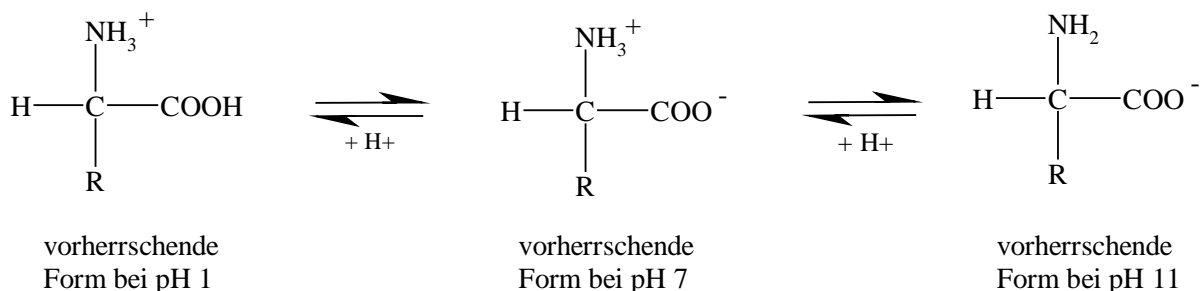


Bestimmung der Glycinkonzentration durch Formoltitration nach Sørensen

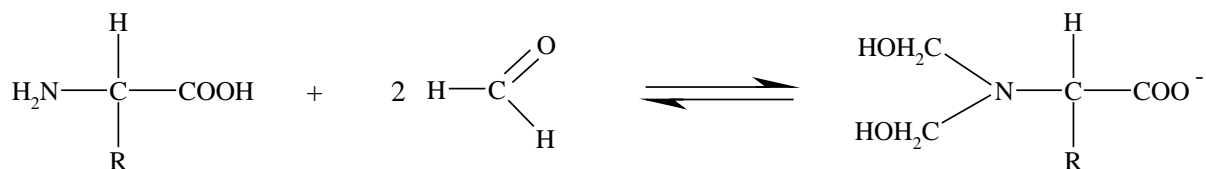
1. Einführung in die Problemstellung

Aminosäuren besitzen zwei ionisierbare Gruppen, die α -Carboxyl- und α -Aminogruppe. Die Carboxylgruppe kann als saure Gruppe H^+ -Ionen abdissoziieren und die Aminogruppe als basische Gruppe H^+ -Ionen aufnehmen. In Lösung liegen Aminosäuren bei neutralem pH-Wert als Zwitter- Ionen und nicht als ungeladene Moleküle vor, d. h. die Aminogruppe ist protoniert ($-NH_3^+$) und die Carboxylgruppe deprotoniert ($-COO^-$). Der Dissoziationsgrad ändert sich mit dem pH-Wert der Lösung. In saurer Lösung (z.B. pH 1) liegt die Carboxylgruppe nichtionisiert ($-COOH$) und die Aminogruppe ionisiert vor ($-NH_3^+$). In alkalischer Lösung (z.B. pH 11) ist die Carboxylgruppe ionisiert (COO^-) und die Aminogruppe nichtionisiert ($-NH_2$).



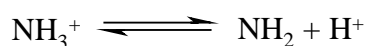
Für die α -Carboxylgruppe liegt der pK-Wert bei den einzelnen Aminosäuren zwischen 1.8 und 2.5, für die α -Aminogruppe zwischen 9.0 und 9.8. Durch Zusatz von Base oder Säure können beide Gruppen titriert werden. Die Titration der Carboxylgruppe oder der Aminogruppe kann zur quantitativen Bestimmung von Aminosäuren herangezogen werden.

Allerdings bereitet die quantitative Bestimmung einige Schwierigkeiten, da sich schwache Säuren oder Basen in wässriger Lösung nur dann quantitativ titrieren lassen, wenn sie durch eine vorgelagerte chemische Reaktion in stärkere Protolyte überführt werden. Anderenfalls ist der pH-Wert nach dem Äquivalenzpunkt nicht durch den Überschuss der als Titrationsmittel verwendeten starken Base oder Säure, sondern durch das Puffervermögen des Ampholyten bestimmt. Bei der Formoltitration nach Sørensen (1908) wird das Prinzip der Umwandlung einer schwachen Säure in einen stärkeren Protolyten durch eine vorgelagerte chemische Reaktion zur Titration der α -Aminogruppe angewendet. Dabei wird die Aminosäure mit Formaldehyd (Formol, Formalin) zur Hydroxymethylverbindung umgesetzt:



Reaktion einer Aminosäure mit Formaldehyd

Durch diese vorgelagerte Reaktion wird das Gleichgewicht:



nach rechts verschoben. Die resultierende Bruttogleichgewichtskonstante entspricht der einer mittelstarken Säure. Auf diese Weise kann die schwache Säure NH_3^+ alkalimetrisch gegen Phe-

nolphthalein als Indikator titriert werden. Im Fall der Aminosäure Glycin verschiebt sich die Gleichgewichtskonstante für die Dissoziation der α -Aminogruppe von $pK = 9.6$ auf $pK = 7.0$ (Abb. 1).

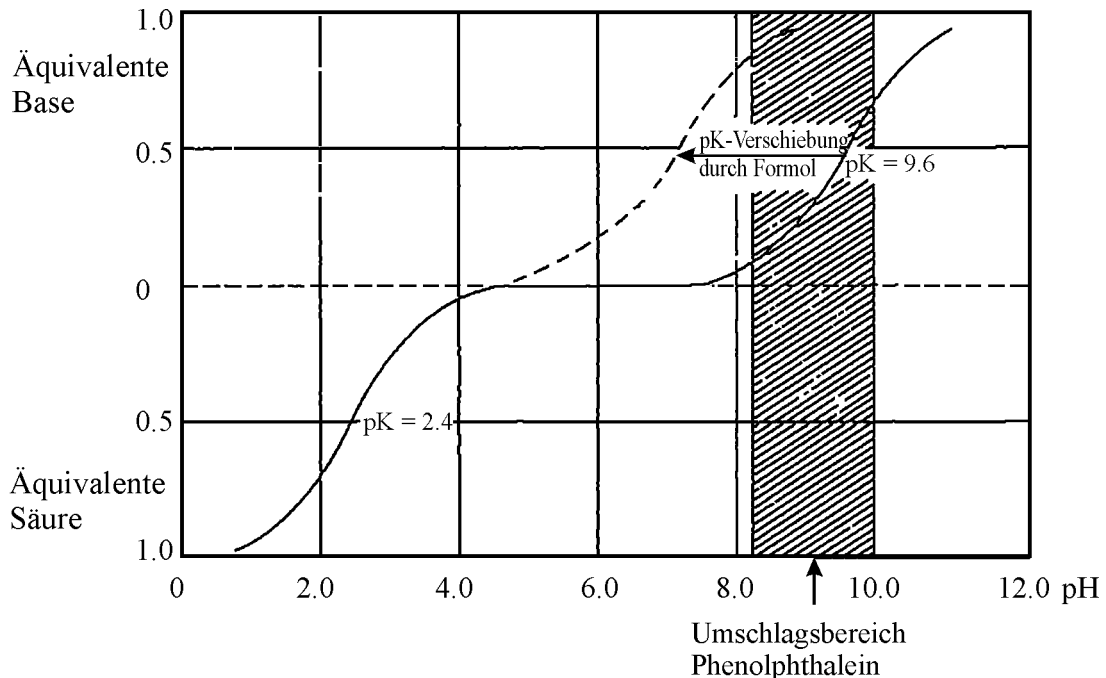


Abb. 1. pK -Wert Verschiebung im Glycin durch Reaktion der α -Aminogruppe mit Formaldehyd

2. Aufgabenstellung und Versuchsdurchführung

In einer ausgehändigten Probe ist die Masse an Glycin mit der Methode der Formoltitration zu bestimmen.

Dabei ist zunächst der Normalitätsfaktor der zu verwendenden NaOH-Lösung (ca. 0.1 N) durch Titration mit einer Glycinlösung bekannter Konzentration zu ermitteln. Nach der Titration der Glycinprobe unbekannter Masse ist außerdem eine Vergleichsprobe zu titrieren, bei der die Formaldehydlösung durch Wasser ersetzt wird.

Reagenzien:

Lösung A: 10 ml Glycin-Maßlösung werden mit Hilfe einer Vollpipette in einen Titrierkolben überführt und mit 10 ml dest. Wasser sowie 4-5 Tropfen Indikator versetzt. (Es sind Dreifachbestimmungen anzusetzen.)

Lösung B: 100 ml Formalin werden mit 4-5 Tropfen Indikator versetzt. Darauf wird tropfenweise 0.1 N NaOH-Lösung bis zur gerade erkennbaren Rosafärbung zuge-
setzt.

Die Lösungen A und B sind vor der eigentlichen Titration herzustellen. Anschließend ist wie folgt weiterzufahren:

- 10 ml Lösung B werden zu der in den Titrierkolben pipettierten Lösung A zugegeben.

- Nach 15 min wird die Glycinlösung mit der NaOH-Lösung bis zur gerade erkennbaren Rosa-färbung titriert. Der Farbumschlag des Phenolphthaleins von farblos nach rosa zeigt den Titrationsendpunkt an. Aus dem Verbrauch an NaOH-Lösung ist deren Normalitätsfaktor zu berechnen. (Aus den drei parallelen Ansätzen ist der Mittelwert zu bilden.)
- Die in einem Wägegglas ausgehändigte Glycin-Probe unbekannter Einwaage wird quantitativ in einen 100 ml Maßkolben überführt und mit destilliertem Wasser auf 100 ml aufgefüllt. Diese Lösung wird, wie oben für die Glycin-Maßlösung beschrieben, weiter behandelt.
- Jeweils 10 ml der Glycinprobe unbekannter Konzentration werden mit 10 ml Lösung B versetzt. Nach 15 min erfolgt die Titration mit der NaOH-Lösung, deren genaue Konzentration zuvor ermittelt wurde. Aus dem Verbrauch an NaOH-Lösung ist die Glycineinwaage der Probe zu berechnen. Die Bestimmung ist für drei parallele Ansätze vorzunehmen. Das erhaltene Ergebnis ist einer Fehlerbetrachtung zu unterziehen.
- In einer Vergleichsbestimmung ist das Glycin in einer wäßrigen Lösung ohne vorherige Umsetzung mit Formaldehyd zu titrieren. Für diesen Versuch sind die 10 ml Lösung B durch ein entsprechendes Volumen an destilliertem Wasser zu ersetzen. Die Bestimmung ist als Einfachbestimmung durchzuführen. Das Ergebnis ist zu diskutieren.

3. Aufgaben zur Selbstkontrolle

1. Was versteht man unter dem isoelektrischen Punkt? Welche Eigenschaften zeigt eine Aminosäure am isoelektrischen Punkt?
2. Erklären Sie die Pufferwirkung von Aminosäuren bzw. Proteinen. Wo hat diese maximale und minimale Werte? Begründen Sie Ihre Aussage.
3. Welche Konfiguration besitzen natürliche Aminosäuren? Wie können entgegengesetzt konfigurierte Aminosäuren im Stoffwechsel abgebaut werden?
4. Erklären Sie den Begriff "essentielle" Aminosäuren und nennen Sie Beispiele für solche Aminosäuren.
5. Geben Sie die Strukturformel von je zwei sauren, basischen, aromatischen und neutralen Aminosäuren an. Wie würden sich diese bei der Formoltitration verhalten? Wo liegen die isoelektrischen Punkte dieser Aminosäuren?
6. Durch welche Farbreaktionen können Aminosäuren nachgewiesen werden?

4. Literaturhinweise

Kleber, H. P., Schlee, D., Schöpp, W. (1997) *"Biochemisches Praktikum"*, V. Auflage, S. 118-124, Gustav Fischer Verlag.

Rapoport, S. M., Raderecht, H. J. (1989) *"Physikalisch-chemisches Praktikum"*, VIII. Auflage, S. 205-207, Verlag Volk und Gesundheit.

Stryer, L. (1990) *Lehrbuch der Biochemie*, Kap. 2 - Struktur und Funktion der Proteine, Spektrum der Wissenschaft Verlagsgesellschaft mbH, Heidelberg.