

Karakterizacija vodikovih veza IR-spektroskopijom

KUI – 10/2012
Prispjelo 1. kolovoza 2011.
Prihvaćeno 24. listopada 2011.

D. Vojta*

Institut Ruđer Bošković, Zavod za organsku kemiju i biokemiju,
Laboratorij za molekulsku spektroskopiju, Bijenička 54, Zagreb

IR-spektroskopija jedna je od najprikladnijih tehnika za određivanje konstanti stabilnosti kompleksa vezanih vodikovom vezom, K_c . Međutim, koliko je osjetljiva na detekciju novonastalih specija, toliko je podložna i pogreškama koje se javljaju u pojedinim koracima istraživanja. Svrha ovog rada, edukativne prirode, opis je metodologije koja se primjenjuje u karakterizaciji vodikovih veza kao i naglašavanje svih izvora nesigurnosti koje utječu na eksperimentalno određenu K_c . Uz to, spomenuti su i prodiskutirani pojedini programi vezani za multivarijantnu analizu dobivenih spektara.

Ključne riječi: Vodikova veza, IR-spektroskopija, koncentracijska ravnotežna konstanta reakcije vezanja, Lambert-Beerov zakon

Uvod

Istraživanje fenomena poput molekuskog prepoznavanja ili samoudruživanja molekula u otopini i čvrstom stanju vođenih primarno vodikovim vezama (HB) nezamislivo je bez njihove temeljite fizikalno-kemijske karakterizacije.¹ Termodinamička veličina kojom se najčešće opisuje vezanje HB-donora **A** i HB-akceptora **B** je standardna ravnotežna konstanta reakcije vezanja, K^\ominus , odnosno K_c kao jedna od njezinih aproksimacija.² U istraživanju HB-a IR-spektroskopija se već desetljećima neprestano i iznova dokazuje kao najosjetljivija i najučinkovitija tehnika^{3,4} jer se nastali HB-kompleks, **C**, vrlo lako registrira i pripadajuća mu vrpca s većom ili manjom lakoćom analizira. Cilj je ovog rada, primarno poučne prirode, izložiti čitatelju proceduru određivanja K_c iz IR-spektara pri kompleksiranju u najjednostavnijoj stehiometriji, $N(\mathbf{A}) : N(\mathbf{B}) = 1 : 1$, kao i svih izvora pogrešaka⁵ koje su prisutne u pojedinim fazama takve eksperimentalne studije.

Kompleksiranje HB-donora **A** i HB-akceptora **B** u inertnom otapalu



najčešće se istražuje metodom visokog razrjeđenja.⁶ Osnovna obilježja spomenute metode su: i) međusoban odnos početnih (analitičkih) koncentracija reaktanata je $c_0(\mathbf{A}) \ll c_0(\mathbf{B})$ te ii) reaktanti su zastupljeni u vrlo malom udjelu u odnosu na inertno otapalo što je aproksimacija idealnih uvjeta u kojima je jedina dominantna interakcija ona koja vodi do stvaranja kompleksa $\mathbf{C} \equiv \mathbf{A} \cdots \mathbf{B}$ neposredno preko H-atoma.⁺ Koncentracijska ravnotežna konstanta reakcije vezanja (1)

$$K_c = \frac{[\mathbf{C}]}{[\mathbf{A}][\mathbf{B}]} \quad (2)$$

može se iskazati u terminu ravnotežne koncentracije slobodnog oscilatora, $[\mathbf{A}]$, (3), te ravnotežne koncentracije kompleksa, $[\mathbf{C}]$, (4):

$$K_c = \frac{c_0(\mathbf{A}) - [\mathbf{A}]}{[\mathbf{A}](c_0(\mathbf{B}) - c_0(\mathbf{A})) + [\mathbf{A}]^2} \quad (3)$$

$$K_c = \frac{[\mathbf{C}]}{c_0(\mathbf{A})c_0(\mathbf{B}) - [\mathbf{C}](c_0(\mathbf{A}) + c_0(\mathbf{B})) + [\mathbf{C}]^2} \quad (4)$$

Ravnotežne koncentracije slobodnog HB-donora, $[\mathbf{A}]$, i kompleksa $[\mathbf{C}]$ mogu se odrediti iz apsorbancija vrpce slobodnog te vezanog oscilatora **A–H** primjenom Lambert-Beerova zakona.⁷ Ukupna koncentracija komponente **A** u smjesi postaje

$$A = A_f + A_b \equiv \varepsilon_f d [\mathbf{A}] + \varepsilon_b d [\mathbf{C}] \quad (5)$$

gdje je A apsorbancija, d duljina puta, a ε su označeni molarni apsorpcijski koeficijenti vrpce komponenti **A** i **C** određeni u maksimumu apsorpcije, a indeksi f i b odnose na slobodne i vezane oscilatore **A–H**. Pretpostavimo radi jednostavnosti da su vrpce slobodnog i vezanog oscilatora potpuno odvojene i da se ne prekrivaju niti međusobno niti s drugim vrpcama. Za određivanje K_c pomoću jedn. (3), potrebne su dvije veličine: i) A_f izmjerena u ternarnom sustavu (**A** + **B** u inertnom otapalu) te ii) molarni apsorpcijski koeficijent slobodnog oscilatora ε_f , koji je moguće odrediti samo koncentracijskom studijom komponente **A** u čistom otapalu pri danoj (uglavnom sobnoj) temperaturi. Tako dobivena K_c ,

* Dr. sc. Danijela Vojta, e-pošta: dvojt@irb.hr

⁺ Interakcije pojedine komponente smjese i otapala smatraju se zanemarljivima u odnosu na navedenu HB, a eventualna samoasocijacija HB-donora ($\mathbf{A} \cdots \mathbf{A}$) je, zbog pažljivo odabrane koncentracije HB-donora, svedena na minimum

$$K_c = \frac{c_0(\mathbf{A}) - \frac{A_f}{d \varepsilon_f}}{\frac{A_f}{d \varepsilon_f} \left(c_0(\mathbf{B}) - c_0(\mathbf{A}) + \frac{A_f}{d \varepsilon_f} \right)} \quad (6)$$

iako egzaktno određena, zahtijeva nužno provođenje dva eksperimenta. Budući da se K_c može odrediti i iz apsorbanije vrpce vezanog oscilatora, A_b , uvrštavanjem drugog člana iz jedn. (5) u jedn. (4) dolazi se do relacije

$$\frac{A_b}{d} = \varepsilon_b \frac{1}{2} \left\{ \left(c_0(\mathbf{A}) + c_0(\mathbf{B}) + \frac{1}{K_c} \right) \pm \sqrt{\left(c_0(\mathbf{A}) + c_0(\mathbf{B}) + \frac{1}{K_c} \right)^2 - 4 c_0(\mathbf{A}) c_0(\mathbf{B})} \right\} \quad (7)$$

pa se K_c i ε_b mogu odrediti simultano nelinearnom regresijom.⁸⁺

Za rješavanje (6) i (7) potrebno je odrediti duljinu svjetlosnog puta ćelije, d , što je izvedivo na dva načina: i) primjenom sekundarnih standarda sukladno Bertijevoj proceduri¹¹ te ii) brojanjem interferencijskih pruga.¹² Prvi način propisuje snimanje spektra jednog od četiriju sekundarnih standarda: benzena (C_6H_6), toluena (C_7H_8), klorbenzena (C_6H_5Cl) ili diklormetana (CH_2Cl_2) te obradu snimljenih spektara programom irytrue kao dijelom paketa ytir. Za određivanje d analiziraju se različite vrpce sekundarnih standarda, ovisno o nominalnoj debljini ćelije. Drugi način sastoji se od odabira spektralnog područja u kojem su interferencijske pruge jasno vidljive i prebrojive, što kod pojedinih ćelija može predstavljati ograničenje. Primjerice, kod ćelija debljine 0,5 cm i debljih, interferencijske pruge se uopće ne vide, a kod ćelija tanjih od 50 μm broj interferencijskih pruga je tako mali da d nije moguće odrediti sa sigurnošću.⁺⁺

Sama izvedba eksperimenta, počevši od priređivanja otopina, snimanja te obrade i analize spektara svakako je važan čimbenik koji doprinosi pogrešci u K_c . Međutim, i uz besprijekorno proveden eksperiment, *Adámek i Ksandr*^{13,14} pokazali su da se odabirom prikladnih eksperimentalnih uvjeta uvijek prisutna pogreška u K_c može smanjiti i to dvojako: i) ako se, uz pretpostavljenu K_c , primjenjuju odgovarajuće početne koncentracije reaktanata¹³ te ii) ako je $[C]$ dobivena iz apsorbanije vrpce koja se nalazi u određenom rasponu vrijednosti.¹⁴

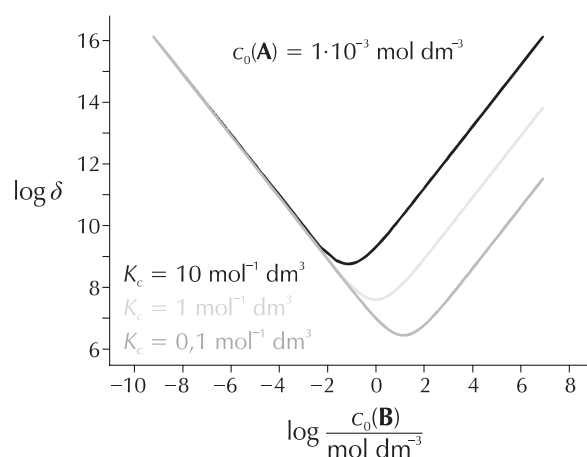
Budući da je K_c , prema (4), funkcija $c_0(\mathbf{A})$, $c_0(\mathbf{B})$ te $[C]$, pogreška u pojedinoj navedenoj veličini utječe i na pogrešku u K_c . Analitičke se koncentracije reaktanata u otopini eksperimentalno lako reguliraju i mogu se prirediti s visokom točnošću pa je pogreška u K_c većinom uvjetovana pogreškom u $[C]$

$$\sigma_{K_c} \approx \delta \cdot \sigma_{[C]}, \quad (8)$$

gdje je δ odgovarajući faktor proporcionalnosti čija vrijednost ovisi o $c_0(\mathbf{A})$, $c_0(\mathbf{B})$ te pretpostavljenoj K_c

$$\delta = \frac{1}{c_0(\mathbf{B}) \cdot c_0(\mathbf{A})} \cdot \{1 + K_c(c_0(\mathbf{B}) + c_0(\mathbf{A}))^2\} \quad (9)$$

Za K_c procijenjenu na temelju preliminarnih mjerenja ili mjerenja sličnih sustava te ako je $c_0(\mathbf{A})$ konstantna, vrijednost $c_0(\mathbf{B})$ za koju je δ minimalan dobiva se grafički (slika 1).



Slika 1 – Ovisnost δ o $c_0(\mathbf{B})$ za konstantan $c_0(\mathbf{A})$ i procijenjen K_c
Fig. 1 – The dependence of δ on $c_0(\mathbf{B})$ for constant $c_0(\mathbf{A})$ and estimated K_c

Tako je za pretpostavljen K_c , primjerice, reda veličine $10 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3$ pronađeno da je idealan raspon koncentracija \mathbf{B} komponente $0,01 < c_0(\mathbf{B}) < 1 \text{ mol dm}^{-3}$ uz fiksiranu koncentraciju \mathbf{A} komponente od $c_0(\mathbf{A}) = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$.⁺⁺⁺ Spomenuti autori svakako nisu jedini koji su tragali za optimalnim koncentracijskim rasponom reaktanata radi reguliranja pogreške u K_c . *Conrow i sur.*¹⁵ te, neovisno o njima, *Rosseinsky i sur.*¹⁶ proveli su iscrpnu analizu pogreške na sintetičkom skupu podataka koje su činile odabrani $c_0(\mathbf{A})$, $c_0(\mathbf{B})$ te K_c i ε_b . Dizajniranjem eksperimenta u kojem je $c_0(\mathbf{A}) \approx 0,005 \text{ mol dm}^{-3}$, dok se $c_0(\mathbf{B})$ mijenja od 0,01 do 0,1 mol dm^{-3} , dobili su najmanje pogreške u K_c za koju je pretpostavljeno da iznosi $10 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3$. Istražujući posebice slabe HB, *Person*¹⁷ je ustanovio da je pogreška u K_c minimalna kad je $[C]$ reda veličine kao i $c_0(\mathbf{A})$. Koncentracija kompleksa \mathbf{C} , kao i bilo koje druge specije, određuje se iz spektralnih parametara pripadajuće vrpce, pa je pokazano da je relativna pogreška u apsorbaniji,¹⁴ $r_A = \frac{\sigma_A}{A}$, najmanja u rasponu $A = 0,5 \pm 0,2$ što je i prikazano na slici 2.

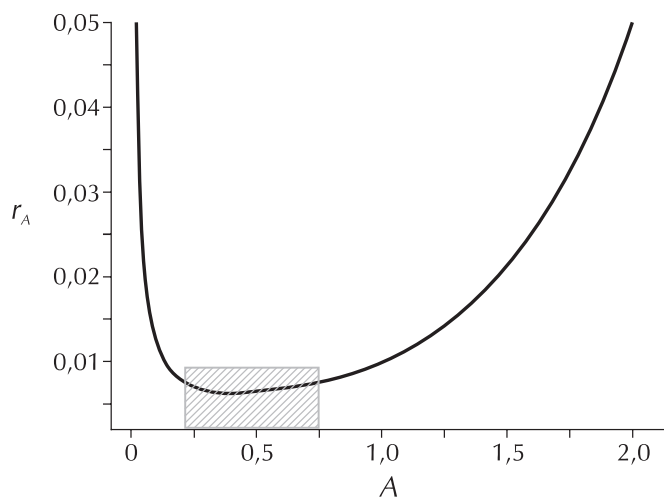
Uz pogreške koje nehotice i redovito unosi sam eksperimentator postoje i one neovisne o njegovu djelovanju. Instrumentna se pogreška manifestira dvojako: i) pogreška u ponovljivosti valnih brojeva te ii) znatno veća pogreška u ponovljivosti apsorbanije.

Položaj pojedine vrpce odnosno njezin pomak zbog određenog podražaja važan je podatak ne samo u spektralnoj asignaciji već i indikator odgovarajućih fenomena i promje-

⁺ Svojedobno su se intenzivno primjenjivale Benesi-Hildebrandova^{7,9} odnosno Scottova¹⁰ linearizacija jednadžbe (7) radom u odgovarajućim eksperimentalnim uvjetima

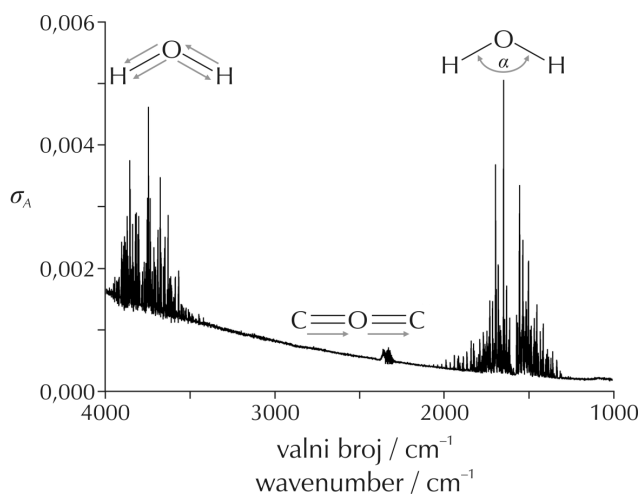
⁺⁺ Iz tih se razloga preporučuje primjena programa irytrue koji se može primijeniti na gotovo sve upotrijebljene ćelije u IR-spektroskopiji.

⁺⁺⁺ Za $K_c = 1 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3$ idealan je koncentracijski raspon \mathbf{B} komponente $1 < c_0(\mathbf{B}) < 10 \text{ mol dm}^{-3}$, a za $K_c = 0,1 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^3$ je $1 < c_0(\mathbf{B}) < 10 \text{ mol dm}^{-3}$ (prema slici 1).



Slika 2 – Preporučeni interval apsorbanije analiziranih vrpca
Fig. 2 – Recommended absorbance interval of analysed bands

na u sustavu. Da bi se pomak smatrao signifikantnim, on mora biti izvan granica pogreške u ponovljivosti instrumenta u valnim brojevima. Događaj pogreška može se odrediti usporedbom položaja vrpca polistirenskog filma kao standarda snimljenog na odgovarajućem instrumentu s položajima vrpca koje su za njega tabelirane.¹⁸ Pogreška u određivanju apsorbanije na upotrijebljenom instrumentu može se testirati 24-satnim snimanjem spektara zraka pri čemu, zbog nelinearnog odziva detektora i apsorpcije H₂O (simetrično i antisimetrično istezanje veze O–H između 4000 i 3500 cm⁻¹ i svijanje kuta H–O–H između 2000 i 1500 cm⁻¹) i CO₂ (antisimetrično svijanje veze C=O pri ≈ 2300 cm⁻¹) iz atmosfere (slika 3), pogreška u apsorbaniji nije jednaka pri svim valnim brojevima. Jasno je da će vrpce čiji se položaj podudara s onim kod molekula H₂O te CO₂ biti najpodložnije pogreškama, no opetovanim snimanjem pozadinskog spektra neposredno prije snimanja spektra uzorka i ta će se pogreška, premda uvijek prisutna, maksimalno reducirati.



Slika 3 – Pogreška u apsorbaniji instrumenta: nelinearnost odziva detektora te apsorpcija H₂O i CO₂
Fig. 3 – Uncertainty of instrumental absorbance: Nonlinearity of detector response, and absorption of H₂O and CO₂

Odabir spektralnog područja i povlačenje bazne linije

Nakon oduzimanja spektra čistog otapala od spektra terne smjese potrebno je odabrati spektralno područje u kojem se nalaze vrpce koje potječu od istezanja slobodnog i vezanog A–H oscilatora, a njihovoj obradi prethodi korekcija bazne linije. Ne samo da subjektivan odabir točaka kroz koje će se ona povući unosi nesigurnosti u spektralnu analizu već, štoviše, u prošlosti se smatrala jednim od najvećih izvora pogreške.¹⁹ Da bi se pogreška zbog korekcije bazne linije smanjila, potrebno je više puta snimiti uzorak i odabrati uporišne točke u kojima je apsorpcija bilo koje komponente uzorka minimalna.

Univarijantna analiza podataka

Dosadašnjim razmatranjem pokazalo se da su A_i i A_b najdražgocjenija veza s K_c . Određivanje A vrpce od interesa provodi se ili numeričkom integracijom, ako je vrpca usamljena, ili usklađivanjem na određenu analitičku funkciju zbog njezina prekrivanja s drugim vrpcama (idealno je Lorentzian²⁰ u pitanju). U procesu prilagodbe spektralne vrpce na danu analitičku funkciju, koji je uz današnja računala više-manje automatiziran proces, početnom procjenom parametara se ne utječe na pogrešku u tolikoj mjeri koliko se utječe odabirom širine istraživanog spektralnog područja.²¹ Naposljetku, iako u manjoj mjeri, primjena različitih apodizacijskih funkcija u svrhu dobivanja digitaliziranih spektara utječe na oblik vrpca, čime otežava usklađivanje kompleksnije strukture.^{22,23} No s tim se problemom spektroskopičari konstantno susreću, pa su sve dileme i nedoumice koje se javljaju na takvom putu već iscrpno analizirane i moguće ih je uspješno predvidjeti.²⁴

Multivarijantna analiza podataka

Za razliku od spomenute univarijantne analize podataka, multivarijantni pristup, posebice analiza glavnih komponenta, PCA, (*Principal Component Analysis*) te faktorska analiza, FA, (*Factor Analysis*) usavršavaju se desetljećima^{25,26} i danas se rutinski primjenjuju u rješavanju mnogih spektroskopskih problema.²⁷

Osim što se u vrlo kratkom vremenskom roku može istražiti i analizirati znatno šire spektralno područje te s lakoćom utvrditi u kojem se dijelu spektra događaju relevantne promjene, moguće je objektivno prosuditi koje su spektralne promjene korelirane, a koje nisu. Zatim, zbog istraživanja otopina u kojima nastaju različite molekulske vrste manja je vjerojatnost da će nam postojanje neke specije promaknuti ako razmatramo čitav spektar, a ne samo jednu točku odnosno jedan njegov dio. Naposljetku, multivarijantnim pristupom šum se nepristrano eliminira, pa nema bojazni da je sam istraživač pogrešno procijenio pojedine spektralne karakteristike proglašivši ih artefaktima odnosno bespotrebno zakomplicirao analizu pripisavši fizikalni smisao zapravo beznačajnim ili zanemarivim spektralnim promjenama. Zbog univerzalne matematičke te matematičko-statističke podloge,²⁸ spomenuti su alati upotrijebljeni i u razvoju računalnih programa poput Specfita²⁹ te HypSpec-a kao zasebnog programa u paketu Hyperquad2008³⁰ (odnosno svih njegovih inačica), kojim se određuju fizikalne veličine, među ostali-

ma i K_c . Opisivanje rada pojedinog programa daleko je izvan dosega ovog rada, pa se zainteresiranom čitatelju može preporučiti odgovarajuća literatura.^{29,30}

Također valja imati i na umu da se svi programski paketi temelje na odgovarajućim modelima,²⁵ pa je potrebno dobro istražiti što uistinu želimo odrediti i koji je zaista najefikasniji način da se do toga i dođe. Ako je neizvjesnost u stehiometriji kompleksiranja svedena na minimum i ako su spektri analizirani do stupnja na kojem se sa sigurnošću zna na koju se spektralnu regiju treba usredotočiti, kao što je u ovom tekstu sve temeljeno na kompleksima $N(\mathbf{A}) : N(\mathbf{B}) = 1 : 1$, univarijantna analiza može biti zadovoljavajuć izbor. No svakako se preporučuje provedba i multivarijantne analize i to iz barem dvaju razloga: i) da se dobiveni podaci što nepristranije sagledaju te ii) da se eksperimentator nauči dovoditi u situacije u kojima mora birati između vrlo sličnih rezultata i time svjesno primora opredjeljivati se za one koji u danoj situaciji imaju veću težinu zbog prirode fizikalnog problema pred njim, a ne samo slijepo primjenjivati programe i mogućnosti koje mu se nude. Ta dva podatka bi, u slučaju korektno provedbe programa i odabira modela, trebala dati jednaku vrijednost spomenute veličine uključujući i vrijednost eksperimentalne odnosno instrumentne pogreške.

Zaključak

IR spektroskopija je moćno oruđe u određivanju K_c između HB-donora **A** i HB-akceptora **B**. Uz nedostatke i propuste u eksperimentalnoj izvedbi u određivanju K_c , gdje je ručni rad eksperimentatora na prvom mjestu, odabir prikladnog koncentracijskog područja i raspona apsorbancije vrpce zaista treba shvatiti kao imperativ, kao i instrumentna ograničenja u kojima dominira nesigurnost u ponovljivosti apsorbancije vrpce. Također, snimljene spektre uzoraka priređenih prema odgovarajućoj proceduri potrebno je i obraditi, odnosno analizirati na adekvatan način. Naposljetku, sve i ako je pred istraživačem minimalan broj nepoznanica i nepredvidljivosti vezanih za sustav, nije suvišno primijeniti i univarijantnu i multivarijantnu analizu dobivenih podataka, ako ništa drugo, barem radi izgradnje vlastite predodžbe o dobitcima, ali i rizicima odabira pojedinog pristupa.

ZAHVALA

Ovaj rad je nastao u okviru projekta "Makrociklički ligandi, strukturne promjene otopina i molekularne spektroskopije" pod vodstvom dr. sc. Gorana Baranovića (br. projekta 098-0982904-2927) zahvaljujući potpori Ministarstva znanosti, obrazovanja i športa. Za sve sugestije, komentare i primjedbe autorica zahvaljuje dr. sc. Vladislavu Tomišiću.

Popis simbola i kratica

List of symbols and abbreviations

| | |
|-------|--|
| A | – apsorbancija – absorbance |
| A_b | – apsorbancija vrpce istezanja vezanog oscilatora A–H – absorbance of the band originated from the stretching of bounded A–H oscillator |

| | |
|-------------------|--|
| A_f | – apsorbancija vrpce istezanja slobodnog oscilatora A–H – absorbance of the band originated from the stretching of free A–H oscillator |
| A | – donator H-atoma u vodikovoj vezi – hydrogen-bond donor |
| [A] | – ravnotežna množinska koncentracija komponente A , mol dm ⁻³ – equilibrium amount concentration of the A component, mol dm ⁻³ |
| B | – akceptor H-atoma u vodikovoj vezi – hydrogen-bond acceptor |
| [B] | – ravnotežna množinska koncentracija komponente B , mol dm ⁻³ – equilibrium amount concentration of the B component, mol dm ⁻³ |
| C | – kompleks nastao stvaranjem vodikove veze između A i B komponente – HB-complex |
| [C] | – ravnotežna množinska koncentracija komponente kompleksa C , mol dm ⁻³ – equilibrium amount concentration of the C complex, mol dm ⁻³ |
| $c_0(\mathbf{A})$ | – početna (analitička) množinska koncentracija komponente A , mol dm ⁻³ – initial (analytical) amount concentration of the A component, mol dm ⁻³ |
| $c_0(\mathbf{B})$ | – početna (analitička) množinska koncentracija komponente B , mol dm ⁻³ – initial (analytical) amount concentration of the B component, mol dm ⁻³ |
| d | – duljina svjetlosnog puta, cm – pathlength, cm |
| FA | – faktorska analiza – factor analysis |
| HB | – vodikova veza – hydrogen bond |
| IR | – infracrveno – infrared |
| K^e | – standardna ravnotežna konstanta reakcije vezanja – standard equilibrium constants of the binding reaction |
| K_c | – koncentracijska ravnotežna konstanta reakcije vezanja, (konstanta stabilnosti kompleksa), mol ⁻¹ dm ³ – concentration equilibrium constants of the binding reaction, (stability constant), mol ⁻¹ dm ³ |
| N | – broj molekula u smjesi – number of molecules in mixture |
| PCA | – analiza glavnih komponenata – principal component analysis |
| r_A | – relativna pogreška u apsorbanciji – relative error in absorbance |
| ε_b | – molarni apsorpcijski koeficijent vrpce istezanja vezanog oscilatora A–H , mol ⁻¹ dm ³ cm ⁻¹ – molar absorption coefficient of the band originated from the stretching of bound A–H oscillator, mol ⁻¹ dm ³ cm ⁻¹ |
| ε_f | – molarni apsorpcijski koeficijent vrpce istezanja slobodnog oscilatora A–H , mol ⁻¹ dm ³ cm ⁻¹ – molar absorption coefficient of the band originated from the stretching of free A–H oscillator, mol ⁻¹ dm ³ cm ⁻¹ |
| σ_A | – pogreška u A iskazana standardnom devijacijom – error in A expressed as standard deviation |
| $\sigma_{[C]}$ | – pogreška u [C] iskazana standardnom devijacijom – error in [C] expressed as standard deviation |
| σ_{K_c} | – pogreška u K_c iskazana standardnom devijacijom – error in K_c expressed as standard deviation |

Literatura

References

1. *Christoph Schalley* (ur.), *Analytical Methods in Supramolecular Chemistry*, Wiley, Weinheim, 2006., str. 2–18.
2. *Vi. Simeon*, *Kemijska termodinamika*, Školska knjiga, Zagreb, 1980., str. 46.
3. *G. C. Pimentel*, *A. L. McClellan*, *The hydrogen bond*, Freeman, San Francisco, 1960., str. 67–141.
4. *K. A. Connors*, *Binding constants*, Wiley, New York, 1987., str. 183.
5. *D. A. Skoog*, *D. M. West*, *F. J. Holler*, *Osnove analitičke kemije*, Školska knjiga, Zagreb, 1999., str. 6.
6. *E. M. Arnett*, *L. Joris*, *E. Mitchell*, *T. S. S. R. Murty*, *T. M. Gorrie*, *P. v. R. Schleyer*, *Studies of Hydrogen-Bonded Complex Formation. III. Thermodynamics of Complexing by Infrared Spectroscopy and Calorimetry*, *J. Am. Chem. Soc.* **92** (1970) 2365–2377.
7. *J. Brandmüller*, *K. Seevogel*, *Infrarotische Untersuchungen zur Wasserstoffbrückenbindung bei Pyridin-Alkohol-Gemischen*, *Spectrochim. Acta* **20** (1964) 453–465.
8. *P. Thordarson*, *Determining association constants from titration experiments in supramolecular chemistry*, *Chem. Soc. Rev.* **40** (2011) 1305–1324.
9. *W. Rui*, *Y. Zhi-Wu*, *Validity and Reliability of Benesi-Hildebrand Method*, *Acta Phys.-Chim. Sin.* **23** (2007) 1353–1359.
10. *R. Scott*, *Some comments on the Benesi-Hildebrand equation*, *Rec. Trav. Chim. Pays-Bas Belg.* **75** (1956) 787–789.
11. *J. E. Bertie*, *C. D. Keefe*, *R. N. Jones*, *Tables of Intensities for the Calibration of Infrared Spectroscopic Measurement in the Liquid Phase*, Blackwell Science, 1995., str. 216.
12. *H. Günzler*, *H.-U. Gremlisch*, *Uvod u infracrvenu spektroskopiju*, Školska knjiga, Zagreb, 2006., str. 220.
13. *P. Adámek*, *Z. Ksandr*, *Accuracy of the determination of hydrogen bond association constant by infrared spectroscopy*, *Collect. Czech. Chem. Commun.* **33** (1968) 3053–3056.
14. *P. Adámek*, *Z. Ksandr*, *Optimum conditions for the determination of hydrogen bond association constant by infrared spectroscopy*, *Collect. Czech. Chem. Commun.* **35** (1970) 1587–1590.
15. *K. Conrow*, *G. Dana Johnson*, *R. E. Bowen*, *Machine Computation of Association Constants from Spectrophotometric Data: An Analysis of Errors*, *J. Am. Chem. Soc.* **86** (1964) 1025–1029.
16. *D. R. Rosseinsky*, *H. Kellawi*, *A Statistical Assessment of Association Constants*, *J. Chem. Soc. A* (1969) 1207–1211.
17. *W. B. Person*, *A Criterion for Reliability of Formation Constants of Weak Complexes*, *J. Am. Chem. Soc.* **87** (1965) 167–170.
18. *D. L. Powell*, *R. West*, *Hydrogen bonding studies—VIII. The thermodynamics of hydrogen bonding of phenol to some oxygen-containing molecules and to benzene*, *Spectrochim. Acta* **20** (1964) 983–991.
19. *H. Günzler*, *H. M. Heise*, *IR-Spektroskopie*, Wiley, Weinheim, 1996., str. 30.
20. *J. L. McHale*, *Molecular Spectroscopy*, Prentice Hall, New Jersey, 1999., str. 167.
21. *D. Vojta*, privatne bilješke
22. *F. J. Harris*, *On the use of windows for harmonic analysis with the discrete Fourier transform*, *Proc. IEEE* **66** (1978) 51–83.
23. *D. Vojta*, *G. Baranović*, *Intramolecular couplings and the secondary structure of C≡C stretching bands*, *Vib. Spectrosc.* **52** (2010) 178–187.
24. *P. R. Griffiths*, *J. A. de Haseth*, *Fourier Transform Infrared Spectrometry*, Wiley, New York, 2007., str. 19–93; str. 161–246.
25. *E. R. Malinowski*, *Factor Analysis in Chemistry*, Wiley, New York, 2002, str. 1–27.
26. Home Page of Jon Shlens, <http://www.sn1.salk.edu/~shlens/> (5. 7. 2011.).
27. *H. Mark*, *J. Workmann, Jr.*, *Chemometrics in Spectroscopy*, Elsevier, Amsterdam, 2007., str. 1–137.
28. *P. Gans*, *Data Fitting in Chemical Sciences*, Wiley, Chichester, 1992., str. 183.
29. *M. Maeder*, *A. D. Zuberbühler*, *Nonlinear Least-Squares Fitting of Multivariate Absorption Data*, *Anal. Chem.* **62** (1990) 2220–2224.
30. *P. Gans*, *A. Sabatini*, *A. Vacca*, *Investigation of equilibria in solution. Determination of equilibrium constants with the HYPERQUAD suite of programs*, *Talanta* **43** (1996) 1739–1753.

SUMMARY**Characterization of Hydrogen Bonds by IR Spectroscopy***D. Vojta*

In the identification and quantification of hydrogen bond, as one of the most abundant non-covalent interactions in phenomena like self-assembly and molecular recognition, IR spectroscopy has been employed as the most sensitive method. The performance of the high dilution method enables determination of the stability constant of hydrogen-bonded complex as one of the most important thermodynamic quantities used in their characterization. However, the alleged experimental simplicity of the mentioned method is loaded with errors originating not only from researcher intervention but also independent from it. The second source of error is particularly emphasized and elaborated in this paper, which is designed as the recipe for the successful characterization of hydrogen bonds. Besides the enumeration of all steps in the determination of hydrogen-bonded stability constants, the reader can be acquainted with the most important experimental conditions that should be fulfilled in order to minimize the naturally occurring errors in this type of investigation. In the spectral analysis, the application of both uni- and multivariate approach has been discussed. Some computer packages, considering the latter, are mentioned, described, and recommended.

*Rudjer Boskovic Institute
Department for Organic Chemistry and Biochemistry
Laboratory for Molecular Spectroscopy
Bijenička 54, 10 000 Zagreb, Croatia*

*Received August 1, 2011
Accepted October 24, 2011*