

Novartis Pharma AG
Schullabor



Chemie in der Biomedizin

Besuchsdatum: Donnerstag, 15. Oktober 2020

Zeit: 09.45 Uhr - 15.15 Uhr

Anzahl Schülerinnen und Schüler:

Begleitung: Ingo Kilian

Schule: Kreisgymnasium Bad Krozingen

Treffpunkt: Porte Klybeck (vis-à-vis Tramstation Ciba)

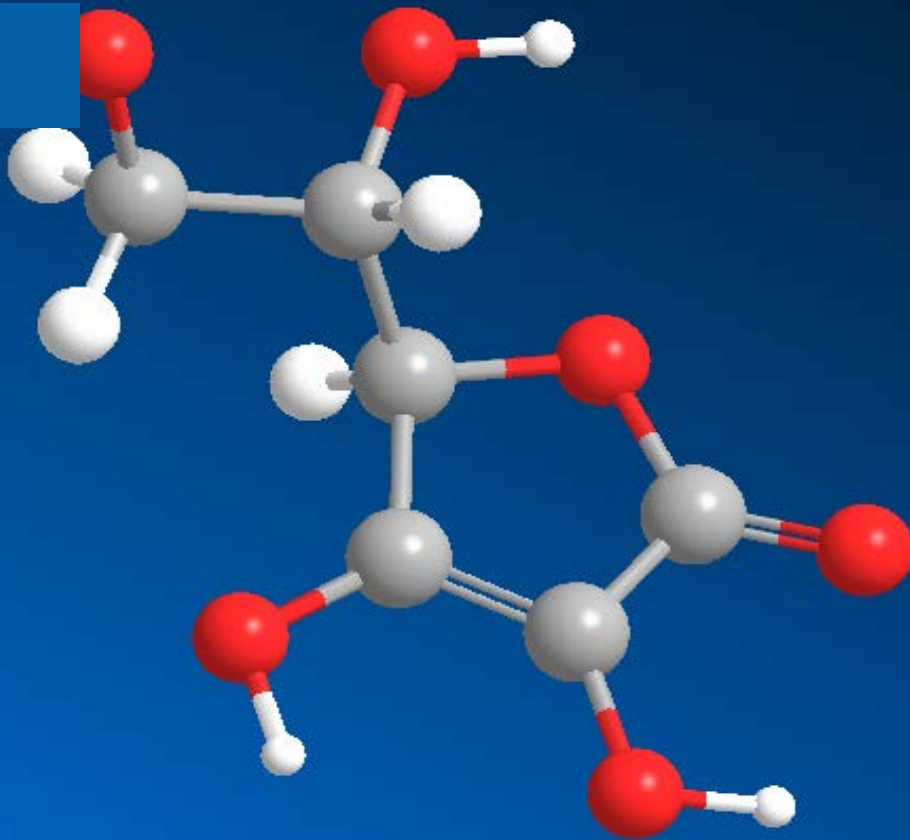
Kursleitung: Silas Götz

- | | |
|-----------|--|
| 09.45 Uhr | Ankunft und Empfang am Treffpunkt. |
| 09.55 Uhr | Einführung Vitamin C und Spektrometrie
Labor: Absorptionsspektrum, Antioxidans |
| 12.15 Uhr | Gemeinsamer Lunch im Personalrestaurant WKL-61 |
| 13.15 Uhr | Labor: Enzymkinetik |
| 15.15 Uhr | Ende des Programms |

Novartis Pharma AG
Novartis Schullabor
CH-4002 Basel
Telefon +41 79 895 02 55
schullabor.novartis@aprentas.com

 **NOVARTIS**

Novartis Pharma AG
Schullabor



Chemie in der Biomedizin

Strukturanalyse und biochemische Funktionen von Vitamin C

2019/1

Herausgeber

Novartis Pharma AG, CH-4002 Basel

Kontaktadresse:

Novartis Pharma AG
Dr. Gesche Standke
WKL-122.2.26A
Postfach
CH-4002 Basel

Tel. 061/696 13 72

E-Mail: kontakt.schullabor@novartis.com
Internet: www.novartis.ch/schullabor

(Ausgabe 2017; Praktikum im Schullabor)

Inhalt

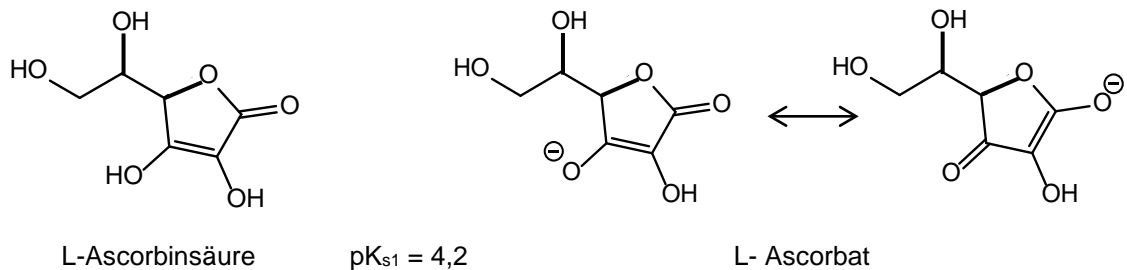
Experiment 1: Absorptionsspektrum von Ascorbinsäure	4
Methode: Wellenlängen Scan.....	4
Laboranleitung:.....	5
Auswertung	7
Experiment 2: Vitamin C als Antioxidans.....	8
Methode: Vergleich der Reaktionsgeschwindigkeiten	8
Laboranleitung:.....	9
Auswertung	12
Experiment 3: Enzymatische Oxidation	13
Methode: Kinetik mit einem Enzym als Bio-Katalysator	13
Laboranleitung:.....	14
Auswertung	18
Quellennachweis.....	19

Experiment 1: Absorptionsspektrum von Ascorbinsäure

Methode: Wellenlängen Scan

Die chemische Struktur der Ascorbinsäure lässt sich von Hexose-Zuckern ableiten. Die charakteristische konjugierte Endiol-Carbonyl Gruppe ist ein interessantes chemisches System. Die Elektronen sind in dem konjugierten System delokalisiert, d.h. über den Bereich der alternierenden Doppelbindungen verteilt. Dieser Bereich kann durch negativ geladene Reste im Molekül erweitert werden. Je grösser die Elektronenwolke des konjugierten Systems ist, desto grösser ist die Wellenlänge, die absorbiert wird. Ascorbinsäure absorbiert unsichtbares UV-Licht und ist daher für unser Auge farblos. Die Spektralanalyse findet im UV-Bereich statt.

Ascorbinsäure reagiert sauer in Wasser und gibt ein Proton H^+ ab. Es gibt eine Strukturformel für die protonierte Form und zwei Strukturformeln für die deprotonierte Form.



In diesem Versuch wird die Änderung des Absorptionsmaximums der protonierten und deprotonierten Form der Ascorbinsäure photometrisch gemessen. Die Absorption von Ascorbinsäure-Lösungen mit verschiedenen pH-Werten wird mittels eines Wellenlängen Scans im UV-Bereich aufgezeichnet.

Ascorbinsäure-Lösung wird in eine Quarz Küvette übertragen und mit Hilfe des Photometers vermessen. Die Absorptionsmaxima sind für die chemische Struktur einer Substanz charakteristisch. Wird die Struktur der zu untersuchenden Substanz durch die Umgebung, hier durch den pH-Wert des Lösungsmittels, beeinflusst, lässt sich der Effekt in der Spektralanalyse zeigen.

Material:

Puffer pH2

Puffer pH7






Asc (0,1 mM L-Ascorbinsäure)

Laboranleitung:

Einrichten des Photometers

1. Die Kursleitung hat das Photometer mindestens 15 Minuten vor Messbeginn eingeschaltet und mit dem LabQuest2 verbunden. LabQuest2 hat einen Touch-Screen. Für Eingaben können Sie den Pen benutzen.
2. Gehen Sie auf das Feld **Betriebsart: Gesamtes Spektrum**. Wählen Sie für den **Wellenlängenbereich: 230 – 280 nm** und bestätigen Sie mit **OK**.
3. Tippen Sie nun auf das rote Feld **USB:Abs**. Wählen Sie **Kalibrieren**. Die Dialogbox zählt 90 Sekunden ab, in denen die Lampen im Spektrometer aufwärmen.
4. Wenn die 90 Sekunden Aufwärmphase abgelaufen sind, stellen Sie den Nullwert für die Küvette wie folgt ein:
5. Fassen Sie die Küvette nur an den matten Seiten an. Stellen Sie die Küvette in den Probenhalter des Photometers. Die klaren Seiten zeigen zu Pfeil- und Lampensymbol. Tippen Sie **Kalibrieren beenden** in der Dialogbox an. Nach kurzer Zeit können Sie mit **OK** abschliessen. Damit setzen Sie die Absorption der Küvette auf 0.000 Abs.
6. Entnehmen Sie die Küvette und stellen Sie sie zurück in den Halter.

Messen

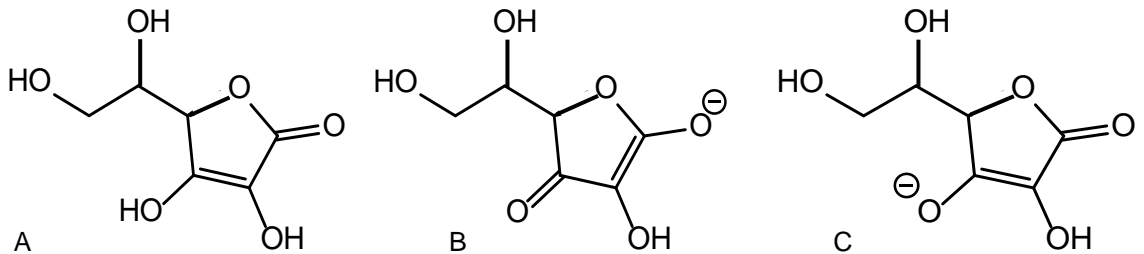
1. Pipettieren Sie 1 ml Puffer pH2 in die Quarz-Küvette.
2. Pipettieren Sie 2 ml Asc (0,1 mM Ascorbinsäure-Lösung) dazu.
3. Fassen Sie die Küvette nur an den matten Seiten an. Stellen Sie die Küvette in den Probenhalter des Photometers. Die klaren Seiten zeigen zu Pfeil- und Lampensymbol.
4. Starten Sie den Wellenlängen Scan mit  .
5. Stoppen Sie nach 10-20 Sekunden mit  .
6. Sie sehen das Absorptionsmaximum von Ascorbinsäure bei pH2! Speichern Sie den 1. Lauf: Tippen Sie auf das Symbol Aktenschrank. 
7. Das Photometer ist bereit für Lauf 2.
8. Entnehmen Sie die Küvette. Giessen Sie den Inhalt in ein Becherglas und stellen Sie die leere Küvette zum Abtropfen kopfüber auf ein Papiertuch. Tupfen Sie die Aussenseite trocken, wischen Sie nicht!
9. Pipettieren Sie nun 1 ml Puffer pH7 in die Quarz-Küvette.
10. Pipettieren Sie 2 ml Asc dazu.
11. Stellen Sie die Küvette in den Probenhalter des Photometers.
12. Starten Sie Lauf 2 mit 
13. Stoppen Sie nach 10-20 Sekunden mit  . Sie sehen das Absorptionsmaximum von Ascorbinsäure bei pH7!
14. Entnehmen Sie die Küvette. Giessen Sie den Inhalt in ein Becherglas und stellen Sie die leere Küvette zum Abtropfen kopfüber auf ein Papiertuch. Spülen Sie die Küvette mit Wasser aus der Spritzflasche über dem Becherglas. Tupfen Sie die Aussenseite trocken, wischen Sie nicht!

Auswertung

1. Gehen Sie auf **Lauf 2** und wählen Sie **Alle Läufe**.
2. Lesen Sie die Wellenlänge des Maximums bei jeweiligem pH-Wert ab. Tippen Sie dazu das Maximum auf dem Bildschirm an. Sowohl die Wellenlänge als auch die Absorption bei diesem Maximum werden nun angezeigt. Tragen Sie die Werte in die Tabelle unten ein.

Probe	pH	Maximum bei Wellenlänge (nm)	Absorption (Abs)
1	2		
2	7		

3. Welche der Strukturformeln der Ascorbinsäure ordnen Sie welchem pH-Wert zu?



Zeichnen Sie das delokalisierte Elektronensystem als Elektronenwolke über die Strukturformeln.

4. Warum verschiebt sich das Absorptionsmaximum bei höherem pH-Wert?

Experiment 2: Vitamin C als Antioxidans

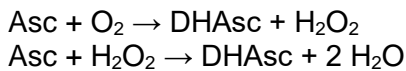
Methode: Vergleich der Reaktionsgeschwindigkeiten

Die biomedizinische Bedeutung von Vitamin C liegt in seiner Eigenschaft als Antioxidans. In den Zellen entstehen reaktive Stoffwechselprodukte. Im Idealfall ist die Bilanz von reduzierenden und oxidierenden Stoffen ausgeglichen. Gerät die Zelle in oxidativen Stress, entstehen zu viele reaktive Sauerstoffspezies (englisch: reactive oxygen species, ROS). ROS verursachen Zellschäden an der Zellmembran, der DNA und Enzymen. Damit scheinen ROS ursächlich an der Entstehung von Krankheitsbildern wie Krebs und Entzündungen beteiligt zu sein. ROS werden durch Vitamin C reduziert und damit unschädlich gemacht.

Linus Pauling, Chemiker und Nobelpreisträger, zeigte in den 1970er Jahren, dass die antioxidative Wirkung von Vitamin C vor Krebs schützt. Seine Ergebnisse konnten nicht wiederholt werden, aber im Dezember 2015 konnten tatsächlich Effekte von Vitamin C auf Darmkrebszellen gezeigt werden.

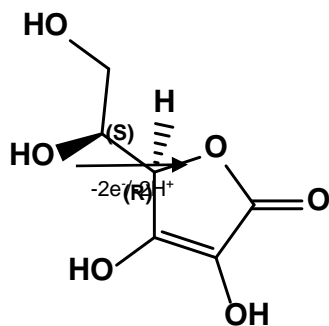
Einige Proteine erhalten erst durch Reduktion mit Vitamin C ihre Funktion. Bei Skorbut, einer Krankheit, die durch Vitamin C-Mangel ausgelöst wird, wird Kollagen, das Protein des Bindegewebes, nicht ausreichend reduziert und erreicht seine Festigkeit nicht. Als Folge können zum Beispiel die Zähne ausfallen.

Für Menschen enthält gesunde Nahrung genug Vitamin C für den täglichen Bedarf. Der Vitamin C Gehalt in der Nahrung nimmt allerdings bei langer Lagerung ab, da Vitamin C von Luftsauerstoff und Enzymen oxidiert wird.

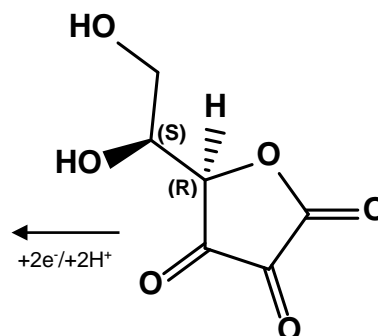


In diesem Versuch wird der Effekt von Luftsauerstoff O_2 und Wasserstoffperoxid H_2O_2 als Beispiel für ROS auf Ascorbinsäure untersucht. Die Konzentration (c) der Ascorbinsäure ist proportional zur Absorption (Abs) bei 265nm.

$$c(\text{Ascorbinsäure}) \approx \text{Abs}(265\text{nm})$$



L-Ascorbinsäure



L-Dehydroascorbinsäure

Dehydroascorbinsäure, die oxidierte Ascorbinsäure, hat kein Absorptionsmaximum bei 265nm.

Material

Wasser

0.1% H₂O₂

Asc (0,1 mM L-Ascorbinsäure)

Laboranleitung:

Einrichten des Photometers

1. Gehen Sie auf **Datei** und wählen Sie **neu**. Eventuell **verwerfen** Sie bestehende Daten.
2. Gehen Sie auf **Betriebsart** und wählen statt „Gesamtes Spektrum“ nun **Zeit basiert** aus.
3. Geben Sie diese Daten ein (wählen Sie zuerst **Dauer:10 Minuten**):

Rate: 0,5

Intervall: 2 Minuten/Messwert

Dauer: 10 Minuten

Beenden Sie mit **OK**.

4. Tippen Sie auf das rote Feld **USB:Abs** und wählen **Wellenlänge ändern** aus. Geben Sie **266nm** ein und bestätigen Sie mit **OK**. Im roten Fenster sollte nun **Abs@265,7** nm angezeigt werden.

Jeder Tisch ermittelt die Kinetik (Geschwindigkeit) der Oxidation von Vitamin C unter anderen Reaktionsbedingungen. Die Ergebnisse werden zusammengetragen und interpretiert.

Beim Messen verwenden Sie nur die Anleitung mit Ihrer Tischnummer!


Messen Tisch 1: L-Ascorbinsäure reagiert mit Luftsauerstoff bei Raumtemperatur

1. Ermitteln Sie die Raumtemperatur:

RT = °C

2. Pipettieren Sie in die Küvette:


Wasser	Ascorbinsäure-Lösung (Asc)
1ml	2ml

3. Fassen Sie die Küvette nur an den matten Seiten an. Stellen Sie die Küvette mit den klaren Seiten in den Lichtstrahl des Photometers.
4. Starten Sie die Messung. 
Es wird nur alle 2 Minuten ein Messpunkt gezeichnet. Warten Sie bis die 10-minütige Messung abgelaufen ist.

Messen Tisch 2: Temperaturerhöhung und Reaktionsgeschwindigkeit bei 55°C

1. Stellen Sie die leere Küvette in den Heizblock. **Die matten Seiten zeigen zum Metall, die klaren Seiten sind frei!**
2. Pipettieren Sie in die Küvette:

Wasser	Ascorbinsäure-Lösung (Asc)
1ml	2ml


3. Lesen Sie vorab sorgfältig die Punkte 4 – 5 durch!
4. Starten Sie den Timer. Fassen Sie die Küvette nur an den matten Seiten an. Stellen Sie die Küvette mit den klaren Seiten in den Lichtstrahl des Photometers.
5. Starten Sie die Messung. 
 - Der erste Messpunkt erscheint sofort. Entnehmen Sie die Küvette und stellen Sie sie vorsichtig in den Thermoblock. **Die matten Seiten zeigen zum Metall, die klaren Seiten sind frei!** Fassen Sie die Küvette nur an den matten Seiten an.
 - Wenn der Timer 2 Minuten erreicht, stellen Sie die Küvette ins Photometer und warten auf den Messpunkt. Stellen Sie die Küvette bis zum nächsten Messpunkt wieder in den Thermoblock. Die letzte Messung erfolgt nach 10 Minuten.
6. Messen Sie die Temperatur des Heizblocks:

Heizblock = °C

Messen Tisch 3: L-Ascorbinsäure reagiert mit H_2O_2

1. Pipettieren Sie in die Küvette:

0.1% H_2O_2	Ascorbinsäure-Lösung (Asc)
1ml	2ml

2. Fassen Sie die Küvette nur an den matten Seiten an. Stellen Sie die Küvette mit den klaren Seiten in den Lichtstrahl des Photometers.
3. Starten Sie die Messung. 
Es wird nur alle 2 Minuten ein Messpunkt gezeichnet. Warten Sie bis die 10-minütige Messung abgelaufen ist.

ALLE nach Ablauf der Messung:

Entnehmen Sie die Küvette. Giessen Sie den Inhalt in ein Becherglas.
Spülen Sie die Küvette über dem Becherglas zweimal mit dest. Wasser aus! Stellen Sie die leere Küvette zum Abtropfen auf ein Papiertuch.

Werten Sie Ihre Ergebnisse aus, siehe Seite 11.

Auswertung

- Bestimmen Sie die Steigung ($\Delta\text{Abs}/\Delta\text{Min}$). Die Steigung der Messkurve ist ein Mass für die Geschwindigkeit der Reaktion.
Gehen Sie auf **Analysieren > Kurvenanpassung**, tippen Sie **Abs@265,7nm** und wählen Sie bei **Anpassung > Linear**.

Tragen Sie den Wert für die Steigung ein:

m (Steigung):

- Tragen Sie die Werte aller Gruppen in die Tabelle ein.

Die Geschwindigkeit der Abnahme der Ausgangsstoffe ist per Definition mit negativem Vorzeichen versehen: Geschwindigkeit = $-dc/dt$

Die Reaktionsgeschwindigkeit der Ausgangsstoffe erhält so positive Werte.

Die Konzentration c [mol liter^{-1}] ist proportional zur Absorption. Die Reaktionsgeschwindigkeit hat die Einheit [$\text{mol liter}^{-1}\text{sec}^{-1}$]. Die Steigung m hat hier die Einheit (Abs min^{-1}), die bei bekannten Konstanten in [$\text{mol liter}^{-1}\text{sec}^{-1}$] umgerechnet werden kann.

Tisch	Reaktion	T1= °C	T2- T1=	Geschwindigkeit - ($\Delta\text{Abs}/\Delta$ Minute)	Geschwindigkeit - ($\Delta\text{Abs}/\Delta$ Stunde)	Wieviel schneller ist die Reaktion 2 im Vergleich zu 1
1	L-Ascorbinsäure reagiert mit Luftsauerstoff					R1=1
2	Temperaturerhöhung und Reaktionsgeschwindigkeit	T2= °C				R2=
3	L-Ascorbinsäure reagiert mit H_2O_2 bei Raumtemperatur					

- Wieviel °C waren in diesem Experiment nötig, um die Geschwindigkeit zu verdoppeln?

$$\frac{2 \times (T2-T1)}{R2}$$

= Verdopplung mit °C

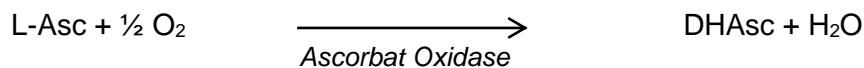
- Stimmt Ihr Ergebnis mit der RGT Regel (Verdopplung der Reaktionsgeschwindigkeit bei Temperaturerhöhung um 10°C) überein? Wenn nicht, haben Sie eine Erklärung?

Experiment 3: Enzymatische Oxidation

Methode: Kinetik mit einem Enzym als Bio-Katalysator

Die biomedizinische Bedeutung von Vitamin C liegt in seiner Eigenschaft als Antioxidans. In den Zellen entstehen reaktive Stoffwechselprodukte. Im Idealfall ist die Bilanz von reduzierenden und oxidierenden Stoffen ausgeglichen. Gerät die Zelle in oxidativen Stress, entstehen zu viele reaktive Sauerstoffspezies (englisch: reactive oxygen species, ROS). ROS verursachen Zellschäden an der Zellmembran, der DNA und Enzymen. Damit scheinen ROS ursächlich an der Entstehung von Krankheitsbildern wie Krebs und Entzündungen beteiligt zu sein. ROS werden durch Vitamin C reduziert und damit unschädlich gemacht.

Für Menschen enthält gesunde Nahrung genug Vitamin C für den täglichen Bedarf. Der Vitamin C Gehalt in der Nahrung nimmt allerdings bei langer Lagerung ab, da Vitamin C von Luftsauerstoff und Enzymen oxidiert wird. Enzyme sind Biokatalysatoren und können eine Reaktion enorm beschleunigen. Während D- oder L- Form eines Stoffes für das Reaktionsverhalten oft keine Rolle spielt, bevorzugen enzymatische Prozesse in der Regel nur eine Form. Enzyme sind stereospezifisch. Das Kupfer-Enzym Ascorbat Oxidase (EC 1.10.3.3) katalysiert spezifisch und effizient die Oxidation der L-Ascorbinsäure (Asc) zur Dehydroascorbinsäure (DHAsc). Es ist in vielen Pflanzen vorhanden und reguliert das Verhältnis von oxidiertem und reduziertem Glutathion und NADPH in der Pflanzenzelle.



Durch die Messung des Stoffumsatzes pro Zeiteinheit und damit der Bestimmung der Reaktionsgeschwindigkeit lässt sich die Aktivität eines Enzyms ermitteln. Die Konzentration von Asc ist proportional zur Absorption bei 265nm. DHAsc hat bei 265nm keine Absorption. Die Abnahme von Ascorbinsäure kann deshalb photometrisch als Abnahme der Absorption bei 265nm gemessen werden. Im linearen Anfangsbereich gilt:

$$-\Delta\text{Abs}^{265\text{nm}}/\Delta t = \text{relative Enzymaktivität}$$

Material

Zucchini	
Puffer pH7	<i>Enzymlösungen:</i>
Asc (0,1 mM L-Ascorbinsäure)	Röhrchen mit A
Iso (0,1 mM D-Isoascorbinsäure)	Röhrchen mit B

Laboranleitung:

Enzympräparation als Rohextrakt

Zwei Gruppen:

1. Schneiden Sie vom Zucchini Stücke ab, ca. 1 cm dick.
2. Davon wiegen Sie 25g im Becher des Stabmixers ab.
3. Messen Sie im Messzylinder 50ml Puffer pH7 ab. Giessen Sie den Puffer zu den Zucchini stücken.
4. Pürieren Sie die Mischung mindestens 60 Sekunden auf höchster Stufe bis ein homogener Extrakt entsteht.

Ab jetzt arbeitet jede Gruppe wieder für sich!

5. Schneiden Sie die Spitze einer blauen Pipettenspitze ab, damit sie nicht verstopft.
6. Beschriften Sie zwei 2ml-Röhrchen mit Ihrer Tischnummer. Beschriften Sie eines der Röhrchen zusätzlich mit A, das zweite mit B. Pipettieren Sie in diese Röhrchen 2 ml des Safts. Werfen Sie gebrauchte Spitzen in den Entsorgungsbeutel ab.
7. Stellen Sie Röhrchen B für 15 Minuten bei 95°C in den Heizblock.
8. Zentrifugieren Sie Röhrchen A 5 Minuten bei 13.400 rpm. Achten Sie darauf, dass der Rotor austariert ist! Während der Extrakt zentrifugiert wird, richten Sie das Photometer ein (Seite15).
9. Inzwischen beschriften Sie ein Reagenzglas mit A und ein Reagenzglas mit B und mit Ihrer Tischnummer. Pipettieren Sie in beide Reagenzgläser 4ml Puffer pH7.
10. Pipettieren Sie 1 ml Überstand des zentrifugierten Saftes aus Röhrchen A in das Reagenzglas A. Sie können nun Lauf 1 und 2 messen (Seite 16).
11. Nach den 15 Minuten im Heizblock zentrifugieren Sie Röhrchen B 5 Minuten bei 13.400 rpm.
12. Pipettieren Sie 1 ml Überstand des zentrifugierten Saftes aus Röhrchen B in das Reagenzglas B. Sie können nun Lauf 3 messen.
13. Räumen Sie auf! Schliessen Sie die Deckel der Röhrchen mit den Extraktresten und werfen Sie die Röhrchen in den Entsorgungsbeutel. Werfen Sie die Zucchinieste in den blauen Eimer. Spülen Sie das gebrauchte Geschirr ab und legen Sie es auf den Spültisch.





Einrichten des Photometers

1. Die Kursleitung hat das Photometer mindestens 15 Minuten vor Messbeginn eingeschaltet und mit dem LabQuest2 verbunden. LabQuest2 hat einen Touch-Screen. Für Eingaben können Sie den Pen benutzen.
2. Tippen Sie auf das rote Feld **USB:Abs**. Wählen Sie **Kalibrieren**. Die Dialogbox zählt 90 Sekunden ab in denen die Lampen im Spektrometer aufwärmen.
3. Wenn die 90 Sekunden Aufwärmphase abgelaufen sind, stellen Sie den Nullwert für die Küvette wie folgt ein:
4. Fassen Sie die Küvette nur an den matten Seiten an. Stellen Sie die Küvette in den Probenhalter des Photometers. Die klaren Seiten zeigen zu Pfeil- und Lampensymbol. Tippen Sie auf **Kalibrieren beenden** in der Dialogbox. Nach kurzer Zeit können Sie mit **OK** abschliessen. Damit setzen Sie die Absorption der Küvette auf 0.000 Abs.
5. Entnehmen Sie die Küvette und stellen Sie sie zurück in den Halter.
6. Tippen Sie auf das rote Feld **USB:Abs** und wählen nun **Wellenlänge ändern** aus. Geben Sie **266nm** ein und bestätigen Sie mit **OK**.
7. Gehen Sie auf das Feld **Betriebsart** und wählen **Zeit basiert**.
8. Geben Sie diese Daten ein:



Rate: 1
Intervall: 1 s/Messwert
Dauer: 60 s

Beenden Sie mit **OK**.


Messen Lauf 1:

1. Stellen Sie die Küvette in den Lichtstrahl des Photometers. Die klaren Seiten zeigen zu Pfeil- und Lampensymbol.
2. Pipettieren Sie 2 ml Asc (0,1 mM Ascorbinsäure-Lösung) in die Quarz-Küvette. Achten Sie darauf, dass keine Flüssigkeit ins Photometer läuft!!
3. Pipettieren Sie 1 ml aus Reagenzglas A dazu und pipettieren Sie zum Mischen einmal auf und ab. Vorsichtig!!
4. Starten Sie **sofort!** die Messung. 
5. Beobachten Sie den Verlauf der Messung.
6. Nach Ablauf der Messung speichern Sie den 1. Lauf: Tippen Sie auf das Symbol Aktenschrank. 
7. Das Photometer ist bereit für Lauf 2.
8. Entnehmen Sie die Küvette. Giessen Sie den Inhalt in ein Becherglas.
9. Spülen Sie die Küvette über dem Becherglas zweimal mit dest. Wasser aus! Stellen Sie die leere Küvette zum Abtropfen auf ein Papiertuch. Tupfen Sie die Aussenseite trocken, wischen Sie nicht!

Messen Lauf 2:

1. Stellen Sie die Küvette in den Lichtstrahl des Photometers. Die klaren Seiten zeigen zu Pfeil- und Lampensymbol.
2. Pipettieren Sie 2 ml Iso (0,1 mM D-Isoascorbinsäure-Lösung) in die Quarz-Küvette. Achten Sie darauf, dass keine Flüssigkeit ins Photometer läuft!!
3. Pipettieren Sie 1 ml aus Reagenzglas A dazu und pipettieren Sie zum Mischen einmal auf und ab. Vorsichtig!!
4. Starten Sie **sofort!** die Messung. 
5. Beobachten Sie den Verlauf der Messung.
6. Nach Ablauf der Messung speichern Sie den 2. Lauf: Tippen Sie auf das Symbol Aktenschrank. 
7. Das Photometer ist bereit für Lauf 3.
8. Entnehmen Sie die Küvette. Giessen Sie den Inhalt in ein Becherglas.
9. Spülen Sie die Küvette über dem Becherglas zweimal mit dest. Wasser aus! Stellen Sie die leere Küvette zum Abtropfen auf ein Papiertuch. Tupfen Sie die Aussenseite trocken, wischen Sie nicht!

Messen Lauf 3:

1. Stellen Sie die Küvette in den Lichtstrahl des Photometers. Die klaren Seiten zeigen zu Pfeil- und Lampensymbol.
2. Pipettieren Sie 2 ml Asc (0,1 mM Ascorbinsäure-Lösung) in die Quarz-Küvette. Achten Sie darauf, dass keine Flüssigkeit ins Photometer läuft!!
3. Pipettieren Sie 1 ml aus Reagenzglas B dazu und pipettieren Sie zum Mischen einmal auf und ab. Vorsichtig!!
4. Starten Sie sofort! die Messung. 
5. Beobachten Sie den Verlauf der Messung.
6. Entnehmen Sie die Küvette. Giessen Sie den Inhalt in ein Becherglas.
7. Spülen Sie die Küvette über dem Becherglas zweimal mit dest. Wasser aus! Stellen Sie die leere Küvette zum Abtropfen auf ein Papiertuch. Spülen Sie gebrauchte Reagenzgläser kurz aus und legen Sie sie in den Korb am Spültisch.

Auswertung

1. Gehen Sie auf **Lauf 3** und wählen Sie **Alle Läufe**. Notieren Sie die Farben der Läufe.

Farbe Lauf 1:

Farbe Lauf 2:

Farbe Lauf 3:

Wählen Sie unter **Alle Läufe** nun **Lauf 1**.

2. Die Steigung der Messkurve ist ein Mass für die Geschwindigkeit der Reaktion. Je steiler die Kurve, desto schneller die Reaktion. Bestimmen Sie die Steigung ($\Delta\text{Abs}/\Delta\text{Sek}$)!

Gehen Sie mit dem Pen über den steilsten linearen Bereich der Kurve. Der Bereich wird grau markiert. Es sollten mindestens 3 Messpunkte in diesem Bereich liegen. Gehen Sie auf **Analisieren > Kurvenanpassung**. Tippen Sie auf **Abs @265,7nm** von Lauf 1 und gehen Sie bei **Anpassung wählen** auf **> Linear**.

Sie erhalten die Steigung m ($\Delta\text{Abs}/\Delta\text{Sek}$).

Wählen Sie unter **Alle Läufe** nun **Lauf 2** und bestimmen Sie die Steigung. Ebenso gehen Sie für Lauf 3 vor.

3. Tragen Sie die Werte aller Läufe in die Tabelle ein.

*Die Geschwindigkeit der Abnahme der Ausgangsstoffe ist per Definition mit negativem Vorzeichen versehen: $\text{Geschwindigkeit} = -dc/dt$
Die Reaktionsgeschwindigkeit der Ausgangsstoffe erhält so positive Werte. Die Konzentration c (üblich in mol/liter) ist proportional zur Absorption. Die Zeit t wird meist in Sekunden angegeben, sodass Angaben zur Reaktionsgeschwindigkeit in der Einheit $\text{mol liter}^{-1}\text{sec}^{-1}$ zu finden sind.*

Messung	Reaktion	Geschwindigkeit - ($\Delta\text{Abs}/\Delta\text{Sek}$)	Geschwindigkeit - ($\Delta\text{Abs}/\Delta\text{Stunde}$)
1	L-Ascorbinsäure mit Extrakt		
2	D- Isoascorbinsäure mit Extrakt		
3	L-Ascorbinsäure mit Extrakt (gekocht)		

4. Woher wissen Sie, dass Sie eine enzymatische Katalyse anschauen?
5. Erklären Sie den Unterschied von Lauf 2 und 3 zu Lauf 1.
6. Würden Sie rohen Zucchini für die Zubereitung eines Smoothies empfehlen?

Quellennachweis

1. Pappenberger G, Hohmann H-P (2013) Industrial Production of L-Ascorbic Acid (Vitamin C) and D-Isoascorbic Acid. *Adv Biochem Eng Biotechnol* doi:10.1007/10_2013_243
2. Reichstein T, Grüssner A (1934) Eine ergiebige Synthese der L-Ascorbinsäure (C Vitamin). *Helv Chim Acta* 17:311-328
3. Solomonov A V, Rumyantsev E V, Kochergin B A, Antina E V (2012) The Kinetics of Oxidation of Bilirubin and Ascorbic Acid in Solution. *Russ J Phys Chem* 86:1048-1052
4. Marchesini A, Kroneck M H (1979) Ascorbate Oxidase from *Curcubita pepo medullosa*. *Eur J Biochem* 101, 65-76
5. Drouin G, Godin J-R, Page B (2011) The Genetics of Vitamin C Loss in Vertebrates. *Current Genomics* 12: 371-378
6. Laidler K, (1970) *Reaktionskinetik I*. B I Hochschultaschenbücher Band 290
7. Karlson P, (1980) *Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler*. Georg Thieme Verlag
8. Ogata Y, Kosugi Y (1970) Ultraviolet Spectra of L-Ascorbic Acid and Cupric Ascorbate Complex. *Tetrahedron* 26:4711-4716
9. Reczek CR, Chandel NS (2015) Revisiting vitamin C and cancer. *Science* 11 2015:1317-18

