

5.1.1 Stammlösung Resorufin (FW Resorufin 235,17)

Der Feststoff muss kühl und dunkel gelagert werden. 1,0 mg/ml in DMSO lösen und 2 Tage rühren!! (Vorstammlösung). Fläschchen gegen Licht schützen und mit Alufolie abdecken. Wenn sich die Kristalle gelöst haben wird die exakte Konzentration der Vorstammlösung photometrisch bestimmt (572 nm, pH 8,0, Molarer Extinktionskoeffizient $\epsilon = 0,0732 \mu\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$). Die Extinktion kann von einer 1:2000 bis 1:10000 Verdünnung der Vorstammlösung in Puffer pH 8,0 als linear angenommen werden.

Verdünnungsfaktor 1	μl Vorstammlösung auf	Puffer pH 8,0
1:400	50 μl	20 ml
1:800	50 μl	40 ml
1:1200	50 μl	60 ml
1:1600	50 μl	80 ml
1:2000	50 μl	100 ml

Der Puffer pH 8,0 wird mit Vollpipetten in Braunglas-Fläschchen vorgelegt. Die 50 μl Vorstammlösung mit einer mindestens +/- 0,1 μl genauen Pipette dosiert. Die Lösungen werden am Photometer gegen Phosphatpuffer pH 8,0 vermessen. Nach den Formeln (1-4) wird jeweils aus der Extinktion die Konzentration der Lösung berechnet, mit der Verdünnung multipliziert und gemittelt. Es ergibt sich die wahre Konzentration der Standardlösung [mg/ml]. Nach Formel (5) wird aus jeder Verdünnung die Reinheit berechnet und gemittelt. Die Reinheit wird auf 2 Nachkommastellen gerundet.

$$A_{572} = \epsilon \cdot C \cdot L \quad C = A_{572} / (L \cdot \epsilon) \quad (C = \text{Konzentration in } \mu\text{M}; L = \text{Lichtweg} = 1 \text{ cm})$$

Symbol	Erklärung	Fester Wert	Rechenbeispiel
A_{572}	Absorption bei 572 nm		0,4625
MG	Molekulargewicht Resorufin	237,17 g/mol = $\mu\text{g}/\mu\text{mol}$	
KVSL	Konzentration Vorstammlösung		5 mg/ml
ϵ	molarer Extinktionskoeffizient Resorufin =	$0,0732 \mu\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1} =$ $0,0732 [1/(\mu\text{mol/l}) \cdot (1/\text{cm})]$	
V1	Verdünnungsfaktor [ohne Einheit]		2000
x	Zwischenergebnis [$\mu\text{mol/l}$]		12636,61
y	Zwischenergebnis [$\mu\text{g/l}$]		2997025,27
z	Wahre Konzentration der Standardlösung [mg/ml]		2,9970
1000000	Faktor von $\mu\text{g/l}$ auf mg/ml		
R	Reinheit [%]		59,94%

FORMEL (1)

$$\frac{A_{572}}{\epsilon \left[\frac{1}{\mu\text{mol/l}} \cdot \frac{1}{\text{cm}} \right]} \cdot V1 = x [\mu\text{mol/l}]$$

FORMEL (2)

$$x [\mu\text{mol/l}] \cdot \text{MG} [\mu\text{g}/\mu\text{mol}] = y [\mu\text{g/l}]$$

FORMEL (3)

$$\frac{y[\mu\text{g/l}]}{1000000} = z[\text{mg} / \text{ml}]$$

FORMEL (4)

$$R [\%] = \frac{z [\text{mg/ml}]}{\text{KVSL} [\text{mg/ml}]} * 100 [\%]$$

Rechenbeispiel für Formeln 1-4 siehe obige Tabelle

Ansetzen der Arbeitslösung Resorufin (0,002 mg/ml)

Auf der Basis der gemessenen Konzentration wird dann eine 8,5 µM Arbeitslösung in DMSO hergestellt (rechnerisch 0,002 mg Resorufin/ml), in 1 ml Portionen aliquotiert und bei -20°C eingefroren. Diese Lösung (8,5 µM = 0,0085 µmol/mL) sollte in Puffer pH 8,0 in einer 1 cm Küvette eine A_{572} von etwa 0,622 haben. Das Ansetzen der Standardlösungen sollte in halbdunklen Räumen geschehen, da Resorufin lichtempfindlich ist.

Symbol	Erklärung	Fester Wert	Rechen- Beispiel
KVSL	Konzentration VorstammLösung		5,0 mg/ml
R	Reinheit		59,95 %
ZielK	gewünschte Konzentration	0,002 mg/ml	
V2	Verdünnungsfaktor		1498,75

FORMEL (5)

$$\frac{(R\%/100) * \text{KVSL}[\text{mg} / \text{ml}]}{\text{ZielK}[\text{mg} / \text{ml}]} = V2$$

Rechenbeispiel siehe Tabelle

Es werden etwa 200 ml Arbeitslösung hergestellt

200 ml / V2 = ml VorstammLösung, die auf 200 aufgefüllt werden

200 ml/ 1498,75 = 0,133 ml = 133µl VorstammLösung

133 µl VorstammLösung ad 200 ml DMSO = StammLösung Resorufin
in Cryovials aliquotieren und einfrieren