

plasmatischen Seite. Einige der neutralen Glykolipide sind für die Blutgruppenspezifität von roten Blutzellen verantwortlich.

NUCLEINSÄUREN

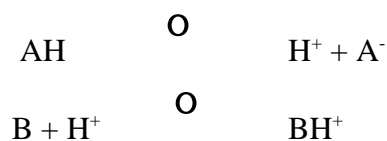
Zur Reinigung und Trennung grossmolekularer Nucleinsäuren, deren Aufbau und Struktur hier nicht behandelt werden soll, dienen ähnliche Methoden wie für Proteine; die Gelchromatographie zur Trennung nach Molekülgrösse und die SDS-Gelelektrophorese (S.14) zur Molekularmassebestimmung. Oligonucleotide können aufgrund ihres Gehalts an negativ geladenen Phosphatgruppen durch Ionenaustauschchromatographie getrennt werden. Nucleinsäuren sind gut wasserlöslich, fallen aber in saurem Milieu aus. Gegen Wärme oder organische Lösungsmittel sind Nucleinsäuren wesentlich stabiler als Proteine. Chemisch können Nucleinsäuren durch Kochen in Säure in die Bausteine Phosphat, Pentose und Nucleinbasen zerlegt werden. Im Organismus werden sie durch Nucleasen verschiedener Spezifität zu Oligo- und Mononucleotiden hydrolysiert. Pankreatische Ribonuclease spaltet die Esterbindung zwischen der Phosphatgruppe eines Pyrimidinnucleotids und dem C₅ der Ribose des nächsten Nucleotids. Es entstehen freie Pyrimidin-3'-phosphate und Oligonucleotide mit einem Pyrimidin-3'-phosphat am einen Ende.

Die Purine und Pyrimidine haben ein Absorptionsmaximum bei 260 nm. Das Absorptionsmaximum ist um rund 20 nm im kurzwelligeren Bereich des Spektrums als dasjenige der Proteine. Die Extinktionskoeffizienten der Purine und Pyrimidine sind wesentlich höher als diejenigen von Tryptophan und Tyrosin. Im allgemeinen sind die Spektren aller Nucleinsäuren gleich, allerdings gibt es gewisse von Struktur und Konformation abhängige Unterschiede. Zum Beispiel ändert sich das Spektrum von DNA bei der Denaturierung von doppelsträngiger zu einsträngiger DNA (Exp. 6.4, bzw. Exp. 8.10).

Das unterschiedliche UV-Spektrum von reduzierten und oxidierten Pyridinnucleotiden wird zur Messung vieler Enzymreaktionen benutzt. Pyridinnucleotide (NAD⁺, NADP⁺) absorbieren ebenfalls maximal bei 260 nm, der Nicotinamid-Rest zeigt zusätzlich eine vom Redoxzustand (NAD⁺ / NADH) abhängige Absorption im längerwelligen UV (Exp. 1.6). Enzymreaktionen, die mit den Reaktionen NAD⁺ / NADH oder NADP⁺ / NADPH gekoppelt sind, können daher bequem photometrisch verfolgt werden. Die Methode, historisch als "Optischer Test nach Warburg" bekannt, wird im klinisch-chemischen Labor ausserordentlich häufig angewandt (S. 44 und Exp. 1.7, 8.1 und 8.3).

pH-MESSUNG UND TITRATION

Eine Säure kann nach Brönsted definiert werden als eine Substanz, die in Lösung ein Wasserstoffion und die konjugierte Base A⁻ dissoziiert. Eine Base ist eine Substanz, die ein Wasserstoffion aufnehmen kann und dadurch zur konjugierten Säure wird. Diese Beziehungen sind gegeben durch die folgenden Gleichgewichte:



Je nach Lage des Gleichgewichts kann eine Säure in wässriger Lösung in der undissoziierten, der dissoziierten Form oder einer Mischung der beiden vorliegen. (Wasserstoffionen existieren in wässriger Lösung nur in hydratisierter Form als H_3O^+ . Aus Gründen der Vereinfachung wird aber im folgenden auf diese Schreibweise verzichtet.)

Bei der **acidimetrischen Titration** von Säuren werden sowohl die freien wie auch alle potentiell dissoziierbaren Wasserstoffionen (undissoziierte saure Äquivalenzen) erfasst. Bei der **pH-Messung** ($\text{pH} = -\log \text{H}^+$) wird nur die freie H^+ -Konzentration (bzw. Aktivität) gemessen.

Starke Säuren sind in wässriger Lösung vollständig dissoziiert. Eine 0.1 M HCl-Lösung liegt beispielsweise vollständig in Form von H^+ und Cl^- Ionen vor und ergibt daher eine H^+ -Konzentration von $0.1 \text{ M} = 10^{-1} \text{ M}$, also einen pH-Wert von 1. Acidimetrische Titration und pH-Messung liefern in diesem Fall das gleiche Resultat.

Bei einer **schwachen Säure** ist die Dissoziation unvollständig. Das Gleichgewicht zwischen der dissoziierten und undissoziierten Form ist gegeben durch die Säuredissoziationskonstante K_a :

$$\frac{[\text{A}^-][\text{H}^+]}{[\text{AH}]} = K_a \quad (1)$$

Je schwächer eine Säure, desto kleiner ist K_a . Acidimetrische Titration und pH-Messung liefern ungleiche Resultate. Eine 0.1 M Essigsäurelösung ist z.B. nur zu 1.5 % dissoziiert. Ihr pH-Wert ist etwa 2.85.

Gleichung (1) gestattet die Berechnung des pH-Wertes von wässrigen Lösungen schwacher Säuren, von Wasser, von wässrigen Lösungen von Salzen einer schwachen Säure und einer starken Base und von Mischungen der Lösungen solcher Salze und der zugehörigen schwachen Säure (Pufferlösungen).

Berechnung des pH-Wertes einer schwachen Säure:

Wenn eine schwache Säure der Hauptlieferant von H^+ ist, dann ist $[\text{H}^+] = [\text{A}^-]$. Gleichung (1) wird somit umgeformt in:

$$\frac{[\text{H}^+]^2}{[\text{AH}]} = K_a, \quad \text{oder} \quad [\text{H}^+]^2 = K_a[\text{AH}]; \quad 2 \log[\text{H}^+] = \log K_a + \log[\text{AH}]$$

Bei einer schwachen Säure in einer Konzentration $> 10 K_a$ entspricht $[\text{AH}]$ fast der ursprünglichen Gesamtkonzentration c (in mol/l), somit

$$\log[\text{H}^+] = (\log K_a + \log c) / 2$$

oder

$$\text{pH} = (\text{p}K_a - \log c) / 2 \quad (2)$$

wobei $pK_a = -\log K_a$. Damit lässt sich der pH-Wert einer schwachen Säure angenähert berechnen. Für 0.01 M Essigsäure (pK_a 4.7) ist der berechnete pH-Wert 3.35.

Berechnung des pH-Wertes von Wasser:

Wasser ist eine sehr schwache Säure ($K_a = 1.7 \times 10^{-16}$) und die Konzentration der undissoziierten Form (H_2O) ist praktisch in allen wässrigen Lösungen konstant (= 55 M). Das Dissoziationsgleichgewicht ist somit

$$\frac{[H^+][OH^-]}{55} = 1.7 \times 10^{-16}.$$

Daraus ergibt sich das Ionenprodukt, K_w , des Wassers

$$[H^+][OH^-] = 10^{-14} = K_w(25EC) \quad (3)$$

In Abwesenheit anderer H^+ -Donatoren ist $[H^+] = [OH^-]$, und daher $[H^+]^2 = 10^{-14}$, bzw. $pH = 7$. Dies ist der pH-Wert von reinem Wasser. Wegen der Aufnahme von Kohlensäure aus der Luft ist der pH-Wert von destilliertem Wasser jedoch meist niedriger (ca. pH 5).

Berechnung des pH-Wertes einer Lösung des Salzes einer schwachen Säure mit einer starken Base:

Salze starker Säuren mit starken Basen sind in wässriger Lösung annähernd neutral; hingegen sind Salze schwacher Säuren mit starken Basen leicht alkalisch. Ein solches Salz ist in wässriger Lösung vollständig dissoziiert: $XA \rightleftharpoons X^+ + A^-$. A^- reagiert mit H_2O gemäss $A^- + HOH \rightleftharpoons AH + OH^-$. Da die Menge von AH gleich der Menge des gebildeten OH^- ist, und da $[A^-]$ praktisch gleich der Salzkonzentration [Salz] ist, folgt aus (1)

$$[H^+] = [AH]K_a/[A^-] = [OH^-]K_a/[Salz]$$

Da $[OH^-] = K_w/[H^+]$, ist $[H^+] = K_a K_w/[H^+][Salz]$. Logarithmieren und Auflösen nach $[H^+]$ ergibt

$$\log[H^+] = \log K_w/2 + \log K_a/2 - \log[Salz]/2$$

$$pH = 7 + pK_a/2 + \log[Salz]/2 \quad (4)$$

Nach Gleichung (4) ist der pH-Wert von 0.1 M Na-Acetat 8.85 .

Berechnung des pH-Wertes einer Pufferlösung:

Lösungen, die eine schwache Säure (AH) und deren Salz (X^+ , A^-) enthalten, werden Pufferlösungen genannt. Sie können dank dem gleichzeitigen Vorhandensein der konjugierten Säure (AH) und Base (A^-) Wasserstoffionen binden oder abgeben. Sie vermögen deshalb Änderungen der H^+ -Konzentration bei Zugabe von Säuren oder Basen innerhalb enger Grenzen abzdämpfen. Dieses als Pufferwirkung bezeichnete Verhalten spielt eine grundlegende Rolle bei der Aufrechterhaltung des pH-Wertes in physiologischen Systemen und auch bei der Kontrolle des pH-Wertes in Experimenten.

Pufferlösungen können durch partielle Neutralisierung einer schwachen Säure mit einer starken Base (z.B. NaOH), oder praktischer durch Vermischen einer Lösung der Säure und der Lösung eines ihrer Alkalisalze hergestellt werden.

Der pH-Wert einer Pufferlösung bekannter Zusammensetzung lässt sich nach Gleichung (1) berechnen. Unter der Annahme, dass [AH] der zugegebenen totalen Säurekonzentration und [A⁻] der zugegebenen totalen Salzkonzentration entspricht (diese Annahme ist nur gültig im Bereich, wo der Anteil von Säure oder Salz mehr als 5 % oder weniger als 95 % ihrer Summe ausmacht), ergibt sich:

$$[H^+] = K_a[AH]/[A^-] = K_a[\text{Säure}]/[\text{Salz}]$$

$$\log [H^+] = \log(K_a[\text{Säure}]/[\text{Salz}])$$

$$\text{pH} = \text{p}K_a + \log \frac{[\text{Salz}]}{[\text{Säure}]} = \text{p}K_a + \log \frac{[A^-]}{[AH]} \quad (5)$$

Das ist die **Henderson-Hasselbalchsche Gleichung**. Aus (5) folgt, dass $\text{pH} = \text{p}K_a$, wenn $[A^-] = [AH]$; d.h. der pH-Wert einer zur Hälfte neutralisierten schwachen Säurelösung entspricht ihrem $\text{p}K_a$ -Wert.

Beispiele:

Zu 10 ml 0.1 M Essigsäure werden 5 ml 0.1 N NaOH zugefügt. Damit wird die Hälfte der Essigsäure in die Salzform übergeführt, so dass $[\text{Salz}]/[\text{Säure}] = 5/5$ wird.

$$\text{pH} = 4.7 + \log \frac{5}{5} = 4.7 + \log 1 = 4.7 \quad (\text{pH} = \text{p}K_a)$$

Zu 10 ml 0.1 M Essigsäure werden 0.2 ml 1 N NaOH zugefügt. Das entspricht der Addition von 2 ml 0.1 N NaOH. Damit wird 1/5 der Essigsäure in die Salzform übergeführt, so dass $[\text{Salz}]/[\text{Säure}] = 1/4$ wird.

$$\text{pH} = 4.7 + \log \frac{1}{4} = 4.7 + \log 0.25 = 4.7 + 0.4 - 1 = 4.1$$

Zu 10 ml 0.15 M Na₂HPO₄ werden 5 ml 0.15 M NaH₂PO₄ zugefügt ($\text{p}K_{a2} = 7.2$)

$$\text{pH} = 7.2 + \log \frac{10}{5} = 7.2 + 0.3 = 7.5$$

Aus je 0.3 M Na₂HPO₄ und NaH₂PO₄ soll eine 0.15 M Phosphatpufferlösung mit $\text{pH} = 7.4$ hergestellt werden.

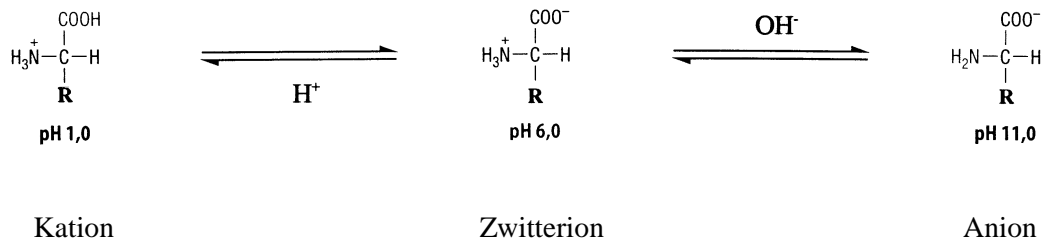
$$7.4 = 7.2 + \log[\text{Salz}]/[\text{Säure}]$$

$$\log[\text{Salz}]/[\text{Säure}] = 7.4 - 7.2 = 0.2; \quad [\text{Salz}]/[\text{Säure}] = 1.58$$

Also müssen 1.58 Teile 0.3 M Na_2HPO_4 , 1 Teil 0.3 M NaH_2PO_4 und 2.58 Teile H_2O gemischt werden.

Ampholyte:

Substanzen, welche sowohl saure wie basische Gruppen enthalten, nennt man Ampholyte, z.B. Aminosäuren sind Ampholyte. Bei Säurezusatz verhalten sich Aminosäuren wie Basen, bei Basenzusatz wie Säuren (Zwitterionen):



Am isoelektrischen Punkt (IEP) liegen sie als Zwitterionen vor. Der isoelektrische Punkt ist derjenige pH-Wert, bei welchem die Nettoladung der Aminosäure gleich Null ist. Bei diesem pH-Wert wandert die Aminosäure in einem elektrischen Feld nicht. Da Proteine aus Aminosäuren zusammengesetzt sind, sind Proteine auch amphoter und weisen auch einen IEP auf. Der IEP eines Proteins wird durch Elektrophorese bestimmt: Der pH-Wert der Proteinlösung wird so lange variiert, bis keine Wanderung im elektrischen Feld mehr feststellbar ist.

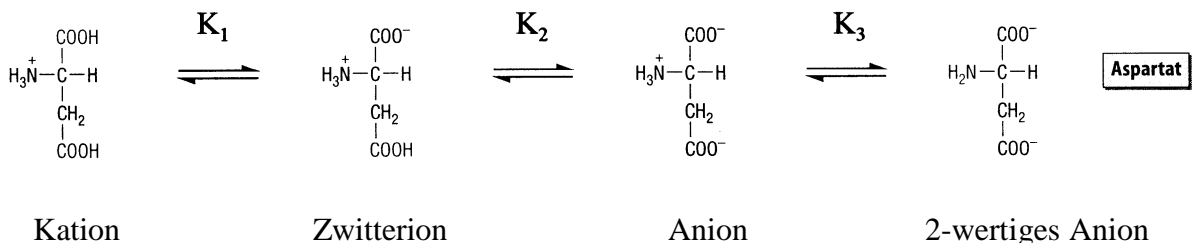
Berechnung des isoelektrischen Punktes einer Aminosäure:

Der pK_a -Wert der Carboxylgruppe wird pK_1 genannt, derjenige der Aminogruppe pK_2 . Am isoelektrischen Punkt ist

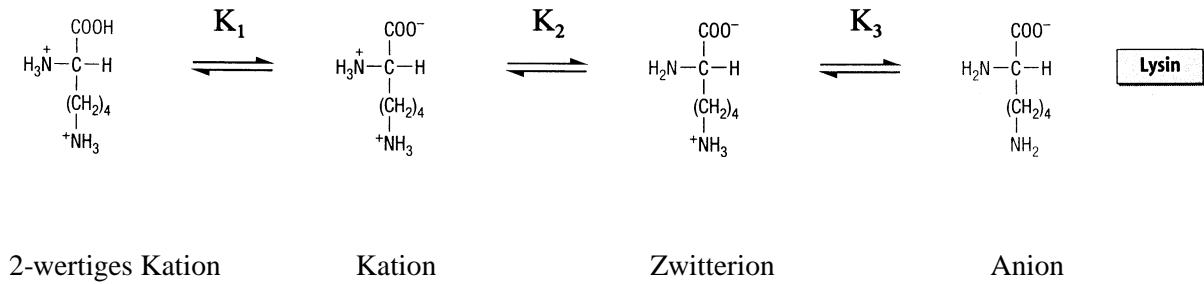
$$\text{pH} = \frac{1}{2} (\text{pK}_1 + \text{pK}_2)$$

Glycin $\text{pK}_1 = 2.34$, $\text{pK}_2 = 9.60$, $\text{IEP} = 5.97$.

Saure und basische Aminosäuren haben 3 pK_a -Werte:



$\text{pK}_1 = 1.88$, $\text{pK}_2 = 3.65$, $\text{pK}_3 = 9.6$, $\text{IEP} = 1/2(\text{pK}_1 + \text{pK}_2) = 2.77$



$$pK_1 = 2.8, \quad pK_2 = 8.95, \quad pK_3 = 10.53, \quad \text{IEP} = 1/2(pK_2 + pK_3) = 9.74$$

Die pK_a - und IEP-Werte einiger weiterer Aminosäuren sind in der nachfolgenden Tabelle zusammengestellt:

Aminosäuren	Carboxyl- gruppe	α -Amino- gruppe	Seitenkettengruppe* (protonierte Form)	IEP
Glycin	2.3	9.6	-	5.95
Asparaginsäure	1.9	9.6	3.7 (β -COOH)	2.80
Glutaminsäure	2.2	9.7	4.3 (γ -COOH)	3.50
Tyrosin	2.2	9.1	10.1 (-OH)	5.65
Cystein	1.9	10.7	8.4 (-SH)	5.15
Histidin	1.8	9.2	6.0 (Imidazolium)	7.60
Lysin	2.2	9.0	10.5 (ϵ -NH ₃ ⁺)	9.75
Arginin	2.2	9.0	12.5 (Guanidinium)	10.75

*In Proteinen gelten oft andere pK -Werte, weil im Proteinverband räumlich benachbarte Seitenketten sich gegenseitig beeinflussen können. Beispiel: $-\text{COO}^- \dots \text{H}_3\text{N}^+$, pK_{NH_2} steigt, pK_{COO^-} sinkt.

Titrationen zeigen die Abhängigkeit des pH-Wertes vom Verhältnis Base / Säure

Der Verlauf der Titrationskurve einer einzelnen protonierbaren Gruppe wird von der Henderson-Hasselbalchschen Gleichung (S. 24) vorausgesagt. Die Titrationskurve eines Gemisches von Aminosäuren oder einer Proteinlösung ist die Summe der Titrationskurven der einzelnen ionisierbaren Gruppen. In der Praxis wird statt des Verhältnisses Base / Säure die Menge der zugegebenen Base gegen den pH-Wert aufgetragen (Exp. 2.2). Titrationskurven zeigen anschaulich, dass bei Zugabe einer gleich grossen Menge Base oder Säure die pH-Änderung im Bereich der pK -Werte gering, im Bereich der Äquivalenzpunkte gross ist. Als Faustregel gilt: Aminosäuren (aber auch andere Säuren und Basen) puffern gut im pH-Bereich von $pK \pm 0.5$.

pH-Indikatoren sind schwache Elektrolyte, bei denen die protonierte und die nicht-protonierte Form verschiedenfarbig sind. Sie wechseln deshalb im Bereich ihres pK_a über ein Intervall von 1 - 2 pH-Einheiten die Farbe. Statt eine Titration am pH-Meter zu verfolgen, kann durch Zusatz eines geeigneten Indikators der Endpunkt der Titration am Farbwechsel des Indikators erkannt werden.

ELEKTROPHORESE

Unter Elektrophorese versteht man die Wanderung von geladenen Partikeln in einem elektrischen Feld. Je nachdem ob die Nettoladung dieser Substanzen positiv oder negativ ist, wandern sie zur Kathode (negativer Pol) oder zur Anode (positiver Pol). Unterschiede in der Nettoladung äussern sich in Unterschieden der Wanderungsgeschwindigkeit und können so zur Trennung von Substanzgemischen verwendet werden. Die Elektrophorese ist eine wichtige Methode zur Trennung von Aminosäuren, Peptiden und Proteinen. Wegen ihres Ampholytcharakters wandern diese Verbindungen je nach ihrem isoelektrischen Punkt (IEP) und je nach dem pH-Wert des Milieus zur Kathode oder zur Anode. Wenn der pH-Wert dem IEP des Ampholyts entspricht, erfolgt keine Wanderung.

Die gebräuchlichste Methode zur Auftrennung von Gemischen ist die **Zonenelektrophorese**. Eine kleine Menge des zu trennenden Gemisches wird als schmale Zone auf einem mit Puffer getränkten Träger aufgetragen. Übliche Trägermaterialien sind Agarose-Gel und Polyacrylamid-Gel. An den Elektrophorese-Träger wird eine Gleichspannung angelegt. Unter dem Einfluss des im Streifen wirksamen elektrischen Feldes kommt es zur räumlichen Auftrennung der Komponenten, die durch geeignete Anfärbemethoden lokalisiert und auch quantitativ bestimmt werden können.

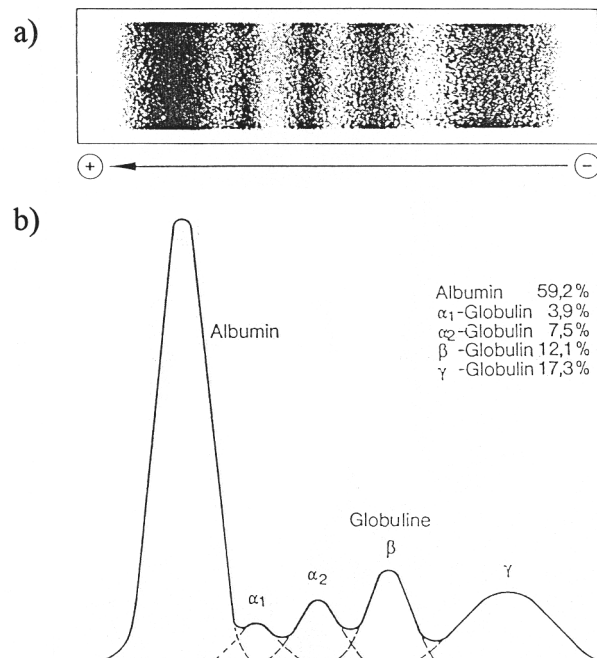


Fig. 5 Elektropherogramm von Serum eines Menschen. a) angefärbter Elektrophoresestreifen, b) die bei der photometrischen Auswertung der Farbbänder entstandene Extinktionskurve; die Zahlen geben die Anteile der Fraktionen in Prozenten, die durch Integration der Flächen unter den einzelnen Gipfeln der Extinktionskurve ermittelt werden.