

Masarykova univerzita

Přírodovědecká fakulta



**ViBuCh**

Vzdělávací ikurz pro budoucí chemiky

# **Vzdělávací ikurz pro budoucí chemiky**

**Zadání 3. série**

**12. ročník (2021/2022)**

Korespondenční seminář ViBuCh probíhá pod záštitou [Ústavu chemie](#) a [Centra RECETOX](#) Přírodovědecké fakulty Masarykovy univerzity.

Recenze úloh:

Simona Krupčíková (C3), Jana Lapešová (S6), Martin Marek (A3), Jan Novotný (B3), Hana Slámová (S5)

© 2022 Zuzana Bílková, Marie Grunová, Matúš Chvojka, Simona Rozárka Jílková, Simona Krupčíkové, Anna Matějková, Petra Pikulová, Daniel Pluskal a Hana Slámová.

© 2022 Masarykova univerzita

## Úvodník

Drazí (po)zůstalí ViBuCh řešící,

nebudeme mainstream a nezačneme poslední úvodník slovy „Rok se s rokem sešel“, protože to dělají na konci ročníku všichni a my jsme *too cool for that*. Ale doopravdy, rok se s rokem sešel. Rok... spíš tak sedm měsíců, které uběhly od doby, kdy jsme vás vítali do začátku podzimu. A ano, je to flashback na první sérii.

Každopádně v té třetí, a pro letošek poslední, vás opět čeká pět velice kvalitních úloh. My orgové i soviška milujeme memes, takže jak započít konec ročníku? Přece právě s memes. Pak vás čeká něco fakt super a to suprahordinové nekovalentních interakcí. Samozřejmě nežertujeme. Tentokrát to není žádný aprílový žertík, a tak vám nebudeme slibovat žádné dinosaury, ale fakt ultra mega namakané moderní enzymborce. Každopádně jak Apríl, tak Velikonoce už jsou za námi a nic tak radostného nás už do léta nečeká. Ovšem s létem přichází i podzim a s podzimem dýně. Zatímco budete čekat na ty opravdové a s nimi i zadání první série dalšího ročníku, můžete se pobavit NMR spektry chemických dýní. Ale teď zcela vážně a bez všech žertů, už se vám podařilo vypátrat toho Analytíka?

Pokud ne, nezoufejte. I když by se to mohlo zdát, tato série není vaší poslední šancí. Přihlaste na Letní soustředění ViBuChu a přijďte ve dnech 7.–13. 8. 2022 do Brna. ☺ A kam že máte posílat přihlášky? Bedlivě sledujte náš FB a IG, kde se včas všechno dozvíte. ☺

A nezapomeňte, soustředko je tu jen pro ty nejlepší z Vás, tak nažhavte mozkové buňky a pusťte se do řešení poslední série. Přejeme vám hodně štěstí (a hlavně zábavy)!

Za ViBuCh orgtým

Maru a Hanka.

## S5 – A přece se kryjí! (pátá úvodní úloha)

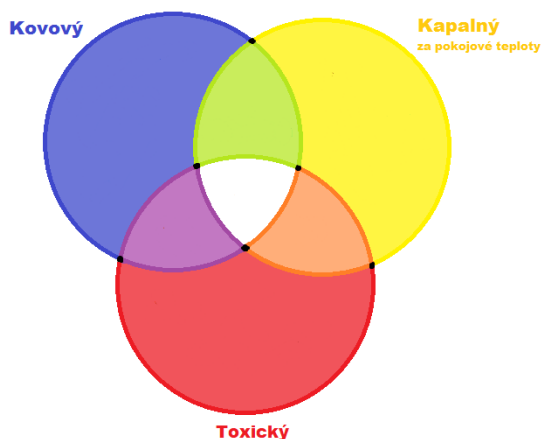
*Autorka: Anna Matějková (e-mail: anna-matejkova@seznam.cz)*

6 bodů

Vennův diagram, nebo také Eulerův-Vennův diagram představil v roce 1881 profesor John Venn z Anglie. Vy jste se s ním nejspíše setkali, když jste se ve škole učili o množinách, a v memech. Znázorňuje vztahy několika množin a jejich prvků.

Sovička, tak jako asi všichni, miluje memy. Ale snad ještě radši má přírodní vědy – matematiku, fyziku, biologii a především chemii. Není tedy divu, že se rozhodla spojit memes s Vennovým diagramem a chemií. Pomozte jí vyšperkovat její vzdělávací meme.

**Úkol 1:** Z nabídky doplňte prvky, sloučeniny či slitiny na správná místa diagramu. Jestli si nejste jistí, uveďte stručně zdůvodnění umístění dané látky. A pokud je člověk opravdu na pochybách, vyplatí se začít s GHS symboly.



Nabídka: aceton,  $\text{As}_2\text{O}_3$ ,  $\text{Br}_2$ ,  $\text{CCl}_4$ ,  $\text{Cl}_2$ , Cr, Dural, Elektrum, Galinstan, Gd, Hg,  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{H}_3\text{C-COOH}$ , KCN,  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ , NaK,  $\text{PH}_3$ , Ru, Tl.

### Úkol 2:

- Pojmenujte nabízené prvky a sloučeniny pomocí systematického názvosloví.
- Napište, ze kterých hlavních prvků se skládají uvedené čtyři slitiny.
- Vyberte si čtyři z nabízených látek a ke každé napište dva možné způsoby využití.

**Úkol 3:** Do každé z následujících oblastí našeho Vennova diagramu vymyslete právě jednu další chemicky čistou látku:

- zelená
- fialová
- oranžová

## S6 – A přece se drží (šestá úvodní úloha)

Autor: Matúš Chvojka (e-mail: mchvojka@mail.muni.cz)

7 bodů

Kromě toho, že jsou atomy vázány v molekulách pomocí kovalentních vazeb, existuje i několik dalších způsobů, jak spolu mohou atomy a molekuly interagovat, ať už intramolekulárně, nebo intermolekulárně. Většina těchto interakcí je způsobená vzájemným přitahováním kladných a záporných nábojů, které mohou být dočasné, nebo trvalé. Mnoho nekovalentních interakcí najdeme například v proteinech, kde jsou zodpovědné za vznik sekundární a terciární struktury. Pár příkladů takových nekovalentních interakcí si představíme a ukážeme v této úloze.

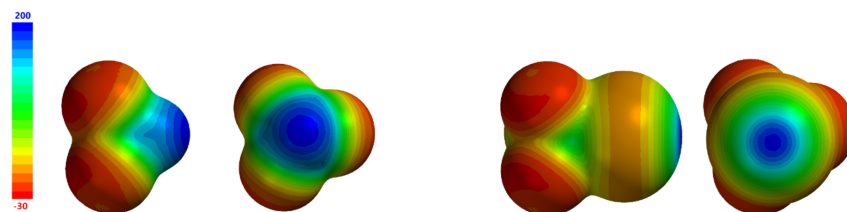
Snad nejznámější a nejčastěji se objevující nekovalentní interakcí je vodíková vazba. Pokud je atom vodíku kovalentně navázaný na jiný atom, který má výrazně vyšší elektronegativitu (například kyslík nebo dusík), potom se na atomu vodíku nachází oblast se sníženou elektronovou hustotou (donor vodíkové vazby). Tato oblast přitahuje části jiných molekul s vysokou elektronovou hustotou (akceptory vodíkové vazby), jako jsou například volné elektronové páry nebo anionty. Úhel  $X^{\delta-}-H^{\delta+}\cdots A^-$  vodíkové vazby je poměrně flexibilní – může být v rozmezí  $90^\circ$  až  $180^\circ$ . Energeticky může být vodíková vazba poměrně slabá – přibližně  $1-2\text{ kJ mol}^{-1}$  – zároveň ale jiné vodíkové vazby dosahují až hodnot kolem  $160\text{ kJ mol}^{-1}$ , například mezi molekulami hydrogenfluoridu ( $HF_2^-$ ).

**Úkol 1:** Tato hodnota ( $160\text{ kJ mol}^{-1}$ ) přesahuje vazebné energie některých kovalentních vazeb. Uveďte příklad kovalentní vazby, která má energii nižší než  $160\text{ kJ mol}^{-1}$ .

Trochu méně tradičním donorem vodíkové vazby může být i C–H vazba, pokud je dostatečně polarizovaná a elektronová hustota je lokalizována spíše na uhlíku přítomností elektronakceptorních skupin v molekule.

**Úkol 2:** Nakreslete/vymyslete analog methanu (jiný než na obrázku 1), který bude vhodným donorem vodíkové vazby.

Podobný charakter jako vodíkové vazby mají i vazby halogenové. V tomto případě je polarizovaným atomem, na kterém je místo se sníženou hustotou, brom nebo jod. Chlor a fluor se jako donory halogenové vazby použít nedají, protože jsou malé a tím pádem i špatně polarizovatelné. Halogenová vazba se od vodíkové liší tím, že je silně geometricky orientovaná – prakticky se setkáme jen s případy, kdy má úhel  $R^{\delta-}-I^{\delta+}\cdots A^-$  velikost  $180^\circ$ . Rozsah energií je podobný jako pro vodíkovou vazbu, typické jsou hodnoty v rozmezí  $10-200\text{ kJ mol}^{-1}$ . Na obrázku 1 si můžete porovnat rozložení elektronové hustoty trifluormethanu (vlevo) a jodtrifluormethanu (vpravo). Všimněte si, že oblast s nízkou elektronovou hustotou okolo atomu vodíku je o mnoho větší než ta na atomu jodu.



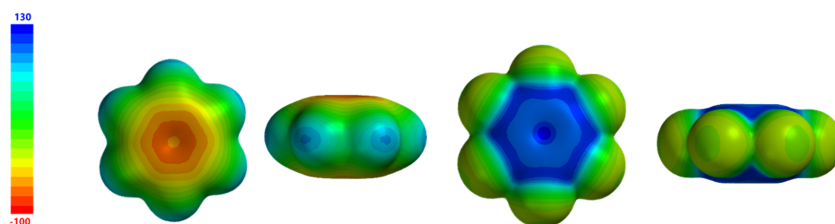
**Obr. 1:** Vypočítané elektrostatické potenciály trifluormethanu (vlevo) a jodotrifluoromethanu (vpravo). Červenou barvou jsou znázorněna místa s vysokou elektronovou hustotou a modrou barvou s nízkou elektronovou hustotou.

Halogenové vazby se také označují jako interakce se  $\sigma$ -dírou, jelikož jsou to interakce s nízkou elektronovou hustotou (tj. dírou) na  $\sigma$ -vazbě.

**Úkol 3:** Existuje více typů interakcí se  $\sigma$ -dírou. Nejděte jejich názvy a ke každé uveďte příklad. Šipkou vyznačte, kde budou interagovat s akceptorem.

Interakce s  $\pi$ -vazbami jsou další kategorií nekovalentních interakcí. Různými substituenty v blízkosti  $\pi$  vazeb je můžeme polarizovat (tj. přesunout elektronovou hustotu převážně na jeden z atomů, které tuto vazbu tvoří) nebo jejich elektronovou hustotu zvýšit nebo snížit. S elektronově bohatými  $\pi$ -vazbami často interagují kationty nebo kovy. Mnoho těchto interakcí je prvním krokem v reakcích katalyzovaných komplexy přechodných kovů. V případě elektronově chudých vazeb bude výhodná jejich interakce s částicemi, které obsahují mnoho elektronů, jako například anionty. Síla takových interakcí může být různá – od 1–2 kJ mol<sup>-1</sup> až po více než 100 kJ mol<sup>-1</sup>. Směr interakcí záleží na konkrétním rozložení elektronové hustoty obou interagujících látek.

**Úkol 4:** Nakreslete, jak spolu mohou interagovat dvě molekuly benzenu a jak jedna molekula benzenu s jednou molekulou hexafluorbenzenu. Využít k tomu můžete obrázek 2.



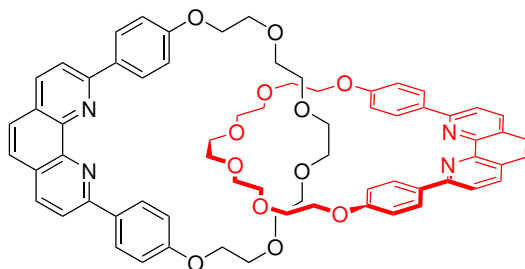
**Obr. 2:** Vypočítané elektrostatické potenciály benzenu (vlevo) a hexafluorbenzenu (vpravo). Červenou barvou jsou znázorněna místa s vysokou elektronovou hustotou a modrou barvou s nízkou elektronovou hustotou.

Samozřejmě velikost všech výše zmíněných interakcí bude záviset na okolním prostředí. Jinak silně budou vzájemně interagovat například boční řetězce lysinu a kyseliny glutamové na povrchu proteinu než uvnitř něj.

**Úkol 5:** Seřadte následující prostředí vzestupně podle toho, jak silné v nich budou elektrostatické interakce:

voda, dimethylsulfoxid, vodný roztok NaCl, chloroform, vakuum, hexan, methanol, tetrahydrofuran

Zajímavým způsobem, jak spojit dvě různé molekuly bez toho, aby spolu vůbec nějak interagovaly, je vytvořit mechanickou vazbu. Například dva spojené kruhy se nazývají katenany. Na obrázku 3 vidíte jeden takový příklad.



**Obr. 3:** Dva kruhy spojené mechanickou vazbou.

**Úkol 6:** Jak se dají tyto kruhy oddělit? Jak velká energie na to bude potřeba?

## A3 – Malé, ale šikovné! – Cesta za superenzymy

Autor: Daniel Pluskal (e-mail: pluskal.daniel@gmail.com)

12 bodů

*Jejich revírem je prostředí s více než 50% obsahem organických rozpouštědel. Jejich katalytické schopnosti jsou vražedné. Jejich protivníci jsou pro běžné enzymy inertní molekuly, nízká selektivita a další evolucí dané limity. Stabilní a plně funkční při teplotách překračujících bod varu vody. Inženýrské enzymy jsou vyvíjeny ve dne v noci – jejich úkolem je být katalytickým nástrojem naší budoucnosti.*

*Túúúú dúú dúú dúúúúú... .*

**Inženýrské enzymy**, tzn. enzymy cíleně navržené či upravené člověkem, jsou nedocenitelnými nástroji snad v každém odvětví moderního biotechnologického průmyslu, od potravinářství a zemědělství přes výrobu léčiv či biopaliv až po přímé aplikace, např. bioremediace. Cílem **proteinového inženýrství** je tak příprava enzymů šitých na míru pro jakýkoliv představitelný účel. Inženýrský enzym může mít oproti divokému typu<sup>1</sup> enzymu vylepšenou teplotní stabilitu, toleranci vůči organickým rozpouštědlům, zdokonalené katalytické schopnosti či selektivitu anebo může mít dokonce vlastnosti zcela nové, evoluční limity zašlapat do země a katalyzovat v přírodě se vůbec nevyskytující reakce za využití pro přírodní enzymy nedotknutelných substrátů.



**Úkol 1:** Pod pojmem *mutace* se rozumí změna v nukleotidové sekvenci DNA. Následkem jedné nebo více mutací v kódujícím genu pak může dojít ke změně aminokyselinové sekvence kódovaného proteinu, čehož se v proteinovém inženýrství hojně využívá. Jaký je rozdíl mezi *substituční* a *indelovou* bodovou mutací? Ke kterému z těchto typů mutace dochází v přírodě častěji a proč?

**Úkol 2:** Biochemik pověděl svému kolegovi, genetikovi, že objevil novou mutantní formu hemoglobinu, ve kterém je jedno residuum lysinu nahrazeno aspartátem. Genetik byl objevem značně překvapen a poslal svého přítele zpátky do laboratoře, aby zjištění ještě ověřil. Proč genetik pochyboval o zmíněné záměně aminokyselinového residua? Jaké jiné záměny (Lys → ?) by pro genetika byly uvěřitelnější?

Cesta za superenzymy, inženýrsky zdokonalenými biokatalyzátory, je málokdy přímočará. Často se musí vyzkoušet více postupů, vracet se na předchozí rozcestí a zkoušet jiné směry, než nakonec natrefíme na ten správný. Jedním ze způsobů, jak tuhle pouť podstoupit, je tzv. *de novo* design, kdy je inženýrský enzym navržený od základů až po střechu člověkem. Tento přístup je však ještě v plenkách a co se analogie k cestování týče, „sice je to dál, zato horší štreka“, kdy výsledky jsou zatím spíše skromné. V současnosti nejčastějším postupem je proto iterativně vylepšovat to, co už v přírodě nějak funguje. Tak odpadají starosti se stavbou základů, jenom šoupneme tohle sem a tamto zase jinam, záclonky zrušíme a po mírných úpravách máme úplně jiné stavení. S tím se ale pojí to, že abychom mohli něco upravovat, musíme to napřed znát.

<sup>1</sup>Pod pojmem „divoký typ“ se označuje taková forma molekuly/organismu, která se běžně vyskytuje v přírodě.



Za účelem zisku informací o nových enzymech se využívají **metagenomické přístupy**, kdy odebereme biologický vzorek z vybraného prostředí, z něj izolujeme veškerou DNA (označovanou jako eDNA, tzv. environmentální DNA) a tu sekvenujeme tzv. „shotgun“ metodami – zkrátka, co nám neuteče, to je bez milosti osekvenováno. Pro tyto účely jsou obzvláště atraktivní extrémní prostředí, jako odpadní voda z povrchových dolů, hlubokomořská vřídla, horká, kyselá půda okolo vulkánů, antarktický permafrost, extrémně slaná jezera a další prázdninové lokality.

### Úkol 3: Proč jsou lokality s extrémními podmínkami tak atraktivním zdrojem eDNA?

Výsledkem metagenomických metod jsou kolosální databáze sekvencí nukleových kyselin i proteinů, které je z důvodu ohromného objemu dat nutné zpracovávat strojově. Jedním z nejvyužívanějších způsobů *in silico* analýzy sekvencí biopolymerů je tzv. **alignment** (= **příkládání** či **zarovnání**) aneb „najdi sedm rozdílů“. Při tomto postupu, který je typicky prováděn pomocí heuristických algoritmů (např. BLAST anebo FASTA) jsou sekvence porovnávány pro nalezení podobností na základě definovaných pravidel a limitů, kdy je možné na základě určité sekvence v databázi dohledávat sekvence příbuzné, ale třeba s pozměněnými vlastnostmi či funkcí.

### Úkol 4: Jaký je rozdíl mezi enzymy *homologními* a *analogickými* z hlediska jejich funkce a příbuznosti sekvence? Na základě kterého z těchto vztahů detekuje podobnost sekvencí algoritmus BLAST?

Jakmile máme k dispozici vhodný výchozí enzym, můžeme se zamýšlet nad tím, co bychom si přáli, aby výsledný inženýrský enzym dovedl. „Milý Ježíšku, přál bych si, aby můj enzym byl ten nejlepší, nejrychlejší, a ještě s vodotryskem!“ až na to, že našim Ježíškem je nejčastěji nějaká grantová agentura. Pak nicméně dochází na lámání chleba – jak našeho vysněného cíle dosáhnout?

Prvním ze způsobů vývoje inženýrských enzymů je **řízená evoluce** (= **directed evolution**). Tento přístup je vlastně glorifikovanou metodou „pokus-omyl“ dotaženou do extrémů. Vezmeme gen pro výchozí enzym a ten různými způsoby náhodně promutováváme, čímž vytváříme rozsáhlé množiny, tzv. knihovny mutantních variant výchozího genu, lišících se od něj ve zpravidla 1–5 nukleotidech resp. 1–3 aminokyselinách translatovaného enzymu. Z těchto knihoven pak vybíráme mutanty, u kterých došlo k nejvýznamnějšímu posunu funkce kýženým směrem a pro ně postup opakujeme – mutageneze, produkce, výběr nejlepších mutantů. . . – a tak to děláme tak dlouho, dokud nemáme gen pro enzym požadovaných kvalit. Mimikujeme tak vlastně přirozený proces evoluce, až na to, že kritéria, na základě kterých daný gen „přežije“ a je předán dalším generacím, si vybíráme dle libosti. Vzhledem k tomu, že, slovy Cave Johnsona „házíme vědou proti zdi, abychom zjistili, zda se něco přilepí“, pro tento přístup není nutná prakticky žádná znalost struktury či reakčního mechanismu původního enzymu. Metoda je to nicméně extrémně pracná; mutantní knihovny jsou velice rozsáhlé, a proto pro jejich pročišťování potřebujeme vysoce výkonné a robustní metody.

### Úkol 5: Dvěma základními přístupy pro výběr mutantních variant enzymů s vylepšenými vlastnostmi jsou *screening* a *selektce*. Jaký je mezi těmito přístupy rozdíl? Jaké jsou výhody a nevýhody těchto přístupů?

### Úkol 6: Uvažujte výchozí protein o délce 320 aminokyselinových residuí (průměrné délce prokaryotního proteinu). Pokud bychom chtěli provést vždy právě dvě aminokyselinové substituce kdekoliv na jeho řetězci, kolik různých variant proteinu můžeme získat? Kolik různých polypeptidových řetězců o délce 320 aminokyselin teoreticky existuje? Pokud bychom zvládli analyzovat 2500 mutantních variant proteinu za sekundu (výkon state-of-the-art mikrofluidických metod),

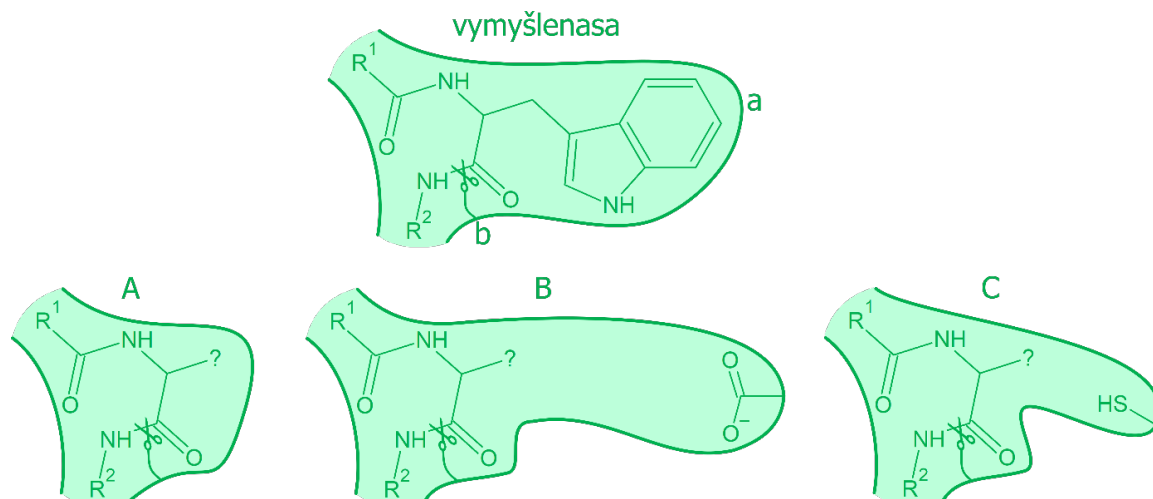
jak dlouho by trvala analýza první (mutagenezní) a druhé (kompletní) knihovny variant? V obou případech předpokládejte, že pracujete se sadou 20 standardních proteinogenních aminokyselin.

Nedocenitelným pomocníkem molekulárních biologů je **PCR**, tedy **polymerasová řetězová reakce** (= **polymerase chain reaction** resp. „*Pipette – Cry – Repeat*“), která umožňuje amplifikaci, neboli zmnožení libovolného regionu templátové DNA. Při PCR cyklicky opakujeme tři kroky: prvním z nich je denaturace, kdy se od sebe vlivem vysoké teploty (cca 95 °C) oddělují dva řetězce dvoušroubovice templátové DNA. Druhým krokem je hybridizace, kdy na sekvenci DNA při nižší teplotě (cca 50–65 °C) specificky nasedají tzv. primery, krátké syntetické fragmenty jednořetězcové DNA (ssDNA = single-stranded DNA), kterými vymezujeme oblast templátové DNA pro amplifikaci. Posledním krokem je syntéza, kdy na naše primery nasedá DNA polymerasa, která při cca 72 °C primery prodlužuje a syntetizuje tak řetězec DNA komplementární k templátu. Pro náhodnou mutagenezi se využívá varianta PCR, tzv. **error-prone PCR** (**epPCR**; **PCR náchylná k chybám**), při které naschvál děláme všechno „špatně“: nastavujeme neideální podmínky, podporujeme nedokonalosti metody, přidáváme nepřírozené příměsi, pipetujeme se zavázanýma očima, nespíme zdravých osm hodin denně. . . A tak docílíme toho, co při běžné PCR rozhodně nechceme: aby při replikaci DNA nastávaly chyby.

**Úkol 7:** Uveďte pět konkrétních příkladů toho, co se při epPCR dělá oproti běžné PCR „špatně“ a stručně vysvětlete, na jakém principu každá z těchto změn přispívá ke zvýšení chybivosti PCR.

Dalším z přístupů tvorby inženýrských enzymů je **racionální design**. Oproti řízené evoluci, kde o sebe mlátíme kamením a občas vylétne jiskra, při racionálním designu provádíme v sekvenci enzymů změny vysoce individualizované. Zavádíme tak jen hrstku přesně definovaných mutací na předem precizně vytipovaných místech, pro které jsme předpověděli vysokou pravděpodobnost toho, že náš enzym vylepší přesně tak, jak chceme. Tyto specifické mutace zpravidla opět provádíme pomocí PCR metody **místně cílené mutageneze** za využití mutantních primerů. Abychom ale mohli postupovat takto vysoce sofistikovaně, musíme mít daný enzym důkladně prostudovaný z hlediska struktury i funkce a dokonale chápat, jakou roli která aminokyselina hraje; volba mutací je tedy naprosto klíčová pro úspěch metody.

**Úkol 8:** Proteolytický enzym vymyšlenasa katalyzuje hydrolýzu peptidové vazby, a to specificky za tryptofany, fenylalaniny a tyrosiny substrátového polypeptidu. Aktivní místo vymyšlenasy (níže) se totiž skládá z místa vazebného (a), které rozpoznává a váže pouze tyto tři aminokyseliny a teprve po úspěšné vazbě může katalytické místo (b) řetězec za rozpoznanou aminokyselinou ustříhnout. Pokud byste aktivní místo vymyšlenasy inženýrsky upravili do podoby A, B nebo C, které aminokyseliny byste předpokládali, že bude vymyšlenasa rozpoznávat? Která aminokyselina, pokud by následovala bezprostředně za tou rozpoznávanou, by mohla činnost vymyšlenasy narušit a proč?



Často se stává, že se z hlediska pochopení daného enzymu nacházíme někde uprostřed. Sice už něco víme, ale ne dost na to, abychom se pokusili o jeho racionální design. Zároveň toho ale víme dostatek, aby se nám nechtělo piplat s pracnou řízenou evolucí. A to kyselo je moc kyselé a bramborák moc bramborovej. A právě v těchto situacích přichází ke slovu třetí z přístupů proteinového inženýrství: **semi-racionální design**. Pomocí toho, co už o daném enzymu víme, a prediktivních algoritmů, kterými doplňujeme chybějící střípky na základě vlastností podobných enzymů, vytipováváme konkrétní aminokyseliny či regiony v aminokyselinové sekvenci, které nejpravděpodobněji ovlivní funkci našeho enzymu. Pak opět provádíme náhodnou či saturační mutagenézi (kdy danou aminokyselinu zkusíme vyměnit za všechny ostatní aminokyseliny), tentokrát ale cílenou na vytipované regiony, což oproti řízené evoluci nejenže zvyšuje pravděpodobnost zdokonalujících mutací, ale i významně zmenšuje mutantní knihovny, a tak usnadňuje jejich analýzu. Avšak ani tento přístup není zcela blbuvzdorný: není mutace jako mutace.

**Úkol 9:** Glycin je aminokyselina, která bývá při evoluci proteinů často vysoce konzervovaná. Proč?

**Úkol 10:** Mutace, která vedla k záměně residua alaninu uvnitř struktury enzymu vydumanasy na isoleucin (Ala → Ile), vedla ke ztrátě vydumanasové aktivity. Pokud však současně s touto mutací nastane druhá mutace na jiné pozici v řetězci, která změní aminokyselinu valin na glycin (Val → Gly), aktivita vydumanasy se obnoví. Jak by tato druhá mutace mohla vést k obnovení aktivity vydumanasy?

**Úkol 11:** Proteinový inženýr dostal za úkol vylepšit globulární enzym tomatasu pro *in vitro* produkci rajské omáčky. Celý nadšený a sršící nápady si všechny rozumné přístupy zapsal do svého zápisníku. Když skončil, dostal ze všech těch myšlenek na rajskou hlad, a tak se šel naobědvat. Ale ouha, co se nestalo, zápisník se během třicetiminutové obědpauzy stal předmětem promyšlené průmyslové sabotáže špiónem najatým společností Kopr a. s., které by velkovýroba rajské lezla do zisků z prodeje vlastní koprovky. Když se proteinový inženýr vrátil do kanceláře, nestačil se divit: nápadů v zápisníku přes oběd nějak přibýlo! Pomozte proteinovému inženýrovi zjistit, které nápady jsou jeho, a mohly by vést k vylepšení tomatasy, a které mu do zápisníku připsal zlomyslný špión. Svá rozhodnutí stručně zdůvodněte:

1. Saturační mutagenéze residua histidinu, které je vysoce konzervované napříč všemi enzymy příbuznými tomatase, za účelem vylepšení tomatasové aktivity

2. Záměna residuí asparaginů a glutaminů tomatasy za jiné aminokyseliny za účelem vylepšení stability a aktivity tomatasy za vyšší teploty
3. Záměna dvou cysteinů, které jsou v sekvenci tomatasy vzdálené, ale v trojrozměrné struktuře tomatasy se nacházejí blízko sebe, za seriny, za účelem obecného vylepšení stability tomatasy (předpokládejte, že tomatasa je extracelulární enzym)
4. Inženýrství geometrie aktivního místa tomatasy pro zesílení vazby produktu a zeslabení vazby transitního stavu tomatasové reakce za účelem vylepšení tomatasové aktivity
5. Záměna fenylalaninu vystaveného na povrchu trojrozměrné struktury tomatasy za serin za účelem zvýšení rozpustnosti tomatasy ve vodě
6. Saturační mutagenese regionu aminokyselin s vysokou hodnotou krystalografického B-faktoru (Debye-Wallerova faktoru) za účelem vylepšení stability tomatasy za vyšší teploty

Tak jsme si nastínili strategii proteinového inženýrství. Přístup řízené evoluce pro situace, kdy moc nevíme, racionálního designu pro případy, kdy naopak víme, a nakonec semi-racionálního designu pro případy, kdy toho víme tak akorát, abychom věděli, že toho zase tolik nevíme. Také jsme si představili alignment a nakousnuli prediktivní výpočetní metody, jejichž ultimátním cílem je přesná predikce struktury a funkce daného oligopeptidu *ab initio*, tedy pouze na základě aminokyselinové sekvence a ničeho jiného, hotová hudba budoucnosti; to vše v současnosti zažívá velký boom. A byť je proteinové inženýrství stále ještě v příslovečných plenkách, již dnes nepochybnitelně platí, že:

*„Zatímco v minulosti byly procesy založené na činnosti enzymů designovány na základě limitací daných enzymy, dnes jsou inženýrské enzymy šité na míru, aby přesně splňovaly nároky dané procesem.“*



## B3 – Strašlivě malé magnety

Autorka: Petra Pikulová (e-mail: pikulova@mail.muni.cz)

13 bodů

Chemici s oblibou využívají ke studiu molekul spektroskopických metod, a jednou z těch, které mají nejraději, je nukleární magnetická rezonance. NMR spektroskopie využívá toho, že jádra s nenulovým spinem mají magnetický moment. Ten interaguje s vnějším magnetickým polem spektrometru a s vnitřními magnetickými poli v molekule a lze s ním manipulovat pomocí pulzů radiofrekvenčního záření, což nám umožňuje měřit spektra a získávat z nich chemicky zajímavé informace. V této úloze se nebudeme do detailů zabývat tím, jak NMR funguje.<sup>2</sup> Místo toho se zaměříme na základní veličinu, která popisuje signál ve spektru, *chemický posun*. A protože nás zajímají paramagnetické látky, ukážeme si hlavně to, co s chemickým posunem dovede udělat přítomnost nepárového elektronu v molekule.

Magnetický moment jádra je přímo úměrný jeho spinovému momentu hybnosti

$$\vec{\mu} = \gamma \vec{I}, \quad (1)$$

kde  $\vec{\mu}$  je magnetický dipólový moment jádra,  $\vec{I}$  je spinový moment hybnosti, a  $\gamma$  je gyromagnetický poměr, konstanta charakteristická pro daný izotop. Velikost tohoto vektoru pak bude

$$|\mu| = |\gamma| \hbar \sqrt{I(I+1)}, \quad (2)$$

kde  $I$  je spinové kvantové číslo. V NMR spektroskopii se nejčastěji využívají jádra se spinem  $I = \frac{1}{2}$ , mezi něž patří např.  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ .

Měří se frekvence, s níž magnetické momenty jader ve vzorku vykonávají precesní pohyb<sup>3</sup> kolem vektoru magnetického pole spektrometru. Larmorova precesní frekvence jádra v molekule závisí na gyromagnetickém poměru, velikosti vnějšího pole a chemickém okolí daného jádra

$$\omega_i = -\gamma B_{\text{loc},i} = -\gamma(1 - \sigma_i)B_0 \quad (3)$$

kde  $B_0$  je vnější magnetické pole spektrometru a  $B_{\text{loc},i}$  je lokální magnetické pole pocíťované jádrem  $i$ . To, jakým způsobem se od sebe tato pole liší, je popsáno stínící konstantou  $\sigma$ . Stínící konstanta se liší pro různá jádra ve stejné molekule, pokud nejsou chemicky ekvivalentní, proto např. v  $^1\text{H}$  NMR spektru ethanolu budeme pozorovat tři signály o mírně odlišných frekvencích, jeden pro  $-\text{CH}_3$  skupinu, druhý pro  $-\text{CH}_2-$  skupinu a třetí pro  $-\text{OH}$  skupinu.

Stínící konstanta vyjadřuje změnu oproti holému jádru a není snadno experimentálně dostupná. V experimentální NMR spektroskopii se k vyjádření naměřených frekvencí obvykle využívá jiné bezrozměrné veličiny zvané chemický posun

$$\delta_i = \frac{\omega_i - \omega_{\text{ref}}}{\omega_{\text{ref}}} \times 10^6 \text{ ppm} = \frac{\sigma_{\text{ref}} - \sigma_i}{1 - \sigma_{\text{ref}}} \times 10^6 \text{ ppm}, \quad (4)$$

která vyjadřuje relativní změnu frekvence vůči referenčnímu signálu. Velikost chemického posunu na rozdíl od rezonanční frekvence  $\omega$  nezávisí na vnějším magnetickém poli a tedy na použitém spektrometru. Jako referenční sloučenina se pro jádra  $^1\text{H}$  a  $^{13}\text{C}$  využívá tetramethylsilan. Můžete

<sup>2</sup>Pokud jste o NMR spektroskopii ještě nikdy neslyšeli, lze jako stručný úvod doporučit vaší pozornosti studijní text vypracovaný Dr. Zdeňkem Moravcem pro jeden z předchozích ročníků ViBuChu. Naleznete jej na odkazu <http://vibuch.math.muni.cz/upload/zadani/2015/Z2-NMR.pdf>

<sup>3</sup>Precese není žádná výsada spinu, která by byla dána jeho "kvantovostí". Jde o příklad precese momentu hybnosti okolo vnějšího pole, které na něj působí momentem síly. V klasické fyzice snadno najdeme analogii v pohybu gyroskopu v tíhovém poli Země - viz např. <https://www.youtube.com/watch?v=7aRKAXD4dAg>

si všimnout, že nejhezčí volbou reference v rovnici 4 by bylo holé jádro, pro něž je  $\sigma_{ref}$  rovno nule, pak bychom dostali absolutní chemický posun, pro nějž platí  $\delta_i = -\sigma_i$ .

Jelikož rozdíly lokálních polí a proto i frekvencí jsou velice malé, udává se chemický posun obvykle jako *parts per million*.

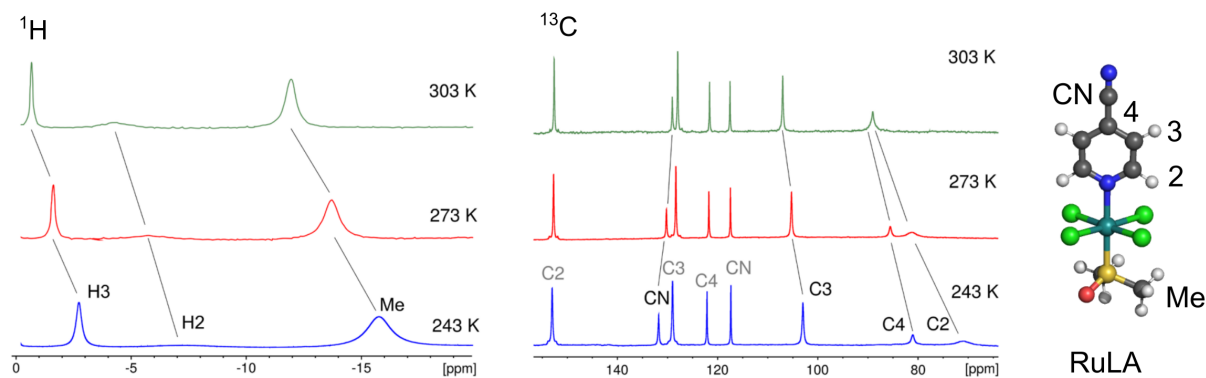
**Úkol 1:** Jaký je chemický posun v ppm, pokud rezonanční frekvence sledovaného jádra  $^1\text{H}$  má hodnotu 400,0010 MHz a rezonanční frekvence reference má hodnotu 400,0004 MHz?

**Úkol 2:** To, že se v molekule rezonanční frekvence odlišuje od holého jádra, je způsobeno přítomností elektronů. Stručně vysvětlete fyzikální mechanismus, jímž elektrony ovlivňují rezonanční frekvenci jádra (v případě diamagnetických látek).

U diamagnetických látek jsou chemické posuny jednotlivých typů funkčních skupin dobře známé a lze je najít v tabulkách. U paramagnetických molekul, které zajímají nás, je to ale komplikovanější, signály se objevují v těžko předvídatelných oblastech, které tabulkovým hodnotám vůbec nemusejí odpovídat. Signál se dokonce nemusí ani nacházet v běžně měřené oblasti, a pak je problém jej vůbec detekovat. Původcem těchto efektů je interakce mezi spinem sledovaného jádra a nepárového elektronu. Podobně jako jaderný spin je i elektronový spin doprovázen magnetickým momentem, který je mu přímo úměrný s konstantou  $\gamma_e$ .

**Úkol 3:** Kolikrát je magnetický moment elektronu větší než magnetický moment jádra  $^1\text{H}$ ?  $|\gamma(^1\text{H})| = 2.675222 \times 10^8 \text{ rad}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{T}^{-1}$ ,  $|\gamma_e| = 1.760859 \times 10^{11} \text{ rad}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{T}^{-1}$ . Jak velký (větší - stejný - menší) magnetický moment mají v porovnání s  $^1\text{H}$  další běžně měřená jádra, jako je  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ?

Jak lze vytušit z řešení úkolu 3, může být vliv magnetického momentu elektronu na magnetický moment jádra dosti velký (příspěvek k lokálnímu magnetickému poli může být i mnohem větší než příspěvek mechanismu z úkolu 3). V obrázku 1 naleznete  $^1\text{H}$  a  $^{13}\text{C}$  NMR spektra paramagnetického komplexu Ru(III), který je strukturně příbuzný sloučenině NAMI-A. Elektronová konfigurace odpovídá dubletu.



**Obr. 1:** Část  $^1\text{H}$  a  $^{13}\text{C}$  NMR spektra molekuly na obrázku při různých teplotách (DMF- $d_7$ , 700 MHz). Píky označené šedě náležejí uhlíkům protiontu, jímž je 4-kyanopyridinium. [1]

**Úkol 4:** Jaký je typický rozsah chemických posunů v  $^1\text{H}$  NMR spektrech diamagnetických látek? V jaké oblasti chemických posunů se obvykle objevují signály uhlíků aromatů?

V NMR spektrech paramagnetických molekul se chemický posun dělí na dva příspěvky

$$\delta^{tot} = \delta^{orb} + \delta^{hf}. \quad (5)$$



První *orbitální* příspěvek si můžeme představit jako chemický posun, jaký by sledované jádro mělo v diamagnetickém analogu studované látky. Do druhého *hyperjemného* příspěvku se pak schová celý efekt nepárového elektronu.

Jistě jste si všimli, že chemický posun ve spektrech z obrázku 1 se silně mění s teplotou. Příspěvek  $\delta^{hf}$  je totiž teplotně závislý. V příznivém případě, jakým je ten náš, má tato závislost tvar Curieho zákona

$$\delta^{tot}(T) = \delta^{orb} + \frac{\Delta}{T} \quad (6)$$

kde  $\delta^{orb}$  je úsek na ose  $y$  a  $\Delta$  je směrnice závislosti.

**Úkol 5:** Využijte spekter z obrázku 1 k sestavení Curieho závislostí pro signály H3, Me, C2, C3 a CN. Jak na to:

1. Z NMR spektra odečtete chemický posun signálu při třech různých teplotách.<sup>4</sup> Odečtené posuny uveďte ve svém řešení, např. formou tabulky.
2. Pro signál vyneste do grafu závislost chemického posunu  $\delta$  na reciproké teplotě  $1/T$  (v grafu budou jen tři body) a proložte body přímkou.

Tyto grafy uveďte v řešení včetně zjištěné rovnice přímky.

**Úkol 6:** Na základě porovnání vámi získaných rovnic s rovnicemi 5 a 6 doplňte tabulku. Odpovídají získané  $\delta^{orb}$  tomu, co byste čekali od diamagnetického analogu dané látky?<sup>5</sup>

	H3	Me	C2	C3	CN
$\delta^{orb}$					
$\delta^{hf}$ (293 K)					
$\delta^{tot}$ (293 K)					

Hyperjemný posun nemusí být jen jakési nezajímavé číslo, které nám ztrpčuje interpretaci NMR spekter. Obsahuje v sobě informace o nepárovém elektronu a struktuře studované molekuly. Tradičně se dělí na dva příspěvky

$$\delta^{hf} = \delta^{fc} + \delta^{pc},$$

kde první se nazývá *Fermiho kontaktní* a druhý *pseudokontaktní*. Kontaktní příspěvek je způsoben spinovou hustotou přímo v místě jádra a aby byl tento mechanismus efektivní, je zapotřebí propojení sledovaného jádra s paramagnetickým centrem (v našem případě Ru) přes malý počet chemických vazeb, což je pro jádra molekuly RuLA splněno.

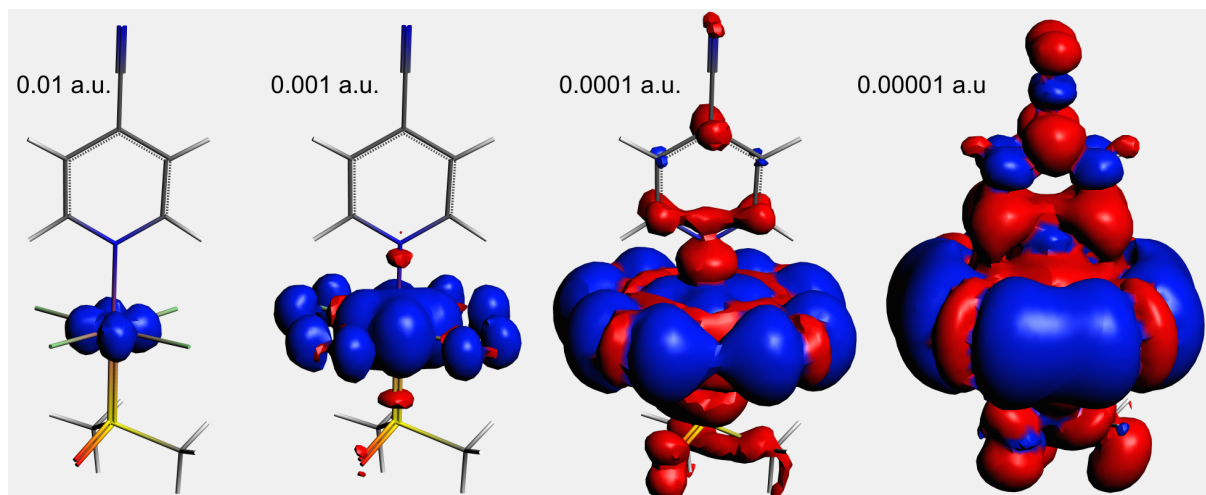
Spinová hustota charakterizuje rozložení elektronového spinu v molekule a je definována jako

$$\rho^{spin} = \rho^{\alpha} - \rho^{\beta}.$$

Kladná hodnota znamená, že je v daném místě větší hustota pravděpodobnosti nalezení elektronu se spinem  $\alpha$ , a záporná hodnota zase vyšší hustotu pravděpodobnosti nalezení elektronu se spinem  $\beta$ . Naše molekula obsahuje jeden nepárový elektron a rozložení spinové hustoty do velké míry kopíruje podobu orbitalu SOMO. Spinová hustota je veličina, kterou lze modelovat pomocí kvantově-chemických výpočtů. Výsledek výpočtu pro anion RuLA naleznete v obrázku 2.

<sup>4</sup>Doporučuji si spektra vytisknout a chemický posun odečíst pomocí pravítka. Nebude to nijak přesné, ale pokud budete postupovat pečlivě, mělo by to stačit k tomu, aby vám vycházely rozumné hodnoty.

<sup>5</sup>Pokud nevíte, dopomožte si tabulkami chemických posunů. Také by vám mohlo pomoci si znovu prohlédnout spektrum z obrázku 1.



**Obr. 2:** Spinová hustota aniontu RuLA zobrazená při různých isohodnotách, modrá = přebytek spinu  $\alpha$ , červená = přebytek spinu  $\beta$ . Vypočítáno v programu ADF [2]

**Úkol 7:** V jakém typu orbitalu centrálního atomu Ru (s/p/d/f) se nachází nepárový elektron v aniontu RuLA?

**Úkol 8:** Pro atomy uhlíku zhodnoťte, zda koreluje znaménko hyperjemného posunu, které jste určili ze spektra, se spinovou hustotou v obrázku 2.

Nyní se vrhneme na úplně jinou situaci, kdy je naopak příspěvek přes vazby zanedbatelný a dominuje pseudokontaktní příspěvek, který působí přes prostor. Budeme se zajímat o nekovalentní interakce paramagnetických komplexů Ru(III) s kavitandem cucurbit[7]urilem, které lze studovat pomocí NMR.<sup>6</sup>

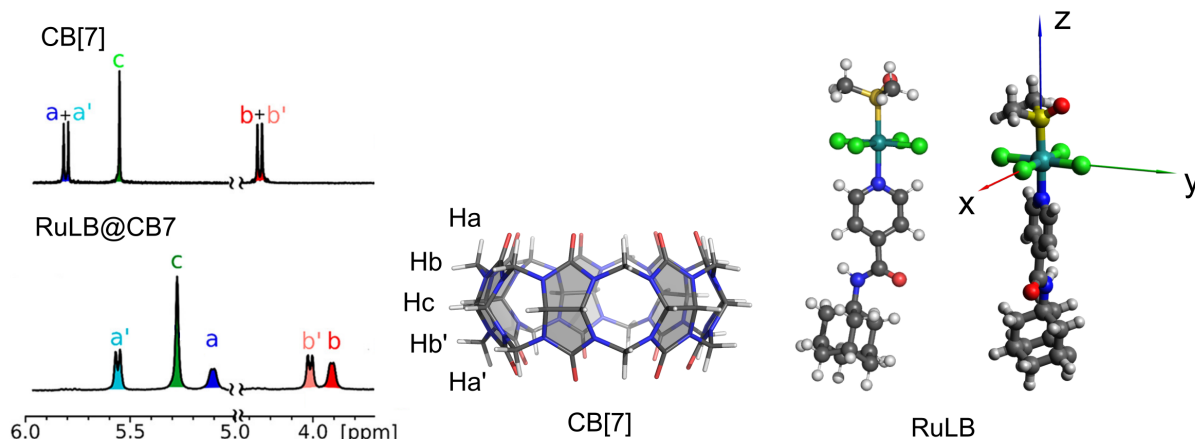
V obrázku 3 je zobrazeno NMR spektrum samotného cucurbit[7]urilu a NMR spektrum vzorku, který vznikl smícháním cucurbit[7]urilu a paramagnetického komplexu RuLB v poměru 1:1. Druhé spektrum tedy náleží supramolekule RuLB@CB7. Povšimněte si, že v tuto chvíli se už nedíváme na jádra komplexu RuLB, ale na jádra cucurbit[7]urilu, která s paramagnetickým centrem nejsou nijak spojena chemickou vazbou, protože RuLB se do kavity CB[7] váže nekovalentně. Změnu chemického posunu mezi volnou a vázanou formou cucurbi[7]urilu ( $\Delta\delta = \delta_{vazana} - \delta_{volna}$ ) interpretujeme jako pseudokontaktní posun.<sup>7</sup>

**Úkol 9:** Vysvětlete, proč jsou signály Ha a Hb dublety. Také vysvětlete, proč se v NMR spektru supramolekuly RuLB@CB[7] objevuje pět různých signálů cucurbit[7]urilu, když v NMR spektru samotného cucurbit[7]urilu jsou signály pouze tři.

<sup>6</sup>NMR studiu supramolekulárních interakcí se v jednom z předešlých ročníků ViBuChu blíže věnovala Jana Lapešová ve svých úlohách o bambusurilech, pokud vás to zajímá, doporučuji nahlédnout do studijního textu <http://vibuch.math.muni.cz/upload/zadani/2018/B4-studmat.pdf>

<sup>7</sup>Zanedbáváme tím změnu orbitálního příspěvku v důsledku navázání RuLB do kavity, tato změna by ale neměla být velká, protože protony směřují vně kavity a nejsou v těsném kontaktu s navázaným hostem.





**Obr. 3:** NMR spektrum volného cucurbit[7]urilu a supramolekuly RuLB@CB[7] (700 MHz, D<sub>2</sub>O, 298 K) [3]

**Úkol 10:** Z NMR spektra v obrázku 3 odečtete pseudokontaktní chemické posuny pro atomy Ha, Hb, Hc, Hb', Ha' cucurbit[7]urilu a doplňte je do tabulky.

	Ha	Hb	Hc	Hb'	Ha'
$\Delta\delta = \delta^{pc}$					

V příloze na stránkách ViBuChu naleznete zip se třemi soubory .xyz. Jedná se o tři hypotetické struktury supramolekuly RuLB@CB[7]. Příloženy jsou také tři soubory .txt, v nichž byly z .xyz souborů vybrány a setříděny souřadnice atomů Ha, Hb, Hc, Hb', Ha' cucurbit[7]urilu. Data jsou ve formátu `typ_atomu : x : y : z`. Souřadnice jsou v jednotkách Å.

**Úkol 11:** Otevřete .xyz soubory v grafickém programu, který umí vykreslovat chemické struktury (doporučuji např. Avogadro). U každé struktury si uložte pěkný obrázek a přiložte jej k řešení.

**Úkol 12:** Už z pohledu na navržené struktury vám může být jasné, že některé z nich jsou více přijatelné než jiné. Zkuste si je všechny pořádně prohlédnout a vysvětlíte, proč si myslíte, že jsou realistické, příp. nerealistické. (Přemýšlejte nad tím, zda nejsou některé atomy v příliš těsném kontaktu, nad tím, že experiment probíhá ve vodě...)

Pseudokontaktní příspěvek pochází z přímé dipól-dipólové interakce magnetického momentu elektronu a jádra přes prostor. Jeho velikost závisí na poloze jádra vůči paramagnetickému centru a na magnetické susceptibilitě charakterizující dané paramagnetické centrum. Magnetická susceptibilita je materiálová veličina, která popisuje, jakou magnetizaci v látce vyvolá vnější magnetické pole. Makroskopická magnetizace vzniká částečnou orientací magnetických momentů, v našem případě jde o jakýsi údaj o průměrném magnetickém momentu elektronu.

Magnetická susceptibilita molekuly není ve všech směrech stejná. Pokud bude vnější magnetické pole mířit podél vazby Ru-Cl, bude vzniklý magnetický moment jiný, než když bude mířit podél vazby Ru-S. Proto není magnetická susceptibilita charakterizována jen jedním číslem, ale hned třemi čísly ( $\chi_{xx}$  charakterizuje magnetickou susceptibilitu ve směru  $x$ , podobně pro  $y$  a  $z$ ) a orientací tří odpovídajících os vůči molekule.

Rovnice pro pseudokontaktní posun ve speciálním případě, kdy je model molekuly příznivě orientován v prostoru (to je náš případ) má tvar

$$\delta^{pc} = \frac{1}{12\pi r^3} \left[ \Delta\chi_{ax} (3 \cos^2 \vartheta - 1) + \frac{3}{2} \Delta\chi_{rh} \sin^2 \vartheta \cos 2\varphi \right] \quad (7)$$

kde

$$\Delta\chi_{ax} = \chi_{zz} - \frac{\chi_{xx} + \chi_{yy}}{2} \quad \Delta\chi_{rh} = \chi_{xx} - \chi_{yy}. \quad (8)$$

Rovnice 7 je vyjádřena ve sférických souřadnicích  $r$ ,  $\vartheta$ ,  $\varphi$ . Již jste se s nimi setkali v první sérii, kde posloužily pro vyjádření problému atomu vodíku a jeho řešení v podobě atomových orbitalů. Pro další úlohu se vám budou hodit vztahy pro převod z kartézských souřadnic  $x$ ,  $y$ ,  $z$  do sférických<sup>8</sup>

$$r = \sqrt{x^2 + y^2 + z^2} \quad \vartheta = \arccos\left(\frac{z}{r}\right) \quad \varphi = \arctg2(y, x). \quad (9)$$

Pro molekulu RuLB z kvantově-chemického výpočtu vychází vlastní hodnoty magnetické susceptibility  $\chi_{xx} = 0,039970 \text{ Å}^3$ ,  $\chi_{yy} = 0,038891 \text{ Å}^3$  a  $\chi_{zz} = 0,025020 \text{ Å}^3$ .

**Úkol 13:** Pomocí rovnice 7 vypočítejte ze zadané magnetické susceptibility pseudokontaktní posuny signálů Ha, Hb, Hc, Hb', Ha' pro tři hypotetické struktury. Jak na to:

- Využijte svého oblíbeného programu, navrhuji tabulkový procesor Excel. Nejprve si připravte funkce pro převod kartézských souřadnic na sférické a funkci pro výpočet pseudokontaktního posunu. Pak už do příslušných buněk pouze vepíšete kartézské souřadnice a Excel vám vrátí pseudokontaktní posun.
- Nezapomeňte posun uvádět v ppm (tedy číselnou hodnotu vynásobit  $10^6$ ).
- V souborech `.txt` jsou pohromadě vždy souřadnice jednoho typu jader v dané supramolekule. Přes tyto ekvivalentní atomy je třeba pseudokontaktní posun průměrovat.
- Do Excelu lze snadno importovat data v podobě CSV (záložka **Data - Načíst data - Ze souboru - Z Text/CSV**), což by měl být snesitelný způsob, jak dostat všechny kartézské souřadnice z `.txt` souborů do své excelovské tabulky.
- Ať budete postupovat jakkoliv, svůj postup důkladně zdokumentujte, například přiložte k řešení přímo tabulku v Excelu, v níž jste posuny počítali. Tabulka shrnující zprůměrované výsledky bez postupu nestačí.
- Pokud přece jen nevíte, jak výpočet provést efektivně pro všechny zadané atomy, uveďte v řešení alespoň ruční výpočet pro konkrétní případ prvního atomu typu Ha v souboru `cb7_at_ru_hydrogens.txt`. Dostanete body za úlohu 13, připravíte se však o úlohu 14.

<sup>8</sup>Funkce `arctg2` řeší problém nejednoznačnosti samotné funkce `arctg`, která vrací hodnoty pouze od  $-\frac{\pi}{2}$  do  $\frac{\pi}{2}$  a nerozlišuje mezi  $(x, y)$  v prvním a třetím nebo druhém a čtvrtém kvadrantu. Například v Excelu je tato funkce dostupná, čehož můžete využít k řešení úkolu 13.

**Úkol 14:** Na základě vypočítaných pseudokontaktních posunů rozhodněte, která z poloh komplexu RuLB v kavitě cucurbit[7]urilu je konzistentní s naměřenými posuny. Nezálekněte se toho, že posuny nesedí číselně zcela dokonale a soustřed'te se raději na znaménka.

Rovnice 7, případně jejího obecnějšího tvaru, se využívá i mnohem kvantitativněji, než jsme to provedli my. Pokud je ke studované molekule připevněna paramagnetická značka, u níž je známa magnetická susceptibilita  $\chi$ , a povede se naměřit pseudokontaktní posuny pro mnoho jader, pak tyto posuny lze použít jako vazné podmínky pro určení struktury. Jelikož každý pseudokontaktní posun závisí na poloze jádra vůči paramagnetickému centru ( $r$ ,  $\vartheta$ ,  $\varphi$ ), sada naměřených pseudokontaktních posunů implicitně obsahuje informace o polohách jader vůči sobě. Tohoto se například využívá při studiu struktur biomakromolekul.

Tím končí třetí a poslední úloha o kvantové chemii, NMR spektroskopii a paramagnetických molekulách. Těším se na vaše řešení a doufám, že s některými z vás se setkám na letním soustředění ☺

### Zdroje

1. Novotný, J.; Sojka, M.; Komorovsky, S.; Nečas, M.; Marek, R. *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138* (27), 8432–8445.
2. ADF 2019, SCM, Theoretical Chemistry, Vrije Universiteit, Amsterdam, The Netherlands, <http://www.scm.com>.
3. Chyba, J.; Novák, M.; Munzarová, P.; Novotný, J.; Marek, R. *Inorg. Chem.* **2018**, *57* (15), 8735–8747.
4. PyMOL Molecular Graphics System, version 2.2.0.0; Schrödinger, LLC, New York, **2017**.

**C3 – A máme tě!**

*Autorky: Zuzana Bílková a Simona Rozárka Jílková  
(e-mail: rozarka.jilkova@recetox.muni.cz)*

12 bodů

„... a ne a ne a ne!“

*Doporučujeme využít tabulkového editoru.*

Na Analytíka jsme se již pořádně připravili. Vybrali jsme vhodnou metodu a také jsme si ověřili, jestli naše metoda bude na odhalení Analytíka fungovat. A už se konečně dostáváme k hledání, kde všude se skutečně Analytík schovává. V první úloze jsme si říkali, že pro Analytíka je v HPLC metodě typický retenční čas, podle kterého můžeme určit, zda tam Analytík je, nebo není.

**Úkol 1:** Jaký se pro tento typ stanovení používá výraz? (Nápověda: Typ stanovení, kdy chceme zjistit, „co to je za látku“.)

Druhým typem stanovení jsme schopni určit, jaké množství Analytíka se v jednotlivých složkách životního prostředí nachází.

**Úkol 2:** Jaký bude výraz pro toto stanovení?

**Úkol 3:** Které parametry chromatogramu se mění v závislosti na množství Analytíka ve vzorku? Pokud si nejste jistí, nápovědu vám zajistí druhá úloha o Analytíkovi (C2).

Abychom zjistili, kolik Analytíka ve vzorku máme, můžeme použít např. metodu vnějšího standardu a sestavit kalibrační křivku. Budeme analyzovat sérii standardů o známé, ale různé, koncentraci StandAnalytíka. V ideálním případě získáme lineární závislost abundance neboli intenzity signálu (závislá proměnná, A) na koncentraci (nezávislá proměnná, c).

**Úkol 4:** Načrtněte, jak by mohl vypadat výše popsáný graf pro lineární závislost včetně správného označení os podle uvedených veličin.

**Úkol 5:** Napište matematický předpis pro:

- a) obecnou rovnici lineární kalibrační přímky
- b) rovnici pro výpočet koncentrace (s dosazením pro abundanci)

V našem případě jsme vytvořili kalibrační roztoky StandAnalytíka o koncentracích 5, 10, 50, 100 a 500 ng ml<sup>-1</sup>.

**Úkol 6:** Pro přípravu kalibračních roztoků o objemu 1,00 ml máte zásobní roztok StandAnalytíka o koncentraci 1 000 ng ml<sup>-1</sup>. Navrhněte postup přípravy daných roztoků tak, abyste nepipetovali méně jak 100 μl. Navržené řešení podložte výpočty. Uvědomte si, že pracujete s velmi nízkými koncentracemi, takže můžete zanedbat kontrakci objemu.

Vytvořené kalibrační roztoky jste změřili a po použití softwaru jste získali jednotlivé abundance (Tabulka 1).

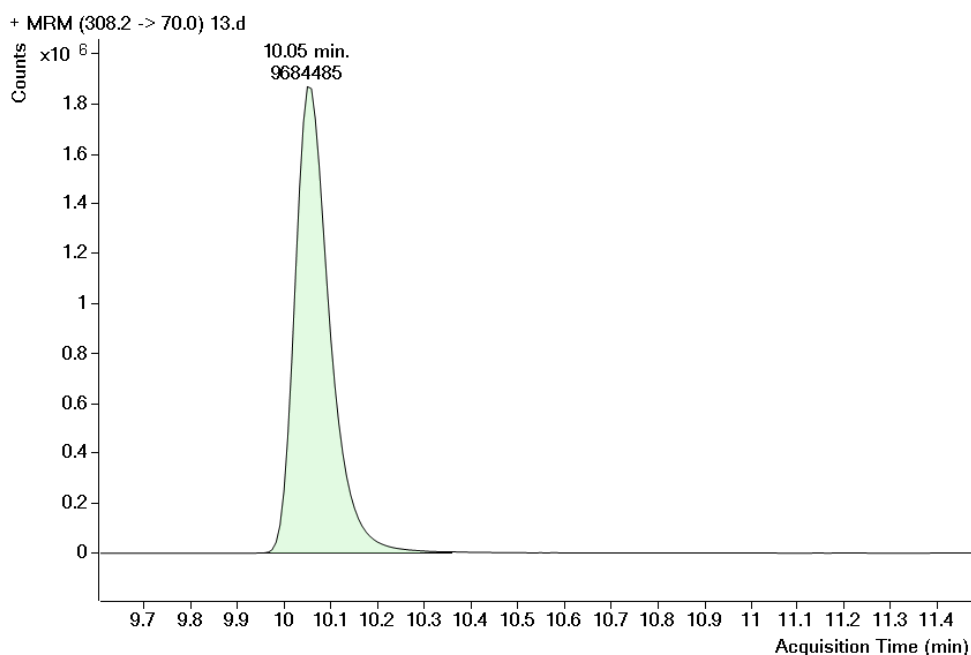
**Úkol 7:** Z naměřených hodnot (tabulka 1) vypočítejte směrnici kalibrační přímky a vytvořte konkrétní rovnici kalibrační přímky.

**Tab. 1:** Koncentrace a abundance StandAnalytíka

$c \text{ (ng ml}^{-1}\text{)}$	Abundance (relative response) ( $A$ )
5	834288
10	1744373
50	8288430
100	17161428
500	83903816

Kalibrace je hotová, teď už zbývá změřit reálný vzorek a zjistit, kolik tam toho Analytíka je. Na obrázku 1 je chromatogram Analytíka. Na ose  $x$  je uveden retenční čas (Acquisition Time), na ose  $y$  abundance (Counts) a u píku, který odpovídá našemu Analytíkovi, je uveden jeho retenční čas a jeho abundance.

**Úkol 8:** Z rovnice kalibrační přímky vytvořené v úkolu 7 a z informací získaných na obrázku 1 vypočítejte koncentraci Analytíka ve vzorku.



**Obr. 1:** Chromatogram Analytíka.

Analytíku, už tě máme a můžeme si s tebou hrát. Kolik tě je v půdě na mé zahrádce?

Jako extrakční metoda je v dnešní době hojně používaná metoda QuEChERS (pro více informací mrkněte na video <https://youtu.be/2lJxT-tAgpk>). V zásadě jde o to, že se ke vzorku přidá extrakční roztok a soli. Vzniklý extrakt se odebere, a buď se ještě přečistí (přidají se další reagenty jako soli nebo aminy), nebo vzorek může být rovnou analyzován.

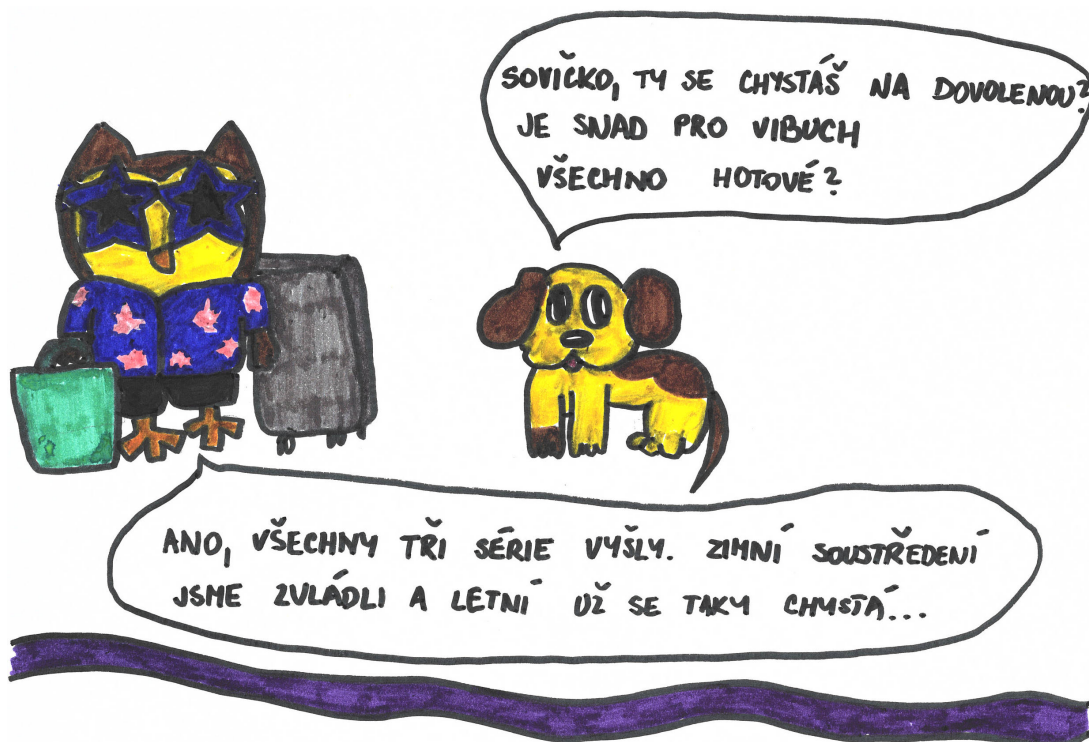
**Úkol 9:** K suchému vzorku 5,27 g půdy přidáme 5,00 ml vody, 5,00 ml acetonitrilu a směs solí. V průběhu extrakce všechna Analytík přechází do acetonitrilu. Odebereme 3,00 ml acetonitrilu a zakoncentrujeme jeho objem na 0,50 ml. Pro zlepšení chromatografické separace se finální extrakt před analýzou na kapalinovém chromatografu zředí vodou v poměru 1:1, celkový objem vzorku je tedy 1,00 ml. Jaký bude hmotnostní zlomek Analytíka v půdě, jestliže byla naměřena abundance 12 814 179?

Postupujte dle následujících kroků:

- a) Použijte kalibrační křivku z úlohy 7
- b) Nezapomeňte do výpočtu zahrnout odebrání pouze 3,00 ml acetonitrilu
- c) Vypočtete hmotnostní zlomek a výsledek uveďte v poměru  $\mu\text{g kg}^{-1}$  s jedním desetinným místem

Analytíka se Vám povedlo vypátrat. Gratulujeme! Jak takový vývoj metody reálně vypadá na přístroji si budete moci vyzkoušet na letním soustředění. Těšíme se na Vás!

## Sovička se chystá na dovolenou



**NENECHTE V TOM SOVIČKU SAMOTNOU  
A PŘIDEJTE SE K ORGANIZAČNÍMU TÝMU VIBUCHU!**  
Více informací u vašeho oblíbeného organizátora. Pro maturanty, kteří jdou na MU.