

VYBRANÉ PROBLÉMY ELEKTROCHEMIE

RNDr. Mgr. Iveta Třísková, Ph. D.

Elektroneutralita a iontová síla

- Elektrostatické interakce iontů – vliv na stabilitu a prostorové uspořádání biologicky významných struktur
- Elektrická vodivost roztoků
- Změny koligativních vlastností (jejich velikost závisí na počtu částic v roztoku) – snížení bodu tuhnutí, zvýšení bodu varu nebo osmotického tlaku v důsledku snížení chemického potenciálu μ
- **Silné elektrolyty** – úplná disociace na ionty; silné kyseliny a silné zásady
- **Slabé elektrolyty** – částečná disociace
- Analytická koncentrace elektrolytu = součet koncentrací všech jeho forem přítomných v roztoku
- Pro dvojsytnou slabou kyselinu (H_2A) platí: $c = [H_2A] + [HA^-] + [A_2^-]$

$$F = \frac{Q_1 Q_2}{\epsilon r^2}$$

Elektroneutralita a iontová síla

- **Podmínka elektroneutrality** - základní vztah pro roztoky elektrolytů → kladné a záporné náboje se navzájem kompenzují

$$\sum_i c_i z_i = 0$$

c_i molární koncentrace iontů i s nábojem z_i

- **Iontová síla** – „koncentrace“ náboje v roztoku, dána vztahem

$$I = \frac{1}{2} \sum_i c_i z_i^2$$

c_i molární koncentrace iontů i s nábojem z_i

Př.: Jaká je iontová síla roztoku $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ o $c = 0,2 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$?

$$I = \frac{1}{2} (2 \cdot 0,2 \cdot 3^2 + 3 \cdot 0,2 \cdot 2^2) = 3 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$$

Aktivita elektrolytů

- Odchylka od ideálního chování je způsobena elektrostatickými interakcemi mezi ionty roztoku, proto pro přesnější výpočty lépe uvažovat **aktivitu iontů** :

$$a_i = \gamma_i \cdot c_i$$

c_i je koncentrace iontů i ; γ_i je aktivní koeficient (nejčastěji molární nebo molální)

!!!!Musí platit podmínka elektroneutrality!!!!

- **Střední aktivní koeficient** $\gamma_{\pm} = \sqrt[\nu]{\gamma_+^{\nu_+} \gamma_-^{\nu_-}}$

Geometrický průměr aktivního koeficientu aniontu a kationtu

Aktivní koeficient

Z klasické termodynamiky:

Pro reálný roztok kationtu M^+ a aniontu X^- při téže molalitě platí:

$$G_m = \mu_+ + \mu_- = \mu_+^{ideal} + \mu_-^{ideal} + RT \ln \gamma_+ + RT \ln \gamma_- = G_m^{ideal} + RT \ln \gamma_+ \gamma_-$$

↓
Střední aktivní koeficient

$$\gamma_{\pm} = (\gamma_+ \gamma_-)^{1/2}$$

Obecně pro sloučeniny $M_p X_q$ platí:

$$G_m = p\mu_+ + q\mu_- = G_m^{ideal} + pRT \ln \gamma_+ + qRT \ln \gamma_-$$

↓
Definice středního aktivního koeficientu

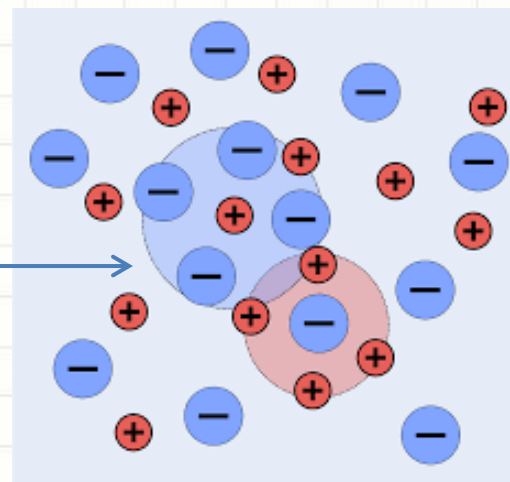
$$\gamma_{\pm} = (\gamma_+^p \gamma_-^q)^{1/s}$$

$$s = p + q$$

Debye-Hückelova teorie iontových roztoků

1923 – Peter Debye a Erich Hückel

Iontová atmosféra



Podkladem D. – H. teorie je tendence aniontů shromažďovat se kolem kationtů a naopak (jeden takový lokální shluk je znázorněn kruhem). Ionty jsou v neustálém pohybu.

Pro velmi nízké koncentrace:

$$\log \gamma_{\pm} = - |z_+ z_-| A I^{1/2}$$

Debye – Hückelův limitní zákon

kde $A = 0,509$ pro vodné roztoky při $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ a I je bezrozměrná **iontová síla** roztoku

Debye-Hückelova teorie iontových roztoků

$$I = \frac{1}{2} \sum_i z_i^2 (b_i / b^\ominus)$$

definice iontové síly

Pro velmi vysoké koncentrace lze aktivní koeficient odhadnout z **rozšířeného Debye – Hückelova zákona**:

$$\log \gamma_{\pm} = - \left(\frac{A |z_+ z_-| I^{1/2}}{1 + BI^{1/2}} + CI \right)$$

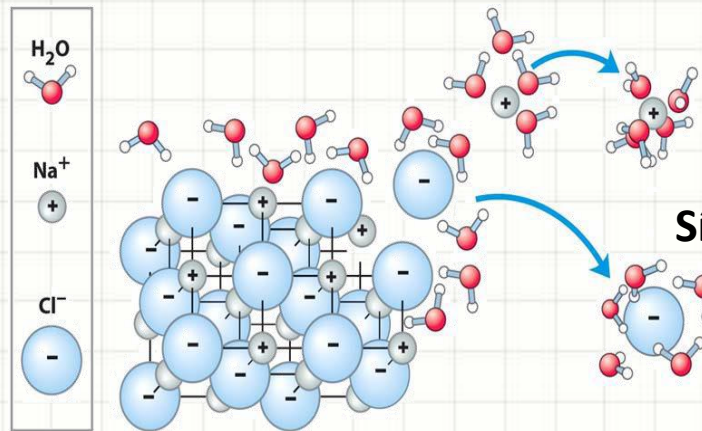
Rozšířený Debye-Hückelův zákon

Kde B a C jsou bezrozměrné konstanty a lze je považovat za nastavitelný empirický parametr

Solvatace v roztocích elektrolytů

A Rozpouštění iontových sloučenin - pochod, při kterém jsou pozitivně a negativně nabité ionty, vyskytující se v mřížce od sebe vzájemně oddalovány v důsledku silného elektrostatického přitahování s dipóly vody – vznik hydratovaných iontů

Water dissolves many crystalline salts by hydrating their component ions. The NaCl crystal lattice is disrupted as water molecules cluster about the Cl and Na ions. The ionic charges are partially neutralized, and the electrostatic attractions necessary for lattice formation are weakened



$$F = \frac{Q_1 Q_2}{\epsilon r^2}$$

Síla iontových interakcí

Hydratace i jako chemická reakce mezi iontem a vodou vedoucí ke vzniku koordinační sloučeniny

Při hydrataci iontů jsou v hydratační sféře předpokládány tři oblasti:

- 1) **Vnitřní vrstva** – molekuly vody jsou vzájemně pevně orientovány na povrchu iontu (jejich struktura je uspořádanější než v samotné vodě)
- 2) **Další vrstva** – ion ruší vodíkové vazby mezi molekulami vody – porušení struktury
- 3) **Vnější vrstva** – struktura „vázané“ vody přechází na strukturu „volné“ vody

Solvatace v roztocích elektrolytů

✓ Rozdílná působnost iontů v hydratačních vrstvách

• ionty Li^+ , Na^+ , H_3O^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , OH^- , F^- - uplatňují se v první vrstvě a působí ve smyslu zpevnění struktury vody

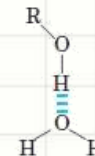
• ionty K^+ , NH_4^+ , Cs^+ , Br^- , I^- , IO_3^- - uplatňují se především ve druhé vrstvě a působí ve smyslu rušení struktury vody

B) Rozpouštění nenabitých polárních molekul (anorganické i organické sloučeniny) tvorba vodíkových můstků s polárními funkčními skupinami (hydroxylové skupiny cukrů a alkoholů, karboxylové skupiny aldehydů a ketonů...)

Between the carbonyl group of a ketone and water



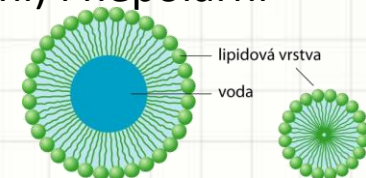
Between the hydroxyl group of an alcohol and water



C) Sloučeniny obsahující pouze nepolární hydrofobní skupiny se ve vodě nerozpouštějí

D) Amfipatické látky – obsahují v molekule polární (hydrofilní) i nepolární (hydrofobní) skupiny. Př.: mastné kyseliny a polární lipidy

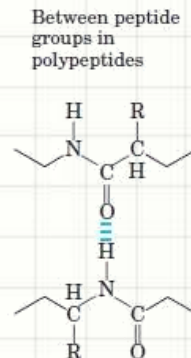
✓ Tvorba micel



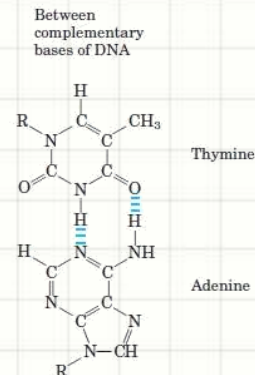
Voda jako rozpouštědlo

ⓓ Amfipatické látky – bílkoviny a nukleové kyseliny

- ✓ **Bílkoviny:** důležitá role (polárních) nabitých skupin COO^- , NH_3^+ imidazolium při vazbě vody na bílkovinu



- ✓ **Nukleové kyseliny:** fosfátové skupiny jsou primárním místem hydratace

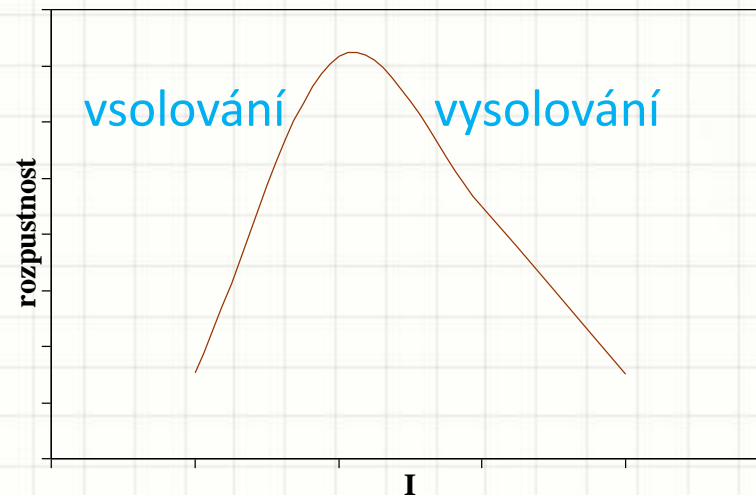


Hydratace bílkovin

- Na povrchu molekuly bílkovin v bezprostředním kontaktu s rozpouštědlem jsou a) nabitě funkční skupiny; b) nenabitě struktury → různé části povrchu biopolymeru jsou solvatovány/ hydratovány odlišným způsobem
- **Hydratační obal bílkovin** – existuje vždy; část této vody vázána mimořádně pevně – nelze ji odstranit bez nevratné destrukce nativní struktury bílkoviny; další podíl vody vázán méně pevně; všechna vázaná voda má však charakteristiky, kterými se liší od čistého rozpouštědla – dvojrozměrná síť molekul vody propojených vodíkovými vazbami, která obepíná molekulu bílkoviny a začleňuje do sebe i klastry vody v některých oblastech. Vodíkové vazby v síti jsou pevnější a mají delší dobu života než tyto vazby ve vzdálenějším okolí
- **Hydratační obal** je klíčový pro biologickou funkci bílkovin (konformační flexibilita)
- **Voda v krystalech bílkovin** – 30 až 50% hmotnosti krystalu; nezbytná pro udržení struktury; chová se jako kapalná → difuze malých molekul do dutin krystalů bílkovin

Vsolování a vysolování bílkovin

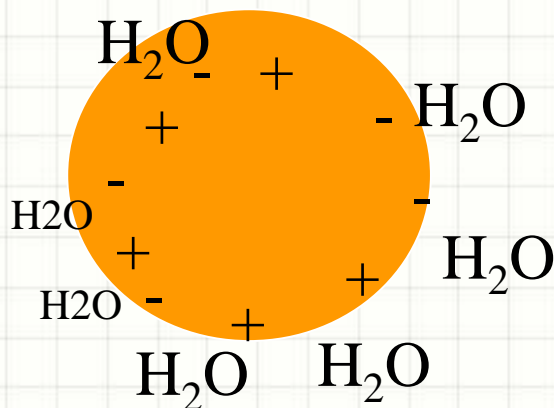
- Rozpustnost bílkovin ve vodě lze ovlivnit přidavkem rozpustné soli
- Závislost rozpustnosti bílkovin na koncentraci přídavné soli prochází maximem
- **Vsolování** – první vzestupná větev, kdy se bílkovina více rozpouští
- **Vysolování** - když křivka dosáhne maxima, začíná s dalšími přidavky soli rozpustnost bílkoviny klesat a při vysoké koncentraci soli → bílkovina z roztoku vypadne; používá se pro frakcionaci lidského séra, izolaci bílkovin



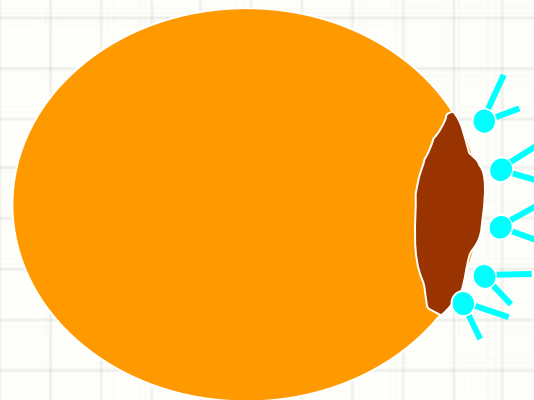
Vsolování a vysolování bílkovin

- Na začátku bílkovina v čisté vodě → navázání iontů přidávané soli → změna náboje molekuly bílkoviny a změna hydratačního obalu → hydrofilisace molekuly bílkoviny → roste rozpustnost až do té doby, než je v roztoku tak velké množství volné soli, že začíná kompetice mezi jejími ionty a bílkovinou o molekuly vody pro hydratační obal → částečná ztráta hydratačního obalu ve prospěch anorganických iontů, zesílení interakcí bílkovina – bílkovina → precipitace (vysolení bílkoviny)

Vsolování



Vysolování



Vsolování a vysolování bílkovin

- **Vsolování** – náboj bílkoviny z^+ kompenzován anionty X^- ; v roztoku se ustavuje rovnováha $PX_z \leftrightarrow P^{z+} + zX^-$;
- termodynamická rovnovážná konstanta:
$$K_r = \frac{a_{pz} + (a_{x^-})^z}{a_{pxz}}$$
- Součin rozpustnosti: $S_{bílka} = a_{pz} + (a_{x^-})^z$
- **Vysolování** – lze použít semiempirický vztah: $\log c_s = \log c_s^0 - K_s I$
- **Franz Hofmeister** (konec 19.stol.) – sestavení řady aniontů a kationtů dle jejich vysolovacího účinku:
- **Anionty se stejným kationtem:** $SO_4^{2-} > F^- > IO_3^- > NO_2^- > Br^- > NO_3^- > I^- > CNS^-$
- **Kationty se stejným aniontem:** $Li^+ > Na^+ > K^+ > NH_4^+ > Rb^+ > Cs^+$
- Vysolovací účinek soli závisí více na aniontu než kationtu
- **Pro vysolování bílkovin:** $Na_2SO_4 > (NH_4)_2SO_4 > NaCl > CaCl_2$
- Nejběžnější vysolovací činidlo pro srážení bílkovin → **síran amonný**

Kyselost roztoků

- Druhá pol. 19. stol. → kyselost roztoků způsobena hydroxoniovými ionty H_3O^+ ; jejich koncentrace souvisí s autoprotolýzou vody dle rovnice:



- Rovnovážná konstanta autoprotolýzy: $(K_{H_2O})_a = \frac{a_{H_3O} \cdot a_{OH}}{a^2_{H_2O}}$

- **Iontový součin vody K_w :** $K_w = [H_3O^+][OH^-] = 1,008 \cdot 10^{-14} \text{ mol}^2 \cdot \text{dm}^{-6}$

- V neutrálním roztoku: $[H_3O^+] = [OH^-] = 1,004 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$

$$[H^+] = [OH^-] = \sqrt{K_{H_2O}} \approx 1 \cdot 10^{-7}$$

- **pH** (Sørensenův vodíkový exponent): **$-\log [H^+]$**

Měření pH

- Pro vysvětlení podstaty techniky měření pH je vhodné vycházet z klasického způsobu měření, kdy se používá článek složený z vodíkové jako indikační a kalomelové jako referenční elektrody
- Pt | H₂(g) | roztok X | KCl(nas) | Hg₂Cl₂(s) | Hg(l) | Pt
- **Reakce:** ½ H₂(g) + ½ Hg₂Cl₂(s) ↔ Hg(l) + H⁺(aq, X) + Cl⁻(aq)
- Elektrodové potenciály:

$$E_v = E(H_3O^+ / H_2) = \frac{RT}{F} \ln \frac{a_{H_3O^+}}{\sqrt{pH_2}}$$

Vodíková elektroda

$$E_k = E(Hg_2Cl_2 / Hg) = E_k^0 - \frac{RT}{F} \ln a_{Cl^-}$$

Kalomelová elektroda

kde pH_2 je parciální tlak plynného vodíku ve vodíkové elektrodě, pro níž je $E_v^0 = 0$ V dle definice

Měření pH

- Elektromotorické napětí $E_x = E_{\text{pravá}} - E_{\text{levá}}$



Nutno zvýšit o kapalinový potenciál $\phi_{L,X}$ na rozhraní roztok X a nasycený KCl; ustavuje se na každém rozhraní, kde se stýkají dva roztoky



$$E_x = \phi_{L,X} + E^0_k - \frac{RT}{F} \left[\ln(a_{H_3O^+})_x + \ln a_{Cl^-} - \frac{1}{2} \ln p_{H_2} \right]$$

$$E_S = \phi_{L,S} + E^0_k - \frac{RT}{F} \left[\ln(a_{H_3O^+})_S + \ln a_{Cl^-} - \frac{1}{2} \ln p_{H_2} \right]$$



Odečteme rovnice

$$E_X - E_S = \phi_{L,X} - \phi_{L,S} - \frac{RT}{F} \left[\ln(a_{H_3O^+})_X - \ln(a_{H_3O^+})_S \right]$$



Přirozené logaritmy převedeme na dekadické a po dalších úpravách

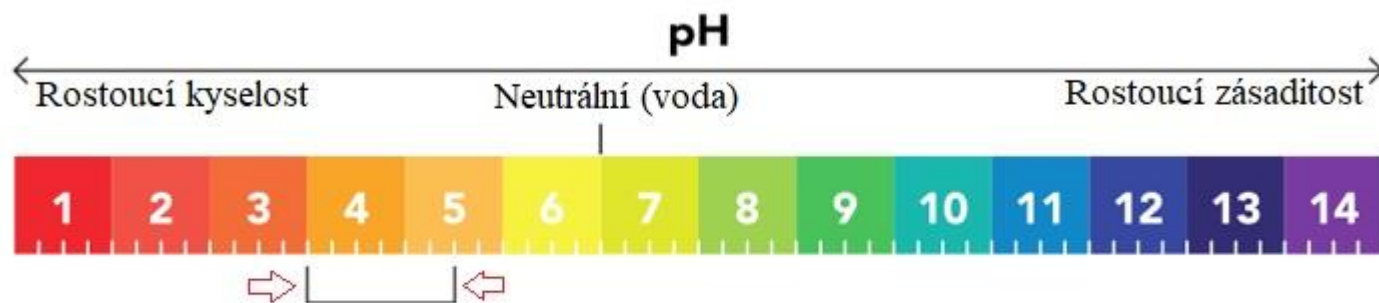
$$pH(X) = pH(S) + \frac{(E_X - E_S)}{2,303RT}$$

Základ měření pH

$$pH(X) = pH(S) + \frac{(E_X - E_S)}{2,303RT}$$

Standardní roztok, má jednoznačně přiřazenou jistou hodnotu pH; nejčastěji pufr

Praktická škála pH



Ideální pH pro zdravou pokožku je **mírně kyselá**, v rozmezí pH 4.0 - 5.5

Skleněná elektroda

- Iontově selektivní elektroda s membránou ze speciálního druhu skla
- **Vnitřním elektrolyt:** octanový nebo fosforečnanový pufr s přidavkem chloridu
- **Referentní elektroda:** argentchloridová nebo kalomelová elektroda ponořená do vnitřního roztoku elektrolytu
- **Základní fce skleněné elektrody:** výměnná reakce iontů mezi sklem a roztokem, jehož pH je měřené (na základě této reakce se na povrchu elektrody ustavuje Donnanův potenciál – potenciálový rozdíl mezi povrchem membrány a okolním roztokem).



- **Membránový potenciál:** rozdíl Donnanových potenciálů na vnější a vnitřní straně skleněné membrány

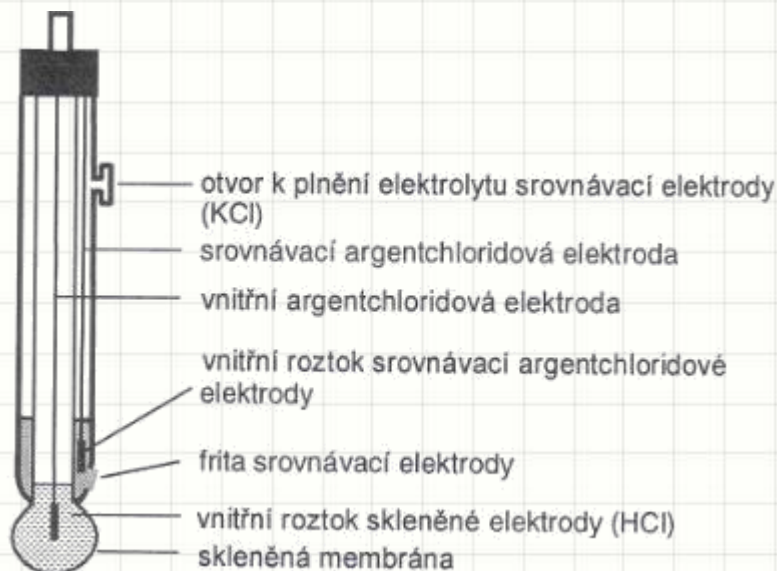
Skleněná elektroda

- **Alkalická (pozitivní) chyba skleněné elektrody** - pH > 10, způsobena rušivým účinkem sodných iontů
- **Kyselá (negativní) chyba skleněné elektrody** – pH = 1 a nižší, nasycení protony v povrchu skleněné membrány → elektroda přestane být k dalšímu snižování pH citlivá
- **Nernstovská odezva elektrody** je rovna 59,12 mV (t = 25 °C)

Nicolsky-Eisenmanova rovnice

$$E = K + \frac{RT}{z_i F} \ln \left[a_i + \sum_j (k_{ij} a_j^{z_i/z_j}) \right]$$

- K ... standardní potenciál ISE [V]
z_i ... nábojové číslo sledovaného iontu i
a_i ... aktivita sledovaného iontu i v měřeném roztoku
R ... molární plynová konstanta (8,314 J·K⁻¹·mol⁻¹)
T ... termodynamická teplota [K]
F ... Faradayova konstanta (96 485,33 C·mol⁻¹)
z_j ... nábojové číslo interferujícího iontu j
a_j ... aktivita interferujícího iontu j
k_{ij} ... konstanta selektivity (vyjadřuje velikost vlivu interferujícího iontu na potenciál elektrody)



Měření pH - přístroje

- Potenciálový rozdíl je odváděn vnitřní elektrodou (Ag/AgCl) a měří se proti referenční argentchloridové nebo kalomelové elektrodě
- Potenciometr s vysokým vstupním odporem a digitální indikací; škála v jednotkách mV nebo pH
- **pH metry se skleněnou elektrodou** – standardizace na dva základní roztoky pufrů o pH 4 a 7

pH metr CyberScan 5500



Závislost pH na teplotě

- ❖ Elektrolyty typu 1-1; jejich molalita je vyšší než 10^{-6} mol·kg⁻¹
- ❖ **Silné kyseliny a zásady** – závislost $p a_H$ (zde záporný logaritmus aktivity H₃O⁺ iontů) na teplotě se omezuje na teplotní závislost aktivitního koeficientu γ
 - **$p a_H$ silných kyselin** s teplotou mírně roste

$$\left(\frac{\delta p a_H}{\delta T} \right)_{p,m} = - \left(\frac{\delta \log \gamma}{\delta T} \right)_{p,m} \rightarrow \text{velmi malá hodnota}$$

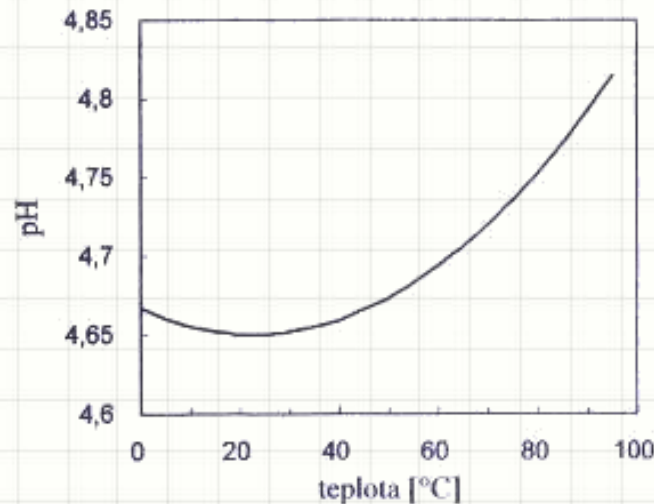
- **$p a_H$ silných zásad** s teplotou výrazně klesá

$$\left(\frac{\delta p a_H}{\delta T} \right)_{p,m} = - \left(\frac{\delta \log K_w}{\delta T} \right)_p + \left(\frac{\delta \log \gamma}{\delta T} \right)_{p,m}$$

↓
Při 25 °C je rovno **-0,033**

Závislost pH na teplotě

- **Pufry**
- Rozhodující vliv na průběh pH pufry s teplotou má teplotní závislost disociační konstanty slabého elektrolytu → závislosti $p a_H$ na teplotě mají stejný tvar jako závislost pK na teplotě
- S rostoucí teplotou pH **kyselých pufřů** roste, **zásaditých** klesá



Teplotní závislost pH acetátového pufry tvořeného 0,05 M kyselinou octovou a 0,05 M octanem sodným (25 °C, pH 4,65)

Obecná teorie kyselin a zásad

- **Arrheniova teorie (1889)**
 - **Kyselina** – sloučenina odštěpující kation H^+
 - **Zásada** – sloučenina odštěpující anion OH^-
- **Brønstedova teorie (1923) – Obecná teorie kyselin a zásad-**
- kyselé nebo zásadité vlastnosti sloučeniny se projevují po její reakci s rozpouštědlem
 - **Kyselina** – látka schopná odštěpovat proton
 - **Zásada** – látka vázající proton
- V roztoku musí být přítomni současně oba partneři - **konjugované páry**
- **Lewisova teorie** – velký význam pro výklad mechanismu organických reakcí
 - **Kyselina** – akceptor elektronového páru
 - **Zásada** – donor elektronového páru

Disociace slabých kyselin a zásad

- Slabá jednosytná kyselina HA: $HA \leftrightarrow H^+ + A^-$

- Disociační konstanta: $K_A = \frac{[H^+][A^-]}{[HA]} = \frac{c\alpha^2}{1-\alpha}$ c je celková koncentrace kyseliny; α je stupeň disociace

- Stupeň disociace: $\alpha = \frac{[A^-]}{[HA] + [A^-]}$

$$pH = \frac{1}{2}(pK_A - \log c)$$

- Slabá zásada BOH: $BOH \leftrightarrow B^+ + OH^-$

$$pH = 14 - \frac{1}{2}(pK_B - \log c)$$

Pufry

- Směs slabé kyseliny nebo zásady a její soli vytváří systém schopný udržovat neměnné pH, když se k nim přidává kyselina nebo zásada
- Příklad: **Acetátový pufr** – směs kyseliny octové (HAc) a octanu sodného (NaAc)
- Přídavek silné kyseliny: $\text{Ac}^- + \text{H}_3\text{O}^+ \leftrightarrow \text{HAc} + \text{H}_2\text{O}$
- Přídavek silné zásady: $\text{HAc} + \text{OH}^- \leftrightarrow \text{Ac}^- + \text{H}_2\text{O}$

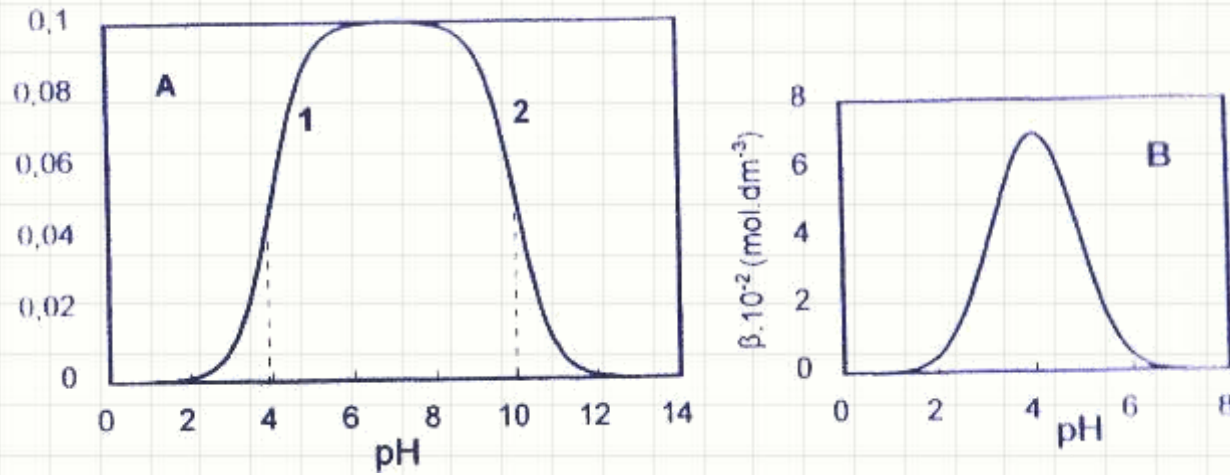
→ pH se nemění

pH pufru

- **Henderson – Hasselbachova rovnice** $\text{pH} = \text{p}K_A + \log \frac{[\text{A}^-]}{[\text{HA}]}$
- i pomocí stupně konverze: $\text{pH} = \text{p}K_A + \log \frac{[\alpha]}{[1-\alpha]}$
- **Pufrační kapacita** – množství silné kyseliny nebo silné zásady potřebné přidat k pufru, aby se jeho pH změnilo o jednotku

Pufry

Pufr má maximální pufrační kapacitu, když je jeho pH rovno pK_A použité slabé kyseliny

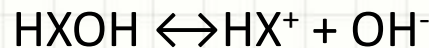
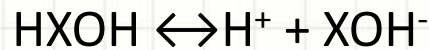


A - vztah pH a složení roztoku pro kyselý a basický pufir, které vycházejí ze slabých elektrolytů s hodnotami $pK_A = 4$ (křivka 1) a $pK_B = 4$ (křivka 2). Koncentrace obou pufirů je 0.1 M. Na svislé ose je vynesena koncentrace c silné zásady přidané k slabé kyselině, resp. silné kyseliny přidané k slabé basi. Maximum pufrační kapacity je pro oba pufiry označeno čárkovaně; pro kyselý je to pH odpovídající číselně pK_A ; pro basický odpovídající hodnotě $(14-pK_B)$.

B – závislost pufrační kapacity na pH pro kyselý pufir znázorněný na panelu A křivkou 1

Amfolyty

- Sloučeniny schopné vystupovat jako kyseliny nebo jako zásady
- Dle klasické Arrheniovy teorie:



- Reakce amfolytu s vodou: $\text{HXOH} + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{H}_3\text{O}^+ + \text{XOH}^-$
 $\text{HXOH} + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{H}_2\text{XOH}^+ + \text{OH}^-$

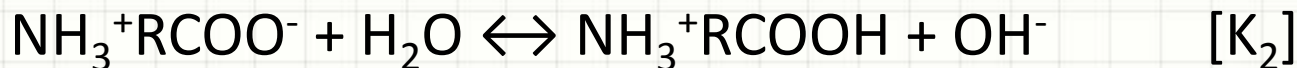
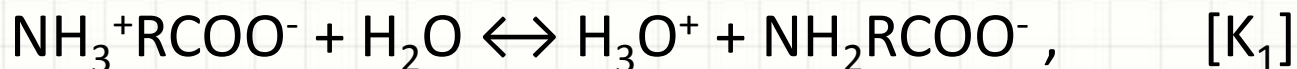
$$K_A = \frac{c_{\text{H}_3\text{O}^+} \cdot c_{\text{XOH}^-}}{c_{\text{HXOH}}}$$

$$K_B = \frac{c_{\text{H}_2\text{XOH}^+} \cdot c_{\text{OH}^-}}{c_{\text{HXOH}}}$$

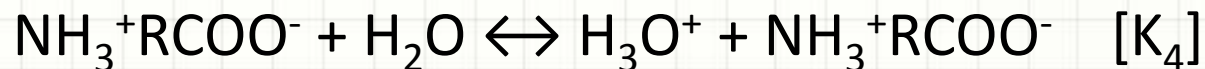
- Tyto úvahy platí pro neutrální molekuly; v biologických soustavách jsou typické amfolyty aminokyseliny
- Vnitřní ionizace aminokyselin: $\text{NH}_2\text{RCOOH} \leftrightarrow \text{NH}_3^+\text{RCOO}^-$

Amfolyty

- Protolytické rovnováhy aminokyselin:



- K_1 – schopnost aminoskupiny NH_3^+ odštěpovat proton; míra kyselosti této skupiny
- K_2 – míra bazicity karboxylátového aniontu
- Pro vyjádření bazicity aminoskupiny a kyselosti karboxylu platí rovnováhy: $\text{NH}_2\text{RCOO}^- + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{NH}_3^+\text{RCOOH} + \text{OH}^-$
[K_3]



- Hodnoty bazických konstant lze získat pomocí iontového součinu vody ze vztahů: $K_w = K_1K_3 = K_2K_4$; tedy $\text{p}K_3 = 14 - \text{p}K_1$ a $\text{p}K_2 = 14 - \text{p}K_4$

Amfolyty

- **Isoelektrický bod** – charakteristický parametr, významný hlavně u aminokyselin (AMK) a bílkovin; je to takové pH při němž daná sloučenina neputuje v elektrickém poli; u AMK splněna podmínka:

$$c_{NH_3^+RCOOH} = c_{NH_2RCOO^-}$$

- S využitím K_1 a K_4 (viz. slide 30) získáme:

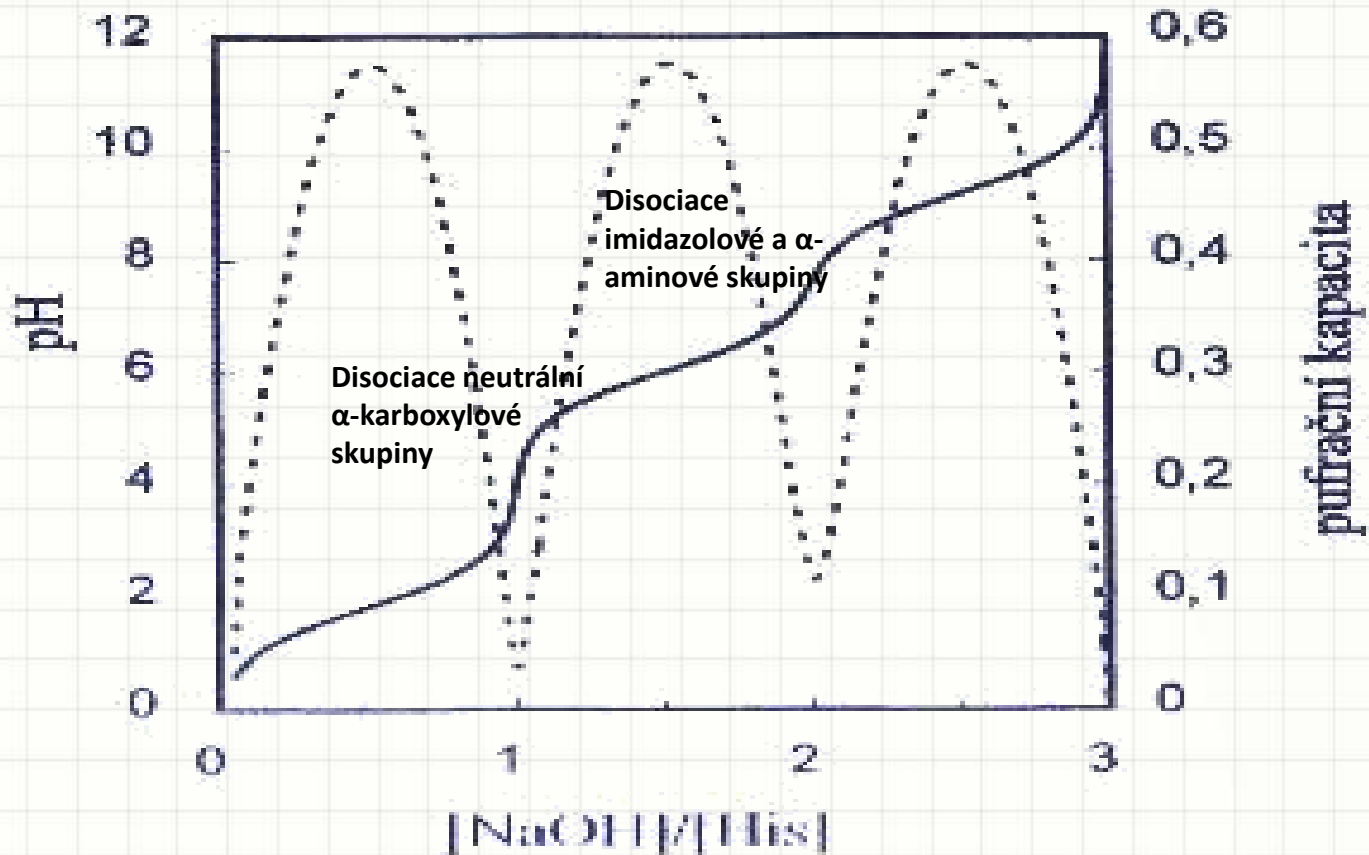
$$K_1 K_4 = a^2 H_3O^+ \frac{c_{NH_2RCOO^-} \gamma_{NH_2RCOO^-}}{c_{NH_3^+RCOOH} \gamma_{NH_3^+RCOOH}}$$

- Hodnotu isoelektrického pH lze vypočítat:

$$pI = -\log(a_{H_3O^+})^2 = \frac{1}{2}(pK_1 + pK_4)$$

Aminokyseliny jako pufry

- Titrační křivka



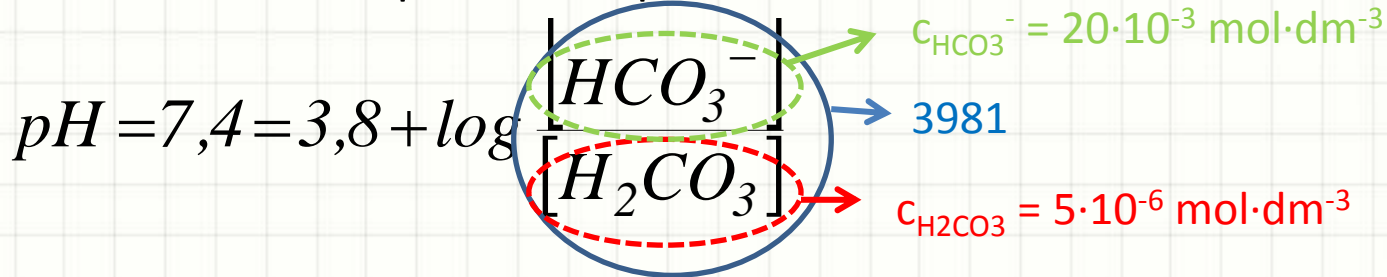
Titrační křivka histidindihydrochloridu (—) a jeho pufrační kapacita (-----)

pH tělních tekutin

- Nekontrolované hromadění metabolických produktů organismu → pokles pH extracelulární tekutiny → narušení až znemožnění životních dějů
- „Fyziologické pH“ (pH 7,4) – pH krevní plazmy
- **Pufrovací (nárazníkové) systémy** – umožňují čelit výchýlkám pH mimo referenční interval (**7,36 – 7,44**)
- **Acidémie** – pokles pod dolní mez
- **Alkalémie** – vzestup nad horní hranici referenčního rozmezí

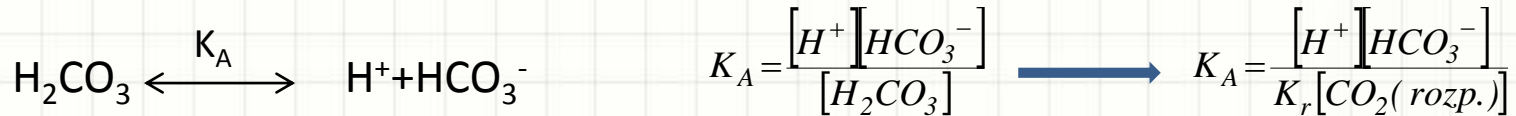
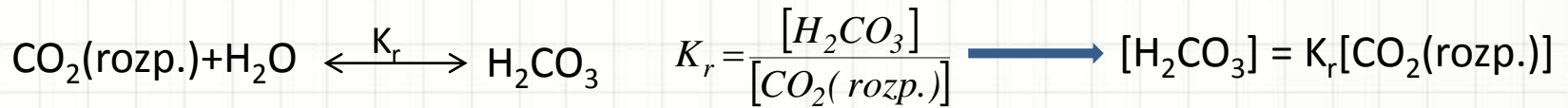
Krevní pufrý

- **A) Fosfátový** ($\text{HPO}_4^{2-}/\text{H}_2\text{PO}_4^-$) – podílí se na udržování intracelulární hodnoty pH; fosfáty jsou hlavní pufrální systém moči, v krevní plazmě pouze 1% pufrální kapacity (v krvi dominuje hydrogenuhličitanový systém)
- **B) Hydrogenuhličitanový** ($\text{HCO}_3^-/\text{H}_2\text{CO}_3$) – klíčový pro udržování pH krevní plazmy
- $\text{H}_2\text{CO}_3 \leftrightarrow \text{H}^+ + \text{HCO}_3^-$ ($\text{pK}_1 = 3,8$ při 37 °C), daleko od fyziologického pH – nedostatečná pufrální kapacita



- Otevřený pufrální systém – prostřednictvím CO_2 komunikuje s okolím

Krevní pufrý



$$K_A K_r = \frac{[\text{H}^+][\text{HCO}_3^-]}{[\text{CO}_2(\text{rozp.})]} = K_{\text{celk}}$$

$$\text{p}K_{\text{celk}} = 6,31$$

Plynný CO_2 doplňuje ztráty H_2CO_3 v důsledku její disociace, a tím udržuje pH krve



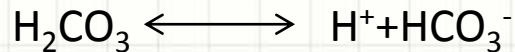
Koncentrace HCO_3^- v krevní plazmě = $20 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ a pH 7,4

Krevní pufrý

C) Bílkovinné pufrující systémy

Hemoglobin

Bohrův efekt – v plicích uvolňuje HbO₂ ionty H⁺, a tím porušuje rovnováhu mezi rozpuštěným HCO₃⁻ a CO₂ ve prospěch vzniku CO₂, jenž je vydechován; v tkáních se naopak hemoglobin stává po uvolnění kyslíku akceptorem protonů a pufruje kyselinu uhličitou vznikající metabolickými procesy



Hodnoty pH některých tělních tekutin dospělého člověka

Tělní tekutina	pH	Tělní tekutina	pH
Krevní plasma	7,34-7,43	Střevní šťáva	6,1-7,3
Lymfa	7,2-7,6	Slzy	7,35
Moč	4,8-7,5	Pot	3,8-6,8
Sliny	5,8-7,1	Sperma	6,9-7,4
Žaludeční šťáva	≈ 2,0	Mateřské mléko	6,6-7,0
Duodenální šťáva	7,5-8,8	Cytoplasma jaterních buněk	6,4-6,5
Žluč	6,2-8,5	Cytoplasma centrálního nervstva	6,7-6,9



Metody studia proteolytických rovnovah v roztoku

Potenciometrie

- Elektrochemická metoda – měří se rovnovážné napětí E galvanického článku
- Skleněná elektroda – měrná elektroda
- Argentchloridová a kalomelová elektroda – referenční elektrody

- Nernstova rovnice:
$$E_{red / ox} = E^0 - \frac{RT}{nF} \ln \frac{a_{red}}{a_{ox}}$$

Přímá potenciometrie

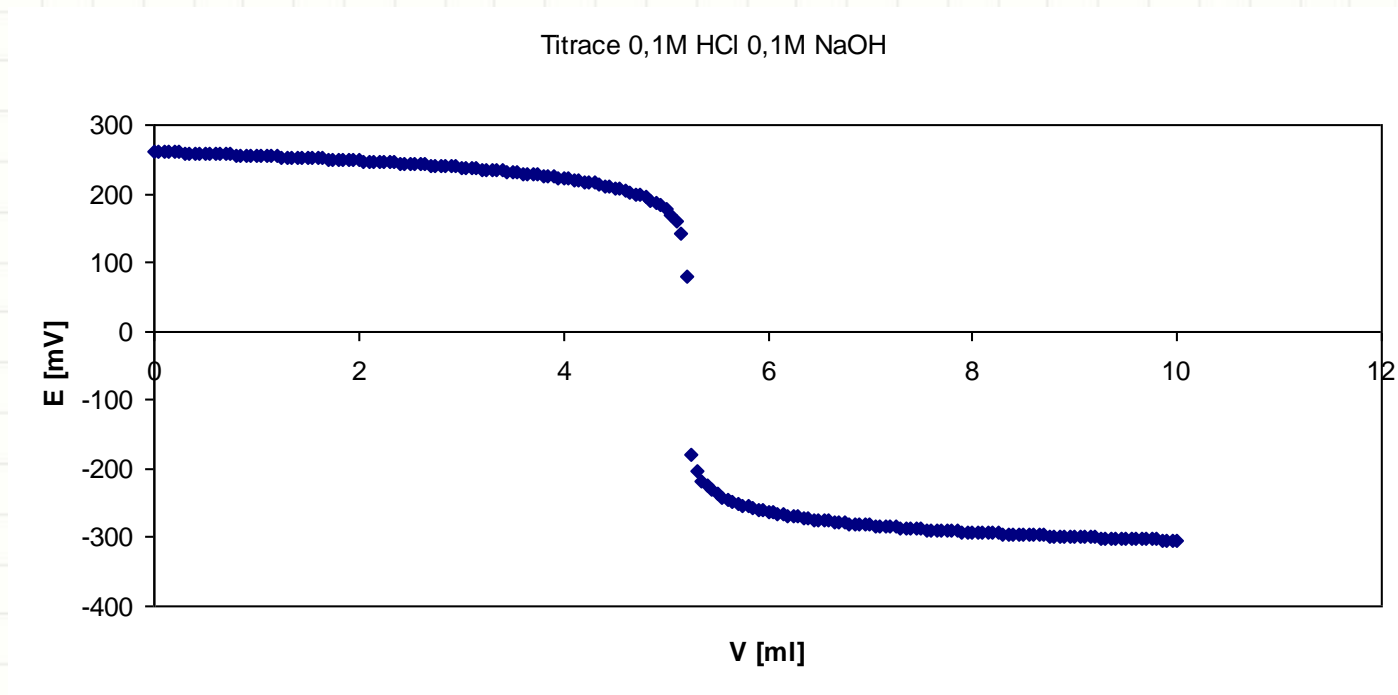
- Využívá se ke stanovení obsahu sloučenin, kde máme k dispozici příslušné indikační elektrody
- Srovnání napětí měrného článku ve vzorku s napětím téhož článku, ponořeného do standardního roztoku analytu

Potenciometrická titrace

- Nepřímá potenciometrie
- Sledování závislosti napětí článku na objemu přidávaného titračního činidla
 - **Acidobazické titrace** – skleněná elektroda
 - **Srážecí titrace** – stříbrná elektroda, ISE
 - **Komplexometrické titrace** – ISE
 - **Redoxní titrace** – platinová redoxní elektroda
- Grafické vyjádření: titrační křivka esovitého tvaru
- **Určení bodu ekvivalence:**
 - a) druhá derivace titrační křivky
 - b) Granova transformace
 - c) Samsonkova metoda

Potenciometrická titrace

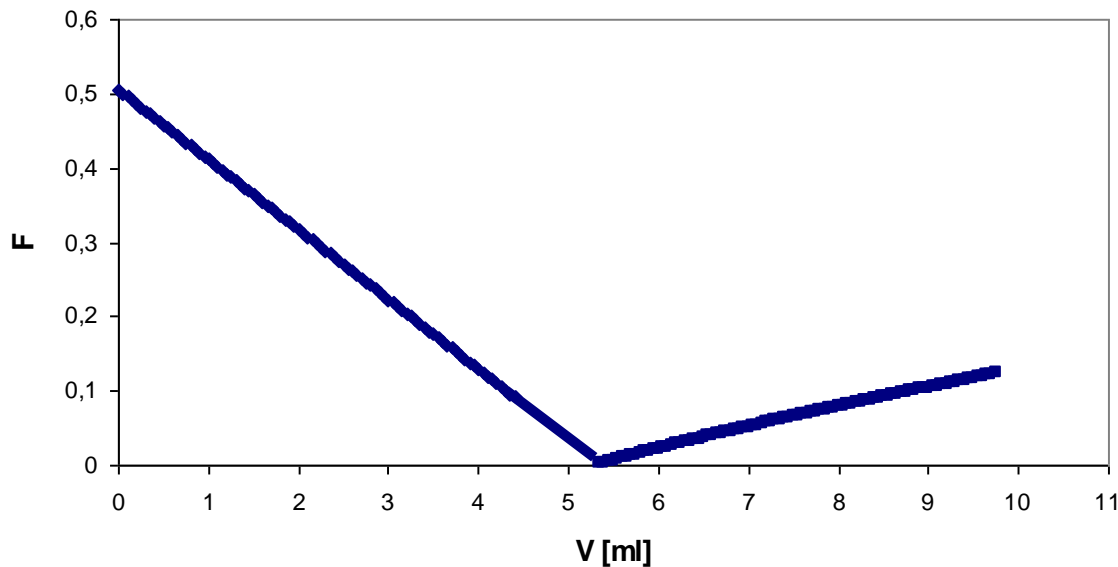
- Potenciometrická titrační křivka



Granova transformace

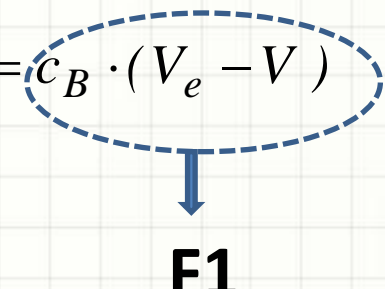
- Titrace silné kyseliny silnou bází
- Podmínka ekvivalence: $V_e \cdot c_B = V_o \cdot c_o$

$$[H^+] = \frac{V_o \cdot c_o}{V_o + V} - \frac{V \cdot c_B}{V_o + V}$$



Granova transformace

- Granova funkce před bodem ekvivalence

$$\left[H^+ \right] = \frac{c_B \cdot (V_e - V)}{V_o + V} \quad 10^{-pH} \cdot (V_o + V) = c_B \cdot (V_e - V)$$


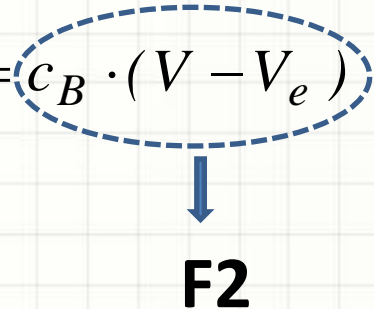
F1

- Pro linearizaci části titrační křivky před bodem ekvivalence lze použít transformaci:

$$F_1 = (V_o + V) \cdot 10^{-pH}$$

Granova transformace

- Granova funkce za bodem ekvivalence

$$\left[OH^{-}\right] = \frac{c_B \cdot (V - V_e)}{V_o + V} \quad 10^{(pH-14)} \cdot (V_o + V) = c_B \cdot (V - V_e)$$


F2

- Pro linearizaci části titrační křivky za bodem ekvivalence lze použít transformaci:

$$F_2 = (V_o + V) \cdot 10^{(pH-14)}$$

Aplikace potenciometrické titrace

- Studium protonačních rovnováh NK a jeho složek (purinové a pyrimidinové báze) a derivátů purinů (cytokininy) ve vodných i směsných roztocích (% (v/v)CH₃OH – H₂O) a stanovení disociační konstanty pK_a s využitím stupně ztitrování z

$$pK_{a_1} = -\log[H^+] - \log\left(\frac{z}{1-z}\right)$$

$$pK_{a_2} = -\log[H^+] - \log\left(\frac{1-z}{z}\right)$$

- Závislost disociační konstanty na teplotě umožňuje stanovit termodynamické parametry ΔH a ΔS
- Lze stanovit i konstanty stability komplexů β uvedených ligandů s biogenními dvojmocnými kovy Cu²⁺, Zn²⁺

$$\beta = \frac{K' - K}{K \cdot [M]}$$

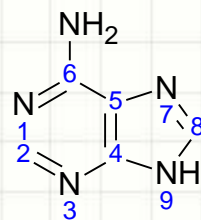
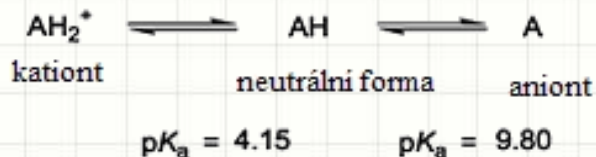
K - zdánlivá protonační konstanta (ligand + kov)

K – protonační konstanta ligandu

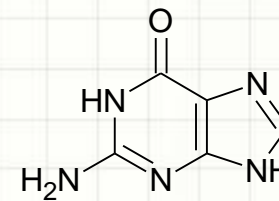
[M] – koncentrace kovu

Aplikace potenciometrické titrace

- **Purinové báze:** adenin a guanin

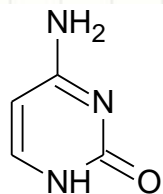


adenin

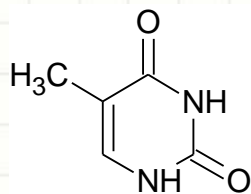


guanin

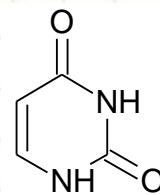
- **Pyrimidinové báze:** cytosin, thymin, uracil



cytosin



thymin

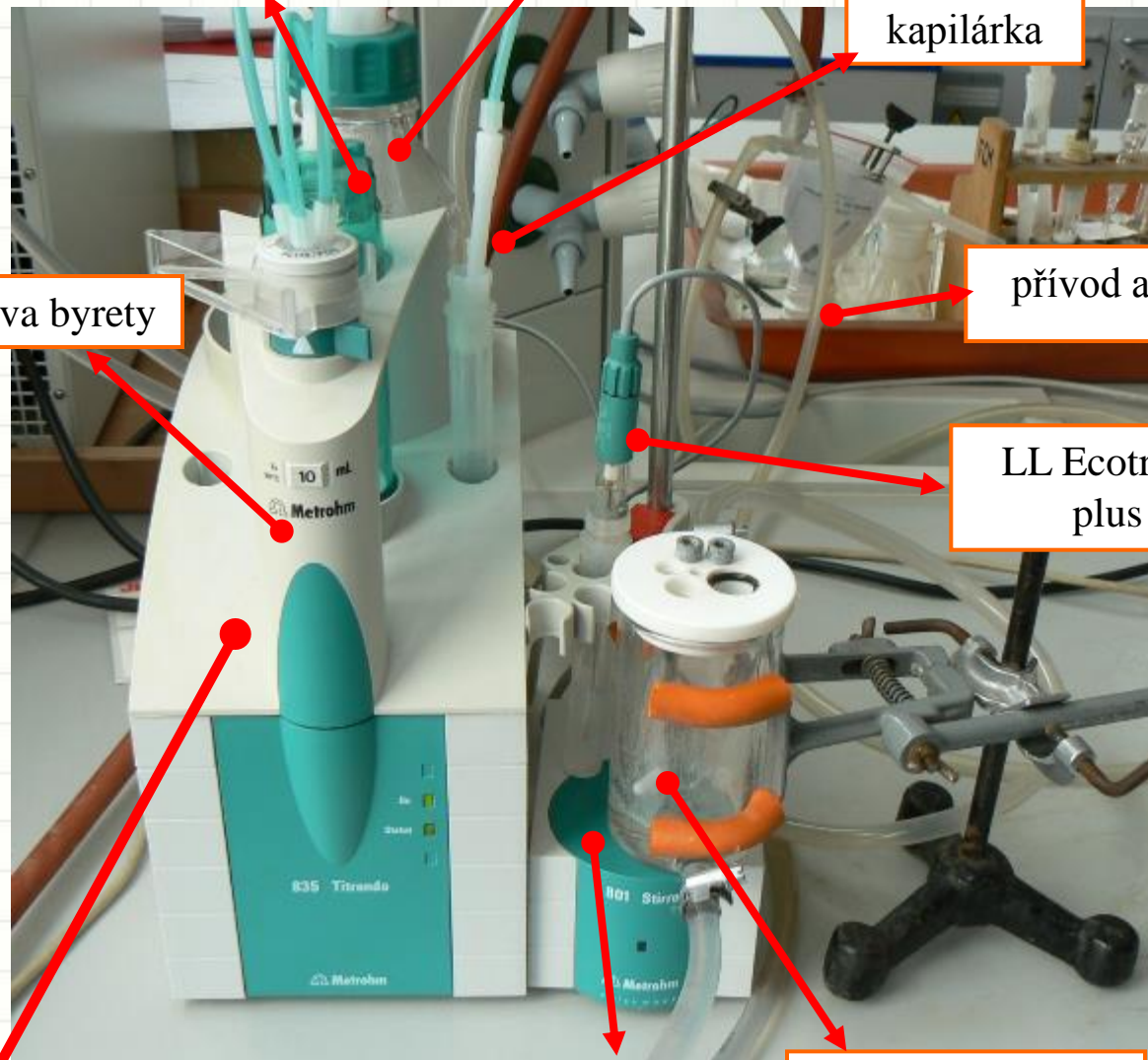


uracil

Potenciometrická titrace - instrumentace

- **Automatický titrátor Titrando 835, Metrohm**
- Různé objemy byret (1 - 20 ml)
- Možnost titrace ve vodných i vodně-alkoholických prostředích
- **Software Tiamo 1.2**
- Možnost vytvoření vlastní titrační metody (MET U – monotonic endpoint titrations)
- Možnost nastavení vlastního titračního módu vybrané metody (OPTIMAL)
- Volitelný přídavek titračního činidla
- **LL Ecotrode plus**
- Inertní argonová atmosféra; temperace





byreta

nádobka s odměrným
roztokem

kapilárka

hlava byrety

přívod argonu

LL Ecotrode
plus

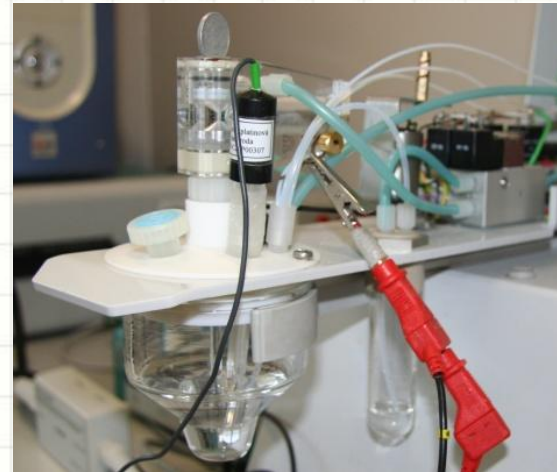
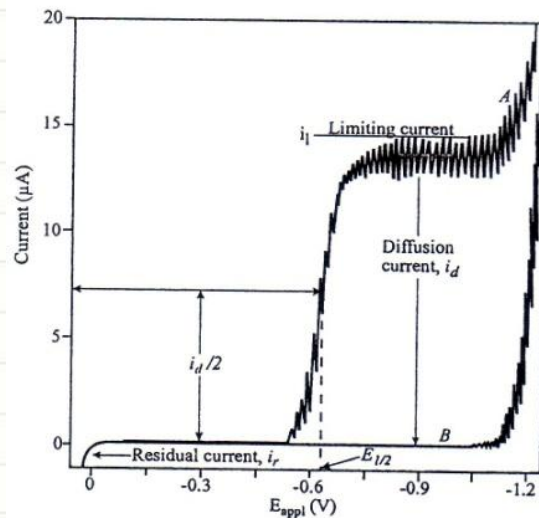
Automatický titrátor

magnetická
míchačka

temperovaná
nádobka

Polarografie

- **1922 – Jaroslav Heyrovský**
- Elektrolýza elektroaktivní látky v roztoku základního elektrolytu
- Potenciál se vkládá mezi pracovní (Hg) a referenční elektrodu (Ag/AgCl/3M KCl)
- Polarografická vlna
- Polarizace elektrody



Polarografické (voltametrické) proudy

Nabíjecí proud (I_c)

- Důležitý při nabíjení elektrodové dvojvrstvy
- Nefaradayický charakter

Migrační proud

- Spojený s transportem elektroaktivní látky k povrchu elektrody
- Eliminován přidávkem nadbytku základního elektrolytu

Difúzní proud (I_d)

- Pro reakce, kde je rychlost určujícím krokem (rate determining step; rds) difúze

$$I_d = zF \frac{dn}{dt} = zFAD \frac{\partial c}{\partial x}$$

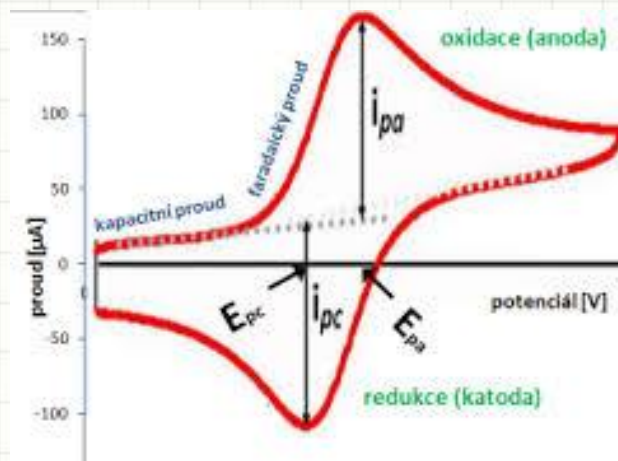
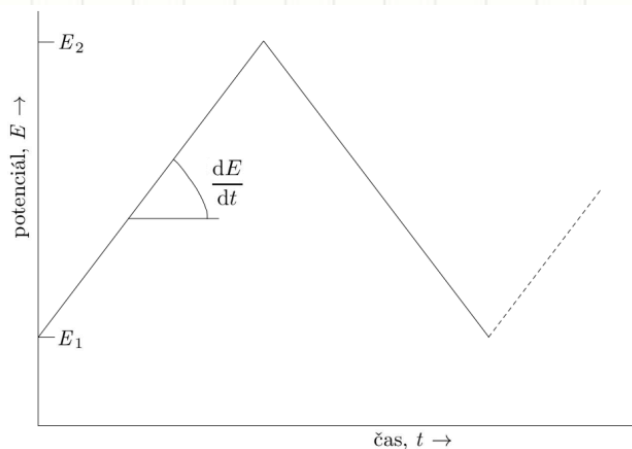
- 1934 – Dionýz Ilkovič

$$\overline{I_D} = k z F D^{1/2} m^{2/3} \tau^{1/6} c$$

Ilkovičova rovnice

Cyklická voltametrie a voltametrie s lineárně se měnícím potenciálem

- Elektrolýza elektroaktivní látky v nadbytku základního elektrolytu
- Tří-elektrodové zapojení
- dE/dt (rychlost polarizace)



- Voltametrické signály mají tvar píku
- Studium redoxních reakcí – mechanismus elektrodové reakce a reversibilita

Cyklická voltametrie

• Reversibilní procesy: Randles – Ševčíkova rovnice

$$I_p = 2,69 \cdot 10^5 n^{3/2} A D^{1/2} c_{ox}^0 v^{1/2}$$

kde I_p je proud píku(A); n počet elektronů; A efektivní plocha elektrody (cm^2); D je difúzní koeficient (cm^2/s); c_{ox} koncentrace elektroaktivní látky(mol/cm^3) a v je rychlost polarizace (V/s).

• Ireversibilní procesy: Delahayova rovnice

$$I_p = 2,99 \cdot 10^5 \cdot n \cdot (\alpha n_a)^{1/2} \cdot A \cdot D^{1/2} \cdot c_{ox}^0 \cdot v^{1/2}$$

kde α je koeficient přenosu náboje; n_a je počet přenesených elektronů v rychlost určujícím kroku(rds)

Eliminační voltametrická procedura (EVP)

- **Eliminační voltametrická procedura (EVP)** – rozvíjela se současně s eliminační polarografií (EP), však ve srovnání s EP je EVP snadnější, rychlejší a lze ji aplikovat i na pevné elektrody
- **EVP** – matematická procedura eliminující/zachovávající některý z dílčích voltametrických proudů (difúzní, nabíjecí, kinetický) z naměřených LSV nebo CV křivek
- **Eliminační funkce** jako lineární kombinace celkových proudů měřených při různých rychlostech polarizace

Dvě základní podmínky EVP

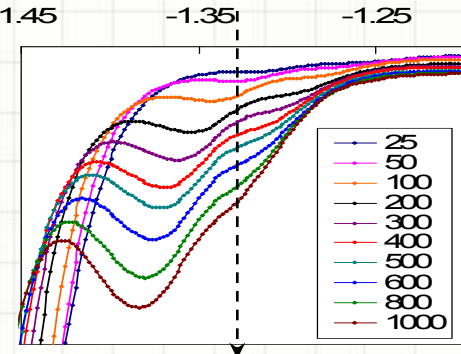
1. podmínka

$$I = \sum_{j=1}^k I_j$$

$$I = I_d + I_k + I_c + \dots$$

2. podmínka

$$I_j = Y_j(E) W_j(v)$$



I_d ... difúzní proud $I_d = Y_d(E) v^{1/2}$

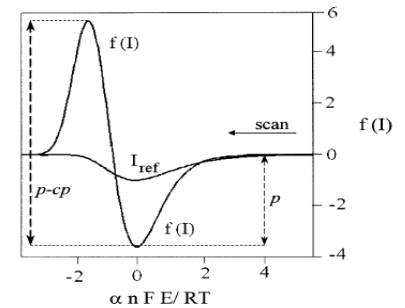
I_k ... kinetický proud $I_k = Y_k(E) v^0$

I_c ... nabíjecí proud $I_c = Y_c(E) v^1$

$$I = Y(E) v^x = \text{const.} v^x$$

$$I_{v/v_{ref}} = \left(\frac{v}{v_{ref}}\right)^0 I_k + \left(\frac{v}{v_{ref}}\right)^1 I_c + \left(\frac{v}{v_{ref}}\right)^{1/2} I_d$$

$$f(I) = a I_{v_{1/2 ref}} + b I_{v_{ref}} + c I_{2ref}$$



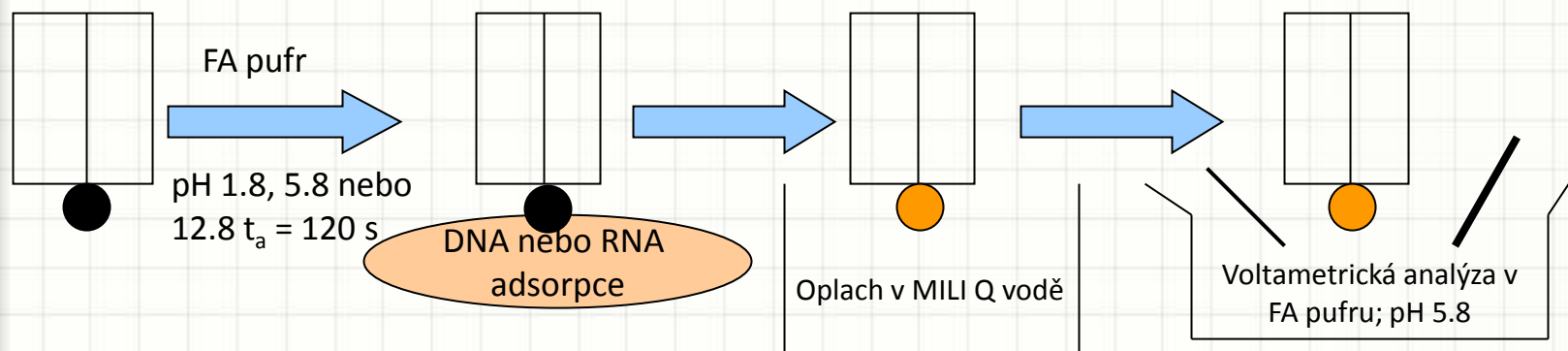
EVP E4

$$I_k + I_c = 0$$

$$I_d \neq 0$$

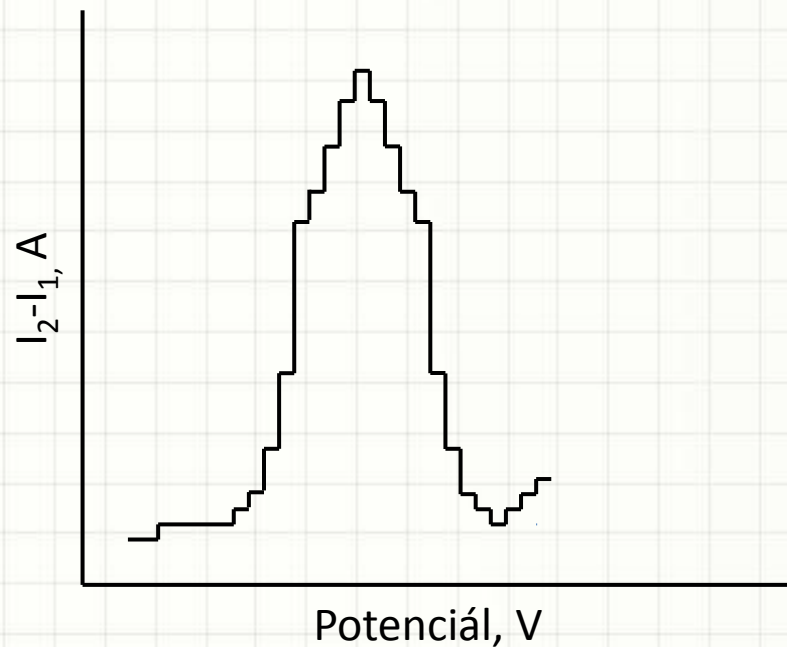
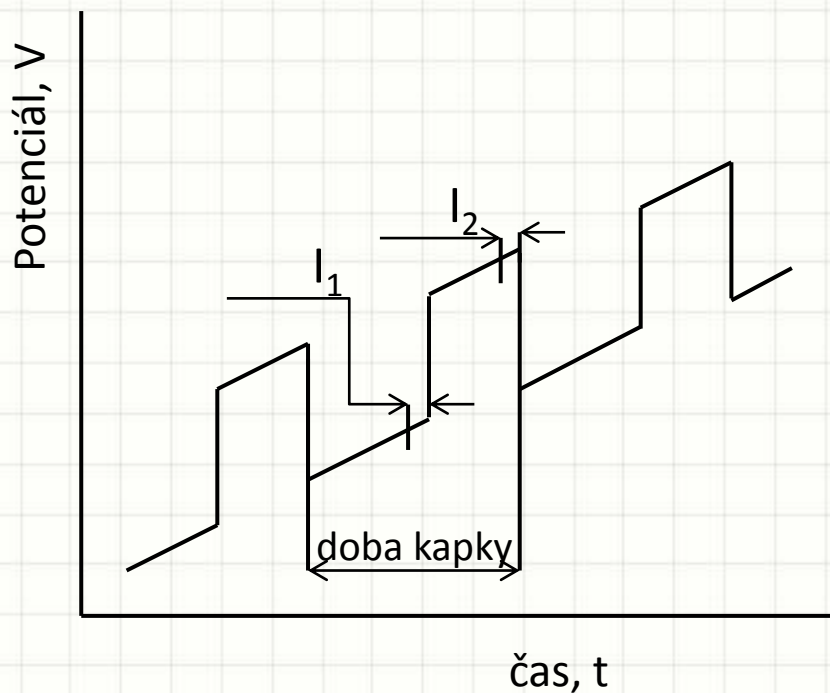
$$f(I) = -11,657 I_{1/2} + 17,485 I - 5,8284 I_2$$

Adsorptivní přenosová rozpouštěcí voltametrie (AdTSV)



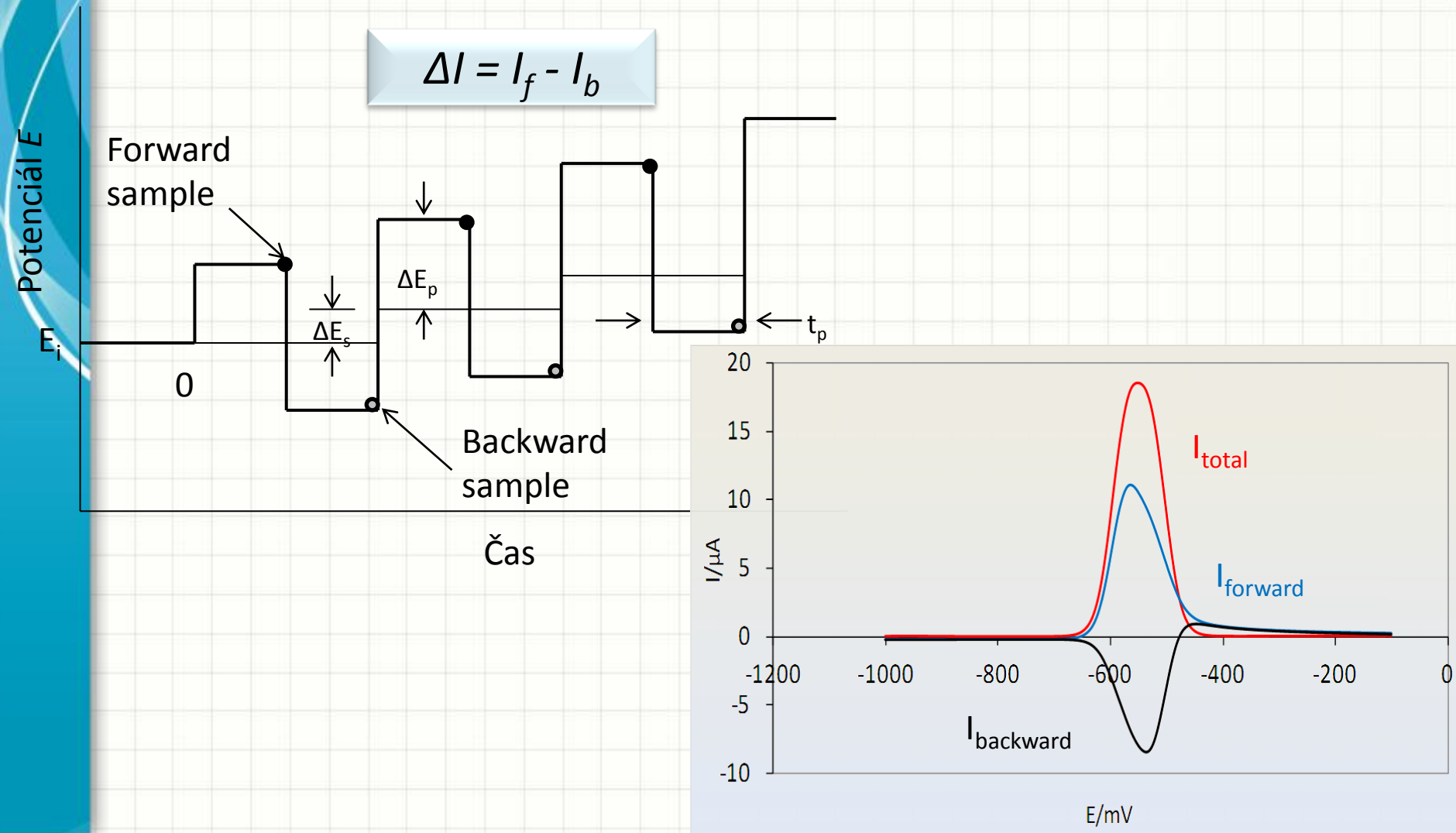
Diferenční pulsní voltametrie

$$\Delta I = I_2 - I_1$$



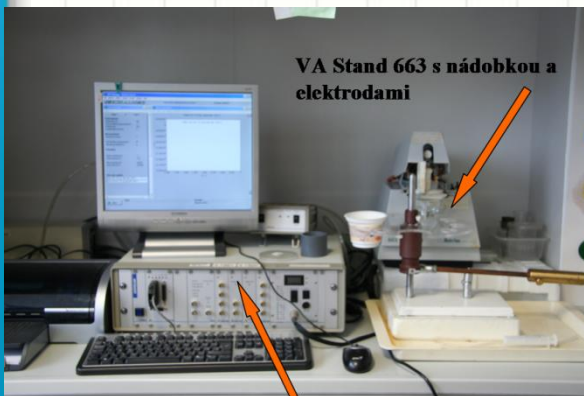
Square-wave voltammetry

•Ramaley a Krause



Přístrojové vybavení

- **Elektrochemické analyzátoři:**
 - AUTOLAB PGSTAT 20 (Eco Chemie, Utrecht, The Netherland)
 - μ AUTOLAB TYPE III (Metrohm, Switzerland)
- **GPES Manager 4.9**
- **Visící rtuťová kapková elektroda (HMDE)**
- **Polymerní pentelková grafitová elektroda (pPeGE)**

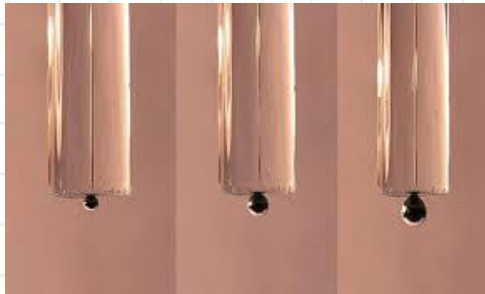


Autolab PGSTAT 20

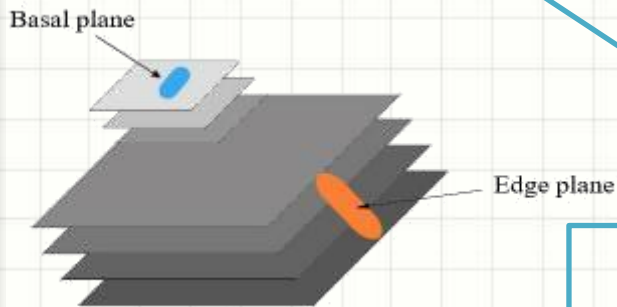


Elektrody

- Visící rtuťová kapková elektroda (HMDE)



- Grafitové elektrody



Vnitřní struktura EPPG a BPPG elektrod

Polymerní pentelková grafitová elektroda

Elektrody z pyrolytického grafitu

„Basal plane“ pyrolytická grafitová elektroda

„Edge plane“ pyrolytická grafitová elektroda

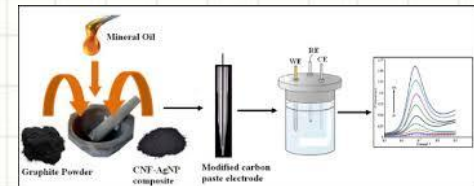


• Grafitové elektrody

Elektrody ze skelného uhlíku



Uhlíkové pastové elektrody

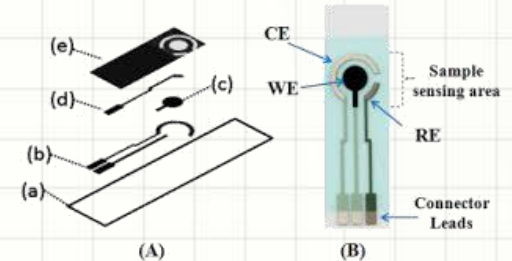



Elektrody z uhlíkových vláken



Borem dopované diamantové elektrody

• Tištěné elektrody



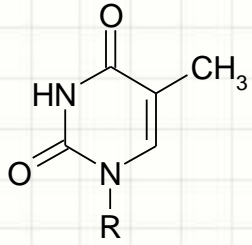


Nukleové kyseliny

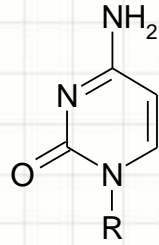
Nukleové kyseliny a jejich složky

A

pyrimidine bases

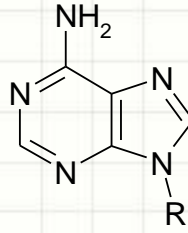


thymine (T)

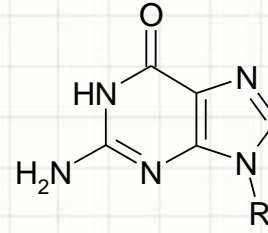


cytosine (C)

purine bases



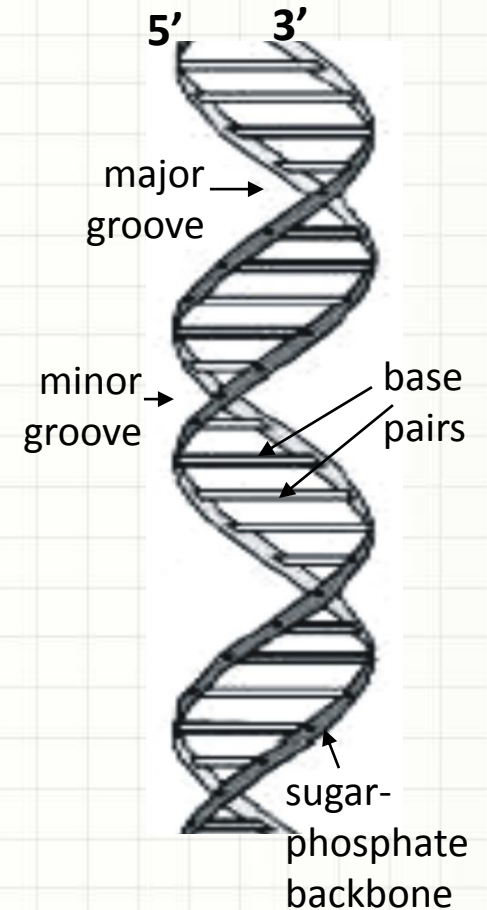
adenine (A)



guanine (G)

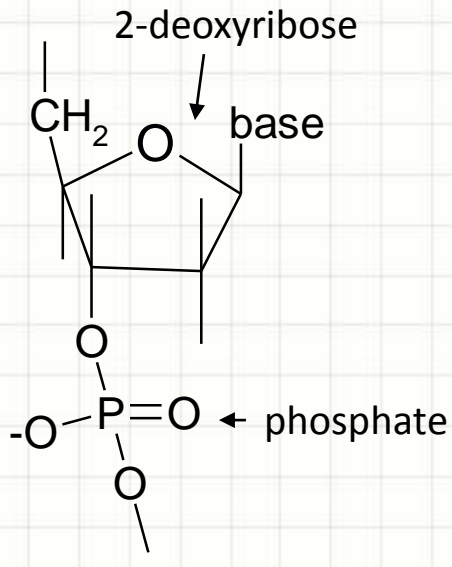
D

DNA double helix



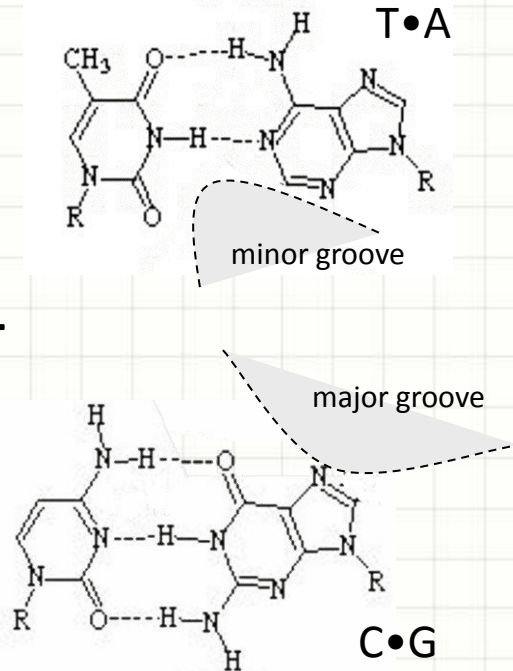
B

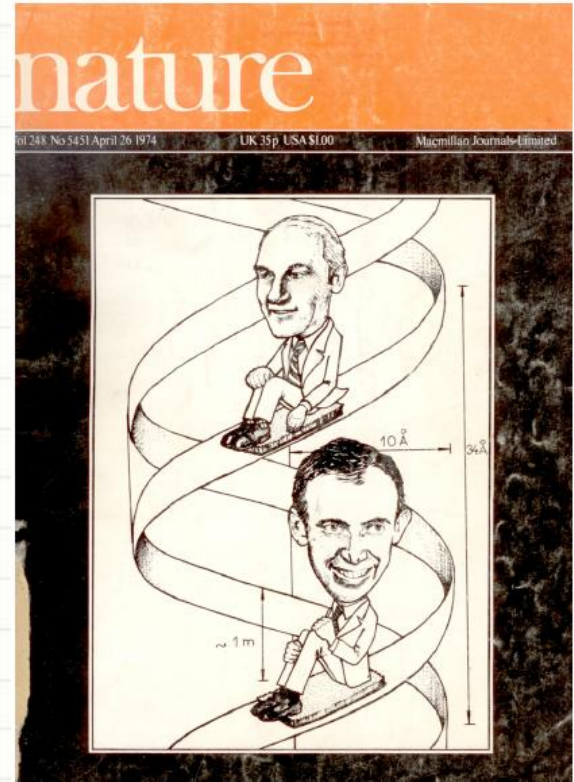
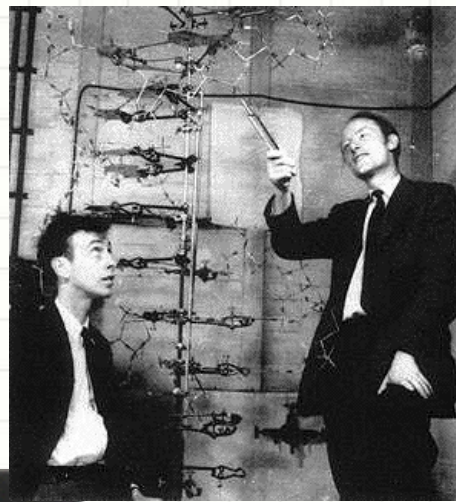
nucleotide



C

Base pairs



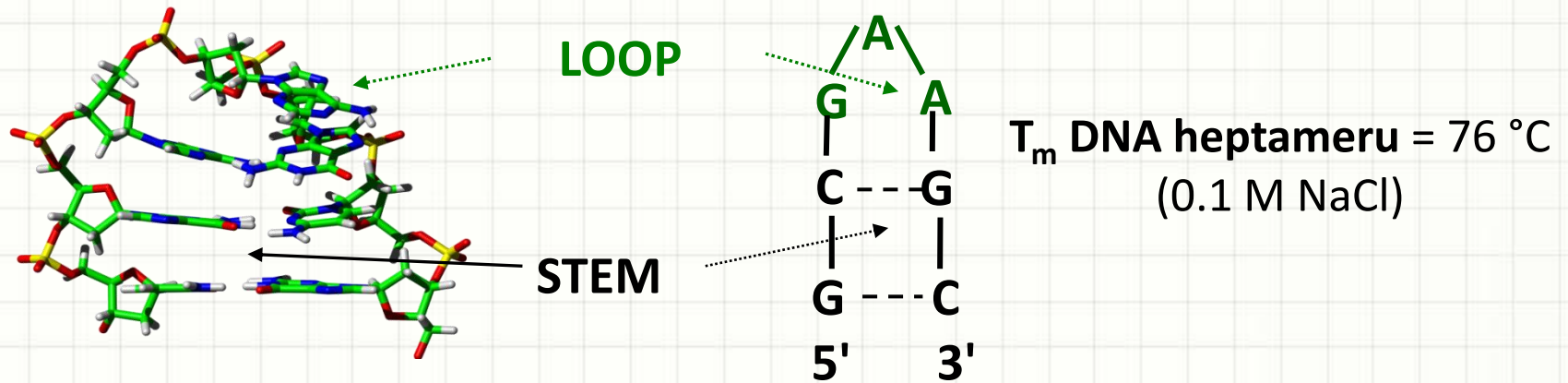


1953: James Watson, Francis Crick, Rosalind Franklin, Maurice Wilkins: DNA double helix

1962: Nobel prize (JW, FC, MW)

Explanation of the basic principles of preservation, transmission and expression of genetic information

Vlásenky



Nejkratší a termodynamicky nejstabilnější vlásenka - DNA heptamer d(GCGAAGC) – replikční počátky fága Φ X 174 and herpes simplex viru, promotorové oblasti *heat - shock* genů bakterie *E. coli* a rRNA genů

Vlásenky

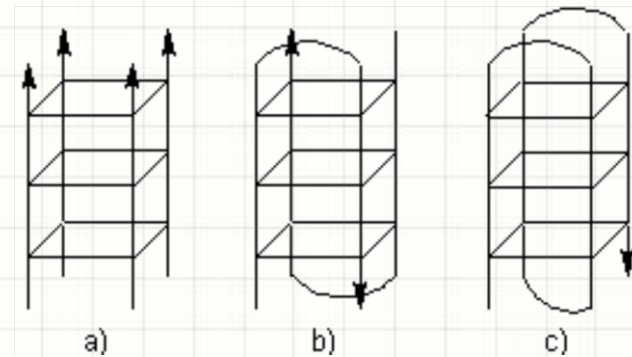
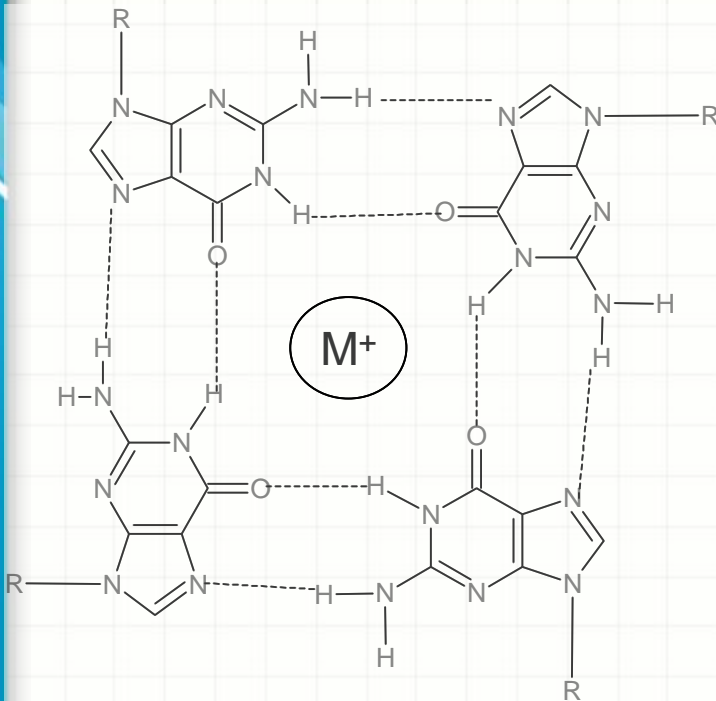
- Vlášenyky jsou spojeny s rozvojem opakujících se tripletových sekvencí v DNA řetězci, které jsou spojeny s mnoha neurodegenerativními chorobami (syndrom fragilního chromozomu, Huntingtonova choroba, Friedriecheva ataxie)

Analýza vlásenek:

d(GCGAAGC): UV, T_m (Hirao 1989, Yoshizawa 1994, 1997), NMR (Hirao 1994, Yoshizawa 1997, Padrta 2002, Sychrovský 2002), Ramanova spektroskopie (Chraibi 2000), elektroforéza (Hirao 1989, Yoshizawa 1994, 1997), CD (Hirao 1989), rtg analýza (Sunami 2004), molekulová dynamika (Nakamura 1999, Padrta 2002), **elektrochemie (Trnková 2004)**

G - kvadruplexy

- Stabilizovány G - kvartety (4 molekuly guaninu vázané Hoogsteenovými vodíkovými vazbami)
- Tvoří se především v přítomnosti Na^+ a K^+ iontů
- Strukturní polymorfismus



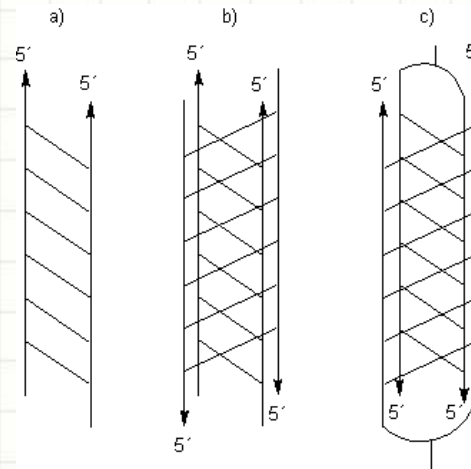
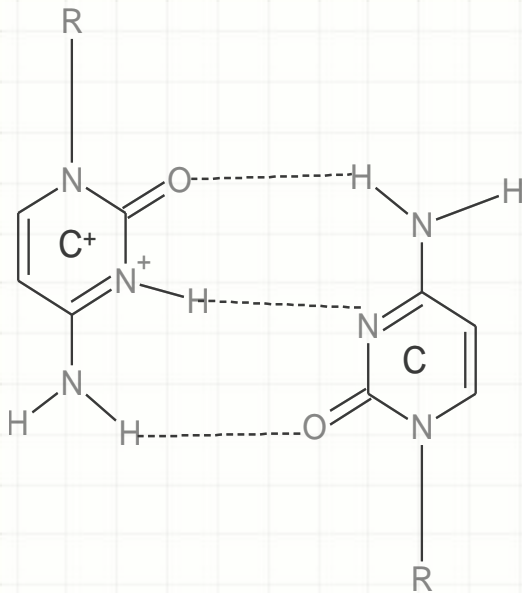
a) Čtyřřetězcový tetraplex

b) Dvouřetězcový intramolekulární tetraplex

c) Jednořetězcový intramolekulární tetraplex

I - motivy

- Hemiprotonizované C – C⁺ páry jako základní strukturní jednotka
- Tvoří se v slabě kyselém nebo neutrálním pH
- Diabetes mellitus a opakující se tripletové sekvence spojené s mnoha neurodegenerativními chorobami
- Strukturní polymorfismus



a) Dvouřetězcová struktura

b) Čtyřřetězcová struktura

c) Čtyřřetězcová struktura se značenými konci

Před více než 55 lety, Emil Paleček: DNA polarografie (1960)



Oscillografie

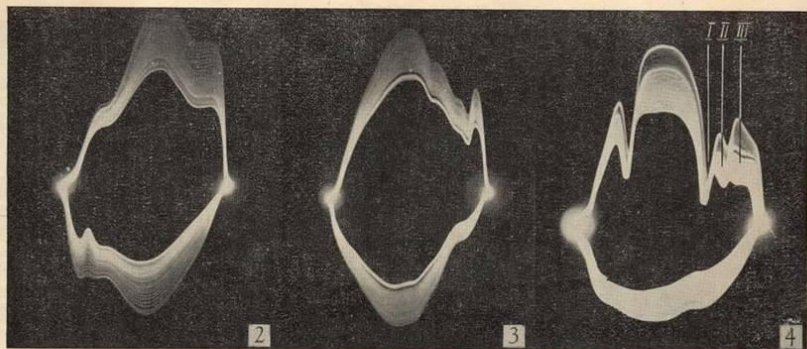


Fig. 2. 100 μgm . deoxyribonucleic acid/ml. 1 M ammonium formate
 Fig. 3. Apurinic acid in 2 M ammonium formate (concentration corresponding to 2 μgm . of deoxyribonucleic acid)
 Fig. 4. 900 μgm . deoxyribonucleic acid + 5 μgm . plasma albumin/1 ml. 10^{-3} M hexamine cobaltic trichloride in 0.1 M ammonium chloride-ammonium hydroxide. Indentations due to cobalt, I; deoxyribonucleic acid, II; protein, III

(Reprinted from *Nature*, Vol. 188, No. 4751, pp. 656-657, November 19, 1960)

Oscillographic Polarography of Highly Polymerized Deoxyribonucleic Acid

PROCEEDING from my finding^{1,2} that nucleotides, nucleosides and the bases of nucleic acids can be analysed by alternating current oscillographic polarography³⁻⁵, I have also tried to study polymerized deoxyribonucleic acid by this method.

The apparatus used was a Polaroskop P 524 (Křížek, Praha). With this apparatus it is possible to plot dE/dt against E (Fig. 1). The analysis was carried out by means of the dropping mercury electrode in the same electrolytes as were used in my previous work^{1,2}. All measurements were carried out with specimens of deoxyribonucleic acid from calf thymus.

I have established that in a medium of molar ammonium formate, deoxyribonucleic acid shows an anodic indentation at the same potential as deoxyguanylic acid (Fig. 2). Other characteristics of both indentations are also analogous (dependence on direct voltage, temperature, concentration of the electrolyte), which appears to indicate that that due to

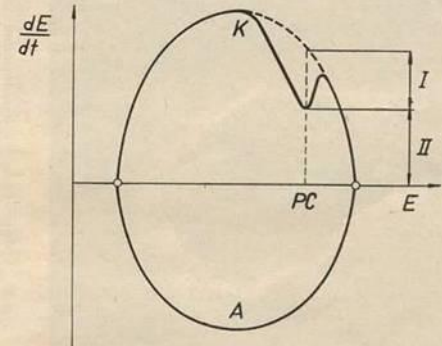
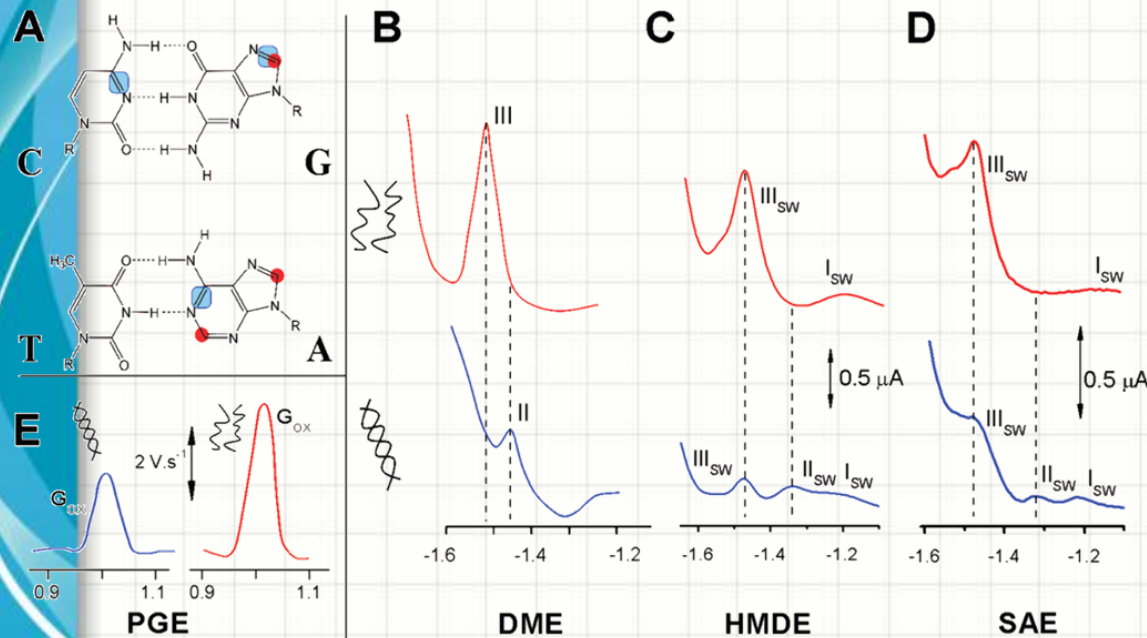


Fig. 1. Graph of dE/dt against E . The nature of the material analysed is characterized by the potential of the indentation (PC), which is somewhat similar to the polarographic half-wave potential. The quantity of the material is characterized by the depth of the indentation. For qualitative analysis, the height II, which can be measured much more easily, is generally measured.
 K, Cathodic part; A, anodic part

Nukleové kyseliny jsou elektroaktivní

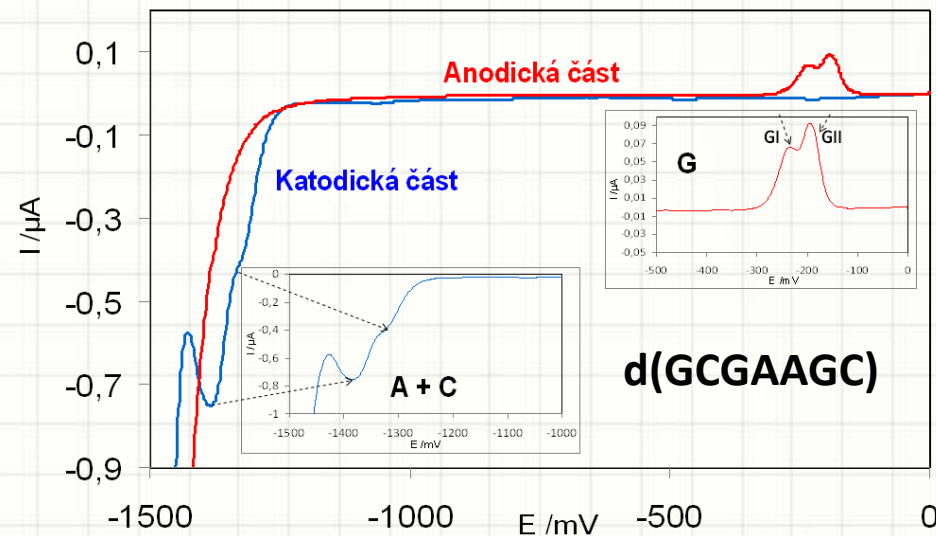
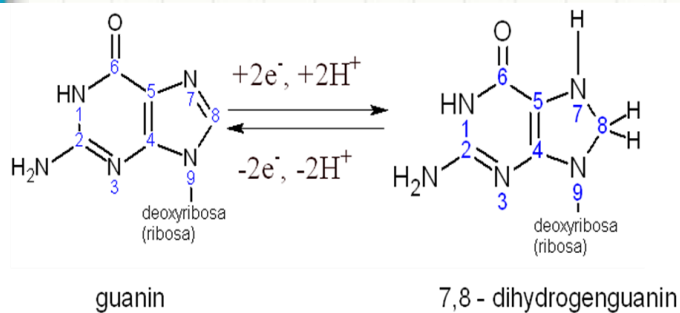
- Hg elektroda: redoxní procesy A,C a G bází
- Uhlíkové elektrody: oxidace purinových a pyrimidinových bází
- Cu elektroda: oxidace cukerných zbytků v NA
Singhal, P.; Kuhr, W. G.: *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 3552-3557; *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 4828-4832.

Elektrochemie NA a ODNs



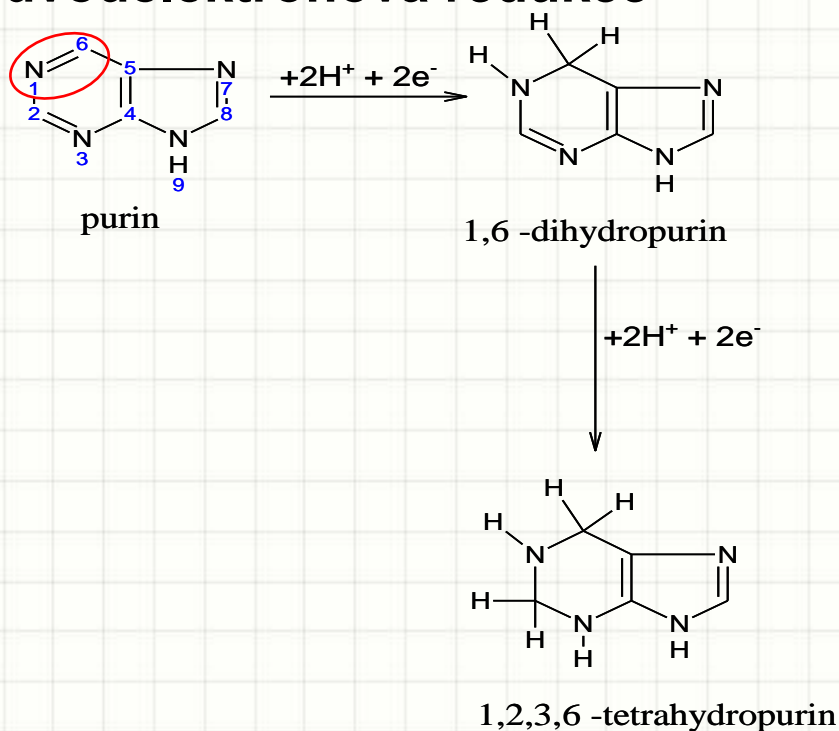
Paleček, E., Bartošík, M.:
**Electrochemistry of Nucleic
 Acids.** *Chem. Rev.*, 2012

DNA



Elektrochemie purinu a purinových derivátů

- Typické elektroaktivní látky
- **1962 - Smith a Elving** – první studie elektrochemické redukce purinu a adeninu pomocí polarografie a coulometrie na Hg elektrodě (DME).
- **Dvoukroková dvouelektronová redukce**



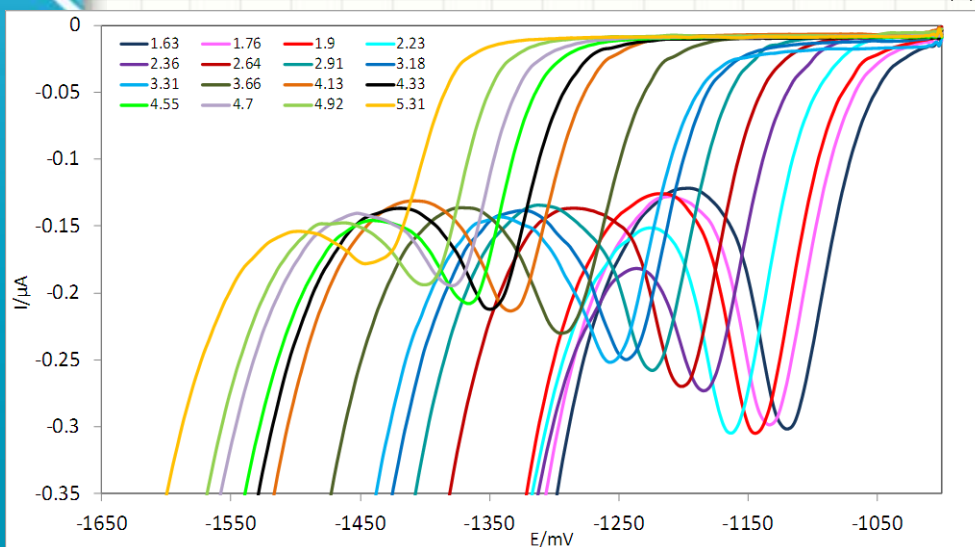
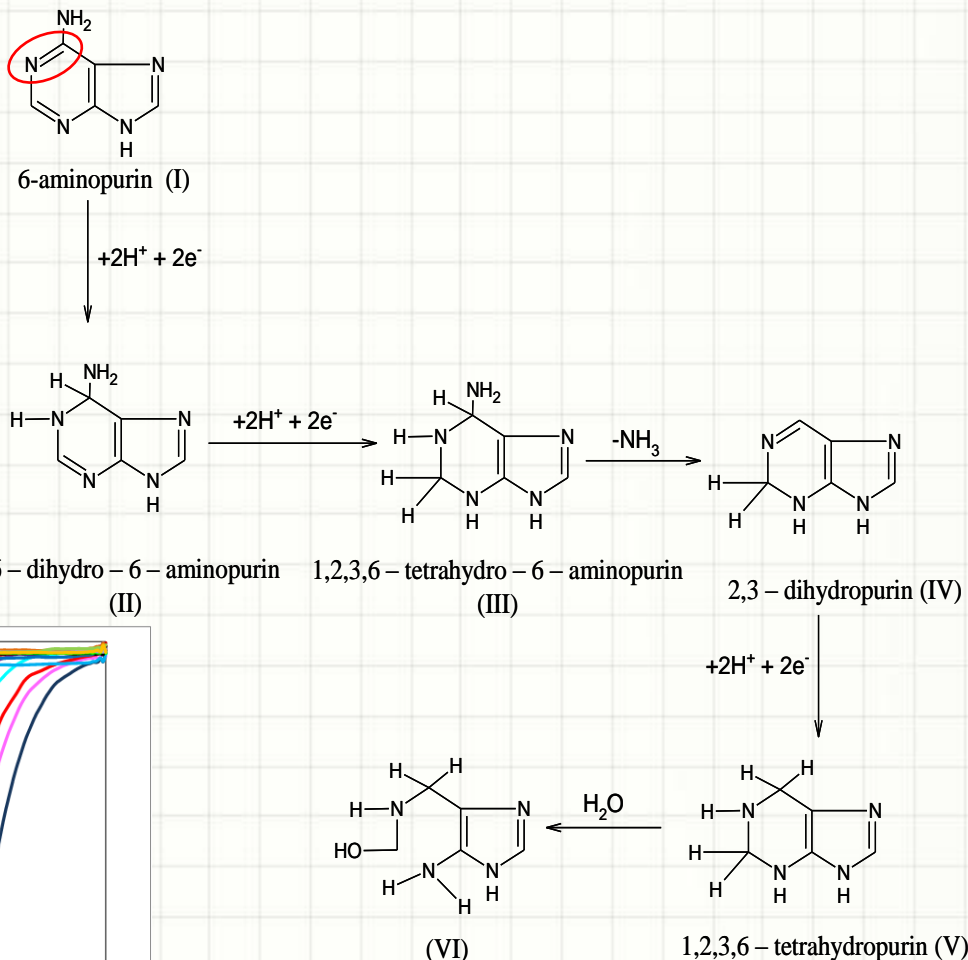
Elektrochemická redukce adeninu

- **Smith a Elving (1962)**

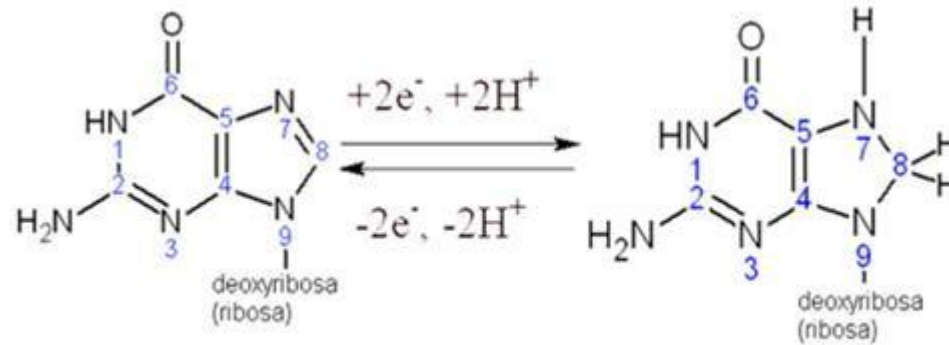
- 6 e⁻ redukční proces je doprovázen deaminačním procesem (př. coulometrie)

- Polarografická redukce je ukončena v bodě III (tvorba 1,2,3,6-tetrahydro-6-aminopurinu)

- Problém redukce adeninu při pH > 6

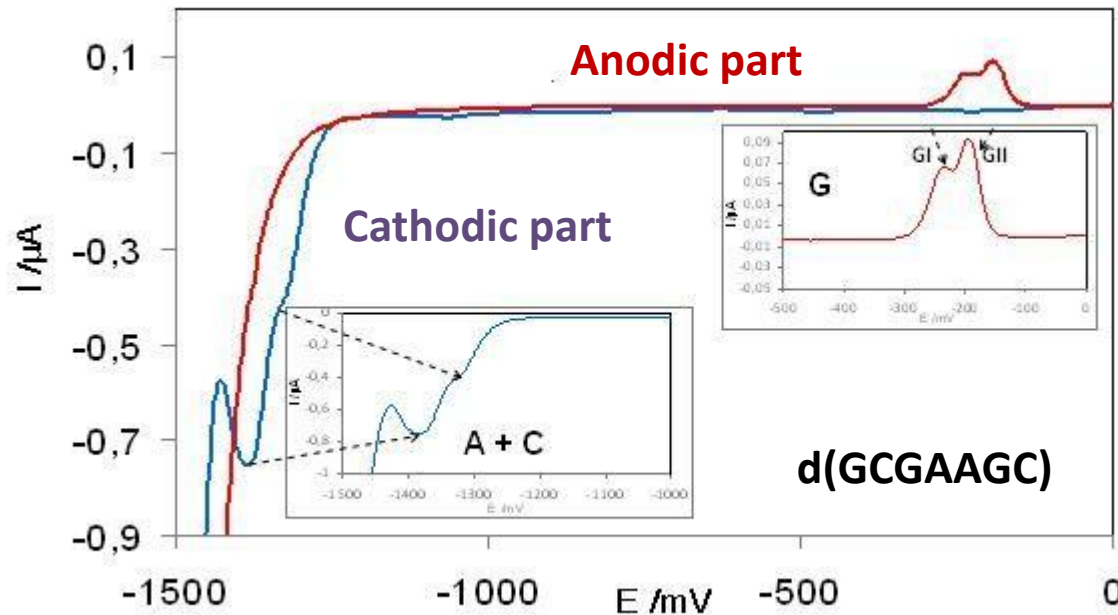


Elektrochemická redukce guaninu



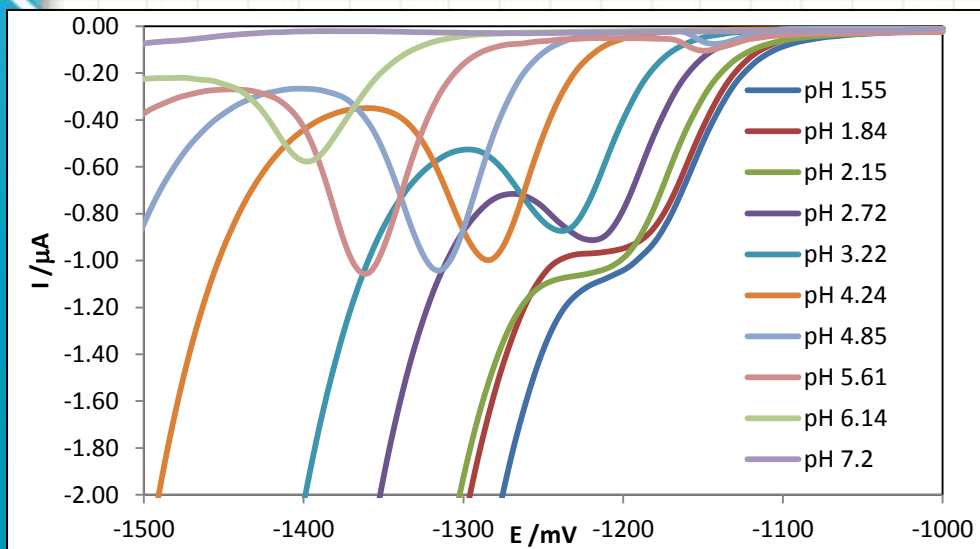
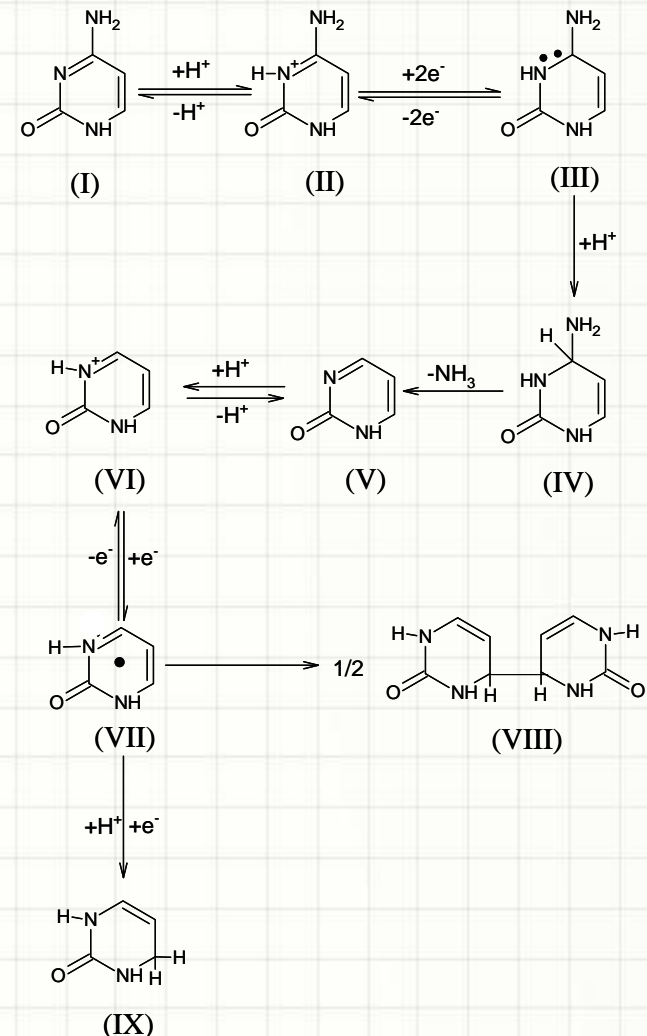
guanine

7, 8 - dihydroguanine



Elektrochemická redukce cytosinu

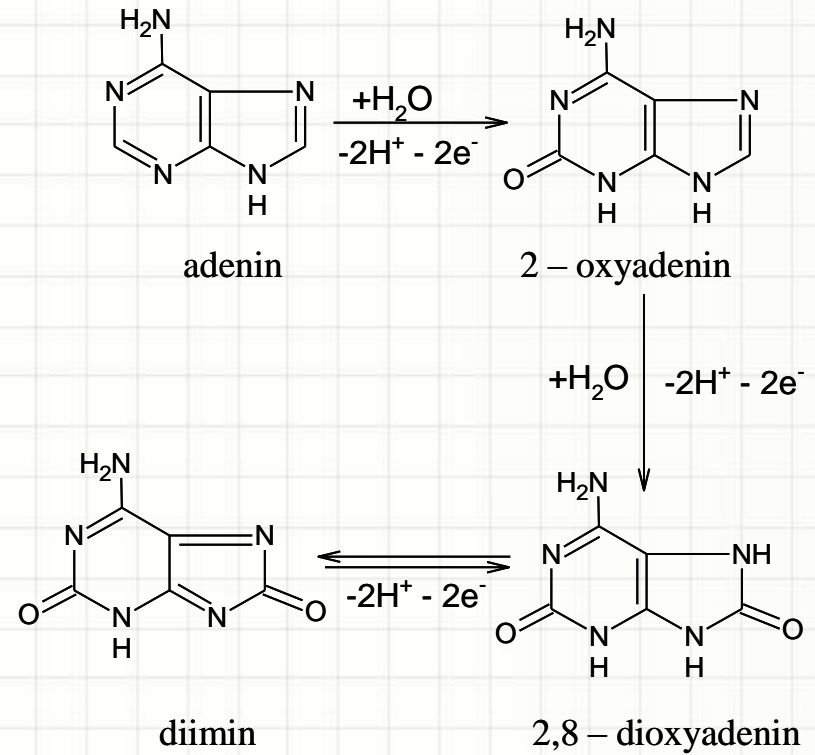
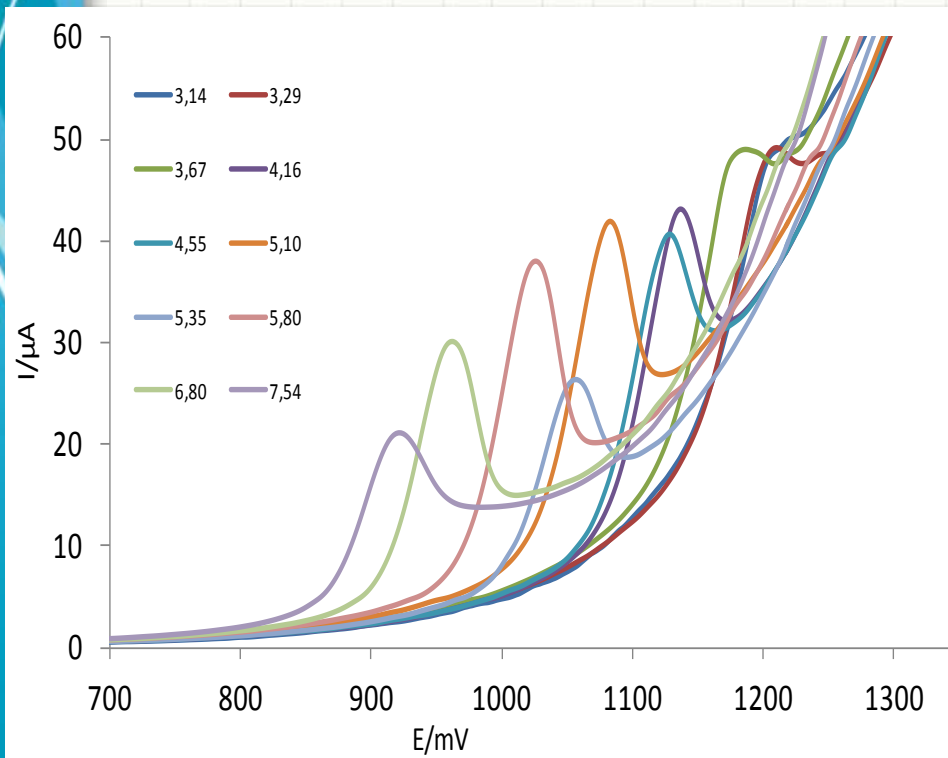
- Elving (1972)
- Redukce je započatá rychlou protonizací cytosinu (I) v N-3 poloze na elektroaktivní formu (II). Dvouelektronová redukce N-3=C-4 následuje a tvoří se karbanion (III)
- Redukce v polarografii a voltametii je ukončena tvorbou 4-amino-3,4-dihydrogenpyrimidine-2-on (IV)
- Jiné meziproducty lze získat s využitím elektrolýzy nebo coulometrie



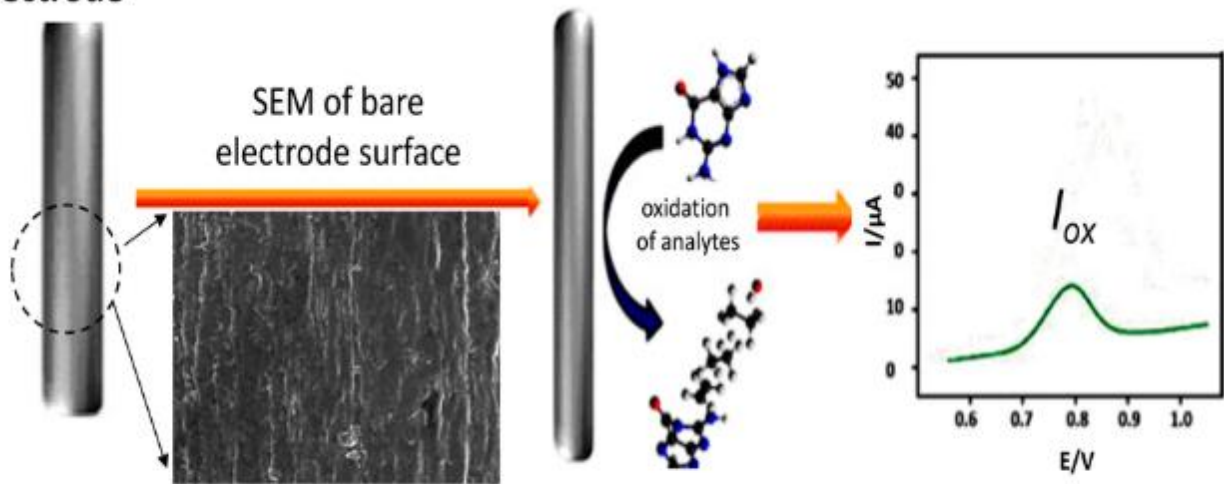
Elektrochemická oxidace adeninu

•Dryhurst, Compton

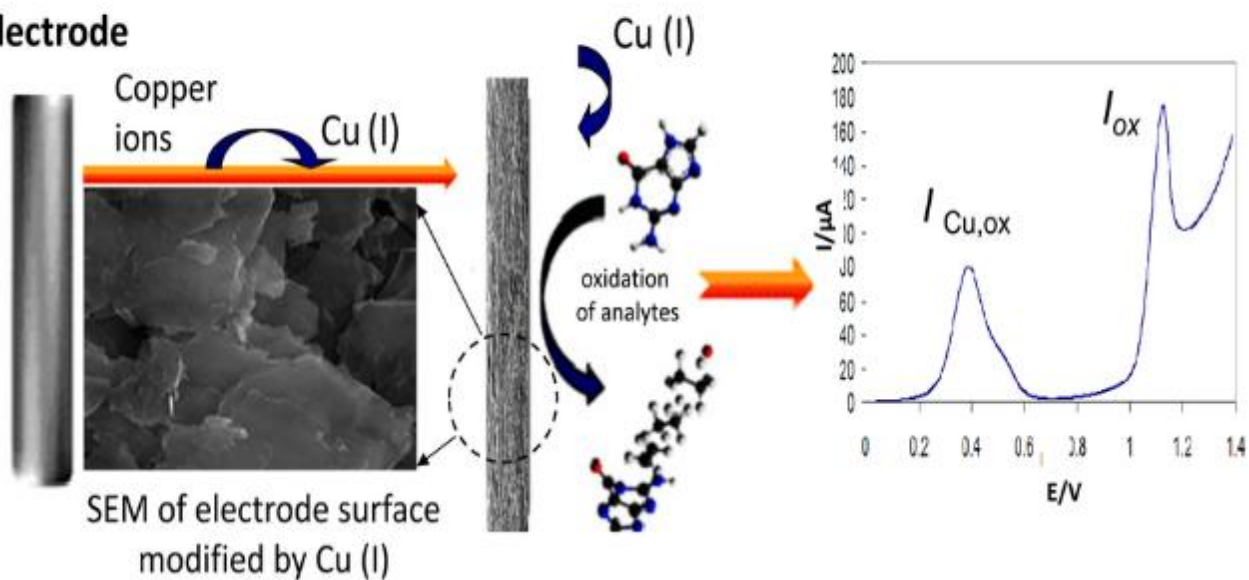
• $6e^-$ and $6H^+$ elektrodový proces



Bare electrode



Bare electrode



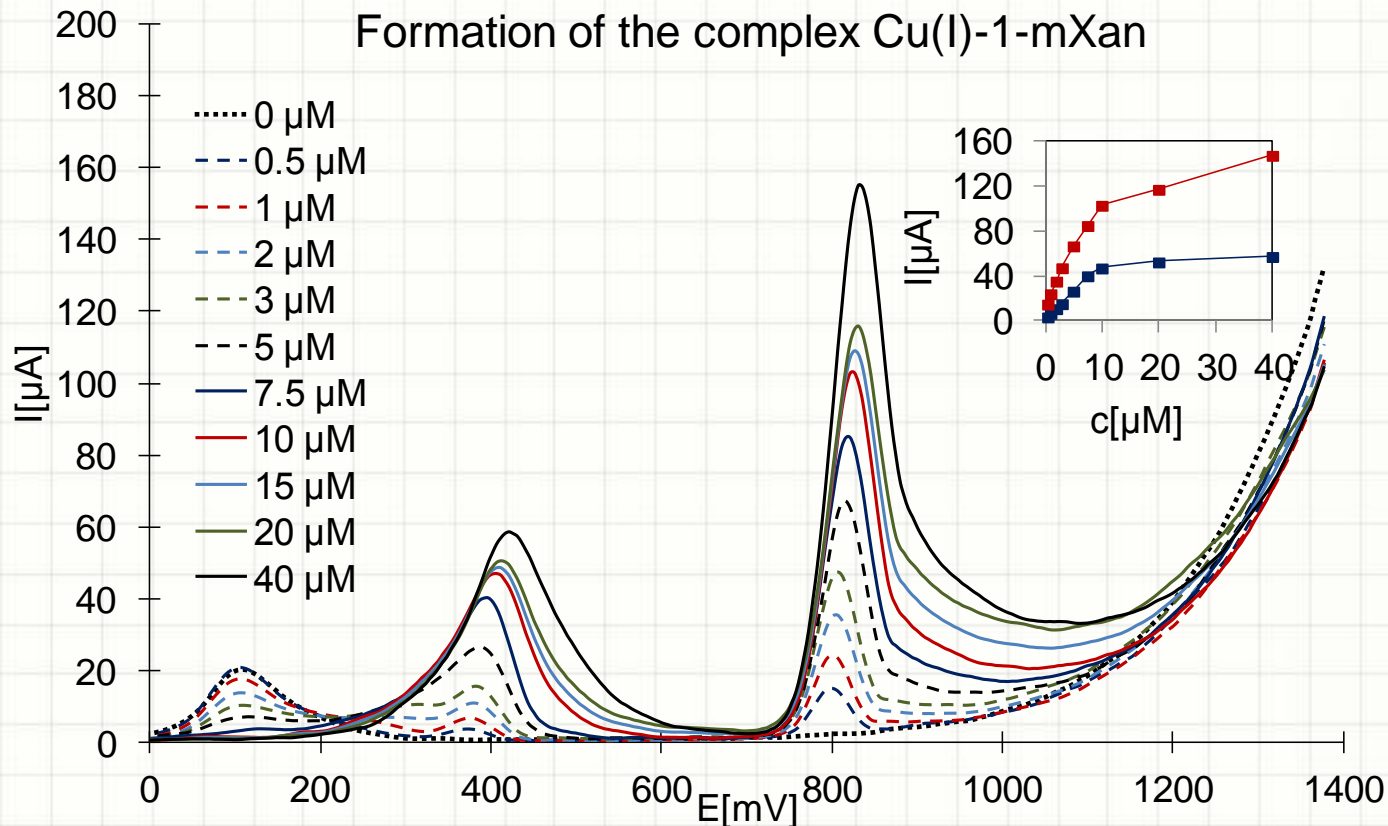


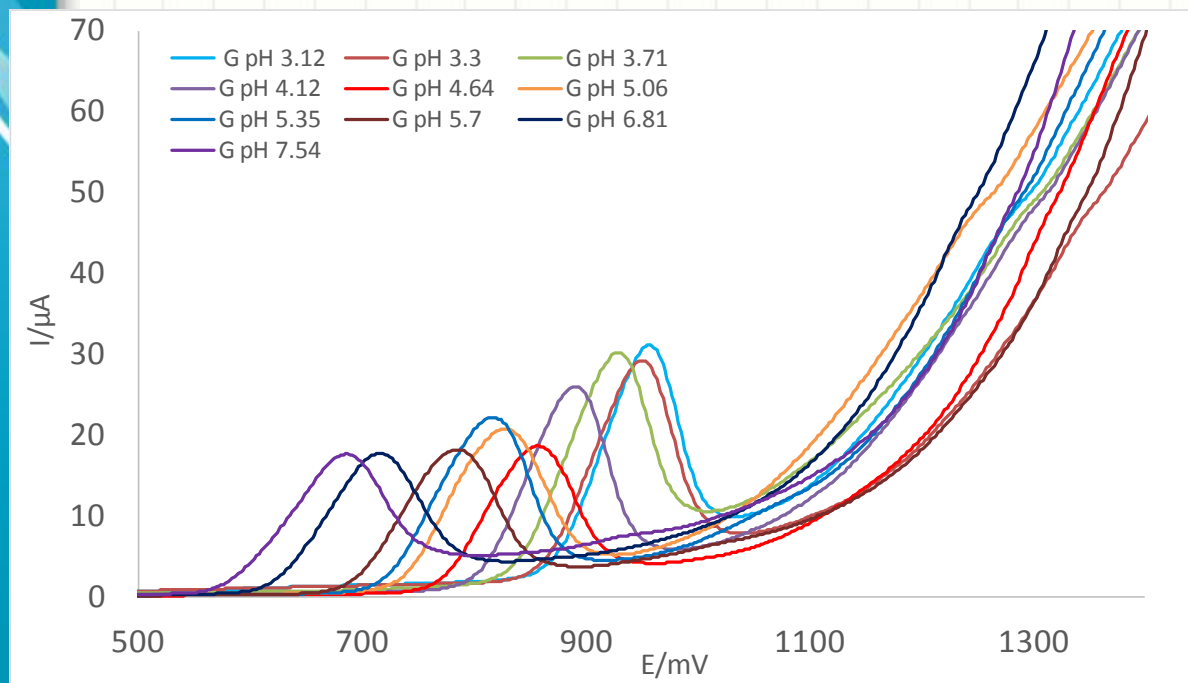
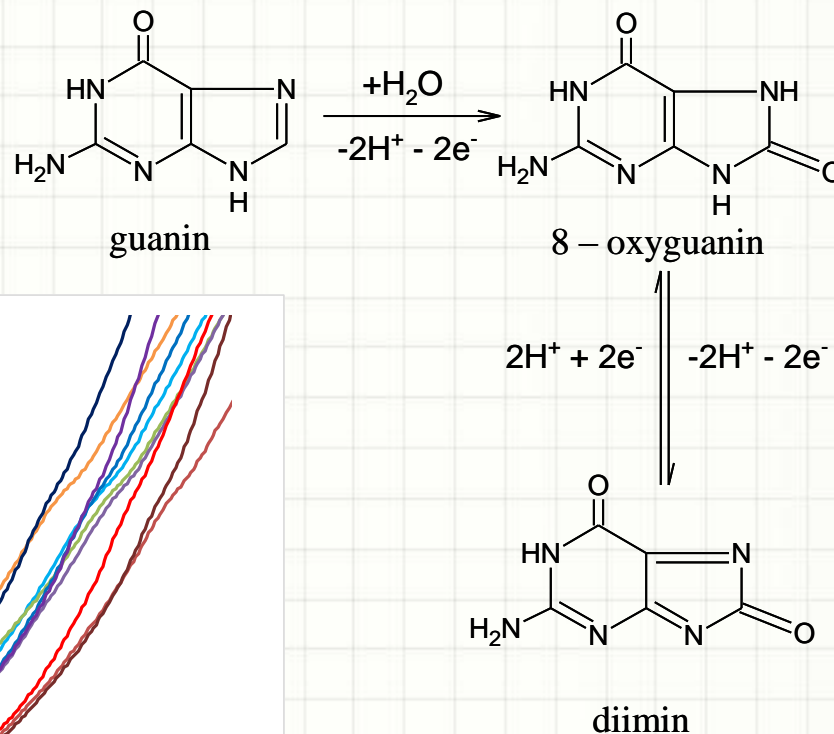
Figure 6: Concentration dependence of 1-mXan in the solution with constant concentration of Cu(II) ions, $c_{Cu} = 20 \mu M$, reference scan rate 400 mV/s; phosphate-acetate buffer pH 5.1


The complex formation and its oxidation can be described by the following scheme:

1. $Cu(II) + e^- \rightarrow Cu(I)$ (at a deposition potential of 0.15 V)
2. $Cu(I) + \text{purine} \rightarrow [Cu(I)\text{-purine}]$ (in the reaction layer on PeGE surface)
3. $[Cu(I)\text{-purine}] \rightarrow [Cu(I)\text{-purine}]_{ads}$ (adsorption of the complex)
4. $[Cu(I)\text{-purine}]_{ads} - e^- \rightarrow [Cu(II)\text{-purine}]_{ads}$ (oxidative stripping, peak Ox_{Com})
5. $[Cu(II)\text{-purine}]_{ads} - e^- \rightarrow \text{purine}_{ox} + Cu(II)$ (oxidative stripping, peak Ox)

Elektrochemická oxidace guaninu

- Dryhurst
- $4e^-$ a $4H^+$ elektrodový proces

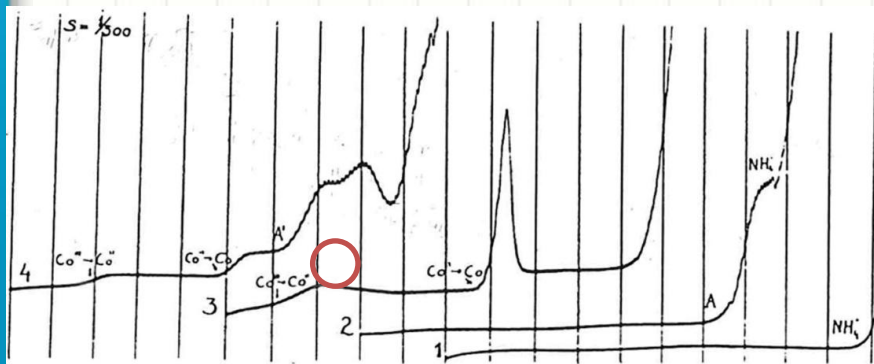




Proteiny

Proteiny jsou elektroaktivní

- První biomakromolekuly studované pomocí elektrochemických metod
- **Herles a Vančura** – polarografická studie lidských tělních tekutin (krevní sérum, moč). „**Prenatriová vlna**“ – Katodická vlna vyskytující se při potenciálu pozitivnějším (300 mV) než je potenciál redukce sodných iontů. Předběžně je tato vlna přiřazována proteinům
- **Heyrovský a Babička** – albumin v přítomnosti amonných iontů tvoří v dc polarografii tzv. „prenatriovou vlnu“ (**H peak**), způsobenou katalytickým vylučováním vodíku
- „Prenatriová vlna“ není vhodná pro analytické účely

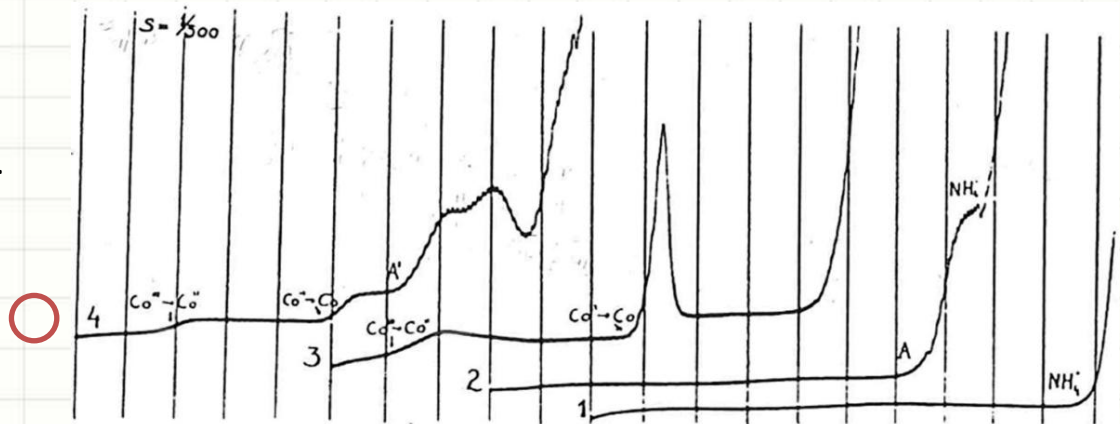


Polarographic catalytic waves of human serum. (2) the “presodium” catalytic wave in 0.1 M ammonia/ammonium chloride

Brdičkova katalytická reakce (BCR)

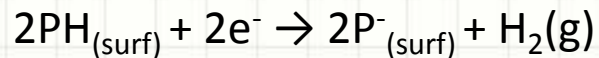
- **1933 – Brdičkova katalytická reakce** – polarografická dvojná proteinů obsahujících Cys zbytky v pufovaných roztocích kobaltu (Brdičkova soluce – amonný pufr $\text{NH}_4\text{OH} + \text{NH}_4\text{Cl}$ a komplex kobaltu $[\text{Co}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$)
- Původně navržena pro detekci látek bohatých na síru, jako jsou organické látky (2- mercaptopropionic acid, 2-diethylaminoethanethiol hydrochloridum), aminokyseliny (cystein, cystin) a bílkoviny (albumin)
- Aplikace Brdičkovy katalytické reakce v klinické medicíně a farmakologii (diagnostika rakoviny)
- Mechanismus elektrodového procesu Brdičkovy reakce není detailně znám, ale předpokládá se, že komplex $\text{Co}(\text{II})$ s $-\text{NH}_2$ and $-\text{SH}$ skupinami hraje klíčovou roli

Polarographic catalytic waves of human serum.
(4) the catalytic double-wave in Brdička solution



Co je katalytické vylučování vodíku (CHER)?

- Elektrochemický jev způsobený katalyzátorem, v jehož přítomnosti se vodík vyvíjí na katodě polarizované do méně negativních potenciálů, než v nepřítomnosti katalyzátoru
- Vyvíjení vodíku je produkováno katodickým katalytickým proudem
- Intenzita proudu závisí na koncentraci katalyzátoru a na jeho kinetické katalytické účinnosti



PH a P⁻: protonizovaná/deprotonizovaná forma AMK zbytků v molekule proteinu
BH je kyselá složka pufru; B⁻ je její konjugovaná báze

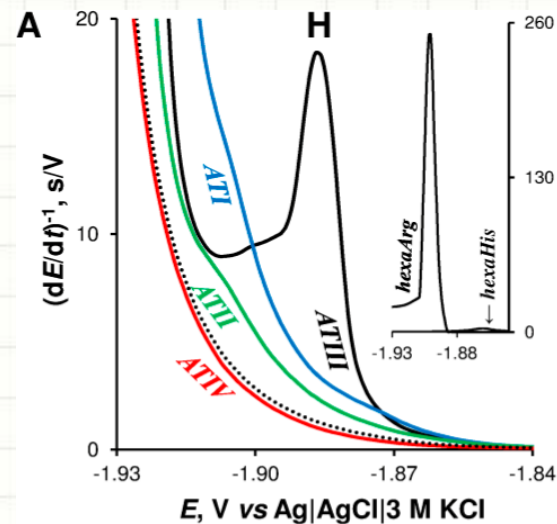
- Reakce naznačují, že katalyzátorem je protein ukotvený na povrchu elektrody
- Cys, Lys, Arg a His zbytky v molekule proteinu jsou schopny katalyzovat vylučování vodíku na Hg elektrodě

H pík

- **V posledních letech** – tzv. „prenatriová vlna“ (J. Heyrovský) v kombinaci s CPSA (chronopotenciometrická stripping analýza) na stacionární a chemicky modifikované Hg elektrodě (zahrnuty amalgámové elektrody) – vhodný nástroj pro analýzu proteinů
- Katalytický signál - **H pík** (objevený díky CHER; pojmenovaný podle J. Heyrovského) – je citlivý na strukturní a konformační změny proteinů
- **H pík** (pro proteiny) využitý pro sledování denaturace, agregace, interakce s nízkomolekulárními ligandy DNA; strukturní změny jako výsledek mutace a redoxního stavu

CPSA – chronopotenciometrická stripping analýza

$$\frac{dE}{dt} = f(E)$$

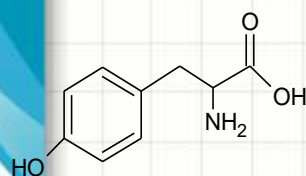


B

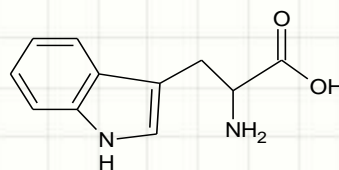
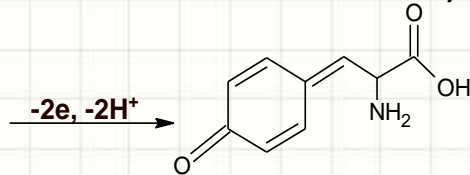
	Asp	Arg	Val	Tyr	Ile	His	Pro	Phe	His	Leu
AT I	D	R	V	Y	I	H	P	F	H	L
AT II	D	R	V	Y	I	H	P	F		
AT III		R	V	Y	I	H	P	F		
AT IV			V	Y	I	H	P	F		

Elektrochemická oxidace proteinů

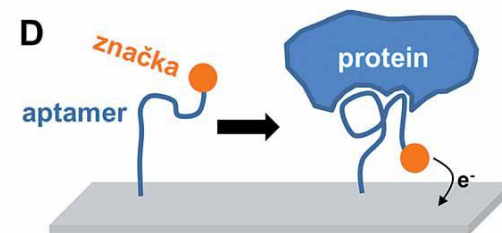
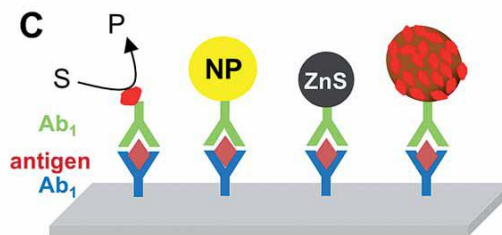
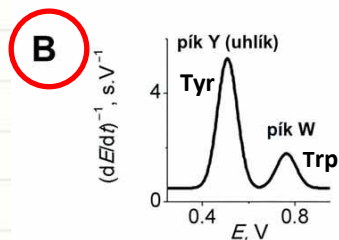
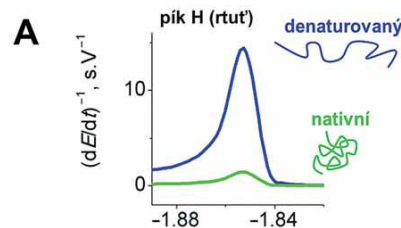
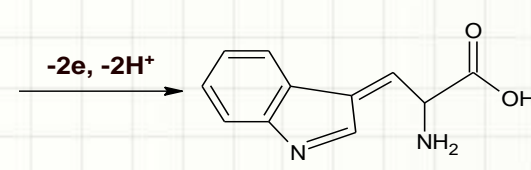
- Volné AMK (Cys, His, Met, Tyr a Trp) se oxidují na uhlíkových elektrodách
- Proteiny jsou oxidovány na uhlíkových elektrodách (CPSA)
- Tyr a Trp zbytky v molekule proteinu poskytují oxidační signál na uhlíkových elektrodách → studium DNA-protein interakce, rozlišení fosforylované a nefosforylované formy, membránové Na/K pumpy, stanovení inzulinu a α -synukleinu (důležité pro Parkinsonovu chorobu)



Tyrosin



Tryptofan

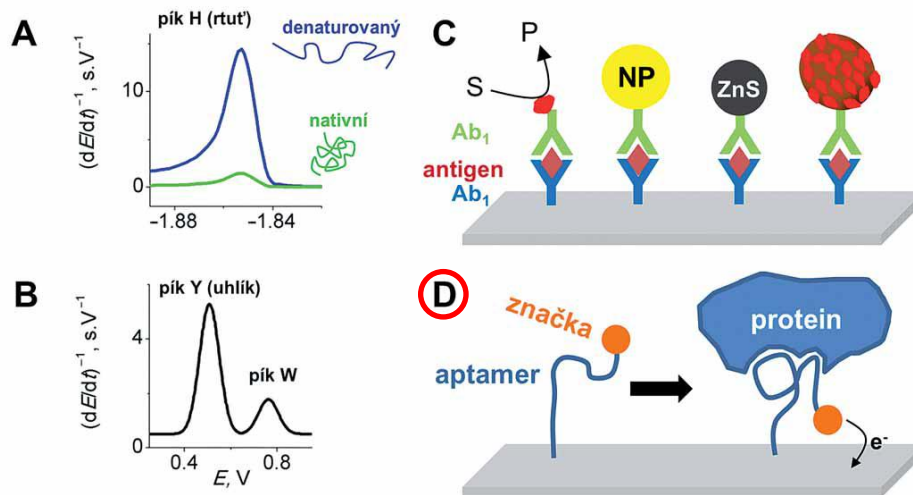
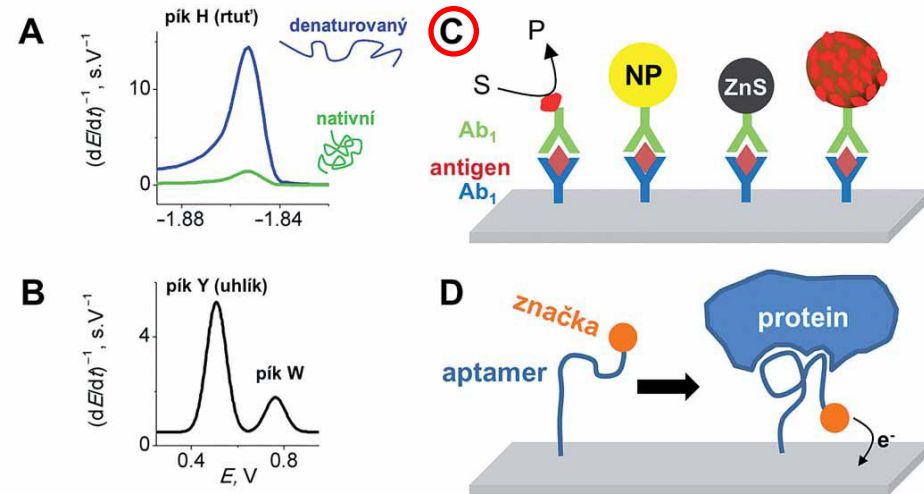


Proteiny jsou elektroaktivní

- Externí značení proteinů (citlivá detekce specifických proteinů ve směsi jiných molekul)
 - ✓ Immunoassays (ELISA)
- Nanotechnologie – nanočástice, nanotrubičky

Bartošík M., Paleček E., Vojtěšek B.: *Klin Onkol*, 2014, 27 (Suppl 1), S53-S60

• Aptamery



Bartošík M., Paleček E., Vojtěšek B.: *Klin Onkol*, 2014, 27 (Suppl 1), S53-S60