

VYUŽITÍ HETEROBIFUNKČNÍCH LIGANDŮ V AFINITNÍ CHROMATOGRAFII

ZDENĚK GLATZ

*Katedra biochemie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita v Brně, Kotlářská 2, 611 37 Brno
e-mail: glatz@chemi.muni.cz*

Došlo dne 3.VII.2001

Klíčová slova: purifikace bílkovin, afinitní interakce, afinitní chromatografie, heterobifunkční ligand

Obsah

1. Úvod
2. Metody založené na afinitních interakcích
3. Heterobifunkční ligandy
 - 3.1. Strategie použití heterobifunkčních ligandů
 - 3.2. Rozdělení heterobifunkčních ligandů podle použité vazebné interakce
4. Závěr

1. Úvod

Výsadní postavení mezi biomakromolekulami co se týče praktického využití mají bílkoviny, neboť se v organismech podílejí na celé řadě funkcí. Z toho vyplývá jejich široké průmyslové a medicínské uplatnění. Nelze rovněž opomenout použití bílkovinných preparátů jak v základním, tak i aplikovaném výzkumu. V závislosti na jejich konečné aplikaci jsou přitom požadovány bílkovinné preparáty o různém stupni čistoty, což klade rozdílné nároky na jejich purifikaci.

Jako výchozí materiál slouží jak rostlinné, tak živočišné tkáně, především však mikroorganismy. Mnoho bílkovin původně rostlinného či živočišného původu bylo klonováno a po expresi rekombinantní DNA v bakteriálních, kvasničných nebo savčích buňkách jsou získávány právě z těchto zdrojů. Vzhledem k tomu, že tyto technologie značně usnadnily získávání výchozího materiálu, představují nyní náklady na purifikaci dané bílkoviny 50–90 % jejich celkových produkčních nákladů¹. Tato skutečnost je dána tím, že bílkoviny jsou velice často izolovány z hrubých extraktů, ve kterých tvoří purifikovaná bílkovina vedle bílkovin balastních pouze minoritní podíl, a rovněž faktem, že bílkoviny se jen velmi málo liší ve svých fyzikálně-chemických vlastnostech, na nichž jsou založeny klasické purifikační postupy. Ty jsou tedy v mnoha případech nejen zdlouhavé a málo specifické, ale vedou i ke ztrátám izolovaných bílkovin.

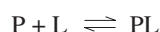
Charakteristickou vlastností, kterou se však bílkoviny navzájem odlišují, je schopnost tvorby biospecifických komplexů s jinými molekulami. Tuto schopnost – schopnost tvorby afinitních interakcí – lze využít při jejich purifikaci, a zefektiv-

nit tak celý proces. Rychlejší a selektivnější separační metody by měly napomoci zvýšení výtěžků, a tím i snížení produkčních nákladů. V tomto směru lze právě očekávat větší rozvoj metod založených na afinitních interakcích² a především jejich uplatnění v počátečních fázích purifikace.

2. Metody založené na afinitních interakcích

Základem všech metod založených na afinitní interakci je tvorba specifického, stabilního a reverzibilního komplexu mezi danou bílkovinou a příslušným ligandem³. Ligandem přitom může být jak látka nízkomolekulární, tak vysokomolekulární, látka anorganického či organického charakteru. Afinitní interakci je přitom nutné brát jako komplexní soubor interakcí, neboť se na ní podílejí elektrostatické, polární i hydrofobní interakce a van der Waalsovy síly. Pro interakci je důležitá také geometrie vazebného místa, tj. prostorové uspořádání interagujících funkčních skupin a jejich sterická dostupnost, a charakter samotného prostředí, ve kterém k interakci dochází, jeho iontová síla, pH, přítomnost iontů atd.

Interakci mezi bílkovinou (P) a ligandem (L) lze popsat jednoduchou rovnicí:



Síla této interakce je vyjádřena afinitní konstantou K_A , respektive její reciprokou hodnotou, konstantou disociační K_D :

Afinitní konstanta (rovnovážná, asociační)

$$K_A = \frac{[PL]}{[P] \cdot [L]} \quad (K_A = 10^4 - 10^8 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{l})$$

Disociační konstanta

$$K_D = K_A^{-1} \quad (K_D = 10^{-8} - 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1})$$

Hodnota disociační konstanty pro danou dvojici bílkovina–ligand by se měla pohybovat ve výše uvedeném rozsahu. Jestliže je disociační konstanta příliš vysoká, k afinitní interakci nemusí dojít, je-li naopak nízká, extrémní podmínky potřebné k disociaci komplexu na původní složky mohou denaturovat danou bílkovinu. Velikost disociační konstanty rovněž určuje použitelnost příslušné afinitní metody pro daný afinitní pár. Je totiž nutné brát v úvahu, že u metod, u kterých dochází ke vzniku afinitní interakce v roztoku, musí být síla interakce vyšší, než u chromatografických metod, kde interakce vzniká při průchodu separované bílkoviny chromatografickou kolonou. Přehled některých častěji používaných afinitních párů bílkovina–ligand⁴ spolu s hodnotami disociačních konstant je uveden v tabulce I.

Pro usnadnění separace afinitního komplexu z roztoku je ligand imobilizován na nosiči, který může být nerozpustný, rozpustný, případně reverzibilně rozpustný–nerozpustný. Typ nosiče a především způsob separace afinitního komplexu jsou

Tabulka I
Přehled nejčastěji používaných afinitních párů bílkovina–ligand

| Bílkovina | Ligand | K_D [mol.l ⁻¹] |
|-------------------------|---------------|-------------------------------------|
| Polyklonální protilátka | antigen | 10 ⁻⁸ –10 ⁻⁶ |
| Monoklonální protilátka | antigen | 10 ⁻¹² –10 ⁻⁸ |
| Avidin | biotin | 10 ⁻¹⁵ |
| Lektin | sacharid | 10 ⁻⁶ –10 ⁻³ |
| Vazebný protein | hormon, toxin | 10 ⁻¹² –10 ⁻⁹ |
| Enzym | substrát | 10 ⁻⁷ –10 ⁻³ |
| Enzym | inhibitor | 10 ⁻¹⁴ –10 ⁻⁶ |

charakteristické pro konkrétní afinitní metodu. V současné době je známa celá řada metod založených na afinitních interakcích. Mezi základní afinitní metody patří afinitní chromatografie, afinitní membránová filtrace a ultrafiltrace, afinitní dvoufázové separace a afinitní precipitace.

Afinitní chromatografie je založena na interakci mezi bílkovinou a ligandem imobilizovaným na chromatografickém sorbentu^{5,6}. Tento sorbent může být umístěn v chromatografické koloně, na kterou je nanesen vzorek, případně může být přímo přidán do roztoku vzorku. Po vymytí balastních bílkovin je ze sorbentu eluována purifikovaná bílkovina. Díky své vysoké selektivitě umožňuje afinitní chromatografie separovat složité směsi bílkovin s vysokým stupněm přečištění. Nevýhodou však je nízká kapacita a vysoká cena afinitních sorbentů. Při práci s hrubými extrakty navíc dochází k ucpávání chromatografických kolon. Afinitní chromatografie je tak obvykle používána jako jeden z posledních purifikačních kroků, kdy se pracuje již s malými objemy vzorku, a její použití v poloprovozním a provozním měřítku je omezené. Proto existuje snaha o integraci afinitních interakcí s rozličnými separačními metodami, jako jsou filtrace a ultrafiltrace, fázové separace a precipitace.

Afinitní membránová filtrace kombinuje specifitu afinitní interakce a rychlost a objemovou kapacitu membránové filtrace^{7,8}. Ligand je imobilizován na filtrační membráně, přes kterou je filtrován roztok vzorku. Zatímco nezachycené balastní bílkoviny membránou volně procházejí, purifikovaná bílkovina se na ni naváže a po promytí membrány je následně eluována. Použití této metody je limitováno ucpáváním pórů membrány, její nízkou vazebnou kapacitou a vysokou cenou doposud používaných membrán.

Afinitní ultrafiltraci lze užít místo afinitní membránové filtrace⁹. Ligand však není imobilizován na ultrafiltrační membráně, ale na vysokomolekulárním polymeru, respektive částici, které jsou přidány přímo do roztoku vzorku. Pro jeho ultrafiltraci je pak použita membrána s takovou velikostí pórů, aby balastní bílkoviny mohly membránou volně procházet, zatímco vzniklý makromolekulární afinitní komplex je zadržen. Po jejich vymytí je vyvolána disociace komplexu a purifikovaná bílkovina již volně projde ultrafiltrační membránou. Jistým omezením této metody je stále ještě vysoká cena používaných ultrafiltračních membrán.

Afinitní dvoufázové separace využívají dělení látek mezi dvě navzájem nemísitelné fáze^{10,11}, kterými bývají nejčastěji

vodné roztoky polyethylenglykolu a dextransu. Bílkoviny se distribuují mezi tyto dvě fáze podle rozdělovacího koeficientu. Tuto distribuci přitom lze posunout tím, že na jednu z fází se naváže afinitní ligand. Purifikovaná bílkovina se tak distribuuje výhradně do této fáze, přičemž distribuce balastních bílkovin se nemění. Opakovanou výměnou fáze bez ligandu pak postupně dochází k přečišťování purifikované bílkoviny, která je poté z komplexu s ligandem disociována. Nevýhodou této metody je kontaminace vyčištěné bílkoviny stopami polymeru, vysoká cena používaných polymerů a problémy s jejich recyklací.

Afinitní precipitace je metoda, při které dochází ke vzniku afinitního komplexu mezi purifikovanou bílkovinou a bis- nebo polyligandem¹². Tento komplex následně samovolně, respektive změnou fyzikálně-chemických vlastností roztoku precipituje, přičemž balastní bílkoviny zůstávají v roztoku. Po centrifugaci a opakovaném promytí precipitátu je vyvolána disociace afinitního komplexu a purifikovaná bílkovina přechází do roztoku. Problémem u této metody zůstávají nespecifické interakce mezi komplexem a balastními bílkovinami, a tím i snížený stupeň dosahovaného přečištění.

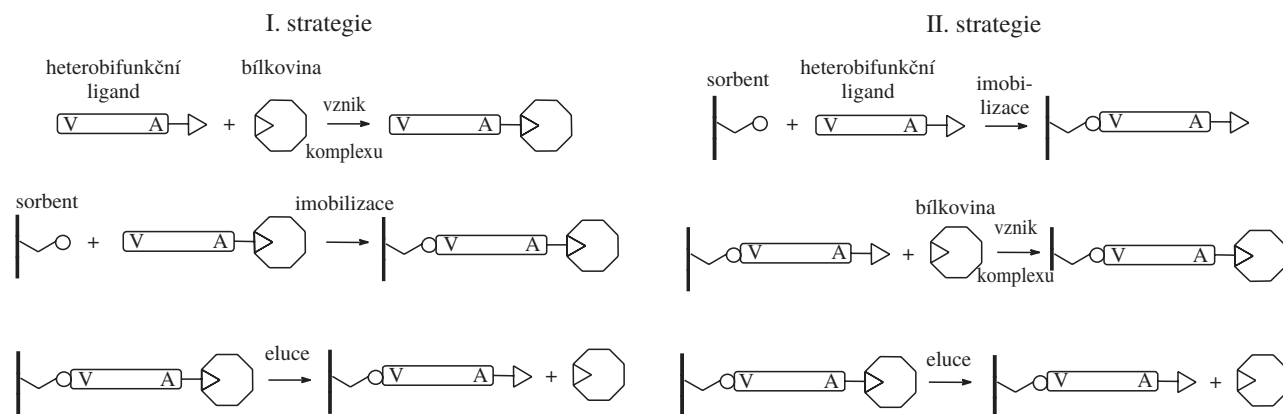
3. Heterobifunkční ligandy

Klasická afinitní chromatografie stále ještě zůstává nejpoužívanější metodou založenou na afinitních interakcích^{3,13–18}. Důležitým krokem v přípravě afinitního sorbentu je imobilizace příslušného ligandu. Kovalentní imobilizace obvykle vede ke statistické orientaci ligandu, což se odráží v jeho nízké dostupnosti pro purifikovanou bílkovinu. Tento problém částečně eliminuje imobilizace reverzibilní, při které je ligand imobilizován prostřednictvím specifických nebo nespecifických interakcí, případně prostřednictvím reverzibilní kovalentní vazby¹⁹. Pomocí tohoto přístupu lze snadno připravit afinitní sorbent požadovaných vlastností, jako jsou typ a koncentrace ligandu. Další nezanedbatelnou výhodou reverzibilní imobilizace je možnost intenzivního promytí či dokonce sterilizace výchozího sorbentu bez imobilizovaného ligandu před jeho opakovaným použitím, což je nezbytné především při produkci farmakologických preparátů.

Jedním z přístupů pro reverzibilní imobilizace ligandů v afinitní chromatografii je využití tzv. heterobifunkčních ligandů²⁰. Tuto metodou zavedl v roce 1989 prof. B. Mattiasson z univerzity v Lundu ve Švédsku. Heterobifunkční ligandy jsou molekuly, které obsahují dvě místa schopná interakce. První z nich – vazebné místo V – slouží k reverzibilní imobilizaci této molekuly na příslušný chromatografický sorbent. Druhé – afinitní místo A – je zodpovědné za biospecifickou interakci s purifikovanou bílkovinou. Ve většině případů jsou heterobifunkční ligandy syntetizovány z odpovídajících složek. Mohou však mezi ně být řazeny i nativní molekuly, jako jsou bílkoviny, fosfolipidy či koenzymy, které obsahují místa pro obě potřebné interakce přímo ve své struktuře.

3.1. Strategie použití heterobifunkčních ligandů

Při práci s heterobifunkčními ligandy lze použít dvě strategie, které se liší ve způsobu vytváření afinitního komplexu (obr. 1).



Obr. 1. Dvě strategie využití heterobifunkčních ligandů v afinitní chromatografii

Tabulka II

Přehled aplikací heterobifunkčních ligandů využívajících nespécifické interakce

| Heterobifunkční ligand | Interakce | | Lit. |
|-------------------------------|------------|--------------------------|------|
| | vazebná | afinitní | |
| Dinonylfenylethoxylát–trypsin | hydrofobní | trypsin–STI | 25 |
| Brij 76–triazinová barviva | hydrofobní | triazinová barviva–RNAsa | 26 |
| Sérový albumin | hydrofobní | albumin–protilátka | 27 |
| Protilátky | hydrofobní | protilátka–antigen | 28 |
| Lecitin | hydrofobní | lecitin–fosfolipasa C | 29 |

Tabulka III

Přehled aplikací heterobifunkčních ligandů využívajících specifické interakce

| Heterobifunkční ligand | Interakce ^a | | Lit. |
|------------------------------------|------------------------|--|-------|
| | vazebná | afinitní | |
| STI–dextran–CB | trypsin–STI | CB–LDH | 20 |
| Dextran–STI | trypsin–STI | dextran–Con A | 30 |
| Ovalbumin | protilátka–ovalbumin | ovalbumin–Con A | 31 |
| Biotin–ligand | avidin–biotin | ligand–? | 32 |
| NAD, NADP, ATP, UTP | borát | koenzymy–enzymy | 33–35 |
| α_2 Makroglobulin | Cu^{2+} | α_2 makroglobulin–endopeptidasy | 36 |
| Con A | Cu^{2+} | Con A–ovalbumin | 37 |
| Iminodiocetová kyselina–PEG–ligand | Cu^{2+} | ligand–? | 38 |
| Dextran–ligand | Con A–dextran | ligand–? | 39 |

^a STI – inhibitor trypsinu ze sóji, CB – Cibacron Blue 3G-A, LDH – laktátdehydrogenasa, Con A – konkanavalin A, PEG – polyethylenglykol, ? – různé aplikace

V prvním případě je heterobifunkční ligand přidán přímo do extraktu biologického materiálu. Po inkubaci, při které došlo k vytvoření afinitního komplexu, je roztok nanesen na daný chromatografický sorbent, na který se tento komplex naváže prostřednictvím vazebného místa heterobifunkčního

ligandu. Po vymytí balastních bílkovin je příslušným způsobem eluována specificky navázaná purifikovaná bílkovina. Ze sorbentu je poté eluován i heterobifunkční ligand. Při tomto postupu však může v roztoku docházet k vazbě balastních bílkovin na vazebnou část heterobifunkčního ligandu, proto se

tento postup používá méně často. Jeho výhodou však je, že k vytváření afinitní interakce dochází v roztoku, čímž jsou eliminovány sterické či difuzní limitace.

Ve druhém případě je heterobifunkční ligand nanesen na příslušný chromatografický sorbent a získaný afinitní sorbent je použit způsobem obvyklým v afinitní chromatografii. Tento sorbent lze používat opakovaně bez dalších manipulací. V obou případech však nesmí být k eluci purifikované bílkoviny použita metoda, která by současně ze sorbentu uvolňovala heterobifunkční ligand.

3.2. Rozdělení heterobifunkčních ligandů podle druhu použité vazebné interakce

Pro vazbu heterobifunkčního ligandu na daný sorbent jsou využívány nespécifické i specifické interakce. Každá z uvedených variant má své výhody a nevýhody. Pro nespécifickou vazbu byly využity hydrofobní interakce. Jako vazebná část heterobifunkčního ligandu byly použity kratší hydrofobní řetězce, neiontový detergent, případně přímo hydrofobní část dané molekuly. Pro jejich vazbu byly použity sorbenty jak pro hydrofobní, tak pro chromatografii s obrácenými fázemi – C₁₈. Hlavní výhodou tohoto uspořádání je skutečnost, že uvedené sorbenty jsou dostatečně chemicky i fyzikálně stabilní a pro jejich čištění lze použít i drastičtější metody. Problémem však je rozsah nespécifické vazby balastních bílkovin přímo na tyto sorbenty.

Tato nevýhoda samozřejmě odpadá u metod založených na specifických interakcích. Pro imobilizaci byly použity systémy enzym–inhibitor, avidin–biotin, protilátka–antigen, lektin–sacharid, systémy využívající boronátovou chromatografii^{21,22} a chromatografii na imobilizovaných kovových iontech^{23,24}. V porovnání s hydrofobní interakcí jsou metody založené na specifických interakcích mnohem citlivější na fyzikálně-chemické faktory prostředí, a možnosti čištění vlastního sorbentu jsou tím omezené. Tato skutečnost platí především v případech, kdy se na vazebné interakci podílí bílkovina. Nezanedbatelnou výhodou však je, že se jedná o orientovanou imobilizaci, což se odráží v lepší dostupnosti ligandu pro vyčištěnou bílkovinu.

Některé příklady aplikací heterobifunkčních ligandů spolu s použitou interakcí jsou uvedeny v tabulkách II a III.

4. Závěr

Reverzibilní imobilizace pomocí heterobifunkčních ligandů představuje jednoduchou metodu přípravy sorbentů pro afinitní chromatografii. Tímto způsobem lze velice rychle připravit sorbent požadovaných vlastností, jako jsou typ a koncentrace příslušného ligandu. Po eluci heterobifunkčního ligandu a regeneraci lze sorbent využít pro další aplikace, čímž je eliminována hlavní nevýhoda afinitní chromatografie, tj. potřeba mít pro každou aplikaci nový chromatografický sorbent. Nezanedbatelná je rovněž možnost důkladného promytí základního sorbentu bez nebezpečí zničení příslušného ligandu. Tato skutečnost by měla napomoci většímu rozšíření afinitní chromatografie do poloprovozních a provozních měřítek.

LITERATURA

1. Dwyer J. L.: *J. Biotechnol.* 1, 3 (1984).
2. Ngo T. T. (ed.): *Molecular Interactions in Bioseparations*. Plenum Press, New York 1992.
3. Turková J.: *Bioaffinity Chromatography*. Elsevier, Amsterdam 1993.
4. Labrou N., Clonis Y. D.: *J. Biotechnol.* 36, 95 (1994).
5. Campbell D. H., Luescher E. L., Lerman L. S.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 35, 575 (1951).
6. Cautrecasas P., Wilchek M., Afinsen C. B.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 61, 636 (1968).
7. Champluvier B., Kula M.-R., v knize: *Separations for Biotechnology* (Pyle D. E., ed.), str. 295. Elsevier, London 1990.
8. Champluvier B., Kula M.-R.: *Biotechnol. Bioeng.* 40, 34 (1992).
9. Glatz Z.: *Chem. Listy* 94, 490 (2000).
10. Albertsson P.-A.: *Partition of Cell Particles and Macromolecules*. Wiley – Interscience, New York 1971.
11. Walter H., Brooks D. E., Fisher D.: *Partitioning in Aqueous Two-Phase Systems: Theory, Methods, Uses and Applications in Biotechnology*. Academic Press, Orlando 1985.
12. Glatz Z.: *Chem. Listy* 94, 389 (2000).
13. Lowe C. R.: *An Introduction to Affinity Chromatography*. North Holland Publishing Company, Amsterdam 1979.
14. Scouten W.H.: *Affinity Chromatography*. Wiley, New York 1981.
15. Gribnau T. C. J., Visser J., Nivard R. J. F. (ed.): *Affinity Chromatography and Related Techniques*. Elsevier, Amsterdam 1982.
16. Chaiken I. M., Wilchek M., Parikh I. (ed.): *Affinity Chromatography and Molecular Recognition*. Academic Press, Orlando 1983.
17. Dean P. D. G., Johnson W. S., Middle F. A. (ed.): *Affinity Chromatography – A Practical Approach*. IRL Press, Oxford 1985.
18. Turková J., v knize: *Separation Methods* (Deyl Z., ed.), str. 321. Elsevier, Amsterdam 1984.
19. Glatz Z.: *Chem. Listy* 94, 314 (2000).
20. Mattiasson B., Olsson U. J.: *J. Chromatogr.* 370, 21 (1986).
21. Beneš M. J., Štambergová A., Scouten W. H., v knize: *Molecular Interactions in Bioseparations* (Ngo T. T., ed.), str. 313. Plenum Press, New York 1992.
22. Psotová J., Janiczek O.: *Chem. Listy* 89, 641 (1995).
23. Kleinmann I., Šmidl P., Plicka J.: *Chem. Listy* 85, 500 (1991).
24. Kučerová Z.: *Chem. Listy* 85, 526 (1991).
25. Kaul R., Olsson U. J., Mattiasson B.: *J. Chromatogr.* 438, 339 (1988).
26. Sing Y. L. K., Algiman E., Kroviarski Y., Massot C., Dhermy D., Bertrand O.: *J. Chromatogr.* 558, 43 (1991).
27. Mattiasson B., Linne E., Kaul R., v knize: *Molecular Interactions in Bioseparations* (Ngo T. T., ed.), str. 395. Plenum Press, New York 1992.
28. Chiong M., Lavadero S., Ramos R., Aguilon J. C., Ferreira A.: *Anal. Biochem.* 197, 47 (1991).
29. Chan E. C. S., Siboo I. R., Siboo R.: *J. Chromatogr.* 568, 85 (1991).

30. Olsson U. J., Mattiasson B.: *J. Chromatogr.* 370, 29 (1986).
31. Turková J., Pekov L., Sajdok J., Káš J., Beneš M. J.: *J. Chromatogr.* 500, 585 (1990).
32. Bayer E. A., Wilchek M.: *J. Mol. Recognition* 3, 102 (1990).
33. Maestas R. R., Prieto J. R., Kuehn G. D., Hageman J. H.: *J. Chromatogr.* 189, 225 (1980).
34. Bouriotis V., Galpin I. J., Dean P. D. G.: *J. Chromatogr.* 210, 267 (1981).
35. Westmark P. R., Valencia L. S., Smith B. D.: *J. Chromatogr.* 664, 123 (1994).
36. Wunderwald P., Schrenk W. J., Port H., Kresze G.-B.: *J. Appl. Biochem.* 5, 31 (1983).
37. Anspach F. B., Altmann-Haase G.: *Biotechnol. Appl. Biochem.* 20, 323 (1994).
38. Ehteshami G., Porath J., Guzman R.: *J. Mol. Recognition* 9, 733 (1996).
39. Glatz Z., Psotová J., Janiczek O., Novotný M. V.: *Int. J. Biochromatogr.* 1, 143 (1994).

Z. Glatz (*Department of Biochemistry, Faculty of Science, Masaryk University, Brno*): **Application of Heterobifunctional Ligands in Affinity Chromatography**

A very important step in the design of affinity sorbents is the choice of an appropriate method for immobilization of the affinity ligand. Covalent immobilization usually leads to statistical orientation of ligands and a part of the ligands is not accessible for binding. An alternative to covalent immobilization is reversible immobilization, which leads to orientation of affinity ligands. The immobilization can be reversed and the column after regeneration can be employed in immobilization of a different ligand and used in another application. A choice for reversible immobilization is the use of heterobifunctional ligands. The ligands are molecules having two binding sites – one for the molecule of the substance to be purified and the other binding to the affinity support. Basic principles of such use of heterobifunctional ligands in affinity chromatography are given together with their applications in protein purification.

Jarmark

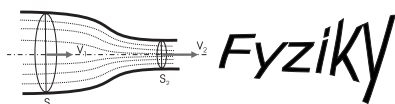
v pavilónu „A“ na výstavišti Flora

aneb poznej kouzlo

24. a 25. května 2002

V Olomouci

Chemie



$\sqrt[3]{(\text{Matematiky})^5}$

- měření tvrdosti přinesené vody (vodní kámen je převít)
- určení obsahu metanolu v tatínkově slivovici
- kontrola kvality slunečních brýlí (vzhledem k UV záření)
- hrátky s plastovými lahvemi
- fyzika a chemie v kuchyni
- stanovení vitamínu C v ovocných nápojích
- počítačový „hyzdič“ dětí, rodičů, babiček a dědečků
- Debrujarijáda, matematické kvízy a hlavolamy
- soutěže („10× odpověz“, „Chemický kufr“), atd.



TEORETICKÉ STUDIUM INTERAKCÍ PŘECHODNÝCH KOVŮ S BIOMOLEKULAMI

LUBOMÍR RULÍŠEK

Ústav organické chemie a biochemie, Akademie věd České republiky a Výzkumné centrum komplexních molekulových systémů a biomolekul, Flemingovo nám. 2, 166 10 Praha 6, e-mail: lubos@uochb.cas.cz

Došlo dne 4.IV.2001

Klíčová slova: přechodné kovy, metaloproteiny, interakce, teoretické studium

Obsah

1. Úvod
2. Studium interakcí přechodných kovů s malými molekulami
3. Interakce přechodných kovů s bázemi nukleových kyselin, nukleotidy a fragmenty RNA a DNA
4. Struktura, funkce a spektroskopické chování vazebných míst kovů v metaloproteinech
5. Perspektivy kvantové bioorganické chemie
6. Závěr

1. Úvod

Tento souhrnný článek volně navazuje na referát, týkající se obecných problémů při teoretickém studiu systémů obsahujících přechodné kovy a metodiky jejich kvantově-chemických výpočtů¹. Nyní půjde o shrnutí výsledků přesných výpočtů provedených na těchto systémech, tedy o aplikaci metod. Nezbytným základem pro pochopení složitějších systémů je porozumění strukturám menších komplexů obsahujících přechodné kovy a interakci kovů s malými ligandy (úvodní kapitola). Další část je zaměřena na nové poznatky v oblasti interakcí bází nukleových kyselin, nukleotidů, fragmentů DNA a RNA s kationty přechodných kovů. Čtvrtou kapitolu referátu věnuji struktuře, funkci a spektroskopickému chování vazebných míst kovů v proteinech a interakcím přechodných kovů s aminokyselinami a v závěru nastíním perspektivy kvantové bioorganické chemie, oboru, který v posledních pěti letech prodělal významný rozvoj.

2. Studium interakcí přechodných kovů s malými molekulami

Komplexy přechodných kovů s malými molekulami se dají podle charakteru vazby rozdělit přibližně do dvou skupin: *i)* Organokovové komplexy s koordinačně-kovalentní vazbou. Pro tyto sloučeniny je charakteristický velký přenos náboje mezi ligandem (donor elektronů) a kovem (akceptor

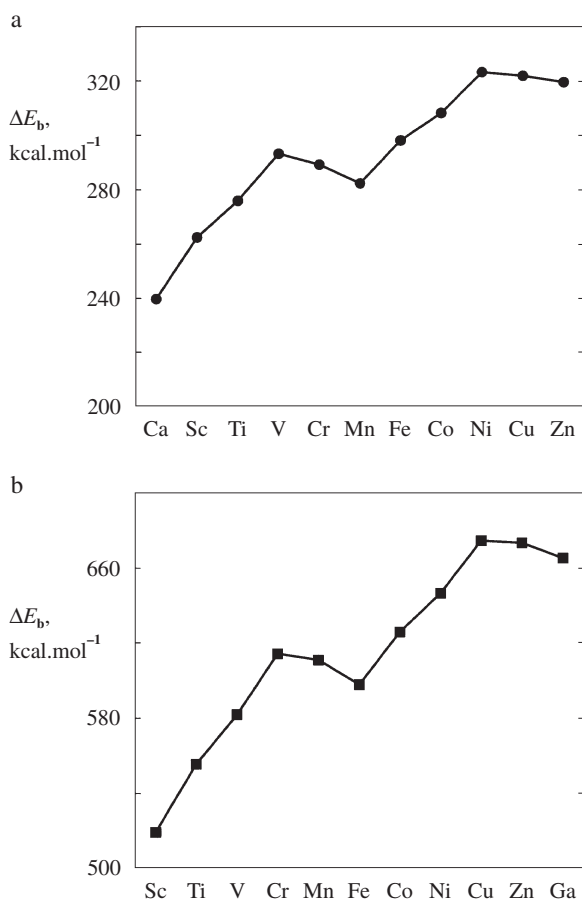
elektronů) s následnou zpětnou donací. Vazebná situace se popisuje pomocí Dewarova-Chattova-Duncansonova modelu^{2,3}. Typickými ligandy jsou alkeny, alkiny, karbeniové ionty, kyanidové anionty, karbonyly a jim příbuzné sloučeniny. *ii)* Komplexy s převážně iontovým charakterem. Zde nedochází k velkému přenosu náboje a jednotlivé komponenty v systému (kov, ligandy) si do značné míry zachovávají svůj charakter. Typickými ligandy jsou molekuly s volnými elektronovými páry, například H₂O, H₂S, NH₃, halogenidové anionty a jim chemicky příbuzné sloučeniny.

Jelikož téměř všechny ligandy, vyskytující se jako vazebné funkční skupiny v biomolekulách, patří do druhé skupiny, bude pozornost zaměřena právě na ni (výjimkou je třída Ni–Fe bakteriálních hydrogenas, u které jak rentgenová strukturní analýza⁴, tak infračervená spektroskopie⁵ odhalily zcela překvapivé a v biochemii bezprecedentní ligandy – CN[–] a CO). Případně zájemce o teoretická studia organokovových komplexů s využitím pro katalýzu nebo průmyslově důležité reakce odkazují na rozsáhlé souhrnné články^{6,7}.

Z druhé skupiny je nejčastěji studovaným ligandem voda. Důvodem je jistě fakt, že většina koordinační chemie se odehrává ve vodném prostředí a aquakomplexy se dají považovat za standardní stav kationtů přechodných kovů. Z výpočetního hlediska navíc patří mezi menší systémy, a proto lze pro jejich studium použít přesných metod. Prvním krokem k porozumění fyzikálně-chemickým vlastnostem je výpočet vazebných energií, vazebných vzdáleností a efektů ligandového pole pro hexahydratované ionty kovů (což je pro většinu z nich stav, ve kterém se ve vodě vyskytují).

Proto byly již v první polovině 90. let provedeny výpočty na úrovni SCF (případně CAS SCF pro systémy s degenerovaným základním stavem) a získány teoretické vazebné energie a vazebné vzdálenosti Me–O izolovaných klastrů [Me(H₂O)₆]¹⁺, kde Me = Sc²⁺, Sc³⁺, ..., Cd²⁺, Cd³⁺ (cit. 8,9). Pro oktaedricky koordinované komplexy sleduje závislost vypočtených vazebných energií na rostoucím atomovém čísle (v dané periodě přechodných kovů) křivku s dvěma vrcholy (obr. 1), tedy v zásadě stejného tvaru, jakou poskytnou experimentálně naměřené solvatační entalpie.

Jedinou výjimkou je kation Ca²⁺, kde je odchylka patrně způsobena vyšším koordinačním číslem v roztoku. Tyto trendy se kvalitativně vysvětlují pomocí teorie krystalového pole¹⁰, neboť vazba kov–ligand je převážně iontová, *d*-orbitály na kovu si zachovávají svůj charakter, a tudíž předpoklady této teorie jsou splněny. V oktaedrickém krystalovém poli pak dochází k rozštěpení jejich energetických hladin na třikrát degenerovanou hladinu *t*_{2g} a dvakrát degenerovanou *e*_g, což má za následek dodatečný energetický příspěvek k celkové energii molekuly, tzv. LFSE (ligand field stabilization energy, pokles celkové energie molekuly v důsledku rozštěpení energie *d*-orbitalů polem okolních ligandů). Dále toto rozštěpení dává vzniknout elektronovým spektrům *d*-*d* přechodů ve viditelné a ultrafialové oblasti a u některých komplexů též Jahnově-Tellerově distorzi (pramenící z degenerace základního molekulového stavu). Ukazuje se však, že snížení celkové energie v důsledku Jahnovy-Tellerovy distorze je zanedbatelné ve



Obr. 1. Závislost celkové vazebné energie, ΔE_b ($\Delta E_b = E\{\text{Me}^{n+}(\text{g})\} + 6E\{\text{H}_2\text{O}(\text{g})\} - E\{\text{[Me}(\text{H}_2\text{O})_6]^{n+}(\text{g})\}$) pro hexaaquakomplexy divalentních (a) a trivalentních (b) kationtů první řady přechodných kovů na rostoucím atomovém čísle. Trendy sledují vzrůstající křivku (danou zmenšujícím se iontovým poloměrem kovů s vyšším atomovým číslem) se dvěma vrcholy v důsledku LSFE (ligand field stabilization energy)

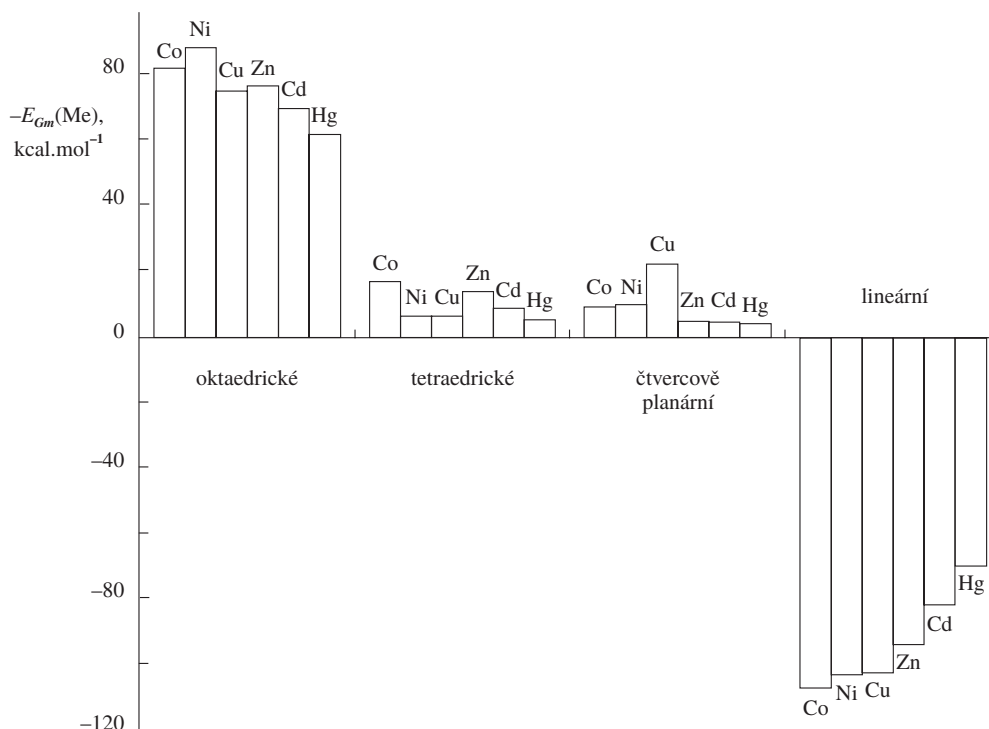
srovnání s energetickými příspěvky pocházejícími od ligandového pole. V krajním případě je důsledkem rozštěpení d -orbitalů změna základního stavu iontu kovu z vysokospinového (neboť voda je ligandem, který vytváří slabé krystalové pole) na nízkospinový, jak se děje například u $[\text{Co}(\text{H}_2\text{O})_6]^{3+}$, kde základním stavem je singlet s formální elektronovou konfigurací $(t_{2g})^6(e_g)^0$. Konečně posledním poučením z provedených výpočtů je poznatek, že trendy ve vazebných energiích lze v prvním přiblížení přímo korelovat s experimentálními entalpiemi. V přesnější aproximaci lze přidat pomocí Bornova-Haberova termodynamického cyklu rozdíl solvatačních energií mezi reaktanty a produkty a dostat se v absolutní stupnici blíže k experimentálními entalpiím.

Co se týče reaktivity a dynamiky aquakomplexů, důležitou reakcí je výměna molekuly vody v první koordinační sféře. Substituční mechanismy byly klasifikovány Langdorffem a Grayem¹¹ pomocí symbolů A, I_a, I_d, D. Symboly A, D znamenají asociativní nebo disociativní mechanismus, tedy zda reakce probíhá přes hepta- nebo pentakoordinované meziproducty; I_a, I_d pak rozlišují mezi současnou záměnou ligan-

dů (concerted mechanism) s asociativním či disociativním charakterem. Teoretické studie těchto mechanismů^{12,13} se opírají o disociační energii šesté molekuly vody v komplexu při disociativním mechanismu a vazebnou energii sedmé, přistupující vody při asociativním mechanismu. Těmito veličinami se aproximuje skutečná aktivační energie ΔE^\ddagger , která vystupuje jako směrnice přímky v Arrheniově diagramu a koreluje s experimentálními aktivačními entalpií ΔH^\ddagger . Pomocnou veličinou je ΔV^\ddagger , tedy změna molárního objemu při aktivaci. Tato veličina sice nepatří mezi kvantově-mechanické veličiny, avšak z jejich experimentálních hodnot lze usoudit na reakční mechanismus ($\Delta V^\ddagger > 0$ indikuje asociativní, $\Delta V^\ddagger < 0$ disociativní). I při kvantově-chemickém výpočtu se dají nalézt rozumné definice této veličiny, takže její vyhodnocení poskytuje teoretickou předpověď, jakým mechanismem pro ten který kov záměna molekuly vody probíhá. Lze prohlásit, že divalentní přechodné kovy z první periody s větším počtem d -elektronů ($\text{Fe}^{2+}, \dots, \text{Zn}^{2+}$) preferují disociativní mechanismus, zatímco kovy z počátku této řady ($\text{Sc}^{3+}, \text{Ti}^{3+}, \text{V}^{2+/3+}, \text{Cr}^{3+}$) preferují asociativní mechanismus.

Deprotonizace jedné nebo několika molekul vody v aquakomplexech vede ke vzniku hydroxokomplexů. Zatímco $\text{p}K_a$ molekuly vody ve vodném prostředí je přibližně 15,7, při vazbě na kov se snižuje o několik jednotek¹⁴. Tím hydroxokomplexy nabývají na významu nejen samy o sobě, ale jako nejjednodušší modely pro interakci deprotonizovaných funkčních skupin (včetně protických aminokyselinových zbytků) s ionty přechodných kovů. Dále lze na příkladu hydroxokomplexů studovat zajímavý jev, tzv. *trans*-efekt¹⁵. *Trans*-efektem se rozumí rozdílná kinetická a termodynamická stabilita *cis*- a *trans*-isomerů daného komplexu. V chemické praxi se těchto znalostí používá k vytvoření empirických pravidel pro dirigování následné substituce do *cis*- nebo *trans*-polohy k danému ligandu, zejména u čtvercově planárních komplexů kationtu platiny (II). Jev byl studován i teoreticky na příkladech několika neutrálních komplexů typu $\text{Me}(\text{OH})_n(\text{H}_2\text{O})_{6-n}$ ($\text{Me} = \text{Mn}(\text{III}), \text{Mn}(\text{IV}), \text{Mn}(\text{V}), \text{Fe}(\text{II}), \text{Fe}(\text{III}), \text{Fe}(\text{IV})$; n je takové, aby byl komplex elektroneutrální) a několika oxo-komplexů těchto kovů¹⁶. V souladu s očekáváním bylo zjištěno, že pro některé oxo-komplexy je dokonce preferována penta-koordinace kvůli silnému *trans*-efektu oxo-skupiny, vedoucímu k disociaci protilehlého ligandu.

Celou další oblastí aplikací kvantově-chemických výpočtů na malé komplexy přechodných kovů iontového charakteru je studium jejich spektroskopických vlastností. Zatímco elektronová spektra hexaaqua-, hexaammin-, hexafluorokomplexů byla změněna před mnoha lety, jejich interpretace pomocí kvantově-chemických metod je stále aktuální. Cílem je nejen výpočtetně zreprodukovat naměřená spektra, ale též identifikovat původ naměřených elektronových excitací. Tak byla například vypočtena $d-d$ elektronová spektra pro CoO v pevné fázi, na CoO (100) povrchu, a u oktaedrických Co^{2+} komplexů¹⁷. Velmi zajímavá je v tomto ohledu práce pojednávající v detailech o spektru hydratovaného iontu Co^{2+} (cit.¹⁸). Elektronové spektrum Co^{2+} ve vodě vykazuje dva široké absorpční píky, jeden okolo 8000 cm^{-1} a druhý, strukturovaný, okolo $20\,000 \text{ cm}^{-1}$. V něm lze dekonvolucí rozlišit dva píky: $19\,400 \text{ cm}^{-1}$ a $21\,550 \text{ cm}^{-1}$. Téměř bez jakýchkoliv dalších pochyb byly tyto píky přisuzovány $d-d$ elektronové excitaci v oktaedrickém komplexu $[\text{Co}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$, což je dominantní forma iontu Co^{2+} ve vodě. Z velmi pečlivé studie provedené



Obr. 2. Relativní komplexační energie divalentních (2+) kationtů jednotlivých kovů v různých koordinačních geometriích

pomocí pokročilých kvantově-chemických metod vyplynulo, že takové píky by mohly v $[\text{Co}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$ existovat, ale ze symetrických důvodů musí mít téměř nulovou intenzitu. Ani distorze tohoto komplexu, porušující symetrii, výrazně nezvyšují jejich intenzitu. Zároveň bylo nastíněno několik dalších možností, týkajících se původu těchto elektronových excitací. Jako možné částice byly uvedeny aquakomplexy s nižším koordinačním číslem či hydroxokomplexy, jež jsou sice zastoupeny zanedbatelně, avšak jejich elektronové excitace mají vyšší intenzitu. Závěry práce nelze brát v ultimativním duchu, spíše jako možný popud pro experimentální snahu o jejich potvrzení či vyvrácení.

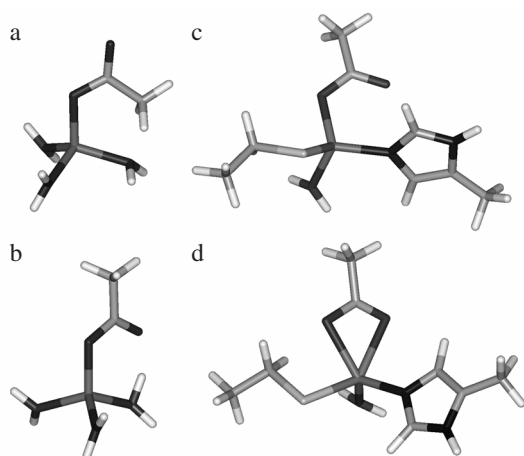
V naší laboratoři jsme se též zabývali spektry Co^{2+} , hlavně pak vlivem porušení oktaedrické symetrie substitucí vody za jednu či dvě funkční skupiny z množiny $\{\text{CH}_3\text{OH}, \text{CH}_3\text{NH}_2, \text{CH}_3\text{SH}\}$, tedy skupin reprezentujících jednoduché modely aminokyselinových postranních řetězců¹⁹. Došli jsme k závěru, že ač je štěpení původně degenerovaných hladin malé (řádu stovek cm^{-1}), jednotlivé stavy se nekříží a každý z nich je dominantně tvořen jednou elektronovou konfigurací, což má kromě důsledků pro spektroskopii i velký význam pro provádění kvantově-chemických výpočtů na těchto systémech. Není asi nutné na závěr tohoto odstavce připomínat, jak velkou úlohu hraje porozumění spektrům malých komplexů přechodných kovů pro teoretické i experimentální studium spektroskopických vlastností vazebných míst kovů v biomolekulách.

Další zajímavou informací, kterou poskytují studie aquakomplexů, je preference pro dané koordinační uspořádání. Zde je nutno, na rozdíl od předešlých prací, uvažovat a mezi sebou porovnávat různé koordinační geometrie. Toto porovnání však není zdaleka triviální, neboť problémem je schopnost chemic-

kého modelu (izolovaného systému $[\text{Me}(\text{H}_2\text{O})_n]^{c+}$) korelovat s tak vzdálenou a nepřiliš rigorózně definovanou veličinou, jakou je afinita kovu k dané koordinační geometrii. Je tedy nutno buď důkladně zahrnovat vliv okolí, v nejjednodušším případě hydrataci systému, nebo porovnat několik kovů v několika koordinačních uspořádáních mezi sebou navzájem. První přístup byl zvolen v práci zabývající se hydratací iontů Be^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Zn^{2+} (cit.²⁰). Pomocí trendů v přírůstcích vazebných energiích připadajících na jednu molekulu vody jejich postupným přidáváním až k vysycení první koordinační sféry a dále k hypotetickému vzniku druhé solvatační sféry, byly těmto iontům připsány preferované koordinační geometrie ve vodném prostředí. Druhý přístup byl zvolen při studii provedené v naší laboratoři²¹. Studovali jsme komplexační energie šesti kationtů (Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} , Hg^{2+}) s vazebným místem $(\text{H}_2\text{O})_n$ uspořádaným v lineární ($n = 2$), tetraedické, čtvercově planární ($n = 4$) a oktaedrické ($n = 6$) koordinační geometrii. Výsledky jsou znázorněny na obrázku 2.

Z obrázku jsou patrné trendy, které kvalitativně souhlasí se závěry rozsáhlé studie analyzující preferované koordinační geometrie v experimentálně změřených strukturách malých molekul a metaloproteinů²². Z ní vyplývá, že Co^{2+} a Ni^{2+} preferují oktaedrické uspořádání, Cu^{2+} čtvercově planární, Zn^{2+} tetraedrické, Hg^{2+} lineární, Cd^{2+} tetraedrické a oktaedrické.

Zatím byla pozornost věnována hlavně aqua- (v malé míře též hydroxo-) komplexům. Ligandy, běžně se vyskytující v bioanorganické chemii, mají jako donorové atomy převážně síru, dusík, a kyslík. Kromě vody jsou (ve vztahu k interakcím kovů s biomolekulami) zajímavými ligandy amoniak (NH_3), thioly (RSH), thioláty (RS^-) a thioethery (RSR'), karboxylo-



Obr. 3. Různé způsoby vazby karboxylátu (RCOO^-) ke kationtům kovů, demonstrované na modelových komplexech $[\text{Zn}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CH}_3\text{COO})]^+$ a $[\text{Zn}(\text{H}_2\text{O})(\text{His})(\text{Cys})(\text{CH}_3\text{COO})]$: a – *anti* (torzní úhel Zn-O-C-O je přibližně 180°), b – *syn* ($t_{\text{Zn-O-C-O}} \sim 0^\circ$), c – monodentátní, d – bidentátní

vé kyseliny (RCOOH) a jejich anionty (RCOO^-), alkoholy (ROH) a alkoholáty (RO^-). O několika studiích pojednávajících o interakcích těchto ligandů s kationty přechodných kovů se nyní stručně zmíníme.

Velmi pěknou a instruktivní práci týkající se reakčního mechanismu $\text{Co}^+(\text{F}, \text{F})$ s NH_3 publikovali Taketsugu a Gordon²³. Díky multikonfiguračnímu charakteru daného problému museli použít velmi pokročilé metody MR-CI. V prvním kroku vytvoří reaktanty ion-molekulový komplex CoNH_3^+ s vazebnou energií 49 (triplet) a 45 (kvintet) $\text{kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$. Posléze je aktivována vazba N–H, což vede k meziprojektu H-Co-NH_2^+ , který je o 60 (triplet) a 44 (kvintet) $\text{kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ energeticky výše. Poté následuje štěpení vazby Co–N nebo Co–H a vytvoření $\text{HCo}^+ + \text{NH}_2$ nebo $\text{H} + \text{CoNH}_2^+$. Oba dva reakční kanály (pro triplet i kvintet) jsou endotermické (54 až 64 $\text{kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$), v dobrém souladu s experimentem. Tato práce poukazuje na nutnost použití velmi náročných výpočetních metod pro dosažení kvantitativní shody s experimentem a představuje poučný příklad studia reakčního mechanismu. Podobným postupem, avšak s použitím metod DFT, je řešen problém aktivace O–H vazby atomem Ni v methanolu (CH_3OH)²⁴. Výpočty vazebných energií jedné či dvou molekul amoniaku se všemi monovalentními kationty první řady přechodných kovů a srovnání amminokomplexů s jejich aquaanalogy jsou námětem jiné studie²⁵, jejíž výsledkem jsou odhady afinity těchto dvou molekul (H_2O , NH_3) ke studovaným kovům. Povaha vazby Cu–N v komplexech Cu^+ s NH_3 , CH_3NH_2 , NHCH_2 , HCN je náplní práce²⁶, která demonstruje použití populačních analýz: Baderovy analýzy AIM a analýzy NBO^1 . Z dalších prací lze uvést teoretické studium fotolytických produktů molekul $\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})$ a $\text{Cu}(\text{NH}_3)$ (cit.²⁷), studium vazby amoniaku na atom mědi, jeho dimer (Cu_2) a trimer (Cu_3) (cit.²⁸) a studium výměnné reakce $\text{Co}(\text{NH}_3)_6^{2+/3+}$, které ukazuje odvození kinetických rovnic a výpočet rychlostních konstant pro procesy, ve kterých vystupují koordinační sloučeniny²⁹. Tento výčet, který si nečiní nárok na úplnost, bych zakončil poukazem na studii, která má přímý vztah ke způsobu vazby karbo-

xylátů (Asp^- , Glu^-) v metaloproteinech obsahujících zinek (II)³⁰. Vazba se může realizovat čtyřmi způsoby: bidentátně, monodentátně, *syn* a *anti*. Tyto způsoby jsou znázorněny na obrázku 3.

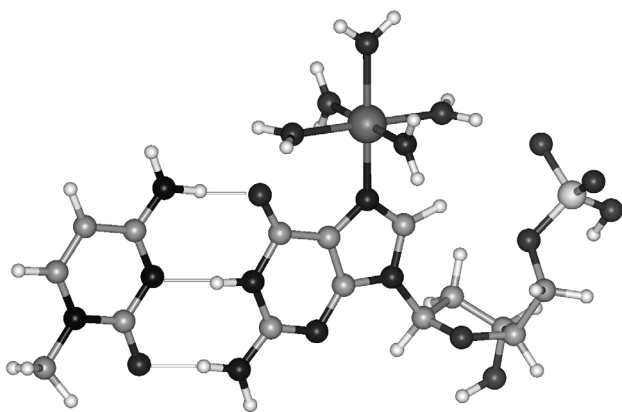
Všechny čtyři způsoby byly vyšetřeny pomocí metody DFT/B3LYP. Bylo zjištěno, že jsou-li ostatní ligandy v tetrakoordinovaném komplexu neutrální (celkový náboj systému je +1), je rozdíl mezi mono- a bidentátním vazebným módem velmi malý (2,5 $\text{kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$). Avšak je-li zde další záporně nabitý ligand, je preferován monodentátní způsob (tedy vazba přes jeden atom kyslíku). Celkově se dá říci, že rozdíl mezi oběma způsoby je malý a konkrétní realizace může být určena interakcemi s druhou solvatační sférou nebo sousedními ligandy. Energetický rozdíl mezi vazebným módem *syn* a *anti* při monodentátní vazbě karboxylátu je větší (16 až 22 $\text{kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ ve prospěch modu *syn*). Rovněž je ve studii zmíněn výpočet vedoucí k odhadu, že $\text{p}K_a$ vody vázané k zinku (II) v karboxy-
petidase a termolysinu je 8 až 9.

Věřím, že bylo uvedeno dostatečné množství argumentů a příkladů ilustrujících, proč je důležité studovat struktury menších systémů obsahujících přechodné kovy. Dovolil bych si tyto argumenty shrnout. Díky tomu, že kationty přechodných kovů jsou významnými molekulovými centry, a to kvůli silné elektrostatické interakci s nejbližšími ligandy, lze jejich chemické chování dobře odhadnout ze struktury a vlastností malých komplexů, tedy lokálního chování. Jejich studium nám ozřejmí spinové stavy, ve kterých se přechodné kovy ve vazebných místech biomolekul nacházejí, dále poskytuje informaci o preferovaném koordinačním čísle a koordinační geometrii, lze z něj dobře usuzovat na spektroskopické chování složitějších vazebných míst kovů (určovaném do velké míry lokálním okolím kovu) a na reakční mechanismy, pro které také platí výše zmíněný princip korespondence. Navíc u malých molekul lze lépe provádět porovnání výsledků s experimentem, neboť výpočet není zkreslen přijatým chemickým modelem.

3. Interakce přechodných kovů s bázemi nukleových kyselin, nukleotidy a fragmenty RNA a DNA

Připomeňme si na úvod výše zmíněný důležitý rys interakce kationtů přechodných kovů s ligandy nesoucími parciální záporný náboj, kterým je síla této interakce (měřená například vazebnou energií komplexu kov–biomolekula). Ta přibližně o jeden řád převyšuje nevazebné interakce (ač v úhrnu početnější) stabilizující supramolekulární strukturu biomolekul. Přítomnost kationtu (přechodného) kovu tedy výrazným způsobem ovlivní jinak velmi vyvážené rovnováhy mezi různými formami téhož útvaru. Zdá se, že příroda tohoto fenoménu využívá i v případech struktur DNA a RNA.

Z tohoto důvodu jsou interakce přechodných kovů s bázemi nukleových kyselin a (poly)nukleotidy předmětem intenzivního výzkumu, neboť je téměř jisté, že kovy mají velký význam při replikaci DNA³¹, tedy ovlivňují přenos genetické informace. Jeden z velmi důležitých efektů, pramenící z nespecifické elektrostatické interakce mezi kationtem a záporně nabitou fosfátovou skupinou, vede ke stabilizaci polynukleotidových řetězců. Kromě toho dochází k přímé, tedy specifické vazbě na fosfát, nebo, i když vzácněji, k vazbě na atomy



Obr. 4. Znárodnění interakce pentahydratovaného iontu Cd^{2+} s Watsonovým-Crickovým párem bází dpG-C (dpG, guanin deoxyribonukleotid monofosfát; C, cytosin). Ion kovu se váže k pozici N7 v guaninu

kyslíku z cukerné jednotky. Konečně posledním, avšak velmi důležitým místem vazby kovu jsou vlastní nukleobáze obsahující atomy kyslíku a dusíku. Zde se opět rozlišuje mezi vnější koordinací, většinou zprostředkovanou molekulami vody, a vnitřní koordinací (inner-sphere coordination), kdy je atom báze přímo vázán ke kationtu kovu³². Zatímco interakce ion kovu s fosfátem pravděpodobně převládá v biologických polynukleotidech, vnitřní koordinace kov–nukleobáze je velice důležitá v několika genetických procesech. Je celkem všeobecně známo, že nejlepší vazebné místo pro kov je pozice N7 v guaninu. Dále následují atom O6 v guaninu, N3 v cytosinu, N7 a N1 v adeninu, N3 v adeninu a guaninu³³. Je ale třeba mít na paměti, že ne všechna tato místa jsou přístupná po spárování bází. V přírodě se lze s těmito interakcemi setkat v několika případech. Ukazuje se například, že koordinace iontu Zn^{2+} na dusík N7 guaninu a adeninu v 5 S RNA genové sekvenci *Xenopus borealis* má za následek silný ohyb molekuly³⁴. Kationty Mn^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} a Cd^{2+} zase stabilizují jisté typy intramolekulárních purin•purin•pyrimidin DNA triplexů, patrně díky vazbě na místa N7 guaninů a adeninů³⁵. Rovněž chemoterapeutický účinek *cis*-diammindichloroplatnatého (DDP) komplexu je dán vazbou platiny(II) na pozici N7 v purinových nukleotidech³⁶.

Po shrnutí stavu problematiky v oblasti interakcí přechodných kovů s RNA, DNA a jejich složkami bych na několika vybraných pracích ukázal, jak konkrétně kvantově-chemické výpočty přispívají nejen k akumulaci, ale i třídění a zpřesňování těchto znalostí. Chemickým modelem je zpravidla hydratovaný kation kovu a fragment molekuly DNA či RNA (většinou však pouze pár bází). Fyzikálními veličinami, které se získávají z výpočtu, jsou *a*) rozdíly v interakčních energiích jednotlivých iontů se studovanými fragmenty, které jsou vodítkem při rozhodování o specifitě interakce, *b*) rovnovážné vzdálenosti v optimalizovaných strukturách, které poskytují informace o místě vazby kovu a geometrických změnách, které tuto vazbu provázejí, *c*) energetické bilance vztahující se k rozličným konstantám rovnováh (tautomerní, protonizační) a konečně *d*) parciální náboje na jednotlivých atomech, dipó-

lové momenty a mapy elektronových hustot, které umožňují vypočtené číselné hodnoty (veličin *a*)–*c*) převést do chemicky srozumitelných termínů (elektrostatické příspěvky, ion-dipólové příspěvky, přenosy náboje atp.). Na rozdíl od komplexů malých molekul však není optimalizace molekulové geometrie a nalezení globálního minima snadnou záležitostí. Jednak jsou minima na povrchu potenciální energie slabě vázaných systémů velmi plochá (což v praxi znamená přísná konvergenční kritéria), jednak tento povrch obsahuje množství lokálních minim, ve kterých může minimalizační algoritmus skončit. Je tedy nutné zkoumat paralelně několik možných struktur (jejich počet a odhad počátečních geometrií je víceméně věcí zkušenosti) a srovnáním celkových energií získat globální minimum. Pro dokreslení situace je na obrázku 4 znázorněna modelová situace interakce hydratovaného kationtu kovu s párem bází.

Co se týká kvantově-chemických metod, v případě interakce Watsonova-Crickova páru bází s kationtem kovu se jeví jako neefektivnější používat hybridní metody DFT (např. B3LYP). V případě, že chemický model obsahuje patrové interakce (báze jsou umístěny nad sebou), mohou metody DFT selhat, a je nutné přejít k výpočetně náročnějším metodám. Většinou se používá Møllerovy-Plessetovy poruchové metody druhého řádu (MP2).

První ilustrativní příklad, týkající se konkrétních kvantově-chemických výpočtů, bude pojednávat o vlivu kationtů na stabilitu párů bází nukleových kyselin. V sérii prací^{37–39} byly zkoumány parametry interakce přechodného kovu s páry bází či celými nukleotidy, a to Watsonovými-Crickovými adenin–thymín (AT), cytosin–guanin (CG) a reverzními Hoogsteenovými AA, GG. Bylo zjištěno, že tzv. energie BPE (base pairing enhancement, rozdíl energie při párování bází bez a v přítomnosti kovu) je -6 až -14 kcal.mol⁻¹, tedy pár bází je kovem stabilizován. Důležitá je však přítomnost záporně nabitých fosfátových skupin stínící ion kovu (celý systém pak má náboj +1), která činí definici energie BPE smysluplnou.

Není-li modelový systém jako celek elektroneutrální, lze přesto srovnávat interakční energie a geometrické parametry vazby stejně nabitých kationtů k nukleobázím, a z těchto usuzovat na jejich biologickou roli. Velmi zajímavý je v tomto ohledu rozdíl v chování jednotlivých iontů, který byl podrobně rozebrán na případu Zn^{2+} versus Mg^{2+} . Je známo, že tyto dva kationty mají rozdílnou roli v určitých biochemických procesech, zatímco v jiných je jejich role identická⁴⁰. Výpočty interakcí těchto kovů (hydratovaných) s nukleobázemi odhalily rozdíl v jejich chemickém chování³⁷. Rozkladem celkové energie systému hydratovaný kov + báze se zjistilo, že interakce zinku s bází je podstatně silnější, avšak na úkor oslabení interakce s vodami první koordinační sféry. U hořčičku je tomu naopak. Systém se zinkem může být tedy spíše považován za hydratovaný metalo-komplex, zatímco s hořčičkem jako komplex hydratovaného kationtu s bází. Tento fakt se vysvětluje vyšším kovalentním příspěvkem ve vazbě Zn–N7. Tedy zinek má spíše tendenci se pevně vázat k bází a měl by mít flexibilnější solvatační sféru, zatímco hořčičk by se měl snáze uvolnit z této vazby do roztoku.

V dalším příkladu bude rozebrán možný vliv kationtů přechodných kovů na vznik vzácných tautomerů posunutím protonizační rovnováhy⁴¹. Usuzuje se, že tyto vzácné tautomery poté mohou způsobovat vznik nesprávných párů (mismatch pairs, mispairs), a tedy poruchy v přepisu genetické informace.

Princip celého jevu spočívá v posunu vyvážené rovnováhy mezi jednotlivými tautomery způsobeném přítomností kovu. Z experimentů zaměřených na acidobazické chování jednotlivých vodíků v bázích⁴² je zřetelná změna jejich acidity při vazbě báze na kov (například pK_a protonu v pozici N1 klesá o 1,5–2, tento se stává kyselejším). Stejnou odpověď poskytuje i analýza krystalových struktur⁴³, kde byl nalezen guanin deprotonovaný v pozici N1 a s kovem vázaným v pozici N7. Z těchto důvodů byly podrobeny kvantově-chemickému zkoumání dva elektroneutrální komplexy:

- $\text{Hg}(1,3\text{-DimeU}^- \text{-C5})(9\text{-MeA}^- \text{-N6})$, kde 1,3-DimeU⁻ je 1,3 dimethyl uracilový a 9-MeA⁻ 9-methyladeninový anion s kovem navázaným ve vyznačených pozicích (obr. 5a).
- $\text{trans}-(\text{am})_2\text{Pt}(1\text{-MeC}^- \text{-N4})_2$, kde am = NH_3 nebo CH_3NH_2 , 1-MeC⁻ je methylcytosinový anion s kovem vázaným v pozici N4 (obr. 5b)

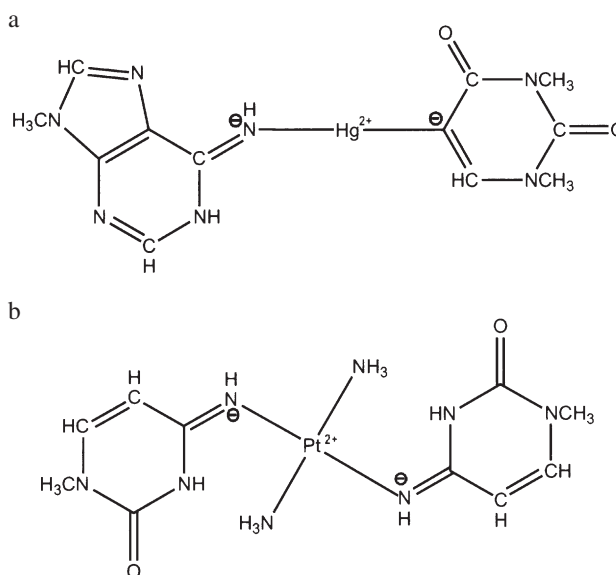
Výpočty⁴¹ prokázaly, že vazba kovu destabilizuje neutrální imino tautomer s úplně deprotonovanou aminoskupinou o 2 až 10 kcal.mol⁻¹. Na druhou stranu má za následek, že protonizační energie aromatického kruhu báze je o 30 až 34 kcal.mol⁻¹ (Pt^{2+}), resp. 10 až 14 kcal.mol⁻¹ (Hg^{2+}) příznivější. Přesně stejný posun protonu byl sledován i v experimentálních studiích. Efekt se nazývá vytvoření metalické formy vzácných imino tautomerů bází nukleových kyselin a může vést ke stabilizaci nesprávných párů. Je zde tedy jistý náznak procesu, který může být odpovědný za mutagenní aktivitu mnohých kovů.

Věřím, že z výše uvedených příkladů je patrné, jak široké možnosti uplatnění má teoretická chemie při výzkumu struktury a chování nukleových kyselin. Zároveň je nutno poznamenat, že v této podoblasti je stále mnoho nevyřešených problémů, které budou vyžadovat realističtější modely a přesnější výpočty.

4. Struktura, funkce a spektroskopické chování vazebných míst kovů v metaloproteinech

Jestliže se dá role přechodných kovů ve fragmentech RNA a DNA stručně charakterizovat jako strukturní, v metaloproteinech k ní přibývá ještě role funkční, kterou dělíme na dvě podskupiny. První podskupina zahrnuje ty systémy, ve kterých se přechodný kov či jeho kation přímo účastní přeměny substrátu, avšak jeho elektronový stav zůstává nezměněn. Druhá podskupina pokrývá zbývající systémy, ve kterých přechodný kov při katalytickém procesu mění své oxidační číslo. Tyto procesy jsou zpravidla spojeny s přenosem elektronu mezi jeho účastníky. Pro větší přehlednost této podkapitoly bude dále zachováno toto dělení, tedy nejprve se zaměříme na strukturní roli přechodných kovů, která úzce souvisí s jejich interakcemi s aminokyselinovými zbytky, dále budou probrány teoretické modely aktivních míst v metaloproteinech první podskupiny a nakonec redoxní procesy v metaloproteinech druhé podskupiny.

Vazebná místa kovů v metaloproteinech mohou vypadat různě. Přesto mají charakteristické rysy, kterými se výrazně odlišují od způsobu vazby kov–krátký peptid. Krátké peptidy interagují s kovy především prostřednictvím koncových skupin, tedy $-\text{COO}^-$ a $-\text{NH}_2$, a tvoří komplexy 1:1, 1:2, případně 1:3 (molární poměr kov:peptid)⁴⁴. Postranní řetězce aminokyselin pak vzniklé komplexy (cheláty) pouze dodatečně stabi-



Obr. 5. **Strukturální vzorce komplexů:** a) $[\text{Hg}(1,3\text{-DimeU}^- \text{-C5})(9\text{-MeA}^- \text{-N6})]$, b) $\text{trans}[\text{Pt}(1\text{-MeC}^- \text{-N4})_2(\text{NH}_3)_2]$, které byly použity jako modelové struktury ve studii týkající se stabilizace vzácných tautomerů vazbou ke kationtu kovu

lizují. Naproti tomu vazba kovu v metaloproteinu se odehrává převážně prostřednictvím postranních řetězců aminokyselin. Ve většině zbylých případů se tvoří vazba prostřednictvím karbonylového kyslíku peptidové vazby a pouze v malém počtu případů se vazby účastní deprotonovaný dusík peptidové vazby či koncové karboxylové a aminové skupiny. Poměr kov:protein je ve vzniklých komplexech téměř výlučně 1:1 (s výjimkou polynukleárních center, kde tento poměr může být i například 2:1).

Z teoretických studií pojednávajících o interakcích volných aminokyselin a malých peptidů s kovy lze uvést práce Hoyaua a Ohanessiana⁴⁵ a de Bruina a spol.⁴⁶ V první z nich autoři studují vazbu volných molekul glycinu, serinu a cysteinu s kationtem Cu^+ . Cílem práce je prozkoumat několik konformačních isomerů a taktéž zwitteriontové formy od každé aminokyseliny a způsob jejich vazby k mědi (I). Jako energeticky nejvýhodnější vychází u glycinu vazba prostřednictvím koncových skupin $-\text{COOH}$ a $-\text{NH}_2$ (bidentátní chelát), která je navíc u serinu a cysteinu doplněna koordinací postranních řetězců $-\text{CH}_2\text{OH}$, resp. $-\text{CH}_2\text{SH}$. V tomto pořadí jsou i jejich vazebné energie: $E_b(\text{Gly}) < E_b(\text{Ser}) < E_b(\text{Cys})$, což je ve shodě s experimentálním pořadím relativních afinit a-aminokyselin k Cu^+ . Pro zajímavost, nejlepší odhad komplexační energie D_0 (tedy včetně zahrnutí energií nulových bodů reaktantů i produktů) získaný výpočtem činí pro glycin 64,3 kcal.mol⁻¹. Je-li tento odhad doplněn výše uvedenou řadou experimentálních relativních afinit, lze získat řadu absolutních afinit, tedy veličiny, které lze posléze přímo porovnávat s experimenty v plynné fázi.

Ve druhé práci⁴⁶ se pak autoři zabývají strukturou a vlastnostmi komplexu bis-(glycinato)- $\text{Cu}^{\text{II}} \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$. Dvě molekuly glycinu se váží ve čtvercově planárním uspořádání (komplex 1:2), dvě zbývající axiální pozice jsou doplněny dvěma molekulami vody. Pomocí DFT/B3LYP metody byla nalezena dvě

minima na povrchu potenciální energie tohoto systému, z nichž jedno odpovídá *trans* (dusíkové a kyslíkové atomy naproti sobě), druhé *cis* konfiguraci (dusík a kyslík vedle sebe). Ve shodě s experimentálními daty vychází, že ve vakuu je *trans* struktura o 18 kcal.mol⁻¹ stabilnější, kdežto v modelovém vodném prostředí se tento rozdíl snižuje na 10 kcal.mol⁻¹. Výsledné geometrie pak do velké míry závisí na počtu vodíkových vazeb mezi karboxyláty, aminoskupinami na jedné straně a zbývajícími dvěma molekulami vody na straně druhé, které soutěží s axiálními interakcemi Cu²⁺...OH₂. Tento poznatek upozorňuje na důležitost ne vazebných interakcí typu ligand–ligand v komplexech přechodných kovů.

Asi nejobecnější práce pojednávající o teoretických výpočtech interakcí mezi všemi aminokyselinovými zbytky schopnými tvořit koordinační vazbu s přechodnými kovy (tedy postranními řetězci obsahujícími kyslík, dusík, síru a fragmenty CH₃CONHCH₃, CH₃CONCH₃, reprezentujícími kyslík a deprotonizovaný dusík peptidové vazby), byla provedena v naší laboratoři²¹. Pro každý z vybrané série kovů (Co²⁺, Ni²⁺, Cu²⁺, Zn²⁺, Cd²⁺, Hg²⁺) byly provedeny výpočty interakčních energií ve čtyřech nejběžnějších koordinačních geometriích (lineární, tetraedické, čtvercově planární a oktaedrické) za účelem kvantitativního vyhodnocení selektivity příslušných aminokyselinových zbytků k vybraným kovům. Výpočty byly provedeny metodou DFT/B3LYP, přičemž interakční energie byla definována jako energie záměny jedné vody v příslušném aquakomplexu [Me(H₂O)_n]²⁺ (*n* je koordinační číslo) za funkční skupinu reprezentující postranní řetězec aminokyseliny. Práce pojednává o třech klíčových faktorech určujících selektivitu vazebného místa pro daný kov. Prvním faktorem je preference kovu pro danou koordinační geometrii, diskutovaná výše. Druhým je optimální velikost dutiny ohraničené *n* donorovými atomy ligandů, která by měla co nejlépe korelovat s iontovým průměrem kovu. Ten se dá odvodit z výpočtu jako průměrná rovnovážná vzdálenost mezi kovem a sérií ligandů, tvořenou v tomto případě aminokyselinovými zbytky. Pro zajímavost, byl nalezen následující bezrozměrný poměr iontových poloměrů kationtů studovaných kovů:

$$r(\text{Co}^{2+}) : r(\text{Ni}^{2+}) : r(\text{Cu}^{2+}) : r(\text{Zn}^{2+}) : r(\text{Cd}^{2+}) : r(\text{Hg}^{2+}) = \\ = 1,01 : 1 : 1 : 1,01 : 1,12 : 1,15$$

Třetím, a patrně nejdůležitějším faktorem je různá afinita přechodných kovů k aminokyselinovým zbytkům. Pojednává o ní semikvantitativní teorie tvrdých a měkkých kyselin a zásad (HSAB, hard and soft acids and bases) Parra a Pearsona. Podle této teorie platí, že čím je u kovu menší poměr poloměr/náboj, tím výrazněji preferuje ligandy stejného charakteru (tedy malé a záporně nabitě) a naopak. Například lze očekávat, že kation Co³⁺ bude preferovat karboxyláty, zatímco Hg₂²⁺ thiolovou skupinu. Je tedy nasnadě tuto afinitu kvantifikovat, k čemuž byly právě použity vypočtené interakční energie a z nich odvozené faktory selektivity. Ve shodě s experimentálními poznatky se zcela přesvědčivě ukázalo, že mezi neutrálními ligandy má nejpříznivější interakční energii histidin, který je také nejhojněji zastoupeným zbytkem účastnícím se vazby na kov v metaloproteinech. Dokonce výpočty ukázaly,

že po vazbě na kov se mění rovnováha mezi jeho isomery. Ve volné formě je energeticky výhodnější 4-methylimidazol, zatímco po vazbě na kov je tomu naopak. To přesně koreluje s četností jejich zastoupení (koordinace prostřednictvím Nε, odpovídající 5-methylimidazolu, je asi dvakrát častější) ve vazebných místech metaloproteinů. Mezi záporně nabitými ligandy vychází nejpříznivější interakční energie pro Cys⁻, následovaném Glu⁻, Asp⁻, Tyr⁻, což opět koreluje s tím, že tyto ligandy jsou na druhém až pátém místě v četnosti zastoupení v metaloproteinech. Přes velkou celkovou afinitu histidinu se však ukázalo, že je ke studovaným kovům velmi málo selektivní. Naopak ligandy obsahující síru (Cys, Met) by měly patřit mezi nejvíce selektivní zbytky.

Po uvedení přehledu prací pojednávajících o interakcích kationtů přechodných kovů s aminokyselinami lze přejít k modelům vazebných míst kovů v metaloproteinech. Jedna z prvních studií týkajících se působení kovu v aktivním místě enzymu pochází z počátku 90. let (cit.⁴⁷). Autoři se zabývají teoretickými výpočty vlastností aktivního místa karboanhydrasy (CA, carbonic anhydrase), enzymu, který posunuje rovnováhu reakce H₂O + CO₂ ↔ H₂CO₃. V nativní formě enzymu je v aktivním místě ion zinku (II), který je vázán ke třem histidinovým zbytkům a výrazně snižuje protonovou afinitu čtvrtého ligandu – hydroxidového iontu, který v reakci vystupuje jako nukleofilní centrum⁴⁸. Experimentální studie ukazují, že zatímco po substituci Zn²⁺ za ion Co²⁺ zůstává aktivita enzymu zachována, ionty Mn²⁺ a Cd²⁺ působí jako katalytické jedy. Cílem studie⁴⁷ je vysvětlení tohoto fenoménu. Byl použit zjednodušený model, kde histidiny byly nahrazeny molekulami amoniaku, a zkoumány tetra- a pentakoordinované komplexy, kde čtvrtá pozice byla obsazena hydroxidovým iontem a pátá molekulou vody. Výpočty prokázaly rozdíly v energetických bilancích pro Co²⁺, Zn²⁺ na jedné straně a Cd²⁺, Mn²⁺ na straně druhé. Pro první dva ionty je výhodnější setrvat v tetraedrickém koordinačním uspořádání s molekulou vody vytlačenu až do druhé solvatační vrstvy, zatímco druhé dva preferují pentakoordinaci s molekulou vody v první koordinační sféře. Tento fakt vede ke zhoršení přístupnosti aktivního místa, tedy hydroxidového iontu pro molekulu CO₂ a ke ztrátě aktivity. Silnější vazba vody k vazebnému místu s Cd²⁺ a Mn²⁺ se dá nazvat inhibičním účinkem.

Dalším zajímavým enzymem je alkoholdehydrogenasa (ADH), která katalyzuje vratnou oxidaci primárních a sekundárních alkoholů a využívá molekuly NAD⁺ jako koenzymu^{49,50}. Ve svém aktivním místě má rovněž zinek (II). Jelikož byla experimentálně provedena řada substitučních studií v aktivním místě enzymu⁵¹, stal se rovněž objektem zájmu teoretických chemiků. Zajímavou prací, pojednávající o substituci zinku (II) za kadmium (II) publikovali Ryde a Hemmingsen⁵². Za účelem interpretace experimentálních dat získaných metodou porušené úhlové korelace γ paprsků byla provedena optimalizace geometrií 11 různých struktur aktivního místa Cd-substituované ADH s koenzymem, bez koenzymu a s dalšími neproteinovými ligandy za pomocí kombinovaných metod QM/MM (quantum mechanics/molecular mechanics). Rovnovážné geometrie nevykazovaly výrazné rozdíly od nativních struktur (samozřejmě až na vzdálenosti kov–ligand), z čehož plyne, že kadmium by mohlo sloužit jako dobrá strukturální

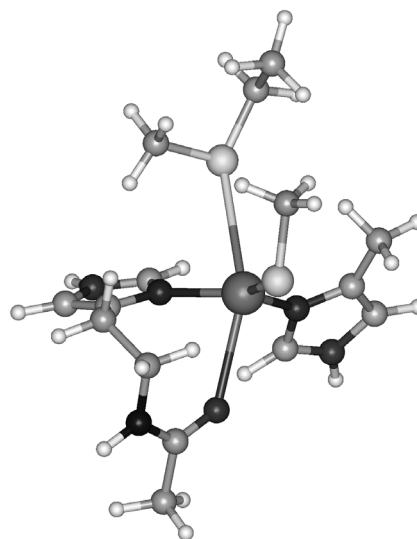
* Tento ligand reprezentuje strukturální molekulu vody při vysokém pH, při kterém enzym působí.

sonda pro koordinační geometrie zinku (II). Velmi dobrá shoda gradientu elektrického pole vypočteného v bodě totožném s jádrem kadmia s experimentální hodnotou pro tetrakoordinovaný komplex potvrzuje, že by se koordinace na iontu kovu neměla při substituci měnit. Důsledkem této shody je potvrzení domněnky, že čtvrtým ligandem tvořícím vazbu s kovem by měl být Glu-68.

Po dvou příkladech metaloenzymů, ve kterých je kov přítomen v katalytickém centru, ale neúčastní se přenosu elektronů, lze přejít k poslední skupině, tedy metaloproteinům obsahujícím redoxní centra. Předem je nutno poznamenat, že tato skupina je zřejmě teoreticky nejobtížnější. Aktivní místa těchto enzymů většinou obsahují více iontů kovu spojených rozličnými strukturními vzory. Někdy se přímo vyskytují vazby typu kov–kov, jindy jsou interakce mezi kovy zprostředkovány thiolátovými, karboxylátovými, či oxo-můstky. Zde je prvním problémem sestavení přijatelného chemického modelu (tedy o velikosti, která nepřesahuje současné možnosti výpočetní chemie) tak, aby byly zachovány všechny podstatné rysy skutečného místa a aby se všechny fyzikálně-chemické procesy odehrály uvnitř modelu. Druhým, neméně obtížným problémem je určení správného elektronového stavu studovaného systému. Díky vazbě nebo alespoň silné interakci mezi kovy (například tzv. (anti)feromagnetické vazbě) jde o netriviální problém a stále ještě existují systémy, kde není uspokojivě vyřešen⁵³. Mnohdy tyto problémy přesahují hranice standardních metod elektronové struktury, a do výpočtu je pak nutné explicitně zahrnout spin-spinovou interakci.

K „jednodušším“ systémům této skupiny patří proteiny typu „blue copper“ (např. nitritreduktasa, pseudoazurin, bazický okurkový protein, plastocyanin), obsahující mononukleární centra. Důležitým procesem je zde oxidace mědi Cu^+ na Cu^{2+} a mezi jejich neobyčejné vlastnosti patří intenzivní modrá barva (pásky u 460 a 600 nm), charakteristická spektra elektronové spinové resonance (ESR), vysoké redoxní potenciály, doprovázené ještě neobvyklou geometrií vazebného místa kovu. Ion mědi je vázán v trigonálním uspořádání (*Cys* a dva *His* ligandy), kdežto v axiálních polohách je slabě vázán *Met* a v některých z nich ještě karbonylový kyslík z proteinové páteře. Na obrázku 6 je znázorněna struktura vazebného místa mědi (II) v jednom ze zástupců této třídy proteinů – azurinu.

Díky výše uvedeným vlastnostem byly tyto proteiny námětem několika teoretických studií^{54–56}. Tyto studie především prokázaly, že struktura modelového místa ve vakuu je téměř identická s krystalovou strukturou proteinu. Tím byly popřeny teorie, které vysvětlovaly tyto vlastnosti pomocí velké rigidity proteinové struktury, nutící ion Cu^{2+} zaujímat identické koordinační uspořádání, jako má ion Cu^+ před oxidací, což mělo mít za následek velký konformační stres ve struktuře. Při hledání alternativního vysvětlení se nejprve hledala odpověď na otázku, proč tyto proteiny preferují trigonální bipyramidální uspořádání, když většina komplexů mědi je čtvercově planárních. Vysvětlení přinesla analýza elektronové struktury, která ukázala, že zatímco vazby σ mezi ligandy a kovem vedou k čtvercově planárnímu uspořádání, π vazby (které lze chápat jako interakce neobsazených *d* orbitalů na atomu síry s obsazenými *d* orbitály atomu kovu) formálně obsazují dvě pozice v koordinační sféře kovu; tedy pro ligandy obsahující atomy síry (*Cys*, *Met*) lze očekávat výrazné odchylky od čtvercově planárního uspořádání. Od porozumění strukturním rysům vede další krok k výpočtu spektroskopických vlastností těchto



Obr. 6. Vazebné místo mědi (II) v azurinu získané z krystalové struktury tohoto enzymu. Třemi ekvatoriálními ligandy jsou dva histidiny a cystein (na obrázku ve vertikálním směru), zatímco v axiálních polohách jsou slabě vázány methionin a peptidový kyslík glycinu sousedícího s histidinem

systémů a jejich vztahu ke struktuře. Elektronová spektra byla vypočtena pomocí metody CASPT2 a šest nejnižších excitací bylo určeno s chybou menší než 1800 cm^{-1} . Díky použití multikonfigurační metody bylo snadné dva píky ve viditelné oblasti spektra interpretovat jako excitace způsobené přenosem náboje mezi cysteinem a mědí: jeden (600 nm) z vazebného π orbitalu a druhý (460 nm) z vazebného σ orbitalu. Poměr jejich intenzit pak závisí na struktuře vazebného místa kovu. Proteiny typu „blue copper“ s trigonální strukturou mají nízký poměr $\epsilon_{460}/\epsilon_{600}$, zatímco u struktur s čtvercově planárním uspořádáním je tomu naopak. Posledním fenoménem, který byl podroben teoretickému zkoumání, jsou redoxní potenciály komplexu. Bylo například prokázáno, že axiální ligandy mají na jejich hodnotu malý vliv, zatímco solvatační efekty jejich hodnotu ovlivňují významným způsobem.

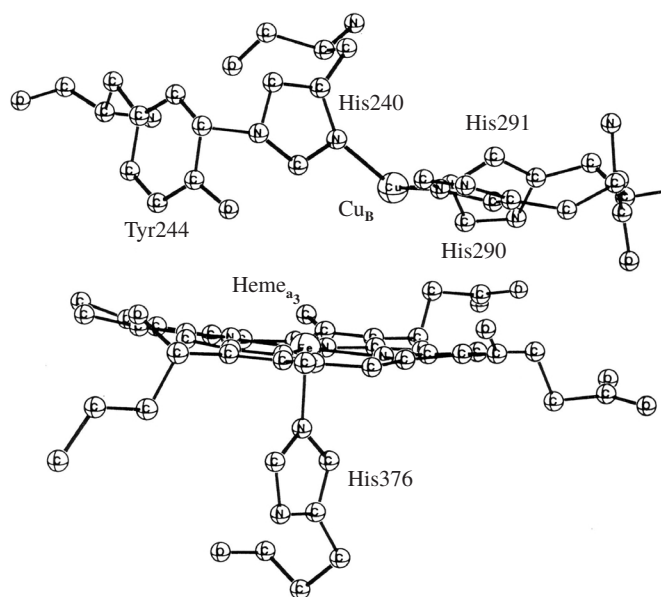
Poslední část této podkapitoly se bude týkat pokroků dosažených při studiu systémů obsahujících více atomů kovu v aktivním místě. Mimo jiné bude na příkladu dvou systémů, cytochromu *c* oxidasy a fotosystému II, demonstrováno použití kvantově-chemických metod pro vysvětlení reakčních mechanismů v systémech, kde dochází k přenosu elektronů.

Cytochrom *c* oxidasa (CcO) zprostředkovává redukcí O_2 na vodu, přičemž získaná energie je uložena ve formě ATP. Při tomto procesu nastává relativně komplikovaný tok elektronů a protonů, jehož detailní znalost je nutná k tomu, aby se vůbec mohlo začít s výpočty. Vlastní reakce probíhá v binukleárním centru se dvěma atomy kovů, mědi vázanou ke třem histidinům a železu obsaženému v hemové jednotce a_3 , ke kterému se v axiální poloze váže ještě jeden histidin. Struktura tohoto komplikovaného centra je znázorněna na obrázku 7.

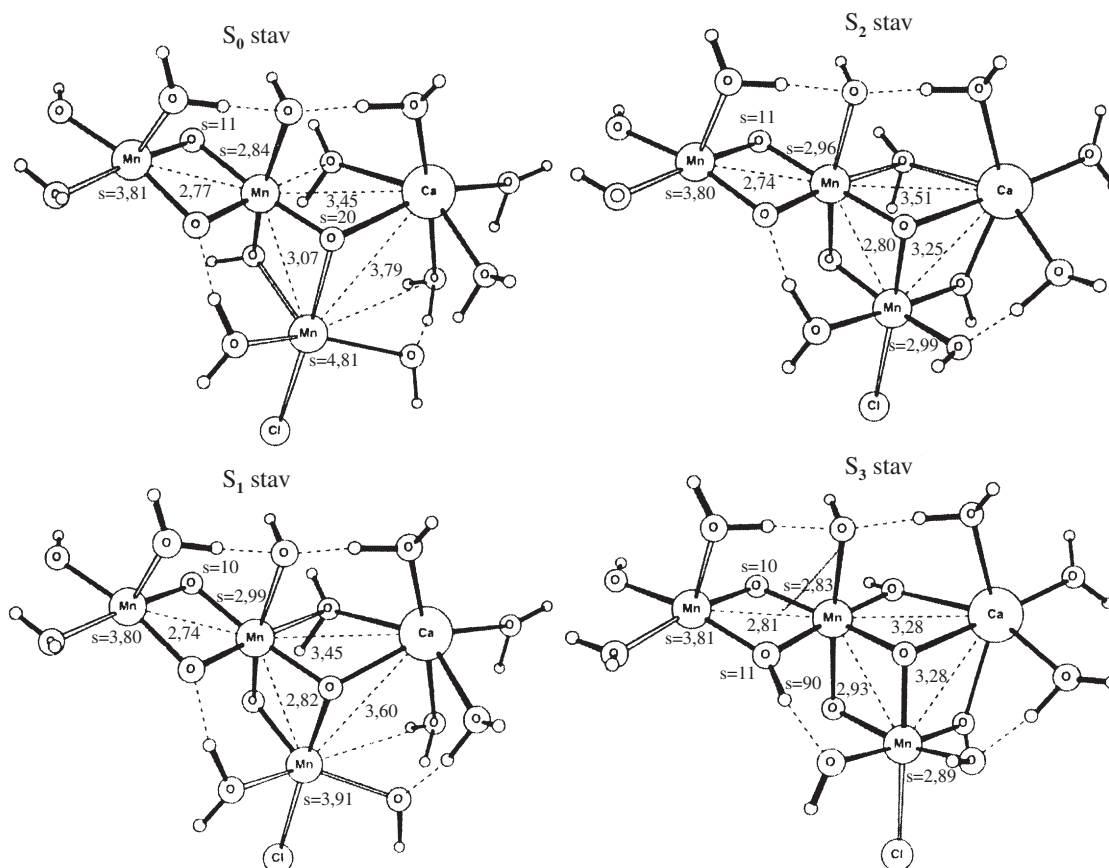
Stav centra před reakcí je Cu (I)–Fe (II) a po reakci se mění na Cu (II)–Fe (III). Zbývající dva elektrony, potřebné k plné redukcí O_2 , přicházejí ze sousedního hemu_a. Tento základní model byl použit při kvantově-chemickém studiu⁵⁷, přičemž

je známo, že reakční mechanismus musí splňovat tato kritéria: *i)* každý reakční krok musí být přibližně termoneutrální, aby se energie nevyplývala ve formě tepla; *ii)* nesmějí být přítom-

ny vysoké energetické bariéry pro tvorbu meziproduktů a tranzitní stavy; *iii)* reakce musí především zvyšovat elektronovou afinitu aktivního místa.



Obr. 7. Struktura binukleárního centra Cu-Fe v katalytickém místě cytochrom *c* oxidasy⁵⁷



Obr. 8. Modelové struktury jednotlivých stavů S₀ až S₃ v katalytickém centru WOC⁶⁵

První krok ve složitě kaskádě následných dějů je aktivace molekuly O_2 vazbou na Fe (II) v hemu. Kyslík je zde velmi slabě vázán, jak vyplývá z vypočtené hodnoty vazebné energie (2 kcal.mol^{-1}) (cit.⁵⁸). Druhým krokem je vznik komplexu, který byl z optických spekter interpretován jako (porf)Fe(III)–O–OH (cit.⁵⁹). Proton pochází z molekuly vody slabě vázané na druhé centrum, Cu (I). Ve stejné chvíli je zároveň přenesen elektron z mědi a výsledkem tohoto druhého kroku je stav Fe (III)–O–OH + Cu (II)OH. Tato reakce je endotermická (6 kcal.mol^{-1}). Třetí krok je rozštěpení O–O vazby a vznik oxoferrylového meziprojektu (porf)Fe (IV) = O. Existují rozpory, zdali k tomuto procesu dochází před nebo po příchodu třetího elektronu ze sousedního hemu. Zde se naskytá možnost, jak kvantově-chemickým výpočtem rozhodnout mezi těmito dvěma hypotézami. Byly proto vypočteny hodnoty reakčních energií pro obě možnosti (6 kcal.mol^{-1} a 30 kcal.mol^{-1}). Jelikož ve druhém případě je reakce příliš exotermická a přebytek energie by se vyotřeboval na tvorbu tepla, musí ke štěpení dojít před příchodem třetího elektronu. Reakční energie je využita ke zvýšení elektronové afinity binukleárního centra, která je vlastní hnací silou pro přenos elektronu. Po rozštěpení O–O vazby je proces dokončen transportem protonů, jejichž cesty jsou známy, na O^{2-} (cit.⁶⁰).

Podstatně těžší je výzkum reakčního mechanismu v komplexu oxidujícím vodu (WOC, water oxidizing complex) ve fotosystému II. Při této unikátní reakci je energie čtyř světelných fotonů přeměněna v energii chemickou za vzniku molekuly O_2 . Ač je výzkumu tohoto systému věnováno nesmírné úsilí, stále panuje mnoho nejistot okolo jednotlivých kroků v procesu. Zároveň však představuje jednu z největších výzev v dnešní chemii⁶¹. Velkým problémem je fakt, že dosud nebyla vyřešena krystalová struktura komplexu, což činí jakékoliv detailní předpovědi mimořádně obtížnými. Pro počáteční výpočty se však jeví jako dostatečné informace, které podávají měření EXAFS. Je tedy známo, že WOC obsahuje čtyři atomy manganu a též zřejmě vápník a chloridový anion. Oxidace vody probíhá ve čtyřech krocích⁶². Meziprojektu se označují S_0 až S_4 , z nichž struktury S_0 až S_3 jsou znázorněny na obrázku 8.

Základním stavem před reakcí je S_1 . V každém kroku vede absorpce fotonu k separaci náboje, proton i elektron pak každý zvlášť opouští WOC. Jedna ze studií provedených metodou DFT/B3LYP testovala hypotézu, že jedním z úkolů tyrosinu, který v každém S stavu vystupuje jako tyrosylový radikál, je odebrání vodíkových atomů z ligandů vody a hydroxidu v klastru manganu⁶³. Výpočty bylo prokázáno, že takový proces je možný, tedy síla vazby O–H v molekule vody a hydroxylu koordinovaném k manganu je přibližně stejná jako ve volném tyrosinu. V dalším studiu byl učiněn pokus modelovat celou sekvenci událostí za použití pouze jednoho manganového centra⁶⁴. Nejdůležitějším poznatkem byl fakt, že pro typické redoxní reakce ve slabém ligandovém poli je nesmírně důležitá poloha excitovaných stavů před a po reakci. Buď excitovaný stav reaktantu, korespondující se základním stavem produktu, nebo excitovaný stav produktu, korespondující se základním stavem reaktantu, musí ležet dostatečně nízko. V případě oxidace vody to znamená, že nejprve musí být v S_3 stavu vytvořen radikál kyslíku a teprve poté může dojít k vytvoření O_2 . V nejnovější studii⁶⁵ je již zkoumán model obsahující všechny atomy manganu spojené oxo- můstky. Z výsledků výpočtů lze usuzovat, že pouze jeden z atomů manganu vykazuje redoxní aktivitu. Vápník má roli silně chelatajícího

kofaktoru, který napomáhá vytvoření nezbytného radikálu kyslíku. Vlastní tvorba vazby O–O by pak mohla probíhat v nekompletní kubanové struktuře (s jedním chybějícím vrcholem), z nichž ve dvou vrcholech jsou atomy manganu a v jednom ion vápníku, zbylé jsou pak tvořeny oxo- můstky. Externí molekula vody, která poskytuje druhý kyslík, vstupuje právě do tohoto volného rohu. Tyto výsledky jsou ve shodě s experimenty EXAFS. Ač se tyto teoretické studie zatím zabývají modelovými strukturami, je obdivuhodné, jakým způsobem pomáhají skládat z neúplných střípků experimentálních informací výsledný obraz.

5. Perspektivy kvantové bioanorganické chemie

V referátu byl prezentován průřez studii, týkajícími se interakcí přechodných kovů a jejich kationtů s molekulami RNA/DNA, aminokyselinami, peptidy a proteiny. Důraz byl kladen ne tak na úplnost výčtu všech prací z této oblasti, jako spíše na podrobnější rozebrání některých příkladů. Věřím, že byly srozumitelně vysvětleny postupy, které se při teoretickém studiu používají. Přestože je zatím studium vazebných míst kovů v biomolekulách v počátcích, dosažené výsledky jsou optimistické.

Pro větší úplnost tohoto referátu bych si dovilil připomenout, že i v relativně mladé oblasti, jakou je kvantová bioanorganická chemie, již byla napsána řada souhrnných článků. V těch lze nalézt mnoho informací komplementárních nebo částečně se překrývajících s obsahem referátu. Kromě monografií citovaných v předešlém článku¹, které shrnují jak experimentální, tak teoretické znalosti o přechodných kovech v biologických systémech, lze poukázat na souhrnné práce Zieglerovy z první poloviny 90. let^{66,67}, ve kterých popisuje první úspěšné výpočty pomocí metod DFT a ukazuje jednoduché prostředky umožňující analýzu vlnové funkce (nebo matice elektronové hustoty) v pojmech bližších chemickému uvažování. Rovněž z počátku 90. let je Veillardova práce⁶⁸, v níž shrnuje výpočty struktury a vlastností organokovových sloučenin. Cory a Zerner⁶⁹ shrnují studie týkající se elektronové výměny mezi kovem a ligandem, která má význam ve spektroskopii těchto systémů. Velmi srozumitelná širokému okruhu chemiků se mi jeví práce Deetheho⁷⁰, která se snaží v jednoduchých pojmech popsat výpočetní chemii pro systémy s přechodnými kovy. Z konce 90. let je práce Comby⁷¹, ve které se zabývá možnostmi (byť omezenými) empirických metod (založených na empirických meziatomových potenciálech, tzv. force fields) pro studia přechodných kovů. Dospívá k závěru, že hlavním přínosem je možnost určit energetickou výhodnost či nevýhodnost pre-organizace daného vazebného místa pro kov. Stručný přehled, který publikoval Chermette⁷², shrnuje rozsah aplikací metod DFT pro komplexy přechodných kovů (vazebné energie, molekulové struktury, plochy potenciální energie a reakční profily, ionizační potenciály, elektronové afinity, vibrační frekvence, UV-VIS spektroskopie, ESR, NMR). Mnoho informací o přechodných kovech lze také nalézt v rozsáhlé encyklopedii výpočetní chemie⁷³. Z poslední doby jsou souhrnné články Niu a Halla⁶ o reakcích přechodných kovů (obzvláště organokovových systémů majících velký význam pro homogenní katalýzu), Loewové a Harrise⁷⁴ o roli hemového aktivního místa a proteinového okolí pro strukturu, spektra a funkci cytochromu P450, Siegbahna

a Blombergov⁵⁷ o teoretických studiích reakčních mechanismů metaloproteinů. Dedieu⁷⁵ pak podává kompletní přehled o kvantové chemii paladia a platiny, Hush a Reimers⁷⁶ shrnují vliv solvatačních efektů na elektronová spektra komplexů přechodných kovů a konečně lze odkázat na velmi instruktivní a poučnou souhrnnou práci Frenkinga a Fröhlicha⁷⁷, pojednávající o charakteru rozličných typů vazeb mezi přechodnými kovy a ligandy.

Nyní lze přejít k vlastnímu tématu této kapitoly, tedy nastínění dalších perspektiv kvantové bioorganické chemie. Jak bylo zmíněno, tento obor je relativně mladý, a přes četné úspěchy při popisu struktur biomolekul obsahujících přechodné kovy jsme v našich snaženích spíše na začátku, než v dohledu bezrozporných vysvětlení chemických procesů v těchto systémech. Základní otázkou zůstává, proč si příroda k plnění svých úkolů vybírá konkrétní přechodné kovy a jsme-li schopni technickými prostředky přírodní procesy napodobit a využít. Tomu ale musí předcházet důkladné porozumění. Zde vidím i do budoucna největší přínos teoretických studií. Zdá se mi, že v současné době nastává v chemii rovnováha mezi teoretickým a experimentálním snažením tak, jak byla popsána v předešlém článku¹. Proces kladení otázek a hledání odpovědí vedoucích k odhalování přírodních zákonitostí se stává víceúrovňovým a závislým na jejich těsném spojení. Konkrétně mnozí experimentální chemici oceňují, když teorie napovídá, jak daný experiment uspořádat a na co je potřeba zaměřit pozornost při analýze výsledků tak, aby bylo odděleno náhodné a zkreslující od zákonitého⁷⁸. O tom, jak je přesný a dobře provedený experiment důležitý pro teorii, není třeba mluvit.

Příští vývoj v kvantové bioorganické chemii se dá předpovědět jak přímou extrapolací současných trendů do budoucna, tak i odhadem, jaké problémy budou námětem teoretického zkoumání. Co se týče přímé extrapolace, lze očekávat, že vývoj výpočetní techniky bude pokračovat nezpomaleným tempem, tedy umožní provádění přesnějších výpočtů a studií větších systémů. Vedle toho lze očekávat další rozvoj hybridních metod typu QMMM nebo solvatačních metod, které posunou studované systémy blíže k experimentálnímu uspořádání (dle terminologie referátů vylepší chemický model). Rovněž ve vlastní metodologii *ab initio* výpočtů lze očekávat nové algoritmy, jejichž cílem bude vylepšení efektivity výpočtu při zachování přesnosti. Ideálem je dosáhnout lineárního růstu náročnosti výpočtu s růstem systému – $O(n)$. Vyjmenuji tři aktuální trendy, které se jeví velmi slibné pro přesnost a rychlost výpočtů. Prvním jsou tzv. lokální korelační metody⁷⁹ předpokládající, že korelační efekty (bez jejichž zahrnutí jsou výpočty na systémech přechodných kovů téměř bezcenné) klesají úměrně r^{-6} , kde r je vzdálenost mezi elektrony (přesněji mezi atomy, pohyb jejichž elektronů koreluje). Jinými slovy, bez velké ztráty přesnosti ve výpočtu lze zanedbat korelaci dvou elektronů, které se nacházejí na opačných koncích větších molekul. Musí být ale splněna podmínka, že lze provést účinnou lokalizaci molekulových orbitalů, a tedy elektronům formálně přisoudit jejich přibližnou polohu v molekule, což ale není u všech chemických systémů proveditelné. Druhým trendem jsou výpočty metodou Monte Carlo⁸⁰ aplikované na řešení elektronového problému, tzv. kvantové MC. Ač je růst této metody přibližně $O(n^5)$, představuje vlastně jeden z přístupů k přímému numerickému řešení Schrödingerovy rovnice, tedy nalezení přesné nerelati-

vistické energie elektronových stavů molekuly. Dříve se zdálo, že oblast použití zůstane omezena na velmi malé systémy, avšak dnes lze počítat i systémy obsahující až dvacet atomů. Třetím přístupem, který je velmi vhodný pro velké systémy a mohl by zanedlouho konkurovat empirickým potenciálům, je tzv. metoda DFT Tight-Binding⁸¹, která provádí řádný výpočet DFT pouze pro atomy přímo spojené vazbou a aproximuje ostatní příspěvky. Je samozřejmě nutné vyzkoušet přijatelnost této aproximace na jednodušších systémech stejného typu, jaký bude námětem cílové studie. V současné chvíli se výpočetní náročnost této metody jeví srovnatelná se semiempirickými výpočty, poskytuje však výrazně přesnější a obecněji použitelné výsledky.

Co se týče konkrétních oblastí v oboru a formulace problémů, očekávám stále větší prosazování výpočtů na větších systémech, které budou blíže konkrétnímu uspořádání v metaloproteinu, fragmentu DNA atp. Budou viditelné jemnější rozdíly v chování těchto systémů ve srovnání s malými molekulami, které doposud sloužily jako jejich modely. Stále asi budou středem zájmu jednotlivé složky fotosyntézy, dále základní metabolické procesy, jichž se účastní přechodné kovy, interakce iontů kovů s RNA, DNA a jejich význam při přenosu genetické informace. Na těchto systémech se kromě klasických kvantově-chemických výpočtů budou provádět molekulárně dynamické studie s potenciálem *ab initio* (Carova-Parrinellova metoda), pro které je extrapolace do budoucna přímočará. Jsme-li dnes na určitém systému schopni provést simulaci zachycující evoluci systému po dobu řekněme 1 ps (tedy 1000 kroků s integračním krokem 1 fs), desetinasobný vzrůst výpočetního výkonu nám za jinak stejných podmínek umožní provést 10 ps simulaci, která už může být schopna zachytit rychlé procesy v systému, tisícinásobný vzrůst (rok 2010?) nás přenesou do nanosekundové oblasti, kde by již mohly být popsány například rychlé konformační změny po nějakém iniciačním procesu (přenos protonu, fotoexcitace).

Kvantová bioorganická chemie patří k oborům, které budou v příštích letech upoutávat pozornost stále většího počtu (nejen) kvantových chemiků.

6. Závěr

V předchozí kapitole jsem prezentoval svůj mírně optimistický pohled na další vývoj oboru. Závěrem bych chtěl vyslovit ale i určité varování. Jako v dalších oblastech výzkumu, také v aplikované kvantové chemii se prosazují programy, které mají sloužit jako „černé skříňky“, které od uživatele vyžadují pouze povrchní znalost problému a tváří se, že je to vše, co potřebuje k provádění výpočtů. Navíc jsou některé z těchto programů velmi komerční, přičemž například pro přechodné kovy chybějí parametry do empirických potenciálů, a to proto, že obecnou parametrizaci téměř nelze provést. Místo toho se doplňují jakési generické parametry, což vede k tomu, že výpočtem získané výsledky jsou téměř bezcenné. Nechci odrazovat zájemce o kvantovou bioorganickou chemii, musím ale upozornit, že za kvalitními výsledky z této oblasti stojí roky poctivé práce a sbírání zkušeností.

Autor děkuje za podporu projektu LN00A032 Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy České republiky (Výzkumné centrum komplexních molekulových systémů a biomolekul)

a grantům 203/01/0832 (GA ČR) a A4055103/01 (GA AV ČR).
RNDr. Zdeňku Havlasovi, DrSc. pak děkuji za pečlivé přečtení
rukopisu.

LITERATURA

- Rulíšek L.: Chem. Listy 95, 796 (2001).
- Dewar M. S. J.: Bull. Soc. Chim. Fr. 18, C71 (1951).
- Chatt J., Duncanson L. A.: J. Chem. Soc. 1953, 2939.
- Volbeda A., Charon M. H., Piras C., Hatchikian E. C., Frey M., Fontecilla-Camps J. C.: Nature 373, 580 (1995).
- Happe R. P., Roseboom W., Pierik A. J., Albracht S. P. J., Bagley K. A.: Nature 385, 126 (1997).
- Niu S., Hall M. B.: Chem. Rev. 100, 353 (2000).
- Torrent M., Solà M., Frenking G.: Chem. Rev. 100, 439 (2000).
- Åkesson R., Pettersson L. G. M., Sandström M., Siegbahn P. E. M., Wahlgren U.: J. Phys. Chem. 96, 10773 (1992).
- Åkesson R., Pettersson L. G. M., Sandström M., Wahlgren U.: J. Am. Chem. Soc. 116, 8691 (1994).
- Bethe H. A.: Ann. Phys. (Leipzig) 3, 133 (1972).
- Langdorf C. H., Gray H. B.: Ligand Substitution Dynamics. Benjamin, New York 1965.
- Åkesson R., Pettersson L. G. M., Sandström M., Wahlgren U.: J. Am. Chem. Soc. 116, 8705 (1994).
- Rotzinger F. P.: J. Am. Chem. Soc. 119, 5230 (1997).
- Baes C. F., Jr., Mesmer R. E.: The Hydrolysis of Cations. Wiley, New York 1976.
- Cotton F. A., Wilkinson G.: Advanced Inorganic Chemistry. Wiley, New York 1980.
- Blomberg M. R. A., Siegbahn P. E. M.: Theor. Chem. Acc. 97, 72 (1997).
- Shi S., Staemmler V.: Phys. Rev. B 52, 12345 (1995).
- Gilson H. S. R., Krauss M.: J. Phys. Chem. A 102, 6525 (1998).
- Rulíšek L., Havlas Z.: J. Chem. Phys. 112, 149 (2000).
- Pavlov M., Siegbahn P. E. M., Sandström M.: J. Phys. Chem. A 102, 219 (1998).
- Rulíšek L., Havlas Z.: J. Am. Chem. Soc. 122, 10428 (2000).
- Rulíšek L., Vondrášek J.: J. Inorg. Biochem. 71, 115 (1998).
- Taketsugu T., Gordon M. S.: J. Chem. Phys. 106, 8504 (1997).
- Fournier R.: Theor. Chim. Acta 91, 129 (1995).
- Langhoff S. R., Bauschlicher C. W., Jr., Partridge H., Sodupe M.: J. Phys. Chem. 95, 10677 (1991).
- Luna A., Amekraz B., Tortajada J.: Chem. Phys. Lett. 266, 31 (1997).
- Pápai I.: J. Chem. Phys. 103, 1860 (1995).
- Fournier R.: J. Chem. Phys. 102, 5396 (1995).
- Newton M. D.: J. Phys. Chem. 95, 30 (1991).
- Ryde U.: Biophys. J. 77, 2777 (1999).
- Sigel A., Sigel H., ed.: Metal Ions in Biological Systems, sv. 32, Interactions of Metal Ions with Nucleotides, Nucleic Acids, and Their Constituents. Marcel Dekker, New York 1996.
- Cowan J. A.: Inorganic Biochemistry, An Introduction. VCH Publishers, New York 1993.
- Sigel H.: Chem. Soc. Rev. 22, 255 (1993).
- Nickol J., Rau D. C.: J. Mol. Biol. 228, 1115 (1992).
- Bernues J., Azorin F., v knize: Nucleic Acids and Molecular Biology (Eckstein F., Lilley D. M., ed.), sv. 9, str. 1. Springer-Verlag, Berlin 1995.
- Lippert B. (ed.): Cisplatin. Chemistry and Biochemistry of Leading Anticancer Drug. Wiley-VCH, Zürich 1999.
- Šponer J., Burda J. V., Sabat M., Leszczynski J., Hobza P.: J. Phys. Chem. A 102, 5951 (1998).
- Šponer J., Sabat M., Burda J. V., Leszczynski J., Hobza P.: J. Phys. Chem. B 103, 2528 (1999).
- Šponer J., Sabat M., Gorb L., Leszczynski J., Lippert B., Hobza P.: J. Phys. Chem. B 104, 7535 (2000).
- Bock C. W., Katz K. A., Glusker J. P.: J. Am. Chem. Soc. 117, 3754 (1995).
- Šponer J., Šponer J. E., Gorb L., Leszczynski J., Lippert B.: J. Phys. Chem. A 103, 11406 (1999).
- Song B., Zhao J., Griesser R., Meiser C., Sigel H., Lippert B.: Chem. Eur. J. 5, 2374 (1999).
- Schröder G., Lippert B., Sabat M., Lock C. J. L., Faggiani R., Song B., Sigel H.: J. Chem. Soc., Dalton Trans. 1995, 3767.
- Pettit L. D., Robbins R. A., v knize: Handbook of Metal-Ligand Interactions in Biological Fluids (Berthon G., ed.), sv. 1, str. 648. Marcel Dekker, New York 1995.
- Hoyau S., Ohanessian G.: J. Am. Chem. Soc. 119, 2016 (1997).
- deBruin T. J. M., Marcelis A. T. M., Zuilhof H., Sudhölter E. J. R.: Phys. Chem. Chem. Phys. 1, 4157 (1999).
- Garmer D. R., Krauss M.: J. Am. Chem. Soc. 114, 6487 (1992).
- Silverman D. N., Lindskog S.: Acc. Chem. Res. 21, 30 (1988).
- Petterson G.: CRC Crit. Rev. Biochem. 21, 349 (1987).
- Eklund H., Brändén C. I., v knize: Zinc Enzymes (Spiro T. G., ed.), str. 124. Wiley, New York 1983.
- Bill E., Haas C., Ding X.-O., Maret W., Winkler H., Trautwein A. X., Zeppezauer M.: Eur. J. Biochem. 180, 111 (1989).
- Ryde U., Hemmingsen L.: J. Biol. Inorg. Chem. 2, 567 (1997).
- Ceulemans A., Chibotaru L. F., Heylen G. A., Pierloot K., Vanquickenborne L. G.: Chem. Rev. 100, 787 (2000).
- Olsson M. H. M., Ryde U., Roos B. O., Pierloot K.: J. Biol. Inorg. Chem. 3, 109 (1998).
- Pierloot K., De Kerpel J. O. A., Ryde U., Olsson M. H. M., Roos B. O.: J. Am. Chem. Soc. 120, 13156 (1998).
- Olsson M. H. M., Ryde U., Roos B. O.: Protein Sci. 7, 2659 (1998).
- Siegbahn P. E. M., Blomberg M. R. A.: Chem. Rev. 100, 421 (2000).
- Ferguson-Miller S., Babcock G. T.: Chem. Rev. 96, 2889 (1996).
- Babcock G. T., Wikström M.: Nature 356, 301 (1992).
- Wikström M.: Biochem. Biophys. Acta 1365, 185 (1998).
- Yachandra V. K., Sauer K., Klein M. P.: Chem. Rev. 96, 2927 (1996).
- Kok B., Forbush B., McGloin M.: Photochem. Photobiol. 11, 457 (1970).
- Blomberg M. R. A., Siegbahn P. E. M., Styring S., Babcock G. T., Åkermark B., Korall P.: J. Am. Chem. Soc. 119, 8285 (1997).

64. Siegbahn P. E. M., Crabtree R. H.: *J. Am. Chem. Soc.* **121**, 117 (1999).
65. Siegbahn P. E. M.: *Inorg. Chem.* **39**, 2923 (2000).
66. Ziegler T.: *Chem. Rev.* **91**, 651 (1991).
67. Ziegler T.: *Can. J. Chem.* **73**, 743 (1995).
68. Veillard A.: *Chem. Rev.* **91**, 743 (1991).
69. Cory M. G., Zerner M. C.: *Chem. Rev.* **91**, 813 (1991).
70. Deeth R. J.: *Coord. Chem.* **82**, 1 (1995).
71. Comba P.: *Coord. Chem. Rev.* **185–186**, 81 (1999).
72. Chermette H.: *Coord. Chem. Rev.* **178–180**, 691 (1998).
73. Schleyer P. v. R., Allinger N. R., Clark T., Gasteiger J., Kollman P. A., Schaefer H. F., III, Schreiner P. R. (ed.): *Encyclopedia of Computational Chemistry*. Wiley, Chichester 1998.
74. Loew G. H., Harris D. L.: *Chem. Rev.* **100**, 407 (2000).
75. Dediue A.: *Chem. Rev.* **100**, 543 (2000).
76. Hush N. S., Reimers J. R.: *Chem. Rev.* **100**, 775 (2000).
77. Frenking G., Fröhlich N.: *Chem. Rev.* **100**, 717 (2000).
78. Doyle A. C.: *Sherlock Holmes: The Complete Illustrated Short Stories*. Chancellor Press, London 1985.
79. Schütz M., Werner H.-J.: *Chem. Phys. Lett.* **318**, 370 (2000).
80. Anderson J. B.: *J. Chem. Phys.* **112**, 9699 (2000).
81. Han W. G., Elstner M., Jalkanen K. J., Frauenheim T., Suhai S.: *Int. J. Quant. Chem.* **78**, 459 (2000).

L. Rulišek (*Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague*):
Theoretical Studies of the Interactions of Transition Metals with Biomolecules

Theoretical studies of various aspects of interactions of transition metal (TM) ions with biomolecules make it possible to analyze the principles governing the fundamental chemical processes, in which they participate, at the atomic or even electronic level. We present a concise review of the recent achievements in the field of quantum bioinorganic chemistry, i.e. the studies dealing with the structure and energetics of TM-containing systems of biological relevance. In the first part, the interactions of TM ions with smaller molecules are analyzed, since they constitute the elementary knowledge that helps understand more complex systems. Then, the work in the field of interactions of TM ions with nucleic acids and their components is briefly summarized. In the third part, we focus on structure, function, and spectroscopic behaviour of metal-binding sites in metalloproteins and, finally, the perspectives of quantum bioinorganic chemistry are outlined.

**POKROKY V CHROMATOGRÁFII
 A ELEKTROFORÉZE 2002
 &
 CHIRANAL 2002**



CHIRANAL



OLMOUC

24. AŽ 27. ČERVNA 2002

REGULACE STABILITY A AKTIVITY NÁDOROVÉHO SUPRESORU p53

STJEPAN ULDRIJAN, VLADIMÍR KOTALA
a BOŘIVOJ VOJTĚSEK

Oddělení experimentální onkologie, Masarykův onkologický ústav, Žlutý kopec 7, 656 53 Brno, e-mail: uldrijan@atlas.cz, kotala@mou.cz, vojtesek@mou.cz

Došlo dne 26.III.2001

Klíčová slova: p53, stabilita, aktivita

Obsah

1. Úvod
2. Regulace stability p53
3. Regulace aktivity p53
4. Stabilizátory a aktivátory p53 v terapii nádorových onemocnění
5. Závěr

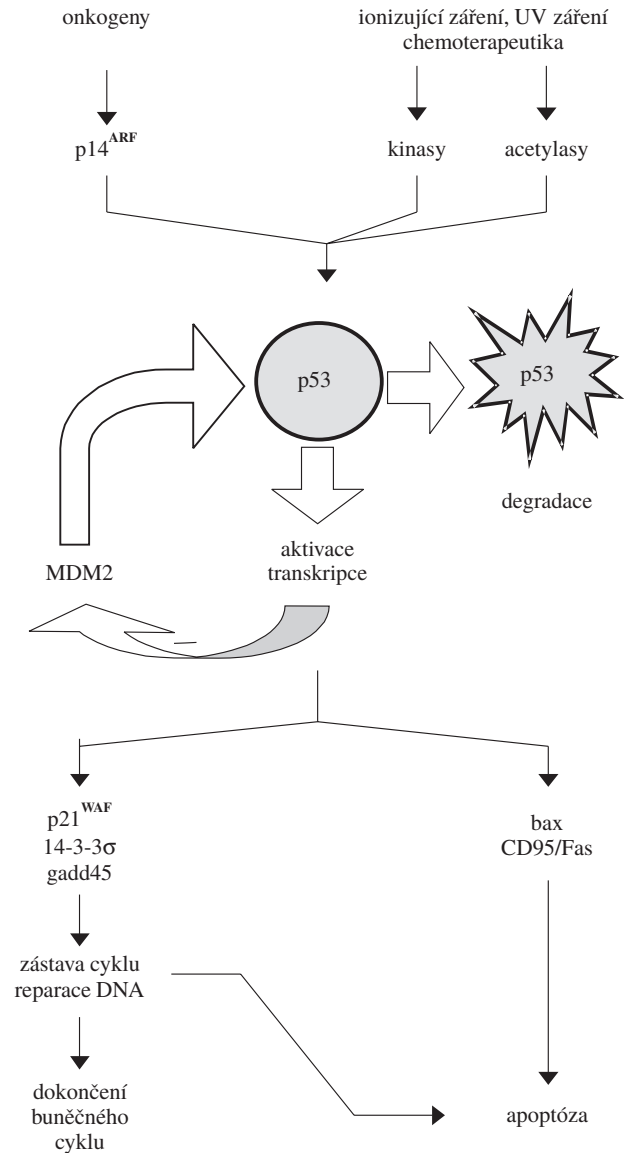
1. Úvod

Během více než dvaceti let, která uběhla od objevení p53 v roce 1979, se protein p53 stal nejintenzivněji studovaným objektem výzkumu v oblasti molekulární onkologie. Významně k tomu přispěla jeho schopnost působit proti nádorové transformaci buňky a také zjištění, že u více než poloviny lidských nádorů dochází k delecí nebo mutaci genu p53. Lidský protein p53, fungující jako jaderný transkripční faktor, je tvořen 393 aminokyselinami a obsahuje 4 hlavní funkční domény. Mutace p53 v nádorových buňkách nejčastěji postihují centrální oblast proteinu, která je nutná pro sekvenčně specifickou vazbu na cílové sekvence DNA. N-konec proteinu obsahuje doménu aktivující transkripci cílových genů a na C-konci se nachází oligomerizační a regulační doména.

Protein p53 je považován za jeden z nejdůležitějších regulátorů odpovědi na nejrůznější formy buněčného stresu (obr. 1). Podílí se na řízení řady buněčných procesů, počínaje zástavou buněčného cyklu, přes inhibici replikace DNA, řízení diferenciace, regulaci transkripce a reparace DNA, udržování stability genomu až po indukci programované buněčné smrti, tzv. apoptózy. Pro supresi nádorového růstu je zvláště významná jeho schopnost řídit reakci buňky na poškození dědičné informace uložené v DNA. Po poškození DNA vyvolá protein p53 zástavu buněčného cyklu v G1 nebo G2 fázi, čímž je umožněna oprava poškozené DNA. V případě rozsáhlého poškození, které nelze opravit, indukuje protein p53 apoptózu, a tím zabrání přenosu poškozené genetické informace do dceřiných buněk.

Většina buněčných procesů řízených p53 závisí na jeho schopnosti aktivovat transkripci cílových genů. Pro účinnou aktivaci transkripce je nutné, aby vznikl tetramer p53, který se

v promotorech cílových genů váže na dvě po sobě následující sekvence 5'PuPuPuC^{A/T}/T^AGPyPyPy 3' (Pu – purinová báze, Py – pyrimidinová báze), které mohou být odděleny až 13 páry



Obr. 1. V normální buňce indukuje protein p53 expresi proteinu MDM2, který blokuje jeho transkripční aktivitu a zároveň stimuluje jeho degradaci. Vzniká tak zpětnovazebná regulační smyčka, která je v nestresované buňce schopna udržovat velmi nízkou hladinu neaktivního proteinu p53. Ke stabilizaci a aktivaci p53 dochází působením různých stresových faktorů, např. poškozením DNA (účinkem UV nebo ionizujícího záření, chemoterapeutik apod.) nebo aktivací onkogenů. Aktivní p53 indukuje transkripci cílových genů, jejichž produkty buď zastaví buněčný cyklus, aby mohlo dojít k opravě poškozené DNA, nebo spustí, v případě rozsáhlého poškození dědičné informace, programovanou buněčnou smrt (apoptózu)

Tabulka I
Regulátory buněčného cyklu a apoptózy indukované proteinem p53

| Transkripce aktivována p53 | Funkce produktu | Výsledek indukce |
|----------------------------|---|------------------------------------|
| p21 ^{WAF1} | inhibitor CDK | zástava b. cyklu (G1, G2/M) |
| MDM2 | vazba na p53, ubikvitin ligasa | inhibice aktivity a degradace p53 |
| EGF-R | receptor EGF | zástava b. cyklu |
| gadd45 | interakce s CDK1, reparace DNA, vazba na PCNA | zástava b. cyklu |
| 14-3-3σ | regulační protein, váže se na p53, CDC25C | zástava b. cyklu (G2/M) |
| Bax | dimerizace s Bcl-2 | podporuje apoptózu |
| BCL-xL | kompetuje s Bax ve vazbě na Bcl-2 | inhibice apoptózy |
| CD95/APO1/Fas | membránový receptor pro CD95L | indukce apoptózy po vazbě CD95L |
| IGF-BP3 | váže IGF (insulin-like growth factor) | apoptóza nebo zástava b. cyklu |
| PIG3 | regulace odpovědi na oxidativní stres | apoptóza nebo zástava b. cyklu |
| p53R2 | podjednotka ribonukleotid reduktasy | zástava cyklu (G2/M), reparace DNA |

bází. V tab. I je uveden výběr regulátorů buněčného cyklu a apoptózy, jejichž exprese je transkripčně aktivována proteinem p53 (cit.¹⁻³). Kromě aktivace transkripce se p53 podílí také na negativní regulaci transkripce mnoha genů, jejichž produkty se mohou účastnit vzniku a progresu nádorových onemocnění. Příkladem může být protein MRP (multidrug resistance – associated protein) (cit.⁴), který způsobuje odolnost nádorových buněk k některým cytostatikům, nebo protein VEGF (Vascular endothelial growth factor) (cit.⁵), jehož působením je indukována tvorba nových cév nutných pro vyživování rostoucího nádoru.

2. Regulace stability p53

V normálních buňkách je hladina proteinu p53 velmi nízká, protože nově syntetizovaný protein je velmi rychle degradován proteasomem 26S (cit.⁶). Degradace proteasomem je obecný mechanismus, kterým je regulováno množství celé řady buněčných proteinů. Aby mohly být proteiny určené k degradaci rozeznány aparátem proteasomu, je nezbytná jejich ubikvitinace, tj. kovalentní připojení ubikvitinu k lyzinům cílového proteinu. Ubikvitin (angl. ubiquitin) je malý protein složený z 76 aminokyselin, jehož sekvence je evolučně konzervována. Byl nalezen prakticky ve všech eukaryotických buňkách, a to buď volně v cytoplazmě, nebo vázaný na proteiny. Pro připojení ubikvitinu k cílovým proteinům je nutná aktivita tří různých enzymů označovaných jako E1 (enzym aktivující ubikvitin), E2 (enzym přenášející ubikvitin) a E3 (ubikvitin ligasa). Ubikvitin ligasy tvoří velkou heterogenní skupinu proteinů a jsou zodpovědné za substrátovou specifitu ubikvitinace. Ubikvitin ligasovou aktivitu, důležitou pro degradaci p53, vykazuje protein MDM2 (mouse double minute 2). Expresce proteinu MDM2 je transkripčně indukována proteinem p53 (cit.⁷), a protože se MDM2 zároveň podílí na jeho degradaci, vzniká tak zpětnovazebná regulační smyčka, která omezí působení proteinu p53 v buňce pouze na dobu nutnou pro iniciaci transkripce cílových genů (viz obr. 1). Dlouhodobé působení aktivního proteinu p53 v buňce může indukovat apoptózu, která je však nežádoucí v případě menšího poškození způsobeného stresovým faktorem, které lze odstranit.

Samotná vazba proteinu MDM2 na p53 pouze blokuje jeho transkripční aktivitu a ke spuštění procesu degradace je nutný transport komplexu p53 – MDM2 z jádra buňky do cytoplazmy⁸⁻¹⁰. Tento transport umožňuje signální sekvence pro export z jádra (NES – nuclear export sequence) proteinu MDM2 (cit.⁹). Mutace v sekvenci NES proteinu MDM2 vede ke zvýšené stabilitě proteinu p53 a jeho akumulaci v jádře¹⁰.

Pokusy na myších, u nichž byly obě alely genu MDM2 vyřazeny homologní rekombinací, prokázaly zásadní význam regulace aktivity a stability p53 proteinem MDM2 pro normální průběh embryogeneze. Tyto myši umírají kvůli nekontrolované aktivitě p53 ve velmi časném stadiu embryonálního vývoje^{11,12}. Příčinou pozorované embryonální letality je aktivace p53 – závislé apoptózy v nepřítomnosti MDM2 (cit.¹³). Naproti tomu myši, u nichž byly homologní rekombinací vyřazeny oba geny, MDM2 i p53, se vyvíjejí normálně.

Neschopnost některých mutantních forem proteinu p53 aktivovat expresi MDM2 vede k jejich akumulaci v nádorových buňkách ve velkém množství. Pokud je v těchto buňkách exprese MDM2 uměle navozena, dochází k degradaci mutantního p53 stejně velkou rychlostí jako v případě nemutovaného p53 (cit.^{14,15}).

Další významnou ubikvitin ligasou způsobující účinnou degradaci p53 je komplex buněčného proteinu E6-AP (E6-associated protein) s onkoproteinem E6 některých lidských papilomavirů (cit.^{16,17}). V nepřítomnosti E6 se buněčný protein E6-AP na degradaci p53 nepodílí¹⁸, ale interakce s E6 pravděpodobně mění jeho substrátovou specifitu a umožní tak ubikvitinaci p53. Předpokládá se, že tento mechanismus degradace p53 je jedním z kritických faktorů pro vznik karcinomu děložního čípku.

Stabilizace p53 zablokováním jeho degradace je odpovědí buňky na různé druhy stresu, např. poškození DNA, aktivaci onkogenů, změny pH nebo teploty, hypoxii nebo nedostatek živin. Jednou z cest vedoucích ke stabilizaci p53 je fosforylace p53 na N-konci v oblasti, na kterou se váže MDM2. Mezi nejlépe prozkoumaná fosforylační místa na N-konci proteinu p53 patří serin 15, fosforylovaný *in vivo* kinasami ATM (ataxia telangiectasia-mutated) a ATR (ATM-related), které hrají důležitou roli při stabilizaci p53 indukované ionizujícím nebo UV zářením¹⁹. Významnou roli při stabilizaci a následné akti-

Tabulka II
Nejdůležitější buněčné regulátory p53 (SST – sekvenčně specifická transaktivace)

| Regulátory p53 | Mechanismus působení na p53 | Efekt na úrovni p53 |
|---------------------|--|--|
| <i>Pozitivní</i> | | |
| ATM | fosforylace (Ser 15) | stabilizace, aktivace SST |
| DNA-PK | fosforylace (Ser 15,37) | stabilizace, aktivace SST |
| ATR | fosforylace (Ser 15) | stabilizace, aktivace SST |
| JNK | fosforylace (Ser 33) | stabilizace (ve stresovaných buňkách) |
| CDK7/CycH/p36 | fosforylace (Ser 33) | aktivace SST |
| CDKs | fosforylace (Ser 315) | aktivace SST |
| p38 | fosforylace (Ser 392) | aktivace SST |
| Casein kinase II | fosforylace (Ser 392) | aktivace SST |
| Protein kinase C | fosforylace (Ser 371,376,378) | aktivace SST |
| p300 | acetylace (Lys 382) | stabilizace, aktivace SST |
| PCAF | acetylace (Lys 320) | aktivace SST |
| c-Abl | vazba na p53, působení proti MDM2 | stabilizace, aktivace SST |
| p14 ^{ARF} | působení proti MDM2 | stabilizace, aktivace SST |
| E2F-1 | indukce p14 ^{ARF} | stabilizace, aktivace SST |
| c-Myc | indukce p14 ^{ARF} | stabilizace, aktivace SST |
| Rb | částečné působení proti MDM2 | stabilizace |
| HIF-1 α | vazba na p53 | stabilizace |
| Ref-1 | regulace redoxního stavu | aktivace SST |
| WT1 | vazba na p53 | stabilizace, aktivace SST |
| PARP | vazba na p53 | stabilizace, aktivace SST |
| BRCA1 | vazba na p53 | aktivace SST |
| p33 ^{ING1} | vazba na p53 | aktivace SST |
| <i>Negativní</i> | | |
| MDM2 | vazba na p53, export z jádra, ubikvitinace | inhibice SST, destabilizace |
| JNK | ubikvitinace | destabilizace (v nestresovaných buňkách) |
| Bcl-2 | blokování importu p53 do jádra | inhibice SST |
| BRCA2 | vazba na p53 | inhibice SST |
| MDMX | vazba na p53 | inhibice SST |
| IGF-1 | indukce exprese MDM2 | působení prostřednictvím MDM2 |
| bFGF | indukce exprese MDM2 | působení prostřednictvím MDM2 |
| Receptor T3R | indukce exprese MDM2 | působení prostřednictvím MDM2 |

vaci p53 po poškození DNA hraje také fosforylace serinu 20 kinasami Chk1 (Checkpoint kinase 1) a Chk2 (cit.^{20,21}). Bylo prokázáno, že aktivita Chk1 je regulována kinasou ATR (cit.²²). Ke stabilizaci proteinu p53 dochází i v případě výrazného zrychlení proliferace buňky, často důsledkem aktivace onkogenů. Na rozdíl od stabilizace vyvolané poškozením DNA se v tomto případě, kromě fosforylace, navíc výrazně uplatňuje protein p14^{ARF}, který se váže na MDM2, inhibuje jeho ubikvitin ligasovou aktivitu, a tím brání degradaci p53 (cit.²³).

3. Regulace aktivity p53

Nedávno publikované práce prokázaly, že samotná stabilizace p53 nezaručuje odpovídající reakci buňky na buněčný stres, a že neexistuje přímá závislost mezi množstvím p53 v buňce a jeho transkripční aktivitou^{24,25}. Aktivita p53 je totiž řízena mnoha různými mechanismy, které ji mohou inhibovat

nebo stimulovat. Mimo mutací, které naruší strukturu některé z důležitých funkčních domén p53, je významným faktorem inhibujícím aktivitu proteinu p53 již zmíněná interakce s proteinem MDM2, která brání kontaktu N-koncové domény p53 s bazálním transkripčním aparátem^{26,27}.

Jak již bylo zmíněno, důležitým předpokladem biologické aktivity p53 je jeho oligomerizace. *In vitro* se p53 váže na cílové sekvence DNA již ve formě dimeru, tato vazba je však poměrně slabá. Spojením dvou dimerů do tetrameru afinita p53 k cílovým sekvencím výrazně roste, udává se, že přinejmenším padesátinásobně²⁸. *In vivo* však ani tyto tetramery nemusí být plně aktivní, a teprve změnou konformace jsou aktivovány k vazbě na cílové sekvence DNA. Tohoto řízení aktivity p53 se účastní jeho C-koncová regulační doména. Její odstranění nebo záměna některých aminokyselin^{29,30}, případně navázání protilátek^{29,31} nebo malých peptidů na tuto doménu^{32,33} vede k aktivaci vazby p53 na DNA.

Pro aktivaci jsou velmi významné posttranslační modifikace p53, zejména fosforylace serinu 315 kinasami CDK1 (cyclin-dependent kinase 1) a CDK2 (cit.³⁴), serinu 378 protein

kinasou C (cit.³⁵) a serinu 392 kasein kinasou II a acetylace lyzinů 320 a 382 acetyltransferasou p300 (cit.³⁶).

Přehled nejdůležitějších pozitivních a negativních buněčných regulátorů p53 je uveden v tab. II (upraveno podle cit.³⁷).

4. Stabilizátory a aktivátory p53 v terapii nádorových onemocnění

Většina chemoterapeutik používaných při léčbě nádorových onemocnění narušuje replikaci a transkripci DNA, případně segregaci chromosomů v mitóze (tj. brání rovnoměrnému rozdělení chromosomů do dceřiných buněk při dělení), což způsobí nevratné poškození nádorové buňky a její smrt. K účinku těchto látek jsou však citlivé všechny dělící se buňky, nejen nádorové. Zvláště citlivé jsou rychle se dělící buňky sliznic a vlasových folikulů, což vede ke známým negativním vedlejším účinkům léčby cytostatiky. Navíc je třeba podávání těchto léků opakovat v několika vlnách, protože se v době jejich aplikace nachází jen určitá část nádorových buněk ve fázi buněčného cyklu, v níž jsou buňky k dané látce citlivé. Tím se zvyšuje riziko vzniku genetického poškození somatických i pohlavních buněk, které může u pacienta vést ke vzniku dalších nádorových onemocnění v pozdějším věku, k neplodnosti, případně k výskytu genetického poškození u jeho potomků. Současný farmaceutický výzkum se proto intenzivně věnuje vývoji stále účinnějších látek, které by však zároveň vykazovaly co nejméně negativních vedlejších účinků.

Stabilizace a aktivace endogenního proteinu p53 bez indukce poškození DNA je jedním z přístupů, který by mohl umožnit účinnější terapii některých typů nádorových onemocnění, která málo reagují na léčbu konvenčními chemoterapeutiky. Příkladem je maligní melanom kůže, který patří mezi zhoubná nádorová onemocnění, jejichž výskyt v naší populaci prudce narůstá. Tento typ nádoru se v rozvinutém stadiu vyznačuje vysokou radiorezistencí a chemorezistencí, a proto u něj klasická léčba často selhává.

Nedávno byla publikována práce ukazující, že syntetické inhibitory cyklin – dependentních kinas (CDK) 6-(benzylamino)-2-[2-(hydroxyethyl)amino]-9-methylpurin (olomoucín) a 6-(benzylamino)-2-[1-(hydroxyethyl)propylamino]-9-isopropylpurin (roscovitín) velmi účinně stabilizují nemutovaný protein p53 u buněčných linií ve 40 μM , respektive 20 μM koncentraci v kultivačním médiu, aniž by přitom docházelo k poškození DNA (cit.³⁸). Přesný mechanismus jejich působení není znám, předpokládá se účast dosud nespecifikované biochemické dráhy regulované CDK, jejíž zablokování vede ke stabilizaci a aktivaci p53. Naše vlastní výsledky dokazují, že protein p53 indukovaný roscovitinem v buňkách maligního melanomu je transkripčně aktivní a zodpovědný za expresi proteinu p21^{WAF1}, který je sám o sobě také inhibitorem CDK. Protože je aktivita CDK nutná pro normální průběh buněčného cyklu, předpokládáme, že by indukovaný p21^{WAF1} mohl dále zesílit inhibiční účinek roscovitinu na dělení buněk. Dalším účinným stabilizátorem proteinu p53 je 2-methoxy-estradiol, přirozený produkt metabolismu estrogenu, který působí zatím neobjasněným mechanismem již v 1 μM koncentraci v kultivačním médiu³⁹. U této látky bylo navíc prokázáno, že výrazně zesiluje účinek radioterapie na určitý typ nádorového onemocnění plic⁴⁰.

5. Závěr

Od objevu proteinu p53 uplynulo již více než dvacet let, přesto však můžeme stěžít říci, že o jeho úloze v regulaci buněčných procesů víme vše. Intenzivní studium p53 přináší stále nové informace, které formují náš pohled na řízení procesů vedoucích k nádorové transformaci buňky. Znalost mechanismů ovlivňujících degradaci proteinu p53 proteasomem a regulujících jeho transkripční aktivitu má význam pro vývoj nových účinnějších chemických látek pro léčbu nádorových onemocnění, a proto jsme se v této práci pokusili o shrnutí nejvýznamnějších z těchto mechanismů.

Tato práce vznikla za podpory grantů IGA MZ ČR č. NC 6404-3 a GA ČR č. 312/99/1550.

LITERATURA

1. Wiman K. G.: *Exp. Cell Res.* 237, 14 (1997).
2. Amundson S. A., Myers T. G., Fornace A. J.: *Oncogene* 17, 3287 (1998).
3. Tanaka H., Arakawa H., Yamaguchi T., Shiraishi K., Fukuda S., Matsui K., Takei Y., Nakamura Y.: *Nature* 404, 42 (2000).
4. Wang Q., Beck W. T.: *Cancer Res.* 58, 5762 (1998).
5. Bouvet M., Ellis L. M., Nishizaki M., Fujiwara T., Liu W., Bucana C. D., Fang B., Lee J. J., Roth J. A.: *Cancer Res.* 58, 2288 (1998).
6. Maki C. G., Huibregtse J. M., Howley P. M.: *Cancer Res.* 56, 2649 (1996).
7. Barak Y., Juven T., Haffner R., Oren M.: *EMBO J.* 12, 461 (1993).
8. Freedman D. A., Levine A. J.: *Mol. Biol. Cell* 18, 7288 (1998).
9. Roth J., Dobbstein M., Freedman D. A., Shenk T., Levine A. J.: *EMBO J.* 17, 554 (1998).
10. Tao W., Levine A. J.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 3077 (1999).
11. Jones S. N., Roe A. E., Donehower L. A., Bradley A.: *Nature* 378, 206 (1995).
12. Montes de Oca Luna R., Wagner D. S., Lozano G.: *Nature* 378, 203 (1995).
13. de Rozières S., Maya R., Oren M., Lozano G.: *Oncogene* 19, 1691 (2000).
14. Midgley C. A., Lane D. P.: *Oncogene* 15, 1179 (1997).
15. Yu Z. K., Geyer R. K., Maki C. G.: *Oncogene* 19, 5892 (2000).
16. Scheffner M., Werness B. A., Huibregtse J. M., Levine A. J., Howley P. M.: *Cell* 63, 1129 (1990).
17. Scheffner M., Huibregtse J. M., Vierstra R. D., Howley P. M.: *Cell* 75, 495 (1993).
18. Talis A. L., Huibregtse J. M., Howley P. M.: *J. Biol. Chem.* 273, 6439 (1998).
19. Lakin N. D., Hann B. C., Jackson S. P.: *Oncogene* 18, 3989 (1999).
20. Unger T., Juven-Gershon T., Moallem E., Berger M., Vogt Sionov R., Lozano G., Oren M., Haupt Y.: *EMBO J.* 18, 1805 (1999).
21. Shieh S. Y., Ahn J., Tamai K., Taya Y., Prives C.: *Genes Dev.* 14, 289 (2000).
22. Liu Q., Guntuku S., Cui X. S., Matsuoka S., Cortez D.,

- Tamai K., Luo G., Carattini-Rivera S., DeMayo F., Bradley A., Donehower L. A., Elledge S. J.: *Genes Dev.* *14*, 1448 (2000).
23. Honda R., Yasuda H.: *EMBO J.* *18*, 22 (1999).
 24. Lu X., Burbidge S. A., Griffin S., Smith H. M.: *Oncogene* *13*, 413 (1996).
 25. Blaydes J. P., Craig A. L., Wallace M., Ball H. M., Traynor N. J., Gibbs N. K., Hupp T. R.: *Oncogene* *19*, 3829 (2000).
 26. Momand J., Zambetti G. P., Olson D. C., George D., Levine A. J.: *Cell* *69*, 1237 (1992).
 27. Oliner J. D., Pietenpol J. A., Thiagalingam S., Gyuris J., Kinzler K. W., Vogelstein B.: *Nature* *362*, 857 (1993).
 28. McLure K. G., Lee P. W.: *EMBO J.* *17*, 3342 (1998).
 29. Hupp T. R., Meek D. W., Midgley C. A., Lane D. P.: *Cell* *71*, 875 (1992).
 30. Marston N. J., Ludwig R. L., Vousden K. H.: *Oncogene* *16*, 3123 (1998).
 31. Pospíšilová S., Brázda V., Amrichová J., Kamermeierová R., Paleček E., Vojtěšek B.: *J. Immunol. Methods* *237*, 51 (2000).
 32. Hupp T. R., Sparks A., Lane D. P.: *Cell* *83*, 237 (1995).
 33. Selivanova G., Iotsova V., Okan I., Fritsche M., Strom M., Groner B., Grafstrom R. C., Wiman K. G.: *Nat. Med.* *3*, 632 (1997).
 34. Blaydes J. P., Luciani M. G., Pospíšilová S., Ball H. M., Vojtěšek B., Hupp T. R.: *J. Biol. Chem.* *14*, 14 (2000).
 35. Baudier J., Delphin C., Grunwald D., Khochbin S., Lawrence J. J.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *89*, 11627 (1992).
 36. Sakaguchi K., Herrera J. E., Saito S., Miki T., Bustin M., Vassilev A., Anderson C. W., Appella E.: *Genes Dev.* *12*, 2831 (1998).
 37. Sionov R. V., Haupt Y.: *Oncogene* *18*, 6145 (1999).
 38. David-Pfeuty T.: *Oncogene* *18*, 7409 (1999).
 39. Mukhopadhyay T., Roth J. A.: *Oncogene* *17*, 241 (1998).
 40. Huober J. B., Nakamura S., Meyn R., Roth J. A., Mukhopadhyay T.: *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* *48*, 1127 (2000).

S. Uldrijan, V. Kotala, and B. Vojtěšek (*Masaryk Memorial Cancer Institute, Brno*): **Regulation of the p53 Tumour Suppressor Stability and Activity**

The p53 tumour suppressor protein plays a crucial role in regulating cell growth and death in response to various types of cellular stress. The loss of its function is the most common event leading to the development of cancer. In normal cells, p53 is present at low levels because the protein is rapidly degraded by the ubiquitin-mediated proteasome pathway following the synthesis. Stress-induced signals inhibit p53 degradation, leading to its rapid stabilization and accumulation in the cell, and followed by its activation by mechanisms including phosphorylation and acetylation. The complexity of the pathways regulating p53 stabilization and activation as well as possible p53 activation in response to small chemical compounds used in certain experimental anti-cancer therapy approaches are discussed in this review.

LABORATORNÍ PŘÍSTROJE A POSTUPY

ZAŘÍZENÍ A METODIKA MĚŘENÍ VYBRANÝCH SORPČNÍCH CHARAKTERISTIK TUHÝCH SORBENTŮ A KATALYZÁTORŮ CHROMATOGRAFICKOU TECHNIKOU

LENKA ČUTOVÁ a BOHUMÍR DVOŘÁK*

Ústav organické technologie, Vysoká škola chemicko-technologická, Technická 5, 166 28 Praha 6
e-mail: Lenka.Cutova@vscht.cz, Bohumir.Dvorak@vscht.cz

Došlo dne 26.VII.2001

Klíčová slova: TPD pyridinu a anilinu, adsorpční isotermy

Úvod

Sorpce plyných i kapalných sorbátů hraje významnou roli nejen v heterogenně katalyzovaných chemických procesech, ale slouží také k hodnocení řady důležitých vlastností širokého spektra tuhých látek aplikovaných v nejrůznějších oblastech průmyslové výroby. Mezi vybrané a posuzované vlastnosti těchto látek patří např. specifický povrch, distribuce pórů, disperzita kovové složky aj. Tyto technické charakteristiky jsou mj. dostupné prostřednictvím adsorpčních isoterem různých sorbátů naměřených za laboratorních, ale zejména za procesních podmínek. Sorpce vybraných sorbátů je účinnou sondou při získávání informací o acidobazických vlastnostech studovaných sorbentů. V literatuře je uváděno mnoho metod na stanovení kyselosti heterogenních katalyzátorů, např. pomocí Hammettových indikátorů¹, FTIR spektroskopie^{2,3}, mikrokolorimetrie^{4,5}, kinetiky katalyzované reakce^{6,7} a teplotně programované desorpce bázi^{8–10}. Především pro schopnost určovat zmíněné charakteristiky za podmínek blízkých procesním a dále pro rychlost a relativní jednoduchost jsou k tomuto účelu s oblibou užívány různé chromatografické techniky^{11–14}.

V současné době řada renomovaných zahraničních firem (např. Micromeritics, Zeton Altamira, ThermoQuest CE Instruments) nabízí velký sortiment jak jednoúčelových, tak i polyfunkčních zařízení využívajících sorpce k charakterizaci tuhé fáze. Protože jde vesměs o produkty kusové výroby, jsou náklady na výrobu takových zařízení značné, a tím i jejich cena vysoká. Podobné, ale mnohem levnější zařízení lze, i když na úkor uživatelského komfortu, postavit ze sériově vyráběných prvků, nebo dokonce ze starších, často již vyřazených zařízení.

Předmětem tohoto článku je popis zařízení na měření adsorpčních isoterem plynů a par na tuhých površích a jejich

teplotně programované desorpce (TPD) z povrchu tuhých sorbentů chromatografickou technikou; toto zařízení bylo postaveno na Ústavu organické technologie VŠCHT Praha. Zařízení, vybudované adaptací dostupných, komerčně vyráběných jednoúčelových zařízení a jejich příslušenství, umožňuje připravovat a dodatečně *in situ* upravovat povrch oxidických i kovových sorbentů. Článek je doplněn popisem metodiky měření zmíněných technických charakteristik a ukázkami naměřených parametrů. Vše je demonstrováno na příkladu měděného nosičového katalyzátoru.

Experimentální část

Popis zařízení

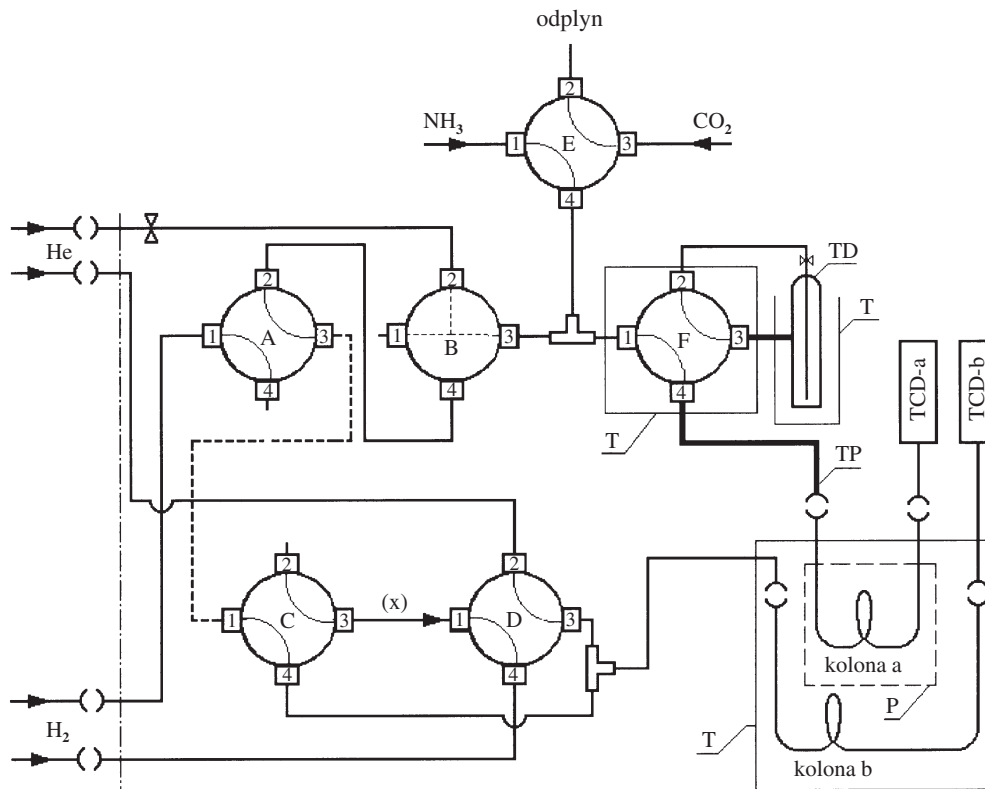
Zařízení ke studiu adsorpčních isoterem sorbátů a jejich teplotně programované desorpce bylo postaveno z komerčně dostupných zařízení, přístrojů a polotovárů. Vybudovaná aparatura je schematicky znázorněna na obr. 1. Její centrální jednotkou je přístavbou a vestavbou modifikovaný komerční chromatograf CHROM-5 (Laboratorní přístroje Praha) s TC-, popř. FI-detektorem. Přístavba chromatografu sestává z tenzního dávkovače, 5 čtyřcestných a jednoho trojcestného kohoutu a celá sestava je napojena na vstupy plynů do hlavy termostatu. Tenzní dávkovač, užívaný při aplikaci kapalných sorbátů, je umístěn ve vodním termostatu a potrubní trasa vystupující z tohoto dávkovače je vyhřívána elektrickými topnými pásy. Kohout F (obr. 1) je umístěn v termostatové jednotce chromatografu CHROM-4, čímž je zajištěna nejen jeho teplota, ale též teplota celé transportní trasy sorbátu na požadovanou teplotu. Kohout E slouží k aplikaci plyných sorbátů.

Popsaná část modifikace centrální jednotky umožňuje měření adsorpčních isoterem sorbátů v rozmezí teplot 20–350 °C a teplotnou úpravu sorbentů v definované atmosféře (včetně redukční) v podmínkách *in situ*. Měřený sorbent je umístěn v klasické nerezové chromatografické koloně (obr. 2a).

Pro měření TPD spekter sorbátů je centrální jednotka, jmenovitě termostat chromatografu CHROM-5, modifikován vestavbou. Do prostoru termostatu je vkládána teplotně programovatelná odporová pec. Její retorta je po umístění adsorpční kolonky tvaru U vyplněna granulátem karborunda za účelem zlepšení homogenizace teplotního pole a transportu tepla v peci. Přívod elektrické energie do pece a termočlánekové jímky na stěnu adsorpční nádoby je zajištěn teflonovou průchodkou uloženou v hlavě termostatu. Adsorpční nádoba (obr. 2b) je připojena na standardní rozvod chromatografu nerezovými kapilárami a spoji typu swagelok.

K měření sorpčních charakteristik je užíván vzorek ve formě granulátu o velikosti zrna 0,315–0,400 mm, který se připravuje drcením komerčních tablet a následnou separací na sítech. Katalyzátor je před vlastním měřením sušen při teplotě 120 °C po dobu 2 h a uchován v exsikatoru. Při měření

* Autor pro korespondenci



Obr. 1. Schéma zařízení na měření sorpčních vlastností katalyzátorů; A, C, D, E, F – čtyřcestné kohouty, B – trojcestný kohout, P – pec s programově nastavitelnou teplotou, T – termostat s regulací teploty, TD – tenzní dávkovač, TP – temperační plášť

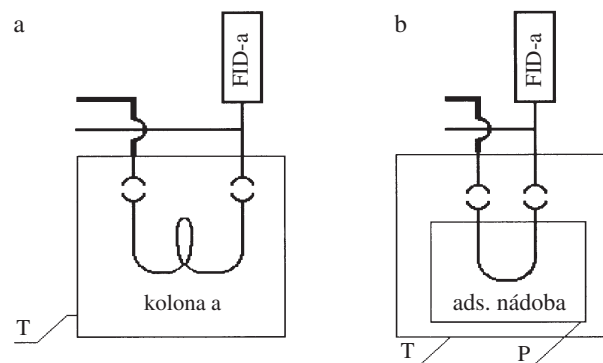
adsorpčních isoterem sorbatů jsou používány standardní nerezové chromatografické kolony délky 1 m s vnitřním průměrem 3 mm umístěné v termostatu chromatografu CHROM-5. Vzorek o objemu 1 ml (cca 0,5 g) je lokalizován ve výstupní části chromatografické kolony, před a za vrstvou katalyzátoru je 1 cm vrstva karborunda o velikosti zrna srovnatelného se zrnem katalyzátoru (40 mesh). Katalyzátorová vrstva je vysoká 10 cm. Zbývající část kolony je vyplněna karborundem o velikosti zrna 22 mesh. Kolona b může sloužit ke kompenzaci klidového proudu při lineárním nárůstu teploty pomocí tzv. duálního zapojení.

Při měření TPD spekter je používána nerezová adsorpční nádoba tvaru U délky 35 cm a vnitřním průměrem 3 mm. Katalyzátorová vrstva o hmotnosti 0,1 g je opět lokalizována ve výstupní části adsorpční nádoby a její výška je 2 cm. Adsorpční kolonka je vložena do pece s programově nastavitelnou teplotou, prostor uvnitř pece je vyplněn SiC, který zlepšuje transport tepla. Pec je umístěna v termostatu chromatografu CHROM-5 (obr. 2b) a umožňuje kromě nastavení teplotního programu realizaci experimentů v rozmezí teplot 20–800 °C.

Metodika měření

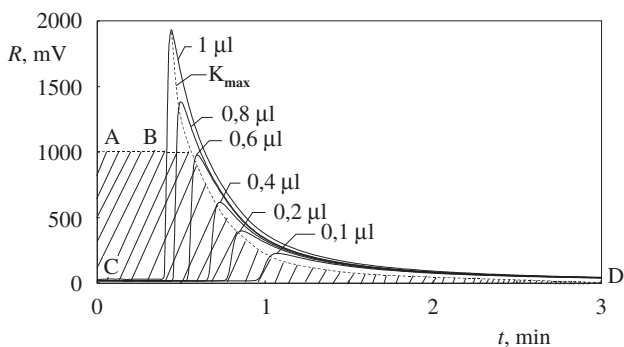
Adsorpční isotermy sorbatů

Měření adsorpční isotermy sorbatů pulsní chromatografickou technikou spočívá v určení množství sorbatu vratně ad-



Obr. 2. Způsob uložení chromatografické kolony; a – měření adsorpčních isoterem sorbatů, b – měření TPD spekter; P – pec s programově nastavitelnou teplotou, T – termostat chromatografu CHROM-5

sorbovaného na povrchu sorbentu při dané teplotě v závislosti na parciálním tlaku užitého sorbatu. Pro experimentální měření rovnovážně sorbovaného množství sorbatu byla zvolena metoda pulsního maxima^{15,16}. Po aktivaci sorbentu v inertní, popř. redukční atmosféře jsou nejprve eliminována centra, na nichž dochází k nevratné sorpci sorbatu. Jejich úplné vysycení je zajištěno opakovaným dávkováním sorbatu a je monitorováno dosažením konstantní odezvy na odpovídající dávku sorbatu. Po vysycení center nevratně vázaným sorbatem při zvo-



Obr. 3. Kumulovaný soubor elučních píků sorbátu demonstrující závislosti odezvy detektoru R na velikosti jeho pulsně dávkovaného množství

Tabulka I

Složení a technické charakteristiky studovaných katalyzátorů

| Parametry | CHEROX | |
|---|--------|-------|
| | 46-00 | 46-01 |
| Složení [hm.%] | | |
| CuO | 39,3 | 37,0 |
| CaO | 4,6 | 5,4 |
| Fe ₂ O ₃ | – | 5,7 |
| SiO ₂ /MgO | 1,8 | 6,0 |
| Celkový specifický povrch [m ² ·g ⁻¹] _{kat} | 297 | 109 |
| Celk. spec. povrch po aktivaci [m ² ·g ⁻¹] _{kat} | 209 | 75 |
| Specifický povrch mědi [m ² _{Cu} ·g ⁻¹] _{Cu} | 48,1 | 17,2 |

lené konstantní teplotě byly při téže teplotě do proudu He (0,7 l.h⁻¹) postupně vsťrikovány dávky sorbátu, jejichž velikost se při použití FI-detektoru pohybovala v rozmezí 0,1–1 µl. V uvedeném rozsahu je odezva detektoru lineární a k jeho kalibraci byla použita metoda popsáná v práci Volfa¹².

Eluční píky, získané po aplikaci různých dávek sorbátu (0,1–1 µl), byly za účelem počítačového zpracování experimentálních výsledků kumulovány do jediného souboru. Maximy jednotlivých píků je následně prokládána křivka K_{\max} reprezentující desorpční větve elučního píku (obr. 3). Hodnoty parciálního tlaku sorbátu (p_s) a jemu odpovídající vratně sorbované množství (q_s) byly určovány výpočtem z dále uvedených vztahů 1–2a, b. Měřenými parametry byly plocha pod křivkou K_{\max} (S_A), navážka katalyzátoru (w), teplota sorpce (T_s) a průtok nosného plynu (F).

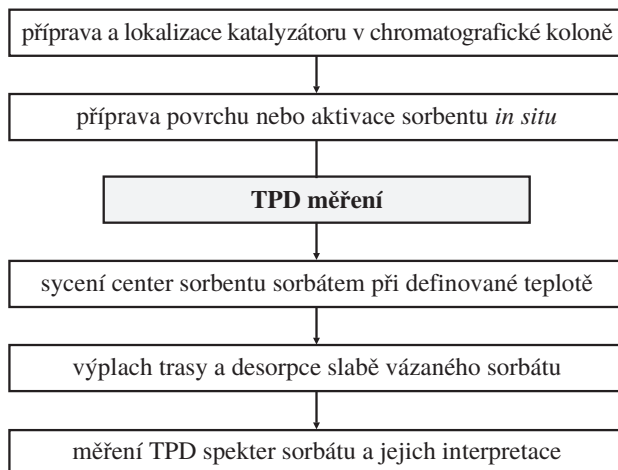
$$p_s = (h.c.RT) / (s.F) \quad (1)$$

$$q_s = S_A / (s.w.S_S) \quad (2a)$$

$$s = (M_S / \rho_S).x \quad (2b)$$

TPD spektra

Metoda tepelně programované desorpce sorbátů slouží ke studiu acidobazických vlastností povrchu tuhé fáze. Její prin-



Obr. 4. Postup měření TPD spekter sorbátu

Tabulka II

Způsob aktivace měděných nosičových katalyzátorů

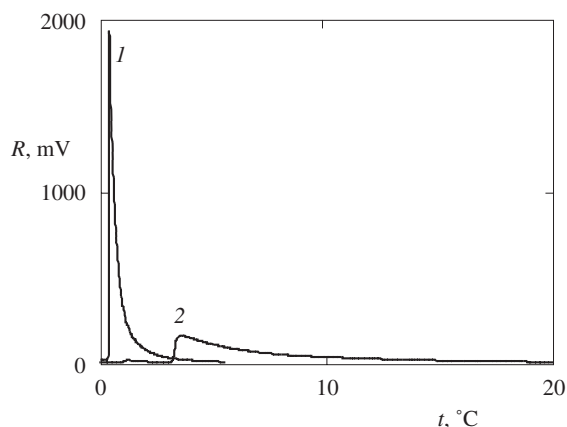
| Doba [h] | Teplota [°C] | Průtok plynu [l.h ⁻¹] ^a | | Parc. tlak vodíku [kPa] |
|----------|--------------|--|----------------|-------------------------|
| | | He | H ₂ | |
| 1 | 220 | 11,4 | 0,6 | ≈5 |
| 1 | 220 | 5,4 | 0,6 | ≈11 |
| 2 | 220 | 0 | 3,6 | 101,3 |
| 2 | 250 | 0 | 3,6 | 101,3 |

^a Měřeno za laboratorní teploty

cip spočívá v detekci molekul sorbátu, popř. jejich částí (nutné užití MS-detektoru), uvolněných desorpcí z povrchu sorbentu při lineárně vzrůstající teplotě. Standardní postup měření TPD spekter bazického nebo kyselého sorbátu je výstižně popsán následujícím blokovým schématem (obr. 4). Měření sorpčních charakteristik sorbentu předchází úprava jeho granulometrie, plnění do adsorpční nádoby, lokalizace nádoby v peci a po vložení pece do termostatu chromatografu její připojení k detekčnímu systému. Vzorek sorbentu je před měřením TPD spekter nejprve aktivován; v závislosti na jeho typu je aktivace *in situ* realizována v inertní, oxidační nebo redukční atmosféře. Následuje sycení jeho povrchu sorbátem v proudu nosného plynu a po něm výplach sorbátu z objemu zařízení a fyzikálně vázaného sorbátu z povrchu sorbentu. Konečná fáze měření sestává z nastavení průtoku nosného plynu a spuštění programu regulátoru ohřevu pece zajišťujícího lineární nárůst teploty, nejčastěji rychlostí v rozmezí 5–10 K.min⁻¹. Průběh sycení, výplachu a TPD sorbátu je s využitím softwaru CSW fy Apex zaznamenáván na monitoru a ukládán do paměti počítače.

Sorbenty

Ke studiu sorpčních vlastností byly jako sorbenty použity vzorky komerčních katalyzátorů CHEROX 46-0X (X = 0 a 1)



Obr. 5. Tvary odezev R na puls pyridinu při jeho rovnovážné sorpci na povrchu vzorků aktivovaných katalyzátorů; 1 – CHEROX 46-01, 2 – CHEROX 46-00

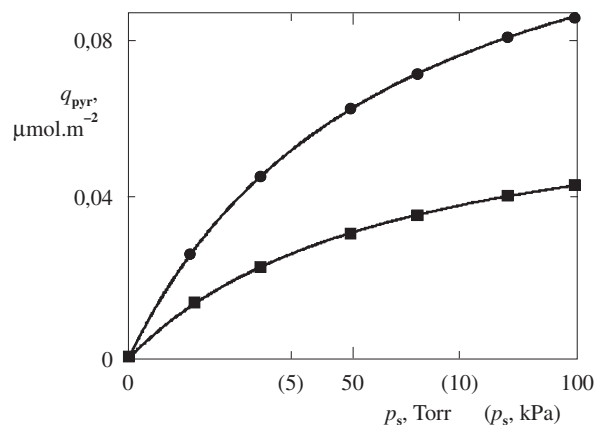
firmy Chemopetrol a.s., Litvínov. Vybrané technické charakteristiky a texturní parametry měřených vzorků jsou shrnuty v tab. I. Vzorky byly aktivovány v proudu plynné směsi vodíku a helia v podmínkách *in situ*. Rychlost redukce prekurzorů mědi byla při teplotě 220 °C řízena velikostí parciálního tlaku vodíku. Závěrečná fáze redukce byla realizována v proudu čistého vodíku ($V = 3,6 \text{ l.h}^{-1}$) při teplotě 250 °C (tab. II).

Příklady z praktické aplikace popsaného zařízení

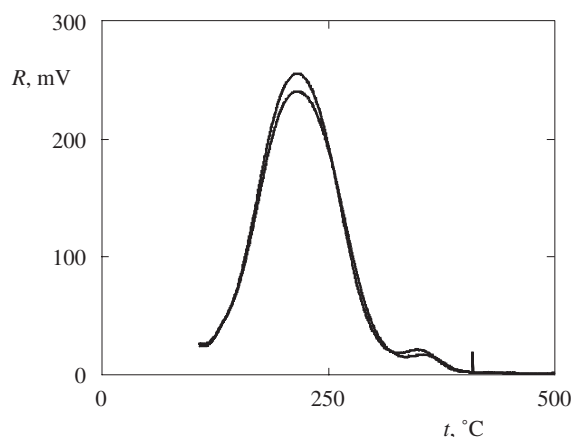
Adsorpční isotermy pyridinu

Na obr. 5 jsou reprodukovány dva typy elučních píků pyridinu charakterizující jeho rovnovážně sorbované množství na povrchu dvou typů aktivovaných měděných nosičových katalyzátorů. Rozdíl v charakteru píků, širokého asymetrického tvaru píků na jedné a ostrého symetričtějšího tvaru na straně druhé signalizuje, spolu se zkrácením retenčního času, zmenšení síly vazby sorbátu s povrchem sorbentu. Popsaná změna je důsledkem chemické modifikace standardního katalyzátoru CHEROX 46-00 a vzhledem k aplikaci bazického sorbátu vypovídá o nižší síle kyselosti katalyzátoru CHEROX 46-01. Z uvedeného je zřejmé, že záznam elučních píků sorbátu (obr. 5) při měření adsorpčních isoterem výše popsanou chromatografickou technikou, může sloužit také ke kvalitativnímu hodnocení síly vazby mezi sorbentem a sorbátem.

Na obr. 6 jsou reprodukovány adsorpční isotermy pyridinu pro povrchy *in situ* aktivovaných vzorků již zmíněných měděných nosičových katalyzátorů CHEROX 46-0X. Obě isotermy mají vzájemně podobný tvar. Vynesené body znázorňují experimentálně naměřené hodnoty a jejich poloha je ve velmi dobré shodě s průběhem křivek popsaných rovnicí Langmuirovy adsorpční isotermy. Křivky byly získány zpracováním experimentálně naměřených hodnot pomocí programu ERA¹⁷. Rozdíly ve vlastnostech vzorků srovnávaných katalyzátorů jsou kvalitativně popsány diferencí v množství pyridinu rovnovážně sorbovaného za srovnatelných podmínek na jejich jednotkovém povrchu. Množství pyridinu $4,6 \cdot 10^{-8} \text{ mol.m}^{-2}$ sorbované při teplotě 250 °C a parciálním tlaku pyridinu 4 kPa



Obr. 6. Adsorpční isotermy pyridinu na povrchu aktivovaných měděných nosičových katalyzátorů; ● CHEROX 46-00, ■ CHEROX 46-01



Obr. 7. TPD spektra pyridinu z povrchu dvou individuálních vzorků neaktivovaného katalyzátoru CHEROX 46-00

na povrchu katalyzátoru CHEROX 46-00 je za uvedených experimentálních podmínek, v porovnání s katalyzátorem CHEROX 46-01, dvakrát větší.

TPD spektra pyridinu

Funkčnost popsaného zařízení a dobrá reprodukovatelnost měření TPD spekter sorbátu je dokumentována příkladem dvou TPD spekter pyridinu z povrchu neaktivovaných vzorků katalyzátoru CHEROX 46-00 (obr. 7).

Desorpce pyridinu byla u obou vzorků indikována ve stejném teplotním rozmezí 100–500 °C. Také hodnoty teplot dvou desorpčních maxim byly zcela srovnatelné, jejich velikost je 220 a 360 °C. Pouze množství desorbovaného pyridinu nebylo úplně shodné. Vzájemná diference, charakterizovaná $\approx 5\%$ rozdílem ve velikosti plochy porovnávaných TPD spekter, je však v relaci s chybami chromatografických metod zcela přijatelná. Dobrá shoda byla zjištěna též v hodnotách teploty T_{end} která je vzhledem k dobré reprodukovatelnosti často doporučeným parametrem pro hodnocení síly kyselosti sor-

Tabulka III
Podmínky měření TPD spekter vybraných bazických sorbátů

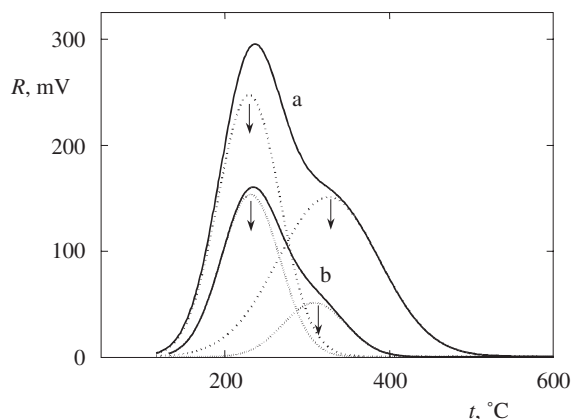
| Etapa měření TPD spektra | Exp. podmínky | Užitý sorbát | | |
|-----------------------------|---|--------------|---------|---------------------|
| | | pyridin | anilin | 2,6-dimethylpyridin |
| Sycení | teplota [°C] | 100 | 170 | 130 |
| | doba [h] | 0,5 | 2 | 0,75 |
| | parc. tlak sorbátu [kPa] | 2 | 2 | 2 |
| Výplach | teplota [°C] | 100 | 170 | 130 |
| | doba [h] | 2 | 2 | 2 |
| Měření TPD | rychlost ohřevu [K.min ⁻¹] | 5 | 5 | 5 |
| | rozsah [°C] | 100–750 | 100–750 | 100–750 |
| | průtok nosného plynu [l.h ⁻¹] | 6,9–7,2 | 6,9–7,2 | 6,9–7,2 |

bentu. Hodnota zmíněného parametru je určována s přesností ± 5 K, její velikost byla pro oba vzorky prakticky stejná a měla hodnotu 450 °C. Také reprodukovatelnost TPD spekter sorbátů z povrchu vzorků aktivovaných *in situ* byla velmi dobrá. Příznivé hodnocení výsledků měření je vedle bezchybné funkce zařízení důsledkem dodržování podmínek aktivace vzorků a standardizace měření TPD, jehož podmínky jsou specifikovány v následující tabulce III.

Na obr. 8 je uveden příklad TPD spekter pyridinu z povrchu aktivovaných vzorků měděných nosičových katalyzátorů, které se lišily složením jejich nosiče. Kromě rozdílu v hodnotě molárního poměru SiO₂/MgO, vzorek s vyšší hodnotou tohoto poměru obsahoval ještě železitou složku (tab. I). Úplná desorpce pyridinu z povrchu katalyzátoru CHEROX 46-01 je ukončena při teplotě 448 °C, zatímco stejná charakteristika katalyzátoru CHEROX 46-00 popsána hodnotou parametru T_{end} byla o 44 K vyšší. Na obou typech katalyzátorů je desorpce pyridinu opět indikována ve stejném teplotním intervalu a také polohy dvou teplotně desorpčních maxim 250 a 320 °C jsou zcela srovnatelné. Za pomoci programu Origin byla provedena dekonvoluce jednotlivých TPD spekter. Rozdílná velikost ploch pod TPD spektry ukázala, že množství sorbátu vázaného na jednotkovou velikost povrchu je pro vzorky srovnávaných katalyzátorů rozdílné. Podstatný je především rozdíl v poměrech ploch píků reprezentujících centra s definovanou silou kyselosti. Navržená metoda je citlivá k posouzení rozdílů v acidobazických vlastnostech vzorků studovaných katalyzátorů a je vhodná k měření síly kyselosti katalyzátorů s různým složením silikátového typu nosiče.

Závěr

Byl postaven přístroj na měření adsorpčních isoterem v teplotním intervalu 20–350 °C a TPD spekter sorbátů (20–750 °C) aplikovaných ve formě plynů i par. Přístroj byl vybudován z komerčních, ale dodatečnou modifikací upravených zařízení, a umožňuje aktivaci sorbentů za podmínek *in situ* ve všech typech definované atmosféry. Reprodukovatelnost naměřených výsledků je velmi dobrá. Zvolená chromatografická technika a v příkladech popsána metodika je vhodná pro měření adsorpčních isoterem a rozlišení acidobazických vlastností studovaných měděných katalyzátorů s nosičem silikátového typu.



Obr. 8. Vliv složení nosiče na TPD spektra pyridinu z povrchu aktivovaných katalyzátorů; a – CHEROX 46-00, b – CHEROX 46-01, — naměřené spektrum, dekonvoluce

Seznam symbolů

- c rychlost posunu zapisovače, cm.s⁻¹
- F průtok nosného plynu, m³.s⁻¹
- h výška píku, cm
- M_S molární hmotnost sorbátu, g.mol⁻¹
- p_S parciální tlak sorbátu, Pa
- q_S adsorbované množství pyridinu, mol.m⁻²
- R plynová konstanta, J.K⁻¹.mol⁻¹
- s citlivost detektoru, cm².mol⁻¹
- S_A plocha pod křivkou ABCD, cm²
- S_S celkový specifický povrch, m².g⁻¹
- T_s teplota sorpčního měření, K
- x odezva detektoru, cm².ml⁻¹
- w hmotnost katalyzátoru, g
- ρ_S hustota sorbátu, g.cm⁻³

Tato práce byla podpořena MŠMT prostřednictvím výzkumného záměru č. CEZ: MSM 223100001.

LITERATURA

1. Sabu K. R. P., Rao K. V. C., Nair C. G. R.: Bull. Chem. Soc. Jpn. 64, 1920 (1991).

2. Wichterlová B., Tvarůžková Z., Sobalík Z., Sarv P.: *Microporous Mesoporous Mater.* 24, 223 (1998).
3. Odenbrand C. U. I., Brandin J. G. M., Busca G.: *J. Catal.* 135, 505 (1990).
4. Auroux A., Gervasini A.: *J. Phys. Chem.* 94, 6371 (1990).
5. Cardona-Martinez N., Dumesic J. A.: *J. Catal.* 125, 427 (1990).
6. Gervasini A., Auroux A.: *J. Catal.* 131, 190 (1991).
7. Lopez T., Gomez R., Llanos M. E., Lopez-Salinas E.: *Mater. Lett.* 38, 283 (1999).
8. Lopez T., Manriquez M. E., Gomez R., Campero A., Llanos M. E.: *Mater. Lett.* 46, 21 (2000).
9. Aramendía M. A., Borau V., Jiménez C., Marinas J. M., Porras A., Urbano F. J.: *J. Mater. Chem.* 6, 1943 (1996).
10. Satsuma A., Westi Y., Kamiya Y., Hattori T.: *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 70, 1317 (1997).
11. Choudhary V. R., Sansare S. D., Thite G. A.: *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 42, 249 (1988).
12. Volf J., Koubek J., Pašek J.: *J. Chromatogr.* 81, 9 (1973).
13. Choudhary V. R., Srinivasan K. R.: *J. Chromatogr.* 148, 373 (1978).
14. Choudhary V. R., Doraiswamy L. K.: *Ind. Eng. Chem. Prod. Res. Dev.* 10, 218 (1971).
15. Kipping P. J., Winter D. G.: *Nature* 205, 1002 (1965).
16. Kipping P. J., Jeffery P. G.: *Nature* 200, 13141 (1963).
17. Zámstný P., Bělohav Z.: *Comput. Chem.* 23, 479 (1999).

L. Čutová and B. Dvořák (*Department of Organic Technology, Institute of Chemical Technology, Prague*): **The Device and Methodology of Measuring Selected Sorption Characteristics of Solid Sorbents and Catalysts by a Chromatographic Technique**

A system, built at the Department using commercially available devices is described. The system is designed for measuring adsorption isotherms and temperature programmed desorption (TPD) spectra of sorbates, applied as gases and vapours. The measured data show a very good reproducibility. Examples of the used methodology as well as of measurement of pyridine adsorption isotherms and its TPD spectra from surface of Cherox 46-00 and 46-01 catalysts (Chemopetrol Co., Litvínov) are given.



Vysoká škola chemicko-technologická v Praze

Ústav technologie ropy a petrochemie

Vám v rámci své hospodářské činnosti nabízí provedení komplexních analýz ropných produktů

- Vlastnosti a složení benzinů, naft a topných olejů
- Vlastnosti a komplexní analýza motorových a průmyslových olejů
- Analýza mazutu, asfaltu a dalších těžkých ropných produktů
- Analýza a stanovení škodlivin v ropných produktech a odpadních materiálech – polyaromatické uhlovodíky a PCB
- Nestandardní analýzy
 - plynová chromatografie (GC)
 - hmotnostní spektrometrie (GC-MS)
 - kapalinová chromatografie s UV, RI a fluorescenční detekcí
 - simulovaná destilace
 - FTIR spektrometrie
 - termická analýza (TG, tlaková DSC)

Kontakt: VŠCHT Praha, Ústav technologie ropy a petrochemie, Technická 5, 166 28 Praha 6, fax 02-24310481

Prof. Ing. Gustav Šebor, CSc., tel. 02-24354162, e-mail: seborg@vscht.cz

Ing. Milan Pospíšil, CSc., tel. 02-24354238, e-mail: pospisim@vscht.cz

STANOVENÍ KADMIA, OLOVA A RTUTI V KREVNÍ PLAZMĚ KOČKY DOMÁCÍ

VERONIKA SMETKOVÁ^a, BOHUMIL DOČEKAL^b, JOSEF SUCHÝ^a a HANA DOČEKALOVÁ^a

^aÚstav chemie a technologie ochrany životního prostředí, Fakulta chemická, Vysoké učení technické v Brně, Purkyňova 118, 612 00 Brno, ^bÚstav analytické chemie, Akademie věd České republiky, Veveří 97, 611 42 Brno
e-mail: smetkova@fch.vutbr.cz, docekal@iach.cz

Došlo dne 8.VIII.2001

Klíčová slova: atomová absorpční spektrometrie, kadmium, olovo, rtuť, krevní plazma, kočka domácí

Úvod

Nedostatek informací o obsahu toxických těžkých kovů v organismu kočky domácí třísť názory odborné veřejnosti na jejich účast v patogenezi poruch metabolismu koček od zcela pozitivního hodnocení až po zdrženlivé stanovisko. Kočky vykazují zvláštnosti metabolických procesů, které u nich podmiňují vyšší toxicitu xenobiotik. Omezená schopnost koček tvořit v játrech a vylučovat ledvinami netoxické metabolity kovů vyvolává nutnost ověřit jejich dopad na vnitřní prostředí¹.

Na I. Interní klinice Fakulty veterinárního lékařství Veterinární a farmaceutické univerzity v Brně je dlouhodobě studován výskyt zdravotních poruch u koček v České republice. U pacientů je prováděno klinické vyšetření včetně odběru a zpracování krve. Vzorky krevní plazmy, které byly podrobeny řadě diagnostických testů, byly následně použity pro prvkovou analýzu. Stanovení stopových koncentrací vybraných prvků v mikrolitrových objemech vzorků vyžaduje použití vysoce citlivých analytických technik a přísné vyloučení možných kontaminací v průběhu zpracování a analýzy vzorků.

Jednou z nejpoužívanějších metod pro stopovou a ultrastopovou prvkovou analýzu klinických materiálů je stále atomová absorpční spektrometrie s elektrotermickou atomizací (ET AAS). Vysoká citlivost a selektivita metody ET AAS a malá spotřeba vzorku jsou základní požadavky při analýze klinických materiálů. Tělní tekutiny, jako je krev, krevní plazma, sérum, moč, mléko, je možné dávkovat do atomizátoru přímo či po příslušném ředění. V tomto případě je nevyhnutelné pracovat s použitím účinného systému kompenzace neselektivní absorpce. Ta je způsobena složením biologické matrice. Vzhledem k její komplikovanosti, vysokým obsahům organických sloučenin a vysoké solnosti se doporučuje použít kompenzaci na principu Zeemanova jevu. Ani tento neúčinnější způsob korekce neselektivní absorpce bohužel neřeší problémy v celém rozsahu, a proto je vždy třeba danou metodu ověřit a v případě neúspěchu přistoupit k odstranění organické matrice mineralizací vzorku. Dnes převažující používání rozkladu na mokré cestě směsí kyselin a oxidačních činidel pomocí mikrovlnné energie vede k nežádoucímu zředění a kontaminaci vzorku. Pro stanovení Cd a Pb v klinických materiá-

lech lze s úspěchem použít i suchý rozklad za kontrolovaných podmínek, který spolehlivě odstraní organickou matici². Vzniklý popel lze rozpustit ve stejném, případně menším objemu zředěných kyselin. Takto lze zachovat či zkoncentrovat původní stopový obsah analytu.

Specifickým problémem při analýze biologických materiálů je stanovení rtuti, která bývá vázána v těkavých organických sloučeninách (methylrtuť, dimethylrtuť), u kterých je při rozkladu vzorků na mokré cestě reálné nebezpečí ztrát. Proto je pro stanovení rtuti velmi vhodné použít jednoúčelového spektrometru AMA 254 (Advanced Mercury Analyzer, Altec Praha), do kterého se analyzovaný vzorek dává v nativním stavu bez předchozí mineralizace.

Cílem předložené práce je stanovit v krevní plazmě kočky domácí stopové obsahy kadmia a olova metodou ET AAS a rtuti pomocí analyzátoru AMA 254 a porovnat u studovaného souboru jedinců obsah těchto prvků s jejich klinickým stavem.

Experimentální část

Chemikálie

K přípravě vzorků a při vlastní analýze byly použity následující chemikálie, a to v nejvyšší dostupné čistotě: HNO₃ konc. Suprapur (Merck, Darmstadt, SRN), PdCl₂ 10 mg.l⁻¹ Pd (Lachema Brno, a.s.), Mg(NO₃)₂·6 H₂O p.a. (Merck, Darmstadt, SRN), NH₄NO₃ p.a. (VEB Jenapharm, SRN). K přípravě standardních roztoků pro kalibraci byly použity zásobní roztoky těchto kovů o koncentraci 1 mg.ml⁻¹ v 0,5 mol.l⁻¹ HNO₃ (Merck, Darmstadt SRN). K ověření správnosti analytického postupu byl použit referenční materiál Seronorm (TM) Whole blood I (Lot. No. 404 107). Při přípravě roztoků byla používána vysoce čistá voda, upravená systémem Ultra-clear (SC Barsbüttel, SRN). Dále byl pro rozkladný systém APION používán kyslík čistoty 2.0 (SIAD VTG) a amoniak čistoty 3.3 (Linde, Praha), pro ET AAS argon o čistotě 5.0 (SIAD VTG) jako inertní plyn a pro AMA 254 kyslík čistoty 2.0 (Linde, Praha) jako nosný plyn.

Vzorky

Krev byla odebírána z žíly *vena cephalica* do zkumavek ošetřených heparinem (15 m.j.ml⁻¹ krve, Heparin Léčiva). Ihned po odběru krve byly vzorky odstředěny na centrifuze MPW – 52 při 5000 ot.min⁻¹ po dobu 10 minut. Supernatant (vzorek krevní plazmy) byl přenesen pipetou do polyethylenové zkumavky (typ Eppendorf) a uchováván až do doby analytického vyšetření v mrazicím boxu při –20 °C. Před analýzou byly vzorky zvolna rozmrazeny za laboratorní teploty a homogenizovány protřepáním.

Instrumentace

Obsah kadmia a olova byl stanoven v mineralizátech krevní plazmy získaných předchozím rozkladem v laboratorním zařízení Dry Mineralizer APION (TESSEK Praha). Analýza byla prováděna na atomovém absorpčním spektrometru firmy Perkin-Elmer, model 4110 ZL, vybaveném automatickou Zeemanovskou korekcí pozadí, příčné vyhříváním grafitovým atomizátorem (THGA) s integrovanou Lvovovou plat-

formou a příslušnými výbojkami s dutou katodou. Byly měřeny hodnoty integrované absorpce při vlnových délkách 228,8 nm pro kadmium a 283,3 nm pro olovo při spektrální šířce štěrbin 0,7 nm v obou případech.

Rtuť byla ve vzorcích krevní plazmy stanovena jednoúčelovým atomovým absorpčním spektrometrem AMA 254.

Postup

Stanovení kadmia a olova v krevní plazmě

Rozklad vzorků

Vzorky krevní plazmy byly před analýzou zvolna rozmrazeny za laboratorní teploty. Pro rozklad bylo do předčištěných mineralizačních nádobek pipetováno 200 μl vzorku. V jedné rozkladné sérii bylo vždy zpracováno 8 vzorků a 4 slepé pokusy. Rozkladný proces sestávající z fáze sušení a fáze mineralizace trval 10 hodin (teplota sušení 110 °C, teplota mineralizace 360 °C). Po proběhnutí rozkladného procesu byl vzniklý bílý popel rozpuštěn v 10 μl koncentrované kyseliny dusičné a 190 μl vysoce čisté vody.

Analýza mineralizovaných vzorků

Kadmium a olovo byly stanoveny v mineralizovaných vzorcích krevní plazmy za použití optimalizovaného teplotního programu (tab. I) v přítomnosti chemických modifikátorů. Pro oba analyty bylo jako modifikátoru použito chloridu paladnatého, a to v množství 10 μg Pd. Modifikátor byl zbaven stop kadmia a olova přímo v atomizátoru předběžnou úpravou při teplotě 1400 °C. Následně pak bylo dávkováno 20 μl roztoku mineralizátu s 10 μl dalšího modifikátoru – pro kadmium s 10 μg $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ a pro olovo se směsí 5 μg $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ a 50 μg NH_4NO_3 .

Tabulka I

Optimalizované podmínky stanovení Cd a Pb

| Kov | Proces | Teplota [°C] | Doba [s] | |
|-----|-----------|--------------|----------|--------|
| | | | nárůstu | trvání |
| Cd | pyrolýza | 500 | 20 | 30 |
| | atomizace | 1700 | 0 | 3 |
| Pb | pyrolýza | 800 | 20 | 20 |
| | atomizace | 1900 | 0 | 4 |

Kalibrováno bylo metodou standardního přídávku v lineární oblasti kalibrační závislosti, tj. pro kadmium v rozsahu 0–4 $\mu\text{g.l}^{-1}$ a pro olovo 0–150 $\mu\text{g.l}^{-1}$.

Pro ověření správnosti a přesnosti celého stanovení byl analyzován referenční materiál a krevní plazma s definovaným přídávkem kadmia a olova.

Stanovení rtuti v krevní plazmě

Rtuť byla stanovena přímo ve vzorcích krevní plazmy. Na niklovou dávkovací lodičku analyzátoru bylo pipetováno 100 μl vzorku. Použitý režim analýzy sestával z fáze sušení

vzorku (70 s), fáze rozkladu vzorku (180 s) a fáze prodlevy mezi skončením rozkladu vzorku a následným vypuzením rtuti do měřících kyvet (45 s).

Výsledné hodnoty slepých pokusů byly zjištěny na základě měření prázdné lodičky za stejných podmínek.

Kalibrace přístroje AMA 254 byla prováděna standardním roztokem rtuti o koncentraci 0,1 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ v 0,1 mol.l^{-1} kyselíně dusičné při dávkování 100 μl roztoku.

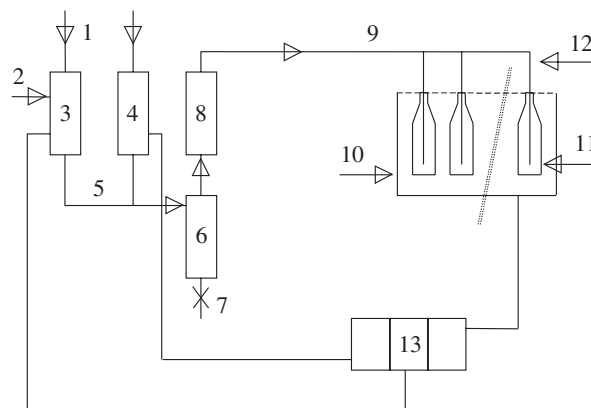
Pro ověření správnosti metody byl analyzován referenční materiál, přesnost metody byla zjištěna opakovaným měřením vzorku hovězí krevní plazmy se srovnatelným obsahem rtuti.

Výsledky a diskuse

Optimalizace stanovení

Nejprve byla ověřována možnost analyzovat přímo vzorky krevní plazmy. I přes ředění vzorku a aplikaci doporučených modifikátorů se nepodařilo dostatečně odstranit silný rušivý vliv organických komponent vzorku. Vlastní specifický absorbanční signál byl v mnohých případech příliš nízký, a to na pozadí velmi širokého nespecifického signálu, který bylo nesmírně obtížné – i přes použití účinné Zeemanovské techniky – kompenzovat. Matrice vzorku rovněž prudce snižovala životnost grafitového atomizátoru. Proto byly vzorky před vlastní analýzou podrobeny mineralizaci.

Rozklad vzorků v zařízení Dry Mineralizer APION probíhá na suché cestě a spočívá v zavádění superoxidační směsi plynů O_2 , NO_x , O_3 do skleněných nádobek se vzorky, které jsou vyhřívány na zvolenou teplotu (obr. 1). Vzniklý popel má jemnou strukturu a snadno se rozpouští i v malém množství zředěných kyselin. Zavádění směsi oxidačních plynů do rozkladných nádobek s úzkým hrdlem snižuje riziko kontaminace z okolního prostředí na minimum. Aby se zabránilo možnému kypění vzorku během sušení, bylo nutné nastavit pozvolné vyhřívání nádobek se vzorky, tj. sušení po dobu 1 hodiny při teplotě 110 °C. Pro mineralizaci odpadku byla zvolena teplota



Obr. 1. Schéma laboratorního zařízení Dry mineralizer APION; 1 – přívod O_2 , 2 – přívod NH_3 , 3 – spalovací pec NH_3 , 4 – ozonizátor, 5 – směšovací trubice, 6 – sběrač kondenzátu (HNO_3), 7 – vypouštěcí kohout, 8 – chladič, 9 – rozvod plynů, 10 – vyhřívávaný blok, 11 – mineralizační nádoby, 12 – přívodní kapiláry, 13 – regulovaný programovatelný napájecí zdroj vyhřívání

360 °C, při které nedochází ke ztrátám analytů. Doba mineralizace byla závislá na množství rozkládaného vzorku. Pro dávky 200 µl krevní plazmy postačilo zahřívát nádobky 4 hodiny. Během celého procesu sušení a mineralizace byla zaváděna směs oxidačních plynů.

Pro mineralizáty krevní plazmy byly optimalizovány podmínky stanovení ET AAS. Optimální teploty pyrolýzy a atomizace byly stanoveny pomocí tzv. křivek pyrolýzy a atomizace. Pyrolytická křivka pro kadmium byla měřena v intervalu teplot 200–800 °C, atomizační v intervalu 1000–2200 °C, totéž pro olovo v intervalech 300–1300 °C a 1200–2200 °C. Při stanovení kadmia a olova, u kterých hrozí nebezpečí ztrát analytu při termické úpravě vzorku, bylo nutné použít chemického modifikátoru, který stabilizuje analyt nebo zvyšuje těkavost nežádoucí matrice. Z řady doporučených a vyzkoušených modifikátorů^{3–7} bylo pro stanovení kadmia v rozložených vzorcích krevní plazmy nejvhodnější použít kombinaci palladia a dusičnanu hořečnatého. Příměsí kadmia a olova v modifikátoru bylo možné se zbavit *in situ* v grafitovém atomizátoru po nadávkování roztoku modifikátoru a jeho pyrolýze při teplotě 1400 °C. V dalším kroku byl pak dávkován mineralizovaný vzorek krevní plazmy s roztokem dusičnanu hořečnatého. Pro stanovení kadmia v rozložené krevní plazmě koček za použití uvedené kombinace modifikátorů v množství 10 µg Pd a 10 µg Mg(NO₃)₂ byla jako optimální nalezena teplota pyrolýzy 500 °C a teplota atomizace 1700 °C. Při stanovení olova v mineralizované krevní plazmě se ukázalo, že je vedle roztoku PdCl₂ v množství 10 µg Pd vhodné použít také směsný roztok dusičnanu hořečnatého a amonného v množstvích 5 µg Mg(NO₃)₂ a 50 µg NH₄NO₃. Použití této směsi vedlo k výraznému snížení signálu pozadí. Při použití uvedených modifikátorů byla pro stanovení olova jako optimální nalezena teplota pyrolýzy 800 °C a teplota atomizace 1900 °C.

Uvedené podmínky byly jak při stanovení kadmia, tak při stanovení olova kompromisem z hlediska charakteru signálu analytu (proporce signálu – výška/šířka) a velikosti neselektivní absorpce.

Podmínky vhodné pro stanovení rtuti při analýze krevní plazmy byly odvozeny z přístrojového doporučení výrobce. Používaný teplotní režim byl popsán.

Charakteristiky stanovení

Při zjišťování obsahu kadmia a olova v krevní plazmě byly v průběhu experimentální práce analyzovány vzorky krevní plazmy 138 jedinců. Paralelně s tím bylo uskutečněno 70 slepých pokusů. Průměrná hodnota obsahu analytů v těchto slepých stanoveních, která prošla celým analytickým procesem podobně jako vzorky, činila 0,1 µg.l⁻¹ Cd a 1,2 µg.l⁻¹ Pb. Průměrná hodnota slepých pokusů při stanovení rtuti, změřených analýzou prázdné lodičky, činila 0,062 ng Hg, což je v přepočtu na dávkované množství 100 µl krevní plazmy 0,62 µg.l⁻¹ Hg. Hodnoty slepých pokusů byly od stanoveného obsahu analytů v konečném vyhodnocení odečítány.

Detekční limit byl vypočten ve smyslu doporučení IUPAC⁸ pro spektrometrická měření jako trojnásobek směrodatné odchylky fluktuace slepého stanovení. Odpovídající hodnota detekčního limitu v krevní plazmě byla pro kadmium 0,1 µg.l⁻¹ a pro olovo 1,2 µg.l⁻¹. Detekční limit při stanovení rtuti byl 0,33 µg.l⁻¹ při dávkování 100 µl vzorku.

Citlivost stanovení, vyjádřená charakteristickou hmotnos-

tí (m_0), činila při optimálních podmínkách měření pro kadmium 1,6 pg, pro olovo pak 28 pg.

Testování správnosti analytického procesu bylo při stanovení kadmia a olova prováděno dvěma způsoby, a to analýzou referenčního materiálu Seronorm (TM) Whole blood I (Lot. No. 404 107) a testem návratnosti. V referenčním materiálu s deklarovaným obsahem kadmia 0,67–0,76 µg.l⁻¹ bylo analýzou čtyř paralelních vzorků stanoveno (0,79±0,09) µg.l⁻¹ Cd. Pro olovo byla nalezena hodnota (32,9±3,6) µg.l⁻¹, která se nachází v intervalu deklarovaného obsahu 31–39 µg.l⁻¹. Test návratnosti byl uskutečněn s přidávkou známých množství analytů ke krevní plazmě. Čtyři paralelní vzorky s přidávkou 400 pg kadmia a 4 ng olova ke 200 µl směsné krevní plazmy byly rozkládány a měřeny současně se čtyřmi paralelními vzorky samotné plazmy a čtyřmi slepými pokusy. Výsledek průměrné návratnosti kadmia byl 104±5,5 %. U olova pak tato hodnota činila 95,3±6,8 %. Pro ověření správnosti stanovení rtuti byl analyzován referenční materiál Seronorm (TM) Whole blood I (Lot. No. 404 107) s definovaným obsahem 3 µg.l⁻¹ Hg. Nalezená hodnota obsahu rtuti činila (2,90±0,13) µg.l⁻¹.

Pro stanovení přesnosti metody bylo využito výsledků analýzy čtyř paralelních vzorků referenčních materiálů. Relativní směrodatná odchylka stanovení, vyjádřená v procentech, činila pro kadmium 7,5 % a pro olovo 4,1 % pro shora uvedené koncentrační hladiny obou analytů. Pro testování přesnosti stanovení rtuti byla využita hovězí krevní plazma. Relativní směrodatná odchylka pro 10 paralelních analýz činila 5,4 % při koncentraci 1,72 µg.l⁻¹ Hg.

Obsah kovů v krevní plazmě

Obsahy sledovaných analytů ve 138 vzorcích krevní plazmy koček se pohybovaly v intervalu 0,10–9,40 µg.l⁻¹ Cd, 1,20–50,10 µg.l⁻¹ Pb a 0,33–15,10 µg.l⁻¹ Hg.

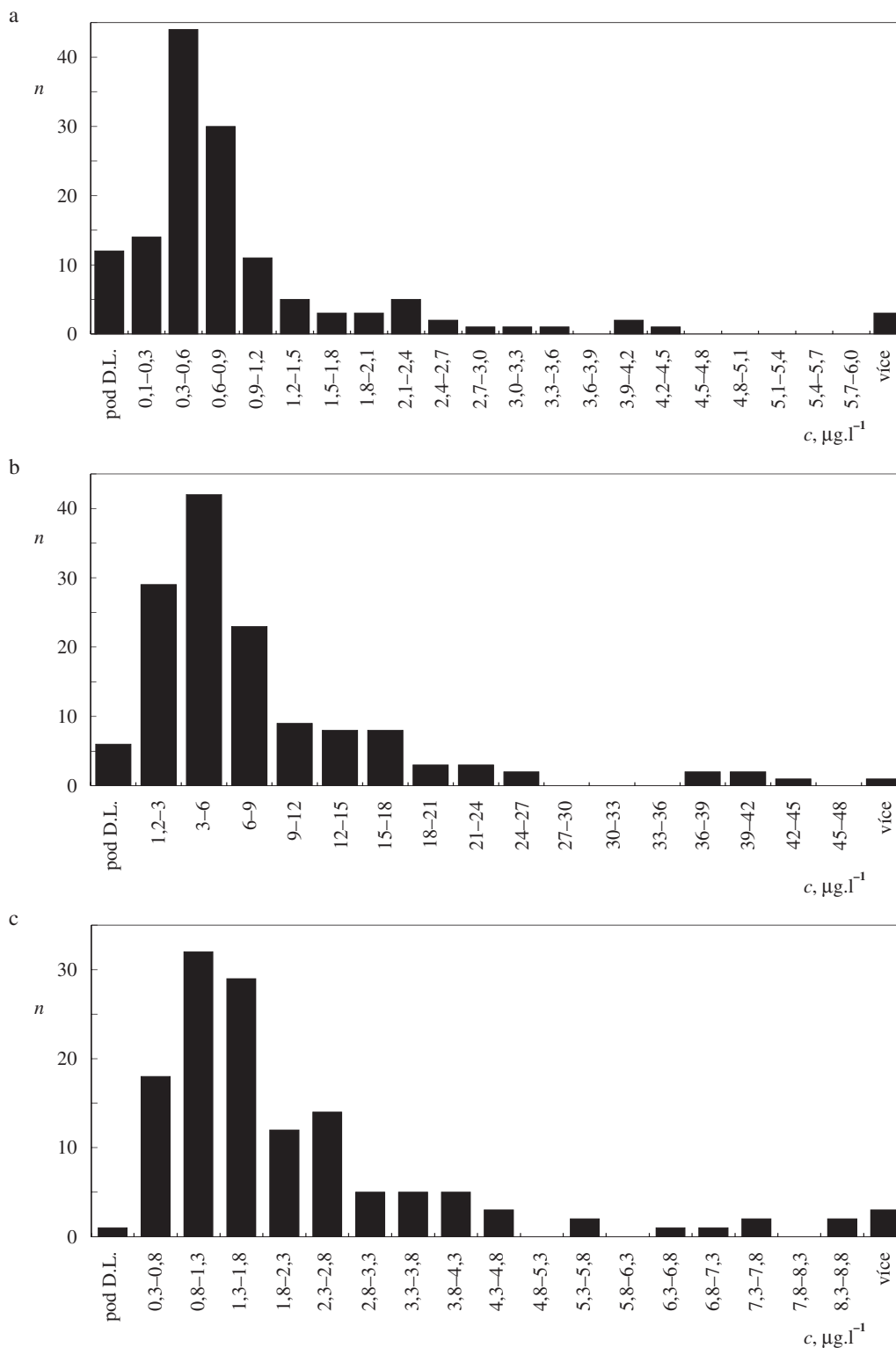
Rozdělení výsledků obsahu kovů ve vzorcích je graficky znázorněno na obrázku 2. Z grafického zpracování je patrné, že rozložení výsledků obsahu analytů neodpovídá symetrickému normálnímu rozdělení, ale je na jedné straně ohraničeno detekčním limitem, na druhé straně je pokles četnosti pozvolnější a vyskytují se zde extrémní hodnoty, blíží se rozdělení logaritmicko-normálnímu. Pro charakterizaci výsledků bylo použito mediánu⁹, robustního odhadu parametrů polohy, často používaného v obdobných studiích pro svoji přesnou interpretaci, a to jak pro symetrická, tak i nesymetrická rozdělení. Medián obsahu analytů ve 138 vzorcích krevní plazmy koček byl 0,59 µg.l⁻¹ Cd se směrodatnou odchylkou mediánu $s_M = 0,05$; 5,4 µg.l⁻¹ Pb s odchylkou $s_M = 0,6$ a 1,59 µg.l⁻¹ Hg s odchylkou $s_M = 0,10$.

Mezi obsahy kovů v jednotlivých vzorcích nebyla nalezena vzájemná statisticky významná korelace. Vzájemná korelace nebyla nalezena ani mezi obsahem kadmia a rtuti, ani mezi obsahem olova a rtuti.

Obsah jednotlivých elementů v krevní plazmě byl srovnán s výsledky studií analýzy lidské krve. Kadmium je mezi složky krve rozděleno relativně rovnoměrně. Na základě publikovaných výsledků obsahu kadmia v krvi, resp. krevní plazmě, které se pohybují řádově v desetínách až jednotkách µg.l⁻¹ (cit.^{10–13}), lze konstatovat, že obsah kadmia v dané tělní tekutině je u lidí a koček řádově srovnatelný. Obsah olova v krvi se pohybuje řádově v desítkách až stovkách µg.l⁻¹ (cit.^{10,12,14,15}).

Olovo však je jedním z elementů, které nejsou mezi složky krve rozděleny rovnoměrně. V převážné míře je vázáno na červené krvinky^{11,12}. V krevní plazmě zůstává méně než 10 %,

což odpovídá řádově jednotkám až desítkám $\mu\text{g.l}^{-1}$ Pb. Právě do tohoto intervalu spadají také výsledky analýzy krevní plazmy koček. Podobně ani rtuť není mezi jednotlivé složky krve



Obr. 2. Rozdělení výsledků obsahu (c): a – kadmia, b – olova, c – rtuti v krevní plazmě koček; n - četnost

rozložena rovnoměrně a je také vázána především na červené krvinky. Koncentrace rtuti v krevní plazmě u lidí se pohybuje řádově v jednotkách $\mu\text{g.l}^{-1}$ (2–10 $\mu\text{g.l}^{-1}$), v krvi pak je její koncentrace 5–20 $\mu\text{g.l}^{-1}$ (cit.¹⁶). Výsledky obsahu rtuti získané analýzou krevní plazmy koček jsou tedy s obsahem rtuti v krevní plazmě lidí také řádově srovnatelné.

Srovnání výsledků s dalšími poznatky o jedincích

Srovnání s klinicko-diagnostickými charakteristikami

Vnitřní prostředí koček je charakterizováno určitými diagnostickými kritérii získanými analýzou krevní plazmy¹⁷. Biochemicky byla hodnocena jediná funkce jater měřením aktivity alaninaminotransferasy (ALT), aspartátaminotransferasy (AST), alkalické fosfatasy (ALP) a množství celkové bílkoviny (CB), jedná funkce ledvin dle množství fosforu (P), močoviny (Urea) a kreatininu (Krea) v krevní plazmě. Na základě znalosti hodnot uvedených diagnostických kritérií bylo možné se pokusit korelovat vzájemně tyto parametry s obsahem kadmia, olova a rtuti ve vzorcích krevní plazmy.

Analýzou výsledků testů ALT, AST, ALP, CB a P a nalezených obsahů kadmia, olova či rtuti v jednotlivých vzorcích nebyla nalezena žádná statisticky významná korelace. Pouze vzájemný vztah obsahu olova a kreatininu vykazoval výraznější míru korelace, a to tak, že u vzorků s vyšším obsahem Pb byl nalezen též zvýšený obsah kreatininu. Statisticky prokazatelnou korelací bylo možno pozorovat také u zvýšeného obsahu olova a močoviny v krevní plazmě. Pro kadmium a rtuť nebyly mezi uvedenými parametry nalezeny žádné statisticky významné korelace.

V uvedeném reprezentativním souboru koček se vyskytlo devět jedinců s chronickým selháním ledvin (CRF) a tři jedinci s akutním selháním ledvin (ARF). Mimo jeden případ s ARF patří ostatních jedenáct jedinců mezi třináct s nejvyšším nalezeným obsahem olova v krevní plazmě. Na základě toho lze konstatovat, že zvýšený obsah olova v krevní plazmě a selhání ledvin spolu vzájemně souvisejí. U některých jedinců s uvedeným poškozením ledvin byl pozorován také zvýšený obsah kadmia a rtuti v krevní plazmě. Naproti tomu byly nalezeny vzorky s vysokým obsahem rtuti, aniž by došlo k poruchám funkce ledvin.

Srovnání s dalšími charakteristikami jedinců

Vzorky byly odebírány od koček žijících v Brně, Praze, Ostravě, Ústí nad Labem, Hradci Králové, Opavě, Plzni a Vlašimi. Přestože zastoupení v jednotlivých skupinách zkoumaného souboru nebylo rovnoměrné, lze konstatovat, že mezi skupinami nebyly nalezeny statisticky významné rozdíly v obsahu sledovaných kovů.

V souboru 138 jedinců bylo 70 samic (F) a 68 samců (M). Rozdělení obsahu kadmia, olova i rtuti u obou pohlaví bylo velmi podobné. I když u samců byly střední hodnoty obsahu Cd, Pb a Hg nepatrně vyšší, nelze rozdíly v obsahu analytů považovat za statisticky významné.

Dále byly výsledky hodnoceny v souvislosti s věkem jedinců. Pro obsah kadmia ani pro obsah olova či rtuti stanovený v krevní plazmě nebyla ve vztahu k věku nalezena významná korelace.

V reprezentativním souboru bylo také zastoupeno několik plemen kočky domácí. Výrazně byla ve výběru zastoupena následující plemena: domácí krátkostrstá (DK) a perská (P). Ojedinelý, pouze jednotkový, byl pak výskyt koček siamských (S), ruských modrých (RM), burmských (BU) či ragdoll (RAD).

Na základě uvedených poznatků lze u daného výběru konstatovat, že pro nalezené obsahy kadmia, olova a rtuti v krevní plazmě nebyla zjištěna korelace s takovými charakteristikami jedinců, jako jsou místo původu, pohlaví, věk a plemeno jedince.

Závěr

Získané výsledky obsahu kadmia, olova a rtuti v krevní plazmě koček jsou řádově srovnatelné s obsahem uvedených kovů v lidské krevní plazmě a pohybují se v intervalu 0,1–9,4 $\mu\text{g.l}^{-1}$ Cd, 1,2–50 $\mu\text{g.l}^{-1}$ Pb a 0,3–15 $\mu\text{g.l}^{-1}$ Hg. Při hodnocení výsledků obsahu kadmia, olova a rtuti nebyla nalezena statisticky významná vzájemná korelace. Podobně tomu bylo také při srovnání obsahu analytů s hodnotami některých klinicko-diagnostických parametrů a dalšími charakteristikami jedinců, jako je místo původu, pohlaví, věk či plemeno. Pouze u vzorků se zvýšeným obsahem olova byla nalezena významná korelace s vyšším obsahem kreatininu a s diagnostikovaným akutním nebo chronickým selháním ledvin.

Tato studie byla provedena za finanční podpory MŠMT – projekt G4/2301 FRVŠ. Autoři děkují doc. MVDr. Z. Knotkovi, CSc. z I. Interní kliniky Fakulty veterinárního lékařství VFU v Brně za poskytnutí vzorků krevní plazmy a výsledků diagnostických testů a Ústřednímu kontrolnímu a zkušebnímu ústavu zemědělskému v Brně za poskytnutí analyzátoru AMA 254.

LITERATURA

1. Wilcke J. R., v knize: *The Cat Disease and Clinical Management* (Sherding R. G., ed.), 2. vyd., sv 1. Churchill, Livingstone 1994.
2. Mader P., Čurdová E.: *Chem. Listy* 91, 227 (1997).
3. Burguera J. L., Burguera M.: *J. Anal. At. Spectrom.* 8, 235 (1993).
4. Alexaki E., Samara C., Alexopoulos C., Tsafaris F., Smokovitis A.: *Environ. Contam. Toxicol.* 45, 824 (1990).
5. Subramanian K. S., Meranger J. C.: *Clin. Chem. (Washington, D. C.)* 27, 1866 (1981).
6. Jin Z., Shouguo J., Shikun Ch., Desen J., Chakraborti D.: *Fresenius' J. Anal. Chem.* 337, 877 (1990).
7. Moreira M., Curtius A. J., Campos R. C.: *Analyst* 120, 947 (1995).
8. *IUPAC Compendium of Analytical Nomenclature, Definitions, and Rules*, 2. vyd. Blackwell Scientific Publications, Oxford 1987.
9. Meloun M., Militký J.: *Statistické zpracování experimentálních dat*. Edice PLUS, Praha 1994.
10. Cibulka J.: *Pohyb olova, kadmia a rtuti v biosféře*. Academia, Praha 1991.
11. Castillo J. R., Concha I., Martinez C.: *Atom. Spectroscopy* 8, 172 (1987).
12. Subramanian K. S., Meranger J. C.: *Clin. Chem. (Washington, D. C.)* 27, 1866 (1981).

13. Jin Z., Shouguo J., Shikun Ch., Desen J., Chakraborti D.: Fresenius' J. Anal. Chem. 337, 877 (1990).
14. Hodges D. J., Skelding D.: Analyst 108, 813 (1983).
15. Hudník V., Marolt-Gomišček M., Gomišček S.: Anal. Chim. Acta 157, 143 (1984).
16. Hutzinger O.: *The Handbook of Environmental Chemistry*, sv. 3, část A: *Anthropogenic Compounds*. Springer-Verlag, Berlin 1996.
17. Bock U.: *Směrné hodnoty důležitých laboratorních vyšetření pro domácí zvířata*. Vetpress, Jílové u Prahy 1994.

V. Smetková^a, B. Dočekal^b, J. Suchý^a, and H. Dočekalová^a (^a*Faculty of Chemistry, Brno University of Technology*, ^b*Institute of Analytical Chemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Brno*): **Determination of Cadmium, Lead and Mercury in Cat Blood Plasma**

A method for determination of Cd, Pb and Hg in blood plasma of the domestic cat was developed. The two-step procedure for determination of Cd and Pb is based on dry

ashing of blood plasma samples and subsequent electrothermal AAS quantitation. In the first step, samples are heated in glassy vials under nitrogen oxides using an Apion dry-mode mineralizer and the inorganic residue is then dissolved in a minimum amount of dilute high-purity nitric acid. In the second step, Cd and Pb are determined by graphite-furnace AAS employing a Perkin-Elmer Model 4110 ZL Zeeman-background-corrected spectrometer equipped with a transversally heated graphite atomizer. In order to stabilize analytes in graphite furnace, their chemical modification with prereduced Pd and other reagents is used. The amount of the used modifiers, temperature program and calibration mode are optimized. Hg is determined without decomposition of samples by AAS. Samples of blood plasma of 138 individuals were analyzed. The contents of Cd, Pb and Hg in the plasma were in the range 0.1–9, 1.2–50 and 0.3–15 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$, respectively. The achieved limits of detection based on the 3σ criterion were 0.1 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ Cd, 1.2 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ Pb and 0.33 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ Hg. The results were correlated with complementary data such as breed, sex, age, environmental conditions, and some other veterinary diagnostic parameters.

Zavedená farmaceutická firma v americkém vlastnictví
hledá pro své pracoviště v Praze pro oddělení QC

VŠ/SŠ s praxí v oboru chemie – instrumentální analýza.

Znalost AJ výhodou. Nástup možný ihned.
Žádosti s profesním životopisem zašlete na:
Interpharma Praha, a.s., Komořanská 955, 143 10 Praha 12
fax: 02/4025144, e-mail: interpharma@interpharma-praha.cz

VÝUKA CHEMIE

KRITÉRIÁ POUŽITIA APROXIMATÍVNYCH VZŤAHOV PRI VÝPOČTE JEDNODUCHÝCH PROTOLYTICKÝCH ROVNOVÁH V ANALYTICKEJ CHÉMII

PETER TOMČÍK, MIRIAM BUČKOVÁ
a DUŠAN BUSTIN

*Katedra analytickej chémie, Fakulta chemickej a potravinárskej technológie, Slovenská technická univerzita, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, Slovenská republika
e-mail: tomcik@cvt.stuba.sk*

Došlo dňa 10.VIII.2001

Kľúčové slová: protolytické rovnováhy, silné protolyty, slabé kyseliny, výpočet pH, aproximácie

Obsah

1. Úvod
2. Výpočet pH vodných roztokov silných kyselín a zásad
3. Výpočet pH vodných roztokov slabých kyselín
4. Záver

1. Úvod

Protolytické rovnováhy sú neoddeliteľnou súčasťou výučby chemických rovnováh v analytickej chémii. Pochopenie podstaty javov a chemizmu pri jednoduchých prípadoch chemických rovnováh je pre analytického chemika veľmi dôležité, pretože rozvíja jeho špekulatívne myslenie. Pritom, príklady na chemické rovnováhy musia byť jednoduché, pretože zložitejšie rovnováhy vedú k algebraicky náročnému riešeniu, často realizovateľnému len pomocou výpočtovej techniky za použitia softwaru, ktorý často ani nevyžaduje chemické myslenie.

Najčastejším príkladom výpočtu jednoduchých protolytických rovnováh je výpočet pH vo vodnom roztoku, ktorý sa dá realizovať pomocou vzťahu

$$\text{pH} = -\log a(\text{H}_3\text{O}^+) = -\log \{[\text{H}^+] \gamma\} \quad (1)$$

V analytickej chémii je zvykom písať kvôli zjednodušeniu iba H^+ . Pritom je známe, že protón vo vodnom roztoku samostatne neexistuje, ale okamžite sa solvatuje štyrmi nedisociovanými molekulami vody¹ za vzniku H_9O_4^+ .

Vo väčšine prípadov ide o dostatočne zriedené roztoky, preto môžeme aktivitný koeficient γ považovať za rovný jednej. Vzťah

$$\text{pH} = -\log [\text{H}^+] \quad (2)$$

je jednoduchý, avšak výpočet $[\text{H}^+]$ je veľmi obťažný. Pri výpočte sa obvykle postupuje tak, že sa napíšu rovnovážne chemické rovnice, zistí sa, aké častice (katióny, anióny a molekuly) sa nachádzajú v danom roztoku. Podľa počtu častíc zúčastňujúcich sa na danej rovnováhe sa nájde rovnaký počet rovníc, čo zabezpečuje riešiteľnosť systému. Uvedený postup smeruje ku vzťahom, kde neznáma $[\text{H}^+]$ vystupuje v tretej, a niekedy aj vyššej mocnine, čo spôsobuje, že sa riešenie dá vykonať len iteračným spôsobom. Preto sa zohľadňujú isté zjednodušujúce predpoklady, ktoré vedú k aproximativným vzťahom. Rozsah ich platnosti je v študijnej literatúre diskutovaný len veľmi stručne, a preto niekedy ten, kto nemá skúsenosti, môže použiť chybný vzťah, a teda dostane chybný výsledok.

V tomto článku sú uvedené kritériá, relatívne presne determinujúce, kedy a ku akému zjednodušeniu sa možno uchýliť a aký vzťah použiť pri výpočte pH silných kyselín a zásad, ako aj slabých kyselín.

2. Výpočet pH vodných roztokov silných kyselín a zásad

Pri výpočte tohto najjednoduchšieho typu protolytickej rovnováhy je najlepšie vychádzať z Arrheniovej teórie, ktorá berie do úvahy elektrolytickú disociáciu daného silného protolytu. Podľa tejto teórie je silný protolyt vo svojom vodnom roztoku úplne disociovaný a svojou disociáciou poskytne H^+ ióny, ak ide o silnú kyselinu, alebo ióny OH^- , ak sa jedná o silnú zásadu.

Pri všeobecnom výpočte treba brať do úvahy aj disociáciu vody podľa rovnice



Rovnovážna konštanta tejto reakcie

$$K = [\text{H}^+][\text{OH}^-] / [\text{H}_2\text{O}] = 1,8 \cdot 10^{-16} \quad (4)$$

Koncentrácia vody je 1000/18, t.j. 55,56 mol.l⁻¹ a úpravou dostaneme vzťah pre iónový súčin vody

$$K_V = [\text{H}^+][\text{OH}^-] = 1 \cdot 10^{-14} \quad (5)$$

Vo vodnom roztoku silnej jednosýtnej kyseliny, napr. HCl, sa na rovnováhe budú zúčastňovať tieto častice:

katióny: $[\text{H}^+]$
anióny: $[\text{OH}^-], [\text{Cl}^-]$

Potrebujeme teda 3 rovnice.

1. Ak je kyselina chlorovodíková úplne disociovaná, platí:

$$[\text{HCl}] = 0 \text{ a } [\text{Cl}^-] = c_{\text{HCl}}$$

2. Podľa podmienky elektroneutrality roztoku platí, že súčet rovnovážnych koncentrácií katiónov sa musí rovnať súčtu rovnovážnych koncentrácií aniónov, ak ide o jednomocné ióny:

$$[\text{H}^+] = [\text{OH}^-] + [\text{Cl}^-] \quad (6)$$

$$[\text{H}^+] = [\text{OH}^-] + c_{\text{HCl}} \quad (7)$$

3. Pre $[\text{OH}^-]$ platí z (5) $[\text{OH}^-] = K_{\text{V}} / [\text{H}^+]$, a teda

$$[\text{H}^+] = (K_{\text{V}} / [\text{H}^+]) + c_{\text{HCl}} \quad (8)$$

Výpočet smeruje ku kvadratickej rovnici v normovanom tvare

$$[\text{H}^+]^2 - c_{\text{HCl}}[\text{H}^+] - K_{\text{V}} = 0 \quad (9)$$

Rovnovážna koncentrácia $[\text{H}^+]$ sa vypočíta podľa vzťahu

$$[\text{H}^+] = (c_{\text{HCl}} + \sqrt{c_{\text{HCl}}^2 + 4K_{\text{V}}}) / 2 \quad (10)$$

Rovnica (9) je exaktným vzťahom pre výpočet $[\text{H}^+]$ a platí aj pre veľmi zriedené roztoky akejkoľvek silnej jednosýtnej kyseliny; ak položíme $c_{\text{HCl}} = 0$, dostaneme výsledok pH 7, čo zohľadňuje fyzikálnu skutočnosť.

Ak môžeme zanedbať prvý člen pravej strany rovnice (7), dostaneme známy jednoduchý aproximatívny vzťah

$$[\text{H}^+] = c_{\text{HCl}} \quad (11)$$

Pre vysoké koncentrácie silnej jednosýtnej kyseliny rovnica (11) poskytuje rovnaké výsledky ako rovnica (10), avšak čím je c_{HCl} menšie, tým viac sa výsledok odchyľuje od správnej hodnoty. Ak je koncentrácia $c_{\text{HCl}} < 10^{-7} \text{ mol.l}^{-1}$, hodnota pH získaná použitím rovníc (10) a (2) je zo zásaditej oblasti, čo svedčí, že chyba určenia $[\text{H}^+]$ je veľká.

Kritériá použiteľnosti aproximatívnych vzťahov sú založené na hľadaní hodnoty kritickej koncentrácie, t.j. koncentrácie, pri ktorej má chyba výpočtu $[\text{H}^+]$ podľa aproximatívneho vzťahu istú hodnotu v porovnaní so správnou hodnotou. O tom, kedy použiť exaktný (10) alebo aproximatívny (11) vzťah, rozhoduje nielen analytická koncentrácia silnej kyseliny, ale aj chyba, ktorú sme ochotní pri výpočte tolerovať. Platí, že čím väčšia je tolerovaná chyba, tým nižšia je koncentrácia, od ktorej môžeme aproximáciu použiť. Maximálnou prípustnou chybou určenia $[\text{H}^+]$ je obvykle 5 % (0,02 pH) (cit.¹), alebo 2,28 % (0,01 pH) (cit.²).

Kritickú koncentráciu silnej jednosýtnej kyseliny vypočítame podľa kritériálnej nerovnice:

$$[\text{H}^+]_{\text{approx}} / [\text{H}^+]_{\text{exakt}} \geq 1 - x \quad (c_{\text{HCl}} = c) \quad (12)$$

kde x (počet percent/100) je chyba v určení $[\text{H}^+]$. Dosadením za $[\text{H}^+]$ z rovníc (10) a (11) sa získa

$$\frac{2c}{c + \sqrt{c^2 + 4K_{\text{V}}}} \geq 1 - x \quad (13)$$

Kritická koncentrácia c sa teda vypočíta podľa vzťahu:

$$c \geq \sqrt{\frac{(1-x)^2}{x}} K_{\text{V}} \quad (14)$$

Ak ide o dvojsýtnu silnú kyselinu (napr. H_2SO_4), predpokladá sa, že je úplne disociovaná do druhého stupňa, a podmienka elektroneutrality môže byť vyjadrená nasledovne:

$$[\text{H}^+] = [\text{OH}^-] + 2[\text{SO}_4^{2-}] \quad (15)$$

Pre výpočet pH sa obdobným spôsobom odvodí exaktný vzťah (kvadratická rovnica)

$$[\text{H}^+]^2 - 2c_{\text{H}_2\text{SO}_4}[\text{H}^+] - K_{\text{V}} = 0 \quad (16)$$

ktorú možno zjednodušiť na aproximatívny vzťah

$$[\text{H}^+] = 2c_{\text{H}_2\text{SO}_4} \quad (17)$$

Kritickú koncentráciu H_2SO_4 vypočítame z kritériálnej nerovnice

$$\frac{4c}{2c + \sqrt{4c^2 + 4K_{\text{V}}}} \geq 1 - x \quad c_{\text{H}_2\text{SO}_4} = c \quad (18)$$

$$c \geq \sqrt{\frac{(1-x)^2}{4x}} K_{\text{V}} \quad (19)$$

Úplne analogicky možno postupovať aj v prípade silných jednosýtnych (NaOH, KOH) a silných dvojsýtnych ($\text{Ca}(\text{OH})_2$, $\text{Ba}(\text{OH})_2$) zásad. Ako ukazuje tab. I, riešenia kritériálnych nerovnic poskytujú rovnaké výsledky ako v prípade kyselín.

Z uvedeného vyplýva, že ak akceptujeme chybu v určení $[\text{H}^+]$ menej ako 5 %, musíme pH vodného roztoku silnej jednosýtnej kyseliny alebo zásady počítat podľa kvadratickej rovnice vtedy, keď je koncentrácia menšia ako $4,25 \cdot 10^{-7} \text{ M}$ (14), alebo $2,12 \cdot 10^{-7} \text{ M}$ (19) v prípade, že silná kyselina alebo zásada je dvojsýtna. Ak má byť chyba určenia pH menšia ako 0,01 pH, chyba určenia $[\text{H}^+]$ je $(1 - 10^{-0,01}) \cdot 100\%$ t.j. 2,28 %, hodnoty koncentrácií pre silnú jednosýtnu kyselinu a zásadu musia byť menšie ako $6,48 \cdot 10^{-7} \text{ M}$, resp. $3,24 \cdot 10^{-7} \text{ M}$ v prípade silnej dvojsýtnej kyseliny alebo zásady.

V prípade problému zadaného opačne, t.j. ak chceme vypočítať analytickú koncentráciu silného protolytu na základe daného pH, kvadratickú rovnicu používame vtedy, ak je pH väčšie ako 6,37 (chyba 5 %), resp. 6,19 (chyba 0,01pH) pri silných kyselinách, alebo ak je hodnota pH menšia ako 7,63 (chyba 5 %), resp. 7,81 (chyba 0,01pH) v prípade silných zásad.

Zistené hodnoty sú v dobrej zhode s literatúrou^{2,3}, kde sa odporúča počítat podľa kvadratickej rovnice vtedy, ak analytická koncentrácia silnej kyseliny alebo zásady je menšia ako $1 \cdot 10^{-6} \text{ M}$.

Tabuľka I

Vzťahy pre výpočet pH a kritériálne nerovnice silných zásad

| Protolyt | Silná zásada | |
|--|---|--|
| | jednosýtna | dvojsýtna |
| Príklad | NaOH, KOH | Ca(OH) ₂ , Ba(OH) ₂ |
| Podmienka elektroneutrality | [OH ⁻] = [H ⁺] + [Na ⁺] | [OH ⁻] = [H ⁺] + 2[Ca ²⁺] |
| Exaktný vzťah | [H ⁺] ² + c _{NaOH} [H ⁺] - K _V = 0 | [H ⁺] ² + 2c _{Ca(OH)₂} [H ⁺] - K _V = 0 |
| Aproximatívny vzťah | [H ⁺] = K _V / c _{NaOH} | [H ⁺] = K _V / 2c _{Ca(OH)₂} |
| Kritériálna nerovnica | $\frac{(-c + \sqrt{c^2 + 4K_V})/2}{K_V/c} > 1 - x$ | $\frac{-2c + \sqrt{4c^2 + 4K_V}}{K_V/c} > 1 - x$ |
| Kritická koncentrácia, resp. kedy použiť aproximáciu | $c > \sqrt{\frac{(1-x)^2}{x}} K_V$ | $c > \sqrt{\frac{(1-x)^2}{4x}} K_V$ |

3. Výpočet pH vodných roztokov slabých kyselín

Učebnicovým príkladom slabej kyseliny je kyselina octová, ktorá na rozdiel od silných kyselín nedisociuje úplne, ale podľa Brönstedovej teórie v súlade s rovnováhou, ktorá sa ustáli podľa hodnoty disociačnej konštanty.



to znamená, že v roztoku bude nenulová rovnovážna koncentrácia týchto častíc: neutrálne molekuly: H₂O (nemá vplyv na rovnováhu), CH₃COOH, anióny: CH₃COO⁻, OH⁻, kationy: H⁺.

Na popis sústavy potrebujeme teda 4 rovnice:

1. Podmienka elektroneutrality roztoku

$$[\text{H}^+] = [\text{CH}_3\text{COO}^-] + [\text{OH}^-] \quad (21)$$

2. Látková bilancia kyseliny octovej

$$[\text{CH}_3\text{COOH}] + [\text{CH}_3\text{COO}^-] = c_{\text{CH}_3\text{COOH}} \quad (22)$$

3. Vzťah pre disociačnú konštantu kyseliny octovej:

$$K_{\text{CH}_3\text{COOH}} = [\text{CH}_3\text{COO}^-] \cdot [\text{H}^+] / [\text{CH}_3\text{COOH}] \quad (23)$$

4. Vzťah pre iónový súčin vody

$$K_V = [\text{H}^+] [\text{OH}^-] \quad [\text{OH}^-] = K_V / [\text{H}^+] \quad (24)$$

Dosadzovacou metódou výpočet smeruje k vzťahu

$$K_{\text{CH}_3\text{COOH}} = [\text{CH}_3\text{COO}^-] \cdot [\text{H}^+] / [\text{CH}_3\text{COOH}] = \frac{\{[\text{H}^+] - (K_V / [\text{H}^+])\} \cdot [\text{H}^+]}{c_{\text{CH}_3\text{COOH}} - [\text{H}^+] + (K_V / [\text{H}^+])} \quad (25)$$

Potom možno postupovať štyrmi spôsobmi:

1. Exaktné riešenie rovnice (25) pre [H⁺] vedie ku kubickej rovnici,

$$[\text{H}^+]^3 + K_{\text{CH}_3\text{COOH}} \cdot [\text{H}^+]^2 - (K_{\text{CH}_3\text{COOH}} \cdot c_{\text{CH}_3\text{COOH}} + K_V) \cdot [\text{H}^+] - K_{\text{CH}_3\text{COOH}} \cdot K_V = 0 \quad (26)$$

z ktorej možno vypočítať koncentráciu [H⁺] iteračným spôsobom. Rovnica (26) je všeobecným vzťahom pre výpočet rovnovážnej koncentrácie vodíkových iónov vo vodnom roztoku slabej kyseliny. Pre nulovú koncentráciu slabej jednosýtnej kyseliny je riešenie $\sqrt{K_V}$, (čo platí pre samotné rozpúšťadlo).

2. Ak možno zanedbať [OH⁻] voči [H⁺] vzťah (25) sa zmení na:

$$K_{\text{CH}_3\text{COOH}} = [\text{H}^+]^2 / (c_{\text{CH}_3\text{COOH}} - [\text{H}^+]) \quad (27)$$

čo možno upraviť na kvadratickú rovnicu v normovanom tvare

$$[\text{H}^+]^2 + K_{\text{CH}_3\text{COOH}} \cdot [\text{H}^+] - K_{\text{CH}_3\text{COOH}} \cdot c_{\text{CH}_3\text{COOH}} = 0 \quad (28)$$

Rovnica (28) je riešiteľná napr. pomocou diskriminanta (fyzikálne významný koreň je kladný).

$$[\text{H}^+] = \left(-K_{\text{CH}_3\text{COOH}} + \sqrt{K_{\text{CH}_3\text{COOH}}^2 + 4K_{\text{CH}_3\text{COOH}} \cdot c_{\text{CH}_3\text{COOH}}} \right) / 2 \quad (29)$$

3. Ak možno zanedbať [H⁺], a teda aj K_V/[H⁺] oproti c_{CH₃COOH} (úbytok kyseliny disociáciou) a [H⁺] oproti K_V/[H⁺] nemožno zanedbať (uvažuje sa autoprotolýza vody), vzťah (25) sa zmení na

$$K_{\text{CH}_3\text{COOH}} = \frac{\{[\text{H}^+] - K_V / [\text{H}^+]\} \cdot [\text{H}^+]}{c_{\text{CH}_3\text{COOH}}} \quad (29a)$$

ktorého riešením je kvadratická rovnica bez lineárneho člena

$$[\text{H}^+] = \sqrt{K_{\text{CH}_3\text{COOH}} \cdot c_{\text{CH}_3\text{COOH}} + K_{\text{V}}} \quad (29b)$$

4. Ak možno zanedbať $[\text{H}^+]$ voči $c_{\text{CH}_3\text{COOH}}$ (úbytok kyseliny disociáciou) aj autoprotolýzu vody, dostaneme:

$$K_{\text{CH}_3\text{COOH}} = [\text{H}^+]^2 / c_{\text{CH}_3\text{COOH}} \quad (30)$$

a teda

$$[\text{H}^+] = \sqrt{K_{\text{CH}_3\text{COOH}} \cdot c_{\text{CH}_3\text{COOH}}} \quad (31)$$

Pri praktickom riešení rovnováhy slabej kyseliny nastávajú isté problémy, ku akému druhu aproximácie sa uchýliť. Uvedené zjednodušenia je pomerne ťažko realizovať, nakoľko obsahujú riešenie problému $[\text{H}^+]$ a môžu sa overiť len retrospektívne.

Situáciu značne komplikuje aj fakt, že na rozdiel od silných protolytov, kritická koncentrácia závisí nielen od chyby, ktorú ešte akceptujeme pri výpočte $[\text{H}^+]$, ale aj od hodnoty disociačnej konštanty príslušnej slabej kyseliny.

Na obr. 1 je zobrazená závislosť logaritmu kritickej koncentrácie od $\text{p}K$ vypočítaná pre chybu 0,01pH, teda 2,28 %. Táto chyba je definovaná pre krivky a, b, c, d, e nasledovne:

krivka a

$$\frac{|[\text{H}^+]_{\text{rov.29}} - [\text{H}^+]_{\text{rov.26}}|}{[\text{H}^+]_{\text{rov.26}}} \cdot 100 = 2,28 \quad (32)$$

krivka b

$$\frac{|[\text{H}^+]_{\text{rov.31}} - [\text{H}^+]_{\text{rov.26}}|}{[\text{H}^+]_{\text{rov.26}}} \cdot 100 = 2,28 \quad (33)$$

krivka c

$$\frac{|[\text{H}^+]_{\text{rov.31}} - [\text{H}^+]_{\text{rov.29}}|}{[\text{H}^+]_{\text{rov.29}}} \cdot 100 = 2,28 \quad (34)$$

krivka d

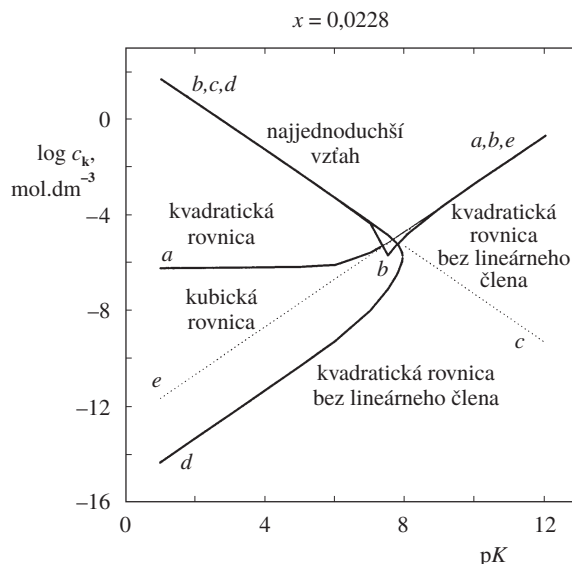
$$\frac{|[\text{H}^+]_{\text{rov.29b}} - [\text{H}^+]_{\text{rov.26}}|}{[\text{H}^+]_{\text{rov.26}}} \cdot 100 = 2,28 \quad (35)$$

krivka e

$$\frac{|[\text{H}^+]_{\text{rov.31}} - [\text{H}^+]_{\text{rov.29b}}|}{[\text{H}^+]_{\text{rov.29b}}} \cdot 100 = 2,28 \quad (35a)$$

Z priebehu daných kriviek je jasné, že kvadratickú rovnicu bez lineárneho člena pre kyseliny s $\text{p}K$ 1 až 6 uprednostníme pred kubickou v prípade extrémne zriedených roztokov, t.j. vtedy, ak je koncentrácia slabej kyseliny menšia, ako vypočítaná podľa veľmi približnej rovnice dolnej časti paraboly d na obr. 1:

$$\log c_{\text{k}} = \text{p}K - 16 - \log(0,2) \quad (35b)$$



Obr. 1. Závislosť logaritmu kritickej koncentrácie slabej kyseliny od $\text{p}K$ a oblasti použitia aproximatívnych vzťahov vypočítaných pre chybu 0,01pH; a – vymedzuje oblasť kritickej koncentrácie, pri ktorej sa výpočet rovnovážnej koncentrácie vodíkových iónov podľa kvadratickej rovnice (29) odchyľuje od exaktnej hodnoty vypočítanej z kubickej rovnice (26) o 2,28 % (chyba určenia pH je 0,01pH), b – vymedzuje oblasť kritickej koncentrácie, pri ktorej sa výpočet rovnovážnej koncentrácie vodíkových iónov podľa najjednoduchšieho vzťahu (31) odchyľuje od exaktnej hodnoty vypočítanej z kubickej rovnice (26) o 2,28 % (chyba určenia pH je 0,01pH), c – vymedzuje oblasť kritickej koncentrácie, pri ktorej sa výpočet rovnovážnej koncentrácie vodíkových iónov podľa kvadratickej rovnice (29) odchyľuje od hodnoty vypočítanej z kvadratickej rovnice bez lineárneho člena (29b) o 2,28 % (chyba určenia pH je 0,01pH), d – vymedzuje oblasť kritickej koncentrácie, pri ktorej sa výpočet rovnovážnej koncentrácie vodíkových iónov podľa kvadratickej rovnice bez lineárneho člena (29b) odchyľuje od hodnoty vypočítanej z kubickej rovnice (26) o 2,28 % (chyba určenia pH je 0,01pH), e – vymedzuje oblasť kritickej koncentrácie, pri ktorej sa výpočet rovnovážnej koncentrácie vodíkových iónov podľa najjednoduchšieho vzťahu (31) odchyľuje od hodnoty vypočítanej z kvadratickej rovnice bez lineárneho člena (29b) o 2,28 % (chyba určenia pH je 0,01pH)

Ak je $\text{p}K$ väčšie ako 6, spodná časť krivky d sa zakrivuje a jej analytické vyjadrenie je zložité. Od hodnoty $\text{p}K$ väčšej ako 7,92 kvadratická rovnica bez lineárneho člena poskytuje výsledky, ktorých odchýlka v porovnaní s kubickou rovnicou nikdy nepresahuje 2,28 %. Z tohto vyplýva, že použitie kubickej rovnice je zbytočné a plne ju nahrádza rovnica (29b). V tejto oblasti $\text{p}K$ sa rozhodujeme len medzi rovnicou (29b), alebo (31). Kritická koncentrácia pre použitie zjednodušenej rovnice, alebo kvadratickej rovnice bez lineárneho člena je vymedzená na obr. 1 krivkou e . Jej analytické vyjadrenie dostaneme z kritériálnej rovnice

$$[\text{H}^+]_{\text{rov.31}} / [\text{H}^+]_{\text{rov.29b}} = 1 - x \quad (36)$$

Dosadením bez indexu slabej kyseliny

$$\sqrt{Kc} / (\sqrt{Kc + K_{\text{V}}}) = 1 - x \quad (37)$$

Riešenie je

$$c_k = [(x - 1)^2 / (2x - x^2)] K_v / K \quad (38)$$

Logaritmovaním dostaneme rovnicu krivky *e*

$$\log c_k = \log \left[\frac{(x - 1)^2}{(2x - x^2)} \right] - 14 + pK \quad (39)$$

Ak je *pK* menšie ako 7,7, je odchýlka najjednoduchšieho vzťahu a kvadratickej rovnice bez lineárneho člena 2,28 %, ale obidve hodnoty rovnovážnych koncentrácií vodíkových iónov sú odchýlené o viac ako 2,28 % oproti exaktnej kubickej rovnici (bodkovaná časť krivky *c*).

Kritická koncentrácia použitia kvadratickej rovnice (29) a kubickej rovnice (26) (krivka *a*) závisí od *pK* veľmi málo a pre *pK* 1 až 3 má takú istú hodnotu ako hodnota vypočítaná zo vzťahu (19) odvodeného pre prípad silných kyselín. Pri hodnotách *pK* 6 až 7,7 však krivka *a* začína stúpať, aj jej analytické vyjadrenie je problematické. Možno konštatovať, že v tomto prípade kubickú rovnicu použijeme vtedy, ak koncentrácia týchto kyselín je menšia ako $1,3 \cdot 10^{-5}$ M. Pri *pK* väčšom ako 7,7 je krivka *a* dobre aproximovaná rovnicou (39) a ako sme už ukázali vyššie, použitie rovníc (26) a (29) nemá zmysel. Kubická rovnica je totiž dobre aproximovaná kvadratickou rovnicou bez lineárneho člena (29b), ktorá prechádza na najjednoduchší vzťah (31) pri koncentráciách daných rovnicou (39).

Kritickú koncentráciu, pri ktorej je odchýlka medzi kubickou rovnicou (26) a najjednoduchším vzťahom (31) 2,28 %, udáva krivka *b*. Pre hodnoty *pK* od 1 do 6,5 je krivka *b* totožná s krivkou *c*, ktorá udáva kritickú koncentráciu, pri ktorej sa najjednoduchší vzťah odchyľuje od kvadratickej rovnice o 2,28 %. Krivku *b* možno v tomto úseku *pK* aproximovať rovnicou krivky *c*, ktorú dostaneme z kritériálnej rovnice:

$$[H^+]_{rov,31} / [H^+]_{rov,29} = 1 + x \quad (40)$$

resp.

$$2 \sqrt{Kc_k} / \left(-K + \sqrt{K^2 + 4Kc_k} \right) = 1 + x \quad (41)$$

riešenie je

$$c_k = K \{ (1 + x) / [(1 + x)^2 - 1] \}^2 \quad (42)$$

logaritmovaním dostaneme rovnicu krivky *c*

$$\log c_k = 2 \log \left[\frac{1 + x}{(1 + x)^2 - 1} \right] - pK \quad (43)$$

pre $x = 2,28 / 100$

Od *pK* 6,5 je kritická koncentrácia chyby 0,01pH určená krivkou *b*, ktorá sa odchyľuje od linearity danej rovnicou (43) a pri *pK* rovnom 7,35 pretína krivku *a*. Kvôli zložitosti analytického vyjadrenia je užitočné zase využiť priaznivé odchýlenie krivky *b* a počítať kritickú koncentráciu podľa rovnice (43) až do *pK* hodnoty 7,7. Chyba bude menšia ako deklarovaných 0,01pH. Pre hodnoty *pK* väčšie ako 7,7 je síce chyba medzi

kvadratickou rovnicou a najjednoduchším vzťahom 2,28 %, avšak obe hodnoty rovnovážnej koncentrácie vodíkových iónov sa výrazne odchyľujú od exaktnej hodnoty vypočítanej podľa kubickej rovnice, a teda počítať kritickú koncentráciu podľa rovnice (43) nemá zmysel (bodkovaná časť krivky *c*).

Z uvedeného vyplýva, že koncentračná oblasť použitia kvadratickej rovnice sa so vzrastajúcou hodnotou *pK* rýchlo zužuje. Avšak pre niektoré slabé kyseliny je tak široká, že výpočet bežných roztokov musí ísť vždy cez kvadratickú rovnicu. Týka sa to najmä kyseliny šťavelovej ($pK_1 = 1,25$) (cit.⁴). Kritická koncentrácia má hodnotu asi 50 M, pričom nasýtený roztok má koncentráciu za normálnych okolností asi 1 M. Podľa kvadratickej rovnice musíme počítať pH vodných roztokov, napr. kyseliny siričitej ($pK_1 = 1,91$, $c_k = 6$ M) a aj desatinomolárne roztoky kyseliny fosforečnej ($pK_1 = 2,15$, $c_k = 3,5$ M).

V obr. 1 sa neuvažuje vplyv iónovej sily, ktorá sa začína prejavovať v koncentrovanejších roztokoch (viac ako 0,01 M). Za takýchto podmienok sa musí kritická a rovnovážna koncentrácia v kritériálnych rovniciach a v obr. 1 formálne nahradíť kritickou aktivitou a termodynamická disociačná konštanta koncentračnou disociačnou konštantou. Predpokladá sa znalosť aktivitných koeficientov všetkých látok. Odvodené kritériá cez aktivitu, ako aj tvar závislosti na obr. 1, budú formálne rovnaké ako v prípade zriedených roztokov.

4. Záver

V tomto článku sme opísali kritériá použitia aproximatívnych vzťahov pri riešení jednoduchých protolytických rovnováh.

V prípade silných protolytov kritická koncentrácia daného protolytu závisí len od hodnoty chyby, ktorú danou aproximáciou urobíme. Pre akceptovateľné hodnoty chýb je kritická koncentrácia veľmi nízka, čo je vo všeobecnosti známy fakt, na ktorý sa v pedagogickom procese nezabúda.

V prípade slabých kyselín je odvodenie kritérií použitia aproximatívnych vzťahov zložitejšie, nakoľko kritická koncentrácia závisí okrem chyby aj od sily príslušnej slabej kyseliny, vyjadrenej disociačnou konštantou. Navyše sa treba rozhodovať medzi štyrmi vzťahmi, ktorými je rovnovážna koncentrácia vodíkových iónov určená.

Zistilo sa, že použitie kubickej rovnice je nutné len pre veľmi zriedené roztoky slabých kyselín s hodnotou *pK* menšou ako 7,92. Pri hodnote *pK* väčšej ako 7,92 je však použitie kubickej rovnice neopodstatnené, nakoľko ju možno dobre nahradíť kvadratickou rovnicou bez lineárneho člena. V tejto oblasti nemá tiež opodstatnenie použitie kvadratickej rovnice. Kvadratickú rovnicu musíme naopak uprednostniť pred najjednoduchším vzťahom vždy pri kyselinách s nízkou hodnotou *pK*. Oblasť použitia kvadratickej rovnice sa so vzrastajúcim *pK* rýchlo zužuje. Odvodené vzťahy pre kritické koncentrácie, od ktorých smerom nahor už možno použiť istý druh aproximatívneho vzťahu, dobre vyjadrujú reálnu skutočnosť. Pre oblasť *pK*, kde je analytické vyjadrenie hraničnej koncentrácie problematické, sú tieto vzťahy o 1–2 % prísnejšie, ale to neobmedzuje ich použiteľnosť. Môžu slúžiť ako jednoduchá pomôcka pri posudzovaní správnosti aproximácií pri výpočte pH jednoduchých protolytických systémov a výpočte začiatkových bodov titračných kriviek (najmä kyselina fosforečná).

Podobné závery sa dajú odvodiť aj pre slabé zásady, soli

a tlmivé roztoky. I napriek tomu sa posudzovanie správnosti aproximácií v študijnej literatúre diskutuje len veľmi zbežne. Dúfame, že táto práca prispieje k skvalitneniu výučby a lepšiemu pochopeniu protolytických rovnováh.

Práca je určená najmä učiteľom základných kurzov analytickej chémie na bakalárskom a magisterskom stupni vysokoškolského štúdia. Dáva si za cieľ stimulovať ich k tomu, aby viac pozornosti venovali aproximáciám a vyzdvihli pred študentami fakt, že rozhodovanie, aký vzťah použiť na výpočet rovnovážnej koncentrácie vodíkových iónov, nie je až také jednoduché, ako by sa mohlo na prvý pohľad zdať.

Môže osloviť aj študentov odboru analytická chémia pre svoju názornosť, miestami až elementárnosť, a to najmä pri vysvetľovaní základov protolytických rovnováh.

Táto práca bola podporená Grantovou agentúrou Slovenskej republiky, VEGA (grant č. 1/6103/99).

LITERATÚRA

1. Garaj J., Bustin D., Hladký Z.: *Analytická chémia*, str. 248. SNTL Alfa, Bratislava 1987.
2. Garaj J., Hladký Z., Labuda J.: *Analytická chémia I*, str. 59. Vydavateľstvo STU, Bratislava 1996.
3. Šůcha L., Kotrlý S.: *Teoretické základy analytickej chémie*, str. 123. SNTL Alfa, Praha 1971.
4. Tarapčík P., Čakrt M., Hladký Z., Beinrohr E., Polonský J., Krupčík J., Rievaj M., Bustin D., Mocák J., Labuda J.: *Zbierka príkladov z analytickej chémie*, str. 238. Vydavateľstvo STU, Bratislava 1995.

P. Tomčík, M. Bučková, and D. Bustin (*Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemical and Food Technology, Slovak University of Technology, Bratislava, Slovak Republic*): **Criteria for Using Approximate Relations for Simple Protolytic Equilibria**

Criteria for using the approximate relations were derived for simple protolytic equilibria in aqueous solutions of strong acids, strong bases and weak acids. The approximate relations can be used if the analytical concentration of a given protolyte is higher than the limiting (critical) concentration calculated from the criterial equation derived in this paper. For strong acids and bases, the limiting concentration, below which the equilibrium concentration of H^+ ions cannot be calculated using the approximate relation is in the micromole range. For extremely weak acids, the cubic equation should be fully approximated with a quadratic equation without linear term. For weak acids with high values of dissociation constants, the use of the quadratic equation for calculation of the equilibrium concentration of H^+ ions is a must.



Děkan Přírodovědecké fakulty Masarykovy univerzity

vypisuje konkurz na obsazení

profesorského místa „Josef Loschmidt Chair“

na katedře organické chemie pro obor fyzikální organické chemie.

Toto místo bylo zřízeno manželý Isabelou a Alfredem Baderovými a je financováno jejich nadací v USA na počest Josefa Loschmidta, jehož jméno nese.

Požaduje se, aby kandidát dosáhl nejméně titulu docent a Ph.D. nebo jeho ekvivalentu, mohl vykázat intenzivní a úspěšnou vědeckou práci v oblasti fyzikální organické chemie a aby měl zájem o pedagogickou činnost v magisterském a doktorském studijním programu. Přihlášky s podrobným životopisem, soupisem publikací, návrhem výzkumného programu a preferovaného způsobu zapojení se do výuky přijímá prof. RNDr. Milan Potáček, který rovněž poskytne podrobné informace.

Kontaktní adresa: Katedra organické chemie,
Přírodovědecká fakulta Masarykovy univerzity,
Kotlářská 2, 611 37 Brno,
e-mail: potacek@chemi.muni.cz.

Přihlášky budou zvažovány kontinuálně do obsazení místa.