

BIOELEKTROCHEMIE



Univerzita Palackého
v Olomouci



Jan Vacek | Veronika Ostatná

BIOELEKTROCHEMIE

Jan Vacek | Veronika Ostatná

Oponenti:

doc. RNDr. Mgr. Miroslav Gál, Ph.D.

Fakulta chemickej a potravinárskej technológie, Slovenská technická univerzita v Bratislave (miroslav.gal@stuba.sk)

prof. RNDr. Jan Hrbáč, Ph.D.

Ústav chemie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita v Brně a Katedra analytické chemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci (jan.hrbac@upol.cz)

prof. Dr. Ing. Tomáš Navrátil, Ph.D.

Ústav fyzikální chemie J. Heyrovského AV ČR, Praha, a Ústav lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky, 1. lékařská fakulta, Univerzita Karlova, Praha (tomas.navratil@jh-inst.cas.cz)

© Jan Vacek, Veronika Ostatná, 2020

© Univerzita Palackého v Olomouci, 2020

Neoprávněné užití tohoto díla je porušením autorských práv a může zakládat občanskoprávní, správněprávní, popř. trestněprávní odpovědnost.

ISBN 978-80-244-5763-5 (tisk)

ISBN 978-80-244-5764-2 (online: PDF)

VUP 2020-0176 (tisk)

VUP 2020-0177 (online: PDF)

doi: 10.5507/lf.20.24457635

*Věnováno památce
profesora Emila Palečka
(1930–2018)*

*To, co pozorujeme, není příroda sama,
ale příroda vystavená našim metodám,
jimiž ji posuzujeme.*

W. K. Heisenberg

*Nikdo přesně neví, co vlastně elektrický náboj je,
ví se jen, že se vyskytuje ve dvou formách: jako záporný a kladný.
Obyčejná hmota, která se skládá z atomů,
nemá žádný úhrnný elektrický náboj.*

M. Chown

Obsah

Seznam zkratk	9
Předmluva a poděkování	12
I. OBECNÁ ČÁST	15
1 UVEDENÍ DO PROBLEMATIKY	16
1.1 Ohmův zákon a základní veličiny	19
1.2 Pracovní elektrody a elektrodové uspořádání	21
1.2.1 Elektrody využívané v bioelektrochemii	22
1.2.2 Tištěné elektrody	26
1.2.3 Vnitřně strukturované a flexibilní elektrodové materiály	28
1.2.4 Chemie elektrodových povrchů	29
1.3 Elektrolyty a stabilita vzorku	33
2 ELEKTROCHEMICKÉ METODY	36
2.1 Cyklická voltametrie	36
2.2 Pulzní voltametrické techniky	39
2.3 Galvanostatické techniky	40
2.4 Adsorpce, AC voltametrie a impedanční metody	41
2.5 Zpět k polarografii	44
3 INTERAKCE BIOMOLEKUL S POVRCHY ELEKTROD	46
3.1 Akumulační (adsorpční) metoda	50
II. ELEKTROANALÝZA BIOMOLEKUL	53
4 ELEKTROCHEMIE NÍZKOMOLEKULÁRNÍCH LÁTEK A IONTŮ	54
4.1 Elementární a speciální analýza	57
5 ELEKTROCHEMICKÁ ANALÝZA BIOPOLYMERŮ	59
5.1 Nukleové kyseliny	60
5.1.1 Magnetoseparační techniky a imobilizace DNA	63

5.2	Proteiny	65
5.2.1	Membránové proteiny	69
5.3	Peptidy	70
5.4	Sacharidy a glykoproteiny	72
6	SENZORY A ČIPY	74
6.1	Glukózové senzory	76
6.2	MIPs	78
7	MĚŘENÍ V PRŮTOKOVÝCH SYSTÉMECH	80
8	NOVÁ TECHNICKÁ ŘEŠENÍ A MINIATURIZACE	83
III.	SPECIÁLNÍ ČÁST	87
9	STRUČNĚ O SUPRAMOLEKULÁRNÍ ELEKTROCHEMII	88
9.1	Lipidy a samouspořádané (samoskladné) systémy	89
10	TRANSPORT NÍZKOMOLEKULÁRNÍCH LÁTEKA LIPIDOVÉ MEMBRÁNY. 94	
11	FOTOBIOELEKTROCHEMIE	97
12	ELEKTROCHEMILUMINISCENCE.	101
13	BIOELEKTROKATALÝZA A BIOPALIVOVÉ ČLÁNKY	104
13.1	Hybridní biopalivové články	108
14	ELEKTROCHEMIE NA ROZHRANÍ DVOU NEMÍSITELNÝCH KAPALIN . 109	
14.1	Princip měření a experimentální uspořádání.	109
14.2	Využití v biochemickém výzkumu	111
15	BIPOLÁRNÍ ELEKTRODY A JEJICH APLIKACE.	114
16	IN VIVO APLIKACE A ELEKTROCHEMICKÁ MIKROSKOPIE	117
	Souhrn a slovo závěrem.	121
	Literatura	124
IV.	DODATEK	151
	E. Paleček <i>in memoriam</i>	161
	Anotace.	163
	Annotation	164

Seznam zkratek

ACV	voltametrie se střídavou složkou napětí
AdT technika	adsorpční přenosová technika
AFM	mikroskopie atomárních sil
ATP	adenosintrifosfát
BDDE	borem dopovaná diamantová elektroda
BDE	vazebná disociační entalpie
BPE	bipolární elektrochemie
BSA	hovězí sérový albumin
CPE	uhlíková pastová elektroda
CHER	reakce katalytického vylučování vodíku
CPSA	chronopotenciometrická analýza konstantním proudem
CV	cyklická voltametrie
Cys	cystein
DART	přímá analýza v reálném čase
DC	stejnsměrný proud
DES	hluboce eutektické rozpouštědlo
DET	přímý přenos elektronů
DFT	teorie funkcionálu elektronové hustoty
DMSO	dimethylsulfoxid
DPV	diferenční pulzní voltametrie
dsDNA	dvouřetězcová kyselina deoxyribonukleová
E	potenciál, napětí
E_A	potenciál akumulace
CE	kapilární elektroforéza
EIS	elektrochemická impedanční spektroskopie
ECL	elektrochemiluminiscence
EPR	elektronová paramagnetická rezonance
ETE	energie přenosu elektronů
ET reakce	reakce založená na přenosu elektronů

EVLS	eliminační voltametrie s lineárním skenem
FRET	Försterův rezonanční přenos energie
FSCV	cyklická voltametrie s vysokou rychlostí polarizace
GCE	elektroda ze skelného uhlíku
GOx	glukózaoxidasa
GST	glutathion-S transferasa
HMDE	rtuťová kapková visící elektroda
HOMO	nejvyšší obsazený molekulový orbital
HSA	lidský sérový albumin
<i>I</i>	elektrický proud
<i>I_c</i>	kapacitní složka proudu
<i>I_f</i>	faradaická složka proudu
<i>I_k</i>	kinetická složka proudu
IČ	infračervená spektroskopie
IT reakce	reakce založená na přenosu iontů
ITO	oxid inditý a cínčitý
KABK	katalyticky aktivní biologická komponenta
ITIES	rozhraní mezi dvěma nemísitelnými elektrolyty
L	ligand
LC	kapalinová chromatografie
LUMO	nejnižší neobsazený molekulový orbital
MD	molekulová dynamika
MS	hmotnostní spektrometrie
MET	zprostředkovaný přenos elektronů
MIPs	molekulově imprintované polymery
NADPH	nikotinamidadeninukleotidfosfát (redukovaný)
NK	nukleová kyselina
<i>o</i> fáze	fáze tvořená organickým rozpouštědlem
OCF	potenciál otevřeného elektrického obvodu
PF-PEC	proteinová filmová fotoelektrochemie
PGE	pyrolytická grafitová elektroda
PNA	peptidová nukleová kyselina
PQQ	pyrrolochinolin chinon
PSI	fotosystém I
PSII	fotosystém II
Q	náboj
QCM	křemenné mikrováhy
<i>R_{ct}</i>	odpor systému vůči přenosu náboje
SAM	samoskladná (samouspořádaná) vrstva
SAE	pevná amalgámová elektroda
SECM	skenovací elektrochemická mikroskopie
SEM	skenovací elektronová mikroskopie

SPE	sítotisková elektroda
ssDNA	jednořetězcová kyselina deoxyribonukleová
SWV	voltametrie s vkládaným pravouhlým napětím
<i>t</i>	čas
TCEP	tris(2-karboxyethyl)fosfin
Tyr	tyrosin
Trp	tryptofan
UV-Vis	spektroskopie v ultrafialové a viditelné oblasti
XPS	rentgenová fotoelektronová spektroskopie
w fáze	vodná fáze

Předmluva a poděkování

Vážení čtenáři,

ještě před samotným uvedením této knižní publikace nám autorům dovolte stručnou historickou poznámku. Ta je zároveň symbolem úcty k učitelům a mentorům, kteří nás naší odbornou činností provázeli či provázejí. Obor bioelektrochemie v českých zemích historicky navázal na velmi dobře etablované obory výzkumu organických sloučenin. Elektrochemické metody se staly integrální součástí nejenom biofyzikálního, ale také biochemického a molekulárně biologického výzkumu. Česká, resp. československá tradice vycházející ze školy laureáta Nobelovy ceny akademika J. Heyrovského byla dále rozvíjena jeho žáky, kteří mj. cílili na rozbor oxidačně-redukčních přeměn nízkomolekulárních látek s přesahem do analýzy léčiv a experimentální medicíny. Současně objevy prof. E. Palečka, jeho kolegů (zde připomínáme jméno prof. V. Vetterla) a žáků představují fundamentální základ pro elektrochemii biopolymerů, a to nejenom na tuzemském, ale taktéž na mezinárodním výzkumném poli. Uvedený přehled jmen je pouze skromným dokladem toho, že elektrochemická výzkumná práce představuje tradici, na kterou dnes navazuje celá řada českých i slovenských výzkumných skupin.

V kontextu uvedeného je pro nás potěšením představit odborníkům a studentům tuto publikaci. Je vůbec jediným textem v českém jazyce posledních dekád, který shrnuje poznatky z oblasti elektrochemické analýzy biologicky aktivních sloučenin, výzkumu biopolymerů a biologicky relevantních supramolekulárních celků. Kniha navazuje na nedávno uveřejněnou práci J. Vacka a kol. (*Chem. Listy* 111, 430–438, 2017)¹ a rozšiřuje ji. Inspirací pro sepsání této knihy byla také účast obou autorů na kongresech „XXIV. a XXV. International Symposium on

¹ Kniha také částečně čerpá z již dříve uveřejněných textů a navazuje na ně: J. Vacek a kol.: *Čs. Čas. Fyz.* 56, 293–304 (2006), *Klin. Biochem. Metab.* 14, 25–30 (2006) a *Chem. Listy* 105, 15–26 (2011), dále J. Vacek, N. Cibiček a kol.: *Principy a využití vybraných analytických metod v laboratorní medicíně*. Univerzita Palackého v Olomouci (2013) a J. Vacek: *Nové přístupy v elektrochemické analýze poškození, hybridizace a dalších interakcí DNA*, disertační práce (2009), Masarykova univerzita v Brně.

Bioelectrochemistry and Bioenergetics of the Bioelectrochemical Society“, které proběhly v Lyonu (2017) a Limericku (2019). Rámcově jsou všechny oblasti zájmu diskutované na těchto kongresech zmíněny v knize, často včetně kritické diskuse nad jednotlivými tématy. Text je zpracován volně, nezávisle na jiných národních a cizojazyčných učebních textech či monografiích a je rozdělen do tří na sebe navazujících částí. Užitečnou pomůckou může být také dodatek, ve kterém čtenář může najít odkazy na další odborné zdroje, popřípadě konkrétní studijní literaturu a vybrané monografie a učebnice, které autoři považují za klíčové.

Autoři doufají, že bude tento text prospěšný nejenom odborníkům, ale bude i vhodnou učební pomůckou pro pedagogy a studijním materiálem pro studenty biochemických, biofyzikálních, farmakologických a medicínských oborů. Závěrem nám dovoluňte poděkovat společnosti Metrohm ČR za finanční podporu, která významně napomohla vydání této knihy. V neposlední řadě patří veliký dík recenzentům knihy, kterými jsou M. Gál, J. Hrbáč a T. Navrátil. Jejich pečlivá práce bezesporu přispěla k vyšší kvalitě textu. Za asistenci s přípravou obrázkové dokumentace autoři děkují D. Novákovi (Lékařská fakulta Univerzity Palackého v Olomouci). Taktéž patří dík P. Vanýskovi (Vysoké učení technické v Brně), S. Hasoňovi, M. Fojtovi a M. Trefulkovi (Biofyzikální ústav Akademie věd ČR v Brně) a J. Barkovi (Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy, Praha) za kritické připomínky k vybraným kapitolám a dodatkové části publikace.

V Olomouci, červen 2020

J. Vacek a V. Ostatná

I.

OBECNÁ ČÁST

1 Uvedení do problematiky

Elektrochemické metody jsou široce využívány v základním fyzikálně-chemickém výzkumu a také v analytické chemii, dnes především v podobě čidel (senzorů) a v miniaturizované laboratorní technice pracující jak ve stacionárním, tak i průtočném režimu. Metodami se měří elektrické veličiny ([kap. 1.1](#)) ve vztahu k chemickým vlastnostem analyzovaného vzorku. Na rozdíl od mnoha analytických metod zkoumajících analyt v homogenních roztocích probíhají elektrochemické procesy na (heterogenním) rozhraní elektroda|roztok. Od druhé poloviny 20. století byly elektrochemické přístupy aplikovány v plné šíři též v biochemickém a biofyzikálním výzkumu, což vedlo ke vzniku nové samostatné disciplíny „bioelektrochemie“ a v roce 1979 vyústilo v založení mezinárodní odborné společnosti „Bioelectrochemical Society“. Jejím zakladatelem byl G. Milazzo, H. Berg a další.

Biologicky aktivní substance jsou v drtivé většině elektrochemicky nebo povrchově aktivní a je možné je studovat pomocí „rovnovážných“ nebo „dynamických“ elektrochemických metod. Rovnovážné metody studují látky za rovnovážných podmínek, řadíme mezi ně potenciometrické metody. Naopak pomocí dynamických metod se látky zkoumají za podmínek vzdálených od podmínek rovnováhy, a to buď při konstantním potenciálu (potenciostatické metody), nebo při konstantním proudu (galvanostatické metody). Oba typy měření vyžadují nejméně dvě elektrody a vodivý roztok (elektrolyt) obsahující zkoumanou látku, tzv. depolarizátor (analyt). Elektroda, na jejímž povrchu podléhá cílový analyt elektrochemické reakci, se nazývá pracovní (nebo také indikační) elektroda, angl. working electrode (více v [kapitole 1.2](#)). Druhá elektroda, označovaná jako referentní elektroda (angl. reference electrode), udržuje konstantní potenciál, se kterým se porovnává potenciál pracovní elektrody. U většiny experimentů se dnes používá tříelektrodový systém. Třetí elektroda, nazývaná pomocná elektroda nebo protielektroda (angl. auxiliary nebo counter electrode), je vyrobena z dobře vodivého materiálu (např. platina, grafit). Elektrický proud protéká v tříelektrodovém zapojení mezi pracovní a pomocnou elektrodou. Schéma základní tříelektrodové elektrochemické cely je ukázáno na [obrázku 1](#).