

MASARYKOVA UNIVERZITA V BRNĚ

Přírodovědecká fakulta

Ústav chemie

Studium komplexotvorných rovnováh adenosinmonofosfátu
s iontem Cu(II)

Bakalářská práce

Brno, květen 2007

Monika Nováčková

Na tomto místě bych ráda poděkovala své vedoucí bakalářské práce RNDr. Martě Farkové, CSc., a konzultantům doc. RNDr. Libuši Trnkové, CSc., a doc. RNDr. Přemyslu Lubalovi, Ph.D. za odborné vedení, užitečné rady a připomínky při řešení této bakalářské práce. Dále bych chtěla poděkovat celému kolektivu pracovníků a studentů Ústavu chemie Přírodovědecké fakulty MU v Brně, kteří svými zkušenostmi a ochotnou pomocí přispěli k dokončení této práce.

V neposlední řadě děkuji celé své rodině a přátelům za podporu ve studiu.

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracovala samostatně a vycházela jsem pouze z uvedené literatury, vlastního výzkumu a poznatků získaných v chemických laboratořích Přírodovědecké fakulty MU v Brně.

Obsah

<u>1.</u>	<u>Úvod</u>	5
<u>2.</u>	<u>Teoretická část</u>	6
2.1.	<u>Měď a její vlastnosti</u>	6
2.2.	<u>Adenosinmonofosfát</u>	7
2.3.	<u>Spektrometrie</u>	9
2.3.1.	<u>Bouger-Lambert-Beerův zákon</u>	10
<u>3.</u>	<u>Instrumentace a metodika měření</u>	11
3.1.	<u>Titrátor</u>	11
3.2.	<u>pH metr</u>	11
3.3.	<u>UV/Vis spektrometr</u>	11
3.4.	<u>Postup při měření spekter</u>	12
<u>4.</u>	<u>Experimentální část</u>	13
4.1.	<u>Použité chemikálie</u>	13
4.2.	<u>Přístrojové vybavení</u>	13
4.3.	<u>Kalibrace elektrody</u>	13
4.4.	<u>Absorpce CuCl_2 v UV/Vis oblasti</u>	21
4.5.	<u>Vliv iontové síly na absorpci záření roztokem CuCl_2 v UV / Vis-oblasti</u>	24
4.6.	<u>Vliv experimentálních podmínek na absorpci záření AMP a komplexu AMP s mědí v UV oblasti</u>	27
4.6.1.	<u>Závislost absorpce komplexu v UV na měnící se koncentraci CuCl_2</u>	27
4.6.2.	<u>Závislost absorpance komplexu v UV oblasti na měnící se iontové síle</u>	30
4.6.3.	<u>Závislost absorpance komplexu v UV na měnícím se pH</u>	35
<u>5.</u>	<u>Závěr</u>	44
<u>6.</u>	<u>Použitá literatura</u>	45
<u>7.</u>	<u>Použité zkratky</u>	45
<u>8.</u>	<u>Seznam grafů</u>	45

1. Úvod

V posledních letech se stále více ozývá potřeba po dokonalejší a přesnější znalosti chemické stránky lidského těla a reakcích, které se v něm odehrávají. Proto se pátrá po citlivějších, rychlejších analytických metodách, které by umožnily identifikaci důležitých chemických látek, z nichž se skládá lidské tělo nebo látek, které v lidském těle vznikají.

Jedním z možných studijních prostředků je UV/Vis-spektrometrie. V dnešní době se jí běžně určuje koncentrace jednotlivých látek. Určit koncentraci více látek najednou, mají-li překrytá absorpční spektra, zatím nelze, bez pomoci softwaru s modelovým programem na principu neutronové sítě. Pomocí UV/Vis-spektrometrie můžeme studovat chemické rovnováhy v roztocích, včetně interakcí kovových iontů s ligandem. Takovým ligandem může být báze nukleové kyseliny, která vytváří s příslušným kovem různé stabilní komplexy. Tvorba komplexu a jeho stabilita v závislosti na různých experimentálních podmínkách je předmětem výzkumu bakalářské a navazující diplomové práce. Konkrétně se jedná o měďnaté ionty a adenin. Tento systém byl vybrán proto, že purinové báze tvoří s mědí komplex, který má specifické elektrochemické vlastnosti a do dnešní doby není známo, jaké je jeho přesné složení a jak je ovlivněn složením roztoku.

Úkolem mé bakalářské práce bylo prozkoumat, jak se mění absorpční spektrum adeninu, popřípadě adenosin monofosfátu v přítomnosti a bez přítomnosti měďnatých iontů v závislosti na různých experimentálních podmínkách.

2. Teoretická část

2.1. Měď a její vlastnosti

Měď patří k d-prvkům, přesněji mezi prvky 11. skupiny, které jsou označovány jako mincovní kovy. Do této skupiny patří i zlato a stříbro, které se nacházejí v elementární formě v přírodě. Zlato a stříbro se používaly jako platidla už před 6000 lety. Měď je známa již 7000 let a před 5000 lety, kdy byla poznána její schopnost tvořit s cínem tvrdé bronz, začala v lidských dějinách doba bronzová.

Měď se nachází převážně ve sloučeninách se sírou nebo ve formě oxidů a hydroxid-uhlícitanů, patří mezi prvky přechodné, které zaplňují vedlejší podskupiny periodické tabulky, označené jako B. Jejich elektronová konfigurace je $ns^2(n-1)d^{1-10}$. Tento obecný vzorec pro elektronovou konfiguraci neplatí u všech prvků. Některé prvky nemají orbital s úplně zaplněný, například měď má v orbitalu s jen jeden elektron. Počet valenčních elektronů u d-prvků souhlasí s číslem podskupiny od podskupiny III. B do podskupiny VII. B a v VIII. B ještě u Fe, Ru, Os je číslo podskupiny stejné jako počet valenčních elektronů. Pak počet elektronů roste. To znamená, že například měď má 11 valenčních elektronů. Ve srovnání s alkalickými kovy mají Cu, Ag a Au menší iontové poloměry, vyšší první a naopak nižší druhé a třetí ionizační energie. Neúplně obsazený systém nd-orbitalů mají pouze jako kationty [8, 10].

D-prvky jsou za normální teploty pevné látky – kovy (s výjimkou Hg), s poměrně velkou hustotou, jejich atomy vytvářejí krystalovou mřížku. Měď vytváří plošně centrovanou kubickou mřížku. Atomy kovu jsou v ní vázány kovalentními vazbami. Pevnost vazby způsobuje kujnost. Valenční elektrony opouští elektronové obaly atomů kovů a volně se pohybují po krystalové mřížce. To způsobuje elektrickou a tepelnou vodivost.

Typickým oxidačním stupněm pro měď je $II+$, měď v oxidačním čísle $I+$ je schopna existence v roztoku pouze jako komplex [8, 10].

Pro sloučeniny měďné jsou typická koordinační čísla dvě (lineární řetězce) a čtyři (tetraedr). Vazby ve sloučeninách měďnatých mají převážně kovalentní charakter, uplatňují se σ - i π - vazby. Většina těchto látek je modrá nebo zelená, bezbarvé jsou pouze tehdy, posune-li se absorpce spojená s d-d-přechody z viditelné do blízké infračervené oblasti (bezvodý síran měďnatý). Při výskytu pásů přenosu náboje (přenos elektronů z ligandů na

centrální kovový kation a obráceně) ve viditelné oblasti se barva mění na hnědou až červenou [10].

Měďnatých komplexů je znám velký počet, ovšem π -komplexy, sendvičové komplexy ani jednoduché alkyl- nebo arylderiváty měďnaté nejsou schopny existence (alkyl- i arylderiváty měďné existují). Z hodnot oxidačně redukčních potenciálů plyne, že v roztocích musí koncentrace kationtů měďnatých řádově převyšovat koncentraci iontů měďných (K_c je přibližně 10^{-6} mol^{-1}). Sloučeniny měďnaté se snadno redukují na měďné pouze tehdy, jsou-li vzniklé komplexy Cu^I stabilní a nerozpustné, jev je typický pro komplexy obsahující ligandy s redukčními vlastnostmi jako I^- , CN^- , SCN^- , thiomocovina [8].

2.2. Adenosinmonofosfát

Adenosinmonofosfát patří mezi nukleotidy. Nukleotidy jsou fosforylované nukleosidy, tedy látky složené z nukleové báze (purinové nebo pyrimidinové báze), pětiuhlíkatého monosacharidu (ribosa nebo deoxyribosa) a jednoho nebo více zbytků kyseliny fosforečné [11]

Nukleotidy jsou stavebními kameny nukleových kyselin a kofaktorů, které v buňce přenášejí energii (konkrétně Gibbsovu energii), účastní se procesů biologických syntéz (mj. kondenzačních reakcí) a mezibuněčné komunikace [11].

Název nukleotidu odpovídá stavbě daného nukleosidu: například adenosinmonofosfát je nukleotid skládající se z adenosinu = nukleosidu tvořeného bází adeninem a ribosou, a jednou molekulou fosfátu. Umístění fosfátové skupiny v nukleotidech se značí číslicí s čárkou ($'$). Například adenosin-3'-monofosfát znamená, že fosfátová skupina je navázána na třetím atomu ribosy [11]

Nejčastěji je fosforylován uhlík číslo 5, proto se v tomto případě označení vynechává, např. adenosin-5'-monofosfát = adenosinmonofosfát [9, 11].

Pro zjednodušení názvosloví byly zavedeny čtyř- nebo třípísmenné zkratky. První písmeno je malé a značí, jestli je součástí nukleotidu ribosa (nepíše se nic) nebo deoxyribosa (malé d). Je-li struktura nukleotidu cyklická, označuje se malým c (cyklický adenosin-3',5'-monofosfát = cAMP). Druhé, velké písmeno označuje druh nukleové báze:

A: adenin

C: cytosin

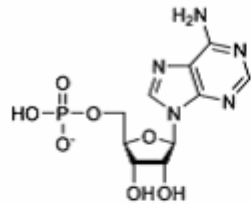
G: guanin

T: thymin

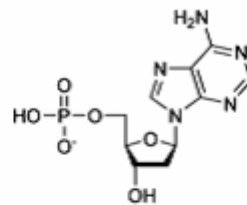
U: uracil

Třetí a čtvrté písmeno určují počet fosfátových skupin (mono-, di-, tri-) a přítomnost fosfátu (P). Například deoxycytin trifosfát má zkratku d-CTP.

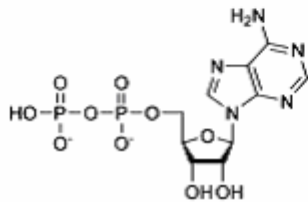
Fosfátové skupiny v nukleosiddifosfátech a nukleosidtrifosfátech jsou navázané jedna za druhou anhydridovou vazbou. Fosfátové skupiny jsou schopny přenášet funkční skupiny a při hydrolýze těchto vazeb se uvolní velké množství energie ($\Delta G < -30$ kJ/mol). Proto jsou nukleosidy sloučeninami, které umožňují aktivaci reaktantů a průběh endergonických reakcí. V levém sloupci na obrázku (Obr. 2) je nukleotid s ribosou, jako cukernou složkou, v pravém sloupci je nukleosid s deoxyribosou jako cukernou složkou. Jednotlivé řádky se od sebe liší počtem navázaných fosfátových skupin [9, 11].



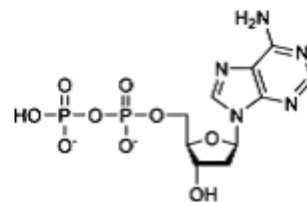
adenosinmonofosfát AMP



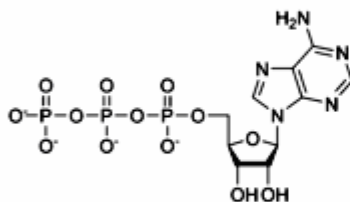
deoxyadenosinmonofosfát dAMP



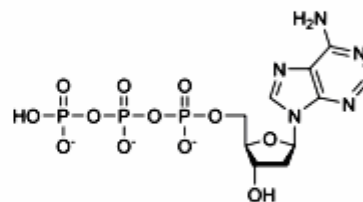
adenosindifosfát ADP



deoxyadenosindifosfát dADP



adenosintrifosfát ATP



deoxyadenosintrifosfát dATP

Obr. 2 Názvosloví nukleotidů podle měnícího se počtu zbytků kyseliny fosforečné [9].

2.3. Spektrometrie

Molekulová absorpční spektrometrie v UV/Vis oblasti patří mezi spektrální metody, které jsou založeny na interakci elektromagnetického záření s hmotou. V závislosti na intenzitě a vlnové délce záření, s nímž látka interaguje, můžeme předpokládat, jaké má látka vlastnosti. Zkoumáme-li jen jednu látku, můžeme určit její koncentraci z velikosti absorbance, neboť hodnota absorbance je přímo úměrná koncentraci, měříme-li za stejných podmínek, jako je například vlnová délka, tloušťka květy, pH... Při interakci molekuly se zářením dochází ke změnám energie molekuly v elektronových orbitalech, a ve vibračních i rotačních hladinách, jinými slovy, dochází k excitaci molekuly [3, 4].

$$\Delta E = E_1 - E_0 = h \cdot \nu$$

h - Planckova konstanta

ν - frekvence dopadajícího záření

ΔE - energie, kterou musí atom nebo molekula přijmout při přechodu ze základního do excitovaného stavu

E_1 - energie atomu nebo molekuly v excitovaném stavu

E_0 - energie atomu nebo molekuly v základním stavu

Excitovaná molekula přechází zpět do základního stavu bez radiace, zářivá energie se mění v energii tepelnou a zvyšuje se kinetická energie molekuly. Absorpce záření v UV/Vis oblasti může být doprovázena rozptylem záření na micelách, makromolekulách a částicích [4].

Měrnými spektrofotometrickými veličinami jsou transmitance, absorptance a absorbance. Transmitance, jinak řečeno propustnost, je podíl intenzity záření prošlého a vstupujícího do vzorku: $T = I / I_0$. Transmitance může dosahovat hodnot od 0 do 1, často je udávána v procentech: $T = I / I_0 \cdot 100$, pak se hodnoty pohybují od 0 do 100 %. Absorptance se dá vyjádřit jako $\alpha = 100 - T$ %, hodnoty se pohybují od 100 do 0 %. Absorbance je záporným logaritmem propustnosti: $A = -\log T$. U většiny přístrojů jsou platnými hodnotami absorbance $A = 0,1 - 1,1$ kvůli rozptylu záření a nestabilní funkci zdroje a detektoru [5].

Nejčastějším využitím absorpční UV/Vis spektrometrie je kvantitativní analýza založená na platnosti Bouger-Lambert-Beerova zákona, pro tyto účely vyniká přesností, rychlostí, citlivostí a experimentální nenáročností [4, 5].

2.3.1. Bouger-Lambert-Beerův zákon

Bouger-Lambert-Beerův zákon vyjadřuje vztah mezi absorbancí a intenzitou dopadajícího a prošlého záření, popř. tloušťkou vrstvy a koncentrací analytu:

$$A = -\log I / I_0 = \varepsilon_{\alpha} \cdot c \cdot l$$

A – absorbance

I – prošlé záření

I_0 – dopadající záření

ε_{α} – molární absorpční koeficient ($l \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)

c – molární koncentrace měřené látky ($\text{mol} \cdot l^{-1}$)

l – tloušťka kyvety (cm)

Bouger-Lambert-Beerův zákon platí jen pro zředěné roztoky, měřené pomocí přísně monochromatického světla. Platí v homogenních i heterogenních systémech. V průběhu měření se nesmí měnit počet a charakter absorbujících částic, absorbance je totiž přímo úměrná počtu absorbujících částic a mohlo by nastat její zvýšení [4, 5].

3. Instrumentace a metodika měření

3.1. *Titrátor*

Titrátor je přístroj s jehož pomocí se dosáhne přesnějších výsledků při titraci, neboť je zatížen nižší chybou, než při dávkování titračního činidla člověkem. Na titrátoru se zvolí rychlost dávkování titračního činidla v ml min^{-1} . Tato hodnota nám udává, kolik ml titračního činidla se za jednu minutu nadávkuje. Dávkování titračního činidla se spouští a zastavuje zmáčknutím tlačítka STOP. Pomocí titrátoru dávkujeme přesné množství titračního činidla, objem použitého titračního činidla se zobrazí na displeji.

3.2. *pH metr*

pH se dá změřit pomocí pH metru, pH metr měří pomocí vodíkové elektrody aktivitu H^+ , pH se vypočítá pomocí vztahu $-\log [\text{H}^+]$. Hodnota pH se zobrazí na displeji přístroje. Hodnotu pH můžeme také získat z měření potenciálu, avšak k tomu je zapotřebí kalibrace elektrody (viz experimentální část str.13).

3.3. *UV/Vis spektrometr*

Spektrometr je schopen automaticky snímat absorpční křivku, tj. závislost propustnosti nebo absorbance na vlnové délce ve vybraném spektru vlnových délek. Laboratorní spektrometry používáme pro vlnové délky ultrafialového spektra ($\lambda = 190$ až 400 nm) a viditelného spektra ($\lambda = 400$ až 800 nm) [5].

Při proměrování absorpční křivky v UV/Vis oblasti se používají dva zdroje záření. Pro vlnové délky 180 až 360 nm se zařazuje deuteriová výbojka a nad 360 nm wolframová žárovka.

Dále se spektrometr skládá z monochromátoru se vstupní a výstupní štěrbinou. Monochromatické světlo získáme pomocí mřížky nebo hranolu. Přednost se dává mřížkovému monochromátoru. Šířka štěrbiny se pohybuje od 10 nm (jednoduché monochromátory) po $0,1$ nm (kvalitní monochromátory).

Absorpční prostředí tvoří obsah kyvety. Kyveta může být křemenná nebo skleněná, má přesně definované rozměry, volitelným rozměrem je tloušťka kyvety, nejčastěji se používají jednocentimetrové kyvety.

Jako detektory se nejčastěji používají fotoelektrické detektory citlivé na ultrafialové a viditelné záření.

3.4. Postup při měření spekter

Proces měření spekter má většinou 3 fáze. V prvním kroku si zvolíme blank a změříme jeho signál. Signál blanku bude sloužit jako pozadí pro další měření, vůči němuž se bude měřit. Obvykle to bývá rozpouštědlo. Nejčastějším rozpouštědlem je voda nebo ethanol. Vůči pozadí se budou v následujících měřeních odčítat hodnoty absorbance.

Ke spektrofotometru může být připojen počítač vybavený vhodným software. S jeho využitím lze snadno manipulovat s naměřenými daty. Proměření průběhu spektra rozpouštědla a uložením v připojeném počítači se získá signál rozpouštědla, který budeme považovat za blank pro další měření na spektrometru, kterým se měří absorbance v určité oblasti vlnových délek. Poté se rozpouštědlo znovu změří. Pokud při změření toho samého rozpouštědla, spektrometr naměří odchylku od nuly v rozmezí $\pm 0,0001$ (Graf. 5), je kyveta čistá a přístroj připravený k měření, nastavené pozadí je správné a výsledky nebudou zatíženy chybou. [5].

Po změření pozadí, je možné začít měřit zkoumanou látku. Je sledováno, jak roztok této látky absorbuje elektromagnetické záření při různých vlnových délkách. Rozsah vlnových délek, v němž bude vzorek absorbovat, záleží jen na jeho vlastnostech. Velikost absorbance je závislá na koncentraci látky v roztoku.

Po změření vzorku následuje vyhodnocení spektra. Většinou nás zajímá určitá oblast spektra, neboť některé látky mohou absorbovat v různých částech spektra s různou intenzitou. Absorbance ve sledované oblasti by však neměla přesáhnout jedničku. Hodnoty absorbance, které přesáhnou 1, nelze pokládat za přesné, ani za správné, protože hodnota absorbance nebude přímo úměrná koncentraci.

Molekulová absorpční spektrometrie v UV/Vis oblasti se může také využít k ověření, zda v roztoku dochází k reakci, případně jaký má tato reakce vliv na chemickou strukturu naší zkoumané molekuly. Na grafu (Graf. 17) můžeme vidět vliv chemické reakce na změnu absorbance v důsledku změny chemické struktury [5].

Z grafu (Graf. 17) kdy byl roztok AMP titrován z alkalické oblasti do bazické je patrné, že roztok AMP má při různém pH odlišné hodnoty absorbance. To je způsobeno tím, že se vyskytuje v odlišných chemických strukturách. Rozdíl ve strukturách je způsoben nábojem [11].

4. Experimentální část

4.1. Použité chemikálie

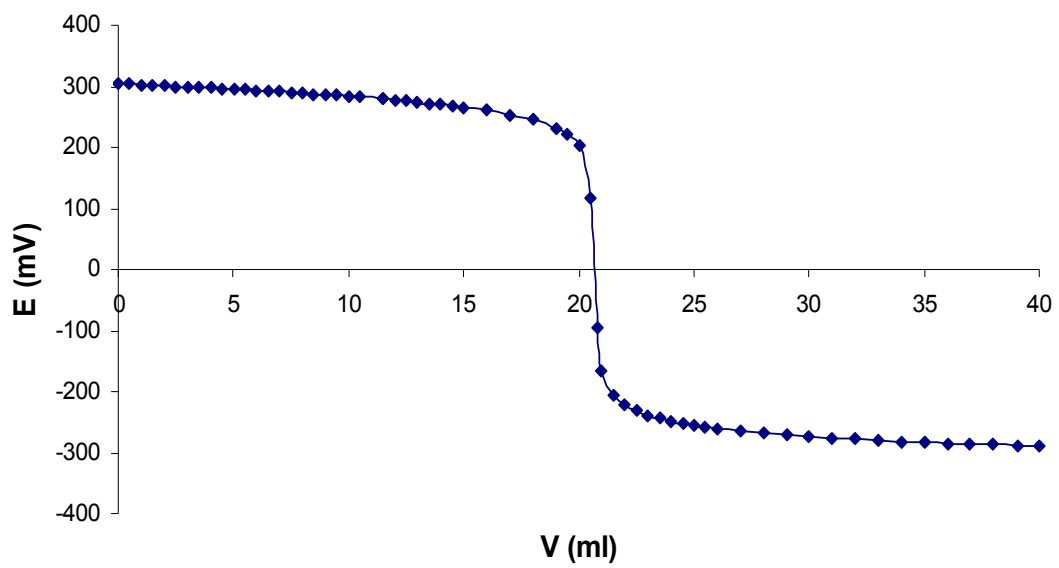
- Kyselina chlorovodíková 35 % – HCl (PENTA)
- Chlorid měďnatý dihydrát – $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (SIGMA – ALDRICH)
- Adenosin-5'-monofosfát disodný – $\text{C}_{10}\text{H}_8\text{N}_5\text{O}_7\text{PNa}_2$ (REANAL – BUDAPEST)
- Hydroxid sodný – NaOH (SIGMA – ALDRICH)

4.2. Přístrojové vybavení

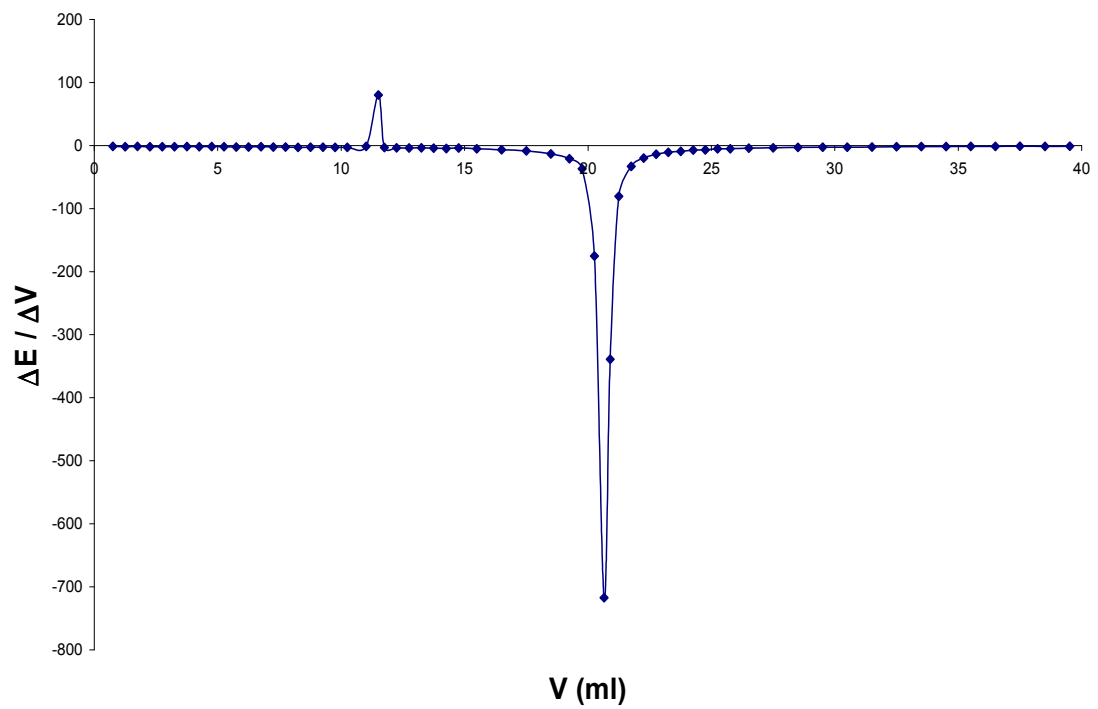
- UV/Vis spektrometr (UNICAM UV4), křemenná kyveta tloušťky 1,0 cm, program: Vision 32 Version 1.21.
- Termostat (LABO – MS s.r.o.)
- pH metr (CYBERSCAN)
- HAMILTON SINGLE PORES elektroda (UTECH INSTRUMENTS)
- AE 240 váhy (METTLER)
- TITRONIC UNIVERSAL titrátor (SCHOTT INSTRUMENTS)

4.3. Kalibrace elektrody.

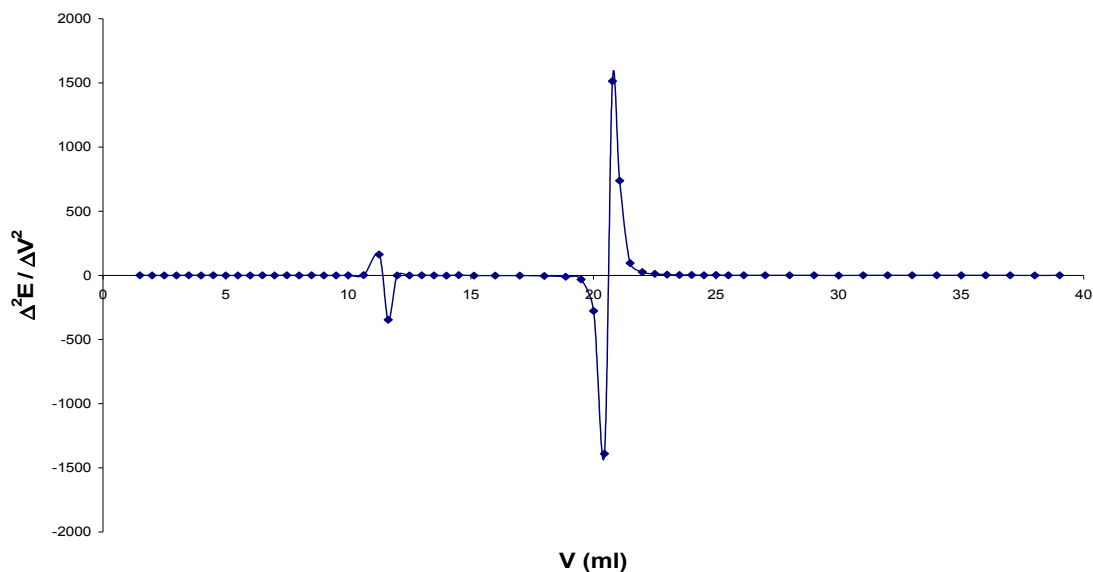
Roztok HCl o koncentraci 0,02 M, objemu 50 ml byl titrován roztokem NaOH o přibližné koncentraci 0,05 M. Ze začátku byly přídavky 0,05 ml až 1 ml, jakmile rozdíl potenciálů mezi jednotlivými přídavky byl větší než 20 mV, zmenšily se přídavky, aby byl dostatek bodů kolem bodu ekvivalence. Za bodem ekvivalence, když se potenciál téměř nemění, se přídavky opět zvýšily na 0,5 ml až 1 ml. Z naměřených hodnot, které jsou uvedené v tabulce (Tab. 1), se vypočítá první a druhá derivace. Absolutní hodnoty první derivace bodu v bodě ekvivalence největší (Graf. 2). Bod ekvivalence se v druhé derivaci projeví změnou záporných hodnot druhé derivace na kladné, spojnice bodu s maximální hodnotou a minimální hodnotou vypočítané druhé derivace bude protínat osu x (Graf. 3).



Graf. 1 Průběh potenciometrické titrační křivky v okolí ekvivalenčního bodu $E = f(V)$.



Graf. 2 Průběh potenciometrické titrační křivky v okolí ekvivalenčního bodu $\Delta E / \Delta V = f(V)$



Graf. 3 Průběh potenciometrické titrační křivky v okolí $\Delta^2 E / \Delta V^2 = f(V)$

První derivaci Δ' vypočítáme:

(1)

$$\Delta' = \frac{(E_2 - E_1)}{(V_2 - V_1)} \quad V'_{avg} = \frac{(V_2 + V_1)}{2}$$

$$\Delta' = \frac{(303,2 - 304)}{(0,5 - 0)} \quad V'_{avg} = \frac{(0,5 + 0)}{2}$$

$$\Delta' = -1,6 \quad V'_{avg} = 0,25 \text{ ml}$$

Δ' - hodnota první derivace

E_1, E_2 - hodnoty potenciálů

V_1, V_2 - objemy přidaného hydroxidu, použitého při titraci

V'_{AVG} - rozdíl objemů hydroxidu, použitého při titraci

Druhou derivaci Δ'' vypočítáme:

(2)

$$\Delta'' = \frac{(\Delta'_2 - \Delta'_1)}{(V'_{AVG 2} - V'_{AVG 1})} \quad V''_{AVG} = \frac{(V'_{avg 2} + V'_{avg 1})}{2}$$

$$\Delta'' = \frac{(-1,6 - (-1,2))}{(0,25 - 0,75)} \quad V''_{AVG} = \frac{(0,25 + 0,75)}{2}$$

$$\Delta'' = 0,8 \quad V''_{AVG} = 0,5 \text{ ml}$$

Δ'' -hodnota druhé derivace

Δ_1' , Δ_2' -hodnota první derivace

V''_{AVG2} – rozdíl rozdílů objemů přidaného hydroxidu, použitého při titraci

Tab. 1 Vyhodnocení titrace HCl pomocí NaOH

V	E	V'_{AVG}	Δ'	V''_{AVG}	Δ''
(ml)	(mV)	(ml)		(ml)	
0	304	0,25	-1,6	0,5	0,8
0,5	303,2	0,75	-1,2	1	-1,6
1	302,6	1,25	-2	1,5	1,2
1,5	301,6	1,75	-1,4	2	-0,8
2	300,9	2,25	-1,8	2,5	-0,4
2,5	300	2,75	-2	3	0
3	299	3,25	-2	3,5	0,8
3,5	298	3,75	-1,6	4	-0,8
4	297,2	4,25	-2	4,5025	0,465929
4,5	296,2	4,755	-1,76471	5,005	-0,55222
5,01	295,3	5,255	-2,04082	5,5025	-0,32158
5,5	294,3	5,75	-2,2	6	2,27E-13
6	293,2	6,25	-2,2	6,5	0,4
6,5	292,1	6,75	-2	7	-0,8
7	291,1	7,25	-2,4	7,5	0,4
7,5	289,9	7,75	-2,2	8	-1,2
8	288,8	8,25	-2,8	8,505	0,588235
8,5	287,4	8,76	-2,5	9,01	-3,6E-13
9,02	286,1	9,26	-2,5	9,505	-1,02041
9,5	284,9	9,75	-3	10	0,4
10	283,4	10,25	-2,8	10,63	1,878225
10,5	282	11,01	-1,37255	11,26	162,7451
11,52	280,6	11,51	80	11,63	-346,667
11,5	279	11,75	-3,2	12	-0,4
12	277,4	12,25	-3,4	12,5	-0,8
12,5	275,7	12,75	-3,8	13	0,4
13	273,8	13,25	-3,6	13,5	-0,8
13,5	272	13,75	-4	14,005	-1,58371
14	270	14,26	-4,80769	14,51	1,698718
14,52	267,5	14,76	-3,95833	15,13	-1,67793
15	265,6	15,5	-5,2	16	-1,4

16	260,4	16,5	-6,6	17	-2
17	253,8	17,5	-8,6	18	-4,6
18	245,2	18,5	-13,2	18,875	-10,1333
19	232	19,25	-20,8	19,505	-31,2368
19,5	221,6	19,76	-36,7308	20,01	-277,372
20,02	202,5	20,26	-175,417	20,455	-1389,53
20,5	118,3	20,65	-717,333	20,775	1513,333
20,8	-96,9	20,9	-339	21,075	738,2857
21	-164,7	21,25	-80,6	21,5	95,2
21,5	-205	21,75	-33	22,0025	25,74257
22	-221,5	22,255	-20	22,5075	12,27723
22,51	-231,7	22,76	-13,8	23,0075	6,027623
23,01	-238,6	23,255	-10,8163	23,5075	3,520525
23,5	-243,9	23,76	-9,03846	24,0125	3,34955
24,02	-248,6	24,265	-7,34694	24,51	0,832986
24,51	-252,2	24,755	-6,93878	25,0025	3,512678
25	-255,6	25,25	-5,2	25,505	0,392157
25,5	-258,2	25,76	-5	26,1375	1,1372
26,02	-260,8	26,515	-4,14141	27,01	0,612182
27,01	-264,9	27,505	-3,53535	28,005	0,664066
28	-268,4	28,505	-2,87129	29,005	0,447045
29,01	-271,3	29,505	-2,42424	30,005	-0,15002
30	-273,7	30,505	-2,57426	31,005	0,453045
31,01	-276,3	31,505	-2,12121	32,0025	0,121821
32	-278,4	32,5	-2	33	0,4
33	-280,4	33,5	-1,6	34,0025	0,015763
34	-282	34,505	-1,58416	35,005	0,271027
35,01	-283,6	35,505	-1,31313	36,0025	0,013197
36	-284,9	36,5	-1,3	37	0,2
37	-286,2	37,5	-1,1	38,0075	-0,15974
38	-287,3	38,515	-1,26214	39,0175	0,342058
39,03	-288,6	39,52	-0,91837	29,7625	0,323716
40,01	-289,5	20,005	-7,23569	10,0025	-0,36169

V tabulce jsou zvýrazněné hodnoty druhé derivace, z kterých se počítal bod ekvivalence.

Bod ekvivalence se vypočítá:

(3)

$$V_e = V_{AVG}'' + \frac{(V_{AVG2}'' + V_{AVG}'') \cdot |\Delta_1''|}{|\Delta_1''| + |\Delta_2''|}$$

$$V_e = 20,60818 \text{ ml}$$

Přesná koncentrace NaOH:

(4)

$$c_{NaOH} = V_e \cdot c_{HCl}$$

$$c_{NaOH} = 20,60818 \cdot 0,02$$

$$c_{NaOH} = 0,0485 \text{ M}$$

pH pro jednotlivé potenciály se spočítal pomocí vztahu:

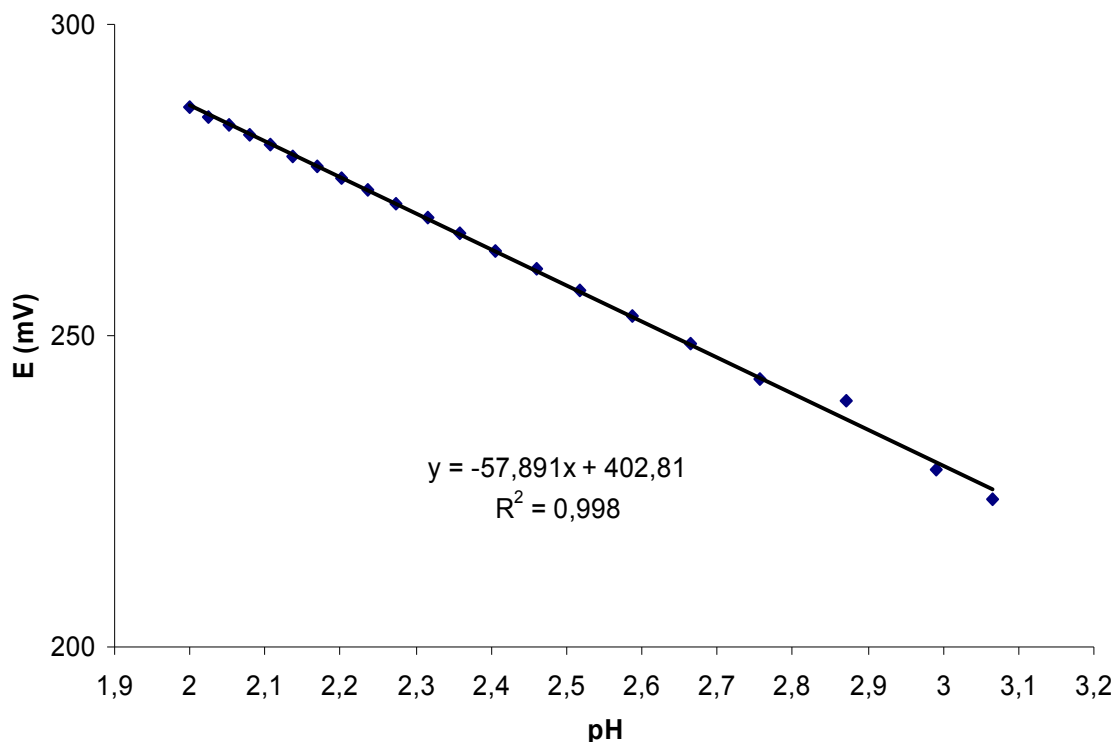
(5)

$$-\log[H^+] = \frac{(c_{HCl} \cdot 50) - (c_{NaOH} \cdot V_{NaOH})}{(50 + V)}$$

$$-\log[H^+] = \frac{(0,02 \cdot 50) - (0,0485 \cdot 0)}{(50 + 0)}$$

$$-\log[H^+] = 1,69897$$

Aby se zjistila závislost mezi potenciálem a pH vynesly se hodnoty naměřených potenciálů a vypočítaných hodnot do grafu (Graf. 6). Z grafu byla zjištěna směrnice vyjadřující závislost mezi naměřeným potenciálem a vypočítaným pH.



Graf. 6 Závislost naměřených hodnot potenciálu na dopočítaných hodnotách pH

Z grafu je vidět, že potenciál je lineární funkcí pH. Z lineární závislosti se může dopočítat $-\log[H^+]$ k jakýmkoliv potenciálům měřeným touto elektrodou, a to podle vztahu (6) který je platný pro elektrodu, s níž jsme měřili

(6)

$$E = 402,19 - 57,481 \cdot \log[H^+]$$

Kdyby se číslo před $\log[H^+]$ rovnalo hodnotě 59, měla by elektroda “nerstovskou funkcí“ avšak rozdíl není velký, proto je elektroda vhodná k měření. Lineární závislost vodíkové elektrody, která měří přesně a správně je:

(7)

$$E = konst - 59 \log[H^+]$$

Pro zjištění odchylky vypočítaných hodnot pH od skutečných, byl vypočítán iontový součin vody podle vztahu (9)

Za E byly dosazeny naměřené hodnoty potenciálů, $[OH^-]$ se vypočítalo z rovnice (8)

(8)

$$[OH^-] = \frac{|(c_{NaOH} \cdot 50) - (c_{HCl} \cdot V_{NaOH})|}{(50 + V)}$$

$$[OH^-] = \frac{|(0,02 \cdot 50) - (0,0485 \cdot 0)|}{(50 + 0)}$$

$$[OH^-] = 0,005971M$$

(9)

$$pK_w = -\log[OH^-] + (-\log[H^+])$$

$$pK_w = 13,48$$

Tab. 2 Vypočítané hodnoty pH a pOH a z nich pKw

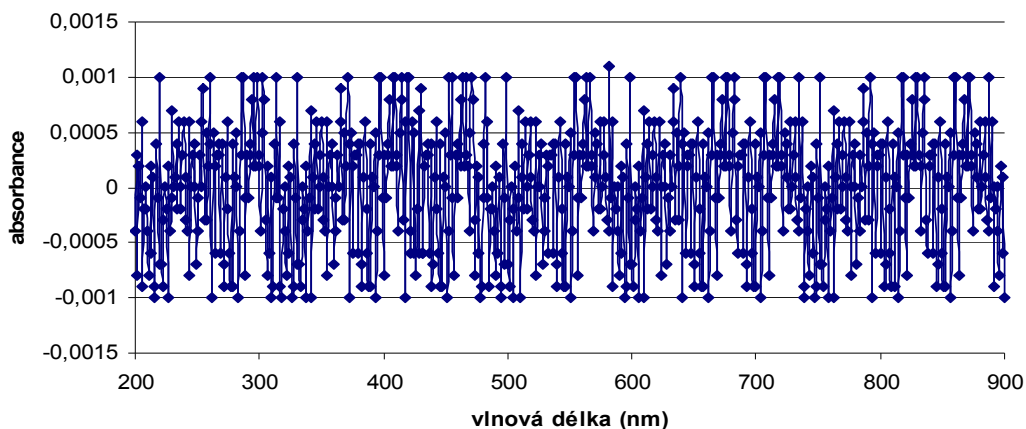
$-\log[H^+]$	$[OH^-]$	$-\log[OH^-]$	pK_w
11,25	0,005971	2,22	13,48
11,33	0,006892	2,16	13,50
11,40	0,007725	2,11	13,51
11,46	0,008524	2,07	13,53
11,50	0,009309	2,03	13,53
11,55	0,010092	2,00	13,54
11,62	0,011501	1,94	13,56
11,68	0,01281	1,89	13,57
11,73	0,014054	1,85	13,58
11,77	0,015191	1,82	13,59
11,82	0,016277	1,79	13,60
11,85	0,017274	1,76	13,62
11,89	0,018221	1,74	13,63
11,92	0,019113	1,72	13,63
11,94	0,019961	1,70	13,64
11,97	0,020747	1,68	13,65
11,99	0,021497	1,67	13,66
12,01	0,022209	1,65	13,66
12,03	0,022903	1,64	13,67
12,05	0,023531	1,63	13,67

Tabelovaný iontový součin vody, za standardních laboratorních podmínek, teplotě 25°C, tlaku 1000 kPa je 13,83 odchylna vypočítaných iontových součinů vody od tabelované hodnoty 0.16 až 0,32 je tolerovatelná.

4.4. Absorpce CuCl_2 v UV/Vis oblasti

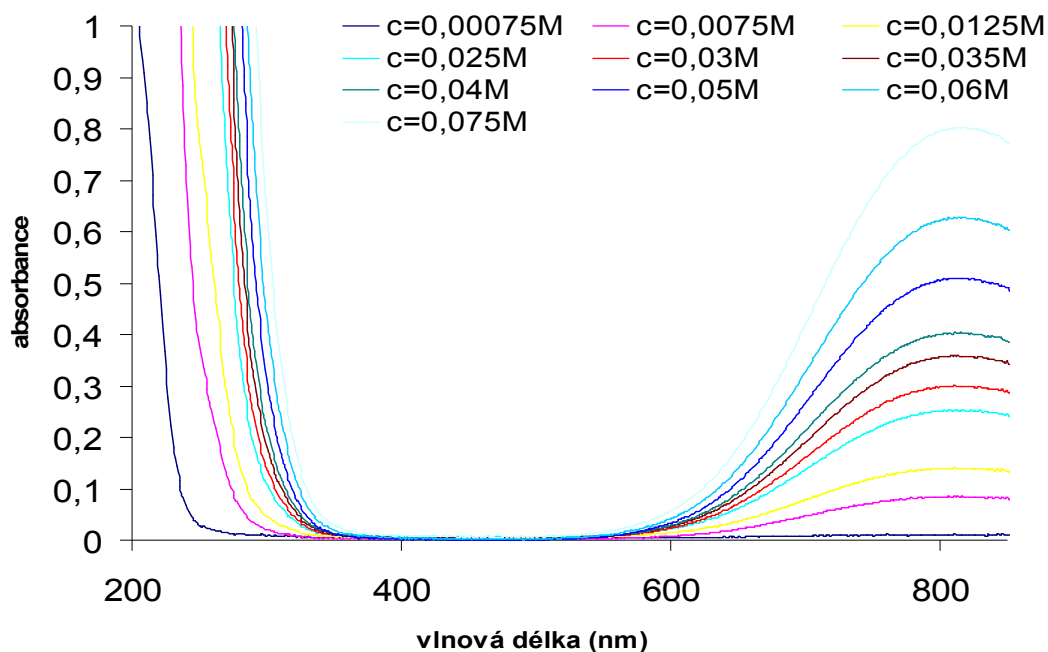
Pro zjištění oblasti spektra, v níž CuCl_2 absorbuje záření a ověření, zda je absorbance přímo úměrná koncentraci roztoku CuCl_2 , byla změřena absorbance roztoků CuCl_2 o různých koncentracích.

Jako pozadí byl použit signál vody (Graf. 4). Z grafu je vidět že chyba se pohybovala v rozmezí $\pm 0,001$. Do bloku



Graf. 4 Absorpční spektrum vody, je-li jako pozadí zvolen signál vody

To znamená že kyveta byla čistá a přístroj byl připravený k měření.

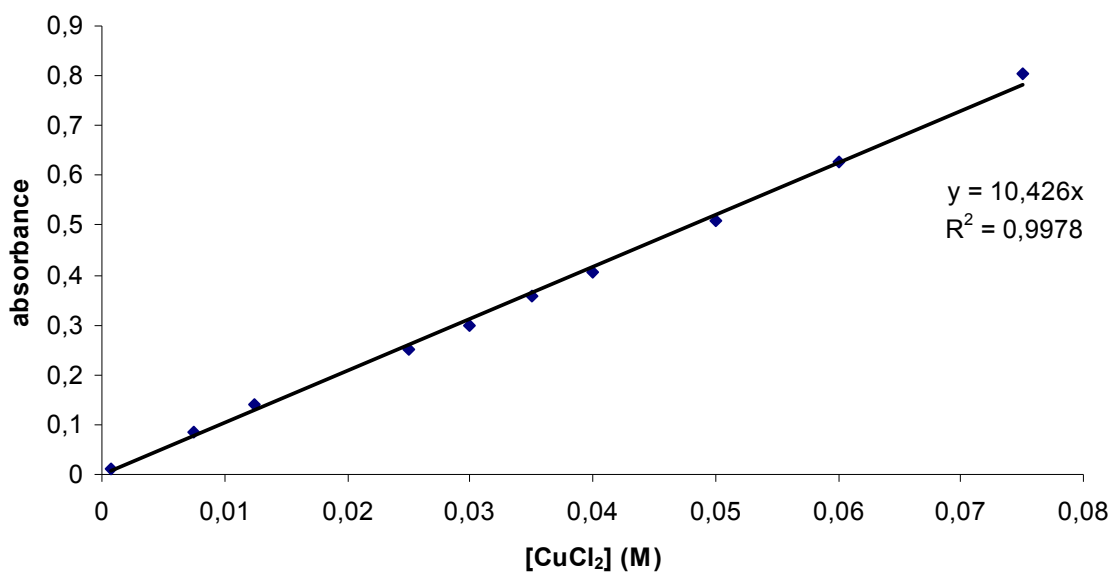


Graf. 5 Absorpční spektra CuCl_2 různých koncentracích. Koncentrace CuCl_2 jsou uvedeny u jednotlivých spekter.

Roztok CuCl_2 absorbuje silně při vlnových délkách do 350 nm a od 550 nm. K porovnání vlivu změny koncentrace na nárůst absorbance je nejvhodnější hodnota při vlnové délce 811 nm, protože při ní absorbance nabývá maxima.

Tab. 3 absorbance chloridu měďnatého při vlnové délce 811 nm

$[\text{CuCl}_2]$ (M)	0,00075	0,0075	0,0125	0,025	0,03	0,035	0,04	0,05	0,06	0,075
A_{811}	0,0117	0,0862	0,1411	0,2524	0,3006	0,3594	0,404	0,5093	0,6281	0,8025



Graf. 6 Závislost absorbance roztoku CuCl₂ na koncentraci roztoku CuCl₂ při vlnové délce 811 nm

Z grafu je patrné, že absorbance je přímo úměrná koncentraci CuCl₂. Uvedené roztoky CuCl₂ nebyly upravovány na stejnou iontovou sílu a s měnící se koncentrací se měnila i iontová síla roztoku. Iontová síla se vypočítá pomocí vztahu

(11)

$$I = \frac{1}{2} \sum (c_i \times z_i^2)$$

I – iontová síla

c – koncentrace látky v roztoku

z-náboje iontů, z nichž se látka skládá

$$I = \frac{1}{2} \sum (c_i \times z_i^2)$$

$$I = \frac{1}{2} [(c_{\text{Cu}^{2+}} \times 2^2) + 2 \times (c_{\text{Cl}^-} \times 1^2)]$$

$$I = \frac{1}{2} [(0,075 \times 2^2) + 2 \times (0,075 \times 1^2)]$$

$$I = 0,225 \quad M$$

I - iontová síla

c_{Cu²⁺} – koncentrace měďnatých iontů

c_{Cl^-} – koncentrace iontů chloridu

Tab. 4 Vypočítané iontové síly pro uvedené koncentrace roztoků $CuCl_2$.

I (M)	0,002	0,023	0,038	0,075	0,09	0,105	0,12	0,15	0,18	0,225
[CuCl₂] (M)	0,0008	0,008	0,013	0,025	0,03	0,035	0,04	0,05	0,06	0,075

4.5. **Vliv iontové síly na absorpci záření roztokem $CuCl_2$ v UV / Vis-oblasti.**

Ke zjištění závislosti absorbance na iontové síle byly měřeny roztoky o různé iontové síle a konstantní koncentraci $CuCl_2$ (0,03 M). Za nejnižší iontovou sílu byla vybrána iontová síla 0,1 M, protože vybraný roztok $CuCl_2$ měl podobnou iontovou sílu (0,09 M) a hodnotu absorbance měl kolem 0,3. Předpokládá se, že se vzrůstající iontovou silou bude růst i absorbance. Iontová síla byla upravována se 1 M NaCl. Správná koncentrace NaCl se k iontovým silám dopočítala pomocí vztahu:

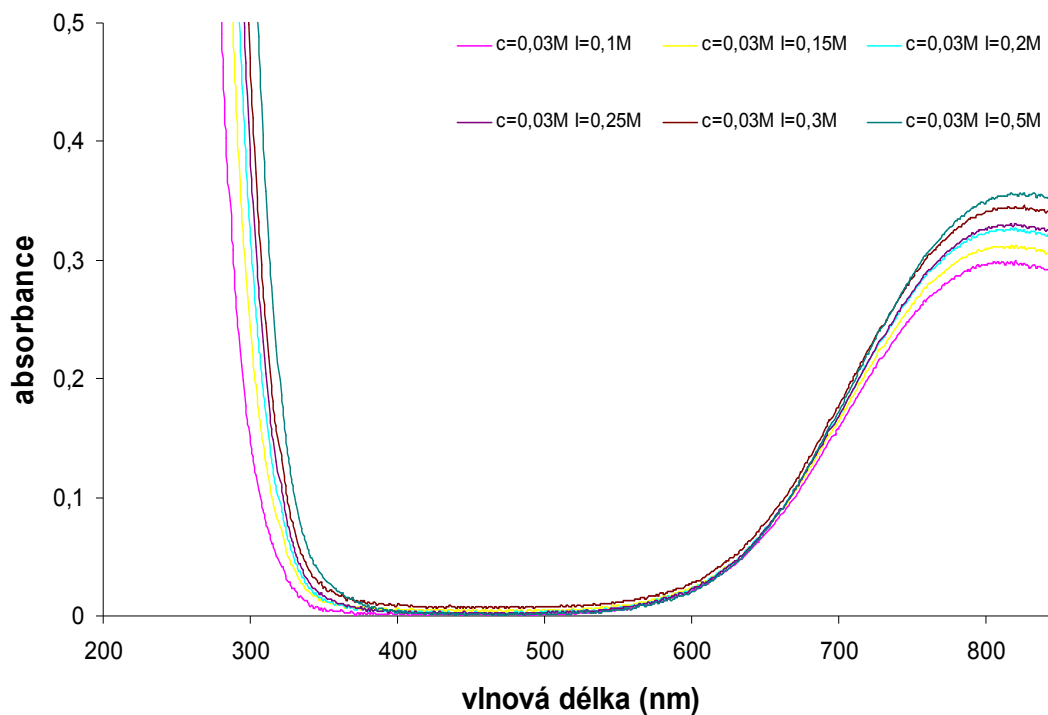
$$I = \frac{1}{2} \left[(c_{Cu^{2+}} \times 2^2) + 2 \times (c_{Cl^-} \times 1^2) + (c_{Na^+} \times 1^2) + (c_{Cl^-} \times 1^2) \right]$$

$$0,15 = \frac{1}{2} \left[(0,03 \times 2^2) + 2 \times (0,03 \times 1^2) + 2c \right]$$

$$c = 0,01 \text{ M NaCl}$$

Tab. 5 Dopočítané koncentrace NaCl k iontovým silám při konstantní koncentraci $CuCl_2$

I	[CuCl₂]	[NaCl]
(M)	(M)	(M)
0,1	0,03	0,01
0,15	0,03	0,06
0,2	0,03	0,11
0,25	0,03	0,16
0,3	0,03	0,21
0,5	0,03	0,41

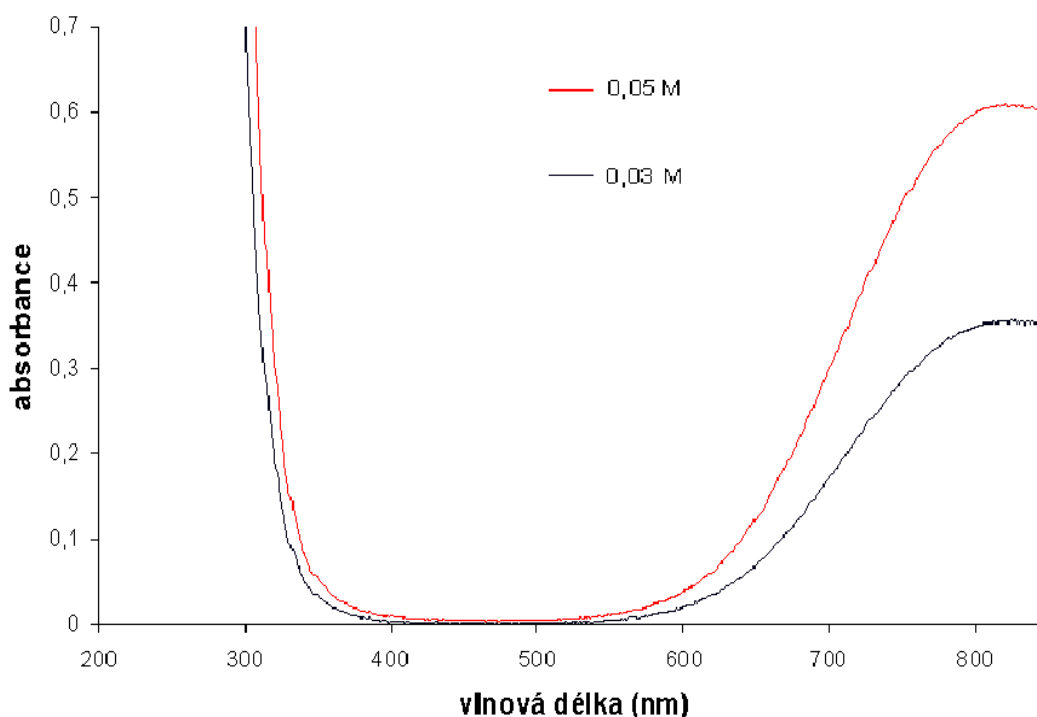


Graf. 7 Absorpční spektrum roztoku CuCl_2 o koncentraci 0,03 M a různých iontových silách, velikost iontových sil je uvedena v grafu.

Absorbance se pohybovala v rozmezí 0,25 až 0,40 pro další studium jsou to hodnoty nízké, proto se dále použil roztok s nejvyšší iontovou silou (0,5 M) a vyšší koncentrací (0,05 M CuCl_2).

Tab. 6 Iontová síla 0.5 při různých koncentracích CuCl_2

I	[CuCl₂]	[NaCl]
(M)	(M)	(M)
0,5	0,03	0,41
0,5	0,05	0,35



Graf. 8 Absorbance roztoku CuCl_2 při iontové síle 0,5 M

Absorbance tohoto roztoku o koncentraci $\text{CuCl}_2 = 0,05 \text{ M}$, se pohybovala kolem 0,6 pro vlnové délky kolem 800 nm. Oblast absorbance kolem 0,5 je pro měření absorbance nejvýhodnější, neboť zde dochází k nejmenším chybám, proto koncentrace CuCl_2 0,05 M je ideální i pro měření nižších iontových sil samotného CuCl_2 . Měří-li se absorbance komplexu AMP s Cu^{2+} použije se roztok CuCl_2 o koncentraci 0,01 M, neboť AMP bude zvyšovat absorpci.

Pro dosažení absorpce mezi 0,5 až 1, se použije roztok AMP o koncentraci 0,05 M. To znamená, že podle výše uvedeného vztahu (11) bude mít iontovou sílu 0,15 M. Jako titrační činidlo se použije CuCl_2 o koncentraci 0,01 M, a iontová síla 0,15 M, které se dosáhlo přidáním NaCl. Koncentrace NaCl v titračním činidle byla 0,12 M.

Při titraci CuCl_2 pomocí AMP se vytvořila sraženina, již při poměru molárních množství 1 : 0,08 (ligand: Cu^{2+}), tato sraženina byla stálá, až do přidavku 0,56 mol AMP to znamená, že se začala rozpouštět až při poměru molárních množství 1 : 0,56. Při obrácené titraci se titroval 0,05 M roztok CuCl_2 , roztokem AMP o koncentraci 0,01 M a NaOH o koncentraci 0,12 M. Při poměru molárních množství 22 : 30 (ligand: Cu^{2+}) se opět vytvořila sraženina.

4.6. *Vliv experimentálních podmínek na absorpci záření AMP a komplexu AMP s mědí v UV oblasti*

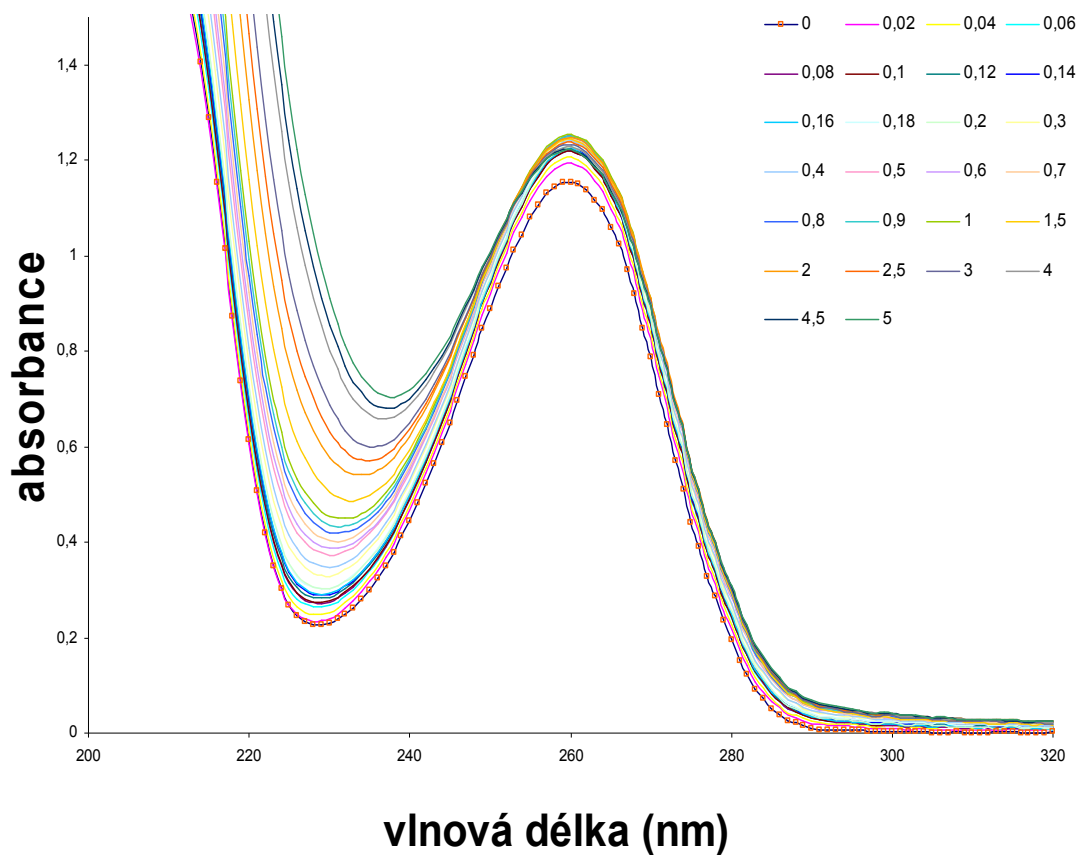
4.6.1. Závislost absorpce komplexu v UV na měnící se koncentraci CuCl₂

Další oblastí, v níž komplex AMP s mědí absorboval, byla UV oblast. Roztoky byly naředěny a měřeny v rozsahu vlnových délek 200 až 300 nm, kde absorbuje AMP. Roztoky nebyly upravovány na určitou iontovou sílu. Koncentrace AMP byla 0,0001 M.

Tab. 7 Hodnoty pH a potenciálu, při měnící se koncentraci CuCl₂

pH	E	V	[Cu ²⁺]	[AMP]	I
	(mV)	(ml)	(M)	(M)	(M)
6,58	21,9	0	0,0003	0,0001	0,0003
6,57	22,3	0,02	0,00036	1,00E-04	0,0009
6,56	23,1	0,04	0,00042	9,99E-05	0,0015
6,52	25,5	0,06	0,00048	9,99E-05	0,0021
6,50	26,9	0,08	0,00054	9,98E-05	0,0027
6,43	30,9	0,1	0,0006	9,98E-05	0,0033
6,41	31,8	0,12	0,00066	9,98E-05	0,0039
6,40	32,5	0,14	0,00072	9,97E-05	0,0045
6,39	33,2	0,16	0,00078	9,97E-05	0,0051
6,38	33,4	0,18	0,00084	9,96E-05	0,0057
6,38	33,5	0,2	0,0009	9,96E-05	0,0063
6,30	38,3	0,3	0,0012	9,94E-05	0,0093
6,24	41,7	0,4	0,0015	9,92E-05	0,0123
6,19	44,8	0,5	0,0018	9,90E-05	0,0153
6,15	46,8	0,6	0,0021	9,88E-05	0,0183
6,11	49,1	0,7	0,0024	9,86E-05	0,0213
6,07	51,7	0,8	0,0027	9,84E-05	0,0243
6,04	53,4	0,9	0,003	9,82E-05	0,0273
6,00	55,7	1	0,0033	9,80E-05	0,0303
5,82	66,2	1,5	0,0048	9,71E-05	0,0453

5,79	67,5	2	0,0063	9,62E-05	0,0603
5,72	72	2,5	0,0078	9,52E-05	0,0753
5,66	75,3	3	0,0093	9,43E-05	0,0903
5,56	80,8	4	0,0123	9,26E-05	0,1203
5,52	83,3	4,5	0,0138	9,17E-05	0,1353
5,49	85	5	0,0153	9,09E-05	0,1503



Graf. 9 Absorpční spektra komplexu při různých koncentracích CuCl_2 a konstantní koncentraci ligandu $[\text{AMP}] = 0,0001 \text{ M}$, iontová síla nebyla upravována na konstantní hodnotu, objemy přidaného CuCl_2 jsou uvedeny.

Absorbance komplexu dosahovala hodnot kolem 1,3. Měřilo se i napětí, jeho změna byla v rozsahu 21,9 mV – 85,4 mV, to znamená že pH kleslo z hodnoty 6,6 na 5,5.

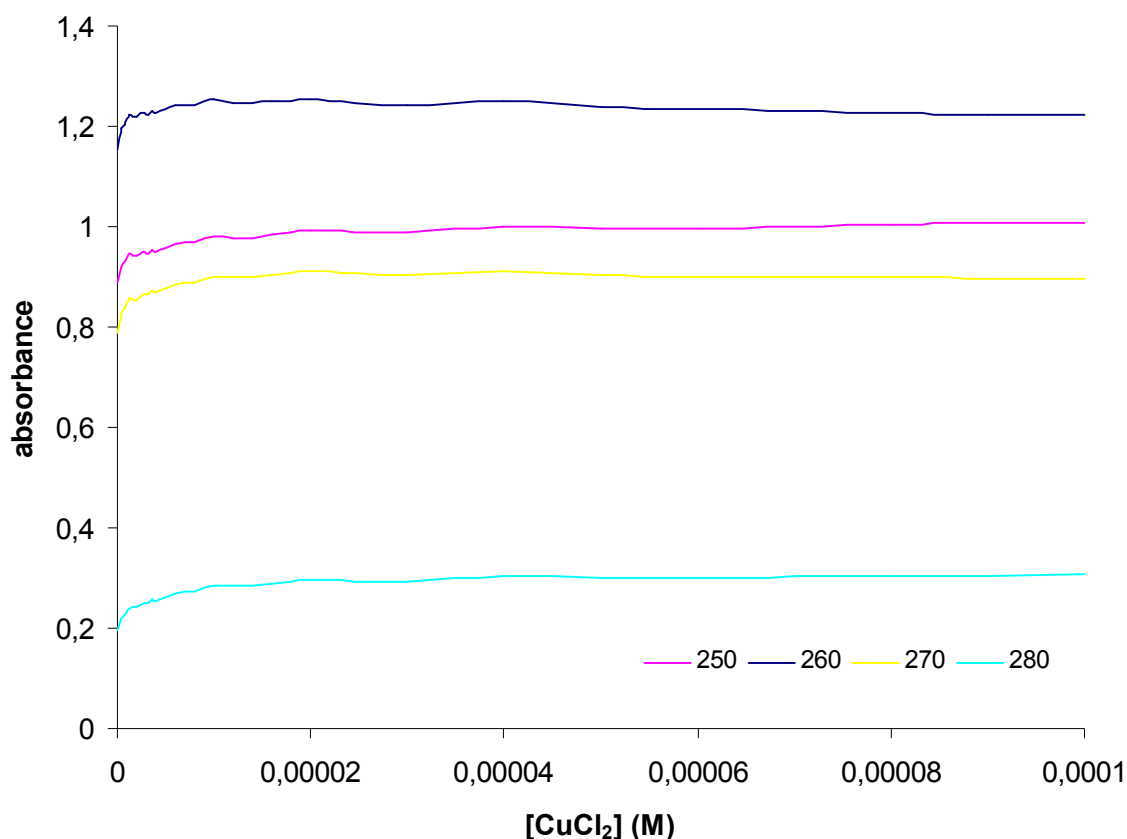
Kolem vlnové délky 260 nm roztoky AMP a CuCl_2 o měnících se koncentracích CuCl_2 měly podobnou změnu absorbance. Proto bylo vhodné sestavit graf závislosti absorbance roztoků při stejné vlnové délce na koncentraci roztoku (Graf. 10). Ukazuje se,

že nárůst koncentrace je velmi podobný. Vlnové délky nižší než 250 nm mohly být ovlivněny absorpcí mědi, nikoliv komplexu.

Tab. 8 Hodnoty absorbance komplexu AMP s mědí při vlnových délkách 250 nm, 260 nm, 270 nm, 280 nm, pro jednotlivé koncentrace roztoku.

[Cu ²⁺]	[AMP]	250 nm	260 nm	270 nm	280 nm
(M)	(M)				
6,00E-09	0,0003	0,8894	1,1548	0,7885	0,1968
7,20E-09	0,00036	0,9204	1,1948	0,8268	0,2177
8,40E-09	0,00042	0,9301	1,2066	0,8397	0,2280
9,60E-09	0,00048	0,9468	1,2262	0,8580	0,2404
1,08E-08	0,00054	0,9427	1,2209	0,8567	0,2431
1,20E-08	0,0006	0,9432	1,2207	0,8573	0,2437
1,32E-08	0,00066	0,9487	1,2280	0,8647	0,2481
1,44E-08	0,00072	0,9519	1,2301	0,8675	0,2514
1,56E-08	0,00078	0,9505	1,2287	0,8674	0,2512
1,68E-08	0,00084	0,9573	1,2354	0,8748	0,2570
1,80E-08	0,0009	0,9541	1,2331	0,8722	0,2553
2,40E-08	0,0012	0,9722	1,2499	0,8892	0,2696
3,00E-08	0,0015	0,9752	1,2503	0,8949	0,2739
3,60E-08	0,0018	0,9889	1,2649	0,9090	0,2856
4,20E-08	0,0021	0,9887	1,2624	0,9091	0,2866
4,80E-08	0,0024	0,9918	1,2635	0,9121	0,2893
5,40E-08	0,0027	1,0006	1,2709	0,9187	0,2944
6,00E-08	0,003	1,0044	1,2736	0,9222	0,2978
6,60E-08	0,0033	1,0172	1,2813	0,9315	0,3030
9,60E-08	0,0048	1,0172	1,2813	0,9315	0,3030
1,26E-07	0,0063	1,0390	1,2985	0,9481	0,3166
1,56E-07	0,0078	1,0453	1,3010	0,9501	0,3169
1,86E-07	0,0093	1,0557	1,3069	0,9543	0,3186
2,46E-07	0,0123	1,0848	1,3268	0,9699	0,3294
2,76E-07	0,0138	1,0964	1,3341	0,9752	0,3322

3,06E-07	0,0153	1,1096	1,3448	0,9845	0,3384
----------	--------	--------	--------	--------	--------



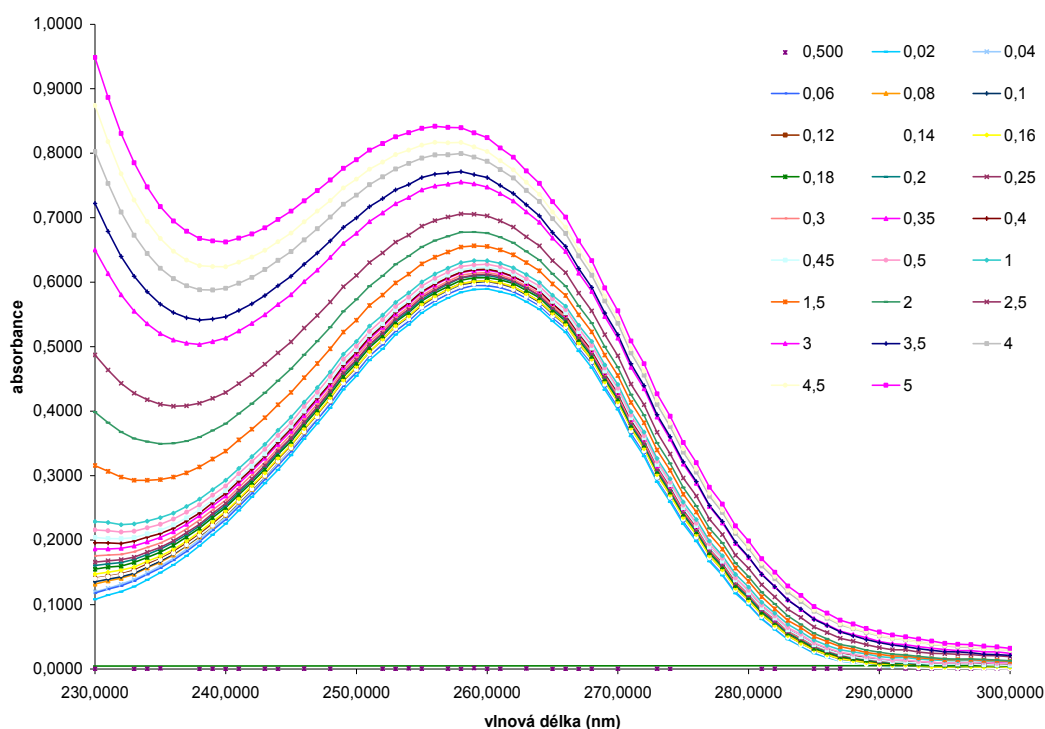
Graf. 10 Změna absorbance roztoku AMP a CuCl₂ v závislosti na [CuCl₂] při vybraných vlnových délkách

Z grafu vyplývá, že se s rostoucí koncentrací CuCl₂ mění absorbance, tato změna není lineární. To znamená, že na nárůst absorbance má vliv tvorba komplexu. Bylo potřeba zjistit, zda je tvorba komplexu ovlivněna iontovou silou, která se s rostoucí koncentrací CuCl₂ zvyšuje, nebo je ovlivněna změnou pH.

4.6.2. Závislost absorbance komplexu v UV oblasti na měnící se iontové síle

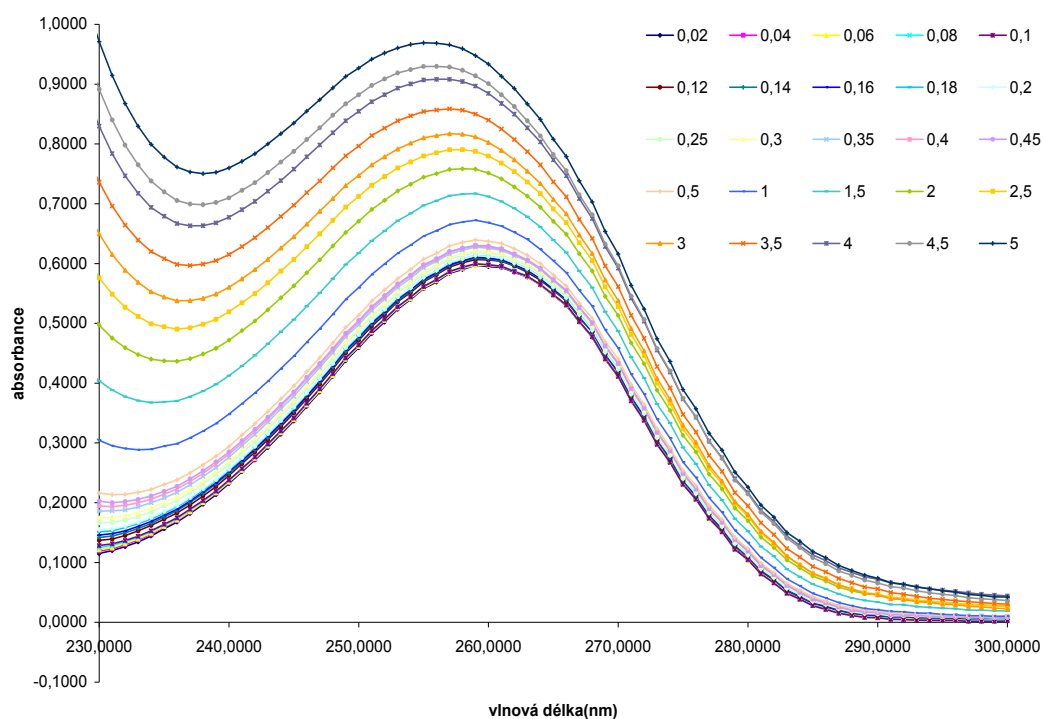
Byla provedena dvě měření o různých iontových silách. Bylo výhodné dosáhnout padesátinásobného molárního množství AMP s malou chybou způsobenou ředěním roztoku. Proto bylo použito roztoku CuCl₂ 0,025 M jako titračního činidla, který má iontovou sílu 0,075 M. Přidáním 5 ml tohoto roztoku k 50ml AMP o koncentraci 0,00005 M, roztok AMP se upraví na stejnou iontovou sílu pomocí NaCl, získáme poměr molárních

množství $1 n_{AMP} : 50 n_{CuCl_2}$. NaCl bude v roztoku s AMP o koncentraci 0,07485 M. Iontová síla 0,075M byla nejmenší iontová síla, které se za těchto podmínek mohlo dosáhnout.



Graf. 11 Absorbance AMP při $I = 0,075 \text{ M}$ v závislosti na měnící se koncentraci $CuCl_2$ v grafu jsou uvedeny objemy titračního činidla v ml

Další experiment byl proveden při dvojnásobné iontové síle tj. iontové síle 0,15 M. To znamená, že titrované AMP mělo koncentraci 0,00005 M a NaCl měl koncentraci 0,14985 M. V titračním činidle bylo $CuCl_2$ o koncentraci 0,025 M a NaCl o koncentraci 0,075 M.



Graf. 12 Absorbance AMP při $I = 0,15\text{M}$ v závislosti na měnící se koncentraci CuCl_2 v grafu jsou uvedeny objemy titračního činidla v ml

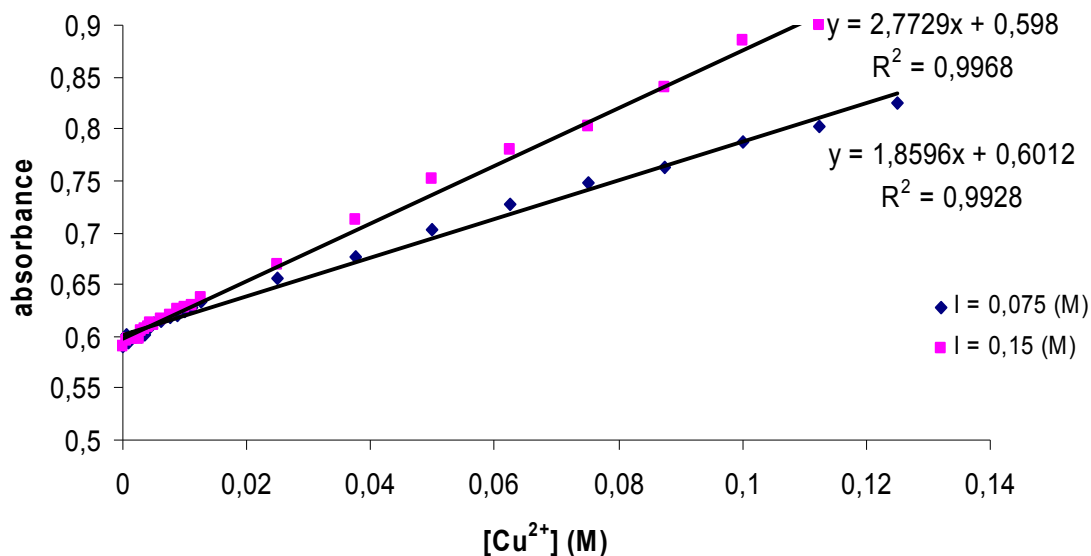
Tab. 9 Hodnoty absorbance při vlnové délce 260 nm koncentrace AMP je 0,00005 a koncentrace CuCl_2 se mění, potenciály, pro roztoky o iontové síle 0,075 M a 0,15 M.

V_1	E		$[\text{CuCl}_2]$	$[\text{AMP}]$	A_{260}		$-\log [H^+]$	
	$I=0,075$	$I=0,15$			$I = 0,075 \text{ M}$	$I = 0,15 \text{ M}$	$I = 0,075 \text{ M}$	$I = 0,15 \text{ M}$
(ml)	(mV)	(mV)	(M)	(M)				
0	38,9	48,1	0	0,00005	0,5896	0,5896	6,29	6,13
0,02	41,2	48,5	0,0005	4,998E-05	0,6012	0,5950	6,25	6,12
0,04	43,4	49,6	0,001	4,996E-05	0,5945	0,5970	6,21	6,10
0,06	44,7	50	0,0015	4,994E-05	0,5999	0,5970	6,19	6,10
0,08	44,9	50,8	0,002	4,992E-05	0,5995	0,5983	6,18	6,08
0,1	45,6	51,6	0,0025	4,99E-05	0,6024	0,5979	6,17	6,07
0,12	46,7	51,8	0,003	4,988E-05	0,5987	0,6059	6,15	6,07
0,14	47,2	52,4	0,0035	4,986E-05	0,6022	0,6075	6,14	6,05
0,16	47,5	52,8	0,004	4,9841E-05	0,6070	0,6091	6,14	6,05

0,18	48	53,3	0,0045	4,9821E-05	0,6103	0,6119	6,13	6,04
0,2	48,8	53,5	0,005	4,9801E-05	0,6126	0,6117	6,12	6,04
0,25	49,9	54,9	0,00625	4,9751E-05	0,6149	0,6173	6,10	6,01
0,3	51	55,5	0,0075	4,9702E-05	0,6185	0,6202	6,08	6,00
0,35	52	56,3	0,00875	4,9652E-05	0,6202	0,6258	6,06	5,99
0,4	52,8	56,9	0,01	4,9603E-05	0,6232	0,6274	6,05	5,98
0,45	53,8	57,6	0,01125	4,9554E-05	0,6279	0,6294	6,03	5,97
0,5	54,6	58,4	0,0125	4,9505E-05	0,6333	0,6371	6,02	5,95
1	62,6	65,2	0,025	4,902E-05	0,6554	0,6686	5,88	5,83
1,5	68,5	70,5	0,0375	4,8544E-05	0,6761	0,7120	5,78	5,74
2	73,1	75,1	0,05	4,8077E-05	0,7028	0,7515	5,70	5,66
2,5	77	78,7	0,0625	4,7619E-05	0,7274	0,7797	5,63	5,60
3	80,3	81,8	0,075	4,717E-05	0,7475	0,8028	5,57	5,55
3,5	83,5	85,4	0,0875	4,6729E-05	0,7622	0,8399	5,52	5,49
4	86,1	87,5	0,1	4,6296E-05	0,7874	0,8845	5,47	5,45
4,5	88,4	89,5	0,1125	4,5872E-05	0,8028	0,9009	5,43	5,41
5	90,3	91	0,125	4,5455E-05	0,8242	0,9336	5,40	5,39

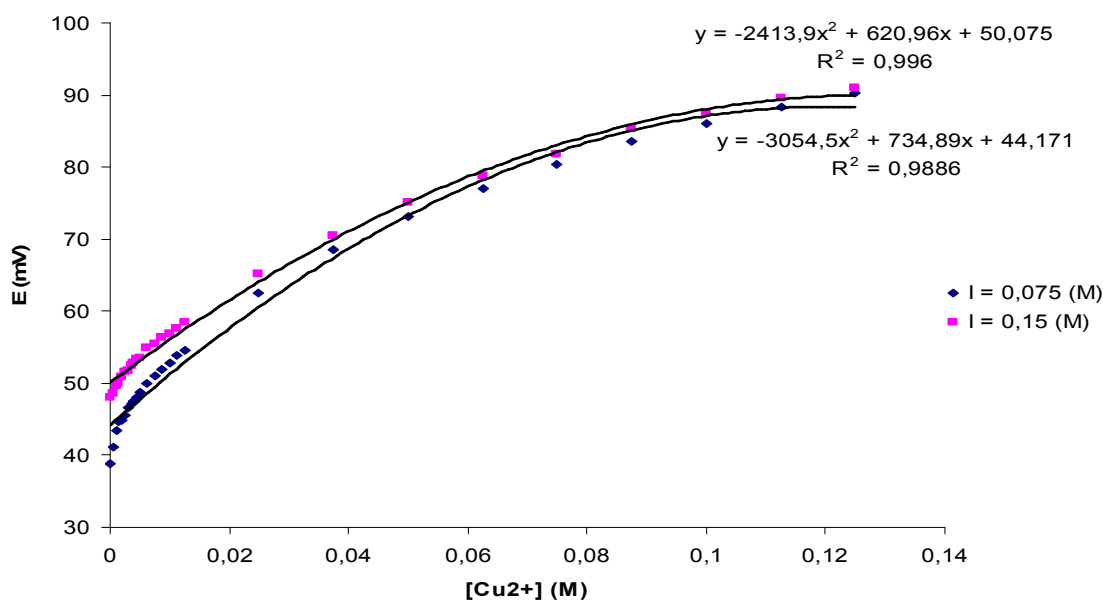
Byla zjištěna závislost absorpce komplexu při vlnové délce 260 nm na koncentraci CuCl_2 v roztoku, protože při ní absorpce dosahuje maxima (Graf. 13).

Během měření se měnil i potenciál. Změna potenciálu je na první pohled stabilní, proto byla vynesena závislost v grafu.



Graf. 13 Závislost absorbance na měnící se koncentraci CuCl_2 v roztoku AMP + CuCl_2 pro dvě různé iontové síly

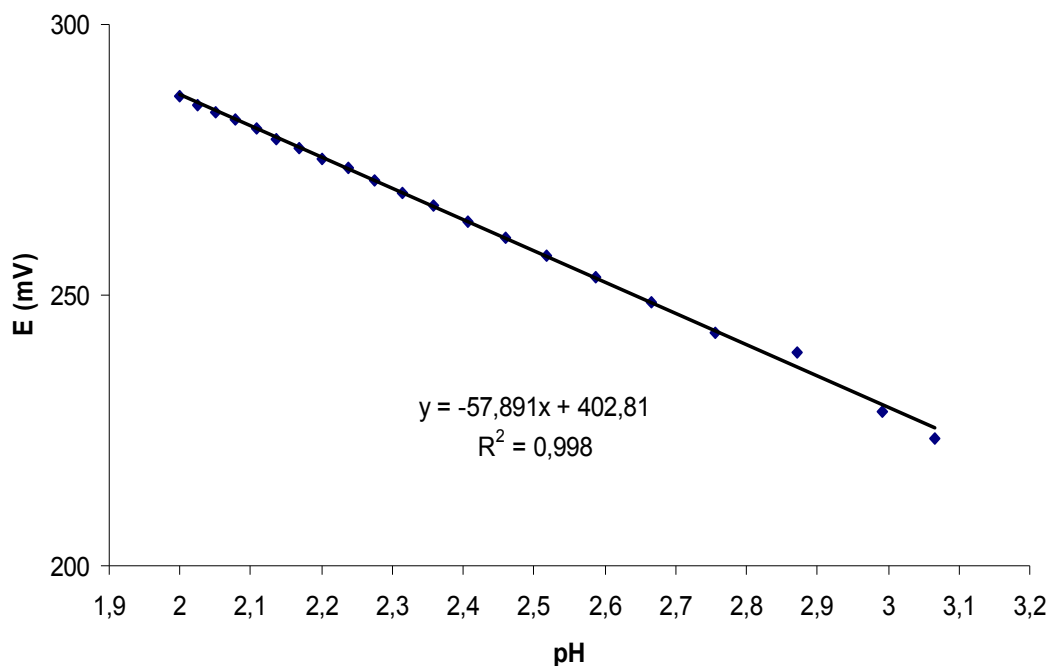
Z grafu vyplývá, že závislost je lineární, to znamená, že nárůst absorbance je způsoben zvyšující se koncentrací CuCl_2 . Nelineární změna v předchozím pokusu byla pravděpodobně způsobena vlivem pH. To naznačují grafy závislosti absorbance na pH nebo na E.



Graf. 14 Závislost potenciálu na změně koncentrace CuCl_2 v roztoku AMP+ CuCl_2 pro dvě různé iontové síly

4.6.3. Závislost absorbance komplexu v UV na měnícím se pH

Aby se mohla začít měřit závislost na pH, bylo zapotřebí standardizovat roztoky, s nimiž budeme pracovat. Koncentrace HCl byla známa, bylo potřeba standardizovat roztok NaOH neboť jeho složení se vlivem CO₂ časem mění. Standardizace se provedla stejným postupem jako při kalibraci elektrody. Získala se závislost naměřených hodnot potenciálu na teoretických hodnotách pH.



Graf. 19 Závislosti potenciálu na pH při standardizaci NaOH použitého k titraci AMP a HCl a roztoku AMP a HCl a CuCl₂

Ze závislosti potenciálu na pH byl vypočítán iontový součin vody, aby se zjistilo, zda měření na elektrodě není zatížené chybou.

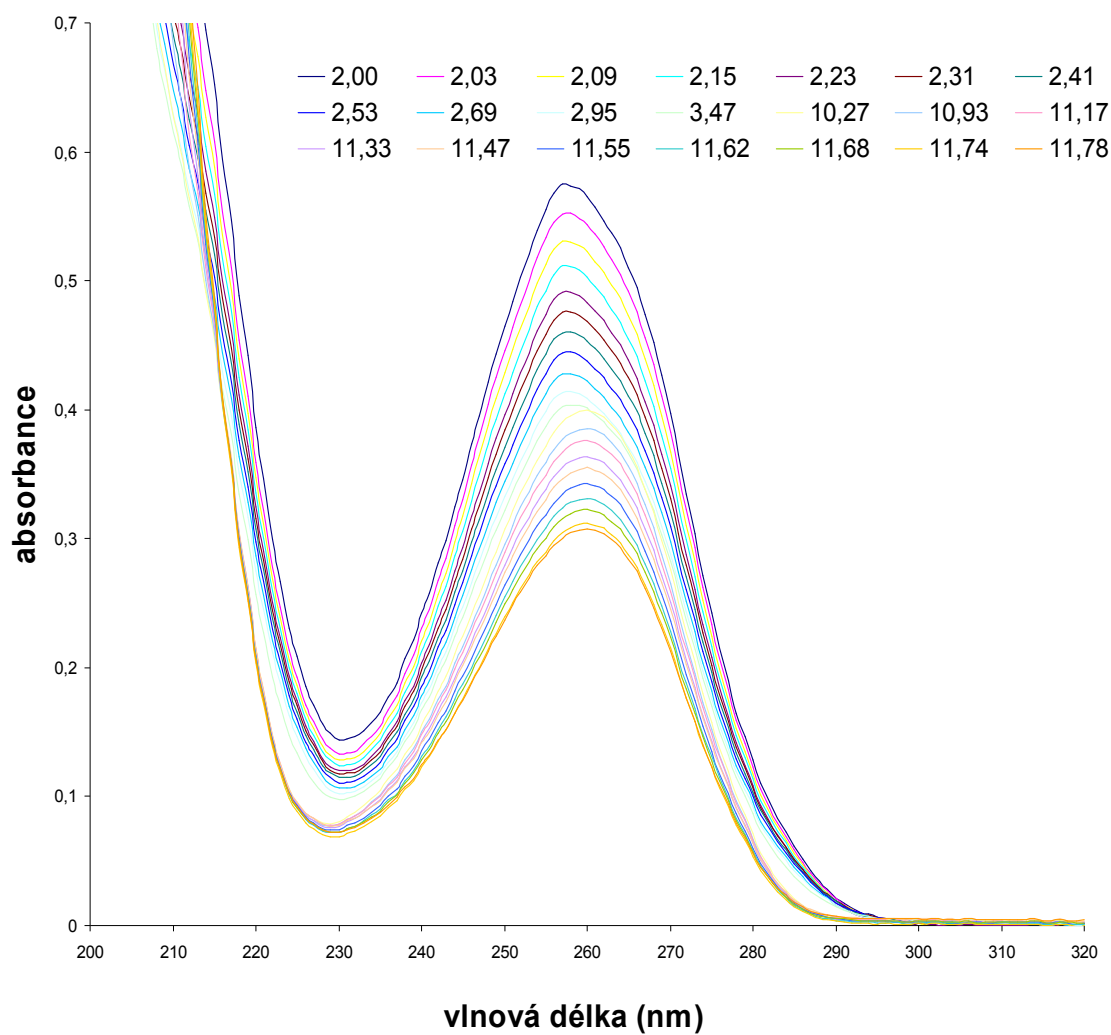
Tab. 11 vypočítané hodnoty pH a pOH a z nich vypočítané pK_w

$-\log[\text{H}^+]$	$[\text{OH}^-] \text{ (M)}$	$-\log[\text{OH}^-]$	pK_w
10,46	0,000392	3,41	13,87
10,63	0,000535	3,27	13,91
10,76	0,000685	3,16	13,92
10,94	0,000982	3,01	13,95
11,01	0,001348	2,87	13,88

11,21	0,001709	2,77	13,97
11,29	0,002063	2,69	13,98
11,36	0,002412	2,62	13,98
11,42	0,002756	2,56	13,98
11,47	0,003094	2,51	13,98
11,52	0,003427	2,47	13,98
11,56	0,003756	2,43	13,99
11,59	0,004079	2,39	13,98
11,63	0,004397	2,36	13,98
11,66	0,004711	2,33	13,98
11,69	0,00502	2,30	13,99
11,71	0,005324	2,27	13,99
11,73	0,005625	2,25	13,98
11,75	0,00592	2,23	13,98
11,77	0,006212	2,21	13,98

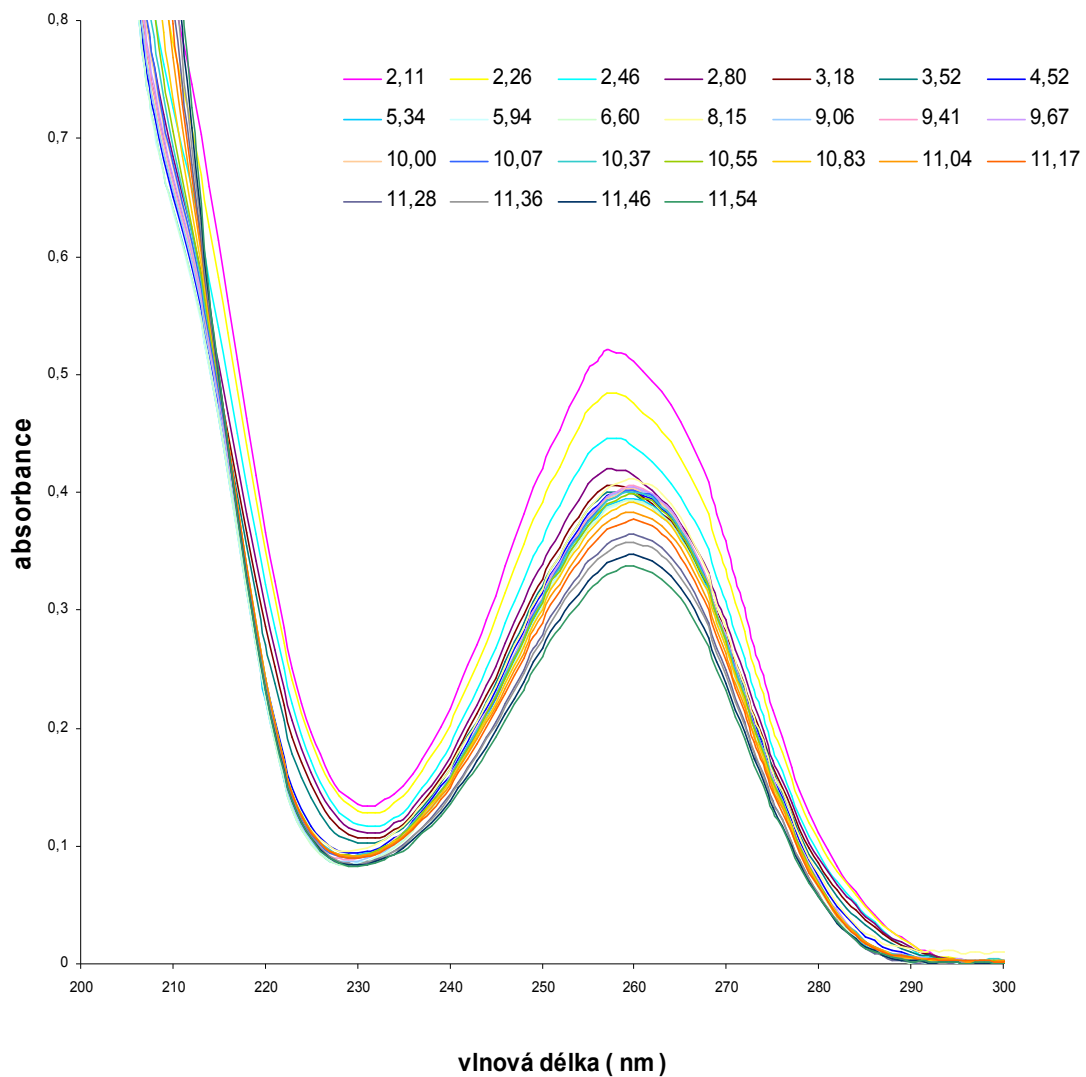
Odchylka vypočítané hodnoty iontového součinu vody 0,04 až 0,15 od tabelované hodnoty 13,83 je tolerovatelná, protože nepřesahuje jedno procento.

Roztok AMP o koncentraci 0,00005 M a I = 0,15 M okyselený 1 ml 0,5 M HCl, se titroval z pH \approx 2 do pH \approx 11, stejnými přídávky NaOH.



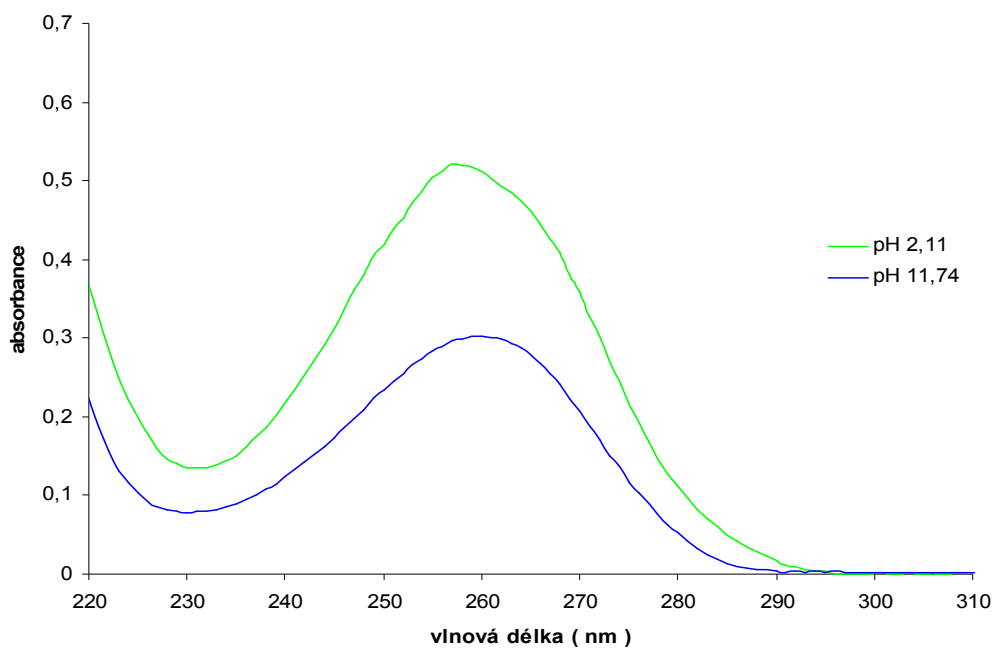
Graf. 15. Titrace AMP z kyselé oblasti do bazické pro pH od 2,00 do 3,47 a od 10,27 do 11,78, hodnoty pH jsou uvedeny

Graf vypadá celistvě, avšak chybí spektra pro pH od 3,47 do 10,27. Bylo potřeba provést další měření, protože spektra náležící ke kyselé oblasti mají absorpční maximum při nižší vlnové délce než spektra náležící k bazické oblasti.



Graf. 16 Absorpční spektra roztoku AMP a HCl titrovaného NaOH hodnoty pH jsou uvedeny u jednotlivých spekter

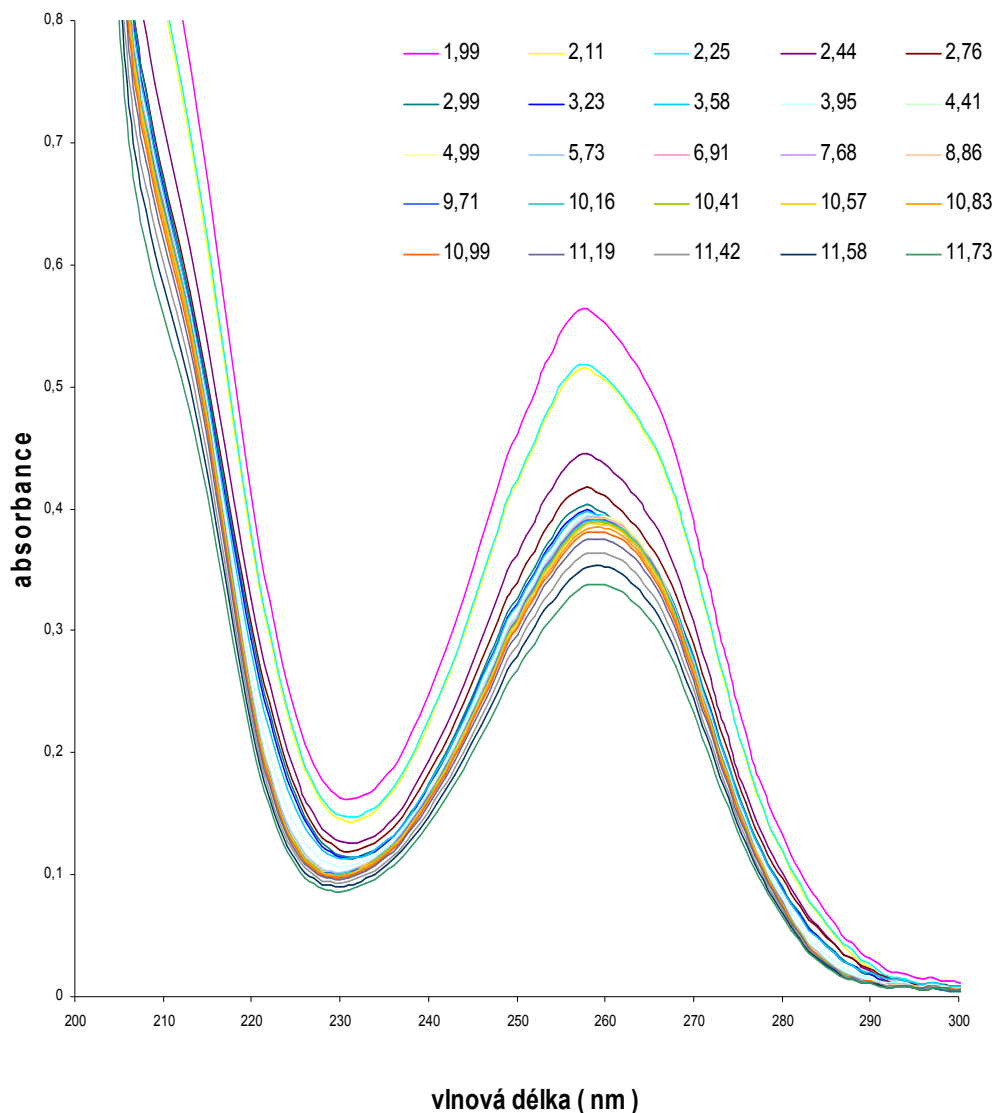
U samotného AMP se hodnota kolem neutrálního pH téměř nemění, k poklesu absorpce záření došlo až v bazické oblasti.



Graf. 17. Absorpční spektrum roztoku AMP o pH = 2,11 (zeleně) a pH = 11,74 (modře)

Roztok AMP byl upraven na pH = 2,11 pomocí HCl, pH = 11,74 bylo dosaženo titrací původního kyselého roztoku, roztokem NaOH. Absorpční maximum při pH = 2,11 bylo 0,52 při vlnové délce 257 nm a při pH = 11,74 bylo absorpční maximum 0,303 při vlnové délce 260 nm

Pro srovnání byla studována analogická situace u komplexu s mědí.



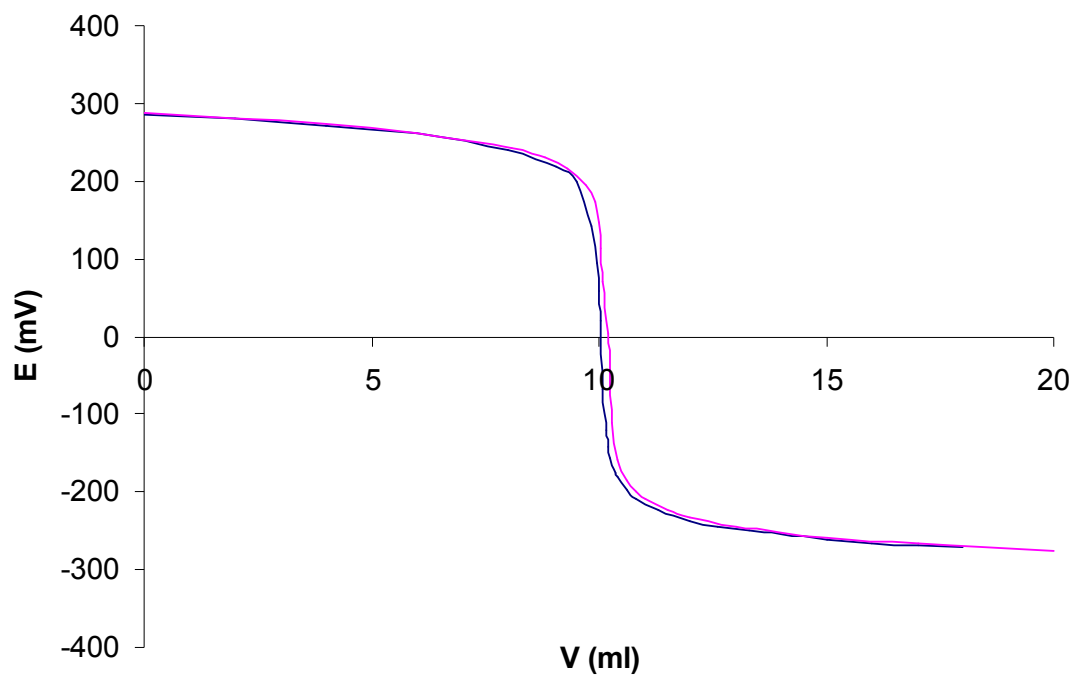
Graf. 18 Absorpční spektra roztoku AMP s CuCl_2 a HCl titrovaného NaOH vypočítané hodnoty pH jsou uvedeny u jednotlivých spekter

Z grafu (Graf. 18) je vidět že spektra kolem $\text{pH} = 7$ se překrývají, stejně jako u samotného AMP došlo k zastavení poklesu absorpce a k posunu maxima.

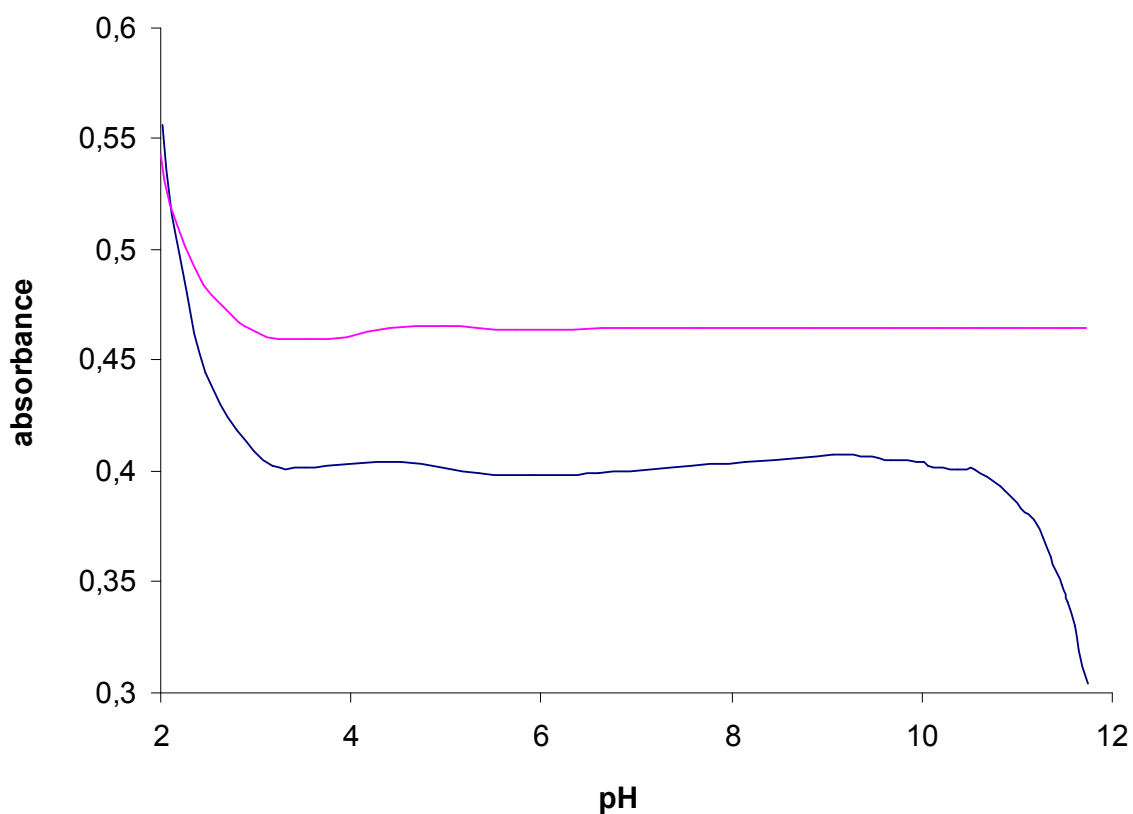
Byla vynesena závislost absorbance na pH. Bylo potřeba zjistit přesné pH pro naměřené potenciály. Titrací roztoku HCl , pomocí NaOH se roztok NaOH standardizoval. Výsledky byly dvakrát derivovány. Zjištěný ekvimolární objem byl 10,5ml a bylo dopočítáno správné pH (Tab. 10)

Tab. 10 Hodnoty absorbance při 260 nm pro vypočítané hodnoty pH

V_{NaOH} (ml)	E (mV)	$-\log [\text{H}^+]$	$[\text{CuCl}_2]$ (M)	A
0	286	2,02	0,00005	0,556
2,01	280,4	2,11	4,81E-05	0,51567
4	271,7	2,26	4,63E-05	0,48081
6	260,3	2,46	4,46E-05	0,44484
8	240,9	2,80	4,31E-05	0,41841
9,06	218,9	3,18	4,23E-05	0,40284
9,51	198,9	3,52	4,20E-05	0,40182
9,84	140,9	4,52	4,18E-05	0,40397
9,95	93,5	5,34	4,17E-05	0,39945
10	59	5,94	4,17E-05	0,3982
10,05	21	6,60	4,16E-05	0,39899
10,1	-68,8	8,15	4,16E-05	0,4045
10,15	-121,5	9,06	4,16E-05	0,40767
10,2	-141,9	9,41	4,15E-05	0,40707
10,25	-157	9,67	4,15E-05	0,40525
10,36	-175,9	10,00	4,14E-05	0,40452
10,4	-180,1	10,07	4,14E-05	0,40246
10,6	-197,4	10,37	4,13E-05	0,40123
10,8	-208	10,55	4,11E-05	0,40054
11,32	-224,2	10,83	4,08E-05	0,39343
12,01	-236,5	11,04	4,03E-05	0,38357
12,62	-243,9	11,17	3,99E-05	0,37784
13,29	-250,3	11,28	3,95E-05	0,36991
14	-255	11,36	3,91E-05	0,36139
15	-260,8	11,46	3,85E-05	0,3491
16	-265,2	11,54	3,79E-05	0,34135
17	-268,9	11,60	3,73E-05	0,32991
18	-272	11,66	3,68E-05	0,31927
20	-276,9	11,74	3,57E-05	0,30429

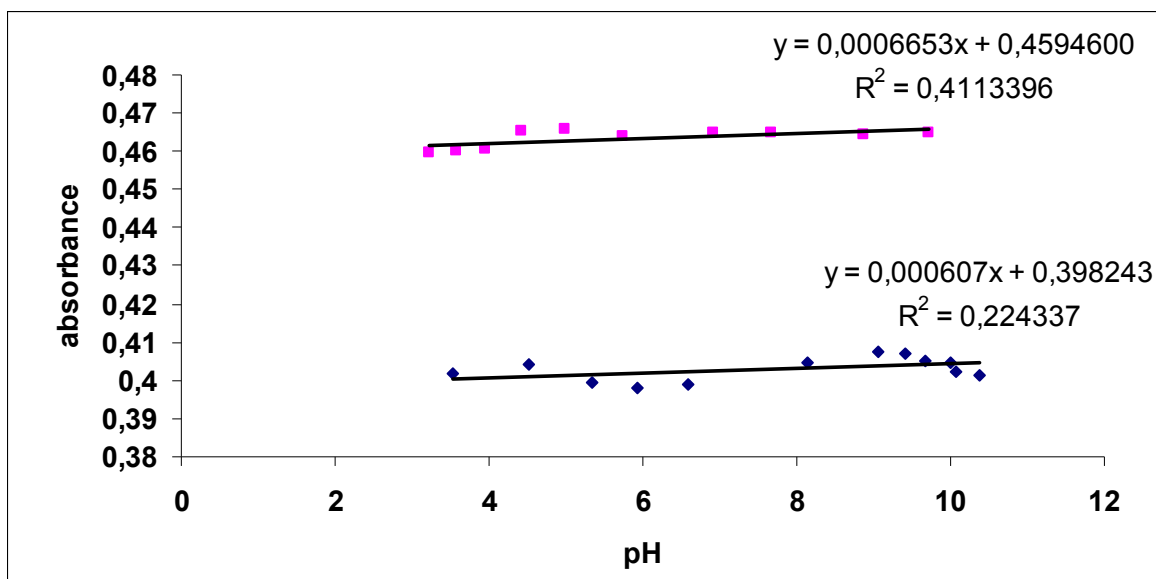


Graf. 20 Titrační křivka z kyselé oblasti do bazické pro AMP (modře) a pro komplex s CuCl_2 (fialově).



Graf. 21 Závislost absorbance na pH roztoků AMP a HCl (modře) a roztoku AMP , HCl a CuCl_2 (fialově)

Byla vybrána oblast pH mezi hodnotou 3 a 10 a proložena body, aby se zjistilo jaká je v této oblasti závislost pH na absorbanci.



Graf. 22 Vybraná oblast závislosti absorbance na pH roztoků AMP a HCl (modře) a roztoku AMP a HCl a (fialově) 260 nm

Po vynesení závislosti absorbance na pH pro oblast pH přibližně mezi hodnotou 3 a 10, bylo zřejmé, že absorbance narůstá. Nárůst je nepatrný, proto byl v programu Medusa nasimulována daná situace a ukázalo se, že komplex je v roztoku zastoupen jen z deseti procent.

5. Závěr

Cílem bakalářské práce, bylo zjistit vliv experimentálních podmínek, jako je pH, iontová cíla, koncentrace ligandu a kovu, na absorpční spektrum adenosin monofosfátu s přídatkem mědi. Bylo zjištěno, že AMP a komplex AMP s mědí absorbuje při vlnových délkách v UV oblasti do 280 nm. Spektra ve viditelné oblasti nebyla zkoumána z důvodů srážení AMP při daných koncentracích. Byla zjištěna optimální koncentrace AMP i mědi pro měření v jednocentimetrové kyvetě. Porovnáním spekter AMP bez mědi a s mědí bylo dokázáno, že se komplex Cu^{2+} s AMP tvoří. Důležitým zjištěním, kterého se dá využít v budoucím studiu bylo, že tvorba komplexu je ovlivněna změnou pH a že se komplex při vysokých koncentracích Cu-AMP sráží, avšak při nízkých koncentracích nevzniká v dostatečném molárním poměru mědi k AMP, aby významnějším způsobem ovlivnil absorbanci. V dalších měřeních by měly být určeny protonizační konstanty. To bude možné za předpokladu, že se vyhneme koncentracím, při nichž dochází ke srážení komplexu. To znamená, že budeme pracovat v nízkých koncentracích, aby absorbance komplexu nepřesahovala 1 v UV oblasti. Komplex absorbuje pouze v UV kolem 260 nm a ve viditelné oblasti kolem 800 nm. Jako nejschůdnější cesta se jeví titrace roztoky o stejné iontové síle a koncentraci AMP 5 až 7 krát vyšší než 0.00005 M v dvoumilimetrové kyvetě. Druhou možností je měřit spektrum ve viditelné oblasti a pro detekci AMP, jako komplexu s mědnatým iontem použít pětcentimetrovou kyvetu. V prvním případě se nemusí podařit dosáhnout dostatečně vysokého poměru koncentrací vytvořeného komplexu k AMP.

6. Použitá literatura

- [1] L. Sommer, Analytická spektrometrie I, UJEP v Brně, 1986.
- [2] J. Zýka a kolektiv, Analytická příručka 1, SNTL/ALFA, Praha, 1979.
- [3] L. Sommer, M. Langová, J. Jambor, J. Komárek, Teorie a praxe vybraných analytických [4]optických metod, Státní pedagogické nakladatelství, Praha, 1976.
- [4] J. Zýka a kolektiv, Analytická příručka 2, SNTL/ALFA, Praha, 1980.
- [5] E. Nováček, M. Potáček, S. Janků, Laboratorní technika ke cvičení z metod organické chemie, Vydavatelství MU, Brno, 2000
- [6] V. Mikeš, Základní pojmy z biochemie, Vydavatelství MU, Brno, 2004
- [7] Z. Šípal, P. Anzenbach, P. Peč, J. Pospíšil, I. Růžička, Biochemie, Státní pedagogické nakladatelství, Praha, 1992(B)
- [8] J. Toužín, Stručný přehled chemie prvků, Vydavatelství MU, Brno, 2006
- [9] <http://cs.wikipedia.org/wiki/Nukleotid>(6.4.2007)
- [10] <http://www.info.estranky.cz/clanky/fyzika/REFERaT--MeD>

7. Použité zkratky

A - adenin

C - cytosin

G - guanin

T - thymin

U - uracil

AMP- adenosin monofosát

8. Seznam grafů

Graf. 1 Průběh potenciometrické titrační křivky v okolí ekvivalenčního bodu $E = f(V)$.	14
Graf. 2 Průběh potenciometrické titrační křivky v okolí ekvivalenčního bodu $\Delta E / \Delta V = f(V)$.	14
Graf. 3 Průběh potenciometrické titrační křivky v okolí $\Delta^2 E / \Delta V^2 = f(V)$.	15
Graf. 4 Absorpční spektrum vody, je-li jako pozadí zvolen signál vody	21
Graf. 5 Absorpční spektra CuCl_2 o různých koncentracích. Koncentrace CuCl_2 jsou uvedeny u jednotlivých spekter.	22
Graf. 6 Závislost absorbance roztoku CuCl_2 na koncentraci roztoku CuCl_2 při vlnové délce 811 nm	23
Graf. 7 Absorpční spektrum roztoku CuCl_2 o koncentraci 0,03 M a různých iontových silách, velikost iontových sil je uvedena v grafu.	25
Graf. 8 Absorbance roztoku CuCl_2 při iontové síle 0,5 M	26

<u>Graf. 9 Absorpční spektra komplexu při různých koncentracích CuCl_2 a konstantní koncentraci ligandu $[\text{AMP}] = 0,0001 \text{ M}$, iontová síla nebyla upravována na konstantní hodnotu, objemy přidaného CuCl_2 jsou uvedeny.</u>	28
<u>Graf. 10 Změna absorbance roztoku AMP a CuCl_2 v závislosti na $[\text{CuCl}_2]$ při vybraných vlnových délkách.</u>	30
<u>Graf. 11 Absorbance AMP při $I = 0,075 \text{ M}$ v závislosti na měnící se koncentraci CuCl_2 v grafu jsou uvedeny objemy titračního činidla v ml</u>	31
<u>Graf. 12 Absorbance AMP při $I = 0,15 \text{ M}$ v závislosti na měnící se koncentraci CuCl_2 v grafu jsou uvedeny objemy titračního činidla v ml</u>	32
<u>Graf. 13 Závislost absorbance na měnící se koncentraci CuCl_2 v roztoku AMP + CuCl_2 pro dvě různé iontové síly</u>	34
<u>Graf. 14 Závislost potenciálu na změně koncentrace CuCl_2 v roztoku AMP + CuCl_2 pro dvě různé iontové síly</u>	34
<u>Graf. 19 Závislosti potenciálu na pH při standardizaci NaOH použitého k titraci AMP a HCl a roztoku AMP a HCl a CuCl_2</u>	35
<u>Graf. 15. Titrace AMP z kyselé oblasti do bazické pro pH od 2,00 do 3,47 a od 10,27 do 11,78, hodnoty pH jsou uvedeny.</u>	37
<u>Graf. 16 Absorpční spektra roztoku AMP a HCl titrovaného NaOH hodnoty pH jsou uvedeny u jednotlivých spekter</u>	38
<u>Graf. 17. Absorpční spektrum roztoku AMP o $\text{pH} = 2,11$ (zeleně) a $\text{pH} = 11,74$</u>	39
<u>Graf. 18 Absorpční spektra roztoku AMP s CuCl_2 a HCl titrovaného NaOH vypočítané hodnoty pH jsou uvedeny u jednotlivých spekter</u>	40
<u>Graf. 20 Titrační křivka z kyselé oblasti do bazické pro AMP (modře) a pro komplex s CuCl_2 (fialově).</u>	42
<u>Graf. 21 Závislost absorbance na pH roztoků AMP a HCl (modře) a roztoku AMP, HCl a CuCl_2 (fialově).</u>	42
<u>Graf. 22 Vybraná oblast závislosti absorbance na pH roztoků AMP a HCl (modře) a roztoku AMP a HCl a (fialově) 260 nm</u>	43