LABORATORNÍ PŘÍSTROJE A POSTUPY

VOLTAMETRICKÉ CHOVÁNÍ A STANOVENÍ NĚKTERÝCH CYTOKININŮ NA RTUŤOVÉ ELEKTRODĚ

RENATA HUŠKOVÁ[a], DANUŠE PĚCHOVÁ[b], MILAN KOTOUČEk[a], KAREL LEMR[a] a KAREL DOLEŽAL[b]

[a]Katedra analytické chemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého, Třída Svobody 8, 771 46 Olomouc, [b]Laboratoř růstových regulátorů, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého a Ústav experimentální botaniky, Akademie věd České republiky, Šlechtitelů 11, 783 71 Olomouc, e-mail: huskova @prfnw.upol.cz

Došlo dne 23.III.2000

Klíčová slova: voltametrie, polarografie, kinetin, N^6-benzylaminopurin

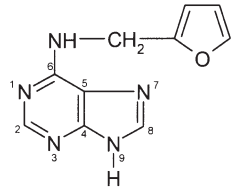
Úvod

Cytokininy tvoří jednu z pěti skupin rostlinných hormonů (fytohormonů), jejichž charakteristickou vlastností je schopnost napomáhat dělení buněk a stimulovat metabolismus rostlin, zejména syntézu RNA a proteinů. Z praktických aplikací cytokininů (spolu s auxiny) je nejvýznamnější jejich využití v rostlinných biotechnologiích jako složek kultivačních médií při množení zemědělsky strategických a okrasných rostlin a dále při regeneraci rostlin *in vitro*. Cytokininy se také používají ke stimulaci větvení okrasných rostlin a v kombinaci s gibereliny ke tvarování plodů některých odrůd jabloní. Exogenní aplikace cytokininů u obilovin v době kvetení vyvolává zvýšení počtu zrn v klasech.

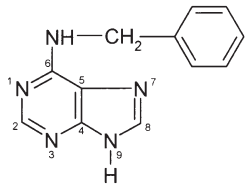
Některé deriváty cytokininů vykazují specifický inhibiční účinek na růst určitých savčích tumorů[1-3]. Uměle připravené deriváty přírodních cytokininů byly v posledních deseti letech studovány pro jejich schopnost inhibovat buněčné dělení prostřednictvím specifické interakce s nedávno objevenými základními regulátory buněčného cyklu tzv. cyklin-dependentními kinasami[4] (CDK). Klinická onkologie spojuje své naděje právě s vývojem nových preparátů, jakými jsou umělé inhibitory CDK potenciálně použitelné jako cytostatika.

Ke stanovení fytohormonů se používají biotesty založené na zjištění růstové nebo metabolické odezvy na daný hormon. Mnohem častěji se však využívá chromatografických a imunochemických technik. Ke stanovení a identifikaci lze využít i méně používané, avšak snadno dostupné a rychlé voltametrické techniky. Elektrochemické chování těchto látek na rtuťové elektrodě může do jisté míry osvětlit dílčí kroky složitého metabolického procesu cytokininů a jejich působení v rostlinách. Zatímco elektrochemické chování adeninu (6-aminopurinu) a jeho některých derivátů již bylo zkoumáno[5-8], skupině biologicky důležitých cytokininů byla věnována doposud malá pozornost[9].

V této práci je tedy s využitím klasické dc-polarografie, diferenčně pulzní voltametrie s rychlým nárůstem potenciálu (FSDPV), potenciostatické coulometrie a adsorptivní stripping voltametrie (AdSV) sledováno chování dvou zástupců aromatických cytokininů: N^6-(furfurylamino)purinu (kinetinu) a N^6-(benzylamino)purin (BAP). Cílem bylo získat další poznatky o mechanismu redukce uvedených cytokininů na rtuťové elektrodě a vypracovat postup pro stanovení v modelových vzorcích a v médiích pro kultivaci rostlin.



kinetin



N^6-(benzylamino)purin

Experimentální část

Kinetin a BAP jako standardní látky byly získány jednak od firmy Fluka Chemie AG, jednak z Laboratoře růstových regulátorů (Ústav experimentální botaniky AV ČR, Olomouc). Zásobní roztoky byly připraveny o koncentraci 1.10^{-3} mol.l^{-1} v methanolu p.a. (Lachema, Neratovice). Roztoky nižších koncentrací byly získány ředěním zásobních roztoků methanolem.

Klasická dc-polarografie byla prováděna na polarografu OH 102 (Radelkis, Budapest) v tříelektrodovém zapojení. Pracovní elektrodou byla rtuťová kapková elektroda s parametry: t = 3,6 s, m = 1,98 mg.s^{-1} při výšce rezervoáru 90 cm. Nasycená kalomelová elektroda (SCE) tvořila elektrodu referenční, pomocnou elektroda platinová (obě Radelkis, Budapest).Technika diferenčně pulzní voltametrie s rychlým nárůstem potenciálu (FSDPV) byla prováděna na polarografickém analyzátoru PA-4 v kombinaci se zapisovačem XY 4106 a statickou rtuťovou elektrodou SMDE (vše Laboratorní přístroje, Praha) s dobou nárůstu kapky 160 ms. Měření křivek cyklické voltametrie, adsorpční stripping voltametrie a stanovení kinetinu metodou FSDPV bylo prováděno na přístroji Eko-Tribo-Polarograf se rtuťovou tužkovou minielektrodou (Polaro-Sensors, Praha), referentní argentchloridovou a pomocnou platinovou elektrodou. Elektrokapilární křivky byly měřeny na analyzátoru PA-4 v tříelektrodovém zapojení, přičemž pracovní elektrodu tvořila Novotného vřetenová elektroda (šířka vřetene d = 160 μm, vnitřní průměr kapiláry d =

* Tato práce získala 1. místo v soutěži o cenu firmy Merck za nejlepší studentskou vědeckou práci v oboru analytické chemie 2.2.2000 v Brně

43 μm). Coulometrická měření byla uskutečněna na analyzátoru OH 404/A (Radelkis, Budapest) s velkoplošnou rtuťovou katodou (A = 26,4 cm^2). SCE sloužila jako elektroda referentní, v anodovém prostoru odděleném fritou byla umístěna pomocná Pt-elektroda. Elektrolytem v obou prostorech byl acetátový pufr daného pH. Produkty coulometrické redukce byly identifikovány hmotnostní spektrometrií na přístroji LCQ (Finnigan Mat, San Jose, CA, USA) vybaveném ionizační technikou ESI (+ modus, teplota kapiláry 250 °C, napětí zdroje 4,5 kV, průtok dusíku 30, napětí na kapiláře 21 V). Parametry spektrometru byly laděny na roztok BAP. Roztoky standardu (2.10^{-4} mol.l^{-1}) a vzorky téže sloučeniny (1.10^{-4} mol.l^{-1}, 10 % v/v methanol, 0,02 molární acetátový pufr) po coulometrické redukci byly dávkovány přímo do ionizačního zdroje průtokem 5 μl.min^{-1}. Spektrofotometrická měření disociačních konstant byla prováděna v křemenných kyvetách měrné tloušťky 1,0 cm, při λ = 287 nm (kinetin), λ = 269 nm (BAP) na přístroji PU 8750 (Philips, Cambridge). Hodnoty pH byly měřeny na pH-metru MV 870 (Präcitronic, Dresden).

Výsledky a diskuse

Cytokininy – kinetin a BAP – podléhají na rtuťové kapkové elektrodě ireverzibilní redukci. Probíhá pouze v kyselém prostředí a je reprezentována jednou difuzní dc vlnou resp. jedním dp-píkem. S rostoucím pH se hodnoty proudů u obou sloučenin snižují a při pH ≈ 6,6 již neposkytují žádnou odezvu (obr. 1). Závislosti $E_{1/2}$ = f (pH) resp. E_p = f (pH) při hodnotě iontové síly I = 0,1 jsou tvořeny dvěma přímkovými úseky, jejichž průsečík odpovídá disociační konstantě oxidované formy (obr. 2). Tato disociační konstanta je v dobré shodě s hodnotou zjištěnou pomocí UV-spektrometrie (tabulka I).

V roztocích o pH < pK_a proud dosahuje nejvyšších hodnot a z toho vyplývá, že redukci na rtuťové elektrodě podléhá protonizovaná forma. Nasvědčují tomu i závislosti $E_{1/2}$ = f (pH) resp. E_p = f (pH). V mírně kyselé oblasti (pH > pK_a), kde elektrochemická reakce ustává, redukce vyžaduje větší energii v důsledku nezbytné prioritní protonizace molekuly, tzn. že ΔE = f (ΔpH) je větší nežli v oblasti pH < pK_a. Protonizovaná forma je stabilizována bohatou mezomerií a tautomerií (schéma 1). Rozhodnout o pravděpodobné struktuře, která podléhá na rtuťové elektrodě redukci, je obtížné. Podle Elvinga[7] je největší elektronová hustota na atomu dusíku N^1 pyrimidinového jádra a tudíž na tomto místě by měla nastat protonizace molekuly a vstup prvního elektronu při redukci.

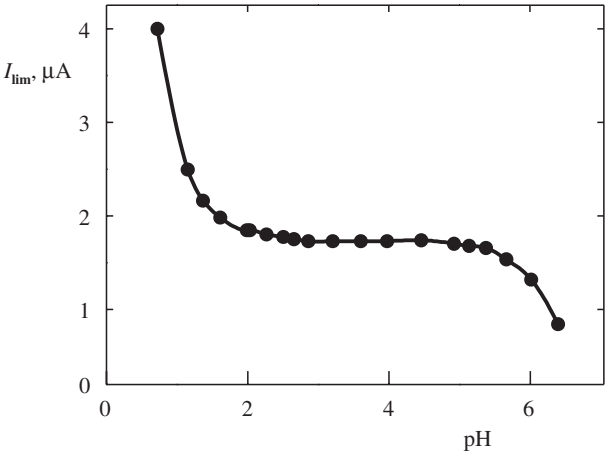
K určení počtu elektronů potřebných na redukci cytokininů byla použita jako základní metoda potenciostatická coulometrie na velkoplošné rtuťové elektrodě. Zjištěno bylo šest elektronů. Šest elektronů bylo zjištěno také srovnávací analýzou dc polarografických vln. Jako srovnávací látky byly použity benzil a *m*-nitrobenzoová kyselina. Současně byla pro srovnání zaznamenána i vlna adeninu. Vlny kinetinu, BAP a rovněž tak vlna adeninu jsou přibližně 1,5krát vyšší než čtyřelektronová vlna *m*-nitrobenzoové kyseliny (tabulka II), a tedy odpovídají šestielektronové redukci. Ve srovnání s vlnou benzilu vykazují cytokininy proud trojnásobný. Není bez zajímavosti úsudek Elvinga[7], že adenin, oproti šestielektronové coulometrické redukci, je polarograficky redukován na

Tabulka I
Hodnoty disociačních konstant pK_a

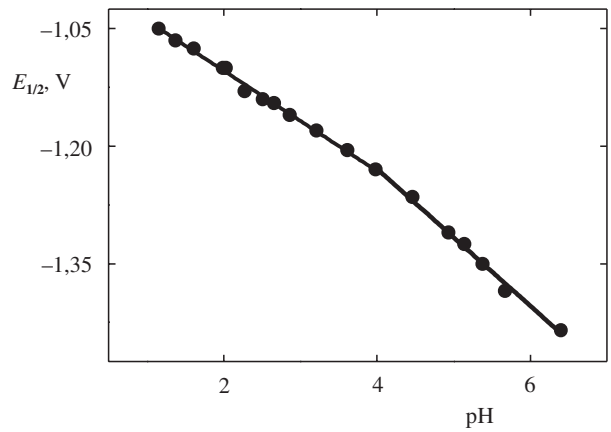
Metoda	Kinetin	BAP
dc-Polarografie	3,9	4,1
FSDPV	3,8	4,2
UV-spektroskopie	3,73	4,16

Tabulka II
Hodnoty proudů dc-vln srovnávacích analýz

1. Srovnávací analýza		2. srovnávací analýza	
Látka (5.10^{-5} mol.l^{-1})	I [μA]	látka (10^{-4} mol.l^{-1})	I [μA]
m-Nitrobenzoová k.	0,528	*m*-nitrobenzoová k.	1,152
Adenin	0,72	adenin	1,728
BAP	0,78	kinetin	1,692



Obr. 1. **Závislost limitního proudu kinetinu na pH v HCl a následně v Brittonových-Robinsonových pufrech**, c = 10^{-4} mol.l^{-1}, 10 % (v/v) methanolu, dc-polarografie



Obr. 2. **Závislost $E_{1/2}$ kinetinu na pH, I = 0,1**

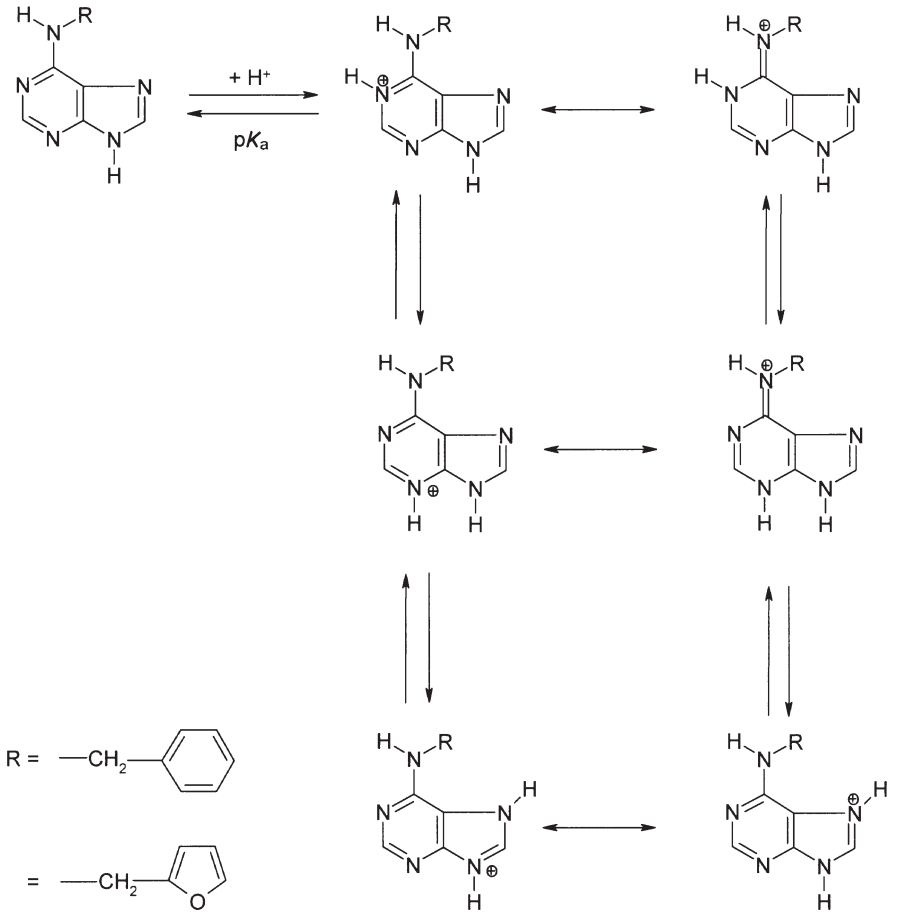


Schéma 1. **Předpokládané mezomerní a tautomerní struktury kinetinu a BAP**

rtuťové kapce pouze čtyřmi elektrony. V tomto případě by však vlna adeninu musela být srovnatelná s čtyřelektronovou vlnou *m*-nitrobenzoové kyseliny. Uvedené výsledky však ukazují, že i v případě polarografické redukce adeninu je elektrodový děj šestielektronový.

V souladu s navrženým mechanismem elektroredukce adeninu[7] lze u cytokininů předpokládat redukci dvojných vazeb N(1)=C(6) a C(2)=N(3) a odštěpení benzylaminu a furfurylaminu v poloze 6. Benzylamin (m/z = 108,1), jeho štěpné produkty a purin (m/z = 121,1) jako meziprodukt coulometrické redukce roztoku BAP byly identifikovány hmotnostní spektrometrií. Problémem zůstává, v které fázi redukce dochází k odštěpení aminoderivátu. Mohou nastat dvě varianty (schéma 2):

a) odštěpení aminoderivátu může nastat v první třetině redukce, tedy po vzniku 1,6- dihydroderivátu (*I*),

b) nebo až po další dvouelektronové redukci, tzn. po vzniku 1,2,3,6-tetrahydroderivátu (*III*).

Jako první by měla podléhat redukci dvojná vazba C(6)=N(1), neboť zde je předpokládaná protonizace, a tedy i vstup prvního elektronu. V případě varianty (*a*) vzniká po dvouelektronové redukci útvar energeticky labilní v důsledku zvýšené elektronové hustoty v oblasti vazby 1,6. Odštěpením substituentu v poloze 6 dojde ke stabilizaci molekuly a k obnově dvojné vazby C(6)=N(1) za vzniku purinu (*II*). Vzniklý purin není od elektrody odstraňován a podléhá elektrochemické přeměně. Jelikož elektrochemická reakce probíhá u potenciálu druhé vlny purinu, musí se jeho redukce uskutečnit v jediném kroku a bude čtyřelektronová. U varianty (*b*) se předpokládá odštěpení aminoderivátu až po vzniku 1,2,3,6-tetrahydroderivátu. V tomto případě by bylo možné očekávat vznik dvou vln, jako je tomu u purinu či methylpurinu[7]. Tyto vlny však nalezeny nebyly.

Sledována byla také adsorpce cytokininů na rtuťové kapkové elektrodě s cílem zvýšení citlivosti voltametrického stanovení. Elektrokapilární křivky, měřené v McIlvainově (pH 4,54) a acetátovém pufru (pH 4,4), v kyselině chlorovodíkové (0,01 mol.l^{-1}) a kyselině citronové (0,01 mol.l^{-1}) vykazují jen velmi malé rozdíly v povrchovém napětí u roztoků bez a s cytokininem. Vyplývá z toho, že adsorpce sledovaných látek na rtuťové elektrodě je malá. Tentýž výsledek poskytují i křivky cyklické voltametrie pro různé rychlosti polarizace elektrody. Závislosti log i_p = f (log v) cytokininů, kde v je rychlost polarizace elektrody v rozmezí 20–2500 mV.s^{-1}, v roztocích McIlvainových pufrů jsou sice přímkové, avšak směrnice jsou vzdáleny hodnotám odpovídajícím zlogaritmovanému vztahu

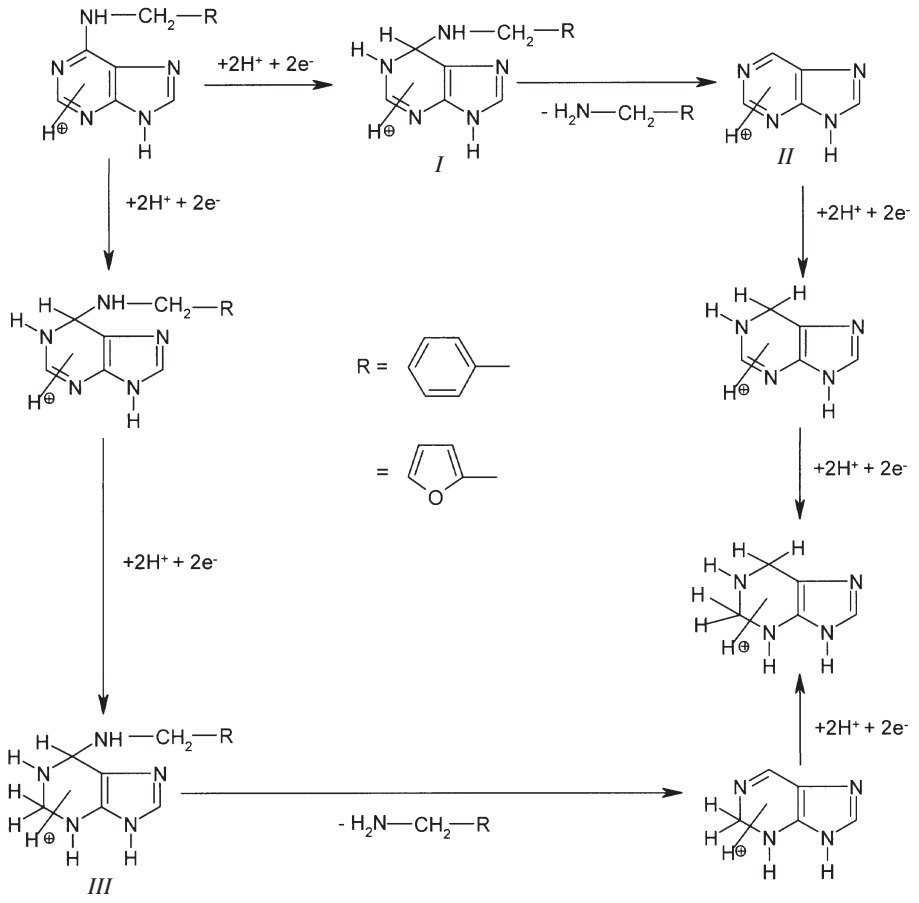


Schéma 2. **Možné varianty elektrochemické redukce kinetinu a BAP**

(*1*) pro adsorpční děj[10] při maximálním pokrytí Γ_o elektrody analytem.

$$i_p = \frac{z^2 F^2}{4RT} . vA\Gamma_o \qquad (1)$$

Tabulka III
Závislosti logaritmu proudu CV-píků na logaritmu rychlosti polarizace elektrody ($c = 10^{-4}$ mol.l^{-1}, 10 % v/v methanol, v = 20–2500 mV.s^{-1})

Látka	pH	Rovnice přímky	Podíl adsorpce [%]
Kinetin	2,6	$y = 0{,}5672x + 1{,}8735$	13,4
	4,84	$y = 0{,}6709x + 1{,}2495$	34,2
BAP	2,6	$y = 0{,}5794x + 2{,}1294$	15,9
	4,45	$y = 0{,}6574x + 1{,}8569$	31,5

Směrnice se pohybuje kolem hodnoty 0,6. Pouze v alkaličtějším prostředí, kde převažuje neprotonizovaná forma cytokininů, je adsorpce poněkud výraznější (tabulka III). Avšak z důvodů nízké proudové odezvy v mírně kyselém prostředí není adsorpce ani v tomto případě analyticky využitelná.

Pro kvantitativní analýzu tedy byla použita metoda FSDPV. Kalibrační přímky získané v různých elektrolytech jsou přímkové v široké koncentrační oblasti. Jako nejvhodnější elektrolyt byla vybrána 0,05 M-kyselina citronová (pH 2,3), kde oba cytokininy poskytují úzké, vysoké píky a nejnižší detekční limity d.l. = 2,3 ng.ml^{-1} (1,1.10^{-8} mol.l^{-1}) u kinetinu a 7,88 ng.ml^{-1} (3,5.10^{-8} mol.l^{-1}) u BAP. Kyselina citronová, jako základní elektrolyt, byla také použita ke stanovení kinetinu a BAP v modelových vzorcích a v reálných vzorcích média pro kultivaci rostlin *in vitro*. U voltametrického stanovení bylo dosaženo relativní směrodatné odchylky $s_r < 10$ %. Jelikož média obsahují různé organické a anorganické látky nezbytné pro růst a vývoj rostlin, bylo nutné vzorky médií před voltametrickým stanovením přečistit a stanovovaný analyt zakoncentrovat. K tomuto účelu byly použity chromatografické metody (iontově výměnná, gelová, adsorpční a afinitní) – schéma 3.

Závěr

Redukce kinetinu a BAP na rtuťové elektrodě probíhá

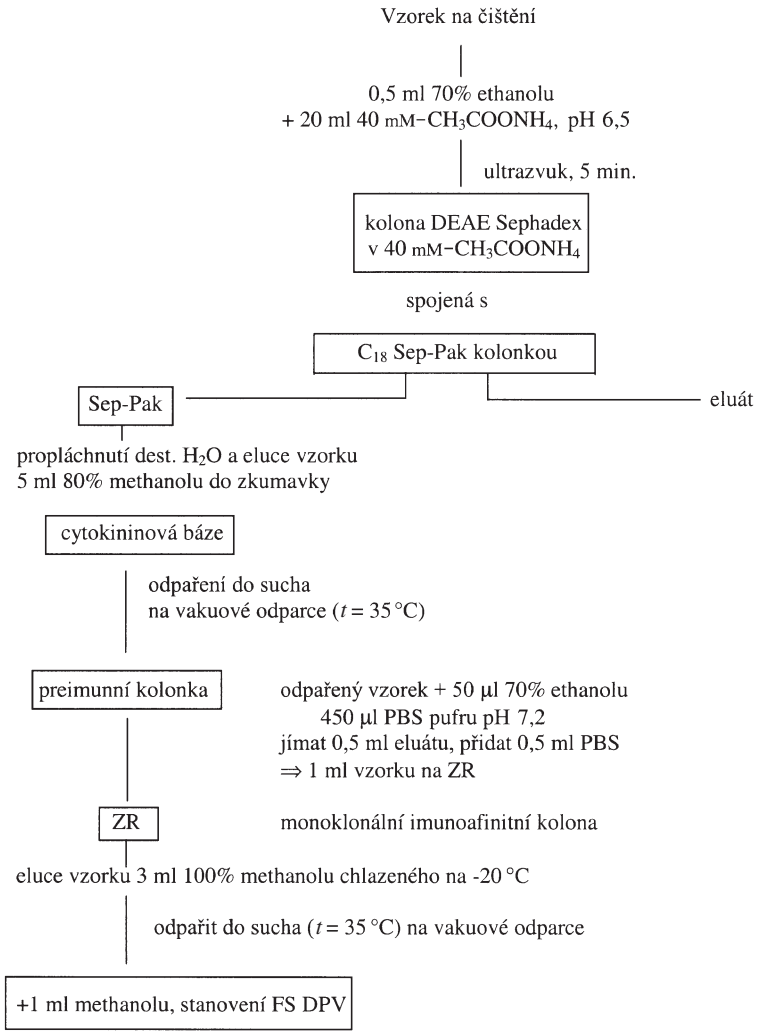


Schéma 3. **Postup čištění média a izolace cytokininu**

v kyselém prostředí, je šestielektronová a ireverzibilní. Místa redukce jsou vazby N(1)-C(6) a C(2)-N(3) pyrimidinového jádra. V důsledku odštěpení aminu z vedlejšího řetězce se obnoví jedna z původních aktivních vazeb a následuje poslední dvouelektronový krok. Na mechanismu elektrodové reakce se uplatňuje protolytická rovnováha. Redukce je reprezentována jednou difuzní dc vlnou, resp. jedním dp-píkem. Adsorpce studovaných cytokininů je na rtuťové elektrodě malá a není vhodná pro analytické využití. Kvantitativní analýza byla tedy provedena technikou FSDPV. Kinetin a BAP byly stanoveny v modelových vzorcích a také v reálných vzorcích média používaných pro kultivaci rostlin *in vitro*. Porovnáním směrodatné odchylky voltametrického stanovení fytohormonů s používanými biotesty vyplynulo, že voltametrické stanovení je přesnější (s_r < 10 % u voltametrického stanovení, $s_r \approx$ 40 % u biotestů).

Autoři děkují Grantové agentuře ČR (grant č. 203/99/1511) za finanční podporu.

LITERATURA

1. Gallo R. C., Whang-Peng J. Perry S.: Science *165*, 400 (1969).
2. Gallo R. C., Hechst S. M., Whang-Peng J., O'Happ S.: Biochim. Biophys. Acta *281*, 248 (1972).
3. Suk D., Simpson C. L., Mihick E.: Cancer Res. *30*, 1429 (1970).
4. Strnad M., Veselý J., Hajdúch M., Havlíček L., Rypka M., Kryštof V., Hanuš J., Weigl E., Lenobel R., Macháček J.: Zprav. Klin. Farmakol. Farmac. *12*, 10 (1998).
5. Smith D. L., Elving P. J.: Anal. Chem. *34*, 930 (1962).
6. Smith D. L., Elving P. J.: J. Amer. Chem. Soc. *84*, 1412 (1962).
7. Janik B., Elving P. J.: Electrochem. Soc. *116*, (8), 1087 (1969).
8. Dryhurst G., Elving P. J.: Talanta *16*, 855 (1969).
9. Smyth M. R., Kell D. B.: J. Electroanal. Chem. *122*, 363 (1981).

10. Gosser D. K., Jr.: *Cyclic Voltammetry*. VCH, New York 1993.

R. Hušková[a], D. Pěchová[b], M. Kotouček[a], and K. Lemr[a]
([a]Department of Analytical Chemistry, Faculty of Science, Palacký University, [b]Laboratory of Growth Regulators, Faculty of Science, Palacký University and Institute of Experimental Botany, Academy of Sciences of the Czech Republic, Olomouc): **Voltammetric Behaviour and Determination of Some Cytokinines on Mercury Electrode**

Electrochemical behaviour of 6-(furfurylamino)purine (kinetin) and 6-(benzylamino)purine (BAP) on a mercury electrode was studied using classic DC polarography, cyclic voltammetry and fast-scan differential pulse voltammetry (FSDPV). The six-electron reduction of the mentioned cytokinines is irreversible and proceeds only in the protonated form. The electrode process starts with four-electron reduction of the pyrimidine skeleton. As a result of elimination of the amine from the side chain, one of the electrochemically active bond is re-established and the last two-electron step follows. The dissociation constants of the oxidized forms determined using UV spectrometry are: pK_a = 3.73±0.16 (kinetin) and pK_a = 4.16±0.19 (BAP). Kinetin and BAP were determined using FSDPV in model samples as well as in real samples of the medium used for cultivation of plants *in vitro*. The analyte was concentrated by ion exchange, gel permeation, adsorption or affinity chromatography. The voltammetric determination is more precise in comparison with the used biotests.