

Analytische Chemie für Biologen

Analytische Chemie für Biologen

1

2

3

Grundlagen

Protonierung/
Deprotonierung
Komplexierung
Red/Ox-Reaktionen

Elektrophorese

Chromatographie

Prozessgrößen
GC
HPLC

Quantitative Analytik

Optische Spektrometrie

Absorption (UV,IR)
Fluoreszenz
Luminiszenz
AS

Massen- Spektrometrie

Analytische Chemie für Biologen I

Grundlagen	Gleichgewichte
Deprotonierung/ Protonierung	$\text{HA} + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{H}_3\text{O}^+ + \text{A}^- \quad K_a$ $\text{B} + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{BH}^+ + \text{OH}^- \quad K_b$
Komplexierung	$\text{M} + \text{L} \leftrightarrow \text{ML} \quad K_c$
Red/Ox-Reaktionen	$\text{Red} + \text{O}_2 + 2 \text{H}^+ \leftrightarrow \text{Ox} + \text{H}_2\text{O} \quad K_{\text{RO}}$

Literatur

„Fundamentals of Analytical Chemistry“

D.A.Skoog, D.M.West und F.J.Holler,
Saunders College Publishing,
Kapitel 4-16

„Analytikum“

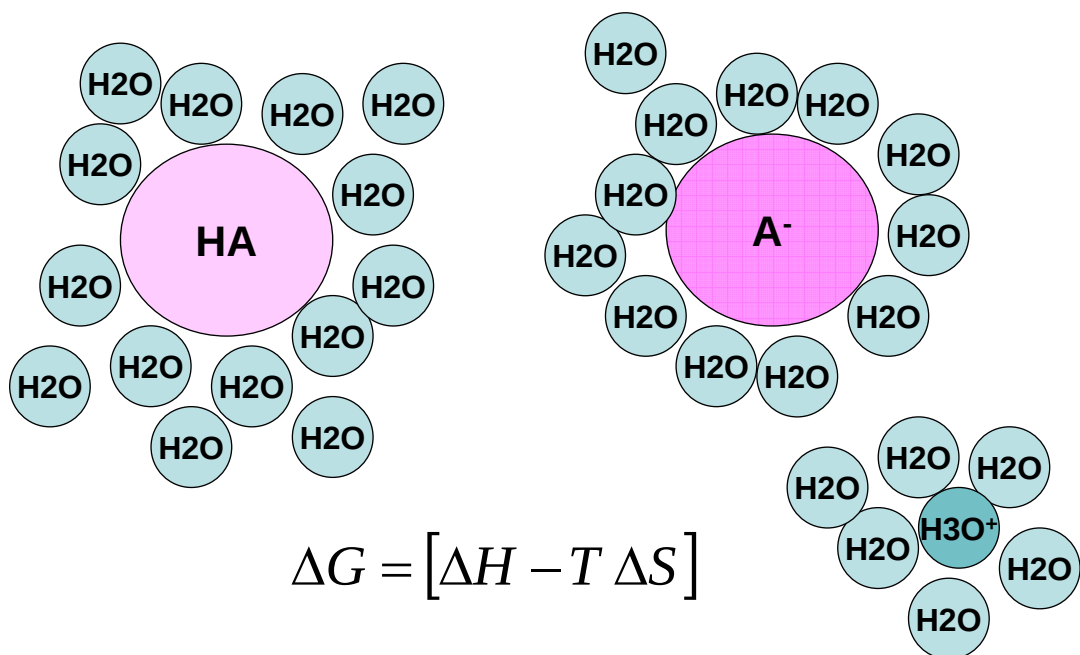
Doerffel, Geyer Eds.,
VEB Deutscher Verlag für Grundstoffindustrie, Leipzig.
Kapitel 2

Gleichgewicht

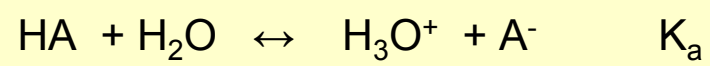
$$RT \ln K = -\Delta G$$

$$\Delta G = [\Delta H - T \Delta S]$$

K	Gleichgewichtskonstante
ΔG	Freie Gibbs Energie
ΔH	Enthalpie
ΔS	Entropie
T	Absolute Temperatur
R	Allgemeine Gaskonstante



Deprotonierung (Säure-Dissoziation)



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

Allgemeine Formulierung eines Gleichgewichtes



$$K = \frac{a_Y^y a_Z^z}{a_X^x a_W^w}$$

a : Aktivität einer Verbindung in Lösung

c : Konzentration / Molenbruch einer Verbindung in Lösung

$[\]$:

Allgemeine Formulierung eines Gleichgewichtes



$$K = \frac{a_Y^y a_Z^z}{a_X^x a_W^w}$$

$$a_i = c_i \gamma_i \quad c_i = a_i / \gamma_i$$

$$K' = \frac{[Y]^y [Z]^z}{[X]^x [W]^w}$$

$$K' = K \frac{[\gamma_w]^w [\gamma_x]^x}{[\gamma_y]^y [\gamma_z]^z}$$

Allgemeine Formulierung eines Gleichgewichtes

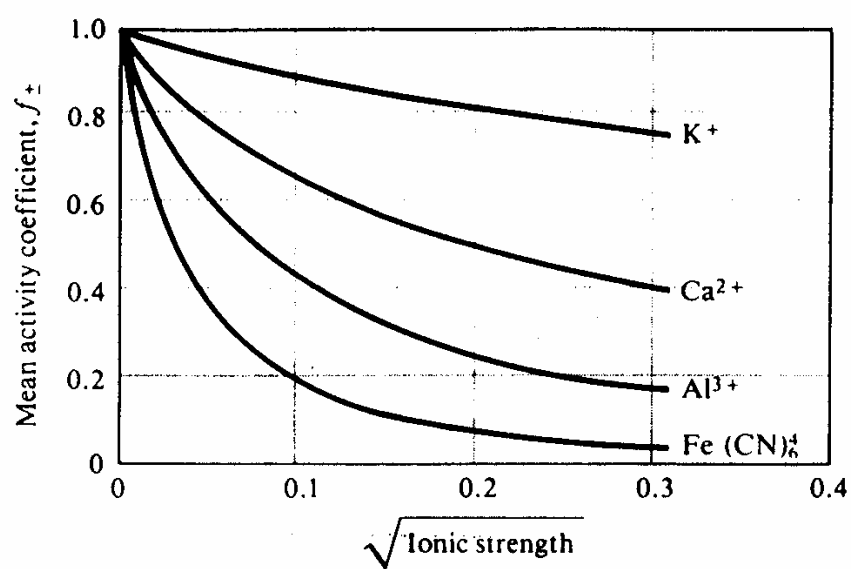
$$K' = K \frac{[\gamma_w]^w [\gamma_x]^x}{[\gamma_y]^y [\gamma_z]^z}$$

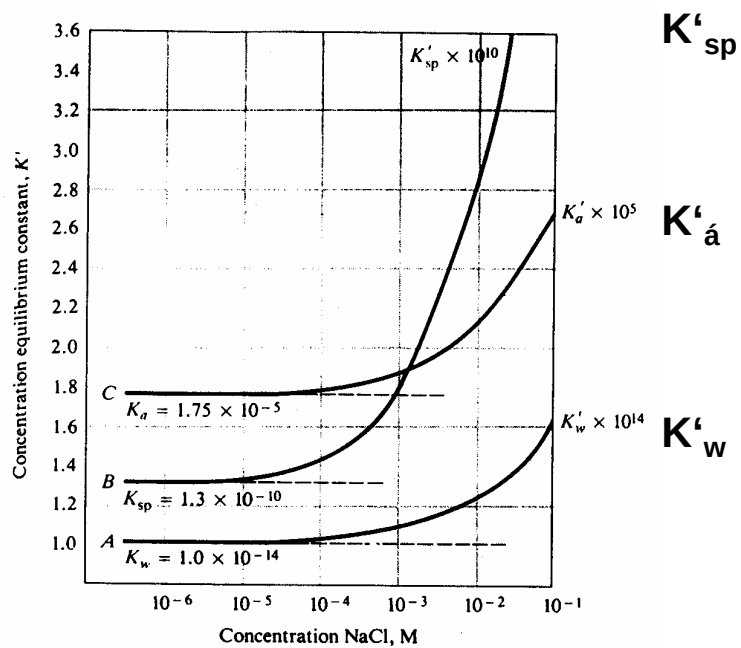
$$-\log \gamma_i = 0.5 z_i^2 \sqrt{I}$$

$$I = \frac{1}{2} \sum_n c_n z_n^2 \quad \text{Ionenstärke}$$

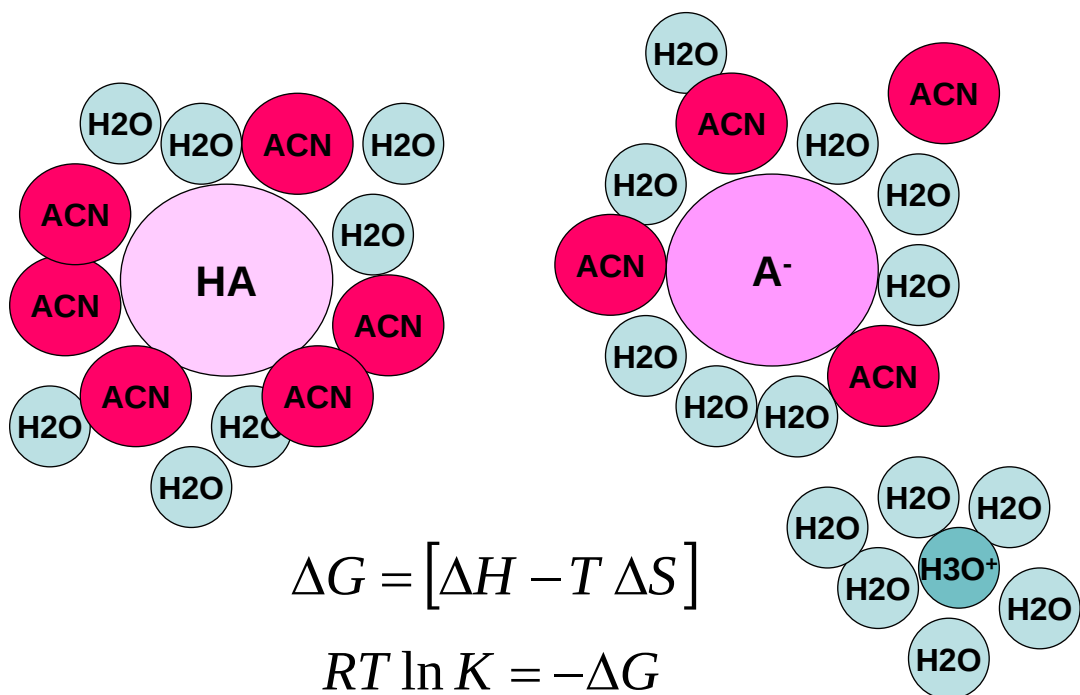
$$-\log \gamma_i = \frac{0.5 z_i^2 \sqrt{I}}{1 + 0.33 r_i \sqrt{I}}$$

$$-\log \gamma_i = 0.5 z_i^2 \sqrt{I}$$





Die Anwesenheit weiterer Ionen begünstigt das Vorliegen dissoziierter (ionischer) Spezies

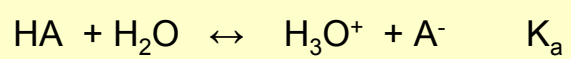


Polarität und Häufigkeit der Lösungsmittelkomponenten
beeinflussen ΔG und damit die Glgw. Konstante

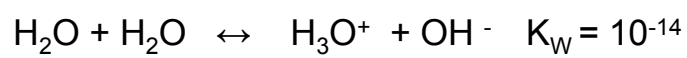
Tabellierte Konstanten verstehen sich als Werte
bei Raumtemperatur
in reinem Wasser
bei sehr geringer Ionenstärke
wenn nicht anders vermerkt

**Protonierungs- /
Deprotonierungs-
Gleichgewichte**

Deprotonierung (Säure-Dissoziation)



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



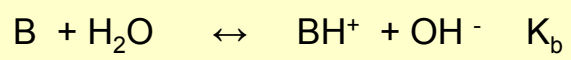
$$K_w = [\text{H}_3\text{O}^+][\text{OH}^-]$$

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

$$\text{p}K_a = -\log K_a$$

$$\text{p}K_w = 14$$

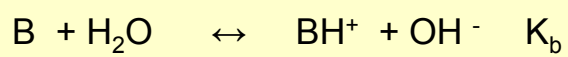
Protonierung einer Base



$$K_b = \frac{[\text{BH}^+][\text{OH}^-]}{[\text{B}]}$$

$$pK_b = -\log K_b$$

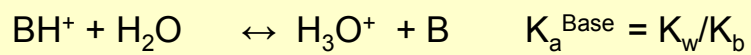
Protonierung einer Base



$$K_b = \frac{[BH^+][OH^-]}{[B]}$$

$$pK_b = -\log K_b$$

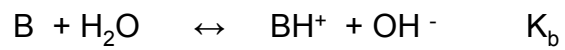
Deprotonierung einer protonierten Base



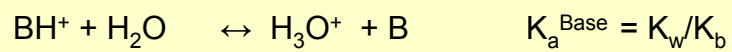
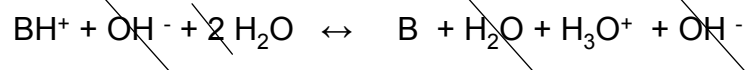
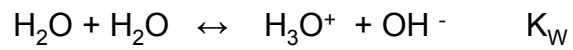
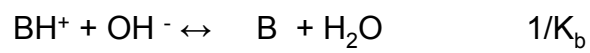
$$K_a^{Base} = \frac{[H_3O^+][B]}{[BH^+]}$$

$$pK_a^{Base} = pK_w - pK_b$$

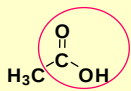
Protonierung



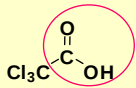
Deprotonierung einer protonierten Base



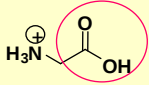
pK_a -Werte



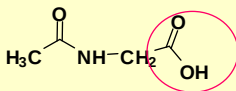
4.75 Carbonsäuren



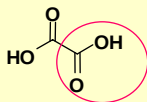
0.89 Trichloressigsäure



2 Aminosäuren

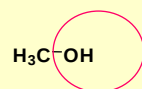


3.5 Amidosäuren / C-Terminus in Peptiden



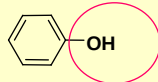
1.27 Di-Carbonsäuren

pK_a -Werte



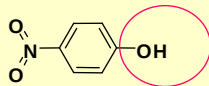
12-14

Alkohole, Polyalkohole, Zucker
sehr geringe Acidität



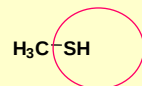
9-10

Phenole



7-8

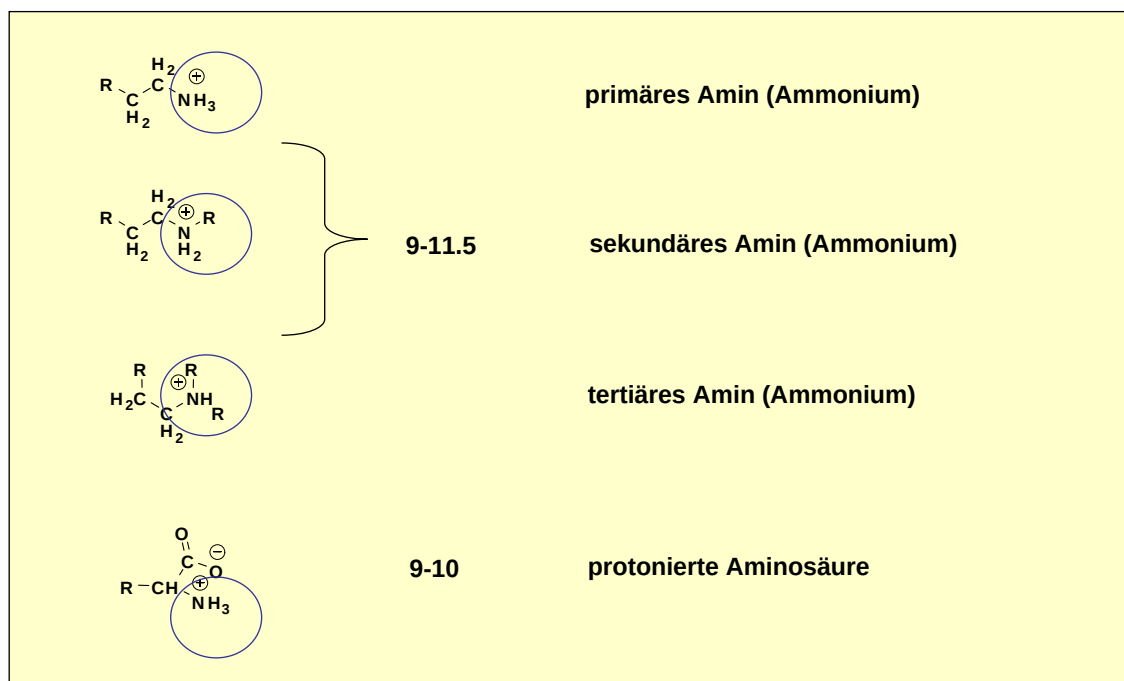
4-Nitro-Phenole



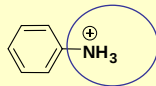
8

Thiole

pK_a^{Base}

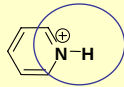


pK_a^{Base}



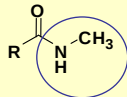
5

aromatisches Amin (Anilinium)



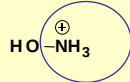
5.5

N in aromatischem System (Pyridinium)



-1

Amid (nicht mehr basisch)



6

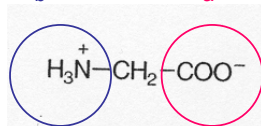
Hydroxylamin

Strukturelemente	molekulare Umgebung	pK _a
-COOH	Carboxyl-Säure	4.5 – 5.5
	α-Aminosäure	1.8 – 2.5
	α-Amidosäure	3.5 – 4.0
-OH	aliphatisch	12 - 14
	phenolisch	9 – 10
	Mono-Nitro-Phenole	7 - 8
-HH ₂ , -NHR, -NR ₂	aliphatisch	9 – 11.5
	aromatisch ^(a)	4.5 – 5.5
	α-Aminosäure	9 - 10
-NH	aromatisch ^(b)	5 – 6.5
-CONH ₂ , - CONHR	Amide	0 bis -1

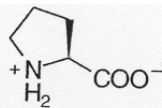
(a) wie in Anilin,
(b) wie in Pyridin

Aminosäuren

$pK_b = 9.0$ $pK_a = 2$

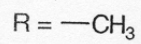


Glycin (Gly) G

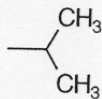


Prolin (Pro) P

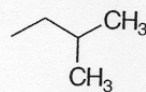
unpolare, aliphatische



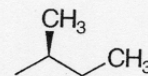
Alanin (Ala) A



Valin (Val) V

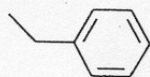


Leucin (Leu) L

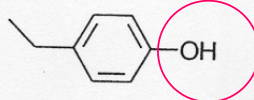


Isoleucin (Ile) I

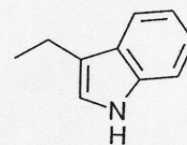
aromatische



Phenylalanin (Phe) F



Tyrosin (Tyr) Y

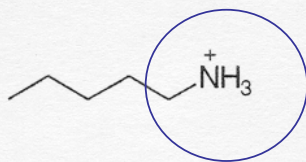


Tryptophan (Trp) W

$pK_a = 10.1$

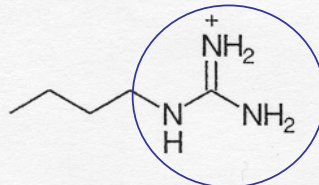
Aminosäuren

positiv geladene



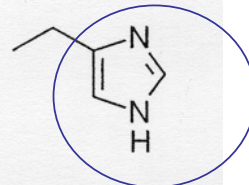
Lysin (Lys) K

$pK_b = 10.5$



Arginin (Arg) R

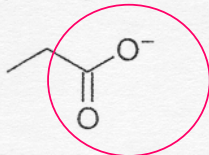
$pK_b = 12.5$



Histidin (His) H

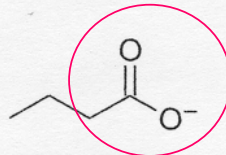
$pK_b = 6.0$

negativ geladene



Aspartat (Asp) D

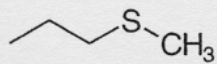
$pK_a = 3.9$



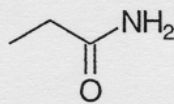
Glutamat (Glu) E

$pK_a = 4.2$

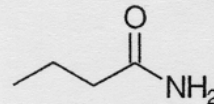
Aminosäuren



Methionin (Met) M

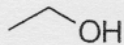


Asparagin (Asn) N

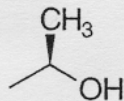


Glutamin (Gln) O

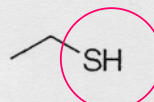
polare, ungeladene



Serin (Ser) S



Threonin (Thr) T



Cystein (Cys) C

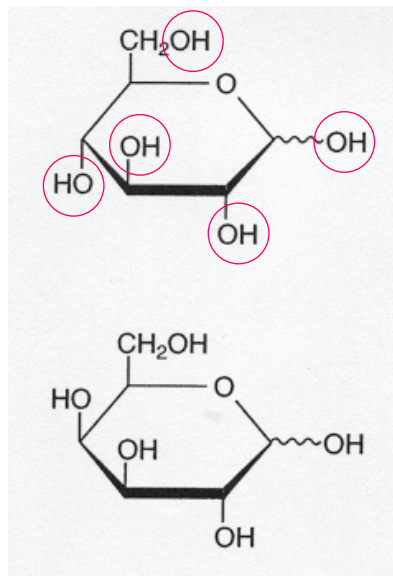
$pK_a = 8.3$

Aminosäuren

		pK _a				
		α -COOH	α -NH ₂	OH, SH COOH	Amino in Seitenkette	
Gly	G	2,34	9,60			
Ala	A	2,35	9,69			
Val	V	2,32	9,62			
Leu	L	2,36	9,60			
Ile	I	2,36	9,68			
Pro	P	1,99	10,60			
Phe	F	1,83	9,13			
Met	M	2,28	9,21			
Trp	W	2,38	9,39			
Ser	S	2,21	9,15			OH
Thr	T	2,63	10,43			OH
Tyr	Y	2,20	9,11	10,07		Phenol
Cys	C	1,71	10,78	8,33		SH
Asp	D	2,09	9,82	3,86		COOH
Glu	E	2,19	9,67	4,25		COOH
Asn	Q	2,02	8,8	-		CONH ₂
Gln	N	2,17	9,13	-		CONH ₂
Lys	K	2,18	8,95		10,53	NH ₂
Arg	R	2,17	9,04		12,48	Guanidino
His	H	1,82	9,17		6,0	Imidazol

Zucker

pK_a -Werte ~13



Glukose

Galaktose

Anorganische Säuren und Basen und häufig eingesetzte Puffersysteme

		pK_a1	pK_a2	pK_a3
Schwefelsäure	H_2SO_4	stark ($\ll 0$)	1.92	
Phosphorsäure	H_3PO_4	2.15	7.20	12.38
Kohlensäure	H_2CO_3	6.35	10.33	
Borsäure	H_3BO_4	9.23		
		pK_a^{Base}		
Ammoniak	NH_3	9.25		
Hydroxylamin	NH_2OH	6.03		

Puffer:

System aus

Säure / Säureanion

und/ oder

Base / Basenkation

Pufferwirkung ist nur gegeben in einem Bereich von

$$\text{pH} = \text{pK}_a \pm 1 \quad \text{bzw.} \quad \text{pH} = \text{pK}_a^{\text{Base}} \pm 1$$

der enthaltenen Puffer-Teilsysteme

$\text{Na}^+ \text{Acetat}^-$ oder $\text{NH}_4^+ \text{Cl}^-$ oder $\text{NH}_4^+ \text{Acetat}^-$

Dissoziations/Protonierungsgrad

„Speziesbrüche“

Dissoziationsgrad

$$\alpha^d = \frac{[A^-]}{[HA] + [A^-]}$$

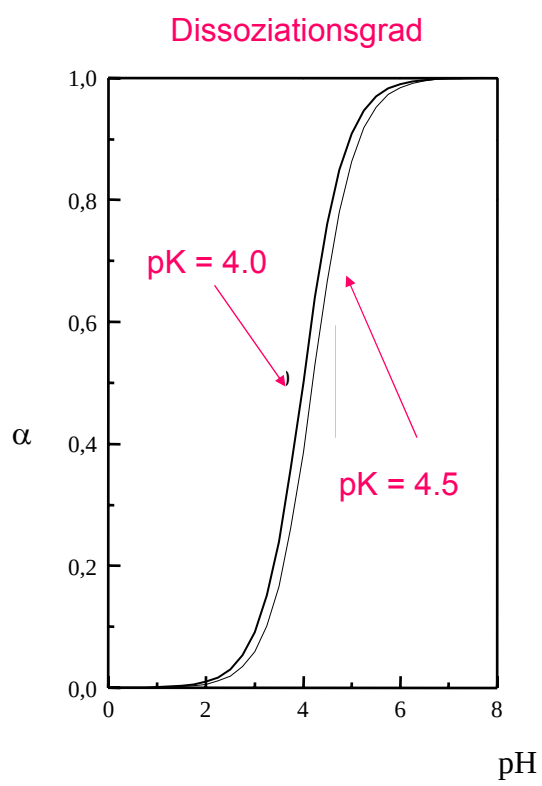
$$K_a = \frac{[A^-][H_3O^+]}{[HA]}$$

Dissoziationsgrad

$$\alpha^d = \frac{[A^-]}{[HA] + [A^-]}$$

$$K_a = \frac{[A^-][H_3O^+]}{[HA]}$$

$$\alpha^d = \frac{1}{1 + 10^{(pK_a - pH)}}$$

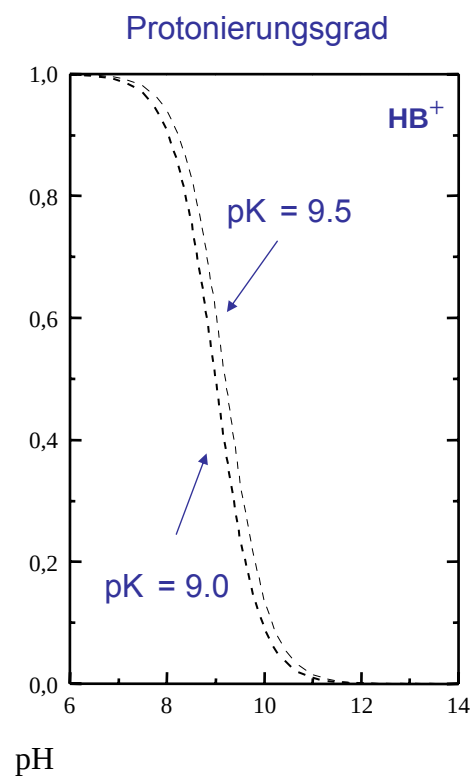


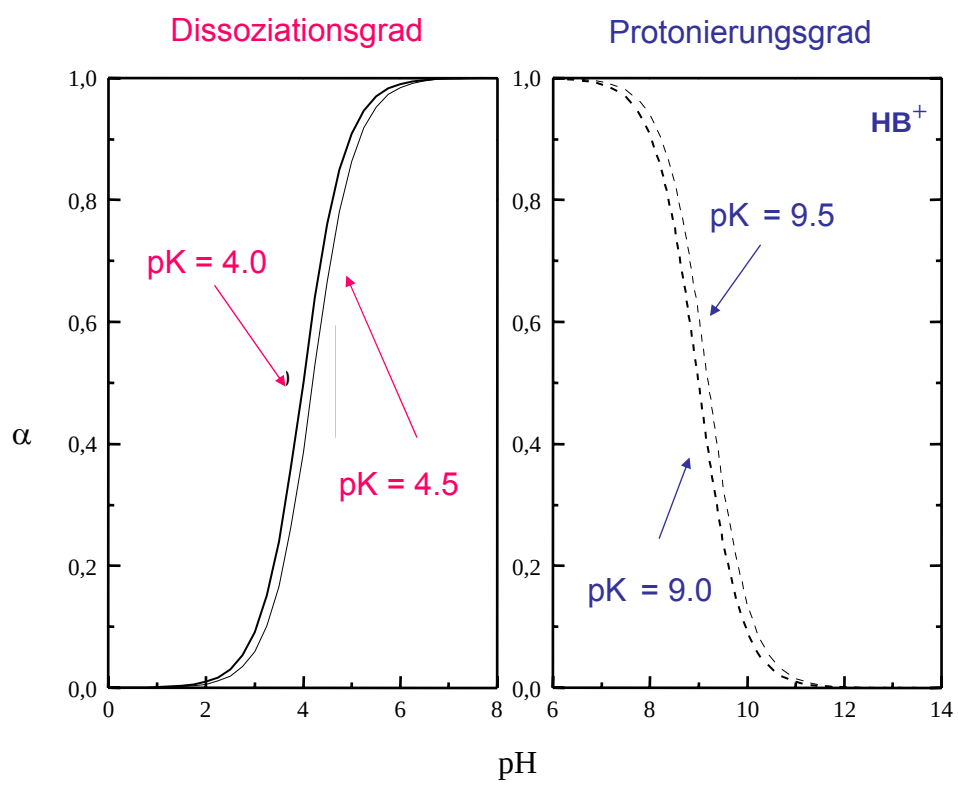
Protonierungsgrad

$$\alpha^p = \frac{[BH^+]}{[BH^+] + [B]}$$

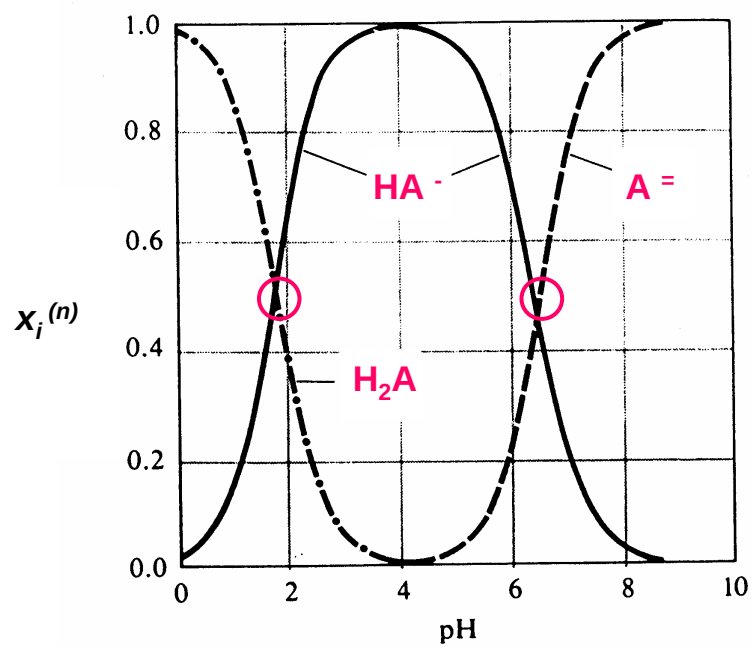
$$K_a^{Base} = \frac{[B][H_3O^+]}{[BH^+]}$$

$$\alpha^p = \frac{1}{1 + 10^{(pH - pK_a^{Base})}}$$





$$\text{"Grad"} = \text{Speziesbruch} = x^{(n)} = \frac{[\text{Spezies } n]}{\sum_k [\text{Spezies } k]}$$



$$pK_{a_1} = 1.5; pK_{a_2} = 6.5$$

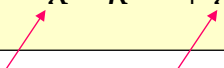
Spezies-Brüche $x_i^{(n)}$

$$x^{H_2A} = \frac{1}{1 + 10^{(pH - pK_{a1})} + 10^{(2pH - pK_{a1} - pK_{a2})}}$$

$$x^{HA-} = \frac{1}{1 + 10^{(pH - pK_{a2})} + 10^{(pK_{a1} - pH)}}$$

$$x^{A=} = \frac{1}{1 + 10^{(pK_{a2} - pH)} + 10^{(pK_{a1} + pK_{a2} - 2pH)}}$$

Chromatographie

$$k^{total} = x^{A-} k^{A-} + x^{HA} k^{HA}$$


$$k_i = \sum_n x_i^n k_i^n$$


Ionenaustausch-Chromatographie: $k^{A-} \gg 0$ $k^{HA} \approx 0$

Reversed-Phase Chromatographie: $k^{A-} \approx 0$ $k^{HA} \gg 0$

Chromatographie

$$k^{total} = x^{A-} k^{A-} + x^{HA} k^{HA}$$

$$k_i = \sum_n x_i^n k_i^n$$

Ionenaustausch-Chromatographie: $k^{A-} \gg 0$ $k^{HA} \approx 0$

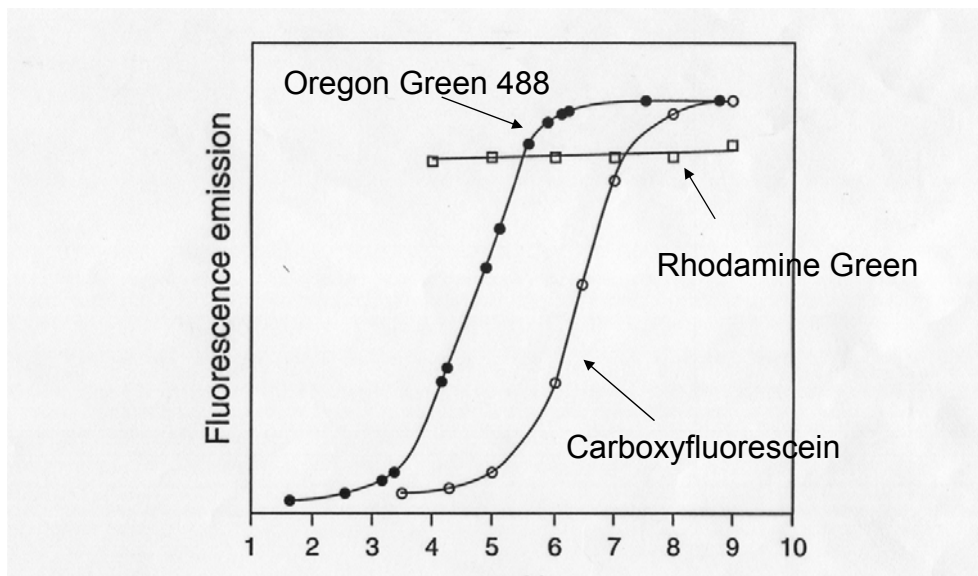
Reversed-Phase Chromatographie: $k^{A-} \approx 0$ $k^{HA} \gg 0$

Elektrophorese

$$\mu^{total} = x^{A-} \mu^{A-} + x^{HA} \mu^{HA}$$

$$\mu_i = \sum_n x_i^n \mu_i^n$$

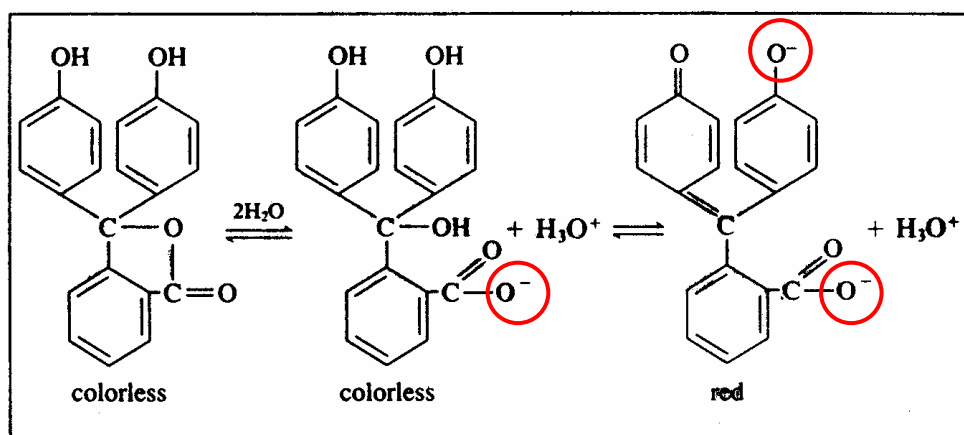
Fluoreszenz



Intensität des Fluoreszenzlichtes ist in vielen Fällen pH-abhängig:

- Reproduzierbarkeit der FL-Messung
- Fluoreszenzlabel als pH-Sonde

UV/Vis – Absorption



Unterschiede in der
Wellenlänge des Absorptionsmaximums
zwischen einzelnen Spezies

Säure-Basen Titration

Konzept jeder Titration

Bestimmung eines „Äquivalenzpunktes“

Äquivalenzpunkt heißt:

Molzahl des Analyts (Titrand) = Molzahl des Titrators

$$n_{\text{Titrand}} = n_{\text{Titrator}}$$

Dadurch wird die Bestimmung von Analytmengen möglich

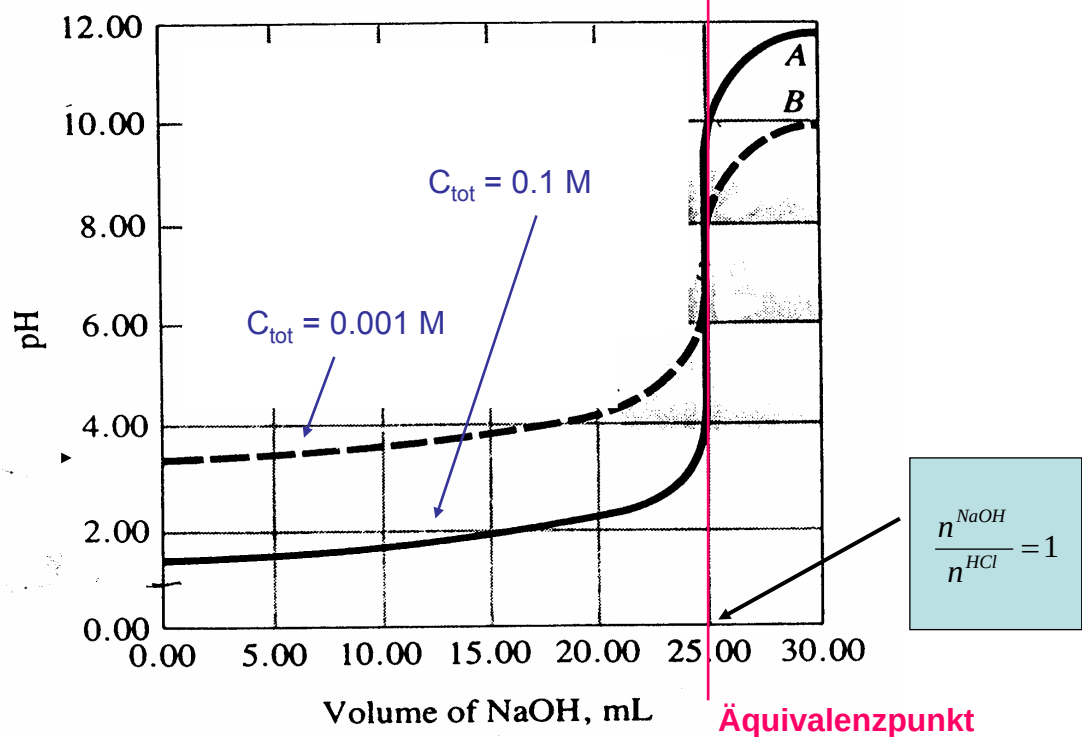
Wie lässt sich der Äquivalenzpunkt finden?

Durch starke Änderung in einer Systemeigenschaft

(z.B.: im pH Wert der Lösung, im Vorliegen freien Metalls etc.)

Säure-Basen-Titration

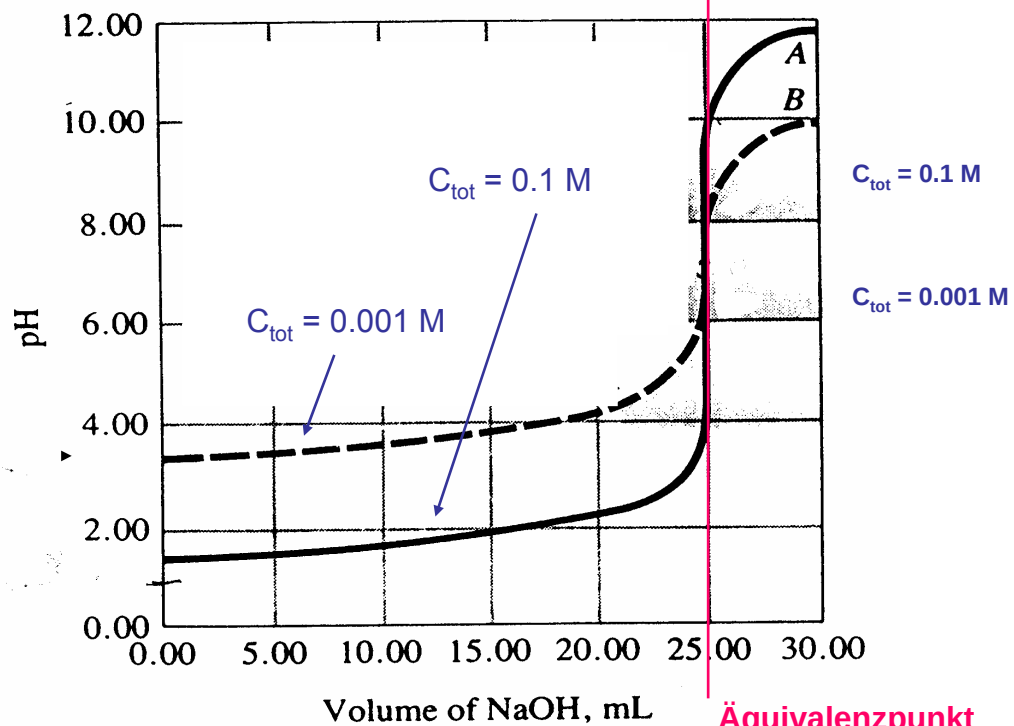
Starke Säure (HCl) wird mit starker Base (NaOH) titriert



Molzahl des Analyts (Titrand) = Molzahl des Titrators

Säure-Basen-Titration

Starke Säure (HCl) wird mit starker Base (NaOH) titriert



Änderung der Systemeigenschaft am Äquivalenzpunkt → starker Sprung im pH Wert

Konzept einer Titration

(1) Bestimmung des Äquivalenzpunktes

Am Äquivalenzpunkt:

Molzahl des Analyts (Titrand) = Molzahl des Titrators

Dadurch ist die Bestimmung der Analytmenge möglich

(2) Wie lässt sich der Äquivalenzpunkt finden? → starker Sprung im pH Wert

(3) Wie lässt sich der Sprung im pH Wert feststellen?

→ Messung mit pH-Elektrode oder

→ Einsatz eines Indikators (Reporter System)

zeigt bei Überschreiten eines bestimmten pH Wertes
eine Farbänderung

Konzept einer Titration

(4) Welcher pH Wert soll die Schwelle für die Farbänderung des Indikators sein?

→ pH Wert am Äquivalenzpunkt: $\text{pH}^{\text{Ä.P.}}$

(5) Wie findet man einen Indikator, dessen Farbumschlag bei einem pH Wert liegt, der dem pH des Äquivalenzpunktes entspricht?

→ Farbumschlag des Indikators findet statt, wenn

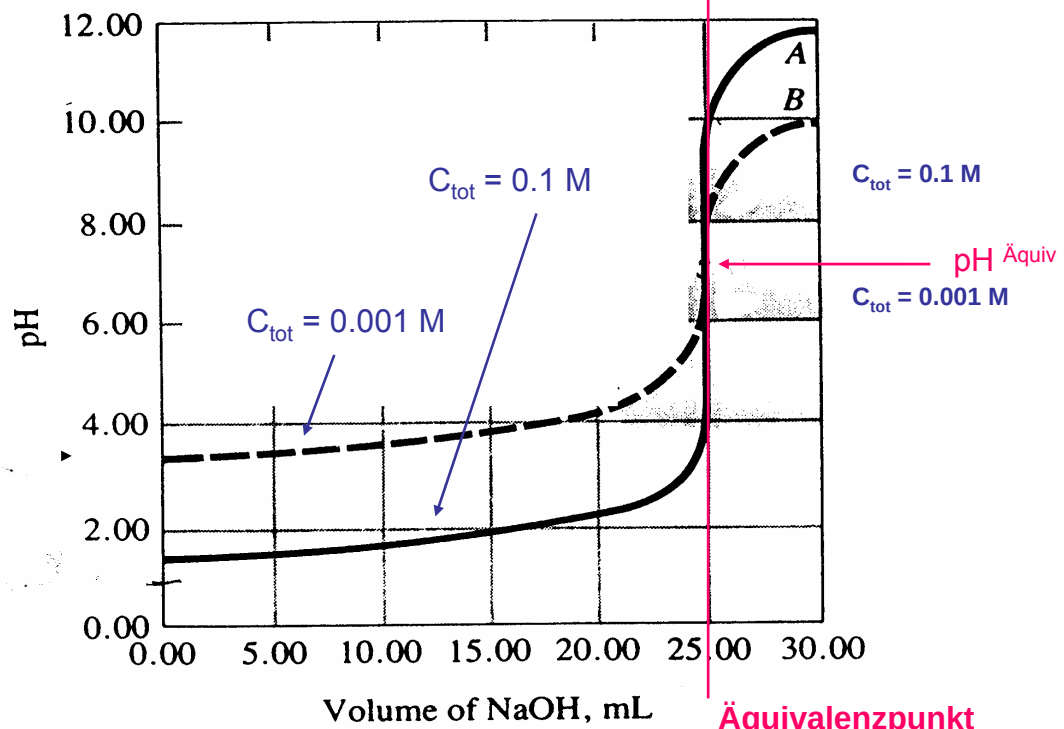
$$\text{pH der Lösung} = \text{pK}_a^{\text{Ind}} \pm 1$$

(6) Also: Der pH Wert für den Umschlagspunkt des Indikators, $\text{pH}^{\text{U.P.}}$ soll ähnlich sein dem pH Wert am Äquivalenzpunkt des Titrand/Titrator Systems

$$\text{pH}^{\text{U.P.}} \sim \text{pH}^{\text{Ä.P.}}$$

Säure-Basen-Titration

Starke Säure (HCl) wird mit starker Base (NaOH) titriert



Änderung der Systemeigenschaft am Äquivalenzpunkt → starker Sprung im pH Wert

pH Werte am Äquivalenzpunkt

Starke Säure (titriert mit starker Base)

$$pH^{\ddot{a}qu} = \frac{1}{2} pK_w = 7$$

schwache Säure (titriert mit starker Base)

$$pH^{\ddot{a}qu} = \frac{1}{2} (pK_w + pK_a + \log C_s)$$

starke Base (titriert mit starker Säure)

$$pH^{\ddot{a}qu} = \frac{1}{2} pK_w = 7$$

schwache Base (titriert mit starker Säure)

$$pH^{\ddot{a}qu} = \frac{1}{2} (pK_w - pK_b - \log C_B)$$

Konzept einer Titration

(4) Welcher pH Wert soll die Schwelle für die Farbänderung des Indikators sein?

→ pH Wert am Äquivalenzpunkt: $\text{pH}^{\text{Ä.P.}}$

(5) Wie findet man einen Indikator, dessen Farbumschlag bei einem pH Wert liegt, der dem pH des Äquivalenzpunktes entspricht?

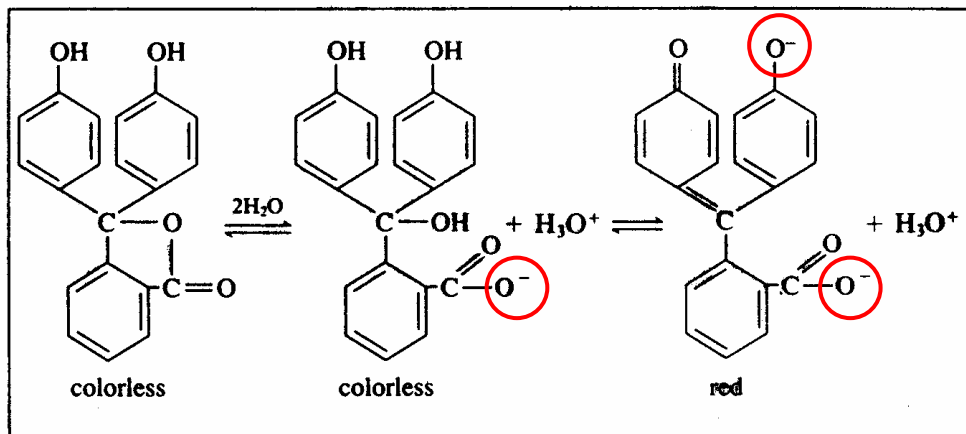
→ Farbumschlag des Indikators findet statt, wenn

$$\text{pH der Lösung} = \text{pK}_a^{\text{Ind}} \pm 1$$

(6) Also: Der pH Wert für den Umschlagspunkt des Indikators, $\text{pH}^{\text{U.P.}}$ soll ähnlich sein dem pH Wert am Äquivalenzpunkt des Titrand/Titrator Systems

$$\text{pH}^{\text{U.P.}} \sim \text{pH}^{\text{Ä.P.}}$$

Säure/Basen - Indikator



$$K_{Ind} = \frac{[Ind^-][H^+]}{[HInd]}$$

Indikator-System

$$K_{Ind} = \frac{[Ind^-][H^+]}{[HInd]}$$

$$\alpha^d = \frac{1}{1 + 10^{(pK_a - pH)}}$$

$$\alpha^d < 0.1 \quad \text{rot} \quad pH \leq pK_a - 1$$

$$\alpha^d > 0.9 \quad \text{blau} \quad pH > pK_a + 1$$

→ Umschlagintervall 2 pH Einheiten

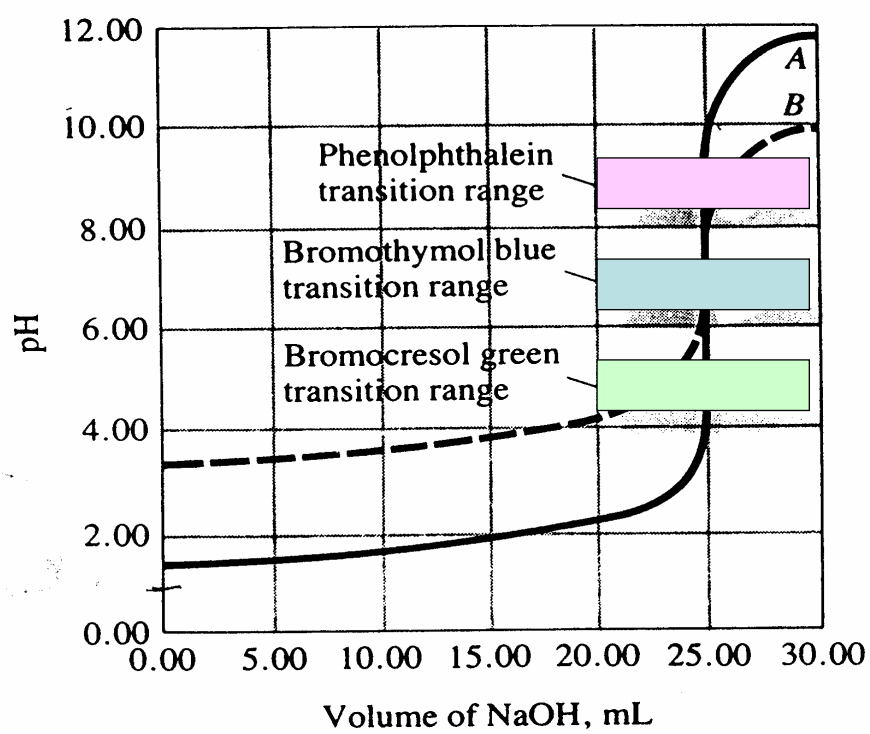
$$\alpha^d < 0.3 \quad \text{farblos} \quad pH \leq pK_a - 0.5$$

$$\alpha^d > 0.3 \quad \text{blau} \quad pH > pK_a - 0.5$$

→ Umschlagintervall 0.3 pH Einheiten

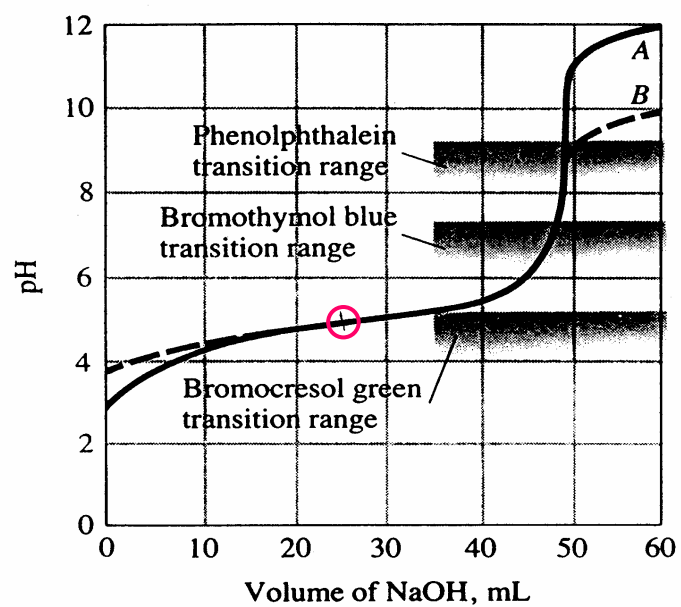
Umschlag: $pH^{UP} = pK_a^{Ind}$

Säure-Basen-Titration



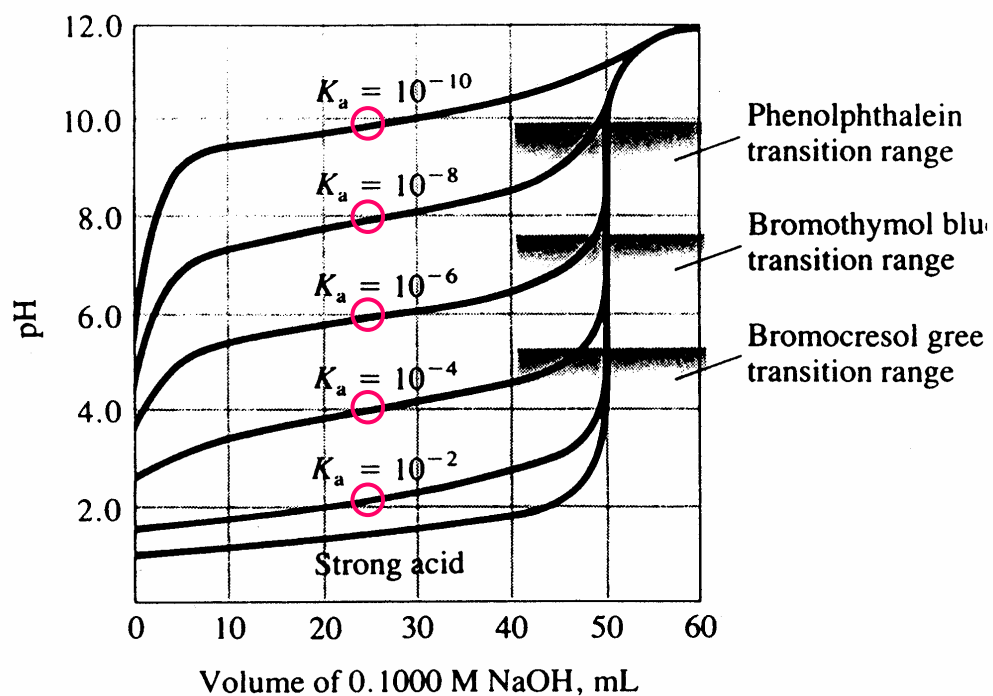
Säure-Basen-Titration

Schwache Säure (HAc) wird mit starker Base (NaOH) titriert



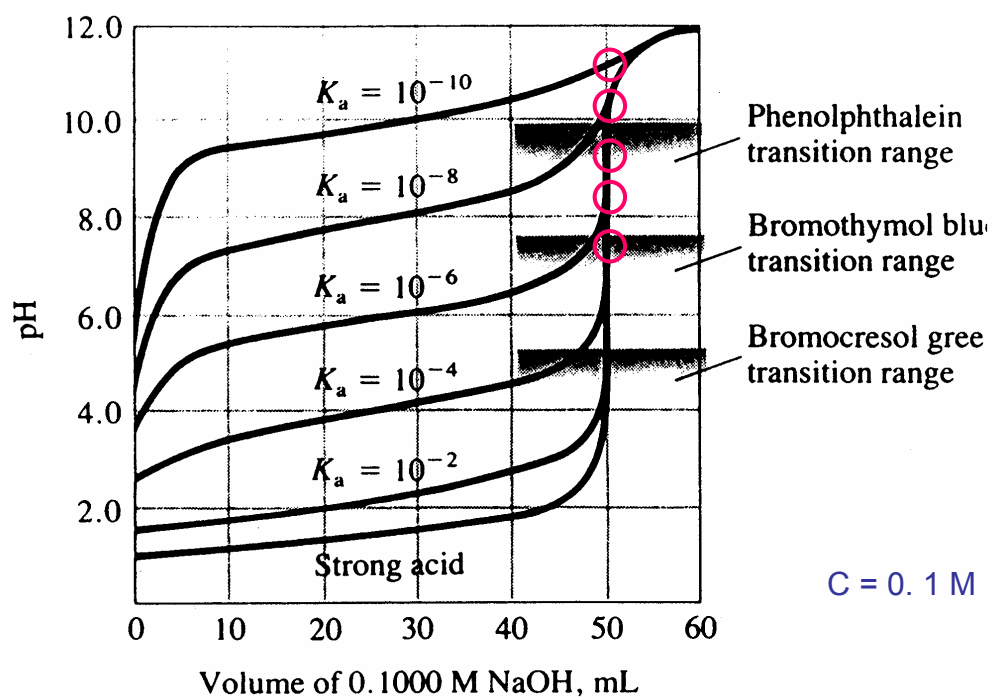
Wendepunkt im Pufferbereich: $\text{pH}^{\text{W.P.}} = \text{pK}_a$

Schwache Säuren (HAc) werden mit starker Base (NaOH) titriert



Wendepunkt im Pufferbereich: $\text{pH}^{\text{W.P.}} = \text{p}K_a$

Schwache Säuren (HAc) werden mit starker Base (NaOH) titriert



Äquivalenzpunkte: $\text{pH}^{\text{Ä.P.}} = 0.5 (\text{p}K_w + \text{p}K_a + \log C)$

pH Werte am Äquivalenzpunkt

Starke Säure (titriert mit starker Base)

$$pH^{\text{äqu}} = \frac{1}{2} pK_w = 7$$

schwache Säure (titriert mit starker Base)

$$pH^{\text{äqu}} = \frac{1}{2} (pK_w + pK_a + \log C_s)$$

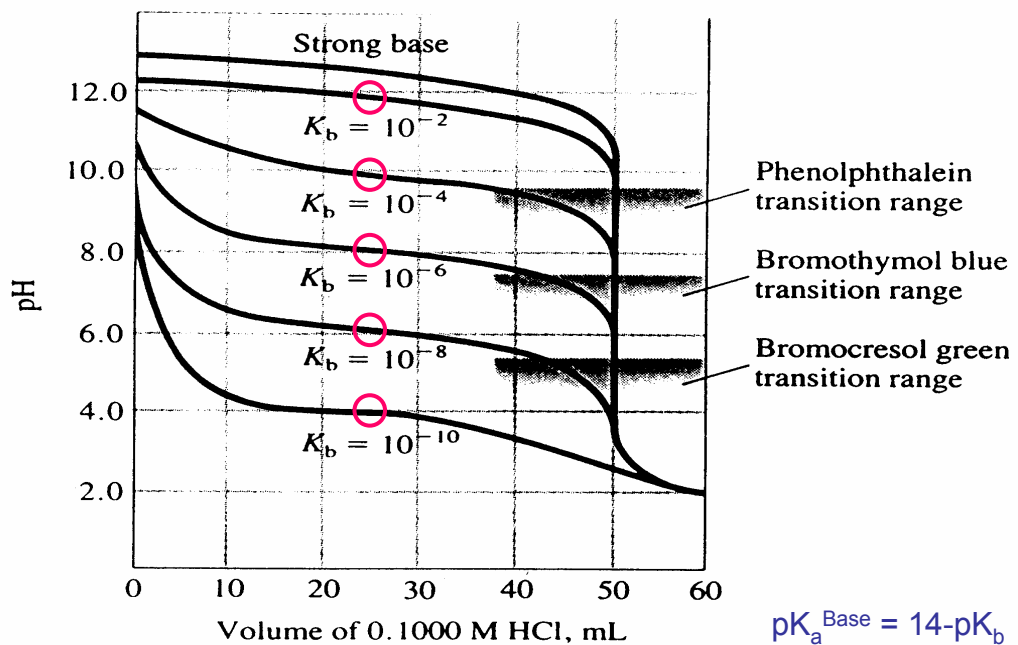
starke Base (titriert mit starker Säure)

$$pH^{\text{äqu}} = \frac{1}{2} pK_w = 7$$

schwache Base (titriert mit starker Säure)

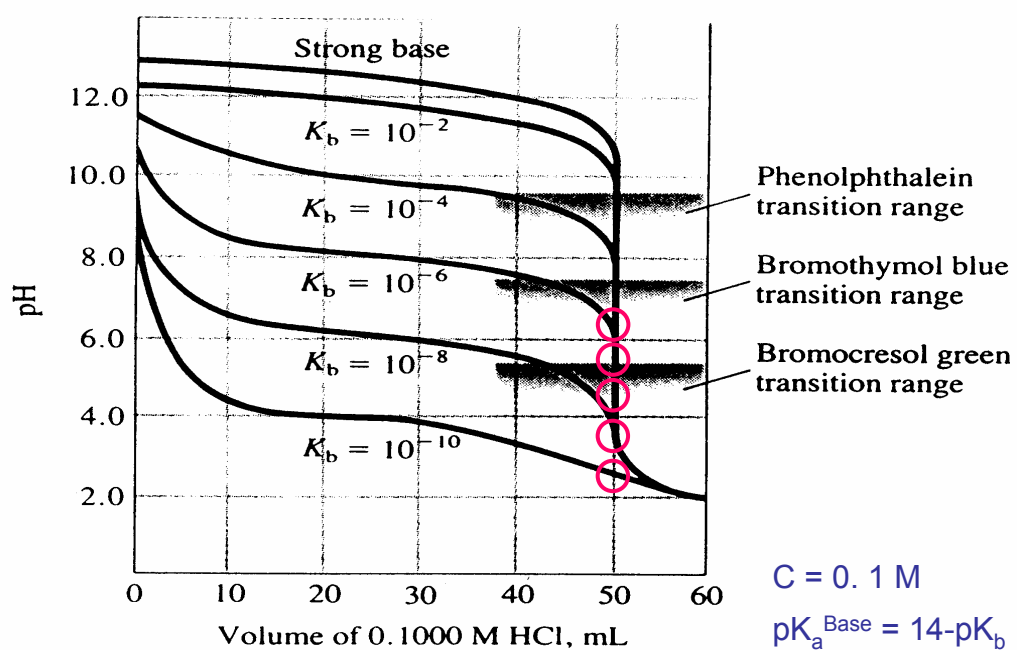
$$pH^{\text{äqu}} = \frac{1}{2} (pK_w - pK_b - \log C_B)$$

Schwache Basen (B) werden mit starker Säure (HCl) titriert



Wendepunkt im Pufferbereich: $pH^{\text{W.P.}} = pK_a^{\text{Base}}$

Schwache Basen (B) werden mit starker Säure (HCl) titriert



Äquivalenzpunkte: $\text{pH}^{\text{Ä.P.}} = 0.5 (\text{p}K_w - \text{p}K_b - \log C)$

pH Werte am Äquivalenzpunkt

Starke Säure (titriert mit starker Base)

$$pH^{\text{äqu}} = \frac{1}{2} pK_w = 7$$

schwache Säure (titriert mit starker Base)

$$pH^{\text{äqu}} = \frac{1}{2} (pK_w + pK_a + \log C_s)$$

starke Base (titriert mit starker Säure)

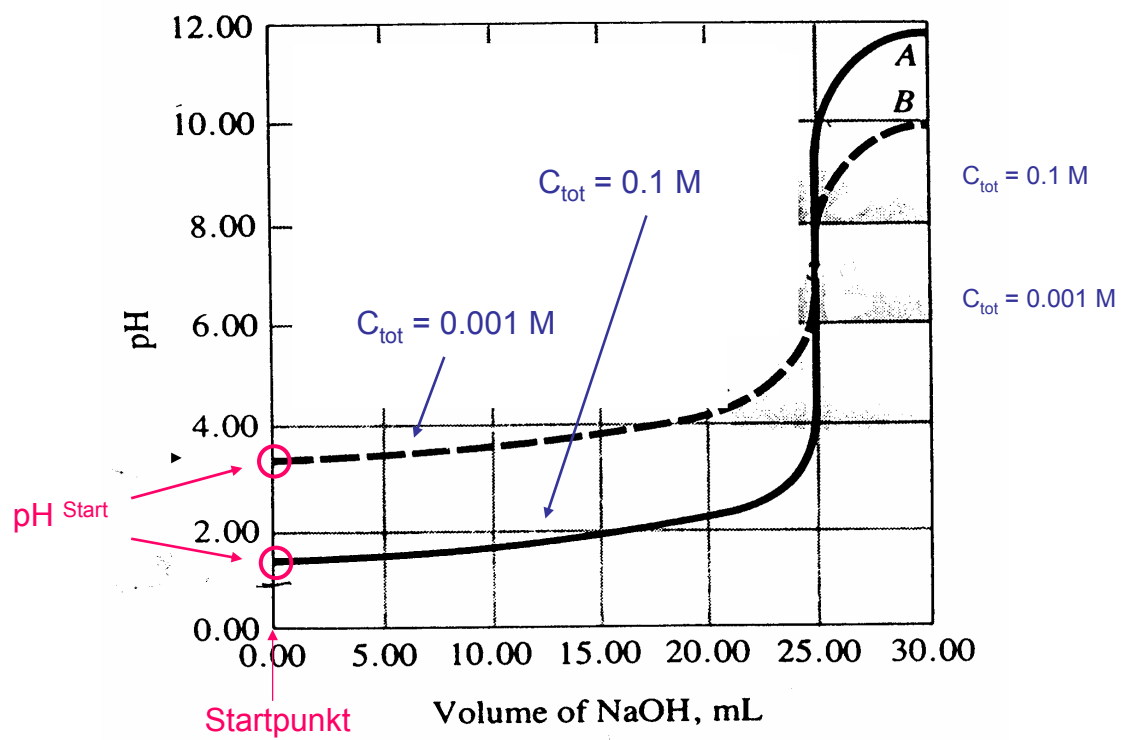
$$pH^{\text{äqu}} = \frac{1}{2} pK_w = 7$$

schwache Base (titriert mit starker Säure)

$$pH^{\text{äqu}} = \frac{1}{2} (pK_w - pK_b - \log C_B)$$

Säure-Basen-Titration

Starke Säure (HCl) wird mit starker Base (NaOH) titriert



pH Werte am Startpunkt

starke Säure

$$pH^{Start} = -\log C_S$$

schwache Säure

$$pH^{Start} = \frac{1}{2}(pK_a - \log C_S)$$

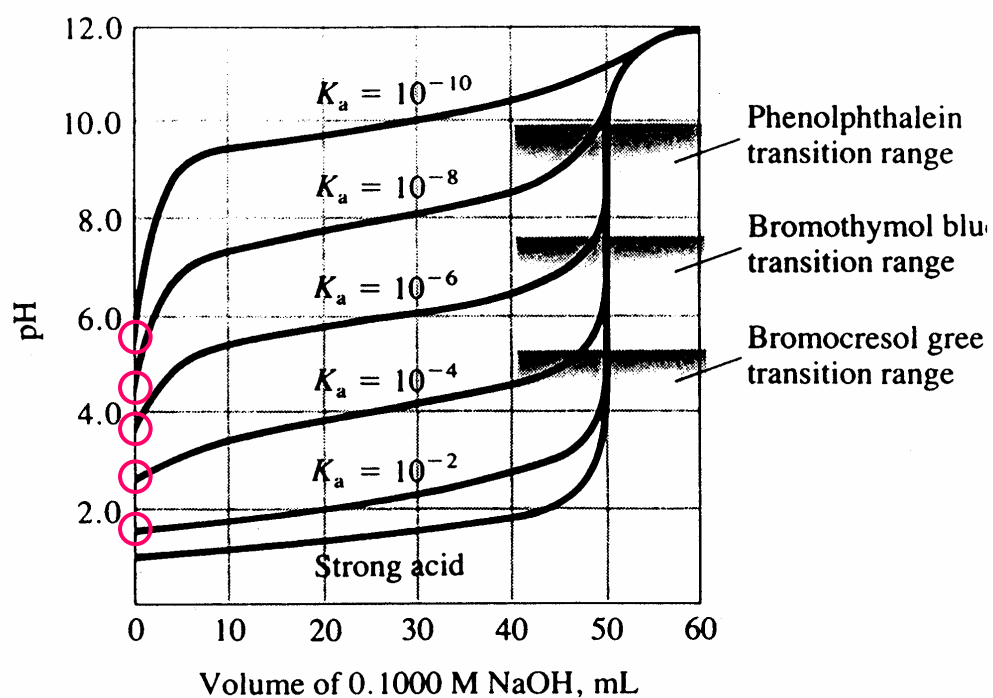
starke Base

$$pH^{Start} = pK_w + \log C_B$$

schwache Base

$$pH^{Start} = pK_w - \frac{1}{2}(pK_b - \log C_B)$$

Schwache Säuren (HAc) werden mit starker Base (NaOH) titriert



Startpunkte: $pH^{S.P.} = 0.5(pK_a - \log C)$

Zweibasige Säure (H_2A) wird mit starker Base (NaOH) titriert

