

UNIVERZITA PARDUBICE

Fakulta chemicko-technologická

**ELIMINAČNÍ VOLTAMETRIE NUKLEOVÝCH
KYSELIN A JEJICH SLOŽEK**

Pavla Kopřivová

Bakalářská práce

2012

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2011/2012

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Pavla Kopřivová**
Osobní číslo: **C09360**
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Klinická biologie a chemie**
Název tématu: **Eliminační voltametrie nukleových kyselin a jejich složek**
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

Zpracujte literární rešerši obsahující:

Seznámení s problematikou elektroanalytických metod se zaměřením na eliminační voltametrii a její využití při studiu krátkých řetězců DNA.

Vypracujte teoretický úvod do dané problematiky:

Princip a využití elektroanalytických metod při analýze nukleových kyselin a jejich poškození se zaměřením na oligonukleotidy obsahující purinové báze, především adenin.

Zaměření se na spojení adsorptivní rozpouštěcí techniky ve spojení s eliminační voltametrii.

Rozsah grafických prací:

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Podle pokynů vedoucího bakalářské práce.

Vedoucí bakalářské práce:

Ing. Dagmar Holubcová

Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání bakalářské práce:

3. října 2011

Termín odevzdání bakalářské práce:

22. června 2012



prof. Ing. Petr Lošťák, DrSc.

děkan

L.S.



doc. RNDr. Zuzana Bílková, Ph.D.

vedoucí katedry

V Pardubicích dne 23. února 2011

Prohlášení autora práce

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci na téma Eliminační voltametrie nukleových kyselin a jejich složek vypracovala samostatně a uvedla jsem všechny použité podklady a literaturu.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Souhlasím s tím, že práce bude prezenčně zpřístupněna v Univerzitní knihovně Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 5. 5. 2012

Pavla Kopřivová

ANOTACE

ČESKY

Předkládaná práce je rešeršní studií elektrochemického chování jednotlivých nukleových bází molekuly DNA, se zaměřením na deriváty purinu. Bakalářská práce nahlíží do problematiky elektroanalytických metod se zaměřením na eliminační voltametrii. Elimanační voltametrie (EVLS – Elimination Voltammetry with Linear Scan) je poměrně novou metodou umožňující separaci potenciálově blízkých signálů, zvýšení proudové citlivosti a odhalení rozdílů v elektrochemickém procesu derivátů purinu. Shromážděná fakta by mohla vést k lepšímu pochopení studovaných procesů a budoucímu vývoji elektrochemických senzorů pro elektroanalýzu nukleových kyselin.

Klíčová slova: voltametrie, rtuťová elektroda, DNA, Purin

ANNOTATION

ENGLISH

The presented work summarizes available information in the field of electrochemical behavior of individual DNA molecules nucleic bases, focusing on the purine derivatives. This bachelor thesis deals with electroanalytical methods especially Elimination Voltammetry with Linear Scan (EVLS). EVLS is relatively new method allowing the separation of signals with close potential value enhance of current detection sensitivity and detecting the differences in electrochemical process of purine derivatives. The collected data should lead to better understanding of studied processes and future development of electrochemical sensors for nucleic acids electroanalysis.

Keywords: voltammetry , mercury electrode, DNA, Purin

Poděkování

Chtěla bych poděkovat paní Ing. Dagmar Holubcové za pomoc, trpělivost, odborné vedení a konzultace při vypracovávání bakalářské práce.

Dále bych chtěla poděkovat paní doc. RNDr. Libuši Trnkové Csc. z Masarykovy univerzity v Brně, za uvedení do problematiky elektrochemické detekce aminoderivátů purinu a eliminační voltametrie již při studiu na SŠ.

OBSAH

ÚVOD	11
1. ELEKTROCHEMICKÉ ANALYTICKÉ METODY	12
1.1. ZÁKLADNÍ ROZDĚLENÍ ELEKTROCHEMICKÝCH ANALYTICKÝCH METOD.....	12
1.1.1. Rovnovážná potenciometrie	12
1.1.2. Polarografie a voltametrie.....	15
1.1.3. Voltametrie.....	22
1.1.4. Eliminační polarografie (EP).....	24
2. MĚŘÍCÍ PŘÍSTROJE A ZAŘÍZENÍ	28
3. NUKLEOVÉ KYSELINY	29
3.1. ELEKTROCHEMIE NUKLEOVÝCH KYSELIN	31
3.2. PURINOVÉ BÁZE	32
3.2.1. Purin	33
3.2.2. Adenin	34
3.2.3. 2-aminopurin (2-AMP)	38
3.2.4. 2,6 - diaminopurin (2, 6-DAMP)	41
3.2.5. Směs aminoderivátů.....	44
3.2.6. Guanin	48
3.3. PYRIMIDINOVÉ BÁZE.....	48
3.3.1. Cytosin	49
3.3.2. Thymin	49
ZÁVĚR	50
POUŽITÁ LITERATURA	51
ZDROJE OBRÁZKŮ	54

SEZNAM ILUSTRACÍ

Obrázek 1	<i>Standardní vodíková elektroda</i>	13
Obrázek 2	<i>Schéma iontově selektivní elektrody</i>	15
Obrázek 3	<i>Kalomelová referenční elektroda</i>	15
Obrázek 4	<i>Jeden z prvních modelů polarografu (1924)</i>	16
Obrázek 5	<i>Polarizační křivky pro elektrochemicky reverzibilní a ireverzibilní děje</i>	17
Obrázek 6	<i>Zapojení elektrického obvodu využívaném při voltametrické analýze v dvuelektrodovém a tříelektrodovém uspořádání experimentu.</i>	20
Obrázek 7	<i>Příklady rtuťových elektrod: a - rtuťová kapková elektroda (DME),</i>	22
Obrázek 8	<i>Princip voltametrie LSV</i>	24
Obrázek 9	<i>VA Stand 663 pro zapojení s rtuťovou elektrodou</i>	28
Obrázek 10	<i>AUTOLAB Electrochemical Analyzer</i>	28
Obrázek 11	<i>Dvoušroubovice DNA</i>	29
Obrázek 12	<i>Komplementarita bází v DNA</i>	30
Obrázek 13	<i>Struktura chromatinu u jaderných organismů</i>	31
Obrázek 14	<i>James Watson a Francis Crick s modelem DNA</i>	31
Obrázek 15	<i>Vzorec purinu s číslováním</i>	33
Obrázek 16	<i>Adenin</i>	34
Obrázek 17	<i>Reakční schéma elektrochemické redukce adeninu</i>	35
Obrázek 18	<i>2-aminopurin</i>	39
Obrázek 19	<i>2,6-diaminopurin</i>	42
Obrázek 20	<i>Guanin</i>	48
Obrázek 21	<i>Cytosin</i>	49
Obrázek 22	<i>Thymin</i>	49

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

2,6-DAMP	2,6-diaminopurin
2-AMP	2-aminopurin
2-AMP:C	2-aminopurin a cytosin
2-AMP:T	2-aminopurin a thymin
A, Ade, ADE	adenin
ADA	Adenosine Deaminase Deficiency
AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrome (Syndrom získaného selhání imunity)
A-T	adenin a thymin
C	cytosin
CA	cytosin, adenin
CV	cyklická voltametrie
DAPA	2,6-diaminopurin arabinosid
ddA	2,3-dideoxyadenosinu
ddDAPR	2,6-diaminopurin-2,3-dideoxyribosid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DME	Drop Mercury Electrode (rtuťová kapková elektroda)
dsDNA	dvouřetězcová deoxyribonukleotidová kyselina
E	napětí
EP	eliminační polarografie
EVLS	Elimination Voltammetry with Liner Scan (eliminační voltametrie s lineárním scanem)
G	guanin
G-C	guanin a cytosin
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HMDE	Hanging Mercury Drop Electrode (visící rtuťová kapková elektroda)
I	proud

ISE	iontově selektivní elektroda
LSV	Linear Sweep Voltammetry (lineární voltametrie)
mRNA	mediátorová (messenger) ribonukleová kyselina
NA, NK	nukleová kyselina
ODN	oligonukleotid
p53	protein zabraňující nádorové transformaci DNA
PAGE	polyakrylamidová gelová elektroforéza
PVC	polyvinylchlorid
RNA	ribonukleová kyselina
SMDE	Stationary Mercury Drop Electrode (stacionární kapková rtuťová elektroda)
tRNA	transferová ribonukleová kyselin

ÚVOD

Struktura deoxyribonukleové kyseliny (DNA) byla popsána v roce 1954. DNA zůstává stále jednou z nejstudovanějších biologických molekul. O tomto faktu svědčí, že v roce 2004 bylo publikováno více než 30 tisíc článků věnujících se studiu DNA.

Strukturu dvoušroubovice DNA objasnili Američan James Watson a Brit Francis Crick pomocí rentgenové strukturní analýzy. V roce 1962 dostali Nobelovu cenu za medicínu. Na objasnění struktury DNA se podílela také Rosalinda Franklinová.

V analýze DNA se uplatňuje celá řada metod a postupů. V současné době je stále nejvíce využívanou metodou detekce DNA elektroforetická separace na PAGE – polyakrylamidová gelová elektroforéza. Jsou hledány nové metody umožňující rychlou a senzitivní analýzu DNA. Alternativu představují elektrochemické metody. Elektrochemií nukleových kyselin (NK) se zabýval Emil Paleček a v roce 1960 v časopise Nature publikoval elektrochemické vlastnosti NK s využitím oscilografické polarografie [38].

Elektrochemie dnes nabízí postupy v oblasti konstrukce levných a rychlých biosenzorů. Navrhované biosenzory jsou navrhovány pro detekci řady závažných genetických, ale i na genech závislých onemocnění (nádorová onemocnění). Pro senzitivní analýzu NK a jejich složek je využívána celá řada nových elektrochemických přístupů. Některé se orientují na nové materiály, použitelné ke konstrukci biosenzorů. Eliminační voltametrie s lineární polarizací elektrody (Elimination Voltammetry with Linear Scan – EVLS) je využívána k analýze NK, ODN a nukleobází při výzkumu na Masarykově univerzitě v Brně, především v posledních deseti letech [1].

1. Elektrochemické analytické metody

Elektroanalytickou chemií můžeme definovat jako část analytické chemie, která k identifikaci a stanovení látek využívá elektrochemických principů. Zkoumá procesy probíhající na rozhraní elektrod a elektrolytu. Elektrody mohou být tuhé, kapalné nebo plynné vodiče, jimiž proud přichází nebo odchází do jiného prostředí. Elektrochemické analytické metody jsou založeny na měření některé z elektrických veličin (napětí na elektrodách, procházejícího elektrického proudu, spotřebovaného náboje, vodivosti roztoku, relativní permitivita). Měřená veličina musí být jednoznačně závislá na koncentraci stanovované látky. Využívá se zde jevů spojených s reakcí přenosu náboje na fázovém rozhraní nebo jevů spojených s transportem nabitých částic v roztoku [2].

1.1. Základní rozdělení elektrochemických analytických metod

Metody, při nichž článkem neprochází elektrický proud:

- **rovnovážná potenciometrie**

Metody, při nichž se obsah analytu ve vzorku elektrolýzou změní zanedbatelně

- **polarografie**
- **voltametrie**
- **amperometrie**

Metody založené na kvantitativní přeměně analytu

- **elektrogravimetrie**
- **coulometrie**

Metody založené na měření elektrické vlastnosti roztoku jako celku

- **konduktometrie**
- **dk-metrie** [2]

1.1.1. Rovnovážná potenciometrie

Má velký význam pro fyzikální chemii - měření disociačních konstant, rovnovážných konstant, konstant stability. Nejprve byly popsány aplikace potenciometrie pro titrační

metody. Využívá se měření potenciálového rozdílu mezi indikační a referentní elektrodou galvanického článku a sleduje se závislost napětí na aktivitě určovaného iontu. Potenciál měrné elektrody závisí na aktivitě stanovovaného iontu, referentní elektroda je charakterizována konstantním potenciálem. Měření se provádí za bezproudového, rovnovážného stavu. Potenciometrické metody se dnes dělí na metody přímé a na metody nepřímé (titrace s potenciometrickou indikací bodu ekvivalence).

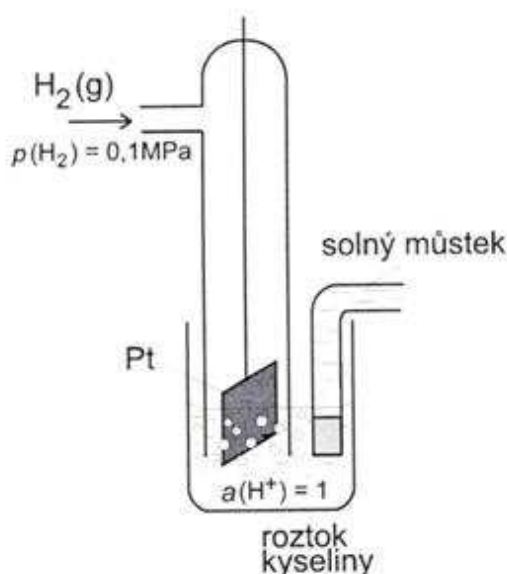
Používané elektrody:

A. Elektrody prvního druhu (indikační)

Příkladem je stříbrná elektroda používaná při argentometrických titracích. Elektroda je realizována kovem ponořeným do roztoku svých iontů.

Potenciál elektrody závisí na aktivitě vlastních iontů podle Nernst-Petersovy rovnice.

Do této skupiny lze zařadit i vodíkovou elektrodu používanou k měření pH.



Obrázek 1 Standardní vodíková elektroda

$$E = E^0 + \frac{R \cdot T}{n \cdot F} \cdot \ln a \quad (1)$$

E^0 – standardní elektrodový potenciál (V), R – molární plynová konstanta ($8,314 \text{ J.K}^{-1}.\text{mol}^{-1}$), T – termodynamická teplota (K), F – Faradayova konstanta (96485 C.mol^{-1}), n – počet elektronů zahrnutých v elektrodové reakci, a – aktivita iontů v roztoku

B. Elektrody založené na rovnováze mezi oxidem kovu a kovem

Jako příklad lze uvést antimonovou, bismutovou či tellurovou elektrodu. Potenciál takovéto elektrody závisí na pH roztoku (koncentraci vodíkových iontů). Redoxní reakce se zde účastní velmi tenká vrstvička oxidu na povrchu elektrody. Výhodou těchto elektrod je jejich mechanická odolnost a jednoduchost. Antimonové elektrody nelze použít v silně kyselých nebo zásaditých roztocích. Bismutová elektroda se doporučuje pro měření pH v silně alkalické oblasti. Závislost potenciálu těchto elektrod na pH nebývá lineární.

C. Elektrody oxidačně - redukční (indikační)

Příkladem je platinová nebo zlatá elektroda. Elektroda zprostředkovává výměnu elektronů mezi oxidovanou a redukovanou formou. Tyto elektrody slouží k měření redoxního potenciálu popsaného Nernst-Petersovou rovnicí.

D. Membránové elektrody (indikační)

Jsou tvořeny membránou, která zcela odděluje dva roztoky. Membrána i roztoky obsahují určitý ion, který se může účastnit výměnné reakce mezi roztokem a membránou.

Potenciál membránové elektrody je určován výměnou iontů mezi membránou a roztokem, nikoliv redoxní reakcí. Membránové elektrody jsou základem iontově selektivních elektrod (*ISE*).

ISE se dělí na elektrody s pevnou a elektrody s kapalnou membránou. Mezi nejčastěji používané *ISE* patří skleněná elektroda pro měření pH.

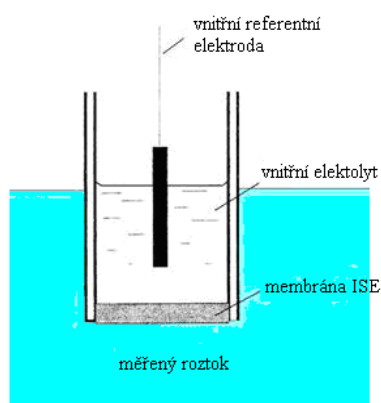
Fluoridová elektroda je tvořena homogenní membránou z monokrystalu LaF_3 .

Elektrody s kapalnou membránou - aktivní komponenta je rozpuštěna v hydrofobním rozpouštědle a je imobilizována v polymerním materiálu (*PVC*). Plynová čidla: sorpce plynu do nějaké látky - například stanovení kyselých plynů (CO_2) po difúzi celofánovou membránou a rozpuštění v roztoku tlumiče (změna pH) za použití skleněné elektrody.

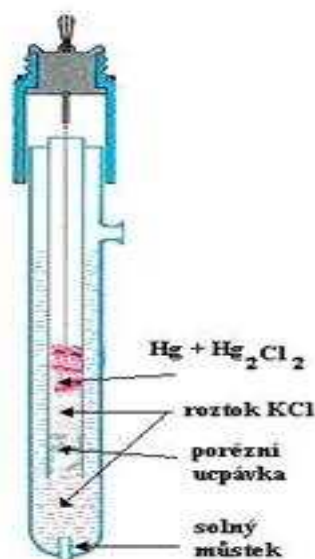
E. Elektrody druhého druhu (referenční)

Potenciál elektrody je zde řízen koncentrací aniontu, se kterým kationty elektrody tvoří nerozpustnou sloučeninu.

- Kalomelová elektroda (nasycená): $\text{Hg(l)} \mid \text{Hg}_2\text{Cl}_2(\text{s}) \mid \text{KCl(aq)}$
- Argentochloridová elektroda: $\text{Ag(s)} \mid \text{AgCl(s)} \mid \text{KCl(aq)}$
- Merkurosulfátová elektroda: $\text{Hg(l)} \mid \text{Hg}_2\text{SO}_4(\text{s}) \mid \text{K}_2\text{SO}_4(\text{aq})$



Obrázek 2 Schéma iontové selektivní elektrody



Obrázek 3 Kalomelová referenční elektroda

1.1.2. Polarografie a voltametrie

Objev polarografie spojen se jménem profesora Jaroslava Heyrovského.

Jaroslav Heyrovský se narodil 20. prosince 1890 v Praze. Studoval na akademickém gymnáziu v Praze. V roce 1909 se zapsal na filozofickou fakultu Karlovy univerzity. Od roku 1910 studoval na Univerzity College v Londýně.

V roce 1913 získal hodnost bakaláře. Jeho studia však přerušila I. světová válka. Heyrovský narukoval ke zdravotníkům. V roce 1918 Heyrovský obhájil na Karlově univerzitě svou disertační práci.

Následující roky se Heyrovský věnoval problematice rtuťové kapkové elektrody, která sloužila k měření povrchového napětí rtuti. V roce 1922 Heyrovský publikoval objev využití elektrolýzy se rtuťovou kapkovou elektrodou, metodu sloužící účelům chemické analýzy.

V roce 1924 sestrojil Jaroslav Heyrovský se svým žákem Japoncem M. Shikatou polarograf - přístroj pro automatický záznam křivky závislosti proudu na napětí při elektrolýze roztoku vzorku. V počátcích se zdála metoda nevhodná pro praktické využití. K rozpracování polarografické metody přispěl Heyrovského další žák D. Ilkovič.



Obrázek 4 Jeden z prvních modelů polarografu (1924)

V roce 1924 vznikl návrh na konstrukci prvního automatického přístroje, který umožnil zkrácení postupu z řádů hodin na minuty. Návrh Jaroslava Heyrovského na polarograf realizovali univerzitní mechanici Peták a Innemann.

37 let po vynálezu polarografie 10. prosince 1959 převzal Jaroslav Heyrovský z rukou švédského krále Gustava Adolfa VI. ve Stockholmu Nobelovu cenu za chemii za vynález a využití polarografie.

Jaroslav Heyrovský získal čestné doktoráty na mnoha univerzitách (mj. Drážďany, Marseille, Paříž, Varšava). Heyrovský byl také čestným členem vědeckých akademií (např. USA - Boston, Indie, Maďarsko, Polsko). Byl viceprezidentem Mezinárodní unie fyziků, prezidentem polarografické společnosti v Londýně, čestným členem Japonské polarografické společnosti, čestným členem chemických společností Československa, Rakouska, Polska, Anglie a Indie.

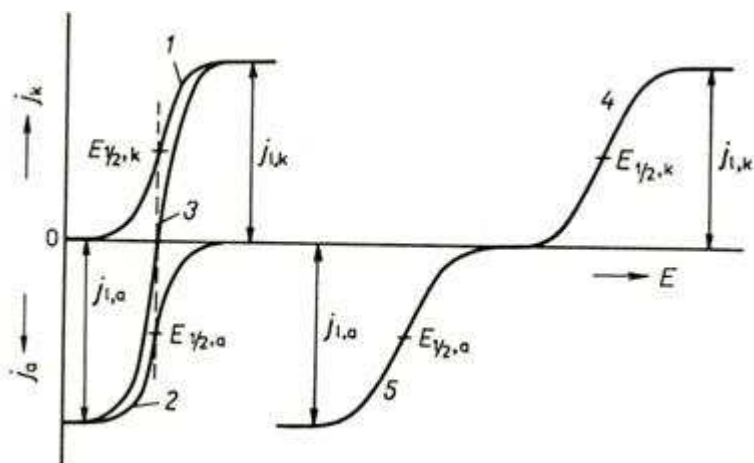
Jaroslav Heyrovský zemřel 27. března 1967 a je pohřben na Vyšehradě [3].

V současné době se v analytických laboratořích používají moderní nestacionární polarografické techniky s eliminací nabíjecího proudu a s akumulací analytu.

Voltametrie se doposud z historického hlediska označuje jako polarografie. Voltametrie používá jako pracovní elektrodu rtuťovou kapkovou elektrodu, která může pracovat v módu visící kapky (*HMDE – hanging mercury drop electrode*). Elektrochemické články používané ve voltametrii jsou sestavovány z polarizovatelné pracovní elektrody a z nepolarizovatelné referenční elektrody.

Polarografie a voltametrie jsou založeny na měření polarizačních křivek. V případě, že v roztoku není přítomna látka, která by se redukovala nebo oxidovala, je pracovní elektroda polarizována a faradayický proud jí neteče.

Je-li v roztoku látka, která podléhá redukci nebo oxidaci, dojde k depolarizaci elektrody a velikost katodického nebo anodického proudu je mírou koncentrace depolarizátoru [3].

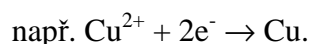


Obrázek 5 Polarizační křivky pro elektrochemicky reverzibilní a ireverzibilní děje
(1 - katodická reverzibilní, 2 - anodická reverzibilní, 3 - anodicko-katodická reverzibilní,
4 - katodická ireverzibilní, 5 - anodická ireverzibilní)

Závislost proudu na potenciálu znázorňuje polarografická křivka: $E_{1/2}$ je tzv. půlplnový potenciál, který je pro danou látku konstantní. Tvar polarizační křivky závisí jen na polarizaci rtuťové kapkové elektrody, která zase závisí na složení roztoku. Polarizační křivka má tři oblasti:

oblast polarizace: vložené napětí nedosahuje hodnoty potřebné k průběhu elektrochemické reakce. Proud je proto prakticky nulový. Nepatrná hodnota proudu se nazývá nabíjecí nebo kapacitní proud.

oblast depolarizace: proud je způsoben redukcí látky na katodě



Příslušné činidlo se nazývá depolarizátor (Cu^{2+} , Zn^{2+} , Ag^+).

oblast limitního difúzního proudu: úbytek přeměněných látek v okolí elektrody se vyrovnává difúzí. Velikost limitního difúzního proudu udáváme výškou vlny.

Každý depolarizátor snižuje polarizaci jinou měrou, což se projeví různým umístěním vlny na ose napětí. Polohu vlny posuzujeme podle tzv. půlvlnového potenciálu $E_{1/2}$ (tj. difúzní proud dosáhne poloviční hodnoty limitního I). $E_{1/2}$ má konstantní hodnotu nezávislou na koncentraci depolarizátoru (hodnoty jsou tabelovány). Je-li v roztoku více složek s dostatečně odlišnými hodnotami $E_{1/2}$ (o 0,2 V), vytváří každá složka svou vlastní vlnu. Získáme tak polarografické spektrum.

U většiny analýz je nutno odstranit kyslík z roztoku, protože se redukuje na katodě a jeho polarografické maximum zastíní křivky jiných složek. Proto do roztoku zavádíme inertní plyn, např. dusík.

Diferenční pulzní polarografie je mnohem citlivější metodou než klasická polarografie. Použitím kapkové elektrody s mechanickým odtrháváním kapek se výrazně snižuje spotřeba rtuti. Napětí vkládané mezi polarizovatelnou a srovnávací elektrodu se mění po malých přírůstcích pro každou novou kapku. Na konci každého přírůstku napětí je vložen obdélníkový napěťový impuls. Proud je měřen vždy před začátkem pulsu a před jeho koncem a je zjištěna diference mezi těmito proudy ΔI . Tato diference se vynášší v závislosti na vkládaném napětí. Měření proudu na konci kapek výrazně omezuje vliv kapacitního proudu [5].

Polarografické proudy

1) Difúzní proud

- V metodě polarografie nese vlastní analytický signál.
- Za přítomnosti základního elektrolytu je přenos depolarizátoru k povrchu elektrody řízen pouze difúzí.
- Hodnota difúzního proudu je podle Ilkovičovy rovnice přímo úměrná koncentraci depolarizátoru.

2) Migrační proud

- Kation redukující se na katodě se dostává k jejímu povrchu též do jisté míry migrací.
- Koncentrace redukujícího se aniontu je migrací snižována.
- Migrační složka polarografického proudu může tudíž snižovat nebo zvyšovat analytický signál.

- Vliv migračního proudu se potlačuje přidavkem indifferenčního elektrolytu.

3) Nabíjecí (kapacitní) proud

- I v případě, kdy základní elektrolyt neobsahuje žádný depolarizátor, lze registrovat po vložení napětí na elektrody náhlý nárůst a následně rychlý pokles proudu.
- Pozorovaný proud souvisí s nabíjením elektrické dvojvrstvy na povrchu elektrody (chová se jako kondenzátor).
- U rtuťové kapkové elektrody se povrch kapky zvětšuje, udržování náboje její elektrické dvojvrstvy se projevuje jako nabíjecí (kapacitní) proud.
- Okamžitá hodnota nabíjecího proudu na každé kapce je funkcí času.
- Při koncentracích depolarizátoru nižších než 10^{-5} mol.l⁻¹ nabíjecí proud již výrazně zkresluje záznam polarografické vlny a tím omezuje dosažitelnou mez detekce.
- Účinně lze vliv nabíjecího proudu potlačit při měřeních s časově proměnným napětím či proudem (metody se superponovaným napětím, tast-polarografie).

4) Kinetické proudy

- Pozorovány u depolarizátorů, jejichž koncentrace u povrchu elektrody nezávisí na difúzi, ale je řízena chemickou reakcí.
- Daná chemická reakce probíhá s určitou rychlostí a tím ovlivňuje výsledný polarografický proud.
- S elektrodovou reakcí souvisí chemická změna depolarizátoru jako děj předřazený, vřazený do elektrodového děje nebo následný.
- Kinetické proudy jsou často značně závislé na teplotě.

5) Katalytický proud vodíku

- Vzniká snížením přepětí vodíku způsobeným již malou koncentrací katalyzátoru.
- Na polarogramu je pozorovatelná dvojná odpovídající vylučování vodíku.

6) Adsorpční proud

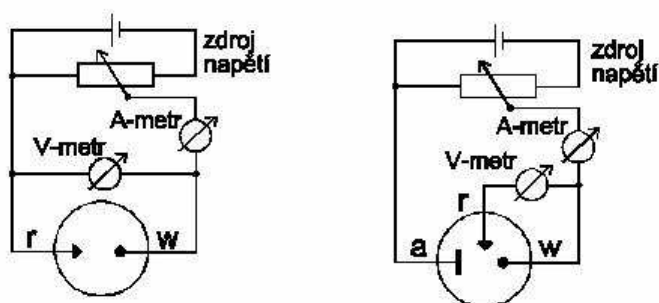
- Pozorován při reverzibilních redoxních dějích u některých organických látek.
- Projevuje se vznikem malé polarografické vlny posunuté k pozitivnějším nebo k negativnějším hodnotám napětí.

- Vznik této vlny souvisí s adsorpcí redukované, respektive oxidované formy na povrchu elektrody [2,6].

Zapojení obvodu pro voltametrická měření

Z hlediska zapojení voltametrické (polarografické) cely máme dvě možnosti. Buď uspořádání dvouelektrodové nebo tříelektrodové.

- **Dvouelektrodové uspořádání** je tvořeno pracovní elektrodou ponořenou do analyzovaného roztoku a referenční elektrodou spojenou s analyzovaným roztokem solným můstkem. Napětí ze zdroje vkládané na pracovní a referenční elektrodu je měřeno voltmetrem a proud procházející článkem je měřen ampérmetrem. Vzhledem k tomu, že potenciál nepolarizovatelné referenční elektrody je konstantní, se změnou vloženého napětí mění potenciál polarizovatelné pracovní elektrody. Nevýhodou dvouelektrodového uspořádání je, že potenciál pracovní elektrody není přesně znám - při průchodu proudem se část vloženého napětí ztratí na odporu analyzovaného roztoku.
- V praxi se většinou používá **tříelektrodové zapojení** voltametrického článku. Článek je doplněn o pomocnou elektrodu. Proud teče mezi pomocnou a pracovní elektrodou, skutečný potenciál pracovní elektrody se měří proti referenční elektrodě za bezproudového stavu. Zdrojem napětí v tříelektrodovém uspořádání je potenciostat. Je to přístroj, který udržuje potenciál pracovní elektrody na požadované hodnotě tím, že požadovaný potenciál neustále porovnává s aktuálním změřeným potenciálem a případný rozdíl, způsobený např. úbytkem napětí na odporu roztoku, automaticky vyrovnává změnou napětí na pomocné elektrodě. Časový průběh potenciálu a měření proudu řídí v moderních přístrojích počítač [2].



Obrázek 6 Zapojení elektrického obvodu využívaném při voltametrické analýze v dvouelektrodovém a tříelektrodovém uspořádání experimentu.

Vysvětlivky v popisu označení: w (working), r (reference), a (auxiliary) electrodes

Voltametrické a polarografické elektrody

A. Pracovní polarizovatelné elektrody

Ve voltametii se nejčastěji používají elektrody platinové, zlaté, uhlíkové či rtuťové. Elektrody mají různý tvar (disk, plíšek, drátek, vlákno, kapka). Pracovat můžeme v klidném i v míchaném roztoku, míchání je zajištěno rotací elektrody nebo mícháním roztoku. V klidném roztoku je analyt dopravován k elektrodě difúzí (polarografie/voltametrie), v míchaném roztoku převládá transport analytu konvekcí (voltametrie s rotující elektrodou).

B. Pomocné elektrody

Ve srovnání s pracovními elektrodami mají podstatně větší povrch. Jsou téměř nepolarizovatelné. Obvykle jsou tvořeny platinovým plíškem či drátkem nebo grafitovou tyčinkou.

C. Referenční elektrody

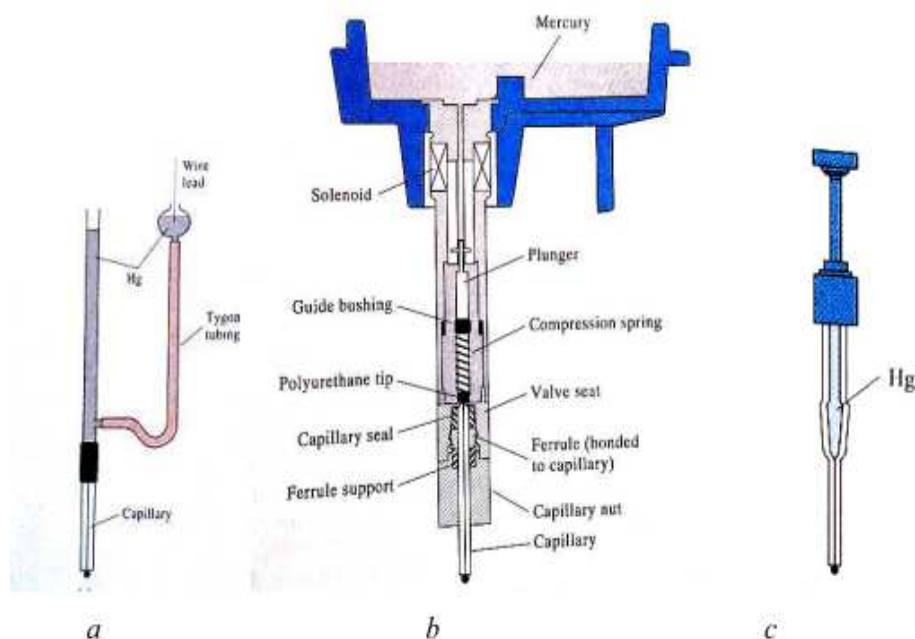
Mají obecné použití jako elektrody neměnného potenciálu pro nejrůznější elektrochemická měření. Jedná se většinou o elektrody druhého druhu a mají univerzální použití ve všech systémech, kde je třeba přesně měřit potenciál. Použitelné jsou i pro všechny elektrochemické měřicí přístroje. Referenční elektrody pro polarografické analyzátoři jsou konstrukcí pouzdra a délkou těla uzpůsobeny pro použití ve „standech“ běžně užívaných polarografů.

Druhy elektrod: argentschloridová, kalomelová, merkurosulfátová [2, 6, 7].

1.1.2.1. Rtuťová kapková elektroda

Rtuť se z rezervoáru přivádí kapilárou (průměr 0,05 mm) do analyzovaného roztoku. Povrch elektrody se v průběhu analýzy periodicky obnovuje. Pravidelným odkapáváním ze skleněné kapiláry udržuje rtuťová kapková elektroda stále čistý povrch.

Rtuť vykazuje značné přepětí vodíku - elektrodu lze tedy polarizovat až ke značně negativním potenciálům (-2,4 V), aniž by se rozkládal základní elektrolyt. Obor pozitivních potenciálů je omezen anodickým rozpouštěním rtuti (+0,4 V). Na elektrodě se vylučuje velmi malé množství depolarizátoru, složení roztoku se v průběhu analýzy prakticky nemění. Typické polarografické křivky (závislost proudu I na napětí E vkládaném na elektrody; drobné oscilace jsou způsobeny odkapáváním rtuti) [7].



Obrázek 7 Příklady rtuťových elektrod: *a* - rtuťová kapková elektroda (DME), *b* - stacionární kapková rtuťová elektroda (SMDE), *c* - visící rtuťová kapková elektroda (HMDE)

1.1.3. Voltametrie

Voltametrie je podobně jako polarografie založena na měření polarizačních křivek. Při voltametrické analýze se používají rozličné pracovní elektrody z různých materiálů (obvykle se jedná o elektrody platinové, zlaté, uhlíkové i rtuťové), v dnešní době při vývoji nových sensorů i nanomateriály. Velmi časté je použití rotujících diskových elektrod. Platinovou elektrodu lze v roztoku kyseliny chloristé polarizovat až k potenciálu +1,5 V. Depolarizátor se dostává k povrchu rotující diskové elektrody konvektivně-difúzním transportem. Konvekcí se dostává depolarizátor do blízkosti povrchu elektrody, kde se utváří tenká difúzní vrstva. Pro konvektivně-difúzní limitní proud platí **Levičova rovnice** ve tvaru:

$$I_l = \pm k' \cdot z \cdot F \cdot \pi \cdot r^2 \cdot D^{2/3} \cdot \nu^{-1/6} \cdot \omega^{1/2} \cdot c = k \cdot c \quad (2)$$

I_l – konvektivně-difúzní limitní proud, k' – numerická konstanta, z – počet vyměňovaných elektronů, F – Faradayova konstanta, r – poloměr diskové elektrody, D – difúzní koeficient, ν – kinematická viskozita roztoku, ω – úhlová rychlost otáčení elektrody, c – koncentrace depolarizátoru, k – numerická konstanta

Při voltametrické analýze se zpravidla polarizuje elektroda v obou směrech (od kladnějších k záporným potenciálům a naopak) z důvodu hystereze měření [2, 6].

1.1.3.1. Cyklická voltametrie

Cyklická voltametrie patří do skupiny potenciodynamických experimentálních metod.

Princip metody, podobně jako v klasické polarografii, spočívá v elektrolýze zkoumaného roztoku elektroaktivní částice, obsahujícího nadbytek základního elektrolytu. Ve zkoumaném roztoku je ponořena stacionární pevná či rtuťová elektroda a tato elektroda je elektrodou pracovní. Je polarizována vloženým stejnosměrným napětím. Referenční elektrodou bývá nasycená kalomelová, nebo argenticchloridová elektroda. Doplňkem do tříelektrodevého zapojení je pomocná elektroda, nejčastěji ve tvaru platinového plíšku.

Cyklická voltametrie je charakterizována plynulým nárůstem potenciálu pracovní elektrody z jedné mezní hodnoty do druhé a zpět do výchozího bodu. Základními nastavitelnými parametry experimentu jsou meze a rychlost změny potenciálu v čase (dE/dt). Ovlivňovat lze rovněž vlastnosti elektrolytu, především koncentraci elektroaktivní látky a teplotu. Výsledkem je tzv. polarizační křivka, neboli závislost proudu protékajícího mezi pracovní a pomocnou elektrodou na potenciálu pracovní elektrody. Tato křivka bývá též někdy označována jako elektrochemické spektrum systému. Existují obecně dva mezní případy studovaných systémů. Jedná se o elektrodové děje vratné (reverzibilní) a nevratné (ireverzibilní) [2, 4, 8].

1.1.3.2. Lineární voltametrie

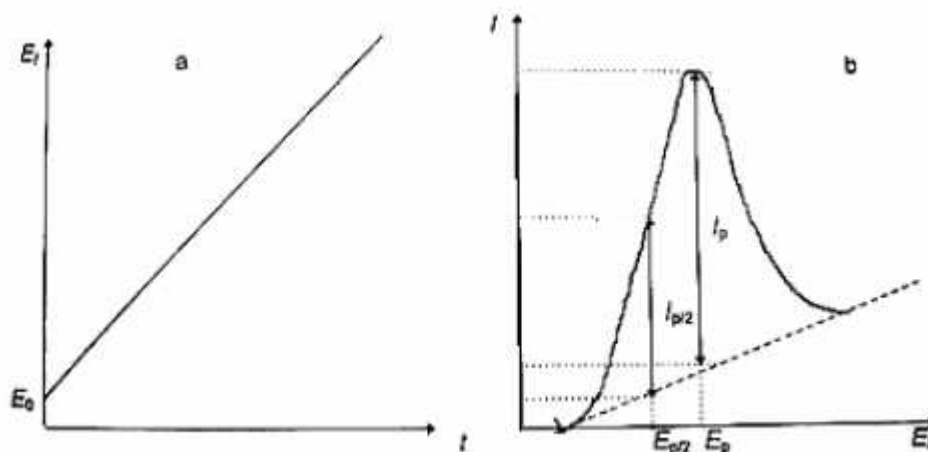
Nestacionární technika s lineárně rostoucím nebo klesajícím potenciálem. Elektroda se zde polarizuje rychleji než v případě klasické polarografie. Zatímco u tradiční polarografie bývá rychlost polarizace elektrody asi 1 mV/s, lze v případě nestacionární lineární voltametrie polarizovat elektrodu 10 až 1000 mV/s. Rychlá změna potenciálu způsobí vyčerpání depolarizátoru v okolí elektrody, a proto místo klasické polarografické vlny získáváme signál v podobě píku (na voltametrické křivce se vytvoří maximum). Potenciál píku je kvalitativním parametrem. Výška píku je kvantitativním parametrem, vždy je úměrná koncentraci analytu.

Metoda lineární voltametrie, stejně jako následující cyklická voltametrie slouží ke studiu kinetiky a mechanismu elektrodových reakcí.

Pro případ difúze (k rovinné elektrodě) je proud píku dán Randles – Ševčíkovou rovnicí ($t = 25^\circ\text{C}$) [8]

$$I_p = 2,69 \cdot 10^5 n^{3/2} AD^{1/2} c_{Ox}^0 v^{1/2} \quad (3)$$

I_p – proud, A – plocha elektrody v cm^2 , D – difúzní koeficient oxidovatelné formy v roztoku v $cm^2 \cdot s^{-1}$, v – rychlost polarizace v $V \cdot s^{-1}$, c_{Ox}^0 – molární koncentrace v $mol \cdot cm^{-3}$



Obrázek 8 Princip voltametrie LSV (a – závislost potenciálu na čase, b – výsledná voltametrická křivka s píkem)

1.1.4. Eliminační polarografie (EP)

EP je elektrochemická metoda, která umožňuje pomocí matematických operací s i - t křivkami naměřených na rtuťové kapající elektrodě eliminovat vybraný typ polarografického proudu. Teorie předpovídá, že touto metodou lze dosáhnout takových výsledků, kterých nelze dosáhnout žádnou jinou existující elektrochemickou metodou.

Pro získání eliminačních polarogramů je třeba určit hodnoty celkového polarografického proudu, jeho integrálu a derivace nebo dvojnásobného integrálu a vypočítat jejich lineární kombinace s vhodnými koeficienty. Pro eliminaci vybraného typu nebo kombinace dvou typů polarografických proudů je dále třeba získat koeficienty této eliminace.

EP umožňuje rozlišování látek podle charakteru elektrodového děje nebo zkoumání interakcí látek s elektrodou i látek mezi sebou jako je například zkoumání interakce DNA s cytostatiky a léky proti AIDS, atd. [9, 10, 11]

1.1.4.1. Eliminační voltametrie

Elektrochemické metody můžeme dělit do dvou skupin podle kontrolujícího parametru. Je-li kontrolujícím parametrem potenciál a závislá proměnná je proud, jedná se o

potenciostatické metody jako například Diferenční pulsní voltametrie, „Linear sweep“ voltametrie, Cyklická voltametrie, či „Square wave“ voltametrie.

U galvanostatických metod je kontrolujícím parametrem proud, závislou hodnotou je potenciál. Sledována je obvykle závislost $E = f(I)$. U potenciostatických metod lze získaný celkový proud považovat za součet jednotlivých dílčích proudů a po dlouhou dobu se objevovaly snahy o vyrušení některého proudu a zachování jiného proudu, např. u pulsních metod [1, 2, 8, 14, 15, 16]. Eliminační voltametrie s lineárním scanem má schopnost některé dílčí proudy zachovat a jiné eliminovat. Je to metoda kontrolující potenciál. Výhodou je, že je schopna eliminovat nejen kapacitní složku proudu, ale z celkové odezvy i kinetické a difúzní proudy. Tyto dílčí proudy může EVLS eliminovat jednotlivě, nebo i současně [1].

EVLS pracuje na jednodušším základě než *EP*, je rychlejší a lze ji aplikovat i na pevné elektrody. U EVLS je závisle proměnnou rychlost polarizace elektrody. V případě proudu-napěťových křivek jak v cyklické voltametii, tak i v „lineární sweep“ voltametii čas ztrácí svoji nezávislost. Protože je spojen s elektrodoým potenciálem, vystupuje jako nezávisle proměnná rychlost polarizace elektrody v .

První podmínkou pro eliminaci je, že eliminovaný proud lze vyjádřit jako součin dvou na sobě nezávislých funkcí: funkce rychlosti polarizace a funkce potenciálu.

Druhou podmínkou pro eliminační proceduru je podobně jako u *EP* vyjádření celkového proudu jako sumy dílčích proudů. Jedna vybraná rychlost polarizace je referenční, další rychlosti polarizace jsou vybrány tak, aby byly násobkem této referenční rychlosti (násobek dvou, nebo čtyř). Může být eliminován v podstatě jakýkoliv proud, u kterého je známá závislost na rychlosti polarizace.

Dá se dokázat, že všechny typy eliminací, při kterých je eliminován kinetický proud, umožňují zvětšení rozsahu měřených potenciálů (potenciálové okno).

Analytickému využití EVLS byla věnována pozornost i v případě elektrochemického stanovení hliníku, adeninu, cytosinu, jejichž redukce probíhá v oblasti negativních potenciálů, často ovlivněných redukčními procesy základního elektrolytu. Velkou výhodou EVLS, podobně jako *EP*, je eliminace konkurenčního redukčního procesu vodíkových iontů, eliminace kinetického proudu a možnost přímého elektrochemického stanovení iontů hliníku na rtuťové elektrodě při velmi negativních potenciálech. Podobná situace vzniká při studiu elektrodoého procesu purinových a pyrimidových bází [12].

Přednosti eliminační voltametrie

Eliminační voltametrie s lineárně se měnícím napětím se využívá pro eliminaci vybraných dílčích proudů, jejich rozdílných závislostí na rychlosti polarizace. Nejčastěji je eliminován proud kapacitní (je přímo úměrný rychlosti polarizace) a proud kinetický (rychlostí polarizace není prakticky ovlivněn). Méně často je eliminován proud difúzní, jehož rychlostní koeficient odpovídá jedné polovině. Eliminace je podmíněna možností vyjádřit celkový proud jako sumu dílčích proudů.

$$I = I_d + I_c + I_k + \dots \quad (4)$$

I_d – difúzní proud, I_c – proud kapacitní, I_k – proud kinetický

Eliminovanými složkami proudů jsou I_k a I_c . I_d je složka zachovaná.

Celkové proudy měřené při rozdílných rychlostech polarizace (zvolených např. 100, 200 a 400 mV/s) se eliminační procedurou převádějí na proudovou eliminační funkci, která požadované dílčí proudy eliminuje, jiné zachovává.

V podstatě se jedná o transformaci celkového proudu do lineární kombinace proudů měřených při různých rychlostech polarizace. Z experimentálního hlediska je úspěch eliminace závislý na výkonném potenciostatu a digitalizaci dat, tedy možnosti jejich exportu do Excelu nebo do Originu. Proudovo-napěťové křivky musí obsahovat stejný počet dvojic $I-E$, a proto musí být všechna měření prováděna se stejným potenciálovým krokem (step). Nejpoužívanější, jak z hlediska zvýšení citlivosti signálů, tak z hlediska jejich rozlišení, je eliminační funkce se simultánní eliminací kapacitního a kinetického proudu a s konzervací proudu difúzního:

$$f(I) = 17.485 I - 11.657 I_{1/2} - 5.8284 I_2 \quad (5)$$

Bylo zjištěno, že tato eliminace je velice perspektivní i pro analýzu adsorbovaného depolarizátoru, kdy eliminační funkce má tvar píku přecházejícího přes proudovou nulu v protipík. Na rozdíl od běžných elektrochemických metod je EVLS schopna rozlišit potenciálově velmi blízké redukční signály adeninu a cytosinu v oligodeoxynukleotidech [12].

Výhody a nevýhody EVLS

Výhody EVLS:

- jednoduchost, časová nenáročnost, cenová dostupnost,
- použitelná i při měření na pevných elektrodách,
- simultánní eliminace více proudů,
- zvětšení rozsahu měřících potenciálů (rozšíření potenciálového okna),
- elektrochemické stanovení látek, jejichž redukce probíhá při negativních potenciálech,
- odkrytí skrytých nebo minoritních procesů,
- zvýšení proudové citlivosti,
- rozlišení potenciálově velmi blízkých elektrochemických signálů.

Nevýhody EVLS:

- horší reprodukovatelnost naměřených signálů, zejména v případě pevných elektrod,
- zkreslení v důsledku vzájemné interakce eliminovaných dílčích proudů,
- pro některé eliminační funkce nastává nutnost vyhlazování naměřených křivek.

Požadavky pro EVLS:

- stejný potenciálový step,
- stabilní proudová nula,
- inertnost základního elektrolytu,
- dobrý potenciostat,
- stejné experimentální podmínky, zejména z hlediska povrchu elektrody [1, 13].

2. Měřicí přístroje a zařízení

Elektrochemická měření je možno provádět na analyzátoru AUTOLAB electrochemical Analyzer firmy EcoChemie z Holandska, ve spojení s VA – stand 663 (Metrohm, Švýcarsko).

Standardní cela je složena z tříelektrodevého systému:

- Pracovní elektroda – visící rtuťová kapková elektroda HMDE
- Referenční elektroda Ag(s)|AgCl(s)|KCl(aq) ($c = 3 \text{ mol/l}$)
- Pomocná elektroda – platinová.

Všechny měřené roztoky musí být zbavovány kyslíku pomocí argonu (99,99%). Před začátkem měření je dobré roztok probublávat vždy alespoň 10 minut.

Lineární voltametrie při studiu struktury DNA se proměřuje s následujícími parametry: počáteční potenciál -0,5 V nebo -0,8 V; -1,0 V, konečný potenciál -1,80 V.

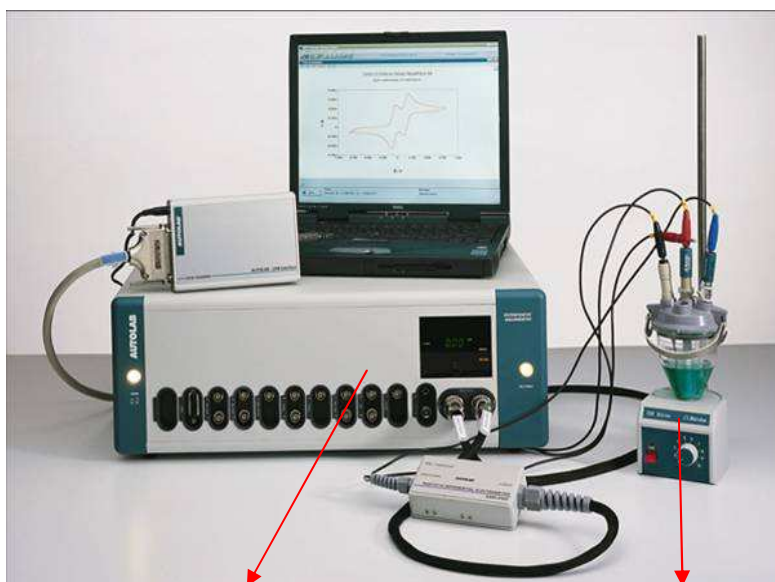
Látky jsou měřeny při rychlostech polarizace 25, 50, 100, 200, 400 mV/s a konstantním potenciálu step 2 mV.

Měření oligonukleotidů probíhá vždy při různých pH.

Pro měření a zpracování dat se může využít softwaru GPES 4.8. K výpočtu eliminačních funkcí mohou být voltmetrické křivky exportovány a zpracovány v programu Microsoft Excel.



Obrázek 9 VA Stand 663 pro zapojení s rtuťovou elektrodou



potenciostat

tříelektrodevé zapojení

Obrázek 10 AUTOLAB Electrochemical Analyzer

3. Nukleové kyseliny

Nukleové kyseliny jsou biomakromolekulární látky společně s bílkovinami považované za nejvýznamnější složky živých soustav. V jejich molekulách se uchovává dědičná (genetická) informace buňky a jejich prostřednictvím se přepisuje do specifické struktury bílkovinných molekul. Nukleové kyseliny se nacházejí v buněčných jádrech (nukleus = jádro). V malých množstvích jsou i mimo buněčná jádra (v mitochondriích a centriolách, u rostlin v chloroplastech). Lineární polymery ribonukleotidů (RNA) nebo deoxyribonukleotidů (DNA) jsou jedno nebo dvouřetězcové o molekulové hmotnosti 20 až 60 kDa. Jednotlivé nukleotidy jsou spojeny přes 3',5'-fosfodiesterovou vazbou [17].



Obrázek 11 *Dvoušroubovice DNA*

Stavba

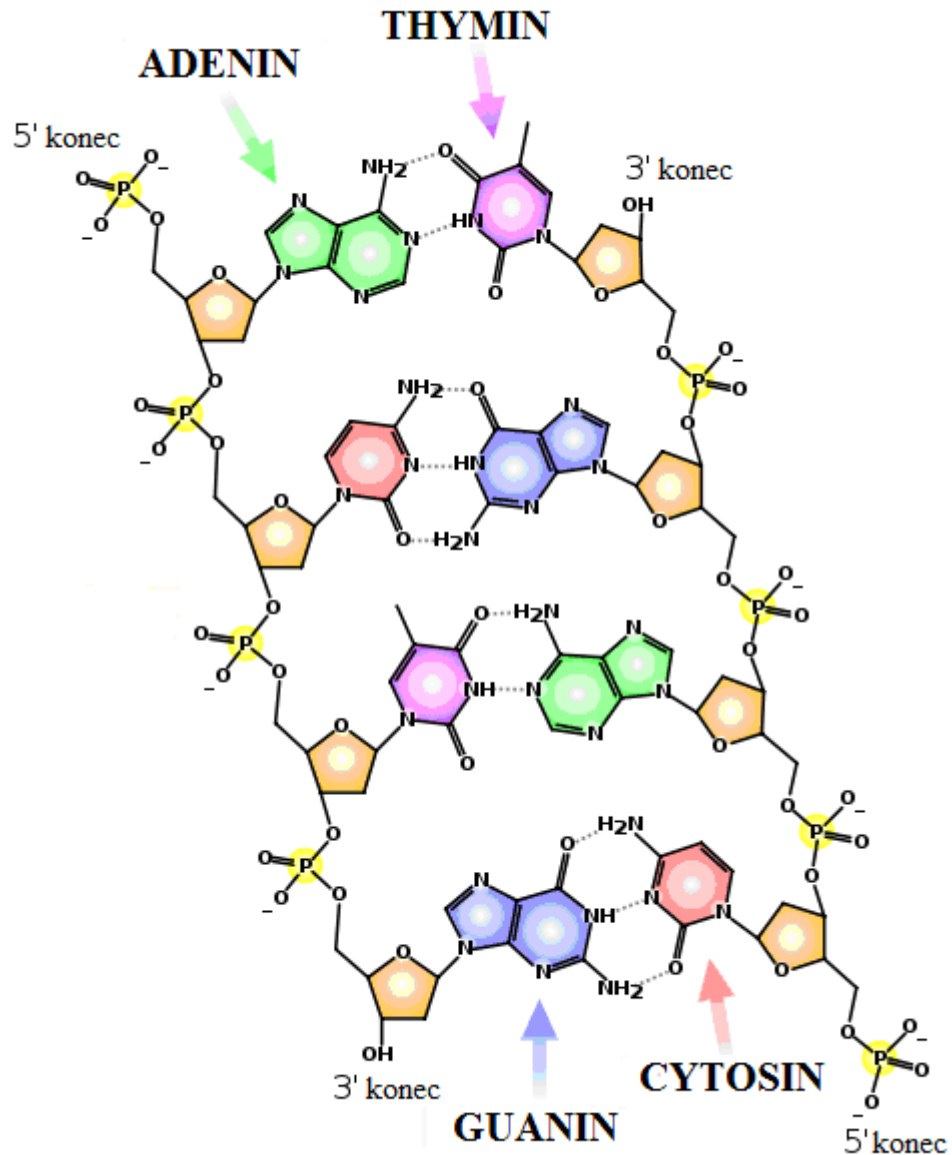
Jako u všech typů nukleových kyselin je nukleotid složen ze tří složek – báze, cukerná složka a zbytek kyseliny fosforečné. Z bází se v DNA vyskytují adenin, thymin, cytosin a guanin. Cukernou složkou je deoxyribóza (konkrétně 2-deoxy- β -D-ribofuranóza).

Dále obsahuje fosfát vázaný 3', 5'-fosfodiesterovou vazbou. V NA dochází ke spojení jednotlivých nukleotidů a spojují se v polynukleotidy. Polynukleotid tvoří základ NA. NA obsahují desítky, stovky až miliony nukleotidů. Počet a pořadí jednotlivých nukleotidů v řetězci závisí na matrici, podle které byl nukleotid syntetizován.

Sekundární struktura

Jedná se o konformaci DNA v prostoru. Převážně je to pravotočivá dvoušroubovice – tedy dva polynukleotidové řetězce (vlákna) stabilizované vodíkovými můstky. Vodíkové můstky vznikají mezi bázemi NA a vyskytují se pouze mezi zcela určitými bázemi. Tento děj

se nazývá komplementarita, nebo-li párování bází. Pro DNA je charakteristický stejný počet adeninových a thyminových, nebo cytosinových a guaninových nukleotidů. Adenin se váže na thymin dvěma vodíkovými vazbami a cytosin s guaninem se váží třemi vodíkovými vazbami.



Obrázek 12 Komplementarita bází v DNA

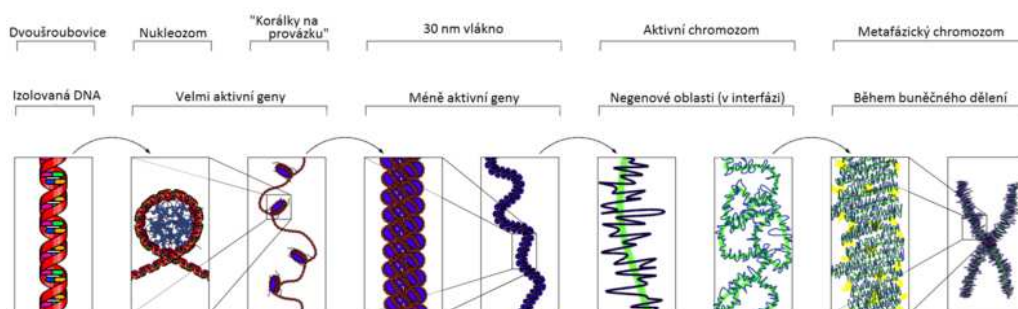
Dvoušrubovnice DNA naprosto zřetelně vykazuje kyselý charakter. V celkové dvoušroubovici je nízký bazický charakter bází převážen ionty kyseliny fosforečné.

V DNA se vyskytují purinové (adenin, guanin) a pyrimidinové (cytosin, thymin) báze. Dusíkaté báze najdeme jako keto-enolové tautomery. Díky konjugovanému systému dvojných vazeb absorbují v oblasti 260 – 270 nm.

Párováním dusíkatých bází se udržuje sekundární struktura nukleových kyselin [18].

Funkce a výskyt

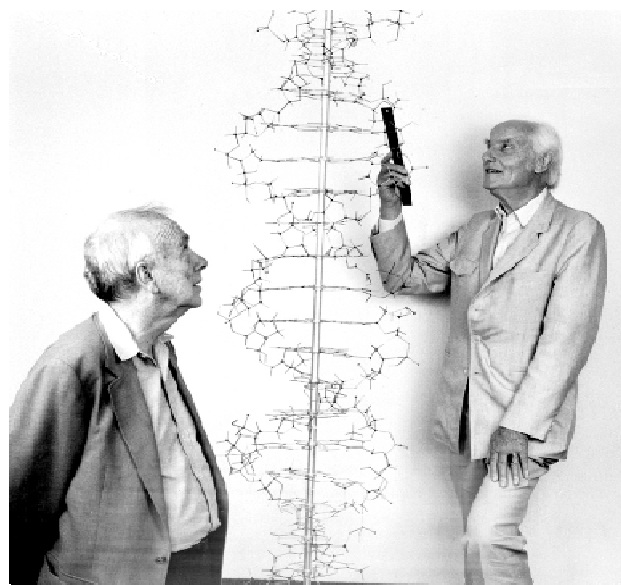
DNA se vyskytuje i v cytoplazmě jako plazmid. Je tvořena chromatinovými vlákny s poskládanými nukleozómy. Nukleozómy jsou v podstatě jednotlivé bílkoviny obalené ve dvoušroubovici DNA. DNA v buňce může být až metr dlouhá, přičemž velikost buňky je řádově v nanometrech. Je to dáno tím, že dochází ke kondenzaci DNA [17].



Obrázek 13 *Struktura chromatinu u jaderných organismů*

Poznámka

James Watson a Francis Crick získali v roce 1953 Nobelovu cenu za objevení a popsání struktury DNA. Jejich model se dodnes používá a označuje se také jako semikonzervativní model.



Obrázek 14 *James Watson a Francis Crick s modelem DNA*

3.1. Elektrochemie nukleových kyselin

Elektroaktivita NA a jejich složek byla objevena zhruba v polovině 60-tých let minulého století pomocí oscilopolarografie [19, 20].

Tyto biopolymery podléhají na elektrodách jak dějům faradaickým, tak vykazují povrchovou aktivitu. Na rtuťových elektrodách jsou faradaické děje spjaty s redukčními

pochody a redukčně-oxidačními pochody v nukleových kyselinách. Na uhlíkových elektrodách dochází k jejich oxidaci [21].

Polarografické a voltametrické redukční signály na rtuťové elektrodě poskytují pouze adenin a cytosin ve formě volných bází, ale i jako nukleosidy a nukleotidy, nebo zabudované do řetězce nukleové kyseliny.

Obě báze jsou v neutrálním prostředí redukovány při potenciálu -1,5 V a NA poskytují obvykle jeden redukční signál. Redukce probíhá v protonizovaném stavu bází, na vazbách 3, 4 cytosinu a 1, 6 adeninu. Přístupnost elektroaktivních vazeb bází povrchu elektrody ovlivňuje velikost redukčního signálu DNA. Voltametrický pík CA dsDNA je proto podstatně menší než pík CA jednořetězcové DNA a objevuje se při vyšších koncentracích dsDNA v roztoku.

Díky eliminační voltametrii s lineárním scanem byl objeven redukční pík adeninu a cytosinu ve směsi dvou homo-oligonukleotidů. Stupeň rozdělení redukčního píku závisí na vzájemném poměru A a C [22]. Nejvýraznější rozdělení A a C bylo sledováno u ODN v poměru 1:2. Později bylo stejnou metodou pozorováno rozdělení hetero-oligonukleotidů [23, 24, 25].

Adenin a cytosin mohou být redukovány na rtuťových elektrodách nebo oxidovány na uhlíkových elektrodách. Redukci podléhají jen A a C a ve velmi negativních potenciálech i guanin [21]. A a C poskytují jen jeden redukční pík, který zatím není možno rozdělit.

3.2. Purinové báze

Puriny jsou látky složené ze šestičtetného pyrimidinového a pětičtetného imidazolového systému. Obsahují uhlíkové a dusíkové atomy.

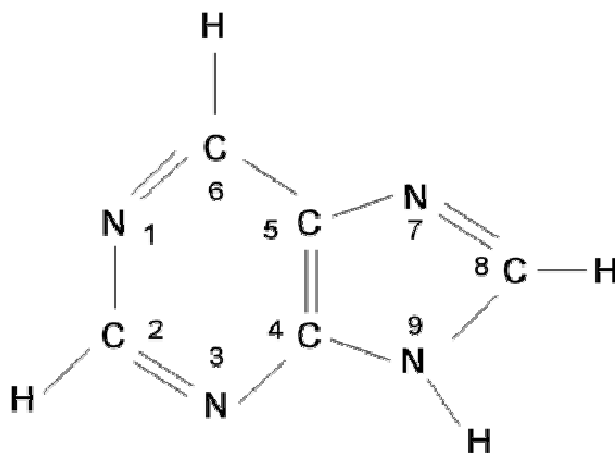
Jsou to krystalické, ve vodě dobře rozpustné látky. Bod varu je asi 217 °C. Mají rovinnou strukturu. Jejich vodné roztoky vykazují v ultrafialové oblasti charakteristická absorpční spektra závislá na pH, což se využívá na jejich identifikaci a stanovení jejich koncentrací.

Schopnost absorbovat ultrafialové záření si purinové báze zachovávají i po vazbě na cukernou složku [28].

Mezi purinové báze vyskytující se v DNA patří adenin a guanin.

3.2.1. Purin

Purin je dusíkatá heterocyklická sloučenina složená z sp^2 – hybridizovaných atomů uhlíku a tří dusíků, tvořená kondenzovaným pyrimidinovým a imidazolovým kruhem. V čistém stavu je to krystalická, zásaditá látka [26].



Obrázek 15 Vzorec purinu s číslováním

Deriváty purinu

Většina purinů se v buňkách nevyskytuje volně, báze jsou navázané nejčastěji na pětiuhlíkatý cukr, ribózu nebo deoxyribózu jako tzv. nukleosidy. Deriváty purinu jsou velmi významné, a proto se celá skupina těchto chemicky podobných látek nazývá puriny. Podle četnosti výskytu v buňkách se někdy rozdělují na hlavní a vedlejší puriny. Toto dělení ale nezohledňuje jejich fyziologickou důležitost.

Nejdůležitějšími deriváty jsou hlavní purinové báze adenin a guanin (kódování genetické informace v DNA). Nejen adenin a guanin se vyskytují v nukleových kyselinách. Velkou řadu derivátů najdeme i v mRNA (N6-methyladenin, N6-N6-dimethyladenin nebo N7-methylguanin), nebo v tRNA. Pokud se přece jen v buňkách volné puriny nacházejí, pak jsou to často produkty metabolismu purinových bází, jako je xanthin, hypoxanthin a kyselina močová.

Deriváty purinů se také vyskytují i v rostlinách ve formě např. alkaloidů. Nejvýznamnějšími alkaloidy jsou kofein (káva), theofylin (čaj) a theobromin (kakao a čokoláda) [26, 29].

Metabolismus purinů

Organismus je schopen nejen využívat puriny obsažené v potravě, ale dokáže je i syntetizovat. Hlavním místem syntézy jsou játra. Potřebnými látkami k syntéze jsou cukr

ribosa a aminokyseliny glycin, glutamin a aspartát. Jako koenzym reakcí slouží kyselina listová, která umožňuje syntézu purinových bází k syntéze nukleových kyselin a tak hraje důležitou roli při buněčném dělení.

Přebytečné puriny jsou oxidovány na kyselinu močovou, která je vylučována v moči. Kyselina močová je ve vodě velmi špatně rozpustná a může být příčinou močových kamenů.

Při metabolické poruše katabolismu purinů, dochází k hyperurikemii, stavu, kdy je v krevním séru vysoká koncentrace močové kyseliny. Pak se mohou krystaly kyseliny ukládat v měkkých tkáních nebo kloubech, což způsobuje zánětlivou reakci, vedoucí k onemocnění s názvem dna. Bylo zjištěno, že dna je dědičná choroba, recesivně vázaná na chromozóm X [26, 27].

3.2.2. Adenin

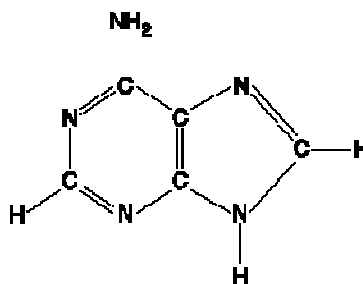
Adenin (vitamín B₄) je jednou ze dvou purinových bází vyskytujících se v nukleových kyselinách. V DNA se adenin váže k thyminu přes dvě vodíkové vazby. V RNA se zapojuje do proteinové syntézy s uracilem a do přenosu genetické informace. Adenin je označován zkratkou Ade a je důležitou složkou některých antibiotik.

Elektrochemické chování adeninu (Ade)

Ade poskytuje jednoduchou, velkou na pH závislou polarografickou vlnu. Neposkytuje ji však nad pH 6. Podle pK je velmi pravděpodobné, že elektrochemicky redukovatelná je právě protonizovaná forma Ade. Coulometricky bylo zjištěno, že úplné redukce Ade se účastní 6 elektronů.

Charakter šesti elektronové vlny Ade redukční produkty indikují:

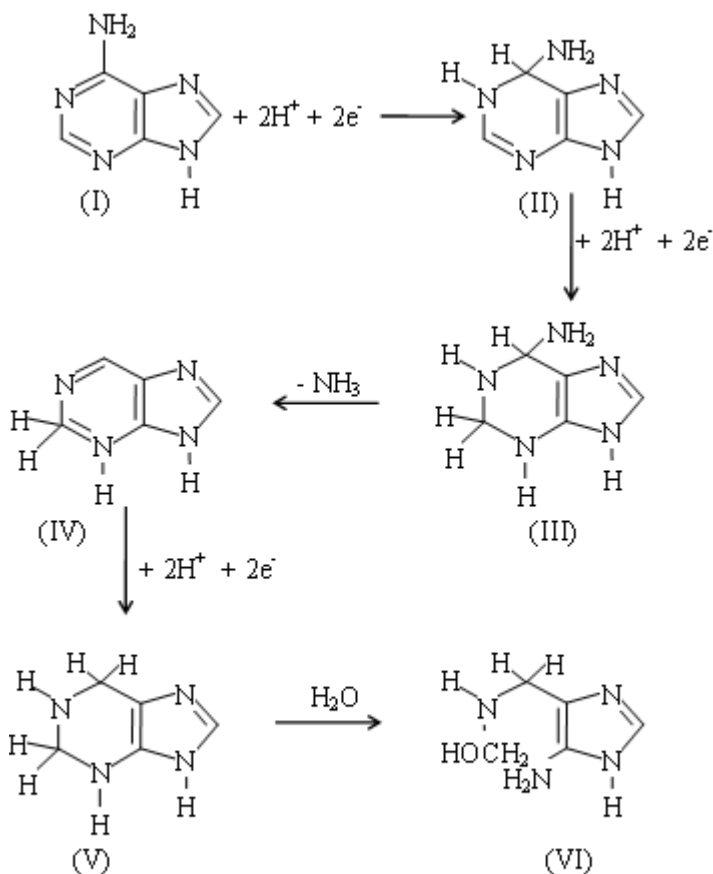
- redukcí dvojně vazby C₆ = N₁
- redukcí dvojně vazby C₂ = N₃
- deaminaci C₆ a opětne redukcí C₆ = N₁



Obrázek 16 Adenin

Adenin (viz I v obrázku 12) je v prvním kroku redukován na 1,6 dihydro-6-aminopurin (II), který přechází na 1,2,3,6 tetrahydro-6-aminopurin (III). Tímto krokem končí redukce Ade na rtuťové kapkové elektrodě.

Při makroelektrolýze na rtuťové velkoplošné elektrodě za konstantního potenciálu 1,2,3,6 tetrahydro-6-aminopurin deaminuje, regeneruje dvojnou vazbu N₁ = C₆ za vzniku 2,3 dihydropurinu (IV), který je okamžitě redukován na 1,2,3,5 tetrahydropurin (V), který se může dále hydrolyzovat na derivát imidazolu (VI).



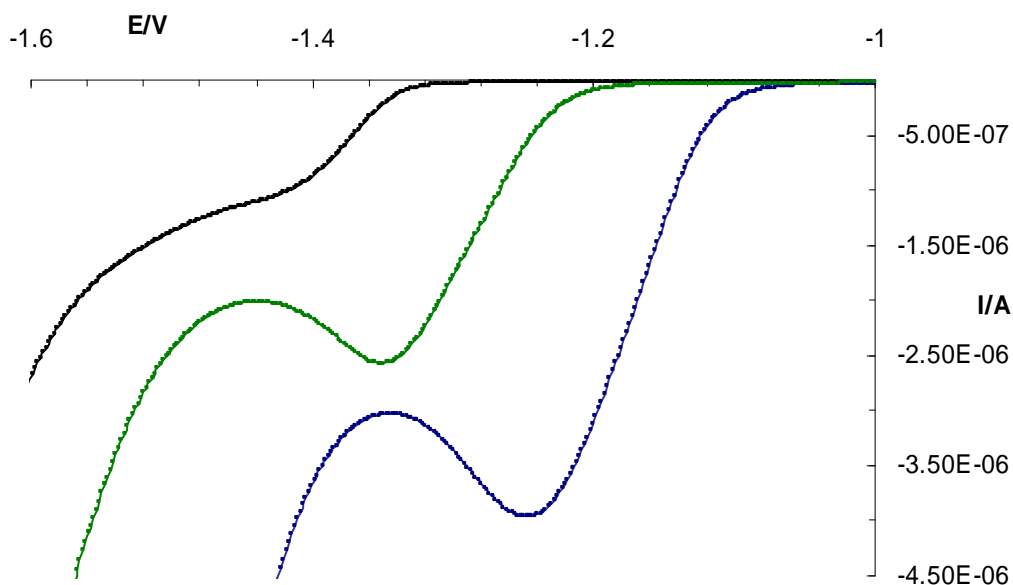
Obrázek 17 Reakční schéma elektrochemické redukce adeninu

Adenin (6-aminopurin) na rtuťové elektrodě poskytuje redukční signál v relativně negativních potenciálech v blízkosti vylučování vodíku.

Se vzrůstající hodnotou pH (3 – 6) se posouvá poloha redukčního píku do negativních potenciálů. Můžeme tedy předpokládat, že dochází k protonizaci báze a přijetí zhruba stejného počtu elektronů a protonů. Bylo zjištěno, že nižší pH podporuje protonizaci a tím i redukci adeninu, avšak elektroanalýzu může být při velmi nízkých pH komplikována procesem vylučování vodíku (redukce protonů).

Poznámka

Všechny uvedené grafy a tabulky byly zpracovány na základě měření a konzultací v letech 2009-2010 ve spolupráci s Ing. Radkou Mikelovou, pod odborným dohledem doc. RNDr. Libuše Trnkové, Csc. na Masarykově univerzitě v Brně.



Graf 1 Redukční signál adeninu při různém pH prostředí

modrá: ADE pH 3,58 rychlost polarizace 200 mV/s

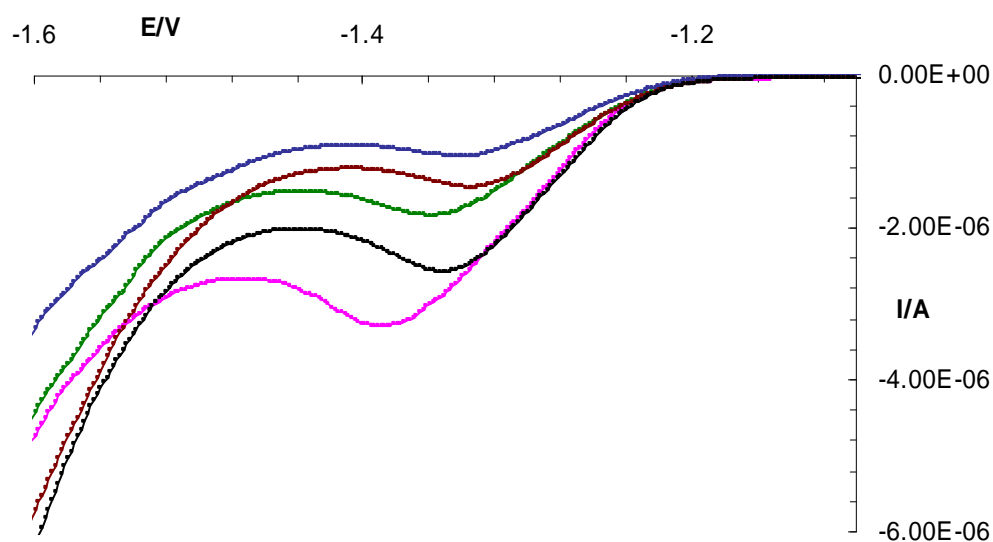
zelená: ADE pH 5,03 rychlost polarizace 200 mV/s

černá: ADE pH 6,06 rychlost polarizace 200 mV/s

Tabulka 1 Závislost výšky a polohy redukčního píku (I_p , E_p) na pH

Látka	pH	Rychlost polarizace v [mV/s]	výška píku I_p [A]	poloha píku E_p [V]
ADE	3,58	200	$2,301 \cdot 10^{-6}$	-1,234
ADE	5,03	200	$1,425 \cdot 10^{-6}$	-1,341
ADE	6,06	200	$2,997 \cdot 10^{-7}$	-1,423

Se zvyšující se rychlostí polarizace rtuťové elektrody (od 25 mV/s do 400 mV/s) adeninový pík roste a jeho potenciál se mírně posouvá do negativních hodnot.



Graf 2 Redukční signál adeninu při různých rychlostech polarizace

modrá: ADE pH 5,03 25 mV/s

hnědá: ADE pH 5,03 50 mV/s

zelená: ADE pH 5,03 100 mV/s

černá: ADE pH 5,03 200 mV/s

růžová: ADE pH 5,03 400 mV/s

Tabulka 2 Redukční signál adeninu při různých rychlostech polarizace v

látka	pH	rychlost polarizace v [mV/s]	výška píku I_p [A]	poloha píku E_p [V]
ADE	5,03	25	$4,274 \cdot 10^{-7}$	-1,316
ADE	5,03	50	$7,358 \cdot 10^{-7}$	-1,317
ADE	5,03	100	$9,570 \cdot 10^{-7}$	-1,337
ADE	5,03	200	$1,425 \cdot 10^{-6}$	-1,341
ADE	5,03	400	$1,597 \cdot 10^{-6}$	-1,377

Procedura eliminační voltametrie (rychlosti polarizace 100, 200, 400 mV/s) zvyšuje proudový signál zhruba trojnásobně a je mnohem lépe odečitatelný v podstatě bez použití základní proudové linie (baseline correction). Oba tyto atributy mají velký význam pro analýzu elektrochemických dat.

3.2.3. 2-aminopurin (2-AMP)

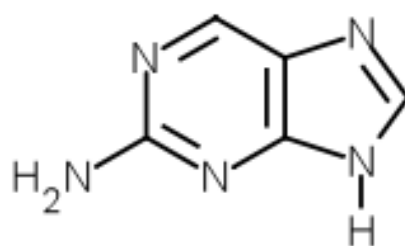
Je to derivát purinu se sumárním vzorcem odpovídajícím Ade. Během replikace DNA může substituovat samotný adenin. Tento analog adeninu se obvykle páruje s thyminem za tvorby pouze jediné vodíkové vazby. Může se však párovat i s cytosinem. Výsledkem těchto procesů je chyba v nově vytvořené DNA, proto lze 2-AMP považovat za velmi silný mutagen a karcinogen.

2-AMP je více než 30 let používán ke zkoumání vlastností nukleových kyselin. Přispívá k tomu skutečnost, že ve srovnání s Ade vykazuje 2-AMP intenzivní fluorescenci. Proto je široce využíván jako DNA-sonda pro studium její konformace a dynamiky, kde 2-AMP nahrazuje jednu z purinových bází DNA dvoušroubovice [17].

Pozorované zhášení v její fluorescenci se obecně předpokládá jako výsledek stohování přiléhajících bází (stacking-interakce). Doby fluorescence mohou sloužit k získání okamžité informace o prostředí dané sondy. Touto cestou lze studovat interakce DNA s proteiny nebo se více dozvědět o osudu DNA v životním prostředí. 2-AMP bývá také označován za tlumič kinázy (látka stupňující působení enzymů). 2-AMP umožňuje buňkám odolávat nepřímému poškození DNA v buňce a jejím zániku nezávisle na p53, proteinu, který zabraňuje nádorové transformaci DNA. Nádorový supresor p53 hraje kritickou roli v kontrole buněčného dělení a při vzniku rakoviny. Mutace proteinu p53 může vést ke ztrátě jeho supresorové funkce a naopak k tomu, že podporuje vznik nádorů a jejich metastatický potenciál. Mutace v DNA vazebné doméně může vést ke změně konformace proteinu, což silně ovlivňuje biochemické aktivity mutovaného p53, včetně vazby na DNA. Téměř nic není známo o vazbě mutantů p53 na nadšroubovicovou DNA.

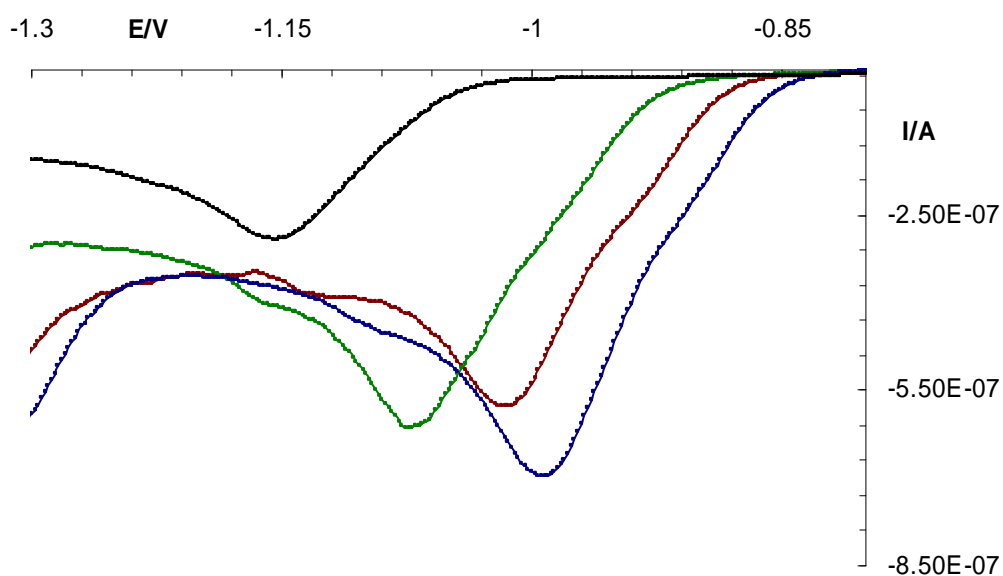
Včleněním 2-AMP do DNA zanikne jeho fluorescence [30]. Tato ztráta redukce fluorescence je připisována komplementárním interakcím s nejbližšími sousedními nukleovými bázemi. Fluorescenční vlastnosti 2-AMP tak bývají používány i ke sledování rovnovážného stavu komplementárních vlastností DNA dvoušroubovic, obsahujících neshodné páry [31]. Distribuce (rozdělování) komplementárních stavů se může měnit s teplotou, typem rozpouštědla, druhem sousedních bází a vázaných proteinů. Všechny tyto podmínky mohou být sledovány použitím fluorescence 2-AMP.

Dynamika (hybnost) komplementárních bází přiléhajících k mutagenním neshodným párům v DNA mohou být částí rozpoznávacího (identifikačního) mechanismu replikačních/opravných enzymů [32].



Obrázek 18 2-aminopurin

Zatímco adenin poskytuje jednoduchý signál v negativnějších potenciálech, 2-AMP se redukuje v pozitivnějších potenciálech. Energeticky menší náročnost procesu vyžaduje hodnoty potenciálu kolem -1 V. Vyšší hodnota pH (6,06) naznačuje jednodušší proces, v případě nižších pH lze pozorovat proces složitější, který bude vyžadovat další elektrochemické zkoumání. Aplikace eliminačního principu zatím ukázala, že redukce 2-AMP v nižších hodnotách pH probíhá ve třech zatím neznámých krocích.



Graf 3 Redukční signál 2-AMP při různých rychlostech polarizace

modrá: 2-AMP pH 4,02 200 mV/s

hnědá: 2-AMP pH 4,46 200 mV/s

zelená: 2-AMP pH 5,03 200 mV/s

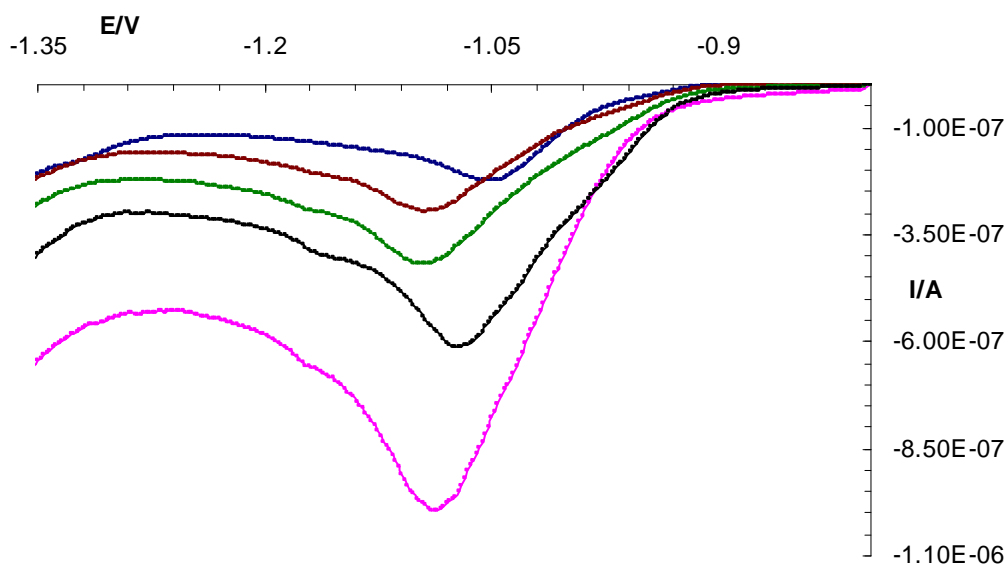
černá: 2-AMP pH 6,06 200 mV/s

V porovnání s Ade má pH u 2-AMP jiný vliv na výšku píku i na jeho polohu. Například při pH 6,06 je redukční pík podstatně nižší a nacházející se při mnohem negativnějších potenciálech než pH 5,03.

Tabulka 3 Charakteristika redukčního signálu 2-AMP v závislosti na pH prostředí

látka	pH	rychlost polarizace v [mV/s]	výška píku I_p [A]	poloha píku E_p [V]
2-AMP	4,02	200	$5,503 \cdot 10^{-7}$	-0,988
2-AMP	4,46	200	$2,885 \cdot 10^{-7}$	-1,016
2-AMP	5,03	200	$4,899 \cdot 10^{-7}$	-1,054
2-AMP	6,06	200	$2,223 \cdot 10^{-7}$	-1,151

V souladu se závislostí na pH nižší rychlost polarizace ukazuje na jednodušší proces. Vyšší rychlosti polarizace zachycují další doprovodné elektrodové procesy, které mají vliv na výšku i polohu signálu.



Graf 4 Redukční signál 2-AMP při různých rychlostech polarizace

modrá: 2-AMP pH 5,03 25 mV/s

černá: 2-AMP pH 5,03 200 mV/s

hnědá: 2-AMP pH 5,03 50 mV/s

růžová: 2-AMP pH 5,03 400 mV/s

zelená: 2-AMP pH 5,03 100 mV/s

Tabulka 4 Závislost redukčního signálu 2-AMP na rychlosti polarizace

látka	pH	rychlost polarizace v [mV/s]	výška píku I_p [A]	poloha píku E_p [V]
2-AMP	5,03	25	$1,669 \cdot 10^{-7}$	-1,064
2-AMP	5,03	50	$2,158 \cdot 10^{-7}$	-1,092
2-AMP	5,03	100	$2,949 \cdot 10^{-7}$	-1,104
2-AMP	5,03	200	$4,899 \cdot 10^{-7}$	-1,054
2-AMP	5,03	400	$7,607 \cdot 10^{-7}$	-1,088

3.2.4. 2,6 - diaminopurin (2, 6-DAMP)

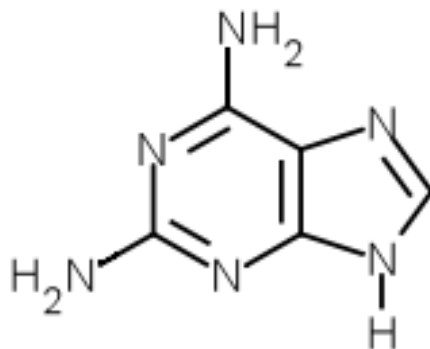
2,6-DAMP je metabolický antagonist přírodních purinů. Je silný inhibitor procesů duplikace DNA, jež předchází mitóze. Nukleosidické analogy jsou užívány v léčbě rakoviny a virových onemocněních. Jako antivirové prvky tyto sloučeniny inhibují replikace virových genů, zatímco protirakovinné sloučeniny inhibují buněčnou DNA replikaci a opraví ji [33].

2,6-diaminopurin arabinosid (DAPA) a 2-amino-6-methoxypurin arabinosid jsou zkoumanými léky, protože jsou rychle hydrolyzovány pomocí adenosin deaminasou. 2,6-diaminopurin-2,3-dideoxyribosid (ddDAPR) je podobný 2,3-dideoxyadenosinu (ddA), který je silný a selektivní inhibitor HIV (Human Immunodeficiency Virus) [34].

Navíc ddDAPR je zároveň silný inhibitor lidské ADA, a proto je využíván v kombinaci s nukleosidickými léčivými umocňujícími jejich aktivitu v léčbě oparů (herpes) a některých virových infekcí (vaccinia) [35]. Acyklický nukleotid, možný derivát adeninu, a 2,6-DAMP je potenciální antivirové. Je účinný proti DNA virům a retrovirům. 2,6-DAMP se často používá k záměně exocyklických funkčních skupin nacházejících se na purinu, determinujících jeho specifickou roli v biologii a chemii.

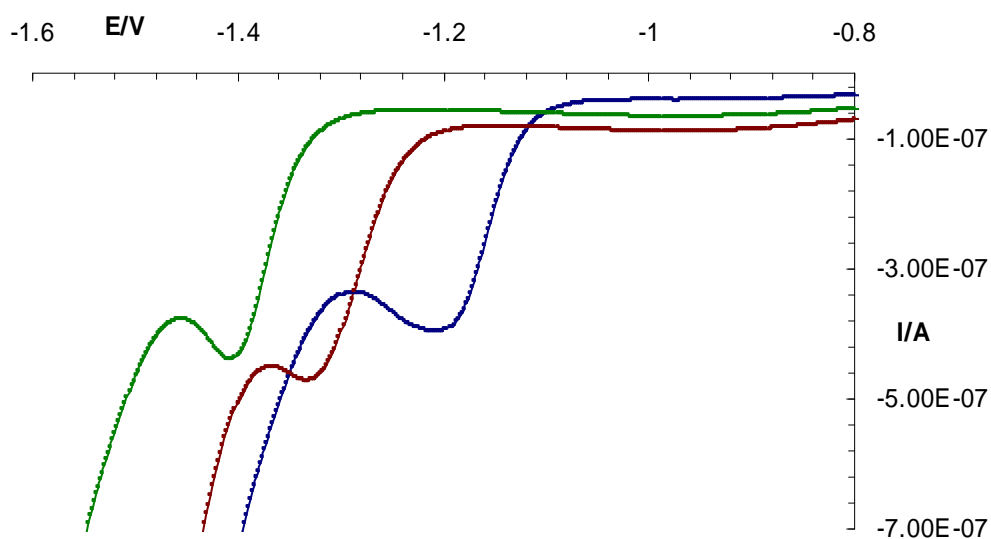
2,6-DAMP je lék proti leukémii a onemocněním kostní dřeně, zabraňující i abnormálnímu bujení bílých krvinek.

Jedna z vlastností nukleobáze 2,6-DAMP, ve srovnání s Ade, je lepší rozlišení bodových mutací. Tato vlastnost může být úspěšně aplikována v biotechnologiích pracujících na principu komplementarity [36, 37].



Obrázek 19 2,6-diamonopurin

Tento aminoderivát má z hlediska polohy redukčního píku velmi blízko Ade, avšak proudová odezva je podstatně nižší. Vliv pH se projevuje především v oblasti nejvyšší kapacity pufru (vliv acetátové složky pufru), kde je výška píku maximální.



Graf 5 Redukční signál 2,6-DAMP při různých pH prostředích

modrá: 2,6-DAMP pH 3,08 400 mV/s

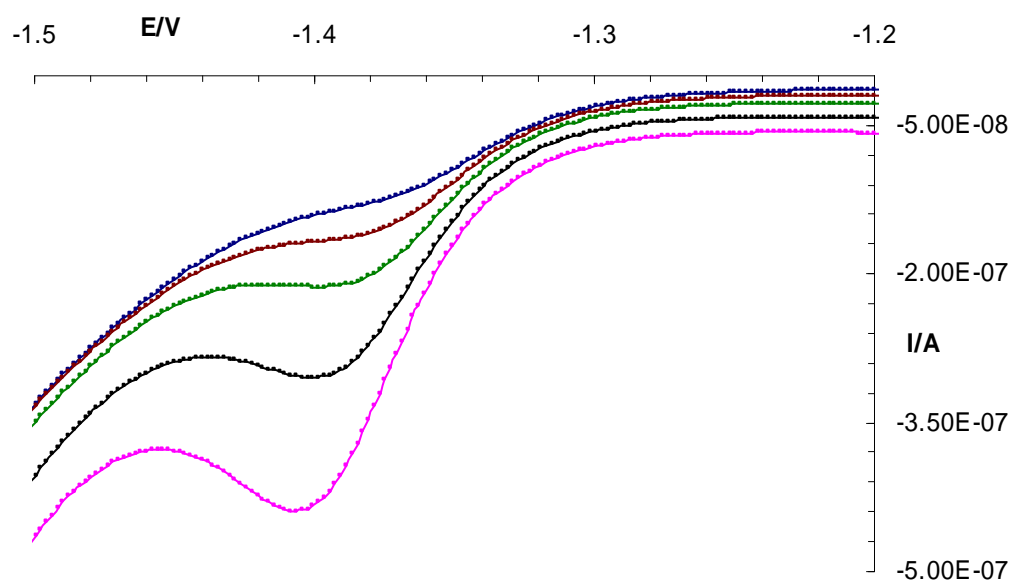
hnědá: 2,6-DAMP pH 4,54 400 mV/s

zelená: 2,6-DAMP pH 5,54 400 mV/s

Tabulka 5 Charakteristika redukčního signálu 2,6-DAMP při různém pH

Látka	pH	rychlost polarizace v [mV/s]	výška píku $I_p[A]$	poloha píku $E_p[V]$
2,6-DAMP	3,08	400	$1,976 \cdot 10^{-7}$	-1,223
2,6-DAMP	4,54	400	$2,213 \cdot 10^{-7}$	-1,336
2,6-DAMP	5,54	400	$1,792 \cdot 10^{-7}$	-1,410

S rostoucí rychlostí polarizace se zvětšuje výška píku (I_p).



Graf 6 Redukční signál 2,6-DAMP při různých rychlostech polarizace

modrá: 2,6-DAMP pH 5,54 25 mV/s

hnědá: 2,6-DAMP pH 5,54 50 mV/s

zelená: 2,6-DAMP pH 5,54 100 mV/s

černá: 2,6-DAMP pH 5,54 200 mV/s

růžová: 2,6-DAMP pH 5,54 400 mV/s

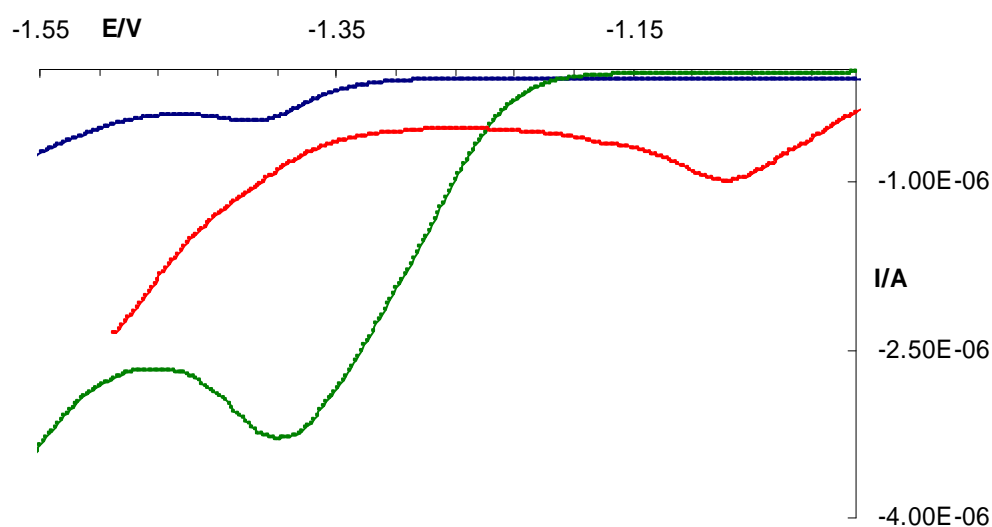
Tabulka 6 Závislost redukčního signálu 2,6-DAMP na rychlosti polarizace

látka	pH	rychlost polarizace v [mV/s]	výška píku I_p [A]	poloha píku E_p [V]
2,6-DAMP	5,54	25	$1,304 \cdot 10^{-8}$	-1,366
2,6-DAMP	5,54	50	$7,934 \cdot 10^{-8}$	-1,372
2,6-DAMP	5,54	100	$6,029 \cdot 10^{-8}$	-1,394
2,6-DAMP	5,54	200	$1,035 \cdot 10^{-7}$	-1,404
2,6-DAMP	5,54	400	$1,792 \cdot 10^{-7}$	-1,408

3.2.5. Směs aminoderivátů

Každá analytická procedura se hodnotí podle její schopnosti látky stanovovat v co nejnižší koncentraci (detekční limit) a podle její schopnosti studované signály rozlišit, popřípadě aplikovat proceduru, která by separaci překrývajících se signálů realizovala. První experimenty, zatím bez optimalizace (pH, složení základního elektrolytu a iontová síla, koncentrace purinu, akumulace při určitém potenciálu, teplota, rychlost polarizace) byly provedeny pro směsi dvojic aminopurinů a nakonec pro směs všech tří aminopurinů.

Jak je patrné z grafu 7, kde jsou zobrazeny voltametrické křivky všech tří purinů, jsou píky svou polohou a velikostí rozdílné. Dalo se předpokládat, že s dvojicí 2-AMP s Ade nebo 2,6-DAMP nebude tak velký problém, jako s dvojicí Ade a 2,6-DAMP, kde rozdíl v potenciálech píků je menší než 40 mV. Z obrázku je vidět rozdíl jak ve velikosti píků, tak v jejich polohách.



Graf 7 Jednotlivé voltamogramy aminopurinů ($10 \mu\text{M}$) při stejné rychlosti polarizace 400 mV/s a blízkém pH

modrá: 2,6-DAMP pH 5,54 400 mV/s

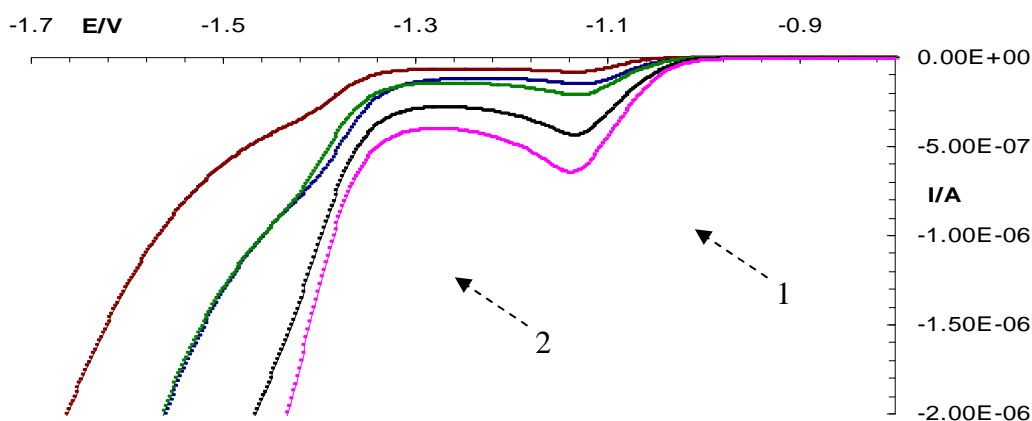
červená: 2-AMP pH 5,03 400 mV/s

zelená: ADE pH 5,03 400 mV/s

Tabulka 7 Graf složený ze tří různých měření – podobná pH, stejné rychlosti polarizace

Látka	pH	rychlost polarizace $v \text{ [mV/s]}$	výška píku $I_p \text{ [A]}$	poloha píku $E_p \text{ [V]}$
2,6-DAMP	5,54	400	$1,792 \cdot 10^{-7}$	-1,402
2-AMP	5,03	400	$7,607 \cdot 10^{-7}$	-1,088
ADE	5,03	400	$1,597 \cdot 10^{-6}$	-1,377

První pokusy o optimalizaci metody byly provedeny ve směsi všech tří derivátů v závislosti na rychlosti polarizace a na pH. Ukazuje se, že kombinací obou parametrů budou nalezeny nejvhodnější experimentální podmínky pro získání separovaných a dobře vykreslených signálů. K tomu nám pomůže i eliminační voltametrie (EVLS), která je schopna nejen zvýšit výšku píku, ale i separovat překrývající se signály.



Graf 8 Směs aminopurinů – zobrazení redukčního signálu při stejném pH a jiných rychlostech polarizace

modrá: směs pH 5,01 25 mV/s

hnědá: směs pH 5,01 50 mV/s

zelená: směs pH 5,01 100 mV/s

černá: směs pH 5,01 200 mV/s

růžová: směs pH 5,01 400 mV/s

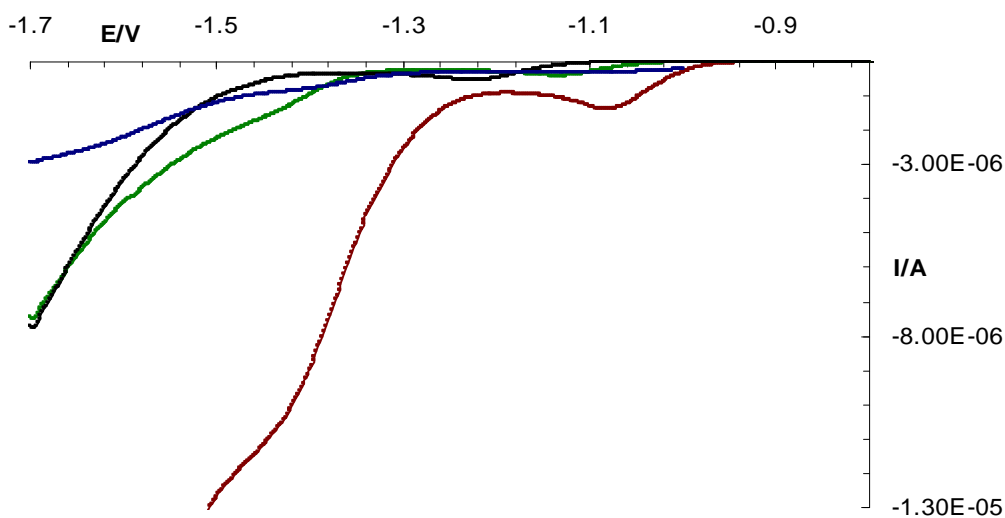
1 odpovídá 2-AMP

2 odpovídá směsi Ade a 2,6-DAMP

Tabulka 8 Směs aminopurinů – zobrazení redukčního signálu při stejném pH a jiných rychlostech polarizace

Látka	pH	rychlost polarizace v [mV/s]	výška píku I_p [A]		poloha píku E_p [V]	
			1	2	1	2
směs	5,01	25	$9,522 \cdot 10^{-8}$	$2,108 \cdot 10^{-8}$	-1,124	-1,392
směs	5,01	50	$3,416 \cdot 10^{-8}$	$8,208 \cdot 10^{-9}$	-1,140	-1,414
směs	5,01	100	$1,270 \cdot 10^{-7}$	$4,180 \cdot 10^{-8}$	-1,132	-1,420
směs	5,01	200	$3,054 \cdot 10^{-7}$	$1,540 \cdot 10^{-9}$	-1,142	-1,141
směs	5,01	400	$4,502 \cdot 10^{-7}$	-	-1,144	-

Měříme-li každý aminopurin zvlášť ukazuje se, že nejvhodnější pH prostředí je pH kolem 5. Ve směsi dochází ke změně, kdy v pH 5 nepozorujeme výrazné píky. Vhodnějším se stává pH 4,46. V tomto prostředí směs aminopurinů poskytuje nejvyšší redukční signály a zdá se, že 2-AMP méně ovlivňuje signály dalších dvou aminoderivátů.



Graf 9 Směs aminopurinů – zobrazení redukčního signálu v různém pH

modrá: směs pH 4,02 200 mV/s

hnědá: směs pH 4,46 200 mV/s

zelená: směs pH 5,01 200 mV/s

černá: směs pH 6,03 200 mV/s

Tabulka 9 Směs aminopurinů – zobrazení redukčního signálu v různém pH

látka	pH	rychlost polarizace v [mV/s]	výška píku I_p [A]		poloha píku E_p [V]	
			1	2	1	2
směs	4,02	200	$4,557 \cdot 10^{-8}$	$5,937 \cdot 10^{-8}$	-1,051	-1,140
směs	4,46	200	$8,938 \cdot 10^{-7}$	$1,137 \cdot 10^{-6}$	-1,087	-1,424
směs	5,01	200	$3,054 \cdot 10^{-7}$	$1,540 \cdot 10^{-9}$	-1,144	-1,444
směs	6,03	200	$3,532 \cdot 10^{-7}$	-	-1,226	-

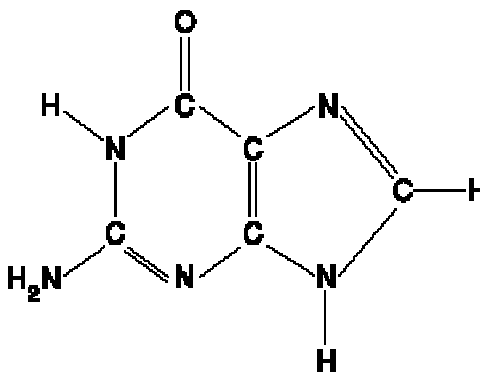
Ve směsi poskytuje první signál (2-AMP) poměrně malý rozptyl ve výškách píků v porovnání se signálem zbylých dvou aminopurinů. Porovnáme-li ale rozptyl 2-AMP ve směsi a samostatně, zjistíme, že směs výrazně ovlivňuje přesnost. Signál dvou aminopurinů je velmi rozdílný od velikosti redukčního signálu. Důvodem může být nejen vliv předcházející redukce 2-AMP, ale i katalytické vylučování vodíku. Purinové báze jsou velmi

dobrým katalyzátorem, zejména když se jedná o zvýšení počtu atomů dusíku prostřednictvím aminoskupiny. Potom se dá předpokládat, že největší katalytický efekt bude mít 2,6-DAMP a zatím se tato předpověď vyplňuje

3.2.6. Guanin

Guanin nalezneme v různých exkrementech a tkáních živočichů. Je zřejmé, že puriny jsou životně důležité součásti buněk živých organismů. Jsou důležité nejen při syntéze proteinů a při zachování či přenosu genetické informace, ale také jako součásti koenzymů zprostředkujících oxidačně – redukční procesy [29].

Elektrochemická redukce guaninu probíhá v protonizovaném stavu ve velmi negativních potenciálech. Z toho plyne, že jeho redukční signál je překryt proudy spojenými s vylučováním základního elektrolytu. Redukční produkt guaninu lze oxidovat zpět při potenciálech okolo -3,0 V, kde vzniká anodický pík. Tento oxidační signál je označován jako G pík a je měřitelný CV při vyšších rychlostech polarizace. Podmínkou pro získání G píku je redukce NA na elektrodě v potenciálovém rozmezí -1,7 až -1,9 V, kdy vzniká 7,8-dihydroguanin. Proces oxidace redukčního produktu G zahrnuje deprotonizaci redukované báze, a proto je pro vznik píku G důležité, aby prostředí mělo dobré pufrací vlastnosti [1].



Obrázek 20 Guanin

3.3. Pyrimidinové báze

Základem je šestičlenný heterocyklus se dvěma dusíkovými heteroatomy. Pyrimidinové báze obsažené v nukleových kyselinách mají vždy v poloze 2 kyslík a v poloze 4 kyslík nebo aminovou skupinu.

Pentosa se váže glykosidovou vazbou na dusíkový atom v poloze 1.

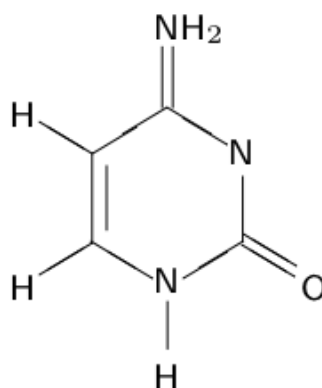
Molekuly pyrimidinových a purinových bází mají planární strukturu a jsou relativně rozpustné ve vodě. Vykazují silnou absorpci UV záření při 260 nm, toho se využívá při stanovení nukleotidů a nukleových kyselin [28].

Mezi pyrimidinové báze vyskytující se v DNA patří thymin a cytosin.

3.3.1. Cytosin

Je to heterocyklická sloučenina. V NA tvoří komplementární pár s guaninem, se kterým se váže třemi vodíkovými můstky. pKa cytosinu je při teplotě 25°C 4,63 [1].

Cytosin poskytuje jednoduchou na pH závislou redukční vlnu. Coulometricky bylo zjištěno, že během redukčního procesu cytosinu, pokud proběhne deaminace, dochází k přenosu 3 elektronů. Redukční mechanismus popsal v roce 1972 Elving [29].

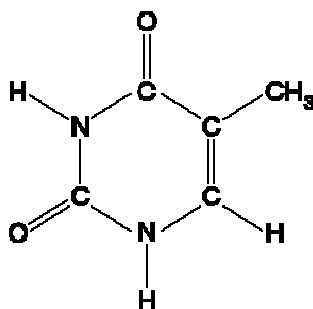


Obrázek 21 Cytosin

3.3.2. Thymin

Je to heterocyklická sloučenina příbuzná pyrimidinu. Vyskytuje se pouze v DNA, kde se páruje s adeninem dvěma vodíkovými můstky. Adsorbuje ultrafialové světlo jako všechny nukleové báze. Teplota tání dosahuje až 317°C.

Thymin v polarografickém a voltametrickém stanovení neposkytuje pík.



Obrázek 22 Thymin

ZÁVĚR

Bakalářská práce nám umožňuje vhléd do zajímavé studie elektrochemického chování především derivátů purinu (2-AMP; Ade; 2,6-DAMP) a guaninu na rtuťové elektrodě a seznamuje nás s problematikou elektroanalytických metod se zaměřením na eliminační voltametrii a aktualizuje využití EV při studiu krátkých řetězců DNA.

Bakalářská práce je zaměřena na princip a využití elektroanalytických metod a jejich aktualizaci při analýze NA a jejich poškození se zaměřením na oligonukleotidy obsahující purinovou bázi adenin. Ostatní báze (cytosin a thymín) neposkytují za těchto podmínek elektrochemický signál.

Bakalářská práce vycházela z disertační práce [1], která dokázala jednoznačnou polohu redukčního signálu 2-AMP, odlišnou od píků 2,6-DAMP a Ade. Adenin a 2,6-DAMP mají při stejné koncentraci rozdílnou výšku píků (Ade vyšší než 2,6-DAMP), ale jejich poloha je podobná a oba vstupují do katalytického procesu vývinu vodíku.

Při měřeních každého aminopurinu se jako ideální pH prostředí ukázalo pH blízké 5. Ve směsi aminoderivátů nastává změna a ideálnější se stává pH blízké 4,5. Důvodem tohoto zvýšení kyselosti může být adenin (signál při pH = 3,5).

Na velikosti píků má vliv i změna rychlosti polarizace. Vyšší rychlost následně zvyšuje výšky píků při odděleném měření aminoderivátů. Je nezbytné využívat při měření směsi nižší rychlosti polarizace, aby nedocházelo k překryvu signálu Ade a 2,6-DAMP.

Pro optimalizaci metody nutné testovat redukční vlastnosti aminoderivátů purinu závislosti na:

- na struktuře purinového derivátu (počet substituentů na pyrimidinovém kruhu a jeho poloha)
- prostředí (pH pufru, složky pufru, jejich koncentrace, iontová síla), koncentraci aminopurinu
- experimentálních nastavitelných parametrech (rychlost polarizace, velikost potenciálového okna, voltametrická metoda, teplota)
- výběru polarizačních rychlostí pro eliminační proceduru

Na tuto problematiku navazuje výzkum a vývoj senzoru aminopurinů s možností diagnostikovat onemocnění způsobené metabolickou poruchou. Výhodou je skutečnost, že elektrochemická detekce je rychlá, levná a časově nenáročná.

POUŽITÁ LITERATURA

- [1] MIKELOVÁ, R. *Elektrochemické studium nukleových kyselin a jejich složek pomocí eliminační voltametrie*, Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta, (Disertační práce)
- [2] BAREK, J.; OPEKAR, F.; ŠTULÍK K. *Elektroanalytická chemie*, Karolinum, Praha 2005. ISBN 80-246-1146-5
- [3] BUREŠ, J. *Nobelova cena* [online] [cit. 6. 4. 2012]. Dostupné na:
<<http://www.converter.cz/nobel/heyrovsky.htm>>
- [4] MINDL, J. *Základy elektroorganické chemie*, Akademie věd České Republiky, 2000. ISBN: 80-200-0769-5
- [5] KRŮŽENECKÁ, S. *Základy analytické chemie*, Univerzita Jana Evangelisty Purkyně, Fakulta životního prostředí, 2007. 53-56 s.
- [6] ZÝKA J. a kol., *Analytická příručka, díl 1.*, Nakladatelství technické literatury, Praha, 1979. ISBN 62.00
- [7] Stránky IT skupiny Přírodovědecké fakulty JU, Elektrochemické analytické metody, [online] [cit. 20.2.2009]
<http://tomcat.prf.jcu.cz/home/sima/analyticka_chemie/elektroa.htm>
- [8] BARD, A. J.; FAULKNER, L. R. *Electrochemical Methods, Fundamentals and Applications*, John Wiley & Sonc., New York, 2001. ISBN 0-471-043729
- [9] DRAČKA, O. *Theory of current elimination in linear scan voltammetry*, J. Electroanal. Chem. 402 (1996) 19-28 s.
- [10] TRNKOVÁ, L. *Identification of current nature by elimination voltammetry with linear scan*, J. of Electroanal. Chem. 582 (2005) 258-266 s.
- [11] TRNKOVÁ L. *Elektrochemické eliminační metody*, Chem. Listy 95 (2001) 518-527.
- [12] TRNKOVÁ L., Chemické Listy 95 (2001) 522-524 s
- [13] ŽŮRKOVÁ, L. *Eliminační voltametrie aminoderivátů purinu*, Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta, (diplomová práce 2009)
- [14] BRETT ,C. M. A.; A. M. Oliviera-Brett *Electrochemistry Principles, Methods, and Applications*, Oxford University Press, Oxford, New York, Tokyo 1994.

- [15] KISSINGER, P. T.; HEINEMAN, W. R. *Laboratory techniques in electroanalytical chemistry*, Marcel Dekker, New York, 1996.
- [16] MARKUŠOVÁ, K. *Elektrochemické metody*, Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach, Košice, 2000; Vol. 1, 150S
- [17] VOET, D.; VOET, J. G. *Biochemistry*, John Wiley & Sons, New York, 1995
- [18] VOLMUTOVÁ, I. *Studium chemie* [online] [cit. 27.2.2012]. Dostupné na: <http://www.studiumchemie.cz/materialy/Ivana_Volmutova/nukleove_kyseliny/vyukove_texty/DNA.pdf>
- [19] PALEČEK, E. *Oscillographic polarography of highly polymerized of Hoogsteenpaired parallel DNA*, Chemistry & Biology 3 (1996) 57-65 s
- [20] PALEČEK, E. *Oszillographische polarographie der nucleinsäuren und ihrer bestandteile*, Naturwissenschaften 45 (1958) 186-187 s
- [21] OLIVEIRA-BRETT, A. M.; PIEDADE, J. A. P.; SILVA, L. A.; DISULESCU, V. C. *Voltammetric determination of all DNA nucleotides*, Anal. Biochem. 332 (2004) 321-329 s
- [22] TRNKOVÁ, L.; JELEN, F.; POSTBIEGLOVÁ, I. *Application of elimination voltammetry to the resolution of adenine and cytosine signals in oligonucleotides. I. Homooligodeoxynucleotides dA₉ and dC₉*, Electroanalysis 15 (2003) 1529-1535 s
- [23] TRNKOVÁ, L.; JELEN, F.; POSTBIEGLOVÁ, I. *Application of elimination voltammetry to the resolution of adenine and cytosine signals in oligonucleotides. II. Heterooligodeoxynucleotides with different sequences of adenine and cytosine nucleosides*, Electroanalysis 18 (2006) 662-669 s.
- [24] TRNKOVÁ, L.; JELEN, F.; PETRLOVÁ, J.; ADAM, V.; KIZEK, R. *Elimination Voltammetry with Linear Scan as a New Detection Method for DNA sensors*, Senzore 5 (2005) 448-464 s
- [25] MIKELOVÁ, R.; TRNKOVÁ, L.; JELEN, F.; ADAM, V.; KIZEK, R. *Resolution overlapped reduction signals in short hetero-oligonucleotides by elimination voltammetry*, Electroanalysis 19 (2007) 348-355 s
- [26] VICENÍK, P. Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta (Diplomová práce 1994)
- [27] ŠEBESTA, I. *Poruchy metabolismu purinů* [online] [cit. 3.6.2012]. Dostupné na: <<http://www1.lf1.cuni.cz/~kocna/biochem/text8.htm>>

- [28] NAVRÁTIL, R. *Voltametrické studium komplexů xanthinů s jednomocnou měďí*, Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta (diplomová práce, 2011)
- [29] DRYHURST, G. *Electrochemistry of biological molecules*, Academic Press, Inc., New York, 1977
- [30] H. R. Guest CR, Sowers LC, Miller DP. *Dynamics of mismatched base Pairs in DNA*, *Biochemistry* 30 (1991) 3271-3279 s
- [31] STIVERS, J.T. *2-Aminopurine fluorescence studies of base stacking interactions at abasic sites in DNA: metal-ion and base sequence effects*, *Nucleic Acids Research* 26 (1998) 3837–3844 s
- [32] BLOOM O. M.; ERITJA, R.; Reha-Krantz LJ, Goodman MF, Beechem JM. *Pre-steady-state kinetic analysis of sequence-dependent nucleotide excision by the 3'-exonuclease activity of bacteriophage T4 DNA polymerase*, *Biochemistry* 33 (1994) 7576-7586 s
- [33] VAN ROMPAY, J.M.; KARLSSON, A. *Substrate specificity and phosphorylation of antiviral and anticancer nucleoside analogues by human deoxyribonucleoside kinases and ribonucleoside kinases*, *Pharmacol Ther.* 100 (2003) 119-139 s
- [34] BALZARINI, D.C.E. *The antiviral activity of 9-beta-D-arabinofuranosyladenine is enhanced by the 2',3'-dideoxyriboside, the 2',3'-didehydro-2',3'-dideoxyriboside and the 3'-azido-2',3'-dideoxyriboside of 2,6-diaminopurine*, *Biochem Biophys Res Commun.* 159 (1989) 61-67 s
- [35] PAUWELS, B.M.; BALZARINI, J.; HERDEWIJN, P.; DESMYTER, J.; ROBINS, M.J.; ZOU, R.M.; MADEJ, D.; De CLERCQ, E. *Investigations on the anti-HIV activity of 2',3'-dideoxyadenosine analogues with modifications in either the pentose or purine moiety. Potent and selective anti-HIV activity of 2,6-diaminopurine 2',3'-dideoxyriboside*, *Biochem Pharmacol.* 37 (1988) 1317-1725 s
- [36] CHAEJOON CHEONG, J.a.A.C.; TINOCO, I. *Thermodynamic studies of base pairing involving 2,6-diaminopurine*, *Nucleic Acids Res.* 16 (1988) 5115–5122s
- [37] JINSUK WOO, R.B.M.; GAMPER, H. B. *G/C-modified oligodeoxynucleotides with selective complementarity: synthesis and hybridization properties*, *Nucleic Acids Research* 24 (1996) 2470–2475 s
- [38] PALEČEK, E. *Oscillographic polarography of highly polymerized deoxyribonucleic acid*, *Nature* 188 (1960) 656-657 s

ZDROJE OBRÁZKŮ

- Obr. 1: Stránky IT skupiny Přírodovědecké fakulty JU, *Elektrochemické analytické metody* [online] [cit. 29.3. 2012]. Dostupné na:
<http://tomcat.prf.jcu.cz/home/sima/analyticka_chemie/elektroa.htm>
- Obr. 2: Stránky IT skupiny Přírodovědecké fakulty JU, *Elektrochemické analytické metody* [online] [cit. 29.3. 2012]. Dostupné na:
<http://tomcat.prf.jcu.cz/home/sima/analyticka_chemie/elektroa.htm>
- Obr. 3: Stránky IT skupiny Přírodovědecké fakulty JU, *Elektrochemické analytické metody* [online] [cit. 29.3. 2012]. Dostupné na:
<http://tomcat.prf.jcu.cz/home/sima/analyticka_chemie/elektroa.htm>
- Obr. 4: BUREŠ, J. *Nobelova cena* [online] [cit. 6. 4. 2012]. Dostupné na:
<<http://www.converter.cz/nobel/heyrovsky.htm>>
- Obr. 5: Stránky IT skupiny Přírodovědecké fakulty JU, *Elektrochemické analytické metody* [online] [cit. 29.3. 2012]. Dostupné na:
<http://tomcat.prf.jcu.cz/home/sima/analyticka_chemie/elektroa.htm>
- Obr. 6: BAREK, J.; OPEKAR, F.; ŠTULÍK K. *Elektroanalytická chemie*, Karolinum, Praha 2005. ISBN 80-246-1146-5
- Obr. 7: SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. *Analytical Chemistry, An Introduction*, USA, 2000
SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J. *Fundamentals of Analytical Chemistry*, 1996
- Obr. 8: MINDL, J. *Základy elektroorganické chemie*, Akademie věd České Republiky, 2000
- Obr. 9: Metrohm, [online] [16.4.2012]. Dostupné na:
<<http://products.metrohm.com/prod-26630020.aspx>>
- Obr. 10: Centre for Valorisation and Transfer of Competence, [online] [16.4.2012]. Dostupné na:
<http://fizica.unitbv.ro/cvtc/Continut/Endowment_en.html>
- Obr. 11: Výukové materiály Mendelovy univerzity v Brně, [online] [16.4.2012]. Dostupné na:
<http://user.mendelu.cz/urban/vsg1/molekul/mol_struktura2.html>

- Obr. 12: WIKIPEDIA, [online] [13.5.2012]. Dostupné na:
<http://en.wikipedia.org/wiki/File:DNA_chemical_structure.svg>
- Obr. 13: WIKIPEDIA, [online] [13.5.2012]. Dostupné na:
<http://cs.wikipedia.org/wiki/Soubor:Chromatin_Structures_cs.png>
- Obr. 14: WITHFRIENDSHIP, [online] [13.5.2012]. Dostupné na:
<http://withfriendship.com/user/svaruna/watson_and_crick.php>
- Obr. 15: ALDEBARAN BULLETIN, [online] [13.5.2012]. Dostupné na:
<http://www.aldebaran.cz/bulletin/2009_38_nan.php>
- Obr. 16: BIONET ŠKOLA, [online] [13.5.2012]. Dostupné na:
<<http://www.bionet-skola.com/w/Adenin>>
- Obr. 17: MIKELOVÁ, R. *Elektrochemické studium nukleových kyselin a jejich složek pomocí eliminační voltametrie*, Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta, (Diplomová práce)
- Obr. 18: WIKIPEDIA, [online] [13.5.2012]. Dostupné na:
<<http://en.wikipedia.org/wiki/File:2-Aminopurine.png>>
- Obr. 19: WIKIPEDIA, [online] [13.5.2012]. Dostupné na:
<<http://en.wikipedia.org/wiki/File:2,6-diaminopurine.svg>>
- Obr. 20: BIOLOGICKÝ BLOG, [online] [13.4.2012]. Dostupné na:
<<http://biologos.blog.cz/1008/molekularni-a-bunecna-genetika-uvod>>
- Obr. 21: BIOLOGICKÝ BLOG, [online] [16.4.2012]. Dostupné na:
<<http://biologos.blog.cz/galerie/genetika/obrazek/68667261>>
- Obr. 22: BIOLOGICKÝ BLOG, [online] [16.4.2012]. Dostupné na:
<<http://biologos.blog.cz/galerie/genetika/obrazek/68667261>>