

ПОТЕНЦИОМЕТРИЧЕСКОЕ ТИТРОВАНИЕ

Т.А.Преображенская

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение

1. Вопросы для подготовки к работе	2
2. Потенциометрическое титрование.....	7
2.1. Особенности титрования растворов амфолитов.....	8
2.2. Кривые титрования белков.....	8
3. Реакции, сопровождающиеся выходом или поглощением протонов.....	9
3.1. Креатинкиназная реакция.....	10
3.1.1. Изменение рН при протекании креатинкиназной реакции....	10

Практическая часть

4. Описание установки для автоматического титрования.....	12
5. Порядок работы при регистрации кривых титрования.....	15
6. Упражнения.....	17
6.1. Определение "неизвестной" аминокислоты.....	17
6.2. Титрование яичного альбумина.....	18
6.3: Определение константы равновесия креатинкиназной реакции....	19

Приложение

7. Кислотно-основные свойства функциональных групп аминокислот.....	21
7.1. Кислоты и основания.....	21
7.2. Связь между строением молекулы и кислотно-основными свойствами.....	23
8. Кислотно-основное равновесие.....	25
8.1. Ионные формы молекул амфолитов. Изоэлектрическая точка.....	25
8.2. Расчет кислотно-основного равновесия; рН раствора глицина.....	27
8.2.1. Зависимость состава раствора глицина от рН.....	29
8.2.2. Связь между изоэлектрической точкой, условием электронейтральности и искомым рН.....	30
8.2.3. Расчет поправки.....	30
8.2.4. Выводы.....	30
Литература.....	31

Настоящая задача знакомит с кислотно-основными свойствами некоторых биологически важных веществ, теми свойствами, которыми определяются заряды макромолекул и низкомолекулярных компонентов клеток* и от которых зависит концентрация ионов гидроксония во внутри- и внеклеточных жидкостях.

Для выполнения практического задания требуется подготовка в объёме спецкурсов 6 и 7 семестров специализации «биофизика». Вопросы для подготовки приведены в начале описания (стр. 2 – 4).

1 и 2 упражнения практической части посвящены анализу кривых титрования аминокислот и белка. В 3-м упражнении метод потенциометрического титрования применяется для регистрации креатинкиназной реакции.

Приложение содержит необходимую терминологию, сведения об ионизации различных кислотных и основных групп, методы расчёта кислотно-основного равновесия.

1. Вопросы для подготовки к работе.

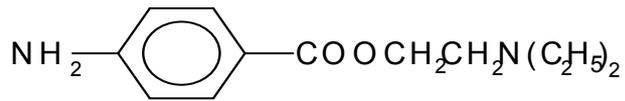
1.1. Кислоты и основания. Ионные формы молекул.

1. Найдите в таблицах 1.1 и 1.2 самые сильные и самые слабые кислотные группы,.... основные группы.
2. Сравните карбоксильные группы карбоновых кислот и аминокислот. У каких более выражены кислотные свойства и почему?
3. Какие аминокислоты содержат боковые группы кислотного характера?, ...основного характера?

*см. “The Importance of Being Ionized”
in F.H. Westheimer, “Why Nature Chose Phosphates”,
Science, 1987, v. 235, 1173-1178.

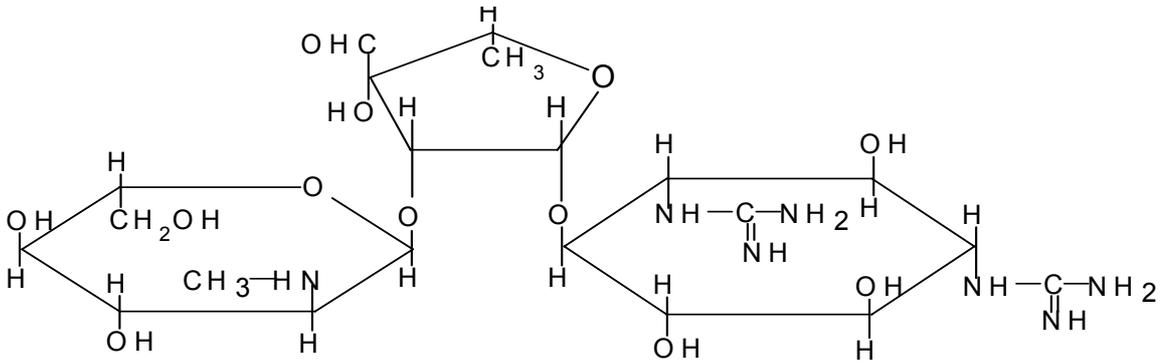
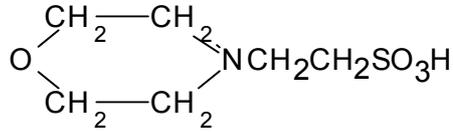
4. Укажите ионогенные группы в следующих соединениях. Как они заряжены при нейтральных рН?

а) новокаин -



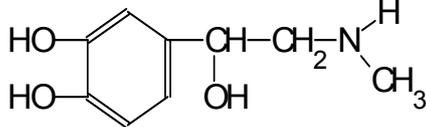
б) 2-(N-морфолино)-

этансульфоновая кислота (MES)



в) стрептомицин

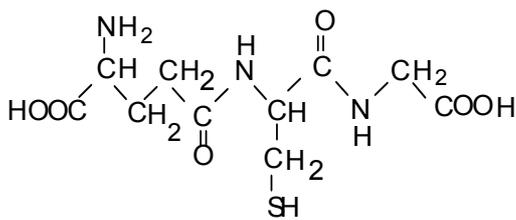
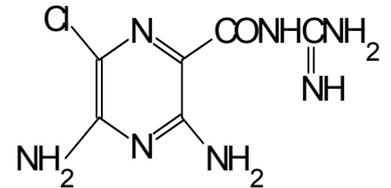
г) адреналин



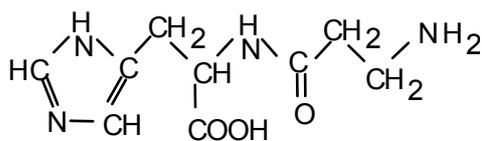
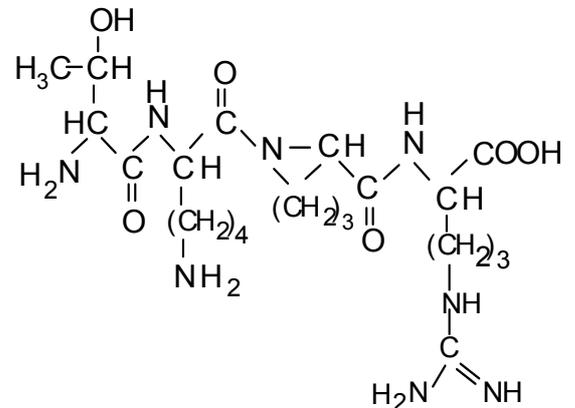
д) холинхлорид



е) амилорид



ж) глутатион (γ-глутамил-цистеинил-глицин)



з) карнозин (β-аланил - гистидин)

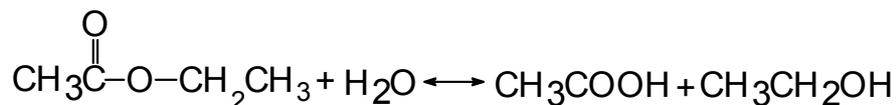
и) тафтсин (треонил-лизил-пролил-аргинин)

1.2. Кислотно-основное равновесие.

1. Вычислите pH 1 М раствора
 - а) уксусной кислоты,
 - б) триса.
2. Чему равен pH раствора, содержащего 1 моль/л триса и 0,1 моль/л глицина?
3. Дано соединение, содержащее A кислотных и B основных групп со следующими величинами pK , расположенными в порядке возрастания: $pK_1, pK_2, \dots, pK_{(A+B)}$. Как расположена изоэлектрическая точка соединения относительно этих величин?
4. Найдите изоэлектрические точки глутатиона, карнозина и тафтсина.
5. Оцените pH достаточно концентрированного раствора
 - а) моноаминодикарбоновой кислоты,
 - б) диаминомонокарбоновой кислоты.
6. Оцените отношение количества неионизованных (NH_2CH_2COOH) молекул, присутствующих в растворе глицина, к количеству биполярных ионов.
7. При каких условиях pH раствора аминокислоты совпадает с изоэлектрической точкой?

1.3. Реакции, сопровождающиеся выходом или поглощением протонов.

1. При каких значениях pH гидролиз этилацетата



сопровождается закислением?

2. Запишите уравнение креатинкиназной реакции для $4 < pH < 7,5$.
3. При каких значениях pH гидролиз глицил-глицина (см. табл. 1.1) можно зарегистрировать с помощью pH-стата?

кислоты		pK _a COOH- групп	основания		pK _a NH ₃ ⁺ - групп
муравьиная	HCOOH	3,8	аммиак	NH ₃	9,2
уксусная	CH ₃ COOH	4,8	метиламин	CH ₃ NH ₂	10,6
пропионовая	CH ₃ CH ₂ COOH	4,9			
каприловая	CH ₃ (CH ₂) ₆ COOH	4,9	этилен- диамин	NH ₂ (CH ₂) ₂ NH ₂	7,0 10,0
хлоруксусная	CH ₂ ClCOOH	2,9			
трихлоруксусная	CCl ₃ COOH	-0,1	пропилен- диамин	NH ₂ (CH ₂) ₃ NH ₂	8,6 10,6
α-хлорпропионовая	CH ₃ CH ₂ ClCOOH	2,8			
β-хлорпропионовая	CH ₂ ClCH ₂ COOH	4,1	бутилен- диамин	NH ₂ (CH ₂) ₄ NH ₂	9,3 10,8
гликолевая	HOCH ₂ COOH	3,8			
молочная	CH ₃ CH(OH)COOH	3,8	трис	$\begin{array}{c} \text{CH}_2\text{OH} \\ \\ \text{H}_2\text{N}-\text{C}-\text{CH}_2\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2\text{OH} \end{array}$	8,1
пировиноградная	CH ₃ COCOOH	2,5			
ацетоуксусная	CH ₃ COCH ₂ COOH	3,6	анилин	NH ₂ - 	4,6
левулиновая	CH ₃ CO(CH ₂) ₂ COOH	4,6			
янтарная	HOOC(CH ₂) ₂ COOH	4,2 5,5	ацетамид	$\text{CH}_3-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{NH}_2$	1
адипиновая	HOOC(CH ₂) ₄ COOH	4,5 5,5			

аминокислоты и дипептиды

глицин	CH ₂ NH ₂ COOH	2,3		9,6
α-аланин	CH ₃ CHNH ₂ COOH	2,3		9,7
β-аланин	H ₂ NCH ₂ CH ₂ COOH	3,5		10,3
γ-аминомасляная	NH ₂ (CH ₂) ₃ COOH	4,0		10,6
ε-аминокапроновая	NH ₂ (CH ₂) ₅ COOH	4,4		10,8
глицил-глицин	$\text{H}_2\text{NCH}_2\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{NHCH}_2\text{COOH}$	3,2		8,3
аланил-глицин	$\text{H}_2\text{NCH}(\text{H}_3\text{C})\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{NHCH}_2\text{COOH}$	3,2		8,2
аспарагиновая кислота	COOHCH ₂ CHNH ₂ COOH	α1,9 β3,7		9,6
аспарагин	H ₂ NCOCH ₂ CHNH ₂ COOH	2,0		8,8
глутаминовая кислота	COOH(CH ₂) ₂ CHNH ₂ COOH	α2,2 γ4,3		9,7
глутамин	H ₂ NCO(CH ₂) ₂ CHNH ₂ COOH	2,2		9,1

Таблица 1. 1

pK_a карбоксильной и аммонийной групп в различных соединениях.

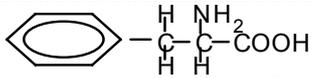
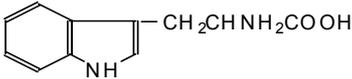
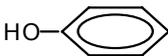
аминокислоты		pK _a COOH- групп	pK _a NH ₃ ⁺ - групп	Функциональные группы и содержащие их вещества	pK _a функц. группы
валин	$\text{H}_3\text{C}-\underset{\text{H}_3\text{C}}{\text{HC}}-\underset{\text{NH}_2}{\text{HC}}-\text{COOH}$	2,3	9,6	$-\text{N}^+=\text{C}^{\ominus}-\text{N}-$ <u>гуанидиний</u>	
лейцин	$\text{H}_3\text{C}-\underset{\text{H}_3\text{C}}{\text{HC}}-\text{CH}_2-\underset{\text{NH}_2}{\text{HC}}-\text{COOH}$	2,3	9,6	гуанидин $\text{H}_2\text{N}-\overset{\text{NH}}{\underset{\text{NH}_2}{\text{C}}}$	14
аргинин	$\text{HN}=\text{C}(\text{H}_2\text{N})-\text{N}(\text{H})-(\text{CH}_2)_3\text{CHNH}_2\text{COOH}$	2,2	9,0		12,5
креатин	$\text{HN}=\text{C}(\text{NH}_2)-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2-\text{COOH}$	2,6			12
лизин	$\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_4\text{CHNH}_2\text{COOH}$	2,2	α9,0 ε10,5		
пролин	$\text{CH}_2-\text{CH}_2-\underset{\text{CH}}{\text{C}}\text{COOH}$ CH_2-NH	2,2	10,6	$\text{HC}=\text{C}-$ $\text{H}-\text{N}^+-\text{N}-\text{H}$ $\text{C}-\text{H}$ <u>имидазолий</u>	
фенил- аланин		1,8	9,1		
триптофан		2,8	9,4	имидазол $\text{HC}=\text{C}-\text{H}$ $\text{N}-\text{C}-\text{H}$ $\text{N}-\text{H}$	6,9
гистидин	$\text{HC}=\text{C}-\text{CH}_2\text{CHNH}_2\text{COOH}$ $\text{N}-\text{H}$ $\text{C}-\text{H}$	1,8	9,2		6,0
серин	$\text{HOCH}_2\text{CHNH}_2\text{COOH}$	2,2	9,2	<u>гидроксильная (OH-группа)</u>	
треонин	$\text{H}_3\text{CCHOHCHNH}_2\text{COOH}$	2,1	9,1	этанол $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$	>14
				трифторэтанол $\text{CF}_3\text{CH}_2\text{OH}$	11,4
				фенол $\text{HO}-$ 	10
тирозин	$\text{HO}-$ 	2,2	9,1		10,1
				<u>сульфгидрильная (SH-группа)</u>	
метионин	$\text{CH}_3-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\text{COOH}$	2,3	9,2	β-меркаптоэтанол $\text{HSCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$	9,5
				тиоуксусная к-та CH_3COSH	3,4
		3,7		тиогликолевая к-та HSCH_2COOH	10,3
цистеин	$\text{HSCH}_2\text{CHNH}_2\text{COOH}$	2,0	10,3		8,2

Таблица 1.2

pK_a карбоксильных, аммонийных и других функциональных групп.
Родственные по функциональным группам соединения обведены рамками.

2. Потенциометрическое титрование.

Титрование - метод количественного химического анализа, основанный на связывании определяемого вещества стандартизированным реагентом – титрантом. Титрант добавляют к раствору постепенно, - до начала появления свободного титранта в растворе – до так наз. конечной точки титрования или точки эквивалентности. При потенциометрическом титровании появление свободного титранта в растворе регистрируют по изменению потенциала электрода, избирательного к данному титранту.

Кислотно-щелочное титрование основано на реакции нейтрализации. В качестве титрантов используют сильные кислоты или щелочи (в настоящей работе - NaOH). Регистрируется разность потенциалов между стеклянным электродом (его потенциал зависит от pH) и каломельным электродом сравнения. Связь между pH раствора и количеством добавленного титранта изображают в виде кривой титрования. В настоящей работе при изображении этих кривых по оси "x" откладывается величина pH (так же как и для кривых диссоциации), по оси "y" - количество титранта.

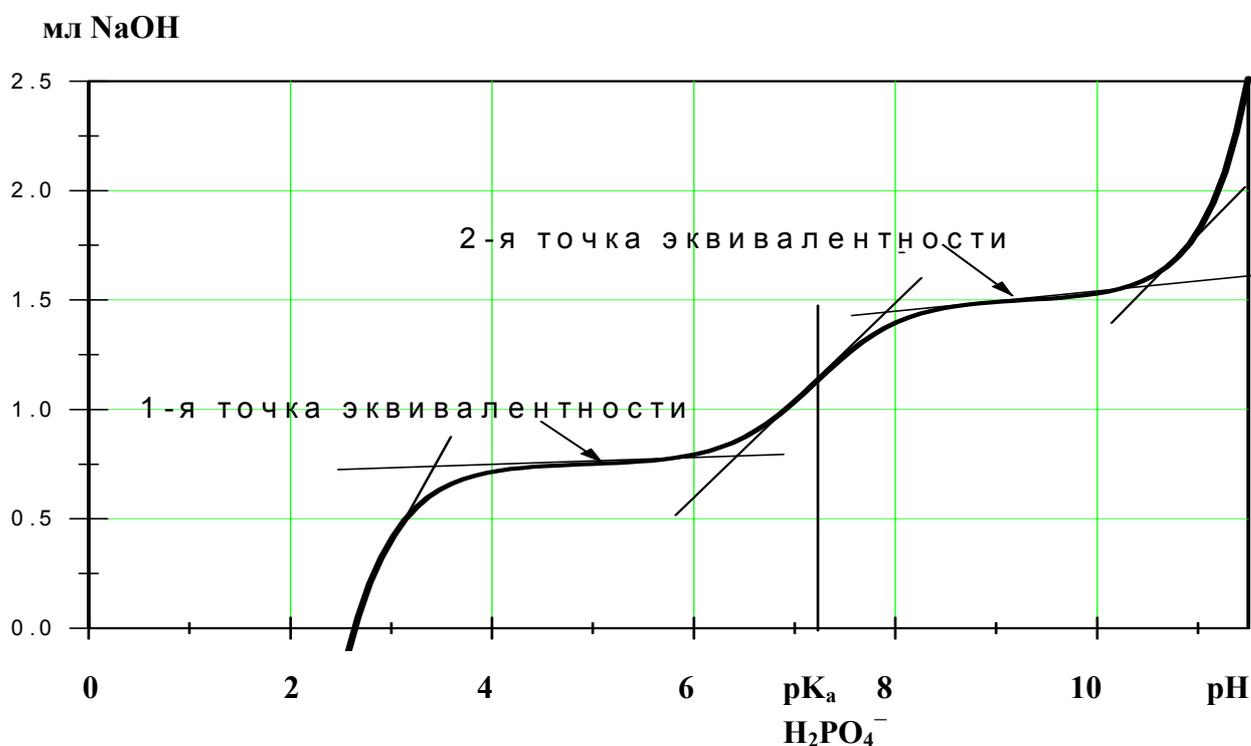


рис.2.1 Кривая титрования 15мл 0,003М фосфорной кислоты (H_3PO_4) 0,06М NaOH

Кривые титрования низкомолекулярных соединений рассчитывают, используя систему уравнений (8.1). На рис.2.1 приведена кривая титрования фосфорной кислоты едким натром, показан способ определения точек эквивалент-

ности и показателя кислотности (pK_a) второй диссоциирующей группы. Наиболее удобен для анализа средний участок кривой титрования (от 5 до 9 ед. рН на рис 2.1), повторяющий по форме кривую диссоциации (рис.7.1), тогда как при высоких и низких значениях рН заметная часть титранта расходуется на создание нужной концентрации ионов гидроксония, что затрудняет анализ кривой в этих областях рН.

В самом деле, если для изменения рН растворителя от 5 до 9 ед. рН требуется всего около 5 мкл NaOH, то для его изменения от 9 до 12 – более 250 мкл. Чтобы выявить группы, диссоциирующие в крайних областях рН, нужно из кривой титрования раствора вычистить кривую титрования растворителя. Разрешение улучшается при одновременном увеличении концентрации и растворенного вещества, и титранта. При увеличении концентраций в 10 раз средний участок раздвигается на 2 ед. рН.

2.1. Особенности титрования растворов амфолитов.

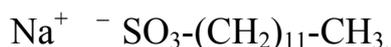
Значения рН растворов амфолитов, к которым относятся аминокислоты и белки, занимают промежуточное положение относительно величин pK_a этих групп (см., например, случай глицина). Полную кривую титрования получают либо (1) в два приема, титруя кислотой от исходного рН в сторону закисления и щелочью -от исходного рН в сторону защелачивания, либо (2) доводят рН раствора с помощью HCl до нужной начальной точки и записывают полную кривую. Для выявления групп, диссоциирующих при высоких и низких значениях рН, из суммарной кривой вычитают кривую титрования HCl. Этот способ применяется в настоящей работе при анализе растворов амфолитов.

2.2. Кривые титрования белков.

При образовании полипептидной цепи заряды внутренних α -карбоксылных и α -аминогрупп исчезают; вклад в общий заряд белка дают боковые группы, а также концевые α -карбоксылная и α -аминогруппа. Заряд молекулы белка, так же как и заряды аминокислот, зависит от величины рН. При определенном для каждого белка значении рН его молекулы электронейтральны. Это значение называют *изоэлектрической точкой* (pI). Величины pK_a большинства аминокислотных остатков в белках близки к значениям, характерным для аминокислот. (Исключение составляют остатки, расположенные вблизи активных центров). Поэтому по кривой титрования белка можно определить количество тех или иных заряженных боковых групп. Вместе с тем, из-за влияния соседних

зарядов величины pK_a отдельных групп смещены по-разному, в результате чего кривые титрования белков более размыты по сравнению с низкомолекулярными соединениями.

В настоящей задаче для выявления групп с низкими значениями pK_a используется так называемый сдвиг заряда, происходящий при образовании комплекса белка с анионным детергентом - додецилсульфатом натрия (ДДС-Na):



В образующихся комплексах отношение ДДН к белку одинаково для разных белков и составляет 1,4 г ДДС-Na на 1 г белка. Сульфокислоты относятся к сильным кислотам, поэтому додецилсульфат заряжен отрицательно при любом pH. Связываясь с неполярными аминокислотными остатками, додецилсульфат сообщает молекуле белка отрицательный заряд, пропорциональный молекулярной массе белка, и придает ей форму жесткого стержня диаметром 1,8 нм. Электрофорез в присутствии додецилсульфата натрия используют для определения молекулярных масс полипептидов.

Применение ДДН упрощает анализ кривой титрования белка в области малых pH. Из-за того, что заряд связанного с белком додецилсульфата намного превосходит собственный заряд молекулы белка, диссоциация протонов от разных групп затрудняется в равной степени, и вся кривая титрования оказывается сдвинутой в сторону бóльших pH, что улучшает её разрешение.

3. Реакции, сопровождающиеся выходом или поглощением протонов.

Протоны появляются или поглощаются в ходе химических реакций в результате образования или исчезновения кислотных или основных групп или изменения их силы. Такие реакции, как дегидрирование, гидролиз, перенос групп (киназные) сопровождаются изменением pH, причем величина этого изменения зависит от того значения pH, при котором протекает реакция. Их можно зарегистрировать двумя способами: 1) по изменению pH, 2) по объему титранта, необходимого для нейтрализации образующейся кислоты или щелочи - с помощью pH-стата. Второй способ используется в настоящей работе при определении константы равновесия креатинкиназной реакции.

3.1. Креатинкиназная реакция.

Креатинкиназа катализирует реакцию фосфорилирования креатина аденозинтрифосфатом:



Ускоряя прямую и обратную реакции, креатинкиназа, как всякий катализатор, обеспечивает быстрое достижение равновесия реакции. Благодаря этому в содержащих креатинкиназу клетках даже во время быстрых и больших затрат энергии концентрация АТФ поддерживается на постоянном уровне.

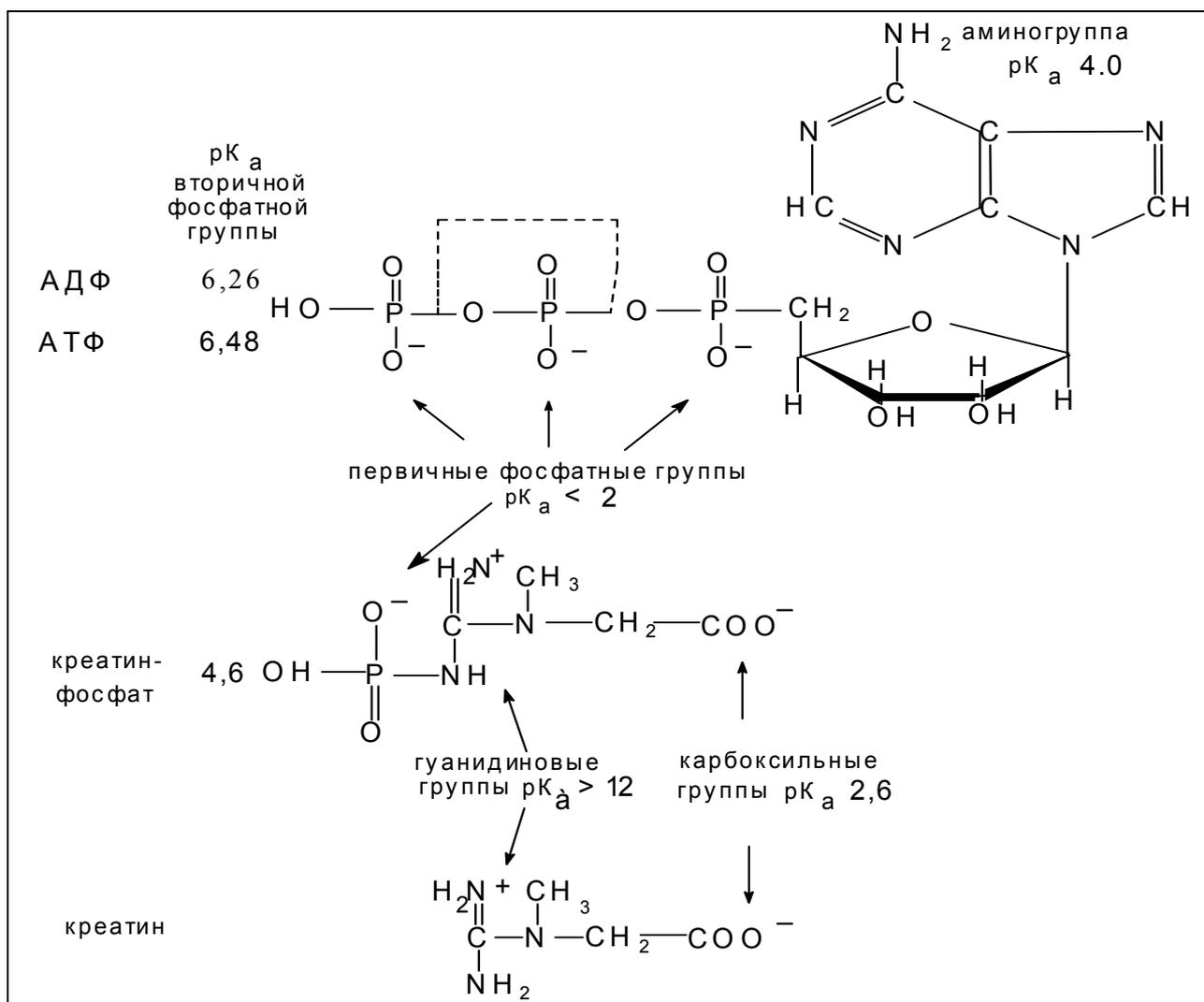
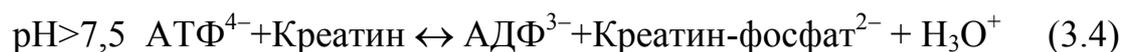
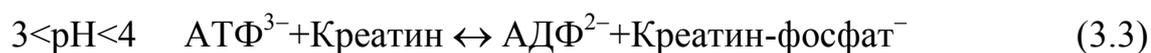


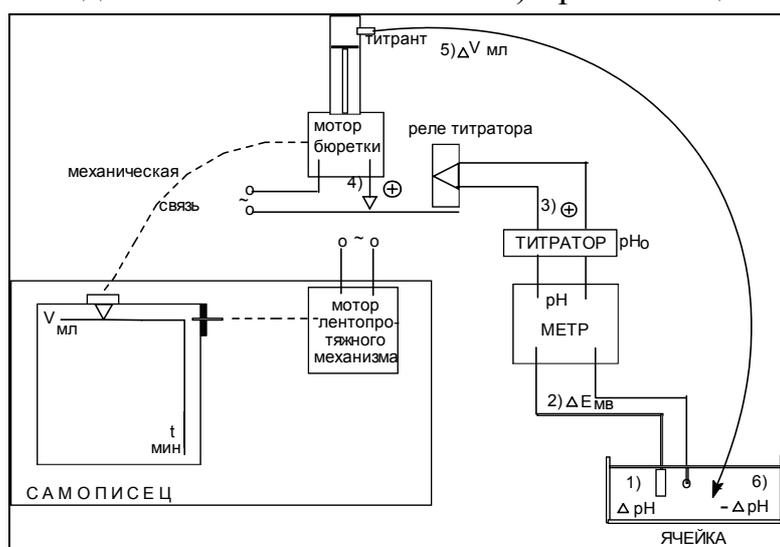
табл.3.2. Ионогенные группы участников креатинкиназной реакции

ПРАКТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

6. Установка для автоматического титрования.

В работе используется комплект приборов фирмы "Radiometer", состоящий из титратора, рН-метра, автоматической бюретки, самописца и ячейки.

На рис. 6.1 показана работа приборов в режиме рН-стата. Цифры указывают последовательность событий: 1) протекающая в ячейке реакция изменила рН



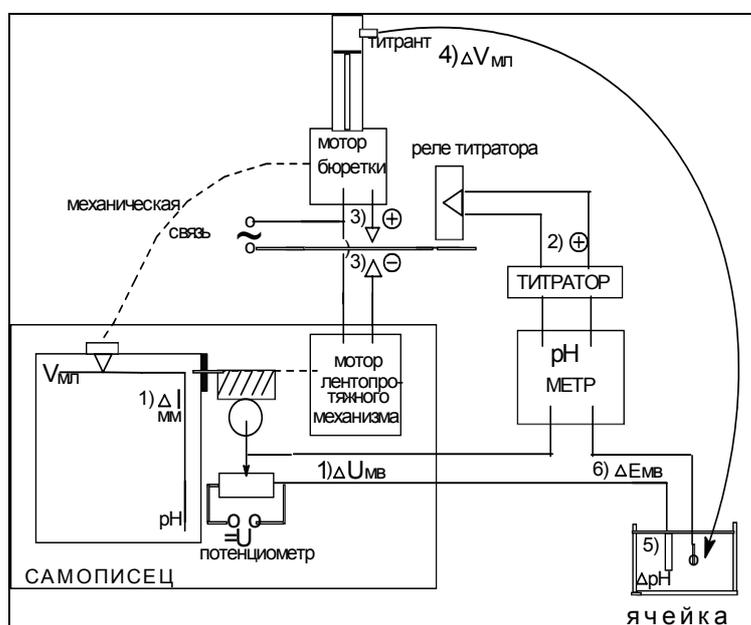
от pH_0 до $pH_0 + \Delta pH$;
 2) соответствующее изменение разности потенциалов между электродами ΔE мВ поступило на рН-метр и титратор;
 3) отклонение сигнала от уровня настройки титратора (pH_0) вызвало импульс тока в обмотке реле на выходе титратора;
 4) включился мотор бюретки;

рис.6.1. Работа приборов в режиме рН-стата. 5) в ячейку добавлено ΔV мл титранта, одновременно переместилось перо самописца;

6) рН раствора вернулся к исходному значению - pH_0 .

В режиме записи кривой титрования (рис.6.2) изменение сигнала инициируется искусственно - с помощью "скользящего" напряжения, снимаемого с потенциометра, связанного с лентопротяжным механизмом самописца.

Последовательность событий такова: 1) включенный самописец переместил бумагу на Δl мм и одновременно

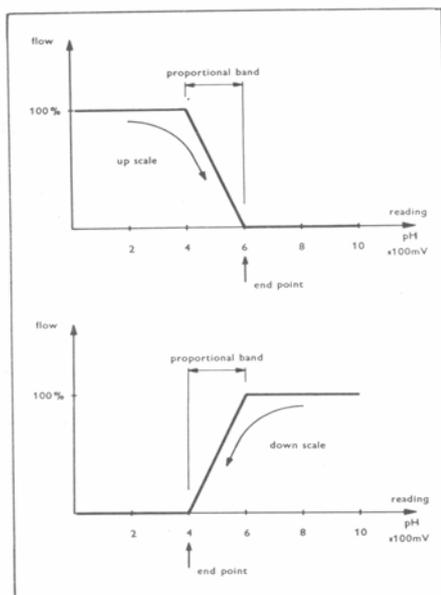


изменил разность потенциалов на входе рН-метра на ΔU мВ;
 2) в реле на выходе титратора появился импульс тока;
 3) лентопротяжный механизм остановлен, одновременно включена бюретка;
 4) объем титранта ΔV мл добавлен в ячейку; соответственно переместилось перо самописца;
 5) рН раствора в ячейке изменился на ΔpH ;
 6) сигнал на входе титратора вернулся к исходному уровню.

рис.6.2. Работа приборов при записи кривой титрования

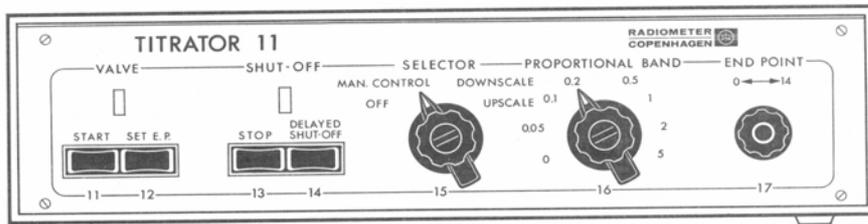
Затем цикл 1-6 повторяется. Кривая титрования состоит из ряда ступенек, размер которых зависит от скорости перемешивания, расположения электродов и трубки с титрантом.

Титратор.



Титратор предназначен для управления работой бюретки в зависимости от величины входного сигнала. С его помощью можно проводить различные виды работ: доведение рН раствора до заданного значения, запись кривой титрования, рН-статирование и т.д. Титратор обеспечивает добавление титранта со скоростью, зависящей от буферных свойств раствора: малыми порциями - к незабуференному и большими - к раствору с большой буферной емкостью. Доведение рН происходит без "перетитровывания", столь мешающего при работе вручную. Это достигается за счет показанной на рисунке характеристики прибора: зависимости потока титрующего вещества от величины входного сигнала. "Конечная точка" - уровень сигнала настройки, задаваемый оператором. На горизонтальных участках характеристик титратор работает в непрерывном режиме, и на бюретку подается постоянное напряжение, вызывающее непрерывную подачу титрующего раствора. В результате рН раствора сдвигается в сторону "конечной точки". Когда значение рН попадает внутрь "полосы пропорциональности", титратор переходит в импульсный режим, - титрующий раствор подается в ячейку порциями. По мере приближения рН раствора к "конечной точке" импульсы, поступающие на бюретку, становятся короче и реже, и поток титрующего раствора уменьшается.

На передней панели титратора расположены следующие регулировки:



11 - "start" - кнопка запуска автоматического титрования; левая зеленая лампа горит, когда на вход бюретки подано напряжение,
12 - "set e.p." - кнопка,

при нажатии на которую на рН-метре виден сигнал настройки,

13 - "stop" - кнопка остановки автоматического титрования; правая зеленая лампа горит, когда титратор отключен от бюретки,

15 - "SELECTOR" - переключатель, с помощью которого выбирается либо ручной режим управления бюреткой, либо автоматический - в нужном направлении изменения рН, ("downscale", "upscale"),

16- установка полосы пропорциональности,

17 - плавная регулировка "конечной точки".

При работе в режиме рН-стата титратор настраивают (устанавливают "конечную точку") на тот рН, при котором проводится реакция. Смещение рабочей точки из-за протекающей реакции вызывает срабатывание титратора и возвращение её в заданное положение.

При записи кривой титрования "конечную точку" устанавливают несколько ниже начального значения рН раствора. Рабочая точка смещается по оси абсцисс искусственно - при подаче "скользящего потенциала" и возвращается к исходному значению при добавлении титрующего раствора.

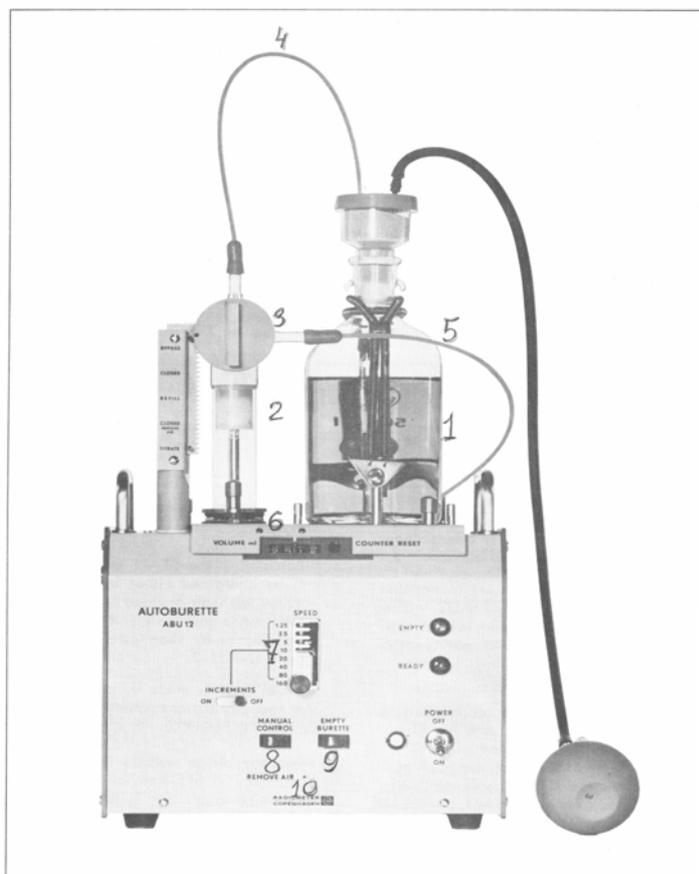
Бюретка.

Fig. D2. Front View of the Autoburette, type ABU12, Showing the Controls.

Снаружи бюретки расположены следующие детали.

1. Сосуд с титрующим раствором.
2. Цилиндр с поршнем.
3. Кран - переключатель; состоящий из трёхходового стеклянного крана, присоединённого к трубкам 4 и 5 и цилиндру, и переключателя, управляющего движением поршня; связь между краном и переключателем осуществляется через зубчатое колесо и рейку.

Кран - переключатель имеет следующие положения, (их указывает красная точка на зубчатой рейке) (а-г) - подготовительные, д - рабочее:

- а) "bypass" - трубки 4 и 5 соединены накоротко, минуя цилиндр; это положение используется для заполнения трубок;
- б) "closed" - трубки и цилиндр разъединены;
- в) "refill" - трубка 4 соединена с цилиндром, одновременно включено

движение поршня вниз, - происходит наполнение цилиндра титрующим раствором;

г) "closed, remove air" - цилиндр изолирован от трубок; для удаления воздуха из верхней части цилиндра нужно вынуть пробку из горлышка цилиндра и нажать ею на кнопку 10 - "удаление воздуха";

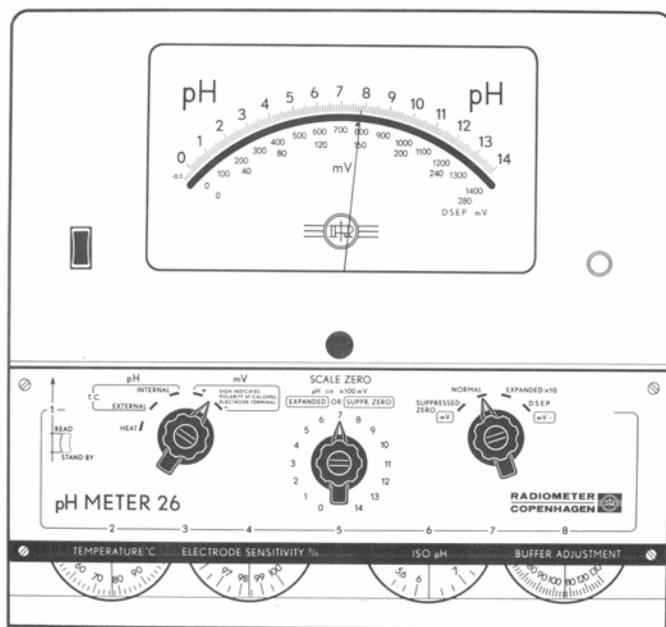
д) "titrate" - цилиндр соединён с трубкой 5, которую опускают в ячейку; движение поршня и, соответственно, подача раствора в ячейку начинается либо автоматически по сигналу титратора, либо вручную (при нажатии кнопки 8 или 9).

6. Счётчик, откалиброванный в мл; полный объём бюретки - 2,5 мл.

7. Переключатель скорости движения поршня.

Меры предосторожности.

1. Поворачивать кран-переключатель 3 осторожно, без больших усилий.
2. Не нажимать на кнопку 10 ("удаление воздуха") ничем, кроме пробки, вынутой из горлышка цилиндра.
3. Перед тем, как перевести переключатель 3 в положение "титрование", нужно убедиться в полной остановке поршня: цифры на счетчике должны остановиться.

pH-метр.

pH-метр имеет следующие регулировки:

1 - кнопка, при нажатии которой сигнал подается на стрелочный прибор;

3 - переключатель режима измерения:

"HEAT"-выключено;

"INTERNAL" - рабочее положение (измерение pH - с внутренним температурным компенсатором);

5 - переключатель диапазона точной шкалы;

7 - переключатель чувствительности шкалы;

2, 4, 6, 8 - плавные регулировки,

служащие для настройки прибора по буферным растворам.

Диск 2, связанный с внутренним температурным компенсатором, устанавливают на температуру раствора. С поворотом диска в сторону меньших температур происходит увеличение чувствительности pH-метра, компенсирующее уменьшение чувствительности стеклянного электрода.

Диском 4 вводится поправка на отклонение чувствительности данного электрода от идеальной ($dE/dpH=RT/F$)

Диском 6 сдвигают электрический 0 прибора.

Диском 8 можно компенсировать постоянную, не зависящую от pH, разность потенциалов между электродами в диапазоне (0-130 мВ).

Правила работы с pH-метром.

1. Перед тем, как вынуть электроды из раствора, нужно перевести переключатель чувствительности в положение "normal".
2. Перед тем, как переключить прибор на 10 - кратную чувствительность, нужно поставить соответствующее начало шкалы.

7. Порядок работы при регистрации кривых титрования.

1. Заполнение бюретки.

а) Поставьте кран-переключатель в положение "bypass"; нажимая на грушу, заполните трубки раствором; не отпуская грушу, переведите переключатель в положение "closed".

б) Включите сеть и наполните цилиндр ("refill").

в) Для удаления воздуха поставьте переключатель в положение "closed, remove air" и, нажимая пробкой, вынутой из горлышка цилиндра, на микровыключатель, удалите воздух.

г) Поставьте переключатель в положение "refill".

2. Настройка рН-метра по двум стандартным буферным растворам.

а) Перед включением прибора отпустите кнопку 1 и переведите переключатель чувствительности 7 в положение "normal".

б) Включите прибор, поставив переключатель 3 в положение "internal t.c." (внутренняя температурная компенсация). Нажмите кнопку 1.

в) Вымойте электроды*, погрузите их в предварительно прогретый до 20° стандартный буферный раствор рН 9,22, включите секундомер и, поставив переключатель "SCALE ZERO" в положение "9", переведите переключатель 7 в положение "expanded x 10".

г) Вращением диска "BUFFER ADJUSTMENT" добейтесь того, чтобы через 1 мин после погружения электродов в буфер стрелка прибора указывала на 9,22.

д) Переключите прибор на нормальную чувствительность и повторите процедуру "в" для буферного раствора рН 1,68.

е) Вращением диска "ELECTRODE SENSITIVITY %" добейтесь того, чтобы через 1 мин после погружения электродов в буфер стрелка прибора указывала на 1,68.

3. Настройка титратора.

а) Включите прибор, поставив переключатель 15 ("SELECTOR") в положение "upscale". Кнопка "stop" должна быть нажата. Поставьте переключатель чувствительности рН-метра в положение "normal".

б) Держа нажатой кнопку 12 ("set e.p.") и вращая ручку 17 ("END POINT"), установите стрелку рН-метра на рН раствора. Для проверки правильности настройки нажмите и отпустите кнопку "start": левая зелёная лампа должна вспыхивать.

4. Подготовка самописца.

а) Включите сеть и поставьте переключатель "RECORDING" в положение "TITRATION CURVE OFF".

б) Вращая на себя большой чёрный барабан, расположенный справа, установите потенциометр на 0: стрелка рН-метра должна указывать на рН раствора.

в) Поставьте бумагу в удобное положение, пользуясь маленькими металлическими колёсиками.

* Электроды считаются вымытыми, если при повторном погружении в воду показания находятся в пределах 0,03 ед.рН. Отмывать электроды нужно при каждой смене раствора.

5. Запуск регистрации кривой титрования.

а) Вымойте и вытрите фильтровальной бумагой конец трубки с титрующим раствором, идущий от бюретки. Опустите его в ячейку до уровня стеклянного электрода.

б) Переведите кран-переключатель бюретки в положение "titrate", самописец - в положение "start" (крайнее левое положение переключателя "RECORDING");

проверьте кнопку "start" на титраторе, - она должна быть отпущена.

6. Остановка записи.

а) Нажмите кнопку "stop" титратора, поставьте переключатель RECORDING самописца - в положение "off", переведите бюретку в положение "refill".

б) Выведите потенциометр самописца на 0.

в) Вымойте ячейку, после чего вытрите конец трубки и оставьте его вне ячейки.

6. Упражнения.

6. 1. Определение "неизвестной" аминокислоты.

В упражнении предлагается узнать аминокислоту по ряду физико-химических параметров: рН раствора, молекулярному весу, количеству титрующихся групп. Для их определения используются рН-метр, титратор и компьютер. Титрантом является раствор NaOH, который нужно откалибровать по кривой титрования раствора KH_2PO_4 . Кривые регистрируются и на самописце, и на компьютере, что позволяет вычестить из кривой титрования аминокислоты с HCl кривую титрования HCl; та же программа позволяет сравнивать участки полученной кривой с кривой диссоциации одноосновной кислоты (рис. 7.1).

Даны следующие реактивы: калий фосфорнокислый однозамещенный KH_2PO_4 , аминокислота,
титрующий раствор - NaOH - 0,1 - 0,5 М
раствор HCl - 2 М .

Порядок работы.

1. Приготовьте растворы следующим образом: в три стаканчика для титрования налейте по 25 мл дистиллированной воды; в одном из них растворите 30 мг KH_2PO_4 , во втором - 30 мг аминокислоты, а в третий добавьте 2М HCl до рН 2,5 (*необходимый для этого объём рассчитайте заранее*).

2. Настройте рН-метр, заполните бюретку и подготовьте самописец.

3. Запишите кривую титрования раствора KH_2PO_4 от установившегося в нем значения рН до рН 10.5 - 11. Определите концентрацию щелочи в титрующем растворе.

4. Запишите кривую титрования HCl от 2,5 до 11 ед.рН. Объясните подъём кривой в щелочной области.

5. Измерьте рН в растворе аминокислоты. Сколько кислотных и основных групп содержит эта аминокислота?

6. Доведите рН в растворе аминокислоты до 2,5 с помощью 2 М HCl. Запишите кривую титрования до рН 10,5 - 11. По кривой титрования, учтя вклад в нее HCl и NaOH, оцените молекулярный вес аминокислоты и значения рК проявившихся

на кривой групп. Используя таблицу, выберите аминокислоту, соответствующую полученным параметрам.

Указание: проверьте, соответствует ли измеренное Вами значение pH исходного раствора (пункт 5) кислотно-основным свойствам выбранной аминокислоты.

6.2. Титрование яичного альбумина.

В упражнении нужно оценить количество групп кислотного и основного характера в молекуле яичного альбумина. Для этого измеряется pH раствора чистого альбумина, затем (в присутствии HCl, которой сдвигают начальную точку титрования и ДДС-Na, которым навязывают отрицательный заряд молекуле белка) записывают кривые его титрования. Вычитание из них контрольных кривых (т.е. записанных в отсутствие белка) и анализ проводится на компьютере. Титрант – NaOH – калибруется по раствору KH_2PO_4 .

Даны следующие реактивы: калий фосфорнокислый однозамещенный KH_2PO_4 ,
:

яичный альбумин,

додецилсульфат натрия ДДС-Na (SDS),

раствор HCl - 0,5 М

титрующий раствор NaOH - 0,05 - 0,1 М

Порядок работы.

1. Приготовьте растворы следующим образом: в 5 стаканчиков для титрования налейте по 50 мл дистиллированной воды; в одном из них растворите 25 мг яичного альбумина, во 2-м - 12 мг KH_2PO_4 , в 3-й добавьте 0,5 М HCl до pH 3,5 (необходимый для этого объём рассчитайте заранее), в 4-м растворите 50 мг ДДС-Na и подкислите так же, как 3-й, в 5-м стаканчике растворите 25 мг яичного альбумина и 50 мг ДДС-Na.

2. Настройте pH-метр, заполните бюретку и подготовьте самописец.

3. Запишите кривую титрования раствора KH_2PO_4 от установившегося в нём значения pH до pH 9. Определите концентрацию щелочи в титрующем растворе.

4. Запишите кривую титрования HCl от 3,5 до 10 ед.pH. Объясните подъём кривой в щелочной области.

5. Измерьте и запишите pH в растворе яичного альбумина. Подкислите раствор до pH 3,5 добавляя 0,5 М HCl при перемешивании. Запишите кривую титрования до pH 10.

6. Запишите кривую титрования HCl в присутствии ДДС-Na.

7. Повторите измерения (5) для раствора яичного альбумина с ДДС-Na.

8. Вычитите на компьютере кривые титрования HCl из кривых титрования альбумина.

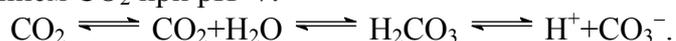
Объясните изменение формы кривой в области pH 4 - 8 в присутствии ДДС-Na.

Боковые группы каких аминокислот титруются в этой области? Определите количество этих групп.

Сколько групп основного характера содержит яичный альбумин?

6.3. Определение константы равновесия креатинкиназной реакции.

Выполнение задачи состоит из следующих этапов: 1) регистрации креатинкиназной реакции, 2) подборе равновесных концентраций субстратов, 3) проверке чувствительности используемого метода к изменению концентраций. Для регистрации реакции используется рН-стат, настроенный на рН 7,5, титрантом для прямой реакции является раствор NaOH, обратной – раствор HCl. Все ферментативные реакции идут на фоне самопроизвольного закисления, вызванного поглощением CO₂ при рН>7:



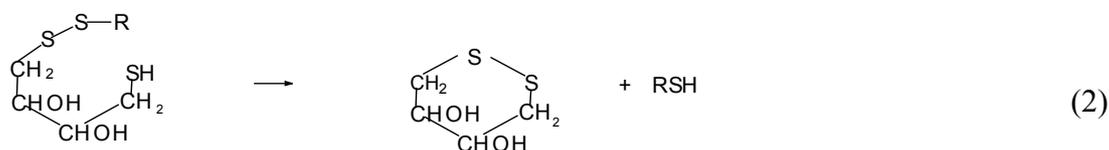
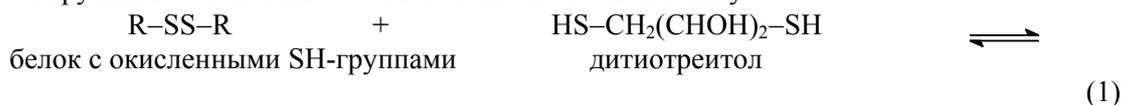
Скорость этой реакции следует учитывать при расчете скоростей креатинкиназной реакции. Она же дает возможность при подборе равновесных концентраций регистрировать небольшие отклонения от равновесия как в ту, так и в другую сторону, используя один и тот же титрант – NaOH.

Даны следующие реактивы:	креатинкиназа,	
растворы:	HCl	0,1 М,
	АТФ	15 мМ,
	АДФ	7,5 мМ,
	креатина	100 мМ,
	креатинфосфата	8 мМ,
	дителиотреитола	10 мМ, *
	Mg(CH ₃ COO) ₂	250 мМ,
	NaOH	0,1М - для доведения рН в реакционной смеси
титрующий раствор	NaOH	1-2 мМ.

Порядок работы.

1. Приготовьте раствор креатинкиназы растворив 5-10 мг сухого препарата в 1-2 мл дителиотреитола. Держите пробирку с этим раствором во льду.
2. Настройте рН-метр, приготовьте 200 мл 1мМ раствора HCl. Заполните им бюретку.

* Для восстановления легко окисляемых SH- групп креатинкиназы измерение активности проводится в присутствии дителиотреитола. В результате реакций *тиол-дисульфидного обмена* (1) и (2) окисленные SH-группы восстанавливаются в течение нескольких минут:



промежуточный дисульфид

циклический дисульфид

3. Запишите кинетику "обратной" реакции (см. ур-е 4.1 на стр.16) при pH 7,5 с помощью pH-стата:

а) в стаканчике для титрования приготовьте 25 мл реакционной смеси:

АДФ	0,15 мМ,
креатинфосфат	0,16 мМ,
Mg(CH ₃ COO) ₂	2,5 мМ;

б) доведите pH смеси до 7,5 с помощью 0,1 М NaOH;

в) настройте титратор на pH 7,5;

г) заполните бюретку ("refill");

д) переведите бюретку в режим "titrate", нажмите кнопку "start" на титраторе, включите самописец (переключатель "RECORDING"-в положение "pH-stat ON");

ж) добавьте в реакционную смесь 20 мкл раствора креатинкиназы; продолжайте запись 4 - 5 мин.

4. Подключите к бюретке сосуд со щелочью, налейте в ячейку 25 мл дист. воды; установите с помощью титратора режим поддержания pH 6,0 ; включите самописец.

5. В работающую ячейку добавьте количество 0,1 М HCl, эквивалентное 1 мл 1 мМ раствора NaOH, и запишите ответ pH-стата.

Определите концентрацию щелочи в титрующем растворе.

6. Запишите кинетику "прямой" реакции при pH 7,5:

а) в стаканчике для титрования приготовьте 25 мл смеси следующего состава:

АТФ	0,3 мМ
креатин	10 мМ
Mg(CH ₃ COO) ₂	2,5 мМ

б) доведите pH смеси до 7,5 с помощью 0,1 М NaOH и титратора,

в) записывайте кинетику поглощения CO₂ 4 -5 мин.,

г) добавьте в реакционную смесь 20 мкл раствора креатинкиназы; продолжайте запись 4-5 мин.

7. Рассчитайте скорости прямой и обратной реакции в единицах ферментативной активности, т.е. в количестве мкмоль субстрата, превращаемых 1 мг фермента за 1 мин, введя поправку на самопроизвольное закисление.

8. Подберите концентрации четырех субстратов, соответствующие равновесию, т.е. такие, при которых после добавления креатинкиназы скорость закисления среды не меняется.

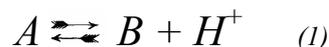
9. Варьируя концентрации субстратов, определите погрешность метода.

10. Найдите константу равновесия, оцените ошибку ее определения.

Рассчитайте изменение стандартной свободной энергии Гиббса для креатинкиназной реакции.

ПРИЛОЖЕНИЕ

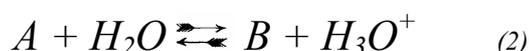
"The simplest and most adequate definition of acids and bases is given by the scheme



where A and B represent acid and base respectively. This scheme indicates that an acid is defined as a substance, which is able to split off H^+ -ions simultaneously forming a base, and a base as a substance capable of uniting with H^+ -ions, thus forming an acid.

The unique position of acids and bases among chemical substances is accounted for by the unique properties of the H^+ -ion. As the only chemical molecule consisting of an atomic nucleus alone, the hydrogen ion possesses an extraordinary position, particularly an extraordinary mobility, shown by the ease with which it passes from one molecule to another. A similar mobility with any other atom or ion would mean the existence of another group of chemical substances to which the name of acids and bases could be applied with a similar justification.

When the equilibrium given by scheme (1) is established in water or another solvent, the H^+ -ion will be solvated. In the case of water as a solvent the equilibrium is



which is double acid-base equilibrium, A and H_3O^+ acting as acids, B and H_2O as bases....."

*J.N.Brönsted **

7. Кислотно-основные свойства функциональных групп аминокислот.

7.1. Кислоты и основания.

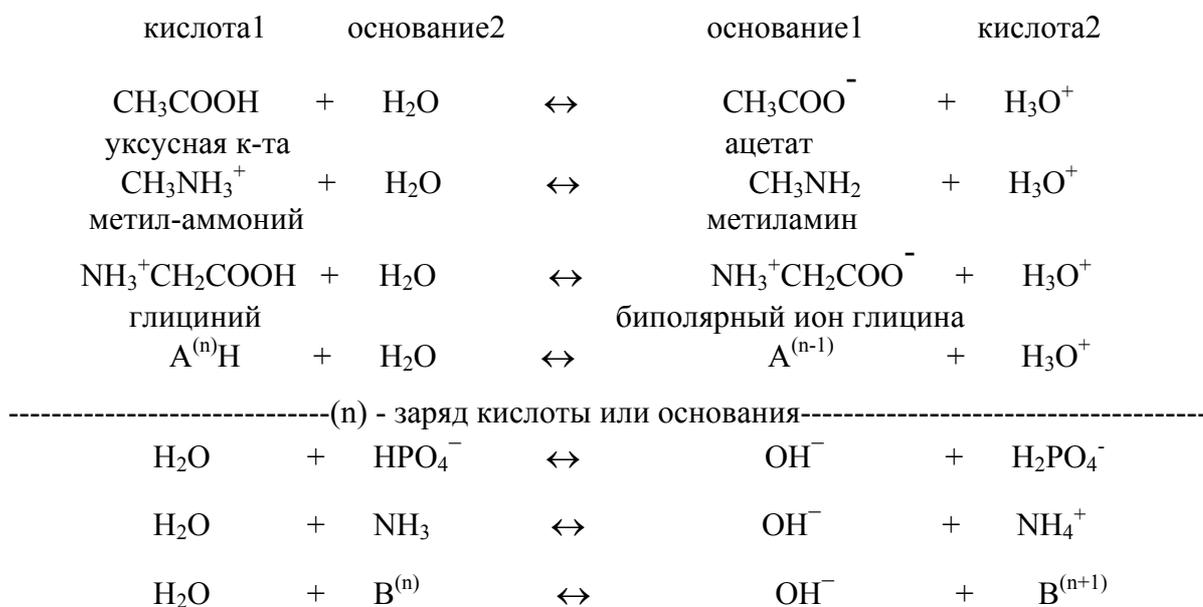
Заряды на молекулах органических соединений образуются, как правило, в результате либо отдачи протонов молекуле воды, либо присоединения протона от воды. При описании таких реакций, называемых кислотно-основными, используются следующие определения:

кислота - соединение, способное отдать протон другому соединению,

основание - соединение, способное присоединить протон, образовав с ним ковалентную связь. Протонированная и депротонированная формы соединения образуют сопряженную пару.

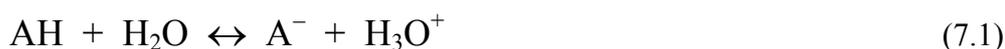
Таким образом, к кислотам относятся не только нейтральные соединения, такие, как, например, соляная и уксусная кислоты, но и катионы (ион аммония - NH_4^+) и анионы (однозамещенный фосфат - $H_2PO_4^-$). Основания также могут быть не только нейтральными (аммиак - NH_3), но и заряженными (гидроксил - OH^- , ацетат - CH_3COO^- , двузамещенный фосфат - HPO_4^{2-} , аминоаммоний - $NH_2-NH_3^+$). Обычно, во избежание путаницы, такие термины, как "группа кислотного" или "основного характера", "кислотные свойства", "основные свойства", - относят к нейтральным формам. Термин "сопряженные" используют для катионных кислот и анионных оснований. В кислотно-основной реакции участвуют две сопряженные пары. В водных растворах одну из них образует вода и один из ионов - OH^- или H_3O^+ . Ниже приведены примеры реакций кислот и оснований с водой.

-
- Датский физико-химик **Дж.Н. Бренстед** – автор современных представлений о кислотах и основаниях.

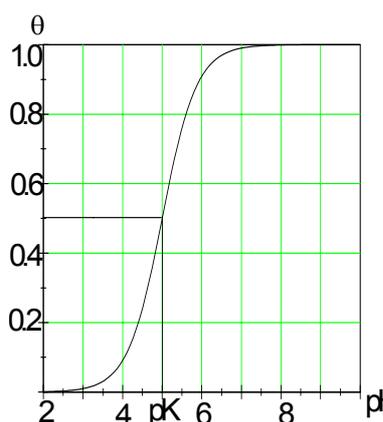


Кислота1 и основание1 образуют одну сопряженную пару, кислота2 и основание2 - другую. Так, метил-аммоний является сопряженной кислотой метиламина, а ацетат - сопряженным основанием уксусной кислоты.

Кислота тем сильнее, чем больше равновесие реакции



сдвинуто вправо. В растворе более сильной кислоты устанавливается меньшее значение рН по сравнению с раствором более слабой кислоты той же концентрации. Количественной характеристикой силы кислоты является константа кислотности (K_a) и ее показатель (pK_a=-lgK_a):



$$K_a = K_{\text{равн}} \times [H_2O] = \frac{[A^-] \times [H_3O^+]}{[AH]} \quad (7.2)$$

$$pK_a = pH - \lg \frac{[A^-]}{[AH]} = pH - \lg \frac{\theta}{1 - \theta} \quad (7.3)$$

где θ - степень диссоциации;

$$\theta = \frac{[A^-]}{[A^-] + [AH]} \quad (7.4)$$

Чем сильнее кислота, тем больше K_a и меньше pK_a.

Кривая диссоциации - это зависимость степени диссоциации от рН:

$$\theta = 10^{pH - pK_a} \quad (7.5)$$

$$pK_a / (1 + 10^{pH - pK_a})$$

Кривая (рис 7.1) имеет вид S-образного перехода между протонированной ($\theta \cong 0$) и депротонированной ($\theta \cong 1$) формами, причем при $pH = pK_a$ кислота диссоциирована наполовину. Ширина зоны перехода с точностью до 1% составляет 4 ед. рН. Форма кривой диссоциации является универсальной: она не зависит от химической природы функциональной группы. Группы различаются лишь положением перехода на оси рН. Для более сильных кислот он расположен при меньших рН. Минеральные кислоты (HCl, HNO₃) полностью

диссоциированы уже при отрицательных значениях рН. Самой сильной кислотой в водных растворах является H_3O^+ - с $\text{pK}_a = -1,7$ ($= -\lg[\text{H}_2\text{O}]$). Одной из самых слабых кислот является вода: ее кислотные свойства характеризуются константой автопротолиза

$$K_w = [\text{H}_3\text{O}^+] \times [\text{OH}^-]; K_w = 1,008 \times 10^{-14} \text{ при } 25^\circ\text{C}. \quad (7.6)$$

Для характеристики силы оснований иногда используют константу основности (K_b) и ее показатель (pK_b):

$$K_b = \frac{[\text{BH}^+][\text{OH}^-]}{[\text{B}]} \quad (7.7), \quad \text{pK}_b = \text{pOH} - \lg \frac{[\text{BH}^+]}{[\text{B}]} \quad (7.8)$$

Использование этих величин, однако, требует перехода к шкале рОН : ($\text{pOH} = -\lg[\text{OH}^-]$).

Обычно для характеристики основания используют константу кислотности сопряженной кислоты:



$$K_a = [\text{H}_3\text{O}^+] \times \frac{[\text{B}]}{[\text{BH}^+]} \quad (7.10); \quad \text{pK}_a = 14 - \text{pK}_b \quad (7.11)$$

В дальнейшем изложении реакции переноса протона записываются в форме диссоциации кислоты (нейтральной или катионной) в следующем упрощенном



Термодинамические характеристики реакции диссоциации связаны с величинами K_a следующим образом:

$$\Delta G^\circ = -RT \ln K_a = 2,3RT \text{pK}_a \quad (7.13)$$

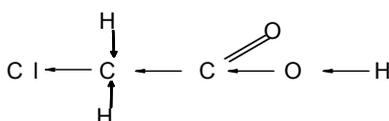
$$\Delta H^\circ = RT^2 \frac{\partial \ln K_a}{\partial T} = -R \frac{\partial \ln K_a}{\partial (1/T)} = 2,3R \frac{\partial \text{pK}_a}{\partial (1/T)} \quad (7.14)$$

$$\Delta S^\circ = (\Delta H^\circ - \Delta G^\circ) / T \quad (7.15)$$

7.2. Связь между строением молекулы и её кислотно-основными свойствами.

В таблицах 1.1 и 1.2 приведены величины pK_a ряда функциональных групп кислотного характера: карбоксовой, гидроксильной, сульфгидрильной, а также pK_a сопряженных кислот групп основного характера: аминогрупп, имидазольной, гуанидиновой. Видно, что на величину pK_a данной функциональной группы влияет строение радикала, к которому она присоединена.

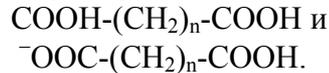
1. Введение электроотрицательных заместителей (-F, -Cl, =O, -OH) в углеводородную цепь увеличивает силу кислоты: трихлоруксусная кислота, например, приближается по силе к азотной. Даже такая недиссоциирующая группа, как OH-группа алифатического спирта, становится кислотной (хотя и в очень слабой степени: $\text{pK}_a \approx 12$) при введении трех атомов фтора. Этот эффект, называемый индукционным, связан со смещением σ -электронов в сторону электроотрицательного заместителя, что ослабляет связь с протоном в диссоциирующем центре. Эффект затухает с увеличением количества σ -связей, разделяющих заместитель и центр.



хлоруксусная
направление смещения σ -электронов)

кислота (стрелками показано

2. Влияние электрического поля. Ионизация функциональных групп аминокислот, дикарбоновых кислот, диаминов и т.д. происходит в электрическом поле, создаваемым другой, уже ионизованной группой. Электрическое поле положительно заряженной аминогруппы способствует удалению протона, т.е. делает карбоксильную группу более кислотной. Поле отрицательного заряда работает в противоположном направлении. У многоосновных кислот ионизация каждой следующей группы характеризуется большим значением pK_a . Для приближенной оценки эффекта нужно сравнить ΔG° двух соединений, различающихся лишь зарядом, например,



Для второй молекулы к энергии, которую нужно затратить на удаление протона от карбоксила, добавляется работа против электрического поля

$$\Delta W = Ne\psi = \frac{N}{Dr} e^2 \quad (1.15),$$

где N -число Авогадро, ψ - потенциал, r -расстояние между центрами, D -диэлектрическая постоянная растворителя, e - заряд электрона.

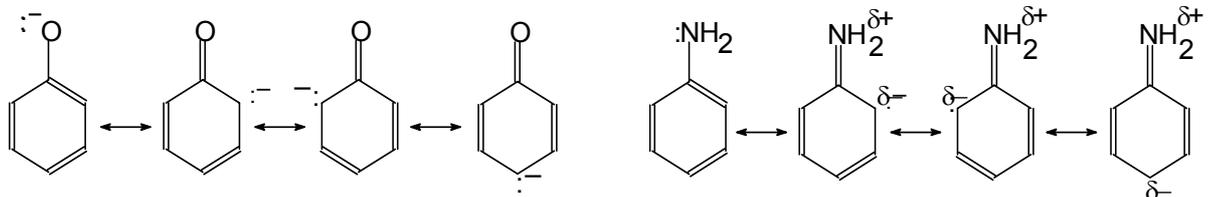
$$\Delta W = \Delta G^\circ_1 - \Delta G^\circ_2 = 2.3RT \Delta pK_a = \frac{N}{Dr} e^2 \quad (1.16)$$

Уравнение применимо при тех условиях, что: 1) электрические силы действуют через растворитель и что 2) растворитель вблизи молекулы можно характеризовать макроскопической диэлектрической постоянной. Поэтому определение r из уравнения дает удовлетворительные результаты лишь для достаточно длинных молекул, например, адипиновой кислоты ($n=4$). Для таких коротких, как глицин, расстояние между зарядами получается заниженным.

Известны случаи аномальных значений pK карбоксильных и аминогрупп в белках. Так, аминогруппа лизина в ацетоацетаткарбоксилазе имеет pK_a около 6 вместо 10.5, а pK_a карбоксильной группы глутаминовой кислоты-35 в лизоциме увеличено до 8. Эти отклонения объясняются низкой полярностью внутренних областей белка и влиянием электрического поля, создаваемого другими заряженными группами.

3. Сопряжение неподеленной пары электронов азота или кислорода функциональной группы с π -электронами заместителя может существенно изменить ее pK_a .

Так, присоединение гидроксильной группы к бензольному кольцу приводит к увеличению кислотности на 4 порядка (у фенолов - по сравнению с алифатическими спиртами). Причина этого эффекта состоит в стабилизации фенолят-аниона за счет сопряжения неподеленной пары электронов кислорода с бензольным кольцом:

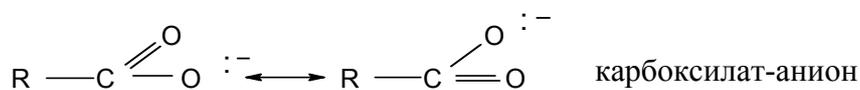


фенолят-анион

анилин

(\longleftrightarrow означает, что истинное распределение электронов является промежуточным между изображенными)

В карбоксильной группе кислотность гидроксила усилена еще больше. Причиной является стабилизация карбоксилат-аниона в результате сопряжения, которое выравнивает заряды на атомах кислорода:

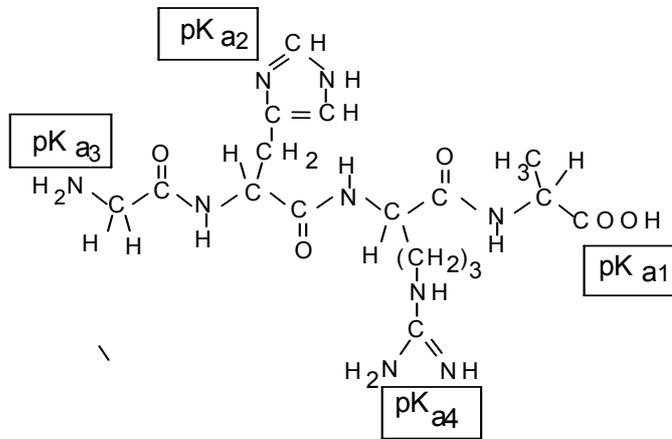


В данном случае эффект сопряжения выражается в увеличении кислотности карбоксильной группы более, чем на 10 порядков, по сравнению с алифатическими спиртами.

ственно меньше, причем тем меньше, чем сильнее различаются величины pK_{ai} .

Приведём качестве примера тетрапептид:

глицил - гистидил-аргинил-аланин



Эта молекула содержит одну группу кислотного характера – концевую карбоксильную группу аланина (pK_{a1}) и три группы основного характера: имидазольную группу гистидина (pK_{a2}), концевую аминогруппу глицина (pK_{a3}) и гуанидиновую группу аргинина (pK_{a4}).

интервалы значений pH				
1	2	3	4	5
$pH < pK_{a1}$	$pK_{a1} < pH < pK_{a2}$	$pK_{a2} < pH < pK_{a3}$	$pK_{a3} < pH < pK_{a4}$	$pH > pK_{a4}$

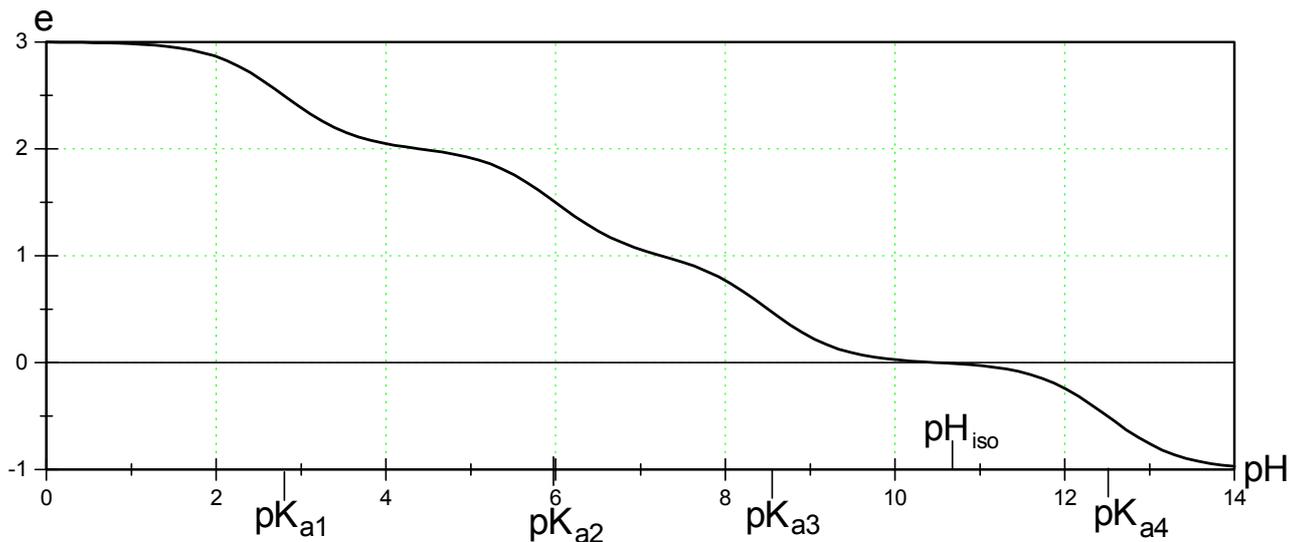


рис.8.1

Ионные формы тетрапептида и зависимость его среднего заряда от pH

На рис.8.1 приведены ионные формы тетрапептида, указаны диапазоны pH, в которых они преимущественно представлены, показана зависимость среднего

электрического заряда (e) от pH . Представленная картина является следствием установления равновесия для каждой ионогенной группы. В самом деле:

1. В области большой концентрации ионов H_3O^+ ($pH < pK_{a1}$) в соответствии с принципом Ле-Шателье тетрапептид полностью протонирован, заряд молекулы равен +3.

2. По мере уменьшения концентрации ионов H_3O^+ происходит последовательное депротонирование – сначала групп, легко отдающих протоны (малые pK_a), затем – групп с более высокими pK_a . При депротонировании каждой группы заряд уменьшается на 1. Равновесие диссоциации каждой из групп определяется только её pK_a и pH раствора. Поэтому переход между соседними ионными формами описывается ранее введенной зависимостью (7.5). При $pH = pK_{ai}$ в растворе равно присутствуют две соседние ионные формы, а при $pK_{ai} < pH < pK_{a(i+1)}$, т.е. в области плато, - преимущественно одна из них.

3. В щелочной области ($pH > pK_{a4}$), где молекулы полностью депротонированы, средний заряд рассматриваемого тетрапептида равен -1

Диапазон существования биполярного иона ($pK_{a3} < pH < pK_{a4}$) содержит изоэлектрическую точку- то значение pH , при котором суммарный электрический заряд молекулы амфолита равен нулю. Кроме биполярных ионов (4 ионная форма), в этом диапазоне в небольшом количестве (0,05-0,01 от общей концентрации) существуют положительные и отрицательные ионы амфолита (3 и 5 ионные формы). В изоэлектрической точке их концентрации равны. Вклад 1 и 2 ионных форм пренебрежимо мал: он составляет (см. зависимость (7.5)) 10^{-8} и 10^{-4} от концентрации амфолита. Таким образом, изоэлектрическая точка расположена посередине диапазона pH , ограниченного двумя соседними pK_a .

Приведённое выше качественное рассмотрение подтверждается формой экспериментальных кривых титрования; его можно подтвердить на основе анализа системы уравнений, описывающих кислотно-основное равновесие.

8.2. Расчёт кислотно-основного равновесия; pH раствора глицина.

Пусть в водном растворе имеется M веществ, содержащих A диссоциирующих групп.

Концентрации всех форм молекул, в том числе и ионов H_3O^+ , рассчитывают из следующей системы $A+M+2$ уравнений:

- 1) условия электронейтральности раствора, в котором должны учитываться все ионы, присутствующие в растворе, в том числе и те, которые не участвуют в кислотно-основном равновесии (Na^+ , Cl^- и т.п.);
- 2) уравнения равновесия диссоциации воды;
- Δ условий равновесия для остальных диссоциирующих групп;
- М условий материального баланса (по одному для каждого растворенного вещества):
сумма концентраций всех ионных и неионной форм данного вещества должна быть равна его исходной концентрации. (8.1)

Решение системы уравнений (8.1) в общем виде затруднительно; рассмотрим в качестве примера расчёт pH водного раствора глицина.

Введем следующие обозначения:

C_0 - концентрация глицина;

K_1 и K_1' - константы кислотности карбоксильной группы ($\text{p}K_1=2,35$);

K_2 и K_2' - константы кислотности аммонийной группы ($\text{p}K_2=9,78$);

K_W - ионное произведение воды;

C^+ - концентрация глициний-ионов $^+\text{NH}_3\text{CH}_2\text{COOH}$;

C^{+-} - концентрация биполярных ионов $^+\text{NH}_3\text{CH}_2\text{COO}^-$;

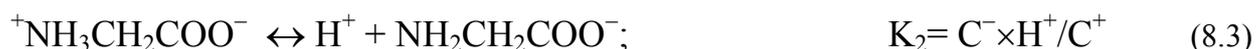
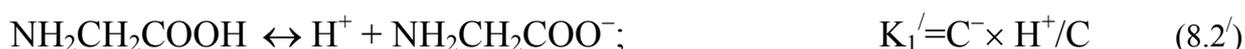
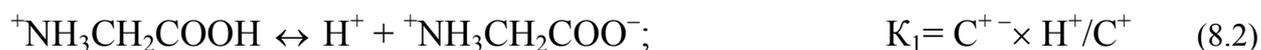
C^- - концентрация глицинат-ионов; $\text{NH}_2\text{CH}_2\text{COO}^-$;

C - концентрация нейтральных молекул глицина $\text{NH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$;

H^+ - концентрация ионов гидроксония H_3O^+ ;

OH^- - концентрация гидроксилат-ионов.

Взаимопревращение различных форм глицина происходит в результате следующих реакций (форма записи – по 7.12); (в записанных справа условиях равновесия активности заменены концентрациями)



Дополним систему уравнений условием материального баланса для глицина:

$$C_0 = C^+ + C^- + C^{+-} + C, \quad (8.4)$$

условием электронейтральности:

$$\text{H}^+ + C^+ = \text{OH}^- + C^- \quad (8.5)$$

и условием равновесия для воды:

$$\text{H}^+ \times \text{OH}^- = K_W \quad (8.6)$$

Разделим решение задачи (о нахождении рН водного раствора глицина) на 2 части. Сначала исследуем зависимость состава раствора глицина от рН, а затем, используя условие электронейтральности, найдем на ней искомую точку.

8.2.1. Зависимость состава раствора глицина от рН.

Условия равновесия 8.2 и 8.3 и условие материального баланса дают возможность выразить неизвестные C^+ , C^- и C^{+-} в виде функций от четвертого неизвестного - H^+ или в виде функций от рН. Построим эту зависимость таким образом.

Исключим из уравнения материального баланса (8.4) величину C - концентрацию нейтральных молекул глицина (см. задачу 6 на стр.3):

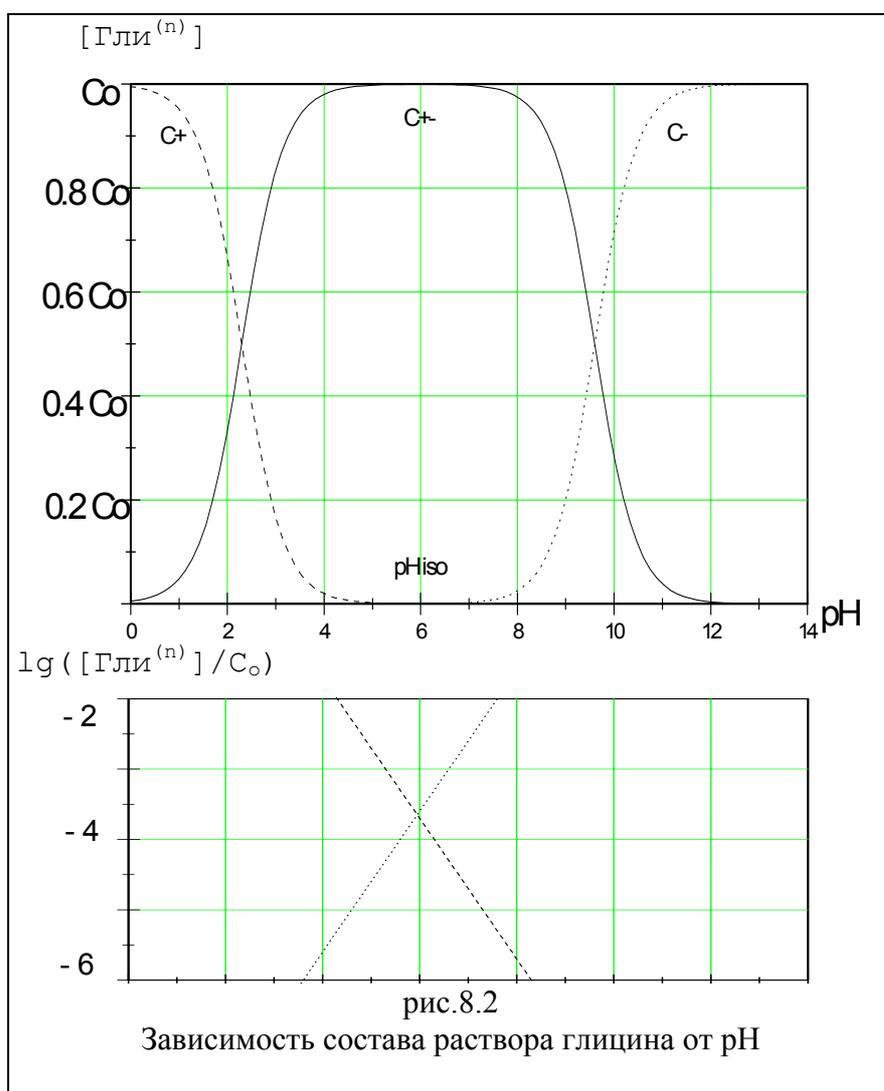


рис.8.2

Зависимость состава раствора глицина от рН

$$C_0 = C^+ + C^- + C^{+-} \quad (8.7)$$

Заметим, что в области $pH \sim pK_1$ (или $H^+ \sim K_1$) из 8.2 и 8.3 следует:

$$C^- / C^{+-} \sim K_2 / K_1 \quad (8.8),$$

т.е. $C^- \ll C^{+-}$,

поэтому условие материального баланса сводится к следующему:

$$C^+ + C^{+-} = C_0 \quad (8.9)$$

Отсюда и из 8.2 получаем зависимость концентрации глициний-ионов от рН:

$$\lg(C^+ / (C_0 - C^+)) = pH + pK_1 \quad (8.10)$$

или

$$C^+ / C_0 = 1 / (1 + 10^{pH - pK_1}) \quad (8.11)$$

Аналогично строится

$$C^- / C_0 = 1 / (1 + 10^{pK_2 - pH}) \quad (8.12)$$

зависимость концентрации глицинат-ионов (C^-) от рН:

Зависимость для C^{+-} получается из 8.7. Соответствующие графики приведены на рис 8.2.

Представленное на них семейство кривых описывает состав раствора глицина во всем диапазоне рН. Полагая в 8.2 и 8.3

$$C^+ = C^-, \quad (8.13),$$

получаем изоэлектрическую точку глицина -

$$H^2_{\text{ИЗО}} = K_1 \times K_2, \quad pH_{\text{ИЗО}} = 1/2(pK_1 + pK_2) \quad (8.14)$$

8.2.2 Связь между изоэлектрической точкой, условием электронейтральности и искомым рН.

Чтобы найти то единственное значение pH , которое соответствует водному раствору глицина в отсутствие каких-либо добавок, используем условие электронейтральности (8.5).

Если концентрация глицина столь высока, что

$$C^+ \gg H^+, \text{ и } C^- \gg OH^- \quad (8.15),$$

условие электронейтральности сводится к условию изоэлектричности раствора 8.13, и в качестве искомого выступает $pH_{ИЗО}$. Ему соответствует максимальная концентрация биполярных ионов и минимальная электропроводность растворенной аминокислоты. Используя 8.11 и 8.12, нетрудно показать, что для глицина рН раствора совпадает с изоэлектрическим при

$$C \geq 0,1 \text{ моль/л} \quad (8.16)$$

8.2.3. Расчет поправки.

Найдем поправку к полученному решению.

Выразив в уравнениях 8.2 – 8.6 все концентрации через H^+ , получим следующее уравнение:

$$H^+ \times (H^{+2} - K_1 K_2) - \frac{1}{C_0} (K_w - H^{+2}) \times (K_1 H^+ + H^{+2} + K_1 K_2) = 0 \quad (8.17).$$

Представим его в виде: $F_0(H^+) - \frac{1}{C_0} F_1(H^+) = 0$ (8.18)

Считая C_0 достаточно большим, будем искать решение в виде:

$$H^+ = H_0^+ + \delta H^+, \quad (8.19)$$

где H_0^+ - решение уравнения $F_0(H^+) = 0$ (8.20)

т.е. $H_0 = \sqrt{K_1 K_2} = H_{ИЗО}$ (8.21)

Для δH^+ имеем:
$$\delta H^+ = - \frac{F_1(H_0^+)}{C_0 F_0'(H_0^+)} \quad (8.22)$$

или
$$\delta H^+ = \frac{K_w - K_1 K_2}{2 C_0} \left(2 + \sqrt{\frac{K_1}{K_2}} \right) \quad (8.23)$$

Для глицина $K_1 K_2 \gg K_w$ и $K_1 > 2 \sqrt{K_2}$, поэтому

$$H^+ = H_0^+ \left(1 - \frac{K_1}{2 C_0} \right), \quad (8.24)$$

приближение верно для $C_0 \gg 0,5 K_1$.

8.2.4. Выводы.

1. При различающихся более, чем на 2,5 порядка, константах ионизации функциональных групп низкомолекулярного амфолита (условие 8.8)

а) в растворе в реальных концентрациях присутствуют те ионные формы, которые соответствуют последовательному депротонированию при увеличении рН (стр. 26-27); концентрация прочих форм, например, нейтральных молекул в растворе глицина, очень мала;

б) переход между соседними ионными формами (рис 8.2, уравнение 8.11) повторяет по форме кривую диссоциации одноосновной кислоты (7.5).

2. рН достаточно концентрированного раствора амфолита близок к его изоэлектрической точке.

Литература

- J.N.Brönsted. The acid-basic function of molecules and its dependency on electric charge type. *J.Phys.Chem.*, 1926, 30, 777-790.
- Физическая химия (под ред. Б.П.Никольского). Л. Химия, 1987.
Кислотно-основные равновесия, стр. 589-606. Потенциометрия, стр.632-642.
- Л.Паулинг. Природа химической связи. М.-Л. Госхимиздат, 1947.
Сила кислот и оснований, стр 201-213.
- В.А.Пальм. Введение в теоретическую органическую химию. Высшая школа, 1974.
Кислотность и основность органических соединений, стр. 235-273.
- Батлер, Джеймс Н. Ионные равновесия (математическое описание).
Л., Химия, 1973
Слабые одноосновные кислоты и основания, стр. 102-151.
- А.Ленинджер. Основы биохимии, в трех томах. М., Мир, 1985.
Аминокислоты и пептиды, стр. 107-136.
- Л.А.Остерман. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот.
Электрофорез и ультрацентрифугирование. М., Наука, 1981.
Разделение белков по размеру с использованием ДДС-Na, стр. 56-58.
- Э.Фёршт. Структура и механизм действия ферментов. М., Мир, 1980.
*Основные уравнения ферментативной кинетики, стр.109-129,
Величины pK_a в ферментах, стр 187-189.*
- Дж.Эдсолл, Х.Гатфренд. Биотермодинамика. М., Мир, 1986.
*Глава 4. Химические равновесия и изменения энергии Гиббса при химических реакциях,
стр. 156-191.*
- Е. Колдин. Быстрые реакции в растворе. М., Мир, 1966.
Релаксационные методы; метод электрического импульса, стр. 81-85.
- Donald Bashford and Martin Karplus. Multiple-site titration curves of proteins: an analysis of exact and approximate methods for their calculation.
J.Phys.Chem., 1991, 95, 9556-9561.
- André H. Juffer. Theoretical calculations of acid-dissociation constants of proteins.
Biochemistry and Cell Biology, 1998, 76, 198-209.
- George L.Kenyon and George H. Reed. Creatine kinase: structure-activity relationships.
Adv.Enzymol.Relat.Areas Mol.Biol., 1983, 54, 367-426
- Sushimita D.Lahiri, Pan-Fen Wang, Patricia C. Babbitt, Michael J. McLeish, George L. Kenyon and Karen N. Allen. The 2.1 Å Structure of *Torpedo californica* Creatine Kinase Complexed with the ADP-Mg²⁺-NO₃⁻ - Creatine Transition-State Analogue Complex.
Biochemistry, 2002, 41, 13861-13867