

Praktikum z experimentálních metod biofyziky a chemické fyziky II.

Vypracoval: Jana Čurdová, Martin Kříž, Vít Marek.

Dne: 16. června 2003

Úloha: 2

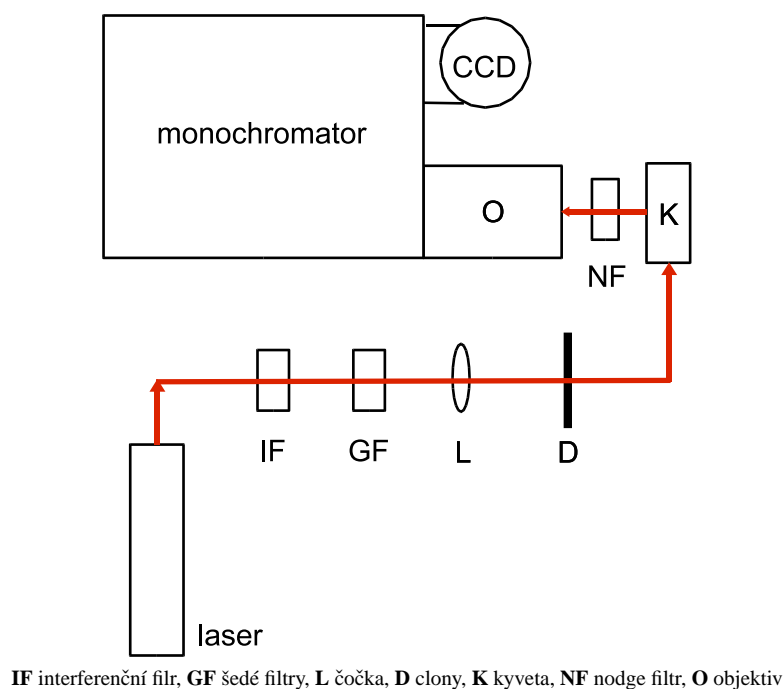
Studium acidobazických rovnováh pomocí Ramanovy spektroskopie

Anotace:

Úloha je zaměřena na užití Ramanovy spektroskopie pro kvalitativní analýzu relativních podílů protonované a disociované formy molekul ve vodném roztoku. V rámci úlohy se provádí série měření Ramanových spekter na mnohokanálovém spektrometru při různých hodnotách pH. Na základě znalosti hodnot pK konstant jsou identifikována spektra jednotlivých forem a stanoveny relativní podíly mezi protonovanou a disociovanou formou v oblasti rovnováh.

Měřicí aparatura:

Schéma aparatury pro měření Ramanova rozptylu je zakresleno na obrázku 1.



Obrázek 1: Schéma měřicí aparatury pro Ramanův rozptyl

5'-adenosinmonofosfát:

5'-adenosinmonofosfát (obrázek 2) je jedna ze základních stavebních jednotek RNA. Zároveň je také zdrojem ATP, makroergické sloučeniny, která má v organismech roli zdroje energie.

Výsledky měření a diskuse:

Nejdříve jsme si připravili roztok AMP. Navážili jsme $m_{AMP} = 0,0393$ g 5'-adenosinmonofosfátu a rozpustili jej v 1 ml vody. Tak jsme připravili vzorek 1 určený k měření (viz. tabulka 1).

Pomocí dvou pufrů o pH 4 a 7 jsme zkalibrovali pH-metr s diferenční minielektrodou. Určili jsme pH připraveného vzorku a výsledek zapsali do tabulky 1.

U Ramanova spektrometru jsme změřili výkon laseru (100 mW). Jako kalibraci při měření spekter jsme používali toulén (spektrum vzniklo 10 akumulacemi po 1 s). Po každém změření kalibrace jsme změřili spektrum vzorku. Při vlastním měření vzorku jsme spektra akumulovali desetkrát po jedné sekundě, celkem 20 framů. Po skončení měření jsme ke vzorku přidali malé množství 0,8 M HCl. Po určení pH jsme opět opakovali měření spekter kalibrace a vzorku na aparatuře pro měření Ramanova roptylu. Celkem jsme provedli 15 měření až k pH 2,89, kdy se začal vzorek srážet. Posledním měřením bylo spektrum vody (z důvodu odečtení jejího spektra od vzorku).

Tabulka 1: pH a koncentrace měřených vzorků

vzorek	pH	V _{HCl} [μl]	V _{vzorek} [ml]	c _{AMP} [mol.dm ⁻³]
1	8,42	0	1	0,100
2	7,86	5	1,005	0,100
3	7,02	10	1,010	0,099
4	6,75	15	1,015	0,099
5	6,54	20	1,020	0,098
6	6,38	25	1,025	0,098
7	6,14	35	1,035	0,097
8	5,89	45	1,045	0,096
9	5,55	55	1,055	0,095
10	4,81	70	1,070	0,094
11	4,26	80	1,080	0,093
12	3,90	90	1,090	0,092
13	3,58	100	1,100	0,091
14	3,23	110	1,110	0,090
15	2,89	120	1,120	0,090

V_{HCl} je objem celkem přidané 0,8 M HCl, c_{AMP} koncentrace AMP ve vzorku

Naměřená spektra jsme zkalibrovali pomocí programu *tolkal0.exe*. Spektra byla převzorkována na 1 cm⁻¹ pomocí lineární interpolace spekter. Od prvního spektra a vody byla odečtena přímka (spojující první a poslední bod spektra). Od všech spekter bylo odečteno lineární pozadí (obrázek 3). Nakonec byla spektra zpracována programem *Pomlazka*. Korigovaná a normalizovaná spektra jsou uvedena na obrázku 4. Po zpracování spekter jsme zjistili, že se během změny pH ve vzorku vyskytovali 3 formy AMP (obrázek 5). Dále jsme rekonstrukci ze subspekter získaných faktorovou analýzou (nafitováno na model 3SS3PF) určili spektra čistých složek a jejich relativní podíl v závislosti na pH (obrázek 6). Ve spektrech čistých složek jsme přiřadili jednotlivým čarám charakteristické skupiny. Z relativního podílu jsme nakonec určili pK konstanty daných přechodů: $pK_1 = 3,70$, $pK_2 = 6,19$.

Na základě známé celkové koncentrace AMP a známých teoretických i naměřených pK konstant jsme do tabulky 2 zapsali koncentrace jednotlivých složek při daném pH. Ty se mezi sebou (teoretické a naměřené) nejvíce liší pro malé koncentrace. To je způsobeno rozdílnými hodnotami teoretických a určených pK₁ konstant. Jedním z důvodů je také nepřesný fit pro malé pH, kde by bylo vhodné změřit ještě další data. Nevýhodou však je srážení vzorku v takto kyselém prostředí.

Tabulka 2: Zastoupení jednotlivých forem AMP u měřených vzorků

vzorek	c_1 [mol.dm ⁻³]	c_2 [mol.dm ⁻³]	c_3 [mol.dm ⁻³]	c_1^{teor} [mol.dm ⁻³]	c_2^{teor} [mol.dm ⁻³]	c_3^{teor} [mol.dm ⁻³]
1	$1,12 \cdot 10^{-8}$	$5,87 \cdot 10^{-4}$	$9,97 \cdot 10^{-2}$	$1,69 \cdot 10^{-8}$	$6,15 \cdot 10^{-4}$	$9,97 \cdot 10^{-2}$
2	$1,45 \cdot 10^{-7}$	$2,09 \cdot 10^{-3}$	$9,77 \cdot 10^{-2}$	$2,19 \cdot 10^{-7}$	$2,19 \cdot 10^{-3}$	$9,76 \cdot 10^{-2}$
3	$6,12 \cdot 10^{-6}$	$1,28 \cdot 10^{-2}$	$8,65 \cdot 10^{-2}$	$9,21 \cdot 10^{-6}$	$1,33 \cdot 10^{-2}$	$8,60 \cdot 10^{-2}$
4	$1,90 \cdot 10^{-5}$	$2,13 \cdot 10^{-2}$	$7,75 \cdot 10^{-2}$	$2,85 \cdot 10^{-5}$	$2,21 \cdot 10^{-2}$	$7,67 \cdot 10^{-2}$
5	$4,39 \cdot 10^{-5}$	$3,04 \cdot 10^{-2}$	$6,79 \cdot 10^{-2}$	$6,54 \cdot 10^{-5}$	$3,13 \cdot 10^{-2}$	$6,70 \cdot 10^{-2}$
6	$8,02 \cdot 10^{-5}$	$3,84 \cdot 10^{-2}$	$5,94 \cdot 10^{-2}$	$1,19 \cdot 10^{-4}$	$3,94 \cdot 10^{-2}$	$5,83 \cdot 10^{-2}$
7	$1,86 \cdot 10^{-4}$	$5,11 \cdot 10^{-2}$	$4,56 \cdot 10^{-2}$	$2,74 \cdot 10^{-4}$	$5,22 \cdot 10^{-2}$	$4,44 \cdot 10^{-2}$
8	$4,11 \cdot 10^{-4}$	$6,37 \cdot 10^{-2}$	$3,19 \cdot 10^{-2}$	$6,02 \cdot 10^{-4}$	$6,45 \cdot 10^{-2}$	$3,09 \cdot 10^{-2}$
9	$1,08 \cdot 10^{-3}$	$7,65 \cdot 10^{-2}$	$1,75 \cdot 10^{-2}$	$1,57 \cdot 10^{-3}$	$7,67 \cdot 10^{-2}$	$1,68 \cdot 10^{-2}$
10	$6,50 \cdot 10^{-3}$	$8,38 \cdot 10^{-2}$	$3,49 \cdot 10^{-3}$	$9,13 \cdot 10^{-3}$	$8,14 \cdot 10^{-2}$	$3,24 \cdot 10^{-3}$
11	$1,99 \cdot 10^{-2}$	$7,22 \cdot 10^{-2}$	$8,48 \cdot 10^{-4}$	$2,62 \cdot 10^{-2}$	$6,59 \cdot 10^{-2}$	$7,39 \cdot 10^{-4}$
12	$3,55 \cdot 10^{-2}$	$5,62 \cdot 10^{-2}$	$2,88 \cdot 10^{-4}$	$4,38 \cdot 10^{-2}$	$4,80 \cdot 10^{-2}$	$2,35 \cdot 10^{-4}$
13	$5,18 \cdot 10^{-2}$	$3,93 \cdot 10^{-2}$	$9,65 \cdot 10^{-5}$	$5,98 \cdot 10^{-2}$	$3,14 \cdot 10^{-2}$	$7,35 \cdot 10^{-5}$
14	$6,75 \cdot 10^{-2}$	$2,29 \cdot 10^{-2}$	$2,51 \cdot 10^{-5}$	$7,32 \cdot 10^{-2}$	$1,72 \cdot 10^{-2}$	$1,80 \cdot 10^{-5}$
15	$7,75 \cdot 10^{-2}$	$1,20 \cdot 10^{-2}$	$6,02 \cdot 10^{-6}$	$8,09 \cdot 10^{-2}$	$8,67 \cdot 10^{-3}$	$4,15 \cdot 10^{-6}$

c_1 naměřená koncentrace dvakrát protonované formy AMP,

c_2 naměřená koncentrace jednou protonované formy AMP,

c_3 naměřená koncentrace neprotonované formy AMP,

c_1^{teor} teoretická koncentrace dvakrát protonované formy AMP,

c_2^{teor} teoretická koncentrace jednou protonované formy AMP,

c_3^{teor} teoretická koncentrace neprotonované formy AMP

Závěr:

V této úloze jsme měřili sérii Ramanových spekter 5'-adenosinmonofosfátu v závislosti na pH. Na základě určených pK konstant jsme pak stanovili spektra jednotlivých protonovaných forem měřené sloučeniny. Naměřené pK konstanty jsou srovnatelné s publikovanými hodnotami.