

Stundenprotokoll vom Donnerstag, 25. April 2002

Es fehlen: keine

Biuretbestimmung von Hydrolysat.

Die Kupferionen haben die Aminosäuren in einem Komplex gebunden. Genau genommen bilden die Stickstoffe der Peptidbindung Komplexbindungen zum Kupfer, nachdem ihnen das Proton durch eine Base entzogen wurde.

Bei der Biuretreaktion ist es wichtig, dass man die Probe zuerst mit der Base erhitzt, dabei aber nicht zu stark erhitzt und nicht zu hoch konzentrierte Base verwendet, da das Protein sonst denaturiert wird. Danach gibt man die hellblaue Kupferlösung dazu und bei erfolgreicher Reaktion färbt sich die Lösung dunkelviolett.

Die Komplexe sind auf der Seite S.34 (Biochemie) zu sehen.

Aufnahme der Absorptionskurve von Biuret-Eiweiß-Farbkomplex im Fotometer.

Biuretreagenz:

- 0,1 mol/l KOH zur Probe

Zur Verfügung steht 47 % Kalilauge (KOH) d.h. 47 g/100ml.
Molmasse von KOH ist 56 g/mol.

Rechnung:

$$\frac{470 \text{ g}}{1000 \text{ ml} \cdot 56 \text{ g/mol}} = \frac{470 \text{ mol}}{1 \text{ l} \cdot 56} = 8,4 \text{ mol/l}$$

$$\begin{array}{rcc} 8,4 & \searrow & 0,1 & \text{1 ml KOH} \\ & & 0,1 & \\ 0 & \nearrow & 8,3 & \text{83 ml Wasser} \end{array}$$

- 1 % CuSO₄ (= 1 g CuSO₄ auf 100ml H₂O)

Proben:

- 1 ml Eiweißhydrolysat (sollte Peptidfrei sein)
- 1 ml Pepsin 1% (= nicht hydrolisiertes Eiweiß)

Wir führen verschiedene Messungen durch: a) Leermessung durch Luft, b) mit leerer Küvette und c) Küvette mit dem blauen Kupfersulfat.

Dabei erhielten wir folgendes Ergebnis:

Von a) nach b) → weniger Intensität

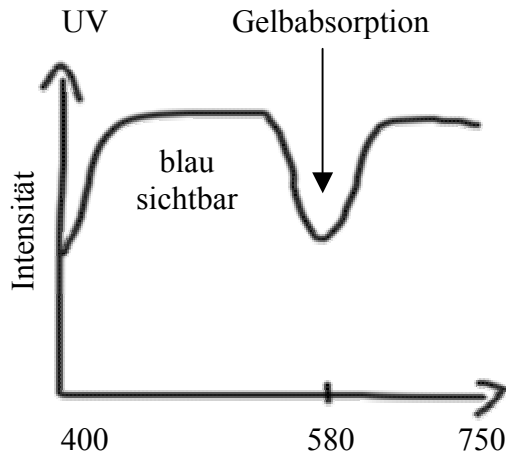
Von b) nach c) → mehr Intensität

Zu erklären ist dies wie folgt: Dadurch, dass sich in der Küvette Luft befindet und die Lichtbrechung dann größer ist, als wenn sich darin eine Flüssigkeit, in diesem Fall das Kupfersulfat, befindet, ist die Lichtbrechung größer und die Intensität kleiner. Sobald wir eine Flüssigkeit hineingeben, verkleinert sich die Brechung, die Intensität steigt.

Durch Drehen an einem Rad, kann man die Intensität mit Hilfe eines Verstärkers so verändern, dass man die Intensität auf 100% setzt, wenn man die gefüllte Küvette misst. Somit ist es eine willkürliche Einstellung, was man als 100% definiert.

Es ist aber nicht so gut, wenn man die blaue Farbe als die 100% setzt, weil Blau auch etwas Licht absorbiert, nämlich gelb.

Im UV-Bereich auch Absorption vorhanden. Dies ist bei jedem Stoff so, weil einige Bindungen und funktionelle Gruppen UV-Licht absorbieren.

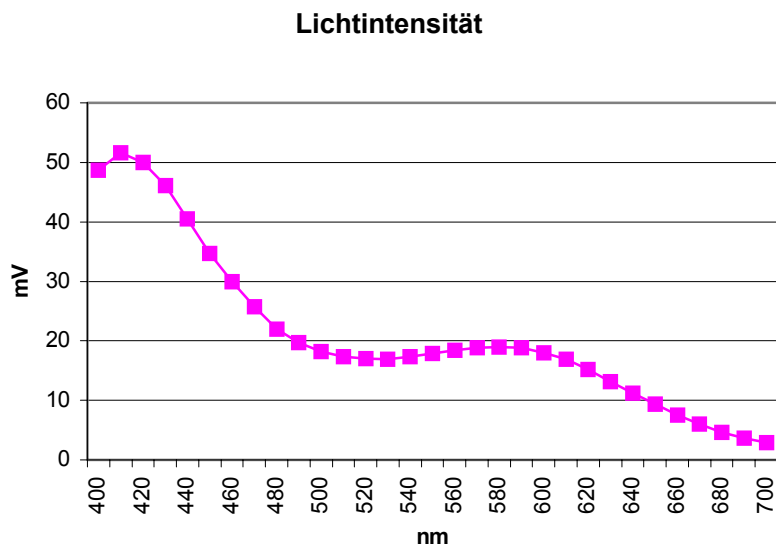


Vorgehen:

Das Lösungsmittel, welches wir verwenden ist blau. Da das Licht der Lampe in jedem Wellenbereich verschieden intensiv ist, müssen wir erst eine Nulllinie bilden. Dazu messen wir alle Wellenlängen durch die Intensität der Lampe, wobei wir gleichzeitig eine Küvette mit dem Lösungsmittel in dem Fotometer haben. Nachher, wenn die Probe in dem Lösungsmittel ist, messen wir wieder die Intensitäten und bilden dann die Differenz zu dieser Nulllinie.

Messung der Kupfersulfatpentahydratlösung

nm	mV	nm	mV
400	48,65	560	18,4
410	51,6	570	18,85
420	50	580	19
430	46,1	590	18,8
440	40,5	600	18
450	34,65	610	16,95
460	29,9	620	15,15
470	25,75	630	13,1
480	21,95	640	11,2
490	19,75	650	9,35
500	18,25	660	7,55
510	17,35	670	6,05
520	17	680	4,65
530	16,95	690	3,7
540	17,3	700	2,95
550	17,9		



Eine weitere Messung mit einem gelben Farbstoff und Auswertung befindet sich in einer separaten Datei.