

Ramanova spektroskopija gvanina

Popović, Klara

Undergraduate thesis / Završni rad

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:171584>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-01**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijski odsjek

Klara Popović

Studentica 3. godine Sveučilišnog prijediplomskog studija KEMIJA

RAMANOVA SPEKTROSKOPIJA GVANINA

Završni rad

Rad je izrađen u Zavodu za analitičku kemiju

Mentor rada: doc. dr. sc. Adriana Kendel

Zagreb, 2024.

Datum predaje prve verzije Završnog rada:

12. srpnja 2024.

Datum ocjenjivanja Završnog rada i polaganja Završnog ispita:

20. rujna 2024.

Mentor rada: doc. dr. sc. Adriana Kendel

Potpis:

Sadržaj

§ SAŽETAK.....	VII
§ 1. UVOD.....	1
§ 2. PRIKAZ ODABRANE TEME	2
2.1. Teorijska osnova	2
2.1.1. Osnovni principi vibracijske spektroskopije	2
2.1.1.1. Vrste prijelaza.....	3
2.1.1.2. Izborna pravila.....	4
2.1.1.3. Ramanova i IR spektroskopija	6
2.1.2. Osnovni principi Ramanove spektroskopije.....	7
2.1.3. Instrumentacija za Ramanovu spektroskopiju.....	8
2.2. Ramanova spektroskopija gvanina	10
2.2.1. Vibracijski modovi gvanina.....	10
2.2.1.1. Bezvodni gvanin.....	11
2.2.1.2. Polikristalni gvanin.....	12
2.2.1.3. Vodena otopina gvanina	12
2.2.2. Ramanov spektar gvanina.....	14
2.2.3. Utjecaj eksperimentalnih uvjeta.....	17
2.2.3.1. Utjecaj otapala.....	17
2.2.3.2. Utjecaj pH.....	18
2.2.3.3. Utjecaj vodikovih veza	18
2.3. Primjena Ramanove spektroskopije u analizi gvanina	18
2.3.1. Analiza tautomernih oblika gvanina	19
2.3.2. Interakcije gvanina s metalnim ionima	19
2.4. Zaključak.....	20
§ 3. LITERATURNI IZVORI.....	XXII

§ Sažetak

Ovaj rad istražuje primjenu Ramanove spektroskopije u analizi gvanina, jedne od četiri osnovne dušične baze koje čine strukturu deoksiribonukleinske kiseline (engl. *deoxyribonucleic acid*, DNA) i ribonukleinske kiseline (engl. *ribonucleic acid*, RNA). Gvanin, zbog svoje sposobnosti stvaranja vodikovih veza s citozinom, igra važnu ulogu u stabilizaciji genetskog materijala, čineći ga predmetom intenzivnog istraživanja u biokemiji i molekularnoj biologiji. Ramanova spektroskopija omogućuje preciznu analizu vibracijskih modova gvanina, čime pruža uvid u njegovu strukturu i dinamiku u različitim eksperimentalnim uvjetima.

U radu su analizirani Ramanovi spektri gvanina u različitim stanjima, uključujući bezvodno, polikristalno i hidratizirano stanje. Također, razmatrano je kako promjene u pH vrijednosti, prisutnost otapala i temperatura utječu na strukturu, a time i spektar gvanina. Posebna pažnja posvećena je određivanju tautomernih oblika gvanina koji se javljaju ovisno o uvjetima u kojima se molekula nalazi, te njihovoj stabilnosti u biološkim sustavima.

Rezultati pokazuju da se Ramanova spektroskopija može učinkovito koristiti za određivanje različitih strukturnih oblika gvanina, identifikaciju promjena u elektronskoj gustoći te praćenje intermolekulskih interakcija koje utječu na funkcionalnost nukleinskih kiselina. Primjena ove metode nije važna samo za osnovna istraživanja, već ima i značajan potencijal u medicinskim i farmaceutskim primjenama, gdje je razumijevanje strukture i funkcije gvanina izuzetno bitno za razvoj novih terapijskih pristupa i dijagnostičkih metoda.

§ 1. UVOD

Ramanova spektroskopija, koju je 1928. godine otkrio indijski fizičar Chandrasekhara Venkata Raman, predstavlja jednu od osnovnih analitičkih tehnika u proučavanju molekulskih vibracija i struktura. Ramanov efekt, koji se sastoji od promjene frekvencije svjetlosti nakon interakcije s molekulama, omogućuje detaljno proučavanje struktura molekula bez potrebe za njihovom modifikacijom ili označavanjem. Zbog svoje sposobnosti da pruži informacije o molekulskoj strukturi, kemijskom okruženju i dinamičkim procesima unutar molekula, Ramanova spektroskopija ima široku primjenu u kemiji, fizici i biologiji.

Otkrivanje Ramanovog efekta označilo je prekretnicu u spektroskopiji, pružajući znanstvenicima alat za analizu materijala na molekularnoj razini. U početku se koristila uglavnom u kemijskim istraživanjima, ali s vremenom je njena primjena proširena i na biologiju, medicinu te inženjerstvo materijala. Danas Ramanova spektroskopija omogućuje analizu složenih biomolekula poput proteina, nukleinskih kiselina i lipida.

Gvanin, jedna od četiri dušične baze u nukleinskim kiselinama, prenosi i pohranjuje genetske informacije. Heterociklička molekula ima sposobnost stvaranja vodikovih veza s citozinom, što doprinosi stabilnosti dvolančane uzvojnice DNA. U fiziološkim uvjetima, gvanin može postojati u različitim tautomernim oblicima, ovisno o pH vrijednosti, temperaturi i otapalu u kojem se nalazi. Tautomerija gvanina, što uključuje promjenu položaja protona unutar molekule, može poprilično utjecati na njegovu reaktivnost i funkciju, osobito u biološkim sustavima gdje su precizne molekulske interakcije za pravilno funkcioniranje stanica izuzetno bitne.

Kroz analizu vibracijskih svojstava gvanina pomoću Ramanove spektroskopije, ovaj rad prikazuje kako različiti fiziološki i kemijski uvjeti mogu utjecati na njegovu strukturu i funkcionalnost. Istraženo je ponašanje gvanina u interakciji s različitim metalnim ionima i kako promjene u njegovoj strukturi mogu utjecati na stabilnost nukleinskih kiselina u biološkim sustavima.

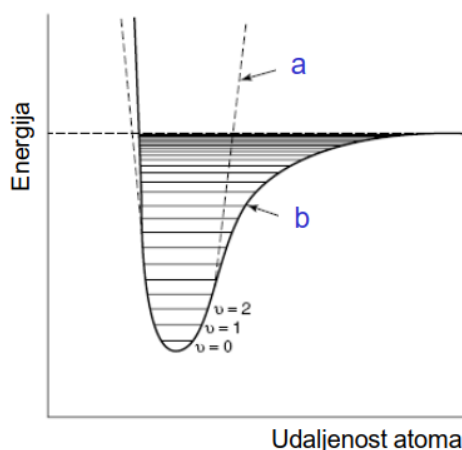
§ 2. PRIKAZ ODABRANE TEME

2.1. Teorijska osnova

2.1.1. Osnovni principi vibracijske spektroskopije

Vibracijska spektroskopija je tehnika koja proučava interakcije između elektromagnetskog zračenja i materije, s fokusom na vibracijske prijelaze unutar molekula. Ova spektroskopija omogućuje proučavanje vibracija atomske jezgre unutar molekula, pri čemu dolazi do apsorpcije ili raspršenja svjetlosti koja odgovara određenim vibracijskim frekvencijama molekule. Frekvencije vibracija su specifične za svaku molekulu, što čini vibracijsku spektroskopiju pogodnu za identifikaciju kemijskih spojeva i proučavanje njihove strukture.¹ Energija vibracije ovisi o udaljenosti između atoma unutar molekule, a ta ovisnost se može opisati Morseovom funkcijom. Funkcija opisuje kako energija molekule varira s promjenom međuatomske udaljenosti (slika 1), uzimajući u obzir anharmoničnost, što je odstupanje stvarnog ponašanja molekula od idealnog harmonijskog oscilatora.²

Vibracijske energijske razine molekule su diskretne, što znači da molekula može imati samo određene vrijednosti energije. U idealnom slučaju harmonijskog oscilatora, razlike između ovih energijskih razina bile bi jednake. Međutim, zbog anharmoničnosti, ove razlike se smanjuju kako se energija povećava. Pri visokim energijama, energijske razine postaju dovoljno blizu jedna drugoj da stvaraju kontinuum, što dovodi do disocijacije molekule, odnosno njenog razdvajanja na atome.²



Slika 1. Krivulja potencijalne energije (a: harmoničnog oscilatora; b: anharmoničkog oscilatora- Morseov potencijal)

Vibracijska stanja su kvantizirana i opisana kvantnim brojem (v). Osnovno vibracijsko stanje odgovara kvantnom broju nula ($v = 0$), a pobuđena stanja imaju više vrijednosti kvantnog broja ($v = 1, 2, 3, \dots$). Najčešće se u vibracijskoj spektroskopiji proučavaju prijelazi između osnovnog i prvog pobuđenog vibracijskog stanja ($(v = 0) \rightarrow (v = 1)$).³

Energija disocijacije je razlika između energije kontinuuma i energije osnovnog vibracijskog stanja. Ravnotežna energija disocijacije uključuje i energiju osnovnog stanja te se računa pri ravnotežnoj udaljenosti atoma.⁴

Napučenost vibracijskih razina opisuje broj molekula u određenom vibracijskom stanju. Prema Boltzmannovoj raspodjeli, pri sobnoj temperaturi većina molekula se nalazi u osnovnom vibracijskom stanju (napučenost prve pobuđene vibracijske razine je samo 1 %), što znači da su osnovni prijelazi mnogo češći nego prijelazi u viša vibracijska stanja.⁴

Princip vibracijske spektroskopije temelji se na činjenici da molekule imaju određene vibracijske frekvencije koje odgovaraju različitim modovima kretanja atoma unutar molekule. Kada molekula apsorbira energiju u obliku infracrvenog zračenja ili kada se svjetlost raspršuje (u slučaju Ramanove spektroskopije), energija se prenosi na molekulu, uzrokujući prijelaz iz jednog vibracijskog stanja u drugo.^{1,3}

2.1.1.1. Vrste prijelaza

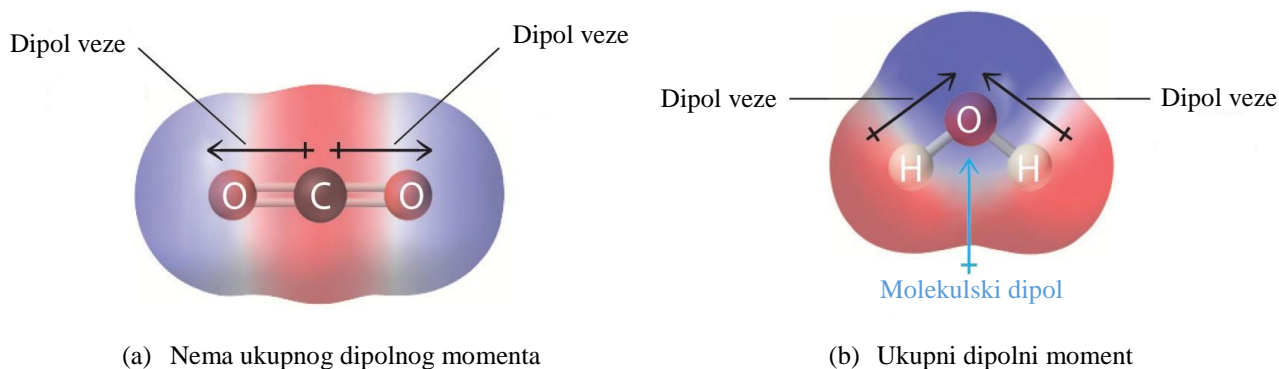
U vibracijskoj spektroskopiji postoje dva osnovna tipa prijelaza: vibracijski prijelazi i rotacijsko-vibracijski prijelazi.³

Vibracijski prijelazi uključuju prijelaze između različitih vibracijskih stanja unutar osnovnog elektronskog stanja. Ovi prijelazi se javljaju kada molekula apsorbira energiju koja odgovara razlici između dvije vibracijske razine.³

Rotacijsko-vibracijski prijelazi uključuju prijelaze između različitih kombinacija vibracijskih i rotacijskih razina. Ove prijelaze obično opažamo u spektrima plinova, gdje rotacije veza molekula značajno doprinose ukupnom izgledu vibracijskog spektra.³

2.1.1.2. Izborna pravila

Izborna pravila za vibracijsku spektroskopiju definiraju koji su prijelazi dopušteni između različitih energijskih stanja molekula. Pravila se temelje na simetriji molekule i zakonu očuvanja energije. Za infracrvenu (engl. *infrared*, IR) spektroskopiju, osnovno izborno pravilo kaže da molekula može apsorbirati infracrveno zračenje samo ako dolazi do promjene dipolnog momenta tijekom vibracije. Dakle, vibracijski mod mora biti aktivan u IR području,

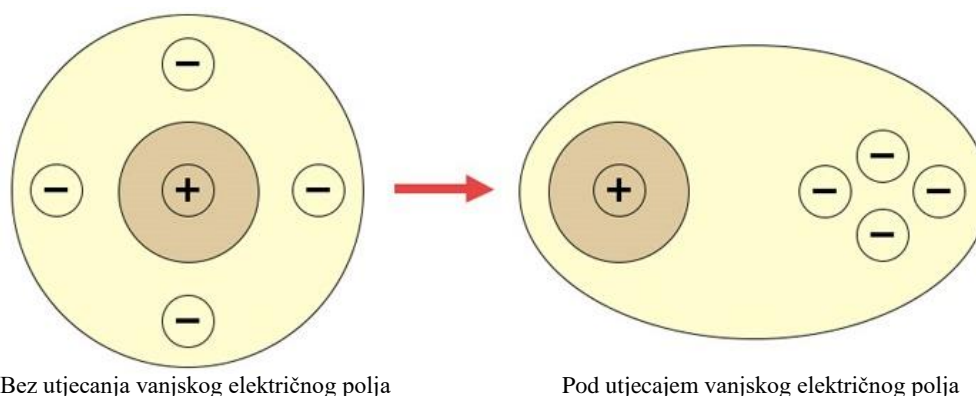


što znači da mora postojati komponenta vibracije koja mijenja dipolni moment molekule.³

Slika 2. Prikaz kako se pojedinačni dipolni momenti veze zbrajaju da bi se dobio ukupni dipolni moment za dvije triatomske molekule s različitim strukturama, (a) CO₂ i (b) H₂O⁵

Kao što se vidi na slici 2, u molekuli CO₂ dipoli veze C–O jednaki su po veličini, ali usmjereni u suprotnim smjerovima (pod kutem od 180°). Njihov vektorski zbroj je nula, pa stoga CO₂ nema ukupni dipol. Molekula vode ima dipole veze O–H također jednake po veličini, ali su međusobno orijentirani pod kutom od 104,5°. Stoga vektorski zbroj nije nula i H₂O ima ukupni dipolni moment.⁵

Za Ramanovu spektroskopiju, izborno pravilo kaže da mora doći do promjene polarizabilnosti molekule tijekom vibracije (shematski prikazano na slici 3). Polarizabilnost je mjera u kojoj elektronski oblak molekule može biti deformiran vanjskim električnim poljem (kao što je elektromagnetsko zračenje). Vibracijski modovi koji uzrokuju promjenu u polarizabilnosti molekule su aktivni u Ramanovoj spektroskopiji.¹



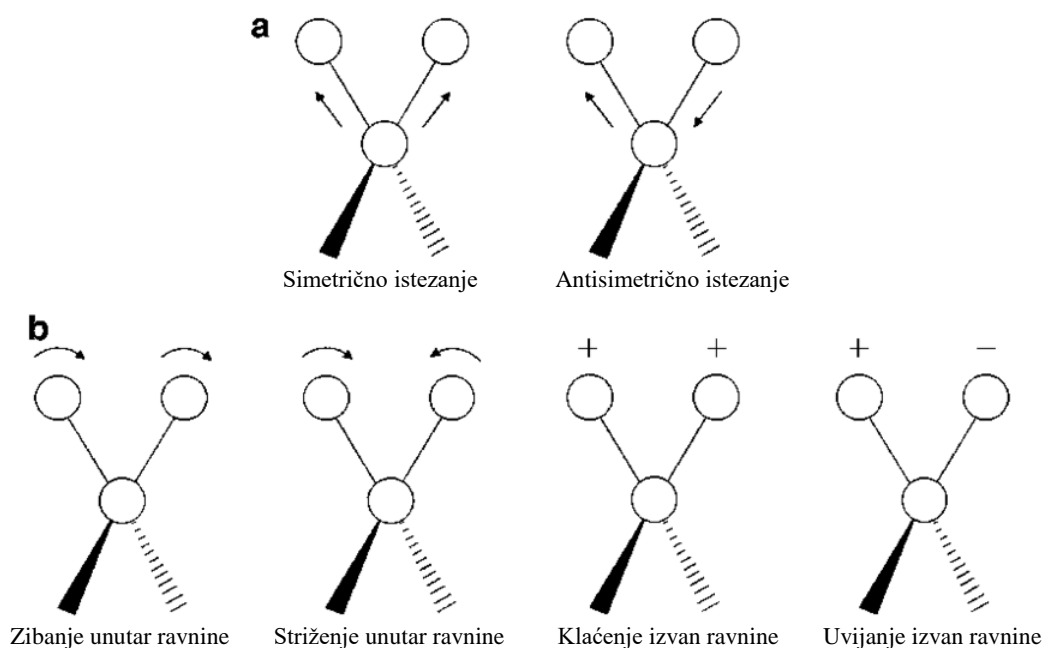
Slika 3. Shematski prikaz promjene polarizabilnosti molekule pod utjecajem vanjskog električnog polja⁶

Vibracije višeatomnih molekula mogu se podijeliti na različite modove, ovisno o tome kako se atomi unutar molekule gibaju u odnosu na druge atome. Osnovna podjela je na istezne vibracije, (koje mogu biti simetrične i antisimetrične) te vibracije svijanja ili deformacije, koje se dijele na deformacije u ravnini i deformacije van ravnine. Za troatomne sustave deformacije se dodatno dijele na striženje, zibanje, klaćenje i uvijanje (slika 4).

Broj vibracijskih modova za molekulu ovisi o njezinoj simetriji i broju atoma. Za linearnu molekulu s N broj atoma, broj vibracijskih modova je $3N - 5$, dok je za nelinearnu molekulu $3N - 6$. Broj stupnjeva slobode za nelinearnu molekulu je sveukupno šest (tri translacijska i tri rotacijska) dok je za linearnu molekulu broj stupnjeva slobode za jedan manji jer se rotacija oko internuklearne osi ne smatra gibanjem.²

Vibracije višeatomnih molekula mogu se međusobno sprežati pod određenim uvjetima:

- vibracije koje se sprežu moraju biti iste simetrije
- najjača interakcija je između vibracija bliskih frekvencija
- sprega između vibracija istezanja postoji samo ako vibracija uključuje zajednički atom
- sprega između vibracija svijanja postoji samo ako vibracija uključuje zajedničku vezu
- sprega između vibracija istezanja i svijanja postoji ako je veza koja se rasteže sastavni dio kuta koji se svija.



Slika 4. Vrste vibracija troatomnih sustava: (a) vibracije istežanja i (b) vibracije savijanja.

Simboli "+" i "-" označavaju kretanje prema papiru, odnosno od papira

Pravilo isključenja govori da za molekule koje imaju centar simetrije, vibracije koje se detektiraju u Ramanovom spektru nisu vidljive u IR spektru. U slučaju molekula koje nemaju centar simetrije, neke vibracije (ne nužno sve) mogu se detektirati i u Ramanovom spektru i u IR spektru, ali im se intenziteti vrpca razlikuje, pa vrpce jakog intenziteta u Ramanovom spektru bit će slabijeg intenziteta u IR spektru, i obrnuto.

2.1.1.3. Ramanova i IR spektroskopija

Vibracijska spektroskopija koja uključuje Ramanovu i infracrvenu spektroskopiju fokusira se na proučavanje vibracijskih stanja molekula. Ove metode omogućuju istraživanje molekularnih vibracija, pružajući uvid u molekulsku strukturu, načine vezanja i kemijsko okruženje molekula.^{1,3}

IR spektroskopija temelji se na apsorpciji infracrvenog zračenja, pri čemu dolazi do prijelaza molekula u više vibracijsko stanje kada energija zračenja odgovara energiji vibracija. S druge strane, Ramanova spektroskopija ne zahtijeva podudaranje energije upadnog zračenja s razlikom energije između vibracijskih stanja. Umjesto toga, Ramanova spektroskopija

koristi lasersko zračenje jedne frekvencije, a informacije o vibracijskim stanjima dobivaju se analizom razlike frekvencija upadnog i raspršenog zračenja.^{1,3}

Prednost Ramanove spektroskopije leži u njenoj sposobnosti da proučava vibracije koje su slabo ili potpuno neaktivne u IR području, čime se ove dvije metode komplementarno koriste za potpuniju analizu molekula. Ramanova spektroskopija je naročito korisna za proučavanje molekula u vodenim otopinama, jer voda slabo raspršuje zračenje, dok snažno apsorbira zračenje u IR području.^{1,3}

2.1.2. Osnovni principi Ramanove spektroskopije

Ramanova spektroskopija je tehnika koja se koristi za proučavanje vibracijskih, rotacijskih i drugih nisko-energijskih prijelaza u molekulama. Ova metoda temelji se na neelastičnom raspršenju svjetlosti, poznatom kao Ramanovo raspršenje, koje omogućuje prikupljanje informacija o vibracijskim stanjima molekula, a time i o njihovoj strukturi i dinamici.³

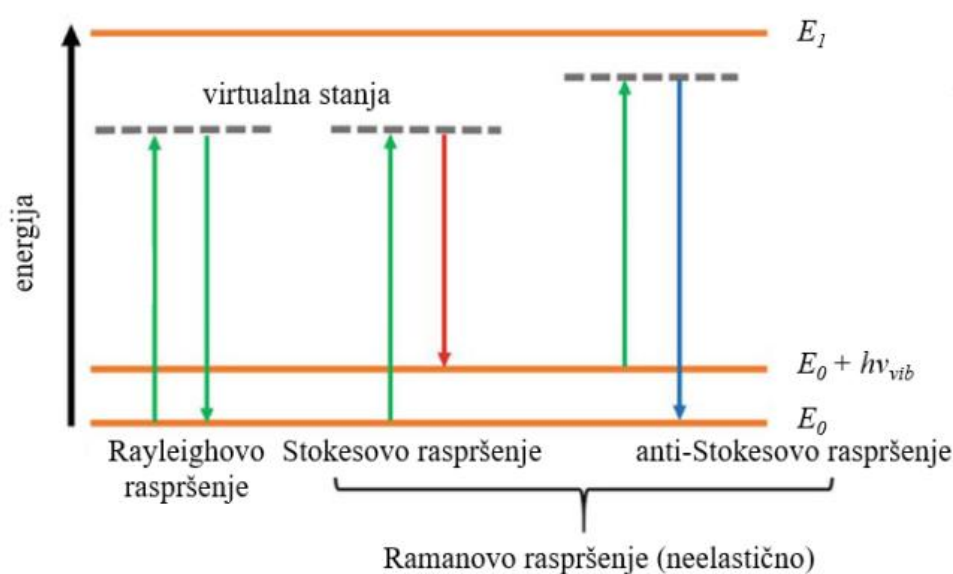
Kada elektromagnetsko zračenje (laserska svjetlost) prođe kroz tvar, može doći do nekoliko različitih interakcija između zračenja i molekula. Jedna od tih interakcija je raspršenje zračenja. U većini slučajeva dolazi do elastičnog raspršenja, poznatog kao Rayleighovo raspršenje, pri kojem nema promjene energije ulaznog i raspršenog fotona, a molekula se vraća u svoje izvorno energijsko stanje. Međutim, u puno manjem broju slučajeva dolazi do neelastičnog raspršenja, odnosno Ramanovog raspršenja, gdje dolazi do promjene energije raspršenog fotona zbog razmjene energije s molekulom koja prelazi u različito energijsko stanje.³

Ramanovo raspršenje može se opisati kao rezultat promjene polarizabilnosti molekule tijekom interakcije s elektromagnetskim zračenjem. Kada foton udari u molekulu, on može potaknuti kratkotrajnu deformaciju elektronskog oblaka molekule, stvarajući tzv. virtualno stanje. Ova deformacija može dovesti do prijenosa energije između fotona i molekule, rezultirajući promjenom energije fotona koji se raspršuje.³

Ramanovo raspršenje se dijeli na Stokesovo i anti-Stokesovo raspršenje. Stokesovo raspršenje se događa kada molekula prima energiju od upadnog fotona i prelazi iz osnovnog vibracijskog stanja u više vibracijsko stanje. Kao rezultat toga, energija raspršenog fotona je manja od energije upadnog fotona, što rezultira Stokesovim vrpčama u Ramanovom spektru. Anti-Stokesovo raspršenje nastaje kada molekula, koja se već nalazi u višem vibracijskom stanju, gubi energiju tijekom raspršenja, vraćajući se u niže vibracijsko stanje. U ovom

slučaju energija raspršenog fotona je veća od energije upadnog fotona, što daje anti-Stokesove vrpce u spektru.³

Relativni intenziteti Stokesovih i anti-Stokesovih vrpca ovise o termodinamičkom stanju molekula. Stokesove vrpce su obično intenzivnije jer se većina molekula u uobičajenim uvjetima mjerenje (sobna temperatura, atmosferski tlak) nalazi u osnovnom vibracijskom stanju. Anti-Stokesove vrpce su slabije intenzitetom, ali mogu se pojačati povećanjem temperature, uslijed čega dolazi do povećanja broja molekula u pobuđenom stanju, odnosno inverzije napučenosti.³ Stokesove i anti-Stokesove vrpce daju istu informaciju o strukturi



molekula.

Slika 6. Energijski dijagram Ramanovog i Rayleighovog raspršenja⁷

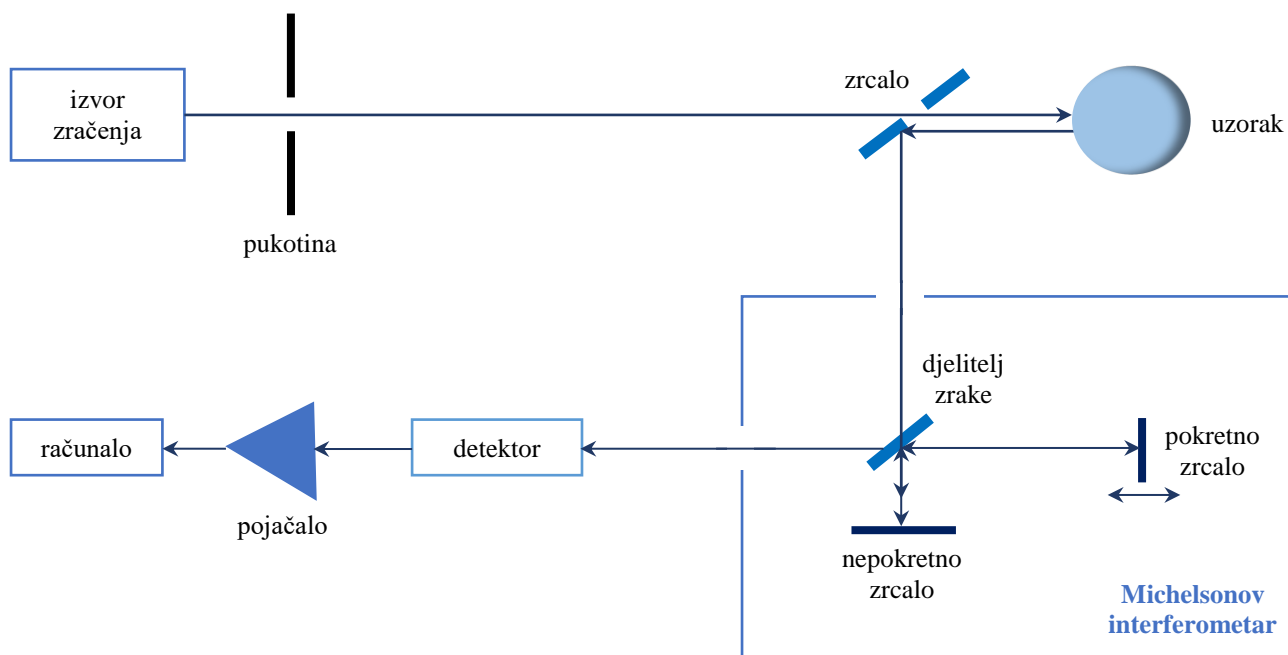
2.1.3. Instrumentacija za Ramanovu spektroskopiju

Instrumentacija koja se koristi u Ramanovoj spektroskopiji razvijala se kroz godine, omogućujući sve precizniju detekciju i analizu. Prvotni eksperimenti koristili su jednostavnije, disperzivne spektrometre, dok se moderni uređaji sve više oslanjaju na Fourierovu transformaciju (FT), koja omogućava detaljniju analizu spektra. Jedan od ključnih komponenti u modernim FT-Ramanovim spektrometrima je Michelsonov interferometar, koji omogućava preciznu analizu promjena u frekvencijama raspršenog svjetla.^{2,8}

FT-Ramanova spektroskopija koristi Nd:YAG laser (engl. *neodymium-doped yttrium aluminium garnet*) kao izvor zračenja, koji emitira svjetlost na valnoj duljini od 1064 nm.

Ovaj laser je odabran zbog svoje sposobnosti da minimizira fluorescenciju, koja može ometati analizu Ramanovog spektra, posebno pri istraživanju obojanih uzoraka.

Središnja komponenta FT-Ramanovog spektrometra je Michelsonov interferometar (slika 7). Ovaj uređaj dijeli zrake pomoću polupropusnog zrcala te omogućava da se svjetlost raspršuje prema različitim ogledalima koja se nalaze na različitim udaljenostima. Kombinacijom tih zraka stvara se interferencijski uzorak i kao rezultat se dobiva interferogram koji se pomoću Fourierovih transformacija pretvara u Ramanov spektar.⁸



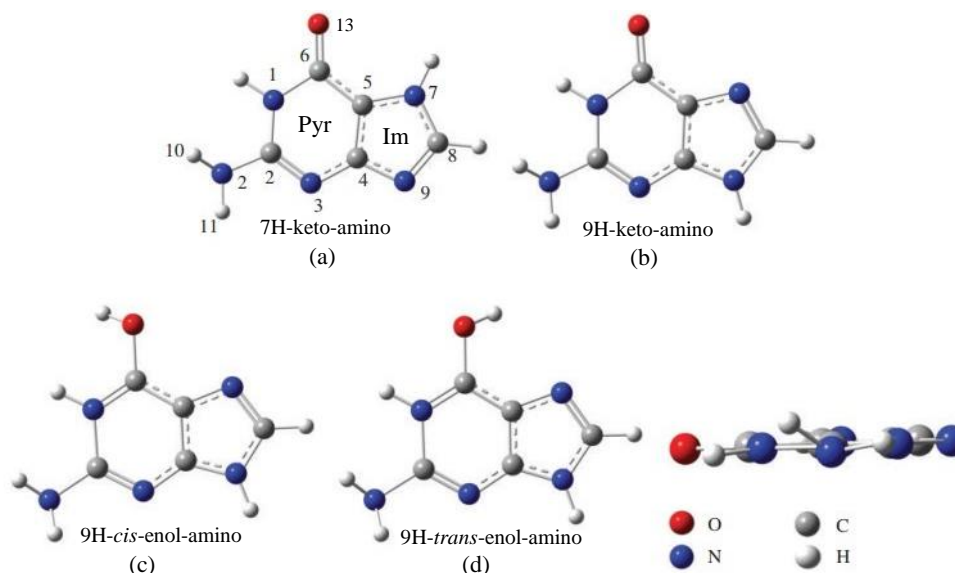
Laserska zraka iz izvora zračenja usmjerava se prema uzorku pomoću sustava ogledala i leća (slika 7). Kada svjetlost udari u uzorak, dolazi do raspršenja svjetlosti, pri čemu se većina fotona elastično rasprši bez značajne promjene energije (Rayleighovo raspršenje), dok se malom broju fotona promijeni energija (Ramanovo raspršenje). Raspršena svjetlost se zatim šalje u Michelsonov interferometar (slika 7). Ovdje dolazi do dijeljenja zrake svjetlosti pomoću polupropusnog zrcala. Svjetlost se reflektira prema dvama zrcalima, od kojih se jedno zrcalo pomiče naprijed-natrag, stvarajući interferencijski uzorak kada se zrake ponovno spoje. Kako bi se eliminiralo neželjeno Rayleighovo raspršeno zračenje i povećala preciznost mjerenja, koristi se filter. Nakon prolaska kroz interferometar, dobiveni interferencijski uzorak dolazi do detektora (obično indijev galijev arsenid, InGaAs) hlađenog tekućim dušikom, koji smanjuje šum i omogućava precizniju detekciju signala. Konačno,

interferogram se računalnom analizom pomoću Fourierovih transformacija pretvara u Ramanov spektar. Ramanov spektar je prikaz intenziteta raspršene svjetlosti u ovisnosti o valnom broju i daje detaljnu analizu vibracijskih modova molekula unutar uzorka.

2.2. Ramanova spektroskopija gvanina

2.2.1. Vibracijski modovi gvanina

Gvanin, kao jedna od četiri dušične baze prisutne u nukleinskim kiselinama, ima specifične vibracijske modove koji su bitni za njegovu analizu Ramanovom spektroskopijom. Molekulska struktura gvanina omogućuje postojanje različitih tautomernih oblika (slika 8), to se prvenstveno odnosi na keto-enolne tautomere, koji ovise o uvjetima sustava poput pH i prisutnosti otapala.⁹ Vibracijski modovi gvanina, posebice oni u području između 1000 i 1700 cm^{-1} , bitni su za razumijevanje intermolekulskih interakcija poput vodikovih veza, ali i za proučavanje konformacijskih promjena.⁹ Promatraju se vibracije veza u prstenu i vibracije istezanja veza, poput N-H i C=O, koje su osjetljive na tautomerne promjene i uvjete u kojima se molekula nalazi.



Slika 8. Strukturni prikaz izračunatih (DFT/B3LYP 6-31G**) četiriju najstabilnijih tautomernih oblika gvanina u plinovitoj fazi. (Uključeno je numeriranje atoma. Pyr i Im odnose se na pirimidinski i imidazolski prsten)¹⁰

2.2.1.1. Bezvodni gvanin

Bezvodni gvanin predstavlja kristalni oblik gvanina koji ne sadrži molekule vode u svojoj strukturi, što rezultira specifičnim vibracijskim svojstvima. U bezvodnom obliku, gvanin se može pojaviti u različitim tautomernim konformacijama, pri čemu su keto-oblici dominantni zbog veće stabilnosti u odsutnosti vode.¹⁰

Najvažnije vibracije bezvodnog gvanina uključuju vibracije istezanja C=O veze, koje su izuzetno osjetljive na konformacijske promjene. Vibracija istezanja C₆=O₁₃ u obliku 7H-keto-amino (slika 8. (a)) pojavljuje se na 1733 cm⁻¹, dok je u 9H-keto-amino (slika 8. (b)) tautomeru ta vibracija pomaknuta na 1758 cm⁻¹.^{10,11} Keto oblik 7H-keto-amino je dominantan u bezvodnim uvjetima dok je 9H-keto-amino tautomer manje stabilan u bezvodnim uvjetima.¹¹ Razlika u frekvencijama ovih vibracija pomaže u razlikovanju različitih tautomera unutar kristalne strukture i interakcijama unutar kristalne rešetke. Vibracije NH₂ skupine također su zanimljive jer se vibracija striženja NH₂ u 7H-keto-amino pojavljuje na oko 1634 cm⁻¹, dok se u 9H-keto-amino tautomeru nalazi na 1630 cm⁻¹.¹⁰

Osim navedenog, i vibracije „disanja prstena“ (engl. *ring breathing*) igraju ulogu u karakterizaciji bezvodnog gvanina. U 7H-keto-amino tautomeru vibracija „disanja prstena“ pojavljuje se na 618 cm⁻¹, dok u 9H-keto-amino tautomeru ta vibracija se nalazi na 613 cm⁻¹.¹¹ Ove vibracije odražavaju stabilnost i simetriju unutar molekule te su korisne za razlikovanje tautomera u bezvodnom stanju.^{10,11}

Tablica 1. Karakteristične vibracije različitih tautomera bezvodnog gvanina¹⁰

Vibracija	Valni broj (cm ⁻¹)	Tautomer
C ₆ =O ₁₃ Istezanje	1733	7H-keto-amino
C ₆ =O ₁₃ Istezanje	1758	9H-keto-amino
Deformacija NH ₂ skupine (striženje)	1634	7H-keto-amino
Deformacija NH ₂ skupine (striženje)	1630	9H-keto-amino
„Disanje prstena“ (<i>ring breathing</i>)	618	7H-keto-amino

„Disanje prstena“ (<i>ring breathing</i>)	613	9H-keto-amino
---------------------------------------------	-----	---------------

2.2.1.2. Polikristalni gvanin

Polikristalni gvanin predstavlja oblik gvanina sastavljen od više nasumično orijentiranih kristala.¹¹ Ovaj oblik gvanina često se istražuje Ramanovnom spektroskopijom zbog svoje stabilnosti i sposobnosti da zadrži vibracijske modove koji odražavaju unutarnje molekulske interakcije.

U polikristalnom gvaninu najvažnije vrpce u Ramanovom spektru javljaju se u području između 600 i 1700 cm^{-1} . Vibracije istezanja C=O skupine su među najistaknutijim u spektru pa se tako vibracija istezanja C₆=O₁₃ pojavljuju na 1715 cm^{-1} .¹¹ Ova vibracija prikazuje stabilnost keto-oblika unutar kristalne rešetke i osjetljiva je na interakcije s okolinom.

Vibracija striženja NH₂ skupine pojavljuje se na približno 1620 cm^{-1} , što je nešto niže nego u bezvodnom stanju zbog interakcija između molekula u polikristalnom stanju.^{10,11} Ova vibracija je bitna jer pokazuje kako međumolekulske interakcije, poput vodikovih veza, utječu na vibracijske modove.

Vibracija „disanja prstena“ u polikristalnom gvaninu javlja se na 635 cm^{-1} , što je pomaknuto u odnosu na bezvodni gvanin, gdje se ova vibracija pojavljuje pri nižem valnom broju. Opaženi pomak odražava dodatne međumolekulske interakcije unutar polikristala koje utječu na simetriju i snagu veza unutar prstena.¹¹

Tablica 2. Karakteristične vibracije za polikristalni gvanin¹¹

Vibracija	Valni broj (cm^{-1})
C ₆ =O ₁₃ Istezanje	1715
Deformacija NH ₂ skupine (striženje)	1620
"Disanje prstena" (<i>ring breathing</i>)	635

2.2.1.3. Vodena otopina gvanina

Vodena otopina gvanina pruža složeno okruženje u kojem se molekule gvanina nalaze u interakciji s molekulama vode, što rezultira promjenama u njihovim vibracijskim svojstvima. U ovakvom sustavu, vodikove veze između molekula vode i funkcijskih skupina gvanina imaju važnu ulogu u određivanju vibracijskih modova dušične baze.

Jedan od najvažnijih vibracijskih modova u vodenoj otopini gvanina je vibracija istezanja C₆=O₁₃ veze. Vrpca ove vibracije, koja se javlja na 1675 cm⁻¹, pomaknuta je prema nižim valnim brojevima u odnosu na spektar bezvodnog oblika gvanina.¹¹ Pomak valnog broj prema nižem području ukazuje na slabljenje C=O veze zbog interakcije s molekulama vode, koje stvaraju vodikove veze s kisikom karbonilne skupine. Ovaj efekt smanjuje jakost veze, što rezultira vrpcom vibracije pri nižem valnom broju.

Vibracija striženja NH₂ skupine također je osjetljiva na prisutnost vode. U vodenoj otopini ova vibracija daje vrpcu na 1613 cm⁻¹, pomaknuto u odnosu na spektar gvanina u bezvodnom stanju.¹¹ Pomak vrpce može se pripisati stvaranju vodikovih veza između NH₂ skupine gvanina i molekula vode.

Vibracija „disanja prstena“ u vodenoj otopini daje vrpcu na 619 cm⁻¹.¹¹ Ova vibracija predstavlja simetrično širenje i skupljanje prstena, a prisutnost vode može utjecati na ovu vibraciju, čineći je manje simetričnom što rezultira promjenom položaja vrpce.

Još jedan važan vibracijski mod je vibracija istezanja N₇-C₈ veze, koja se u vodenoj otopini javlja na 1365 cm⁻¹.¹¹ Ova vibracija je osjetljiva na međumolekulske interakcije, a u prisutnosti vode dolazi do jačanja veza unutar prstena, što dovodi do pomaka vrpce prema većem valnom broju.

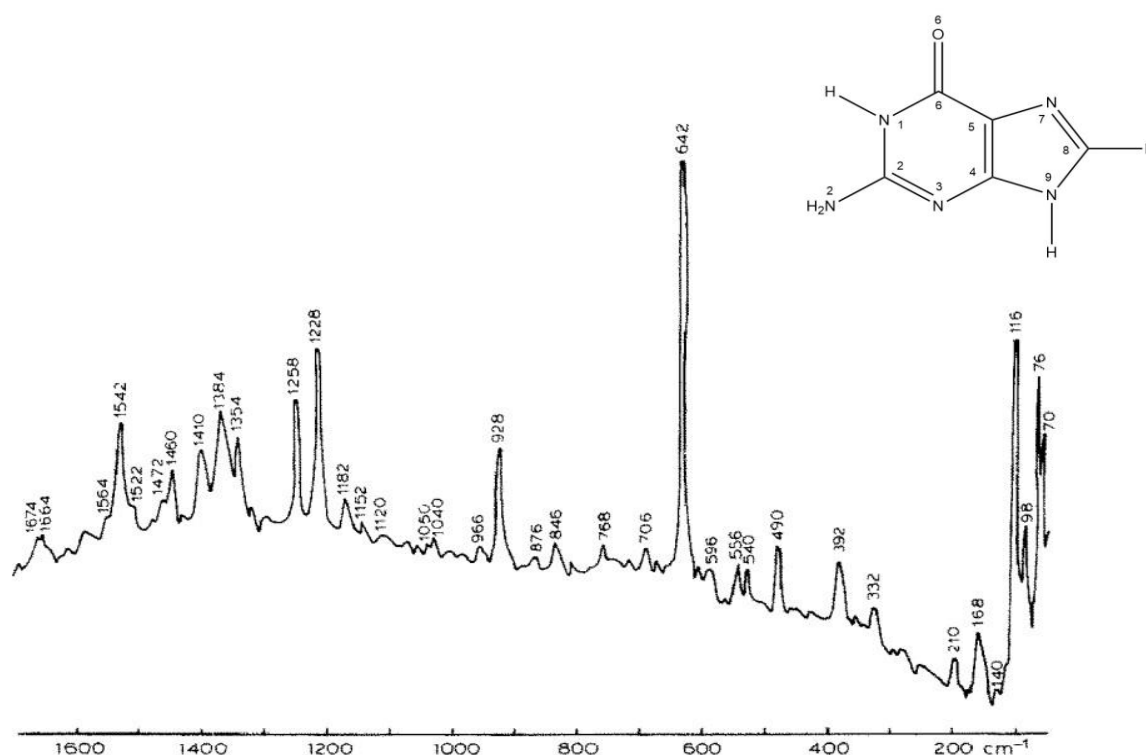
Vodena otopina gvanina također utječe na vibracije koje uključuju interakcije između različitih dijelova molekule. Primjerice, kombinirane vibracije istezanja veza N₇-C₈ i C₈-N₉, koje pokazuju osjetljivost na promjene u okolini, doživljavaju blage promjene u položajima odgovarajućih vrpca što ukazuje na prisutnost složenih međumolekulskih interakcija.¹¹

Tablica 3. Specifične vibracije gvanina u vodenoj otopini¹¹

Vibracija	Valni broj (cm ⁻¹)
C ₆ =O ₁₃ Istezanje	1675
Deformacija NH ₂ skupine (striženje; <i>scissoring</i>)	1613
"Disanje prstena" (<i>ring breathing</i>)	619
N ₇ -C ₈ Istezanje	1365

2.2.2. Ramanov spektar gvanina

Na slici 9 prikazan je eksperimentalno dobiven Ramanov spektar gvanina, a detaljan prikaz intenzivnih vrpca i pripadajućih vibracijskih modova nalazi se u tablici 4. Za snimanje Ramanovog spektra gvanina korišten je spektrometar s pobudnim zračenjem pri 514,5 nm. Spektrometar je opremljen disperzivnim rešetkama, što omogućuje preciznu analizu Ramanovih pomaka. Detekcija je provedena pomoću CCD (engl. *Charge-Coupled Device*)



detektora, a razlučivanje uređaja iznosilo je 1 cm^{-1} .

Slika 9. Ramanov spektar gvanina¹²

Vibracija istezanja C=O veze pojavljuje se kao jedna od najistaknutijih vrpca u spektru, što je u skladu s očekivanjima za molekulu gvanina. Ova vibracija se nalazi na 1664 cm^{-1} , a pripisuje se vibraciji istezanja keto skupine ($\text{C}_6=\text{O}_6$).¹² Ova vrpca je važna jer ukazuje na stabilnost keto oblika gvanina u ispitivanom uzorku, pri čemu prisutnost ove vibracije potvrđuje dominaciju keto-tautomera u uvjetima u kojoj je spektar snimljen.

Striženje NH_2 rezultira vrpčama na 1472 i 1460 cm^{-1} i njeni položaji u spektru se mijenjaju ovisno o interakcijama s okolinom, poput formiranja vodikovih veza.¹² U ovom

slučaju položaj vrpce odgovara spektru snimljenom u standardnim uvjetima te ne upućuje na dodatne međumolekulske interakcije.

Vrpce u Ramanovom spektru gvanina na 1384 i 1354 cm^{-1} odgovaraju kombinaciji vibracija istezanja veza $\text{N}_7\text{-C}_8$ i $\text{C}_8\text{-N}_9$.¹² Ova vibracije su vrlo osjetljive na promjene u kemijskoj okolini molekule, što može uključivati međumolekulske interakcije ili promjene u tautomernom obliku molekule. Stabilnost ove vrpce i njen intenzitet u Ramanovom spektru ukazuju na konzistentnost strukture gvanina unutar uzorka i naglašava otpornost molekule na promjene u eksperimentalnim uvjetima.¹² Kako se vibracija odnosi na veze unutar prstena, njezin intenzitet je pod utjecajem promjena u elektronskoj gustoći unutar molekule. Ova vibracija istezanja također može služiti kao pokazatelj međumolekulskih interakcija, posebno u slučajevima gdje gvanin veže s drugim molekulama ili stvara agregate. U takvim slučajevima, promjene u intenzitetu ili pomak u položaju ove vrpce mogu ukazivati na stvaranje novih interakcija, što može utjecati na ukupnu strukturnu stabilnost molekule.¹²

Vrpca koja se nalazi na 1258 cm^{-1} pripisuje se vibracijama istezanja veza $\text{C}_4\text{-C}_5$. Ova vibracija je također povezana s prstenom purina i pokazuje kako se unutarnje veze u prstenu raspoređuju kroz molekulu.¹² Promjena položaja ove vrpce u Ramanovom spektru može ukazivati na promjenu u lokalnoj kemijskoj strukturi, posebno ako su prisutne interakcije s molekulama otapala ili drugi vanjski utjecaji.

Vrpce na 1228 cm^{-1} doprinose vibracije koje uključuje istezanje $\text{C}_8\text{-N}_9$ i $\text{C}_5\text{-N}_7$.¹² Ova vrpca je važna jer kombinira informacije iz različitih dijelova molekule, pružajući sveobuhvatan uvid u dinamiku unutar prstena. Prisustvo ove vrpce u spektru gvanina ukazuje na postojanost i stabilnost ovih veza unutar molekule u eksperimentalnim uvjetima.

Vrpce na 966 i 928 cm^{-1} u Ramanovom spektru gvanina obično odgovaraju vibracijama unutar purinskog prstena. Tako se vrpca na 966 cm^{-1} pripisuje deformacijama prstena u ravnini (engl. *in-plane*, ip) C-N i C-C veza unutar purinskog prstena. Ova vibracija uključuje kretanje atoma unutar prstena koje zadržava molekulu unutar jedne ravnine. Opisano svijanje može biti povezano s promjenama u elektronskoj gustoći unutar prstena, što također može pomoći razumijevanju stabilnosti strukture i pokazatelj tautomernih promjena u molekuli. Vrpca na 928 cm^{-1} također se pripisuje deformacijama prstena unutar ravnine, ali s naglaskom na kombinirane deformacije C-N i N-H veza. Ove vibracije su karakteristične za kretanje atomskih skupina unutar prstena, gdje dolazi do deformacije veza koje povezuju ugljikove i dušikove atome.¹²

Vrpce u nižem području valnih brojeva, poput one na 683 cm^{-1} , pripisuju se deformacijama prstena i važne su jer pružaju informacije o mogućim tautomernim promjenama u molekuli gvanina.¹²

Vibracija disanja prstena (engl. *ring breathing*), koja je karakteristična za purinski prsten gvanina, pojavljuje se na 642 cm^{-1} .¹² Promjena položaja i/ili intenziteta spomenute vrpce mogu ukazivati na promjene u simetriji, interakcije prstena s drugim molekulama ili postojanje unutarmolekulskih interakcija.

Ostale vrpce u području „otiska prsta“ su slabijeg intenziteta. Tako vrpca na 556 cm^{-1} odgovara rastezanju (C–C=C), dok bi vrpca na 540 cm^{-1} mogla biti povezana s vibracijom (N–C=C) unutar prstena. Također, vrpca na 540 cm^{-1} može nastati zbog druge deformacije (N–C–C), uključujući modove (N₉–C₄=C₅) i (N₇–C₄=C₅).

Za timin je otkriveno da je savijanje veze C=O lokalizirano na 432 cm^{-1} .¹² Prema jednoj Ramanovoj studiji, deformacija karboksilne skupine može se također nalaziti u tom frekvencijskom području.¹² Stoga, vrpca na 392 cm^{-1} dodijeljena je deformaciji C=O veze. Frekvencije zabilježene na ili ispod 332 cm^{-1} su povezane s vodikovim vezama i međukristalnim silama.

Tablica 4. Asignacije vibracija u Ramanovom spektru gvanina¹²

Valni broj (cm ⁻¹)	Asignacija vibracije	Opis
1664	$\nu(\text{C}=\text{O})$	Vibracija istezanja keto skupine (C ₆ =O ₆)
1472, 1460	striženje NH ₂ (<i>scissoring</i>)	Međumolekulske interakcije unutar molekule
1384, 1354	$\nu(\text{N}_7-\text{C}_8)$ i $\nu(\text{C}_8-\text{N}_9)$	Kombinirana vibracija, osjetljiva na kemijske uvjete
1258	$\text{N}(\text{C}_4-\text{C}_5)$	Vibracija veza unutar prstena purina
1228	$\nu(\text{C}_8-\text{N}_9)$ i $\nu(\text{C}_5-\text{N}_7)$	Kombinirana vibracija veza, dinamička unutar prstena
966	$\Delta(\text{C}-\text{N}$ i $\text{C}-\text{C})$	Savijanje unutar ravnine prstena
928	$\Delta(\text{C}-\text{N}$ i $\text{N}-\text{H})$	Deformacija veza unutar prstena
683	Deformacija prstena	Fleksibilnost i tautomerne promjene unutar prstena
642	"Disanje prstena" (<i>ring breathing</i>)	Simetrična ekspanzija i kontrakcija prstena
556	$\nu(\text{C}-\text{C}=\text{C})$	Rastezanje unutar prstena
540	$\nu(\text{N}-\text{C}=\text{C})$	Vibracija unutar prstena
490	$\Delta(\text{N}-\text{C}-\text{C})$	Deformacija prstena
390	C=O savijanje	Savijanje C=O veze
332	Intermolekularne sile	Deformacija uzrokovana vodikovim vezama i međukristalnim silama
392	$\delta(\text{C}=\text{O})$	Deformacija karboksilne skupine (C=O)

v: istezanje; δ : deformacija; Δ : *In-plane* deformacija prstena

2.2.3. Utjecaj eksperimentalnih uvjeta

Promjene eksperimentalnih uvjeta poput vrijednosti pH, prisutnost otapala i vodikove veze jako utječu na izgled Ramanovog spektra gvanina. Promjene se reflektiraju kroz pomake u položajima i intenzitetima vrpci, stoga je Ramanova spektroskopija vrlo dobra metoda za analizu i strukturnu karakterizaciju molekula pod utjecajem različitih eksperimentalnih uvjeta.

2.2.3.1. Utjecaj otapala

Prisutnost otapala ima velik utjecaj na Ramanov spektar gvanina. Molekule otapala mogu stvoriti vodikove veze s funkcijskim skupinama gvanina, kao što su C=O i NH₂ skupine. Nastale vodikove veze mogu dovesti do promjena u frekvenciji vibracija zbog promjena u

elektronskoj gustoći i jačini kemijskih veza. Kada gvanin stupi u interakciju s polarnim otapalima poput vode, vrpca vibracije istezanja C=O skupine može se pomaknuti prema nižim vrijednostima. To je zbog smanjenja „krutosti“ C=O veze, jer vodikove veze s molekulama otapala smanjuju energiju potrebnu za vibraciju ove veze. U spektru se to manifestira kao pomak vrpce prema nižim valnim brojevima i smanjenje intenziteta, jer je energija vibracije raspodijeljena na više interakcija. U nepolarnim otapalima, gdje su interakcije manje izražene, Ramanov spektar pokazuje manje pomake vrpca i slabije intenzitete.⁹

2.2.3.2. Utjecaj pH

Promjena pH vrijednosti otopine također utječe na tautomernu ravnotežu gvanina. U kiselim uvjetima, gvanin se može protonirati na položaju N₇ ili O₆, što dovodi do nastajanja različitih tautomernih oblika. Ovi oblici imaju različite vibracijske modove zbog promjene raspodjele elektrona u molekuli. Primjerice, u kiselim uvjetima može doći do povećanja frekvencije vibracije istezanja N–H veza zbog protonacije, što se u spektru vidi kao pomak vrpce prema većim valnim brojevima. S druge strane, u alkalnim (bazičnim) uvjetima može doći do deprotonacije, što također mijenja elektronsku raspodjelu i vibracijske modove te se vrpce pomiču prema nižim valnim brojevima i mijenja im se intenzitet.⁹

2.2.3.3. Utjecaj vodikovih veza

Vodikove veze utječu na stabilizaciju strukture gvanina, osobito u čvrstom stanju i u vodenim otopinama. Ove veze utječu na Ramanov spektar, posebno na vrpce povezane s vibracijama koje uključuju NH₂ i C=O skupine. Jače vodikove veze obično dovode do smanjenja frekvencije vibracija jer se smanjuje energija potrebna za istezanje veza i vrpce se pomiču prema nižim valnim brojevima pri čemu dolazi do smanjenja intenziteta vrpca.⁹

2.3. Primjena Ramanove spektroskopije u analizi gvanina

Analiza gvanina pomoću Ramanove spektroskopije koristi se u biokemijskim istraživanjima, farmaceutskoj industriji i u razvoju novih dijagnostičkih tehnika. Moguća je identifikacija specifičnih tautomernih oblika gvanina, praćenje njegovih interakcija s metalnim ionima te analiza strukturnih promjena u različitim uvjetima.¹³

2.3.1. Analiza tautomernih oblika gvanina

Fiziološka temperatura ljudskog tijela je oko 37°C. U tim uvjetima, gvanin je stabilan i može sudjelovati u biološkim procesima poput replikacije i transkripcije DNA. Unutar stanica, pH vrijednost je blago bazična, obično oko 7,2 do 7,4. Kod takvog pH gvanin je u obliku stabilnog keto-tautomera. U ovoj formi gvanin ima C=O (keto) skupinu i amino skupinu (NH₂) koje sudjeluju u stvaranju vodikovih veza s drugim bazama. U fiziološkim uvjetima, gvanin se nalazi u prisutnosti različitih iona, poput Na⁺, K⁺, i Mg²⁺, koji stabiliziraju strukture DNA i RNA. Također, molekule vode su prisutne kao otapalo koje omogućuje pravilno stvaranje vodikovih veza između baza.

Ramanova spektroskopija omogućuje razlikovanje tautomernih oblika gvanina na temelju njihovih specifičnih vibracija. Vibracije istezanja C=O i N-H veza u različitim tautomernim oblicima javljaju se na različitim valnim brojevima. Navedeno je važno u istraživanju mutacija u DNA, gdje promjene u tautomernim oblicima gvanina mogu utjecati na stabilnost i funkcionalnost genetskog materijala. Farmaceutska industrija oslanja se na razumijevanje tautomernih oblika gvanina kako bi se omogućio razvoj lijekova koji su usmjereni na specifične baze u nukleinskim kiselinama, što omogućuje precizniju terapiju.¹³

2.3.2. Interakcije gvanina s metalnim ionima

Gvanin stvara interakcije i s metalnim ionima u stanici koji sudjeluju u raznim fiziološkim funkcijama. Ioni ne samo da stabiliziraju strukturu nukleinskih kiselina poput DNA i RNA, već sudjeluju i u regulaciji različitih biokemijskih procesa, uključujući enzimske aktivnosti i signalne puteve. Ramanova spektroskopija omogućuje praćenje tih interakcija kroz promjene u spektru koje nastaju uslijed kompleksiranja gvanina s metalnim ionima.¹³ Metalni ioni se mogu vezati na specifične atome u molekuli gvanina, kao što su dušik ili kisik, što dovodi do promjena u elektronskoj gustoći unutar molekule.¹³ Pomak u frekvencijama vibracija često se manifestira kao promjena položaja vrpce u spektru, posebno onih povezanih s vibracijama C=O i N-H veza, dok intenzitet vrpce može varirati, ovisno o jačini vezanja iona na gvanin. Različiti metalni ioni mogu uzrokovati različite promjene u spektru, omogućujući razlikovanje vrsta iona na temelju prikupljenih spektralnih podataka.

2.4. Zaključak

Ramanova spektroskopija se pokazala kao dobar način karakterizacije gvanina te omogućuje precizno određivanje tautomernih oblika, praćenje interakcija s metalnim ionima i razumijevanje utjecaja različitih fizioloških i kemijskih uvjeta na molekulsku strukturu.

Usporedba teorijskih izračuna vibracijskih modova gvanina (poglavlje 2.2.1) s eksperimentalno dobivenim Ramanovim spektrima (poglavlje 2.2.2) pokazuje visoku razinu kompatibilnosti, što potvrđuje valjanost primijenjenih teorijskih modela. Teorijski izračuni, izvedeni metodama poput DFT (engl. *Density Functional Theory*), omogućuju predviđanje frekvencija vibracija i intenziteta vrpca, što se pokazalo vrlo korisnim za tumačenje eksperimentalnih podataka. Primjerice, vibracije istezanja C=O veze, koje su teorijski predviđene na približno 1675 cm^{-1} , vrlo su dobro korelirale s eksperimentalno dobivenom vrpcom pri 1664 cm^{-1} . Ovakvo podudaranje ukazuje na to da teorijski modeli uspješno oponašaju stvarnu molekularnu dinamiku gvanina u proučavanim uvjetima.

Međutim, postoje i određene razlike između teorijskih i eksperimentalnih rezultata koje se ne mogu zanemariti. Vibracije povezane sa striženjem NH_2 skupine pokazale su blago odstupanje predviđenih od eksperimentalno dobivenih frekvencija, što može biti posljedica složenih međumolekulskih interakcija i/ili utjecaja specifičnih eksperimentalnih uvjeta koji nisu u potpunosti obuhvaćeni teorijskim modelima. Odstupanja upućuju na potrebu za finijim usavršavanjem teorijskih modela kako bi se postigla još bolja korelacija s eksperimentalnim podacima i kasnije olakšala analiza spektara.

Eksperimentalni rezultati također su istaknuli utjecaj vodikovih veza i interakcija s otapalom na vibracijska svojstva gvanina. Usporedba podataka dobivenih u različitim uvjetima pokazala je da prisutnost otapala, kao što je voda, može znatno utjecati na frekvencije vibracija, posebno na vibracije istezanja C=O i NH_2 skupina. Teorijski modeli su manje učinkoviti u predviđanju ovih efekata, što ukazuje na potrebu za promjenom parametara modela ili uključivanjem dodatnih faktora koji uspješnije oponašaju stvarne eksperimentalne uvjete.

Iako teorijski modeli pružaju dobru osnovu za razumijevanje vibracijskih svojstava, njihova kombinacija s eksperimentalnim podacima nužna je za postizanje potpune slike o molekulskim karakteristikama gvanina. Kompatibilnost između teorijskih i eksperimentalnih rezultata je visoka, ali postoje aspekti koje treba dodatno istražiti i usavršiti kako bi se postigla još veća preciznost i razumijevanje.

Rezultati ističu važnost kontinuiranog razvoja teorijskih modela i njihove prilagodbe specifičnim uvjetima eksperimentalnih sustava, što će omogućiti još bolju interpretaciju spektroskopskih podataka i primjenu u biomedicinskim istraživanjima i razvoju novih terapija.

§ 3. LITERATURNI IZVORI

1. C. N. Banwell, *Fundamentals of Molecular Spectroscopy*, McGraw Hill, London, 1983, str. 1–32.
2. P. Novak, T. Jednačak, *Strukturna analiza spojeva spektroskopskim metodama*, TIVA, Varaždin, 2013, str. 63–73.
3. E. Smith, G. Dent, *Modern Raman Spectroscopy – A Practical Approach*, John Wiley & Sons, Norwich, 2005, str. 72–93.
4. T. Cvitaš, *Fizikalna kemija* (interna skripta), Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb, 2014, str. 1–34.
5. <https://courses.lumenlearning.com/suny-mcc-organicchemistry/chapter/dipole-moments/> (datum pristupa 13. kolovoza 2024.)
6. <https://www.chemistrylearner.com/polarizability.html> (datum pristupa 13. kolovoza 2024.)
7. <https://www.intechopen.com/chapters/72277> (datum pristupa 11. kolovoza 2024.)
8. R. L. McCreery, *Raman spectroscopy for Chemical Analysis*, John Wiley & Sons, New York, 2000, str. 73–95.
9. L.-J. Yu, R. Pang, S. Tao, H.-T. Yang, D.-Y. Wu, Z.-Q., *J. Phys. Chem. A* **117** (2013), 4286–4296.
10. R. P. Lopes, M. P. M. Marques, R. Valero, J. Tomkinson, L. A. E. Batista de Carvalho, *Spectroscopy: An International Journal* **27** (2012) 273–292.
11. G. N. Ten, T. G. Bourova, V. I. Baranov, *Journal of Structural Chemistry* **46** (2005) 998–1005.
12. M. Mathlouthi, A. M. Seuvre, J. L. Koenig, *Carbohydrate Research* **146** (1986) 15–27
13. J. Palacký, M. Vorlíčková, I. Kejnovská, P. Mojzeš, *Nucleic Acids Research* **41** (2013) 1005–1016.