Elektrokemijska karakterizacija L-karnozina

Mihaljević, Martina

Master's thesis / Diplomski rad

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Department of Chemistry / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za kemiju**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:182:797682

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-19**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Department of Chemistry, Osijek

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Odjel za kemiju
Diplomski studij kemije

Martina Mihaljević

Elektrokemijska karakterizacija L-karnozina

Diplomski rad

Osijek, 2017.

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Odjel za kemiju
Diplomski studij kemije

Martina Mihaljević

Elektrokemijska karakterizacija L-karnozina

Diplomski rad

Mentorica: doc.dr.sc. Martina Medvidović Kosanović

Osijek, 2017.

Zahvaljujem svojoj mentorici doc. dr. sc. Martini Medvidović-Kosanović za stručno i prijateljsko vodstvo i savjetovanje tijekom izrade diplomskoga rada te kolegama Jeleni Budimčić i Milanu Pajičiću za svesrdnu podršku i pomoć.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA **Diplomski rad**

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Odjel za kemiju
Diplomski studij kemije
Znanstveno područje: Prirodne znanosti
Znanstveno polje: Kemija

ELEKTROKEMIJSKA KARAKTERIZACIJA L-KARNOZINA

Martina Mihaljević

Rad je izrađen na: Odjelu za kemiju

Mentor: doc. dr. sc. Martina Medvidović-Kosanović

Sažetak

Elektrokemijska svojstva L-karnozina u puferima pH vrijednosti od 3,5 do 8,0 ispitivan je diferencijalnom pulsnom voltametrijom, cikličkom voltametrijom i kronoamperometrijom. Kao radna elektroda u troelektrodnoj elektrokemijskoj ćeliji korištena je elektroda od staklastog ugljika. Cilj rada bio je ispitati oksidaciju i adsorpciju L-karnozina, pratiti utjecaj pH na potencijal i struju oksidacijskog strujnog vrha, odrediti granicu detekcije L-karnozina te pokušati modificirati površinu elektrode od staklastog ugljika karnozinom. Ustanovljeno je da L-karnozin oksidira pri navedenim eksperimentalnim uvjetima pri čemu dolazi do adsorpcije njegovog oksidacijskog produkta na površinu elektrode. Visina oksidacijskog strujnog vrha L-karnozina varirala je s promjenom pH vrijednosti (optimalna pH vrijednost za oksidaciju je 4,8), određena granica detekcije L-karnozina iznosi $1 \cdot 10^{-5}$ mol dm^{-3} i uspješno je modificirana elektroda od staklastog ugljika. U metodičkom dijelu rada osmišljen je mini projekt pod nazivom „Od aminokiselina do polipeptida“ predviđen za učenike četvrtog razreda gimnazije. Trajanje mini projekta je 4 školska sata, a uključuje obradu novog gradiva, rješavanje zadataka i pokuse.

Diplomski rad obuhvaća: *73* stranice, *24* slike, *2* tablice, *33* literaturna navoda.

Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: karnozin/voltametrija/oksidacija/adsorpcija

Rad prihvaćen: 27. lipnja 2017.

Stručno povjerenstvo za ocjenu:

1. Doc. dr. sc. Elvira Kovač-Andrić
2. Doc. dr. sc. Martina Medvidović-Kosanović
3. Doc. dr. sc. Aleksandar Sečenji

Rad je pohranjen: u Knjižnici Odjela za kemiju, F. Kuhača 20, Osijek

BASIC DOCUMENTATION CARD **Diploma Thesis**

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek
Department of Chemistry
Graduate Study of Chemistry
Scientific Area: Natural Sciences
Scientific Field: Chemistry

ELECTROCHEMICAL CHARACTERIZATION OF L-CARNOSINE

Martina Mihaljević

Thesis completed at: Department of chemistry

Supervisor: Assist. Prof. Martina Medvidović-Kosanović

Abstract

Differential pulse voltammetry, cyclic voltammetry and chronoamperometry were used to determine the electrochemical properties of L-carnosine in a buffer solutions with pH values from 3,5 to 8,0. Glassy carbon electrode was used as a working elektrode in the three electrode electrochemical cell. The aim of this thesis was to determine oxidation and adsorption characteristics of L-carnosine, monitor the influence of pH on potential and current of the oxidation peak, determine the detection limit of L-carnosine and to attempt to modify the surface of the glassy carbon electrode with carnosine. L-carnosine showed one oxidation peak, which decreased with successive scans indicating the adsorption of the oxidation products on the electrode surface. Oxidation peak current varied with the change in pH (optimal pH for oxidation was 4,8), detection limit of L-carnosine was successfully determined and it amounts $1 \cdot 10^{-5}$ mol dm^{-3} and the surface of the glassy carbon electrode was successfully modified. In methodical part of this thesis mini project entitled „From amino acids to polypeptides“ suitable for the 4^{th} grade Gymnasium students was described. Duration of the mini project is 4 school periods and includes learning of new material, solving numerical problems and experiments.

Thesis includes: *73* pages, *24* figures, *2* tables, *33* references

Original in: Croatian

Keywords: carnosine/voltammetry/oxidation/adsorption

Thesis accepted: 27^{th} June 2017.

Reviewers:

1. Assist. Prof. Elvira Kovač-Andrić
2. Assist. Prof. Martina Medvidović-Kosanović
3. Assist. Prof. Aleksandar Sečenji

Thesis deposited: at the Library of Department of Chemistry, F. Kuhača 20, 31000 Osijek, Croatia

Sadržaj

1. Uvod.....1
2. Literaturni pregled.....2
   2.1. Aminokiseline.....2
   2.2. Karnozin.....5
   2.3. Metode određivanja karnozina.....10
      2.3.1. Elektrokemijske metode određivanja karnozina.....10
         2.3.1.1. Voltametrijske metode.....12
         2.3.1.2. Kronoamperometrija.....14
3. Eksperimetalni dio.....16
   3.1. Kemikalije i priprava otopina.....16
   3.2. Elektrokemijska ćelija.....17
      3.2.1. Radna elektroda.....18
      3.2.2. Protuelektroda.....18
      3.2.3. Referentna elektroda.....19
   3.3. Eksperimentalne tehnike i uvjeti mjerenja.....20
      3.3.1. Diferencijalna pulsna voltametrija.....20
      3.3.2. Kronoamperometrija.....20
      3.3.3. Ciklička voltametrija.....20
4. Rezultati i rasprava.....21
   4.1. Ispitivanje oksidacije L-karnozina.....21
   4.2. Ispitivanje adsorpcije L-karnozina.....22
   4.3. Utjecaj pH.....23
   4.4. Kalibracijski pravac.....26
   4.5. Modificirana elektroda od staklastog ugljika.....28
   4.6. Pretpostavljeni mehanizam oksidacije L-karnozina.....29
5. Metodički dio.....31
6. Zaključak.....71
7. Literatura.....72

1. Uvod

Cilj ovoga rada bio je ispitati elektrokemijska svojstva L-karnozina, pratiti utjecaj pH vrijednosti na potencijal i struju oksidacijskog stujnog vrha, odrediti granicu detekcije L-karnozina i pokušati elektrokemijski modificirati elektrodu od staklastog ugljika nanošenjem sloja karnozina na elektrodnu površinu.

Pri izvedbi eksprimentalnog dijela rada korištene su tri elektrokemijske tehnike, a to su diferencijalna pulsna voltametrija, ciklička voltametrija i kronoamperometrija.

U prvom dijelu rada opisan je karnozin, njegova svojstva i biološka važnost, te su detaljnije opisane korištene tehnike i aparatura koja je potrebna za elektrokemijska mjerenja.

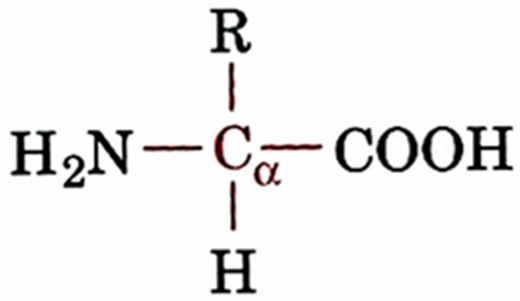
U drugom dijelu rada navedeni su uvjeti pri kojima su odrađena elektrokemijska ispitivanja, zatim su prikazani dobiveni rezultati i prokomentirana je njihova važnost.

U zadnjem dijelu rada prikazan je mini projekt za učenike srednjih škola pod nazivom „Od aminokiselina do polipeptida“. Mini projekt je osmišljen kako bi se potaknulo učenike na aktivnost, razvijanje vlastitog kritičkog mišljenja, sposobnosti zapažanja te kako bi se novo gradivo povezalo sa prethodno stečenim znanjima kemije i srodnih predmeta.

2. Literaturni pregled

2.1. Aminokiseline

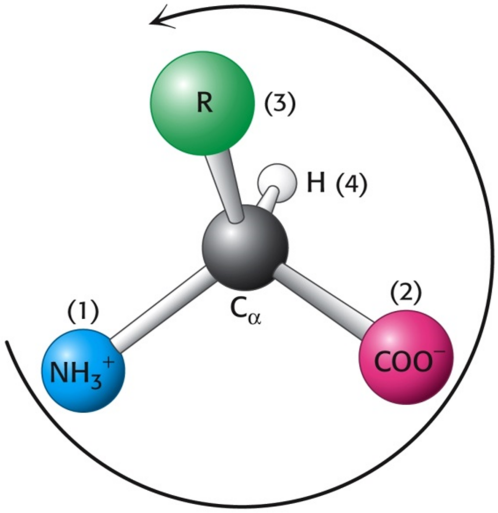
Aminokiseline su osnovne gradivne jedince proteina. α-Aminokiselina sastoji se od centralnog atoma ugljika koji zovemo α-ugljikom povezanog sa amino skupinom, karboksilnom skupinom, atomom vodika i skupinom R (*Slika 2.1*). R skupina često se naziva bočnim ogrankom aminokiseline. [1]



Slika 2.1. Opća formula aminokiseline.

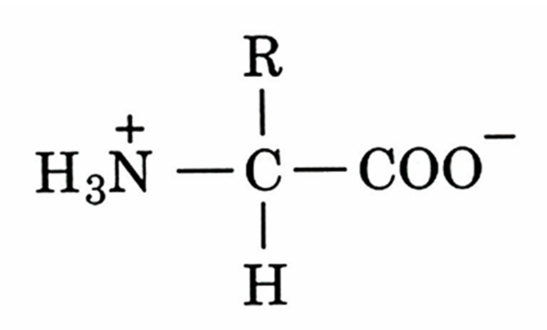
Sa 4 različite skupine povezane na tetraedarski α-ugljikov atom, α-aminokiseline su kiralne, što znači da se svaka aminokiselina pojavljuje u 2 oblika: u obliku L i D izomera. Samo L-izomeri grade proteine. Za gotovo sve aminokiseline L-izomer ima S apsolutnu konfiguraciju (*Slika 2.2*).

Kako bi se odredila apsolutna konfiguracija aminokiseline, supstituentima asimetričnog ugljikovog atoma dodjeljuju se prioriteti prema atomskim brojevima. Supstituent najnižeg prioriteta (atom vodika) okrenut je od smjera promatrača. Ako je progresija od najvišeg do najnižeg prioriteta preostala 3 supstituenta u smjeru kazaljke na satu tada je konfiguracija R, dok je u slučaju progresije u suprotnome smjeru konfiguracija S. [1]



Slika 2.2. Određivanje apsolutne konfiguracije aminokiseline.

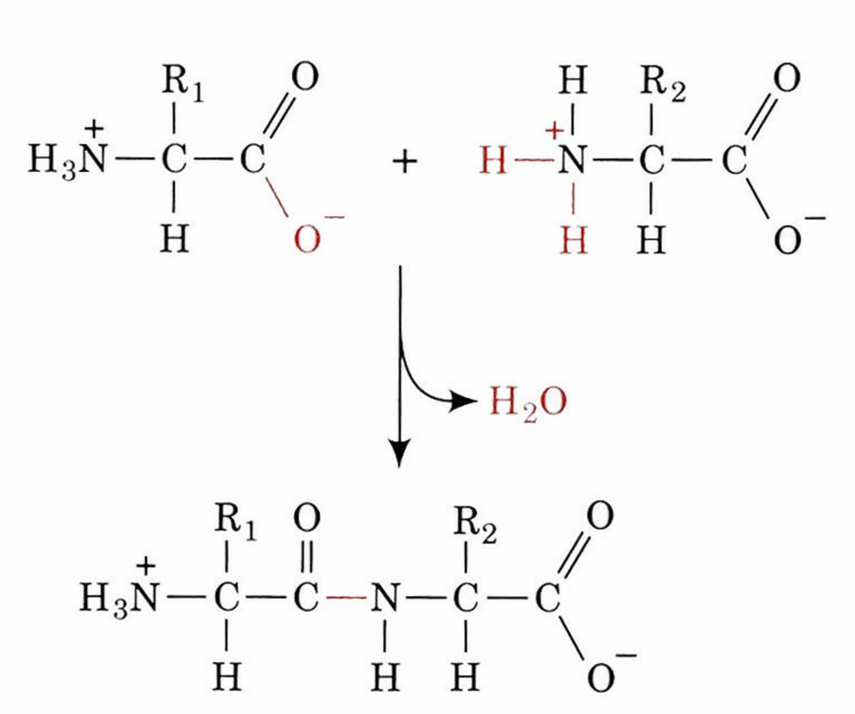
Aminokiseline u otopini pri neutralnom pH pretežno se nalaze u obliku zwitteriona (*Slika 2.3*). U takvom obliku amino skupina je protonirana ($-NH_3^+$), a karboksilna skupina deprotonirana ($-COO^-$).



Slika 2.3. Aminokiselina u obliku zwitteriona.

Svi proteini, od onih koji grade bakterije do onih koji se nalaze u ljudskom organizmu, izgrađeni su od istih 20 aminokiselina. Ove aminokiseline razlikuju se u bočnom ogranku, koji varira u veličini, obliku, naboju, sposobnosti vezanja vodika, hidrofobnom karakteru i kemijskoj reaktivnosti.

Aminokiseline se međusobno vežu peptidnom vezom (*Slika 2.4*). Peptidna veza nastaje vezanjem α-karboksilne skupine jedne aminokiseline s α-amino skupinom druge aminokiseline uz izdvajanje molekule vode. Prema dogovoru, terminalna amino skupina uzima se kao početak polipeptidnog lanca. [1]



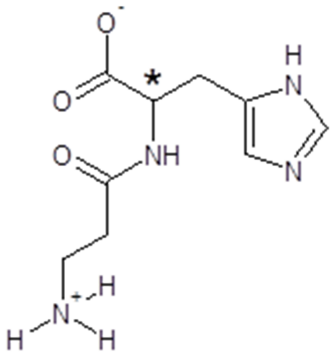
Slika 2.4. Nastanak peptidne veze.

Vezanjem dvaju aminokiselina peptidnom vezom nastaju dipeptidi. Jedan od takvih spojeva je L-karnozin, koji nastaje vezanjem L-histidina i β-alanina, a biti će opisan u nastavku rada.

2.2. Karnozin

W. S. Gulewitsch je otkrio karnozin 1900. godine, a Severin je tek 53 godine kasnije ustanovio njegovu prvu funkciju. Otkrio je da izolirani žablji mišići u prisutnosti karnozina mogu akumulirati velike količine laktata, dok u njegovoj odsutnosti nastupa dramatična acidifikacija tkiva koja uzrokuje kontrakciju mišića. [2]

Prema Međunarodnoj uniji za čistu i primjenjenu kemiju (IUPAC) karnozin je definiran kao 2-[(3-aminopropanoil)amino]-3-(1H-imidazol-4-il) propanska kiselina ili skraćeno β-alanilhistidin [3], a struktura mu je prikazana na *slici 2.5.* Europska agencija za kontrolu hrane (EFSA) definira L-karnozin[1] kao bijeli kristalični dipeptid, molekulske formule $C_9H_{14}N_4O_3$ i relativne molekulske mase 226, koji u organizmu nastaje sintezom aminokiselina L-histidina i β-alanina, a sadržavaju ga svi organizmi iz koljena kralježnjaka. [4]



Slika 2.5. Struktura L-karnozina u obliku zwitteriona s prikazanim kiralnim centrom (*) na temelju kojeg mu je određena relativna konfiguracija, a time i biološka važnost.[2]

[1] Budući da karnozin posjeduje i stereogeni i kiralni centar, koji je na *slici 2.5* označen zvjezdicom, postoji u dvjema relativnim konfiguracijama, L i D, u usporedbi s dogovorno odabranom molekulom gliceraldehida. Kao što je većina proteinogenih aminokiselina L-konfiguracije, tako je i L-karnozin biološki aktivan spoj, dok D-karnozin nema veliku biološku važnost. D-karnozin je uglavnom ispitan zajedno s L-karnozinom u obliku racemične smjese.

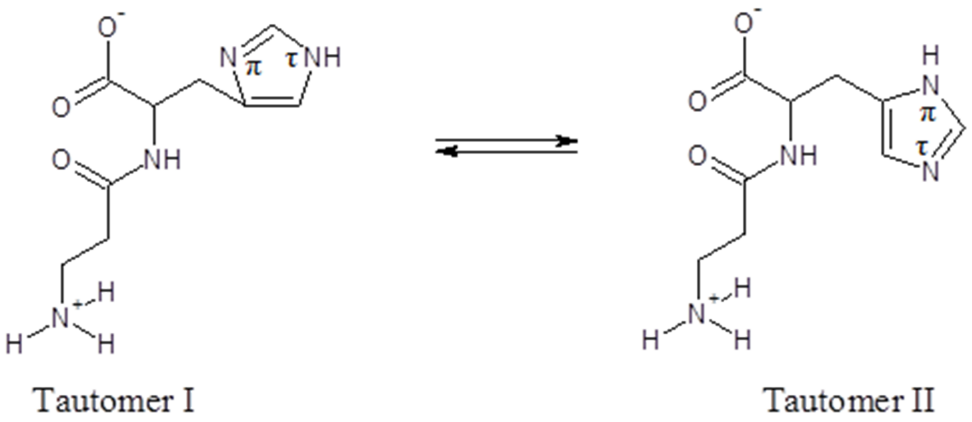
[2] Sve su strukture karnozina crtane programom ACD/Chemsketch.

Karnozin kao racemat ima vrlo dobru topljivost u vodi, 1 g u 3,1 mL vode pri 25 ^{O}C. Kao što je vidljivo na *slici 2.5*, karnozin je karakteriziran trima ionizirajućim skupinama: karboksilnom skupinom, čija je pK_a vrijednost 2,76; amino-skupinom β-alaninskog ostatka, čija je pK_a vrijednost 9,32 te dušikom imidazolnog prstena s pK_a vrijednošću 6,72. Stoga je u organizmu karnozin prisutan uglavnom u dipolnom ili zwitterionskom obliku kako je prikazano.

Atom dušika imidazolnog prstena karnozina regulira pufersku aktivnost ovog dipeptida, stoga je bitno posvetiti mu malo pozornosti. Dokazano je da su u neutralnom mediju prisutna dva tautomerna oblika karnozinovog imidazolnog prstena: Nτ protonirani (tautomer I) i Nπ protonirani oblik (tautomer II), iako je omjer 3:1 u korist tautomera I. Keliranje metala može još više pomaknuti ravnotežu k tautomeru I, kao što je keliranje iona dvovalentnog bakra, budući da je Nτ uključen u keliranje. Tautomerni oblici prikazani su na *slici 2.6*. [5]

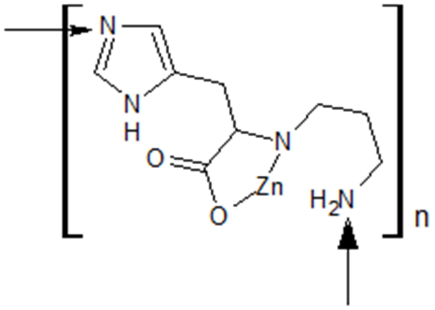
Prema radu Begum [6] Mannion je 1992. odredio okvirnu procjenu koliko karnozin doprinosi puferskom kapacitetu unutar mišićne mase ljudskog organizma tijekom vježbi velikog intenziteta. Iznenađujući je bio podatak da karnozin doprinosi puferskom kapacitetu tek oko 7%, što je izuzetno malo u odnosu na druge testirane organizme, pa se postavilo pitanje je li karnozin značajan faktor za puferiranje u ljudskom organizmu. Osim navedenih rezultata, Begum donosi brojne druge preglede radova. Daveyjevi pokusi pokazuju kontradiktorne rezultate, karnozin i anserin (metilirani oblik karnozina), doprinose puferskom kapacitetu ljudskog organizma oko 40%, dok drugi smatraju da je za ljudski organizam taj podatak nerelavantan jer je koncentracija anserina u ljudskom organizmu zanemarivo mala u odnosu na koncentraciju karnozina. [6] Jedini je Kraemer sa suradnicima dosada napravio istraživanje o utjecaju karnozina kao dodatka prehrani na puferski kapacitet ljudi koji imaju intenzivne treninge i na koncentraciju unutarmišićnog karnozina. Testirano je 20 ljudi, 10 biciklista i 10 ljudi koji ne treniraju, kojima je dan ili placebo ili tableta s dodatkom karnozina. Placebo se sastojao od 1000 mg natrijevog dihidrogenfosfata i 240 mg kalijevog hidrogenkarbonata, a dodatak s karnozinom je uz navedeno sadržavao i 12,5 mg karnozina. Rezultati istraživanja pokazali su da dodatak karnozina u prehrani nema utjecaja na puferski kapacitet tijekom intenzivnih vježbi niti na koncentraciju unutarmišićnog karnozina u ljudskom organizmu. [7] Drugi znanstvenici ističu činjenicu da je korištena doza karnozina premala da bi imala utjecaja na puferski

kapacitet jer je u istraživanju sa štakorima pokazano da dodatak karnozina od 2 mg/kg do 20 mg/kg pospješuje puferiranje, a uz to inducira i antiupalni i antihistaminski efekt. [6]



Slika 2.6. Tautomerni oblici L-karnozina prisutni u neutralnom mediju.

Iako je je bakrov (II) ion najčešći kelirajući agens, karnozin veže i druge dvovalentne metale kao što su kobaltov (II), niklov (II), kadmijev i cinkov ion. [8] Posebno su zanimljivi kompleksi L-karnozina i cinka koji se koriste u sprječavanju i liječenju bolesti gastrointestinalnog trakta kao što je oštećenje sluznice nastalo pretjeranom sekrecijom kiseline ili zarazom bakterijom *Heliobacter Pylori*. Zanimljivo je da navedeni kompleks nema isti mehanizam djelovanja kao klasični pripravci. Kompleks L-karnozin-cink povećava sintezu faktora rasta 1 (IGF-1), kemijskom strukturom analognom inzulinu, koji pospješuje zacjeljivanje rana na sluznici; ubrzava stvaranje interleukina, proteina odgovornih za signaliziranje u upalnom procesu; te smanjuje gastrointestinalni stres svojim svojstvom dobrog „skupljača“ slobodnih radikala. Osim navedenih uloga, prednost ovoga kompleksa je relativno niska vrijednost konstante produkta topljivosti uzrokovana njegovim polimernim karakterom prikazanim na *slici 2.7*, koja omogućuje dulje zadržavanje u kiseloj sredini pospješujući tako zacjeljivanje oštećene sluznice. [5]



Slika 2.7. Polimerna struktura kompleksa L-karnozin-cink.

Osim što kelatni kompleksi L-karnozina imaju antioksidativni učinak, objavljen je niz radova u kojima je dokazano da i sam karnozin ima antioksidacijska svojstva. Zbog svoje dobre topljivosti u vodi dobar je „hvatač“ hidroksilnog i superoksidnog radikala, singletnog molekularnog kisika te prijelaznih metala koji su također topljivi u vodi, a koji su medijatori oksidacije u citosolu prisutni u većoj koncentraciji. Također je dokazano na modelnim sustavima membrana da sprječava peroksidaciju. Zbog svoga mehanizma djelovanja karnozin se uspoređuje s vodotopljivim dijelovima molekula poznatih antioksidansa kao što su vitamin E ili α-tokoferol. Dodatak karnozina u prehrani s α-tokoferolom ili bez njega dokazano učinkovito smanjuje nastanka reaktivnih jedinki derivata tiobarbiturne kiseline u homogenatu skeletnog mišića štakora. [9]

Mehanizam interakcije karnozina sa superoksidnim radikalnom bazira se na mogućnosti stvaranja kompleksa-prenositelja naboja, koji smanjuje reaktivnost samog superoksidnog radikala. Ne samo karnozin, nego i svi spojevi koji sadrže imidazolni prsten, reagiraju sa singletnim molekularnim kisikom tvoreći endoperoksidne produkte. Utvrđeno je da L-karnozin reagira sa singletnim molekularnim kisikom dva do četiri puta brže od slobodnoga L-histidina i dva puta brže od N-terminalnog ostatka dipeptida s L-histidinom.

Karnozin i slični peptidi djeluju kao zaštitni spojevi u reakcijama ovisnim o peroksinitritima. Pokusima je pokazano da L-karnozin, koncentracije 20 mmol L^{-1}, baš kao u ljudskom organizmu, uspješno štiti tirozin od nitriranja, α1-antiproteinazu od inaktivacije i ljudski lipoprotein male gustoće od modifikacija uzrokovanim peroksinitritima. Također se pokazalo da je karnozin vrlo uspješan u zaštiti od hipokloritne kiseline, koja uzrokuje unakrsno kovalentno vezanje proteina i oligopeptida. [8,9] U radu Nina [10] pokazano je

da lokalna primjena 0,5%-tne otopine L-karnozina ili njegovog acetiliranog derivata N-acetil L-karnozina štiti ljudsku kožu od UVB zračenja.

Ostala svojstva karnozina zapravo potječu od njegovog antioksidacijskog djelovanja. Pokazano je da L-karnozin svojim antioksidacijskim svojstvima usporava proces starenja na nekoliko načina. Osim što štiti stanične membrane od peroksidacije, štiti i stanične membrane eritrocita, crvene krvne stanice koje sadrže hemoglobin, a koje su zadužene za prijenos kisika u tijelu. Eritrociti su najviše izloženi kisikovim radikalima, a izgrađeni su od velikog broja polinezasićenih masnih kiselina, koji su dobri supstrati za reakcije peroksidacije, stoga L-karnozin igra ključnu ulogu u njihovoj zaštiti. Dodatkom L-karnozina u krvni serum štakora, eritrociti oštećeni vodikovim peroksidom, smanjenim osmotskim tlakom ili smjenjenom pH vrijednošću, pokazali su povećanu otpornost na hemolizu i bolja mehanička svojstva. [11] Kang [12] donosi rezultate kojima potkrjepljuje zaštitno djelovanje L-karnozina.

L-karnozin svojim antioksidacijskim svojstvima štiti DNK molekule od utjecaja citotoksina vodikovog peroksida i željezovih (II) spojeva. Pokazano je da u prisutnosti L-karnozina DNK molekula ostaje u prvobitnoj tercijarnoj strukturi α-uzvojnice te da su njena oštećenja vidljiva na šećeru deoksiribozi, no u manjoj mjeri nego u slučaju kada L-karnozin nije primijenjen.

L-karnozin pozitivno utječe na inhibiranje rasta stanica tumora mozga, te njihovu opskrbu energijom, i to najvjerojatnije u koraku glikolize kada nastaju trioze od fruktoze-1,6-bisfosfata, jer se smatra da utječe na enzim fruktozu-1,6-bisfosfatazu. Dodatak L-karnozina stanicama raka na hranjivoj podlozi od glukoze uzrokovao je smrt 20 % stanica raka i smanjio ukupnu brzinu rasta, dok L-histidin nije imao takav utjecaj. [13]

2.3. Metode određivanja karnozina

Prisutnost karnozina određuje se u mesnim proizvodima, uzorcima urina i biološkim materijalima pomoću kapilarne elektroforeze s UV detekcijom [14-16], laserski inducirane fluorescencije (LIF) [17], detekcije elektrosprej masenom spektrometrijom [18] i elektroforeze na mikročipu uz detekciju kemiluminescencijom.[19] Elektrokemijske metode rijetko se koriste za određivanje dipeptida koji sadrže histidin, no ponekad se koriste ciklička voltametrija [20-23] i potenciometrija. [24-26]

2.3.1. Elektrokemijske metode određivanja karnozina

Osnovna aparatura za elektrokemijska mjerenja nije preskupa i komercijalno je dostupna. Za svako elektrokemijsko mjerenje potrebna je elektrokemijska ćelija sa troelektrodnim sustavom, potenciostat i računalo Sistem se treba nalaziti u prostoriji u kojoj nema velikih električnih interferencija, vibracija i drastičnih promjena u temperaturi. Također je moguće ćeliju smjestiti u Faradayev kavez kako bi se sistem zaštitio od vanjskih utjecaja. Ćelija je uglavnom čaša ili tikvica volumena 5-50 mL i sadrži tri elektrode: radna, referentna i pomoćna (protuelektroda) koje su uronjene u otopinu uzorka. Na radnoj elektrodi se odvija reakcija, dok referentna elektroda daje stabilan i reproducibilan potencijal (neovisno o sastavu uzorka) s kojim se uspoređuje potencijal radne elektrode.[27]

Odabir otapala određen je topljivošću analita i njegovim redoks potencijalom, te svojstvima otapala: električna provodnost, elektrokemijska aktivnost i kemijska reaktivnost. Otapalo ne smije reagirati s analitom i produktima reakcije te mora biti elektrokemijski stabilno u širokom području potencijala. Kada je potrebna pH kontrola, kao elektroliti se koriste puferi. Kako bi se uklonio otopljeni kisik iz otapala koriste se različite metode od kojih je najčešća propuhivanje inertnim plinom 4-8 minuta prije mjerenja. [27]

Učinkovitost mjerenja uvelike ovisi o materijalu od kojega je načinjena radna elektroda. Odabir elektrode najviše ovisi o dva faktora: redoks potencijalu analita i pozadinskoj struji u području potencijala potrebnom za mjerenje. Neki od drugih faktora koji utječu na odabir radne elektrode su: toksičnost, dostupnost, električna provodnost, mehanička svojstva i dostupan raspon potencijala. Najpopularniji metali za izradu elektroda su živa, ugljik i plemeniti metali (Pt i Au).[27]

Čvrste ugljikove elektrode su u širokoj uporabi u elektroanalizi zbog svog širokog raspona potencija, niske pozadinske struje, niske cijene, kemijske inertnosti i primjenjivosti za razne aplikacije detekcije. Jedan od nedostataka ugljikovih elektroda je to što su brzine transfera elektrona na površini ugljika često sporije nego kod metalnih elektroda. Sve uobičajene ugljikove elektrode imaju istu osnovnu strukturu šesteročlanog aromatskog prstena (sp^2 hibridizacija), ali se razlikuju u relativnoj gustoći. [27]

Staklasti ugljik je popularan zbog izvrsnih mehaničkih i električnih svojstava, širokog raspona potencijala, kemijske inertnosti i reproducibilne djelotvornosti. Materijal se priprema pažljivim kontroliranim grijanjem premodeliranog polimernog (fenol-formaldehid) „resin“ tijela u inertnoj atmosferi. Proces karbonizacije odvija se vrlo sporo kroz raspon temperature od 300-1200 ^{0}C kako bi se osigurala eliminacija kisika, dušika i vodika. Struktura staklastog ugljika sastoji se od tankih, zapetljanih vrpci poprečno povezanih ploča nalik na grafit.

Zbog visoke gustoće i male veličine pora proces impregnacije nije potreban. Uglavnom se primjenjuje predtretman površine kako bi se stvorila aktivna i reproducibilna elektroda od staklastog ugljika te da bi se poboljšala njezina analitička djelotvornost. Takav predtretman se najčešće sastoji od poliranja elektrodne površine sitnim česticama suspenzije aluminijevog oksida (veličina čestica do 0.05μm). Elektroda se zatim ispire deioniziranom vodom prije uporabe. [27]

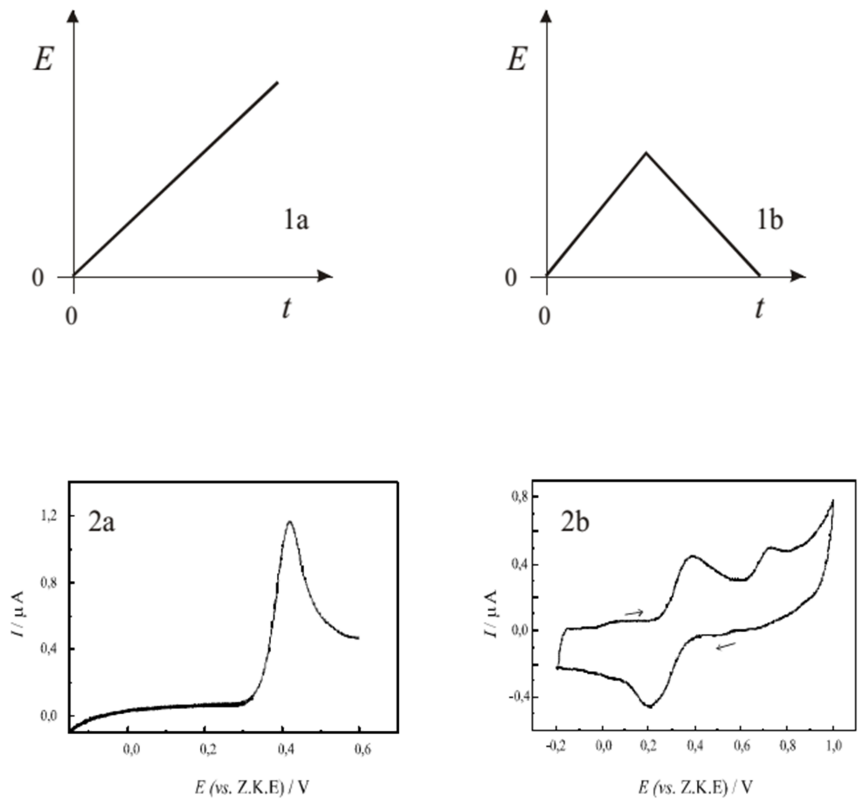
U ovom radu korištene su tri elektrokemijske metode za karakterizaciju karnozina. To su ciklička voltametrija, diferencijalna pulsna voltametrija i kronoamperometrija. U nastavku će biti detaljnije objašnjeni principi rada svake od navedenih metoda.

2.3.1.1. Voltametrijske metode

Voltametrija je elektrokemijska metoda u kojoj mjerimo struju kao funkciju primijenjenog potencijala. Dobiveni voltamogram je prikaz ovisnosti struje odziva kao funkcije primijenjenog potencijala koji nam daje kvalitativne i kvantitativne podatke o elektroaktivnim vrstama koje sudjeluju u reakcijama oksidacije i redukcije.[28]

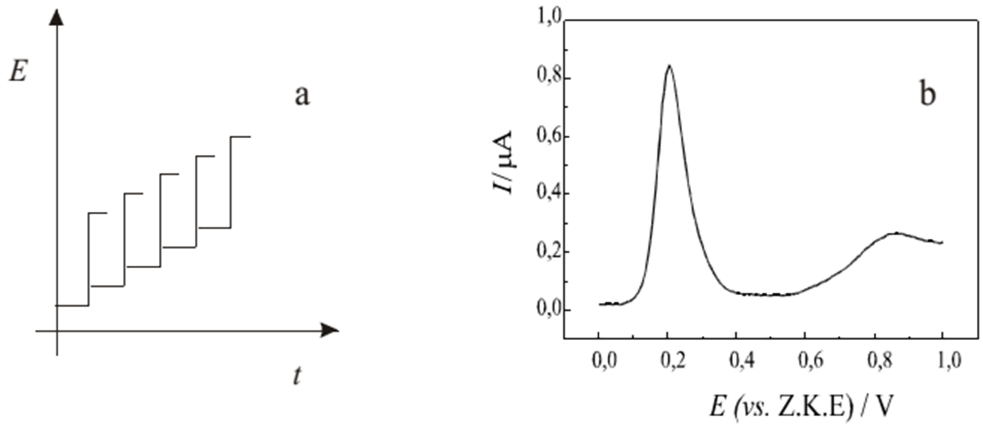
Prva primijenjena voltametrijska tehnika bila je polarografija, koju je razvio Jaroslav Heyrovsky u ranim tridesetim godinama 20. stoljeća za što je dobio Nobelovu nagradu za kemiju 1959. godine. Od tada su razvijene brojne voltametrijske metode od kojih su neke: voltametrija s linearnom promjenom potencijala, ciklička voltametrija, diferencijalna pulsna voltametrija i pravokutnovalna voltametrija. Navedene voltametrijske metode razlikuju se u signalima pobude i odziva.[28]

Signal pobude kod voltametrije s linearnom promjenom potencijala je linearna promjena potencijala (*Slika 2.8 1a*). Prilikom mjerenja potencijal se mijenja u zadanom intervalu i prati se proces oksidacije/redukcije reaktanata, pri čemu se u okolici elektrode stvara znatna koncentracija produkta. Ukoliko se obrne smjer linearne promjene potencijala (*Slika 2.8 1b*), može doći do redukcije oksidirane elektroaktivne specije pa se radi o cikličkoj voltametriji. Eksperimentalne veličine koje karakteriziraju ciklički voltamogram su omjer struje oksidacijskog i redukcijskog strujnog vrha ($I_{p,a}/I_{p,k}$) te razlika potencijala anodnog i katodnog strujnog vrha ($\Delta E_p = E_{p,a} - E_{p,k}$).[29]



Slika 2.8. Signali pobude (1) i odziva (2) za voltametriju s linearnom promjenom potencijala (a) i cikličku voltametriju (b)

Diferencijalna pulsna voltametrija je metoda koja kao pobudni signal ima niz kratkotrajnih pulseva potencijala (širina pulsa 70 ms, visina pulsa 25 mV), koji je superponiran na linearno rastući potencijal ili na stepenastu rampu (*Slika2.9*).[29]

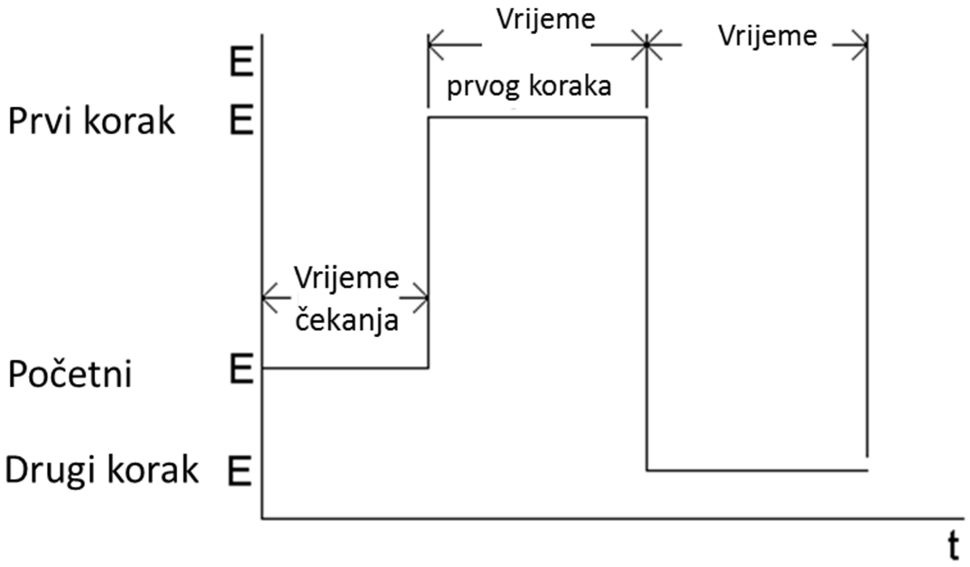


Slika 2.9. Prikaz signala pobude (a) i odziva (b) za diferencijalnu pulsnu voltametriju.

Struja se uzorkuje na rampi, neposredno prije pulsa i na kraju pulsa, dok se razlika tih dvaju uzorkovanja bilježi kao funkcija potencijala rampe. Signal ima oblik zvonolike krivulje (*I vs. E*) određene strujnim maksimumom, koji je proporcionalan koncentraciji reaktanta u masi otopine.[29]

2.3.1.2. Kronoamperometrija

Kronoamperometrija je jedna od tehnika kontroliranog potencijala koje se baziraju na mjerenju strujnog odziva na primijenjeni potencijal. Ova metoda uključuje povećanje potencijala radne elektrode sa vrijednosti pri kojoj nema Faradayske reakcije na potencijal pri kojem je površinska koncentracija elektroaktivnih specija efektivno nula pri čemu se prati rezultirajuća ovisnost jakosti struje o vremenu (*I vs. t*). Transport mase pri ovim uvjetima odvija se isključivo putem difuzije stoga *I-t* krivulja pokazuje promjenu koncentracijskog gradijenta u blizini površine. [27] . Kronoamperometrija se može provesti u jednom ili dva koraka. Na *slici 2.10* prikazano je kako se potencijal trenutno mijenja s početnog potencijala na potencijal prvog koraka („first step potential“) i zadržava jednaku vrijednost u zadanom vremenskom periodu. To je eksperiment u jednom koraku. Pri eksperimentu u dva koraka, nakon zadanog vremenskog perioda potencijal se mijenja s potencijala prvog koraka na potencijal drugog koraka („second step potential“) te se zadržava na tom potencijalu u zadanom vremenskom periodu. Kronoamperometrija se razlikuje od ostalih tehnika kontroliranog potencijala u tome što je vrijeme mjerenja kraće za red veličine. [30]



Slika 2.10. Pobudni val za kronoamperometriju.

3. Eksperimentalni dio

3.1. Kemikalije i priprava otopina

U radu su korištene sljedeće kemikalije:

- octena kiselina, CH_3COOH (Prolabo VWR, Leuven, Belgija)
- natrijev acetat, CH_3COONa (Kemika, Zagreb)
- natrijeva lužina, NaOH (Kemika, Zagreb)
- kalijev dihidrogen fosfat, KH_2PO_4 (Kemika, Zagreb)
- kalijev hidrogen ftalat, $C_8H_5KO_4$ (Prolabo VWR, Leuven, Belgija)
- natrijev hidrogen fosfat, Na_2HPO_4 (Kemika, Zagreb)
- natrijev dihidrogen fosfat, NaH_2PO_4 (Kemika, Zagreb)
- L-karnozin, $C_9H_{14}N_4O_3$ (Acros Organics, Geel, Belgija)
- kalijev klorid, KCl (Kemika, Zagreb)
- kalijev heksacijanoferat II, $K_4[Fe(CN)_6]$, (Kemika, Zagreb)
- kalijev heksacijanoferat III, $K_3[Fe(CN)_6]$, (Kemika, Zagreb)
- bakrov (II) nitrat, $Cu(NO_3)_2$ (Kemika, Zagreb)
- cinkov (II) nitrat, $Zn(NO_3)_2$ (Fisher Scientific, UK)
- suspenzija α-Al_2O_3 (0,05 μm) (Bas Inc., Tokio, Japan)

Otopine pufera određenih pH vrijednosti (Tablica 3.1) priređene su u ultračistoj vodi te su upotrijebljene za pripremu ispitivanih otopina L-karnozina.

Izvorna otopina L-karnozina ($c = 1 \cdot 10^{-2}$ mol dm^{-3}) dobivena je otapanjem L-karnozina u ultračistoj vodi. Otopina L-karnozina željene koncentracije priređena je razrjeđivanjem izvorne otopine L-karnozina otopinom pufera odgovarajuće pH vrijednosti neposredno prije mjerenja.

Tablica 3.1. Priređivanje otopina pufera.

pH	Pufer
3.5	$C_8H_5KO_4$/HCl
3.5 – 5.0	CH_3COOH/CH_3COONa
4.5 – 5.5	$C_8H_5KO_4$/NaOH
5.5 – 8.0	Na_2HPO_4/NaH_2PO_4

3.2. Elektrokemijska ćelija

Sva elektrokemijska mjerenja provedena su u elektrokemijskoj ćeliji s troelektrodnim sustavom smještenoj u Faradayevom kavezu (*Slika 3.1*) pri sobnoj temperaturi. Inertna atmosfera postignuta je propuhivanjem sustava argonom visoke čistoće Ar 5 (Φ_{Ar} = 99,999 %) prije mjerenja u trajanju od 4-5 minuta na sobnoj temperaturi (θ = ± 25 °C).

Slika 3.1. Prikaz aparature za provedbu elektrokemijskih mjerenja.

3.2.1. Radna elektroda

Kao radna elektroda (*Slika 3.2*) korištena je elektroda od staklastog ugljika („glassy carbon“) proizvođača ALS (Tokio, Japan). Površina elektrode je prije svakog mjerenja polirana suspenzijom α–Al_2O_3, veličine čestica 0,05 μm, do zrcalnog sjaja te isprana ultračistom vodom.

Slika 3.2. Radna elektroda- elektroda od staklastog ugljika.

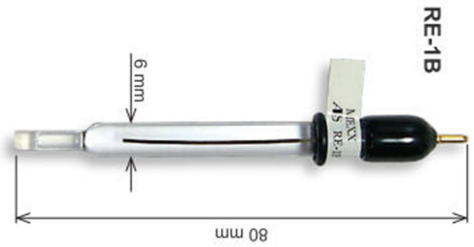
3.2.2. Protuelektroda

Kao protuelektroda (*Slika 3.3*) korištena je platinska žica (ALS, Tokio, Japan), duljine 5 cm, radi zatvaranja strujnog kruga.

Slika 3.3. Protuelektroda – platinska žica.

3.2.3. Referentna elektroda

Kao referentna elektroda (*Slika 3.4*) korištena je Ag/AgCl elektroda (ALS, Tokio, Japan). Sve vrijednosti potencijala u ovom diplomskom radu dane su u odnosu na potencijal Ag/AgCl elektrode, koji iznosi 0,210 V u odnosu na standardnu vodikovu elektrodu ($E_{AgCl/Ag}$ = 0,210 V *vs*. SVE).



Slika 3.4. Referentna elektroda – Ag/AgCl elektroda (unutrašnji elektrolit 3 mol dm^{-3} KCl).

3.3. Eksperimentalne tehnike i uvjeti mjerenja

3.3.1. Diferencijalna pulsna voltametrija

Diferencijalna pulsna voltametrija korištena je za ispitivanje oksidacije i adsorpcije L-karnozina na površinu elektrode od staklastog ugljika, za određivanje granice detekcije L-karnozina te za praćenje utjecaja pH na potencijal i struju oksidacijskog strujnog vrha L-karnozina. Diferencijalni pulsni voltamogrami snimljeni su u otopinama L-karnozina u granicama potencijala od -0,6 V do 1,5 V u odnosu na Ag/AgCl elektrodu u vodenom mediju uz brzinu promjene potencijala od 5 mV s^{-1}, visinu pulsa 25 mV, širinu pulsa 70 ms i *scan increment* 5 mV.

3.3.2. Kronoamperometrija

Karnozin je elektrokemijski nanesen na površinu elektrode od staklastog ugljika kronoamperometrijom na potencijalu od 1,2 V (5 min) u otopini karnozina ($c = 1 \cdot 10^{-3}$ mol dm^{-3}) u fosfatnom puferu, pH=6,18.

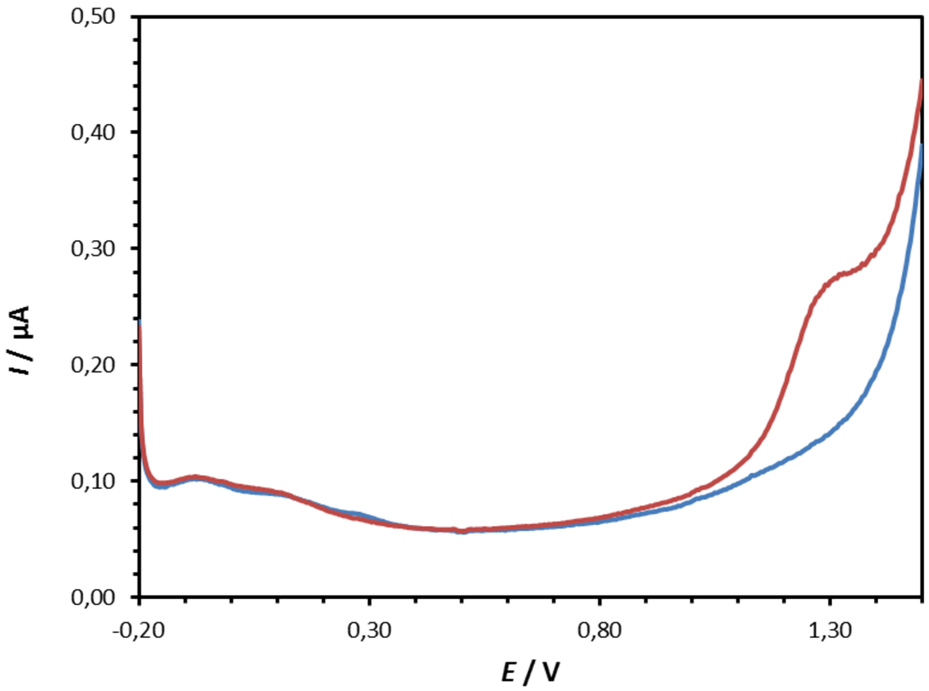
3.3.3. Ciklička voltametrija

Za dobivanje općih informacija o elektrokemijskom ponašanju modificirane i nemodificirane elektrode od staklastog ugljika korištena je ciklička voltametrija. Ciklički voltamogrami snimljeni su u otopini $K_4Fe(CN)_6$ ($c = 5 \cdot 10^{-3}$ mol dm^{-3}) i $K_3Fe(CN)_6$ ($c = 5 \cdot 10^{-3}$ mol dm^{-3}) uz ionsku jakost, I_c = 0,1 mol dm^{-3} KCl. Mjerenja su izvedena u području potencijala od -0,2 V do 1,2 V uz brzinu promjene potencijala 50 mV/s.

4. Rezultati i rasprava

4.1. Ispitivanje oksidacije L-karnozina

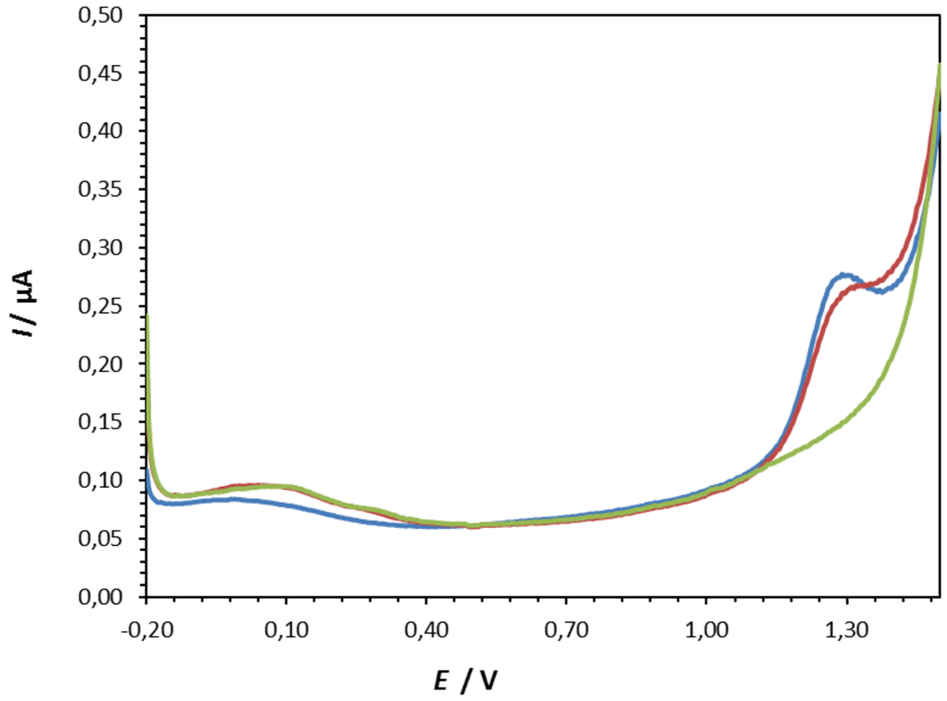
Na slici 4.1 prikazan je diferencijalni pulsni voltamogram L-karnozina (c = 3·10^{-4} mol dm^{-3}) snimljen na elektrodi od staklastog ugljika u acetatnom puferu (pH =4,79). Na voltamogramu je vidljiv jedan oksidacijski strujni vrh na potencijalu $E_{p,a}$ = 1,30 V.



Slika 4.1. Diferencijalni pulsni voltamogram L-karnozina (c = 3·10^{-4} mol dm^{-3}) snimljen u puferu (pH=4,79; I_c= 0,1 mol dm^{-3}), pri brzini polarizacije 5 mV/s. (—) pufer, (—) otopina sa karnozinom.

4.2. Ispitivanje adsorpcije L-karnozina

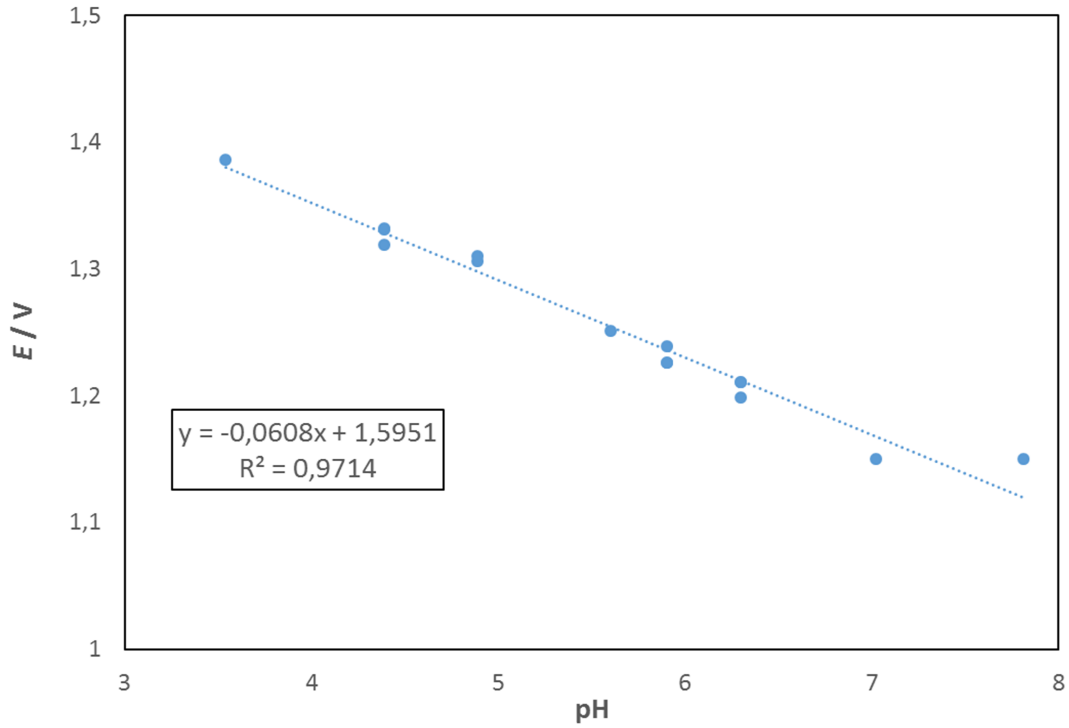
Na *slici 4.2*. prikazani su uzastupno snimljeni diferencijalni pulsni voltamogrami L-karnozina (c = 3·10^{-4} mol dm^{-3}) snimljeni na elektrodi od staklastog ugljika u acetatnom puferu (pH = 4,79). Iz slike je vidljivo da sukcesivnim snimanjem voltamograma opada oksidacijski strujni vrh L-karnozina što može ukazivati na adsorpciju ili vezanje oksidacijskog produkta L-karnozina na površinu elektrode od staklastog ugljika.



Slika 4.2. Diferencijalni pulsni voltamogrami snimljeni u otopini L-karnozina (3·10^{-4} mol dm^{-3}) u acetatnom puferu (pH = 4,79; I_c = 0,1 mol dm^{-3}). (—) 1. *scan*, (—) 2. *scan* , (—) acetatni pufer.

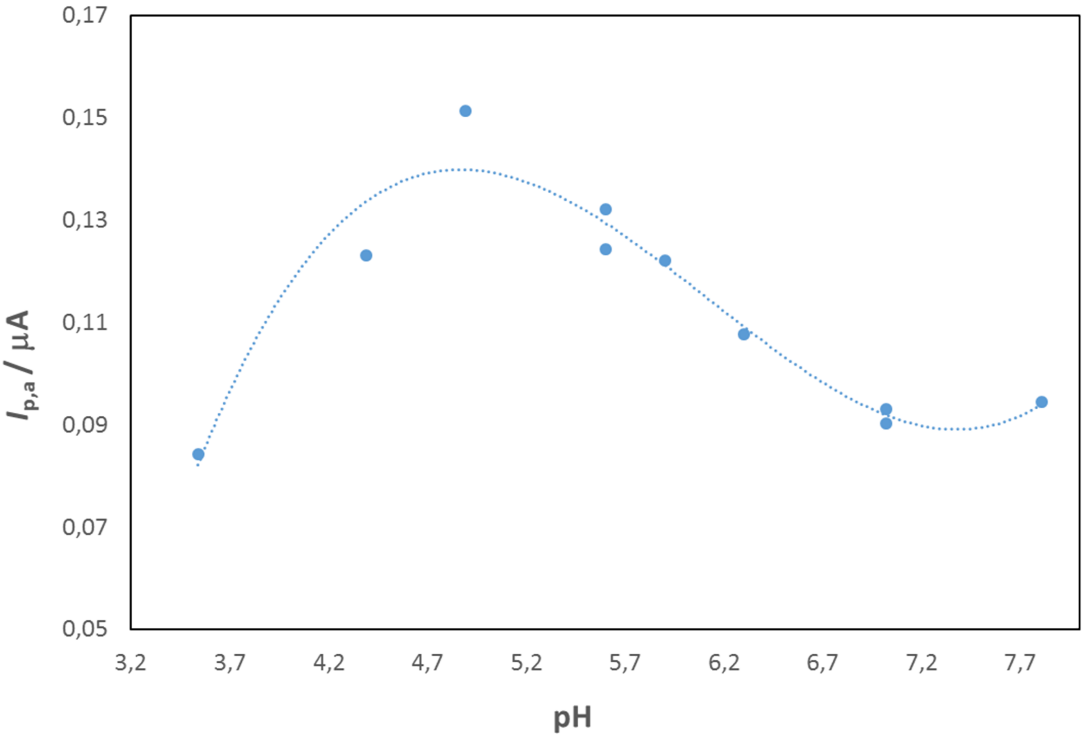
4.3. Utjecaj pH

Na *slici 4.3* prikazana je ovisnost oksidacijskog potencijala o pH vrijednosti. Iz slike vidimo da potencijal anodnog strujnog vrha linearno ovisi o pH u ispitivanom pH području (od pH = 3,5 do pH = 8,0), a nagib pravca iznosi 60,8 mV, što ukazuje na oksidacijski mehanizam koji uključuje izmjenu istog broja protona i elektrona.



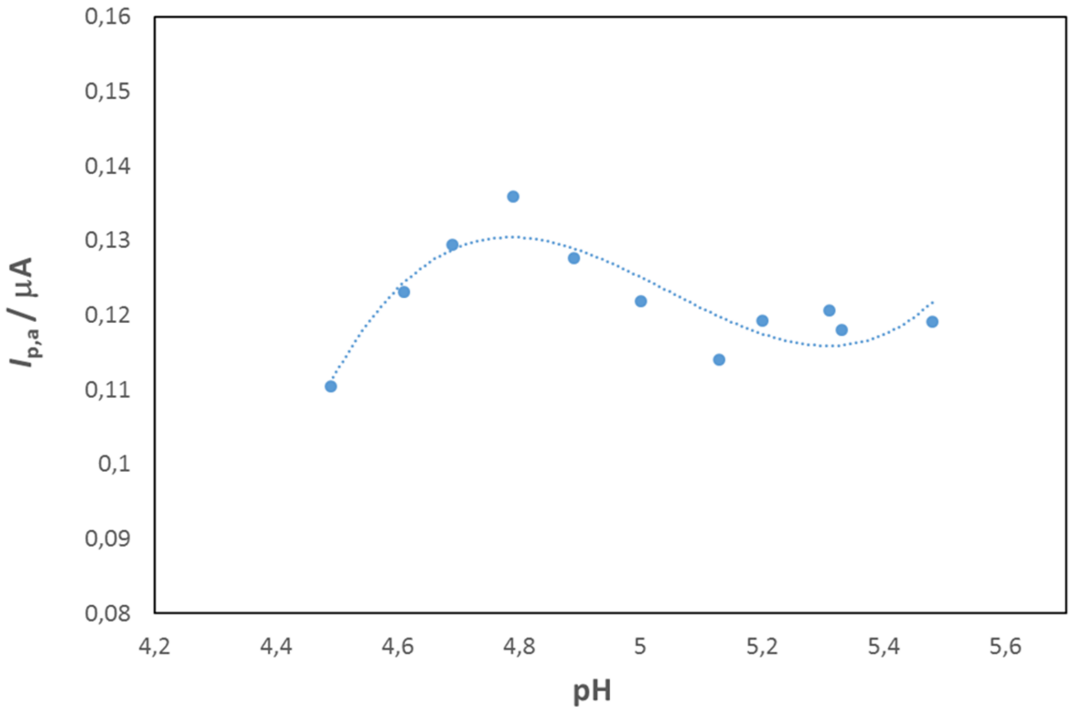
Slika 4.3. Prikaz ovisnosti oksidacijskog potencijala, $E_{p,a}$ o pH vrijednosti ispitivanih otopina L-karnozina (c = 3·10^{-4} mol dm^{-3}; I_c= 0,1 mol dm^{-3}).

Na *slici 4.4* vidimo kako struja anodnog strujnog vrha ovisi o pH vrijednosti ispitivanih otopina karnozina. Iz slike je vidljivo da struja anodnog strujnog vrha varira sa promjenom pH vrijednosti, raste do pH~ 4,7 te nakon toga opada daljnjim povećanjem pH vrijednosti. Kako bismo što preciznije odredili maksimum anodnog strujnog vrha, mjerenje je ponovljeno u užem rasponu pH vrijednosti (*Slika 4.5*) oko vrijednosti gdje vidimo maksimum anodnog strujnog vrha (pH ~ 4,7).



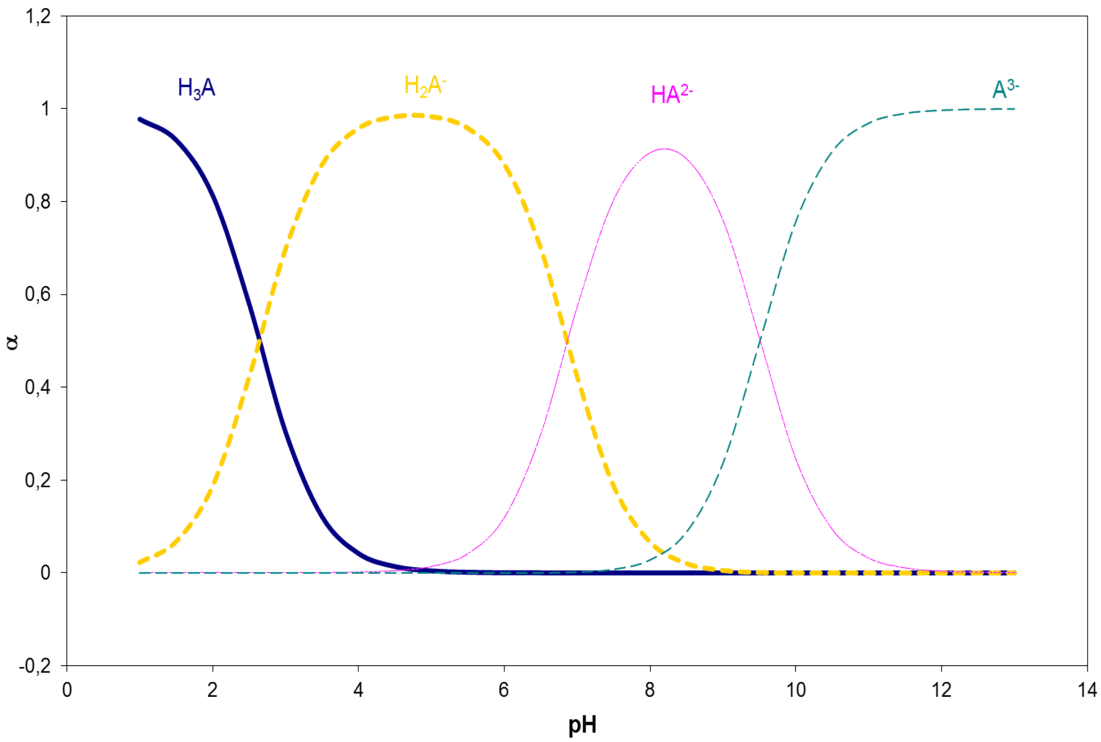
Slika 4.4. Prikaz ovisnosti struje anodnog strujnog vrha, $I_{p,a}$ o pH vrijednosti ispitivanih otopina L-karnozina ($c = 3 \cdot 10^{-4}$ mol dm^{-3}; $I_c = 0{,}1$ mol dm^{-3}).

Na *slici 4.5* vidimo da je maksimum anodnog strujnog vrha pri pH = 4,8; iz čega možemo zaključiti da je to optimalna pH vrijednost za oksidaciju L-karnozina.



Slika 4.5. Prikaz ovisnosti struje anodnog strujnog vrha, $I_{p,a}$ o pH vrijednosti ispitivanih otopina karnozina ($c = 3 \cdot 10^{-4}$ mol dm^{-3}; $I_c = 0{,}1$ mol dm^{-3}).

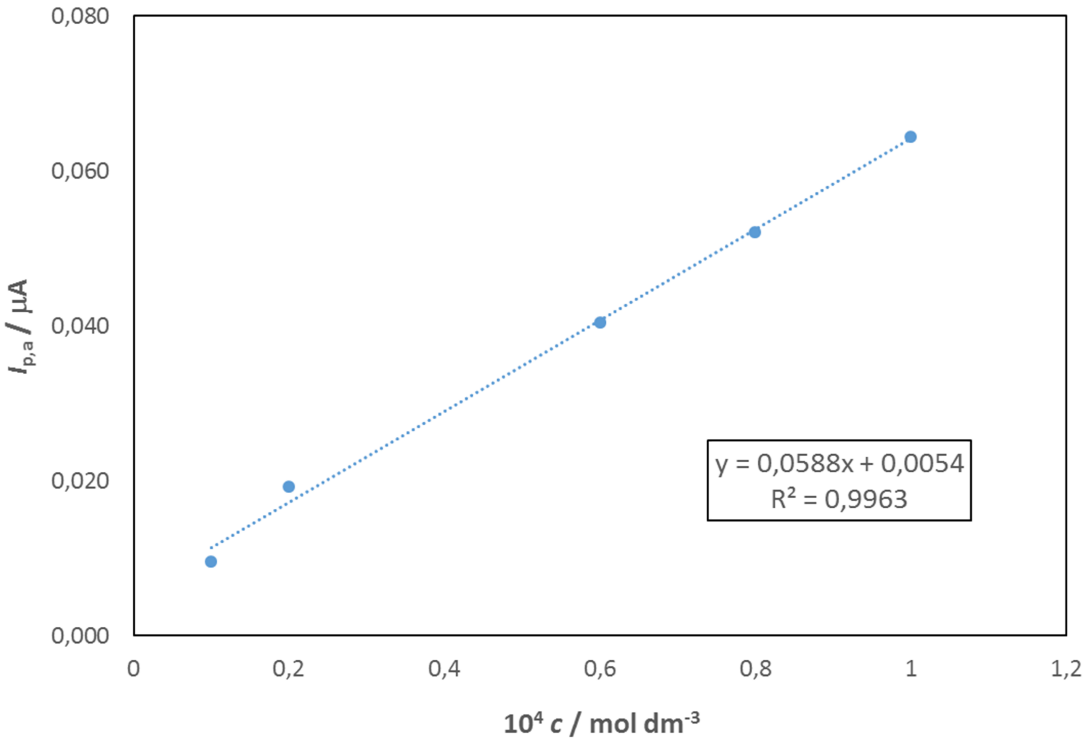
Iz dijagrama specijacije (*Slika 4.6*) je vidljivo da L-karnozin spontano deprotonira pri pH = 1, što dokazuje da u oksidaciji L-karnozina i u adsorpcijskim procesima do pH =5 sudjeluje deprotonirani oblik H_2A^-. Pri višim pH vrijednostima (pH = 5 do 8) nastavlja se spontana deprotonacija i nastaju drugi disocirani oblici molekule karnozina (H_2A^-, HA^{2-}, A^{3-}).



Slika 4.6. Dijagram disocijacije L-karnozina: nedisocirani oblik (H_3A), deprotonirani oblici (H_2A^-, HA^{2-}, A^{3-}). Konstante disocijacije (pKa_1 = 2,64; pKa_2 = 6,83; pKa_3= 9,51 [31]).

4.4. Kalibracijski pravac

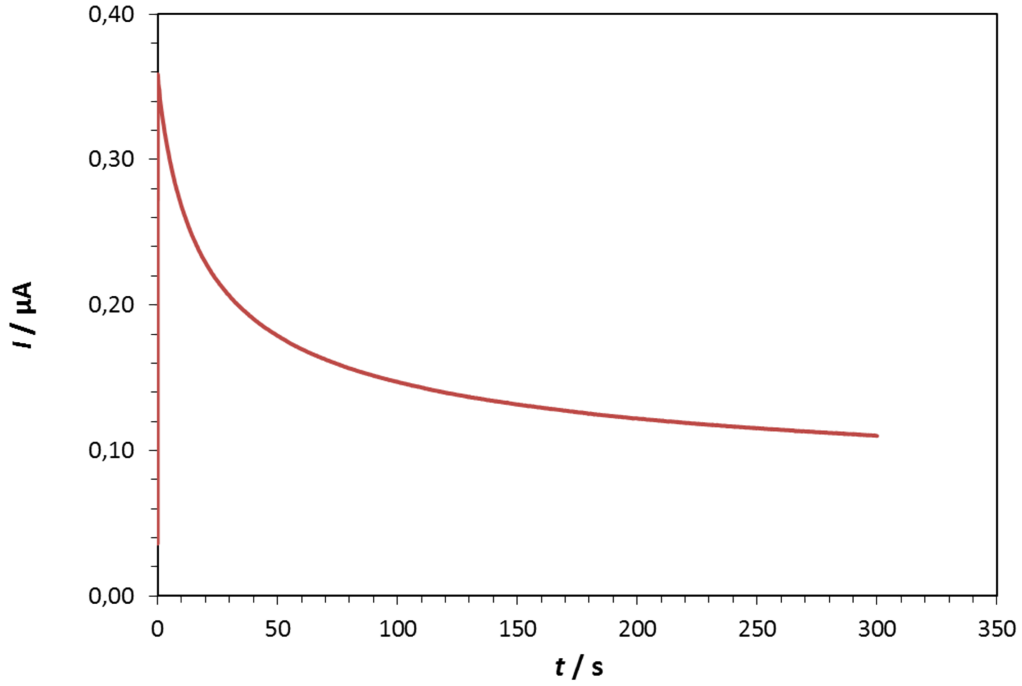
Na *slici 4.7* prikazana je ovisnost anodnog strujnog vrha o koncentraciji karnozina određena pri pH = 4,8. Iz slike je vidljivo da je ta ovisnost linearna u koncentracijskom području od $1 \cdot 10^{-4}$ mol dm^{-3} do 1 10^{-5} mol dm^{-3}. Dobivena je linearna regresijska jednadžba, I_p= 0,0588 c + 0,0054; sa koeficijentom korelacije R^2= 0,9963 (I_p je struja oksidacijskog vrha, a c koncentracija karnozina izražena u 10^{-4} mol dm^{-3}).



Slika 4.7. Kalibracijski pravac L-karnozina (granica detekcije , $c = 1 \cdot 10^{-5}$ mol dm^{-3}).

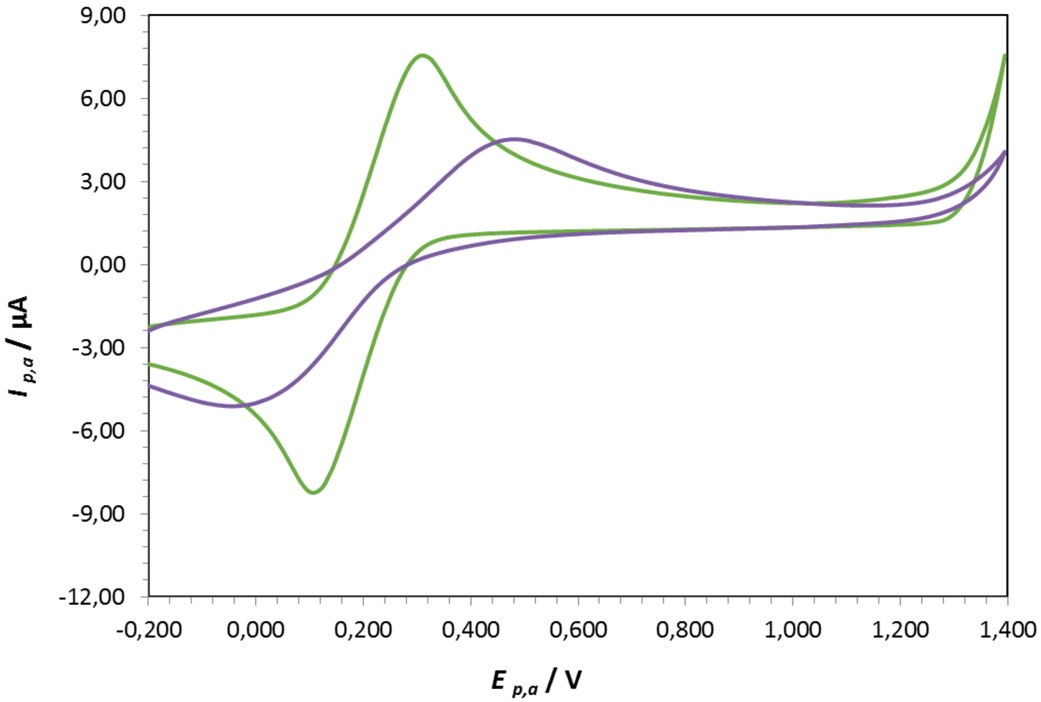
4.5. Modificirana elektroda od staklastog ugljika

Na slici 4.8 prikazano je kronoamperometrijsko nanošenje L-karnozina na površinu elektrode od staklastog ugljika. Karnozin je nanošen pri potencijalu 1,20 V u trajanju od 5 minuta kako bi se modificirala površina elektrode.



Slika 4.8. Kronoamperometrijsko nanošenje L-karnozina ($c = 1 \cdot 10^{-3}$ mol dm^{-3}) u fosfatnom puferu (pH=6,18; $I_c = 0{,}1$ mol dm^{-3}) na površinu elektrode od staklastog ugljika.

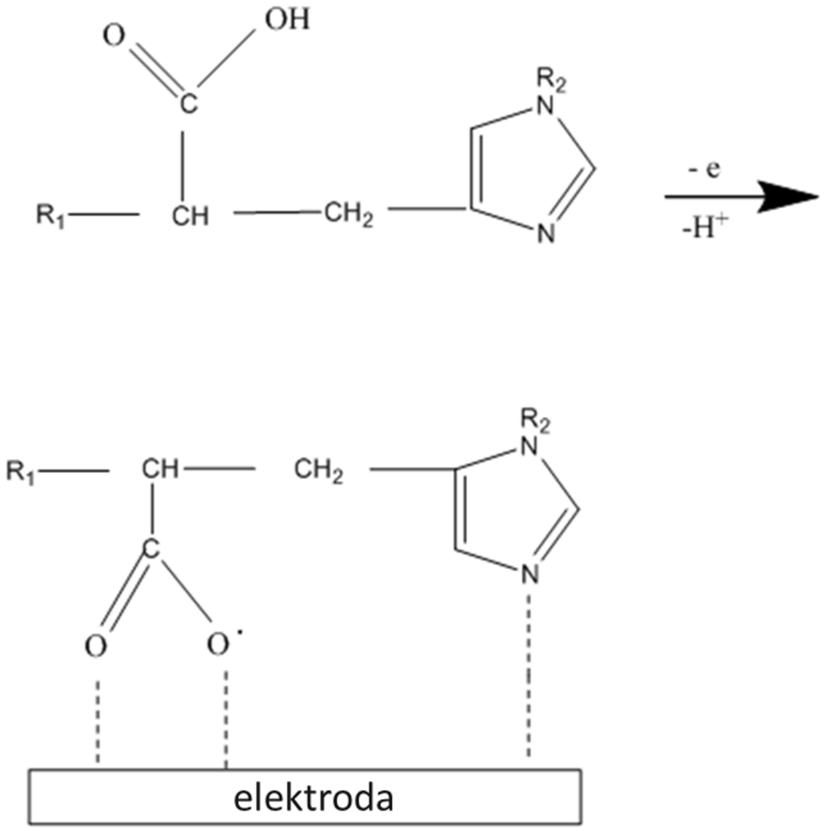
Na *slici 4.9* prikazani su ciklički voltamogrami snimljeni u $5 \cdot 10^{-3}$ mol dm^{-3} Fe^{3+}/Fe^{2+} sustavu (I_c = 0,1 mol dm^{-3} KCl) snimljeni na modificiranoj i nemodificiranoj elektrodi od staklastog ugljika. Iz slike je vidljivo da je došlo do promjene u odzivu elektrode (potencijal oksidacijskog strujnog vrha se pozitivirao, a potencijal katodnog strujnog vrha se negativirao) nakon što smo ju kronoamperometrijski modificirali karnozinom na temelju čega možemo zaključiti da se L-karnozin vezao na površinu elektrode od staklastog ugljika.



Slika 4.9. Usporedba cikličkih voltamograma dobivenih korištenjem modificirane (—) i nemodificirane (—) elektrode od staklastog ugljika snimljenih u $5 \cdot 10^{-3}$ mol dm^{-3} Fe^{3+}/Fe^{2+}sustavu (I_c = 0,1 mol dm^{-3} KCl). v = 50 mV/s.

4.6. Pretpostavljeni mehanizam oksidacije L-karnozina

Na slici 4.10 prikazan je pretpostavljeni oksidacijski mehanizam L-karnozina. Iz dobivenih rezultata se može zaključiti da je predloženi oksidacijski mehanizam ovisan o pH (optimalna pH vrijednost za oksidaciju L-karnozina je 4,8) i uključuje izmjenu 1 e^- i 1 H^+ (nagib pravca $E_{p,a}$ *vs*. pH je 60,8 mV). Produkt oksidacije je radikal L-karnozina, koji se preko karboksilnog radikala i amino grupe imidazolnog prstena veže na površinu elektrode od staklastog ugljika i blokira ju. [17]



Slika 4.10. Pretpostavljeni mehanizam oksidacije L-karnozina (R_1 = H_2NCH_2COHN, R_2 = H).

5. Metodički dio

Budući da je karnozin dipeptid, ovu je temu najprikladnije obraditi u sklopu nastavne cjeline biološki važnih spojeva, koja je kurikulumom predviđena za drugo polugodište četvrtih razreda gimnazija iz nastavnoga predmeta kemije. Za uspješno savladavanje previđenih vježbi potrebna su predznanja iz:

- biologije (prvi razred gimnazije): o strukturi, podjeli i funkciji aminokiselina i proteina;
- fizikalne kemije (drugi razred gimnazije): o pripravi otopina određene koncentracije i određenog masenog udjela;
- anorganske kemije (treći razred gimnazije): o solima teških metala i njihovom učinku na ljudski organizam;
- organske kemije (četvrti razred gimnazije): o funkcionalnim skupinama i nazivlju spojeva prema IUPAC-u, o kiralnosti, o aromatskim spojevima i njihovim reakcijama, o strukturi karboksilnih kiselina i amina

Kako bi se potakla učenikova aktivnost i motivacija, predviđeno je temu obraditi u obliku mini projekta, u trajanju 4 školska sata (180 minuta). Mini projekt je izvrsna metoda obrade nastavnoga gradiva jer naglasak stavlja na učenikovu aktivnost i postignuća, te sintezu prethodnih znanja iz raznih predmeta, dok se nastavnikova uloga temelji na nadziranju i usmjeravanju učenika. Očekivani ishodi učenja navedeni su u tablici 5.1.

1. Mini projekt: Od aminokiselina do polipeptida

Mini projekt se sastoji od četiri etape, prikazane u tablici 5.1., a svaka etapa traje jedan školski sat (45 minuta). Nastavnikova je dužnost podijeliti razred u skupine od 4 ili 5 učenika, te osigurati potreban pribor i kemikalije. Osim toga, nastavnik je dužan upozoriti učenike na mjere opreza te preostalo vrijeme trajanja pojedine etape.

Tablica 5.1. Pregled aktivnosti u mini projektu te očekivanih ishoda učenja.

Od aminokiselina do polipeptida	**Aktivnosti nastavnika**	**Aktivnosti učenika**	**Očekivani ishodi**	**Trajanje**
Radni listić I. Upoznavanje aminokiselina i nastanak polipeptida	Nastavnik podjeli radni listić 1 te vodi računa o preostalom trajanju rješavanja radnoga listića 1.	Učenici čitaju radni listić 1. te ga rješavaju dogovorom unutar skupine.	Nakon završenog i napisanog radnog listića 1. opisati građu i svojstva aminokiselina i polipeptida	35 min
	Nastavnik obavještava učenike o završetku rješavanja radnog listića 1. Predlaže skupinama kratko izlaganje o tome što su naučili.	Učenici iz pojedine skupine dijele svoja saznanja o tome što su naučili s ostalim skupinama.		10 min
Radni listić II. Račun i priprema potrebnih otopina	Nastavnik podjeli radni listić 2 te vodi računa o preostalom trajanju rješavanja radnoga listića 2.	Učenici čitaju radni listić 2. te ga rješavaju dogovorom unutar skupine.	Nakon završenog i napisanog radnog listića 2. učenici bi trebali znati kako izračunati i pripraviti potrebne otopine koje se koriste u vježbi uključujući otopine točno određene množinske koncentracije i masenog udjela.	35 min
	Nastavnik obavještava učenike o završetku rješavanja radnog listića 2. Predlaže skupinama kratko izlaganje o tome što su naučili.	Učenici iz pojedine skupine dijele svoja saznanja o tome što su naučili s ostalim skupinama.		10 min
Radni listić III.	Nastavnik podjeli radni listić 3 te vodi računa o preostalom trajanju rješavanja radnoga listića 3.	Učenici čitaju radni listić 3. te ga rješavaju dogovorom unutar skupine.	Nakon završenog i napisanog radnog listića 3 steći vještine o pripravi potrebne otopine i izvođenju	25 min

Dokazne reakcije proteina	Nastavnik obavještava učenike o završetku rješavanja radnog listića 3. Predlaže skupinama kratko izlaganje o tome što su naučili.	Nakon dobivenih podataka svaka skupina će prirediti po jednu otopinu	predviđene vježbe, te navesti karakteristične reakcije aminokiselina i proteina.	20 min
Radni listić IV. Sinteza znanja i ocjena pojedinačnih i skupnih postignuća	Nastavnik podjeli radni listić 4 te vodi računa o preostalom trajanju rješavanja radnoga listića 4.	Učenici čitaju radni listić 4. te ga rješavaju dogovorom unutar skupine.	Nakon završenog i napisanog radnog listića 4 povezati uočeno sa stečenim znanjem te usporediti i komentirati rezultate radnih listića.	20 min
	Nastavnik obavještava učenike o završetku rješavanja radnog listića 4. Predlaže skupinama kratko izlaganje o tome što su naučili.	Učenici iz pojedine skupine razmjenjuju jedni s drugima svoje radne listiće i međusobno se ocjenjuju.		25min

I. Upoznavanje aminokiselina i nastanak polipeptida

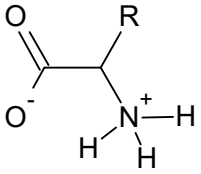
Uputa nastavniku:

Učenike je potrebno podijeliti u skupine od 4 ili 5 članova, ovisno o veličini razreda i procjeni samoga nastavnika. Potrebno je osigurati dovoljan broj primjeraka radnog listića 1 te ga podijeliti svakom učeniku. Učenici rješavaju radni listić 1 otprilike 30 minuta, stoga nastavnik treba voditi računa o preostalom vremenu i upozoriti učenike kada im preostane 5 minuta. Nakon što prvih tridesetak minuta prođe, nastavnik obavještava učenike da je rješavanje gotovo te da odlože svoj pisaći pribor. Nastavnik predlaže učenicima razmjenu saznanja tako da barem jedan učenik iz svake skupine podijeli s učenicima iz drugih skupina što je taj sat naučio te postavi pitanje ukoliko mu je nešto i dalje nejasno.

Na kraju svakoga zadatka nalazi se maksimalan broj bodova koje je moguće ostvariti, a na početku radnoga listića nastavnik bilježi ukupan broj bodova. Maksimalan broj bodova koje je moguće ostvariti rješavanjem radnog listića 1 je 12.

Upoznavanje aminokiselina i nastanak polipeptida	
Ime i prezime	
Razred i skupina	
Broj postignutih bodova	/12

Aminokiselina je monomer polimera polipeptida, odnosno proteina. Sastoji se od dviju glavnih funkcionalnih skupina, karboksilne i amino-skupine. Pri fiziološkoj pH vrijednosti karboksilna je skupina deprotonirana, dok je amino-skupina protonirana, stoga aminokiseline najtočnije prikazujemo strukturnom formulom prikazanom na slici 1, koja se naziva dipolni oblik ili oblik zwitteriona. Aminokiseline se međusobno razlikuju prema bočnom ogranku –R, koji može biti bilo koja funkcionalna skupina.



Slika 1. Opća formula aminokiselina u obliku zwitteriona.

Glicin je najjednostavnija aminokiselina čiji bočni ogranak čini samo atom vodika. No, nije samo prema tome posebna. Jedina je aminokiselina koja nema niti stereogeni, niti kiralni centar.

Strukturnom formulom prikaži molekulu glicina. Zašto ta molekula nema niti stereogeni niti kiralni centar?

Prikaz strukture

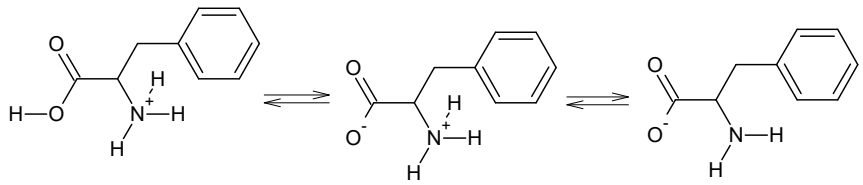
	1+1

Budući da aminokiseline sadrže skupine i s kiselim i s bazičnim svojstvima, za njih se kaže da su amfoterni spojevi.

Nabroji barem par spojeva koji imaju amfoterna svojstva, o kojima ste učili prethodnih godina iz kemije.

	1+1

Topljivost aminokiselina ovisi o pH vrijednosti okoline u kojoj se nalaze. Na slici 2 nalaze se tri strukturne formule fenilalanina. Dobro promotri sliku kako bi mogao odgovoriti na sljedeća pitanja.



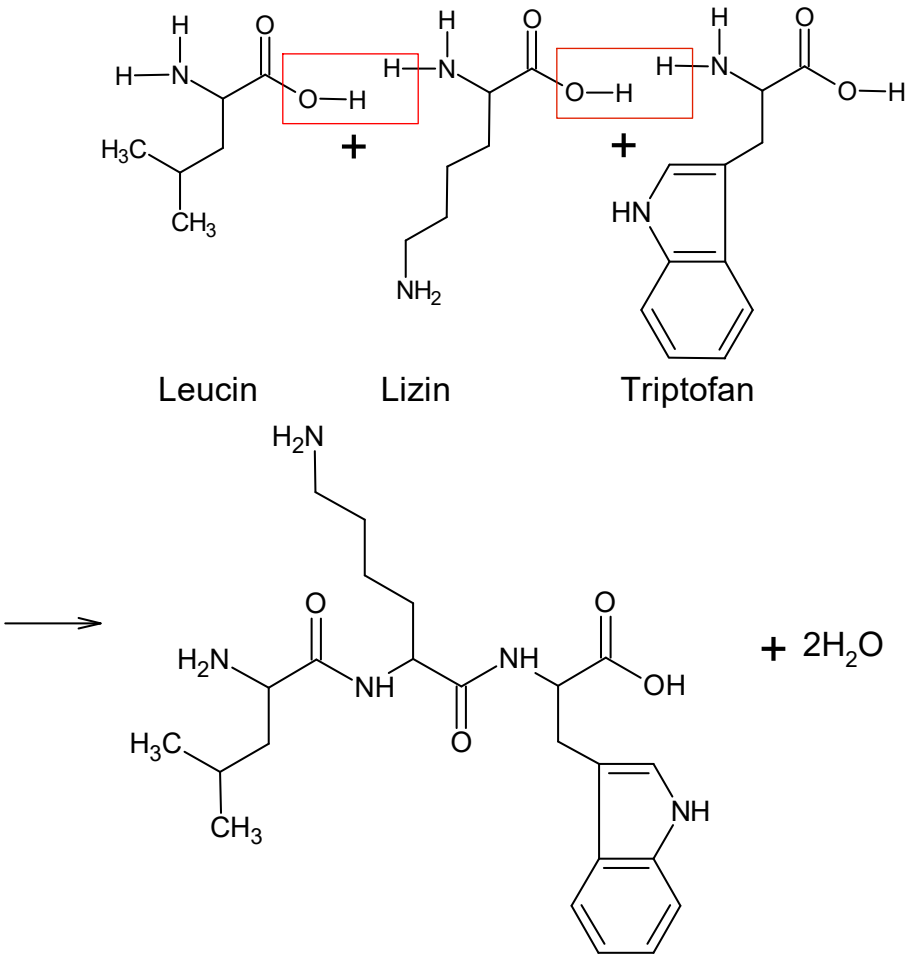
Slika 2. Ovisnost strukture fenilalanina o pH vrijednosti okoline. Struktura s lijeve strane najzastupljenija je pri niskom pH, dok je struktura s desne strane najzastupljenija pri visokom pH.

Ako je koncentracija oksonijevih iona u otopini 4 x 10^{-2} mol L^{-1}, nacrtaj strukturu alanina koja će biti najzastupljenija ako znaš da je naziv alanina prema IUPAC-u 2-aminopropanska kiselina.

Račun i prikaz strukture

	2+2

Od svih poznatih aminokiselina, 20 je proteinogeno, što znači da izgrađuje proteine, a samo 9 esencijalno, što znači da ih organizam ne može sam sintetizirati, već ih moramo unositi hranom. Proteini nastaju povezivanjem proteinogenih aminokiselina peptidnom vezom u dugačke lance koji mogu biti različito raspoređeni u prostoru. Na slici 3 prikazan je nastanak tripeptida leucil-lizil-triptofana.



Slika 3. Nastanak tripeptida leucil-lizil-triptofana.

Na slici 3 prikazan je tripeptid u trans-konformaciji, koja je stabilnija jer su atom kisika karbonilnog ugljika i vodik amino-skupine na suprotnim stranama ravnine. Primjetimo da peptidna veza nastaje između sp^2 hibridizarnoga ugljika i dušika te tako zadržava velik udio karaktera dvostruke veze pa rotacija oko nje nije moguća bez utroška energije.

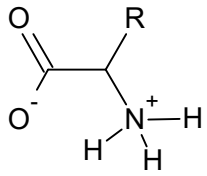
Prikaži nastanak dipeptida glicil-lizina u manje stabilnoj *cis*-konformaciji te zaokruži peptidnu vezu.

Prikaz reakcije

	2+2

Upoznavanje aminokiselina i nastanak polipeptida	
Ime i prezime	
Razred i skupina	
Broj postignutih bodova	/12

Aminokiselina je monomer polimera polipeptida, odnosno proteina. Sastoje se od dviju glavnih funkcionalnih skupina, karboksilne i amino-skupine. Pri fiziološkoj pH vrijednosti karboksilna je skupina deprotonirana, dok je amino-skupina protonirana, stoga aminokiseline najtočnije prikazujemo strukturnom formulom prikazanom na slici 1, koja se naziva dipolni oblik ili oblik Zwitteriona. Aminokiseline se međusobno razlikuju prema bočnom ogranku –R, koji može biti bilo koja funkcionalna skupina.

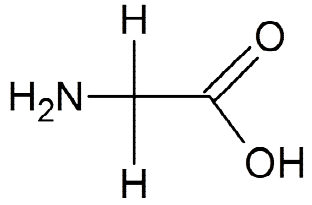


Slika 1. Opća formula aminokiselina u obliku Zwitteriona.

Glicin je najjednostavnija aminokiselina čiji bočni ogranak čini samo atom vodika. No, nije samo prema tome posebna. Jedina je aminokiselina koja nema niti stereogeni, niti kiralni centar.

Strukturnom formulom prikaži molekulu glicina. Zašto ta molekula nema niti stereogeni niti kiralni centar?

Prikaz strukture



Zato što je centralni ugljikov atom okružen sa dva atoma vodika, amino skupinom i karboksilnom skupinom. Da bi molekula imala stereogeni i kiralni centar mora imati četiri različite skupine vezane za C atom

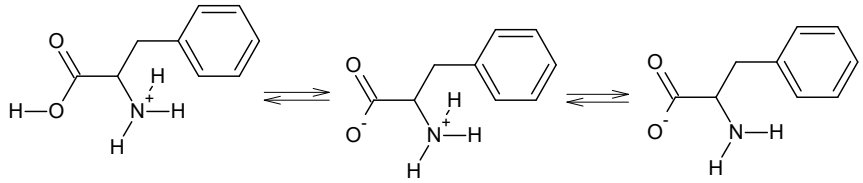
	1+1

Budući da aminokiseline sadrže skupine i s kiselim i s bazičnim svojstvima, za njih se kaže da su amfoterni spojevi.

Nabroji barem par spojeva koji imaju amfoterna svojstva, o kojima ste učili prethodnih godina iz kemije.
Cinkov oksid (ZnO), Aluminijev hidroksid ($Al(OH)_3$), Olovo oksid (PbO), Aluminijev oksid (Al_2O_3), Berilijev hidroksid ($Be(OH)_2$)

	1+1

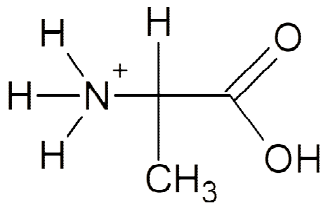
Topljivost aminokiselina ovisi o pH vrijednosti okoline u kojoj se nalaze. Na slici 2 nalaze se tri strukturne formule fenilalanina. Dobro promotri sliku kako bi mogao odgovoriti na sljedeća pitanja.



Slika 2. Ovisnost strukture fenilalanina o pH vrijednosti okoline. Struktura s lijeve strane najzastupljenija je pri niskom pH, dok je struktura s desne strane najzastupljenija pri visokom pH.

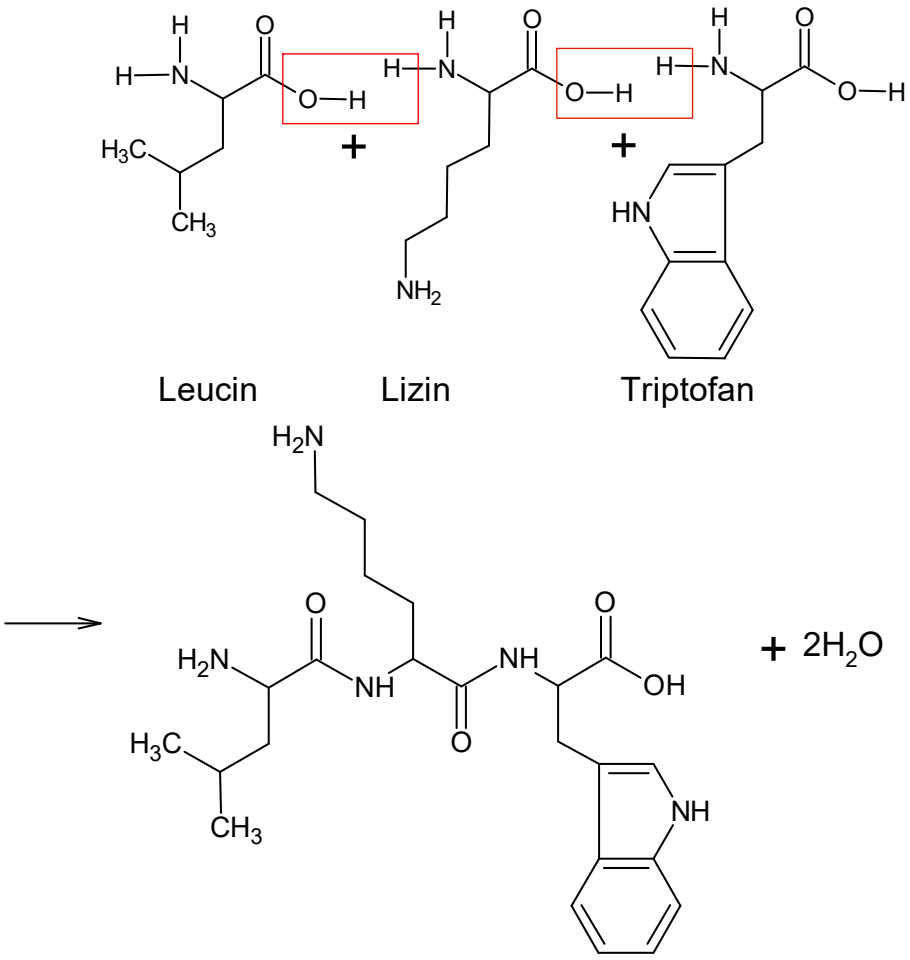
Ako je koncentracija oksonijevih iona u otopini 4 x 10^{-2} mol L^{-1}, nacrtaj strukturu alanina koja će biti najzastupljenija ako znaš da je naziv alanina prema IUPAC-u 2-aminopropanska kiselina.

Račun i prikaz strukture:
$[H_3O^+] = 4 * 10^{-2}\ mol\ L^{-1}$
pH=?
$pH = -log[H_3O^+]$
$pH = -log[4 * 10^{-2}]$
$pH = 1{,}40$



	2+2

Od svih poznatih aminokiselina, 20 je proteinogeno, što znači da izgrađuje proteine, a samo 9 esencijalno, što znači da ih organizam ne može sam sintetizirati, već ih moramo unositi hranom. Proteini nastaju povezivanjem proteinogenih aminokiselina peptidnom vezom u dugačke lance koji mogu biti različito raspoređeni u prostoru. Na slici 3 prikazan je nastanak tripeptida leucil-lizil-triptofana.

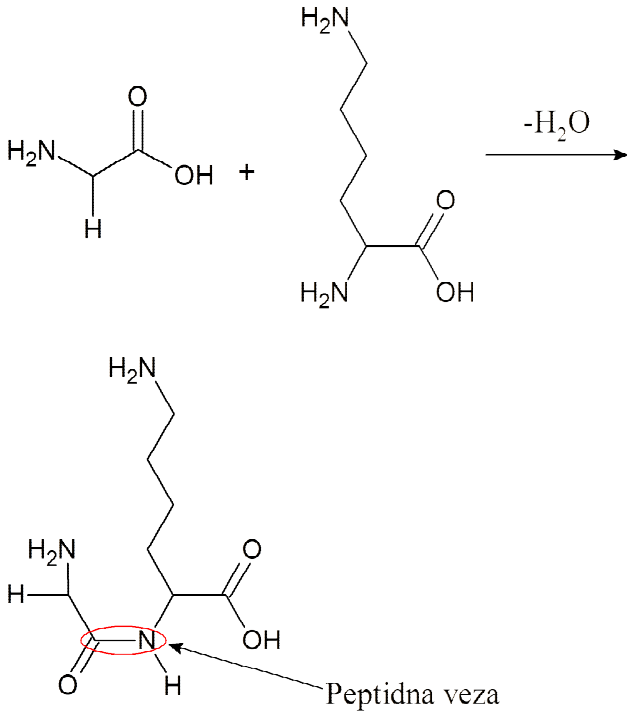


Slika 3. Nastanak tripeptida leucil-lizil-triptofana.

Na slici 3 prikazan je tripeptid u trans-konformaciji, koja je stabilnija jer su atom kisika karbonilnog ugljika i vodik amino-skupine na suprotnim stranama ravnine. Primjetimo da peptidna veza nastaje između sp^2 hibridizarnoga ugljika i dušika te tako zadržava velik udio karaktera dvostruke veze pa rotacija oko nje nije moguća bez utroška energije.

Prikaži nastanak dipeptida glicil-lizina u manje stabilnoj *cis*-konformaciji te zaokruži peptidnu vezu.

Prikaz reakcije



	2+2

II. Račun i priprema potrebnih otopina

Uputa nastavniku:

Učenike je potrebno podijeliti u skupine od 4 ili 5 članova, ovisno o veličini razreda i procjeni samoga nastavnika. Potrebno je osigurati dovoljan broj primjeraka radnog listića 2 te ga podijeliti svakom učeniku. Učenici rješavaju radni listić 2 otprilike 30 minuta, stoga nastavnik treba voditi računa o preostalom vremenu i upozoriti učenike kada im preostane 5 minuta. Nakon što prvih dvadeset pet minuta prođe, nastavnik obavještava učenike da je rješavanje gotovo te da odlože svoj pisaći pribor. Nastavnik predlaže učenicima da svaka skupina napravi jednu od potrebnih otopina za koje su računali potrebne mase i volumene.

Na kraju svakoga zadatka nalazi se maksimalan broj bodova koje je moguće ostvariti, a na početku radnoga listića nastavnik bilježi ukupan broj bodova. Maksimalan broj bodova koje je moguće ostvariti rješavanjem radnog listića 2 je 15.

Račun i priprema potrebnih otopina	
Ime i prezime	
Razred i skupina	
Broj postignutih bodova	/15

Priprema i sastav otopina

Otopine su homogene smjese dviju ili više tvari koje se sastoje od otopljene tvari i otapala. Otopine se pripremaju na različite načine:

- Otapanjem čistih tvari u otapalu
- Razrjeđivanjem otopina poznatih koncentracija

- Otapanje čvrstih tvari u otapalu

Za pripremu otopine poznatog masenog udjela (*w*), potrebno je izvagati izračunatu masu tvari i otopiti ju u masi otapala.

Npr. za pripravu 5%-tne otopine kalijeva klorida, potrebno je izračunati masu kalijeva klorida koju je potrebno izvagati da se pripremi otopina potrebnog volumena. Potrebno je pripraviti 100 g smjese. Smjesa = m(KCl) + m(H_2O)

$w(KCl) = 5\%$

$m(smjese) = 100g$

$m(KCl) = ?$

$$w(KCl, smjesa) = \frac{m(KCl)}{m(smjese)} * 100\%$$

$$m(KCl) = \frac{w(KCl, smjesa) * m(smjese)}{100\%}$$

$$m(KCl) = \frac{5\cancel{\%} * 100g}{100\cancel{\%}}$$

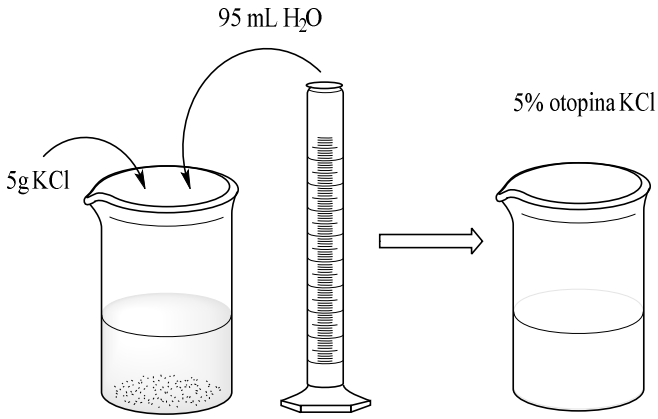
$$m(KCl) = 5g$$

$m(smjese) = m(KCl) + m(H_2O)$

$m(H_2O) = m(smjese) - m(KCl)$

$m(H_2O) = 100g - 5g$

$m(H_2O) = 95g$



Za pripremu 5%-tne otopine kalijeva klorida potrebno je odvagati 5g kalijeva klorida, staviti ga u laboratorijsku čašu i na tu masu dodati 95 mL vode. m (H_2O) = V(H_2O) jer je gustoća vode jednaka 1 g/mL.

- <u>Razrjeđivanje otopina poznatih koncentracija</u>

Kod priprave otopina točno određenih množinskih koncentracija koristi se razrjeđivanje koncentriranijih otopina iste tvari.

Npr. potrebno je pripraviti 200 mL otopine klorovodične kiseline čija množinska koncentracija iznosi 0,5 mol/dm^3 iz otopine klorovodične kiseline čija je množinska koncentracija 1 mol/dm^3.

$c_1(HCl) = 0{,}5\ mol\ dm^{-3}$

$V_1(HCl) = 200\ mL = 0{,}2dm^3$

$c_2(HCl) = 1\ mol\ dm^{-3}$

$V_2(HCl) =?$

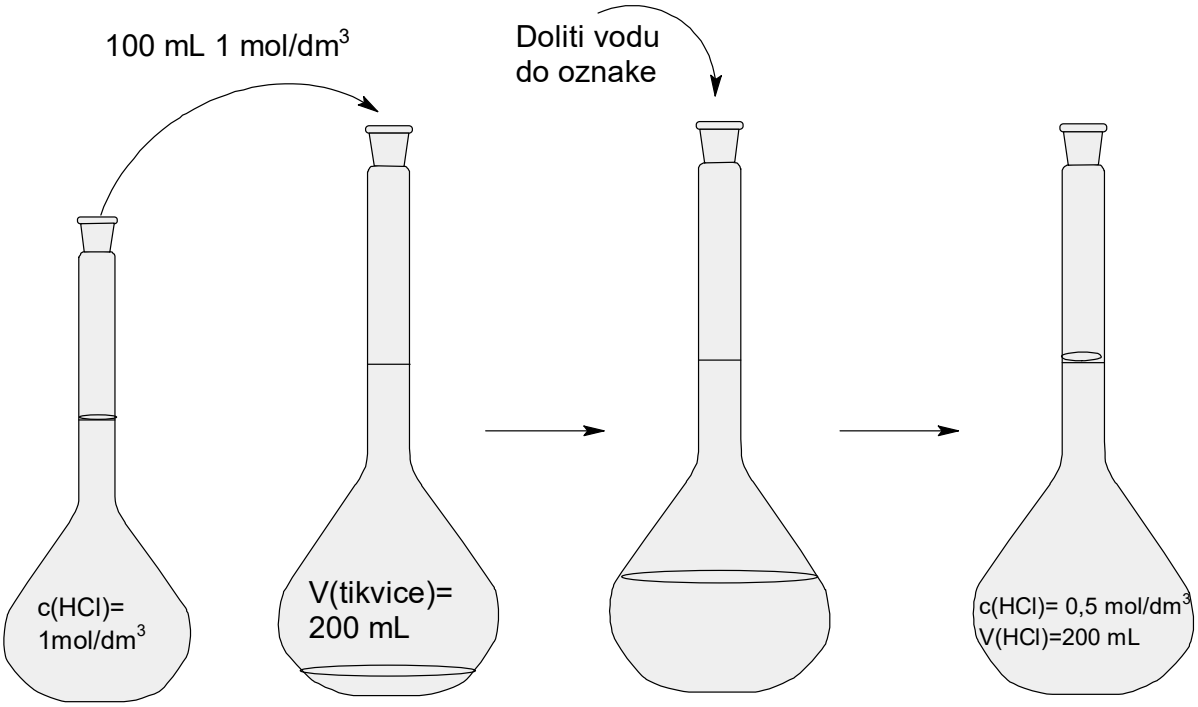
$c_1(HCl) * V_1(HCl) = c_2(HCl) * V_2(HCl)$

$$V_2(HCl) = \frac{c_1(HCl) * V_1(HCl)}{c_2(HCl)}$$

$$V_2(HCl) = \frac{0{,}5\ \cancel{mol\ dm^{-3}} * 0{,}2dm^3}{1\ \cancel{mol\ dm^{-3}}}$$

$V_2(HCl) = 0{,}1dm^3 = 100mL$

Za pripravu 200 mL 0,5 mol/dm^3 otopine klorovodične kiseline potrebno je pipetom odmjeriti 100 mL 1 mol/dm^3 klorovodične kiseline. Izmjereni volumen uliti u odmjernu tikvicu od 200 mL i razrijediti vodom do oznake. Prethodno je u odmjernu tikvicu potrebno uliti manju količinu vode jer se ne smije dodavati vodu u kiselinu.



Zadatak 1.

Koliki volumen natrijevog hidroksida množinske koncentracije (c) 4 mol/dm^3 je potrebno doliti u odmjernu tikvicu, da se priredi 50 mL otopine natrijevog hidroksida množinske koncentracije (c) 2 mol/dm^3?

Račun:

	3

Zadatak 2.

Koliku masu amonijevog hidroksida je potrebno odvagati za pripremu 50 mL otopine amonijevog hidroksida masenog udjela (w) 10% ?

Račun:

	3

Zadatak 3.

Koliku je masu kalijeva heksacijanoferata ($K_4[Fe(CN)_6]$) potrebno odvagati za pripravu 100 mL otopine množinske koncentracije (c) 0,05 mol/dm^3? M($K_4[Fe(CN)_6]$)= 368,35 g/mol.

Račun:

	3

Zadatak 4.

Koliki volumen octene kiseline masenog udjela (w) 25% je potrebno dodati u tikvicu od 50 mL za pripravu 10%-tnu otopinu octene kiseline.

Račun:

	3

Zadatak 5.

Koliku je masu bakrova sulfata potrebno odvagati za pripravu 100 mL otopine bakrova sulfata množinske koncentracije (c) 0,05 mol/dm^3? M($CuSO_4$)= 159,61 g/mol.

Račun:

	3

Račun i priprema potrebnih otopina	
Ime i prezime	
Razred i skupina	
Broj postignutih bodova	/15

Priprema i sastav otopina

Otopine su homogene smjese dviju ili više tvari koje se sastoje od otopljene tvari i otapala. Otopine se pripremaju na različite načine:

- Otapanjem čistih tvari u otapalu
- Razrjeđivanjem otopina poznatih koncentracija

- Otapanje čvrstih tvari u otapalu

Za pripremu otopine poznatog masenog udjela (*w*), potrebno je izvagati izračunatu masu tvari i otopiti ju u masi otapala.

Npr. za pripravu 5%-tne otopine kalijeva klorida, potrebno je izračunati masu kalijeva klorida koju je potrebno izvagati da se pripremi otopina potrebnog volumena. Potrebno je pripraviti 100 g smjese. Smjesa = m(KCl) + m(H_2O)

$w(KCl) = 5\%$

$m(smjese) = 100g$

$m(KCl) = ?$

$$w(KCl, smjesa) = \frac{m(KCl)}{m(smjese)} * 100\%$$

$$m(KCl) = \frac{w(KCl, smjesa) * m(smjese)}{100\%}$$

$$m(KCl) = \frac{5\cancel{\%} * 100g}{100\cancel{\%}}$$

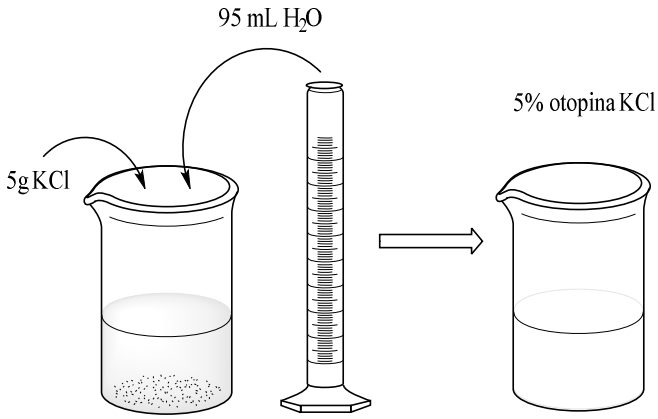
$$m(KCl) = 5g$$

$m(smjese) = m(KCl) + m(H_2O)$

$m(H_2O) = m(smjese) - m(KCl)$

$m(H_2O) = 100g - 5g$

$m(H_2O) = 95g$



Za pripremu 5%-tnu otopine kalijeva klorida potrebno je odvagati 5g kalijeva klorida,staviti ga u laboratorijsku čašu i na tu masu dodati 95 mL vode.

$m(H_2O) = V(H_2O)$ jer je gustoća vode jednaka 1 g/mL.

- Razrjeđivanje otopina poznatih koncentracija

Kod priprave otopina točno određenih množinskih koncentracija koristi se razrjeđivanjem koncentriranijih otopina iste supstancije.

Npr. potrebno je pripraviti 200 mL otopine klorovodične kiseline čija množinska koncentracija 0,5 mol/dm^3 iz otopine klorovodične kiseline čija je koncentracija 1mol/dm^3.

$c_1(HCl) = 0{,}5\ mol\ dm^{-3}$

$V_1(HCl) = 200\ mL = 0{,}2dm^3$

$c_2(HCl) = 1\ mol\ dm^{-3}$

$V_2(HCl) = ?$

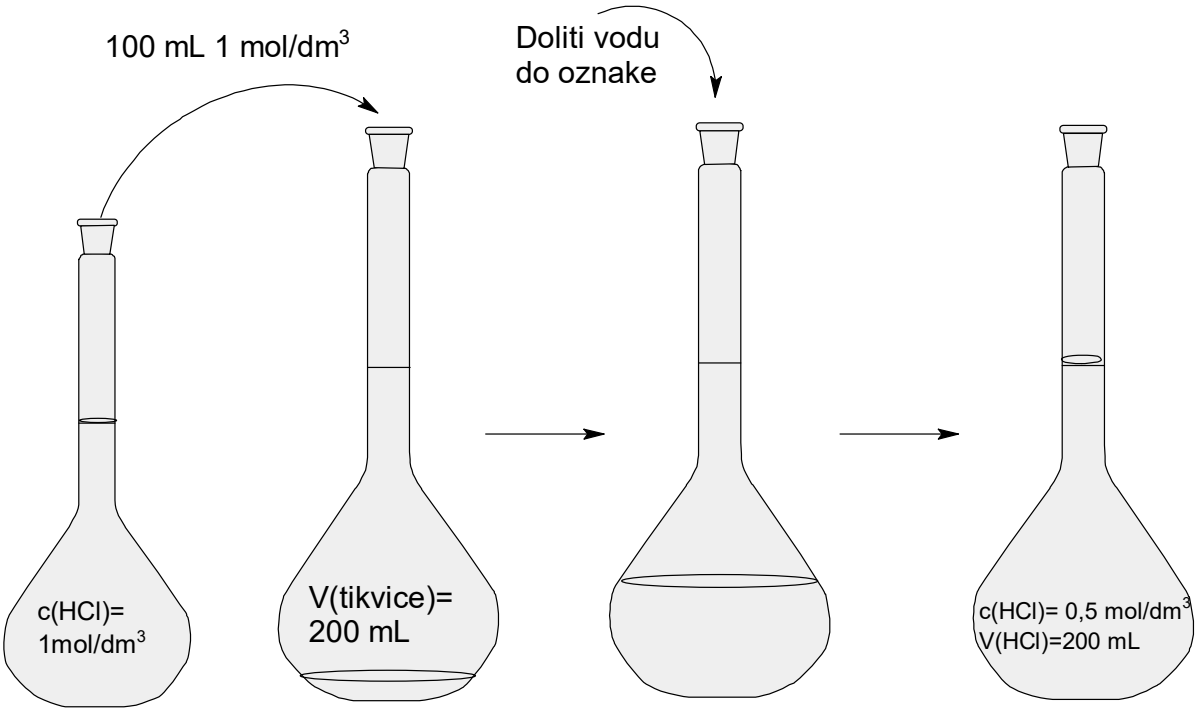
$c_1(HCl) * V_1(HCl) = c_2(HCl) * V_2(HCl)$

$$V_2(HCl) = \frac{c_1(HCl) * V_1(HCl)}{c_2(HCl)}$$

$$V_2(HCl) = \frac{0{,}5\ \cancel{mol\ dm^{-3}} * 0{,}2dm^3}{1\ \cancel{mol\ dm^{-3}}}$$

$V_2(HCl) = 0{,}1dm^3 = 100mL$

Za pripravu 200 mL 0,5 mol/dm^3 otopine klorovodične kiseline potrebno je pipetom odmjeriti 100 mL 1 mol/dm^3 klorovodične kiseline. Izmjereni volumen uliti u odmjernu tikvicu od 200 mL i razrijediti vodom do oznake. Prethodno je u odmjernu tikvicu potrebno uliti manju količinu vode jer se ne smije dodavati vodu u kiselinu.



Zadatak 1.

Koliki volumen natrijevog hidroksida množinske koncentracije (c) 4 mol/dm^3 je potrebno doliti u odmjernu tikvicu, da se priredi 50 mL otopine natrijevog hidroksida množinske koncentracije (c) 2 mol/dm^3?

Račun:

$$c_1(HCl) = 2\ mol\ dm^{-3}$$

$$V_1(NaOH) = 50\ mL = 0{,}05 dm^3$$

$$c_2(NaOH) = 4\ mol\ dm^{-3}$$

$$V_2(HCl) = ?$$

$$c_1(HCl) * V_1(HCl) = c_2(HCl) * V_2(HCl)$$

$$V_2(HCl) = \frac{c_1(HCl) * V_1(HCl)}{c_2(HCl)}$$

$$V_2(HCl) = \frac{2\ \cancel{mol\ dm^{-3}} * 0{,}05 dm^3}{4\ \cancel{mol\ dm^{-3}}}$$

$$V_2(HCl) = 0{,}025 dm^3 = 25 mL$$

	3

Zadatak 2.

Koliku masu amonijevog hidroksida je potrebno odvagati za pripremu 50 mL otopine amonijevog hidroksida masenog udjela (w) 10% ?

Račun:

$$w(NH_4OH) = 10\%$$

$$m(smjese) = 50\ ml = 50 g$$

$$m(NH_4OH) = ?$$

$$w(NH_4OH, smjesa) = \frac{m(NH_4OH)}{m(smjese)} * 100\%$$

$$m(KCl) = \frac{w(NH_4OH, smjesa) * m(smjese)}{100\%}$$

$$m(NH_4OH) = \frac{10\cancel{\%} * 50 g}{100\cancel{\%}}$$

$$m(NH_4OH) = 5 g$$

	3

Zadatak 3.

Koliku je masu kalijeva heksacijanoferata ($K_4[Fe(CN)_6]$) potrebno odvagati za pripravu 100 mL otopine množinske koncentracije (c) 0,05 mol/dm^3? $M(K_4[Fe(CN)_6])$= 368,35 g/mol.

Račun:

$$c\ (K_4[Fe(CN)_6]) = 0{,}05\ mol\ dm^{-3}$$

$$V\ (K_4[Fe(CN)_6]) = 100\ mL = 0{,}1 dm^3$$

$$M\ (K_4[Fe(CN)_6]) = 368{,}35\ g\ mol^{-1}$$

$$m\ (K_4[Fe(CN)_6]) = ?$$

$$c = \frac{n}{v}\ \ ;\ \ n = \frac{m}{M}\ \ ;\ \ c = \frac{m}{M * V}$$

$$m = c * M * V$$

$$m\ (K_4[Fe(CN)_6]) = \mathrm{c}\ (K_4[Fe(CN)_6]) * \mathrm{M}\ (K_4[Fe(CN)_6]) * \mathrm{V}$$

$$m\ (K_4[Fe(CN)_6]) = 0{,}05\ \cancel{mol\ dm^{-3}} *\ 368{,}35\ g\ \cancel{mol^{-1}} *\ 0{,}1\cancel{dm^3}$$

$$m\ (K_4[Fe(CN)_6]) = 1{,}842\ g$$

	3

Zadatak 4.

Koliki volumen octene kiseline masenog udjela (w) 25% je potrebno dodati u tikvicu od 50 mL za pripravu 10%-tne otopine octene kiseline.

Račun:

$$w_1(HCl) = 10\%$$

$$V_1(HCl) = 50\ mL = 0{,}05 dm^3$$

$$w_2(HCl) = 25\%$$

$$V_2(HCl) = ?$$

$$w_1(HCl) * V_1(HCl) = w_2(HCl) * V_2(HCl)$$

$$V_2(HCl) = \frac{w_1(HCl) * V_1(HCl)}{w_2(HCl)}$$

$$V_2(HCl) = \frac{10\ \% * 0{,}05\ dm^3}{25\ \%}$$

$$V_2(HCl) = 0{,}02 dm^3 = 20 mL$$

	3

Zadatak 5.

Koliku je masu bakrova sulfata potrebno odvagati za pripravu 100 mL otopine bakrova sulfata množinske koncentracije (c) 0,05 mol/dm^3? M($CuSO_4$)= 159,61 g/mol.

Račun:

$$c\ (\mathrm{CuSO_4}) = 0{,}05\ mol\ dm^{-3}$$

$$V(\mathrm{CuSO_4}) = 100\ mL = 0{,}1 dm^3$$

$$M\ (\mathrm{CuSO_4}) = \ 159{,}61\ g\ mol^{-1}$$

$$m\ (\mathrm{CuSO_4}) = ?$$

$$c = \frac{n}{v} \ ; \ n = \frac{m}{M} \ ; \ c = \frac{m}{M * V}$$

$$m = c * M * V$$

$$m\ (\mathrm{CuSO_4}) = \mathrm{c}\ (\mathrm{CuSO_4}) * \mathrm{M}\ (\mathrm{CuSO_4}) * \mathrm{V}$$

$$m\ (K_4[Fe(CN)_6]) = 0{,}05\ \cancel{mol\ dm^{-3}} * 159{,}61\ g\ \cancel{mol^{-1}} * \ 0{,}1\cancel{dm^3}$$

$$m\ (K_4[Fe(CN)_6]) = 0{,}798\ g$$

	3

III. Dokazne reakcije proteina

Uputa nastavniku:

Učenike je potrebno podijeliti u skupine od 4 ili 5 članova, ovisno o veličini razreda i procjeni samoga nastavnika. Potrebno je osigurati dovoljan broj primjeraka radnog listića 3 te ga podijeliti svakom učeniku. Učenici rješavaju radni listić 3 otprilike 30 minuta, stoga nastavnik treba voditi računa o preostalom vremenu i upozoriti učenike kada im preostane 5 minuta. Nakon što prvih tridesetak minuta prođe, nastavnik obavještava učenike da je rješavanje gotovo te da odlože svoj pisaći pribor te laboratorijski pribor i kemikalije. Nastavnik predlaže učenicima razmjenu dobivenih rezultata tako da barem jedan učenik iz svake skupine podijeli svoje rezultate s učenicima iz drugih skupina o tome što je taj sat naučio i zapazio iz dobivenih reakcija. Nastavnik bi trebao upozoriti učenike na mjere opreza pri radu u laboratoriju.

Na kraju svakoga zadatka nalazi se maksimalan broj bodova koje je moguće ostvariti, a na početku radnoga listića nastavnik bilježi ukupan broj bodova. Maksimalan broj bodova koje je moguće ostvariti rješavanjem radnog listića 3 je 12.

Dokazne reakcije proteina	
Ime i prezime	
Razred i skupina	
Broj postignutih bodova	/12

Dokazne reakcije aminokiselina i proteina

Sve reakcije za dokazivanje aminokiselina i proteina se mogu podijeliti na:

- Obojene- dokazuje se pojedina aminokiselina ili peptidna veza
- Taložne- temelji se na koloidnim svojstvima otopine proteina

Za ove reakcije koristi se vodena otopina bjelanjka koji je odvojen od žumanjka. U laboratorijsku čašu je potrebno odvojiti bjelanjak i dodati trostruki volumen vode te dobro promiješati staklenim štapićem, nakon miješanja otopinu profiltrirati preko filter papira. Takva otopina koristi se u svim pokusima.

OBOJENE REAKCIJE:

1) **BIURET REAKCIJA**

Pribor: stalak s epruvetom, čaša, 2 kapaljke

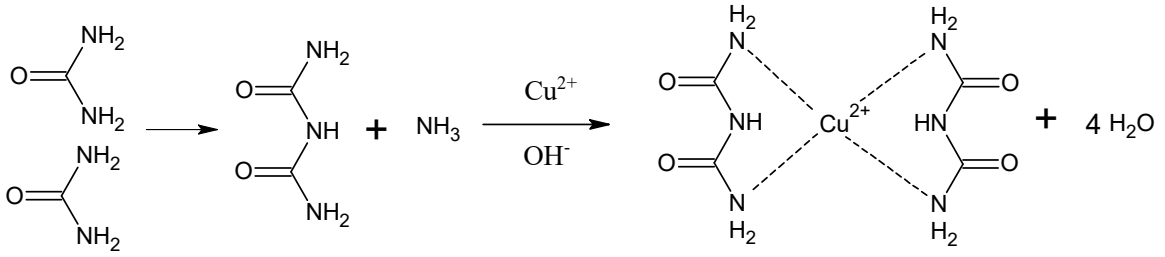
Kemikalije: bjelanjak, otopina NaOH (c = 2 mol/dm^3), otopina $CuSO_4$ (c = 0,05 mol/dm^3)

Postupak:

Otopinu bjelanjka zalužiti s nekoliko kapi natrijeve lužine i u nju dodati nekoliko kapi otopine $CuSO_4$. Otopina se oboji u ljubičasto.

Objašnjenje:

Biuret reakcija je općenita reakcija za dokazivanje proteina pa stoga nije specifičan test za aminokiseline. Naziv potječe od spoja biuret koji nastaje kondenzacijom dviju molekula uree uz izdvajanje amonijaka. Opisanu reakciju će dati svi spojevi koji imaju peptidnu vezu.



2) KSANTOPROTEINSKA REAKCIJA

Pribor: epruveta, 2 kapaljke, pipeta od 2 mL, propipeta, vodena kupelj

Kemikalije: bjelanjak, otopina NaOH (c = 2 mol/dm^3), koncentrirana HNO_3, univerzalni indikator papir

Postupak:

U 2 mL otopine bjelanjka u epruveti se doda nekoliko kapi koncentrirane HNO_3 te se smjesa zagrijava na vodenoj kupelji nekoliko minuta. Kada se otopina ohladi dodaje joj se otopina NaOH do lužnate reakcije, pri čemu žuta boja otopine prelazi u narančastu.

Objašnjenje:

Ova reakcija služi za dokazivanje aromatskih aminokiselina kao što su tirozin, triptofan i fenilalanin.

3) NITROPRUSIDNA REAKCIJA

Pribor: epruveta, čaša, 2 kapaljke, pipeta od 2 mL, propipeta,

Kemikalije: bjelanjak, otopina NH_4OH (w = 10 %), otopina natrijevog nitroprusida

Postupak:

U epruvetu se ulije 2 mL otopine bjelanjka i nekoliko kapi otopine natrijevog nitroprusida. Smjesa se zaluži otopinom NH_4OH. Nastaje karakteristično ljubičasto ili crveno obojenje.

Objašnjenje:

Većina prirodnih spojeva sadrži aminokiselinu cistein. SH- (sulfohidrilna) skupina reagira s natrijevim nitroprusidom i time stvara karakteristično obojenje koje dokazuje prisustvo aminokiseline cisteina.

TALOŽNE REAKCIJE

4) TALOŽENJE POMOĆU KALIJEVOG HEKSACIJANOFERATA

Pribor: stalak s epruvetom, 2 kapaljke

Kemikalije: bjelanjak, octena kiselina (w = 10 %), otopina ($K_4[Fe(CN)_6]$) (c = 0,05 mol/dm^3)

Postupak:

U epruvetu se ulije nekoliko mL otopine bjelanjka te nekoliko kapi octene kiseline i $K_4[Fe(CN)_6]$. Na dnu epruvete se stvara bijeli talog.

Objašnjenje:

Veliki anioni poput $[Fe(CN)_6]^{4-}$ mogu neutralizirati pozitivan naboj proteina, čime se smanjuje međusobno odbijanje koloidnih čestica te dolazi do koagulacije.

Zadatak: Izvesti više navedenih vježbi pažljivo prateći propise, te napisati zapažanja i zaključak. U predviđeni prostor za crteže nacrtati do kojih je promjena boja došlo u epruvetama.

1) BIURET REAKCIJA

Zapažanja:

Zaključak:

Skica

	3

2) KSANTOPROTEINSKA REAKCIJA

Zapažanja:

Zaključak:

Skica

	3

3) NITROPRUSIDNA REAKCIJA

Zapažanja:

Zaključak:

Skica

	3

4) TALOŽENJE POMOĆU KALIJEVOG HEKSACIJANOFERATA

Zapažanja:

Zaključak:

Skica

	3

Dokazne reakcije proteina	
Ime i prezime	
Razred i skupina	
Broj postignutih bodova	/12

Dokazne reakcije aminokiselina i proteina

Sve reakcije za dokazivanje aminokiselina i proteina se mogu podijeliti na:

- Obojene- dokazuje se pojedina aminokiselina ili peptidna veza
- Taložne- Temelji se na koloidnim svojstvima otopine proteina

Za ove reakcije koristi se vodena otopina bjelanjka koji je odvojen od žumanjka. U laboratorijsku čašu je potrebno odvojiti bjelanjak i dodati trostruki volumen vode te dobro promiješati staklenim štapićem, nakon miješanja otopinu profiltrirati preko filter papira. Takva otopina koristi se svim pokusima.

OBOJENE REAKCIJE:

5) BIURET REAKCIJA

Pribor: stalak s epruvetom, čaša, 2 kapaljke

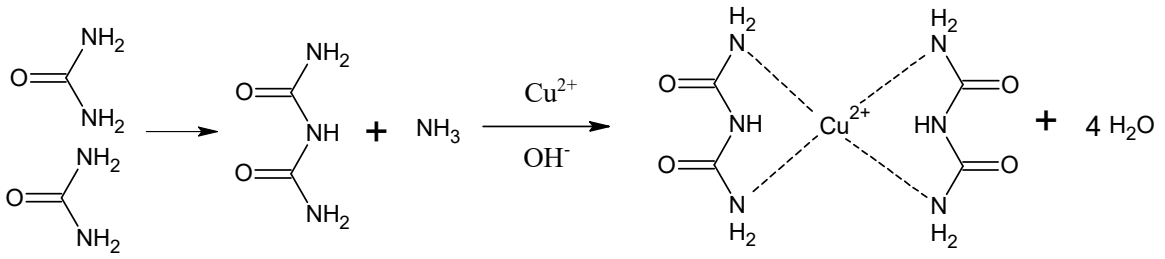
Kemikalije: bjelanjak, otopina NaOH (c= 2 mol/dm^3), otopina $CuSO_4$ (c=0,05 mol/dm^3)

Postupak:

Otopinu bjelanjka zalužiti s nekoliko kapi natrijeve lužine i u nju dodati nekoliko kapi otopine $CuSO_4$. Otopina se oboji u ljubičasto.

Objašnjenje:

Biuret reakcija je općenita reakcija za dokazivanje proteina pa stoga nije specifičan test za aminokiseline. Naziv potječe od spoja biuret koji nastaje kondenzacijom dviju molekula uree uz izdvajanje amonijaka. Opisanu reakciju će dati svi spojevi koji imaju peptidnu vezu.



6) KSANTOPROTEINSKA REAKCIJA

Pribor: epruveta, 2 kapaljke, pipeta od 2 mL, propipeta, vodena kupelj

Kemikalije: bjelanjak, otopina NaOH (c= 2 mol/dm^3), koncentrirana HNO_3, univerzalni indikator papir

Postupak:

U 2 mL otopine bjelanjka u epruveti se doda nekoliko kapi koncentrirane HNO_3 te se smjesa zagrijava na vodenoj kupelji nekoliko minuta. Kada se otopina ohladi dodaje joj se otopina NaOH do lužnate reakcije, pri čemu žuta boja otopine prelazi u narančastu.

Objašnjenje:

Ova reakcija služi za dokazivanje aromatskih aminokiselina kao što su tirozin, triptofan i fenilalanin.

7) NITROPRUSIDNA REAKCIJA

Pribor: epruveta, čaša, 2 kapaljke, pipeta od 2 mL, propipeta,

Kemikalije: bjelanjak, otopina NH_4OH (*w*= 10 %), otopina natrijevog nitroprusida

Postupak:

U epruvetu se ulije 2 mL otopine bjelanjka i nekoliko kapi otopine natrijevog nitroprusida. Smjesa se zaluži otopinom NH_4OH. Nastaje karakteristično ljubičasto ili crveno obojenje.

Objašnjenje:

Većina prirodnih spojeva sadrži aminokiselinu cistein. SH- (sulfohidrilna) skupina reagira s natrijevim nitroprusidom i time stvara karakteristično obojenje koje dokazuje prisustvo aminokiseline cisteina

TALOŽNE REAKCIJE

8) TALOŽENJE POMOĆU KALIJEVOG HEKSACIJANOFERATA

Pribor: stalak s epruvetom, 2 kapaljke

Kemikalije: bjelanjak, octena kiselina (*w*= 10 %), otopina ($K_4[Fe(CN)_6]$) (c=0,05 mol/dm^3)

Postupak:

U epruvetu se ulije nekoliko mL otopine bjelanjka te nekoliko kapi octene kiseline i $K_4[Fe(CN)_6]$. Na dnu epruvete se stvara bijeli talog.

Objašnjenje:

Veliki anioni poput $[Fe(CN)_6]^{4-}$ mogu neutralizirati pozitivan naboj proteina, čime se smanjuje međusobno odbijanje koloidnih čestica te dolazi do koagulacije.

Zadatak: Izvesti više navede vježbe pažljivo prateći propise, te napisati zapažanja i zaključak. U predviđeni prostor za crtež nacrtati do kojih je promjena boja došlo u epruvetama

5) BIURET REAKCIJA

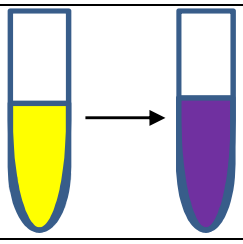
Zapažanja:

Otopina se obojila u ljubičasto dodatkom bakrova sulfata.

Zaključak:

Ljubičasta boja nam pokazuje da su u otopini prisutne aminokiseline.

Skica



	3

6) KSANTOPROTEINSKA REAKCIJA

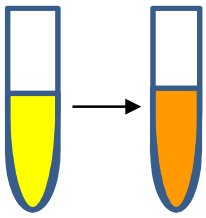
Zapažanja:

Zagrijavanjem bjelanjka uz prisutnost HNO_3, te dodatkom NaOH u ohlađenu otopinu boja prelazi iz žute u narančastu.

Zaključak:

Pri pozitivnom testu možemo zaključiti da se u smjesi nalaze aromatske aminokiseline

Skica



	3

7) NITROPRUSIDNA REAKCIJA

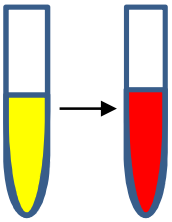
Zapažanja:

Dodatkom nitroprusida u zaluženu otopinu bjelanjka nastaje crveno obojenje otopine

Zaključak:

Crvena boja je dokaz aminokiseline cisteina

Skica



	3

8) TALOŽENJE POMOĆU KALIJEVOG HEKSACIJANOFERATA

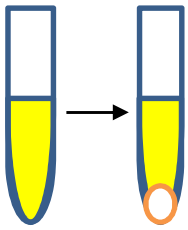
Zapažanja:

Dodatkom $K_4[Fe(CN)_6]$ u zakiseljenu otopinu bjelanjka na dnu epruvete se stvara bijeli talog.

Zaključak:

Kada se doda $K_4[Fe(CN)_6]$ dolazi do taloženja proteina zbog koagulacije.

Skica



	3

IV. Sinteza znanja i ocjena pojedinačnih i skupnih postignuća

Uputa nastavniku:

Učenike je potrebno podijeliti u skupine od 4 ili 5 članova, ovisno o veličini razreda i procjeni samoga nastavnika. Potrebno je osigurati dovoljan broj primjeraka radnog listića 4 te ga podijeliti svakom učeniku. Učenici rješavaju radni listić 4 otprilike 20 minuta, stoga nastavnik treba voditi računa o preostalom vremenu i upozoriti učenike kada im preostane 5 minuta. Nakon što prvih dvadesetak minuta prođe, nastavnik obavještava učenike da je rješavanje gotovo te da odlože svoj pisaći pribor. Nastavnik predlaže učenicima razmjenu dobivenih rezultata tako da svi učenici izmijene svoje radne listiće te isprave i ocijene listiće svojih kolega te na kraju prokomentiraju dobivene rezultate s nastavnikom.

Na kraju svakoga zadatka nalazi se maksimalan broj bodova koje je moguće ostvariti, a na početku radnoga listića nastavnik bilježi ukupan broj bodova. Maksimalan broj bodova koje je moguće ostvariti rješavanjem radnog listića 4 je 12.

Sinteza znanja	
Ime i prezime	
Razred i skupina	
Broj postignutih bodova	/12

Nakon rješavanja zadataka ćete odložiti ispite i pribor, te ćete se na nastavnikov znak zamijeniti i uz pomoć nastavnika ćete ispraviti listiće i ocijeniti ih.

Zadatak 1.

Prikaži nastanak dipeptida alanil-serina te zaokruži peptidnu vezu.

Prikaz reakcije

	4

Zadatak 2.

Koliki volumen klorovodične kiseline čija je gustoća (ρ) 1,18 g/cm^3, a maseni udio (w) 36 % je potreban za pripravu 200 mL otopine klorovodične kiseline čija je množinska koncentracija (c) 1,2 mol/dm^3? M(HCl)= 36,458 g/mol.

Račun:

	4

Zadatak 3.

Dopunite tablicu

Tvar	Reagensi	Boja
Proteini (peptidna veza)		
Aromatske aminokiseline		
SH- skupina iz cisteina		
Taloženje proteina		

	4

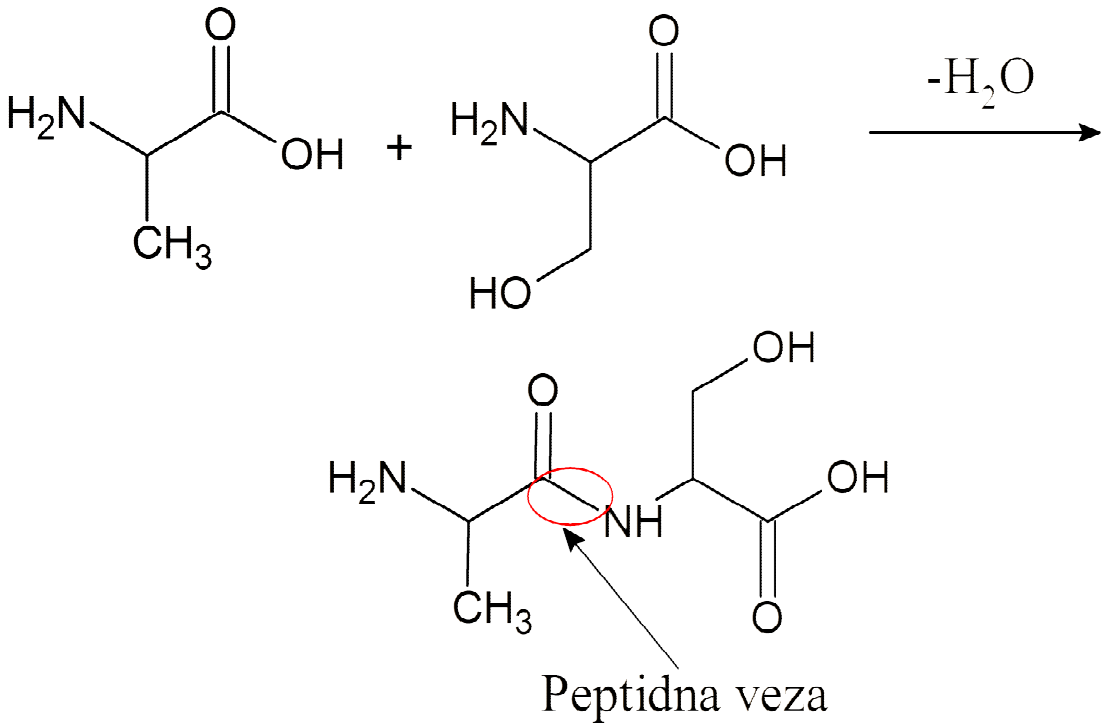
Sinteza znanja	
Ime i prezime	
Razred i skupina	
Broj postignutih bodova	/12

Nakon rješavanja zadataka ćete odložiti ispite i pribor, te ćete se na nastavnikov znak zamijeniti te uz pomoć nastavnika ispraviti listiće i ocijeniti ih.

Zadatak 1.

Prikaži nastanak dipeptida alanil-serina te zaokruži peptidnu vezu.

Prikaz reakcije



	4

Zadatak 2.

Koliki volumen klorovodične kiseline čija je gustoća (ρ) 1,18 g/cm^3, a maseni udio (w) 36 % je potreban za pripravu 200 mL otopine klorovodične kiseline čija je množinska koncentracija (c) 1,2 mol/dm^3? M(HCl)= 36,458 g/mol.

Račun:

$\rho(HCl)$= 1,18 g/cm^3

$w(HCl)$= 36 % = 0,36

$M(HCl)$= 36,458 g/mol

$c_2(HCl) = 1{,}2\ mol\ dm^{-3}$

$\underline{V_2(HCl) = 200\ mL = 0{,}2 dm^3}$

$c_1(HCl), V_1(HCl) = ?$

$$c_1(HCl) = \frac{w(\mathrm{HCl}) * \rho(\mathrm{HCl})}{M(HCl)} = \frac{0{,}36 * 1{,}18\ \mathrm{g}\ cm^{-3}}{36{,}458\ g\ mol^{-1}}$$

$$c_1(HCl) = 0{,}01165\ mol\ cm^{-3} = 11{,}65\ mol\ dm^{-3}$$

$$c_1(HCl) * V_1(HCl) = c_2(HCl) * V_2(HCl)$$

$$V_1(HCl) = \frac{c_2(HCl) * V_2(HCl)}{c_1(HCl)}$$

$$V_1(HCl) = \frac{c_2(HCl) * V_2(HCl)}{c_1(HCl)} = \frac{1{,}2\ \cancel{mol\ dm^{-3}} * 0{,}2 dm^3}{11{,}65\ \cancel{mol\ dm^{-3}}} = 0{,}0206\ dm^3 = 20{,}6\ cm^3$$

	4

Zadatak 3.

Dopunite tablicu

Tvar	Reagensi	Boja
Proteini (peptidna veza)	NaOH i $CuSO_4$	Ljubičasta
Aromatske aminokiseline	NaOH i HNO_3	Iz žute u narančastu
SH- skupina iz cisteina	Nitroprusid i NH_4OH	Crvena ili ljubičasta
Taloženje proteina	Octena kis. i $K_4[Fe(CN)_6]$	Bijeli talog

	4

6. Zaključak

U ovom su diplomskom radu istraživana elektrokemijska svojstva otopina L-karnozina u pH području od 3,5 do 8,0 na elektrodi od staklastog ugljika uporabom diferencijalne pulsne voltametrije te je utvrđeno da se L-karnozin oksidira pri navedenim eksperimentalnim uvjetima.

Visina oksidacijskog strujnog vrha L-karnozina varirala je s promjenom pH, a najviša vrijednost oksidacijskog strujnog vrha dobivena je pri pH=4,8; iz čega možemo zaključiti da je to optimalna pH vrijednost za oksidaciju karnozina. Uzastopnim snimanjem diferencijalnih pusnih voltamograma smanjivala se visina oksidacijskog strujnog vrha, što upućuje na adsorpciju oksidacijskih produkata L-karnozina na površinu elektrode od staklastog ugljika.

Visina oksidacijskog strujnog vrha povećavala se s povećanjem koncentracije L-karnozina. Dobivena je linearna ovisnost oksidacijske struje o kocentraciji ispitivanog spoja u koncentracijskom području od $1 \cdot 10^{-5}$ mol dm^{-3} do $1 \cdot 10^{-4}$ mol dm^{-3}.

L-karnozin je kronoamperometrijski nanošen na površinu elektrode od staklastog ugljika i utvrđeno je da se on vezao na elektrodnu površinu čime je dobivena modificirana elektroda od staklastog ugljika.

Iz dobivenih rezultata može se zaključiti da je mehanizam oksidacije L-karnozina ovisan o pH (optimalan pH za oksidaciju je 4,8), uključuje izmjenu 1 elektrona i 1 protona (nagib pravca $E_{p,a}$ *vs. pH* je 60,8 mV), produkt oksidacije je radikal L-karnozina, koji se preko karboksilnog radikala i amino skupine imidazolnog prstena veže na površinu elektrode od staklastog ugljika i blokira ju.

U metodičkom dijelu diplomskog rada obrađena je nastavna jedinica Aminokiseline i proteini u sklopu nastavne cjeline biološki važnih spojeva. Tema je obrađena u obliku mini projekta u trajanju 4 školska sata, predviđenoga za učenike četvrtih razreda gimnazije.

7. Literatura

[1] J. M. Berg, J. T. Tymoczko, L. Stryer, *Biochemistry, Fifth Edition*, W. H. Freeman, 2002.

[2] V. P. Skulachev, (2000.), *Biological role of carnosine in the functioning of excitable tissues*, Biochemistry Moscow, **65** (7) 749-750

[3] http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.9001.html 31.10.2015.

[4] EFSA, (2011.), *Scientific opinion of the substantiation of health claims related to L-carnosine and increase in muscle power, increase in endurance capacity, skin and maintenance of normal cardiac function* persuant to article 13(1) of regulation No 1924/2006, EFSA Journal **9**(4)

[5] http://puneetlabs.com/pdf/Zinc_carnosine-Brochure.pdf 31.10.2015.

[6] G. Begum, A. Cuncliff, M. Leveritt, *Psychological role of carnosine in contracting muscle*, International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism, **15** (2015.) 493-514

[7] J. Y. Culbertson, R. B. Kreider, M. Greenwood, M. Cooke, *Effects of beta alanine on muscle carnosine and exercise performance: A review of current literature*, Nutrients **2** (2010.) 75-98

[8] A. A. Boldyrev, G. Aldini, W. Derave, *Psychology and pathopsychology of carnosine*, Psychol. Rev. **93** (2013.) 1803-1845

[9] S. E. Gariballa, A. J. Sinclair, *Carnosine: Psychological properties and therapeutic potential,* Age and Aging **29** (2000.) 207-210

[10] M. Nino, B. Iovine, P. Santoianni, *Carnosine and N-Acetylcarnosine induce inhibition of UVB Erythema in human skin*, Journal of Cosmetics, Dermatological Sciences and Applications, **1** (2011.) 177-179

[11] A. S. Artis, S. Aydogan, *Carnosine and its role on erythrocyte rheology*
Dostupan na: www.intechopen.com 30.10.2015.

[12] J. H. Kang, (2010.), *Protective effects of carnosine and homocarnosine on ferritin and hydrogen peroxide-mediated DNA damage*, BMB Reports **43**(10) 683-687

[13] A. R. Hipkiss, S. C. Cartwright, C. Bromley, S. R. Gross, R. M. Bill, (2013.), *Carnosine: Can understanding its actions on energy metabolism and protein homeostasis inform its therapeutic potential*, Chemistry Central Journal, **7**(38)

[14] Y. Huang, Y. Shi, J. Duan and G. Chen, J. Sep. Sci., **29** (2006) 1026

[15] Y. Huang, J. Duan, J. Zhang and G. Chen, Chin. J. Chromatogr., **25** (2007) 326

[16] A. Zinellu, S. Stogia, I. Campesi, F. Franconi, L. Deiana and C. Carru, Talanta, **84** (2011) 931

[17] Y. Huang, J. Duan, H. Chen, M. Chen and G. Chen, Electrophoresis, **26** (2005) 593

[18] A. Stanová, J. Marák, M. Rezeli, C.Páger, F. Kilár and D. Kaniansky, J.Chromatogr. A, **1218** (2011) 8701

[19] S. Zhao, Y. Huang, M. Shi, J. Huang and Y.-M. Liu, Anal. Biochem., **393** (2009) 105.

[20] R. Kohen, Y. Yamamoto, K.C. Cundy and B.N. Ames, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **85** (1988) 3175

[21] S.G. Weber, H. Tsai and M. Sandberg, J. Chromatogr. A, **638** (1993) 1

[22] J.-G. Chen, E. Vinski, K. Colizza and S.G. Weber, J. Chromatogr. A, **705** (1995) 171

[23] M. L. Branham, P. Singh, K. Bisetty, M. Sabela and T. Govender, Molecules, **16** (2011) 10269

[24] M. Suyama and T. Shimizu, Bull. Japan. Soc. Sci. Fish, **48** (1) (1982) 89

[25] M. Bertinaria, B. Rolando, M. Giorgis, G. Montanaro, S. Guglielmo, M. Federica Buonsanti, V. Carabelli, D. Gavello, P. Giuseppe Daniele, R. Fruttero and A.Gasco, J. Med. Chem., **54** (2011) 611

[26] Ö. Hakli, K. Ertekin, M.S. Özer and S. Aycan, J. Anal. Chem., **63** (11) (2008) 1051)

[27] J. Wang, *Analytical Electrochemistry*, Second Edition, Wiley-VCH, 2001.

[28] D. Harvey, *Modern Analytical Chemistry*, McGraw-Hill, 2000.

[29] M. Medvidović-Kosanović, *Elektrokemijska i antioksidacijska svojstva nekih prirodnih polifenola*, doktorska disertacija, PMF, Zagreb, 2011.

[30] https://www.basinc.com/manuals/EC_epsilon/Techniques/ChronoI/ca 14.03.2017.

[31] http://www.druglead.com/cds/carnosine.html 14.03.2017

[32] M. Jozanović, M. Medvidović-Kosanović, M Sak-Bosnar, *Voltammetric Characterization and Determination of Histidine Dipeptides – Carnosine and Anserine*, Int. J. Electrochem Sci., **10** (2015) 6548-6557

[33] A. Kučak, *Vježbe iz biokemije, priručnik za učenike kemijskih tehničkih škola i gimnazija*, Profil, Zagreb, 2003.