

# Laboratorium Chemii Fizycznej II

**Ćwiczenie nr 7:**  
Kinetyka reakcji zegarowej Landolta.

**Ćwiczenie nr 8:**  
Kataliza enzymatyczna.

**Ćwiczenie nr 9:**  
Wyznaczanie parametrów procesu elektrodowego reakcji redoks.

# I. Kinetyka reakcji autokatalitycznych i zegarowych

## I.1. Ogólna charakterystyka reakcji zegarowych i autokatalitycznych

Przedmiotem kinetyki chemicznej są badania szybkości i mechanizmów reakcji chemicznych. Badania takie ujawniają, iż praktycznie nie ma reakcji, które przebiegałyby według najprostszego możliwego mechanizmu, czyli jednoetapowo. Nawet reakcje uważane do niedawna za jednoetapowe, jak np. synteza jodowodoru z pierwiastków, w istocie mają bardziej złożony przebieg. Na mechanizmy rzeczywistych reakcji składa się z reguły sekwencja elementarnych etapów o różnej cząsteczkowości i szybkości.

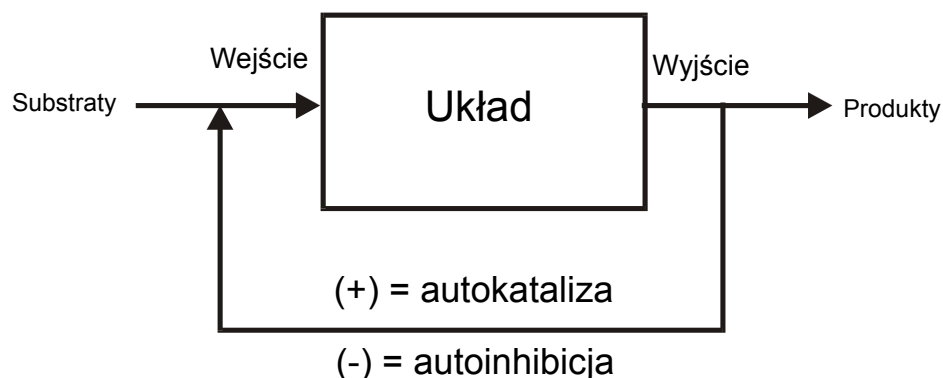
Złożone mechanizmy reakcji mogą być źródłem ich bardzo interesujących, nietypowych przebiegów. Przykładem mogą być różne reakcje oscylacyjne, charakteryzujące się niemonotoniczną (periodyczną lub chaotyczną) zmiennością stężenia niektórych reagentów w czasie, a jeśli reagenty te są barwne, przebieg takiej reakcji nabiera szczególnie efektownego charakteru, poprzez spontaniczne zmiany koloru mieszaniny reakcyjnej. Należy podkreślić, że – zgodnie z II zasadą termodynamiki - zjawiska takie mogą występować tylko poza stanem równowagi układu. Jeśli roztwór nie jest idealnie mieszany, oscylacyjny przebieg procesu może, poprzez sprzężenie kinetyki chemicznej z transportem (dyfuzją) reagentów, prowadzić do powstania nierównowagowych struktur przestrzennych lub czasowo-przestrzennych.

Innym przykładem efektownie przebiegających procesów chemicznych są tzw. reakcje zegarowe. Charakteryzują się one gwałtowną zmianą stężeń reagentów po upływie ściśle określonego czasu, zależnego od stężeń substratów reakcji. Jeśli ponadto skład układu zostanie dobrany tak, aby gwałtowna zmiana stężenia wybranego reagenta wiązała się ze zmianą barwy roztworu, przebieg reakcji zegarowej wygląda szczególnie efektownie. Na przykład, jeśli w pewnym momencie, w bezbarwnym roztworze zawierającym skrobię, pojawia się elementarny jod (w postaci jonu  $I_3^-$ ), układ przyjmuje momentalnie ciemnoniebieskie zabarwienie.

W mechanizmie niektórych reakcji zegarowych obecne są etapy autokatalityczne. Etapy takie występują także w mechanizmach reakcji oscylacyjnych. Autokataliza jest przejawem dodatniego chemicznego sprzężenia zwrotnego, a przejawem ujemnego sprzężenia zwrotnego są procesy autoinhibicyjne.

## I.2. Reakcje autokatalityczne

Zgodnie z tym, co powiedziano wyżej, reakcja autokatalityczna jest przykładem dodatniego sprzężenia zwrotnego w chemii, co ilustruje schemat na Rys. I.2.1



Rys. I.2.1. Ogólny schemat układu z dodatnim (+) lub ujemnym (-) sprzężeniem zwrotnym

Schemat ten ma uniwersalne znaczenie dla ilustracji pojęcia sprzężenia zwrotnego. Przedstawiony na nim prostokąt mógłby sygnalizować nie tylko układ chemiczny, ale np. wzmacniacz napięcia i wtedy Rys. I.2.1 przedstawiałby elektroniczny, tzw. blokowy schemat wzmacniacza z (dodatnim lub ujemnym) sprzężeniem zwrotnym.

W przełożeniu na język typowych pojęć chemicznych reakcja autokatalityczna (autoinhibicyjna) oznacza proces, którego przebieg jest przyspieszany (opóźniany) przez jego własny produkt. Jednym z klasycznych przykładów procesów autokatalitycznych jest utlenianie kwasu szczawowego jonami manganianowymi(VII) w kwaśnym ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) środowisku, przebiegające zgodnie z sumarycznym równaniem:



Jeśli mieszanina reakcyjna zawiera początkowo wyłącznie rozpuszczone w wodzie substraty, na odbarwienie roztworu, związane z redukcją jonów  $\text{MnO}_4^-$ , trzeba dość długo czekać. Obserwując pełny przebieg tej reakcji dochodzimy do wniosku, że ulega ona gwałtownemu przyspieszeniu dopiero po upływie pewnego „martwego” czasu, który będziemy nazywać dalej okresem (lub czasem) indukcji. Okazuje się jednak, że czas indukcji można znacznie skrócić, jeśli do mieszaniny substratów dodamy nieco  $\text{MnSO}_4$ , który jest jednym z produktów

reakcji. Czas indukcji będzie tym krótszy, im więcej  $\text{MnSO}_4$  zostanie wprowadzone. Oznacza to, że jony  $\text{Mn}^{2+}$  wywierają na przebieg rozważanej tu reakcji działanie autokatalityczne.

Można zastanawiać się, jakie jest źródło określonego (skończonego) czasu indukcji w próbce, która początkowo nie zawiera  $\text{MnSO}_4$ . Skoro początkowo w próbce nie ma  $\text{Mn}^{2+}$ , to może reakcja utleniania kwasu szczawiowego nie powinna w ogóle przebiegać, czyli – formalnie – jej czas indukcji powinien rozciągać się do nieskończoności? Istota sprawy polega jednak na tym, że także w nieobecności  $\text{Mn}^{2+}$  wśród początkowych reagentów, utlenianie kwasu szczawiowego jonami  $\text{MnO}_4^-$  przebiega, choć wielokrotnie wolniej. Powoduje to jednak stopniowy wzrost stężenia jonów  $\text{Mn}^{2+}$ , które w końcu osiąga taką wartość, że jony te wywierają widoczny efekt autokatalityczny. Gdyby zatem autokatalityczny przebieg powyższej reakcji był jedynym możliwym, utlenianie bez dodatku  $\text{MnSO}_4$  istotnie w ogóle by nie nastąpiło. Tego typu sytuacje nie są jednak raczej spotykane w praktyce.

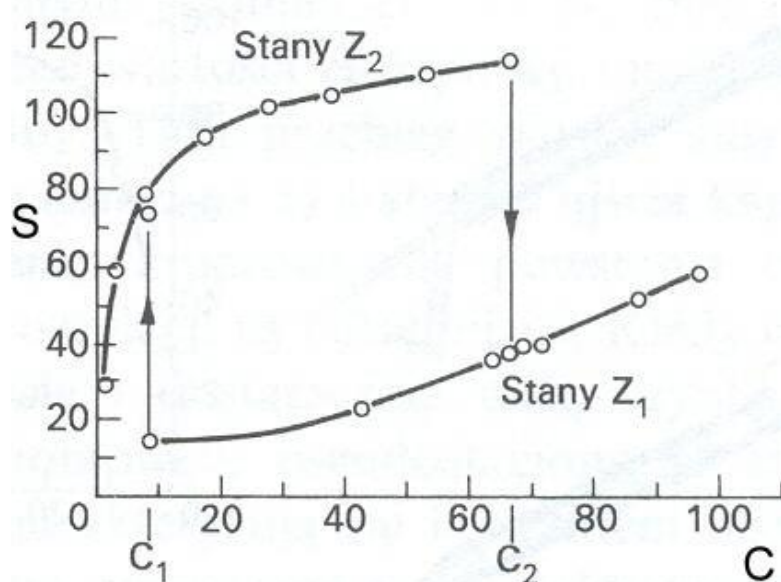
Należy przy tym zwrócić uwagę, że autokataliza nie jest specyficzna dla reakcji z udziałem jonów  $\text{MnO}_4^-$  - np. utlenianie za ich pomocą jonów  $\text{Fe}^{2+}$  do  $\text{Fe}^{3+}$  nie wykazuje już cech procesu autokatalitycznego, jest bardzo szybkie także bez dodatku produktów, a zatem czas indukcji wynosi zero.

Do szczegółowego mechanizmu utleniania kwasu szczawiowego jonami  $\text{MnO}_4^-$  wrócimy jeszcze później.

Zastanówmy się nad możliwie prostym i szybkim sposobem sprawdzenia, czy badana przez nas dowolna reakcja (której produkty mogą być częściowo lub nawet całkowicie nieznane), ma charakter autokatalityczny. Wystarczy w tym celu użyć roztworu, powstałego po zakończeniu tej reakcji, a więc zawierającego jej produkty, jako środowiska reakcji (rozpuszczalnika) dla tych samych substratów w następnym eksperymencie. Jeśli wykaże on szybszy przebieg reakcji, można sądzić, że wykazuje ona autokatalizę i wtedy pozostaje zbadać, który z jej produktów wywiera takie specyficzne działanie.

Można postawić pytanie, jak zmienia się szybkość reakcji autokatalitycznej w czasie po pokonaniu przez układ czasu indukcji. Zależy to od typu reaktora. Jeśli jest on zamknięty, tzn. substraty zostały do niego wprowadzone tylko na początku reakcji i nie są później uzupełniane, to szybkość reakcji autokatalitycznej musi przejść przez maksimum i w końcu spaść do zera, gdy wyczerpią się substraty. Jeśli natomiast reakcja prowadzona jest w reaktorze przepływowym, do którego stale dopływają nowe porcje substratów i odprowadzany jest roztwór zawierający produkty, to zagadnienie nieoczekiwanie staje się o wiele bardziej skomplikowane. Poza powstaniem stanu stacjonarnego może bowiem (niekiedy, to zależy od mechanizmu konkretnej reakcji) wystąpić zjawisko bistabilności,

polegające na tym, że układ będzie przybierał – dla danych parametrów kontrolnych – jeden z dwóch możliwych stabilnych stanów stacjonarnych. Stan układu przestaje więc być wtedy jednoznaczny funkcją jego parametrów kontrolnych, zaczyna za to zależeć od „historii”, czyli od tego, czy aktualne parametry kontrolne (np. szybkość przepływu reagentów przez reaktor) zostały osiągnięte przez zwiększenie ich początkowo względnie niskich wartości, czy też zmniejszenie ich, początkowo względnie wysokich, wartości. Tego typu zachowanie układu, możliwe do wystąpienia jedynie poza stanem równowagi, oznacza, w pewnym sensie, przypisanie temu układowi pewnej „pamięci” (ang. memory effect). Istnienie bistabilności w pewnym zakresie parametrów kontrolnych jest tożsamy z wystąpieniem histerezy w zachowaniu układu pod wpływem cyklicznych zmian tych parametrów. Ideę zachowania bistabilnego i związanej z nim histerezy ilustruje rysunek I.2.2.



Rys. I.2.2. Typowy eksperymentalny przejaw bistabilności - zachowanie układu (S) może w pewnym zakresie parametrów kontrolnych (C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>) odpowiadać albo stanom Z<sub>1</sub>, albo stanom Z<sub>2</sub>, w zależności od kierunku zmian C.

Problemem bistabilności i reaktorów przepływowych nie będziemy się dalej zajmować, ograniczając poniższe rozważania do zwykłych, zamkniętych reaktorów.

### **Teoretyczny opis reakcji autokatalitycznej**

Najprostszy do teoretycznej analizy jest modelowy proces, który może przebiegać wyłącznie autokatalitycznie. Proces taki możemy przedstawić prostym schematem:



Oczywiście zapis taki może oznaczać także zwykłą, nie autokatalityczną reakcję. Jeśli jednak reakcja ta wykazuje autokatalizę, to jej szybkość ( $v$ ) jest tym większa, im wyższe jest stężenie produktu P. W najprostszej postaci szybkość ta będzie proporcjonalna do iloczynu stężeń A i P w pierwszej potęgze:

$$v = k[A][P] \quad (\text{I.2.3})$$

i taki przypadek rozważymy w dalszej analizie. Zauważmy, że jeśli  $[P] = 0$ , to reakcja w ogóle nie przebiega, co jest zgodne z powyżej przyjętym założeniem, iż rozważany proces przebiega wyłącznie na drodze autokatalitycznej. Jest więc dalej oczywiste, że nasza modelowa reakcja może przebiegać tylko pod warunkiem, że wyjściowa mieszanina reakcyjna zawierać będzie nie tylko substrat o początkowym stężeniu  $[A]_0$ , ale także pewną ilość produktu, o stężeniu  $[P]_0$ . W trakcie reakcji stężenie produktu będzie rosnąć, a stężenie substratu – maleć, przy czym ze stechiometrii (I.2.2) wynika, iż w dowolnym czasie spełniona będzie relacja:

$$[P] = [P]_0 + ([A]_0 - [A]) \quad (\text{I.2.4})$$

Równanie kinetyczne opisujące następujący w takich warunkach zanik substratu A w czasie przybiera więc następującą postać:

$$-\frac{d[A]}{dt} = k[A][P] = k[A]([P]_0 + [A]_0 - [A]) \quad (\text{I.2.5})$$

Wygodne jest zdefiniowanie nowej zmiennej  $x$ , która opisuje przyrost stężenia produktu P w czasie:

$$x = [P] - [P]_0 = [A]_0 - [A] \quad (\text{I.2.6})$$

Wtedy  $dx/dt = -d[A]/dt$  i równanie kinetyczne przyjmuje postać:

$$\frac{dx}{dt} = k([A]_0 - x)([P]_0 + x) \quad (\text{I.2.7})$$

Rozwiązanie równania (I.2.7) ma postać:

$$\ln\left(\frac{[A]_0 - x}{[P]_0 + x}\right) = \ln\left(\frac{[A]_0}{[P]_0}\right) - k([A]_0 + [P]_0)t = \ln\left(\frac{[A]_0}{[P]_0}\right) - k't \quad (\text{I.2.8})$$

gdzie nowa stała  $k'$  jest iloczynem stałej szybkości reakcji  $k$  i sumy stałych (bo początkowych) stężeń substratu i produktu:

$$k' = k([A]_0 + [P]_0) \quad (\text{I.2.9})$$

Rozwiązanie (R8) można przekształcić do postaci  $x = f(t)$ :

$$x = \frac{[A]_0(1 - e^{-k't})}{\left(\frac{[A]_0}{[P]_0}\right)e^{-k't} + 1} \quad (\text{I.2.10})$$

Przebieg zależności  $x=f(t)$ , dla kilku początkowych stężeń produktu  $[P]_0$ , pokazuje Rys. I.2.3.

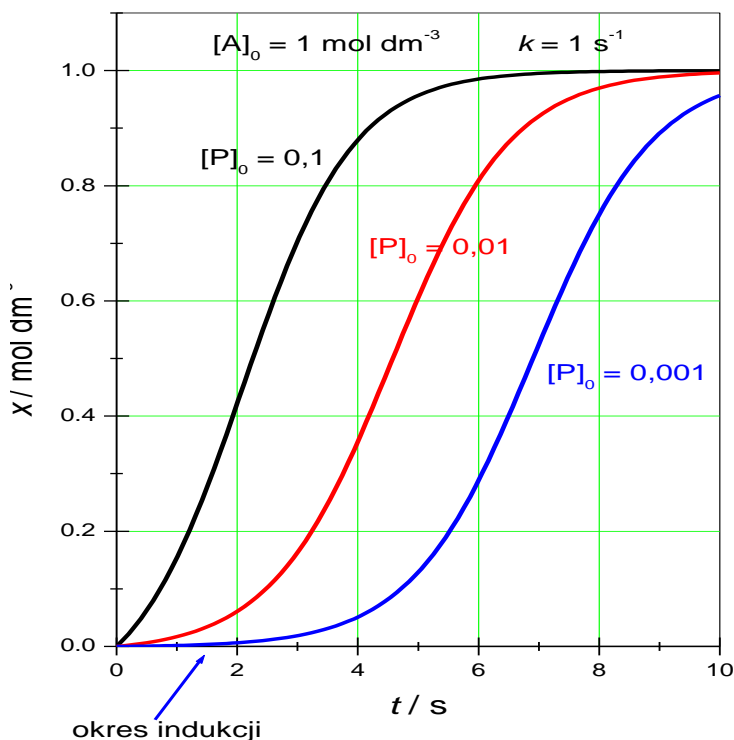
Z rysunku tego wynikają następujące podstawowe cechy przebiegu reakcji autokatalitycznej:

- wspomniane wcześniej gwałtowne przyspieszenie reakcji po upływie *czasu indukcji*, tym krótszego, im większe jest początkowe stężenie produktu:  $[P]_0$ .
- sigmoidalny kształt krzywej przyrostu stężenia produktu P w czasie.

Należy zwrócić uwagę, że pochodna  $dx/dt$  jest równa szybkości reakcji  $v$ :

$$v = \frac{dx}{dt} = \frac{d[P]}{dt} = -\frac{d[A]}{dt} \quad (\text{I.2.11})$$

Krzywe kinetyczne reakcji autokatalitycznej  $A \rightarrow P$   
 $x = [P] - [P]_0 = f(t)$



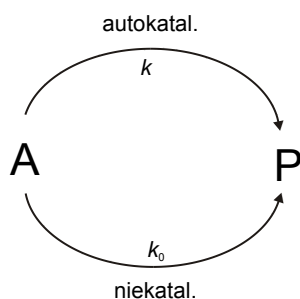
Rys. I.2.3. Krzywe tworzenia produktu w reakcji autokatalitycznej dla różnych początkowych stężeń produktu  $[P]_0$

Kształt zależności  $x=f(t)$  pokazuje zatem, że pochodna  $dx/dt$ , czyli szybkość reakcji autokatalitycznej rośnie z czasem od zera do wartości maksymalnej, odpowiadającej punktowi przegięcia sigmoidy, po czym spada do zera, gdy (asymptotycznie) ustali się stężenie  $x$ , ponieważ wyczerpał się substrat A. Taka zależność szybkości reakcji

autokatalitycznej od czasu jest zatem zupełnie inna niż analogiczna zależność dla reakcji „zwykłej”, charakteryzującej się monotonicznym spadkiem szybkości reakcji w czasie (z wyłączeniem niektórych specyficznych przypadków, takich jak reakcja zerowego rzędu, której szybkość pozostaje stała – równa stałej szybkości - aż do wyczerpania substratów).

Porównując analizowany tu mechanizm choćby z omawianą na początku reakcją utleniania kwasu szczawiowego z jonami  $\text{MnO}_4^-$  widzimy jednak, że taki model nie odpowiada dokładnie tej rzeczywistej sytuacji, ponieważ utlenianie kwasu przebiega równoległe, choć znacznie wolniej, na drodze nieautokatalitycznej. Pożyteczne więc jest rozważenie teraz modelowego mechanizmu bardziej odpowiadającego tej reakcji, a także wielu innym rzeczywistym procesom autokatalitycznym.

Mechanizm taki można przedstawić prostym schematem (Rys. I.2.4):



Rys. I.2.4. Schemat równoległej autokatalitycznej i nieautokatalitycznej przemiany substratu A w produkt P.

Odpowiadające mu równanie kinetyczne, uwzględniające równoległy przebieg reakcji autokatalitycznej – ze stałą szybkości  $k$  i nieautokatalitycznej - ze stałą szybkości  $k_0$ , ma postać:

$$-\frac{d[A]}{dt} = \frac{d[P]}{dt} = k[A][P] + k_0[A] \quad (\text{I.2.12})$$

Poszukamy rozwiązania, zakładając początkowe stężenie produktu  $[P]_0 = 0$ , skoro obecność P nie jest tym razem niezbędna dla rozpoczęcia reakcji. Definicja wielkości  $x$  jako przyrostu stężenia P w czasie upraszcza się zatem do postaci:

$$x = [A]_0 - [A] = [P] \quad (\text{I.2.13})$$

i wyrażone za jej pomocą równanie (I.2.12) ulega transformacji do równania:

$$\frac{dx}{dt} = k([A]_0 - x)x + k_0([A]_0 - x) = k([A]_0 - x) \left( \frac{k_0}{k} + x \right) \quad (\text{I.2.14})$$



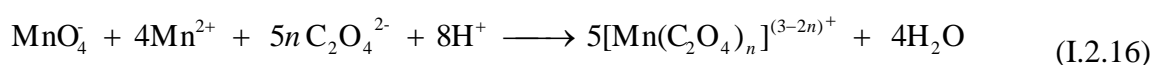
Dla wyciągnięcia stosownych wniosków wystarczające jest porównanie tego równania z równaniem (I.2.7), wyprowadzonym dla poprzednio rozważanego mechanizmu. Ogólne matematyczne formy tych równań są bowiem takie same:

$$\frac{dx}{dt} = k([A]_0 - x)x + k_0([A]_0 - x) = k([A]_0 - x)(\text{const} + x) \quad (\text{I.2.15})$$

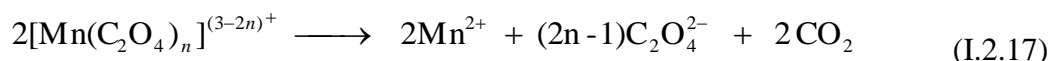
a zmianie uległ tylko sens fizyczny stałej const, poprzednio równej  $[P]_0$ , a teraz  $k_0/k$ . Zatem zależność  $x=f(t)$ , będąca rozwiązaniem (wynikiem całkowania) równania (I.2.14) będzie miała także sigmoidalną postać, jak na Rys. I.2.3, tyle że czas indukcji będzie zależny od stosunku stałych szybkości  $k_0/k$ . Logiczne jest, że im wyższa jest stała szybkości reakcji nieautokatalitycznej ( $k_0$ ), tym szybciej osiągnięte zostanie stężenie produktu P, pozwalające na widoczne przyspieszenie reakcji autokatalitycznej, a więc tym krótszy będzie czas indukcji.

Jeśli potrafimy mierzyć zmiany stężenia produktu P (lub substratu A) w czasie, to dopasowując (najlepiej nieliniową metodą najmniejszych kwadratów) teoretyczną zależność  $x(t)$  do eksperymentalnie wyznaczonego przebiegu  $x_{\text{eksper}}(t)$ , znajdujemy poszukiwane stałe kinetyczne:  $k, k_0, k'$  itd. jako parametry owego dopasowania.

Po tych teoretycznych rozważaniach powrócimy do rzeczywistej autokatalitycznej reakcji utleniania kwasu szczawiowego jonami  $\text{MnO}_4^-$ , aby przybliżyć jej mechanizm. Co prawda niektóre szczegóły tego mechanizmu pozostają jeszcze kwestią dyskusji, ale wydaje się bardzo prawdopodobne, że substancją szybciej niż  $\text{MnO}_4^-$  i bezpośrednio utleniającą kwas szczawiowy są jony  $\text{Mn}^{3+}$ . Do ich wytworzenia potrzebne są jednak jony  $\text{Mn}^{2+}$ . Dochodzi wtedy do reakcji dysproporcjonowania, np. według takiego (jednego z możliwych!) schematu:



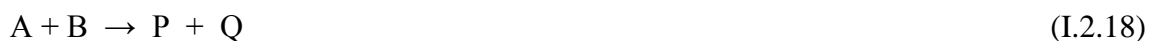
W obrębie powstałego związku kompleksowego jony  $\text{Mn}^{3+}$  utleniają aniony szczawianowe:



Ponieważ reakcja (I.2.17) przebiega wolniej niż (I.2.16), to ona kontroluje szybkość całego procesu. Podwojone równanie (I.2.16), dodanie do pomnożonego przez 5 równania (I.2.17) prowadzi do sumarycznego równania (I.2.1)

Oba wyżej rozważane teoretyczne modele reakcji autokatalitycznych nie odpowiadają jednak, jako zbyt proste, powyższemu mechanizmowi. Bardziej realistyczny będzie w tym przypadku poniższy schemat:

Reakcja sumaryczna:



Mechanizm autokatalizy:

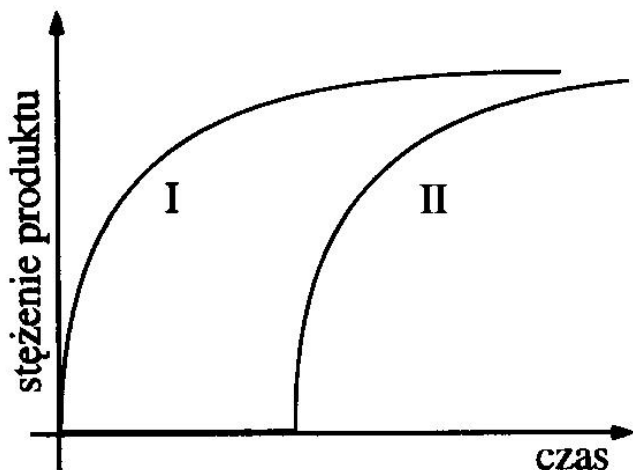


przy czym (pomijając współczynniki stechiometryczne i konkretne postacie reagentów): A jest analogiem  $\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4$ , B -  $\text{MnO}_4^-$ , P -  $\text{Mn}^{2+}$ , Q -  $\text{CO}_2$ , I -  $\text{Mn}^{3+}$ .

Dla innych reakcji możliwe są też inne szczegółowe schematy autoakatalizy.

### I.3. Reakcje zegarowe

Zgodnie z podanym na początku tego opracowania ogólnym opisem reakcji zegarowej, różnice w przebiegu stężenia produktu (-ów) takiej reakcji, w porównaniu z reakcją „zwykłą” dobrze oddaje Rys. I.3.1.



Rys. I.3.1. Porównanie zmian stężenia produktów w czasie dla reakcji zwykłej (I) i zegarowej (II).

Nie należy jednak sądzić, że typowe dla reakcji zegarowej, a nietypowe dla reakcji zwykłej opóźnienie w tworzeniu produktu musi koniecznie dowodzić niezwykle skomplikowanego mechanizmu. „Tajemnica” takich procesów może kryć się - w dużym stopniu - w odpowiednio dobranym zestawie reagentów. Załóżmy, że w pewnej, stosunkowo wolnej reakcji wydziela się wolny jod, np. w wyniku utleniania  $\text{I}^-$  za pomocą  $\text{S}_2\text{O}_8^{2-}$ :



Ponadto w roztworze powinna znajdować się skrobia oraz pewna ilość tiosiarczanu sodu, koniecznie jednak mniejsza niż ta, która byłaby potrzebna do zredukowania całej ilości jodu, zgodnie z równaniem:



Dla takiego układu stężeń reagentów tworzący się przez pewien czas elementarny jod jest usuwany w powyższej reakcji, ale ponieważ jonów tiosiarczanowych jest mniej niż podwojona całkowita ilość wydzielającego się jodu, w pewnym momencie cała ilość  $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$  ulega przereagowaniu i każda następna porcja jodu wywołuje powstanie niebieskiego zabarwienia ze skrobią (w obecności jonów  $\text{I}^-$ ). Barwa ta pojawia się gwałtownie, co wzmacnia efektowny charakter przebiegu reakcji zegarowej.

Odpowiadający takiemu wariantowi reakcji zegarowej przykładowy modelowy mechanizm można przedstawić w postaci uproszczonej sekwencji reakcji:

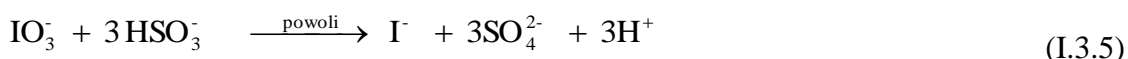


przy czym  $[\text{C}]_0 < [\text{P}]_\infty$ , gdzie indeks „ $\infty$ ” odnosi się do stężenia po „nieskończenie długim czasie”, a więc do końcowego stężenia P.

Analogiczny „zegarowy” przebieg, choć inny mechanizm, wykazuje reakcja wykorzystująca redukcję jonów  $\text{IO}_3^-$  do  $\text{I}_2$  i dalej do  $\text{I}^-$  za pomocą  $\text{HSO}_3^-$ . Reakcje redoks z udziałem jonów  $\text{IO}_3^-$  noszą nazwę reakcji Landolta. Niekiedy termin ten rozciąga się na reakcje redoks z udziałem innych połączeń jodu. Dla celów edukacyjnych reakcje Landolta są dziś często prowadzone w takich warunkach, aby ich przebieg nabrał efektownego, „zegarowego” charakteru lub miał też inny, nie mniej pasjonujący przebieg. Kinetyczna charakterystyka reakcji Landolta i przykłady jej nietypowego przebiegu zostaną opisane niżej.

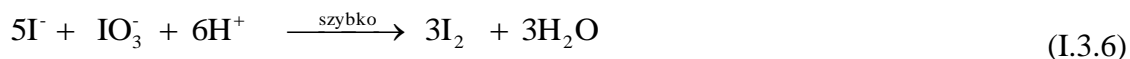
### **Klasyczna reakcja Landolta**

Klasyczna reakcja Landolta przebiega według równania:



Zgodnie z oznaczeniem nad strzałką, reakcja ta jest powolna, ale tylko początkowo, gdyż po upływie określonego czasu indukcji ulega ona autokatalitycznemu przyspieszeniu. Zgodnie z przedstawionymi wyżej wyjaśnieniami, jeśli reakcja ta ma przebiegać na sposób „zegarowy”, z gwałtowną eksplozją niebieskiej barwy początkowo bezbarwnego roztworu, w próbce musi znajdować się także skrobia, a początkowy układ stężeń substratów nie może być stechiometryczny, lecz odpowiadać relacji:  $[\text{IO}_3^-]_0 > 1/3 \times [\text{HSO}_3^-]_0$ . Zwróćmy uwagę, że układ ten nie wymaga dodania obcej substancji, takiej jak tiosiarczan sodu w poprzednim przykładzie. Sumaryczne równanie reakcji tego nie ujawnia, ale wydzielający się początkowo elementarny jod, który mógłby spowodować powstanie niebieskiego kompleksu  $\text{I}_3^-$  ze skrobią, jest dalej redukowany przez jony  $\text{HSO}_3^-$ , póki cały ich zapas nie zostanie zużyty.

Mechanizm reakcji Landolta przedstawia się następująco. Zgodnie z równaniem (I.3.5) w układzie powoli pojawiają się jony jodkowe  $I^-$ . To one powodują autokatalityczne przyspieszenie reakcji. Między powstającymi jonami  $I^-$  i substratami  $IO_3^-$  dochodzi bowiem do szybkiego oddziaływania, znanego jako reakcja Dushmana:

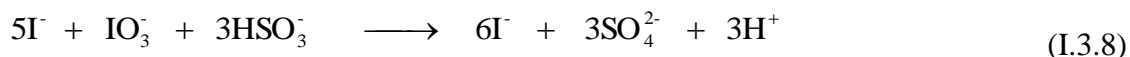


a powstający w tym procesie elementarny jod jest praktycznie natychmiast redukowany dalej przez  $HSO_3^-$  do jonów  $I^-$ :



W ten sposób przebieg reakcji Landolta ulega autokatalitycznemu przyspieszeniu, ponieważ jej produkt  $I^-$  otwiera inną, znacznie szybciej biegnącą, drogę reakcji. Oczywiście to właśnie niedomiar jonów  $HSO_3^-$  w stosunku do  $IO_3^-$  powoduje, że elementarny jod przestaje być w końcu zużywany w reakcji (I.3.7) i wywołuje niebieskie zabarwienie w kompleksie ze skrobią.

Autokatalityczny charakter tej reakcji można zilustrować jeszcze inaczej. Zauważmy, że sumaryczną reakcję (I.3.5) można przedstawić jako sumę reakcji Dushmana (I.3.6) i potrójonej reakcji (I.3.7). Celowo nie skracając występujących po obu stronach jonów  $I^-$ , otrzymujemy wtedy równanie o postaci:



Taki zapis reakcji, który, w odniesieniu do reguł stechiometrii, mógłby zostać uznany za „niedokończony” ze względu na pozostawienie po lewej stronie pozornie zbędnych jonów jodkowych, jest jednak istotny dla pokazania autokatalitycznego mechanizmu reakcji. Dowodzi on bowiem, że jony  $I^-$ , będące – w świetle równania (I.3.5) – produktami tej reakcji, są również jej substratami. W kinetyce chemicznej taki zapis równania reakcji jest więc istotnym źródłem informacji o jej mechanizmie.

Ten sposób zapisu reakcji autokatalitycznej pomaga również zrozumieć, dlaczego modelowo autokataliza bywa często wyrażana równaniem reakcji o uproszczonej, ale kluczowej dla tego typu mechanizmu postaci:

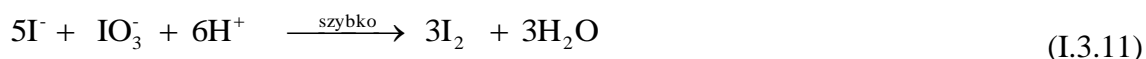


### **Reakcja Landolta z udziałem $IO_3^-$ i $AsO_3^{3-}$ jako źródło fal chemicznych**

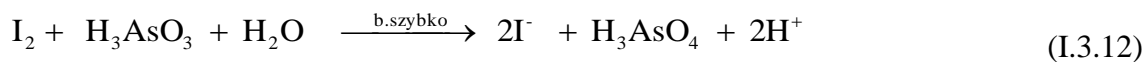
Zasadniczy mechanizm tej (także autokatalitycznej) reakcji jest analogiczny do przedstawionego wyżej. Sumaryczne równanie reakcji przedstawia się następująco:



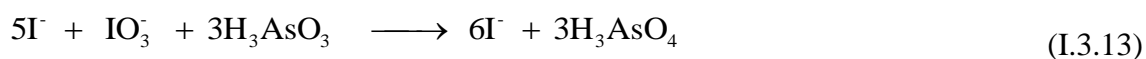
a w jej mechanizmie rozróżnia się, jak poprzednio, reakcję Dushmana:



oraz reakcję analogiczną do (I.3.7), którą w tym przypadku określa się jako reakcję Roebucka:

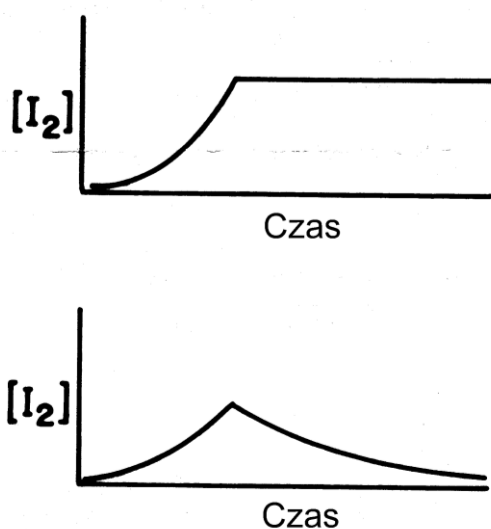


Cząsteczkowy zapis  $\text{H}_3\text{AsO}_3$  i  $\text{H}_3\text{AsO}_4$ , w przeciwieństwie do zapisu jonowego dla analogicznych połączeń z siarką w poprzednio dyskutowanym wariacie reakcji Landolta, symbolicznie odzwierciedla różnice w kwasowości odpowiadających sobie związków. Analogicznie jak dla klasycznej reakcji Landolta, równanie reakcji Dushmana, dodane do potrojonego równania reakcji Roebucka, prowadzi do równania ujawniającego autokatalityczne działanie jonów  $\text{I}^-$ :



Oczywiście omawiana tu zmodyfikowana reakcja Landolta, w przypadku niedomiaru  $\text{H}_3\text{AsO}_3$  w stosunku do  $\text{IO}_3^-$ , może w obecności skrobi jako wskaźnika, ujawnić również swój zegarowy charakter. Wykazano jednak, że – w zależności od początkowego stosunku stężeń substratów, może ona również prowadzić – w niemieszonym roztworze - do powstawania dwóch typów barwnych stref, poruszających się wzdłuż reaktora. Zjawiska takie należą do grupy fal chemicznych.

Dla zrozumienia warunków tworzenia się poszczególnych typów fal chemicznych w omawianej tu reakcji warto najpierw zapoznać się ze schematycznym przebiegiem tej reakcji w jednorodnym, mieszanym układzie, w zależności od początkowego stosunku stężeń substratów (Rys. I.3.2).

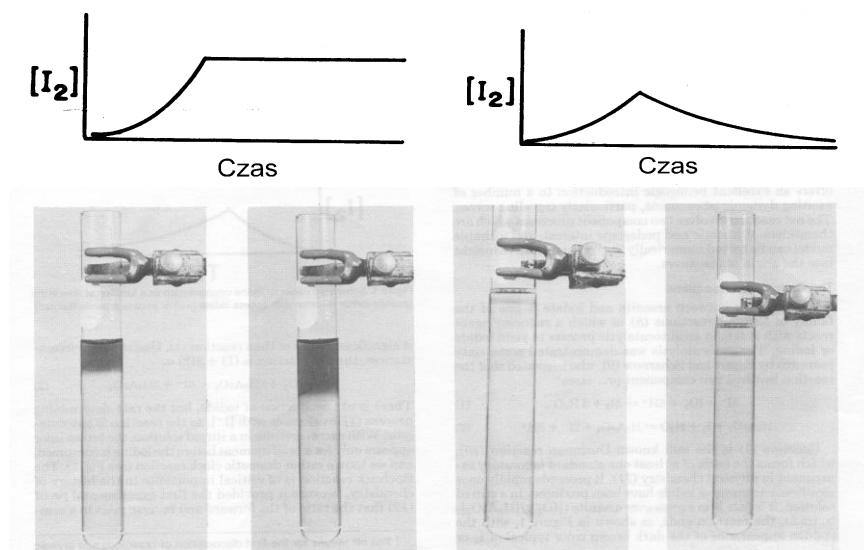


Rys. I.3.2. Schemat zmian stężenia  $I_2$  w reakcji  $IO_3^- + H_3AsO_3$ , w zależności od stosunku stężeń substratów: w przypadku nadmiaru jodanu(V) (u góry) i w przypadku nadmiaru arsenianu(III) (u dołu).

W przypadku nadmiaru jodanu(V) w stosunku do arsenianu(III) oczywistą konsekwencją jest ostateczne nagromadzenie się w układzie elementarnego jodu, do dalszej redukcji którego nie wystarczyło już arsenianu(III). W przypadku nadmiaru arsenianu(III) jod co prawda nie może pozostać w stanie końcowym układu, ale – jak widać z dolnego rysunku - przejściowo może się w układzie pojawić. Zjawisko takie jest jednak możliwe tylko pod warunkiem, że szybkości tworzenia i destrukcji jodu nie równoważą się, lecz przez pewien czas szybkość powstawania jodu w reakcji Dushmana jest nieco większa niż szybkość jego destrukcji w reakcji Roebucka. Reakcja Dushmana, początkowo powolna, ulega autokatalitycznemu przyspieszeniu. Z czasem jednak zaczyna brakować jonów  $IO_3^-$ , reakcja Dushmana ulega więc spowolnieniu, a powstający jod jest bardzo szybko usuwany w reakcji Roebucka.

Zaobserwowanie odpowiadających powyższym przebiegom fal chemicznych wymaga umieszczenia reagentów tej reakcji w pionowo ustawionej probówce. Należy dobrać odpowiedni skład początkowy roztworu – stężenia głównych substratów, skrobi, a także pH (kontrolowane przez odpowiedni bufor  $HSO_4^-/SO_4^{2-}$ ). Ważny jest kontakt górnej powierzchni roztworu z powietrzem (tlenem), a także jej oświetlenie. Reakcje są bowiem inicjowane na powierzchni roztworu najprawdopodobniej dzięki fotochemicznemu utlenianiu jonów  $I^-$  do elementarnego jodu, co – w świetle schematu reakcji Roebucka – uruchamia autokatalityczne

przyspieszenie reakcji. Możliwe warianty rozwoju fal chemicznych w tym układzie i ich korelacje z wcześniejszymi wykresami zmian stężeń jodu w czasie ilustruje rysunek I.3.3.



Rys. I.3.3. Fale chemiczne w reakcji Landolta: po lewej - w przypadku nadmiaru jodanu(V) - barwna strefa kompleksu jodu ze skrobią ogarnia stopniowo cały roztwór, po prawej - w przypadku nadmiaru arsenianu(III), wąska barwna obręcz przesuwa się w dół probówki.

Należy podkreślić, że opisywane tu fale chemiczne są zjawiskami nierównowagowymi, uporządkowaniami powstającymi zatem tylko w warunkach dyssypacji (rozpraszania) energii. W tym sensie stanowią one przykład wspomnianych na początku tzw. czasowo-przestrzennych struktur dyssypatywnych, dla których stan układu zmienia się nie tylko w funkcji czasu, ale także w funkcji współrzędnych przestrzennych.

### Inne reakcje zegarowe

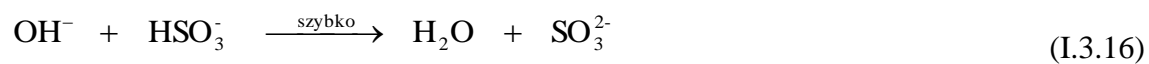
Zegarowy przebieg reakcji można zaobserwować także dla utleniania jonów  $I^-$  do jodu za pomocą  $H_2O_2$ , z dodatkiem skrobi i  $Na_2S_2O_3$ , opóźniającego powstawanie niebieskiej barwy roztworu. Zasadniczy proces nosi nazwę reakcji Harcourta:



Innym przykładem jest reakcja formaldehydowa, przebiegająca między aldehydem mrówkowym i składnikami buforu siarczanowego(IV): siarczanem(IV) i wodorosiarczanem(IV) sodu, w obecności odpowiednika wskaźnika pH, np. fenoloftaleiny lub tymoloftaleiny. Początkowo roztwór jest bezbarwny. W wyniku powoli przebiegającej reakcji:



uwalniane są jony wodorotlenowe, które jednak nie od razu wywołują zmianę barwy wskaźnika, ponieważ – dzięki buforującemu działaniu środowiska - szybko ulegają reakcji z  $\text{HSO}_3^-$ :



Dla odpowiednio dobranych proporcji stężeń reagentów dochodzi jednak do sytuacji, gdy pojemność buforu się kończy i wtedy pH gwałtownie wzrasta, wywołując - np. w obecności tymoloftaleiny – gwałtowne pojawienie się błękitnej barwy roztworu.



## II. Kinetyka reakcji enzymatycznych

Za kontrolę nad prawie wszystkimi procesami biochemicznymi – od szlaków metabolicznych po translację i transkrypcję materiału genetycznego - odpowiadają wyspecjalizowane biokatalizatory zwane enzymami. Choć pod względem chemicznym przytłaczająca większość enzymów to białka, należy podkreślić, że specyficzne własności katalityczne może mieć również kwas rybonukleinowy (RNA). Natomiast w przypadku konwencjonalnych „białkowych” enzymów bardzo często ich aktywne „centrum” katalityczne wykorzystuje niebiałkową cząsteczkę (tzw. grupę prostetyczną) związaną kowalencyjnie bądź topologicznie z częścią białkową (apoenzymem). Kompletna, aktywna katalitycznie cząsteczka białka to tzw. „holoenzym”. Dzięki badaniom dyfrakcyjnym i, w mniejszym stopniu zastosowaniu NMR, możliwe było poznanie dokładnych struktur 3D wielu enzymów. Analizując te struktury (np. zdeponowane w Protein Data Bank <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>) uderza nas dysproporcja między masywną cząsteczką białka (nawet małe enzymy, jak np. rybonukleaza A, z reguły mają masę cząsteczkową wyższą od 10 000 daltonów, co odpowiada ok. 100 resztom aminokwasowym), a małym centrum aktywnym. Czy mamy tu do czynienia z marnotrawieniem białka i kodującego go materiału genetycznego? Czy enzymy mogłyby być mniejsze? Do czego potrzebna jest białkowa „koperta” wokół centrum katalitycznego enzymu? Łatwiej będzie nam odpowiedzieć na te pytania, gdy uświadomimy sobie, co się dzieje w centrum aktywnym w trakcie katalizowanej przez enzym reakcji.

W klasycznej teorii katalizy enzymatycznej rozważa się hipotetyczną reakcję przemiany substratu  $S$  w produkt  $P$ :



Założmy, że  $\Delta G_{S \rightarrow P} < 0$  i jedynym powodem, dla którego reakcja nie zachodzi spontanicznie z obserwowalną szybkością jest znaczna bariera energetyczna tworzenia się stanu przejściowego  $I$  z substratu  $S$ . Stan  $I$  może reprezentować pewną wysokoenergetyczną konformację substratu  $S$ , która zdolna jest do dalszej spontanicznej przemiany w produkt  $P$ , albo z powrotem w substrat  $S$ . Otóż w tak zdefiniowanej sytuacji katalityczną aktywność enzymu  $E$  można tłumaczyć jego powinowactwem wobec stanu  $I$ , faworyzowanym termodynamicznie powstawaniem kompleksu  $EI$  i efektywnym obniżeniem bariery energetycznej pomiędzy  $S$  i  $P$  (Rys. II.1.1):



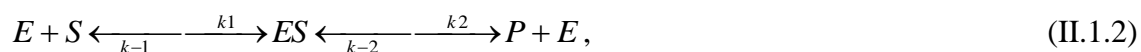
enzym-substrat, dla czego warunkiem *sine qua non* jest oczywiście ich ściśle dopasowanie topologiczne i chemiczne. Zatem miejsce aktywne enzymu musi być „komplementarne” pod względem kształtu i oddziaływań międzymolekularnych (wiązań wodorowych, oddziaływań elektrostatycznych, dyspersyjnych, etc.) wobec stanu  $I$ . Osiągnięcie tego celu często wiąże się z koniecznością usunięcia konkurenta w tworzeniu wiązań wodorowych pomiędzy substratem a enzymem, jakim jest woda, albo potrzebą zapewnienia lokalnie niskiej przenikalności dielektrycznej, przez co rośnie siła oddziaływań kulombowskich. To tylko niektóre z powodów, dla których centra aktywne enzymów muszą mieć często niepolarny charakter. Wracając do wcześniej postawionych pytań dotyczących celowości dysproporcji między cząsteczką enzymu a jego centrum aktywnym: bardzo często jest ona po prostu koniecznością konstrukcyjną dla stworzenia odpowiedniego środowiska w miejscu aktywnym enzymu i stelażu dla stabilnego wiązania stanu  $I$ . Oczywiście można sobie wyobrazić wiele konkurencyjnych przemian  $S$  do różnych produktów  $P_1, P_2, ..P_N$ , którym odpowiadałyby różne stadia pośrednie  $I_1, I_2, ..I_N$ . Specyficzne powinowactwo, czy też „dopasowanie” enzymu  $E$  do jednego z tych stanów tłumaczy katalizowanie jednej zdefiniowanej reakcji prowadzącej do powstania określonego produktu. Inne, nie spokrewnione strukturalnie i genetycznie enzymy z centrami aktywnymi komplementarnymi wobec innych stanów  $I_i$  będą katalizować alternatywne reakcje chemiczne.

Fakt, iż kataliza enzymatyczna jest możliwa tylko dzięki przejściowemu formowaniu się kompleksu enzym-substrat ma swoje określone implikacje dla kinetyki tego typu reakcji.

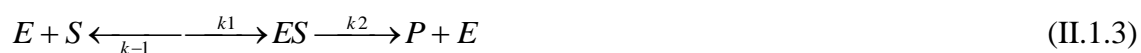
Rozważmy jeszcze raz reakcję



katalizowaną przez enzym  $E$ , przechodzącą przez niskoenergetyczny kompleks  $EI$ , który dla uproszczenia oznaczymy jako  $ES$ .



gdzie  $k_1$  i  $k_{-1}$  są odpowiednio stałymi szybkości tworzenia kompleksu  $ES$  i jego rozpadu na substraty, a  $k_2$  i  $k_{-2}$  są stałymi szybkości rozpadu  $ES$  na produkty, bądź ich „re-asocjacji” i odtworzenia  $ES$ . Kiedy ten ostatni proces jest zaniedbywalny (co jest uprawnionym założeniem dla reakcji enzymatycznych z równowagą znacznie przesuniętą w stronę produktów), powyższy schemat kinetyczny upraszcza się do:



W warunkach stanu stacjonarnego  $[ES]$  jest stałe, a szybkość jego powstawania jest równa sumarycznej szybkości rozpadu  $ES$  do  $P$ , bądź do  $S$ :

$$k_1[E] \cdot [S] = k_{-1}[ES] + k_2[ES] \quad (\text{II.1.4})$$

a zatem:

$$[E] \cdot [S] / [ES] = (k_{-1} + k_2) / k_1 \quad (\text{II.1.5})$$

lewa strona równania definiuje człon  $(k_{-1} + k_2) / k_1$  jako pewną stałą. Wielkość ta oznaczana jako  $K_M$  jest nazywana stałą Michaelisa.

$$[E] \cdot [S] / [ES] = K_M \quad (\text{II.1.6})$$

Typowej katalizie enzymatycznej odpowiada znaczny molowy nadmiar substratu nad enzymem, a stężenie substratu w danej chwili jest praktycznie równe jego stężeniu początkowemu pomniejszonemu o „wytworzone” stężenie produktu  $[P]$ . W tej skali ilość  $S$  w kompleksie  $ES$  jest zanedbywalnie niewielka. Z drugiej strony ilość enzymu związanego w kompleks z substratem nie jest zanedbywalną częścią całkowitego stężenia enzymu  $[E]_T$ . Bezpiecznie jest więc zapisać:

$$[E] + [ES] = [E]_T \quad (\text{II.1.7})$$

a więc:

$$K_M = ([E]_T - [ES]) \cdot [S] / [ES] \quad (\text{II.1.8})$$

stąd wyrażone  $[ES]$ :

$$[ES] = [E]_T \cdot [S] / ([S] + K_M) \quad (\text{II.1.9})$$

ponieważ efektywna szybkość reakcji enzymatycznej, czyli szybkość powstawania produktu  $P$  jest określona jako:

$$V = k_2 \cdot [ES] \quad (\text{II.1.10})$$

to

$$V = k_2 \cdot [E]_T \cdot [S] / ([S] + K_M) \quad (\text{II.1.11})$$

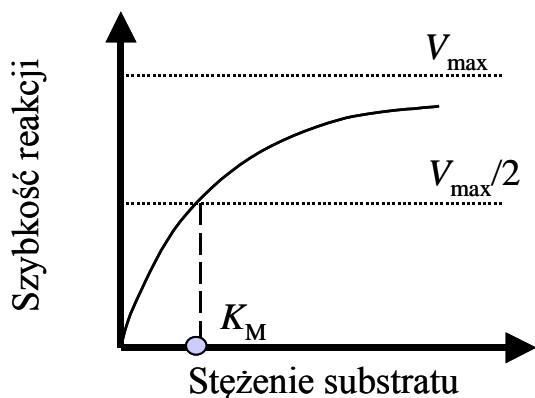
Najwyższa możliwa szybkość reakcji podyktowana tym równaniem to

$$V_{max} = k_2 \cdot [E]_T \quad (\text{II.1.12})$$

dla  $[S] \rightarrow \infty$ . Ostatecznie:

$$V = V_{max} \cdot [S] / ([S] + K_M) \quad (\text{II.1.13})$$

Ponieważ jednostką stałej Michaelisa jest  $[\text{mol}/\text{dm}^3]$ , z równania tego wynika wprost jej dodatkowa, kinetyczna interpretacja:  $K_M$  odpowiada stężeniu substratu, przy którym szybkość reakcji enzymatycznej jest równa połowie szybkości maksymalnej. (Rys. II.1.2)



Rys. II.1.2. Typowy „hiperboliczny” przebieg kinetyczny reakcji enzymatycznej i najprostsza interpretacja stałej  $K_M$ .

To, oczywiście jest równoważne wypełnieniu połowy miejsc aktywnych enzymu i  $[ES]=[E]_T/2$ . Eksperymentalnie zmierzone  $K_M$  enzymów wahają się pomiędzy  $10^{-1}$ , a  $10^{-7}$  [mol/dm<sup>3</sup>] i zależą od wszelkich czynników determinujących względną stabilność termodynamiczną kompleksu  $ES$  i samego enzymu: temperatury, ciśnienia, pH, siły jonowej (w mniejszym stopniu), obecności czynników denaturujących itd. Z równania:

$$K_M = (k_{-1} + k_2)/k_1 = [E] \cdot [S]/[ES] \quad (\text{II.1.14})$$

wynika, że dla  $k_2 \ll k_{-1}$   $K_M$  wyraża wprost stałą dysocjacji kompleksu enzym substrat i przez to energię wiązania  $ES$ . Drastyczna destabilizacja białka, np. za sprawą mutacji punktowej, często prowadzi do radykalnej dysfunkcji katalitycznej, wyrażającej się spadkiem energii wiązania enzymu z substratem i wzrostem wartości  $K_M$ .  $K_M$  w zgrubny sposób określa górny pułap stężeń substratu efektywnie konwertowanych przez enzym. Co ciekawe, ta cecha wydaje się być ‘zaprogramowana’ genetycznie i pozostaje w zgodzie z zakresem stężeń substratu ‘oczekiwanych’ przez dany enzym w miejscu jego fizjologicznej funkcji. Ta empiryczna prawidłowość pozwala na odgadywanie zakresu stężeń substratów reakcji enzymatycznych *in vivo* w oparciu o wartości  $K_M$  wyznaczone *in vitro*. Dodatkowym, praktycznym parametrem pozwalającym na ilościowy opis aktywności enzymu jest tzw. „liczba obrotów” (ang. *turnover number*) zdefiniowana jako:

$$k_{cat} = V_{max} / [E]_T \quad (\text{II.1.15})$$

a określająca maksymalną liczbę cząsteczek substratu przetworzonych w produkt przez jedną cząsteczkę enzymu w jednostce czasu. Dla bardzo efektywnych enzymów i w optymalnych warunkach biochemicznych liczba obrotów może dochodzić do setek tysięcy na sekundę!

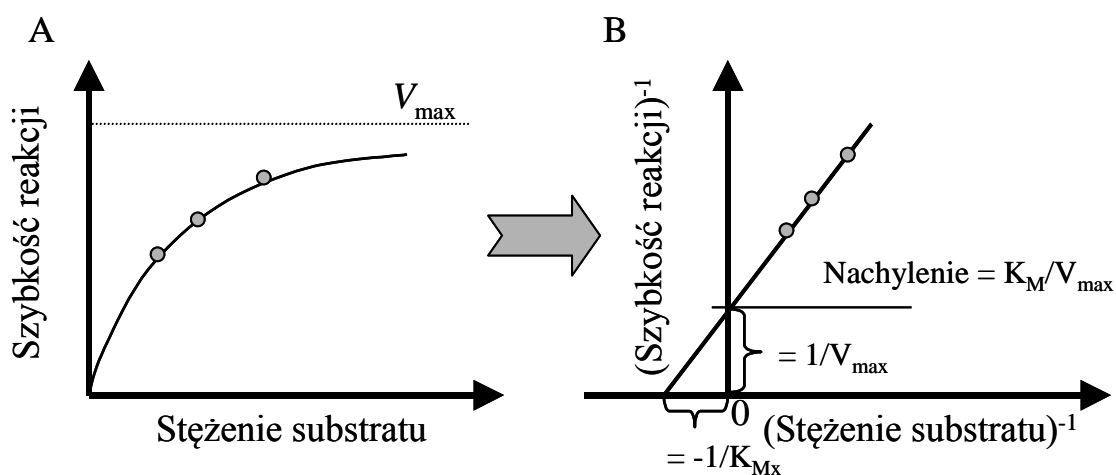
Punktem wyjścia dla eksperymentalnego wyznaczania wartości  $K_M$  i  $V_{max}$  jest przetworzenie równania:

$$V = V_{max} \cdot [S] / ([S] + K_M) \quad (\text{II.1.16})$$

do postaci:

$$1/V = 1/V_{max} + K_M/V_{max} \cdot 1/[S] \quad (\text{II.1.17})$$

co pozwala na wykreślenie danych eksperymentalnych: zależności szybkości reakcji enzymatycznej dla kilku różnych stężeń substratu przy ustalonym stężeniu enzymu i niezmiennych parametrach fizykochemicznych reakcji w postaci linii prostej – tzw. *Lineweaver-Burk double-reciprocal plot*. Ekstrapolacja do  $1/[S] = 0$  ( $[S] \rightarrow \infty$ ) i  $1/V = 0$  pozwala na odczytanie wartości ‘ $1/V_{max}$ ’ i ‘ $-1/K_M$ ’ odpowiednio z osi rzędnych i odciętych. Nachylenie linii prostej jest równe  $K_M/V_{max}$ . Przetworzenie danych kinetycznych z wykresu konwencjonalnego (A) na wykres *Lineweaver-Burka* (B) jest zilustrowane na Rys. II.1.3.:

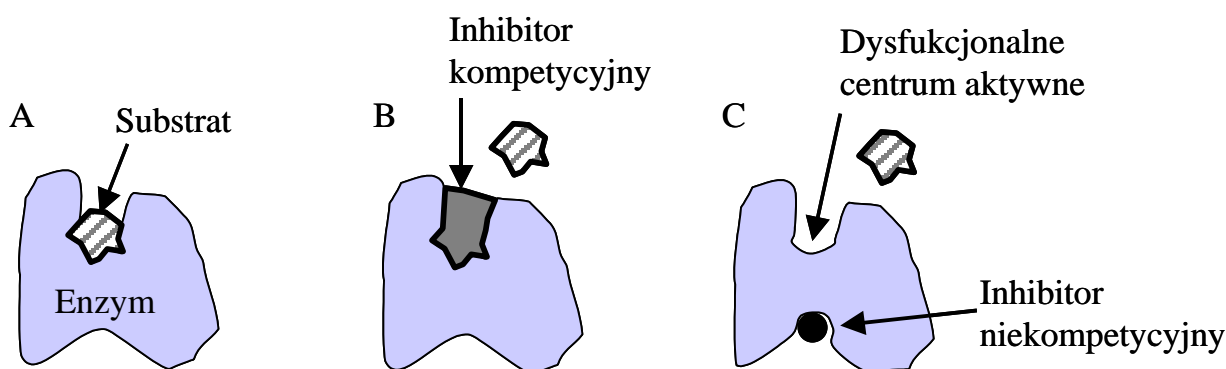


Rys. II.1.3. Linearyzacja konwencjonalnego wykresu zależności szybkości reakcji enzymatycznej od stężenia substratu metodą Lineweavera-Burka pozwala na łatwe wyznaczenie parametrów  $K_M$ ,  $V_{max}$ .

Należy podkreślić, że powyższe rozważania kinetyczne – tzw. model Michaelisa-Menten nie mają zastosowania do klasy tzw. enzymów allosterycznych, w których jedna molekula białka ma wiele miejsc aktywnych, a przyłączenie jednej cząsteczki substratu zmienia energię oddziaływania enzymu z każdą kolejną jego cząsteczką.

Podstawowym zagadnieniem w enzymologii jest regulacja aktywności enzymów. Aktywność enzymów jest kontrolowana na bardzo wiele sposobów – począwszy od oczywistej kontroli ekspresji samego białka, po fundamentalne mechanizmy biochemiczne, w których bardzo często muszą brać udział mniejsze cząsteczki – tzw. kofaktory, np. kwas adenozynotrójfosforowy, ATP, którego egzoenergetyczna dysocjacja po sprzężeniu z właściwym procesem katalitycznym staje często termodynamiczną siłą napędową reakcji

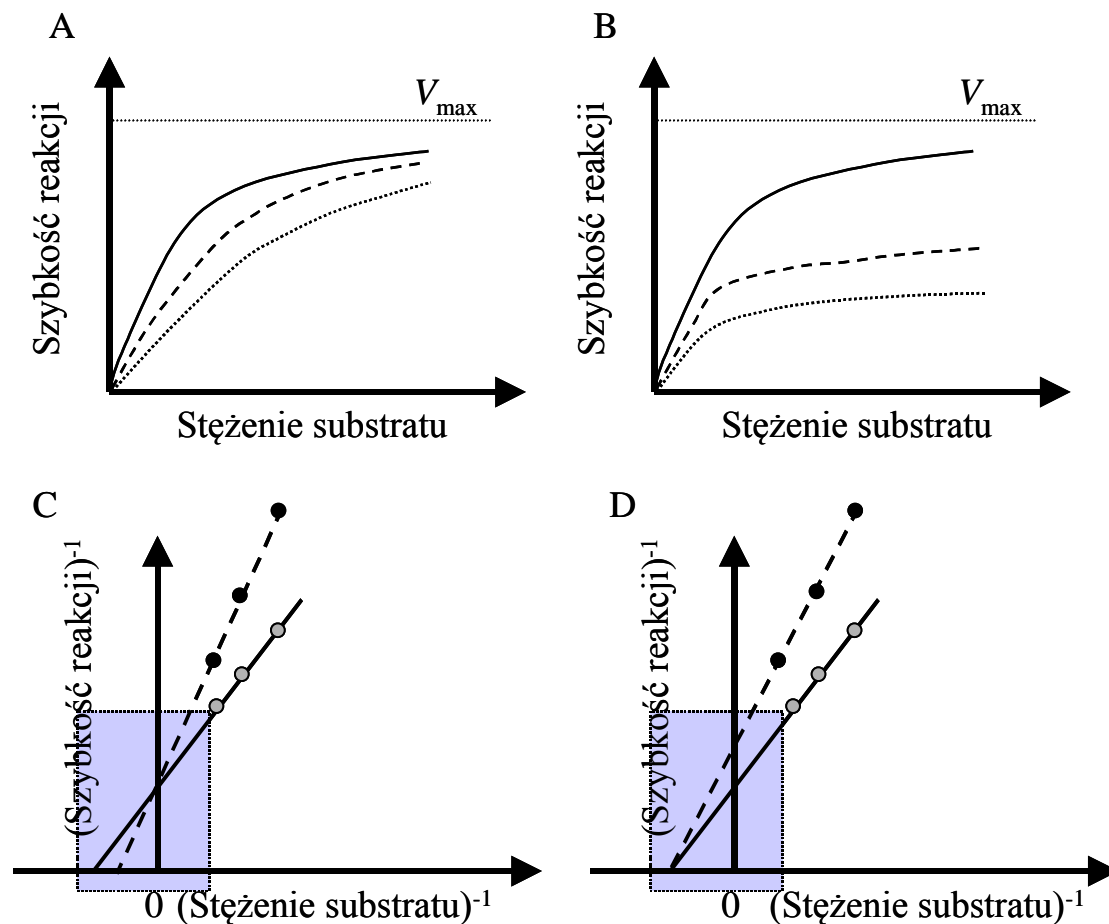
enzymatycznych. Specyficznym rodzajem regulacji jest inhibicja – czyli spowolnienie bądź nieodwracalne wyłączenie pracy enzymu. Badania nad inhibicją enzymów pozwalają z jednej strony zrozumieć mechanizmy ich działania i relację pomiędzy ich stabilnością, dynamiką na funkcją biologiczną. Z drugiej zaś strony selektywna inhibicja *in vivo* enzymów bakteryjnych, wirusowych czy też związanych z transformacją nowotworową jest wciąż podstawową strategią farmakologiczną w medycynie. Skuteczność wielu antybiotyków np. penicyliny wynika wprost z ich silnych i selektywnych właściwości jako inhibitorów enzymów niezbędnych do życia i rozmnażania się drobnoustrojów chorobotwórczych. Ze względu na mechanizm procesu inhibicji można wyróżnić dwa podstawowe jej rodzaje: inhibicję kompetycyjną (współzawodniczą) i niekompetycyjną.



Rys. II.1.4. Swobodny dostęp substratu do miejsca aktywnego enzymu (A) może być utrudniony poprzez pojawienie się konkurencji w postaci inhibitora kompetycyjnego (B). Inhibitor niekompetycyjny, z kolei, przyłączając się z dala od centrum aktywnego destabilizuje cząsteczkę białka, bądź jedynie wyłącza jej funkcję katalityczną

Jak pokazuje Rys. II.1.4, inhibitor kompetycyjny jest – podobnie jak substrat – komplementarny pod względem strukturalnym i chemicznym do miejsca aktywnego enzymu (Ryc. II.1.4. A i B), przez co wiąże się z nim wypierając właściwy substrat. Inhibitor taki nie staje się jednak sam substratem dla enzymu i jego przyłączenie nie prowadzi do alternatywnej reakcji enzymatycznej. Wiązanie inhibitora kompetycyjnego może mieć charakter kowalencyjny – w takich przypadkach jest nieodwracalne. Jeżeli jednak oddziaływanie inhibitora kompetycyjny-enzym mają charakter niekowalencyjny (np. oddziaływanie elektrostatyczne, dyspersyjne), to powstający kompleks można efektywnie rozbić zwiększając stężenie właściwego substratu. Tak więc typową cechą odwracalnych inhibitorów kompetycyjnych jest to, że ich wpływ na kinetykę reakcji enzymatycznej zanika

w miarę zwiększania stężenia substratu. Ta prawidłowość nigdy nie jest obserwowana w przypadku drugiego typu inhibitorów enzymatycznych – działających według niekompetycyjnego mechanizmu (Rys. II.1.4.C). Molekuły należące do tej grupy nie muszą wykazywać jakiegokolwiek podobieństwa chemicznego do substratów, mają za to zdolność do bardzo silnego, najczęściej nieodwracalnego łączenia się z enzymem daleko od jego miejsca aktywnego. Połączenie takie jest z reguły znacznie mniej specyficzne od inhibicji kompetycyjnej i często sprowadza się do powstania silnego wiązania kowalencyjnego z jakąś reaktywną grupą chemiczną reszty aminokwasowej (np. grupy tiolowej cysteiny). Konsekwencje tego faktu są takie iż, pewne inhibitory np. jony metali ciężkich reaktywne wobec reszt bocznych cysteiny, inhibują bardzo szerokie spektrum enzymów, co z jednej strony tłumaczy ich toksyczne właściwości – z drugiej zaś – ze względu na niespecyficzność ich działania – wyklucza zastosowania farmakologiczne.



Rys. II.1.5. Różne mechanizmy molekularne inhibicji enzymów mają swoje implikacje kinetyczne, co pozwala na odróżnienie inhibicji kompetycyjnej (A, C) od niekompetycyjnej (B, D) zarówno używając klasycznych wykresów kinetycznych (A, B) jak i wykresów Lineweavera-Burka (C, D)



Dokowaniu inhibitora niekompetycyjnego na powierzchni enzymu musi towarzyszyć pewna daleko-zasięgowa przemiana strukturalna (np. „naprężenie” łańcuchów białkowych okalających centrum aktywne) enzymu, która blokuje jego funkcję katalityczną.

Jakkolwiek molekularne scenariusze inhibicji enzymatycznej mogą mieć bardzo skomplikowany, „mieszany” przebieg, te dwa opisane graniczne przypadki są łatwo – przynajmniej w wyidealizowanych układach modelowych – odróżnialne kinetycznie.

Jak już wcześniej wspomniano, wysokie stężenie prawidłowego substratu jest w stanie wypłukać odwracalny inhibitor kompetycyjny, przez co  $V_{max}$  nie ulega zmianie, zmienia się natomiast  $K_M$ . Odwrotnie jest w przypadku nieodwracalnej inhibicji niekompetycyjnej. Inhibitor trwale eliminuje część molekuł enzymu zmniejszając jego efektywne stężenie. Nieinhibowane molekuly zachowują się normalnie, ale rosnące stężenie substratu nie jest w stanie reaktywować enzymu inhibowanego. Zmienia się  $V_{max}$ , ale stała Michaelisa ( $K_M$ ) pozostaje bez zmian. Obserwacje te są przedstawione na rysunku (Rys. II.1.5), gdzie obok konwencjonalnych wykresów zależności szybkości reakcji od stężenia substratów (Rys. II.1.5, A i B) przedstawione są odpowiadające im wykresy liniowe Lineweaver-Burka (Rys. II.1.5, C, D). Rysunek uwzględnia przypadki inhibicji kompetycyjnej (Rys. II.1.5, A, C), oraz niekompetycyjnej (Rys. II.1.5, B i D). Czarną, nieprzerywaną linią zaznaczono przebieg eksperymentu przeprowadzonego pod nieobecność inhibitora, podczas gdy linie przerywane i kropkowane oznaczają dwa przypadki coraz wyższych stężeń inhibitora.

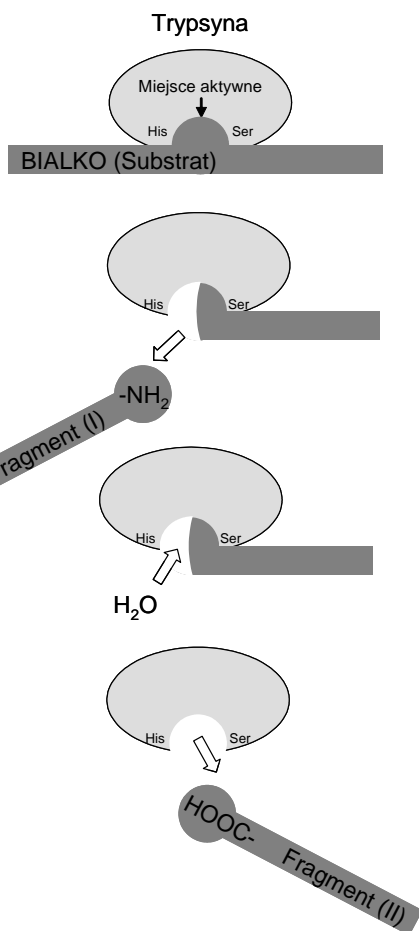
Badając zjawiska inhibicji enzymów należy przede wszystkim brać pod uwagę białkową naturę enzymów i ich marginalną – jako białek właśnie – stabilność termodynamiczną. To sprawia, że enzymy mogą być dezaktywowane – z różnym stopniem odwracalności – poprzez zmianę parametrów fizykochemicznych takich jak temperatura, ciśnienie, pH, etc. Dla każdego enzymu istnieje pewien zestaw optymalnych wartości tych parametrów, dla których katalizowana reakcja przebiega najszybciej. Paradoksalnie, to optimum katalityczne enzymu nie musi się pokrywać z optimum jego stabilności termodynamicznej (ale, oczywiście nie może też być odeń zbyt daleko). Ta dość nieintuicyjna obserwacja może wynikać np. z dostępności pewnych kofaktorów czy reagentów wyłącznie w warunkach częściowo destabilizujących enzym jako białko – np. optimum pH dla pepsyny jest rzędu 1,5-1,6! Inny powód to potrzeba uelastycznienia konformacji białka do wypełnienia jego katalitycznej funkcji, uelastycznienia możliwego w wyniku ograniczonej i lokalnej destabilizacji struktur III-rzędowych. Ta marginalna stabilność enzymów niejednokrotnie jest powodem wystąpienia nieliniowych zachowań w kinetyce enzymatycznej związanych np. z inhibicją substratem, bądź powstającym produktem, albo z sytuacją, w której produkt reakcji

enzymatycznej zmienia parametry fizykochemiczne środowiska pracy enzymu (np. pH) i przez to wywołuje zmiany jego zachowania jako biokatalizatora. Choć z punktu widzenia fizykochemicznego zjawiska te wyłącznie komplikują ilościowy opis kinetyczny i termodynamiczny prowadząc do efektów autoinhibicyjnych bądź autokatalitycznych, z punktu widzenia biochemii i biofizyki stanowią fascynującą ilustrację możliwości najprostszej regulacji fizjologicznej na poziomie molekularnym.

Trypsyna (EC 3.4.21.4) jest enzymem proteolitycznym z grupy endopeptydaz serynowych (w funkcji miejsca aktywnego enzymu kluczową rolę odgrywa reszta seryny). Prekursorem (zymogenem) trypsyny jest trypsynogen – białko wydzielane przez trzustkę do soku żołądkowego, które pod wpływem częściowego enzymatycznego nadtrawienia odszczepia terminalny, 6-aminokwasowy fragment peptydowy przekształcając się w aktywną formę - trypsynę. Miejsce trawienia trypsynogenu na drodze jego przekształcenia się w trypsynę jest rozpoznawane przez m.in. przez enterokinazę, ale, co ciekawe, również przez

samą trypsynę, dzięki czemu konwersja trypsynogenu do formy aktywnej enzymatycznie ma charakter autokatalityczny. Trypsyna jest endopeptydazą – zamiast odszczepiać kolejne aminokwasy od swobodnego końca łańcucha peptydowego, przecina taki łańcuch ‘w środku’.

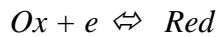
Trypsyna ma w swoim miejscu aktywnym – obok reszty seryny – naładowaną ujemnie resztę kwasu asparaginowego, co decyduje o jej specyficzności substratowej: hydrolizowane przez enzym są wiązania peptydowe obok dodatkowo naładowanych aminokwasów – lizyny i argininy (o ile nie sąsiadują w sekwencji z wprowadzającą zawadę steryczną proliną). W przeciwieństwie do pepsyny, optimum pH tego enzymu leży blisko pH neutralnego, tj. w obszarze, w którym zarówno reszty kwasu asparaginowego jak i lizyny (argininy) są naładowane.



Tworzenie przez trypsynę i trawione białko (peptyd) kompleksu ES zachodzi według tzw. mechanizmu typu ‘ping-pong’, typowego dla peptydaz serynowych, w którym pomiędzy sekwencyjnie zachodzącymi: (a) odłączeniem się produktu-I (fragment łańcucha z nowym N-końcem), i (b) odłączeniem się produktu-II (fragment łańcucha z nowym C-końcem), przejściowy stan enzym-substrat przyłącza cząsteczkę wody.

### III. Reakcje elektrodowe

Jednym z bardzo ważnych działów współczesnej kinetyki chemicznej jest kinetyka reakcji redoks zachodzących na elektrodach. Załóżmy ogólnie, że przebiega reakcja redoks:



W procesie tym można wyróżnić kilka etapów. Pierwszy z nich to transport substancji elektroaktywnej na drodze dyfuzji lub konwekcji do powierzchni elektrody, drugi to przeniesienie elektronu z elektrody do substancji elektroaktywnej, trzeci to odtransportowanie produktu reakcji na drodze dyfuzji lub konwekcji w głąb roztworu.

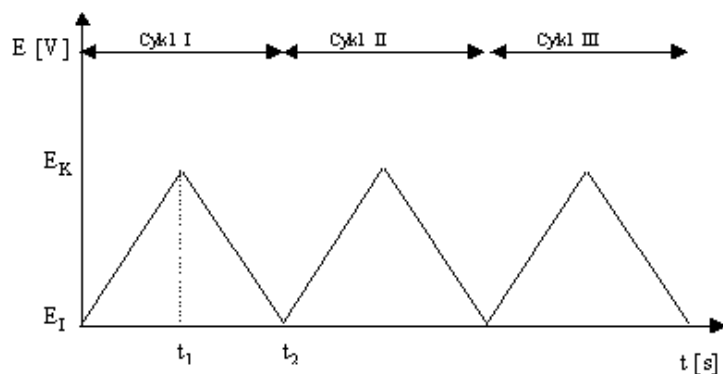
Całkowita szybkość procesu jest limitowana szybkością etapu najwolniejszego. Jeżeli więc stworzymy warunki pomiaru takie aby, najwolniejszym procesem był proces przeniesienia elektronu to zbadamy szybkość reakcji elektrodowej. Gdy najwolniejszym procesem będzie proces transportu to zbadamy parametry tego procesu.

W badaniach kinetyki możemy stosować wiele metod, ich przydatność zależy jednak od zakresu minimalnej i maksymalnej szybkości transportu. Dla stosowanych w ćwiczeniu metod, te zakresy wynoszą:

- metoda woltamperometrii cyklicznej: od  $4.8 \cdot 10^{-4} \text{ cm s}^{-1}$  (dla  $1.6 \text{ mV s}^{-1}$ ) do  $1.2 \cdot 10^{-1} \text{ cm s}^{-1}$  (dla  $100 \text{ V s}^{-1}$ ),
- metoda wirującej elektrody: od  $2 \cdot 10^{-3} \text{ cm s}^{-1}$  (2 obr/s) do  $1.6 \cdot 10^{-2} \text{ cm s}^{-1}$  (130 obr/s).

#### III.1. Metoda woltamperometrii cyklicznej

W metodzie woltamperometrii cyklicznej potencjał elektrody badanej zmieniany jest liniowo w czasie, z szybkością  $v$  (mV/s), zwaną szybkością przemiatań, według schematu pokazanego na Rys. III.1.1. Polaryzację rozpoczyna się od wartości  $E_l$ , przy której nie przebiega żadna reakcja elektrodowa, a mierzony prąd jest wyłącznie prądem pojemnościowym,  $I_{poj}$ . Następnie, potencjał zmieniany jest do wartości, przy których zachodzą procesy utleniania lub redukcji, a przy wybranym potencjale  $E_k$  następuje odwrócenie kierunku polaryzacji. Po czasie  $t_2$  potencjał powraca do wartości początkowej  $E_l$ .

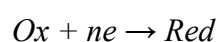


Rys. III.1.1. Piłozębny przebieg zmian potencjału w czasie w metodzie chronowoltamperometrii cyklicznej

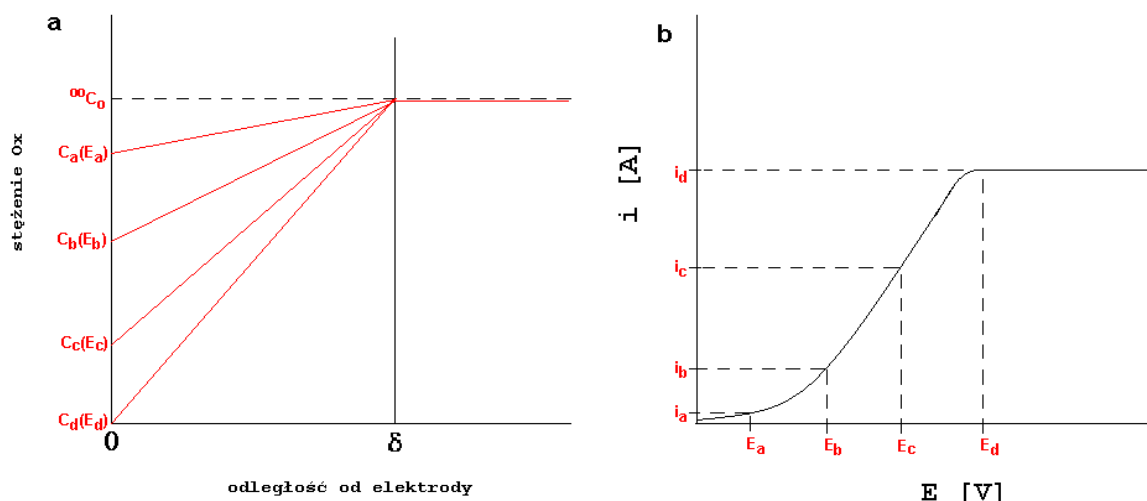
Przebieg zależności prądu przepływającego w obwodzie elektrycznym od potencjału polaryzacji zależy, między innymi, od szybkości procesu przeniesienia ładunku i szybkości dyfuzji substancji elektroaktywnej (jeżeli nie ma transportu konwekcyjnego) do powierzchni elektrody. W przypadku procesu odwracalnego (według kryteriów kinetyki elektrodowej) czyli takiego, w którym szybkość przeniesienia ładunku przez granice faz jest dużo większa od szybkości dyfuzji, na krzywej woltamperometrycznej powinny wykształcić się piki utleniania i redukcji.

#### Skąd się bierze pik?

Złożmy, że w roztworze, w którym umieszczona jest elektroda Pt znajduje się tylko forma utleniona naszego reagenta  $Ox$  o stężeniu  $C_{Ox}$ . Na elektrodzie Pt powinna więc zachodzić następująca reakcja:



Jeżeli na elektrodę narzucimy liniową i bardzo powolną zmianę potencjału, lub też przeprowadzimy pomiar punkt po punkcie (tzn. narzucamy odpowiedni potencjał, czekamy na ustalenie stanu równowagi i odczytujemy natężenie prądu), to otrzymamy krzywą  $i=f(E)$  wyglądającą jak krzywa dla stanu stacjonarnego (Rys. III.1.2. wykres b).



Rys. III.1.2. Profile stężeń (a) i krzywa voltamperometryczna (b) dla pomiarów przeprowadzanych w warunkach stacjonarnych

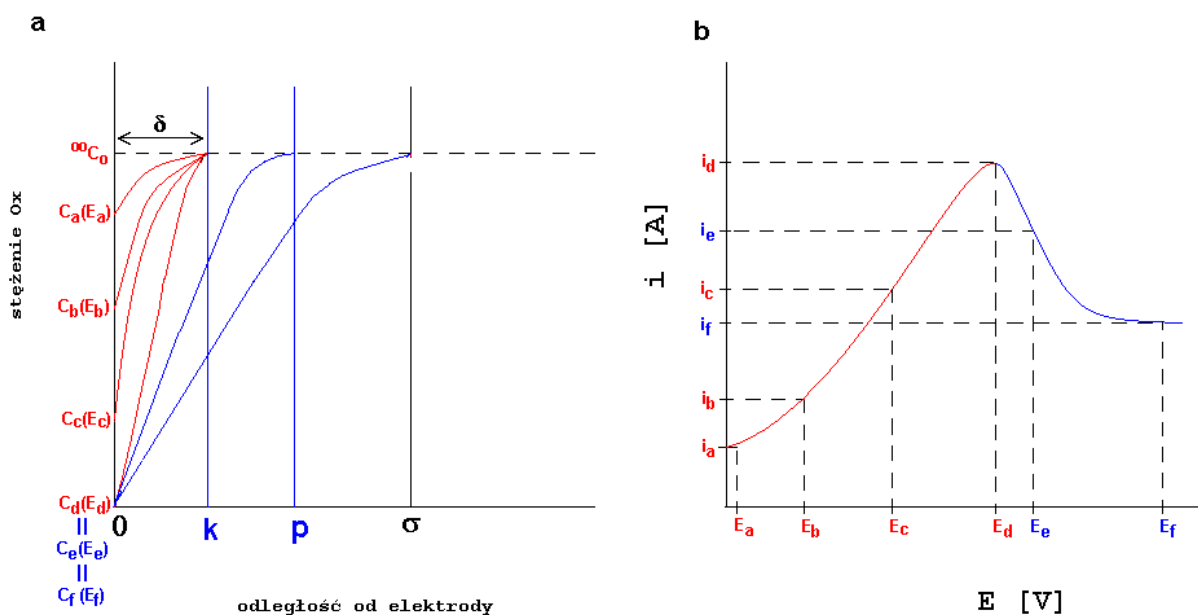
Dzieje się tak dlatego, że dla warunków stanu stacjonarnego stężenie  $Ox$ , poczynając od odległości  $\delta$  od elektrody jest stałe i równe stężeniu formy  $Ox$  wewnątrz roztworu ( ${}^{\infty}C_{Ox}$ ), za co odpowiedzialna jest naturalna konwekcja (Rys. III.1.2. wykres a).

Odległość  $\delta$  równa jest grubości warstwy dyfuzyjnej Nernsta, w której dla warunków stacjonarnych gradient stężenia reagenta  $Ox$  ( $\Delta C_{Ox}/\delta$ ) jest liniowy, zaś stosunek  ${}^0C_{Ox}/C_R$  na powierzchni elektrody, dany równaniem Nernsta, jest zależny od potencjału.

Im potencjał jest bardziej ujemny ( $|E_a| > |E_b| > |E_c| > |E_d|$ ), tym stężenie formy  $Ox$  przy powierzchni elektrody jest mniejsze ( $C_a > C_b > C_c > C_d$ ). W konsekwencji zwiększa się gradient stężenia i obserwujemy coraz większe natężenie prądu  $i$ .

Gdy stężenie substancji  $Ox$  na powierzchni stanie się równe 0, gradient stężenia w warstwie dyfuzyjnej Nernsta przyjmuje wartość maksymalną i wartość prądu  $i$  nie może się już bardziej zmieniać i na wykresie  $i=f(E)$  obserwuje się plateau (Rys. III.1.2. wykres b). Mierzony prąd jest w tym przypadku prądem granicznym,  $i_{lim}$ . Tego typu krzywe rejestrujemy przy bardzo powolnej zmianie potencjału lub gdy prowadzimy pomiar „punkt po punkcie”.

Jeżeli będziemy zmieniać potencjał z większą szybkością, to warstwa dyfuzyjna Nernsta nie będzie miała czasu na relaksację – na powrót do stanu równowagi. Nie będzie sięgała tak daleko w głąb roztworu i profile stężeń w jej obrębie nie będą liniowe (Rys. III.1.3. wykres a).



Rys. III.1.3. Profile stężeń (a) i krzywa woltamperometryczna (b) dla pomiarów przeprowadzanych w warunkach nierównowagowych

W chwili gdy osiągnięty zostanie potencjał redukcji formy  $Ox$  to stężenie  $Ox$  na powierzchni elektrody zmaleje ( $C_a$ )- zgodnie z równaniem Nernsta i ustali się gradient stężenia  $(\partial C_{Ox}/\partial x)_a$  (krzywa a), w wyniku czego w obwodzie zewnętrznym popłynie prąd o natężeniu  $i_a$ , proporcjonalnym do gradientu stężenia.

Gradient  $(\partial C_{Ox}/\partial x)_a$  odpowiadający stężeniu powierzchniowemu ( $C_a$ ) nie jest stały i będzie maleć na skutek dyfuzji (warstwa Nernsta ulega relaksacji). Jednak potencjał elektrody zmienia się w sposób liniowy przyjmując coraz bardziej ujemne wartości, tak więc stężenie powierzchniowe substancji  $Ox$  musi się zmniejszać:

$$(C_a) \rightarrow (C_b) \rightarrow (C_c) \rightarrow (C_d)$$

a gradient rosnąć:

$$(\partial C_{Ox}/\partial x)_a \rightarrow (\partial C_{Ox}/\partial x)_b \rightarrow (\partial C_{Ox}/\partial x)_c \rightarrow (\partial C_{Ox}/\partial x)_d$$

aż do momentu, gdy stężenie powierzchniowe  $Ox$  stanie się równe 0 ( $C_d$ ), a gradient osiągnie wartość maksymalną  $(\partial C_{Ox}/\partial x)_d$ .

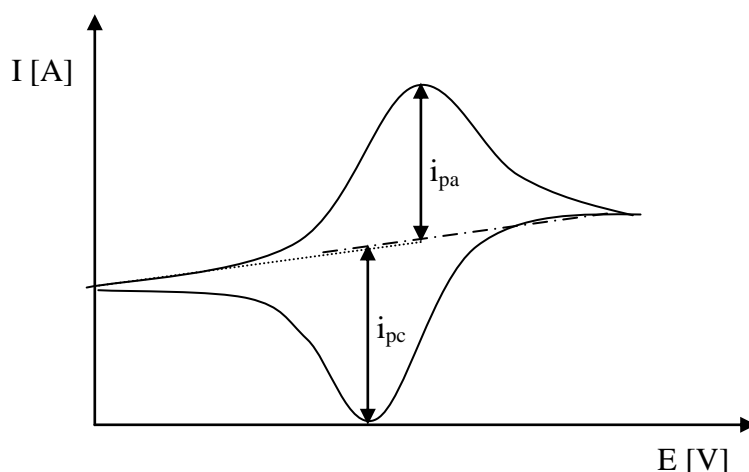
Należy zauważyć, że dla danego potencjału i odpowiadającemu mu stężeniu  $Ox$  na powierzchni elektrody gradient stężenia w warstwie dyfuzyjnej Nernsta oraz rejestrowany prąd jest większy niż prąd rejestrowany w warunkach stanu stacjonarnego.

Po osiągnięciu przez gradient stężenia wartości maksymalnej (krzywa d) jego wartość zaczyna się zmniejszać na wskutek dyfuzji (krzywe e i f). Dyfuzja powoduje poszerzenie

warstwy dyfuzyjnej Nernsta od  $k$  do  $p$  i do  $\sigma$  (Rys. III.1.3. wykres a). Rejestrowany prąd musi się również zmniejszyć i stąd na krzywej  $i=f(E)$  formuje się pik (Rys. III.1.3, wykres b).

Gradyenty stężeń  $\partial C_{Ox}/\partial x$  oraz prądy będą tym większe im szybciej zmieniamy potencjał, ponieważ im większe  $v$  tym krótsza skala czasowa eksperymentu i tym mniej czasu na relaksację ma warstwa dyfuzyjna Nernsta.

Gdy odwrócimy kierunek polaryzacji, to dla to dla warunków stanu stacjonarnego krzywe  $i=f(E)$  powinny się pokryć. Jeżeli jednak przemiatamy potencjałem ze znaczną szybkością to w po odwróceniu kierunku polaryzacji na powierzchni elektrody znajduje się znaczna ilość formy  $Red$  i ta forma  $Red$  jest nadal tworzona, aż do momentu osiągnięcia potencjału formalnego pary  $Ox/Red$ . Wtedy forma  $Red$  obecna na elektrodzie zaczyna się utleniać z powrotem do formy  $Ox$  i zaczyna płynąć prąd o znaku przeciwnym. W trakcie tych zmian potencjału stężenie formy  $Red$  na powierzchni osiąga 0 i dlatego na krzywej  $i=f(E)$  przy przemiataniu powrotnym kształtuje się również pik, tak jak przedstawiono na Rys. III.1.4.



Rys. III.1.4. Przykładowy chronowoltamperogram cykliczny dla procesu odwracalnego

Wartość prądu w pikie katodowym lub anodowym zależy od stężenia substancji elektroaktywnej w roztworze,  $C$  [ $\text{mol cm}^{-3}$ ], jej współczynnika dyfuzji,  $D$  [ $\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$ ], powierzchni elektrody  $A$  [ $\text{cm}^2$ ], liczby przenoszonych elektronów  $n$  oraz szybkości przemiatania [ $\text{V s}^{-1}$ ], zgodnie z równaniem Randlesa-Sevcika w przypadku dyfuzji liniowej:

$$i_p = 2,69 \cdot 10^5 n^{3/2} A D^{1/2} v^{1/2} C \quad (\text{III.1.1})$$

Na podstawie różnicy potencjałów pików anodowego ( $E_{pa}$ ) i katodowego ( $E_{pk}$ ) oraz stosunku prądu pików anodowego i katodowego można określić czy badany proces jest odwracalny, quasi-odwracalny, czy też nieodwracalny.

Dla procesów odwracalnych:

$$1) \quad \Delta E_p = E_{pa} - E_{pc} = 59/n \text{ [mV]}$$

$\Delta E_p$  – różnica potencjałów pików prądu anodowego i katodowego

$$2) \quad i_{pa}/i_{pc} = 1$$

$i_{pa}$  - prąd pikowy anodowego

$i_{pc}$  - prąd pikowy katodowego

$$3) \quad i_p \sim \nu^{1/2}$$

$i_p$  – prąd pikowy

$\nu$  – szybkość zmian potencjału

4)  $E_p$  nie zależy od  $\nu$

**Uwaga!** Zastanów się nad kryteriami procesów quasi i nieodwracalnych.

### III.2. Metoda wirującej elektrody

Szybkość transportu substancji elektroaktywnej ( $v_i$ ) wzdłuż osi  $x$ , w nieobecności transportu konwekcyjnego, jest proporcjonalna do gradientu potencjału elektrochemicznego i może być opisana równaniem:

$$g_i = -k_i \frac{\partial \mu}{\partial x} \quad (\text{III.2.1})$$

gdzie  $k_i$  jest współczynnikiem proporcjonalności ( $k_i = D_i/RT$ ;  $D_i$  jest współczynnikiem dyfuzji składnika  $i$ ). Rozpisując potencjał elektrochemiczny, przekształcamy równanie (III.2.1) do postaci:

$$g_i = -k_i \left( RT \frac{\partial \ln a_i}{\partial x} + z_i F \frac{\partial \Phi}{\partial x} \right) \quad (\text{III.2.2})$$

Mnożąc równanie (III.2.2) stronami przez stężenie składnika  $i$ , otrzymujemy:

$$J_i = -k_i c_i RT \frac{\partial \ln a_i}{\partial x} - k_i c_i z_i F \frac{\partial \Phi}{\partial x} \quad (\text{III.2.3})$$

gdzie  $J_i$  jest strumieniem substancji elektroaktywnej, czyli ilością substancji (wyrażoną w molach) przemieszczającej się przez płaszczyznę o powierzchni  $1 \text{ cm}^2$  w ciągu 1 sekundy, czyli  $J_i = -dn_i/dt = c_i v_i$ .

Pierwszy z członów równania (III.2.3) odpowiada transportowi dyfuzyjnemu, a drugi transportowi migracyjnemu pod wpływem pola elektrycznego.



W nieobecności gradientu potencjału równanie (III.2.3) upraszcza się do postaci :

$$J_i = -k_i c_i RT \frac{\partial \ln a_i}{\partial x} \quad (\text{III.2.4})$$

W przypadku roztworów rozcieńczonych współczynnik aktywności  $f_i \approx 1$  i  $\partial \ln f_i / \partial x = 0$ , czyli  $\partial \ln a_i / \partial x = \partial \ln c_i / \partial x$ .

Ponieważ  $\frac{\partial \ln c}{\partial x} = \frac{1}{c} \frac{\partial c}{\partial x}$ , równanie (III.2.4) zapisujemy w postaci:

$$J_i = -D_i \frac{\partial c_i}{\partial x} \quad (\text{III.2.5}).$$

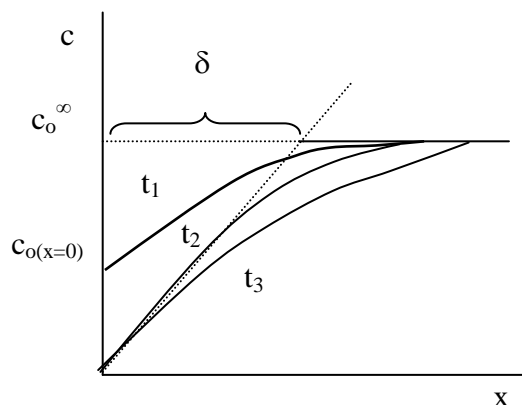
Jest to pierwsze prawo dyfuzji, zwane pierwszym prawem Ficka.

Współczynnik dyfuzji wyrażany jest w  $\text{m}^2 \text{s}^{-1}$  lub  $\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$ . Typowe wartości współczynnika dyfuzji w roztworach są rzędu  $10^{-5} - 10^{-6} \text{cm}^2 \text{s}^{-1}$ .

W eksperymentach elektrochemicznych strumień substancji elektroaktywnej przepływającej przez powierzchnię o przekroju poprzecznym  $A$ , w bezpośredni sposób wiąże się z natężeniem prądu ( $i$ ) płynącego w obwodzie elektrycznym. Ponieważ liczba moli przenoszonej substancji może być wyznaczona z pomiaru ładunku elektrycznego  $n_i = Q_i / z_i F$ , to  $J_i = (1/z_i F A) dQ_i / dt$ , czyli  $J_i = i / z_i F A$ . W ten sposób dochodzimy do równania opisującego prąd dyfuzyjny:

$$i = z F A D_i \frac{\partial c_i}{\partial x} \quad (\text{III.2.6}).$$

W przypadku gdy dyfuzja jest najwolniejszym etapem procesu elektrodowego, stężenie substancji elektroaktywnej przy powierzchni elektrody w trakcie elektrolizy szybko maleje i w chwili  $t_2$  osiąga zero, a model warstwy dyfuzyjnej można przedstawić w tym przypadku dla różnych czasów tak jak na Rys. III.2.1:



Rys. III.2.1. Model dyfuzyjnej warstwy Nernsta

W przypadku, gdy warstwa dyfuzyjna może rozrastać się bez ograniczeń w głąb roztworu, prąd po osiągnięciu maksymalnej wartości (w chwili  $t_2$ ) zaczyna maleć dla  $t > t_2$ .

Przy zastosowaniu wirującej elektrody dyskowej, przy określonej szybkości obrotów elektrody, grubość warstwy dyfuzyjnej jest stała, a gdy stężenie substancji elektroaktywnej przy elektrodzie staje się równe zero, to prąd osiąga wartość graniczną,  $i_{lim}$ :

$$i_{lim} = zFAD_0 \frac{C_0^\infty}{\delta} \quad (III.2.7)$$

Grubość warstwy dyfuzyjnej jest określona równaniem:

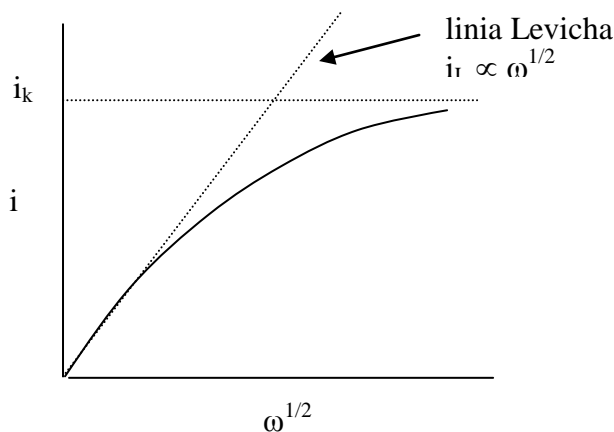
$$\delta = 1,61 D_0^{1/3} \nu^{1/6} \omega^{-1/2} \quad (III.2.8)$$

przy czym  $\nu$  jest lepkością kinematyczną roztworu ( $\nu = \eta/\rho$ , gdzie  $\eta$  jest współczynnikiem lepkości dynamicznej, a  $\rho$  gęstością roztworu;  $\nu \approx 0.01 \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$  dla wody), natomiast  $\omega$  jest kołową szybkością obrotów ( $\text{rad s}^{-1}$ ), przy czym  $\omega = 2\pi f$ , gdzie  $f$  jest częstotliwością obrotów, wyrażoną w Hz).

Po wstawieniu wyrażenia na grubość warstwy dyfuzyjnej do równania (III.2.7) otrzymujemy równanie Levicha, opisujące związek między prądem granicznym a kołową szybkością obrotów:

$$i_L = 0,62nFAD^{2/3} \nu^{-1/6} c_0^\infty \omega^{1/2} \quad (III.2.9)$$

Na podstawie przebiegu wykresu  $i_L = f(\omega^{1/2})$  można wnioskować o charakterze procesu elektrodowego. Odchylenie zależności  $i$  vs.  $\omega^{1/2}$  od linii prostej sugeruje dyfuzyjno-kinetyczną kontrolę reakcji elektrodowej. Należy też pamiętać o tym, że równanie (III.2.8) odnosi się do laminarnego przepływu cieczy w pobliżu dysku. Aby laminarność przepływu była spełniona, liczba Reynoldsa,  $R_e$ , określona wyrażeniem:  $R_e = r^2 \omega / \nu$  nie powinna przekraczać  $10^5$ .



Rys. III.2.2. Zależność natężenia prądu od szybkości obrotów elektrody dla procesu o kontroli mieszanej, kinetyczno-dyfuzyjnej

Dla procesu całkowicie nieodwracalnego (gdy szybkość przeniesienia ładunku jest znacznie wolniejsza od szybkości dyfuzji) prąd (kinetyczny,  $i_k$ ) jest funkcją stężenia i stałej szybkości procesu ( $k_f(E)$ ):

$$i_k = nFAc_o^\infty k_f(E) \quad (\text{III.2.10})$$

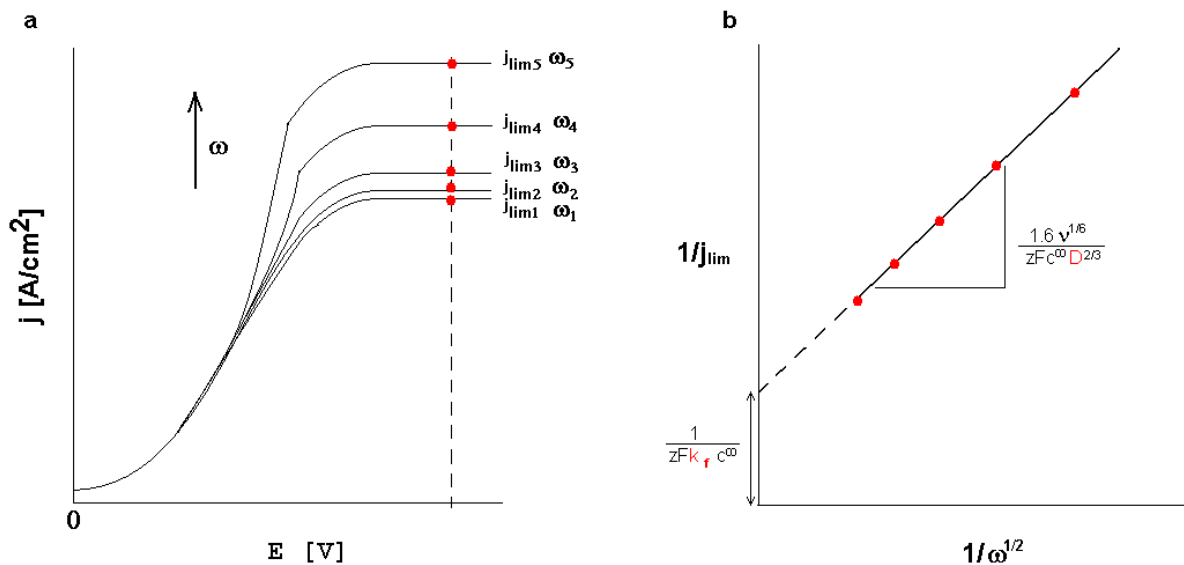
gdzie  $k_f(E) = k_o \exp[-\alpha n_a F(E - E^{\circ'})/RT]$ , gdzie  $k_o$  – standardowa stała szybkości procesu,  $\alpha$  – współczynnik przejścia,  $n_a$  – elektronowość procesu,  $E^{\circ'}$  - potencjał standardowy.

Dla bardzo wolnych reakcji elektrodowych natężenie prądu mierzonego na elektrodzie wirującej nie zależy od szybkości obrotów elektrody.

W przypadku dyfuzyjno-kinetycznej kontroli procesu, parametry kinetyczne reakcji można wyznaczyć stosując równanie Levicha Koutecky'ego:

$$\frac{1}{j_{lim}} = \frac{1}{zFk_{ox}c^\infty} + \frac{1.6v^{1/6}}{zFc^\infty D^{2/3}} \frac{1}{\omega^{1/2}} \quad (\text{III.2.11})$$

W tym celu należy odczytać z kolejnych krzywych  $j=f(E)$  wartości gęstości prądów granicznych  $j_{lim} = i_{lim}/A$  dla danej kołowej szybkości obrotów elektrody  $\omega$  (Rys. III.2.3. wykres a) i wykreślić zależność  $1/j_{lim} = f(1/\omega^{1/2})$  (Rys. III.2.3. wykres b). Z nachylenia prostej na wykresie b można oszacować współczynnik dyfuzji substancji elektroaktywnej D. Z punktu przecięcia ekstrapolowanej krzywej  $1/j_{lim} = f(1/\omega^{1/2})$  z osią rzędnych można wyznaczyć stałą szybkości reakcji elektrodowej  $k_f$ .



Rys. III.2.3. Przykładowy przebieg zależności woltamperometrycznych dla różnych szybkości obrotów elektrody wirującej (a) i ilustracja graficzna równania Levicha-Kouteckiego.

### III.3. Potencjał formalny - wyznaczenie

Potencjał elektrodowy dla reakcji redoks:



jest opisany równaniem Nernsta

$$E = E^0 + \frac{RT}{nF} \ln \frac{a_{ox}}{a_{red}} \quad (III.3.1)$$

gdzie  $E^0$  jest potencjałem standardowym,  $a_{ox}$ ,  $a_{red}$  są aktywnościami formy utlenionej i zredukowanej. Ponieważ aktywność jest zdefiniowana iloczynem stężenia ( $C$ ) i współczynnika aktywności ( $f$ ) równanie (III.3.1) można zapisać w postaci:

$$E = E^0 + \frac{RT}{nF} \ln \frac{f_{ox}}{f_{red}} + \frac{RT}{nF} \ln \frac{C_{ox}}{C_{red}} \quad (III.3.2)$$

Współczynnik aktywności jest miarą oddziaływań występujących w roztworze, zależy więc od mocy jonowej, solwatacji, asocjacji, itp. Wygodniej jest więc zapisać równanie (III.3.2) w postaci:

$$E = E_f^0 + \frac{RT}{nF} \ln \frac{C_{ox}}{C_{red}} \quad (III.3.3)$$

gdzie  $E_f^0$  jest potencjałem formalnym.

Potencjały formalne można wyznaczyć stosując metody statyczne lub dynamiczne. W większości metod dynamicznych wyznacza się odwracalny potencjał półfali  $E_{1/2}$ , który jest związany z potencjałem formalnym zależnością:

$$E_f^0 = E_{1/2} + \frac{RT}{nF} \ln \left( \frac{D_{ox}}{D_{red}} \right)^{1/2} \quad (\text{III.3.4})$$

Zakładając, że  $D_{ox} = D_{red}$  uzyskujemy  $E_f^0 = E_{1/2}$

Praktyczne zastosowanie zależności (III.3.4) jest proste, jeżeli badamy proces całkowicie odwracalny, tzn. najwolniejszym stadium reakcji jest transport substancji do lub od elektrody. W metodzie woltamperometrii cyklicznej dla procesu kontrolowanego dyfuzją liniową substancji elektroaktywnej istnieje związek między  $E_{1/2}$  i potencjałem pików  $E_p$

$$E_{1/2} = E_p \pm 1,1 \frac{RT}{nF} \quad \begin{array}{l} + \text{ dla redukcji} \\ - \text{ dla utleniania} \end{array} \quad (\text{III.3.5})$$

W przypadku procesów quasi – odwracalnych, potencjał  $E_{1/2}$  jest równy średniej arytmetycznej potencjałów pików katodowego i anodowego:

$$E_{1/2} = (E_{pk} + E_{pa}) / 2 \quad (\text{III.3.6})$$

Do wyznaczania  $E_{1/2}$  można zastosować również metodę wirującej elektrody dyskowej. W tym przypadku odwracalny potencjał półfali wyznacza się z ekstrapolacji zależności  $\log [i / (i_{lim} - i)]$  od potencjału do wartości logarytmu = 0. Nachylenie tej zależności powinno wynosić  $2,3 RT/nF$ . Jeżeli nachylenie różni się znacznie od tej wartości to proces można uznać za nieodwracalny.

# **Instrukcje wykonania ćwiczeń**

# Ćwiczenie nr 7

## Kinetyka reakcji zegarowej Landolta.

### Wymagania kolokwialne

1. Równanie kinetyczne i rzędowość reakcji. Charakterystyka reakcji pierwszego i drugiego rzędu. Metody wyznaczania rzędów reakcji. Czas połowkowy reakcji. Etap limitujący szybkość wieloetapowej reakcji chemicznej. Częstotliwość etapu reakcyjnego.
2. Pojęcie autokatalizy. Przykłady reakcji autokatalitycznych i ich mechanizmów.
3. Pojęcie i ogólna charakterystyka reakcji zegarowych. Typowe zmiany stężeń reagentów w czasie. Przykłady reakcji zegarowych.
4. Reakcje Landolta z udziałem jonów jodanowych(V) i arsenianowych(III). Charakterystyka kinetyczna i chemiczna jej etapów – reakcji Dushmana i reakcji Roebucka. Autokataliza w reakcji Landolta. Reakcja Landolta jako źródło fal chemicznych. Zależność przebiegu reakcji od ilościowych proporcji substratów. Zarys mechanizmu obserwowanych zjawisk.
5. Reakcja Landolta między jonami nadsiarczanowymi i jodkowymi (reakcja „nadsiarczanowa”) jako eksperymentalna realizacja reakcji „zegarowej”. Sumaryczne równanie reakcji. Detekcja produktów reakcji. Reakcja jodu ze skrobią i jonami tiosiarczanowymi.

### Instrukcja wykonania ćwiczenia

Ćwiczenie polega na badaniu kinetyki reakcji między jonami  $\Gamma^-$  i  $S_2O_8^{2-}$  z wykorzystaniem efektu reakcji „zegarowej”. Jest to jedna z modyfikacji tzw. reakcji Landolta. Dla ustalonego stężenia jonów  $S_2O_8^{2-}$  badany jest wpływ zmiany stężenia jonów  $\Gamma^-$  na szybkość tej reakcji, a następnie w analogiczny sposób badany jest wpływ zmiany stężenia jonów  $S_2O_8^{2-}$  przy ustalonym stężeniu  $\Gamma^-$ . Detekcja wydzielanego jodu dokonuje się dzięki tworzeniu barwnego kompleksu ze skrobią. Na podstawie uzyskanych danych wyznacza się równanie kinetyczne i stałą szybkości tej wersji reakcji Landolta.

#### **Sprzęt:**

Kolba stożkowa o poj. 250 cm <sup>3</sup>	-	2 szt.
Zlewki o poj. 100 cm <sup>3</sup>	-	6 szt.
Pipeta jednomiarowa 25,0 cm <sup>3</sup>	-	1 szt.
Pipeta jednomiarowa 10,0 cm <sup>3</sup>	-	2 szt.
Pipeta jednomiarowa 5,0 cm <sup>3</sup>	-	2 szt.

Pipeta wielomiarowa 25,0 cm <sup>3</sup>	-	3 szt.
Pipeta wielomiarowa 10,0 cm <sup>3</sup>	-	3 szt.
Pipetka-wkraplacz		1 szt.
Cylinder miarowy 50 cm <sup>3</sup>	-	1 szt.
Mieszadło magnetyczne	-	1 szt.
Mieszadélka		2 szt.
Stoper		1 szt.
Gruszka do pipet	-	1 szt.

Bibuła filtracyjna

**Odczynniki:**

0,60 mol/dm<sup>3</sup> KI (przechowywany w ciemności !)

0,60 mol/dm<sup>3</sup> (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>

0,60 mol/dm<sup>3</sup> KNO<sub>3</sub>

0,60 mol/dm<sup>3</sup> (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

0,30 mol/dm<sup>3</sup> Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>

0,10 mol/dm<sup>3</sup> EDTA

0,3 % skrobia rozpuszczalna

Woda destylowana w tryskawce

**1. Badanie wpływu stężenia jonów I<sup>-</sup> na szybkość reakcji Landolta**

W Tabeli 1 zestawione są objętości roztworów reagentów używane w pierwszej serii eksperymentów kinetycznych.

Tabela 1.

Nr dośw.	Objętość 0,60 mol/dm <sup>3</sup> KI V <sub>1</sub> [cm <sup>3</sup> ]	Objętość 0,60 mol/dm <sup>3</sup> KNO <sub>3</sub> V <sub>2</sub> [cm <sup>3</sup> ]
1	25,0	0
2	20,0	5,0
3	15,0	10,0
4	10,0	15,0
5	5,0	20,0

Każdy z eksperymentów 1-5 wykonaj według następującego schematu:

a) Do kolby stożkowej o pojemności 250 cm<sup>3</sup> odpipetuj kolejno:

V<sub>1</sub> cm<sup>3</sup> roztworu KI,

V<sub>2</sub> cm<sup>3</sup> roztworu KNO<sub>3</sub>,

10,0 cm<sup>3</sup> roztworu Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>,

5,0 cm<sup>3</sup> roztworu skrobi,



- a następnie dodaj odmierzone cylindrem miarowym 35 cm<sup>3</sup> wody destylowanej i 1-2 krople roztworu EDTA.
- b) Wrzuć mieszadełko do kolby, postaw ją na mieszadle magnetycznym i włącz mieszanie o umiarkowanej szybkości
- c) Do zlewki o poj. 100 cm<sup>3</sup> odpipetuj 25,0 cm<sup>3</sup> roztworu (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>
- d) Szybkim ruchem wlej zawartość zlewki do kolby stożkowej, włączając jednocześnie stoper ! Zanotuj czas  $\tau$  (z dokładnością do 1 s), który upłynie do chwili zabarwienia roztworu w kolbie na niebiesko.

## 2. Badanie wpływu stężenia jonów S<sub>2</sub>O<sub>8</sub><sup>2-</sup> na szybkość reakcji Landolta

W Tabeli 2 zestawione są objętości roztworów reagentów używane w drugiej serii eksperymentów kinetycznych.

Tabela 2.

Nr Dośw.	Objętość 0,60 mol/dm <sup>3</sup> (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>8</sub> V <sub>1</sub> [cm <sup>3</sup> ]	Objętość 0,60 mol/dm <sup>3</sup> (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> V <sub>2</sub> [cm <sup>3</sup> ]
6	25,0	0
7	20,0	5,0
8	15,0	10,0
9	10,0	15,0
10	5,0	20,0

Każdy z eksperymentów 6-10 wykonaj według następującego schematu:

- a) Do kolby stożkowej o pojemności 250 cm<sup>3</sup> odpipetuj kolejno:
- 25 cm<sup>3</sup> roztworu KJ,
  - V<sub>2</sub> cm<sup>3</sup> roztworu (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>,
  - 10 cm<sup>3</sup> roztworu Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>,
  - 5 cm<sup>3</sup> roztworu skrobi,
- a następnie dodaj odmierzone cylindrem miarowym 35 cm<sup>3</sup> wody destylowanej i 1-2 krople roztworu EDTA.
- b) Wrzuć mieszadełko do kolby, postaw ją na mieszadle magnetycznym i włącz mieszanie o umiarkowanej szybkości

- c) Do zlewki o poj. 100 cm<sup>3</sup> odpipetuj taką objętość roztworu (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>, jaka podana jest w tabeli 2 (objętość V<sub>1</sub>)
- d) Szybkim ruchem wlej zawartość zlewki do kolby stożkowej, włączając jednocześnie stoper ! Zanotuj czas  $\tau$  (z dokładnością do 1 s), który upłynie do chwili zabarwienia roztworu w kolbie na niebiesko.

## Literatura

1. P. W. Atkins, Chemia fizyczna, PWN, Warszawa 2001
2. T. Pluciński, Doświadczenia chemiczne, wyd. Adamantan, Warszawa 1997
3. N. M. Emanuel, D. G. Knorre, Kinetyka chemiczna w układach jednorodnych, PWN, Warszawa 1985
4. M. Orlik, Reakcje oscylacyjne – porządek i chaos, WNT Warszawa 1996.
5. A. Gładysz-Płaska, M. Majdan, P. Sadowski, Chemia w Szkole, 236 (1) (2001) 16
6. I. R. Epstein, J. Chem. Educ. 60 (1983) 494

## Instrukcja wykonania opisu

1. Napisz sumaryczne równanie badanej reakcji Landolta
2. Oblicz średnie szybkości reakcji ( $v$ ) w doświadczeniach 1-10 zdefiniowane jako zmiana stężenia jonów S<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>2-</sup> w czasie od momentu zmieszania reagentów do wystąpienia niebieskiej barwy (podaj jednostki):

$$v = \frac{\Delta C_{S_2O_3^{2-}}}{\tau}$$

Pokaż przebieg obliczeń.

3. Zestaw wyniki doświadczeń i obliczeń w następującej Tabeli:

Nr dośw.	Stężenie początkowe [mol/dm <sup>3</sup> ]		Czas reakcji $\tau$ [s]	Średnia szybkość reakcji $v$ [mol/(dm <sup>3</sup> s)]	Log $v$
	S <sub>2</sub> O <sub>8</sub> <sup>2-</sup>	I <sup>-</sup>			

4. Oblicz względny ubytek stężenia  $S_2O_8^{2-}$  w eksperymentach 1-5 i względny ubytek stężenia  $I^-$  w eksperymentach 6-10 i odpowiedz na pytanie: czy usprawiedliwione jest założenie o praktycznej stałości stężeń tych jonów w odpowiednich seriach doświadczeń?
5. Na podstawie wyników eksperymentów 1-5 wykonaj wykresy zależności a) szybkości reakcji  $v$  od stężenia jonów  $I^-$  oraz b) logarytmu tej szybkości od logarytmu stężenia jonów  $I^-$ . Na podstawie wyników eksperymentów 6-10 wykonaj analogiczne wykresy zależności szybkości reakcji  $v$  i jej logarytmu od stężenia i logarytmu stężenia jonów  $S_2O_8^{2-}$ .
6. Na podstawie przebiegu wykresów wyznacz:
  - a) cząstkowe rzędy reakcji Landolta względem jonów  $I^-$  oraz  $S_2O_8^{2-}$ ;
  - b) jej rząd całkowity oraz
  - c) stałą szybkości reakcji Landolta, podając jej miano.Porównaj otrzymane rzędy cząstkowe ze stechiometrią sumarycznego równania badanej reakcji i wyciągnij stosowne wnioski.
7. Wyjaśnij rolę dodatku  $KNO_3$ ,  $(NH_4)_2SO_4$  i EDTA w badanych roztworach

# Ćwiczenie nr 8

## Kataliza enzymatyczna.

### Wymagania kolokwialne

Na czym polega specyfika katalizy enzymatycznej? Czym są pod względem chemicznym enzymy i jakie oddziaływania chemiczne odgrywają rolę w tworzeniu kompleksu enzym-substrat? Jaką rolę spełnia apoenzym w funkcji holoenzymu?

Wyprowadzenie i założenia kinetyki Michaelisa-Menten. Interpretacje stałej  $K_M$  i liczby obrotów enzymu. W jakich warunkach zmienia się  $K_M$ , w jakich przypadkach równania kinetyczne Michaelisa-Menten nie opisują poprawnie kinetyki enzymatycznej? Wyznaczanie eksperymentalne  $K_M$ ,  $V_{max}$  i  $k_{cat}$ .

Charakterystyka porównawcza inhibicji kompetycyjnej i niekompetycyjnej.

### Instrukcja wykonania ćwiczenia

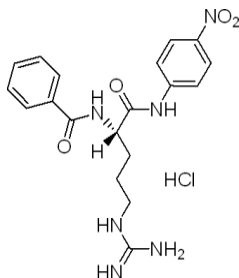
Celem ćwiczenia jest poznanie specyfiki kinetyki reakcji enzymatycznych na przykładzie hydrolizy modelowego substratu peptydowego: *N*- $\alpha$ -benzylo-L-arginino-4-nitroanilidu za pomocą trypsyny wyizolowanej z trzustki wołowej.

#### Sprzęt:

- Termostatowany spektrofotometr, kuwety plastikowe 10 mm
- 2 zlewki 100 ml
- Mikropipety automatyczne 20-200 i 100-1000 mikrolitrów wraz z końcówkami
- Jednorazowe próbówki typu eppendorf po 1,5 i 2 ml, jednorazowe zamykane próbówki 50 ml (6 sztuk)
- Tryskawka

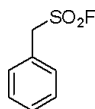
#### Odczynniki:

- ENZYM: Trypsyna z trzustki wołowej z **SIGMA: T 1426** (5 mg /ćwiczenie)
- SUBSTRAT: *N*- $\alpha$ -Benzoyl-L-arginine 4-nitroanilide hydrochloride z **SIGMA: B 3279** (3 mg / ćwiczenie)



-INHIBITOR: Fluorek  $\alpha$ -toluenosulfonylu z SIGMA: P 7626

(10  $\mu$ g /ćwiczenie)



- Bufor TRIS 50 mM pH 7.6

(40 ml / ćwiczenie)

- Dimetylosulfotlenek cz.d.a. (DMSO)

(1 ml / ćwiczenie)

- Etanol cz.d.a.

(1 ml / ćwiczenie)

- Woda dejonizowana

(1 l / ćwiczenie)

**UWAGA: Fluorek  $\alpha$ -toluenosulfonylu jest trujący – w trakcie pracy z nim należy zachować wszelkie zasady bezpieczeństwa, używać rękawic ochronnych i umyć ręce po zakończonym eksperymencie.**

### 1. Spektrofotometryczne monitorowanie kinetyki reakcji enzymatycznej.

Odważkę 5 mg trypsyny (gotowa w eppendorfie oznakowanym „E” – od prowadzącego ćwiczenie) należy rozpuścić w 1 ml 50 mM buforu TRIS pH 7.6 (oznaczyć jako roztwór E<sub>1</sub>). Następnie pobrać 50  $\mu$ l E<sub>1</sub>, przenieść do czystego eppendorfa i dopełnić 950  $\mu$ l buforu TRIS (roztwór E<sub>2</sub>).

Naważkę 3 mg substratu (*N*- $\alpha$ -Benzoyl-L-arginine 4-nitroanilide hydrochloride - gotowy w eppendorfie oznaczonym literą „S” – od prowadzącego ćwiczenie) należy rozpuścić w 200  $\mu$ l bezwodnego DMSO (roztwór S<sub>1</sub>). Następnie przygotować serię rozcieńczonych roztworów substratu w DMSO (S<sub>1</sub> do S<sub>5</sub> włącznie) w osobnych próbkach typu eppendorf biorąc za każdym razem 30  $\mu$ l roztworu bardziej stężonego i 70  $\mu$ l DMSO: np. S<sub>2</sub> uzyskuje się rozcieńczając 30  $\mu$ l S<sub>1</sub> 70-oma  $\mu$ l czystego DMSO, a S<sub>3</sub> z 30  $\mu$ l S<sub>2</sub> i 70  $\mu$ l DMSO.

Przygotowanie próbki do pomiaru kinetycznego polega na rozcieńczeniu 100  $\mu$ l roztworu enzymu E<sub>2</sub> za pomocą 1.8 ml buforu TRIS, dokładnym wymieszaniu, użyciu roztworu TRIS/enzym jako próbki odniesienia do wyzerowania absorpcji przy 410 nm („AUTOZERO”), a następnie dodaniu – bezpośrednio przed uruchomieniem pomiarów kinetycznych – 30  $\mu$ l roztworu substratu S<sub>n</sub>. Pomiar kinetyczny polega na śledzeniu zmian absorpcji w czasie przy długości fali 410 nm, w temperaturze 37 °C (termostat) przez 360 sekund. Zachodzącej reakcji enzymatycznej (przecięcie wiązania peptydowego w substracie i uwolnienie intensywnie żółtego *p*-nitro-aminobenzenu) towarzyszy wzrost absorpcji przy 410 nm. Należy założyć, że absorpcja w tym zakresie jest wprost proporcjonalna do stężenia produktu reakcji enzymatycznej. Serie pomiarowe należy powtórzyć dla każdego stężenia substratu (S<sub>1</sub> do S<sub>5</sub>).

## 2. Inhibicja trypsyny za pomocą fluorku $\alpha$ -toluenosulfonylu.

Należy przygotować serię progresywnie rozcieńczonych roztworów inhibitora (fluorku  $\alpha$ -toluenosulfonylu) w wykorzystując w tym celu otrzymany od prowadzącego roztwór wyjściowy (2.5 % fluorek  $\alpha$ -toluenosulfonylu w etanolu) i czysty etanol. Wyjściowy roztwór inhibitora to  $I_1$ , kolejne roztwory z serii powstają przez 5-krotne rozcieńczanie: w celu uzyskania  $I_2$  należy rozcieńczyć 20  $\mu$ l  $I_1$  za pomocą 80  $\mu$ l etanolu, etc. – do  $I_6$  włącznie. Wszystkie roztwory należy sporządzić w nowych, odpowiednio oznakowanych flamastrem eppendorfach.

Następnie należy przygotować kolejną serię 6 pustych eppendorfów oznakowanych  $A_1$  do  $A_6$  i do każdego z nich dodać po 1 ml buforu TRIS oraz 10  $\mu$ l roztworu enzymu  $E_1$  – wszystkie starannie wymieszać. W kolejnym kroku, do każdego eppendorfa z serii A zawierającego trypsynę, należy dodać 20  $\mu$ l roztworu inhibitora z odpowiadającego mu numerem eppendorfa serii I (np. 20  $\mu$ l inhibitora o rozcieńczeniu  $I_3$  do próbki trypsyny  $A_3$  itd.). Wszystkie próbki należy starannie wymieszać i inkubować w temperaturze pokojowej przez 5 minut. Po tym czasie należy do każdej próbki dodać 10  $\mu$ l roztworu  $S_1$  wymieszać i inkubować całą serię  $A_1$  do  $A_6$  przez 5 minut w temperaturze pokojowej. Należy określić graniczne rozcieńczenie inhibitora, przy którym pojawia się po tym czasie żółta barwa świadcząca o aktywności enzymu.

## 3. Badania wpływu inhibicja trypsyny przez fluorek $\alpha$ -toluenosulfonylu na kinetykę reakcji proteolizy.

Eksperyment sprowadza się do przeprowadzenia serii pomiarów kinetycznych analogicznych do tych opisanych w punkcie 1. „Spektrofotometryczne monitorowanie kinetyki reakcji enzymatycznej”, z tym, że do każdej próbki zawierającej enzym (a przed dodatkiem substratu), należy dodać 20  $\mu$ l roztworu etanolowego inhibitora o rozcieńczeniu  $I_n$ , określonym w punkcie 2. jako „rozcieńczenie graniczne”, inkubować 1 minutę przed dodatkiem substratu i rozpoczęciem pomiarów kinetycznych. Do każdego eksperymentu kinetycznego z inhibitorem należy stosować czystą kuwetę spektrofotometryczną. Należy zwrócić uwagę na niebezpieczeństwo kontaminacji próbek, pipet i sprzętu laboratoryjnego inhibitorem, co uniemożliwi poprawne przeprowadzenie i interpretację wyników kolejnych eksperymentów.

## Literatura

1. Jeremy M. Berg, John L. Tymoczko, Lubert Stryer, Biochemia, PWN 2005

## Instrukcja wykonania opisu

1. Sporządzić wykresy zmian absorpcji czy  $\lambda_{410}$  nm w funkcji czasu dla różnych stężeń substratu. Odczytać szybkości reakcji jako nachylenia tych wykresów. Wyznaczyć stałą  $K_M$  enzymu.
2. Ustalić przybliżoną stechiometrię wiązania inhibitora przez enzym. Przybliżone masy molowe: trypsyna – 23 800 g/mol, *N*- $\alpha$ -benzylo-L-arginino-4-nitroanilid – 435 g/mol, fluorek  $\alpha$ -toluenosulfonylu – 174 g/mol.
3. Czy otrzymane dane kinetyczne (bez i z inhibitorem) pozwalają stwierdzić, według jakiego mechanizmu fluorek  $\alpha$ -toluenosulfonylu inaktywuje trypsynę?
4. Przeprowadzić dyskusję sensu wyznaczenia stałej  $K_M$  w świetle mechanizmu ping-pong działania trypsyny, oraz możliwego wpływu DMSO i etanolu na enzym.

# Ćwiczenie nr 9

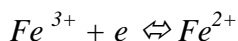
## Wyznaczanie parametrów procesu elektrodowego reakcji redoks.

### Wymagania kolokwialne

Odwracalność, nieodwracalność reakcji elektrodowych. Równanie Nernsta, potencjał formalny. Szybkość reakcji elektrodowej, gdy najwolniejszym procesem jest przeniesienie elektronu – równanie Volmera – Butlera. Szybkość reakcji, gdy najwolniejszym procesem jest transport dyfuzyjny – prąd dyfuzyjny, graniczny. Podstawy metod woltamperometrii cyklicznej i elektrody wirującej.

### Instrukcja wykonania ćwiczenia

Celem ćwiczenia jest zastosowanie metod woltamperometrii cyklicznej i wirującej elektrody dyskowej do wyznaczenia parametrów procesów elektrodowych reakcji redoks:



Wyznaczanymi parametrami będą: potencjał formalny, stała szybkości reakcji oraz współczynniki dyfuzji.

W pomiarach zastosujemy naczynie trójelektrodowe zawierające elektrodę pracującą – dysk platynowy o powierzchni geometrycznej  $0,0314 \text{ cm}^2$ , elektrodę odniesienia kalomelową lub chlorosrebrową, elektrodę pomocniczą – siatkę platynową lub drut platynowy. Elektrodę pracującą należy przed pomiarem oczyścić na papierze ściernym, a następnie przepłukać wodą i elektrolitem podstawowym. Roztwór do badań będzie zawierał  $5 \cdot 10^{-3} \text{ M Fe}^{3+}$  i  $5 \cdot 10^{-3} \text{ M Fe}^{2+}$  w  $1 \text{ M HClO}_4$  lub  $0,5 \text{ M KCl}$ .

W pierwszym etapie należy dobrać zakresy polaryzacji (będą one zależały od rodzaju elektrolitu podstawowego), a następnie korzystając z podanych powyżej informacji należy zaprojektować przeprowadzenie pomiarów tak, aby można było stosując te dwie metody wyznaczyć:

- potencjał formalny reakcji:  $Fe^{3+} + e \rightleftharpoons Fe^{2+}$
- współczynniki dyfuzji jonów  $Fe^{3+}$  i  $Fe^{2+}$
- stałą szybkości reakcji:  $Fe^{3+} + e \rightleftharpoons Fe^{2+}$

W badaniach chronowoltamperometrycznych na pomiary należy wykonać przy różnych szybkościach przemiatania potencjałem  $v$ . Zakres  $v$  [ $\text{V s}^{-1}$ ] powinien obejmować co najmniej dwa rzędy wielkości np. od  $0,005$  do  $0,2$  [ $\text{V s}^{-1}$ ].



W badaniach na wirującej elektrodzie dyskowej rejestrujemy krzywe  $i-E$  dla 13 różnych szybkości obrotów elektrody: od 0 do 2300 rpm, stosując zakres polaryzacji taki sam jak w woltamperometrii cyklicznej (teraz rejestrujemy krzywą dla połowy cyklu) i szybkość przemiatań potencjałem  $v \approx$  równą 0005 [ $V s^{-1}$ ]

## Literatura

1. A. Kiswa, Elektrochemia II, Elektrodyka, WNT, 2001
2. Praca zbiorowa pod redakcją Z. Galusa, Elektroanalityczne Metody Wyznaczania Stałych Fizykochemicznych. PWN 1979.
3. A.J. Bard, L.R. Faulkner, Electrochemical Methods Fundamentals and Applications, 2<sup>nd</sup> edition, Wiley&Sons, Inc 2001.

## Instrukcja wykonania opisu

### Metoda chronowoltamperometrii cyklicznej

1. Z zarejestrowanych krzywych woltamperometrycznych odczytujemy natężenia prądu pików anodowych  $i_{pa}$  i katodowych  $i_{pc}$  oraz potencjały tychże pików  $E_{pa}$  i  $E_{pc}$  dla różnych szybkości przemiatań  $v$ .
2. Sporządzamy wykres  $i_p \sim v^{1/2}$ .
3. Badamy odwracalność procesu sprawdzając czy:
  - a)  $\Delta E_p = E_{pa} - E_{pc} = 59/n$  [mV]
  - b)  $i_{pa}/i_{pc} = 1$
  - c)  $i_p \sim v^{1/2}$
  - d)  $E_p$  nie zależy od  $v$
4. Z wykresu  $i_p \sim v^{1/2}$  na podstawie równania Randlesa-Sevcika wyznaczmy współczynniki dyfuzji jonów  $Fe^{3+}$  i  $Fe^{2+}$ .
5. Po ustaleniu stopnia odwracalności reakcji  $Fe^{3+} + e \rightleftharpoons Fe^{2+}$  wyznaczmy jej potencjał formalny korzystając z odpowiednich wzorów.

### Metoda wirującej elektrody dyskowej

1. Z krzywych  $i-E$  odczytujemy wartości prądów granicznych  $i_{lim}$  dla różnych szybkości obrotów elektrody  $\omega$  i przeliczamy je na gęstości prądu  $j_{lim}$ .

2. Sporządzamy wykres  $1/j_{lim} \sim f(\omega^{-1/2})$ , z nachylenia którego wyznaczmy współczynnik dyfuzji jonów  $Fe^{2+}$ , a z przecięcia ekstrapolowanej prostej z osią rzędnych wyznaczmy stałą szybkości reakcji  $Fe^{3+} + e \rightleftharpoons Fe^{2+}$ .

**W opisie powinny znaleźć się:**

- 1) Zarejestrowane krzywe woltamperometryczne
- 2) Krzywe zarejestrowane na wirującej elektrodzie dyskowej
- 3) Dwa zestawy danych w formie tabeli:
  - a) Dla woltamperometrii cyklicznej:

$\nu$ [V s <sup>-1</sup> ]	$i_{pa}$ [μA]	$i_{pc}$ [μA]	$E_{pa}$ [V]	$E_{pc}$ [V]
0,002				
0,02				
0,04				
0,08				
0,12				
0,16				
0,20				

- b) Dla metody wirującego dysku:

$f$ [rpm]	$\omega$ [rad s <sup>-1</sup> ]	$i_{lim}$ [μA]	$j_{lim}$ [mA cm <sup>-2</sup> ]
80			
120			
240			
360			
480			
600			
720			
1200			
1420			
1640			
1860			
2100			
2300			

- 4) Dwa wykresy

a)  $i_p \sim \nu^{1/2}$

b)  $I/j_{lim} \sim \omega^{1/2}$

5) Wartości parametrów wyznaczonych ze wspomnianych wykresów:

- potencjał formalny reakcji:  $Fe^{3+} + e \rightleftharpoons Fe^{2+}$

- współczynniki dyfuzji jonów  $Fe^{3+}$  i  $Fe^{2+}$

- stała szybkości reakcji:  $Fe^{3+} + e \rightleftharpoons Fe^{2+}$

6) Dyskusja wyników.