

Stanovení disociační konstanty pomocí isotermální titrační mikrokolorimetrie

Bc. Andrea Jarošová

Diplomová práce
2021



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav technologie potravin

Akademický rok: 2020/2021

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Andrea Jarošová**
Osobní číslo: **T19418**
Studijní program: **N0721A210004 Technologie potravin**
Studijní obor: **Technologie potravin**
Forma studia: **Kombinovaná**
Téma práce: **Stanovení disociačních konstant pomocí isotermální titrační mikrokolorimetrie**

Zásady pro vypracování

I. Teoretická část:

Vypracujte rešerši na uvedená témata:

1. Charakterizace disociace a disociačních konstant kyselin a bází, metody stanovení disociačních konstant.
2. Slabé organické kyseliny a slabé zásady, se zaměřením jejich využití v potravinářském, farmaceutickém a kosmetickém průmyslu a jejich disociační konstanty.
3. Stručná charakteristika isotermální titrační mikrokolorimetrie, oblasti využití této metody se zaměřením na stanovení disociačních konstant kyselin a zásad.

II. Praktická část:

1. Ověřte metodu stanovení disociačních konstant pomocí isotermální titrační mikrokolorimetrie a pokuste se o optimalizaci této metody pro některé slabé kyseliny.

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná/elektronická**

Seznam doporučené literatury:

- [1] WROLSTAD, Ronald E. *Handbook of food analytical chemistry*. Hoboken, N.J.: Wiley-Interscience, 2005, 2 sv. ISBN 9780471709084. <http://onlinelibrary.wiley.com/book/10.1002/0471709085>
- [2] Tajc, S. G.; Tolbert, B. S.; Basavappa, R.; Miller, B. L. Direct determination of thiol p*K_a* by isothermal titration microcalorimetry. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 10508? 10509
- [3] Mezinárodní elektronické databáze (Scopus, SciFinder, Web of Science...)

Vedoucí diplomové práce: **Ing. Zdeňka Prucková, Ph.D.**
Ústav chemie

Datum zadání diplomové práce: **31. prosince 2020**

Termín odevzdání diplomové práce: **14. května 2021**

L.S.

prof. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan

Ing. Robert Gál, Ph.D.
ředitel ústavu

Ve Zlíně dne 8. února 2021

PROHLÁŠENÍ AUTORA DIPLOMOVÉ PRÁCE

Beru na vědomí, že:

- diplomová práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému a dostupná k nahlédnutí;
- na moji diplomovou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3;
- podle § 60 odst. 1 autorského zákona má Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- podle § 60 odst. 2 a 3 autorského zákona mohu užít své dílo – diplomovou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- pokud bylo k vypracování diplomové práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tj. k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové práce využít ke komerčním účelům;
- pokud je výstupem diplomové práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Prohlašuji,

- že jsem diplomové práci pracoval samostatně a použitou literaturu jsem citoval. V případě publikace výsledků budu uveden jako spoluautor.
- že odevzdaná verze diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou obsahově totožné.

Ve Zlíně dne:

Jméno a příjmení studenta:

.....
podpis studenta

ABSTRAKT

Tato diplomová práce se zabývá problematikou disociačních konstant slabých kyselin a možnostmi jejich stanovení. Teoretická část práce je zaměřena na charakteristiku disociační konstanty kyselin a zásad, také jsou zde zmíněny metody vhodné k měření těchto konstant. Dále pojednává o slabých kyselinách významných v potravinářství, jejich významu a o jejich využití v dalších odvětvích. Cílem experimentální části této diplomové práce bylo optimalizovat stanovení disociačních konstant některých sloučenin metodou isothermální titrační mikrokolorimetrie. Při zpracovávání experimentu byl kladen důraz na stanovení hodnot vazebných konstant probíhajících protonačních reakcí, pomocí nichž byly vypočítány výsledné disociační konstanty zkoumaných kyselin. Touto studií byla nastavena cesta k možné aplikaci isothermální titrační mikrokolorimetrie jakožto vhodné alternativy sloužící ke stanovení disociačních konstant neznámých sloučenin. K úplné optimalizaci této metody a jejímu zavedení do praxe za účelem měření disociačních konstant sloučenin bude však zapotřebí provést daleko větší množství stanovení zahrnujících širší spektrum sloučenin.

Klíčová slova: disociační konstanta, isothermální titrační mikrokolorimetrie, slabá kyselina

ABSTRACT

The Master's thesis is focused on the problematics of determination of dissociation constants of weak acids. The theoretical study includes the characteristics of the acid and base dissociation constants, it also compares conventional methods used for its determination and discusses advantages and disadvantages of each one. It also comments on weak acids used in food industry as well as in other industries. The aim of the experimental study was to determine the association constants of protonation reactions which served for the calculation of dissociation constants of known acids. Unfortunately, it will take a long time to optimize ITC as suitable method for determination of dissociation constants of unknown compounds and many more experiments with diverse compounds will need to be carried out.

Keywords: dissociation constant, isothermal titration microcalorimetry, weak acid

Tímto bych chtěla poděkovat vedoucí své diplomové práce Ing. Zdeňce Pruckové, Ph.D. za všechny rady, ochotu, trpělivost a za její přátelství. Dále bych chtěla poděkovat Ústavu chemie FT UTB za poskytnutí všech chemikálií nutných k provedení mých experimentů. A především děkuji své rodině za lásku, podporu a za to, že jsou a vždy byli pevným bodem mém životě!

Prohlašuji, že odevzdaná verze bakalářské/diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou totožné.

OBSAH

ÚVOD.....	9
I TEORETICKÁ ČÁST	10
1 DISOCIACE	11
1.1 TEORIE KYSELIN A ZÁSAD	11
1.2 DISOCIAČNÍ KONSTANTA	13
1.2.1 Disociace kyselin a zásad.....	13
1.2.2 Disociace vody	14
1.2.3 Stupeň disociace.....	14
1.2.4 Příklady disociačních konstant slabých kyselin a zásad	15
1.2.5 Metody stanovení disociační konstanty	16
2 POTRAVINÁŘSKY VÝZNAMNÉ SLABÉ ORGANICKÉ KYSELINY	20
2.1 KYSELINA OCTOVÁ	20
2.1.1 Výroba.....	20
2.1.2 Využití.....	22
2.2 KYSELINA L-ASKORBOVÁ	23
2.2.1 Význam	24
2.2.2 Výroba.....	24
2.2.3 Využití.....	25
2.3 KYSELINA BENZOOVÁ	26
2.3.1 Výroba.....	26
2.3.2 Využití.....	27
2.4 KYSELINA MLÉČNÁ	28
2.4.1 Výroba.....	28
2.4.2 Využití.....	29
2.5 AMINOKYSELINY	30
2.5.1 Význam	31
2.5.2 Výroba.....	32
2.5.3 Využití.....	33
3 ISOTERMÁLNÍ TITRAČNÍ MIKROKALORIMETRIE	35
3.1 PRINCIP MĚŘENÍ	36
3.2 STANOVENÍ DISOCIAČNÍ KONSTANTY POMOCÍ ITC.....	37
II PRAKTICKÁ ČÁST	41
4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	42
4.1 POUŽITÉ PŘÍSTROJE	42
4.1.1 VP-ITC Mikrokolorimetr	42
4.1.2 ThermoVac.....	42
4.1.3 pH-metr	42
4.1.4 Mikrováhy	42

4.2	POUŽITÉ KYSELINY A DALŠÍ CHEMIKÁLIE	43
4.2.1	Měření kyseliny	43
4.2.2	Další chemikálie	45
4.3	PŘÍPRAVA POUŽÍVANÝCH ROZTOKŮ	46
5	VÝSLEDKY A DISKUSE	48
5.1	STANOVENÍ SLABÝCH KYSELIN VE FORMĚ JEJICH SODNÝCH SOLÍ	48
5.2	STANOVENÍ SLABÝCH KYSELIN V PROTONOVANÉ FORMĚ	55
5.3	STANOVENÍ KYSELINY BENZOOVÉ V ROZTOKU METHANOL/VODA	60
	ZÁVĚR	62
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	64
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	72
	SEZNAM OBRÁZKŮ	74
	SEZNAM TABULEK	76

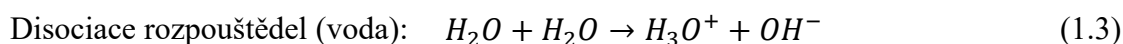
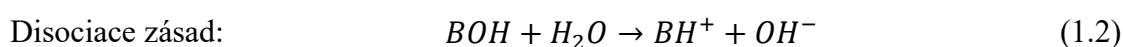
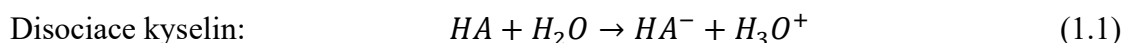
ÚVOD

Disociační konstanta představuje významný chemický parametr určující sílu kyseliny nebo zásady, který je nezbytný pro pochopení základních chemických a biochemických reakcí. Na hodnotě disociační konstanty závisí rozpustnost a lipofilita dané molekuly, což ovlivňuje, za jakých podmínek bude docházet k absorpci, distribuci a vylučování této molekuly z těla. Proto hraje disociační konstanta významnou roli především při výrobě léčiv či doplňků stravy. V současné době je k jejímu stanovení využíváno široké spektrum chemických metod, některé z nich jsou však zdlouhavé, finančně nákladné či vyžadují specifické požadavky na zkoumaný vzorek. Isotermální titrační mikrokalorimetrie se tak při stanovení disociačních konstant nabízí jako vhodná alternativa již zažitých metod, neboť se jedná o metodu snadnou a přesnou, která neklade vysoké nároky na požadované vlastnosti zkoumaného vzorku. Další nespornou výhodou isotermální titrační mikrokalorimetrie pro stanovení disociačních konstant je současné stanovení vazebné konstanty a vazebné entalpie, práce s nízkými koncentracemi roztoků a malými objemy roztoků. Tato metoda by tedy byla vhodná pro stanovení látek málo rozpustných ve vodě, popř. drahých sloučenin, jak na jejich přípravu nebo nákup.

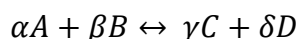
I. TEORETICKÁ ČÁST

1 DISOCIACE

Chemická disociace je jev, při němž dochází ke štěpení látky vlivem rozpouštědla (vody) na menší částice (kationty a anionty). Na základě disociace je možné stanovit disociační konstantu a tím pak sílu kyseliny nebo zásady. [1] Disociace kyseliny nebo zásady je procesem, při němž se rozpouštěná látka i rozpouštědlo na sebe snaží vázat uvolněný kation vodíku. Výsledek ovlivňuje ochota látek vodík odštěpit (kyselost), stejně jako ochota látek vodík přijmout (zásaditost). [2]



Při chemické disociaci dochází k ustanovení rovnovážného stavu, který je charakterizován rovnovážnou konstantou K_c . Tuto konstantu lze spočítat pomocí rovnice vycházející z obecné chemické reakce:



Kde A , B , C , D jsou symboly chemických látek (A , B jsou výchozí látky a C , D jsou produkty), symboly α , β , γ , δ značí stechiometrické koeficienty. [3]

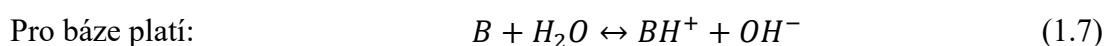
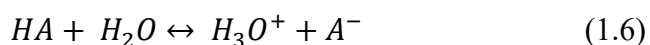
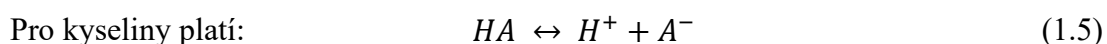
Rovnice pro výpočet rovnovážné konstanty je pak odvozena jako:

$$K_c = \frac{[C]^\gamma \cdot [D]^\delta}{[A]^\alpha \cdot [B]^\beta} \quad (1.4)$$

1.1 Teorie kyselin a zásad

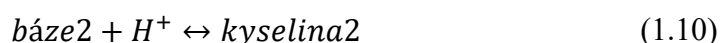
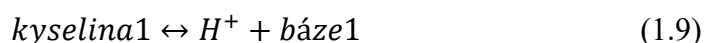
Arrheniova teorie

Z Arrheniovy teorie vyplývá, že kyselina je látkou schopnou odštěpit kation vodíku H^+ , zatímco zásada je schopna odštěpit hydroxidový aniont OH^- . Tato teorie je však omezena pouze na reakce ve vodném prostředí. [4]



Brønsted-Lowryho teorie

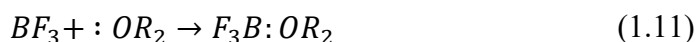
V roce 1923 chemici Nicolaus Brønsted a Thomas Martin Lowry vytvořili teorii týkající se kyselin a zásad založenou na schopnosti přijímat nebo odevzdávat kation H^+ . Na základě tohoto principu je kyselina definována jako donor vodíku, je tedy schopna vodík odštěpit, zatímco zásada představuje akceptor neboli příjemce vodíku. K uvolnění vodíku z kyseliny dochází pouze za přítomnosti zásady, která konjugovaný kation vodíku přijme. Tato zásada se tak stane kyselinou, která s druhou zásadou tvoří první konjugovaný pár, a zároveň první kyselina, která uvolní vodík, se stane zásadou, která vytvoří s druhou kyselinou druhý konjugovaný pár. Podle rovnice (1.9) jsou kyselina1 a báze1 konjugovanými páry stejně tak jako báze2 a kyselina2 v rovnici (1.10). Konjugovaným párem je tedy dvojice částic lišících se o proton (H^+). [4]



Pro každou Brønsted-Lowryho kyselinu existuje konjugovaná zásada a naopak. [4]

Lewisova teorie

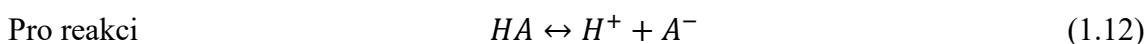
Podle Lewisovy teorie může kyselina přijmout elektronový pár od zásady a stejně tak může báze darovat svůj elektronový pár kyselině. Příkladem je reakce kyseliny BF_3 se zásadou ROR (ether) [4]:



1.2 Disociační konstanta

1.2.1 Disociace kyselin a zásad

Disociační konstanta je významným chemickým parametrem sloužícím k učení síly kyseliny nebo zásady. Jsou-li kyselina nebo zásada rozpouštěny ve vodě, zpravidla disociují na anionty a kationty. Rozsah disociace závisí na síle dané kyseliny nebo báze. Jako silná kyselina se označuje taková, která disociuje úplně (například HCl), zatímco slabá kyselina disociuje pouze částečně (například CH₃COOH). [4]



lze disociační konstantu kyseliny spočítat dle vzorce [5]:

$$K_a = \frac{[A^-][H^+]}{[HA]} \quad (1.13)$$

Hodnoty K_a se však pohybují ve velmi širokém rozpětí, proto je síla kyselin v praxi popisována pomocí hodnoty pK_a , což je záporný dekadický logaritmus hodnoty K_a :

$$pK_a = -\log K_a \quad (1.14)$$

Platí, že čím vyšší hodnotu K_a a zároveň čím nižší hodnotu pK_a má kyselina, tím je silnější. [5] Dále také platí, že zásada, jejíž konjugovaná kyselina je slabší (má vyšší pK_a), je silnější zásadou. [6]

Disociační konstantu zásady K_b lze spočítat obdobně jako u kyselin [5]:

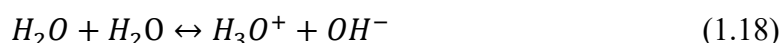


$$K_b = \frac{[OH^-][B^+]}{[BOH]} \quad (1.16)$$

$$pK_b = -\log K_b \quad (1.17)$$

1.2.2 Disociace vody

Voda je označována jako amfolyt, neboť má zároveň vlastnosti kyseliny i zásady. Dvě molekuly vody společně reagují za vzniku oxoniového kationtu a hydroxidového aniontu, které navzájem s původními molekulami vody tvoří konjugované páry. Tento jev je označován jako autoprotolýza vody. [7]



Rovnovážná konstanta této reakce se nazývá iontový součin vody a značí se K_v . Lze ji spočítat pomocí rovnovážné konstanty reakce K_c [7]:

$$K_c = \frac{[H_3O^+][OH^-]}{[H_2O]^2} \quad (1.19)$$

Platí, že:
$$K_v = K_c \cdot [H_2O]^2 = [OH^-][H_3O^+] \quad (1.20)$$

$$K_v = 10^{-14} \text{ mol}^2 \cdot \text{l}^{-2} \quad (1.21)$$

1.2.3 Stupeň disociace

Stupeň disociace udává poměr počtu disociovaných molekul k celkovému počtu molekul účastnících se reakce a je závislý na koncentraci kyseliny v roztoku. Jedná se o bezrozměrnou veličinu, která se značí symbolem α . Lze jej stanovit podle rovnice [7][8]:

$$\alpha = \frac{(c_1 - c_0)}{c_0} = \frac{\Delta c}{c_0} \quad (1.22)$$

Kde c_0 je počáteční koncentrace kyseliny, c_1 je koncentrace kyseliny po ustanovení rovnováhy a Δc je pokles koncentrace kyseliny (oproti c_0). Pomocí stupně disociace lze také stanovit hodnotu disociační konstanty [7][8]:

$$K_a = \frac{(\Delta c)^2}{(c_0 - \Delta c)} = \frac{c_0 \cdot \alpha^2}{(1 - \alpha)} \quad (1.23)$$

$$pK_a = -\log \frac{c_0 \alpha^2}{(1 - \alpha)} \quad (1.24)$$

1.2.4 Příklady disociačních konstant slabých kyselin a zásad

Tabulka 1- Hodnoty disociačních konstant vybraných kyselin [9]

Název kyseliny	pK_a
kyselina mravenčí	3,75
kyselina octová	4,76
kyselina glykolová	3,83
kyselina maleinová	1,92
kyselina L-glutamová	2,13
kyselina L-askorbová	4,04
kyselina benzoová	4,20
kyselina mléčná	3,86
kyselina citronová	3,13
kyselina šťavelová	1,25

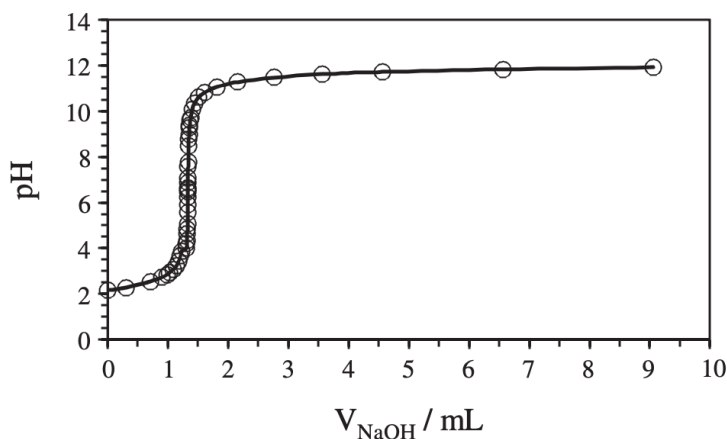
Tabulka 2 - Hodnoty disociačních konstant vybraných zásad [9]

Název zásady	pK_a
amoniak	9,25
methylamin	10,66
anilin	4,87
ethylamin	10,65
pyridin	5,23
morfin	8,21
glycerol	14,15
difenylamin	0,79
piperidin	11,12
acetamid	15,10

1.2.5 Metody stanovení disociační konstanty

Potenciometrie

Jednoduchost a nízká cena dělají z potenciometrické titrace jednu z nejpoužívanějších metod sloužících ke stanovení hodnoty disociační konstanty. Při této metodě je postupně přidáván známý objem reakčního činidla k roztoku analytu, přičemž je neustále měřena změna potenciálu reakce pomocí dvou elektrod – indikační a referenční. Většinou bývají tyto elektrody zkombinovány v tzv. pH elektrodu. Při stanovení slabých kyselin platí, že jsou-li při této metodě použity roztoky o známém pH, zjištěný potenciál může být lineárně převeden na hodnotu pH, která odpovídá hodnotě pK_a . Nevýhodou potenciometrické titrace je nutná koncentrace nejméně $10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a také skutečnost, že se nehodí pro látky s nízkou rozpustností ve vodě. [10]

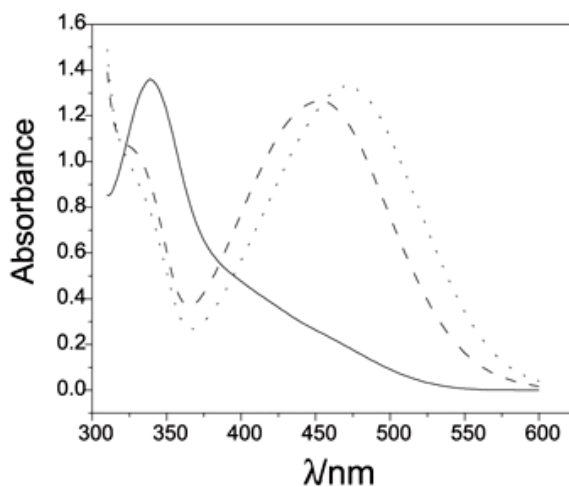


Obrázek 1: Příklad potenciometrického stanovení kyseliny askorbové [11]

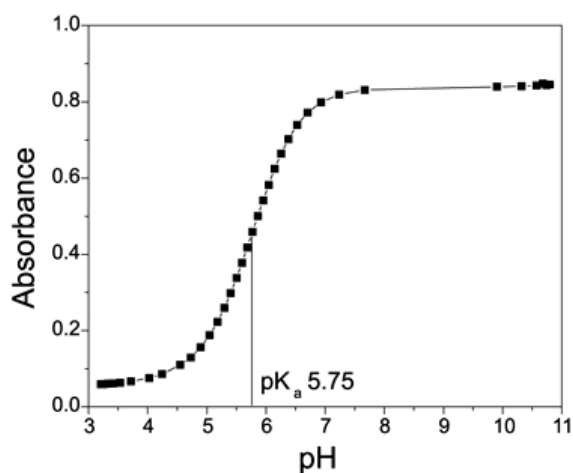
Spektrofotometrie

Alternativou k potenciometrické titraci je spektrofotometrie v UV-VIS oblasti, která oproti potenciometrii dokáže analyzovat sloučeniny s nižší rozpustností a pracovat s nižšími koncentracemi vzorku. Hlavní výhodou je vyšší citlivost ($> 10^6 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$) ke sloučeninám s příznivými molárními absorpčními koeficienty, které charakterizují schopnost látky absorbovat elektromagnetické záření. Sloučenina však musí obsahovat UV aktivní chromofor. Spektrální data (intervaly vlnových délek, které jsou zachycovány do oddělených obrazových pásem) jsou průběžně zaznamenávána spektrofotometrem obsahujícím detektor s diodovým polem. Obvykle bývá měřena absorpce dvou různých vlnových délek při měnícím se pH. Poměr absorpcí při těchto dvou vlnových délkách je

vynesen do grafu v závislosti na pH a tímto způsobem je získána sigmoidální křivka, z jejíhož inflexního bodu lze stanovit hodnotu pK_a . Jedna z vlnových délek musí být přiřazena chromoforu a druhá vlnová délka by měla být při změně pH neměnná. Použitím druhé vlnové délky jako reference nebude experiment ovlivněn změnou celkové koncentrace. Spektrofotometrické metody nabízejí vynikající přesnost, ale vyžadují znalost specifického spektra, které je charakteristické pro každou látku. Také platí, že používaná činidla musí být čistá, případně mohou obsahovat pouze nečistoty, které neabsorbují UV světlo. [13]



Obrázek 2: Příklad absorpčního spektra [13]



Obrázek 3: Příklad výsledného grafu získaného spektrofotometrickým stanovením pK_a [13]

Konduktometrie

Konduktometrie je založena na schopnosti roztoku elektrolytu vést elektrický proud. Při určování disociační konstanty pomocí konduktometrické metody je využíváno toho, že silné elektrolyty kompletně disociují při různých koncentracích, zatímco slabé elektrolyty dosáhnou úplné disociace pouze při nekonečném zředění. Měřením vodivosti vzorku tak lze získat hodnotu, která je součtem vodivostí všech iontů v roztoku. [10]

$$\Lambda = \sum \lambda_i \quad (1.25)$$

Zde Λ znamená ekvivalentní vodivost, λ_i představuje vodivost iontu.

Λ je měřitelnou veličinou a Λ^0 lze získat extrapolací z grafu závislosti ekvivalentní vodivosti na druhé odmocnině koncentrace roztoku. Ekvivalentní vodivost závisí na množství iontů v roztoku a dosahuje své limitní hodnoty Λ^0 při nekonečném zředění. Stupeň disociace pak lze určit pomocí rovnice [10]:

$$\alpha = \frac{\Lambda}{\Lambda^0} \quad (1.26)$$

Poté může být zjištěna zdánlivá disociační konstanta K' pomocí Ostwaldova zředovacího zákona [10]:

$$K' = \Lambda^2 \cdot c / [\Lambda^0 \cdot (\Lambda^0 - \Lambda)] \quad (1.27)$$

Konduktometrie představuje relativně spolehlivou a rychlou metodu stanovení disociační konstanty při dosažení vysoké přesnosti s odchylkou $\pm 0,01 - 0,03$. Hlavní nevýhodou této metody je její nespecifičnost, což znamená, že nemohou být různé ionty měřeny samostatně. Proto se při konduktometrii musí pracovat výhradně s čistými sloučeninami. [10]

Voltametrie

Při této metodě na analyzovaný roztok působí měnící se napětí, přičemž sledovanou veličinou je výsledný proud. Typická voltmetrická sestava je tvořena třemi elektrodami: referenční, pracovní a pomocnou. Pracovní a pomocná elektroda mají funkci anody a katody, zatímco referenční elektroda slouží jako výchozí bod pro měření vyvíjeného napětí. Moderní voltmetrické metody jsou velmi citlivé se schopností měřit i při velmi nízkých koncentracích roztoků. V zásadě se jedná o měření elektrické odezvy molekul. Je však nutné použít porovnávací vzorek. Posun píku u porovnávacího vzorku oproti vzorku měřenému je pak využit ke stanovení disociační konstanty. Voltametrie není typickou metodou

používanou ke stanovení disociačních konstant, a to především z důvodu nutnosti vzorku, který obsahuje elektro-aktivní molekuly rozpustné ve vodivém rozpouštědle. [10]

NMR titrace

Ke stanovení disociační konstanty může být využita metoda NMR titrace. Sleduje se změna chemického posunu protonů v ^1H NMR spektru, která je závislá na množství, tj. koncentraci aniontů v analyzovaném roztoku. Při měření se postupně zvyšuje koncentrace aniontů v roztoku a po každém přidavku se změní ^1H NMR spektrum. Ze získaných hodnot chemických posunů lze pomocí titrační křivky vypočítat disociační konstantu. [13] Výhodou NMR je plná automatizace procesu, mezi hlavní nevýhody patří nutnost rozpuštění vzorku v deuterovaném rozpouštědle a vysoká pořizovací cena přístroje. [14]

Isotermální titrační mikrokalorimetrie (ITC)

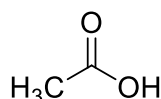
Všechny kalorimetrické metody fungují na stejném principu, kdy v analyzovaném vzorku probíhá fyzikální nebo chemický proces, při kterém se měří množství uvolněného nebo spotřebovaného tepla. Měření hodnot pK_a pomocí ITC probíhá pomocí acidobazické titrace. Ta probíhá v adiabatickém plášti uvnitř kalorimetru, kdy je měřena energie potřebná k udržení konstantní teploty pláště. [15] Výhoda ITC ve stanovení disociační konstanty kyselin spočívá v současném stanovení vazebné konstanty a enthalpie. Disociační konstantu lze vypočítat z vazebné konstanty a teplotní závislost pK_a je možné stanovit pomocí enthalpie. [16] Využití ITC ke studiu protonačních reakcí je méně časté ve srovnání s běžnější aplikací této metody za účelem studia makromolekul a ligandů. V posledních letech bývá metoda ITC používána ke stanovení disociačních konstant peptidů a vlivu pH na vazby na specifické ionizovatelné skupiny. Metoda ITC bývá nazývána „zlatým standardem“ pro charakterizaci biomolekulárních interakcí. [15]

2 POTRAVINÁŘSKY VÝZNAMNÉ SLABÉ ORGANICKÉ KYSELINY

Slabými jsou nazývány kyseliny, které na rozdíl od silných kyselin ve vodném prostředí disociují pouze částečně. [4] Takovéto organické kyseliny jsou široce využívány v potravinářském průmyslu, zejména jako konzervační látky potravin a nápojů. [17]

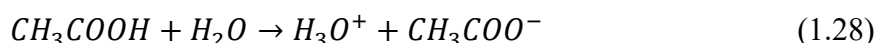
2.1 Kyselina octová

Kyselina octová (CH_3COOH), známá také jako kyselina ethanová, je jednou z nejvýznamnějších karboxylových kyselin. [18] Jedná se o čirou bezbarvou kapalinu s dráždivým octovým zápachem, bodem tání $16,73\text{ }^\circ\text{C}$ a bodem varu $117,9\text{ }^\circ\text{C}$. Komerčně je prodávána pod názvem ledová kyselina octová s koncentrací 98 % a zároveň s méně než 1 % vody (případné nečistoty vyplývají z procesu, kterým byla kyselina získána). Hustota kyseliny je $1,0491\text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$ při $20\text{ }^\circ\text{C}$. [18]



Obrázek 4: Strukturální vzorec kyseliny octové [18]

Jedná se o vysoce hygroskopickou kapalinu velmi dobře rozpustnou ve vodě, jejíž disociační konstanta činí 4,76. [9][18] Disociaci kyseliny octové lze popsat následující rovnicí [4]:



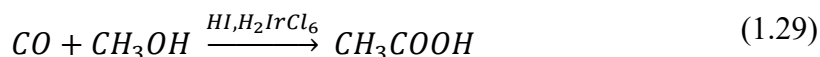
2.1.1 Výroba

Kyselina octová může být produkována přírodní nebo chemickou cestou v závislosti na účelu jejího dalšího využití. [20]

Karbonylace methanolu

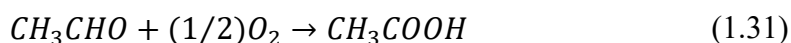
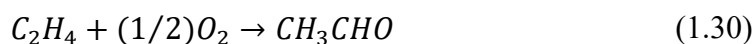
Nejpoužívanějším syntetickým způsobem vedoucím k získání kyseliny octové je karbonylace methanolu procesem vyvinutým společností Monsanto. Při karbonylaci reagují metanol a oxid uhelnatý v kapalně fázi za přítomnosti katalyzátoru na bázi rhodia při teplotě $150\text{--}200\text{ }^\circ\text{C}$ a tlaku $3\cdot 10^6\text{--}5\cdot 10^6\text{ Pa}$. Vzniká kyselina octová s výtěžkem 95 % a s 5 % vedlejších produktů, jako jsou kyselina mravenčí a formaldehyd, promotorem reakce je zde jodovodík. Reakce probíhá v kapalně fázi s methylacetátem jako rozpouštědlem. Pro reakci

je také potřebné regulovat množství vody, na němž je závislá rychlost reakce. Vedlejšími produkty reakce jsou H_2 , CO_2 a methanol, které jsou následně zpětně využity. Tento proces byl časem modifikován použitím iridia místo rhodia jako katalyzátoru a vešel ve známost jako tzv. Cativa proces [20]:



Oxidace acetaldehydu

Nejprve je oxidací ethylenu připraven acetaldehyd za použití palladia a chloridu měďnatého jako katalyzátoru. Acetaldehyd je poté oxidován při tlaku $5 \cdot 10^6$ Pa a teplotě 150 °C za vzniku kyseliny octové [21]:



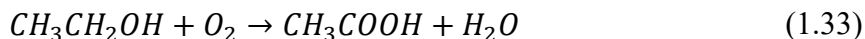
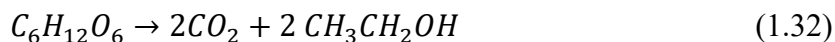
Může být také uplatněn jednostupňový proces přeměny ethylenu na kyselinu octovou za použití olova a platiny jako katalyzátoru při vysokém tlaku. Ve srovnání s oxidací acetaldehydu je však výtěžek kyseliny octové při tomto jednostupňovém procesu velmi nízký. [21]

Oxidace uhlovodíků

Uhlovodíky odvozené z ropných látek, jako jsou butan a nafta, jsou využívány k výrobě kyseliny octové za použití katalyzátorů octanu kobaltnatého a octanu chromitého. Reakce probíhá při poměrně širším teplotním rozmezí (150 – 230 °C) a tlaku ($5 \cdot 10^6$ – $6 \cdot 10^6$ Pa). Tento proces využívá přítomnosti ropných surovin, které obsahují uhlovodíkovou směs, což vede k tvorbě dalších vedlejších produktů, jako jsou aceton, kyselina mravenčí či kyselina propionová. Tímto procesem ovšem nedochází k produkci čisté kyseliny octové. [20]

Fermentace

Fermentační způsob je většinou využíván k získání potravinářské kyseliny octové neboli octa. Tento proces zahrnuje využití obnovitelného uhlíku ze zdrojů, jako jsou například jablka, hrozny, hrušky nebo datle, sirupové cereálie, a dále využívá bakterií octového kvašení. [22] Nejpoužívanějšími rody jsou *Acetobacter* a *Gluconacetobacter*. [20] Fermentační proces zahrnuje dva kroky. V prvním kroku kvasinky *Saccharomyces cerevesiae* konvertují zkvasitelné cukry na ethanol a oxid uhličitý. Ve druhém kroku převedou bakterie octového kvašení (*Acetobacter acetii*) ethanol na kyselinu octovou a vodu [23]:



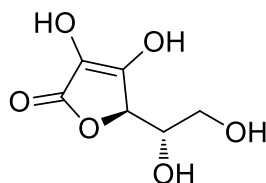
Po dokončení procesu je provedena separace produktů centrifugací, směs kyseliny octové a vody je oddělena destilací. [22] Cena octa se liší podle druhu použitého zdroje a oblasti, kde je vyráběn. [20]

2.1.2 Využití

V EU je kyselina octová využívána v potravinářství pod značkou E 260. Používá se jako přírodní konzervační a antimikrobiální činidlo nejen při sterilaci zeleniny, ale i jako aktivní složka jedlých filmů sloužících k prodloužení trvanlivosti potravin. Přidává se do majonézy jako ochrana proti bakterii rodu *Salmonella*, využívá se také jako okyselující látka, která dodává potravinám charakteristický chuťový profil. Kyselina octová a její anhydrid jsou široce používány při výrobě modifikovaných škrobů, které jsou využívány jako stabilizátory a emulzifikátory v potravinářských výrobcích. [24] Kromě potravinářského průmyslu lze kyselinu octovou využít i jiných odvětvích, jako je například zpracovatelský průmysl. Zde se z kyseliny octové vyrábí monomer vinylacetát, který lze později použít k výrobě polyvinylacetátu, acetátu celulózy a k výrobě dalších sloučenin, které tvoří důležité složky v barvách a lepidlech. Také se kyselina octová používá při výrobě esterů, z nichž jsou následně vyráběny inkousty. [25]

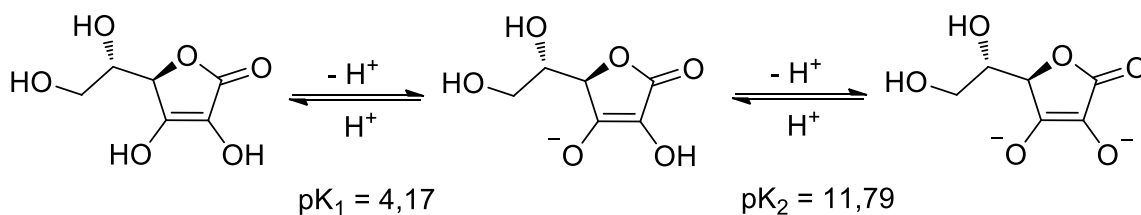
2.2 Kyselina L-askorbová

Kyselina L-askorbová, známá také jako vitamin C, patří mezi deriváty D-glukosy. Chemická struktura představuje γ -laktonový kruh obsahující konfiguraci endiolu ($-\text{COH}=\text{COH}$) navázaného na karbonylovou skupinu. [26]



Obrázek 5: Strukturální vzorec kyseliny L-askorbové [26]

Vyskytuje se ve formě bílého nebo slabě žlutého prášku s mírně kyselou chutí, dobře rozpustného ve vodě, špatně rozpustného v alkoholu a nerozpustného v chloroformu. Při vystavení světlu postupně tmavne. Molární hmotnost kyseliny činí $176,13 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, bod tání je $189\text{--}193 \text{ }^\circ\text{C}$. [26]

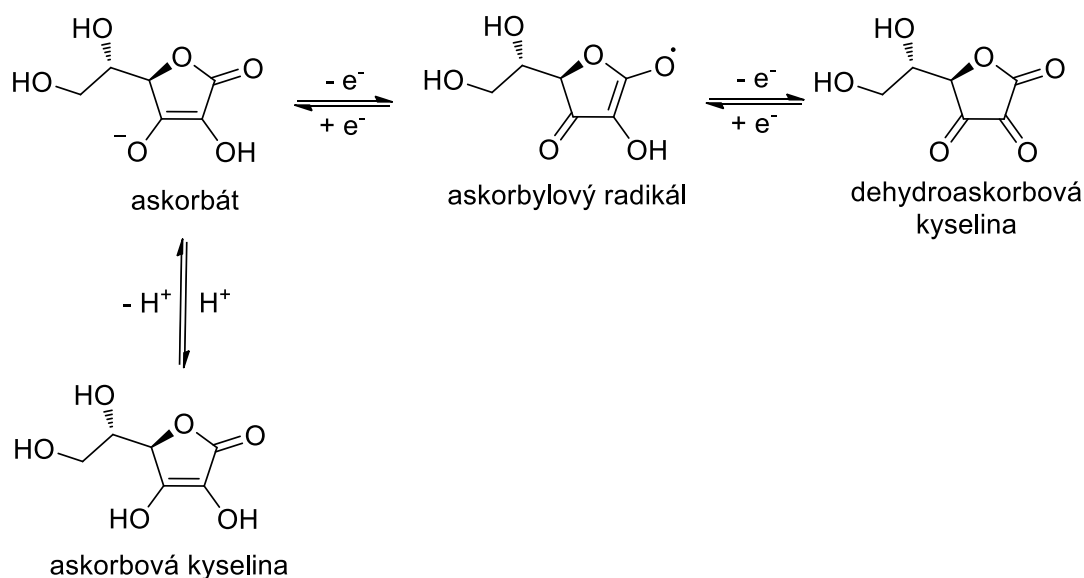


Obrázek 6: Schéma disociace kyseliny L-askorbové (upraveno dle [27])

Kyselina L-askorbová je produkována rostlinami a některými druhy zvířat, ovšem ne lidmi či jinými primáty. Ti ji musí přijímat pouze stravou. [26] V důsledku přítomnosti dvou enolových hydroxylových skupin vykazuje tato kyselina značně kyselý charakter. Protože snadno podléhá oxidaci, je významným redukčním činidlem, uplatňujícím se v mnoha extracelulárních i intracelulárních procesech probíhajících v organismu. [28][29] Funguje jako enzymatický kofaktor pro mnoho enzymů a slouží jako donor elektronů monooxygenáz a dioxygenáz. Také se uplatňuje jako silný antioxidant, stimuluje imunitní odpověď a podílí se na syntéze kolagenu, karnitinu a neurotransmiterů. Nedostatečný příjem kyseliny askorbové je spojen s onemocněním zvaným kurděje. [26]

V suchém stavu je kyselina na vzduchu stabilní, v roztoku reverzibilně oxiduje na kyselinu dehydroaskorbovou, čímž vzniká askorbylový radikálový anion známý jako

semidehydroaskorbát. Kyselina dehydroaskorbová má plnou aktivitu vitamínu C, protože je v organismu snadno redukována na kyselinu askorbovou. [26]



Obrázek 7: Schéma oxidace kyseliny L-askorbové (upraveno dle [29])

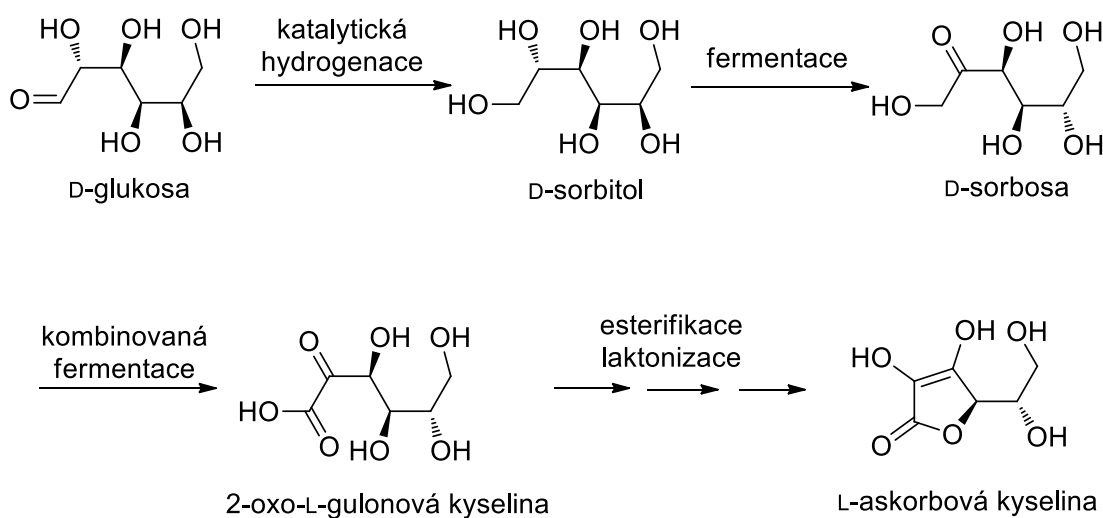
2.2.1 Význam

Jednou z nejdůležitějších vlastností kyseliny askorbové jsou její redukční schopnosti. V přítomnosti kyslíku má tendenci silně oxidovat, může tak reagovat s volnými radikály a zastavit jejich řetězové reakce, které by vyvolaly nebezpečné účinky na organismus. Také stabilizuje ostatní důležité biologicky aktivní látky, jako jsou vitamin A, E, kyselina listová a thiamin. Je rovněž nezbytná pro syntézu kolagenu, důležitá pro hojení ran a slouží k prevenci krvácení. [30] Neschopnost biosyntézy kyseliny L-askorbové v lidském organismu je způsobena nedostatkem terminálního aromatického enzymu L-gulono-1,4-laktonoxidázy. Tento oxidační enzym je nutný v posledním kroku přeměny L-gulono- γ -laktonu na 2-oxo-L-gulono- γ -lakton, který je tautomerem kyseliny L-askorbové a spontánně se sám transformuje na vitamin C. Vysoké koncentrace vitamínu C se nacházejí v ovoci, jako jsou pomeranče, grapefruity, mandarinky, citrony, limety, papája, jahody a meloun. Také mnoho druhů zeleniny obsahuje vitamín C, například rajčata, brokolice, paprika či listová zelenina. [31]

2.2.2 Výroba

Na počátku 30. let 20. století byla pro syntézu kyseliny askorbové vyvinuta Reichstein-Grüssnerova metoda. Zde je jako výchozí materiál použita D-glukóza, která je katalytickou dehydrogenací převedena na D-sorbitol. Ten je poté biokonvertován na L-sorbózu pomocí

mikroorganismu *Gluconobacter* spp. Následně je L-sorbóza v několika krocích oxidována na 2-keto-L-gulonovou kyselinu, která je nakonec přeměněna na kyselinu askorbovou procesem laktonizace. Reichstein-Grüssnerova metoda je však vysoce energeticky náročná a závisí na použití řady toxických chemikálií. Proto byla vyvinuta mikrobiální metoda na principu fermentace, která se stala mnohem atraktivnější díky své nízké ceně a vyšší ekologičnosti. Dvoustupňový proces fermentace lze svým způsobem považovat za vylepšenou Reichstein-Grüssnerovu metodu. V prvním kroku je fermentována L-sorbóza a ve druhém pak 2-oxo-L-gulonová kyselina. [32]



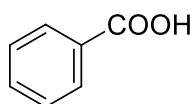
Obrázek 8: Dvoustupňová fermentace kyseliny L-askorbové (upraveno dle [30])

2.2.3 Využití

Silná antioxidační aktivita kyseliny askorbové přiměla průmyslová odvětví k vývoji přísad za účelem použití této látky v různých potravinářských výrobcích. Existuje mnoho přídatných látek na bázi kyseliny askorbové: samotná kyselina askorbová (E300), soli askorbát sodný (E301), askorbát vápenatý (E302) a askorbát draselný (E303) či lipofilní ester askorbylpalmitát (E304). Tyto přídatné látky nachází uplatnění při výrobě piva, želatiny, džemu, cukrovinek, chleba a pekařských výrobků, ovocných džusů i k prodloužení trvanlivosti masa a rybích produktů. [31]

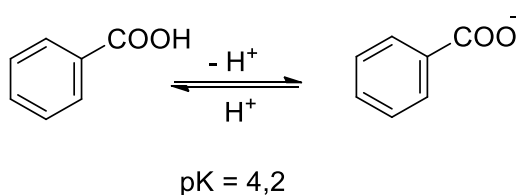
2.3 Kyselina benzoová

Kyselina benzoová je nejjednodušší aromatickou karboxylovou kyselinou s jednou karboxylovou skupinou navázanou na benzenový kruh. Jedná se o bezbarvý nebo bílý prášek, který může být bez zápachu či s mírným charakteristickým zápachem. [33]



Obrázek 9: Strukturální vzorec kyseliny benzoové [33]

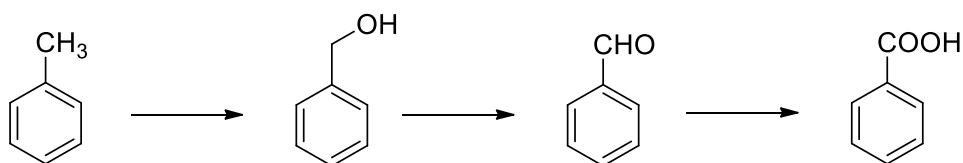
Vykazuje teplotu tání 122 °C a bod varu 249 °C. Tato kyselina je špatně rozpustná, ovšem její sodná sůl (benzoan sodný) je ve vodě vysoce rozpustná a používá se jako konzervační prostředek k potlačení růstu kvasinek. Kyselina benzoová a mnoho jejích derivátů se vyskytují jako běžné metabolity v rostlinách, živočiších a také jsou obsaženy v rozličných potravinách. [32] Disociační konstanta kyseliny benzoové ve vodě nabývá hodnoty 4,2. [33][34]



Obrázek 10: Schéma disociace kyseliny benzoové [35]

2.3.1 Výroba

Hlavní postup průmyslové výroby kyseliny benzoové je založen na oxidaci toluenu v přítomnosti kovového katalyzátoru za vysokého tlaku a teploty (obvykle 140–165 °C). Tento proces je energeticky náročný a neekologický, neboť toluen je získáván z neobnovitelných surovin, fosilních paliv. Existují sice přirozené cesty pro biosyntézu kyseliny benzoové, jsou však často neefektivní a podléhají složité regulaci. [36]



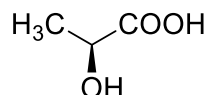
Obrázek 11: Schéma oxidace toluenu (upraveno dle [37])

2.3.2 Využití

Kyselina benzoová, její soli a další deriváty jsou klasifikovány jako potravinářské přídatné látky, zejména jako konzervační látky a látky určené k aromatizaci. Nedisociovaná forma kyseliny benzoové je neúčinnější jako antimikrobiální činidlo, přednostně jsou tedy jako přídatné látky využívány její soli, zejména benzoan sodný. Antimikrobiální aktivita kyseliny benzoové a benzoanů byla zkoumána vůči širokému spektru mikroorganismů způsobujících znehodnocování potravin a bylo prokázáno, že jsou účinné proti kvasinkám a plísním patřícím k rodům *Aspergillus*, *Penicillium*, *Eurotium*, *Debaryomyces*, *Saccharomyces*, *Pichia*, *Candida*, *Kloeckera*, *Kluyveromyces* a *Zygosaccharomyces*. Také ničí bakterie *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus plantarum*, *Leuconostoc dextranicum* a *Leuconostoc mesenteroides*. Kyselina benzoová bývá používána jako ochucující látka v potravinách, kde je schopna zvýšit vnímání sladkosti, snížit vnímání kyselosti a slanosti a výrazně snížit hořkost. [33]

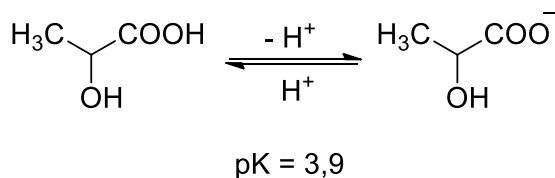
2.4 Kyselina mléčná

Kyselina mléčná (2-hydroxypropionová, 2-hydroxypropanová) je nejčastěji se vyskytující hydroxykarboxylovou kyselinou. Jedná se o nažloutlou kapalinu bez zápachu s bodem varu 53 °C. Je velmi dobře mísitelná s vodou [38]:



Obrázek 12: Strukturální vzorec kyseliny L-mléčné [38]

Kyselina mléčná obsahuje chirální uhlík, díky němuž je kyselina mléčná opticky aktivní a vyskytuje se proto ve dvou opticky aktivních formách, kterými jsou L(+)-kyselina mléčná a D(-)-kyselina mléčná, nebo v racemické formě, což je směs kyselin L(+)-mléčné a D(-)-mléčné. Tyto dva izomery mají stejné fyzikální vlastnosti (bod tání, rozpustnost, disociační konstanta, hustota atd.) i stejné chemické vlastnosti. Kyselina L-mléčná se však v živých organismech nachází častěji než kyselina D-mléčná. V lidském těle je produkována při svalové kontrakci a také je výhodnější pro použití v potravinách a v medicíně, neboť metabolická přeměna kyseliny L-mléčné v těle probíhá rychleji než u kyseliny D-mléčné. [38] Disociační konstanta kyseliny mléčné je 3,9. [9]



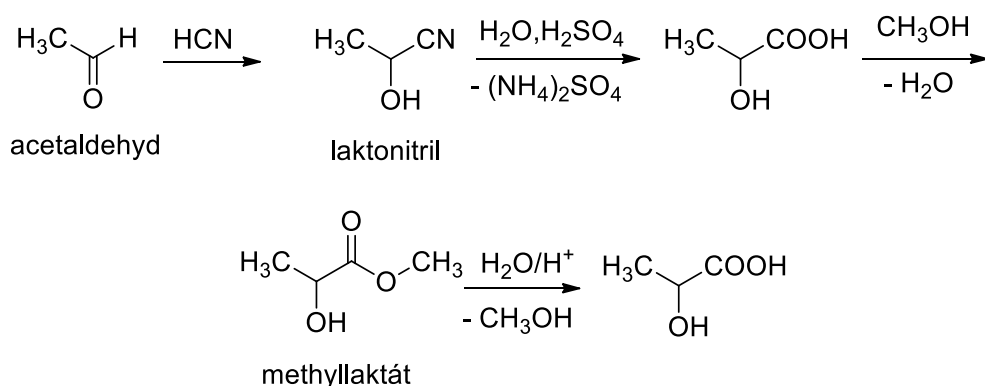
Obrázek 13: Schéma disociace kyseliny mléčné [38]

2.4.1 Výroba

Chemická syntéza

Výroba kyseliny mléčné chemickou syntézou probíhá přes laktonitril, kdy je kyanovodík přidáván do kapalného acetaldehydu v přítomnosti bazického katalyzátoru za vysokého tlaku. Vzniklý laktonitril je poté izolován, vydestilován a nakonec hydrolyzován pomocí kyseliny sírové za vzniku kyseliny mléčné a síranu amonného. Kyselina mléčná je následně esterifikována methanolem a vzniklý methyllaktát je izolován, přečištěn destilací a hydrolyzován okyselenou vodou za vzniku kyseliny mléčné a methanolu. Methanol je

oddělen destilací a recyklován. Chemická syntéza je ovšem drahá a závislá na fosilních surovinách. Proto je k výrobě kyseliny mléčné využívána především fermentace. [38]



Obrázek 14: Schéma chemické syntézy kyseliny mléčné [38]

Fermentace

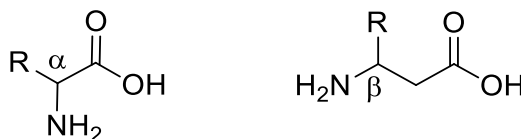
Tento způsob výroby pokrývá až 90 % produkce kyseliny mléčné. Proces fermentace je charakterizován biologickou degradací substrátu (glukózy) pomocí mikroorganismů na metabolity, jako jsou ethanol, kyselina citrónová a kyselina mléčná. Při výrobě kyseliny mléčné lze použít několik druhů mikroorganismů a substrátů. Vysoce čistých fermentačních produktů lze dosáhnout především za použití čistých substrátů, jako je sacharóza z cukrové třtiny a cukrové řepy, což vede ke snížení nákladů na čištění produktu. [38]

2.4.2 Využití

V potravinářském průmyslu je tato kyselina využívána jako okyselující prostředek díky své mírně kyselé chuti ve srovnání s jinými kyselinami používanými při výrobě potravin. Používá se také jako regulátor pH a inhibitor zbytkových bakterií při zpracování potravin, jako jsou sladkosti, nealkoholické nápoje, pivo a další produkty. Je nezbytnou přísadou ve fermentovaných potravinách, například v jogurtech či v konzervované zelenině. Kyselina mléčná nachází uplatnění také v textilním průmyslu jako mořidlo pro barvení a může nahradit ethylenglykol v nemrznoucí směsi. Deriváty, soli a estery kyseliny mléčné se využívají jako rozpouštědla, emulgátory a změkčovadla. Ve farmaceutickém průmyslu je využívána v implantátech, pilulkách a systémech řízeného uvolňování léčiva. Je oblíbenou složkou kosmetických produktů díky svým zvlhčujícím, antimikrobiálním a omlazujícím účinkům na pokožku. Používá se také ve výrobcích pro ústní hygienu. [38]

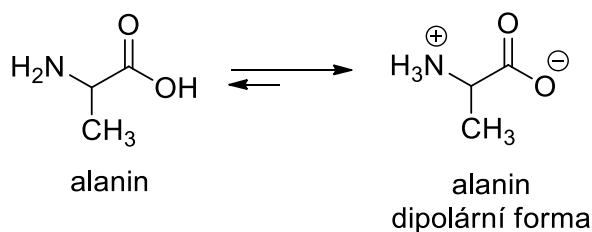
2.5 Aminokyseliny

Také aminokyseliny lze řadit mezi slabé kyseliny. Jedná se o substituční deriváty karboxylových kyselin, jež jsou základními stavebními prvky proteinů a významně určují jejich fyzikálně-chemické vlastnosti. [39] Jsou tvořeny aminoskupinou ($-\text{NH}_2$), karboxylovou skupinou ($-\text{COOH}$) a postranním řetězcem (R), které jsou navázány na centrální atom uhlíku, tzv. α uhlík. Právě rozdílná struktura postranního řetězce určuje odlišnost ve vlastnostech jednotlivých aminokyselin. [40] Aminokyseliny bývají označovány pomocí řeckých písmen α nebo β podle toho, jaké uspořádání mezi sebou zaujímají karboxylová skupina a aminoskupina. [41]



Obrázek 15: Obecné vzorce α a β aminokyselin [42]

V důsledku přítomnosti zásadité aminoskupiny a zároveň kyselé karboxylové skupiny v jedné v molekule, vykazují aminokyseliny vlastnosti amfolytů. To znamená, že reagují s látkami kyselé i zásadité povahy. [43] Při neutrálním pH jsou aminoskupina i karboxylová skupina ionizované a vykazují opačný náboj. V tomto stavu je tedy molekula dipolární, takzvaně zwitterionická. [41]



Obrázek 16: Zwitterionická forma aminokyseliny alanin (upraveno dle [41])

Hodnota pH, při které je aminokyselina elektroneutrální se nazývá isoelektrický bod (pI). Je-li aminokyselina v tomto stavu podrobena titraci kyselinou, dojde k protonizaci karboxylové skupiny. pH, při kterém platí, že koncentrace $[\text{COO}^-]$ je rovna koncentraci $[\text{COOH}]$, je definována jako pK_{al} (záporný logaritmus disociační konstanty kyseliny K_1). Stejně tak platí, že je-li zwitterionická aminokyselina titrována zásadou, NH_3^+ skupina se

stává deprotonizovanou a pH, kdy koncentrace $[\text{NH}_3^+] = [\text{NH}_2]$ lze vyjádřit jako pK_{a2} . [43]
Pro všechny neutrální aminokyseliny platí [41]:

$$pI = (pK_{a1} + pK_{a2})/2 \quad (1.34)$$

Pro kyselé aminokyseliny platí [43]:

$$pI = (pK_{a1} + pK_{a3})/2 \quad (1.35)$$

Pro bazické aminokyseliny platí [43]:

$$pI = (pK_{a2} + pK_{a3})/2 \quad (1.36)$$

Zde indexy 1, 2 a 3 odlišují disociační konstanty karboxylové skupiny, aminoskupiny a postranního řetězce. [43]

Stupeň ionizace v roztoku při jakémkoli pH může být určen pomocí Henderson-Hasselbachovy rovnice [43]:

$$pH = pK_a + \frac{[\text{konjugovaná báze}]}{[\text{konjugovaná kyselina}]} \quad (1.37)$$

2.5.1 Význam

Aminokyseliny jsou základními stavebními složkami proteinů. V přírodě existuje více než 700 volných aminokyselin, avšak pouze 20 základních (tzv. kódovaných) aminokyselin slouží jako stavební jednotky bílkovin. Tyto aminokyseliny bývají také označovány jako proteinogenní. Většinu z 20 proteinogenních aminokyselin je lidské tělo schopno nasyntetizovat samo. Devět z nich však musí být přijímáno výhradně potravou, neboť jsou syntetizovány pouze v rostlinách nebo v mikroorganismech. [41] Tyto aminokyseliny jsou nazývány esenciálními a řadí se zde: fenylalanin, valin, tryptofan, threonin, leucin, izoleucin, methionin, histidin a lysin. [44]

Tabulka 3 - Rozdělení kódovaných aminokyselin [41]

Neutrální aminokyseliny	alanin, asparagin, cystein, glutamin, glycin, izoleucin, leucin, methionin, fenylalanin, prolin, serin, threonin, tryptofan, tyrosin, valin
Kyselé aminokyseliny	aspartamová kyselina, glutamová kyselina
Zásadité aminokyseliny	histidin, lysin, arginin

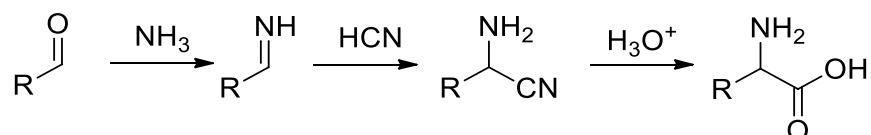
2.5.2 Výroba

Hydrolyza proteinů

Původní metodou pro výrobu aminokyselin je hydrolyza proteinů, jako metoda získávání L-aminokyselin má však nyní jen omezený význam, i když je stále relevantní pro výrobu L-serinu, L-prolinu, L-hydroxyprolinu a L-tyrosinu, není vhodná pro velkovýrobní produkci aminokyselin. [45]

Chemická syntéza

Aminokyseliny jsou synteticky připravovány sérií chemických reakcí známých jako Streckerova syntéza. Reakce vychází z aldehydu nebo ketonu, který kondenzuje s chloridem amonným v přítomnosti kyanidu draselného za vzniku α -aminonitrilu, který poté hydrolyzuje za zisku požadované aminokyseliny. Produktem chemické syntézy je však racemická směs a k zisku biologicky aktivní L-formy aminokyseliny je nutný další krok za užití imobilizovaného enzymu aminoacylázy produkovaného mikroorganismem *Aspergillus niger*. Kvůli vysokým výrobním nákladům druhého výrobního kroku je velmi málo aminokyselin (glycin, methionin) vyráběno chemickou syntézou. [45]



Obrázek 17: Streckerova syntéza α -aminokyselin [46]

Enzymová katalýza

Při enzymové katalýze je prekurzor aminokyseliny převeden na cílovou aminokyselinu pomocí jednoho nebo dvou enzymů. Tato metoda používá spíše čisté enzymy než enzymové systémy živých mikroorganismů, jako je tomu u metody fermentace. Například kyselina L-asparagová se vyrábí hlavně enzymově katalyzovaným přidavkem amoniaku ke kyselině fumarové. Protože je tímto způsobem vyrobena pouze přirozeně se vyskytující L-forma, není nutný další krok sloužící k rozlišení směsi, jako je tomu v předchozí metodě, kdy vzniká racemická směs aminokyselin. [45]

Fermentace

Tato metoda využívá mikroorganismů, které přeměňují živiny na různé životně důležité látky pro svou potřebu. Při fermentační metodě jsou do média ke kulturám mikroorganismů přidávány surové materiály, například sirupy. Proliferující mikroorganismy poté produkují aminokyseliny. Reakce je závislá na působení enzymů produkovaných mikroorganismy. Mikroorganismy obecně produkují až 20 druhů aminokyselin, ovšem pouze v množství, které samy potřebují. Děje se tak díky regulačním mechanismům, jichž jsou mikroorganismy schopny. Řízením těchto mechanismů je umožněno, aby byla cílová aminokyselina produkována ve velkém množství. [45] Fermentační proces zahrnuje následující kroky:

1. Fermentační nádrž je naplněna kultivačním médiem a sterilizována. Médium obsahuje vhodný zdroj uhlíku (například sirup z cukrové třtiny), stejně jako požadované zdroje dusíku, síry a fosforu a některé stopové prvky.
2. Semenná kultura produkčního kmene s menší velikostí dříve vypěstovaného ve fermentoru se přidá do fermentační nádrže a míchá se za stanovených podmínek (teplota, pH a provzdušňování).
3. V závislosti na požadavcích na kultivaci se během fermentace kontrolovaným způsobem přidávají další živiny, aby bylo dosaženo optimálního výtěžku. [47]

Výtěžek aminokyseliny závisí na množství a na vlastnostech působících enzymů. Obecně platí, že výsledný výtěžek se zvyšuje, jsou-li enzymy přítomny ve velkém množství a s jejich klesajícím obsahem se pak snižuje. Aminokyseliny L-fenylalanin, L-threoin a L-cystein lze získat fermentací s kmeny *E. coli*, téměř všechny proteinogenní aminokyseliny lze průmyslově vyrábět speciálně vyvinutými kmeny *Corynebacterium glutamicum*. [45]

2.5.3 Využití

Potravinářství

Aminokyseliny nachází v potravinářském průmyslu široké uplatnění. Do potravin mohou být přidávány za účelem zvýšení jejich nutriční hodnoty – jedná se především o rostlinné produkty charakteristické nízkým obsahem limitujících aminokyselin (například chléb obohacený o lysin či sójové výrobky obohacené o methionin). Jako konzervační složku při uchovávání sušeného mléka lze uplatnit tryptofan v kombinaci s histidinem. Fenylalanin a kyselina aspartamová tvoří dipeptid aspartam, který je používán jako nízkokalorická alternativa k umělému sladidlu v nealkoholických nápojích. Cystein bývá využíván jako

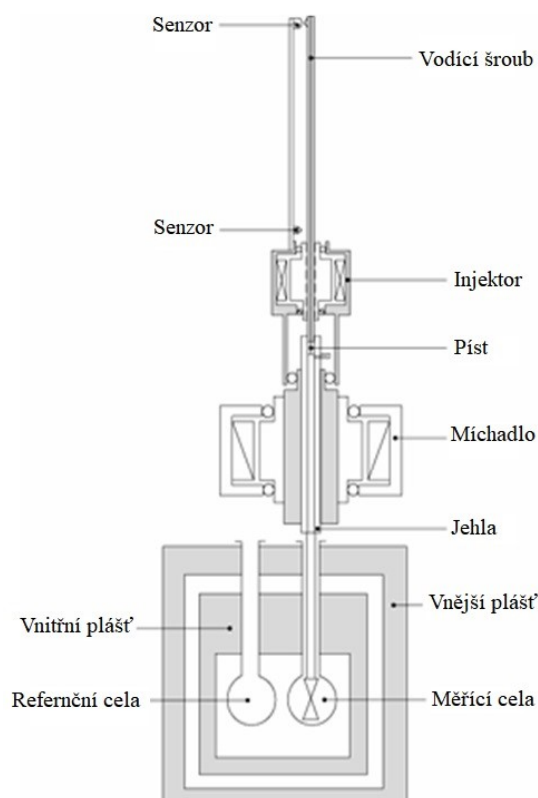
antioxidant džusů, glycin prodlužuje trvanlivost rybích produktů. Sůl kyseliny glutamové, glutaman sodný, je dnes již běžným modifikátorem chuti různých druhů potravin. Některé aminokyseliny (leucin, valin, prolin, alanin, cystein a isoleucin) pak mohou být složkami v doplňcích stravy, které slouží k podpoře růstu svalové hmoty. [48][49]

Kosmetický průmysl

Aminokyseliny a jejich soli jsou široce využívány jako kosmetické přísady, primárně jako složky produktů sloužících k úpravě vlasů a k péči o pokožku. [50] Estery aminokyselin získané působením vyšších alkoholů (např. tetradecylestery glycinu, serinu a kyseliny aspartamové) jsou kationické povrchově aktivní látky, které narušují permeabilitu membrány a jsou vysoce aktivní vůči grampozitivním i gramnegativním bakteriím. To je činí užitečnými pro různé druhy aplikací, jako jsou dezinfekční prostředky a antiseptika. Kationické povrchově aktivní deriváty bazických aminokyselin vykazují antimikrobiální a antifungální účinky, a proto mohou být využity jako dezinfekční a antiseptické složky zubních past či toaletních vod. Mnoho aminokyselin také slouží jako prekurzory pesticidů a herbicidů. [49]

3 ISOTERMÁLNÍ TITRAČNÍ MIKROKALORIMETRIE

Isotermální titrační mikrok calorimetr je přístroj, jehož princip měření je založen na titraci jednoho reaktantu do druhého. Měřeným signálem je pak teplo uvolněné nebo absorbované při interakci těchto dvou reaktantů. [51] Měření přenosu tepla během vazby umožňuje přesné stanovení rovnovážné vazebné konstanty (K_a), reakční stechiometrie (n), entalpie (ΔH) a entropie (ΔS), což poskytuje úplný termodynamický profil probíhající molekulární interakce. [52]



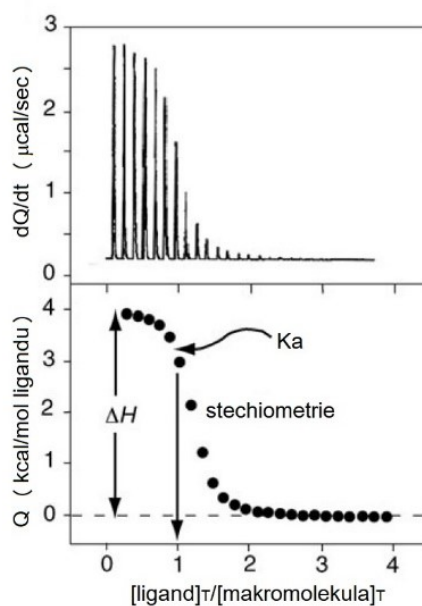
Obrázek 18: Schéma přístroje ITC (upraveno dle [53])

V adiabatickém plášti přístroje jsou umístěny dvě naprosto stejné cely tvaru mince (měřicí a referenční). Díky Peltierovu článku, který se nachází mezi těmito celami, je měřeno množství energie ($\mu\text{cal}\cdot\text{s}^{-1}$) nutné k udržení konstantního teplotního rozdílu mezi oběma celami. [54]

3.1 Princip měření

Roztok jednoho z reaktantů (makromolekula, M) je přidán do měřicí cely a druhý (ligand, L) do injekční jehly. V průběhu experimentu, který funguje na principu titrace, je pomocí injekční jehly postupně přidáván definovaný objem (μl) roztoku ligandu k roztoku makromolekuly v měřicí cele, zatímco je neustále celý systém promícháván. Každým přidáním roztoku do měřicí cely je vyvolána vazebná interakce za vzniku komplexu molekula/ligand (ML), jehož množství je závislé na vazebné afinitě a koncentraci látek v měřicí cele. Při tvorbě komplexu dochází k uvolňování nebo absorpci tepla, které má za následek změnu teplotního rozdílu mezi oběma celami. Aby byla tato teplotní nerovnost kompenzována, systém zpětné vazby sníží nebo zvýší tepelnou energii a po každém přidavku je tak ustanovena rovnováha systému. Záznam signálu má podobu píku, kde se na počátku titrace nachází nejvyšší hodnota signálu (koncentrace makromolekuly v cele je nevyšší). S postupnými přidávkami dalších molekul ligandu pak dochází k obsazení makromolekul a ke snížení tepelného signálu až do hodnoty ekvivalence, kdy jsou všechny makromolekuly obsazeny ligandem. V roztoku se poté již nachází jen volný ligand a hodnota měřeného signálu je minimální. [54]

Výstupem měření je graf závislosti změny tepelné kapacity na čase, který podléhá korelaci na tepelné vlivy spojené s ředěním ligandu a mícháním při jednotlivých přidávkách. Tuto korelaci lze provést odečtením referenční křivky dané měřením, které probíhá za stejných podmínek, ovšem s absencí makromolekuly v měřicí cele. [55]



Obrázek 19: Výstupní graf měření na ITC (upraveno dle [54])

Integrací píků je získána výsledná sigmoidální křivka, jejímž vyhodnocením lze stanovit hodnoty entalpie, vazebné konstanty a stechiometrii reakce. [54]

3.2 Stanovení disociační konstanty pomocí ITC

Isotermální titrační kalorimetrie je využívána za účelem měření vazebných konstant. Ačkoli většinou slouží k vyhodnocování interakcí mezi biologickými makromolekulami, nabízí tato metoda také potenciál ke stanovení disociačních konstant. Hlavní výhodou oproti jiným metodám je současné vyhodnocení vazebné konstanty a entalpie. Jako protonační reakce zde probíhá reakce kyseliny se zásadou, při níž je kyselina tvořena reakcí protonu s konjugovanou bází [16]:

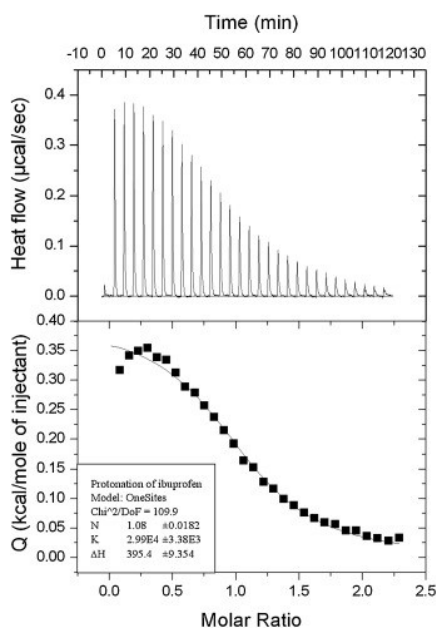


Stanovení disociační konstanty pomocí ITC může probíhat několika principy. L. Samuelsen a kol., dle článku č. 16, využili tuto metodou ke stanovení pK_a ibuprofenu, kyseliny askorbové, 2-morpholin-4-ylethansulfonové kyseliny a paracetamolu. Využili skutečnosti, že při protonační reakci je uvolněno nebo absorbováno měřitelné teplo, na jehož základě lze stanovit vazebnou konstantu reakce (K) a podle ní pak spočítat disociační konstantu kyseliny (pK_a) [16]:

$$K = \frac{[HA]}{[H^+][A^-]} \quad (1.39)$$

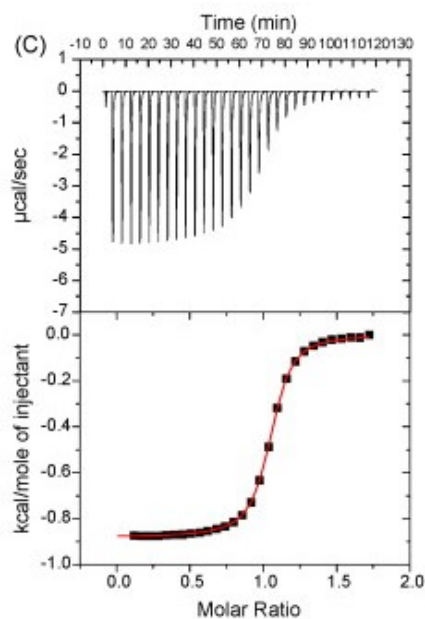
$$pK_a = -\log(1/K) \quad (1.40)$$

Vazebná konstanta reakce byla stanovena z titrační křivky, která byla získána titrací neutralizované slabé kyseliny kyselinou chlorovodíkovou nebo hydroxidem sodným při konstantní teplotě 25 °C. Analýzou naměřených dat pomocí softwaru OriginLab za využití funkce „One Set of Sites“. Záznam absorbovaného tepla spolu s integrovanou křivkou jsou uvedeny na *Obrázku 20*. Z hodnoty vazebné konstanty byla vypočítána hodnota pK_a pro ibuprofen 4,47, což odpovídá tabelované hodnotě. [16]



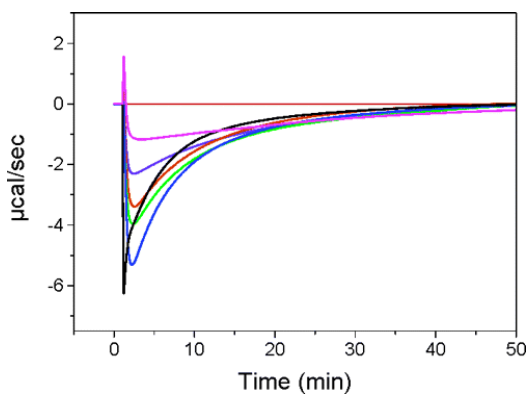
Obrázek 20: Výstupní graf měření stanovení ibuprofenu [16]

E. Shongi a kol. stanovovali disociační konstanty kyseliny benzoové a kyseliny octové ve směsi methanol/voda v rozsahu teplot 15–65 °C. Směsi methanolu a vody bývají využívány jako mobilní fáze při separaci látek v kapalinové chromatografii. Přidávky vodného roztoku HCl byly aplikovány do titrační cely obsahující roztoky benzoanu nebo octanu sodného ve směsi voda/methanol s hmotnostním zlomkem 0,5. Příklad stanovení kyseliny benzoové při 25 °C v roztoku methanol/voda, 50 % (w/w) je uveden na *Obrázku 21*. Hodnoty enthalpie a disociačních konstant byly odečteny z kalorimetrické titrační křivky pomocí programu OriginLab. Získaná data byla poté porovnána s hodnotami disociačních konstant stanovených potenciometricky. Matematické výpočty hodnot pK_a z termodynamických parametrů disociačních měření však nebyla jednoznačně a důsledně popsána ani vyhodnocena. [56]



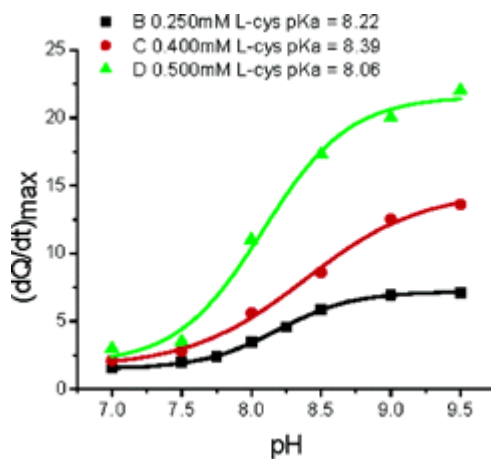
Obrázek 21: Výstupní graf měření kyseliny benzoové v roztoku methanol/voda [56]

Isotermální titrační mikrokaloriemtrii lze také využít ke stanovení disociačních konstant aminokyselin. [57] Zde Stephen G. Tajc a kol. určují pK_a sulfanylové skupiny L-cysteinu. Při stanovení byla využito reakce mezi sulfanylovou skupinou L-cysteinu a jodacetamidem. Bylo sledováno teplo, které se spotřebovalo během jediného přidavku $1,0 \mu\text{l}$ jodacetamidu o koncentracích v rozmezí hodnot $250\text{--}500 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ do roztoku L-cysteinu o koncentraci $0,25 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Tento postup „Single injection“ stanovení byl aplikován za konstantní teploty $30 \text{ }^\circ\text{C}$ pro různé hodnoty pH, které byly dané systémem tří pufrů. Záznam spotřebovaného tepla v čase v závislosti na pH je uveden na Obrázku 22. [57]



Obrázek 22: Graf závislosti spotřebovaného tepla v závislosti na čase [57]

Od stanoveného tepla ionizace bylo nutno odečíst zředovací teplo dané přidavkem 1,0 μ l jodacetamidu o stejné koncentraci do roztoku pufru o daném pH. Hodnoty pK_a byly zjištěny ze závislosti hodnot pH na spotřebovaném teple daného systému nelineární metodou nejmenších čtverců. [57]



Obrázek 23: Graf závislosti spotřebovaného tepla na pH při třech různých koncentracích L-cysteinu [57]

II. PRAKTICKÁ ČÁST

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Použité přístroje

4.1.1 VP-ITC Mikrokolorimetr

Pro práci v experimentální části byl využit isothermální titrační kalorimetr VP-ITC firmy MicroCal, fungující na principu měření tepla uvolněného nebo spotřebovaného v důsledku mísení přesných objemů dvou reaktantů. Přístroj je složen z injekční jehly a ze dvou cel – měřicí a referenční. Do injekční jehly byl nasát roztok látky o koncentraci 10krát vyšší, než byla koncentrace roztoku v měřicí cele, referenční cela byla naplněna destilovanou vodou. Poté byla injekční jehla vložena do měřicí cely a počítačovým písem bylo v rozmezí 210 s injekční jehlou o objemu 10 μl postupně dávkováno 29 přídavek roztoku do roztoku v měřicí cele. Kvůli přítomnosti iontů v roztoku měřicí cely, které by mohly difundovat do roztoku v jehle během ekvilibrace, byl první přídavek roztoku z jehly o nižším objemu, a to 2 μl . Teplo uvolněné nebo spotřebované v průběhu jednotlivých přídavek roztoku z jehly bylo monitorováno kaloriemtrm a veškerá získaná data byla poté zpracována počítačovým programem VPViewer. Pro porovnání pak bylo pro každé měření stanoveno zředovací teplo. V průběhu celého experimentu byla udržována konstantní teplota 25 °C. Zředovací teplo bylo odečteno od tepla uvolněného při jednotlivých přídavicích. Nakonec byly experimentálně získané údaje počítačově vyhodnoceny pomocí programu ORIGIN 7.0, který díky vhodnému výpočetnímu matematickému modelu „One Set of Sites“ umožňuje stanovit reakční stechiometrii (n), vazebnou konstantu (K_a), entalpii (ΔH) a entropii (ΔS).

4.1.2 ThermoVac

Před provedením experimentu byly všechny analyzované vzorky odplyněny pomocí přístroje ThermoVac MicroCal.

4.1.3 pH-metr

U všech vzorků bylo také stanoveno pH, a to pH-metrem HI 2221-02 s kombinovanou pH elektrodou HI1131P společnosti Hanna Instruments.

4.1.4 Mikrováhy

Všechny pevné látky byly navažovány na mikrováhách Mettler Toledo s přesností na mikrogramy.

4.2 Použité kyseliny a další chemikálie

Všechny kyseliny a další chemikálie použité pro účely této diplomové práce byly poskytnuty Ústavem chemie FT UTB a byly z komerčních zdrojů.

4.2.1 Měřené kyseliny

Kyselina L-askorbová

Systematický název: (5R)-[(1S)-1,2-dihydroxyethyl]-3,4-dihydroxyfuran-2(5H)-on

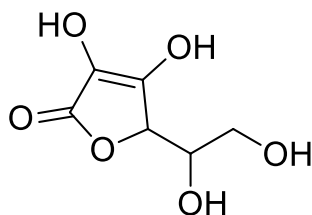
Sumární vzorec: $C_6H_8O_6$

Molární hmotnost: $176,12 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Vzhled: bílý krystalický prášek

Disociační konstanta: 4,0

Chemická struktura:



Kyselina benzoová

Systematický název: benzen-1-karboxylová kyselina

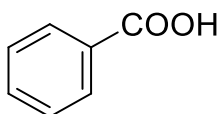
Sumární vzorec: $C_7H_6O_2$

Molární hmotnost: $122,12 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Vzhled: bílý krystalický prášek

Disociační konstanta: 4,2

Chemická struktura:



Kyselina L-mléčná

Systematický název: 2-hydroxypropanová kyselina

Sumární vzorec: $C_3H_6O_3$

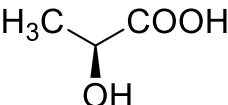
Molární hmotnost: $90,08 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Hustota: $1,1879 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$

Čistota: 90 %

Vzhled: bezbarvá kapalina

Disociační konstanta: 3,9

Chemická struktura: 

Benzoan sodný

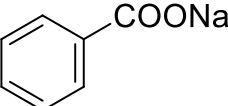
Systematický název: benzenkarboxylát sodný

Sumární vzorec: $C_7H_5NaO_2$

Molární hmotnost: $144,11 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Vzhled: bezbarvá kapalina

Disociační konstanta: 9,8

Chemická struktura: 

4.2.2 Další chemikálie

Hydroxid sodný

Vzorec:	NaOH
Molární hmotnost:	39,98 g·mol ⁻¹
Vzhled:	bílý krystalická látka

Kyselina chlorovodíková 36 %

Vzorec:	HCl
Molární hmotnost:	36,46 g·mol ⁻¹
Vzhled:	bezbarvá kapalina

Methanol

Vzorec:	CH ₃ OH
Molární hmotnost:	32,04 g·mol ⁻¹
Vzhled:	bezbarvá kapalina

Chlorid draselný

Sumární vzorec:	KCl
Molární hmotnost:	74,55 g·mol ⁻¹
Vzhled:	bílá krystalická látka

4.3 Příprava používaných roztoků

Roztok č. 1 – roztok NaOH o přibližné koncentraci $0,3 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$

- Navážka 12,286 mg byla kvantitativně převedena do 100 ml odměrné baňky, rozpuštěna a doplněna destilovanou vodou po rysku.
- Přesná koncentrace roztoku byla takto stanoveného roztoku byla $0,307 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$.
- U připraveného roztoku bylo naměřeno pH 8,28.

Roztok č. 2 – roztok HCl o přibližné koncentraci $3 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$

- 129,0 μl koncentrované kyseliny chlorovodíkové bylo odpipetováno pomocí mikropipety do 500 ml odměrné baňky a doplněno destilovanou vodou po rysku.
- Přesná koncentrace takto připraveného roztoku byla $3,003 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$.
- U připraveného roztoku bylo naměřeno pH 2,28.

Roztok č. 3 – roztok NaOH o přibližné koncentraci $3 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$

- Navážka 11,975 mg byla kvantitativně převedena do 100 ml odměrné baňky, rozpuštěna a doplněna destilovanou vodou po rysku.
- Přesná koncentrace roztoku byla $2,994 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$.
- U připraveného roztoku bylo naměřeno pH 11,38.

Roztok č. 4 – 2. roztok NaOH o přibližné koncentraci $3 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$

- Navážka 5,802 mg byla kvantitativně převedena do 50 ml odměrné baňky, rozpuštěna a doplněna destilovanou vodou po rysku.
- Přesná koncentrace takto připraveného roztoku byla $2,901 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$.
- U připraveného roztoku bylo naměřeno pH 11,53.

Roztok č. 5 – roztok HCl o přibližné koncentraci $10 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$

- 42,95 μl bylo odpipetováno pomocí mikropipety do 50 ml odměrné baňky a doplněno destilovanou vodou po rysku.
- Přesná koncentrace takto připraveného roztoku byla $10,000 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$.
- U připraveného roztoku bylo naměřeno pH 1,78.

Roztok č. 6 – roztok HCl o přibližné koncentraci 5 mmol·l⁻¹

- 10,74 µl bylo odpipetováno pomocí mikropipety do 25 ml odměrné baňky a doplněno destilovanou vodou po rysku.
- Přesná koncentrace takto připraveného roztoku byla 5,001 mmol·l⁻¹.
- U připraveného roztoku bylo naměřeno pH 2,56.

Roztok č. 7 – roztok MeOH/voda 50 % (w/w) s KCl o přibližné konc. 50 mmol·l⁻¹

- Navážka 185,13 mg byla kvantitativně destilovanou vodou převedena do 50 ml odměrné baňky, k tomuto roztoku bylo odpipetováno 31,6 ml methanolu a celá směs byla destilovanou vodou doplněna o po rysku.
- Přesná koncentrace KCl v takto připraveném roztoku byla 49,660 mmol·l⁻¹.

Roztok č. 8 – roztok HCl v MeOH/H₂O s KCl o přibližné koncentraci 5 mmol·l⁻¹

- 10,74 µl bylo odpipetováno pomocí mikropipety do 25 ml odměrné baňky a doplněno roztokem č. 7 po rysku.
- Přesná koncentrace HCl v takto připraveném roztoku byla 5,001 mmol·l⁻¹.
- U připraveného roztoku bylo naměřeno pH 1,75.

Roztoky sodných solí kyselin o přibližné koncentraci 0,3 mmol·l⁻¹

- Vypočítaný objem kyseliny L-mléčné nebo vypočítané navážky kyselin L-askorbové a benzoové byly kvantitativně převedeny do určené odměrné baňky pomocí roztoku NaOH (č. 1), poté byly doplněny tímto roztokem po rysku. Takto by mělo být dosaženo přibližně stejného látkového množství kyselin a hydroxidu sodného.

5 VÝSLEDKY A DISKUSE

5.1 Stanovení slabých kyselin ve formě jejich sodných solí

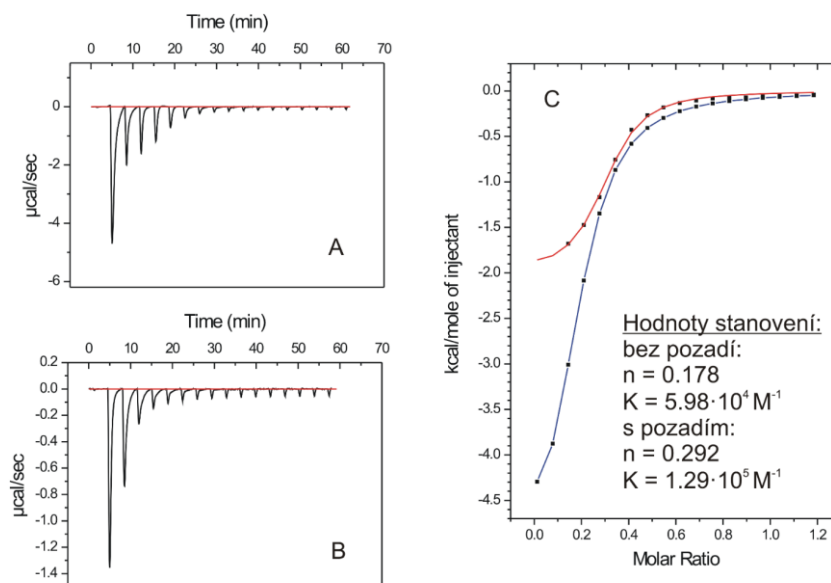
První série stanovení byla inspirována článkem od autorky L. Samuelsen [16]. Autorka se svým kolektivem optimalizovala metodu stanovení pK_a pro tři slabé kyseliny a jednu zásadu. Stanovení slabých kyselin bylo prováděno titrací kyseliny chlorovodíkové (koncentrace $3 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) do roztoku slabých kyselin (koncentrace $0,3 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$), které byly ve formě sodných solí (k roztoku bylo přidáno ekvivalentní množství NaOH).

Stanovení kyseliny L-askorbové

Roztok kyseliny L-askorbové ($c = 0,320 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) byl připraven kvantitativním převedením navážky $0,564 \text{ mg}$ kyseliny L-askorbové do odměrné baňky o objemu 10 ml pomocí roztoku NaOH (č. 1) a byl doplněn tímto roztokem NaOH po rysku. Roztok takto připravené kyseliny L-askorbové byl po odplynění nadávkován do měřicí cely. K tomuto stanovení byl do injekční jehly použit roztok HCl (č. 2) o koncentraci $3,003 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ přímo ze zásobního roztoku bez nutnosti dalšího ředění. Záznam průběhu stanovení, tj. závislost uvolněného tepla v čase je znázorněn na *Obrázku 24 A*.

Jak je zřejmé, prvním přídatkem se uvolnilo teplo přibližné hodnoty $2 \mu\text{J}$. Množství tohoto tepla s dalšími přídatky klesalo a asi po 9. přídatku bylo uvolněné teplo minimální. Předpokládaná ekvivalence by měla při správném nastavení stanovení nastat v polovině přidaného množství látky z jehly, tj. kolem 15. přídatku, zároveň by přídatku v polovině měření měla hodnota molárního poměru n být rovna jedné, což se v tomto případě nestalo. Celé stanovení bylo ukončeno po 17. přídatku. Poté následovalo měření tepla uvolněného při přídatcích kyseliny chlorovodíkové do roztoku rozpouštědla, tedy vody. Toto stanovení je možno nazvat jako stanovení pozadí, reference, slepé stanovení či stanovení zředovací a mělo by mít minimální vliv na měření samotné. Jak je ale uvedeno na *Obrázku 24 B*, v tomto případě tomu tak nebylo, jelikož průběh uvolněného tepla je velmi podobný jako při stanovení samotném, jen je teplo asi čtyřikrát menší. Z těchto dvou stanovení nelze jednoznačně určit, zda proběhla protonační reakce mezi sodnou solí kyseliny L-askorbové v cele a HCl v jehle. Na *Obrázku 24 C* je uvedena křivka proložená integrovanými body tohoto stanovení, kdy červená křivka odpovídá vyhodnocení analýzy s odečteným referenčním teplem a modrá křivka odpovídá stanovení, ve kterém není zohledněno

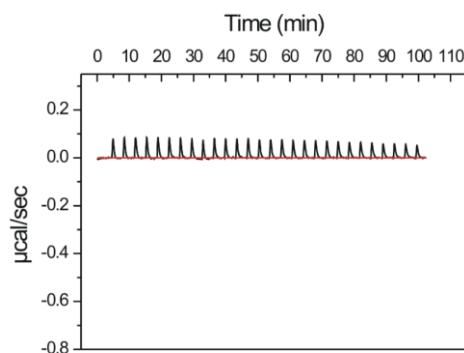
referenční teplo. Pod tímto obrázkem jsou uvedeny hodnoty pro stechiometrický poměr n a pro vazebnou konstantu K . Dle rovnice (1.40) je hodnota disociační konstanty pro vyhodnocení se zředováním rovna 5,11 a pro vyhodnocení bez zředování je rovna 4,78. Hodnota 4,78 je bližší k hodnotě pK_a kyseliny L-askorbové dané literaturou (4,04). [9]



Obrázek 24: Záznam uvolněného tepla při stanovení kyseliny L-askorbové A: průběh stanovení, B: průběh referenčního měření a C: výsledná křivka (modrá – bez průběhu reference, červená – s referencí)

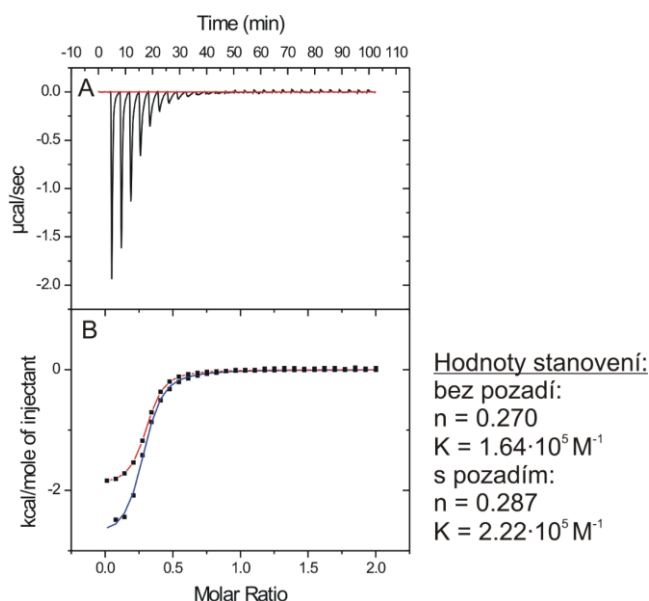
Stanovení kyseliny L-mléčné

Roztok kyseliny mléčné ($c = 0,301 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$) byl připraven odpipetováním $12,66 \mu\text{l}$ kyseliny mléčné z originální láhve do odměrné baňky o objemu 500 ml a doplněním roztokem NaOH (č. 1) po rysku. Tímto roztokem po odplynění byla naplněna měřící cela mikrokolorimetru a injekční jehla byla naplněna roztokem HCl (č. 2, $c = 3,003 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$). Závislost uvolněného tepla na čase titrace je uvedena na Obrázku 25 a je z něj patrné, že se při tomto stanovení neuvolnilo žádné výrazné množství tepla, tedy neproběhla žádná interakce mezi stanovovanou sodnou solí kyseliny L-mléčné a NaOH.



Obrázek 25: Záznam uvolněného tepla při stanovení kyseliny L-mléčné

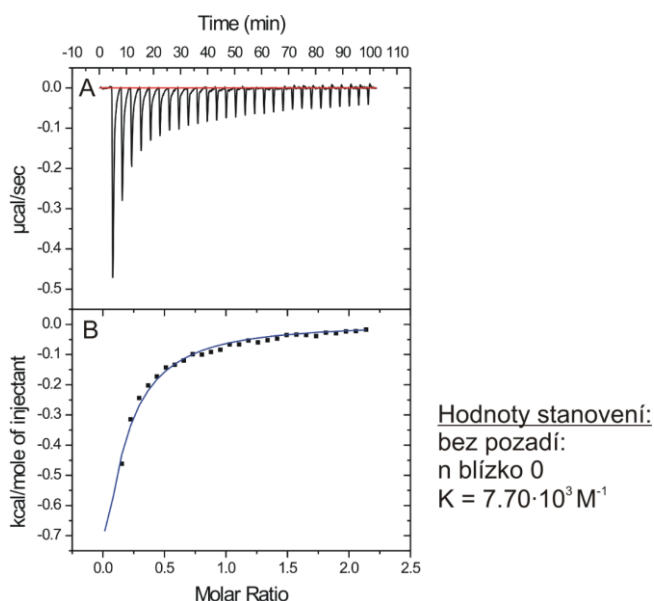
Z tohoto důvodu bylo stanovení opakováno podruhé s jiným postupem přípravy roztoku kyseliny L-mléčné, který zahrnoval pipetování vyšších objemů kyseliny mléčné z komerčně dostupného roztoku. Pro přípravu roztoku sodné soli byl pipetován 1 ml 90% kyseliny L-mléčné do odměrné baňky o objemu 1 litr, která byla poté doplněna vodou po rysku. Koncentrace připraveného roztoku byla $11,868 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$. Z tohoto roztoku bylo pipetováno 2,711 ml do odměrné baňky o objemu 100 ml, k čemuž byla pomocí destilované vody kvantitativně převedena navážka 1,289 mg NaOH a roztok byl destilovanou vodou doplněn po rysku. Koncentrace kyseliny mléčné v roztoku s Na^+ ionty byla $0,322 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$. Tento roztok byl po odplynění nadávkován do měřicí cely mikrokalorimetru a poté byl titrován roztokem HCl o koncentraci $3,003 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ (č. 2). Průběh uvolněného tepla je patrný z *Obrázku 26 A*. Teplo uvolněné prvním přidavkem je nižší než teplo uvolněné při titraci kyseliny L-askorbové a rovněž ani při tomto experimentu nebylo dosaženo ekvivalence v polovině stanovení. Průběh referenčního měření byl stejný jako pro stanovení kyseliny L-askorbové a je uveden na *Obrázku 24 B*. *Obrázek 26 B* znázorňuje křivku proloženou matematickým modelem integrovanými body stanovení s odečteným referenčním teplem (červená křivka) a bez odečteného referenčního zředovacího procesu (modrá křivka). Hodnoty stechiometrického poměru n a vazebné konstanty K se od sebe výrazně neliší. Dle rovnice (1.40) je hodnota disociační konstanty rovna 5,21 nebo 5,34, což je velmi odlišné od hodnoty pK_a dané literaturou (3,86). [9]



Obrázek 26: Záznam uvolněného tepla při stanovení kyseliny L-mléčné A: průběh stanovení, B: výsledná křivka matematického modelu (modrá – bez referene, červená – s referenčním teplem)

Stanovení kyseliny benzoové

Roztok kyseliny benzoové ($c = 0,301 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$) byl připraven kvantitativním rozpuštěním navážky 1,838 mg v destilované vodě v odměrné baňce o objemu 50 ml. Tento odplyněný roztok byl přidán do cely mikrokolorimetru a do injekční jehly byl použit odplyněný roztok HCl (č. 2) o koncentraci $3,003 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ přímo ze zásobního roztoku bez nutnosti dalšího ředění. Záznam průběhu uvolněného tepla a výsledná křivka jsou uvedeny na *Obrázku 27 A* resp. *B*. Uvolněné teplo v průběhu stanovení bylo o jeden řád nižší než při stanovení kyseliny mléčné a opět zde není zřetelný bod ekvivalence. Proložít matematickou funkcí „One Set of Sites“ při vyhodnocování s odečteným referenčním teplem nebylo možné. Také vyhodnocení bez referenčního zředovacího tepla (modrá křivka *Obrázek 27 B*) nebylo optimální, jelikož hodnota stechiometrického koeficientu limitovala k hodnotě 0. Z vazebné konstanty stanovení byla vypočtena hodnota disociační konstanty 3,87, což se nepatrně blíží hodnotě pK_a dané literaturou (4,20). [9]



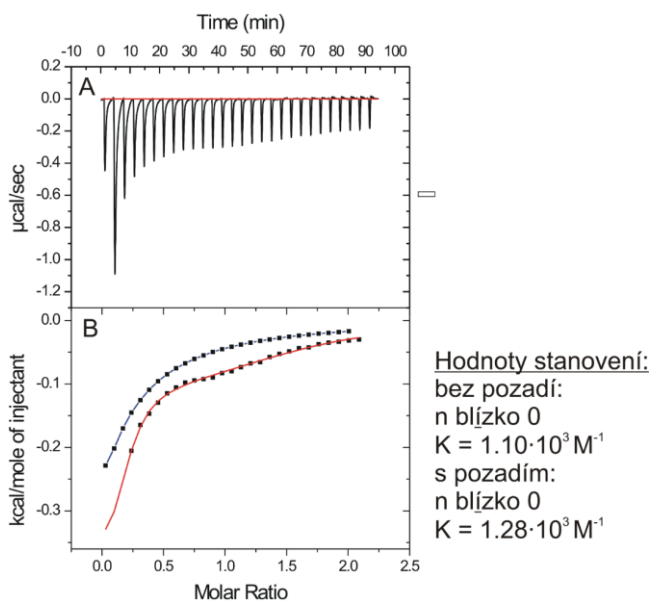
Obrázek 27: Záznam uvolněného tepla při stanovení kyseliny benzoové A: průběh stanovení, B: výsledná křivka bez reference

Po sériích uvedených měření bylo navrženo stanovení použít k vlastnímu přímo roztok benzoanu sodného. Pro toto měření benzoanu sodného v roztoku HCl byl inspirací článek podle E. Shongi a kol. [56]. Byla vyzkoušena dvě měření roztoku benzoanu sodného o koncentraci $1 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ s roztoky HCl o dvou různých koncentracích.

Stanovení kyseliny benzoové pomocí pevného benzoanu sodného

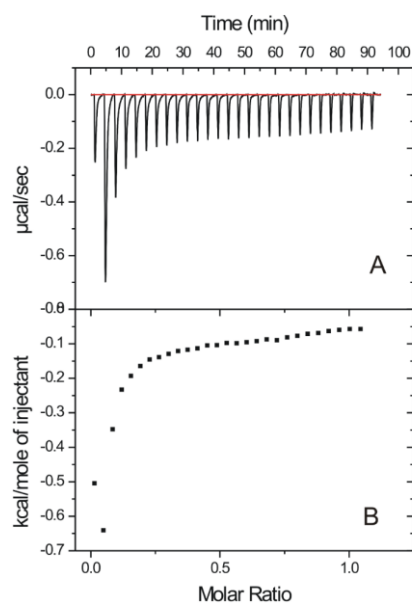
Roztok benzoanu sodného ($c = 0,995 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$) byl připraven kvantitativním převedením navážky 7,171 mg do odměrné baňky o objemu 50 ml a doplněním destilovanou vodou po rysku. Po odplynění byla tímto roztokem naplněna měřící cela mikrokolorimetru. Ke stanovení byl do injekční jehly použit odplyněný roztok HCl (č. 5) přímo ze zásobního roztoku bez nutnosti dalšího ředění. Záznam průběhu uvolněného tepla a výsledná křivka matematického modelu proloženého integrovanými body jsou uvedeny na *Obrázku 28 A* a *28 B*. Velmi podobný průběh uvolněného tepla byl získán při zředovacím stanovení, jen bylo uvolněné teplo při prvních přídavicích nepatrně menší. Také v tomto případě nebylo dosaženo ekvivalence v polovině měření a výsledná křivka neměla sigmoidální průběh. Dle všeho i v tomto případě nedošlo k protonační reakci. Přesto se dalo proložit matematickou funkcí integrovanými body a hodnota stechiometrického koeficientu se blížila v obou

případech (s i bez odečteného referenčního zředovacího procesu) nule a hodnoty vazebné konstanty byly takřka stejné.



Obrázek 28: Záznam uvolněného tepla při stanovení kyseliny benzoové A: průběh stanovení, B: výsledná křivka vyhodnocená bez referenčního procesu (modrá) a s referencí (červená)

Jelikož se zdálo být patrné, že v prvních přídavicích měření je uvolněné teplo větší, bylo navrženo měření s roztokem kyseliny HCl o poloviční koncentraci v injekční jehle oproti měření předchozímu. Tak by se teplo uvolněné v prvních 3 přídavicích mělo rozdělit do více přídavek. Roztok benzoanu sodného o stejné koncentraci ($c = 0,995 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$) byl též jako v předešlém měření. Ke stanovení byl do injekční jehly použit odplyněný roztok HCl (č. 6) o koncentraci $c = 5,001 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ přímo ze zásobního roztoku bez nutnosti dalšího ředění. Záznam uvolněného tepla je uveden na Obrázku 29. Jak je patrné, průběh stanovení je takřka shodný s předchozím měřením a lze tedy usoudit, že změnou koncentrace odměrného roztoku nedošlo k žádné významné změně při stanovení samotném. Toto měření je proto opět nevhodné pro výpočet hodnoty pK_a , čemuž také odpovídá absence matematického modelu, kterým nešlo integrované body proložit, a tedy nejsou u tohoto stanovení uvedeny parametry stechiometrického poměru a vazebné konstanty.



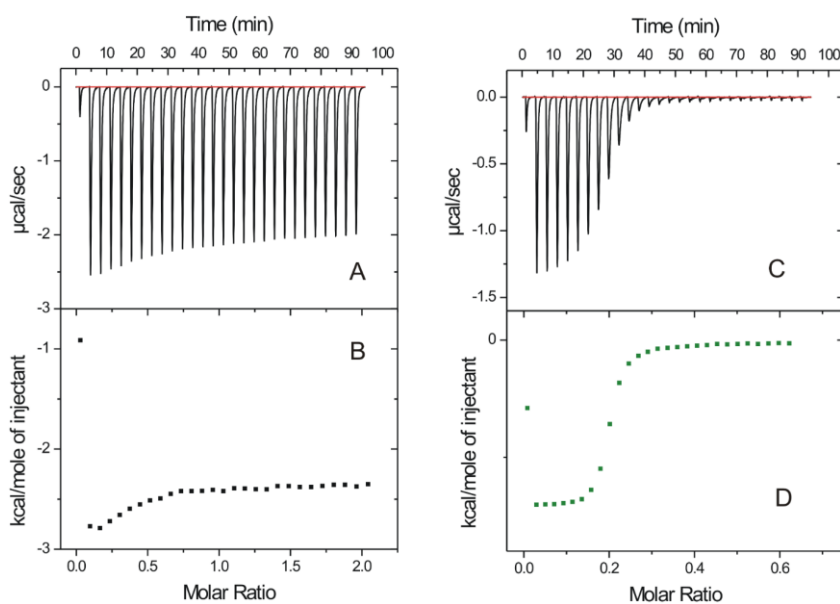
Obrázek 29: Záznam uvolněného tepla při stanovení kyseliny benzoové A: průběh stanovení s poloviční koncentrací HCl, B: body odpovídající integraci píků

5.2 Stanovení slabých kyselin v protonované formě

Po sérii předešlých měření byl navržen postup odlišný, kdy roztok analyzované slabé kyseliny byl v měřicí cele mikrokalorimetru a tento roztok byl titrován roztokem hydroxidu sodného z injekční jehly.

Stanovení kyseliny L-askorbové

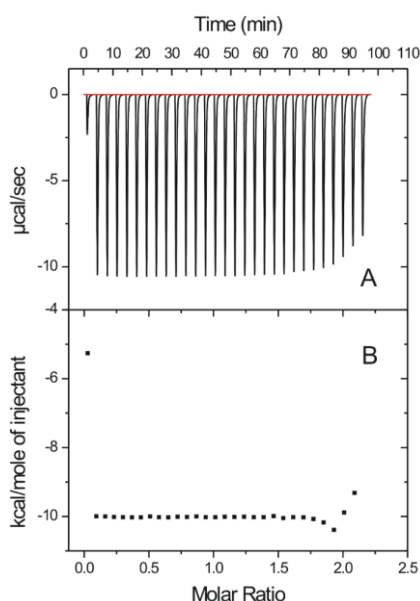
Roztok kyseliny L-askorbové ($c = 0,303 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) byl připraven kvantitativním rozpuštěním navážky 2,682 mg v destilované vodě v odměrné baňce o objemu 50 ml a po odplynění jím byla naplněna měřicí cela mikrokalorimetru. Ke stanovení byl do injekční jehly použit odplyněný roztok NaOH o koncentraci $2,994 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ (č. 3) přímo ze zásobního roztoku bez nutnosti dalšího ředění. Záznam průběhu uvolněného tepla a výsledná křivka jsou uvedeny na *Obrázku 30 A resp. 30 B*. Během stanovení se uvolnilo větší množství tepla, které bylo v průběhu celého experimentu takřka stejně velké. Velmi zajímavé je měření referenčního tepla, které se uvolnilo při přidavcích roztoku NaOH do odplyněné destilované vody *Obrázek 30 C resp. 30 D*. Zde je patrný bod ekvivalence, leč nejde jednoznačně říct, co se v měřicí cele s Na^+ ionty odehrává a zda se tento jev děje i při vlastním stanovení kyseliny L-askorbové. Ačkoli zde byla snaha o matematické vyhodnocení, je patrné, že bez k vlastnímu reference nelze stanovení vyhodnotit a pokud bylo odečteno referenční zředovací teplo, nešlo křivku matematickým modelem proložit.



Obrázek 30: Záznam uvolněného tepla při stanovení kyseliny L-askorbové A: průběh stanovení, B: body odpovídající integraci píků stanovení, C: průběh referenčního stanovení, D: body odpovídající integraci píků při referenčním stanovení

Stanovení kyseliny L-mléčné

Roztok kyseliny L-mléčné byl připraven rozpuštěním 24,8 μl kyseliny v destilované vodě v odměrné baňce o objemu 1 l a po odplynění byl dávkován do měřicí cely mikrokalorimetru. Koncentrace takto připraveného roztoku byla 0,301 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$. Ke stanovení byl do injekční jehly použit odplyněný roztok NaOH (č. 4) o koncentraci 2,901 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ přímo ze zásobního roztoku bez nutnosti dalšího ředění. Záznam průběhu uvolněného tepla a body odpovídající integraci píků jsou uvedeny na *Obrázku 31 A a 31 B*.

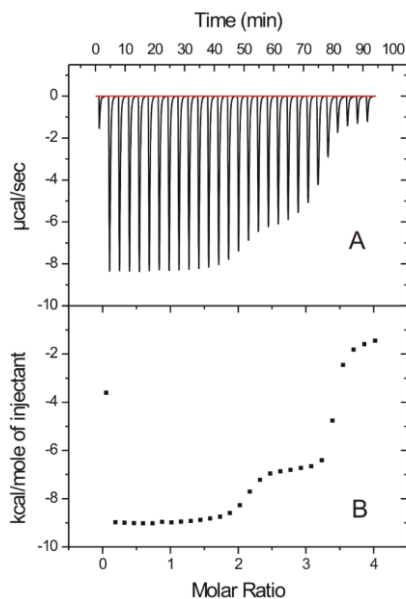


Obrázek 31: Záznam uvolněného tepla při stanovení kyseliny L-mléčné A: průběh stanovení, B: body odpovídající integraci píků stanovení kyseliny L-mléčné

Ze záznamu z měření kyseliny L-mléčné je patrné, že při každém přidavku bylo uvolněno teplo cca 4 μJ . Uvolněné teplo bylo ve všech přidavcích NaOH stejné, až v samém závěru měření se pozvolna zmenšovalo, což by mohlo naznačovat případnou nastávající ekvivalenci. Toto stanovení nebylo možno matematicky vyhodnotit a byl navržen postup za použití roztoku kyseliny L-mléčné o poloviční koncentraci oproti měření znázorněném na *Obrázku 31*, aby bylo možno případnou ekvivalenci již monitorovat.

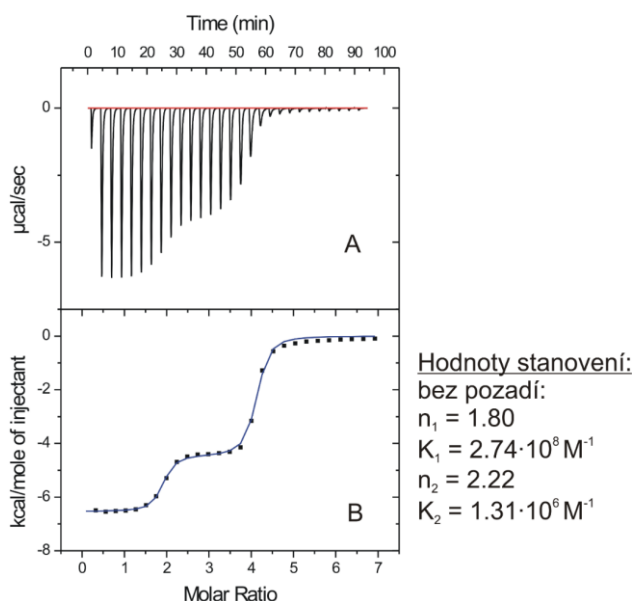
Nový roztok kyseliny L-mléčné byl připraven do odměrné baňky o objemu 1 l rozpuštěním 12,4 μl kyseliny L-mléčné ze zásobní láhve v destilované vodě (koncentrace $c = 0,1503 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$). Tento roztok byl převeden do měřicí cely. Ke stanovení byl do injekční jehly použit roztok NaOH (č. 4) přímo ze zásobního roztoku bez nutnosti dalšího

ředění. Záznam průběhu uvolněného tepla a výsledné integrované body jsou uvedeny na *Obrázku 32*.



Obrázek 32: Záznam uvolněného tepla při stanovení kyseliny mléčné A: průběh stanovení, B: body odpovídající integraci píků stanovení, C: průběh referenčního stanovení, D: body odpovídající integraci píků při referenčním stanovení

Po snížení koncentrace kyseliny L-mléčné na polovinu oproti předchozímu měření došlo k zachycení dokonce dvou bodů ekvivalence, jak je patrné z *Obrázku 32 B*. Pro lepší zachycení druhého bodu ekvivalence bylo navrženo další měření s ještě nižší koncentrací kyseliny L-mléčné v injekční jehle. Tento roztok byl připraven zředěním 30 ml roztoku kyseliny mléčné z předešlého měření o koncentraci $0,150 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ do 50 ml odměrné baňky. Výsledná koncentrace roztoku tedy byla $0,090 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$. Tento roztok byl po odplynění použit do cely mikrokolorimetru, do injekční jehly byl po odplynění dávkován roztok NaOH (č. 4) o koncentraci $2,901 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ přímo ze zásobního roztoku. Průběh uvolněného tepla je uveden na *Obrázku 33*.

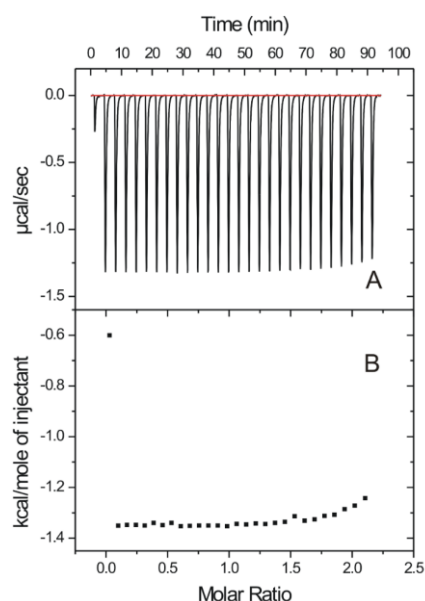


Obrázek 33: Záznam mikrokolorimetrického měření kyseliny L-mléčné (o snížené koncentraci oproti předchozímu měření)

Měření při snížené koncentraci kyseliny L-mléčné na hodnotu $0,090 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ prokázalo, že při reakci dochází k významnému uvolnění tepla a na záznamu měření, znázorněném na Obrázku 33 lze pozorovat dva výrazné body ekvivalence. Vyhodnocení matematickým modelem muselo být provedeno bez referenčního zředovacího tepla. První bod ekvivalence nastává při poměru n_1 rovnu hodnotě 1,8 a byla pro něj vyhodnocena matematickým modelem vazebná konstanta $2,74 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}$. Této hodnotě by musela pak dle výpočtu (1.40) odpovídat disociační konstanta 8,44, což je nereálné. Druhý bod ekvivalence n_2 nastává při hodnotě 2,22, čemuž odpovídá vazebná konstanta $1,31 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$ a dle výpočtu by disociační konstanta měla hodnotu 6,11, což je hodnota opět odlišná od literatury (3,86). [9]

Měření kyseliny benzoové v roztoku č. 3

Roztok kyseliny benzoové ($c = 0,296 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) byl připraven kvantitativním převedením navážky 1,805 mg do odměrné baňky o objemu 50 ml a doplněním destilovanou vodou po rysku. Tento roztok byl po odplynění dávkován do cely mikrokalorimetru. Ke stanovení byl do injekční jehly použit odplyněný roztok NaOH (č. 3) o koncentraci $2,994 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ přímo ze zásobního roztoku bez nutnosti dalšího ředění. Záznam průběhu uvolněného tepla a výsledná křivka jsou uvedeny na *Obrázku 34*.

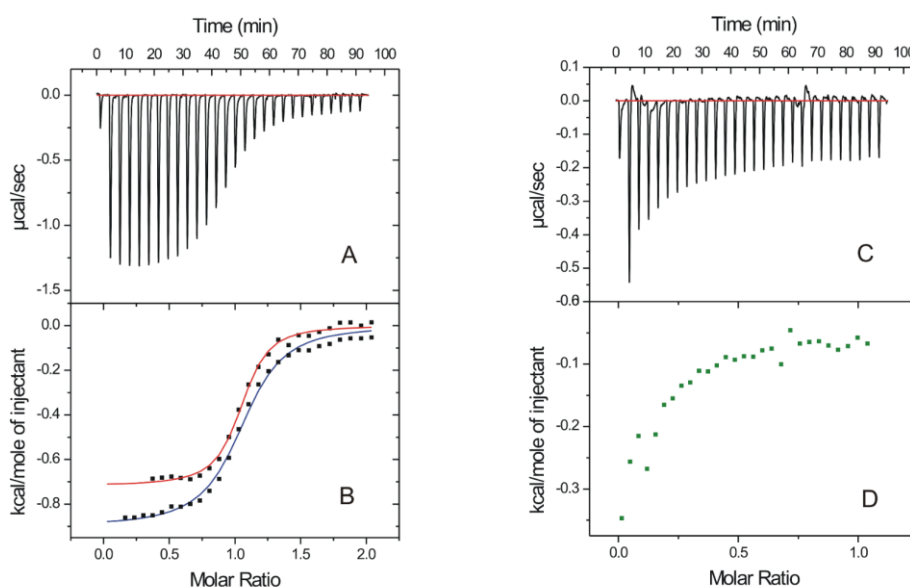


Obrázek 34: Záznam uvolněného tepla při stanovení kyseliny benzoové A: průběh stanovení, B: body odpovídající integraci píků stanovení kyseliny benzoové

Z *Obrázku 34* je patrné, že při reakci se kyselina benzoová chová v přítomnosti roztoku NaOH obdobně jako kyselina L-mléčná. Přidáváním NaOH dochází k uvolňování tepla, ale není patrný žádný bod ekvivalence. Tento výsledek proto také nebyl vyhodnocen. Z důvodu nedostatku času nebylo toto stanovení opakováno s nižší koncentrací v cele pro ověření možné ekvivalence a bylo přistoupeno ke stanovení v roztoku methanol/voda pro kyselinu benzoovou.

5.3 Stanovení kyseliny benzoové v roztoku methanol/voda

Tento postup byl zopakován dle literatury [56]. Roztok benzoanu sodného byl připraven rozpuštěním navážky 1,835 mg benzoanu sodného v roztoku (č. 7) voda/MeOH ($w = 0,5$) s KCl. Koncentrace benzoanu sodného v takto připraveném roztoku byla $0,509 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$. Tento roztok by po odplynění přidán do cely mikrokolorimetru. Ke stanovení byl do injekční jehly použit odplyněný roztok HCl v voda/MeOH ($w = 0,5$) s KCl (č. 8) přímo ze zásobního roztoku bez nutnosti dalšího ředění. Záznam průběhu měření a výsledná křivka jsou uvedeny na *Obrázku 35*.



Hodnoty stanovení:

bez pozadí:

$$n = 1.05$$

$$K = 7.99 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$$

s pozadím:

$$n = 1.03$$

$$K = 1.95 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$$

Obrázek 35: Záznam mikrokolorimetrického měření benzoanu sodného v roztoku methanol/voda

Toto stanovení ve směsi methanol/voda 50 % (w/w) uvedené na *Obrázku 35 A* bylo velmi blízké stanovení, které bylo publikováno v článku [56]. Z *Obrázku 35 A* je zřetelný bod ekvivalence v bodě stechiometrického parametru s hodnotou 1. Také referenční zředovací teplo (*Obrázek 35 C*) neovlivnilo výsledek matematického modelu jak s odečtenou referencí (červená křivka na *Obrázku 35 B*) tak bez odečteného referenčního tepla (modrá křivka na *Obrázku 35 B*). Obě matematické křivky mají sigmoidální tvar, bylo tedy možné odečíst z nich hodnotu vazebné konstanty (K_a). Lepšího výsledku bylo dosaženo při výpočtu

disociační konstanty z měření vyhodnoceného bez reference, kdy hodnota pK_a pro kyselinu benzoovou odpovídá 4,90 (dle literatury [9] má kyselina benzoová hodnotu pK_a 4,20).

ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce bylo optimalizovat stanovení disociačních konstant některých slabých kyselin metodou isotermální titrační mikrokalorimetrie. Důraz byl kladen na stanovení hodnot vazebných konstant probíhajících protonačních reakcí, pomocí nichž byly vypočítány výsledné disociační konstanty zkoumaných kyselin.

Nejprve byla provedena série stanovení slabých kyselin ve formě jejich solí, kdy byl roztok sodné soli slabé kyseliny titrován kyselinou chlorovodíkovou. Při stanovení kyseliny L-askorbové neutralizované pomocí NaOH byla stanovena disociační konstanta 4,78 z křivky bez odečtení referenčního tepla a tato hodnota se blíží reálné hodnotě pK_a kyseliny L-askorbové. Stejným způsobem bylo provedeno stanovení kyseliny L-mléčné neutralizované roztokem NaOH, pro tuto kyselinu ale nebylo možno stanovit hodnoty pK_a . Lepší výsledky byly získány při stanovení disociační konstanty kyseliny benzoové, kdy byla z vazebné konstanty vypočítána hodnota disociační konstanty 3,87, což se blíží hodnotě pK_a dané literaturou. Toto stanovení bylo opakováno přímo s benzoanem sodným, ale ani při jednom ze dvou provedených měření protonační reakce neproběhla a stanovení proto byla nevhodná pro výpočet hodnoty pK_a .

Druhým způsobem stanovení disociační konstanty pomocí ITC bylo stanovení slabých kyselin v protonované formě titrací roztokem NaOH. Tímto postupem nebyly získány uspokojivé výsledky, ze kterých by bylo možno vypočítat disociační konstantu.

Nejllepších výsledků bylo dosaženo při stanovení kyseliny benzoové v roztoku methanol/voda. Výsledná křivka matematického modelu má sigmoidální tvar a bylo z ní možné odečíst hodnotu vazebné konstanty, ze které byla určena hodnota disociační konstanty (pK_a) kyseliny benzoové 4,90.

Ze zjištěných dat vyplývá, že by isotermální titrační mikrokalorimetrie mohla být slibnou alternativou k doposud běžně využívaným metodám sloužícím ke stanovení disociační konstanty. Jedná se však zatím o téma vcelku neprobádané, které skýtá mnohá úskalí a bohužel, z časových důvodů, nebylo provedeno dostatečné množství měření, které by umožnilo eliminovat všechny možné faktory ovlivňující průběh reakcí majících vliv na výsledné hodnoty vazebných, a tedy i disociačních konstant. Bylo by proto vhodné prozkoumat více možných kombinací stanovovaných kyselin a jejich roztoků a poté provedená stanovení porovnat s hodnotami zjištěnými potenciometrickým měřením stejných vzorků při stejných koncentracích a teplotách. Isotermální titrační mikrokalorimetrie

rozhodně nabízí slibný potenciál v měření disociačních konstant neznámých sloučenin, především proto, že umožňuje stanovení roztoků velmi malých objemů při nízkých koncentracích.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] BARTOŠ, Martin, Jitka ŠRÁMKOVÁ a Václav STANĚK. *Analytická chemie*. Pardubice: Univerzita Pardubice, 2011. ISBN 978-80-7395-408-6.
- [2] BRDIČKA, Rudolf, Mirko KALOUSEK a Alexandr SCHÜTZ. *Úvod do fyzikální chemie*. 2. dopl. a přeprac. vyd. Praha: SNTL - Nakladatelství technické literatury, 1972. 493 s.
- [3] CÍDLOVÁ, Hana, Zuzana MOKRÁ a Barbora VALOVÁ. *Obecná chemie*. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2018. Elportál. ISBN 978-80-210-8953-2.
- [4] SUAHI, Faiz Bukhari Mohd, Wan Saime Wan NGAH a Che Sofiah SAIDIN. *Basic Analytical Chemistry* [online]. Penerbit USM, 2018, 241 s. [cit. 2020-11-26]. Dostupné z <https://app.knovel.com/hotlink/toc/id:kpBAC00001/basic-analytical-chemistry/basic-analytical-chemistry>
- [5] ALONGI, Kristin S. a George C. SHIELDS. *Theoretical Calculations of Acid Dissociation Constants: A Review Article* [online]. 6. Elsevier, 2010, 113-138 [cit. 2020-11-26]. Annual Reports in Computational Chemistry. DOI: 10.1016/S1574-1400(10)06008-1. ISBN 9780444535528. ISSN 1574-1400. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S1574-1400\(10\)06008-1](https://doi.org/10.1016/S1574-1400(10)06008-1)
- [6] ROSSI, Robert D. What Does the Acid Ionization Constant Tell You? An Organic Chemistry Student Guide: A Review Article. *Journal of Chemical Education*. [online]. Elsevier, 2012, 2010, 90(2), 183-190. [cit. 2020-11-26]. Annual Reports in Computational Chemistry. DOI: 10.1021/ed200512n. ISBN 9780444535528. ISSN 0021-9584. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/ed200512n>
- [7] MUNEGUMI, Toratane. Where is the Border Line between Strong Acids and Weak Acids? *Journal of Chemical Education* [online]. Naruto University of Education, 2013, (1), 12-16. [cit. 2020-11-26]. DOI: 10.12691/wjce-1-1-4. Dostupné z: <http://pubs.sciepub.com/wjce/1/1/4/>

- [8] LEHMANN, H. P., X. FUENTES-ARDERIU a L. F. BERTELLO. Glossary of terms in quantities and units in Clinical Chemistry (IUPAC-IFCC Recommendations 1996) [online]. *Pure and Applied Chemistry*. 1996, **68**(4), 957-1000. [cit. 2020-11-26]. ISSN 1365-3075. DOI: 10.1251/pac199668040957. Dostupné z: <https://doi.org/10.1351/pac199668040957>
- [9] CRC Handbook of Chemistry and Physics, 88th ed Editor-in-Chief: David R. Lide (National Institute of Standards and Technology) CRC Press/Taylor & Francis Group. *Journal of the American Chemical Society* [online]. 2008, **130**(1), 42-51 [cit. 2021-04-13]. ISSN 0002-7863. DOI: 10.1021/ja077011d. Dostupné z: http://www2.chm.ulaval.ca/gecha/chm1903/4_acide-base/organic_acids.pdf
- [10] REIJENGA, Jetse, Arno VAN HOOFF, Antonie VAN LOON a Bram TEUNISSEN. Development of Methods for the Determination of pK a Values [online]. *Analytical Chemistry Insights*. 2013, **8**, 53-71. [cit. 2021-2-1]. DOI: 10.4137/ACI.S12304. ISSN 1177-3901. Dostupné z: <http://dx.doi.org/10.4137/ACI.S12304>
- [11] JABBARI, Morteza a Sedigheh KHOSRAVINIA. Thermodynamic Study on the Acid-Base Properties of Antioxidant Compound Ascorbic Acid in Different NaClO₄ Aqueous Ethanol Solutions. *Journal of the Brazilian Chemical Society* [online]. [cit. 2021-04-17]. ISSN 0103-5053. Dostupné z: <http://dx.doi.org/10.5935/0103-5053.20150336>
- [12] BABIĆ, Sandra, Alka J.M. HORVAT, Dragana MUTAVDŽIĆ PAVLOVIĆ a Marija KAŠTELAN-MACAN. Determination of pK_a values of active pharmaceutical ingredients [online]. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2007, **26**(11), 1043-1061. [cit. 2021-2-1]. DOI: 10.1016/j.trac.2007.09.004. ISSN 01659936. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2007.09.004>
- [13] OSSOWSKI, Tadeusz, Marília O. F. GOULART, Fabiane C. de ABREU, et al. Determination of the pK_a values of some biologically active and inactive hydroxyquinones. *Journal of the Brazilian Chemical Society* [online]. 2008, **19**(1), 175-183 [cit. 2021-04-15]. ISSN 0103-5053. DOI: 10.1590/590/S0103-50532008000100025. Dostupné z: <https://doi.org/10.1590/S0103-50532008000100025>
- [14] KUMAR, Dipesh, Bhaskar SINGH, Kuldeep BAUDDH a John KORSTAD. Bio-oil and Biodiesel as Biofuels Derived from Microalgal Oil and Their Characterization

- by Using Instrumental Techniques. SINGH, Bhaskar, Kuldeep BAUDDH a Faizal BUX, ed. *Algae and Environmental Sustainability* [online]. New Delhi: Springer India, 2015, 2015-12-22, s. 87-95 [cit. 2021-04-15]. ISBN 978-81-322-2639-0. DOI: 10.1007/978-81-322-2641-3_7. Dostupné z: https://doi.org/10.1007/978-81-322-2641-3_7
- [15] PATHARE, Bebee a Vrushali TAMBE. A review on various analytical methods used in determination of dissociation constant [online]. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. India, 2014, 6(8), 26-34. [cit. 2021-2-3]. ISSN 0975-1491. Dostupné také z: <https://innovareacademics.in/journals/index.php/ijpps/article/view/1641/10292>
- [16] SAMUELSEN, Lisa, René HOLM, Audrey LATHUILE a Christian SCHÖNBECK. Determination of acidity constants for weak acids and bases by isothermal titration calorimetry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* [online]. 2020, 184 [cit. 2021-03-09]. ISSN 07317085. DOI: 10.1016/j.jpba.2020.113206. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2020.113206>
- [17] ULLAH, Azmat, Gayathri CHANDRASEKARAN, Stanley BRUL a Gertien J. SMITS. Yeast adaptation to weak acids prevents futile energy expenditure. *Frontiers in Microbiology* [online]. 2013, 4 [cit. 2021-03-02]. DOI: 10.3389/fmicb.2013.00142. ISSN 1664-302X. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00142>
- [18] BROWN, William H.. "Acetic acid". *Encyclopedia Britannica* [online]. [cit. 2021-03-03]. <https://www.britannica.com/science/acetic-acid>
- [19] DIMIAN, Alexandre C., Costin Sorin BILDEA a Anton A. KISS. Acetic Acid. *Applications in Design and Simulation of Sustainable Chemical Processes* [online]. Elsevier, 2019, 2019, s. 483-519 [cit. 2021-03-03]. DOI: 10.1016/B978-0-444-63876-2.00013-9. ISBN 9780444638762. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63876-2.00013-9>
- [20] DESHMUKH, Gunjan a Haresh MANYAR. Production Pathways of Acetic Acid and Its Versatile Applications in the Food Industry. *Acetic Acid-Production and Applications in the Food Industry [Working Title]* [online]. IntechOpen, 2020, 2020-5-15 [cit. 2021-03-03]. DOI: 10.5772/intechopen.92289. Dostupné z: <https://doi.org/10.5772/intechopen.92289>

- [21] SANO, Ken-ichi, Hiroshi UCHIDA a Syoichirou WAKABAYASHI. A new process for acetic acid production by direct oxidation of ethylene. *Catalysis Surveys from Japan* [online]. 3(1), 55-60 [cit. 2021-03-04]. ISSN 13846574. DOI: 10.1023/A:1019003230537. Dostupné z: <https://doi.org/10.1023%2FA%3A1019003230537>
- [22] SOLIERI, Lisa a Paolo GIUDICI, ed. *Vinegars of the World* [online]. Milano: Springer Milan, 2009 [cit. 2021-03-04]. ISBN 978-88-470-0865-6. DOI: 10.1007/978-88-470-0866-3. Dostupné z: <https://www.springer.com/gp/book/9788847008656>
- [23] PATEL, N a Hirai N. PANDYA. Production of acetic acid from molasses by fermentation process. *International Journal of Advance Research and Innovative Ideas in Education* [online]. 2015, (1), 58-60 [cit. 2021-03-04]. Dostupné z: <https://www.semanticscholar.org/paper/Production-of-acetic-acid-from-molasses-by-process-Patel-Pandya/9e1b86d3851ab0c3630b6097e73ed0b64b943f03>
- [24] BABIC, Jurislav. *Acetic Acid in the Food Industry* [online]. 2013, leden 2013, 163-167 [cit. 2021-03-04]. ISSN 978-1-62948-217-0. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/268277985_Acetic_Acid_in_the_Food_Industry
- [25] THOMAS, Stanley. *Uses of Acetic Acid* [online]. 25. 2. 2016 [cit. 2021-03-04]. Dostupné z: <https://medium.com/@stanleythomas.usa/uses-of-acetic-acid-e440f84adec1>
- [26] PATHY, Krishnasarma. *Process for Preparation of Vitamin C and Method for Determination of Vitamin C in Tablets* [online]. 2018, 1(3) [cit. 2021-03-05]. ISSN 26436760. DOI: 10.32474/SCSOAJ.2018.01.000114. Dostupné z: <https://doi.org/10.32474/SCSOAJ.2018.01.000114>
- [27] RIMPAPA, Z., A. PLEHO-KAPIĆ, S. GALIJAŠEVIĆ, A. ŠAPČANIN a F. KORAC. Change in Acidity of L-Ascorbic Acid in the Mixed Solvent DMSO - Water Followed by Conductometric Determination of Dissociation Constants. *Bulletin of the Chemists and Technologists of Bosnia and Herzegovina* [online]. University of Sarajevo, Medical Faculty Sarajevo, Bosnia and Herzegovina, 13. 6. 2013, (40), 1 [cit. 2021-04-13]. ISSN 2232-7266. Dostupné z: <http://www.pmf.unsa.ba/hemija/glasnik/files/Issue%2040/40-7-Rimpapa.pdf>

- [28] KOMPRDA, T. *Základy výživy*. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 2003. s. 84-86. ISBN 80-7157-655-7.
- [29] DOSTÁL, J. et al. *Lékařská chemie II*. 2. vydání. Brno: Nakladatelství MU, 2005. s. 156. ISBN 80-210-3789-X.
- [30] YANG, Weichao a Hui XU. Industrial Fermentation of Vitamin C. *Industrial Biotechnology of Vitamins, Biopigments, and Antioxidants* [online]. Weinheim, Germany, 2016, 2016-04-29, 1(3), 161-192 [cit. 2021-03-05]. ISBN 9783527337347. ISSN 26436760. DOI: 10.1002/9783527681754.ch7. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/9783527681754.ch7>
- [31] VARVARA, Michele, Giancarlo BOZZO, Chiara DISANTO, Cosimo Nicola PAGLIARONE a Gaetano Vitale CELANO. The use of the ascorbic acid as food additive and technical-legal issues. *Italian Journal of Food Safety* [online]. 2016, 5(1) [cit. 2021-03-06]. ISSN 2239-7132. DOI: 10.4081/ijfs.2016.4313. Dostupné z: <https://doi.org/10.4081/ijfs.2016.4313>
- [32] LIMA, Débora R. S., Marcelo COSSENZA, Carlos Gustavo GARCIA, Camila C. PORTUGAL, Flávia F. de C. MARQUES, Roberto PAES-DE-CARVALHO a Annibal D. PEREIRA NETTO. Determination of ascorbic acid in the retina during chicken embryo development using high performance liquid chromatography and UV detection. *Analytical Methods* [online]. 2016, 8(27), 5441-5447 [cit. 2021-04-12]. ISSN 1759-9660. DOI: 10.1039/C6AY01249C. Dostupné z: <https://doi.org/10.1039/C6AY01249C>
- [33] DEL OLMO, Ana, Javier CALZADA a Manuel NUÑEZ. Benzoic acid and its derivatives as naturally occurring compounds in foods and as additives: Uses, exposure, and controversy. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* [online]. 2015, 57(14), 3084-3103 [cit. 2021-03-06]. ISSN 1040-8398. DOI: 10.1080/10408398.2015.1087964. Dostupné z: <https://doi.org/10.1080/10408398.2015.1087964>
- [34] INDRAYANTO, Gunawan, Achmad SYAHRANI, Manuel MUGIHARDJO, et al. Benzoic Acid: Uses, exposure, and controversy. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* [online]. Elsevier, 1999, 1999, 57(14), 1-46 [cit. 2021-03-06]. Analytical Profiles of Drug Substances and Excipients. ISBN 9780122608261. ISSN

- 1040-8398. DOI: 10.1016/S0099-5428(08)60620-6. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S0099-5428\(08\)60620-6](https://doi.org/10.1016/S0099-5428(08)60620-6)
- [35] PARK, Jung Mee, Alessandro LAIO, Marcella IANNUZZI a Michele PARRINELLO. Dissociation Mechanism of Acetic Acid in Water. *Journal of the American Chemical Society* [online]. 2006, **128**(35), 11318-11319 [cit. 2021-5-4]. ISSN 0002-7863. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/ja060454h>
- [36] ZHOU, Yi, Balaji Sundara SEKAR, Shuke WU, et al. Benzoic acid production via cascade biotransformation and coupled fermentation-biotransformation: Effect of Ionic Strength and Temperature. *Biotechnology and Bioengineering* [online]. Elsevier, 2020, 1999, **117**(8), 2340-2350 [cit. 2021-03-06]. Analytical Profiles of Drug Substances and Excipients. ISBN 9780122608261. ISSN 0006-3592. DOI: 10.1002/bit.27366. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/bit.27366>
- [37] JIA, Jiaojiao, Xi CHEN, Lijun ZHAI a Yulan NIU. Oxidation of toluene to benzoic acid via VOTPP catalyst synthesized with an improved method. *Monatshefte für Chemie-Chemical Monthly* [online]. [cit. 2021-5-2]. ISSN 0026-9247. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s00706-020-02688-1>
- [38] KOMESU, Andrea, Johnatt Allan Rocha de OLIVEIRA, Luiza Helena da Silva MARTINS, et al. Lactic Acid Production to Purification: A Review. *BioResources* [online]. Elsevier, 2017, 1999, **12**(2), 4364-4383 [cit. 2021-03-06]. Analytical Profiles of Drug Substances and Excipients. ISBN 9780122608261. ISSN 1930-2126. DOI: 10.15376/biores.12.2.Komesu. Dostupné z: <https://doi.org/10.15376/biores.12.2.Komesu>
- [39] VONDRÁŠEK, Jiří a Jiří VYMĚTAL. Konformační chování aminokyselin v peptidech a proteinech z pohledu molekulárního modelování a výpočetních metod [online]. *Chemické listy*. Praha: Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, 2016, (110), 385-393. [cit. 2021-2-3]. Dostupné také z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2016_05_385-393.pdf
- [40] REDDY, Michael K. Amino acid: Chemical Compound. *Encyclopedia Britannica* [online]. 20. 10. 2020 [cit. 2021-03-06]. Dostupné z: <https://www.britannica.com/science/amino-acid>
- [41] MCMURRY, John. *Fundamentals of organic chemistry* [online]. 7th ed., internat. student ed. Belmont: Brooks/Cole, 2011 [cit. 2021-02-03]. ISBN 978-143-9049-730.

- [42] MCMURRY, John. *Organická chemie*. V Brně: VUTIUM, 2007, 1260 s. Překlady vysokoškolských učebnic. ISBN 978-80-7080-637-1.
- [43] DAMODARAN, Srinivasan, Kirk L. PARKIN a Owen R. FENNEMA. *Fennema's food chemistry*. 4. Boca Raton: CRC Press/Taylor & Francis, 2008, 1160 s. ISBN 9781420020526.
- [44] LOPEZ, Michael J. a Shamim S. MOHIUDDIN. *Biochemistry, Essential Amino Acids* [online]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2020 [cit. 2021-02-03]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557845/>
- [45] IVANOV, Kalin, Assena STOIMENOVA, Danka OBRESHKOVA a Luciano SASO. *Biotechnology in the Production of Pharmaceutical Industry Ingredients: Amino Acids* [online]. 2014, **27**(2), 3620-3626 [cit. 2021-02-11]. ISSN 1310-2818. DOI: 10.5504/BBEQ.2012.0134. Dostupné z: <https://doi.org/10.5504/BBEQ.2012.0134>
- [46] ZUEND, Stephan J., Matthew P. COUGHLIN, Mathieu P. LALONDE a Eric N. JACOBSEN. Scaleable catalytic asymmetric Strecker syntheses of unnatural α -amino acids. *Nature* [online]. 2009, **461**(7266), 968-970 [cit. 2021-5-2]. ISSN 0028-0836. DOI: 10.1038/nature08484. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/nature08484>
- [47] SANCHEZ, S. a A.L. DEMAINE. FERMENTATION (INDUSTRIAL) | Production of Amino Acids. *Encyclopedia of Food Microbiology* [online]. Elsevier, 2014, 2014, s. 778-784 [cit. 2021-5-2]. ISBN 9780123847331. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00373-6>
- [48] DAVIS, Jack. 2018. *Amino Acid Uses in Industry*. News-Medical [online]. [cit. 2021-02-13]. Dostupné z: <https://www.news-medical.net/life-sciences/Amino-Acid-Uses-in-Industry.aspx>
- [49] SADOVNIKOVA, M S a Vasilii M BELIKOV. Industrial Applications of Amino-acids. *Russian Chemical Reviews* [online]. 1978, **47**(2), 199-212 [cit. 2021-02-13]. ISSN 0036-021X. Dostupné z: <https://iopscience.iop.org/article/10.1070/RC1978v047n02ABEH002212>
- [50] BURNETT, Christina L., Bart HELDRETH, Wilma F. BERGFELD, et al. Safety Assessment of α -Amino Acids as Used in Cosmetics. *International Journal of*

- Toxicology* [online]. 2013, **32**(6_suppl), 41S-64S [cit. 2021-02-15]. ISSN 1091-5818. Dostupné z: <https://doi.org/10.1177/1091581813507090>
- [51] DUFF, JR., Michael R., Jordan GRUBBS a Elizabeth E. HOWELL. Isothermal Titration Calorimetry for Measuring Macromolecule-Ligand Affinity. *Journal of Visualized Experiments* [online]. 2011, (55) [cit. 2021-03-08]. ISSN 1940-087X. DOI: 10.3791/2796. Dostupné z: <https://dx.doi.org/10.3791/2796>
- [52] MAZZEI, Luca, Stefano CIURLI a Barbara ZAMBELLI. Hot Biological Catalysis: Isothermal Titration Calorimetry to Characterize Enzymatic Reactions. *Journal of Visualized Experiments* [online]. 2014, (86) [cit. 2021-03-08]. ISSN 1940-087X. DOI: 10.3791/51487. Dostupné z: <https://doi.org/10.3791/51487>
- [53] *VP-ITC MicroCalorimeter: User's Manual*. Northampton, USA: MicroCal, LL. 107 s. Dostupné také z: https://ctrstbio.org.uic.edu/manuals/vpita_manual.pdf
- [54] VELÁZQUEZ-CAMPOY, Adrián, Hiroyasu OHTAKA, Azin NEZAMI, Salman MUZAMMIL a Ernesto FREIRE. Isothermal Titration Calorimetry. *Current Protocols in Cell Biology* [online]. 2004, 23(1) [cit. 2021-03-08]. ISSN 1934-2500. DOI: 10.1002/0471143030.cb1708s23 Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/0471143030.cb1708s23>
- [55] HOFER, Ctirad. Mikrokolorimetrie biologicky významných molekul. *Československý časopis pro fyziku*. Česká republika: Fyzikální ústav AVČR, 2006, 56 (5), s. 288-292. [cit. 2021-03-09]. ISSN 0009-0700.
- [56] SHOGHI, Elham, Lilian ROMERO, Mario RETA, Clara RÀFOLS a Elisabeth BOSCH. Enthalpies and constants of dissociation of several neutral and cationic acids in aqueous and methanol/water solutions at various temperatures. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* [online]. 2009, **49**(4), 923-930 [cit. 2021-04-17]. ISSN 07317085. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2009.01.037>
- [57] TAJC, Stephen G., Blanton S. TOLBERT, Ravi BASAVAPPA a Benjamin L. MILLER. Direct Determination of Thiol p K a by Isothermal Titration Microcalorimetry. *Journal of the American Chemical Society* [online]. 2004, **126**(34), 10508-10509 [cit. 2021-04-17]. ISSN 0002-7863. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/ja047929u>

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

λ_i	vodivost iontu
α	stupeň disociace
$^{\circ}\text{C}$	stupeň Celsia
ΔH	enthalpie
BF_3	fluorid boritý
BOH	obecný vzorec pro zásadu
C_2H_4	ethylen
CO	oxid uhelnatý
CO_2	oxid uhličitý
H^+	kation vodíku
H_2O	voda
H_3O^+	oxoniový kationt
HA	obecný vzorec pro kyselinu
HCl	kyselina chlorovodíková
HI	jodovodík
CH_3COOH	kyselina octová
$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$	ethanol
CH_3OH	methanol
ITC	isotermální titrační mikrokalorimetrie
K	vazebná konstanta reakce
K'	zdánlivá disociační konstanta
$K_b, \text{p}K_b$	disociační konstanta zásady
K_c	rovnovážná konstanta
KCl	chlorid draselný
K_v	iontový součin vody

L	ligand
l	litr
M	makromolekula
MetOH	methanol
mmol	milimol
n	stechiometrie
NaOH	hydroxid sodný
NMR	nukleární magnetická rezonance
O ₂	kyslík
OH ⁻	hydroxidový aniont
Pa	pascal
pK _a	disociační konstanta kyseliny
ROR	ether
s	sekunda
ΔS	entropie
Λ	ekvivalentní vodivost
Λ ⁰	limitní hodnota ekvivalentní vodivosti
μcal	mikrokalorie
μl	mikrolitr
μmol	mikromol

SEZNAM OBRÁZKŮ

<i>Obrázek 1: Příklad potenciometrického stanovení kyseliny askorbové</i>	16
<i>Obrázek 2: Příklad absorpčního spektra</i>	17
<i>Obrázek 3: Příklad výsledného grafu získaného spektrofotometrickým stanovením pK_a ...</i>	17
<i>Obrázek 4: Strukturní vzorec kyseliny octové</i>	20
<i>Obrázek 5: Strukturní vzorec kyseliny L-askorbové</i>	23
<i>Obrázek 6: Schéma disociace kyseliny L-askorbové</i>	23
<i>Obrázek 7: Schéma oxidace kyseliny L-askorbové</i>	24
<i>Obrázek 8: Dvoustupňová fermentace kyseliny L-askorbové</i>	25
<i>Obrázek 9: Strukturní vzorec kyseliny benzoové</i>	26
<i>Obrázek 10: Schéma disociace kyseliny benzoové</i>	26
<i>Obrázek 11: Schéma oxidace toluenu</i>	26
<i>Obrázek 12: Strukturní vzorec kyseliny L-mléčné</i>	28
<i>Obrázek 13: Schéma disociace kyseliny mléčné</i>	28
<i>Obrázek 14: Schéma chemické syntézy kyseliny mléčné</i>	29
<i>Obrázek 15: Obecné vzorce α a β aminokyselin</i>	30
<i>Obrázek 16: Zwitterionická forma aminokyseliny alanin</i>	30
<i>Obrázek 17: Streckerova syntéza α-aminokyselin</i>	32
<i>Obrázek 18: Schéma přístroje ITC</i>	35
<i>Obrázek 19: Výstupní graf měření na ITC</i>	36
<i>Obrázek 20: Výstupní graf měření stanovení ibuprofenu</i>	38
<i>Obrázek 21: Výstupní graf měření kyseliny benzoové v roztoku methanol/voda</i>	39
<i>Obrázek 22: Graf závislosti spotřebovaného tepla v závislosti na čase</i>	39
<i>Obrázek 23: Graf závislosti spotřebovaného tepla na pH při třech různých koncentracích L-cysteinu</i>	40
<i>Obrázek 24: Záznam uvolněného tepla při stanovení kyseliny L-askorbové A: průběh stanovení, B: průběh referenčního měření a C: výsledná křivka (modrá – bez průběhu reference, červená – s referencí)</i>	49
<i>Obrázek 25: Záznam uvolněného tepla při stanovení kyseliny L-mléčné</i>	50
<i>Obrázek 26: Záznam uvolněného tepla při stanovení kyseliny L-mléčné A: průběh stanovení, B: výsledná křivka matematického modelu (modrá – bez reference, červená – s referenčním teplem)</i>	51
<i>Obrázek 27: Záznam uvolněného tepla při stanovení kyseliny benzoové A: průběh stanovení, B: výsledná křivka bez reference</i>	52
<i>Obrázek 28: Záznam uvolněného tepla při stanovení kyseliny benzoové A: průběh stanovení, B: výsledná křivka vyhodnocená bez referenčního procesu (modrá) a s referencí (červená)</i>	53

<i>Obrázek 29: Záznam uvolněného tepla při stanovení kyseliny benzoové A: průběh stanovení s poloviční koncentrací HCl, B: body odpovídající integraci píků.....</i>	<i>54</i>
<i>Obrázek 30: Záznam uvolněného tepla při stanovení kyseliny L-askorbové A: průběh stanovení, B: body odpovídající integraci píků stanovení, C: průběh referenčního stanovení, D: body odpovídající integraci píků při referenčním stanovení.....</i>	<i>55</i>
<i>Obrázek 31: Záznam uvolněného tepla při stanovení kyseliny L-mléčné A: průběh stanovení, B: body odpovídající integraci píků stanovení kyseliny L-mléčné</i>	<i>56</i>
<i>Obrázek 32: Záznam uvolněného tepla při stanovení kyseliny mléčné A: průběh stanovení, B: body odpovídající integraci píků stanovení, C: průběh referenčního stanovení, D: body odpovídající integraci píků při referenčním stanovení.....</i>	<i>57</i>
<i>Obrázek 33: Záznam mikrokolorimetrického měření kyseliny L-mléčné (o snížené koncentraci oproti předchozímu měření).....</i>	<i>58</i>
<i>Obrázek 34: Záznam uvolněného tepla při stanovení kyseliny benzoové A: průběh stanovení, B: body odpovídající integraci píků stanovení kyseliny benzoové</i>	<i>59</i>
<i>Obrázek 35: Záznam mikrokolorimetrického měření benzoanu sodného v roztoku methanol/voda.....</i>	<i>60</i>

SEZNAM TABULEK

<i>Tabulka 1 - Hodnoty disociačních konstant vybraných kyselin [9].....</i>	15
<i>Tabulka 2 - Hodnoty disociačních konstant vybraných zásad [9].....</i>	15
<i>Tabulka 3 - Rozdělení kódovaných aminokyselin [41]</i>	31