

氨基酸质子化反应的滴定量热测定*

刘士军 汪存信 吴绪亨 屈松生
(武汉大学化学系, 武汉 430072)

摘要 在 298.2K 和 $0.1\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ (KNO_3) 离子强度的实验条件下, 用常规滴定量热法测定了八种氨基酸羧基质子化反应的平衡常数和反应焓变; 用扩展的滴定量热法测定了这些氨基酸氨基质子化反应的平衡常数和反应焓变; 并讨论了各热力学性质之间的关系.

关键词: 滴定量热法, 氨基酸, 质子化反应

氨基酸是蛋白质的基本组成单元, 它在水溶液中的质子化反应的热力学性质, 对生命科学的研究具有重要的意义. 氨基酸是两性物质, 其羧基和氨基均能发生质子化反应, 已有人对氨基酸的质子化反应的平衡常数作过研究^[1], 但大多采用 pH 电位法或其它非热化学方法, 为得到更准确、更直接的热力学信息, 最好采用直接量热的方法^[2]. 滴定量热法在测量化学反应焓变 ΔH 的同时, 还可测定反应的平衡常数, 进而获得反应的 ΔG 和 ΔS ^[3]. 有人曾用滴定量热法测定了某些氨基酸羧基质子化反应的热力学性质^[4], 但尚未见用此法测定氨基质子化反应热力学性质的报道. 常规量热滴定法仅适用于 ΔH 不为零且反应平衡常数 $\log K$ 在 0 ~ 4 之间的反应, 而氨基酸的氨基质子化平衡常数 $\log K$ 在 9 ~ 10 左右, 常规的量热滴定法已不适用, 而须用扩展的滴定量热法进行测定^[5], 即用一个合适的已知反应来偶合被研究的滴定反应. 为了获得完整的氨基酸质子化的热力学性质并进一步进行氨基酸与金属离子配合反应的研究, 本文采用常规滴定量热法测定了氨基酸羧基质子化的热力学性质, 采用扩展的滴定量热法, 以质子化的咪唑为滴定剂, 测定了氨基酸的氨基质子化的热力学性质.

1 原理和计算方法

图 1 是量热滴定曲线, 被研究系统在 x 点开始反应, 于 y 点滴定结束, 反应前期和后期的温度变化率分别为 S_i 和 S_f . 因滴定热量计的测温元件为热容很小的热敏电阻, 故可不考虑热滞的影响, 于是滴定过程中任一点 p 所对应的化学反应热效应 $Q_{c,p}$ 可表示为:

$$Q_{c,p} = Q_p - Q_{T,p} - Q_{D,p}$$

式中的 Q_p 为表观热效应, 若系统与环境间的热交换服从牛顿冷却定律, 参考文献^[6,7]所用的方法, Q_p 可由下式计算:

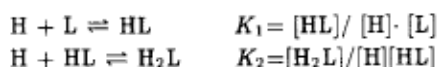
$$Q_p = U_p \times [(E_p - E_x) \cdot (1 + 0.5k \cdot t) - S_i \cdot t]$$

1994-05-05 收到初稿, 1994-10-31 收到修改稿. 联系人: 汪存信. * 国家自然科学基金资助项目

E_p 、 E_x 是在 p 点和 x 点记录仪的毫伏数； k 为热损常数： $k = (S_f - S_i) / (E_x - E_y)$ ； t 为从 x 点滴定至 p 点的时间间隔； U_p 为 p 点的能当量。 $Q_{T,p}$ ：由于滴定液与被滴定液的起始温度不同所引起的混合热效应。本实验恒温时间较长，实验证明，本实验中此项热效应很小，可以忽略不计。 $Q_{D,p}$ ：稀释热。由于被滴定液体积变化不大，故这部分稀释热可以忽略不计，只考虑滴定液的稀释热， $Q_{D,p}$ 可由滴定液加入空白溶剂中另行测出。

1.1 氨基酸羧基质子化反应的数据处理方法

以 HL 表示等电点的氨基酸，则滴定过程中的反应有 (略去电荷)：



但羧基质子化反应的实验条件是用强酸对等电点附近的氨基酸进行滴定，在等电点时，氨基酸以 L 形式存在的量很少，可以忽略不计，因此，可以认为系统中只存在羧基质子化反应。为求反应的 ΔH 和 ΔG ，可就反应平衡常数 K_2 设一假定值，结合滴定过程中的 pH 值及实验初始条件，求出热谱曲线上各点的 H_2L 的生成量 Δn_{H_2L} ，因为系统中实际上只有一种反应，故有

$$Q_{c,p} = \Delta H_2 \cdot \Delta n_{H_2L,p}$$

由上式可以求出反应的焓变 ΔH_2 。选定滴定曲线上不同的点，每一点均可求出相应的 ΔH_2 值，但因为测量误差及各种因素的影响，由各点求出的 ΔH_2 的值不可能完全相同，将由各点求得的 ΔH_2 值取平均，再按下式求误差的平方和

$$U(K_2 \cdot \Delta H_2) = \sum_{p=1}^m (Q_{c,p} - \Delta \bar{H}_2 \cdot \Delta n_{H_2L,p})^2$$

不断改变设定的 K_2 值，重复上述手续，可得出相应的 U 值，直至所得 U 值最小，与其相对应的一组 ΔH_2 、 K_2 即为最佳值，也就是所研究反应的焓变和平衡常数。

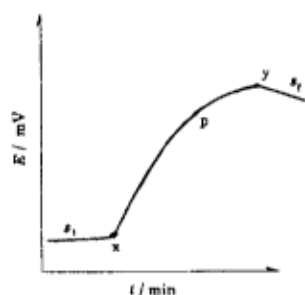


图 1 量热滴定曲线

Fig.1 The curve of enthalpy titration

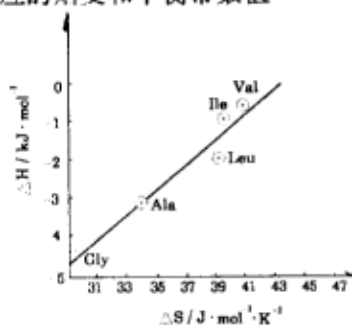
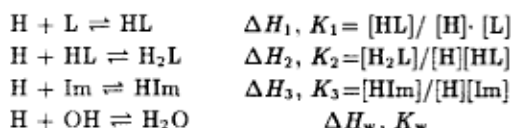


图 2 ΔH 与 ΔS 的直线关系

Fig.2 The liner relationship between ΔH and ΔS

1.2 氨基酸氨基质子化反应的数据处理方法

因氨基质子化反应的平衡常数很大，故不能采用直接滴定的方法，而须采用扩展的滴定量热法。本实验采用咪唑为滴定剂，即用质子化的咪唑作为酸去滴定被碱中和的氨基酸，在滴定过程中，系统内并存四个反应：



在具体实验条件下, 系统的 pH 值约为 10, 故有 $[\text{H}_2\text{L}]/[\text{HL}] = K_2 \cdot [\text{H}] \approx 10^{-7}$, 因而 H_2L 的生成量极少, 可忽略不计, 故系统中实际存在的只有三个反应. 整个滴定过程可视为质子化的咪唑 (HIm) 离解出 H 和 Im , 离解出的 H 的去向有两个: 与 L 结合生成 HL 以及与 OH 结合生成 H_2O . 上述 4 个反应中, 第 3、4 两个反应的焓变和平衡常数均为已知值, 因而需拟合的数值是氨基质子化反应的 ΔH_1 和 K_1 . 与前面所用的方法相类似, 可先假定 K_1 的值, 从咪唑、氨基酸的总浓度和溶液的 pH 值, 求出热谱曲线上各点的 Δn_{HL} 、 Δn_{Im} 和 $\Delta n_{\text{H}_2\text{O}}$. 于是有

$$Q_{C-p} = \Delta H_1 \cdot \Delta n_{\text{HL}} - \Delta H_3 \cdot \Delta n_{\text{Im}} + \Delta H_w \cdot \Delta n_{\text{H}_2\text{O}}$$

由文献^[5,8]查得: $\Delta H_3 = -36.736 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$; $\log K_3 = 6.99$; $\Delta H_w = -55.84 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$. 由各点求得的 ΔH_1 值求平均, 将结果代入下式求误差的平方和:

$$U(K_1 \cdot \Delta H_1) = \sum_{p=1}^m [Q_{C-p} - \overline{\Delta H_1} \Delta n_{\text{HL-p}} + \Delta H_3 \cdot \Delta n_{\text{Im-p}} - \Delta H_w \cdot \Delta n_{\text{H}_2\text{O-p}}]^2$$

不断改变 K_1 值, 直至 U 值最小, 所获得的最佳 ΔH_1 和 K_1 值, 即为所求反应的焓变和平衡常数.

对每种滴定反应均重复三次, 每次取 8 个数据点, 用自编程序在微型计算机上完成计算, 再由求得的反应的 K 和 ΔH 值, 计算出反应的 ΔG 和 ΔS .

2 实验和结果

仪器 自行研制的滴定热量计^[9], 控温精度为 $\pm 0.001 \text{ K}$, 测温精度 $\pm 5 \times 10^{-5} \text{ K}$, 用 5000 型 $6\frac{1}{2}$ 位数字电压表记录测温电桥的输出电压 (mV). 在进行本实验前, 用 THAM 对热量计进行了化学标定, 测得在 298.15 K 下, THAM 与 $0.1000 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ HCl}$ 的反应热为 $-47567 \pm 76 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1}$, 与文献值吻合, 证明仪器准确可靠.

试剂 氨基酸 (生化试剂、进口分装), 直接取用; HNO_3 (G·R); KOH (A·R) 按常规配成标准溶液备用; 咪唑 (A·R), 在苯中重结晶两次; KNO_3 (A·R), 用以维持离子强度, 所有溶液皆用二次蒸馏水配制.

实验步骤 以 $0.01547 \text{ mL} \cdot \text{s}^{-1}$ 的速率连续加样, 滴定总量 3.8 mL 左右, 每 $15 \sim 30$ 秒记录一次系统的温度 (测温电桥输出的电压信号). 对于羧基质子化反应, 用标准 HNO_3 溶剂为滴定剂, 等电点的氨基酸为被滴定液, 氨基酸溶液的量为 100.0 mL ; 测定氨基质子化反应时, 以用等摩尔量的 HNO_3 质子化的咪唑为滴定液, 以用 KOH 中和 ($\omega(\text{KOH}) = 0.99$) 后的氨基酸 (100 mL) 为被滴定液. 所有溶液均用 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ 的 KNO_3 维持离子强度, 反应温度为 298.15 K , 量热滴定前, 恒温数小时, 使反应系统与环境达到热平衡. 在 298.15 K 温度下单独测定滴定过程的 pH 值.

因为滴定量热过程中, 系统的总量随着滴定液的加入而不断增加, 故量热体系的能当量 U_p 也随之发生变化, 且呈线性关系^[6]. 另由实验证明, 由于溶液浓度很稀, 用溶剂的能当量代替溶液的能当量不会引起可察觉的误差. 本文中能当量经验公式为

$$U_p = 5.127 + 6.50 \times 10^{-4}t$$

U_p 是系统在 p 点的能当量, 单位 $J \cdot mV^{-1}$, t 为加样至 p 点的时间, 单位为秒.

8 种氨基酸的两级质子化反应量热测定的结果及得到的热力学函数值见表 1 和表 2. 本文所研究的大都是不带极性侧链的憎水性 α 氨基酸, 测定的结果与文献值^[1,4] 相符.

表 1 氨基酸羧基质子化反应的热力学函数

Table 1 Thermodynamic functions of carboxyl group's protonation reactions of amino acids ($T=298.15K$)

	$\log K_2$	$-\Delta H/kJ \cdot mol^{-1}$	$-\Delta G/kJ \cdot mol^{-1}$	$\Delta S/J \cdot mol^{-1} K^{-1}$
glycine	2.33+0.01	4.59+0.03	13.29	29.2
alanine	2.31+0.01	3.05+0.02	13.28	34.0
leucine	2.39+0.01	1.95+0.03	13.64	39.2
isoleucine	2.25+0.03	0.97+0.01	12.84	39.8
valine	2.27+0.05	0.77+0.04	12.95	40.9
phenylalanine	2.10+0.01	2.36+0.04	11.98	32.3
methionine	2.18+0.01	3.12+0.02	12.44	31.3
tryptophan	2.23+0.02	3.17+0.05	12.72	32.1

表 2 氨基酸氨基质子化反应的热力学函数

Table 2 Thermodynamic functions of amino group's protonation reactions of amino acids ($T=298.15K$)

	$\log K_1$	$-\Delta H/kJ \cdot mol^{-1}$	$-\Delta G/kJ \cdot mol^{-1}$	$\Delta S/J \cdot mol^{-1} K^{-1}$
glycine	9.72+0.01	44.18+0.22	55.46	37.9
alanine	9.87+0.01	44.31+0.16	56.32	40.3
leucine	9.73+0.01	44.83+0.04	55.52	35.9
isoleucine	9.70+0.01	46.59+0.07	55.35	29.4
valine	9.64+0.01	44.56+0.05	55.00	35.0
phenylalanine	9.25+0.01	42.27+0.07	52.78	35.3
methionine	9.21+0.01	43.60+0.02	52.55	30.0
tryptophan	9.46+0.01	45.11+0.01	53.98	29.8

3 讨论

从表 1 可看出, 各氨基酸羧基质子化反应的吉布斯自由能 ΔG 值的差别不大, 但反应的焓变和熵变有一定的差别. 对脂肪族氨基酸, 其羧基质子化反应热 ($-\Delta H_2$) 遵循下列顺序: 甘氨酸 $>$ L-丙氨酸 $>$ L-亮氨酸 $>$ L-异亮氨酸 $>$ L-缬氨酸, 而反应的熵变 ΔS_2 的顺序则正好相反. 这个序列与氨基酸侧链基团的空间位阻逐步增大的顺序相同, 故可以认为, 对脂肪族氨基酸, 其羧基质子化的 ΔH 和 ΔS 的差异主要来自 α 碳原子上侧链的空间位阻效应.

从表 1 和表 2 的数据可以看出, 氨基酸两级质子化反应的 ΔS 均为正值, 且大小相近, 而 ΔH 值相差很大, 其中氨基质子化反应的 ΔH 值很大, 羧基质子化的 ΔH 值相对要小得多, 故可以认为对于氨基酸的氨基质子化反应, 反应焓起主要推动作用, 对于羧基质子化反应, 反应的熵变起主要推动作用.

脂肪族氨基酸的羧基质子化反应的 ΔH_2 和 ΔS_2 的关系如图 2 所示, 两者基本呈线性关系. 这说明脂肪族氨基酸的羧基具有一定的水化能力^[10]. 这与文献^[2] 的观点一致. 因而, 脂肪族氨基酸的羧基去水化作用是其质子化过程中的一个重要因素.

参 考 文 献

- 1 Martail A E. Smith R M. Critical Stability Constants. Vol.1, New York: Plenum Press, 1982
- 2 Rodante F. *Thermochimica Acta*, 1989, 149:57
- 3 Cali R. Maccarrone G. Purrello R. *Thermochimica Acta*, 1989, 155:353
- 4 张保林, 王文清, 李 忠等. 高等学校化学学报, 1991, 12:1522
- 5 Christensen J J, Wrathall D P, Izatt R M. *Anal. Chem.*, 1968, 40:175
- 6 Eatouch D J, Christensen J J, Izatt R M, *Thermochimica Acta*, 1972, 3:219
- 7 黄锡荣, 蒋本呆, 尹敬执等. 化学学报, 1991, 49:359
- 8 Grenthe I, Ots H, Ginstrup O. *Acta Chem. Scand.*, 1970, 24:1067
- 9 黄应军, 汪存信, 宋昭华等. 武汉大学学报, 1994, 6: 76
- 10 张亚飞, 牛春古, 倪嘉纘等. 化学学报, 1992, 50:135

The Determination of the Thermodynamic Functions of Protonation Reactions of Eight Kinds of Amino Acids by Titration Calorimetry

Liu Shijun Wang Cunxin Wu Xuheng Qu Songsheng
(Department of Chemistry, Wuhan University, Wuhan 430072, China)

Abstract The protonation reaction of eight kinds of amino acids — glycine, L-alanine, L-leucine, L-isoleucine, L-valine, L-phenylalanine, L-methionine, and L-tryptophan — at 298.15K and ionic strength $I=0.1$ ($0.1 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3} \text{ KNO}_3$), have been studied by titration calorimetry. The thermodynamic functions of the protonation of these reactions were determined. The protonation of carboxyl group was studied by using nitric acid as titrant, and the protonation of amino group was studied by using imidazolium ion as titrant. The results are in good agreement with literature values.

Keywords: Titration calorimetry, Amino acid, Protonation reaction