

Određivanje termodinamičkih i kinetičkih reakcijskih veličina u otopini iz eksperimentalnih podataka

Modrušan, Matija

Undergraduate thesis / Završni rad

2018

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:711971>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-18**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijski odsjek

Matija Modrušan

Student 3. godine Preddiplomskog sveučilišnog studija KEMIJA

**ODREĐIVANJE TERMODINAMIČKIH I
KINETIČKIH REAKCIJSKIH VELIČINA U
OTOPINI IZ EKSPERIMENTALNIH
PODATAKA**

Završni rad

Rad je izrađen u Zavodu za fizikalnu kemiju

Mentor rada: doc. dr. sc. Gordan Horvat

Zagreb, 2018.

Datum predaje prve verzije Završnog rada:

10. srpnja 2018.

Datum ocjenjivanja Završnog rada i polaganja Završnog ispita:

7. rujna 2018.

Mentor rada: doc. dr. sc. Gordan Horvat

Potpis:

Sadržaj

| | |
|---|-----|
| § SAŽETAK..... | VII |
| § 1. UVOD..... | 1 |
| § 2. ODREĐIVANJE TERMODINAMIČKIH I KINETIČKIH REAKCIJSKIH VELIČINA U OTOPINI IZ EKSPERIMENTALNIH PODATAKA..... | 4 |
| 2.1. Spektrofotometrija..... | 4 |
| 2.2. Potenciometrija..... | 12 |
| 2.3. Konduktometrija..... | 16 |
| 2.4. Izotermna titracijska kalorimetrija (ITC)..... | 19 |
| 2.5. Cirkularni dikroizam..... | 23 |
| 2.6. NMR spektroskopija..... | 26 |
| § 3. LITERATurna VRELA..... | 31 |

§ Sažetak

Metode i postupci kojima je moguće odrediti termodinamičke i kinetičke reakcijske veličine u otopinama vrlo su važne za proučavanje i karakterizaciju kemijskih reakcija. Najvažnije fizikalne veličine za termodinamički i kinetički opis reakcija su konstanta ravnoteže, K i koeficijent brzine reakcije, k . One su povezane sa svim ostalim veličinama u kemijskoj termodinamici i kinetici te se na temelju tih veličina može odrediti spontanost reakcije u pojedinim uvjetima, predvidjeti tijek, brzina i mehanizam reakcije te mnoga druga svojstva promatranog sustava.

Postoje mnoge metode određivanja navedenih veličina, pri čemu se u takvim eksperimentima mjeri neko svojstvo sustava povezano s trenutnom (kinetika) ili ravnotežnom (termodinamika) koncentracijom jednog ili više sudionika reakcije. Prilikom obrade podataka za jednostavnije modele moguće je koristiti metodu linearne regresije, no postupak obrade kod većine reakcija je složen te najčešće zahtjeva uporabu nelinearne regresije. Cilj ovog rada je opisati neke od najčešće korištenih eksperimentalnih metoda pomoću kojih se uz prikladnu obradu dobivenih podataka određuju termodinamički i kinetički parametri procesa u otopini. U ovom radu biti će opisana istraživanja ravnoteža u kojima nastaju kompleksi stehiometrije 1:1, pri čemu se korištene metode i obrada podataka mogu uz male preinake koristiti i za određivanje termodinamičku karakterizaciju nastajanja kompleksnih vrsta drugog stehiometrijskog omjera. Kinetički dio, odnosno određivanje koeficijenta brzine reakcije opisan će se na temelju reakcije prvog reda, reakcije u kojoj iz jednog reaktanta nastaje jedan produkt.

§ 1. UVOD

Kemijska termodinamika¹ je grana fizikalne kemije koja karakterizira stanja sustava i njihovu promjenu pomoću termodinamičkih veličina. Jedna od najvažnijih termodinamičkih veličina je reakcijska Gibbsova energija $\Delta_r G$ koja je kriterij spontanosti nekog procesa pri konstantnom tlaku i temperaturi, odnosno pri uvjetima koji su najčešći u kemijskom laboratoriju. Iz predznaka reakcijske Gibbsove energije može se utvrditi da li je reakcija spontana ili ne za određeni sastav sustava. Reakcijska Gibbsova energija pri standardnim uvjetima naziva se standardna reakcijska Gibbsova energija, $\Delta_r G^\circ$. Ta veličina povezana je s još jednom važnom fizikalnom veličinom, standardnom konstantom ravnoteže K° preko relacije:

$$\Delta_r G^\circ = -RT \ln K^\circ \quad (1)$$

gdje je R opća plinska konstanta koja iznosi $8,314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$, a T termodinamička temperatura. Izraz za standardnu konstantu ravnoteže povezan s ravnotežnim sastavom reakcijske smjese glasi:

$$K^\circ = \prod_{i=1}^n a_i^{v_i} \quad (2)$$

gdje je n broj sudionika reakcije, a_i je relativni aktivitet i -tog sudionika reakcije, a v_i je pripadajući stehiometrijski koeficijent. Relativni aktivitet povezan je sa koncentracijom sudionika preko relacije:

$$a_i = \frac{\gamma_i \cdot c_i}{c^\circ} \quad (3)$$

gdje je γ_i koeficijent aktiviteta, c_i koncentracija i -te vrste, a c° standardna koncentracija koja iznosi 1 mol dm^{-3} . Uz poznavanje vrijednosti konstante ravnoteže i analitičkih koncentracija sudionika reakcije može se pretpostaviti ravnotežni sastav smjese. U laboratoriju se konstanta ravnoteže neke reakcije najčešće određuje eksperimentalnim mjerenjem nekog svojstva

sustava koje je direktno povezano s koncentracijom jednog ili više sudionika reakcije, kao što je to apsorpcija.

Proučavanje brzinskih procesa zove se kinetika ili dinamika. Dio kinetike koji proučava brzinu i mehanizam kemijske reakcije naziva se kemijska kinetika.² Brzina kemijske reakcije definirana je izrazom:

$$v = \frac{d\xi}{V \cdot dt} \quad (4)$$

gdje je ξ doseg reakcije, t je vrijeme, a V je volumen sustava. Doseg reakcije jednak je množini jediničnih pretvorbi, koja se računa na način da se promjena množine nekog sudionika reakcije podijeli s njegovim stehiometrijskim koeficijentom. Tako se gornja jednadžba može zapisati u drugom obliku:

$$v = \frac{dn_i}{\nu_i \cdot V \cdot dt} = \frac{dc_i}{\nu_i \cdot dt} \quad (5)$$

gdje je dc_i promjena koncentracije nekog sudionika reakcije, a ν_i je stehiometrijski koeficijent tog sudionika. Za mnoge reakcije nađeno je da trenutna brzina reakcije ovisi o trenutnim koncentracijama sudionika prema izrazu:

$$v = k[A]^\alpha[B]^\beta[C]^\gamma \dots [M]^\lambda \quad (6)$$

gdje je k veličina koja se naziva koeficijent brzine reakcije te ovisi o temperaturi i tlaku, no u nekim slučajevima može ovisiti i o koncentracijama sudionika reakcije, a eksponenti $\alpha, \beta, \gamma, \dots, \lambda$ nazivaju se parcijalni redovi reakcije čiji zbroj daje ukupni red reakcije. Koeficijent k povezan je s energijom aktivacije E_a pa time i sa aktivacijskog entalpijom $\Delta^\ddagger H$ te sa aktivacijskom entropijom $\Delta^\ddagger S$. Kemijske reakcije dijele se na brze i spore, ovisno o vremenu polureakcije, odnosno vremenu potrebnom da pola množine reaktanata prijeđe u produkt. Posljedica takvog dijeljenja kemijskih reakcija je da postoje različite vrste eksperimenata kojima možemo promatrati kinetiku reakcije. Eksperimenti kojima se proučavaju brze reakcije (vrijeme polureakcije je od 10^1 do 10^{-3} s) nisu prikladni za određivanje kinetičkih parametara sporih reakcija i obratno, no svim eksperimentalnim metodama kemijske kinetika zajedničko je to da

se pomoću njih mjeri ovisnost nekog makroskopskog svojstva, kao što je apsorbancija, električna provodnost, električni potencijal o vremenu tijekom reakcije.

Cilj ovog rada je dati principe rada nekoliko eksperimentalnih metoda i literaturne primjere u kojima se tim metodama određeni termodinamički ili kinetički parametri reakcija. Princip rada tih metoda u ravnotežnim mjerenjima biti će dan ilustriran za modelu u kojem iz dva reaktanta nastaje kompleks stehiometrije 1:1, dok će obrada kinetičkih mjerenja biti opisana za kinetički model reakcije prvog reda.

§ 2. ODREĐIVANJE TERMODINAMIČKIH I KINETIČKIH REAKCIJSKIH VELIČINA U OTOPINI IZ EKSPERIMENTALNIH PODATAKA

2.1. Spektrofotometrija

Spektrofotometrija je metoda kojom se mjeri interakcija tvari s elektromagnetskim zračenjem u UV-Vis području. Temelji se na mjerenju apsorbancije A otopine u prozirnoj ćeliji točno određene duljine optičkog puta.³ Apsorbancija A je povezana s promjenom intenziteta zrake prije i nakon prolaska kroz otopinu što je posljedica apsorpcije energije elektromagnetskog zračenja od strane spektralno aktivne vrste u uzorku. Ona je po definiciji povezana sa transmitancijom preko jednadžbe:

$$A = -\log T = \log \frac{I_0}{I} \quad (7)$$

gdje je I intenzitet izlazne zrake svjetlosti, a I_0 intenzitet upadne zrake svjetlosti. U svrhu određivanja apsorpcije uzorka intenzitet zrake koja prolazi kroz uzorak uspoređuje se s intenzitetom zrake koja prolazi kroz kivetu s čistim otapalom. Iz tog smanjenja intenziteta koncentraciju uzorka računa se pomoću Beer-Lambertovog zakona:

$$A(\lambda) = -\log \frac{I_0}{I} = \varepsilon(\lambda) \cdot c \cdot l \quad (8)$$

gdje je ε molarni apsorpcijski koeficijent, c koncentracija spektralno aktivne vrste, a l je duljina optičkog puta. Iz ove jednadžbe vidljivo je da molarni apsorpcijski koeficijent ovisi o valnoj duljini elektromagnetskog zračenja i temperaturi u kojoj se nalazi uzorak. U slučaju da u uzorku postoji n tvari koje apsorbiraju na istoj valnoj duljini ukupna apsorbancija je suma apsorbancija pojedinih tvari:

$$A_{\text{uk}}(\lambda) = \sum_{i=1}^n A_i(\lambda) = l \cdot \sum_{i=1}^n \varepsilon_i(\lambda) c_i. \quad (9)$$

Spektrofotometrijska titracija je metoda prikladna za određivanje ravnotežnih konstanti u slučajevima kad se molarni apsorpcijski koeficijenti reaktanata i produkata razlikuju u određenom području valnih duljina. Za sustav u kojem se zbiva reakcija:



standardna konstanta ravnoteže za tu reakciju glasi:

$$K_1^\circ = \frac{a_{ML}}{a_M \cdot a_L} \quad (10)$$

pri čemu je ta konstanta povezana s koncentracijskom konstantom ravnoteže preko koeficijenata aktiviteta sudionika reakcije:

$$K^\circ = \frac{\gamma_{ML} [ML]c^\circ}{\gamma_M \gamma_L [M][L]} = \frac{\gamma_{ML}c^\circ}{\gamma_M \gamma_L} K_c \quad (11)$$

U slučaju da su M i ML jednako nabijene vrste, a L nenabijen, jednadžba (11) može se pojednostaviti izjednačavanjem koeficijenta aktiviteta vrsta M i ML dok se aktivitet vrste L može aproksimirati jedinicom. Tada se dobiva izraz:

$$K^\circ = K_c \cdot c^\circ \quad (12)$$

Uvrštavanjem bilance masa:

$$c_M = [M] + [ML] \quad (13)$$

$$c_L = [L] + [ML] \quad (14)$$

u izraz za koncentracijsku konstantu reakcije dobivamo izraz:

$$K_c = \frac{[ML]}{(c_L - [ML])(c_M - [ML])} \quad (15)$$

Uz pretpostavku da pri određenoj valnoj duljini apsorbiraju samo vrste L i ML, može se nakon uspostavljanja ravnoteže pisati:

$$a = \frac{A}{l} = \varepsilon_L[L] + \varepsilon_{ML}[ML] = \varepsilon_L c_L - (\varepsilon_L - \varepsilon_{ML})[ML] \quad (16)$$

gdje [L] i [ML] označuju ravnotežne koncentracije odgovarajućih vrsta. Kada se iz gornje relacije izrazi ravnotežna koncentracija kompleksa [ML] te se taj izraz uvrsti u jednadžbu (15) dobiva se:

$$a = \varepsilon_L c_L - (\varepsilon_L - \varepsilon_{ML}) \frac{c_L + c_M + \frac{1}{K_c} - \sqrt{\left(c_L + c_M + \frac{1}{K_c}\right)^2 - 4c_L c_M}}{2}. \quad (17)$$

Nelinearnom regresijskom analizom ovisnosti a o c_M (i/ili c_L) moguće je odrediti iznos konstante ravnoteže i molarne koeficijente ε_L i ε_{ML} , ukoliko nisu poznati.

Dosadašnje određivanje konstante nastajanja kompleksa ML temeljilo se na mjerenju apsorpcije spektralno aktivnih vrsta u otopini pri jednoj valnoj duljini. Drugi način prikupljanja podataka jest mjerenje apsorpcija tih vrsta pri više valnih duljina odnosno spektara što se naziva multivarijantna obrada podataka. Rezultati dobiveni u takvom pristupu mnogo su točniji i precizniji.

Spektar se može prikazati u obliku vektora apsorpcija:

$$\mathbf{a} = \begin{bmatrix} A(\lambda_1) \\ \vdots \\ A(\lambda_m) \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \varepsilon(\lambda_1) \\ \vdots \\ \varepsilon(\lambda_m) \end{bmatrix} \cdot c \cdot l \quad (18)$$

U slučaju kada sustav sadrži više spektralno aktivnih vrsta, apsorpcijski spektar smjese jednak je zbroju spektara pojedinih spektralno aktivnih komponenata:

$$\mathbf{a}_{uk} = \sum_{i=1}^n \mathbf{a}_i = l \cdot \sum_{i=1}^n \varepsilon_i c_i. \quad (19)$$

gdje ε_i označava pripadajući vektor svojstvenog spektra. Prethodna jednadžba se u matričnom obliku može zapisati kao:

$$\mathbf{a} = \begin{bmatrix} A(\lambda_1) \\ \vdots \\ A(\lambda_m) \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \varepsilon_1(\lambda_1) & \cdots & \varepsilon_n(\lambda_1) \\ \vdots & \ddots & \vdots \\ \varepsilon_1(\lambda_m) & \cdots & \varepsilon_n(\lambda_m) \end{bmatrix} \cdot \begin{bmatrix} c_1 \\ \vdots \\ c_n \end{bmatrix} \cdot l \quad (20)$$

gdje stupci matrice molarnih apsorpcijskih koeficijenata sadržavaju svojstvene spektre pojedinih komponenata smjese.

Tijekom titracije mijenjaju se ravnotežne koncentracije vrsta koje apsorbiraju, a samim time i apsorbancije. Stoga se izraz (20) može zapisati kao:

$$\mathbf{a} = \begin{bmatrix} A_1(\lambda_1) & \cdots & A_k(\lambda_1) \\ \vdots & \ddots & \vdots \\ A_1(\lambda_m) & \cdots & A_k(\lambda_m) \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \varepsilon_1(\lambda_1) & \cdots & \varepsilon_n(\lambda_1) \\ \vdots & \ddots & \vdots \\ \varepsilon_1(\lambda_m) & \cdots & \varepsilon_n(\lambda_m) \end{bmatrix} \cdot \begin{bmatrix} c_{11} & \cdots & c_{1k} \\ \vdots & \ddots & \vdots \\ c_{n1} & \cdots & c_{nk} \end{bmatrix} \cdot l \quad (21)$$

odnosno u matricnom zapisu:

$$\mathbf{A} = \mathbf{E} \mathbf{C} l \quad (22)$$

gdje je \mathbf{E} matrica molarnih apsorpcijskih koeficijenata i jednaka je onoj u jednadžbi (20) jer se radi o intrizičnom svojstvu tvari, a \mathbf{C} je matrica ravnotežnih koncentracija.

Ako su tijekom spektrofotometrijske titracije određene apsorbancije pri više valnih duljina, može se, provesti iterativni postupak u kojem se računa vrijednost konstante ravnoteže reakcije i molarni apsorpcijski koeficijenti reaktanata i produkata. Prvo se pretpostavi neka vrijednost konstante ravnoteže, K te pomoću analitičkih koncentracija reaktanata izračuna matrica ravnotežnih koncentracija \mathbf{C} . Zatim se matrica apsorbancija, podijeljena sa duljinom optičkog puta, množi s pseudoinverzom matrice ravnotežnih koncentracija čime se dobiva matrica molarnih apsorpcijskih koeficijenata \mathbf{E}' :

$$(\mathbf{A}/l) \mathbf{C}^T (\mathbf{C} \mathbf{C}^T)^{-1} = \mathbf{E}' \quad (23)$$

Dobivena matrica apsorpcijskih koeficijenata množi se sa matricom ravnotežnih koncentracija i duljinom optičkog puta te se dobiva nova matrica apsorbancija \mathbf{A}' :

$$\mathbf{A}' = \mathbf{E}' \mathbf{C} l \quad (24)$$

Nakon toga se računa suma kvadrata odstupanja matrice \mathbf{A}' od matrice \mathbf{A} :

$$SS = \sum_i \sum_j (A'_{ij} - A_{ij})^2 \quad (25)$$

Variranjem vrijednosti konstante ravnoteže sve dok suma kvadrata odstupanja ne poprimi minimalnu vrijednost dobiva se optimalna vrijednost konstante ravnoteže reakcije stvaranja kompleksa ML.

Kod kinetičkih mjerenja izvedba eksperimenta je drugačija u odnosu na ravnotežne eksperimente. U tim mjerenjima nakon miješanja reaktanata apsorbanciju se prikuplja u određenim vremenima tijekom reakcije. Taj postupak je najčešće kontroliran računalom. Za reakciju prvog reda:



vrijedi zakon brzine reakcije:

$$v = k[A] \quad (26)$$

koji se uvrštavanjem jednadžbe (55) svodi na:

$$\frac{dc_A}{dt} = -kc_A \quad (27)$$

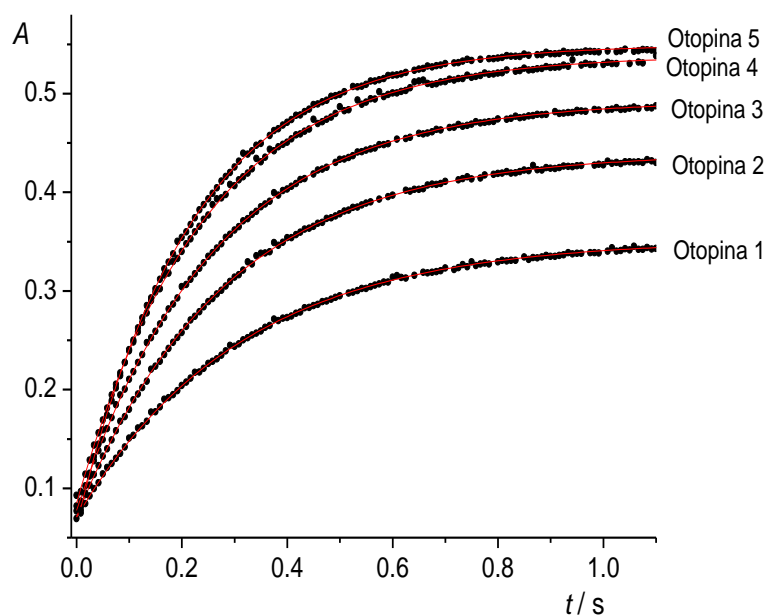
Ovisnost koncentracije reaktanta A o vremenu dobiva se integriranjem ove jednadžbe:

$$c_A(t) = c_{a,0} \cdot e^{-kt} \quad (28)$$

Uz pretpostavku da prije reakcije nema produkta B, koncentracija te vrste mijenja se prema izrazu:

$$c_B(t) = c_{A,0} - c_{A,0} \cdot e^{-kt} = c_{A,0}(1 - e^{-kt}) \quad (29)$$

gdje je $c_{A,0}$ koncentracija reaktanta A prije početka reakcije. U slučaju da reaktant A apsorbira pri nekoj valnoj duljini, tada je iz izmjerene apsorbancije pri toj valnoj duljini moguće odrediti zakon brzine i koeficijent brzine reakcije (slika 1).



Slika 1. Spektrofotometrijsko određivanje koeficijenta brzine reakcije.⁴

U kinetičkim mjerenjima najkvalitetniji rezultati se dobivaju obradom multivarijantnih spektrofotometrijskih podataka. Prilikom takve obrade dobiva se jednačbu slična jednačbi (21), u kojoj su u matrici koncentracija sadržane koncentracije spektralno aktivnih sudionika reakcije u pojedinim vremenima:

$$\mathbf{a} = \begin{bmatrix} A_1(\lambda_1) & \cdots & A_k(\lambda_1) \\ \vdots & \ddots & \vdots \\ A_1(\lambda_m) & \cdots & A_k(\lambda_m) \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \varepsilon_1(\lambda_1) & \cdots & \varepsilon_n(\lambda_1) \\ \vdots & \ddots & \vdots \\ \varepsilon_1(\lambda_m) & \cdots & \varepsilon_n(\lambda_m) \end{bmatrix} \cdot \begin{bmatrix} c_{11} & \cdots & c_{1k} \\ \vdots & \ddots & \vdots \\ c_{n1} & \cdots & c_{nk} \end{bmatrix} \cdot l \quad (30)$$

Ta jednačba u matičnom zapisu glasi:

$$\mathbf{A} = \mathbf{E} \mathbf{C} l \quad (31)$$

gdje je \mathbf{A} matrica trenutnih apsorbancija, \mathbf{E} matrica apsorpcijskih koeficijenata, \mathbf{C} matrica trenutnih koncentracija, a l duljina puta zrake kroz uzorak. Postupak određivanja konstante brzine reakcije svodi se na provođenje sljedećeg algoritma. Najprije se pretpostavi neki iznos koeficijenta brzine reakcije iz čega se pomoću jednačbi (28) i (29) izračuna matrica koncentracija \mathbf{C} . Zatim se jednačba (31) množi desnom pseudoinverzom matrice \mathbf{C} te se tako dobiva matrica apsorpcijskih koeficijenata \mathbf{E}' koju množimo sa izračunatom matricom \mathbf{C} i

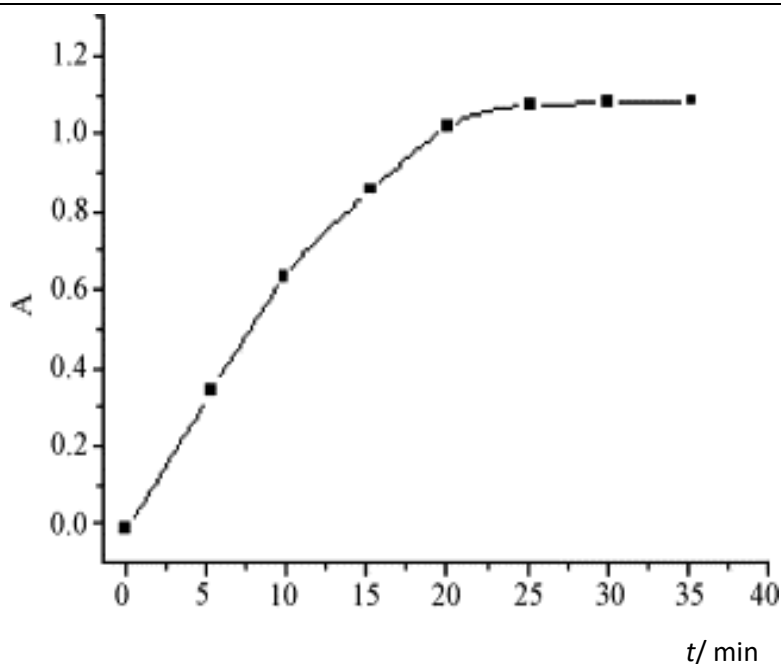
duljinom optičkog puta l kako bismo dobili matricu apsorbancija A' . Iz matrica A i A' računa se suma kvadrata odstupanja SS na način:

$$SS = \sum_i \sum_j (A'_{ij} - A_{ij})^2 \quad (32)$$

Postupak se ponavlja sve dok suma kvadrata odstupanja ne poprimi minimalnu vrijednost.

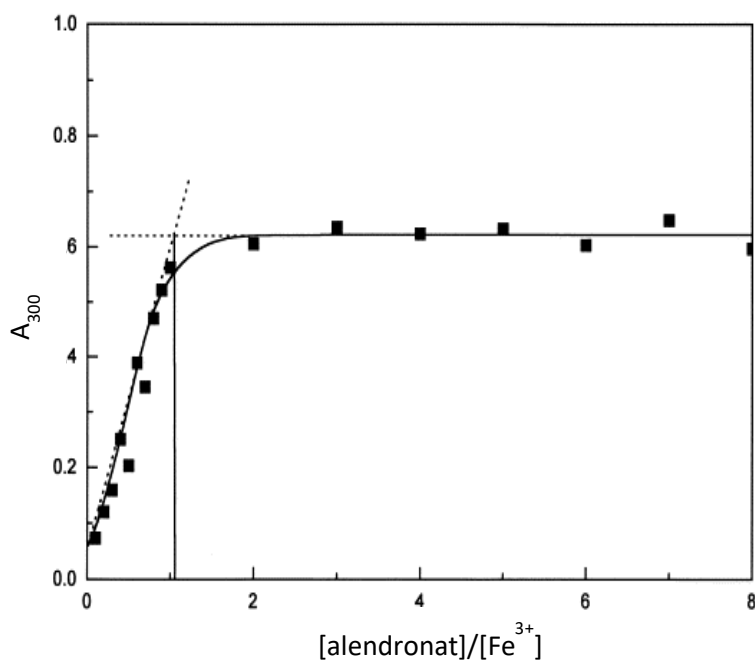
Spektrofotometrijska mjerenja imaju vrlo široku primjenu te se često koriste u biokemiji i molekularnoj biologiji. Mnogi proteini i nukleinske kiseline apsorbiraju elektromagnetsko zračenje zbog toga što se sastoje od molekula koje posjeduju nezasićenu cikličku jezgru. Na taj se način može mjeriti čistoća proteina u nekom uzorku. Nadalje mnogi kofaktori poput NAD^+ koji sudjeluju u raznim enzimskim reakcijama imaju apsorpcijski maksimum pri nekoj valnoj duljini. Mjerenjem promjene apsorbancije otopine u kojoj dolazi do reakcije u kojoj sudjeluje jedan takav kofaktor može se promatrati kinetika enzimskih reakcija koja je vrlo bitna za razumijevanje reakcija koje se zbivaju u našem tijelu.

Tang i sur.⁵ koristili su spektrofotometriju (slika 2) za praćenje superoksidnih anionskih radikala ($O_2^{\cdot-}$) i enzima superoksid dismutaze (SOD) koji je okarakteriziran kao vrlo učinkovit i vrlo specifičan enzim. Superoksidni anionski radikal česti je međuprodukt staničnog disanja, a superoksid dismutaza ga pretvara u kisik i vodikov peroksid koji se dalje uz pomoć katalaze ili glutation peroksidaze prevodi u vodu. Istraživanje je temeljeno na reakciji spajanja 2,4-klorfenola (2,4-DCP) i 4-amino antipirina uz prisutnost vodikovog peroksida, pri čemu nastaje voda. Reakcija je katalizirana kompleksom metala i Schiffove baze, salicilidien-2-amino-4-feniltiazola (SAPTS) koji je služio kao mimetički enzim. Uspoređivana je aktivnost tog enzima mijenjanjem metala koji je u kompleksu sa navedenom Schiffovom bazom te su došli do zaključka da najveću aktivnost ima kompleks $Cu(II)$ - $(SAPTS)_2$. Također, mjerili su aktivnost enzima inkluziranog u β -ciklodekstrin umreženi polimer (β -CDP) te je pokazano da na taj način enzim ima još bolju aktivnost i selektivnost.



Slika 2. Spektrofotometrijsko određivanje koeficijenta brzine reakcije enzima superoksid dismutaze.⁵

Kuljanin i sur.⁶ su prilikom svojih istraživanja nad alendronatom, lijekom koji se koristi za liječenje bolesti kostiju odredili stehiometrijski broj i uvjetnu konstantu vezanja alendronata i željeza (III) u kiseloj vodenoj otopini.

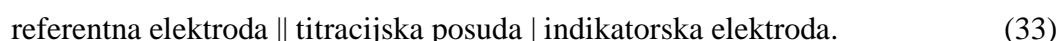


Slika 3. Spektrofotometrijsko određivanje stehiometrijskog omjera.⁶

Iz dobivenih podataka metodom kontinuirane varijacije i metodom molarnih omjera određen je stehiometrijski omjer kompleksiranja željeza(III) i alendronata koji je iznosio iznosi 1:1 (slika 3). Kao vrijednost uvjetne konstante vezanja dobili su vrijednost od $\log K' = 4,50$.

2.2. Potencijometrija

Potencijometrija je elektroanalitička metoda kojom se mjeri razlika potencijala između elektroda elektrokemijske ćelije uz ravnotežne uvjete. Kada je struja koja prolazi kroz ćeliju vrlo mala, odnosno kada su reakcije na elektrodama elektrokemijski reverzibilne, potencijometrijom se mogu odrediti vrlo važne termodinamički parametri procesa poput reakcijske Gibbsove energije, konstante ravnoteže, koncentracije sudionika reakcije i prosječni koeficijenti aktiviteta.⁷ Metoda se temelji na izvođenju titracije unutar galvanskog članka:



Elektromotivnost E , članka (33) dana je jednadžbom:

$$E = E_i - E_{\text{ref}} + E_j \quad (34)$$

pri čemu je E_i potencijal indikatorske elektrode, E_{ref} potencijal referentne elektrode, a E_j difuzijski potencijal. U slučaju da je difuzijski potencijal stalan gornja jednadžba može se napisati u obliku:

$$E = E_i - E_0 \quad (35)$$

gdje je $E_0 = E_{\text{ref}} - E_j$. Elektromotivnost članka opisana je jednadžbom sličnom Nernstovoj:

$$E = E'_0 + \alpha \frac{RT}{zF} \ln a_M \quad (36)$$

gdje je $E'_0 = E_0 + E_i^0$, a α predstavlja odstupanje od teorijske (Nernstove) jednadžbe. Uvede li se izraz za relativni aktivitet u tu jednadžbu dobiva se:

$$E = E'_0 + \alpha \frac{RT}{zF} \ln \left(\frac{\gamma_M [M]}{c^0} \right) = E'_0 + \alpha \frac{RT}{zF} \ln \gamma_M + \alpha \frac{RT}{zF} \ln \left(\frac{[M]}{c^0} \right). \quad (37)$$

Dodatkom dovoljnog suviška inertnog elektrolita u reakcijsku posudu ne dolazi do promjene ionske jakosti tijekom eksperimenta, pri čemu se izraz (37) može pisati:

$$E = E'_0 + \alpha \frac{RT}{zF} \ln \left(\frac{[M]}{c^0} \right) = E'_0 + \alpha \frac{RT \ln 10}{zF} \log \left(\frac{[M]}{c^0} \right) = E''_0 - s p[M] \quad (38)$$

u kojem je $p[M] = -\log([M]/c^0)$. Vrijednosti E''_0 i s određuju se kalibracijom pri ionskoj jakosti jednakoj onoj koja se koristi prilikom titracije. Koncentracija slobodne vrste M može se izvesti iz jednadžbe (38):

$$[M] = c^0 10^{(E''_0 - E)/s} = c^0 10^{(\Delta E)/s}. \quad (39)$$

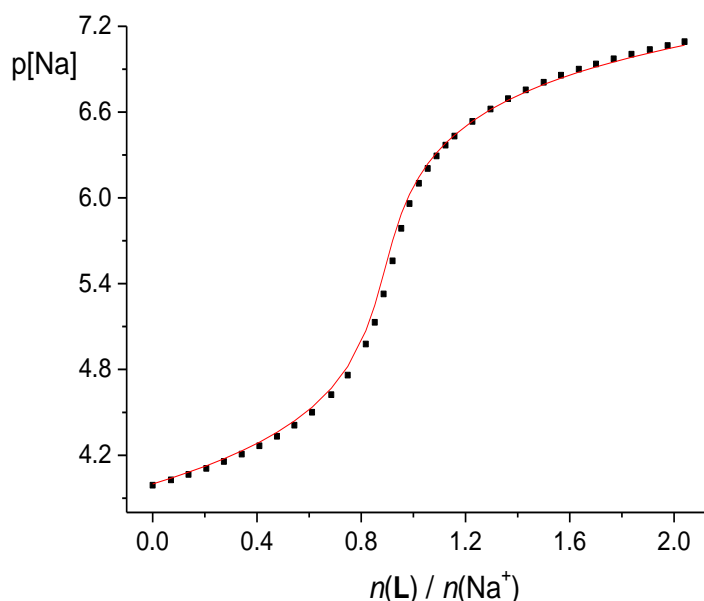
Uvrštavanjem izraza (13) i (39) u (15) dobiva se:

$$K_c = \frac{c_M - 10^{\Delta E/s} c^0}{(c_L - c_M + 10^{\Delta E/s} c^0) 10^{\Delta E/s} c^0} \quad (40)$$

iz čega slijedi:

$$10^{\Delta E/s} = \frac{-\left(c_L - c_M + \frac{1}{K_c}\right) K_c + \sqrt{\left(c_L - c_M + \frac{1}{K_c}\right)^2 K_c^2 + 4c_M K_c}}{2K_c \cdot c^0} \quad (41)$$

Rezultat je jednadžba s pomoću koje se, kao i u slučaju spektrofotometrije, može jednostavnom nelinearnom regresijom odrediti vrijednost konstante stabilnosti (slika 4). Treba napomenuti da se u opisanom postupku ne uzimaju u obzir različite pouzdanosti pojedinih mjerenja (npr. vrijednosti elektromotivnosti izmjerene blizu točke ekvivalencije znatno su manje pouzdane od ostalih). Stoga je poželjno provesti račun ujednačenja varijancije (tzv. statističko vaganje).



Slika 4. Potenciometrijsko određivanje konstante ravnoteže.⁴

Za potenciometrijsko određivanje koeficijenta brzine reakcije prvog reda iz jednadžbi (28) i (39) dobiva se ovisnost mjerenog svojstva o vremenu:

$$c_A(t) = c^0 10^{(\Delta E)/s} = c_{a,0} \cdot e^{-kt} \quad (42)$$

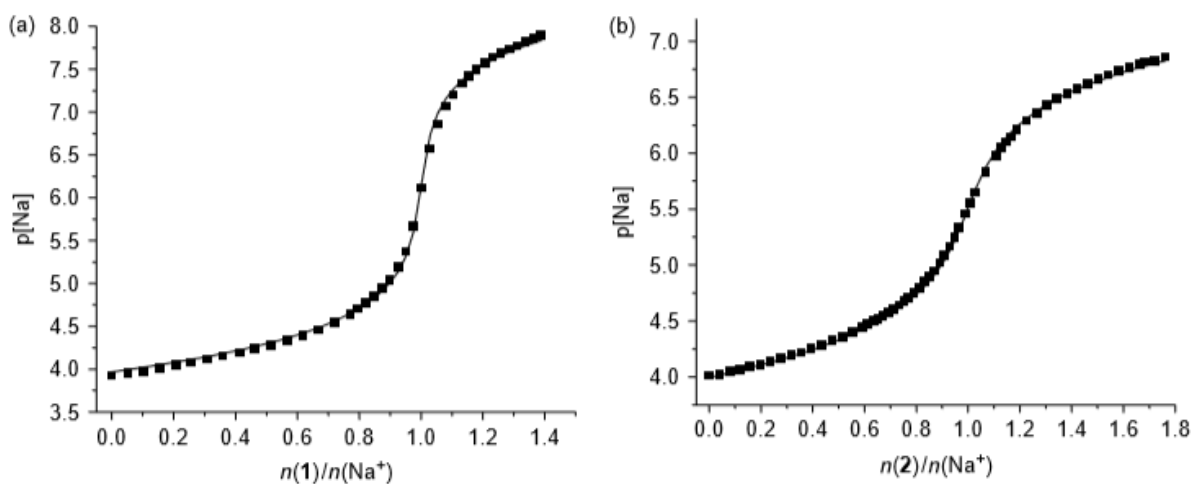
odnosno:

$$10^{(\Delta E)/s} = \frac{c_{a,0}}{c^0} \cdot e^{-kt} \quad (43)$$

Nelinearnom regresijom jednadžbe (43) može se doći do vrijednosti koeficijenta brzine reakcije.

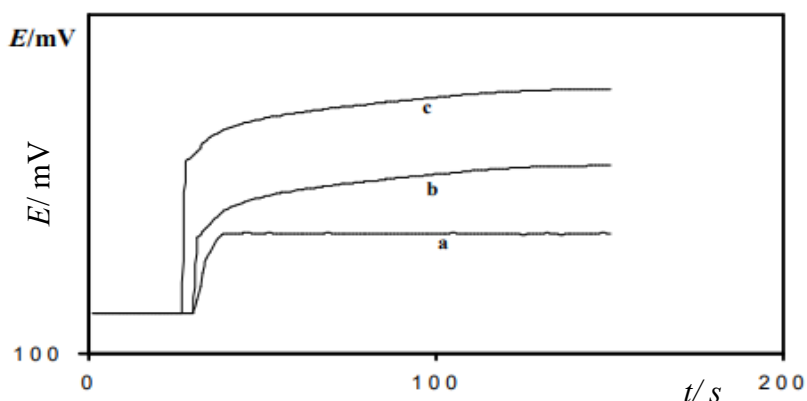
U današnje vrijeme postoje različite vrste indikatorskih elektroda te je potenciometrijskom titracijom moguće odrediti koncentraciju gotovo svakog elementa u otopini. Galić i sur.⁸ proučavali su kompleksiranje alkalijskih metala i Eu(II) sa dvama triptofanskim derivatima kaliks[4]arena pomoću spektrofotometrije, spektrofluorimetrije, konduktometrije i potenciometrije. Iz potenciometrijskih mjerenja uz korištenje natrij-

selektivne elektrode odredili su konstante stabilnosti kompleksa kaliksarenskih derivata s Na^+ ionom (slike 5 a i b). Ostalim metodama opaženo je da uz natrijev kation ligandi tvore stabilne komplekse i s litijevim kationom dok je afinitet tih derivata prema ionu kalija bio manji u odnosu na litijev i natrijev ion. Veći kation Rb^+ tvori komplekse samo s jednim derivatom, dok kompleksi s cezijevim kationom nisu opaženi.



Slika 5. Potenciometrijsko određivanje konstante vezanja natrija sa dvama derivatima kaliks[4]arena.⁸

Karimi i sur.⁹ koristili su potenciometriju pri istodobnom određivanju Zr(IV) i Fe(III) iona u smjesi uz pomoć PLS regresije i HPSAM-a (*H-point standard addition method*). Metoda je temeljena na razlici koeficijenata brzine reakcije kompleksiranja Zr(IV) i Fe(III) iona sa fluoridnim ionima (slika 6). Reakcija je praćena selektivnom fluoridnom elektrodom.



Slika 6. Potenciometrijsko praćenje reakcije fluoridnih iona sa a) $10,0 \mu\text{g Fe(III)}$, b) $10,0 \mu\text{g Zr(IV)}$, c) smjesom jednog i drugog.⁹

2.3. Konduktometrija

Brzina prijenosa električnog naboja kroz materiju naziva se električna vodljivost i označava se simbolom G . Elektroanalitička metoda u kojoj se mjeri električna vodljivost zove se konduktometrija. Za razliku od ostalih elektroanalitičkih metoda, konduktometrija nije selektivna, odnosno ne može odrediti količinu jedne vrste iona ako otopina sadržava više vrsta.⁷ Električna vodljivost dana je izrazom:

$$G = \kappa \frac{A}{l} \quad (44)$$

gdje je κ električna provodnost otopine, a A površina presjeka otopine kroz koji se odvija tok struje, a l razmak između elektroda ćelije. Omjer A/l daje konstantu ćelije, K_{cell} . Za dovoljno razrijeđenu otopinu električna provodnost povezana je sa koncentracijom elektrolita prema jednadžbi:

$$\kappa = \sum_i \Lambda_i c_i \quad (45)$$

gdje je Λ_i molarna provodnost elektrolita, a c_i je koncentracija elektrolita. Ako se u otopini nalazi potpuno disocirana vrsta MX i nenabijeni ligand može se za ukupnu provodnost pisati:

$$\kappa = \lambda_{\text{M}}[\text{M}] + \Lambda_{\text{ML}}[\text{ML}] + \lambda_{\text{X}}[\text{X}] \quad (46)$$

Kako X ne sudjeluje u reakciji, ravnotežna koncentracije te vrste jednaka je:

$$[\text{X}] = [\text{M}] + [\text{ML}] = c_{\text{M}} \quad (47)$$

Uvrštavanjem realnog rješenja izraza (15) u (46) te pomoću jednadžbe (47) dobiva se izraz:

$$\kappa = c_M(\Lambda_X + \Lambda_M) - (\Lambda_M - \Lambda_{ML}) \frac{c_L + c_M + \frac{1}{K_C} - \sqrt{\left(c_L + c_M + \frac{1}{K_C}\right)^2 - 4c_L c_M}}{2} \quad (48)$$

Nelinearnom regresijskom analizom ove jednadžbe može se odrediti konstanta ravnoteže kompleksiranja nabijene vrste M nenabijenim ligandom L. Valja napomenuti da se kod konduktometrijskih mjerenja ionska jakost ne održava stalnom dodatkom inertnog elektrolita jer i on sam vodi struju, a moguća je i pojava ionske asocijacije pri većim koncentracijama elektrolita.

Određivanje kinetičkih parametara reakcije moguće je provesti i pomoću konduktometrijskih mjerenja. Promatrajući brzinu reakcije prvog reda u kojoj iz reaktanta A nastaje produkt B u molarnom omjeru 1:1, te uz pretpostavku da obje vrste provode električnu struju, može se doći do izraza za ukupnu koncentraciju elektrolita u sustavu:

$$c_{el.} = c_A(t) + c_B(t) = c_{0,A} \quad (49)$$

gdje su $c_A(t)$ i $c_B(t)$ koncentracije vrsta A i B u određenom trenutku, a $c_0(A)$ je početna koncentracije reaktanta A. Provodnost tog sustava je:

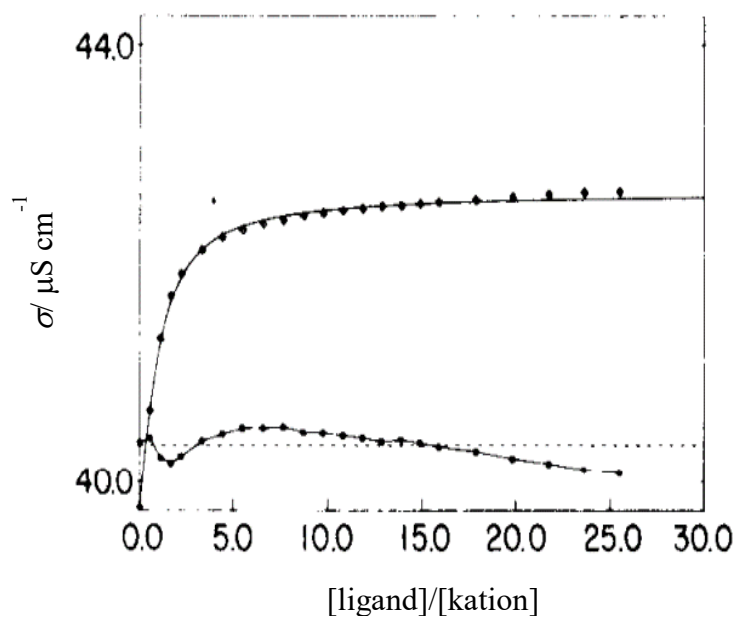
$$\kappa = \Lambda_A c_A(t) + \Lambda_B c_B(t) \quad (50)$$

Uvrštavanjem jednadžbe (28) u izraz (50) te korištenjem izraza (49) dobiva se jednadžba:

$$\kappa = \Lambda_B c_{0,A} + (\Lambda_A - \Lambda_B) c_{0,A} e^{-kt} \quad (51)$$

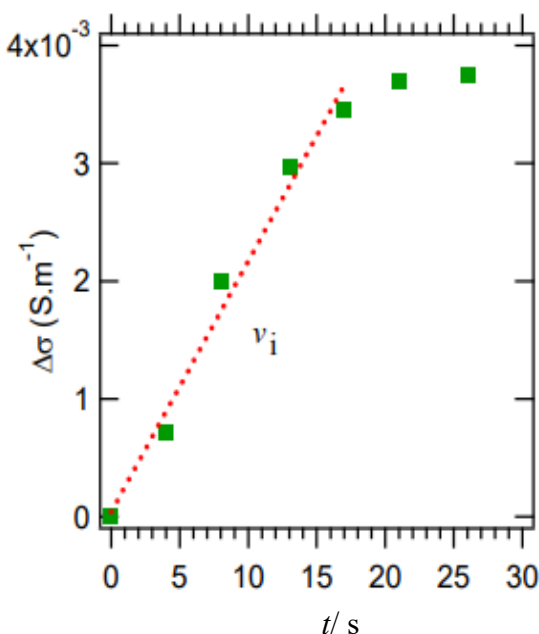
iz koje se nelinearnom regresijom dolazi do koeficijenta brzine reakcije.

Chen i sur.¹⁰ proučavali su reakcije kompleksiranja dvovalentnih kationa Ca^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , Pb^{2+} , Mg^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} sa makrocikličnim eterima 15-kruna-5, 18-kruna-6, dicikloheksil-18-kruna-6, dibenzo-24-kruna-8 u metanolu. Konduktometrijskim mjerenjima (slika 7) odredili su da se za komplekse stehiometrijskog omjera 1:1 $\log K$ kreće između 2,1-4,2 za navedene katione što je manje od $\log K$ alkalijskih kationa koji se kreću između 4,3-6,2 što se može pripisati tome da su dvovalentni kationi bolje solvatirani nego jednovalentni.



Slika 7. Konduktometrijsko određivanje konstante vezanja.¹⁰

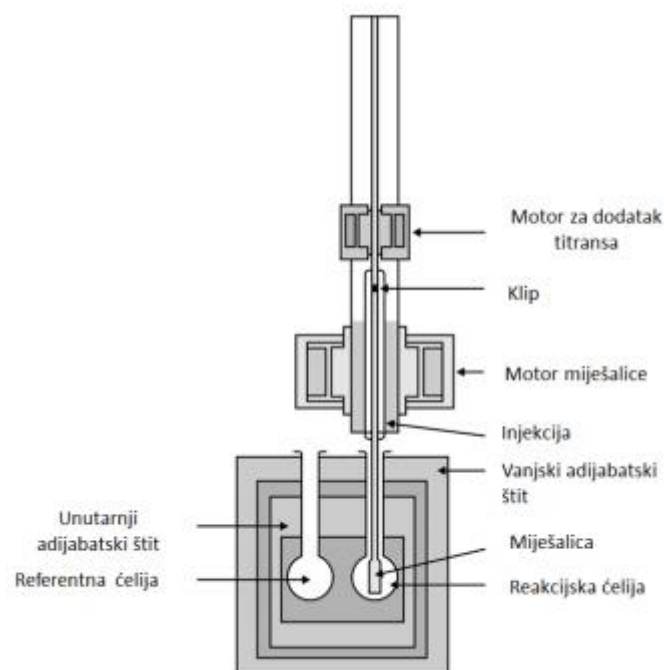
Konduktometrijsko određivanje koeficijenta reakcije proveli su Kechadi i sur.¹¹ Oni su određivali koeficijent brzine enzimske reakcije defosforilacije složenog superparamagnetičnog kompleksa fosfataze pri čemu su kao supstrate koristili adenzin monoesterfosfat, adenzin difosfat i adenzin trifosfat. Izmjerene vrijednosti koeficijenta brzine reakcije kreću se od 39-31 s^{-1} pri čemu adenzin trifosfat ima najveći, a adenzin monoesterfosfat najmanji koeficijent (slika 8) što je pokazatelj steričkog utjecaja na kinetiku enzimske reakcije.



Slika 8. Konduktometrijsko određivanje koeficijenta brzine reakcije.¹¹

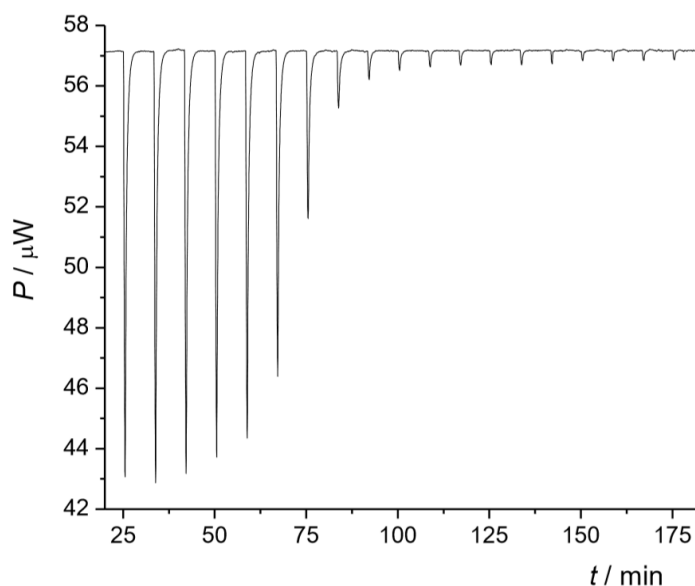
2.4. Izotermna titracijska kalorimetrija (ITC)

Izotermna titracijska kalorimetrija¹² je eksperimentalna metoda kojom se mjeri promjena entalpije prilikom nakon dodatka otopine titransa u titrand pri konstantnoj temperaturi. Toplina koja se oslobađa dodatkom titransa nije jednaka toplini oslobođenoj prilikom vezanja dviju tvari, već se ona sastoji i od topline razrjeđenja te od ostalih nespecifičnih efekata koji se određuju dodatkom titransa u otopinu čistog otapala u kojem je bio otopljen titrand. Mjerenje topline omogućuje određivanje vrlo važnih termodinamičkih parametara poput standardne konstante vezanja, standardne reakcijske Gibbsove energije, standardne reakcijske entalpije, te standardne reakcijske entropije. Uređaj za izotermnu titracijsku kalorimetriju u dvojnoj izvedbi sastoji se od dvije ćelije, referentne i reakcijske. U referentnoj ćeliji nalazi se otapalo sa svim reaktantima dok se u reakcijskoj nalazi otopina titranda u koju se dodaju alikvoti titransa u određenim vremenskim razmacima. Shema jednog takvog uređaja prikazana je na slici 9.



Slika 9. Shematski prikaz uređaja za izotermnu titracijsku kalorimetriju.¹²

Na slici 10 prikazani su rezultati dobiveni izotermnom titracijskom kalorimetrijom. Površina svakog signala odgovara toplini oslobođenoj prilikom dodatka titransa.

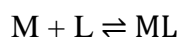


Slika 10. Rezultati mjerenja izotermnom titracijskom kalorimetrijom.¹²

Toplina izmjerena prilikom jednog dodatka titransa direktno je povezana s promjenom dosegaja reakcije i reakcijskom entalpijom:

$$q_p = \Delta\xi \cdot \Delta_r H \quad (52)$$

U slučaju nastajanja kompleksa ML:



promjena dosegaja može se izraziti pomoću koncentracije nastalog kompleksa te se dobiva jednadžba:

$$q_p = \Delta\xi \cdot \Delta_r H = ([ML]_2 - [ML]_1) \cdot V \cdot \Delta_r H \quad (53)$$

gdje je $[ML]_1$ ravnotežna koncentracija kompleksa prije dodatka titransa, $[ML]_2$ ravnotežna koncentracija kompleksa nakon dodatka titransa, a V je volumen sustava.

Ako se u jednadžbu (15) uvrste analitičke koncentracije reaktanata prije dodatka titransa (c_{M1} i c_{L1}) te analitičke koncentracije reaktanata nakon dodatka titransa (c_{M2} i c_{L2}) mogu se dobiti izrazi za ravnotežnu koncentraciju kompleksa ML prije i nakon reakcije. Uvrštavanjem tih izraza u jednadžbu (53) dobiva se jednadžba:

$$q_p = \Delta_r H \left(\frac{c_{L2} - c_{L1} + c_{M2} - c_{M1} - \sqrt{\left(c_{L2} + c_{M2} + \frac{1}{K_c}\right)^2 - 4c_{M2}c_{L2}} + \sqrt{\left(c_{L1} + c_{M1} + \frac{1}{K_c}\right)^2 - 4c_{M1}c_{L1}}}{2} \right) \cdot V \quad (54)$$

iz koje se pomoću nelinearne regresije može doći do reakcijske entalpije i koncentracijske konstante ravnoteže.

U izotermnoj titracijskoj kalorimetriji mjeri se toplinska snaga reakcije u vremenu koja je sa oslobođenom energijom u reakciji povezana preko izraza:

$$P = \frac{dW}{dt} = -\frac{dq}{dt} \quad (55)$$

gdje je W rad izvršen u toj reakciji koji je u izotermnom (ΔU) procesu po apsolutnoj vrijednosti jednak termičkoj energiji, odnosno toplini q oslobođenoj u tom procesu dok je t

vrijeme reakcije. Ukoliko se titracija provodi u uvjetima konstantnog tlaka, tada je toplina jednaka promjeni entalpije. Toplinska snaga može se dovesti u vezu s koncentracijom produkta:

$$P = -\frac{dH}{dt} = -\frac{\Delta_r H \cdot d\xi}{dt} = -\frac{\Delta_r H \cdot dn}{\nu_B \cdot dt} = -\frac{\Delta_r H \cdot dc}{V \cdot \nu_B \cdot dt} \quad (56)$$

gdje je $\Delta_r H$ reakcijska entalpija, ν_B stehiometrijski broj produkta, a V volumen sustava. Uvrštavanjem jednadžbi (5) i (6) u tu jednadžbu dobiva se izraz:

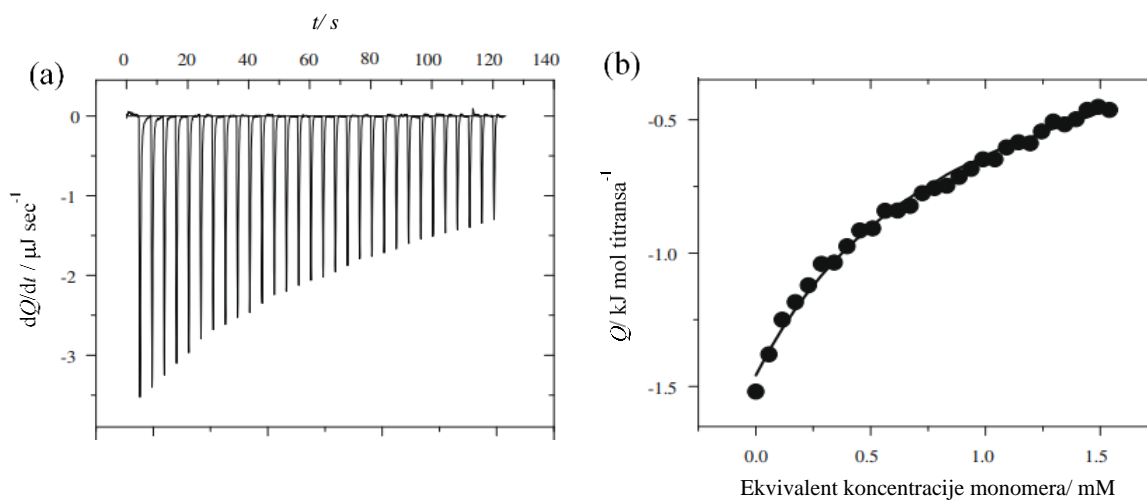
$$P = -\frac{\Delta_r H}{V} \cdot kc_B(t) \quad (57)$$

Korištenjem izraza (29) dobiva se ovisnost toplinske snage kemijske reakcije o vremenu:

$$P = -\frac{\Delta_r H}{V} \cdot kc_{A,0}(1 - e^{-kt}) \quad (58)$$

iz kojeg se, uz korištenje nelinearne regresije, može doći do konstante brzine reakcije k .

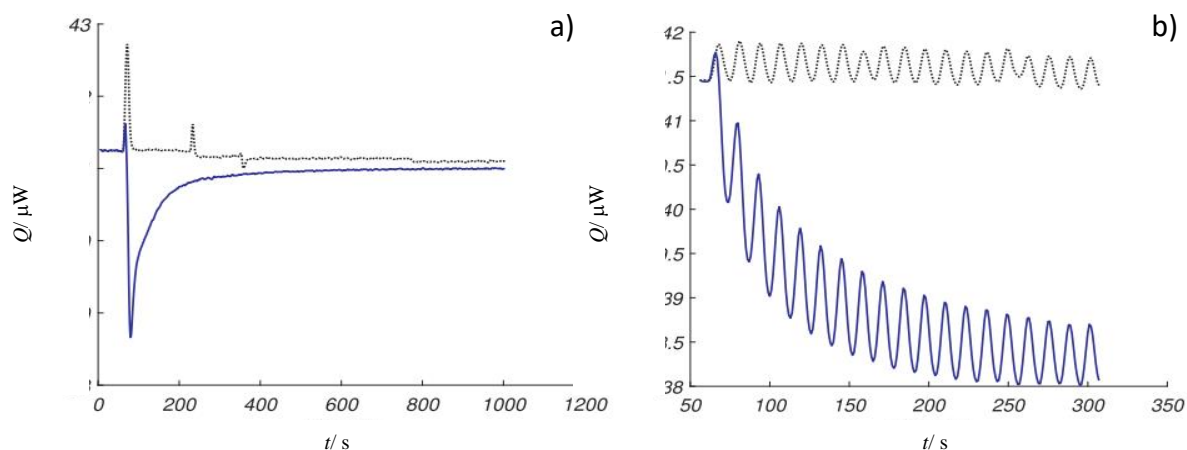
Andujar-Sanchez i sur.¹³ pratili su dimerizaciju fluorescentnog spoja, 8-anilino-1-naftalensulfonske kiseline (ANS) koristeći izotermnu titracijsku kalorimetriju (slike 11 a i b). Eksperiment je proveden pri različitim pH vrijednostima kako bi se odredila ovisnost konstante dimerizacije o pH otopine.



Slika 11. Kalorimetrijsko praćenje dimerizacije 8-anilin-1-naftalensulfonske kiseline.¹³

Eksperiment je pokazao da pK dimerizacije dvaju ANS u obliku zwitter-iona iznosi oko 5,6, što je vrlo malo. Nadalje, pokazalo se da je konstanta dimerizacije jako ovisna o pH otopini te da iznad pH 7 ne dolazi do dimerizacije. Iz ovih podataka znanstvenici su još odredili i promjenu entalpije, entropije i Gibbsove energije za navedenu reakciju te isto tako ovisnost promjene entalpije o temperaturi pri pH vrijednosti od 3 i 5.

Luo i sur.¹⁴ koristili su izotermnu titracijsku kalorimetriju u proučavanju kinetike pepsina. Kao supstrat koristili su albumin iz goveđeg seruma te su proveli dvije vrste titracija. Iz titracija u kojima je titrans dodavan kontinuirano uz pomoć *single injection* metode odredili su prividnu promjenu entalpije (slika 12 a), dok su iz metode višestrukog dodatka titransa dobili koeficijente brzine reakcije pri različitim koncentracijama supstrata (slika 12 b). Istraživanje je pokazalo da pri nižim pH vrijednostima otopine brzina reakcije katalizirane pepsinom je veća, a afinitet prema supstratu manji. Nadalje, pri istoj pH vrijednosti aktivnost I afinitet pepsina smanjuju se povećanjem ionske jakosti.



Slika 12. Određivanje kinetike pepsina izotermnom titracijskom kalorimetrijom. a) *single injection method* b) *multiple injection method*.¹⁴

2.5. Cirkularni dikroizam

Cirkularni dikroizam¹⁵ je pojava kiralnih objekata da različito apsorbiraju lijevu i desnu kružnu polariziranu svjetlost. Spektroskopija cirkularnog dikroizma je kiralna varijanta atomske spektroskopije i mjerenja indeksa refrakcije. Za razliku od atomske spektroskopije cirkularni dikroizam koristi polariziranu svjetlost kako bi odredio kiralnost neke molekule.

Najčešće se koristi kako bi se dobile informacije o strukturi, te kinetičkim i termodinamičkim svojstvima makromolekula kao što su primjerice proteini.

Spektroskopija cirkularnog dikroizma temelji se na mjerenju razlike apsorbancije lijeve i desne kružno polarizirane svjetlosti:

$$\Delta A = A_{LCP} - A_{RCP} \quad (59)$$

gdje je A_{LCP} apsorbancija lijeve kružno polarizirane svjetlosti, a A_{RCP} apsorbancija desne kružno polarizirane svjetlosti. Uvođenjem jednadžbe (8) u jednadžbu (59) i pretpostavkom da su u uzorku spektralno aktivne vrste L i ML dobiva se odnos promjene apsorbancije i koncentracije te vrste:

$$\Delta A = (\varepsilon_{LCP,L} - \varepsilon_{RCP,L}) \cdot [L] \cdot l + (\varepsilon_{LCP,ML} - \varepsilon_{RCP,ML}) \cdot [ML] \cdot l = \Delta\varepsilon_L [L]l + \Delta\varepsilon_{ML} [ML]l \quad (60)$$

$$\Delta a = \frac{\Delta A}{l} = \Delta\varepsilon_L [L] + \Delta\varepsilon_{ML} [ML] = \Delta\varepsilon_L c_L - (\Delta\varepsilon_L - \Delta\varepsilon_{ML}) [ML] \quad (61)$$

gdje su $\Delta\varepsilon_L$ i $\Delta\varepsilon_{ML}$ razlika molarnih apsorpcijskih koeficijenata prilikom apsorpcije lijeve odnosno desne kružno polarizirane svjetlosti za vrstu L odnosno ML.

Analognim provođenjem izvoda kao u slučaju spektrofotometrijskih titracija dobiva se izraz ovisnosti Δa o c_L odnosno c_M :

$$\Delta a = \Delta\varepsilon_L c_L - (\Delta\varepsilon_L - \Delta\varepsilon_{ML}) \frac{c_L + c_M + \frac{1}{K_c} - \sqrt{\left(c_L + c_M + \frac{1}{K_c}\right)^2 - 4c_L c_M}}{2} \quad (62)$$

iz kojeg se nelinearnom regresijom može dobiti konstanta ravnoteže i razlika molarnih apsorpcijskih koeficijenata prilikom apsorpcije lijeve odnosno desne kružno polarizirane svjetlosti vrste L odnosno ML.

Kod određivanja koeficijenta brzine reakcije prvog reda, uzimajući u obzir da i reaktant A i produkt B apsorbiraju zračenje ukupna promjena apsorbancije lijeve i desne kružno polarizirane svjetlosti u nekom trenutku reakcije jednaka je:

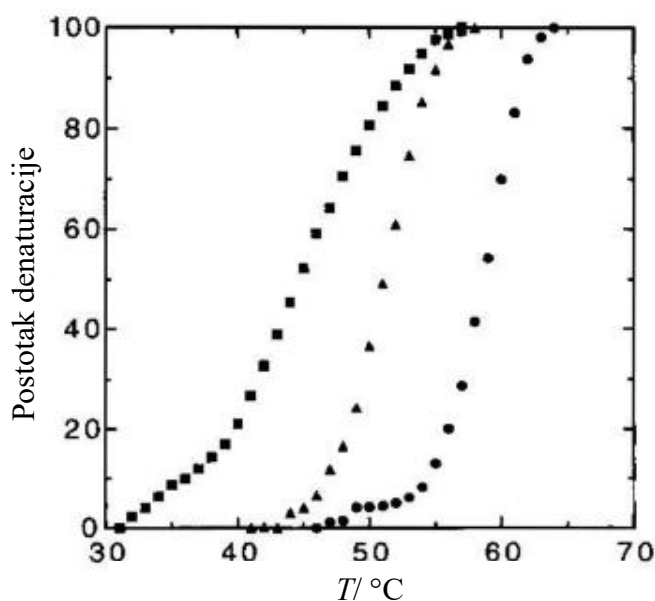
$$\Delta a = \frac{\Delta A}{l} = \Delta\varepsilon_A c_A(t) + \Delta\varepsilon_B c_B(t) = \Delta\varepsilon_A c_{A,0} - (\Delta\varepsilon_A - \Delta\varepsilon_B) c_B(t) \quad (63)$$

odnosno uz uvrštavanje izraza (29):

$$\Delta a = \Delta \varepsilon_A c_{A,0} - (\Delta \varepsilon_A - \Delta \varepsilon_B) c_{A,0} (1 - e^{-kt}) \quad (64)$$

Pomoću nelinearne regresije uz korištenje ovog izraza moguće je dobiti koeficijent brzine reakcije kao i razlike apsorbacijskih koeficijenata lijeve i desne kružno polarizirane svjetlosti reaktanta A i produkta B.

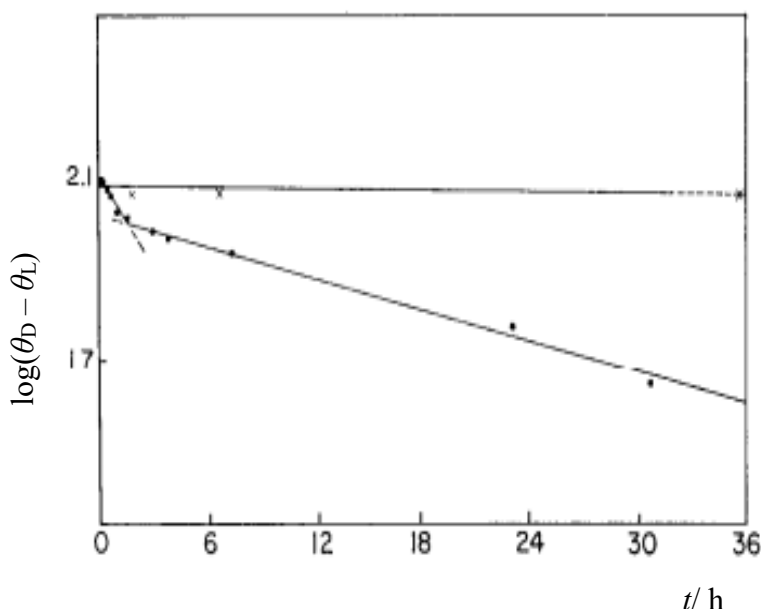
Morgan i sur.¹⁶ proučavali su vezanje nonamernih peptida na K^d protein koji spada u skupinu velikih kompleksa histokompatibilnosti klase I (MHC). Ti proteini vežu fragmente peptida iz degradiranih proteina i prezentiraju ih T stanicama imunskog sustava. Znanstvenici su koristili cirkularni dikroizam prilikom određivanja konstante disocijacije, K_D nonamernih peptida sa K^d te su pokazali da termalna stabilnost kompleksa K^d/peptid direktno ovisi o konstanti disocijacije (slika 13). Iz dobivenih rezultata izveli su izraz kojim povezuju konstantu disocijacije sa temperaturom termalne denaturacije, T_m .



Slika 13. Određivanje konstante disocijacije nonamernih peptida sa K^d proteina korištenjem cirkularnog dikroizma.¹⁶

Volini i Tobias¹⁷ određivali su koeficijent brzine reakcije deacilacije trimetilacetil kimotripsina korištenjem metode cirkularnog dikroizma (slika 14). Promjene u apsorpciji polariziranog svjetla prilikom ove enzimske reakcije mogu biti posljedica promjene

konformacije proteina prilikom vezanja i otpuštanja supstrata ili pomicanja tirozinskog, triptofanskog i/ili cistidinskog bočnog ogranka koji se nalaze u aktivnom mjestu enzima. Iz dobivenih podataka izračunat je koeficijent brzine reakcije koji iznosi $4,9 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$.



Slika 14. Rezultati dobiveni mjerenjem cirkularnog dikroizma enzima trimetilacetil kimotripsina prilikom enzimske reakcije deacetilacije.¹⁷

2.6. NMR spektroskopija

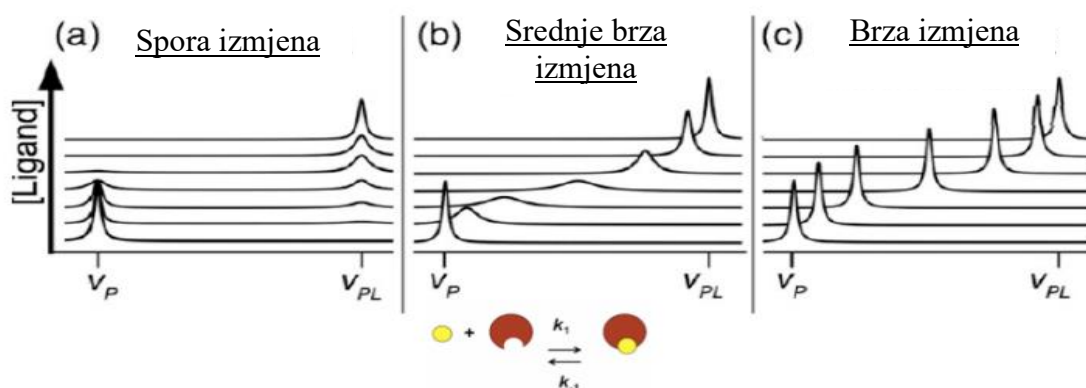
Spektrometar za nuklearnu magnetsku rezonanciju (NMR) sastoji se od magnetna, radiofrekventnog (rf) odašiljača ili oscilatora i rf detektora. Kada se uzorak sastavljen od atoma čija jezgra ima određeni nuklearni magnetski spin stavi u magnet i izloži rf polju oscilatora, dolazi do apsorpcije energije kod određenih kombinacija frekvencije oscilatora i jakosti magnetskog polja, a detektor prima taj rf signal.¹⁸ Na taj se način, NMR titracijom mogu dobiti ne samo kvantitativne informacije, već i informacije o tome kako molekula „domaćina“ i „gosta“ međudjeluju te se može doći i do stehiometrije nastalog kompleksa.¹⁹ Najčešće se koristi ¹H NMR koji daje informacije o kemijskim pomacima protona, no postoje i druge vrste NMR spektroskopije kojima je moguće mjeriti kemijske pomake drugih atoma kao što su ¹¹B, ¹³C, ¹⁵N. Tijekom NMR titracije uslijed nastanka kompleksa mijenjaju se kemijski pomaci nekih

protona u vrstama koje tvore kompleks što nazivamo kemijskom izmjenom. Razlikujemo sporu, srednje brzu te brzu izmjenu (slika 15).²⁰

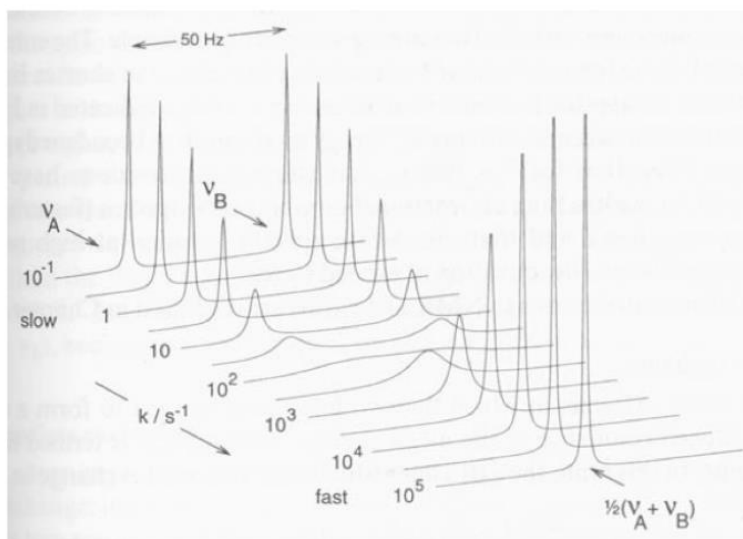
| | Sporo | Srednje | Brzo |
|-------------------------|---------------------------|----------------------------|---------------------------|
| Kemijski pomak | $k_{ex} \ll \Delta\omega$ | $k_{ex} \sim \Delta\omega$ | $k_{ex} \gg \Delta\omega$ |
| Transverzalno opuštanje | $k_{ex} \ll \Delta R_2$ | $k_{ex} \sim \Delta R_2$ | $k_{ex} \gg \Delta R_2$ |
| Skalarno sprezanje | $k_{ex} \ll \Delta J$ | $k_{ex} \sim \Delta J$ | $k_{ex} \gg \Delta J$ |

Slika 15. Podjela kemijske izmjene.²¹

Do spore izmjene dolazi kada je brzina reakcije konformacijske promjene ili nastajanja kompleksa manja od pulsog slijeda NMR eksperimenta. Tada je kroz cijeli eksperiment molekula u stanju A ili stanju B pa su dva maksimuma vrlo jasno odvojena (slika 16 a). Kako se brzina reakcije povećava tako se ona zbiva unutar pulsog slijeda. Rezultat toga je da se maksimumi počnu približavati, postaju niži te širi (slika 16 b). Kada je reakcija vrlo brza molekule će tokom pulsog slijeda pola vremena biti u stanju A, a pola vremena u stanju B što će rezultirati samo jednim oštrim, visokim maksimumom na prosječnom kemijskom pomaku između stanja A i B (slika 16 c). Prikaz oblika NMR signala kod kinetičkih mjerenja u ovisnosti o vrijednosti konstante brzine reakcije dan je na slici 17.



Slika 16. NMR spektar različitih kemijskih izmjena pri mjerenju konstante vezanja.²¹



Slika 17. NMR spektar različitih kemijskih izmjena kod kinetičkih mjerenja.²¹

Za kemijske pomake protona prilikom titracije vrijedi matricna jednačba:

$$\begin{bmatrix} J_{\text{obs},1}(H_1) & \cdots & J_{\text{obs},n}(H_1) \\ \vdots & \ddots & \vdots \\ J_{\text{obs},1}(H_m) & \cdots & J_{\text{obs},n}(H_m) \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} J(H_1 - L) & J(H_1 - ML) \\ \vdots & \vdots \\ J(H_m - L) & J(H_m - ML) \end{bmatrix} \cdot \begin{bmatrix} x_{\text{eq},1}(H-L) & \cdots & x_{\text{eq},n}(H-L) \\ x_{\text{eq},1}(H-ML) & \cdots & x_{\text{eq},n}(H-ML) \end{bmatrix} \quad (65)$$

odnosno:

$$J_{\text{obs}} = J \cdot X \quad (66)$$

gdje je J_{obs} skup kemijskih pomaka protona za jedno mjerenje, J je skup kemijskih pomaka protona u ligandu i kompleksu za pojedinu vrstu protona, a u stupcima matrice X nalaze se ravnotežni množinski udijeli vrsta L i ML za pojedino mjerenje.

Ako matrica J_{obs} sadrži više vrsta protona, moguće je iterativnim postupkom izračunati vrijednost konstante ravnoteže i kemijske pomake protona u vrstama M i ML. Prvo se pretpostavi neka vrijednost konstante ravnoteže K iz koje se, uz poznate početne koncentracije reaktanata, računa matrica X . Množenjem matrice J_{obs} desnom pseudoinverzom matrice X dobivamo matricu molarnih kemijskih pomaka J' :

$$(J_{\text{obs}})X^T(XX^T)^{-1} = J' \quad (67)$$

Množenjem te matrice sa matricom ravnotežnih množinskih udjela, X dobiva se nova matrica pomaka J_{obs} :

$$J'_{\text{obs}} = J' \cdot X \quad (68)$$

Zatim se računa suma kvadrata odstupanja J'_{obs} od J_{obs} :

$$SS = \sum_i \sum_j (J'_{\text{obs},ij} - J_{\text{obs},ij})^2 \quad (69)$$

Postupak utočnjavanja konstante ravnoteže svodi se na variranje vrijednosti konstante sve dok suma kvadrata odstupanja SS ne postigne minimalnu vrijednost odnosno dok se ne zadovolji zadani kriterij konvergencije.

Kinetička obrada podataka NMR spektroskopije ne razlikuje se mnogo od one kod spektrofotometrije. Mjerenjem kemijskih pomaka u određenim vremenskim intervalima od početka reakcije dobiva se matrica trenutnih kemijskih pomaka J_{obs} jednaka onoj u izrazu (65) te se dobiva jednadžba:

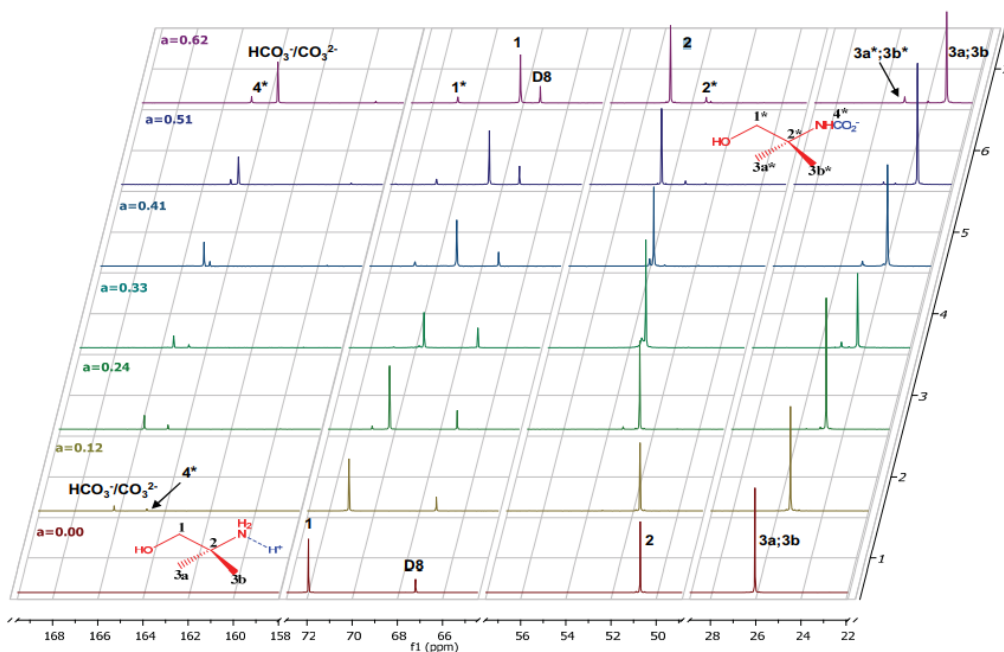
$$\begin{bmatrix} J_{\text{obs},1}(H_1) & \cdots & J_{\text{obs},n}(H_1) \\ \vdots & \ddots & \vdots \\ J_{\text{obs},1}(H_m) & \cdots & J_{\text{obs},n}(H_m) \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} J(H_1 - L) & J(H_1 - ML) \\ \vdots & \vdots \\ J(H_m - L) & J(H_m - ML) \end{bmatrix} \cdot \begin{bmatrix} x_1(H - L) & \cdots & x_n(H - L) \\ x_1(H - ML) & \cdots & x_n(H - ML) \end{bmatrix} \quad (70)$$

odnosno u matričnom zapisu:

$$J_{\text{obs}} = J \cdot X \quad (71)$$

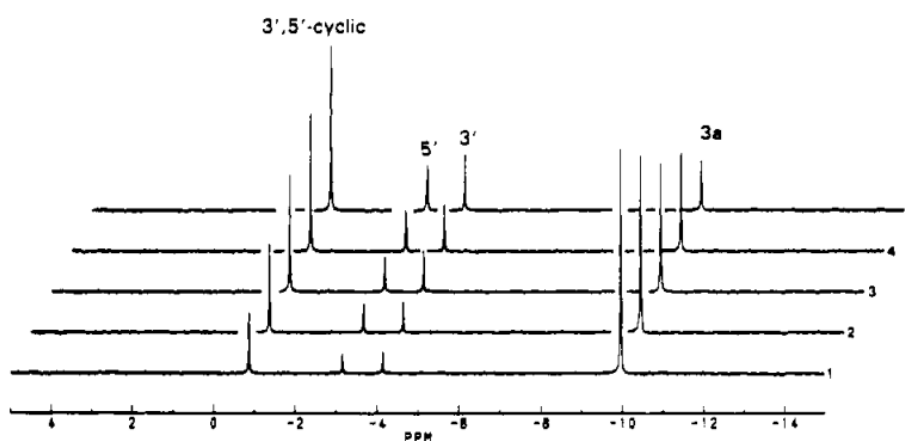
gdje je X sada matrica trenutnih množinskih udjela. Identičnim iterativnim postupkom opisanim kod računanja konstante ravnoteže pomoću NMR spektroskopije može se doći do koeficijenta brzine reakcije, k .

Ciftja i sur.²² koristili su ^{13}C NMR za proučavanje otopine 2-amino-2-metilpropan-1-ola (AMP) sa različitom količinom CO_2 pri 25°C (slika 18). Iz dobivenih rezultata zaključili su da glavne vrste koje nastaju u sustavu jesu: AMP/AMPH^+ , AMPCO_2^- i $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_3^{2-}$. Promjenom kemijskog pomaka ugljika dodatkom CO_2 izračunali su molarne udjele AMP, HCO_3^- i CO_2 iz kojih su dobili konstantu ravnoteže od 0,47 pri 25°C .



Slika 18. Rezultati ^{13}C NMR titracije 2-amino-2-metilpropan-1-ola ugljikovim dioksidom pri različitim molarnim udjelima CO_2 .²²

Broeders i sur.²³ proučavali su hidrolizu određenih cis-nukleozid 3',5' cikloaril [^{18}O]monofosfata te njihovih neobilježenih analoga u lužnatoj otopini. Koristeći ^{31}P NMR detektirali su tri vrste koje nastalu kao produkti reakcije (slika 19) te su odredili njihovu stereokemiju. Osim stereokemije, iz ^{31}P NMR rezultata došli su do zaključka da su reakcije drugog reda te su iz podataka izračunali koeficijente brzina hidroliza.



Slika 19. ^{31}P NMR hidroliza cis-nukleozid 3',5' cikloaril [^{18}O]monofosfata. Slike od 1 do 5 prikazuju različite vremenske periode reakcije nakon 5, 10, 18, 27, 60 minuta od početka reakcije.²³

§ 3. LITERATURNA VRELA

1. P. Atkins i J. de Paula, *Atkins' Physical Chemistry*, W. H. Freeman and Company, New York, 2010, str. 44–124.
2. I. N. Levine, *Physical Chemistry*, McGraw-Hill, New York, 2009, str. 474.
3. D. A. Skoog, F. J. Holler, S. R. Crouch, *Principles of Instrumental Analysis Sixth Edition*, Thompson Brooks/Cole, Belmont, 2007, str. 336–338.
4. G. Horvat, *Nastavni materijali iz kolegije Kemijska termodinamika diplomskog studija kemije, Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu*.
5. B. Tang, G.-Y. Zhang, Y. Liu, F. Han, *Anal. Chim. Acta* **459** (2002) 83–91.
6. J. Kuljanin, I. Janković, J. Nedeljković, D. Prstojević, V. Marinković, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **28** (2002) 1215–1220.
7. I. Piljac, *ELEKTROANALITIČKE METODE Teorijske osnove, mjerne naprave i primjena*, RMC, Zagreb, 1995, str. 101.
8. N. Galić, N. Burić, R. Tomaš, L. Frankec, V. Tomišić, *Supramol. Chem.* **23** (2011) 389–397.
9. M.A. Karimi, M.H. Mashhadizadeh, M. Mazloum-Ardakani, M.R.Z. Monfared, *Anal. Bioanal. Electrochem.* **2** (2010) 52–66.
10. L. Chen, M. Bos, P.D.J. Grootenhuis, A. Christenhusz, E. Hoogendam, D.N. Reinhoudt, W.E. van der Linden, *Anal. Chim. Acta* **201** (1987) 117–125.
11. M. Kechadi, B. Sotta, J. Gamby, *Talanta* **132** (2015) 785–789.
12. T. Rinkovec, *Primjena kalorimetrije u termodinamičkoj karakterizaciji kemijskih i fizikalnih procesa u supramolekulskim i biokemijskim sustavima*, Završni rad, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2001, str. 9–10.
13. M. Andujar-Sanchez, A. Camara-Artigas, V. Jara-Perez, *J. Chem. Thermodyn.* **42** (2010) 337–341.
14. Q. Luo, D. Chen, R.M. Boom, A.E.M. Janssen, *Food Chem.* **268** (2018) 94–100.
15. C. A. Schalley, *Analytical Methods in Supramolecular Chemistry*, WILEY-VCH, Weinheim, 2012, str. 337.
16. C.S. Morgan, J.M. Holton, B.D. Olafson, P.J. Bjorkman, S.L. Mayo, *Protein Sci.* **6** (1997) 1771–1773.

17. M. Volini, P. Tobias, *J. Biol. Chem.* **244** (1969) 5105–5109.
18. J. D. Roberts, *Nuclear Magnetic Resonance, Applications to organic chemistry*, McGraw-Hill, New York, 1959, str. 1.
19. P. Thordarson, *Chem. Soc. Rev.* **40** (2011) 1305–1323.
20. <http://www.protein-nmr.org.uk/general/chemical-shifts/chemical-exchange/> (preuzeto 26. kolovoza 2018. godine)
21. <https://www.ucl.ac.uk/biosciences/departments/smb/christodoulou/people/chris-waudby/exchange-part-I> (preuzeto 26. kolovoza 2018. godine)
22. A.F. Ciftja, A. Hartono, E.F. da Silva, H.F. Svendsen, *Energy Procedia* **4** (2011) 614–620.
23. N.L.H.L. Broeders, A.P. van der Heiden, I. Peeters, H.M. Janssen, L.H. Koole, *J. Am. Chem. Soc.* **114** (1992) 9624–9633.