

STUDIUM INTERAKCÍ HYDROXYLOVÝCH RADIKÁLŮ A PURINOVÝCH BÁZÍ DNA

RENATA FADRNÁ

Ústav fyzikální chemie J. Heyrovského, Akademie věd České republiky, Dolejškova 3, 182 23 Praha 8
e-mail: fadrna@jh-inst.cas.cz

Došlo 5.9.02, přepracováno 21.1.03, přijato 20.3.03.

Klíčová slova: stříbrné amalgámové elektrody, HMDE, voltametrie, báze, DNA

Úvod

Studium deoxyribonukleové kyseliny (DNA), jejího složení, struktury a případně poškození je v současnosti velmi aktuální téma a voltametrické metody nezůstávají v této oblasti stranou. V devadesátých letech minulého století se mohutně vyvíjela především optická a elektrochemická čidla monitorující různé interakce DNA (zahrnující hybridizaci, interakce DNA s léky a poškození DNA). Přestože vývoj elektrochemických metod a čidel byl například za optickými metodami poněkud zpožděn, je v posledních letech v této problematice i v oblasti elektrochemických senzorů dosahováno poměrně výrazných úspěchů. Mezi hlavní výhody elektrochemických přístrojů patří především jejich nízká cena, vysoká citlivost a jednoduché uspořádání. Především polarografie a voltametrie se ukazují jako velmi citlivé nástroje k monitorování integrity a reakcí DNA. Základní práce v tomto směru pocházejí již z počátku 60. let (cit.¹). Diferenční pulzní polarografie (s rtuťovou kapkovou elektrodou) byla užita k detekci přerušení řetězce DNA (cit.²). Další pokrok pak přinesly rozpouštěcí (stripping) metody. V poslední době byly testovány i adsorpční přenosové techniky, založené na imobilizaci DNA na povrchu elektrody, následném promytí a přenosu elektrody se zachycenou DNA do čistého základního elektrolytu, kde není analýza rušena organickými látkami přítomnými v měřeném roztoku a zároveň je možno analyzovat extrémně malé objemy analytů (až jednotky mikrolitrů).

Adsorpční rozpouštěcí voltametrie (AdSV) využívá adsorpčně/desorpčních procesů uplatňujících se na povrchu elektrody³. Adsorpce či desorpce povrchové aktivních látek (PAL) na polarizované elektrodě při určitém potenciálu je doprovázena změnou struktury elektrodové dvojvrstvy projevující se měřitelným proudovým signálem, a to i v případě, že PAL není elektroaktivní, tj. že nedochází k její redukci či oxidaci. Tento signál je funkcí povrchové koncentrace Γ PAL (přesněji relativního povrchového přebytku), resp. její objemové koncentrace c v roztoku.

Z elektrodové kinetiky je známo⁴, že PAL mohou znatelně ovlivnit též redukční či oxidační proces na elektrodě. Působí zpravidla změnu mechanismu elektrodové reakce, zastoupení jednotlivých reakčních meziproductů atd. To může být využito i při studiu elektrodových procesů a jejich praktickém využití.

Příkladem z minulosti bylo využití přísadků PAL k potlačování polarografických maxim prvního i druhého druhu nebo ke snížení limitního difuzně řízeného proudu. Jiné možnosti skýtá ovlivňování voltametrické redukce látky (např. peroxidu vodíku či iontů zinku) na povrchu elektrody. Tato metoda byla dříve užívána především při studiu vlivu PAL na druhý stupeň redukce vzdušného kyslíku, tj. redukci peroxidu vodíku. Ukázalo se, že tento princip lze využít i k odhadu či stanovení obsahu PAL (cit.⁵⁻⁹) v roztoku.

DNA vykazuje vlastnosti PAL stejně jako její báze adenin, guanin, thymin a cytosin. K jejich voltametrickému stanovení sloužily např. visící rtuťová kapková elektroda (HMDE)¹⁰, stříbrná amalgámová¹¹ a měděná amalgámová elektroda¹². Tyto metody však nejsou jednoduché a selektivita není zcela optimální. To vede k hledání jiných možností kvalitativního a kvantitativního sledování nukleových bází. Jednou z cest může být sledování jejich interakcí s hydroxylovými radikály při redukci peroxidu vodíku jak na rtuťových kapkových tak na amalgámových elektrodách.

Studiu vzájemných interakcí DNA a hydroxylových radikálů je v poslední době věnována poměrně značná pozornost¹³. Zaměřena byla dosud na radikály, generované buď v roztoku (např. hydroxylové radikály vzniklé Fentonovou reakcí¹⁴) nebo v těsné blízkosti molekuly DNA, jestliže existuje specifická interakce (např. Cu/1,10-fenanthrolinový systém¹⁵) nebo za užití komplexu železo/EDTA (cit.¹⁶). Bylo zjištěno, že tyto hydroxylové radikály štěpí řetězec DNA, což je možno voltametricky detegovat. Předpokládá se, že radikály reagují s bázemi DNA a deoxyribosovými zbytky¹³. Pojednání o jejich vlivu na samotné báze se však dosud v odborné literatuře nevyskytuje.

Experimentální část

Přístroje

Pro měření byl využit počítačem řízený Eco-Tribo Polarograf PC ETP s příslušenstvím (Polaro-Sensors, Praha)¹⁷ se softwarem Polar Pro v. 4.0. pro Windows 95/98/Me. Jako referentní byla užita 1 M argentochloridová elektroda oddělená od roztoku solným můstkem, naplněným 1 M-KNO₃, k níž jsou vztaženy všechny v této práci udávané hodnoty potenciálů, a jako pomocná sloužila elektroda platinová (obě Elektrochemické detektory, Turnov). Měrnou elektrodou byla buď rtuťová kapková elektroda (HMDE) nebo stříbrná menisková amalgámová elektroda (m-AgSAE), zhotovená amalgamováním stříbrného prášku a pokrytím vzniklého povrchu AgSAE meniskem rtuťí vytvořeným krátkým ponořením ústí AgSAE do rtuť^{18,19} (obě elektrody byly produkty firmy Polaro-Sensors, Praha). Pomocí speciální procedury zahrnuté do programu Polar Pro byla z jednotlivých kroků sestavena metoda, zahrnující sled všech operačních stupňů (akumulaci, měření, automatické opakování měření, obnovení kapky atd.), takže celé měření probíhalo automatizovaně.

Vlastní měření probíhalo v režimu katodické diferenční pulzní voltametrie (DPV) při výšce pulzu 50 mV a jeho šířce 100 ms stejně jako doba mezi dvěma následujícími pulzy, se vzorkováním během posledních 20 ms před začátkem, resp. koncem pulzu. Potenciál akumulace činil ve všech případech -600 mV vs. Ag/AgCl, doba akumulace 60 s a po ní následo-

vala klidová doba 15 s. Počáteční potenciál byl shodný s potenciálem akumulace. V případě m-AgSAE bylo před zahájením měření provedeno 50 regeneračních cyklů mezi +300 a -1300 mV. Rychlost polarizace byla u obou elektrod 20 mV.s⁻¹. Měření probíhala při pokojové teplotě 20±2 °C.

Chemikálie

Pro přípravu základních roztoků byla použita redestilovaná voda, všechny chemikálie byly čistoty p.a. (Lachema, Brno). Jako srovnávací povrchové aktivní standard byl použit zásobní vodný roztok neionogenního surfaktantu Triton-X-100 o koncentraci 17,6 mg.l⁻¹. Báze adenin a guanin byly čistoty p. a. (Sigma-Aldrich). Roztoky adeninu a guaninu byly připraveny ředěním zásobních roztoků o koncentraci 1.10⁻³ mol.l⁻¹ v redestilované vodě. Jako základní elektrolyt sloužil 0,1 M-KCl, resp. 0,1 M-Na₂SO₄.

Používané regresní vztahy

Pro regresi potenciálových či proudových závislostí na koncentraci PAL bylo možno použít v užších intervalech koncentrací přímkové závislosti typu

$$I_p = a_1 + b_1c; \quad E_p = a_2 + b_2c \quad (1)$$

kde I_p je výška píku, resp. E_p jeho potenciál, c je koncentrace PAL a a_1 , b_1 , a_2 , b_2 jsou parametry příslušných lineárních závislostí. V některých případech však bylo v souladu s literaturou^{3,20,21} vhodnější užívat relativní hodnoty pro vyjádření změn výšky píků nebo jejich polohy:

$$X = \frac{E_p - E_{p,0}}{E_{p,1} - E_{p,0}} \quad (2)$$

$$Y = \frac{I_p - I_{p,0}}{I_{p,1} - I_{p,0}} \quad (3)$$

kde I_p a E_p značí proud, resp. potenciál píku; index 0 – proud či potenciál bez přítomnosti PAL, index 1 – proud či potenciál při úplném pokrytí elektrody PAL. Použití výrazů (2) a (3) je například vhodné v případech^{3,21}, kdy je závislost veličin X , Y na koncentraci hyperbolická, sigmoidní nebo tvarově podobná. To přirozeně nevylučuje použití i možnosti lineární aproximace vhodných úseků křivek vztahy (1), obecně při rozdílných hodnotách koeficientů a_1 , b_1 , a_2 , b_2 . Aproximaci kalibračních závislostí polynomy druhého a vyšších stupňů lze aplikovat tam, kde jde o prosté proložení dat polynomem bez fyzikálního významu.

Pro nalezení takových závislostí je lépe aplikovat některou z izoterem (Langmuirova, Freundlichova, resp. izoterma dle Novotného^{3,8}). Všechny izotermy je možno užívat buď v absolutních (I_p , E_p , c) nebo v relativních souřadnicích X , Y . Izoterma dle Novotného má pak např. tvar

$$\frac{Y}{1-Y} \exp\left(\sum_{i=1}^4 A_i Y^i\right) = bc \quad (4)$$

resp.

$$\frac{X}{1-X} \exp\left(\sum_{i=1}^4 A_i X^i\right) = b'c \quad (5)$$

Vyčíslování regresních parametrů lze realizovat buď v programu MS Excel 9 nebo v programu ETP pro DOS v. 3.1 (Polaro-Sensors, Praha).

Výsledky a diskuse

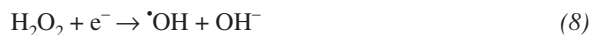
V literatuře byl popsán vliv běžných kationaktivních, anionaktivních a především neionogenních PAL (cit.^{22,23}) na redukcí peroxidu vodíku, případně zinečnatých iontů. Při velmi nízkých koncentracích PAL docházelo často nejprve k nepatrnému zmenšení redukčního píku H₂O₂, avšak s rostoucí koncentrací PAL výška píku monotónně rostla a špěla postupně k určité limitní velikosti. Obdobně tomu bylo s potenciálovým posuvem. Bylo tedy zřejmé, že v oblasti nejnižších koncentrací, kdy probíhá na povrchu elektrody řada vzájemně si konkurujících dějů³ (substituční adsorpce, změny struktury elektrochemické dvojvrstvy, atd.), má popis pomocí závislostí typu (4) a (5) aproximativní charakter. Dominantní adsorpce PAL při dalším zvyšování koncentrace však užití rovnic (4) a (5) opravňuje. Případný posuv píku nejprve k pozitivním a posléze k negativním hodnotám souvisí patrně s vlivy přítomných iontů základního elektrolytu a dalších složek roztoku, s jejichž přítomností, koncentrací a větší či menší aktivitou na povrchu elektrody je třeba obecně počítat. Vhodnou volbou neaktivního základního elektrolytu je možno strukturu elektrochemické dvojvrstvy stabilizovat a zmíněné vlivy minimalizovat nebo eliminovat. Ukázalo se, že směr potenciálové změny a její velikost stejně jako proudové změny jsou závislé na typu (anionaktivní, kationaktivní, neionogenní) a množství přítomných PAL (cit.²²).

Reakční elektrodové schéma elektroredukce O₂ v přítomnosti PAL

Sumárně lze proces redukce kyslíku popsat rovnicemi (6) a (7)²⁴:



Druhý stupeň (7) lze pak rozdělit na dvě následné reakce:



Je přítom známo, že redukční stupeň dle rovnice (7) je ireverzibilní a kinetika redukce O₂ je složitější, než jak naznačují rovnice (8) a (9).

V literatuře⁵⁻⁸ popsaný způsob detekce a stanovení obsahu PAL vychází z poznatku, že vlivem jejich interakcí na povrchu rtuťové kapkové elektrody dochází k výraznému posuvu voltametričkému píku, příslušejícího druhému stupni redukce rozpuš-

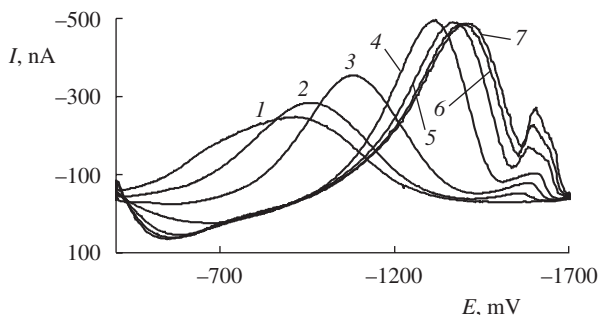
těného molekulárního kyslíku, přesněji redukci peroxidu vodíku, na vodu v potenciálové oblasti $-0,9$ V (a negativnější) vs. Ag/AgCl. Současně s tím dochází i ke změně výšky tohoto píku^{7,8,22}.

Veškeré v literatuře popsané efekty však byly realizovány na rtuťových elektrodách. Reakce probíhá naprosto analogicky jak za přítomnosti peroxidu vzniklého redukcí vzdušného kyslíku, tak peroxidu vodíku úmyslně přidaného.

Kvalitativní popis vlivu PAL na voltametrické křivky redukce peroxidu vodíku na HMDE a na m-AgSAE

Jako modelová látka, jejíž vliv na redukci peroxidu vodíku již byl v literatuře⁵ popsán, byl použit Triton X-100. S jeho vzrůstající koncentrací v základním elektrolytu 0,1 M-KCl roste na HMDE výška redukčního píku peroxidu vodíku a zároveň se jeho vrchol posouvá směrem k negativnímu potenciálu, jak je patrné z obr. 1.

Ve stejném základním elektrolytu měly přídavky roztoků adeninu i guaninu při použití HMDE podobný vliv, pod $0,2$ mg.l⁻¹ docházelo však nejprve k malému posuvu píku směrem k pozitivním potenciálům, následovaným pro $c > 0,2$ mg.l⁻¹ posuvem k negativním potenciálům. Nárůst velikosti proudu či posuvy potenciálů vrcholů píků směrem k negativnějším potenciálům nebyly však tak výrazné jako v přítomnosti neionogenního Tritonu X-100, jak je vidět z obr. 2 pro adenin (vliv guaninu je obdobný).



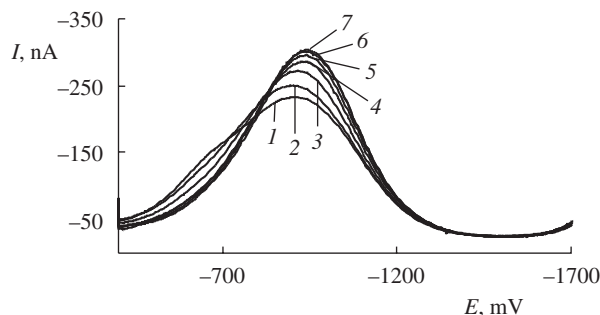
Obr. 1. Vliv Tritonu X-100 na DP voltamogram redukčního píku peroxidu vodíku v 0,1 M-KCl na HMDE; koncentrace Tritonu X-100 v mg.l⁻¹: 1 – 0; 2 – 0,2; 3 – 0,4; 4 – 0,6; 5 – 0,8; 6 – 1,0; 7 – 1,2

Odlišné chování vykazovala v tomto směru menisková stříbrná amalgámová elektroda. Zatímco Triton X-100 ovlivňoval zde výšku i polohu píku (při poněkud nižší citlivosti) stejným způsobem, jako tomu bylo na HMDE (obr. 3), vliv adeninu a guaninu se naprosto odlišoval ode všech dosud zkoumaných PAL. Výška píku se zvyšovala se vzrůstající koncentrací zmíněných bází, stejně jako ostrost píku, avšak posuv vrcholu píků směřoval do pozitivní oblasti potenciálů v celém použitém koncentračním rozsahu od 0 do 1,2 mg.l⁻¹, jak je patrné z obr. 4 pro adenin (vliv guaninu je obdobný). Citlivost tohoto posuvu vůči koncentraci byla přítom podstatně větší než při užití HMDE.

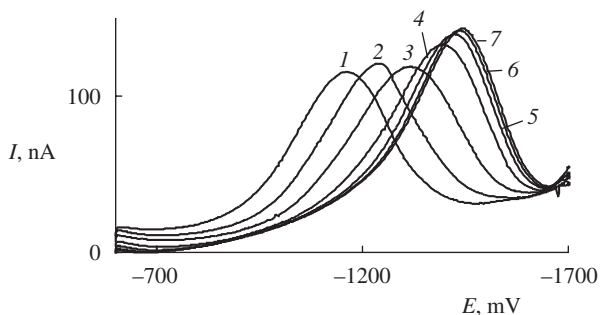
Pokud základní elektrolyt neobsahoval chloridy (0,1 M-Na₂SO₄), posouval se vrchol redukčního píku peroxidu vodíku za přítomnosti bází stejným způsobem jak na HMDE, tak na m-AgSAE. Z toho je možné usuzovat, že příčinou změny směru posuvu píku na m-AgSAE byly právě chloridové ionty, které se specificky adsorbují na povrchu elektrody nebo mohou tvořit nerozpustný AgCl, čímž dochází k modifikaci povrchu elektrody.

Mez detekce²⁸ (vypočtená z kalibrační křivky relativní změny výšky píku peroxidu vodíku v závislosti na koncentraci PAL) jak u Tritonu, tak u bází v 0,1 M-KCl se pohybuje kolem 0,05 mg.l⁻¹.

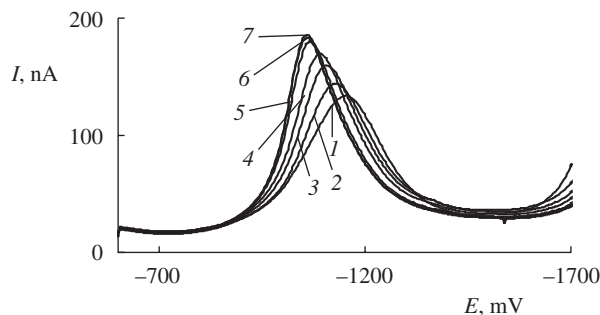
Registrované proudové hodnoty redukce peroxidu vodíku byly ve srovnání s odpovídajícími redukčními proudy adeninu několikanásobně větší, což způsobilo překrytí píku adeninu píkem H₂O₂.



Obr. 2. Vliv adeninu na DP voltamogram redukčního píku peroxidu vodíku v 0,1 M-KCl na HMDE; koncentrace adeninu v mg.l⁻¹: 1 – 0; 2 – 0,2; 3 – 0,4; 4 – 0,6; 5 – 0,8; 6 – 1,0; 7 – 1,2



Obr. 3. Vliv Tritonu X-100 na DP voltamogram redukčního píku peroxidu vodíku v 0,1 M-KCl na m-AgSAE; koncentrace Tritonu X-100 v mg.l⁻¹: 1 – 0; 2 – 0,2; 3 – 0,4; 4 – 0,6; 5 – 0,8; 6 – 1,0; 7 – 1,2

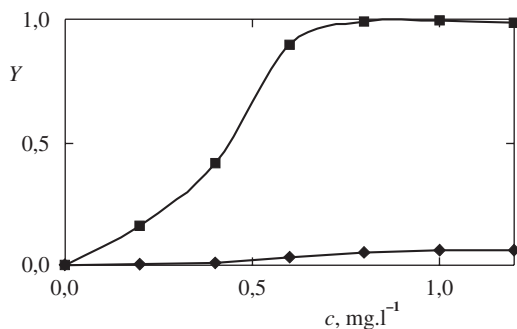


Obr. 4. Vliv adeninu na DP voltamogram redukčního píku peroxidu vodíku v 0,1 M-KCl na m-AgSAE; koncentrace adeninu v mg.l⁻¹: 1 – 0; 2 – 0,2; 3 – 0,4; 4 – 0,6; 5 – 0,8; 6 – 1,0; 7 – 1,2

Kalibrační závislosti relativních posuvů výšek a potenciálů píků

Z výše uvedeného vyplývá, že směr posuvu potenciálu může být jedním z faktorů odlišení bází DNA od jiných PAL. Dalším zkoumaným aspektem bylo možné rozlišení zmíněných bází velikostí a tvarem změřených koncentračních závislostí, obdobně jako v cit.³

Pokud byly mezi sebou porovnávány absolutní hodnoty výšek proudů a potenciálů vrcholů píků, vznikal problém s výškou základního píku peroxidu vodíku, který musel být stejný pro všechny vzorky. Vzhledem k tomu, že množství redukovaného peroxidu vodíku bylo určováno koncentrací rozpuštěného vzdušného kyslíku, byla právě ta určující. Na ni měla pak vliv teplota, atmosférický tlak apod. Jelikož reprodukovatelnost těchto podmínek nebyla zaručena, jevílo se jako vhodnější používat relativní souřadnice vypočtené podle rovnic (2) a (3), takže prvý bod obou kalibračních křivek ležel při stejné proudové či potenciálové hodnotě $I_{p,0}$ resp. $E_{p,0}$. Jelikož $I_{p,1}$ resp. $E_{p,1}$ pro první křivku nebyl v absolutních hodnotách shodný s $I_{p,1}$ resp. $E_{p,1}$ druhé křivky, došlo by po přepočtu do relativních souřadnic v rozmezí 0–1 a následném srovnání v grafické podobě k nepřijatelným deformacím křivek. Proto byly vzaty relativní souřadnice zvolené křivky za vztahnou soustavu a body druhé křivky byly přepočteny do relativních souřadnic křivky první. Pokud byly absolutní hodnoty $I_{p,1}$ resp. $E_{p,1}$ vztahné soustavy menší než $I_{p,1}$ resp. $E_{p,1}$ druhé křivky, mohlo být dosaženo relativních hodnot Y resp. X větších než 1.

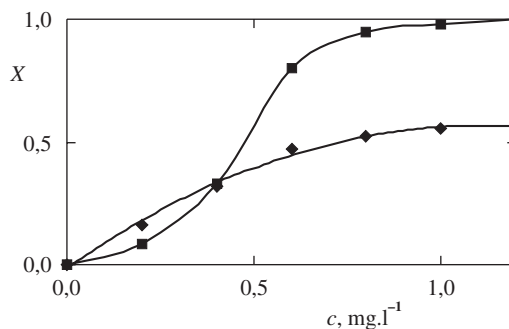


Obr. 5. Vliv Tritonu X-100 na relativní výšku DPV redukčního píku peroxidu vodíku v 0,1 M-KCl na HMDE ■ a na m-AgSAE ◆

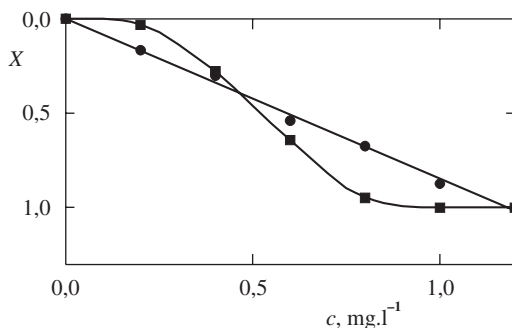
Ačkoli obě elektrody, HMDE i m-AgSAE, měly stejnou aktivní plochu, registrované relativní změny výšek proudů Y redukčního píku za přítomnosti Tritonu X-100 se podstatně liší (relativní změna na rtuťové elektrodě je až 20× větší) (viz obr. 5). Ve srovnání s tím dosahuje relativní potenciálový posuv X na HMDE maximálně dvakrát větší hodnoty než hodnoty X na m-AgSAE (obr. 6). Zatímco izoterma Y vs. c vykazovala na obou elektrodách prakticky identický tvar (lišící se pouze velikostí), tvar izoterem potenciálového posuvu byl výrazně odlišný: průběh izotermy měřené na amalgamové elektrodě byl parabolický, zatímco průběh izotermy na rtuťové elektrodě byl sigmoidní.

Lze konstatovat, že rozdíly v relativních posuvech Y na HMDE v závislosti na koncentraci adeninu a guaninu vykazují parabolický průběh a liší se jen nepatrně. Naproti tomu relativní potenciálové rozdíly X v závislosti na koncentraci těchto látek vykazují vzájemné rozdíly: zatímco izoterma guaninu se v koncentračním rozsahu 0–1,2 mg.l⁻¹ dá velmi dobře aproximovat přímkou (korelační koeficient $r = 0,9982$), izoterma adeninu vykazuje klesající sigmoidní tvar (výška redukčního píku H_2O_2 se se vzrůstající koncentrací adeninu snižuje, a proto hodnoty X nabývají záporných hodnot) (obr. 7).

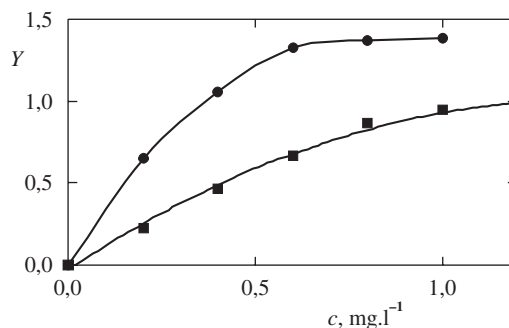
Naopak na amalgamové elektrodě není velký rozdíl mezi relativními potenciálovými posuvy X v závislosti na koncentraci adeninu a guaninu. Jako výraznější na m-AgSAE se však jeví rozdíly mezi izotermami relativních proudových posuvů Y (obr. 8).



Obr. 6. Vliv Tritonu X-100 na relativní polohu DPV redukčního píku peroxidu vodíku v 0,1 M-KCl na HMDE ■ a na m-AgSAE ◆



Obr. 7. Závislost relativního potenciálového posuvu DPV redukčního píku peroxidu vodíku v 0,1 M-KCl na koncentraci guaninu ● a adeninu ■ na HMDE



Obr. 8. Závislost relativního proudového nárůstu DPV redukčního píku peroxidu vodíku v 0,1 M-KCl na koncentraci guaninu ● a adeninu ■ na m-AgSAE

Tabulka I
Regresní parametry izotermy dle rovnic (4) a (5)

Parametr	HMDE				m-AgSAE			
	adenin		guanin		adenin		guanin	
	X	Y	X	Y	X	Y	X	Y
$b, \text{l.mg}^{-1}$	0,16	0,43	0,32	0,72	0,31	0,32	0,39	0,38
A_1	-7,53	-6,97	-1,39	-5,96	-14,26	-10,10	-9,04	-10,65
A_2	7,96	10,85	-	11,97	113,03	76,98	18,85	30,12
A_3	-4,96	-7,60	-	-9,21	-378,21	-272,30	-	-20,72
A_4	-	-	-	-	434,95	332,60	-	-
MEP ^a	0,19	0,06	0,05	0,02	0,06	0,05	0,11	0,14

$$^a \text{MEP} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (Y_{\text{změřeno}} - Y_{\text{vypočteno}})^2 \text{ dle cit.}^{28}$$

V ýklad pozorovaných dějů

V práci²³ byly odvozeny vztahy pro případ ovlivnění redukčního píku peroxidu vodíku purinovými bázemi adeninem a guaninem. Bylo zde předpokládáno, že PAL pokrývající povrch elektrody mají vliv jak na rychlostní konstantu probíhajícího faradaického děje, tak na Gibbsovu energii, tj. na polohu vrcholu faradaického píku. Práce^{7,8,22,23} diskutují několik možností vysvětlení daného efektu (maxima druhého druhu, posuv vrcholů píků v důsledku změny koncentrace základního elektrolytu, zvyšování ireverzibility, homogenizace povrchu elektrody, regenerace redukované formy, atd.). Tyto práce vyvracejí i předpoklad, že by sledovaný pík mohl být považován za pouhý faradaický pík zvýšený o desorpční pík PAL (samotné desorpční píky se vyskytují v jiné oblasti potenciálů a jejich výška není probíhající redukcí dotčena). Jejich autoři nakonec dospívají k závěru, že uvedené jevy vznikají v důsledku slabých interakčních sil (např. díky vodíkovým můstkům, uplatňujícím se jak u zkoumané PAL, tak u peroxidu vodíku). Vazba může mít při tom inter- či intramolekulární charakter. Působením těchto slabých interakčních sil dochází k nahromadění většího množství peroxidu vodíku v okolí elektrody, než jaké by odpovídalo transportu bez přítomnosti PAL. Právě slabé interakční síly také brzdí nebo akcelerují průběh reakce, takže k jejímu nastartování dochází při negativnějším nebo naopak pozitivnějším potenciálu (viz posuv potenciálu píku), zato však s větším množstvím peroxidu (viz růst píku).

Při složitějších elektrochemických mechanismech se zřejmě můžou v přítomnosti PAL urychlovat některé reakční stupně, takže výsledný efekt se projeví jako akcelerace elektrodového děje. V důsledku toho se zvyšuje ΔI_p s koncentrací PAL, případně při jiných potenciálech (posunutých o ΔE_p), než je tomu bez přítomnosti PAL. Celkově bychom mohli hovořit o tom, že děj probíhá s jinou výslednou efektivní rychlostní konstantou, vyšší než bez přítomnosti PAL (tj. mění se rychlostní konstanty dílčích reakcí, což se projeví ve výsledku jako změna efektivní rychlostní konstanty souhrnné reakce, tj. redukce H_2O_2). Lze tedy říci, že některé z dílčích reakcí probíhají za daných podmínek rychleji, ale současně se zpomalují zpětné reakce.

Pokud se vrcholy píku redukce peroxidu posunují k pozitivním hodnotám, ačkoliv výška píku stoupá, lze to vysvětlit např. kompeticí mezi různými slabými interakčními silami a nábojem elektrody.

Pro báze na meniskové stříbrné amalgámové elektrodě za přítomnosti chloridů je charakteristický posun k pozitivnějším potenciálovým hodnotám. Na obou testovaných elektrodách (HMDE i m-AgSAE) probíhá reakce na rtuťovém povrchu, a tudíž by měly být všechny interakce prakticky shodné (resp. probíhat stejným způsobem). Není však zřejmé, jakou roli hraje vliv stříbrných iontů v amalgámové elektrodě. K interakčním silám pravděpodobně přistupuje vliv specificky se sorbujících chloridových iontů ve vnitřní Helmholtzově rovině, které také ovlivňují popisované interakční síly a efekty. Pro objasnění dějů by bylo vhodné porovnat výše popisované výsledky s vlivem bází či PAL na redukci kyslíku na kovových stříbrných nebo kompozitních stříbrných elektrodách^{25–27} za a bez přítomnosti chloridových iontů; v literatuře nebyly příslušné informace nalezeny a budou proto předmětem dalšího výzkumu.

Pro vytvoření regresního modelu byla užita izoterma podle Novotného dle rovnic (4) a (5) a byly získány parametry pro adenin a guanin na HMDE a m-AgSAE, shrnuté v tabulce I.

Ukázalo se, že hodnota parametru b (souvisejícího s adsorptivitou resp. adsorpčním koeficientem daných látek) se pohybovala v řádu desetin l.mg^{-1} (0,16–0,72 l.mg^{-1}), což odpovídá kategorii středně silně až silně adsorptivních látek. Přitom bylo nalezeno, že se parametr b případ od případu lišil jen relativně málo; jeho hodnoty na m-AgSAE byly vzájemně téměř shodné (viz tab. I). Naopak jednotlivé parametry A_i , související zřejmě s uplatněním povrchových a mezičásticových interakcí, se u obou sledovaných látek i elektrod vzájemně výrazně lišily. Záporná polarita parametru A_1 ve všech zmíněných případech souhlasí s představou o podobném charakteru interakcí jak mezi molekulami adeninu, tak i guaninu. V souladu s klasickými představami lze tedy tuto interakci interpretovat jako mezimolekulární přitažlivost. Koeficienty A_2 a další, příslušející v rovnicích (4) a (5) členům vyššího řádu, již tuto jednotnou polaritu podle předpokladu nevykazovaly.

Závěr

Pro rozlišení mezi běžnými PAL a nukleovými bázemi je možno použít jejich vliv na redukci peroxidu vodíku, resp. jejich rozdílného potenciálového posuvu vrcholu redukčního píku na amalgámové elektrodě. Byla zjištěna možnost vzájemného rozlišení některých bází (adeninu a guaninu) na základě různých tvarů izoterem relativních posuvů, a to proudového na amalgamové a potenciálového na HMDE.

K výhodám užití této metody patří i fakt, že měřené proudy se pohybují řádově v desítkách až stovkách nA, což je asi o jeden řád více, než odpovídající výšky voltamtrických fardaických píků uvedených bází.

Velmi podstatným se jeví vliv chloridových iontů, které svými specifickými interakcemi s bázemi, povrchem elektrody, resp. s peroxidem vodíku umožňují rozlišení mezi běžnými PAL a uvedenými bázemi a zvyšují selektivitu analýzy.

Autoři děkují za finanční podporu grantu č. 101/02/U111/CZ.

LITERATURA

- Paleček E.: *Nature* 188, 656 (1960).
- Paleček E.: *Biochim. Biophys. Acta* 145, 410 (1967).
- Novotný L. v knize: *Electrochemistry for Environmental Protection* (Kalvoda R., Štulík K., ed.). UNESCO-ROSTE Publishing House, Venezia 1995.
- Galus Z.: *Fundamentals of Electrochemical Analysis*. Polish Scientific Publisher, Warszawa 1994.
- Navrátil T., Novotný L., Battisti A.: *Chem. Listy* 90, 121 (1996).
- Novotný L., Navrátil T.: *Vodni Hospodarstvi* 12, 390 (1997).
- Novotný L., Navrátil T.: *Electroanalysis* 10, 8 (1998).
- Navrátil T., Novotný L.: *Fresenius' J. Anal. Chem.* 366, 249 (2000).
- Navrátil T., Novotný L., Bečičková D.: *Univerzitní noviny, List Masarykovy Univerzity a Nadace Universitas Masarykiana* 6, 21 (1999).
- Paleček E., Jelen F., Hung M.: *Bioelectrochem. Bioenerg.* 8, 621 (1981).
- Yosypchuk B., Heyrovský M., Paleček E., Novotný L.: *Electroanalysis* 14, 1488 (2002).
- Jelen F., Yosypchuk B., Kouřilová A., Novotný L., Paleček E.: *Anal. Chem.* 74, 4788 (2002).
- Fojta M., Kubičárová T., Paleček E.: *Biosens. Bioelectron.* 15, 107 (2000).
- Price M. A., Tullis T. D.: *Methods Enzymol.* 212, 194 (1992).
- Feig A. L., Therdarahn T., Sigman D. S.: *Biophys. Res. Commun.* 155, 338 (1988).
- Dabrowiak J., Kissinger K., Goodisman J.: *Electrophoresis* 10, 404 (1989).
- Polaro-Sensors: Manuál k počítačovému Eco-Tribo Polarografu PC-ETP*, Praha 2001. <http://www.polarsen.cz;> 20.8.2002.
- Novotný L., Yosypchuk B.: *Chem. Listy* 94, 1118 (2000).
- Yosypchuk B., Novotný L.: *Crit. Rev. Anal. Chem.* 32, 141 (2002).
- Novotný L.: *Habilitační práce*. Univerzita Pardubice, ÚFCH – J. Heyrovského AV ČR, Praha 1995.
- Kopanica M., Novotný L.: *Anal. Chim. Acta* 368, 211 (1998).
- Navrátil T.: *Doktorská dizertační práce*. Univerzita Karlova, Praha 1996.
- Bečičková D.: *Diplomová práce*. Univerzita Pardubice, Pardubice 1997.
- Heyrovský M., Vavříčka S.: *J. Electroanal. Chem.* 353, 335 (1993).
- Navrátil T., Kopanica M.: *Crit. Rev. Anal. Chem.* 32, 153 (2002).
- Navrátil T., Kopanica M.: *Chem. Listy* 96, 111 (2002).
- Šebková S., Navrátil T., Kopanica M.: *Anal. Lett.* 36, (2003), v tisku.
- Meloun M., Militký J.: *Statistické zpracování experimentálních dat*. Edice Plus, Praha 1994.

R. Fadrná (*J. Heyrovsky Institute of Physical Chemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague*): **Study of the Interactions Between Hydroxyl Radicals and Purine DNA Bases**

The effect of nucleic acid bases (adenine, guanine) on the second reduction step of oxygen (electroreduction of hydrogen peroxide) on the hanging mercury drop electrode (HMDE) or the meniscus-modified silver amalgam electrode (m-AgSAE) was studied. In the presence of chloride anions the corresponding voltammetric peak increases with increasing concentration of the bases while the peak potential is shifted to more positive potentials.