

LABORATORIUM ZAAWANSOWANEJ CHEMII

- chemia bionieorganiczna -

Temat: *Wyznaczanie parametrów termodynamicznych reakcji metodą izotermicznego miareczkowania kalorymetrycznego*

WPROWADZNIŁE TEORETYCZNE

1. Wstęp
2. Izotermiczna kalorymetria miareczkowa
3. Warunki eksperymentu
4. Parametry termodynamiczne reakcji kompleksowania

ZAKRES I CEL ĆWICZENIA

CZĘŚĆ LABORATORYJNA

LITERATURA UZUPEŁNIAJĄCA

WPROWADZNIIE

1. Wstęp

Procesom fizycznym i chemicznym towarzyszą w większości przypadków efekty energetyczne, dlatego ciepło stanowi uniwersalny wskaźnik przemian fizycznych i chemicznych. Dział, zajmujący się metodami pomiaru ilości ciepła wydzielanego lub pochłanianego podczas procesów fizycznych lub chemicznych nazywamy kalorymetrią.

W kalorymetrii, wskaźnikiem zmian własności badanego układu jest ciepło, q , którego jednostką w układzie SI jest džul, J. Wciąż jednak w literaturze chemicznej oraz w oprogramowaniu dołączanym do kalorymetrów przez producentów powszechnie używaną jednostką ciepła jest kaloria, cal.:

$$1 \text{ cal} = 4,184 \text{ J}$$

Pomiary kalorymetryczne wykonywane są w funkcji czasu. Wynikiem pomiaru jest termogram przedstawiający zależność zmian mocy, dq/dt , do czasu, t . Jednostką mocy

w układzie SI jest wat, W.:

$$1 \text{ W} = 1 \text{ J} \cdot \text{s}^{-1}$$

W praktyce, pomiary kalorymetryczne w większości przypadków prowadzone są w warunkach stałego ciśnienia (atmosferycznego), p , stąd też globalny efekt energetyczny towarzyszący badanemu procesowi jest równy różnicy entalpii ΔH układu w stanie końcowym i początkowym:

$$\Delta H = H_2 - H_1 = q_p (p = \text{const.})$$

W przypadku procesów zachodzących w stałej temperaturze i przy stałym ciśnieniu (kalorymetria izotermiczna), możliwość zajścia procesu samorzutnego określa wartość energii swobodnej Gibbsa, ΔG , zdefiniowanej równaniem:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S,$$

gdzie ΔS oznacza zmianę entropii układu. Z równania wynika, że w warunkach izotermicznych o samorzutności danego procesu może decydować czynnik entalpowy, ΔH oraz entropowy, ΔS .

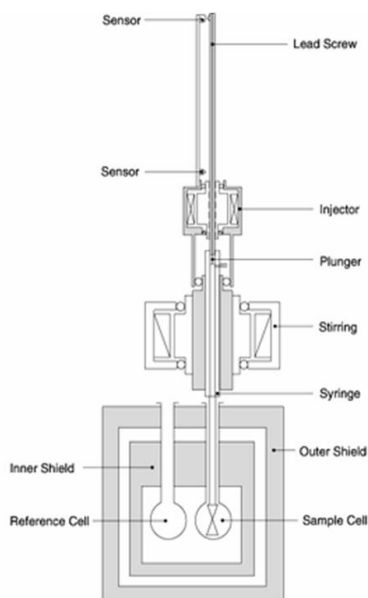
$\Delta G < 0$	proces samorzutny
$\Delta G = 0$	stan równowagi
$\Delta G > 0$	proces wymuszony

2. Izotermiczna kalorymetria miareczkowa

Izotermiczna kalorymetria miareczkowa (z ang. *Isothermal Titration Calorimetry*, w skrócie ITC) należy do metod termoanalitycznych, w której mierzy się efekty energetyczne towarzyszące procesom zachodzącym w stałej temperaturze podczas dodawania do roztworu zawierającego substrat roztwór liganda.

Kalorymetr miareczkowy składa się z dwóch identycznych celk: celki pomiarowej (ang. *sample cell*), w której zachodzi reakcja oraz celki odniesienia (ang. *reference cell*), wypełnionej wodą (rys. 1). Obie celki umieszczone są symetrycznie wewnątrz tego samego płaszcza adiabatycznego. Pomiędzy celkami znajduje się czujnik

temperatury (Differential Power sensor) rejestrujący różnicę temperatur obu celk (rys. 2).

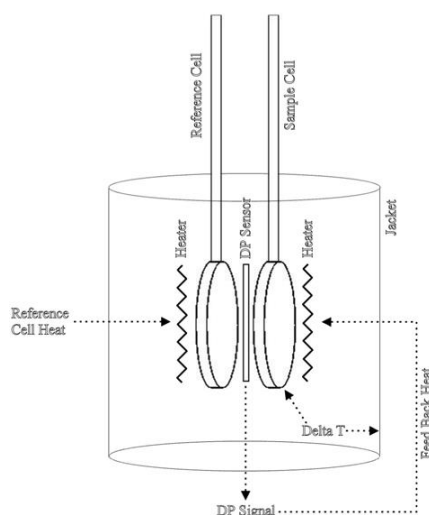


Rys. 1. Schemat układu miareczkującego – ITC

Roztwór substratu znajduje się w celce pomiarowej, do której dodawany jest za pomocą strzykawki, w ustalonych odstępach czasu, roztwór liganda. Podczas pomiaru, obracająca się z zadaną prędkością igła strzykawki, z odpowiednio wyprofilowaną końcówką, zapewnia ciągle mieszanie reagentów.

Podczas wstrzykiwania roztworu liganda ciepło zostaje uwalniane lub absorbowane, w zależności od rodzaju oddziaływania, w ilości proporcjonalnej do liczby moli związanego liganda. W przypadku reakcji endotermicznej temperatura celki pomiarowej jest niższa od temperatury celki odniesienia. Sygnał o powstaniu różnicy temperatur przechodzi do układu sterującego dodatkowym elementem grzejnym, który

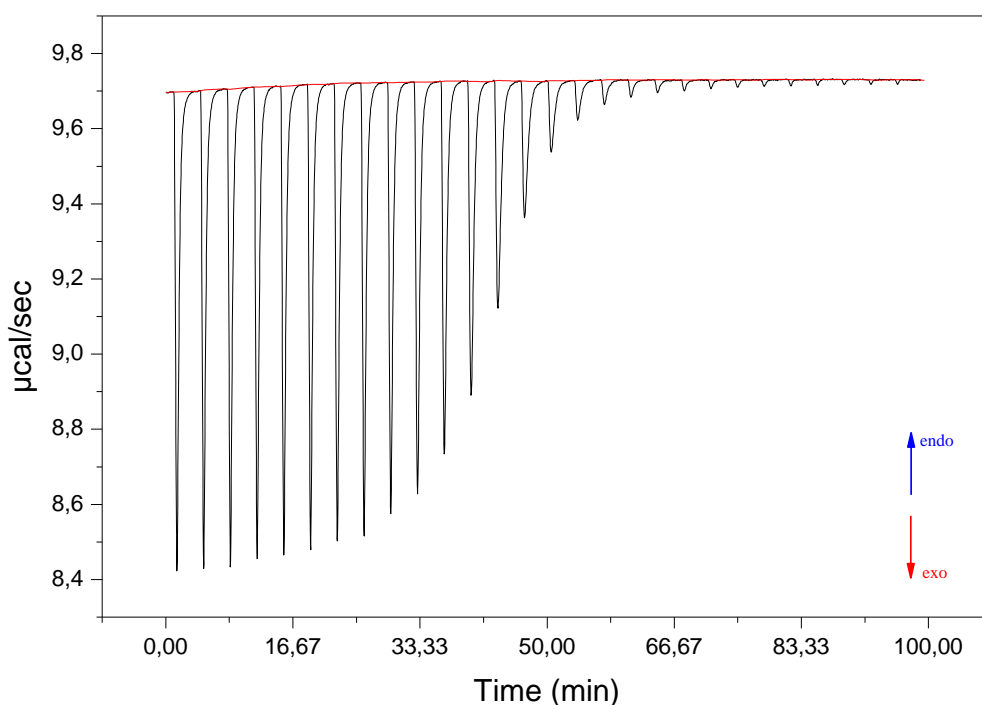
doprowadza do celki pomiarowej tyle energii, ile potrzeba do skompensowania różnicy temperatur (rys. 2). W procesie egzotermicznym, temperatura celki pomiarowej jest wyższa od temperatury celki odniesienia, a dodatkowy element grzejny musi doprowadzić dodatkową ilość energii do celki odniesienia, aby temperatury obu naczyń były w czasie pomiaru jednakowe. Energia doprowadzona dodatkowo do celki reakcyjnej lub referencyjne (w zależności od typu przemiany) odpowiada entalpii przemiany, ΔH .



Rys. 2. Pomiar różnicy temperatur pomiędzy celką reakcyjną a odniesienia

Dane miareczkowania kalorymetrycznego przedstawiane są na termogramie zależności mocy [$\mu\text{cal} \cdot \text{s}^{-1}$] od czasu [min], $t = f(dH/dt)$. Wykres przedstawia serię pików, które odpowiadają kolejnym krokom miareczkowania (rys. 3). Kalorymetr połączony jest z elektronicznym urządzeniem całkującym, co umożliwia obliczanie pola

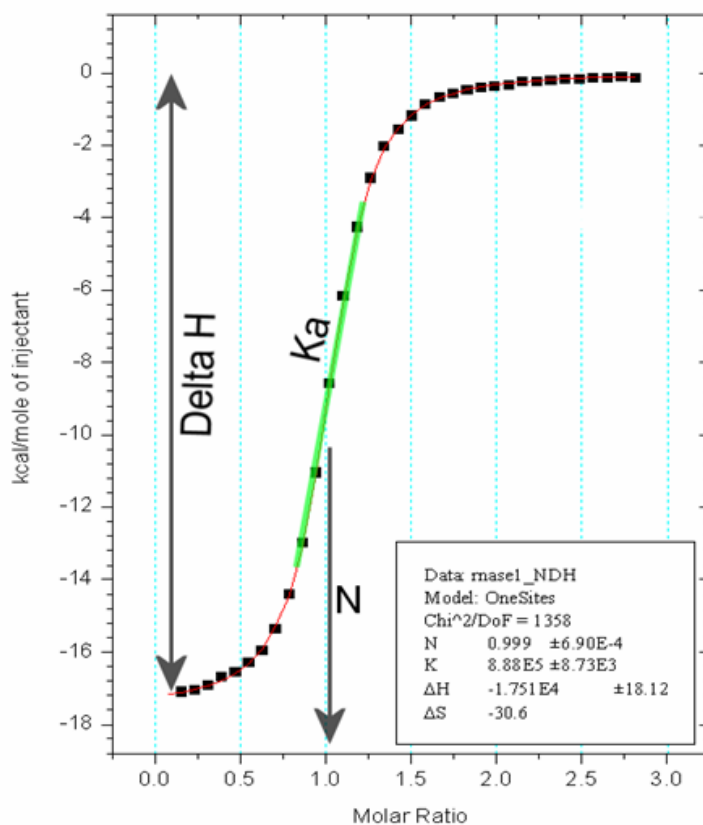
piku, a tym samym oznaczanie entalpii ΔH . Powierzchnia piku jest proporcjonalna do efektu cieplnego przemiany. Wraz z dodatkiem kolejnych porcji titranta wielkość pików maleje z uwagi na malejącą ilość reagentów biorących udział w reakcji. Miareczkowanie prowadzi się do momentu, w którym wszystkie potencjalne miejsca substratu zdolne do wiązania liganda zostaną wysyczone, a na termogramie rejestrowane są jedynie efekty cieplne związane z rozcieńczaniem dodawanego roztworu liganda.



Rys. 3. Termogram w metodzie ITC

Przedstawiając na wykresie wartości entalpii [$\text{kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ liganda] odpowiadających kolejnym krokom miareczkowania w funkcji stosunku molowego

liganda do substratu $[\text{ligand}]/[\text{substrat}]$ otrzymujemy krzywą miareczkowania kalorymetrycznego w metodzie ITC, tzw. izotermę wiązania (rys. 4).



Rys. 4. Krzywa miareczkowania kalorymetrycznego w metodzie ITC – izoterma wiązania

Cały eksperyment sterowany jest przez komputer. Użytkownik wprowadza parametry eksperymentalne tj.:

- temperatura [°C] – zakres: od 2 °C do 70°C
- liczba kroków miareczkowania
- objętość dodawanego titranta [μl] – max. 280 μl

- czas dodawania titranta [s]
- czas pomiędzy kolejnymi krokami miareczkowania [s]
- prędkość obrotów mieszadła [rpm]

Do analizy danych ITC wykorzystuje się program komputerowy dołączony przez producenta kalorymetru, za pomocą którego, dopasowuje się krzywe miareczkowania do danych eksperymentalnych. Z krzywych eksperymentalnych oblicz się:

- stechiometrię reakcji (n)
- stałą trwałości (K_b)
- entalpię reakcji (ΔH)
- entropię reakcji (ΔS)

3. *Warunki eksperymentu*

Przygotowanie próbek

Izotermiczny kalorymetr miareczkowy mierzy ciepło reakcji podczas dodawania titranta zawierającego ligand do roztworu substratu umieszczonego w celce pomiarowej. W trakcie miareczkowania mieszanina reakcyjna utrzymywana jest w stałej temperaturze i mieszana z jednakową prędkością. Podczas dodawania titranta do roztworu miareczkowanego generowane są jednocześnie dodatkowe efekty energetyczne, inne niż ciepło wiązania ligand – substrat. W celu prawidłowego przeprowadzenia pomiaru należy w możliwie jak największym stopniu zminimalizować

uboczne efekty cieplne, aby z jak największą dokładnością mierzyć ciepło wiązania reagentów.

Dodatkowe efekty energetyczne, nie związane z ciepłem wiązania to:

- a) *ciepło mieszania* roztworów liganda i substratu, które jest tym większe im większa są różnica wartości pH, stężenia oraz temperatury obu roztworów,
- b) *ciepło rozcieńczania* roztworu liganda, którego wartość może być znaczna w sytuacji, gdy cząsteczki liganda są zdolne przy wyższych stężeniach tworzyć dimery lub większe agregaty.

Głównym czynnikiem zakłócającym dokładne wyznaczenie entalpii wiązania jest różnica pH roztworów liganda i substratu. W celu jego wyeliminowania, w metodzie ITC stałe próbki rozpuszcza się najczęściej bezpośrednio w roztworach buforowych o takim samym stężeniu. Po rozpuszczeniu reagentów sprawdza się pH otrzymanych roztworów pehametrem. Jeżeli pH roztworu sporządzonego różni się od pH roztworu buforowego, w którym rozpuszczono próbkę, więcej niż 0,05 jednostki, wówczas należy dopasować wartość pH dodając do niego niewielką ilość 1 M NaOH lub 1 M HCl.

Stężenia reagentów dobiera się w zależności od stechiometrii reakcji (n), entalpii wiązania (ΔH_b) oraz stałej wiązania (K_b). W przypadku silnych oddziaływań stosuje się małe stężenia roztworów (0,05 – 1 mM), natomiast słabe oddziaływania bada się przy dużych stężeniach reagentów (10 – 100 mM). W praktyce, stosuje się najczęściej 2,5 - 3-krotny nadmiar odczynnika miareczkującego, aby upewnić się, że całkowita ilość substratu przereagowała. Jeżeli próbka liganda jest słabo rozpuszczalna, droga lub dysponujemy niewielką jej ilością, wówczas możemy wykonać miareczkowanie

odwrotne, umieszczając w celce pomiarowej ligand i miareczkują go roztworem substratu.

Wykonanie pomiarów

W dokładnych pomiarach należy uwzględnić udział wszystkich efektów energetycznych, również tych nie związanych z ciepłem wiązania, które towarzyszą reakcji. W tym celu przeprowadza się trzy eksperymenty:

1. pomiar ciepła rozcieńczenia liganda ($\Delta_{\text{rozc.}}H_L$) w tym samym rozpuszczalniku, w którym przygotowano roztwór substratu
2. pomiar ciepła rozcieńczenia substratu w tym samym rozpuszczalniku, w którym był rozpuszczony ligand ($\Delta_{\text{rozc.}}H_S$)
3. pomiar ciepła mieszania roztworu liganda z roztworem substratu ($\Delta_m H_{\text{eksp.}}$)

Następnie, od wyznaczonego ciepła reakcji miareczkowania substratu ligandem należy odjąć ciepło rozcieńczenia liganda oraz ciepło rozcieńczenia substratu. W ten sposób otrzymuje wartość entalpii wiązania ligand – substrat (ΔH_b):

$$\Delta H_b = \Delta_m H_{\text{eksp.}} - \Delta_{\text{rozc.}}H_L - \Delta_{\text{rozc.}}H_S$$

4. Parametry termodynamiczne reakcji kompleksowania

Większość reakcji chemicznych zachodzących w przyrodzie to reakcje kompleksowania. Mają one fundamentalne znaczenie w chemii analitycznej, technologii chemicznej, medycynie oraz w różnorodnych procesach biochemicznych. Metoda

izotermicznego miareczkowania kalorymetrycznego stanowi, w odróżnieniu od innych metod analitycznych, potężne narzędzie do badania reakcji powstawania kompleksów, ponieważ podczas jednego eksperymentu uzyskujemy informacje o stechiometrii powstałego kompleksu (n), stałej trwałości (K), a także o parametrach termodynamicznych reakcji (ΔH , ΔS , ΔG). Dane te pozwalają na opis badanego procesu na poziomie molekularnym. Z tych powodów, metoda ITC znajduje, szczególnie w ostatnich latach, szerokie zastosowanie do badania, między innymi, aktywności biologicznej i farmakologicznej nowych związków.

Związki, kandydujące do roli potencjalnych leków muszą charakteryzować się wysoką selektywnością, aktywnością oraz odpowiednią trwałością termodynamiczną i kinetyczną w połączeniach z makrocząsteczkami biologicznymi. Określenie zależności pomiędzy strukturą a własnościami związku stanowi podstawowy cel w technologii odkrywania leków. Parametrem optymalizowanym podczas projektowania nowych, biologicznie czynnych związków jest stała trwałości (wiązania) – K_b . Dla reakcji równowagowej opisanej równaniem:



wartość K_b opisuje stan, w którym niezwiązane reagenty i kompleks pozostają w równowadze. Dla reakcji przebiegającej w stosunku molowym 1:1, wyrażenie na stałą trwałości przedstawia wzór:

$$K_b = \frac{[LS]}{[L][S]} \quad (T = \text{const.})$$

Wyrażenie to definiuje stan równowagi, nie informuje jednak o szybkości z jaką stan ten został osiągnięty. Duża wartość stałej K_b oznacza, że stan równowagi przesunięty jest w stronę tworzenia kompleksu, zaś mała wartość oznacza przesunięcie stanu równowagi w stronę niezwiązanych reagentów. Z tych powodów chemiczne

modyfikacje struktury potencjalnych leków prowadzi się w taki sposób, aby wartość stałej K_b danej reakcji była jak największa. Poprawia się w ten sposób parametry farmakologiczne i selektywność badanych związków.

Stała trwałości (K_b) dostarcza ogólnych informacji o oddziaływaniach wiążących. Jej wartość obejmuje wszystkie efekty występujące podczas wiązania liganda z substratem. Każdej reakcji towarzyszy zawsze szereg odrębnych procesów tj. zmiany w strukturze konformacyjnej reagentów, zrywanie i powstawanie wiązań wodorowych, oddziaływania elektrostatyczne, hydrofobowe oraz zmiany własności środowiska reakcji. Znajomość parametrów termodynamicznych reakcji pozwala zatem lepiej zrozumieć charakter przemian chemicznych oraz czynniki wpływające na trwałość powstających połączeń, aniżeli znajomość jedynie wartości stałej K_b .

Jeżeli zapiszemy równanie reakcje, jak poprzednio, w postaci: $nL_{(aq)} + S_{(aq)} = L_nS_{(aq)}$, to $\Delta_b H$ tej reakcji jest energią kompleksowania. Trwałość kompleksu określona jest różnicą energii kompleksowania substratu z rozpuszczalnikiem i z ligandem. W wyrażeniach na stałe trwałości pomija się stężenie rozpuszczalnika, zakładając, że stężenia reagentów są na tyle małe, iż aktywność rozpuszczalnika pozostaje stała w czasie pomiaru. Wartość entalpii wiązania ($\Delta_b H$) otrzymuje się w metodzie ITC bezpośrednio z eksperymentu, natomiast wartość energii swobodnej Gibbsa ($\Delta_b G$) oblicza się z równania:

$$K_b = e^{\frac{(-\Delta_b G)}{RT}},$$

które po logarytmowaniu przyjmuje postać:

$$\ln K_b = -\frac{\Delta_b G}{RT}$$

$$\Delta_b G = -RT \ln K_b$$

Przeprowadzając eksperyment w więcej niż w jednej temperaturze uzyskujemy informacje o zmianie pojemności cieplnej (ΔC_p). Pozwala to na obliczenie zmian entalpii i entropii badanego procesu w funkcji temperatury:

$$\Delta C_p = \frac{d(\Delta_b H)}{dT} = T \frac{d(\Delta_b S)}{dT} = \frac{\Delta_b H_{T_2} - \Delta_b H_{T_1}}{T_2 - T_1}$$

Wartość stałej wiązania określa energia swobodna Gibbsa, która jest funkcją entalpii i entropii tworzenia kompleksu. Wiązaniu liganda z substratem towarzyszą zmiany w oddziaływaniach wewnątrz- i międzycząsteczkowych wszystkich składników badanego układu, a w tym również cząsteczek rozpuszczalnika oraz mogących tworzyć się produktów pośrednich. Efekty te znajdują swoje odzwierciedlenie w wartościach entalpii i entropii reakcji, których wzajemna relacja wpływa na wartość $\Delta_b G$, a tym samym na K_b .

Czynnik entalpowy związany jest z liczbą oraz siłą oddziaływań międzyatomowych w procesie wiązania. Wzrost siły i liczby oddziaływań powoduje uwalnianie większej ilości ciepła, a więc $\Delta_b H$ przyjmować będzie bardziej ujemne wartości. Jak wynika z zależności $\Delta_b G = \Delta_b H - T\Delta_b S$, im bardziej ujemna jest wartość entalpii wiązania tym większa jest wartość stałej K_b , a tym samym wzrasta stabilność termodynamiczna kompleksu.

Podczas tworzenia kompleksu następuje zrywanie i tworzenie się dużej liczby wiązań. Jeżeli wiązanie substratu z ligandem przebiega z równoczesnym uwalnianiem z bezpośredniej sfery koordynacyjnej substratu większej liczby cząsteczek niż liczba przyłączanych ligandów, wówczas zmiana energii swobodnej silnie zależy od zmiany entropii, której dodatnia wartość w takiej sytuacji zwiększa się. Ma to również swoje

konsekwencje we wzroście ujemnej wartości $\Delta_b G$. Czynniki entropowe ma szczególne znaczenia np. w procesie tworzenia kompleksów chelatowych, np.:



W powyższej reakcji 3 cząsteczki dwukleszczowego liganda etylenodiaminy (en) wymieniają 6 cząsteczek ligandu NH_3 . Zwiększenie entropii wynika z faktu, że liczba cząsteczek substratów jest równa 4, a produktów 7.

Reakcji może towarzyszyć także wzrost uporządkowania układu. Wówczas ujemna wartość entropii musi być kompensowana obniżeniem wartości entalpii, aby $\Delta_b G < 0$. Interpretacja termodynamiki reakcji nie jest prosta i należy dokonywać jej z dużą ostrożnością. Pełne zrozumienie natury powstawania kompleksu wymaga jednak poznania profilu termodynamicznego reakcji na poziomie molekularnym.

ZAKRES I CEL ĆWICZENIA

Podczas przeprowadzania eksperymentów student zapozna się z obsługą izotermicznego kalorymetru miareczkowego, ideą pomiaru, a także z opracowywaniem wyników oraz ich interpretacją. Umiejętności te pozwolą mu na wykorzystanie zdobytej wiedzy podczas planowania badań biochemicznych, farmaceutycznych oraz analitycznych.

Zakres ćwiczenia obejmuje przeprowadzenie jednego z niżej zaproponowanych doświadczeń:

1. Wyznaczanie parametrów termodynamicznych reakcji kompleksowania wybranych jonów kwasem etylenodiaminotetraoctowym.
2. Charakterystyka termodynamiczna oddziaływania cytydyno-2-monofosforanu z rybonukleazą A
3. Wyznaczanie ciepła dysocjacji słabych kwasów organicznych.

CZĘŚĆ LABORATORYJNA

1. Wyznaczanie parametrów termodynamicznych reakcji kompleksowania wybranych jonów kwasem etylenodiaminotetraoctowym.

Kwas etylenodiaminotetraoctowy, w skrócie EDTA, jest powszechnie stosowanym kompleksonem [1]. Reaguje on z jonami metalu w stosunku stechiometrycznym 1:1, niezależnie od wartościowości metalu [2]. Kompleksy te są trwałe i dobrze rozpuszczalne w wodzie. Charakterystyka oddziaływań kwasu z jonami dwuwartościowych metalami stanowić może prosty model pozwalający głębiej wniknąć w mechanizm oraz specyficzność procesu oddziaływania metali z miejscami koordynacyjnymi ligandu [3]. Z uwagi na rosnące zainteresowanie możliwościami aplikacyjnymi kwasu EDTA oraz jego pochodnymi w biotechnologii i medycynie (jako środka terapeutycznego) duże znaczenie poznawcze ma zrozumienie termodynamicznego procesu chelatacji [5].

Literatura

- [1] Y. V. Griko, *Biophys. Chem.*, 79 (1999) 117-127.
- [2] S. J. Lippard, J. M. Berg, *Podstawy chemii bionieorganicznej*, PWN W-wa (1998) 34-38.
- [3] T. Christensen, i in., *J. Am. Chem. Soc.*, 125 (2003) 7357-7366.
- [4] D. Wyrzykowski, *Izotermiczna kalorymetria miareczkowa – aspekty teoretyczne i praktyczne*, IX Szkoła Analizy Termicznej, Zakopane (2019)
- [5] H. Siitari i in., *Nature* 301 (1983) 258.

Wykonanie pomiarów

Przygotowanie roztworów buforowych:

Przygotować roztwór buforowy MES o stężeniu 20 mM i pH równym 6 oraz 2 roztwory buforowe TRIS o stężeniu 20 mM i pH równym 6 i 8. W tym celu rozpuścić w kolbie miarowej o pojemności 1 dm³ odpowiednie ilości składników, a następnie sprawdzić za pomocą pehametru wartość pH. Do roztworu dodawać porcjami niewielki ilość 1 M roztworu HCl lub NaOH, aż do uzyskania wymaganej wartości pH

Przygotowanie roztworów próbek:

Przygotować buforowe roztwory soli CaCl₂, NiCl₂ (lub innych wskazanych przez prowadzącego ćwiczenia) o stężeniu równym 10 mM. W tym celu rozpuścić w kolbie miarowej o pojemności 10 cm³ obliczoną ilość soli w przygotowanym wcześniej roztworze buforowym, a następnie sprawdzić pH otrzymanego roztworu. Pobrać 1 cm³ tak sporządzonego roztworu i przenieść go do drugiej kolby miarowej o pojemności 10 cm³. Kolbę uzupełnić do kreski roztworem buforowym, poczym ponownie sprawdzić wartość pH. Należy pamiętać, aby wartość pH tak sporządzonego roztworu nie różniła się więcej niż 0,05 jednostki pH od roztworu buforowego.

Roztwór liganda o stężeniu 10 mM sporządzić w analogiczny sposób jak opisano wyżej, rozpuszczając w kolbce miarowej o pojemności 10 cm³ odpowiednią ilość kwasu EDTA w danym roztworze buforowym. Roztwór rozcieńczyć odpowiednim roztworem buforowym, aby jego stężenie było równe 0,1 mM.

Miareczkowanie wykonujemy w kalorymetrze AutoITC firmy MicroCal, Inc. (Northampton, MA) zgodnie ze wskazówkami prowadzącego ćwiczenia. Aby wyznaczyć

stałą wiązania K oraz parametry termodynamiczne reakcji kompleksowania, należy przeprowadzić, zachowując te same warunki pomiaru, dwa eksperymenty:

- a) wyznaczyć ciepło rozcieńczania soli (substratu) w roztworze buforowym nie zawierającym liganda,
- b) wyznaczyć ciepło mieszania roztworu EDTA (liganda) z roztworem substratu.

Pomiar ciepła mieszania roztworu liganda i substratu wykonuje się trzykrotnie, a następnie wprowadza się korektę na ciepło rozcieńczania soli.

Do analizy danych miareczkowania wykorzystuje się program komputerowy Origin (MicroCal Inc) dołączony do kalorymetru przez producenta.

2. Charakterystyka termodynamiczna oddziaływania cytydyno-2-monofosforanu z rybonukleazą A.

Literatura

- [1] D. Wyrzykowski, *Izotermiczna kalorymetria miareczkowa – aspekty teoretyczne i praktyczne*, IX Szkoła Analizy Termicznej, Zakopane (2019)
- [2] L. Stryer, J. L. Tymoczko, J. M. Berg, *Biochemia*, PWN, Warszawa 2005.
- [3] I. Wadsö, *Standards in isothermal microcalorimetry* (IUPAC Technical Report). *Pure App. Chem.*, 73 (2001) 1625-1639.

Wykonanie pomiarów

Przygotowanie buforu octanowego o stężeniu 50 mM i pH 5,5:

Rozpuścić w kolbie miarowej o pojemności 2 dm³ 9,814 g soli (ACS grade) w wodzie dejonizowanej. Następnie sporządzić 500 cm³ 50 mM roztworu kwasu octowego rozpuszczając w kolbie miarowej 1,431 cm³ bezwodnego kwasu octowego.

Bufor octanowy sporządza się dodając 50 mM roztwór kwasu octowego do 1,5 dm³ 50 mM roztworu octanu potasu do momentu, w którym pH buforu osiągnie wartość 5,5.

Przygotowanie buforu TRIS-HCl o stężeniu 0,2 M i pH 7:

Rozpuścić 2,422 g zasady TRIS w kolbie miarowej o pojemności 100 cm³ w wodzie dejonizowanej, a następnie doprowadzić roztwór do pH równego 7,0 dodając porcjami niewielkie ilości 1 M HCl.

Przygotowanie roztworu cytydyno-2-monofosforanu o stężeniu 2,0 – 2,2 mM:

Rozpuścić ok. 10 mg cytydyno-2-monofosforanu w 5,5 cm³ 50 mM roztworu octanu potasu, a następnie dodać 5,5 cm³ 50 mM roztworu buforowego octanowego o pH 5,5. Aby uzyskać roztwór cytydyno-2-monofosforanu o pH równym 5,5, należy dodawać do niego porcjami niewielkie ilości 50 mM roztworu kwasu octowego lub octanu potasu.

Oznaczanie stężenie roztworu cytydyno-2-monofosforanu:

Stężenie roztworu wyznacza się metodą spektrofotometryczną. W tym celu 0,5 cm³ badanego roztworu rozcieńcza się w kolbie miarowej o pojemności 10 cm³ 0,2 molowym roztworem buforu TRIS o pH = 7,0. Następnie wyznacza się wartość absorpcji przy długości fali 260 nm. Dla molowego współczynnika ekstynkcji równego 7400 [cm⁻¹ · M⁻¹] wyznaczyć się stężenie cytydyno-2-monofosforanu korzystając ze wzoru:

$$c = \frac{A}{\varepsilon \cdot l},$$

gdzie:

A – absorpcja przy danej długości fali

ε – molowy współczynnik ekstynkcji

l – grubość kuwety

Przygotowanie roztworu rybonukleazy A o stężenie ok. 0,06 mM:

Rozpuścić ok. 20 mg rybonukleazy A w 20 cm³ buforu octanowego o pH = 5,5. Tak przygotowany roztwór dializować dwukrotnie w 500 cm³ roztworu buforowego, używając worków o wielkości porów 6-8000 kD. Każda dializa powinna trwać ok. 3 godzin w temperaturze ok. 4°C.

Oznaczenie stężenie roztworu rybonukleazy A:

Stężenie roztworu wyznacza się metodą spektrofotometryczną, odczytując wartość absorpcji przy długości fali 280 nm i biorąc do obliczeń wartość molowego współczynnika ekstynkcji równą 9800 [cm⁻¹ · M⁻¹]

Miareczkowanie wykonujemy w kalorymetrze AutoITC firmy MicroCal, Inc. (Northampton, MA) zgodnie ze wskazówkami prowadzącego ćwiczenia. Aby wyznaczyć stałą wiązania K_b oraz parametry termodynamiczne oddziaływania, należy przeprowadzić, zachowując te same warunki pomiaru, dwa eksperymenty:

- c) wyznaczyć ciepło rozcieńczenia cytydyno-2-monofosforanu (substratu) w roztworze buforowym nie zawierającym liganda,
- d) wyznaczyć ciepło mieszania roztworu rybonukleazy A (liganda) z roztworem substratu.

Pomiar ciepła mieszania roztworu liganda i substratu wykonuje się trzykrotnie, a następnie wprowadza się korektę na ciepło rozcieńczenia soli. Do analizy danych miareczkowania wykorzystuje się program komputerowy Origin (MicroCal Inc) dołączony do kalorymetru przez producenta.

3. Wyznaczanie ciepła dysocjacji słabych kwasów organicznych

Wyznaczenie ciepła dysocjacji mocnego kwasu jest stosunkowo proste i można tego dokonać w bezpośrednim pomiarze kalorymetrycznym, mierząc ciepło reakcji [1,2]:



Z kolei, ciepło dysocjacji słabego kwasu jest trudne do wyznaczenia z bezpośrednich pomiarów kalorymetrycznych. Procesowi temu towarzyszy szereg innych efektów, które nie są związane z tworzeniem cząsteczki wody, tak jak ma to miejsce w przypadku reakcji zobojętniania mocnego kwasu. Słabe kwasu nie ulegają w roztworze wodnym całkowitej dysocjacji i oprócz efektu cieplnego związanego z tworzeniem cząsteczki wody, procesowi temu towarzyszą efekty energetyczne związane z dysocjacją kwasu oraz hydratacją jonów powstających podczas dysocjacji.

Można przyjąć, że różnica ciepł zobojętniania mocnego i słabego kwasu tą samą zasadą wynika ze zużywania się części energii na dysocjację słabego kwasu [3]:

$$\Delta_{\text{dys.}}H_{\text{HA}} = \Delta_{\text{zob.}}H_{\text{HA}} + \Delta_{\text{zob.}}H_{\text{HCl}}$$

Literatura

- [1] I. Wadsö, Standards in isothermal microcalorimetry (IUPAC Technical Report). Pure App. Chem., 73 (2001) 1625-1639.
- [2] L. Sobczyk, A. Kiswa, Chemia fizyczna dla przyrodników, PWN, Warszawa 1981.
- [3] Ćwiczenia laboratoryjne z chemii fizycznej, Wydawnictwo UG, Gdańsk 1974.

Wykonanie pomiarów

Przygotować 0,1 M roztwory zasady NaOH oraz kwasów mrówkowego, octowego, chlorooctowego oraz propionowego.

Miareczkowanie wykonujemy w kalorymetrze AutoITC firmy MicroCal, Inc. (Northampton, MA) zgodnie ze wskazówkami prowadzącego ćwiczenia. Aby wyznaczyć ciepło dysocjacji słabego kwasu należy przeprowadzić, zachowując identyczne warunki, następujące eksperymenty:

- wyznaczyć ciepło rozcieńczenia kwasu HCl ($\Delta_{\text{roz.}}H_{\text{HCl}}$)
- wyznaczyć ciepło reakcji kwasu HCl zasadą NaOH ($\Delta_{\text{zob.}}H_{\text{HCl}}$)
- wyznaczyć ciepło rozcieńczenia słabego kwasu ($\Delta_{\text{roz.}}H_{\text{HA}}$)
- wyznaczyć ciepło reakcji słabego kwasu zasadą NaOH ($\Delta_{\text{zob.}}H_{\text{HA}}$)

Ciepło dysocjacji słabego kwasu ($\Delta_{\text{dys.}}H_{\text{HA}}$) oblicz się na podstawie:

$$\Delta_{\text{dys.}}H_{\text{HA}} = \Delta_{\text{zob.}}H_{\text{HA}} - \Delta_{\text{roz.}}H_{\text{HA}} - \Delta_{\text{zob.}}H_{\text{HCl}} + \Delta_{\text{roz.}}H_{\text{HCl}}$$

Każdy pomiar należy wykonać trzykrotnie. Do analizy danych miareczkowania wykorzystuje się program komputerowy Origin (MicroCal Inc) dołączony do kalorymetru przez producenta.

LITERATURA UZUPEŁNIAJĄCA

1. D. Wyrzykowski, *Izotermiczna kalorymetria miareczkowa – aspekty teoretyczne i praktyczne*, IX Szkoła Analizy Termicznej, Zakopane (2019)

Materiały Online

1. Principles of isothermal titration calorimetry (ITC)

https://www.youtube.com/watch?v=o_IpWcWKNXI (dostęp: 14 września 2019 r.)

2. ITC – wybrane zagadnienia

a) Can calorimetry provide accurate estimates of long-term stability for monoclonal antibodies?

b) ITC: affinity is not everything

c) Enthalpic efficiency and the role of thermodynamic data in drug development: possibility or a pipeline dream!

d) A new era for microcalorimetry in drug development

<https://www.europeanpharmaceuticalreview.com/?s=Freire> [dostęp: 14 września 2019 r.]

3. Publikacje naukowe [dostęp: Biblioteka Główna UG – baza *Web of Science*]

1) V. Frasca, Biophysical characterization of antibodies with isothermal titration calorimetry. *J. Appl. Bioanal.*, 2 (2016) 90.

2) Dean E. Wilcox, Isothermal titration calorimetry of metal ions binding to proteins: An overview of recent studies. *Inorganica Chim. Acta*, 361 (2008) 857.

- 3) N. E. Grossoehme, A. M. Spuches, D. E. Wilcox, Application of isothermal titration calorimetry in bioinorganic chemistry. *J. Biol. Inorg. Chem.*, 15 (2010) 1183.
- 4) R. J. Falconer, Applications of isothermal titration calorimetry – the research and technical developments from 2011 to 2015. *J. Mol. Recognit.*, 29 (2016) 504.
- 5) J. B. Chaires, Calorimetry and thermodynamics in drug design. *Annu. Rev. Biophys.*, 37 (2008) 135.
- 6) J. Tellinghuisen, Optimizing Experimental Parameters in Isothermal Titration Calorimetry. *J. Phys. Chem. B.*, 109 (2005) 20027.
- 7) L. C. O'Brien, H. B. Root, C. -C. Wei, D. Jensen, N. Shabestary, C. De Meo, D. J. Eder M^{2+} -EDTA Binding Affinities: A Modern Experiment in Thermodynamics for the Physical Chemistry Laboratory. *J. Chem. Educ.*, 92 (2015) 1547.
- 8) C. -C. Wei, D. Jensen, T. Boyle, L. C. O'Brien, C. De Meo, N. Shabestary, D. J. Eder, Isothermal Titration Calorimetry and Macromolecular Visualization for the Interaction of Lysozyme and Its Inhibitors. *J. Chem. Educ.*, 92 (2015) 1552.
- 9) D. E. Moore, D. R. Goode, C. S. Seney, J. M. Boatwright, Isothermal Titration Calorimetry Can Provide Critical Thinking Opportunities. *J. Chem. Educ.*, 93 (2016) 304.
- 10) E. Freire, O. L. Mayorga, M. Straume, Isothermal titration calorimetry, *Anal. Chem.* 62, (1990) 950A.
- 11) D. R. Bundle, B. W. Sigurskjold, Determination of accurate thermodynamics of binding by titration microcalorimetry. *Methods Enzymol.*, 247 (1994) 288.
- 12) A. Cooper, Microcalorimetry of protein-protein interactions. *Methods Mol. Biol.*, 88 (1998) 11.

- 13) W. B. Turnbull, A. H. Daranas, On the Value of c : Can Low Affinity Systems Be Studied by Isothermal Titration Calorimetry?. *J. Am. Chem. Soc.*, 125 (2003) 14859.
- 14) R. N. Goldberg, N. Kishore, R. M. Lennen, Thermodynamic Quantities for the Ionization Reactions of Buffers, *J. Phys. Chem. Ref. Data*, 31, (2002) 231.
- 15) N. E. Good, G. D. Winget, W. Winter, T.N. Connolly, S. Izawa, R.M. M. Singh, Hydrogen Ion Buffers for Biological Research. *Biochemistry*, 5 (1966) 467.

GDAŃSK 2023