

Quantitative Proteinbestimmung / Photometrie

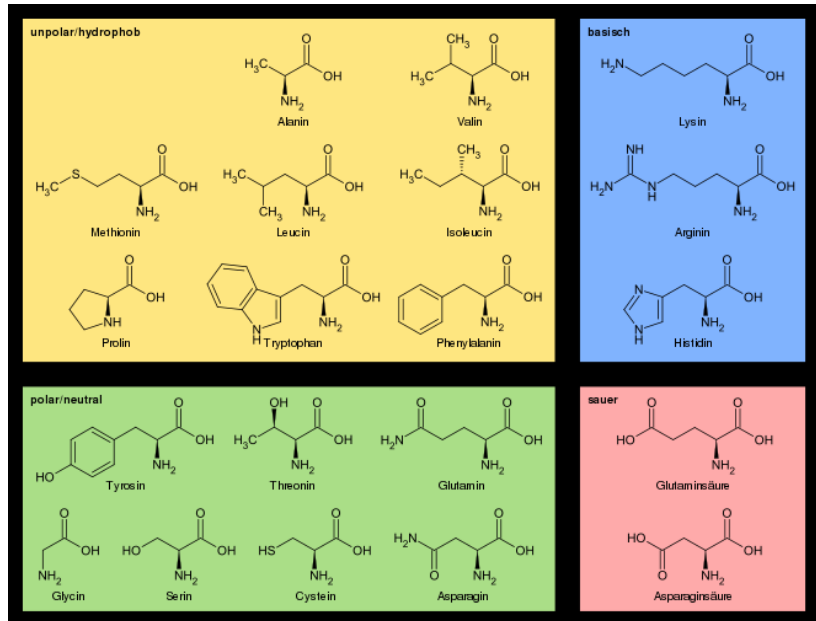
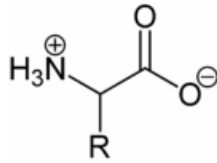
Analytisch-Chemisches Grundpraktikum II

QUANTITATIVE PROTEINBESTIMMUNG / PHOTOMETRIE.....	1
THEORIE.....	2
AUFBAU DER PROTEINE	2
BESTIMMUNGSMETHODEN	3
<i>UV-Absorption bei 280nm</i>	4
<i>Fluoreszenzeigenschaften</i>	4
<i>spezifische Chromophore</i>	4
<i>Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl</i>	5
<i>Bradford</i>	5
<i>Ninhydrin</i>	5
<i>Immunoassays, radioaktive Assays</i>	6
<i>Lowry et al.</i>	7
<i>BCA-Methode nach Smith et al.</i>	7
<i>How the BCA Protein Assay Detects Protein:</i>	8
PHOTOMETRIE.....	9
<i>Lambert-Beer'sche Gesetz</i>	10
<i>Photometrie bei mehreren absorbierenden Komponenten</i>	11
<i>systematische Fehler in der Photometrie</i>	11
<i>Die Präzision photometrischer Messungen</i>	12
<i>Allgemeine Hinweise zu photometrischen Quantifizierungsmethoden von Proteinen mittels Proteinstandards</i>	12
PRÄZISION, RICHTIGKEIT UND GENAUIGKEIT	13
ANALYSEVORSCHRIFT	14
HERSTELLUNG VON REAGENTIEN	14
FEHLERQUELLEN.....	15
GERÄTE UND CHEMIKALIENLISTE PRAKTIKUM.....	16
<i>Geräte (für 10 Studenten)</i>	16
<i>Chemikalien</i>	16
AUSWERTUNGEN.....	17
STANDARDFORM DER ANGABE VON ANALYSENERGEBNISSEN.....	17
<i>Mittelwert \pm Vertrauensbereich VB</i>	17
<i>Standardabweichung s</i>	17
SIGNIFIKANTE STELLEN.....	17
AUSREIßERTEST DEAN UND DIXON	18
KALIBRIERFUNKTION	18
KENNDATEN DES ANALYSEVERFAHRENS:	18
➤ <i>Empfindlichkeit</i>	18
➤ <i>Verfahrensstandardabweichung s_{VF}</i>	19
<i>Wdh.: Normalverteilung und Standardabweichung</i>	19
➤ <i>Nachweisgrenze, Erfassungsgrenze, Bestimmungsgrenze</i>	19
STATISTISCHE TABELLEN.....	21
<i>Zweiseitige Student t-Verteilung</i>	21
<i>Ausreißertest nach Dean & Dixon</i>	21
PROTOKOLL-CHECKLISTE	22

Theorie

Aufbau der Proteine

➤ Aminosäuren



- Primärstruktur: AS-Sequenz, Verknüpfung der AS über Peptidbindungen (-CO-NH-)
- Sekundärstruktur
 - Stabilisierung durch H-Brückenbindung
 - α -Helix
 - β -Faltblattstruktur

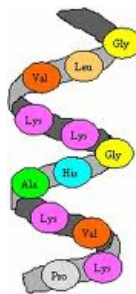


Abbildung 1: α -Helix

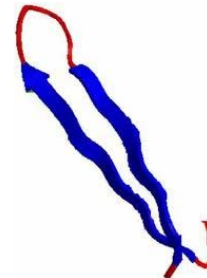
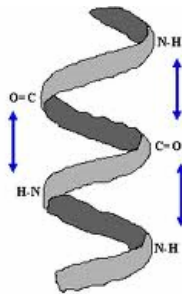


Abbildung 2: β -Faltblatt

- Tertiärstruktur
 - Disulfidbrücken durch das Cystein (Stabilisierung der Proteinstruktur)

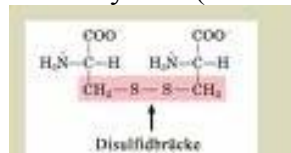


Abbildung 3: Disulfidbrücken durch Cystein

- Quartärstruktur
 - Protein kann aus mehreren Untereinheiten (zusammengelagerten AS-Sequenzen) bestehen
 - zusätzliche prosthetische Gruppen (Kofaktor) (kovalent gebunden), z.B. Zuckerreste, Biotin, ... Verleiht dem Protein spezifische Eigenschaften. Für Enzyme meist unerlässlich
 - Koenzyme: organische/anorganische Moleküle, die nicht kovalent gebunden, aber z.B. für die Funktion eines Enzyms unerlässlich sind, Bsp. Salze, ATP

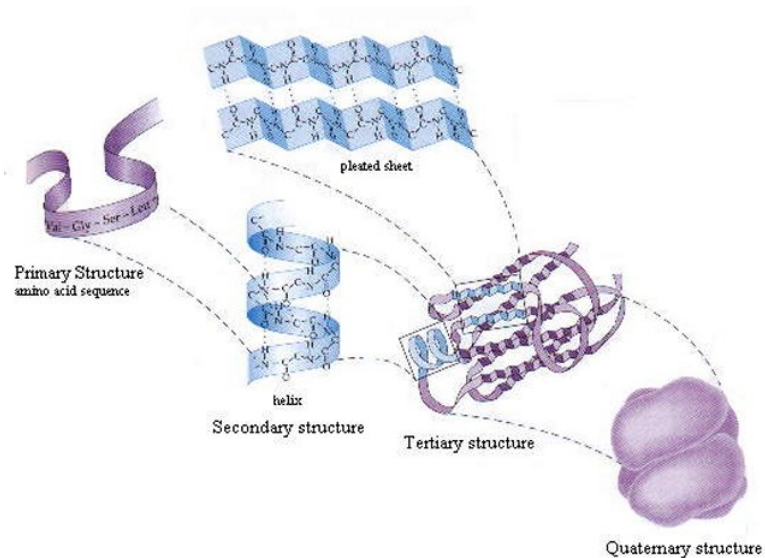


Abbildung 4: Proteinstruktur (http://kvhs.nbed.nb.ca/gallant/biology/protein_structure.html)

Bestimmungsmethoden

Proteine gehören neben der DNA/RNA zu den wichtigsten Bausteinen lebender Materie. Sie haben im lebenden Organismus unterschiedliche Aufgaben. Die Quantifizierung der Proteine ist daher die Voraussetzung aller vergleichenden Verfahren in der Biochemie, Pharmazie und Medizin.

Aufgrund des unterschiedlichen Aufbaus der Proteine (untersch. AS-Sequenzen und untersch. Aufbau in der Struktur) gibt es bis heute keine universelle und empfindliche Methode, die sowohl für Proteingemische wie für isolierte Proteine, für lösliche wie schwerlösliche oder membrangebunden gleichermaßen geeignet ist.

Die Wahl der Methode von fünf Hauptkriterien abhängig:

1. Menge an Protein die zur Verfügung steht
2. Konzentration an Protein
3. Spezifität der Methode
4. Anwesenheit von Störsubstanzen (z.B. Puffer, Detergentien)
5. Einfachheit und Verlässlichkeit der Methode

Analysenmethode	Empfindlichkeitsbereich	Störungen
KJELDAHL	≥ 5 mg	N-haltige Verbindungen
BRADFORD	0.2 - 1500 µg	Große Variation zwischen einzelnen Proteinen; Detergenzien; ungenügende Linearität im oberen Empfindlichkeitsbereich
LOWRY <i>et al.</i>	2 - 1500 µg	Histamin, Imidazol, Puffer, Kohlenhydrate, Tenside; ungenügende Linearität im oberen Empfindlichkeitsbereich
SMITH <i>et al.</i>	0.2 - 1500 µg	Cu-komplexierende Verbindungen, Amine
Fluoreszenzderivat (z. B. Fluoram)	0.1 - 100 µg	Primäre Amine
UV Absorption	> 1 µg	Nukleinsäuren

Abbildung 5: Vergleich einiger allgemein eingesetzter Bestimmungsmethoden von Proteinkonzentrationen

UV-Absorption bei 280nm

- aromatische AS Tryptophan und Tyrosin (Phenylalanin)
- Vorteil: zerstörungsfrei
- Nachteil: Empfindlichkeit der Methode und oft Störsubstanzen, die ebenfalls zwischen 200 und 280nm absorbieren
- DNA/RNA hat Absorptionsmaximum bei 260nm
- Bestimmung der Protein/DNA-Konzentration nach Warburg-Christian (280/260nm)
 - $P \text{ (mg/ml)} = 1,56 \times E_{280\text{nm}} - 0,757 \times E_{260\text{nm}}$

je nach Anteil an aromatischen AS hat jedes Protein andere Absorptionsintensitäten bei 280nm → Bsp. dafür, dass es keine universelle Bestimmungsmethode gibt

Fluoreszenzeigenschaften

- Tryptophan (Aromatische AS)
- extrem empfindlich und zerstörungsfrei
- jedoch von zahlreichen Störfaktoren beeinflusst

spezifische Chromophore

- z.B. Häm-Gruppe als prosthetische Gruppe
- Messen im Absorptionsmaximum dieser Gruppe

Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl

- in der Lebensmittelchemie oft verwendet
- Vorteil: Untersuchung aller Arten von Proteinen möglich
- Nachteil: N-haltige Substanzen (z.B. Nukleinsäuren) stören, (s.a. Melaminskandal in China, 2008)

Aufschluss der Proteine erfolgt mit kochend heißer Schwefelsäure:

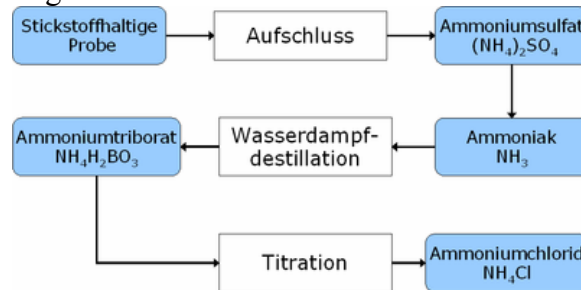


Abbildung 6: Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl

- Best. des N-Gehaltes
- Bekannt: N-Gehalt in Proteinen (15-18%, Ø 16%)
- Zurückrechnen auf Protein durch Faktor 6,25

Bradford

- schnelle und empfindliche Methode
- Bindung des Proteins an den Farbstoff Coomassie Brilliantblau in Phosphorsäure
- Shift des Absorptionsmaximums von 465nm nach 595nm
- Bindung des Farbstoffes primär an Arginin (geringer an Histidin, Lysin, Tyrosin, Tryptophan und Phenylalanin)
- Nachteil: Bindung des Farbstoffes stark von Proteinspezies abhängig und grobe Abweichungen vom Standardprotein möglich

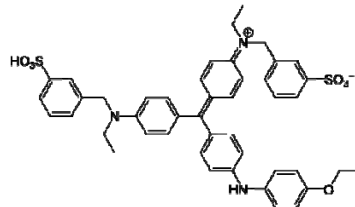


Abbildung 7: Coomassie-Brilliantblau R-250

Ninhydrin

- Ninhydrin wird vor allem für den Nachweis von Aminosäuren und Proteinen verwendet. Für Proteine ist der Test jedoch nur erfolgreich, wenn relativ kurze Oligopeptide vorliegen, da Ninhydrin nur mit freien Aminogruppen reagiert und diese bei langkettigen Polypeptiden kaum vorhanden sind. Der Nachweis wird in Lösung (unter Erhitzen im Wasserbad) durchgeführt. Ninhydrin wird häufig auch als Sprühreagenz z. B. bei der Papierchromatografie oder Dünnschichtchromatographie verwendet.
- Eine weitere auf dieser Reaktion basierende Anwendung ist die Erstellung von Fingerabdrücken. Da im Schweiß Aminosäuren vorkommen, können diese mit Ninhydrin reagieren und die Finger- bzw. Handabdrücke sichtbar machen.

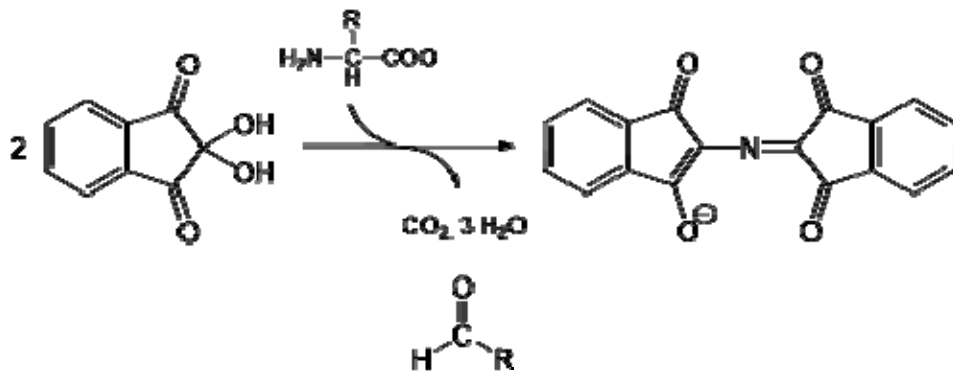


Abbildung 8: Zwei Moleküle Ninhydrin reagieren in alkalischem Milieu mit kurzen Oligopeptiden zu einem blauen Farbstoff, Ruhemanns Violett (Wikipedia)

Immunoassays, radioaktive Assays

- Als Immunassays (engl.: *Immunoassay*) werden zusammenfassend eine Reihe von Methoden in der Bioanalytik bezeichnet, deren gemeinsames Grundprinzip die Erkennung und damit der Nachweis eines Analyten in einer flüssigen Phase durch die Bindung eines Antigens an einen Antikörper ist.
- Je nach Konfiguration des Assays können sowohl Antigen als auch Antikörper der nachzuweisende Analyt sein. Bei der Durchführung von Immunassays wird die hohe Spezifität und Bindungsstärke der Bindung zwischen Antigenen und Antikörpern genutzt.

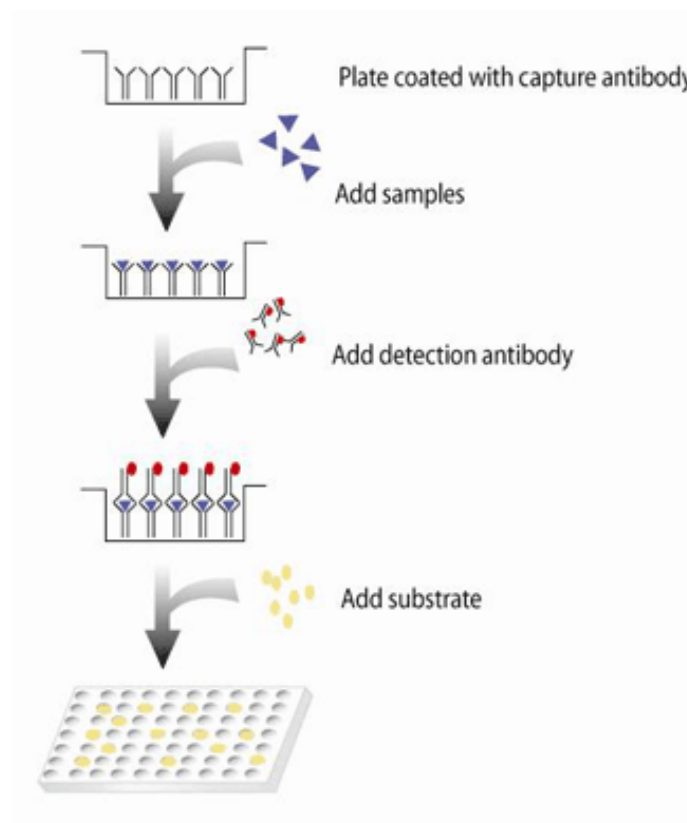


Abbildung 9: Bsp. eines möglichen Aufbaus eines Immunoassays

- Bsp. ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)
- oder direkte Messung biologischer Aktivitäten *in vivo* oder *in vitro*
- Messung kann in Mikrotiterplatten durchgeführt werden

Lowry et al.

- lange Zeit die dominante Methode
 - Komplexierung von Cu^+ Ionen durch zwei oder mehr Peptidbindungen in alkalischer Lösung und Oxidation der aromatischen AS Tyrosin und Tryptophan
 - Es bildet sich ein Kupfer-Protein-Komplex
 - Dieser unterstützt die Reduktion des Folin-Ciocalteu Reagens
 - anschl. UV-Absorptionsmessung (750nm bzw. 500nm)
- Nachteile
 - große Farbunterschiede zwischen verschiedenen Proteinen
 - Farbe nicht streng proportional zur Proteinkonzentration
 - viele Verbindungen interferieren (Saccharose, Lipide, Phosphatpuffer, Monosaccharide, Ammoniumsulfat, Puffersalze, Aminosäuren, chelatbildende Reagentien, Detergentien)
 - Farbentwicklung stark pH abhängig (sollte 10-10,5 betragen), bei diesem pH ist aber Reagenz instabil

BCA-Methode nach Smith et al.

- Bicinchoninsäure-Methode
- beruht wie Lowry auf Reduktion von Cu^{2+} Ionen zu Cu^+ Ionen durch das Protein unter alkalischen Bedingungen.
- Unterschied: Bicinchoninsäure statt Folin-Ciocalteu Reagens zur Komplexierung der einwertigen Kupferionen
- BCA im alkalischen stabil
- hohe Spezifität für Cu^+
- starke Absorption bei 562nm

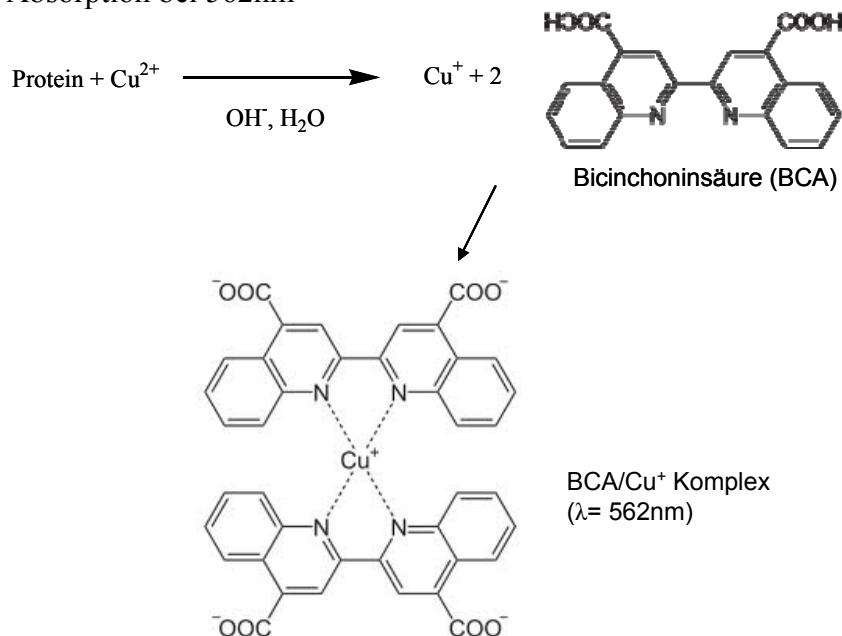


Abbildung 10: Smith et al. Methode

How the BCA Protein Assay Detects Protein:

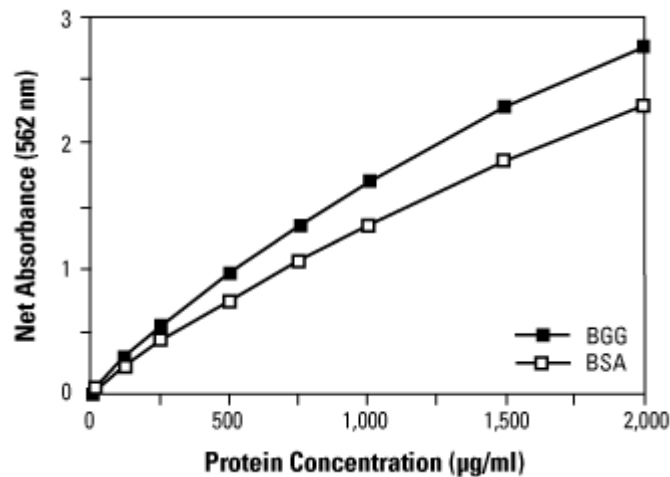


Abbildung 11: Typical standard curves for bovine serum albumin (BSA) and bovine gamma globulin (BGG) in the BCA Protein Assay (www.piercenet.com)

The BCA Protein Assay combines the well-known reduction of Cu^{2+} to Cu^{1+} by protein in an alkaline medium with the highly sensitive and selective colorimetric detection of the cuprous cation (Cu^{1+}) by bicinchoninic acid. The first step is the chelation of copper with protein in an alkaline environment to form a light blue complex. In this reaction, known as the biuret reaction, peptides containing three or more amino acid residues form a colored chelate complex with cupric ions in an alkaline environment containing sodium potassium tartrate.

In the second step of the color development reaction, bicinchoninic acid (BCA) reacts with the reduced (cuprous) cation that was formed in step one. The intense purple-colored reaction product results from the chelation of two molecules of BCA with one cuprous ion. The BCA/copper complex is water-soluble and exhibits a strong linear absorbance at 562 nm with increasing protein concentrations. The BCA reagent is approximately 100 times more sensitive (lower limit of detection) than the pale blue color of the first reaction.

The reaction that leads to BCA color formation is strongly influenced by four amino acid residues (cysteine or cystine, tyrosine, and tryptophan) in the amino acid sequence of the protein. However, unlike the Coomassie dye-binding methods, the universal peptide backbone also contributes to color formation, helping to minimize variability caused by protein compositional differences.

(www.piercenet.com)

Photometrie

Definition:

- Unter Photometrie versteht man die Messung von Lichtintensität bzw. Lichtabsorption. Sie kann zur quantitativen chemischen Analyse eingesetzt werden.
- Absorption meist im
 - IR-Bereich ($\lambda < 800\text{nm}$ IR, Molekülschwingungen)
 - UV/VIS (UV: $\lambda = 150 - \text{ca } 350\text{nm}$, VIS: $350 - \text{ca } 850\text{nm}$, Elektronenübergänge im Molekül)

Absorbierter Farbbereich	Wellenlängenbereich [nm]	Beobachtete Farbe (Komplementärfarbe)
Violett	380 - 450	Gelbgrün
Blau	450 - 495	Gelb
Grün	495 - 570	Violett bis Rotviolett
Gelb	570 - 590	Blau
Orange	590 - 620	Grünblau
Rot	620 - 750	Blaugrün

Abbildung 12: Aufstellung der Farbbereiche des sichtbaren Lichtes

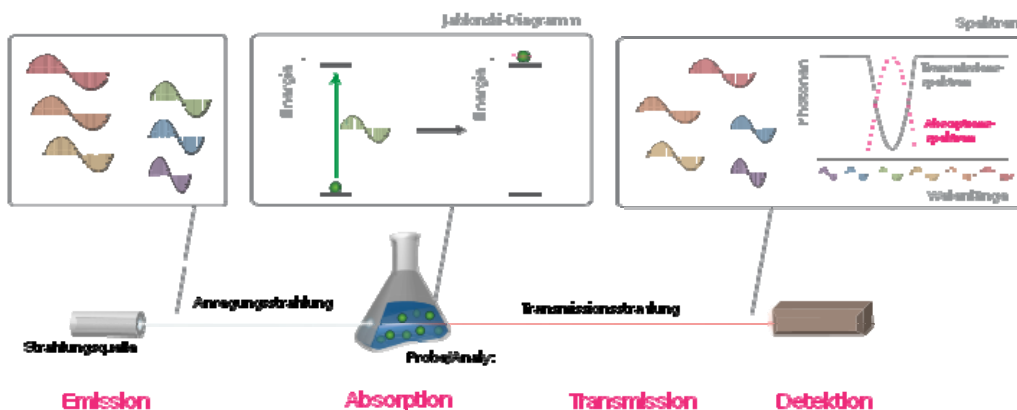


Abbildung 13: Prinzip eines Photometers (Wikipedia)

- Absorptionsmessungen können sowohl zur qualitativen als auch zur quantitativen Analyse verwendet werden. Für die qualitative Analyse ist die Lage des Maximums bzw. der Maxima und die Intensität und Form der Absorptionsbanden von Bedeutung, da sie für die absorbierende Substanz charakteristisch sind. Zwar ist die eindeutige Identifizierung von unbekanntem Substanzen in Gemischen meist nicht möglich, aber für reine Substanzen ist die Zuordnung einer Struktur durch Vergleich des Spektrums mit den betreffenden katalogisierten Spektren in der Regel durchführbar.
- Quantitative Bestimmungen mit dem Spektrometer werden meist bei der Wellenlänge (oder im Wellenlängenbereich) des Maximums der stärksten Absorptionsbande durchgeführt. Ist allerdings die Absorption zu groß ($> \text{ca. } 80\%$ des gesamten Meßbereichs) oder die betreffende Bande gestört, so geht man zweckmäßig zu einer schwächeren Bande über. Quantitative Analysen werden überwiegend mit Hilfe von Kalibrierfunktionen durchgeführt. Für mehrere Kalibrierlösungen verschiedener

Konzentrationen der zu bestimmenden Substanz trägt man die gemessene Extinktion auf der Ordinate gegen die Konzentration auf der Abszisse auf. Bei Gültigkeit des Lambert-Beerschen Gesetzes erhält man eine Kalibriergerade, die in erster Näherung durch den Koordinatenursprung geht. Nach der Erstellung der Kalibrierkurve wird die Extinktion der Lösung mit der unbekannt Konzentration der betreffenden Substanz gemessen. Aus der Kalibrierkurve ergibt sich dann sofort der zur gemessenen Extinktion zugehörige Konzentrationswert. Alle Messungen müssen bei der gleichen Wellenlänge, mit der gleichen Referenzküvette und bei gleicher Temperatur durchgeführt werden. Für genaue Messungen ist eine Temperaturkonstanz von etwa 11° K erforderlich.

- Bei Anregung von lichtabsorbierenden Substanzen mit polychromatischem Licht wird ein bestimmter Wellenlängenbereich herausgefiltert, während Licht anderer Wellenlänge durchgelassen wird. Im sichtbaren Bereich besitzt nun solch eine Lösung eine Farbe entsprechend des Wellenlängenspektrums, welches nicht absorbiert wurde. So erscheint z.B. eine Lösung bei Absorption von Licht des blauen Spektrums gelb, welches die Komplementärfarbe zu blau ist.

Lambert-Beer'sche Gesetz

- beschreibt die Lichtabsorption beim Durchgang von Licht durch ein homogenes Medium:
- die durch Absorption verursachte Lichtschwächung ist proportional der Zahl absorbierender Teilchen

Durchquert ein paralleles monochromatisches Lichtbündel eine Lösung der Konzentration c , so ist auf einer Wegstrecke ds die Verringerung der Lichtintensität dI proportional der Konzentration und der Lichtintensität.

$$-dI = k \cdot I \cdot c \cdot ds$$

k ...Proportionalitätsfaktor, abh. von der Wellenlänge des Lichts

- Integration über die gesamte durchquerte Schichtdicke d
 - von der einfallenden Lichtintensität I_0 bei $s = 0$ bis zur austretenden Lichtintensität I bei $s = d$
- und Umwandlung in den dekadischen Logarithmus ergibt:

$$\log \frac{I_0}{I} = \varepsilon \cdot c \cdot d$$

c ...Konzentration der Lösung [mol/l]

d ...Schichtdicke der Lösung [cm]

ε ...molarer Extinktionskoeffizient [L/mol x cm⁻¹]

- weitere Kenndaten in der Photometrie sind:

- Transmission (Durchlässigkeit)

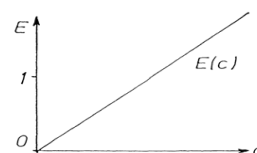
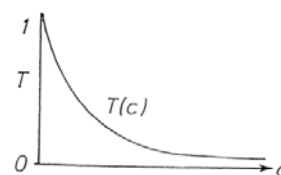
$$T = \frac{I}{I_0}$$

$$0 \text{ (0\%)} \leq T \leq 1 \text{ (100\%)}$$

- Extinktion, E (engl. Absorbance, A)

$$E = -\log T = \log \frac{I_0}{I} = \varepsilon \cdot c \cdot d$$

$$\infty > E > 0$$



Photometrie bei mehreren absorbierenden Komponenten

- Lösung mit einem Gemisch aus mehreren Analyten
- die keine Wechselwirkungen eingehen (chemische Reaktion, Komplexbildung, H-Brücken,...)
- lineare Addition ihrer Absorptionsspektren, die Summe geht über alle Chromophore

$$E_{\lambda}(\text{Gemisch}) = d \sum_i \epsilon_{\lambda i} \cdot c_{xi}$$

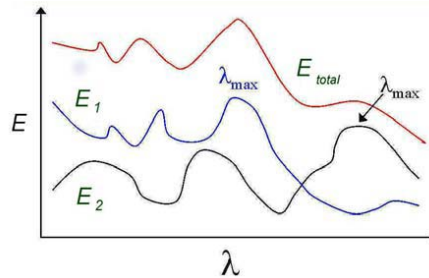


Abbildung 14: Photometrie bei mehreren absorbierenden Komponenten

systematische Fehler in der Photometrie

Eine Reihe von Faktoren kann zu Abweichungen vom Beer'schen Gesetz, d.h. zu nicht-linearen Eichfunktionen $E(c)$ führen. Dabei können sowohl positive als auch negative Abweichungen beobachtet werden.

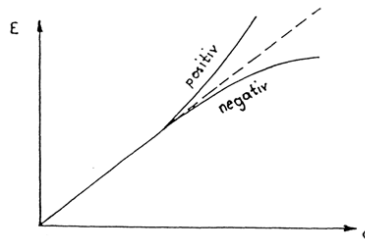


Abbildung 15: systematische Fehler in der Photometrie

1. durch zu hohe Konzentrationen der Lösung

- Lambert Beer nur in bestimmten Konzentrationsbereich linear
- Das Beer'sche Gesetz ist nur anwendbar auf verdünnte Lösungen ($c < 0.01 \text{ Mol/L}$).
- Bei höheren Konzentrationen kommt es zu einer Änderung des Brechungsindex in der Lösung, die von Änderungen im Absorptionsindex überlagert sein können. Meist resultieren daraus negative Abweichungen vom Beer'schen Gesetz.
- (Abhilfe: Verdünnen der Lösungen bis in den Bereich unter 0.01 Mol/L).

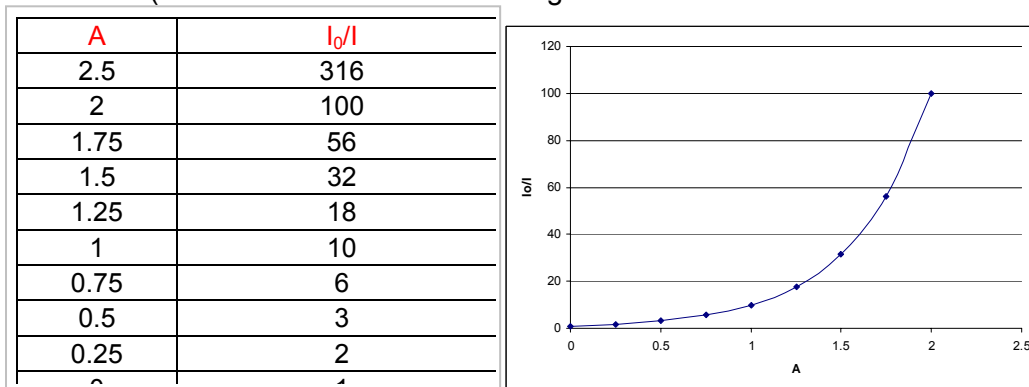


Abbildung 16: A vs. I_0/I (Wdh.: $E = \log I_0/I$)

- bei einer Absorbance von 1 wird $1/10$ detektiert, bei 2 nur mehr $1/100$

2. **durch Verwendung von polychromatischem Licht zu großer Bandbreite**
 - Das Beer'sche Gesetz gilt streng nur für monochromatisches Licht.
 - Verwendet man zur Messung Licht mit einem Wellenlängenbereich $\lambda_1 + \Delta\lambda$, so ist die gemessene Extinktion der Extinktion bei λ_1 weder gleich noch proportional und folglich auch nicht mehr linear von der Konzentration abhängig. Die Verwendung von polychromatischem Licht führt daher zu Extinktionswerten, die Mittelwerte über den Messbereich sind. Diese Mittelwerte weichen umso stärker von einem mit monochromatischem Licht gemessenen Wert ab, je stärker sich der molare Extinktionskoeffizient in dem Wellenlängenbereich ändert. Die Abweichungen vom Beer'schen Gesetz sind daher umso größer, je größer die Bandbreite des Messstrahls ist und je schmaler die natürliche Bandbreite im gemessenen Spektrum ist.
 - Monochromatoren (Gitter, Prismen, Filter) liefern Licht mit einer bestimmten endlichen Bandbreite. Solange diese Bandbreite weniger als 10% der natürlichen Bandbreiten im UV- oder sichtbaren Absorptionsspektrum beträgt, ist der Fehler in der registrierten Peakhöhe kleiner 0,5 %.
3. **durch Streulicht**
 - Da jeder Anteil des einfallenden Lichtes, der nicht im austretenden Lichtstrahl registriert wird, als „absorbiert“ erscheint, kommt es zu Abweichungen vom Beer'schen Gesetz.
 - Streulicht kann aus mehreren Quellen stammen:
 - Inhomogenität der Lösung
 - Streulicht aus dem Photometer
4. **„scheinbare“ Abweichungen – (Irrtümer)**
 - sekundäre chemische Gleichgewichte, die die Konzentration der interessierenden, absorbierenden Moleküle in der Lösung verändern

Die Präzision photometrischer Messungen

- Die Präzision photometrischer Messungen wird vom Signal/Rausch-Verhältnis bei der Messung der Lichtintensität bestimmt, wobei es im besonderen auf die Änderung der Größe des Rauschanteils mit der Lichtintensität ankommt.
- Je nach Mechanismus, der das Rauschen verursacht, unterscheidet man zwei Grenzfälle:
 - Thermisches Rauschen (Johnson-Rauschen, Widerstandsrauschen): der Rauschanteil ist unabhängig von der Lichtintensität.
 - „Shot Noise“, hervorgerufen durch die statistische Natur der Prozesse in denen Elektronen eine Grenzfläche überschreiten wie z.B. bei der Emission aus Photokathoden. Der „shot noise“-Anteil ist proportional zur Wurzel der Lichtintensität.
- Das Rauschen in Photoröhren, Photoelektronenvervielfachern und Photodioden (Photoelemente) wird überwiegend durch „shot noise“ verursacht. Die meisten anderen Photodetektoren zeigen thermisches Rauschen.

Allgemeine Hinweise zu photometrischen Quantifizierungsmethoden von Proteinen mittels Proteinstandards

- Messung von Proteinkonzentrationen im mittleren Empfindlichkeitsbereich, um mögliche Nichtlinearitäten im unteren und/oder oberen Bereich zu vermeiden
- Nachteil photometrischer Messungen: verschiedene Proteine liefern unterschiedliche Absorptionen
 - wenn möglich gleiches Protein für Kalibrierfunktion verwenden
 - oft nicht vorhanden oder zu teuer
 - Verwendung eines anderen Proteins als Standard
 - erhaltene Werte als relativ anzusehen

- wichtig daher: Angabe der Bestimmungsmethode UND des verwendeten Standards
- Proteinstandards generell:
 - immer gleich behandeln wie Probe
 - gleiche Reaktionszeiten
 - gleiche Lösungen
 - gleiche Lagerung und Temperaturen, ...

Präzision, Richtigkeit und Genauigkeit

Präzision (precision)

- Die Präzision ist ein Maß für die Übereinstimmung zwischen unabhängigen Messergebnissen unter festen Bedingungen. Liegen also mehrere Messwerte dicht beieinander, so hat die Messmethode eine hohe Präzision. Das bedeutet aber noch nicht, dass die gemessenen Werte auch richtig sind. Sie könnten präzise falsch sein. Dies ist beispielsweise im zweiten Bild unten der Fall. Hier könnten durch einen systematischen Fehler (bei GPS z.B. durch falsches Kartendatum) die Wert zwar sehr präzise bestimmt worden sein, aber eben verschoben sein.

Richtigkeit (trueness, accuracy of the mean)

- Die Richtigkeit ist ein Maß für die Übereinstimmung zwischen dem aus einem großen Datensatz erhaltenen Mittelwert und dem anerkannten Referenzwert. Wenn also der Mittelwert aus vielen Messungen gut dem dem wahren Wert übereinstimmt, so ist die Richtigkeit hoch. Dies sagt nichts darüber aus, wie stark die einzelnen Werte streuen.

Genauigkeit (accuracy)

- Der Begriff Genauigkeit wird (fälschlicherweise) häufig mit Präzision gleichgesetzt. Die Genauigkeit ist ein Maß für die Übereinstimmung zwischen dem (einzelnen) Messergebnis und dem wahren Wert der Messgröße. Eine hohe Genauigkeit kann man also nur erreichen, wenn sowohl die Präzision als auch die Richtigkeit gut sind.

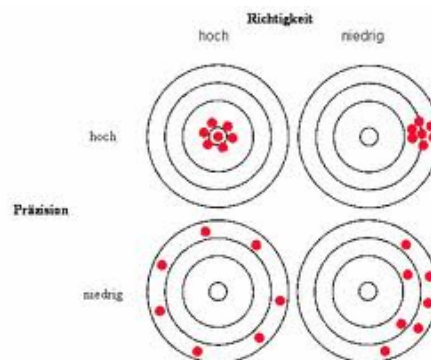


Abbildung 17: Richtigkeit und Präzision

Analysenvorschrift

1. 20 – 50mg Albumin in einem 25ml Messkolben einwiegen
2. ca. 10-15 ml Lösungsmittel zugeben und durch vorsichtiges Schwenken des Kolben vollständig lösen, danach bis zur Markierung auffüllen.
3. Herstellen von 5 Proteinstandards im Konzentrationsbereich von 50-400 μ g/ml
 - $c_1 \times V_1 = c_2 \times V_2$
 - durch 1:1 Verdünnungen (am genauesten, Pipettenfehler hebt sich auf)
4. 30 μ l von je
 - 5 Proteinstandards
 - 4 unverdünnten Probelösungen
 - 5 Blindwertproben (ohne Protein, mit Lösungsmittel)in 1,5ml Eppendorfgefäßen vorlegen (insgesamt also 14 Samples)
5. möglichst gleichzeitige Zugabe von 600 μ l AR und gut durchmischen
6. Inkubation im Wasserbad 30 min bei 60°C
 - Eppis in Pyrostorschwimmer (gebastelt aus Deckel von der Kuvettenschachtel)
7. Abkühlen unter Leitungswasser auf Raumtemperatur
8. Messen innerhalb max 30 min bei 565 nm
 - gebrauchtes AR in Becherglas sammeln (korrekte Beschriftung)
 - ➔ **zum Schluss: Entsorgung metallhaltige Lösungen**

Herstellung von Reagentien

- **Reagenz A**
100 ml ausreichend für 10 Studenten:
 - 1,0 g 2,2'-Bichinolin-4,4'-dicarbonsäure Dinatriumsalzhydrat (Fluka 14339)
 - 2,0g Natriumcarbonat
 - 0,16 g Natriumtartrat
 - 0,95 g Natriumhydrogencarbonat
 - in 100ml dH₂O lösen
 - mit 3M NaOH auf pH 11,25 einstellen
- **Reagenz B**
fertige Lösung, bestehend aus:
 - 0,5 g CuSO₄ x 5 H₂O in 10ml dH₂O
- **Arbeitsreagenz AR**
 - 50 A + 1 B
 - 100 ml Reagenz A + 2 ml Reagenz B
- **Lösung für Proteinstandards**
 - Deionisiertes Wasser mit 0,9% (w/v) NaCl

Fehlerquellen

1. Waage

- a. Waage im Lot?
 - Ausrichten wie Wasserwaage
 - Fehler bis zu 30%
 - Waagen nicht verschieben!!!
- b. sauberes Arbeiten
 - aus Hygienegründen, der Nachfolger freut sich
 - Einwiegen außerhalb der Waage, Probe neben dem Messkolben auf der Waage verfälscht Ergebnis
- c. wenn Anzeige stabil, genauen (!) Wert aufschreiben

2. Lösen des Proteins in Lösungsmittel:

- a. Lösen des Proteins durch vorsichtiges Schwenken
 - starkes Schwenken führt zu extremer Schaumbildung
 - Protein gelangen an die Luft, streifen ihre Hydrathülle ab und entfalten sich (Schaum)
 - leichte Schaumbildung lässt sich kaum vermeiden
- b. Auffüllen auf 25ml Marke
 - genau arbeiten, sonst zieht sich Fehler durch ganzes Beispiel
 - nach Auffüllen gut durchmischen!

3. Arbeiten mit Pipetten

- a. Pipettieren
 - drücken bis zum 1. Anschlagspunkt
 - Lösung langsam aufziehen
 - bei zu schnellem Aufziehen: falsches Volumen (Viskosität von Flüssigkeiten) und Lösung spritzt hoch in die Pipette
 - Tropfen auf der Pipettenspitze abstreifen (Tropfen hat ca 20µl. Beim Pipettieren von 100µl bereits 20% Fehler!)
 - Entleeren der Pipettenspitze durch langsames Drücken bis zum 2. Anschlagspunkt
- b. Ungenauigkeit von (Praktikums-)pipetten
 - üben des Pipettierens an der Waage mit Wasser
 1. üben des richtigen Pipettierens
 2. Wiederholbarkeit
 3. Einstellen verschiedener Volumina und Vergleich Soll/Ist
 - möglichst mit einer Pipette arbeiten und nicht zwischendurch Wechseln
- c. generelle Handhabung
 - Pipetten nie verkehrt rum mit Spitze nach oben halten
 - Verletzungsgefahr
 - Flüssigkeit rinnt in die Spitze
 - a. Pipette verschmutzt und Nachfolger hat deine Probe in seiner
 - b. Salze kristallisieren und verstopfen Filter

4. Durchmischen und Schütteln von Proben

- a. Stammkonzentration von Protein in 25ml Kolben
- b. Herstellen von Verdünnungen in Eppendorfgefäßen
 - Oberflächenspannung von Wasser
 - Schwenken alleine zu wenig
 - Durchmischen z.B. durch Schnippen mit Finger

Geräte und Chemikalienliste Praktikum

Geräte (für 10 Studenten)

Photometer
Wasserbad
1,5ml Eppendorfgefäße
5x Spateln
10x 25ml Messkolben
Mikrokuvetten
5x 1000 μ l Pipetten (verstellbar)
5x 100 μ l Pipetten (verstellbar)
gelbe Pipettenspitzen
blaue Pipettenspitzen
2x Spritzflaschen (Aceton und dH₂O)
10x Eppihalter
10 Bechergläser (50 – 100ml)

Chemikalien

2,2'-Bichinolin-4,4'-dicarbonsäure Dinatriumsalzhydrat (BCA)
Natriumcarbonat
Natriumtartrat
Natriumhydrogencarbonat
Natronlauge
Reagenz B (0,5g CuSO₄x5H₂O in 10ml dH₂O)
Natriumchlorid
Rinderserumalbumin, BSA (Fraktion V, Reinheit ~99%)

Auswertungen

- Jedes Analysenresultat ist mit zufälligen Fehlern behaftet
- zufällige Fehler führen zur Streuung der Messwerte
- die Beschreibung der Streuung der Messwerte macht es möglich, das Ausmaß der Unsicherheit von Analysenresultaten anzugeben

die Qualität der Analysen ist nur dann zu beurteilen, wenn ihre Resultate in der vollständigen Standardform angegeben werden!

Standardform der Angabe von Analysenresultaten

Mittelwert ± Vertrauensbereich VB

$$\bar{x} \pm \frac{t(P, f)s}{\sqrt{n}}(n, s, P)[Dimension]$$

Standardabweichung s

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$$

f...Zahl der Freiheitsgrade = n-1

P...statistische Sicherheit (laut Konvention meist P = 0,95)

t (P,f)...Studentfaktor, für zweiseitige Fragestellungen, mit P und f

Anmerkungen

1. Analysenresultat ohne Angabe seines Unsicherheitsbereiches unvollständig
 - Qualität des Analysenresultates nicht ersichtlich
 - mindestens n und s müssen angeführt werden
2. Der Unsicherheitsbereich wird – in Abwesenheit systematischer Fehler – durch den Vertrauensbereich beschrieben
 - gibt das Intervall an, innerhalb dessen sich der wahre Wert mit einer bestimmten Wahrscheinlichkeit befindet
 - je größer VB, desto größer das Ausmaß der Unsicherheit
3. Einzelwert für VB zu wenig
 - kann Ausreißer sein
 - aber auch mehr als 4-5 Parallelbestimmungen machen keinen Sinn
 - VB wird nur mit $1/\sqrt{n}$ langsam kleiner

signifikante Stellen

Nur weil ein Rechenprogramm eine große Anzahl von Kommastellen liefert, macht es in den allerwenigsten Fällen Sinn, diese anzugeben

- Diejenigen Dezimalstellen gelten als signifikant, die mit Sicherheit bekannt sind, plus der ersten unsicheren Stelle
 - Bsp. Auswaage von 23,854g gleichbedeutend mit $23,854 \pm 0,001g$
- bei Addition oder Subtraktion kann das Ergebnis maximal so hoch sein, wie die Ungenauigkeit des Parameters mit den wenigsten signifikanten Stellen
 - schwächstes Glied in der Kette
 - Bsp.: $4,231 + 23 = 27$ ($\neq 27,231$)

Ausreißertest Dean und Dixon

Gegeben: Messserie aus n Werten, die einen ausreißerverdächtigen Wert x_1 enthält

Durchführung des Tests:

1. Ordnen der Messwerte x_i der Größe nach beginnend mit ausreißerverdächtigem x_1
2. Quotient Q_{exp} aus der Distanz des ausreißerverdächtigen Wertes zu dem benachbarten Wert und der Spannweite der Messserie und Vergleich mit kritischem Tabellenwert $Q_{\text{krit}}(P;n)$

$$Q_{\text{exp}} = \frac{|x_1 - x_2|}{|x_1 - x_n|}$$

3. Entscheidung: x_1 ist ein Ausreißer, wenn $Q_{\text{exp}} > Q_{\text{krit}}$

Kalibrierfunktion

Fast alle Analysenverfahren müssen kalibriert werden. Dazu misst man die Signal einer Reihe von Kalibrierstandards und ermittelt daraus die Kalibrierfunktion durch Auftragen der Signalgröße als Funktion des Gehaltes (Menge, Konzentration) der Kalibration

- **Kalibrierfunktion:** $y = f(x)$

Zur Durchführung der Analyse einer unbekannt Probe geht man den umgekehrten Weg: man misst das Analysensignal und bestimmt dann den Gehalt der Probe mittels der Analysenfunktion (Umkehrfunktion der Kalibrierfunktion)

- **Analysenfunktion:** $x = f^{-1}(y)$

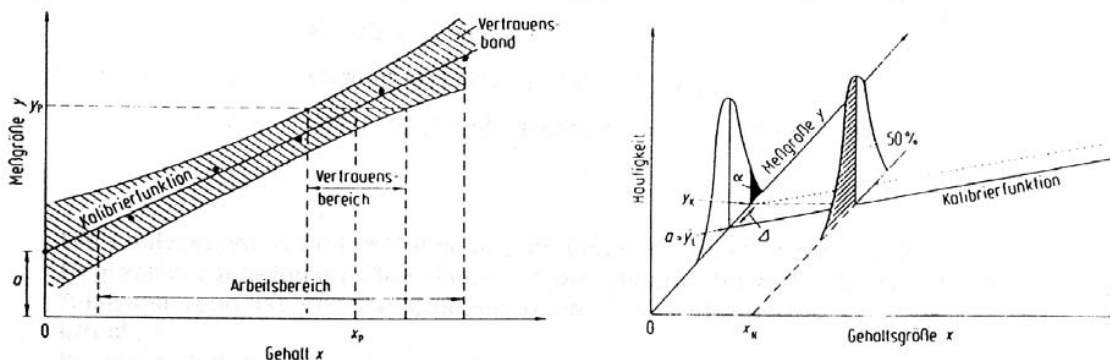


Abbildung 18: Kalibrierfunktion, Vertrauensbereich, Arbeitsbereich, Messgröße und Gehalt

Aus der Kalibrierfunktion bestimmt man die :

Kenndaten des Analysenverfahrens:

➤ Empfindlichkeit

- Empfindlichkeit b ist die Steigung der Kalibrierfunktion bei einer bestimmten Konzentration
- für lineare Kalibrierfunktion von der Konzentration unabhängig und daher eine Konstante

➤ Arbeitsbereich und Bestimmungsgrenzen

- der Arbeitsbereich ist der Konzentrationsbereich, in dem der Vertrauensbereich von Analysenergebnissen einen maximal hinnehmbaren Bereich der Ergebnisunsicherheit nicht überschreitet

- liegt zwischen der unteren und der oberen Bestimmungsgrenze, die durch den Vertrauensbereich der Kalibrierfunktion (und damit durch die Präzision der Kalibration) bestimmt sind
- **Verfahrensstandardabweichung s_{VF}**
 - Maß für die kleinsten Unterschiede in der Konzentration von Analyten, die mit dem Analysenverfahren als unterschiedliche Konzentrationen erkannt werden können
 - s_{VF} ist der Quotient s_y / b aus der Standardabweichung der Streuung der Signalwerte bei der Messung der Kalibrierstandards um die Ausgleichsgerade und der Empfindlichkeit

Wdh.: Normalverteilung und Standardabweichung

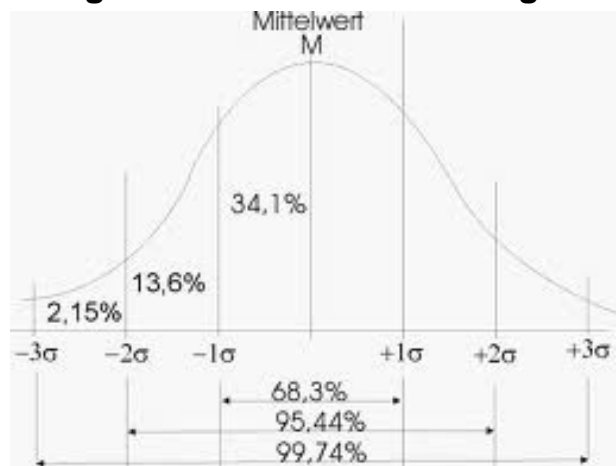


Abbildung 19: Normalverteilung und Standardabweichung

- **Nachweisgrenze, Erfassungsgrenze, Bestimmungsgrenze**

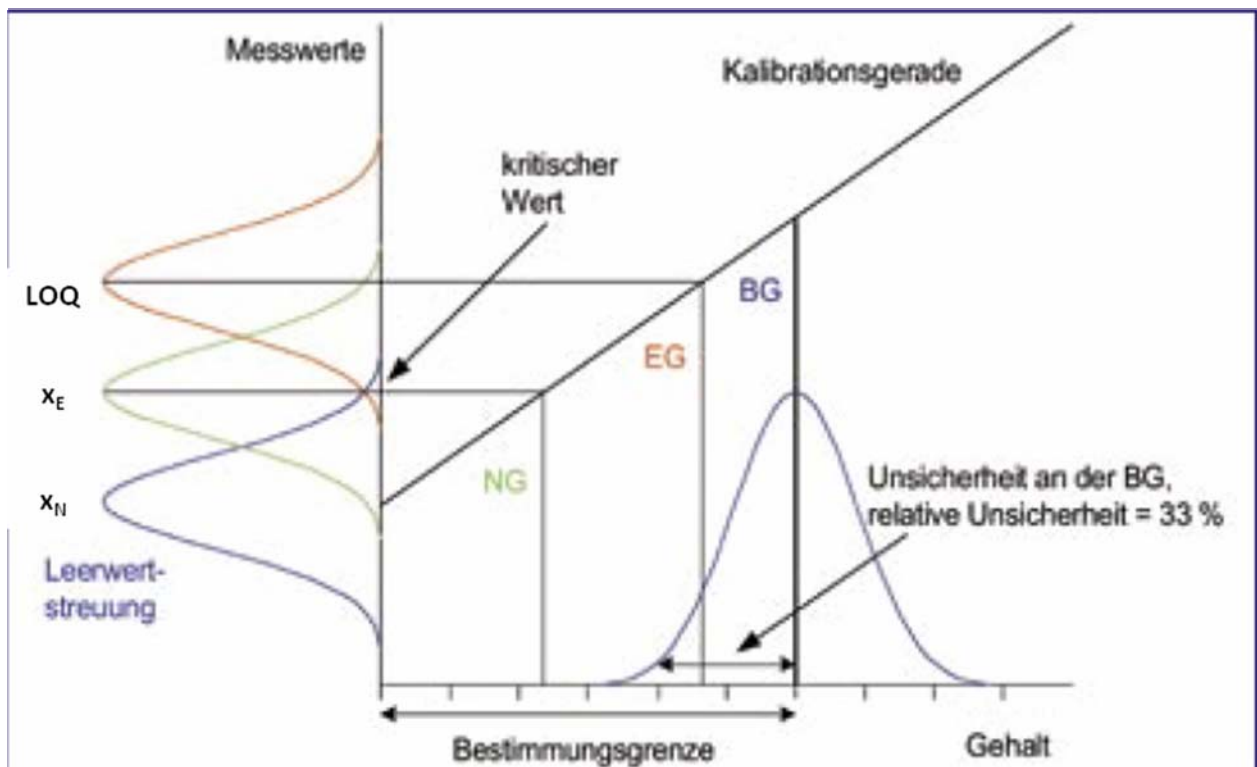


Abbildung 20: Neitzel V., CLB Chemie in Labor und Biotechnik, 54. Jahrgang, Heft 07/2003

Nachweisgrenze x_n , LOD, limit of detection

$$x_n = y_L + 3 \cdot s_L$$

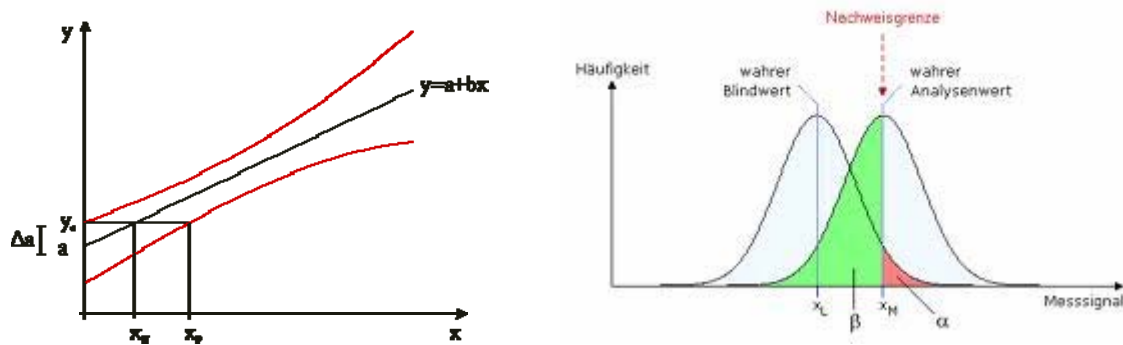


Abbildung 21: Nachweisgrenze

Ein Stoff gilt erst dann als nachgewiesen, wenn das Messsignal das Leerwertsignal statistisch signifikant überschreitet.

- x_n bezeichnet den Wert eines Analysenverfahren, bis zu dem das Analysensignal gerade noch zuverlässig nachgewiesen werden kann (Ja/Nein-Entscheidung).
- Signale an der Nachweisgrenze können mit 50% Wahrscheinlichkeit einem Analyten und mit 50% Wahrscheinlichkeit einem Leerwert zugerechnet werden

Erfassungsgrenze x_E

$$x_E = y_L + 6 \cdot s_L$$

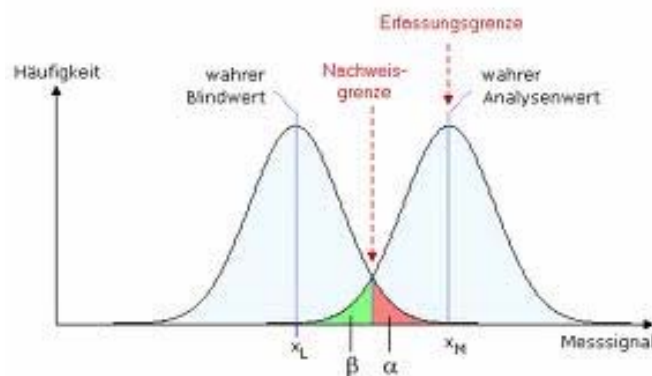


Abbildung 22: Erfassungsgrenze

- jene Konzentration, die mit vorgegebener bereits hoher statistischer Wahrscheinlichkeit erfasst wird
- Wahrscheinlichkeit, dass Signal vom Analyten kommt bereits ca 99%

LOQ, limit of quantification, Bestimmungsgrenze

$$LOQ = y_L + 9 \cdot s_L$$

bzw. je nach Definition: $LOQ = y_L + 10 \cdot s_L$

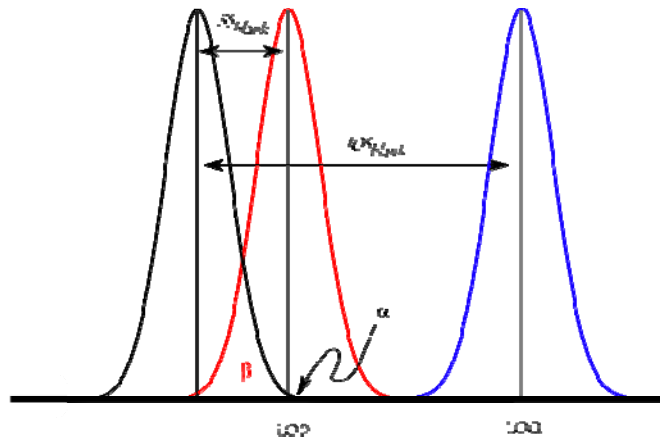


Abbildung 23: LOQ, Bestimmungsgrenze

- kleinste Konzentration eines Analyten, die quantitativ mit einer festgelegten Präzision bestimmt werden kann
- erst ab LOQ quantitative Aussagen möglich

Statistische Tabellen

Zweiseitige Student t-Verteilung

f	P = 95 %	P = 99 %
1	12,706	63,657
2	4,303	9,925
3	3,182	5,841
4	2,776	4,604
5	2,571	4,032
6	2,447	3,707
7	2,365	3,499
8	2,306	3,355
9	2,262	3,250
10	2,228	3,169
∞	1,960	2,576

Ausreißertest nach Dean & Dixon

n	Q_{kritisch}	
	P = 95 %	P = 99 %
3	0,970	0,994
4	0,829	0,926
5	0,710	0,821
6	0,625	0,740
7	0,568	0,680
8	0,526	0,634

Protokoll-Checkliste

- Datum
- Aufgabenstellung
- Grundprinzipien Photometrie (inkl. Lambert Beer)
- Beschreibung der verwendeten chemischen Reaktion nach Smith et al
- Analysenvorschrift
- verwendete Chemikalien
- Herstellung der Lösungen
- Messergebnisse in Tabellenform
- Angabe und graphische Darstellung der Kalibration
- Formeln und Berechnung von
 - Nachweisgrenze, Erfassungsgrenze und Bestimmungsgrenze
 - Standardabweichung und Vertrauensbereich
 - Ausreißertest Dean und Dixon
- Analysenresultat mit Vertrauensbereich