

M7. WYZNACZANIE PUNKTU IZOELEKTRYCZNEGO ŻELATYNY METODĄ WISKOZYMETRYCZNĄ

Zagadnienia: Punkt izoelektryczny, żelatyna: budowa cząsteczki i zastosowanie w medycynie i farmacji, roztwory buforowe, równania Hendersona-Hasselbalcha, gęstość i jej wyznaczanie, pomiar lepkości, lepkość dynamiczna, lepkość kinematyczna

Wstęp

Żelatyna jest naturalnie występującym białkiem. Odgrywa kluczową rolę w medycynie i farmacji ze względu na swoje unikalne właściwości fizykochemiczne, biokompatybilność oraz biodegradowalność. Jest stosowana w wielu produktach i procedurach, zarówno jako substancja pomocnicza, jak i aktywny składnik (**produkcja kapsułek, nośnik substancji leczniczych, materiały opatrunkowe, inżynieria tkankowa, suplementy diety, diagnostyka i badania laboratoryjne**).

Punkt izoelektryczny (pI) to wartość pH, przy której cząsteczka amfoteryczna, taka jak białko, posiada zerowy ładunek netto. Punkt izoelektryczny żelatyny zależy od proporcji zasadowych i kwasowych aminokwasów w jej strukturze. Przeciętny punkt izoelektryczny żelatyny mieści się w zakresie **pH 4,7–5,2**, co wynika z obecności takich aminokwasów jak glicyna, prolina, hydroksyprolina oraz kwasy: glutaminowy i asparaginowy.

Może zachowywać się zarówno jak kwas (oddając protony), jak i jak zasada (przyjmując protony).

$\text{pH} < \text{pI}$ – żelatyna posiada ładunek dodatni, ponieważ grupy aminowe ($-\text{NH}_2$) ulegają protonowaniu do formy $-\text{NH}_3^+$,

$\text{pH} = \text{pI}$ – suma ładunków dodatnich i ujemnych w cząsteczce jest równa zero,

$\text{pH} > \text{pI}$ – żelatyna posiada ładunek ujemny, ponieważ grupy karboksylowe ($-\text{COOH}$) tracą protony, tworząc formy $-\text{COO}^-$.

Jednym z prostych sposobów wyznaczania punktu izoelektrycznego (pI) żelatyny jest **metoda wiskozymetryczna**. Opiera się na pomiarze lepkości roztworu żelatyny w różnych wartościach pH. Stałą, określoną wartość pH roztworu otrzymuje się dzięki roztworowi buforowemu. W punkcie izoelektrycznym żelatyny jej cząsteczki posiadają zerowy ładunek netto, co minimalizuje oddziaływania elektrostatyczne, a w konsekwencji prowadzi do spadku lepkości roztworu.

Roztwory buforowe to mieszaniny, które utrzymują względnie stałe pH nawet po dodaniu niewielkich ilości mocnego kwasu lub zasady. Ich działanie opiera się na obecności słabego kwasu i jego soli z mocną zasadą (lub odwrotnie), które tworzą równowagę chemiczną zdolną do neutralizowania dodanych jonów wodorowych (H^+) lub wodorotlenkowych (OH^-).

Mechanizm działania roztworów buforowych można schematycznie opisać:

Dodanie kwasu (jonów H^+):

- Jony H^+ reagują ze sprzężoną zasadą (A^-), zwiększając stężenie cząsteczek słabego kwasu (HA).
- Dzięki temu wzrost stężenia H^+ w roztworze jest minimalny, a pH zmienia się nieznacznie.

Dodatek zasady (jonów OH^-):

- Jony OH^- reagują z jonami H^+ tworząc wodę i zmniejszając ich stężenie. Wówczas równowaga przesuwa się w stronę dysocjacji słabego kwasu (HA), co uzupełnia brakujące jony H^+ .

Obliczanie pH roztworu buforowego opiera się na **równaniu Hendersona-Hasselbalcha**:

$$pH = pK_a + \log \frac{[HA]}{[A^-]} \quad (M7-1)$$

Gdzie:

pH – wartość pH roztworu,

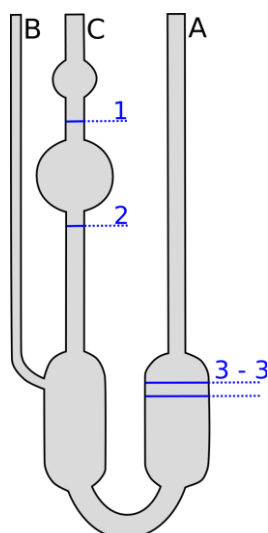
pK_a – ujemny logarytm dziesiętny stałej dysocjacji kwasu (K_a),

$[A^-]$ – stężenie anionu, sprzężonej zasady słabego kwasu,

$[HA]$ – stężenie niedysocjowanego słabego kwasu.

W tym ćwiczeniu korzystać będziemy z buforu octanowego, w którego skład wchodzi kwas octowy i octan sodu.

Pomiaru lepkości dokonywać będziemy korzystając z wiskozymetru Ubbelohdego. Pomiaru lepkości dokonuje się mierząc czas przepływu cieczy przez kapilarę o znanej grubości. Im lepkość roztworu jest większa, tym czas przepływu będzie dłuższy. Lepkość roztworów silnie zależy od temperatury, dlatego też pomiarów dokonuje się w stałej,



kontrolowanej temperaturze.

Rysunek M7-1 Schemat wiskozymetru Ubbelohdego

Współczynnik dyfuzji zależy od ośrodka, w którym dyfuzja przebiega mianowicie dla układów gazowych będzie charakteryzował się największą wartością, gdyż tam

Wykonanie ćwiczenia

Celem ćwiczenia jest wyznaczenie punktu izoelektrycznego żelatyny na podstawie lepkości jej wodnych roztworów w różnych pH.

- Przygotuj 250g 1% roztworu żelatyny w wodzie.
 - Oblicz jaką masę żelatyny i wody należy zmieszać
 - Przygotuj roztwór, delikatnie go podgrzewając aż do całkowitego rozpuszczenia
 - Schłódź otrzymany roztwór
- Wspólnie z Prowadzącym ustaw temperaturę termostatu na 25 °C i uruchom pompę. Pozostaw termostat, aby temperatura w nim mogła się ustabilizować.
- Przygotuj 6 roztworów buforu octanowego o objętości 100 ml i pH zmieniającym się co 0,5 w zakresie 3,5 do 6,0
 - Korzystając ze wzoru Hendersona-Hasselbalcha oblicz, ile kwasu octowego i octanu sodu należy zmieszać, wyniki obliczeń zapisz w [Tabeli M1-1](#).
 - Podpisz kolbki, w których będą przygotowane roztwory
 - Zmieszaj odpowiednie ilości roztworów kwasu octowego i octanu sodu
- Sprawdź i zanotuj stałą K wiskozymetru
- Przepłucz wiskozymetr: napełnij go wodą, następnie usuń ją przy pomocy pompy wodnej
- Zmieszaj roztwór żelatyny z roztworami buforowymi o różnych pH w stosunku 1:1, podpisz kolbki.
- Umieść przygotowane roztwory (żelatyna w buforze) w misie termostatu.
- Procedurę powtórz dla wszystkich roztworów
- Wykonaj pomiary niezbędne do wyznaczenia gęstości roztworów:
 - Umieść na wadze czystą, suchą zlewkę
 - Wytaruj wagę
 - Pobierz 20 cm³ badanego roztworu i przenieś do zlewki
 - Odczytaj i zanotuj masę pobranego roztworu
 - Zmierz czas przepływu tego roztworu przez kapilarę wiskozymetru (patrz kolejny punkt)
- Pomiar czasu przepływu cieczy przez kapilarę wiskozymetru:
 - Przepłucz wiskozymetr dwukrotnie małą ilością badanego roztworu
 - Do ramienia A wiskozymetru wprowadź badaną ciecz tak, aby jej poziom ustalił się pomiędzy kreskami 3–3 na ramieniu A wiskozymetru

- Za pomocą pompki zaciągnij ciecz aż do zbiornika C nieco powyżej linii 1 (zatykając jednocześnie wylot ramienia B).
- Pozwól na swobodne opadanie cieczy, zwalniając wszystkie otwory wiskozymetru
- Zmierz czas opadania menisku od kreski 1 do kreski 2.
- Pomiar powtórz 3-krotnie. Wyniki zapisz w tabeli 1
- Jeśli kolejne wyniki dla danego stężenia maleją lub rosną, oznacza to, że badana ciecz nie osiągnęła jeszcze zadanej temperatury. Należy wówczas odczekać kilka minut i powtórzyć pomiary.
- Po zakończeniu pomiaru jednego roztworu - usuń go z wiskozymetru przy pomocy pompy wodnej
- Przejdź do pomiarów dla kolejnego roztworu (zaczynij od pomiarów gęstości! Patrz poprzedni podpunkt)
- Wyniki zanotuj w Tabeli M1-2.

Tabela M7-1 Przygotowanie roztworów buforowych

pH	V_{kw}	V_{soli}
3,5		
4		
4,5		
5		
5,5		
6		

Tabela M7-2 Wyniki pomiarów

pH	m dla $V=20cm^3$	t_1	t_2	t_3	$t_{\text{średnie}}$	
3,5						
4						
4,5						
5						
5,5						
6						

Opracowanie wyników

- Oblicz wartość lepkości dynamicznej (μ)
- Oblicz gęstości otrzymanych roztworów
- Znając gęstość roztworu oblicz wartość lepkości kinematycznej (ν)
- Wykreśl zależność $\nu = f(pH)$
- Odczytaj z wykresu wartość punktu izoelektrycznego będącą minimalną wartością z otrzymanych danych.
- Porównaj otrzymaną wartość punktu izoelektrycznego z wartością literaturową.

Literatura

doi: 10.1021/ed040p468