

Ramanova spektroskopija adenina

Vuković, Lovra

Undergraduate thesis / Završni rad

2022

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:217:938226>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-10-07**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijski odsjek

Lovra Vuković

Studentica 3. godine Preddiplomskog sveučilišnog studija KEMIJA

RAMANOVA SPEKTROSKOPIJA ADENINA

Završni rad

Rad je izrađen u Zavodu za analitičku kemiju

Mentor rada: doc. dr. sc. Adriana Kendel

Zagreb, 2022.

Datum predaje prve verzije Završnog rada:

14. srpnja 2022.

Datum ocjenjivanja Završnog rada i polaganja Završnog ispita:

23. rujna 2022.

Mentor rada: doc. dr. sc. Adriana Kendel

Potpis:

SADRŽAJ

§ SAŽETAK.....	V
§ 1. UVOD.....	1
§ 2. PRIKAZ ODABRANE TEME	2
2.1. Adenin	2
2.1.1. Građa adenina	2
2.1.2. Funkcija adenina.....	4
2.2. Ramanova spektroskopija	5
2.2.1. Osnove Ramanove spektroskopije.....	5
2.2.2. Ramanov spektrometar	8
2.3. Ramanova spektroskopija adenina	9
2.4. Primjena Ramanove spektroskopije u određivanju strukture adenina pri različitom pH i u prisutnosti manganovih(II) kationa.....	14
§ 3. LITERATURNI IZVORI.....	XVIII

§ Sažetak

Adenin, kemijskim imenom 6-aminopurin, najpoznatija je purinska baza, uz gvanin. Zbog svoje građe i dostupnosti u samom organizmu sudjeluje u mnogim procesima kao što su izgradnja kofaktora, komunikacija unutar i izvan stanice, izgradnja potencijalnih antitumorskih lijekova i sl. U prvom dijelu rada opisuje se struktura, uloga i funkcija adenina.

Izabrana vibracijska spektroskopska metoda, osim što služi za identifikaciju spojeva i kvantitativno određivanje količine tvari u uzorku, koristi se za određivanje polimorfije, kristalne građe i interakcija u molekulama. Prilikom istraživanja adenina primjenjuje se Ramanova spektroskopija u sprezi s kvantnomehaničkim izračunima. Opisana je teorijska pozadina Ramanove spektroskopije i sam princip rada spektrometra. Uspoređene su Ramanove vrpce adenina dobivene eksperimentalnim mjerenja i teorijskim izračunima.

Ramanovom spektroskopijom moguće je prikazati utjecaj niskih pH vrijednosti na strukturu deoksiribonukleinske kiseline, a time i na adenin kao njezin gradivni element. Veliki utjecaj na dušične baze nukleotida ima i mala prisutnost divalentnih metalnih iona (Mn^{2+}), a u ovom radu opisan je utjecaj metalnog kationa na molekule adenina.

§ 1. UVOD

Adenin i gvanin spadaju u skupinu purina građenih od dva kondenzirana aromatska heterociklička prstena, a razlikuju se prema položaju funkcijskih skupina na šesteročlanom pirimidinskom prstenu. Adenin s timinom može stvarati dvije vodikove veze stabilizirajući tako dvostruku uzvojnica deoksiribonukleinske kiseline, ali u organizmu može djelovati i kao nesparena baza u sintezi proteina u stanici, metaboličkih signala i sl. Kao nesparena baza može postojati u više protoniranih tautomernih oblika, ovisno o okolini u kojoj se nalazi.

Ramanova spektroskopija temelji se na neelastičnom raspršenju elektromagnetnog zračenja uslijed međudjelovanja s uzorkom. Kada se pod utjecajem monokromatskog zračenja tijekom vibracije mijenja polarizabilnost molekule, takva vibracija bit će aktivna u Ramanovom spektru. Na temelju Ramanovih vrpca karakterističnih za određene funkcijske skupine moguće je identificirati spojeve i odrediti njihovu strukturu. Također, uočene razlike u spektrima ovise o strukturnim promjenama koje se događaju prilikom promjene pH ili utjecajem drugih molekula u sustavu.

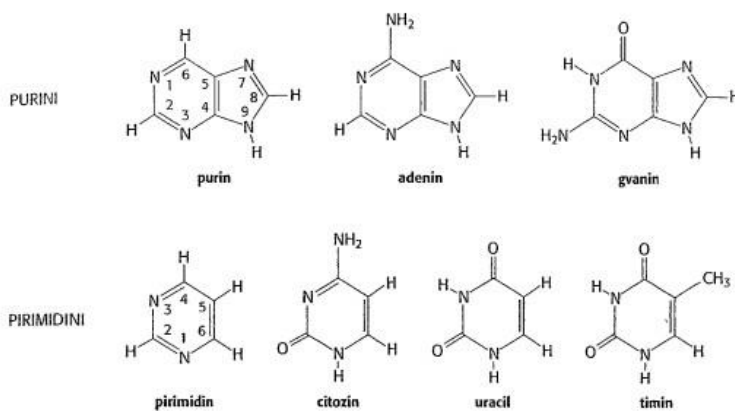
Istraživanje opisano u ovom radu opisuje utjecaj pH na protonaciju adenina te utjecaj manganovih iona na strukturu adenina, odnosno deoksiribonukleinske kiseline dobivene iz telećeg timusa.

§ 2. PRIKAZ ODABRANE TEME

2.1. Adenin

2.1.1. Građa adenina

Najpoznatije nukleinske kiseline, deoksiribonukleinska kiselina (eng. *deoxyribonucleic acid*, DNA) i ribonukleinska kiselina (eng. *ribonucleic acid*, RNA) građene su od velikog broja nukleotida povezanih fosfodieterskom vezom i zbog svoje kovalentne strukture idealne su za prijenos genetičke informacije među generacijama. Svaki nukleotid sastoji se od šećera, riboze ili deoksiriboze, koji gradi okosnicu nukleinskih kiselina, fosfatne skupine i dušične baze povezanih N-glikozidnom vezom s molekulom šećera. Okosnica nukleinskih kiselina ostaje nepromijenjena dok se baze mijenjaju ovisno o nukleotidu. Dvije baze u DNA derivati su purina; adenin (A) i gvanin (G), a dvije pirimidina; citozin (C) i timin (T) (slika 1).¹

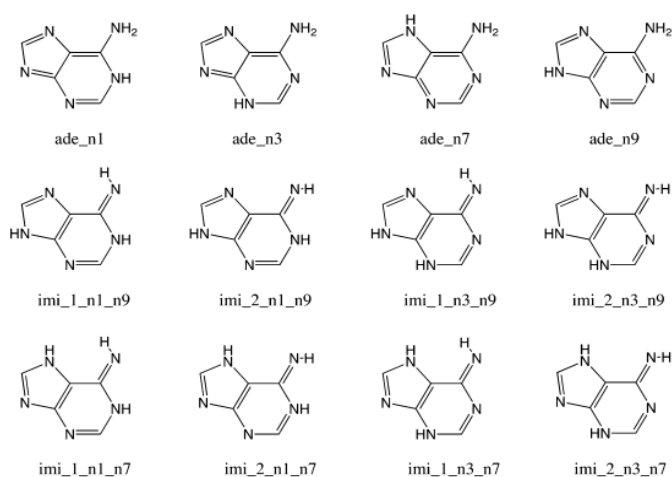


Slika 1. Purini i pirimidini. U RNA nalazimo uracil umjesto timina¹

Purini su heterociklički aromatski spojevi građeni od jednog šesteročlanog piridinskog i jednog peteročlanog imidazolnog prstena spojenih preko C4 i C5 atoma. U svojoj strukturi purini sadrže pet atoma ugljika, četiri atoma dušika i četiri atoma vodika. Dušične baze adenin i gvanin razlikuju se po funkcijskim skupinama supstituiranim na različitim C atomima heterocikličkog

sustava. Purinske baze adenin i gvanin vežu se vodikovim vezama s komplementarnim tautomernim oblikom određene pirimidinske baze (T/U i C) po Watson – Crick modelu. Nespareni oblici purina mogu služiti za sintezu proteina u stanici, proizvodnju lijekova (npr. antitumorski lijekovi), sintezu metaboličkih signala, u reakcijama fosforilacije i kao esencijalni kofaktori.²

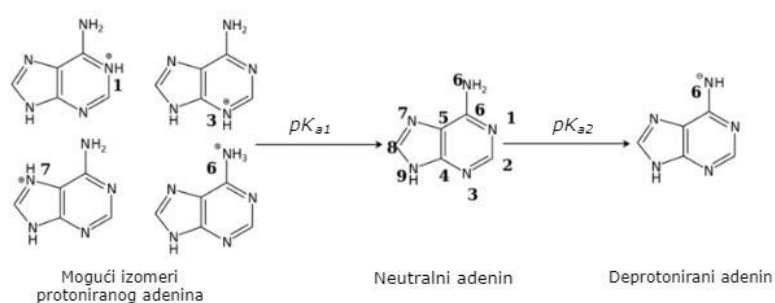
Adenin ($C_5H_5N_5$, $M = 135.13$ g/mol), 6 – aminopurin je najstabilnija dušična baza koja gradi nukleotide i na C6 atomu šesteročlanog prstena sadrži amino skupinu. Služi kao prekursor za sintezu adenzina i deoksiadenzina (nukleozida). Kondenzirani aromatski prstenovi koji sadrže atome dušika u strukturi omogućuju postojanje čak 14 različitih tautomera u plinovitom stanju i vodenoj otopini, od kojih su četiri amino i deset imino forma (slika 2, nedostaju dvije imino forme). Najstabilniji tautomerni oblik izolirane molekule i molekule u krutom stanju je kanonski oblik (N9H).³



Slika 2. Tautomeri adenina⁴

Adenin može postojati u protoniranim i deprotoniranim oblicima tautomera (slika 3), a udio određenih tautomera ovisi o reakcijskim uvjetima sustava. U otopini se preferirano protonira N1 atom, dok je u plinovitom stanju moguća protonacija bilo kojeg atoma dušika u molekuli.⁵ Adenin može postojati u kondenziranom obliku i u formi bezvodne molekule koja kristalizira

u monoklinskom sustavu, u čijoj se jediničnoj ćeliji nalazi osam molekula adenina ($C_5H_5N_5$) vidljivih na slici 7.³



Slika 3. Smjesa različitih tautomera protoniranog adenina i prosječne vrijednosti pK_a prilikom protonacije i deprotonacije⁶

2.1.2. Funkcija adenina

Adenin može imati različite funkcije, ali ključnu ulogu ima u samom organizmu. Postojanje protoniranih i tautomernih vrsta otežava predviđanje njihove stabilnosti i relativne zastupljenosti, no unatoč tome jedna od glavnih uloga adenina je izgradnja genetičkog materijala, točnije nukleinskih kiselina. Adenin povezan dvjema vodikovim vezama s timinom u DNA ili s uracilom u RNA stabilizira dvostruku odnosno jednostruku uzvojnica nukleinskih kiselina što čini mogućima daljnje procese replikacije, transkripcije i translacije.¹ Dvostruku uzvojnica DNA destabiliziraju različiti faktori i utjecaji, među koje spadaju i divalentni metalni kationi pri niskim vrijednostima pH.⁷ Razna istraživanja pokazala su da je „mokra“ DNA, koja u sebi sadrži hidratizirane dušične baze A, C, G i T dobar prenositelj naboja, točnije da se ponaša kao dobar vodič, dok je „suha“ DNA, koja sadrži bezvodne dušične baze, izolator ili poluvodič.⁸

Osim što je građevna jedinka DNA i RNA, adenin sudjeluje i u važnim biološkim procesima. U reakcijama oksidativne fosforilacije javlja se u obliku visokoenergetskih prenositelja elektrona nikotinamid adenin dinukleotida (NADH) i flavin adenin nukleotida (FAD), koji uz pomoć protonskih crpki stvaraju protonski gradijent te sintetiziraju glavnu energetsku jedinicu adenozin 5' trifosfat (ATP). Osim što izgrađuje kofaktore i stvara energiju

potrebnu za normalnu funkciju stanice i organizma, adenin može graditi i spojeve odgovorne za komunikaciju unutar stanice i izvan nje. Molekulu cikličkog adenozin monofosfata (cAMP) aktivira enzim adenil ciklaza uz pomoć već spomenutog ATP-a i djeluje kao sekundarni glasnik.¹

Posebna značajka adenina je antitumorsko djelovanje zbog kojeg se smatra izrazito važnom dušičnom bazom. Zbog učinka na inhibiciju rasta tumorskih stanica, adenin se vrlo intenzivno proučava u današnjim istraživanjima vezanim uz antitumorske lijekove.⁹

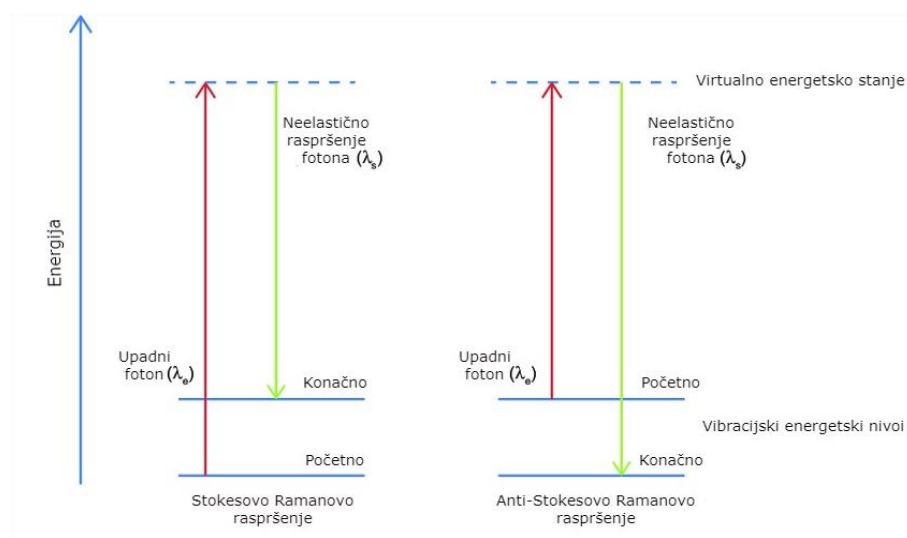
2.2. Ramanova spektroskopija

2.2.1. Osnove Ramanove spektroskopije

Ramanova spektroskopija je metoda vibracijske spektroskopije koja se koristi za određivanje strukture molekula, komplementarna infracrvenoj spektroskopiji.

Kada usmjerimo elektromagnetsko zračenje na neku tvar, može doći do apsorpcije zračenja, raspršenja zračenja ili zračenje može proći kroz tvar bez interakcija.¹⁰ Kako bi došlo do apsorpcije zračenja, koja se promatra u infracrvenoj spektroskopiji, energija upadnog zračenja mora odgovarati razlici energije između dva vibracijska stanja. Ramanova spektroskopija se temelji na raspršenju zračenja. Uzorak se pobuđuje zračenjem samo jedne valne duljine koja ne mora odgovarati razlici energije dvaju vibracijskih stanja. Zato se kao izvori zračenja mogu koristiti laseri koji emitiraju zračenje u ultraljubičastom, vidljivom i bliskom infracrvenom području. Interakcijom upadnog monokromatskog zračenja i molekule polarizira se elektronski oblak oko jezgara atoma. Pri tome nastaje kratkoživuće stanje molekule koje se naziva virtualno stanje. Virtualno stanje nije stvarno energijsko stanje molekule, nastaje samo pod utjecajem vanjskog zračenja te njegova energija ovisi o energiji pobude. Iz virtualnog stanja se brzo otpuštaju fotoni zračenja i molekula se vraća u osnovno stanje. Fotoni se mogu raspršiti elastično i neelastično. Kod elastičnog raspršenja, koje se još naziva i Rayleighovo, raspršeni foton ima jednaku energiju kao i pobudni foton i takvo raspršenje je dominantno, ali ne daje informaciju o strukturi molekule. Uslijed neelastičnog Ramanovog raspršenja, energija upadnog fotona i raspršenog fotona se razlikuju. Ramanovo raspršenje se dijeli na Stokesovo i anti-Stokesovo (slika 4). Stokesovo raspršenje nastaje kada se molekula pobuđuje iz osnovnog vibracijskog stanja u virtualno stanje te se raspršenjem fotona vraća u pobuđeno vibracijsko stanje. U ovom slučaju energija raspršenog fotona je manja od energije upadnog fotona za

vrijednost koja odgovara energiji prijelaza između dva vibracijska stanja. Kod anti-Stokesovog raspršenja molekula iz pobuđenog vibracijskog stanja, nakon ozračivanja, prelazi u virtualno stanje iz kojeg se vraća u osnovno vibracijsko stanje i raspršeni foton ima veću energiju od upadnog fotona.¹¹



Slika 4. Prikaz Stokesovih i anti-Stokesovih vrpca¹²

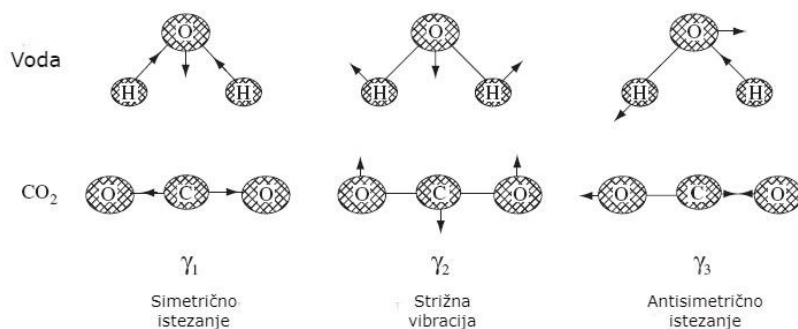
Stokesov i anti-Stokesov spektar daju istu informaciju o strukturi molekula, ali Stokesovo raspršenje se uobičajeno mjeri u Ramanovoj spektroskopiji, s obzirom da se mali broj molekula nalazi u pobuđenom vibracijskom stanju na sobnoj temperaturi, a koje pridonose anti-Stokesovom raspršenju. Relativni intenziteti Stokesovog i anti-Stokesovog raspršenja ovise o broju molekula u osnovnom i pobuđenom vibracijskom stanju molekule, a njihov odnos može se izračunati pomoću Boltzmanove jednadžbe (1)¹³

$$\frac{N_n}{N_m} = \frac{g_n}{g_m} e^{\left[\frac{-(E_n - E_m)}{kT}\right]} \quad (1)$$

gdje je N_n broj molekula u pobuđenom stanju, a N_m broj molekula u osnovnom stanju. g_n je degeneracija n razine, a g_m degeneracija m razine, E_n energija pobuđenog vibracijskog stanja, a

E_m energija osnovnog vibracijskog stanja. k je Boltzmannova konstanta i iznosi $1,3807 \times 10^{-23}$ JK⁻¹, dok je T temperatura izražena u Kelvinima.

Ramanovo raspršenje se zbiva uslijed vibracija koje mijenjaju polarizabilnost nakon pobude zračenjem, stoga skupine bogate elektronima poput aromatskih sustava ili nezasićenih veza vrlo intenzivno raspršuju zračenje. Broj i vrsta vibracija molekule ovisi o broju atoma u molekuli te samoj geometriji molekule. Kod višeatomnih molekula gibanje je određeno stupnjem slobode kod kojeg će nelinearne molekule imati ukupno šest (tri translacijska i tri rotacijska), a linearne će imati pet (tri translacijska i dva rotacijska) stupnjeva slobode. Za nelinearne molekule broj vibracijskih stupnjeva slobode je dan formulom $3N - 6$, dok je za linearne jednak $3N - 5$ (N označava broj atoma u molekuli).¹¹ Vibracije se najčešće dijele na dvije vrste. To su vibracije istezanja (ν), gdje se mijenja duljina veze, i vibracije svijanja ili deformacije (δ), pri kojim se mijenja kut između veza. Istezne vibracije mogu biti simetrične (ν_s), gdje se atomi istovremeno gibaju prema središnjem ili od središnjeg atoma, te antisimetrične (ν_{as}), pri kojima se atomi gibaju naizmjenično, u odnosu na središnji atom. Vibracije svijanja dijele se na deformacije u ravnini (engl. *in plane*, δ_{ip}) i deformacije van ravnine (engl. *out of plane*, δ_{oop}). Kod troatomnih skupina, deformacije u ravnini se dodatno dijele na striženje (engl. *scissoring*, *sc*) i zibanje (engl. *rocking*, *rc*), a deformacije van ravnine na klaćenje (engl. *wagging*, *wg*) i uvijanje (engl. *twisting*, *tw*). Na slici 5 su primjeri vibracija nelinearnih i linearnih troatomnih molekula,



Slika 5. Vibracije nelinearne (voda) i linearne (ugljkov dioksid) molekule slijeva na desno: simetrično istezanje, vibracija striženja i antisimetrično istezanje¹¹

Ramanov spektar prikazuje ovisnost Ramanovog intenziteta o valnom broju, odnosno razlici valnih brojeva. Uobičajeno je da se na apcisi navode razlike, a ne apsolutne vrijednosti valnih brojeva, jer se tako mogu uspoređivati spektri neovisno o frekvenciji pobudnog zračenja.

Ramanova spektroskopija je tehnika komplementarna infracrvenoj spektroskopiji jer je razlika u energiji sustava prije i nakon Ramanovog raspršenja jednaka energiji koju molekula apsorbira prilikom ozračivanja infracrvenim zračenjem. Zbog različitih izbornih pravila, intenzivne vrpce u infracrvenom spektru imaju mali intenzitet, dok u Ramanovom spektru obratno. Izvedbom su Ramanov i infracrveni spektrometar slični, no razlikuje ih u kojem položaju se nalazi uzorak u odnosu na zračenje i način na koji se skuplja zračenje. Ramanov spektrometar mjeri intenzitet zračenja koji se raspršuje u interakciji s uzorkom, dok infracrveni spektrometar mjeri transmisiju što pomaže kod određivanja (ne)simetričnosti molekula. Bitno je naglasiti kako infracrvena spektroskopija i Ramanova spektroskopija funkcioniraju na principu uzajamnog isključenja ukoliko se radi o molekulama s centralnom simetrijom, a to znači da će vibracije biti aktivne ili u jednom ili u drugom spektru, ali nikako u oba. Za molekule koje nemaju centralnu simetriju takvo pravilo ne vrijedi.¹¹

Prednosti Ramanove spektroskopije su jednostavnost pripreme uzorka, mogućnost snimanja plinovitih, tekućih i krutih uzoraka, mala količina uzorka za analizu, široko spektralno područje, mogućnost praćenja reakcije, dostupnost i povoljnost. Nedostaci Ramanove spektroskopije su slaba osjetljivost, pojava fluorescencije te izrazito precizna i zahtjevna mehanika i optika koje se koriste za izradu spektrometra.¹³

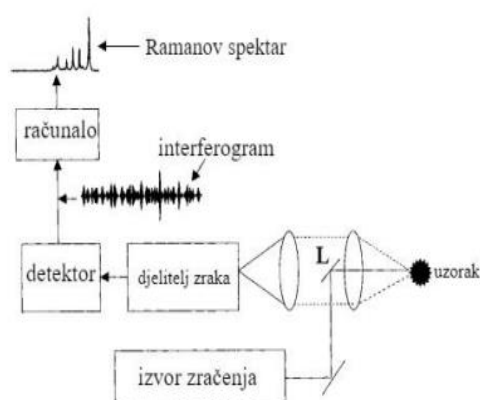
2.2.2. Ramanov spektrometar

Postoje dvije izvedbe Ramanovog spektrometra. to su disperzivni Ramanovi spektrometri i Ramanovi spektrometri s Fourierovim transformacijama.

Disperzivni Ramanov spektrometar koristi za pobudu lasere u vidljivom području elektromagnetskog spektra (najčešće kod 514 nm, 633 nm i 785 nm), dok je optički element difrakcijska rešetka, a kao detektor valnih duljina raspršenog zračenja se koristi CCD uređaj (slika 6).

Ramanov spektrometar s Fourierovom transformacijom koristi pobudno zračenje u bliskom infracrvenom području (vrlo često pri 1064 nm), a spektralno razlaganje zraka omogućava interferometar. Kao detektor koriste se poluvodiči poput germanija ili silicija, koji se dodatno hlade tekućim dušikom kako bi im se povećala osjetljivost. Prije dobivanja Ramanova spektra

(ovisnost intenziteta o valnom broju) podaci se nalaze u obliku interferograma (ovisnost intenziteta frekvencija u vremenu) koji je povezan s računalom i daje cjelokupni Ramanov spektar koji nastaje promjenom valnih duljina zraka koje padaju na detektor. Pomoću Fourierovih transformacija interferogram se prevodi u Ramanov spektar. Prednosti odabira FT-Ramanovog spektrometra jest mogućnost sakupljanja svih valnih duljina u isto vrijeme te uklanjanje fluorescencije s obzirom na korišteni laser s pobudom u NIR području.¹³



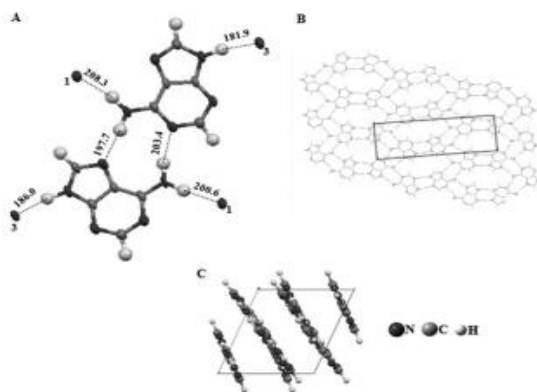
Slika 6. Shema Ramanova spektrometra s Fourierovom transformacijom¹⁴

2.3. Ramanova spektroskopija adenina

U posljednje vrijeme, povećan je interes za proučavanje dušičnih baza DNA pomoću eksperimentalnih spektroskopskih metoda spregnutih s određenim teorijskim kvantomehaničkim metodama. Dušične baze nukleotida postoje u velikom broju tautomera i teško je predvidjeti njihovu stabilnost i samim time spektralna asignacija je kompleksan zadatak.

Upotrebom Ramanove spektroskopije zajedno s teorijom funkcionalne gustoće (engl. *Density Functional Theory*, DFT) u radu je prikazana potpuna konformacijska analiza za izoliranu molekulu krutog dehidratiziranog adenina te molekulu adenina u krutom stanju u

obliku najstabilnijeg tautomera 9H – 6-aminopurina.³ Na slici 7 prikazan je dehidratizirani adenin za kojeg su snimljeni i opisani spektri u nastavku.



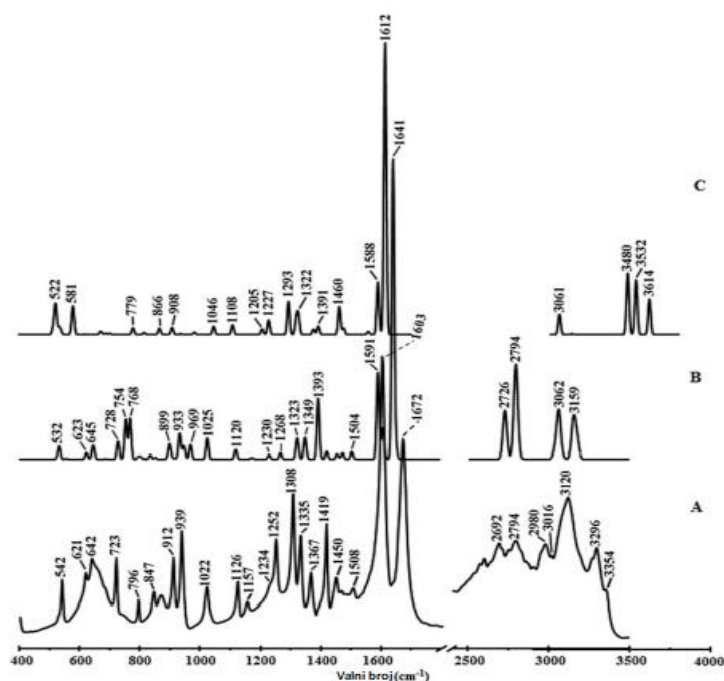
Slika 7. Prikaz (A), optimizirana nesimetrična jedinica dehidratiziranog adenina, (B) longitudinalni prikaz duž osi c , kristalna rešetka s označenom jediničnom ćelijom, (C) lateralni prikaz duž osi b , jednična ćelija

Ramanovi spektri adenina dobiveni su snimanjem na sustavu Jobin-Yvon T64000 opremljenog s holografskom rešetkom od 1800 brazda po milimetru, koji sadrži tri spektrometra radi dobivanja Ramanovih spektara visoke rezolucije, dok se za detekciju signala koristio CCD (engl. *Charge Coupled Device*) detektor dodatno hlađen tekućim dušikom. Snimanje područja vrlo niskih valnih brojeva ($20 - 200 \text{ cm}^{-1}$) osigurano je konfiguracijom trostrukog monokromatora uz termoelektrični Burle C31034, PMT (engl. *Photo Multiplier Tube*) detektor. Kao pobudno zračenje korišten je argonov laser s pobudom pri 514,5 nm (model Innova 300-05) snage 15 mW kako bi se izbjegla snažna emisija fluorescencije te skupljeno zračenje pod kutem od 90° . Sva mjerenja su izvršena pri sobnoj temperaturi.³

Vrpce opažene u Ramanovim spektrima mogu se podijeliti prema područjima valnih brojeva u tri područja:

1. Područje nižih valnih brojeva (do 950 cm^{-1}) kod kojeg se javljaju najčešće deformacije izvan ravnine u sprezi s kretanjem svih atoma u molekuli. Najniži valni brojevi (ispod 350 cm^{-1}) pripisuju se vibracijama kristalne rešetke (torzija prstena).

2. Srednje područje spektra (od 950 cm^{-1} do 1700 cm^{-1}) odgovara svijanju atoma u prstenu unutar ravnine s N–C i C–C istezanjima koja se međusobno isprepliću zbog čega je asignacija određenih vrpca zahtjevnija.
3. Područje visokih valnih brojeva (od 2700 cm^{-1} do 3400 cm^{-1}) uključuje istezne vibracije atoma ugljika s vodikovim atomima.



Slika 8. Ramanov spektar dehidratiziranog adenina. (A) eksperimentalno, (B) izračunato za kondenziranu fazu, (C) izolirana molekula³

Izračunate vrijednosti valnih brojeva za izoliranu molekulu adenina dobivene su koristeći program GAUSSIAN 03W (GO3W) s DFT metodom koje uračunavaju interakcije između elektrona, dok je za geometriju molekule zaslužna optimizacija pomoću Bernyeva algoritma s postavljenim parametrima duljine veze 0,1 pm i veznim kutem od $0,1^\circ$. Za adenin u krutoj fazi korištena je također DFT metoda temeljena na Fourierovoj transformaciji s Perdew–Zunger LDA (engl. *Local Density Approximation*) i PW metoda (engl. *Plane–Wave*). Atomske

koordinate dobivene su prema objavljenoj strukturi dehidratiziranog adenina (slika 7) koji kristalizira u monoklinskom sustavu kao što je već navedeno.

Eksperimentalno dobiven Ramanov spektar za dehidratizirani adenin (slika 8) dobro se poklapa s teorijski izračunatim vrijednostima. Veliki značaj pripisuje se najnižim valnim brojevima (između 20 cm^{-1} i 180 cm^{-1}) koji odgovaraju translaciji rešetke obzirom da dobiveno nije bilo opisano u starijoj literaturi. Dobra preklapanja izračunatih Ramanovih vrpca s eksperimentalnim uz iznimku pri 1334 cm^{-1} prikazana su u tablici 1. Očekivano, izmjerene vrijednosti valnih brojeva ne slažu se u potpunosti s izračunatima za izoliranu molekulu adenina, ali ukupna raspodjela intenziteta vrpca ipak potvrđuje konzistentnost s izračunatim vrijednostima.

Vrpce pri najnižim valnim brojevima (između 17 i 128 cm^{-1}) odgovaraju deformaciji rešetke i translaciji dimerne molekule adenina. Kod dimernih molekula adenina dolazi do snažnog pomicanja amino skupine unutar ravnine koja uzrokuje promjenu duljine vodikove veze između $\text{N6} - \text{H10} \cdots \text{N7}$ i $\text{N6} - \text{H11} \cdots \text{N1}$. Vodikova veza, konjugacija ili rezonancija smanjuju jakost kemijske veze stoga će se vibracije funkcijskih skupina koje sudjeluju u vodikovoj vezi nalaziti pri nižim valnim brojevima.⁹ Pri 536 cm^{-1} i 561 cm^{-1} dolazi do deformacije atoma u pirimidinskom prstenu unutar i van ravnine dok prva simetrična istežanja svih pirimidinskih i imidazolnih atoma u prstenovima poznato kao „disanje prstenova“, rezultiraju vrpcom pri 724 cm^{-1} . Karakteristično istežanje Ramanove vrpce pri 623 cm^{-1} pripisuju se deformaciji pirimidinskog prstena unutar ravnine. Vrpca pri 900 cm^{-1} odgovara simetričnim vibracijama molekula, ali bez uključenih vibracija vodikovih atoma. Iznad 1000 cm^{-1} dominiraju vibracije unutar ravnine (vrpca na 1250 cm^{-1}), dok vrpce pri 1309 , 1334 i 1372 cm^{-1} su karakteristične za istežanja C–N veze i deformacijama (C2)H atoma unutar ravnine. Široka Ramanova vrpca pri 1484 cm^{-1} odgovara preklapanju C–N i C–C istežanju pirimidinskog i imidazolnog prstena. U području viših valnih brojeva, vrpce pri 3039 i 3129 cm^{-1} odgovaraju N9–H i C2–H istežanjima dok je vrpca pri 3039 cm^{-1} također odgovorna za intermolekulske vodikove veze unutar adenina. Potpun i točan spektar dobiven je koristeći dostupnu vibracijsku spektroskopsku tehniku (Ramanova spektroskopija) u sprezi s teorijskim modelima. Upotrebom PW metode i izračuna uz pomoć DFT metode dobivena su izvrsna poklapanja teoretskih podataka za kondenziranu fazu adenina i eksperimentalnih mjerenja.

Tablica 1. Eksperimentalne vrijednosti dobivene Ramanovom spektroskopijom i teorijske vrijednosti valnih brojeva za dehidratizirani adenin koristeći (GO3W i PW)

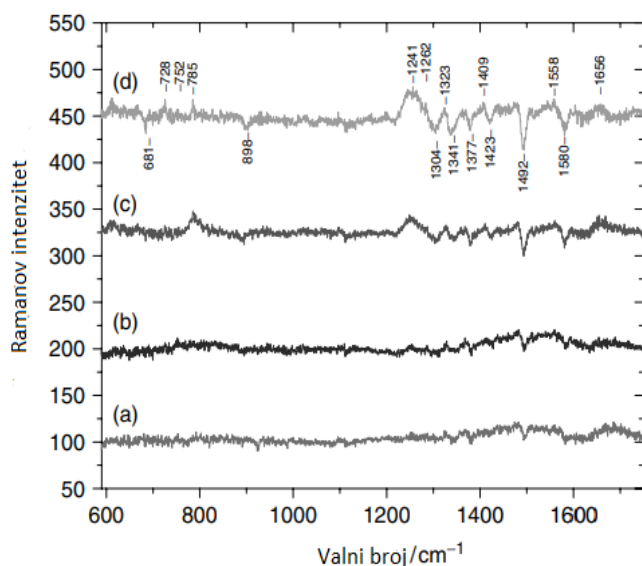
Valni broj (cm ⁻¹)			Asignacija
Raman (eksperimentalno)	Izolirana molekula (izračunato, GO3W)	Kondenzirana faza (izračunato, PW)	
17			
29		26–49	translacija rešetke
35			
54		46–69	translacija dimera
66			
78			
81			
96			
112		74–153	translacija dimera
117			
128			
321	305	309–323	Γ(N1–C2–N3) Γ(C8–N7–C5) Δ(C6–C5–N7)
327	276	332–349	Δ(N1–C6–N6) Δ(N3–C4–N9)
332			
537			
561	542	524–538	
623	621	620–626	Δ(C4–C5–N7) Δ(C4–N9–C8) Δ(N1–C6–N6)
724	701	724–730	disanje prstena
900	867	888–900	Δ(N1–C2–N3) Δ(C8–N9–C5)
1250	1227	1253–1274	δ(C8–H) δ(N9–H) υ(C2–N3) υ(C8–N7) υ(C2–N1) υ(C5–N7) υ(C4–N9)
1309	1293		
1334	1319 1325	1320–1355	δ(C2–H) υ(C2–N3) υ(C5–N7) υ(C8–N7) υ(C4–N9)
1372	1375		δ(N9–H) δ(C8–H) υ(C8–N9) υ(C4–C5) υ(C2–N3) υ(C6–N1) υ(C5–C6) υ(C2–N1) υ(C4–N3) υ(C8–N7)
1484	1475	1480–1519	α(NH2) δ(N9–H) δ(C8–H) δ(C2–H) υ(C4–C5) υ(C2–N1) υ(C6–N1) υ(C8–N9) υ(C2–N3) υ(C4–N9) υ(C8–N9)
3039	3532	2726–2835	υ(N9–H)
3129	3060	3043–3048	υ(C2–H)

Kratice: Γ – deformacija izvan ravnine atoma u prstenu, Δ – deformacija unutar ravnine atoma u prstenu, δ – deformacija unutar ravnine, υ – simetrična/antisimetrična istezanja, α – striženje.

2.4. Primjena Ramanove spektroskopije u određivanju strukture adenina pri različitim pH i u prisutnosti manganovih(II) kationa

Ramanovi spektri DNA dobivenog iz telećeg timusa (engl. *calf thymus DNA*) snimani su u uvjetima različite pH vrijednosti i uz prisutnosti manganovih(II) iona.⁷ Promatrane su strukturne promjene DNA u prisutnosti Mn^{2+} kationa u rasponu pH od 6,4 do 3,45 i protonacija AT para baza te pripadni spektri, s posebnim naglaskom na promjene na molekuli adenina.

Ramanovi spektri snimljeni su pri sljedećim vrijednostima pH: 6,4; 5,8; 5,1; 4,4; 3,8 i 3,45. Eksperimentalni dio započinje pripremom uzoraka DNA koji svi sadrže 150 mmol/L NaCl i 10 mmol/L $MnCl_2$. Uzorak pri pH = 6,4 sadrži 10 mmol/L pufera BISTRIS, a uzorak pri pH = 3,45 sadrži 50 mmol/L glicina i njegove soli dok svi ostali uzorci s preostalim pH sadrže 10 mmol/L pufera natrijeva acetata. Snimljen je i spektar telećeg timusa DNA otopljenog u 10 mmol/L pufera Tris/HCl, 150 mmol/L NaCl pri fiziološkom pH = 7,0 sa i bez 10 mmol/L $MnCl_2$. Za snimanje spektara korišten je Ramanov spektrometar T64000 kao i u prethodno opisanoj analizi adenina (pogl. 2.3.), no uz drugačiju pobudu. Ovdje je korišten argonov laser ($\lambda = 488$ nm, Coherent Innova 90) uz snagu od 200 mW što je najveća moguća snaga odabranog lasera. Sva mjerenja su izvršena pri temperaturi od 22 °C. Šest uzorka snimljeno je u trajanju od 120 sekundi, u sustavima gore navedenih vrijednosti pH (slika 9). Vrpca na 1092 cm^{-1} , prema kojoj je cijeli spektar skaliran, odgovara simetričnom istezanju PO_2^- iz okosnice DNA, a intenzitet vrpce nije osjetljiv na protonaciju DNA sve do vrijednosti pH = 2,35.



Slika 9. Ramanov spektar DNA iz telećeg timusa pri različitim pH vrijednostima bez pH = 6,4 i pH = 5,8: (a) pH = 5,1; (b) pH = 4,4; (c) pH = 3,8; (d) pH = 3,45 (spektar je skaliran prema vrpci 1092 cm^{-1})

Područje valnih brojeva od 600 do 1150 cm^{-1} daje informaciju o konformaciji nukleotida, geometriji i interakciji s PO_2^- skupinom. Karakteristična vrpca adenina dA kod 729 cm^{-1} služi kao marker za anti-konformaciju B–DNA polinukleotida i prilikom kidanja vodikovih veza između komplementarnih parova baza intenzitet takvog nesporenog adenina se povećava. B–DNA konformacija je jedna od tri moguće konformacije DNA (A, B i Z) koja je u organizmu najzastupljenija. Elektronska struktura baza i parova baza utječe na vrpce u Ramanovom spektru u području 1150–1720 cm^{-1} , dok vrpce u spektru između 1200 i 1600 cm^{-1} općenito odgovaraju vibracijama heterocikličkih aromatskih prstenova purina i pirimidina. Vrijednosti valnih brojeva za mononukleotid adenina nisu potpuno usporedive s vrijednostima za nukleotid u DNA dvostrukoj uzvojnici, ali protonacija adenina na N1 ($\text{pK}_a = 3,80$) događa se pri višem pH nego primjerice za gvanin ($\text{pK}_a = 2,30$).

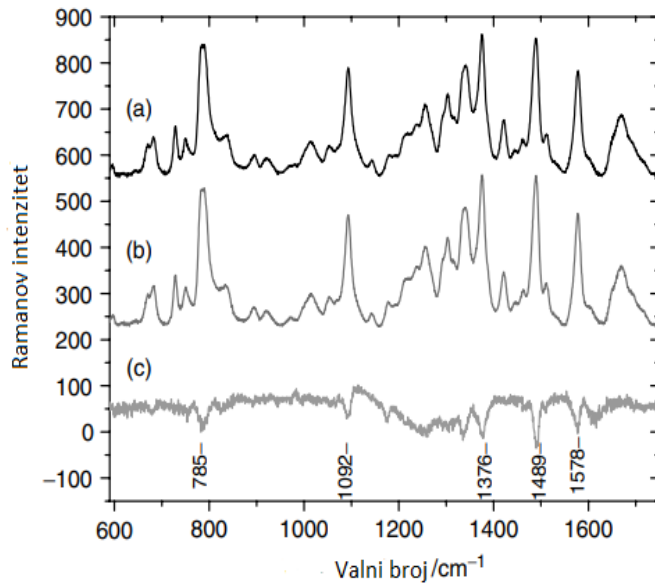
Promjene u intenzitetu vrpce dušičnih baza u spektru se očituju kao negativni ili pozitivni signali u odnosu na intenzitet odabrane vrpce za skaliranje. Tako se negativan signal adenina pri 1492 cm^{-1} povećava snižavanjem do pH = 4,40 (b), a drugi negativni signal pri 1377 cm^{-1} ostaje istog intenziteta. Treći negativni signal adenina pri 1580 cm^{-1} pripisuje se vibracijama

Commented [AK2]: Osi moraju biti na hrvatskom jeziku.

Commented [Ma3R2]:

pirimidinskog i imidazolnog prstenova. Razlika u intenzitetu vrpce pri 1323 cm^{-1} upućuje na početak protonacije adenina koja je potpomognuta kidanjem vodikovih veza između AT parova, a sama protonacija pospješuje se snižavanjem do $\text{pH} = 3,80$ (c) što je vidljivo i po karakterističnoj vrpci pri 1409 cm^{-1} koja odgovara A^+ . Pri $\text{pH} = 3,45$ (d) dolazi do malog povećanja intenziteta vrpce kod neprotoniranog (728 cm^{-1}) i protoniranog (A^+) adenina (1558 cm^{-1}). Ramanov spektar za niže pH vrijednosti (3,1 i 2,8) ne daje vidljive vrpce vibracija baza. Protonacija adenina, odnosno kidanje dviju vodikovih veza između parova baza adenina i timina, postaje vidljiva pri pH vrijednosti 4,40 pa sve do $\text{pH} = 3,45$.

Na slici 10 prikazan je Ramanov spektar DNA dobiven iz telećeg timusa pri konstantnom $\text{pH} = 7,0$ uz dodatak i bez dodane 10 mmol/L otopine MnCl_2 . Uz prisutnost 10 mmol/L MnCl_2 (a) vidljive su vrpce pri 1376 , 1489 i 1578 cm^{-1} koje su indikatori kidanja vodikovih veza između parova baza što je posljedica vezanja Mn^{2+} na DNA. Uočava se i vrpca pri 1092 cm^{-1} koja opisuje vezanje manganovih(II) iona na fosfatne grupe nukleotida. Usporedbom Ramanovih vrpca (slika 9) vidljivo je da dolazi do kompeticije između protonacije baza i koordinativnog vezanja manganovih (II) iona na nukleotide telećeg timusa, dok divalentni kationi mangana ujedno djeluju i kao inhibitori usporavajući protonaciju DNA pri malim koncentracijama. Bez dodatka otopine 10 mmol/L MnCl_2 (b) vrpce u spektru su manjeg intenziteta u odnosu na spektar (a). Eksperimentalni podaci ukazuju na strukturne promjene koje se javljaju u DNA telećeg timusa uslijed promjene pH i nakon dodatka Mn^{2+} iona. Najveće promjene u Ramanovom spektru dolaze od elektronskih strukturnih promjena baza pri $\text{pH} = 3,80$ i $\text{pH} = 3,45$, a one su: protonacija adenina u AT parovima baza koja uzrokuje i kidanje vodikovih veza između AT parova baza, inhibicija protonacije pomoću Mn^{2+} iona i potpuna promjena konformacije cijele okosnice DNA. Nađeno je da čak i mali dodatak iona mangana inhibira protonaciju DNA.



Slika 10. Ramanov spektar DNA iz telećeg timusa ($\gamma = 12$ mg/mL) pri pH = 7,0 uz dodatak 10 mmol/L Mn^{2+} iona (a) i bez dodatka Mn^{2+} iona (b). Spektar (c) prikazuje diferenciran spektar (a) i (b) spektra pomnožen s 3. Spektar je skaliran prema 1014 cm^{-1} , a sva mjerenja su snimljena uz laser snage 200 mW

Commented [AK4]: Osi na hrvatskom jeziku.

§ 3. LITERATURNI IZVORI

Commented [AK5]: Literaturne izvore sredite prema uputama.

1. J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer, *Biochemistry*, W.H. Freeman & Co Ltd, New York, 2007, str. 107-111.
2. <https://study.com/academy/lesson/what-are-purines-definition-lesson-quiz.html> (datum pristupa 10. srpnja 2022.)
3. R. P. Lopes, R. Valero, J. Tomkinson, M. P. Marques, L. A. Batista de Carvalho, *New J. Chem.* **37** (2013) 2691-2699.
4. C. Fonseca Guerra, F. M. Bickelhaupt, S. Saha, F. Wang, *J. Phys. Chem. A.* **110** (2006) 4012–4020. (slika 2.)
5. F. Tureček, X. Chen, *J. Am. Soc. Mass Spectrom* **16** (2005) 1713–1726.
6. https://www.researchgate.net/figure/Different-tautomers-of-the-protonated-bases-and-the-average-pK-a-values-of-the-process_fig8_281629934 (datum pristupa 10. srpnja 2022.)
7. C. M. Muntean, L. Dostál, R. Misselwitz, H. Welfle, *Journal of Raman Spectroscopy* **36** (2005) 1047 – 1051.
8. F. F. Maia, V. N. Freire, E. W. Caetano, D. L. Azevedo, F. A. Sales, E. L. Albuquerque, *J. Chem. Phys.* **134** (2011) 175101
9. H.-W. Lai, J. C.-C. Wei, H.-C. Hung, C.-C. Lin, *Evid Based Complement Alternat Med.* (2019) 9151070
10. E. Smith, G. Dent, *Modern Raman Spectroscopy - A Practical Approach*, John Wiley and Sons, West Sussex, 2005.
11. Predrag Novak, Tomislav Jednačak, *Strukturna analiza spojeva spektroskopskim metodama*, TIVA Tiskara Varaždin, Varaždin (2013.), str. 63-73.
12. https://www.researchgate.net/figure/Stokes-Anti-Stokes-lines_fig1_348340237 (datum pristupa 17. rujna 2022.)
13. M. Cindrić, *Ramanova spektroskopija u zaštiti od krivotvorenja*, Diplomski rad, Grafički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2017., str. 11-29.
14. I. Bajan, *Ramanova spektroskopija kofeina*, Završni rad, Prirodoslovno – Matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2020., str. 3-9.

