

## LABORATORNÍ PŘÍSTROJE A POSTUPY

### METODIKA ŘEŠENÍ SYSTÉMU NÁSLEDNÝCH REAKCÍ PRVNÍHO A PSEUDOPRVNÍHO ŘÁDU Z ČASOVÉHO ZÁZNAMU UV-VIS SPEKTER

JIŘÍ HANUSEK<sup>a</sup> a JAN SVOBODA<sup>b</sup>

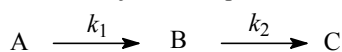
<sup>a</sup> Katedra organické chemie, Fakulta chemicko-technologická, Univerzita Pardubice, Nám. Čs. legií 565, <sup>b</sup> Společná laboratoř chemie pevných látek ÚMCH AV ČR a Univerzity Pardubice, Studentská 84, 532 10 Pardubice  
jiri.hanusek@upce.cz, jan.svoboda@upce.cz

Došlo 20.10.03, přijato 25.3.04.

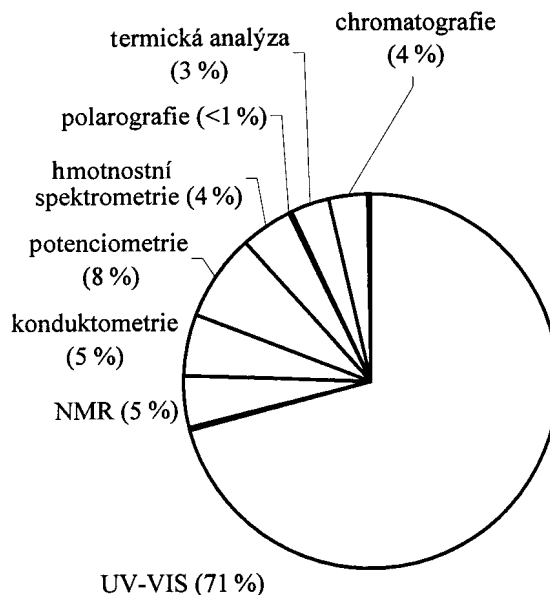
Klíčová slova: kinetika, následné reakce, nelineární regrese, citlivostní analýza

#### Úvod

Jako následné se označují takové reakce, které probíhají ve více na sebe přímo navazujících stupních, přičemž meziprodukt vzniklý v prvním stupni je výchozí látkou pro stupeň druhý atd. Pro tyto systémy platí, že v jejich průběhu postupně narůstá a potom klesá koncentrace meziproduktu; přitom koncentrace meziproduktu není zanedbatelná ve srovnání s koncentracemi výchozích reaktantů a produktů<sup>1</sup>. Tento časový průběh koncentrací reagujících složek však není charakteristický pouze pro reakce následné – vykazuje jej i systém dvou paralelních reakcí s jedním vratným stupněm. Nejjednodušším případem následné reakce je dvoustupňová nevratná reakce,



u níž každý stupeň probíhá jako reakce prvního resp. pseudoprvního řádu. Je-li hodnota rychlostní konstanty druhého stupně  $k_2$  o více než 2 řády nižší než prvního stupně  $k_1$  anebo naopak, lze obě reakce studovat odděleně<sup>2</sup>. V případě, že oba stupně mají srovnatelné nebo dokonce stejné rychlostní konstanty, což je jev v chemii velice častý, komplikuje se optimalizace syntézy požadovaného meziproduktu, který není za daných podmínek zcela stabilní a podléhá následnému rozkladu<sup>3</sup>, nebo se studium reakčních mechanismů kinetickými metodami znesnadňuje<sup>4,5</sup>. Na druhé straně kinetické systémy zahrnující dva po sobě jdoucí stupně nabývají velkého významu při studiu farmakokinetiky, pro kterou je často simulován model postihující absorpci a eliminační procesy léčiva v organismu. Ke sledování těchto modelových procesů se



Obr. 1. Experimentální techniky používané pro získávání kinetických dat v pracích publikovaných v roce 2002 (uvedeny pouze práce uvádějící použitou techniku v souhrnu)

často využívá kinetické analýzy, která je charakteristická vysokou citlivostí, selektivitou a adaptabilitou.

Z přístrojového hlediska se pro sledování kinetik reakcí v kapalných soustavách používá nejčastěji UV-VIS spektrofotometrie. Odhaduje se<sup>1</sup>, že je použita v cca 80–90 % publikovaných pracích – zbylých 10–20 % pak připadá na IČ a NMR spektroskopii, chromatografii, konduktometrii a potenciometrii a v tuhé fázi pak na metody termické analýzy.

Pro systémy sledované UV-VIS spektrofotometrií bylo v minulosti navrženo několik metod získání rychlostních konstant obou reakčních stupňů resp. molárního absorpčního koeficientu meziproduktu. Tyto metody lze principiálně rozdělit do dvou skupin, a to na metody využívající linearizaci dat a jejich vyhodnocení při jedné nebo více vlnových délkách lineární regresi a na metody vycházející z nijak neupravených dat vyhodnocovaných nelineární regresi opět při jedné resp. více vlnových délkách.

Společným prvkem všech početních metod<sup>6</sup> pro výběr kinetické rovnice resp. určení rychlostních konstant je vhodné kritérium přiléhavosti vypočtených závislostí k experimentálním bodům. Nejčastěji se jako toto kritérium volí součet čtverců odchylek vypočtených ( $y_i'$ ) a naměřených ( $y_i$ ) hodnot závisle proměnné přes všechny provedené pokusy ( $N$ ). Pro zkoumanou kinetickou rovnici se hledají takové hodnoty konstant, aby tento součet byl minimální. Přesně vzato, toto kritérium poskytuje nejlepší

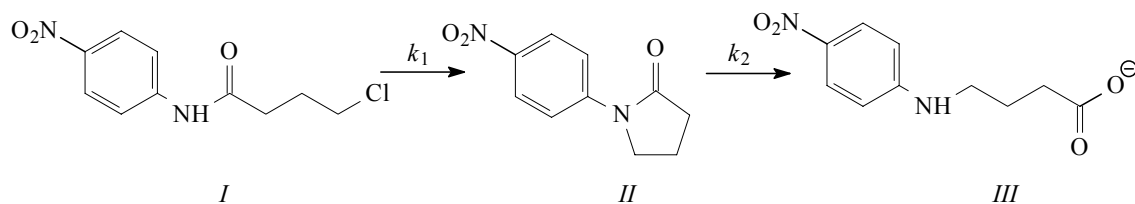
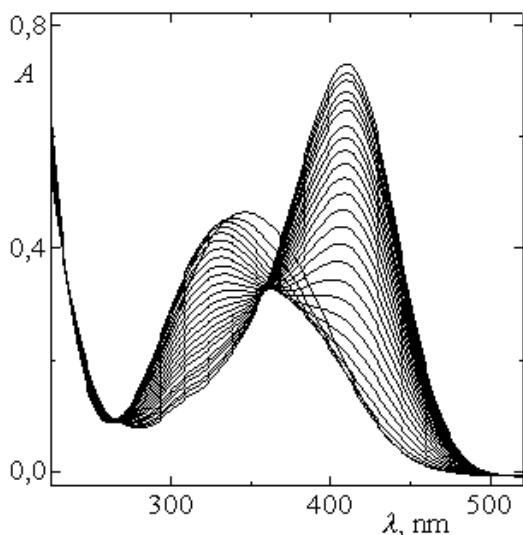
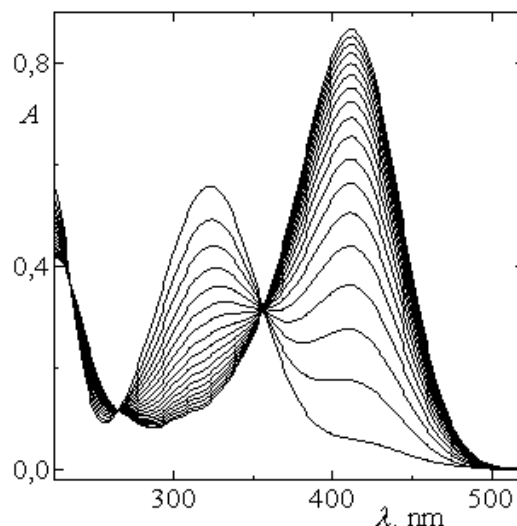


Schéma 1. Studovaná následná reakce

hodnoty konstant jen tehdy, když je veličina  $y$  v celém rozsahu zatížena stejnou chybou. Jsou-li však rozptyly měření navzájem závislé, což nastává v případě použití stejné analytické metody zjišťování koncentrací, je správnější<sup>6</sup> použít minimalizaci hodnoty determinantu matice  $\mathbf{M} = \{m_{i,j}\}$  kde  $m_{i,j} = \Sigma (y'_{i,k} - y_{i,k})(y'_{j,k} - y_{j,k})$  a  $k \in \{1 \dots N\}$ .  $y'$  resp.  $y$  odpovídá vypočtené resp. změřené hodnotě koncentrace  $i$ -té složky  $j$ -tého reakčního stupně v  $k$ -tém pokusu. V případě měření závislosti absorbance celé směsi na čase však nejsme schopni podobnou matici sestavit – existuje nekonečné množství lineárních kombinací součinů absorpčních koeficientů a koncentrací jednotlivých složek se stejnou celkovou absorbancí.

## Experimentální část

V tomto článku budou všechny popisované metody demonstrovány na systému (Schéma 1) následné reakce<sup>5</sup> 4-chlor-*N*-(4-nitrofenyl)butanamidu (*I*) který v alkalickém prostředí cyklizuje na 1-(4-nitrofenyl)pyrrolidin-2-on (*II*) rozkládající se za stejných podmínek na sůl 4-(4-nitroanilino)butanové kyseliny (*III*). Protože se v tomto případě podařilo za použití dvoufázového systému izolovat mezi-

Obr. 2. Spektrální záznam následné reakce  $I \rightarrow II \rightarrow III$  v 1 M roztoku NaOHObr. 3. Spektrální záznam reakce  $II \rightarrow III$  v 1 M roztoku NaOH

produkt *II*, bylo možné porovnat změřenou a optimalizovanou pozorovanou rychlostní konstantu  $k_2$ .

Jako analytické metody pro studium následné reakce  $I \rightarrow II \rightarrow III$  resp.  $II \rightarrow III$  (Schéma 1) bylo použito UV-VIS spektrofotometrie. Systém byl sledován za podmínek pseudoprvního řádu ( $[I]_0 \approx 5.10^{-5} \text{ mol.l}^{-1}$ ) při teplotě 25 °C ve vodném roztoku hydroxidu sodného o koncentraci 1,0 mol.l<sup>-1</sup>. Spektrální záznam byl snímán v osmisesekundových až desetisesekundových intervalech na přístroji HP UV-VIS 8453 Diode Array (obr. 2 a 3).

## Výsledky a diskuse

### Matematický popis systému následných reakcí

Změny koncentrací jednotlivých složek jsou definovány diferenciálními kinetickými rovnicemi:

$$\frac{d[I]}{dt} = -k_1[I] \quad (1)$$

$$\frac{d[II]}{dt} = k_1[I] - k_2[II] \quad (2)$$

$$\frac{d[III]}{dt} = k_2[II] \quad (3)$$

$$\frac{d[I]}{dt} + \frac{d[II]}{dt} + \frac{d[III]}{dt} = 0 \quad (4)$$

Jejich integrací při počátečních podmínkách  $[I]_0 = 0$  a  $[III]_0 = 0$  a za předpokladu, že  $k_1 \neq k_2$  nebo si nejsou blízké, získáme rovnice:

$$[I] = [I]_0 \cdot e^{-k_1 t} \quad (5)$$

$$[II] = [I]_0 \cdot \frac{k_1}{k_2 - k_1} \cdot [e^{-k_1 t} - e^{-k_2 t}] \quad (6)$$

$$[III] = [I]_0 \left( 1 + \frac{k_1 e^{-k_2 t} - k_2 e^{-k_1 t}}{k_2 - k_1} \right) \quad (7)$$

Z integrálních kinetických rovnic (5) až (7) získáme pro absorbanci  $A_t^\lambda$  reakčního roztoku při vlnové délce  $\lambda$  v libovolném čase  $t$  po dosazení do Lambertova-Beerova zákona (8) vztah (9):

$$A_t^\lambda = \varepsilon_I^\lambda [I] + \varepsilon_{II}^\lambda [II] + \varepsilon_{III}^\lambda [III] \quad (8)$$

$$A_t^\lambda = [I]_0 \left\{ (\varepsilon_I^\lambda - \varepsilon_{III}^\lambda) + \frac{k_1}{k_2 - k_1} (\varepsilon_{II}^\lambda - \varepsilon_{III}^\lambda) e^{-k_1 t} - \left[ \frac{k_1}{k_2 - k_1} (\varepsilon_{II}^\lambda - \varepsilon_{III}^\lambda) e^{-k_2 t} + \varepsilon_{III}^\lambda \right] \right\} \quad (9)$$

Hodnoty  $\varepsilon_I^\lambda$ ,  $\varepsilon_{II}^\lambda$ ,  $\varepsilon_{III}^\lambda$  jsou molární absorpční koeficienty látek *I*, *II* a *III* při dané vlnové délce. Protože na konci reakce (v čase  $t_\infty$ ) je v reakční směsi přítomna pouze látka *III*, je absorbance  $A_\infty^\lambda = \varepsilon_{III}^\lambda [I]_0$ . Rovnici (9) lze pak napsat v obecně platném tvaru (10):

$$A_t^\lambda - A_\infty^\lambda = M \cdot e^{-k_1 t} + N \cdot e^{-k_2 t} \quad (10)$$

*M* a *N* jsou konstanty, které zahrnují rychlostní konstanty  $k_1$  a  $k_2$  a molární absorpční koeficienty reagujících komponent.

Jsou-li konstanty  $k_1$  a  $k_2$  stejné, neplatí rovnice (6) až (10), protože nejsou splněny podmínky nutné k integraci diferenciálních rovnic. Pokud jsou hodnoty  $k_1$  a  $k_2$  blízké, nastávají problémy numerického rázu, které lze překonat vhodnou strategií – náhradou  $k_2 = k_1 + \Delta k$  a rozvinutím rovnic (6) a (7) v Taylorovu řadu, což pro  $\Delta k \rightarrow 0$  poskytnou rovnice<sup>7</sup>:

$$[II] = [I]_0 k \cdot t \cdot e^{-k \cdot t} \quad (11)$$

$$[III] = [I]_0 (1 - (1 + k \cdot t) e^{-k \cdot t}) \quad (12)$$

Ke stejnému výsledku lze dospět rovněž aplikací l'Hôpitalova pravidla na řešení limit rovnic (6) a (7) pro  $k_1 \rightarrow k_2$ , resp. na základě citlivostní analýzy. Další výhodou citlivostní analýzy je možnost nalezení vhodného způsobu provádění experimentů, tj. měření ve vhodném rozsahu koncentrací a kombinací jejich velikostí, zejména pak u reakcí druhého řádu, kde jsou hodnoty rychlostních konstant závislé na koncentraci. Při sledování absorbance reakční směsi je však experiment limitován rozsahem měřitelných absorbcí (nejlépe v intervalu 0,2–0,8). Vzhledem k neznámým molárním absorpčním koeficientům jednotlivých složek a k sledování reakce za podmínek pseudoprvního řádu (rychlostní konstanty nezávisí na koncentraci výchozích látek), není potřeba provádět analýzu citlivostních funkcí vzhledem k parametrům *M* a *N* z rovnice (10). Nicméně je třeba na analýzu citlivostních funkcí pamatovat, a to zejména v případě řešení složitějších následných reakcí, kde by byly hodnoty pozorovaných rychlostních konstant blízké a bylo by možné určit alespoň některé hodnoty molárních absorpčních koeficientů.

#### V ý p o č e t r y c h l o s t n í c h k o n s t a n t z l i n e a r i z o v a n ý c h d a t

Nejjednodušší a nejstarší způsob určování<sup>8,9</sup> obou rychlostních konstant  $k_1$  a  $k_2$  vychází z kinetické křivky při vlnové délce, při které je celková změna absorbance co největší a kde molární absorpční koeficienty zúčastněných látek jsou rozdílné – tj. mimo oblasti isosbestických bodů. Těto podmínce nejlépe vyhovuje vlnová délka 405 nm (obr. 2). Kinetickou křivku pak linearizujeme logaritmováním rozdílu  $\ln(A_t^\lambda - A_\infty^\lambda)$  resp.  $\ln(A_\infty^\lambda - A_t^\lambda)$  a vynesemím těchto logaritmu proti času  $t$ . Tím získáme pro danou vlnovou délku částečně linearizovanou závislost, z jejíž lineární části (v našem případě pro  $t > 250$  s) určíme menší z obou rychlostních konstant. Větší rychlostní konstantu získáme z nelineární části závislosti (v našem případě pro  $t < 100$  s) logaritmováním  $\ln[A_t^\lambda - (A_\infty^\lambda - A_t^\lambda)]$ , kde  $A_t^\lambda$  představuje absorbanci získanou lineární extrapolací nelineární části závislosti. Tato metoda je v současnosti vhodná spíše k orientačnímu zjištění rychlostních konstant obou stupňů a získané hodnoty lze použít jako výchozí pro nelineární regresi (tab. I). Pro srovnání je uvedena (tab. II) i rychlostní konstanta reakce *II* → *III* při 405 nm měřená z nezávisle získaného meziprojektu.

Tabulka I

Hodnoty rychlostních konstant získané linearizací při  $\lambda = 405$  nm

Regresní charakteristika	Pomalejší reakce (II → III)	Rychlejší reakce (I → II)
$k$ , s <sup>-1</sup>	$5,51 \cdot 10^{-3}$	$1,75 \cdot 10^{-2}$
$s(k)$ , s <sup>-1</sup>	$6,89 \cdot 10^{-6}$	$8,43 \cdot 10^{-5}$
Relativní chyba, %	0,125	0,482
Poločas, s	125,8	39,6

Tabulka II  
Regresní charakteristiky pro kinetickou křivku reakce  $I \rightarrow III$  při 405 nm

Parametr	Hodnota
$k, s^{-1}$	$6,17 \cdot 10^{-3}$
$s(k), s^{-1}$	$5,56 \cdot 10^{-5}$
Relativní chyba, %	0,90
Poločas, s	112,3
Reziduální směrodatná odchylka, $s^{-1}$	$5,46 \cdot 10^{-4}$

Tabulka III  
Regresní charakteristiky pro kinetickou křivku reakce  $I \rightarrow II \rightarrow III$ , měřenou v intervalu  $\lambda = 319\text{--}349$  nm a  $399\text{--}500$  nm

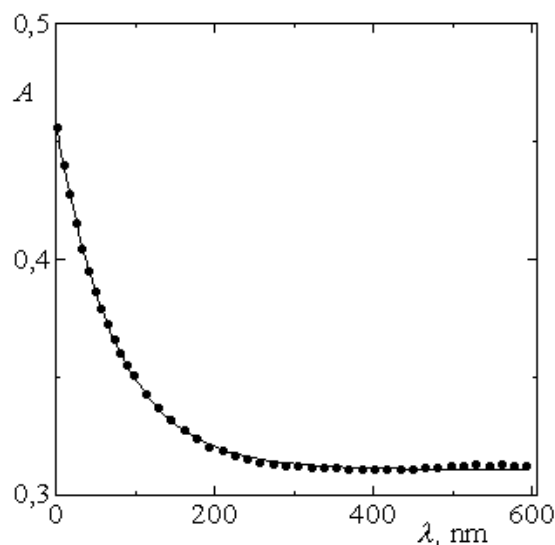
Regresní charakteristika	Pomalejší reakce ( $II \rightarrow III$ )	Rychlejší reakce ( $I \rightarrow II$ )
$k, s^{-1}$	$5,63 \cdot 10^{-3}$	$1,68 \cdot 10^{-2}$
$s(k), s^{-1}$	$4,47 \cdot 10^{-4}$	$1,10 \cdot 10^{-3}$
Relativní chyba, %	7,94	6,55
Poločas, s	123,1	41,3

V předchozím odstavci byla vybrána pouze jedna vlnová délka, při níž byly vypočteny rychlostní konstanty. Je však vhodné odstranit subjektivní výběr vlnové délky a zabývat se výpočtem z celých časových záznamů spekter. I v tomto případě je však třeba zohlednit oblasti isosbestických bodů, ve kterých metoda výpočtu selhává a poskytuje naprosto chybné hodnoty rychlostních konstant. Pro ilustraci jsou uvedeny rychlostní konstanty získané z oblastí vlnových délek 319–349 a 399–500 nm. Tento výběr byl proveden na základě hodnot modelovací síly, jak bude blíže vysvětleno v kapitole Nelineární metody. Výsledky jsou shrnuty v tabulce III.

Z hodnot v tabulce III vyplývá, že oproti výsledkům pro jednu vlnovou délku (tab. I) se vypočtené hodnoty mírně zlepšily. Hodnoty směrodatných odchylek jsou zde relativně horší, protože ty v tomto případě znamenají směrodatné odchylky od aritmetického průměru rychlostních konstant pro všechny vlnové délky na rozdíl od hodnot v tab. I představujících odchylky pro daný parametr jediné lineární regrese.

#### Metoda měření v isosbestickém bodě

Jak je patrné ze spektrálního záznamu reakce  $II \rightarrow III$  (obr. 3), odpovídá isosbestický bod reakce (tj. bod, při kterém jsou molární absorpční koeficienty výchozí látky  $II$  a produktu  $III$  stejné) vlnové délce 356 nm. Měřením následné reakce  $I \rightarrow II \rightarrow III$  při této vlnové délce získáme



Obr. 4. Kinetická křivka reakce  $I \rightarrow II$  měřená v isosbestickém bodě při  $\lambda = 356$  nm

Tabulka IV  
Regresní charakteristiky pro kinetickou křivku reakce  $I \rightarrow II$  měřenou v isosbestickém bodě ( $\lambda = 356$  nm)

Parametr	Hodnota
$k_1, s^{-1}$	$1,36 \cdot 10^{-2}$
$s(k_1), s^{-1}$	$9,40 \cdot 10^{-5}$
Relativní chyba, %	0,692
Poločas, s	51,1
Reziduální směrodatná odchylka, $s^{-1}$	$9,36 \cdot 10^{-4}$

kinetickou křivku (obr. 4) odpovídající pouze reakci  $I \rightarrow II$ , a z ní hodnotu rychlostní konstanty  $k_1$  (tab. IV).

Tato hodnota představuje nejlepší odhad rychlostní konstanty prvního reakčního stupně a jak je patrné z tabulky II uvedené u linearizace, je cca o 29 % nižší než rychlostní konstanta  $k_{\max}$ .

#### Nelineární metody

Vyhodnocením kinetických dat bez jejich linearizace se zabývá velké množství prací, přičemž jako kritéria přiléhavosti se opět používá nejmenší součet čtverců odchylek změřené a vypočtené veličiny. Metody hledání tohoto součtu jsou např. derivační Gaussova-Newtonova metoda<sup>10</sup>, jejíž nevýhodou je nutnost počátečního relativně přesného odhadu parametrů<sup>11</sup> nebo metoda<sup>12</sup> na bázi Hartleyova algoritmu<sup>13</sup>. S výhodou lze rovněž použít kombinace různých metod, jako je tomu např. u komerčního software<sup>14</sup> OPgm (kombinace nederivační simplexové<sup>15,16</sup> a derivační Le-

venbergovy-Marquardtovy metody<sup>17</sup>), použitého ke zpracování kinetických dat v tomto článku. Další metody jsou popsány v literatuře<sup>18,19</sup>. Všechny tyto práce mají společné, že optimalizují hodnoty těchto rychlostních konstant z kinetické křivky příslušející pouze jedné vlnové délce zpravidla odpovídající celkové maximální změně absorbance resp. jiné lineárně závislé veličiny reagujícího systému (jednoduchá nelineární regrese). Tento subjektivní výběr je v některých případech očividný, avšak z obecného hlediska je mnohem spolehlivějším přístupem výpočet rychlostních parametrů z celých záznamů spekter na čase. Tento postup byl v literatuře<sup>20</sup> rovněž popsán a na jeho základě byl vytvořen i komerčně dostupný software<sup>21</sup> Pro-K dodávaný spolu s produkty firmy Applied Photophysics.

Náš přístup spočívá v optimalizaci (program OPgm, cit.<sup>14</sup>) obou rychlostních konstant při subjektivně zvolených hodnotách vlnových délek 405 nm a 235 nm a jejich porovnání se správnými hodnotami konstant, získanými měřeními v isosbestickém bodě ( $k_{\max} = k_1$ ) v reakci  $I \rightarrow III$  ( $k_{\min} = k_2$ ). Výsledky spolu s regresními charakteristikami jsou shrnuty v tabulce V.

Z uvedených hodnot je zřejmé, že se pozorované rychlostní konstanty získané optimalizačním postupem více blíží „správným“ hodnotám pozorovaných rychlostních konstant, získaných z měření odděleného druhého stupně a měření reakce v isosbestickém bodě. Přes poměrně dobré proložení experimentálních hodnot absorbance v čase modelovou rovnicí pro obě vlnové délky je vidět, že se hodnoty pozorovaných rychlostních konstant při jednotlivých vlnových délkách liší. Proto se nabízí otázka, jak zjistit, které vlnové délky je nejlepší použít k určení hodnot pozorovaných rychlostních konstant. Jedním z možných postupů je použít metodu hlavních komponent<sup>22</sup>, používanou k redukci počtu sloupců datové matice. V našem pří-

Tabulka V

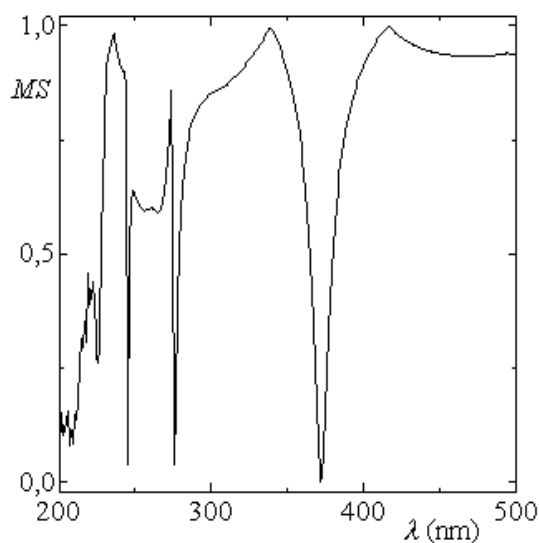
Regresní charakteristiky jednoduché nelineární regrese pro kinetickou křivku následné reakce  $I \rightarrow II \rightarrow III$  při  $\lambda = 325$  a 405 nm

Regresní charakteristika	$\lambda = 405$ nm	$\lambda = 325$ nm
$k_1, s^{-1}$	$5,74 \cdot 10^{-3}$	$5,84 \cdot 10^{-3}$
$s(k_1), s^{-1}$	$3,64 \cdot 10^{-5}$	$1,94 \cdot 10^{-4}$
Relativní chyba, %	0,63	3,32
Poločas, s	120,8	118,7
Reziduální směrodatná odchylka, $s^{-1}$	$6,34 \cdot 10^{-4}$	$1,60 \cdot 10^{-3}$
$k_2, s^{-1}$	$1,50 \cdot 10^{-2}$	$1,43 \cdot 10^{-2}$
$s(k_2), s^{-1}$	$1,58 \cdot 10^{-4}$	$7,34 \cdot 10^{-5}$
Relativní chyba, %	1,06	5,12
Poločas, s	46,2	48,5
Reziduální směrodatná odchylka, $s^{-1}$	$6,34 \cdot 10^{-4}$	$1,68 \cdot 10^{-3}$

padě je matice tvořena z hodnot změřených absorbancí. Řádky matice tvoří jednotlivé časy měření spekter a sloupce pak přísluší jednotlivým vlnovým délkám. Cílem metody hlavních komponent je určit, kolika na sobě lineárně nezávislými sloupci vypočítané matice  $\mathbf{T}$  lze popsat celkovou variabilitu všech sloupců zdrojové matice  $\mathbf{X}$ . Toho lze docílit rozkladem matice  $\mathbf{X}$  podle schématu  $\mathbf{X} = \mathbf{TP}^T + \mathbf{E}$ , kde  $\mathbf{X}$  je zdrojová matice dat o  $N$  řádcích a  $M$  sloupcích,  $\mathbf{T}$  je matice latentních proměnných („score“ matice) o  $N$  řádcích a obsahuje  $P$  sloupcových vektorů  $\mathbf{t}$  označovaných jako hlavní komponenty. Matice  $\mathbf{P}$  se nazývá matice zátěží nebo také „loadings“. Obsahuje  $M$  řádků a  $P$  sloupcových vektorů  $\mathbf{p}$ . Jednotlivé sloupcové vektory matice  $\mathbf{P}$  představují míru příspěvku příslušné latentní proměnné k popisu variability sloupců zdrojové matice. Matice  $\mathbf{E}$  je rozměrem shodná se zdrojovou maticí a obsahuje nevysvětlenou variabilitu. Rozkladem zdrojové matice dat na matici latentních proměnných a na matici zátěží získáme matici  $\mathbf{T}$  o podstatně nižším počtu sloupců  $P$ . Statistickou analýzou lze pak určit, jaká je míra lineární závislosti vypočtených vektorů  $\mathbf{t}$  na jednotlivých sloupcích zdrojové datové matice. V našem případě se určí, kolika různými způsoby závisí absorbance na čase. První vektor  $\mathbf{t}_1$  reprezentuje v našem případě jakousi průměrnou změnu absorbance v čase, vypočtenou ze všech vlnových délek zdrojové matice. Jde však o změnu absorbance se shodným trendem. Pro neshodný trend, například oblasti kolem isosbestických bodů, mají jednotlivé příspěvky do výsledného vypočítaného vektoru podstatně nižší váhu. Tyto oblasti pak popisuje další vektor latentní proměnné  $\mathbf{t}_2$ . Rozkladů zdrojové matice podle shora uvedeného postupu lze provést nekonečně mnoho, tyto rozklady jsou však navzájem lineárně transformovatelné. Důležitou vlastností rozkladu je, že se vždy na příslušné latentní proměnné izoluje shodné množství variability původní zdrojové matice. Z této skutečnosti vyplývá, že vypočtený vektor latentní proměnné  $\mathbf{t}_1$  je lineárně závislý na vektorech zdrojové matice (změna absorbance v čase při jednotlivých vlnových délkách). I když je vypočtený a neodpovídá tudíž skutečným hodnotám absorbance, má však smysl změny absorbance v čase (výše zmíněná lineární závislost). Rychlostní konstanty jsou v naší optimalizační rovnici nelineárními parametry, a proto se jejich hodnoty lineární transformací ve smyslu metody hlavních komponent nezmění. Pro vyšší přesnost matematického zpracování je výhodné provést výpočet dvakrát. Poprvé s použitím kompletního spektrálního záznamu (všech vlnových délek 200–500 nm) a podruhé s vyloučením těch vlnových délek, jejichž modelovací síla je nižší než 90 %. Modelovací síla ( $MS$ ) je užitečnou charakteristikou, která vychází z matice latentních proměnných a z matice zátěží ( $I3$ ).

$$M = 1 - \frac{1}{N - P - 1} \sum_{k=1}^N \frac{e_{ik}^2}{s_{i0}} \quad (13)$$

kde  $s_{i0}$  znamená směrodatnou odchylku  $i$ -tého sloupce zdrojové matice  $\mathbf{X}$  a  $e_{ik}$  je klasické reziduum z matice  $\mathbf{E}$ .

Obr. 5. Závislost modelovací síly  $MS$  na vlnové délce  $\lambda$ 

Změna modelovací síly s vlnovou délkou je zřejmá z obrázku (obr. 5). Modelovací síla má význam míry společné variability vektoru latentních proměnných a  $i$ -tého sloupce zdrojové matice. Lze ji tedy použít jako kritérium pro vyloučení oblastí vlnových délek nevhodných pro optimalizaci rychlostních konstant následných reakcí. Jak je vidět ze záznamu prvního výpočtu metodou hlavních komponent (PCA), modelovací síla je nízká právě v oblasti isobestických bodů, jejichž vlnové délky byly určeny již na první pohled jako nevhodné pro optimalizaci. Naopak vlnové délky, při nichž je modelovací síla maximální a jsou tedy pro výpočet nejvhodnější, jsou  $\lambda = 339$  nm ( $MS = 0,996$ ) a  $\lambda = 416$  nm ( $MS = 0,999$ ).

Výsledky pozorovaných rychlostních konstant určených optimalizací časových závislostí vypočtených vektorů  $\mathbf{t}_1$  získaných rozkladem matic sestavených z vlnových délek jsou: A pro data 319–349 nm a 399–500 nm, B pro data 319–349 nm a C pro data 399–500 nm.

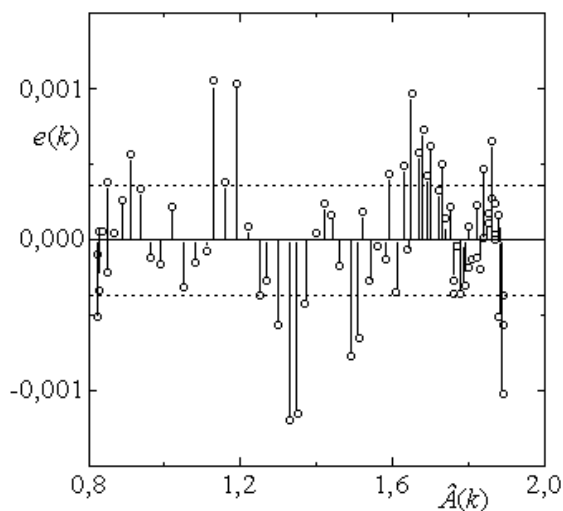
Jak je vidět, jsou vypočtené hodnoty rychlostních konstant velmi blízké hodnotám získaným při subjektivně zvolených vlnových délkách. Na rozdíl od těchto hodnot se však vyznačují mnohem lepšími výsledky regresní diagnostiky nelineární regrese. Kvalitu nelineární regrese můžeme posoudit na základě hodnot směrodatných odchylek (tab. VI) odhadovaných parametrů, reziduálních sum čtverců a reziduálních standardních odchylek celé regrese.

O kvalitě proložení experimentálních bodů svědčí nejlépe hodnoty reziduálních směrodatných odchylek. Někdy se však podaří pro různé modely docílit podobných hodnot statistických charakteristik, např. u směrodatných odchylek. Důležitým předpokladem pro vhodnost regresního modelu je konstantní a konečný rozptyl chyb v datech, která se za těchto podmínek nazývají homoskedastická. O homoskedasticitě se lze přesvědčit nejlépe grafickým

Tabulka VI

Regresní charakteristiky vícenásobné nelineární regrese spektrálních dat následné reakce  $I \rightarrow II \rightarrow III$  v oblastech  $\lambda = 319\text{--}349$  nm a  $\lambda = 399\text{--}500$  nm a jejich spojení

Regresní charakteristiky	319–349 nm 399–500 nm	319–349 nm 399–500 nm	399–500 nm
$k_1, \text{s}^{-1}$	$5,81 \cdot 10^{-3}$	$5,83 \cdot 10^{-3}$	$5,79 \cdot 10^{-3}$
$s(k_1), \text{s}^{-1}$	$1,17 \cdot 10^{-5}$	$5,45 \cdot 10^{-5}$	$3,01 \cdot 10^{-5}$
Relativní chyba, %	0,20	0,93	0,52
Poločas, s	119,3	118,9	119,7
$k_2, \text{s}^{-1}$	$1,49 \cdot 10^{-2}$	$1,43 \cdot 10^{-2}$	$1,51 \cdot 10^{-2}$
$s(k_2), \text{s}^{-1}$	$5,18 \cdot 10^{-5}$	$2,06 \cdot 10^{-4}$	$1,38 \cdot 10^{-4}$
Relativní chyba, %	0,35	1,44	0,92
Poločas, s	46,5	48,5	45,9
Reziduální suma čtverců	$8,06 \cdot 10^{-6}$	$1,71 \cdot 10^{-4}$	$5,52 \cdot 10^{-5}$
Reziduální směrodatná odchylka	$3,39 \cdot 10^{-4}$	$1,56 \cdot 10^{-3}$	$8,88 \cdot 10^{-4}$

Obr. 6. Závislost predikovaného rezidua  $e(k)$  na predikované hodnotě absorbance  $\hat{A}(k)$ 

znázorněním, např. na obr. 6. Grafické znázornění na obr. 6 by mělo v optimálním případě vykazovat nahodilé rozložení odchylek, a to v uspořádání jednou nad a podruhé pod dělicí úsečkou a dále se srovnatelnou výškou. Takové zobrazení znamená, že jde o konstantní a konečný rozptyl chyb. Je-li v zobrazovaných bodech viditelný nějaký trend, pak tato skutečnost indikuje pravděpodobnou

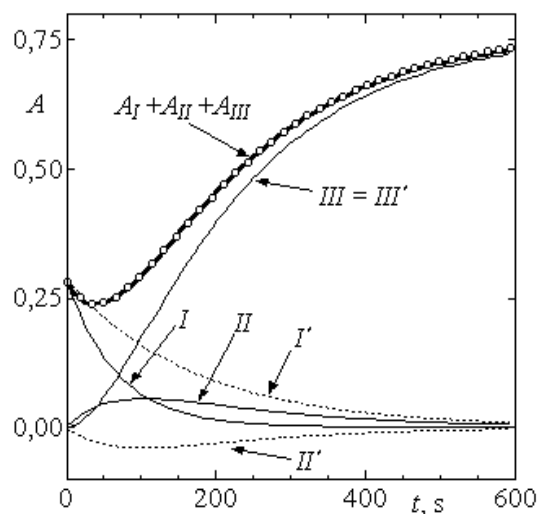
chybu v regresním modelu nebo chybu v datech. Nevykazují-li zobrazená rezidua trend, ale zvyšující se resp. snižující se velikost, znamená to, že není dosaženo konstantního rozptylu chyb.

Nevykazují-li data heteroskedasticitu a jsou-li vhodným způsobem proložena, můžeme považovat optimalizační funkci za správnou. Jestliže byla rovnice, podle které optimalizujeme, odvozena na základě teorie pro daný fyzikálně-chemický problém, mají jednotlivé parametry přesně daný význam. Nejsou-li optimalizací získané hodnoty jednotlivých parametrů v rozporu s teoretickými hodnotami (záporné hodnoty rychlostních konstant nebo molárních absorpčních koeficientů), je-li splněna homoskedasticita a jsou-li uspokojivé statistické charakteristiky, můžeme o modelu prohlásit, že není v rozporu s uvedenou teorií, avšak to neznamená, že jiná teorie by nepopsala tentýž problém lépe.

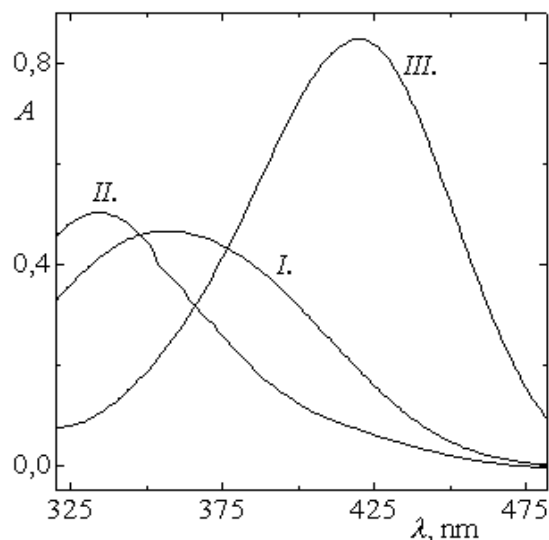
#### Problém přiřazení rychlostních konstant jednotlivým stupňům

Podstatný problém představuje přiřazení jednotlivých získaných rychlostních konstant správné reakci,  $A \rightarrow B$  resp.  $B \rightarrow C$ . Z podstaty matematického zpracování experimentálních dat plyne, že není možné určit, která rychlostní konstanta náleží které reakci. Neplatí tedy, že rychlá změna absorbance následovaná změnou pomalou znamená rychlý první stupeň následovaný stupněm pomalým<sup>10</sup>. Aby bylo možno určit, která z rychlostních konstant  $k_1$  a  $k_2$  odpovídá reakci  $I \rightarrow II$  resp.  $II \rightarrow III$ , je např. třeba připravit látku  $II$  a samostatně změřit rychlostní konstantu její přeměny na látku  $III$ , čímž určíme rychlostní konstantu  $k_2$ , nebo nalézt ve spektrálním záznamu reakce isosbestický bod přeměny  $II \rightarrow III$  a sledovat spektrofotometricky reakci při této vlnové délce. Přeměna  $II \rightarrow III$  se v tomto isosbestickém bodě spektrálně neprojeví, to znamená, že získáme kinetickou křivku pouze pro první reakci a z ní hodnotu  $k_1$ . Poslední možností, která se však dá použít jen málokdy, je samostatné spektrální sledování meziproductu. V oblasti klasických UV-VIS spekter však téměř neexistují případy, kdy při dané vlnové délce absorbuje pouze intermediát – pásy se často překrývají. Spektrální sledování intermediátu je však možné, pokud vykazuje na rozdíl od výchozí látky a produktu fluorescenci<sup>23</sup>.

Námi navržený postup spočívá v myšlence, že dvě matematicky nerozlišitelná řešení součtu dvou exponenciál se musí lišit ve znaménku molárních absorpčních koeficientů. Kladná znaménka odpovídají reálné situaci, zatímco kterýkoliv záporný koeficient postačuje k vyloučení dané eventualit. Abychom toto mohli určit, je třeba provést zpětný výpočet absorbance z rovnice (8) při dané vlnové délce pro jednotlivé složky reakční směsi v čase. Na základě srovnání těchto závislostí s teoretickým předpokladem průběhu pak provedeme správné přiřazení. Toto ilustruje obr. 7, kde je při špatném přiřazení jednotlivých konstant vidět, že absorbance meziproductu  $II$  po začátku reakce klesá a pak opět roste (křivka označená  $II'$ ). Takový průběh by byl možný pouze v případě, že by meziproduct vyzařoval záření příslušné vlnové délky (snižoval absorbanci směsi –



Obr. 7. Vypočtené a skutečné časové průběhy absorbancí jednotlivých složek reakce při vlnové délce  $\lambda = 405 \text{ nm}$ ;  $I$  – představuje časovou změnu absorbance výchozí látky při správném přiřazení pozorovaných rychlostních konstant a  $I'$  při chybném přiřazení,  $II'$  – úbytek meziproductu v čase při špatném přiřazení rychlostních konstant,  $II$  – změna absorbance meziproductu v čase při správném přiřazení rychlostních konstant,  $III$  a  $III'$  – změna absorbance produktu v čase vychází pro obě varianty stejně.



Obr. 8. Vypočtená spektra jednotlivých složek  $I$ ,  $II$  a  $III$

tj. měl záporný molární absorpční koeficient), neboť koncentrace meziproductu musí nutně nejprve růst a pak klesat. Při správném přiřazení pozorovaných rychlostních konstant jednotlivým reakčním stupňům získáme osově symetrický průběh absorbance meziproductu v čase ( $II$ ). Takový průběh je již z hlediska teorie správný, neboť kon-

centrace meziprojektu v čase se nejprve zvyšuje, poté dosáhne maxima a opět klesá k nule.

Obr. 7 ukazuje časové průběhy jednotlivých složek reakce při vlnové délce 405 nm. Body na obrázku představují experimentální měření absorbance směsi a proložená křivka součet optimalizovaných absorbancí  $A_I + A_{II} + A_{III}$ . Je zde vidět nepatrná změna v průběhu vypočteném, protože pro výpočet bylo použito rychlostních konstant získaných výše uvedenou analýzou latentních proměnných s nejlepšími hodnotami statistických charakteristik.

## Závěr

Závěrem lze konstatovat, že k vyhodnocení systému následných reakcí je nejvhodnější metoda nelineární regrese kombinovaná s metodou hlavních komponent. Hodnoty rychlostních konstant se nejvíce blíží hodnotám získaným nezávislým měřením, event. za speciálních podmínek (měření v isosbestickém bodě). Naproti tomu starší metody linearizační se dají spíše použít jako odhad rychlostních konstant. Jejich použití sebou nese riziko nevhodného výběru vlnové délky, resp. ne zcela optimálního odhadu  $A_\infty$ . Výhodou počítačového zpracování je navíc možnost modelování spekter jednotlivých složek (viz obr. 8) (zejména meziprojektu, pokud není dostupný nezávislou cestou) a možnost správného přiřazení rychlostních konstant jednotlivým stupňům.

## LITERATURA

- Štěrbá V., Panchartek J.: *Kinetické metody při studiu reakcí organických sloučenin*. SNTL, Praha 1985.
- Kaválek J., Macháček V., Sedlák M., Štěrbá V.: Collect. Czech. Chem. Commun. 58, 1122 (1983).
- Prinz T., Keim W., Driessen-Holscher B.: Angew. Chem. Int. Ed. 35, 1708 (1996).
- Sedlák M., Hanusek J., Holčapek M., Štěrbá V.: J. Phys. Org. Chem. 14, 187 (2001).
- Sedlák M., Hejtmánková L., Kašparová P., Kaválek J.: J. Phys. Org. Chem. 15, 165 (2002).
- Kraus M., Schneider P., Beránek L.: *Chemická kinetika pro inženýry*. SNTL, Praha 1978.
- Deranleau D. A.: Experientia 38, 661 (1982).
- Swain C. G.: J. Am. Chem. Soc. 66, 1696 (1944).
- Jackson W. G., Harrowfield J. B., Vowles P. D.: Int. J. Chem. Kinet. 9, 535 (1977).
- Alcock N. W., Benton D. J., Moore P.: Trans. Faraday Soc. 66, 2210 (1970).
- Salvador F., González J. L.: React. Kinet. Catal. Lett. 25, 125 (1984).
- Casado J., González J. L., Moreno M. N.: React. Kinet. Catal. Lett. 33, 357 (1987).
- Wolfe M. A.: *Numerical Methods for Unconstrained Optimizations*. Van Nostrand Reinhold Co., London 1978.
- Pytela O.: *OPgm program package version 3.07*. Univerzita Pardubice, Pardubice 1992–2003.
- Spendley W., Hext G. R., Himworth F. R.: Technometrics 4, 441 (1962).
- Nelder J. A., Mead R.: Comput. J. 7, 308 (1965).
- More J. J., v knize: *The Levenberg-Marquart algorithm: Implementation and theory*. In G. E. Watson, (ed.), Lect. Notes Math. 630, 105 (1978).
- Wu X. Z., Zhang W. Z., Cai S. M., Han D. G.: React. Kinet. Catal. Lett. 47, 51 (1992).
- Kahley M. J., Novak M.: J. Chem. Educ. 73, 359 (1996).
- Maeder M., Zuberbühler A. D.: Anal. Chem. 62, 2220 (1990).
- !Pro-K global analysis and simulation software version 4.21*. Applied Photophysics Ltd., Leatherhead 2000.
- Afifi A. A., Azen S. P.: *Statistical Analysis. A Computer Oriented Approach*. Academic Press, New York 1979.
- Cai R. X., Wu X.G., Liu Z.H., Ma W.H.: Analyst 124, 751 (1999).

Autoři děkují Ministerstvu školství, mládeže a tělovýchovy České republiky za finanční podporu (projekt CI MSM 253 100 001).

**J. Hanusek<sup>a</sup> and J. Svoboda<sup>b</sup>** (<sup>a</sup>Department of Organic Chemistry, Faculty of Chemical Technology, University of Pardubice, <sup>b</sup>Joint Laboratory of Solid State Chemistry of Institute of Macromolecular Chemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, and University of Pardubice): **Methods of Solution of a System of First-order and Pseudofirst-order Consecutive Reactions Based on Time Dependence of UV-VIS Spectra**

The article deals with the methods of obtaining rate constants of first-order and pseudofirst-order consecutive reactions from time dependences of UV-VIS spectra, either whole or at selected wavelengths, and gives a method of unambiguous assignment of the constants to individual reaction steps. Common linearization methods of evaluation of the constants at a single wavelength were compared with the methods based on simple nonlinear regression combined with the principal component methods in a model system of 4-chloro-*N*-(4-nitrophenyl)butanamide. The precision of the methods was further compared with independent experimental second-order rate constants.