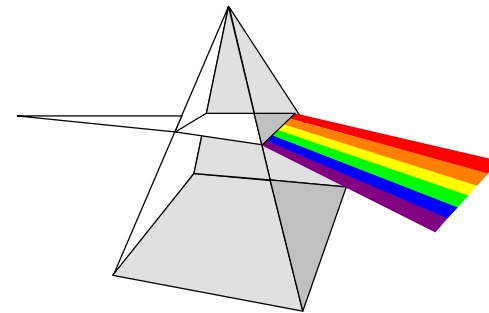


„Photometrie mit Pyridinnucleotiden“

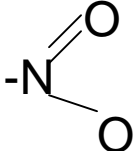
- Grundlagen der Photometrie
- Photometer-Arten
- Eppendorf-Photometer
- Struktur und Funktion des NADH
- Beispiele des optischen Tests
- Berechnungsverfahren



Farbaktive Gruppen

- Chromophore:
Atomgruppen, die die selektive Absorption nennenswert beeinflussen
- Bathochromie:
Verschiebung der Absorptionsmaxima zu langwelligerem / sichtbarem Licht - Farbvertiefung durch Anhäufung solcher Gruppen
- Auxochrome:
Bindeglieder zwischen Chromophoren und Fasern

⇒ Doppelbindungen: $-C=C-$
Ketogruppen: $>C=O$

Nitrogruppen: 

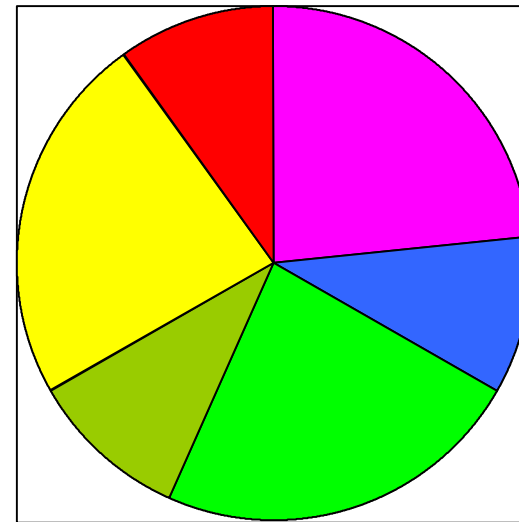
⇒ Aminogruppen: $-NH_2$
Hydroxylgruppen: $-OH$
Sulfonsäuregruppen: $-SO_3H$

Licht-Absorption

- Energie definierter Größe (Quantengröße) einer Strahlung ändert den Energiezustand des Atoms / Moleküls
- Atom: Anhebung der Elektronen auf höhere Orbitale
- Moleküle: Anregung von Schwingungs- / Rotationsbewegungen
- Energie der absorbierten Strahlung $E = h \nu$, mit $\nu :=$ Wellenlänge
 $h := 6,626 \cdot 10^{-34} \text{ Js}$
(Planck'sches Wirkungsquantum)
- Beim Rückfall auf altes Energieniveau: Abgabe der Energie hauptsächlich als Wärme
- Fluoreszenz: Energieabgabe als Lichtstrahlung
- Absorbierbare Quantengrößen sind charakteristisch für den Stoff, da nur zu den Änderungen „passende“ Quanten aufgenommen werden
- Absorptionsausmaß ist proportional der Konzentration des Stoffes (und der Schichtdicke) - s.u.

Absorption und Farbe bei organischen Stoffen

- Voraussetzung für die Lichtabsorption bei organischen Verbindung sind vorwiegend Doppelbindungen
- Je mehr konjugierte Doppelbindungen, desto langwelliger und höher ist das Absorptionsmaximum
- Farbige Stoffe = Stoffe, die sichtbares Licht aufnehmen.
- Stofffarbe ist die Komplementärfarbe des resorbierten Lichtes



Gesetz von Lambert-Beer

$$I = I_0 e^{-k c d}$$

$$\Leftrightarrow I = I_0 10^{-\varepsilon c d}$$

mit:

I := Intensität des Lichtes nach der Probe [cd = Candela]

I_0 := Intensität vor der Probe [cd]

k := Materialkonstante [l/(mol cm)]

c := Stoffkonzentration [mol/l]

d := Schichtdicke [cm]

ε := molarer Extinktionskoeffizient [l/(mol cm)]

- Monochromatisches Licht
- jedes Molekül absorbiert den selben Intensitätsanteil
- Größe dieses Anteils abhängig von k bzw. ε
- Anzahl der absorbierten Anteile abhängig von der Anzahl der getroffenen Moleküle ($c * d$)

Transmission und Extinktion

Transmission

- Durchlässigkeit des Mediums für das Licht
- Abhängig von der Wellenlänge

$$T = \frac{I}{I_0} = 10^{-\epsilon c d}$$

- Einheitenlos, Angabe in % oder als Bruch
- $T = 1$ bedeutet keine Absorption

Extinktion

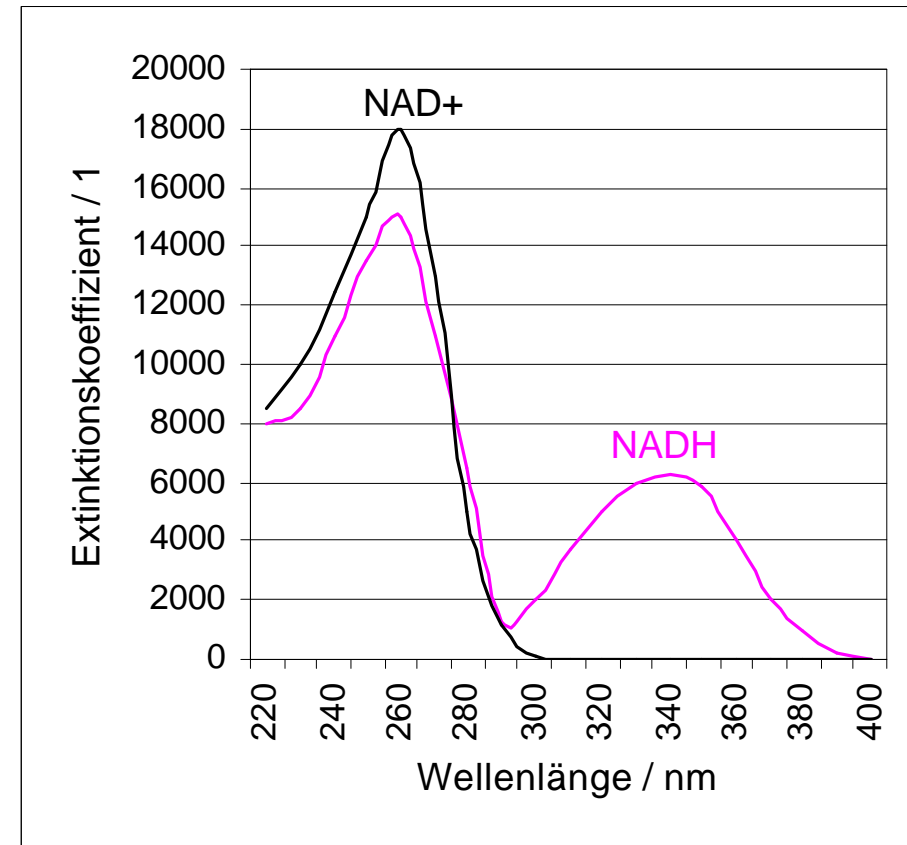
- Absorption durch das Medium
- ebenfalls abhängig von der Wellenlänge

$$E = \epsilon c d$$

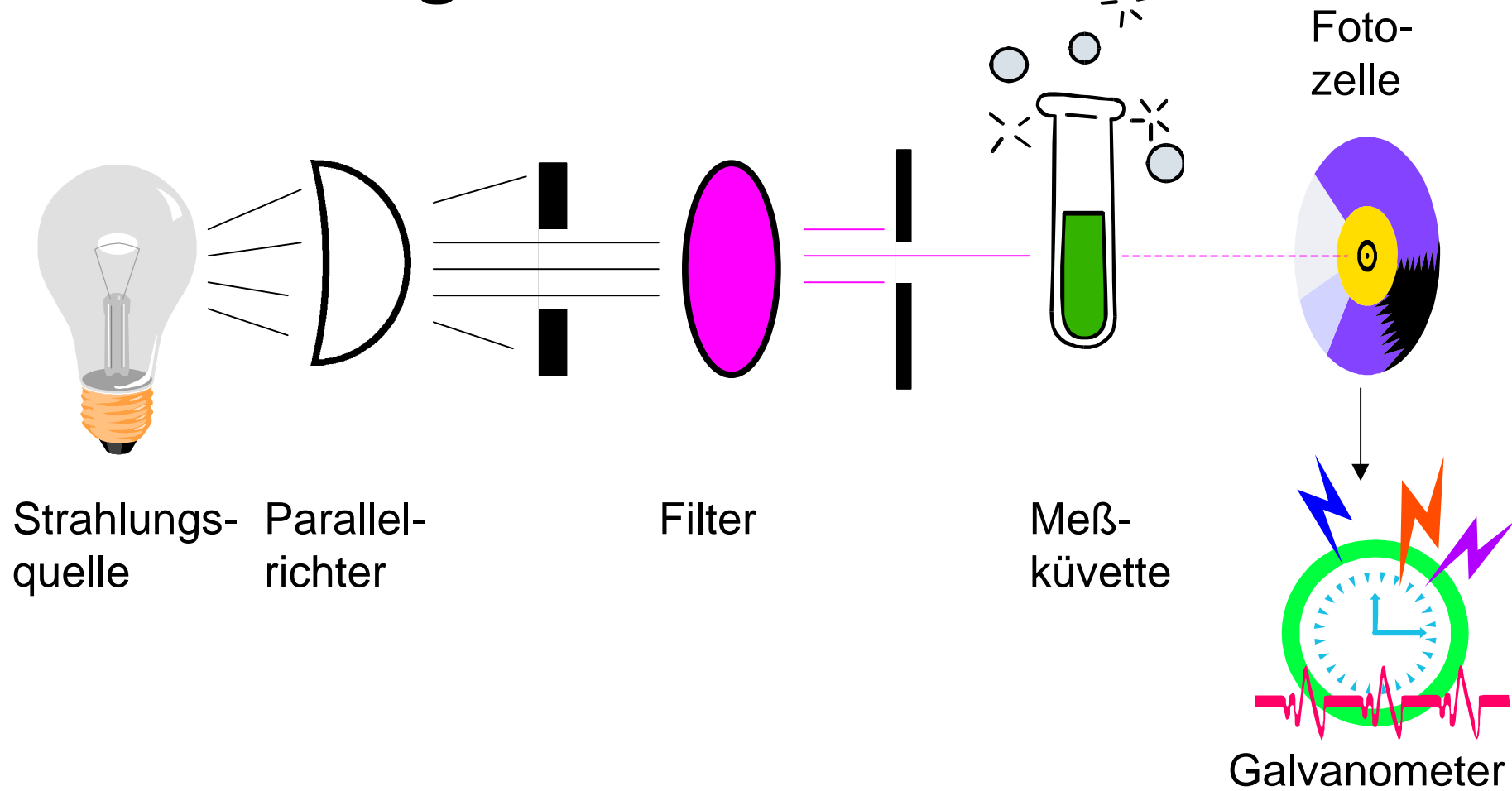
- Einheitenlos
- $E = \log 1 / T$
- Optimaler Meßbereich:
 $0 < E < 1$

Absorptionsspektrum

- Messung der Extinktion einer Substanz bei verschiedenen Wellenlängen
- Berechnung der Extinktionskoeffizienten jeder Wellenlänge hieraus
- Auftragung der $\epsilon(\lambda)$ gegen die Wellenlänge λ
- Dieses Spektrum ist charakterisierend für die Substanz



Allgemeines Photometer



Qualitätskriterien der Photometrie

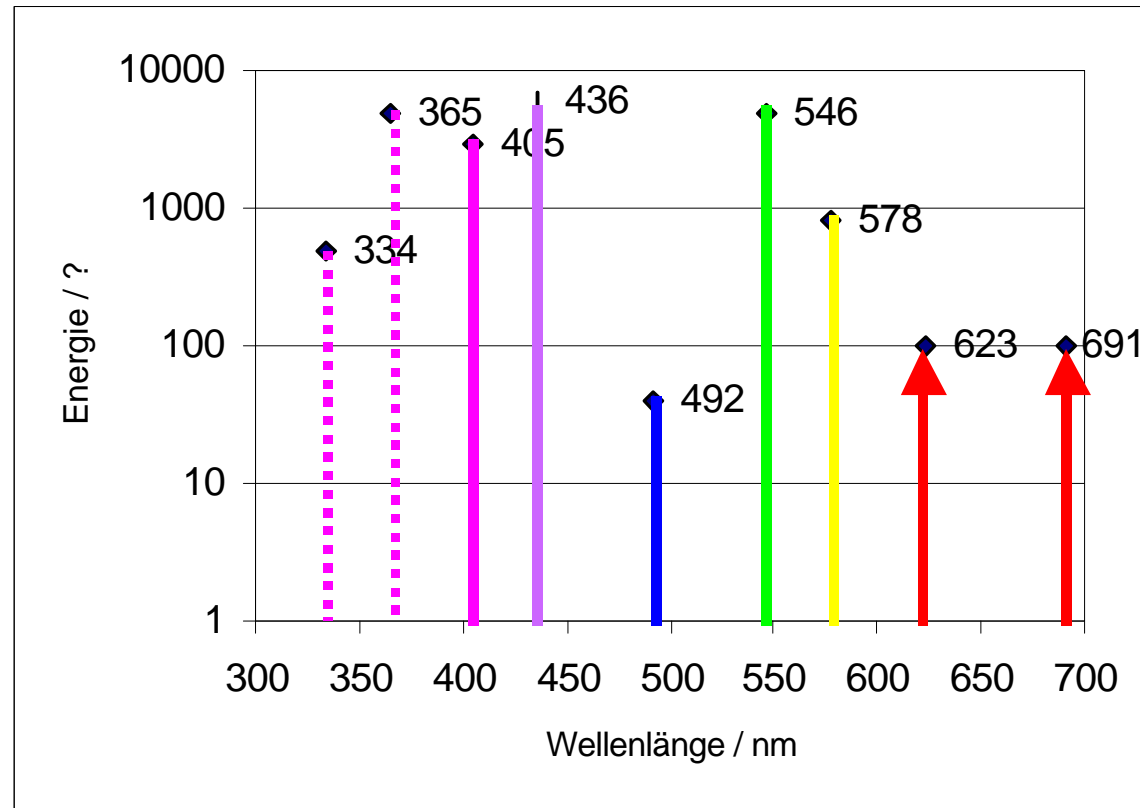
- Je monochromatischer das Licht ist, umso exakter ist die photometrische Messung, d.h. umso linearer ist die Abhängigkeit des Extinktionskoeffizienten von der Stoffkonzentration

Photometer-Typen

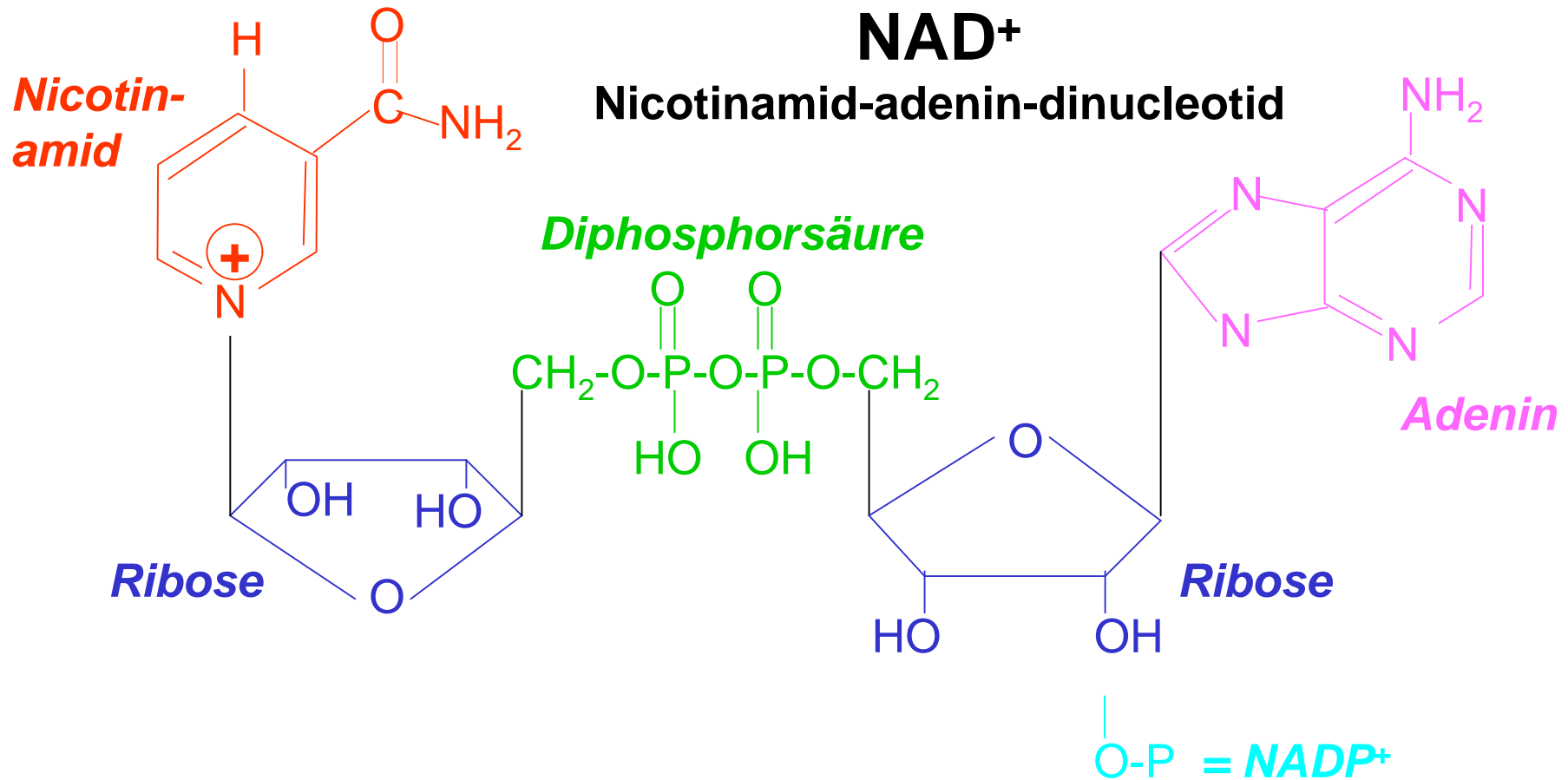
- **Filterphotometer:**
Lichtquelle \Rightarrow weisses, kontinuierliches Licht (z.B. Wolframlampe)
Monochromatisierung \Rightarrow Filter aus gefärbtem Glas
Vorteil \Rightarrow einfach und robust
- **Spektrallinienphotometer:**
Lichtquelle \Rightarrow Gasentladungslampe (z.B. Quecksilberdampf)
Monochromatisierung \Rightarrow Farbfilter
Vorteil \Rightarrow strenger monochromatisches Licht
- **Spektralphotometer:**
Lichtquelle \Rightarrow weisses, kontinuierliches Licht
Monochromatisierung \Rightarrow Prisma + Spaltblende
Vorteil \Rightarrow beliebige Wellenlänge verfügbar
- **Doppelstrahlphotometer:**
 \Rightarrow Spektralphotometer mit gleichzeitig zwei Strahlengängen
Vorteil \Rightarrow Parallelmessung der Probe und der Referenzprobe

Eppendorf-Photometer

- Spektrallinienphotometer
- Strahlungsquelle:
Quecksilberdampf Lampe
- Anzeige durch
Spiegelgalvanometer
- Anzeigenskala:
oben Extinktion
unten Transmission

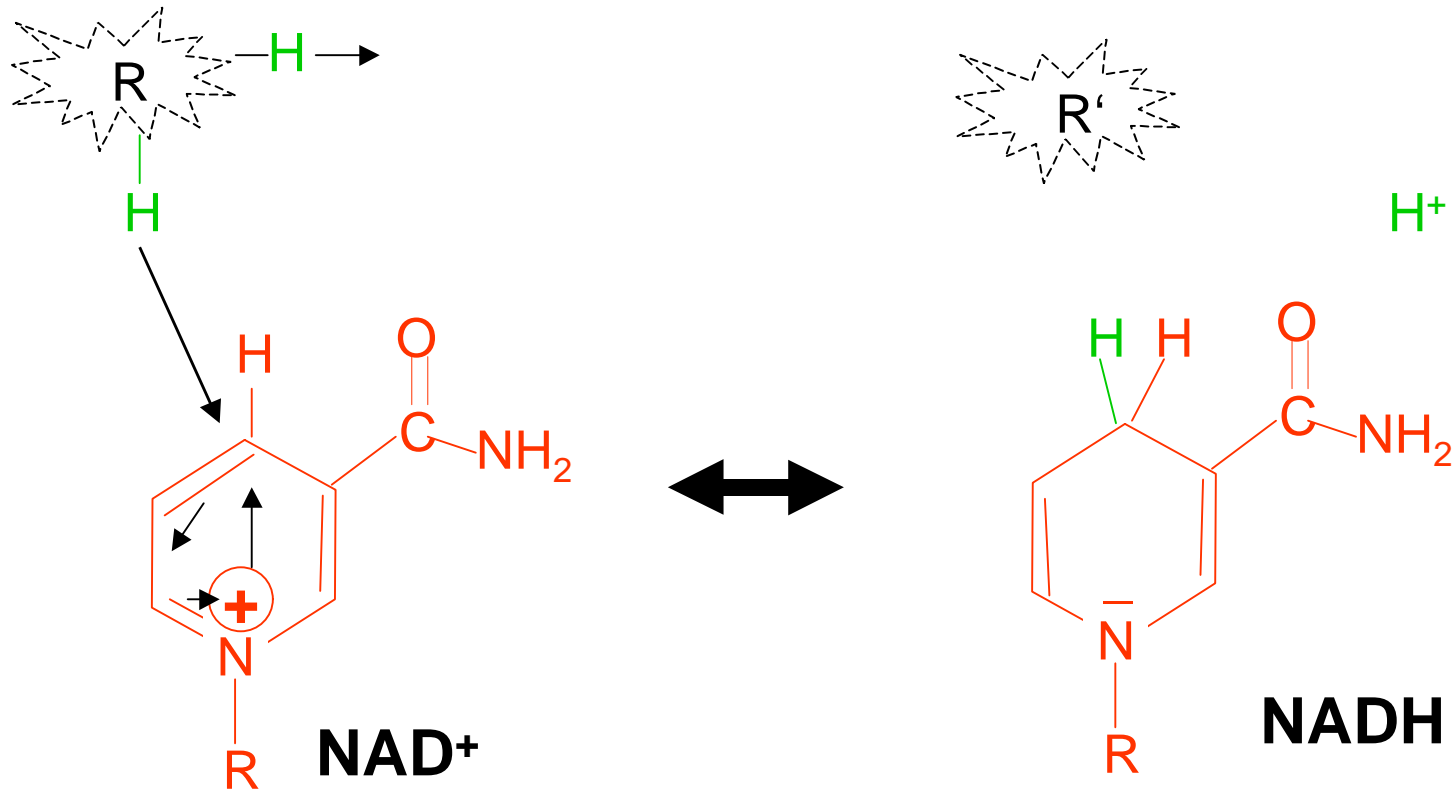


Pyridin-Nucleotide



NAD⁺

NADH + H⁺



Funktionen der Nicotinamidnucleotide

- Coenzyme zahlreicher Dehydrogenasen
- i.A. reversible Reaktionen
- H₂-Transport intrazellulär

NADH:

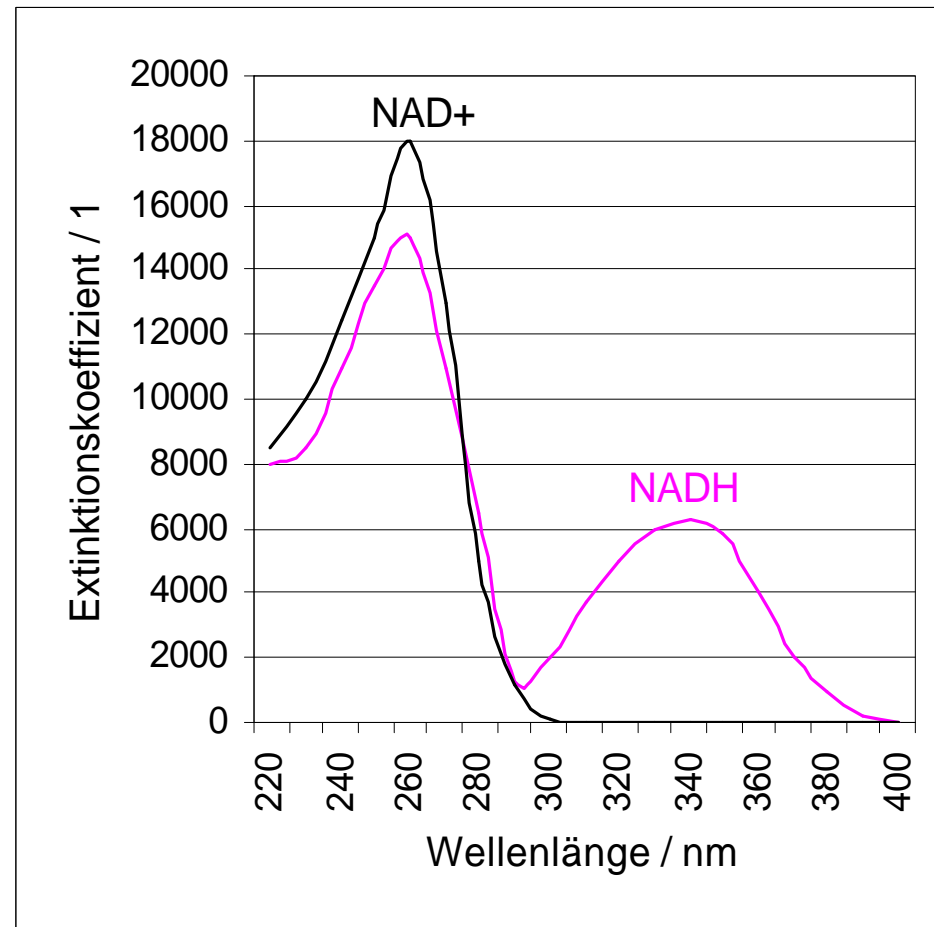
- Oxidation (H⁺-Abgabe) an Enzyme der Atmungskette
- z.B. Lactat + NAD⁺
Pyruvat + NADH + H⁺
- Ethanol + NAD⁺
Acetaldehyd + NADH + H⁺

NADPH:

- Oxidation - Biosynthese
- Reduktion - Fettsäure-Biosynthese und CO₂-Reduktion bei der Photosynthese

Spektrales Verhalten der NAD's

- Farbaktives Zentrum sind die Doppelbindungen im Pyridinring
- Reduktion des NAD⁺ zum NADH
Verändert den aromatischen Charakter des Rings NAD⁺
⇒ zusätzliches Absorptionsmaximum bei 340 nm
- ϵ bei 340 nm:
NADH / NADPH: $6.3 \cdot 10^3$
- ϵ bei 365 nm (s. Hg-Spektrum):
NADH: $3,4 \cdot 10^3$
NADPH: $3,5 \cdot 10^3$



Anwendungsbeispiele

Lactat im Plasma:

- NAD⁺ - Zugabe
- Messung der Ausgangsextinktion E_0
- Zugabe von Lactatdehydrogenase (LDH)
- ⇒ Umsetzung des Lactat zu Pyruvat
- ⇒ Umbau des NAD⁺ zu NADH
- ⇒ Anstieg der Extinktion bei z.B. 365 nm

Aktivität - Lactatdehydrogenase:

- Enzymaktivität ~ Reaktionsgeschwindigkeit
- Pyruvat + NADH
- Zugabe des Serums mit dem LDH
- ⇒ Pyruvat zu Lactat
- ⇒ NADH zu NAD⁺
- Abnahme der Extinktion
- Messung der Abnahme pro Zeiteinheit

Berechnung der Substratkonzentration

$$E = \epsilon c d \Leftrightarrow c = \frac{E}{\epsilon d}$$

$$C = \frac{\Delta E}{\epsilon * d} * \frac{V}{v} * F$$

- c := Konzentration in der Probe [mol / l]
- ΔE := Extinktionsveränderung
- V := Endvolumen [ml]
- v := Ursprungsvolumen der Probe [ml]
- F := Verdünnungsfaktor vor Testbeginn

Berechnung der Enzymaktivität

$$A = c / t \Leftrightarrow$$

$$A = \frac{\Delta E}{t * \epsilon * d} * \frac{V}{v} * F$$

- A := Enzymaktivität
[mol / (l * min)]
- c := Konzentration in der Probe
[mol / l]
- ΔE := Extinktionsveränderung
- V := Endvolumen [ml]
- v := Ursprungsvolumen der Probe [ml]
- F := Verdünnungsfaktor vor Testbeginn
- t := Zeit [min]