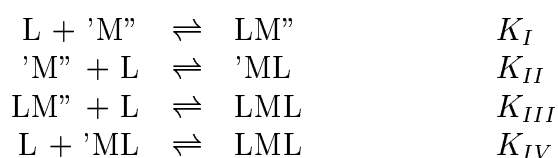


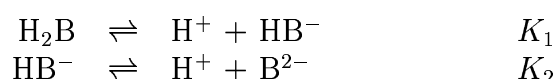
TITREKURVER

Indledning

Binding af ligander til specifikke receptorer på biologiske makromolekyler er et af de mest fundamentale elementer af biokemiske processer. Vigtige biologiske eksempler er binding af metabolitter til enzymer, binding af oxygen til hæmoglobin og binding af insulin til receptorer der regulerer cellens stofskifte. Syrebaser ligevægte for diprote syrer er simple eksempler på binding af ligander L til et molekyle M med to mulige bindingssteder ' og ". Mekanismen for denne proces består af fire trin



hvor K_I, K_{II}, K_{III} og K_{IV} er de respektive bindingskonstanter. Hvis værdierne af bindingskonstanterne vokser med antallet af bundne ligander kaldes systemet positivt kooperativt. Hvis værdierne er uafhængig af antallet af bundne ligander kaldes systemet neutralt kooperativt og hvis værdierne aftager med antallet af ligander kaldes systemet negativt kooperativt. Hvis liganden L er H^+ kaldes den reciprokke af disse bindingskonstanter for mikroskopiske syrekonstanter for at skelne dem fra de makroskopiske syrekonstanter K_1 og K_2 der defineres ved følgende to processer.



Med specielle eksperimentelle teknikker som f.eks. NMR kan de mikroskopiske syrekonstanter bestemmes direkte, men den traditionelle metode er at beregne værdier for de mikroskopiske konstanter ud fra målinger af de makroskopiske konstanter.

Formål

Øvelsens formål er at bruge en titrering ved konstant ionstyrke til at bestemme de mikroskopiske ligevægtskonstanter for binding af protoner til de korresponderende baser for en række mono og diprote syrer, samt redegøre for systemets kooperativitet.

Litteratur

Inden øvelsen påbegyndes, bør man have studeret Atkin afsnit 9.5, øvelsesheftets indledende afsnit om "Elektrolytter" (EP) samt de afsnit af lærebogen, der her henvises til. Litteraturværdier for termodynamiske syrekonstanter findes i Handbook of Chemistry and Physics (CRC) (fremlagt på laboratoriet).

Problemformulering

I øvelsen benyttes et voltmeter og en kombielektrode til at måle hydrogenionaktiviteten i en række forskellige opløsninger med samme ionstyrke. Som forklaret i appendiks til øvelsen sikrer den konstante ionstyrke, at der er en bestemt sammenhæng mellem kombielektrodens potential og hydrogenionkoncentrationen.

Denne sammenhæng bestemmes ved en eksperimentel kalibrering af elektroden, som består i at udføre en blindtitrering af saltsyre med kaliumhydroxid i en 0.1M KCl opløsning. Ved titrering af en anden syre ved samme ionstyrke som den der blev anvendt under kalibreringen kan den pågældende syres makroskopiske syrekonstanter bestemmes.

Ud fra disse værdier, eventuelt suppleret med anden information, beregnes værdier for de mikroskopiske syrekonstanter (se appendiks).

Den eksperimentelle fremgangsmåde

Combielektroden

En glaselektrode er en relativt sart indretning, der skal behandles forsigtigt. Den må blandt andet ikke tørre ud; når den ikke er i brug opbevares den derfor neddyppet i en opbevaringsvæske med $\text{pH} = 7$, hvortil der er sat lidt KCl.

Elektroden er foroven forsynet med et hul til at fylde væske i elektroden. Det skal være åbent, når man måler. Der er ingen grund til at dække det imellem de enkelte målinger; men når man er færdig med dagens målinger, skal det dækkes til igen.

Elektroden er også forsynet med en gummiring, der er placeret, så elektroden kommer tilstrækkeligt langt ned i titrerkolben, uden at den kommer i karambolage med magnetrøreren.

Før hver måling (eller titrering) skylles elektroden med destilleret vand. Ved titreringerne nøjes man med at prøve at dryppe vandet af bedst muligt. Når man er færdig med målingerne, skal elektroden skylles med destilleret vand.

Indstilling af pH-meteret

Når du kommer, vil displayet normalt vise dato og tid; er dette ikke tilfældet, skal du trykke på knappen "Mode". Over dato og tid bør displayet vise 'mV'; er dette ikke tilfældet, skal du trykke på en vandret piletast. Når målingerne skal begynde, trykkes på knappen pH/mV. (Lad være med at trykke på knappen, da dette kan give problemer; de øvrige knapper har kun betydning ved direkte aflæsning af pH).

Foruden værdien af E i mV kan displayet vise teksten STAB. Hvis displayet ikke viser nogen tekst eller kun en del af denne tekst, betyder det, at pH-meteret ikke synes, at aflæsningen er stabil.

For at kontrollere langtidsstabiliteten indledes øvelsen med at lave en måling af E med combielektroden neddyppet i en buffer med $\text{pH} = 7.00$. Voltmeterets visning noteres til senere brug.

Betjening af buretten

Det er vigtigt, at der ikke er luftbobler i slangen, når man stikker tilledningsspidsen ned i titrerkolben. Registreringen af, hvor mange mL KOH-opløsning, man har sat til, bliver simplest, hvis håndtaget på buretten vender nedad, når man begynder. Derfor iværksættes følgende procedure, inden tilledningsspidsen stikkes ned i titrerkolben:

Med tilledningsspidsen i skyllekarret køres buretten først så langt frem, at der ikke er luft i slangen eller tilledningsspidsen; dernæst køres den frem, indtil håndtaget er i bundstillingen, og til sidst ”resettes” buretten. Den vil nu tilsætte 0.20 mL per omdrejning. Husk at tørre en eventuel dråbe på tilledningsspidsen af på kanten af skyllekarret, inden denne stikkes ned i titrerkolben.

Husk at slukke for buretten på ”on/off-knappen, når I er færdige med en titrering (for at spare på batterierne).

Blindtitrering

Først anbringes med glaspipette 50 mL 0.1 M KCl-opløsning i titrerkolben. Med digitalpipette tilsættes derpå 2 mL 0.2 M HCl-opløsning. Der titreres med 0.2 M KOH-opløsning i spring på højst 0.2 mL. Lidt før og lidt efter ækvivalenspunktet, der er karakteriseret ved en brat ændring af værdien af E , tilsættes dog kun cirka 0.05 mL ad gangen. Lav derfor en beregning af titratorvoluminet ved ækvivalenspunktet, inden titreringen påbegyndes. For hver tilsætning noteres værdierne af titratorvoluminet V_{tr} og af E . Vent med at aflæse E til der er ligevægt! Hvis visningen bliver ved med at drive, må man foretage en aflæsning og fortsætte til næste måling. I alt tilsættes 4 mL titrator, og man bør nu have mindst 30 punkter på titrerkurven. Af hensyn til kontrollen af, om man bruger udstyret rigtigt, skal resultatet af databehandlingen af blindkurven foreligge, inden man går videre.

Bestemmelse af syrekonstanter

Dernæst titreres hver af de fire organiske stoffer propansyre (propionsyre), pentandisyre (glutarsyre), hexandisyre (adipinsyre), glycin og glycinmethylester. Først afpipetteres 50 mL af en opløsning af det organiske stof i 0.1 M KCl-opløsning, og derpå tilsættes som før 2 mL 0.2 mol/L HCl-opløsning. Det ækvivalenspunkt, hvor vi kommer til at konstatere en brat ændring af E , svarer til, at titrerkolbens indhold er blevet omdannet til en opløsning af henholdsvis propionat, glutarat, adipinat og glycin. Der titreres efter samme fremgangsmåde som for blindtitreringen med i alt 6 mL KOH-opløsning, dog kun 4 mL for glycin. For glycinmethylester tilsættes dog kun 0.25 ml 0.2 mol/L HCl, og der titreres med 1.5 ml 0.2 mol/L KOH. Man skal have mindst 40 punkter til hver titrerkurve.

Kontrol af pH-meteret

Til sidst gentages som kontrol målingen på bufferen med $\text{pH} = 7.00$. Husk at anføre resultaterne af begge buffermålinger i rapporten!

Databehandling

Måleresultaterne fra blindtitreringen behandles ved hjælp af programmet `blindfit`. Resultaterne fra de øvrige titreringer behandles ved hjælp af programmet `syrefit` der beregner koncentrations syrekonstanterne ved at anvende kalibrerings parametrene fra programmet `blindfit`. I øvrigt følges de vejledninger, der kommer på skærmen. Programmernes virkemåde er beskrevet ganske kort i et appendiks til øvelsen.

Tabelværdier

Slå værdierne af de makroskopiske syrekonstanter for de fire protolytssystemer op i CRC. (For propansyre drejer det sig kun om 1 syrekonstant).

Rapporten

Rapporten skal være en sammenhængende tekst der beskriver øvelsens formål, dens teoretiske grundlag og giver en vurdering af de resultater i selv har opnået. Udover resultatarkene fra programmerne **blindfit** og **syrefit** skal rapporten omfatte nedenstående beregninger samt svar til de anførte spørgsmål.

- Hvor meget har pH-meterets visning med combielektroden i pufferen $\text{pH} = 7.00$ ændret sig løbet af den tid, øvelsen har varet? Diskuter hvilken betydning denne ændring har for målingernes nøjagtighed?
- Beregn på grundlag af gennemsnittet af de to målinger på bufferen, værdien af aktivitetskoefficienten for $\text{H}^+(\text{aq})$ i 0.1 M KCl-opløsning. Sammenlign denne værdi med den værdi der estimeres ud fra Güntelbergs formel.
- Beregn $K_w^\ominus = a_{\text{H}^+} a_{\text{OH}^-}$ i 0.1 M KCl ud fra de eksperimentelle værdier for b0, b1 og d0. Aktivitetskoefficienten for OH^- estimeres ud fra Güntelbergs formel.
- Beregn K_1^\ominus og K_2^\ominus ud fra de målte værdier for K_1^c og K_2^c ved at bruge Güntelbergs formel til at estimere aktivitetskoefficienterne. Sammenlign disse værdier med tabellerede værdier. For H^+ anvendes den målte aktivitetskoefficient. Giv en samlet vurdering af kvaliteten af jeres data.
- Beregn de mikroskopiske bindingskonstanter $K_I^\ominus \dots K_{IV}^\ominus$ ud fra de relationer der eksisterer mellem de makroskopiske syrekonstanter K_1^\ominus og K_2^\ominus og de mikroskopiske bindingskonstanter samt indbyrdes mellem de mikroskopiske bindingskonstanter.
- Hvilke relationer vil man forvente mellem $K_I^\ominus \dots K_{IV}^\ominus$ og mellem K_1^\ominus og K_2^\ominus for en dicarboxylsyre, hvor antallet af carbonatomer i alkankæden mellem de to carboxylsyregrupper er så stort, at de to carboxylgrupper ikke påvirker hinanden?
- Hvilke af erfaringerne fra denne øvelse vil kunne anvendes ved titrering af et protein med mange bindingssteder?

Appendiks

Måling af hydrogenionkoncentrationen ved brug af en glaselektrode.

Til øvelsen benyttes en såkaldt combielektrode forbundet til et pH-meter, der her anvendes som voltmeter. I combielektroden er referenceelektroden bygget sammen med sølvchlorid-elektroden og glasmembranen. De to elektroder er forbundet til voltmeteret således, at elementskemaet bliver:

calomelektrode || titrand | glasmembran | saltsyre | AgCl(s) | Ag

Den elektromotoriske kraft E for en sådan elektrode varierer lineært med pH d.v.s.

$$E = d_0 + b_1 \text{pH} \quad (1)$$

Værdien af d_0 bestemmes af de involverede elektrodens standardpotentialer og af koncentrationerne i opløsningerne omkring calomel og sølvchlorid. d_0 er derfor konstant under titreringen. Den anden konstant i (1) bliver:

$$b_1 = -\frac{RT \ln 10}{F} \quad (2)$$

b_1 er altså proportional med temperaturen og udgør ved 24.2°C netop -0.059 V. Som det ses af (2) varierer b_1 kun lidt med temperaturen der under målingerne er tæt ved stuetemperaturen som er ca. 24°C.

Kalibrering af elektroden ved hjælp af en blindtitrering

Blindtitreringen kan f.eks. udføres på følgende måde. Titranden består af $V_0 = 50.00$ mL 0.1 M kaliumchlorid opløsning, hvortil der med pipette er sat $V_{\text{HCl}} = 2.000$ mL af en $C_{\text{HCl}} = 0.2000$ M saltsyre. Titrator er en $C_{\text{KOH}} = 0.2$ M kaliumhydroxidopløsning. Værdien af C_{KOH} behøver ikke at kendes med mere end et betydende ciffer. Under titreringen aflæses combielektrodens elektromotoriske kraft E på voltmeteret for en række voksende værdier af titratorvoluminet V_{tr} , hvilket giver et antal punkter på en (V_{tr}, E) - graf. Ved at indsætte $\text{pH} = -\log(a_{\text{H}^+}) = -\log(\gamma_{\text{H}^+} [\text{H}^+]/c^\ominus)$ i (1) hvor \log betegner titalslogaritmen og $c^\ominus = 1$ M fås

$$E = d_0 - b_1 \log(\gamma_{\text{H}^+}) - b_1 \log\left(\frac{[\text{H}^+]}{c^\ominus}\right) = b_0 - b_1 \log\left(\frac{[\text{H}^+]}{c^\ominus}\right) \quad (3)$$

Da ionstyrken holdes konstant under målingerne ved at tilsætte KCl i en mængde der er stor i forhold til mængden af de andre ioner i opløsningerne kan $b_0 = d_0 - b_1 \log(\gamma_{\text{H}^+})$ betragtes som konstant. Et af blindtitreringens formål er bestemmelse af værdien af b_0 .

Vi anvender nu elektroneutralitetsbetingelsen på titranden, som indeholder de fire ionarter K^+ , Cl^- , H^+ og OH^- .

$$n_{\text{K}^+} - n_{\text{Cl}^-} + n_{\text{H}^+} - n_{\text{OH}^-} = 0 \quad (4)$$

Før tilsætningen af saltsyre vil ladningsbidragene fra K^+ og Cl^- i titranden være lige store med modsat fortegn. Når vi opstiller elektroneutralitetsbetingelsen gældende for et vilkårligt punkt på titrerkurven, behøver vi derfor ikke at medtage disse bidrag. Under antagelsen om additive voluminer fås

$$V_{tr} C_{\text{KOH}} - V_{\text{HCl}} C_{\text{HCl}} + (V_0 + V_{\text{HCl}} + V_{tr})([\text{H}^+] - [\text{OH}^-]) = 0 \quad (5)$$

Ved brug af udtrykket for vandets ionprodukt $K_w^c = [\text{H}^+][\text{OH}^-]$ fås

$$V_{tr} C_{\text{KOH}} - V_{\text{HCl}} C_{\text{HCl}} + (V_0 + V_{\text{HCl}} + V_{tr})\left([\text{H}^+] - \frac{K_w^c}{[\text{H}^+]}\right) = 0 \quad (6)$$

(6) danner sammen med (3) udgangspunkt for databehandlingen. I disse to ligninger betragtes værdierne af b_1 , V_0 , V_{HCl} og C_{HCl} som kendte. Ud fra de aflæste målepunkter (V_{tr} , E) skal programmet bestemme værdierne af parametrene b_0 , C_{KOH} og K_w^c . Programmet anvender hertil et kriterium baseret på, at den titrerkurve $E(V_{tr})$, der fremkommer, når (6) løses med hensyn til $[\text{H}^+]$, og roden derpå indsættes i (3), forløber så tæt forbi målepunkterne som muligt. I praksis sker tilpasningen i mange trin. Inden det første trin foretages et kvalificeret gæt på tre parameterværdier. Hvert trin bygger på eksisterende parameterværdier. Først beregnes titrerkurven ved løsning af de to ligninger. Dernæst beregnes den korteste afstand mellem hvert af målepunkterne og kurven. Endelig udregnes summen af kvadraterne af disse afstande. Med henblik på at gøre denne sum mindst mulig følger programmet en bestemt strategi til ændring af parameterværdierne. De nye parameterværdier danner så grundlag for det næste trin. Proceduren er færdig, når en variation af parametrene ikke længere påvirker kvadratsummen væsentligt. De værdier af $(b_0, C_{\text{KOH}}, K_w^c)$, der svarer til den mindste kvadratsum, udskrives som blindtitreringens resultat. Kendskabet til b_0 og b_1 indebærer, at man nu kan finde værdien af hydrogenionkoncentrationen i en vilkårlig opløsning med samme ionstyrke som anvendt ved blindtitreringen blot ved at måle den elektromotoriske kraft med combielektroden og derpå anvende (3). Resultaterne af blindtitreringen anvendes nu sammen med en titrering af den givne syre til bestemmelse af de makroskopiske syrekonstanter.

Bestemmelse af koncentrationssyrekonstanterne K_1^c og K_2^c ved titrering.

Der afmåles $V_0 = 50.00$ mL af en opløsning af en uladet syre i 0.1 M kaliumchlorid. En omtrentlig værdi af total koncentrationen er angivet på flasken. Med pipette tilsættes $V_{\text{HCl}} = 2.000$ mL af en $C_{\text{HCl}} = 0.2000$ M saltsyre, og der titreres med den samme $C_{\text{KOH}} = 0.2$ M kaliumhydroxidopløsning som under blindtitreringen.

Idet $\overline{N_H}([\text{H}^+])$ er middeltallet af protoner som er bundet til et stambasemolekyle og z_B stambasens ladning, skal man på tilsvarende måde som ved udledning af (6) vise, at der her gælder

$$V_{tr}C_{\text{KOH}} - V_{\text{HCl}}C_{\text{HCl}} + (V_0 + V_{\text{HCl}} + V_{tr})([\text{H}^+] - \frac{K_w^c}{[\text{H}^+]}) + V_0C_B(z_B + \overline{N_H}([\text{H}^+])) = 0 \quad (7)$$

hvor det sidste led er protolyt-systemets ladningsbidrag. Man kan beregne at $\overline{N_H}([\text{H}^+]) = \frac{[\text{H}^+]}{[\text{H}^+] + K^c}$ for en monoprot syre og $\overline{N_H}([\text{H}^+]) = \frac{2[\text{H}^+]^2 + K_1^c[\text{H}^+]}{[\text{H}^+]^2 + K_1^c[\text{H}^+] + K_1^cK_2^c}$ for en diprot syre. Når (7) skal løses, anvendes værdierne af C_{KOH} og K_w^c fra blindtitreringen. Størrelserne V_0 , V_{HCl} , C_{KOH} , C_{HCl} , K_w^c og z_B kan derfor betragtes som kendte. Værdierne af $K_1^c = \frac{[\text{H}^+][\text{HB}^-]}{[\text{H}_2\text{B}]}$ og eventuelt $K_2^c = \frac{[\text{H}^+][\text{B}^{2-}]}{[\text{HB}^-]}$ samt af C_B fittes af programmet således, at den titrerkurve $E(V_{tr})$, der er bestemt ved løsning af (7) og brug af (3), forløber så tæt på målepunkterne (V_{tr} , E) som muligt. Programmet følger samme metode som beskrevet under blindtitreringen. Gyldigheden af de fundne værdier af syrekonstanterne er naturligvis begrænset til opløsninger med netop samme ionstyrke og temperatur som i de anvendte titrandopløsninger.

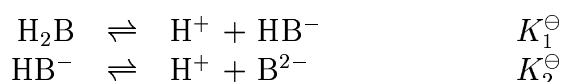
Glycinmethylesteren tilsættes som et salt på formen $\text{CH}_3\text{OOCCH}_2\text{NH}_3\text{Cl}$ som, når det opløses i vand, bliver til $\text{CH}_3\text{OOCCH}_2\text{NH}_3^+ + \text{Cl}^-$. Som beskrevet i vejledningen anvendes programmet syrefit til databehandlingen. I dette program antages det at syren tilsættes på neutral form. Derfor skal man først beregne stofmængden af tilsat ester, n_{ester} , og ud fra denne beregne hvor mange mL 0.2 M ester-opløsning det ville svare til. Dette tal skal lægges til de 0.25 mL tilsat 0.2 M HCl, når programmet spørger om mængden af tilsat HCl. På

denne måde indregnes den saltsyre, der formelt set tilsættes sammen med esteren, når den tilsættes i form af ovennævnte estersalt.

Alternativt kan programmets elektrolytregnskab korrigeres ved at angive værdien -1 for stambasen i denne titrering. Formelt svarer dette til at "saltets stambase" betragtes som $\text{NH}_2\text{CH}_2\text{COOCH}_3 + \text{Cl}^-$.

Beregning af de makroskopiske syrekonstanter K_1^\ominus og K_2^\ominus .

For at kunne sammenligne de beregnede koncentrations syrekonstanter med tabelværdier er det nødvendigt at korrigere for ionstyrken af opløsningerne. Dissociationen af H^+ fra den diprote syre H_2B er givet ved følgende to processer



hvor K_1^\ominus og K_2^\ominus er de ionstyrkeuafhængige makroskopiske syrekonstanter. Det antages at aktivitetskoefficienterne er 1 for alle uladete molekyler og at aktivitetskoefficienterne for ladede molekyler kan beregnes ud fra den udvidede Debye-Hückel formel

$$\log \gamma_i = -Az_i^2 \frac{\sqrt{I}}{1 + B\sqrt{I}} \quad (8)$$

hvor I er ionstyrken og A har værdien $0.509 \text{ M}^{\frac{1}{2}}$ ved 25°C . Med $B = 1 \text{ M}^{\frac{1}{2}}$ kaldes formelen for Güntelbergs formel. I denne approksimation afhænger aktivitetskoefficienterne kun af ionladningen og ionstyrken og er ivotrigt uafhængige af ionernes art. Man får nu

$$K_1^\ominus = \frac{a_{\text{H}^+} a_{\text{HB}^-}}{a_{\text{H}_2\text{B}}} = \frac{\gamma_{\text{H}^+} \frac{[\text{H}^+]}{c^\ominus} \gamma_{\text{HB}^-} \frac{[\text{HB}^-]}{c^\ominus}}{\gamma_{\text{H}_2\text{B}} \frac{[\text{H}_2\text{B}]}{c^\ominus}} = \gamma_{\text{H}^+} \gamma_1 \frac{K_1^c}{c^\ominus} \quad (9)$$

$$K_2^\ominus = \frac{a_{\text{H}^+} a_{\text{B}^{2-}}}{a_{\text{HB}^-}} = \frac{\gamma_{\text{H}^+} \frac{[\text{H}^+]}{c^\ominus} \gamma_{\text{B}^{2-}} \frac{[\text{B}^{2-}]}{c^\ominus}}{\gamma_{\text{HB}^-} \frac{[\text{HB}^-]}{c^\ominus}} = \frac{\gamma_{\text{H}^+} \gamma_2 K_2^c}{\gamma_1 c^\ominus} \quad (10)$$

hvor γ_1 er aktivitetskoefficienten for en enkeltladet ion og γ_2 er aktivitetskoefficienten for en dobbeltladet ion. For H^+ anvendes den målte aktivitetskoefficient i stedet for den estimerede. Tilsvarende udtryk kan opstilles for glyciniumionens protolyse.

Beregning af mikroskopiske bindingskonstanter.

Af historiske årsager er den naturlige syrebase proces en fraspaltning af protoner fra syren. Denne proces er den omvendte af binding af protoner til den korresponderende base. Syrekonstanten for fraspaltning af protoner fra syren er en dissociationskonstant hvis værdi altid den reciprokke af den tilsvarende bindingskonstant for protonen til den korresponderende base. Ud fra reaktionsmekanismerne fås

$$K_I^\ominus = \frac{a_{\text{LM}''}}{a_{\text{L}} a_{\text{M}''}} \quad K_{II}^\ominus = \frac{a_{\text{ML}}}{a_{\text{L}} a_{\text{M}''}} \quad K_{III}^\ominus = \frac{a_{\text{LML}}}{a_{\text{L}} a_{\text{LM}''}} \quad K_{IV}^\ominus = \frac{a_{\text{LML}}}{a_{\text{L}} a_{\text{ML}}} \quad (11)$$

Disse fire mikroskopiske bindingskonstanter er ikke uafhængige. Vis at $K_I^\ominus K_{III}^\ominus = K_{II}^\ominus K_{IV}^\ominus$. Giv en termodynamisk begrundelse for denne relation. Udtryk endvidere syrekonstanterne

K_1^\ominus og K_2^\ominus ved hjælp af $K_I^\ominus, K_{II}^\ominus, K_{III}^\ominus$ og K_{IV}^\ominus ved at udnytte at $[HB^-] = [LM''] + [ML]$ og at aktivitetskoefficienterne for LM'' , $MLog HB^-$ er ens, da de har samme ladning.

Når K_1^\ominus og K_2^\ominus er bestemt ud fra titrerkurven har vi tre relationer til at bestemme de fire konstanter $K_I^\ominus, K_{II}^\ominus, K_{III}^\ominus$ og K_{IV}^\ominus . For pentansyre og hexansyre hvor carboxylgrupperne sidder symmetrisk er $K_I^\ominus = K_{II}^\ominus$ og $K_{III}^\ominus = K_{IV}^\ominus$ så for sådanne syrer kan de mikroskopiske bindingskonstanter bestemmes ud fra titrerkurven. For glycin som er usymmetrisk kunne vi antage at værdien for $\frac{1}{K_I^\ominus}$ svarer til syrekonstanten for glycins methylester (hvis bindingssted ' vælges som NH_3^+ enden af glycin).