

75 LET OSCILOGRAFICKÉ POLAROGRAFIE J. HEYROVSKÉHO A SOUČASNÁ CHRONOPOTENCIOMETRIE KONSTANTNÍM PROUDEM

EMIL PALEČEK^a a MICHAEL HEYROVSKÝ^b

^a Biofyzikální ústav AV ČR, v.v.i., Královopolská 135, 612 65 Brno, ^b Ústav fyzikální chemie J. Heyrovského AV ČR, v.v.i., Dolejškova 2155/3, 182 23 Praha 8
palecek@ibp.cz, michael.heyrovsky@jh-inst.cas.cz

Došlo 15.10.16, přijato 30.11.16.

Klíčová slova: oscilografická polarografie vnuceným proudem, chronopotenciometrie konstantním proudem, elektrochemie nukleových kyselin, katalytické vylučování vodíku, rtuťové elektrody, strukturně citlivá analýza bílkovin

Obsah

1. Úvod
2. Oscilografická polarografie vnuceným střídavým proudem
3. Elektrochemie nukleových kyselin
4. Elektrochemie bílkovin
5. Závěr

1. Úvod

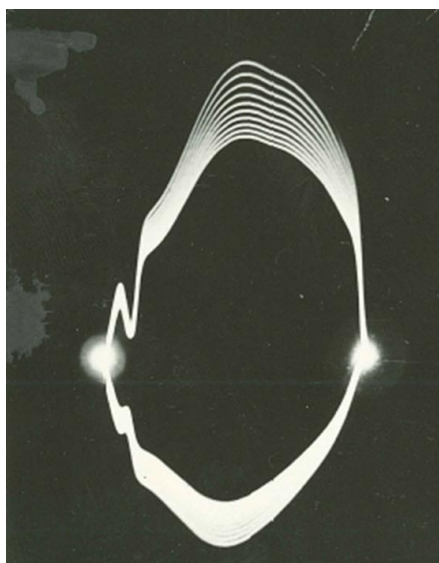
25. dubna 1941 přednesl Jaroslav Heyrovský na schůzi České společnosti chemické svoji přednášku „Použití oscilografu v polarografii“, která byla v prosinci téhož roku publikována v Chemických listech¹. V této přednášce se zabýval především otázkou registrace polarografických křivek a upozornil na nové možnosti sledování polarografických dějů pomocí oscilografu. V úvodu shrnul několik prací zahraničních laboratoří, které se v poslední době začaly touto problematikou zabývat^{2,3}. Vedle obvyklé polarizace rtuťové kapkové elektrody s vloženým napětím a sledováním závislosti proudu na potenciálu, uvažoval i možnost polarizace této elektrody střídavým proudem a sledování závislosti potenciálu na čase, tj. chronopotenciometrii. V závěru své přednášky se zmiňuje o spolupráci s Jindřichem Forejtem z firmy Philips, Praha. Z této spolupráce vznikla Heyrovského oscilografická polarografie vnuceným střídavým proudem^{4,5}, která po uvedení poměrně levného Polaroskopu P 524 (obr. 1) do prodeje v první polovině 50. let 20. století vzbudila velkou pozornost mezi československými vědci. Již v r. 1954 byl tento přístroj v laboratoři prof. V. Morávka v Brně k dispozici studentům biochemie, kteří některé své výsledky publikovali již



Obr. 1. Polaroskop P 524 vyrobený firmou Křižík, Praha

během svého studia^{6–8}. Lze říci, že zmíněný článek profesora Heyrovského v Chemických listech¹ znamenal počátek oscilografické polarografie vnuceným proudem (OP) a jejího využití v různých oblastech vědy. V kapitole o OP v knize o polarografii Heyrovský a Kůta⁹ rozlišují oscilografickou polarografii (i) vnuceným napětím a (ii) vnuceným proudem. Je třeba si uvědomit, že slovo „polarografie“ zde není vztaženo ke způsobu polarizace elektrody, ale spíše k použití rtuťových elektrod.

V tomto článku se budeme zabývat především OP vnuceným proudem, tedy chronopotenciometrií střídavým nebo konstantním proudem. Před 10 lety shrnul Britz v krátkém článku poznatky o chronopotenciometrii¹⁰, aniž by se zmínil o Heyrovského OP. Podobně např. Iwamoto v r. 1958 navrhuje derivační chronopotenciometrii¹¹ a Herman a Bard¹² v r. 1963 cyklickou chronopotenciometrii beze zmínky o OP, která od svých začátků poskytovala derivační křivky v cyklickém modu a nabízela jak katodickou, tak i anodickou větev (obr. 2). Určitou výjimku představuje Sturrock¹³, který cituje práci Heyrovského a Forejta z r. 1943 (cit.⁴) a navrhuje novou metodu odvozenou od OP a nazývá ji derivační cyklická voltmetrie konstantním proudem (derivative cyclic constant current voltammetry). Jagner^{14,15}, který v druhé polovině 70. a v 80. letech minulého století významně přispěl k uplatnění chro-



Obr. 2. 50 μM thymin v 0,1 M NaOH. Rtuťová kapková elektroda, polarizační střídavý proud 0,3 mA. OP aktivita thyminu je podmíněna schopností této látky vytvářet špatně rozpustné sloučeniny se rtuť. Více podrobností nalezne čtenář v cit.^{81,82}. (Převzato z kandidátské dizertační práce E. Paleček: O vlivu ionizujícího záření na nukleové kyseliny a některých nových možnostech jejich analýzy, Brno 1959).

nopotenciometrie v analytické chemii, svoji práci však k OP nevztahuje. Podobně se chová řada jiných autorů, jako např. Kryger¹⁶ a Nishida¹⁷ a výjimku netvoří ani některé knižní publikace¹⁸.

Velmi malou návaznost moderní chronopotenciometrie na OP si lze vysvětlit nejméně dvěma faktory: (i) OP vznikla a rozvíjela se v Československu, tedy za „železnou oponou“, komplikující komunikaci se zahraničními vědci, (ii) OP měla ve svém názvu slovo „polarografie“, svádějící k představě, že polarizace elektrody je v OP shodná s polarizací v klasické polarografii. Ve skutečnosti však, díky prvnímu komerčně dostupnému přístroji pro chronopotenciometrii (obr. 1), mohla OP již v první polovině 50. let minulého století učinit první významnější krok k aplikaci chronopotenciometrie (jejíž podstata byla zmiňována již před více jak 100 lety¹⁹) k analytickým účelům.

2. Oscilografická polarografie nuceným střídavým proudem

Jaroslav Heyrovský se nepochybně zasloužil o rozvoj chronopotenciometrie v 50. letech minulého století, i když ne všechna odpovídající literatura z 60. a dalších let tomu nasvědčuje. Vedle něj se o rozvoj OP zasloužili i další českoslovenští vědci a zvláště Robert Kalvoda^{20,21} a další kolegové, jako např. G. Dušínský, K. Míčka, L. Molnar, J. Volke a D. Weiss. Tito a další vědci přispěli rovněž k organizaci oscilopolarografických kurzů pro českoslo-

venské a zahraniční vědce v Praze a v Bratislavě. Pravidelné konference na zámku ve Smolenicích věnované OP navštěvovalo mnoho vědců i sám profesor Heyrovský.

Vedle určitých nevýhod měla OP ve srovnání s klasickou polarografií řadu předností při praktické analýze různých látek, včetně biomolekul. Např. při OP byla analýza mnohem rychlejší, byla prováděna na jediné kapce rtuťi za přístupu vzduchu, umožňovala akumulaci silně adsorbovaných látek na povrchu elektrody a podobně jako cyklická voltametrie (CV) (komerčně dostupné přístroje pro CV nebyly v polovině 50. let minulého století v Československu k dispozici) pracovala v cyklickém modu a poskytovala informace jak o katodických, tak i o anodických procesech (obr. 2). Je zajímavé, že některé principy OP byly využívány po desetiletí při analýze biomakromolekul a zvláště DNA a bílkovin a děje se tak až do dnešní doby.

3. Elektrochemie nukleových kyselin

První elektrochemické studie nukleových kyselin a zvláště DNA se jen díky OP mohly objevit již více jak před 55 lety^{22–25}. Klasická polarografie byla k tomuto účelu málo vhodná²⁶, protože byla málo citlivá a nemohla využít silné adsorpce a akumulace DNA na povrch elektrody²⁷ v okolí potenciálu elektrokapilární nuly (p.z.c.) a nemohla postihnout redukce bází v akumulované DNA u negativních potenciálů. Naproti tomu v případě OP bylo snadné akumulovat DNA na rtuťové kapce a na téže kapce DNA vzápětí redukovat^{22,23,28,29}. Koncem 50. let jsme se na Biofyzikálním ústavu ČSAV v Brně začali zabývat myšlenkou konstrukce dokonalejšího přístroje, než byl Polaroskop P 524. Emil Paleček se dohodl s elektrotechniky Ing. F. Ševčíkem a K. Metzlem, kteří se ochotně tohoto úkolu ujali. Již v r. 1962 jsme měli k dispozici přístroj pracující s pravouhlým polarizačním proudem, který nabízel řadu výhod, včetně metody „první křivky“, velmi důležité pro analýzu DNA. V té době přístroj zvenku ještě nevypadal pěkně, byl však mnohem dokonalejší než Polaroskop P 576 (který nahradil P 524) a dalo se s ním dobře pracovat. Po svém návratu z ročního pobytu v USA nalezl Emil Paleček již hotový přístroj, který i pěkně vypadal³⁰.

Teprve citlivější derivační pulsní polarografie G. C. Barkera³¹ umožnila analýzu DNA bez její akumulace na rtuťové kapce^{32,33}. Nukleové kyseliny poskytovaly při OP i anodický signál G, za který odpovídaly zbytky guaninu. Brzy se ukázalo, že tento OP signál závisí na potenciálu pravého (negativního) krajního bodu a že je podmíněn oxidací redukčního produktu guaninu^{34,35} vznikajícího u negativních potenciálů v oblasti rozkladu základního elektrolytu. Více podrobností o analýze DNA pomocí OP nalezne čtenář v článku publikovaném v r. 2014 v Chemických listech³⁶. Některé přednosti OP zůstaly nedoceny v počátcích OP a jejich význam se ukázal až v pozdějších letech, jak uvedeme v dalších odstavcích a v části 4.

V druhé polovině 60. let minulého století se zájem o OP začal snižovat, protože se objevily komerčně dostup-

né přístroje pro elektrochemickou analýzu pomocí nových metod, které v některých směrech předčily OP. Například diferenční pulzní polarografie (DPP) předčila OP při analýze DNA lepší citlivostí, spojenou s výbornou eliminací kapacitního proudu³². Není pochyb, že přístroj pro OP konstruovaný na základě předválečných technologií mohl jen stěží soutěžit s elektrochemickými přístroji založenými na novějších technologiích. Později v elektrochemické analýze zcela převládly voltametrické metody kombinované s pevnými elektrodami. Díky dobrým zkušenostem s OP v první polovině 60. let se nám v pozdějších letech po OP stýskalo a doufali jsme, že se objeví moderní přístroj pro chronopotenciometrii. Teprve v r. 1995 měl jeden z nás (EP) příležitost seznámit se s přístrojem Tracelab v laboratoři prof. J. Wanga a využít tento přístroj k analýze RNA³⁷. Dr. Kees van Velzen, s nímž jsme měli příležitost diskutovat problémy elektrochemické analýzy, akceptoval náš návrh a rozšířil spektrum elektrochemických metod v přístroji Autolab (EcoChemie, Holandsko) o chronopotenciometrii. Do dnešní doby Autolab ke chronopotenciometrickým měřením používáme. Chronopotenciometrie je dnes součástí většiny elektroanalytických přístrojů, dokonce i české provenience, např. Eco-Tribo Polarograf (Ecotrend Plus, Praha).

OP byla uváděna jako polarografická metoda založená na polarizaci elektrody programovaným střídavým proudem (podle současné nomenklatury, tedy chronopotenciometrie střídavým proudem). Některé výhody tohoto způsobu polarizace nebyly však do nedávna uvažovány. V posledním desetiletí bylo ukázáno, že je možné při chronopotenciometrii využít vysokých proudových hustot a rychlé změny potenciálu rtuťové elektrody k analýze změn ve struktuře bílkovin.

4. Elektrochemie bílkovin

V r. 1930 Heyrovský a Babička ukázali, že bílkoviny katalyzují vylučování vodíku na rtuťové kapkové elektrodě a poskytují u silně negativních potenciálů tzv. prenatriovou vlnu³⁸. Tato vlna byla špatně vyvinutá, protože byla příliš blízko rozkladu základního elektrolytu a byla považována za málo vhodnou pro analýzu bílkovin³⁹. Byla proto brzy zastíněna dobře vyvinutou tzv. Brdičkovou dvojnou, poskytovanou bílkoviny za přítomnosti iontů kobaltu. Aplikace OP ke studiu prenatriové vlny bílkovin nepřinesla lepší výsledky než klasická polarografie, protože OP signály bílkovin byly na oscilogramu příliš blízko koncového bodu a jejich měření bylo ještě obtížnější než měření prenatriové vlny pomocí klasické polarografie. Na druhé straně užitečnost OP při analýze aminokyselin a kapacitních signálů bílkovin byla přesvědčivě demonstrována ve sděleních^{40–43}.

Chronopotenciometrie bílkovin. V posledních desetiletích bylo zjištěno, že rozpouštěcí chronopotenciometrie konstantním proudem (Constant current chronopotentiometric stripping, CPS) se velmi dobře hodí k analýze bílkovin⁴⁴. Téměř před 20 lety jsme ukázali, že bioaktivní

peptidy poskytují při CPS u negativních potenciálů pik dobře oddělený od pozadí⁴⁵ a o několik let později jsme zjistili, že podobný pik poskytují i bílkoviny^{46–50}.

Tento pik, který je způsoben vylučováním vodíku^{51–55}, katalyzovaným zbytky aminokyselin jako lysin, arginin, cystein a histidin^{45,56–60}, byl nazván pik H na počest J. Heyrovského a díky vylučování vodíku (Hydrogen) a vysoké citlivosti (High sensitivity).

Zprvu jsme se domnívali, že CPS pouze umožňuje vhodnější stanovení bílkovin pomocí prenatriové vlny. Další práce v této oblasti však ukázaly, že CPS umožňuje i analýzu změn ve struktuře peptidů^{56,61,62} a bílkovin^{63–68} a výzkum specifických interakcí bílkovin s DNA⁶⁹ a dalšími látkami^{65,70,71} při vysokých proudových hustotách. Zjistili jsme rovněž, že bílkoviny po adsorpci na rtuťovou elektrodu nejsou denaturovány, ale k denuraci adsorbované bílkoviny dochází až při negativních potenciálech^{72,73}. Při katalytickém vylučování vodíku se uvolňuje velké množství elektronů, umožňující práci s vysokými negativními proudovými intenzitami (proudovými hustotami při konstantní ploše elektrody). Za těchto podmínek je možno zkrátit dobu, po kterou je adsorbovaná bílkovina vystavena účinkům elektrického pole (u negativních potenciálů) na milisekundy, při níž je denaturace bílkoviny na povrchu elektrody zanedbatelná. Bylo zjištěno, že bílkovina adsorbovaná na elektrodě může podléhat strukturálnímu přechodu v závislosti na proudové hustotě, na teplotě či na iontových podmínkách^{74,75}. Díky těmto novým přístupům je možno elektrochemicky detegovat malé změny ve struktuře podmíněné mutací (např. výměnou jediné aminokyseliny⁶⁷ nebo poškozením bílkoviny vnějšími činiteli⁶⁸ i specifické interakce bílkoviny s DNA⁶⁹ a jinými látkami). Pik H byl velmi úspěšně využit Vackovou laboratoří (Univerzita Palackého v Olomouci) ke studiu glykace proteinů⁷⁶, špatně rozpustných membránových bílkovin^{77–80} a vlastností peptidů⁶².

5. Závěr

V r. 1941 J. Heyrovský navrhl OP vnuceným proudem v kombinaci se rtuťovými elektrodami. Zavedl tím do chemické analýzy nejen novou metodu záznamu elektrochemických křivek, ale stimuloval i přípravu jednoduchého a komerčně dostupného přístroje pro chronopotenciometrii. Počátkem 50. let minulého století byla OP v Československu a sousedních zemích široce aplikována při analýze různých látek a zvláště biomolekul. OP v té době představovala renezanci chronopotenciometrie a díky OP bylo možno publikovat první zásadní práce o elektrochemii DNA již na přelomu 50. a 60. let. V současné době jsme svědky dalšího vývoje chronopotenciometrie při analýze biomolekul a zvláště při strukturně citlivé analýze bílkovin založené na katalytickém vylučování vodíku na rtuťových elektrodách. Věříme, že profesor J. Heyrovský by byl spokojen s tím, jak jeho OP stimulovala rozvoj vědy.

Tato práce se uskutečnila v rámci projektu CAS RVO 68081707. Autoři jsou zavázáni kolegům Dr. V. Dorčákoví, Dr. V. Ostatní, Dr. D. Kalábovi a Dr. Z. Pechanovi za cenné připomínky k rukopisu.

LITERATURA

- Heyrovský J.: Chem. Listy 35, 155 (1941).
- Müller R. H., Garman R. L., Droza M. E., J. P.: Ind. Engin. Chem. Anal. Ed. 10, 339 (1938).
- Boeke J., van Suchtelen H.: Phillips' Technische Rundschau 4, 243 (1939).
- Heyrovsky J., Forejt J.: Z. Phys. Chem. 193, 77 (1943).
- Heyrovsky J.: Anal. Chim. Acta 12, 600 (1955).
- Kalab D.: Die Pharmazie 11, 256 (1956).
- Kalab D.: Die Pharmazie 11, 268 (1956).
- Pechan Z., Kalab D., Palecek E.: Die Pharmazie 10 (1955).
- Heyrovský J., Kůta J.: *Základy polarografie*, Nakladatelství Československé akademie věd, Praha 1962.
- Britz D.: Int. J. Electrochem. Sci. 1, 379 (2006).
- Iwamoto R. T.: Anal. Chem. 31, 1062 (1959).
- Herman H. B., Bard A. J.: Anal. Chem. 35, 1121 (1963).
- Sturrock P. E.: J. Electroanal. Chem. 8, 425 (1964).
- Jagner D.: Trends Anal. Chem. 2, 53 (1983).
- Jagner D., Graneli A.: Anal. Chim. Acta 83, 19 (1976).
- Kryger L.: Anal. Chim. Acta 120, 19 (1980).
- Nishida M., Kato N., Nakano K.: J. Electroanal. Chem. 164, 189 (1984).
- Bard A. J., Faulkner L. R., *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*, 2. vyd., J. Wiley, New York 2001.
- Sand H. J. S.: Phil. Mag. 1, 45 (1901).
- Heyrovsky J., Kalvoda R.: *Oscillographische Polarographie mit Wechselstrom*, Akademie Verlag, Berlin 1960.
- Kalvoda R.: *Techniques of Oscillographic polarography*, Elsevier, Amsterdam 1965.
- Palecek E.: Naturwiss. 45, 86 (1958).
- Palecek E.: Nature 188, 656 (1960).
- Palecek E.: Collect. Czech. Chem. Commun. 76, 1799 (2011).
- Palecek E., Bartosik M.: Chem. Rev. 112, 3427 (2012).
- Palecek E., Vetterl V.: Biopolymers 6, 917 (1968).
- Brabec V., Palecek E.: Biopolymers 11, 2577 (1972).
- Paleček E., Kaláb D.: Chem. Listy 57, 13 (1963).
- Palecek E., v: *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology, Vol. 9* (Davidson J. N., Cohn W. E., ed.), Academic Press, New York 1969.
- Sevcik F., Metz K.: Chem. Zvesti 18, 458 (1964).
- Barker G. C., Gardner A. W.: Z. Anal. Chem. 173, 79 (1960).
- Palecek E., Frary B. D.: Arch. Biochem. Biophys. 115, 431 (1966).
- Palecek E., v: *Methods in Enzymology: Nucleic Acids, part D, Vol. 21* (Grossman L., Moldave K., ed.), Academic Press, New York 1971.
- Palecek E., Jelen F., Trnková L.: Gen. Physiol. Biophys. 5, 315 (1986).
- Janik B., Palecek E.: Z. Naturforsch. 21b, 1117 (1966).
- Paleček E., Ostatná V., Pechan Z.: Chem. Listy 108, 490 (2014).
- Wang J., Cai X., Wang J., Jonsson C., Palecek E.: Anal. Chem. 67, 4065 (1995).
- Heyrovský J., Babička J.: Collect. Czech. Chem. Commun. 2, 370 (1930).
- Březina M., Zuman P.: *Polarografie v lékařství, biochemii a farmacii*, Zdravotnické nakladatelství, Praha 1952.
- Kalab D.: Naturwiss. 44, 350 (1957).
- Kalab D.: Experientia 19, 392 (1963).
- Kalab D.: Acta Virol. 10, 279 (1966).
- Kalab D.: Naturwiss. 52, 185 (1965).
- Palecek E., Tkac J., Bertok T., Bartosik M., Ostatná V., Palecek J.: Chem. Rev. 115, 2045 (2015).
- Tomschik M., Havran L., Fojta M., Palecek E.: Electroanalysis 10, 403 (1998).
- Tomschik M., Havran L., Palecek E., Heyrovsky M.: Electroanalysis 12, 274 (2000).
- Ostatna V., Dogan B., Uslu B., Ozkan S., Palecek E.: J. Electroanal. Chem. 593, 172 (2006).
- Palecek E., Ostatna V.: Electroanalysis 19, 2383 (2007).
- Dorcak V., Bartosik M., Ostatna V., Palecek E., Heyrovsky M.: Electroanalysis 21, 662 (2009).
- Palecek E., Heyrovsky M., Janik B., Kalab D., Pechan Z.: Collect. Czech. Chem. Commun. 74, 1739 (2009).
- Heyrovsky M.: Croat. Chem. Acta 79, 1 (2006).
- Mader P., Vesela V., Dorcak V., Heyrovsky M.: Collect. Czech. Chem. Commun. 66, 397 (2001).
- Heyrovsky M.: Collect. Czech. Chem. Commun. 66, 67 (2001).
- Heyrovsky M.: Electroanalysis 16, 1067 (2004).
- Heyrovsky M., v: *Electrochemistry of Nucleic Acids and Proteins: Towards Electrochemical Sensors for Genomics and Proteomics* (Palecek E., Scheller F., Wang J., ed.), Elsevier, Amsterdam 2005.
- Dorcak V., Palecek E.: Electroanalysis 19, 2405 (2007).
- Zivanovic M., Aleksic M., Ostatna V., Doneux T., Palecek E.: Electroanalysis 22, 2064 (2010).
- Vargova V., Zivanovic M., Dorcak V., Palecek E., Ostatna V.: Electroanalysis 25, 2130 (2013).
- Dorcak V., Ostatna V., Palecek E.: Electrochem. Commun. 31, 80 (2013).
- Dorcak V., Vargova V., Ostatna V., Palecek E.: Electroanalysis 27, 910 (2015).
- Kurzatkowska K., Ostatna V., Hamley I. W., Doneux T., Palecek E.: Electrochim. Acta 106, 43 (2013).
- Dorcak V., Kabelac M., Kroutil O., Bednarova K., Vacek J.: Analyst 141, 4554 (2016).

63. Masarik M., Stobiecka A., Kizek R., Jelen F., Pechan Z., Hoyer W., Jovin T. M., Subramaniam V., Palecek E.: *Electroanalysis* 16, 1172 (2004).
64. Palecek E., Ostatna V., Masarik M., Bertoncini C. W., Jovin T. M.: *Analyst* 133, 76 (2008).
65. Dorcak V., Palecek E.: *Anal. Chem.* 81, 1543 (2009).
66. Ostatna V., Cernocka H., Palecek E.: *J. Am. Chem. Soc.* 132, 9408 (2010).
67. Palecek E., Ostatna V., Cernocka H., Joerger A. C., Fersht A. R.: *J. Am. Chem. Soc.* 133, 7190 (2011).
68. Vargova V., Gimenez R. E., Cernocka H., Trujillo D. C., Tulli F., Zanini V. I. P., Palecek E., Borsarelli C. D., Ostatna V.: *Electrochim. Acta* 187, 662 (2016).
69. Palecek E., Cernocka H., Ostatna V., Navratilova L., Brazdova M.: *Anal. Chim. Acta* 828, 1 (2014).
70. Bartosik M., Ostatna V., Palecek E.: *Bioelectrochemistry* 76, 70 (2009).
71. Vargova V., Helma R., Palecek E., Ostatna V.: *Anal. Chim. Acta* 935, 97 (2016).
72. Palecek E., Ostatna V.: *Analyst* 134, 2076 (2009).
73. Cernocka H., Ostatna V., Palecek E.: *Anal. Chim. Acta* 789, 41 (2013).
74. Palecek E., Ostatna V.: *Chem. Commun.* 1685 (2009).
75. Cernocka H., Ostatna V., Palecek E.: *Electrochim. Acta* 174, 356 (2015).
76. Havlikova M., Zatloukalova M., Ulrichova J., Dobes P., Vacek J.: *Anal. Chem.* 87, 1757 (2015).
77. Vacek J., Zatloukalova M., Havlikova M., Ulrichova J., Kubala M.: *Electrochem. Commun.* 27, 104 (2013).
78. Vacek J., Zatloukalova M., Geleticova J., Kubala M., Modriansky M., Fekete L., Masek J., Hubatka F., Turanek J.: *Anal. Chem.* 88, 4548 (2016).
79. Vecerkova R., Hernychova L., Dobes P., Vrba J., Josypcuk B., Bartosik M., Vacek J.: *Anal. Chim. Acta* 830, 23 (2014).
80. Zatloukalova M., Orolinova E., Kubala M., Hrbac J., Vacek J.: *Electroanalysis* 24, 1758 (2012).
81. Palecek E.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 25, 2283 (1960).
82. Palecek E.: *Anal. Chim. Acta* 174, 103 (1985).

E. Paleček^a and M. Heyrovský^b (^a*Institute of Biophysics, Acad. Sci. CR, v.v.i., Brno*, ^b*J. Heyrovsky's Institute of Physical Chemistry, Prague*): **75 years of J. Heyrovsky's Oscillographic Polarography and Present Constant Current Chronopotentiometry**

On 25th April 1941, at a meeting of the Czech Chemical Society in Prague, Jaroslav Heyrovský delivered his lecture "Use of oscillograph in polarography". This lecture was published in *Chemické Listy* in December 1941. His lecture marked the beginning of the oscillographic polarography with controlled alternating current (OP). In the first half of the 1950's, a simple instrument Polaroskop P 524 became available, stimulating wide application of OP as a method of fast and simple chemical analysis of various compounds, including biomolecules. In the 1960's and in the following decades a number of papers on chronopotentiometry were published but J. Heyrovsky's OP was almost forgotten. At present we can witness another step in the development of chronopotentiometry in the application of CPS in the analysis of biomacromolecules and particularly in the structure-sensitive analysis of proteins based on catalytic hydrogen evolution reaction (CHER). This analysis requires mercury-containing electrodes, such as HMDE (hanging mercury drop electrode) or solid amalgam electrodes, because the CHER has not been observed with any other electrode. We believe that Professor J. Heyrovský would be satisfied by the fruitful development of chronopotentiometry and its application in bioelectrochemistry, stimulated by his OP.