Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biofyziky a fyzikální chemie

Diplomová práce

Fyzikálně chemické vlastnosti léčiv

Hradec Králové, 2016 **Miroslav Suchý**

Prohlášení:

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpal, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové dne 10. 5. 2016 *……*

Miroslav Suchý

Poděkování:

Touto cestou bych rád poděkoval svému vedoucímu, panu Ing. Vladimíru Kubíčkovi, CSc., za rady a konzultace při měření a psaní této diplomové práce.

Obsah

1. Abstrakt 5
2. Abstract 7
3. Úvod 9
4. Teoretická část 10
   4.1. Co je to disociační konstanta? 10
   4.2. Význam pro léčivo 11
   4.3. Metody stanovení 13
      4.3.1. Potenciometrická titrace 13
      4.3.2. Spektrofotometrie 15
5. Experimentální část 18
   5.1. Pufry 19
   5.2. Použitý materiál při měření 19
   5.3. Titrační činidla 20
   5.4. Postup 20
      5.4.1. Potenciometrické měření 20
      5.4.2. Spektrofotometrické měření 21
6. Přehled výsledků a diskuze 23
   6.1. 6-chlor-2-karboxypyrazin 23
      6.1.1. Potenciometrie 23
      6.1.2. Zhodnocení výsledků 25
   6.2. 5-(2-hydroxybenzoyl)-2-karboxypyrazin 26
      6.2.1. Spektrofotometrie 26
      6.2.2. Zhodnocení výsledků 27
   6.3. Aminopyrazin 28
      6.3.1. Potenciometrie 28
      6.3.2. Spektrofotometrie 30
      6.3.3. Zhodnocení výsledků 32
   6.4. 3-amino-2-karboxypyrazin 33
      6.4.1. Potenciometrie I. 33
      6.4.2. Potenciometrie II. 35
      6.4.3. Spektrofotometrie 37
      6.4.4. Zhodnocení výsledků 39
   6.5. Karboxypyrazin 40
      6.5.1. Potenciometrie 40
      6.5.2. Spektrofotometrie 42
      6.5.3. Zhodnocení výsledků 44
   6.6. 2-aminobenzimidazol 44
      6.6.1. Potenciometrie 44
      6.6.2. Spektrofotometrie 46
      6.6.3. Zhodnocení výsledků 48
   6.7. Shrnutí výsledků 48
7. Závěr 51
8. Seznam použité literatury 52
9. Seznam tabulek, obrázků a grafů 54

1. Abstrakt

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biofyziky a fyzikální chemie

Kandidát: *Miroslav Suchý*

Vedoucí diplomové práce: *Ing. Vladimír Kubíček, CSc.*

Název diplomové práce: *Fyzikálně chemické vlastnosti léčiv*

Testovat fyzikálně chemické vlastnosti molekul je během vývoje nových léčiv zásadní. Tyto vlastnosti můžou pomoci porozumět nebo předvídat farmakokinetické vlastnosti nových léčiv při zkoušení in vivo, nebo in vitro.

Jedna z těchto fyzikálně chemických vlastností je disociační konstanta (pK). Její hodnota udává „číslo na stupnici pH, kde je právě 50% sloučeniny v ionizovaném stavu“. V reálním případě můžeme podle tohoto čísla určit, kde se bude léčivo v gastrointestinálním traktu vstřebávat. V gastrointestinálním traktu se vstřebávají pouze léčiva s disociační konstantou od 3 do 11. Mimo tuto škálu se léčiva nevstřebávají.

V této práci představuji experimentální možnosti měření disociační konstanty. Zabýval jsem se dvěma metodami měření ve vodě rozpustných sloučenin. První metoda byla spektrofotometrie a druhá potenciometrická titrace. Zjistil jsem, že potenciometrická titrace je základní metoda, která dává dobré a přesné výsledky. Spektrofotometrická metoda byla na základě mých měření vyhodnocena až jako sekundární metoda, protože při srovnávání výsledků s potenciometrickou titrací dala kvalitní výsledek jen pro sloučeninu 2-aminobenzimidazol. U pyrazinových sloučenin s různými funkčními skupinami se spektrofotometrická metoda neosvědčila. Potenciometrická titrace poskytla dobré výsledky.

Disociační konstanta je ovlivňována funkčními skupinami, které molekula obsahuje. Zkusil jsem porovnat látky s různými funkčními skupinami na pyrazinovém jádře, aby se ukázalo, jak ovlivní hodnotu disociační konstanty. Vzhledem k tomu, že se jednalo o pyrazinové jádro, byla hodnota disociačních konstant (pK) u sloučenin aminopyrazin, karboxypyrazin a 3-amino-2-karboxypyrazin ovlivněna jen v rámci jednotek. Díky pyrazinovému jádru a s ním spojeným elektronovým posunem mají všechny tři látky disociační konstantu v kyselém rozmezí stupnice pH.

2. Abstract

Charles University in Prague

Faculty of Pharmacy in Hradec Kralove

Department of Biophysics and Physical Chemistry

Candidate: *Miroslav Suchy*

Supervisor: *Ing. Vladimir Kubicek, CSc.*

Title of Diploma Thesis: *Physico-Chemical properties of drugs*

To test physico-chemical properties of new molecules is necessary during drug development. It could be helpful to understand or predict the pharmacokinetic parametres of a new drug in vivo/in vitro experiments.

One of this parameters is a dissociation constant (pK). Dissociation constant is defined as „ Number on pH scale, wherein is just fifty percent of molecule in a ionization condition“. In real case this number can help us to know where in the gastro-intestinal tract (GIT) the drug will be absorbed. In GIT only molecules exhibiting pK from 3 to 11 could be absorbed. Out of this range it is not possible.

In this work I would like to introduce the ways of experimental measurement of pK values. I was working with two methods to measure the pK values of water-soluble compounds. The spectrophotometric method and the potentiometric one. I had to find out, that potentiometric titration is primary method which gets us good and accurate results. Based on my measurement I evaluated the spectrophotometric method as the secondary method. Spectrophotometric method gave us good results only for 2-aminobenzimidazole compound. The spectrophotometric method did not work with the pyrazines compounds with variety of functional groups. Potentiometric titration gave us good results.

The dissociation constant is affected by functional groups in the molecule. So I also tried to compare a variety of functional groups on pyrazine heterocyclic to show how a pK value is changed by introduction of various functional groups. Whereas it was the pyrazine nucleus was the pK values of compounds aminopyrazine, carboxypyrazine and

3-amino-2-carboxypyrazine affected in small range. All of these three compounds have the pK value in the acidic range of pH scale. This is due to the electron shift to the pyrazine ring.

3. Úvod

Každá látka má své fyzikálně-chemické vlastnosti, které prozrazují informace o jejím chování. Umět tyto parametry změřit nebo vypočítat má význam pro predikci vlastností a chování látek. Fyzikálně-chemických vlastností je celá řada. Od teploty tání, přes optickou otáčivost, index lomu, molekulovou hmotnost až po hustotu. Fyzikálně-chemické vlastnosti dokáží prozradit něco o molekule, ale také s jejich pomocí můžeme neznámou molekulu kvalifikovat.

Já jsem si vybral disociační konstantu, která mi přijde nejzajímavější z pohledu dalšího využití. Není to jen číslo na stupnici pH, které může sloužit ke kvalitativnímu určení látky, ale i informace, která nám o látce z pohledu distribuce v organismu něco prozrazuje.

Jako cíl své diplomové práce jsem si stanovil zkusit změřit disociační konstantu u různých látek dvěma metodami - UV-VIS spektrofotometrií a potenciometrickou titrací. Snažil jsem se zjistit, jestli se data naměřená různými metodami významně odlišují, nebo jsou stejná a metody jsou tudíž rovnocenné. V neposlední řadě bylo mým cílem podívat se, co a jak disociační konstantu určité molekuly ovlivňuje. Mnoho vzorků léčiv, které na katedru biofyziky a fyzikální chemie přicházejí, je z katedry farmaceutické chemie a kontroly léčiv, kde se zabývají jejich syntézou. Proto jsem se zabýval deriváty pyrazinu, které jsou používány k léčbě tuberkulózy. Zkoumal jsem a hodnotil, jak se liší disociační konstanta derivátů pyrazinu s různými funkčními skupinami.

4. Teoretická část

V následující části práce si povíme něco o disociační konstantě. Objasníme, co to disociační konstanta je, k čemu slouží a jak se vypočítá nebo experimentálně změří.

4.1. Co je to disociační konstanta?

Disociační konstanta je důležitý fyzikálně chemický parametr pro charakteristiku molekuly. Udává hodnotu na stupnici pH, při kterém je právě 50% sloučeniny v ionizovaném stavu.[1] To o molekule prozrazuje mnohé z jejích vlastností. Je to také hodnota, která říká, jak snadno je možné odštěpit vodíkový kation, označuje se poté pK_A. Jestliže molekula odštěpuje hydroxylový anion, je poté zkratka pK_B. Vztah mezi hodnotou pK_A a pK_B je následující:[2]

$$pK_A + pK_B = 14$$

Čím je hodnota disociační konstanty větší (hodnota K_A nebo K_B), tím jsou větší koncentrace iontů oproti neionizovaným molekulám, a tím je kyselina nebo zásada silnější.[2]

Disociační konstanta vychází z rovnovážné konstanty disociační reakce pro slabou kyselinu:[2]

$$HA <-> H^+ + A^-$$

Kde levá strana rovnice představuje formu neionizovanou a pravá strana rovnice ionizovanou formu sloučeniny. Reakce má dynamický charakter, takže změna pH prostředí ovlivní její rovnováhu směrem doleva nebo doprava. Hodnota disociační konstanty prozradí podíl ionizované/neionizované části sloučeniny v různých prostředích s rozdílným pH.[1] Jak dále víme, slabé kyseliny nebo zásady nejsou ve vodných roztocích zcela disociovány, proto je lze z pohledu termodynamiky vyjádřit vztahem pro rovnovážnou konstantu:[2]

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

V čitateli je vyjádřená koncentrace pro disociovanou část molekuly a ve jmenovateli pro nedisociovanou (ne celkovou) část.[2]

Obdobné rovnice platí i pro slabou zásadu. Disociační rovnice má tvar:[2]

$$BOH <-> B^+ + OH^-$$

Rovnice pro rovnovážnou konstantu má poté tvar následující:[2]

$$K_B = \frac{[B^+] * [OH^-]}{[BOH]}$$

Disociační konstanta je významný parametr u léčivých látek, proto jsem zkoumal látky, které jsou potencionální léčiva, nebo výchozí části látek pro syntézu léčiv.

4.2. Význam pro léčivo

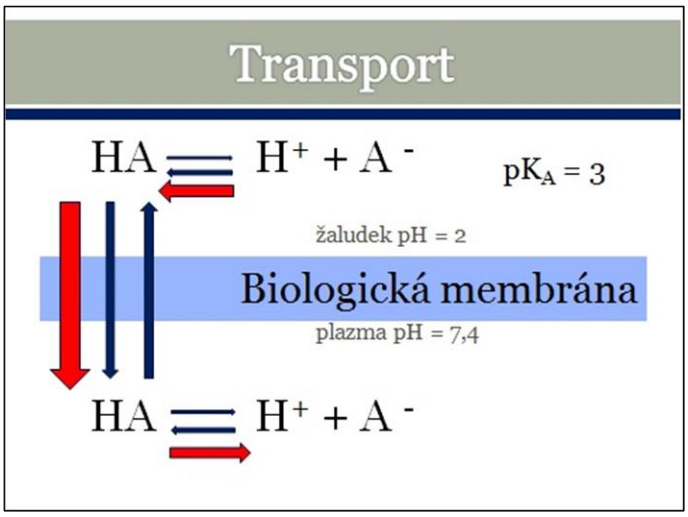
Znát hodnotu disociační konstanty u nově vyvíjeného léčiva může značně pomoci při testování absorpce léčiva. Jelikož lidské tělo není homogenní systém a má ve svých různých částech různé hodnoty pH, může hodnota disociační konstanty pomoci s predikcí, kde se může léčivo vstřebat.[1,3] Sděluje, v které části gastrointestinálního traktu se vstřebá nebo jestli traktem jen projde a nevstřebá se - tudíž nebude mít systémové účinky, ale jen lokální. To není někdy nežádoucí stav, vzhledem k například cílenému působení v tlustém střevě.[1,3] Poté je nevstřebatelnost v žaludku jev žádoucí. Je třeba zmínit, že hodnota disociační konstanty není jediný parametr určující vstřebatelnost léčiva. Záleží i na dalších vlastnostech molekuly, jako je třeba lipofilita nebo velikost.[1]

Jak již bylo řečeno, v různých částech těla jsou různé hodnoty pH a molekula musí mít určité vlastnosti pro vstřebávání a následnou distribuci v organismu. Vstřebávání neboli přechod přes membránu, se děje jen u neionizované frakce molekuly. Následná distribuce je již ve vodném prostředí, takže je dobré, když je poté molekula ve formě ionizované. Také místa pro absorpci v gastrointestinálním traktu jsou závislá na pH molekuly. Látky mírně a středně kyselé se vstřebávají v žaludku. Látky mírně zásadité se vstřebávají v tenkém střevě. Zde je to ovlivněno ionizací a rozdílným pH prostředí. Silně zásadité a silně kyselé látky se nevstřebávají. V *tabulce č. 1* je uveden příklad částí těla a jejich hodnot pH.[1,3]

Část těla	Hodnota pH
Plazma (krev)	7,4
Žaludek	1-3
Duodenum	5-6
Ileum, tlusté střevo	8
Moč	4-8
Plod	7,3

Tabulka č. 1: Hodnoty pH v různých částech těla.[3]

Na následujícím *obrázku č. 1*[4] můžeme vidět příklad léčiva s $pK_A = 3$ (například aspirin) a jeho chování při přestupu přes membránu. Jak se změní poměr ionizované a neionizované frakce molekuly v závislosti na pH prostředí, je ukázáno v *tabulce č. 2*, kde jsou hodnoty procentuálního zastoupení neionizované části molekuly.[3]



Obrázek č. 1: Přestup léčiva přes membránu – červené šipky naznačují posun dynamické rovnováhy v závislosti na pH.[3,4]

pH	Neionizovaná část molekuly
2	90 %
3	50 %
4	10 %
6	0,1 %
8	0,001 %

Tabulka č. 2: Ionizace molekuly v závislosti na pH.[3]

Na *obrázku č. 1*[4] je vidět klasický průběh vstřebávání molekuly. V kyselém prostředí žaludku je rovnováha ionizace molekuly posunuta směrem doleva, takže 90% léčiva je v neionizované formě. V této podobě projde přes membránu do krevního oběhu, kde je pH již neutrální. Vzhledem k tomu, že molekula léčiva má kyselý charakter, je v neutrálním pH skoro veškeré léčivo disociované, tudíž rozpustné ve vodní fázi a lépe distribuováno dále. Díky iontovému charakteru v neutrálním prostředí, nemůže léčivo projít přes membránu zpět do žaludku, takže je takto vstřebáváno do systémové cirkulace skoro celé. Část léčiva se při absorpci vždy ztratí, ať se jedná o reakci s jinými látkami nebo rychlejší posun v gastrointestinálním traktu. Proto po perorálním podání není biodostupnost léčiva 100%.[3]

Zjednodušeně řečeno: Hodnota disociační konstanty předpovídá, jestli a kde se léčivo vstřebá.

4.3. Metody stanovení

K určení disociační konstanty slouží mnoho metod. Vedle těch základních a často využívaných, jako je potenciometrické a spektrofotometrické stanovení, je to i stanovení konduktometricky, nukleární magnetickou rezonancí (NMR) nebo výpočtem.[5]

4.3.1. Potenciometrická titrace

Stanovení pomocí potenciometrické titrace je základní metoda.[5] Jedná se o nejrychlejší a za použití přístrojů i plně automatizovanou metodu, která je velice přesná i při malých koncentracích, okolo 10^{-4} mol/l. Takto malá koncentrace zaručuje i malou spotřebu daného vzorku, kterého stačí ve výsledku několik miligramů.[6] Vzorek se převede do roztoku a měří se změna pH po přídavcích kyseliny nebo zásady. Pro lepší představu, například k 10ml vzorku se přidává kyselina nebo zásada po 0,1ml.[5,6] Koncentrace kyseliny nebo zásady, která je využita k titraci jako titrační činidlo, je vždy o jeden řád vyšší než koncentrace vzorku. Takže používá-li se například roztok vzorku 0,001 mol/l, koncentrace kyseliny nebo zásady je 0,01 mol/l.[6]

Celé měření tedy vypadá tak, že po změření prvotního pH, se po přídavcích kyseliny nebo zásady nechá hodnota pH ustálit a hodnoty se zaznamenají. Vše probíhá nejlépe za stálého míchání. U automatizovaných přístrojů se po skončení titrace ukáže výsledný graf a hodnoty. K výslednému výpočtu disociační konstanty je potřeba znát hodnoty pH vzorku během titrace, počáteční objem i se změnou během titrace roztoku a počáteční koncentrace vzorku a kyseliny nebo zásady.[6] Na výpočet slouží řada vzorců, do kterých se postupně dosazuje. Jednotlivé výsledky se poté dosadí do vzorce, který může mít podobu:[2,6]

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

nebo se může počítat i s koncentrací kationtů vodíku v roztoku, výsledek je poté přesnější a vzorec vypadá následovně:[2,6]

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

Pro dosazení do hlavních vzorců je třeba uvést několik dílčích výpočtů, které jsou zapotřebí. Význam použitých zkratek je uveden v *tabulce č. 3*.[2,6]

$C_{HA} = \frac{A * C´HA}{X}$

$C_{OH} = \frac{B * C´OH}{X} = [A^-]$

$X = A + B$

$[HA] = C_{HA} – C_{OH}$

$[H^+] = 10^{-pH}$

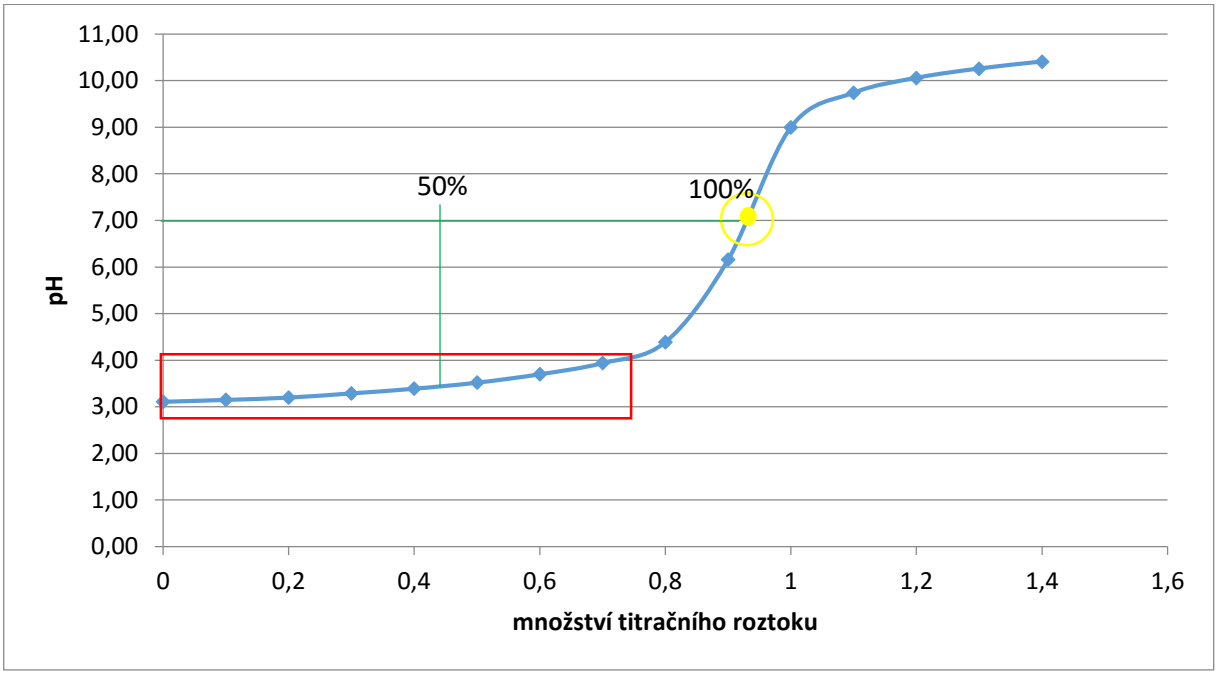
Symbol	Význam
C_{OH}	Aktuální koncentrace titračního činidla
$C´_{OH}$	Původní koncentrace titračního činidla
C_{HA}	Aktuální koncentrace látky v roztoku
$C´_{HA}$	Původní koncentrace látky v roztoku
X	Celkový objem roztoku
A	Počáteční objem roztoku
B	Přídavek titračního činidla
$[HA]$	Rozdíl koncentrací látky a titračního činidla Koncentrace neionizované frakce
$[H^+]$	Koncentrace kationtů vodíku v roztoku
$[A^-]$	Koncentrace ionizované frakce

Tabulka č. 3: Význam zkratek užitých při výpočtu z potenciometrické titrace.[2,6]

Oba vzorce pro výpočet disociační konstanty pomocí potenciometrické titrace jsou založeny na faktu, že v pH prostředí které je rovno hodnotě disociační konstanty sloučeniny, je právě 50% sloučeniny ve stavu ionizovaném a druhých 50% ve stavu neionizovaném (hodnoty $[A^-]$ a [HA] ve vzorci). Z toho vyplývá, že: dosadíme-li do vzorce dvě stejné hodnoty koncentrací, získáme poměr, který je roven jedné. Tento poměr je po zlogaritmování roven nule (log 1 = 0). Poté je pK = pH, když je sloučenina ionizovaná 50:50.[2,1]

Jestliže hodnoty zjištěného pH při titraci a množství přidávaného titračního činidla vyneseme do grafu, získáme titrační křivku, ze které můžeme vyčíst přibližné hodnoty disociační konstanty. Příklad titrační křivky je uveden na *grafu č. 1*. Hodnota disociační konstanty na titrační křivce není shodná s bodem ekvivalence, který je používán k výpočtu při stanovení koncentrací.[7] Hodnota disociační konstanty na stupnici pH je v místě, kde je právě 50% sloučeniny v ionizovaném stavu. Na grafu se tedy vyskytuje v oblasti, než se začne titrační křivka prudce zvedat.[2] Taková oblast je označena v červeném rámečku na *grafu č. 1*. Zjednodušeně se dá určit jako ½ vzdálenosti mezi začátkem titrace a bodem ekvivalence.[2] V bodě ekvivalence je totiž 100% molekuly ionizované a žádná ze sloučenin, vzorek nebo titrační činidlo, není v nadbytku.[7] Obecně lze říci, že bod ekvivalence je při acidobazickém

stanovení v okolí pH 7. Při titraci silné kyseliny silnou zásadou nebo slabé kyseliny slabou zásadou je přesně 7. Při titraci slabé zásady silnou kyselinou je pod bodem 7. Při titraci slabé kyseliny silnou zásadou je nad bodem 7.[7] Na *grafu č. 1* je tento bod označen žlutě, respektive žlutým kroužkem.



Graf č. 1: Příklad potenciometrické titrační křivky, označení bodu ekvivalence (žlutě), místa výskytu hodnoty disociační konstanty (červeně) a poloviční vzdálenost mezi začátkem titrace a bodem ekvivalence (zeleně).

4.3.2. Spektrofotometrie

Alternativní metoda k potenciometrické titraci je UV-VIS spektrofotometrie. Její největší výhodou je citlivost. Detekuje vzorky již od koncentrace 10^{-6} mol/l. Nespornou výhodou je potřeba malého množství vzorku, který je následně převeden do roztoku. Vzhledem k tak malé koncentraci roztoku se vzorek většinou bez problémů rozpustí ve vodné fázi. Rozpuštění ve vodě je lepší pro pozdější měření absorbance. Zamezí to zkreslení výsledků, které by mohlo nastat, když je látka rozpuštěna v organických rozpouštědlech.[5]

Vlastní měření se provádí při vlnových délkách ultrafialového (UV, 190 - 380 nm) a viditelného záření (VIS, 380 - 780 nm). Výsledky měření při vlnových délkách pod 190 nm jsou již ovlivněny okolními plyny, takže i vzduchem kolem kyvety, proto v tomto rozmezí nemá měření význam. Měření v infračerveném záření (IČ, >780 nm) se také neprovádí.[5,8] Pro měření je důležité použít kyvety z křemenného skla, které záření UV-VIS neabsorbují. Nepoužití

křemenných kyvet velmi zkreslí výsledky, jelikož kyvety z optického skla absorbují skoro veškeré UV záření.[9]

Vzorek je potřeba proměřit při různých hodnotách pH za použití vhodných pufrů. Někdy je potřeba druhé měření na menším intervalu pH s menšími rozdíly mezi jednotlivými hodnotami pH v okolí hodnoty, která se rovná disociační konstantě. Takový interval určíme z prvního měření. Stanovovaný roztok se vzorkem je nutno měřit proti slepému roztoku, který obsahuje jenom pufr. Tím dostaneme absorpční křivky pouze vzorku a ne pufru. Největší změna v absorbanci nastává, když se pH pufru rovná hodnotě pK. Z grafu určíme vlnovou délku, při níž se hodnoty absorbance nejvíce liší mezi jednotlivými hodnotami pH a tyto hodnoty zaznamenáme do výpočtu pomocí vzorce:[5,8]

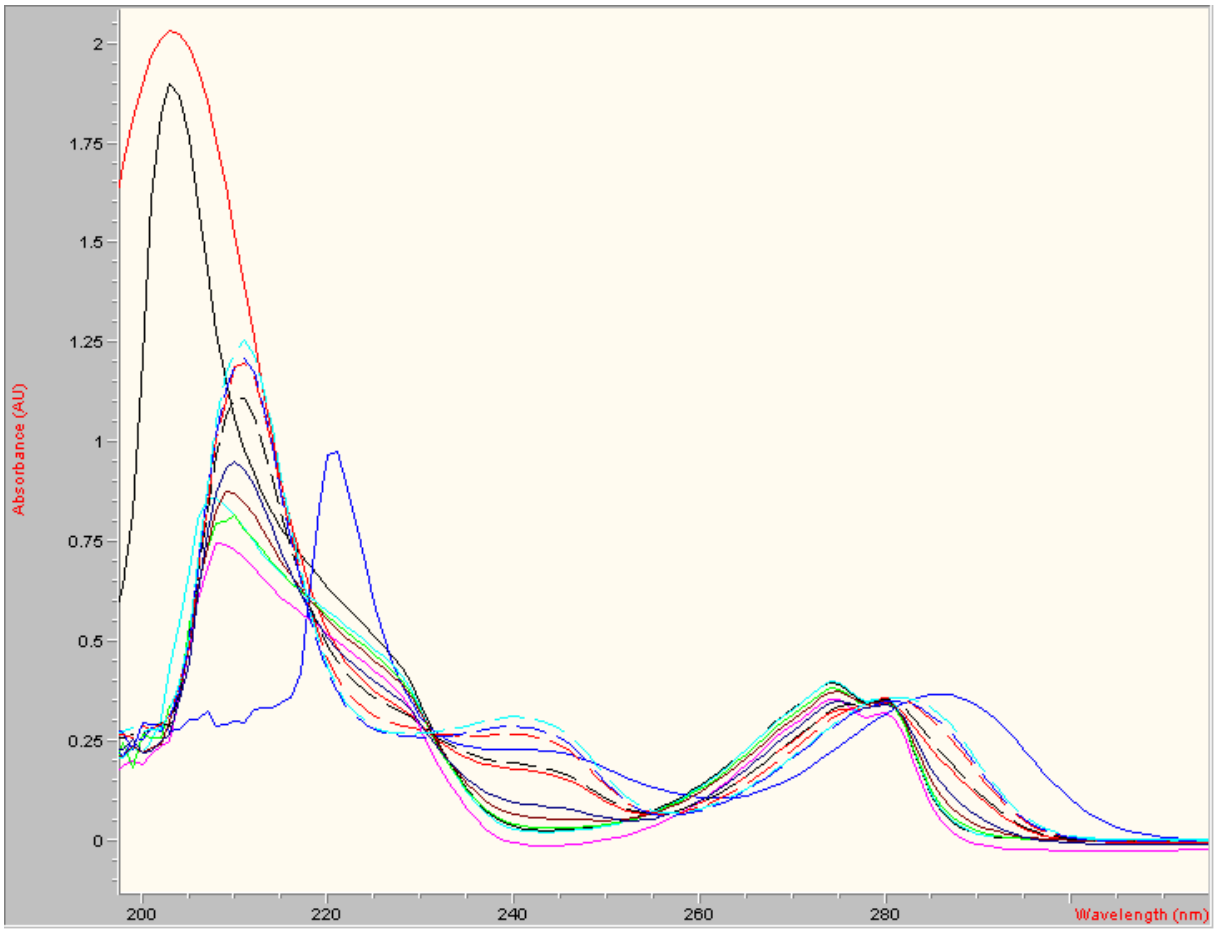
$$pK = pH + \log \frac{A_I^- - A}{A - A_{HI}}$$

Vysvětlení jednotlivých zkratek použitých ve vzorci je v *tabulce č. 4*.[8]

Symbol	Význam
pH	pH pufru
A_I-	Absorbance v zásaditém prostředí
A_{HI}	Absorbance v kyselém prostředí
A	Absorbance zkoumané látky

Tabulka č. 4: Význam zkratek užitých při výpočtu spektrofotometrickou metodou. [8]

Na modelovém příkladu (*obrázek č. 2*) si můžeme ukázat jak takové absorpční křivky, pro vzorek při různých hodnotách pH, na celé škále UV-VIS vypadají.



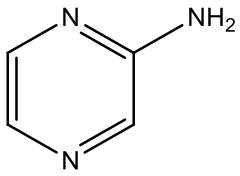
Obrázek č. 2: Absorpční křivky vzorku při různých hodnotách pH. Červeně je označena křivka pro HCl, černě pro H_2O a modře pro NaOH.

Z grafu určíme vlnovou délku, při níž se hodnoty absorbance nejvíce liší mezi jednotlivými hodnotami pH a tyto hodnoty zaznamenáme do výpočtu.[5] U modelového *obrázku č. 2* je to při vlnové délce 241nm. Podle počtu funkčních skupin, které vzorek obsahuje, může mít více disociačních konstant. Poté přistupujeme jednotlivě ke každé změně v absorbanci zvlášť a počítáme každou konstantu pK nezávisle na sobě. Místa, kde se všechny křivky protínají, se nazývají isosbestické body.[2,10] Výskyt takového místa je dán tím, že vzorek existuje v roztoku ve 2 formách (ionizovaná část a neionizovaná část).[10]

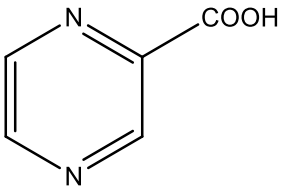
5. Experimentální část

V následující části práce se budu zabývat svým vlastním měřením. Věnoval jsem se především sloučeninám pyrazinu s různými funkčními skupinami, abych zjistil, jak skupina ovlivňuje disociační konstantu pyrazinu. Poté jsem se věnoval měření disociační konstanty několika léčiv. Dvě léčiva jsou odvozena od pyrazinu, jedno je odvozeno od benzimidazolu. Deriváty pyrazinu jsou potencionální léčiva na léčbu tuberkulózy. Deriváty benzimidazolu se používají jako antihelmintika.[11]

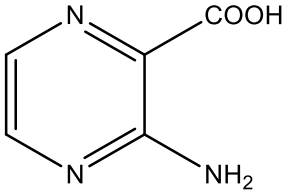
Spektrofotometrickou metodou a potenciometrickou titrací jsem zkoumal a experimentálně počítal disociační konstantu u následujících látek:



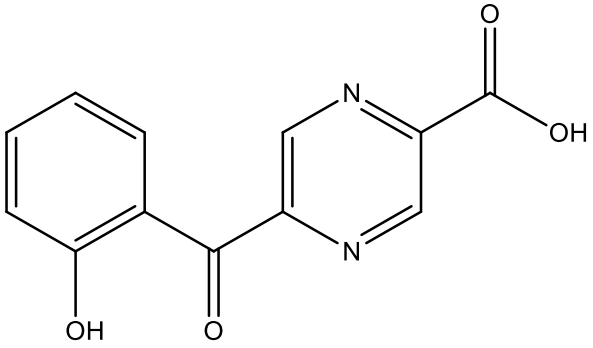
aminopyrazin
Mr = 95,10



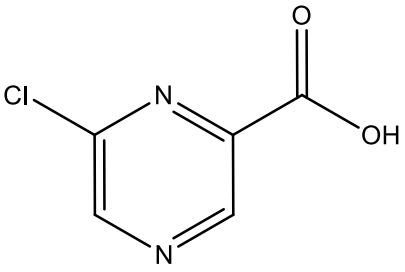
karboxypyrazin
Mr = 124,10



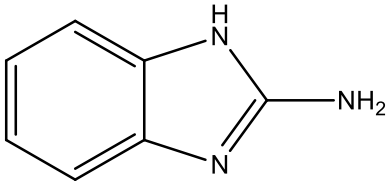
3-amino-2-karboxypyrazin
Mr = 139,11



5-(2-hydroxybenzoyl)-2-karboxypyrazin
Mr = 244,05



6-chlor-2-karboxypyrazin
Mr = 157,99



2-aminobenzimidazol
Mr = 133,06

5.1. Pufry

Roztoky, které jsou schopné udržet stabilní pH. Z chemického pohledu jde o „roztoky slabých kyselin a jejich solí se silnou zásadou nebo roztoky slabých zásad a jejich solí se silnou kyselinou“.[2] Při měření disociačních konstant byly použity dva různé pufry k vytvoření různých hodnot pH. První je Brittonův-Robinsonův univerzální pufr, se kterým se dosahuje rozmezí pH od 2 do 12. Jedná se o zásobní roztok kyseliny fosforečné, borité a octové ve vodě, jehož pH je následně upraveno určitým množstvím přidaného hydroxidu sodného. Druhý pufr, který byl použit při měření, byl citrátový, který má své rozmezí pH od 3 do 6. Chemicky jde o směs kyseliny citronové a citrátu, míchaných v různých poměrech pro určité pH. Množství kyselé a zásadité složky pro dané pH u obou pufrů jsem čerpal z odborné literatury.[12]

5.2. Použitý materiál při měření

pH metr inoLab 720 (WTW) + kalibrační TEC pufry (WTW)

Kombinovaná elektroda typ Sentix 61 (WTW)

Magnetická míchačka (Heidolph) + míchadla

Spektrofotometr Agilent HP8453 (Agilent Technologies)

PC s programem UV-Visible ChemStation Software (Agilent Technologies)

Analytické váhy (Sartorius)

MS Excel 2016

Kyvety (Agilent Technologies)

Pipety + špičky

Laboratorní sklo

Základní roztok Brittonova-Robinsonova pufru (připraven na katedře biofyziky a fyzikální chemie)

Kyselina citronová monohydrát p.a. (Penta)

Kyslina chlorovodíková p.a. (Penta)

Hydroxid sodný p.a. (Penta)

Fenolftalein p.a. (Lachema Brno)

5.3. Titrační činidla

Pro titraci jsem používal kyselinu chlorovodíkovou (0,0926 mol/l), která pro samotnou titraci byla vždy 10x zředěna na koncentraci 0,00926 mol/l. Koncentrace hydroxidu sodného byla stanovena vždy v den měření a je uvedena v každé tabulce s výpočtem. Koncentrace roztoku hydroxidu se pohybovala vždy kolem hodnoty 0,1 mol/l a následně byl roztok pro titraci zředěn 10x na koncentraci cca 0,01 mol/l. Správná koncentrace roztoku hydroxidu byla stanovována každý den titrací kyselinou chlorovodíkovou (c = 0,0926 mol/l) na indikátor fenolftalein, který je v kyselém prostředí bezbarvý a v zásaditém fialový. Změna barvy fenolftaleinu je dána změnou prostorového uspořádání molekuly při změně pH z kyselého na zásadité.[13]

5.4. Postup

Jelikož jsou jednotlivé postupy pro měření velice podobné, bude zde uveden jeden všeobecný postup a na konci v *tabulce č. 5* uvedeny navážky a přesné koncentrace roztoků vzorků.

Pro měření disociační konstanty bylo nejprve nutné si převést látku do roztoku o koncentraci 0,001 mol/l. Za využití vzorce:[14]

$$c = \frac{m}{Mr \cdot V}$$

na výpočet koncentrace jsem zjistil navážku látky pro přípravu roztoku o objemu 50 ml. Látku jsem nasypal do odměrné baňky, přidal destilovanou vodou, promíchal tak, aby se látka rozpustila a dolil destilovanou vodou po rysku. 50 ml roztoku stačí na potenciometrické i na spektrofotometrické stanovení. Záleží jen na době mezi jednotlivými stanoveními, proto jsem roztoky připravoval vždy v den měření nové, když byla delší časová prodleva.

5.4.1. Potenciometrické měření

Z odměrné baňky se odebralo 10 ml roztoku do 25 ml kádinky. Nebral jsem kádinku větší, aby při titraci byla elektroda dostatečně ponořena v roztoku, minimálně nad diafragmu elektrody. Poté nakalibrovanou elektrodou na pH metru začala samotná titrace. Po ustálení prvotního pH a zaznamenání hodnoty jsem přidával pipetou 0,1 ml NaOH (HCl) o předem přesně stanovené koncentraci. Hodnoty jsem zaznamenával až do přechodu do zásaditého

(kyselého) pH. Titraci jsem prováděl vždy 3x pro eliminaci chyb a výsledné hodnoty pH jsem zprůměroval a zanesl do tabulky s výpočtem.

V každé tabulce s výpočtem v kapitole „Přehled výsledků a diskuze“ je uvedena původní koncentrace stanovované látky v roztoku ($C´_{HA}$), původní koncentrace titračního činidla ($C´_{OH}$), počáteční množství stanovované látky (a) a změna koncentrace po přídavcích titračního činidla (C_{HA}) a velikost přídavku titračního činidla (b) a jeho koncentrace v roztoku (C_{OH}). Také koncentrace vodíkových kationtů v roztoku při daném pH ($[H^+]$) a celkový objem roztoku (X).

5.4.2. Spektrofotometrické měření

Při výpočtech založených na spektrofotometrickém stanovení je důležité, aby v každé kyvetě byla stejná koncentrace zkoumané látky. Koncentrace se nedosazuje do žádného výpočtu.[5] Při měření jsem použil koncentraci 0,0001 mol/l, která se mi nejlépe osvědčila, když jsem zkoušel měřit spektra jedné látky při různých koncentracích.

Roztok o koncentraci 0,001 mol/l se ještě 10x zředil přímo v kyvetě, tj. na koncentraci 0,0001 mol/l, tak, že se k 0,2 ml vzorku přidalo 1,8 ml pufru. Měřilo se oproti 2 ml slepého vzorku, který obsahoval pouze pufr. Škála pH je ideální co nejširší, proto jsem často volil Brittonův-Robinsonův pufr, který má rozpětí pH od 2 do 12.[12] Dále bylo potřeba změřit absorpční křivky vzorku v kyselém, neutrálním a zásaditém prostředí. To znamená, že 0,2 ml vzorku jsem doplnil 1,8 ml 0,1 mol/l kyseliny chlorovodíkové, pro další měření 1,8 ml 0,1 mol/l hydroxidu sodného a v posledním měření 1,8 ml destilované vody, měřených zase oproti 2 ml slepého vzorku. Hodnoty absorbancí z těchto absorpčních křivek byly poté použity do vzorce pro výpočet. Ideální bylo použití dvou stejných kyvet pro eliminaci chyb. Volil jsem vždy dvě stejné kyvety od jednoho výrobce, protože kyvety od různých výrobců mohou mít odlišné absorbance a tím mohou zkreslit výsledek měření. Pomocí spektrofotometru jsem poté zjistil absorpční křivky vzorku při jednotlivých hodnotách pH. Z grafu jsem určil vlnovou délku, při níž se hodnoty absorbance nejvíce liší mezi jednotlivými hodnotami pH a tyto hodnoty jsem zaznamenal do výpočtu.

U všech experimentů v kapitole „Přehled výsledků a diskuze“ byl použit Brittonův-Robinsonův pufr při stanovení spektrofotometrickou metodou. Citrátový pufr byl používán při hledání chyb a zkoušení alternativ. Bohužel se ani v jednom případě neosvědčil, ale zmínku si v této práci zaslouží.

V následující *tabulce č. 5* jsou uvedeny přesné navážky a koncentrace pro jednotlivé vzorky.

Látka	Molární hmotnost	Objem	Navážka	Koncentrace
Aminopyrazin	95,10	50 ml	0,004755	0,001 mol/l
Karboxypyrazin	124,10	50 ml	0,006205	0,001 mol/l
3-amino-2-karboxypyrazin	139,11	50 ml	0,006955	0,001 mol/l
2-aminobenzimidazol	133,15	50 ml	0,006675	0,001 mol/l
2-aminobenzimidazol	133,15	25 ml	0,001668	0,0005 mol/l
5-(2-hydroxybenzoyl)-2-karboxypyrazin	244,05	50 ml	0,012202	0,001 mol/l
6-chlor-2-karboxypyrazin	157,99	50 ml	0,007899	0,001 mol/l

Tabulka č. 5: Navážky a koncentrace připravovaných roztoků vzorků.

6. Přehled výsledků a diskuze

V této části práce se podíváme na zpracování výsledků. Výpočty budou uvedeny v tabulce a v některých případech doloženy grafickým zpracováním. V případě spektrofotometrického měření budou k dispozici i spektrální data. Pro větší přehled jsem připojil i následnou diskuzi nad výsledky do této kapitoly. Diskuze bude vždy na konci odstavce za výsledkem, bude hodnotit výsledek měření, jeho správnost a úspěšnost.

Považoval jsem za správné vynechat při výpočtech aritmetického průměru disociační konstanty takové hodnoty $pK/pK_1/pK_2$, které byly evidentně odlehlé.

Směrodatné odchylky u všech výpočtů jsou uvedeny v závorce za výsledkem. Jsou značeny řeckým písmenem sigma (σ).

6.1. 6-chlor-2-karboxypyrazin

Na této látce jsem se učil výpočet disociační konstanty z potenciometrické titrace. Proto bylo stanovení disociační konstanty provedeno pouze na základě potenciometrické titrace a ne spektrofotometrického měření.

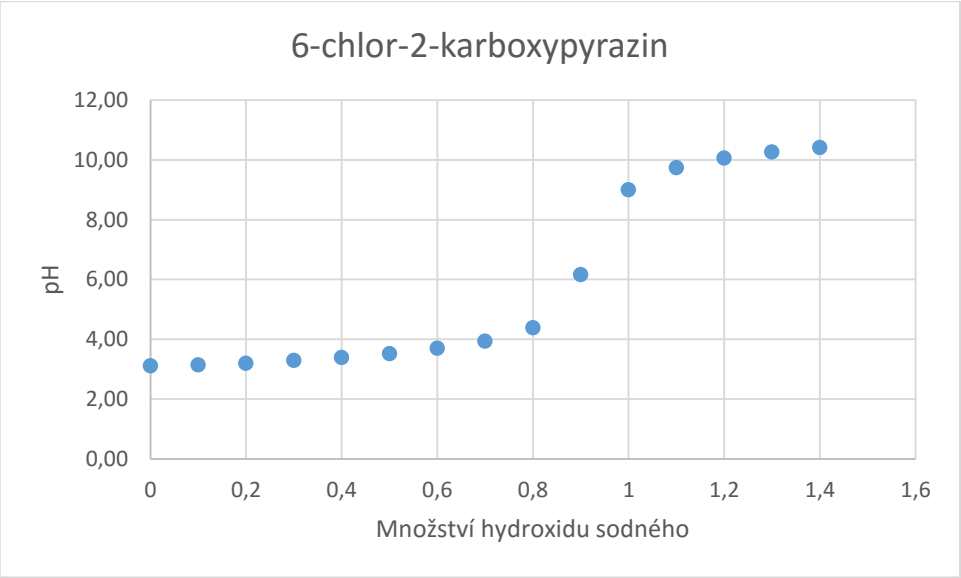
6.1.1. Potenciometrie

Výsledky potenciometrické titrace 6-chlor-2-karboxypyrazinu hydroxidem sodným jsou uvedeny v *tabulce č. 6*. Titrační křivka 6-chlor-2-karboxypyrazinu je uvedena na *grafu č. 2*.

Ještě jednou bych rád připomněl, že v každé tabulce pro výpočet disociační konstanty z potenciometrické titrace je u všech látek uvedena: původní koncentrace stanovované látky v roztoku (C'_{HA}), původní koncentrace titračního činidla (C'_{OH}), počáteční množství stanovované látky (a) a změna koncentrace po přídavcích titračního činidla (C_{HA}) a velikost přídavku titračního činidla (b) a jeho koncentrace v roztoku (C_{OH}). Také koncentrace vodíkových kationtů v roztoku při daném pH ($[H^+]$) a celkový objem roztoku (X).

Číslo měření	X	a	b	C'_{OH}	$[A^-] / C_{OH}$	C'_{HA}	C_{HA}	[HA]	$[H^+]$	pH	pK_1	pK_1	pK_2	pK_2
0	10	10	0	0,01173	0	0,00104	0,00104	0,00104	0,000776	3,11	########	#######	2,6412	2,64
1	10,1	10	0,1	0,01173	0,000116	0,00104	0,00103	0,000914	0,000708	3,15	4,045763	4,05	2,54709	2,55
2	10,2	10	0,2	0,01173	0,00023	0,00104	0,00102	0,00079	0,000631	3,20	3,735684	3,74	2,46546	2,47
3	10,3	10	0,3	0,01173	0,000342	0,00104	0,00101	0,000668	0,000513	3,29	3,581232	3,58	2,54916	2,55
4	10,4	10	0,4	0,01173	0,000451	0,00104	0,001	0,000549	0,000407	3,39	3,475126	3,48	2,60689	2,61
5	10,5	10	0,5	0,01173	0,000559	0,00104	0,00099	0,000432	0,000302	3,52	3,408309	3,41	2,69886	2,70
6	10,6	10	0,6	0,01173	0,000664	0,00104	0,000981	0,000317	0,0002	3,70	3,379148	3,38	2,83431	2,83
7	10,7	10	0,7	0,01173	0,000767	0,00104	0,000972	0,000205	0,000115	3,94	3,36585	3,37	2,94754	2,95
8	10,8	10	0,8	0,01173	0,000869	0,00104	0,000963	9,41E-05	4,07E-05	4,39	3,424506	3,42	3,15816	3,16
9	10,9	10	0,9	0,01173	0,000969	0,00104	0,000954	-1,4E-05	6,92E-07	6,16	#ČÍSLO!	#ČÍSLO!	#ČÍSLO!	#ČÍSLO!
10	11	10	1	0,01173	0,001066	0,00104	0,000945	-0,00012	1E-09	9,00	#ČÍSLO!	#ČÍSLO!	#ČÍSLO!	#ČÍSLO!
11	11,1	10	1,1	0,01173	0,001162	0,00104	0,000937	-0,00023	1,82E-10	9,74	#ČÍSLO!	#ČÍSLO!	#ČÍSLO!	#ČÍSLO!
12	11,2	10	1,2	0,01173	0,001257	0,00104	0,000929	-0,00033	8,71E-11	10,06	#ČÍSLO!	#ČÍSLO!	#ČÍSLO!	#ČÍSLO!
13	11,3	10	1,3	0,01173	0,001349	0,00104	0,00092	-0,00043	5,5E-11	10,26	#ČÍSLO!	#ČÍSLO!	#ČÍSLO!	#ČÍSLO!
14	11,4	10	1,4	0,01173	0,001441	0,00104	0,000912	-0,00053	3,89E-11	10,41	#ČÍSLO!	#ČÍSLO!	#ČÍSLO!	#ČÍSLO!

Tabulka č. 6: Výsledky potenciometrické titrace 6-chlor-2-karboxypyrazinu.



Graf č. 2: Titrační křivka 6-chlor-2-karboxypyrazinu.

Do konečného výsledku jsem vzal hodnoty pK_2, které byly se započítáním koncentrace vodíkových kationtů přesnější. Aritmetický průměr jsem vytvořil ze 7 hodnot pK_2. Jednalo se o hodnoty: 2,55; 2,47; 2,55; 2,61; 2,70; 2,83 a 2,95 z výpočtu pK_2 v *tabulce č. 6*. Vypočítal jsem, že:

$$pK_2 = 2{,}66\ (\sigma = 0{,}16)$$

Kterou jsem mohl porovnat s dříve naměřenou pK = 3,35 na katedře biofyziky a fyzikální chemie.[15]

6.1.2. Zhodnocení výsledků

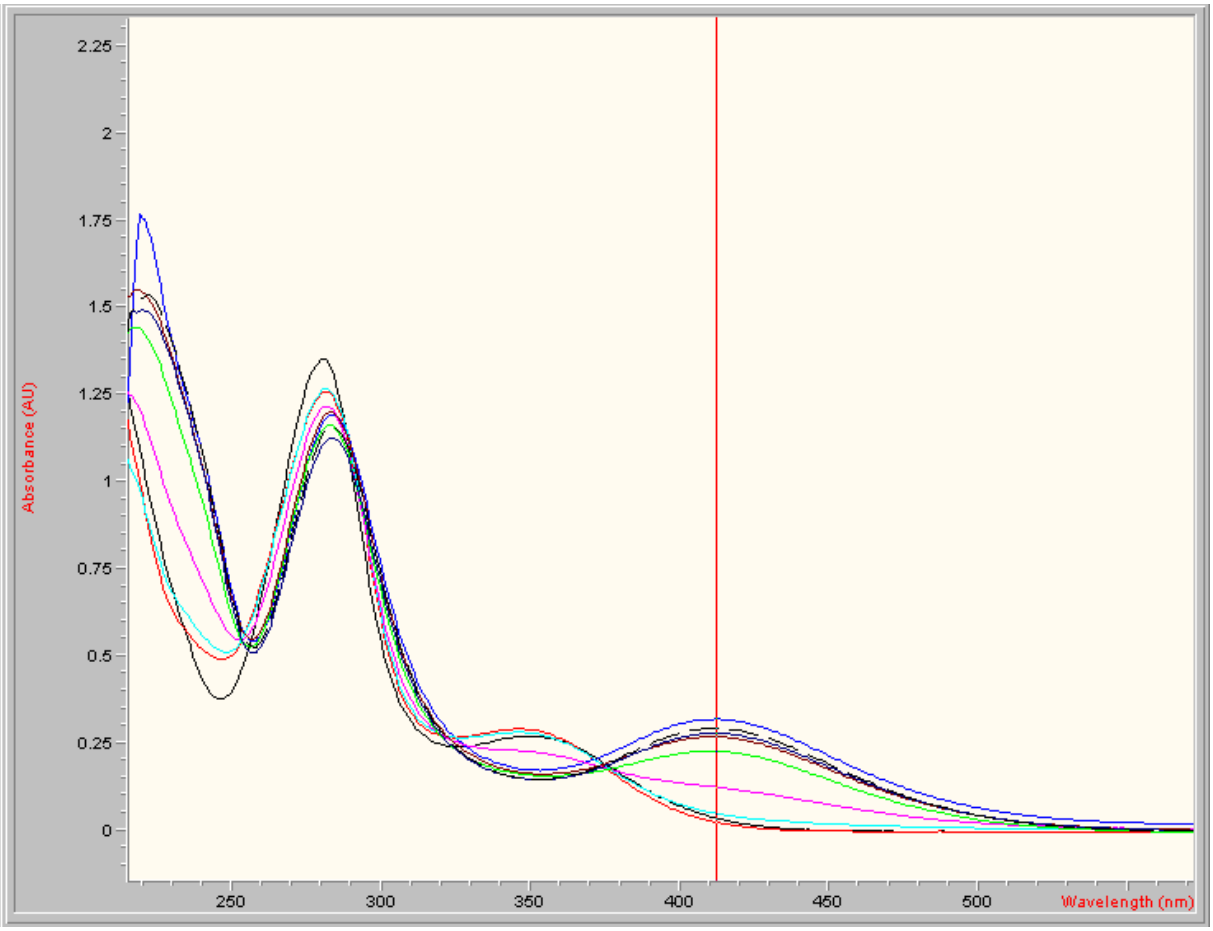
Tuto sloučeninu jsem zvolil, protože mělo jít o snadný modelový příklad, na kterém jsem se měl výpočet disociační konstanty z potenciometrické titrace naučit. Své výsledky jsem mohl porovnat s jinými, protože na katedře biofyziky a fyzikální chemie již byla jednou disociační konstanta 6-chlor-2-karboxypyrazinu změřena. Jak je vidět z výsledků i z grafu, jednalo se opravdu o modelový příklad měření a výpočtu. Když koncentrace hydroxidu sodného při titraci přesáhla koncentraci 6-chlor-2-karboxypyrazinu nešlo již vypočítat disociační konstantu. Ve výpočtové *tabulce č. 6* jsou tyto výpočty označeny textem #ČÍSLO.

6.2. 5-(2-hydroxybenzoyl)-2-karboxypyrazin

Pro spektrofotometrickou metodu jsem zvolil další sloučeninu, která byla již na katedře biofyziky a fyzikální chemie jednou změřena. Na této sloučenině 5-(2-hydroxybenzoyl)-2-karboxypyrazin jsem se učil výpočet disociační konstanty spektrofotometrickým stanovením, proto nebyla disociační konstanta experimentálně změřena potenciometrickou titrací.

6.2.1. Spektrofotometrie

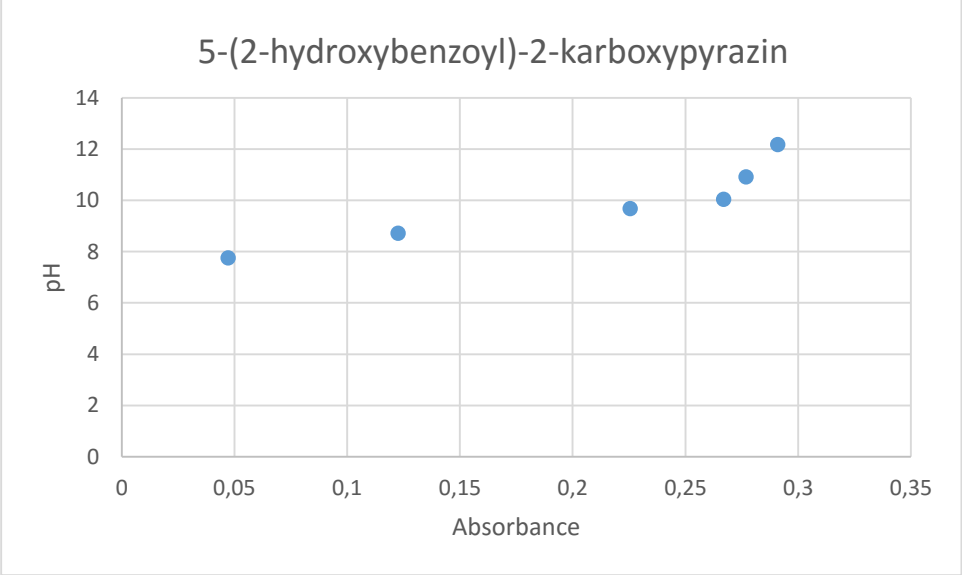
Absorpční křivky jsou na *obrázku č. 3*. Z absorpčních křivek jsem určil místo s největší změnou absorbance při různých hodnotách pH. Tato změna nastala při vlnové délce 412 nm. Hodnoty absorbancí z vlnové délky 412 nm jsem zaznamenal do výpočtové *tabulky č. 7*.
Do *grafu č. 3* jsem vynesl hodnoty absorbancí pro různé hodnoty pH a získal tak grafickou závislost absorbance na hodnotě pH.



Obrázek č. 3: Absorpční křivky 5-(2-hydroxybenzoyl)-2-karboxypyrazinu.

Číslo měření	A_{HI}	A_{I}-	A	pH	pK	pK
1	0,0337	0,318	0,047137	7,75	9,05444737	9,05
2	0,0337	0,318	0,12258	8,72	9,06216496	9,06
3	0,0337	0,318	0,22549	9,68	9,36336272	9,36
4	0,0337	0,318	0,26695	10,04	9,38017409	9,38
5	0,0337	0,318	0,27691	10,91	10,1377547	10,14
6	0,0337	0,318	0,29087	12,18	11,2032295	11,20

Tabulka č. 7: Výpočet disociační konstanty 5-(2-hydroxybenzoyl)-2-karboxypyrazinu spektrofotometrickou metodou.



Graf č. 3: Grafické znázornění výsledků 5-(2-hydroxybenzoyl)-2-karboxypyrazinu.

Po zobrazení vypočítaných hodnot jsem udělal aritmetický průměr z prvních čtyř hodnot výsledků pK (9,05; 9,06; 9,36 a 9,38) a zjistil jsem, že:

$$pK = 9,22 \ (\sigma = 0,16)$$

Tento výsledek jsem mohl porovnat s dříve naměřenou hodnotou pK = 9,14 z katedry biofyziky a fyzikální chemie.[16]

6.2.2. Zhodnocení výsledků

Pro první stanovení disociační konstanty za použití spektrofotometrického měření jsem zvolil látku, u které jsem předpokládal minimální problémy s měřením a výpočtem. Jak se ukázalo, disociační konstanta látky 5-(2-hydroxybenzoyl)-2-karboxypyrazin vyšla spektrofotometrickým stanovením opravdu dobře, bez zjevných problémů během měření. Již

z *obrázku č. 3* bylo vidět, že absorpční křivky dávají pěkné údaje. Následným výpočtem v *tabulce č. 7* a grafickém zpracování v *grafu č. 3* jsem se v této domněnce utvrdil. Bylo potřeba si uvědomit, že tato disociační konstanta je pro fenolickou skupinu, nikoliv pro karboxylovou. Disociační konstanta pro karboxylovou skupinu by šla lehce vypočítat z potenciometrické titrace.

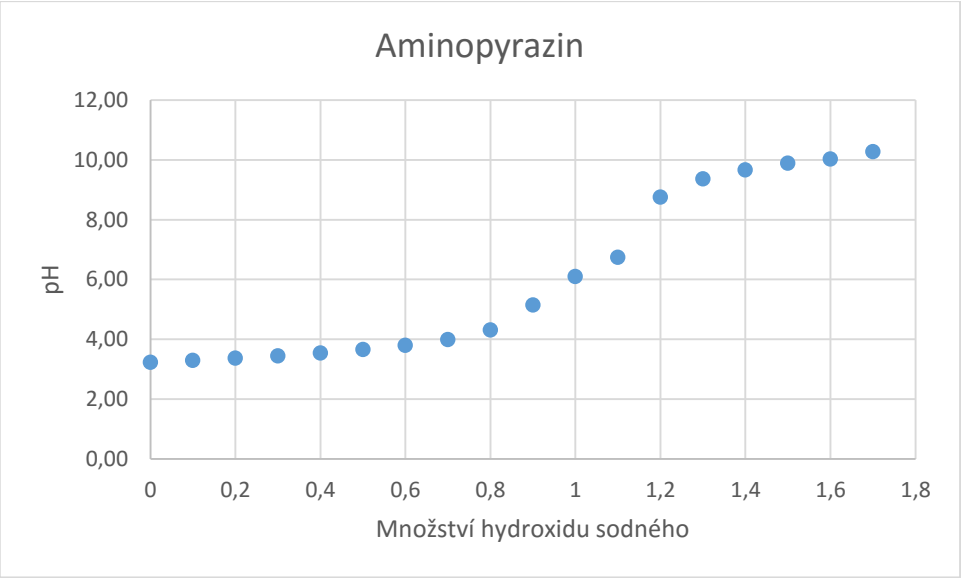
6.3. Aminopyrazin

6.3.1. Potenciometrie

Výsledky potenciometrické titrace aminopyrazinu hydroxidem sodným jsou uvedeny v *tabulce č. 8.* Grafická závislost změny pH na přidaném objemu hydroxidu sodného (titrační křivka) je uvedena v *grafu č. 4*.

Číslo měření	X	a	b	C'_{OH}	$[A^-] / C_{OH}$	C'_{HA}	C_{HA}	[HA]	$[H^+]$	pH	pK_1	pK_1	pK_2	pK_2
0	10	10	0	0,00995	0	0,001	0,001	0,001	0,000582	3,24	########	########	3,091069	3,09
1	10,1	10	0,1	0,00995	9,85E-05	0,001	0,00099	0,000892	0,000507	3,30	4,251661	4,25	3,097884	3,10
2	10,2	10	0,2	0,00995	0,000195	0,001	0,00098	0,000785	0,000432	3,37	3,969779	3,97	3,116725	3,12
3	10,3	10	0,3	0,00995	0,00029	0,001	0,000971	0,000681	0,000355	3,45	3,821083	3,82	3,154253	3,15
4	10,4	10	0,4	0,00995	0,000383	0,001	0,000962	0,000579	0,000288	3,54	3,719713	3,72	3,176277	3,18
5	10,5	10	0,5	0,00995	0,000474	0,001	0,000952	0,000479	0,000221	3,66	3,659343	3,66	3,223316	3,22
6	10,6	10	0,6	0,00995	0,000563	0,001	0,000943	0,00038	0,000158	3,80	3,629331	3,63	3,287410	3,29
7	10,7	10	0,7	0,00995	0,000651	0,001	0,000935	0,000284	0,000101	4,00	3,634238	3,63	3,379960	3,38
8	10,8	10	0,8	0,00995	0,000737	0,001	0,000926	0,000189	4,84E-05	4,32	3,723717	3,72	3,567468	3,57
9	10,9	10	0,9	0,00995	0,000822	0,001	0,000917	9,59E-05	7,16E-06	5,15	4,212051	4,21	4,174565	4,17
10	11	10	1	0,00995	0,000905	0,001	0,000909	4,55E-06	7,94E-07	6,10	3,801147	3,80	3,717350	3,72
11	11,1	10	1,1	0,00995	0,000986	0,001	0,000901	-8,5E-05	1,8E-07	6,75	#ČÍSLO!	#ČÍSLO!	#ČÍSLO!	#ČÍSLO!
12	11,2	10	1,2	0,00995	0,001066	0,001	0,000893	-0,00017	1,78E-09	8,75	#ČÍSLO!	#ČÍSLO!	#ČÍSLO!	#ČÍSLO!
13	11,3	10	1,3	0,00995	0,001145	0,001	0,000885	-0,00026	4,32E-10	9,37	#ČÍSLO!	#ČÍSLO!	#ČÍSLO!	#ČÍSLO!
14	11,4	10	1,4	0,00995	0,001222	0,001	0,000877	-0,00034	2,16E-10	9,67	#ČÍSLO!	#ČÍSLO!	#ČÍSLO!	#ČÍSLO!
15	11,5	10	1,5	0,00995	0,001298	0,001	0,00087	-0,00043	1,29E-10	9,89	#ČÍSLO!	#ČÍSLO!	#ČÍSLO!	#ČÍSLO!
16	11,6	10	1,6	0,00995	0,001372	0,001	0,000862	-0,00051	9,33E-11	10,03	#ČÍSLO!	#ČÍSLO!	#ČÍSLO!	#ČÍSLO!
17	11,7	10	1,7	0,00995	0,001446	0,001	0,000855	-0,00059	5,25E-11	10,28	#ČÍSLO!	#ČÍSLO!	#ČÍSLO!	#ČÍSLO!

Tabulka č. 8: Výsledky potenciometrické titrace aminopyrazinu.



Graf č. 4: Titrační křivka aminopyrazinu.

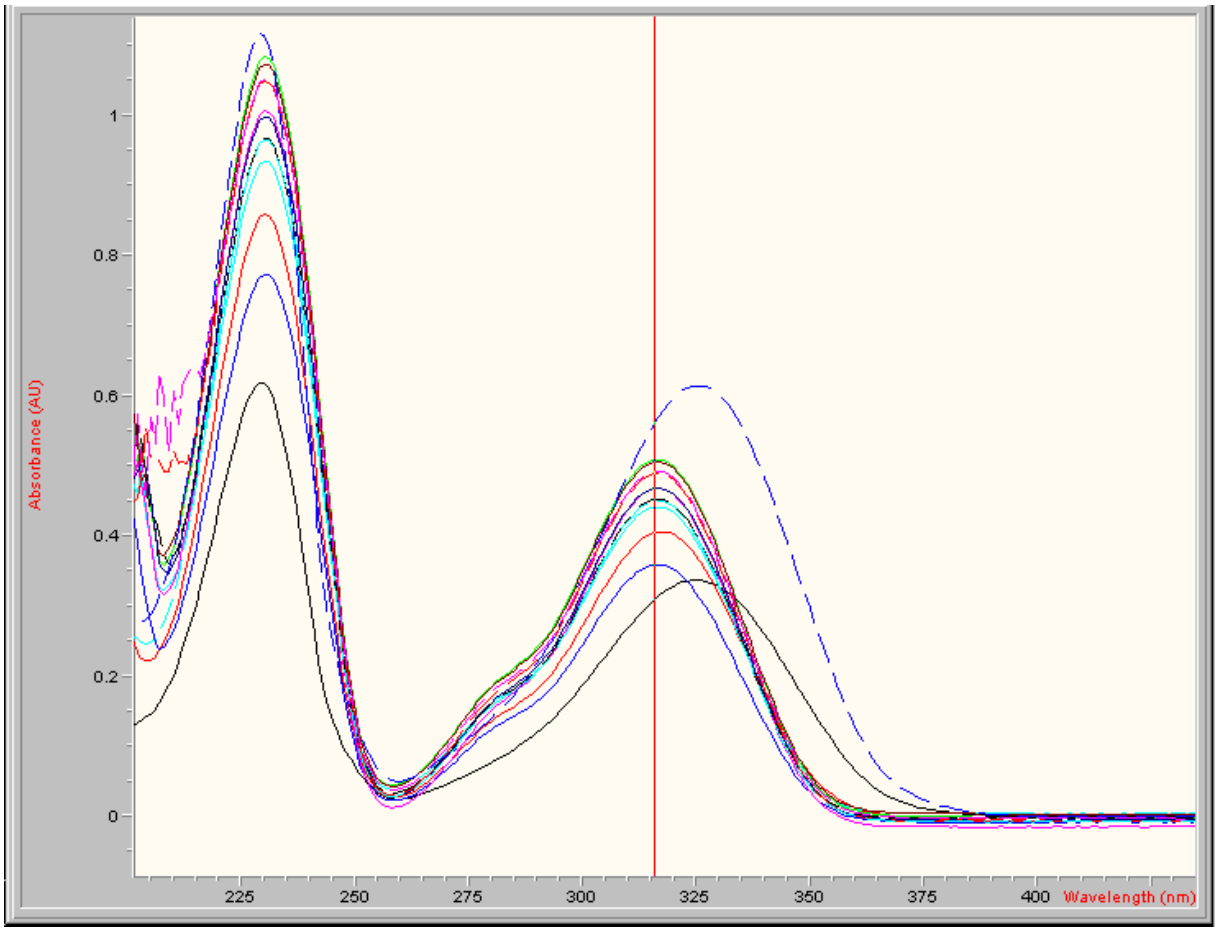
Po zobrazení vypočítaných hodnot pK_1 a pK_2 jsem udělal aritmetický průměr z 5 hodnot pK_2 (3,10; 3,12; 3,15; 3,18 a 3,22) z *tabulky č. 8*, které jsou se započítáním koncentrace kationtů vodíku přesnější, a zjistil jsem, že:

$$pK_2 = 3{,}15\ (\sigma = 0{,}04)$$

Hodnota tabelovaného pK_a je 3,1.[17]

6.3.2. Spektrofotometrie

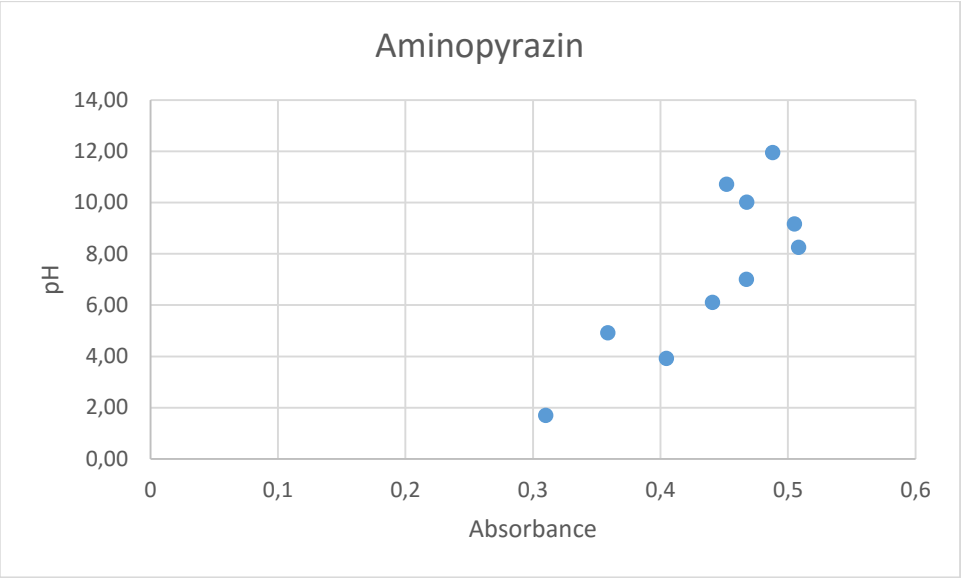
Spektra aminopyrazinu jsou uvedena na *obrázku č. 4*, na jeho základě byla stanovena největší změna absorbance pro různé hodnoty pH při vlnové délce 316 nm. Výsledky spektrofotometrických měření jsou uvedeny v *tabulce č. 9* a následné grafické zpracování v *grafu č. 5*.



Obrázek č. 4: Absorpční křivky aminopyrazinu.

Číslo měření	A_{HI}	A_{I}-	A	pH	pK	pK
1	0,31002	0,4917	0,31003	1,69	5,949283	5,949
2	0,31002	0,4917	0,40472	3,92	3,883069	3,883
3	0,31002	0,4917	0,35881	4,92	5,355161	5,355
4	0,31002	0,4917	0,44097	6,10	5,688159	5,688
5	0,31002	0,4917	0,46756	7,01	6,195346	6,195
6	0,31002	0,4917	0,50855	8,25	#ČÍSLO!	#ČÍSLO!
7	0,31002	0,4917	0,5052	9,17	#ČÍSLO!	#ČÍSLO!
8	0,31002	0,4917	0,46777	10,02	9,200973	9,201
9	0,31002	0,4917	0,45191	10,71	10,15782	10,158
10	0,31002	0,4917	0,48811	11,95	10,25445	10,254

Tabulka č. 9: Výpočet disociační konstanty aminopyrazinu spektrofotometrickou metodou.



Graf č. 5: Grafické znázornění výsledků aminopyrazinu.

Z uvedené *tabulky č. 9* a nejvíce z *grafu č. 5* je patrné, že spektrofotometrickou metodou jsem se nedobral žádného správného výsledku.

6.3.3. Zhodnocení výsledků

Pro experimentální stanovení disociační konstanty potenciometrickou titrací jsem vzorek musel smíchat s ekvimolárním množstvím kyseliny chlorovodíkové a poté titrovat hydroxidem sodným. Bylo potřebné se dostat na nižší hodnotu pH. Zprvu mě zaujalo, že i když je aminoskupina skupinou bazickou, disociační konstanta je v rozmezí kyselém. Tento fakt je dán elektronegativitou dusíků na pyrazinovém jádře, které odtáhnou elektrony z aminoskupiny a ta se posléze chová jako N-kyselina. Potenciometrickou titrací jsem dostal výsledek, který byl reálný a přesvědčivý. Po porovnání s odbornou literaturou i relativně přesný. Hodnoty disociační konstanty se již nepočítají, když koncentrace hydroxidu v roztoku překročí koncentraci aminopyrazinu. V *tabulce č. 8* s výpočtem je tato hranice vidět, když místo hodnot pK_1 a pK_2 je uveden nápis #ČÍSLO!. Veškerý vzorek je již plně disociován a hodnota [HA] je záporná. Spektrofotometrickou metodou jsem se nedobral žádného správného výsledku disociační konstanty. Zkoušel jsem počítat i s absorbancemi z vlnové délky 231 nm, ale bezvýsledně. Z *obrázku č. 4* s absorpčními křivkami to bylo zprvu trochu jasné, jelikož chybí isosbestický bod. Z *grafu č. 5* to bylo posléze vidět naprosto skvěle, že hodnoty nedávají smysl. Domnívám se, že se může jednat o jistou formu reakce aminopyrazinu s pufrem, nebo

přítomnost chyb a nečistot během měření, i když jsem se snažil zajistit dokonalé podmínky pro měření.

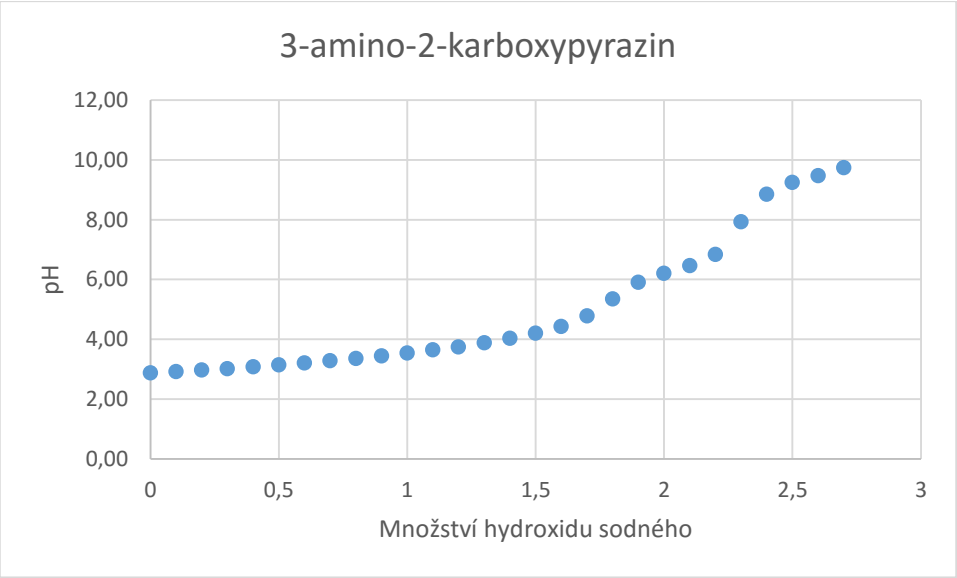
6.4. 3-amino-2-karboxypyrazin

6.4.1. Potenciometrie I.

Výsledky potenciometrické titrace 3-amino-2-karboxypyrazinu s ekvimolárním množstvím kyseliny chlorovodíkové titrované hydroxidem sodným jsou uvedeny v *tabulce č. 10*. Na *grafu č. 6* je uvedena titrační křivka 3-amino-2-karboxypyrazinu s ekvimolárním množstvím kyseliny chlorovodíkové.

Číslo měření	X	a	b	C'_{OH}	$[A^-] / C_{OH}$	C'_{HA}	C_{HA}	[HA]	$[H^+]$	pH	pK_1	pK_1	pK_2	pK_2
0	10	10	0	0,00995	0	0,001	0,001	0,001	0,001334	2,88	########	########	#ČÍSLO!	#ČÍSLO!
1	10,1	10	0,1	0,00995	9,85E-05	0,001	0,00099	0,000892	0,001202	2,92	3,876661	3,88	#ČÍSLO!	#ČÍSLO!
2	10,2	10	0,2	0,00995	0,000195	0,001	0,00098	0,000785	0,001059	2,98	3,579779	3,58	#ČÍSLO!	#ČÍSLO!
3	10,3	10	0,3	0,00995	0,00029	0,001	0,000971	0,000681	0,000955	3,02	3,391083	3,39	#ČÍSLO!	#ČÍSLO!
4	10,4	10	0,4	0,00995	0,000383	0,001	0,000962	0,000579	0,000832	3,08	3,259713	3,26	#ČÍSLO!	#ČÍSLO!
5	10,5	10	0,5	0,00995	0,000474	0,001	0,000952	0,000479	0,000716	3,15	3,149343	3,15	#ČÍSLO!	#ČÍSLO!
6	10,6	10	0,6	0,00995	0,000563	0,001	0,000943	0,00038	0,000617	3,21	3,039331	3,04	#ČÍSLO!	#ČÍSLO!
7	10,7	10	0,7	0,00995	0,000651	0,001	0,000935	0,000284	0,000525	3,28	2,919238	2,92	#ČÍSLO!	#ČÍSLO!
8	10,8	10	0,8	0,00995	0,000737	0,001	0,000926	0,000189	0,000437	3,36	2,768717	2,77	#ČÍSLO!	#ČÍSLO!
9	10,9	10	0,9	0,00995	0,000822	0,001	0,000917	9,59E-05	0,000359	3,45	2,512051	2,51	#ČÍSLO!	#ČÍSLO!
10	11	10	1	0,00995	0,000905	0,001	0,000909	4,55E-06	0,000288	3,54	1,241147	1,24	#ČÍSLO!	#ČÍSLO!
11	11,1	10	1,1	0,00995	0,000986	0,001	0,000901	-8,5E-05	0,000226	3,65	#ČÍSLO!	#ČÍSLO!	#ČÍSLO!	#ČÍSLO!
12	11,2	10	1,2	0,00995	0,001066	0,001	0,000893	-0,00017	0,000178	3,75	#ČÍSLO!	#ČÍSLO!	#ČÍSLO!	#ČÍSLO!
13	11,3	10	1,3	0,00995	0,001145	0,001	0,000885	-0,00026	0,000132	3,88	#ČÍSLO!	#ČÍSLO!	#ČÍSLO!	#ČÍSLO!
14	11,4	10	1,4	0,00995	0,001222	0,001	0,000877	-0,00034	9,33E-05	4,03	#ČÍSLO!	#ČÍSLO!	#ČÍSLO!	#ČÍSLO!
15	11,5	10	1,5	0,00995	0,001298	0,001	0,00087	-0,00043	6,24E-05	4,21	#ČÍSLO!	#ČÍSLO!	#ČÍSLO!	#ČÍSLO!
16	11,6	10	1,6	0,00995	0,001372	0,001	0,000862	-0,00051	3,67E-05	4,44	#ČÍSLO!	#ČÍSLO!	#ČÍSLO!	#ČÍSLO!
17	11,7	10	1,7	0,00995	0,001446	0,001	0,000855	-0,00059	1,66E-05	4,78	#ČÍSLO!	#ČÍSLO!	#ČÍSLO!	#ČÍSLO!
18	11,8	10	1,8	0,00995	0,001518	0,001	0,000847	-0,00067	4,42E-06	5,36	#ČÍSLO!	#ČÍSLO!	#ČÍSLO!	#ČÍSLO!
19	11,9	10	1,9	0,00995	0,001589	0,001	0,00084	-0,00075	1,24E-06	5,91	#ČÍSLO!	#ČÍSLO!	#ČÍSLO!	#ČÍSLO!
20	12	10	2	0,00995	0,001658	0,001	0,000833	-0,00083	6,17E-07	6,21	#ČÍSLO!	#ČÍSLO!	#ČÍSLO!	#ČÍSLO!
21	12,1	10	2,1	0,00995	0,001727	0,001	0,000826	-0,0009	3,43E-07	6,47	#ČÍSLO!	#ČÍSLO!	#ČÍSLO!	#ČÍSLO!
22	12,2	10	2,2	0,00995	0,001794	0,001	0,00082	-0,00097	1,45E-07	6,84	#ČÍSLO!	#ČÍSLO!	#ČÍSLO!	#ČÍSLO!
23	12,3	10	2,3	0,00995	0,001861	0,001	0,000813	-0,00105	1,16E-08	7,94	#ČÍSLO!	#ČÍSLO!	#ČÍSLO!	#ČÍSLO!
24	12,4	10	2,4	0,00995	0,001926	0,001	0,000806	-0,00112	1,41E-09	8,85	#ČÍSLO!	#ČÍSLO!	#ČÍSLO!	#ČÍSLO!
25	12,5	10	2,5	0,00995	0,00199	0,001	0,0008	-0,00119	5,69E-10	9,25	#ČÍSLO!	#ČÍSLO!	#ČÍSLO!	#ČÍSLO!
26	12,6	10	2,6	0,00995	0,002053	0,001	0,000794	-0,00126	3,39E-10	9,47	#ČÍSLO!	#ČÍSLO!	#ČÍSLO!	#ČÍSLO!
27	12,7	10	2,7	0,00995	0,002115	0,001	0,000787	-0,00133	1,82E-10	9,74	#ČÍSLO!	#ČÍSLO!	#ČÍSLO!	#ČÍSLO!

Tabulka č. 10: Výsledky potenciometrické titrace 3-amino-2-karboxypyrazinu s ekvimolárním množstvím kyseliny chlorovodíkové.



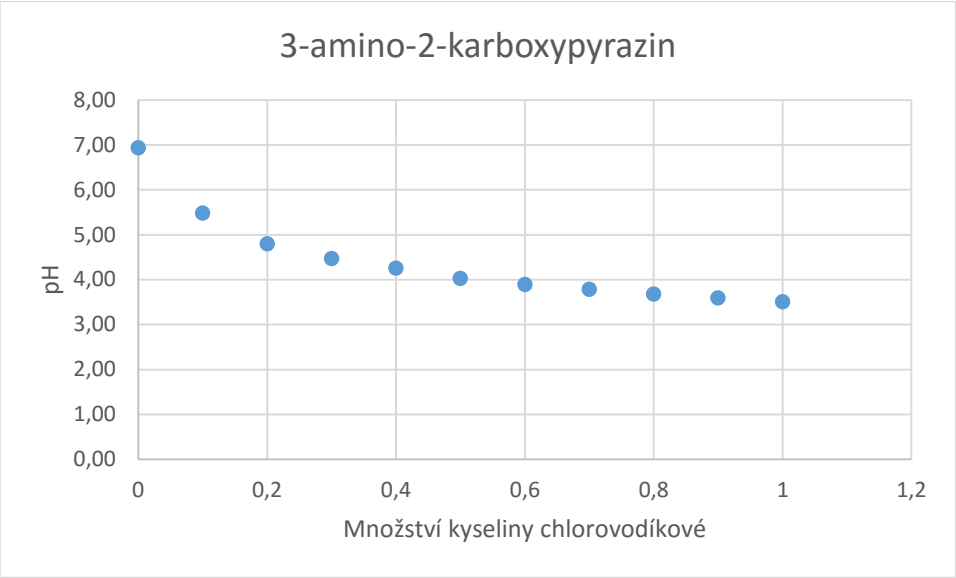
Graf č. 6: Titrační křivka 3-amino-2-karboxypyrazinu s ekvimolárním množstvím kyseliny chlorovodíkové.

6.4.2. Potenciometrie II.

Výsledky potenciometrické titrace 3-amino-2-karboxypyrazinu s ekvimolárním množstvím hydroxidu sodného titrované kyselinou chlorovodíkovou jsou uvedeny v *tabulce č. 11*. V *grafu č. 7* je uvedena titrační křivka 3-amino-2-karboxypyrazinu s ekvimolárním množstvím hydroxidu sodného.

Číslo měření	X	a	b	C'_{H+}	$[A^-] / C_{H+}$	C'_{HA}	C_{HA}	[HA]	$[H^+]$	pH	pK_1	pK_1	pK_2	pK_2
0	10	10	0	0,00926	0	0,001	0,001	0,001	1,16E-07	6,94	########	########	10,86995	10,87
1	10,1	10	0,1	0,00926	9,17E-05	0,001	0,00099	0,000898	3,27E-06	5,49	6,476188	6,48	6,459367	6,46
2	10,2	10	0,2	0,00926	0,000182	0,001	0,00098	0,000799	1,6E-05	4,80	5,43841	5,44	5,392857	5,39
3	10,3	10	0,3	0,00926	0,00027	0,001	0,000971	0,000701	3,39E-05	4,47	4,884925	4,88	4,812017	4,81
4	10,4	10	0,4	0,00926	0,000356	0,001	0,000962	0,000605	5,56E-05	4,26	4,485394	4,49	4,380573	4,38
5	10,5	10	0,5	0,00926	0,000441	0,001	0,000952	0,000511	9,44E-05	4,03	4,089393	4,09	3,916515	3,92
6	10,6	10	0,6	0,00926	0,000524	0,001	0,000943	0,000419	0,000129	3,89	3,793012	3,79	3,53813	3,54
7	10,7	10	0,7	0,00926	0,000606	0,001	0,000935	0,000329	0,000164	3,79	3,519587	3,52	3,115354	3,12
8	10,8	10	0,8	0,00926	0,000686	0,001	0,000926	0,00024	0,000209	3,68	3,223934	3,22	2,220594	2,22
9	10,9	10	0,9	0,00926	0,000765	0,001	0,000917	0,000153	0,000254	3,60	2,895822	2,90	#ČÍSLO!	#ČÍSLO!
10	11	10	1	0,00926	0,000842	0,001	0,000909	6,73E-05	0,000309	3,51	2,412621	2,41	#ČÍSLO!	#ČÍSLO!

Tabulka č. 11: Výsledky potenciometrické titrace 3-amino-2-karboxypyrazinu s ekvimolárním množstvím hydroxidu sodného.



Graf č. 7: Titrační křivka 3-amino-2-karboxypyrazinu s ekvimolárním množstvím hydroxidu sodného.

Pro výpočet disociační konstanty za využití dat z potenciometrické titrace jsem u látky 3-amino-2-karboxypyrazin musel kvůli dvěma funkčním skupinám provést dvě titrace. První titrace probíhala s ekvimolárním množstvím kyseliny chlorovodíkové a postupně se titrovalo hydroxidem sodným. Z aritmetického průměru 8 hodnot pK_1 (3,58; 3,39; 3,26; 3,15; 3,04; 2,92; 2,77 a 2,51) z výpočtové *tabulky č. 10* vyšlo, že:

$$pK_1 = 3{,}08\ (\sigma = 0{,}32)$$

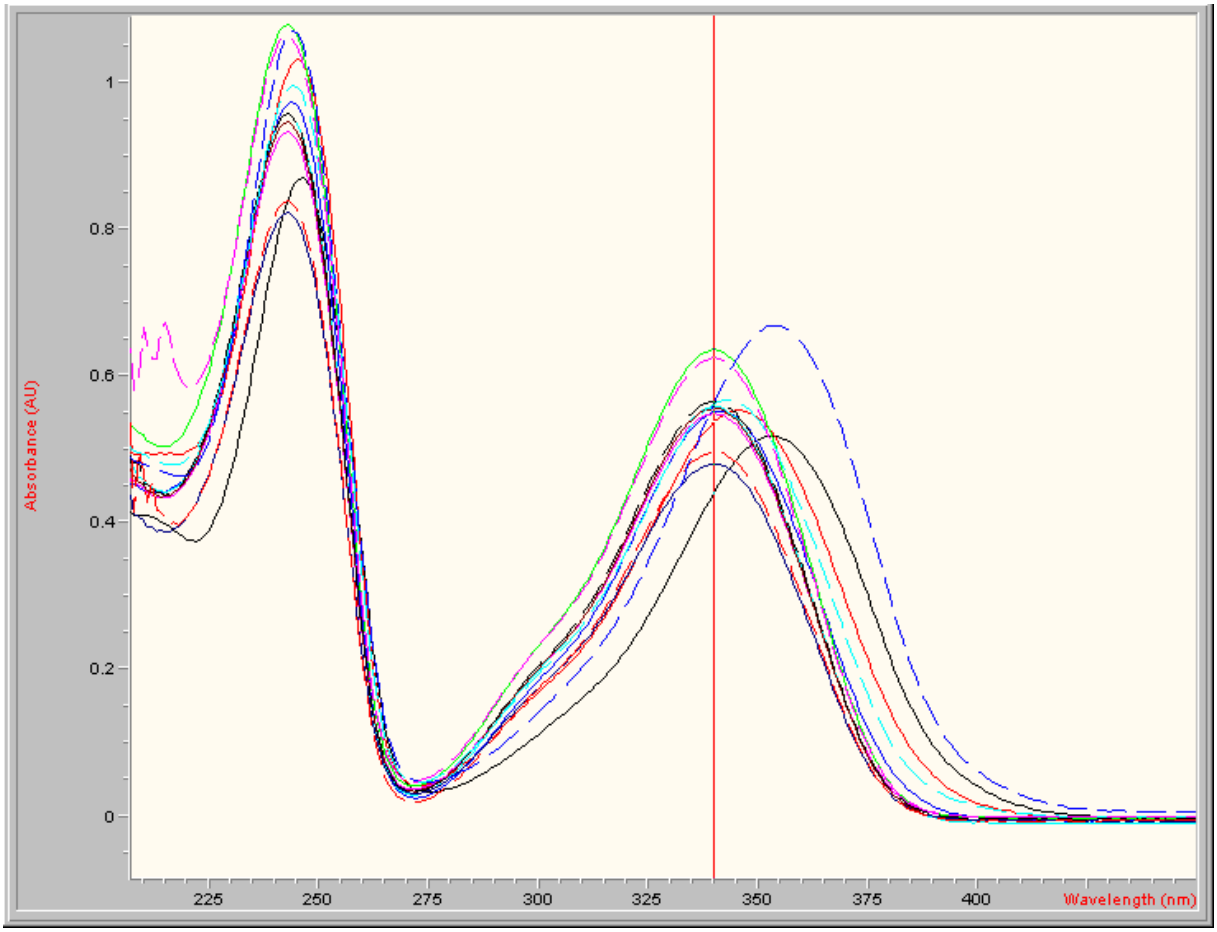
U druhé titrace látky 3-amino-2-karboxypyrazin s ekvimolárním množstvím hydroxidu sodného se postupně titrovalo kyselinou chlorovodíkovou. Z aritmetického průměru 7 hodnot pK_2 (5,39; 4,81; 4,38; 3,92; 3,54; 3,12 a 2,22) z výpočtové *tabulky č. 11* vyšlo, že

$$pK_2 = 3{,}91\ (\sigma = 0{,}99)$$

Odborná literatura uvádí, že reálná disociační konstanta látky 3-amino-2-karboxypyrazinu je 3,7.[18]

6.4.3. Spektrofotometrie

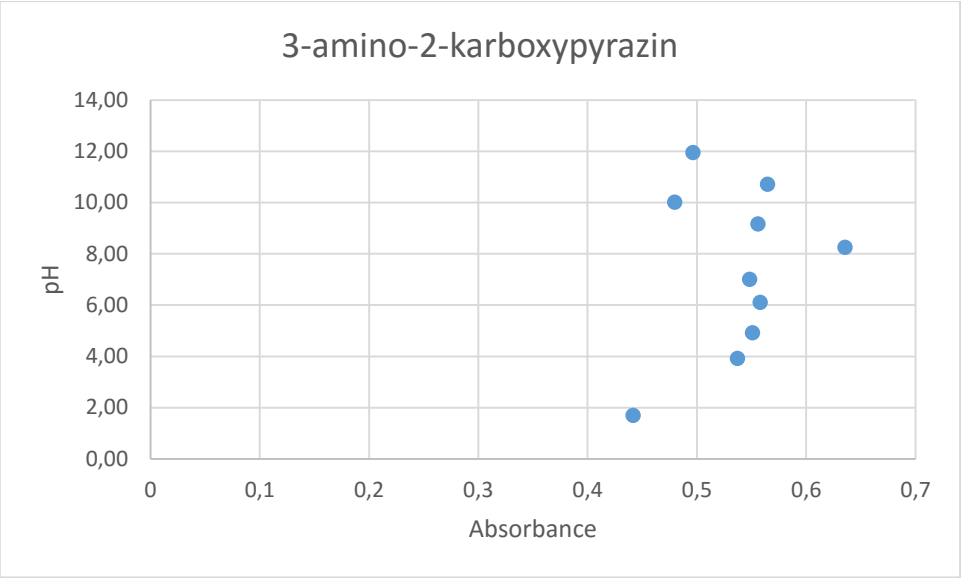
Na *obrázku č. 5* jsou vidět spektrální křivky 3-amino-2-karboxypyrazinu. Na základě největších změn absorbance, jsem určil vlnovou délku 340 nm, kterou jsem použil do výpočtu v *tabulce č. 12*. Na *grafu č. 8* je vidět závislost jednotlivých hodnot absorbance na pH.



Obrázek č. 5: Absorpční křivky 3-amino-2-karboxypyrazinu.

Číslo měření	A_{HI}	A_{I}-	A	pH	pK	pK
1	0,44168	0,62462	0,44169	1,69	5,952285	5,952
2	0,44169	0,62462	0,53741	3,92	3,879564	3,880
3	0,44169	0,62462	0,55111	4,92	4,74725	4,747
4	0,44169	0,62462	0,55807	6,10	5,85727	5,857
5	0,44169	0,62462	0,54836	7,01	6,864255	6,864
6	0,44169	0,62462	0,63579	8,25	#ČÍSLO!	#ČÍSLO!
7	0,44169	0,62462	0,55607	9,17	8,947657	8,948
8	0,44169	0,62462	0,4799	10,02	10,59835	10,598
9	0,44169	0,62462	0,56483	10,71	10,39623	10,396
10	0,44169	0,62462	0,49669	11,95	12,31661	12,317

Tabulka č. 12: Výpočet disociační konstanty 3-amino-2-karboxyparazinu spektrofotometrickou metodou.



Graf č. 8: Grafické znázornění výsledků 3-amino-2-karboxypyrazinu.

Z uvedené *tabulky č. 12* a *grafu č. 8* je patrné, že spektrofotometrickou metodou jsem se nedobral žádného správného výsledku.

6.4.4. Zhodnocení výsledků

Díky dvěma funkčním skupinám látky 3-amino-2-karboxypyrazin jsem musel provádět dvě titrace. První titrace probíhala s ekvimolárním množstvím kyseliny chlorovodíkové a bylo titrováno hydroxidem sodným, tento postup zaručil výpočet disociační konstanty pro karboxylovou funkční skupinu. Druhá titrace s ekvimolárním množstvím hydroxidu sodného pomocí kyseliny chlorovodíkové umožnila výpočet disociační konstanty pro aminoskupinu. Dostal jsem tedy dvě hodnoty disociační konstanty 3,08 a 3,91. Odborná literatura uvádí pouze jednu hodnotu a to 3,7.[18] Domnívám se, že zde se budou hodnoty disociačních konstant trošku prolínat, jelikož zjištěné hodnoty pK jsou velmi blízko sebe. Spektrofotometrickou metodou jsem se nedobral adekvátního výsledku.

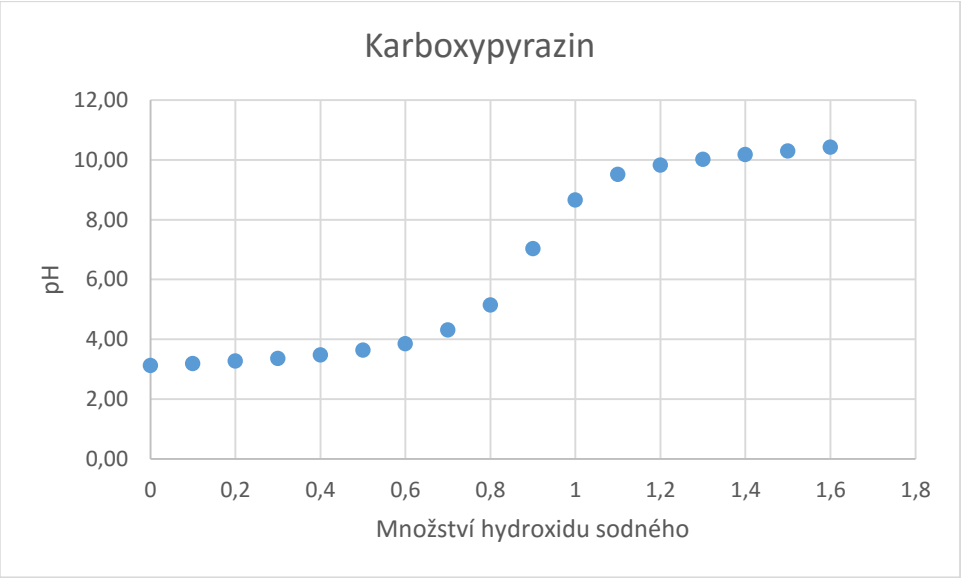
6.5. Karboxypyrazin

6.5.1. Potenciometrie

Výsledky potenciometrické titrace karboxypyrazinu hydroxidem sodným jsou uvedeny v *tabulce č. 13*. Grafické zpracování těchto výsledků je uvedeno v *grafu č. 9*.

Číslo měření	X	a	b	C'_{OH}	$[A^-] / C_{OH}$	C'_{HA}	C_{HA}	[HA]	$[H^+]$	pH	pK_1	pK_1	pK_2	pK_2
0	10	10	0	0,01098	0	0,001	0,001	0,001	0,00075	3,13	########	########	2,656416	2,66
1	10,1	10	0,1	0,01098	0,000109	0,001	0,00099	0,00088	0,00064	3,19	4,102219	4,10	2,700021	2,70
2	10,2	10	0,2	0,01098	0,000215	0,001	0,00098	0,00077	0,00054	3,27	3,820685	3,82	2,751655	2,75
3	10,3	10	0,3	0,01098	0,00032	0,001	0,00097	0,00065	0,00043	3,36	3,672073	3,67	2,824784	2,82
4	10,4	10	0,4	0,01098	0,000422	0,001	0,00096	0,00054	0,00033	3,48	3,582812	3,58	2,911065	2,91
5	10,5	10	0,5	0,01098	0,000523	0,001	0,00095	0,00043	0,00023	3,63	3,547938	3,55	3,049337	3,05
6	10,6	10	0,6	0,01098	0,000622	0,001	0,00094	0,00032	0,00014	3,85	3,564255	3,56	3,224407	3,22
7	10,7	10	0,7	0,01098	0,000718	0,001	0,00093	0,00022	4,9E-05	4,31	3,791996	3,79	3,653008	3,65
8	10,8	10	0,8	0,01098	0,000813	0,001	0,00093	0,00011	7,1E-06	5,15	4,291241	4,29	4,259274	4,26
9	10,9	10	0,9	0,01098	0,000907	0,001	0,00092	1,1E-05	9,2E-08	7,04	5,113704	5,11	5,109957	5,11
10	11	10	1	0,01098	0,000998	0,001	0,00091	-8,9E-05	2,2E-09	8,66	#ČÍSLO!	#ČÍSLO!	#ČÍSLO!	#ČÍSLO!
11	11,1	10	1,1	0,01098	0,001088	0,001	0,0009	-0,00019	3E-10	9,52	#ČÍSLO!	#ČÍSLO!	#ČÍSLO!	#ČÍSLO!
12	11,2	10	1,2	0,01098	0,001176	0,001	0,00089	-0,00028	1,5E-10	9,82	#ČÍSLO!	#ČÍSLO!	#ČÍSLO!	#ČÍSLO!
13	11,3	10	1,3	0,01098	0,001263	0,001	0,00088	-0,00038	9,5E-11	10,02	#ČÍSLO!	#ČÍSLO!	#ČÍSLO!	#ČÍSLO!
14	11,4	10	1,4	0,01098	0,001348	0,001	0,00088	-0,00047	6,7E-11	10,18	#ČÍSLO!	#ČÍSLO!	#ČÍSLO!	#ČÍSLO!
15	11,5	10	1,5	0,01098	0,001432	0,001	0,00087	-0,00056	5E-11	10,30	#ČÍSLO!	#ČÍSLO!	#ČÍSLO!	#ČÍSLO!
16	11,6	10	1,6	0,01098	0,001514	0,001	0,00086	-0,00065	3,7E-11	10,43	#ČÍSLO!	#ČÍSLO!	#ČÍSLO!	#ČÍSLO!

Tabulka č. 13: Výsledky potenciometrické titrace karboxpyrazinu.



Graf č. 9: Titrační křivka karboxypyrazinu.

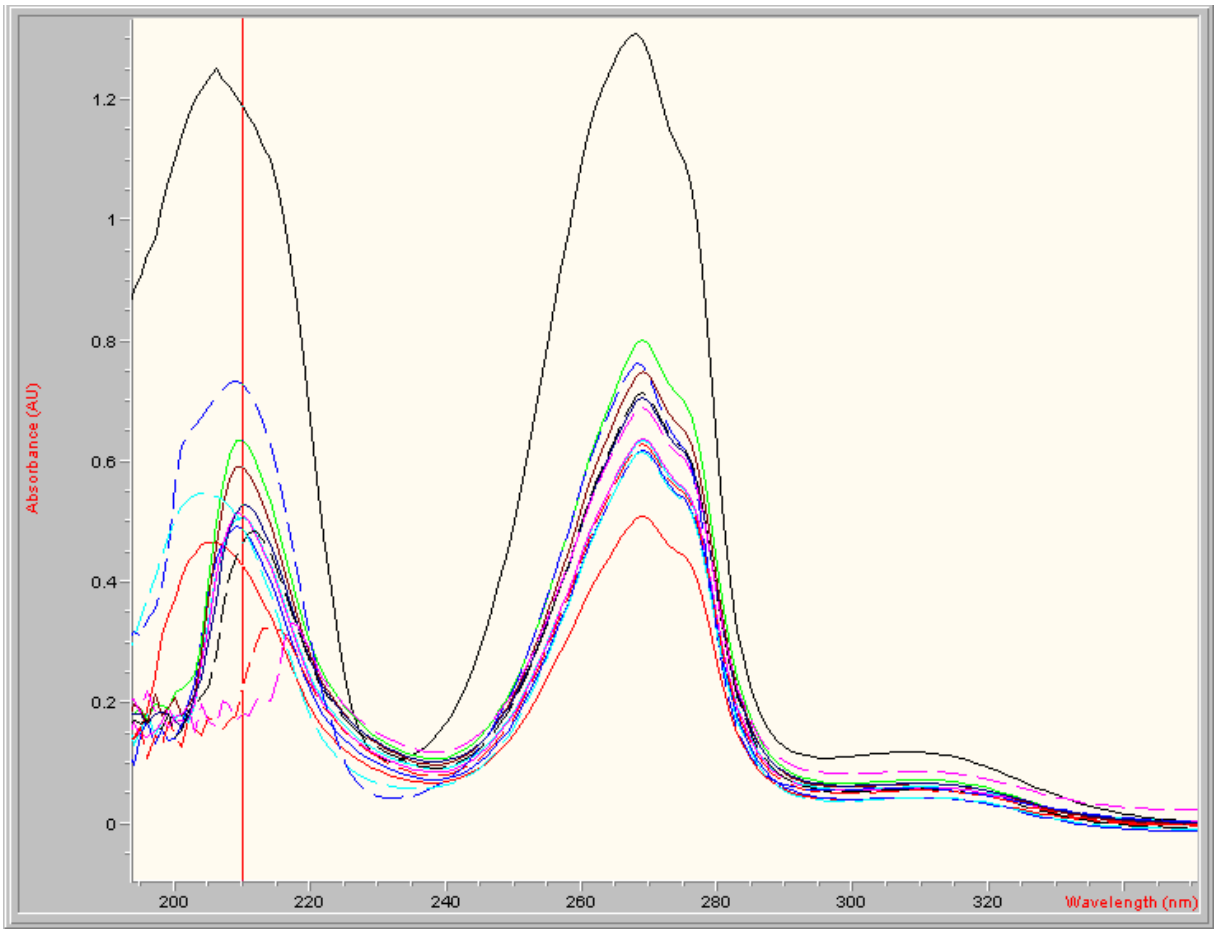
Z výpočtové *tabulky č. 13* jsem aritmetickým průměrem prvních 7 hodnot pK_2 (2,66; 2,70; 2,75; 2,82; 2,91; 3,05 a 3,22), vypočítal, že:

$$pK_2 = 2,87 \ (\sigma = 0,31)$$

Výpočet hodnot pomocí vzorce na výpočet pK_2 je se započítáním koncentrací kationtů vodíku přesnější, ovšem ne vždy jde použít. Výsledek jsem porovnal s odbornou literaturou, která uvádí, že pK karboxypyrazinu je 2,91.[19]

6.5.2. Spektrofotometrie

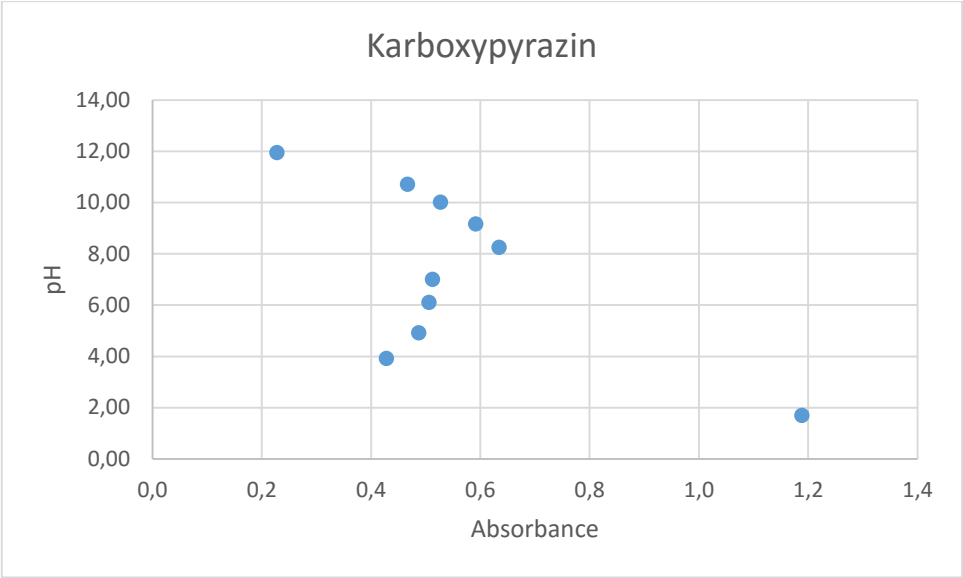
Na *obrázku č. 6* jsou vidět absorpční křivky karboxypyrazinu při různých hodnotách pH. Z tohoto *obrázku č. 6* jsem stanovil největší rozdíl absorbancí při vlnové délce 210 nm. Tyto hodnoty jsem dosadil do výpočtové *tabulky č. 14* a zpracoval i následný *graf č. 10*, který ukazuje závislost absorbance na hodnotě pH.



Obrázek č. 6: Absorpční křivky karboxypyrazinu.

Číslo měření	A_{HI}	A_{I^-}	A	pH	pK	pK
1	0,72768	0,18035	1,18900	1,69	#ČÍSLO!	#ČÍSLO!
2	0,72768	0,18035	0,42825	3,92	3,837981	3,84
3	0,72768	0,18035	0,48758	4,92	5,027071	5,03
4	0,72768	0,18035	0,50655	6,10	6,268836	6,27
5	0,72768	0,18035	0,51273	7,01	7,199297	7,20
6	0,72768	0,18035	0,63473	8,25	8,93917	8,94
7	0,72768	0,18035	0,59159	9,17	9,650269	9,65
8	0,72768	0,18035	0,52737	10,02	10,25865	10,26
9	0,72768	0,18035	0,46681	10,71	10,75064	10,75
10	0,72768	0,18035	0,22782	11,95	10,92757	10,93

Tabulka č. 14: Výpočet disociační konstanty karboxypyrazinu spektrofotometrickou metodou.



Graf č. 10: Grafická závislost absorbance na pH u karboxypyrazinu.

Z uvedené *tabulky č. 14* a *grafu č. 10* je patrné, že spektrofotometrickou metodou jsem se nedobral žádného správného výsledku.

6.5.3. Zhodnocení výsledků

Výpočet disociační konstanty z potenciometrické titrace dal smysluplné výsledky, které jsem předpokládal. Ve výpočtové *tabulce č. 14* je vidět, kdy přesáhne koncentrace hydroxidu koncentraci zkoumaného karboxypyrazinu. V tu chvíli je karboxypyrazin plně disociován, hodnota [HA] je záporná a místo výsledků výpočtu pK_1 a pK_2 je nápis #ČÍSLO!. Disociační konstanta se v tuto chvíli již nepočítá.

Výpočet disociační konstanty spektrofotometrickou metodou nebyl úspěšný.

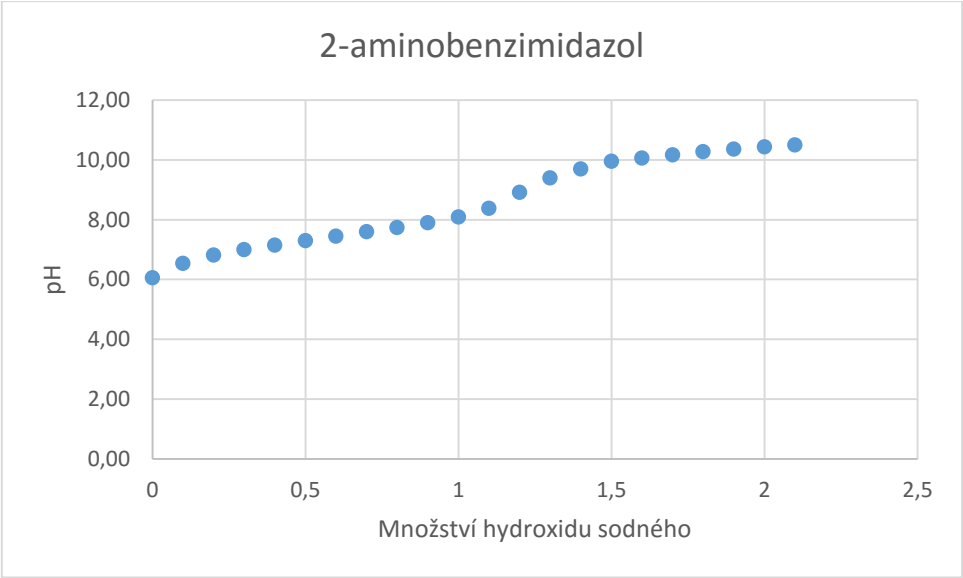
6.6. 2-aminobenzimidazol

6.6.1. Potenciometrie

Výsledky potenciometrické titrace 2-aminobenzimidazolu s ekvimolárním množstvím kyseliny chlorovodíkové titrované hydroxidem sodným jsou uvedeny v *tabulce č. 15*. Grafické zpracování těchto výsledků je uvedeno v *grafu č. 11*.

Číslo měření	X	a	b	C'_{OH}	$[A^-] / C_{OH}$	C'_{HA}	C_{HA}	[HA]	$[H^+]$	pH	pK_1	pK_1	pK_2	pK_2
0	10	10	0	0,01012	0	0,001	0,001	0,001	8,71E-07	6,06	########	########	9,119622	9,12
1	10,1	10	0,1	0,01012	0,0001	0,001	0,00099	0,00089	2,88E-07	6,54	7,488483	7,49	7,487094	7,49
2	10,2	10	0,2	0,01012	0,000198	0,001	0,00098	0,000782	1,51E-07	6,82	7,415575	7,42	7,415159	7,42
3	10,3	10	0,3	0,01012	0,000295	0,001	0,000971	0,000676	1E-07	7,00	7,360557	7,36	7,360345	7,36
4	10,4	10	0,4	0,01012	0,000389	0,001	0,000962	0,000572	7,08E-08	7,15	7,317422	7,32	7,317290	7,32
5	10,5	10	0,5	0,01012	0,000482	0,001	0,000952	0,00047	5,01E-08	7,30	7,289576	7,29	7,289485	7,29
6	10,6	10	0,6	0,01012	0,000573	0,001	0,000943	0,000371	3,55E-08	7,45	7,26084	7,26	7,260771	7,26
7	10,7	10	0,7	0,01012	0,000662	0,001	0,000935	0,000273	2,51E-08	7,60	7,214509	7,21	7,214452	7,21
8	10,8	10	0,8	0,01012	0,00075	0,001	0,000926	0,000176	1,82E-08	7,74	7,111396	7,11	7,111341	7,11
9	10,9	10	0,9	0,01012	0,000836	0,001	0,000917	8,18E-05	1,26E-08	7,90	6,890942	6,89	6,890868	6,89
10	11	10	1	0,01012	0,00092	0,001	0,000909	-1,1E-05	8,13E-09	8,09	#ČÍSLO!	#ČÍSLO!	#ČÍSLO!	#ČÍSLO!
11	11,1	10	1,1	0,01012	0,001003	0,001	0,000901	-0,0001	4,17E-09	8,38	#ČÍSLO!	#ČÍSLO!	#ČÍSLO!	#ČÍSLO!
12	11,2	10	1,2	0,01012	0,001084	0,001	0,000893	-0,00019	1,2E-09	8,92	#ČÍSLO!	#ČÍSLO!	#ČÍSLO!	#ČÍSLO!
13	11,3	10	1,3	0,01012	0,001164	0,001	0,000885	-0,00028	3,98E-10	9,40	#ČÍSLO!	#ČÍSLO!	#ČÍSLO!	#ČÍSLO!
14	11,4	10	1,4	0,01012	0,001243	0,001	0,000877	-0,00037	2E-10	9,70	#ČÍSLO!	#ČÍSLO!	#ČÍSLO!	#ČÍSLO!
15	11,5	10	1,5	0,01012	0,00132	0,001	0,00087	-0,00045	1,12E-10	9,95	#ČÍSLO!	#ČÍSLO!	#ČÍSLO!	#ČÍSLO!
16	11,6	10	1,6	0,01012	0,001396	0,001	0,000862	-0,00053	8,71E-11	10,06	#ČÍSLO!	#ČÍSLO!	#ČÍSLO!	#ČÍSLO!
17	11,7	10	1,7	0,01012	0,00147	0,001	0,000855	-0,00062	6,76E-11	10,17	#ČÍSLO!	#ČÍSLO!	#ČÍSLO!	#ČÍSLO!
18	11,8	10	1,8	0,01012	0,001544	0,001	0,000847	-0,0007	5,25E-11	10,28	#ČÍSLO!	#ČÍSLO!	#ČÍSLO!	#ČÍSLO!
19	11,9	10	1,9	0,01012	0,001616	0,001	0,00084	-0,00078	4,37E-11	10,36	#ČÍSLO!	#ČÍSLO!	#ČÍSLO!	#ČÍSLO!
20	12	10	2	0,01012	0,001687	0,001	0,000833	-0,00085	3,63E-11	10,44	#ČÍSLO!	#ČÍSLO!	#ČÍSLO!	#ČÍSLO!
21	12,1	10	2,1	0,01012	0,001756	0,001	0,000826	-0,00093	3,16E-11	10,50	#ČÍSLO!	#ČÍSLO!	#ČÍSLO!	#ČÍSLO!

Tabulka č. 15: Výsledky potenciometrické titrace 2-aminobenzimidazolu.



Graf č. 11: Titrační křivka 2-aminobenzimidazolu.

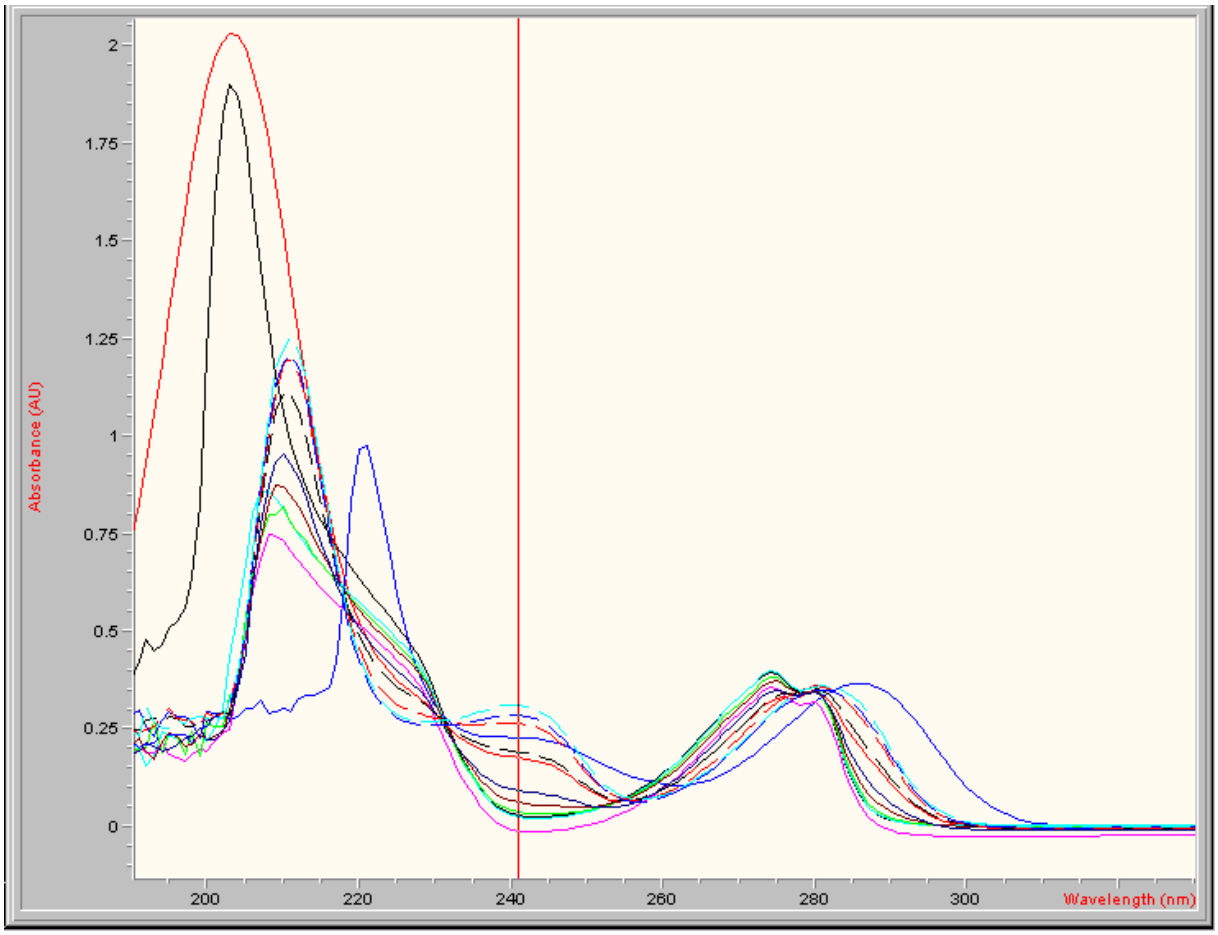
Z výpočtové *tabulky č. 15* jsem aritmetickým průměrem 8 hodnot pK_2 (7,49; 7,42; 7,36; 7,32; 7,29; 7,26; 7,21 a 7,11), vypočítal, že:

$$pK_2 = 7{,}31\ (\sigma = 0{,}11)$$

Jelikož je zde započítávaná koncentrace vodíkových kationtů malá, kvůli relativně velké hodnotě pH, jsou hodnoty pK_1 a pK_2 stejné.

6.6.2. Spektrofotometrie

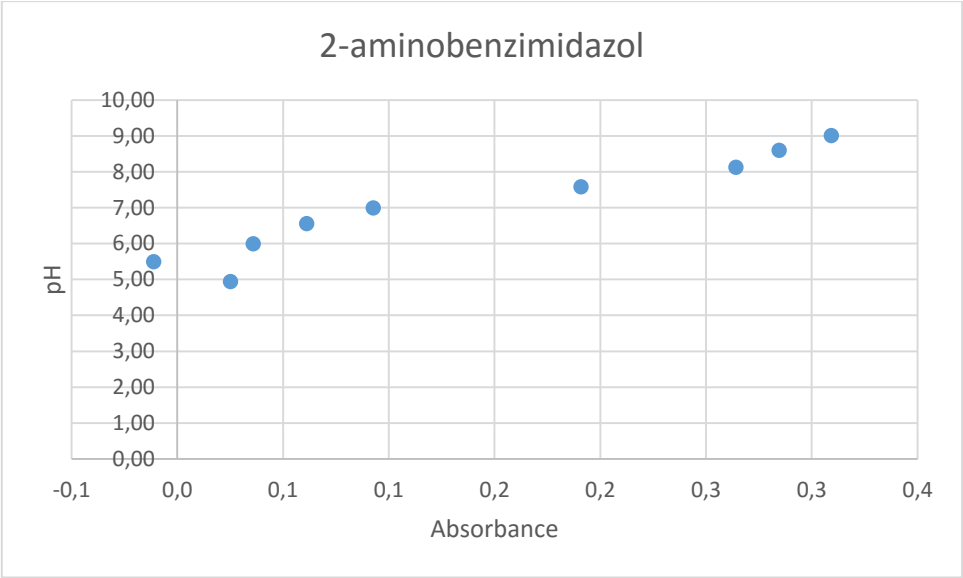
Na *obrázku č. 7* jsou vidět absorpční křivky 2-aminobenzimidazolu při různých hodnotách pH. Z tohoto *obrázku č. 7* jsem stanovil největší rozdíl absorbancí při vlnové délce 241 nm. Tyto hodnoty jsem dosadil do výpočtové *tabulky č. 16* a zpracoval i následný *graf č. 12*, který ukazuje závislost absorbance na hodnotě pH.



Obrázek č. 7: Absorpční křivky 2-aminobenzimidazolu.

Číslo měření	A_{HI}	A_{I^-}	A	pH	pK	pK
1	0,02970	0,22845	0,02524	4,94	#ČÍSLO!	#ČÍSLO!
2	0,02970	0,22845	-0,01101	5,49	#ČÍSLO!	#ČÍSLO!
3	0,02970	0,22845	0,03597	5,99	7,477127	7,48
4	0,02970	0,22845	0,06127	6,56	7,283855	7,28
5	0,02970	0,22845	0,09272	6,99	7,32317	7,32
6	0,02970	0,22845	0,19101	7,58	6,945664	6,95
7	0,02970	0,22845	0,26424	8,13	#ČÍSLO!	#ČÍSLO!
8	0,02970	0,22845	0,28475	8,60	#ČÍSLO!	#ČÍSLO!
9	0,02970	0,22845	0,30941	9,01	#ČÍSLO!	#ČÍSLO!

Tabulka č. 16: Výpočet disociační konstanty 2-aminobenzimidazolu spektrofotometrickou metodou.



Graf č. 12: Grafické znázornění výsledků 2-aminobenzimidazolu.

Z výpočtové *tabulky č. 16* jsem aritmetickým průměrem 3 hodnot pK (7,48; 7,28 a 7,32) vypočítal, že:

$$pK = 7{,}36\ (\sigma = 0{,}08)$$

6.6.3. Zhodnocení výsledků

Poprvé jsem zde dostal výsledky oběma metodami. Navíc byly oba výsledky přesvědčivé a stejné. Potenciometrická titrace 2-aminobenzimidazolu musela být za přítomnosti ekvimolárního množství kyseliny chlorovodíkové, abych se dostal na počáteční hodnotu pH. Poté probíhalo již vše podle standardního postupu. Spektrofotometrické měření nevyšlo hned napoprvé. Poprvé jsem upravoval rozmezí pH na hodnoty 5 až 9. Podruhé jsem měnil i pufr z Brittonova-Robinsonova na citrátový. Poté zpět na Brittonův-Robinsonův pufr, ale koncentraci léčiva jsem zmenšil na 0,0005 mol/l. Poté ji ještě 10x zředil přímo v kyvetě. Po veškerých změnách jsem se dobral krásného výsledku, který po porovnání s odbornou literaturou má jen malou odchylku. Reálná hodnota pK 2-aminobenzimidazolu je 7,18.[20]

6.7. Shrnutí výsledků

V následující *tabulce č. 17* jsou shrnuty veškeré získané disociační konstanty a převzaté hodnoty disociačních konstant z jiných zdrojů pro porovnání.[15,16,17,18,19,20]

Látka	pK potenciometricky	pK spektrofotometricky	pK tabelované
Aminopyrazin	3,15	-	3,1
Karboxypyrazin	2,87	-	2,91
3-amino-2-karboxypyrazin	3,08/3,91	-	3,7
2-aminobenzimidazol	7,31	7,36	7,18
5-(2-hydroxybenzoyl)-2-karboxypyrazin	X	9,22	9,14
6-chlor-2-karboxypyrazin	2,66	X	3,35

Tabulka č. 17: Výsledky disociačních konstant u zkoumaných látek. Symbolem X je označena metoda, která nebyla prováděna, symbolem - je označena metoda, která nevyšla.

Různé funkční skupiny na pyrazinovém jádře ovlivní hodnotu disociační konstanty. Ne nějak drasticky, ale v rámci jednotek ano. Zkusil bych dokonce tvrdit, že více než funkční skupiny ovlivňují pyrazinové jádro, ovlivňuje více pyrazinové jádro funkční skupiny - díky elektronovým posunům na aromatickém kruhu se silně elektronegativnějším dusíkem oproti uhlíku. I aminoskupina u aminopyrazinu vykazovala kyselou disociační konstantu. Veškeré sloučeniny pyrazinu, u kterých jsem stanovoval disociační konstantu, jsou středně silné kyseliny (v případě aminopyrazinu středně slabé báze). Vypočtená disociační konstanta pro látku 5-(2-hydroxybenzoyl)-2-karboxypyrazin spektrofotometrickou metodou je pro fenolickou skupinu, ne pro karboxylovou skupinu. Bohužel potenciometrická titrace nebyla provedena, takže experimentálně vypočítanou hodnotu pro karboxylovou skupinu nemám z mého měření k dispozici.

Výsledky, kterých jsem se dobral u pyrazinu s jednou nebo dvěma funkčními skupinami, mi připadají správné, minimálně z pohledu, kdybych měl srovnat jednotlivé látky podle síly kyselosti (sestupně):

1) 6-chlor-2-karboxypyrazin - pK = 2,66 - halogenový substituent na aromatickém jádře zvyšuje kyselost[1]
2) Karboxypyrazin - pK = 2,87
3) Aminopyrazin - pK = 3,15
4) 3-amino-2-karboxypyrazin - pK = 3,08/3,91

Je zvláštní, že u tří látek – aminopyrazin, karboxypyrazin a 3-amino-2-karboxypyrazin – vyšly hodnoty disociačních konstant pouze z potenciometrické titrace a žádné měření nevyšlo spektrofotometrickou metodou (sloučenina 6-chlor-2-karboxypyrazin nebyla spektrofotometrickou metodou měřena). Jelikož nevyšla ani jedna z těchto sloučenin spektrofotometrickou metodou, nemyslím si, že je chyba v provedeném postupu měření. Navíc spektrální data u všech těchto tří látek jsou velice podobná, což se i očekávalo. Každé z těchto měření bylo provedeno i s citrátovým pufrem, abych zjistil, jestli látky s Brittonovým-Robinsonovým pufrem nějak nereagují. Zkusil jsem dosadit i další hodnoty absorbancí pro potencionálně vyhlížející vlnové délky do výpočtu, tabulky s těmito výpočty zde již nejsou uvedeny, protože se také nepovedlo dobrat smysluplného výsledku.

U sloučeniny 2-aminobenzimidazol jsem dokázal, že obě metody dávají shodné výsledky.

7. Závěr

Ve své práci jsem se přesvědčil, proč je potenciometrická titrace u zkoumání disociační konstanty základní metoda. Dávala mi kvalitní a přesné výsledky. Spektrofotometrická metoda mi z nějakého důvodu nevyšla ani u jednoho ze zkoumaných derivátů pyrazinu s různou funkční skupinou. Mé výsledky tedy potvrzují její roli sekundární možnosti zkoumání. U látky 2-aminobenzimidazol jsou výsledky obou metod prakticky stejné. Z toho mi plyne, že spektrofotometrická metoda se obecně nedá použít na všechny látky, u kterých je potřeba experimentálně změřit hodnotu disociační konstanty. Ovšem u látek, u kterých to lze, dává spolehlivé výsledky, stejně jako potenciometrická titrace.

Z výše uvedeného jsem usoudil, že pro experimentální zjištění disociační konstanty je dobré vždy použít potenciometrickou titraci. UV-VIS spektrofotometrii bych volil jako doplňkovou metodu, která buď výsledek potvrdí, pomůže odhalit další funkční skupinu (čili další disociační konstantu) nebo žádný výsledek neposkytne a v tom případě na ni samozřejmě není brán zřetel.

Dále jsem své zkoumání věnoval pyrazinu s různými funkčními skupinami. Zajímalo mne, jak kyselá (karboxylová), zásaditá (amino) skupina nebo obě skupiny dohromady na pyrazinu ovlivní příslušnou disociační konstantu. Vzhledem k přítomnosti dvou dusíků na aromatickém kruhu a posunu elektronů díky elektronegativitě, je hodnota disociační konstanty (pK) ovlivněna jen v rámci jednotek. Ovšem neustále se drží na kyselé straně stupnice pH pro všechny 3 zkoumané deriváty pyrazinu.

8. Seznam použité literatury

[1] HARTL J., PALÁT K.: Farmaceutická chemie I., Nakladatelství Karolinum, Praha 2004, ISBN 978-80-7184-619-2

[2] LÁZNÍČKOVÁ A., KUBÍČEK V.: Základy fyzikální chemie, Nakladatelství Karolinum, Praha 2004, ISBN 80-246-0220-2

[3] ŠTAUD F.: Transport léčiv přes biologické membrány, Hradec Králové, 2015

[4] SUCHÝ M.: Studentská vědecká konference 2015, Fyzikálně chemické vlastnosti léčiv – Měření disociační konstanty a její využití, Hradec Králové, 2015

[5] BABIĆ S., HORVAT A.J.M., PAVLOVIĆ D.M., KAŠTELAN-MACAN M.: Trends in Analytical Chemistry, Vol. 26 (2007), str.: 1043-1061

[6] ALBERT A., SERJEANT E. P.: The Determination of Ionization Constants by potentiometric titration using a glass electrode, Chapman and Hall, London, 1984

[7] KLIMEŠ J., SOCHOR J., MOKRÝ M., KASTNER P., PILAŘOVÁ P.: Kontrolně-analytické hodnocení léčiv lékopisnými metodami, Nakladatelství Karolinum, Praha 2015, ISBN 978-80-260-8175-3

[8] JANKULOVSKA M., SPIREVSKA I., ŠOPTRAJANOVA L.: Bulletin of the Chemistry and Technologists of Macedonia, Vol. 25 (2006), str.: 99 – 106, ISSN 0350-0136

[9] Webová stránka WikiSkripta, 2016, převzato z: http://www.wikiskripta.eu/index.php/Spektrofotometrie#Materi.C3.A1l_kyvety

[10] CÍDLOVÁ H., Laboratorní cvičení z fyzikální chemie, Brno 2003

[11] HARTL J., DOLEŽAL M., MILETÍN M., OPLETALOVÁ V., ZIMČÍK P.: Farmaceutická chemie IV., Nakladatelství Karolinum, Praha 2006, ISBN 80-246-1169-4

[12] DVOŘÁK J., SUK V.: Příručka měření pH, Státní nakladatelství technické literatury, Praha 1975

[13] Webová stránka Wikipedie, 2016, převzato z: https://cs.wikipedia.org/wiki/Fenolftalein

[14] SOVA J., PALÁT K., KUBICOVÁ L., KLIMEŠOVÁ V.: Seminární cvičení z obecné a anorganické chemie, Nakladatelství Karolinum, Praha 2007, ISBN 9788024614397

[15] SMOLOVÁ E.: Stanovení fyzikálně chemických charakteristik léčiv, Diplomová práce, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova v Praze, 2014

[16] KRČILOVÁ Š.: Fyzikálně chemické vlastnosti nově připravených léčiv, Diplomová práce, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova v Praze, 2012

[17] DEWICK M. P.: Essentials of Organic Chemistry: For Students of Pharmacy, Medicinal Chemistry and Biological Chemistry, Wiley 2006, ISBN 978-0-470-01666-4

[18] GORDON B. B.: The Chemistry of Heterocyclic Compounds, The Pyrazines, Wiley 2009, str. 311; ISBN 0470188693

[19] Webová stránka ChemicalBook, 2016, převzato z: http://www.chemicalbook.com/ProductMSDSDetailCB3346855_EN.htm

[20] SULLIVAN J. D., GILES R.L., LOOPER R.E.: Current Bioactive Compounds, 2-Aminoimidazoles from Leucetta Sponges: Synthesis and Biology of an Important Pharmacophore, Bentham Science Publishers Ltd. 2009, Vol. 5, No. 1, str. 3

9. Seznam tabulek, obrázků a grafů

Tabulka č. 1: Hodnoty pH v různých částech těla.

Tabulka č. 2: Ionizace molekuly v závislosti na pH.

Tabulka č. 3: Význam zkratek užitých při výpočtu z potenciometrické titrace.

Tabulka č. 4: Význam zkratek užitých při výpočtu spektrofotometrickou metodou.

Tabulka č. 5: Navážky a koncentrace připravovaných roztoků vzorků.

Tabulka č. 6: Výsledky potenciometrické titrace 6-chlor-2-karboxypyrazinu.

Tabulka č. 7: Výpočet disociační konstanty 5-(2-hydroxybenzoyl)-2-karboxypyrazinu spektrofotometrickou metodou.

Tabulka č. 8: Výsledky potenciometrické titrace aminopyrazinu.

Tabulka č. 9: Výpočet disociační konstanty aminopyrazinu spektrofotometrickou metodou.

Tabulka č. 10: Výsledky potenciometrické titrace 3-amino-2-karboxypyrazinu s ekvimolárním množstvím kyseliny chlorovodíkové.

Tabulka č. 11: Výsledky potenciometrické titrace 3-amino-2-karboxypyrazinu s ekvimolárním množstvím hydroxidu sodného.

Tabulka č. 12: Výpočet disociační konstanty 3-amino-2-karboxyparazinu spektrofotometrickou metodou.

Tabulka č. 13: Výsledky potenciometrické titrace karboxpyrazinu.

Tabulka č. 14: Výpočet disociační konstanty karboxypyrazinu spektrofotometrickou metodou.

Tabulka č. 15: Výsledky potenciometrické titrace 2-aminobenzimidazolu.

Tabulka č. 16: Výpočet disociační konstanty 2-aminobenzimidazolu spektrofotometrickou metodou.

Tabulka č. 17: Výsledky disociačních konstant u zkoumaných látek.

Obrázek č. 1: Přestup léčiva přes membránu.

Obrázek č. 2: Absorpční křivky vzorku při různých hodnotách pH.

Obrázek č. 3: Absorpční křivky 5-(2-hydroxybenzoyl)-2-karboxypyrazinu.

Obrázek č. 4: Absorpční křivky aminopyrazinu.

Obrázek č. 5: Absorpční křivky 3-amino-2-karboxypyrazinu.

Obrázek č. 6: Absorpční křivky karboxypyrazinu.

Obrázek č. 7: Absorpční křivky 2-aminobenzimidazolu.

Graf č. 1: Příklad potenciometrické titrační křivky.

Graf č. 2: Titrační křivka 6-chlor-2-karboxypyrazinu.

Graf č. 3: Grafické znázornění výsledků 5-(2-hydroxybenzoyl)-2-karboxypyrazinu.

Graf č. 4: Titrační křivka aminopyrazinu.

Graf č. 5: Grafické znázornění výsledků aminopyrazinu.

Graf č. 6: Titrační křivka 3-amino-2-karboxypyrazinu s ekvimolárním množstvím kyseliny chlorovodíkové.

Graf č. 7: Titrační křivka 3-amino-2-karboxypyrazinu s ekvimolárním množstvím hydroxidu sodného.

Graf č. 8: Grafické znázornění výsledků 3-amino-2-karboxypyrazinu.

Graf č. 9: Titrační křivka karboxypyrazinu.

Graf č. 10: Grafická závislost absorbance na pH u karboxypyrazinu.

Graf č. 11: Titrační křivka 2-aminobenzimidazolu.

Graf č. 12: Grafické znázornění výsledků 2-aminobenzimidazolu.