

Übungen in physikalischer Chemie für Studierende der Biochemie (B.Sc.)	
Versuch Nr.: S17	Version 2019 (060319)
Kurzbezeichnung: Proteindichte	

# Bestimmung des partiellen spezifischen Volumens eines Proteins in wässriger Lösung

## Aufgabenstellung

Aus einer Stammlösung des Proteins BSA (Bovine Serum Albumin) sind durch Verdünnen weitere vier wässrige Lösungen herzustellen und ihre Dichten mit einem Dichtemessgerät (DMA 4500) nach Anton Paar bei 20°C zu bestimmen. Die partiellen spezifischen Volumina des Proteins sind sowohl nach der Ordinatenabschnittsmethode als auch nach der Tangentenmethode für alle Messpunkte zu berechnen.

## Grundlagen

Die Ermittlung der partiellen spezifischen Volumina von BSA und Wasser geht beim vorliegenden Versuch von der Messung der Dichten  $\rho$  von wässrigen BSA-Lösungen in Abhängigkeit vom Massenanteil  $w_B$  des Proteins aus.

Die Bestimmung der  $V_{mB}$  nach der Tangentenmethode beruht auf der Definition des partiellen spezifischen Volumens:

$$V_{mB} = \left( \frac{\partial v}{\partial m_B} \right)_{T,p,m_A} \quad (1)$$

Um diese partielle Ableitung numerisch bilden zu können, benötigt man das Lösungsvolumen als Funktion der Proteinmasse bei konstant gehaltener Masse des Wassers.

Legt man nun eine bestimmte Masse  $m_A$  des Wassers (z.B. 1 g) zugrunde, dann kann man die Proteinmasse  $m_B$  errechnen, die zu demselben Massenanteil wie in den vermessenen Proben führen würde:

$$w_B = \frac{m_B}{m_A + m_B} \quad \underset{m_A \rightarrow 1g}{=} \quad \frac{m_B}{1g + m_B} \quad (2a)$$

$$m_B = \frac{1g \cdot w_B}{1 - w_B}$$

Das zugehörige Lösungsvolumen erhält man aus der für den Massenanteil  $w_B$  ermittelten Dichte:

$$v = \frac{m_A + m_B}{\rho} \quad \underset{m_A \rightarrow 1g}{=} \quad \frac{1g + m_B}{\rho} \quad (2b)$$

Nun können die  $v$  durch polynomische Regression an die  $m_B$  angepasst werden:

$$v \approx A_0 + A_1 m_B + A_2 m_B^2 + \dots$$

Die Kenntnis der Koeffizienten  $A_0, A_1$  usw. ermöglicht die Ermittlung der gesuchten  $V_{mB}$  aus Gl. (1), also quasi aus den *Tangentenanstiegen* an den jeweiligen Messpunkten im  $v$ -über- $m_B$ -Diagramm.

Zur *Bestimmung der  $V_{mB}$  nach der Ordinatenabschnittsmethode* benutzt man die gemessenen Dichten zur Berechnung des jeweiligen Volumens einer festgelegten Lösungsmasse  $m_0$ :

$$v = \frac{m_0}{\rho}$$

Für ein solches Lösungsvolumen gilt das totale Differential

$$dv = \left( \frac{dv}{dm_A} \right)_{T,p,m_B} dm_A + \left( \frac{dv}{dm_B} \right)_{T,p,m_A} dm_B = V_{mA} dm_A + V_{mB} dm_B$$

Nach dem Euler-Theorem gilt zugleich:

$$v = V_{mA} m_A + V_{mB} m_B$$

Dividiert man beide Seiten der vorangegangenen Gleichungen durch  $m_0$ , so erhält man mit  $m_A = m_0 - m_B$ ,

$$\bar{V}_m = \frac{v}{m_0} \quad \text{und} \quad w_B = m_B/m_0:$$

$$d\bar{V}_m = -V_{mA} dw_B + V_{mB} dw_B$$

und

$$\bar{V}_m = V_{mA} (1 - w_B) + V_{mB} w_B$$

$$\boxed{\bar{V}_m = V_{mA} + (V_{mB} - V_{mA}) w_B} \quad (3a)$$

Da

$$\frac{d\bar{V}_m}{dw_B} = V_{mB} - V_{mA} \quad (3b)$$

ergibt sich:

$$\boxed{\bar{V}_m = V_{mA} + \frac{d\bar{V}_m}{dw_B} w_B} \quad (3c)$$

Um dieses Gleichungssystem auszuwerten, müssen neben den über die Messung zugänglichen

$\bar{V}_m = \frac{1}{\rho}$  auch die  $\frac{d\bar{V}_m}{dw_B}$  für ein vorgegebenes  $w_B$  zur Verfügung stehen. Dazu werden die  $\bar{V}_m$ -Werte

mittels Regression an das Polynom

$$\bar{V}_m = B_0 + B_1 w_B^1 + B_2 w_B^2 + \dots$$

angepasst und die Koeffizienten  $B_0$ ,  $B_1$  usw. erhalten.

Aus der Gleichung (3c) erhält man nun zunächst  $V_{mA}$ , und bei dessen Kenntnis ist die Berechnung von  $V_{mB}$  aus der Gleichung (3a) möglich.

**Literatur:** C. Czeslik, H. Seemann und R. Winter, Basiswissen Physikalische Chemie, Vieweg+Teubner, Wiesbaden, 3. Auflage, 2009, Kap. 2.3  
Peter W. Atkins und Julio de Paula, Kurzlehrbuch Physikalische Chemie 4. vollständig überarbeitete Auflage, WILEY-VCH Verlag 2008

M. O. Dayhoff, G. E. Perlman D. A. MacInnes, J. Am. Chem. Soc. , 74 (1952) 2515

### Vorbereitungsfragen

Informieren Sie sich über das Prinzip der im vorliegenden Versuch verwendeten Dichtemessung. Welche anderen Methoden zur Bestimmung der Dichten von Lösungen sind Ihnen bekannt?

### Durchführung

0. Falls noch nicht geschehen, das Gerät mittels Kippschalter (links unten) an der Geräterückseite einschalten und Abwarten bis der Selbsttest vollständig (ca. 2 Minuten) abgeschlossen ist. Im Display erscheinen dann folgende Angaben :



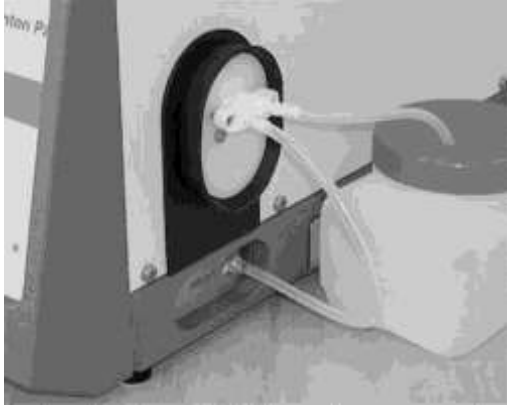
A Kopfzeile

B Messfenster

C Fußzeile

## 1. Kontrollmessung mittels Luftdichtemessung

Der aus dem DMA-Messgerät kommende Schlauch mit dem Adapter aus Plaste ist in den vorderen Fülladapter auf der rechten Seite des Gerätes zu stecken.



Zum Starten der Kontrollmessung ist der Button PUMP zu betätigen. Der Schriftzug PUMP blinkt nun links oben im Display, bis nach ca. 30 Sekunden durch erneutes Betätigen des PUMP-Buttons die Luftbspülung ausgeschaltet wird. Anschließend ist durch Drücken des Buttons START die Kontrollmessung zu starten. Während der Messung blinkt rechts oben im Display ein kleines Viereck. Ist die Messung beendet, wird eine Melodie hörbar und die Messergebnisse werden blinkend im Display angezeigt. Sie können nun notiert werden, wenn hinter Status: „Gueltig“ angezeigt wird. Andernfalls ist die Messung zu wiederholen. Für trockene Luft sollte der angezeigte Wert der Dichte  $\rho = 0,001199 \text{ g/cm}^3$  betragen (unter Normalluftdruck von 1013 hPa und bei 20 °C).

### 1.1 Kontrollmessung mit Wasser (entgastes VE-Wasser = „Aqua. Dest. gekocht“)

Zum Befüllen der Messzelle ist eine Injektionsspritze mit ca. 2 ml „Kalibrierwasser“ („Aqua. Dest. gekocht“) zu füllen und auf den vorderen Fülladapter (wo zuvor der Pumpenschlauch angeschlossen war) zu stecken.



Unter gleichmäßigem Druck auf den Stempel der Injektionsspritze ist die Messzelle blasenfrei mit Wasser zu befüllen, bis es aus dem hinteren Abflussschlauch wieder austritt. Danach erfolgt die Messung durch Betätigen des Buttons START. Während der Messung blinkt rechts oben im Display ein kleines Viereck. Ist die Messung abgeschlossen, wird eine Melodie

hörbar und die Messergebnisse werden blinkend im Display angezeigt. Sie können nun notiert werden, wenn im Messfenster hinter Status: „Gueltig“ lesbar ist. Andernfalls ist die Messung zu wiederholen.

Die angezeigte Dichte sollte bei 20 °C  $\rho = 0,998203 \text{ g/cm}^3$  betragen.

## 2. Herstellen der Untersuchungslösungen

In einen 10-ml-Maßkolben (Kennzeichnung: Stamm-Lsg.) sind 1g BSA einzuwiegen. Die endgültige Einwaage ist exakt (0,1 mg genau) im Messprotokoll zu notieren. Anschließend ist der 10-ml-Maßkolben mit ca. 8 ml VE-Wasser (**Nicht mit „Aqua. Dest. gekocht“!**) zu befüllen und der Feststoff durch Schütteln zu lösen. Dazu ist der Stopfen mehrfach zu entfernen, damit die Luftblasen entweichen und die Schaumbildung reduziert wird. Nach ihrer vollständigen Entfernung wird der Kolben auf das endgültige Volumen (unterer Meniskus auf der Eichmarkierung!) mit VE-Wasser aufgefüllt und homogenisiert, indem die eingeschlossene Luft im Hals des Kolbens mehrmals durch Umdrehen des Kolbens durch die Flüssigkeit geschüttelt wird.

Aus dieser Stammlösung sind nun weitere (verdünnte) Lösungen herzustellen.

Von dieser, in ein Becherglas gefüllten Stammlösung werden mit Hilfe einer Eppendorf-Pipette folgende Volumina:

- 1 ml
- 1,25 ml
- 2,5 ml
- 3,0 ml

in jeweils einen 10-ml-Maßkolben pipettiert, bis zur Eichmarke mit VE-Wasser aufgefüllt und homogenisiert.

## 3. Dichtemessung

Mit Hilfe der bereitliegenden 2-ml-Injektionspritze mit aufgesteckter 12 cm langer Injektionskanüle wird die zu untersuchende Probenlösung direkt aus dem Maßkolben in die Spritze eingesogen. Danach wird die Injektionskanüle von der Spritze entfernt, die gefüllte Spritze in den Fülladapter am DMA gesteckt und unter gleichmäßigem Druck auf den Stempel der Injektionspritze ist in die Messzelle blasenfrei zu befüllen, bis die Untersuchungssubstanz aus dem hinteren Abflussschlauch wieder austritt. Danach erfolgt die Messung durch Betätigen des Buttons START. Während der Messung blinkt rechts oben im Display ein kleines Viereck. Ist die Messung abgeschlossen, wird eine Melodie hörbar und die Messergebnisse werden blinkend im Display angezeigt. Sie können nun notiert werden, wenn im Display hinter Status: „Gueltig“ lesbar ist.

Andernfalls ist die Messung zu wiederholen.

## 4. Reinigung der Messzelle

Nach erfolgter Messung ist die Messzelle des Gerätes zu reinigen. Dazu wird mit Hilfe einer (anderen) Injektionspritze 2 Mal VE-Wasser durch die Messzelle gespült bis es aus dem hinteren Abflussschlauch wieder austritt. Danach ist der Pumpenschlauch auf den Einfülladapter zu stecken und die Pumpe für ca. 1 Min. mittels PUMP-Button zu starten. In die so gereinigte und getrocknete Messzelle wird dann die nächst höher konzentrierte Lösung zur Untersuchung eingefüllt und die Messung wie oben beschrieben durchgeführt.

Alle Messergebnisse sind ins Messdatenprotokoll zu erfassen.

**Achtung:** Nach der letzten Messung muss vor dem Ausschalten des Gerätes die Reinigungsprozedur durchgeführt werden!

### Hinweise zur Auswertung

#### a) Tangentenmethode

Zunächst wird der Massenanteil des Proteins in den angesetzten Lösungen aus:

$$w_B = \frac{m_{BSA0} * v_{Stammlsg.} / 10ml}{\rho * 10ml}$$

ermittelt. (Dabei beträgt das Volumen der Stammlösung in der Stammlösung natürlich 10 ml.)

Danach sind anhand der lt. Datenblatt ermittelten Dichten die Proteinmassen  $m_B$  (Gl. 2a) und Lösungsvolumina  $v$  (Gl. 2b) zu errechnen, die man für Mischungen mit jeweils 1 g Wasser anzusetzen hätte bzw. erhielt.

Daraus ist ein Diagramm  $v$  über  $m_B$  zu erstellen und ein Regressionspolynom 2. Grades anzupassen:

$$v \approx A_0 + A_1 m_B^1 + A_2 m_B^2$$

Mit Hilfe der in der Trendfunktion enthaltenen Koeffizienten  $A_0$ ,  $A_1$  und  $A_2$  kann man nun leicht aus Gl. 1 die gesuchten partiellen spezifischen Volumina errechnen. Das Diagramm und die erhaltenen Koeffizienten sind im Protokoll anzugeben.

Zur Darstellung der Ergebnisse ist folgende Tabelle zu verwenden:

	$\rho$	$m_B$	$v$	$V_{mB}$
$w_B$	in .....	in.....	in .....	in.....

#### b) Ordinatenabschnittsmethode

Stellt man Gleichung (3c) nach  $V_{mA}$  um, erhält man:

$$V_{mA} = \bar{V}_m - \frac{d\bar{V}_m}{dw_B} w_B$$

Nach Gleichung (3a) gilt für  $V_{mA}$  ebenfalls

$$V_{mA} = V_{mB} - \frac{d\bar{V}_m}{dw_B},$$

woraus

$$\bar{V}_m - \frac{d\bar{V}_m}{dw_B} w_B = V_{mB} - \frac{d\bar{V}_m}{dw_B}$$

und

$$\boxed{V_{mB} = \bar{V}_m + (1 - w_B) \frac{d\bar{V}_m}{dw_B}} \quad (3)$$

folgen.

Um  $\frac{d\bar{V}_m}{dw_B}$  als Funktion von  $w_B$  zu ermitteln, ist ein Diagramm  $\bar{V}_m$  über  $w_B$  zu erstellen und ein Regressionspolynom 2. Grades anzupassen, wobei man die Koeffizienten  $B_0$ ,  $B_1$  und  $B_2$  der Gleichung

$$\boxed{\bar{V}_m \approx B_0 + B_1 w_B^1 + B_2 w_B^2} \quad (4)$$

aus der Trendlinienfunktion entnimmt. Das Diagramm und die erhaltenen Koeffizienten sind im Protokoll anzugeben.

Unter Benutzung dieser Koeffizienten kann man leicht die Ableitungen  $\frac{d\bar{V}_m}{dw_B}$  für die einzelnen Massenbrüche aus (4) errechnen, die dann in die Gleichung (3) einzusetzen sind.

Zur Darstellung der Ergebnisse ist folgende Tabelle zu verwenden:

	$\rho$	$\bar{V}_m = \frac{1}{\rho}$	$d \bar{V}_m / dw_B$	$V_{mB}$
$w_B$	in .....	in.....	in .....	in.....

### Nachbereitungsaufgabe

Der durch analytische Ultrazentrifugation bei 20°C bestimmbare Sedimentationskoeffizient  $s$

$$s = \frac{M_B(1 - V_{mB}\rho)}{fN_A}$$

beträgt für BSA in hochverdünnter wässriger Lösung ca. 4,1 S. Durch Diffusionsmessungen wurde ermittelt, dass der Reibungskoeffizient  $f$   $6,734 \cdot 10^{-11}$  Ns/m beträgt.

Wie groß ist die ungefähre Molmasse  $M_B$  des BSA, wenn das partielle spezifische Volumen bei unendlicher Verdünnung und die Dichte des reinen Wassers zu Grunde gelegt werden?

## Symbole

Symbol	Bedeutung	Einheit
w	Massenanteil, Massenbruch	
$V_m$	partielles spezifisches Volumen	$\text{cm}^3/\text{g}$
v	Volumen	$\text{cm}^3$
T	Kelvin-Temperatur	K
p	Druck	bar
m	Masse	g
$\rho$	Dichte	$\text{g}/\text{cm}^3$
$A_i$	Koeffizienten des Polynoms $v=f(m)$	$\text{cm}^3/\text{g}^i$
$\bar{V}_m$	mittleres spezifisches Volumen	$\text{cm}^3/\text{g}$
$m_0$	Masse der Lösung	g
$B_i$	Koeffizienten des Polynoms $\bar{V}_m=f(w)$	$\text{cm}^3/\text{g}$
s	Sedimentationskoeffizient	$S=10-13 \text{ s}$
M	Molmasse	$\text{g}/\text{cm}^3$
f	Reibungskoeffizient	$\text{Ns}/\text{m}$
$N_A$	Avogadrozahl	$6,022 \cdot 10^{23}/\text{mol}$
<b>Indices</b>		
A	Lösungsmittel (hier Wasser)	
B	Solut (hier Protein)	

## Anhang1: Das Prinzip der Dichtemessung

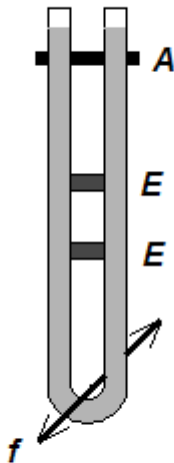


Abb. 1.: Vibrierendes U-Rohr-System zur Dichtemessung an Flüssigkeiten

Äußerst präzise Dichtemessung an Flüssigkeiten und Gasen werden dadurch möglich, dass ein mit ihnen gefülltes gläsernes, an der starren Aufhängung A befestigtes U-Rohr, ähnlich wie eine Stimmgabel, in Vibration versetzt wird. Dies geschieht durch die elektromagnetischen Abnehmer E, mit deren Hilfe auch die Resonanzfrequenz f ermittelt wird.

Für die Vibrationsperiode T gilt bei Resonanz:



$$T = \frac{1}{f} = 2\pi\sqrt{\frac{m}{D}}$$

Dabei ist  $D$  die Elastizitätskonstante des U-Rohrs,  $m$  die Gesamtmasse des schwingenden U-Rohrs.

Wichtig für die erreichbare Präzision der Dichtemessung ist nun, dass *nur* der Anteil des U-Rohrs unterhalb der Aufhängung  $A$  an der Schwingung teilnimmt, so dass die oberhalb der Unterkante der Aufhängung anstehenden Flüssigkeiten bzw. Gase keinen Einfluss auf die Resonanzfrequenz nehmen können.

Daher ergibt sich die Gesamtmasse  $m$  des schwingenden U-Rohrs aus der konstanten Masse  $m_U$  des unterhalb der Aufhängung schwingenden Glaskörpers und der Masse der unterhalb der Aufhängung befindlichen Probe  $m_P$ :

$$m = m_U + m_P$$

Die Probenmasse ergibt sich nun aus dem konstanten Volumen des U-Rohrs im Schwingungsbereich und der gesuchten Dichte der Probe:

$$m_P = \rho_P v_U$$

Damit ist:

$$T = 2\pi\sqrt{\frac{m_U + v_U\rho_P}{D}}$$

$$T^2 = 4\pi^2 \frac{m_U + v_U\rho_P}{D}$$

$$\rho_P = T^2 \frac{D}{4\pi^2 v_U} - \frac{m_U}{v_U} = \frac{D}{4\pi^2 v_U} \left( T^2 - \frac{4\pi^2 m_U}{D} \right)$$

$$\rho_P = A(T^2 - B)$$

Dabei sind  $A$  und  $B$  Apparatekonstanten, in die nur die Daten des schwingenden Glaskörpers eingehen, und die mit Hilfe von mindestens zwei Referenzmaterialien bekannter Dichte (z.B. reines Wasser, Zuckerlösung mit genau bekanntem Zuckergehalt) ermittelt werden können.

Literatur: Ludger O. Figura, Arthur A. Teixeira, Food Physics, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2007, S. 455 ff

## Anhang 2: Die graphische Interpretation der Achsen- oder Ordinatenabschnittsmethode

Da die in Gleichung (3c) enthaltene Ableitung als Anstieg der Tangente an den Graphen interpretiert werden kann, entspricht die Gleichung (3c) der Geradengleichung dieser Tangente, und man kann die gesuchte partielle Größe als deren Achsenabschnitt (Ordinatenabschnitt) ablesen.

Gleichung (3c) kann auf die Form gebracht werden

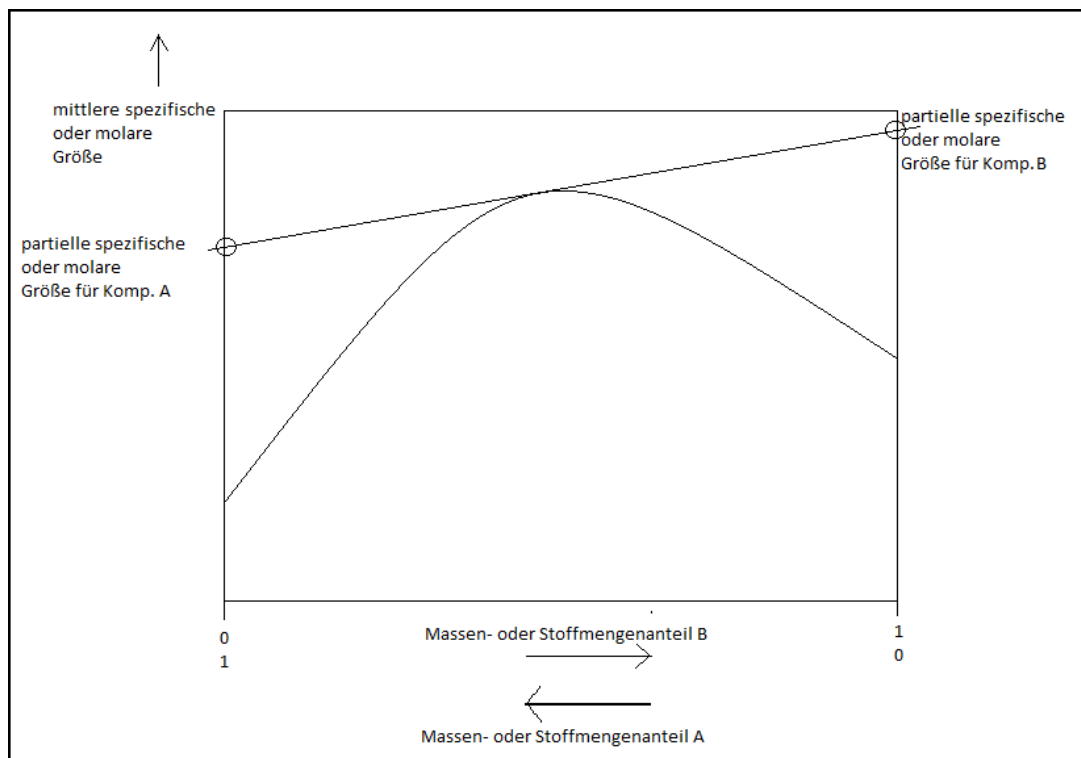
$$\bar{V}_m = V_{mB} - (1 - w_B) \frac{d\bar{V}_m}{dw_B}$$

Da  $(1 - w_B) = w_A$  und  $dw_B = -dw_A$  resultiert die Gleichung:

$$\bar{V}_m = V_{mB} + w_A \frac{d\bar{V}_m}{dw_A}$$

Dies entspricht der Geradengleichung der Tangente im  $\bar{V}_m$ -über- $w_A$ -Koordinatensystem. Den Ordinatenabschnitt liest man also im  $\bar{V}_m$ -über- $w_B$ -Koordinatensystem bei  $w_B=1$  ab.

Für partielle spezifische oder molare Größen aller Art gilt für eine binäre Mischung die Verallgemeinerung:



**Übungen in physikalischer Chemie für Studierende der B.Sc.****Datenblatt: Proteindichte**

Gruppe: .....

Datum:.....

 *Anmeldung nicht vergessen!*BSA-Einwaage:  $m_{\text{BSA0}} = \dots\dots\dots\text{g}$  $\rho_{20^\circ\text{C}}$  (Luft):..... $\rho_{20^\circ\text{C}}$  (Wasser):.....

Lösung	$\rho_{20^\circ\text{C}}$
1,00 ml Stammlösung auf 10 ml Lsg.	
1,25ml Stammlösung auf 10 ml Lsg.	
2,50ml Stammlösung auf 10 ml Lsg.	
3,00ml Stammlösung auf 10 ml Lsg.	
Stammlösung	

*Wenn abweichende Stammlösungsvolumina verwendet wurden, ist das tatsächlich verwendete Volumen unter das Vorgabevolumen zu schreiben.*

Der Versuch wurde ordnungsgemäß durchgeführt, die  Daten in das Excel-Formular eingetragen und der  Arbeitsplatz übergeben.

.....

**(Unterschrift)** *Abmeldung nicht vergessen!*