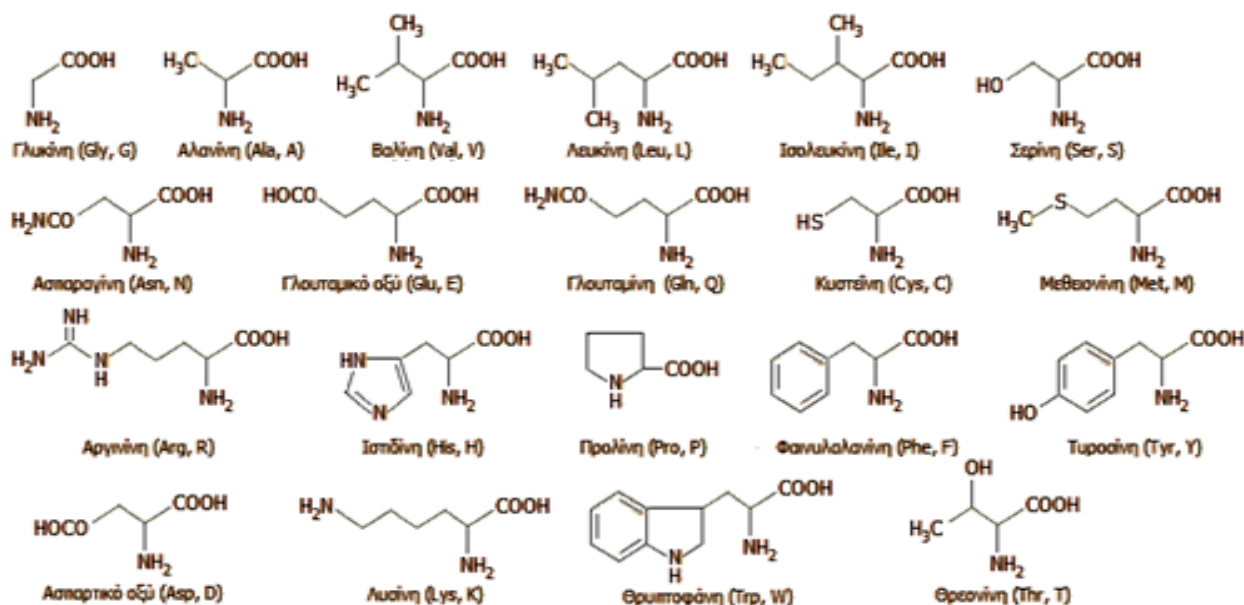


ΟΞΕΟΒΑΣΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΑΜΙΝΟΞΕΩΝ

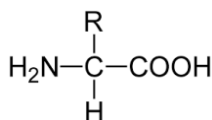
ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΑΜΙΝΟΞΕΩΝ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οι πρωτεΐνες είναι μακρομόρια που αποτελούν περισσότερο από το 50% του ξηρού βάρους των κυττάρων. Συμμετέχουν σε ένα μεγάλο αριθμό λειτουργιών ως δομικά στοιχεία (κολλαγόνο, ελαστίνη κ.α.) και ως ένζυμα, που εμπλέκονται στον μεταβολισμό. Παρουσιάζουν σπουδαία βιολογική δράση, αφού σε αυτές ανήκουν οι ορμόνες, τα αντιγόνα, οι πρωτεΐνες με προστατευτική δράση στο αίμα, με αποθηκευτική, αντιβιοτική και άλλες δράσεις. Με υδρόλυση των πρωτεϊνών λαμβάνονται τα 20 αμινοξέα που αποτελούν και τις δομικές μονάδες των πρωτεϊνών.



Τα αμινοξέα είναι οργανικές ενώσεις που περιέχουν στο μόριο τους μία αμινομάδα (-NH₂), μία καρβοξυλική ομάδα (-COOH), ένα άτομο υδρογόνου και μία πλευρική αλυσίδα -R συνδεδεμένα με ένα α άτομο άνθρακα (βρίσκεται σε α θέση ως προς την καρβοξυλική ομάδα).



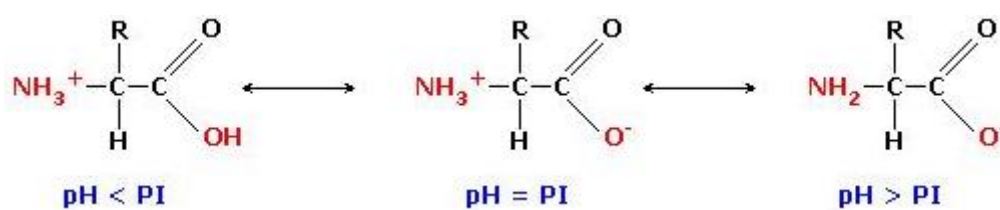
Τα συνήθη αμινοξέα είναι 20 και κατηγοριοποιούνται με βάση τις ιδιότητες της ομάδας R:

- μη πολικές αλειφατικές
- αρωματικές, πολικές μη φορτισμένες

- θετικά φορτισμένες (βασικές)
- αρνητικά φορτισμένα (όξινα) ομάδες.

Σε διάλυμα με ουδέτερο pH τα αμινοξέα συναντιούνται κατά κύριο λόγο στη μορφή διπολικών ιόντων. Ένα διπολικό ιόν μπορεί να δρα είτε σαν οξύ (δότης πρωτονίου) είτε σαν βάση (δέκτης πρωτονίου). Χημικές ενώσεις που έχουν αυτή την διττή φύση ονομάζονται αμφοτερίζουσες.

Η χαρακτηριστική τιμή pH στην οποία σχηματίζονται τα διπολικά ιόντα ονομάζεται ισοηλεκτρικό σημείο (pI) ενός αμινοξέος. Στο ισοηλεκτρικό σημείο, η **αμινομάδα** είναι **θετικά φορτισμένη** και η **καρβοξυλομάδα αρνητικά φορτισμένη**, έτσι, το διπολικό ιόν είναι ουδέτερο (καθαρό ηλεκτρικό φορτίο μηδέν). Τα αμινοξέα σε υδατικό διάλυμα υπάρχουν κυρίως στην ισοηλεκτρική μορφή.



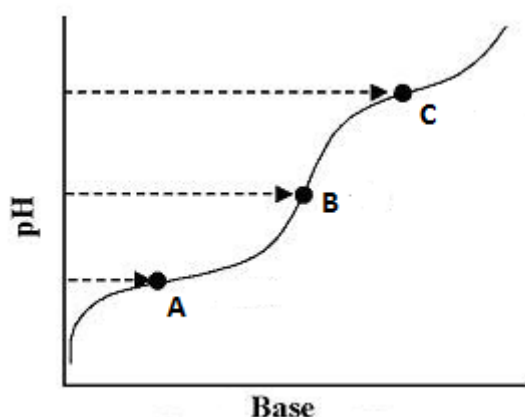
Ένα αμινοξύ έχει αρνητικό φορτίο σε οποιοδήποτε pH μεγαλύτερο του pI, και θετικό φορτίο σε οποιοδήποτε pH μικρότερο από το pI. Επιπλέον, κάθε αμινοξύ έχει τη δική του τιμή pI.

A. Καμπύλη τιτλοδότησης αμινοξέος

Η καμπύλη τιτλοδότησης αμινοξέος γίνεται με παρακολούθηση του pH διαλύματος αμινοξέος μετά από διαδοχική προσθήκη οξέος ή βάσεως. Η καμπύλη τιτλοδότησης είναι η απεικόνιση του pH σε συνάρτηση με τον όγκο του διαλύματος που προστίθεται ή ορθότερα με τον αριθμό των ισοδυνάμων που προστίθενται ανά mole του δείγματος. **Κατά την ογκομέτρηση του αμινοξέος με οξύ, το αμινοξύ λειτουργεί ως μια βάση (A⁻), και κατά την ογκομέτρηση με βάση, λειτουργεί ως οξύ (HA).** Για αυτή την τιτλοδότηση εφαρμόζεται η εξίσωση των Henderson-Hasselbalch και το αμινοξύ αντιστοιχεί είτε στο προϊόν σύζευξης βάσης A⁻ είτε στο συζυγές οξύ HA.

$$\text{pH} = \text{pKa} + \log \frac{[\text{A}^-]}{[\text{HA}]}$$

Το K_a , ή σταθερά διάστασης είναι ένα μέτρο της ισχύος του οξέος ή της βάσης. Το pK_a ($-COOH$) στην περίπτωση του αμινοξέος είναι ίσο με το pH στο οποίο η μισή ποσότητα του οξέος έχει αντιδράσει με τη βάση. Όταν η καμπύλη φθάσει στην πρώτη από τις δύο επίπεδες περιοχές (plateau-σημείο A) έχει αποπρωτονιωθεί το ήμισυ της καρβοξυλομάδας. Στο σημείο καμπής (σημείο B) η καρβοξυλομάδα είναι εντελώς αποπρωτονιωμένη και εδώ βρίσκεται το ισοηλεκτρικό σημείο. Σε αυτό το σημείο υπάρχει το αμινοξύ στην αμφοτερίζουσα μορφή. Στη δεύτερη από τις δύο επίπεδες περιοχές, (σημείο C), το μισό της αμινομάδας έχει πρωτονιωθεί.



Το ισοηλεκτρικό σημείο ενός αμινοξέος μπορεί να υπολογιστεί σύμφωνα με την ακόλουθη εξίσωση:

$$pI = \frac{pK_a[-COOH] + pK_a[-NH_3^+]}{2}$$

Η εξίσωση αυτή ισχύει μόνο στην περίπτωση των αμινοξέων που δεν φέρουν όξινη ή βασική ομάδα στην αλυσίδα R.

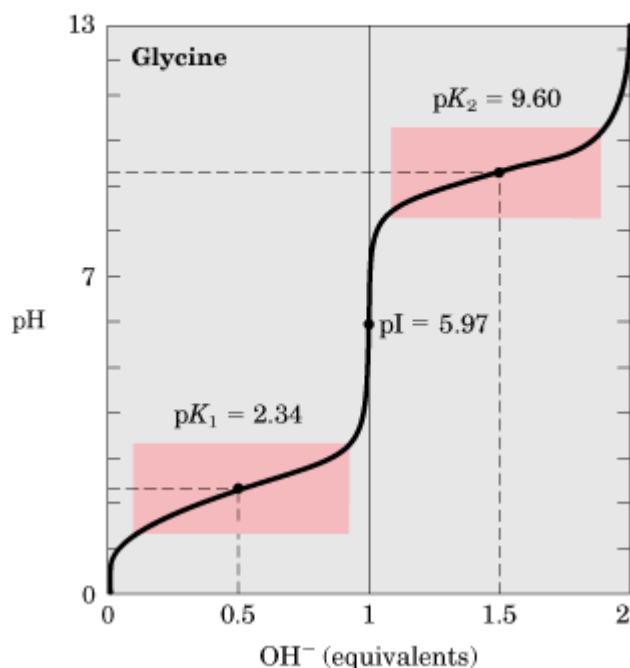
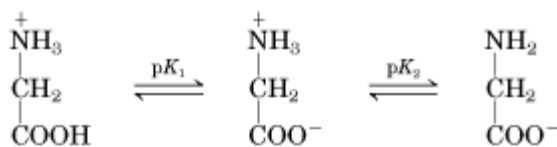
B. Παραδείγματα Καμπύλης Τιτλοδότησης

I. Γλυκίνη

Με δεδομένο ότι κατά την τιτλοδότηση της γλυκίνης εφαρμόζεται η εξίσωση Henderson-Hasselbalch, η γλυκίνη έχει μια καρβοξυλική ομάδα και μια αμινομάδα, με pK_a 2,34 και 9,6 αντίστοιχα.

Ειδικότερα, σε υδατικό διάλυμα με pH 6, η γλυκίνη εμφανίζεται με τη μορφή διπολικού ιόντος στο οποίο η καρβοξυλομάδα είναι μη πρωτονιωμένη (COO^-) και η αμινομάδα πρωτονιωμένη δίνοντας υποκατεστημένο ιόν αμμωνίου ($-NH_3^+$).

Σε όξινο διάλυμα, (πχ. pH = 3,0), η καρβοξυλομάδα πρωτονιώνεται (-COOH). Η προσθήκη του οξέος μειώνει το pH του διαλύματος αρχικά γρήγορα και στη συνέχεια πιο αργά αφού δημιουργείται ρυθμιστικό με το καρβοξύλιο. Στο pH 2,34 έχει καταναλωθεί το μισό του οξέος.



<http://cbc.arizona.edu/>

Η τιτλοδότηση της αμινομάδας με βάση ακολουθεί μια παρόμοια καμπύλη στην αλκαλική περιοχή. Η καρβοξυλομάδα αποπρωτονιώνεται (σχηματισμός -COO⁻) όπως και η αμινομάδα (σχηματισμός -NH₂). Σε pH μεγαλύτερο του 11-12 έχουμε πλήρη αποπρωτονίωση.

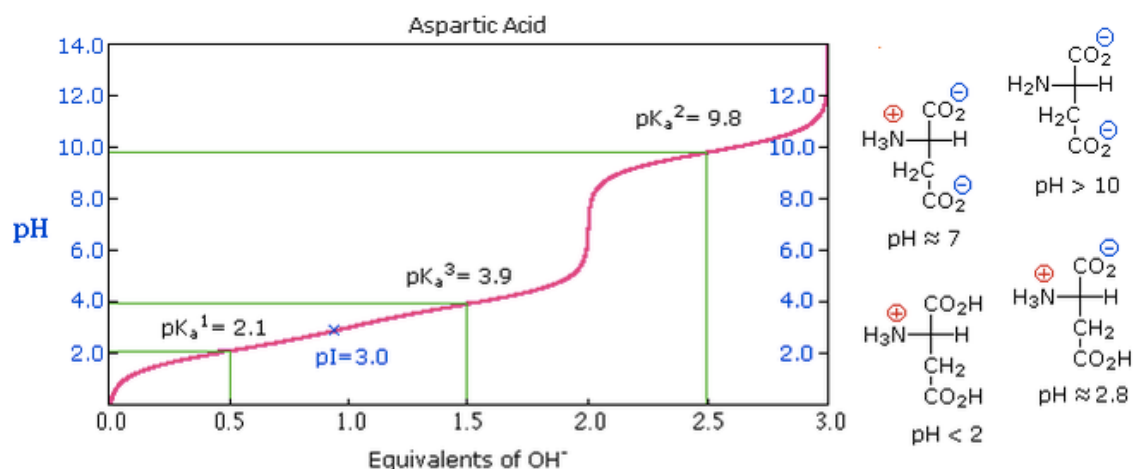
Στη τομή μεταξύ της τιτλοδότησης της καρβοξυλομάδας και της τιτλοδότησης της αμινομάδας βρίσκεται το ισοηλεκτρικό σημείο (pI).

Έτσι, το ισοηλεκτρικό σημείο για τη γλυκίνη υπολογίζεται να είναι: $(2,34 + 9,6) / 2 = 5,97$.

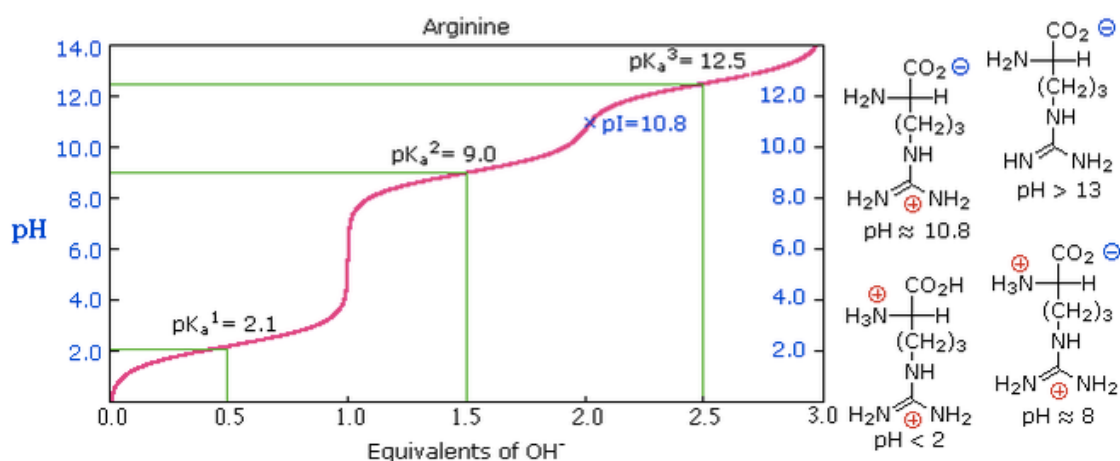
II. Ασπαρτικό οξύ & Αργινίνη

Η παρουσία επιπλέον οξίνων ή βασικών ομάδων στη πλευρική αλυσίδα επηρεάζει το pI που δίνεται ως μέσος όρος των pK_a των δύο οξέων ή βάσεων. Έτσι, για το ασπαρτικό οξύ

και το γλουταμικό οξύ με αρνητικά φορτισμένη πλευρική αλυσίδα $pI = \frac{1}{2}(pK_a^1 + pK_a^3)$, όπου pK_a^1 είναι το pK_a της πλευρικής αλυσίδας.



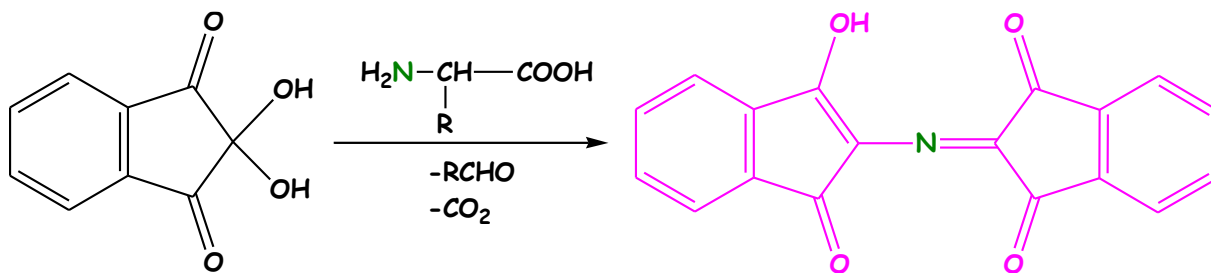
Για τη Ιστιδίνη και την Λυσίνη και Αργινίνη με θετικά φορτισμένη πλευρική αλυσίδα ισχύει $pI = \frac{1}{2}(pK_a^2 + pK_a^3)$.



<https://www2.chemistry.msu.edu/faculty/reusch/virttxtjml/proteins.htm>

ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΑΜΙΝΟΞΕΩΝ

Το γεγονός ότι τα αμινοξέα στην πλειονότητά τους δεν είναι ορατά τόσο στην ηλεκτροφόρηση όσο και στη χρωματογραφία, οδήγησε στην εύρεση της ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ ΝΙΝΥΔΡΙΝΗΣ. Αιθανολικό διάλυμα νινυδρίνης 1% w/v αντιδρά με ελεύθερα αμινοξέα δίνοντας ένα έγχρωμο ιώδες προϊόν το οποίο είναι ορατό και εύκολα ανιχνεύσιμο, αφού απορροφά σε μήκος κύματος $\lambda_{max} = 570nm$ σύμφωνα με της αντίδραση:



Η αντίδραση αυτή γίνεται σε pH 5-7 από όλα τα α-αμινοξέα που έχουν ελεύθερη αμινομάδα (συμμετέχει αποκλειστικά η πρωτοταγής αμινομάδα του αμινοξέος).

Η νινυδρίνη αντιδρά με όλα τα α-αμινοξέα και δίνει διμοριακή κυανή ένωση, εκτός της προλίνης με την οποία δίνει κίτρινο χρώμα.

Η αντίδραση αυτή όμως δεν αφορά αποκλειστικά τα αμινοξέα, αλλά είναι δυνατό να λάβει χώρα και με οιαδήποτε άλλο μόριο που φέρει μια πρωτοταγή αμινομάδα.

Στην περίπτωση των πρωτεϊνών το εμφανιζόμενο χρώμα μπορεί να είναι και κόκκινο ή και καφέ ανάλογα με τη φύση της πρωτεΐνης.

Η αντίδραση αυτή είναι γενική και δίνεται σε pH 5-7 από όλα τα α-αμινοξέα που έχουν ελεύθερη αμινομάδα.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ Α.

Σκοπός Εργαστηριακής Άσκησης

Η μελέτη των όξινων και βασικών ιδιοτήτων των αμινοξέων μέσω καμπύλης τιτλοδότησης. Προσδιορισμός των τιμών pKa, ισοηλεκτρικού σημείου pI και αναγνώριση ενός αγνώστου αμινοξέος.

Ασφάλεια: Καταγράψτε τα MSDS των αντιδραστηρίων.

Φοράτε εργαστηριακή ρόμπα, προστατευτικά γυαλιά και γάντια.

Υλικά

- 2 Ποτήρια Ζέσεως των 50 mL
- Σταγονομετρικά
- 2 Προχοϊδες των 50 mL
- Στήριγμα για τις προχοϊδες
- Πεχάμετρο
- Μαγνητικός Αναδευτήρας

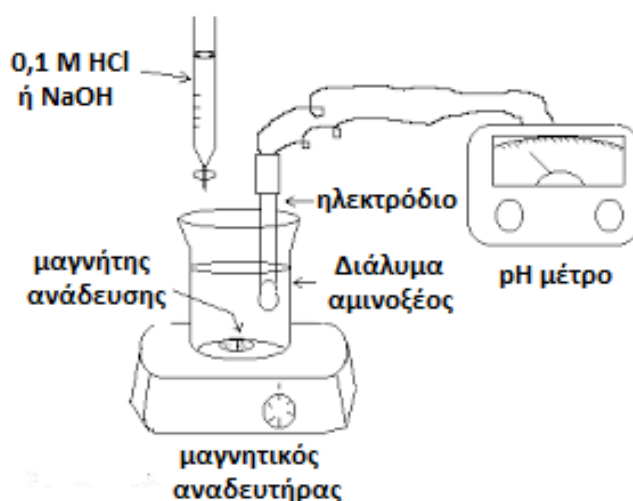
Διαλύτες/Διαλύματα/Πρώτες ύλες

- Διάλυμα αμινοξέος 0,1 M
- Διάλυμα NaOH 0,1 M
- Διάλυμα HCl 0,1 M

Πειραματική διαδικασία

A. Όγκομέτρηση με HCl

1. Σε ποτήρι ζέσεως των 100 mL προσθέστε με σιφώνιο 10 mL διαλύματος του αμινοξέος 0,1M και 10 mL απιονισμένου νερού.
2. Ξεπλύνετε την προχοΐδα με διάλυμα HCl (τρεις φορές).
3. Καταγράψτε το pH του διαλύματος του αμινοξέος
4. Γεμίστε την προχοΐδα με διάλυμα HCl 0,1 M
(Βεβαιωθείτε ότι το ρύγχος της προχοΐδας είναι γεμάτο με διάλυμα HCl και προσέξτε τον μηνίσκο).
5. Τοποθετήστε το ποτήρι που περιέχει το διάλυμα αμινοξέος κάτω από την προχοΐδα.
6. Βυθίστε το ηλεκτρόδιο στο διάλυμα του αμινοξέος και καταγράψτε το pH.
7. Προσθέστε υπό ανάδευση 1 mL διαλύματος HCl, και καταγράψτε το pH του διαλύματος. Επαναλαμβάνετε την προσθήκη 1mL διαλύματος HCl και την παράλληλη καταγραφή, μέχρι το pH του διαλύματος γίνει 1,5.



B. Όγκομέτρηση με NaOH

1. Ξεπλύνετε την προχοΐδα με διάλυμα NaOH (τρεις φορές).
2. Γεμίστε την προχοΐδα με διάλυμα NaOH (βεβαιωθείτε ότι το ρύγχος της προχοΐδας είναι γεμάτο με διάλυμα NaOH και προσέξτε τον μηνίσκο).
3. Τοποθετήστε το ποτήρι που περιέχει το διάλυμα αμινοξέος κάτω από την προχοΐδα.
4. Βυθίστε το ηλεκτρόδιο στο διάλυμα του αμινοξέος και καταγράψτε το pH.
5. Προσθέστε 1 mL διαλύματος NaOH, και καταγράψτε το pH του διαλύματος.
6. Επαναλάβετε την προσθήκη 1 mL διαλύματος NaOH και την παράλληλη καταγραφή μέχρι όπου το pH του διαλύματος να αρχίζει να παρουσιάζει μεγάλη μεταβολή, οπότε μειώνετε την ποσότητα του διαλύματος NaOH προσθέτοντας, 0,5 mL και καταγράφοντας τις τιμές του pH.

7. Όταν η μεταβολή του pH σταματήσει να είναι έντονη προσθέστε από 1 mL διαλύματος NaOH μέχρις ότου το pH του διαλύματος δεν μεταβάλλεται.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ Β.

Σκοπός Εργαστηριακής Άσκησης

Ανίχνευση αμινοξέων και πρωτεϊνών με αντίδραση νυνιδρίνης.

Ασφάλεια: Καταγράψτε τα MSDS των αντιδραστηρίων.

Φοράτε εργαστηριακή ρόμπα, προστατευτικά γυαλιά και γάντια.

Υλικά

Διαλύτες/Διαλύματα/Πρώτες ύλες

- 5 δοκιμαστικοί σωλήνες
- Σταγονομετρικά
- Στήριγμα για δοκιμαστικούς σωλήνες
- Διάλυματα αμινοξέων (Γλυκίνη και Προλίνη)
- Αντιδραστήριο Νυνιδρίνης (Αιθανολικό 1%)

Πειραματική διαδικασία

1. 1 mL δείγματος τοποθετείται το σε καθαρό δοκιμαστικό σωλήνα

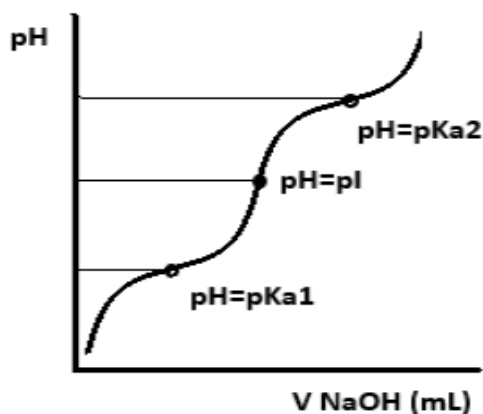
ΔΕΙΓΜΑΤΑ: Αιθανόλη, Γλυκίνη, Προλίνη, Ασπράδι Αυγού, Πρωτεΐνη Σόγιας και Γάλα

2. Περίπου 0,5 ml (5 σταγόνες) αντιδραστηρίου Νυνιδρίνης προστίθεται στο δείγμα.
3. Ο δοκιμαστικός σωλήνας τοποθετείται πάνω από το υδατόλουτρο για 3-5 λεπτά

Δείγμα	ΤΥΦΛΟ	Γλυκίνη	Προλίνη	Ασπράδι Αυγού	Πρωτεΐνη Σόγιας	Γάλα
ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΗ						

ΕΡΓΑΣΙΑ

1. Σχεδιάστε την καμπύλη τιτλοδότησης στο EXCEL (γραφική παράσταση του pH του διαλύματος έναντι του όγκου της βάσης που προστέθηκε στο αμινοξύ) όπως παρακάτω:



1. Από την καμπύλη τιτλοδότησης καθορίστε:
 - το pKa της καρβοξυλικής ομάδας
 - το pKa αμινομάδας
 - το ισοηλεκτρικό σημείο (pI).
2. Συγκρίνετε τις τιμές αυτές με τις τιμές τις βιβλιογραφίας και αποφασίστε σε ποιο αμινοξύ μπορεί να αντιστοιχεί.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Skoog, D. A., Holler, F.J. and Nieman T.A. "Αρχές Ενόργανης Ανάλυσης", (Εκδ. Κωσταράκης, Αθήνα 2002.
2. Pecsok, Shields, Cairns, McWilliam "Σύγχρονες μέθοδοι στη Χημική Ανάλυση, , Εκδόσεις Πνευματικός, Αθήνα 1980.
3. Ebbing, Darrell D. Steven D. Gammon, Γενική Χημεία, Μετάφραση: Νικόλαος Δ. Κλούρας, Τραυλός, Αθήνα 2011.
4. Vogel, A.I. A Text-book of Quantitative Inorganic Analysis, Longman, London, 1975.
5. Chemistry 2A Laboratory Manual Standard Operating Procedures Department of Chemistry University of California - Davis Davis, CA 95616 Summer 2015 <http://chemistry.ucdavis.edu/undergraduate/documents/2a-lab-manual-ss15.pdf>

6. *Vogel, A.I. A Text-book of Quantitative Inorganic Analysis, Longman, London, 1975.*
7. John McMurry, "Οργανική Χημεία", Κεφ. 14, 26, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, 2017.
8. *Κωνσταντίνου Β. & Κουλαδούρος Η., Πρακτικά και Θεωρητικά Θέματα Γενικής Χημείας, ΓΠΑ, Αθήνα 1999.*
9. *Χατζηιωάννου, Θ.Π. Εργαστήρια και Ασκήσεις Ποσοτικής Αναλυτικής Χημείας, Αθήνα 1992.*
10. *Λιοδάκη Σ. Αναλυτική Χημεία. Παπασωτηρίου, Αθήνα 2001.*
11. *Κλούρας Ν.Δ. Βασική Ανόργανη Χημεία, Τραυλός, Αθήνα 2002.*
12. <http://swc2.hccs.edu/pahlavan>
13. <http://orgchem.colorado.edu/Technique/Procedures/TLC/TLC.html>
14. http://www.chem.uoa.gr/chemicals/chem_lycopene.htm
15. <https://www2.chemistry.msu.edu/faculty/reusch/virttxtjml/proteins.htm>
16. <http://cbc.arizona.edu/>
17. <http://users.sch.gr/>