

Spektrofluorimetrische Bestimmung der Komplexbildungskonstanten von Bilirubin mit Bovin Serum Albumin

1. Lernziel

In diesem Versuch wird eine Methode zur Untersuchung des Komplexgleichgewichtes in einem biochemischen System erlernt. Der Versuch soll zeigen, wie mit Hilfe des Fluoreszenzverhaltens eines Systems die Komplexbildungskonstante ermittelt werden kann.

2. Aufgabenstellung

Die Komplexbildung zwischen Bilirubin (BR) und Bovin Serum Albumin (BSA)



wird anhand der intensiven Fluoreszenz des Komplexes BRBSA bei ca. 540 nm untersucht. Es werden zwei unterschiedliche Methoden zur Berechnung der Komplexbildungskonstanten miteinander verglichen.

3. Theorie

Bilirubin ist das Hauptabbauprodukt des Hämoglobinstoffwechsels. Da es in höheren Konzentrationen toxisch wirkt, muss es effizient aus dem Körper eliminiert werden. Bilirubin ist wasserunlöslich und wird für den Transport im Körper an Albumin komplexiert. In dieser Form wird es in die Leber transportiert wo es zu einem wasserlöslichen Molekül umgewandelt und schliesslich mit der Galle ausgeschieden wird. Bei Neugeborenen funktioniert diese Bilirubinausscheidung zum Teil nur ungenügend, was zu einer Anreicherung des toxischen Stoffes mit schweren Folgen führen kann. Die Ausscheidung des Bilirubins wird durch die Verabreichung gewisser Medikamente, die sich an die Rezeptorstellen des Albumins binden, weiter verhindert. Es ist daher wichtig, Daten über die Komplexbildung von Albumin mit Bilirubin und konkurrierenden Medikamenten quantitativ zu kennen.

Bei der optischen Untersuchung des Komplexgleichgewichtes (2.1) wird die starke Änderung der Fluoreszenzeigenschaft des Systems bei der Bildung des Komplexes BRBSA ausgenützt. Wird der Komplex bei ca. 460 nm angeregt kann eine starke Fluoreszenz bei ca. 540 nm beobachtet werden. Die Intensität der Fluoreszenz ist abhängig von der in der Messlösung vorhandenen Konzentration des Komplexes.

Bestimmen der Komplexbildungskonstanten, 1. Methode

Die Komplexbildung wird durch das chemische Gleichgewicht (2.1) und die Komplexbildungskonstante

$$K_B = \frac{[\text{BRBSA}]}{[\text{BR}][\text{BSA}]} \quad (3.1)$$

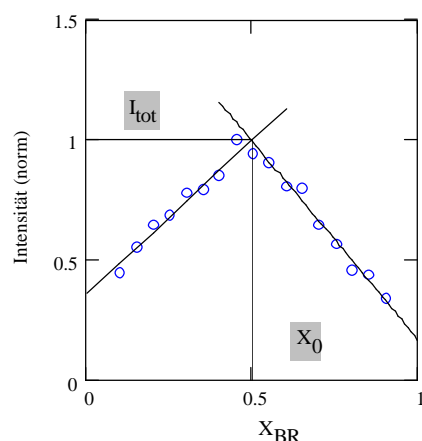
beschrieben.

Das Verhältnis $[\text{BR}]:[\text{BSA}]$ im Komplex entspricht 1:1. Für diesen Spezialfall kann die Komplexbildungskonstante K_B mit Hilfe der Methode nach Job ermittelt werden. Dazu werden Messlösungen mit einer konstanten Konzentration $[\text{BR}]_0 + [\text{BSA}]_0$ hergestellt, wobei der BR-Anteil, $[\text{BR}]_0/([\text{BR}]_0 + [\text{BSA}]_0)$, variiert wird. Von diesen Lösungen wird die Fluoreszenz gemessen. Da die Fluoreszenzintensität direkt proportional zu $[\text{BRBSA}]$ ist, kann die Gleichung (3.1) umgeschrieben werden in

$$K_B = \frac{\frac{I}{I_{\text{tot}}}[\text{BRBSA}]_{\text{tot}}}{\left([\text{BR}]_0 - \frac{I}{I_{\text{tot}}}[\text{BRBSA}]_{\text{tot}}\right)\left([\text{BSA}]_0 - \frac{I}{I_{\text{tot}}}[\text{BRBSA}]_{\text{tot}}\right)} \quad (3.2)$$

wobei $[\text{BRBSA}]_{\text{tot}}$ der Konzentration für $K_B \rightarrow \infty$ bei $[\text{BR}]_0 = [\text{BSA}]_0$ und I_{tot} der korrespondierenden Fluoreszenz entspricht.

Wird nun die Fluoreszenzintensität I in einem Plot gegen $[\text{BR}]_0/([\text{BR}]_0 + [\text{BSA}]_0)$ aufgetragen (Figur 1), kann aus der Extrapolation der linearen Bereiche ein hypothetischer Wert für die Fluoreszenzintensität I_{tot} und für den stöchiometrischen Konzentrationsanteil X_0 am Schnittpunkt der beiden Geraden berechnet werden.



Figur 1: Plot der Fluoreszenzintensität von BRBSA bei λ_{max} vs $[\text{BR}]_0$ Anteil bei einer totalen Konzentration $[\text{BR}]_0 + [\text{BSA}]_0$ von $2 \mu\text{M}$. Die Einheiten der Intensitäten sind willkürlich.

Für den Fall $X_{BR} \leq X_0$ ist Bilirubin die limitierende Komponente und $[BRBSA]_{tot}$ ist gleich der Konzentration $[BR]_0$. Aus (3.2) wird

$$K_B = \frac{I \cdot I_{tot}}{(I_{tot} - I)(I_{tot} [BSA]_0 - I [BR]_0)} \quad (3.3)$$

Für $X \geq X_0$ kann eine ähnliche Gleichung aufgestellt werden. Mit der Gleichung (3.3) kann aus den Messresultaten die Komplexbildungskonstante K_B berechnet werden.

Bestimmen der Komplexbildungskonstanten, 2. Methode

Da die Intensität der Fluoreszenz einer Messlösung direkt proportional zu der darin vorhandenen Konzentration $[BRBSA]$ ist, wird eine Funktion $[BRBSA](x)$ gesucht, um die BRBSA Konzentration (und somit die Fluoreszenzintensität) in Abhängigkeit von der Komplexbildungskonstanten K_B und der Konzentration $[BR]_0 + [BSA]_0$ theoretisch darzustellen.

Zum Verständnis der folgenden Gleichungen muss unterschieden werden zwischen Ausgangskonzentrationen, die mit einem 0 indiziert sind, und Konzentrationen nach Bildung des Komplexes in der Messlösung, die keinen Index haben.

Die Konzentration c_0 ist gegeben durch

$$c_0 = [BR]_0 + [BSA]_0 \quad (3.4)$$

und

$$c_0 = [BR] + [BSA] + 2 [BRBSA] \quad (3.5)$$

Die in der Messlösung nach Bildung des Komplexes noch vorhandene Konzentration an freiem BR kann beschrieben werden durch

$$[BR] = [BR]_0 - [BRBSA] \quad (3.6)$$

Mit Gleichungen (3.4) - (3.6) kann (3.1) umformuliert werden in

$$K_B = \frac{[BRBSA]}{([BR]_0 - [BRBSA])(c_0 - [BR]_0 - [BRBSA])} \quad (3.7)$$

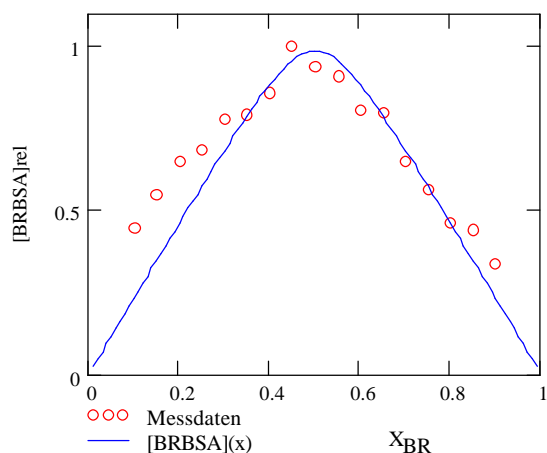
Wird nun

$$[BR]_0 = c_0 x \quad (3.8)$$

gesetzt, und die Gleichung nach $[BRBSA]$ umformuliert, erhält man die Funktion

$$[BRBSA](x) = \frac{c_0}{2} + \frac{1}{2 K_B} - \sqrt{\frac{c_0}{2 K_B} + \frac{1}{4 K_B^2} + c_0^2 \left(x^2 - x + \frac{1}{4} \right)} \quad (3.9)$$

Die Funktion $[BRBSA](x)$ beschreibt nun die BRBSA Konzentration in Abhängigkeit von c_0 (bekannt) und K_B (gesucht). Nun wird das K_B so gewählt, dass die kleinste Abweichung von der Funktion $[BRBSA](x)$ zu den Messdaten resultiert (Figur 2).



Figur 2: Vergleich der Messdaten mit der Funktion $[BRBSA](x)$ bei einem K_B Wert von 3.2×10^7 . Die Einheiten der Intensitäten sind willkürlich.

4. Apparatur

Die Spektren werden mit einem Fluorolog Fluoreszenzspektrometer aufgenommen. Vor dem Bedienen des Gerätes wird dieses vom Assistenten erklärt.

5. Experimentelle Durchführung

Generell: wegen Kontaminationsgefahr werden Chemikalien niemals direkt aus der Originalflasche pipettiert!

Für den Versuch werden in einem 50 mL Messkolben 5×10^{-4} M Bilirubinlösung in DMF hergestellt. Daraus werden in einer Pyrex Glasflasche mit Hilfe von Vollpipetten 10 mL 2×10^{-4} M BR in DMF zubereitet. Achtung: bilirubinhaltige Lösungen möglichst im Dunkeln aufbewahren!

5.1 Wellenlängenbestimmung

In Reagenzgläsern werden nun je 10 mL von folgenden Lösungen hergestellt:

Lösung A: 2 μ M BSA in Phosphatpuffer.

Lösung B: 2 μ M BR in Phosphatpuffer.

Lösung C: 1 μ M BSA plus 1 μ M BR in Phosphatpuffer.

Von der Lösung C wird nun ein Anregungsspektrum gemessen. In unserem Fall wird die Lösung von 360 nm bis 530 nm angeregt und die Emission bei 550 nm wird beobachtet. Mit dem Filter F26 wird das Anregungslicht nach durchlaufen der Probe gefiltert. Die Spaltenbreiten des Instrumentes werden auf 10 nm gestellt und die Scangeschwindigkeit auf 200 nm/min. Nun wird von der Lösung C ein Emissionsspektrum gemessen. Anhand des Anregungsspektrums werden mit dem Assistenten die Bedingungen für das Emissionsspektrum gewählt. Um sicher zu stellen, dass die einzelnen Komponenten (BR, BSA und Phosphatpuffer) unter diesen gewählten Bedingungen keine Fluoreszenz zeigen, werden von den Lösungen A und B und von reinem Phosphatpuffer ebenfalls ein Emissionsspektrum aufgenommen. Die Spektren werden ausgedruckt.

5.2 Fluoreszenzmessungen der Proben

In Reagenzgläsern werden 17 Lösungen mit je einer totalen Konzentration $[BR]_0 + [BSA]_0$ von 2.0 μM in Phosphatpuffer und einem totalen Volumen von je 10 mL hergestellt. Die Konzentrationen der einzelnen Komponenten sollten sich in 0.1 μM Abständen von 0.2 μM BR + 1.8 μM BSA bis hin zu 1.8 μM BR + 0.2 μM BSA erstrecken. Zu jeder Lösung sollten insgesamt 100 μL DMF zugegeben werden, wobei das DMF in der BR Lösung ebenfalls berücksichtigt werden muss.

Von diesen Lösungen wird nun je ein single read scan gemessen. Die erhaltenen Intensitäten werden notiert.

6. Auswertung der Daten

Die Daten werden mit dem Mathcadprogramm Auswertung KOMBIL.mcd ausgewertet. Die erhaltenen Werte für die Komplexbildungskonstante K_B sollen diskutiert und mit Werten aus der Literatur verglichen werden. Vergleiche die beiden Methoden zur Berechnung der Komplexbildungskonstanten K_B . Diskutiere den Fall $K_B \rightarrow \infty$ und vergleiche ihn mit den Messresultaten. Berechne auch die freie Reaktionsenthalpie für die Reaktion (2.1).

7. Fragen

Leite ausgehend von Gleichung (3.1) Schritt für Schritt Gleichung (3.3) her. Als Starthilfe sollen die Gleichungen (3.6), (7.1) und (7.2) dienen.

$$I = k [\text{BRBSA}] \quad (7.1)$$

$$I_{\text{tot}} = k [\text{BRBSA}]_{\text{tot}} \quad (7.2)$$

wobei k aus mehreren Konstanten, die im Fluoreszenzprozess eine Rolle spielen, zusammengesetzt ist. Um die Gleichung (3.3) herleiten zu können, müssen in der Gleichung (3.1) alle unbekannt Konzentrationen $[\text{BR}]$, $[\text{BSA}]$ und $[\text{BRBSA}]$ ersetzt werden durch die bekannten Konzentrationen $[\text{BR}]_0$, $[\text{BSA}]_0$ und $[\text{BRBSA}]_{\text{tot}}$.

Wie lautet die Gleichung (3.3) für den Fall $X \geq X_0$?

8. Literatur

- (1) K. R. Williams et al., Journal of Chemical Education, Vol. 79, No. 1, January 2002, 115 - 116.
- (2) P. W. Atkins, Physikalische Chemie, Kapitel zur Fluoreszenz.

9. Chemikalien

- Bilirubin. Bilirubin möglichst im Dunkeln handeln.
- N,N-Dimethylformamid (DMF): DMF wird leicht durch die Haut resorbiert, wirkt stark haut- u. schleimhautreizend, Leber- u. Nierenschäden möglich. Potentielles kanzerogen.
- Phosphatpuffer, 0.125 M, pH 7.4
- Bovin Serum Albumin, 2×10^{-4} M in Phosphatpuffer 0.125 M, pH 7.4

10. Inventarliste

- Messkolben: 50 mL
- Bechergläser: 2×50 mL
- Vollpipetten: 4 mL, 6 mL
- Stabpipette: 10 mL
- Reagenzgläser, Gestell
- Kolbenhubpipette: 10 - 100 μ L
- 2 Glasküvetten
- Peleusball

Das Inventar ist nach jedem Versuch vollständig und sauber zu hinterlassen.