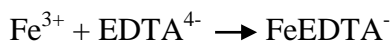
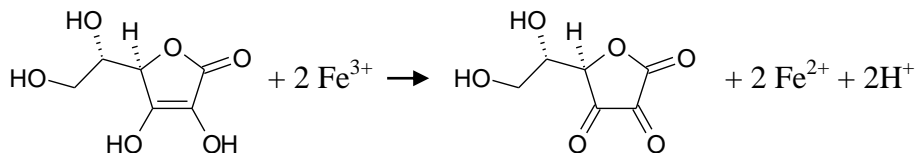


Rozwiązania zadań kwalifikacyjnych na warsztaty chemiczne na Wydziale Chemii UW

Zadanie 1. (12 pkt)

1. Równania reakcji: (3 pkt)



2. Oznaczanie witaminy C (kwasu askorbinowego) polega na utlenianiu analitu za pomocą jonów żelaza (III) a następnie na odmiareczkowaniu nadmiaru tych jonów za pomocą EDTA, które najpierw wiąże jony żelaza (III), a dopiero w nadmiarze kompleksuje jony żelaza (II) ze względu na mniejszą stałą trwałości takiego kompleksu.

Uwzględniając stechiometrię reakcji witaminy C z jonami żelaza (III) można obliczyć ilość witaminy C w poszczególnych próbkach.

$$n_{\text{witC}} = (\text{C}_{\text{Fe(III)}} \cdot V_{\text{Fe(III)}} - \text{C}_{\text{EDTA}} \cdot V_{\text{EDTA}}) / 2 = (10 \text{ mM} \cdot 25 \text{ mL} - 10 \text{ mM} \cdot V_{\text{EDTA}}) / 2 = 125 \text{ } \mu\text{mol} - 5 \text{ mM} \cdot V_{\text{EDTA}}$$

Zawartość witaminy C w poszczególnych próbkach wyniesie odpowiednio: 29.0, 24.5, 28.0, 29.5 i 26.5 μmol . (1 (+2) pkt)

Aby obliczyć masę witaminy C w litrze soku z cytryny należy uwzględnić masę molową kwasu askorbinowego oraz objętość próbek.

$$m_{\text{witC}} = n_{\text{witC}} \cdot (1 \text{ L} / 0.01 \text{ L}) \cdot M_{\text{witC}} = n_{\text{witC}} \cdot 100 \cdot 176 \text{ mg} / 1000 \text{ } \mu\text{mol} = n_{\text{witC}} \cdot 17.6 \text{ mg} / \text{ } \mu\text{mol}$$

Po podstawieniu ilości witaminy C oznaczonej w poszczególnych próbkach do tego równania uzyskuje się odpowiednio wartości 510, 431, 493, 519 i 466 mg/L. (1 (+2) pkt)

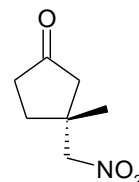
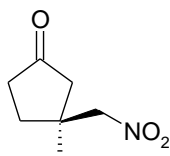
Średnia zawartość witaminy C w soku z cytryny to 484 mg/L. (1 pkt)

Błąd standardowy średniej (SEM) wyznacza się znając odchylenie standardowe, które w naszym przypadku wynosi 14 mg/L, oraz ilość pomiarów (5).

$$\text{SEM} = \sigma / n^{1/2} = 14 \text{ mg/L} / 2.24 = 3.0 \text{ mg/L} \quad (4 \text{ pkt})$$

Zadanie 2. (8 pkt)

1.2. W wyniku addycji Michaela nitrometanu do 3-metylocyklopent-2-enonu powstaje 3-metylo-3-(nitrometylo)cyklopentanon (związek X). Obydwa enancjomery narysowano poniżej i podano ich nazwy. (4 pkt)



(*S*)-3-metylo-3-(nitrometylo)cyklopentanon

(*R*)-3-metylo-3-(nitrometylo)cyklopentanon

3. Konfrontacja chromatogramów A i B (czasów retencji dla obydwu enancjomerów w połączeniu z intensywnością pików) wyraźnie wskazuje, że enancjomer *R* jest dominującym produktem.

Nadmiar enancjomeryczny opisuje procentowy nadmiar jednego enancjomeru względem drugiego. Względną ilość enancjomeru odczytuje się z intensywności pików (pole powierzchni pod pikiem).

$$ee = 100\% \cdot (n_1 - n_2) / (n_1 + n_2) = 100\% \cdot (943055 - 60529) / (943055 + 60529) = 87.9\% \quad (4 \text{ pkt})$$

Zadanie 3. (12 pkt)

1. Zgodnie z równaniem Nernsta, potencjał elektrody szklanej zależy prostoliniowo od pH.

$$E = E^0 - (RT/nF) \cdot \ln[H^+] = E^0 - (2.303 \cdot RT/F) \cdot \text{pH}$$

Regresja linowa potencjału w zależności od pH roztworu daje wartość nachylenia -56.5 mV na jednostkę pH. (3 pkt)

Teoretyczne nachylenie krzywej kalibracyjnej wynika z równania Nernsta i jest równe $-2.303 \cdot RT/F = -2.303 \cdot 8.315 \text{ [J/(mol} \cdot \text{K)]} \cdot 293 \text{ K} / (96485 \text{ C/mol}) = -58.1 \text{ mV}$ (2 pkt)

Procentowa różnica pomiędzy teoretycznym a eksperymentalnym nachyleniem:

$$\Delta = 100\% \cdot (s_t - s_e) / s_t = 100\% \cdot [-58.1 \text{ mV} - (-56.5 \text{ mV})] / (-58.1 \text{ mV}) = 2.8\% \quad (1 \text{ pkt})$$

2. Oczekiwaną wartością pH dla wody destylowanej jest 7.0. Oczekiwany potencjał elektrochemiczny takiego roztworu można obliczyć używając wyznaczoną wartość nachylenia krzywej kalibracyjnej oraz potencjał standardowy elektrody (E^0 , wartość przecięcia krzywej z osią odciętych), który wynosi 223 mV.

$$E_o = E^0 + s_e \cdot \text{pH} = 223 \text{ mV} + (-56.5 \text{ mV}) \cdot 7.0 = -172 \text{ mV}$$

Nie należy używać potencjału zmierzonego dla buforu o pH 7.0, gdyż pojedyncza wartość jest mniej wiarygodna od wartości uzyskanej za pomocą sześciu buforów kalibracyjnych. (3 pkt)

Różnica pomiędzy potencjałem oczekiwanym a zmierzonym:

$$\Delta = E_o - E_e = -172 \text{ mV} - (-127 \text{ mV}) = -45 \text{ mV} \quad (1 \text{ pkt})$$

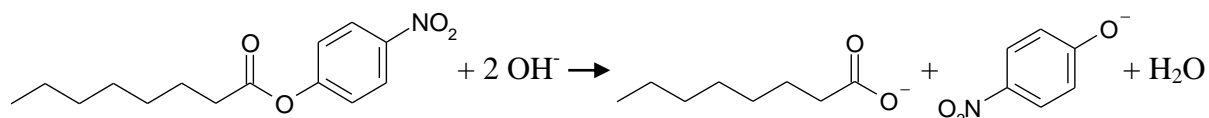
Za pomocą zmierzonego potencjału wody destylowanej można wyznaczyć jej pH korzystając z równania krzywej kalibracyjnej.

$$\text{pH} = (E - E^0) / s_e = (-127 \text{ mV} - 223 \text{ mV}) / (-56.5 \text{ mV}) = 6.2$$

Z tego wynika, że woda destylowana ma pH słabo kwaśne zamiast oczekiwanego neutralnego. Przyczyną takiego zjawiska może być pochłanianie dwutlenku węgla z powietrza podczas przechowywania wody destylowanej, co powoduje lekkie zakwaszenie roztworu. (2 pkt)

Zadanie 4. (21 pkt)

1. W wyniku hydrolizy kaprylanu *p*-nitrofenylowego powstaje kaprylan i *p*-nitrofenol. (2pkt)



2. Wyznaczenie stężenia enzymu:

ProtParam podaje masę molową LipA jako 19362 Da (g/mol) i współczynnik ekstynkcji rozwiniętego białka (w 6 M roztworze silnej soli chaotropowej, chlorowodoru guanidyny) przy długości fali 280 nm jako 24410 M⁻¹cm⁻¹. (2 pkt)

Znając prawo Lamberta-Beera można obliczyć stężenie molowe enzymu w roztworze użytym to oznaczania:

$$c = A_{280} / (\epsilon_{280} * l) = 0.757 / (24.41 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1} * 1.00 \text{ cm}) = 0.031 \text{ mM} \quad (2 \text{ pkt})$$

Aby obliczyć stężenie enzymu w roztworze źródłowym, należy uwzględnić rozcieńczenie roztworu wykonane przy pomiarze stężenia.

$$c_e = 0.031 \text{ mM} * (900 \mu\text{L} + 100 \mu\text{L}) / 100 \mu\text{L} = 0.31 \text{ mM} \quad (1 \text{ pkt})$$

Inaczej wyrażone stężenie:

$$c_g = c_e * M_e = 0.31 \mu\text{mol/mL} * 19.362 \text{ mg}/\mu\text{mol} = 6.0 \text{ mg/mL} \quad (1 \text{ pkt})$$

3. Wyznaczenie parametrów kinetycznych reakcji.

Parametry kinetyczne reakcji są obliczane z użyciem zależności szybkości reakcji enzymatycznej od stężenia substratu, w związku z tym należy wyznaczyć szybkość reakcji dla każdego stężenia substratu. W podanym przypadku należy oznaczyć szybkość wzrostu absorpcji (lub stężenia produktu) w czasie. Zgodnie z prawem Lamberta-Beera, zmiana absorpcji jest proporcjonalna do zmiany stężenia substancji absorbującej (w tym przypadku produktu reakcji, *p*-nitrofenolu).

Szybkość reakcji wyznacza się dla początkowego, prostoliniowego przebiegu reakcji. Należy wizualnie sprawdzić przebieg reakcji i ewentualnie wyeliminować punkty leżące w zakresie nieprostoliniowym. W naszym przypadku będą to wartości absorpcji powyżej 1-1.1 dla pomiarów przy stężeniach substratu od 1.5 mM i powyżej. Następnie należy obliczyć szybkość reakcji wyrażoną jako nachylenie prostej przedstawiającej zmianę absorpcji

w czasie. Wartości obliczone za pomocą regresji liniowej dla poszczególnych stężeń substratu to: 0.5 mM 0.0688/min, 1.0 mM 0.1035/min, 1.5 mM 0.1244/min, 2.0 mM 0.1413/min oraz 2.5 mM 0.1549 mM. (4 pkt)

Otrzymane dane (szybkość reakcji wyrażona jako szybkość zmiany absorpcji) w zależności od stężenia substratu) należy użyć w celu obliczenia stałej Michaelisa i szybkości maksymalnej. Najbardziej odpowiednią procedurą jest regresja nieliniowa do równania Michaelisa-Menten, która daje szybkość maksymalną 0.225 jednostki absorpcji na minutę i stałą Michaelisa 1.17 mM. Można także użyć metod liniowych i po odpowiednim przekształceniu równania Michaelisa-Menten do postaci liniowej, użyć regresji liniowej do wyznaczenia parametrów kinetycznych reakcji. Takie podejście oferują metody np. Lineweavera-Burka, Eadie-Hofstee czy Hanesa-Woolfa. W naszym przypadku dają one wartości zbliżone do stałych wyznaczonych za pomocą regresji nieliniowej, choć generalnie te metody są mniej wiarygodne od regresji nieliniowej. (4 pkt)

W celu wyznaczenia szybkości maksymalnej, należy przeliczyć absorpcję na stężenie wytworzonego produktu. Z prawa Lamberta-Beera wiadomo, że obydwie wielkości są do siebie proporcjonalne, a znając absorpcję 50 μM *p*-nitrofenolu (produktu reakcji) w warunkach reakcji można obliczyć szybkość maksymalną reakcji katalizowanej przez LipA.

$$V_{\max} = 0.225 \text{ min}^{-1} * 50 \mu\text{M} / 0.52 = 21.6 \mu\text{M}/\text{min} \quad (2 \text{ pkt})$$

Stałą katalityczną wiąże szybkość maksymalną ze stężeniem enzymu. Znając stężenie źródłowego roztworu enzymu i jego rozcieńczenie podczas przygotowywania mieszaniny reakcyjnej, można policzyć końcowe stężenie enzymu w roztworze.

$$[\text{E}] = 0.31 \text{ mM} / (200 * 200 \mu\text{L} / 20 \mu\text{L}) = 0.155 \mu\text{M}$$

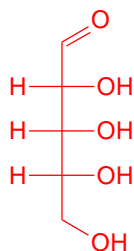
Stała katalityczna:

$$k_{\text{cat}} = V_{\max}/[\text{E}] = 21.6 \mu\text{M}/\text{min} / 0.155 \mu\text{M} = 139 \text{ min}^{-1} = 2.32 \text{ s}^{-1} \quad (3 \text{ pkt})$$

Zadanie 5. (14 pkt)

1. Kolejno: E, B, D, F, C, G, A. (3.5 pkt)

2. D-ryboza



(1 pkt)

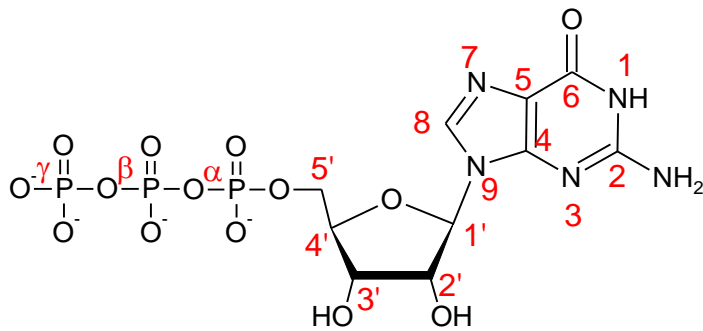
3. β (0.5 pkt)

4. Do puryn. (0.5 pkt)

5. Wiązanie fosfoestrowe jest bardziej trwale niż pirofosforanowe. Wynika to z faktu, że fosforan (lub pirofosforan) jest dużo lepszą grupą odchodzącą niż jon alkoholowy, ponieważ jest słabszą zasadą. Z kolei wiązanie pirofosforanowe jest trwalsze od bezwodnikowego. Trwałość ta wynika z obecności ładunków ujemnych na fosforanie utrudniających atak nukleofila (wody, jonu OH⁻) na atom fosforu. W przypadku bezwodnika atak następuje na obojętny atom węgla. Poza tym podczas ataku na tetraedryczny atom fosforu powstaje zatłoczony sterycznie pięciokoordynacyjny stan przejściowy (w przypadku reakcji S_N2). Podczas hydrolizy bezwodnika stan przejściowy jest tetraedryczny i w związku z tym łatwiej go wytworzyć. Pirofosforany są trwałe w roztworze wodnym, a bezwodniki łatwo hydrolizują. (3 pkt)

6. GTP jest substratem polimerazy RNA, ponieważ zawiera on resztę D-rybozy, a nie D-deoksyrybozy. (0.5 pkt)

7.



(2 pkt)

8. Chromatografia na żelu krzemionkowym jest chromatografią adsorpcyjną, gdzie faza stacjonarna jest polarna, a faza mobilna jest niepolarna. W związku z tym związki bardziej polarne, które silniej adsorbują się na żelu krzemionkowym, będą słabiej wmywane przez fazę ruchomą od związków mniej polarnych. W związku z tym im bardziej polarny związek, tym mniejszy jego współczynnik retencji podczas chromatografii adsorpcyjnej na polarnym nośniku. Ze względu na obecność zjonizowanych grup fosforanowych, GTP jest najbardziej polarnym związkiem, 5'-guanozynomonofosforan jest mniej polarny od GTP, ale bardziej polarny od pozostałych związków. Guanozyna jest bardziej polarna od guaniny ze względu na obecność polarnej reszty cukrowej w cząsteczce. Współczynnik retencji będzie rósł w szeregu GMP < 5'-guanozynomonofosforan < guanozyna < guanina. Jednocześnie im większa polarność związku tym lepsza jego rozpuszczalność w wodzie. W związku z tym rozpuszczalność w wodzie maleje w szeregu GMP > 5'-guanozynomonofosforan > guanozyna > guanina. (4 pkt)