



Τμήμα Αειφορικής Γεωργίας

Γεωπονική Σχολή
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΠΑΤΡΩΝ

Εργαστηριακές Ασκήσεις Αναλυτικής και Οργανικής Χημείας

Αγγελική Απ. Γαλάνη

Χημικός PhD, Εργαστηριακό Διδακτικό Προσωπικό (ΕΔΙΠ)

10^η Εργαστηριακή Άσκηση
Οξεοβασικές Ιδιότητες Αμινοξέων - Προσδιορισμός
ισοηλεκτρικού σημείου

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

ΑΜΙΝΟΞΕΑ

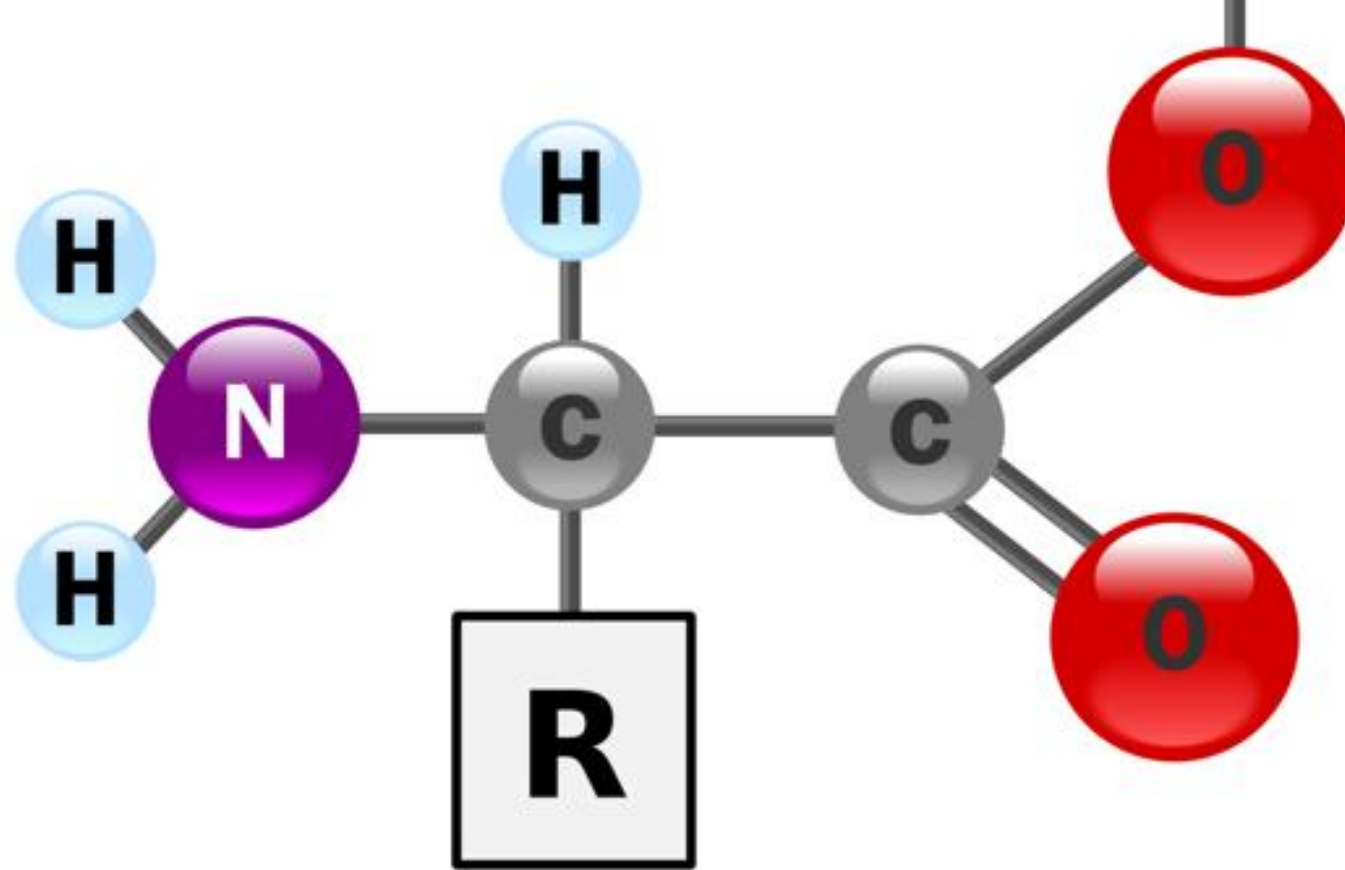
3

Αγγελική Απ. Γαλάνη

Είναι οργανικές ενώσεις που περιέχουν δύο λειτουργικές ομάδες, μια βασική αμινομάδα ($-NH_2$) και μια όξινη καρβοξυλομάδα ($-COOH$).

Εξαίρεση αποτελεί η προλίνη, που έχει ιμινομάδα αντί αμινομάδα

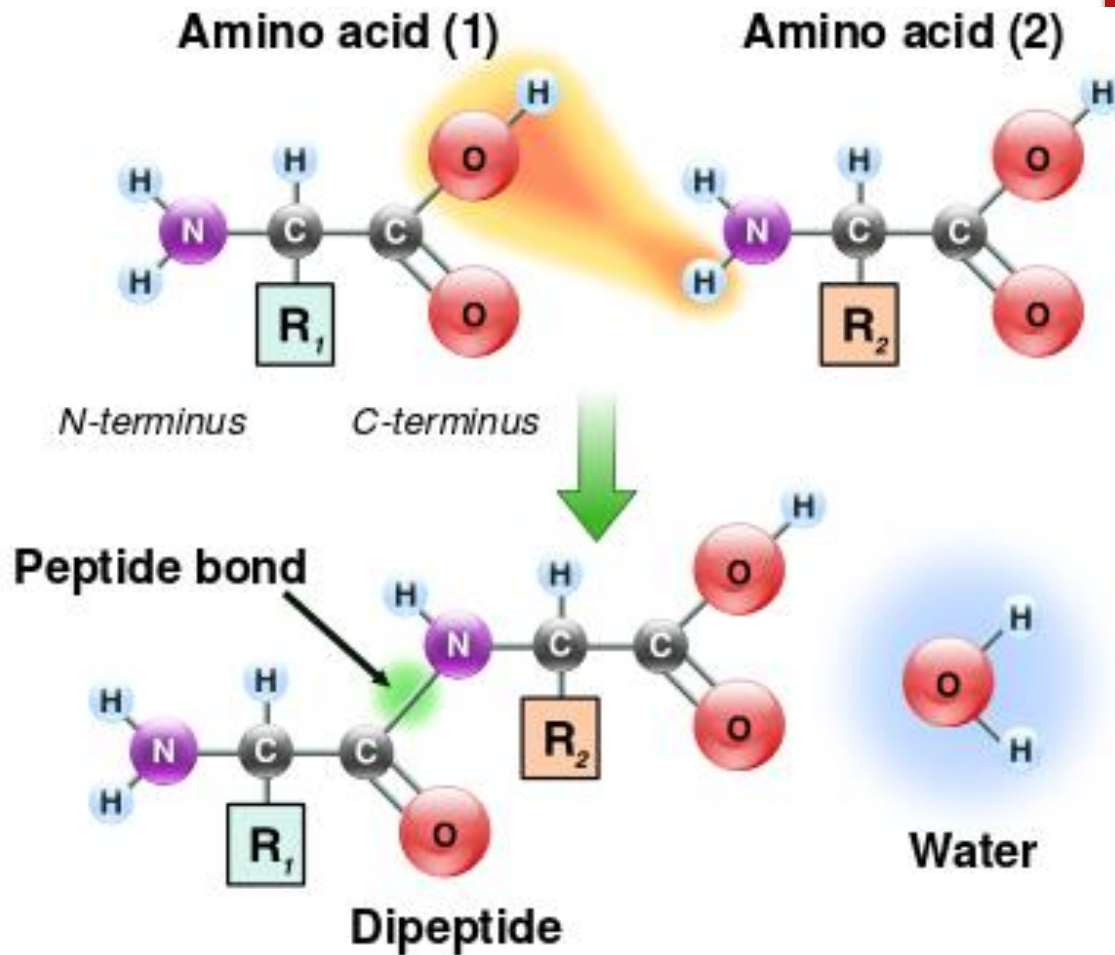
Τα αμινοξέα που βρίσκονται στη φύση είναι πάνω από 200, όμως μόνο 20 παρουσιάζουν ενδιαφέρον, τα οποία είναι οι δομικές μονάδες των πρωτεϊνών. Στα 20 αυτά αμινοξέα, η αμινομάδα βρίσκεται σε α-θέση ως προς την καρβοξυλομάδα.



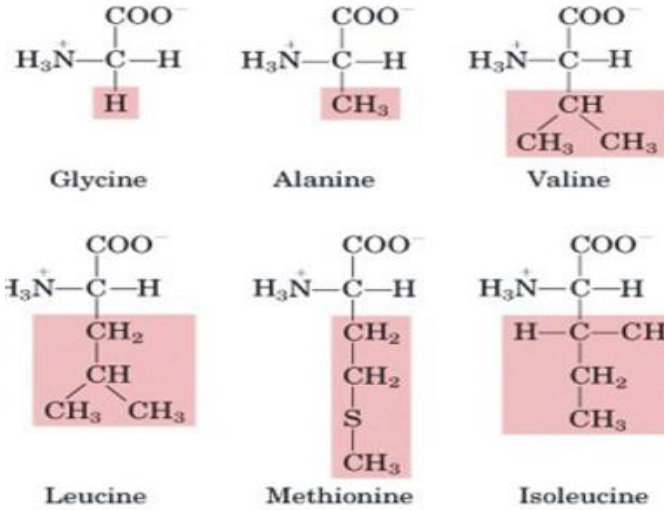
α - αμινοξέα

ΠΕΠΤΙΔΙΚΟΣ ΔΕΣΜΟΣ

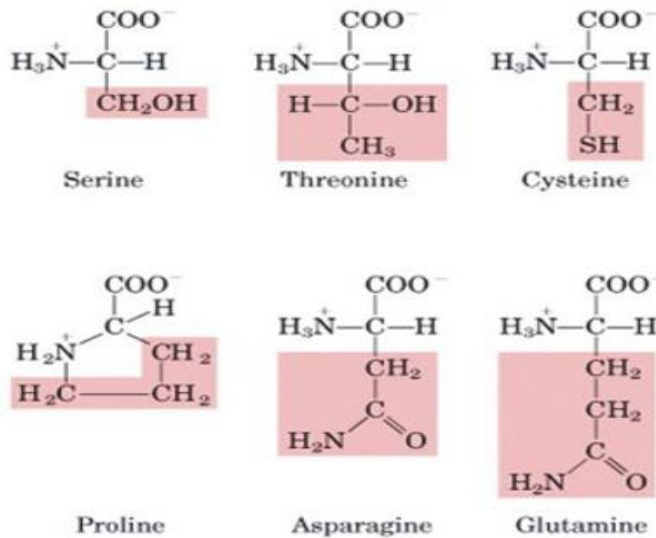
Τα α-αμινοξέα
συνδέονται μεταξύ
τους με πεπτιδικό
δεσμό και σχηματίζουν
τα πεπτίδια.



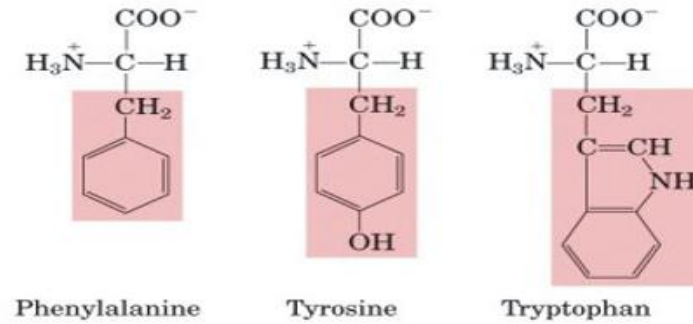
Nonpolar, aliphatic R groups



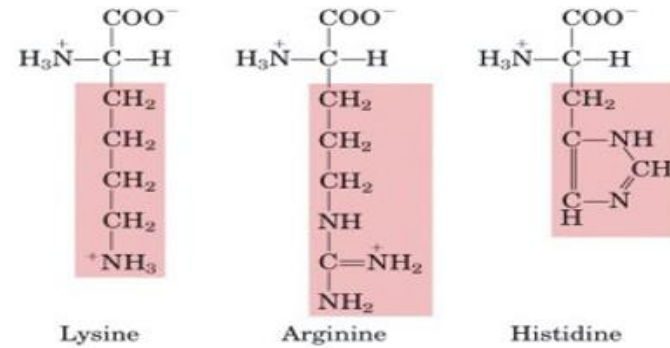
Polar, uncharged R groups



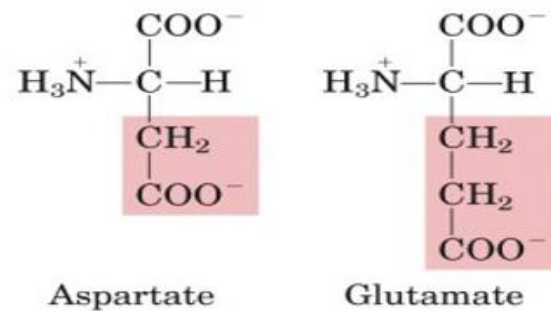
Aromatic R groups



Positively charged R groups



Negatively charged R groups



Τα 20 βασικά αμινοξέα

**Απαραίτητα
Αμινοξέα****Μη απαραίτητα
αμινοξέα****Ιστιδίνη****Αλανίνη****Ισολευκίνη****Αργινίνη****Λευκίνη****Ασπαραγίνη****Λυσίνη****Ασπαραγινικό Οξύ****Μεθειονίνη****Κυστεΐνη****Φαινυλαλανίνη****Γλουταμινικό οξύ****Θρεονίνη****Γλουταμίνη****Τρυπτοφάνη****Γλυκίνη****Βαλίνη****Προλίνη****Σερίνη****Τυροσίνη**

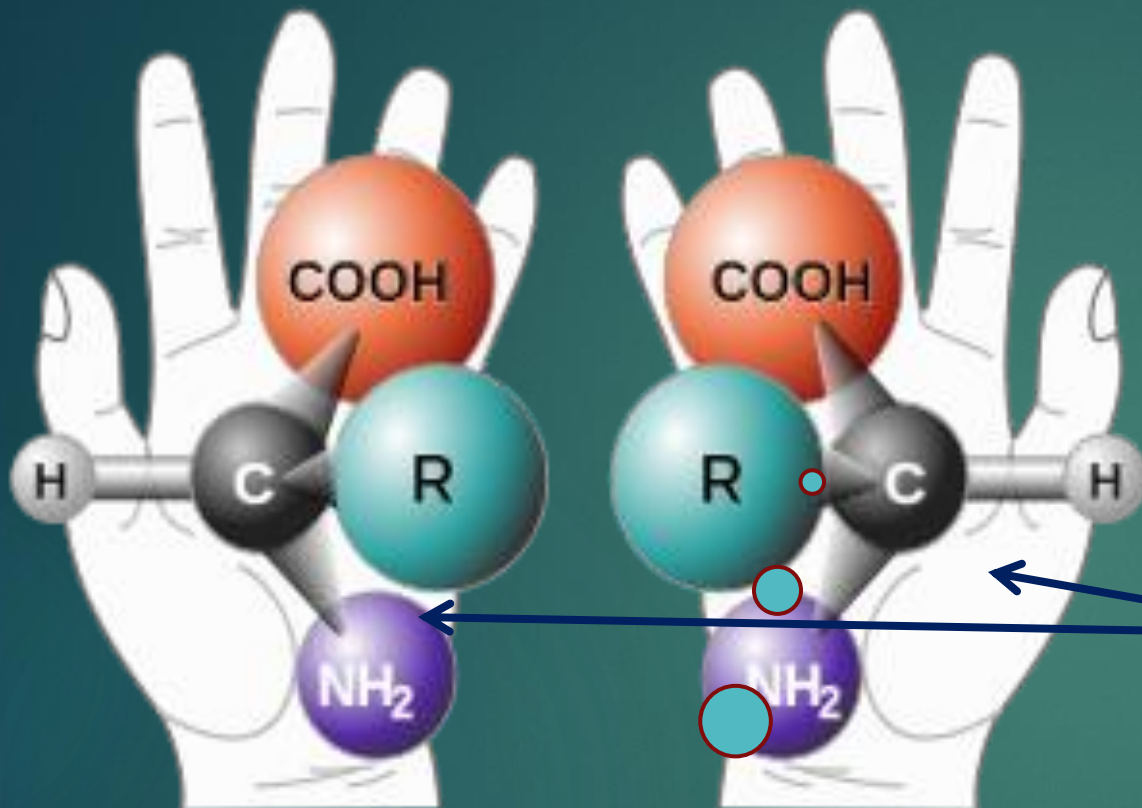
Όσα δεν
μπορεί ο
οργανισμός
να τα
συνθέσει
από μόνος
του και
πρέπει να
τα πάρει
από τροφές.

Όσα ο
οργανισμ
ός μπορεί
να τα
συνθέσει
μόνος
του.

Φυσικές ιδιότητες

8

Αγγελική Απ. Γαλάνη



Όλα τα αμινοξέα, εξαιρουμένης της γλυκίνης, έχουν τουλάχιστον ένα ασύμμετρο άτομο άνθρακα και είναι οπτικά ενεργές ενώσεις. Τα πρωτεϊνικά αμινοξέα ανήκουν στην L-μορφή.

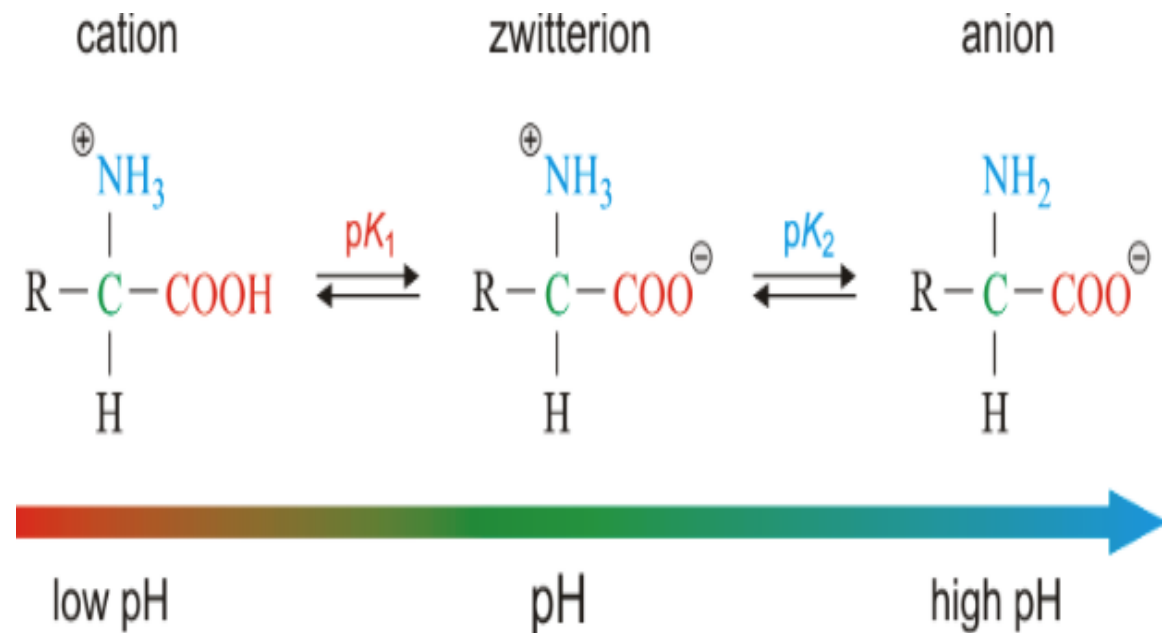
Άτομο άνθρακα με 4 διαφορετικούς υποκαταστάτες

Έχουν την ικανότητα να στρέφουν το επίπεδο του πολωμένου φωτός, δεξιά ή αριστερά.

Οξεοβασικές ιδιότητες αμινοξέων

9

- Τα αμινοξέα ανάλογα με το pH του διαλύματος στο οποίο βρίσκονται, έχουν την ικανότητα να ιονιστούν από την αμινομάδα (κατιόν), από την καρβοξυλομάδα (ανιόν), ή και από τις δύο (ισοϊονική μορφή - zwitterion ion).
- Χαρακτηρίζονται ως αμφολύτες, γιατί έχουν την ικανότητα να δρουν άλλοτε ως οξέα (να δίνουν H^+), και άλλοτε ως βάσεις (να δέχονται H^+).



Ισοηλεκτρικό σημείο αμινοξέος pI

10

Αγγελική Απ. Γαλάνη

Ισοηλεκτρικό σημείο ονομάζεται η τιμή pH κατά την οποία το αμινοξύ βρίσκεται στην ισοϊονική του μορφή.



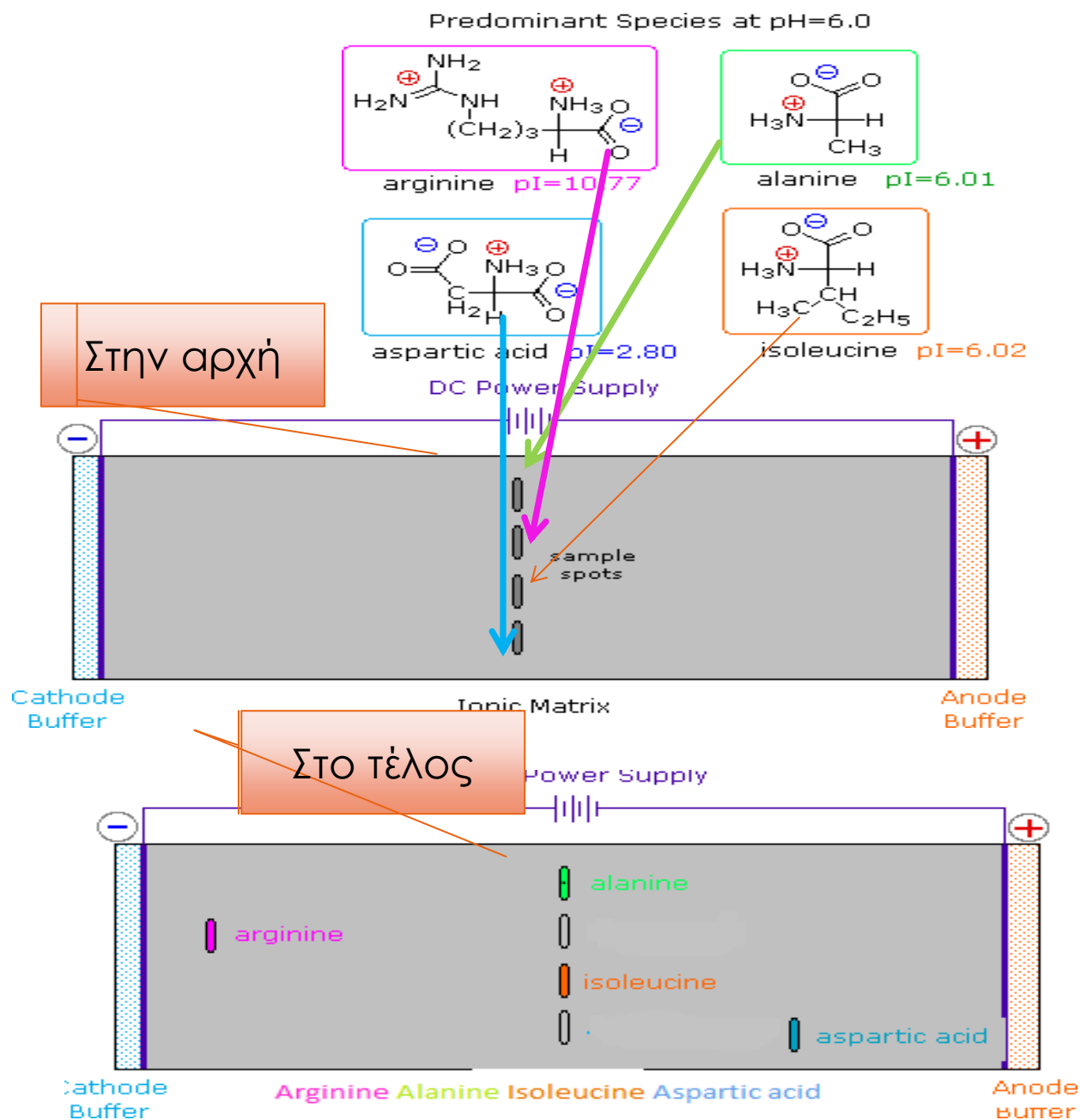
Σε αυτή την τιμή pH το θετικό φορτίο του αμινοξέος εξισώνεται με το αρνητικό.



Κάθε αμινοξύ έχει διαφορετικό ισοηλεκτρικό σημείο.



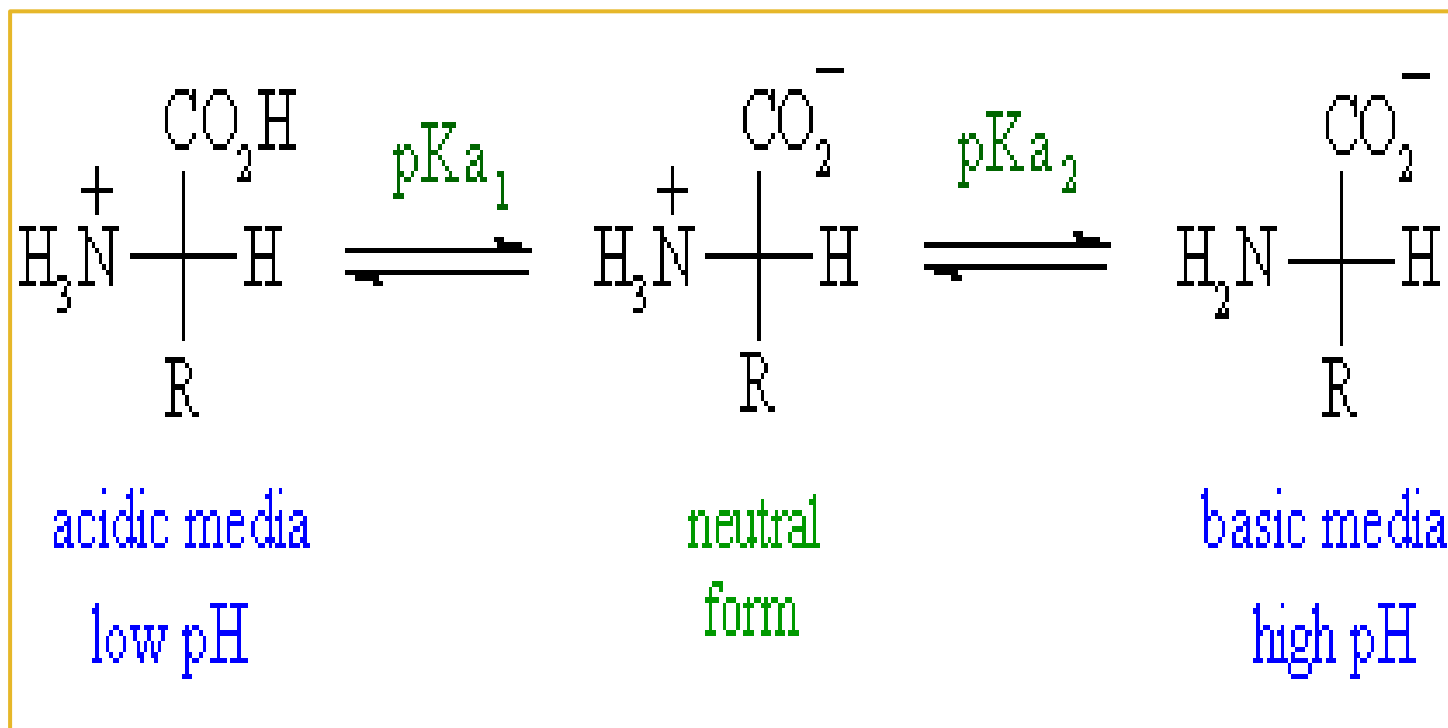
Στη μέθοδο διαχωρισμού των αμινοξέων με ηλεκτροφόρηση, χρησιμοποιούνται οι διαφορές των αμινοξέων στις τιμές pI .



Διαχωρισμός αμινοξέων με ηλεκτροφόρηση

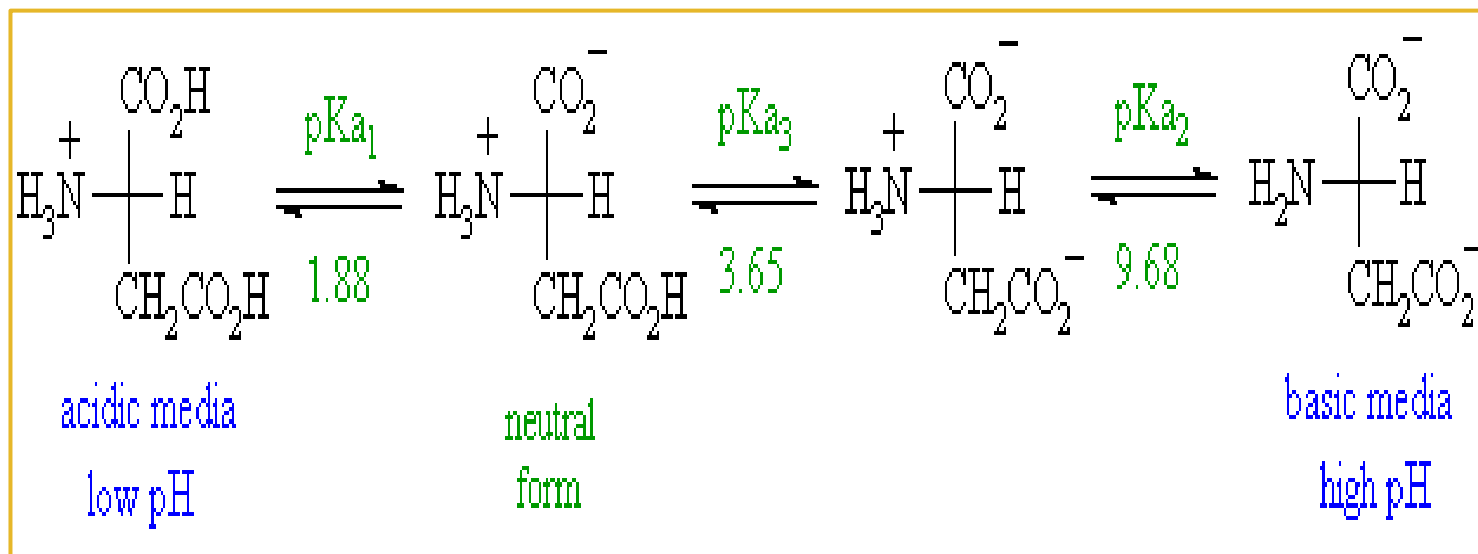
Υπολογισμός ισοηλεκτρικού σημείου για ουδέτερα αμινοξέα

$$pI = 1/2 (pK_{a_1} + pK_{a_2})$$



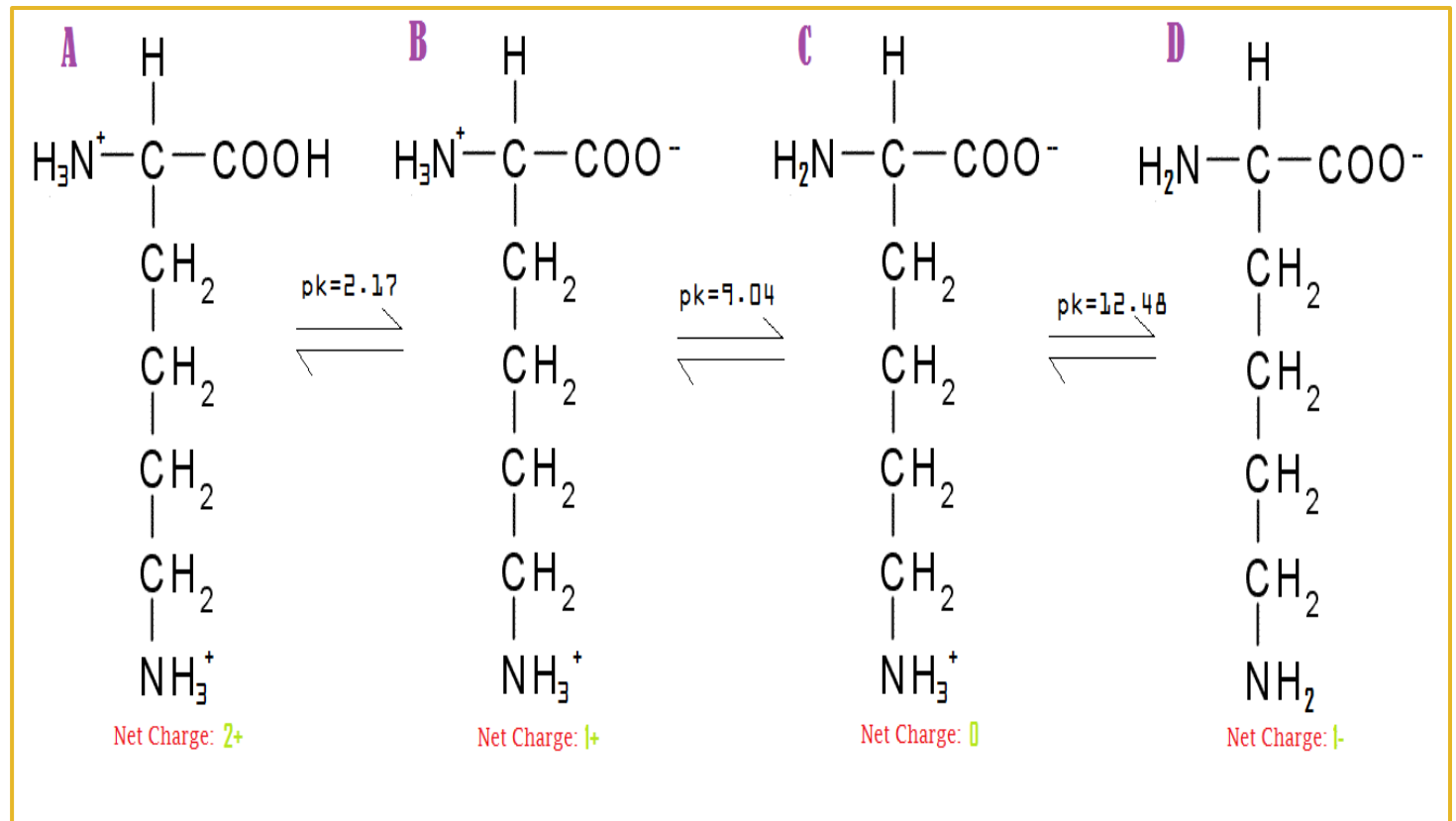
Υπολογισμός
ισοηλεκτρικού
σημείου
αμινοξέων που
περιέχουν
όξινες
πλευρικές
αλυσίδες

$$pI = 1/2 (pK_{a1} + pK_{a3})$$



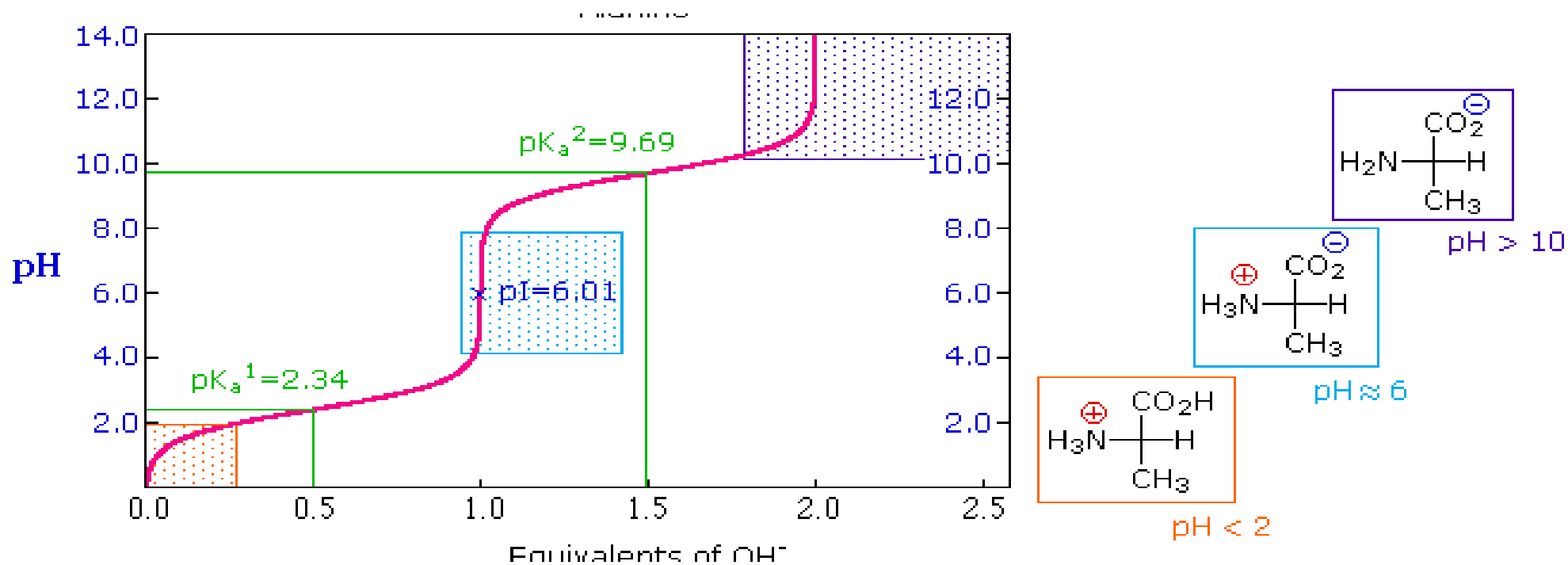
Υπολογισμός ισοηλεκτρικού σημείου αμινοξέων που περιέχουν βασικές πλευρικές αλυσίδες

$$pI = 1/2 (pK_{a2} + pK_{a3})$$



Amino Acid	Abbreviation		pK ₁	pK ₂	pK _R	pI
	3-Letters	1-Letter	-COOH	-NH ₃ ⁺	R group	
Alanine	Ala	A	2.34	9.69	-	6.00
Arginine	Arg	R	2.17	9.04	12.48	10.76
Asparagine	Asn	N	2.02	8.80	-	5.41
Aspartic Acid	Asp	D	1.88	9.60	3.65	2.77
Cysteine	Cys	C	1.96	10.128	8.18	5.07
Glutamic Acid	Glu	E	2.19	9.67	4.25	3.22
Glutamine	Gln	Q	2.17	9.13	-	5.65
Glycine	Gly	G	2.34	9.60	-	5.97
Histidine	His	H	1.82	9.17	6.00	7.59
Isoleucine	Ile	I	2.36	9.60	-	6.02
Leucine	Leu	L	2.36	9.60	-	5.98
Lysine	Lys	K	2.18	8.95	10.53	9.74
Methionine	Met	M	2.28	9.21	-	5.74
Phenylalanine	Phe	F	1.83	9.13	-	5.48
Proline	Pro	P	1.99	10.60	-	6.30
Serine	Ser	S	2.21	9.15	-	5.58
Threonine	Thr	T	2.09	9.10	-	5.60
Tryptophan	Trp	W	2.83	9.39	-	5.89
Tyrosine	Tyr	Y	2.20	9.11	10.07	5.66
Valine	Val	V	2.32	9.62	-	5.96

From Lehninger Principle of Biochemistry.



Τιτλοδότηση αμινοξέος – Υπολογισμός pI

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Αντιδραστήρια- Σκεύη-Όργανα

Διάλυμα υδροχλωρικής γλυκίνης 0,1 M, διάλυμα NaOH 0,1 M, ποτήρι ζέσεως 100 mL, μαγνήτης ανάδευσης, προχοΐδα, πεχάμετρο, μαγνητικός αναδευτήρας

Πειραματική πορεία

1. Προσθέτονται 10 mL διαλύματος υδροχλωρικής γλυκίνης 0,1M σε ποτήρι ζέσεως των 100 mL, το οποίο είναι εφοδιασμένο με μαγνήτη και βρίσκεται πάνω σε αναδευτήρα.
2. Μετριέται το pH του διαλύματος.





3. Γεμίζεται μια προχοΐδα με διάλυμα NaOH 0,1 M.
4. Τοποθετείται το ποτήρι ζέσης με το διάλυμα της υδροχλωρικής γλυκίνης και το μαγνήτη ανάδευσης, πάνω σε μαγνητικό αναδευτήρα.
5. Ανοίγεται η ανάδευση σε λίγες στροφές, (ήπια ανάδευση) και προσθέτονται από την προχοΐδα 0,5 mL NaOH .



5. Αφήνεται για λίγο το διάλυμα να αναδευθεί, και μετριέται το pH με πεχάμετρο. Η σωστή ρύθμιση του πεχάμετρο ελέγχεται από πριν με τη χρήση buffers pH=10, 4 και 7.
6. Επαναλαμβάνεται η διαδικασία έως ότου το pH του διαλύματος της υδροχλωρικής γλυκίνης να πάρει τιμή περίπου 12,5.

▶ Προσοχή χρησιμοποιείται διάλυμα υδροχλωρικής γλυκίνης 0,1 M και όχι διάλυμα γλυκίνης 0,1 M, οπότε δε χρειάζεται να γίνει τιτλοδότηση και με διάλυμα HCl 0,1 M για να βρεθεί το ισοηλεκτρικό σημείο της γλυκίνης.

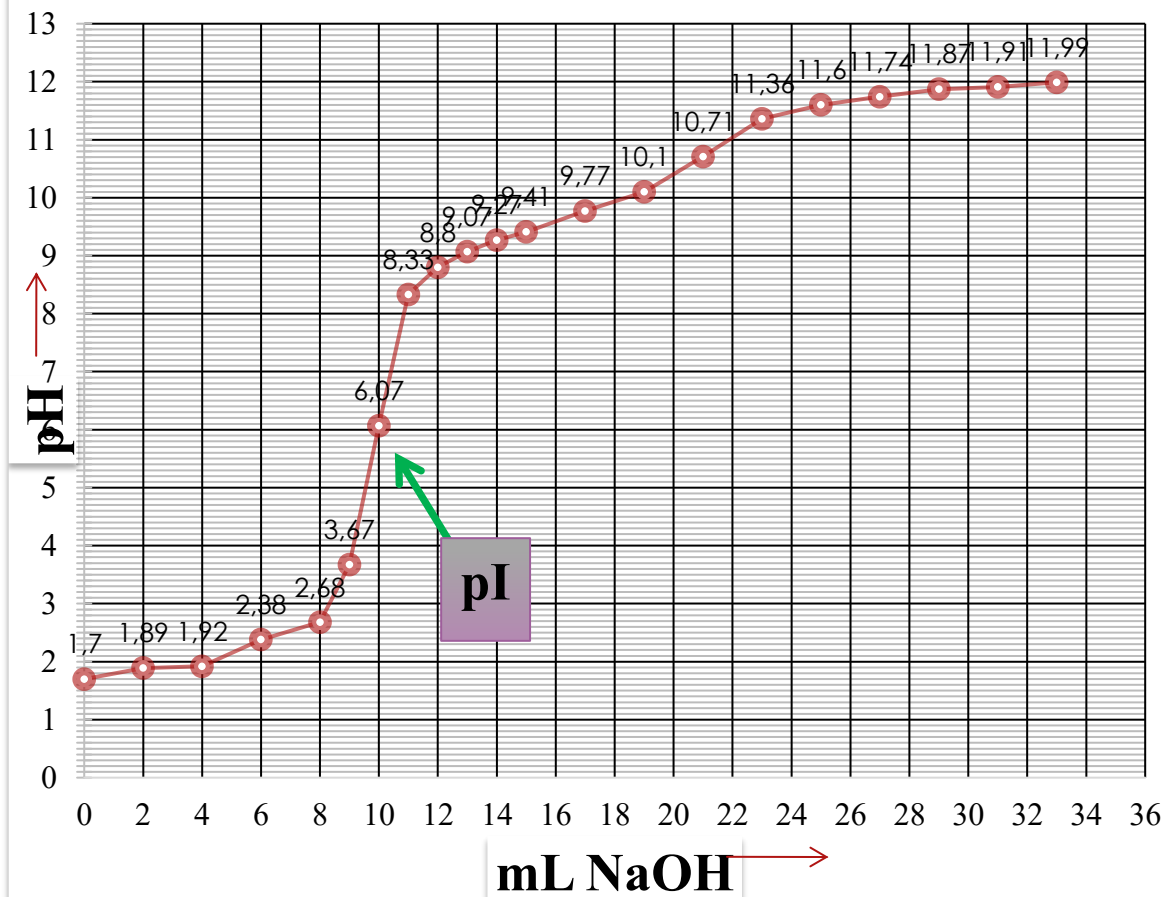
Μετρήσεις - Αποτελέσματα

Κατασκευάζεται η γραφική παράσταση των τιμών pH συναρτήσει των mL NaOH και μέσω αυτής υπολογίζεται η τιμή του ισοηλεκτρικού σημείου της γλυκίνης.

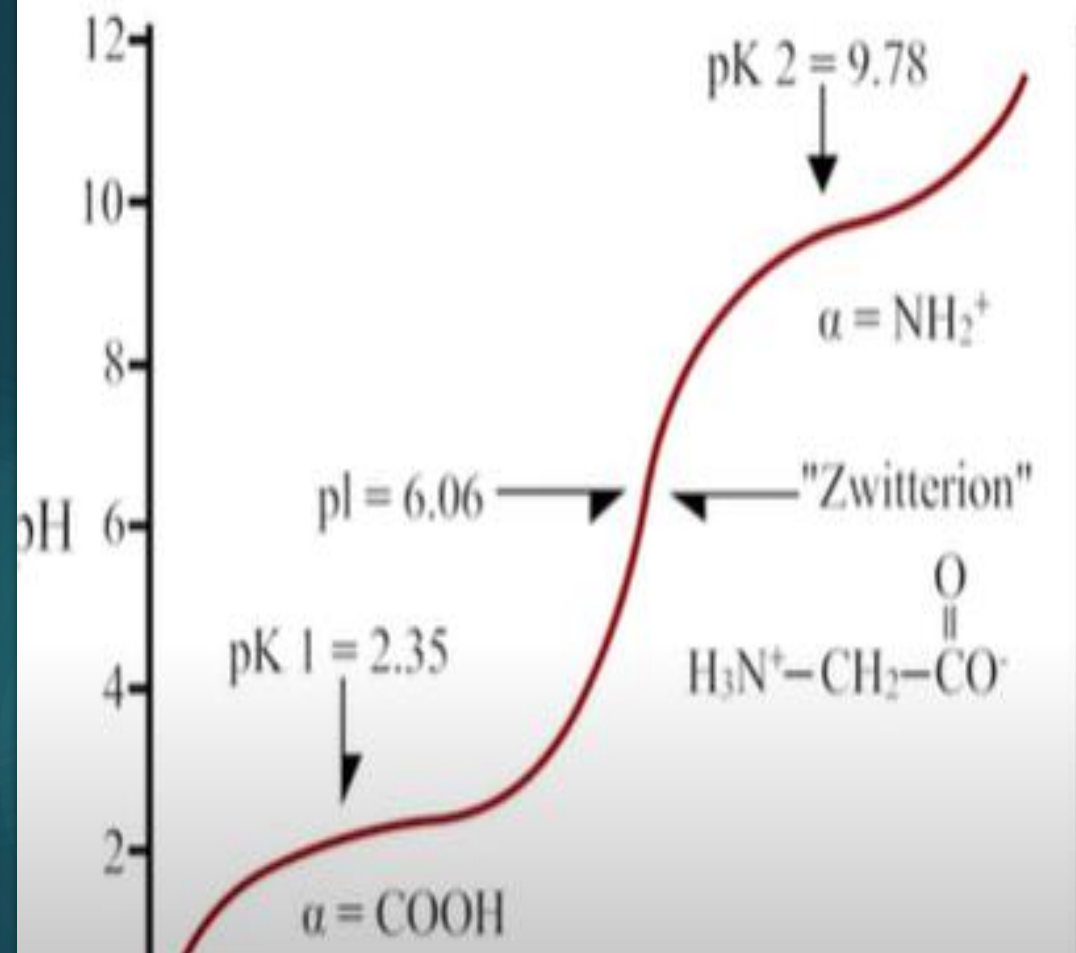
ΣΥΝΟΛΙΚΑ ML NaOH 0,1 M	pH
0	
0,5	
1	
1,5	
.	
.	
.	
.	
.	
.	
.	
.	
.	
Όσα χρειαστούν έως τιμή pH περίπου 12,5	

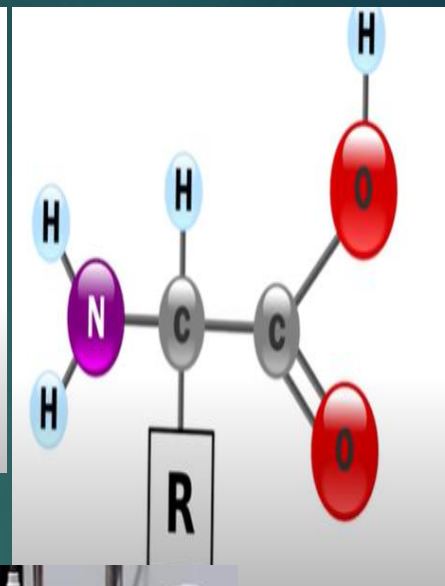
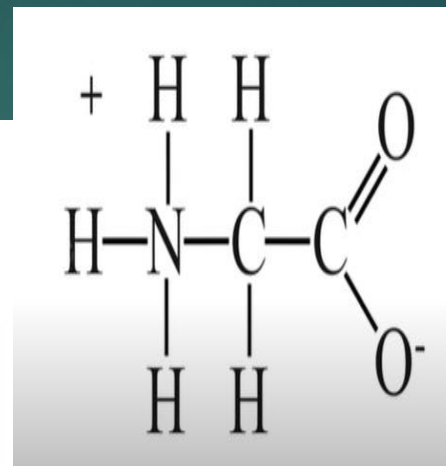
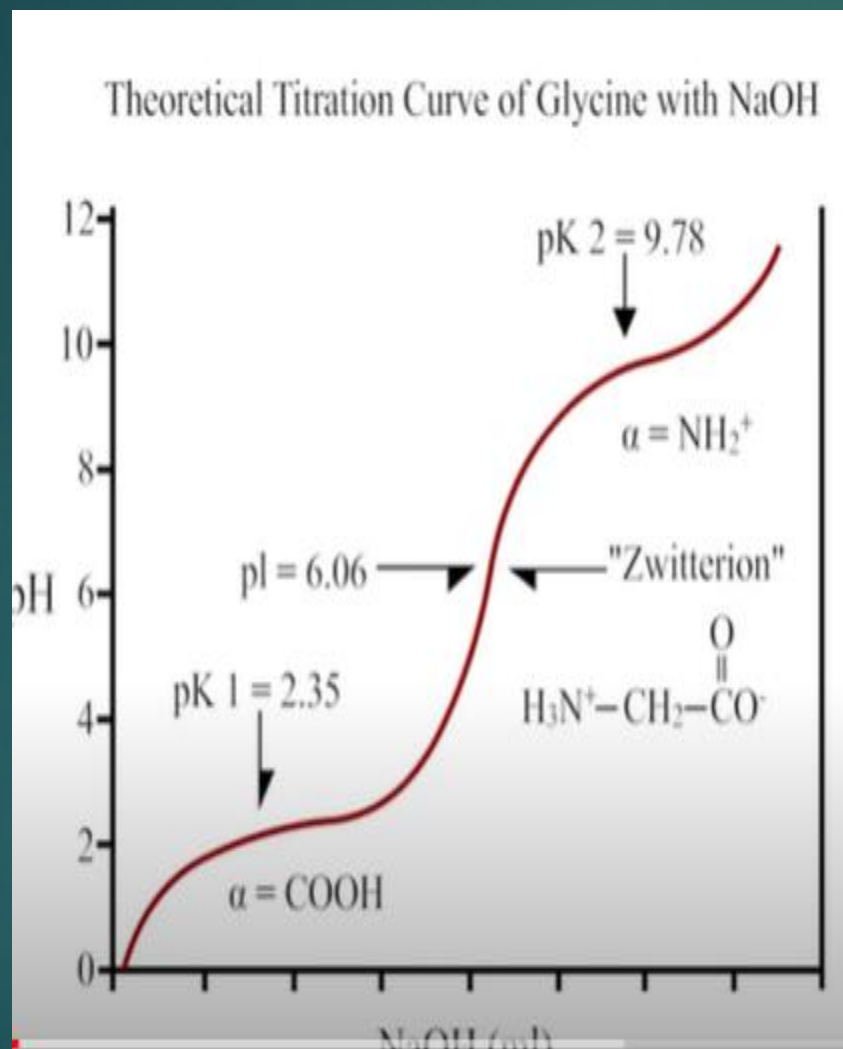
Τιτλοδότηση Γλυκίνης

24



Theoretical Titration Curve of Glycine with NaOH





ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ

- ▶ Αγγελική Απ. Γαλάνη, « Σημειώσεις Εργαστηρίου Οργανικής Χημείας», Τμήμα Δ.Π.Φ.Π., Πανεπιστήμιο Πατρών, Ιούνιος 2016.
- ▶ <https://www.youtube.com/watch?v=2vInVzyXluo>
- ▶ Αλεξάνδρου Ν.Ε., Βάρβογλης Α.Γ., « Οργανική Χημεία», Εκδόσεις Ζήτη, 1996.
- ▶ JOHN MCMURRY «Οργανική Χημεία», Μετάφραση Βάρβογλης Αναστάσιος, Ορφανόπουλος Μιχάλης, Σμόνου Ιουλία, Στρατάκης Μανώλης, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, 2015.
- ▶ Darell Ebbing, Steven Gammon, « ΓΕΝΙΚΗ ΧΗΜΕΙΑ», Μετάφραση Κλούρας Νικόλαος, Εκδόσεις Π. Τραυλός, 2011.
- ▶ www.biochemist01.wordpress.com/tag/equilibrium-equations
- ▶ www.mhhe.com/physsci/chemistry/carey5e/Ch27/ch27-1-4.html
- ▶ www.geneinfinity.org/images/aapks.jpg
- ▶ <https://www2.chemistry.msu.edu/faculty/reusch/virttxtjml/protein2.htm#aacd6>
- ▶ www.chem.fsu.edu/chemlab/bch4053l/Protein%20Characterization/AA%20Titration/index.html
- ▶ http://fac.ksu.edu.sa/sites/default/files/amino_acid_titration.pdf