

Anna Jakubowska

ĆWICZENIE 8

Właściwości elektrolityczne i buforowe wodnych roztworów aminokwasów

Podstawowe pojęcia: aminokwasy, hydroliza, jonizacja, jon obojnaczy, amfotery, elektrolit, protoliza, pH, stała dysocjacji, punkt izoelektryczny, sprzężona zasada, roztwór buforowy, pK, pojemność buforowa.

Wstęp

Aminokwasy są to kwasy karboksylowe zawierające w cząsteczce grupę aminową; w cząsteczce proliny i hydroksyproliny obecna jest grupa iminowa. W aminokwasach, otrzymanych przez *hydrolizę* białek, grupa aminowa występuje zawsze w pozycji α , tzn. jest połączona z tym samym atomem węgla, przy którym znajduje się grupa karboksylowa. Ogólny wzór aminokwasów można przedstawić następująco: $RCH(NH_2)COOH$. α -Atom węgla w aminokwasach jest asymetryczny, a występujące w przyrodzie aminokwasy należą w ogromnej większości do szeregu konfiguracyjnego L.

Oprócz wymienionych już grup funkcyjnych, w cząsteczkach aminokwasów mogą występować jeszcze i inne grupy, np. $-OH$, $-SH$, grupa indolowa lub dodatkowa grupa karboksylowa albo aminowa. Według obecności różnych grup funkcyjnych w łańcuchu bocznym można podzielić aminokwasy na cztery zasadnicze typy: 1) aminokwasy z apolarnym łańcuchem bocznym $-R$, 2) aminokwasy z łańcuchem bocznym $-R$ zawierającym nie ulegającą jonizacji w roztworze wodnym grupę polarną ($-OH$, $-SH$), 3) aminokwasy z dodatkową grupą karboksylową, 4) aminokwasy z dodatkową grupą aminową. Pierwsze dwa typy należą do aminokwasów obojętnych.

Celem ćwiczenia jest zbadanie właściwości buforowych wodnego roztworu alaniny, $CH_3CH(NH_2)COOH$, będącej aminokwasem obojętnym 1-go typu.

Teoria

Zarówno grupa karboksylowa, jak i aminowa aminokwasów łatwo ulegają *jonizacji*. Pierwsza odszczepia proton H^+ i przekształca się w anion karboksylanowy, a druga przyłącza proton, przekształcając się w kation amoniowy. W ten sposób powstają dwubiegunowe *jony obojnacze* zawierające zarówno dodatni, jak i ujemny ładunek:

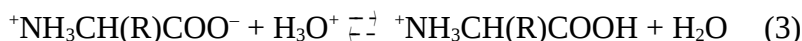


Zgodnie z teorią protonową obojnacze jony aminokwasowe są typowymi *amfoterami*. Ich grupy amoniowe $-NH_3^+$ są kwasowymi protonodawcami, a grupy karboksylanowe $-COO^-$ zasadowymi protonobiorcami.

Obojnaczy jon aminokwasu jednoaminojednokarboksylowego jest słabym *elektrolitem* i w roztworze wodnym w niewielkim stopniu ulega *protolizie*, jednak na tyle dużym, by *pH* roztworu wyraźnie różniło się od *pH* wody. Grupa amoniowa $-NH_3^+$ jest silniejszy kwasem ($K_a = \text{ok. } 10^{-8}$) niż grupa karboksylanowa $-COO^-$ zasadą ($K_b = \text{ok. } 10^{-11}$), zatem w roztworze wodnym tego typu aminokwasu ustala się równowaga protolityczna:



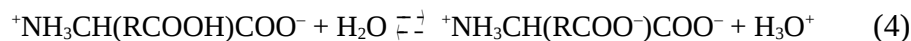
i dzięki powstałym jonom H_3O^+ *pH* roztworu jest mniejsze od 7. W obecności mocnego kwasu równowaga protolityczna reakcji opisanej równaniem (2) jest przesunięta w lewo, a ponadto zachodzi reakcja zgodnie z równaniem:



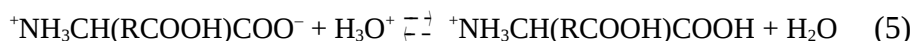
Przy odpowiednim stężeniu mocnego kwasu, roztwór będzie zawierać duży nadmiar jonów obojnych oraz niewielkie, ale równe sobie ilości anionów, $NH_2CH(R)COO^-$, i kationów, $^+NH_3CH(R)COOH$. *pH* takiego roztworu określa się jako *punkt izoelektryczny* danego aminokwasu (*pI*). W tym punkcie cząsteczki aminokwasów nie migrują w polu elektrycznym. W roztworach o $pH < pI$ cząsteczki aminokwasów przemieszczają się do katody, natomiast w roztworach o $pH > pI$ – wędrują do anody. Wartości liczbowe *pI* aminokwasów jednoaminojednokarboksylowych zawierają się w granicach od 5 do 6, nie różnią się więc zbyt od *pH* czystej wody i dlatego też aminokwasy tego typu nazywane są obojętnymi.

Obecność kwasowej grupy karboksylowej $-COOH$ ($K_a = \text{ok. } 10^{-4}$) w łańcuchu bocznym aminokwasów jednoaminodwukarboksylowych sprawia, że

ich roztwory wodne wykazują pH dużo mniejsze od 7. Przyczyną tego jest protoliza obojnacznego jonu zachodząca zgodnie z równaniem:

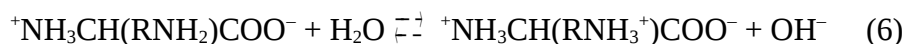


W obecności mocnego kwasu równowaga reakcji (4) ulega przesunięciu w lewo i równocześnie zachodzi protoliza:

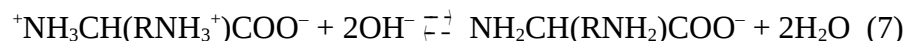


Dla tych aminokwasów należy znacznie bardziej, niż w przypadku aminokwasów jednoaminojednokarboksylowych, zwiększyć stężenie mocnego kwasu w roztworze, aby otrzymać $\text{pH} = \text{pI}$ aminokwasu. W rezultacie wartości liczbowe pI aminokwasów jednoaminodwukarboksylowych są w pobliżu 3. W konsekwencji, tego typu aminokwasy noszą nazwę kwaśnych.

Aminokwasy dwuaminojednokarboksylowe dzięki obecności w łańcuchu bocznym zasadowej grupy $-\text{NH}_2$ ($K_b = \text{ok. } 10^{-6}$) tworzą z wodą roztwory o $\text{pH} > 7$ zgodnie z protolityczną reakcją przebiegającą według równania:



Aby sprowadzić pH roztworu do punktu izoelektrycznego, należy przesunąć w lewo równowagę tej reakcji i zmniejszyć liczbę dodatnich grup amoniowych poprzez dodanie mocnej zasady:



Tak więc aminokwasy dwuaminojednokarboksylowe mają wartości $\text{pI} > 7$ i są nazywane aminokwasami zasadowymi.

Właściwości elektrolityczne aminokwasów obojętnych można rozważyć na przykładzie równania (3) protolizy. Zgodnie z protonową teorią kwasów amfoteryczny jon dipolarny, $^+\text{NH}_3\text{CH}(\text{R})\text{COO}^-$, jest *zasadą sprzężoną* ze słabym kwasem, jakim jest kation $^+\text{NH}_3\text{CH}(\text{R})\text{COOH}$. Zatem miareczkowany mocnym kwasem roztwór aminokwasu staje się mieszaniną słabego kwasu i sprzężonej z nim zasady, mającą właściwości *układu buforowego*. pH układu buforowego jest określone równaniem:

$$\text{pH} = \text{pK}_{\text{HA}} + \log \frac{[\text{A}^-]}{[\text{HA}]} \quad (8)$$

gdzie pK_{HA} jest ujemnym logarytmem stałej dysocjacji słabego kwasu HA, $[HA]$ - jego molowym stężeniem, a $[A^-]$ - molowym stężeniem sprzężonej z nim zasady.

Podstawiając odpowiednie stężenia molowe kationów aminokwasu (słaby kwas) oraz jonów dipolarnych (sprzężona z nim zasada), zależne od ilości dodawanego mocnego kwasu, otrzymuje się wyrażenie opisujące zmiany pH miareczkowanego roztworu aminokwasu:

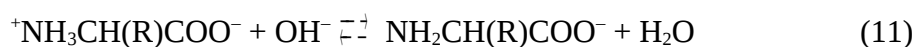
$$pH = pK_1 + \log \frac{[{}^+\text{NH}_3\text{CH(R)COO}^-]}{[{}^+\text{NH}_3\text{CH(R)COOH}]} \quad (9)$$

gdzie K_1 jest stałą dysocjacji grupy karboksylowej tego aminokwasu. Ponieważ wartość pK_1 jest stała (zależy tylko od temperatury), to zmiany pH miareczkowanego roztworu są zależne jedynie od wartości liczbowej drugiego wyrazu prawej strony równania (9). Na początku miareczkowania zdolność buforowania roztworu jest niewielka i nawet niezbyt duże ilości dodawanego mocnego kwasu powodują znaczne zmiany wartości pH. Łatwo zauważyć, że w przypadku równości stężeń molowych jonów dipolarnych i kationów, $[{}^+\text{NH}_3\text{CH(R)COO}^-] = [{}^+\text{NH}_3\text{CH(R)COOH}]$,:

$$\log \frac{[{}^+\text{NH}_3\text{CH(R)COO}^-]}{[{}^+\text{NH}_3\text{CH(R)COOH}]} = \log 1 = 0 \quad (10)$$

i równanie (9) przybiera postać $pH = pK_1$. Wtedy też roztwór aminokwasu wykazuje bardzo dużą *pojemność buforową*.

Jeżeli wodny roztwór aminokwasu będzie miareczkowany mocną zasadą, to będzie zachodzić reakcja zgodnie z równaniem:



Jon dipolarny zgodnie ze swym amfoterycznym charakterem zachowuje się w tych warunkach jak słaby kwas i przekształca się w sprzężoną zasadę $\text{NH}_2\text{CH(R)COO}^-$. Powstaje układ buforowy, którego właściwości są opisane równaniem:

$$pH = pK_2 + \log \frac{[\text{NH}_2\text{CH(R)COO}^-]}{[{}^+\text{NH}_3\text{CH(R)COO}^-]} \quad (12)$$

gdzie K_2 jest stałą dysocjacji grupy amoniowej $-\text{NH}_3^+$. Powstały układ buforowy ma największą pojemność w pobliżu $\text{pH} = \text{p}K_2$.

Krzywe miareczkowania aminokwasów obojętnych 1)-go typu (alanina, walina, leucyna, izoleucyna, fenyloalanina, prolina) oraz 2)-go typu (seryna, metionina, tryptofan, hydroksyprolina), a także glutaminy i asparaginy, mają przebieg analogiczny, a nawet niekiedy niemal identyczny, ponieważ te aminokwasy mają bardzo zbliżone wartości $\text{p}K_1$, $\text{p}K_2$ i pI .

Część praktyczna

Metoda

Badanie właściwości buforowych wodnego roztworu danego aminokwasu polega na wyznaczeniu krzywej miareczkowania tego aminokwasu. W tym celu mierzy się pH roztworu aminokwasu w funkcji zarówno ilości milimoli dodanego mocnego kwasu, jak i ilości milimoli dodanej mocnej zasady. Ponadto oblicza się wartości logarytmów w równaniach: (9) – miareczkowanie mocnym kwasem, i (12) – miareczkowanie mocną zasadą, aby móc określić w jakich przedziałach pH badany aminokwas tworzy układy buforowe. W tych przedziałach pH wartości logarytmów są bliskie zera i roztwór aminokwasu wykazuje dużą pojemność buforową.

W ćwiczeniu badanym aminokwasem jest alanina, $\text{NH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{COOH}$.

Odczynniki i aparatura

- alanina
- roztwór HCl o stężeniu $1,0 \text{ mol/dm}^3$
- roztwór NaOH o stężeniu $1,0 \text{ mol/dm}^3$
- bufor wzorcowy o $\text{pH} = 4$
- bufor wzorcowy o $\text{pH} = 7$
- bufor wzorcowy o $\text{pH} = 9$
- pH -metr z dołączoną elektrodą kombinowaną
- mieszadło magnetyczne z elementem mieszającym
- waga analityczna, łopatka, naczynie służące do przygotowania naważki
- 2 biurety o pojemności 10 cm^3
- pipeta o pojemności 20 cm^3
- 4 zlewki o pojemności 50 cm^3
- kolba miarowa o pojemności 50 cm^3
- tryskawka

Wykonanie ćwiczenia

1. W kolbie miarowej o pojemności 50cm^3 przygotować roztwór alaniny o stężeniu $0,27\text{ mol/dm}^3$.
2. Wykalibrować pH-metr na bufory o pH 7 i 4.
3. Odmierzyć do zlewki 20 cm^3 roztworu alaniny i zmierzyć jego pH.
4. Miareczkować roztwór aminokwasu roztworem kwasu solnego w następujący sposób. Do roztworu alaniny dodawać z biurety początkowo po jednej kropli HCl. Po dodaniu każdej porcji kwasu starannie mieszać roztwór i mierzyć jego pH oraz odczytywać odpowiadającą mu objętość dodanego HCl (V_{HCl}). Gdy zmiany pH pomiędzy kolejnymi odczytami będą nie większe niż 0,07 – 0,09 mierzyć pH roztworu po dodaniu każdych dwóch kropli kwasu, następnie po dodaniu każdych trzech, czterech, itd. kropli HCl. Ilość dodawanych kropli kwasu zwiększa się o jedną gdy wartość pH różni się od wartości pH z poprzedniego pomiaru o około 0,09. Miareczkowanie wykonuje się do momentu, w którym pH roztworu osiągnie wartość około 1,6.
5. Odmierzyć do zlewki 20 cm^3 wody destylowanej (tzw. próba ślepa), zmierzyć pH wody i miareczkować ją roztworem kwasu solnego w sposób opisany w poprzednim punkcie.
6. Wykalibrować pH-metr na bufory o pH 7 i 9.
7. Odmierzyć do zlewki 20 cm^3 roztworu alaniny i zmierzyć jego pH.
8. Roztwór aminokwasu miareczkować roztworem wodorotlenku sodowego do pH 11, wykonując pomiary pH w ten sam sposób, w jaki przeprowadzono miareczkowanie kwasem (punkt 4.).
9. Odmierzyć do zlewki 20 cm^3 wody destylowanej (tzw. próba ślepa), zmierzyć pH wody i miareczkować ją roztworem NaOH w sposób opisany w poprzednim punkcie.
10. Wyniki pomiarów umieścić w tabelach: 1 i 2.

Tabela 1

Miareczkowanie wody		Miareczkowanie roztworu alaniny				
$V_{\text{HCl}} [\text{cm}^3]$	pH	$V_{\text{HCl}} [\text{cm}^3]$	pH	$c_2 [\text{mmole}]$	c_2/c_1	$\log(c_2/c_1)$

V_{HCl} – objętość dodanego HCl. Jest ona liczbowo równa ilości milimoli dodanego HCl i (w przypadku miareczkowania roztworu alaniny) jest także liczbowo równa ilości milimoli kationu alaniny, $^+\text{NH}_3\text{CH}(\text{CH}_3)\text{COOH}$, c_1 (wyjaśnić te związki);

c_2 – ilość milimoli jonu dipolowego alaniny, $^+\text{NH}_3\text{CH}(\text{CH}_3)\text{COO}^-$, przy czym $c_2 = c_0 - c_1$ (wyjaśnić tę równość), gdzie c_0 – początkowa ilość milimoli alaniny w roztworze z punktu 3.

Tabela 2

Miareczkowanie wody		Miareczkowanie roztworu alaniny				
V_{NaOH} [cm^3]	pH	V_{NaOH} [cm^3]	pH	c_2 [mmole]	c_3/c_2	$\log(c_3/c_2)$

V_{NaOH} – objętość dodanego NaOH. Jest ona liczbowo równa ilości milimoli dodanego NaOH i (w przypadku miareczkowania roztworu alaniny) jest także liczbowo równa ilości milimoli anionu alaniny, $\text{NH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{COO}^-$, c_3 (wyjaśnić te związki);

c_2 – ilość milimoli jonu dipolowego alaniny, $^+\text{NH}_3\text{CH}(\text{CH}_3)\text{COO}^-$, przy czym $c_2 = c_0 - c_3$ (wyjaśnić tę równość), gdzie c_0 – początkowa ilość milimoli alaniny w roztworze z punktu 7.

Obliczenia

1. Obliczyć wartości c_2 , c_2/c_1 i $\log(c_2/c_1)$ (tabela 1) oraz wartości c_2 , c_3/c_2 i $\log(c_3/c_2)$ (tabela 2).

2. Wykreślić krzywą miareczkowania alaniny, czyli zależność zmierzonego pH od ilości milimoli zarówno dodanego HCl jak i dodanego NaOH. W tym celu zerową ilość milimoli (dodanego HCl i NaOH) należy umieścić w połowie osi odciętych: na prawo od tego zerowego miejsca osi odkładać ilości milimoli dodanego NaOH, a na lewo – ilości milimoli dodanego HCl. Dla porównania, na ten sam wykres należy nanieść krzywą miareczkowania wody.

3. Wykreślić zależność pH od $\log(c_2/c_1)$ dla HCl, oraz zależność pH od $\log(c_3/c_2)$ dla NaOH. Dla każdej zależności przeprowadzić prostą przez punkty leżące w pobliżu zerowych wartości logarytmów i obliczyć parametry tej prostej. Wyznaczyć wartości pK_1 oraz pK_2 alaniny.

Dyskusja

1. Podać, czy przebiegi krzywych miareczkowania alaniny i wody różnią się między sobą. W przypadku występowania różnic zinterpretować je.

2. Wskazać, w jakich przedziałach pH alanina tworzy układy buforowe.

3. Obliczyć pH roztworu alaniny ($\text{pK}_1 = 2,34$, $\text{pK}_2 = 9,69$) o stężeniu $0,1 \text{ mol/dm}^3$, gdy występuje ona w formie:

a) chlorowodorku (kationu),

b) jonu obojnego.

Literatura cytowana

[1] B. Filipowicz, W. Ostrowski, *Ćwiczenia z chemii ogólnej i fizjologicznej*, Państwowy Zakład Wydawnictw Lekarskich, Warszawa, 1976, rozdz. 24.

[2] L. Stryer, *Biochemia*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 1999.

Literatura uzupełniająca

[3] A. Zgirski, R. Gondko, *Obliczenia biochemiczne*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 1998, rozdz. 4.

Zagadnienia dodatkowe

Równowagi kwasowo-zasadowe. Teoria Brönsteda kwasów i zasad. Półogniwa, potencjał półogniwa, rodzaje półogniw. Ogniwa elektrochemiczne, siła elektromotoryczna. Potencjometryczny pomiar pH.