۳۹۰
۲۰۵

* بسمه تعالی *

مرکز اطلاعات و مدارک علمی ایران
تهیه مدارک

دانشگاه مازندران
انستیتو شیمی

۳۱۱۰ /۱۵۷/ ۱۲

پایان نامه کارشناسی ارشد شیمی

تحت عنوان :

اکسیداسیون الکتروشیمیایی آدنین و گوانوزین

استاد راهنما :

آقای دکتر عباسعلی رستمی

نگارش از :

علی اکبر صبوری

بابلسر - تیرماه ۱۳۶۸

۳۹۰

اعضـــاء بررســی کننده پایان نامه کارشناسی ارشد شیمی :

۱ ــ آقای دکتر عباسعلی رستمـــــی (استادراهنمـــا)

۲ ــ آقای دکتر مسعود گروسیـــــان (استاد مشـــاور)

۳ ــ آقای دکتر محمّدرضا حاج محمّدی (استاد مشـــاور)

۴ ــ آقای دکتر فریدون میلانی نـــژاد (استادمدعـــــو)

* بسمه تعالی *

سپاس بیکران خداوندی که راهنمای اصلی انسانهاست . اوست یکتای بی همتا ، قیّوم توانا ، برهمه چیز دانا ، درهمه حال بینا ، ازعیب محقّا ، ازشریك مبّرا ، اصل هردوا وجانداروی دلهاست . اوحکیمی است ، پوشنده خطا ، درذات وصفا بی همتا وازادراك خلق جدا .

سپاس وتشکرازاستادمحترم آقای دکتر رستمی که امرراهنمایی پروژه اینجانب رابه عهده داشته وازهیچ همکاری دریغ ننموده ومتقبّل زحمات زیادی درتدوین پروژه شدند .

سپاس وتشکر ازپدربزرگوارم ، که بادرك واقعی ایمان وعلم همیشه مشعلدار راهنمایی من بوده وبرای تحصیل من همیشه کوشش نموده ومشقّات زیادی را متحمل شده است . هرآنچه که تابه امروزکسب نموده‌ام فقط بخاطر کوششهای اوبوده است . پاداش اعمالش رابه خداوندمتعال واگذارمی کنم .

سپاس وتشکر ازاساتیدمحترم آقایان دکترگروسیان ودکترحاج محمدی که ازراهنمائیهای آنهاهمواره برخوردار بوده‌ام .

وسپاس وتشکر ازهمه دوستانی که درطول مدّت انجام پروژه به من کمك کرده‌اند .

درپایان ازخانم مبورا عباسی که باتایپ زیبای خوداین نگارش رامذین نمودند تشکر می کنم .

علی اکبر مبوری

چکیده

اکسیداسیون الکتروشیمیایی آدنین توسط ولتامتری چرخه‌ای برروی الکترود گرافیت درمحیط بافرفسفات آبی باقدرت یونی $\mu=0.5$ درPHهای مختلف ودردمای معمولی مطالعه شد . در $PH < 10.6$ تنهایك پیك اکسیدی برگشت ناپذیر ، و در $PH \geq 10.6$ دوپیك اکسیدی برگشت ناپذیر مشاهده شد . پتانسیل اوّلین پیك اکسیدی تابع PH محیط وسرعت‌جاروب (Scan Rate) بوده وبرطبق یك رابطه خطی باافزایشPH محیط بافری کاهش می یابد . جریان پیك اکسیدی نیزبرطبق روابط خطی باافزایش غلظت گونه اکسیدشونده وسرعت جاروب دستگاه افزایش می یابد .

محلول فوق اشباع آدنین درمحیط فسفات بافربا $PH=7.00$ نسبت به الکترود مرجع‌نقره - کلرور-نقره برروی الکترود مشبّك گرافیت تحت پتانسیل ثابت 1.100 ولت (0.160 ولت بیشتراز پتانسیل پیك اکسیدی دراین محیط) قرارگرفت . درحین اکسیداسیون تحت پتانسیل ثابت ، درزمانهای مختلف برروی محلول ولتامتری چرخه‌ای (Cyclic Voltammetry) انجام داده ووقتی پیك اکسیدی محوشد (جریان اکسیدی به حداقل رسید) عمل اکسیداسیون خاتمه می یابد . رنگ محلول درخاتمه اکسیداسیون زردمی باشد و PH محیط ثابت می ماند . دی اکسید کربن ، آمونیاك و اوره ازجمله موادی است که دراثر اکسیداسیون آدنین به وجودمی آید . یکسری ترکیبات دیگرکه درناحیه UVدارای جذب می باشند،به وجودآمده که می تواندتوسط HPLC با حلال $99\%H_2O:01\%CH_3OH$ بادتکتور UV جداوشناسایی گردد . براساس اطلاعات بدست آمده مکانیزمی برای اکسیداسیون آدنین پیشنهادمی شود .

مطالعات ولتامتری چرخه‌ای گوانوزین نیزدرمحیط آبی با $PH=2.00$ تری فلوراسیداستیك (TFA) دردمای معمولی انجام شد ودوپیك اکسیدی درپتانسیلهای 1.125 و 1.300 ولت نسبت به الکترود مرجع‌نقره - کلروزنقره مشاهده شد . محلول فوق اشباع گوانوزین تحت پتانسیل ثابت 1.400 ولت قراردادده شد و وقتی جریان پیك اکسیدی به حداقل رسید ، اکسیداسیون متوقف شد . محلول اکسیدشده بی رنگ بوده وترکیبات حاصل می تواند توسّط حلال $98\%H_2O:1\%CH_3OH:1\%CH_3CN$ که با TFA به $PH=3.00$ رسانده شده است توسط HPLC بادتکتور UV جدا گردد .

فهرست

عنوان	صفحه
مقدمه	۱
فصل اوّل :	
آدنین ومشتقات آن درحیات سلولی	۵
۱ ـ ۱ پیورینها	۵
۱ ـ ۲ ترکیب شیمیایی آدنین	۶
۱ ـ ۳ خصوصیات فیزیکی آدنین	۶
۱ ـ ۴ آدنین درساختمان اسیدهای نوکلئیك	۷
۱ ـ ۵ آدنین درساختمان کوآنزیم ها	۱۱
۱ ـ ۶ واکنش های آدنین ومشتقات آن درحیات سلولی	۱۱
۱ ـ ۷ اکسیداسیون بیولوژیکی آدنین	۱۳
۱ ـ ۸ گوانوزین	۱۴
فصل دوّم :	۱۶
ولتامتری چرخه‌ای	۱۶
۲ ـ ۱ متغیّرهای موثرروی واکنش الکترودی	۱۸
۲ ـ ۲ ولتامتری	۱۸
۲ ـ ۳ جاروب خطی ولتاژ	۲۰
۲ ـ ۴ کاربردهای ولتامتری چرخه‌ای	۲۰
۲ ـ ۵ دستگاه	۲۶
۲ ـ ۶ انواع مکانیزم های واکنش	۲۷
۲ ـ ۷ سیستم های برگشت پذیر (نرسی)	۳۳
۲ ـ ۸ سیستم های کاملا" غیربرگشت پذیر	۳۶
۲ ـ ۹ سیستم های شبه برگشت پذیر	۴۰
۲ ـ ۱۰ سایرمکانیزم های الکترودی	

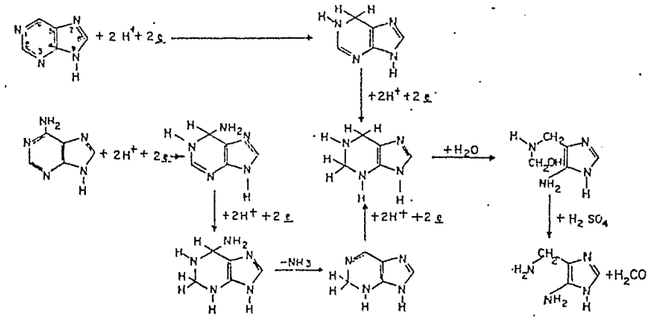
عنوان	صفحه
فصل سوّم :	
کارهای تجربی	۴۴
۱ ـ ۳ تهیه الکترودها برای ولتامتری چرخه‌ای	۴۴
۲ ـ ۳ تعیین مساحت سطح الکترودکار (PGE)	۴۵
۳ ـ ۳ اثرPH محیط روی پتانسیل اکسیداسیون آدنین با استفاده از روش ولتامتری چرخه‌ای	۴۸
۴ ـ ۳ اثرسرعت جاروب برروی جریان پیك اکسیداسیون آدنین	۵۱
۵ ـ ۳ اثرغلظت روی جریان پیك اکسیدی آدنین	۵۴
۶ ـ ۳ اکسیداسیون آدنین در PH=7.00 فسفات بافر . . .	۵۷
۷ ـ ۳ شناسایی آمونیاك درمحلول آدنین اکسیدشده	۵۹
۸ ـ ۳ شناسایی اوره درمحصول آدنین اکسیدشده	۶۰
۹ ـ ۳ شناسایی دی اکسیدکربن درآدنین اکسیدشده	۶۰
۱۰ـ۳ جداسازی محصولات جاذبUVتوسط HPLC بادتکتور UV	۶۰
۱۱ـ۳ مطالعه ولتامتری چرخه‌ای گوانوزین در PH=2.00 تری فلوراستیك اسید (TFA)	۶۳
۱۲ـ۳ اکسیداسیون گوانوزین در PH=2.00 TFA درپتانسیل ثابت	۶۵
۱۳ـ۳ جداسازی محصولات حاصل ازاُکسایش گوانوزین توسط HPLC	۶۵
فصل چهارم :	
بحث وبررسی اکسیداسیون الکتروشیمیایی آدنین	۶۷
۱ ـ ۴ اکسیداسیون الکتروشیمیایی آدنین به عنوان یك سیستم غیربرگشت پذیر	۶۷
۲ ـ ۴ تاثیرPH روی پتانسیل پیك اکسیدی	۶۸
۳ ـ ۴ تاثیرسرعت جاروب درجریان پیك اکسیدی آدنین	۷۰
۴ ـ ۴ تاثیرغلظت درجریان پیك اکسیدی آدنین	۷۱
۵ ـ ۴ بررسی مسیراکسیداسیون آدنین در PH=7.00 فسفات بافرآبی	۷۱

عنوان	صفحه
فهرست موادشیمیایی ودستگاههای مورداستفاده	۷۵
مراجع	۷۶

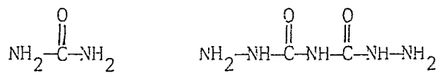
مقدمه

کاتابولیسم پیورین ومشتقات آن که به طورطبیعی درارگانیزم انجام می پذیرد ، عموما" شامل یکسری واکنش های پیچیده پی درپی و واکنش های هیدرولیزی می باشد . انجام این پدیده ها به طور طبیعی درسیستمهای بیولوژیکی تاحدزیادی موردقبول بیولوژیست ها می باشد . ولی شواهدامرنشان می دهد که مکانیزم این واکنش ها ومحصولات حاصل درسلولهای زنده ناشناخته می باشند. مطالعه اکسیداسیون - احیاء الکتروشیمیایی پیورین ومشتقّات آن درآزمایشگاه می تواندکمك بسیارزیادی درروشن کردن اکسیداسیون - احیاء بیولوژیکی مشتقّات پیورین درسیستمهای بیولوژیکی بنماید. زیرافاکتورهایی که درانتقال الکترون مؤثرمی باشد ، (نظیر PH ، دما ، قدرت یونی محلول و نوع نمك و ...) دربسیاری موارد درهردوروش الکتروشیمی وبیولوژیکی یکسان می باشد [1] .

آدنین به عنوان یك ترکیب پیورینی سیستم بیولوژیکی درسال ۱۹۶۲ دردانشگاه میشیگان توسط Philip J. Elving و David L.Smith مورد توجه قرارگرفته واحیای الکتروشیمیایی آن بررسی شد [2] . آنها درمطالعه رفتارپلاروگرافیکی آدنین یك موج احیائی مشاهده کردند ، که باانجام کولومتری مشخص شد یك مولکول آدنین بادریافت شش الکترون احیاء می گردد . مطالعه احیاء الکتروشیمیایی آدنین در PH بین 1-13 درقدرت یونی ثابت $\mu=0.5$ استات بافرمنجربه ارائه یك رابطه خطی بین $E_{1/2}$ و PH به صورت $E_{1/2}=-0.975-0.090\ PH$ شد . مکانیزم احیاء الکتروشیمیایی آدنین در PH=1.40 به صورت زیرپیشنهادشده است .[4,3] :



مطالعه وبررسی اکسیداسیون بیولوژیکی آدنین همواره موردتوجه بوده و تاحدودی شناخته شده و گزارش شده است [5] ۰ آدنین نیزدربسیاری ازگیاهان اکسیدشده ومحصولات اصلی اکسیداسیون، آلانتیون (Allantoin) واسید آلانتویك (Allantoic Acid) گزارش شده است [6] ۰ درسال ۱۹۶۳ اکسیداسیون آدنین درآزمایشگاه توسط دی اکسیدمنگنز (MnO_2) درمحلول آبی ودردمای ۱۰۰ °c مطالعه شدومحصولات حاصل ازاکسیداسیون دراین موردارزیابی (Urea) و بی — اورت (Biuret) گزارش شده است [7] ۰



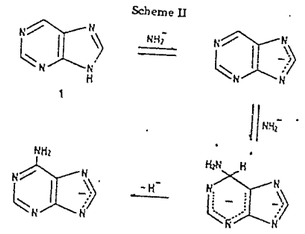
Urea

Biuret

درسال ۱۹۷۹ باانجام واکنش چی چی بابین‌پیورین تحت تاثیر پتاسیم آمید (KNH_2) قرارگرفت ، که نتیجه آن سنتز آدنین شد ، [8] ۰ مکانیزم واکنش نیزبه کمك اثرات ایزوتوپی موردتائیدقرارگرفت وعلاوه براین برای بازآلی آدنین یك مرکزاسیدی پیشنهادشد :

Chichibabin Reaction of Purines

Scheme II



بنابراین علاوه برسنتزآزمایشگاهی آدنین ،پروتون روی نیتروژن شماره نُه اسیدی شناخته شد ۰

دراین پروژه اکسیداسیون الکتروشیمیایی آدنین درمحیط های فسفات بافرآبی که تاکنون مورد مطالعه قرارنگرفته است ، به‌عنوان یك مطلب جدیدموردمطالعه وبررسی قرارداده ومسیراکسیداسیون رادرPH=7.00 فسفات بافرآبی دنبال می کنیم ۰

بافرض براینکه آدنین یك جسم الکترواکتیومی باشد ، می توان ولتامتری چرخه‌ای آدنین‌را درPH های مختلف بافرآبی مطالعه کرد ۰ تاثیر PH وسرعت جاروب روی پتانسیل اکسیداسیون وتاثیر سرعت جاروب دستگاه وغلظت نمونه روی جریان پیك اسیدی قابل مطالعه می باشد ۰ پتانسیل لازم برای اکسیداسیون درمحیط آبی فسفات بافربا PH=7.00 وباقدرت یونی $\mu=0.5$

ازولتامتری چرخه‌ای بدست می آید . با اعمال این پتانسیل برروی یك نمونه فوق اشباع آدنین درمحیط فوق ، عمل اکسیداسیون انجام شده ومحصولاتی ایجادمی گردد . محصولاتی که درناحیه ماوراء بنفش (UV) دارای جذب باشد ، می توانندبا HPLC که دارای ددکتور UV باشد باحلالهای وستون مناسب ، جداسازی شده وباروشهای اسپکتروسکوپی شناسایی گردند . بعضی ترکیبات که فاقد جذب درناحیه UV میباشند ، به روشهای کلاسیکی درآزمایشگاه قابل شناسایی می باشند . انجام کولومتری ویابامحاسبات الکتروشیمیایی نیزمی توان به تعدادالکترون لازم برای اکسیداسیون هرمولکول آدنین دست یافت .

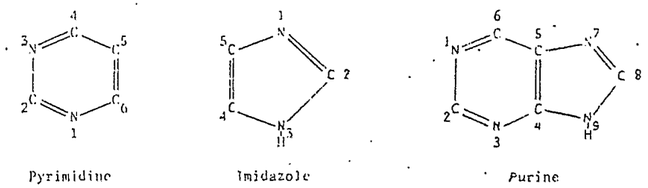
چنین روشی می توانددرمطالعه اکسیداسیون ـ احیاء الکتروشیمیایی سایرترکیبات الکترواکتیو ، نظیر دیگرپیورینها ، به کاررود . اکسیداسیون الکتروشیمیایی گوانوزین (Guanosine) درمحلول فسفات بافرآبی با $\mu=0.5$ و PH=7.00 موردمطالعه قرارگرفته ومسیراکسیداسیون آن به خوبی شناخته شده است ؛ [31] . دراین پروژه اکسیداسیون الکتروشیمیایی گوانوزین در PH=2.00 تری فلوراسیداستیك (TFA) موردبررسی ومطالعه قرارمی گیرد .

فصل اوّل

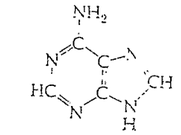
آدنین ومشتقات آن درحیات سلولی

۱ـ۱ پیورینها :

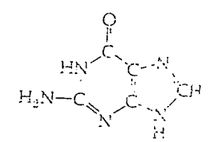
قبل از آنکه باآدنین آشناشویم ، بهتراست راجع به خانواده‌ای که آدنین نیزعضوی ازآن خانواده است مطالبی ارائه کنیم . نام این خانواده پیورینها (Purines) می باشد . پیورینها ازترکیبات مهم بیولوژی محسوب می گردند که درهمه سلولهای زنده وجوددارند . سر خانواده پیورینها ، پیورین می باشد ، که شامل دوحلقه پیریمیدن و ایمیدازول بوده ، که درکربنهای شماره چهار و پنج برطبق مدل نامگذاری امیل فیشر (Emil Fischer) دریکدیگر ذوب (Fused) شده اند [9] :



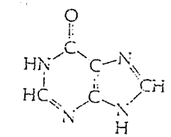
پیورینهای سیستم بیولوژیکی مشتقاتی ازگونه های مختلف زیر می باشد [9] :



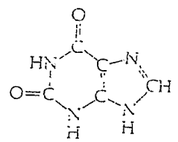
Adenine (6-aminopurine)



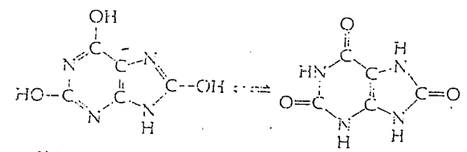
Guanine (2-amino-6-oxypurine)



Hypoxanthine
(6-oxypurine)



Xanthine
(2,6-dioxypurine)



Uric acid (lactim form)

Uric acid (lactam form)
(2,6,8-trioxypurine)

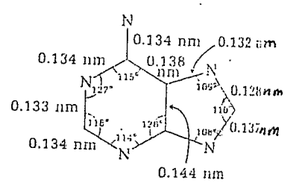
هرچند همه این ترکیبات هتـــروسیکلی عضوخانواده پیورینها نقش بسیاراساسی درحیات سلولی دارند ، آدنین وگوانین به دلیل شرکت آنهادرساختمان اسیدهای نوکلئیـــک (Nucleic Acid) دارای اهمیّت ویژه‌ای هستند • بحث روی اهمیّت آدنین درسیستم بیولوژی رابه جای خودواگذارکرده و بحث روی اهمیّت بقیّه ترکیبات رابه کنجکاوی خواننده واگذارمی کنیم [9,12].

اکسیداسیون واحیاء آنزیمی پیورینهادرسیستم بیولوژیکی ، که منجربه تغییرات وتحولاتـــی درموادسیستم می شود ، ازجمله جالبترین مطالعات بیوشیمیست ها است ، که دارای اهمیّت خاصّی درپزشکی می باشد • تلاش درجهت دستیابی به مکانیزم اکسیداسیون - احیاء این ترکیبات نیـــز الکتروشیمیست هارابرآن داشته است تامسیراکسیداسیون - احیاء این ترکیبات رادرمحیطی خـارج از بافت های سلولی به طریق الکتروشیمی موردمطالعه قراردهند •دراین رابطه بایدازیکی ازمعروفترین محقّق‌های الکتروشیمی پیورینها ، یعنی آقای Glenn Dryhurst (بخـــش شیمـــی دانشگاه Oklahoma آمریکـــا) نام برد • وی ازسال ۱۹۶۵ مطالعات وسیعی روی اکسیداسیون - احیاء الکتروشیمیایی پیورینهاواینذولهـــاداشته ومقالات وکتابهای متعدّدی دراین زمینـــه نوشته است [10] •

۲ ـ ۱ ترکیب شیمیایی آدنین :

آدنین که از آن به عنوان ویتامین B_4 نیز یاد می شود ؛ دارای فرمول شیمیایی بسته $C_5H_5N_5$ با وزن مولکولی $135.14\ gr.mole^{-1}$ می باشد . (C 44.45% ، H 3.73% ، N 51.82%) (11).

پیریمیدنها مولکولهای مسطح (Planar) بوده ، امّا پیوریـن ها ساختمانهای نزدیک به مسطح دارند . ساختمان مولکول آدنین امروزه توسطّ دیفراکسیون اشعه X (X-Ray Diffraction) کاملا" مشخص شده است ، که در شکل (۱ ـ ۱) نشان داده شده است [۱۲].



شکل ۱ ـ ۱

ابعاد مولکول آدنین

آدنین یك بازآلی است . محلول آبی آن خنثی می باشد . با اسیدها وبازها ترکیب می گردد . پس بستگی به قوّت اسیدوبازمزدوج شده با آن می تواندبه عنوان اسیدیابازعمل کند .

۲ ـ ۳ خصوصیّات فیزیکی آدنین :

آدنین سفیدرنگ ودرشرایط معمولی پودرجامد می باشد . فرم سه آب آن نیز به صورت ارتورومبیك های سوزنی شکل وجوددارد . در $220^{\circ}C$ تصعید می شود . در $360-365^{\circ}C$ تجزیه می گردد [11].

جذب ماکزیمم آن در UV اسپکتروسکوپی در PH=7.0 برابر 207nm. (ε=23200) و 260.5nm (ε=13400) می باشد . مقدار سمیّت (Lethal Dose) آن برابر LD_{50}=745 mgr/kg درمورد موش صحرائی (Rats) می باشد [11].

حلالیّت فرم بی آب آن $0.5\ gr.liter^{-1}$ (یا $0.0037\ mole.liter^{-1}$) درآب $25^{\circ}C$ می باشد . حلالیّت آن درآب جوش $25\ gr.liter^{-1}$ (یا $0.1850\ mole.liter^{-1}$) می باشد[11] .

۴ـ۱ آدنین درساختمان اسیدهای نوکلئیک :

اسیدهای نوکلئیك درهسته وسیتوپلاسم سلولی وجودداشته وکنترل فرامین وراثتی رابه عهده دارند . این اسیدها دونوع می باشند [9,12] :

۱ ـ رایبونوکلئیك اسیدیا RNA (Ribo Nucleic Acid) که درساختمان آن ترکیبات زیر وجوددارد ؛

(الف) بازهای آلی ؛ آدنین (Adenine) ، گوانین (Guanine) ، سیتوزین (Cytosine) و اوراسیل (Uracil) .

(ب) قند پنج کربنه رایبوز .

(ج) گروههای فسفات .

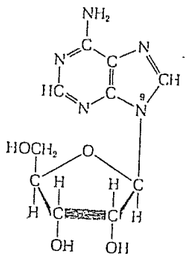
۲ ـ دِاُکسی رایبونوکلئیك اسید یا DNA (Deoxyribo Nucleic Acid) که درساختمان آن ترکیبات زیروجوددارد ؛

(الف) بازهای آلی ؛ آدنین (Adenine) ، گوانین (Guanine) ، سیتوزین (Cytosine) و تیمین (Thymin) .

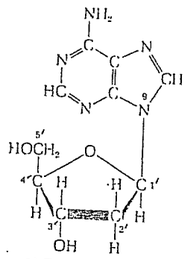
(ب) قند پنج کربنه دِاُکسی رایبوز .

(ج) گروههای فسفات .

اسیدهای نوکلئیك دارای واحدهای ساختمانی به نام نوکلئوتید (Nucleothide) می باشند. ازاینرو گاه به آنها پلیمرخطی نوکلئوتیدها می گویند . نوکلئوتیدهانیزازواحدهای ساختمانی به نام نوکلئوزید (Nucleoside) تشکیل شده‌اند . نوکلئوزید حاصل ترکیب یك بازآلی وقندپنج کربنه می باشد . مثلا" حاصل ترکیب آدنین باقندپنج کربنه رایبوز ادنوزین (Adenosine) بوده که درساختمان RNA دیده می شود ونیزحاصل ترکیب آدنین باقند پنج کربنه دِاُکسی رایبوز عبارت است از ۲´ ـ دِاُکسی ادنوزین (2´ — Deoxyadenosine) که درساختمان DNA وجوددارد ، (شکل ۲ ـ ۱) .



Adenosine
(9-β-D-ribofuranosyladenine)



2'-Deoxyadenosine
(9-β-2'-deoxy-D-ribofuranosyladenine)

شکـــــل (۲ ـ ۱)

نوکلئوزیـــدهـای آدنیـــــــــن

سایرنوکلئوزیدهای ساختمان RNA و DNA عبارتنداز[9,12] :

Guanine+Ribose ⟶ Guanosine

Uracile+Ribose ⟶ Uridine

Cytosine+Ribose ⟶ Cytidine

Guanine+Deoxyribose ⟶ 2'-Deoxyguanosine

Thymine+Deoxyribose ⟶ Thymidine

Cytosine+Deoxyribose ⟶ 2'-Deoxycytidine

علاوه براینهانوکلئوزیدهای دیگری نیزدرسیستم بیولوژی وجوددارد ، منجملـــه زنتوزیـــــــن (Xanthosine) وآنیـــوزیـــــن (Inosine) کـــه به ترتیب درساختمان آنهابازهـــای آلی پیورینـــی‌زانتیـــن (Xanthine) و هـــایپـــوزانتین (Hypoxanthine) وجـــــود دارد .

همانطورکه گفتیم نوکلئوزیدها واحدهای ساختمانی نوکلئوتیدها می باشند . نوکلئوتیدهـــا استرهای اسید فسفریك بوده ویك اسیدقوی محسوب می گردند . وقتی درموقعیّت 5' قندپنج کربنـــه یك نوکلئوزید ، یك ، دو ویاسه گروه فسفات قرارگیرد یك نوکلئوتیدبدست می آیـــــــــــد. نوکلئوتیدهای ساختمان RNA و DNAدرشکل (۳ ـ ۱) نشان داده شده است [9,12] .