

也谈多电离基团氨基酸的等电点计算

化学系 李国栋

文[1]对多电离基团氨基酸的等电点计算公式作了推导。但是,由于文中不恰当地采用了三个电离常数的乘积:

$$K_1 K_2 K_3 = \frac{[A][H^+]}{[AH^+]} \cdot \frac{[A^-][H^+]}{[A]} \cdot \frac{[A^{2-}][H^+]}{[A^-]} = \frac{[A^{2-}][H^+]^3}{[AH^+]}$$

然后,又用 $K_3 = \frac{[A^{2-}][H^+]}{[A^-]}$ 这个恒等式代入上式,从而消去 K_3 , 得到 $PI =$

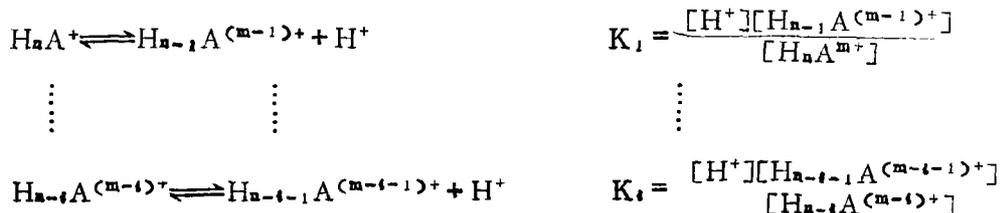
$\frac{1}{2}(pk_1 + pk_2)$, 因而得出“多电离基团氨基酸的PI值与另一个K值无关”这样一个不够准确的结论。实际上,用 $PI = \frac{1}{2}(pk_m + pk_{m+1})$, (m 为氨基酸分子含有的碱性基数)来计算多电离基团氨基酸的等电点只能得到近似的结果,其近似的程度要由各级电离常数的相对大小决定。本文拟对氨基酸等电点计算公式的导出过程和适用范围加以讨论。

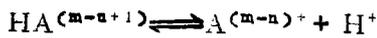
一、由等电点时分别向正负电极移动的阴阳离子数相等原理导出公式

氨基酸的等电点是指溶液中的氨基酸在电场作用下既不向阳极也不向阴极移动时的pH值。但上述只是从宏观上说的,而实际上,在等电点时的溶液中,偶极离子、阴离子、阳离子共存,处于化学平衡状态。在电场作用下,阴、阳离子总要分别向正极或负极移动。只不过分别向两极迁移的阴阳离子数相等,宏观上没有明显的浓度变化,因此整个溶液体系是处于动态平衡。

当电场强度相等时,带电质点所受的电场力与其所带的电量成正比,带等量电荷的离子受到的电场力相等,二价离子受到的电场力为一价离子的两倍。由于带不同量净电荷的同种氨基酸的各型体离子的质量数仅相差一两个原子单位,所以离子的加速度似乎应近似地与所带的电荷成正比。但是,离子带的电荷越多,水化层就越大,离子运动的阻力也就越大。

综合两种因素,可以假定离子移动速度与其所带的净电荷成正比*(注:下文将得到证实)。设有一氨基酸 $H_n A^{m+}$, 在水溶液中存在一系列的平衡[3]:





$$K_n = \frac{[\text{H}^+][\text{A}^{(m-n)+}]}{[\text{HA}^{(m-n+1)-}]}$$

其中 m 为能结合质子的碱性基团数, 包括氨基、胍基等, $(n-m)$ 为能电离出质子的酸性基团数, 包括羧基、羟基等。

$$\text{定义: } \alpha_i = \frac{[\text{H}_{n-i}\text{A}^{(m-i)+}]}{C_T} \quad [3]$$

$$C_T = \sum_{i=0}^n [\text{H}_{n-i}\text{A}^{(m-i)+}]$$

将各级平衡关系代入得到

$$[\text{H}_{n-i}\text{A}^{(m-i)+}] = \alpha_i C_T \quad (1)$$

$$\alpha_i = \frac{[\text{H}^+]^{(n-i)} \prod_{j=1}^i K_j}{\sum_{j=0}^n [\text{H}^+]^{(n+j)} \prod_{j=1}^j K_j} \quad (2)$$

因为等电点时分别向两极迁移的氨基酸的阴阳离子数相等, 由此可导出氨基酸的等点计算公式:

1. $n=2, m=1$, 一酸基一碱基氨基酸

由于溶液中只有一价离子, 所以应有 $[\text{H}_2\text{A}^+]_i = [\text{A}^-]_i$

I 表示体系处于等电点。用 (1), (2) 式代入上式

$$\frac{[\text{H}^+]_i^2 C_T}{[\text{H}^+]_i^2 + K_1[\text{H}^+]_i + K_1 K_2} = \frac{K_1 K_2 C_T}{[\text{H}^+]_i^2 + K_1[\text{H}^+]_i + K_1 K_2}$$

$$[\text{H}^+]_i^2 = K_1 K_2 \quad (3)$$

$$\therefore \text{pI} = \frac{1}{2}(\text{p}K_1 + \text{p}K_2)$$

2. $n=3, m=1$, 两酸基一碱基氨基酸

由于二价阴离子的迁移速度是一价阴离子的迁移速度的两倍, 为使迁移到两极的阴阳离子总数相等, 应有 $[\text{H}_3\text{A}^+]_i = [\text{HA}^-]_i + 2[\text{A}^{2-}]_i$

将 (1), (2) 式代入上式整理得:

$$[\text{H}^+]_i^3 = K_1 K_2 [\text{H}^+]_i + 2K_1 K_2 K_3$$

$$[\text{H}^+]_i^3 = K_1 K_2 ([\text{H}^+]_i + 2K_3) \quad (4)$$

若等电点时有 $[\text{H}^+]_i \gg K_3$

$$\text{即: } [\text{H}^+]_1 + 2K_3 \approx [\text{H}^+]_1 \quad (5)$$

$$(4) \text{ 式成为 } [\text{H}^+]_1^2 \approx K_1 K_2$$

$$\therefore \text{pI} \approx \frac{1}{2}(\text{pK}_1 + \text{pK}_2)$$

3. $n = 3, m = 2$, 两碱基一酸基氨基酸
与前类似, 应有:

$$\begin{aligned} 2[\text{H}_3\text{A}^{2+}]_1 + [\text{H}_2\text{A}^+]_1 &= [\text{A}^-]_1 \\ 2[\text{H}^+]_1^3 + K_1[\text{H}^+]_1^2 &= K_1 K_2 K_3 \end{aligned} \quad (6)$$

若等电点时有 $[\text{H}^+]_1 \ll K_1$

$$\text{即 } 2[\text{H}^+]_1 + K_1 \approx K_1 \quad (7)$$

则(6)式成为 $[\text{H}^+]_1^2 \approx K_2 K_3$

$$\text{pI} \approx \frac{1}{2}(\text{pK}_2 + \text{pK}_3)$$

对 n, m 值更大的氨基酸, 可类似上法处理。若各级电离常数相差足够大, 则一般可得到

$$\text{pI} \approx \frac{1}{2}(\text{pK}_m + \text{pK}_{m+1}) \quad (8)$$

二、由等电点时氨基酸的溶解度最小导出计算公式

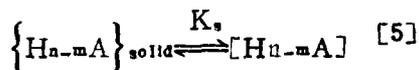
氨基酸等电点时溶解度最小是等电点的一个重要性质。基于这一性质, 也可导出等电点的计算公式。

令 $i = m$, 则(1), (2)两式分别成为

$$[\text{H}_{n-m}\text{A}] = \alpha_m C_T \quad (9)$$

$$\alpha_m = \frac{[\text{H}^+]^{n-m} \prod_{i=1}^m K_i}{\sum_{j=0}^n [\text{H}^+]^{n-j} \prod_{i=1}^j K_i} \quad (10)$$

讨论溶解度时, 溶液处于饱和状态, 并与未溶的固体保持沉淀---溶解平衡。即,



$$[\text{H}_{n-m}\text{A}] = K_s \cdot \{\text{H}_{n-m}\text{A}\}_{\text{solid}}$$

由于纯固体的活度规定等于1, 所以

$$[\text{H}_{n-m}\text{A}] = K_s \quad (11)$$

$$C_T = C_m / \alpha_m = K_s / \alpha_m$$

要求溶解度最小时的pH值, 只要求 $\frac{dC_T}{d[H^+]} = 0$ 时的pH值即可。[4], 将(9)、(10)、(11)式代入, 即可导出等电点计算公式。

$$1. n=2, m=1, \alpha_m = \alpha_1 = \frac{K_1[H^+]}{[H^+]^2 + K_1[H^+] + K_1K_2}$$

$$\left(\frac{dC_T}{d[H^+]}\right)_{pH=pI} = K_s \cdot \frac{K_1[H^+]_i(2[H^+]_i + K_1) - K_1([H^+]_i^3 + K_1[H^+]_i + K_1K_2)}{(K_1[H^+]_i)^2} = 0$$

整理后得 $[H^+]_i^2 = K_1K_2$ 与(3)式相同

$$\therefore pI = \frac{1}{2}(pK_1 + pK_2)$$

$$2. n=3, m=1, \alpha_m = \alpha_1 = \frac{K_1[H^+]^2}{[H^+]^3 + K_1[H^+]^2 + K_1K_2[H^+] + K_1K_2K_3}$$

$$\left(\frac{dC_T}{d[H^+]}\right)_{pH=pI} = 0 \quad \text{即} \quad K_s \cdot \frac{[H^+]_i^3 - K_1K_2[H^+]_i - 2K_1K_2K_3}{(K_1[H^+]_i^2)^2} = 0$$

$[H^+]_i^3 = K_1K_2[H^+]_i + 2K_1K_2K_3$, 与(4)式相同。

若(5)式成立, 则有

$$pI \approx \frac{1}{2}(pK_1 + pK_2)$$

$$3. n=3, m=2 \quad \alpha_m = \alpha_2 = \frac{K_1K_2[H^+]}{[H^+]^3 + K_1[H^+]^2 + K_1K_2[H^+] + K_1K_2K_3}$$

$$\text{类似地得到} \quad K_s \cdot \frac{2[H^+]_i^3 + K_1[H^+]_i^2 - K_1K_2K_3}{(K_1K_2[H^+]_i)^2} = 0$$

$2[H^+]_i^3 + K_1[H^+]_i^2 = K_1K_2K_3$, 与(6)式相同

若(7)式成立, 则有

$$pI \approx \frac{1}{2}(pK_2 + pK_3)$$

对于其它的n、m值, 可类推得到(8)式。

$$pI \approx \frac{1}{2}(pK_m + pK_{m+1})$$

三、使用近似公式(8)进行计算的条件

多电离基团氨基酸等电点能否用式(8)进行计算, 取决于氨基酸各级电离常数的相对大小和对计算结果的准确度的要求。

在现有的实验和技术条件下,人们测定氨基酸的离解常数,相对误差一般大于百分之一。所以,只要计算结果的相对误差不大于百分之一,就可以用(8)式进行计算。

对 $n = 3, m = 2$ 的氨基酸,为得到简单结果,可近似采用 $2[\text{H}^+]_1 + K_1 \approx K_1$, 事实上只要满足

$$\left| \frac{K_1 - (2[\text{H}^+]_1 + K_1)}{2[\text{H}^+]_1 + K_1} \right| < 1\%$$

就可使用(7)式,也就是可用(8)式来计算等电点。用 $[\text{H}^+]_1 \approx \sqrt{K_2 K_3}$ 代入得到

$$K_1 > 200\sqrt{K_2 K_3} \quad (12)$$

同样,对 $n = 3, m = 1$ 的氨基酸,只要满足

$$\left| \frac{[\text{H}^+]_1 - ([\text{H}^+]_1 + 2K_2)}{[\text{H}^+]_1 + 2K_2} \right| < 1\%$$

也就是 $[\text{H}^+]_1 > 200K_2$, 即 $\sqrt{K_1 K_2} > 200K_3$

$$(13)$$

就可用(8)式计算等电点。

对于具体的氨基酸,这些条件能否满足呢?我们看两个例子:

1. 谷氨酸, $\text{p}K_1 = 2.19$ $\text{p}K_2 = 4.25$ $\text{p}K_3 = 9.67$. [2]

$$\frac{\sqrt{K_1 K_2}}{K_3} = 10^{6.47} \gg 200$$

满足条件(13)式。

2. 赖氨酸, $\text{p}K_1 = 2.18$ 、 $\text{p}K_2 = 8.95$ 、 $\text{p}K_3 = 10.53$. [2]

$$\frac{K_1}{\sqrt{K_2 K_3}} = 10^{7.86} \gg 200$$

满足条件(12)式。

通过计算可知,常见氨基酸都能满足条件式(12)或(13)。这就是生物化学教科书中

采用 $\text{pI} = \frac{1}{2} (\text{p}K_m + \text{p}K_{m+1})$ 来计算氨基酸等电点的理由。但是,对于更复杂的氨基酸或肽,例如一个含三个碱基的分子,其三个碱基的电离常数又很接近,这时如果仍用 $\text{pI} = \frac{1}{2} (\text{p}K_m + \text{p}K_{m+1})$ 来计算其等电点,就会产生大于1%的误差。在这种情况下,则应采用较复杂但更精确的计算公式。

参 考 文 献

- [1] 陈建林、孙栋材,《化学通报》,1982, 4.52页。
- [2] 沈同等编,《生物化学》,人民教育出版社 1980年.81页
- [3] 武汉大学等编,《分析化学》第二版,高等教育出版社(1982年)161页
- [4] Werner Stumm and James J. Margan. Aquatic Chemistry. Wiley-Interscience. A Division of John Wiley & Sons, Inc. (1970) p.173
- [5] L. 休哈等著,周锡顺等译。《分析化学中的溶液平衡》。人民教育出版社(1979年), 257页