

REAKCIJSKA KALORIMETRIJA I NJEZINA
PRIMJENA U BIOKEMIJI, FIZIOLOGIJI
I SRODNIM PODRUČJIMA

V. L. SIMEON

*Institut za medicinska istraživanja i medicinu rada JAZU, Zagreb**(Primljeno 5. VII 1973)*

Opisane su najvažnije vrste kalorimetrijskih uređaja (isoperibolni, adijabatski, isotermni, kondukcijski) i razmotrena njihova osjetljivost i pouzdanost. Navedeni su primjeri kalorimetrijskih tehnika, kao termodinamičkih i kao analitičkih metoda u biochemiji, fiziologiji i termobiologiji.

Svaka fizikalna ili kemijska promjena gotovo bez izuzetka biva popraćena stanovitim toplinskim učinkom: ili se pri takovoj promjeni oslobodi ili se pak utroši neka količina topline. Upravo stoga toplinska su mjerenja gotovo universalno primjenljiv način otkrivanja fizikalnih ili kemijskih promjena, a također i njihova kvantitativnog proučavanja. Toplinska, točnije kalorimetrijska mjerenja mogu biti sama sebi svrhom — ako istraživača zanima energetska vid proučavanoga procesa, — ili pak mogu biti korisno sredstvo za neku praktičnu svrhu (slijeđenje toka procesa, kvantitativno određivanje količine neke tvari itd.).

Universalna primjenljivost kalorimetrijskih mjerenja nije samo njihova odlika, već ujedno i najveći nedostatak: ta mjerenja nisu naime selektivna, a pogotovu ne specifična, što može otežati njihovu analitičku primjenu, ali joj nije nikako nesavladivom preprekom. Druga teškoća u svezi s tim mjerenjima jest metodičke dotično tehničke naravi: mjerenja topline sve do nedavno bila su razmjerno slabo reproducibilna, osobito ako je valjalo mjeriti malene količine topline. U novije vrijeme razvijen je niz kalorimetara koji se odlikuju visokom osjetljivošću, ali — istodobno — i točnošću i preciznošću jednakom kao kod drugih mjernih metoda. Zbog toga, kalorimetrijske metode sve se više primjenjuju, i to u znanstvenim područjima izvan fizike i fizikalne kemije, gdje su već dulji niz godina — iako smatrane pomalo eksotičnima — bile ipak donekle udomaćene. Tako se npr. kalorimetrija počinje primjenjivati u

enzimologiji (kako u enzimskoj analitici tako i za proučavanje energetike enzimskih reakcija), termobiologiji (osobito malih biljaka i životinja), bakteriologiji i analitičkoj kemiji.

Svrha je ovomu članku prikazati suvremene mikrokalorimetrijske metode, tj. visoko osjetljive kalorimetrijske postupke (koji ujedno zahtijevaju male količine mjernoga uzorka), njihove teorijske zasade i instrumentalnu izvedbu, te njihovu primjenu u biokemiji, (pato)fiziologiji i srodnim im znanostima. Ovaj prikaz neće obuhvatiti metode kombustijske kalorimetrije (kalorimetrije sagorijevanja), jer je njihova primjena razmjerno ograničena, dok druge vrste kalorimetara postaju sve češće upotrebljavan pribor u znanosti i praksi. Na taj način želi se pridonijeti popularizaciji mikrokalorimetrije, a znanstvene i stručne radnike izvan područja fizike i kemije upozoriti na njezinu korisnost.

OSNOVNA NAČELA

Kalorimetrijski uređaji mogu se klasificirati na različite načine: prema toplinskim uvjetima, namjeni, agregatnom stanju istraživanog sistema itd. Razdioba, koja je načinjena u ovom radu, osniva se na toplinskim uvjetima, jer o njima ponajviše ovise građa i osobine kalorimetra. Prije izlaganja te klasifikacije valja napomenuti da će ovdje biti prikazani samo tzv. reakcijski (mikro)kalorimetri i njihova primjena. To su uređaji namijenjeni studiju reakcija u tekućoj fazi i oni se najčešće upotrebljavaju. Ostale vrste kalorimetrije jesu: evaporacijska kalorimetrija, kalorimetrija otapanja, kombustijska kalorimetrija, kalorimetrija toplinskih kapaciteta itd.

Tri su osnovna načina za mjerenje količine topline razvijene ili utrošene u nekomu fizikalnom ili kemijskom procesu:

a) Mjeri se promjena temperature u uređaju koji je toplinski izoliran od svoje okoline, tako da s njom izmjenjuje tako mali dio od toplinskog učinka proizvedenog u kalorimetru. Ako je pri tom okolina kalorimetra na stalnoj temperaturi, zove se takav kalorimetar *isoperibolnim*; ako pak uopće nema izmjene topline između kalorimetra i njegove okoline, tada je to *adijabatski* kalorimetar.

b) Sav se toplinski učinak proizveden u kalorimetru izmjenjuje s okolinom, koja ima stalnu temperaturu. Takvi kalorimetri ne smiju biti termički izolirani, a nazivaju se *isotermnima*.

c) Veći dio toplinskoga učinka izmjenjuje se s okolinom, a na prikladan način mjeri se *toplinski tok*, tj. brzina izmjene topline s okolinom. To su tzv. *kondukcijski* kalorimetri. Toj vrsti pripadaju gotovo svi današnji mikrokalorimetri, dok uređaji sagrađeni na adijabatskom, isoperibolnom ili isotermnom načelu ponajčešće služe za mjerenje većih količina topline (reda veličine 1 cal ili više).

Mikrokalorimetar se danas definira kao instrument kojim se mogu mjeriti malene količine topline (od 0,1 mcal na više), a njegova je osjetljivost ili, točnije, moć razlučivanja otprilike 1–10 μ cal, dakle nekoliko

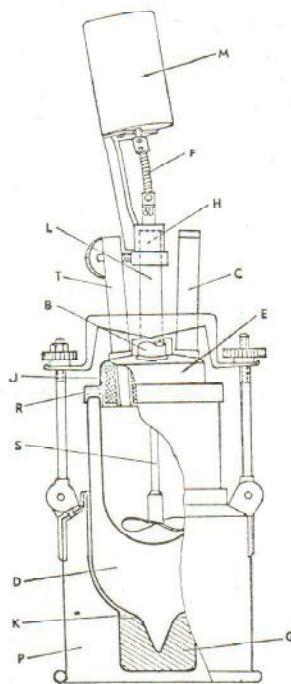
mikrokalorija. Pri tome se podrazumijeva da za mjerenje nije potrebno više nego nekoliko mikromolova proučavane tvari, otopljene u malom volumenu (ne više od 10—20 cm³) otapala.

Valja reći riječ-dviije o jedinicama kojima se mjere toplinske veličine. Količina topline — kao i svaki drugi oblik energije — mjeri se jedinicom joule (1 J = VAs), a prema međunarodno važećim propisima (1) utvrđen je odnos termokemijske kalorije (cal_{th}) i joulea: 1 cal_{th} = 4,184 J. Termodinamička temperatura mjeri se jedinicom kelvin (K), koja je po iznosu jednaka Celsiusovu stupnju: T/K = t/°C + 273,15. U ovom radu upotrebljava se prigodice — pored službene jedinice J i termokemijska kalorija, jer se u veoma velikom broju radova upotrijebila ta jedinica.

ISOPERIBOLNI KALORIMETRI

Većina reakcijskih kalorimetara niže ili srednje osjetljivosti pripada isoperibolnom tipu. Crtež jednoga isoperibolnog kalorimetra (2) prikazan je na sl. 1.

Kalorimetar se nalazi u termostatu, kojemu se temperatura održava stalnom unutar kojih $\pm 0,001^{\circ}\text{C}$, a od termostatskoga medija odijeljen je izolacijskim plaštem, najčešće zrakom, a katkad se taj međuprostor



Sl. 1. Isoperibolni kalorimeter (2): D — Dewarova posuda, E — poklopac, P — podnožje, T, H, C, B — cijevi za termistor, grijalicu, hladilo i biretu s reagensom, R — brtva, S — miješalica, M — motor miješalice

i evakuira. Mjerenje se izvodi tako da se mjeri promjena temperature kalorimetra prouzročena promatranim procesom. To se čini najčešće s pomoću jednoga ili nekoliko termoparova (v. kasnije) ili pak nekom vrsti tzv. otpornog termometra, tj. otpornika kojega je otpor ovisan o temperaturi. Danas se kao otporni termometri najčešće rabe termistori, koji imaju temperaturni koeficijent otpora od oko $4\%/K$.

Otpor termistora nije linearno ovisan o temperaturi, nego se približno ravna po eksponencijalnom izrazu

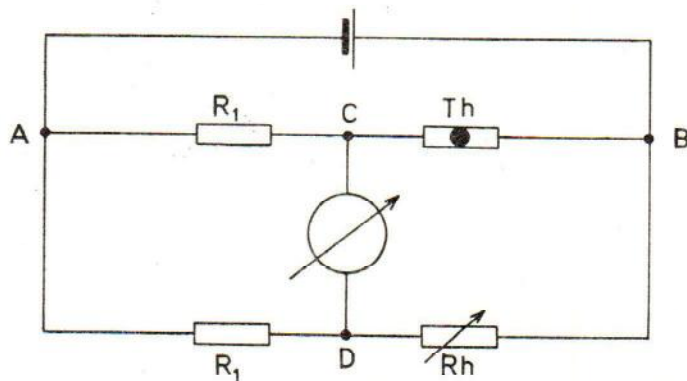
$$R = A \cdot e^{-BT}, \quad (1)$$

gdje R označuje otpor termistora pri temperaturi T , a A i B su konstante karakteristične za dani termistor. No $\lg R$ linearna je funkcija temperature (3):

$$T_1 - T_2 = C \lg (R_1/R_2), \quad (2)$$

pri čemu je $C = -1/0,4343 B$.

Budući da se u kalorimetriji mjere *promjene* temperature, a ne njezina apsolutna vrijednost (ta treba da bude definirana unutar razmjerno širokih granica, recimo $\pm 0,02 K$), za crtanje kalorimetrijskih krivulja dovoljno je crtati zavisnost logaritma otpora u zavisnosti o vremenu. To naravno vrijedi kada se na bilo koji način mjeri izravno otpor termistora. Moguće je također »linearizirati« odziv termistora različitim prikladnim električkim sklopovima. Najjednostavniji je način priključiti termistor kao jednu granu *Wheatstoneova* mosta (v. sl. 2), na početnoj temperaturi ugoditi most i kasnije, kako se temperatura mijenja, mjeriti razliku potencijala u točkama C i D. Umjesto galvanometra G može se priključiti diferencijalno pojačalo i potencijometrijsko pisalo, pa se tako dobije kontinualan zapis toka temperature u kalorimetrijskom pokusu. Razlika potencijala V_{CD} linearno je ovisna o temperaturi, ako odstupanje od ravnoteže mosta nije preveliko; za promjene temperature manje od $0,2 K$ pogreška uslijed nelinearnosti bit će zanemarljivo malena za većinu termistora.



Sl. 2. Termometrijski sklop s termistorom u grani *Wheatstoneova* mosta

Da bi se iz promjene temperature mogla izračunati količina topline razvijena ili utrošena u promatranom procesu, potrebno je kalorimetar baždariti, što se redovito čini tako da se izvede neki proces kojega je toplinski učin točno poznat; za to obično služi *Jouleov* efekt: kroz grijalicu poznatoga otpora R pusti se poznata konstantna istosmjerna struja I , a vrijeme prolaska struje (t) mjeri se točnom zapornom urom. Razvijena toplina tada je

$$Q_0 = RI^2t. \quad (3)$$

Iskaže li se otpor u ohmima, struja u amperima, a vrijeme u sekundama, Q_0 će imati dimenzije $\Omega A^2s = VAs = J$.

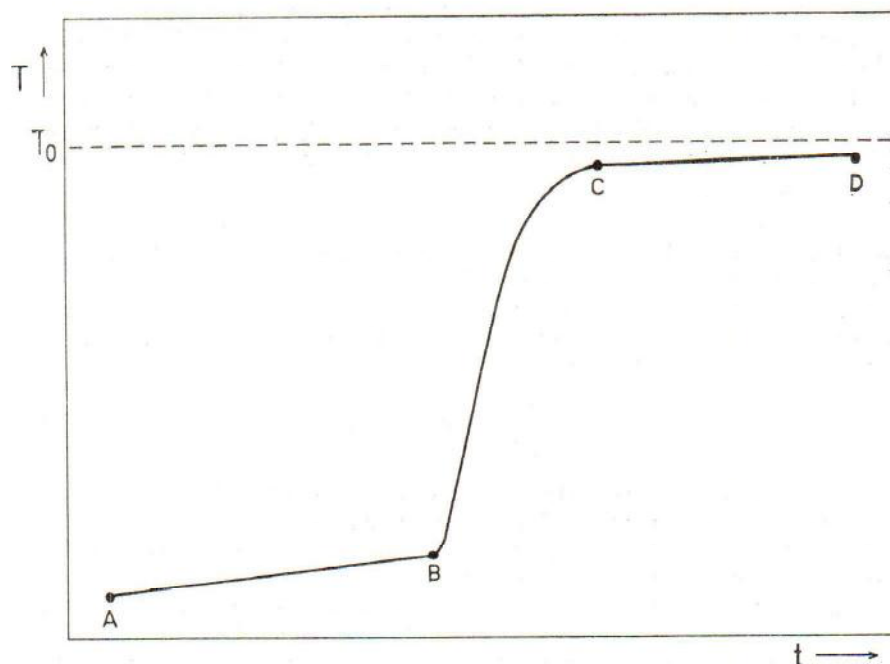
Poznajući toplinu Q_0 i odgovarajući porast temperature ΔT_0 , te promjenu temperature ΔT_x uzrokovanu studiranim procesom, moguće je izračunati toplinski učin toga procesa Q_x :

$$Q_x = \frac{Q_0}{\Delta T_0} \cdot \Delta T_x = \varepsilon \Delta T_x. \quad (4)$$

Konstanta ε naziva se toplinski ekvivalent kalorimetra ili efektivni toplinski kapacitet kalorimetra ili kalorimetrijska konstanta.

U isoperibolnom kalorimetru uvijek postoji stanovita razlika između temperature kalorimetra, T , i temperature okoline, T_0 . To znači da će uvijek postojati stanovit toplinski tok iz okoline u kalorimetar (ako je $T_0 > T$) ili obrnuto, iz kalorimetra u okolinu (ako je $T_0 < T$). Stoga će i mjerena promjena temperature biti veća ili manja od vrijednosti koja bi se izmjerila kada ne bi bilo toga toplinskog toka. Na sreću, moguće je izračunati korekciju za izmjenu topline i doći do vrijednosti ΔT , koja je vrlo točna aproksimacija »prave« vrijednosti. Računanje korekcije za izmijenjenu toplinu osniva se na tzv. *Newtonovu* »zakonu hlađenja« (v. kasnije), tj. na pretpostavci da se sva izmijenjena toplina prenosi vođenjem. Krivulja temperatura-vrijeme, kakva se obično snima pri kalorimetrijskim pokusima, prikazana je na sl. 3. Ovdje je temperatura termostata (T_0) viša nego temperatura u kalorimetru (T). Da se ustanovi brzina izmjene topline s okolinom, neko se vrijeme mjeri temperatura u pravilnim intervalima. Ako je kalorimetar dobro uravnotežen s okolinom, tok krivulje $T = f(t)$, tzv. termograma, bit će linearan, s nagibom g_i . To je tzv. početni period kalorimetrijskog pokusa. U času kada se otopini u kalorimetru doda reagens, ili se pak započne grijanje električkom grijalicom u svrhu kalibracije, počinje glavni period. Nakon dovršenja reakcije, dotično rada grijalice, uskoro će termogram ponovno poprimiti linearan oblik. Od toga časa počinje tzv. završni period. Nagib termograma u završnom periodu (g_f) bit će u promatranom slučaju manji negoli u početnom periodu, jer se zbog eksotermne reakcije temperatura u kalorimetru povisila, pa se razlika temperaturâ $T_0 - T$ smanjila, pa se smanjio i tok topline iz okoline u kalorimetar.

Korigirani porast temperature može se odrediti grafički, kako je to pokazano na sl. 3, ili se može primijeniti numerička metoda po *Regnaultu* i *Pfaundleru* (4—6):



Sl. 3. Termogram eksotermnog procesa u isoperibolnom kalorimetru

$$\Delta T = (T_c - T_B) - [g_i + (T_m - T_i)(g_t - g_i)/(T_f - T_i)](t_c - t_B) \quad (5)$$

$$K = \frac{(g_t - g_i)(T_m - T_i)}{T_f - T_i} \quad (6)$$

T_i , T_m , T_f označuju srednje vrijednosti T u početnomu, dotično glavnom, dotično završnom periodu. Omjer razlike nagibâ početnoga (g_i) i završnog (g_t) perioda prema odgovarajućoj razlici srednjih temperatura naziva se *konstanta izmjene topline* (K) i to je karakteristična veličina za svaki pojedini kalorimetar.

Pored ovih dviju metoda često se primjenjuje i grafička ekstrapolacija po Dickinsonu (4, 5), a sporadički i metoda nazvana »First Geophysical Laboratory Method«, koja je u osnovi slična Regnault-Pfaundlerovoj, ali je nešto eksaktnija (5).

Da bi se pouzdano mogla računati promjena temperature, ΔT , kao i toplinski ekvivalent, ε , potrebno je da temperaturno osjetilo mjeri *prosječnu* temperaturu sadržaja kalorimetra u svakom času. Međutim, na sl. 1. vidi se da u kalorimetru postoji samo jedno takvo osjetilo (gdjeka da ih bude nekoliko, ali ne više od 5 do 6). Prema tomu, treba temperaturu kalorimetrijske tekućine učiniti jednakom u svima njezinim dijelo-

vima, što se postiže miješalicom. No, uporaba miješalice neizbježno je skopčana s *trenjem*, koje je izvor topline. Na sreću, taj je efekt približno konstantan, pa neće uzrokovati znatnijih pogrešaka ako mjerni toplinski efekti nisu premaleni. Naime, konstantna evolucija topline očitovat će se kao da je tok topline u kalorimetar povećan za konstantan iznos, pa će u tom smislu biti promijenjen nagib krivulje temperatura-vrijeme.

Osjetljivost isoperibolnog kalorimetra ograničena je upravo zbog toga što je miješanje prijeko potrebno. Naime, mjereni toplinski efekt mora biti veći nego što je toplina trenja pri miješanju. Ako je uspon krivulje $T = f(t)$ jako velik, što će se dogoditi ako se signal termometra znatno pojača, tada će mali toplinski učin istraživanog procesa biti jedva primjetljiv na krivulji $T = f(t)$ jer će malo utjecati na njezin uspon. S druge strane, pri povećanoj osjetljivosti uređaja za mjerenje temperature jače će se izraziti kolebanja u temperaturi. Miješanje, naime, nije nikada idealno niti trenutačno, pa će se temperaturno osjetilo naći čas u struji toplije, čas hladnije tekućine. Koliko je to osjetljivo, može se razabrati iz ovoga primjera: neka kalorimetar sadržava 10 cm^3 vode i neka se u nj unese toplina od 1 mcal . To će prouzročiti porast temperature od oko $0,0001 \text{ }^\circ\text{C}$. Da bi se taj porast izmjerio relativnom točnošću od $0,5\%$, bit će potrebno upotrijebiti termometar kojemu je moć razlučivanja barem $0,000\ 000\ 5 \text{ }^\circ\text{C}$. Takav termometar nije nemoguće načiniti, ali to ne bi imalo mnogo smisla, jer su temperaturna kolebanja uslijed nesavršenog miješanja mnogo veća negoli osjetljivost termometra.

Veoma slično stanje je i u adijabatskim kalorimetrima, pa se stoga i jedan i drugi instrument rijetko upotrebljavaju u mikrokolorimetriji. No valja istaknuti da je najveći dio termokemijskih mjerenja načinjen upravo isoperibolnim aparatima. Takvi uređaji upotrebljavaju se i za entalpiometrijske titracije (6). Njihova se pouzdanost povećava veoma znatno ako se načini tzv. *dvojni kalorimetar* (engl. *twin calorimeters*), tj. ako se upotrebljavaju dva što sličnije građena, gotovo potpuno jednaka kalorimetra, i to tako da se u jednomu zbiva istraživana reakcija, a drugi služi kao »termička tara« (7). Mjerni se uređaj složi redovito tako da se signal iz »slijepog« kalorimetra odbija od signala iz »glavnog« kalorimetra. Na taj će se način isključiti gotovo potpuno efekt izmjene topline, a u velikoj mjeri i efekt trenja pri miješanju. Pouzdanost dvojnog kalorimetra znatno se povećava ako se primijeni kompenzacijsko načelo (8): zbiva li se u glavnom kalorimetru neki eksotermni proces, temperatura »slijepoga« kalorimetra može se s pomoću električne grijalice stalno održavati jednakom (ili bliskom) temperaturi glavnog kalorimetra. Ako je pak proces u glavnom kalorimetru endoterman, tada se taj učin kompenzira vlastitom grijalicom toga kalorimetra. Prednost takvog postupka jest u tomu što je doziranje Jouleove topline moguće izvesti s mnogo većom preciznošću negoli određivanje reakcijske topline iz temperaturnog skoka. Ako kompenzacija promatranog toplinskog učinka nije potpuna, ali iznosi oko 90% ili više, mogu se tolerirati znatno veće pogreške u određivanju ΔT (jedn. 5 i 6), do kojih može doći ako je promatrani proces dugotrajan (dulji od 15—20 minuta).

ADIJABATSKI KALORIMETRI

Adijabatski su kalorimetri obično vrlo slični isoperibolnima, s tom razlikom da je na neki način spriječen tok topline u kalorimetar ili iz njega. To se u načelu može postići na dva načina:

(1) ako se izolacijski plašt načini od veoma dobrog toplinskog izolatora ili se pak drži evakuiran, a debljina plašta treba pri tom biti što veća; ili ako

(2) temperatura okoline točno slijedi temperaturu kalorimetra, što se može postići automatskim termoregulacijskim uređajem.

Drugi način, iako aparativno mnogo složeniji, mnogo je bolji od prvoga, jer nije moguće načiniti termički apsolutno izoliran kalorimetar: postojat će stanovita izmjena topline kroz električke vodove (termistor, grijalica), kroz osovinu miješalice i uređaj za dodavanje reagensa, te kroz konstruktivne elemente.

Načini li se dvojni adijabatski kalorimetar s kompensacijom toplinskog učinka, dobiva se jedan od najsavršenijih instrumenata za mjerenje razmjerno velikih količina topline (1—2 cal na više), čak i kada promatrani proces traje nekoliko sati. Dobar dio najtočnijih mjerenja u klasičnoj termokemiji načinjen je s pomoću takvih uređaja.

ISOTERMNI KALORIMETRI

Ako je kalorimetar u toliko tijesnom kontaktu sa svojom okolinom da veoma brzo gubi svu razvijenu toplinu (ili pak veoma brzo iz okoline dobiva svu utrošenu toplinu), tada on radi isotermno. Prvi takav kalorimetar konstruirao je *Black* 1760. god., a kasnije ga je usavršio *Bunsen* 1870. god. (*Bunsenov* »ledeni kalorimetar«). Načelna shema toga i srodnih kalorimetara prikazana je na sl. 4. Kalorimetar (K) nalazi se u ravnotežnoj smjesi vode i leda (M). Svaki eksotermni proces uzrokovat će da se dio leda rastali, što će prouzročiti povećanje volumena smjese (M) i stoga porast razine žive u kapilari (T). Obrnuto, endoterma će proces prouzročiti sleđivanje tekuće vode i, konsekventno, sniženje razine žive u kapilari. Temperatura pri tom ostaje konstantnom dok god se sva voda ne sledi ili se sav led ne rastali.

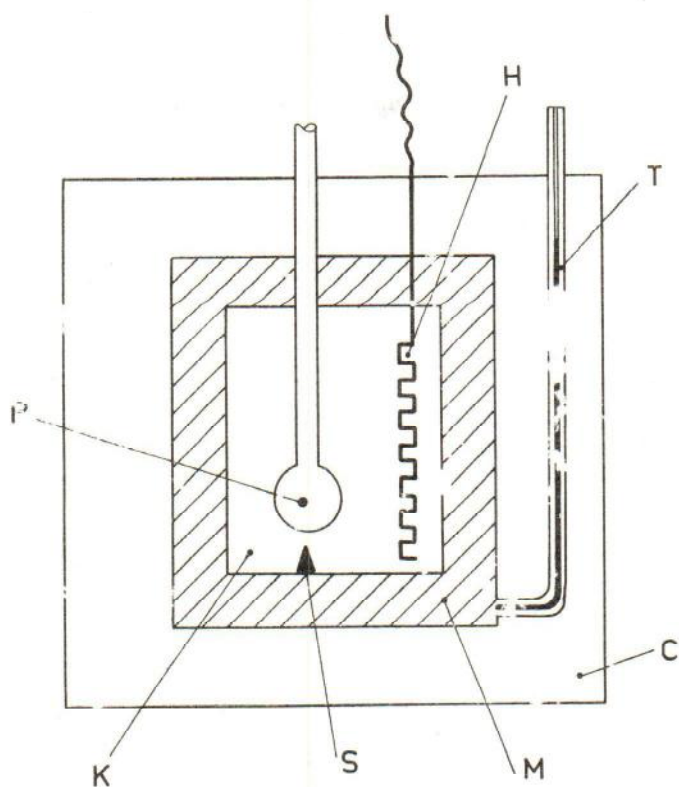
Kalorimetar se može baždariti npr. električki, s pomoću grijalice (H) ili pak kakvom kemijskom reakcijom, koje je toplinski učinak točno poznat. Reakcija se izvodi tako da se u glavni prostor (K) stavi reakcijska otopina, a reagens (tekući ili kruti) nalazi se u ampuli (P) koja se može u željenom trenutku razbiti o šiljak (S).

Preciznost ovakvih kalorimetara kreće se oko 0,5—0,2%, a izuzetno čak i 0,02% (9). Najveće su im mane fiksirana radna temperatura, znatna termička tromost i veoma teška priprava ledenog plašta.

Danas se ledeni kalorimetar rijetko upotrebljava, ali se tu i tamo susreću kalorimetri punjeni difenil-eterom (talište 26,87 °C), a opisan je i kalorimetar za više temperature, u kojemu se nalazi vrijući tetraklor-

metan pri 76,8 °C (ref. 3, str. 162). Svi opisani kalorimetri nazivaju se *transformacijski kalorimetri* (9) ili *kalorimetri s faznim prijelazom* (engl. phase transition calorimeters).

U novije vrijeme grade se *isotermni kalorimetri s toplinskom crpkom* (engl. heat pump calorimeters). U njima se održava stalna temperatura s pomoću regulacijskog uređaja koji — već prema tomu da li je proces u kalorimetru eksoterman ili endoterman — stavlja u pogon grijalicu ili Peltierovu rashladnu bateriju, tako da se zapravo mjeri količina topline koja je potrebna da se kompenzira toplinski učin promatranog procesa (10—13). Ovakvi kalorimetri mogu biti vrlo precizni i točni, ali su veoma složene građe.



Sl. 4. Načelna shema transformacijskoga isoternnog kalorimetra

KONDUKCIJSKI MIKROKALORIMETRI

Prije je rečeno da se svi suvremeni mikrokalorimetri zasnivaju na mjenju toplinskog toka. Taj se tok mjeri koristeći termoelektrički učinak.

Toplinski tok, Φ , definira se kao količina topline (Q) predana od hladnijega tijela toplijemu u jedinici vremena:

$$\Phi = dQ/dt. \quad (7)$$

Postoje tri načina kako se toplina prenosi: kondukcija (vođenje), konvekcija i radijacija (zračenje). Pri projektiranju i izgradnji kalorimetara nastoji se smanjiti prijenos topline iz kalorimetra (ili u nj) konvekcijom i radijacijom. Prijenos topline kondukcijom ravna se po jednostavnom *Newtonovu* »zakonu hlađenja«:

$$\Phi = K(T_0 - T) = K\Delta T \quad (8)$$

gdje T_0 označuje temperaturu okoline, T temperaturu u kalorimetru u času t , a konstanta razmjernosti K naziva se koeficijentom prijenosa topline; ona ovisi o toplinskoj vodljivosti tijela kroz koje se toplina prenosi, kao i o geometrijskim odnošajima (obliku) kalorimetra i njegove okoline. Za dani kalorimetar bit će K konstanta pa će toplinski tok ovisiti samo o razlici temperatura ($T_0 - T$), ako ta razlika nije prevelika. Toplinski tok smatra se pozitivnim ako kalorimetar prima toplinu iz okoline, tj. kada je $T_0 > T$.

Zanimljivo je napomenuti da je gornji zakon formalno analogan Ohmovu zakonu ako se ovaj napiše u obliku:

$$I = GAU, \quad (9)$$

pri čemu se vodljivost, G , definira kao recipročna vrijednost električkog (ohmskog) otpora: $G = 1/R$.

Vrijedi li Newtonov zakon hlađenja za dani kalorimetar, temperatura razlika $T_0 - T$ bit će mjera za toplinski tok, tj. za razmjenu topline kalorimetra s okolinom. Prikladno osjetilo za razliku dviju temperatura jest termoelektrički članak ili, kraće, termočlanak. Takav se članak sastoji od dviju žica načinjenih od različitih kovina (A i B), s time da je u strujni krug uključen još i galvanometar (G). Nalaze li se spojna mjesta (»spojke«) J_1 i J_2 na različitim temperaturama ($T_1 = T_2$), galvanometar G pokazat će stanoviti otklon. U krugu je dakle potekla električna struja, tj. između spojki J_1 i J_2 javila se razlika potencijala, tzv. termička elektromotorna sila, E . Ta je elektromotorna sila razmjerna razlici temperatura ($T_1 - T_2$) spojki J_1 i J_2 :

$$E = E^0(T_1 - T_2), \quad (10)$$

pri čemu su elektromotorne sile u seriju spojenih termočlanaka aditivne. Načini li se serija od n istovrsnih termočlanaka (termobaterija »termostup« ili »termel«) tako da se jedna spojka svakog članka nalazi na temperaturi T_1 , a druga na temperaturi T_2 , ukupni napon termostupa bit će

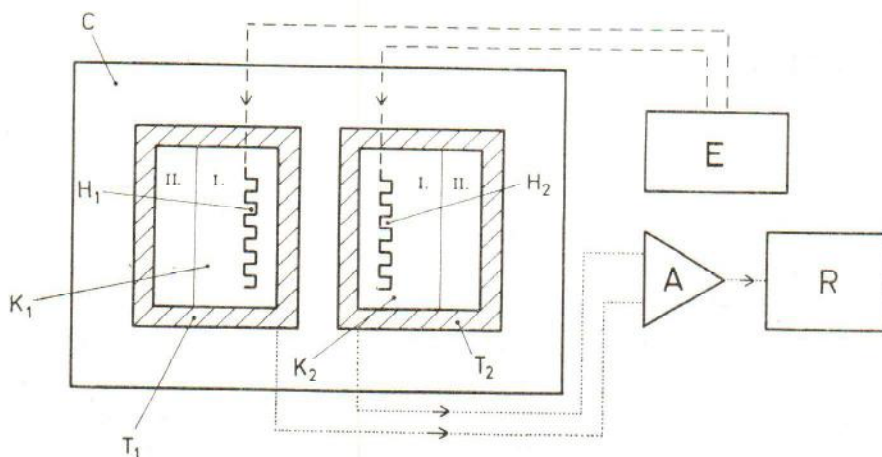
$$U = E_1 + E_2 + E_3 + \dots + E_n = \sum_i E_i = E^0 N (T_1 - T_2) \quad (11)$$

U novije vrijeme grade se termobaterije sve češće od poluvodiča, umjesto od kovina, jer se na spojka poluvodiča javljaju kud i kamo veće termoelektromotorne sile, pa je njihova detekcija i mjerenje lakše i točnije

Stajaći (»batch«) sistemi

Prvi mikrokalorimetar zasnovan na termoelektričkom mjerenju toplinskoga toka sagradio je 1923. u Marseilleu *A. Tian* (14), čiji je rad na razvoju mikrokalorimetrijskih metoda i instrumentacije nastavio njegov nasljednik *E. Calvet*, koji je konstruirao niz različitih tipova kalorimetara za razne svrhe (15—17). Neke od tih instrumenata proizvodi i danas francuska tvrtka Sctaram.

Na sl. 5. prikazana je načelna shema reakcijskog mikrokalorimetra, kojim se mjeri toplinski tok. Kalorimetri (K_1 i K_2) obloženi su termobaterijom (T_1 i T_2) tako, da se sva (ili gotovo sva) toplina razmijenjena s okolinom (metalni blok, C, koji se nalazi u tekućinskom ili zračnom termostatu) prenosi kroz termobaterije. Signal iz termobaterija vodi se u pojačalo (A) i — tako pojačan — registrira se u uređaju za registraciju (R), a to je najčešće potenciometrijsko pisalo. Da bi se kalorimetar mogao električki baždariti, u nj je ugrađena grijalica (H) točno poznatog otpora (na $\pm 0,01\%$), kroz koju se u željenom času može pustiti stabilizirana istosmjerna struja iz jedinice za električku kalibraciju (E). Uređaj (E) ne služi samo kao izvor stalne struje, već je potrebno da se njime mjeri i trajanje prolaska struje kroz grijalicu. To se tehnički najčešće izvodi tako da se sklopka za uključivanje izvora stalne struje mehanički veže sa zapornom urom. Grijalica (H) mora zadržati konstantan otpor i



Sl. 5. Načelna shema stajaćega (»batch«) mikrokalorimetra

na znatno različitoj temperaturi od temperature tekućine u kalorimetru, pa je nužno načiniti je od manganina ili konstantana. Svaki kalorimetar podijeljen je u dva odjeljka (I, II), koji se mogu prema želji spojiti. Na taj način moguće je reakciju dvaju reaktanata izvesti kad god se to želi. Naravno, oblik kalorimetra i pojedinih njegovih odjeljaka može biti različit: tako npr. reakcijska posuda u Wadsövim mikrokalorimetrima (18) koje proizvodi tt. LKB (Stockholm-Bromma, Švedska) pravokutna je oblika, s pregradom koja dijeli dva reaktanta, a koji se mogu pomiješati prevrtanjem cijelog kalorimetra. Reakcijska pak posuda u kalorimetru *Benzingera* i *Kitzinger*a (19) (proizvodi ih tt. *Beckman*) cilindrična je dvostjena posudica, s dvije jažice na unutrašnjem plaštu, u koje se stavljaju mali volumen jednoga ili dvaju reagensa, dok se glavna otopina nalazi u donjem dijelu prostora između dviju stijenki. Miješanje reagensa također se vrši prevrtanjem cijelog uređaja. Na taj se način izbjegava potreba za uporabom rotacijske ili vibracijske miješalice koja bi trenjem razvijala znatne količine topline. *Calvet* upotrebljava razne načine za dodavanje reagensa, najčešće ampule za razbijanje ili razne konstrukcije pipeta.

U pravilu se reakcijski mikrokalorimetri grade u dvojnjoj izvedbi, a električki se spajaju tako da se u pojačalo dovodi *razlika* njihovih signala, tzv. diferencijalni signal. Diferencijalni uređaj ima dvije važne prednosti pred jednostrukim: toplinu razrjeđenja reagensa nije potrebno određivati u posebnom pokusu, već se ona automatski odbija, a pored toga — što je još važnije — uklanja se utjecaj eventualnih kolebanja temperature otopine (C). Signal iz prvoga kalorimetra proporcionalan je razlici temperature kalorimetra i okoline:

$$U_1 = NE^0(T_0 - T_1), \quad (12)$$

a i tok topline iz njega ili u nj:

$$\Phi_1 = K(T_0 - T_1). \quad (13)$$

Prema tomu, signal termobaterije proporcionalan je toplinskom toku:

$$U_1 = \frac{NE^0}{K} \Phi_1 \quad (14)$$

Analogno se može pisati i za drugi kalorimetar:

$$U_2 = \frac{NE^0}{K} \Phi_2, \quad (15)$$

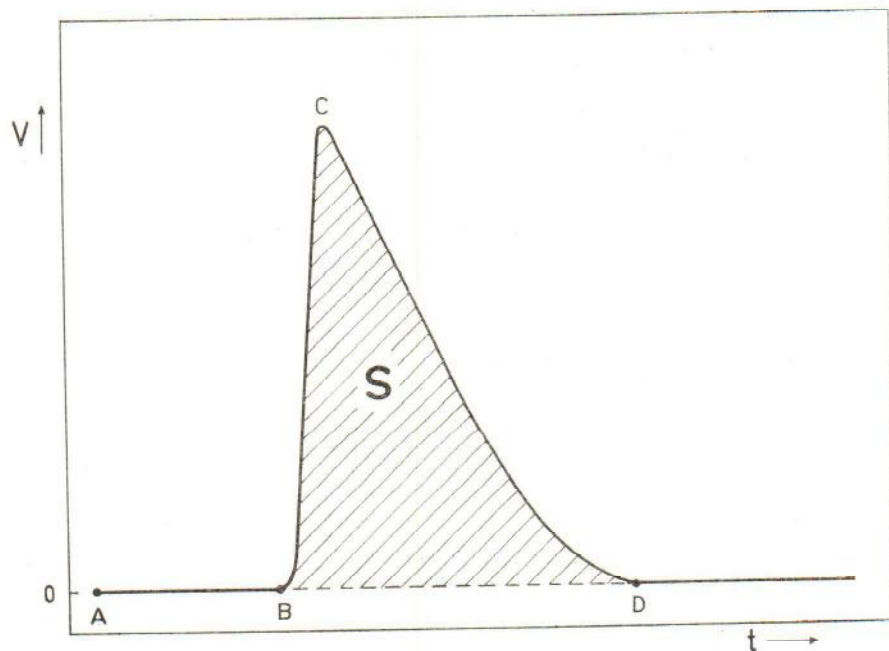
pa je diferencijalni signal

$$V = U_1 - U_2 = \frac{NE^0}{K} (\Phi_1 - \Phi_2). \quad (16)$$

Diferencijalni je signal dakle mjera razlici toplinskih tokova u (ili: iz) dva kalorimetra, uz uvjet da su dva kalorimetra toliko slična da im konstante K i E^0 budu jednake, kako je to pretpostavljeno u navedenim jed-

nadžbama. Također se može lako pokazati da diferencijalni signal neće ovisiti o vrijednosti T_0 , naravno ako se ta vrijednost ne promijeni toliko da više ne bi vrijedio Newtonov zakon za prijenos topline.

Da bi se odredila količina topline razvijene u promatranom procesu, potrebno je bilježiti vrijednosti diferencijalnog signala u ovisnosti o vremenu, tj. snimiti termogram toga procesa, a pored toga potrebno je snimiti i termogram kalibracijskog procesa, kojega je toplina točno poznata. Najčešća je vrst kalibracijskog procesa razvijanje Jouleove topline električkom grijalicom, ali se gdjekad primjenjuju i radioaktivni izvori (npr. radijeva igla točno poznate toplinske snage). Pri tom valja nastojati da količina topline razvijene u »glavnom« pokusu bude podjednaka onoj u kalibracijskom pokusu. Tipični termogram pokazan je na sl. 6.



Sl. 6. Termogram eksotermnog procesa u stajaćemu kondukcijskom mikrokalorimetru

U vremenskom intervalu AB, koji se naziva početni period, ustanovi se položaj nulte linije. U času t_B započet je neki eksoterman proces, koji je trajao otprilike do trenutka t_C , poslije čega se kalorimetar »hladio« do trenutka t_D , kada se diferencijalni signal vratio na početnu vrijednost. Vremenski interval DE naziva se završnim periodom. Potrebno je snimiti termogram i toga perioda da bi se provjerila postojanost nulte linije.

Razvijena toplina proporcionalna je površini (S) ispod linije BCD. Površina S može se odrediti grafičkom ili numeričkom integracijom.

Ako je u glavnom pokusu određena površina S_x , a u kalibraciji površina S_0 , koja odgovara toplini Q_0 , količina topline razvijene u glavnom pokusu izračunat će se iz razmjera

$$Q_0 : Q_x = S_0 : S_x,$$

to jest

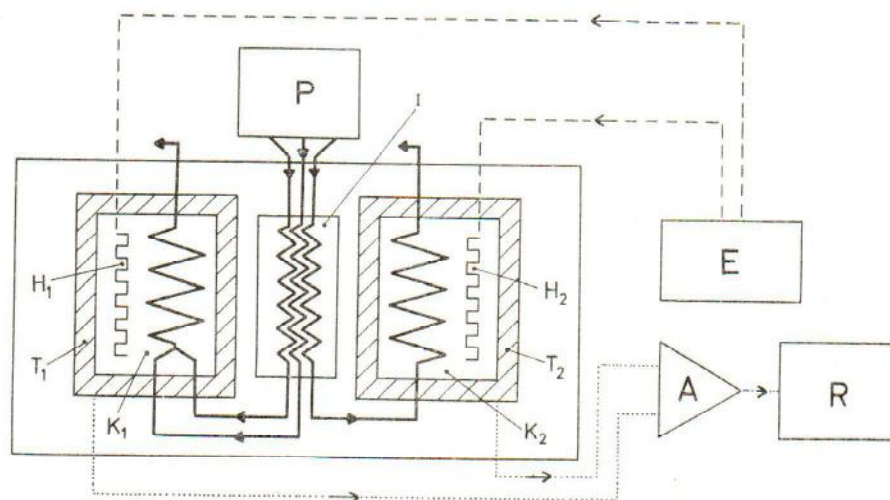
$$Q_x = \frac{Q_0}{S_0} S_x = \varepsilon S_x. \quad (17)$$

Omjer $Q_0/S_0 = \varepsilon$ naziva se kalorimetrijska konstanta ili toplinski ekvivalent.

Protočni sistemi

Protočni kalorimetrijski sistemi imaju nekoliko prednosti pred stajaćima: znatno brže postižu termičku ravnotežu, nemaju plinske faze, a adsorpcijske pojave u njima ne uzrokuju pogrešaka. Najčešće se danas rabi protočni mikrokalorimetar po *Wadsöu* (20) koji proizvodi tt. LKB. Taj je instrument zasnovan također na kondukcijskom načelu, kao i mikrokalorimetar *Stoessera i Gilla*.

Načelna shema kondukcijskoga protočnog mikrokalorimetra pokazana je na sl. 7. U osnovnoj građi taj je instrument sličan stacionarnom tipu. Razlike su u konstrukciji protočnih kalorimetrijskih jedinica, a pored toga ovdje su u sistem uključene peristaltičke crpke (P) i toplinski izmjenjivač (I). Potonjemu je svrha da izjednači temperature reagensa, što ih tlače crpke P, s temperaturom metalnog bloka C (koja je jednaka



Sl. 7. Načelna shema protočnoga mikrokalorimetra

temperaturi termostata). Na taj način svi reagensi ulaze u kalorimetrijske jedinice s jednakom temperaturom. Jedinica K_1 (reakcijska jedinica) građena je tako da se u njoj miješaju dva reaktanta, a »prolazna«, »slijepa« jedinica K_2 građena je jednostavnije jer joj je svrha samo kompensacija topline trenja koje se zbiva pri protoku i eliminacija utjecaja kolebanja okolne temperature.

Ako je promatrana reakcija znatno (barem 4—5 puta) brža od vremena prolaska reakcijske smjese kroz kalorimetar (u LKB-ovu protočnom kalorimetru vrijeme prolaska iznosi oko 5 min), pri konstantnoj brzini protoka bit će i toplinski učin ($P/I \text{ s}^{-1}$) konstantan. Potraje li taj toplinski učin dovoljno dugo, uspostaviti će se toplinsko stacionarno stanje, tj. toplinski učin postat će jednak toplinskom toku (Φ). Najveći dio toplinskog toka prenijet će termobaterija (Φ_t), a ostatak (Φ_n) predat će se toplinskom spremniku (C) kroz mali dio površine stijenki, koji nije u dodiru s termobaterijom, ili će izaći iz kalorimetra zajedno s izlazećom reakcijskom smjesom. Za dani kalorimetar, brzinu protoka i reakcijski sistem bit će odnos

$$\Phi_t/\Phi_n = \Phi_t/P = a \quad (18)$$

konstantan. Veličina Φ_t proporcionalna je diferencijalnom signalu

$$\Phi_t = \beta V \quad (19)$$

tako da se eliminacijom Φ_t dobiva izraz:

$$P = \frac{\beta}{a} V = \varepsilon V \quad (20)$$

Kalorimetrijska konstanta ε određuje se i ovdje električkom kalibracijom. Toplina reakcije može se izračunati na slijedeći način: ako se određuje toplina reakcije



tako da se u kalorimetrijskoj jedinici miješaju otopine gornjih reaktanta ($c_x < c_y$), a reakcija (21) dovoljno je brza, opazit će se pri konstantnom protoku (u) konstantan naponski signal V (v. sl. 8); toplina reakcije (ΔH) izračunat će se iz odnosa:

$$\Delta H = \frac{V}{u \cdot c_x} \text{ J mol}^{-1} \quad (22)$$

Ako li je pak promatrana reakcija spora, njezinu toplinu neće biti moguće odrediti protočnim kalorimetrom (osim tehnikom zaustavljenog toka, koja — primijenjena u kalorimetriji — ne daje osobito preciznih rezultata). No, bude li moguće načiniti kalorimetrijski pokus tako da za cijelo vrijeme prolaska reakcijske smjese kroz kalorimetar reakcijska brzina (v) ostane konstantna, moći će se odrediti brzina reakcije. Ovaj je slučaj posebno važan za enzimsku analizu: pri dovoljnom suvišku supstrata (naravno, valja paziti da taj ne bi bio prevelik, jer se neki enzimi inhibiraju i velikim suviškom supstrata) ostat će brzina enzimske re-

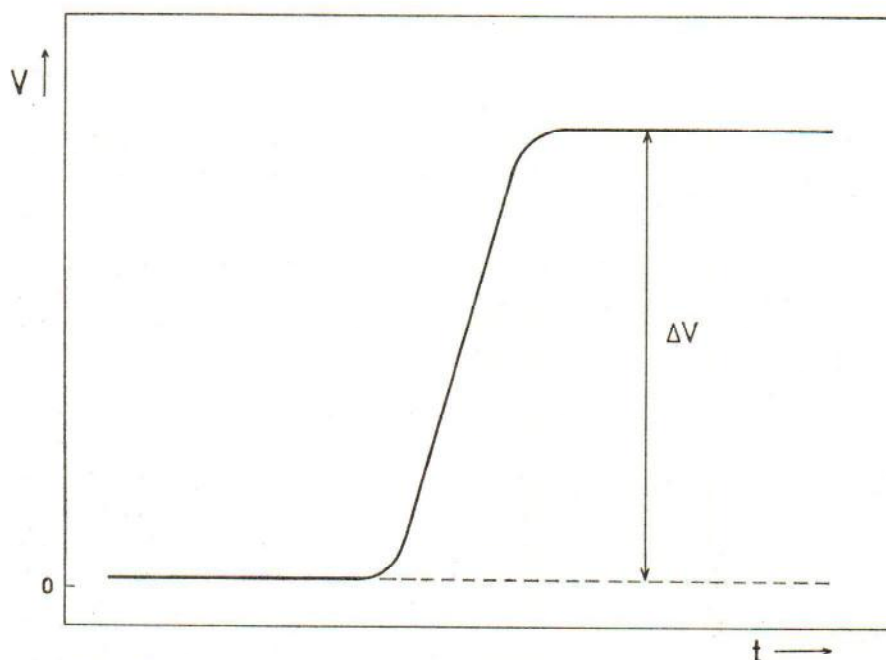
akcije konstantnom nekoliko minuta, što je dovoljno da se obavi kalorimetrijsko određivanje. U takvom će se slučaju moći primijeniti izraz

$$P = \varepsilon \cdot V = v \cdot \Delta H = \text{const.} \quad (23)$$

$$v = \varepsilon \cdot V / \Delta H. \quad (24)$$

Za računanje apsolutnog iznosa brzine reakcije (dotično aktivnosti enzima) potrebno je poznavati toplinu reakcije koju enzim katalizira. Najčešće nije potrebno poznavati apsolutni njezin iznos, jer se obično uspoređuju brzine reakcije pri različitim uvjetima. Tada nije potrebno poznavati toplinu reakcije, pa čak niti vršiti električku kalibraciju, jer se reakcijske brzine odnose kao odgovarajući diferencijalni signali:

$$v_1 : v_2 = V_1 : V_2$$



Sl. 8. Termogram eksotermnog procesa u protočnom kondukcijskom mikrokalorimetru

POUZDANOST KALORIMETRIJSKIH MJERENJA
I NAJČEŠĆE SISTEMATSKE POGRESKE

Kalorimetrijska mjerenja mogu biti podložna znatnim slučajnim (stohastičkim) i sistematskim pogreškama. Osobito je opasnost od sistematskih pogrešaka veća nego možda u ikojoj drugoj mjerenoj tehnici. Na preciznost i točnost kalorimetrijskih mjerenja utječe cio niz čimbenika: definiranost početnoga i završnog stanja (kvalitativni i kvantitativni sastav sistema), točnost mjerenja prilikom kalibracije (mjerenje pada napona i struje kroz grijalicu, te mjerenje vremena), valjanost (reproducibilnost i linearnost) termometrijskog uređaja, itd. Nesigurnost kalorimetrijskog mjerenja prouzrokovana slučajnim pogreškama (stohastička nesigurnost) iskazuje se, kako je to dogovorom utvrđeno (21), kao dvostruka standardna pogreška aritmetičke sredine izmjerenih vrijednosti:

$$\pm 2 \sqrt{\frac{\sum_i (x_i - \bar{x})^2}{N(N-1)}}$$

U kombustijskoj kalorimetriji, koja je metodološki veoma pomno proučena i kojom se bave pretežito specijalizirani laboratoriji, nerijetko se postiže ukupna nesigurnost od svega 0,01%, a u reakcijskoj kalorimetriji rijetko kada uspijeva postići nesigurnost manju od 0,1% (to je pošlo za rukom tek za nekoliko etalonskih procesa [22]). Preciznost određivanja topline stajacim mikrokalorimetrom (izražena kao relativna standardna pogreška aritmetičke sredine) kreće se od 0,3% (za topline od kojih 40 mJ na više) do oko 1% (za topline od svega 4 mJ). Takva preciznost veoma je zadovoljavajuća za gotovo sve primjene mikrokalorimetrije. No, u mnogim primjenama ne postavlja se samo pitanje preciznosti, nego se iziskuje i (apsolutna) točnost kalorimetrijskog uređaja, tj. kalorimetrijski rezultati moraju biti ne samo reproducibilni nego i slobodni od sistematskih pogrešaka, dotično sistematske pogreške moraju biti unutar granica slučajnih pogrešaka. Izvori sistematskih pogrešaka mogu biti ovi:

1. *Konstrukcija grijalice.* Ako grijalica ne stoji u vrlo tijesnom termičkom dodiru s okolnom tekućinom, kalorimetrijski rezultati bit će previsoki: naime, električnim putem razvijena kalibracijska toplina (Q_0) računa se iz otpora grijalice, struje koja kroz nju protječe i iz trajanja grijanja (jedn. 3). Pretpostavlja se, dakle, da je cjelokupna toplina Q_0 predana kalorimetrijskoj tekućini. Ako tomu nije tako, dio te topline odvest će se kondukcijom kroz vodove grijalice, a u kalorimetar će dospjeti manja količina topline. Budući da se u izrazu za računanje kalorimetrijske konstante, ε (jedn. 4), član Q_0 nalazi u brojniku, kalorimetrijska konstanta izaći će prividno veća, što će prouzročiti i previsok rezultat. Stoga treba grijalicu providjeti nekim »hladnjakom« preko kojega će se razvijena Jouleova toplina brzo predavati okolnoj tekućini. Također vodovi grijalice ne treba da budu veoma debeli, jer će u tom slučaju toplina »bježati« kroz njih. Nasuprot tomu, budu li vodovi pretanki, u njima će se također stvarati primjetljive količine topline, što će pak dovesti do negativne sistematske pogreške.

2. *Učinci adsorpcije na stijenke kalorimetra.* Budući da suvremeni kalorimetri omogućuju rad s prilično razrijeđenim otopinama, adsorpcija otopljenih tvari na stijenke posude reakcijskog kalorimetra može imati primjetljivog učinka: kao i svaki fizikalni ili kemijski proces, i adsorpcija je popraćena toplinskim učinkom, koji će kod tako osjetljivih instrumenata kao što su to suvremeni mikrokalorimetri postati znatan u usporedbi s malenim toplinama koje se žele mjeriti. Taj će efekt proizročiti pozitivnu ili negativnu sistematsku pogrešku, već prema predznaku topline adsorpcije. Također, pri veoma niskim koncentracijama, može adsorpcija uzrokovati i koncentracijsku pogrešku (smanjenje stvarne koncentracije jednoga ili više reaktanata) (4, 23).

3. *Mehanički učinci.* U makrokalorimetriji glavni je izvor topline trenja miješanje. Ono se vrši bilo uporabom rotacijske ili vibracijske miješalice, bilo rotacijom cijeloga kalorimetra. Pri miješanju rotacijskom miješalicom (osovina sa 1—3 elise) toplinska snaga miješanja razmjerna je kvadratu (gdjekad čak i kubu) kutne brzine miješalice (24). Budući da razvijena toplinska snaga pri uporabi miješalice nije dovoljno konstantna niti reproducibilna, to bi u mikrokalorimetrijskim mjerenjima dovelo do znatnih pogrešaka, pa se miješa samo kada se započinje sama reakcija. Kako je prije rečeno, u stajaćim kalorimetrima to se najčešće izvodi rotacijom kalorimetra, čime se reaktanti dovedu u kontakt i reakcijska se smjesa dobro izmiješa. Ta je operacija popraćena malenim toplinskim učinkom, kojemu treba iznos odrediti u slijepom pokusu (ista tekućina u oba odjeljka kalorimetra). U makrokalorimetriji reakcija se najčešće započinje razbijanjem ampule ili otvaranjem kakvoga zavora, pri čemu se može razviti toplina i do 50 mJ, što je često zanemarljivo malo u makrokalorimetriji, ali veoma mnogo i nedovoljno reproducibilno u mikrokalorimetriji (23). U protočnoj mikrokalorimetriji razvija se približno konstantna toplinska snaga trenjem tekućine o stijenke; taj učinak jedan je od čimbenika koji ograničuju osjetljivost te metode.

4. *Učinci isparavanja.* Ako je u kalorimetru volumen plinske faze znatan (u usporedbi s volumenom tekuće faze), mogu se dogoditi promjene u sastavu plinske faze, osobito ako se radi o miješanju hlapljivih reaktanata. Da bi se mogla izvršiti korekcija za toplinu isparavanja (dotično ukapljivanja), potrebno je znati sastav plinske i tekuće faze, te latentne topline isparavanja svih nazočnih tvari. Na žalost, u mikrokalorimetrima poput Wadsöova i Benzinger-Kitzingerova, u kojima je plinska faza zajednička za oba reaktanta, nije moguće točno utvrditi sastav plinske faze, jer se ravnoteža obiju tekućih i plinske faze uspostavlja veoma sporo. Ako se tlakovi para nad dvjema tekućim fazama razlikuju, dolazi do pojave destilacije. Pri radu s vodenim otopinama promjene u sastavu plinske faze obično su malene, a njihovi toplinski efekti zanemarljivi. Ipak, kada se žele određivati topline razrjeđenja, potrebno je imati na umu i mogućnost pogrešaka te vrsti. Wadsö (4, 23) navodi slijedeći primjer: u pokusu se želi odrediti toplina razrjeđenja vodene otopine ureje, koje je koncentracija 1 mol dm^{-3} s dvostrukim volumenom vode. Iako je

sastav plinske faze prije miješanja slabo definiran, može se najveća moguća pogreška procijeniti, pretpostavi li se da je plinska faza prije miješanja u ravnoteži s čistom vodom. Maksimalno sniženje tlaka para može se tada izračunati iz Raoultova zakona i ono iznosi 0,15 Torr (1 Torr = 101 325/760 Pa). Ako volumen parne faze u kalorimetru iznosi 3 cm³, ta promjena tlaka odgovara kondenzaciji 25 nmol vode ili toplinskom učinku od oko 1,3 mJ (0,3 mcal).

Ovdje su nabrojani samo najčešći izvori sistematskih pogrešaka. Ne treba posebno napominjati da pri kalorimetrijskom studiju svakoga pojedinog sistema treba pomno analizirati mogućnost pojavljivanja sistematske pogreške, kao i njezino ponašanje pri različitim eksperimentalnim uvjetima. Takva pogreška može biti konstantna, tj. kolika god izmjerena toplina bila, uvijek će u tom slučaju biti previsoka ili preniska za stanoviti iznos. Često su sistematske pogreške proporcionalne, tj. veličina pogreške raste s porastom izmjerene vrijednosti, pri čemu je omjer pogreške i mjerne vrijednosti konstantan. Moguća je i linearna kombinacija sistematskih pogrešaka: konstantnih i proporcionalnih. Te činjenice valja držati na umu i onda kada se rade relativna mjerenja: npr. pri proučavanjima kemijske kinetike veoma se često, gotovo uvijek, određuje omjer dviju veličina. U takvom slučaju neće smetati ako su obje veličine opterećene proporcionalnom pogreškom, ali se neće ukloniti konstantna pogreška (iako će se njezin utjecaj redovito smanjiti).

Neki od mikrokolorimetara, što ih je sagradio *Calvet*, imaju veoma oštromno smišljen kompenzacijski uređaj, uporabom kojega se može znatno povećati preciznost mjerenja. U tim se instrumentima uz glavnu termobateriju nalazi i tzv. Peltierova baterija, koja — već prema smjeru struje kojom se napaja — vrši reproducibilan rashladni ili grijaći učin:

$$P = \pm \pi I + RI^2 \quad (26)$$

Ako je promatrani proces endoterman, upotrijebit će se takav smjer struje da se u *Peltierovoj* bateriji (ili u nekoj zasebnoj grijalici) razvija toplina. Pri eksotermnom pak procesu morat će se iskoristiti rashladno djelovanje te baterije. Veličina kompenzacijskog učina odabrat će se tako da se kompenzira oko 90% toplinskog učina promatranog procesa. Time se postiže povećanje točnosti: budući da je reproducibilnost i točnost doziranja topline *Peltierovom* baterijom 0,1% ili bolja, dovoljno je da se integral ispod krivulje termograma odredi s točnošću od 1%. Ovakav je postupak osobito koristan pri veoma dugotrajnim pokusima, koji mogu trajati danima, pa i tjednima.

Osjetljivost i preciznost protočnih mikrokolorimetara slična je onoj stajaćih («batch») mikrokolorimetara. Ti su instrumenti veoma prikladni za rutinsku uporabu zbog svoje jednostavnosti, a također nisu podložni nekim pogreškama (adsorpcijski efekti, isparavanje otapala), koje ograničuju osjetljivost stajaćih kalorimetara. No i protočni kalorimetri imaju nedostataka: nije lako načiniti crpkc s veoma stalnom brzinom protoka (svi toplinski učinci protoka ne kompenziraju se u potpunosti itd.). Posve je sigurno da je stajaći kalorimetrijski sistem superioran instru-

ment kada treba točno odrediti topline reakcija. Mikrokalorimetrom što ga proizvodi tt. LKB moguće je točno mjeriti topline reakcija koje traju i po nekoliko sati, a *Calvet* je svojim instrumentom uspio načiniti kalorimetrijske pokuse koji su trajali čak i do mjesec dana!

PRIMJENE MIKROKALORIMETRIJE U BIOKEMIJI I FIZIOLOGIJI

Kalorimetrijska mjerenja najčešće služe dobivanju podataka o toplinskom učinku nekog procesa ili o toplinskim osobinama tvari, ona dakle služe *termodinamičkim proučavanjima*, drugim riječima (mikro)kalorimetrija jedna je od *termodinamičkih metoda*. No pored toga postoji još jedno, veoma važno, područje primjene kalorimetrije, a to je kalorimetrijska analiza. Naime, toplinski učinak koji prati gotovo svaku fizikalnu ili kemijsku pretvorbu, karakteristična je konstanta (pod stanovitim, definiranim uvjetima pokusa), upravo tako kako je to npr. konstanta ravnoteže, konstanta brzine reakcije ili standardni redoks-potencijal. Toplinski učinak osnovna je i jednoznačna značajka procesa, analogno kao što su npr. ekstinkcijski koeficijent, molarna refrakcija ili temperatura taljenja jednoznačne značajke pojedinih tvari. Primjena mikrokalorimetrije kao *analitičke metode* zasniva se upravo na konstantnosti i reproducibilnosti toplinskog učinka: ako je molarna topline nekoga procesa pod određenim uvjetima ΔH , tada će se pod istim uvjetima pri reakciji n molova reaktanta uvijek razviti (ili utrošiti) količina topline $n \Delta H$.

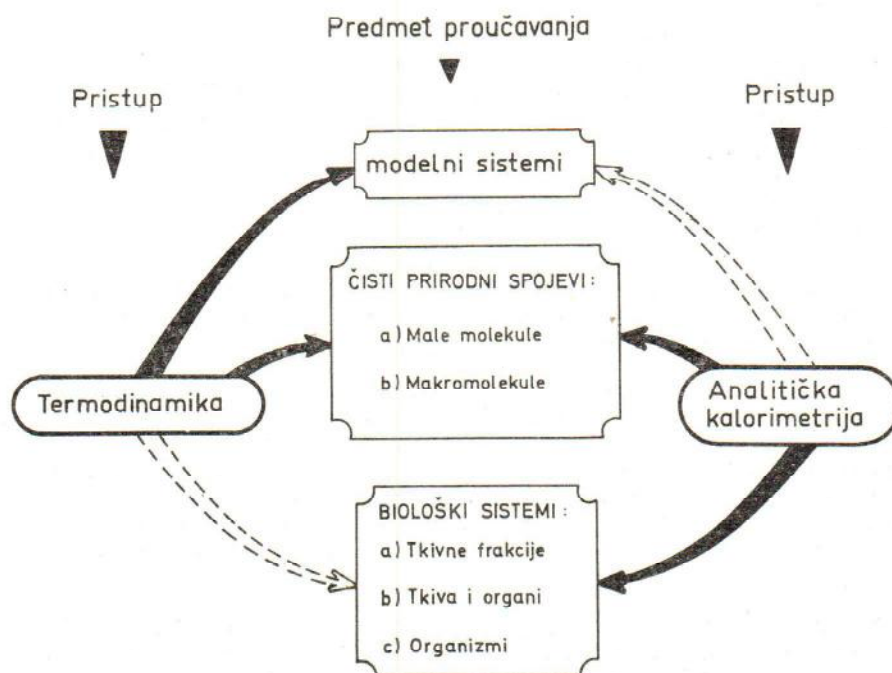
Otkako su se na tržištu pojavili pouzdani i razmjerno jednostavni kalorimetrijski uređaji (najpoznatiji su mikrokalorimetri tvrtki LKB, Beckman, Setaram i Knauer), naglo se povećao interes za metode eksperimentalne termokemije među istraživačima na području biokemije, fiziologije, biologije i gotovo svih bio-znanosti, tako da se u posljednjih desetak godina razvila nova disciplina — biotermokemija, koja se primjenjuje ne samo u biokemiji već i u biologiji.

Budući da su sistemi, koji zanimaju biokemičara ili fiziologa, najčešće toliko složeni da je nemoguće proučavati ih detaljno, osnovne znanstvene informacije obično se dobivaju istraživanjem jednostavnijih modelnih sistema. U nizu zgodno odabranih modelnih sistema moguće je sistematski varirati npr. strukturu određenog spoja i na temelju termodinamičkih mjerenja dovesti u svezu strukturne i termodinamičke osobine. Tako npr. aminokiseline i jednostavniji peptidi mogu poslužiti kao model za interakcije proteina s ionima metala, koji su veoma važni aktivatori ili inhibitori enzimskih procesa u živim bićima. Primjena mikrokalorimetrijskih metoda u proučavanjima modelnih sistema gotovo je u cijelosti usmjerena na dobivanje termodinamičkih podataka, dok je uloga analitičke kalorimetrije neznatna.

Pri studiju više ili manje čistih prirodnih spojeva također je važniji termodinamički pristup: kod jednostavnijih spojeva moguće je određivanje izvesti s visokom preciznošću i apsolutnom točnošću, jer se ti spo-

jevi mogu pripremiti u veoma čistom stanju. Kada se pak radi o studiju reakcija velikih molekula, najčešće se ne može postići osobita točnost (u apsolutnom smislu), iako relativna preciznost može biti izvanredno visoka. Razlog je tomu to što je nemoguće definirati stanje uzorka s točnošću boljom od nekoliko postotaka. No moguće je i ovako slabo definirano stanje makromolekule smatrati nekom vrstom unutrašnjeg standarda za cijelu seriju pokusa, upotrebljavajući u njoj makromolekularni reaktant pripremljen odjednom, u istoj »šarži«.

U sistemima s više ili manje očuvanim biokemijskim ili fiziološkim funkcijama (pojedini enzimski sistemi, tkivne frakcije, tkiva, organi ili čak čitavi manji organizmi) teško da je moguće vršiti termodinamička istraživanja, osim možda izravnog određivanja toplinske bilance. U tim slučajevima dolazi do izražaja uporaba mikrokolorimetrije kao analitičke metode: budući da su sve funkcije promatrane tvari, bila to jedna jedina molekula ili složeni sistem poput živoga organizma, neizbježno povezane s odgovarajućim toplinskim učinkom, moguće je te funkcije mjeriti količinom razvijene ili utrošene topline. Naravno, neće biti moguće analizirati tako dobivene rezultate na molekularnoj razini zbog toga što sistemi na kojima su oni dobiveni nisu s termodinamičkoga stajališta nikako definirani.



Sl. 9. Primjene (mikro)kalorimetrije u biokemiji, fiziologiji i biologiji

Modelni sistemi

Jedan od veoma važnih problema fizikalne biokemije jest interakcija biološki aktivnih spojeva s vodom, jer su svi biološki sistemi vodene otopine. Unatoč važnosti toga problema i znatnom broju radova koji su mu posvećeni, još se razmjerno malo zna o tim interakcijama, pri čemu je sigurno jedna od najvećih smetnji nedostatno poznavanje strukture same vode u kapljevitom stanju. No ipak su dosadašnji radovi urodili nekim vrijednim saznanjima, koja imaju barem empirijsku vrijednost, iako eksperimentalnim činjenicama nedostaje potanje teorijsko objašnjenje. Tako je npr. utvrđeno da pri otapanju organskih spojeva u vodi dolazi do veoma znatnih promjena prividnog toplinskog kapaciteta otopljene tvari, $\Phi C_{p,2}$. Te je vrijednosti moguće odrediti na taj način da se pri različitim temperaturama mjere topline otapanja nekoga spoja ili čitavoga niza spojeva u vodi. Temperaturni gradijent topline otapanja ΔH jednak je promjeni toplinskog kapaciteta sistema:

$$\Delta \bar{C}_p = \left(\frac{\partial \Delta_s H}{\partial T} \right)_p$$

Poznavajući toplinski kapacitet čiste otopljene tvari, $C_{p,2}^*$ može se doći do tražene vrijednosti:

$$\Phi C_{p,2} = C_{p,2}^* + \Delta \bar{C}_p$$

Za ravnolančane alifatske alkohole, karbonske kiseline i amide vrijednost $\Phi C_{p,2}$ jedinstvena je linearna funkcija broja ugljikovih atoma u lancu, tako da je njezin prirast konstantan i iznosi oko $20 \text{ cal}_{15} \text{ K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ za svaki ugljikov atom (25). Za čiste ugljikovodike ne postoji još na žalost dovoljno pouzdanih podataka, koji bi potkrijepili taj nalaz *Koničeka* i *Wadsöa*. Smatra se da se utjecaj nazočnosti nepolarnih hidrofobnih ostataka na toplinski kapacitet može pripisati povišenju pravilnosti strukture vode. Nasuprot tomu, polarni, pogotovu ionski spojevi drastično narušavaju strukturu vode (voda, kako je to nedvojbeno utvrđeno, i u kapljevitom stanju ima relativno fiksnu strukturu zahvaljujući vodikovim vezama između pojedinih njezinih molekula).

Veoma je mnogo radova posvećeno zanimljivom i važnom pitanju ionizacije, odn. protonacije organskih baza i kiselina, a u posljednje vrijeme i biološki važnih molekula, kao npr. DNA, RNA i njihovih sastavnih dijelova. Taj rad toliko je opsežan da je nemoguće prikazati ga u ovako kratkom članku. Spomenimo samo da postoje veoma iscrpne tablice tih podataka, koje su skupili ugledni radnici na tom području: *R. M. Izatt* i *J. J. Christensen* (26), *W. P. Jencks* i *J. Regenstein* (27), te *J. W. Larson* i *L. G. Hepler* (28).

Kompleksni spojevi što ih peptidi, proteini i nukleinske kiseline grade s raznim metalnim ionima također se veoma iscrpno proučavaju termokemijskim metodama. Danas su vjerojatno u središtu kompleksi malih peptida s prijelaznim i teškim metalima, kao modelni sistemi za koordi-

nativne reakcije proteina. Pored dobre kritičke kompilacije termodinamičkih podataka (29) zanimljivi su radovi *Skinnera* i njegovih suradnika (30) i *G. H. Nancollasa* (31).

Biokemijski sistemi

Biokemijskim sistemima u užem smislu mogu se smatrati termodinamička istraživanja reakcija čistih prirodnih spojeva, jer istraživanja jednostavnih modelnih sistema pripadaju ipak više općoj termokemiji, iako daju dragocjenih podataka i biokemičaru. Oni pak sistemi u kojima su životne funkcije u većoj mjeri sačuvane, odviše su složeni da bi eksaktan termodinamički studij bio uopće moguć.

Ovdje će biti navedeno tek nekoliko značajnijih radova s područja biokemijske termokemije, koji uvjerljivo pokazuju domet i snagu suvremene mikrokolorimetrije u rješavanju biokemijskih problema. Čitatelj koji želi podrobnije upoznati ovo područje, posebice novije radove (1969—1971), upućuje se na veoma opsežan prikaz *I. Wadsöa* (32).

Henkens i sur. (33) proučavali su termodinamiku vezivanja Zn^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} i Cd^{2+} na apo-karboanhidraze A i B metodama stajanje i protočne mikrokolorimetrije. Iz kalorimetrijskih podataka, kao i iz ranije određenih ravnotežnih konstanti za proučavane reakcije izračunali su veličine ΔG , ΔH i ΔS i našli da su te reakcije jako eksergonične ($\Delta G < 0$), iako su izrazito endotermne. Usporedivši svoje rezultate s vrijednostima za stvaranje kompleksa cinka s aminokiselinama, utvrdili su da se cink vjerojatno veže na karboksilatne skupine proteina, a ne na dušikove atome amino-skupine ili imidazolske skupine.

Adams i *Weiss* (34) mjerili su toplinu reakcije hemoglobina s haptoglobinom i iznijeli na osnovi tih podataka pretpostavku da se ta reakcija zbiva tako da se najprije tetramerni hemoglobin disocira u dvije čestice dimera:



a zatim slijede reakcije s heptoglobinom (Hp):



Rezultati njihovih kalorimetrijskih titracija govore u prilog nazoru da molekula $Hp - \alpha\beta$ ima veći afinitet za dimer $\alpha\beta$ negoli slobodna molekula Hp.

Shiao i *Sturtevant* (35), mjereći toplinu razrijeđenja kimotripsina, našli su da je u koncentriranijim otopinama kimotripsin dimeriziran u znatnoj mjeri, a razrijeđivanjem disocira:



Ravnoteža konstanta za tu reakciju iznosi $3,5 \times 10^{-4}$ mol dm^{-3} , a toplina disocijacije 35,4 kcal po molu dimera.

Watt i Sturtevant (36) istraživali su mikrokalorimetrijski oksidaciju ferocitokroma c fericijanid-ionom, te redukciju ferocitokroma c askorbat-ionom u ovisnosti o pH, te su izračunali ΔH za ukupni ravnotežni proces:



Njihova vrijednost za reakcijsku toplinu ($-14,1 \text{ kcal mol}^{-1}$ kod $\text{pH} = 7$ i $t = 25^\circ\text{C}$) dobro se slaže s literaturnim vrijednostima. Toplina reakcije jako je ovisna o pH, a krivulja $\Delta H = f(\text{pH})$ sigmoidnog je oblika, što se tumači konformacijskom promjenom u molekuli $\text{Fe}^{\text{III}}\text{cyt c}$ prilikom njezine protonacije. Protonacija ferocitokroma c karakterizirana je pK-vrijednošću 9,3 i toplinom protoniranja od oko $-16 \text{ kcal mol}^{-1}$.

Analitička primjena mikrokalorimetrije

Mikrokalorimetrijske metode nalaze prilično široku primjenu u biološkim i medicinskim znanostima, gdje zbog složenosti i nedostatne definiranosti sistema termodinamička mjerenja nisu izvediva. Prednosti kalorimetrije pred uobičajenim optičkim (najčešće fotometrijskim) metodama jesu ove:

1. Veoma često uzorci nisu optički čisti, što smeta optičkim mjerenjima. Kada se uzorak i može »razbistriti« centrifugiranjem ili filtracijom, mnogo je prikladnije uštedjeti analitičaru taj posao i primijeniti metodu kojoj mutnoća uzorka neće smetati.

2. Većina analitičkih postupaka, posebice u kliničkoj enzimologiji, uključuje dodavanje stanovitog reagensa koji denaturira uzorak (»razvijanje boje« ili pak separacijski postupci). Mikrokalorimetrom je moguće pratiti tok nekoga procesa u fiziološkim (ili simuliranim fiziološkim) uvjetima.

3. Kalorimetrija omogućuje *kontinualno* praćenje toka promatranog procesa (v. jedn. 22), što je rijetkost među metodama kliničke enzimologije, koje su najčešće diskontinualne.

4. Protočni kalorimetar lako je povezati s automatskim analitičkim spravama (npr. Technicon Auto Analyser), s pomoću kojih se može izvršiti prethodna obradba uzorka (frakcioniranje, dodavanje reagensa i sl.). Pretvori li se izlazni signal mikrokalorimetra, koji je analogna električka veličina, u digitalni oblik, moguće je povezati cjelokupni analitički uređaj s elektroničkim računalom i tako vršiti neposrednu (»on line«) obradbu analitičkih podataka i po potrebi pohraniti ih u memoriju računala za kasnije statističke ili slične studije.

5. Suvremenim mikrokalorimetrima može rukovati i osoblje bez posebne tehničke naobrazbe.

Naravno, kalorimetrijska je metoda opterećena i stanovitim nedostacima: nedostatak specifičnosti, dugo trajanje (iako je danas trajanje pokusa protočnim mikrokalorimetrom svega 10 minuta, mnoge druge metode traju često tek desetinu tog vremena), manja osjetljivost (stoga je za kalorimetrijsko određivanje potrebna veća količina uzorka).

Na području enzimske kinetike promijenjena je protočna mikrokalorimetrija za određivanje aktivnosti glukoza-oksidadze, laktat-dehidrogenaze, adenosintrifosfataze (ATPaze), alkalne fosfataze, acetilkolinesteraze i pronaze (37, 38), a također i za praćenje inhibicije acetilkolinesteraze nekim organofosforinim spojevima (37, 39).

U području termobiologije zanimljivi su radovi *Wadsöa* o rastu *E. coli* (37, 40), kojima je pokazao da je kalorimetrijska metoda kud i kamo pouzdanija nego turbidimetrija za praćenje rasta bakterija. *Levin* (41, 42) promatrao je eksotermnu aktivnost leukocita i trombocita, te utjecaj citostatika na nju. Skupina *H. Prata* (15—17) bavi se proučavanjem termogeneze ne samo mikroorganizama i insekata već čak i malih sisavaca.

Literatura

1. Physical Quantities and Symbols for Physical Quantities, Pure Appl. Chem., 21 (1970) 7.
2. *Simeon, Vl., Ivičić, N., Tkalčec, M.*: Construction of A Simple Reaction Calorimeter and Heats of Some Standard Reactions at 20 °C, Z. physik. Chem. (Frankfurt), 78 (1972) 1—12.
3. *Skinner, H. A., Sturtevant, J. M., Sumner, S.*: The Design and Operation of Reaction Calorimeters, u: *Skinner, H. A.* (ur.): Experimental Thermochemistry, vol. II, Interscience, New York 1962, str. 169.
4. *Wadsö, I.*: Calculation Methods in Reaction Calorimetry, Science Tools, 13 (1966) 33.
5. *Sturtevant, J. M.*: Calorimetry, u: *Weissberger, A.* (ur.): Physical Methods of Organic Chemistry, Part I, 2. izd., Interscience, New York 1949, str. 743—7.
6. *Christensen, J. J., Izatt, R. M., Hansen, L. D.*: New Precision Titration Calorimeter, Rev. Sci. Instr., 36 (1965) 779.
7. *Nancollas, G. H.*: Interactions in Electrolyte Solutions, Elsevier, Amsterdam 1966, str. 60—8.
8. Ref. 5, str. 749—50, 776—8, 825—7; usp. i: *Lange, E., Robinson, A. L.*, Chem. Revs., 9 (1931) 89; *Gucker, F. T., Pickard, H. B., Planck, R. W.*, J. Am. Chem. Soc., 61 (1939) 459.
9. *Kubaschewski, O., Hultgren, R.*: Metallurgical and Alloy Thermochemistry, ref. 3, str. 359—61.
10. *Wallisch, W., Becker, F.*: Isotherme Kalorimetrie mit automatisch gesteuerter Peltier-Kühlung und fortlaufender Integration der Kompensationsleistung. I., Z. physik. Chem. (Frankfurt), 36 (1963) 97; id.: II. Eine Messanordnung für thermokinetische Untersuchungen, ibid., 46 (1965) 268.
11. *Christensen, J., Johnston, D. D., Izatt, R. M.*: An Isothermal Titration Calorimeter, Rev. Sci. Instr., 39 (1968) 1356.
12. *Albert, H. B.*: Pulsed-Current Control and Measurement System for Precision Microcalorimetry, Rev. Sci. Instr., 44 (1972) 766.
13. *Gill, S. J., Chen, Y.*: Rapid Response Flow Microcalorimeter, Rev. Sci. Instr., 44 (1972) 774.
14. *Tian, A.*: Microcalorimètre à compensation par effets Peltier et Joule, Bull. Soc. Chim. France, (1923) 427.
15. *Calvet, E., Prat, H.*: Microcalorimétrie. Applications physico-chimiques et biologiques, Masson, Paris, 1956.

16. *Calvet, E., Prat, H.*: Récents progrès en microcalorimétrie, Dunod, Paris, 1958.
17. *Calvet, E.*: Recent Progress in Microcalorimetry, ref. 3, str. 385—410.
18. *Wadsö, I.*: Design and Testing of A Micro Reaction Calorimeter, *Acta Chem. Scand.*, 22 (1968) 927.
19. *Benzinger, T. H., Kitzinger, C.*: *Methods Biochem. Anal.*, 8 (1960) 309, cit. po 17.
20. *Monk, P., Wadsö, I.*: A Flow Micro Reaction Calorimeter, *Acta Chem. Scand.*, 22 (1968) 1842.
21. *Kolesov, V. P., McGlashan, M. L., Rouquerol, J., Seki, S., Vanderzee, C. E., Westrum, E. F.*: A Guide to Procedures for the Publication of Thermodynamic Data, *J. Chem. Thermodyn.*, 4 (1972) 511.
22. *Gunn, S. R.*: A Comparison of Standard Reactions for Solution and Combustion Calorimetry I. Solution-Calorimeter Measurements, *J. Chem. Thermodyn.*, 2 (1970) 535.
23. *Wadsö, I.*: Microcalorimetry and Its Applications in Biological Sciences, u: *Pain, R., Smith, B.* (ur.): *New Techniques in Biophysics and Cell Biology*. J. Wiley, New York, 1973.
24. *Danielson, B., Ginstrup, O., Ingri, N.*: An Automatic Precision Titration Calorimeter I. Main Design and Evaluation of Heat Parameters, *Chem. Scripta*, 3 (1973) 81.
25. *Koniček, J., Wadsö, I.*: Thermochemical Properties of Some Carboxylic Acids, Amines and N-substituted Amides in Aqueous Solution, *Acta Chem. Scand.*, 25 (1971) 1541.
26. *Izatt, R. M., Christensen, J. J., Rytting, J. H.*: Sites and Thermodynamic Quantities Associated with Proton and Metal Ion Interaction with Ribonucleic Acid, Deoxyribonucleic Acid, and Their Constituent Bases Nucleosides and Nucleotides, *Chem. Rev.*, 71 (1971) 439.
27. *Jencks, W. P., Regenstein, J.*, u: *Sober, H. A.* (ur.): *Handbook of Biochemistry*, Chemical Rubber Co., Cleveland 1968, str. J—151.
28. *Coetzee, J. F., Ritchie, C. d.* (ur.): *Solute-Solvent Interactions*, Dekker, New York, 1969.
29. *Christensen, J. J., Izatt, R. M.*: *Handbook of Metal Ligand Heats and Related Thermodynamic Quantities*, Dekker, New York, 1970.
30. *Tipping, E. W., Skinner, H. A.*: Microcalorimetric Studies: Enthalpies of Formation of Aminoacid and Peptide Complexes of Copper (II) and Nickel (II), *J. Chem. Soc. Faraday Trans. I*, 68 (1972) 1764.
31. *Nancollas, G. H., Poulton, D. J.*: Thermodynamics of Ion Association. XVIII. Copper Complexes of Tetraglycine, *Inorg. Chem.*, 8 (1969) 680.
32. *Wadsö, I.*: Biochemical Thermochemistry, u: *Skinner, H. A.* (ur.): *Thermodynamics and Thermochemistry*, MTP International Review of Science, Vol. X, Butterworths, London 1973.
33. *Henkens, R. W., Watt, G. D., Sturtevant, J. M.*: The Enthalpy of Binding of Various Transition Metal Ions to Bovine Apocarbonic Anhydrase, *Biochemistry*, 8 (1969) 1874.
34. *Adams, E. C., Weiss, M. R.*: Calorimetric Studies of the Haemoglobin-Haptoglobin Reaction, *Biochem. J.*, 115 (1969) 441.
35. *Shiao, D. D. F., Sturtevant, J. M.*: Calorimetric Investigations of the Binding of Inhibitors to α -Chymotrypsin I. The Enthalpy of Dilution of α -Chymotrypsin and of Proflavin, and the Enthalpy of Binding of Indole, N-Acetyl-D-tryptophan and Proflavin to α -Chymotrypsin, *Biochemistry*, 8 (1969) 4910.
36. *Watt, G. D., Sturtevant, J. M.*: *Biochemistry*, 8 (1969) 4567, cit. po 32.

37. *Wadsö, I.*: Microcalorimetry, u: Proc. Internatl. Symp. »Calorimetry in Chemical and Biological Sciences«, Univ. of Surgery, Guildford, 1969, str. 53.
38. *Monk, P., Wadsö, I.*: Flow Microcalorimetry as An Analytical Tool in Biochemistry and Related Areas, Acta Chem. Scand., 23 (1969) 29.
39. *Koničková, J., Wadsö, I.*: Use of Flow Microcalorimetry for the Determination of Cholinesterase Activity and Its Inhibition by Organophosphorus Pesticides, Acta Chem. Scand., 25 (1971) 2360.
40. *Eriksson, R., Wadsö, I.*: Proc. 1st Eur. Biophysics Congress, Vol. IV, Wiener Medizinische Akademie, Beč 1971, str. 319 (cit. po 32).
41. *Levin, K.*: Clinical Aspects of Flow Microcalorimetry and Its Applications to Clinical Science, u: Proc. Internatl. Symp. »Calorimetry in Chemical and Biological Sciences«, Univ. of Surrey, Guildford 1969, str. 61.
42. *Levin, K.*: Clin. Chim. Acta, 32 (1971) 87, cit. po. 23.

Summary

REACTION CALORIMETRY AND ITS APPLICATIONS IN BIOCHEMISTRY, PHYSIOLOGY AND RELATED AREAS

Most important types of reaction calorimeters (isoperibol, adiabatic, isothermal, conduction) are described and their sensitivity and reliability compared. Examples of the application of calorimetric techniques as thermodynamic and analytical tools are given.

Received for publication July 5, 1973

*Institute for Medical Research
and Occupational Health, Yugoslav
Academy of Arts and Sciences,
Zagreb*