

PRACOWNIA CHEMII

Ćwiczenia laboratoryjne dla studentów II roku kierunku

„Zastosowania fizyki w biologii i medycynie”

Biofizyka molekularna

Projektowanie molekularne i bioinformatyka

Równowaga chemiczna (Fiz2)

Wyznaczanie stałej dysocjacji 7-metyloguanozyny

Osoby prowadzące:

mgr Marcin Ziemiak

dr Elżbieta Bojarska



KAPITAŁ LUDZKI
NARODOWA STRATEGIA SPÓJNOŚCI



UNIA EUROPEJSKA
EUROPEJSKI
FUNDUSZ SPOŁECZNY



1. Wprowadzenie

1.1. Reakcje odwracalne i nieodwracalne

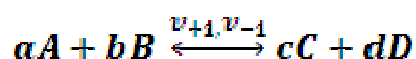
Odwracalność reakcji chemicznych jest związana z osiągnięciem stanu równowagi. Większość reakcji chemicznych nie prowadzi do całkowitej przemiany substratów w produkty, ponieważ w miarę wzrostu stężenia produktów coraz szybciej przebiega reakcja odwrotna.

Kiedy szybkość reakcji przebiegających w przeciwnych kierunkach jest jednakowa to między reagentami ustala się stan równowagi dynamicznej. Warunek ten jest spełniony wówczas, gdy żaden z reagentów nie opuszcza środowiska reakcji, czyli reakcja przebiega w układzie zamkniętym.

Reakcje nie osiągające stanu równowagi (przebiegające do całkowitego wyczerpania substratów) są reakcjami nieodwracalnymi.

1.2. Prawo działania mas

Dla reakcji odwracalnej



szybkość reakcji jest opisywana następującymi równaniami kinetycznymi

$$v_{+1} = k_{+1} [A]^\alpha [B]^b$$

$$v_{-1} = k_{-1} [C]^c [D]^d$$

W stanie równowagi $v_{+1} = v_{-1}$, co oznacza, że stosunek stałych szybkości k_{-1}/k_{+1} jest wartością stałą, nazywaną stałą równowagi

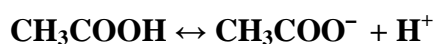
$$K_c = \frac{[C]^c [D]^d}{[A]^\alpha [B]^b}$$

gdzie K_c oznacza stężeniową stałą równowagi.

Duża wartość stałej równowagi wskazuje, że w układzie w stanie równowagi stężenia produktów są znacznie większe niż stężenia substratów, czyli reakcja przebiega z dużą wydajnością. Mała wartość stałej równowagi oznacza, że w układzie w stanie równowagi stężenia substratów są większe od stężeń produktów, a reakcja przebiega z małą wydajnością. Wartość stałej równowagi zależy od temperatury, nie zależy natomiast od początkowych stężeń substratów. Jeżeli na układ będący w stanie równowagi dynamicznej działa jakiś czynnik zewnętrzny, to układ będzie przeciwdziałać zmianom zmierzającym do naruszenia tego stanu (reguła przekory Le Chateliera-Brauna).

1.3. Wpływ zmian stężenia reagentów na stałą równowagi

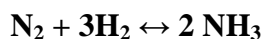
Jeżeli układ znajdujący się w stanie równowagi zostaje zaburzony poprzez zmianę stężenia jednego z reagentów, to w układzie zachodzą reakcje prowadzące do zmian stężeń pozostałych reagentów. Wzrost stężenia substratu A lub B spowoduje wzrost stężenia produktu C lub D, ponieważ zwiększa się szybkość reakcji w kierunku tworzenia produktów. W celu zwiększenia wydajności produktów reakcji stosuje się zatem nadmiar jednego z substratów, przez co wzrasta stopień przereagowania drugiego i wydajność reakcji. Wartość K jest stała w danej temperaturze, zatem zmiana wartości stężeń w liczniku musi być zrównoważona zmianą stężeń w mianowniku ułamka. Przykładem wpływu zmian stężenia reagentów na stałą równowagi jest proces dysocjacji słabych elektrolitów w obecności elektrolitów mocnych o wspólnym jonie. Proces dysocjacji kwasu octowego



ulega cofnięciu w obecności CH_3COO^- , nie wpływając na wartość stałej równowagi.

1.4. Wpływ zmian ciśnienia na stałą równowagi

Podobnie jak zmiana stężenia reagentów, na wydajność reakcji wpływa zmiana ciśnienia, jeżeli reakcja przebiega w fazie gazowej. Wpływ zmian ciśnienia na stałą równowagi obserwuje się tylko w przypadku, gdy liczba moli produktów jest różna od liczby moli substratów. Przykładem takiej reakcji jest synteza amoniaku przebiegająca według równania stechiometrycznego



W czasie przebiegu reakcji zmniejsza się objętość układu, ponieważ z 4 moli substratów powstają 2 mole produktów. Wzrost ciśnienia przesuwa równowagę w kierunku syntezy amoniaku, ponieważ ten proces pociąga za sobą zmniejszenie objętości układu. Zmniejszenie ciśnienia powoduje efekt przeciwny, przesunięcie równowagi w kierunku tworzenia substratów.

Jeżeli liczba moli produktów jest większa niż liczba moli substratów, np. w procesie rozkładu N_2O_4 zgodnie z równaniem



to zwiększenie ciśnienia przesuwa równowagę w kierunku syntezy N_2O_4 , ponieważ ten proces prowadzi do zmniejszenia objętości całego układu.

W przypadku, gdy reakcja przebiega bez zmiany objętości (jak w procesie syntezy H₂, reakcja poniżej), zmiana ciśnienia nie wpływa na stan równowagi.

1.5. Wpływ temperatury na stałą równowagi

Zmiana temperatury powoduje zmianę wartości stałej równowagi. W przypadku reakcji endotermicznej wartość stałej równowagi rośnie wraz ze wzrostem temperatury, a w przypadku reakcji egzotermicznej – maleje.

Dla reakcji egzotermicznej



wartość stałej dysocjacji maleje ze wzrostem temperatury, co oznacza, że stężenie HJ maleje, a stężenia H_2 i J_2 rosną.

Z reguły Le Chateliera wynika, że wzrost temperatury sprzyja reakcjom zużywającym ciepło. W procesie syntezy HJ ciepło jest wydzielane, natomiast w reakcji odwrotnej ciepło jest pochłaniane. Wzrost temperatury wpływa więc na przesunięcie równowagi w kierunku tworzenia substratów (trwałość HJ maleje ze wzrostem temperatury).

1.6. Podstawy spektroskopii absorpcyjnej

Spektroskopia absorpcyjna należy do metod spektroskopowych opartych na absorpcji promieniowania przez materię. Absorpcja cząsteczek w zakresie nadfioletowym (200-340 nm) oraz widzialnym (340-800 nm) zależy od struktury elektronowej i powoduje przeniesienie elektronu z orbitalu w stanie podstawowym (o niższej energii) na orbital w stanie wzbudzonym (o wyższej energii). Wzbudzenie elektronu jest związane z absorpcją kwantu promieniowania o ściśle określonej energii, równej przerwie energetycznej między poziomem podstawowym, a jednym z poziomów wzbudzonych.

Zależność między energią pochłoniętą przy przejściu elektronowym a częstotliwością promieniowania ν lub długością fali λ powodującej to przejście jest wyrażona wzorem:

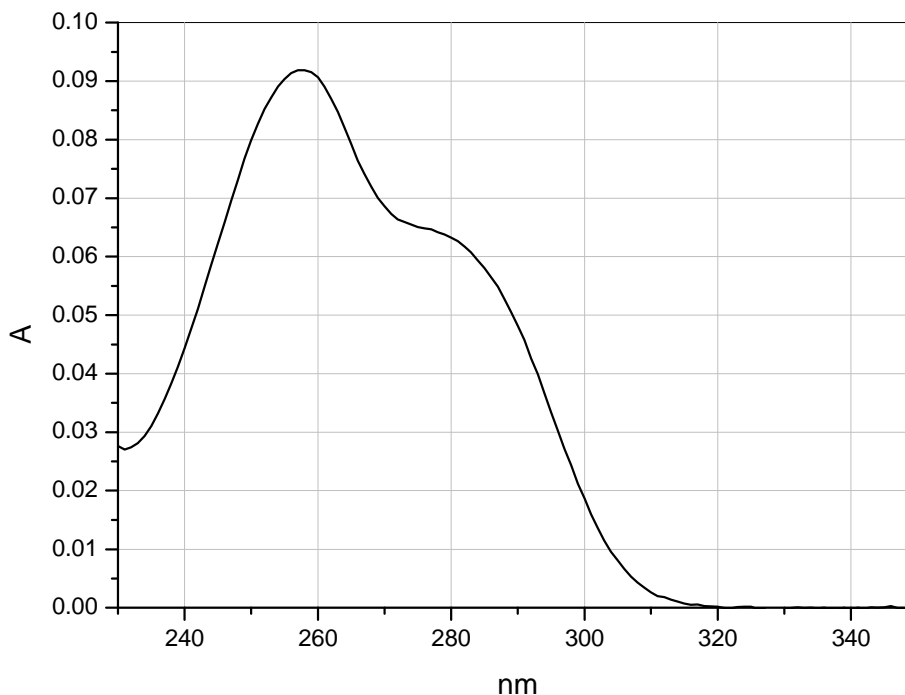
$$\Delta E = h\nu = \frac{hc}{\lambda}$$

gdzie h jest stałą Plancka, a c – prędkością światła.

Całkowita energia cząsteczki jest sumą energii jej wiązań, czyli energii elektronowej, energii oscylacyjnej i energii rotacyjnej. Wielkość tych energii maleje w kolejności: $E_e > E_{osc} > E_{rot}$. Energia pochłaniana w obszarze nadfioletu i widzialnym wywołuje zmiany energii elektronowej cząsteczki w wyniku przejść elektronów walencyjnych ze stanu podstawowego do wzbudzonego. Przejścia te następują z orbitalu molekularnego niewiążącego n lub wiążącego π na orbital o wyższej energii, przeważnie antywiązący orbital σ^* lub π^* . Odpowiednie przejścia elektronowe oznacza się jako $n \rightarrow \sigma^*$, $\pi \rightarrow \pi^*$.

Energia absorbowana przez cząsteczki jest skwantowana, zatem widmo absorpcji wywołane pojedynczym przejściem elektronowym powinno się składać z pojedynczej linii. W praktyce linii takiej nie otrzymuje się, ponieważ absorpcja elektronów nakłada się na podpoziomy oscylacyjne i rotacyjne. Widma prostych cząsteczek w stanie gazowym składają się z wąskich

pasem absorpcyjnych, reprezentujących przejścia z określonej kombinacji poziomów oscylacyjnych i rotacyjnych w stanie podstawowym do odpowiedniej kombinacji w stanie wzbudzonym. W cząsteczkach bardziej złożonych duża liczba poziomów oscylacyjnych i małe przerwy energetyczne pomiędzy nimi powodują, że wąskie pasma pochodzące od pojedynczych przejść zlewają się dając szerokie pasma absorpcyjne, jak na rysunku poniżej.



Widmo absorpcyjne 7-metyloguanozyny w wodzie

Wielkością mierzoną w metodzie spektrofotometrycznej jest absorbanca (A) proporcjonalna do liczby cząsteczek absorbujących promieniowanie, wyrażona za pomocą iloczynu grubości warstwy roztworu (l) oraz jego stężenia (c). Zależność pomiędzy promieniowaniem padającym na próbkę, promieniowaniem przechodzącym przez próbkę oraz stężeniem roztworu i grubością warstwy, określa prawo Lamberta-Beera:

$$A = \log \frac{I_0}{I} = \epsilon \cdot c \cdot l$$

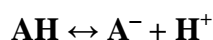
gdzie I_0 jest natężeniem promieniowania padającego na próbkę, I - natężeniem promieniowania po przejściu przez próbkę, c - stężeniem molowym badanego związku, l - grubością warstwy roztworu, ϵ - molowym współczynnikiem absorpcji.

Pasmo absorpcyjne charakteryzuje się podając położenie jego maximum (λ_{\max}) oraz intensywność (wartość absorbancji lub molowego współczynnika absorpcji ϵ_{\max}).

Prawo Lamberta-Beera jest podstawą ilościowych oznaczeń wykonywanych metodą spektroskopii absorpcyjnej w nadfiolecie i zakresie widzialnym. Grubość warstwy jest w pomiarach stała (wynosi zazwyczaj 10 mm) a molowy współczynnik absorpcji jest wielkością charakterystyczną dla danej substancji (dla wielu substancji wartość ϵ można znaleźć w odpowiednich tablicach). Jeśli układ spełnia prawo Lamberta-Beera, to wykres zależności $A = f(c)$ jest linią prostą. W praktyce analitycznej wystarczy, aby roztwór spełniał tę zależność dla stężeń odpowiadających wartościom absorbancji nie większym niż 1. Odchylenia od prawa Lamberta-Beera są wynikiem reakcji chemicznych zachodzących w badanych roztworach o różnych stężeniach (np. dysocjacja kompleksów w miarę rozcieńczania roztworów) lub też efektem nieodpowiednio ustawionych parametrów pomiarowych (niedostateczna monochromatyzacja promieniowania, nieodpowiednia szerokość wiązki spektralnej).

1.7. Wyznaczanie stałej dysocjacji metodą spektrofotometryczną

Dla reakcji dysocjacji kwasowej



stała równowagi ma postać

$$K_a = \frac{[H^+][A^-]}{[HA]}$$

stąd

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

Wyrażając stężenia formy całkowicie zdysocjowanej A^- oraz całkowicie uprotonowanej HA przy pomocy absorbancji, otrzymuje się po przekształceniach wzór pozwalający wyznaczyć stałą dysocjacji na podstawie wartości absorbancji roztworów w różnych pH:

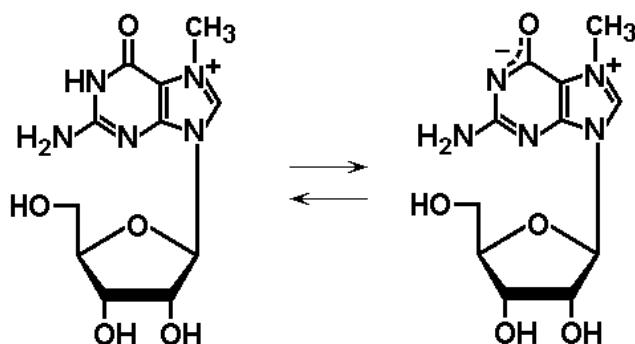
$$pK_a = pH - \log \frac{A_{Jon} - A}{A - A_{HA}}$$

gdzie A_{Jon} oznacza wartość absorbancji formy całkowicie zdysocjowanej, A_{HA} – absorbancję formy niezdisocjowanej, A – absorbancję mieszaniny obu form w danym pH. Pomiar trzech wartości absorbancji wykonuje się dla wybranej długości fali, przy której obserwuje się znaczące różnice absorbancji.

2. Cel ćwiczenia

Ćwiczenie umożliwia zapoznanie się z metodą spektrofotometryczną wyznaczania stałej równowagi. W analizowanym przykładzie jest to stała dysocjacji 7-metyloguanozyny. Równowagi kwasowo-zasadowe cząsteczek biologicznych mają duże znaczenie w oddziaływaniach typu białko-ligand oraz w przebiegu reakcji enzymatycznych. Wyznaczanie

stałych równowagi dysocjacji cząsteczek biologicznych pozwala na określenie warunków, w których występują określone formy jonowe. Przykładem jest przedstawiona poniżej na schemacie równowaga pomiędzy formami jonowymi 7-metyloguanozyny, decydująca o specyficznym oddziaływaniu z białkami.



Formy jonowe 7-metyloguanozyny

3. Zagadnienia do przygotowania

- pojęcie szybkości reakcji i stałej równowagi
- czynniki wpływające na stałą równowagi
- równowagi kwasowo-zasadowe zasad purynowych (adenina, guanina, ksantyna)
- elektronowe widmo absorpcyjne, rodzaje przejść elektronowych
- prawo Lamberta-Beera
- spektrofotometryczna metoda wyznaczania stałej dysocjacji

4. Materiały

- roztwór wodny 7-metyloguanozyny
- fosforanowe roztwory buforowe o pH w zakresie 6,8 - 7,6 o stężeniu 0,1 mol/dm³
- roztwór wodny HCl o stężeniu 0,01 mol/dm³
- roztwór wodny NaOH o stężeniu 0,01 mol/dm³

5. Aparatura i sprzęt

- spektrofotometr absorpcyjny
- kuwety absorpcyjne, kwarcowe
- probówki (15 ml)
- zestaw pipet automatycznych
- zestaw końcówek do pipet
- rękawiczki ochronne

6. Wykonanie ćwiczenia

- w probówkach o pojemności 15 ml przygotować po 5 ml roztworów $m^7\text{Guo}$ w buforach fosforanowych oraz w roztworze HCl (pH ~2) i NaOH (pH ~10 i pH ~12), poprzez rozcieńczenie roztworu podstawowego (stężenie $m^7\text{Guo}$ musi takie same we wszystkich badanych spektrofotometrycznie roztworach)
- uruchomić spektrofotometr zgodnie z instrukcją osoby prowadzącej, wybrać funkcję pomiaru widma, ustawić parametry pomiarowe
- sprawdzić stabilność 7-metyloguanozyny w roztworach alkalicznych rejestrując widmo absorpcyjne 5-krotnie w odstępach 3-minutowych
- zarejestrować widma absorpcyjne pozostałych roztworów $m^7\text{Guo}$
- dla 2 wybranych długości fali odczytać wartość absorbancji wszystkich pasm absorpcyjnych
- pomiary wykonać dla 2 różnych temperatur

7. Opracowanie wyników

- odczytane wartości absorbancji zebrać w tabeli
- dla każdej z 2 długości fali policzyć wartości pK_a
- wykonać analizę niepewności pomiarowych
- otrzymaną wartość porównać z wartością literaturową
- przedyskutować zależność stałej równowagi od temperatury

8. Literatura

- L. Jones, P. Atkins, „Chemia ogólna”, PWN 2009
- P. Atkins, „Chemia fizyczna”, PWN 2008



KAPITAŁ LUDZKI
NARODOWA STRATEGIA SPÓJNOŚCI



UNIA EUROPEJSKA
EUROPEJSKI
FUNDUSZ SPOŁECZNY



Projekt Fizyka wobec wyzwań XXI wieku współfinansowany ze środków Unii Europejskiej w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego