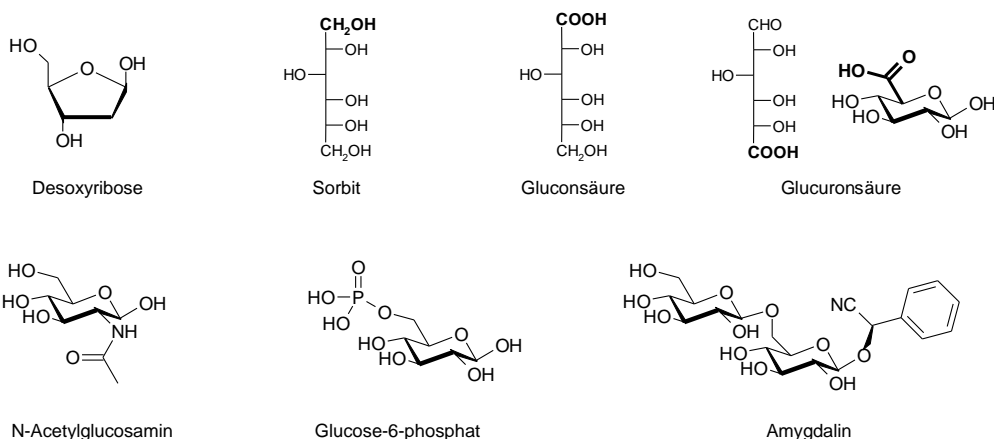
Desoxyzuckern fehlt eine oder mehrere Hydroxygruppen.  $\beta$ -2-Desoxy-D-ribose bildet das Rückgrat der DNA (Desoxyribonukleinsäure).

Zuckeralkohole (Alditole) sind Kohlenhydrate, deren Aldehyde bzw. Ketone zu Alkoholen reduziert sind. Sorbit ist reduzierte Glukose, kommt in der Natur in manchen Obstsorten vor und wird als Süßstoff und Feuchthaltemittel genutzt.

Wenn Zucker zu Carbonsäuren oxidiert werden, entstehen je nach Position der Säure Onsäuren oder Uronsäuren. In der Leber werden auszuscheidende Substanzen üblicherweise mit Glucuronsäure verknüpft, um sie besser wasserlöslich zu machen.

Aminozucker haben Aminogruppen anstelle von Hydroxylgruppen. Diese Amine sind außerdem häufig acetyliert. Acetylglucosamin (GlcNAc) ist der Grundbaustein von Chitin.

Zuckerphosphate sind die Ester von Kohlenhydraten mit Phosphorsäure. Glucose-6-phosphat ist im Stoffwechsel eine Schlüsselverbindung



### Beispiele für Zuckerderivate

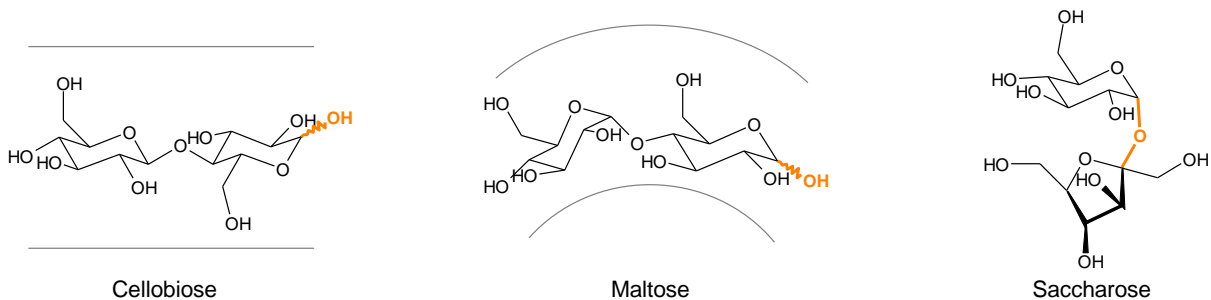
Glycoside sind Substanzen, bei denen ein Kohlenhydrat über das anomere Zentrum mit einem Alkohol, Thiol oder Amin eines anderen Moleküls verknüpft ist. Glycokongulate können zum Beispiel mit Peptiden, Proteinen oder Fettsäuren gebildet werden. Amygdalin ist das Glycosid von Glucose und Mandelonitril und findet sich in Steinobstkernen.

## DI-, OLIGO- UND POLYSACCHARIDE

Zucker, die miteinander verbunden sind, heißen Dimere (2 Zucker), Oligomere (bis 20 Zucker) und Polymere (mehr als 20 Zucker). Bestehen die Ketten aus einer Art von Kohlenhydratmonomer, spricht man von einem Homoglycan, wird die Kette aus verschiedenen Monomeren aufgebaut, handelt es sich um ein Heteroglycan. Glycan ist die allgemeine Bezeichnung für ein Oligo- bzw. Polysaccharid, Glucane bestehen hingegen ausschließlich aus Glucose.

Cellobiose (D-Glucosyl- $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-D-glucose) und Maltose (D-Glucosyl- $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4)-D-glucose) sind Disaccharide, die aus zwei Glucosemolekülen gebildet werden. Cellobiose ist  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-verknüpft, während Maltose  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4)-verknüpft ist. Der Unterschied zwischen den beiden Molekülen besteht also ausschließlich im Bindungswinkel zwischen den Monomeren, aus denen sie aufgebaut sind. Cellobiose ist ein gerades Molekül, das Polymer, das aus ihr entsteht, ist Cellulose, ein sehr starres und teilkristallines Polymer. Maltose kann aufgrund seiner Krümmung Helices ausbilden, das von ihr abstammende Polymer Stärke ist weich und bildet große Körner aus.

Bei Saccharose ( $\alpha$ -D-Glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-fructofuranosid) handelt es sich um den alltäglichen Kristallzucker. Da die beiden Zucker über ihre anomeren Zentren verbunden sind, können sie kein Gleichgewicht zwischen der offenkettigen und der ringförmigen Struktur ausbilden und sind daher nicht-reduzierend. Wird die Bindung zwischen den beiden Monomeren getrennt, entsteht Glucose und Fructose.

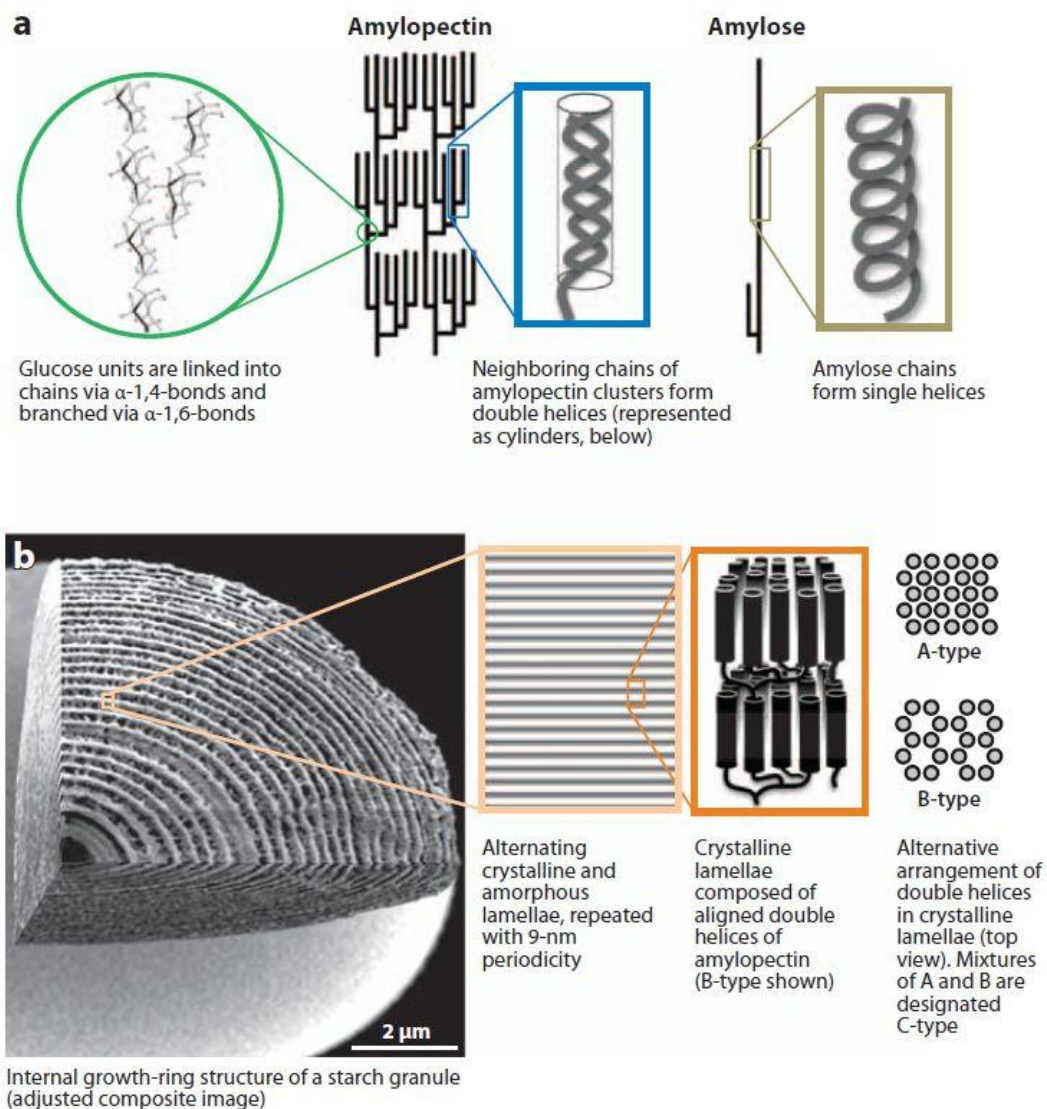


Die Art der Verknüpfung von Disacchariden beeinflusst ihre chemischen und makroskopischen Eigenschaften. Cellobiose und Maltose unterscheiden sich nur durch die Konfiguration des anomeren Kohlenstoffs. Die entsprechenden Polymere (Cellulose und Stärke) haben völlig unterschiedliche Eigenschaften.

Polysaccharide können je nach enthaltenen Monomeren Homopolymere oder Heteropolymere sein. Der Polymerisationsgrad und die Anzahl und Länge eventuell vorhandener Verzweigungen variiert und ist nicht wie bei Proteinen streng vorgegeben. Polyglykane werden im Allgemeinen zur Energiespeicherung oder zum Aufbau von festen Strukturen genutzt.

Tiere nutzen Glycogen als Speichermolekül. Dabei handelt es sich um ein Homopolymer aus  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4)-verknüpfter Glucose, das eine größere Zahl kurzer Verzweigungen und einen sehr hohen Polymerisationsgrad (etwa 50 000) aufweist.

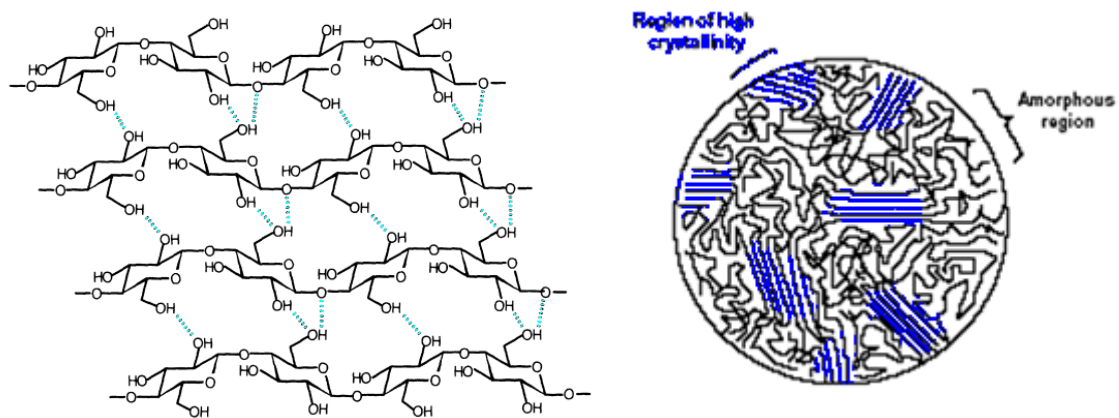
In Pflanzen kommt vor allem Stärke als Energiespeicher vor. Stärke besteht aus zwei  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4)-verknüpften Glucosepolymeren, der linearen Amylose und dem stark  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 6)-verzweigten Amylopektin. Die Seitenketten des Amylopektins haben in etwa die gleiche Länge und bilden miteinander Doppelhelices. Die Doppelhelices arrangieren sich in teilkristallinen Ebenen, aus denen schichtweise ein Stärkekorn aufgebaut wird.



Der hierarchische Aufbau der Stärke: Kohlenhydratpolymere bilden Helices, die sich in geordneten Schichten anordnen, aus denen wiederum Körner aufgebaut sind (Abbildung aus Annu. Rev. Plant Biol. 2010. 61:209–34).

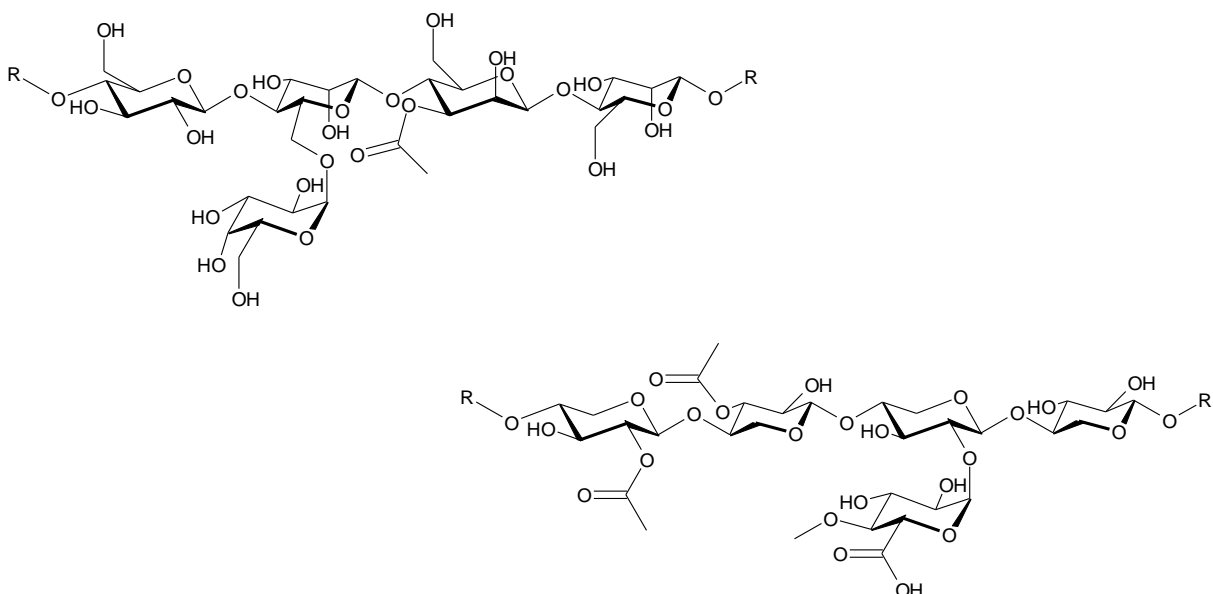


Cellulose ist die massenmäßig häufigste Kohlenhydratverbindung und wird von Pflanzen zum Aufbau stabiler Strukturen genutzt. Cellulose ist ein  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-verknüpftes Glucosepolymer, dessen lineare Ketten sich zu kristallinen Bereichen aneinanderfügen können. Die Ketten werden in diesen Bereichen von Wasserstoffbrückenbindungen so sehr stabilisiert, dass Cellulose beim Erhitzen nicht schmilzt sondern zersetzt wird. Die Wasserunlöslichkeit der Cellulose und die große Stabilität der Kombination aus Cellulose und Lignin erlaubt es Pflanzen, sehr groß zu werden.



Cellulose besteht aus langen, linearen Glucoseketten, die von Wasserstoffbrücken (blau) stabilisierte kristalline Bereiche bilden. Die kristallinen Bereiche wechseln sich mit amorphen Bereichen ab.

In Pflanzen findet sich noch eine weitere große Gruppe an Polysacchariden: Hemicellulosen. Diese verzweigten Heteropolysaccharide sind relativ kurzkettenig, bestehen aus einigen verschiedenen Hexosen, Pentosen und Uronsäuren und haben keine einheitliche Zusammensetzung. Die Hemicellulosen von Laubhölzern, Nadelhölzern und Gräsern sind sehr unterschiedlich. Das häufigste Monomer bei Laubhölzern ist acetylierte Xylose, während bei Nadelhölzern Mannose überwiegt.



Schematische Darstellung von Hemicellulosen aus Nadelholz (oben) und Laubholz (unten).

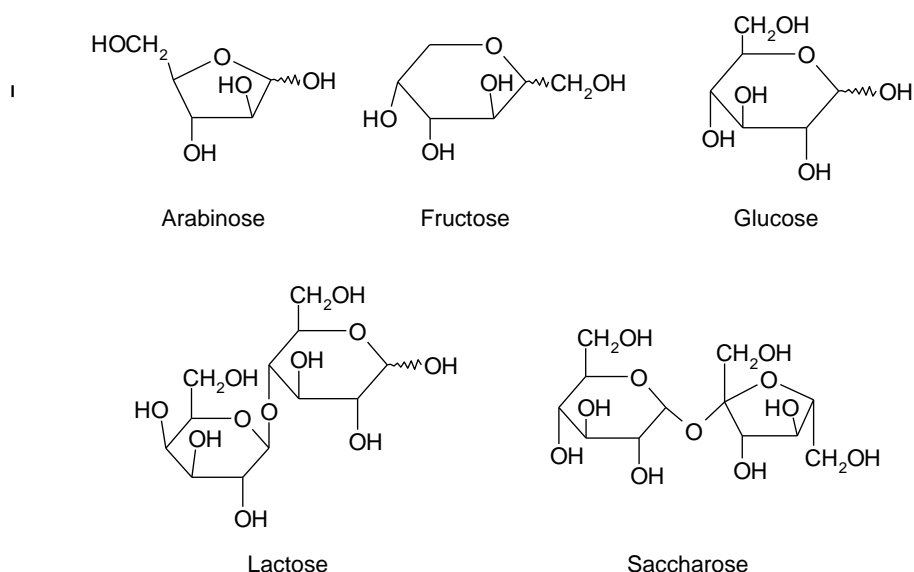
Chitin bildet den Panzer von Insekten, Schalentieren und einigen Algen und Pilzen. Wie Cellulose ist es ein lineares,  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-verknüpftes Homopolymer. Das Monomer ist in diesem Fall aber N-Acetylglucosamin (GlcNAc).

Alginat ist ein Heteropolysaccharid aus Guluronsäure und Mannuronsäure. Kationen wie  $\text{Ca}^{2+}$  werden von den Carbonsäuren der Monomere komplexiert und vernetzen dadurch die einzelnen Alginatketten. Die dabei entstehenden Gele werden für Abdrücke und als Geliermittel genutzt.

Dextrane sind stark verzweigte Homopolymere aus Glucose mit sehr hoher Molmasse. Sie werden von Milchsäurebakterien aus Saccharose als Speichermolekül hergestellt und finden sich unter anderem auch im Zahnbelag wieder. Aufgrund ihrer großen Molmasse werden sie genutzt, um eine bestimmte Viskosität zu erzielen oder Filme zu bilden. Quervernetzte Dextrane werden als Säulenfüllmaterial für die Gelfiltration genutzt.

## PRAKTISCHE ANLEITUNG

Das Kohlenhydrat in der ausgeteilten Probe soll identifiziert werden. Es kann sich um Arabinose, Fructose, Glucose, Lactose, Stärke oder Saccharose handeln.



Die verwendeten Nachweisreaktionen sind: Fehling-Probe (reduzierende Zucker), Seliwanoff-Probe (Ketoheptosen), Bial-Probe (Pentosen), Farbreaktion mit Methylamin (Lactose) und Lugolsche Lösung (Stärke).

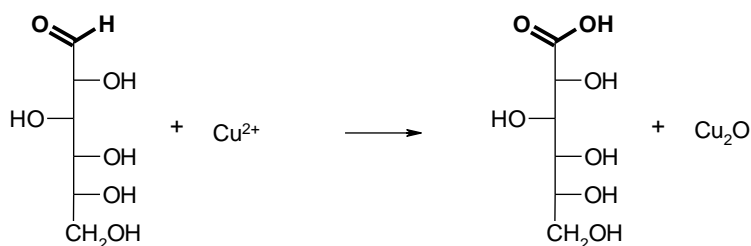
Jede Nachweisreaktion sollte unbedingt mit einer positiven und einer negativen Referenz durchgeführt werden!

Alle Reaktionen werden in Mikroreaktionsgefäßen (Eppis) durchgeführt. Bei Bedarf werden die Proben im Heizblock auf 95°C erhitzt. Die Eppideckel sollen dabei offen bleiben.

**Vorsicht! Manche Nachweisreagenzien sind stark ätzend!**

### FEHLING-PROBE:

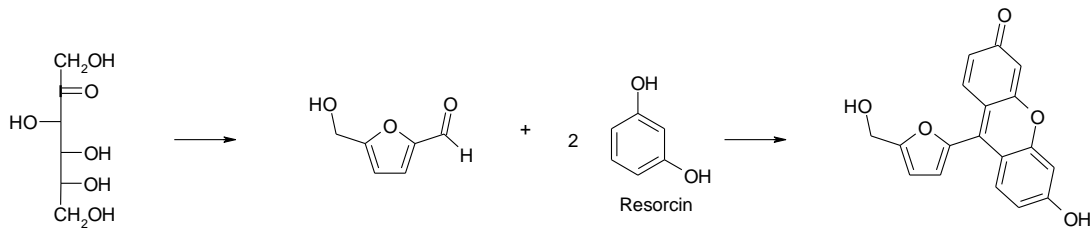
250 µL Lösung A und 250 µL Lösung B werden gemischt und mit 500 µL Probenlösung versetzt. Das Gemisch wird einige Minuten aufgeheizt. Bei einem positiven Test bildet sich ein roter Niederschlag.



Lösung A enthält Kupfer(II)-Sulfat, Lösung B ist eine alkalische Weinsäurelösung. Das Weinsäuresalz hält das Kupfer(II) als blauer Komplex in Lösung. Das Kupfer(II) reagiert mit dem reduzierenden Ende von **Aldosen** zum unlöslichen, roten Kupfer(I)oxid. Das Aldehyd der Aldose wird dabei zur Carbonsäure oxidiert.

### SELIWANOFF-PROBE:

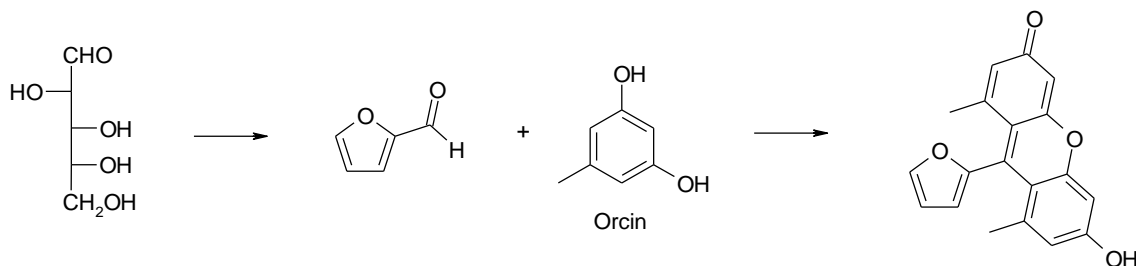
1 mL Reagens wird mit wenigen Tropfen Probe versetzt und erhitzt. Nach 6-8 Minuten färbt sich eine positive Probe rot.



Das Reagens ist eine Resorcinlösung in Salzsäure. **Ketohexosen** werden von der starken Säure zu 2-Hydroxymethylfurfural umgewandelt, das mit Resorcin ein rotes Molekül bildet.

### BIAL-PROBE

500 µL Probe werden mit 1 mL Reagens vermischt und im Abzug erhitzt. Eine positive Probe färbt sich blau.



Das Reagens besteht aus Orcin und Eisen(III)chlorid in konzentrierter Salzsäure. Aus **Pentosen** entsteht unter der Einwirkung der starken Säure Furfural, das mit dem Orcin zu einem polyzyklischen Molekül reagiert. Zusammen mit den Eisenionen entsteht eine blaue Farbe.

### LACTOSENACHWEIS MIT METHYLAMIN

1 mL Probe wird mit wenigen Tropfen 20% Natronlauge und wenigen Tropfen 5% Methylaminlösung versetzt und erhitzt. Bei einer roten Verfärbung ist die Probe positiv.

### LUGOLSCHES LÖSUNG:

Zu 1 mL Probe werden wenige Tropfen der Jodlösung zugegeben. Ein positiver Test färbt die Lösung dunkel.

Das Nachweisreagens enthält Jod und Kaliumjodid. Die in dieser Lösung enthaltenen Pentaoidid-Anionen ( $I_5^-$ ) werden in die Helices der **Stärke** eingelagert und färben sich dabei blau.

# QUANTITATIVE BESTIMMUNG VON SACCHAROSE

---

## ZIELSETZUNG, AUFGABE

---

Der Zuckergehalt in echten Proben wird mit verschiedenen Messmethoden bestimmt. Die Eignung und der Messbereich der Methoden werden verglichen und bewertet.

## METHODE

---

Die physikalischen Eigenschaften von Lösungsmitteln (zB Wasser) werden verändert, wenn Substanzen (zB Saccharose) darin aufgelöst werden. Anhand dieser Änderungen kann der Gehalt an Substanz bestimmt werden. Es werden die Änderungen der Dichte, des Brechungsindex und der Leitfähigkeit untersucht.

Zucker in Lösung können auch direkt nachgewiesen werden, indem mit ihnen selektive Reaktionen durchgeführt werden. Das Reaktionsprodukt hat eine Farbe, die im Photometer gemessen werden kann. Bei dieser Übung wird die Zuckerkonzentration mit einem Orcin-Reagens bestimmt.

Die Änderung der physikalischen Eigenschaften bzw der Farbe wird in einer Kalibrationsgerade gegen den Zuckergehalt aufgetragen. Damit kann die Zuckerkonzentration in einer Probe bestimmt werden.

## THEORIE

---

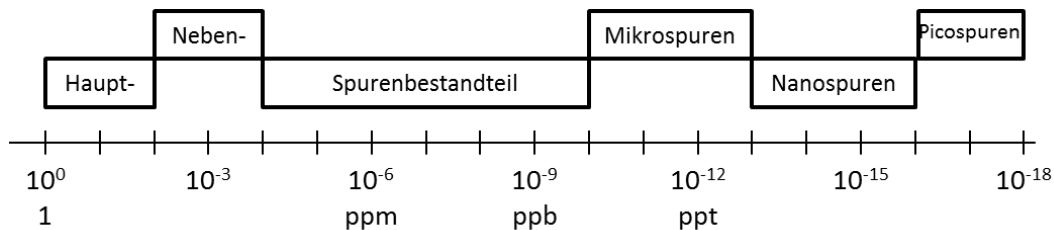
Die Konzentration einer Substanz in einer Lösung kann mit verschiedenen Methoden bestimmt werden. Physikalische Eigenschaften von Lösungen (Dichte, Brechungsindex) ändern sich mit dem Stoffgehalt, daher können sie genutzt werden, um die Menge an gelösten Substanzen zu bestimmen. Gelöste Stoffe können auch mit chemischen Reaktionen in eine leichter messbare Form umgewandelt werden (zB. ist die untersuchte Substanz nach einer Fällung nicht mehr gelöst und kann gewogen werden).

Die Wahl der Messmethode kann nach folgenden Kriterien getroffen werden:

- Wie genau muss die Methode sein? Müssen 10g von 100g oder 10,01g von 10,02g unterschieden werden? Reicht es möglicherweise bereits aus zu wissen, dass der gemessene Wert größer oder kleiner als eine bestimmte Vorgabe ist?
- Über welchen Bereich gehen die zu erwartenden Werte? Ist ein Arbeitsbereich von 10g bis 11g ausreichend, oder schwanken die Werte zwischen 0,1g und 1000g?
- Welche Selektivität ist erforderlich? Bei der Messung einer Stammwürze kann es reichen, den Gesamtzuckergehalt zu bestimmen, sollen aber Spuren von Laktose bestimmt werden, wird ein sehr selektiver Nachweis erforderlich sein.
- Wie lange darf die Messung dauern? Gibt es viele Proben, muss die Zeit für eine Bestimmung kurz sein.
- Wie viel darf es kosten? Tests, die sehr oft wiederholt werden oder keine gravierenden Konsequenzen haben, sollten sehr billig sein.

Bestimmungen, die auf der direkten Messung physikalischer Größen beruhen, sind meistens einfach durchzuführen aber unspezifisch. Chemische Bestimmungen sind oft aufwändiger, haben aber eine größere Selektivität. Das heißt, dass die benutzte Nachweismethode nur mit einer bestimmten Substanz oder Substanzklasse reagiert.

Messmethoden werden anhand ihres Arbeitsbereichs eingeteilt. Je nach erforderlicher Probenmenge unterscheidet man Makroproben (Gramm) bis Ultramikroproben (Mikrogramm). Der Anteil des Analyten an der Probe entscheidet, ob es sich um einen Hauptbestandteil, Nebenbestandteil oder Spuren handelt.



Analytische Verfahren werden nach Verhältnis von Analytenmasse zu Probenmasse (Gehalt) eingeteilt.

Messwerte können nur in wenigen Fällen (Gravimetrie, Volumetrie) direkt in eine Analytkonzentration umgerechnet werden. Bei den meisten Methoden ist es vielmehr notwendig, eine Kalibrierfunktion zu erstellen, die das Verhältnis zwischen Messwert und Konzentration über den betrachteten Konzentrationsbereich beschreibt. Im einfachsten Fall ist diese Funktion eine Gerade mit der allgemeinen Gleichung:

$$y = k \cdot x + d$$

**x** ist die Konzentration des Analyten, **y** der erhaltene Messwert, **k** die Steigung der Gerade und **d** der Messwert einer Probe, die keinen Analyten enthält

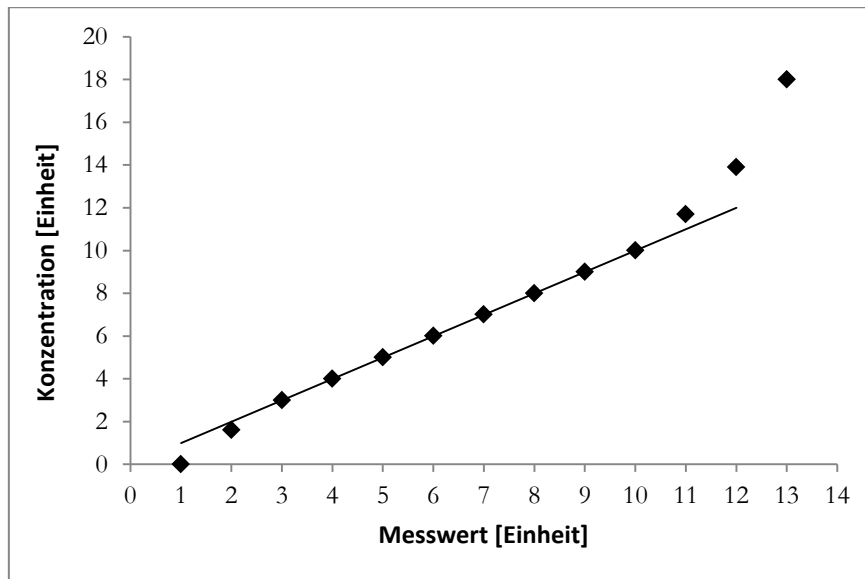
**d** kann bestimmt werden, indem man das gesamte Messverfahren auf eine Probenlösung anwendet, die keinen Analyten enthält. Diese Probe heißt Blindprobe und der erhaltene Messwert Blindwert. Der Blindwert ist der Messwert, der nur aufgrund der Messmethode entsteht, zum Beispiel durch die Zugabe von Reagenzien. Man kann den Blindwert von allen Messwerten abziehen, um eine Kalibrationsgerade zu erhalten, die durch den Nullpunkt geht. Das Messergebnis wird davon nicht beeinflusst.

Die Steigung **k** der Kalibrationsgerade ist proportional zur Empfindlichkeit der Messung. Eine große Steigung bedeutet, dass sich kleine Änderungen der Analytkonzentration stark auf den Messwert auswirken, die Methode ist daher sehr empfindlich.

Der Messbereich, für den die Messmethode genutzt werden kann, wird von mehreren Faktoren eingeschränkt:

- Die gemessenen Konzentrationen sollen zwischen der größten und der kleinsten Konzentration liegen, mit der die Kalibrierung durchgeführt wurde. Die Kalibrierfunktion zu extrapolieren kann zu unzuverlässigen Ergebnissen führen.
- Der Messwert muss vom Detektor angezeigt werden können. Zu kleine Werte sind vom Rauschen nicht zu unterscheiden, während Werte, die den Detektor übersteuern - das heißt, er zeigt nur noch den Maximalwert an – nicht voneinander unterschieden werden können.

Bei starken Wechselwirkungen mit der Probenmatrix und Abweichungen bei der Probennahme und Probenvorbereitung kann die Kalibrationsgerade zu einer Kurve werden. In diesem Fall ist der Messbereich auf den geraden Teil beschränkt.



Der lineare Bereich dieser Eichgerade erstreckt sich ungefähr von 3 bis 10 Konzentrationseinheiten.

Interferenzen mit der Matrix können dazu führen, dass überhaupt keine Kalibrationsgerade erstellt werden kann. Es ist auch möglich, dass die Matrixeffekte in der echten Probe sich so stark auf die Messung auswirken, dass die Kalibrationsgerade für die Probe nicht gültig ist.

Eine gute Messmethode reagiert sehr selektiv auf die zu bestimmende Substanz und wird von eventuellen Effekten der Matrix nicht beeinflusst. Zum Beispiel kann die rote Farbe in Traubensaft die Rotfärbung einer Nachweisreaktion komplett überdecken. Eine Bestimmung des Zuckergehalts in Traubensaft über die Dichte wird hingegen von der Farbe nicht beeinflusst.

In einem UV/Vis-Spektrometer wird gemessen, wie stark die Intensität eines Lichtstrahls abnimmt, wenn er durch eine gelöste Probe fällt. Der Zusammenhang der Intensität des austretenden Lichts mit der Konzentration des Analyten wird durch das Lambert-Beersche Gesetz beschrieben:

$$E = \epsilon(\lambda) \cdot d \cdot c$$

**c** ist die Konzentration der Probe in mol/L. Wenn mit Standards eine Kalibrationsgerade erstellt wird, ist die Konzentration bekannt. Wird eine Probe gemessen, ist die Konzentration der Wert, der ermittelt wird.

**d** ist die Schichtdicke der Küvette, in der sich die Probe befindet, in cm. Sie ist durch das verwendete Photometer oder die verwendeten Küvetten vorgegeben.

**$\epsilon(\lambda)$**  ist der molare Extinktionskoeffizient in L/(mol · cm), der für diesen Analyten bei dieser Wellenlänge  $\lambda$  charakteristisch ist. Da er nur für die Wellenlänge gilt, bei der die Kalibrierung durchgeführt worden ist, darf auch die Messung nur bei dieser bestimmten Wellenlänge erfolgen. Daher wird im Photometer mit einem Filter oder mit einem Beugungsgitter monochromatisches (einfärbiges) Licht genau dieser Wellenlänge erzeugt.

**E** ist die Extinktion, die bei der Messung bestimmt wird. Extinktion ist ein Maß für die Abschwächung des Lichts und wird von der Transmission abgeleitet.

Die Transmission **T** ist das Verhältnis der Lichtintensität nach der Probe **I** zur Lichtintensität vor der Probe **I<sub>0</sub>**:

$$T = I/I_0$$

Eine Transmission von 0,01 bedeutet also, dass der Lichtstrahl nach dem Durchleuchten der Probe nur noch ein Hunderstel bzw. 1% der ursprünglichen Intensität hat.

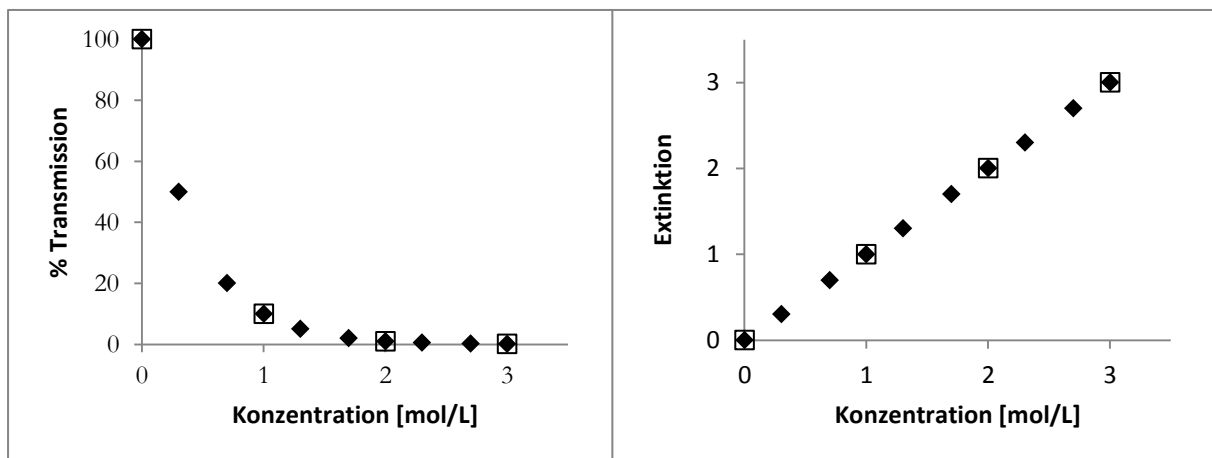
Die Extinktion ist der negative dekadische Logarithmus der Transmission:

$$E = -\log T = -\log(I/I_0)$$

Eine Transmission von 0,01 entspricht also einer Extinktion von 2. Die Extinktion hat den praktischen Vorteil, dass sie *linear* von der Konzentration abhängt, wie es im Lambert-Beerschen Gesetz beschrieben wird.

Konzentration [mol/L]	Transmission	Transmission in %	Extinktion
0	1	100	0
1	0,1	10	1
2	0,01	1	2
3	0,001	0,1	3

Gegenüberstellung von Transmission und Extinktion (für  $\epsilon(\lambda) = 1 \text{ L}/(\text{mol} \cdot \text{cm})$  und  $d = 1 \text{ cm}$ )



Graphische Darstellung der Anhängigkeit der Transmission und Extinktion von der Konzentration (wieder für  $\epsilon(\lambda) = 1 \text{ L}/(\text{mol} \cdot \text{cm})$  und  $d = 1 \text{ cm}$ ). Die in der Tabelle angegebenen Werte sind umrandet.

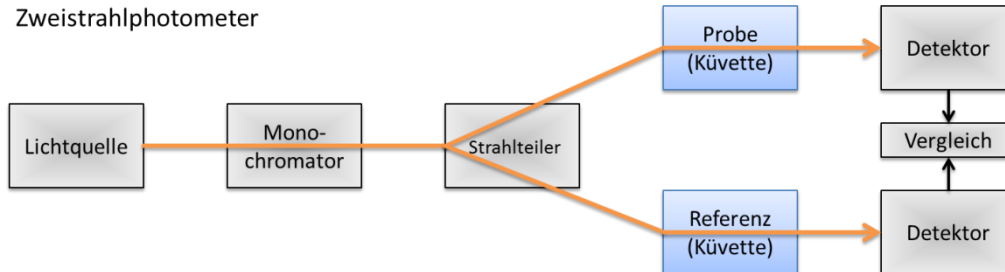
Beim Durchgang durch die Küvette wird das Licht nicht nur vom Analyten abgeschwächt sondern auch durch Streuung, durch Reflexion an der Küvettenwand und durch Absorption durch das Küvettenmaterial und durch das Lösungsmittel. Um diese Einflüsse zu korrigieren, wird bei einem Einstrahlphotometer die Extinktion einer identischen Küvette, die nur Lösungsmittel enthält, als 0 (also keine Extinktion, 100% Transmission) festgelegt. Bei einem Zweistrahphotometer wird der Lichtstrahl geteilt und einerseits durch die Probe und andererseits durch eine Referenzküvette, die nur Lösungsmittel enthält, gelenkt. Die Messwerte, die bei der Referenz und bei der Probe erhalten werden, unterscheiden sich nur durch den Einfluss des Analyten, und man erhält einen vom Messaufbau unbeeinflussten Messwert.



### Einstrahlphotometer

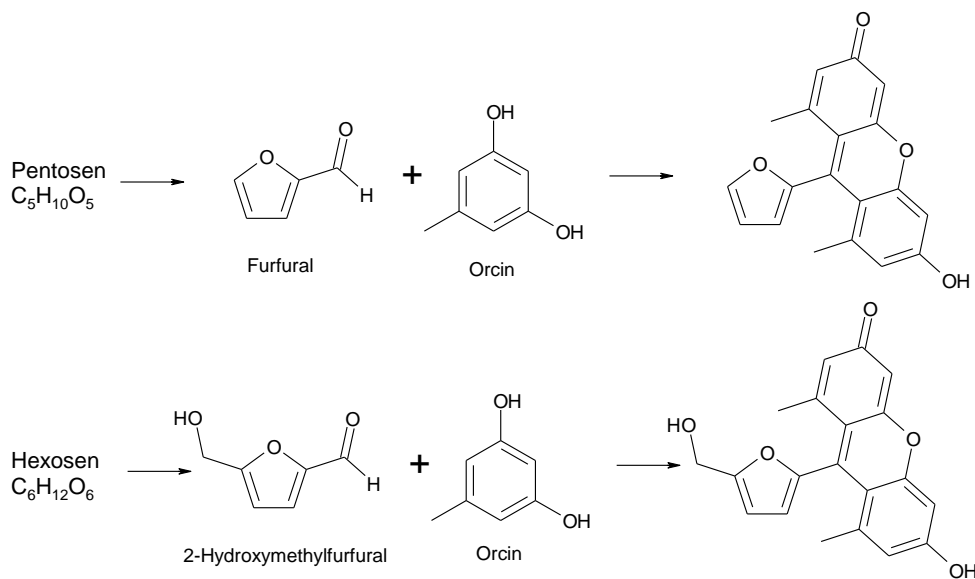


### Zweistrahphotometer



Prinzipieller Aufbau von Einstahl- und Zweistahlphotometern.

Bei diesem Beispiel wird die Konzentration von Saccharose in Getränken gemessen. Die in den Getränken enthaltenen Kohlehydrate werden sauer in Monosaccharide gespalten, aus Saccharose („Zucker“) wird dabei Glucose und Fructose. Durch die Säure entstehen in weiterer Folge aus den Hexosen 2-Hydroxymethylfurfural und aus den Pentosen Furfural. Diese Verbindungen reagieren mit Orcin zu polyzyklischen Molekülen, deren Farbintensität im Photometer gemessen wird.



Reaktion von Kohlenhydraten mit Orcin – die Reaktionsprodukte haben eine leicht nachzuweisende, rote Farbe.

% (w/v) Saccharose	0	2	4	6	8	10	12	14	16
Dichte [g/mL]	0,9982	1,0060	1,0139	1,0219	1,0299	1,0381	1,0465	1,0549	1,0635

Dichte von Zuckerlösungen bei 20°C (M. Holtzhausen: Biochemische Labormethoden, Springer. 1997.).

## PRAKTISCHE ANLEITUNG

---

Es wird der Zuckergehalt in mehreren Proben bestimmt. Um die Kalibrationsgeraden der verwendeten Messmethoden zu erstellen, werden eine Stammlösung und Verdünnungen mit bestimmten Konzentrationen hergestellt.

Mit den Zuckerlösungen darf ausschließlich auf dem angegebenen Platz gearbeitet werden!

Die Stammlösung und alle Verdünnungen werden in 500 mL Messkolben hergestellt, als Standard dient Kristallzucker. Die Stammlösung hat eine Konzentration von 50 mg/mL, die Verdünnungen decken einen Bereich bis 0,5 mg/mL ab. Die untersuchten Getränkeproben werden 1:5 verdünnt, die ausgeteilte Probe wird nicht verdünnt.

Es werden die Stammlösung, 5 Verdünnungen, ein Blindwert, zwei Getränkeproben und eine ausgeteilte Probe gemessen. Bei jeder Probe und allen Standards wird eine Dreifachbestimmung durchgeführt. Die Messungen erfolgen von der verdünntesten zur konzentriertesten Probe.

Jedes Zweierteam stellt seine eigene Verdünnungsreihe, Probenverdünnungen und Eichgeraden her. Jedes Team führt eine photometrische Bestimmung mit Orcin und entweder dem Refraktometer oder dem Aräometer durch.

### ZUCKERBESTIMMUNG MIT ORCIN

---

0,5mL Probe werden in einer Eprovette mit 1,25 mL Orcinreagens vermischt. **Vorsicht**, das Nachweisreagens enthält **Schwefelsäure!** Die Zugabe erfolgt mit einem Dispenser, die fertige Probe wird mit dem Vortexer gemischt. Die Eprovetten mit allen Proben werden in ein Gestell gestellt, mit Alufolie zugedeckt und 40 min bei 40 °C inkubiert.

Nach 40 Minuten werden die Proben mit Eiswasser abgekühlt und die Extinktion bei 405nm gemessen. Während der Inkubation werden die anderen Messmethoden kalibriert und auf die Proben angewandt.

Für die Messungen sollen möglichst wenige Küvetten verwendet werden.

### ZUCKERBESTIMMUNG MIT DEM REFRAKTOMETER

---

Die Zuckerlösung wird auf die Messzelle geträufelt und der Brechungsindex abgelesen.

### ZUCKERBESTIMMUNG MIT DEM ARÄOMETER (SENKSPINDEL)

---

Etwa 100 mL der Probe werden in einen 100 mL-Messzylinder gefüllt. Das Aräometer wird drehend in die Flüssigkeit eingetaucht. Wenn es weder Wand noch Boden berührt und zur Ruhe gekommen ist, wird am Meniskus die Dichte abgelesen. Die Dichte wird anhand der tabellierten Werte in den Zuckergehalt umgerechnet.

### ZUCKERBESTIMMUNG MIT DEM KONDUKTOMETER

---

Die Elektroden des Leitfähigkeitsmessgeräts werden in die Probe gehalten und der Wert abgelesen.

# GELFILTRATION

---

## AUFGABE

---

Eine Mischung aus verschiedenen Molekülen wird durch Gelfiltration in ihre Bestandteile aufgetrennt. Welche Moleküle in welcher Fraktion enthalten sind, wird photometrisch in einem Plate Reader überprüft. Die in der aufgegebenen Probe enthaltene Substanzmenge wird bestimmt, indem Konzentration und Volumen in jeder Fraktion gemessen wird.

## METHODE

---

Für die Übung wird eine Gelfiltrationssäule mit Vorratsgefäß und Fraktionskollektor verwendet. Wasser fließt aus dem Vorratsgefäß durch die Säule und wird im Fraktionskollektor in Eprouvetten aufgefangen. Beim Durchfließen der Säule werden die in der Probe enthaltenen Verbindungen nach ihrer Molekülgröße aufgetrennt.



Die drei für eine Gelfiltration benötigten Bestandteile: Vorratsgefäß, Säule und Fraktionskollektor.

Die Detektion erfolgt erst nach der Trennung, indem im Photometer die Absorption der einzelnen Fraktionen bei verschiedenen Wellenlängen bestimmt wird. Wird die Absorption gegen die Fraktionsnummer aufgetragen, erhält man ein Chromatogramm. Da die Absorptionsmaxima der aufgetrennten Substanzen unterschiedlich sind, erhält man je nach Wellenlänge verschiedene Chromatogramme. Diese sind je nach Wellenlänge sehr spezifisch für einzelne Substanzen oder erfassen unspezifisch alle Verbindungen.

In der Praxis wird die Gelfiltration zum Aufreinigen oder Entsalzen von Proteinen verwendet, oder um den Puffer auszutauschen, in dem die Proteine gelöst sind. Mit zusätzlichen Geräten wird die Methode auch genutzt, um die Molmasse von Polymeren zu bestimmen.

## THEORIE

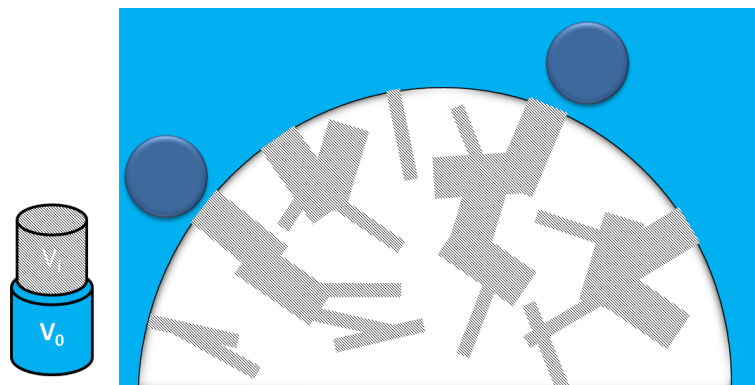
---

Gelfiltration ist eine Variante der Größenausschlusschromatographie (Size Exclusion Chromatography, SEC). Bei dieser Methode werden Moleküle in einer Trennsäule anhand ihres Volumens in Lösung aufgetrennt. Es wird zwischen Gelpermeationschromatographie (Gel Permeation Chromatography, GPC) und Gelfiltration unterschieden, obwohl das Trennprinzip in

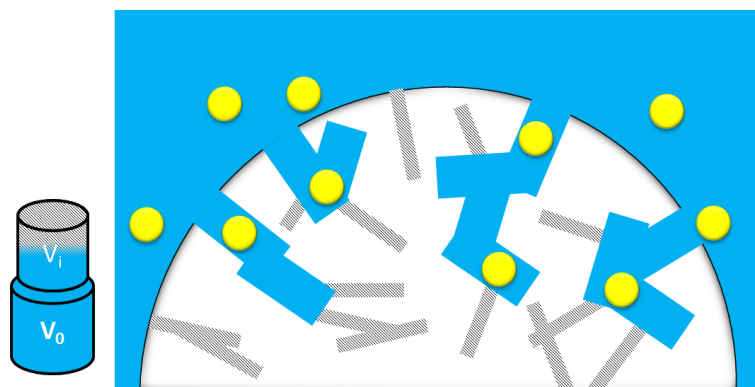
beiden Fällen das gleiche ist. Bei der GPC werden organische Lösungsmittel als Laufmittel und Füllmaterialien aus quervernetzten, synthetischen Polymeren verwendet. Hingegen ist das Laufmittel bei der Gelfiltration wässrig, und das Füllmaterial besteht aus weichen Polymeren (zB. Agarose, Dextran, Polyacrylamid), die nur eine geringe Druckbeständigkeit haben. Gelfiltration wird üblicherweise verwendet, um Enzyme aufzureinigen.

### MECHANISMUS

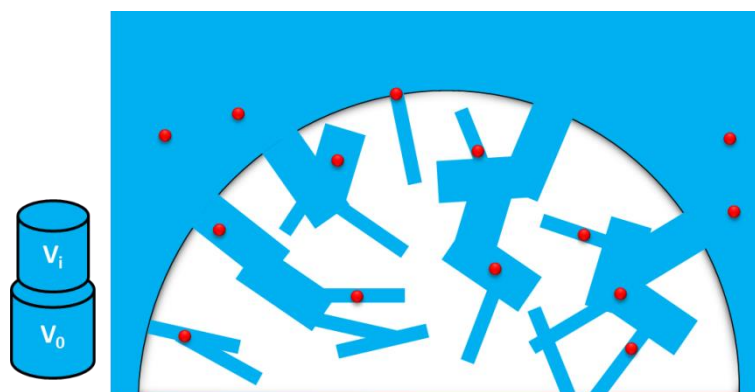
Der Trennmechanismus der Größenausschlußchromatographie beruht darauf, dass manche Moleküle zu groß sind, um in die Poren des Füllmaterials zu diffundieren, während andere durchaus klein genug sind, um in die Poren einzudringen.



Die blauen Moleküle sind zu groß, um in die Poren zu diffundieren. Ihnen steht nur das Volumen  $V_0$  außerhalb des Füllmaterials zur Verfügung.



Die gelben Moleküle sind klein genug, um in die großen Poren einzudringen, aber zu groß, um in die kleinen Poren zu gelangen. Sie können sich in einem Volumen aufhalten, das größer als  $V_0$  ist.

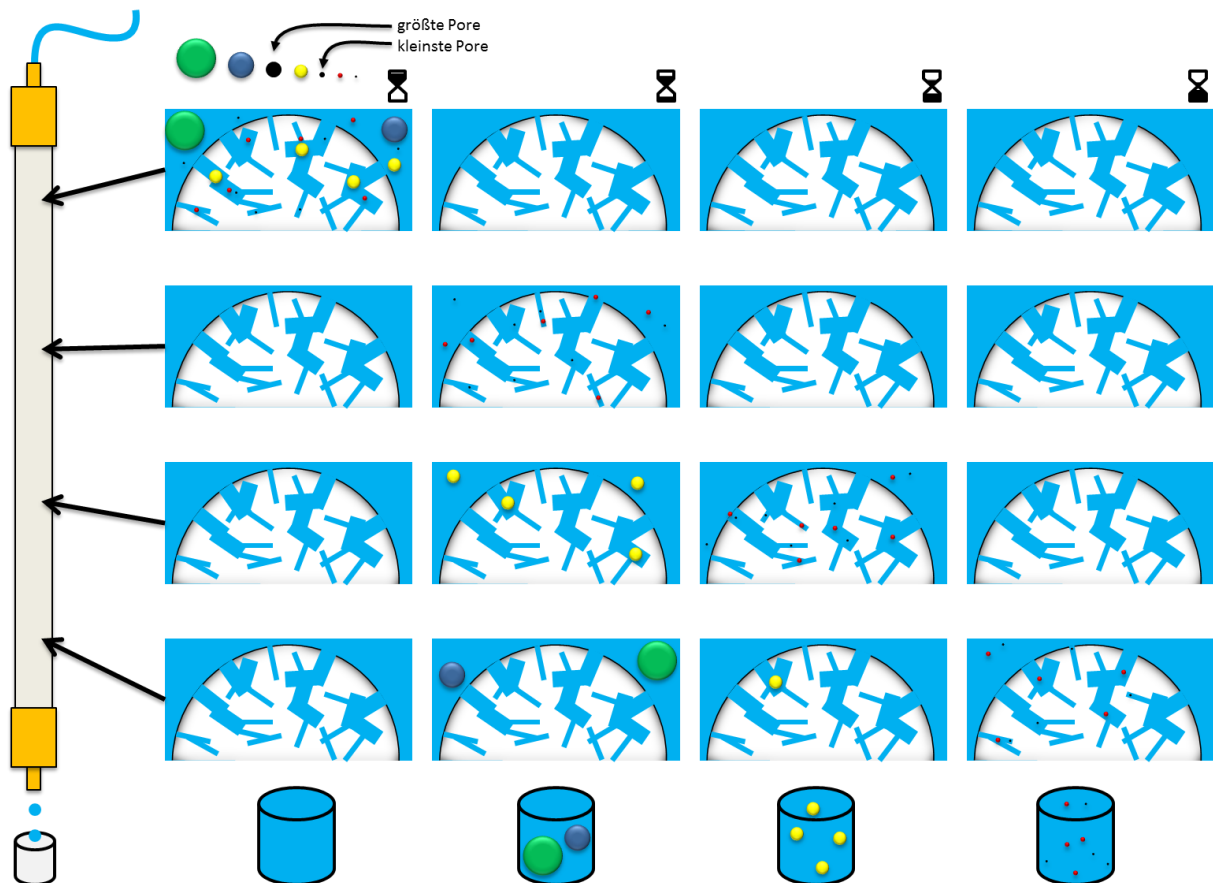


Die roten Moleküle sind so klein, dass sie in alle Poren gelangen können. Für sie steht das Volumen  $V_m$  zur Verfügung, das sich aus dem Volumen außerhalb des Füllmaterials  $V_0$  und dem ganzen Porenvolumen  $V_i$  zusammensetzt.

Die Trennsäule ist mit Laufmittel und Füllmaterial gefüllt, das Poren mit einer bestimmten Größe und Porengrößenverteilung hat. Das Laufmittel außerhalb der Körner des Füllmaterials hat das Volumen  $V_0$ . In den Poren des Füllmaterials befindet sich Laufmittel mit dem Volumen  $V_i$ , insgesamt ist in der Säule das Laufmittelvolumen  $V_m$ , das aus dem Volumen innerhalb und außerhalb der Poren besteht ( $V_0 + V_i$ ).

Wenn eine Substanz zu groß ist um in die Poren einzudringen, muss das Volumen  $V_0$  durch die Säule gepumpt werden, um die Substanz wieder auszuspülen. Hingegen wird eine Substanz, die klein genug ist um in alle Poren einzudringen, erst nach dem Volumen  $V_m$  aus der Säule eluiert.

$V_0$  ist kleiner als  $V_m$  ( $V_m = V_0 + V_i$ ), daher verlassen große Moleküle die Säule vor kleinen Molekülen.



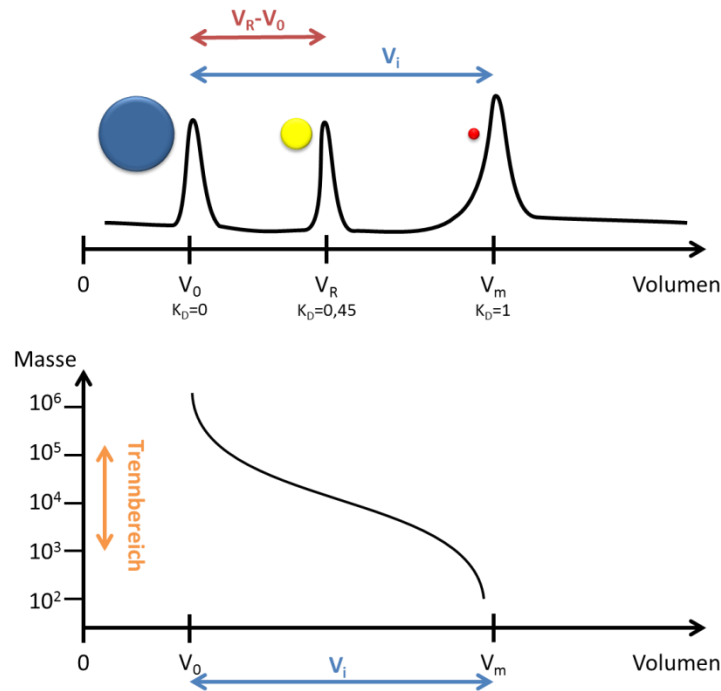
Auf die Gelfiltrationssäule links wird eine Mischung aus Grün, Blau, Gelb, Rot und Schwarz aufgetragen. Grün und Blau sind größer als alle Poren im Füllmaterial, und Rot und Schwarz sind klein genug, um in alle Poren zu gelangen. Gelb kann in einen Teil der Poren aber nicht in alle diffundieren.

Grün und Blau werden als erste wieder aus der Säule gespült, da für sie das kleinste Volumen zugänglich ist. Gelb wird als nächstes eluiert, weil es zusätzlich das Volumen in den großen Poren erreicht. Rot und Schwarz kommen als letzte, weil sie das gesamte Volumen außerhalb und innerhalb der Poren nutzen.

Rot konnte nicht von Schwarz getrennt werden und Grün nicht von Blau.

## QUALITATIVE AUSWERTUNG

Alle Moleküle, die so groß sind, dass sie von allen Poren ausgeschlossen sind, werden gleichzeitig bei  $V_0$  aus der Säule gespült und nicht voneinander getrennt. Ebenso werden die Moleküle, die klein genug sind um in alle Poren einzudringen, gemeinsam bei  $V_m$  eluiert und nicht getrennt. Um Moleküle voneinander zu unterscheiden steht also nur das Volumen  $V_i$  in den Poren zur Verfügung.



In der Abbildung sieht man das Chromatogramm einer Trennung von drei Substanzen (Blau, Gelb, Rot). Wenn das Volumen  $V_0$  durch die Säule gepumpt worden ist, eluiert das blaue Molekül, das zu groß für alle Poren ist. Das rote Molekül ist klein genug um in alle Poren zu passen, und wird daher mit dem Volumen  $V_m$  aus der Säule gespült. Das gelbe Molekül hat eine Größe, die in manche der Poren passt, daher wird es bei dem für diese Größe typischen Volumen  $V_R$  ausgespült. Darunter sieht man die Kalibrationsgerade für diese Trennung. Der Bereich, in dem das Verhältnis zwischen Volumen und dem Logarithmus der Masse linear ist, kann für eine Molekülgrößenbestimmung genutzt werden.

Ein Molekül, dessen Größe zwischen der größten und der kleinsten Pore liegt, wird in manche Poren diffundieren können und in andere nicht. Diese Moleküle werden bei einem Volumen  $V_R$  eluiert, das zwischen  $V_0$  und  $V_m$  liegt. Der Faktor  $K_D$  beschreibt, bei welchem Anteil des für die Trennung relevanten Volumens  $V_i$  das Molekül aus der Säule gespült wird.

$$K_D = (V_R - V_0) : V_i$$

Für alle Moleküle, die für die Poren zu groß sind, ist  $K_D$  gleich 0, für Moleküle, die in alle Poren passen, ist  $K_D$  gleich 1. Für Moleküle, für die ein Teil der Poren zugänglich ist, hat  $K_D$  einen Wert zwischen 0 und 1.

Um mit SEC Molekülgrößen zu bestimmen, werden Eichgeraden erstellt, die den Logarithmus der Molekülgröße gegen das Elutionsvolumen abbilden. Zwischen  $V_0$  und  $V_m$  ist die Abhängigkeit des Elutionsvolumens von der Molekülgröße streckenweise logarithmisch, ein bestimmtes Elutionsvolumen entspricht also einer bestimmten Molekülgröße.

Für welche Molekülgrößen dieser analytisch nutzbare Bereich gilt, hängt von der Porengröße und Porengrößenverteilung der Säule ab. Kleine Poren sind für kleine Moleküle geeignet, für große Moleküle werden große Poren benötigt. Um den Bereich der messbaren Molekülgrößen zu erweitern, können mehrere Säulen mit unterschiedlichen Poren hintereinander gehängt werden. Haben alle Poren ungefähr dieselbe Größe (enge Porengrößenverteilung), ist der Bereich der bestimmbar Molekülgrößen klein, dafür ist die Bestimmung sehr genau. Haben die Poren sehr unterschiedliche Größen, kann ein weiter Bereich an Molekülgrößen aufgetrennt werden, dafür nimmt die Genauigkeit aber ab.

Die Standards, die für die Kalibrierung genutzt werden, müssen den später gemessenen Substanzen möglichst ähnlich sein, damit der Zusammenhang zwischen Molekülgröße und Molekülmasse richtig erfasst wird. Sind keine Standards verfügbar, kann die Molekülmasse auch direkt mit einem Lichtstreuendetektor und einem konzentrationsabhängigen Detektor (RI, UV,...) bestimmt werden. Proteine werden häufig denaturiert (mit Guanidin, Harnstoff oder SDS), um sie in eine einheitliche Kugelform zu bringen und ihre chemischen Eigenschaften weitestgehend zu unterdrücken.

Kommt es während der Trennung zu Wechselwirkungen zwischen den Analyten und Füllmaterial, wird das Ergebnis stark verfälscht. Das Trennprinzip beruht ausschließlich auf der unterschiedlichen Verfügbarkeit des Porenvolumens je nach Molekülgröße, Wechselwirkungen würden Moleküle größer oder kleiner erscheinen lassen, als sie es tatsächlich sind. Ionen können beispielsweise nicht mehr in Poren eindringen, in die sie eigentlich passen würden, und würden zu früh eluieren. Moleküle, die wegen apolarer oder ionischer Wechselwirkungen am Füllmaterial haften, würden später eluieren. Um diese Effekte zu verhindern, muss jede Interaktion zwischen Füllmaterial und Analyten vermieden werden. Häufige Methoden sind Anpassungen des pH-Werts und der Ionenstärke oder die Zugabe eines organischen Lösungsmittels.

Als analytische Variante hat die SEC folgende Vorteile:

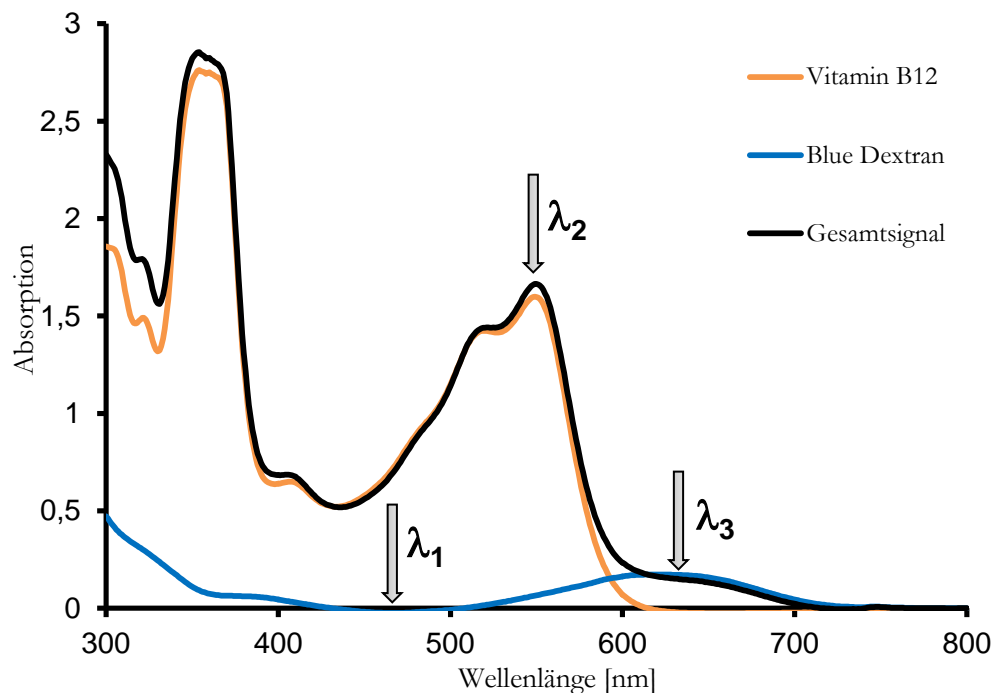
- Die Analysen sind relativ schnell (~10min pro Säule).
- Die Wiederfindungsrate ist hoch.
- Die Anforderung an die Pumpe sind gering, da nur ein Laufmittel benötigt wird und die Flussrate und der Gegendruck relativ klein sind.

Die Nachteile der SEC als Analysentechnik sind:

- Die Auflösung ist gering.
- Es können nur kleine Probenmengen injiziert werden.
- Die Lebensdauer der Säulen ist kurz.

Die Detektion der eluierten Substanzen erfolgt im Praktikum erst nach dem Beenden der Säulenchromatographie (offline). Blue Dextran und B12 können aufgrund ihrer Farbe und damit auch ihrer Spektren unterschieden werden. Daher ist schon mit freiem Auge erkennbar, welche Fraktionen wahrscheinlich nur eine Substanz und welche ein Gemisch enthalten. Um beide Substanzen in der Mischung separat quantifizieren zu können, gibt es zwei Strategien:

- Man misst bei einer Wellenlänge, bei der nur die Substanz von Interesse absorbiert. Dabei muss man unter Umständen eine geringere Empfindlichkeit bzw. Ein ungenaueres Messergebnis in Kauf nehmen.
- Man misst bei einer Wellenlänge mit hohem Extinktionskoeffizienten (also mit großer Empfindlichkeit) und zieht den Anteil, den die Verunreinigung zum Gesamtsignal beiträgt, vom Messergebnis ab. Dazu muss die Konzentration der Verunreinigung bekannt sein, die zum Beispiel bei einer Referenzwellenlänge bestimmt worden ist.



Diese Probe enthält sowohl B12 also auch Blue Dextran. Mit dem Spektrometer kann nur das Gesamtsignal der Probe gemessen werden, das sich aus den Spektren der enthaltenen Einzelsubstanzen zusammensetzt.

Sowohl für B12 als auch für Blue Dextran gibt es einen Wellenlängenbereich, in dem nur die eine Substanz aber nicht die andere absorbiert ( $\lambda_1$ ,  $\lambda_3$ ). Hier können die Substanzen getrennt voneinander quantifiziert werden.

Bei der Wellenlänge, bei der B12 maximal absorbiert ( $\lambda_2$ ), absorbiert auch Blue Dextran. Der Anteil des Gesamtsignals von Blue Dextran bei dieser Wellenlänge  $\lambda_2$  kann berechnet werden, wenn die Konzentration von Blue Dextran bekannt ist. Der Gehalt an Blue Dextran wird dazu bei einer Referenzwellenlänge ( $\lambda_3$ ) gemessen.



Die Probe enthält Blue Dextran, Cobalamin (Vitamin B12) und Riboflavin (Vitamin B2). Die Substanzen sollen voneinander getrennt werden und die enthaltenen Mengen Blue Dextran und Vitamin B12 (Cobalamin) bestimmt werden.

In den Fraktionskollektor werden 40 Eprouvetten gestellt und der Kollektorarm an die erste Eprouvette angelehnt. Vorsicht: Es gibt verschiedene Eprouvettengrößen, die aber mit einer Lehre unterschieden werden können

- 1) Der obere Schlauch wird abgeklemmt, der untere mit einem Bischofsstab verschlossen. Der obere Verschluss der Säule wird abgehoben und das restliche Wasser aus der Säule pipettiert.
- 2) 0,5 mL Probenlösung werden mit einer Pasteurpipette vorsichtig in die Säule pipettiert. Die Pipettenspitze berührt dabei die Wand der Säule an einer Stelle, die weit genug von der Säulenfüllung entfernt ist, um diese nicht aufzuwirbeln, und die zugleich weit genug unten ist, dass die Tropfen der Probe gut ablaufen können.
- 3) Der Bischofsstab wird entfernt, um die Probe einsickern zu lassen.
- 4) Wenn die Probe ganz in die Säule eingesickert ist, wird der untere Schlauch wieder mit dem Bischofsstab verschlossen.
- 5) Etwa 0,5 mL Wasser werden vorsichtig in die Säule pipettiert, und der untere Schlauch wird wieder geöffnet.
- 6) Wenn das Wasser ganz in die Säule eingesickert ist, wird der untere Schlauch wieder mit dem Bischofsstab verschlossen.
- 7) Wasser wird vorsichtig in die Säule pipettiert, bis sie fast ganz gefüllt ist. Der obere Verschluss wird aufgesetzt, die Klemme entfernt, der untere Schlauch geöffnet (und falls notwendig mit dem Fraktionskollektor verbunden) und der Fraktionskollektor gestartet.



Die aufgetrennten Moleküle werden erst nach der Trennung detektiert und quantifiziert, indem die Absorption jeder Fraktion bei verschiedenen Wellenlängen im Plate Reader gemessen wird. Die Vorbereitungen dafür werden durchgeführt, während die Probe durch die Säule läuft.

Ausgehend von Stammlösungen mit 0,5 mg/mL werden für Blue Dextran und Vitamin B12 durch einfaches Zusammenpipettieren Verdünnungen mit folgenden Konzentrationen erstellt:

Blue Dextran: 0,5 mg/mL, 0,4 mg/mL, 0,3 mg/mL, 0,2 mg/mL, 0,1 mg/mL und 0 mg/mL

Vitamin B12: 0,1 mg/mL, 0,08 mg/mL, 0,06 mg/mL, 0,04 mg/mL, 0,02 mg/mL und 0 mg/mL

Im Spektrometer werden von den Proben mit 0,3 mg/mL Spektren von 300-800 nm aufgenommen. Drei Wellenlängen werden für die spätere Messung mit dem Plate Reader ausgewählt: jeweils eine spezifische Wellenlänge für Blue Dextran beziehungsweise Vitamin B12 sowie eine Wellenlänge, bei der beide Substanzen etwa gleich gut absorbieren. Die ersten beiden Wellenlängen ermöglichen eine gezielte Detektion nur dieser einen Substanz, die dritte erlaubt es, das Konzentrationsverhältnis direkt aus dem Chromatogramm abschätzen zu können.

200 µL jeder Verdünnung werden in die Mikrotiterplatte pipettiert.

Weiters wird das Durchschnittsgewicht der Epruvetten bestimmt, wobei darauf geachtet werden muss, nur Epruvetten gleicher Größe abzuwiegen.

Wenn die Gelfiltration beendet ist, wird das Volumen der Fraktionen bestimmt, indem die Epruvetten mit der gesammelten Fraktion gewogen werden.

200 µL jeder Fraktion werden in die Mikrotiterplatte überführt. Im Plate Reader werden die Absorptionen bei den drei ausgewählten Wellenlängen gemessen.

Mit den erhaltenen Daten wird folgendes gemacht:

Die Absorptionen werden gegen die Fraktionsnummer aufgetragen. Man erhält dadurch für jede Wellenlänge ein eigenes Chromatogramm. Je nach Wellenlänge zeigt das Chromatogramm entweder beide eluierten Substanzen im richtigen Verhältnis an, oder es ist spezifisch für Blue Dextran bzw. Vitamin B12.

Anhand der Standards wird eine Eichgerade erstellt und die Konzentration von Blue Dextran und Vitamin B12 in jeder Fraktion berechnet. Da von jeder Fraktion die Konzentration und das Volumen bekannt ist, kann berechnet werden, wieviel von jeder Substanz in der **ursprünglich aufgegebenen Probe** enthalten war.

## EMPFOHLENE LITERATUR

---

### ALLGEMEIN

---

Barker, Kathy: Das Cold Spring Harbor Laborhandbuch für Einsteiger, Elsevier, 2006.

ISBN: 3-8274-1656-6

Barker, Kathy: At the bench: a laboratory navigator, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1998.

ISBN: 0-87969-523-4

Bast, Eckhard: Mikrobiologische Methoden: Eine Einführung in grundlegende Arbeitstechniken, Spektrum Akademischer Verlag, 2011.

ISBN: 978-3-8274-1813-5

### HERSTELLERBROSCHÜREN ZU WIEGEN UND VOLUMENSMESSUNG

---

Mettler Toledo: Wägefibel, richtiges Wiegen mit Laborwaagen

Mettler Toledo: Wägefibel, richtiges Arbeiten mit elektronischen Analysen- und Mikrowaagen

Sartorius: Der richtige Umgang mit Analysen- und Mikrowaagen, Correct Use and Handling of Analytical and Microbalances

Thermo Scientific: Good Laboratory Pipetting Guide

Gilson Guide to Pipetting

Eppendorf SOP Standardanweisung für Pipetten

Brand: Informationen zur Volumenmessung

### SÄULENCHROMATOGRAPHIE

---

Snyder, Lloyd R.: Introduction to modern liquid chromatography, Wiley & Sons, 2010.

ISBN: 978-0-470-16754-0

### QUALITATIVE ZUCKERBESTIMMUNG

---

Malherbe, J. S.; Meyer, C. J., A Mini-Qualitative Carbohydrate Analysis Session. *Journal of Chemical Education* **1997**, 74 (11), 1304.

## PROTOKOLLVORGABEN

---

Das muss zur Nachbesprechung mitgebracht werden.

Auf dem Deckblatt stehen Name, Matrikelnummer, Kursnummer, LVA-Nummer und die erhaltenen Proben.

Das Protokoll darf praktisch keine Rechtschreibfehler enthalten, bei den Ergebnissen muss die signifikante Stelle angemessen gewählt werden.

### GELFILTRATION

---

- Die Spektren von Blue Dextran und Vitamin B12
- Die Rohdaten für Quantifizierung
- Die Kalibrationsgerade für die Quantifizierung mit korrekter Beschriftung
- Berechnung der Konzentration und Menge an Blue Dextran bzw. Vitamin B12 in den relevanten Fraktionen (mit selektiver Wellenlänge und Referenzwellenlänge), die aufsummierte Menge und die Konzentration in der aufgegeben Probe
- Eine Graphik mit den Chromatogrammen, die auf dem Plate Reader gemessen wurden (klar dargestellt und korrekt beschriftet)
- Die Antworten auf folgende Fragen:
  - Welches Molekül ist das kleinere, welches das größere?
  - Ist in einer Fraktion reines Blue Dextran oder Vitamin B12?

### QUALITATIV

---

- Die beobachteten Effekte der Tests auf die Proben, die positive und die negative Referenz
- Welches Strukturmerkmal ist für die positive bzw. negative Reaktion verantwortlich?
- Welche Nachweisreaktionen waren für die Identifizierung ausschlaggebend?
- Welche Zucker waren in der erhaltenen Probe enthalten?

### QUANTITATIV

---

- Rohdaten der Kalibrierungen und Probenmessungen
- klare Abbildungen der Kalibrationsgeraden für alle drei Bestimmungen mit korrekter Beschriftung
- gemessene Zuckerkonzentrationen mit Darstellung des Rechenwegs, Vergleich mit den Herstellerangaben
- Vier Auswertungen der Refraktometriemesswerte: mit 3, 4 und 5 Nachkommastellen **in der Gleichung der Kalibriergeraden** sowie mit den Excelbefehlen „Achsenabschnitt“ („intercept“) und „Steigung“ („slope“)
- Die Antworten auf folgende Fragen:
  - Welche Zuckerkonzentration hatten die Probe und die Getränke?
  - Welche Methode war die empfindlichste, welche die unempfindlichste?
  - Waren die Methoden selektiv, welche Interferenzen waren möglich?
  - Wie groß ist der Effekt der Nachkommastellen in der Geradengleichung auf das Ergebnis?
  - Wie gut waren Ihrer Meinung nach die eingesetzten Methoden insgesamt geeignet, um die Zuckerkonzentration zu bestimmen?