2177

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie

Titrační křivky aminokyselin a přírodních látek (optimalizace úlohy pro pokročilé praktikum)

Bakalářská práce

Biochemie

Filip Frühauf

Školitel: **Doc. RNDr. Jiří Hudeček, CSc.**

Praha 2007

Poděkování

Děkuji svému školiteli Doc. RNDr. Jiřímu Hudečkovi, CSc. za podporu, ochotu a motivaci k práci.

Prohlášení

„Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracoval samostatně pod vedením školitele Doc. RNDr. Jiřího Hudečka, Csc. a všechny použité prameny jsem řádně citoval."

V Praze dne 20. 8. 2007

Obsah

A. Cíle práce *1*

B. Přehled literatury *2*

1. Experiment jako součást výuky 2

2. Teorie kyselin a zásad 3

2.1. Základy teorie kyselin a zásad 3

2.2. Tlumivé roztoky (pufry) 4

2.3. Pufrační kapacita 6

2.4. Amfoterní elektrolyty – aminokyseliny jako amfoterní elektrolyty 8

2.5. Izoelektrický bod 9

3. Měření pH 10

3.1. Principy měření pH 10

3.2. Měření pH vodíkovou elektrodou 11

3.3. Měření pH skleněnou elektrodou 13

3.4. Měření pH dalšími vybranými elektrodami 16

3.5. Novější metody měření pH 17

4. Potenciometrická titrace 17

4.1. Principy potenciometrické titrace 17

4.2. Metody vyhodnocování potenciometrické titrace 19

4.3. Automatická potenciometrická titrace 19

4.4. Průběh neutralizačních titračních křivek 21

5. Acidobazické vlastnosti aminokyselin a bílkovin 22

5.1. Acidobazické vlastnosti aminokyselin 22

5.1.1. Disociace aminokyselin 23

5.1.2. Mikroskopické disociační konstanty 25

5.1.3. Makroskopické disociační konstanty 26

5.2. Acidobazické vlastnosti bílkovin a jejich titrace 26

5.2.1. Izoionický a izoelektrický bod bílkovin 28

5.2.2. Teoretický popis acidobazických vlastností bílkovin 28

6. Interpretace titračních křivek aminokyselin a bílkovin 30
6.1. Interpretace titračních křivek aminokyselin 30
6.2. Formolá titrace aminokyselin 34
6.3. Interpretace titračních křivek bílkovin 35

C. Praktická část *39*

7. Materiály a přístroje 39
7.1. Chemikálie 39
7.2. Přístroje a pomůcky 39
7.2.1. Obecný popis 40
7.2.2. Popis použité titrační aparatury 41
7.2.3. Popis použité kombinované elektrody 48

8. Metodika 49
8.1. Sestavení a zapojení titrační soupravy 50
8.1.1. Sestavení a zprovoznění automatické byrety 50
8.1.2. Zapojení a příprava titrační soupravy 50
8.1.3. Příprava a zapojení kombinované elektrody, kalibrace pH-metru 52
8.2. Provedení úlohy 53
8.2.1. Standardní postup obsluhy titrační soupravy 53
8.2.2. Stanovení analytického faktoru hydroxidu sodného 54
8.2.3. Titrace aminokyselin kyselinou chlorovodíkovou a „slepá titrace“ 54
8.2.4. Titrace histidinu kyselinou chlorovodíkovou
při zapojení derivačního modulu 56
8.2.5. Titrace glycinu a α-alaninu hydroxidem sodným 57
8.3. Zpracování výsledků 57
8.3.1. Zpracování dat derivačním modulem zapisovače 57
8.3.2. Zpracování výsledků výpočetní technikou 58

9. Výsledky 60
9.1. Výsledky ze studentských protokolů 60
9.2. Stanovení analytického faktoru hydroxidu sodného 61
9.3. Titrační křivka histidinu a její derivace při zapojení derivačního modulu 62
9.4. Ttirační křivky aminokyselin – vyhodnoceno výpočetní technikou 63

9.4.1. Titrace aminokyselin kyselinou chlorovodíkovou 63
9.4.2. Formolová titrace glycinu a α-alaninu 64
9.4.3. Vliv narůstajícího objemu kyseliny chlorovodíkové na pH roztoku 65
9.4.4. Titrace aminokyselin hydroxidem sodným 66

10. Diskuse 67
10.1. Rozbor studetských protokolů 67
10.2. Diskuse pracovního postupu 68
10.3. Diskuse zpracování dat a výsledků 69

11. Závěr praktické části 71

D. Shrnutí *72*

E. Seznam použité literatury *73*

F. Přílohy

Cíle práce

Úloha „Potenciometrická titrace aminokyselin“ byla v dřívějších letech běžně zařazována do praktické výuky biochemie, ale i výuky cizojazyčných studentů medicíny. V současné době není součástí praktik mimo jiné z důvodu nedostatků automatické titrační soupravy. Tato práce si tedy klade za úkol rozšířit a upravit zadání úlohy ze skript pro zahraniční studenty, které bylo jediné dostupné, aby bylo využitelné pro pokročilá praktika z biochemie v následujících letech. Práce se proto zabývá rozborem protokolů studentů a zhodnocením jimi získaných výsledků. Dále uvádí možné modifikace pracovního postupu, ale zejména nové možnosti zpracování získaných dat s cílem zvýšit přesnost výsledků, zlepšit efektivnost vyhodnocování titračních křivek a umožnit stanovení všech hodnot disociačních konstant a izoelektrických bodů u vybraných aminokyselin. Velký důraz je kladen na postup sestavení a obsluhy titrační aparatury, stejně jako na metodiku vyhodnocování výsledků výpočetní technikou. Cílem modifikací je navržení nového zadání úlohy, které bude splňovat všechna důležitá kritéria.

Přehled literatury shrnuje obecné znalosti o kyselinách a zásadách, o měření pH, o vlastní potenciometrické titraci a zejména o acidobazických vlastnostech a titračních křivkách aminokyselin a bílkovin.

Přehled literatury

1. Experiment jako součást výuky [1 – 3]

Pozorování a experiment tvoří důležitou součást výuky, a to zejména v oborech empirického charakteru. Experiment nachází uplatnění při zvýšení motivace, v procesu osvojování a upevňování vědomostí a dovedností. V rámci přírodovědecké fakulty UK je tato forma výuky realizována systémem praktických cvičení. V nich si studenti osvojují nezbytné návyky pro práci v laboratoři, seznamují se se základními metodami a postupy, učí se zpracovávat a hodnotit získané údaje.

Lze říci, že experiment sehrává ve výuce tři základní funkce – informativní, formativní a metodologickou. Informativní funkce spočívá ve vytvoření určitého základu poznatků, které student získá v průběhu práce. Formativní funkce se projevuje rozvojem senzomotorických a intelektuálních dovedností, jakož i celkové osobnosti studenta. Jako metodologicka funkce se označuje porozumění postupům využívaným v experimentu a jejich další uplatnění v praxi.

Experimenty je možné dělit podle doby jejich provedení na krátkodobé (např. pokusy demonstrační) a dlouhodobé (např. dlouhodobější samostatná práce prováděná právě jako součást praktických cvičení).

Jako základní didaktické úlohy experimentu se uvádějí motivace, osvojování a fixování učiva a také kontrola naučeného.

Obecně lze rozlišovat čtyři fáze chemického experimentu

a) příprava – materiální (chemikálie, přístroje, laboratorní nádobí) a nemateriální (výchozí vědomosti a dovednosti studentů)
b) provedení a pozorování průběhu
c) vyhodnocení získaných dat (empirické údaje)
d) zpracování empirických údajů (empirické poznatky).

Při provádění experimentu je nutné dodržovat některé zásady

a) bezpečnost a hygiena práce

Nutným předpokladem pro zařazení experimentu do výuky je zajištění bezpečnosti postupu provedení, s čímž souvisí výběr chemikálií, technického vybavení a také připravenost ze strany studentů.

b) časová optimalizace

Doba potřebná k provedení experimentu je limitována délkou trvání příslušného semináře nebo praktika. Turnusová praktická cvičení na fakultě umožňují zařazení i časově náročnějších úloh.

c) ekonomická optimalizace

Při provedení experimentu ve výuce je samozřejmě potřeba řídit se dostupnou technikou a vybavením laboratoří.

d) připravenost a aktivita

Studenti si musí osvojit nezbytné intelektuální vědomosti a senzomotorické dovednosti, potřebné k technickému provedení experimentu a následnému vyhodnocení získaných výsledků.

e) ověření postupů

Pro zařazení do výuky musí být voleny pouze experimentálně ověřené postupy. Je nutné předpokládat vysokou variabilitu podmínek a odchylek od stanoveného postupu.

2. Teorie kyselin a zásad /4 – 6/

2.1. Základy teorie kyselin a zásad

1) Podle Arrheniovy teorie, tedy klasického pojetí, je jako kyselina chápána látka, která v roztoku disociuje na anion a vodíkový kation. Jako zásada se označuje látka, která disociuje na kation a hydroxidový anion. Arrheniova teorie se dnes již nepoužívá, protože ji nelze použít za všech podmínek a pro všechny typy reakcí.

2) Brønstedova teorie protolytických reakcí vysvětluje chování kyselin a zásad ve vodném, ale i nevodném prostředí na základě přenosu protonů. Tato novější teorie umožňuje popis a vysvětlení dějů, jako je disociace, neutralizace, hydrolýza, reakce v tlumicích směsích a reakce indikátorovů.

Podle Brønsteda je charakteristickou vlastností kyselin a zásad schopnost odštěpovat nebo přijímat proton, tzn. účastnit se reakce probíhající podle rovnice

$$A \leftrightarrow B + H^{+}, \qquad (2.1)$$

kde H^+ značí proton, A kyselinu a B zásadu. Z této teorie vyplývá, že kyselina má v reakci vždy kladnější náboj, než její odpovídající (konjugovaná) zásada B. Kyselina je pak látka, která odštěpuje ze své molekuly proton, zatímco zásadou je nazývána látka, která proton

přijímá. Identická látka se může různých reakcí účastnit jako kyselina i báze, což závisí především na reakčním partnerovi. Takové látky se nazývají amfolyty.

Protolytickou reakci lze psát ve tvaru

$$A_1 + B_2 \leftrightarrow A_2 + B_1, \tag{2.2}$$

kde A_1 a B_1 značí kyselinu a konjugovanou zásadu látky 1 a A_2 a B_2 kyselinu a konjugovanou zásadu látky 2. Každá protolytická reakce tedy představuje soubor dvou dílčích reakcí, ve kterých dochází vzájemně k přenosu protonu.

Rovnovážná konstanta základní protolytické reakce je popsána vztahem

$$K_A = \frac{a_{H+}.a_B}{a_A}, \tag{2.3}$$

kde a_{H+}, a_B, a_A značí rovnovážné aktivity protonu, kyseliny A a konjugované zásady B. Absolutní hodnotu této konstanty nelze sice stanovit, je však možno provést její srovnání s hodnotami rovnovážných konstant jiných konjugovaných párů

$$A_1 \leftrightarrow B_1 + H^+ \quad K_{A1} = \frac{a_{H+}.a_{B1}}{a_{A1}}, \tag{2.4}$$

$$H^+ + B_2 \leftrightarrow A_2 \quad K_{B2} = \frac{a_{A2}}{a_{H+}.a_{B2}} = \frac{1}{K_{A2}}, \tag{2.5}$$

$$A_1 + B_2 \leftrightarrow B_1 + A_2 \quad K = \frac{a_{B1}.a_{A2}}{a_{A1}.a_{B1}} = K_{A1}.K_{B2} = \frac{K_{A1}}{K_{A2}}. \tag{2.6}$$

Rovnovážnou konstantu výsledné protolytické reakce je možno experimentálně stanovit, např. z potenciometrických nebo konduktometrických měření.

3) Zobecněním pojmů kyselina a zásada je Lewisova teorie založená na sdílení elektronového páru, kterou lze uplatnit na více druhů látek. Zásadou je zde látka schopná fungovat jako donor elektronového páru, kyselinou je akceptor elektronového páru. Pro účely titrace aminokyselin a bílkovin, jimiž se zabývá tato práce, se lze spokojit s teorií Brønstedovou.

2.2. Tlumivé roztoky (pufry)

Jako tlumivé roztoky (pufry) se označují takové roztoky, které mají schopnost udržovat víceméně konstantní pH i po přídavku kyseliny či zásady. Zpravidla obsahují slabou kyselinu, popřípadě slabou zásadu, a její sůl. Jejich pH se jen málo mění se zředěním. Přídavek silné kyseliny nebo zásady působí sice změnu poměru koncentrace kyseliny a soli, avšak vliv na pH celé tlumicí směsi je malý. pH pufru je závislé na síle

slabé kyseliny, resp. zásady, což charakterizují příslušné disociační konstanty, a na poměru koncentrací kyseliny, resp. zásady a její soli. Při výpočtu pH pufru se vychází ze základní rovnice disociace slabé kyseliny či zásady

$$HA + H_2O \rightarrow A^- + H_3O^+, resp. \quad (2.7)$$

$$B + H_2O \rightarrow BH^+ + OH^-, \quad (2.8)$$

pro které lze odvodit termodynamické disociační konstanty K_a (dis. konst. acidity) resp. K_b (dis. konst. bazicity). Z těchto konstant lze dále získat jednoduchou úpravou výraz pro aktivitu oxoniových kationtů

$$K_a = \frac{a_{A^-}.a_{H_3O^+}}{a_{HA}}, \text{ resp. } K_b = \frac{a_{BH^+}.a_{OH^-}}{a_B} \text{ a} \quad (2.9)$$

$$a_{H_3O^+} = \frac{K_a.a_{HA}}{a_{A^-}}, \text{ resp. } a_{OH^-} = \frac{K_b.a_B}{a_{BH^+}} \rightarrow a_{H_3O^+} = \frac{K_w.a_{BH^+}}{K_b.a_B}, \quad (2.10)$$

kde K_w představuje iontový součin vody jako termodynamickou konstantu autoprotolýzy vody, takže platí $K_W = a_{H_3O^+}.a_{OH^-}$.

Zohledňují se tedy aktivity jednotlivých iontů, které lze vypočítat jako součin koncentrace iontu c v roztoku a jeho aktivitního koeficientu γ. Aktivita slabé kyseliny HA nebo slabé zásady B je rovna její koncentraci, neboť její aktivitní koeficient γ(HA) či γ(B) se rovná 1. Potom lze získat logaritmováním a následným dosazením rovnovážných koncentrací a aktivitních koeficientů následující vztahy

$$\log K_a = \log a_{H_3O^+} + \log \frac{a_{A^-}}{a_{HA}}, \text{ resp. } \log K_b = -\log a_{H_3O^+} + \log K_w + \log \frac{a_{BH^+}}{a_B} \text{ a} \quad (2.11)$$

$$\log a_{H_3O^+} = \log K_a + \log \frac{c_{HA}}{c_{A-}.\gamma_{A-}}, \text{ resp. } \log a_{H_3O^+} = \log K_w - \log K_b + \log \frac{c_{BH^+}.\gamma_{BH^+}}{c_B}. \quad (2.12)$$

Podle definice pH platí, že se jedná o záporně vzatý dekadický logaritmus aktivity vodíkových kationtů, takže pH = $-log\ a_{H+}$, resp. oxoniových iontů $pH = -\log a_{H_3O^+}$. Zároveň se v tomto duchu zavádí záporně vzatý dekadický logaritmus pravé disociační konstanty K_a nebo K_b tedy pK_a = $-log\ K_a$ nebo pK_b = $-log\ K_b$

$$pH = pK_a + \log \frac{c_{A^-}.\gamma_{A^-}}{c_{HA}}, \text{ resp. } pH = pK_w - pK_b + \log \frac{c_B}{c_{BH^+}.\gamma_{BH^+}}. \quad (2.13)$$

Hodnota koeficientu $\gamma_\pm$ je ovlivněna především iontovou sílou roztoku definovanou vztahem

$$I = \frac{1}{2}\sum_{i=1}^{i=n} c_i.z_i^2, \quad (2.14)$$

což znamená, že se jedná o součet všech součinů koncentrace příslušných iontů c_i a čtverců jejich nábojů z_i.

V praxi se často místo aktivit iontů používají jejich rovnovážné koncentrace a místo pravých termodynamických disociačních konstant koncentrační disociační konstanty K'_a a K'_b, pro které platí následující obdobné vztahy

$$K'_a = \frac{[A^-].[H_3O^+]}{[HA]} \text{ a } K'_b = \frac{[BH^+].[OH^-]}{[B]}. \tag{2.15}$$

Výraz 2.15 lze dále upravit tak, aby bylo možné přímo vypočítat pH příslušného pufru. Touto cestou se lze dobrat ke zjednodušené Hendersonově-Hasselbalchově rovnici

$$[H_3O^+] = K'_a.\frac{[HA]}{[A^-]}, \text{ resp. } [H_3O^+] = \frac{K_w.[BH^+]}{K'_b.[B]}, \tag{2.16}$$

$$-\log[H_3O^+] = -\log K'_a - \log\frac{[HA]}{[A^-]}, -\log[H_3O^+] = -\log K_w + \log K'_b + \log\frac{[B]}{[BH^+]}, \tag{2.17}$$

$$pH = pK'_a + \log\frac{[A^-]}{[HA]}, \text{ resp. } pH = pK_w - pK'_b + \log\frac{[B]}{[BH^+]}. \tag{2.18}$$

Z výše zapsané rovnice je zřejmé, že pokud je koncentrace soli právě rovna koncentraci kyseliny nebo baze, je pH tlumivého roztoku rovno pK'_a příslušné slabé kyseliny resp. zásady

$$[A^-] = [HA] \rightarrow \log\frac{[A^-]}{[HA]} = log\ 1 = 0 \rightarrow pH = pK'_a. \tag{2.19}$$

Tato rovnice pro výpočet pH tlumivého roztoku platí přesně pouze pro obor dvou jednotek pH, a to pro pK'_a $(pK'_b) \pm 1$. Při nižších i vyšších hodnotách pH je nutné zavést další členy vyjadřující vlastní disociaci slabé kyseliny, a v přítomnosti velkého nadbytku soli (vyšší pH) je také potřeba přihlédnout k reakci aniontů s vodou za tvorby málo disociované kyseliny (hydrolýze). Dále je při zpřesňování výpočtů nutné zohlednit iontovou sílu roztoku.

2.3. Pufrační kapacita

Kvantitativní mírou tlumicí schopnosti pufru je kapacita tlumicí směsi β neboli pufrační kapacita, definovaná vztahem

$$\beta = \frac{dc_B}{dpH} = -\frac{dc_A}{dpH}, \tag{2.20}$$

kde c_B značí koncentraci silné zásady a c_A koncentraci silné kyseliny, které jsou přidávány k pufru. Pufrační kapacita má hodnotu jedna, způsobí-li jednotková změna koncentrace

přidávané silné zásady (nebo silné kyseliny) změnu pH také o jednotku. Tlumivá kapacita je tedy dána (při záměně koncentrace analytické za relativní rovnovážnou koncentraci) poměrem infinitezimální změny koncentrace soli $d[A^-]$ vzniklé přídavkem kyseliny nebo zásady, ku odpovídající změně pH o dpH.

Pufrační kapacita β závisí na poměru koncentrací soli a slabé kyseliny $[A^-]/[HA]$, resp. c_B/c_A (viz obr. 1, str. 8) a na celkové koncentraci roztoku pufru, resp. při konstantním poměru $[A^-]/[HA]$ (c_B/c_A) na koncentraci slabé kyseliny c_A (viz obr. 2, str. 8). Pro danou koncentraci má tlumivý roztok největší hodnotu pufrační kapacity tehdy, když se rovnají koncentrace kyseliny a její konjugované zásady, takže poměr $[A^-]/[HA]$ je roven jedné a pH roztoku se rovná pK'_a (viz obr. 1, str. 8).

Vztah pro pufrační kapacitu je možné získat derivací Hendersonovy-Hasselbalchovy rovnice.

$$pH = pK'_a + \log\frac{c_B}{c_0 - c_B} , \tag{2.21}$$

kde c_0 je celková koncentrace slabé kyseliny, c_B koncentrace silné zásady ve výsledném roztoku a $c_0 - c_B$ koncentrace nedisociovaných molekul slabé kyseliny. Derivací podle c_B dostáváme vztah

$$2{,}303.\frac{dpH}{dc_B} = \frac{c_0}{c_B.(c_0 - c_B)} . \tag{2.22}$$

Odtud se jednoduchou úpravou získá výraz

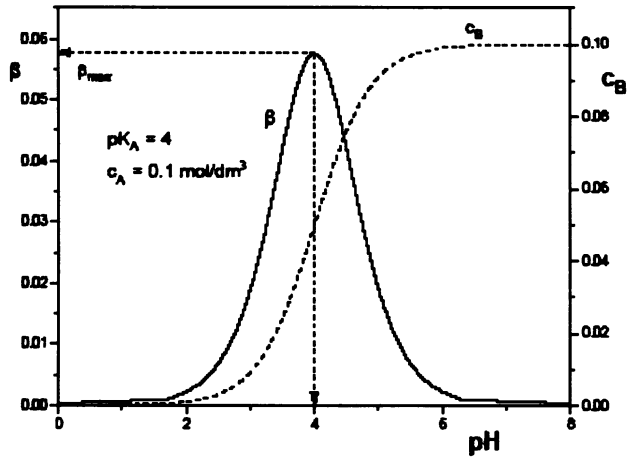
$$\frac{dc_B}{dpH} = \beta = 2{,}303.c_B\left(1 - \frac{c_B}{c_0}\right) . \tag{2.23}$$

Pro maximum $(d\beta/dc_B = 0)$ platí

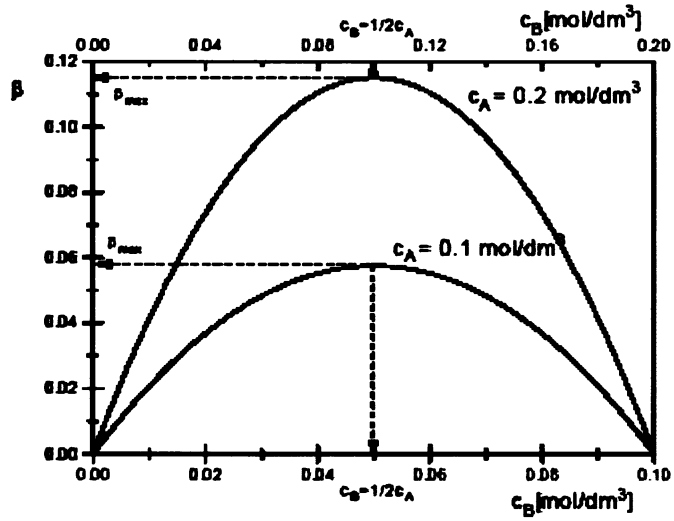
$$\frac{d\beta}{dc_B} = 0 = 2{,}303.\left(1 - \frac{2c_B}{c_0}\right) , \tag{2.24}$$

tedy slabá kyselina je právě z jedné poloviny neutralizována silnou zásadou $(c_B = 1/2c_0)$ a koncentrace soli je rovna koncentraci slabé kyseliny (viz obr. 1, str. 8).

Za jistých okolností je možné použít pro praktický výpočet malých, ale konečných změn v koncentracích soli a pH, takže upravený vztah je $\beta = \Delta[A^-]/\Delta pH$. Ze všch popsaných poznatků vyplývá, že je vhodné používat tlumivé roztoky o dostatečné koncentraci a volit takovou bázi nebo kyselinu , aby $pH = pK'_a \pm 1$.



Obr. 1: Závislost pufrační kapacity β na pH (plná čára), vztah koncentrace podané silné zásady c_B a pH roztoku (přerušovaná čára), vztah koncentrace podané silné zásady c_B a pufrační kapacity β, převzato z /7/, upraveno



Obr. 2: Závislost pufrační kapacity β na koncentraci podané silné zásady c_B při konstantních koncentracích slabé kyseliny v pufru c_A (c_A = *0,1 mol/dm^3 a* c_A = *0,2 mol/dm^3*), převzato z /7/, upraveno

2.4. Amfoterní elektrolyty – aminokyseliny jako amfoterní elektrolyty /8/

Amfoterní elektrolyty jsou elektrolyty, které mohou v roztoku odštěpovat i přijímat protony, takže mají povahu současně slabé kyseliny i slabé zásady. Disociace příslušného amfolytu ve vodném prostředí může být charakterizována jak disociační konstantou acidity K_a, tak disociační konstantou bazicity K_b.

Aminokyseliny se řadí právě mezi elektrolyty, jež v roztocích projevují jak kyselý, tak zásaditý charakter a jsou díky své rozšířenosti jedním z nejnázornějších příkladů

amfolytických vlastností. V molekule každé aminokyseliny je kyselou skupinou skupina karboxylová a zásaditou skupinou potom skupina aminová. U některých aminokyselin jsou přítomny další charakteristické skupiny, které ovlivňují celkovou reakci aminokyseliny. Disociaci aminokyselin ve vodných roztocích lze popsat rovnicemi, které vystihují jejich kyselý i zásaditý charakter

$$NH_2RC'OOH + H_2O \leftrightarrow NH_2RCOO^- + H_3O^+ \quad K_a = \frac{a_{H_3O^+}.a_{NH_2RC'OO^-}}{a_{NH_2RC'OOH}} \text{ a} \qquad (2.25)$$

$$H_2O + NH_2RC'OOH \leftrightarrow OH^- + NH_3^+RCOOH \quad K_b = \frac{a_{OH^-}.a_{NH_3^+RC'OOH}}{a_{NH_2RC'OOH}}. \qquad (2.26)$$

Tyto ionty poté reagují opět ve vodném prostředí

$$NH_3^+RC'OOH + H_2O \leftrightarrow NH_3^+RCOO^- + H_3O^+, \quad K_{a1} = \frac{a_{NH_3^+RC'OO^-}.a_{H_3O^+}}{a_{NH_3^+RC'OOH}}, \qquad (2\ 27)$$

a účastní se dalších reakcí

$$NH_3^+RC'OO^- + H_2O \leftrightarrow NH_2RCOO^- + H_3O^+, \quad K_{a2} = \frac{a_{NH_2RC'OO^-}.a_{H_3O^+}}{a_{NH_3^+RC'OO^-}}, \qquad (2.28)$$

Vztah mezi konstantami K_{a1} a K_{a2} a konstantami K_a a K_b lze popsat jako

$$K_{a1}.K_{a2} = \frac{K_w.K_a}{K_b}, \qquad (2.29)$$

kde K_w zastupuje iontový součin vody.

2.5. Izoelektrický bod

Izoelektrický bod je označení pro pH roztoku, v němž daný amfolyt zaujímá elektricky neutrální stav, takže množství kladných a záporných nábojů je stejné.

Izoelektrický bod s využitím konstant z výrazů 2.27 a 2.28 vystihuje následující výraz

$$K_{a1}.K_{a2} = \frac{a_{NH_2RC'OO^-}.a^2_{H_3O^+}}{a_{NH_3^+RC'OOH}} = \frac{c_{NH_2RC'OO^-}}{c_{NH_3^+RC'OOH}}.\frac{\gamma_{NH_2RC'OO^-}}{\gamma_{NH_3^+RC'OOH}}.a^2_{H_3O^+}, \qquad (2.30)$$

kde c_i značí koncenraci a γ_i aktivitní koeficient i-té součásti roztoku.

Je-li koncentrace kladných i záporných iontů amfoterního elektrolytu stejná, je podíl iontů nesoucích určitý celkový kladný a celkový záporný náboj (první podíl na pravé straně rovnice) roven jedné a pro izoelektrický bod *pI*, pak dostáváme vztah

$$a^2_{H_3O^+} = K_{a1}.K_{a2}.\frac{\gamma_{NH_3^+RC'OOH}}{\gamma_{NH_2RC'OO^-}}. \qquad (2.31)$$

Za vhodných podmínek, tzn. ve velmi zředěných roztocích, nastává rovnost mezi oběma aktivitními koeficienty, tedy aktivitními koeficienty kationtu a aniontu aminokyseliny.

$$\frac{\gamma_{NH_3^+RCOOH}}{\gamma_{NH_2RCOO^-}} = 1 \ . \tag{2.32}$$

Spojením předchozích vztahů a následným logaritmováním lze získat výslednou rovnici

$$a^2_{H_3O^+} = K_{a1}.K_{a2}\,, \tag{2.33}$$

$$2.\log a_{H_3O^+} = \log K_{a1} + \log K_{a2}\,, \tag{2.34}$$

$$pI = -\log a_{H_3O^+} = \frac{pK_{a1} + pK_{a2}}{2}\,, \tag{2.35}$$

kde pI značí pH izoelektrického bodu, pK_{a1} a pK_{a2} záporně vzatý dekadický logaritmus konstant K_{a1} a K_{a2}. Platí, že je uvažován izoelektrický bod zředěného roztoku amfoterního elektrolytu.

Izoelektrický bod je jako důležitá charakteristika roztoků aminokyselin a dalších přírodních látek (bílkovin) určován převážně konduktometricky, protože elektrická vodivost roztoku příslušného elektrolytu má v izoelektrickém bodě minimum, stejně tak i řada jiných vlastností (např. viskozita, rozpustnost).

3. Měření pH

3.1. Principy měření pH /9 – 12/

Podle již dříve uvedených definic v literatuře představuje pH záporně vzatý logaritmus relativní aktivity vodíkových iontů./9/ Tato definice je pouze teoretická, protože pH představuje bezrozměrnou veličinu kvantifikující aktivitu jediného iontu v roztoku a ta je neměřitelná. pH nelze určovat v absolutní hodnotě, vždy jen jako rozdíl pH měřeného roztoku a pH zvoleného standardu.

Základní metodou pro zjišťování pH je potenciometrie, kdy se pH měří jako elektromotorické napětí (síla) článku. Každý článek se skládá z elektrody indikační a referentní. Jako indikační elektrody lze při stanovování pH použít elektrody vodíkové, chinhydronové, skleněné, oxidové a další. Zcela zásadní význam mezi těmito měřeními má vodíková elektroda. Jako referentní elektrody, přímo zavedené do roztoku, spojené s roztokem kapalinovými můstky nebo přímo spojené do jednoho celku s indikačními

elektrodami (kombinované), slouží elektrody nasycené kalomelové, argentchloridové, thallium-amalgamové a další. Stále častěji se v praxi běžně používají nové metody založené na polovodičových technikach typu FET (field-effect transistor), MOSFET (metal-oxide-semiconductor FET) a IGFET (insulated-gate FET) sensorů. Pro účely měření koncentrace iontů v roztoku (včetně koncentrace vodíkových kationtů, tedy pH) byly vyvinuty jako modifikace předchozích typů sensory označované jako ISFET (ion-sensitive field effect transistor).[13]

3.2. Měření pH vodíkovou elektrodou

Toto měření je klíčové pro definici pH, v běžné praxi se však nepoužívá. Měřící článek se skládá z vodíkové a referentní elektrody. Vodíková elektroda je tvořena platinovým či palladiovým plíškem nebo drátkem pokrytým platinovou černí (kovovou platinou elektrolyticky vyloučenou z roztoku kyseliny chloroplatičité), je sycena plynným vodíkem připraveným rovněž elektrolyticky a ponořena do analyzovaného roztoku.[6]

Z hodnot elektromotorického napětí článku E se při známém potenciálu referentní elektrody E_{ref} vypočítá potenciál vodíkové elektrody E_{H_2} jako

$$E_{H_2} = E_{ref} - E \ . \tag{3.1}$$

Po dosazení výrazu pro potenciál standardní vodíkové elektrody získáme vztah

$$\frac{RT}{F}.\ln a_{H^+} = E_{ref} - E \, , \tag{3.2}$$

kde R je univerzální plynová konstanta *(R = 8,314 J/mol.K)*, F zastupuje Faradayovu konstantu *(F = 96485 C/mol)* a T představuje termodynamickou teplotu.
Použitím výrazu pro výpočet pH z hodnot aktivity vodíkových iontů dostáváme výraz

$$pH = \frac{E - E_{ref}}{2{,}303.\frac{RT}{F}} \, . \tag{3.3}$$

Postup při měření pH vodíkovou elektrodou spočívá v porovnání elektromotorické síly článku $E(X)$ obsahujícího roztok o neznámém $pH(X)$ s elektromotorickou silou článku $E(S)$ se standardem o známém $pH(S)$ [9, 10]

referentní elektroda | KCl (aq, nas) | | roztok X - neznámý | H_2 | Pt $\quad E(X)$, (3.4)

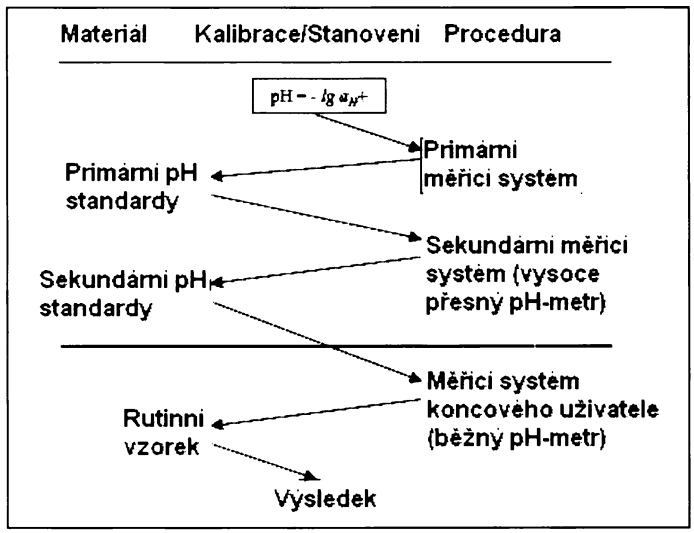
referentní elektroda | KCl (aq, nas) | | roztok S - standard | H_2 | Pt $\quad E(S)$. (3.5)

pH měřeného roztoku se vypočte podle výrazu

$$pH(X) = pH(S) + \frac{E(S) - E(X)}{2{,}303.\frac{RT}{F}}, \qquad (3.6)$$

kde použité symboly jsou popsány u výrazu 3.2 a v textu. Oba články použité pro měření mají mít konstatní shodné podmínky – tzn. teplotu, tlak plynného vodíku a referentní elektrodu.

Standardy použité pro měření pH lze dělit na primární (PS) a sekundární (SS).[9] Primární standardy jsou pufry připravené z látek, které lze připravit velmi čisté, takže jsou dostupné jako ceritifikovaný referentní materiál, a jejichž roztoky jsou stabilní po dostatečně dlouhou dobu. Dalšími požadavky jsou nízká hodnota zbytkového potenciálu kapalinového kontaktu a hodnota pH v rozmezí 3 až 11. Mezi tyto standardy se řadí např. nasycený hydrogentartarát draselný; dihydrogencitrát draselný 0,1 mol/kg; hydrogenfosforečnan sodný 0,025 mol/kg; dihydrogenfosforečnan draselný 0,025 mol/kg; hydrogenfosforečnan sodný 0,3043 mol/kg; dihydrogenfosforečnan draselný 0,00869 mol/kg, tetraboritan sodný 0,01 mol/kg, hydrogenuhličitan sodný 0,025 mol/kg nebo uhličitan sodný 0,025 mol/kg. Jejich pH při zvolené teplotě je dostupné v tabulkách. Sekundární standardy splňují jen částečně kritéria platná pro primární standardy, používají se ve vodných roztocích v různých koncentracích zcela podle potřeb měření a jejich počet je prakticky neomezený. Při zavádění nových metod pro měření pH je důležité dodržovat postupnou hierarchii standardů pro zajištění přesnosti a reprodukovatelnosti výsledků (viz obr. 3). [14]



Obr.3: Schéma postupu při měření pH, převzato z /14/, upraveno

Vodíková elektroda se používá především v základním chemickém výzkumu a to zejména tehdy, jsou-li kladeny na měření maximální požadavky přesnosti. Umožňuje stanovení pH s přesností na ± 0,01 a navíc s ní lze měřit pH i v alkalické oblasti.

Nedostatky vodíkové elektrody jsou však také četné. Nelze ji použít v roztocích obsahujících těkavé látky a redoxní systémy. Některé látky působí na vodíkovou elektrodu jako katalytické jedy, poněvadž způsobují velice pomalé ustalování potenciálu a při větších koncentracích nereprodukovatelnost výsledků. Rušivě působí přítomnost bílkovin a koloidů ve větších koncentracích.[11]

3.3. Měření pH skleněnou elektrodou [9 - 12]

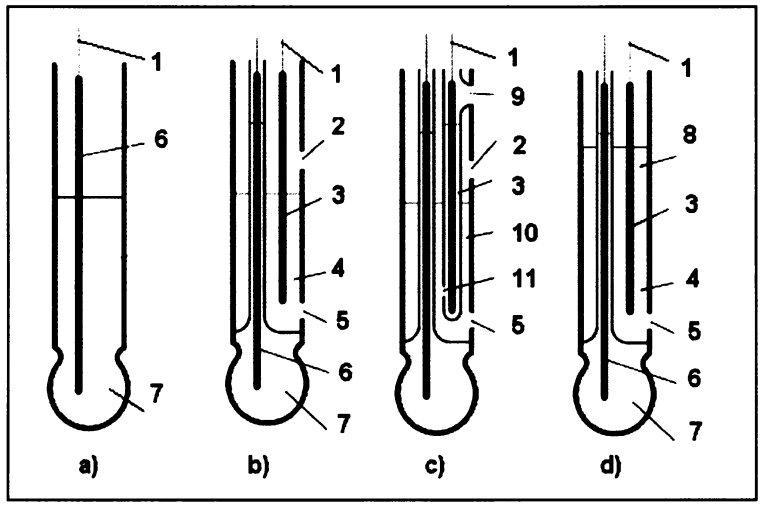
V běžném výzkumu stejně jako v chemické, biochemické i lékařské praxi se pro meření pH využívají sekundární metody a měřící systémy. Těchto metod existuje velké množství, pravděpodobně nejrozšířenější z nich je měření skleněnou elektrodou. Řada prací se zabývá srovnáváním různých měřících systémů a možnostmi jejich zpřesnění. [15]

Základem funkce této elektrody je selektivní permeabilita tenké skleněné membrány, jež je propustná pro vodíkové ionty a prakticky nepropustná pro ionty ostatní. Proto se skleněná elektroda řadí mezi tzv. iontově selektivní elektrody. Na membráně se ustavuje potenciál, jenž je popisován rovnováhou výměny vodíkových iontů z roztoku, do kterého je elektroda ponořena, za sodné ionty z povrchu skla.

Prostá skleněná elektroda (viz obr. 4, str. 14) je tvořena základním kmenem ze silného odolného skla zakončeného výše zmíněnou tenkou membránou ze skla velmi křehkého a citlivého. Tvar zakončení je převážně kulovitý, ale jsou možné i jiné tvary pro speciální aplikace. Elektroda je naplněna roztokem a vybavena vnitřní referentní elektrodou. Vnitřní roztok je buď kapalný nebo gelovitý, vždy má ale konstantní koncentraci vodíkových kationtů. Používají se nasycené roztoky KCl, HCl nebo různé pufry. Kombinované elektrody (viz obr. 4, str. 14) obsahují navíc ještě zabudovanou vnější referentní elektrodou.

Při měření pH je tenkostěnná baničkа skleněné elektrody ponořena do měřeného roztoku. Referentní elektrody jsou v kontaktu s oběma roztoky a v takto vzniklém článku propouští skleněná membrána pouze vodíkové ionty. Vzniklý potenciál je zjišťován připojeným pH-metrem. Kontakt s analyzovaným roztokem má podobu tenké kapiláry, keramické zátky, frity apod. Jako referentní elektrody se používají zejména elektrody argentchloridové nebo kalomelové. U argentchloridových referentních elektrod lze vypozorovat v roztocích o malé vodivosti ztrátu stability kapalinového kontaktu mnohem

výrazněji než u elektrod kalomelových. Výsledkem je porucha rovnováhy na membráně elektrody z důvodu nekontrolovaného průtoku iontů a kontaminace vnitřního roztoku. Úprava referentních elektrod pro zpřesnění měření je cílem řady současných prací. /16/



Obr. 4: Schéma vybraných typů elektrod (skleněná, kombinovaná), převzato z /17/, upraveno
a) prostá skleněná elektroda – v dnešní době je uspořádání skleněná elektroda a od ní oddělená referentní elektroda již opuštěno; b) kombinovaná elektroda s jedním kontaktem – základní typ kombinované elektrody s jedním kontaktním místem; c) kombinovaná elektroda s dvojitým kontaktem – pokročilý typ kombinované elektrody s delší životností, ale nákladnější; d) kombinovaná elektroda s gelovou náplní – jednodušší použití a uchovávání, ale kratší životnost, protože „kontaminový gel" nemůže být vyměněn
Popis: 1 – připojení k pH-metru, 2 – plnicí otvor elektrody, 3 – vnější referentní elektroda (nejčastěji Ag/AgCl), 4 – vnitřní roztok referentní elektrody (např. nasycený roztok KCl), 5 – kontakt elektrody – malý otvor krytý porózní membránou nebo keramickou destičkou, 6 – vnitřní referentní elektroda, 7 – baňka skleněné elektrody ze speciálního skla, naplněná vnitřním roztokem o konst. známém pH s vrstvičkou krystalů, 8 – gel – zpomaluje odtékání vnitřního roztoku, ale nezabraňuje difúzní výměně iontů přes kontakt, 9 – plnicí otvor referentní elektrody, 10 – přídavná komora referentní elektrody, 11 – kontakt referentní elektrody

Teoretický rozbor lze provést pro tradiční kombinovanou elektrodu s vnější i vnitřní referentní nasycenou kalomelovou elektrodou, kde roztok I je vnitřní roztok o známé aktivitě protonů (pH_I) a roztoku II je vnější, u něhož pH měříme (pH_{II}). Schematicky /6/:

$$Hg\ (l)\ |\ Hg_2Cl_2\ (s),\ KCl\ (nas)\ |\ roztok\ I\ (a_{H+} = a_I)\ |\ roztok\ II\ (a_{H+} = a_{II})\ KCl\ (nas),\ Hg_2Cl_2\ (s)\ |\ Hg\ (l) \quad (3.7)$$

Elektromotorická síla článku se řídí rovnicí

$$E = \frac{RT}{F}.\ln\frac{a_{(H^+)I}}{a_{(H^+)II}}. \qquad (3.8)$$

Výsledný tvar po úpravě je

$$pH_{II} = pH_I + \frac{\Delta E}{2{,}303.\frac{RT}{F}}. \qquad (3.9)$$

pH_{II} měřeného roztoku je lineární funkcí pouze zjištěné elektromotorické síly ΔE sestaveného článku, protože všechny ostatní veličiny rovnice 3.9 jsou konstantami. Před měřením je potřeba každou skleněnou elektrodu kalibrovat pomocí roztoků o známém pH a až poté je měření v oblasti 1 až 10 spolehlivé a plně reprodukovatelné.

Článek se skleněnou indikační elektrodou má značný vnitřní odpor, a proto je nutné při měření jeho elektromotorické síly použít citlivější přístroje, transistorové voltmetry. Odpor skleněné elektrody je dán především tloušťkou membrány a druhem skla, z kterého je vyrobena. Podle odporu se dělí skleněné elektrody na nízkoohmové (10^5 až 10^6) a vysokoohmové (10^7 až 10^8). Tloušťka membrány dosahuje řádově setiny až desetiny milimetrů. Sklo použité na výrobu elektrody je voleno tak, aby mělo relativně dobrou elektrickou vodivost a zároveň malou rozpustnost, zvláště v alkalické oblasti. Často používaným typem je sklo označované jako Corning 015 zavedené McInnesem, jež obsahuje 72% SiO_2, 6% CaO a 20% Na_2O. Zvýšení vodivosti zajišťuje přídavek oxidů těžkých kovů a zmenšení alkalické chyby náhrada oxidu sodného oxidem lithným. Elektrody s obsahem lithia se označují jako alkalické, protože umožňují měření pH i v alkalických oblastech (pH 13).[11, 12]

Při měření nelze v roztocích neznámé iontové síly očekávat větší přesnost než ± 0,05. Při přibližně známé iontové síle a složení roztoku, kdy lze zjistit velikost tzv. kapalinového potenciálu, je přesnost stanovení pH přibližně ± 0,02. Měření je rychlé a neruší je přítomnost oxidačních ani redukčních látek. Před měřením je nutné elektrodu vložit do destilované vody, přičemž doba nutná k úpravě jejího povrchu je závislá na druhu elektrody a činí hodiny až dny. Stejně tak v době, kdy je elektroda v klidu, musí být ponořena ve vodě, resp. ve vhodném pufru, protože se tak předejde oschnutí, kdy by se vysušil křemičitý gel z povrchu. V případě alkalické elektrody se doporučuje boritanový pufr. Dalším problémem zjišťování pH tímto typem elektrod mohou být polymerní látky, zejména bílkoviny, které mohou na povrchu tvořit nepropustný film a zabraňovat tak kontaktu elektrody s roztokem.[10 – 12]

Výhody skleněné elektrody:[9 - 12]

1) Závislost potenciálu v rozmezí hodnot pH 1 až 10 je lineární a u elektrod ze speciálního lithného skla je tento rozsah posunut až do pH 14. Některé nové metody dovolují posunout hranici měření pH do velmi vysokých hodnot a předejít typickým problémům, jako je porucha stability kontaktu elektrody s vnějším roztokem, kationtové chyby nebo poškození membrány.[18]
2) Rovnováha na elektrodě je ustavena téměř okamžitě.
3) Elektroda může měřit přesně i v přítomnosti kyslíku, oxidu uhličitého, siřičitého a dalších těkavých složek.
4) Přesnost měření nesnižují ani redoxní děje.
5) Měření lze provádět i v roztocích zakalených a zabarvených, tedy i v koloidních roztocích a emulzích.
6) Práce se skleněnou elektrodou je jednoduchá.
7) Speciální skleněnou elektrodu lze použít i pro mikroanalytická měřítka

Nevýhody skleněné elektrody:[9 - 12]

1) Skleněná elektroda vyžaduje šetrné zacházení.
2) Vzhledem k velkému odporu je nutné použít uzpůsobený voltmetr.
3) Elektroda jeví alkalickou i kyselou chybu.
4) Větší změny teploty mohou ovlivnit měření, projevuje se hystereze v měření pH.

3.4. Měření pH dalšími vybranými elektrodami

1) Chinhydronová elektroda – Chinhydronová elektroda je prakticky jediný organický redoxní systém, který nachází uplatnění při měření pH v praxi. Měření pH pomocí této elektrody je poměrně rychlé a poskytuje spolehlivé výsledky v oblasti kyselé a neutrální, kdežto nad pH 8,5 se uplatňuje vlastní disociace hydrochinonu a v zásaditém prostředí nastává oxidace vzdušným kyslíkem, tudíž je měření vlastně nemožné.[6] Dnes se tato elektroda používá pouze ojediněle, protože může být velice dobře nahrazena elektrodou skleněnou a nebude tedy v této práci dále popisována.
2) Oxidové elektrody – K měření pH se z oxidových elektrod nejčastěji používají elektrody antimonové, bismutové, dále také molybdenové, telurové, wolframové, tantalové, niobové a iridiové.[6] Tyto elektrody (zvláště antimonové a bismutové) jsou vhodné pro potenciometrické sledování neutralizačních titrací, a to i v nevodném

prostředí, nebo pro měření v mikroanalytickém měřítku, či pro některé speciální aplikace.[19, 20]

3.5. Novější metody měření pH

Jak již bylo zmíněno v úvodu této kapitoly, lze pro měření pH použít polovodičové sensory ISFET. Tyto sensory jsou tvořeny křemíkovou vrstvou s polovodiči typu n a p, mezi kterými prochází elektrický proud. Na povrchu této destičky se nachází izolátor (SiO_2), který je u FET sensorů pro měření pH ještě překryt vrstvou Si_3N_4 a celé zařízení je zapouzdřeno kromě oblasti kontaktu s roztokem Vodíkové kationty (ale i jakékoli jiné ionty) jsou u ISFET v přímém kontaktu s povrchem a způsobují tak svým elektrickým nábojem vznik napětí mezi izolátorem a polovodičem. Při změně koncentrace iontů (např. pH) dojde k dostatečné, měřitelné změně napětí. Výhodami těchto sensorů jsou citlivost při měření, odolnost materiálu a delší životnost.[13, 21]

Z dalších moderních modifikací meření pH lze uvést aplikace nových druhů referentních elektrod založených jednak na úpravě stávajících materiálů[22], jednak na vývoji zcela nových, mezi něž můžeme řadit vodivé polymery.[23]

V biochemickém a biomedicínském výzkumu se objevují nové postupy měření pH založené na spektrofotometrickém přístupu. Jedná se o pH sensory na bázi optických vláken, kde i malá změna hodnot pH může být zaznamenána jako výrazný posun vlnových délek maxim absorpčního spektra vybraného indikátoru.[24] Jako inidikátor je vhodný fluoresceinamin imobilizovaný v polymeru detekční sondy.[25, 26] Vhodnou modifikací distálního konce sensoru lze upravovat rozah pH i přesnost jeho stanovení. Jinými příklady jsou detektor obsahující inkorporovaný eosin jako fluorofor a fenolovou červeň jako absorbér[27], nebo detektor s GFP (green fluorescent protein). Výhodou těchto měření je miniaturizace měřící soupravy a možnost jejího použití in vivo (např. GFP jako neinvazivní intracelulární pH indikátor).[28]

4. Potenciometrická titrace

4.1. Principy potenciometrické titrace [4, 5, 6, 10]

Potenciometrická titrace je odměrná analýza, při níž je ekvivalenční bod zjišťován měřením elektromotorické síly vhodného článku. Při potenciometrické titraci se do roztoku obsahujícího titrovanou látku přídává titrační činidlo a po každém přídavku se

zjišťuje elektromotorické napětí (síla) vytvořeného článku. Potenciometrická titrační křivka je potom grafický záznam závislosti tohoto elektromotorického potenciálu na přídavku titračního činidla. Tímto způsobem lze měřit velké množství veličin jako termodynamické disociační konstanty kyselin a zásad, produkty rozpustnosti, konstanty stability komplexů nebo rovnovážné konstanty redoxních dějů. Standardní potenciály lze využít pro zjišťování Gibbsových energií.

Zařízení pro potenciometrickou titraci se vždy skládá z titrační nádobky obsahující titrovaný roztok, elektrody indikační a referentní, míchačky a byrety, kterou se přidává titrační činidlo. Indikační elektroda se volí podle druhu titrované látky. Při srážecích titracích halogenidů je to stříbrná elektroda, při redoxních titracích nejčastěji platinová elektroda, při neutralizačních titracích se používají elektrody pro měření pH, zejména skleněná elektroda. Pro referentní elektrodu se vybírá elektroda kalomelová, argentchloridová, merkurosulfátová a další.

Potenciometrické titrace se dělí zpravidla na 3 základní typy – srážecí, oxidačně redukční a neutralizační titrace.

1) Srážecí potenciometrické titrace představují odměrná stanovení založená na vzniku nerozpustných nebo málo disociovaných solí, popř. komplexních sloučenin. Indikace ekvivalenčního bodu je poměrně přesná. Ostrost bodu ekvivalence v podstatě závisí na součinu rozpustnosti nerozpustné soli vznikající v průběhu reakce. V některých případech je dokonce možné titrovat součásti roztoku postupně po sobě.

2) Oxidačně redukční titrace jsou založené na reakcích, při nichž ionty odevzdávají nebo přijímají elektrony. Analyticky využitelných oxidačně redukčních titrací je velmi mnoho a lze je vesměs potenciometricky sledovat. Indikace bodu ekvivalence je obvykle také velmi ostrá.

3) Do souboru neutralizačních titrací jsou zařazeny titrace založené na vzájemné neutralizaci vodíkových a hydroxidových iontů, tj. na reakci $H^+ + OH^- \rightarrow H_2O$. Neutralizační titrace patří mezi nejčastěji používané titrační metody.

V dalším textu se budeme věnovat pouze neutralizačním titracím a to v jejich nejběžnějším uspořádání.

4.2. Metody vyhodnocování potenciometrické titrace [4 - 6]

Potenc. neutralizační titrací lze zjišťovat hodnoty ekvivalenčních bodů u všech kyselin a zásad, dále hodnoty disociačních konstant u slabých kyselin a zásad a také hodnoty izoelektrických bodů. Při zjišťování těchto údajů lze zvolit metody grafické nebo početní.

Při grafickém zpracování se vychází přímo z titrační křivky nebo z její první či druhé derivace. První derivace se získává tak, že se vede v příslušných bodech tečna a určí se její směrnice (tg α) dE/dV. Hledaný bod odpovídá vždy lokálnímu extrému na křivce první derivace. Při druhé derivaci je spotřeba odpovídající inflexnímu bodu (např. ekvivalenci) v průsečíku křivky derivace s osou objemu.

Početní metoda je obdobná. Do tabulky se zaznamenává spotřeba titračního činidla a příslušné naměřené elektromotorické napětí. Dále se počítá z odpovídajících hodnot kvocient $\Delta E/\Delta V$, kde ΔE představuje rozdíl dvou po sobě následujících hodnot elektromotorického napětí E a ΔV rozdíl dvou po sobě následujících hodnot přidaného objemu titračního činidla. Tento kvocient dosahuje v příslušném bodě maximálních nebo minimálních hodnot. Dále je možné obdobně získat kvocient $\Delta E/\Delta V^2$, který odpovídá druhé derivaci a inflexní bod je určen změnou znaménka.

Velice přínosné pro zpřesnění a zrychlení celého zpracování výsledků je provést část procesů nebo celou operaci pomocí výpočetní techniky po digitalizaci dat.

4.3. Automatická potenciometrická titrace [4 - 6]

U automatické titrace je titrační činidlo přidáváno samočinně pístovou byretou poháněnou motorkem. Napětí článku je přiváděno na vstupní svorky kompenzačního registračního potenciometru nebo tranzistorového voltmetru se zapisovačem. Rychlost posunu papíru je přímo úměrná rychlosti přidávání titračního činidla. U některých přístrojů je naopak výchylka pisátka řízena množstvím přidávaného činidla a rychlost posunu papíru elektromotorickým napětím. U moderních aparatur pro titraci je zpravidla možné použít počítač jak pro vlastní titraci, tak zejména pro vyhodnocování výsledků, veškerá data jsou v digitální podobě.

Při automatické titraci bez zapisovače lze použít pH-metr, který ovládá motor pístové byrety nebo elektromagnetickou tlačku, připojenou na hadičku, kterou vytéká titrační činidlo z byrety. Pístová byreta umožňuje přesnější odečítání objemu titračního činidla.

Další metody titrace představují například titrace k potenciálu inflexe a diferenční titrace. Při titraci k potenciálu inflexe se vedle indikační elektrody zapojuje ještě další oddělená elektroda, jejíž potenciál je roven potenciálu indikační elektrody v inflexním

bodě (v ekvivalenci). Takto sestavený článek bude mít maximální elektromotorické napětí na počátku titrace, s přídavkem titračního činidla se bude tato hodnota snižovat a v inflexi (v ekvivalenci) klesne na nulu. Elektroda nesoucí potenciál rovnající se inflexi je vyrobena ze stejného kovu jako elektroda indikační. Obdobnou metodou je tzv. titrace s protichůdným napětím. V tomto případě se proti napětí článku odvětví z potenciometru napětí, které má tento článek právě v bodě inflexe (ekvivalence). Potenciometrická titrace k potenciálu inflexe je vhodná zejména pro sériová stanovení vzorků, ale zpravidla ji předchází klasická potenciometrická titrace, při níž se zjišťují podmínky pro nastavení potenciálu elekrody (resp. odvětvovaného napětí).

Při diferenční titraci se získává křivka první derivace přímo v experimentu. Existuje několik metod pro tento způsob titrace:

1) Coxova metoda je nejstarší a je založena na měření rozdílu napětí mezi dvěma stejnými indikačními elektrodami, jež jsou ponořeny ve dvou nádobkách s obsahem stejného množství titrovaného roztoku a propojených solným můstkem. Objem titračního činidla přidávaného do obou nádobek současně se má lišit asi o 0,1 ml. Rozdíl v přidání titračního činidla se projeví v rozdílu elektromotorického napětí článku a následně se vynáší závislost $\Delta E/\Delta V$ na přidaném objemu. Maximum křivky je v bodě ekvivalence.

2) MacInnesova metoda je založena na ponoření dvou stejných elektrod do téhož titrovaného roztoku různým způsobem. Jedna elektroda je umístěna v titrovaném roztoku běžným způsobem, kdežto druhá elektroda je umístěna v úzké trubičce přecházející až v kapiláru. Po přidání titrovaného roztoku lze naměřit potenciálový rozdíl, protože elektrody jsou obklopeny roztoky o rozdílném složení. Dochází totiž k nasávání (lze použít i balónek) a vytlačování roztoku z trubičky obklopující druhou elektrodu. Rozdíl v potenciálech elektrod a odpovídající elektromotorické napětí je největší v ekvivalenci.

3) Metoda s brzděnou elektrodou je založena na faktu, že jedna z použitých elektrod je potažena blankou z kolódia nebo agaru, jež zpomaluje difúzi iontů ke kovu elektrody. Tato brzděná elektroda má poněkud odlišný potenciál než druhá elektroda, tedy indikační. Získaný záznam se blíží křivce první derivace.

4) Často používanou metodou je konstrukce derivační křivky při automatické titraci elektronickou cestou použitím tzv. derivačního zapojení titrační soupravy.

5) Možné a díky rozšíření výpočetní techniky stále běžnější je provedení numerické derivace off line, tedy až po změření titrační křivky.

4.4. Průběh neutralizačních titračních křivek [4 – 6, 8]

Titrační křivky kyselin nebo zásad vyjadřují závislost pH na objemu přidaného titračního činidla (silné kyseliny nebo silné zásady). Jsou to grafické záznamy titrace získané potenciometricky, konduktometricky nebo spektrofotometricky. Při potenciometrickém (elektrometrickém) stanovení závisí průběh křivky na síle titrované kyseliny nebo zásady (viz obr. 5 – 7, str. 22).

Pro kyseliny i zásady platí stejné zákonitosti. Při titraci silné kyseliny silnou zásadou nebo opačně je průběh křivky obdobný (viz obr. 5a, 6a; str. 22). Na počátku titrace se pH mění jen pomalu. V bodě ekvivalence se projevuje prudká změna pH. Po dosažení ekvivalence se změna pH opět zpomaluje.

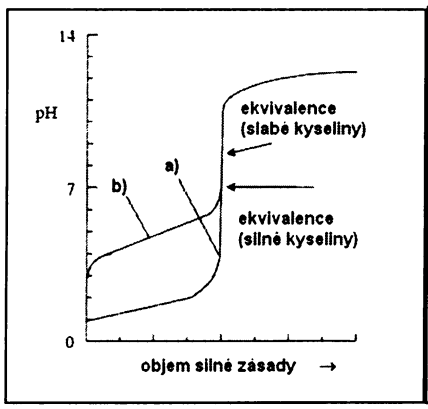
Pro slabé kyseliny platí, že jejich pH je vyšší než pH stejně koncentrované silné kyseliny, protože u slabého elektrolytu se ustavuje rovnováha mezi neutrálními molekulami a ionty (také oxoniovými), takže jejich aktivita (koncentrace) je vždy relativně nižší. Z průběhu titračních křivek (viz obr. 5b, str. 22) vyplývá, že přídavkem malého množství hydroxidu se pH mění intenzivně, ale další přidávání titračního činidla už není na křivce tak patrné. Důvodem tohoto stavu je vznik tlumivého roztoku (pufru), díky čemuž dochází jen k malé změně pH. Závislost pH na přídavku titračního činidla v této oblasti titr. křivky popisuje Hendersonova-Hasselbalchova rovnice (viz kap. 2.2.)

Relativně nejmenší změna pH nastává tehdy, když objem titračního činidla dosáhne právě poloviny ekvivalentního množství odpovídajícího stechiometrii, protože pufrační kapacita vzniklého roztoku je maximální právě tehdy, když se vyrovná koncentrace slabé kyseliny a její soli. V tomto bodě pufrační kapacita dosahuje maxima a změna pH *(dpH)* v závislosti na změně objemu titračního činidla *(dV)* je minimální. Právě $pH_{ekv/2}$ náležící poloviničnímu objemu $(V_{ekv/2})$, než je objem v ekvivalenci (V_{ekv}), se rovná hodnotě pK'_a slabé kyseliny.

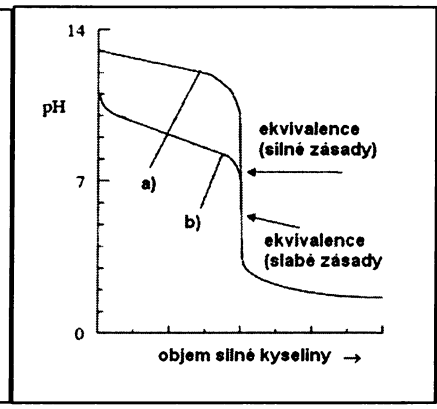
V dalších oblastech lze na křivce pozorovat opět strmější průběh. V bodě ekvivalence je zaznamenána skoková změna pH. Velikost této změny v ekvivalenci přibližně koreluje se sílou příslušné kyseliny. U středně silných kyselin se jedná asi o 3 jednotky pH, u slabých kyselin je tento skok velmi malý až nezřetelný. Oproti silným kyselinám je počáteční část titrační křivky slabé kyseliny esovitého tvaru s jasně pozorovatelným inflexním bodem, který udává hodnotu pK'_a. Obdobný popis platí i pro titrační křivky slabých zásad při jejich titraci silnou kyselinou (viz obr. 6b, str. 22).

Jako titrační činidlo není vhodné používat slabé kyseliny nebo slabé zásady z důvodu zmenšení potenciálových skoků a překrytí vlastní titrační křivky záznamem disociace tohoto titračního činidla (viz obr. 7).

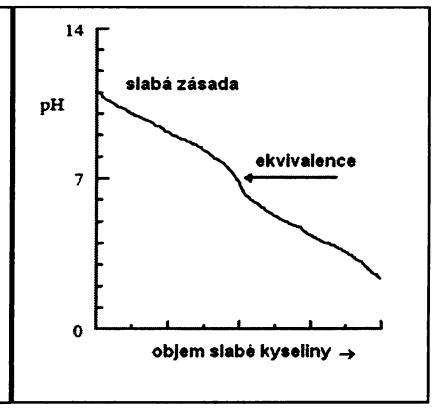
Titrační křivky aminokyselin i bílkovin se podobají křivkám středně silných až slabých kyselin při titraci silnou zásadou (viz obr. 5b). Po alkalizaci titrované směsi je lze přirovnat k titračním křivkám slabých zásad titrovaných silnou kyselinou (viz obr. 6b).



Obr. 5



Obr. 6



Obr. 7

Obr. 5: Titrační křivka a) silné kyseliny b) slabé kyseliny při titraci silnou zásadou, převzato z /29/, upraveno

Obr. 6: Titrační křivka a) silné zásady b) slabé zásady při titraci silnou kyselinou, převzato z /29/, upraveno

Obr. 7: Titrační křivka slabé zásady titrované slabou kyselinou, převzato z /29/, upraveno

5. Acidobazické vlastnosti aminokyselin a bílkovin

5.1. Acidobazické vlastnosti aminokyselin [7, 8, 30]

Aminokyseliny nesou ionizovatelné skupiny, které mohou přijímat i odštěpovat protony v závislosti na pH roztoku. Podle konvence jsou v základním stavu všechny ionizovatelné skupiny zapisovány jako kyseliny, tzn. v protonizované formě. Zásadité skupiny jsou zobrazovány ve formě svých konjugovaných kyselin, tedy jako α-ammonium a ε-ammonium, dále jako imidazolium a guanidinium. Přehled 20 proteinogenních aminokyselin udává tab.1 (str. 23). Disociační konstanty přísluší vždy

daným charakteristickým skupinám, tedy α-karboxylové skupině, α-aminoskupině a specifickým skupinám postranních řetězců příslušných aminokyselin.

Z hodnot uvedených v tabulce 1 vyplývá, že α-karboxylové skupiny aminokyselin mají pK_a nižší než karboxylové skupiny jiných organických kyseliny jako např. kyseliny octová – $pK_a = 4,73$ nebo mravenčí – $pK_a = 3,75$. Aminokyseliny lze tedy označit za středně silné kyseliny z hlediska jejich α-karboxylů. Tento posun souvisí s elektrostatickými vlivy okolních skupin, především skupiny $-NH_3^+$.

Tab. 1: Přehled nejdůležitějších konstant (pK_a a pI) vybraných aminokyselin, převzato z /31/, upraveno

aminokyselina	zkratka	pK_a(-COOH)	pK_a($-NH_3^+$)	pK_a(R)	pI
alanin	Ala, A	2,34	9,69	-	6,01
arginin	Arg, R	2,17	9,04	12,48	10,76
asparagin	Asn, N	2,02	8,80	-	5,41
asparagová kys.	Asp, D	1,88	9,60	3,65	2,77
cystein	Cys, C	1,96	8,18	10,28	5,07
fenylalanin	Phe, F	1,83	9,13	-	5,48
glutamin	Gln, Q	2,17	9,13	-	5,65
glutamová kys.	Glu, E	2,19	9,67	4,25	3,22
glycin	Gly, G	2,34	9,60	-	5,97
histidin	His, H	1,82	9,17	6,10	7,59
isoleucin	Ile, I	2,36	9,68	-	6,02
leucin	Leu, L	2,36	9,60		5,98
lysin	Lys, K	2,18	8,95	10,53	9,74
methionin	Met, M	2,28	9,21	-	5,74
prolin	Pro, P	1,99	10,96	-	6,48
serin	Ser, S	2,21	9,15	13,60	5,98
threonin	Thr, T	2,11	9,62	13,60	5,87
tryptofan	Trp, W	2,38	9,39	-	5,89
tyrosin	Tyr, Y	2,20	9,11	10,07	5,66
valin	Val, V	2,32	9,62	-	5,97

5.1.1. Disociace aminokyselin /7, 8/

V roztocích aminokyselin se ustaluje rovnováha mezi neutrálními molekulami a ionty vzniklými buď prostou disociací, nebo interakcí s rozpouštědlem. Vzniklou rovnováhu popisují stejně jako u jiných slabých elektrolytů disociační konstanty K_a resp. K'_a. V silně zředěných roztocích je možné obě konstanty ztotožnit. V běžné praxi jsou používány disociační konstanty koncentrační, zdánlivé K'_a. Jejich hodnoty se zjišťují titracemi, a proto se označují také jako titrační.

Pro disociaci nejjednodušší aminokyseliny glycinu platí rovnice /32/

$$NH_3^+CH_2COOH + H_2O \leftrightarrow NH_3^+CHCOO^- + H_3O^+ \text{ a} \quad (5.1)$$

$$NH_3^+CH_2COO^- + H_2O \leftrightarrow NH_2CHCOO^- + H_3O^+ , \quad (5.2)$$

popisované disociačními konstantami K'_{a1} a K'_{a2} (viz kap. 2.4). Kation ($NH_3^+CH_2COOH$) je přítomen v kyselém prostředí, kde aniontem je obvykle chloridový iont. V tuhém stavu je pak preparát aminokyseliny (glycinu) většinou jako hydrochlorid. V neutrálním prostředí je aminokyselina (glycin) přítomna ve formě elektricky neutrální, vnitřně ionizované částice, zwitteriontu, amfiiontu neboli dipolárního iontu ($NH_3^+CHCOO^-$). V alkalickém prostředí je aminokyselina (glycin) převedena na anion ($NH_2CH_2COO^-$), který se váže s přítomnými kationty (nejčastěji Na^+).

Při popisu ionizace aminokyselin se využívá veličina *h*, tj. počet protonů, jež je nutné odejmout z výchozího standardního stavu aminokyseliny, aby vznikla daná forma. U neutrálních aminokyselin (např. u glycinu) platí pro kation A^+ $h = 0$, pro obojetný iont $A^{+/-}$ $h = 1$ a pro aniont A^- $h = 2$. U kyselých aminokyselin (např. u kyseliny asparagové) nabývá koeficient *h* postupně hodnot 0, 1, 2 a 3. Jednotlivé formy bazických aminokyselin (např. lysinu) lze charakterizovat koeficienty *h* také o hodnotách 0, 1, 2 a 3. Číselně se tyto hodnoty rovnají chemickým ekvivalentům příslušného titračního činidla.

Hodnoty pravých disociačních konstant aminokyselin pK_a lze získat např. pomocí galvanického článku s vodíkovou a argentchloridovou elektrodou, naplněného roztokem obsahujícím slabou kyselinu, její sodnou sůl a chlorid sodný. Experimentálně se provádí soubor měření elektromotorického napětí tohoto článku při konst. poměru $[HA]/[A^-]$ a pro různou koncentraci NaCl, tedy pro různou iontovou sílu roztoku. Následně vynesením vhodně upravených rovnic pro elektromotorické napětí a extrapolací k nulové hodnotě iontové síly lze získat hodnotu pravé disociační konstanty pK_a.

Z dalších možných postupů pro zjišťování hodnot disociačních konstant pK_a lze uvést ještě konduktometrická a spektrofotometrická stanovení. Při konduktometrii se měří vodivost samotné slabé kyseliny a z ní se z Ostwaldova zřeďovacího zákona vypočítá hodnota pravé disociační konstanty pK_a. Také při spektrofotometrickém stanovení pK_a se volí řada roztoků se stejnou koncentrací rozpuštěné látky, ale s různými hodnotami pH. Obor pH je volen tak, aby v něm došlo k disociaci analyzované látky a zaznamenávají se spektra jednotlivých roztoků.

Vzhledem k popsané složitosti a omezeným možnostem postačují v běžné praxi pouze zdánlivé, tedy koncentrační konstanty odečítané z titračních křivek.

5.1.2. Mikroskopické disociační konstanty [7, 8, 30, 32]

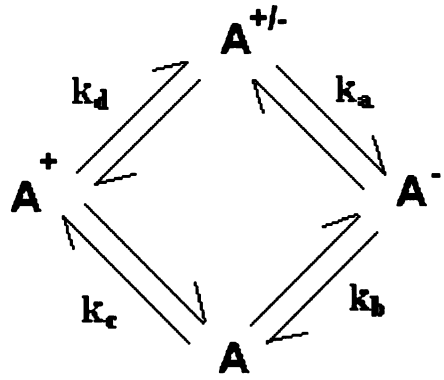
Při podrobnějším posuzování rovnováh v roztocích aminokyselin je nutné vedle titračních disociačních konstant zavést ještě mikroskopické neboli vnitřní disociační konstanty. Do souboru iontů a dipolárních iontů aminokyseliny musíme zahrnout všechny teoreticky možné disociace (např. u glycinu), schematicky na obr. 8.

$$NH_3^+CH_2COO^- \leftrightarrow NH_2CH_2COO^- \qquad k_a, \qquad (5.3)$$

$$NH_2CH_2COO^- \leftrightarrow NH_2CH_2COOH \qquad k_b, \qquad (5.4)$$

$$NH_2CH_2COOH \leftrightarrow NH_3^+CH_2COOH \qquad k_c, \qquad (5.5)$$

$$NH_3^+CH_2COOH \leftrightarrow NH_3^+CH_2COO^- \qquad k_d. \qquad (5.6)$$



Obr. 8: Schéma disociací neutrální aminokyseliny (např. glycinu), převzato z /7/

Konstanty k_a, k_b, k_c a k_d představují vnitřní disociační konstanty glycinu charakterizující rovnováhy vzniklé při disociaci aminokyseliny v jednotlivých krocích. Při zjišťování těchto konstant je potřeba blokovat vždy určité charakteristické skupiny tak, aby byla získána zvolená ionizovaná forma aminokyseliny. Lze například připravit estery příslušných aminokyselin, u nichž probíhá pouze disociace α-aminoskupin $-NH_3^+$, karboxylové skupiny jsou převedeny na odpovídající skupiny esterové, a tak u nich k disociaci nedochází. Mikroskopické disociační konstanty lze využít pro výpočet distribučních diagramů jednotlivých elektrolytických forem aminokyseliny.

Je důležité podotknout, že disociace kationtu (A^+) na anion (A^-) probíhá téměř vždy přes dipolární ion ($A^{+/-}$). K disociaci kationtu přes nenabitou molekulu prakticky nedochází. Poměr tautomerních forem – amfiiontu ($A^{+/-}$) a neutrální molekuly (A) je totiž značně vysoký, např. u glycinu 223000. V dřívějších úvahách se často zmiňovala možnost výskytu nenabité molekuly, tedy bez náboje na charakteristických skupinách, avšak

výsledky různých fyz. a chem. analýz (spektroskopie, dielektrická konstanta, titrace v organických rozpouštědlech) ukázaly, že správnou strukturu představuje dipolární ion.

5.1.3. Makroskopické disociační konstanty [7, 8, 30]

Makroskopické disociační konstanty získáme jako podíl všech rovnovážných koncentrací forem, ze kterých oddisocioval určitý počet vodíkových kationtů (tj. 0, 1 nebo 2) ku sumě rovnovážných koncentrací forem, které jsou výsledkem disociace do dalších stupňů. Velikost makroskopické konstanty je možno vypočítat rovněž z mikroskopických konstant. Makroskopické disociační konstanty pro glycin jsou charakterizovány výrazy

$$K'_1 = \frac{[H_3O^+].([NH_3^+CH_2COO^-]+[NH_2CH_2COOH])}{[NH_3^+CH_2COO^-]} \text{ a} \qquad (5.7)$$

$$K'_2 = \frac{[H_3O^+].[NH_2CH_2COO^-]}{[NH_3^+CH_2COO^-]+[NH_2CH_2COOH]} . \qquad (5.8)$$

U aminokyselin, jako je glycin, které jsou schopny odštěpovat nebo přijímat pouze dva vodíkové kationty, se tyto makroskopické konstanty prakticky rovnají titračním konstantám. Naproti tomu u aminokyselin, které mohou odštěpit nebo přijmout více než dva vodíkové kationty, se makroskopické konstanty od konstant titračních mohou lišit výrazněji.

5.2. Acidobazické vlastnosti bílkovin a jejich titrace [30, 32, 33]

Při rozboru acidobazických vlastností bílkovin hraje důležitou roli fakt, že jsou tvořeny aminokyselinami spojenými vzájemně peptidickými vazbami, na jejichž vzniku se podílí α-karboxylové skupiny a α-aminoskupiny. Ty se tak nemohou uplatnit při acidobazických reakcích. Bílkoviny nesou ionizovatelné skupiny především na postranních řetězcích vázaných aminokyselin. Jedná se o β- a γ-karboxyly asparagové a glutamové kyseliny, ε-aminoskupiny lysinu, hydroxylové skupiny tyrosinu, guanidinové skupiny argininu, imidazolové skupiny histidinu a sulfhydrylové skupiny cysteinu. Kromě těchto funkčních skupin obsahují molekuly bílkovin ještě menší množství koncových α-karboxylových skupin a α-aminoskupin. Důležitým faktem je také to, že hodnoty disociačních konstant daných skupin jsou ovlivňovány elektrostatickými a jinými stínícími faktory sousedních i vzdálenějších skupin (v závislosti na vyšších strukturách bílkovin a na celkovém prostorovém uspořádání). Jako výsledek těchto interakcí se v různých bílkovinách, ale často i v molekule jedné bílkoviny, liší disociační konstanty stejných charakteristických skupin.[30]

Tvar titrační křivky příslušné bílkoviny je velmi složitý a závisí především na množství a typu skupin v postranních řetězcích a na hodnotách jejich pK_a (viz tab. 2). Hodnoty těchto konstant nelze určit přesně a standardizovat je pro všechny bílkoviny, proto se uvádí rozsahy pH, ve kterých dochází k disociaci dané skupiny.[32]

Tab. 2: Přehled rozmezí hodnot pK_a vybraných skupin postranních řetězců bílkovin, převzato z /32/, upraveno

skupina	pK_a
- COOH (α)	3,0 - 3,2
- COOH (aspartyl)	3,0 - 4,7
- COOH (glutamyl)	cca 4,4
imidazolium	5,6 - 7
$- NH_3^+$ (α)	7,6 - 8,4
$- NH_3^+$ (ε)	9,4 - 10,6
C_6H_5 -OH	9,8 - 10,4
- SH	9,1 - 10,8
$- HN(NH_2)C{=}NH_2^+$	11,6 - 12,6

Stanovení počtu ionizovatelných skupin a jejich pK_a lze provést acidobazickou titrací čistých roztoků bílkovin známé koncentrace, tzn. roztoků zbavených všech ostatních iontů.[33] Proteiny stejně jako i další polyelektrolyty mají totiž schopnost vázat malé anorganické i organické ionty, což bylo studováno v mnoha pracích předchozích let.[34] Nejčastěji používanou metodou pro analýzu interakce bílkovin s ionty je konduktometrie, kdy se měří pokles specifické vodivosti roztoku soli po přídavku proteinu.[35, 36, 37] Příprava roztoků potřebných pro titraci spočívá v důkladné dialýze roztoku bílkoviny proti destilované vodě nebo v elektrodialýze. Moderní metody jsou potom založeny na měničích iontů obsahujících katexy a anexy.

Na začátku titrace bílkoviny se k jejímu roztoku přidává vhodná sůl (např. KCl), aby byla dosažena konstantní iontová síla roztoku, jejíž přesně známá hodnota má velký význam zvláště při titraci polyelektrolytů. Následně se provádí vlastní titrace silnou kyselinou (např. HCl) a paralelně silnou zásadou (např. NaOH). Je nutné provést ještě dva slepé pokusy, tedy titrace roztoku KCl stejné koncentrace příslušnou silnou kyselinou a příslušnou silnou zásadou. pH se může měřit různými postupy, např. pomocí systému skeněná/referentní elektroda. Teplota se udržuje konstantní na hodnotě 25°C.[7]

5.2.1. Izoionický a izoelektrický bod bílkovin

V roztoku bílkoviny je dosaženo při titraci v jistém bodě pH označované jako izoionické. Při tomto pH je počet kladně nabitých skupin roven počtu skupin záporně nabitých, kdy tyto skupiny mohly vzniknout výhradně disociací bílkoviny nebo solventu. Původní definice teoreticky popisuje izoionický bod jako pH, při kterém je počet protonů vázajících se na bazické skupiny roven počtu protonů oddisociovaných z kyselých skupin, zatímco izoelektrický bod jako pH, při kterém je celkový průměrný náboj molekuly bílkoviny nulový.

Z důvodu neměřitelnosti těchto bodů podle původní definice v praxi se zavádí nové operační definice. Izoionický bod je vyjádřen jako pH roztoku izoionického materiálu, který po rozpuštění v destilované vodě netvoří vodíkové ani hydroxidové ionty. Izoelektrický bod je definován pomocí elektroforetických vlastností jako pH, při kterém nedochází k migraci bílkoviny ve vnějším elektrickém poli. Při hodnotě izoelektrického pH se rovněž shoduje počet kladně a záporně nabitých skupin, avšak nutné je započítat také náboje příslušející jiným vázaným iontům než vodíkovým.[30]

Izoionické a izoelektrické body se mohou pro určitou bílkovinu výrazně lišit v závislosti na druhu přidané soli a její koncentraci, tedy zvolené iontové síle. Například pro protein BSA (Bovine Serum Albumin) platí, že v 0,15 M roztoku NaCl je jeho izoionický bod při pH 5,37, zatímco izoelektrický bod při pH 4,40. Po snížení koncentrace roztoku NaCl na 0,01 M se hodnota izoelektrického bodu zvýší, a to na pH 4,80, čímž se přiblíží k izoionickému bodu albuminu bez přítomnosti jakékoli soli (pH 4,90). Z těchto údajů je patrné, že zvýšení koncentrace NaCl vede ke zvýšení hodnoty pH izoionického bodu a snížení hodnoty pH bodu izoelektrického. Toto lze vysvětlit větší sílou vazby chloridových iontů na albumin než iontů sodíkových.[30, 33]

Izoelektrický bod pI je významnou charakteristikou bílkovin. Protože je při hodnotě pH odpovídající tomuto bodu celkový průměrný elektrický náboj bílkoviny roven nule, nepohybuje se tato makromolekula ve vnějším elektrickém poli.

5.2.2. Teoretický popis acidobazických vlastností bílkovin

Z rozdílu hodnot pH v pokusu s bílkovinou a bez bílkoviny je možné vypočítat množství vodíkových kationtů vázaných na bílkovinu *h* (viz kap. 5.1.1). Dále je ze známé koncentrace a tedy látkového množství bílkoviny možné určit počet molů vodíkových kationtů vázaných nebo oddisociovaných z 1 molu bílkoviny. Titrační křivka bílkoviny se potom získá vynesením tohoto údaje proti pH. [33]

Při zjišťování pK_a jednotlivých skupin bílkoviny se vychází z teoretického popisu titrace. Je nutné provést některá zjednodušení. Pro matematický model titrace bílkoviny se využívá představa bílkoviny jako koule neprostupné pro molekuly rozpouštědla, na jejímž povrchu je rovnoměrně rozptýlen náboj Z.[38] Tento povrchový náboj je uvažován jako algebraický součet všech dílčích nábojů pozitivních i negativních. Také se dále zohledňuje elektrostatické působení mezi nabitými skupinami molekuly bílkoviny a zohledňuje se i vazba cizích anorganických iontů na molekulu bílkoviny. Jedná se o poměrně složité výpočty, a tak se v praxi používá upravená rovnice vystihující průběh experimentální titrační křivky[39]

$$pH - \log\frac{\alpha}{(1-\alpha)} = pK_i - 0{,}868w.Z\,. \qquad (5.9)$$

pK_i označuje vnitřní disociační konstantu vždy pro příslušný i-tý druh skupiny, což jinými slovy předpokládá rovnocennost příslušných skupin. $1\text{-}\alpha$ označuje podíl nedisociovaných skupin a α vyjadřuje disociační stupeň této i-té skupiny, který se vypočte jako

$$\alpha = \frac{n}{n-h}, \qquad (5.10)$$

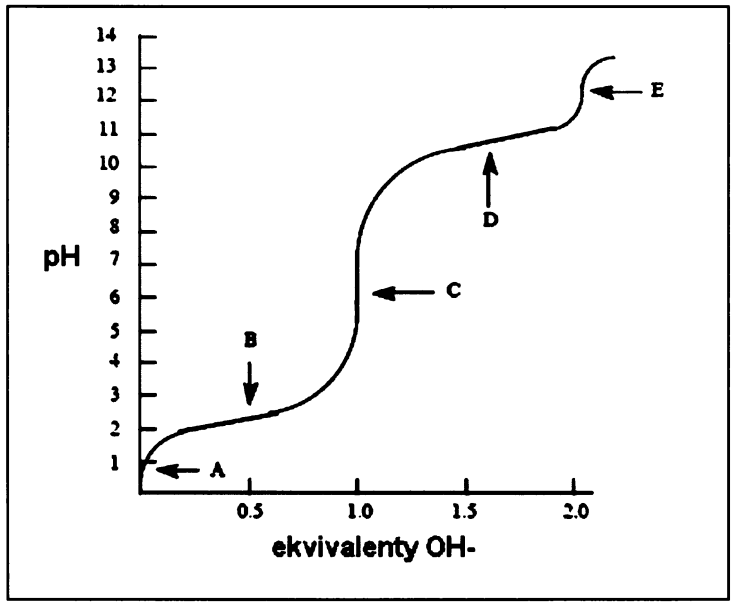
kde n představuje počet skupin typu i, h počet vázaných vodíkových kationtů a $n\text{-}h$ tedy počet oddisociovaných protonů.. Poslední člen rovnice 5.9, tedy $0{,}868wZ$ je korekce pro elektrostatickou interakci mezi náboji na molekule bílkoviny. Veličina Z představuje algebraický součet všech nábojů vzniklých disociací charakteristických skupin a také vazbou anorganických iontů z roztoku. Korekční elektrostatický interakční faktor w závisí na poloměru molekuly, teplotě a iontové síle, avšak nezávisí na typu charakteristické skupiny. Existuje ještě řada dalších modelů pro molekuly jiného tvaru než kulového nebo pro molekuly částečně propustné pro rozpouštědlo.[39]

Hodnota pK_i specifická pro danou charakteristickou skupinu v molekule bílkoviny se zjišťuje vynesením vztahu $pH - \log\frac{\alpha}{1-\alpha}$ proti náboji Z. Následně se extrapoluje pro Z blížící se 0, čímž se získává jednak hodnota pK_i, jednak ze směrnice faktor w. Změny tohoto faktoru v závislosti na pH se vysvětlují jako změna konformace bílkoviny.[38]

6. Interpretace titračních křivek aminokyselin a bílkovin

6.1. Interpretace titračních křivek aminokyselin /7, 8/

Titrační křivky aminokyselin mají tvar a průběh, který je vždy určen přítomností a typem ionizovatelných skupin v jejich molekule. Jak již bylo popsáno, aminokyseliny se dělí podle charakteristických skupin v postranním řetězci na neutrální (např. glycin), kyselé (např. kyselina asparagová) a zásadité (např. lysin). Tyto charakteristické skupiny ovlivňují nejen vlastní hodnoty pH a tedy posun křivky po ose y, ale zejména tvar křivky (inflexní body, potenciálové skoky atd.). Typický průběh titrační křivky neutrální aminokyseliny (glycinu) je zachycen na obr. 9.



Obr. 9: Titrační křivka obecné neutrální aminokyseliny, převzato z /29/, upraveno
Popis: 100 % $^{+}NH_3CHRCOOH$, B: 50 % $^{+}NH_3CHRCOOH$ a 50 % $^{+}NH_3CHRCOO^{-}$, C: 100 % $^{+}NH_3CHRCOO^{-}$, D: 50 % $^{+}NH_3CHRCOO^{-}$ a 50 % $NH_2CHRCOO^{-}$, E: 100 % $NH_2CHRCOO^{-}$

Na titračních křivkách aminokyselin neutrálních, které nenesou v postranních řetězcích nabité skupiny, pozorujeme vždy jen jeden potenciálový skok, jenž odpovídá jak bodu ekvivalence, tak izoelektrickému bodu. V oblastech titrační křivky s mírným stoupáním resp. poklesem se uplatňuje pufrační schopnost vzniklých tlumivých roztoků. V první části titrační křivky se vyskytuje hodnota $pK'_a(-COOH)$, jež leží v bodě odpovídajícím polovině ekvivalence. V druhé části titrační křivky se nalézá $pK'_a(-NH_3^+)$ v bodě 1,5násobku ekvivalentu OH^-.

Z titrační křivky je možné při zjišťování hodnot pK'_a odečítat pufrační kapacitu, a to jako převrácenou hodnotu směrnice tečny k titrační křivce. Směrnice tečny v daném bodě je totiž vyjádřena jako $tg\alpha = \Delta pH/\Delta V$, což odpovídá po úpravě výrazu $\Delta pH/\Delta[A^-] = 1/\beta$.

Platí, že jsou-li hodnoty pK'_a jednotlivých stupňů od sebe dostatečně vzdáleny, pak se získává tolik skoků na titrační křivce aminokyseliny, kolik je stupňů disociace neboli ionizovatelných skupin v její molekule. Pokud jsou si hodnoty pK'_a aminokyselin velmi blízké, pak je nelze při běžném provedení experimentu zaznamenat, protože splývají do jediného skoku.

Při interpretaci titračních křivek aminokyselin je nutné podrobněji analyzovat chování aminokyselin v roztocích v závislosti na změně pH. Je potřeba vtátit se k definici izoelektrické formy, jako jedné ze základních charakteristik. Za izoelektrickou formu se považuje elektricky neutrální stav molekuly aminokyseliny, např. $NH_3^+CH_2COO^-$ (glycin), $HOOCCH_2CHNH_3^+COO^-$ (asparagová kyselina), $NH_3^+(CH_2)_4CHNH_2COO^-$ (lysin) atd. Hodnotu izoelektrického bodu pI lze vypočítat přibližně jako aritmetický průměr příslušných konstant pK'_a (viz kap. 2.5), přitom se ale tento výpočet liší pro aminokyseliny neutrální, kyselé a zásadité.

1) Neutrální aminokyseliny – např. glycin

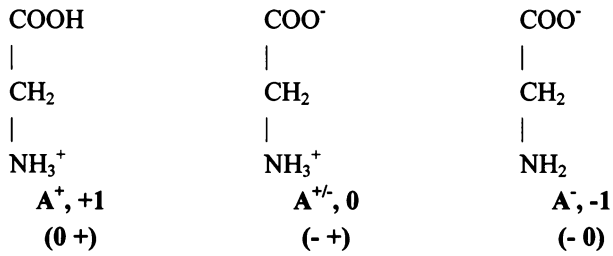
Pro izoelektrický bod glycinu $(pK'_{a1} = pK'_a(\text{-}COOH) = 2{,}34$ *a* $pK'_{a2} = pK'_a(\text{-}NH_3^+) = 9{,}60)$ platí

$$pI = \frac{pK'_{a1} + pK'_{a2}}{2} = \frac{2{,}34 + 9{,}60}{2} = 6\,. \qquad (6.1)$$

U aminokyselin, které nemají v postranních řetězcích nabité skupiny, se dosazují za hodnoty pK'_{a1} a pK'_{a2} hodnoty odpovídající disociačním konstantám α-karboxylové skupiny a α-aminoskupiny.

- Při pH nižším než pK'_{a1} nese neutr. aminokys. (glycin) vždy náboj kladný o hodnotě +1, protože všechny skupiny jsou protonizované a α-aminoskupina je kladně nabitá.
- Mezi hodnotami pK'_{a1} a pK'_{a2} při pI je počet kladných a záporných nábojů právě vyrovnán a výsledný náboj aminokyseliny (glycinu) je 0, protože proběhla deprotonizace karboxylové skupiny, která tím získává jednotkový záporný náboj, kdežto α-aminoskupina zůstává stále protonizována, a má tak jednotkový náboj kladný.
- Při pH vyšším než pK'_{a2} (tzn. v zásadité oblasti) nese neutr. aminokys. (glycin) náboj záporný o hodnotě -1, neboť ze všech skupin oddisocioval proton, karboxyl se vyskytuje ve formě aniontu a proběhla i deprotonizace α-aminoskupiny, která tím náboj ztratila.

Pro shrnutí je uvedeno schéma na obr. 10. V případě glycinu z důvodu velkého rozdílu v hodnotách obou pK'_a hovoříme o izoelektrické oblasti (pH 4 až 7).



Obr. 10: Schéma disociace neutrální aminokyseliny (glycinu) v závislosti na pH

2) Kyselé aminokyseliny – např. kyselina asparagová

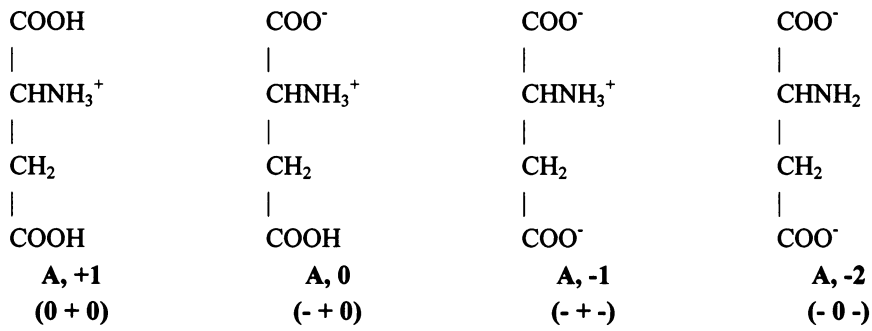
U asparagové kyseliny *($pK'_{a1} = pK'_a(-COOH) = 1,88$, $pK'_{a2} = pK'_{aR} = 3,65$ a $pK'_{a3} = pK'_a(-NH_3^+) = 9,60$)* je hodnota izoelektrického bodu nižší

$$pI = \frac{pK'_{a1} + pK'_{a2}}{2} = \frac{1,88 + 3,65}{2} = 2,77. \qquad (6.2)$$

U aminokyselin nesoucích v postranním řetězci kyselé (záporně nabité) skupiny, jako je kyselina asparagová resp. glutamová, se dosazují za hodnoty pK'_{a1} a pK'_{a2} hodnoty odpovídající disociačním konstantám α-karboxylu a β- resp. γ-karboxylu.

- Při pH nižším než pK'_{a1} je výsledný náboj kyselé aminokys. (kys. asparagové) kladný a má hodnotu +1 díky kladnému náboji protonizované α-aminoskupiny.
- Při pH nacházejícím se mezi hodnotami pK'_{a1} a pK'_{a2} odpovídajícím pI je výsledný náboj právě 0, protože z α-karboxylu se odštěpil proton a má tak záporný náboj -1, zatímco ostatní skupiny zůstávají protonizované, α-aminoskupina nese kladný náboj +1.
- Při pH mezi hodnotami pK'_{a2} a pK'_{a3} nese kyselá aminokys. (kys. asparagová) výsledný náboj záporný -1, poněvadž proběhla disociace kyselé skupiny v postranním řetězci (β-karboxylu), a tak je v molekule kyseliny jednotkový záporný náboj již na obou karboxylech a jednotkový kladný náboj zůstává na α-aminoskupině.
- Při pH dosahujícím hodnot nad pK'_{a3} probíhá disociace všech ionizovatelných skupin v aminokyselině, tedy včetně α-aminoskupiny, a výsledný náboj je proto -2.

Pro shrnutí je uvedeno schéma na obr. 11 (str. 33). U asparagové kyseliny jsou si hodnoty pK'_a velmi blízké, takže izoelektrická oblast je velmi ostrá a úzká, na titrační křivce kyseliny asparagové dokonce splývají oba skoky do jednoho.



Obr. 11: Schéma disociace kyselé aminokyseliny (kys. asparagové) v závislosti na pH

3) Zásadité aminokyseliny – např. lysin

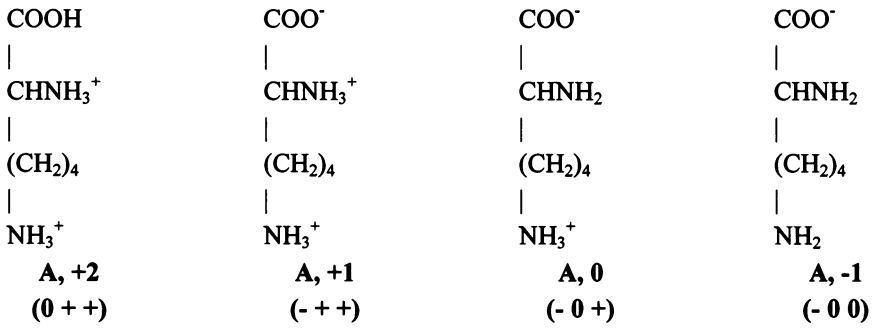
U lysinu *($pK'_{a1} = pK'_a(-NH_3^+) = 8,95$, $pK'_{a2} = pK'_{aR} = 10,53$ a $pK'_{a3} = pK'_a(-COOH) = 2,18$)* je hodnota izoelektrického bodu vyšší než v předchozích případech

$$pI = \frac{pK'_{a1} + pK'_{a2}}{2} = \frac{8,95 + 10,53}{2} = 9,74. \qquad (6.3)$$

U aminokyselin, v jejichž postranních řetězcích se objevují zásadité (kladně nabité) skupiny, jako je lysin, se dosazují za hodnoty pK'_{a1} a pK'_{a2} hodnoty odpovídající disociačním konstantám α-aminoskupiny a příslušné zásadité skupiny postranního řetězce v tomto případě ε-aminoskupiny.

- Při pH nižším než pK'_{a3} je výsledný náboj zás. aminokys. (lysinu) kladný a má hodnotu +2 díky kladným nábojům protonizovaných skupin (α- i ε-aminoskupin).
- Při pH mezi hodnotami pK'_{a3} a pK'_{a1} má aminokyselina (lysin) výsledný náboj kladný +1, poněvadž proběhla disociace α-karboxylové skupiny, která tím získává jednotkový záporný náboj, zatímco α- i ε-aminoskupiny nesou stále jednotkové kladné náboje.
- Při pH nacházejícím se mezi hodnotami pK'_{a1} a pK'_{a2} odpovídajícím pI je výsledný náboj právě 0, protože z α-aminoskupiny se odštěpil proton a tato skupina se tak stává elektricky neutrální, zatímco ε-aminoskupina zůstává protonizovaná (jednotkový kladný náboj) a α-karboxylová skupina stále nese záporný jednotkový náboj.
- Při pH dosahujícím hodnot nad pK'_{a2} dojde k odštěpení protonů u všech ionizovatelných skupin v aminokyselině, tedy včetně ε-aminoskupiny, a výsl. náboj je -1.

Pro shrnutí je uvedeno schéma na obr. 12 (str. 34).



Obr. 12: Schéma disociace zásadité aminokyseliny (lysinu) v závislosti na pH

6.2. Formolová titrace aminokyselin [7, 32, 33]

Při titraci aminokyselin za přítomnosti formaldehydu dochází k posunu hodnot jejich pK'_a směrem k nižším hodnotám. Tento fakt je znám již dlouhou dobu. Vysvětlení se zakládá na asociaci neionizovaných α-aminoskupin aminokyselin s jednou nebo dvěma molekulami formaldehydu. Ionizované α-aminoskupiny schopnost vázat molekuly formaldehydu ztrácejí.

$$R\text{-}NH_2 + CH_2O \leftrightarrow R\text{-}NH\text{-}CH_2OH \leftrightarrow R\text{-}N(CH_2OH)_2. \qquad (6.4)$$

Uvažujeme-li tuto monoamino-monokarboxylovou kyselinu, platí, že se váže s formaldehydem pouze při pH vyšším než je její izoelektrický bod, tzn. α-aminoskupina je deprotonizována. Reakci vystihuje disociační konstant K_2. Vazbu molekul formaldehydu potom popisují asociační konstanty L_1 pro vazbu jedné molekuly a L_2 pro vazbu dvou molekul.

$$^+NH_3RCOO^- \leftrightarrow NH_2RCOO^- + H^+ \qquad K_2 \qquad (6.5)$$

$$NH_2RCOO^- + CH_2O \leftrightarrow {}^-OOCRNH(CH_2OH) \qquad L_1 \qquad (6.6)$$

$$NH_2RCOO^- + 2\,CH_2O \leftrightarrow {}^-OOCRNH(CH_2OH)_2 \qquad L_2 \qquad (6.7)$$

S využitím vztahů definujících disociační konstanty, vztahů pro výpočet pH a spojením výše popsaných chemických rovnic lze po matematických úpravách dospět k výrazu pro disociační konstantu α-aminoskupiny příslušné aminokyseliny v přítomnosti formaldehydu K_{2f}.

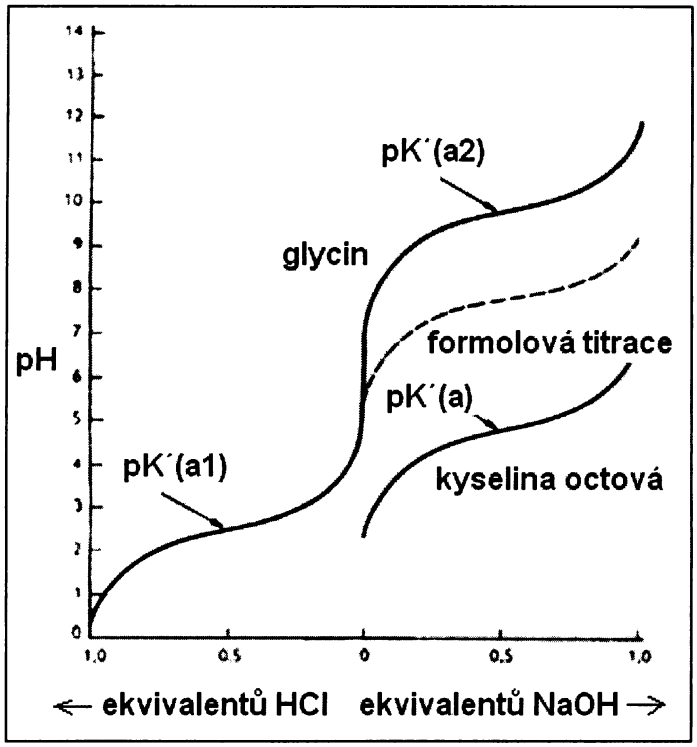
$$pK_{2f} = -\log (K_2 + K_2L_1a_f + K_2L_2a_f^2), \qquad (6.8)$$

kde a_f zastupuje aktivitu formaldehydu v roztoku, resp. jeho koncentraci.

Srovnání aminokyselin ukazuje, že hodnoty konstant L_1 a L_2 se výrazně liší i pro aminokyseliny s podobnou strukturou. Iminokyseliny, prolin, hydroxyprolin a sarkosin

mají L_2 rovno nule, protože mohou vázat jen jednu molekulu formaldehydu, stejně tak i tryptofan.

Formolovou titraci lze použít pro stanovení aminoskupin zejména u polypeptidů. Přídavek formaldehydu má jen malý efekt na titraci kyrboxylových a fenolových skupin, ale výrazný účinek na pokles hodnot titrační křivky v oblasti aminoskupin a imidazolových skupin podobně jako u samotných aminokyselin. Na příkladu titrační křivky glycinu lze dokázat tento specifický pokles, který zde činí přibližně 3 jednotky pH, takže stechiometrický titrační konec připadá na pH 9 místo původního pH 12 (viz obr. 13).



Obr. 13: Srovnání titrační křivky glycinu a titrační křivky téže aminokyseliny při formolové titraci (pro srovnání je uvedena také titrační křivka kys. octové), převzato z /8/

6.3. Interpretace titračních křivek bílkovin /30, 32, 33, 40/

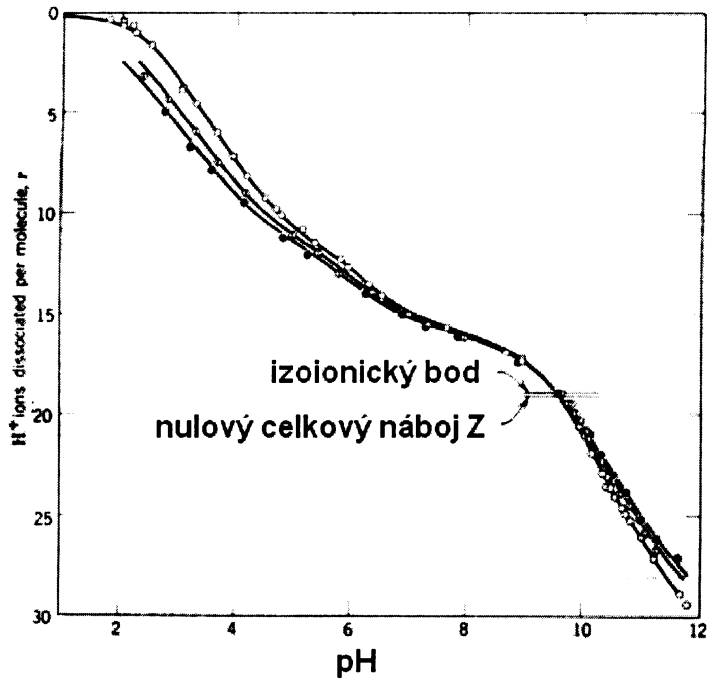
Titrační křivky bílkovin mají některé specifické oblasti odpovídající přítomnosti nejčastěji zastoupených aminokyselin, jejichž postranní řetězce nesou charakteristické skupiny významně ovlivňující pH. Titrační křivku bílkovin tedy lze popsat následujícím způsobem:

1) V kyselé oblasti od maximálního počtu vázaných vodíkových kationtů do pH přibližně 6 lze vidět první skok, který představuje disociaci karboxylových skupin (kyseliny asparagové a kyseliny glutamové).

2) Druhý mírnější a pozvolnější pokles se objevuje mezi hodnotami pH 6 a 8,5, kdy dochází k disociaci imidazolových skupin (histidinu) a zároveň α-aminoskupin.

3) Třetí oblast nad pH 8,5 zahrnuje disociace ε-aminoskupin (lysinu) a fenolových skupin (tyrosinu). Nad pH 10 až 11 dochází ke ireverzibilním změnám (denaturaci) bílkoviny, a proto se také titrace u těchto hodnot zastavuje. Jelikož guanidinové skupiny (argininu) disociují právě až při pH vyšším než 11, není zpravidla možné odpovídající skoky na titrační křivce pozorovat.

Typická titrační křivka bílkoviny je uvedena na příkladu ribonukleasy na obr. 14



(osa y – počet vodíkových kationtů oddisociovaných z molekuly, r)

Obr. 14: Data z titrace bílkoviny ribonukleasy při teplotě 25°C, při iontové síle 0,01(●), 0,03 (ə) a 0,15 (○). Graf ukazuje bod nulového celkového náboje molekuly (odpovídá r = 19) a také izoionické pH při koncentraci, která byla použita. Převzato z /41/, upraveno.

Z údajů titrace a z titračních křivek je možné vypočítat zastoupení a množství daných charakteristických skupin v postranních řetězcích makromolekuly bílkoviny. S určitou přesností se z titrační křivky odečte počet ionizovatelných skupin karboxylových,

imidazolových a α-aminoskupin, fenolových skupin a ε-aminoskupin. Kontrolu výpočtů lze provést následnou hydrolýzou a analýzou bílkovin.

Protože se jednotlivé titrovatelné skupiny ovlivňují navzájem, je situace jejich určení komplikovaná. Z tohoto důvodu jsou navrženy postupy zjednodušení tak, aby bylo možné titrační křivky bílkovin rozložit na jednotlivé standardní úseky.[42]

Typické údaje, které je možné získat rozborem titračních křivek bílkovin uvádí tab. 3. na příkladu ribonukleasy.

Tab. 3: Přehled titrovatelných skupin ribonukleasy, převzato z /41/, upraveno

skupina	očekávané údaje		data získaná z titr. křivky	
	pK_i	počet skupin	pK_i	počet skupin
α-karboxylová	3,75	1	----	11 1[a]
karboxyl. v postran. řetězci	4,6	10	4,7	10
imidazolová	7	4	6,5	5 4
α-aminoskupina	7,8	1	7,8	1[a]
fenolová	9,6	6	9,95[c]	16 6[c]
aminoskup. v postran.řetězci	10,2	10	10,2	10
guanidylová	>12	4	12	4[b]

Poznámky:

[a]Tyto hodnoty byly odhadnuty správně, protože již předem bylo předpokládáno z dostupných údajů, že ribonukleasu tvoří jediný řetězec.

[b]Guanidyly nejsou titrací přímo zjistitelné, protože bílkovina při vysokém pH denaturuje, avšak jejich počet lze vypočítat. Jedná se o rozdíl maximálního pozitivního náboje a náboje za izoelektrického pH.

[c]Fenolové skupiny lze určit spektrofotometricky. Bez této pomocné metody by nebylo možné rozlišit 16 titrovatelných skupin v alkalické oblasti.

Pro titrační křivky bílkovin tedy lze vytvořit následujícíc sumarizaci:

1) Počet disociabilních skupin může být určen přímo z křivky jako celkový počet vázaných protonů.

2) Pufrační kapacita bílkoviny může být odvozena ze směrnice tečny v každém bodě křivky.

3) Pomocí vhodných modifikací titrace mohou být rozeznány některé typy charakteristických skupin (např. spektrofotometrická titrace tyrosinu, titrace aminoskupin pomocí metody titrace s formaldehydem, titrace za dvou a více různých teplot atd.)

4) Některé maskované skupiny mohou být odhaleny porovnáním počtu disociabilních skupin nalezených titrací s počtem těchto skupin zjištěných analýzou aminokyselin po hydrolýze bílkoviny.
5) Stejně tak může být určena chemická reakce, která vedla k blokování příslušného typu charakteristické skupiny.
6) Počet iontů (jiných než vodíkových) vázaných z roztoku na molekulu bílkoviny a korespondující pH lze ve většině případů určit jen speciálními metodami.

Bílkoviny se vyznačují vysokou pufrační kapacitou. Tato vlastnost je významná zejména v biologických systémech, kde bílkoviny tvoří hlavní složku pufračních soustav. Uvádí se, že například 80 % pufrační kapacity savčí krve představují právě bílkoviny. Při fyziologických hodnotách pH (7,34 až 7,43) ovlivňují pufrační kapacitu bílkovin především imidazolové skupiny a α-aminoskupiny.

Praktická část

7. Materiály a přístroje

7.1. Chemikálie

glycin p. u., LACHEMA PRAHA, **DL-histidin hydrochlorid** p. u., LACHEMA PRAHA, **DL-α-alanin** p. u., LACHEMA PRAHA, **L-β-alanin** p. u., LACHEMA PRAHA, **DL-citrulin** p. u., LACHEMA PRAHA, **kyselina D-asparagová** p. u, LACHEMA PRAHA, **hydroxid sodný** NaOH p. u., LACH-NER, **kyselina chlorovodíková** HCl 35% p. u. LACHEMA PRAHA, **formaldehyd** CH_2O (36 – 38 % roztok) stabil. p. a., LACH-NER

Pro účely této práce i úlohy jako součásti pokročilých praktik z biochemie jsou potřeba 0,1 M roztoky aminokyselin, 0,5 M roztok hydroxidu sodného, 1 M roztok kyseliny chlorovodíkové a 10 % roztok formaldehydu.

Roztoky aminokyselin požadované koncentrace byly připraveny rozpouštěním odváženého množství pevných vzorků aminokyselin (glycin 0,38 g; histidin 0,78 g; α-alanin 0,45 g; β-alanin 0,45 g; citrulin 0,88 g; kyseliny asparagová 0,67 g) v destilované vodě a následně doplněním do objemu 50 ml v odměrných baňkách.

Roztok NaOH byl získán rozpouštěním odváženého množství pevného hydroxidu sodného (5 g) v destilované vodě v kádince s následným doplněním na objem 250 ml a převedením do zásobní láhve. Roztok HCl byl připraven rozpouštěním přesně odměřeného objemu 35 % kyseliny chlorovodíkové (22 ml) v destilované vodě, následně byl doplněn na konečný objem 250 ml v kádince a přelit do zásobní láhve. Roztok formaldehydu 10 % byl získán ředěním přesně odměřeného objemu 37% roztoku formaldehydu (25 ml) destilovanou vodou do konečného objemu 100 ml v kádince.

7.2. Přístroje a pomůcky

Popis vybavení potřebného pro experiment a pro provedení úlohy, který následuje, bude poněkud podrobnější. Hlavním důvodem pro obsáhlejší popis aparatury, ale i pracovního postupu, je zajistit studentům dostatek informací o funkcích a možnostech titračního zařízení. Tento popis tedy může sloužit jako pomůcka k úloze v praktiku. V původním zadání úlohy popis přístrojů a pomůcek úplně chybí. Předem je nutné říci, že titrační aparatura v této práci je starší, delší dobu nepoužívaná, navíc sestavená z částí

z různých aparatur a tedy ne plně kompatibilních (např. autobyreta). Podrobný popis a postup obsluhy aparatury hraje důležitou roli i proto, že se jedná v mnoha případech o improvizaci při absenci manuálu a při využití nepůvodních částí zařízení.

7.2.1. Obecný popis

Pro titraci byla v úloze použita titrační souprava firmy RADIOMETER COPENHAGEN, která sestává z 6 oddělitelných částí

A. vlastního titračního zařízení s mechanickým úchytem titrační nádobky a míchadlem (TITRATION ASSEMBLY TTA 60),
B. automatické byrety (AUTOBURETTE ABU 12),
C. pH-metru (PHM 62 STANDARD pH-METER),
D. titrátoru pro ovládání titrace (TTT 60 TITRATOR),
E. registračního přístroje (REA 160 TITRIGRAPH MODULE) a
F. stojanu pro upevnění aparatury, který je vybaven skříní pro zapojení spojovacích kabelů.

Součástí titrační aparatury je rovněž 5 šedých síťových kabelů, 1 černý spojovací kabel a šroubový převod. (Popis samotné titrační aparatury a její sestavení viz 7.2.2.) Dále bylo v experimentu použito jako součást výbavy k titrační sadě 6 titračních plastových kelímků, zapisovací papír značky RADIOMETER COPENHAGEN (po vyčerpání části zásob papír značky LABORATORNÍ PŘÍSTROJE PRAHA) a 2 zapisovací fixy různých barev.

Při měření byla použita kombinovaná skleněná/referentní elektroda opět značky RADIOMETER COPENHAGEN typu GK2401B s příslušenstvím včetně čistícího roztoku RADIOMETER ANALYTICAL RENOVO.X a doplňovacího nasyceného roztoku KCl RADIOMETER ANALYTICAL KCl.L.

Při kalibraci pH-metru před vlastním měřením byly použity 3 kalibrační roztoky o pH 4,01; 7,00 a 10,00.

Dále se pracovalo se zásobní láhví na titrační činidlo, se skleněnou lahví na HCl, s plastovou lahví na roztok NaOH, se 6 odměrnými baňkami ā 50 ml, s 1 odměrnou baňkou 100 ml, se 3 kádinkami ā 250, se 3 pipetami (2, 5 a 10 ml), s odměrným válcem 25 ml, se skleněnou tyčinkou, s pipetovacím nástavcem a se střičkou.

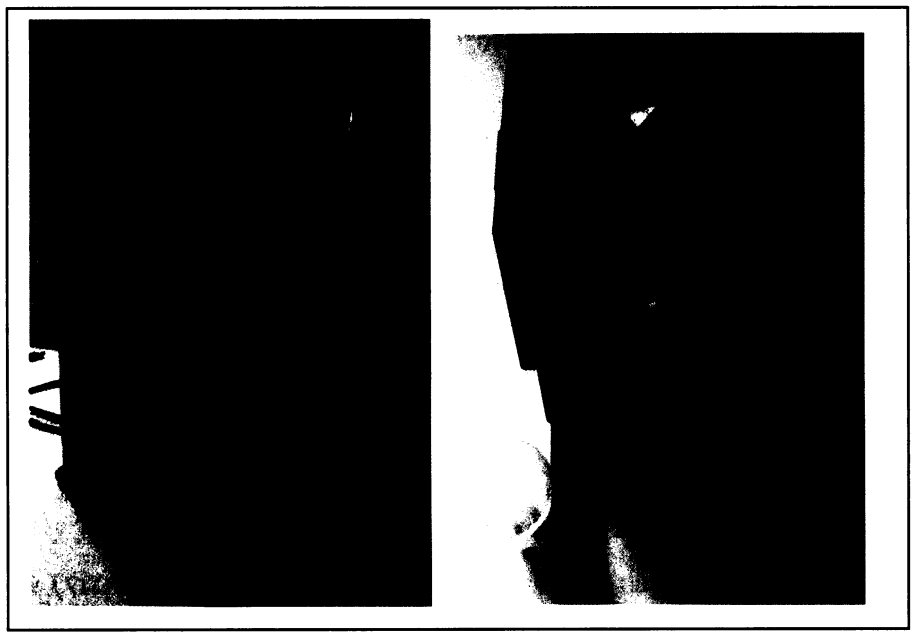
Pro odvažování pevných látek byly použity analytické váhy.

Vyhodnocování získaných titračních křivek bylo provedeno pomocí programů WINDIG 2.5 (D. Lovy), PEAK FIT Version 4 (AISN Software Inc.) a ORIGIN 6.0

(Mirocal Software Inc.) na běžném PC. Program WINDIG slouží k digitalizaci zakreslených titračních křivek. Tyto křivky je nutné upravit, k čemuž lze použít program PEAK FIT umožňující získat hladké křivky s body vždy stejně od sebe vzdálenými na ose x (tzv. ekvidistanční záznam). Pro vlastní derivaci byl zvolen program ORIGIN, protože jeho obsluha je poměrně jednoduchá a studenti se s ním již většinou setkali v jiných předmětech nebo v předchozích ročnících na fakultě.

7.2.2. Popis použité titrační aparatury

A) **Titrační zařízení TITRATION ASSEMBLY TTA 60** (viz obr. 15) je zařízení, které slouží k upevnění titračního kelímku, fixaci elektrody a promíchávání titrovaného roztoku. Titrační zařízení tvoří stojan s mechanickým pohonem a úchyt pro titrační nádobku. Do držáku se přivádí skleněná alonž jako výstup z byrety a připevňuje se do něj elektroda. V držáku je připojeno míchadlo. Zadní strana přístroje nese pouze zdířku pro síťové napájení. K ovládání přístroje se používá tlačítko ON/OFF, kterým se spouští a vypíná míchání.

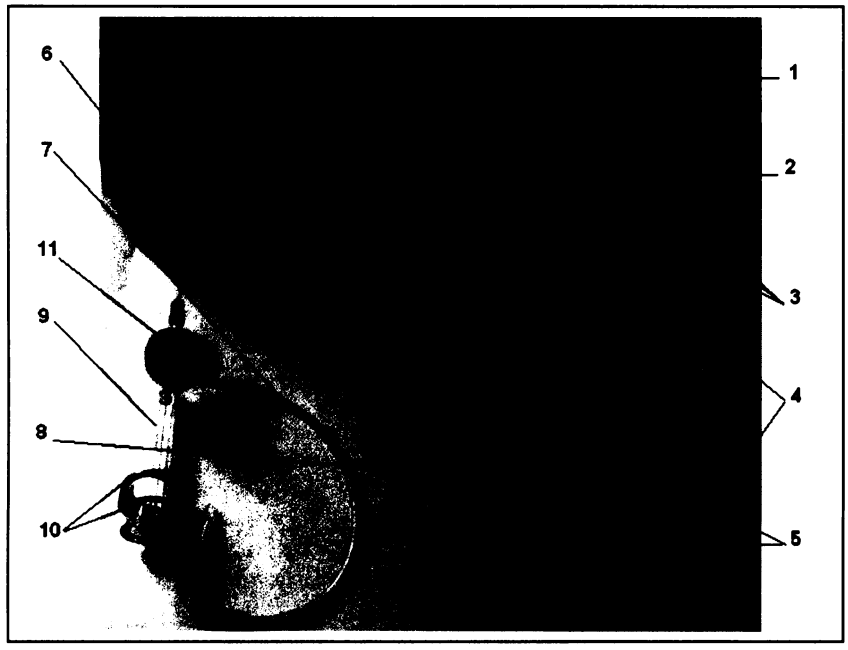


Obr. 15: Titrační zařízení TITRATION ASSEMBLY TTA 60

B) **Automatická byreta AUTOBURETTE ABU 12** umožňuje odměřování titračního činidla v tomto případě s přesností na 0,001 ml a také přímé ovládání titrace. Přístroj se

skládá z pevné části s ovládacími prvky a vyměnitelné části nesoucí vlastní skleněný zvon byrety a zásobní láhev s titračním činidlem.

Nejprve je nutné popsat vybavení, které se připojuje na horní stěnu pevné části autobyrety ještě před vlastním zapojením celé aparatury (viz obr. 16).



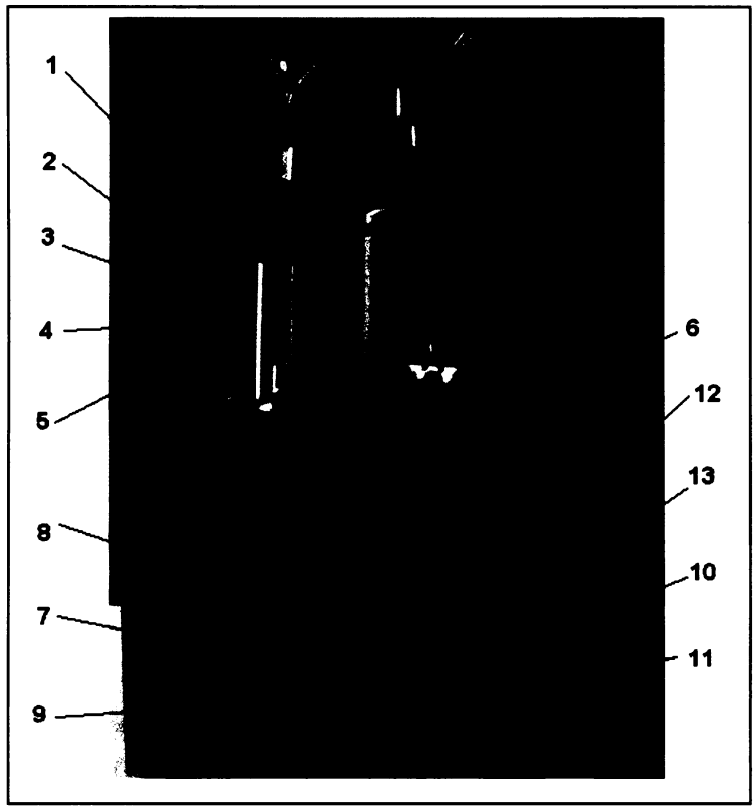
Obr. 16: Zobrazení a popis dílů vyměnitelné části autobyrety AUTOBURETTE ABU 12

Popis: 1 - zásobní láhev s titračním činidlem (HCl), 2 - základna vyměnitelné části, 3 - šroubky pro upevnění vyměnitelné části byrety, 4 - ocelové pružiny pro upevnění zásobní láhve, 5 - plastový nástavec na hrdlo zásobní láhve s balónkem pro plnění, 6 - hadice pro spojení byrety a zásobní láhve, 7 - hadice pro spojení byrety a titrační nádobky, 8 - píst byrety, 9 - skleněný zvon byrety s vnitřní trubicí o objemu 2,5 ml, 10 - prstenec a těsnění pro uchycení byrety k základně a 11 - trojcestný kohout s plastovým krytem

Ovládání byrety je zajištěno jednak trojcestným kohoutem, jednak ovládacími prvky na krytu přístroje (viz obr. 17, str. 43). Trojcestný kohout je napojen na hřebenový převod, který ovládá přepínač funkcí uvnitř přístroje. Pomocí tohoto mechanizmu lze volit mezi jednotlivými stavy, a to podle popisu na spojovacím článku byrety a zásobní láhve.

Na pravé boční stěně se ještě nachází šroubení pro připojení ohebné hřídele k registračnímu přístroji. Autobyreta se zapojuje do sítě pomocí síťového kabelu (LINE FUSE) na zadní straně přístroje. Na zadní stěně se ještě nachází zdířky označené INPUT 1, INPUT 2, AUX a uzemnění, které nejsou pro účely této úlohy potřebné. Kabel pro propojení autobyrety s titrátorem (RECORDER) není v našem případě kompatibilní se

zdířkami titrátoru, a tak nemůže být titrátor použit pro přímé ovládání autobyrety. Vlastní titrace se proto v našich podmínkách spouští právě stlačením EMPTY BURETTE na autobyretě.



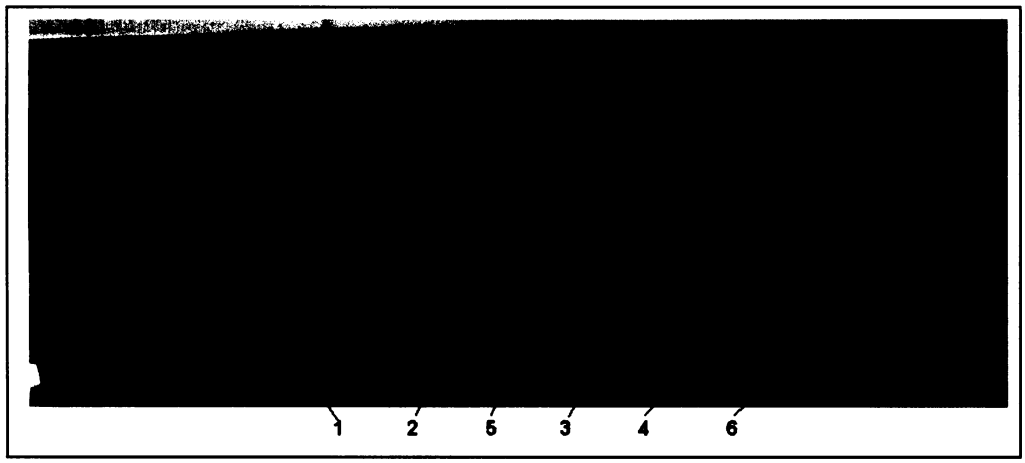
Obr. 17: Automatická byreta AUTOBURETTE ABU 12

Popis: 1 - BYPASS – tok titračního činidla mimo skleněný zvon byrety, 2 - CLOSED – uzavření byrety (nepoužívá se), 3 - REFILL – plnění byrety titračním činidlem ze zásobní láhve, 4 - CLOSED remove air – uzavření byrety pro odstranění vzduchu, 5 - TITRATE – připravení byrety pro titraci, 6 - číselník objemu na čtyři platné číslice s červeně značeným hrotem desetinné čárky, tlačítko COUNTER RESET pro vynulování číselníku před zahájením titrace, 7 - INCREMENTS ON/OFF – nastavení titračního kroku (zapojeno ON), 8 - zařízení pro nastavení rychlosti titrace (číslo určuje procentuální část celkového objemu vytlačeného za minutu) – rozsah – 1,25; 2,5; 5; 10; 20; 40; 80; 160, 9 - MANUAL CONTROL – manuální ovládání titrace, 10 - EMPTY BURETTE – spuštění automatické titrace, 11 - POWER ON/OFF – zapnutí/vypnutí byrety, oranžová žárovka značí zapnutí, 12 - EMPTY (červená žárovka) – označení prázdné byrety, 13 - READY (zelená žárovka) – označení připravení pro titraci

C) Pro měření pH se v našem provedení používá postačující **pH-metr PHM 62 STANDARD**. Podle popisu v literatuře se jedná o digitální, přesný laboratorní pH-metr, založený na tranzistorových a integrovaných obvodech. Umožňuje měření pH v rozmezí 0

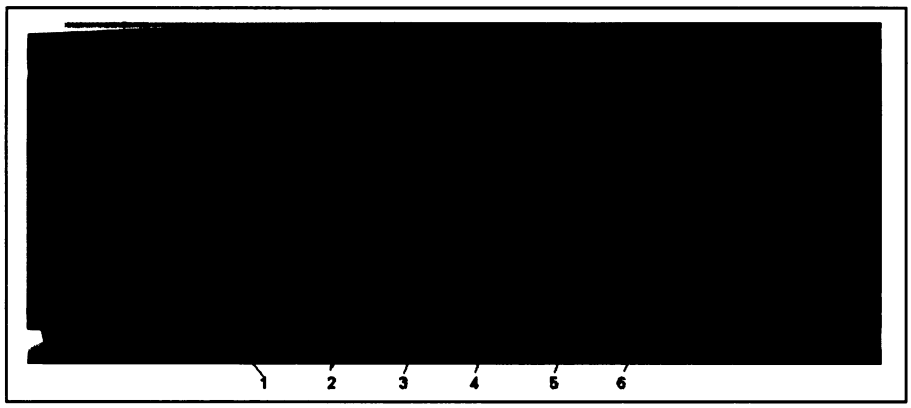
– 14 s přesností 0,01 a měření potenciálu v rozsazích ± 1400 mV s přesností ± 0,1 mV a ± 7000 mV s přesností ± 1 mV.[43]

Na přední stěně pH-metru jsou umístěny nejdůležitější ovládací a zobrazovací prvky (viz obr. 18). Přípojné zdířky a některé části ovládání jsou na zadní ploše přístroje (viz obr. 19).



Obr. 18: pH-metr PHM 62 STANDARD – pohled zpředu

Popis: 1 - číselník na čtyři platné číslice, 2 – SENS. – ovládání citlivosti elektrody, 3 - TEMP°C – ovládání a kontrola teploty (v našem případě se nastaví 22°C), 4 - BUFFER – kalibrace na zvolené pufry, 5 - HOLD – tlačítko pro zafixování poslední zaznamenané hodnoty a 6 - tlačítko přepínání mezi funkcemi pH-metru a potenciometru



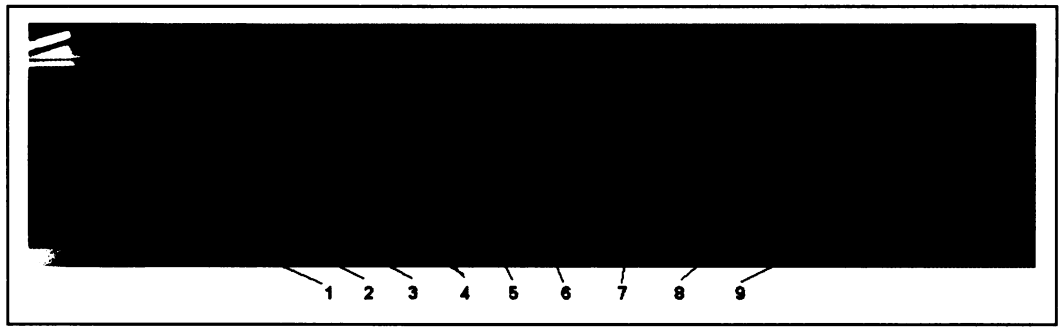
Obr. 19: pH-metr PHM 62 STANDARD – pohled zezadu

Popis: 1 - zdířka pro síťové napájení, 2 - zdířky POL.(žlutá), uzemnění (zelená), červená a černá – připojení kabelů (v našem experimentu se nepoužívají), 3 - zdířka pH/mV pro kabel elektrody, 4 - El. ZERO – elektronická nula pro přepínání podle zvoleného rozsahu hodnot pH nebo potenciálu (standardně přepnuta na hodnotu 7), 5 - EXT T.C. – výstup z pH-metru (v našem zapojení se nepoužívá) a 6 - RECORDER – zdířka pro zapojení spojovacího kabelu z titrátoru

pH-metr se zapojuje síťovým kabelem do zdířky na skříni stojanu a spojovacím kabelem s titrátorem.

D) **Titrátor TTT 60 TITRATOR** je zařízení, které zajišťuje automatický průběh potenciometrické titrace a její řízení. Titrátory jsou buď již přímo kombinovány s potenciometry (pH-metry), nebo se k potenciometrům volně připojují, jako tomu je v tomto případě.[43]

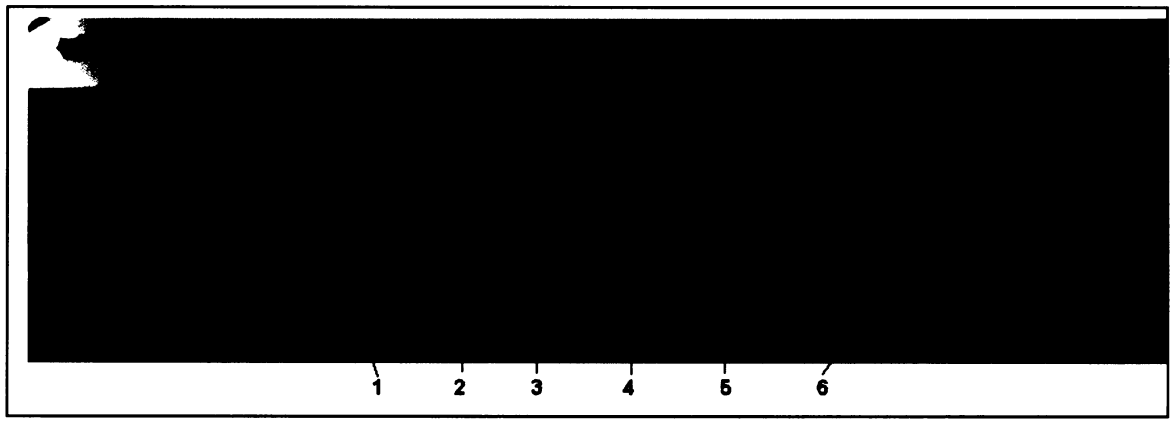
Přední panel titrátoru slouží pro ovládání titrace (viz obr. 20), zadní částí se titrátor propojuje s dalšími částmi aparatury (viz obr. 21, str.46).



Obr. 20: Titrátor TTT 60 TITRATOR – pohled zpředu

Popis: 1 - START – zahájení titrace, 2 - STOP – manuální zastavení titrace, 3 - END POINT – ovládání potenciálu konce titrace, 4 - UP, DOWN – volba směru titrace, 5 - kontrolka TITR. – kontrolka označující probíhající titraci (po stlačení START), 6 - kontrolka SHUTT OFF – kontrolka ukončení titrace (po stlačení STOP), 7 - PROPORTIONAL BAND – nastavení pásma, 8 - DELAY SEC. – nastavení zpoždění – s (v našem případě se nastaví na TITRATION CURVE) a 9 - END POINT – nastavení číselné hodnoty potenciálu konce titrace

Titrátor se zapojuje síťovým kabelem do zdířky na skříni stojanu a dále se propojuje s pH-metrem a spojovacím kabelem také se zapisovačem.



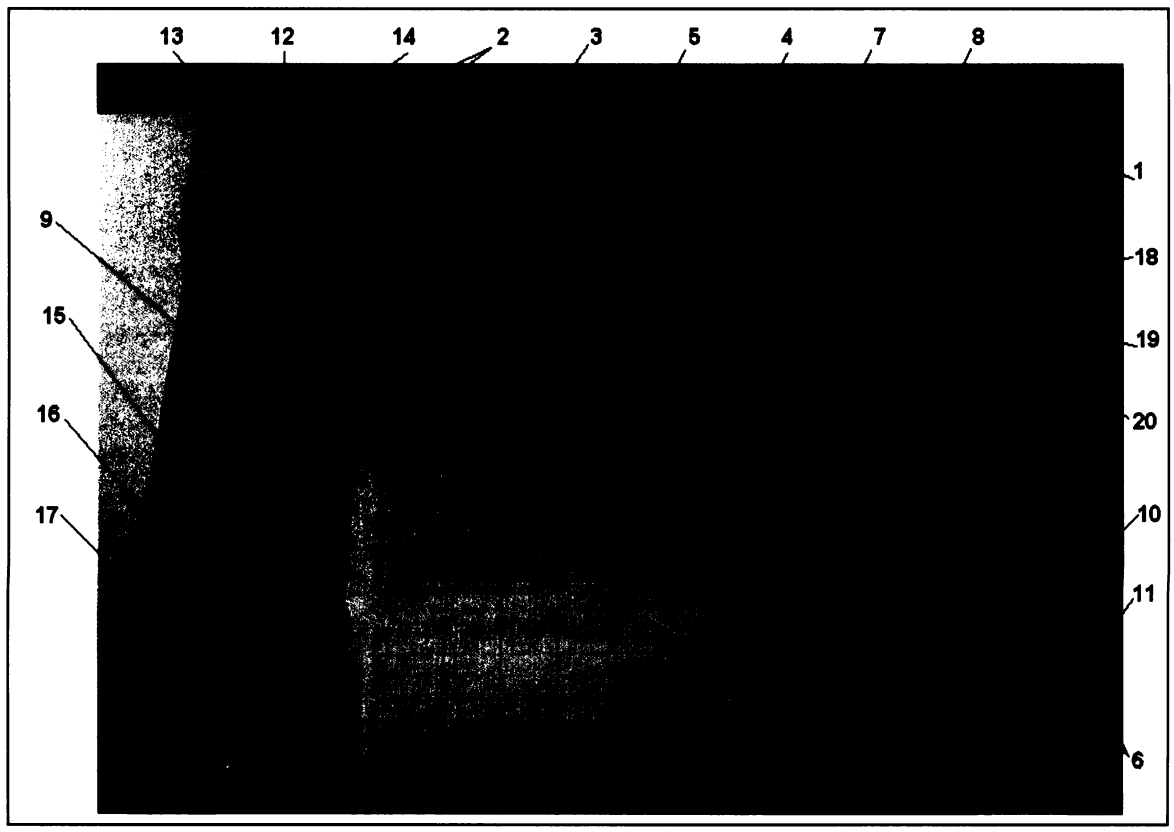
Obr. 21: Titrátor TTT 60 TITRATOR – pohled zezadu

Popis: 1 - konektory pro síťové napájení, 2 - REFILL – vypínač automatického plnění byrety ve třech polohách at start/off/at shut off (v našem případě se nastaví na off), 3 - BURETTE – připojení k byretě, 4 - pH METER – připojení k pH-metru, 5 - RECORDER – připojení k zapisovači a 6 - EXT. CONTROL – speciální konektor pro dálkové ovládání (v našem případě se nepoužívá)

E) **Liniový zapisovač REC 61 SERVOGRAPH** je registrační přístroj, který slouží pro registraci titračních nebo pH-statických křivek. Může být použit jednak samostatně pro záznam napěťových signálů, jednak ve spojení s titrátorem, pH-metrem a autobyretou jako zapisovací zařízení potenciometrických křivek a takto je využit v našem případě. Jeho výhodou oproti starším typům je rychlá odezva. Přístroj je vybaven vyměnitelnými moduly umístěnými v levé části chassis, které ovlivňují citlivost měření.[43] V tomto experimentu byl používán **modul REA 16O TITRIGRAPH MODUL** vhodný pro automatické titrace. Na levé stráně chassis vzadu je připojen modul pro registraci derivovaných závislostí – **REA 260 DERIVATION UNIT**.

Ovládání zapisovače je umístěno na přední ploše zařízení (viz obr. 22, str. 47). Při popisu přístroje si ještě všímáme zadní stěny, kde lze najít konektor pro síťové napájení, INPUT – vstup pro spojovací kabel z titrátoru a EXT. CONTROL – zdířku pro externí ovládání (v našem případě se nepoužívá).

Zapisovač se připojuje síťovým kabelem k hlavní rozvodné skříni na stojanu a spojovacím kabelem se propojí s titrátorem.

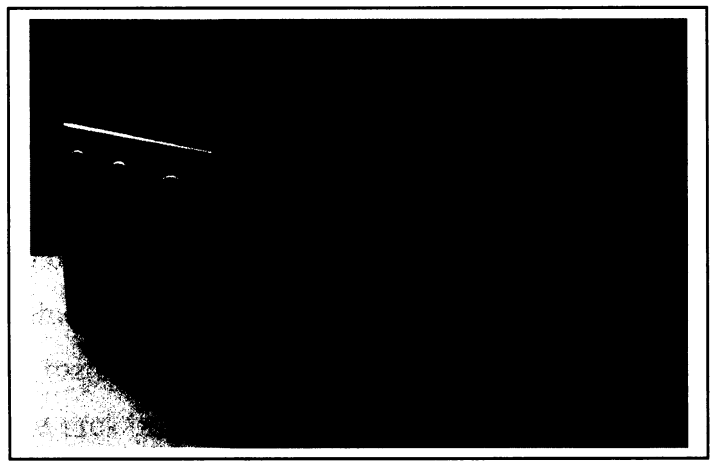


Obr. 22: Zapisovač REC 61 SERVOGRAPH

Popis: *základní chassis* – 1 - POWER – síťový vypínač, 2 - PEN POSITION COARSE FINE – ovládání polohy pera hrubě (COARSE) a jemně (FINE), 3 - pravítko se škálou, 4 - vodicí lišta pera, 5 - držák na pero, 6 - přítlačná klapka papíru, 7 - lišta přidržující papír, 8 - registrační papír, 9 - STAND BY/PEN UP (REMOTE)/DOWN – přepínač polohy pera (pero odpojeno / pero reaguje na signál / pero přitlačeno k papíru a připraveno k záznamu), 10 - CHART FEED sec/cm min/cm – volič rychlosti posunu papíru (v našem případě automatické titrace se nastaví na FREE) a 11 - CHART – přepínač směru pohybu papíru (v našem případě automatické titrace se ponechá ve střední pozici), *derivační modul* – 12 - START/STOP – zapínání a vypínání modulu derivace, 13 - DERIVATION UP / OFF / DOWN – volič směru zápisu derivační křivky a 14 - DERIVATION ABRUPT/MEDIUM/WEAK – volič citlivosti zápisu derivační křivky, *modul automatické titrace* – 15 - PEN min/FULL SCALE (SERVO, 2, 5, 7, 14, 28, 70) – přepínač rychlosti přeběhu pera přes papír (v našem případě SERVO), 16 - SPAN (1,4; 2,8; 7; 14) – rozsah potenciálu (pH) na registračním papíru (nastaví se na 14) a 17 - SCALE ZERO – nastavení hodnoty potenciálu (pH) na pravém okraji papíru (standardně nastaveno + 0,00), *boční stěna registrátoru* – 18 - závit pro externí pohon papíru a pro připojení k autobyretě, 19 - spojka pro externí pohon s funkcemi CLUTCH OFF/ON a 20 - manuální ovládání posunu papíru

F) **Stojan** (viz obr. 23, str. 48) slouží k zafixování celé aparatury. K základně stojanu se připevňuje zapisovač a na horní plošinu se na sebe pokládají titrátor a pH-metr. V zadní části se nachází skříň obsahující celkem 5 zdířek (odlišných od běžné normy) pro

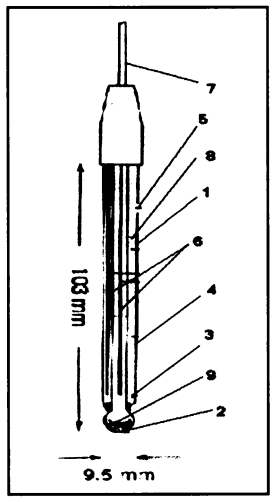
napájecí kabely pH-metru, titrátoru, zapisovače a titračního zařízení a 1 zdířka pro síťový kabel. Autobyreta je do sítě připojena vlastním konektorem.



Obr. 23: Zobrazení stojanu titrační aparatury

7.2.3. Popis použité kombinované elektrody /44/

Jedná se o elektrodu typu **GK2401B**, která představuje kombinovanou skleněnou/referentní elektrodu vhodnou k rutinním i vědeckým účelům pro měření v širokém rozsahu koncentrací. Zvolená kombinovaná elektroda má jako referentní elektrodu argentchloridovou (viz obr. 24).



Obr.24: Kombinovaná elektroda GK2401B převzato z /44/, upraveno

Popis: 1 - skleněné vnější pouzdro, 2 - skleněná membrána, 3 - porézní pin, 4 - referentní část, 5 - otvor pro plnění koncentrovaného roztoku KCl, 6 - červené referentní elektrody Ag/AgCl, 7 - konektor pro spojení s pH-metrem, 8 - výplň tvoří koncentrovaný roztok KCl, jehož hladina musí vždy zasahovat výše než hladina měřeného roztoku, 9 - na dně elektrody jsou krystaly KCl, jejich dostačující výše má být 0,5 cm

8. Metodika

Byly vyhodnoceny protokoly studentů z let minulých. Z rozboru protokolů vyplynuly zásadní nedostatky úlohy i jejího zpracování, které byly dále diskutovány. Z těchto poznatků se také vycházelo ve vlastním experimentu s cílem odstranit nepřesnosti, zajistit reprodukovatelnost výsledků, rozšířit počet aminokyselin i jejich stanovovaných konstant, zejména potom disociačních konstant α-karboxylů a umožnit objektivní a spolehlivé zpracování získaných dat.

Při provádění úlohy byly zkoušeny variace původního návodu. Jednalo se o změnu poměru objemů aminokyselin a hydroxidu sodného resp. kyseliny chlorovodíkové stejně jako i koncentrací roztoků aminokyselin. Následné rozbory výsledků takto získaných titračních křivek ale prokázaly, že původní postup uváděný ve skriptech je postačující, resp. popsané obměny nevedou ke zlepšení tvaru titračních křivek v oblasti nižšího pH. Byl tedy s jistými úpravami dodržen návod uváděný ve skriptech (viz příloha č. 1), kde se popisuje stanovení analytického faktoru hydroxidu sodného, titrace aminokyselin glycinu, histidinu a formolová titrace glycinu. Dále byla práce rozšířena o měření titračních křivek α-alaninu, β-alaninu, citrulinu, kyseliny asparagové, formolovu titraci α-alaninu, o „slepou titraci", tedy sledování závislosti pH na zvyšování koncentrace kyseliny chlorovodíkové, o titraci histidinu s derivačním zapojením zapisovače a o titraci glycinu a α-alaninu hydroxidem sodným. Výsledné vyhodnocování křivek bylo provedeno u histidinu přímým derivováním křivky na zapisovači a u všech aminokyselin souhrnně (jako modifikace úlohy) pomocí počítačových programů WINDIG (automatická digitalizace získaných dat), PEAK FIT (převedení na ekvidistanční záznam nutný pro pozdější derivování) a ORIGIN (derivace digitalizovaných, upravených titračních křivek).

Byl vypočten analytický faktor 0,5 M roztoku hydroxidu sodného.

Záměrem bylo stanovit hodnoty všech disociačních konstant všech titrovaných aminokyselin, avšak u některých aminokyselin bylo možné určit hodnoty pouze některých jejich charakteristických skupin. Největší problémy doprovázejí vždy určení disociačních konstant α-karboxylů pK'_{a2}. Dále byly naměřeny hodnoty izoelektrických bodů pI. Za zmínku také stojí, že v původním zadání úlohy (viz příloha č. 1) není přesně řečeno jaké konstanty mají být určeny, a tak se obvykle hledají pouze hodnoty disociačních konstant α-aminoskupin pK'_{a1}. Ani v jednom z dostupných studentských protokolů se neobjevuje stanovení hodnot disociačních konstant α-karboxylů pK'_{a2}.

U glycinu a α-alaninu byly provedeny titrace s formaldehydem a z nich odhadnuto přibližné zastoupení dipolárních ionizovaných a neionizovaných forem těchto

aminokyselin v neutrálním roztoku. Poznatky získané v průběhu experimentu byly využity při sestavování upraveného zadání úlohy (viz příloha č. 2).

8.1. Sestavení a zapojení titrační soupravy

Aparatura pro titraci aminokyselin byla sestavena podle mnou vytvořeného postupu.

8.1.1. Sestavení a zprovoznění automatické byrety

Před zapojením celé titrační aparatury je nejprve potřeba sestavit samotnou autobyretu, protože vyměnitelné části se skladují odděleně.

1) Na horní stěnu krytu přístroje pro vlastní ovládání byrety byla pomocí šroubků připevněna základna byrety s podstavcem pro zásobní láhev.

2) Do otvoru v pravé části přístroje byl zaveden píst, který byl pevně uchycen mezi čelistmi vnitřního mechanismu.

3) V dalším kroku byl na takto upevněný píst nasazen skleněný zvon byrety s vnitřní trubicí o objemu 2,5 ml, v dolní části s těsněním a svorkou, která byla připevněna k základně šroubky.

4) Na skleněném zvonu byrety je již zpravidla nasazen trojcestný kohout s plastovým krytem. V případě netěsností nebo chybného nastavení je nutné kohout oddělit a znovu sestavit. Zuby kohoutu mají správně a přesně zapadat mezi zuby na spojení byreta-zásobní láhev (na hřebenovém převodu).

5) Zásobní láhev byla umístěna na označené místo v levé části základny byrety a přichycena pomocí dvou pružinových úchytů.

8.1.2. Zapojení a příprava titrační soupravy

Aparatura byla sestavena podle schématu na obr. 25 (str. 52).

1) Do stojanu byly upevněny zapisovač, titrátor a pH-meter a pomocí síťových kabelů zapojeny. Do skříně stojanu bylo připojeno také titrační zařízení. Zabudovaným konektorem byly spojeny titrátor a pH-metr (zdířky pH-METER ↔ RECORDER). Spojovacím kabelem byly propojeny titrátor a zapisovač (zdířky RECORDER ↔ INPUT). Automatická byreta byla samostatně zapojena do sítě a kovovým převodem spojena se zapisovačem. Konkrétní popis je uveden v kap. 7.2.2.

2) Stojan byl zapojen do elektrické sítě a tím byla celá souprava aktivována. Zkouškou provozuschopnosti je rozsvícení displeje pH-metru, kontrolek titrátoru, zapisovače, autobyrety a pohyb míchátka po jejich zapnutí (viz kap. 7.2.2.).

3) Byla provedena kontrola některých důležitých ovládacích prvků, popřípadě bylo opraveno jejich nastavení. Tento výchozí stav aparatury musí být obnoven po ukončení každého jednotlivého měření (zvýrazněné úkony je nutné opakovat po každém novém měření):

a) pH-metr – **HOLD stlačeno**, Temp°C nastaveno na 22°C, tlačítko přepínání pH/mV přepnuto na pH stlačením, El. zero zapojeno na 7

b) titrátor – **START – spuštěno** (nelze v našem zapojení používat k zahájení titrace, protože neovládá přímo autobyretu), **DOWN – spuštěno**, ostatní tlačítka vypnuta, ovladač DELAY SEC. nastaven na TITR. CURVE (ostatní ovladače ve střední pozici) , REFILL vypnuto na OFF

c) zapisovač – **POWER aktivováno**, tlačítko DERIVATION vypnuto na OFF pro měření bez derivačního zapojení, ovladač STAND BY/PEN UP/DOWN směruje na STAND BY, PEN min/FULL SCALE přepnuto na SERVO pro automatickou titraci, SCALE ZERO vynulováno, CHART ve střední pozici a jezdec CHART FEED na FREE, spojka externího pohonu v dolní pozici – tedy na volno CLUTCH OFF

d) autobyreta – **POWER aktivováno na ON**, display stlačením COUNTER RESET vynulován, jezdec INCREMENTS zapnut v poloze ON, ostatní tlačítka nespuštěna

e) titrační zařízení – **vypnuto OFF**

4) Do registrátoru byl vložen zapisovací papír a vybraný fix byl upevněn do držáku.

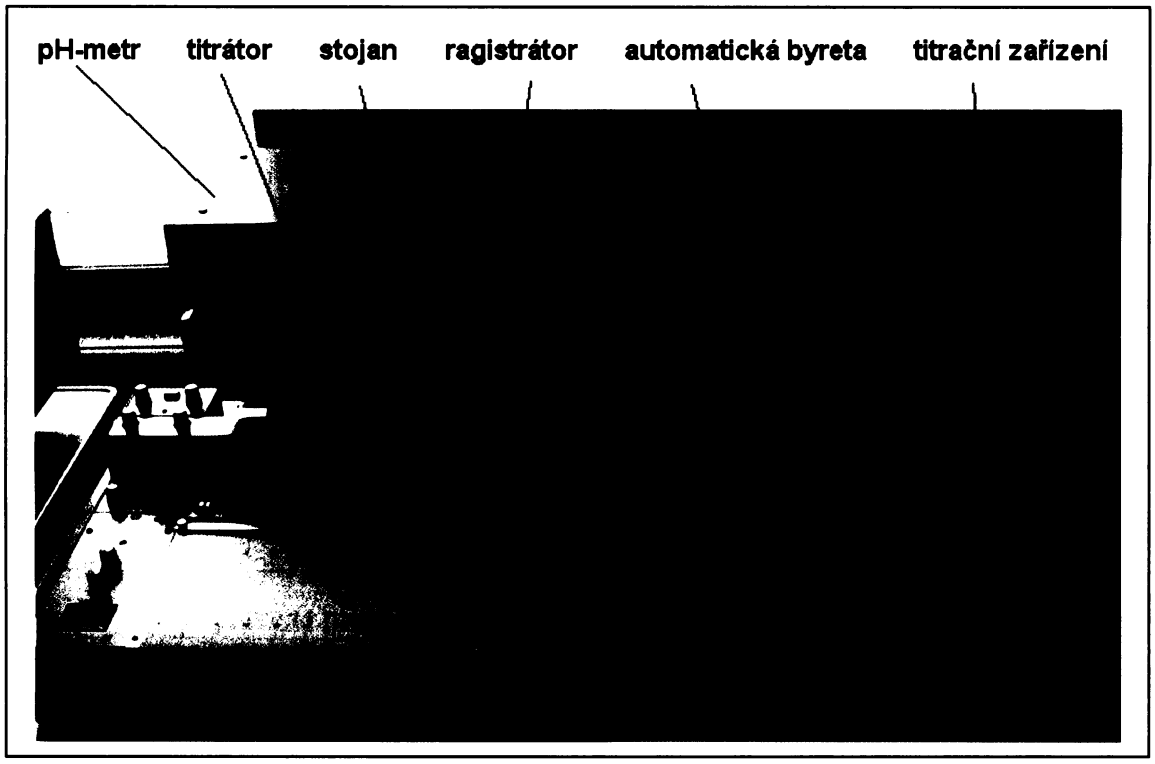
5) Byla zprovozněna autobyreta a zkontrolována funkce trojcestného kohoutu.

a) Zásobní láhev byla naplněna titračním činidlem a připevněna ocelovými poutky k základně vyměnitelné části autobyrety, do hrdla láhve byl vsunut plastový nástavec s hadicí ústící do skleněného zvonu byrety, který byl uzavřen zátkou.

b) Na trojcestném kohoutu bylo nastaveno **REFILL**, poté byla odstraněna zátka, nastaveno **CLOSED REMOVE AIR** a spuštěno odvzdušnění tlačítkem **REMOVE AIR** v dolní části přístroje, poté byla zátka vrácena na své místo, opakováno **REFILL** a následně nastaveno **TITRATE**.

c) Na voliči rychlosti **SPEED** byla nastavena maximální rychlost 160 a byreta byla vyprázdněna stiskem tlačítka **EMPTY BURETTE**.

d) Tento postup byl několikrát opakován až do stavu, kdy bylo celé zařízení bez vzduchových bublin a titrační činidlo vyplňovalo všechny hadice a byretu, čímž se byreta stala zcela připravenou pro titraci.



Obr. 25: Sestavení titrační soupravy

8.1.3. Příprava a zapojení kombinované elektrody, kalibrace pH-metru

Kombinovaná elektroda GK2401B byla po dodání připravena pro měření podle přiloženého návodu.[44]

1) Kryt elektrody s parafilmem byl odstraněn. Vnitřek byl naplněn koncentrovaným roztokem KCl dodaným spolu s elektrodou (RADIOMETER ANALYTICAL KCl. L) a byly přidány krystalky KCl, jejichž hladina má dosahovat minimálně 0,5 cm. Elektroda byla ponořena přes noc do vody.

2) Po aktivaci elektrody a odstranění všech vzduchových bublinek a shluků krystalů, které mohou zablokovat kapalinové rozhraní mezi referentní elektrodou a vzorkem, byla elektroda připojena konektorem k pH-metru, a to do zdířky pH/mV v jeho zadní stěně. Elektroda byla zasunuta do držáku titračního zařízení.

3) Následně byla provedena kalibrace pH-metru:

a) pH-metr byl uveden do stavu připravenosti k zobrazování hodnot **vypnutím tlačítka HOLD**.

b) Elektroda byla ponořena do kalibračního roztoku o pH 7,00 a tato hodnota na číselníku pH-metru byla nastavena pozvolným otáčením ovladače **BUFFER**. (Při prvních měření pomocí elektrody se rovnováha s ustálením hodnoty pH dostavovala

po delším časovém úseku.) Kalibrační roztok byl odstraněn a elektroda omyta proudem destilované vody ze střičky.

c) V druhém kroku byla elektroda ponořena do kalibračního roztoku o pH 4,01. Po ustálení rovnováhy se požadovaný číselný údaj na displeji pH-metru zpřesnil pomocí opatrného otáčení ovladačem **SENS.** a elektroda byla opět omyta.

d) Pro kontrolu byla elektroda ponořena i do třetího kalibračního roztoku o pH 10,00, kdy na číselníku se objevila přesná požadovaná hodnota.

4) Elektroda byla ponořena do vody. Na zapisovači byla zapojena funkce **PEN UP (REMOTE)** a hodnota pH na displeji byla nastavena i ukazovátkem držáku na pravítku. Byly použity ovladače **PEN POSITION COARSE** a **FINE** k docílení nejprve přibližné a následně přesné polohy pisátka. Zapojením elektrody a kalibrací pH-metru byla titrační souprava plně připravena pro měření.

5) Na pH-metru bylo opět **stlačeno HOLD**, čímž byl přístroj deaktivován.

8.2. Provedení úlohy

8.2.1. Standardní postup obsluhy titrační soupravy

1) Všechny titrované látky i s reakčními činidly byly podle sestaveného postupu napipetovány nebo nality do plastových kelímků a ty přichyceny v titračním zařízení. Následně bylo spuštěno míchání tlačítkem **ON**, a to po dostatečně dlohou dobu před vlastním měřením.

2) Na zapnuté autobyretě byl kohout převeden do polohy **REFILL** při zátce na ústí byrety, po naplnění byla byreta v případě potřeby odvzdušněna odstraněním zátky, převedením na ***CLOSED (REMOVE AIR)*** a stiskem příslušného tlačítka ***REMOVE AIR***. Dále byl kohout posunut do fáze **TITRATE**. Číselník autobyrety byl po úplném naplnění skleněné trubice uvnitř zvonu byrety vynulován pomocí **COUNTER RESET**. Volič rychlosti **SPEED** byl posunut na hodnotu 10 (pokud byla použita jiná rychlost titrace, tak bude dále zvlášť uvedeno). Tato rychlost byla vybrána po předcházejícím zkoušení rychlostí vyšších i nižších, kdy právě vybraná hodnota byla vyhodnocena jako optimální z hlediska času stráveného titrací, přesnosti měření, citlivosti zapisovače a pohybu pisátka po papíře.

3) pH-metr byl uveden do pohotovosti k měření **vypnutím tlačítka HOLD**.

4) Na zapisovači byla zkontrolována popřípadě upravena poloha pisátka na papíře pomocí nastavení ***PEN UP (REMOTE)***, ***PEN POSITION (FINE)*** a dále byl propojen

převod mezi zapisovačem a autobyretou zapnutím spojky **CLUTCH ON**. Následně bylo pisátko po kontrole jeho nastavení spuštěno na papír funkcí **PEN DOWN**.

5) Konečné spuštění titrace v tomto provedení zajišťovala autobyreta – **EMPTY BURETTE**. Byla provedena titrace rychlostí 10, a to do úplného vyprázdnění byrety, tzn. do maximálního objemu titračního činidla 2,5 ml.

6) Na konci titrace bylo ukončeno odkapávání titračního činidla vypnutím tlačítka **EMPTY BURETTE**, ukončeno míchání funkcí **OFF** na vypínači titračního zařízení, vypojen převod mezi zapisovačem a autobyretou **CLUTCH OFF**, odpojeno pisátko od papíru pomocí **STAND BY** na ovladači zapisovače a pH-metr deaktivován **stlačením HOLD**.

7) Byl odstraněn kelímek se směsí titrované látky a činidel, elektroda byla opláchnuta destilovanou vodou ze střičky. V aparatuře byl znovu obnoven výchozí stav (viz kap. 8.1.2). Mezi jednotlivými sériemi měření, byla elektroda vždy po omytí ponořena do kelímku s vodou.

8.2.2. Stanovení analytického faktoru hydroxidu sodného

Toto měření nemá vztah k dalším dílčím úkolům úlohy a slouží studentům k seznámení se s prací titrační soupravy. V této práci byla provedena 3 měření podle standardního postupu obsluhy titrační aparatury.

1) Pomocí pipety bylo odměřeno 8 ml zásobního 0,5 M roztoku NaOH, převedeno do 100 ml odměrné baňky a doplněno destilovanou vodou po rysku a promícháno.

2) Do každého ze tří titračních plastových kelímků bylo nalito z odměrného válce vždy 20 ml tohoto zředěného roztoku a titrováno 1 M roztokem HCl podle standardního postupu, ale rychlostí 40 (viz kap. 8.2.1.)

Ze tří získaných titračních křivek (typu silná zásada titrovaná silnou kyselinou) byly odečteny hodnoty spotřeby titračního činidla (0,5 M HCl) právě v bodě ekvivalence, z nich byly vypočteny tři hodnoty analytického faktoru NaOH a ty zprůměrovány.

8.2.3. Titrace aminokyselin kyselinou chlorovodíkovou a „slepá titrace“

Byly proměřeny titrační křivky aminokyselin glycinu, histidinu, glycinu s formaldehydem, α-alaninu, β-alaninu, citrulinu, kyseliny asparagové a α-alaninu s formaldehydem. Vždy byla měření opakována třikrát, u histidinu čtyřikrát. Pro zobrazení vlivu narůstající koncentrace kyseliny chlorovodíkové na tvar titračních křivek

v oblastech nízkého pH byla provedena jedna „slepá titrace“ – tedy prosté přidávání titračního činidla k destilované vodě.

1) Do každého ze tří titračních plastových kelímků byly pipetováno vždy 4 ml 0,1 M roztoku **glycinu**, dále 1 ml 0,5 M roztoku NaOH a odměrným válcem odměřeno 16 ml destilované vody. Následně bylo vše promícháno skleněnou tyčinkou, roztok v kelímku vložen do titračního zařízení a titrován 1 M roztokem HCl podle standardního postupu (viz kap. 8.2.1.).

2) Do každého ze čtyř titračních plastových kelímků byly pipetovány vždy 4 ml 0,1 M roztoku **histidinu**, dále 1 ml 0,5 M roztoku NaOH a odměrným válcem odměřeno 16 ml destilované vody. Následně bylo vše promícháno skleněnou tyčinkou, roztok v kelímku vložen do titračního zařízení a titrován 1 M roztokem HCl podle standardního postupu (viz kap. 8.2.1.).

3) Do každého ze tří titračních plastových kelímků byly pipetovány vždy 4 ml 0,1 M roztoku **glycinu**, dále 1 ml 0,5 M roztoku NaOH, 1 ml 10% roztoku **formaldehydu** a odměrným válcem bylo odměřeno 15 ml destilované vody. Následně bylo vše promícháno skleněnou tyčinkou, roztok v kelímku vložen do titračního zařízení a titrován 1 M roztokem HCl podle standardního postupu (viz kap. 8.2.1,) s tou modifikací, že jako pisátko byl použit černý fix a na zapisovači byl v přípravné fázi vrácen začátek titrace na počátek titrační křivky glycinu.

4) Do každého ze tří titračních plastových kelímků byly pipetováno vždy 4 ml 0,1 M roztoku **α-alaninu**, dále 1 ml 0,5 M roztoku NaOH a odměrným válcem odměřeno 16 ml destilované vody. Dále stejně jako u titrace glycinu

5) Do každého ze tří titračních plastových kelímků byly pipetovány vždy 4 ml 0,1 M roztoku **β-alaninu**, dále 1 ml 0,5 M roztoku NaOH a odměrným válcem bylo odměřeno 16 ml destilované vody. Dále stejně jako u titrace glycinu

6) Do každého ze tří titračních plastových kelímků byly pipetovány vždy 4 ml 0,1 M roztoku **citrulinu**, dále 1 ml 0,5 M roztoku NaOH a odměrným válcem bylo odměřeno 16 ml destilované vody. Dále stejně jako u titrace glycinu.

7) Do každého ze tří titračních plastových kelímků byly pipetovány vždy 4 ml 0,1 M roztoku **kyseliny asparagové**, dále 1 ml 0,5 M roztoku NaOH a odměrným válcem bylo odměřeno 16 ml destilované vody. Dále stejně jako u titrace glycinu.

8) Do každého ze tří titračních plastových kelímků byly pipetovány vždy 4 ml 0,1 M roztoku **α-alaninu**, dále 1 ml 0,5 M roztoku NaOH, 1 ml 10% roztoku **formaldehydu** a

odměrným válcem bylo odměřeno 15 ml destilované vody. Dále stejně jako u formolové titrace glycinu.

9) Do plastového kelímku bylo odměrným válcem odměřeno 21 ml destilované vody, kelímek byl vložen do titračního zařízení a titrován 1 M roztokem HCl podle standardního postupu (viz kap. 8.2.1.)

Získané titrační křivky byly vyhodnoceny výpočetní technikou. Derivace těchto křivek umožnily určit hodnoty pK'_a (koncentračních disociačních konstant) charakteristických skupin jednotlivých aminokyselin a jejich izoelektrických bodů pI. U formolových titrací glycinu a α-alaninu bylo z posunu hodnoty pK'_a těchto dvou aminokyselin posuzováno zastoupení dipolárních ionizované a neionizované formy. Byl posouzen tvar titračních křivek v oblastech nízkých hodnot pH a vliv narůstajícího objemu (koncentrace) kyseliny chlorovodíkové na jejich průběh.

8.2.4. Titrace histidinu kyselinou chlorovodíkovou při zapojení derivačního modulu

Při titraci histidinu s derivačním nástavcem byl připraven titrovaný roztok histidinu podle postupu z kap. 8.2.3, avšak pouze v jednom provedení. Byly provedeny všechny úkony podle standardního postupu (viz kap. 8.2.1.) kromě spuštění vlastní titrace. Zásadní rozdíl spočívá v nastavení zapisovače s derivační jednotkou a obsluze aparatury.

1) Na zapisovači bylo pisátko nastaveno na počátek jedné z titračních křivek histidinu, poté byla zapnuta derivační jednotka tlačítkem DERIVATION **ON**. Dále byla navolena citlivost pomocí ovladače DERIVATION na **MEDIUM**, kdy tato poloha byla vybrána po předchozích pokusech jako optimální (volby ABRUPT a WEAK se neosvědčily). V dalším kroku byl druhý ovladač DERIVATION přepnut na **DOWN**. Pisátko se poté sklopí na papír a vykoná pohyb nahoru a dolů.

2) Po ustálení pisátka ve střední poloze byla spuštěna titrace autobyretou, tlačítkem EMPTY BURETTE. Další kroky byly učiněny již zcela podle standardního postupu, ale titrace proběhla rychlostí 5 (viz kap. 8.2.1.). Rychlost byla optimalizována, protože derivační nástavec je velmi citlivý.

Získaný záznam dovoluje zjistit hodnoty disociačních konstant pK'_a charakteristických skupin histidinu i hodnotu izoelektrického bodu pI přímo transpozicí lokálních maxim křivky derivace (jedná se o záporné hodnoty) na titrační křivku histidinu. U této metody byla také posuzována její přesnost vzhledem k dalším variantám a vhodnost pro úlohu v pokročilém praktiku.

8.2.5. Titrace glycinu a α-alaninu hydroxidem sodným

Hydroxidem sodným byly titrovány 2 aminokyseliny – glycin a α-alanin, a to pouze v jednom provedení.

1) Do zásobní lahve pro titrační činidlo bylo po propláchnutí destilovanou vodou nalito zbývající množství 0,5 M roztoku NaOH. Celou výbavou autobyrety byl několikrát protažen zásobní roztok a autobyreta byla následně připravena pro titrace postupem stejným jako u roztoku HCl (viz kap. 8.1.2.).

2) Do titračního plastového kelímku byly pipetovány 4 ml 0,1 M roztoku glycinu, dále 0,5 ml 1 M roztoku HCl a odměrným válcem bylo přidáno 16 ml destilované vody. Následně bylo vše promícháno skleněnou tyčinkou, roztok v kelímku byl vložen do titr. zařízení a titrován 0,5 M roztokem HCl podle standardního postupu (viz kap. 8.2.1.).

3) Do titračního plastového kelímku byly pipetovány 4 ml 0,1 M roztoku α-alaninu, dále 0,5 ml 1 M roztoku HCl a odměrným válcem bylo přidáno 16 ml destilované vody. Dále stejně jako u titrace glycinu.

Získané titrační křivky byly hodnoceny z hlediska výhodnosti této varianty titrace pro pokročilá praktika. Záznamy byly porovnány s titračními křivkami při použití kyseliny chlorovodíkové s důrazem na oblasti nižších hodnot pH (stanovení pK'_{a2}). Byly stanoveny hodnoty disociačních konstant pK'_a a izoelektrických bodů pI pomocí výpočetní techniky.

8.3. Zpracování výsledků

Z protokolů je patrné, že studenti doposud vyhodnocovali naměřené titrační křivky pouze manuální derivací, popřípadě sestrojením grafů závislosti pufrační kapacity (tedy reciproční derivace) na pH. Tyto metody byly shledány jadnak jako velmi pracné, takže zabíraly velkou část praktika, jednak vzhledem k subjektivnímu zpracování, jako nepřesné a nespolehlivé. Z tohoto důvodu byly zvoleny nové přístupy k vyhodnocování dat, které budou dále podrobně popsány.

8.3.1. Zpracování dat derivačním modulem zapisovače

Ze záznamu titrační křivky a křivky derivace byly ihned určeny hodnoty disociačních konstant pK'_a promítnutím lokálních maxim negativních hodnot derivace do průběhu křivky titrační. Byla rovněž stanovena hodnota izoelektrického bodu pI, a to transpozicí lokálního minima derivace na křivky titrační. Tato metoda byla porovnána s dalšími variantami zpracování dat a byla vyhodnocena její přesnost.

8.3.2. Zpracování výsledků výpočetní technikou

Základem počítačového zpracování záznamů titračních křivek z analogových zapisovačů je jejich digitalizaci v podobě souboru souřadnic. Po proložení takto získaných bodů hladkou „umělou" křivkou, je možné provádět na tomto souboru libovolné matematické operace.

Hlavním úkolem této práce je určení koncentračních disociačních konstant a izoelektrických bodů jednotlivých aminokyselin. V teoretickém úvodu této práce bylo uvedeno, že k těmto hodnotám se lze dobrat pomocí derivace titračních křivek. Hledané hodnoty pK'_a odpovídají lokálním maximům na křivkách převrácených hodnot první derivace (tedy na křivkách pufrační kapacity), respektive lokálním minimům na křivkách první derivace. Izoelektrické body aminokyselin se obdobně určují z lokálních minim křivek pufrační kapacity, respektive z lokálních maxim při první derivaci titračních křivek. Tuto definici lze doslovně použít pouze pro titraci hydroxidem sodným, kdy průběh křivky je rostoucí, křivka odpovídá standardnímu tvaru a hodnoty derivace nabývají kladných hodnot. Při titraci kyselinou chlorovodíkovou, je získaná křivka klesající, a proto derivace nabývá záporných hodnot. Hodnoty disociačních konstant se tedy nacházejí v lokálních maximech a hodnoty izoelektrických bodů v lokálních minimech.

Při zpracování získaných dat bylo použito několik programů, mezi nimi stěžejní byly 3 **WINDIG**, **PEAK FIT** a **ORIGIN**. Je nutné podotknout, že posup nelze dále zjednodušit, protože programy jsou buď úzce specializované (WINDIG), nebo nezajišťují všechny potřebné funkce (PEAK FIT a ORIGIN). Program WINDIG slouží k digitalizace analogových dat. Program PEAK FIT se v této práci používá k převedení originálních křivek, tvořených body různě od sebe vzdálenými na ose x, na ekvidistanční záznam. Program ORIGIN se využívá k řadě matematických operací, v tomto případě k derivaci upravených křivek. Bylo postupováno podle následujícího návodu (také viz příloha č. 2).

1) **Scanner** – Záznamy titračních křivek byly naskenovány ve zvoleném formátu .bmp (např. gly.bmp).
2) Snímky titračních křivek byly upraveny v programu **COREL PHOTO-PAINT 8.**
3) Soubory byly zpracovány v programu **WINDIG 2.5.**
   a) otevření souboru: **FILE** → **OPEN** → výběr souboru (např. gly.bmp) → **OK**
   b) vytvoření souřadnicového systému: **SCALE** → **DEFINE 3 PTS** – pohyb po pracovní ploše pomocí **HOME/END/PAGE UP/PAGE DOWN**, šipkami označit 3 body – 1. bod jako průsečík souřadnic x a y → **ENTER** → do oteřeného okna

COORDINATES příslušné souřadnice (např. **[X=0, Y=0]**) → **OK**, 2. bod libovolně na ose y → **ENTER** → do okna **COORDINATES** souřadnice (např. **[X=0, Y=1]**) → **OK**, 3. bod libovolně na ose x → **ENTER** → zadat v okně **COORDINATES** souřadnice (např. **[X=1, Y=0]**), zaostření pomocí **WINDIG ZOOM**

c) aktivace křivky: **OPTIONS** → **COLOR LIMITS** → červená křivka **R > 255, G < 0** a **B < 0** → **OK**, černá křivka **R > 255, G > 255** a **B > 255** → **OK**, v případě neidentifikovatelné, měnící se barvy **klávesa L** na vybraném úseku křivky → **OK**

d) inaktivace okolí křivky: **FILE** → **RUBBER** → tahem myši překrýt okolí křivky neaktivní barvou → **ESC** (pouze pokud je potřeba)

e) vlastní digitalizace křivky a uložení dat: **RIGHT CLICK** na začátku křivky → **DATA** → **SAVE** → název souboru (např. gly.dat) → **OK**

4) Soubory dat byly převedeny do programu **EXCEL**, zde upraveny do podoby dvou paralelních sloupců a uloženy ve formátu .xls (např gly.xls).

5) Dále byly soubory upraveny v programu **PEAK FIT version 4**

a) načtení souborů: **FILE** → **IMPORT** → výb. soubor (např. gly.xls) → **OTEVŘÍT**

b) výběr a označení dat: 1. sloupec → **X Values** → 2. sloupec → **Y Values** → v okně **DATA DESCRIPTION** popsat **X Title, Y Title** → **OK**→ **OK**

c) úprava dat, proložení křivkou: **DATA** → **DIGITAL FILTER** → **FINAL DATA COUNT – 250** (optimalizace), **WINDOW POINT COUNT – 6** (optimalizace), **FIT MODEL – QUADRATIC** → **OK**

d) uložení souboru ve formátu .txt: **FILE** → **SAVE AS** název souboru.txt (např. gly.txt) → **ULOŽIT**

6) Data byla následně v programu **ORIGIN 6.0** opět převedena do podoby křivek a ty derivovány. Z derivovaných křivek byly odečteny hodnoty jejich maxim i minim a ty promítnuty do průběhu odpovídajících titr. křivek. Hodnoty pK'_a lze získat jako y-ové souřadnice titračních křivek v maximech derivace, hodnoty pI obdobně z minim derivace.

a) načtení souborů: **FILE** → **IMPORT** → **SINGLE ASCII** → výběr souboru (např. gly.txt) → **OTEVŘÍT**

b) zpětné sestrojení titrační křivky: **výběr sloupců** → **PLOT** → **LINE** → **OK**

c) derivace titrační křivky: **ANALYSIS** → **CALCULUS** → **DIFFERENTIATE** → **SCREEN READER** a **DATA READER** → zobrazení hodnot na **DATA DISPLAY**

d) promítnutí hodnoty x odpovídající lokálnímu maximu křivky derivace na původní titrační křivku a zjištění hodnoty pK'_a jako y-ové souřadnice

e) promítnutí hodnoty x odpovídající lokálnímu minimu křivky derivace na původní titrační křivku a zjištění hodnoty pI jako y-ové souřadnice

Tento postup byl uplatněn na vyhodnocení výsledků titrací kyselinou chlorovodíkovou (včetně formolových titrací) i titrací hydroxidem sodným za účelem určení hodnot zdánlivých disociačních konstant pK'_{a1}, pK'_{a2} a pK'_{aR}, izoelektrických bodů pI a pro vyhodnocení formolových titrací. Metoda zpracování výsledků výpočetní technikou byla porovnána s dalšími variantami zpracování dat.

9. Výsledky

9.1. Výsledky ze studentských protokolů

K dispozici bylo celkem 9 protokolů z dřivějších let, kdy se tato úloha prováděla jako součást pokročilých praktik z biochemie. Úloha byla zařazena také do výuky cizojazyčných studentů medicíny, z jejichž skript[45] jsem přejal zadání, avšak k jejich protokolům jsem přístup neměl. Dostupné protokoly vykazují celou řadu nedostatků. Jedná se především o jejich nereprodukovatelnost a neúplnost, protože studenti neuvádějí všechny podstatné či potřebné údaje a hodnoty. Zřejmě i z důvodů časových nebyly často určeny všechny hodnoty, které bylo možné stanovit z titračních křivek. V dostupných protokolech se objevují aminokyseliny glycin, histidin a β-alanin a také formolová titrace glycinu (viz tab. 4, str. 61), avšak vždy v různých protokolech, nikdy souhrnně v jednom z nich. Většinou studenti uvádějí hodnoty koncentračních disociačních konstant α-aminoskupin a imidazolového zbytku histidinu, v některých případech i hodnoty izoelektrických bodů. V žádném z protokolů nejsou uvedeny hodnoty disociačních konstant α-karboxylů, protože není dosaženo tak nízkého pH, titrační křivka nemá odpovídající tvar nebo nelze ručně křivku v dané oblasti vyhodnotit.

Získané údaje nebyly statisticky vyhodnoceny, přestože u glycinu (viz tab. 4, str. 61) se již jedná o větší soubor dat a toto zpracování by již mělo určitou vypovídací hodnotu, nebylo by však možné porovnání s odpovídajícími hodnotami této práce. Z výsledků vyplývá, že hodnoty izoelektrických bodů byly stanoveny s větší přesností než hodnoty koncentračních disociačních konstant. Nejpřesněji byly určeny hodnoty všech konstant pro histidin, kde se přesnost výrazně blíží metodám výpočetní techniky, jak bude popsáno dále. Celkově ale můžeme pozorovat v naměřených hodnotách u ostatních aminokyselin

velký rozptyl a také větší odchylky od hodnot tabelovaných než u metod použitých v této práci, což lze přisuzovat právě ručnímu derivování křivek.

Tab.4: Přehled hodnot pK'_a a pI vybraných aminokyselin naměřených studenty

pK'_{a1}	10,05	10,35	10,35	10,04	9,68	10,40
odchylka [%]	4,91	8,04	8,04	4,80	1,04	8,56
pI	5,90	6,28	6,07	6,00	6,35	X
odchylka [%]	1,17	5,19	1,68	0,50	6,37	X
pK'_{a1}	9,25	9,25	9,30	X	X	X
odchylka [%]	1,76	1,76	2,31	X	X	X
pI	7,60	7,56	X	X	X	X
odchylka [%]	0,13	0,40	X	X	X	X
pK'_{aR}	6,00	6,10	6,20	X	X	X
odchylka [%]	0,66	0,99	2,65	X	X	X
pK'_{a1}	10,70	10,80	10,75	X	X	X
odchylka [%]	6,15	7,14	6,65	X	X	X
pK'_{a1}	8,15	8,27	7,80	8,20	X	X

9.2. Stanovení analytického faktoru hydroxidu sodného

Ze získaných titračních křivek (viz příloha č. 3, obr. 1) byly vyhodnoceny ve všech 3 měřeních spotřeby kyseliny chlorovodíkové v bodě ekvivalence.

Titrace: c_{HCl} = 1 mol/dm^3, V_{HCl} = spotřeba titr. činidla (viz tab. 5, str. 62), c_{NaOH} = 0,5 mol/dm^3, V_{NaOH} = 8 ml ředěno dále 5krát, f = analytický faktor NaOH (viz tab. 5, str. 62)

Výpočet:

$$f = \frac{5.c_{HCl}.V_{HCl}}{c_{NaOH}.V_{NaOH}}$$

Analytický faktor zásobního roztoku hydroxidu sodného byl stanoven na f = 1,076. Bod ekvivalence, jako bod ve kterém je právě veškerý přítomný hydroxid neutralizován titračním činidlem (kyselinou chlorovodíkovou), byl odečítán při pH = 7. Toto zjednodušení neovlivňuje příliš hodnotu spotřeby HCl z důvodu strmosti křivky a pro stanovení je tato úvaha postačující. Vzhledem k tomu, že tento úkol je součástí praktik zejména z důvodu seznámení se s aparaturou a pro další práci nemá význam, může byt postup výpočtu považován za dostatečný a nebude dále diskutován a rozebírán.

Tab. 5: Přehled spotřeb HCl a odpovídajících hodnot analytického faktoru NaOH

měření	V_{HCl} [ml]	faktor f	průměrná hodnota f
1.	0,870	1,088	1,076
2.	0,860	1,075	
3.	0,852	1,065	

9.3. Titrační křivka histidinu a její derivace při zapojení derivačního modulu

Ze záznamu (viz příloha č. 3, obr. 2) vyplývá, že bylo možné stanovit hodnoty pouze 2 disociačních konstant, a to dis. konst. α-aminoskupiny pK'_{a1} a dis. konst. imidazolového zbytku pK'_{aR}. Tyto údaje byly stanoveny podle popsaného postupu transpozicí lokalních maxim křivky derivace na titrační křivku. Dále byla stanovena hodnota izoelekrického bodu histidinu pI obdobně z lokálního minima téže křivky mezi prvním a druhým lokálním maximem. Nebylo možné určit hodnotu disociační konstanty α-karboxylu pK'_{a2}, ačkoli bylo dosaženo pH nižší než předpokládaná hodnota. Průběh křivky v oblasti potenciálního výskytu této disociační konstanty je obtížně vyhodnotitelný, neboť se zde objevuje výrazný šum. Obecně platí, že při derivaci dochází až k desetinásobnému zhoršení odstupu šumu od signálu, což se projevuje právě typickým rozkolísáním křivky. Z titrační křivky histidinu a křivky derivace bylo zjištěno, že

pK'_a α-aminoskupiny – pK'_{a1} = 9,25 (1,76%);

pK'_a imidazolového zbytku – pK'_{aR}(His) = 6,05 (0,17%) a

pI histidinu – pI = 7,70 (1,45%).

Tabelované hodnoty pro histidin jsou 9,09; 6,04; 7,59 a dále 1,70 pro α-karboxyl. Odchylky od hodnot v tabulkách jsou uvedeny v závorkách za příslušnými údaji.

Lze konstatovat, že tato metoda vyhodnocení titračních křivek je dosti přesná. Její výhodou je rychlost, poněvadž tato varianta zpracování dat umožňuje určení přesných hodnot koncentračních disociačních konstant i izoelektrického bodu ihned po provedení titrace. Zároveň je tato metoda, pokud je k dispozici popsaná aparatura, i jednoduchá z hlediska obsluhy. Nevýhodou této metody může být nežádoucí příspěvek šumu, jenž vede k velkým výchylkám pisátka, a to může ztěžovat vyhodnocování.

9.4. Titrační křivky aminokyselin – vyhodnoceno výpočetní technikou

9.4.1. Titrace aminokyselin kyselinou chlorovodíkovou

Z titračních křivek (viz příloha č. 3, obr. 3 – 8), z jejich rekonstrukce pomocí výpočetní techniky a z následné derivace (vybrané příklady viz příloha č. 4, obr. 1 – 12) je patrné, že bylo možné určit hodnoty obou koncentračních disociačních konstant (pK'_{a1} α-aminoskupiny a pK'_{a2} α-karboxylu) a hodnoty izoelektrických bodů pI u většiny aminokyselin (gly, α-ala, β-ala, cit). Titrační křivky odpovídají svým tvarem křivkám titrace slabé zásady silnou kyselinou, což lze očekávat vzhledem k přidání hydroxidu sodného před vlastní titrací do roztoků aminokyselin.

U histidinu (viz příloha č. 3, obr. 4; příloha č. 4, obr. 3, 4) byly určeny hodnoty disociační konstanty α-aminoskupiny pK'_{a1} a imidazolového zbytku $pK'_{aR(His)}$ a také hodnota izoelektrického bodu pI. Obdobně jako v případě derivačního záznamu nebylo možné určit hodnotu titrační disociační konstanty α-karboxylu z důvodu velké rozkolísanosti křivky.

U kyseliny asparagové (viz příloha č. 3, obr. 8; příloha č. 4, obr. 11, 12) byla určena jen hodnota disociační konstanty α-aminoskupiny pK'_{a1} a β-karboxylu $pK'_{aR(Asp)}$. Nebylo možné u této aminokyseliny stanovit ani hodnotu izoelektrického bodu pI, ani hodnotu disociační konstanty α-karboxylu pK'_{a2} (v jednom případě nebyla určena ani hodnota dis. konst. pK'_{aR}).

Údaje získané z titračních záznamů a počítačového zpracování (viz tab. 6, str. 64) byly porovnány s tabelovanými hodnotami (viz tab. 7, str. 64). Z důvodu malého souboru dat nebylo provedeno statistické hodnocení, pouze byly vypočteny odchylky neměřených hodnot od tabulkových údajů (viz tab. 6, str. 64).

Tento způsob vyhodnocování dat lze rovněž považovat za dosti přesný. Výhodou tohoto zpracování dat je také možnost zpracování většího počtu křivek v krátkém časovém intervalu, a proto se tato varianta jeví jako velmi vhodná pro účely praktické výuky. Možné nepřesnosti mohou vznikat zejména při převodu dat do digitální podoby, ale i ty se jeví zanedbatelné při porovnání s ručním zpracování titračních křivek. Pomocí této metody lze s velkou přesností určit hodnoty disociačních konstant α-karboxylů, což derivování křivky manuálně často nedovoluje. Nevýhody metody jsou zřejmé, jedná se především o vyšší nároky na vybavení hardware (PC, scanner) i software (programy WINDIG, PEAK FIT a ORIGIN) a o vyšší náročnost práce ve třech různých počítačových programech. Lze však předpokládat, že požadavky na vybavení fakulta

splní a za pomoci mnou sestaveného postupu se práce s počítačem zjednoduší na sled přesně popsaných kroků.

Tab.6: Přehled naměřených hodnot pK'_a a pI a jejich odchylek od tabelovaných hodnot (při titraci kyselinou chlorovodíkovou)

aminokyselina	měření	pK'_{a1}	odchylka [%]	pI	odchylka [%]	pK'_{a2}	odchylka [%]	pK'_{aR}	odchylka [%]
glycin	1.	**9,76**	1,88	**5,91**	1,01	**2,48**	5,98	*NA*	*NA*
	2.	**9,77**	1,98	**5,90**	1,17	**2,49**	6,41	*NA*	*NA*
	3.	**9,68**	1,04	**5,91**	1,01	**2,30**	1,71	*NA*	*NA*
histidin	1.	**9,10**	0,11	**7,41**	2,37	*ND*	*ND*	**6,05**	0,17
	2.	**9,12**	0,33	**7,51**	1,05	*ND*	*ND*	**6,05**	0,17
	3.	**9,10**	0,11	**7,51**	1,05	*ND*	*ND*	**6,00**	0,66
α-alanin	1.	**9,79**	0,82	**6,03**	0,50	**2,33**	0,00	*NA*	*NA*
	2.	**9,90**	1,96	**6,19**	3,17	**2,31**	0,86	*NA*	*NA*
	3.	**9,80**	0,93	**6,01**	0,17	**2,26**	3,00	*NA*	*NA*
β-alanin	1.	**10,17**	0,89	**6,87**	1,18	**3,49**	0,57	*NA*	*NA*
	2.	**10,18**	0,99	**6,49**	4,42	**3,43**	2,28	*NA*	*NA*
	3.	**10,23**	1,49	**6,21**	8,54	**3,48**	0,85	*NA*	*NA*
citrulin	1.	**9,47**	1,83	**5,91**	0,17	**2,29**	1,29	*NA*	*NA*
	2.	**9,59**	3,12	**6,01**	1,52	**2,28**	1,72	*NA*	*NA*
	3.	**9,54**	2,58	**5,96**	0,68	**2,19**	5,60	*NA*	*NA*
kys. asparagová	1.	**9,76**	1,04	*ND*	*ND*	*ND*	*ND*	**3,66**	1,35
	2.	**9,78**	1,24	*ND*	*ND*	*ND*	*ND*	**3,68**	0,81
	3.	9,77	1,14	*ND*	*ND*	*ND*	*ND*	*ND*	*ND*

(vysvětivky: NA – nelze aplikovat, ND – nelze určit)

Tab. 7: Přehled tabelovaných hodnot pK_a a pI vybraných aminokyselin, převzato z /31/, upraveno

aminokyselina	pK_{a1}	pI	pK_{a2}	pK_{aR}
glycin	9,58	5,97	2,34	*NA*
histidin	9,09	7,59	1,70	6,04
a-alanin	9,71	6,00	2,33	*NA*
b-alanin	10,08	6,79	3,51	*NA*
citrulin	9,30	5,92	2,32	*NA*
kys. asparagová	9,66	2,77	1,95	3,71

9.4.2. Titrace glycinu a α-alaninu s přídavkem formaldehydu

Z titrace glycinu a α-alaninu a z titrací těchto aminokyselin při přídavku CH_2O (viz příloha č. 3, obr. 9, 10; vybrané příklady viz příloha č. 4, obr. 13 – 16) byly odečteny pouze hodnoty disociačních konstant α-aminoskupin pK'_{a1}. Tyto hodnoty plně postačují

pro účely srovnání vlivu formaldehydu (viz tab. 8). Odpovídající hodnoty pK'_{a1} byly vzájemně porovnány.

Tab. 8: Srovnání hodnot disociačních konstant glycinu a α-alaninu při prosté titraci kyselinou chlorovodíkovou (pK'_{a1}) a při titraci s přídavkem formaldehydu (pK'_{a1f})

	gly	gly + CH_2O	rozdíl dis. konst. (gly)	poměr dis. konst.(gly)	α-ala	α-ala + CH_2O	rozdíl dis. konst.(α-ala)	poměr dis. konst. (α-ala)
měření	pK'_{a1}	pK'_{a1f}	$pK'_{a1} - pK'_{a1f}$	pK'_{a1f} / pK'_{a1}	pK'_{a1}	pK'_{a1f}	$pK'_{a1} - pK'_{a1f}$	pK'_{a1f} / pK'_{a1}
1.	9,64	7,45	2,19	0,77	9,84	8,91	0,93	0,91
2.	9,73	7,62	2,11	0,78	9,73	8,69	1,04	0,89
3.	9,49	7,39	2,10	0,78	9,80	8,78	1,02	0,90

Ze získaných výsledků vyplývá, že při použití roztoku formaldehydu dochází ke snížení hodnot disociačních konstant u obou aminokyselin – glycinu i α-alaninu, jak je uváděno v teoretické části této práce. Stejně tak bylo prokázáno, že vliv formaldehydu se výrazně liší u jednotlivých aminokyselin (porovnání poklesu u glycinu a α-alaninu). Efekt přidání formaldehydu k titrované aminokyselině spočívá v posunu rovnováhy směrem k neionizované formě. Podle rozdílů hodnot příslušných dis. konst. lze porovnávat intenzitu vazby formaldehydu, tedy velikost asociačních konstant vazby formaldehydu s aminokyselinou (pro glycin vyšší než pro α-alanin). Naměřená data a jejich porovnání také potvrzují předpoklad, že v neutrálním roztoku převažuje dipolární ionizovaná forma nad formou neionizovanou.

9.4.3. Vliv narůstající koncentrace kyseliny chlorovodíkové na pH

Z křivky „slepé titrace" (viz příloha č. 3, obr. 11) je patrné, že přidávání kyseliny má na pokles pH charakteristický vliv. Křivka závislosti pH na narůstajícím objemu titračního činidla – kyseliny chlorovodíkové prokazuje vysokou podobnost s oblastí titračních křivek při nižších hodnotách pH. Právě pokles pH na titračních křivkách za bodem ekvivalence po neutralizaci veškerého hydroxidu odpovídá typické logaritmické závislosti pH na koncentraci kyseliny. Tento fakt může ztěžovat nalezení hodnot disociačních konstant α-karboxylu pK'_{a2}. I přesto lze u většiny aminokyselin (kromě histidinu a kyseliny asparagové, kde jsou hodnoty pK'_{a2} velmi nízké 1,7 resp. 1,90) tyto hodnoty určit pomocí počítačového zpracovní dat. Lze proto doporučit titraci až do konečného objemu HCl 2,5 ml k hodnotám pH bezpečně nižším než očekávané hodnoty pK'_{a2}.

9.4.4. Titrace aminokyselin hydroxidem sodným

Z naměřených titračních křivek (viz příloha č. 3, obr. 12, 13; příloha č. 4, obr. 17 – 20) je zřejmé, že u glycinu bylo možné určit hodnoty obou koncentračních disociačních konstant – tedy dis. konst. α-aminoskupiny pK'_{a1} i dis. konst. α-karboxylu pK'_{a2} a také hodnotu izoelektrického bodu pI (viz tab. 9). Naproti tomu u α-alaninu byla určena pouze hodnota disociační konstanty pK'_{a1} a izoelektrický bod pI, hodnota disociační konstanty pK'_{a2} nebyla určena (viz tab. 9) z důvodu nejasností v dotčené oblasti titrační křivky. Naměřené hodnoty byly porovnány s hodnotami tabelovanými (viz tab. 7, str. 64) a byly vypočítány jejich odchylky.

Titrace hydroxidem sodným zajišťuje při zpracování výpočetní technikou obdobnou přesnost jako titrace kyselinou chlorovodíkovou (u pK'_{a2} glycinu je však odchylka vysoká). Na druhou stranu tento postup nezajišťuje vyřešení nedostatků s určováním hodnot disociačních konstant α-karboxylů pK'_{a2}. Titrační křivky mají standardní tvar uváděný ve většině publikací (odpovídají křivkám titrace slabé kyseliny silnou zásadou), což lze ocenit z hlediska didaktického. Nevýhody této metody však převažují, protože při stejné nebo i nižší přesnosti a při stejných komplikacích v oblasti nízkého pH, dochází navíc k ryze praktickým problémům, jako např. srážení uhličitanu sodného v titrační soupravě. Tento postup proto pro úlohu pokročilého praktika nelze doporučit.

Tab 9: Přehled naměřených hodnot pK'_a a pI a jejich odchylek od hodnot tabelovaných (při titraci hydroxidem sodným)

aminokyselina	pK'_{a1}	odchylka [%]	pI	odchylka [%]	pK'_{a2}	odchylka [%]
glycin	9,67	0,94	6,00	0,50	2,67	14,10
α-alanin	9,88	1,75	5,99	0,17	----	----

10. Diskuse

Zásadní problém úlohy představuje především otázka stanovení hodnoty disociační konstanty α-karboxylu u aminokyselin a také nereprodukovatelnost a částečně i nepřesnost manuálního zpracovaní výsledků. Proto se následující diskuse týká zejména těchto problému.

10.1. Rozbor studentských protokolů

Co se týče postupu práce popsaného v protokolech posluchačů, lze říci, že ve většině případů byl dodržen návod ze skript, který umožňuje dosažení přesných a reprodukovatelných údajů. Jednou z uvažovaných modifikací je snížení titrační rychlosti z vysokých hodnot 20 a 40, uváděných v protokolech, na 10. Při vyšší rychlosti titrace je často citlivost aparatury výrazně snížena. Dalším často opakovaným nedostatkem je ukončení titrace při vyšších hodnotách pH, takže nebylo možné přiblížit se k hodnotám disociačních konstant α-karboxylů, proto lze doporučit dovést titraci do konečného objemu 2,5 ml HCl, čímž se ve většině případů překoná pufrační kapacita titrovaných roztoků a dojde k výraznějšímu poklesu pH. Spíše méně závažným nedostatkem je používání nevhodného záznamového papíru, který vyhodnocování křivek znepřehledňuje.

Důvody chyb a vyšších odchylek výsledků lze rozdělit do tří skupin. Objevují se nedostatky plynoucí z nejasného zadání v dostupném textu (viz příloha č. 1), kde se neuvádí přesně, jaké konstanty mají být určeny, chybí návod obsluhy a nastavení titračního zařízení, kalibrace pH-metru a zadání přesných podmínek titrace (rychlost titrace, objem titračního činidla, druh zapisovacího papíru atd.). Druhá skupina chyb je při předpokladu splnění pracovního postupu ze zadání, správného nastavení titrační sestavy a kalibrace pH-metru způsobena zřejmě ručním vyhodnocováním výsledků, které vnáší do zpracování značnou subjektivitu a z toho plynoucí nepřesnosti. Studenti totiž postupují tak, že v oblasti nejmenšího poklesu křivky vyhledávají body, u kterých derivaci nahrazují podílem rozdílu hodnot pH a rozdílu hodnot objemu HCl a z těchto hodnot vybírají ty nejmenší. Tento postup nelze považovat za ideální, lze ho ale spolu se sestrojením grafu závislosti pufrační kapacity na pH uplatnit jako doplňkový krok k metodám použitých v této práci. Třetí skupinu chyb představují chyby vyvolané nedodržením návodu úlohy či porušením pracovního postupu a ty nebudou dále diskutovány.

10.2. Diskuse pracovního postupu

Pracovní postup byl přejat z dostupných skript, z návodu úlohy – Potenciometrická titrace aminokyselin (viz příloha č. 1), byl však výrazně rozšířen a částečně modifikován. Byly vyzkoušeny některé dílčí změny v koncentracích použitých roztoků a jejich použitých objemů, avšak ty nepřinesly úpravu tvaru titračních křivek v oblasti nižšího pH a neusnadnily ani zjišťování hodnot koncentračních disociačních konstant α-karboxylů, což bylo považováno za největší nedostatek protokolů studentů. Z tohoto důvodu bylo rozhodnuto vrátit se k původnímu pracovnímu postupu jako základu a modifikovat spíše způsob vyhodnocování naměřených dat.

Pracovní postup uvedený ve skriptech splňuje základní požadavky na titraci. Zajišťuje titraci ve velkém rozmezí hodnot pH od zásaditých po kyselé díky přidání hydroxidu před titrací. Je vyvážen z hlediska objemů, protože objem titrovaného roztoku v plastovém kelímku umožňuje ideální míchání, kontakt s elektrodou i plynulé odkapávání titračního činidla přímo do roztoku. Optimální jsou také koncentrace použitých roztoků, poněvadž na zobrazení titračních křivek v celém rozsahu postačuje jedno vyprázdnění byrety, tedy objem 2,5 ml HCl. Koncentrace roztoků aminokyselin se jeví také jako postačující.

Při výběru aminokyselin pro tento experiment i pro upravené zadání úlohy byla zohledněna zejména jejich dostupnost v laboratoři a také jisté didaktické požadavky, tzn. aby byly zastoupeny aminokyseliny zásadité, neutrální i kyselé (gly, his, α-ala, β-ala, cit, asp). Po analýze výsledků, však byl počet aminokyselin vhodných pro úlohu praktik zredukován, jak bude dále popsáno.

V této práci byla prováděna titrace kyselinou chlorovodíkovou a titrace hydroxidem sodným. Ze získaných výsledků vyplývá, že přesnost obou metod je obdobná, popřípadě nižší pro titraci hydroxidem sodným. Nelze však učinit spolehlivé závěry, protože k dispozici není dostatečně velký soubor dat. Titrace hydroxidem sodným má celou řadu praktických nevýhod, jež se projevily už v průběhu práce, a proto ji nelze pro úlohu pokročilých praktik doporučit.

Ukázalo se, že titrační aparaturu RADIOMETER COPENHAGEN lze v praktiku dále používat, ačkoli pro ni chybí manuál a je již starší, takže jsou dostupné novější výrobky. Soupravu se podařilo zprovoznit a optimalizovat, ale nebylo vyřešeno propojení autobyrety s titrátorem. Z tohoto důvodu nelze využít některé funkce titrátoru, především titraci do určitého konečného pH a pH-statická měření. Ovládání autobyretou však po vypracování podrobného návodu obsluhy plně postačuje pro měření potřebná v úloze praktik.

10.3. Diskuse zpracování dat a výsledků

Pro zpracování výsledků byly zvoleny dvě nové metody, které mají zpřesnit dříve použité manuální derivování oblastí s nejnižším poklesem pH na titrační křivce a sestrojování grafů závislosti pufrační kapacity na pH.

Výhody i nevýhody zpracování dat derivační jednotkou zapisovače a výpočetní technikou již byly popsány. Lze shrnout, že se jedná o metody srovnatelně přesné a spolehlivé. Derivace modulem zapisovače je poměrně jednoduchá pro obsluhu a umožňuje odečítat hodnoty disociačních konstant přímo ze zakreslených grafů. Nevýhodou je často velký příspěvek šumu.

Zpracování dat výpočetní technikou dovoluje vyhodnocení většího množství křivek v sériích, při dostatečné přesnosti i rychlosti. Nevýhodou je náročnost práce s více programy. Po vypracování přesného návodu pro WINDIG, PEAK FIT a ORIGIN se domnívám, že lze tuto metodu považovat za vhodnou i pro účely praktitk, a to jako základní postup vyhodnocování titračních křivek. Zajistí se zpracování výsledků přímo v průběhu praktik i s jejich kontrolou a srovnáním a umožní se tak titrace většího počtu aminokyselin. Největším přínosem této metody je rozšíření počtu stanovovaných titračních disociačních konstant i o dis. konst. α-karboxylů pK'_{a2}.

Ve srovnání s původním manuálním derivováním získaných křivek vykazuje derivování pomocí derivačního modulu i počítačových programů vyšší objektivnost a přesnost a usnadňuje zjišťování hodnot disociačních konstant α-karboxylů.

Před analýzou problémů se zpracováním titračních křivek je potřeba říci, že bylo provedeno zjednodušení spočívající v úvaze, že stejná infinitezimální změna objemu titračního činidla odpovídá stejné změně koncentrace. Z této úvahy potom vyplývá, že není potřeba vypočítávat koncentraci kyseliny chlorovodíkové po každém jednotlivém přídavku tohoto činidla a pro pufrační kapacitu zjednodušeně platí, že závislost dc(HCl)/dpH se rovná dV(HCl)/dpH. Lze také uvažovat tak, že celkový objem titrovaného roztoku je konstantní, resp. změna objemu po každém přídavku činidla je natolik malá, že je možné ji zanedbat. Pozornost je potřeba věnovat také faktu, že při titraci aminokyselin kyselinou chlorovodíkovou má titrační křivka průběh klesající a její derivace tak nabývá záporných hodnot. Minima absolutních hodnot derivace proto odpovídají maximům negativních hodnot derivace a opačně.

Komplikace při určování důležitých konstant z titračních křivek se objevují především u lokálních maxim v oblastech nízkého pH. Jde o sporné určení hranice jednotlivých přechodů pro jejich nízkou amplitudu, pro výskyt rozsáhlejších neohraničených plateau

nebo rozkolísanost záznamu. V těchto oblastech titračních křivek se výrazně uplatňuje typický pokles pH v závislosti na zvyšování koncentrace kyseliny chlorovodíkové v roztoku. K zpřesnění lze doporučit druhou derivaci, kde změna znaménka může být více průkazná a lépe lokalizovatelná. Na tyto problémy je potřeba studenty upozornit.

Vlastní výsledky experimentu se ukazují jako dosti přesné, srovnatelné nebo přesnější než v dostupných protokolech posluchačů. I když nebylo provedeno statistické vyhodnocení dat, lze říci, že přesné je určení hodnot izoelektrických bodů pI, protože minima na křivce derivace jsou zřejmá a digitalizace jejich nalezení ještě zpřesňuje. Vcelku přesné je i stanovení hodnot koncentračních disociačních konstant α-aminoskupin pK'_{a1} (maxima opět jasně patrná), imidazolového zbytku u histidinu a β-karboxylu u kys. asparagové pK'_{aR}. Vyšší odchylky vykazuje stanovení hodnot disociačních konstant α-karboxylů pK'_{a2}.

Z hlediska přesnosti a úplnosti výsledků lze posoudit i jednotlivé aminokyseliny v experimentu. Odchylky hodnot od tabelovaných údajů včetně jejich rozptylu jsou podobné pro všechny aminokyseliny. Vyšší odchylky se objevují u pK'_{a2} glycinu, pI β-alaninu a α-alaninu, pK'_{a1} i pK'_{a2} citrulinu. V ostatních případech se odchylky pohybují v rozmezí 0 – 3 %. Měření a výpočty jsou úplné pro glycin, α-alanin, β-alanin a citrulin, kde se větší komplikace u titračních křivek neobjevují. Pro histidin nebylo možné určit hodnotu pK'_{a2} ani v jednom případě, avšak křivky měly očekávaný průběh a ostatní konstatny byly určeny přesně. U kyseliny asparagové titrační křivky dokazují platnost hypotézy vyslovené v teoretické části, totiž že z důvodu blízkých hodnot disociačních konstant splynou skoky na titrační křivce do jednoho výraznějšího a odečítání všech konstant je výrazně ztíženo. Pro účely praktik tedy nedoporučuji provádět titraci kyseliny asparagové, i přes nesporné didaktické přínosy (kyselá aminokyselina).

Odchylky měření i následného zpracování dat mohou být způsobeny chybami v přípravě roztoků, chybami práce s elektrodou, nedostatky a nepřesnostmi v průběhu kalibrace pH-metru, nepřesným nastavením zapisovače, dále nedostatky při digitalizace dat a odečítání hodnot po derivaci.

Po důkladném zvážení výhod a nevýhod a s vědomím omezených časových podmínek úlohy v praktiku lze pro prostou titraci kyselinou chlorovodíkovou navrhnout aminokyseliny glycin, histidin, α-alanin a β-alanin a pro formolovou titraci ponechat původní glycin.

11. Závěr praktické části

Všechny nabyté poznatky a závěry byly uplatněny na nové zadání úlohy pro pokročilá praktika z biochemie (viz příloha č. 2). Tento pozměněný návod se zaměřuje především na zpracování dat, zatímco modifikace v pracovním postupu jsou spíše dílčí. Rozdílem od předešlého zadání je přesné vytýčení úkolů a cílů úlohy, stejně jako i konkrétních hodnot, které je nutné přímo zjistit. V návodu je rovněž přesně popsán způsob obsluhy titračního zařízení, metodika práce stejně jako i metodika vyhodnocení výsledků titrace výpočetní technikou a derivační jednotkou, což má zajistit vyšší přesnost a reprodukovatelnost údajů.

V úloze byl rozšířen nejen počet titrovaných aminokyselin (glycin, histidin, glycin s formaldehydem, α-alanin a β-alanin), ale také počet dílčích úkolů. V upraveném zadání je požadováno stanovení všech hodnot disociačních konstant a izoelektrických bodů (pK'_{a1}, pK'_{a2}, pI i pK'_{aR}), je však nutné tolerovat i výsledky bez určení disociačních konstant α-karboxylů pK'_{a2}.

Další úkol studentů – titrace glycinu s formaldehydem a porovnání hodnot disociačních konstant α-aminoskupiny s titrací glycinu bez formaldehydu – byl ponechán v původní podobě, protože je dostatečně názorný a postačuje.

Novým úkolem je rozlišení α-alaninu a β-alaninu umístěných v lahvích označených jen *alanin* podle jejich odlišných koncentračních disociačních konstant. Tento úkol klade vyšší nároky na přesnost, které lze splnit díky počítačovému vyhodnocení dat.

Snahou je zajistit zpracování výsledků titrace větším počtem metod – manuální derivací, derivační jednotkou zapisovače a výpočetní technikou. Studenti mají tyto metody porovnat na glycinu (manuálně a výpočetní technikou) a histidinu (manuálně a zapojením derivačního modulu) z hlediska přesnosti i náročnosti. Cílem úlohy má být seznámit studenty nejen s principy titrace, s užitím automatických titračních souprav, s titračními křivkami aminokyselin jako typických přírodních látek a zároveň slabých elektrolytů, ale také s užitím titrace pro účely kvalitativní analýzy (α-alanin a β-alanin) a obecně s různými možnostmi zpracování naměřených dat. Přitom mají studenti porovnat jejich odlišnou přesnost, spolehlivost i složitost.

Shrnutí

- Z literárních zdrojů byly shrnuty poznatky o teorii kyselin a zásad, o měření pH, o potenciometrických titracích, o acidobazických vlastnostech aminokyselin a bílkovin a o jejich titračních křivkách.

- Potenciometrickou titrací kyselinou chlorovodíkovou byl stanoven analytický faktor hydroxidu sodného a měřeny neutralizační titrační křivky aminokyselin glycinu, histidinu, α-alaninu, β-alaninu, citrulinu a kyseliny asparagové. Dále byla za stejných podmínek provedena titrace aminokyselin glycinu a α-alaninu s přídavkem formaldehydu. Při titraci histidinu bylo vyzkoušeno zapojení derivační jednotky zapisovače. Při hledání optimalizace úlohy byla provedena potenciometrická titrace aminokyselin glycinu a α-alaninu hydroxidem sodným.

- Výsledky měření praktické části byly zpracovány pomocí výpočetní techniky a porovnány jednak s výsledky získanými z derivační jednotky zapisovače, jednak s výsledky manuální derivace ze studentských protokolů dřívějších let. Byla posouzena vhodnost těchto metod pro účely pokročilých praktik z biochemie.

- Titrační křivky aminokyselin byly popsány z teoretického hlediska a byly z nich odvozeny hodnoty koncentračních disociačních konstant a hodnoty izoelektrických bodů. Také byly vysvětleny výsledky formolových titrací.

- S využitím všech poznatků byl vypracován podrobný návod pro sestavení a obsluhu titrační aparatury, zevrubná metodika pro zpracování výsledků výpočetní technikou a nové zadání úlohy pro pokročilá praktika.

Věřím, že úloha, která již delší dobu není do pokročilých praktik běžně zařazována, se může v modifikované podobě vrátit jako jejich plnohodnotná součást.

Seznam použité literatury

1) Pachmann, E., Hofmann, V.: Obecná didaktika chemie. SPN, Praha (1981)
2) Čtrnáctová, H., Halbych, J.: Didaktika a technika chemických pokusů. UK, Praha (1997)
3) Kusáková, J.: Ionexová chromatografie směsi aminokyselin na silně kyselém katexu v Na^+ cyklu – rozbor a modifikace úlohy pro pokročilé praktikum z biochemie: Diplomová práce PřF UK Praha, katedra biochemie, str. 1 – 4 (2000)
4) Dvořák, J., Koryta, J., Boháčková, V.: Elektrochemie. Academia, Praha (1975)
5) Fischer, O., Fišer, J., Kišová, L., Mollin, J., Zemánek, F.: Roztoky elektrolytů, v knize Fyzikální chemie II, SPN, Praha, str. 156 – 178 (1984)
6) Hála, E., Reiser, A.: Elektrochemie, v knize Fysikální chemie 2, Academia, Praha, str.235 – 376 (1966)
7) Kalous, V., Pavlíček, Z.: Biofyzikální chemie. SNTL, Praha (1980)
8) Dawes, A.E.: Kvantitativní problémy v biochemii. Nakladatelství Československé akademie věd, Praha (1965)
9) Covington, A.K., Bates, R.G., Durst, R.A.: Pure Appl. Chem. 57, 531 – 542 (1985)
10) Baucke, F.G.K.: Anal. Bioanal. Chem. 374, 772 – 777 (2002)
11) Čihalík, J., Dvořák, J., Suk, V.: Příručka měření pH. SNTL, Praha (1975)
12) Kalous, V.: Potenciometrie, v knize Základy fyzikálně chemických metod, SNTL, Praha, str. 168 – 209 (1975)
13) Chin, Y.-L., Chou, J.-Ch., Sun, T.-P., Chung, W.-Y., Hsiung, S.-K.: Sens. Actuators, B 76, 582 – 593 (2001)
14) Laongsri, B., Boonyakong, Ch., Tangpaisarnkul, N., Cherdachu, Ch.: Accred. Qual. Assur. 12, 194 – 200 (2007)
15) Prenesti, E., Fisicaro, P., Berto, S., Ferrara, E., Daniele, P. G.: Anal. Bioanal. Chem. 387, 2595 – 2600 (2007)
16) Ito, S., Hachiya, H., Baba, K., Asano, Y., Wada, H.: Talanta 42, 1685 – 1690 (1995)
17) www.ph-meter.info/single-double-junction (6.6.2007, 15:00)
18) Licht, S.: Anal. Chem. 57, 514 – 519 (1985)
19) Ha, Y., Wang, M.: Electroanalysis 18, 1121 – 1125 (2006)
20) Li, J., Du, Y., Fang, Ch.: Electroanalysis 19, 608 – 611 (2007)
21) Em, P.B.: Přednáška ISFET, Theory and Practice (Toronto, October 2003), na URL: http://ewh.ieee.org/tc/sensors/Tutorials/ISFET-Bergveld.pdf (10.6.2007, 13:00)
22) Gabel, J., Vonau, W., Shuk, P., Guth, U.: Solid State Ionics 169, 75 – 80 (2004)

23) Blaz, T., Migdalski, J., Lewenstam, A.: Analyst 130, 637 – 643 (2005)

24) Egami, C., Takeda, K., Isai, M., Ogita, M.: Opt. Commun. 122, 122 – 126 (1996)

25) Saari, L.A, Seitz, W.R.: Anal. Chem. 54, 821 – 823 (1982)

26) Munkholm, Ch., Walt, D. R., Milanovich, F.P., Klainer, S.M.: Anal. Chem. 58, 1427 – 1430 (1986)

27) Jordan, D.M., Walt, D.R., Milanovich, F.P.: Anal. Chem. 59, 437 – 439 (1987)

28) Kneen, M., Farinas, J., Li, Y., Verkman, A. S.: Biophys. J. 74, 1591 – 1599 (1998)

29) www.chemguide.co.uk/physical/acidbaseeqia (6. 6. 2007, 16:00)

30) Alberty, R.A.: Electrochemical Properties of the Proteins and Amino Acids, v knize The Proteins Chemistry, Biological Acitivity, and Methods, (Neurath, H., Bailey, K.) Academic Press, New York, str. 461 – 548 (1953)

31) Lide, D.R.:Handbook of Chemistry and Physics. Taylor Francis, New York (2005 – 2006)

32) Edsall, J. T.: Proteins as Acids and Bases, v knize Proteins, Amino Acids and Peptides as Ions and Dipolar Ions, (Cohn, J.E. ed.) Reinhold Publis., New York, str. 444 – 505 (1943)

33) Steinhardt, J., Zaiser, E.M.: Adv. Protein Chem. 10, 151 – 226 (1955)

34) Van Os, G.A.J., Koopman – Van Eupen, J.H.M.: Rec. Trav. Chim. Pays-Bas 76, 390 – 400 (1957)

35) Karpenko, V., Kalous, V., Pavlíček, Z.: Collect. Czech. Chem. Commun. 33, 3457 – 3462 (1968)

36) Karpenko, V., Kalous, V.: Collect. Czech. Chem. Commun. 37, 3972 – 3977 (1972)

37) Karpenko, V., Kalous, V.: Collect. Czech. Chem. Commun. 38, 2684 - 2685 (1973)

38) Kolektiv: Biophysical Chemistry, Practical Training Unesco Courses, skriptum PřF UK Praha, str. 17 – 27 (1974)

39) Tanford, Ch., Kirkwood, J.G.: J. Am. Chem. Soc.79, 5333 - 5338 (1957)

40) Steinhardt, J., Reynolds, J. A.: Multiple Equilibria in Proteins. Academic Press, New York, London (1969)

41) Tanford, Ch.: Physical Chemistry of Macromolecules. Wiley, New York, London, Sydney (1961)

42) Onufriev, A., Case, D.A., Ullmann, G.M.: Biochemistry 40, 3413 – 3419 (2001)

43) Beran, P., Opekar, F., Štulík, K.: Instrumentální analytické metody, Texty k praktickým cvičení. SPN, Praha (1977)

44) Příručka ke komb. elektrodě RADIOMETER COPENHAGEN GK2401C, bez vročení

45) Kolektiv: Biochemical techniques (A practical course) II, skriptum PřF UK Praha, str. 23 – 25 (1995)

„Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovatelů."

Jméno a příjmení s adresou	**Číslo OP**	**Datum vypůjčení**	**Poznámka**

Přílohy

Příloha č. 1: Původní zadání úlohy (přeloženo z angličtiny)[45]

Potenciometrická titrace aminokyselin

Úkol:

Měřte titrační křivky silné zásady a aminokyselin glycinu a histidinu, odhadněte zdánlivé disociační konstanty obou aminokyselin. Z titrační křivky glycinu za přítomnosti formaldehydu se pokuste vyvodit závěr o populaci dipolárních ionizovaných a neionizovaných forem této aminokyseliny v neutrálním prostředí.

Princip:

Aminokyseliny jsou titrovány silnou kyselinou HCl za použití automatické titrační aparatury. Zdánlivé disociační konstanty pK ionizovaných skupin se rovnají pH při maximální pufrační kapacitě, kdy je koncentrace ionizované a neionizované formy totožná. Formaldehyd se váže na nenabité aminoskupiny, ale nereaguje s pozitivně nabitými skupinami. Účinek přidání formaldehydu spočívá v posunu pK aminoskupiny směrem do oblasti, kde jsou přítomny nabité formy.

Reagencie:

roztok glycinu 0,1 M

roztok histidin hydrochloridu 0,1 M

roztok NaOH 0,5 M

roztok HCl 1 M

roztok formaldehydu 10% neutralizovaný NaOH

Přístroje a pomůcky:

Titrační zařízení RADIOMETER COPENHAGEN – pH-metr, titrátor, zapisovač, automatická byreta, pipety (1, 2, 5 ml)

Postup:

1) Pipetujte 2 ml 0,5 M roztoku NaOH, přidejte 18 ml destilované vody a titrujte roztokem HCl. Opakujte třikrát.
2) Pipetujte 4ml 0,1 M roztoku glycinu, přidejte 1 ml roztoku NaOH a 16 ml destilované vody. Titrujte 1 M roztokem HCl.
3) Pipetujte 4 ml 0,1 M roztoku glycinu, přidejte 1 ml roztoku NaOH, 1 ml roztoku formaldehydu a 15 ml destilované vody a titrujte 1 M roztokem HCl.
4) Pipetujte 4 ml 0,1 M roztoku histidinu, 2 ml roztoku NaOH a 15 ml destilované vody. Titrujte 1M roztokem HCl.

Vyhodnocení:

1) Z výsledků titrace NaOH vypočtěte analytický faktor roztoku NaOH jako podíl *přesná koncentrace/teoretická koncentrace*.
2) Z titračních křivek v titraci 2, 3 a 4 vypočtěte pufrační kapacitu a sestrojte graf závislosti pufrační kapacity na pH. Odhadněte zdánlivé disociační konstanty glycinu, glycinu s přídavkem formaldehydu a histidinu.

Příloha č. 2: Upravené zadání úlohy

Potenciometrická titrace aminokyselin

Úkol:

Měřte titrační křivky silné zásady (NaOH) a aminokyselin glycinu, histidinu, α-alaninu, β-alaninu a kyseliny asparagové. Odhadněte a následně zpřesněte zdánlivé disociační konstanty aminokyselin. Určete hodnoty disociačních konstant α-aminoskupin pK'_{a1}, hodnoty izoelektrických bodů pI, hodnoty disociačních konstant skupin imidazolu u histidinu a β-karboxylu u kyseliny asparagové pK'_{aR} a také hodnoty disociačních konstant α-karboxylů pK'_{a2}, pokud je to možné. Z titrační křivky glycinu za přítomnosti formaldehydu se pokuste vyvodit závěr o populaci dipolárních ionizovaných a neionizovaných forem této aminokyseliny v neutrálním prostředí. Srovnejte posun hodnot disociačních konstant pK'_{a1} v těchto dvou krocích.

Princip:

Aminokyseliny jsou titrovány silnou kyselinou HCl za použití automatické titrační aparatury. Zdánlivé disociační konstanty pK'_a ionizovaných skupin se rovnají pH při maximální pufrační kapacitě, kdy je koncentrace ionizované a neionizované formy stejná. Formaldehyd se váže na neionizované aminoskupiny, ale nereaguje s nabitými. Účinek přidání formaldehydu spočívá v posunu pK'_a aminoskupiny směrem do oblasti, kde jsou přítomny nabité formy.

Reagencie:

roztok glycinu 0,1 M

roztok histidin hydrochloridu 0,1 M

roztok α-alaninu 0,1 M (označeno jako alanin)

roztok β-alaninu 0,1 M (označeno jako alanin)

roztok NaOH 0,5 M

roztok HCl 1 M

roztok formaldehydu 10%

Přístroje a pomůcky:

Titrační zařízení RADIOMETER COPENHAGEN – pH-metr, titrátor, zapisovač, automatická byreta, KCl elektroda, 6 titračních plastových kelímků, zapisovací papír RADIOMETER COPENHAGEN nebo LP PRAHA, zapisovací fixy, 2 pipety (2, 5 ml), odměrný válec 25 ml, skleněná tyčinka, pipetovací nástavec a střička.

Postup:

1) Pipetujte 2 ml 0,5 M roztoku NaOH, přidejte 18 ml destilované vody a titrujte roztokem HCl rychlostí 20 nebo 40. Opakujte třikrát.
2) Pipetujte 4ml 0,1 M roztoku glycinu, přidejte 1 ml roztoku NaOH a 16 ml destilované vody. Titrujte 1 M roztokem HCl rychlostí 10.
3) Pipetujte 4 ml 0,1 M roztoku glycinu, přidejte 1 ml roztoku NaOH, 1 ml roztoku formaldehydu a 15 ml destilované vody a titrujte 1 M roztokem HCl.
4) Pipetujte 4 ml 0,1 M roztoku histidinu, 2 ml roztoku NaOH a 15 ml destilované vody. Titrujte 1M roztokem HCl rychlostí 10.
5) Pipetujte 4 ml 0,1 M roztoku histidinu, 2 ml roztoku NaOH a 15 ml destilované vody. Titrujte 1M roztokem HCl rychlostí 5 se zapojením derivační jednotky na zapisovači.
6) Pipetujte 4ml roztoku z první lahve označené jako alanin, přidejte 1 ml roztoku NaOH a 16 ml destilované vody. Titrujte 1 M roztokem HCl rychlostí 10.
7) Pipetujte 4ml roztoku z druhé lahve označené jako alanin, přidejte 1 ml roztoku NaOH a 16 ml destilované vody. Titrujte 1 M roztokem HCl rychlostí 10.

Obsluha titrační aparatury při standardní titrace:

Titrační aparatura je zapojena a uvedena do standardního výchozího stavu, připravena pro titraci. Autobyreta je spolehlivě zprovozněna. Elektroda je aktivní a ponořena ve vodě v plastovém kelímku.

1) Kalibrace – **vypnout HOLD** na pH-metru, standardní roztok o pH 7,00 – pomocí **BUFFER** nastavit hodnotu na číselníku pH-metru, roztok o pH 4,01 – pomocí **SENS.** doladit přesnost pH-metru, roztok o pH 10,00 (mezi dalšími měřeními v tomto kroku jen plastový kelímek s vodou) – **PEN UP (REMOTE)** a pomocí **PEN POSITION** upřesnit polohu pisátka na zapisovači (mezi měřeními vždy omýt elektrodu dest. vodou ze střičky)
2) Titrace – míchadlo – **ON**, autobyreta – **REFILL, CLOSE (REMOVE AIR)** – pokud je potřeba, **TITRATE, COUNTER RESET, SPEED** – volba rychlosti, zapisovač – **CLUTCH ON, PEN DOWN**, autobyreta – **EMPTY BURETTE** – provést titraci až do konečného objemu 2,5 ml HCl
3) Po skončení titrace – míchadlo **OFF**, autobyreta – vypnout **EMPTY BURETTE**, zapisovač – **CLUTCH OFF, PEN STAND BY**, pH-metr **HOLD**

Obsluha titrační aparatury při derivačním zapojení (viz předchozí):

Na zapisovači – **DERIVATION UNIT – ON, MEDIUM, DOWN**

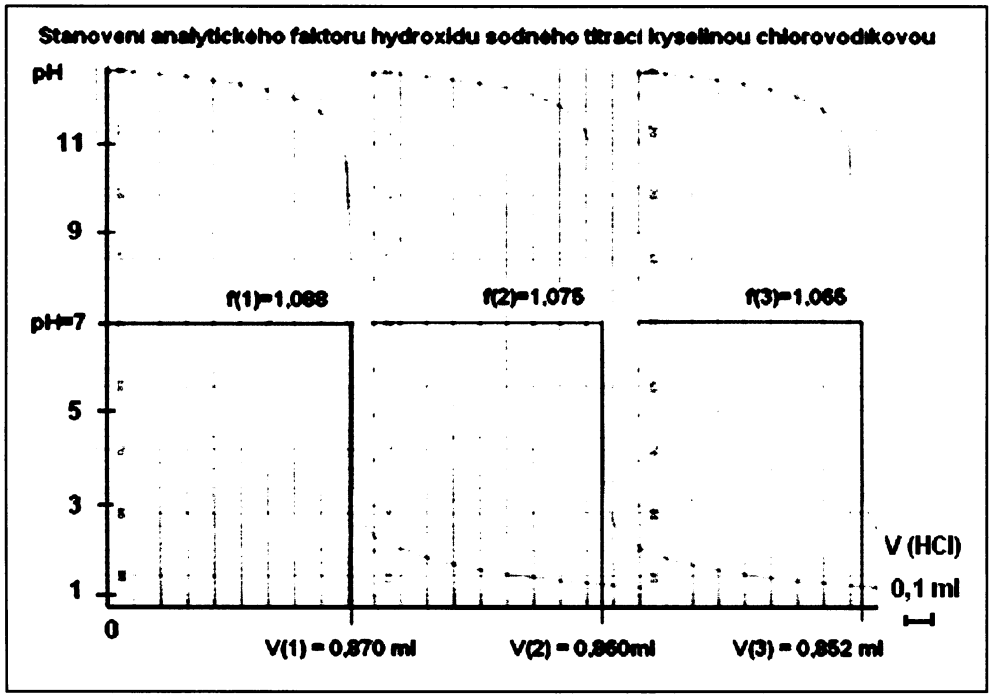
Vyhodnocení:

1) Z výsledků titrace NaOH vypočtěte analytický faktor roztoku NaOH jako podíl *přesná koncentrace/teoretická koncentrace*.
2) Z titračních křivek v titraci 2 a 4 vypočtěte pufrační kapacitu a sestrojte graf závislosti pufrační kapacity na pH. Odhadněte zdánlivé disociační konstanty a izoelektrické body glycinu, glycinu s přídavkem formaldehydu a histidinu.
3) Titrační křivky z titrací 2, 3, 6 a 7 vyhodnoťte pomocí výpočetní techniky. Z titrační a paralelní derivační křivky z titrací 4 a 5 přímo odečtěte požadované hodnoty.
4) Srovnejte získané hodnoty s hodnotami tabelovanými. Porovnejte přesnost metod zpracování výsledků u glycinu (manuální derivace a výpočetní technika) a u histidinu (manuální derivace a derivační zapojení zapisovače) včetně možnosti získání hodnot disociačních konstant α-karboxylů pK'_{a2}.
5) Porovnejte titrační křivky glycinu, alaninu a histidinu, popište jejich tvar, popřípadě odchylky od předpokladu. Určete, zda lze odlišit titrací α-alanin a β-alanin a následně proveďte.
6) Porovnejte titrační křivky glycinu a glycinu s formaldehydem. Vysvětlete rozdíl hodnot pK'_{a1} a vliv formaldehydu. Vyslovte závěry o nenabitých a nabitých dipolárních formách glycinu v neutrálním roztoku.

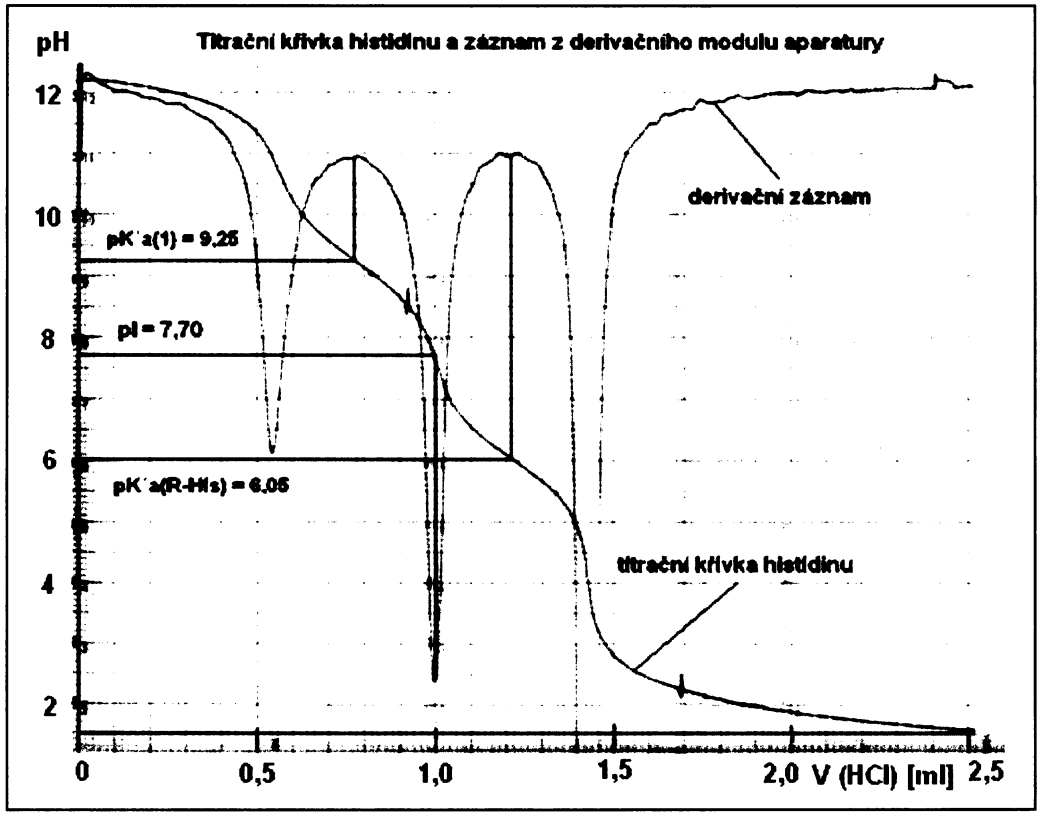
Postup zpracování výsledků pomocí výpočetní techniky:

1) **Scanner** – obsluha závisí na typu a značce
2) **WINDIG**: FILE → OPEN → název (např. gly.bmp) → OK, SCALE → DEFINE 3 PTS → zadat do COORDINATES, OPTIONS → COLOR LIMITS volba aktivní barvy, FILE → RUBBER vygumovat okolí křivky → RIGHT CLICK na začátku křivky → DATA → SAVE → gly.dat → OK
3) **EXCEL**: SOUBOR → OTEVŘÍT → gly.dat → OK, úprava na 2 sloupce hodnot, SOUBOR → ULOŽIT→ gly.xls → OK
4) **PEAK FIT**: FILE → IMPORT → gly.xls→ OTEVŘÍT, označení sloupce X Values, Y Values → OK→ OK, DATA → DIGITAL FILTER → FINAL DATA COUNT – 250, WINDOW POINT COUNT – 6, FIT MODEL – QUADRATIC→ OK, FILE → SAVE AS → gly.txt → ULOŽIT
5) **ORIGIN**: FILE → IMPORT → SINGLE ASCII → gly.txt → OTEVŘÍT, výběr sloupců → PLOT → LINE → OK, ANALYSIS → CALCULUS → DIFFERENTIATE → SCREEN READER a DATA READER → hodnoty na DATA DISPLAY, FILE → PRINT

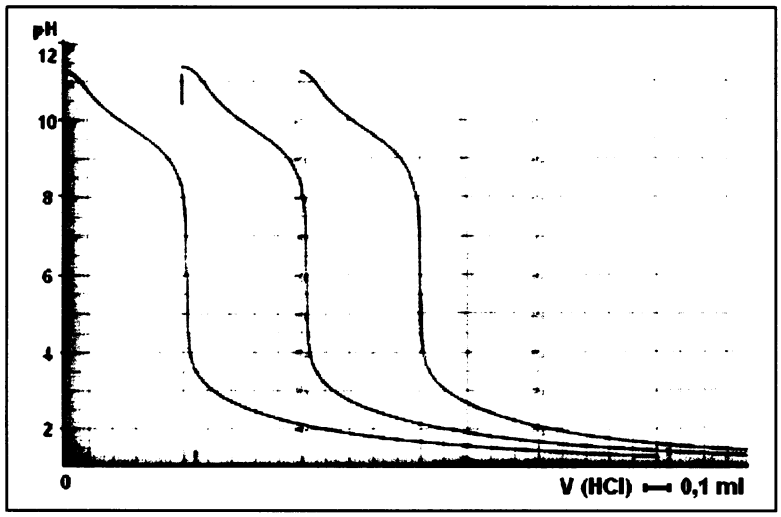
Příloha č. 3: Přehled titračních křivek získaných ze zapisovače titrační aparatury



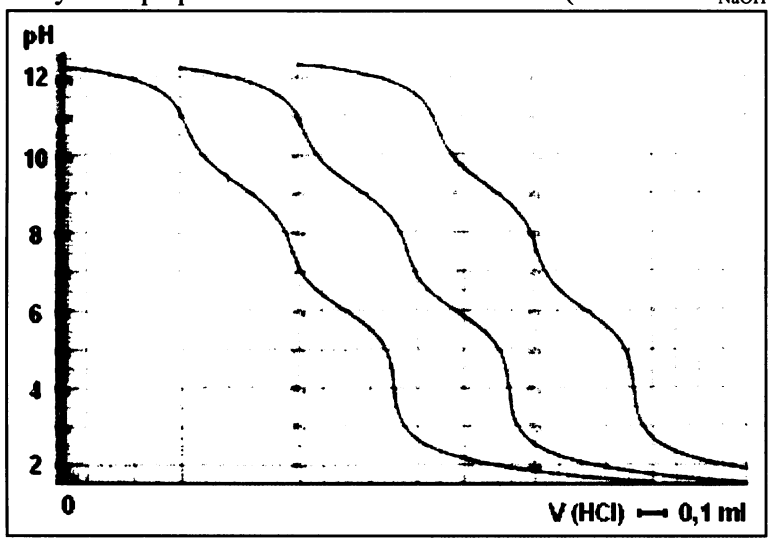
Obr.1: Stanovení analytického faktoru roztoku NaOH (teoretická koncetrace c_{NaOH} = 0,5 mol/l) titrací kyselinou chlorovodíkovou (c_{HCl} = 1 mol/l) při rychlosti 40 na autobyretě.



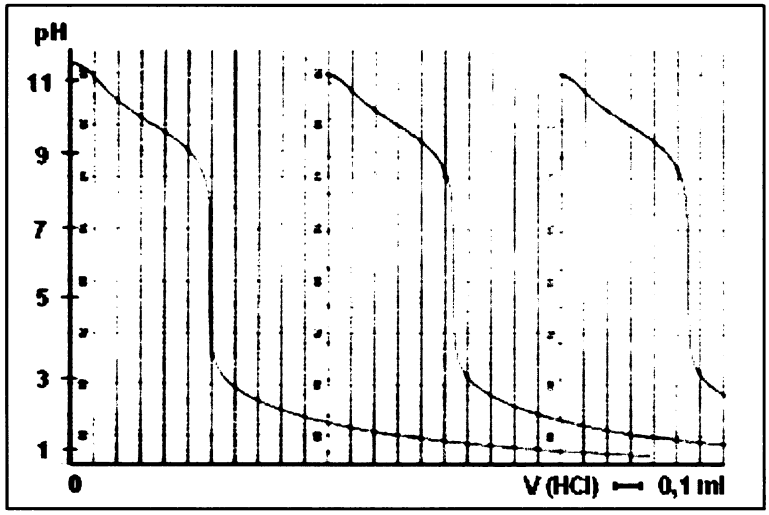
Obr. 2: Zpracování titrační křivky histidinu (c_{His} = 0,02 mol/l) derivačním modulem aparatury. Titrace byla provedena kyselinou chlorovodíkovou (c_{HCl} = 1 mol/l), rychlostí 5 na autobyretě a po předchozí alkalizaci roztokem NaOH (v titrovaném roztoku c_{NaOH} = 0,02 mol/l).



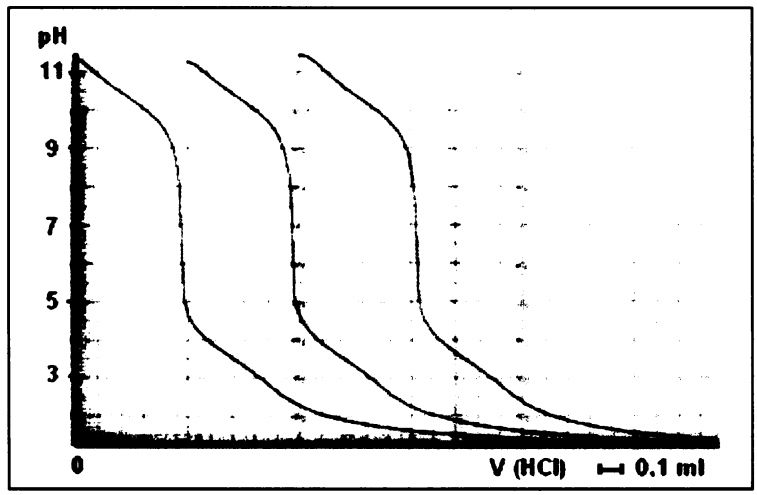
Obr.3: Titrační křivky glycinu (c_{gly} = 0,02 mol/l) při titraci kys. chlorovodíkovou (c_{HCl} = 1 mol/l), rychlostí 10 na autobyretě a po předchozí alkalizaci rozt. NaOH (v titr. rozt. c_{NaOH} = 0,02 mol/l).



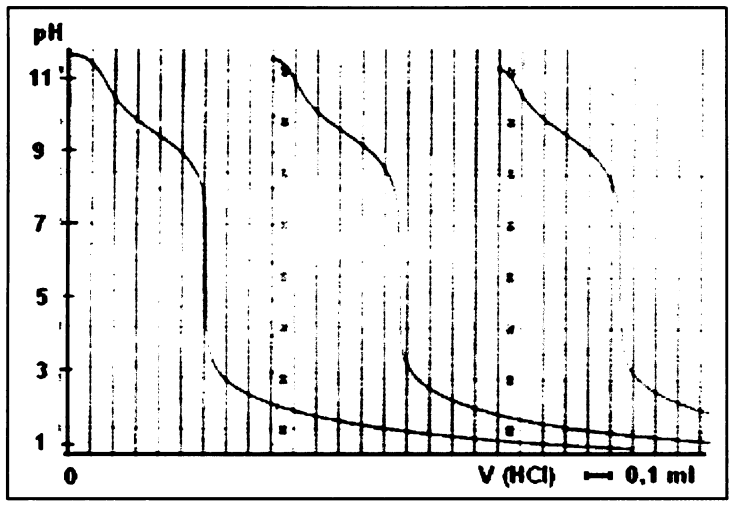
Obr. 4: Titr. křivky histidinu (c_{His} = 0,02 mol/l) při titraci kys. chlorovodíkovou (c_{HCl} = 1 mol/l), ryhlostí 10 na autobyretě a po předchozí alkalizaci rozt. NaOH (v titr. rozt. c_{NaOH} = 0,02 mol/l).



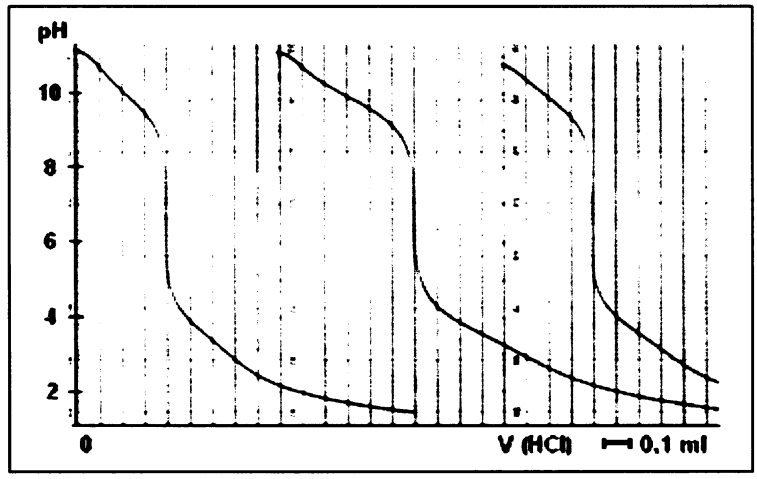
Obr. 5: Titr. křivky α-alaninu ($c_{\alpha\text{-ala}}$ = 0,02 mol/l) při titraci kys. chlorovodíkovou (c_{HCl} = 1 mol/l), rychlostí 10 na autobyretě a po předchozí alkalizaci rozt. NaOH (v titr. rozt. c_{NaOH} = 0,02 mol/l).



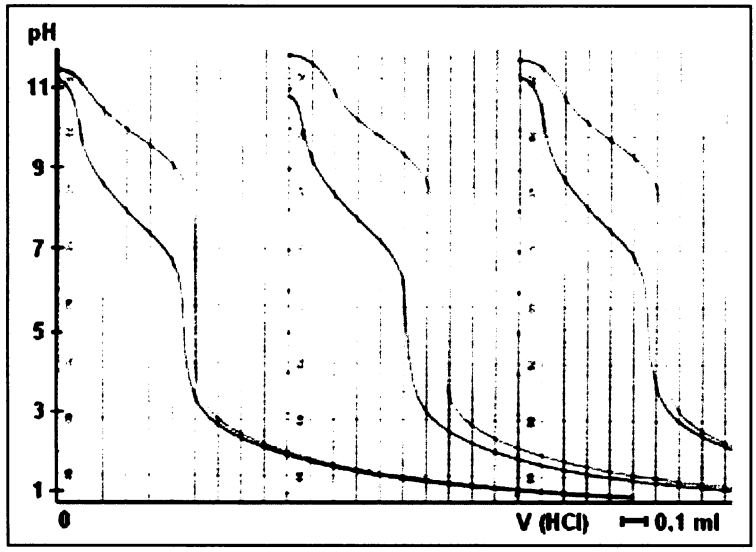
Obr. 6: Titr. křivky β-alaninu ($c_{\beta\text{-ala}}$ = 0,02 mol/l) při titraci kys.chlorovodíkovou (c_{HCl} = 1 mol/l), rychlostí 10 na autobyretě a po předchozí alkalizaci rozt. NaOH (v titr. rozt. c_{NaOH} = 0,02 mol/l).



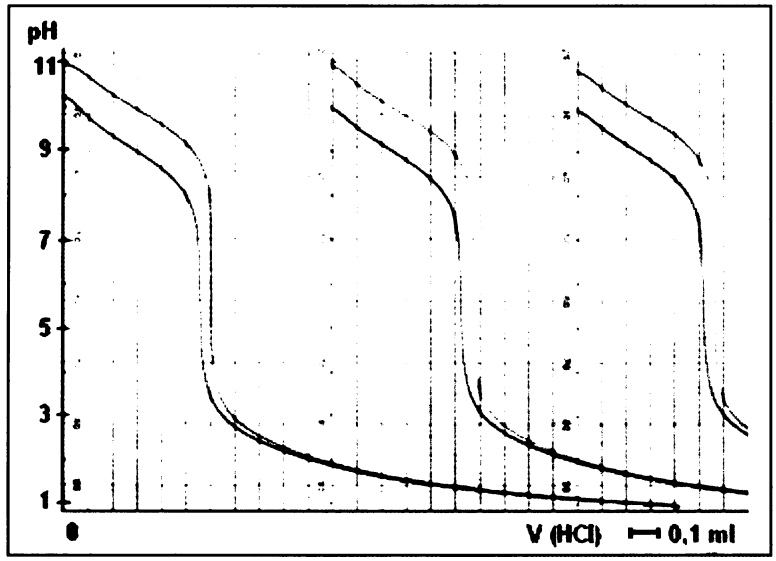
Obr. 7: Titrační křivky citrulinu (c_{cit} = 0,02 mol/l) při titraci kys. chlorovodíkovou (c_{HCl} = 1 mol/l), rychlostí 10 na autobyretě a po předchozí alkalizaci rozt. NaOH (v titr. rozt. c_{NaOH} = 0,02 mol/l).



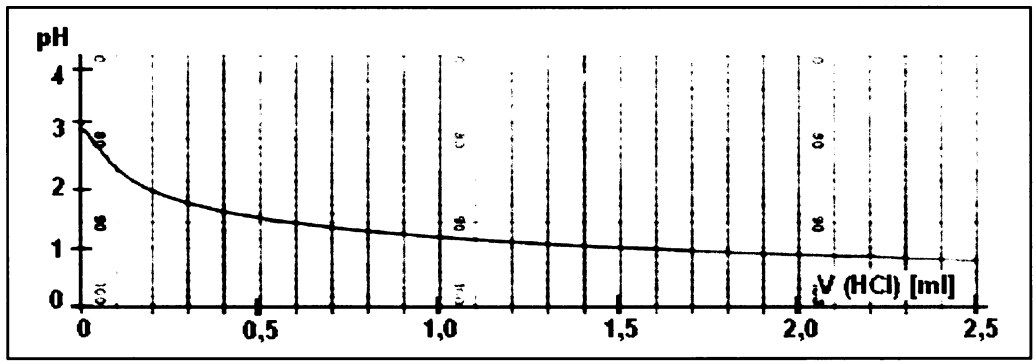
Obr. 8: Titrační křivky kyseliny asparagové (c_{asp} = 0,02 mol/l) při titraci kys.chlorovodíkovou (c_{HCl} = 1 mol/l), rychlostí 10 na autobyretě a po předchozí alkalizaci roztokem NaOH (v titrovaném roztoku c_{NaOH} = 0,02 mol/l).



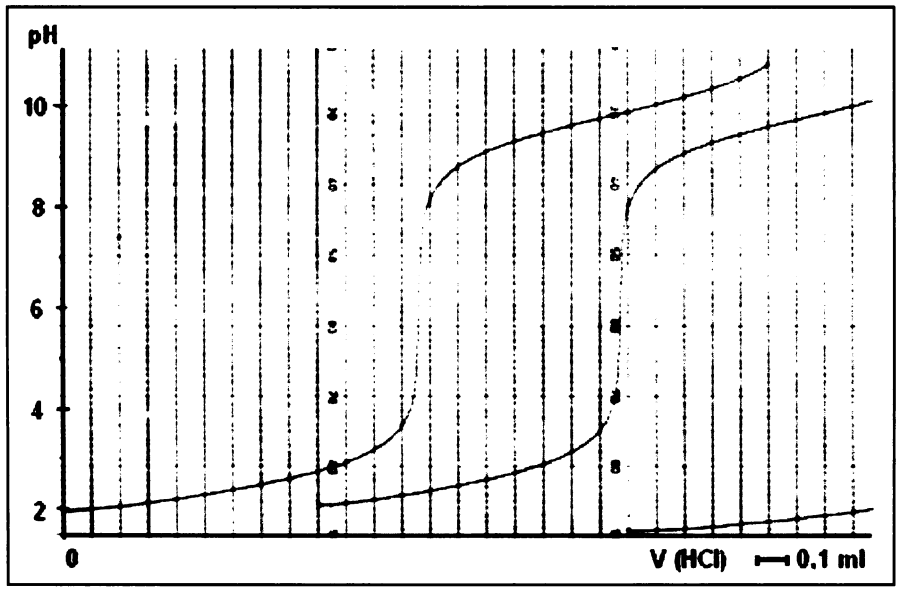
Obr. 9: Titr. křivky glycinu (c_{gly} = 0,02 mol/l) při titraci kys. chlorovodíkovou (c_{HCl} = 1 mol/l) bez přídavku CH_2O (červeně) a s přídavkem 10% roztoku CH_2O (černě) vždy rychlostí 10 na autobyretě a po předchozí alkalizaci roztokem NaOH (v titrovaném roztoku c_{NaOH} = 0,02 mol/l).



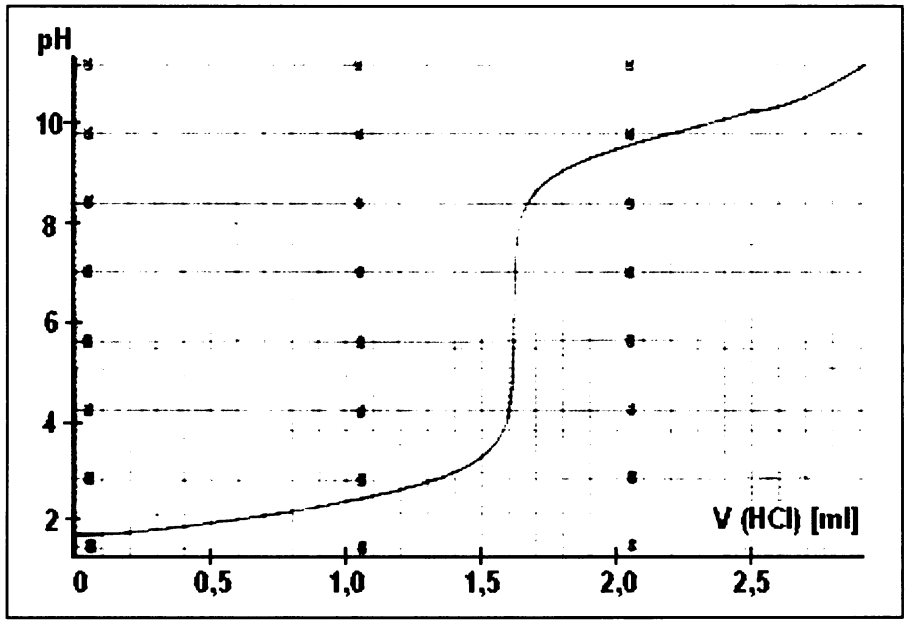
Obr. 10: Titr. křivky α-alaninu ($c_{\alpha\text{-ala}}$ = 0,02 mol/l) při titraci kys. chlorovodíkovou (c_{HCl} = 1 mol/l) bez přídavku CH_2O (červeně) a s přídavkem 10% roztoku CH_2O (černě) vždy rychlostí 10 na autobyretě a po předchozí alkalizaci roztokem NaOH (v titrovaném roztoku c_{NaOH} = 0,02 mol/l).



Obr. 11: „Slepá titrace" – Závislost pH na koncentraci kyseliny chlorovodíkové, provedeno prostým přidáváním titračního činidla (HCl, c = 1 mol/l) do destilované vody (V_0 = 21 ml).



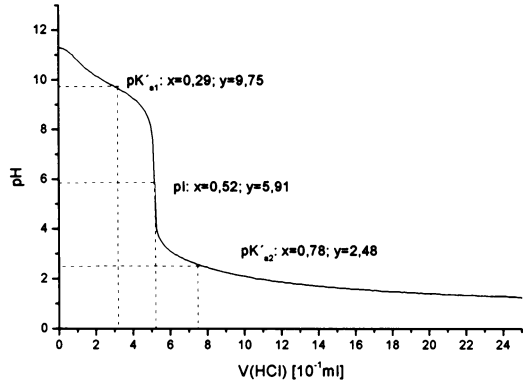
Obr. 12: Titrační křivky glycinu (c_{gly} = 0,02 mol/l) při titraci hydroxidem sodným (c_{NaOH} = 0,5 mol/l), rychlostí 10 na autobyretě a po předchozím okyselení HCl (v titrovaném roztoku c_{HCl} = 0,02 mol/l).



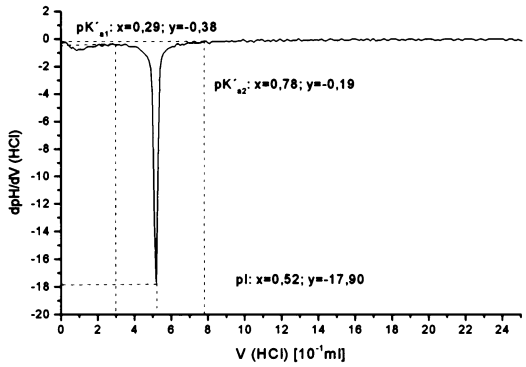
Obr. 13: Titrační křivka α-alaninu ($c_{\alpha\text{-ala}}$ = 0,02 mol/l) při titraci hydroxidem sodným (c_{NaOH} = 0,5 mol/l), rychlostí 10 na autobyretě a po předchozím okyselení HCl (v titrovaném roztoku c_{HCl} = 0,02 mol/l).

Příloha č. 4: Vybrané příklady titračních křivek aminokyselin a jejich derivace po zpracování výpočetní technikou

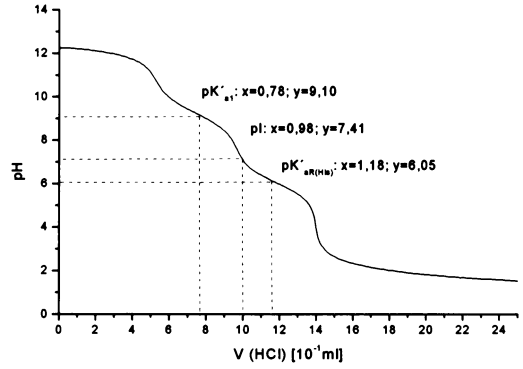
Jedná se o ukázky rekonstrukce titračních křivek a jejich první derivace provedené pomocí výpočetní techniky v programu ORIGIN 6.0 (Mirocal Software Inc.). Bližší popisy všech titračních křivek stejně jako podmínky titrace jsou dostupné v příloze 3 u příslušných grafů.



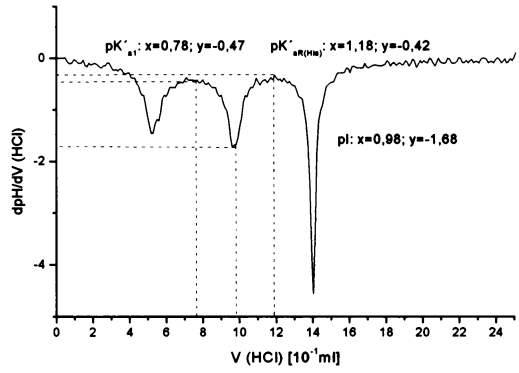
Obr. 1: Titrační křivka glycinu



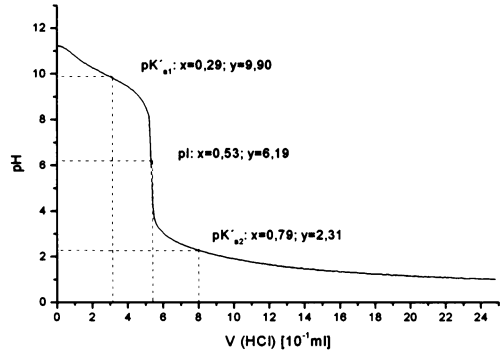
Obr. 2: Derivace titrační křivky glycinu



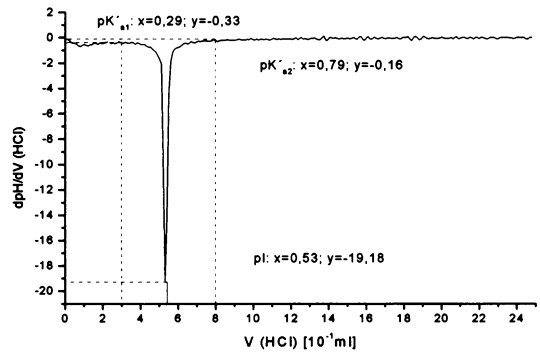
Obr. 3: Titrační křivka histidinu



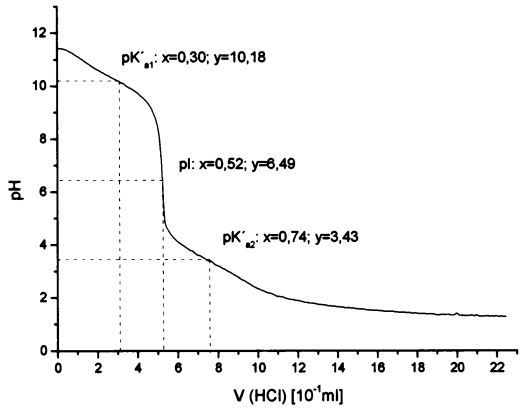
Obr. 4: Derivace titrační křivky histidinu



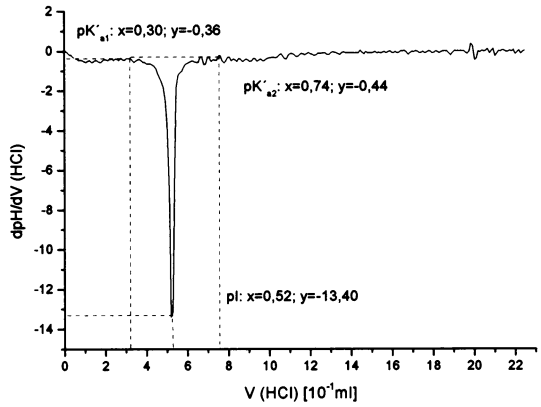
Obr. 5: Titrační křivka α-alaninu



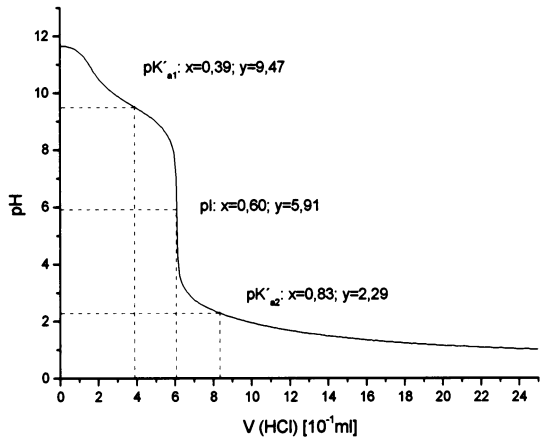
Obr. 6: Derivace titrační křivky α-alaninu



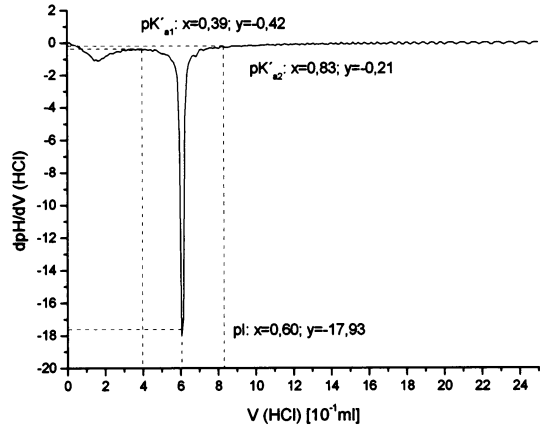
Obr. 7: Titrační křivka β-alaninu



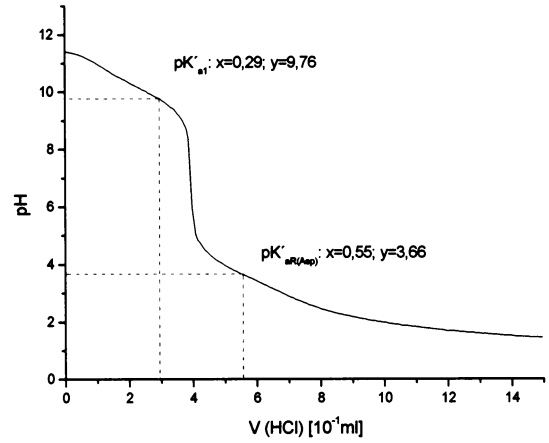
Obr. 8: Derivace titrační křivky β-alaninu



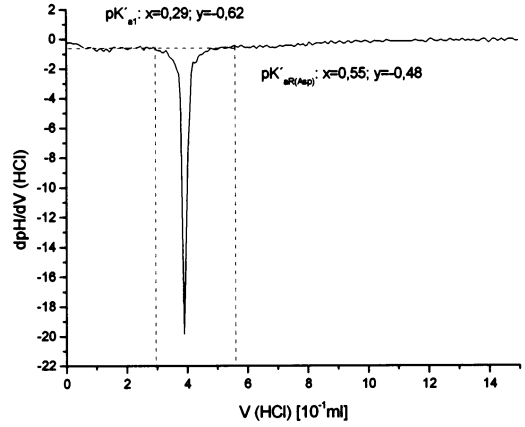
Obr. 9: Titrační křivka citrulinu



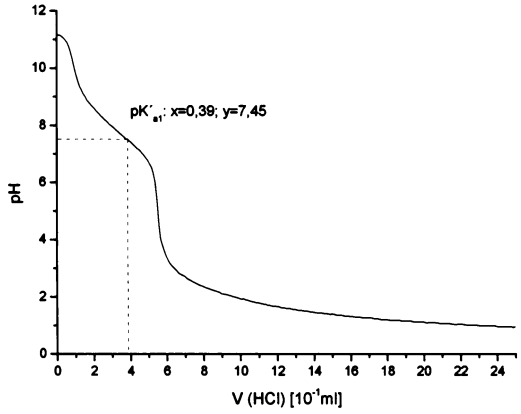
Obr. 10: Derivace titrační křivky citrulinu



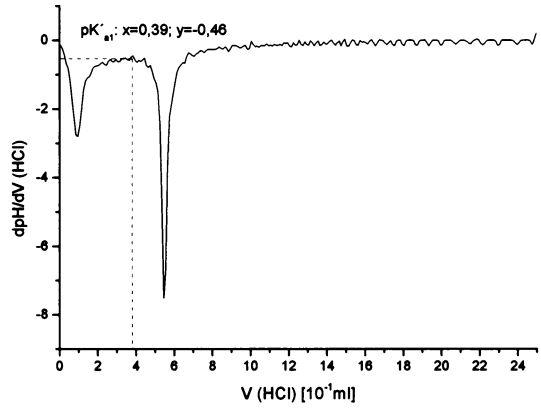
Obr. 11: Titrační křivka kyseliny asparagové



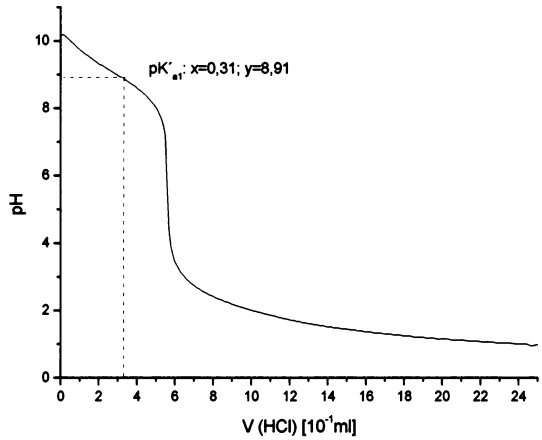
Obr. 12: Derivace titrační křivky kys. asparagové



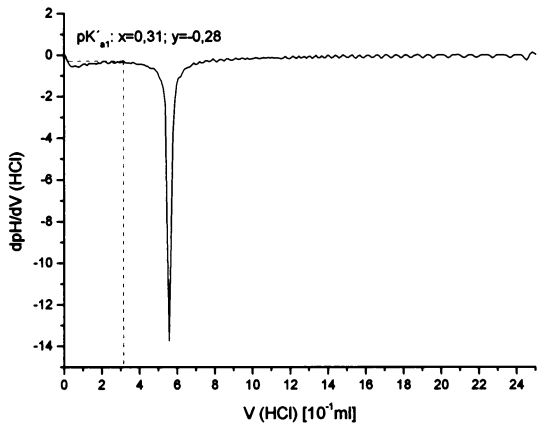
Obr. 13: Titrační křivka glycinu s CH_2O



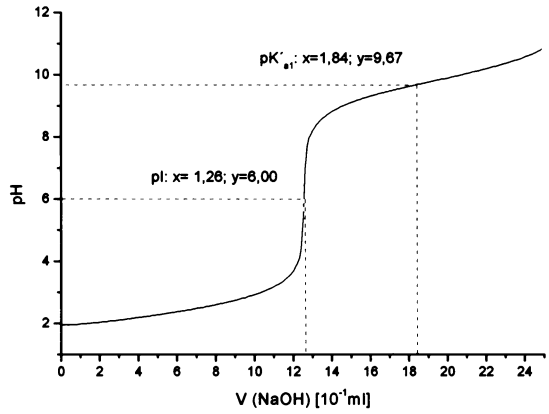
Obr. 14: Derivace titrační křivky glycinu s CH_2O



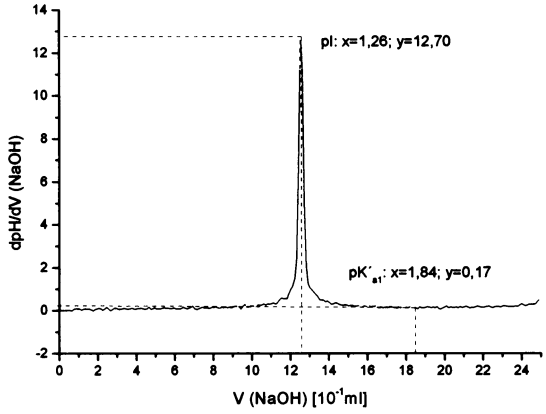
Obr. 15: Titrační křivka α-alaninu s CH_2O



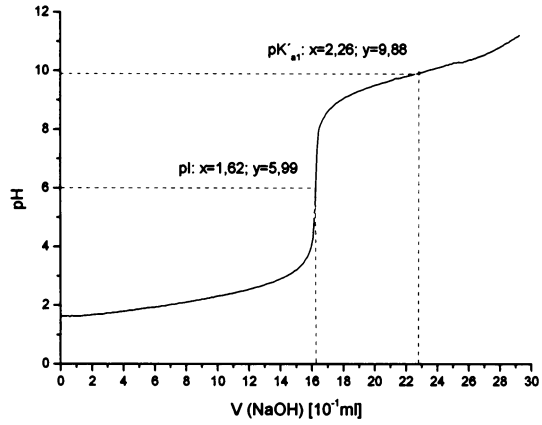
Obr. 16: Derivace titr. křivky α-alaninu s CH_2O

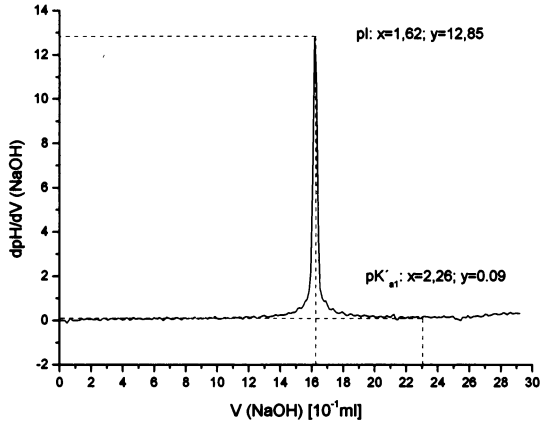


Obr 17: Titr. křivka glycinu při titraci NaOH



Obr 18: Derivace titr. křivky glycinu při titr. NaOH





Obr. 19: Titr. křivka α-alaninu při titr. NaOH Obr. 20: Deriv. titr. křivky α-alaninu při titr. NaOH