

Spektrofotometrija <http://aris.gusc.lv/BioThermodynamics/LabSpectr16L.pdf>

UZDEVUMS: Noteikt ar spektrofotometru "Jenway" riboflavīna vitamīna B₂ koncentrāciju un novērtēt jūtīgumu aprēķinot molāro absorbcijas koeficientu: dotajiem paraugiem Nr.2,Nr.3,Nr.4,Nr.5,Nr.6.

Kalibrēšanas grafika pagatavošanas dati tabulā 1.

- No riboflavīna standarta šķīdumu $C_{\text{riboflavīns}}=0.04 \text{ mg/mL}$ pagatavo 8 mēģenes 10 mL ar destilētu ūdeni šķīdumi kalibrēšanas grafika konstruēšanai (skat. 3.lpp).
- Koncentrāciju aprēķina formulā $C_{B_2} = \frac{C_{\text{Riboflavin}} \cdot V_{B_2}}{10\text{mL}}$ un fiksē tabulā.
- Iestāda spektrofotometrā "Jenway" viļņa garumu $\lambda = 445 \text{ nm}$ un mēra absorbciju $A_x = \log(I_0/I)$ izvēlētajam **paraugam** Nr. __. Lieto kalibrēšanas grafiku un nolasa nezināmo koncentrāciju **paraugam** C_x .

Tabula 1. kalibrēšanas grafiks

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	paraugs X
$V_{B_2} \text{ (mL)}$ $C_{B_2}=0.04$	0.5	1.	1.5	2.	2.5	3.	3.5	4.	10	Nr. _____
mL V_{water}	9.5	9.	8.5	8.	7.5	7.	6.5	6.	0	
$C_{B_2}, \text{mg/mL}$	0,002	0,004	0,006	0,008	0,010	0,012	0,014	0,016	0,036	mērījums A_x
Absorbcija $A = \log(I_0/I)$	0,091	0,141	0,205	0,285	0,341	0,440	0,510	0,580	1,300	

Koncentrācija **paraugā:** $C_x = \dots\dots\dots \text{ mg/mL} = \text{ g/L}$

Kalibrēšanas grafika taisne Bēra Lamberta Bugēra izteiksmē $A = a \cdot C \cdot \ell$ iet cauri nulles punktam. $A = C = 0$

Mēra **parauga** absorbciju A_x lai analizētu un aprēķinātu tā koncentrāciju C_x lietojot grafiku (mg/mL).

Uzrakstīt rezultātu riboflavīna mg% saturam, kurš rāda
 $\text{mg}\% = \text{mg}/100\text{mL} \cdot 100\% = \dots\dots\dots \text{mg}\%$.

4. B₂ vitamīna riboflavīna oksidētās formas mola masa ir $M_{B_2} = 454.35 \text{ g/mol}$.

<http://aris.gusc.lv/FlavinMonoNucleoB2vitamPO4.Tgf>. Aprēķina B₂ šķīduma molaritāti $C_M = C_x/M_{B_2}$ un molāro absorbcijas koeficientu $a \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, ja kivetes biezums ir ar lineālu nomērīts lielums! $\ell = 1 \dots\dots \text{ cm}$.

$$C_M = C_x/M_{B_2} = \dots\dots\dots \text{g/L}/454.35 \dots\dots\dots \text{g/mol} = \dots\dots\dots \text{ M}$$

$$a = \frac{A_x}{C_M \cdot \ell}, \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1} = \dots\dots\dots \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$$

Zīmējums Riboflavīns B₂ vitamīns oksidēto un reducēto formu spektrs.

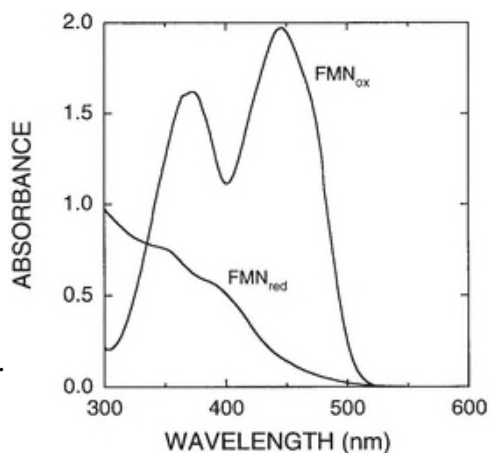
Molārais absorbcijas koeficients pie $\lambda = 360 \text{ nm}$

$a = 10500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (3) un pie $\lambda = 445 \text{ nm}$

$a = 15499 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (3).

Olbaltumi dažos gadījumos pazemina pKa pie N(3)-H (flavīnam) veicinot protona disociāciju un pazemina molāro absorbcijas koeficientu $a = 9200 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Latīniski *flavus* – dzeltens.



Bioķīmiskie elektronu transportētāji **oksidēšanās reducēšanas** reakcijās – vitamīni.

Bioķīmiskie divu reducējošo ekvivalentu **H+H** pārnēsēji ir vitamīni **B₂** un **B₃**.

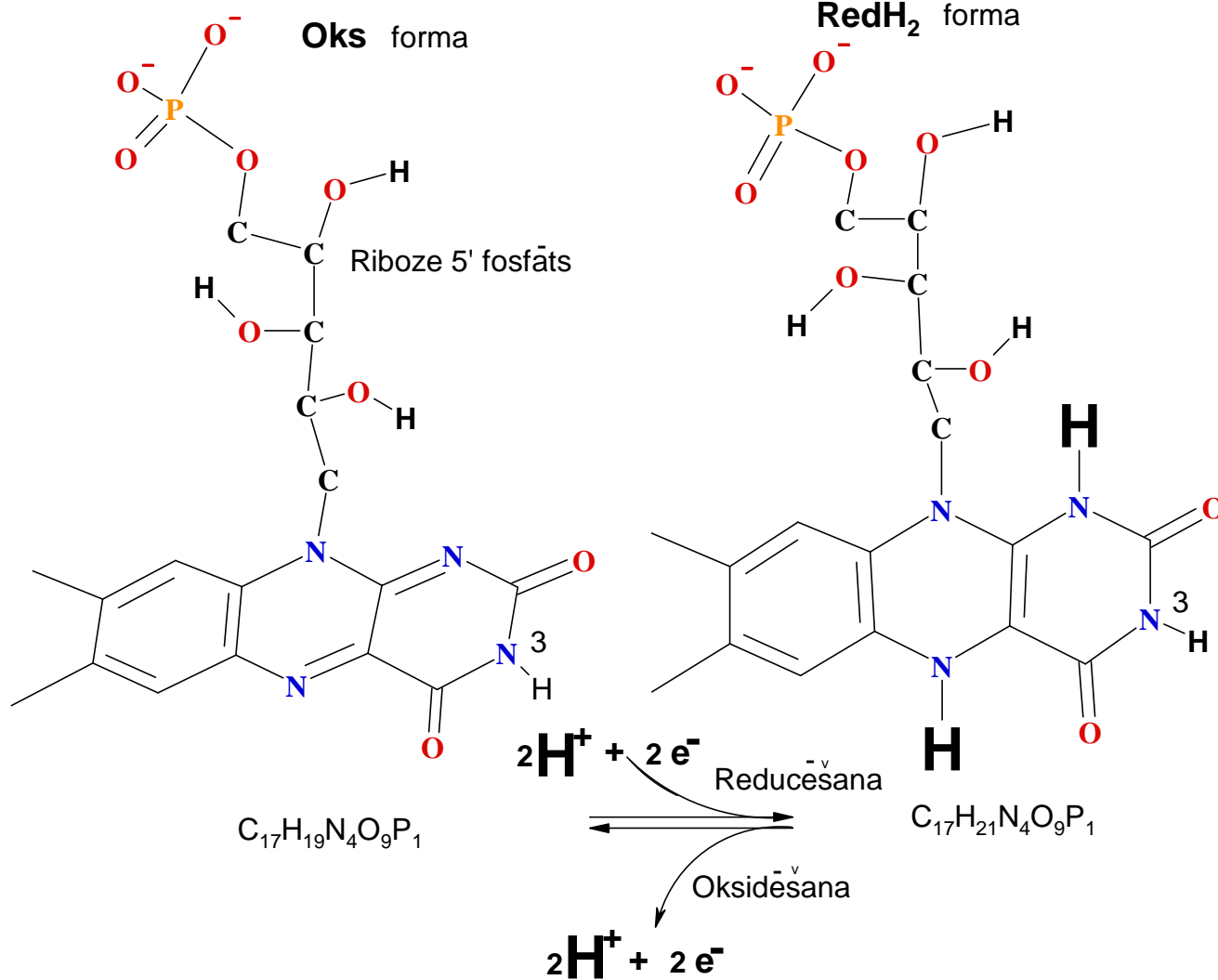
B₂ un **B₃** vitamīni ir oksidēšanas un reducēšanas kofaktori, kuri sadarbojas ar pirmās klases E.1 enzīmiem ar **OksidoReduktāzēm**.

Vitamīni **B₂**, **B₃** ir ūdenī šķīstošas molekulas, kuras ūdens vidē pārnes divus elektronus $2e^-$.

FMN - Flavīna Mono Nukleotīds, riboflavīns -5'-fosfāts, B₂ vitamīns

Molmasa = 454.34 g/mol

Molmasa = 456.35 g/mol



Reducēšana ir ūdeņraža atoma pievienošana:

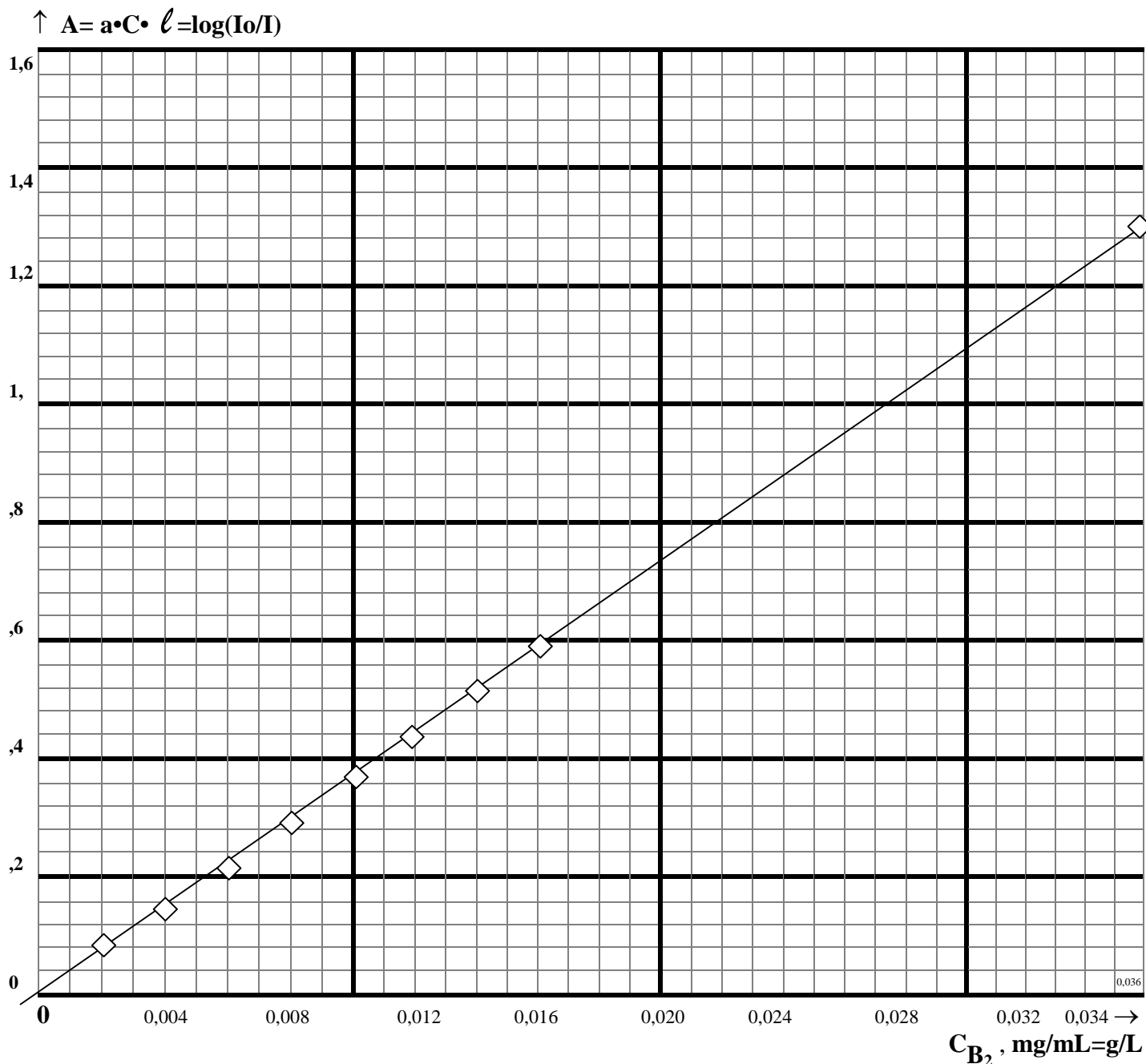
Reducēšana: **FMN+2 H => FMNH₂**

Oksidēšana ir ūdeņraža atraušana:

Oksidēšana: **FMNH₂ => FMN + 2 H**

Ūdenī šķīstošu divu elektronu pārnēsējs **FMNH₂** vitamīns **B₂**.

Vitamīns **B₂**, kura oksidēto formu **FMN** mēs analizējam ar spektrofotometru “Jenway” ir: oksidēšanās-reducēšanās reakciju **virzītājs** kā ūdenī šķīstošs divu elektronu pārnēsējs, kuru apzīmē par kofaktoru vai vitamīnu. Vitamīni **B₂** un **B₃** kā kofaktori sadarbojas ar pirmās klases E.1 enzīmiem ar kopēju apzīmējumu **OksidoReduktāzes**



Secinājumi

- 1a. Riboflavīns B₂ vitamīns ir 2H pārnesējs enzīmu klasē: E.1 **OksidoReduktāzēs**.....
- 1b. Reducēšana ir: ūdeņraža pievienošana..... 1c. Oksidēšana ir ūdeņraža atraušana.....
2. Gaismas absorbcijas maksimumi riboflavīnā ar viļņu garumu 360.....nm un 445.....nm
3. Krītošās gaismas intensitātes **I**₀ attiecība pret cauri izgājušo gaismu **I** logaritms absorbcijas mērījumos ir **A_x**=.....
4. Gaismas absorbcija aprēķināta kā logaritmiska izteiksme **A_x**=**log(I₀/I)**=.....
5. Riboflavīna koncentrācija paraugā **Nr**..... uzrāda nomērīto absorbciju **A_x**=.....
6. Bēra-Bugēra-Lamberta likumam **A_x**= **a**•**C**• **ℓ**=**log(I₀/I)** atbilstoši gaismas absorbcija **A_x** ir proporcionāla:
 vitamīna B₂ koncentrācijai **C_x**=..... .g/L
 Riboflavīns vitamīna B₂ molārai koncentrācijai **C_M**=.....mol/L.
7. Aprēķinātais molārās absorbcijas koeficients pie $\lambda=445$ nm **a**=15499.....M⁻¹cm⁻¹