

# **VYBRANÉ PROBLÉMY ELEKTROCHEMIE**

RNDr. Mgr. Iveta Třísková, Ph. D.

# Elektroneutralita a iontová síla

- Elektrostatické interakce iontů – vliv na stabilitu a prostorové uspořádání biologicky významných struktur
- Elektrická vodivost roztoků
- Změny koligativních vlastností (jejich velikost závisí na počtu částic v roztoku) – snížení bodu tuhnutí, zvýšení bodu varu nebo osmotického tlaku v důsledku snížení chemického potenciálu  $\mu$
- **Silné elektrolyty** – úplná disociace na ionty; silné kyseliny a silné zásady
- **Slabé elektrolyty** – částečná disociace
- Analytická koncentrace elektrolytu = součet koncentrací všech jeho forem přítomných v roztoku
- Pro dvojsytnou slabou kyselinu ( $H_2A$ ) platí:  $c = [H_2A] + [HA^-] + [A_2^-]$

$$F = \frac{Q_1 Q_2}{\epsilon r^2}$$

# Elektroneutralita a iontová síla

- **Podmínka elektroneutrality** - základní vztah pro roztoky elektrolytů → kladné a záporné náboje se navzájem kompenzují

$$\sum_i c_i z_i = 0$$

$c_i$  molární koncentrace iontů  $i$  s nábojem  $z_i$

- **Iontová síla** – „koncentrace“ náboje v roztoku, dána vztahem

$$I = \frac{1}{2} \sum_i c_i z_i^2$$

$c_i$  molární koncentrace iontů  $i$  s nábojem  $z_i$

Př.: Jaká je iontová síla roztoku  $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$  o  $c = 0,2 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  ?

$$I = \frac{1}{2} (2 \cdot 0,2 \cdot 3^2 + 3 \cdot 0,2 \cdot 2^2) = 3 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$$

# Aktivita elektrolytů

- Odchylka od ideálního chování je způsobena elektrostatickými interakcemi mezi ionty roztoku, proto pro přesnější výpočty lépe uvažovat **aktivitu iontů** :

$$a_i = \gamma_i \cdot c_i$$

$c_i$  je koncentrace iontů  $i$ ;  $\gamma_i$  je aktivní koeficient (nejčastěji molární nebo molální)

**!!!!Musí platit podmínka elektroneutrality!!!!**

- **Střední aktivní koeficient**  $\gamma_{\pm} = \sqrt[v]{\gamma_+^{v+} \gamma_-^{v-}}$

Geometrický průměr aktivního koeficientu aniontu a kationtu

# Aktivní koeficient

Z klasické termodynamiky:

Pro reálný roztok kationtu  $M^+$  a aniontu  $X^-$  při téže molalitě platí:

$$G_m = \mu_+ + \mu_- = \mu_+^{ideal} + \mu_-^{ideal} + RT \ln \gamma_+ + RT \ln \gamma_- = G_m^{ideal} + RT \ln \gamma_+ \gamma_-$$

↓  
Střední aktivní koeficient

$$\gamma_{\pm} = (\gamma_+ \gamma_-)^{1/2}$$

Obecně pro sloučeniny  $M_p X_q$  platí:

$$G_m = p\mu_+ + q\mu_- = G_m^{ideal} + pRT \ln \gamma_+ + qRT \ln \gamma_-$$

↓  
Definice středního aktivního koeficientu

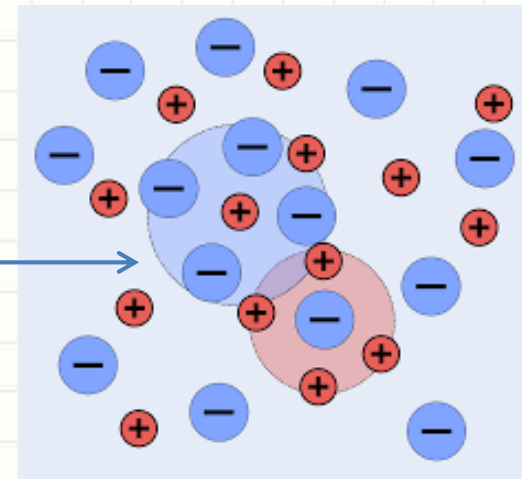
$$\gamma_{\pm} = (\gamma_+^p \gamma_-^q)^{1/s}$$

$$s = p + q$$

# Debye-Hückelova teorie iontových roztoků

1923 – Peter Debye a Erich Hückel

Iontová atmosféra



Podkladem D. – H. teorie je tendence aniontů shromažďovat se kolem kationtů a naopak (jeden takový lokální shluk je znázorněn kruhem). Ionty jsou v neustálém pohybu.

Pro velmi nízké koncentrace:

$$\log \gamma_{\pm} = - |z_+ z_-| A I^{1/2}$$

Debye – Hückelův limitní zákon

kde  $A = 0,509$  pro vodné roztoky při  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  a  $I$  je bezrozměrná **iontová síla** roztoku

# Debye-Hückelova teorie iontových roztoků

$$I = \frac{1}{2} \sum_i z_i^2 (b_i / b^\ominus)$$

definice iontové síly

Pro velmi vysoké koncentrace lze aktivní koeficient odhadnout z rozšířeného Debye – Hückelova zákona:

$$\log \gamma_{\pm} = - \left( \frac{A |z_+ z_-| I^{1/2}}{1 + BI^{1/2}} + CI \right)$$

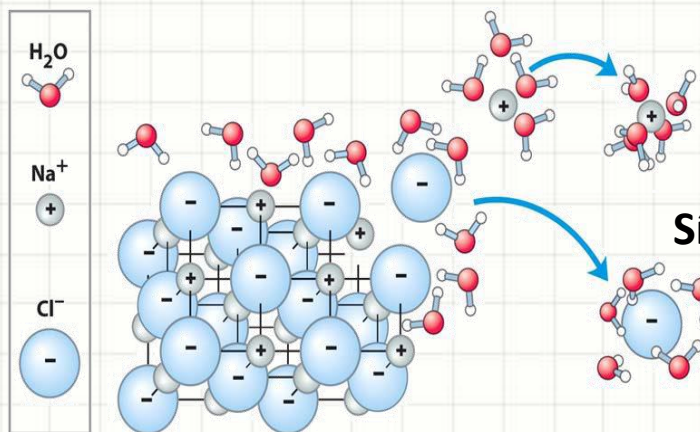
Rozšířený Debye-Hückelův zákon

Kde  $B$  a  $C$  jsou bezrozměrné konstanty a lze je považovat za nastavitelný empirický parametr

# Solvatace v roztocích elektrolytů

**A Rozpouštění iontových sloučenin** - pochod, při kterém jsou pozitivně a negativně nabité ionty, vyskytující se v mřížce od sebe vzájemně oddalovány v důsledku silného elektrostatického přitahování s dipóly vody – vznik hydratovaných iontů

Water dissolves many crystalline salts by hydrating their component ions. The NaCl crystal lattice is disrupted as water molecules cluster about the Cl and Na ions. The ionic charges are partially neutralized, and the electrostatic attractions necessary for lattice formation are weakened



$$F = \frac{Q_1 Q_2}{\epsilon r^2}$$

Síla iontových interakcí

**Hydratace** i jako chemická reakce mezi iontem a vodou vedoucí ke vzniku koordinační sloučeniny

Při hydrataci iontů jsou v hydratační sféře předpokládány tři oblasti:

- 1) **Vnitřní vrstva** – molekuly vody jsou vzájemně pevně orientovány na povrchu iontu (jejich struktura je uspořádanější než v samotné vodě)
- 2) **Další vrstva** – ion ruší vodíkové vazby mezi molekulami vody – porušení struktury
- 3) **Vnější vrstva** – struktura „vázané“ vody přechází na strukturu „volné“ vody



# Solvatace v roztocích elektrolytů

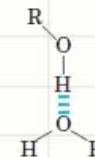
- ✓ Rozdílná působnost iontů v hydratačních vrstvách
  - ionty  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{H}_3\text{O}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{OH}^-$ ,  $\text{F}^-$  - uplatňují se v první vrstvě a působí ve smyslu zpevnění struktury vody
  - ionty  $\text{K}^+$ ,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{Cs}^+$ ,  $\text{Br}^-$ ,  $\text{I}^-$ ,  $\text{IO}_3^-$  - uplatňují se především ve druhé vrstvě a působí ve smyslu rušení struktury vody

- ⓑ **Rozpouštění nenabitých polárních molekul** (anorganické i organické sloučeniny) tvorba vodíkových můstků s polárními funkčními skupinami (hydroxylové skupiny cukrů a alkoholů, karboxylové skupiny aldehydů a ketonů...)

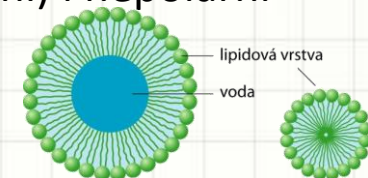
Between the carbonyl group of a ketone and water



Between the hydroxyl group of an alcohol and water



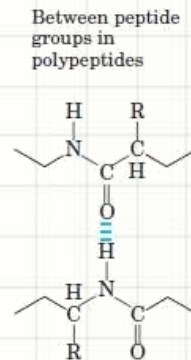
- Ⓒ **Sloučeniny obsahující pouze nepolární hydrofobní skupiny** se ve vodě nerozpouštějí
- Ⓓ **Amfipatické látky** – obsahují v molekule polární (hydrofilní) i nepolární (hydrofobní) skupiny. PŘ.: mastné kyseliny a polární lipidy
  - ✓ Tvorba micel



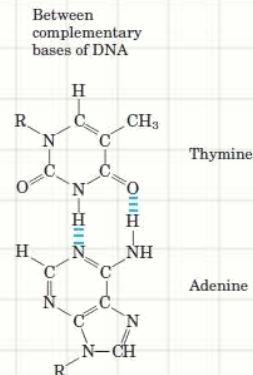
# Voda jako rozpouštědlo

## ⓓ Amfipatické látky – bílkoviny a nukleové kyseliny

- ✓ **Bílkoviny:** důležitá role (polárních) nabitých skupin  $\text{COO}^-$ ,  $\text{NH}_3^+$  imidazolium při vazbě vody na bílkovinu



- ✓ **Nukleové kyseliny:** fosfátové skupiny jsou primárním místem hydratace

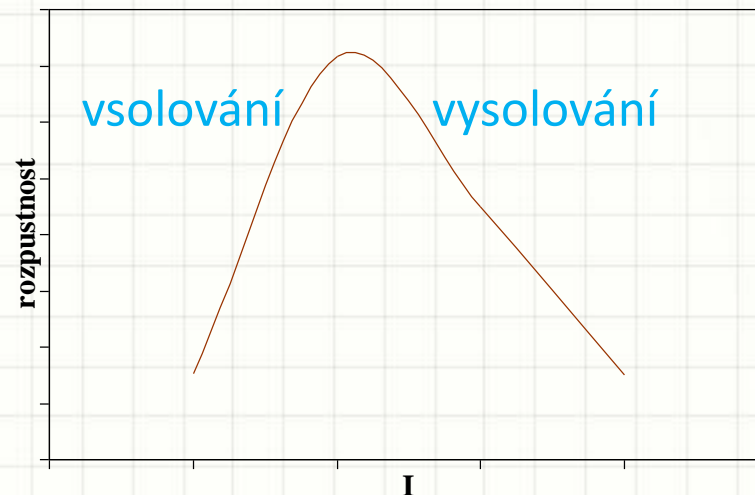


# Hydratace bílkovin

- Na povrchu molekuly bílkovin v bezprostředním kontaktu s rozpouštědlem jsou a) nabitě funkční skupiny; b) nenabitě struktury → různé části povrchu biopolymeru jsou solvatovány/ hydratovány odlišným způsobem
- **Hydratační obal bílkovin** – existuje vždy; část této vody vázána mimořádně pevně – nelze ji odstranit bez nevratné destrukce nativní struktury bílkoviny; další podíl vody vázán méně pevně; všechna vázaná voda má však charakteristiky, kterými se liší od čistého rozpouštědla – dvojrozměrná síť molekul vody propojených vodíkovými vazbami, která obepíná molekulu bílkoviny a začleňuje do sebe i klastry vody v některých oblastech. Vodíkové vazby v síti jsou pevnější a mají delší dobu života než tyto vazby ve vzdálenějším okolí
- **Hydratační obal** je klíčový pro biologickou funkci bílkovin (konformační flexibilita)
- **Voda v krystalech bílkovin** – 30 až 50% hmotnosti krystalu; nezbytná pro udržení struktury; chová se jako kapalná → difuze malých molekul do dutin krystalů bílkovin

# Vsolování a vysolování bílkovin

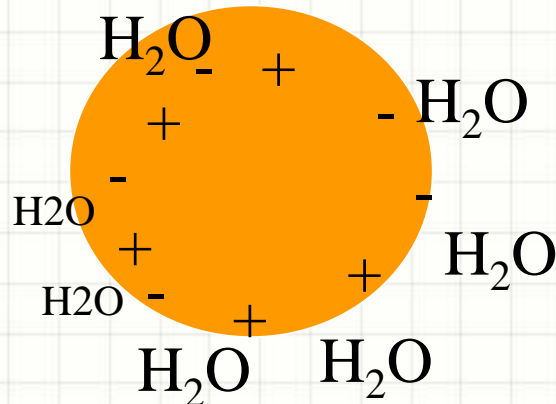
- Rozpustnost bílkovin ve vodě lze ovlivnit přidavkem rozpustné soli
- Závislost rozpustnosti bílkovin na koncentraci přídavné soli prochází maximem
- **Vsolování** – první vzestupná větev, kdy se bílkovina více rozpouští
- **Vysolování** - když křivka dosáhne maxima, začíná s dalšími přidavky soli rozpustnost bílkoviny klesat a při vysoké koncentraci soli → bílkovina z roztoku vypadne; používá se pro frakcionaci lidského séra, izolaci bílkovin



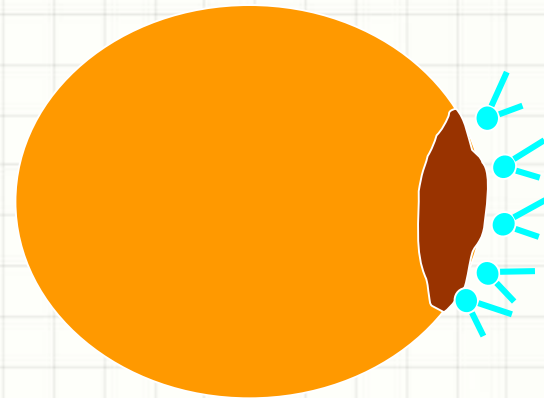
# Vsolování a vysolování bílkovin

- Na začátku bílkovina v čisté vodě → navázání iontů přidávané soli → změna náboje molekuly bílkoviny a změna hydratačního obalu → hydrofilisace molekuly bílkoviny → roste rozpustnost až do té doby, než je v roztoku tak velké množství volné soli, že začíná kompetice mezi jejími ionty a bílkovinou o molekuly vody pro hydratační obal → částečná ztráta hydratačního obalu ve prospěch anorganických iontů, zesílení interakcí bílkovina – bílkovina → precipitace (vysolení bílkoviny)

**Vsolování**



**Vysolování**



# Vsolování a vysolování bílkovin

- **Vsolování** – náboj bílkoviny  $z^+$  kompenzován anionty  $X^-$ ; v roztoku se ustavuje rovnováha  $PX_z \leftrightarrow P^{z+} + zX^-$ ;
- termodynamická rovnovážná konstanta: 
$$K_r = \frac{a_{pz} + (a_{x^-})^z}{a_{pxz}}$$
- Součin rozpustnosti:  $S_{bílka} = a_{pz} + (a_{x^-})^z$
- **Vysolování** – lze použít semiempirický vztah:  $\log c_s = \log c_s^0 - K_s I$
- **Franz Hofmeister** (konec 19.stol.) – sestavení řady aniontů a kationtů dle jejich vysolovacího účinku:
- **Anionty se stejným kationtem:**  $SO_4^{2-} > F^- > IO_3^- > NO_2^- > Br^- > NO_3^- > I^- > CNS^-$
- **Kationty se stejným aniontem:**  $Li^+ > Na^+ > K^+ > NH_4^+ > Rb^+ > Cs^+$
- Vysolovací účinek soli závisí více na aniontu než kationtu
- **Pro vysolování bílkovin:**  $Na_2SO_4 > (NH_4)_2SO_4 > NaCl > CaCl_2$
- Nejběžnější vysolovací činidlo pro srážení bílkovin → **síran amonný**

# Kyselost roztoků

- Druhá pol. 19. stol. → kyselost roztoků způsobena hydroxoniovými ionty  $H_3O^+$ ; jejich koncentrace souvisí s autoprotolýzou vody dle rovnice:



- Rovnovážná konstanta autoprotolýzy:  $(K_{H_2O})_a = \frac{a_{H_3O} \cdot a_{OH}}{a_{H_2O}^2}$

- **Iontový součin vody  $K_w$ :**  $K_w = [H_3O^+][OH^-] = 1,008 \cdot 10^{-14} \text{ mol}^2 \cdot \text{dm}^{-6}$

- V neutrálním roztoku:  $[H_3O^+] = [OH^-] = 1,004 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$

$$[H^+] = [OH^-] = \sqrt{K_{H_2O}} \approx 1 \cdot 10^{-7}$$

- **pH** (Sørensenův vodíkový exponent):  **$-\log [H^+]$**

# Měření pH

- Pro vysvětlení podstaty techniky měření pH je vhodné vycházet z klasického způsobu měření, kdy se používá článek složený z vodíkové jako indikační a kalomelové jako referenční elektrody
- $\text{Pt} | \text{H}_2(\text{g}) | \text{roztok X} | \text{KCl}(\text{nas}) | \text{Hg}_2\text{Cl}_2(\text{s}) | \text{Hg}(\text{l}) | \text{Pt}$
- **Reakce:**  $\frac{1}{2} \text{H}_2(\text{g}) + \frac{1}{2} \text{Hg}_2\text{Cl}_2(\text{s}) \leftrightarrow \text{Hg}(\text{l}) + \text{H}^+(\text{aq}, \text{X}) + \text{Cl}^-(\text{aq})$
- Elektrodové potenciály:

$$E_v = E(\text{H}_3\text{O}^+ / \text{H}_2) = \frac{RT}{F} \ln \frac{a_{\text{H}_3\text{O}^+}}{\sqrt{p\text{H}_2}}$$

Vodíková elektroda

$$E_k = E(\text{Hg}_2\text{Cl}_2 / \text{Hg}) = E_k^0 - \frac{RT}{F} \ln a_{\text{Cl}^-}$$

Kalomelová elektroda

kde  $p\text{H}_2$  je parciální tlak plynného vodíku ve vodíkové elektrodě, pro níž je  $E_v^0 = 0 \text{ V}$  dle definice



# Měření pH

- Elektromotorické napětí  $E_x = E_{\text{pravá}} - E_{\text{levá}}$



Nutno zvýšit o kapalinový potenciál  $\phi_{L,X}$  na rozhraní roztok X a nasycený KCl; ustavuje se na každém rozhraní, kde se stýkají dva roztoky



$$E_x = \phi_{L,X} + E^0_k - \frac{RT}{F} \left[ \ln(a_{H_3O^+})_x + \ln a_{Cl^-} - \frac{1}{2} \ln p_{H_2} \right]$$

$$E_S = \phi_{L,S} + E^0_k - \frac{RT}{F} \left[ \ln(a_{H_3O^+})_S + \ln a_{Cl^-} - \frac{1}{2} \ln p_{H_2} \right]$$



Odečteme rovnice

$$E_X - E_S = \phi_{L,X} - \phi_{L,S} - \frac{RT}{F} \left[ \ln(a_{H_3O^+})_X - \ln(a_{H_3O^+})_S \right]$$



Přirozené logaritmy převedeme na dekadické a po dalších úpravách

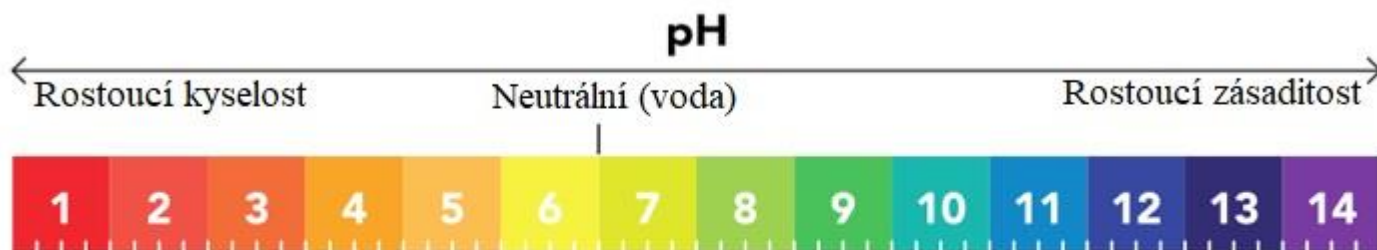
$$pH(X) = pH(S) + \frac{(E_X - E_S)}{2,303RT}$$

**Základ měření pH**

$$pH(X) = pH(S) + \frac{(E_X - E_S)}{2,303RT}$$

Standardní roztok, má jednoznačně přiřazenou jistou hodnotu pH; nejčastěji pufr

## Praktická škála pH



Ideální pH pro zdravou pokožku je **mírně kyselá**, v rozmezí pH 4.0 - 5.5

# Skleněná elektroda

- Iontově selektivní elektroda s membránou ze speciálního druhu skla
- **Vnitřním elektrolyt:** octanový nebo fosforečnanový pufr s přídavkem chloridu
- **Referentní elektroda:** argentchloridová nebo kalomelová elektroda ponořená do vnitřního roztoku elektrolytu
- **Základní fce skleněné elektrody:** výměnná reakce iontů mezi sklem a roztokem, jehož pH je měřené (na základě této reakce se na povrchu elektrody ustavuje Donnanův potenciál – potenciálový rozdíl mezi povrchem membrány a okolním roztokem).



- **Membránový potenciál:** rozdíl Donnanových potenciálů na vnější a vnitřní straně skleněné membrány

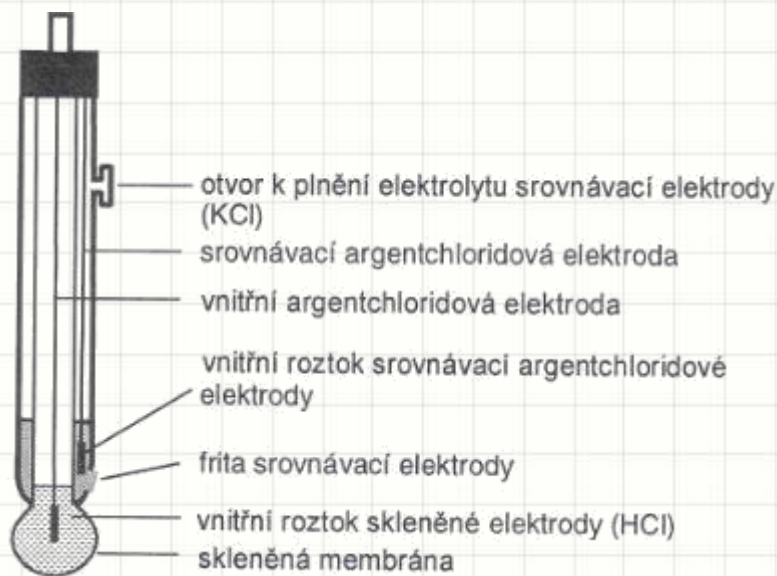
# Skleněná elektroda

- **Alkalická (pozitivní) chyba skleněné elektrody** -  $\text{pH} > 10$ , způsobena rušivým účinkem sodných iontů
- **Kyselá (negativní) chyba skleněné elektrody** –  $\text{pH} = 1$  a nižší, nasycení protony v povrchu skleněné membrány → elektroda přestane být k dalšímu snižování pH citlivá
- **Nernstovská odezva elektrody** je rovna  $59,12 \text{ mV}$  ( $t = 25^\circ \text{C}$ )

## Nicolsky-Eisenmanova rovnice

$$E = K + \frac{RT}{z_i F} \ln \left[ a_i + \sum_j (k_{ij} a_j^{z_i/z_j}) \right]$$

- K ... standardní potenciál ISE [V]  
z<sub>i</sub> ... nábojové číslo sledovaného iontu i  
a<sub>i</sub> ... aktivita sledovaného iontu i v měřeném roztoku  
R ... molární plynová konstanta (8,314 J·K<sup>-1</sup>·mol<sup>-1</sup>)  
T ... termodynamická teplota [K]  
F ... Faradayova konstanta (96 485,33 C·mol<sup>-1</sup>)  
z<sub>j</sub> ... nábojové číslo interferujícího iontu j  
a<sub>j</sub> ... aktivita interferujícího iontu j  
k<sub>ij</sub> ... konstanta selektivity (vyjadřuje velikost vlivu interferujícího iontu na potenciál elektrody)



# Měření pH - přístroje

- Potenciálový rozdíl je odváděn vnitřní elektrodou (Ag/AgCl) a měří se proti referenční argentchloridové nebo kalomelové elektrodě
- Potenciometr s vysokým vstupním odporem a digitální indikací; škála v jednotkách mV nebo pH
- **pH metry se skleněnou elektrodou** – standardizace na dva základní roztoky pufrů o pH 4 a 7

pH metr CyberScan 5500



# Závislost pH na teplotě

- ❖ Elektrolyty typu 1-1; jejich molalita je vyšší než  $10^{-6}$  mol·kg<sup>-1</sup>
- ❖ **Silné kyseliny a zásady** – závislost  $p\alpha_H$  (zde záporný logaritmus aktivity  $H_3O^+$  iontů) na teplotě se omezuje na teplotní závislost aktivitního koeficientu  $\gamma$ 
  - **$p\alpha_H$  silných kyselin** s teplotou mírně roste

$$\left(\frac{\delta p\alpha_H}{\delta T}\right)_{p,m} = -\left(\frac{\delta \log \gamma}{\delta T}\right)_{p,m} \rightarrow \text{velmi malá hodnota}$$

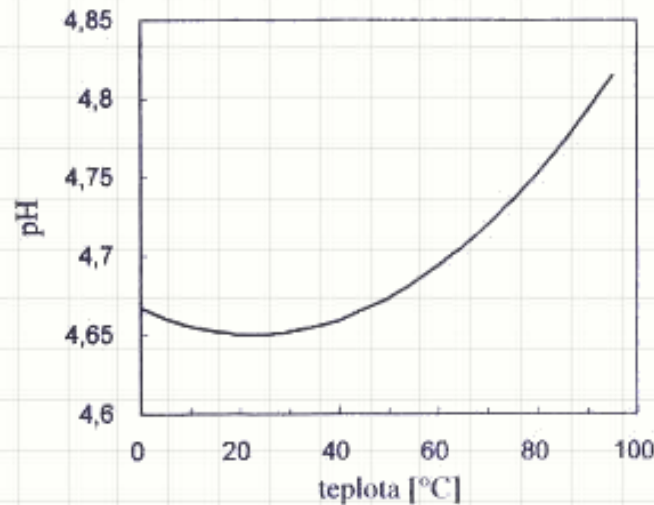
- **$p\alpha_H$  silných zásad** s teplotou výrazně klesá

$$\left(\frac{\delta p\alpha_H}{\delta T}\right)_{p,m} = -\left(\frac{\delta \log K_w}{\delta T}\right)_p + \left(\frac{\delta \log \gamma}{\delta T}\right)_{p,m}$$

↓  
Při 25 °C je rovno **-0,033**

# Závislost pH na teplotě

- **Pufry**
- Rozhodující vliv na průběh pH pufry s teplotou má teplotní závislost disociační konstanty slabého elektrolytu → závislosti  $p a_H$  na teplotě mají stejný tvar jako závislost  $pK$  na teplotě
- S rostoucí teplotou pH **kyselých pufřů** roste, **zásaditých** klesá



Teplotní závislost pH acetátového pufry tvořeného 0,05 M kyselinou octovou a 0,05 M octanem sodným (25 °C, pH 4,65)

# Obecná teorie kyselin a zásad

- **Arrheniova teorie (1889)**
  - **Kyselina** – sloučenina odštěpující kation  $H^+$
  - **Zásada** – sloučenina odštěpující anion  $OH^-$
- **Brønstedova teorie (1923) – Obecná teorie kyselin a zásad-**
- kyselé nebo zásadité vlastnosti sloučeniny se projevují po její reakci s rozpouštědlem
  - **Kyselina** – látka schopná odštěpovat proton
  - **Zásada** – látka vázající proton
- V roztoku musí být přítomni současně oba partneři - **konjugované páry**
- **Lewisova teorie** – velký význam pro výklad mechanismu organických reakcí
  - **Kyselina** – akceptor elektronového páru
  - **Zásada** – donor elektronového páru



# Disociace slabých kyselin a zásad

- Slabá jednosytná kyselina HA:  $HA \leftrightarrow H^+ + A^-$

- Disociační konstanta:  $K_A = \frac{[H^+][A^-]}{[HA]} = \frac{c\alpha^2}{1-\alpha}$   $c$  je celková koncentrace kyseliny;  $\alpha$  je stupeň disociace

- Stupeň disociace:  $\alpha = \frac{[A^-]}{[HA] + [A^-]}$

$$pH = \frac{1}{2}(pK_A - \log c)$$

- Slabá zásada BOH:  $BOH \leftrightarrow B^+ + OH^-$

$$pH = 14 - \frac{1}{2}(pK_B - \log c)$$

# Pufry

- Směs slabé kyseliny nebo zásady a její soli vytváří systém schopný udržovat neměnné pH, když se k nim přidává kyselina nebo zásada
- Příklad: **Acetátový pufr** – směs kyseliny octové (HAc) a octanu sodného (NaAc)
- Přídavek silné kyseliny:  $\text{Ac}^- + \text{H}_3\text{O}^+ \leftrightarrow \text{HAc} + \text{H}_2\text{O}$
- Přídavek silné zásady:  $\text{HAc} + \text{OH}^- \leftrightarrow \text{Ac}^- + \text{H}_2\text{O}$

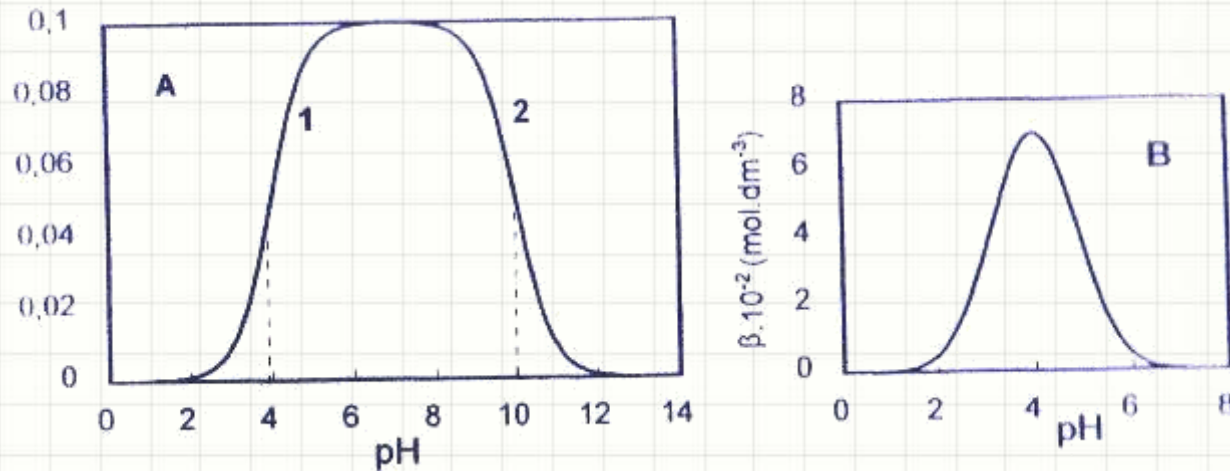
→ pH se nemění

## pH pufru

- **Henderson – Hasselbachova rovnice**  $\text{pH} = \text{p}K_A + \log \frac{[\text{A}^-]}{[\text{HA}]}$
- i pomocí stupně konverze:  $\text{pH} = \text{p}K_A + \log \frac{[\alpha]}{[1-\alpha]}$
- **Pufrační kapacita** – množství silné kyseliny nebo silné zásady potřebné přidat k pufru, aby se jeho pH měnilo o jednotku

# Pufry

Puftr má maximální pufrační kapacitu, když je jeho pH rovno  $pK_A$  použité slabé kyseliny

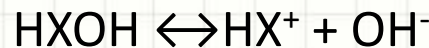
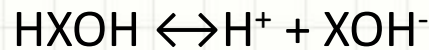


A - vztah pH a složení roztoku pro kyselý a basický puftr, které vycházejí ze slabých elektrolytů s hodnotami  $pK_A = 4$  (křivka 1) a  $pK_B = 4$  (křivka 2). Koncentrace obou pufřů je 0.1 M. Na svlé ose je vynesena koncentrace  $c$  silné zásady přidané k slabé kyselině, resp. silné kyseliny přidané k slabé basi. Maximum pufrační kapacity je pro oba pufry označeno čárkovaně; pro kyselý je to pH odpovídající číselně  $pK_A$ ; pro basický odpovídající hodnotě  $(14-pK_B)$ .

B – závislost pufrační kapacity na pH pro kyselý puftr znázorněný na panelu A křivkou 1

# Amfolyty

- Sloučeniny schopné vystupovat jako kyseliny nebo jako zásady
- Dle klasické Arrheniovy teorie:



- Reakce amfolytu s vodou:  $\text{HXOH} + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{H}_3\text{O}^+ + \text{XOH}^-$   
 $\text{HXOH} + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{H}_2\text{XOH}^+ + \text{OH}^-$

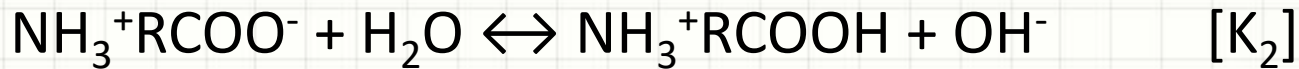
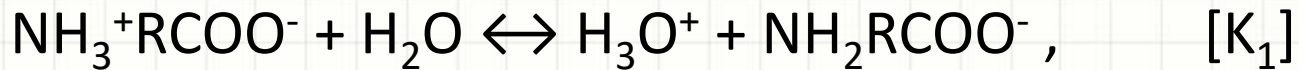
$$K_A = \frac{c_{\text{H}_3\text{O}^+} \cdot c_{\text{XOH}^-}}{c_{\text{HXOH}}}$$

$$K_B = \frac{c_{\text{H}_2\text{XOH}^+} \cdot c_{\text{OH}^-}}{c_{\text{HXOH}}}$$

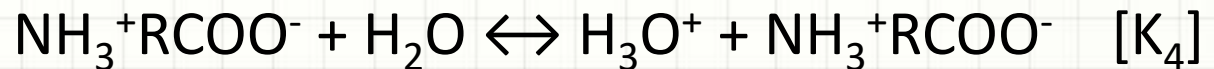
- Tyto úvahy platí pro neutrální molekuly; v biologických soustavách jsou typické amfolyty aminokyseliny
- Vnitřní ionizace aminokyselin:  $\text{NH}_2\text{RCOOH} \leftrightarrow \text{NH}_3^+\text{RCOO}^-$

# Amfolyty

- Protolytické rovnováhy aminokyselin:



- $K_1$  – schopnost aminoskupiny  $\text{NH}_3^+$  odštěpovat proton; míra kyselosti této skupiny
- $K_2$  – míra bazicity karboxylátového aniontu
- Pro vyjádření bazicity aminoskupiny a kyselosti karboxylu platí rovnováhy:  $\text{NH}_2\text{RCOO}^- + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{NH}_3^+\text{RCOOH} + \text{OH}^-$   
[ $K_3$ ]



- Hodnoty bazických konstant lze získat pomocí iontového součinu vody ze vztahů:  $K_w = K_1K_3 = K_2K_4$ ; tedy  $\text{p}K_3 = 14 - \text{p}K_1$  a  $\text{p}K_2 = 14 - \text{p}K_4$

# Amfolyty

- **Isoelektrický bod** – charakteristický parametr, významný hlavně u aminokyselin (AMK) a bílkovin; je to takové pH při němž daná sloučenina neputuje v elektrickém poli; u AMK splněna podmínka:

$$c_{NH_3^+RCOOH} = c_{NH_2RCOO^-}$$

- S využitím  $K_1$  a  $K_4$  (viz. slide 30) získáme:

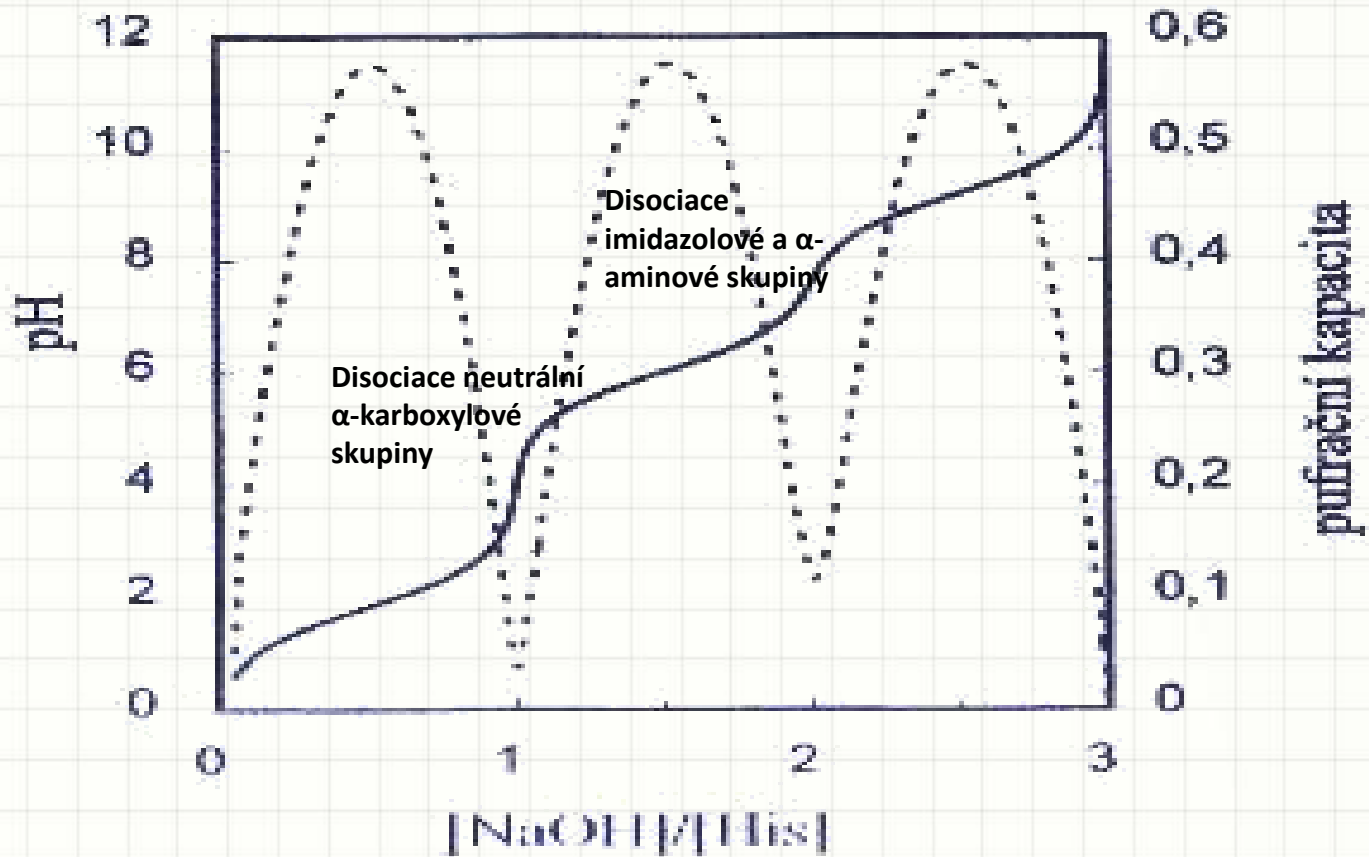
$$K_1 K_4 = a_{H_3O^+}^2 \frac{c_{NH_2RCOO^-} \gamma_{NH_2RCOO^-}}{c_{NH_3^+RCOOH} \gamma_{NH_3^+RCOOH}}$$

- Hodnotu isoelektrického pH lze vypočítat:

$$pI = -\log(a_{H_3O^+})^2 = \frac{1}{2}(pK_1 + pK_4)$$

# Aminokyseliny jako pufry

- Titrační křivka



Titrační křivka histidindihydrochloridu (—) a jeho pufrací kapacita (-----)

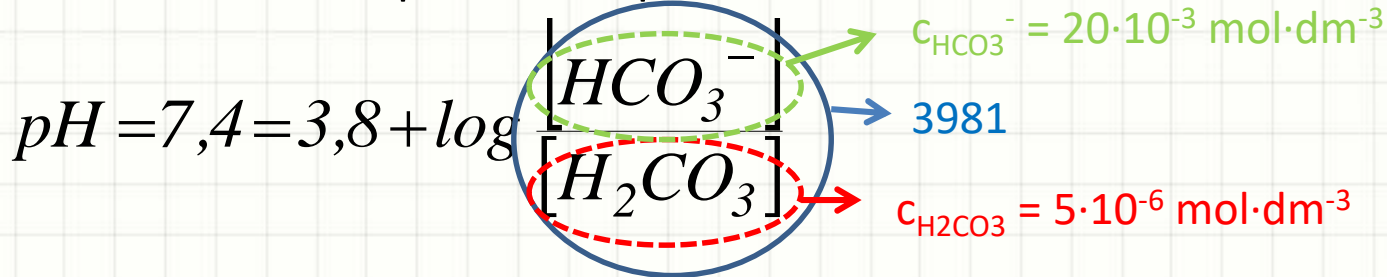
# pH tělních tekutin

- Nekontrolované hromadění metabolických produktů organismu → pokles pH extracelulární tekutiny → narušení až znemožnění životních dějů
- „Fyziologické pH“ (pH 7,4) – pH krevní plazmy
- **Pufrovací (nárazníkové) systémy** – umožňují čelit výchýlkám pH mimo referenční interval (**7,36 – 7,44**)
- **Acidémie** – pokles pod dolní mez
- **Alkalémie** – vzestup nad horní hranici referenčního rozmezí



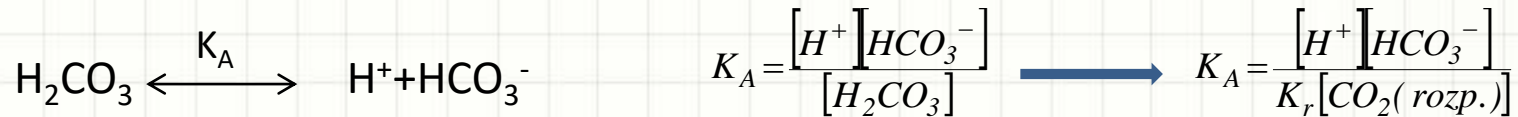
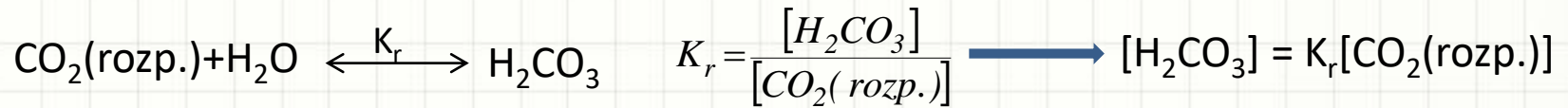
# Krevní pufrý

- **A) Fosfátový** ( $\text{HPO}_4^{2-}/\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ) – podílí se na udržování intracelulární hodnoty pH; fosfáty jsou hlavní pufrální systém moči, v krevní plazmě pouze 1% pufrální kapacity (v krvi dominuje hydrogenuhličitanový systém)
- **B) Hydrogenuhličitanový** ( $\text{HCO}_3^-/\text{H}_2\text{CO}_3$ ) – klíčový pro udržování pH krevní plazmy
- $\text{H}_2\text{CO}_3 \leftrightarrow \text{H}^+ + \text{HCO}_3^-$  ( $\text{pK}_1 = 3,8$  při  $37^\circ\text{C}$ ), daleko od fyziologického pH – nedostatečná pufrální kapacita



- Otevřený pufrální systém – prostřednictvím  $\text{CO}_2$  komunikuje s okolím

# Krevní pufrý



$$K_A K_r = \frac{[\text{H}^+][\text{HCO}_3^-]}{[\text{CO}_2(\text{rozp.})]} = K_{\text{celk}}$$

$$\text{p}K_{\text{celk}} = 6,31$$

Plynný  $\text{CO}_2$  doplňuje ztráty  $\text{H}_2\text{CO}_3$  v důsledku její disociace, a tím udržuje pH krve



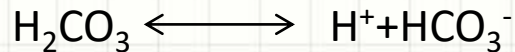
Koncentrace  $\text{HCO}_3^-$  v krevní plazmě =  $20 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  a pH 7,4

# Krevní pufrý

## C) Bílkovinné pufrující systémy

### Hemoglobin

Bohrův efekt – v plicích uvolňuje HbO<sub>2</sub> ionty H<sup>+</sup>, a tím porušuje rovnováhu mezi rozpuštěným HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> a CO<sub>2</sub> ve prospěch vzniku CO<sub>2</sub>, jenž je vydechován; v tkáních se naopak hemoglobin stává po uvolnění kyslíku akceptorem protonů a pufruje kyselinu uhličitou vznikající metabolickými procesy



# Hodnoty pH některých tělních tekutin dospělého člověka

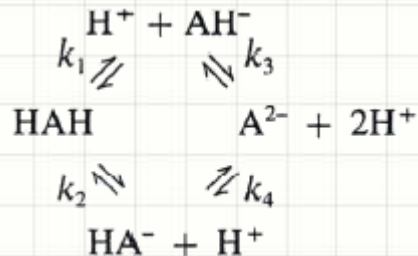
Tělní tekutina	pH	Tělní tekutina	pH
Krevní plasma	7,34-7,43	Střevní šťáva	6,1-7,3
Lymfa	7,2-7,6	Slzy	7,35
Moč	4,8-7,5	Pot	3,8-6,8
Sliny	5,8-7,1	Sperma	6,9-7,4
Žaludeční šťáva	$\approx 2,0$	Mateřské mléko	6,6-7,0
Duodenální šťáva	7,5-8,8	Cytoplasma jaterních buněk	6,4-6,5
Žluč	6,2-8,5	Cytoplasma centrálního nervstva	6,7-6,9

# Polyelektrolyty

- Polymery složené z makromolekul, ve kterých značná část konstitučních jednotek obsahuje iontové nebo ionizovatelné skupiny, nebo oboje
- Ionizovatelné skupiny polyelektrolytů v polárních rozpouštědlech mohou disociovat
- Polymery nesoucí kladně nebo záporně nabitě skupiny jsou označovány jako polyionty a v roztoku se neutralizují protiionty (malé ionty opačného náboje vzniklé disociací polyelektrolytu) <sup>1, 2</sup>
- Polyanionty
- Polykationty
- Polyamfolyty (postranní řetězce jsou nabitě oběma typy náboje)
  
- **1. Hess, M., Jones, R. G., Kahovec, J., Kitayama, T., Kratochvíl, P., Kubisa, P., Mormann, W., Stepto, R. F. T., Tabak, D., Vohlídal, J., Wilks, E. S. (2006).** Terminology of polymers containing ionizable or ionic groups and of polymers containing ions (IUPAC Recommendations 2006). *Pure and Applied Chemistry*, 78(11), 2067-2074.
- **2. Manning, G. S. (1979).** Counterion binding in polyelectrolyte theory. *Accounts of Chemical Research*, 12(12), 443-449.

# Disociace polyelektrolytů

- Stejně jako elektrolyty i polyelektrolyty lze dělit na silné a slabé
- Disociace vícesytných elektrolytů je složitější děj
- **Disociace dvojsytného elektrolytu:**
- Máme-li obecnou dvojsytnou kyselinu HAH, jejíž obě disociovatelné skupiny jsou stejné, tak na každé z nich může dojít k disociaci se stejnou pravděpodobností



- ✓ Disociace je popsána 4 disociačními konstantami, vztahujícími se k disociaci vždy jedné přesně určené funkční skupiny – tzv. **mikroskopické disociační konstanty** ( $k_1 k_3 = k_2 k_4$ )

$$k_1 k_3 = \frac{[\text{H}^+][\text{AH}^-]}{[\text{HAH}]} \frac{[\text{H}^+][\text{A}^{2-}]}{[\text{AH}^-]}$$

- ✓ Pro **makroskopické disociační konstanty**  $K_i$  platí

$$K_1 = \frac{[\text{H}^+]\{[\text{HA}^-] + [\text{AH}^-]\}}{[\text{HAH}]} \quad K_2 = \frac{[\text{H}^+][\text{A}^{2-}]}{\{[\text{HA}^-] + [\text{AH}^-]\}}$$

# Disociace polyelektrolytů

- ✓ Makroskopické konstanty souvisejí s mikroskopickými:

$$K_1 = k_1 + k_2$$

$$\frac{1}{K_2} = \frac{1}{k_3} + \frac{1}{k_4}$$

$$K_1 K_2 = k_1 k_3 = k_2 k_4$$

- ✓ Disociace slabého dvojsytného elektrolytu vyjádřená pomocí mikroskopických disociačních konstant:

- ❖ Analytická koncentrace  $c$  tohoto elektrolytu:  $c = [HAH] + [HA^-] + [AH^-] + [A^{2-}]$

- ❖ Podmínka elektroneutrality:  $[M^+] + [H^+] = [AH^-] + [HA^-] + 2[A^{2-}] + [OH^-]$

↓  
 Koncentrace kationtů hydroxidu,  
 který se přidává v průběhu titrace

Dosadíme do obou předchozích rovnic a získáme

$$[M^+] + [H^+] = [HAH] \left[ \frac{k_1 + k_2}{[H^+]} + \frac{2k_1 k_3}{[H^+]^2} \right] + [OH^-] \quad c = [HAH] \left[ 1 + \frac{k_1 + k_2}{[H^+]} + \frac{k_1 k_3}{[H^+]^2} \right]$$

# Disociace polyelektrolytů

Tyto rovnice navzájem vydělíme, a protože se jedná o disociaci slabého dvojsytného elektrolytu, zanedbáme koncentrace  $[H^+]$  a  $[OH^-]$  proti  $[M^+]$  a získáme:

$$\frac{[M^+]}{c} \stackrel{h}{=} \frac{\frac{k_1 + k_2}{[H^+]} + \frac{2k_1k_3}{[H^+]^2}}{1 + \frac{k_1 + k_2}{[H^+]} + \frac{k_1k_3}{[H^+]^2}}$$

Přesné matematické vyjádření disociace dvojsytného elektrolytu

Střední počet protonů v kterémkoliv okamžiku titrace

$h$  je počet protonů, které musejí oddisociovat z výchozí formy, aby vznikly určité disociované formy daného elektrolytu: pro formy  $AH^-$  a  $HA^-$  je tedy  $h = 1$ , pro formu  $A^{2-}$  je  $h = 2$

V případě dvojsytného elektrolytu bylo možné najít číselné hodnoty mikroskopických disociačních konstant, u polyelektrolytů to **NENÍ MOŽNÉ**

- Disociace  $n$ -sytného polyelektrolytu

$${}^n A = \frac{n!}{(n-h)!h!}$$

Pro zkoumaný polyelektrolyt s  $n$  disociovatelnými skupinami se všechny mikroskopické konstanty  ${}^1k$  disociace do prvního stupně nahradí jednou makroskopickou:

$$K_1 = \sum_{i=1}^n {}^1k_i$$



# Disociace polyelektrolytů

Další disociační krok lze vyjádřit konstantou  $K_2$

$$K_2 = \frac{[H^+](\sum [{}^2A])}{(\sum [{}^1A])}$$

Nakonec, s použitím disociačních konstant  $K_n$ , bychom opět mohli vyjádřit veličinu,  $\bar{h}$ , tedy popsat titrační křivku  $n$ -sytného polyelektrolytu

$$\begin{aligned}\bar{h} &= \frac{\sum [{}^1A] + 2\sum [{}^2A] + \dots + n\sum [{}^nA]}{[{}^0A] + \sum [{}^1A] + \sum [{}^2A] + \dots + \sum [{}^{n-1}A] + [{}^nA]} = \\ &= \frac{\frac{K_1}{[H^+]} + \frac{2K_1K_2}{[H^+]^2} + \frac{3K_1K_2K_3}{[H^+]^3} + \dots + \frac{nK_1K_2 \dots K_n}{[H^+]^n}}{1 + \frac{K_1}{[H^+]} + \frac{K_1K_2}{[H^+]^2} + \dots + \frac{K_1K_2 \dots K_n}{[H^+]^n}}.\end{aligned}$$

- ✓ Předchozí úvahy ukázaly, že exaktní analýzu titračních křivek polyelektrolytů lze provést jen u sloučenin s malým počtem disociovatelných funkčních skupin
- ✓ Tento postup není možný pro převážnou většinu běžných polyelektrolytů, syntetických i přírodních (NK a proteiny)

# Jak bude probíhat disociace bílkovin?

- ✓ V molekule bílkoviny je velký počet disociovatelných skupin, které se mohou navíc lišit svými hodnotami  $pK_a$ , neboť jde o skupiny lokalizované v různých oblastech bílkovinné globule
- ✓ První aproximací, používanou při analýze disociace bílkovin, bývá pokus uvažovat každý typ disociovatelných skupin zvlášť (nejdříve karboxylové, potom imidazolové...)
- ✓ Zvolme jeden typ  $i$  disociovatelné skupiny, přičemž nechť je celkový počet skupin tohoto typu v molekule bílkoviny  $n_i$
- ✓ AMK jsou slabé kyseliny a tudíž i bílkoviny budou slabé kyseliny a budeme-li předpokládat o všech  $n_i$  skupinách daného typu, že jsou ekvivalentní z hlediska disociačních vlastností, potom lze H.-H. rovnici pro slabý pufr vyjádřit ve tvaru:

$$pH = pK_i + \log \frac{h_i}{n_i - h_i}$$

# Vlastnosti polyelektrolytů

- ✓ Coulombovy elektrostatické interakce mezi náboji v roztocích polyelektrolytů

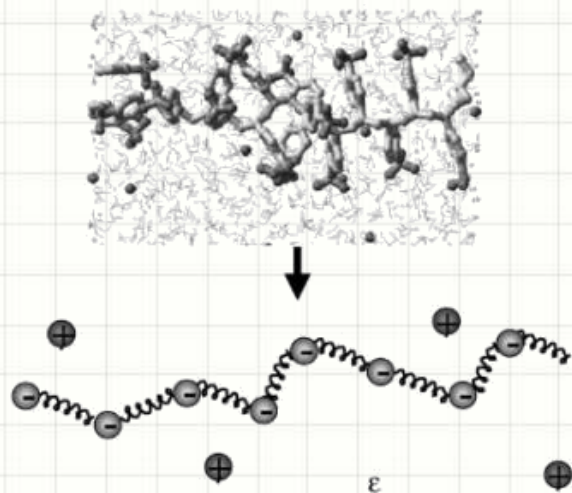
$$F = \frac{1}{4\pi\epsilon_0\epsilon_r} \frac{Q_1Q_2}{r^2}$$

F je síla,  $\epsilon_0$  je permitivita vakua,  $\epsilon_r$  je reálná permitivita,  $Q_1$  a  $Q_2$  jsou náboje,  $r$  je vzdálenost mezi náboji

- ✓ Roztoky polyelektrolytů se liší v hodnotách osmotického tlaku a závislosti na viskozity na koncentraci (od roztoků nenabitých polymerů)
- ✓ Vlastnosti polyelektrolytů v roztocích nebo na nabitých površích závisí na<sup>3</sup>:
  - množství disociovaných iontových skupin,
  - kvalitě rozpouštědla,
  - dielektrické permitivitě rozpouštědla – vysoká hodnota pro polární rozpouštědla a nízká hodnota pro nepolární rozpouštědla → v polárních rozpouštědlech na sebe budou bodové náboje působit mnohem menší elektrickou silou
  - koncentraci soli a interakcích mezi polymerem a solí

# Teorie polyelektrolytů

- Polyelektrolyt v roztoku lze popsat modelem tvořeným řetězcem nabitých korálek spojených pružinkami, který je obklopen protionty



- ✓ Korálky v řetězci představují skupiny monomerních podjednotek
- ✓ Molekuly rozpouštědla jsou prezentovány jako kontinuum s dielektrickou permitivitou  $\epsilon$
- ✓ Protionty tlumí elektrostatické interakce mezi ionizovanými skupinami na polymerním řetězci

Pro potenciální energii polyelektrolytů se stupněm polymerizace  $N$ , s frakcí nabitých skupin na polymerním řetězci  $f$  v médiu s dielektrickou permitivitou  $\epsilon$  platí:

$$\frac{U(\{r_i\})}{k_B T} = \frac{3}{2b^2} \sum_{i=1}^{N-1} (r_{i+1} - r_i)^2 + \sum_{i=1}^N \sum_{i < j} \frac{l_B q_i q_j}{|r_i - r_j|} \exp(-\kappa |r_i - r_j|) + \frac{U_{sh}(|r_i - r_j|)}{k_B T}$$

# Teorie polyelektrolytů

$$\frac{U(\{r_i\})}{k_B T} = \frac{3}{2b^2} \sum_{i=1}^{N-1} (r_{i+1} - r_i)^2 + \sum_{i=1}^N \sum_{i < j} \frac{l_B q_i q_j}{|r_i - r_j|} \exp(-\kappa |r_i - r_j|) + \frac{U_{sh}(|r_i - r_j|)}{k_B T}$$

Entropická elasticita harmonických vazeb o délce  $b$

Příspěvek stínění coulombické interakce mezi nabitými monomerními jednotkami,  $l_B$  je Bjerrumova délka

Interakce krátkého dosahu mezi monomerními jednotkami, popsány Lennard-Jonesovým potenciálem

$$l_B = \frac{e^2}{\epsilon k_B T}$$

**Bjerrumova délka**

Vzdálenost, na kterou je elektrostatická interakční energie dvou elementárních nábojů stejná jako tepelná energie  $k_B T$

- ✓ Elektrostatické interakce jsou vyjádřeny skrz koncentrační závislost ze vztahu pro Debyeovu stínící délku  $r_D = \kappa^{-1}$

$$r_D^{-2} = \kappa^2 = 4\pi l_B \sum_s c_s q_s^2 \quad c_s \text{ je koncentrace malých iontů } s, q_s \text{ je jejich valence}$$

- ✓ Elektrostatické interakce jsou stíněny ve větším rozsahu než je Debyeova stínící délka  $r_D$ ; ve zředěných roztocích spolu ionizované skupiny interagují přes nestíněný Coulombův potenciál

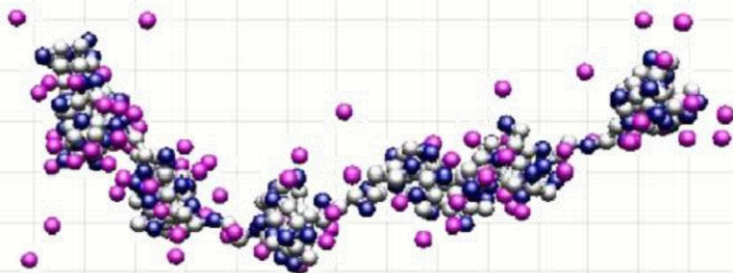
$$U_{LJ}(r) = 4\epsilon_{LJ} \left[ \left( \frac{\sigma}{r} \right)^{12} - \left( \frac{\sigma}{r} \right)^6 \right]$$

**Lennard-Jonesův potenciál**

$\epsilon_{LJ}$  interakční parametr,  $\sigma$  průměr monomerní jednotky

# Jev kondenzace

- Při vytvoření rovnováhy mezi elektrostatickým přitahováním protiiontů k polymernímu řetězci a ztrátou konformační entropie, díky lokalizaci protiiontů v blízkosti polymerního řetězce (viz obrázek)
- Ve velmi zředěném roztoku polyelektrolytu je velmi vysoký pokles entropie a většina protiiontů opustí okolí řetězce a zůstane volně v roztoku; se zvýšením koncentrace polymeru se pokles entropie snižuje, což vede ke zvýšení počtu kondenzovaných protiiontů



Náhrdelníková konformace řetězce polyelektrolytu

Negativně nabitě skupiny monomerních podjednotek polymerního řetězce (modře); monomerní jednotky bez náboje (šedá) a kladně nabitě protiionty (růžová)

# Teoretické modely kondenzace protiiontů

- **Model „dvou-stavové protiiontové kondenzace“ (Manning, Oosawa)**- rovnováha mezi elektrostatickým přitahováním protiiontů k hlavnímu řetězci polyelektrolytu a ztrátou konfigurační entropie vlivem umístění protiiontů do blízkosti polymerního řetězce; protiionty jsou zde děleny na **volné** (rozprostřeny v celém objemu roztoku; **stav 1**) a **kondenzované** (nacházejí se pouze v malém objemu u řetězce polymeru; **stav 2**)

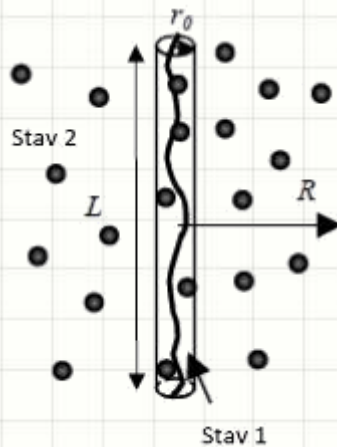


Schéma řetězce polyelektrolytu pro dvou-stavový model;  
R - velikost buňky, L-délka řetězce

# Teoretické modely kondenzace protiiontů

- **„Buňkový model“ (Katchalsky a spol.)** – odděluje protiiontové a polymerní stupně volnosti a poskytuje rovnovážný hustotní profil protiiontů pro stálou konformaci polymeru; hustotní profil lze získat metodou středního pole vyřešením nelineární Poisson-Boltzmannovy rovnice pro distribuci elektrostatického potenciálu kolem polymeru; přesné řešení této rovnice existuje pouze pro tyčinkové polyelektrolyty
- **„Model dvou zón“ (Deshkovski a spol.)** – objem, který zaujímá nabitá tyčinka polyelektrolytu je rozdělen na dva typy oblastí. Vnitřní oblasti- válcové zóny kolem nabitě tyče (průměr v řádu délky tyčinky  $L$ ); vnější oblasti – kulové zóny vně válcových oblastí (rozprostírají se až do vzdálenosti mezi řetězci  $R$ ); přesné řešení nelineární Poisson-Boltzmannovy rovnice pro elektrostatický potenciál ve válcových oblastech kolem polyiontů

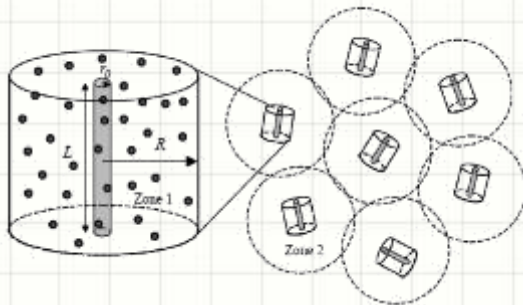


Schéma zředěného roztoku tyčinkovitého polyelektrolytu pro dvou-zónový model;  $R$  - velikost buňky,  $L$ -délka tyčinkovitého polyiontu





# **Metody studia proteolytických rovnovah v roztoku**

# Potenciometrie

- Elektrochemická metoda – měří se rovnovážné napětí  $E$  galvanického článku
- Skleněná elektroda – měrná elektroda
- Argentchloridová a kalomelová elektroda – referenční elektrody

- Nernstova rovnice: 
$$E_{red / ox} = E^0 - \frac{RT}{nF} \ln \frac{a_{red}}{a_{ox}}$$

# Přímá potenciometrie

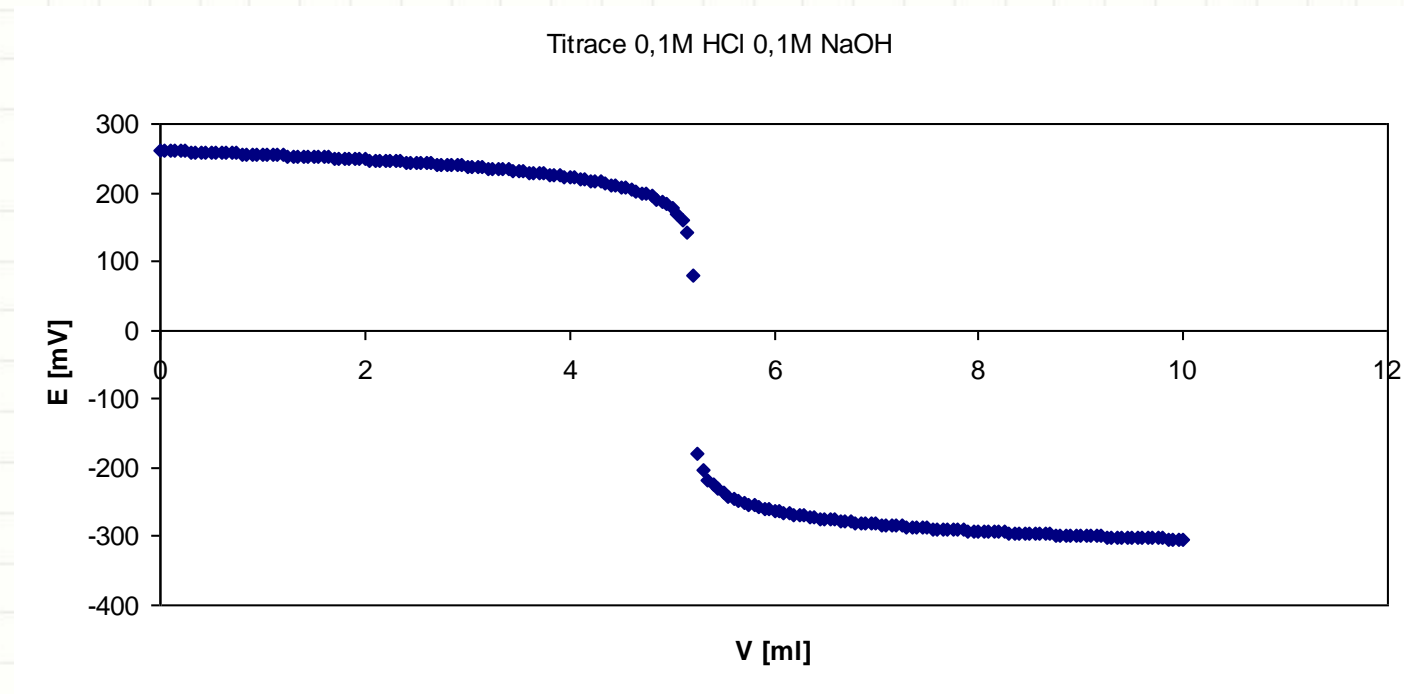
- Využívá se ke stanovení obsahu sloučenin, kde máme k dispozici příslušné indikační elektrody
- Srovnání napětí měrného článku ve vzorku s napětím téhož článku, ponořeného do standardního roztoku analytu

# Potenciometrická titrace

- Nepřímá potenciometrie
- Sledování závislosti napětí článku na objemu přidávaného titračního činidla
  - **Acidobazické titrace** – skleněná elektroda
  - **Srážecí titrace** – stříbrná elektroda, ISE
  - **Komplexometrické titrace** – ISE
  - **Redoxní titrace** – platinová redoxní elektroda
- Grafické vyjádření: titrační křivka esovitého tvaru
- **Určení bodu ekvivalence:**
  - a) druhá derivace titrační křivky
  - b) Granova transformace
  - c) Samsonkova metoda

# Potenciometrická titrace

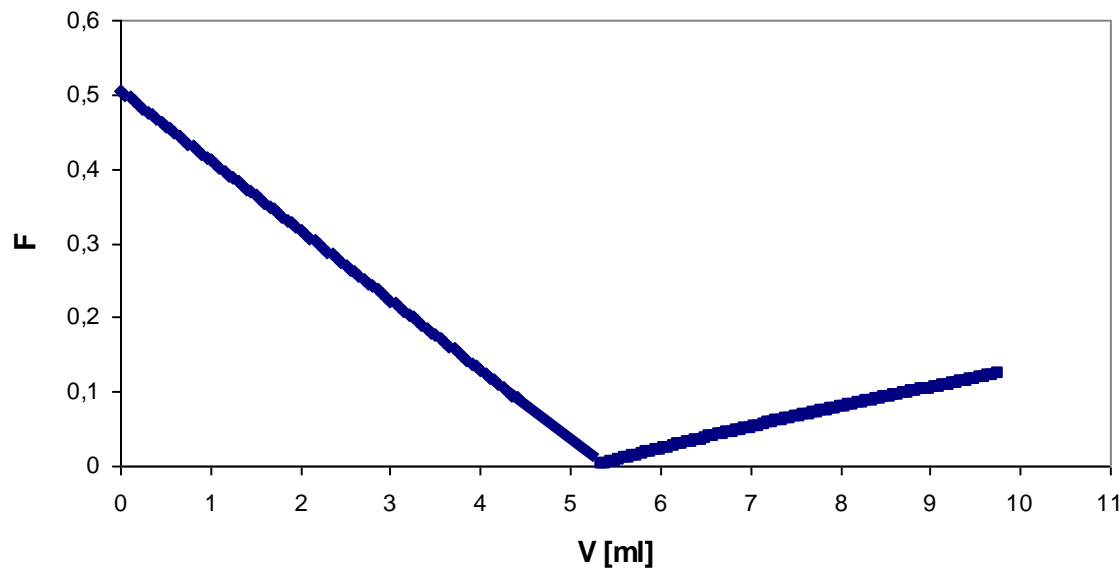
- Potenciometrická titrační křivka



# Granova transformace

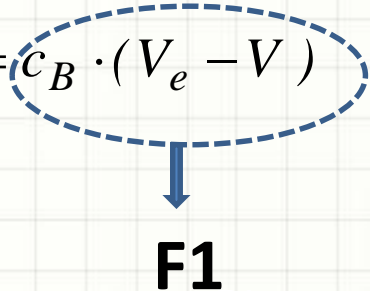
- Titrace silné kyseliny silnou bází
- Podmínka ekvivalence:  $V_e \cdot c_B = V_o \cdot c_o$

$$[H^+] = \frac{V_o \cdot c_o}{V_o + V} - \frac{V \cdot c_B}{V_o + V}$$



# Granova transformace

- Granova funkce před bodem ekvivalence

$$\left[ H^+ \right] = \frac{c_B \cdot (V_e - V)}{V_o + V} \quad 10^{-pH} \cdot (V_o + V) = c_B \cdot (V_e - V)$$


**F1**

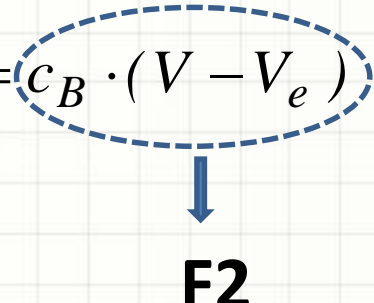
- Pro linearizaci části titrační křivky před bodem ekvivalence lze použít transformaci:

$$F_1 = (V_o + V) \cdot 10^{-pH}$$

# Granova transformace

- Granova funkce za bodem ekvivalence

$$\left[OH^{-}\right] = \frac{c_B \cdot (V - V_e)}{V_o + V} \quad 10^{(pH-14)} \cdot (V_o + V) = c_B \cdot (V - V_e)$$

  
**F2**

- Pro linearizaci části titrační křivky za bodem ekvivalence lze použít transformaci:

$$F_2 = (V_o + V) \cdot 10^{(pH-14)}$$



# Aplikace potenciometrické titrace

- Studium protonačních rovnováh NK a jeho složek (purinové a pyrimidinové báze) a derivátů purinů (cytokininy) ve vodných i směsných roztocích (% (v/v)CH<sub>3</sub>OH – H<sub>2</sub>O) a stanovení disociační konstanty pK<sub>a</sub> s využitím stupně ztitrování z

$$pK_{a_1} = -\log[H^+] - \log\left(\frac{z}{1-z}\right)$$

$$pK_{a_2} = -\log[H^+] - \log\left(\frac{1-z}{z}\right)$$

- Závislost disociační konstanty na teplotě umožňuje stanovit termodynamické parametry  $\Delta H$  a  $\Delta S$
- Lze stanovit i konstanty stability komplexů  $\beta$  uvedených ligandů s biogenními dvojmocnými kovy Cu<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>

$$\beta = \frac{K' - K}{K \cdot [M]}$$

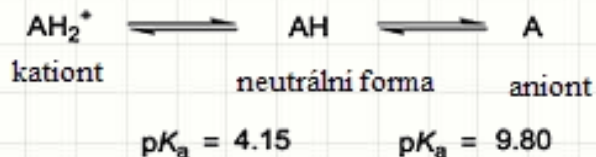
K' - zdánlivá protonační konstanta (ligand + kov)

K – protonační konstanta ligandu

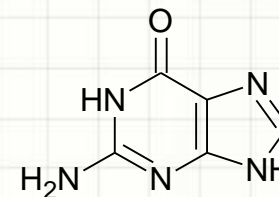
[M] – koncentrace kovu

# Aplikace potenciometrické titrace

- **Purinové báze:** adenin a guanin

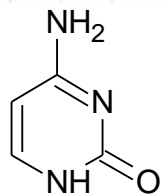


adenin

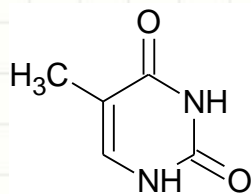


guanin

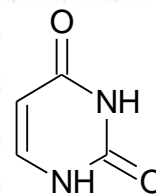
- **Pyrimidinové báze:** cytosin, thymin, uracil



cytosin



thymin

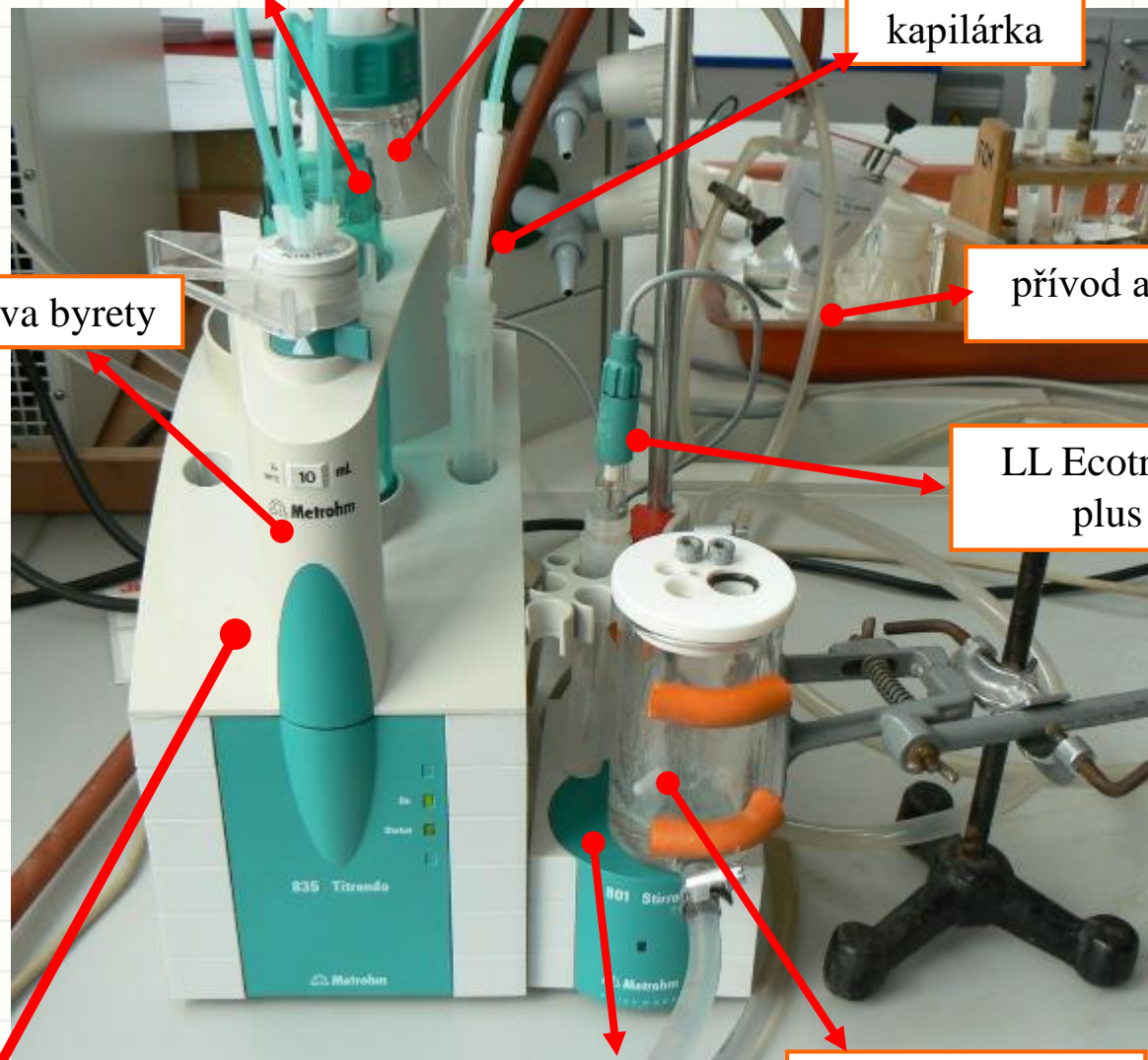


uracil

# Potenciometrická titrace - instrumentace

- **Automatický titrátor Titrand 835, Metrohm**
- Různé objemy byret (1 - 20 ml)
- Možnost titrace ve vodných i vodně-alkoholických prostředích
- **Software Tiamo 1.2**
- Možnost vytvoření vlastní titrační metody (MET U – monotonic endpoint titrations)
- Možnost nastavení vlastního titračního módu vybrané metody (OPTIMAL)
- Volitelný přídavek titračního činidla
- **LL Ecotrode plus**
- Inertní argonová atmosféra; temperace





byreta

nádobka s odměrným  
roztokem

kapilárka

hlava byrety

přívod argonu

LL Ecotrode  
plus

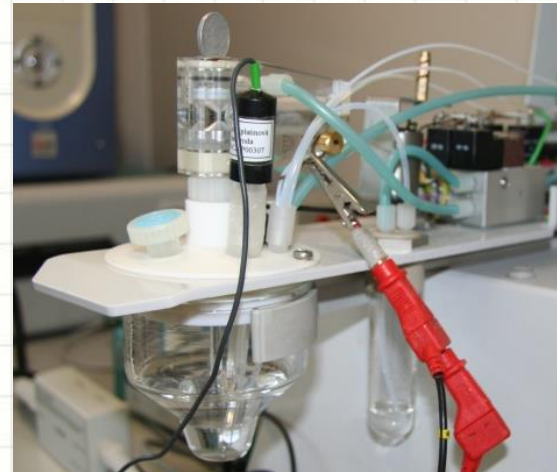
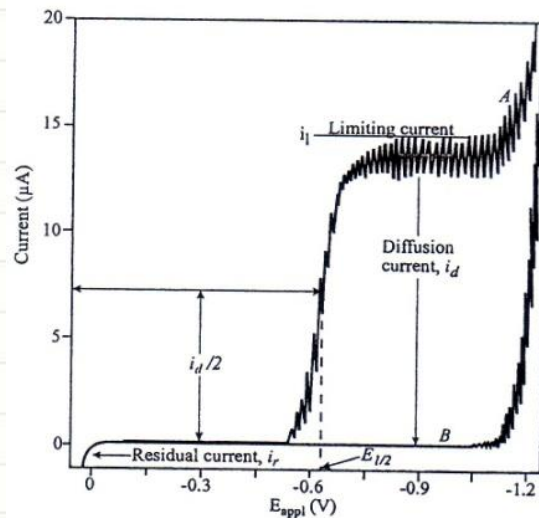
**Automatický titrátor**

magnetická  
míchačka

temperovaná  
nádobka

# Polarografie

- **1922 – Jaroslav Heyrovský**
- Elektrolýza elektroaktivní látky v roztoku základního elektrolytu
- Potenciál se vkládá mezi pracovní (Hg) a referenční elektrodu (Ag/AgCl/3M KCl)
- Polarografická vlna
- Polarizace elektrody



# Polarografické (voltametrické) proudy

## Nabíjecí proud ( $I_c$ )

- Důležitý při nabíjení elektrodové dvojvrstvy
- Nefaradayický charakter

## Migrační proud

- Spojený s transportem elektroaktivní látky k povrchu elektrody
- Eliminován přidávkem nadbytku základního elektrolytu

## Difúzní proud ( $I_d$ )

- Pro reakce, kde je rychlost určujícím krokem (rate determining step; rds) difúze

$$I_d = zF \frac{dn}{dt} = zFAD \frac{\partial c}{\partial x}$$

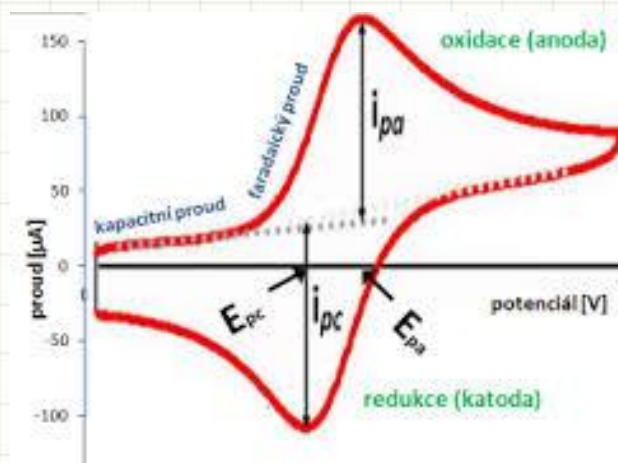
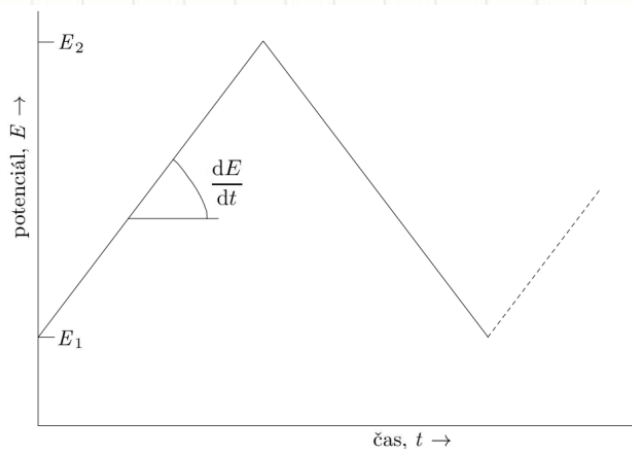
- 1934 – Dionýz Ilkovič

$$\overline{I_D} = k z F D^{1/2} m^{2/3} \tau^{1/6} c$$

**Ilkovičova rovnice**

# Cyklická voltametrie a voltametrie s lineárně se měnícím potenciálem

- Elektrolýza elektroaktivní látky v nadbytku základního elektrolytu
- Tří-elektrodové zapojení
- $dE/dt$  (rychlost polarizace)



- Voltametrické signály mají tvar píku
- Studium redoxních reakcí – mechanismus elektrodové reakce a reversibilita

# Cyklická voltametrie

## • Reversibilní procesy: Randles – Ševčíkova rovnice

$$I_p = 2,69 \cdot 10^5 n^{3/2} A D^{1/2} c_{ox}^0 v^{1/2}$$

kde  $I_p$  je proud píku (A);  $n$  počet elektronů;  $A$  efektivní plocha elektrody ( $\text{cm}^2$ );  $D$  je difúzní koeficient ( $\text{cm}^2/\text{s}$ );  $c_{ox}$  koncentrace elektroaktivní látky ( $\text{mol}/\text{cm}^3$ ) a  $v$  je rychlost polarizace ( $\text{V}/\text{s}$ ).

## • Ireversibilní procesy: Delahayova rovnice

$$I_p = 2,99 \cdot 10^5 \cdot n \cdot (\alpha n_a)^{1/2} \cdot A \cdot D^{1/2} \cdot c_{ox}^0 \cdot v^{1/2}$$

kde  $\alpha$  je koeficient přenosu náboje;  $n_a$  je počet přenesených elektronů v rychlost určujícím kroku (rds)



# Eliminační voltametrická procedura (EVP)

- **Eliminační voltametrická procedura (EVP)** – rozvíjela se současně s eliminační polarografií (EP), však ve srovnání s EP je EVP snadnější, rychlejší a lze ji aplikovat i na pevné elektrody
- **EVP** – matematická procedura eliminující/zachovávající některý z dílčích voltametrických proudů (difúzní, nabíjecí, kinetický) z naměřených LSV nebo CV křivek
- **Eliminační funkce** jako lineární kombinace celkových proudů měřených při různých rychlostech polarizace

# Dvě základní podmínky EVP

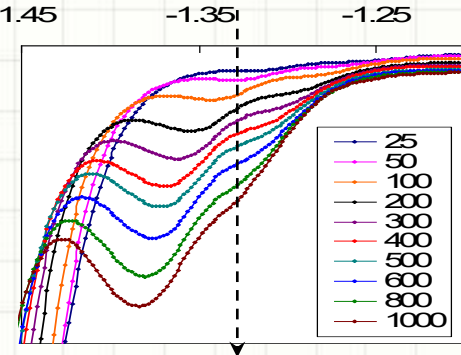
## 1. podmínka

$$I = \sum_{j=1}^k I_j$$

$$I = I_d + I_k + I_c + \dots$$

## 2. podmínka

$$I_j = Y_j(E) W_j(v)$$



$I_d$  ... difúzní proud  $I_d = Y_d(E) v^{1/2}$

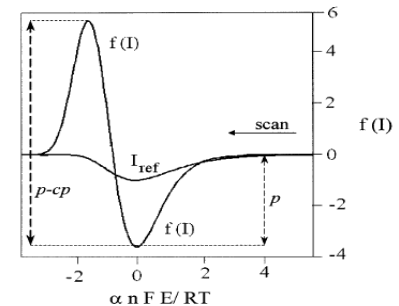
$I_k$  ... kinetický proud  $I_k = Y_k(E) v^0$

$I_c$  ... nabíjecí proud  $I_c = Y_c(E) v^1$

$$I = Y(E) v^x = \text{const. } v^x$$

$$I_{v/v_{ref}} = \left( \frac{v}{v_{ref}} \right)^0 I_k + \left( \frac{v}{v_{ref}} \right)^1 I_c + \left( \frac{v}{v_{ref}} \right)^{1/2} I_d$$

$$f(I) = a I_{v_{1/2 ref}} + b I_{v_{ref}} + c I_{2ref}$$



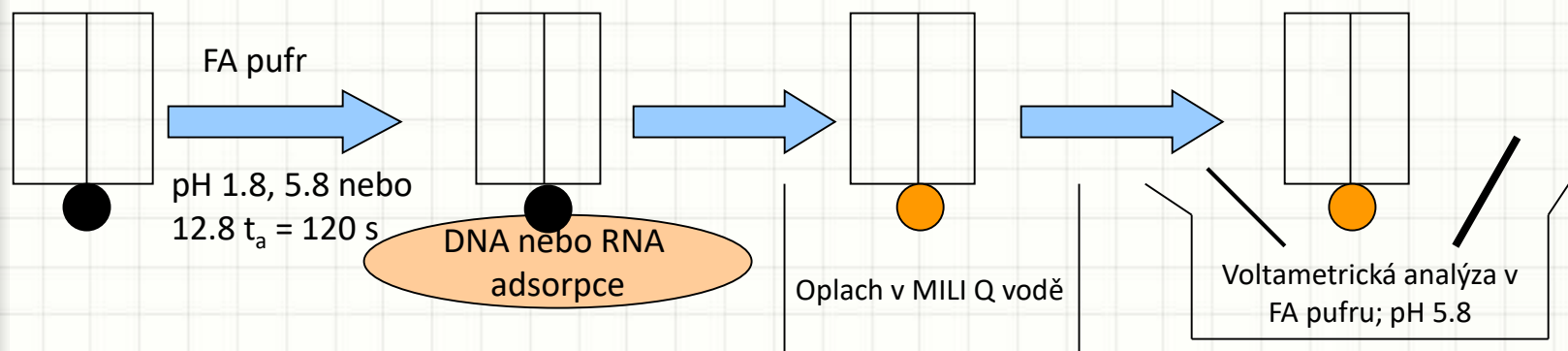
EVP E4

$$I_k + I_c = 0$$

$$I_d \neq 0$$

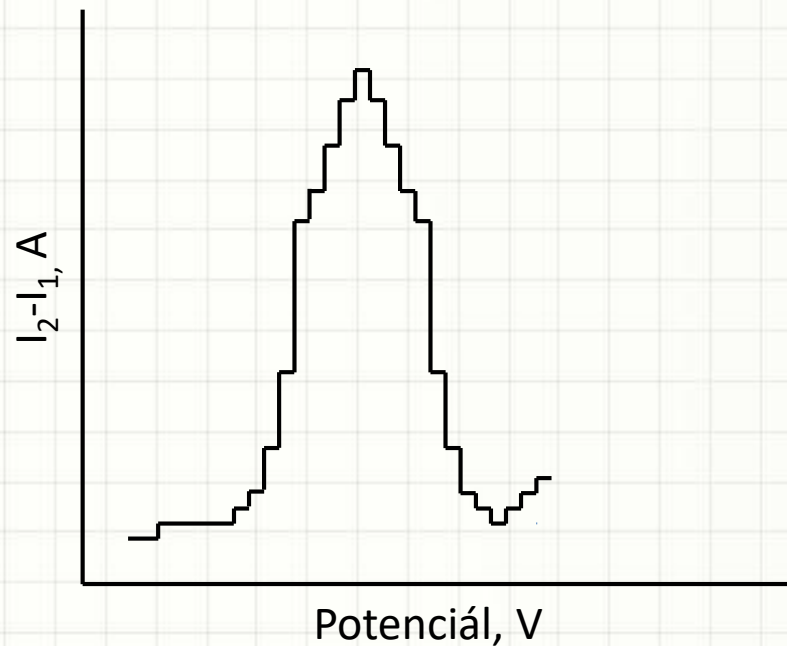
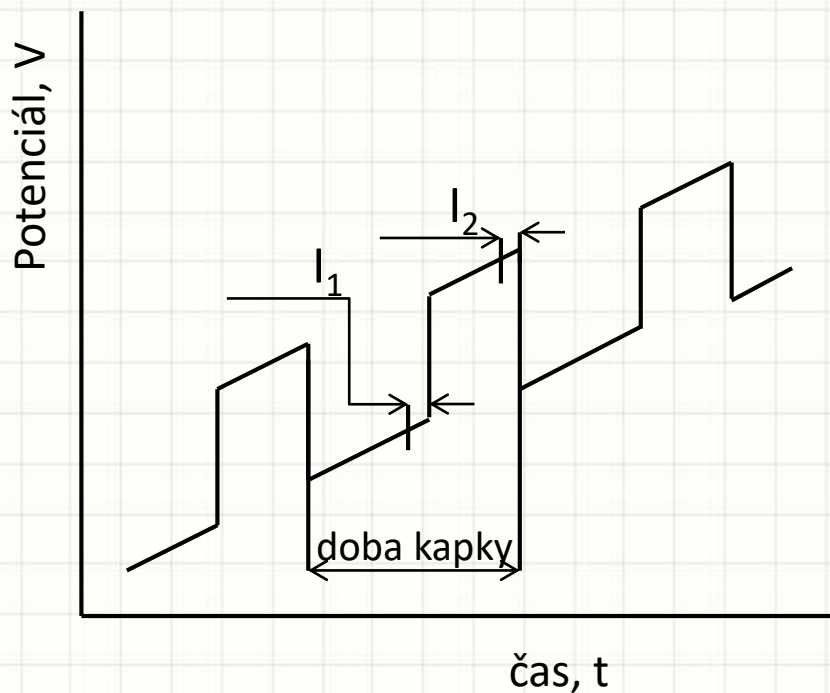
$$f(I) = -11,657 I_{1/2} + 17,485 I - 5,8284 I_2$$

# Adsorptivní přenosová rozpouštěcí voltametrie (AdTSV)



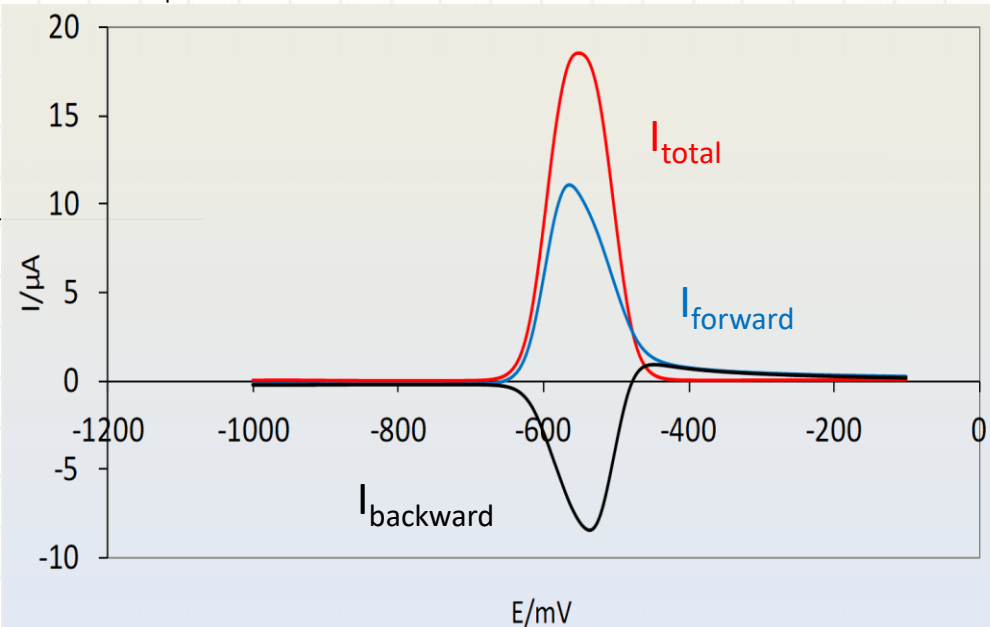
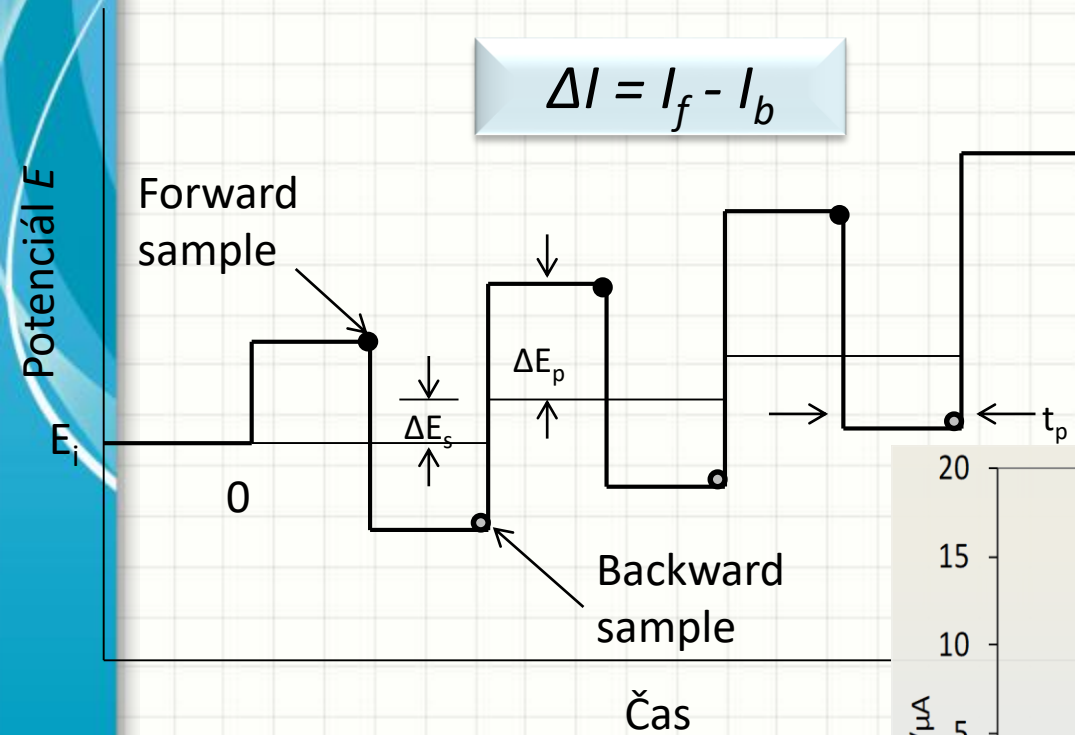
# Diferenční pulsní voltametrie

$$\Delta I = I_2 - I_1$$



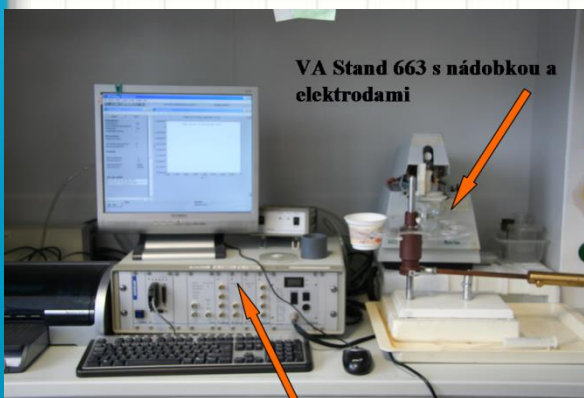
# Square-wave voltammetry

## • Ramaley a Krause



# Přístrojové vybavení

- **Elektrochemické analyzátoři:**
  - AUTOLAB PGSTAT 20 (Eco Chemie, Utrecht, The Netherland)
  - $\mu$ AUTOLAB TYPE III (Metrohm, Switzerland)
- **GPES Manager 4.9**
- **Visící rtuťová kapková elektroda (HMDE)**
- **Polymerní pentelková grafitová elektroda (pPeGE)**

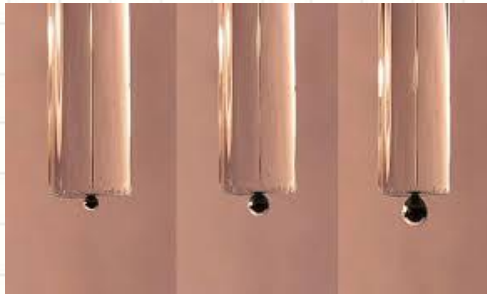


Autolab PGSTAT 20

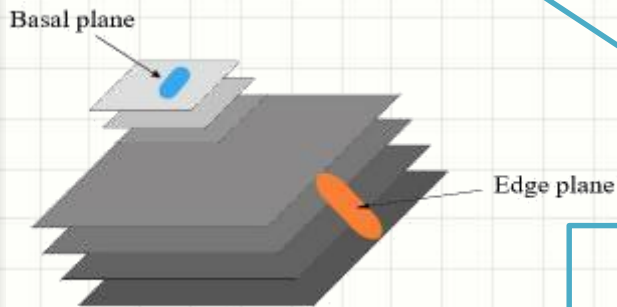


# Elektrody

- Visící rtuťová kapková elektroda (HMDE)



- Grafitové elektrody



Vnitřní struktura EPPG a BPPG elektrod

Polymerní pentelková grafitová elektroda

Elektrody z pyrolytického grafitu

„Basal plane“ pyrolytická grafitová elektroda

„Edge plane“ pyrolytická grafitová elektroda

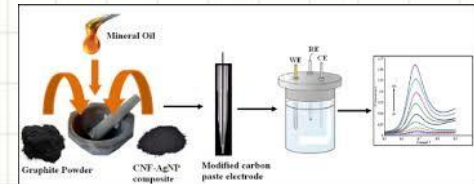


# • Grafitové elektrody

Elektrody ze skelného uhlíku



Uhlíkové pastové elektrody

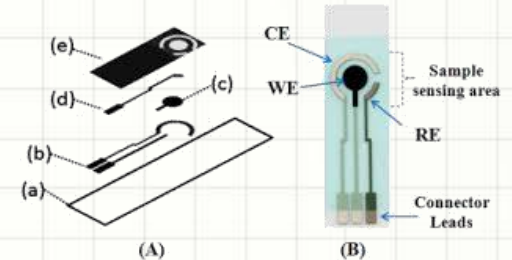
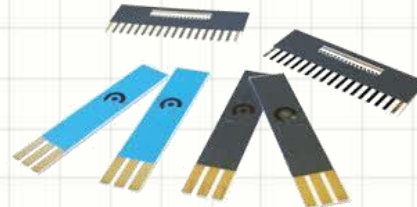


Elektrody z uhlíkových vláken



Borem dopované diamantové elektrody

# • Tištěné elektrody





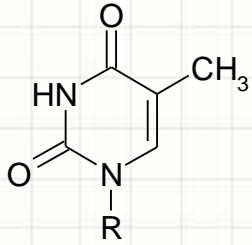


# Nukleové kyseliny

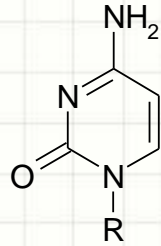
# Nukleové kyseliny a jejich složky

A

pyrimidine bases

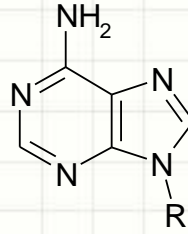


thymine (T)

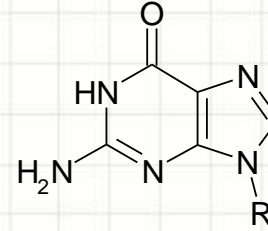


cytosine (C)

purine bases



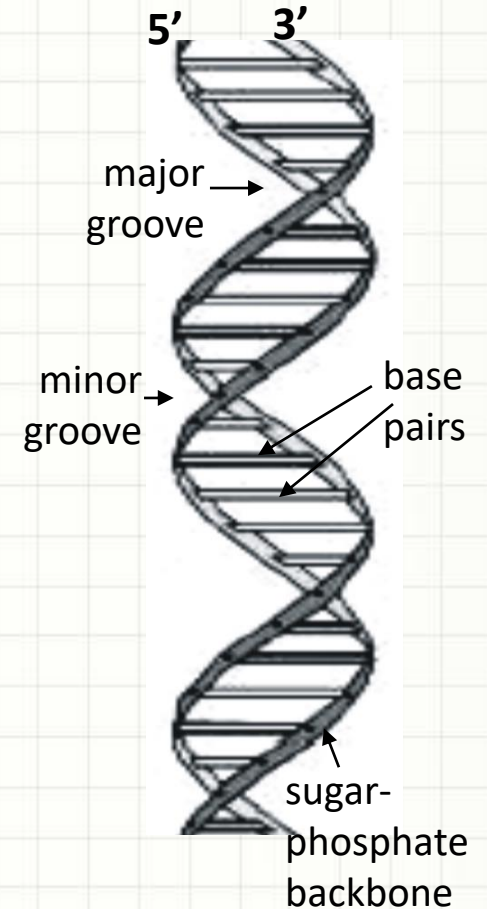
adenine (A)



guanine (G)

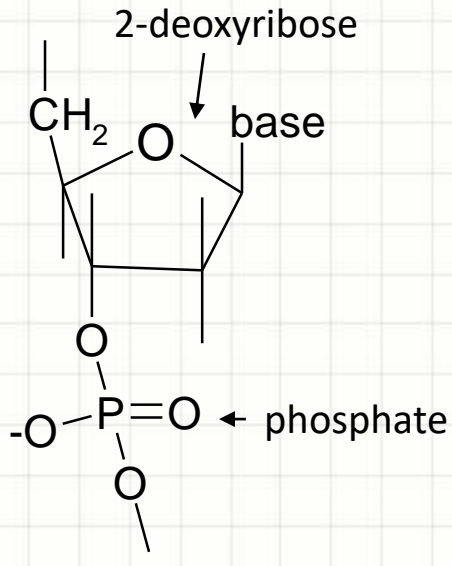
D

DNA double helix



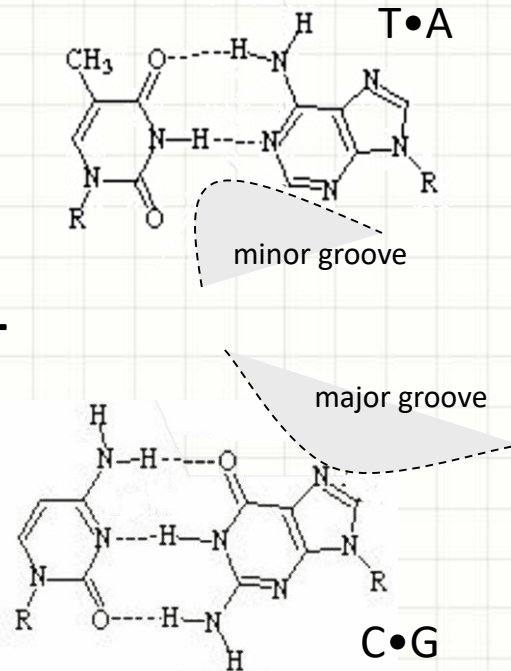
B

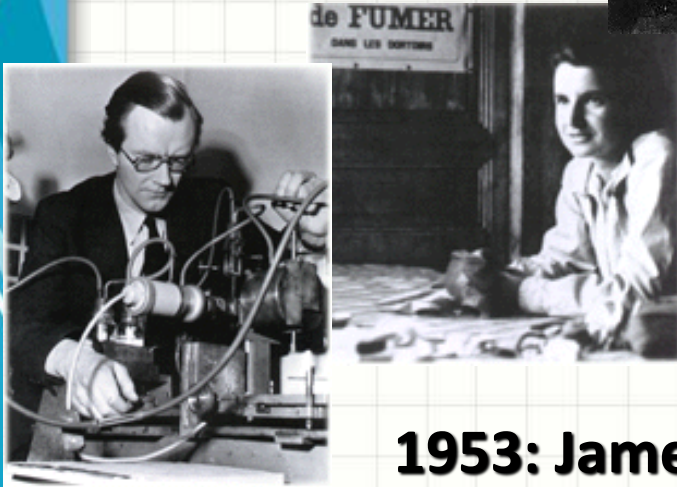
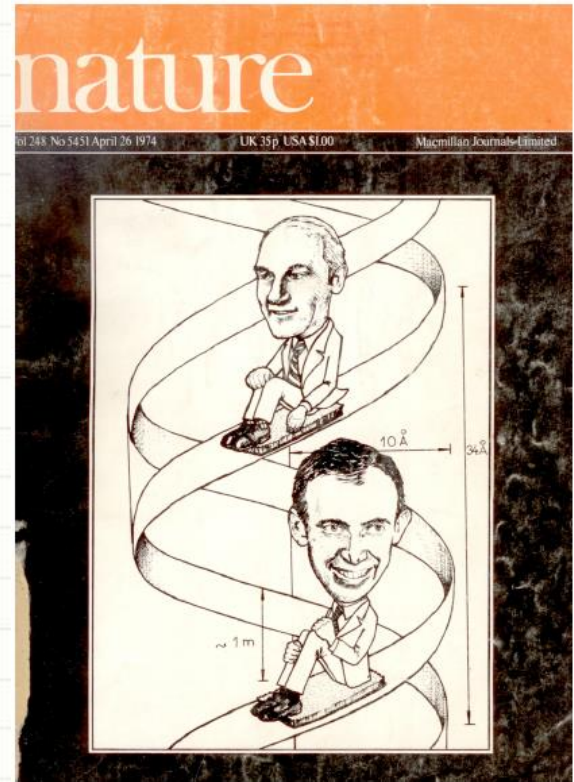
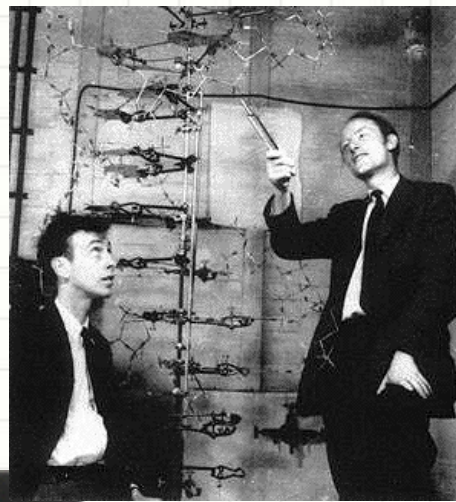
nucleotide



C

Base pairs



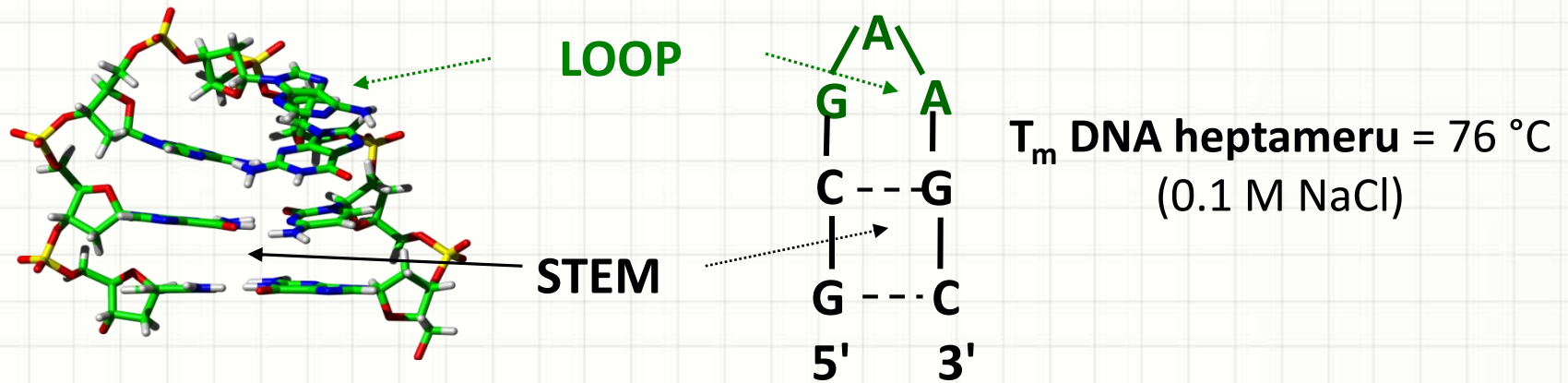


**1953: James Watson, Francis Crick, Rosalind Franklin, Maurice Wilkins: DNA double helix**

**1962: Nobel prize (JW, FC, MW)**

**Explanation of the basic principles of preservation, transmission and expression of genetic information**

# Vlásenky



Nejkratší a termodynamicky nejstabilnější vlásenka - DNA heptamer d(GCGAAGC) – replikční počátky fága  $\Phi$ X 174 and herpes simplex viru, promotorové oblasti *heat* – *shock* genů bakterie *E. coli* a rRNA genů

# Vlásenky

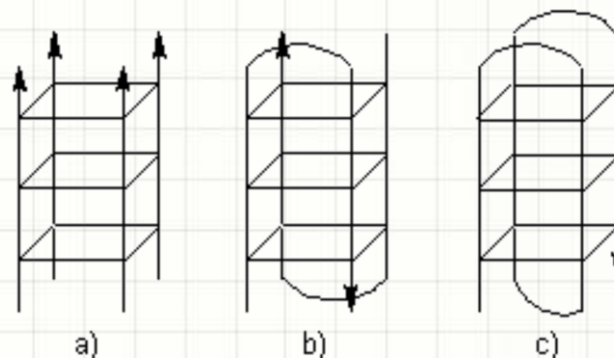
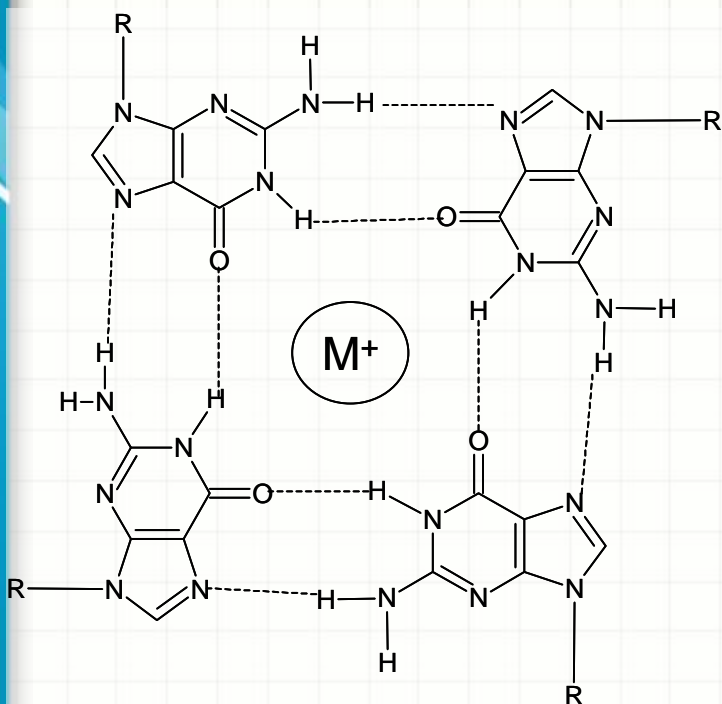
- Vlášeny jsou spojeny s rozvojem opakujících se tripletových sekvencí v DNA řetězci, které jsou spojeny s mnoha neurodegenerativními chorobami (syndrom fragilního chromozomu, Huntingtonova choroba, Friedreichova ataxie)

## Analýza vlásenek:

**d(GCGAAGC):** UV,  $T_m$  (Hirao 1989, Yoshizawa 1994, 1997), NMR (Hirao 1994, Yoshizawa 1997, Padrta 2002, Sychrovský 2002), Ramanova spektroskopie (Chraibi 2000), elektroforéza (Hirao 1989, Yoshizawa 1994, 1997), CD (Hirao 1989), rtg analýza (Sunami 2004), molekulová dynamika (Nakamura 1999, Padrta 2002), **elektrochemie (Trnková 2004)**

# G - kvadruplexy

- Stabilizovány G - kvartety (4 molekuly guaninu vázané Hoogsteenovými vodíkovými vazbami)
- Tvoří se především v přítomnosti  $\text{Na}^+$  a  $\text{K}^+$  iontů
- Strukturní polymorfismus



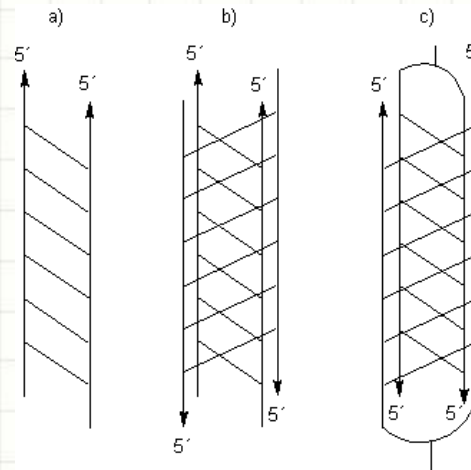
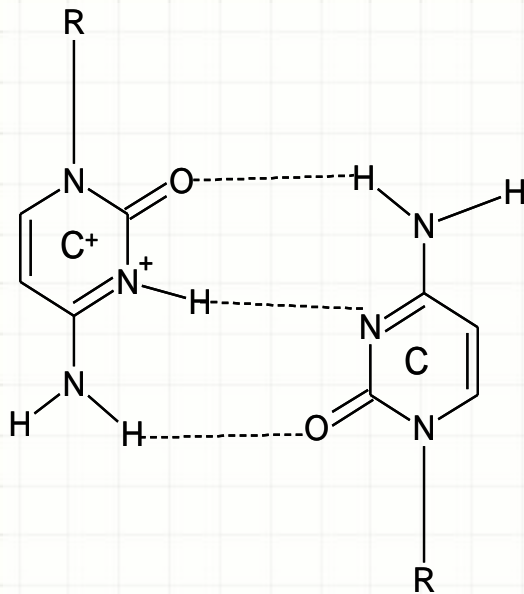
a) Čtyřřetězcový tetraplex

b) Dvouřetězcový intramolekulární tetraplex

c) Jednořetězcový intramolekulární tetraplex

# I - motivy

- Hemiprotonizované C – C<sup>+</sup> páry jako základní strukturní jednotka
- Tvoří se v slabě kyselém nebo neutrálním pH
- Diabetes mellitus a opakující se tripletové sekvence spojené s mnoha neurodegenerativními chorobami
- Strukturní polymorfismus



a) Dvouřetězcová struktura

b) Čtyřřetězcová struktura

c) Čtyřřetězcová struktura se značenými konci

# Před více než 55 lety, Emil Paleček: DNA polarografie (1960)



## Oscillografie

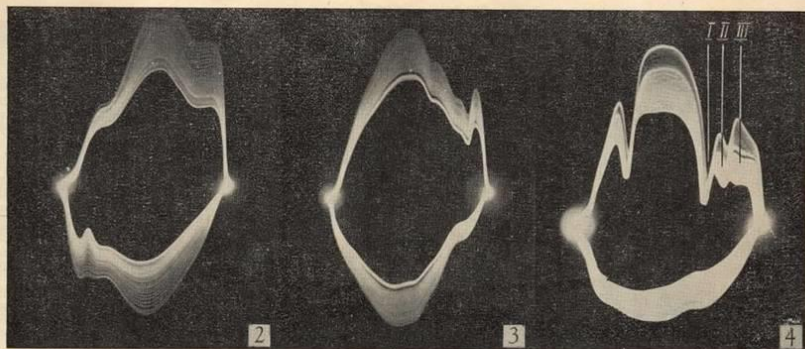


Fig. 2. 100  $\mu\text{gm}$ . deoxyribonucleic acid/ml. 1  $M$  ammonium formate  
 Fig. 3. Apurinic acid in 2  $M$  ammonium formate (concentration corresponding to 2  $\mu\text{gm}$ . of deoxyribonucleic acid)  
 Fig. 4. 900  $\mu\text{gm}$ . deoxyribonucleic acid + 5  $\mu\text{gm}$ . plasma albumin/1 ml.  $10^{-3} M$  hexamine cobaltic trichloride in 0.1  $M$  ammonium chloride-ammonium hydroxide. Indentations due to cobalt, I; deoxyribonucleic acid, II; protein, III

(Reprinted from *Nature*, Vol. 188, No. 4751, pp. 656-657, November 19, 1960)

### Oscillographic Polarography of Highly Polymerized Deoxyribonucleic Acid

PROCEEDING from my finding<sup>1,2</sup> that nucleotides, nucleosides and the bases of nucleic acids can be analysed by alternating current oscillographic polarography<sup>3-5</sup>, I have also tried to study polymerized deoxyribonucleic acid by this method.

The apparatus used was a Polaroskop P 524 (Křížek, Praha). With this apparatus it is possible to plot  $dE/dt$  against  $E$  (Fig. 1). The analysis was carried out by means of the dropping mercury electrode in the same electrolytes as were used in my previous work<sup>1,2</sup>. All measurements were carried out with specimens of deoxyribonucleic acid from calf thymus.

I have established that in a medium of molar ammonium formate, deoxyribonucleic acid shows an anodic indentation at the same potential as deoxyguanylic acid (Fig. 2). Other characteristics of both indentations are also analogous (dependence on direct voltage, temperature, concentration of the electrolyte), which appears to indicate that that due to

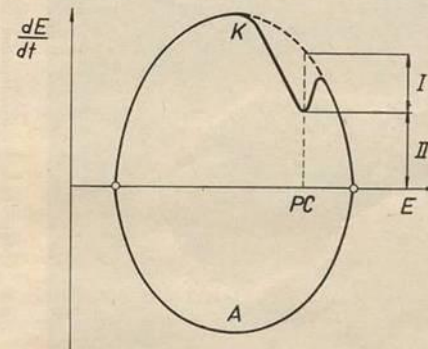


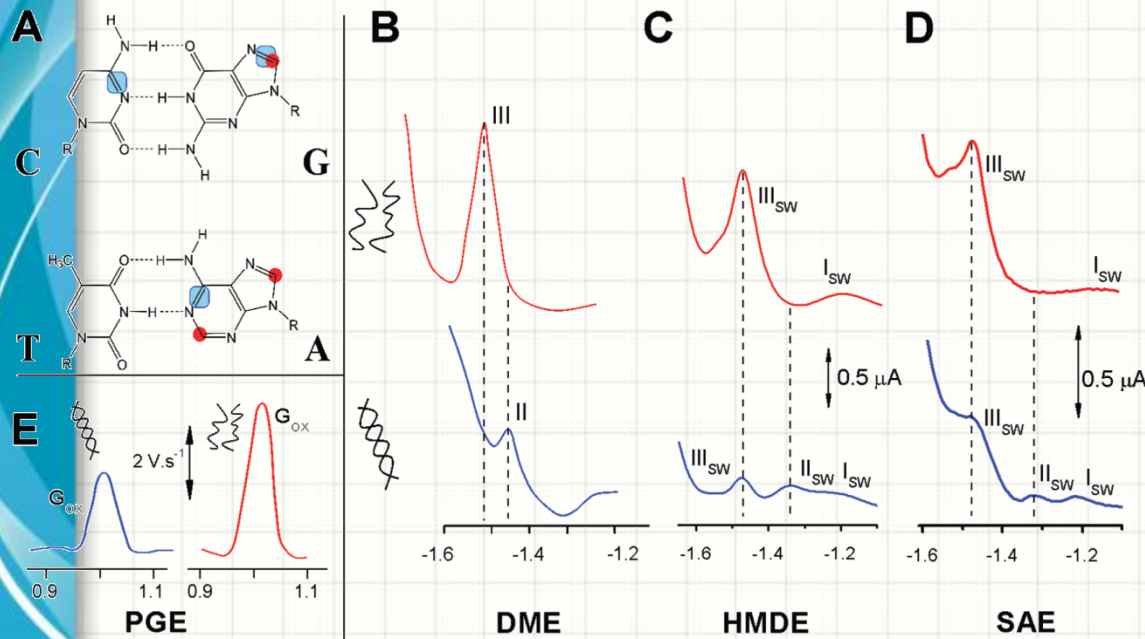
Fig. 1. Graph of  $dE/dt$  against  $E$ . The nature of the material analysed is characterized by the potential of the indentation ( $PC$ ), which is somewhat similar to the polarographic half-wave potential. The quantity of the material is characterized by the depth of the indentation. For qualitative analysis, the height II, which can be measured much more easily, is generally measured.  
 K, Cathodic part; A, anodic part



# Nukleové kyseliny jsou elektroaktivní

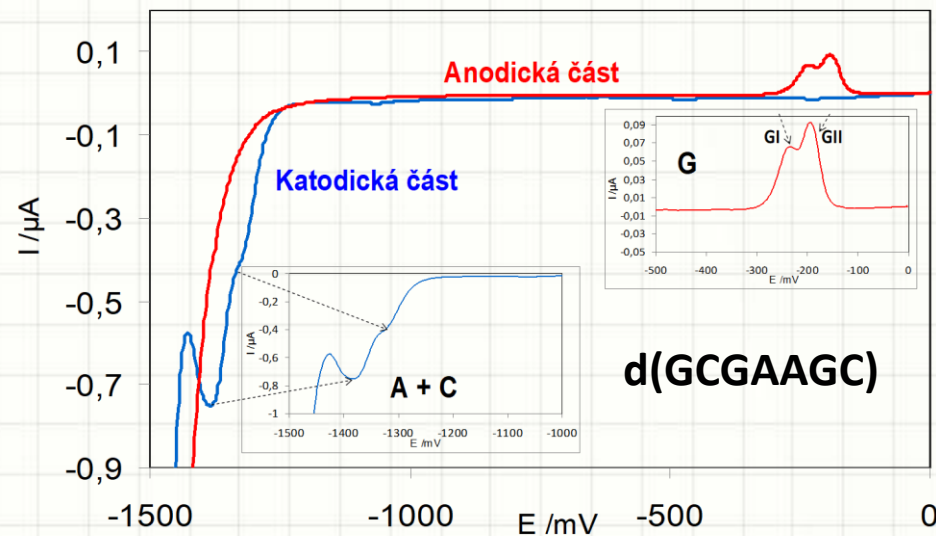
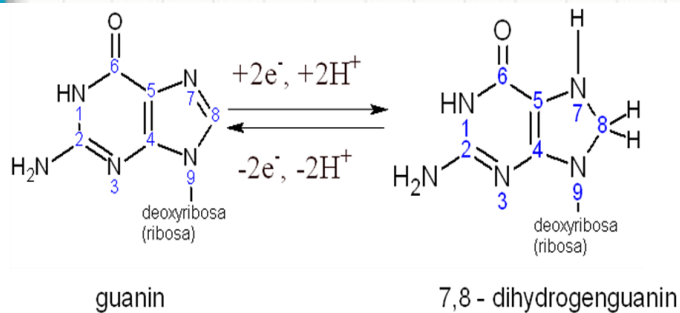
- Hg elektroda: redoxní procesy A,C a G bází
- Uhlíkové elektrody: oxidace purinových a pyrimidinových bází
- Cu elektroda: oxidace cukerných zbytků v NA  
Singhal, P.; Kuhr, W. G.: *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 3552-3557; *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 4828-4832.

# Elektrochemie NA a ODNs



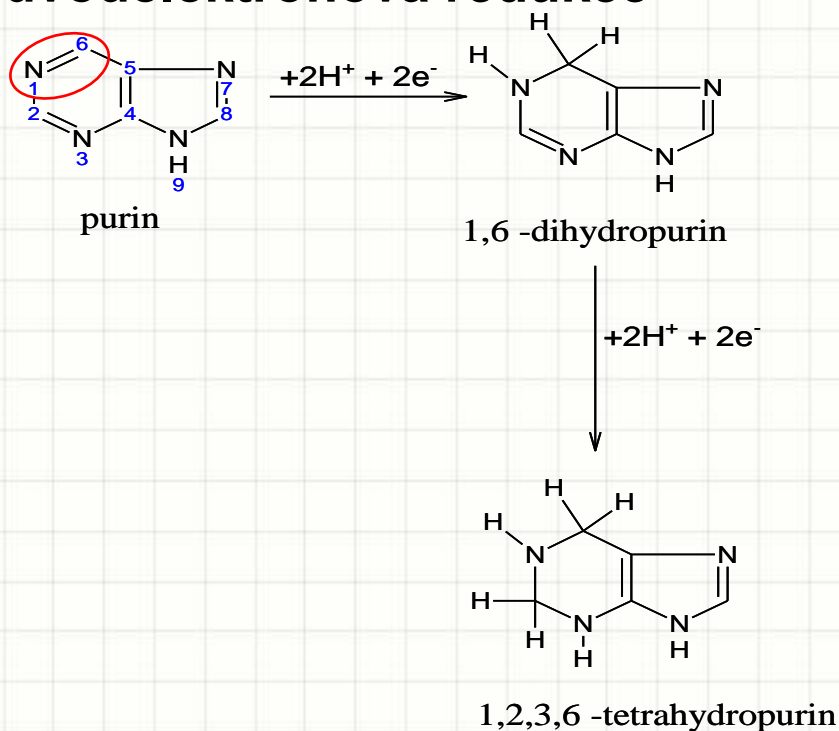
Paleček, E., Bartošík, M.:  
**Electrochemistry of Nucleic  
 Acids.** *Chem. Rev.*, 2012

# DNA



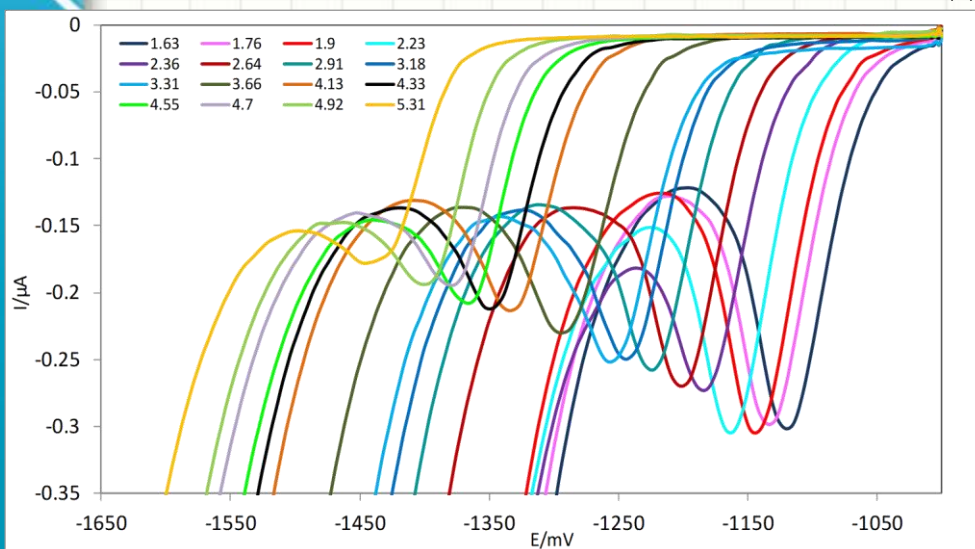
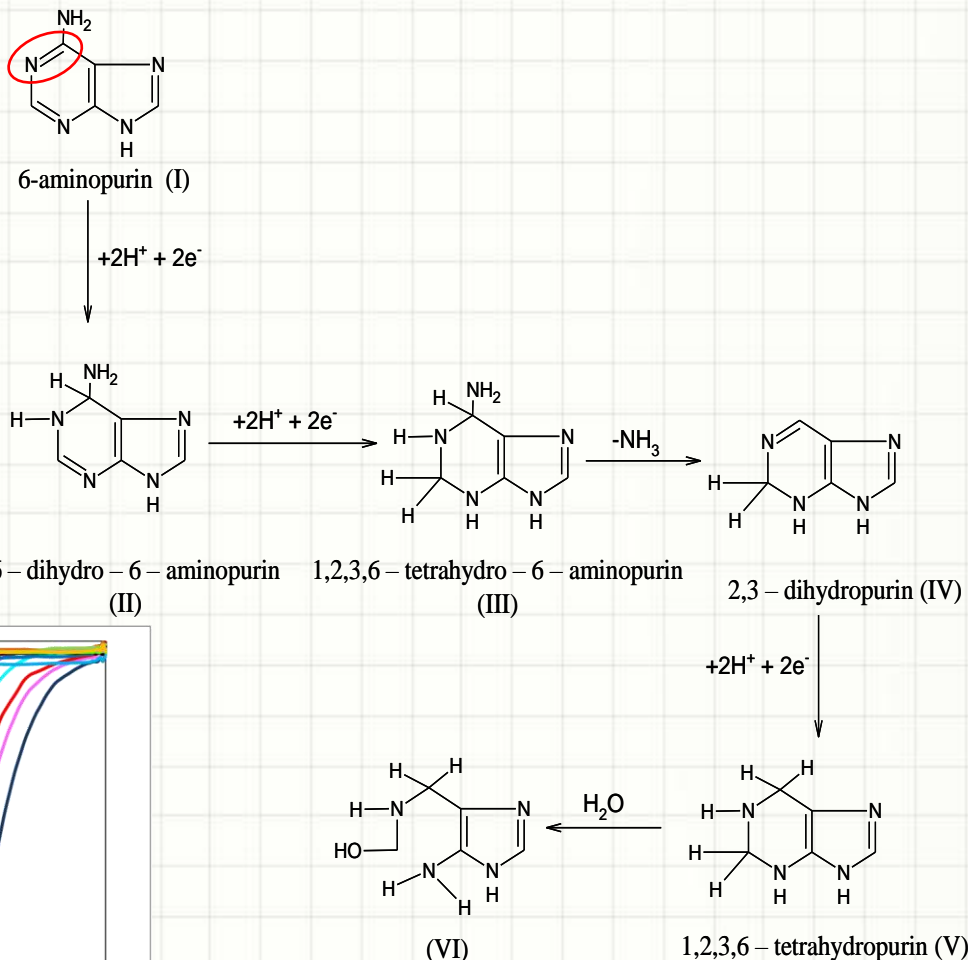
# Elektrochemie purinu a purinových derivátů

- Typické elektroaktivní látky
- **1962 - Smith a Elving** – první studie elektrochemické redukce purinu a adeninu pomocí polarografie a coulometrie na Hg elektrodě (DME).
- **Dvoukroková dvouelektronová redukce**

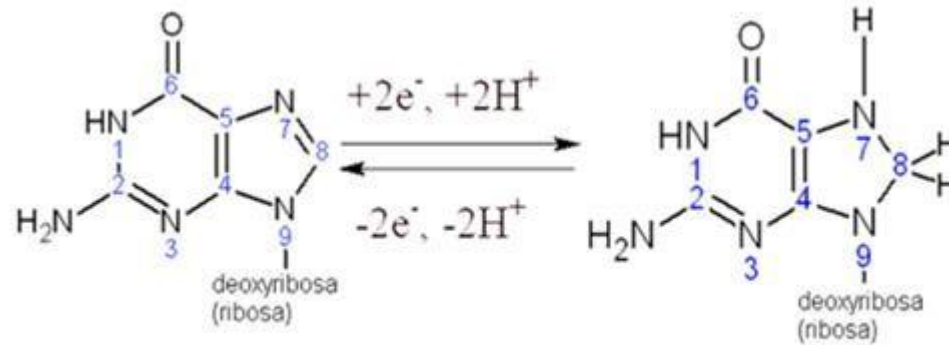


# Elektrochemická redukce adeninu

- **Smith a Elving (1962)**
- 6 e<sup>-</sup> redukční proces je doprovázen deaminačním procesem (př. coulometrie)
- Polarografická redukce je ukončena v bodě III (tvorba 1,2,3,6-tetrahydro-6-aminopurinu)
- Problém redukce adeninu při pH > 6

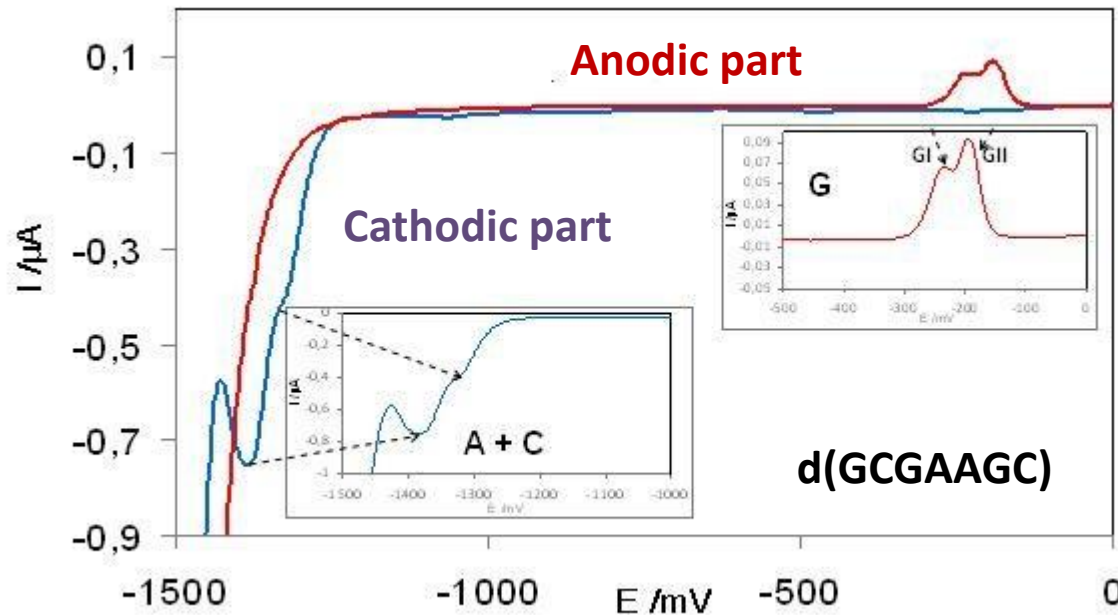


# Elektrochemická redukce guaninu



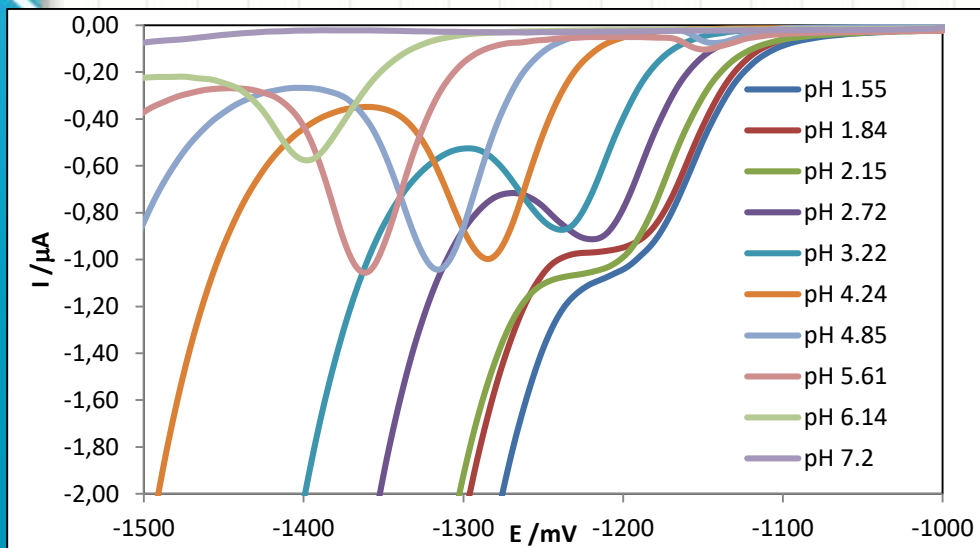
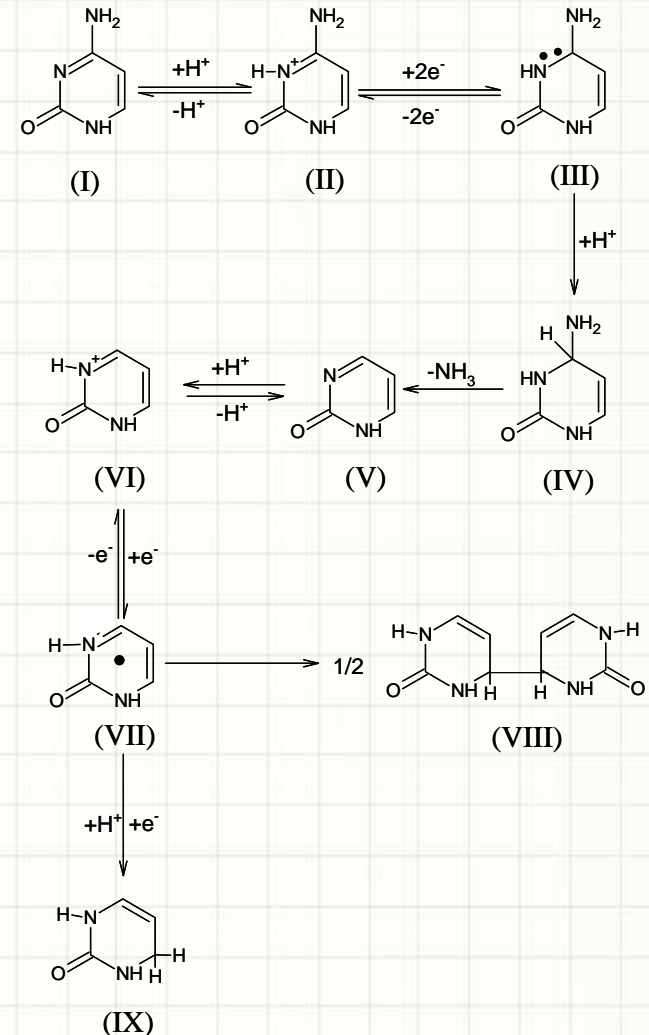
guanine

7, 8 - dihydroguanine



# Elektrochemická redukce cytosinu

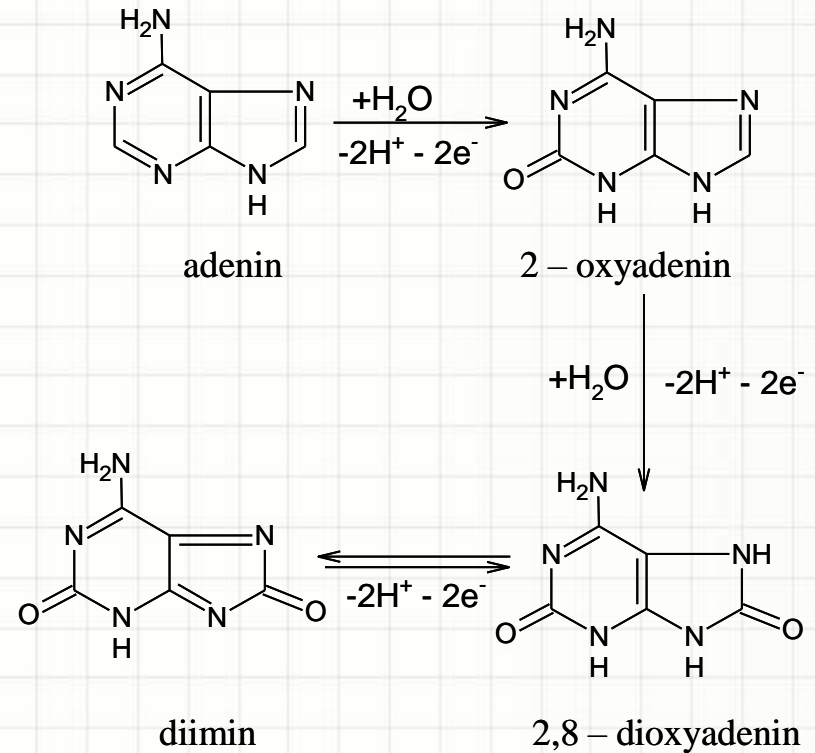
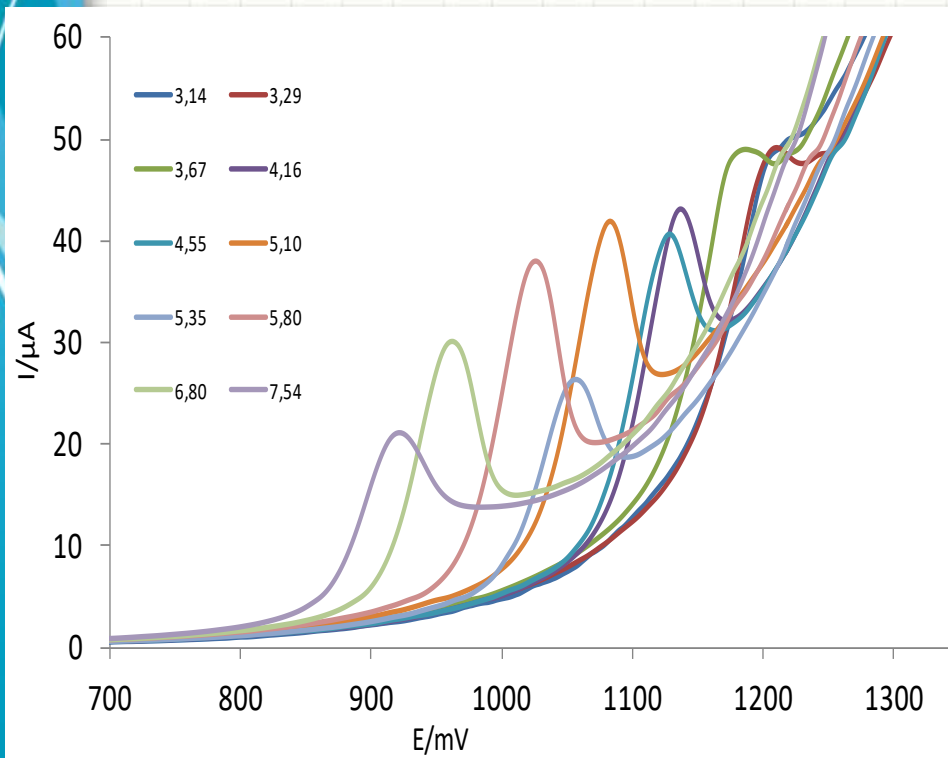
- Elving (1972)
- Redukce je započatá rychlou protonizací cytosinu (I) v N-3 poloze na elektroaktivní formu (II). Dvouelektronová redukce N-3=C-4 následuje a tvoří se karbanion (III)
- Redukce v polarografii a voltametii je ukončena tvorbou 4-amino-3,4-dihydrogenpyrimidine-2-on (IV)
- Jiné meziproducty lze získat s využitím elektrolýzy nebo coulometrie



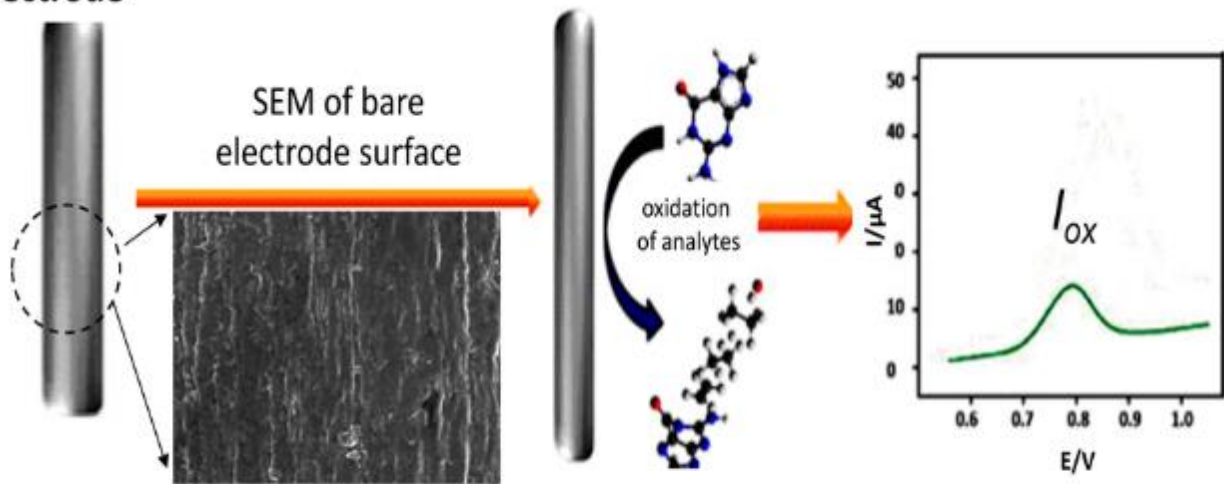
# Elektrochemická oxidace adeninu

## •Dryhurst, Compton

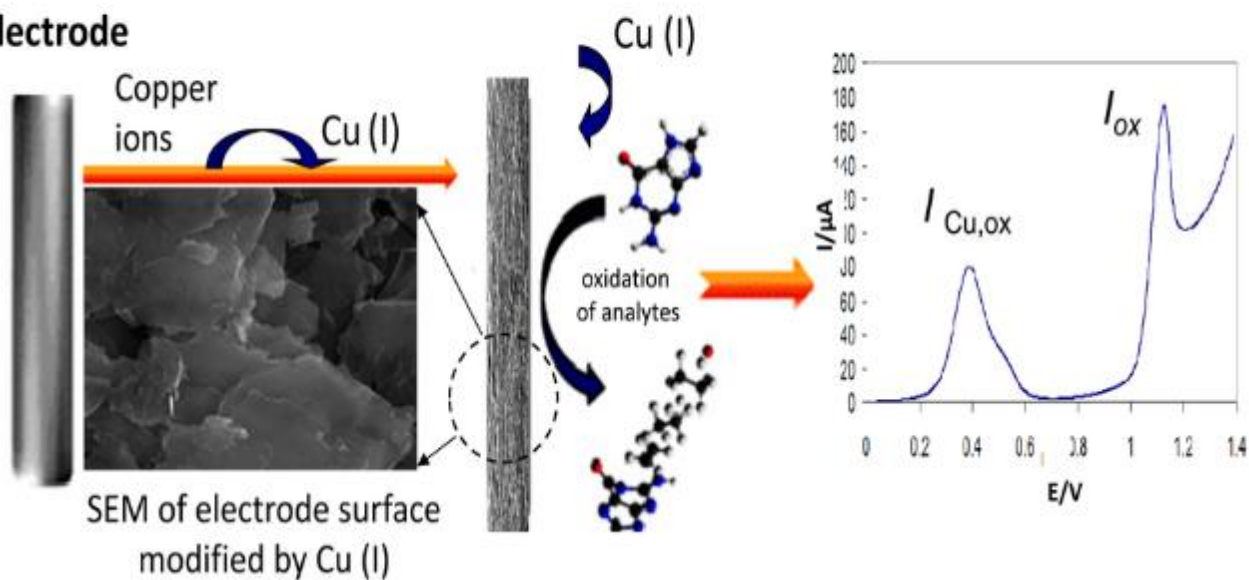
• $6e^-$  and  $6H^+$  elektrodový proces



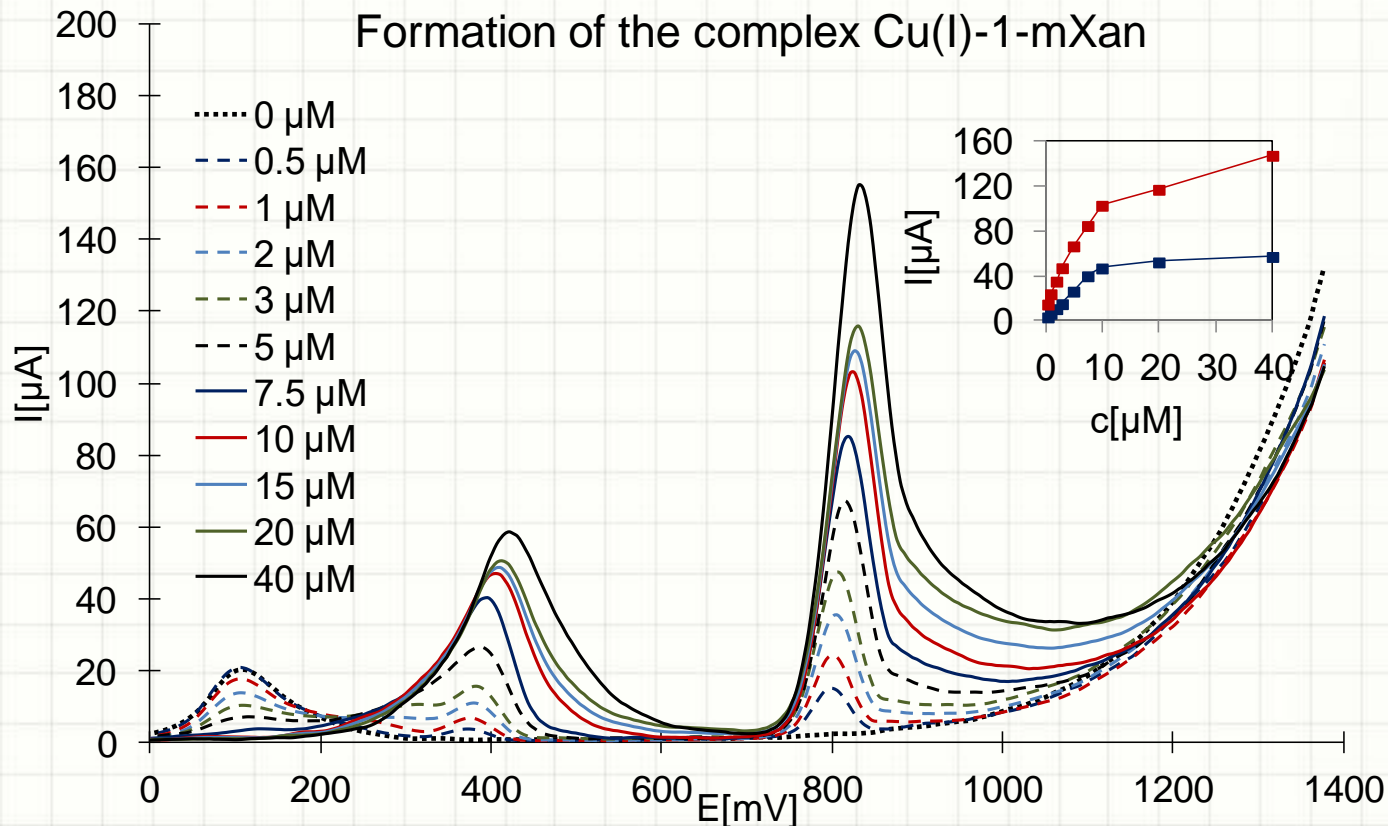
### Bare electrode



### Bare electrode







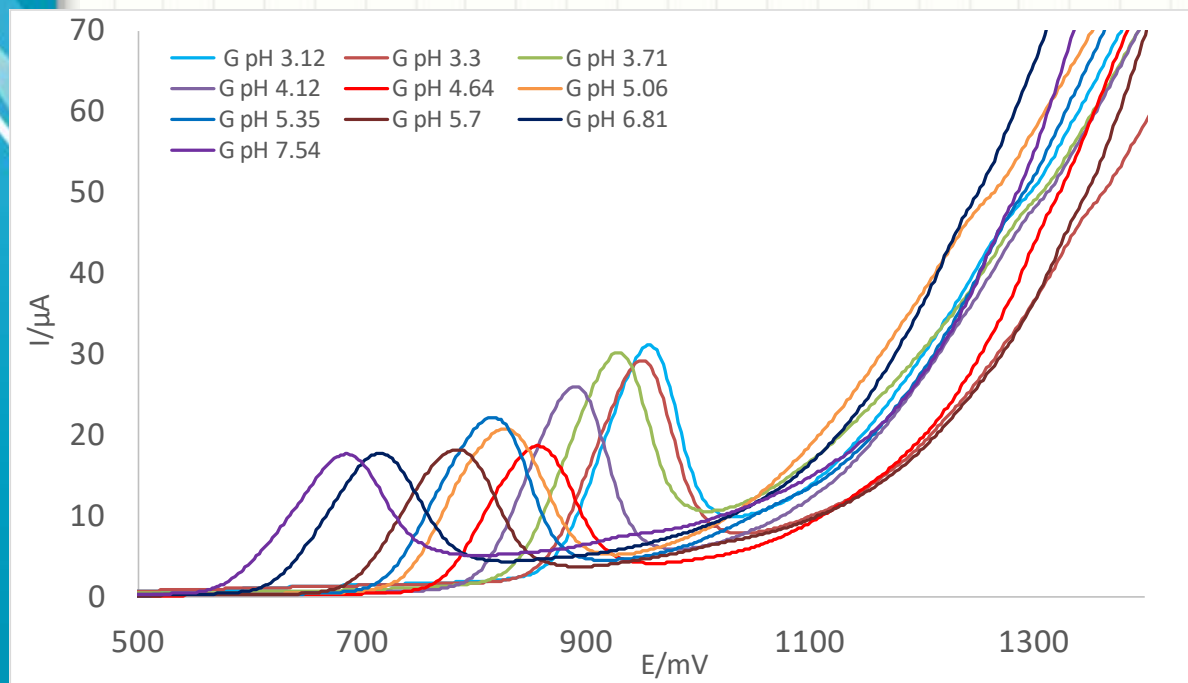
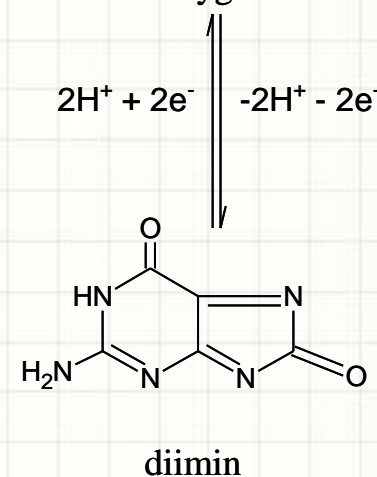
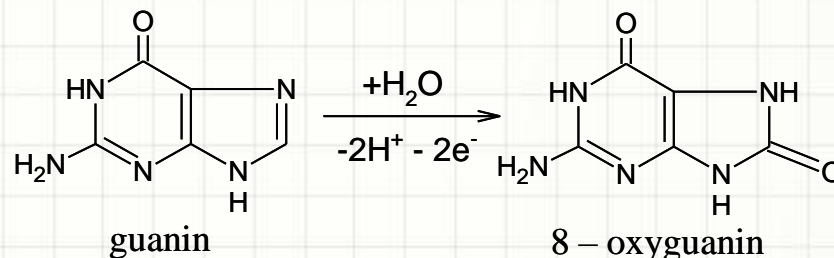
**Figure 6:** Concentration dependence of 1-mXan in the solution with constant concentration of Cu(II) ions,  $c_{\text{Cu}} = 20 \mu\text{M}$ , reference scan rate 400 mV/s; phosphate-acetate buffer pH 5.1


**The complex formation and its oxidation can be described by the following scheme:**

1.  $\text{Cu(II)} + \text{e}^- \rightarrow \text{Cu(I)}$  (at a deposition potential of 0.15 V)
2.  $\text{Cu(I)} + \text{purine} \rightarrow [\text{Cu(I)-purine}]$  (in the reaction layer on PeGE surface)
3.  $[\text{Cu(I)-purine}] \rightarrow [\text{Cu(I)-purine}]_{\text{ads}}$  (adsorption of the complex)
4.  $[\text{Cu(I)-purine}]_{\text{ads}} - \text{e}^- \rightarrow [\text{Cu(II)-purine}]_{\text{ads}}$  (oxidative stripping, peak  $\text{Ox}_{\text{Com}}$ )
5.  $[\text{Cu(II)-purine}]_{\text{ads}} - \text{e}^- \rightarrow \text{purine}_{\text{ox}} + \text{Cu(II)}$  (oxidative stripping, peak Ox)

# Elektrochemická oxidace guaninu

- Dryhurst
- $4e^-$  a  $4H^+$  elektrodový proces

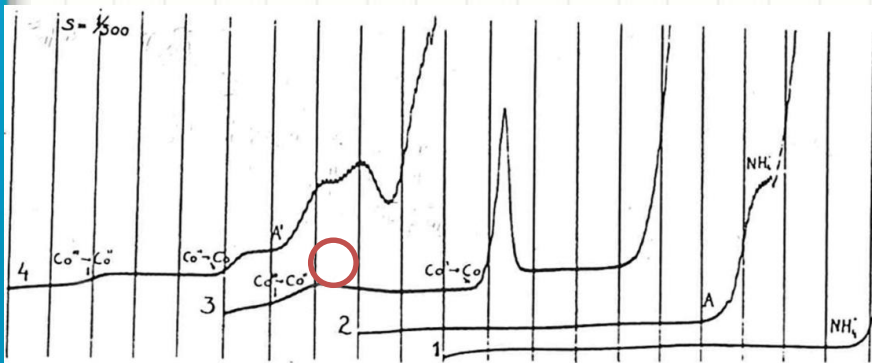




# Proteiny

# Proteiny jsou elektroaktivní

- První biomakromolekuly studované pomocí elektrochemických metod
- **Herles a Vančura** – polarografická studie lidských tělních tekutin (krevní sérum, moč). „**Prenatriová vlna**“ – Katodická vlna vyskytující se při potenciálu pozitivnějším (300 mV) než je potenciál redukce sodných iontů. Předběžně je tato vlna přiřazována proteinům
- **Heyrovský a Babička** – albumin v přítomnosti amonných iontů tvoří v dc polarografii tzv. „prenatriovou vlnu“ (**H peak**), způsobenou katalytickým vylučováním vodíku
- „Prenatriová vlna“ není vhodná pro analytické účely

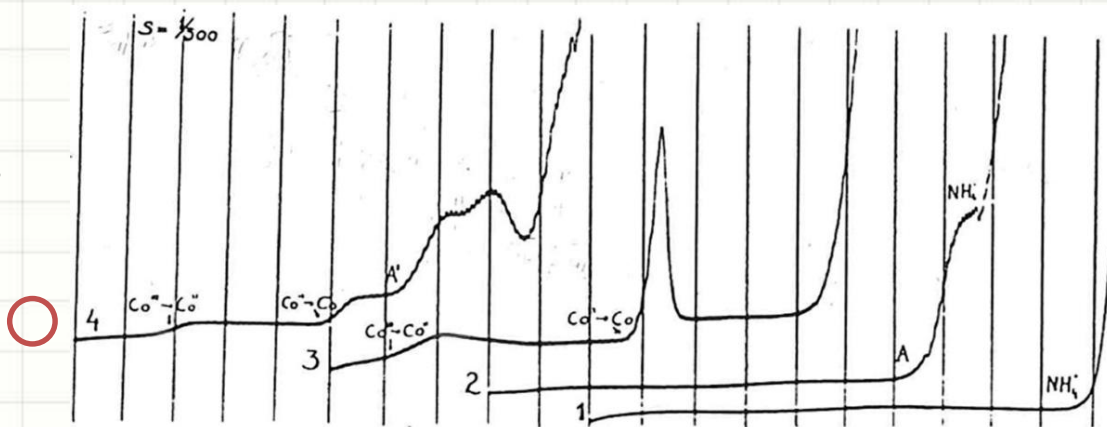


Polarographic catalytic waves of human serum. (2) the “presodium” catalytic wave in 0.1 M ammonia/ammonium chloride

# Brdičkova katalytická reakce (BCR)

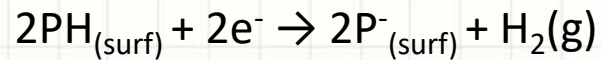
- **1933 – Brdičkova katalytická reakce** – polarografická dvojná proteinů obsahujících Cys zbytky v pufovaných roztocích kobaltu (Brdičkova soluce – amonný pufr  $\text{NH}_4\text{OH} + \text{NH}_4\text{Cl}$  a komplex kobaltu  $[\text{Co}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$ )
- Původně navržena pro detekci látek bohatých na síru, jako jsou organické látky (2- mercaptopropionic acid, 2-diethylaminoethanethiol hydrochloridum), aminokyseliny (cystein, cystin) a bílkoviny (albumin)
- Aplikace Brdičkovy katalytické reakce v klinické medicíně a farmakologii (diagnostika rakoviny)
- Mechanismus elektrodového procesu Brdičkovy reakce není detailně znám, ale předpokládá se, že komplex  $\text{Co}(\text{II})$  s  $-\text{NH}_2$  and  $-\text{SH}$  skupinami hraje klíčovou roli

Polarographic catalytic waves of human serum.  
(4) the catalytic double-wave in Brdička solution



# Co je katalytické vylučování vodíku (CHER)?

- Elektrochemický jev způsobený katalyzátorem, v jehož přítomnosti se vodík vyvíjí na katodě polarizované do méně negativních potenciálů, než v nepřítomnosti katalyzátoru
- Vyvíjení vodíku je produkováno katodickým katalytickým proudem
- Intenzita proudu závisí na koncentraci katalyzátoru a na jeho kinetické katalytické účinnosti



PH a P<sup>-</sup>: protonizovaná/deprotonizovaná forma AMK zbytků v molekule proteinu  
BH je kyselá složka pufru; B<sup>-</sup> je její konjugovaná báze

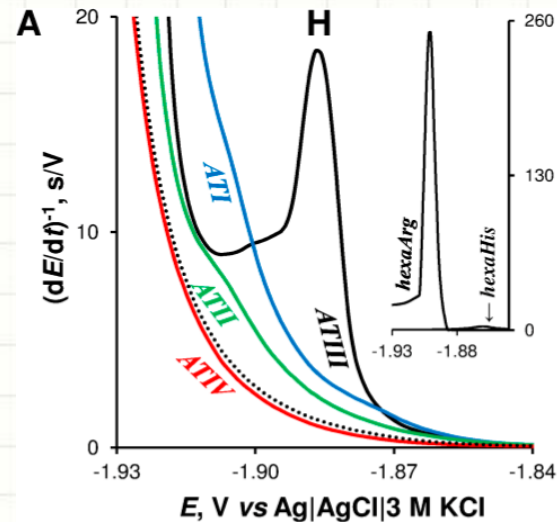
- Reakce naznačují, že katalyzátorem je protein ukotvený na povrchu elektrody
- Cys, Lys, Arg a His zbytky v molekule proteinu jsou schopny katalyzovat vylučování vodíku na Hg elektrodě

# H pík

- **V posledních letech** – tzv. „prenatriová vlna“ (J. Heyrovský) v kombinaci s CPSA (chronopotenciometrická stripping analýza) na stacionární a chemicky modifikované Hg elektrodě (zahrnuty amalgámové elektrody) – vhodný nástroj pro analýzu proteinů
- Katalytický signál - **H pík** (objevený díky CHER; pojmenovaný podle J. Heyrovského) – je citlivý na strukturní a konformační změny proteinů
- **H pík** (pro proteiny) využitý pro sledování denaturace, agregace, interakce s nízkomolekulárními ligandy DNA; strukturní změny jako výsledek mutace a redoxního stavu

**CPSA – chronopotenciometrická stripping analýza**

$$\frac{dE}{dt} = f(E)$$

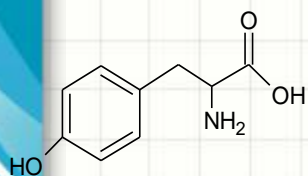


**B**

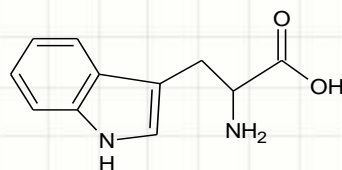
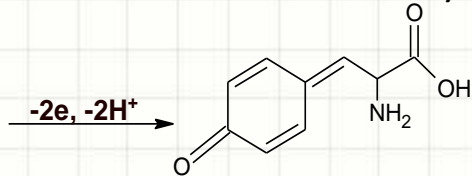
	Asp	Arg	Val	Tyr	Ile	His	Pro	Phe	His	Leu
AT I	D	R	V	Y	I	H	P	F	H	L
AT II	D	R	V	Y	I	H	P	F		
AT III		R	V	Y	I	H	P	F		
AT IV			V	Y	I	H	P	F		

# Elektrochemická oxidace proteinů

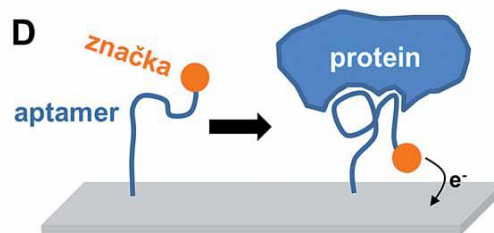
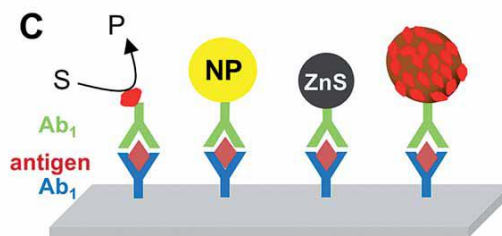
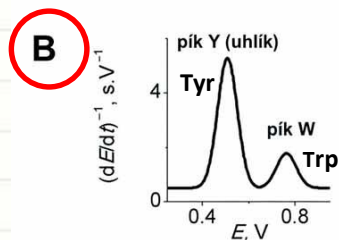
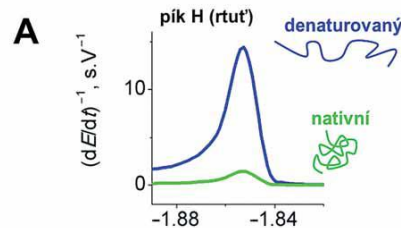
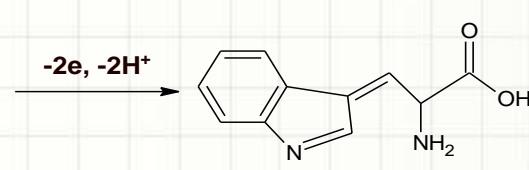
- Volné AMK (Cys, His, Met, Tyr a Trp) se oxidují na uhlíkových elektrodách
- Proteiny jsou oxidovány na uhlíkových elektrodách (CPSA)
- Tyr a Trp zbytky v molekule proteinu poskytují oxidační signál na uhlíkových elektrodách → studium DNA-protein interakce, rozlišení fosforylované a nefosforylované formy, membránové Na/K pumpy, stanovení inzulínu a  $\alpha$ -synukleínu (důležité pro Parkinsonovu chorobu)



Tyrosin



Tryptofan



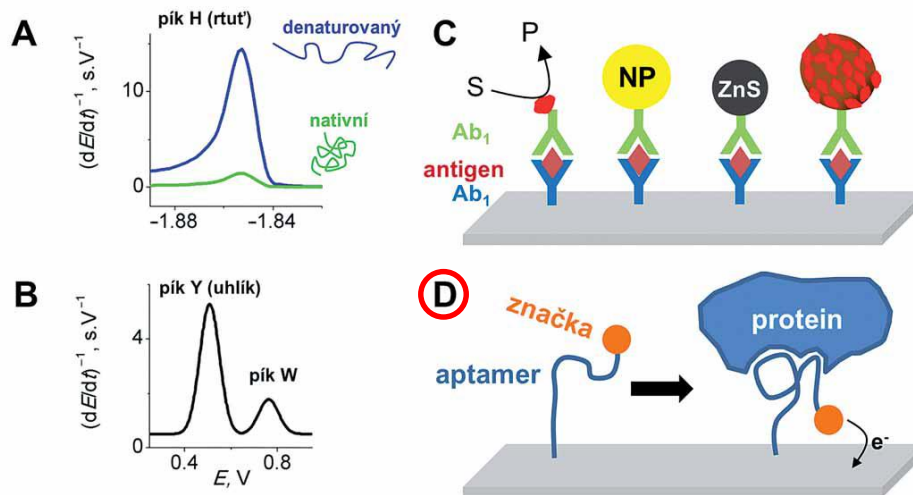
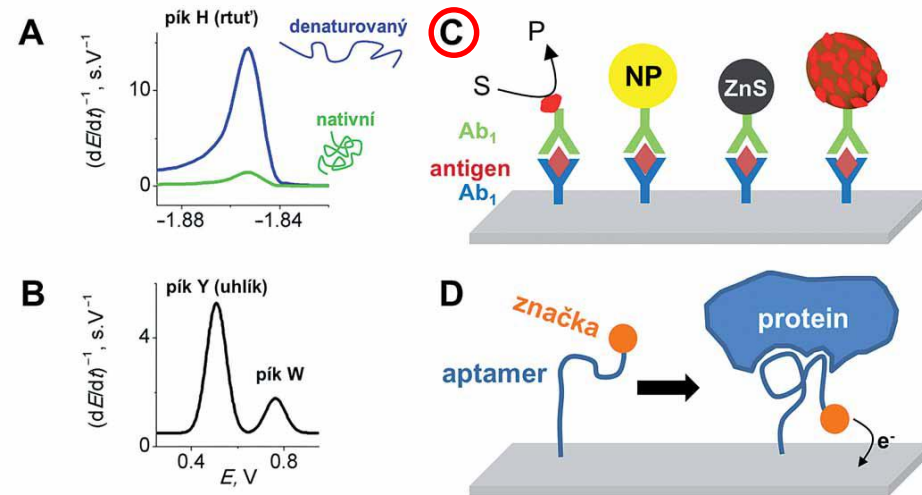


# Proteiny jsou elektroaktivní

- Externí značení proteinů (citlivá detekce specifických proteinů ve směsi jiných molekul)
  - ✓ Immunoassays (ELISA)
- Nanotechnologie – nanočástice, nanotrubičky

Bartošík M., Paleček E., Vojtěšek B.: *Klin Onkol*, 2014, 27 (Suppl 1), S53-S60

## • Aptamery



Bartošík M., Paleček E., Vojtěšek B.: *Klin Onkol*, 2014, 27 (Suppl 1), S53-S60