

1. CEL DOŚWIADCZENIA

Zapoznanie się z metodą wyznaczenia punktu izoelektrycznego kazeiny opartej na pomiarze zmętnienia roztworów metodą turbidymetryczną w buforze octanowym o różnym pH.

2. TEORIA

- Elektrolity amfoteryczne i ich dysocjacja
- Własności elektryczne roztworów koloidalnych. Własności optyczne koloidów.
- Koagulacja koloidów pod wpływem elektrolitów.
- Zasada działania spektrofotometru
- pH i wpływ kwasowości na dysocjację

Amfolitami nazywamy substancje wykazujące zarówno właściwości zasadowe jak i kwasowe. Typowymi przedstawicielami tych związków są aminokwasy i białka. Na skutek jednoczesnej obecności grup zasadowych oraz kwasowych, związki te mogą dysocjować, jako kwasy i jako zasady. W roztworach silnie kwaśnych istnieją pod postacią kationów np. $+\text{NH}_3\text{RCOOH}$ a w roztworach zasadowych, jako aniony, np. $\text{NH}_2\text{-R-COO}^-$. Przy pośrednich wartościach pH dominującą formą jonową w roztworze są amfijony, czyli jony dwubiegunowe, np. $^+\text{NH}_3\text{-R-COO}^-$. Cząsteczka białka zawiera wiele grup kwasowych i zasadowych, których jonizacja (a tym samym również całkowity ładunek cząsteczki), zmienia się wraz ze zmianą pH środowiska. Przy określonej wartości pH sumaryczny ładunek cząsteczki amfijonu może wynosić zero, dzięki równej liczbie zjonizowanych grup kwasowych i zasadowych. Wartość pH odpowiadającą temu stanowi amfijonu nazywamy jego punktem izoelektrycznym. Jednocześnie jest to takie pH roztworu, przy którym stężenie molowe formy kationowej jest równe stężeniu molowemu formy anionowej. Roztwór kazeiny, tak jak roztwory innych białek jest trwały tylko wtedy, kiedy cząsteczki koloidu mają ładunek elektryczny różny od zera. W pobliżu punktu izoelektrycznego jego zmętnienie silnie wzrasta na skutek występowania koagulacji spowodowanej utratą ładunku cząsteczek koloidalnych oraz obecnością soli. W punkcie izoelektrycznym koagulacja osiąga swoje maksimum.

3. MATERIAŁY, ODCZYNNIKI, URZĄDZENIA:

Spektrofotometr

2 kuwety polistyrenowe

1% r-r kazeiny w 1 M octanie sodu

1 M kwas octowy

Woda destylowana

Waga

12 falkonów

Pipeta Pasteura

Pipeta 100-1000 μl

Pipeta szklana 25 ml

Gruszka do pipety

Końcówki do pipety (niebieskie)

pH-metr

Elektroda ELMETRON EPS-1

4. PRZEBIEG DOŚWIADCZENIA

a) Włączanie spektrofotometru:

Włączyć spektrofotometr przełącznikiem znajdującym się z boku obudowy. Następnie odczekać co najmniej 15 minut na rozgrzanie się lampy. W tym czasie przygotować roztwory do pomiarów zgodnie z punktami b-d.

UWAGA! Podczas inicjalizacji spektrofotometru nie podnosić pokrywy komory pomiarowej! Jeśli spektrofotometr jest włączony należy się upewnić czy był włączony, przez co najmniej 15min.

- b) Na wadze elektronicznej do pustego falkonu odważyć 3,0g 1% r-r kazeiny w 1 M octanie sodu. Wynik zapisać w zeszycie laboratoryjnym. Następnie r-r rozcieńczyć wodą destylowaną do 30,0g. Wynik zapisać. Roztwór wymieszać. Obliczyć stężenie octanu amonu i kazeiny w otrzymanym roztworze.
- c) W falkonach przygotować po 40 ml 0,1 M i 0,01 M roztworu kwasu octowego korzystając z dostępnego 1,0 M kwasu octowego. Przed przystąpieniem do wykonania tej części, należy skonsultować obliczenia z prowadzącym.
- d) Przygotowanie roztworów do pomiarów zmętnienia:
Do ponumerowanych falkonów wlewamy za pomocą pipet (szklanej lub automatycznej) wodę destylowaną i kwas octowy w ilościach podanych w tabelce, a następnie do każdego falkonu po 2 ml uprzednio przygotowanego roztworu białka. Roztwór mieszamy i po 3 min. pobieramy 3 ml do kuwety polistyrenowej i mierzymy jego zmętnienie (patrz punkt d). Równoległe dokonujemy pomiaru pH roztworów. Wyniki notujemy w zeszycie laboratoryjnym.

Tabela 1. Przygotowanie roztworów do pomiarów zmętnienia i pH.

Nr	1	2	3	4	5	6	7	8	9
H ₂ O [ml]	16,8	15,5	17,5	17,0	16,0	14,0	10,0	2,0	14,8
0.01 M CH ₃ COOH	1,2	2,5	-	-	-	-	-	-	-
0.1 M CH ₃ COOH	-	-	0,5	1,0	2,0	4,0	8,0	16,0	-
1 M CH ₃ COOH	-	-	-	-	-	-	-	-	3,2
Karenina w CH ₃ COONa	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
Absorbancja									
Transmitancja									
pH roztworu	*								
	**								

* wpisać wartość odczytaną z pH-metru

** wpisać wartość obliczoną z równania Hendersona-Hasellbacha

e) Pomiar zmętnienia:

1. Wstawić do komory pomiarowej spektrofotometru kuwetę napełnioną 3 ml wody destylowanej – jest to próbka referencyjna, następnie zamknąć pokrywę.
2. Nastawić długość fali na 500 nm. postępując zgodnie z instrukcją obsługi urządzenia. Zmierzyć w ten sposób próbę ślepą w trybie absorbancja.
3. Włożyć kuwetę napełnioną 3 ml roztworu białka, zamknąć pokrywę pomiarową, następnie dokonać pomiaru.
4. Całość powtórzyć dla trybu transmitancji.

5. PRZEDSTAWIENIE WYNIKÓW:

1. W tabeli przedstawić: stężenia kwasu octowego, octanu sodu i białka oraz odczytane wartości absorbancja i transmitancji i odpowiadające im wartości pH.
2. Obliczyć pH roztworów buforowych w poszczególnych probówkach wykorzystując równanie Hendersona-Hasellbacha:

$$pH = pK_a + \log \frac{[CH_3COO^-]}{[CH_3COOH]}$$

3. gdzie: $pK_a = -\log K_a$, K_a jest stałą dysocjacji kwasu octowego. **W obliczeniach należy również uwzględnić stężenie octanu sodu dodanego z kazeiną.**
4. Sporządzić wykres absorbancji [a.u.] w funkcji pH roztworu.
5. Z wykresów wyznaczyć punkt izoelektryczny mierzonego białka.

Opracował:
mgr. inż. Jan Procek