

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra organické chemie

KOMPLEXY ŽELEZNATÝCH SOLÍ A FLAVONOIDŮ

Bakalářská práce

studijního programu Klinická a toxikologická analýza

Praha 2010

Tereza Schröpferová

Tato bakalářská práce vznikla v souvislosti s řešením výzkumného záměru MSM0021620857.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně, pod vedením školitelky Mgr. Jany Roithové, Ph.D. a že jsem všechny použité prameny řádně citovala.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 1. května 2010.

Abstrakt:

Práce je zaměřena na studium interakcí železnatých iontů s flavonoidy (epikatechin, katechin, quercetin) pomocí hmotnostní spektrometrie s využitím elektrosprejové ionizace. Nejprve bylo provedeno měření s modelovými molekulami (pyrokatechol, resorcinol, 3-hydroxy-2-methyl-4-pyrone) za účelem zjištění, jak reagují OH skupiny na uhlovodíkových kruzích. U flavonoidů bylo zjištěno, že epikatechin a pravděpodobně i katechin (u něhož se měření nezdařilo kvůli kontaminaci sodíkem) vážou železo mezi OH skupiny kruhu B, může tak dojít k retro-Diels-Alderově reakci a rozštěpení pyranového kruhu. Jelikož quercetin má na pyranovém kruhu ještě keto a OH skupinu, železo se přednostně váže mezi ně, spíše než na postranní OH skupiny. Nemůže tak dojít k retro-Diels-Alderově reakci (rozštěpení pyranového kruhu) a komplex ztrácí pouze malé molekuly vody a CO z postranních kruhů, jako to bylo pozorováno pro komplexy modelových molekul.

Abstract:

This work is devoted to a study of the interaction between iron(II) ions and flavonoids (epicatechin, catechin, quercetin) by means of mass spectrometry and electrospray ionization. First, a measurement with model molecules (pyrocatechol, resorcinol, 3-hydroxy-2-methyl-4-pyrone) has been performed in order to find how iron(II) interacts with the OH groups on the hydrocarbon rings. It has been found that Fe^{2+} coordinates to epicatechin and probably also catechin (the measurement with catechin was unsuccessful because of contamination by sodium) between the OH groups at the ring B and the fragmentation of the complex can proceed via a retro-Diels-Alder's reaction and thus lead to cleavage of the pyrone ring. Quercetin has at the pyrone ring the keto function next to the OH group, therefore the iron ion binds to these functions rather than to the OH groups at the ring B. Accordingly, the retro-Diels-Alder's reaction is not possible and the complex loses only small molecules of water and carbon oxide from the side rings as it was found for the complexes of model molecules.

Klíčová slova:

Antioxidační aktivita, elektrosprejová ionizace, flavonoidy, hmotnostní spektrometrie

Key words:

Antioxidation activity, electrospray ionization, flavonoids, mass spectrometry

OBSAH

OBSAH.....	4
SEZNAM SCHÉMAT.....	5
SEZNAM ZKRATEK A SYMBOLŮ.....	6
1. ÚVOD.....	7
1.1 Úkol bakalářské práce.....	7
1.2 ESI-MS.....	7
1.3 FeSO ₄	8
1.4 Flavonoidy.....	9
2. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	12
2.1 Chemikálie.....	12
2.2 Podmínky měření.....	12
2.3 Spektrum rozdělení kolizní energie.....	12
3. VÝSLEDKY MĚŘENÍ.....	14
3.1 Chování FeSO ₄ ve vodě.....	14
3.2 Komplexy modelových molekul s FeSO ₄	15
3.2.1 Komplexy pyrokatecholu (ortho-dihydroxybenzenu).....	16
3.2.2 Komplexy resorcinolu (meta-dihydroxybenzenu).....	18
3.2.3 Komplexy 3-hydroxy-2-methyl-4-pyronu.....	19
3.3 Komplexy flavonoidů s FeSO ₄	22
3.3.1 Komplexy epikatechinu.....	23
3.3.2 Komplexy katechinu.....	25
3.3.3 Komplexy quercetinu.....	27
4. ZÁVĚR.....	29
LITERATURA.....	30

SEZNAM SCHÉMÁT

Schéma 1: Blokové schéma hmotnostního spektrometru s ESI.

Schéma 2: Struktura FeSO_4 : a) 2D zobrazení (lineární), b) 3D zobrazení.

Schéma 3: Základní struktury jednotlivých skupin flavonoidů: a) flavan (zároveň základ všech flavonoidů), b) flavon, c) flavonol, d) flavanon, e) flavanol, f) isoflavon, g) anthokyanidin.

Schéma 4: Spektrum rozdělení kolizní energie. Červená křivka reprezentuje závislost intenzity signálu mateřského iontu na potenciálovém rozdílu mezi Q1 a O. Černá křivka ukazuje derivaci křivky intenzity. FWHM (full width at half maximum) neboli šířka píku v polovině výšky má hodnotu 1,5 eV a byla určena experimentálně ze tří měření.

Schéma 5: Tvorba komplexů Fe^{2+} s vodou v závislosti na podmínkách měření. Bylo měřeno za těchto podmínek: a) CAP -54,4 eV, TUBEL 10 eV; b) CAP -4,1 eV, TUBEL 64 eV; c) CAP 45,6 eV, TUBEL 164,1 eV; d) CAP 145,7 eV, TUBEL 249,9 eV.

Schéma 6: Modelové molekuly: a) pyrokatechol (ortho-dihydroxybenzen), b) resorcinol (meta-dihydroxybenzen), c) 3-hydroxy-2-methyl-4-pyron.

Schéma 7: Zdrojové hmotnostní spektrum pyrokatecholu ve vodě a pyrokatecholu s FeSO_4 ve vodě.

Schéma 8: CID spektrum m/z 201 (komplexu pyrokatecholu s Fe^{2+}) při $E_{CM} = 4; 8$ a 12 eV.

Schéma 9: Schéma ztrát molekul z komplexu pyrokatecholu s Fe^{2+} (CID m/z 201).

Schéma 10: Zdrojové hmotnostní spektrum resorcinolu s FeSO_4 ve vodě.

Schéma 11: CID spektrum m/z 201 (komplexu resorcinolu s Fe^{2+}) při $E_{CM} = 4$ eV.

Schéma 12: Zdrojové hmotnostní spektrum 3-hydroxy-2-methyl-4-pyronu v methanolu a 3-hydroxy-2-methyl-4-pyronu s FeSO_4 v methanolu.

Schéma 13: CID spektrum m/z 245 (komplexu 3-hydroxy-2-methyl-4-pyronu s Fe^{2+}) při $E_{CM} = 10,5$ a $17,5$ eV.

Schéma 14: Schéma ztrát molekul z komplexu 3-hydroxy-2-methyl-4-pyronu s Fe^{2+} (CID m/z 245).

Schéma 15: Studované flavonoidy: a) (-) epikatechin, b) (+) katechin hydrát, c) quercetin dihydrát.

Schéma 16: Zdrojové hmotnostní spektrum epikatechinu v methanolu a epikatechinu s FeSO_4 v methanolu.

Schéma 17: CID spektrum m/z 377 (komplexu epikatechinu s Fe^{2+}) při $E_{CM} = 1,3; 2,6$ a $6,5$ eV.

Schéma 18: Schéma ztrát molekul z komplexu epikatechinu s Fe^{2+} (CID m/z 377).

Schéma 19: Zdrojové hmotnostní spektrum katechin hydrátu s FeSO_4 v methanolu.

Schéma 20: CID spektrum m/z 345 při $E_{CM} = 8,3$ a $13,8$ eV.

Schéma 21: Zdrojové hmotnostní spektrum quercetinu s FeSO_4 v methanolu.

Schéma 22: CID spektrum m/z 421 (komplexu quercetinu s Fe^{2+}) při $E_{CM} = 7$ a 12 eV.

Schéma 23: Schéma ztrát molekul z komplexu quercetinu s Fe^{2+} (CID m/z 421).

SEZNAM ZKRATEK A SYMBOLŮ

CID	kolize vyvolaná srážkou (collision-induced dissociation)
E_{CM}	energie v těžišťové soustavě (center-of-mass) [eV]
ESI	elektrosprejová ionizace (electrospray ionization)
FWHM	šířka píku v polovině výšky (full width at half maximum) [eV]
m/z	specifický náboj, efektivní hmota
MS	hmotnostní spektrometrie (mass spectrometry)
O	oktupól, kolizní cela
Q1, Q2	kvadrupól, kvadrupólový hmotnostní analyzátor

1. ÚVOD

1.1 Úkol bakalářské práce

Tato práce je věnována studiu interakce vybraných flavonoidů a příbuzných molekul s dvojmocným železem. Cílem práce je zjistit způsob interakce mezi železem a danými flavonoidy a prostudovat unimolekulární reaktivity komplexů pomocí hmotnostní spektrometrie s využitím elektrosprejové ionizace.

1.2 ESI-MS

Při své práci jsem používala metodu hmotnostní spektrometrie (dále MS) s využitím elektrosprejové ionizace (dále ESI). Hmotnostní spektrometrie je fyzikálně-chemická metoda, vysoce citlivá, destruktivní analytická metoda, při které se molekuly převedou na ionty, takto vzniklé ionty se analyzují podle poměru hmotnosti a náboje (m/z – specifický náboj či efektivní hmota) a následně se zaznamenávají relativní intenzity jednotlivých iontů.¹ Ze vzniklých hmotnostních spekter je možno zjistit molekulární hmotnost měřené látky a odvodit její strukturu. Tato metoda vyžaduje jen velmi nepatrné množství měřené látky, pouze 10^{-12} g, navíc v téměř libovolné formě (plazma, plyn, kapalina, tuhá látka). Jelikož se analýza i detekce iontů provádí ve vakuu, a náklady na vakuovou techniku představují značný podíl z ceny celého přístroje, je vysoká cena snad jedinou nevýhodou hmotnostních spektrometrů.²

Hmotnostní spektrometrie je využívána od počátku 20. století a v posledních dvaceti letech se rozšířila do všech oblastí přírodních věd. Mezi nejjednodušší způsoby analýzy biologických vzorků pomocí MS patří použití desorpčních ionizačních technik nebo ionizace elektrosprejem. ESI byla vynalezena až v osmdesátých letech minulého století. Je to měkká technika použitelná pro přesun nabitých iontových komplexů kovů do plynné fáze přímo z roztoku a téměř bez fragmentace. Tato technika otevřela možnost analyzovat komplexy v nepřítomnosti rozpouštědla, nebo zkoumat složité chemické systémy, např. anorganické klastry,³ dále poskytuje důležité informace o struktuře, stechiometrii a oxidačním stavu komplexů kovů přítomných v roztoku.⁴

Za vývoj technik hmotnostní spektrometrie byly uděleny celkem čtyři Nobelovy ceny za fyziku nebo chemii. Poslední Nobelova cena za hmotnostní spektrometrii byla udělena v roce 2002 za objev technik umožňujících ionizaci biomolekul (hlavně bílkovin a

nukleových kyselin). Tuto Nobelovu cenu za chemii získali pánové Wüthrich, Fenn a Tanaka.⁵

Při elektrosprejové ionizaci se zředěný roztok vzorku přivede kovovou kapilárou, na kterou je vloženo vysoké napětí 3-5 kV, do iontového zdroje. Na výstupu z kapiláry se pak za pomoci koaxiálně přiváděného dusíku jako zamlžovacího plynu rozpráší vznikající kapičky, které nesou velké množství nábojů (kladných nebo záporných). Kapičky se dále dělí a desolvatují, až vznikne pouze nabitý molekulový ion (molekulový ion je obvykle protonovaný).

Z hlediska flexibility, citlivosti, čistoty i technického provedení je tento zdroj velmi praktický a účinný.⁶ ESI pro biomolekuly je proveditelná pouze s vodným nebo alkoholovým roztokem, pro jiné sloučeniny lze použít různá polární rozpouštědla, jako acetonitril, aceton, dichlormethan, chloroform nebo směs těchto rozpouštědel. Nejlépe ESI funguje při průtoku řádově jednotek až desítek $\mu\text{l}/\text{min}$ a koncentraci 0,001 – 10 mmol/l .⁷

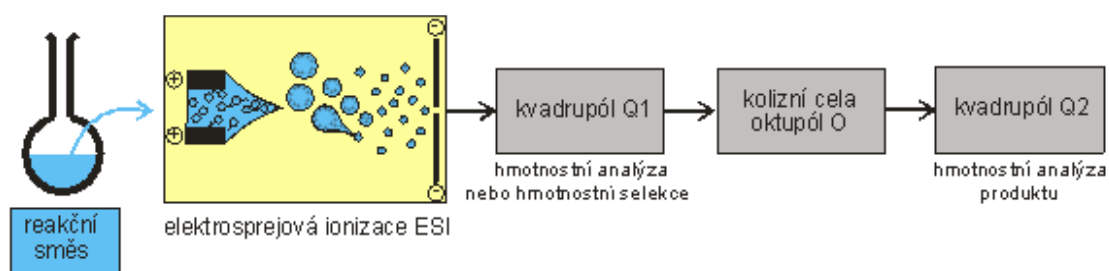


Schéma 1: Blokové schéma hmotnostního spektrometru s ESI.

1.3 FeSO_4

Ke studiu interakcí flavonoidů s dvojmocným železem jsem používala FeSO_4 , neboli síran železnatý. Je to běžná železnatá sloučenina, která se nejčastěji vyskytuje ve formě heptahydrátu (váže na sebe 7 molekul vody) a tato forma se nazývá zelená skalice, podle její typické zelené barvy. Síran železnatý se ovšem vyskytuje i v dalších formách, které lze výjimečně najít i v přírodě, např. monohydrát, tetrahydrát, pentahydrát nebo hexahydrát. Mé experimenty ovšem probíhaly pouze s bezvodným síranem, což je bezbarvá práškovitá látka, ve vodě dobře rozpustná. Struktura FeSO_4 je znázorněna na Schématu 2.

Železnaté sloučeniny se v neutrálním roztoku snadno oxidují na sloučeniny železité, které jsou mnohem stálejší. Oxidační číslo +II u železa je stálé pouze v kyselém prostředí nebo v případě koordinačních sloučenin s elektroneutrálními ligandy.⁸

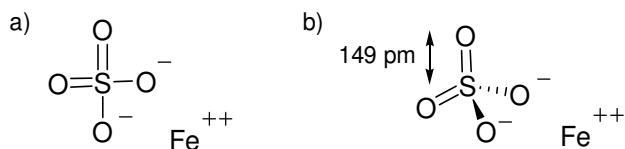


Schéma 2: Struktura FeSO_4 : a) 2D zobrazení (lineární), b) 3D zobrazení.

Železo je přechodný kov s protonovým číslem 26. Je základní živinou rostlin, ovlivňuje jejich růst, ale jeho přehromadění může vést k oxidativnímu stresu. V buňkách se železo váže na bílkoviny a ferritiny.

1.4 Flavonoidy

Flavonoidy tvoří jednu ze skupin v přírodě se vyskytujících polyfenolových sloučenin. Najdeme je hlavně v zelenině, ovoci, sóje, cereáliích a semenech, ale i v dalších potravinách rostlinného původu. Vyskytují se také v nápojích, jako je červené víno, káva, čaj a pivo (kam se dostávají z ječmene, resp. sladu a z chmele). Je známo, že flavonoidy se vyskytují ve všech cévnatých rostlinách a jsou důležité pro jejich přežití, při jejich klíčení, tvorbě pigmentu, fotosyntéze, morfogenezi i při ochraně proti škůdcům. Působí v nich také jako fotoreceptory, antioxidanty, ochrana proti UV záření, atraktanty pro opylovače atd. Jejich obsah je v poškozených částech rostlin vyšší než ve zdravých.⁹

Základní strukturou flavonoidů je flavan, neboli 2-fenyl-benzo- γ -pyran¹⁰ (dvě benzenová jádra spojená tříuhlíkatým řetězcem). Na základě stupně substituce a oxidace základního pyranového skeletu rozdělujeme flavonoidy do sedmi skupin: flavany, flavony, flavonoly, flavanoly (katechiny a proanthokyanidiny), flavanony, anthokyanidiny a isoflavony (Schéma 3).¹¹

Ve flavonech a isoflavonech je 2,3-dvojná vazba konjugovaná s 4-oxofunkcí, ve flavanolech jsou hydroxyskupiny buď pouze na uhlíku C-3 nebo na uhlících C-3 a C-4 a ve flavanonech je v pozici C-4 oxoskupina. B kruh se může také posunout do polohy C-3 nebo C-4, jak je tomu v případě isoflavonů.¹²

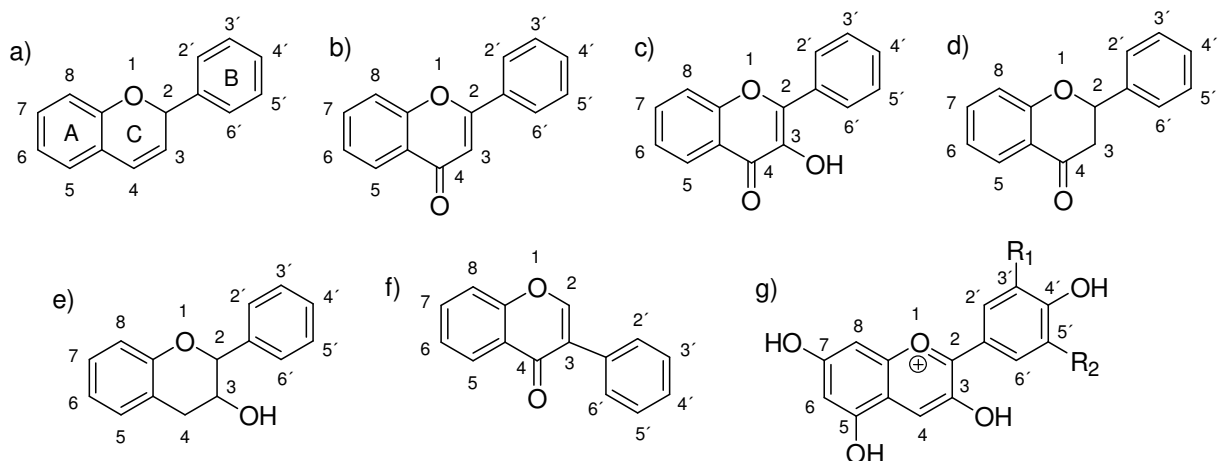


Schéma 3: Základní struktury jednotlivých skupin flavonoidů: a) flavan (zároveň základ všech flavonoidů), b) flavon, c) flavonol, d) flavanon, e) flavanol, f) isoflavon, g) anthokyanidin.

Flavonoidy se vyskytují v rostlinách také ve formě aglykonů (s fenylovým kruhem na uhlíku C-2) nebo glykosidů (s cukernatým zbytkem na hydroxylové skupině)¹³ a díky svému efektu glykosidace činí flavonoidy méně reaktivní a více rozpustné ve vodě, povolují tak jejich uskladnění ve vakuolách rostlinných buněk a zlepšují jejich stabilitu. Strukturální rozmanitost flavonoidů vzniká z různé hydroxylace, methylace a glykosidace vzorků při nahrazování kruhů.

Dodneška bylo popsáno asi 9000 různých druhů flavonoidů, a tím tvoří největší skupinu v přírodě se vyskytujících polyfenolů. I když se zdá, že tyto sloučeniny jsou důležité pouze pro rostliny, jsou důležité i pro živočichy a člověka. Staly se důležitou součástí lidské stravy a jejich denní dávka se pohybuje mezi několika stovkami mg až po 1-2 g, hlavně díky jejich výskytu v běžné zelenině a ovoci.¹⁴ V poslední době se o nich v široké veřejnosti mluví hlavně kvůli jejich vlivu na lidské zdraví. Zvýšený výskyt flavonoidů v potravě je dáván do souvislosti s prevencí vzniku civilizačních chorob, např. aterosklerózy a následné cévní mozkové příhody, kardiovaskulárních a koronárních nemocí srdce, diabetes, rakoviny, dále AIDS, bakteriálních infekcí, neurodegenerativních nemocí (Parkinsonova a Alzheimerova nemoc) atd.¹⁵ Flavonoidy ovlivňují funkci krevních destiček a leukocytů, zlepšují průtok krve, působí proti ischemickému procesu a při nižších koncentracích také jako imunostimulanty. Mají různé účinky na savčí buněčné systémy a struktury a bylo prokázáno, že chrání biologické membrány proti volnému radikálově-indukčnímu oxidativnímu poškození.¹⁶ Redukují riziko předčasného stárnutí pleti a těla, také mají protinádorové, protizánětlivé, antihepatotoxické, antiosteoporotické,

antivirotické a antibakteriální účinky, působí proti vzniku vředů, proti alergiím, křečím, průjmům atd.

Tyto účinky jsou přisuzovány inhibici peroxidace lipidů, modulaci enzymatické aktivity a hlavně jejich silné antioxidační aktivitě, která je přisuzována jejich schopnosti darovat elektron a která se zvyšuje s rostoucí lipofilitou flavonoidů.¹⁷ Antioxidační aktivitu ovlivňuje přítomnost dvojně vazby mezi uhlíky C-2 a C-3 spolu s přítomností OH skupiny v poloze 3 na stejném uhlíkovém kruhu. Antioxidační aktivita roste i se zvyšujícím se počtem OH skupin na celém flavonoidovém skeletu, hlavně ovšem na B kruhu.¹⁸ Obecně jsou přírodní polyfenolové složky silnějšími antioxidanty a také lepšími vylučovači volných radikálů než vitaminy C, E a provitamin β -karoten, jsou také účinnější než med nebo propolis.

Kromě antioxidační aktivity mají tedy také schopnost vylučovat volné radikály, chrání biologické molekuly proti oxidaci a brání tak nádorové invazi a metastazování. Nezbytné pro tuto činnost se zdá být přítomnost ortho-dihydroxy struktury na B kruhu a dvojně vazby mezi uhlíky C-2 a C-3 v konjugaci s 4-oxo funkcí na kruhu C. Vylučování radikálů zlepšuje také přítomnost 3-hydroxyl skupiny na heterocyklickém kruhu, zatímco další hydroxylové skupiny v pozici 5 a 7 na A kruhu se nezdají být pro tuto činnost důležité. Tyto strukturální vlastnosti přispívají ke zvýšení stability aryloxy radikálu, tedy antioxidační kapacity mateřské sloučeniny.¹⁹ Dále působí flavonoidy jako chelátory škodlivých kovů a mají schopnost bránit oxidaci nízkohustotních lipoproteinů (LDL).²⁰

Za metabolismus vstřebávání flavonoidů u člověka jsou z velké části zodpovědná játra. Střevní stěna a ledviny jsou pouze sekundárním místem jejich absorpce. Některé jsou pro člověka špatně vstřebatelné či se dokonce vůbec nevstřebávají. Ačkoli jsou flavonoidy dnes běžnou součástí běžných doplňků stravy, jejich bezpečnost je stále diskutabilní. Vystavení lidského těla vysoké dávce flavonoidů (a hlavně syntetických antioxidantů) může mít nepříznivý vliv na lidské zdraví hlavně kvůli jejich prooxidativním a promutagením účinkům.²¹ Některé studie ukazují, že mohou mít závažné vedlejší účinky (akutní intravaskulární hemolýza, akutní selhání ledvin), genotoxické účinky²², nebo že vysoké dávky flavonoidů mohou působit negativně na celý kardiovaskulární systém.²³

2. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

2.1 Chemikálie

Všechny testované flavonoidy, tzn. katechin hydrát, epikatechin a quercetin dihydrát a také 3-hydroxy-2-methyl-4-pyrone pocházely od Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Německo; ortho-dihydroxybenzen, meta-dihydroxybenzen, bezvodý síran železnatý a rozpouštědla methanol a destilovaná voda, pocházely z vlastních zdrojů katedry.

2.2 Podmínky měření

Všechny experimenty byly prováděny na hmotnostním spektrometru Finnigan TSQ 7000. Tento analyzátor má konfiguraci kvadrupól-oktupól-kvadrupól a elektrosprejové rozhraní (Schéma 1). Napětí na trubkové čočce a kapilární napětí byla optimalizována pro dosažení maximálního množství detekovaných iontů. Podle nastavení napětí se mění ionizace na měkkou a tvrdou, při měkkých podmínkách vznikají větší iontové klastry, při tvrdších pak menší desolvatované ionty. Ionty jsou generovány ve vyhřívané kapiláře o teplotě 300° C.

V prvním kvadrupólu Q1 probíhá hmotnostní analýza iontů nebo hmotnostní selekce iontů. Oktupól O slouží jako kolizní cela a z důvodu minimalizace difúze kolizního plynu (xenonu) do vakuové komory je umístěn v plášti. Tlak v komoře během experimentu je udržován mezi 3 až 10×10^{-6} mbar a tlak xenonu v kolizní cele mezi 1 až 2×10^{-4} mbar. CID experimenty s xenonem byly prováděny při různých kolizních energiích ($E_{LAB} = 5-50$ eV).

2.3 Spektrum rozdělení kolizní energie

Kolizní energie je dána rozdílem potenciálů mezi Q1 a O v rozmezí 0 – 196 V a potenciál Q2 je nastaven na součet potenciálů Q1 a O. Disociace vyvolaná srážkou (CID = collision-induced dissociation) může být provedena při různých kolizních energiích pro hmotnostně vybrané, neboli mateřské ionty. Kolizní energie E_{LAB} byla převedena z laboratorní do těžišťové soustavy (CM = center-of-mass) podle rovnice (1.1).

$$E_{CM} = \frac{E_{LAB} \times m}{M+m} \quad (1.1)$$

kde E_{CM} je energie těžišťové soustavy [eV], E_{LAB} je laboratorní energie [eV], m je hmotnost xenonu a M je hmotnost mateřského iontu.

Příklad určení škály kolizní energie a šířky rozdělení kinetické energie:

Toto měření bylo prováděno s roztokem pyrokatecholu ve vodě. Kvadrupóly Q1 a Q2 byly nastaveny na selekci m/z 201 a byl měněn potenciálový rozdíl mezi Q1 a oktupólem v rozmezí 2 – (-20) V. Intenzita zaznamenaného signálu byla zanesena do grafu. Nominální nulovou kinetickou energii definujeme jako inflexní bod na vzrůstu intenzity (oktupólem prochází právě polovina generovaných iontů). Tak bylo zjištěno, že nulové hodnoty kinetické energie iontů je dosaženo při potenciálu -3 V. Graf byl upraven tak, že potenciál byl převeden na energii v eV vzhledem k nulové hodnotě energie. Závislost intenzity signálu na kinetické energii byla zderivována a z derivace byla určena šířka rozdělení kinetické energie (šířka píku v polovině výšky; FWHM = full width at half maximum), která má hodnotu 1,5 eV.²⁴

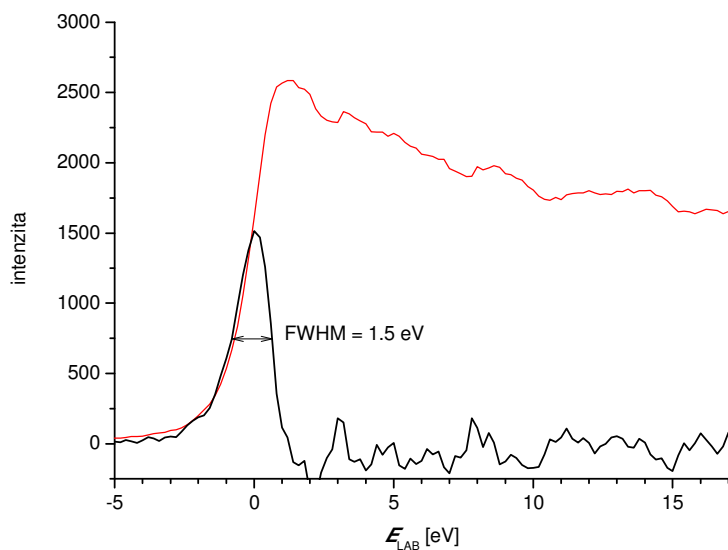


Schéma 4: Spektrum rozdělení kolizní energie. Červená křivka reprezentuje závislost intenzity signálu mateřského iontu na potenciálovém rozdílu mezi Q1 a O. Černá křivka ukazuje derivaci křivky intenzity. FWHM (full width at half maximum) neboli šířka píku v polovině výšky má hodnotu 1,5 eV a byla určena experimentálně ze tří měření.

3. VÝSLEDKY MĚŘENÍ

3.1 Chování FeSO₄ ve vodě

Chování železnaté soli ve vodě bylo měřeno při různých podmínkách. První graf ukazuje komplexy při měkkých podmínkách měření. Poslední graf naopak zobrazuje komplexy při tvrdých podmínkách. Druhý a třetí graf jsou přechodem mezi oběma výše popsanými grafy. Ionty s m/z 127 odpovídají komplexu $[\text{Fe}(\text{OH})(\text{H}_2\text{O})_3]^+$. Kromě nastavení potenciálu v (5b) můžeme rovněž vidět ion s m/z 109, který odpovídá komplexu $[\text{Fe}(\text{OH})(\text{H}_2\text{O})_2]^+$. Jak bylo popsáno v kap. 2, při měkkých podmínkách vznikaly větší iontové klastry, oproti tvrdé ionizaci, která podporuje vznik menších desolvatovaných iontů. Při „nejtvrdších“ podmínkách znázorněných ve Schématu 5d můžeme dokonce pozorovat samotný ion Fe^+ (m/z 56). Ionty s vyššími poměry m/z , které se tvoří zejména při měkčích podmínkách, dále neanalyzujeme, protože s největší pravděpodobností pocházejí z nečistot zdroje.

Při všech měřeních bylo nastaveno napětí pro elektrosprej na hodnotu 4,9 kV, napětí na transferovém kvadrupólu na hodnotu -1,6 eV a napětí na čočkách a na hodnoty 7,6 eV a -29,4 eV. Měnily se hodnoty CAP = napětí na kapiláře (od -54,4 do 145,7 eV, z počátku po 50 eV, naposledy po cca 100 eV) a TUBEL = napětí na trubkové čočce (od 10 do 249,9 eV, poprvé po 50 eV, poté po cca 100 eV).

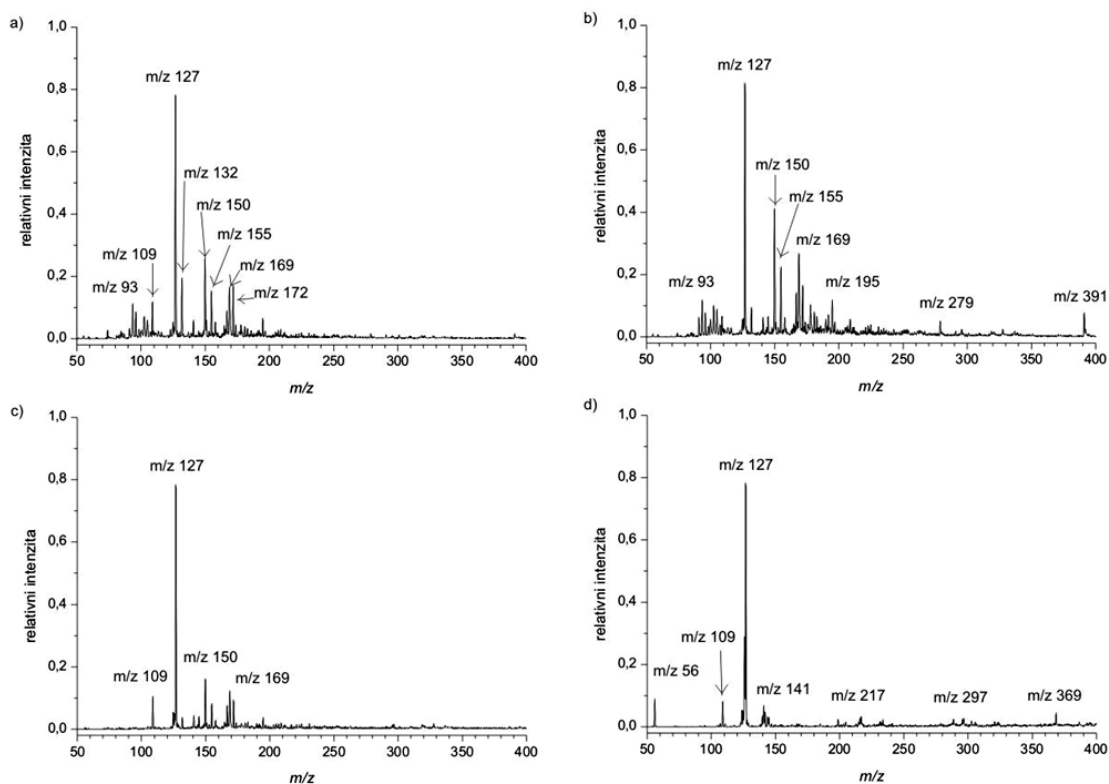


Schéma 5: Tvorba komplexů Fe^{2+} s vodou v závislosti na podmínkách měření. Bylo měřeno za těchto podmínek: a) CAP -54,4 eV, TUBEL 10 eV; b) CAP -4,1 eV, TUBEL 64 eV; c) CAP 45,6 eV, TUBEL 164,1 eV; d) CAP 145,7 eV, TUBEL 249,9 eV.

3.2 Komplexy modelových molekul s FeSO_4

První experimenty byly provedeny s modelovými molekulami pyrokatecholu, resorcinolu a 3-hydroxy-2-methyl-4-pyronu kvůli zjištění, jak reagují a jaké komplexy tvoří s dvojmocným železem postranní OH skupiny (v polohách ortho a meta) na uhlíkovém kruhu. Ve spektrech jsou popsány pouze nejvyšší a nejdůležitější píky a hmoty.

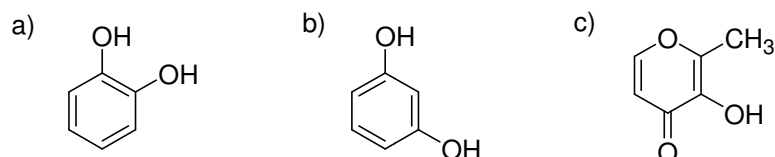


Schéma 6: Modelové molekuly: a) pyrokatechol (ortho-dihydroxybenzen), b) resorcinol (meta-dihydroxybenzen), c) 3-hydroxy-2-methyl-4-pyron.

3.2.1 Komplexy pyrokatecholu (*ortho*-dihydroxybenzenu)

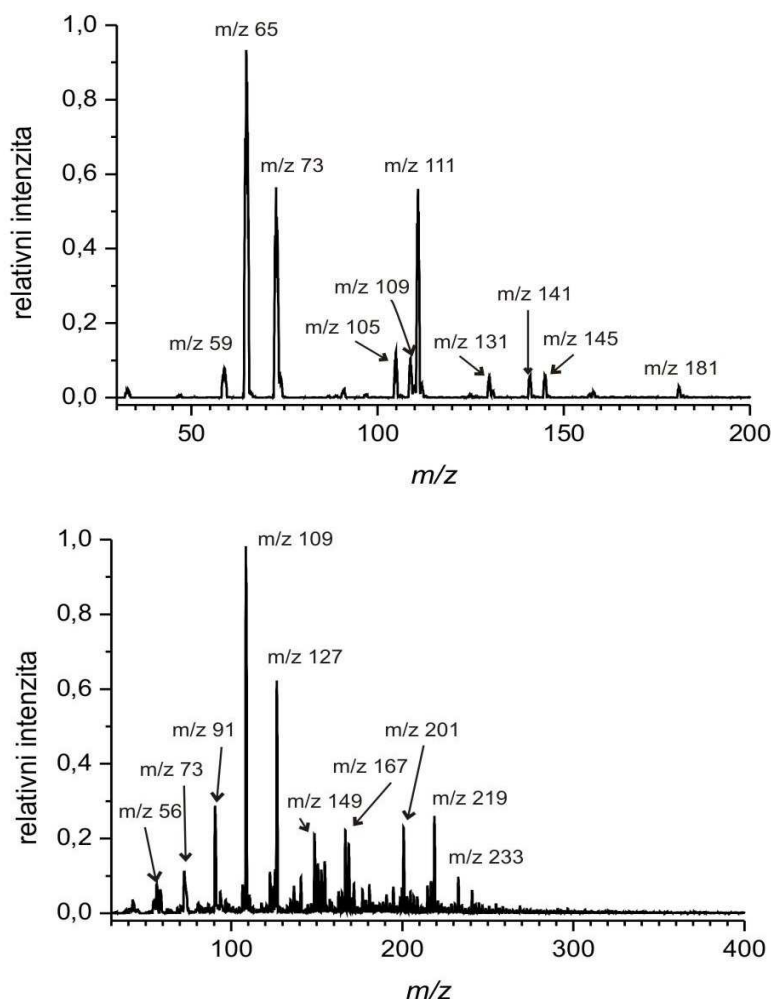


Schéma 7: Zdrojové hmotnostní spektrum pyrokatecholu ve vodě a pyrokatecholu s FeSO₄ ve vodě.

U pyrokatecholu ($M_r = 110$) bylo změřeno zdrojové hmotnostní spektrum samotné látky rozpuštěné ve vodě a poté po přidání FeSO₄ rozpuštěného ve vodě. V prvním spektru se vyskytují protonovaná (m/z 111) i oxidovaná protonovaná (m/z 109) forma pyrokatecholu.

Ve druhém spektru je nejdůležitější pík m/z 201, což je komplex pyrokatecholu s Fe²⁺ a jednou molekulou vody, který byl dále použit k CID měření. Dále pík m/z 219, což je stejný komplex, ale se dvěma molekulami vody. Ve spektru je vidět železný ion m/z 56 (Fe⁺) a hmoty odpovídající různě hydratovanému komplexu [FeOH]⁺ (m/z 73, dále m/z 91 [Fe(OH)(H₂O)]⁺, m/z 109 [Fe(OH)(H₂O)₂]⁺ a m/z 127 [Fe(OH)(H₂O)₃]⁺). Poslední dvě hmoty mohou odpovídat i protonované oxidované formě pyrokatecholu a jeho komplexu s molekulou vody.

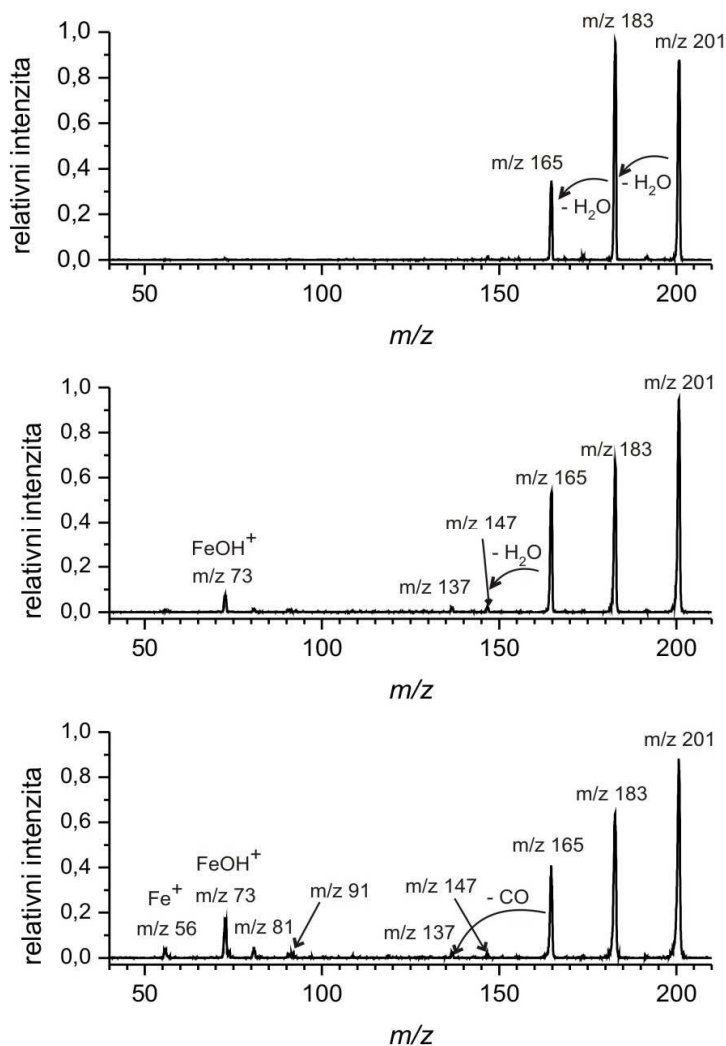


Schéma 8: CID spektrum m/z 201(komplexu pyrokatecholu s Fe^{2+}) při $E_{CM} = 4; 8$ a 12 eV.

V CID spektrech jsou pro lepší přehlednost grafu znázorňovány ztráty molekul postupně, jak přibývaly s rostoucí kolizní energií. Při nejnižší energii se odštěpovaly pouze molekuly vody, při vyšších energiích se odštěpila molekula CO. Jednotlivé ztráty jsou popsány přehledněji ve Schématu 9.

Kromě popsanych ztrát jsou vidět i píky, které by odpovídaly ztrátě hmoty m/z 9. S největší pravděpodobností se jedná o ztrátu vody z dikationtu, který obsahuje dva železnaté ionty, dva pyrokatecholy a čtyři molekuly vody, přičemž buď pyrokatecholy, nebo dvě molekuly vody musí být deprotonovány. Jedna z možných struktur dikationtu je znázorněna ve Schématu 9.

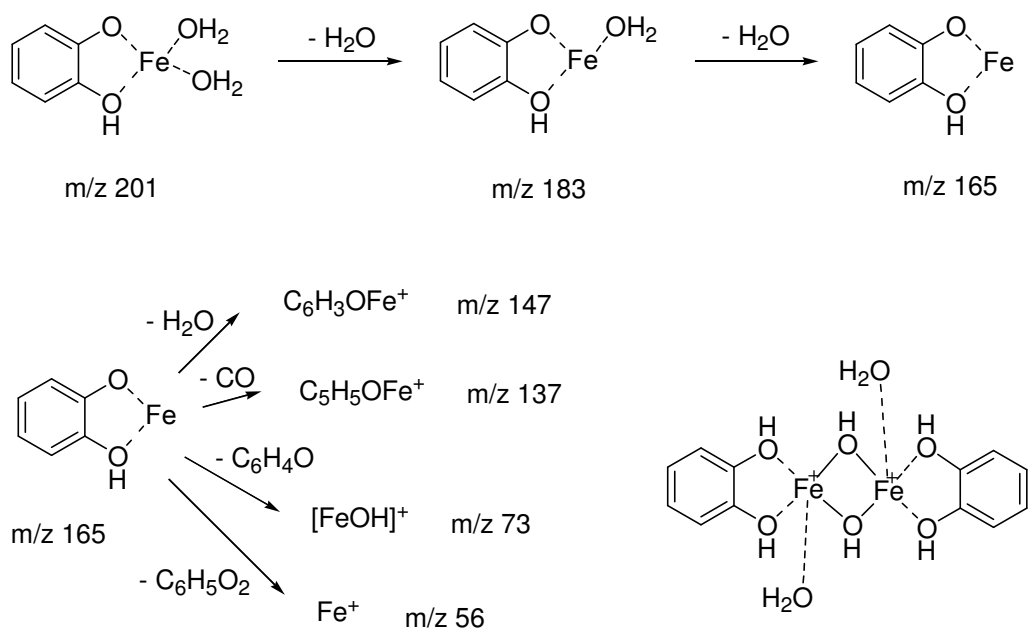


Schéma 9: Schéma ztrát molekul z komplexu pyrokatecholu s Fe^{2+} (CID m/z 201).

3.2.2 Komplexy resorcinolu (*meta*-dihydroxybenzenu)

Pro resorcinol ($M_r = 110$), rozpuštěný ve vodě bylo změřeno pouze spektrum s přidáním $FeSO_4$ (rozpuštěným ve vodě). Ve zdrojovém spektru se opět vyskytuje pík m/z 201, který odpovídá komplexu resorcinolu s Fe^{2+} a jednou molekulou vody, použitý dále na CID měření. Hmoty m/z 219 a m/z 237 odpovídají stejnému komplexu se dvěma, resp. třemi molekulami vody. Hmoty m/z 111 je protonovaný resorcinol a hmota m/z 129 je protonovaný resorcinol s jednou molekulou vody.

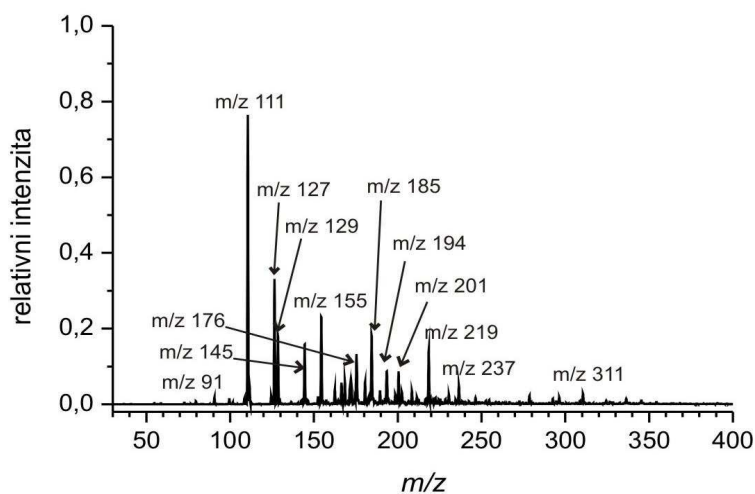


Schéma 10: Zdrojové hmotnostní spektrum resorcinolu s $FeSO_4$ ve vodě.

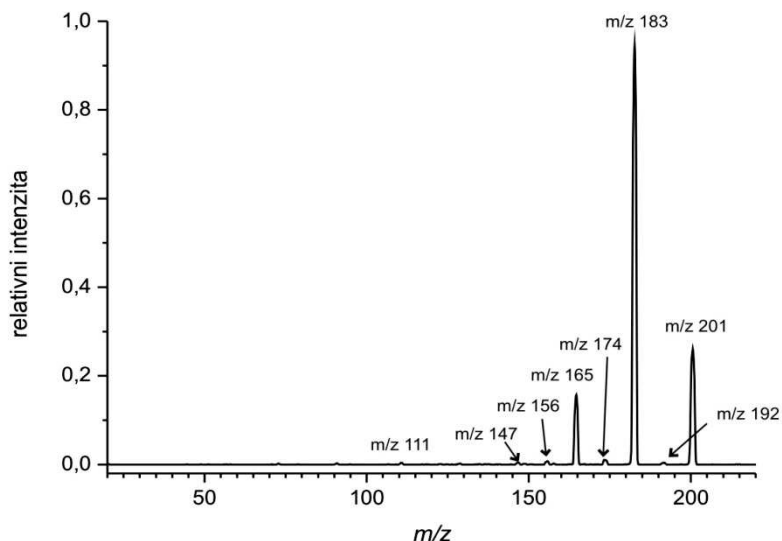


Schéma 11: CID spektrum m/z 201 (komplexu resorcinolu s Fe^{2+}) při $E_{CM} = 4 \text{ eV}$.

CID spektrum hmoty m/z 201 bylo změřeno pouze při jedné energii. Ve spektru je vidět ztráta vody z mateřského iontu m/z 201. Zároveň je vidět několik ztrát hmoty m/z 9, které nejspíše opět odpovídají ztrátě vody z dikationtu. Fragmentace resorcinolu je analogická fragmentaci pyrokatecholu. Jediný podstatný rozdíl je v přítomnosti hmoty m/z 111, která byla způsobena odštěpením neutrálního $\text{Fe}(\text{OH})_2$ z mateřského iontu a vznikl tak protonovaný resorcinol. To je způsobeno mnohem slabší vazbou resorcinolu (hydroxy skupiny v meta poloze) k železnatým iontům, než má pyrokatechol (ortho uspořádání).

3.2.3 Komplexy 3-hydroxy-2-methyl-4-pyronu

U 3-hydroxy-2-methyl-4-pyronu ($M_r = 126$) bylo změřeno zdrojové hmotnostní spektrum samotné látky rozpuštěné v methanolu a dále po přidání FeSO_4 rozpuštěného ve vodě. V prvním spektru jsou dobře vidět píky m/z 127 a m/z 159, odpovídající protonovanému pyronu bez a s jednou molekulou vody. Hmoty m/z 65 a m/z 97 pocházejí od methanolu ($\text{CH}_3\text{OH}_2^+ \cdot \text{CH}_3\text{OH}$ a $\text{CH}_3\text{OH}_2^+ \cdot 2 \text{CH}_3\text{OH}$).

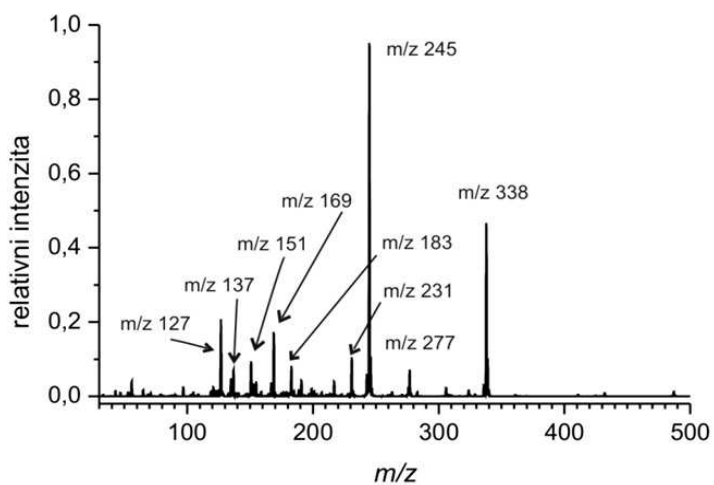
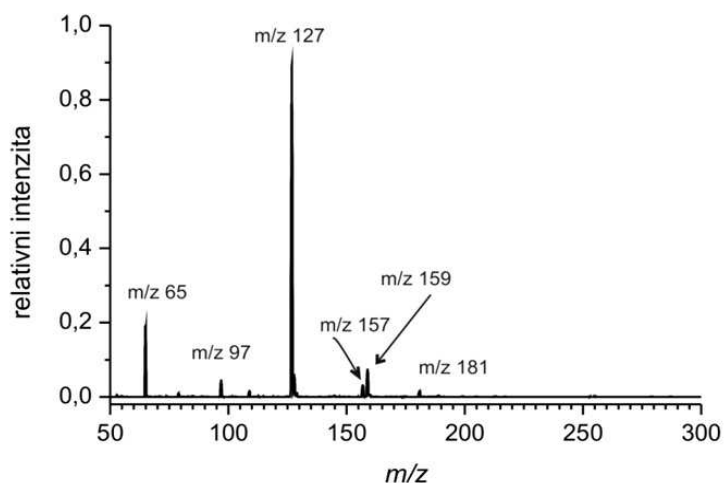


Schéma 12: Zdrojové hmotnostní spektrum 3-hydroxy-2-methyl-4-pyronu v methanolu a 3-hydroxy-2-methyl-4-pyronu s FeSO_4 v methanolu.

Ve druhém spektru je nejdůležitější pík m/z 245, odpovídající komplexu 3-hydroxy-2-methyl-4-pyronu s Fe^{2+} a dvěma molekulami methanolu, použitý dále k CID měření. Hmota m/z 181 odpovídající komplexu bez methanolu ve spektru není vidět, naopak patrné jsou hmoty m/z 153 a m/z 127 popsané níže ve Schématu 14.

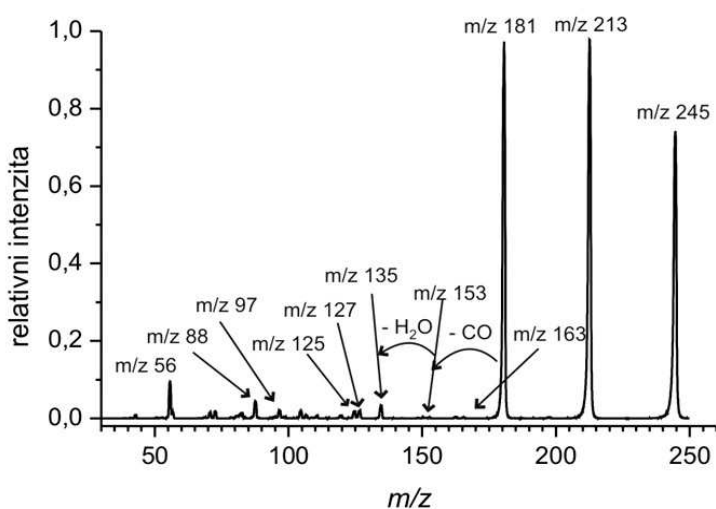
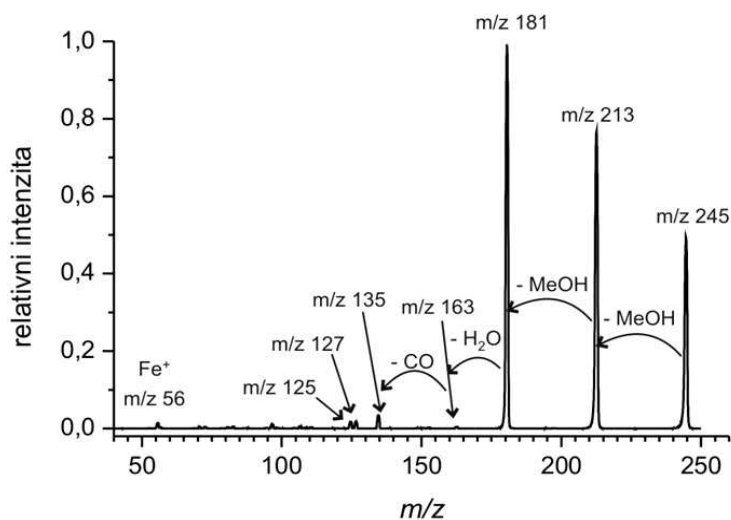


Schéma13: CID spektrum m/z 245 (komplexu 3-hydroxy-2-methyl-4-pyronu s Fe^{2+}) při $E_{CM} = 10,5$ a $17,5$ eV.

Toto CID měření bylo provedeno s hmotou m/z 245, odpovídající komplexu 3-hydroxy-2-methyl-4-pyronu s Fe^{2+} a dvěma molekulami methanolu, proto první ztráty patřily právě methanolu. Další ztráty jsou popsány ve Schématu 15: buď se nejprve odštěpuje molekula vody a poté CO nebo naopak, nejprve CO a poté voda, další CO nebo C_2H_2 .

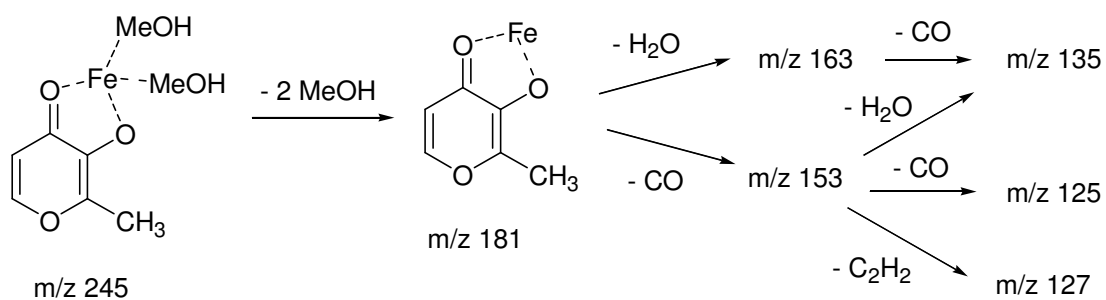


Schéma14: Schéma ztrát molekul z komplexu 3-hydroxy-2-methyl-4-pyronu s Fe^{2+} (CID m/z 245).

3.3 Komplexy flavonoidů s $FeSO_4$

Další experimenty byly prováděny s flavonoidy typu flavanolu – epikatechinem a katechin hydrátem a typu flavanolu – quercetin dihydrátem.

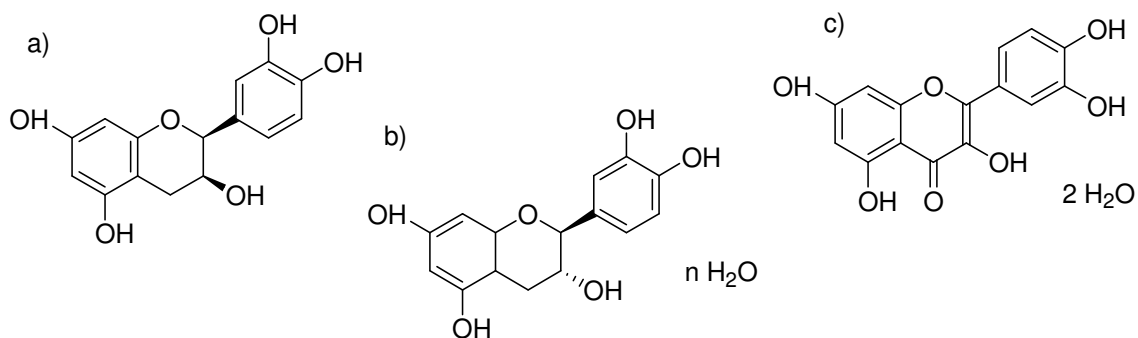


Schéma15: Studované flavonoidy: a) $(-)$ epikatechin, b) $(+)$ katechin hydrát, c) quercetin dihydrát.

3.3.1 Komplexy epikatechinu

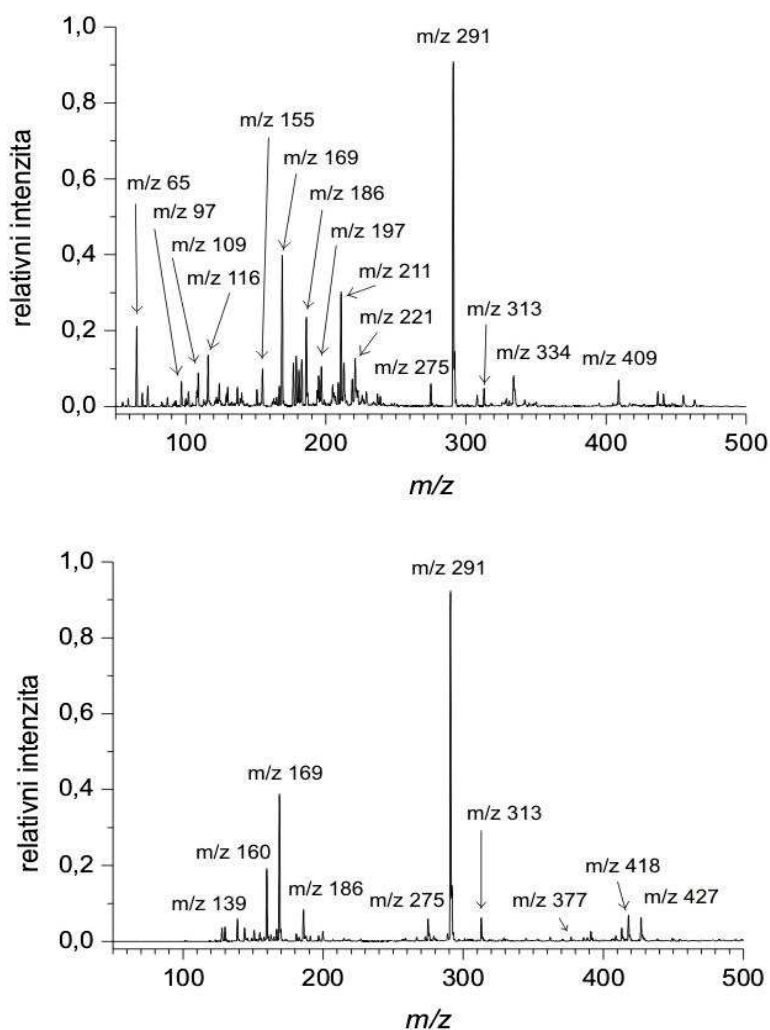


Schéma16: Zdrojové hmotnostní spektrum epikatechinu v methanolu a epikatechinu s FeSO_4 v methanolu.

U epikatechinu ($M_r = 290$) bylo změřeno hmotnostní spektrum samotné látky rozpuštěné v methanolu a po přidání FeSO_4 rozpuštěného ve vodě. V prvním spektru je dobře vidět pík m/z 291, který odpovídá protonovanému epikatechinu. Hmoty m/z 65 a m/z 97 opět pocházejí od methanolu ($\text{CH}_3\text{OH}_2^+ \cdot \text{CH}_3\text{OH}$ a $\text{CH}_3\text{OH}_2^+ \cdot 2 \text{CH}_3\text{OH}$).

Ve druhém spektru je nejdůležitější pík m/z 377, který odpovídá komplexu epikatechinu s Fe^{2+} a jednou molekulou methanolu, který byl dále použitý na CID měření. Opět se zde vyskytuje hmota m/z 291 od protonovaného epikatechinu. Ve spektru se nevyskytovala hmota m/z 345 odpovídající komplexu epikatechinu s Fe^{2+} bez methanolu, proto bylo CID měření provedeno od hmoty m/z 377.

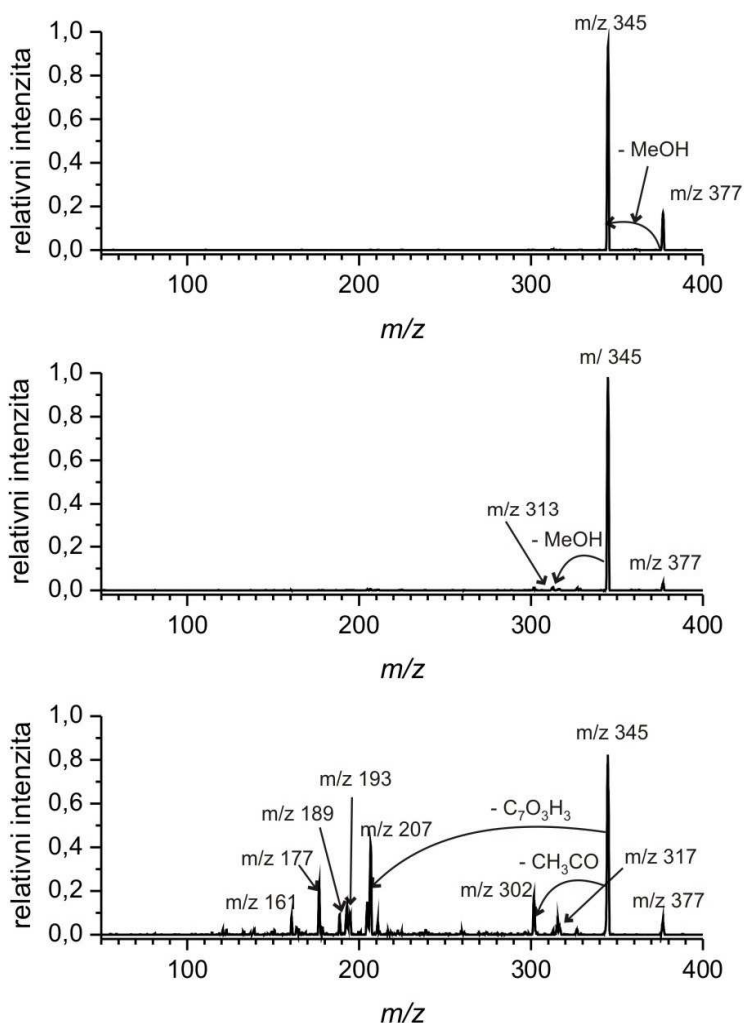


Schéma 17: CID spektrum m/z 377 (komplexu epikatechinu s Fe^{2+}) při $E_{CM} = 1,3; 2,6$ a $6,5$ eV.

V CID spektru jsou popsány ztráty molekul z komplexu epikatechinu s Fe^{2+} s jednou molekulou methanolu (m/z 377), proto první ztrátou je právě tato molekula methanolu. Při nižších energiích se odštěpovaly ještě molekuly CO a CH_3CO , zbytky tedy odpovídají hmotám m/z 317 a m/z 302. Je pravděpodobné, že pod tímto komplexem epikatechinu s Fe^{2+} o hmotě m/z 377 se nachází ještě isobarická nečistota o stejné hmotě m/z 377 – komplex epikatechinu s Na^+ a dvěma molekulami methanolu, která ztrácí tyto dvě molekuly methanolu a vzniká tak hmota m/z 313, která je ve spektru vidět při nižších energiích.

Při použití vyšší energie dochází k retro-Diels-Alderově reakci. U molekuly epikatechinu s navázaným železem se rozštěpí pyranový kruh, ztrácí se část o hmotě 138 a ve spektru je vidět pík hmoty m/z 207. Ztráta je znázorněna ve Schématu 19. Vytvořený

ion s m/z 207 má podobnou strukturu jako studovaný komplex pyrokatecholu se železem a vykazuje i podobnou fragmentaci. Může ztrácet molekulu CO a poté molekulu vody nebo naopak. Kromě toho lze vidět i dehydrogenaci, která s největší pravděpodobností odpovídá fragmentaci hydroxyvinylového řetězce. Následuje opět ztráta oxidu uhelnatého.

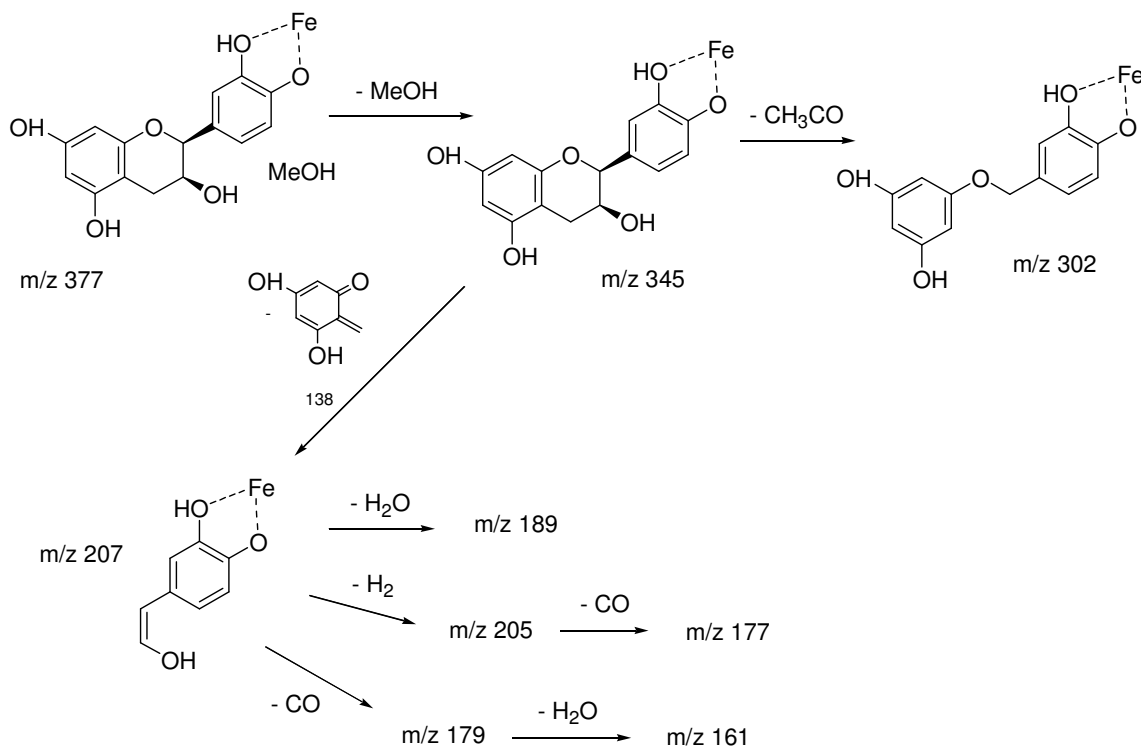


Schéma 18: Schéma ztrát molekul z komplexu epikatechinu s Fe²⁺ (CID m/z 377).

3.3.2 Komplexy katechinu

U katechinu ($M_r = 290$) bylo změřeno pouze spektrum této látky, rozpuštěné v methanolu s FeSO₄ (rozpuštěným ve vodě). Ve zdrojovém spektru byl dobře vidět pík m/z 291 patřící protonovanému katechinu i pík m/z 345 odpovídající komplexu katechinu s Fe²⁺, použitý dále na CID měření.

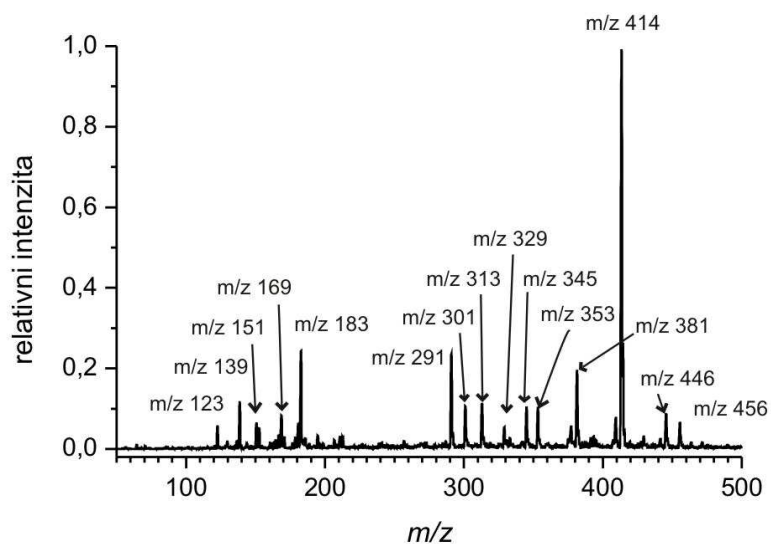


Schéma 19: Zdrojové hmotnostní spektrum katechin hydrátu s FeSO_4 v methanolu.

Po CID měření hmoty m/z 345 bylo ovšem jasné, že toto spektrum buď neodpovídá námi hledanému komplexu katechinu s Fe^{2+} nebo se jedná o směs různých isobarických iontů. Z časových důvodů už ale další spektra od katechinu nebyla měřena.

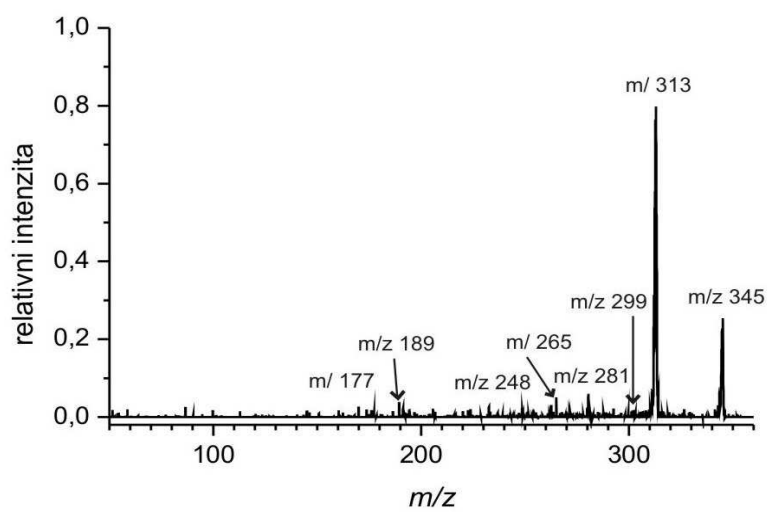
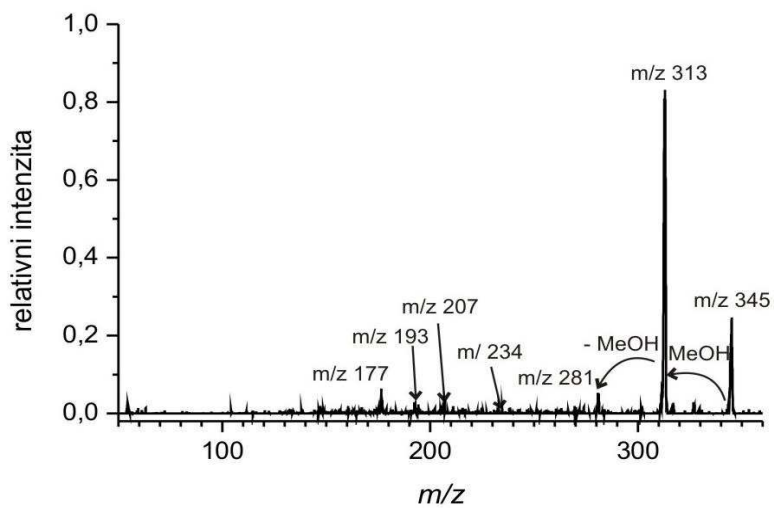


Schéma 20: CID spektrum m/z 345 při $E_{CM} = 8,3$ a $13,8$ eV.

3.3.3 Komplexy quercetinu

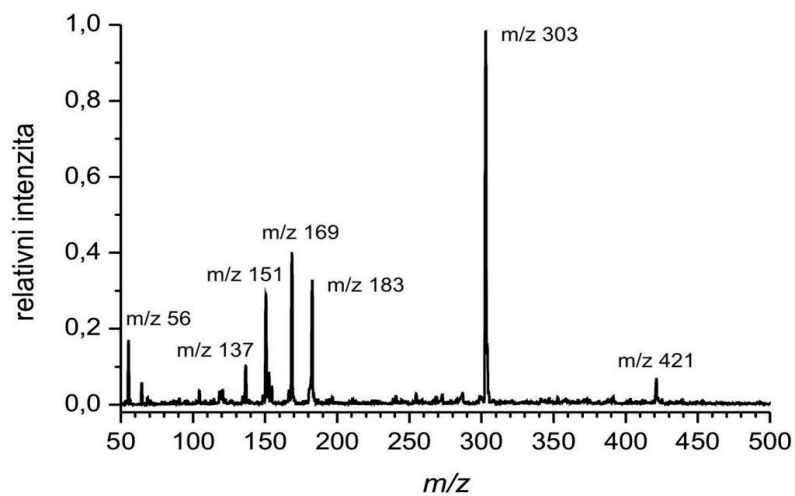


Schéma 121: Zdrojové hmotnostní spektrum quercetinu s FeSO_4 v methanolu.

U quercetinu ($M_r = 302$) bylo změřeno pouze hmotnostní spektrum této látky, rozpuštěné v methanolu s FeSO_4 (rozpuštěným ve vodě). Ve spektru je důležitý pík m/z 421 odpovídající komplexu quercetinu s Fe^{2+} a dvěma molekulami methanolu. Dále je ve spektru pík m/z 303, což je protonovaný quercetin.

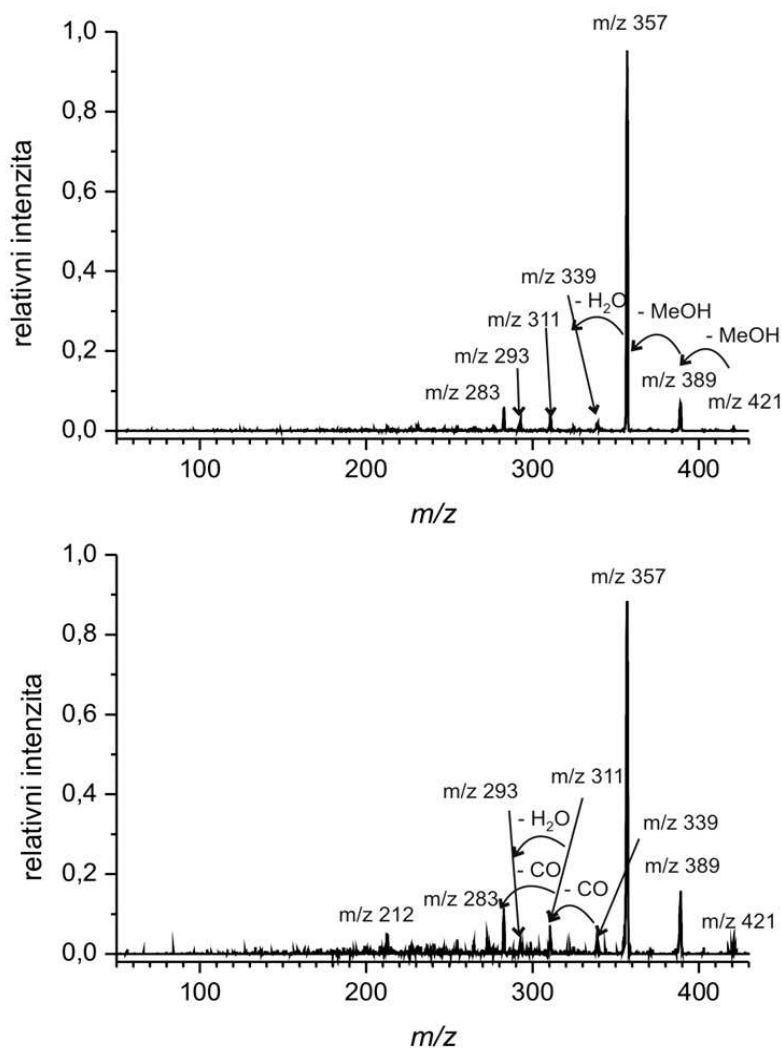


Schéma 22: CID spektrum m/z 421 (komplexu quercetinu s Fe^{2+}) při $E_{CM} = 7$ a 12 eV.

V CID spektru jsou vidět nejprve ztráty methanolu, protože námi měřený komplex quercetinu s Fe^{2+} obsahoval dvě molekuly methanolu. Dále se z komplexu odštěpují již pouze molekuly vody a CO, což napovídá o tom, že železo se u quercetinu váže mezi kyslíkové atomy na pyranovém kruhu, ne jako u epikatechinu mezi kyslíky na benzenovém jádře. Proto u quercetinu nemůže docházet k retro-Diels-Alderově reakci a

rozštěpení pyronového kruhu. Místo toho pozorujeme pouze fragmentace typické pro polyfenoly, které pocházejí z pyrokatecholového substituentu a anelovaného resorcinolu.

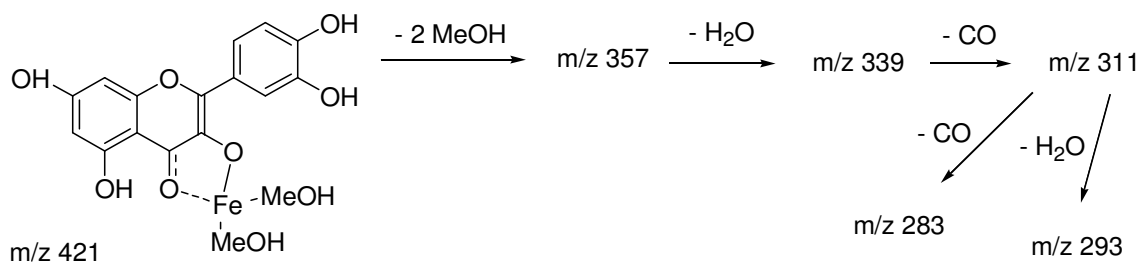


Schéma 23: Schéma ztrát molekul z komplexu quercetinu s Fe²⁺ (CID m/z 421).

4. ZÁVĚR

Tato bakalářská práce je zaměřena na studium interakce železnaté soli (FeSO₄) s flavonoidy. Flavonoidy jsou přírodní polyfenolické látky, které se vyskytují v téměř všech rostlinách. Mají prokazatelně příznivé účinky na lidské zdraví, především na kardiovaskulární a nervový systém.

K měření interakcí byla použita metoda hmotnostní spektrometrie s využitím elektrosprejové ionizace. Pro zjištění, jak reagují a jaké komplexy poskytují postranní OH skupiny na uhlíkovém kruhu flavonoidů (v polohách ortho a meta), byly nejprve k měření použity modelové molekuly: pyrokatechol (ortho-dihydroxybenzen), resorcinol (meta-dihydroxybenzen) a 3-hydroxy-2-methyl-4-pyron. Po navázání železa mezi OH skupiny, tyto modelové struktury ztrácejí zpravidla pouze molekuly vody nebo CO, pyronový komplex ztrácí také molekulu C₂H₂. Nejmenší hmoty, které vznikají při těchto fragmentacích, jsou ionty železa Fe⁺ a Fe(OH)⁺. Meta poloha u resorcinolu vykazovala známky slabší vazby k železnatým iontům než ortho poloha u pyrokatecholu.

Z flavonoidů byli použiti tyto tři zástupci: epikatechin, katechin hydrát a quercetin dihydrát. Všechny tyto struktury mají vždy na jednom kruhu (A nebo B) dvě postranní OH skupiny (na jednom v poloze ortho, na druhém v poloze meta). Quercetin navíc nese na C kruhu keto a OH skupinu v poloze ortho. Postavení těchto skupin na jednotlivých kruzích určuje průběh fragmentace.

Katechin byl vyřazen, jeho měření se nezdařilo kvůli kontaminaci roztoku sodíkem. Fragmentace epikatechinu se podařila změřit velmi dobře. Při nižších energiích se ztrácely pouze molekuly methanolu, jako u modelových struktur, nebo CH₃CO. Při vyšší energii došlo k retro-Diels-Alderově reakci, tzn. rozštěpení C kruhu, takže vznikly dva zbytky s celým aromatickým kruhem. K tomuto jevu nedošlo u quercetinu, proto lze předpokládat, že železo se v tomto případě váže mezi keto a OH skupinu (v poloze ortho) na C kruhu (ne mezi postranní OH skupiny jako u epikatechinu). To brání rozpadu tohoto kruhu a z komplexu se uvolňují pouze malé molekuly z postranních kruhů – dochází k dekarboxylaci a dehydrataci.

Ve flavonoidech se železo bude spíše vázat k hydroxyskupinám, které jsou vůči sobě v poloze ortho, tedy ne primárně ke kruhu A.

LITERATURA

¹ Štícha M.: *Úvod do hmotnostní spektrometrie* [prezentace k přednášce Hmotnostní spektrometrie].

² Vidová V., Lemr K., Havlíček V.: Současné trendy hmotnostní spektrometrie. *Chemické Listy* **102**, 957-959 (2008).

³ Jian W., Schäfer A., Choudhary Mohr P., Schalley Ch. A.: Monitoring Self-Sorting by Electrospray Ionization Mass Spectrometry: Formation Intermediates and Error-Correction during the Self-Assembly of Multiply Threaded Pseudorotaxanes. *Journal of the American Chemical Society* **132**, 2309-2320 (2010).

⁴ Tsierkezos N. G., Schröder D., Schwarz H.: Complexation of nickel(II) by ethylenediamine investigated by means of electrospray ionization mass spectrometry. *International Journal of Mass Spectrometry* **235**, 33-42 (2004).

⁵ Ranc V., Havlíček V., Bednář P., Lemr K.: Desorpční elektrosprej: Moderní metoda analýzy organických povrchů. *Chemické Listy* **101**, 524-529 (2007).

- ⁶ Whitehouse C. M., Dreyer R. N., Yamashita M., Fenn J. B.: Electrospray Interface for Liquid Chromatographs and Mass spectrometers. *Analytical Chemistry* **57**, 675-679 (1985).
- ⁷ Chen P.: Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry in High-Throughput Screening of Homogeneous Catalysts. *Angewandte Chemie International Edition* **42**, 2832-2847 (2003).
- ⁸ Lukeš I.: *Systematická anorganická chemie*, Praha, Karolinum 2009.
- ⁹ Čopíková J.: Čokoláda a zdraví. *Chemické Listy* **95**, 610-615 (2001).
- ¹⁰ Ondrejovič M., Maliar T., Polívka L., Šilhár S.: Polyfenoly jablka. *Chemické Listy* **103**, 394-400 (2009).
- ¹¹ Firáková S., Jedinák A., Maliar T., Šturdík E.: Kvantitativne vzťahy medzi štruktúrou a schopnosťou flavonoidov redukovať železitý komplex. *Chemické Listy* **100**, 980-981 (2006).
- ¹² Čepička J., Karabín M.: Polyfenolové látky piva – prirodzené antioxidanty. *Chemické Listy* **96**, 90-95 (2002).
- ¹³ Di Carlo G., Mascolo N., Izzo A. A., Capasso F.: Flavonoids: Old and New Aspects of a Class of Natural Therapeutic Drugs. *Life Sciences* **65**:4, 337-340 (1999).
- ¹⁴ Amić D., Davidović-Amić D., Bešlo D, Rastija V., Lučić B., Trinajstić N.: SAR and QSAR of the Antioxidant Activity of Flavonoids. *Current Medicinal Chemistry* **14**, 827-828 (2007).
- ¹⁵ Čopíková J.: Čokoláda a zdraví. *Chemické Listy* **95**, 610-615 (2001).
- ¹⁶ Asgary S., Naderi G. H., Askari N.: Protective effect of flavonoids against red blood cell hemolysis by free radicals. *Experimental and Clinical Cardiology* **10**:2, 88-90 (2005).
- ¹⁷ Rastija V., Medić-Šarić M.: QSAR study of antioxidant activity of wine polyphenols. *European Journal of Medicinal Chemistry* **44**, 400-408 (2009).
- ¹⁸ Firáková S., Jedinák A., Maliar T., Šturdík E.: Kvantitativne vzťahy medzi štruktúrou a

schopnosťou flavonoidov redukovať železitý komplex. *Chemické Listy* **100**, 983-986 (2006).

¹⁹ Pannala A. S., Chan T. S., O' Brien P. J., Rice-Evans C. A.: Flavonoid B-Ring Chemistry and Antioxidant Activity: Fast Reaction Kinetics. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **282**, 1161-1168 (2001).

²⁰ Satterfield M., Brodbelt J. S.: Enhanced Detection of Flavonoids by Metal Complexation and Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry* **72**:24, 5898-5906 (2000).

²¹ Amić D., Davidović-Amić D., Bešlo D, Rastija V., Lučić B., Trinajstić N.: SAR and QSAR of the Antioxidant Activity of Flavonoids. *Current Medicinal Chemistry* **14**, 829-845 (2007).

²² Di Carlo G., Mascolo N., Izzo A. A., Capasso F.: Flavonoids: Old and New Aspects of a Class of Natural Therapeutic Drugs. *Life Sciences* **65**:4, 341-353 (1999).

²³ Dajas F., Rivera-Megret F., Blasina F., Arredondo F., Abin-Carriquiry J. A., Costa G., Echeverry C., Lafon L., Heizen H., Ferreira M., Morquio A.: Neuroprotection by flavonoids. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* **36**:12, 1613-1620 (2003).

²⁴ Ducháčková L., Roithová J.: The Particular Interaction of Zinc(II) and Hydroxamic Acids and a Metal-Triggered Lossen Rearrangement. *Chemistry – A European Journal* **15**:48, 13399-13405 (2009).