

1

Herstellung von Lösungen in der biowissenschaftlichen Forschung

1.1 Einführung

Um die vielen komplexen Prozesse und Wechselwirkungen zu verstehen, die in einer Zelle (in vivo) ablaufen, ist es oft notwendig, zelluläre Vorgänge im Reagenzglas (in vitro) zu simulieren. Die vielen Bestandteile der Zelle variieren in ihrer Konzentration, Größe und ihren physikalischen Eigenschaften, und obwohl es oft schwierig ist, die zelluläre Umgebung im Labor exakt zu simulieren, ist es möglich, eine Umgebung zu schaffen, in der der untersuchte Zellbestandteil normal arbeitet. Durch sorgfältige Anpassung der Lösung kann dann ein Verständnis für die Rolle des Zellbestandteils in der Zelle gewonnen werden. Die Herstellung von Lösungen ist also ein wichtiger Schritt in der biowissenschaftlichen Forschung und ein Thema, mit dem alle Studenten der Biowissenschaften vertraut sein sollten.

Um dieses Thema jedoch vollständig zu beherrschen, *müssen* Sie sich die wichtigsten Themen einprägen, wie beispielsweise die in der biowissenschaftlichen Forschung verwendeten Einheiten (Tab. 1.1). Die einzige Möglichkeit, Unklarheiten zu vermeiden, besteht darin, sich die verschiedenen Einheiten einzuprägen oder eine Kopie von Tab. 1.1 griffbereit aufzubewahren. Die in Tab. 1.1 aufgeführten Einheiten sind repräsentativ für die Konzentrationen, in denen viele Metaboliten in der Zelle vorhanden sind, z. B. können Calciumionen (Ca^{2+}) außerhalb der Zelle in mM-Konzentrationen vorhanden sein, aber nur in nM-Konzentrationen im Zytoplasma der Zelle.

Übung 1.1

- Prägen Sie sich die Einheiten in Tab. 1.1 ein.
- Prägen Sie sich die Unterteilungen der Einheiten in Tab. 1.1 ein.

Tab. 1.1 In den Biowissenschaften häufig verwendete Einheiten.

	1.0	1.0×10^{-3}	1.0×10^{-6}	1.0×10^{-9}	1.0×10^{-12}
Konzentration	molar (M)	millimolar (mM)	mikromolar (μ M)	nanomolar (nM)	pikomolar (pM)
Menge	Mol (mol)	Millimol (mmol)	Mikromol (μ mol)	Nanomol (nmol)	Pikomol (pmol)
	Gramm (g)	Milligramm (mg)	Mikrogramm (μ g)	Nanogramm (ng)	Pikogramm (pg)
Volumen	Liter (l)	Milliliter (ml)	Mikroliter (μ l)	Nanoliter (nl)	Pikoliter (pl)

Wenn Sie die Einheiten kennen, sind Sie gut vorbereitet, um die Informationen für die Herstellung von Lösungen anzuwenden. Einer der größten Stolpersteine ist häufig, dass die Abneigung gegen Berechnungen überwunden werden muss. Viele Studierende betrachten die Biowissenschaften als anschauliches Fach und versuchen, die rechnerischen Aspekte auszublenden. Sollte dies bei Ihnen der Fall sein, wird diese Einstellung Ihr Engagement für das Thema stark einschränken. Tatsächlich ist diese Angst vor dem Rechnen meist unangebracht, da die meisten Berechnungen einfach sind und mit etwas Übung zu einer Routine werden können.

Aus praktischer Sicht unterscheiden sich Rechenprüfungen in biowissenschaftlichen Studiengängen in einem wesentlichen Punkt von Bewertungen bei deskriptiven Themen. Bei einem Test ist es möglich, 100 % der verfügbaren Punkte für eine Rechenaufgabe zu erhalten, während dies bei einer deskriptiven Antwort selten der Fall ist. Der Prüfer wird immer zögern, 100 % der Punkte zu vergeben, da das eine perfekte Antwort bedeuten würde.

1.2 Konzentration

Die Konzentration von Metaboliten, Chemikalien und Reagenzien, die in der Biowissenschaft verwendet werden, wird in verschiedenen Bezeichnungen angegeben (z. B. Molarität und Prozent).

1.2.1 Molarität

In der Wissenschaft wird die Molarität verwendet, um die numerische Äquivalenz in Bezug auf die in einer Lösung vorhandenen Moleküle sicherzustellen. In einem Mol (Symbol: mol) einer beliebigen chemischen Substanz sind 6.022×10^{23} Moleküle enthalten (Avogadro-Zahl). Dies gilt für alle Reagenzien, z. B. enthält ein Mol Natriumchlorid (NaCl; Mr 54,55), Glucose ($C_6H_{12}O_6$; Mr 180,16) oder Adenosinriphosphat-Dinatriumhydrat (ATP; Mr 551,14) die gleiche Anzahl von Molekülen.

Ein Mol dieser Reagenzien ergibt unterschiedliche Gewichte, da die verschiedenen Komponenten unterschiedliche Atome in ihrer Struktur aufweisen, d. h. eine unterschiedliche Größe oder Masse. Ein Mol eines Reagens hat jedoch *immer* die gleiche Anzahl von Molekülen.

Die Molarität (M) ist die gebräuchlichste Methode zur Beschreibung der Konzentration eines Reagens in Lösung. Der Satz sollte noch einmal gelesen werden: die *Konzentration* eines Reagens *in Lösung*. Damit wird genau beschrieben, was passiert, wenn ein Reagens (möglicherweise ein Pulver) in einem Flüssigkeitsvolumen (normalerweise Wasser) gelöst wird. Es sind daher zwei Dinge erforderlich, bevor eine Konzentration angegeben werden kann: Ein bekanntes Gewicht eines Reagens muss physikalisch abgewogen und dann in einem bekannten Flüssigkeitsvolumen gelöst werden. Ein Mol einer Komponente ist ein physikalisches Gewicht (relative Molekülmasse [Mr] in Gramm). Sie können zum Chemikalienregal gehen, das gewünschte Reagens entnehmen und ein Mol abwiegen.

Wenn ein Reagens in einem Flüssigkeitsvolumen gelöst wird, ändern sich die Einheiten von Mol zu Molarität (M; eine Einheit der Konzentration). Die Kurzform dieser Einheit ist der Großbuchstabe M (Tab. 1.1). Diese Konzentrationseinheit beschreibt eine in einem Flüssigkeitsvolumen gelöste Reagensmenge.

Eine molare Lösung (M) ist die Molekülmasse in Gramm (1 mol), gelöst in einem Liter (1.000 ml) Wasser (siehe Tab. 1.1).

$$1,0 \text{ M Lösung} = \frac{\text{Molekülmasse in Gramm eines Reagens (1,0 Mol)}}{\text{Volumen (1,0 oder 1000 ml)}}$$

1.3 Verwendung einer Waage zum Einwiegen von Reagenzien

1.3.1 Verwendung einer elektronischen Waage

In der Praxis hängt die Menge des Reagens, das Sie zur Herstellung einer Lösung abwiegen wollen, von der Verfügbarkeit des Reagens (überprüfen Sie immer das Sicherheitsdatenblatt des Reagens, unterschreiben Sie es und halten Sie es ein, bevor Sie mit dem Abwiegen beginnen) und dem Zugang zu einer geeigneten genauen Waage ab.

Die meisten biowissenschaftlichen Labore verfügen über eine Reihe von Waagen mit einer Genauigkeit von 1, 2, 3 oder 4 Dezimalstellen. Große Mengen preiswerter Reagenzien werden routinemäßig auf Präzisionswaagen abgewogen (siehe Abb. 1.1), während kleine Mengen teurer Reagenzien mit einer Analysenwaage abgewogen werden sollten. Wenn ein gefährliches Reagens eingewogen wird, ist eine Waage zu verwenden, die sich in einem ausgewiesenen Sicherheitsbereich befindet, in dem ein Unterdruck herrscht, um sicherzustellen, dass keine Partikel des Reagens in die Laborluft gelangen und diese kontaminieren können.

Die meisten, wenn nicht sogar alle Waagen haben sowohl eine 0-Taste als auch eine TARE-Taste. Bevor Sie eine Waage benutzen, schließen Sie alle Zugangstüren

(a)



Abb. 1.1 Beispiele für typische Waagen
(a) Präzisionswaage (b) Analysenwaage.

(b)



und drücken Sie die 0-Taste. Dadurch wird die Anzeige auf null gesetzt, ohne dass sich ein Gewicht auf der Waagschale befindet. Stellen Sie einen Reagensbehälter auf die Waage, schließen Sie die Zugangstüren und stellen Sie die Anzeige erneut auf null, diesmal mit der TARE-Taste. Die TARE-Taste berücksichtigt das Gewicht des Reagensbehälters und setzt die Waage auf null zurück, so dass der Benutzer nur die Masse des gewünschten Reagens genau abwiegen kann.

1.3.2 Verwendung einer Präzisionswaage

Vergewissern Sie sich stets, dass die Waage sauber ist. Wenn Sie die Waage reinigen müssen, treffen Sie die entsprechenden Gesundheits- und Sicherheitsvorkehrungen und entsorgen Sie den Abfall in einem vorgeschriebenen Behälter.

- Drücken Sie die 0-Taste, um die Anzeige der Waage auf null zu stellen.
- Stellen Sie ein geeignetes Gefäß (z. B. Becherglas, Wägeschiffchen aus Kunststoff oder Aluminiumfolie) vorsichtig auf die Waagschale (siehe Abb. 1.1a) und warten Sie, bis sich die elektronische Anzeige stabilisiert hat.
- Drücken Sie die TARE-Taste auf der Waage, um den Messwert auf null zu setzen.
- Geben Sie das Reagens mit einem geeigneten Spatel (siehe Abb. 1.2a) vorsichtig in den Behälter, um das gewünschte Gewicht zu erreichen.
- Nachdem Sie das korrekt gewogene Reagens von der Waage genommen haben, vergewissern Sie sich, dass keine Reste auf der Waagschale oder in der Umgebung verschüttet wurden. Dies ist wichtig, um eine Kreuzkontamination bei Lösungen anderer Personen und Gesundheits- und Sicherheitsprobleme für die nächste Person, die die Waage benutzt, zu vermeiden.

1.3.3 Verwendung einer Analysenwaage

Analysenwaagen reagieren empfindlich auf Umgebungsvibrationen und werden normalerweise auf einem vibrationsfreien Tisch aufgestellt (siehe Abb. 1.1b).

- Vergewissern Sie sich stets, dass die Waage sauber ist; falls sie gereinigt werden muss, treffen Sie die entsprechenden Gesundheits- und Sicherheitsvorkehrungen (siehe oben).
- Schließen Sie die Zugangstüren und drücken Sie die 0-Taste, um die Anzeige der Waage auf null zu stellen.
- Öffnen Sie die Seitentür der Waage und stellen Sie ein geeignetes Gefäß auf die Waagschale (z. B. ein kleines Becherglas, ein Kunststoffrohr, ein Wägeschiffchen aus Kunststoff oder Aluminiumfolie).
- Schließen Sie die Tür und warten Sie, bis sich die elektronische Anzeige stabilisiert hat. Drücken Sie die TARE-Taste an der Waage, um die Anzeige auf null zu setzen. Alternativ können Sie auch das Gewicht des Bechers notieren und das Gewicht des Bechers zur benötigten Reagensmenge addieren.
- Geben Sie das Reagens mit einem Mikrospatel in den Behälter auf der Schale der Analysenwaage (siehe Abb. 1.2b), schließen Sie die Seitentür und warten Sie, bis sich die Anzeige stabilisiert hat. Genaues Einwiegen ist eine Kunst, aber mit etwas Übung ist es möglich, nur 1,0 mg eines Reagens einzuwiegen.
- Wenn die gewünschte Reagensmenge eingewogen wurde, sollte der Behälter vorsichtig entnommen und das Reagens gelöst werden.
- Achten Sie darauf, dass der Boden und die Schale der Waage sauber sind. In der Regel stehen Bürsten und Tücher zur Verfügung, um diese wichtigen Laborgeräte sauber zu halten (denken Sie daran, eventuelle Rückstände unter Beachtung der Gesundheits- und Sicherheitsvorschriften zu entsorgen).

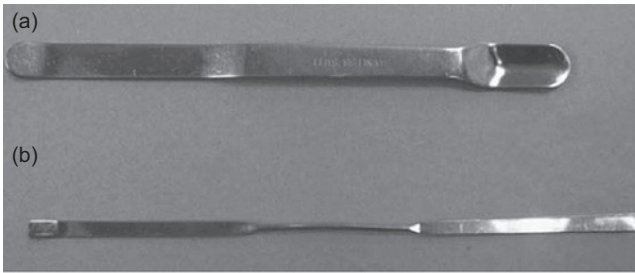


Abb. 1.2 Ein typischer (a) Spatel und (b) Mikrospatel.

1.4 Praktische Überlegungen bei der Herstellung einer einmolaren Lösung (1,0 M)

Egal, wie sorgfältig Sie bei der Herstellung einer Lösung für die biowissenschaftliche Forschung vorgehen, es besteht immer die Möglichkeit, dass Bakterien oder Pilze zunächst in geringer Zahl in der endgültigen Lösung vorhanden sind. Dies mag kein Problem sein, wenn die Lösung sofort verwendet werden soll, es kann aber ein Problem sein, wenn die Lösung über einen längeren Zeitraum gelagert wird.

- Die Lagerung von Lösungen bei niedrigen Temperaturen hemmt oder verlangsamt das Bakterienwachstum. Eine Lösung, die regelmäßig verwendet wird, sollte im Kühlschrank (4–8 °C) aufbewahrt und dann vor der Verwendung auf die erforderliche Betriebstemperatur erwärmt werden. Lösungsvorräte können eingefroren (–25 °C) in praktischen Anteilen gelagert werden, die dann aufgetaut und vor der Verwendung auf die erforderliche Betriebstemperatur erwärmt werden.
- Eine konzentrierte Stammlösung (z. B. 10fach konzentriert) kann dazu beitragen, das Wachstum von Bakterien oder Pilzen zu verhindern (oder zu stoppen). Aus der Stammlösung können Verdünnungen hergestellt werden (siehe Abschnitt 1.5), die weniger Lagerplatz beanspruchen.
- Wenn das Reagens hitzestabil ist, kann die vorbereitete Lösung in einen geeigneten Behälter gegeben und unter Druck im Autoklav auf 120 °C erhitzt werden. Lassen Sie die Lösung vor der Lagerung abkühlen.
- Alternativ kann die Lösung vor der Lagerung durch einen Filter mit einer Porengröße (0,2 oder 0,45 µm Porendurchmesser) geleitet werden, die klein genug ist, um kleine Partikel und Bakterien abzufangen. Viele Bakterien haben einen Durchmesser von etwa 0,5 µm (500 nm).
- Ein anderer Ansatz ist die Anwendung aseptischer Techniken zur Herstellung der Lösung in einem gefilterten Luftstrom (siehe Kapitel 8 für weitere Informationen).
- Es können verschiedene Kombinationen der oben genannten Verfahren erforderlich sein.

Die Berechnung der Menge, die zur Herstellung eines Liters einer einmolaren Lösung eines beliebigen Reagens erforderlich ist, ist relativ einfach. Sie können die relative Molekülmasse (M_r) des Reagens auf der Reagensflasche oder aus einer Referenzquelle ermitteln, die benötigte Menge genau abwiegen, den Feststoff in ein geeignetes Becherglas (oder Gefäß) geben und dann das hochwertigste verfügbare Wasser¹ zunächst bis zu einem Volumen von weniger als 1.000 ml zugeben, um das Reagens zu lösen (siehe Arbeitsbeispiel 1.1).

Um die richtige Endkonzentration zu erreichen, muss das Reagens vollständig gelöst werden. Üblicherweise wird ein Magnetrührstab („Floh“) in die Lösung im Becherglas gegeben und dieses dann auf einen Magnetrührer gestellt. Lassen Sie das Gerät langsam rühren und warten Sie, bis sich das Reagens gelöst hat (siehe Abb. 1.3). Schwer lösliche Reagenzien erfordern möglicherweise Wärmezufuhr. Hierfür können Heizplattenrührer in Verbindung mit einem Becherglas verwendet werden (denken Sie an die entsprechenden Sicherheitsvorkehrungen). Alternativ kann ein Mikrowellengerät verwendet werden, um die Temperatur der Flüssigkeit leicht zu erhöhen, wobei darauf zu achten ist, dass der Behälter mikrowellengeeignet ist. In jedem Fall sollte ein Kochen des Wassers mit dem Reagens vermieden werden. Ultraschallbäder können ebenfalls verwendet werden, um Feststoffe schnell in einer Lösung zu dispergieren, aber denken Sie daran, dass eine längere Verwendung dieser Bäder schließlich die Temperatur der Lösung erhöht. Ein Temperaturanstieg kann gemindert werden, indem Eis in die Flüssigkeit des Ultraschallbads gegeben wird.

Wenn der pH-Wert des Reagens eingestellt werden muss (siehe Abschnitt 1.7.1), sollte die Lösung zunächst auf die Temperatur abgekühlt werden, bei der sie verwendet wird (der Grund dafür ist, dass einige Reagenzien bei verschiedenen Temperaturen einen anderen pH-Wert aufweisen, z. B. TRIS/HCl-Puffer). Der pH-Wert kann durch Zugabe einer geeigneten Säure oder Base eingestellt werden (siehe Abb. 1.7), bevor die Lösung in einen Messkolben gegeben wird (siehe Abb. 1.3a).

1.4.1 Herstellung von Lösungen mit einer Konzentration von weniger als 1,0 M und einem Volumen von weniger als einem Liter

Da die Konzentration von Metaboliten in der Zelle selten im molaren Bereich liegt, sind aus Gründen der Bequemlichkeit und der Kostenersparnis häufig weniger konzentrierte Lösungen erforderlich. Diese Berechnungen führen bei vielen Studenten zu einer Vielzahl von Fehlern, aber wenn Sie die Berechnung in ihre Bestandteile zerlegen und üben, wird die Berechnung zu einer Routine (siehe Arbeitsbeispiel 1.2). Dies mag wie ein simpler Tipp für Studienanfänger erscheinen, aber man macht bei diesen Berechnungen leicht einen Fehler. Wenn Sie sich jedoch an diese Methode halten, können Sie Fehler vermeiden.

Manchmal sind auch weniger konzentrierte Lösungen erforderlich. Die oben beschriebene Berechnungsweise kann auch für diese weniger konzentrierten Lösungen angewendet werden.

Arbeitsbeispiel 1.1**Herstellen einer einmolaren Lösung NaCl**

- Eine einmolare (1,0 M) Lösung NaCl enthält 54,5 g NaCl in 1.000 ml.
- Wiegen Sie 54,5 g NaCl in einem 1.000 ml Becherglas auf einer Präzisionswaage ab.
- Fügen Sie 750 ml destilliertes Wasser hinzu, um das NaCl zu lösen. Dies kann durch Verwendung eines Rührfisches und anschließendes Aufsetzen des Becherglases auf einen Magnetrührer erleichtert werden.
- Wenn sich der Feststoff gelöst hat, wird die Flüssigkeit in einen 1000-ml-Messkolben umgefüllt. Messkolben verfügen über eine Markierung am Gefäßhals, so dass das richtige Volumen erreicht wird, wenn der Flüssigkeitsmeniskus diese Markierung berührt.
- Geben Sie destilliertes Wasser in den Kolben, bis sich der Flüssigkeitsmeniskus an der Markierung am Hals des Messkolbens befindet.
- Setzen Sie einen Stopfen auf und schwenken Sie den Kolben 5–10 Mal, um die Flüssigkeit zu mischen.
- Füllen Sie die Flüssigkeit im Messkolben in eine Vorratsflasche/einen Vorratskolben um. Beschriften Sie diese mit (i) dem Namen des Reagens, (ii) der Molarität, (iii) dem pH-Wert, (iv) besonderen Gesundheits- und Sicherheitsvorkehrungen (z. B. ätzend oder giftig), (v) dem Datum der Zubereitung und (vi) Ihrem eigenen Namen und Kurs.
- Bewahren Sie die Flüssigkeit im Kühlschrank, im Gefrierfach oder bei Raumtemperatur auf.

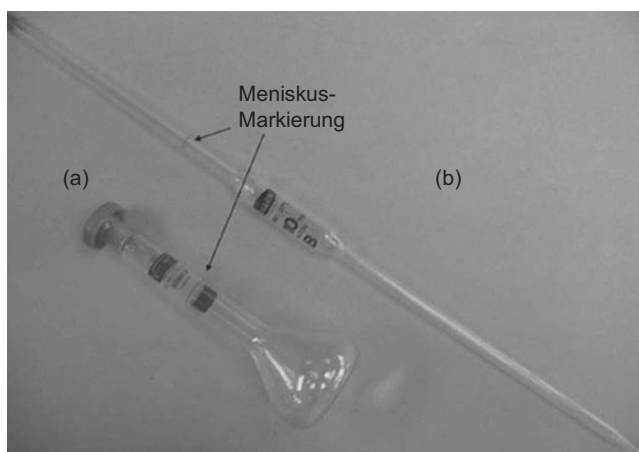


Abb. 1.3 Messkolben (a) und Pipetten (b).

Arbeitsbeispiel 1.2**Herstellen einer 25-ml-Lösung von Adenosintriphosphat (ATP) mit einer Endkonzentration von 50 mM**

- Schreiben Sie auf, welches ATP-Gewicht für eine einmolare Lösung benötigt wird: Eine Masse von 551,14 g ATP-Dinatriumsalzhydrat muss abgewogen und in 1,0 l (1.000 ml) gelöst werden, um eine einmolare Lösung herzustellen. Bei teuren Reagenzien ist dies natürlich eine unerschwingliche Menge.
- Passen Sie das benötigte Volumen an.

Wir wollen nicht 1.000 ml (1,0 l), da wir nur 25 ml benötigen (1,0 ml sind 10^{-3} von 1,0 l). Dividieren Sie also die Mr von ATP durch 1.000, um 1,0 ml zu erhalten, und multiplizieren Sie dann mit 25, um das benötigte Volumen (25 ml) zu erhalten. Dies ist nun das Gewicht ATP in Gramm, das benötigt wird, um 25 ml einer einmolaren Lösung herzustellen.

$$\frac{551,14 \times 25}{1000} = 13,78 \text{ g} \quad (\text{A})$$

Sie stellen eine Lösung her, für die ein kleineres Volumen als ein Liter erforderlich ist. Prüfen Sie daher immer, dass das berechnete Gewicht kleiner als die Mr des benötigten Reagens ist. *Passen Sie die Konzentration an.*

Wir wollen nicht 25 ml einer einmolaren Lösung, sondern eine Endkonzentration von 50 mM (1,0 mM ist $1,0 \times 10^{-3}$ von 1,0 M). Dividieren Sie also das oben berechnete ATP-Gewicht (A) durch 1.000, um 1,0 mM zu erhalten, und multiplizieren Sie dann mit 50, um die erforderliche Molarität zu erhalten.

$$\frac{13,78 \times 50}{1000} = 0,69 \text{ g} \quad (\text{B})$$

Dies ist das Gewicht (0,69 g) ATP, das benötigt wird, um 25 ml einer 50 mM-Lösung herzustellen.

Mit dieser Methode ist es möglich, die für eine beliebige Konzentration oder ein beliebiges Volumen erforderliche Reagenismenge in Gramm korrekt zu berechnen.

1.4.2 Herstellen von molaren Flüssigkeitslösungen

Ähnlich wie bei festen Substanzen können molare Lösungen von Flüssigkeiten hergestellt werden, indem man die benötigte Flüssigkeitsmenge in Gramm in einem Becherglas auf einer Waage abwägt, bevor man Wasser hinzufügt. Um zum Beispiel 1,0 M Ethanol (Mr: 46,07) herzustellen, wird ein Becherglas auf eine Waage gestellt und das Ethanol in das Becherglas pipettiert, bis die Anzeige 46,07 g anzeigt. Das Becherglas kann von der Waage genommen und Wasser hinzugefügt werden,

Arbeitsbeispiel 1.3**Herstellen einer 50-ml-Lösung ATP mit einer Endkonzentration von 750 Mm**

- Schreiben Sie auf, welches ATP-Gewicht für eine einmolare Lösung benötigt wird. Eine Masse von 551,14 g ATP muss abgewogen und in 1,0 l (1.000 ml) gelöst werden, um eine einmolare Lösung herzustellen.
- Passen Sie das benötigte Volumen an.

Wir brauchen keine 1.000 ml (1,0 l) herzustellen, da wir nur 50 ml benötigen (1,0 ml sind $1,0 \times 10^{-3}$ von 1,0 l). Dividieren Sie also die Mr von ATP durch 1.000, um 1,0 ml zu erhalten, und multiplizieren Sie dann mit 50, um das erforderliche Volumen zu erhalten. Dies ist nun das Gewicht in Gramm ATP, das benötigt wird, um 50 ml einer einmolaren Lösung herzustellen.

$$\frac{551,14 \times 50}{1000} = 27,56 \text{ g} \quad (\text{A})$$

Wenn Sie wie im Beispiel oben eine Lösung herstellen, für die ein kleineres Volumen als ein Liter benötigt wird, überprüfen Sie immer, ob das berechnete Gewicht geringer ist als die Mr des benötigten Reagens. *Führen Sie eine Anpassung auf die Konzentration durch.* Sie benötigen nicht 50 ml einer einmolaren Lösung, sondern eine Endkonzentration von 750 Mm (1,0 Mm ist $1,0 \times 10^{-6}$ von 1,0 M). Dividieren Sie also das oben berechnete ATP-Gewicht (A) durch 1.000.000, um 1,0 Mm zu erhalten, und multiplizieren Sie dann mit 750, um das Gewicht zu berechnen, das für die erforderliche Molarität benötigt wird.

$$\frac{27,56 \times 750}{1000 \times 1000} = 0,02 \text{ g} \quad (\text{B})$$

Dies ist das Gewicht (0,02 g) ATP, das benötigt wird, um 50 ml einer 750 Mm Lösung herzustellen.

um das Volumen auf 1.000 ml zu erhöhen. Die Ethanollösung ist nun einmolar. Es ist nicht das gleiche, wenn man 46,0 ml Ethanol nimmt und das Volumen auf 1.000 ml erhöht, um eine einmolare Ethanollösung herzustellen, da Ethanol eine andere Dichte hat als Wasser. Flüssigkeiten haben eine Dichte, die relativ zur Dichte von Wasser ($1,0 \text{ g ml}^{-1}$) ist; Ethanol gehört zu den Flüssigkeiten mit einer geringeren Dichte als Wasser ($0,78 \text{ g ml}^{-1}$) und Glycerin zu den Flüssigkeiten mit einer höheren Dichte als Wasser ($1,26 \text{ g ml}^{-1}$).

Die Dichte (ρ) ist definiert als der Raum zwischen den Molekülen und kann berechnet werden, indem man die Masse (kg oder g) durch das Volumen (1.000 ml) dividiert. Die Dichte steht in keinem Zusammenhang mit der Viskosität (Fließwiderstand), eine Temperaturerhöhung vergrößert jedoch den Raum zwischen den Molekülen, so dass eine Flüssigkeit mit weniger Widerstand fließen kann.

$$\text{Dichte } (\rho) = \frac{\text{Gewicht (g)}}{\text{Volumen (ml)}}$$

Das Volumen Ethanol, das zur Herstellung einer einmolaren Lösung ohne Verwendung einer Waage und unter Berücksichtigung der Dichte von Ethanol ($0,78 \text{ g ml}^{-1}$) erforderlich ist, wird daher wie folgt berechnet:

$$\text{Erforderl. Volumen (ml)} = \frac{\text{Erforderl. Gewicht (g)}}{\text{Dichte (g ml}^{-1}\text{)}} = \frac{46,07 \text{ g}}{0,78 \text{ g ml}^{-1}}$$

= 59,0 ml Ethanol in einen Messkolben geben und das Volumen mit Wasser auf 1.000 ml auffüllen

= 1,0 M Lösung Ethanol.

Im Allgemeinen werden Lösungsmittel üblicherweise als prozentuale Lösungen verwendet (siehe unten).

1.4.3 Herstellen von prozentualen Lösungen

Sowohl in der Chemie als auch in den Biowissenschaften werden üblicherweise prozentuale Volumen/Volumen-Lösungen (v/v) und Gewichts/Volumen-Lösungen (w/v) verwendet, insbesondere in der Chromatographie (siehe Kapitel 7) und für Zellkulturen (siehe Kapitel 8).

Eine prozentuale Lösung bedeutet, dass pro 100 ml Flüssigkeit eine Reagenzmenge in Gramm gelöst wird. Wenn die prozentuale Einheit (w/v) lautet, handelt es sich um das Gewicht eines Reagens in einem Volumen von 100 ml (w/v) (z. B. 0,9 % w/v NaCl, das in phosphatgepufferter Salzlösung, abgekürzt PBS, verwendet wird).

Wenn also 100 ml dieser Lösung benötigt werden, wird sie durch Abwiegen von 0,9 g NaCl in einem geeigneten Gefäß hergestellt. Ein Volumen von weniger als 100 ml Wasser wird hinzugefügt und das NaCl gelöst. Wenn sich das NaCl gelöst hat, kann die Lösung auf 100 ml aufgefüllt werden, um die endgültige prozentuale Lösung von 0,9 % (w/v) NaCl zu erhalten.

Wird ein anderes Endvolumen benötigt, so sind sowohl die Menge des Reagens als auch das Volumen entsprechend anzupassen (siehe Arbeitsbeispiel 1.4).

Flüssigkeiten können auch eingewogen werden, um ein Gewicht in einer Volumenlösung zu erhalten, z. B. 2 % (w/v) Glycerin. Wenn 100 ml 2-prozentiges Glycerin (w/v) benötigt werden, werden 2,0 g des flüssigen Glycerins in ein Becherglas eingewogen und Wasser bis zu einem Volumen von weniger als 100 ml hinzugefügt. Wenn sich das Glycerin gelöst hat, kann das Volumen auf 100 ml aufgefüllt werden.

Flüssigkeiten werden jedoch häufig als Volumen in einer Volumenkonzentration (v/v) hergestellt (z. B. 5 % [v/v] Methanol, das in der Chromatographie verwendet wird, siehe Kapitel 7). Wenn 100 ml einer 10-prozentigen Methanollösung (v/v) benötigt werden, werden 10,0 ml Methanol abgemessen und mit destilliertem

Arbeitsbeispiel 1.4**Herstellen von prozentualen Lösungen**

- Stellen Sie 25 ml 0,9 % (w/v) NaCl her.

Um die benötigte Menge für 1,0 ml zu erhalten, dividieren Sie durch 100. Multiplizieren dann mit 25, um die benötigte Menge für 25 ml zu erhalten.

$$= \frac{0,9 \times 25 \text{ g}}{100} = 0,225 \text{ g}$$

Lösen Sie diese Menge Reagens in einem Volumen von weniger als 25,0 ml; wenn sich das NaCl gelöst hat, füllen Sie das Volumen auf 25,0 ml auf.

- Stellen Sie 375 ml 0,9 % (w/v) NaCl her.

Um die benötigte Menge für 1,0 ml zu erhalten, dividieren Sie durch 100 und multiplizieren dann mit 375, um die benötigte Menge für 375 ml zu erhalten.

$$= \frac{0,9 \times 375 \text{ g}}{100} = 3,375 \text{ g}$$

Lösen Sie diese Menge NaCl in einem Volumen von weniger als 375,0 ml; wenn sich das Reagenz gelöst hat, füllen Sie das Volumen auf 375,0 ml auf.

Wasser auf 100 ml aufgefüllt. Kleinere Mengen desselben Prozentsatzes können hergestellt werden, indem die Volumen der beiden Flüssigkeiten proportional angepasst werden.

1.4.3.1 Einwiegen in Volumen-Lösungen (w/v)

Einige in den Biowissenschaften häufig anzutreffende Stoffe, z. B. Proteine und Nukleinsäuren, werden üblicherweise als Gewicht in einem angegebenen Volumen gelöst, z. B. 1,0 mg ml⁻¹ (dies kann auch in mg/ml angegeben werden). Der Grund dafür ist, dass Lösungen von Proteinen eine heterogene Population verschiedener Moleküle sein können, was die Berechnung von molaren Konzentrationen sinnlos macht. Außerdem werden die Konzentrationen von Proteinen aus Zellextrakten üblicherweise mit Hilfe von Reagenzien geschätzt, die mit Proteinen wechselwirken und ein gefärbtes Produkt erzeugen (siehe Kapitel 3, Abschnitt 3.8).

1.5 Verdünnungen und die Verwendung von Pipetten

In Abschnitt 1.4 wurde als bequeme Methode zur Herstellung von Lösungen unterschiedlicher Konzentrationen vorgeschlagen, zunächst eine konzentrierte Stammlösung herzustellen und dann von dieser konzentrierten Lösung auf die gewünschte Konzentration und das gewünschte Volumen zu verdünnen. Die Fähigkeit, genaue

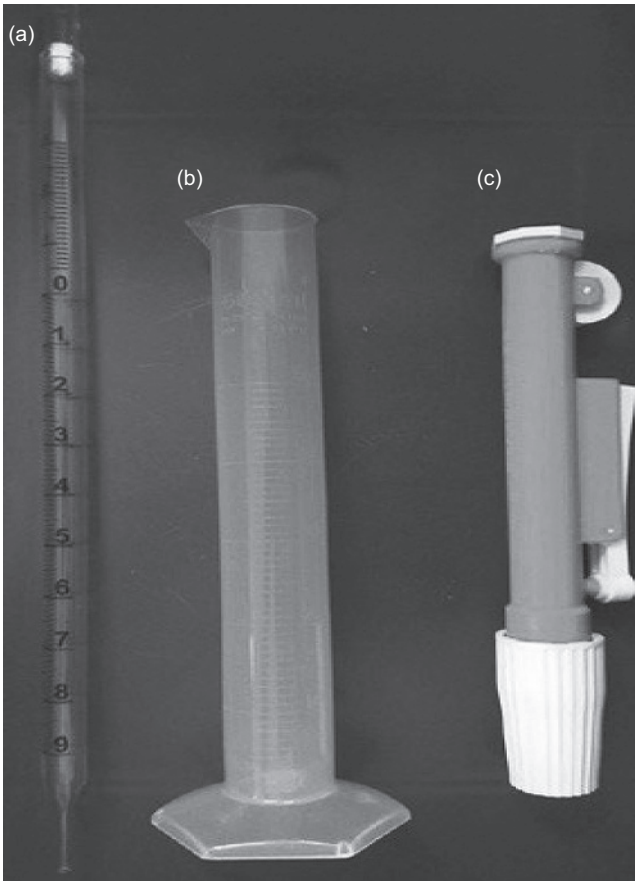


Abb. 1.4 Beispiel für (a) eine Pipette mit Skala, (b) einen Messzylinder und (c) eine Pipettierhilfe.

Verdünnungen herzustellen, ist in der biowissenschaftlichen Forschung wichtig (siehe auch Kapitel 2 und 8).

Großvolumige Verdünnungen können mit einem Messzylinder hergestellt werden (siehe Abb. 1.4b), aber für genaue Verdünnungen muss eine kalibrierte Pipette verwendet werden. Volumetrische Glaspipetten (siehe Abb. 1.3b) oder zylindrische Glas-/Kunststoffpipetten mit Skala (siehe Abb. 1.4a) werden immer noch verwendet, sind aber vor allem aus Gründen des Gesundheitsschutzes sowie der Sicherheit, Genauigkeit und Benutzerfreundlichkeit durch die Verwendung mechanischer (oder elektronischer) Mikropipetten (siehe Abb. 1.5) ersetzt worden. Alle Pipetten funktionieren, indem sie in einem Flüssigkeitsvorratsbehälter ein Vakuum über der zu dosierenden Flüssigkeit erzeugen. Die Flüssigkeit wird durch vorsichtiges Aufheben des Vakuums dosiert.



Abb. 1.5 Beispiel für vier häufig eingesetzte Laborpipetten.

UNBEDINGT MERKEN 1.1

- Eine Verdünnung bedeutet, dass die Konzentration der endgültigen Arbeitslösung *niedriger* ist als die Konzentration der Stammlösung. Wenn Ihre Berechnung einen Wert ergibt, der eine höhere Konzentration als die der Stammlösung hat, müssen Sie die Berechnung wiederholen. Es ist auch wichtig, dass die Einheiten für Volumen und Konzentration (siehe Tab. 1.1) auf beiden Seiten der Gleichung gleich sind.
- Eine 1:10-Verdünnung (1:10) ist 1 Teil in einem Endvolumen von 10 (nicht 1 Teil hinzugefügt zu 10 Teilen).

1.5.1 Verwendung von zylindrischen Glas- oder Kunststoffpipetten mit Skala

Wenn eine zylindrische Glas- oder Kunststoffpipette mit Skala benötigt wird, um eine Verdünnung aus einer Stammlösung herzustellen:

- Ziehen Sie *niemals* mit dem Mund Flüssigkeit in die Pipette!!
- Vergewissern Sie sich, dass die Pipette sauber ist und an beiden Enden keine Beschädigungen aufweist.
- *Halten Sie die Pipette am oberen Ende* und setzen Sie sie in die Öffnung eines Pipettenfüllers ein, so dass sie fest sitzt (siehe Abb. 1.4c oder Abb. 8.1). Versuchen Sie nicht, die Pipette mit Gewalt in den Füller zu schieben; wenn der Füller und die Pipette nicht gut passen, tauschen Sie den Pipettenfüller gegen einen neuen aus.
- Ziehen Sie die Flüssigkeit bis zu dem vom Hersteller empfohlenen Niveau in den zylindrischen Behälter ein. Halten Sie die Pipette über die Stammlösung und prüfen Sie, ob Flüssigkeit aus der Pipette tropft. Wenn Flüssigkeit aus der Pipette tropft, ersetzen Sie die Pipette (oder den Pipettenfüller und/oder beides).
- Füllen Sie die Stammlösung in ein geeignetes Gefäß.
- Legen Sie die gebrauchte Pipette zum Reinigen in eine geeignete Schale.

1.5.2 Verwendung von Handmikropipetten

Mikropipetten werden in biowissenschaftlichen Laboren routinemäßig verwendet. Obwohl es viele verschiedene Hersteller von Handmikropipetten gibt, ist das letztendliche Design grundsätzlich ähnlich (siehe Abb. 1.5).

- Mikropipetten sind nur in dem vom Hersteller angegebenen Volumenbereich genau (z. B. 100–1.000 μl oder 0,1–1,0 ml). Dieser Bereich ist normalerweise auf der Seite und der Oberseite der Pipette angegeben. Überprüfen Sie daher, ob die Pipette den erforderlichen Bereich abdeckt. Ist dies nicht der Fall, nehmen Sie eine andere Pipette.
- Stellen Sie das Volumen an der Pipette auf das gewünschte Volumen ein (1,0 ml entsprechen 1.000 μl – siehe Tab. 1.1). Verwenden Sie keine Einstellung, die über den vorgesehenen Pipettenbereich hinausgeht.
- Ziehen Sie einen Handschuh an und halten Sie mit dieser Hand eine geeignete Spitze am oberen (breiteren) Kunststoffende und setzen Sie sie auf das aufnehmende Ende der Mikropipette (Hinweis: Für Pipetten mit unterschiedlichen Volumenbereichen sind unterschiedliche Spitzen erforderlich. Bitte überprüfen Sie dies, wenn Sie nicht sicher sind). Alternativ können Pipettenspitzen auch gekauft oder vorbereitet werden, wobei alle Spitzen in einer Schachtel mit dem offenen Ende zum Bediener hin angeordnet sind. Stecken Sie in diesem Fall das aufnehmende Ende der Pipette in das offene Ende einer Spitze, üben Sie Druck aus, damit die Spitze in der Pipette einrastet, ziehen Sie die Spitze dann zurück und verwenden Sie sie.
- Bevor Sie die Flüssigkeit aufziehen, halten Sie die Pipette in der Hand und drücken Sie den Kolben mit dem Daumen nach unten.

Beachten Sie, dass es zwei Anschläge gibt, bis zu denen der Kolben heruntergedrückt werden kann. Durch Aufziehen vom ersten Anschlag wird das erforderliche Flüssigkeitsvolumen in die Pipettenspitze aufgenommen und durch Drücken bis

zum zweiten Anschlag werden alle Flüssigkeitsreste aus der Pipettenspitze herausgedrückt.

- Setzen Sie die Pipettenspitze auf das Ende der Mikropipette und drücken Sie den Kolben bis zum ersten Anschlag; tauchen Sie die Spitze in die Flüssigkeit ein und lassen Sie den Kolben langsam in die Ausgangsposition zurückkehren. Überprüfen Sie, dass keine Luftblasen in die Spitze gezogen werden. Befindet sich eine Luftblase in der Spitze, geben Sie die Flüssigkeit zurück in die Stammlösung und beginnen Sie erneut. Lösungen, die Proteine und/oder Detergenzien enthalten, neigen zur Schaumbildung, und es muss darauf geachtet werden, dass keine Luftblasen entstehen. Trotz aller Sorgfalt kann es vorkommen, dass sich eine Luftblase bildet. In diesem Fall ist es am besten, die Pipettenspitze wegzuerwerfen und erneut zu beginnen.
- Das Pipettieren von Lösungsmitteln kann mühsam sein, weil nach der Aufnahme der Flüssigkeit in die Pipettenspitze das Lösungsmittel aus der Spitze auslaufen kann. Ein einfaches Verfahren, um dies zu verhindern, ist, das Lösungsmittel in die Spitze zu geben und die Flüssigkeit wegzuschütten. Bei der nächsten Betätigung der Pipette wird das Lösungsmittel in die Pipettenspitze aufgenommen und es tropft keine Flüssigkeit ans der Spitze.
- Bewegen Sie die Pipette zum Dosierbehälter, drücken Sie den Kolben zunächst bis zum ersten Anschlag und dann bis zum zweiten Anschlag.
- Die Pipettenspitze kann dann entfernt (die meisten Mikropipetten haben eine mechanische Vorrichtung zum Entfernen der Spitze) und gemäß den Gesundheits- und Sicherheitsvorschriften entsorgt werden.
- Die Fähigkeit, genau zu pipettieren, kann mit einem leeren Becherglas auf einer Waage und etwas destilliertem Wasser geübt werden. Stellen Sie die Pipette auf ein bestimmtes Volumen ein und dosieren Sie Wasser in das Becherglas auf der Waage. Notieren Sie das Gewicht bei jeder Zugabe und ermitteln Sie nach zehn Zugaben das Durchschnittsgewicht und die Standardabweichung (siehe Kapitel 4). Das Durchschnittsgewicht sollte mit der Einstellung der Pipette übereinstimmen, wodurch die Genauigkeit der Pipette angezeigt wird, und die Standardabweichung zeigt Ihnen, wie gut Sie das gleiche Volumen dosieren können. Wenn Pipetten ungenau zu sein scheinen, können sie oft anhand der Richtlinien des Herstellers auf die richtige Kalibrierung eingestellt werden. Wiederholen Sie das Abwiegen des Wassers, bis die Pipette das richtige Volumen dosiert.

UNBEDINGT MERKEN 1.2

- Ein Volumen von 0,1 ml Wasser wiegt 0,1 g (100 mg).
- Ein Volumen von 1,0 ml Wasser wiegt 1,0 g.
- Ein Volumen von 1.000 ml wiegt 1,0 kg.

1.5.3 Verdünnung aus einer Stammlösung

Zur Berechnung von Verdünnungen aus einer Stammlösung kann eine bequeme Formel verwendet werden, wobei zu beachten ist, dass alle Einheiten auf beiden Seiten der Gleichung gleich sein müssen. Das heißt, dass alle Einheiten sowohl des Volumens (z. B. ml, μ l, nl) als auch der Konzentration (z. B. M, mM, μ M oder nM) denselben Wert haben müssen (siehe Arbeitsbeispiele 1.5 und 1.6).

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

Anfangskonzentration (C_1) \times Anfangsvolumen (V_1) = Endkonzentration (C_2) \times Endvolumen (V_2)

Arbeitsbeispiel 1.5

- Sie verfügen über eine einmolare Stammlösung von Pyruvat.

Welches Volumen der einmolaren Pyruvat-Stammlösung wird benötigt, wenn Sie 5 ml einer 25 mM Lösung herstellen wollen?

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

$$1.000 \times V_1 = 5 \times 25 \text{ (ml)}$$

$$V_1 = 5 \times 25 / 1.000 \text{ (ml)}$$

$$V_1 = 0,125 \text{ ml oder } 125 \mu\text{l}$$

Antwort: Nehmen Sie 0,125 ml der einmolaren Stammlösung und füllen Sie diese auf 5,0 ml auf, um eine 25 mM Lösung zu erhalten.

- Sie verfügen über eine 25 mM Stammlösung L-Lysin.

Welches Volumen der 25 mM L-Lysin-Stammlösung wird benötigt, wenn Sie 0,75 ml (750 μ l) einer 500 μ M Lösung herstellen wollen?

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

Alle Einheiten in 1×10^{-6} (Mikro) umrechnen (siehe Tab. 1.1)

$$25.000 \times V_1 = 500 \times 750 \quad \text{Anmerkung: } C_1 \text{ ist 25 mM oder 25.000 M (siehe Tab. 1.1)}$$

$$V_1 = 500 \times 750 / 25.000$$

$$V_1 = 375.000 / 25.000 = 15 \mu\text{l}$$

Die Antwort lautet 15 μ l oder 0,015 ml, die der Stammlösung entnommen und auf 0,75 ml aufgefüllt werden sollten.

1.6 Wasser, Säuren und Basen

Die lebende Materie besteht zu etwa 70 % aus Wasser. Viele seiner Eigenschaften, einschließlich der Bildung von Wasserstoffbrückenbindungen und der Fähigkeit zur Ionisierung, sind für die korrekte Struktur und die Eigenschaften vieler biologischer Moleküle von grundlegender Bedeutung. Das Verständnis der Eigenschaften von Wasser und seiner Wechselwirkungen mit anderen Molekülen ist für das Verständnis vieler Themen in den Biowissenschaften von grundlegender Bedeutung.

Die Struktur von Wasser bedingt, dass es im Molekül elektronenreiche Bereiche (angereicherte negative Ladung) und elektronenarme Bereiche (angereicherte positive Ladung) gibt, Ladungsdipol genannt. Dieser Ladungsdipol ist permanent und trägt zu vielen Eigenschaften des Wassers bei, da der positive Dipol eines Wassermoleküls mit dem negativen Dipol anderer Wassermoleküle in Wechselwirkung treten kann (siehe Abb. 1.6a), wodurch ein Netz von Wechselwirkungen entsteht, das als Wasserstoffbrückenbindungen (H-Brücken) bezeichnet wird. In Wasser sind die meisten Moleküle an Wasserstoffbrückenbindungen mit ihren nächsten Nachbarn beteiligt, und jede Bindung dauert zwischen 1 und 20 Pikosekunden ($1 \text{ Piko- sekunde} = 10^{-12} \text{ s}$), bevor die Bindung neu gebildet wird oder eine neue Bindung mit einem benachbarten Wassermolekül entsteht. Wasserstoffbrückenbindungen sind relativ schwache Bindungen (die *Bindungsdissoziationsenergie* ist mit 23 kJ mol^{-1} gering), wenn man sie mit einigen kovalenten Bindungen vergleicht (470 kJ mol^{-1} zum Brechen der kovalenten O–H-Bindung oder 348 kJ mol^{-1} zum Brechen einer kovalenten C=C-Bindung). Dies zeigt sich auch in dem größeren Bindungsabstand der Wasserstoffbrückenbindung im Vergleich zu einer kovalenten Bindung (siehe Abb. 1.6a). Das bedeutet, dass mit steigender Temperatur (und damit steigender verfügbarer Wärmeenergie) der Anteil der Wasserstoffbrückenbindungen abnimmt. In Eis bilden H_2O -Moleküle vier Wasserstoffbrückenbindungen mit anderen H_2O -Molekülen, um ein Niedrigtemperatur-Kristallgitter zu bilden. Die erhöhte Temperatur von flüssigem Wasser führt zu einer Zunahme der zufälligen Bewegung (Entropie) der H_2O -Moleküle, und jedes Molekül geht Wasserstoffbrückenbindungen mit nur 3,4 Wassermolekülen ein.

UNBEDINGT MERKEN 1.3

- Wasserstoffbrückenbindungen sind wichtige schwache Bindungen, die dazu beitragen, die Strukturen von Proteinen und Nukleinsäuren zusammenzuhalten. In den meisten Fällen werden die Wasserstoffbrückenbindungen in makromolekularen Strukturen durch erhöhte Temperaturen (z. B. $> 37^\circ \text{C}$) geschwächt, so dass sich die Struktur auflöst und denaturiert wird.

- Wasserstoffbrückenbindungen können in biologischen Systemen auch zwischen anderen Molekülen als Wasser gebildet werden. Der Dipol an elektronenreichen Atomen wie Sauerstoff und Stickstoff (relativ negativ und somit ein Wasserstoffbrückenbindungsakzeptor) und der Dipol am Wasserstoff, der an Sauerstoff oder Stickstoff gebunden ist (relativ positiv und somit ein Wasserstoffbrückendonator), können wechselwirken, wenn sie sich im richtigen Abstand zur Bindungsbildung befinden.

1.6.1 Wasser als Lösungsmittel

Wasser ist ein polares Lösungsmittel, weil der Dipol der Wassermoleküle es ermöglicht, mit sich selbst und anderen geladenen (*polaren*) Molekülen in Wechselwirkung zu treten, so dass sie (*hydrophile*) Stoffe lösen können (siehe Abb. 1.6b). Im Gegensatz dazu können unpolare (*hydrophobe*) Moleküle nicht mit Wasser in Wechselwirkung treten; in Gegenwart von Wasser neigen unpolare Moleküle dazu, sich zu Gruppen zusammenzuschließen. Die Wassermoleküle, die die unpolaren Moleküle umgeben, bilden Käfigstrukturen (*Clathrate*) (siehe Abb. 1.6c).

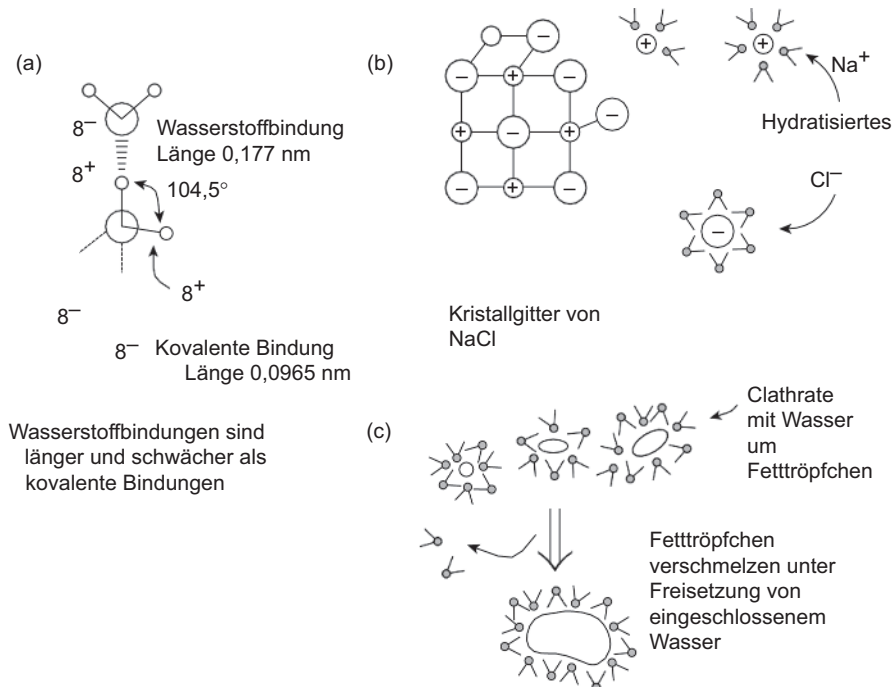


Abb. 1.6 Die Struktur von Wasser (a) trägt zu seiner Fähigkeit bei, ionische Bindungen (b) zu lösen, nicht aber nichtionische Bindungen (c).

1.6.2 Ionisierung von Wasser

Auf eine Milliarde Wassermoleküle (10⁹) kommen etwa zwei Moleküle, die bei Raumtemperatur ionisieren. Dies ist zwar ein geringer Ionisierungsgrad, stellt aber dennoch eine weitere wichtige Eigenschaft von Wasser dar.

Wasser ionisiert in ein positiv geladenes Wasserstoffion $[H^+]$ * und ein negativ geladenes Hydroxydion $[OH^-]**$.



Alle Reaktionen können ein Gleichgewicht erreichen, bei dem die Dissoziationsrate gleich der Assoziationsrate ist. Die Gleichgewichtskonstante für Wasser K_{eq} bei 25 °C ergibt sich durch die Gleichung:

$$K_{eq} \rightleftharpoons \frac{[H^+] + [OH^-]}{H_2O} \quad (1.1)$$

In reinem Wasser beträgt die molare Konzentration von Wasser 55,5 M (Gewicht von 1,0 l Wasser [d. h. 1.000 g] durch die relative Molekülmasse von Wasser dividieren; $M_r = 18$), und die K_{eq} für Wasser wurde experimentell bestimmt: $1,8 \times 10^{-16}$.

Setzen Sie diese Werte in Gleichung (1.1) ein.

$$1,8 \times 10^{-16} \rightleftharpoons \frac{[H^+] + [OH^-]}{55,5}$$

Das Ionenprodukt von Wasser (K_w) bei 25 °C ist:

$$K_w = [1,8 \times 10^{-16}] [55,5] = [H^+] [OH^-]$$

$$K_w = 1 \times 10^{-14} \text{ M}$$

Das Ionenprodukt von Wasser (K_w) ist immer gleich 1×10^{-14} M. Wenn die Konzentration von $[H^+]$ gleich der Konzentration von $[OH^-]$ ist, hat die Lösung den neutralen pH-Wert (7,0).²

Dieser Wert kann berechnet werden, wenn die Konzentration von $[H^+]$ gleich der Konzentration von $[OH^-]$ ist.

$$K_w = [H^+] [OH^-] = [H^+]^2$$

Dies nach $[H^+]$ auflösen:

$$\begin{aligned} [H^+] &= \sqrt{K_w} = \sqrt{1 \times 10^{-14}} \\ &= 1 \times 10^{-7} \end{aligned}$$

Das Ionenprodukt von Wasser ist konstant. Das bedeutet, dass, wenn die Konzentration von $[H^+]$ hoch ist, die Konzentration von $[OH^-]$ entsprechend abnimmt.

Das Ionenprodukt von Wasser (K_w) ist die Grundlage der pH-Skala, die die molare Konzentration von $[H^+]$ in der Lösung angibt.

$$\text{pH} = -\log_{10} [H^+]$$

Tab. 1.2 Skala des pH-Werts.

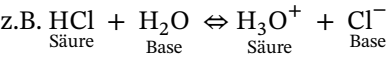
[H ⁺] (M)	pH	[OH ⁻] (M)
10 ⁰ (1,0)	0,0	10 ⁻¹⁴ (0,000000000000001)
10 ⁻¹ (0,1)	1,0	10 ⁻¹³ (0,000000000000001)
10 ⁻² (0,01)	2,0	10 ⁻¹² (0,00000000000001)
10 ⁻³ (0,001)	3,0	10 ⁻¹¹ (0,0000000000001)
10 ⁻⁴ (0,0001)	4,0	10 ⁻¹⁰ (0,000000000001)
10 ⁻⁵ (0,00001)	5,0	10 ⁻⁹ (0,00000000001)
10 ⁻⁶ (0,000001)	6,0	10 ⁻⁸ (0,000000001)
10 ⁻⁷ (0,0000001)	7,0	10 ⁻⁷ (0,0000001)
10 ⁻⁸ (0,00000001)	8,0	10 ⁻⁶ (0,000001)
10 ⁻⁹ (0,000000001)	9,0	10 ⁻⁵ (0,00001)
10 ⁻¹⁰ (0,0000000001)	10,0	10 ⁻⁴ (0,0001)
10 ⁻¹¹ (0,00000000001)	11,0	10 ⁻³ (0,001)
10 ⁻¹² (0,000000000001)	12,0	10 ⁻² (0,01)
10 ⁻¹³ (0,0000000000001)	13,0	10 ⁻¹ (0,1)
10 ⁻¹⁴ (0,00000000000001)	14,0	10 ⁰ (1,0)

Durch Bildung des negativen Logarithmus werden die oben genannten exponentiellen Werte (1×10^{-x}) in lineare arithmetische Zahlen umgewandelt, z. B. ist bei neutralem pH-Wert $[H^+] = 1 \times 10^{-7}$ M, was dem pH-Wert 7,0 entspricht (siehe Tab. 1.2).

Die pH-Skala ist der negative dekadische Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration $[H^+]$. Das bedeutet, dass die Werte für die molare Konzentration von $[H^+]$ mit jeder pH-Zahl um den Faktor 10 und nicht um den Faktor 1 abnehmen.

1.6.3 Säuren und Basen

Die im vorherigen Abschnitt beschriebene pH-Skala ist ein Maß für den Säuregrad einer Lösung und beschreibt die molare Konzentration von $[H^+]$ in der Lösung. Stoffe, die H^+ -Ionen in Lösung abgeben können, werden als Säuren bezeichnet. Im Jahr 1923 stellten die beiden Wissenschaftler Johannes Nicolaus Brønsted (Dänemark) und Thomas Martin Lowry (England) unabhängig voneinander im Wesentlichen dieselbe Theorie zu Säuren und Basen auf. Diese Theorie ist heute als Brønsted-Lowry-Theorie der Säuren und Basen bekannt. Sie besagt, dass eine Säure ein Protonendonator (H^+) und eine Base ein Protonenakzeptor (H^+) ist. Darüber hinaus hat jede Säure eine konjugierte Base und jede Base eine konjugierte Säure.

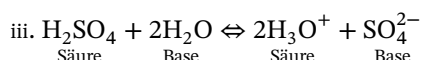
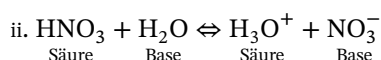
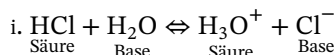


Zur gleichen Zeit schlug ein anderer Wissenschaftler, Gilbert Newton Lewis (USA), vor, dass Säuren als Elektronenpaar-Donatoren (Lewis-Säure) und Basen als Elektronenpaar-Akzeptoren (Lewis-Base) betrachtet werden können.

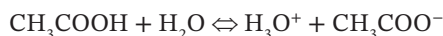
1.6.3.1 Starke und schwache Säuren

Säuren werden oft als „stark“ oder „schwach“ bezeichnet. Dies bezieht sich nicht auf ihre Fähigkeit, andere Stoffe zu lösen, sondern gibt Auskunft über ihre Fähigkeit, in Lösung zu ionisieren und zu dissoziieren.

Eine starke Säure (z. B. Salzsäure (HCl), Salpetersäure (HNO₃) oder Schwefelsäure (H₂SO₄)) ionisiert und dissoziiert bei *allen pH-Werten* in ihre konjugierten Teile Säure und Base.



Im Gegensatz dazu ist der Grad der Ionisierung und Dissoziation von „schwachen Säuren“ abhängig vom pH-Wert der Lösung, in der sie gelöst sind. Essigsäure (CH₃COOH) ist eine bekannte schwache Säure, die in der pH-Skala unterschiedlich stark ionisiert (siehe Abb. 1.7).



Unterhalb von pH 3,0, wenn die [H⁺]-Konzentration hoch ist (siehe Tab. 1.2), wird jeder Verlust von [H⁺] an der Carboxylgruppe der Essigsäure (–COOH) schnell ersetzt. Oberhalb von pH 3,0 (d. h. wenn die [H⁺]-Konzentration in der Lösung rasch abnimmt; siehe Tab. 1.2) kann sich das Proton an der Carboxylgruppe der Essigsäure jedoch abspalten und in Lösung gehen. Dadurch ergeben sich eine negativ geladene Carboxylgruppe an der Essigsäure und ein positiv geladenes Proton in der Lösung.

1.7 Puffer

Viele biologische Stoffe weisen in ihrer Struktur schwach saure Gruppen auf. Infolgedessen variiert die Oberflächenladung des Moleküls je nach dem pH-Wert der Umgebung. Aminosäuren, Proteine, Nukleotide und Nukleinsäuren haben schwache saure Gruppen als Teil ihrer Struktur, und der Grad der Ionisierung dieser Moleküle ist pH-abhängig. Da die Integrität und Funktionalität dieser Moleküle vom pH-Wert abhängt, ist die Aufrechterhaltung dieses optimalen pH-Werts in der Biologie *äußerst wichtig*. Puffer werden von Wissenschaftlern verwendet, um die korrekte Struktur biologischer Moleküle bei In-vitro-Experimenten zu erhalten. Der

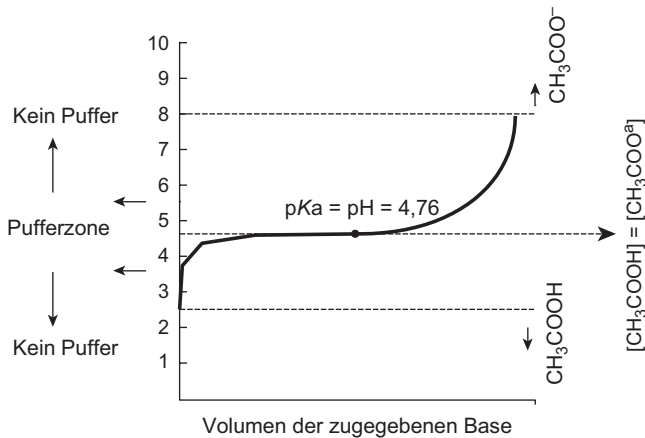


Abb. 1.7 Titrationskurve für Acetatpuffer.

ideale pH-Wert für die maximale Aktivität eines Enzyms kann bestimmt werden, indem das Enzym bei verschiedenen pH-Werten getestet wird. Das pH-Maximum muss nicht unbedingt der zelluläre pH-Wert von 7,4 sein, z. B. ist Transglutaminase 2 ein zelluläres Enzym mit einem pH-Maximum von 8,5. Dies bedeutet nicht, dass das Enzym bei einem physiologischen pH-Wert inaktiv ist, sondern dass es Reaktionen mit etwa 50–70 % seiner maximalen Rate katalysiert.

1.7.1 Herstellung eines Puffers und Verwendung eines pH-Messgeräts

Es gibt viele verschiedene Puffer, die in biowissenschaftlichen Laboren verwendet werden, um den pH-Wert einer Lösung zu erhalten (einige Puffer sind in Tab. 1.3 aufgeführt). Ein Puffer besteht aus einer schwachen Säure und einem ihrer Salze (konjugierte Base) oder einer schwachen Base und einem ihrer Salze (konjugierte Säure). Puffer funktionieren am besten, wenn ein Gleichgewicht zwischen den geladenen und den ungeladenen Spezies besteht (pK_a) (siehe Abb. 1.7 und Abschnitt 1.8). Bei dem pK_a -Wert eines Puffers ist dieser in der Lage, Änderungen der Konzentration von $[H^+]$ -Protonen oder Hydroxylgruppen $[OH^-]$ zu absorbieren, ohne den Gesamt-pH-Wert der Lösung wesentlich zu verändern. Diese Pufferkapazität hat eine Grenze, die bei etwa 1,0 pH-Einheiten auf beiden Seiten des pK_a des Puffers liegt. Liegt der gewünschte pH-Wert am äußersten Rand des pK_a -Werts des Puffers, sollte die Molarität des Puffers erhöht oder ein besser geeigneter Puffer verwendet werden (siehe Tab. 1.3).

- Wenn die gewünschte Molarität des Puffers feststeht, kann das Salz bzw. können die Salze, aus denen der Puffer besteht, abgewogen und in einem Wasservolumen (höchster verfügbarer Reinheitsgrad) gelöst werden, das kleiner ist als das benötigte Endvolumen (siehe Abschnitt 1.4). Alle Zusätze zum Puffer, die zum endgültigen pH-Wert beitragen können (z. B. Ethylendiamintetraessigsäure [EDTA], die

sauer ist), sollten in diesem Stadium gelöst werden, bevor der pH-Wert endgültig festgelegt wird. Wenn sich der Puffer gelöst hat, kann der pH-Wert mit einem pH-Meter eingestellt werden (siehe Abb. 1.8).

- Die Sonde des pH-Meters sollte durch Abspülen mit destilliertem Wasser gereinigt und die Reaktion des Geräts mit Standardpufferlösungen gemäß den Anweisungen des Herstellers kalibriert werden.
- Der pK_a -Wert einiger Puffer kann sich bei Temperaturschwankungen ändern (z. B. beträgt der pK_a -Wert von TRIS bei 4 °C 8,8, bei 20 °C jedoch nur noch 8,3). Die meisten pH-Meter verfügen auch über einen Schalter zur Temperatureinstellung. Vor der Einstellung des pH-Werts sollte der Puffer auf die Temperatur

Tab. 1.3 Liste gebräuchlicher Puffer und ihres effektiven pH-Bereichs.

Puffer	pK_a	Effektiver Pufferbereich
Maleat	1,97	1,2–2,6
Acetat/ CH_3COOH	4,76	3,6–5,6
MES	6,10	5,5–6,7
PIPES	6,76	6,1–7,5
NaH_2PO_4/Na_2HPO_4	7,20	5,8–8,0
HEPES	7,48	6,8–8,2
Tricin	8,05	7,4–8,8
TRIS/HCl	8,06	7,5–9,0
$Na_2CO_3/NaHCO_3$	10,33	9,0–10,7

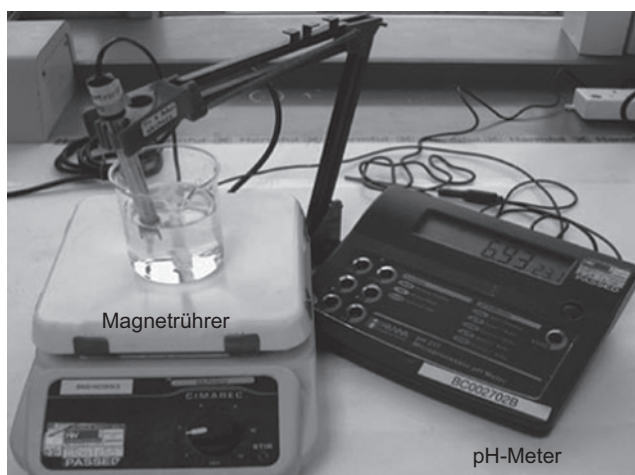


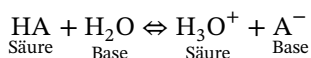
Abb. 1.8 Typischer Aufbau für die Einstellung des pH-Werts einer Lösung.

(z. B. 37 °C) gebracht werden, bei der er in einem geplanten Experiment verwendet werden soll.

- Die Pufferlösung kann auf einer Magnetrührplatte gestellt werden, und ein geeigneter Magnetrührstab (Floh) sollte gespült werden, bevor er in die Pufferlösung gegeben wird. Die Rührgeschwindigkeit sollte nicht zu hoch sein, da der Floh springen und die pH-Sonde beschädigen könnte (besonders wichtig bei der Verwendung von Glassonden).
- Die Sonde sollte mit destilliertem Wasser abgespült werden, bevor sie in die Pufferlösung gegeben wird.
- Warten Sie ein paar Minuten, bis sich der pH-Wert der Lösung auf der Anzeige des pH-Meters stabilisiert hat, bevor Sie mit der Einstellung des pH-Werts beginnen.
- Denken Sie daran, dass Puffer aus bestimmten Kombinationen bestehen; z. B. besteht Natriumacetatpuffer aus einer basischen Komponente (Natriumacetat) und einer sauren Komponente (Essigsäure). Wenn der gewünschte pH-Wert überschritten wird, vermeiden Sie es, den pH-Wert mit einer starken Säure oder Base, z. B. Salzsäure (HCl) oder Natriumhydroxid (NaOH), wieder auf den richtigen pH-Wert einzustellen. Dadurch wird die Pufferkapazität aufgebraucht und es entsteht ein weniger wirksamer Puffer. Stellen Sie stattdessen den richtigen pH-Wert mit einer konzentrierten Lösung eines der Pufferbestandteile ein; dadurch wird die Molarität des Puffers leicht verändert, die Pufferkapazität bleibt jedoch erhalten.
- Wenn der richtige pH-Wert erreicht ist, kann die pH-Sonde entfernt und in destilliertem Wasser gespült werden, bevor sie wieder in die Aufbewahrungslösung für die pH-Sonde gelegt wird.
- Der Puffer kann dann auf ein bestimmtes Volumen aufgefüllt und wie erforderlich gelagert werden. Wenn der Puffer für die Chromatographie verwendet werden soll (siehe Kapitel 7), ist es ratsam, den Puffer durch einen 0,2 µm-Filter zu filtern, um Partikel und Bakterien zu entfernen.
- Durch Einlegen der pH-Sonde über Nacht in eine 0,1 M HCl-Lösung werden die meisten verschmutzten Glas-pH-Sonden gereinigt und wiederhergestellt.

1.8 Gleichgewichts-/Dissoziationskonstante (K_a) für eine Säure oder Base

Ein Maß für die Stärke einer Säure ist die Gleichgewichts-/Dissoziationskonstante (K_a) der Säuredissoziation für diese Säure.



Die Dissoziationskonstante $K_a = \frac{[\text{H}_3\text{O}^+][\text{A}^-]}{[\text{HA}]}$

- Eine starke Säure dissoziiert leicht bei allen pH-Werten und hat einen hohen K_a -Wert (HCl: $K_a = 1 \times 10^3$).

- Eine schwache Säure hat einen niedrigen K_a -Wert (siehe Abb. 1.7) und ihre Dissoziation ist pH-abhängig (CH_3COOH : $K_a = 1,8 \times 10^{-5}$).
- Um K_a -Werte in brauchbare Zahlen umzuwandeln, wird der $\text{p}K_a$ -Wert einer Säure oder Base verwendet, der negative Logarithmus von K_a . In diesem Fall hat eine starke Säure einen niedrigen $\text{p}K_a$ -Wert.

$$\text{p}K_a = \log 1/K_a$$

1.8.1 Henderson-Hasselbalch-Gleichung

Die quantitativen Aspekte von Puffern können durch die Henderson-Hasselbalch-Gleichung bestimmt werden, die den pH-Wert mathematisch mit dem $\text{p}K_a$ -Wert verknüpft.

$$\text{pH} = \text{p}K_a + \log_{10} \frac{[\text{A}^-]}{[\text{HA}]} \quad \text{oder} \quad \text{pH} = \text{p}K_a + \log_{10} \frac{[\text{Protonenakzeptor}]}{[\text{Protonendonator}]}$$

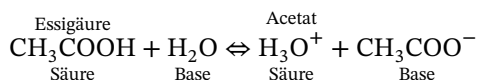
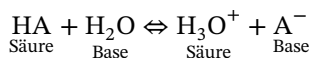
- Dabei ist $[\text{A}^-]$ die Konzentration der Base und $[\text{HA}]$ die Konzentration der Säure. In der Regel handelt es sich um eine molare Konzentration, aber da $[\text{A}^-]/[\text{HA}]$ ein

Arbeitsbeispiel 1.6

Anwendung der Henderson-Hasselbalch Gleichung

Berechnen Sie den pH-Wert einer Lösung, die 0,15 M Essigsäure und 0,25 M Natriumacetat enthält. (Zu den Bestandteilen eines Natriumacetatpuffers siehe Tab. 1.3).

Der $\text{p}K_a$ -Wert von Essigsäure beträgt 4,76.



$$\text{pH} = \text{p}K_a + \log_{10} \frac{[\text{A}^-]}{[\text{HA}]} \quad \text{oder} \quad \text{pH} = \text{p}K_a + \log_{10} \frac{[\text{Protonenakzeptor}]}{[\text{Protonendonator}]}$$

$$\text{pH} = \text{p}K_a + \log_{10} \frac{[\text{Acetat}]}{[\text{Essigsäure}]}$$

$$\text{pH} = 4,76 + \log_{10} \frac{0,25}{0,15}$$

$$\text{pH} = 4,76 + 0,22$$

$$\text{pH} = 4,96$$

Verhältnis ist, sind auch andere Konzentrationseinheiten akzeptabel. Mit diesem Verhältnis wird der pH-Wert einer Lösung bestimmt.

- In der Mitte der Titrationskurve (siehe Abb. 1.7), wenn die Konzentration von $[HA]$ gleich der Konzentration von $[A^-]$ ist, ist der pH-Wert $= pK_a$. Dies ist der Moment, bei dem Puffer am wirksamsten sind.

$$pH = pK_a + \log 1 = pK_a + 0 = pK_a$$

$$\text{oder } pH = pK_a$$

Wenn $[HA] > [A^-]$ ist, ist der pH-Wert des Puffers kleiner als pK_a ; wenn $[A^-] > [HA]$ ist, ist der pH-Wert größer als pK_a .

- Dieses $[A^-]/[HA]$ -Verhältnis kann nur innerhalb bestimmter Grenzen variiert werden, in der Regel bis 1,0 pH-Einheiten auf beiden Seiten des pK_a -Werts. Dies bedeutet, dass an den Extremen des Pufferbereichs wenig oder gar nicht gepuffert wird und es notwendig sein kann, die Konzentration des Puffers zu erhöhen, um eine gute Pufferkapazität zu erhalten, oder auf einen anderen Puffer mit einem anderen pK_a -Wert auszuweichen.

Die Henderson-Hasselbalch-Gleichung ermöglicht

- Berechnung von pK_a , wenn der pH-Wert und die molaren Konzentrationen von Protonendonator und -akzeptor bekannt sind.
- Berechnung des pH-Wertes, wenn der pK_a -Wert des Puffers und die molaren Konzentrationen von Protonendonator und -akzeptor bekannt sind.
- Berechnung der molaren Konzentrationen von Protonendonator und -akzeptor, wenn der pK_a - und der pH-Wert bekannt sind.

1.9 Zusammenfassung

Die Grundlage einer erfolgreichen experimentellen Arbeit ist die korrekte Herstellung von Lösungen. Wenn Sie einen Kurs in den Biowissenschaften belegen, müssen Sie über folgende Fähigkeiten auf einem zufriedenstellenden Niveau verfügen, insbesondere wenn Sie eine Karriere in einem biowissenschaftlichen Labor anstreben.

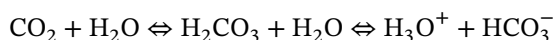
- Herstellung von molaren und prozentualen Lösungen
- Herstellung von Verdünnungen aus einer Stammlösung
- Genaue Verwendung von Pipetten
- Kenntnis des pH-Werts sowie der Herstellung und Verwendung von Puffern

1.9.1 Hinweise

- 1 Wasser aus dem Wasserhahn kann Verunreinigungen (z. B. Metallionen) enthalten, die ein Experiment stören können. Durch Destillation gewonnenes Wasser bietet eine Mindestreinheit und sollte idealerweise zur Herstellung

von Lösungen verwendet werden. Wasseraufbereitungsanlagen, die Leitungswasser durch Filter pumpen, können zur Herstellung von destilliertem und deionisiertem Wasser mit unterschiedlichem Reinheitsgrad verwendet werden. Die höchste Reinheit von Wasser weist eine Leitfähigkeit von $18,2 \Omega \text{ ms}^{-1}$ ($0,055 \mu\text{S}$) auf.

- 2 Der pH-Wert der Zelle liegt bei etwa 7,0. Dieser Wert wird auch als physiologischer pH-Wert bezeichnet. Wasser hat selten einen pH-Wert von 7,0, weil Kohlendioxid (CO_2) sich darin unter Bildung von Kohlensäure löst, was zu einem leicht sauren pH-Wert für Wasser von etwa 5,5 führt.



- * $[\text{H}^+]$ ist ein Proton, das aber in Lösung nie verfügbar ist. Das Proton verbindet sich mit einem anderen Wassermolekül und erzeugt ein positiv geladenes Oxonium-Ion $[\text{H}_3\text{O}^+]$.
- ** $[\text{OH}^-]$ Die eckigen Klammern geben an, dass es sich um eine bestimmte Konzentration handelt, in der Regel, wenn nicht anders angegeben, um die molare Konzentration.