Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie

Spektrofotometrické stanovení chelatace železa při různých pH

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: PharmDr. Přemysl Mladěnka PhD.

Hradec Králové 2011 Monika Šulcová

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány.

Děkuji PharmDr. Přemyslu Mladěnkovi PhD., školiteli mé diplomové práce, za poskytnuté materiály, rady a pomoc při řešení a zpracování této diplomové práce. Děkuji také Mgr. Tomáši Filipskému za pomoc během měření, a také oběma za vytvoření příjemného prostředí. Také děkuji Grantové agentuře Univerzity Karlovy, díky její pomoci byla tato diplomová práce uskutečněna (GAUK 53707 B).

Obsah

Abstrakt 6
Abstrakt v angličtině 8
1.Úvod 10
2. Teoretická část 11
2.1. Železo 11
2.1.1. Fyziologie železa 11
2.1.2. Patologické stavy spojené primárně s železem 13
2.1.2.1. Nedostatek železa 13
2.1.2.2. Nadbytek železa 13
2.1.2.3. Toxické vlastnosti železa 14
2.2. Chelatace železa 16
2.2.1. Klinicky používané chelátory železa 16
2.2.1.1. Deferoxamin (DFO) 17
2.2.1.2. Deferipron (DFP) 18
2.2.1.3. Deferasirox 19
2.2.1.4. Dexrazoxan 20
2.2.2. Hydroxychinoliny 20
2.2.3. Kvercetin 21
3. Experimentální část 23
3.1. Cíl práce 23
3.2. Materiál a metodika 23
3.2.1.Použité chemikálie 23
3.2.2. Přístroj 24
3.2.3. Charakteristika metodiky 25
3.2.4. Postup 33
3.2.4.1. Příprava zásobních roztoků (stock solutions) 33
3.2.4.2. Kalibrace železnatých a železitých iontů 34
3.2.4.3. Stanovení absorpčního maxima komplexu a absorpční konstanty komplexu 36
3.2.4.4. Vlastní měření 37
3.2.4.5.Výpočet poměru zkoušená látka/Fe^{n+} nebo směrnice 42
3.2.5.Statistická analýza 43
3.3.Výsledky 44
3.4.Diskuze 81
3.5.Závěr 83

4.Seznam zkratek 84
5.Literatura.....85

Abstrakt

Železo je prvek nezbytný pro život buněk. Nebezpečný pro organismus může být jeho nedostatek, ale i nadbytek. Proto jeho hladiny musí být pečlivě regulovány. Nejčastější příčinou přetížení železem je jeho nadbytečný přívod. K nadbytku dochází zejména při častém podávání transfúzí nebo při hematologických onemocnění. Toxicita železa je založena na schopnosti katalyzovat tvorbu volných radikálů, které modifikují buněčné makromolekuly a způsobují tak poškození tkání. Při přetížení organismu železem je racionální terapií používání chelátorů železa.

Chelátory železa jsou molekuly různé struktury vážící železo, které je posléze eliminováno z organismu a brání tak akumulaci železa ve tkáních. Používají se zejména při intoxikaci, ale některé mají využití i v jiných indikacích. Pozornost je věnována zejména jejich potenciální aplikaci v léčbě neurodegenerativních onemocnění a nádorů.

Existuje celá řada postupů ke stanovení hladin železa. Pro stanovení chelatace železnatých iontů se dá úspěšně použít ferrozinová metoda. Tato metodika ale není použitelná pro přímé stanovení chelatace železitých iontů. Ta se dá stanovit mj. přímou spektrofotometrií. Ferrozinovou metodou nelze také přesně určit chelatační poměr sloučenina:železo.

Cílem této práce byla snaha o vytvoření a standardizaci screeningové metodiky ke stanovení schopnosti různých látek chelatovat železnaté a železité ionty pomocí spektrofotometrie. Současně v případě pozitivity, tj. schopnosti látky chelatovat železo, měla umožnit stanovení stechiometrického poměru komplexu.

Byly vyvinuty nové modifikované *in-vitro* metody pro zjištění železo-chelatačních vlastností při různých pH (4,5, 5,5, 6,8 a 7,5) přímou UV-VIS spektrofotometrií. Aktivní sloučeniny vytvářejí komplexy s železnatými/železitými ionty, které mají odlišné absorpční maximum, než původní sloučenina. Nejjednodušší měření představuje záznam absorbance v absorpčním maximu komplexu. Tato metodika je užitečná pouze v omezených případech, kdy je rozdíl mezi absorpčním maximem čisté látky a jejího komplexu velký. Ve většině případů (kdy rozdíl mezi absorpčním maximem čisté látky a jeho komplexu s železem je malý) je zapotřebí sofistikovanější metody založené na hodnocení molárního absorpčního koeficientu testované látky a jejího komplexu.

Změřené stechiometrické poměry u známých chelátorů (deferipron, 8-hydroxychinolin) se shodují s dostupnými literárními zdroji a ukazují tak na správnost použité metodiky. V případě flavonoidů se různé práce liší ve výsledných stechiometrických poměrech.

Proto je tato metoda slibným přístupem pro stanovení železo-chelatační aktivity zvláště flavonoidů. Jako modelový příklad byl vybrán kvercetin. Byly u něj s výjimkou pH 4.5, kdy kvercetin nechelatoval železnaté ionty, nalezeny při všech dalších experimentálních podmínkách komplexy se stechiometrií 1:1.

Abstrakt v angličtině

Iron is an essential element for living cells. Dangerous for the organism can be its lack and abundance as well. Therefore, its level must be meticulously regulated. The most common cause of iron overload is the excess supply. The iron overload is mainly brought about frequent use of transfusion or hematologic diseases. Iron toxicity is based on the ability to catalyze the formation of free radicals that modify cellular macromolecules and cause tissue damage. The use of iron chelators is therefore a rational therapy of iron overload conditions.

Iron chelators are molecules with different structures sparing the ability of iron binding, which results in iron elimination from the organism and prevent iron accumulation in tissues. It is mainly used for intoxication, but some of them are also used in other indications. Attention is paid to the chemotherapy and the treatment of neurodegenerative diseases.

There are many methods for determination of iron levels. Ferrozine method can be successfully used for the assessment of ferrous ions chelation. But this methodology is not applicable for the direct determination of the chelation of ferric iron ions. That can be provided by direct spectrophotometry. Ferrozine method cannot also accurately determine the complex ratio of the chelating compound:iron.

The aim of this work was to create and standardize screening methodology for the determination of the ability of different compounds to chelate iron by spectrophotometrical approach. At the same time in case of positivity, i.e. the ability of a tested compound to chelate iron, should allow the determination of stoichiometric ratio of the formed complex.

They have developed new modified *in vitro* methods to detect iron-chelating properties at different pH (4.5, 5.5, 6.8 and 7.5) by direct UV-VIS spectrophotometry. Active compounds form complexes with ferrous/ferric ions, which have different absorption maximum, than the original compound. The simplest measurement is the recording of absorbance at absorption maximum of the complex. This methodology is useful only in limited cases where the difference between the absorption maximum of pure substances and its complex is large. However in most cases (the difference between the absorption maximum of pure substances and its complex with iron is small), this requires more sophisticated methods based on the evaluation of the molar absorption coefficient of the test substance and its complex.

Stoichiometric ratios measured for known chelators (deferiprone, 8-hydroxyquinoline) is consistent with the available literature sources and demonstrate the correctness of the methodology used. In the case of flavonoids, available studies differ published

stoichiometric ratios. Therefore, this method is a promising approach for the determination of iron-chelating activity of flavonoids in particular. Quercetin was chosen as a model compound. It was shown that quercetin with the exception of pH 4.5, when quercetin didnot chelate iron ions, formed complexes with 1:1 stoichiometry in all other experimental conditions.

1.Úvod

Železo je stopový prvek nezbytný pro vývoj a vznik červených krvinek, oxidativní metabolismus a buněčné imunitní odpovědi. Jeho hladiny však musí být pečlivě regulovány, neboť jeho nedostatek a zejména jeho přebytek mohou být pro organismus nebezpečné. Buněčný nedostatek železa zastaví růst buněk a nakonec vede k buněčné smrti. Nadbytek železa v organismu je spojen s tvorbou kyslíkových radikálů.

V léčbě přetížení železem se uplatňují zejména chelátory železa. Chelátory jsou látky různé struktury, které vytvářejí komplexy s ionty těžkých kovů, a tím eliminují jejich toxicitu. Dosud nejpoužívanějším chelátorem železa je desferoxamin. Chelatační léčba je důležitá v terapii u pacientů s chronickou transfuzní léčbou zejména u pacientů s thalassemií. Kromě léčby intoxikací mají chelátory využití i v jiných indikacích. V budoucnu se očekává jejich využití zejména v terapii nádorů a neurodegenerativních onemocnění.

2. Teoretická část

2.1. Železo

2.1.1. Fyziologie železa

Železo je nezbytným esenciálním prvkem pro prakticky všechny živé buňky. Je součástí mnoha proteinů zastávajících klíčové funkce ve fyziologických procesech, jako je transport kyslíku, respirace, syntéza DNA, regulace buněčného cyklu a mnohé další (1). Volné železo je velmi reaktivní a jeho nadbytek může vést k poškození tkání a orgánů. Naopak buněčný nedostatek železa zastaví růst buněk a nakonec vede k buněčné smrti. Protože neexistuje mechanizmus vylučování železa z těla, je jeho absorpce ve střevě za fyziologických okolností přísně regulována. Pokrok v metodologických přístupech umožnil identifikaci mnoha genů a proteinů podílejících se na absorpci železa a pochopení základních procesů jeho příjmu, transportu a skladování na buněčné úrovni. Přesto však stále nejsou některé pochody úplně objasněny. Mnoho nejasného zůstává hlavně v otázce regulace příjmu železa v závislosti na potřebách organizmu. Poruchy metabolizmu železa, jak ve smyslu jeho deficitu, tak nadbytku, jsou poměrně častým onemocněním. Rostoucí znalosti o fyziologickém metabolizmu železa mohou být využívány v diagnostice při preventivním screeningu nebo při stanovení účinnosti terapie (2).

Nejdůležitější vlastností železa, pro které je nezbytnou součástí mnoha enzymů, je jeho schopnost darovat a přijímat elektron, tj. schopnost konverze mezi železnatými a železitými formami. Nicméně tato užitečná funkce může být nebezpečná za určitých podmínek, protože železo je také známé vytvářet volné radikály.

Železo může existovat ve dvou formách, jako tzv. hemové (organické) železo nebo nehemové (anorganické) železo. Dvojmocné železo se oxiduje na trojmocné při styku s vodou nebo kyslíkem (3).

Nehemové železo je absorbováno převážně jako železo dvojmocné (4). Trojmocné železo musí být tedy redukováno na dvojmocné v kyselém prostředí žaludku. Tato přeměna je realizována na apikální membráně (5) pomocí na hemu závislé železité reduktázy – duodenálního cytochromu b (6). Po konverzi jsou železnaté ionty přepravovány přes apikální membránu pomocí dvojmocného kovového transportéru (ang. divalent metal transporter, DMT-1). Hlavním místem absorpce železa je proximální část duodena, kde v enterocytech může být dvojmocné železo zpět oxidováno na železo trojmocné, které se poté váže na protein apoferritin za vzniku

ferritinu. Ferritin je hlavní zásobní forma železa v organismu. Železo může být kromě uskladnění ve feritinu také vyplaveno ze zmíněných mukózních buněk do krve, kde je vázáno na svůj transportní protein transferin, s jehož pomocí se železo dostává do jater, sleziny a kostní dřeně, kde je opět skladováno ve formě feritinu (5). Za eflux železa z buňky je zodpovědný ferroportin. Ferroportin je basolaterální exportér železa, má pravděpodobně i funkci reduktázy, jejíž vliv na transport železa není jednoznačný (7). Ještě před navázáním na transferin, musí být totiž dvojmocné železo zoxidováno na trojmocné, tento děj je zprostředkována enzymatickým proteinem haephastinem. Rychlost absorpce železa je řízena poměrem apoferritinu k feritinu v mukózních buňkách. Jestliže je množství ferritinu nízké, je absorpce železa usnadněna, a naopak. Inhibice absorpce železa, jsou-li zásoby ferritinu saturované, se nazývá mukózní blokáda (4).

Výchyt železa buňkou se uskutečňuje pomocí specifických receptorů pro transferin (transferinový receptor 1 TfR1). Celý komplex je poté endocytózou transportován dovnitř buňky. Uvnitř v endosomu se díky okyselení ATP-dependentní protonovou pumpou následně uvolňuje železo, transferin a TfR1 z komplexu. Železité ionty jsou redukovány na železnaté, protože pouze železnaté ionty mohou být transportovány pomocí výše uvedeného DMT-1 přes endocytární membránu do cytoplasmy (8).

Celkové množství železa v organismu kolísá od 2 do 6 g. Množství železa v těle činí 50 mg/kg u mužů a 40 mg/kg u žen. Největší množství železa je uloženo v cirkulujících erytrocytech (1,8 g), parenchymatických jaterních buňkách (1 g), retikuloendoteliálních makrofázích (0,6 g), kostní dřeni (0,3 g) a svalech (0,3 g) (9).

Obsah železa v organismu se snižuje přibližně o 0,5-1,0 mg/den u mužů a až o 2 mg/den u menstruujících žen, což je následek ztráty železa v buňkách, které jsou však ihned opět nahrazovány. Jedná se o epidermální buňky kůže, vlasů a nehtů, mukózní buňky gastrointestinálního a respiračního traktu a epiteliální buňky močového a pohlavního ústrojí.

Denní příjem železa závisí na potravě. V normální evropské a severoamerické dietě je přítomno průměrně 15-20 mg železa. Z tohoto množství se absorbuje 0,5-2 mg, což je množství dostatečné pro požadavky mužů, netěhotných žen a dětí. Samozřejmě relativní potřeba dětí je vyšší, pokud jsou požadavky přepočítány na jednotku hmotnosti. Přirozeným zdrojem železa je zelenina (4). Absorpce se může zřídka zvýšit i nad 6 mg (8).

Jak již bylo dříve uvedeno, lidé nemají žádný zvláštní mechanismus pro vylučování železa. Železo se vylučuje pouze odlupováním erytrocytů nebo menstruačním krvácením. Vyloučená část zpravidla odpovídá absorbovanému množství, které je obvykle 0,5 až 2 mg/den. Jak je uvedeno výše, většina železa je uložena v červených krvinkách. Na konci jejich života, jsou červené krvinky fagocytovány specializovanou populací retikuloendoteliálních makrofágů. Degradace hemoglobinu uvolní železo, které se pak vrátí do oběhu vazbou na transferin. Transferin pak distribuuje železo v těle a dodává ho do železo vyžadujících buněk, přednostně opět pro syntézu hemoglobinu (7).

2.1.2. Patologické stavy spojené primárně s železem

2.1.2.1. Nedostatek železa

V některých částech světa (např. rozvojové země Afriky) je určitá deficience železa spíše normou než výjimkou. Platí to především o dětech a ženách ve fertilním věku, kde požadavky nejsou kryté potravou. Při menstruaci se ztrácí 17,5 mg železa měsíčně. U mnoha žen jsou však ztráty mnohem větší, a pak dochází k anémii ze ztráty železa. K menším ztrátám krve dochází i během porodu. Proto požadovaný příjem železa v potravě by měl být dvakrát až třikrát vyšší, než je norma. Špatné vstřebávání např. při nemocech trávicího traktu rovněž může vést k nedostatku železa v organismu. Také chronické krvácení je častou příčinou negativní bilance železa. K těmto ztrátám dochází v mírném klimatu při chronickém krvácení z nosu, z hemoroidů nebo ze sliznice žaludku, jak tomu může být i při chronickém užívání nesteroidních antiflogistik. V tropickém klimatu může dojít k anémii při krvácení v důsledku napadení měchovci. V některých zemích je železo přidáváno do mouky nebo do chleba. Anémie z nedostatku železa (tzv. anemický syndrom) zahrnuje pocit slabosti, únavu, bolesti hlavy, nevýkonnost a námahovou dušnost. Pacienti jsou bledí a vykazují známky tzv. koilonychie (tenké konkávní nehty na prstech) a stomatitidy (zánět jazyka a sliznice dutiny ústní). K léčbě tohoto typu anémie je užívána suplementace železa v perorální nebo parenterální formě (4).

2.1.2.2. Nadbytek železa

Nadbytek železa je pro organismus škodlivý stejně jako nedostatek železa.

Přetížení železem může vést k závažnému postižení orgánů v důsledku hromadícího se toxického železa. Nejčastější příčinou přetížení železem je jeho nadbytečný přívod, jako je tomu při dědičné hemochromatóze a u nemocných s anémií s hyperplastickou inefektivní erytropoézou dependentních na podávání transfuzí krve (thalasemie, myelodysplastický syndrom). V diagnostice nadbytku železa se uplatňují laboratorní metody (hladina feritinu v séru, saturace transferinu), invazivní metody (jaterní biopsie) a neinvazivní metody kvantifikující množství železa v játrech či myokardu (nukleární magnetická resonance). Klinické příznaky povětšinou odrážejí hromadění nadbytečného železa v orgánech.

Soli železa mají adstringentní účinek, čímž způsobují podráždění sliznice v trávicím ústrojí. Častými nežádoucími účinky jsou nauzea, zvracení, průjem, nebo naopak zácpa, které se objevují až u 15% pacientů. Dráždivý účinek perorálního železa je snížen, pokud se užívá při jídle, ale zároveň je snížena i absorpce železa. Při podávání příliš vysokých dávek soli železa dochází obvykle k poškození mukózních buněk, což má za následek bolest v epigastriu a krvácení do žaludku či duodena. Následná nekróza mukózní membrány může vést k perforaci střevní stěny. Poškozená sliznice trávicího ústrojí neposkytuje obvyklou bariéru a absorpce železa se může podstatně zvýšit.

Nadbytek železa v portální venózní krvi může následně působit nekrotické změny jaterních buněk. Chronické podávání příliš velkého množství železa může vést k sekundární hemosideróze, kdy jsou veškeré zásoby železa v organismu saturované a nadbytečné železo se akumuluje v játrech, pankreatu, žlázách s vnitřní sekrecí, v srdci s následnou toxicitou. Hemosideróza musí být léčena nejlépe opakovanou flebotomií. Někdy je třeba odebírat týdně 500 ml krve po dobu až dvou let (4).

Základem léčby přetížení železem je včasné podávání dostatečně vysoké dávky chelátoru po dostatečně dlouhou dobu. Jako chelátor, v tomto případě vlastně antidotum, se nejčastěji používá deferoxamin (4). V současné době se v léčbě uplatňují i perorální chelátory, jejichž účinek je srovnatelný s účinkem desferioxaminu. Jedná se zejména o deferiprone a v poslední době též o deferasirox (2).

2.1.2.3. Toxické vlastnosti železa

Jak již bylo řečeno, hladiny železa v organismu musí být pečlivě regulovány. Schopnost železnatých iontů odevzdávat elektrony a železitých iontů elektrony přijímat,

je nezbytnou součástí mnoha reakcí při mnoha biochemických pochodech a řadí tak železo k esenciálním prvkům.

Železo může za aerobních podmínek snadno katalyzovat vznik škodlivých reaktivních forem kyslíku (ROS, angl. reactive oxygen species) (10).

$$Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + \bullet OH + OH^-$$

Důležité je, že ROS jsou nevyhnutelnými vedlejšími produkty aerobního dýchání a objevují se v mitochondriích. ROS mohou být také generovány v průběhu enzymatické reakce v jiných subcelulárních kompartmentech, jako v peroxisomech, endoplazmatickém retikulu, nebo cytoplasmě. Dalším zdrojem může být také NADPH-oxidázový komplex, který je důležitou součástí antimikrobiální obrany organismu. Vytváří velké množství superoxidu při „oxidativním vzplanutí“, který se pak spontánně přeměňuje na peroxid vodíku. Produkty této reakce pak umožňují vznik dalším oxidantům jako je peroxynitrit ($ONOO^-$) nebo chlornan (OCl^-), kteří následně ještě zvyšují cytotoxicitu.

Redoxní aktivita železa katalyzuje vznik nejen hydroxylových radikálů, ale také dalších reaktivních forem, jako například peroxylových (ROOS), alkoxylových (ROS), thiylových (RS), nebo thiyl-peroxylových (RSOOS) radikálů (10).

$$Fe^{2+} + ROOH \rightarrow Fe^{3+} + OH^- + \bullet RO$$

$$Fe^{3+} + ROOH \rightarrow Fe^{2+} + H^+ + \bullet ROO$$

$$RSH + \bullet OH \rightarrow \bullet RS + H_2O$$

$$RSH + \bullet ROO \rightarrow \bullet RS + ROOH$$

$$\bullet RS + O_2 \rightarrow \bullet ROO$$

Volné radikály mohou také vznikat přímou reakcí Fe^{2+} s kyslíkem. Železo může také přispět jako reaktant, spíše než jako katalyzátor.

$$Fe^{2+} + O_2 \rightarrow [Fe\ (II)\text{-}\ O_2 \rightarrow Fe(III)\text{-}\ O_2^{-}\bullet] \rightarrow Fe^{3+} + \bullet O_2^{-}$$

Volné radikály jsou vysoce reaktivní a mohou způsobit oxidaci proteinů, peroxidaci membránových lipidů, a modifikaci nukleových kyselin.

Podobně, dusíkové radikály, jako například peroxynitrit, mohou vést k poškození proteinů nitrací. Překročením hladiny reaktivních forem kyslíku (a dusíku) mimo antioxidační kapacity organismu vzniká tzv. oxidační (a nitrační) stres, který se vyskytuje u mnoha patologických stavů, jako je chronický zánět, ischemická choroba srdeční, nebo neurodegenerativní onemocnění. Přebytek železa s redoxní aktivitou (stejně jako měď) zhoršuje oxidační (a nitrační) stres a vede k urychlení tkáňové degenerace. Toto je evidentní u primárních nebo sekundárních poruch přetížení železem (10).

2.2. Chelatace železa

Přetížení železem může vést k závažnému postižení orgánů v důsledku hromadícího se toxického železa. Základem léčby přetížení železem je včasné podávání dostatečně vysoké dávky chelátoru po dostatečně dlouhou dobu.

Chelátotvorné látky mají rozdílnou strukturu, používají se jako antidota nejen u otrav těžkými kovy. Vytvářejí komplexy s ionty těžkých kovů, a tím eliminují jejich toxicitu. U chelátů (řecky chele = klepeto) hovoříme o komplexu vytvořeném mezi iontem kovu a látkami, které na své molekule nesou pro iont kovu více vazebných míst. Cheláty jsou netoxické, jsou eliminovány z organismu a až do úplného vyloučení udržují vázaný kov i v koncentrované a většinou kyselé moči (11).

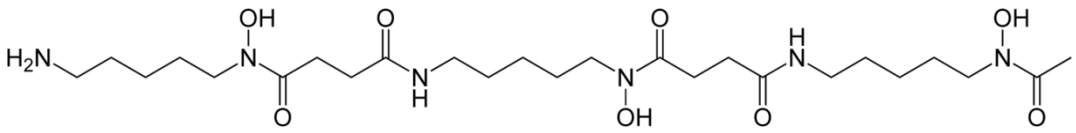
Železo má koordinační číslo 6 a centrální atom železa může navázat až 6 jednovazebných ligandů. Výsledkem je osmistěnný chelát (11). Ligandy mající více atomů, které mohou být navázány na centrální atom, se nazývají podle jejich počtu dvojvazné, trojvazné a šestivazné. Stabilita dvojvazných, trojvazných a šestivazných chelátorů je výrazně vyšší než u jednovazných chelátorů. Většina z nově vyvinutých sloučenin je dvojvazná nebo trojvazná kvůli obtížím při perorální dostupnosti šestivazných látek jako je deferoxamin (11).

2.2.1. Klinicky používané chelátory železa

Chelatační léčba byla původně vyvíjena pro terapii onemocnění z přetížení železem (12). V současné době se v léčbě intoxikace kromě deferoxaminu uplatňují i perorální chelátory, jejichž účinek je srovnatelný s účinkem deferoxaminu. Jedná se zejména o deferipron a v poslední době též o deferasirox (2).

Kromě již uvedeného využití, chelátory mají i jiné terapeutické využití. Například dexrazoxan (DEX) (10) je používán jako antidotum antracyklinových cytostatik (13). Nový chelátor furildioxim (FDO) je nyní ve vývoji jako fotoprotektivní agent (11). Chelátor zileuton, inhibitor enzymu 5-lipoxygenázy, který katalyzuje vznik leukotrienů z kyseliny arachidonové, se používá k léčbě astmatu (11). Chelátory železa mohou být také užitečné k zabránění vzniku hydroxylových radikálů, k léčbě malárie, postischemické reperfuze (11) a neurodegenerativních onemocnění (14).

2.2.1.1. Deferoxamin (DFO)

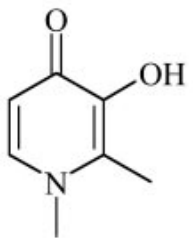


Obr. 1 Strukturní vzorec deferoxaminu

Deferoxamin (Obr. 1), šestivazný chelátor železa, se získává z bakterií Streptomyces pilosus. Látka má vysokou vazebnou afinitu pro železo, tvoří s ním komplexy v poměru 1:1, neodnímá však z organismu centrálně vázané železo z hemoglobinu a cytochromu. Po perorálním podání se nesnadno absorbuje, při terapii otravy železem se musí aplikovat parenterálně. Perorální podání je vhodné pouze pro snížení enterální resorpce železa. Z vedlejších účinků se uvádějí zejména hypotenze a alergické reakce (15).

Výzkumem se také zjistilo, že deferoxamin významně snižuje znaky zánětlivého poškození srdeční tkáně. Dá se předpokládat, že tato látka může být účinná v prevenci poškození myokardu (16).

2.2.1.2. Deferipron (DFP)



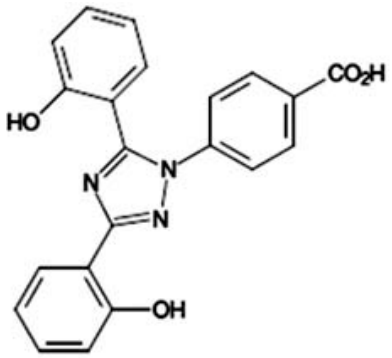
Obr. 2 Strukturní vzorec deferipronu

Deferipron (Obr. 2) byl první a v současnosti i jedinou používanou sloučeninou v hydroxypyridinové třídě chelátorů železa zveřejněný v roce 1982 Hiderem a jeho spolupracovníky (17). Deferipron je syntetický analog mimosinu, chelátoru železa izolovaného z luštěniny Mimosa paduca. Je dvojvaznou sloučeninou. První použití tohoto chelátoru u člověka bylo zaznamenáno v roce 1987 (11).

Deferipron prochází rozsáhlým metabolismem v játrech a více než 85% podané dávky je vyloučeno močí jako chelatačně-neúčinný O-glukuronid. Relativně vysoká perorální dávka 75 mg/kg je nezbytná pro léčbu při stavech přetížení železem. Druhá generace sloučenin, která je zatím testována, je určena k zablokování O-glukuronidace na C3 kyslíku deferipronového skeletu (11).

Profil bezpečnosti a snášenlivosti zahrnuje gastrointestinální potíže, elevaci jaterních enzymů, přibývání na váze, artropatii, neutropenii a agranulocytózu. Poslední vyžaduje pečlivé sledování krevního obrazu. Profil účinnosti je podobný mezi třemi dostupnými chelátory. Stále více důkazů naznačuje, že DFP, samostatně nebo v kombinaci s deferoxaminem, je účinný při odstraňování železa uloženého v srdeční tkáni a k prevenci zvýšené koncentrace železa v srdci. Z dostupných údajů je potřeba zdůraznit důležitou roli DFP při řízení přetížení železem (18).

2.2.1.3. Deferasirox

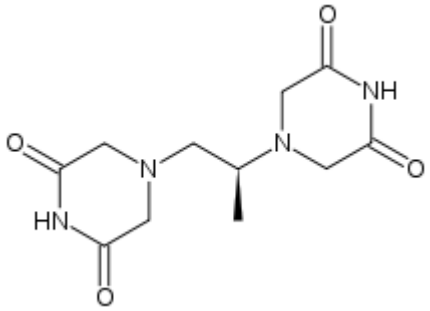


Obr. 3 Strukturní vzorec deferasiroxu

Deferasirox (Obr. 3) je orálně podávaný chelátor železa. Má prodloužený plazmatický poločas umožňující aplikaci pouze jednou denně. Jedná se o trojvazný chelátor navržený počítačovým modelováním (19), který vyžaduje dvě molekuly k vytvoření stabilního komplexu s každým atom železa (20). Deferasirox odstraňuje železo jak z krve, tak i z jaterních a srdečních buněk (19).

Deferasirox je indikován k léčbě chronického přetížení organismu železem v důsledku dlouhodobého použití krevních transfúzí (19). Chelatační léčba je tu efektivní pro rychlé odstranění železa, udržování nízkých zásob železa, prevenci srdečních a dalších poškození orgánů způsobených přetížení železem. Tato chelatační terapie je spojena s delším přežíváním pacientů ve srovnání s neléčenými jedinci (21).
Je určen pro děti ve věku od 2 let a dospělé. Mechanismus účinku tohoto chelátoru spočívá v silné vazbě na železo, které se následně snadno vylučuje stolicí. Mezi nejčastější nežádoucí účinky patří průjem, bolesti hlavy, břicha, horečka, kašel. Možný je i rozvoj reverzibilních známek poruch renálních funkcí. Doporučuje se proto v prvním měsíci kontrola hodnot kreatininu. Deferasirox je kontraindikován u osob, kteří již užívají chelátor železa kvůli zvýšenému riziku toxicity (19).

2.2.1.4. Dexrazoxan



Obr. 4 Strukturní vzorec dexrazoxanu

Dexrazoxan (Obr. 4) je cyklický derivát kyseliny edetové, který se používá zejména k ochraně srdce před kardiotoxickými vedlejšími účinky antracyklinů, jako je doxorubicin. Jak je uvedeno v klinických studiích, intravenózní aplikace dexrazoxanu významně snižuje výskyt městnavého srdečního selhání, které je indukované antracykliny a snižuje nežádoucí srdeční příhody u žen s pokročilým karcinomem prsu nebo u dospělých se zhoubným nádorem měkkých tkání.

Dexrazoxan poskytuje ochranu srdce před antracykliny primárně přes chelataci železa jeho intracelulárními hydrolytickými produkty v myokardu. Tato činnost zahrnuje chelataci volného železa a železa vázaného v antracyklinových komplexech. Výsledkem je zabránění vzniku kardiotoxických reaktivních kyslíkových radikálů. Účinná forma chelatuje železo v poměru 3:1. Dexrazoxan je enzymaticky hydrolyzován v játrech, ledvinách, srdci, erytrocytech a leukocytech. Vylučování je převážně ledvinami v nezměněné formě. Distribuce a eliminace se zdají být významně vyšší u dětí než u dospělých (21).

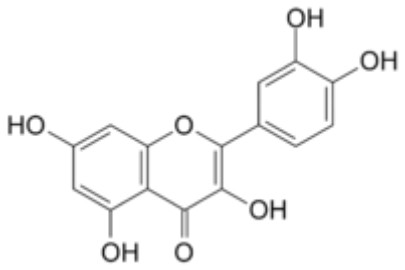
2.2.2. Hydroxychinoliny

8-hydroxychinolin (8HQ), také nazvaný 8-chinolinol nebo oxin, tvoří stabilní pětičlenné chelátové kruhy s různými kovy vykazující silné komplexotvorné schopnosti a nízkou selektivitu. S trojmocnými kovovými ionty ochotně tvoří neutrální lipofilní komplexy $M(8HQ)_3$. Trojmocné železo spolu s 8HQ můžou tvořit mono-, bis- nebo tris komplexy v závislosti na pH a poměru kov:chelátor. Se železnatými ionty dává červený komplex, který se snadno oxiduje. V neoxidovaném stavu zůstává pouze v přítomnosti silného redukčního činidla (22).

Rozpustnost v tucích neutrálního komplexu železo-8HQ umožňuje prostup epitelem a distribuci buňkami. Bylo prokázáno, že železo vázané na 8HQ způsobuje oxidativní poškození v živých buňkách (peroxidace lipidů). Dále byly prokázány cytotoxické a DNA inhibiční účinky na buněčných liniích a dále antiproliferativní účinky a fenotypové změny vyvolané 8-hydroxychinolinem v nádorových buňkách (22).

Na základě struktury přírodních chelátorů byl připraven syntetický chelátor, který má schopnost chelatovat Fe^{2+} i Fe^{3+}. Jedná se o ve vodě rozpustný chelátor O-TRENSOX. Tento šestivazný ligand váže železo v poměru 1:1. Jeho afinita k Fe^{3+} je srovnatelná s DFO. O-TRENSOX a od něj odvozené ligandy tvoří nadějnou skupiny chelátorů, se zatím neobjasněnými, ale zajímavými biologickými vlastnostmi (22).

2.2.3. Kvercetin



Obr. 5 Strukturní vzorec kvercetinu

Kvercetin patří do skupiny flavonoidů. Flavonoidy jsou velice rozsáhlou skupinou heterocyklických sekundárních rostlinných metabolitů. V současné době je známo více než 4000 flavonoidních látek a stále se nacházejí další sloučeniny. Biochemická aktivita flavonoidů či jejich metabolitů závisí na chemické struktuře a relativní orientaci kruhů v této molekule (23), ale samozřejmě také na substitucích na této molekule. Substituce zahrnují hydroxyskupiny, metylskupiny, malonylskupiny, sulfoskupiny a glykosylskupiny (24).

Kvercetin je jedním z nejlépe prozkoumaných flavonoidů. Není to proto, že by byl samostatně tak významně rozšířen, jako aglykon se v rostlinné říši vyskytuje méně často. Ale je základem dalších glykosidů rutinu a kvercitrinu, a vzhledem k tomu, že během úpravy rostlin při přípravě potravin či při podmínkách panujících v trávicím

traktu dochází k zvyšování koncentrace aglykonů na úkor glykosidů, je jeho význam nesporný. Navíc se prokázalo, že má výborné protizánětlivé a antioxidační vlastnosti (25), protisrážlivé působení, antiestrogenní (26) antimikrobní a spasmolytické účinky či může působit protinádorově (25). Antioxidační aktivita kvercetinu se projevuje například schopností „zhášet“ reaktivní kyslíkové radikály nebo ochranou LDL lipidových frakcí před oxidační modifikací (27,28). Na druhou stranu přijímání vysokých farmakologických dávek kvercetinu v množství 2% z celkového množství přijaté stravy způsobovalo u potkanů zhoubné novotvary močového měchýře (29). Nelze se tedy dívat na tuto skupinu jako na celek a všechny flavonoidy považovat za prospěšné.

Kvercetin se vyskytuje v mnoha běžných potravinách, včetně jablka, čaje, cibule, ořechů, květáku a zelí (30)

3. Experimentální část

3.1. Cíl práce

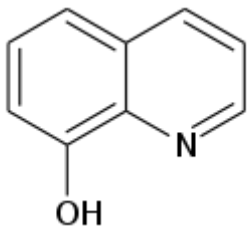
Cílem této diplomové práce je snaha o vytvoření a standardizaci screeningové metodiky ke stanovení schopnosti různých látek chelatovat železnaté a železité ionty pomocí spektrofotometrie. Současně by v případě pozitivity, tj. schopnosti látky chelatovat železo, měla umožnit stanovení stechiometrického poměru komplexu.

3.2. Materiál a metodika

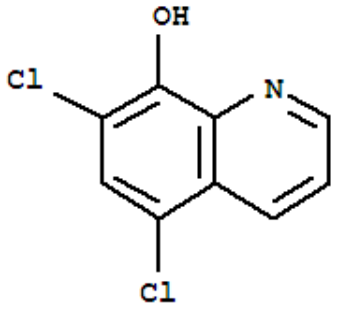
3.2.1. Použité chemikálie

Chlorid železitý hexahydrát ($FeCl_3.6H_2O$), vínan železitý, síran železnatý heptahydrát ($FeSO_4.7H_2O$), ferrozin, hydroxylamin, 8-hydroxychinolin (Obr. 6), 5,7-dichlor-8-hydroxychinolin (Obr. 7), 5-chlor-7-jod-8-hydroxychinolin (Obr. 8), ferrozin (Obr. 9), superčistá voda, metanol, kyselina octová, octan sodný, HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethanesulfonová kyselina), HEPES sodná sůl byly zakoupeny od Sigma-Aldrich (Německo), deferoxamin od Novartis (Švýcarsko).

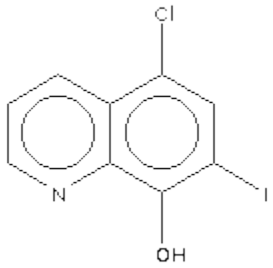
Všechny použité pufry byly 15mM, pufry 4.5 a 5.5 byly acetátové a pufry 6.8 a 7.5 HEPES/HEPES sodná sůl.



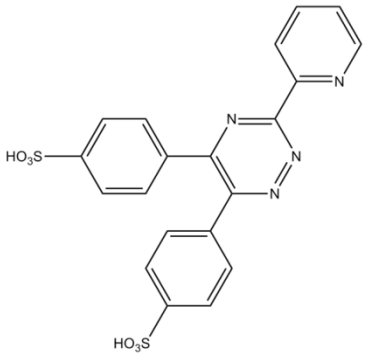
Obr. 6 Strukturní vzorec 8-hydroxychinolinu



Obr. 7 Strukturní vzorec 5,7-dichlor-8-hydroxychinolinu



Obr. 8 Strukturní vzorec 5-chlor-7-jod-8-hydroxy-chinolinu



Obr. 9 Strukturní vzorec ferrozinu

3.2.2. Přístroj

Během měření byly použity analytické váhy KERN ALT 220-4NM (Kern, Německo), spektrofotometr HELIOS GAMMA (firma ThermoSpectronic, Německo) a různé druhy automatických pipet (Mikropipeta Biohit Proline mechanická 20-200 µl, jednokanálová,

Mikropipeta Biohit Proline mechanická 10 - 100 µl, jednokanálová, Mikropipeta Biohit mLINE 500 - 5000 µl, jednokanálová, Mikropipeta BRANDTransferpette S 100-1000 µl, jednokanálová). Nutností byl také PC-program VISIONlite Scan (version 2.2., ThermoScientific) a Microsoft Excel.

3.2.3. Charakteristika metodiky

V řadě stanovení, která se využívají pro analýzu látek, se využívá skutečnosti, že mnoho látek pohlcuje elektromagnetické záření ve viditelné nebo ultrafialové části spektra. Míra, jakou látka pohlcuje světlo různých vlnových délek (tj. absorpční spektrum) závisí na struktuře sloučeniny. Množství světla určité vlnové délky, které pohltí např. látka rozpuštěná v roztoku, závisí na koncentraci látky. Spektrofotometrie je metoda určená ke zjištění absorpce záření (31).

Množství světla určité vlnové délky, které prošlo vzorkem, popisuje veličina transmitance (lat. *transmitto* převádím, propouštím). Ta je definována

$$T = \frac{I}{I_0}$$

kde

- T je transmitance
- I je intenzita světla, které prošlo vzorkem
- I_0 je intenzita světla, které do vzorku vstoupilo.

Absorbance *A*, veličina používaná ve spektrofotometrii, je definována jako dekadický logaritmus převrácené hodnoty transmitance *T* pro monochromatické záření a je vyjádřena vztahem:

$$A = \log\frac{1}{T} = log\frac{Io}{I}$$

Udává, jak mnoho světla bylo pohlceno měřeným vzorkem.

Absorbance je přímo úměrná koncentraci měřené látky. Tento vztah popisuje Lambert-Beerův zákon (30):

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot l$$

ε…molární absorpční koeficient (závisí na vlnové délce) [$l.mol^{-1}cm^{-1}$]

c…koncentrace měřené látky [$mol.l^{-1}$]

l…síla měřené vrstvy [cm]

Absorbance je aditivní funkcí:

$$A=\sum_{i}^{n} A_i = L(\varepsilon_1 c_1 + \varepsilon_2 c_2 + ... + \varepsilon_n c_n)$$

K měření světelné absorpce se používají spektrofotometry, přístroje, které umožňují vlnovou délku monochromatického světla libovolně nastavit, nebo měřit část absorpčního spektra v určitém úseku vlnových délek. Každý spektrofotometr se skládá ze zdroje záření, monochromátoru nebo filtru, detektoru záření, měrného zařízení a kyvety se vzorkem (32).

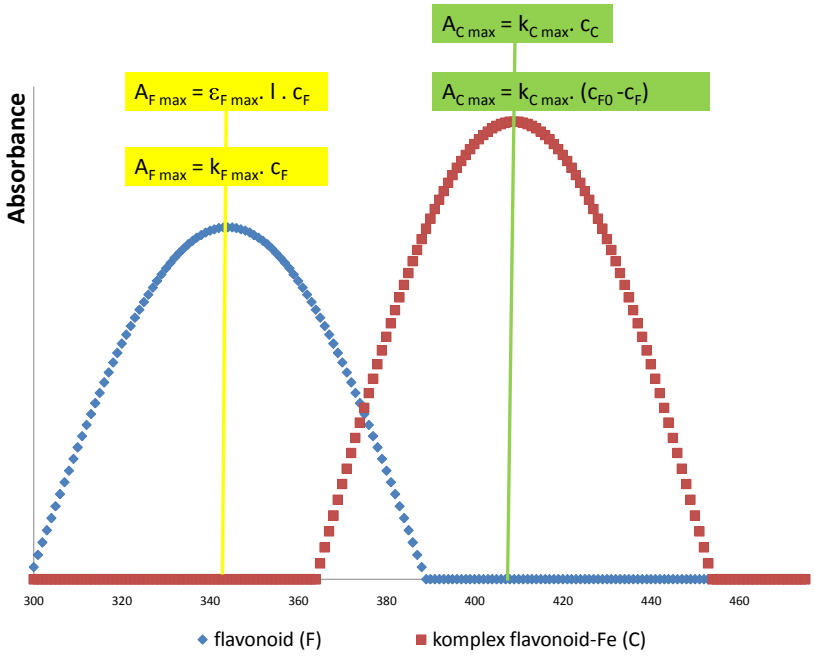
Při měření této diplomové práce byla použita zejména spektrofotometrie v ultrafialové a viditelné oblasti.

Pro stanovení chelatace železnatých iontů se dá úspěšně použít ferrozinová metoda. Ferrozin je specifické činidlo, které tvoří s železnatými ionty purpurový komplex s maximální absorpcí při vlnové délce 562 nm (33). Ferrozin nereaguje s železitými ionty, ale metoda může být rozšířena o celkovou chelataci železa přidáním vhodného redukčního činidla. Redukce železitých iontů na železnaté je do značné míry závislá na okolních podmínkách.

Absorbance je následně změřena pomocí spektrofotometru po přídavku ferrozinu. Sloučenina vytvoří se železem komplex a ferrozin naváže nezchelatované tj. volné železnaté ionty. Měřením se tedy zjistí množství nezreagovaného železa (nepřímo se stanoví množství sloučeniny, která vytvořila komplex se železem). Tato metoda s použitím ferrozinu má relativně dostatečnou přesnost a specifičnost a může být použita pro rychlou analýzu chelatace železa. Tuto metodiku není možné použít při vyšším pH pravděpodobně, protože rozpustnost železitých iontů se snižuje přechodem z kyselého pH na neutrální pH (34).

Kromě toho tato metodika ale není použitelná pro přímé stanovení chelatace železitých iontů. Ta se dá stanovit mj. přímou spektrofotometrií. Tato diplomová práce je dále zaměřena na hodnocení poměru chelatační sloučenina-železo, který nelze při ferrozinové metodě vždy přesně určit.

Na základě výše zmíněných vlastností absorbance různých látek bylo navrhnuto 5 postupů pro stanovení poměru komplexu testovaná látka-železo. Tyto metodiky jsou založeny na aditivním charakteru absorbance a rozdílech v absorpčních koeficientech a maximu absorpce testované látky a jejího komplexu s železnatými nebo železitými ionty (viz. Obr. 10)



Obr. 10 Schematické znázornění spekter sloučeniny (flavonoidu) a jeho komplexu s železem. Pro zjednodušení je součin $\varepsilon.l$ vyjádřen jako nová konstanta k. Koncentrace komplexu c_C je vyjádřena jako rozdíl počáteční koncentrace testované látky (c_{F0}) a koncentrace nezreagované látky (c_F).

I. **Metoda Přímé spektrum** je nejjednodušší. Je založena na změření absorpce komplexu látka-chelátor v jeho maximu absorpce při různých poměrech testované látky a železa. Do grafu jednoduše zanášíme absorbance při vlnové délce maximální absorbance komplexu železa se zkoušenou látkou. Během měření se absorbance zpočátku zvyšuje a poté se hodnota na určité úrovni zastaví. Tato metoda je jednoduchá. Není potřeba ani vypočítat molární absorpční koeficienty. Může být ale ovlivněna absorbancí zkoušené látky.

II. **Metoda Symetrie píku** využívá jevu, kdy absorbance od absorpčního maxima v ideálním případě klesá na obě strany, tj. k vyšší i nižší vlnové délce, stejně. Schematicky je znázorněna na Obr. 11.

Jak vyplývá z obrázku, absorbance změřeného spektra při určité vlnové délce odpovídá součtu absorbance nezreagované testované látky a absorbance komplexu při dané vlnové délce. Při měření se tedy zobrazí běžně jeden pík, který neodpovídá ani píku zkoumané látky ani píku komplexu, je ale umístěn mezi vlnovou délkou maximální absorpce zkoušené látky ($\lambda_{F\ max}$) a jejím komplexem ($\lambda_{C\ max}$). Pří této vlnové délce (λ) pro absorpci podle aditivního charakteru veličiny platí:

$$A_{\lambda} = A_{F\lambda} + A_{C\lambda}$$

kde $A_{F\lambda}$ je absorpce nezreagované látky a $A_{C\lambda,}$ je absorpce vzniklého kompexu s železem.

$A_{C\lambda}$ lze pak nahradit A při vlnové délce $\lambda_{sym,}$ pro kterou platí:

$$|\lambda_{C\ max} - \lambda| = |\lambda_{C\ max} - \lambda_{sym}|$$

Při vlnové délce λ_{sym} je její odpovídající $A_{sym\ \lambda}$ totiž rovna absorbanci komplexu při λ, tj.:

$$A_{C\lambda} = A_{sym\ \lambda}$$

Původní vztah lze tedy napsat jako:

$$A_{\lambda} = A_{F\lambda} + A_{sym\ \lambda}$$

kde $A_{F\lambda}$ je podle Lambert-Beerova zákona přímo úměrná koncentraci nezreagované testované látky (c_F):

$$A_{F\lambda} = c_F \cdot l \cdot \varepsilon_{F\lambda}$$

kde l je tloušťka měřené vrstvy a $\varepsilon_{F\lambda}$ – molární absorpční koeficient testované látky při dané vlnové délce λ. Tento koeficient se dá lehce stanovit změřením různých koncentrací testované látky při dané vlnové délce. Pro zjednodušení, kdy je l konstantní, budeme v dalším výpočtu používat konstantu $k_{F\lambda}$, pro kterou platí

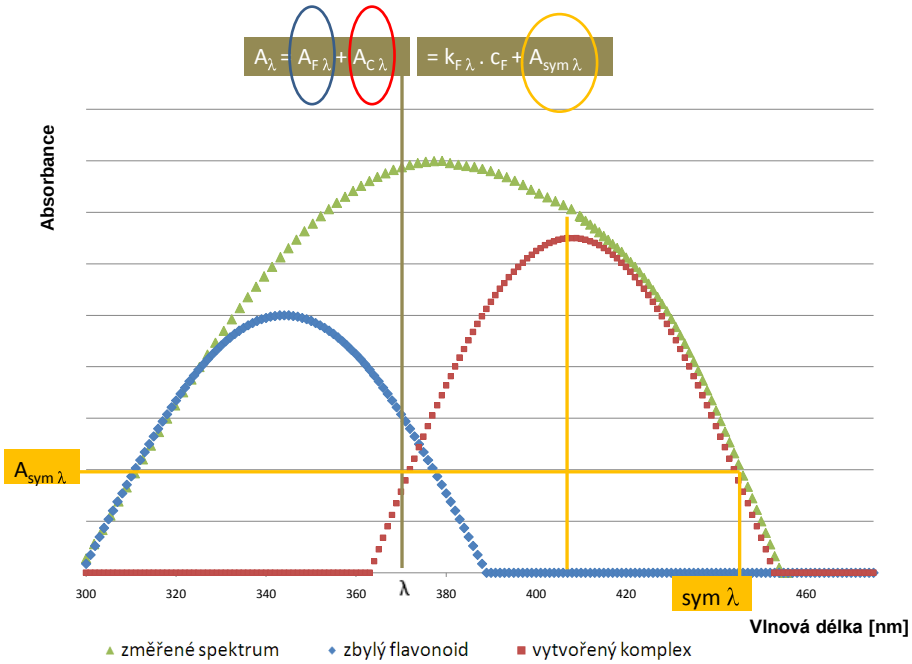
$$k_{F\lambda} = l \cdot \varepsilon_{F\lambda}$$

dosazením daných veličin do původního vztahu pak získáme vztah:

$$A_{\lambda} = c_F \cdot k_{F\lambda} + A_{sym\,\lambda}$$

Ze kterého lze lehce odvodit vztah pro výpočet koncentrace nezreagované látky:

$$c_F = (A_{\lambda} - A_{sym\,\lambda}) / k_{F\lambda}$$

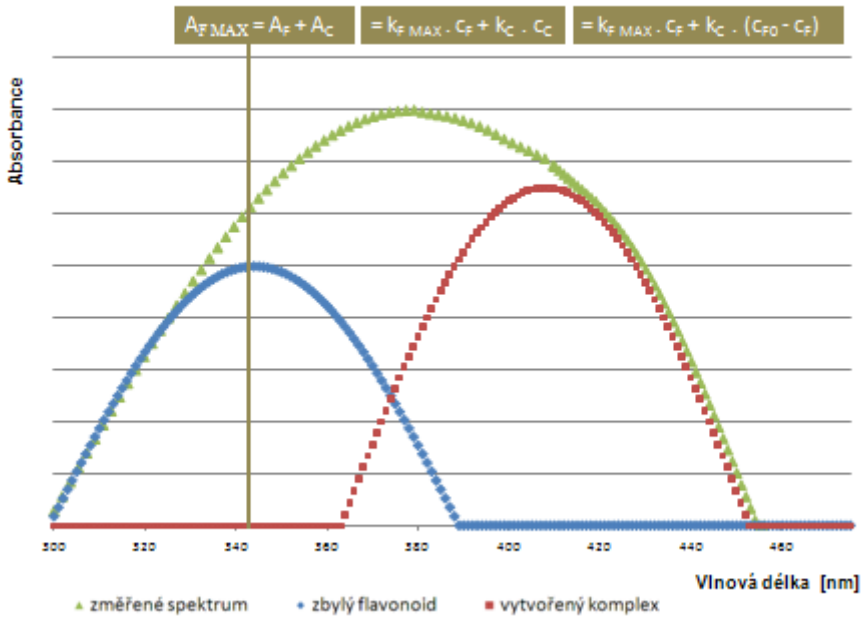


Obr. 11 Metoda symetrie píků. Modrá křivka zobrazuje teoreticky spektrum čisté (tedy nezreagované) testované látky, červená pak teoreticky absorbanci komplexu. V reálné situaci ovšem přístroj změří v přítomnosti testované látky a železa většinou spektrum vypadající jako zelená křivka, a to v důsledku aditivity absorbancí, kdy nám část látky zreagovala na komplex a část zůstala nezreagovaná. Pro zjednodušení je součin $\varepsilon.l$ vyjádřen jako nová konstanta k. $A_{C\lambda}$ lze nahradit A při vlnové délce $\lambda_{sym.}$

III. Metoda maxima absorbance testované látky

Analogicky jako v předchozím případě, absorbance změřeného spektra při vlnové délce odpovídající maximu zkoušené látky ($\lambda_{F\ max}$) odpovídá součtu absorbance zkoušené látky a absorbance komplexu při této vlnové délce (viz Obr.12). Následným poupravením vzorce na základě Lambert-Beerova zákona lze vypočítat koncentraci nezreagované sloučeniny v případě znalosti molárních

absorpčních koeficientů zkoušené látky (ε_{Fmax}) a jeho komplexu při této vlnové délce (ε_{CFmax}).



Obr. 12 Metoda absorbance při vlnové délce odpovídající maximu flavonoidu. Pro zjednodušení je součin $\varepsilon.l$ vyjádřen jako nová konstanta k. Koncentrace komplexu c_c je vyjádřena jako rozdíl počáteční koncentrace testované látky (c_{F0}) a koncentrace nezreagované látky (c_F).

Jak již bylo uvedeno,

$$A_{F\,MAX} = A_F + A_C$$

kde $A_{F\,MAX}$ je absorbance změřeného spektra při vlnové délce odpovídající maximu zkoušené látky, A_F je absorbance nezreagované látky a A_C je absorbance vzniklého komplexu s železem při této vlnové délce.

A_F a A_C jsou podle Lambert-Beerova zákona přímo úměrné koncentraci nezreagované testované látky (c_F) a komplexu (c_C):

$$A_F = c_F . l . \varepsilon_F$$

$$A_C = c_C . l . \varepsilon_C$$

kde l je tloušťka měřené vrstvy a ε_F (resp. ε_C) – molární absorpční koeficient testované látky (komplexu) při dané vlnové délce λ. Tento koeficient se dá lehce stanovit změřením různých koncentrací testované látky při dané vlnové délce. V případě komplexu je nutno změřit absorbanci komplexu při nadbytku železa, aby bylo zajištěno, že všechna testovaná sloučenina zreaguje (viz Kap 6.4.3)

Pro zjednodušení, kdy je l konstantní, budeme v dalším výpočtu opět používat konstanty $k_{F\,MAX}$ a k_C pro které platí

$$k_{F\,MAX} = l \,.\, \varepsilon_F$$

$$k_C = l \,.\, \varepsilon_C$$

dosazením daných veličin do původního vztahu pak získáme vztah:

$$A_{F\,MAX} = k_{F\,MAX} \,.\, c_F + k_C \,.\, c_C$$

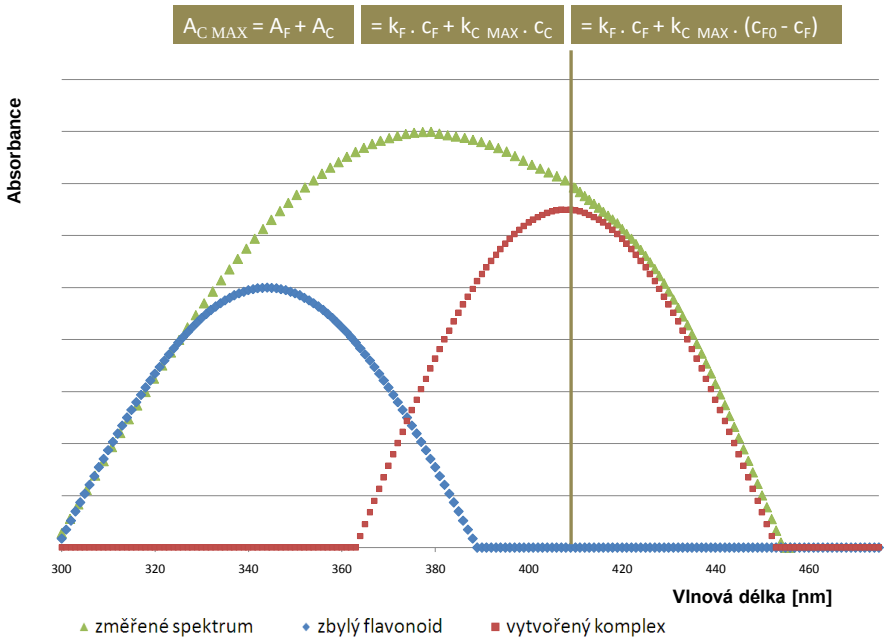
Koncentraci komplexu (c_C) lze pak nahradit rozdílem počáteční koncentrace testované látky (c_{F0}) a koncentrace nezreagované látky (c_F), kdy platí vztah

$$A_{F\,MAX} = k_{F\,MAX} \,.\, c_F + k_C \,.\, (c_{F0} - c_F)$$

Ze kterého lze odvodit vztah pro výpočet koncentrace nezreagované látky:

$$c_F = (A_{F\,MAX} - k_C \,.\, c_{F0}) \,/\, (k_{F\,MAX} - k_C)$$

IV. Podobnou možností jako ve třetím případě je **metoda absorbance odpovídající maximu komplexu – metoda komplexu** (Obr. 13).



Obr. 13 Metoda absorbance při vlnové délce odpovídající maximu komplexu. Pro zjednodušení je součin ε.l vyjádřen jako nová konstanta k. Koncentrace komplexu c_c je vyjádřena jako rozdíl počáteční koncentrace testované látky (c_{F0}) a koncentrace nezreagované látky (c_F).

Absorbance změřeného spektra při vlnové délce odpovídající maximu komplexu ($A_{C\ MAX}$) je opět součtem absorbance flavonoidu (A_F) a absorbance komplexu se železem (A_C) při dané vlnové délce.

$$A_{C\ MAX} = A_F + A_C$$

Analogicky jako v předchozím případě opět platí:

$$A_F = c_F . l . \varepsilon_F$$

$$A_C = c_C . l . \varepsilon_C$$

a dosazením daných veličin do původního vztahu pak získáme vztah:

$$A_{C\ MAX} = k_F . c_F + k_{C\ MAX} . c_C$$

Koncentraci komplexu (c_C) opět nahradíme rozdílem počáteční koncentrace testované látky (c_{F0}) a koncentrace nezreagované látky (c_F), kdy platí vztah

$$A_{C\ MAX} = k_F \cdot c_F + k_{C\ MAX} \cdot (c_{F0} - c_F)$$

Ze kterého lze odvodit vztah pro výpočet koncentrace nezreagované látky:

$$c_F = (A_{C\ MAX} - k_{C\ MAX} \cdot c_{F0}) / (k_F - k_{C\ MAX})$$

Pomocí těchto třech metod (II-IV) a vhodně zvolených poměrů pro stanovení lze vyhodnotit chelatační aktivitu látky výsledným stechiometrickým poměrem chelatace (P), který nám udává poměr testované látky v komplexu se železem. Vypočítá se jako podíl koncentrace testované látky, která byla využita ke tvorbě komplexu, a koncentrací železa (c_{Fe}). První zmíněná koncentrace se vypočte jako rozdíl počáteční koncentrace testované sloučeniny (c_{F0}) a nezreagované koncentrace testované sloučeniny(c_F). Pro poměr tedy platí

$$P = (c_{F0} - c_F) : c_{Fe}$$

V případě, že testovaná látka jen slabě reaguje s železem a nelze tedy přesně určit stechiometrický poměr komplexu, lze alespoň stanovit afinitu dané látky k železu pomocí směrnice přímky. Při tvorbě komplexu s jasnou stechiometrií se tato směrnice přímky blíží 1.

V. Poslední metodou je **„teoretická metoda“,** kdy po stanovení molárních absorpčních koeficientů komplexu a zkoušené látky při absorpčním maximu lze připravit teoretické křivky pro základní stechiometrické křivky komplexu, obvykle 1:1, 2:1 a 3:1. Poté se změří absorbance a výsledky se zanesou do teoretického grafu. Pokud odpovídají některé teoretické křivce, lze s velkou pravděpodobností odhadnout stechiometrii komplexu.

3.2.4. Postup

3.2.4.1. Příprava zásobních roztoků (stock solutions)

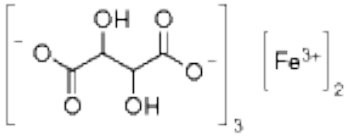
1. zásobní roztok testované látky ve vhodném rozpouštědle (metanol, př. superčistá voda) - ideálně koncentrace 10x vyšší než testovaná (běžně 2,5 mM)

2. zásobní roztok <u>železnatých iontů</u> v destilované superčisté vodě – koncentrace 5 mM ($FeSO_4.7H_2O$, M_w = 278,02 g/mol)
3. zásobní roztoky <u>železitých iontů</u>

   a) $FeCl_3.6H_2O$ v destilované superčisté vodě – koncentrace 5 mM (M_w= 207,3 g/mol)

   b) Vínan (tartarát) železitý v destilované superčisté vodě – koncentraci je třeba přepočítat na Fe^{3+} c (Fe^{3+}) = c (vinan Fe^{3+}) * 2

   koncentrace Fe^{3+} 5 mM (M_w = 555,9 g/mol)



3.2.4.2. Kalibrace železnatých a železitých iontů

<u>KALIBRACE Fe^{2+}</u> (viz. Tab. 1)

A) příprava 5 mM roztoku ferrozinu v superčisté vodě

B) příprava 10 mM roztoku hydroxylaminu (HA) v superčisté vodě.

C) příprava 5 mM roztoku Fe^{2+} soli v superčisté vodě

D) nepipetování připravených chemikálií do Eppendorfek podle tabulky v tomto pořadí:

1. 10 mM hydroxylamin
2. 5 mM roztok Fe^{2+} soli
3. 5 mM ferrozin

Konečná koncentrace Fe^{2+} mM	**Objem Fe^{2+}** µl	**Objem ferrozinu** µl	**Objem HA** µl	**λ = 562 nm**
100	30	500	970	
70	21	500	979	
40	12	500	988	

Tabulka 1 Postup kalibrace pro železnaté ionty

E) protřepání roztoků napipetovaných v Eppendorfkách

F) změření absorbance při vlnové délce λ 562 nm – spektrum cca od 450 do 650 nm proti slepému vzorku tvořenému vodou

G) zaznamenaní naměřené A pří λ 562 nm do tabulky

H) sestrojení grafu

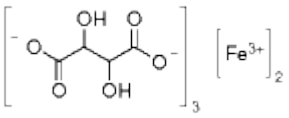
I) rozmezí hodnot konstanty *k* pro Fe^{2+} 0.023 - 0.028, v případě jiných hodnot provést novou kalibraci

KALIBRACE Fe^{3+} (viz. Tab. 2-3)

A) příprava 10 mM roztoku hydroxylaminu (HA) v superčisté vodě

B) příprava 5 mM roztoku ferrozinu v superčisté vodě

C) příprava 5 mM (podle potřeby i nižší c – 1,5 mM u vínanu železitého) roztoku Fe^{3+} soli v superčisté vodě



D) napipetování připravených chemikálií do Eppendorfek podle tabulek v tomto pořadí:

1. 10 mM hydroxylamin
2. superčistá voda
3. roztok Fe^{3+} soli
4. 5 mM ferrozin

Konečná koncentrace Fe^{3+} mM	Objem Fe^{3+} µl	Objem HA µl	Objem ferrozinu µl	Objem H_2O µl	λ = 562 nm
100	30	500	500	470	
70	21	500	500	479	
40	12	500	500	488	

Tabulka 2 Kalibrace železitých iontů při pH 6.8 a 7.5 (vínan železitý)

Konečná koncentrace Fe^{3+} mM	Objem Fe^{3+} µl	Objem HA µl	Objem ferrozinu µl	Objem H_2O µl	λ = 562 nm
100	30	500	500	470	
70	21	500	500	479	
40	12	500	500	488	

Tabulka 3 Kalibrace železitých iontů při pH 4.5 a 5.5 (chlorid železitý)

E) protřepání roztoků napipetovaných v Eppendorfkách

F) změření absorbance při vlnové délce 562 nm. Slepým vzorkem je opět voda

G) zaznamenaní naměřené A pří λ 562 nm do tabulky

H) sestrojení grafu

I) rozmezí hodnot konstanty *k* pro Fe^{3+} vínan 0.018 - 0.022, Fe^{3+} chlorid 0.024 - 0.028, v případě jiných hodnot provést novou kalibraci

3.2.4.3. Stanovení absorpčního maxima komplexu a absorpční konstanty komplexu

Princip metody: daná metodika předpokládá, že při vyšší koncentraci železa než zkoušené látky (6-50x) bude zkoušená látka prakticky úplně spotřebována na tvorbu komplexu. Absorbance v maximu komplexu, které se touto metodou také zjistí, potom závisí lineárně na koncentraci zkoušené látky. Pokud by nebyl nalezen lineární vztah, je pravděpodobné, že afinita dané látky pro železo je nízká a nelze tedy molární absorpční konstantu s jistotou stanovit a metody III-V nelze použít.

Postup (shrnut v Tab.4):

a) do Eppendorfky napipetujeme žádané množství rozpouštědla zkoušené látky (většinou metanolu)
b) přidání žádaného množství roztoku zkoušené látky
c) přidání žádaného množství pufru
d) přidání žádaného množství roztoku Fe^{2+} nebo Fe^{3+}

míchání přesně po dobu 3 minut a poté okamžitě změříme spektrum cca od 220 do 600 nm

Jako blank slouží v případě železnatých iontů při všech pH 1000 µl pufru + 500 µl rozpouštědla. Při pH 7,5 se používá jako pufr 5mM roztok hydroxylaminu v pufru pH 7,5.

V případě železitých iontů se při pH 4,5 a 5,5 měří s chloridem železitým vzhledem k blanku tvořeným 1000 µl pufrem + 500 µl rozpouštědlem. Při pH 6,8 a 7,5 (bez HA) se měří s vínanem železitým vzhledem k blanku tvořeným 500µl rozpouštědlem + 150 µl roztokem Fe^{3+} + 850 µl pufrem. Při pH 6,8 a 7,5 se musí blanky připravit v čase potřeby.

e) stanovení vlnové délky absorpčního maxima komplexu ($\lambda_{C\ MAX}$) a absorpční konstanty v maximu komplexu ($k_{C\ MAX}$). Pro absorpční konstantu je nutno mít alespoň 3 nezávislé body

Testovaná sloučenina	Sloučenina	
Zkratka		
Zásobní roztok sloučeniny (mM)		**0,250**
Zásobní roztok železa ve vodě (mM)		**5,000**

Rozpouštědlo sloučeniny	metanol
Rozpouštědlo železa	voda
Konečný objem (ml)	1,5

Fe^{n+}		**pufr**	**Poměr železo:sloučenina**			**Sloučenina**		
konečná koncentrace	přidaný objem zásobního roztoku železa	přidaný objem pufru				konečná koncentrace	přidaný objem zásobního roztoku sloučeniny	přidaný objem metanolu
mM	µl	µl				mM	µl	µl
0,500	150	850	50	:	1	0,0100	60	440
			45,45	:	1	0,0110	66	434
			40	:	1	0,0125	75	425
			34,09	:	1	0,0147	88	412
			30	:	1	0,0167	100	400
			25	:	1	0,0200	120	380
			20	:	1	0,0250	150	350
			15	:	1	0,0333	200	300
			10	:	1	0,0500	300	200
			7,5	:	1	0,0667	400	100
			6	:	1	0,0833	500	0

Tabulka 4 Postup při stanovení absorpční konstanty komplexu

3.2.4.4. Vlastní měření

<u>Příprava měřených vzorků – železnaté a železité ionty</u>

a) napipetování žádaného množství rozpouštědla do Eppendorfek
b) příprava testovaného roztoku zkoušené látky (0,25 mM)
c) přidání do Eppendorfek žádané množství tohoto vzorku

d) v případě pH 4.5 se připraví finální roztok železa 150 μM v žádaném pufru, v případě ostatních pH roztok 250 μM ve vodě
e) v případě pH 4.5 přidání žádaného množství roztoku Fe^{2+} do Eppendorfek, v případě ostatních pH přidání nejdříve pufru a pak roztoku Fe^{2+}
f) protřepání a po 3 minutách změření v požadovaném rozmezí vlnových délek (290-550 nm) proti slepému porovnávacímu vzorku, který tvoří 500 μl rozpouštědla testované látky a 1000 μl požadovaného pufru s výjimkou pH 7.5. Při tomto pH je při měření železnatých iontů tento blank tvořen stejným množstvím rozpouštědla ale jako pufr je použit 5 mM vodný roztok hydroxylaminu v pufru 7.5.

Shrnutí postupů je v Tab.5-8

Odečtení absorbancí

a) odečtení absorbancí při vlnové délce maximální absorbance zkoušené látky ($\lambda_{F\ MAX}$) a jejího komplexu s železem ($\lambda_{C\ MAX}$) , tedy - $A_{F\ MAX}$ a $A_{C\ MAX}$
b) odečtení absorbance při vlnových délkách λ_1 (odpovídající zkoušené látce, tj. A_1) a λ_2 (jejímu komplexu s Fe^{n+}, tj. A_2). Je-li rozdíl maximální absorpce mezi zkoušenou látkou ($\lambda_{F\ MAX}$) a jejím komplexem ($\lambda_{C\ MAX}$) <50 pak $\lambda_1 = \lambda_{F\ MAX}$ a $\lambda_2 = 2x\ \lambda_{C\ MAX} - \lambda_{F\ MAX,}$ v opačném případě $\lambda_1 = \lambda_{F\ MAX} – 50$ nm a $\lambda_2 = \lambda_{C\ MAX} + 50$ nm. Při výpočtu podle metody 2 pak λ_2 je A_{sym}.

Testovaná sloučenina			Sloučenina			Rozpouštědlo sloučeniny		metanol			vlnová délka odpovídající maximální absorbanci sloučeniny		vlnová délka odpovídající maximální absorbanci komplexu	
Zkratka						pH 4.5	Zkratka	4						
Testovaný roztok sloučeniny (mM)						0,250								
Testovaný roztok železa ve vodě (mM)						0,150	Konečný objem (ml)		1,5		λ_C=		λ_{CX}=	
Číslo vzorku	poměr sloučenina : Fe^{2+}				Fe^{2+}		pH 4.5	Sloučenina		metanol	odpovídající absorbance sloučeniny při určité vlnové délce	odpovídající absorbance komplexu při určité vlnové délce	absorbance při vln.délce odpovídající maximu sloučeniny	absorbance při vln.délce odpovídající maximu komplexu
					konečná koncentrace	přidaný objem Fe^{2+} v pH 4,5	přidaný objem pufru	konečná koncentrace	přidaný objem zásobního roztoku	přidaný objem metanolu				
					mM	µl	µl	mM	µl	µl	λ_1	λ_2	λ_{FL}	λ_{CX}
201	1	:	2	0,5				0,005	30	470				
202	1	:	1	1,0				0,010	60	440				
203	1,5	:	1	1,5				0,015	90	410				
204	2	:	1	2,0	0,010	1000	0	0,020	120	380				
205	3	:	1	3,0				0,030	180	320				
206	4	:	1	4,0				0,040	240	260				
207	6	:	1	6,0				0,060	360	140				
208	6	:	0		0	0	1000	0,060	360	140				
209	4	:	0		0	0	1000	0,040	240	260				
210	2	:	0		0	0	1000	0,020	120	380				

Testovaná sloučenina			Sloučenina			Rozpouštědlo sloučeniny		metanol			vlnová délka odpovídající maximální absorbanci sloučeniny		vlnová délka odpovídající maximální absorbanci komplexu	
Zkratka						pH 4.5	Zkratka	4						
Testovaný roztok sloučeniny (mM)						0,250								
Testovaný roztok železa ve vodě (mM)						0,150	Konečný objem (ml)		1,5		λ_C=		λ_{CX}=	
Číslo vzorku	poměr sloučenina : Fe^{3+} Cl				Fe^{3+} Cl		pH 4.5	Sloučenina		metanol	odpovídající absorbance sloučeniny při určité vlnové délce	odpovídající absorbance komplexu při určité vlnové délce	absorbance při vln.délce odpovídající maximu sloučeniny	absorbance při vln.délce odpovídající maximu komplexu
					konečná koncentrace	přidaný objem Fe^{3+} v pH 4,5	přidaný objem pufru	konečná koncentrace	přidaný objem zásobního roztoku	přidaný objem metanolu				
					mM	µl	µl	mM	µl	µl	λ_1	λ_2	λ_{FL}	λ_{CX}
301	1	:	2	0,5				0,005	30	470				
302	1	:	1	1,0				0,010	60	440				
303	1,5	:	1	1,5				0,015	90	410				
304	2	:	1	2,0	0,010	1000	0	0,020	120	380				
305	3	:	1	3,0				0,030	180	320				
306	4	:	1	4,0				0,040	240	260				
307	6	:	1	6,0				0,060	360	140				
308	6	:	0		0	0	1000	0,060	360	140				
309	4	:	0		0	0	1000	0,040	240	260				
310	2	:	0		0	0	1000	0,020	120	380				

Tabulka 5 Postup pro železnaté a železité ionty při pH 4.5

Testovaná sloučenina			Sloučenina		Rozpouštědlo sloučeniny			metanol			vlnová délka odpovídající maximální absorbanci sloučeniny		vlnová délka odpovídající maximální absorbanci komplexu	
Zkratka					pH 5.5	Zkratka		5						
Testovaný roztok sloučeniny (mM)					0,250									
Testovaný roztok železa ve vodě (mM)					0,250	Konečný objem (ml)			1,5		λ_C=		λ_{CX}=	
Číslo vzorku	poměr sloučenina : Fe^{2+}				Fe^{2+}		pH 5.5	Sloučenina		metanol	odpovídající absorbance sloučeniny při určité vlnové délce	odpovídající absorbancek omplexu při určité vlnové délce	absorbance při vln.délce odpovídající maximu sloučeniny	absorbance při vln.délce odpovídající maximu komplexu
					konečná koncentrace	přidaný objem roztoku Fe^{2+}	přidaný objem pufru	konečná koncentrace	přidaný objem zásobního roztoku	přidaný objem metanolu				
					mM	µl	µl	mM	µl	µl	λ_1	λ_2	λ_{FL}	λ_{CX}
201	1	:	2	0,5				0,005	30	470				
202	1	:	1	1,0				0,010	60	440				
203	1,5	:	1	1,5				0,015	90	410				
204	2	:	1	2,0	0,010	60	940	0,020	120	380				
205	3	:	1	3,0				0,030	180	320				
206	4	:	1	4,0				0,040	240	260				
207	6	:	1	6,0				0,060	360	140				
208	6	:	0		0	0	1000	0,060	360	140				
209	4	:	0		0	0	1000	0,040	240	260				
210	2	:	0		0	0	1000	0,020	120	380				

Testovaná sloučenina			Sloučenina		Rozpouštědlo sloučeniny			metanol			vlnová délka odpovídající maximální absorbanci sloučeniny		vlnová délka odpovídající maximální absorbanci komplexu	
Zkratka					pH 5.5	Zkratka		5						
Testovaný roztok sloučeniny (mM)					0,250									
Testovaný roztok železa ve vodě (mM)					0,250	Konečný objem (ml)			1,5		λ_C=		λ_{CX}=	
Číslo vzorku	poměr sloučenina : Fe^{3+} Cl				Fe^{3+} Cl		pH 5.5	Sloučenina		metanol	odpovídající absorbance sloučeniny při určité vlnové délce	odpovídající absorbancek omplexu při určité vlnové délce	absorbance při vln.délce odpovídající maximu sloučeniny	absorbance při vln.délce odpovídající maximu komplexu
					konečná koncentrace	přidaný objem roztoku Fe^{3+}	přidaný objem pufru	konečná koncentrace	přidaný objem zásobního roztoku	přidaný objem metanolu				
					mM	µl	µl	mM	µl	µl	λ_1	λ_2	λ_{FL}	λ_{CX}
301	1	:	2	0,5				0,005	30	470				
302	1	:	1	1,0				0,010	60	440				
303	1,5	:	1	1,5				0,015	90	410				
304	2	:	1	2,0	0,010	60	940	0,020	120	380				
305	3	:	1	3,0				0,030	180	320				
306	4	:	1	4,0				0,040	240	260				
307	6	:	1	6,0				0,060	360	140				
308	6	:	0		0	0	1000	0,060	360	140				
309	4	:	0		0	0	1000	0,040	240	260				
310	2	:	0		0	0	1000	0,020	120	380				

Tabulka 6 Postup pro železnaté a železité ionty při pH 5.5

Testovaná sloučenina			Sloučenina		Rozpouštědlo sloučeniny		metanol				vlnová délka odpovídající maximální absorbanci sloučeniny		vlnová délka odpovídající maximální absorbanci komplexu	
Zkratka					pH 6.8	Zkratka	6							
Testovaný roztok sloučeniny (mM)					0,250									
Testovaný roztok železa ve vodě (mM)					0,250	Konečný objem (ml)		1,5			λ_C=		λ_{CX}=	
Číslo vzorku	poměr sloučenina : Fe^{2+}				Fe^{2+}	pH 6.8	Sloučenina		metanol	odpovídající absorbance sloučeniny při určité vlnové	odpovídající absorbance komplexu při určité vlnové délce	absorbance při vln.délce odpovídající maximu sloučeniny	absorbance při vln.délce odpovídající maximu komplexu	
					konečná koncentrace	přidaný objem roztoku železa	přidaný objem pufru	konečná koncentrace	přidaný objem zásobního roztoku	přidaný objem metanolu				
					mM	µl	µl	mM	µl	µl	λ_1	λ_2	λ_{FL}	λ_{CX}
201	1	:	2	0,5				0,005	30	470				
202	1	:	1	1,0				0,010	60	440				
203	1,5	:	1	1,5				0,015	90	410				
204	2	:	1	2,0	0,010	60	940	0,020	120	380				
205	3	:	1	3,0				0,030	180	320				
206	4	:	1	4,0				0,040	240	260				
207	6	:	1	6,0				0,060	360	140				
208	6	:	0		0	0	1000	0,060	360	140				
209	4	:	0		0	0	1000	0,040	240	260				
210	2	:	0		0	0	1000	0,020	120	380				

Testovaná sloučenina			Sloučenina		Rozpouštědlo sloučeniny		metanol				vlnová délka odpovídající maximální absorbanci sloučeniny		vlnová délka odpovídající maximální absorbanci komplexu	
Zkratka					pH 6.8	Zkratka	6							
Testovaný roztok sloučeniny (mM)					0,250									
Testovaný roztok železa ve vodě (mM)					0,250	Konečný objem (ml)		1,5			λ_C=		λ_{CX}=	
Číslo vzorku	poměr sloučenina : vínan železitý				Fe^{3+} vínan	pH 6.8	Sloučenina		metanol	odpovídající absorbance sloučeniny při určité vlnové délce	odpovídající absorbance komplexu při určité vlnové délce	absorbance při vln.délce odpovídající maximu sloučeniny	absorbance při vln.délce odpovídající maximu komplexu	
					konečná koncentrace	přidaný objem roztoku vínanu železitého	přidaný objem pufru	konečná koncentrace	přidaný objem zásobního roztoku	přidaný objem metanolu				
					mM	µl	µl	mM	µl	µl	λ_1	λ_2	λ_{FL}	λ_{CX}
301	1	:	2	0,5				0,005	30	470				
302	1	:	1	1,0				0,010	60	440				
303	1,5	:	1	1,5				0,015	90	410				
304	2	:	1	2,0	0,010	60	940	0,020	120	380				
305	3	:	1	3,0				0,030	180	320				
306	4	:	1	4,0				0,040	240	260				
307	6	:	1	6,0				0,060	360	140				
308	6	:	0		0	0	1000	0,060	360	140				
309	4	:	0		0	0	1000	0,040	240	260				
310	2	:	0		0	0	1000	0,020	120	380				

Tabulka 7 Postup pro železnaté a železité ionty při pH 6,8

Testovaná sloučenina			Sloučenina		Rozpouštědlo sloučeniny			metanol			vlnová délka odpovídající maximální absorbanci sloučeniny		vlnová délka odpovídající maximální absorbanci komplexu	
Zkratka					pH 7.5		Zkratka	7						
Testovaný roztok sloučeniny (mM)					0,250									
Testovaný roztok železa ve vodě (mM)					0,250		Konečný objem (ml)		1,5		λ_C=		λ_{CX}=	
Číslo vzorku	poměr sloučenina : Fe^{2+}				Fe^{2+}		pH 7,5 5mM HA	Sloučenina		metanol	odpovídající absorbance sloučeniny při určité vlnové délce	odpovídající absorbancek omplexu při určité vlnové délce	absorbance při vln.délce odpovídající maximu sloučeniny	absorbance při vln.délce odpovídající maximu komplexu
					konečná koncentrace	přidaný objem roztoku železa	přidaný objem pufru	konečná koncentrace	přidaný objem zásobního roztoku	přidaný objem metanolu				
					mM	µl	µl	mM	µl	µl	λ_1	λ_2	λ_{FL}	λ_{CX}
201	1	:	2	0,5				0,005	30	470				
202	1	:	1	1,0				0,010	60	440				
203	1,5	:	1	1,5				0,015	90	410				
204	2	:	1	2,0	0,010	60	940	0,020	120	380				
205	3	:	1	3,0				0,030	180	320				
206	4	:	1	4,0				0,040	240	260				
207	6	:	1	6,0				0,060	360	140				
208	6	:	0		0	0	1000	0,060	360	140				
209	4	:	0		0	0	1000	0,040	240	260				
210	2	:	0		0	0	1000	0,020	120	380				

Testovaná sloučenina			Sloučenina		Rozpouštědlo sloučeniny			metanol			vlnová délka odpovídající maximální absorbanci sloučeniny		vlnová délka odpovídající maximální absorbanci komplexu	
Zkratka					pH 7.5		Zkratka	7						
Testovaný roztok sloučeniny (mM)					0,250									
Testovaný roztok železa ve vodě (mM)					0,250		Konečný objem (ml)		1,5		λ_C=		λ_{CX}=	
Číslo vzorku	poměr sloučenina : vínan železitý				Fe^{3+} vínan		pH 7.5	Sloučenina		metanol	odpovídající absorbance sloučeniny při určité vlnové délce	odpovídající absorbancek omplexu při určité vlnové délce	absorbance při vln.délce odpovídající maximu sloučeniny	absorbance při vln.délce odpovídající maximu komplexu
					konečná koncentrace	přidaný objem roztoku vínanu železitého	přidaný objem pufru	konečná koncentrace	přidaný objem zásobního roztoku	přidaný objem metanolu				
					mM	µl	µl	mM	µl	µl	λ_1	λ_2	λ_{FL}	λ_{CX}
301	1	:	2	0,5				0,005	30	470				
302	1	:	1	1,0				0,010	60	440				
303	1,5	:	1	1,5				0,015	90	410				
304	2	:	1	2,0	0,010	60	940	0,020	120	380				
305	3	:	1	3,0				0,030	180	320				
306	4	:	1	4,0				0,040	240	260				
307	6	:	1	6,0				0,060	360	140				
308	6	:	0		0	0	1000	0,060	360	140				
309	4	:	0		0	0	1000	0,040	240	260				
310	2	:	0		0	0	1000	0,020	120	380				

Tabulka 8 Postup pro železnaté a železité ionty při pH 7.5

3.2.4.5. Výpočet poměru zkoušená látka/Fen+ nebo směrnice

A) Orientační znázornění poměru

Do grafu naneseme na osu x poměr chelátor/železo a na osu y absorbanci v maximu komplexu tj. při $\lambda_{C\ MA}$

B) Vypočítání absorpčních konstant k pro zkoušenou látku - pro $\lambda_{F\ MAX}$ ($k_{F\ MAX}$), $\lambda_{C\ MAX}$ ($k_{F\ C\ MAX}$), λ_1 (k_1) a λ_1 (k_2) a pro komplex při $\lambda_{F\ MAX}$ ($k_{C\ F\ MAX}$) a $\lambda_{C\ MAX}$ ($k_{C\ MAX}$).

C) Vypočet zbylé koncentrace testované látky (flavonoidu):

a) pomocí metody symetrie píku: $c_F = (A_l - A_2) / k_l$

b) pomocí metody absorbance v maximu testované látky (flavonoidu):

$c_F = (A_{F\ MAX} - c_{F0} * k_{C\ F\ MAX}) / (k_{F\ MAX} - k_{C\ F\ MAX})$,

c) metody absorbance v maximu komplexu:

$c_F = (A_{C\ MAX} - c_{F0} * k_{C\ MAX}) / (k_{F\ C\ MAX} - k_{C\ MAX})$

D) Stanovení stechiometrického poměru komplexu P (viz kap. 6.4.4) nebo směrnice

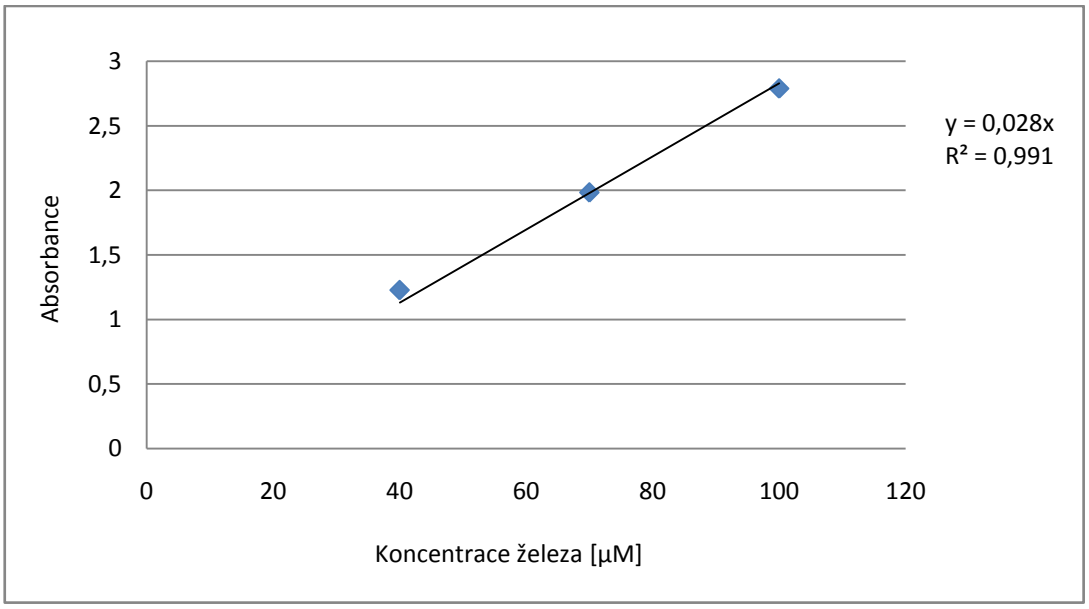
E) Stanovení stechiometrického poměru pomocí metody V. (viz kap. 6.4.5)

3.2.5. Statistická analýza

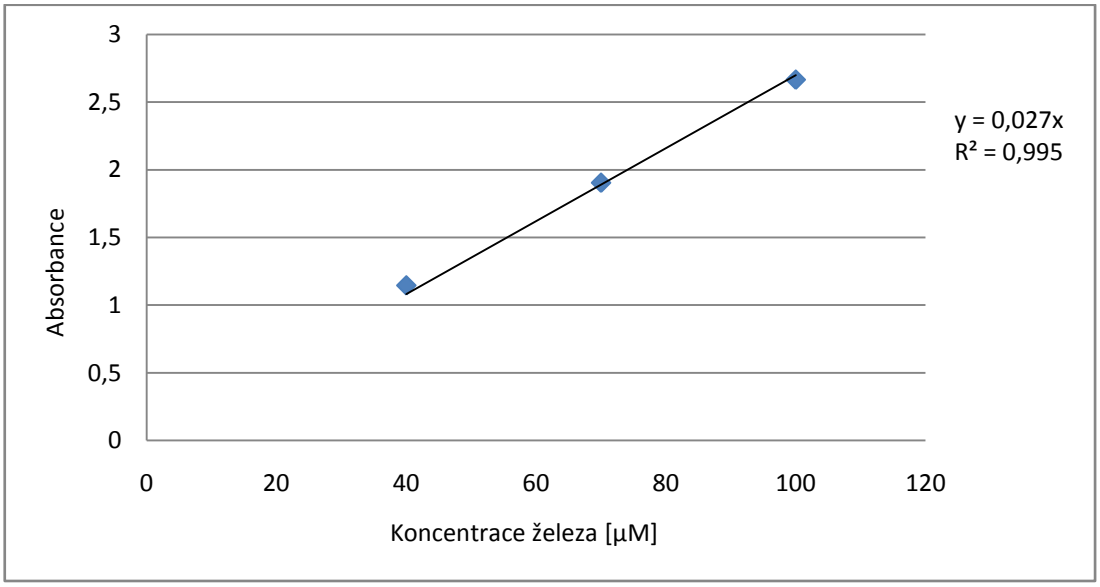
Výsledky jsou vyjádřeny jako průměr +/- směrodatná odchylka (vypočítaná podle vzorce $\sqrt{\frac{\sum (x-\bar{x})^2}{n}}$).

3.3. Výsledky

Nejprve byla stanovena kalibrační křivka pro železnaté (Obr. 14) a železité ionty (Obr. 15).



Obr. 14 Kalibrační křivka železnatých iontů



Obr. 15 Kalibrační křivka železitých iontů

U každé testované sloučeniny a každého testovaného pH byly dále nejdříve stanoveny molární absorpční konstanty při maximu absorpce testované sloučeniny a také maximu absorpce komplexu u železnatých i železitých iontů. Na Obr. 16 a Obr. 18

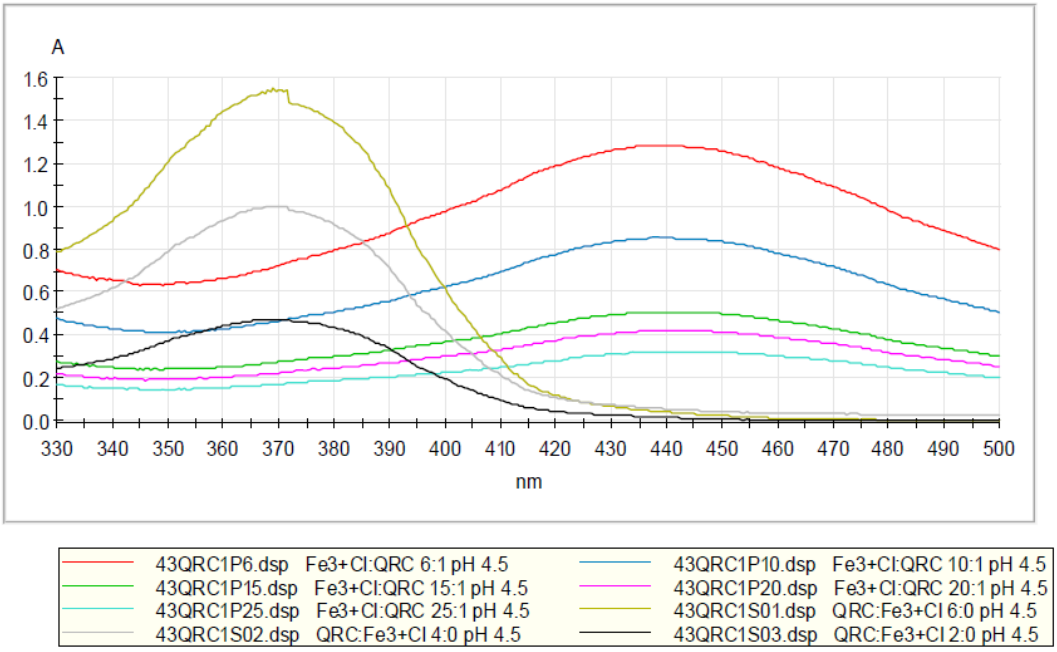
je znázorněn ilustrativní příklad – kvercetin a jeho komplex s železitými ionty při pH 4.5. Z obrázku 17 lze určit molární absorpční koeficient ε_{K370} nebo pro zjednodušení konstantu absorpce (k_{K370}). Pro kvercetin v jeho absorpčním maximu 370 nm platí:

A = 25,246 c (kvercetin v mM)

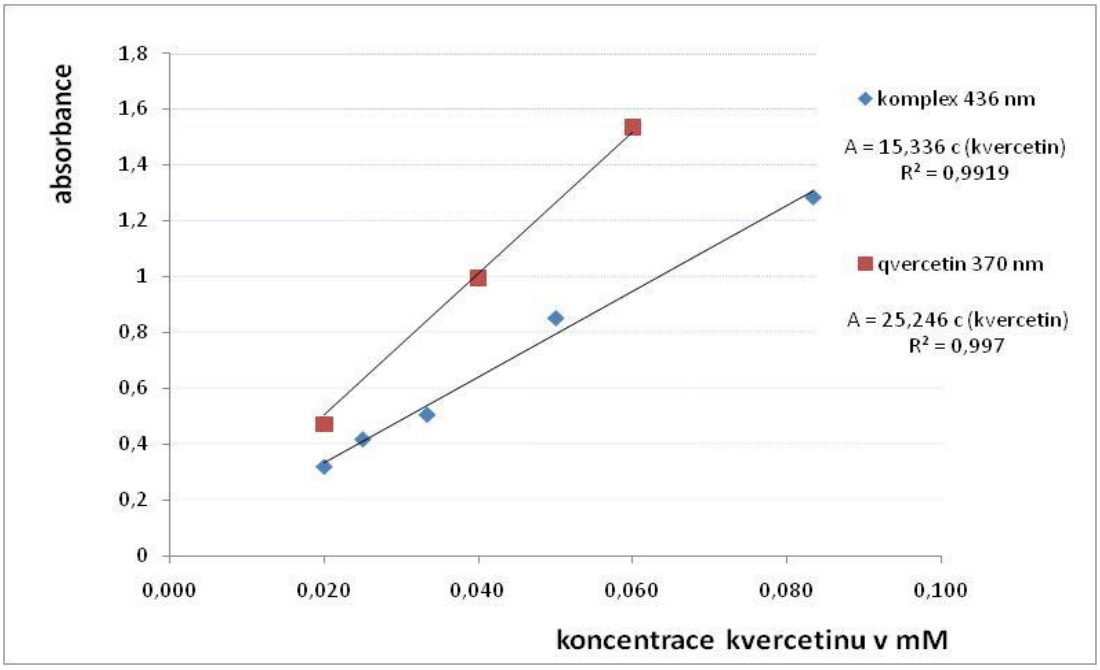
z toho plyne, že k_{K370} = 25,246 $l.mmol^{-1}$

nebo respektive při standardní používané šířce kyvety 1 cm je ε_{K370} 25 246 $l.mol^{-1}.cm^{-1}$

Pro komplex je možné vypočítat opět k nebo ε. Jediným rozdílem je, že se daná konstanta vztahuje k ekvivalentní koncentraci kvercetinu, vzhledem k předem nejasné stechiometrii komplexu je toto jediná varianta.

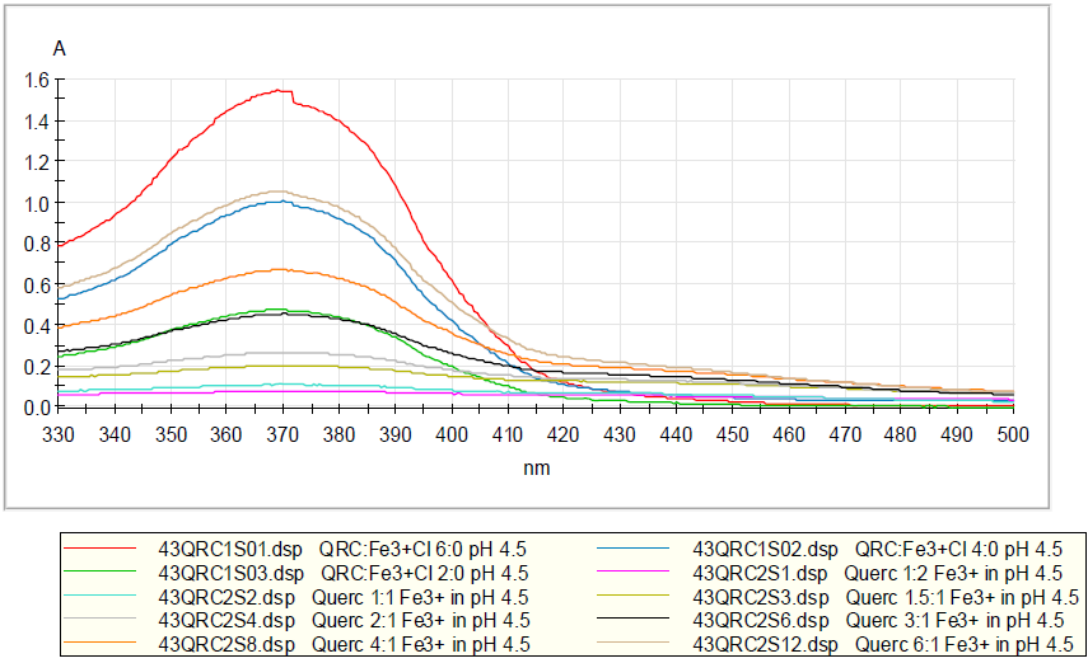


Obr. 16 Absorpční spektrum kvercetinu (žlutá, šedá a černá křivka – různé koncentrace kvercetinu) a jeho komplexu s železitými ionty při pH 4.5 (ostatní barvy). V experimentu byly použity stabilní koncentrace železitých iontů a variabilní koncentrace kvercetinu. Grafické znárodnění absorpce v maximu kvercetinu (370 nm) a jeho komplexu (436 nm) je zobrazeno v Obr. 17.

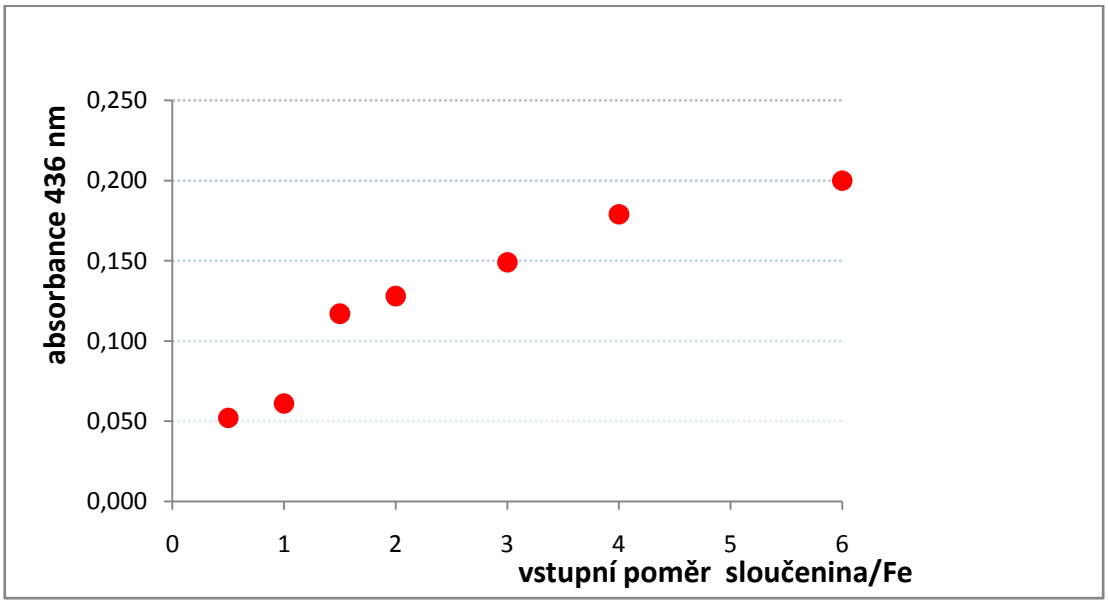


Obr. 17 Vztah absorbance kvercetinu a jeho komplexu s železitými ionty při pH 4.5 v maximu absorpce kvercetinu (červená křivka) a jeho komplexu s železitými ionty (modrá křivka). Vzhledem k vysokému koeficientu R^2 jsou obě závislosti jednoznačně lineárního charakteru.

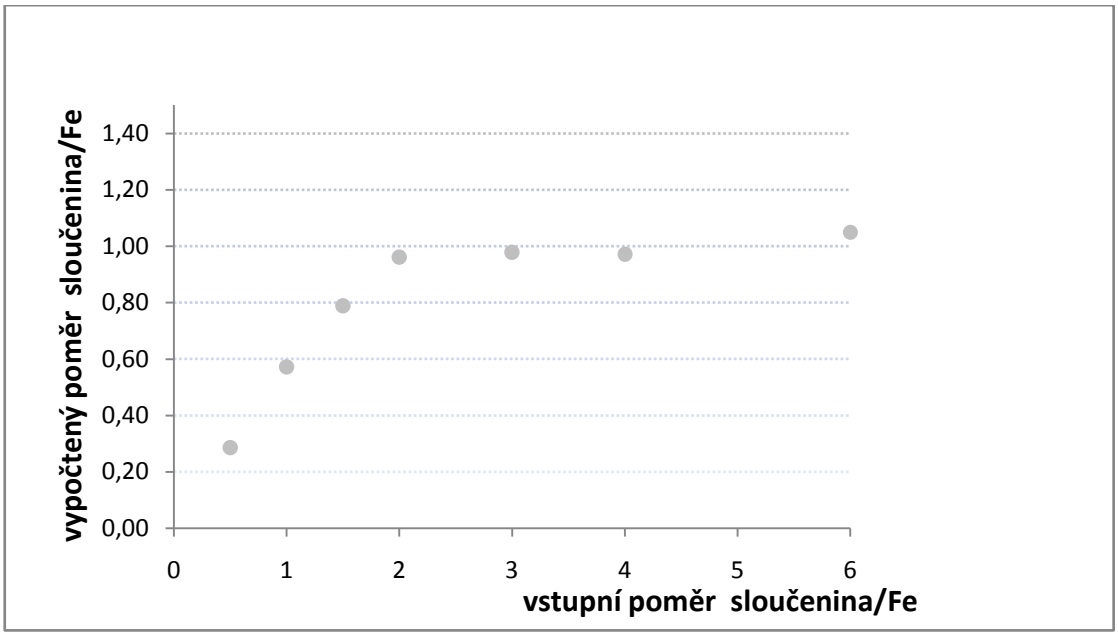
U každé testované látky a každého pH byly pak změřeny absorpční spektra v různém vstupním poměru kvercetin/železo pro železnaté i železité ionty. Jako vhodný příklad jsou uvedena spektra kvercetinu (Obr. 18). Každé spektrum bylo poté vyhodnoceno podle výše popsané metodiky všemi 5 postupy (Obr. 19-22).



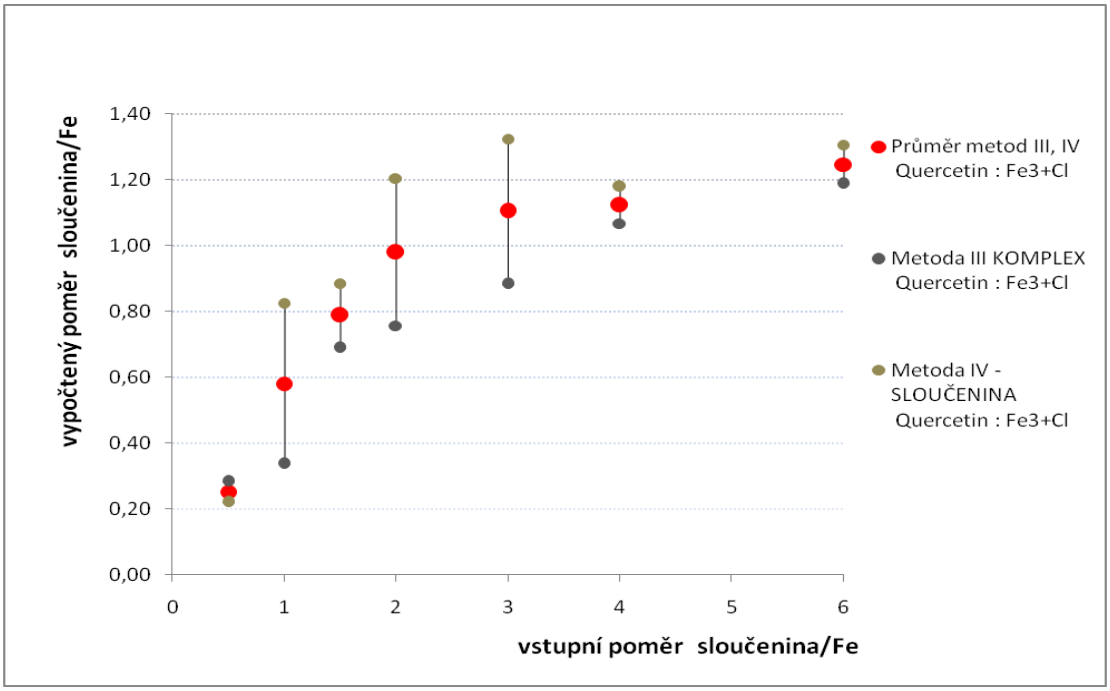
Obr. 18 Absorpční spektrum kvercetinu s železitými ionty při pH 4.5. Pro porovnání jsou znázorněny i absorpční křivky tří koncentrací čistého kvercetinu (červená, tmavě modrá a zelená). Ostatní křivky znázorňují komplex s železitými ionty v různém vstupním poměru kvercetin/Fe^{3+}.



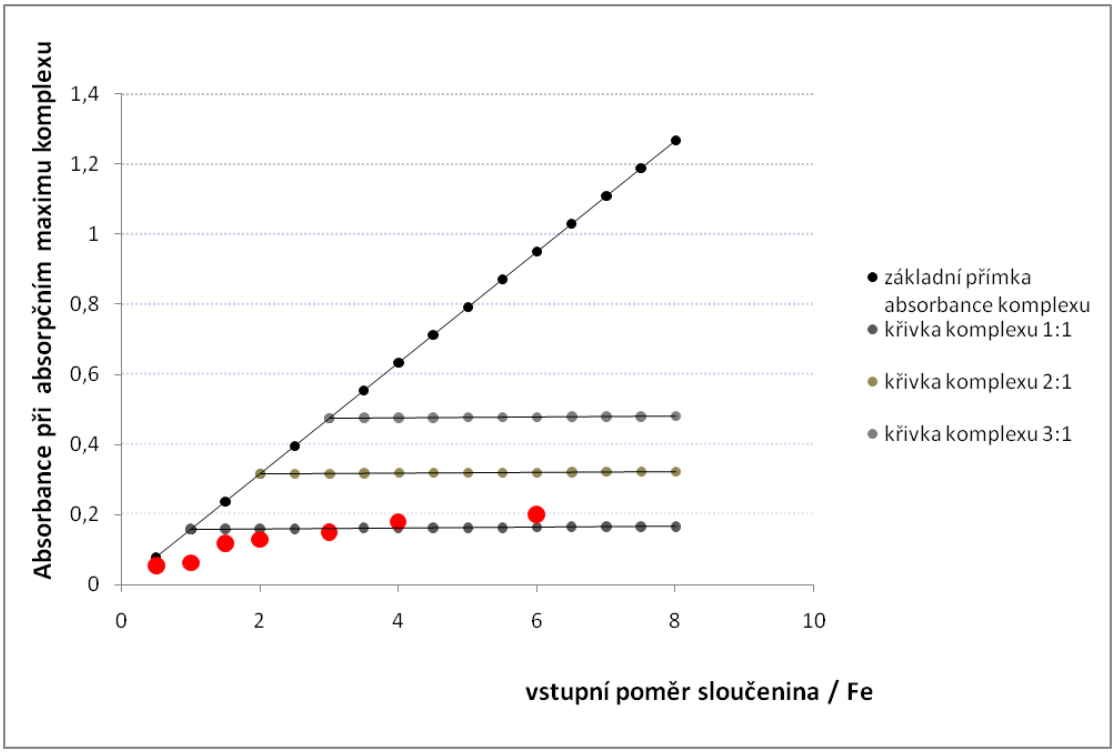
Obr. 19 Vyhodnocení spektra z Obr. 18 pomocí metody I. Graf znázorňuje vztah vstupního poměru kvercetin/železo a absorbance v maximu komplexu. Z grafu nelze určit jaký je poměr kvercetinu a železa v komplexu.



Obr. 20 Vyhodnocení spektra z Obr. 18 pomocí metody II. Po vypočtení koncentrace nezreagovaného kvercetinu podle v metodologii uvedených vzorců byl určen finální poměr pomocí změřené metody symetrie píků (1:1).



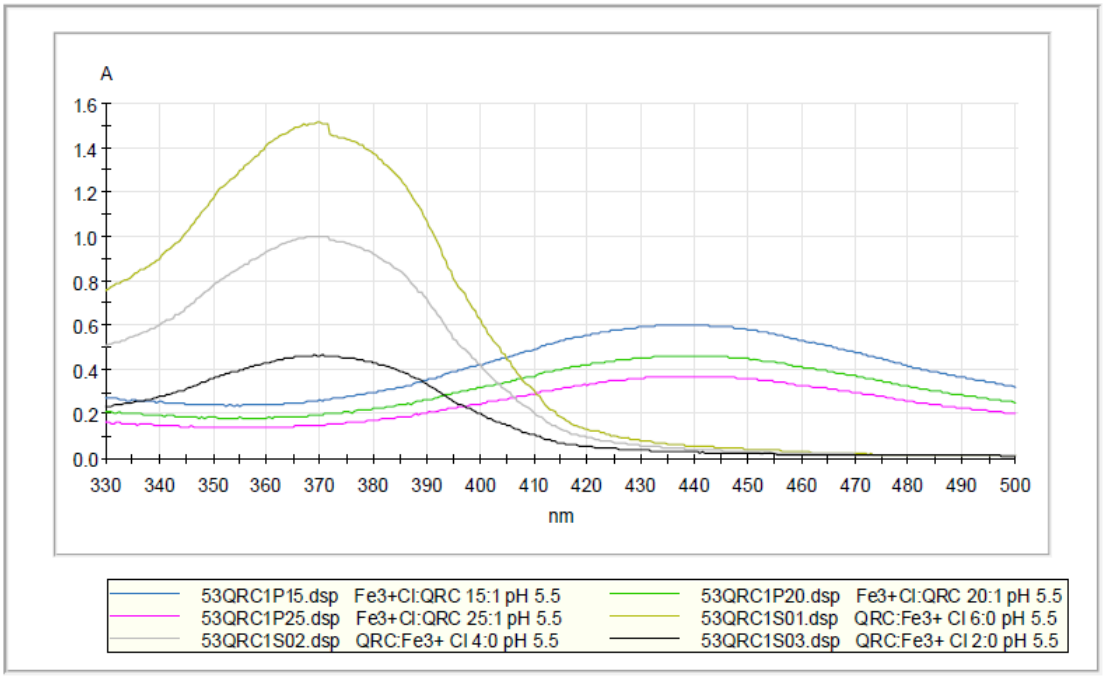
Obr. 21 Vyhodnocení spektra z Obr. 18 pomocí metod III-IV, respektive jejich průměru. Po vypočtení koncentrace nezreagovaného kvercetinu podle v metodologii uvedených vzorců byl určen finální poměr pomocí metody maxima absorbance testované látky (III) a maxima absorbance komplexu (IV). Vzhledem k závislosti metod III a IV byl zobrazen i jejich průměr. Finální poměr lze pravděpodobně určit 1:1.



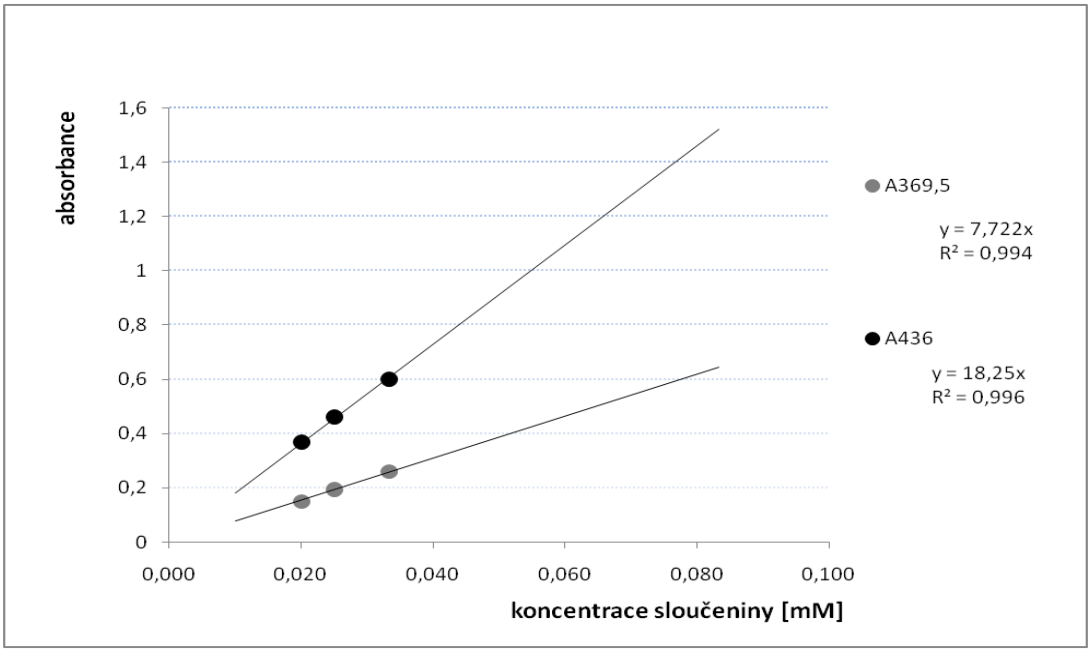
Obr. 22 Vyhodnocení spektra z Obr. 18 pomocí průměru metody V. Pomocí molárních absorpčních koeficientů kvercetinu a komplexu byly připraveny teoretické přímky pro komplexy se stechiometrií 1:1, 2:1 a 3:1. Naměřené koncentrace zapadají do stechiometrie 1:1 kvercetin:železité ionty.

Na dalších obrázcích (Obr. 23-28) je znázorněn kvercetin a jeho komplex s železitými ionty při pH 5.5. Z obrázku 24 lze určit molární absorpční koeficient $\varepsilon_{K369,5}$ nebo pro zjednodušení konstantu absorpce ($k_{K369,5}$). Pro kvercetin v jeho absorpčním maximu 369,5 nm platí, že:

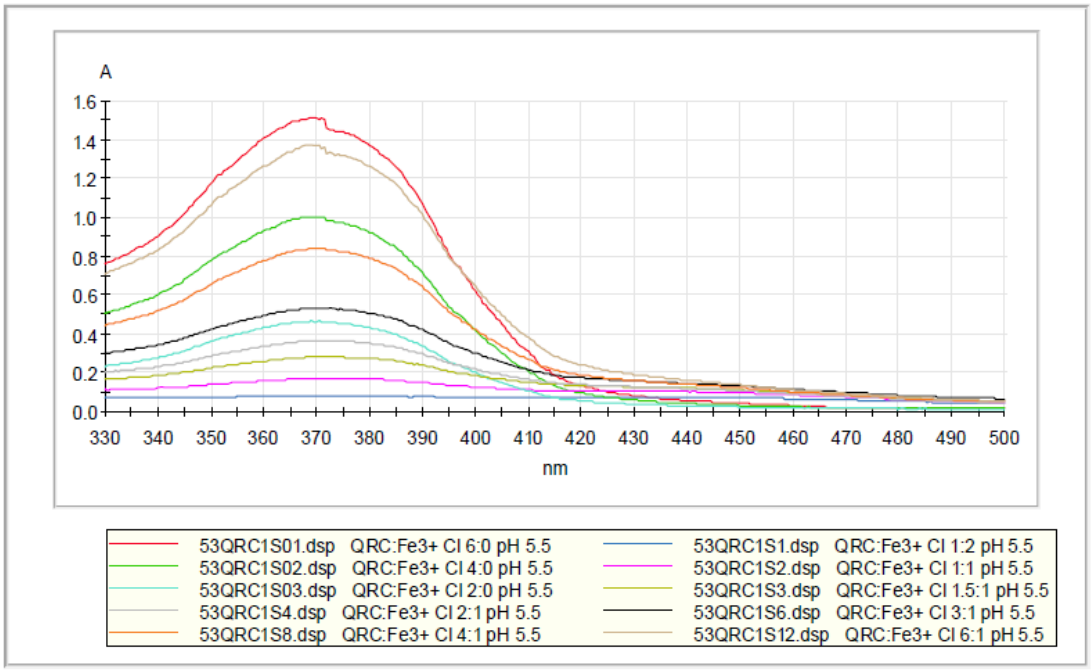
$k_{K369,5} = 7{,}722\ l.mmol^{-1}$



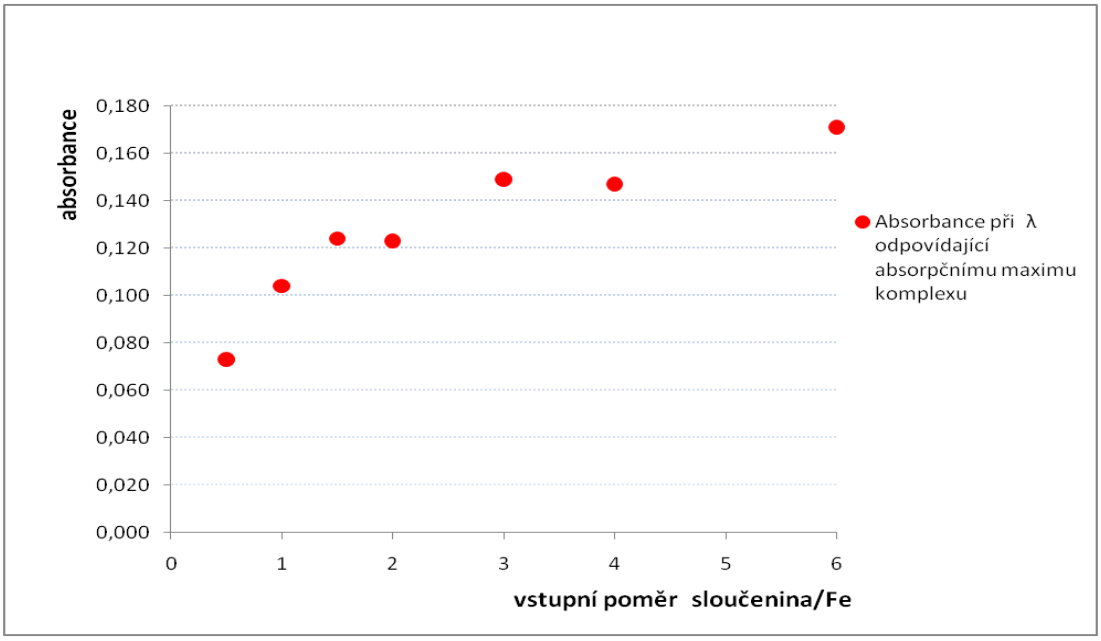
Obr. 23 Absorpční spektrum kvercetinu (žlutá, šedá, černá křivka – různé koncentrace kvercetinu) a jeho komplexu s železitými ionty při pH 5.5 (ostatní barvy). V experimentu byly použity stabilní koncentrace železitých iontů a variabilní koncentrace kvercetinu. Grafické znárodnění absorpce v maximu kvercetinu (369,5 nm) a jeho komplexu (436 nm) je zobrazeno v obr.24



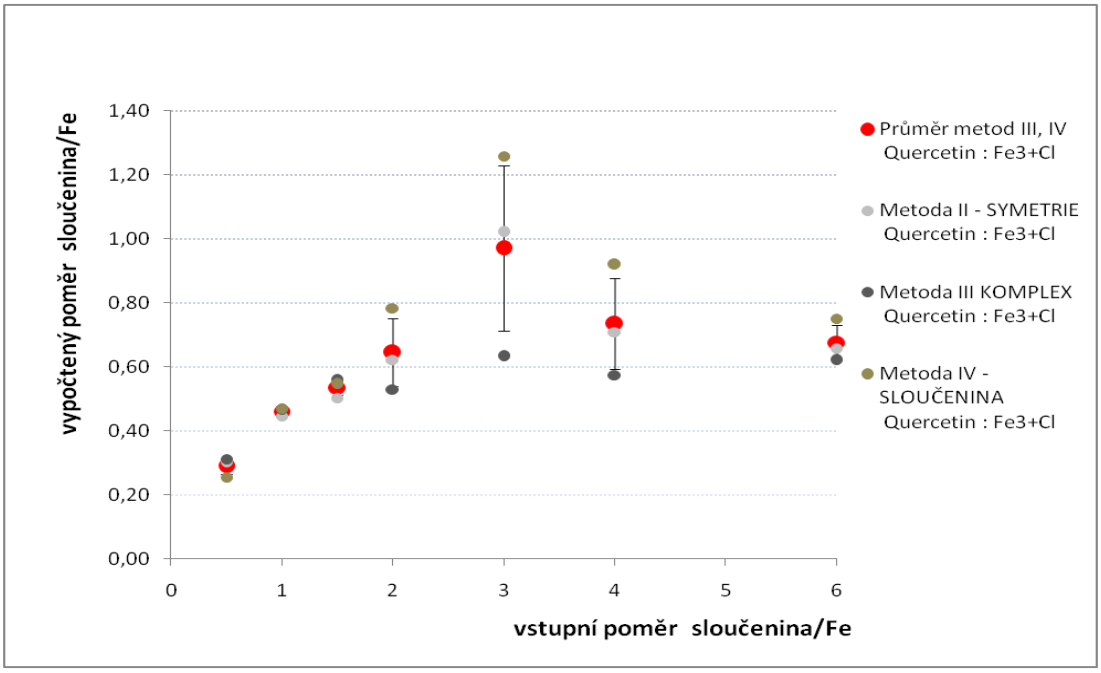
Obr. 24 Vztah absorbance kvercetinu a jeho komplexu s železitými ionty při pH 5.5 v maximu absorpce kvercetinu (šedá křivka) a jeho komplexu s železitými ionty (černá křivka). Vzhledem k vysokému koeficientu R^2 jsou obě závislosti jednoznačně lineárního charakteru.



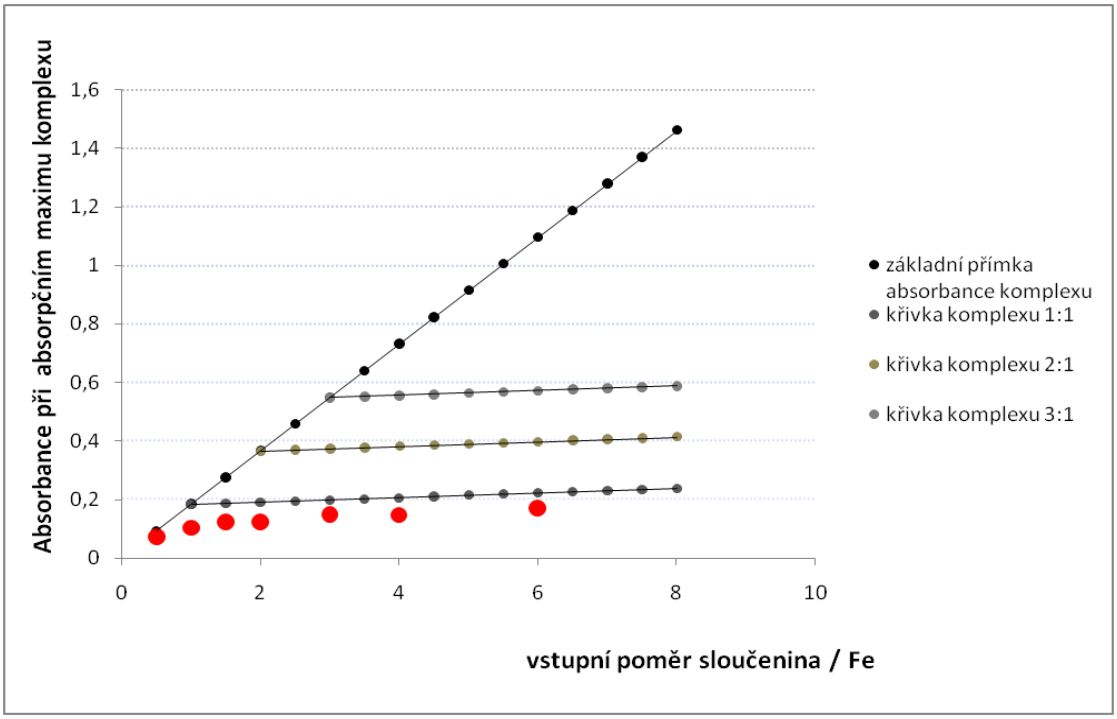
Obr. 25 Absorpční spektrum kvercetinu s železitými ionty při pH 5.5. Pro porovnání jsou znázorněny i absorpční křivky tří koncentrací čistého kvercetinu (červená, zelená, světle modrá). Ostatní křivky znázorňují komplex s železitými ionty v různém vstupním poměru kvercetin/Fe^{3+}.



Obr. 26 Vyhodnocení spektra z Obr. 25 pomocí metody I. Graf znázorňuje vztah vstupního poměru kvercetin/železo a absorbance v maximu komplexu. Z grafu nelze určit jaký je poměr kvercetinu a železa v komplexu.



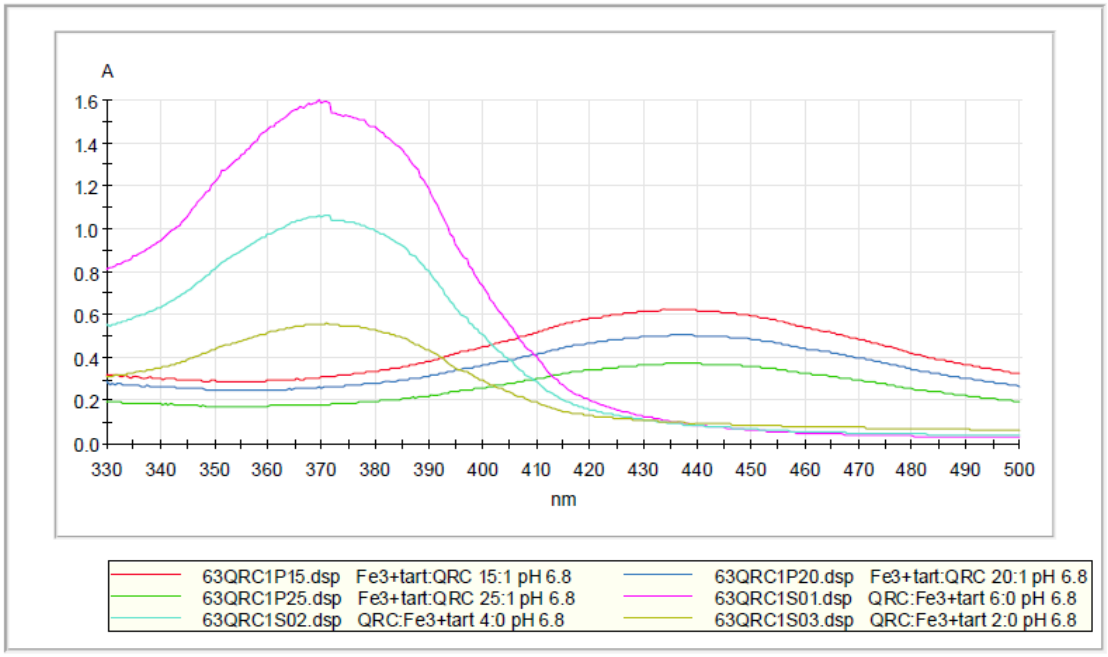
Obr. 27 Vyhodnocení spektra z Obr. 25 pomocí metod II-IV, respektive jejich průměru. Po vypočtení koncentrace nezreagovaného kvercetinu podle v metodologii uvedených vzorců byl určen finální poměr pomocí metody symetrie píků (II), metody maxima absorbance testované látky (III) a maxima absorbance komplexu (IV). Vzhledem k závislosti metod III a IV byl zobrazen i jejich průměr. Finální poměr lze pravděpodobně určit 1:1.



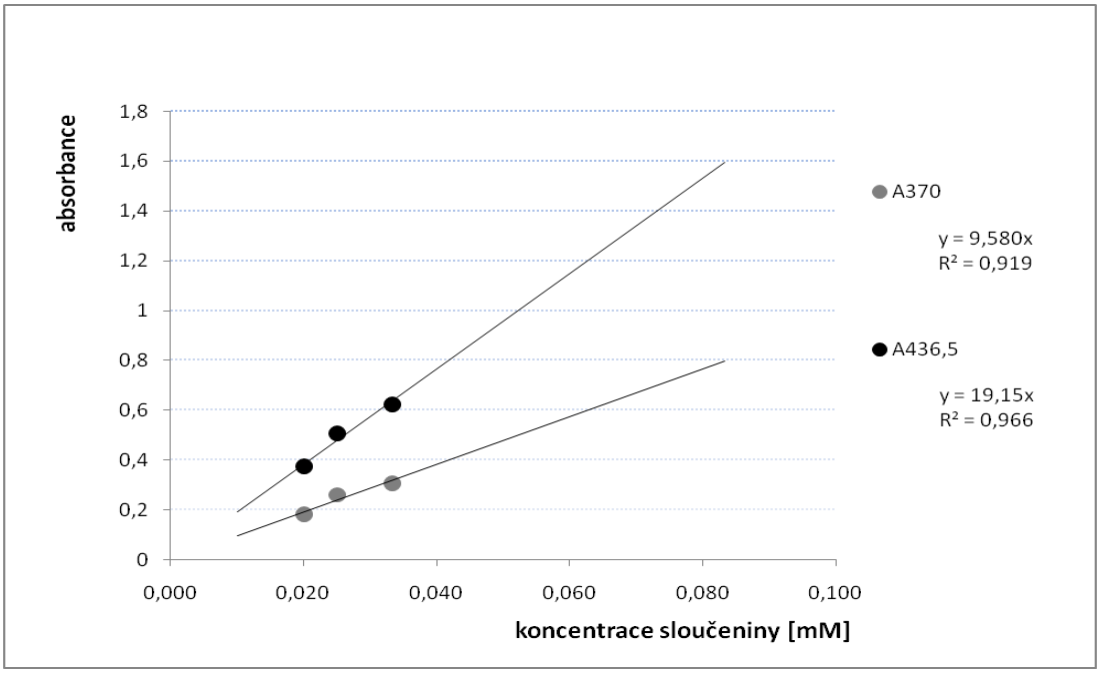
Obr. 28 Vyhodnocení spektra z Obr. 25 pomocí průměru metody V. Pomocí molárních absorpčních koeficientů kvercetinu a komplexu byly připraveny teoretické přímky pro komplexy se stechiometrií 1:1, 2:1 a 3:1. Naměřené koncentrace zapadají do stechiometrie 1:1 kvercetin:železité ionty.

Obr. 29-34 znázorňují kvercetin a jeho komplex s železitými ionty při pH 6.8. Z obrázku 30 lze určit molární absorpční koeficient ε_{K370} nebo pro zjednodušení konstantu absorpce (k_{K370}). Pro kvercetin v jeho absorpčním maximu 370 nm platí, že:

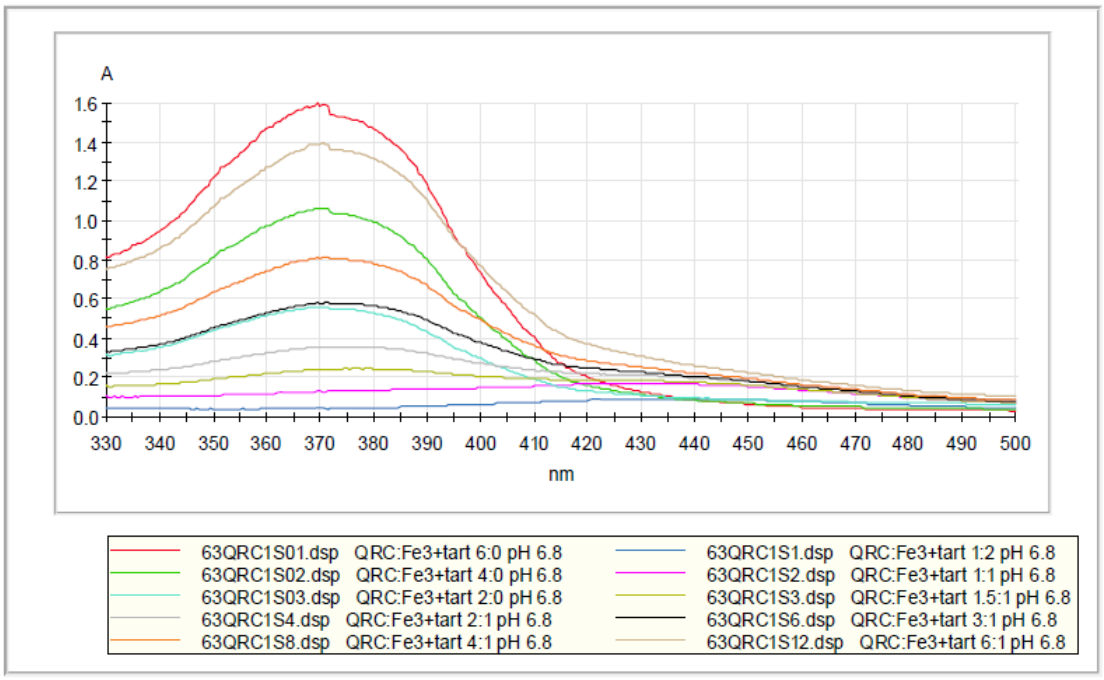
k_{K370} = 9,580 l.mmol^{-1}



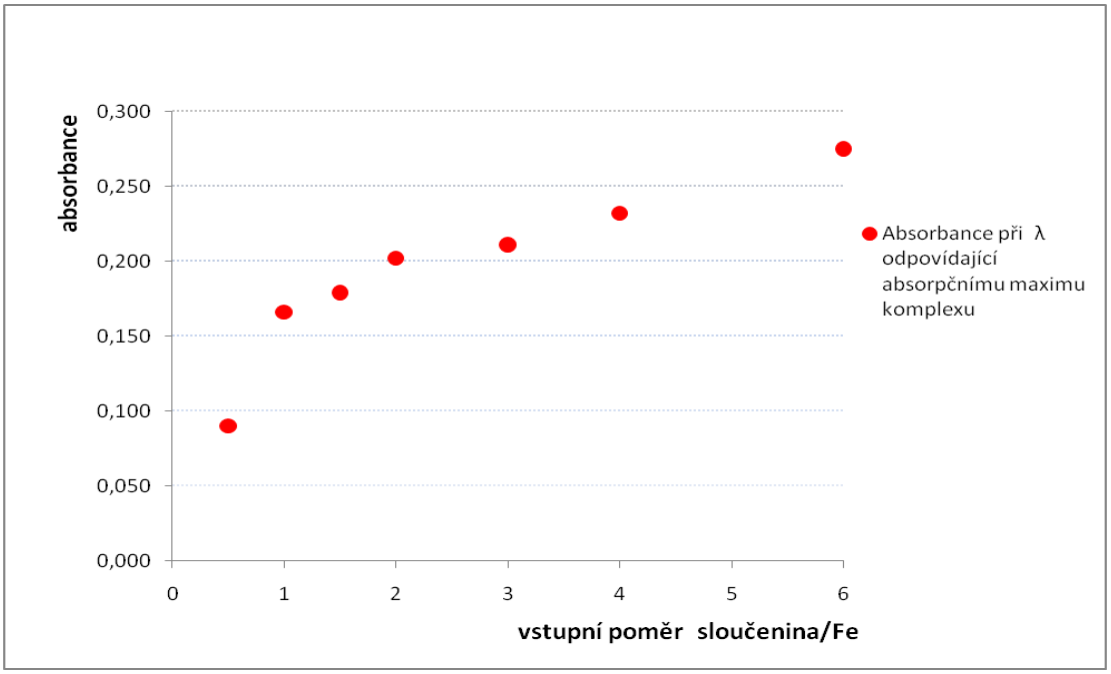
Obr. 29 Absorpční spektrum kvercetinu (žlutá, fialová, světle modrá křivka – různé koncentrace kvercetinu) a jeho komplexu s železitými ionty při pH 6,8 (ostatní barvy). V experimentu byly použity stabilní koncentrace železitých iontů a variabilní koncentrace kvercetinu. Grafické znárodnění absorpce v maximu kvercetinu (370 nm) a jeho komplexu (436,5 nm) je zobrazeno v obr. 30.



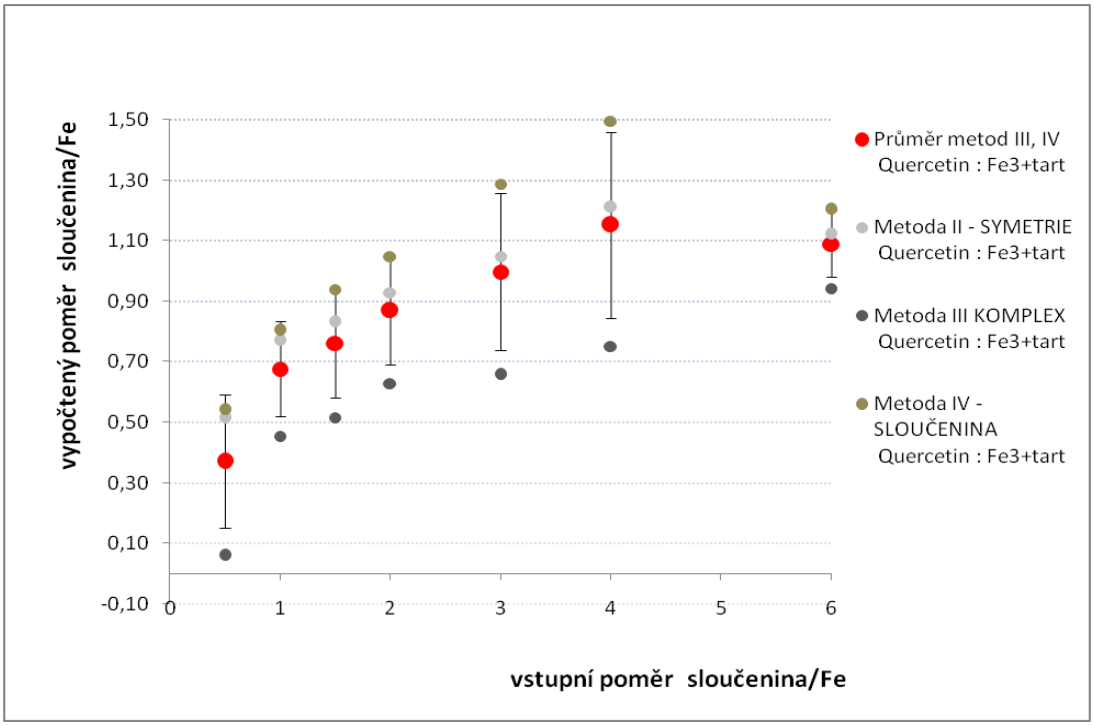
Obr. 30 Vztah absorbance kvercetinu a jeho komplexu s železitými ionty při pH 6,8 v maximu absorpce kvercetinu (šedá křivka) a jeho komplexu s železitými ionty (černá křivka). Vzhledem k vysokému koeficientu R^2 jsou obě závislosti jednoznačně lineárního charakteru.



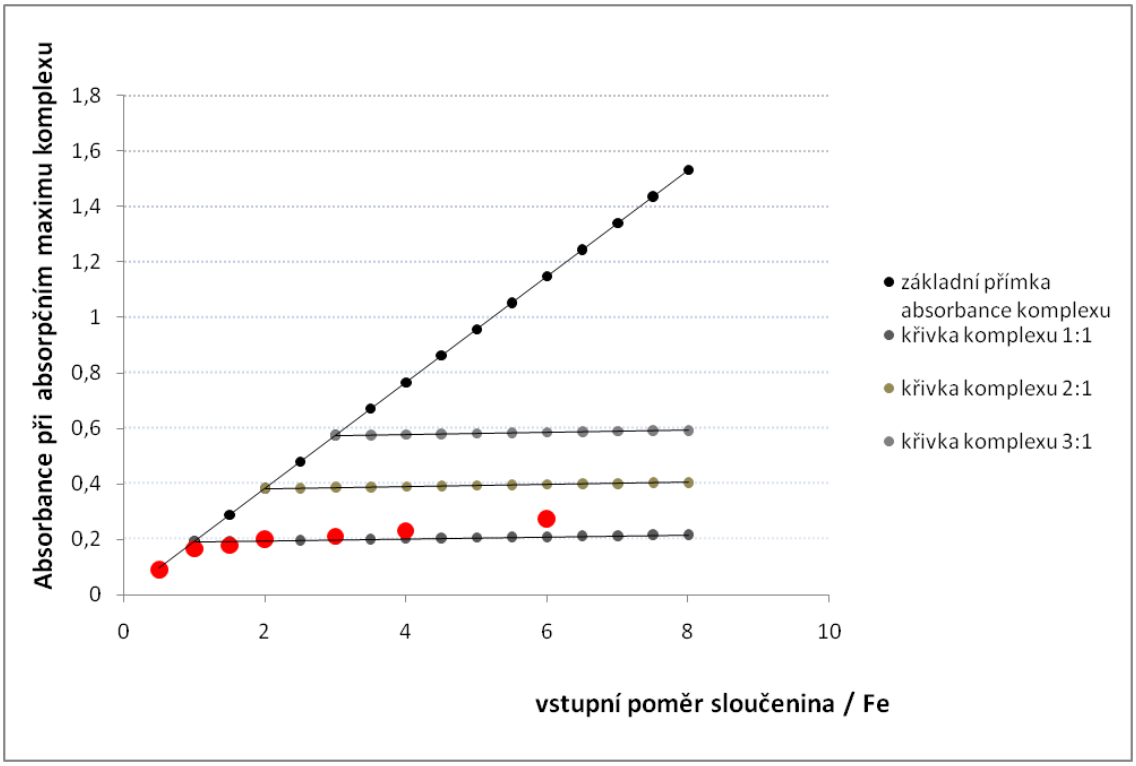
Obr. 31 Absorpční spektrum kvercetinu s železitými ionty při pH 6,8. Pro porovnání jsou znázorněny i absorpční křivky tří koncentrací čistého kvercetinu (červená, zelená, světle modrá). Ostatní křivky znázorňují komplex s železitými ionty v různém vstupním poměru kvercetin/Fe^{3+}.



Obr. 32 Vyhodnocení spektra z Obr. 31 pomocí metody I. Graf znázorňuje vztah vstupního poměru kvercetin/železo a absorbance v maximu komplexu. Z grafu nelze určit jaký je poměr kvercetinu a železa v komplexu.



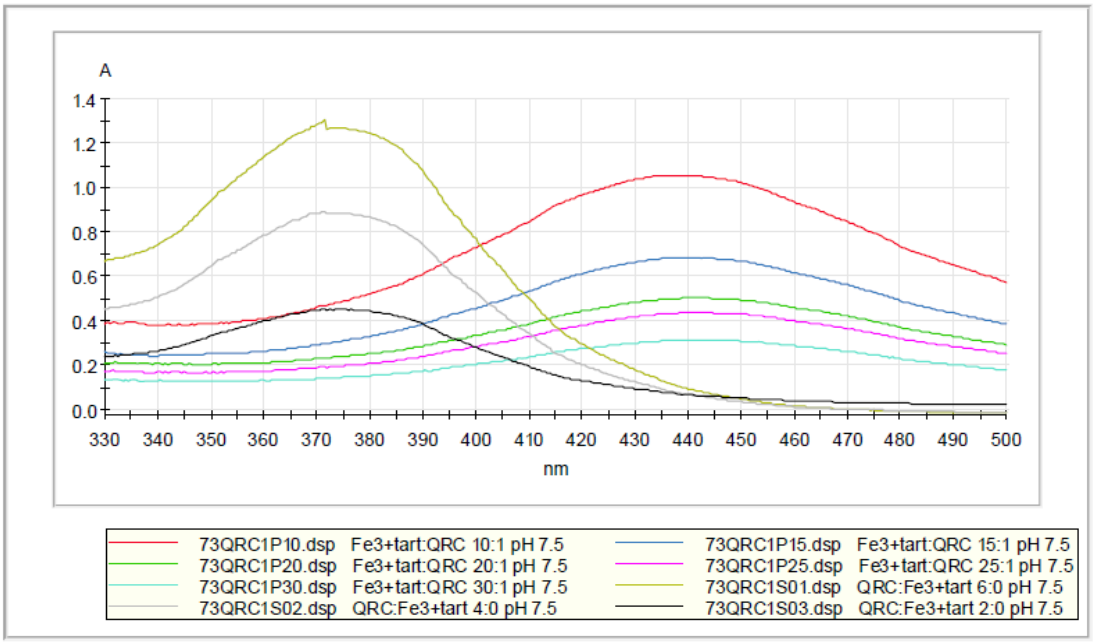
Obr. 33 Vyhodnocení spektra z Obr. 31 pomocí metod II-IV, respektive jejich průměru. Po vypočtení koncentrace nezreagovaného kvercetinu podle v metodologii uvedených vzorců byl určen finální poměr pomocí metody symetrie píků (II), metody maxima absorbance testované látky (III) a maxima absorbance komplexu (IV). Vzhledem k závislosti metod III a IV byl zobrazen i jejich průměr. Finální poměr lze pravděpodobně určit 1:1.



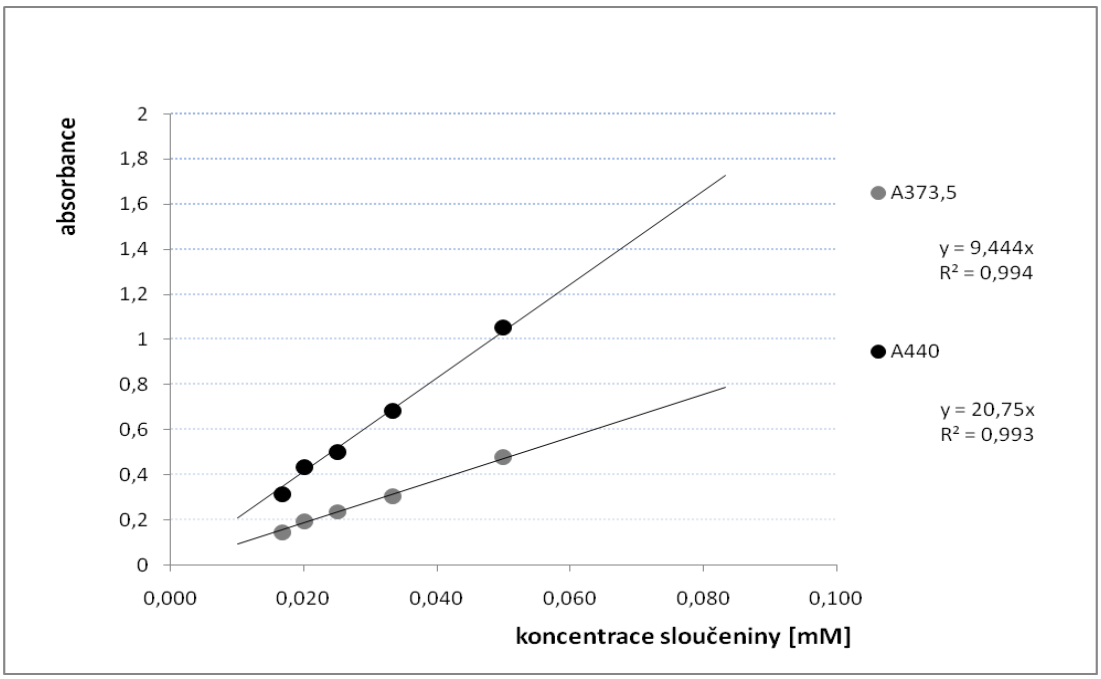
Obr. 34 Vyhodnocení spektra z Obr. 31 pomocí průměru metody V. Pomocí molárních absorpčních koeficientů kvercetinu a komplexu byly připraveny teoretické přímky pro komplexy se stechiometrií 1:1, 2:1 a 3:1. Naměřené koncentrace zapadají do stechiometrie 1:1 kvercetin:železité ionty.

Na Obr. 35-40 je znázorněn kvercetin a jeho komplex s železitými ionty při pH 7.5. Z obrázku 36 lze určit molární absorpční koeficient $\varepsilon_{K373,5}$ nebo pro zjednodušení konstantu absorpce ($k_{K373,5}$). Pro kvercetin v jeho absorpčním maximu 373,5 nm platí, že:

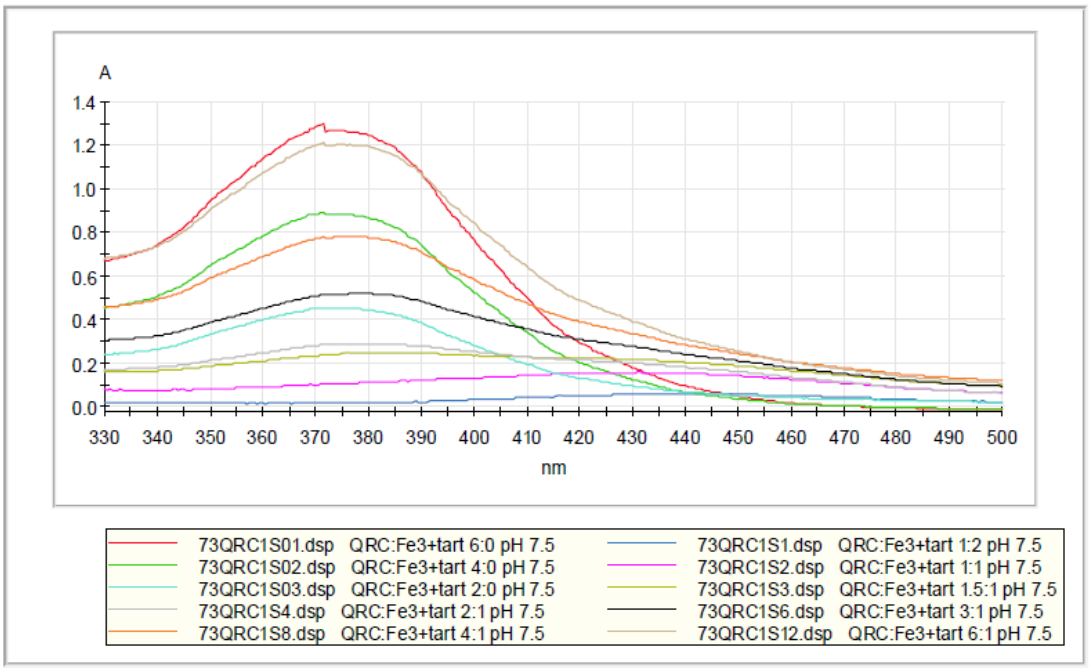
$k_{K373,5} = 9{,}444\ l.mmol^{-1}$



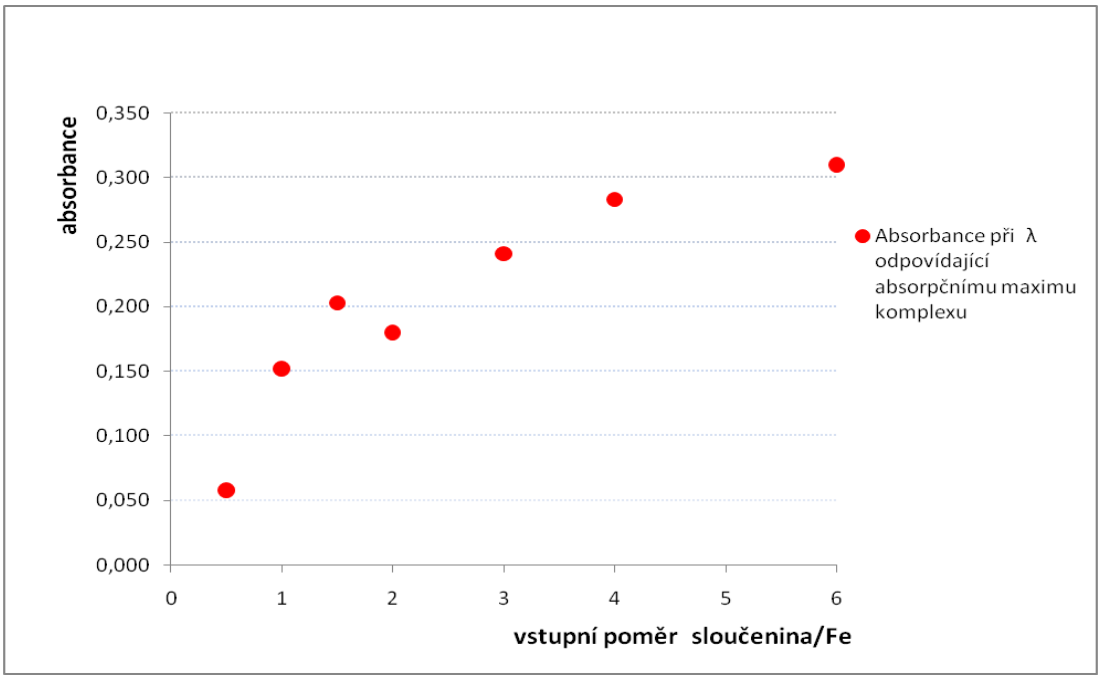
Obr. 35 Absorpční spektrum kvercetinu (žlutá, šedá, černá křivka – různé koncentrace kvercetinu) a jeho komplexu s železitými ionty při pH 7.5 (ostatní barvy). V experimentu byly použity stabilní koncentrace železitých iontů a variabilní koncentrace kvercetinu. Grafické znárodnění absorpce v maximu kvercetinu (373,5 nm) a jeho komplexu (440 nm) je zobrazeno v obr. 36.



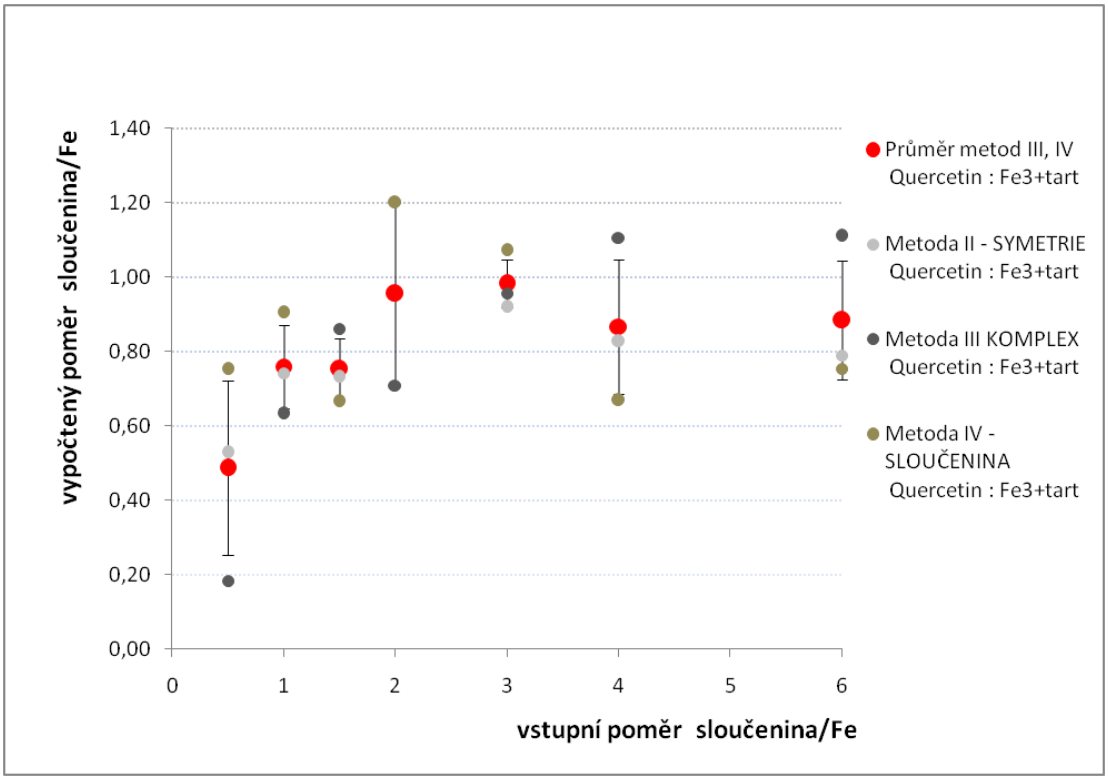
Obr. 36 Vztah absorbance kvercetinu a jeho komplexu s železitými ionty při pH 7.5 v maximu absorpce kvercetinu (šedá křivka) a jeho komplexu s železitými ionty (černá křivka). Vzhledem k vysokému koeficientu R^2 jsou obě závislosti jednoznačně lineárního charakteru.



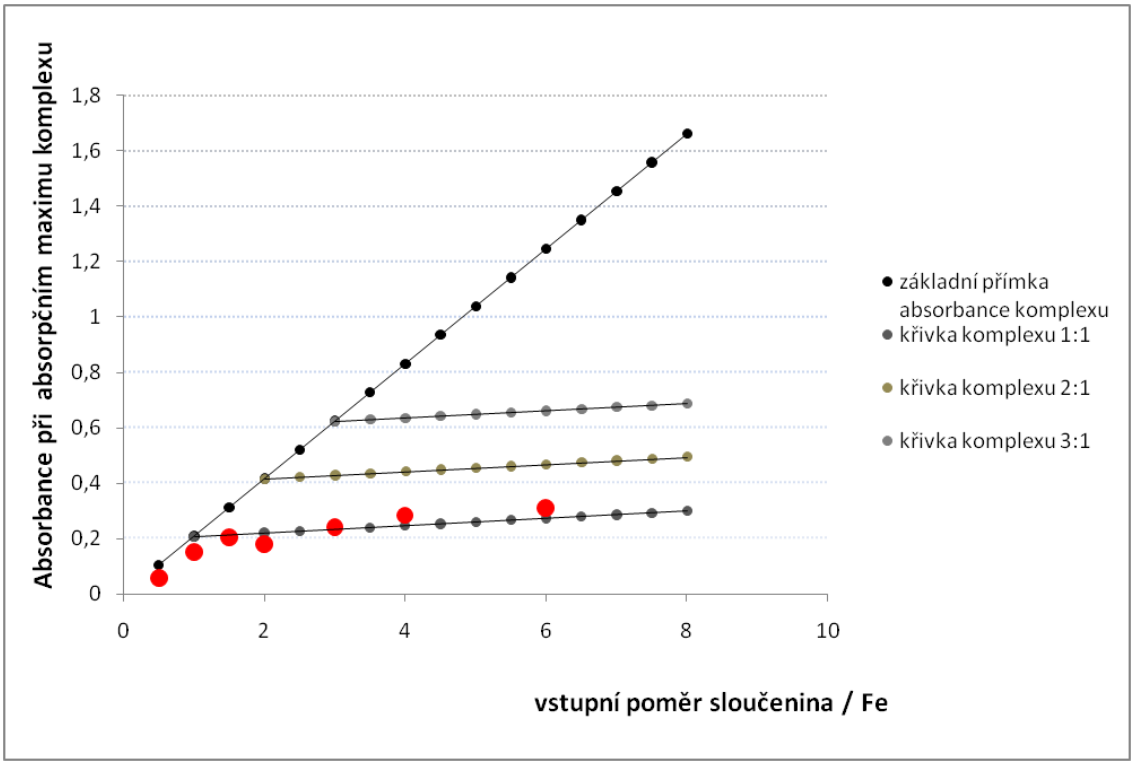
Obr. 37 Absorpční spektrum kvercetinu s železitými ionty při pH 7.5. Pro porovnání jsou znázorněny i absorpční křivky tří koncentrací čistého kvercetinu (červená, zelená, světle modrá). Ostatní křivky znázorňují komplex s železitými ionty v různém vstupním poměru kvercetin/Fe^{3+}.



Obr. 38 Vyhodnocení spektra z Obr. 37 pomocí metody I. Graf znázorňuje vztah vstupního poměru kvercetin/železo a absorbance v maximu komplexu. Z grafu nelze určit jaký je poměr kvercetinu a železa v komplexu.

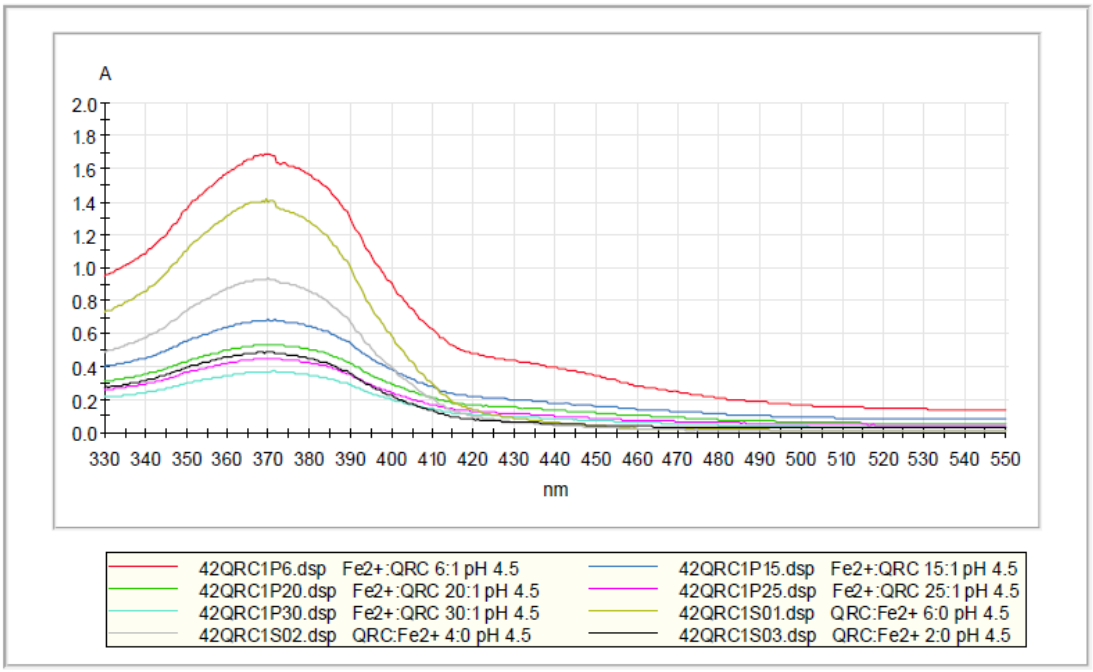


Obr. 39 Vyhodnocení spektra z Obr. 37 pomocí metod II-IV, respektive jejich průměru. Po vypočtení koncentrace nezreagovaného kvercetinu podle v metodologii uvedených vzorců byl určen finální poměr pomocí metody symetrie píků (II), metody maxima absorbance testované látky (III) a maxima absorbance komplexu (IV). Vzhledem k závislosti metod III a IV byl zobrazen i jejich průměr. Finální poměr lze pravděpodobně určit 1:1.



Obr. 40 Vyhodnocení spektra z Obr. 37 pomocí průměru metody V. Pomocí molárních absorpčních koeficientů kvercetinu a komplexu byly připraveny teoretické přímky pro komplexy se stechiometrií 1:1, 2:1 a 3:1. Naměřené koncentrace zapadají do stechiometrie 1:1 kvercetin:železité ionty.

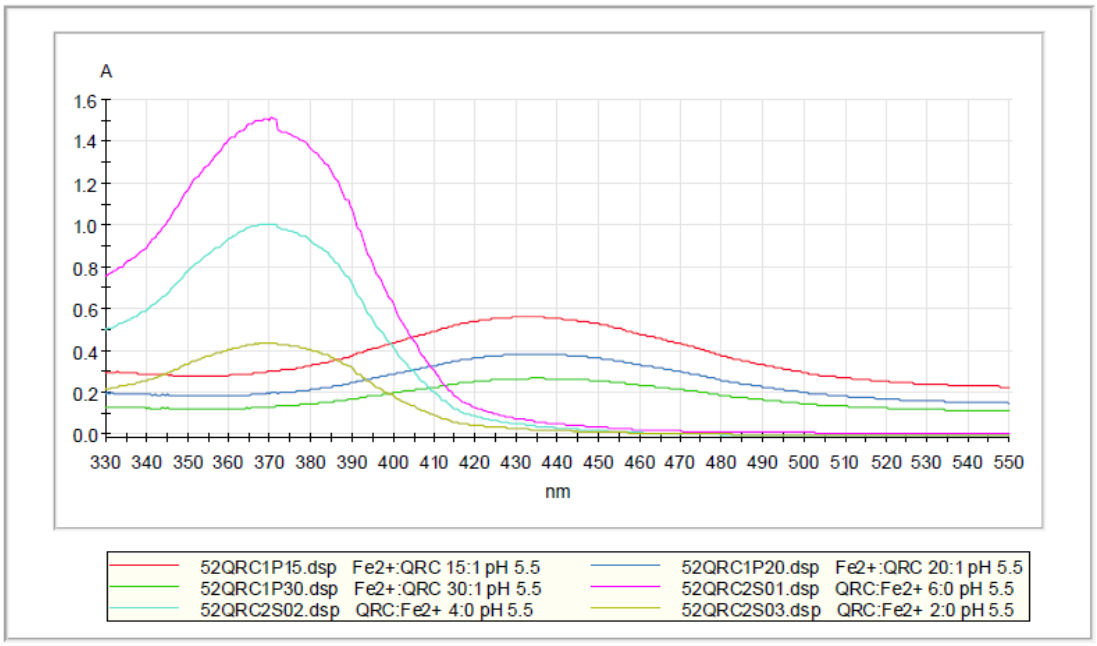
Na obrázku 41 je zobrazeno absorpční spektrum kvercetinu s železnatými ionty při pH 4.5. V tomto případě nedochází k tvorbě komplexu.



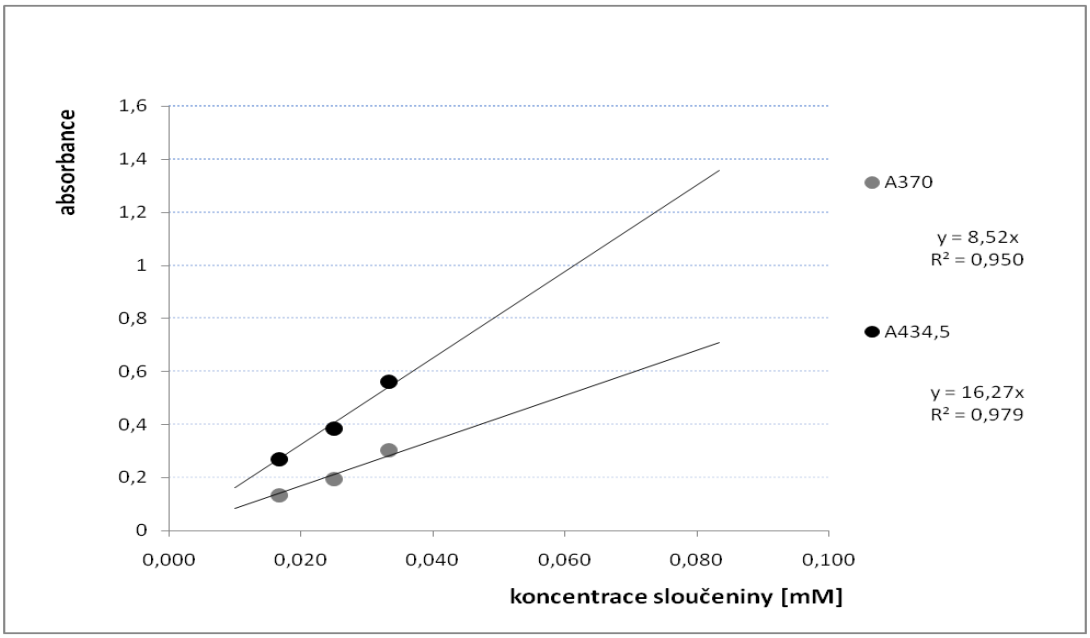
Obr. 41 Absorpční spektrum kvercetinu s železnatými ionty při pH 4.5. Při tomto pH netvoří Fe^{2+} s kvercetinem komplex.

Na obrázcích 42-47 je zobrazen kvercetin a jeho komplex s železnatými ionty při pH 5.5. Z obrázku 43 lze určit molární absorpční koeficient ε_{K370} nebo pro zjednodušení konstantu absorpce (k_{K370}). Pro kvercetin v jeho absorpčním maximu 370 nm platí, že:

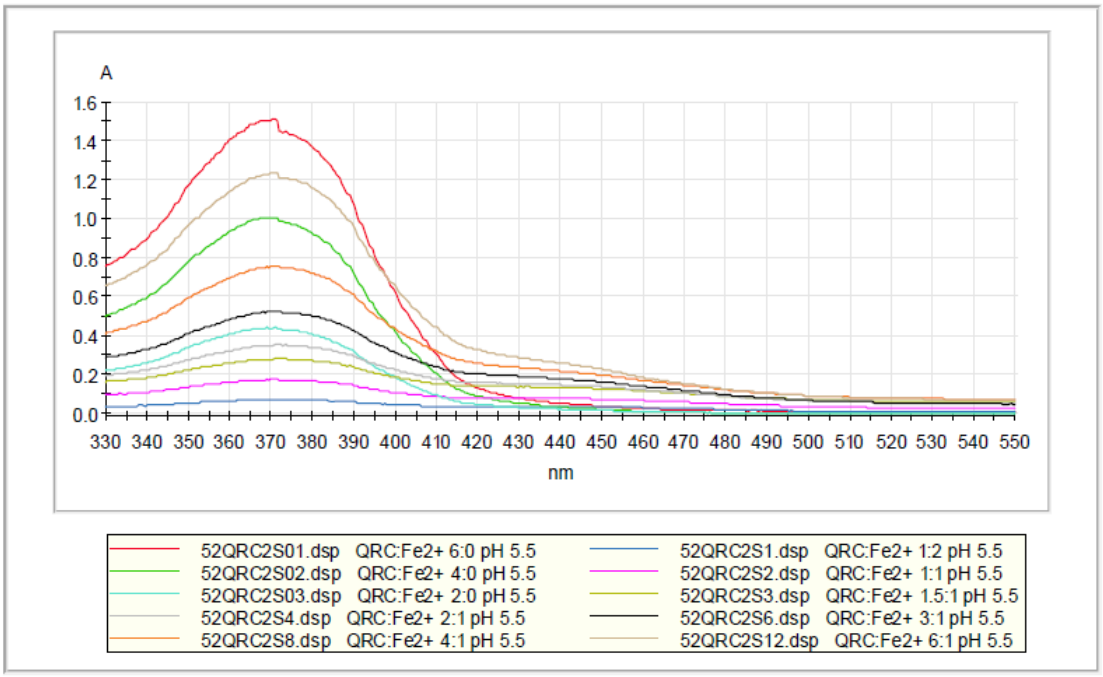
$k_{K370} = 8{,}52\ l.mmol^{-1}$



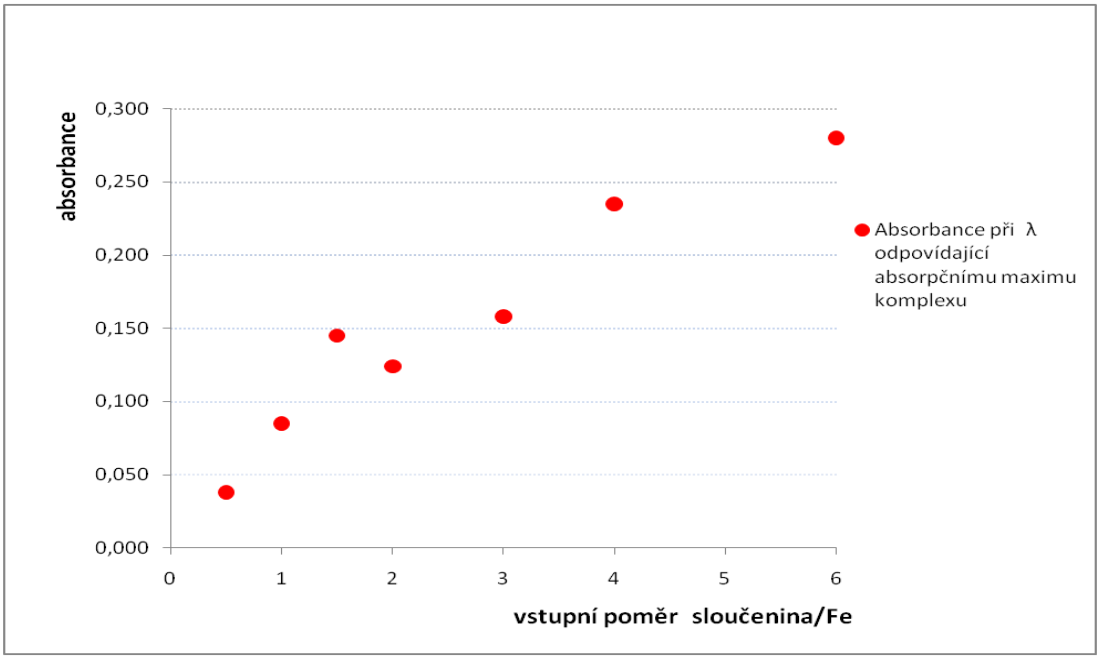
Obr. 42 Absorpční spektrum kvercetinu (žlutá, fialová, světle modrá křivka – různé koncentrace kvercetinu) a jeho komplexu s železnatými ionty při pH 5.5 (ostatní barvy). V experimentu byly použity stabilní koncentrace železnatých iontů a variabilní koncentrace kvercetinu. Grafické znárodnění absorpce v maximu kvercetinu (370 nm) a jeho komplexu (434,5 nm) je zobrazeno v obr. 43.



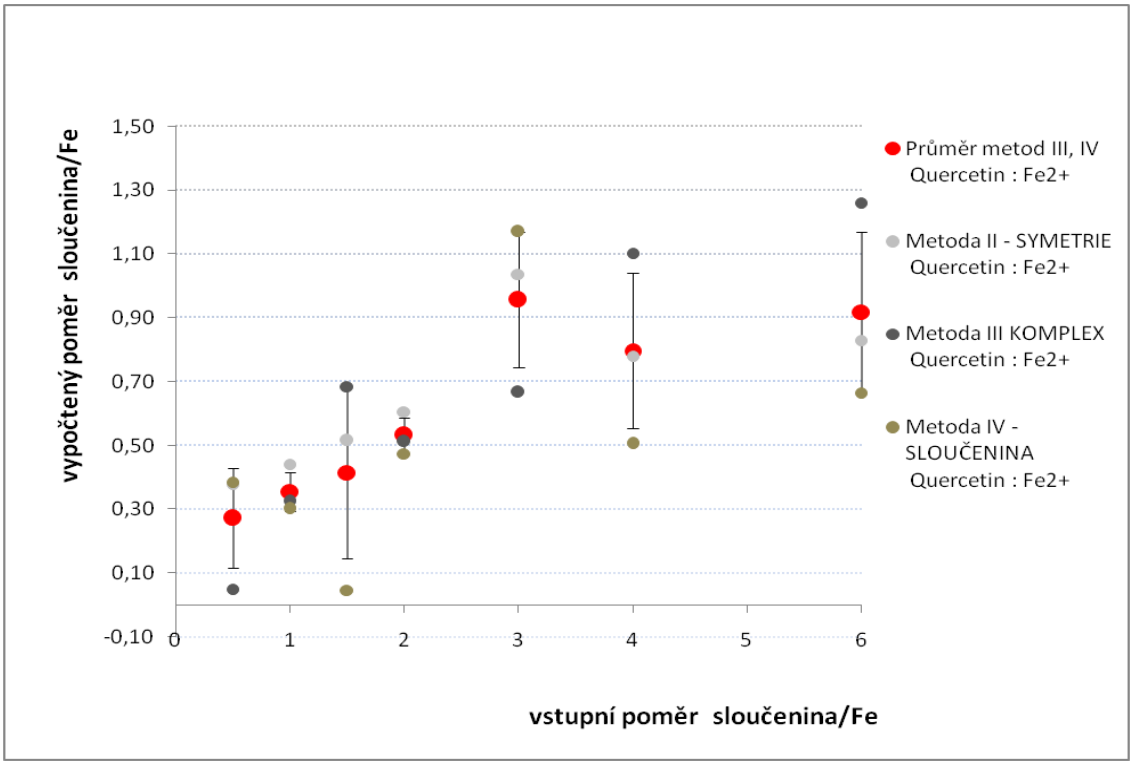
Obr. 43 Vztah absorbance kvercetinu a jeho komplexu s železnatými ionty při pH 5.5 v maximu absorpce kvercetinu (šedá křivka) a jeho komplexu s železnatými ionty (černá křivka). Vzhledem k vysokému koeficientu R^2 jsou obě závislosti jednoznačně lineárního charakteru.



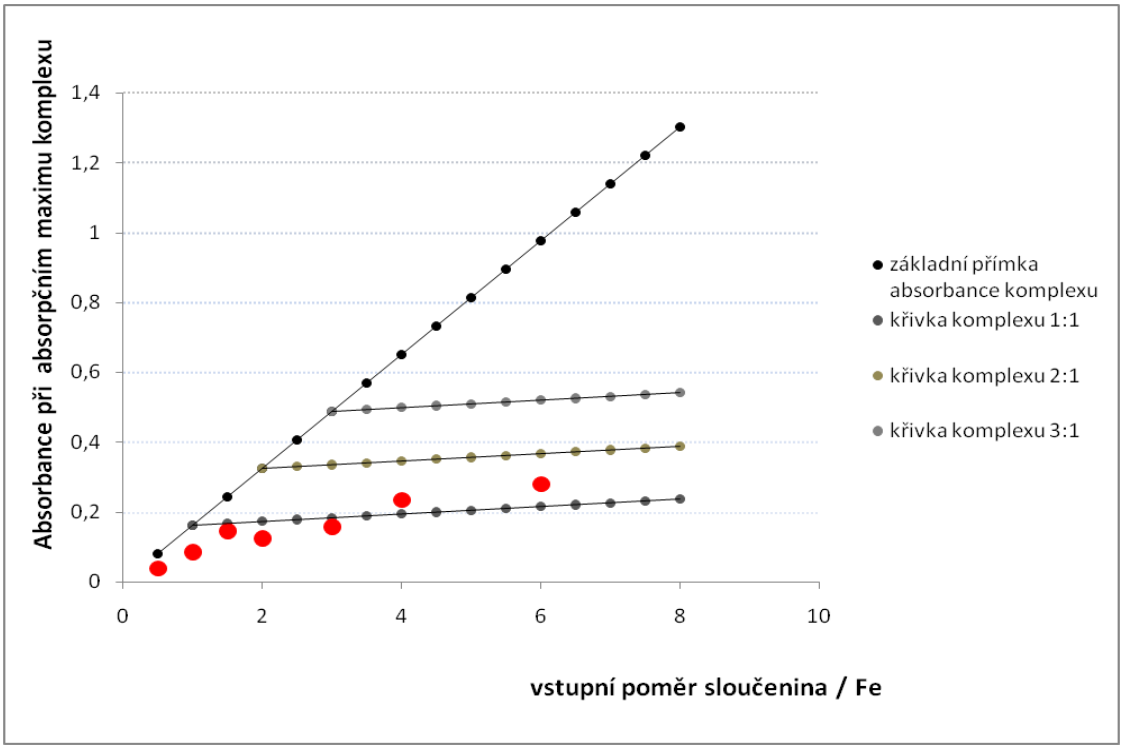
Obr. 44 Absorpční spektrum kvercetinu s železnatými ionty při pH 5.5. Pro porovnání jsou znázorněny i absorpční křivky tří koncentrací čistého kvercetinu (červená, zelená, světle modrá). Ostatní křivky znázorňují komplex s železnatými ionty v různém vstupním poměru kvercetin/Fe^{2+}.



Obr. 45 Vyhodnocení spektra z Obr. 44 pomocí metody I. Graf znázorňuje vztah vstupního poměru kvercetin/železo a absorbance v maximu komplexu. Z grafu nelze určit, jaký je poměr kvercetinu a železa v komplexu.



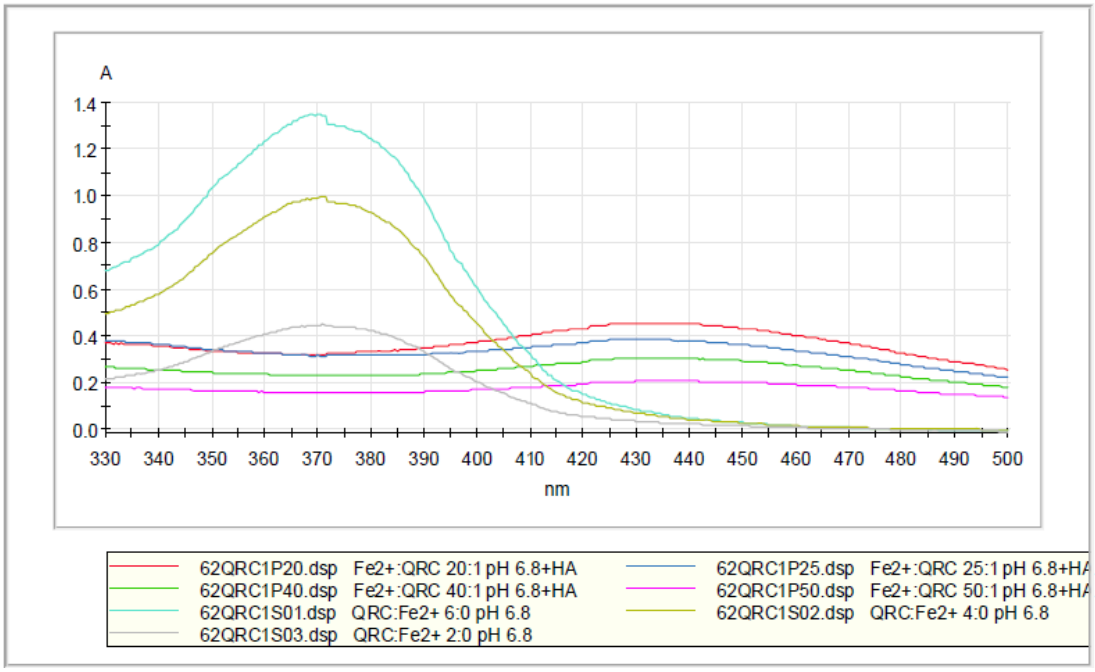
Obr. 46 Vyhodnocení spektra z Obr. 44 pomocí metod II-IV, respektive jejich průměru. Po vypočtení koncentrace nezreagovaného kvercetinu podle v metodologii uvedených vzorců byl určen finální poměr pomocí metody symetrie píků (II), metody maxima absorbance testované látky (III) a maxima absorbance komplexu (IV). Vzhledem k závislosti metod III a IV byl zobrazen i jejich průměr. Finální poměr nelze s jistotou určit, pravděpodobně 1:1.



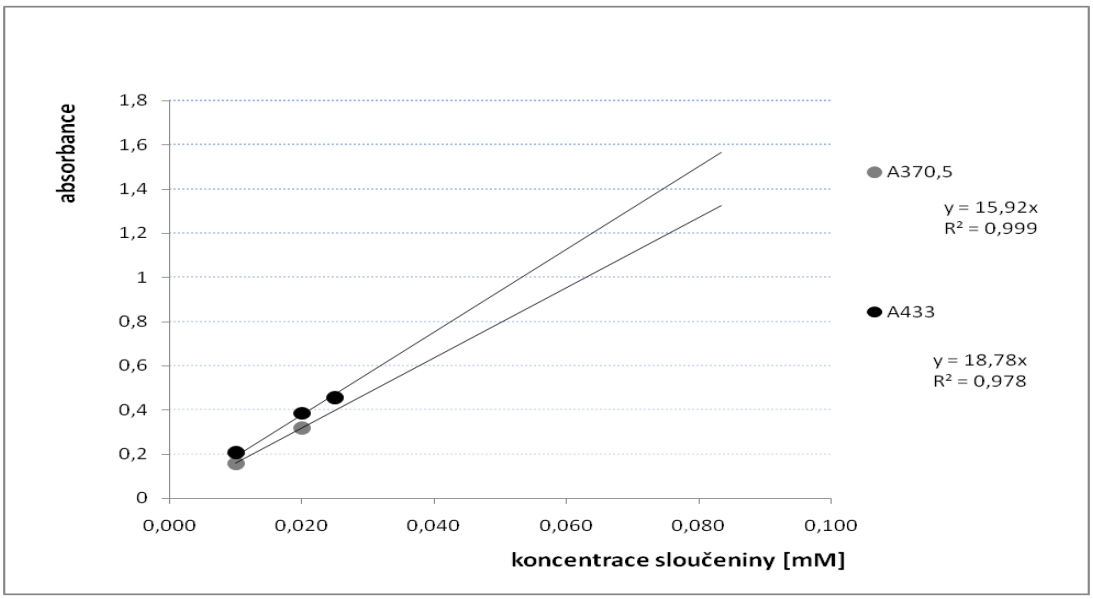
Obr. 47 Vyhodnocení spektra z Obr. 44 pomocí průměru metody V. Pomocí molárních absorpčních koeficientů kvercetinu a komplexu byly připraveny teoretické přímky pro komplexy se stechiometrií 1:1, 2:1 a 3:1. Naměřené koncentrace zapadají do stechiometrie 1:1 kvercetin:železnaté ionty.

Obr. 48-53 zachycují kvercetin a jeho komplex s železnatými ionty při pH 6.8. Z obrázku 49 lze určit molární absorpční koeficient $\varepsilon_{K370,5}$ nebo pro zjednodušení konstantu absorpce ($k_{K370,5}$).

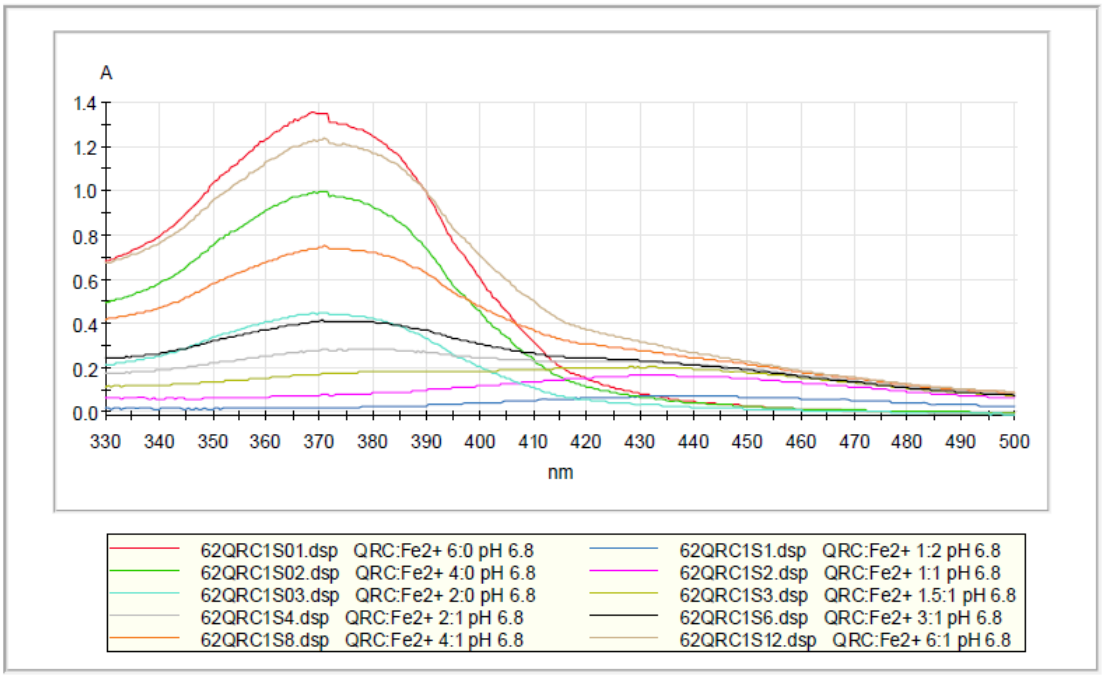
$k_{K370,5}$ = 15,92 $l.mmol^{-1}$



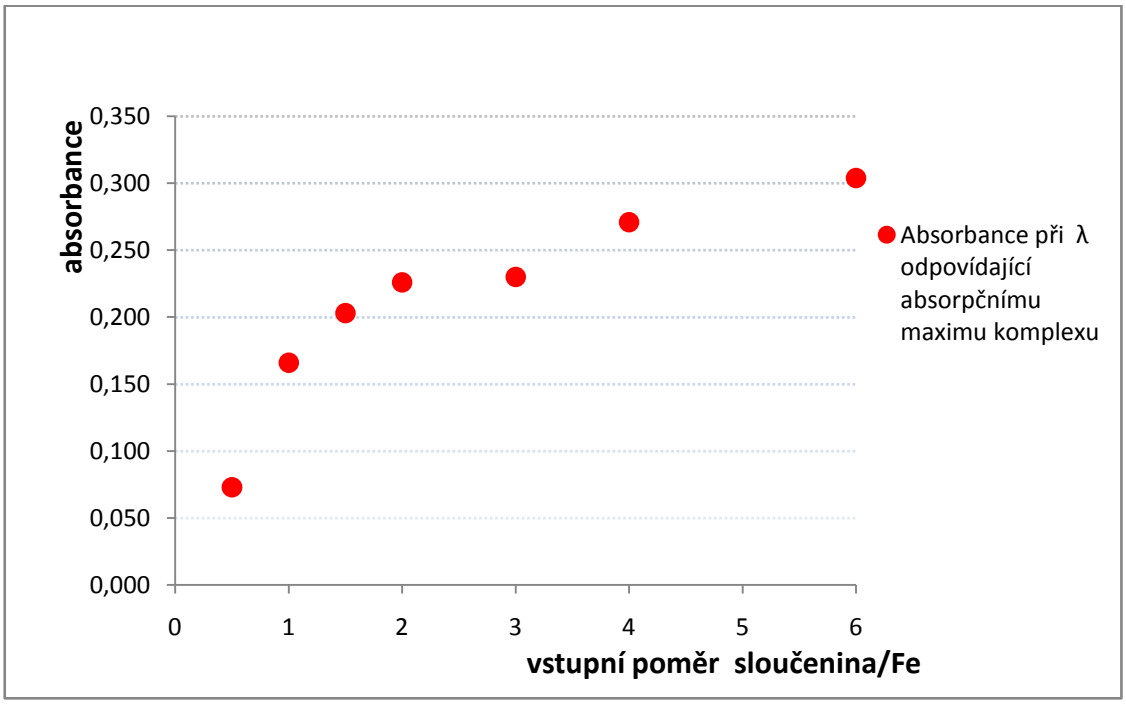
Obr. 48 Absorpční spektrum kvercetinu (světle modrá, žlutá, šedá křivka – různé koncentrace kvercetinu) a jeho komplexu s železnatými ionty při pH 6,8 (ostatní barvy). V experimentu byly použity stabilní koncentrace železnatých iontů a variabilní koncentrace kvercetinu. Grafické znárodnění absorpce v maximu kvercetinu (370,5 nm) a jeho komplexu (433 nm) je zobrazeno v obr. 49.



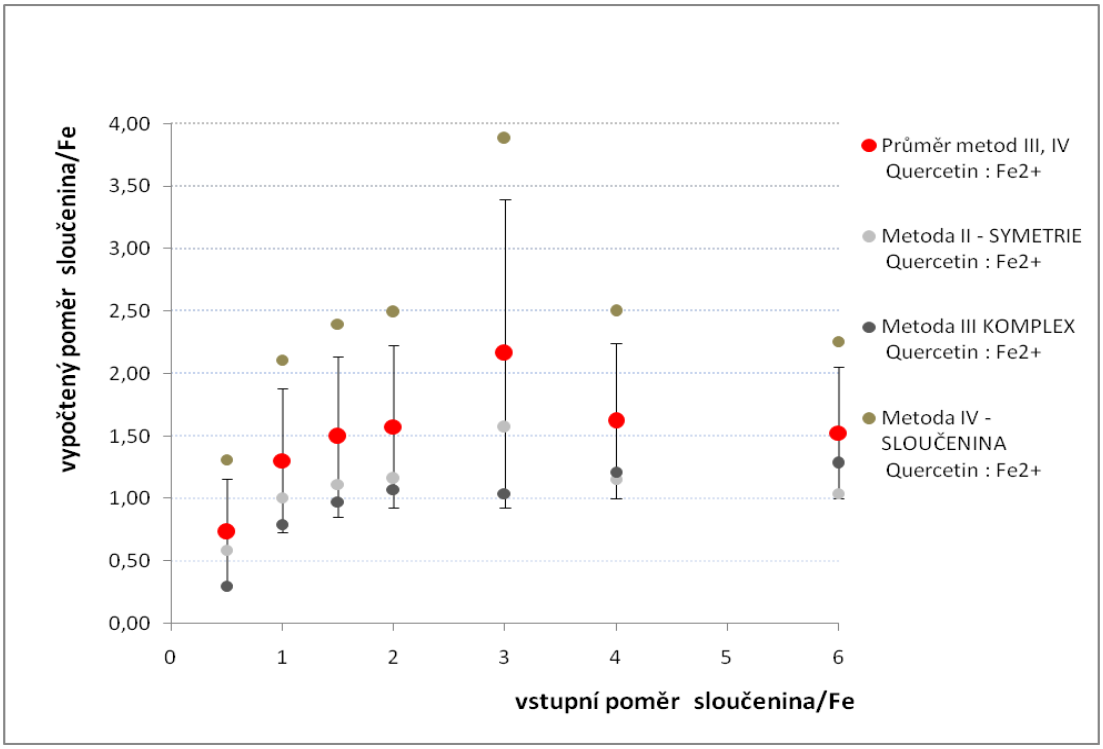
Obr. 49 Vztah absorbance kvercetinu a jeho komplexu s železnatými ionty při pH 6,8 v maximu absorpce kvercetinu (šedá křivka) a jeho komplexu s železnatými ionty (černá křivka). Vzhledem k vysokému koeficientu R^2 jsou obě závislosti jednoznačně lineárního charakteru.



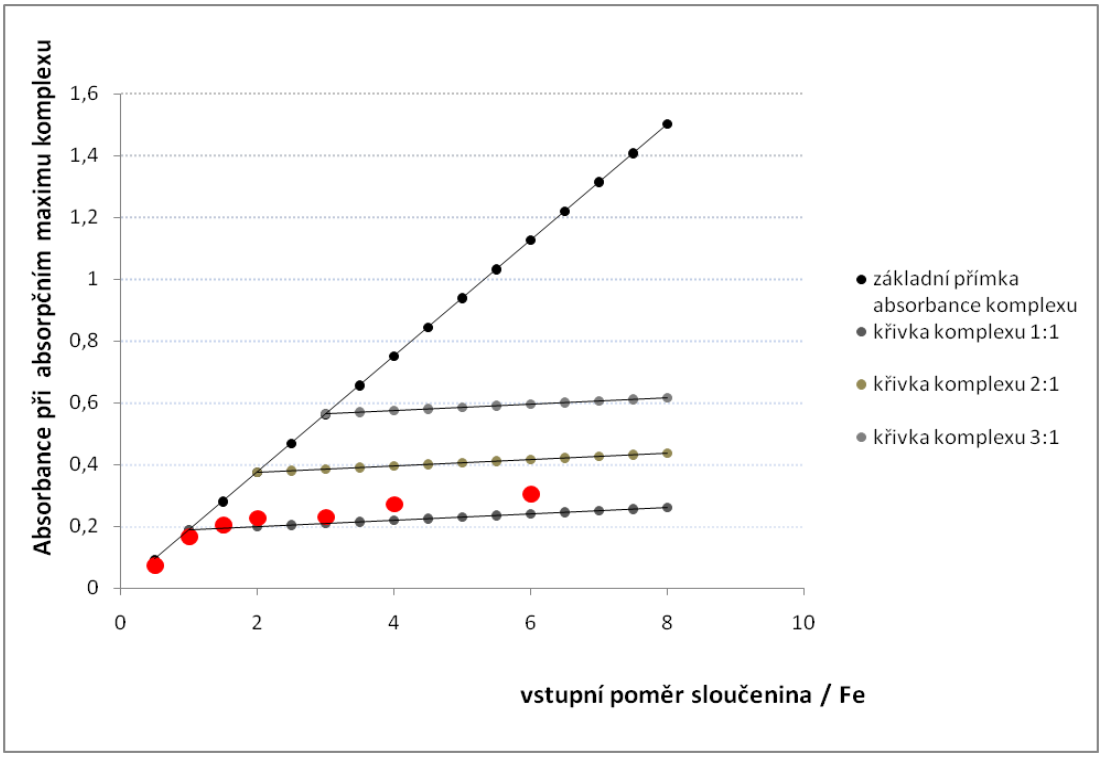
Obr. 50 Absorpční spektrum kvercetinu s železnatými ionty při pH 6,8. Pro porovnání jsou znázorněny i absorpční křivky tří koncentrací čistého kvercetinu (červená, zelená, světle modrá). Ostatní křivky znázorňují komplex s železnatými ionty v různém vstupním poměru kvercetin/Fe^{2+}.



Obr. 51 Vyhodnocení spektra z Obr. 50 pomocí metody I. Graf znázorňuje vztah vstupního poměru kvercetin/železo a absorbance v maximu komplexu. Z grafu nelze určit, jaký je poměr kvercetinu a železa v komplexu.



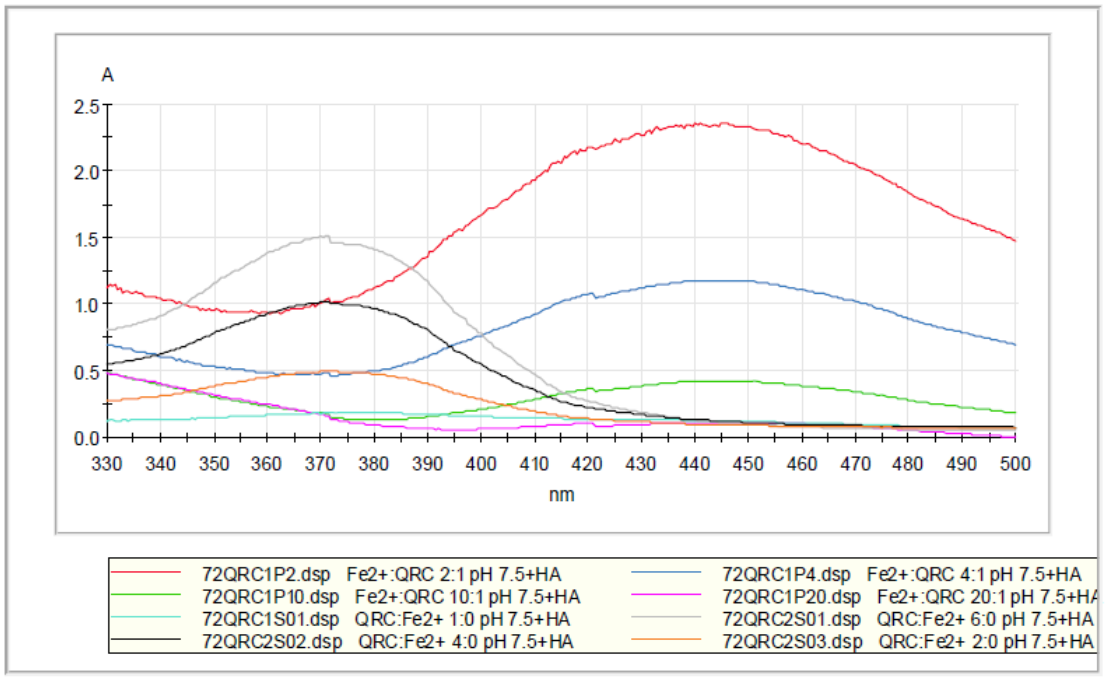
Obr. 52 Vyhodnocení spektra z Obr. 50 pomocí metod II-IV, respektive jejich průměru. Po vypočtení koncentrace nezreagovaného kvercetinu podle v metodologii uvedených vzorců byl určen finální poměr pomocí metody symetrie píků (II), metody maxima absorbance testované látky (III) a maxima absorbance komplexu (IV). Vzhledem k závislosti metod III a IV byl zobrazen i jejich průměr. Finální poměr lze pravděpodobně určit z metody II na 1:1, u průměru metod III a IV je výsledek nejednoznačný.



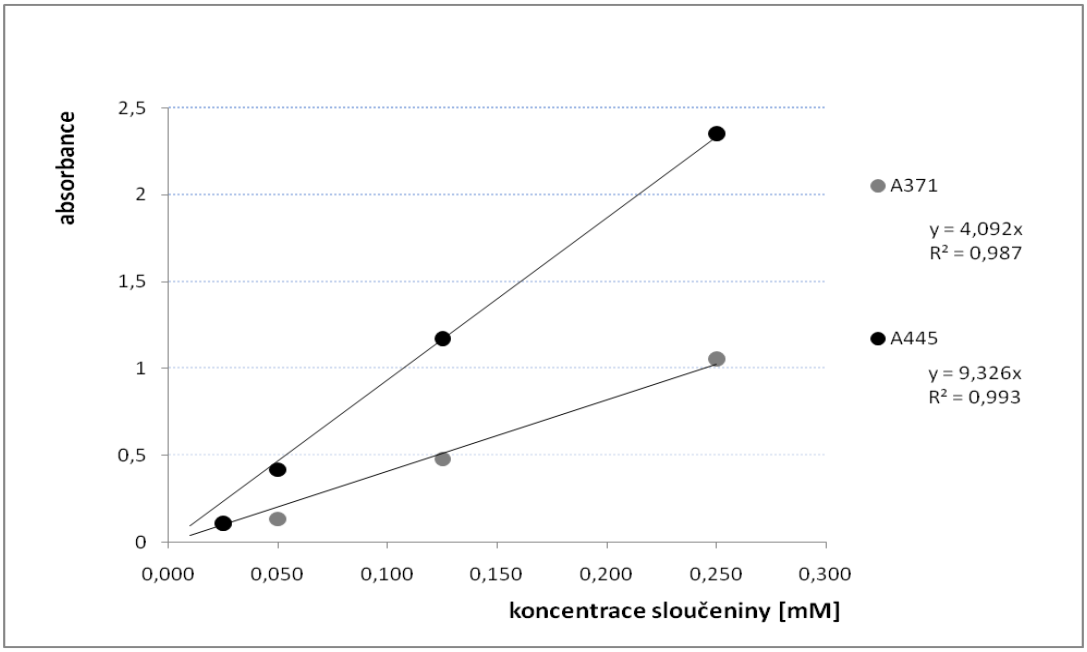
Obr. 53 Vyhodnocení spektra z Obr. 50 pomocí průměru metody V. Pomocí molárních absorpčních koeficientů kvercetinu a komplexu byly připraveny teoretické přímky pro komplexy se stechiometrií 1:1, 2:1 a 3:1. Naměřené koncentrace zapadají do stechiometrie 1:1 kvercetin:železnaté ionty.

Posledním příkladem této sloučeniny je jeho komplex s železnatými ionty při pH 7.5 (Obr. 54-59). Z obrázku 5 lze určit molární absorpční koeficient ε_{K371} nebo pro zjednodušení konstantu absorpce (k_{K371}). Pro kvercetin v jeho absorpčním maximu 371 nm platí, že:

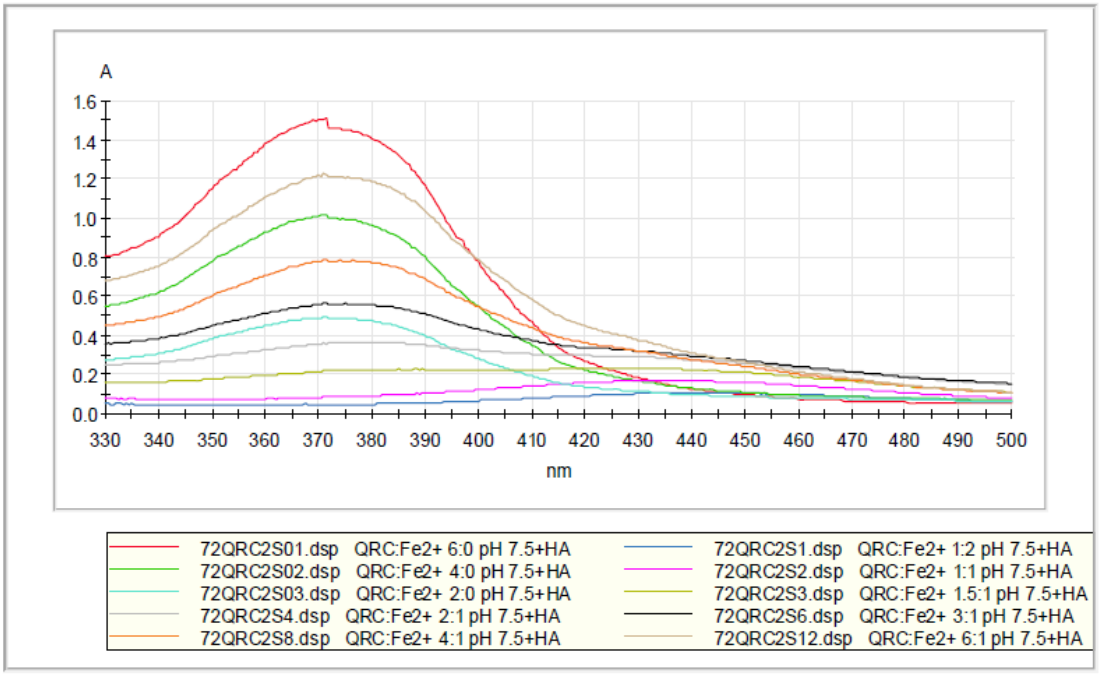
k_{K371} = 4,092 $l.mmol^{-1}$



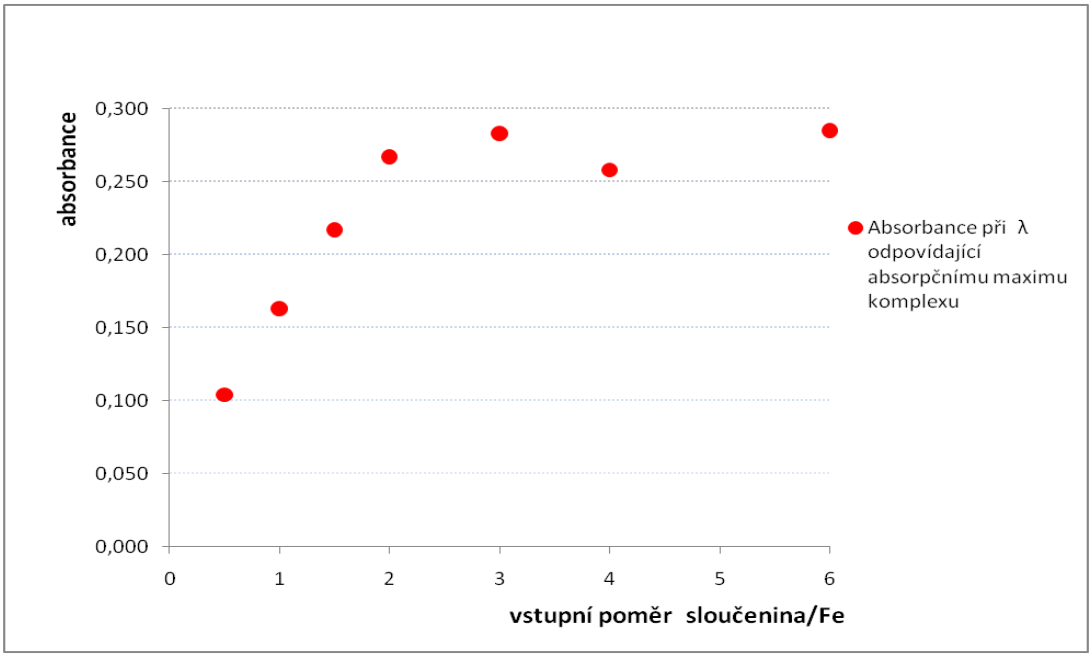
Obr. 54 Absorpční spektrum kvercetinu (světle modrá, oranžová, šedá, černá křivka – různé koncentrace kvercetinu) a jeho komplexu s železnatými ionty při pH 7.5 (ostatní barvy). V experimentu byly použity stabilní koncentrace železnatých iontů a variabilní koncentrace kvercetinu. Grafické znárodnění absorpce v maximu kvercetinu (371 nm) a jeho komplexu (445 nm) je zobrazeno v obr. 55.



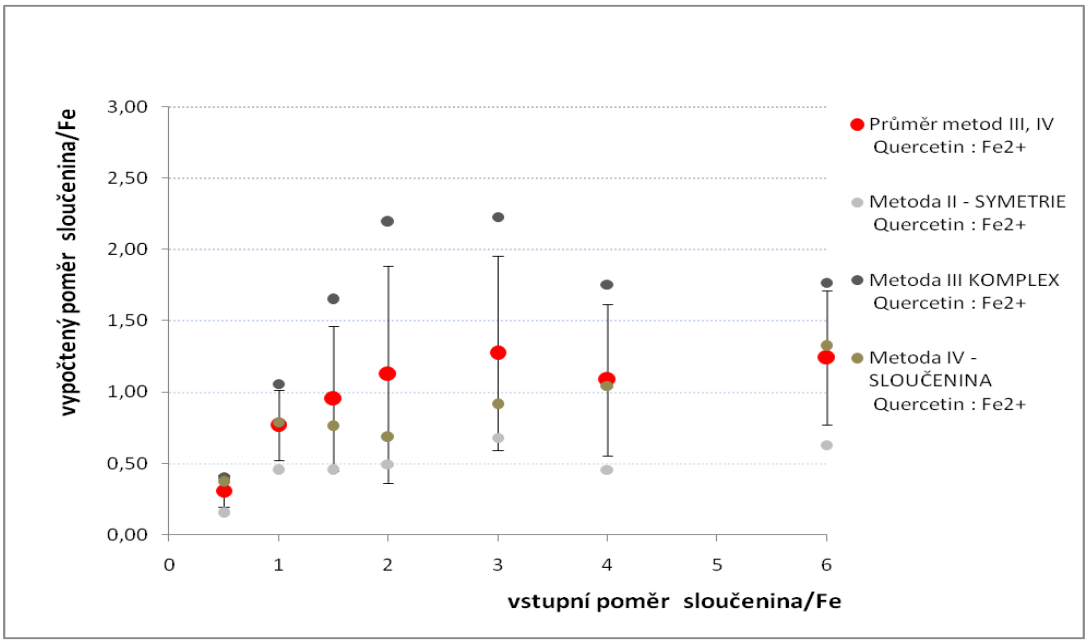
Obr. 55 Vztah absorbance kvercetinu a jeho komplexu s železnatými ionty při pH 7.5 v maximu absorpce kvercetinu (šedá křivka) a jeho komplexu s železnatými ionty (černá křivka). Vzhledem k vysokému koeficientu R^2 jsou obě závislosti jednoznačně lineárního charakteru.



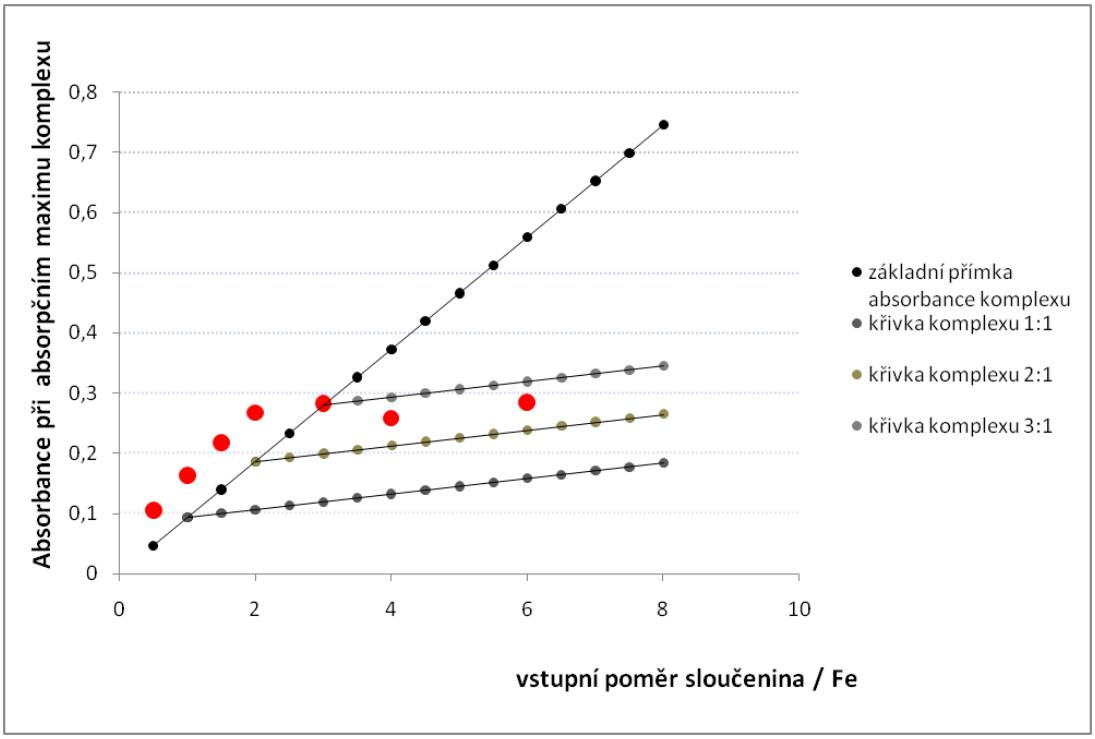
Obr. 56 Absorpční spektrum kvercetinu s železnatými ionty při pH 7.5. Pro porovnání jsou znázorněny i absorpční křivky tří koncentrací čistého kvercetinu (červená, zelená, světle modrá). Ostatní křivky znázorňují komplex s železnatými ionty v různém vstupním poměru kvercetin/Fe^{2+}.



Obr. 57 Vyhodnocení spektra z Obr. 56 pomocí metody I. Graf znázorňuje vztah vstupního poměru kvercetin/železo a absorbance v maximu komplexu. Graf naznačuje poměr 2:1.

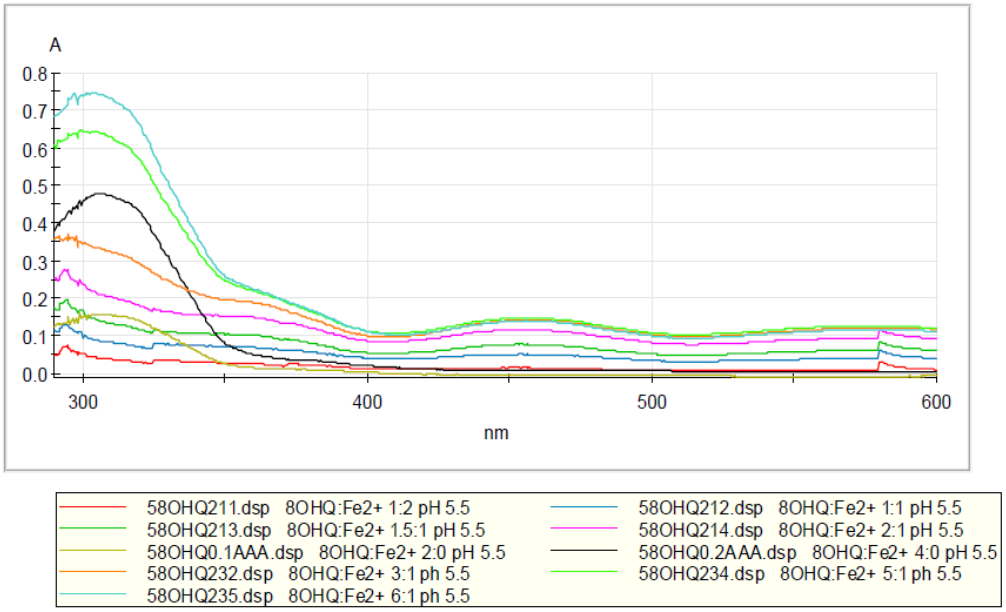


Obr. 58 Vyhodnocení spektra z Obr. 56 pomocí metod II-IV, respektive jejich průměru. Po vypočtení koncentrace nezreagovaného kvercetinu podle v metodologii uvedených vzorců byl určen finální poměr pomocí metody symetrie píků (II), metody maxima absorbance testované látky (III) a maxima absorbance komplexu (IV). Vzhledem k závislosti metod III a IV byl zobrazen i jejich průměr. Metoda II ukazuje jednoznačně na komplex 1:1, průměr metod III a IV je nezřetelný,

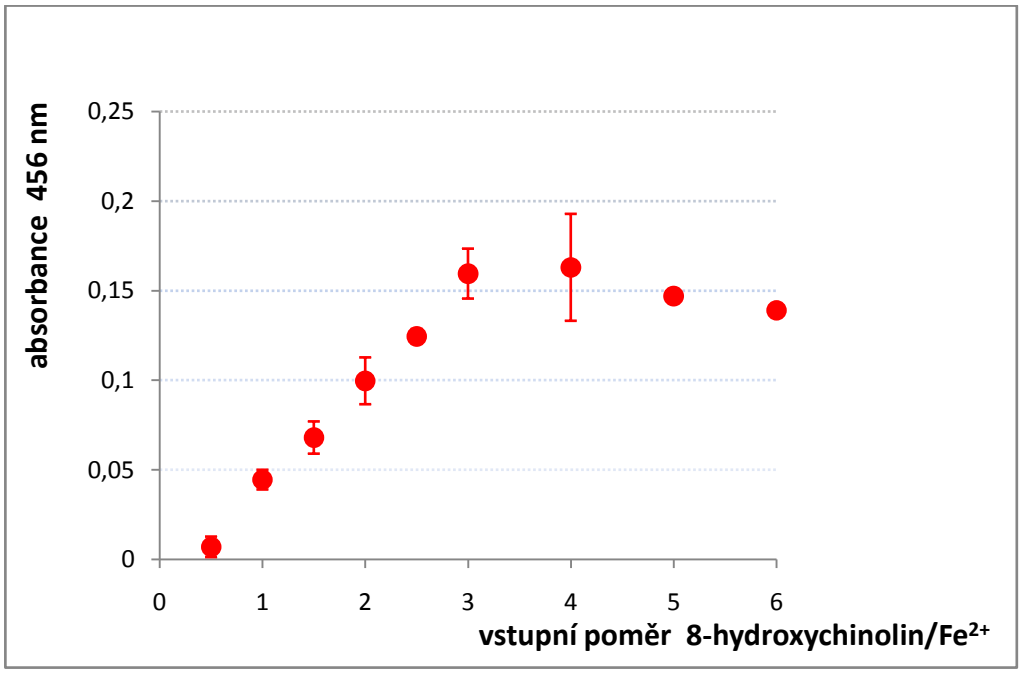


Obr. 59 Vyhodnocení spektra z Obr. 56 pomocí průměru metody V. Pomocí molárních absorpčních koeficientů kvercetinu a komplexu byly připraveny teoretické přímky pro komplexy se stechiometrií 1:1, 2:1 a 3:1. Pomocí této metody při tomto pH nelze přesně určit poměr kvercetin:železnaté ionty. Ani základní křivka neodpovídá přímce koncentrace kvercetinu, je tedy pravděpodobné, že absorpční konstanty nebyly správně určeny.

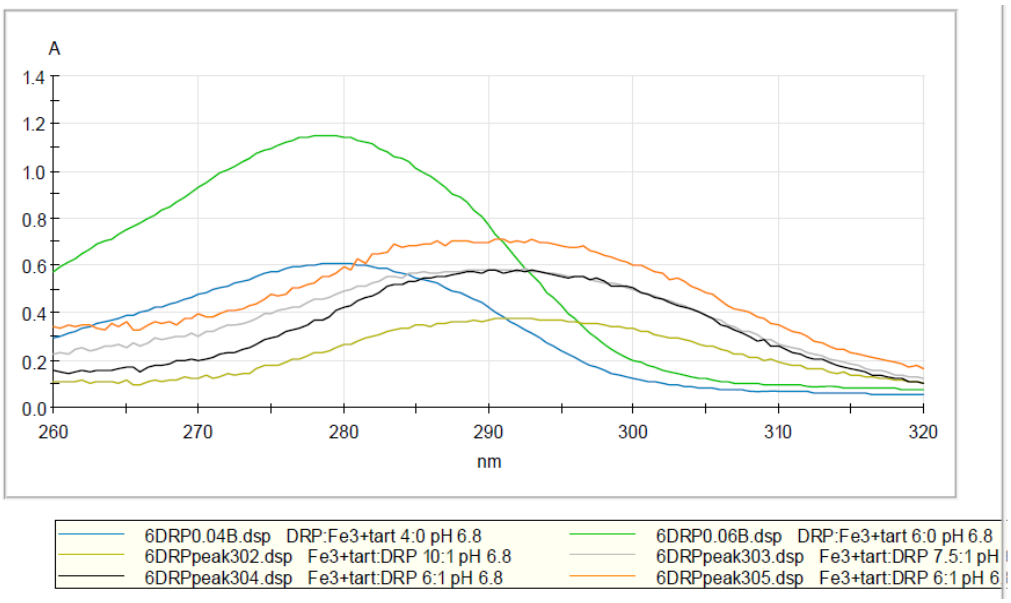
Jako další modelové látky byly vybrány standardně používaný p.o. chelátor železa deferipron a experimentální chelátor 8-hydroxychinolin a provedena u nich chelatace při různých pH s železnatými i železitými ionty. Tyto příklady byly vybrány úmyslně jako látky, u kterých jsou rozdíly mezi absorpčním spektrem testované látky velké (8-hydroxychinolin) nebo naopak velmi malé (deferipron). Jako vzorový příklad byla vybrána chelatace železnatých iontů 8-hydroxychinolinem při pH 5.5 (Obr. 60) a železitých při pH 6.8 deferipronem (Obr. 62). U 8-hydroxychinolinu jde již z naměřeného spektra a odpovídající absorbance v maximu komplexu (obr. 61) jednoznačně určit stechiometrii komplexu, další metody nebyly prováděny. Naopak u deferipronu nelze vůbec z absorbance při maximu absorpce komplexu určit stechiometrii komplexu (Obr. 63).



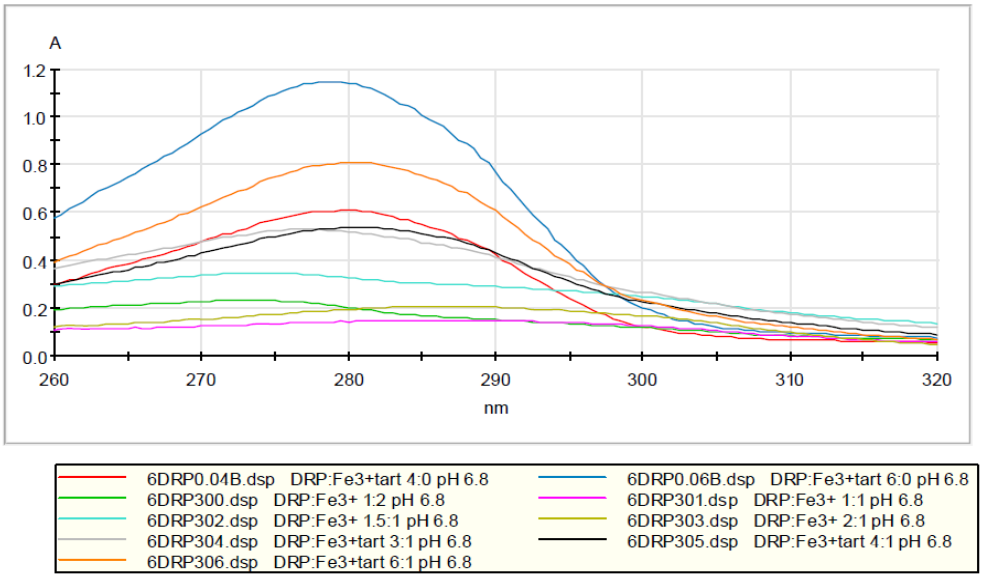
Obr. 60 Absorpční spektrum 8-hydroxychinolinu v kombinaci s železnatými ionty při pH 5.5. Ze spektra je dobře patrné, že při poměrech 3:1, 4:1 a 6:1 jsou již změny v absorpčním maximu komplexu (tj. 456 nm) minimální, což je dobře vidět i na následujícím obr. 61.



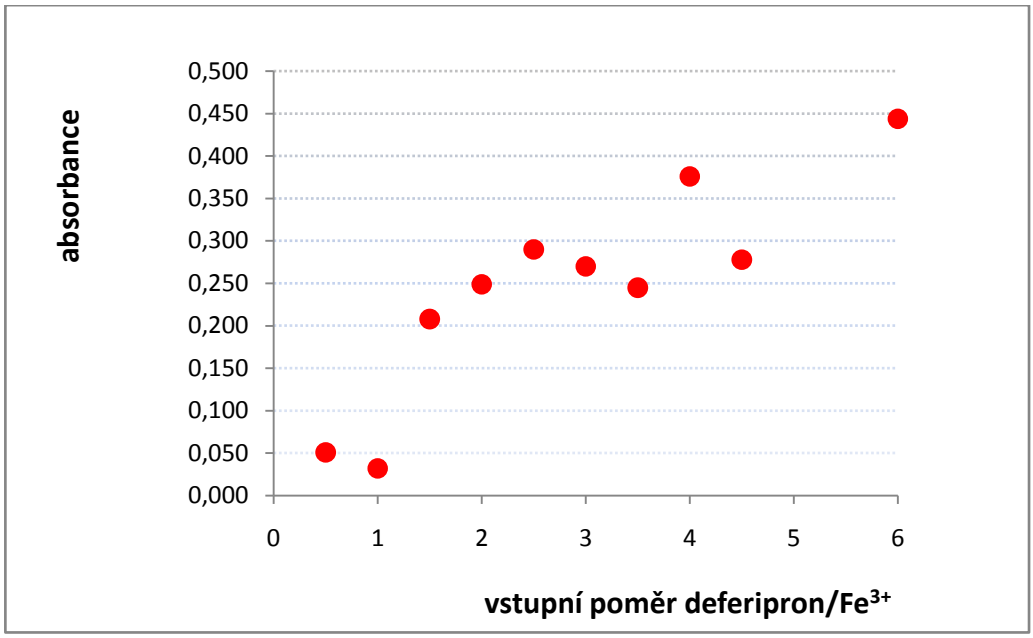
Obr. 61 Vyhodnocení spektra z Obr. 60 pomocí metody I. Graf znázorňuje vztah vstupního poměru 8-hydroxychinolin/železo a absorbance v maximu komplexu (456 nm). Jde o průměr dvou měření. Z grafu jednoznačně vyplývá komplex se stechiometrií 3:1.



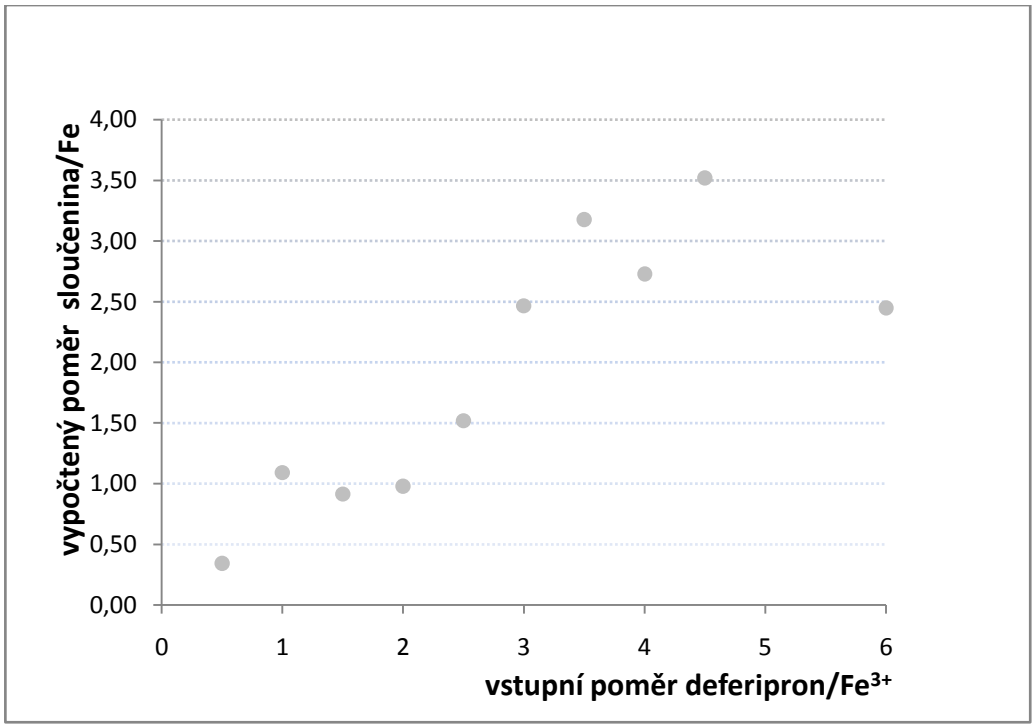
Obr. 62 Absorpční spektrum deferipronu (zelená a modrá křivka) a jeho komplexu s železitými ionty při pH 6.8 (ostatní barvy, stabilní koncentrace železitých iontů a variabilní koncentrace deferipronu). Absorpce v maximu kvercetinu odpovídá vlnové délce 279,5 nm, absorpce v maximu komplexu 292 nm.



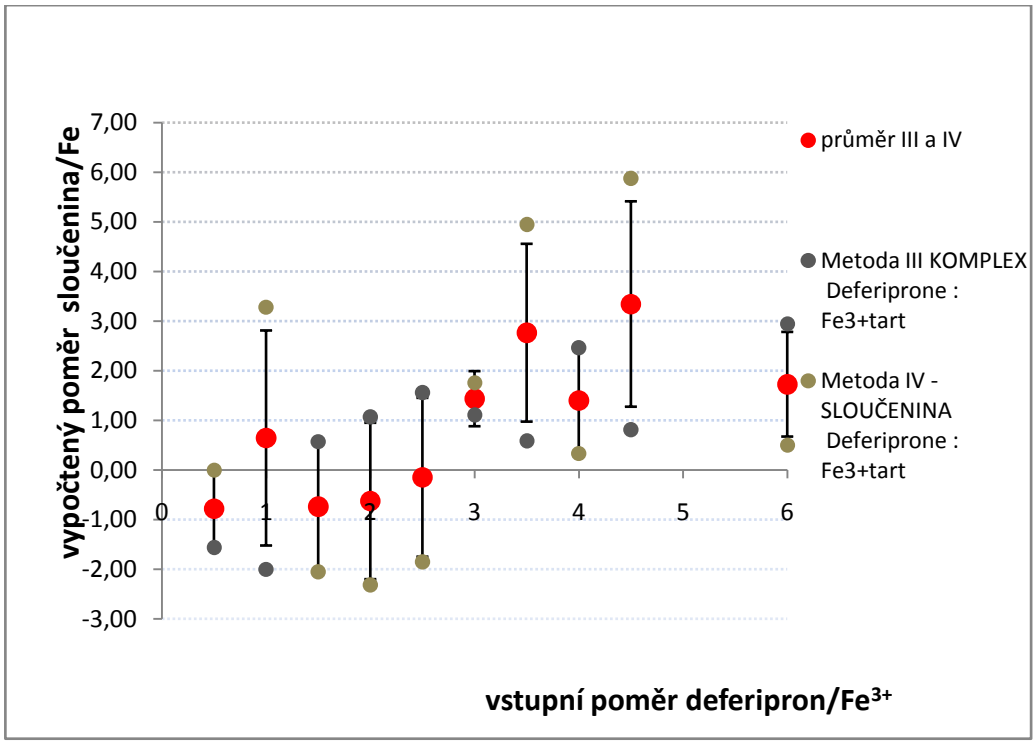
Obr. 63 Absorpční spektrum různých koncentrací deferipronu při stabilní koncentraci železitých iontů při pH 6.8. Ze spektra je na rozdíl od předchozích případů (Obr. 60) nemožné zjistit přímo stechiometrii komplexu. Proto bylo poté spektrum vyhodnoceno podle výše popsané metodiky všemi 5 postupy (Obr. 64-67).



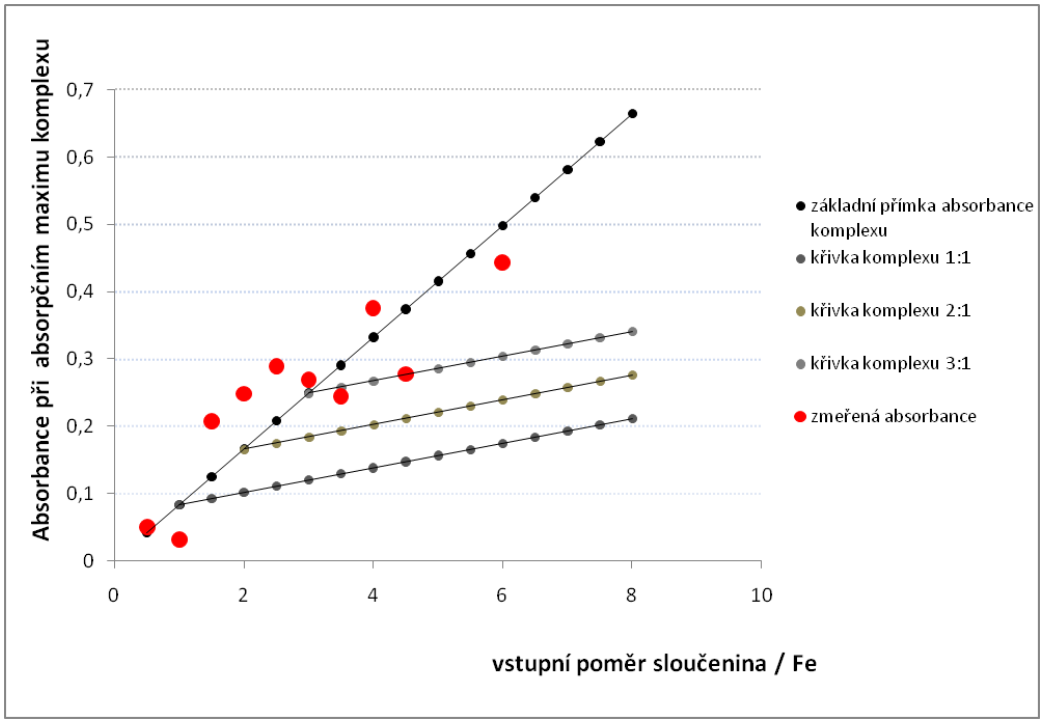
Obr. 64 Vyhodnocení spektra z Obr. 63 pomocí metody I. Graf znázorňuje vztah vstupního poměru deferipron/železo a absorbance v maximu komplexu (292 nm). Z grafu nelze vůbec určit stechiometrii komplexu.



Obr. 65 Vyhodnocení spektra z Obr. 63 pomocí metody II. Z grafu je částečně patrné, že při poměru 3:1 už poměr dále nestoupá a osciluje kolem vypočtené hodnoty (osy) 3 ukazující na poměr 3:1.



Obr. 66 Vyhodnocení spektra z Obr. 63 pomocí metod III-IV, respektive jejich průměru. Po vypočtení koncentrace nezreagovaného deferipronu podle v metodologii uvedených vzorců byl určen finální poměr pomocí metody maxima absorbance testované látky (III) a maxima absorbance komplexu (IV). Vzhledem k závislosti metod III a IV byl zobrazen i jejich průměr. Z grafu nelze s jistotou určit stechiometrii komplexu.



Obr. 67 Vyhodnocení spektra z Obr. 63 pomocí průměru metody V. Pomocí molárních absorpčních koeficientů deferipronu a komplexu byly připraveny teoretické přímky pro komplexy se stechiometrií 1:1, 2:1, 3:1. Naměřené koncentrace nejvíce zapadají do stechiometrie 3:1, ale výsledek je nejednoznačný.

Shrnutí testovaných příkladů je uvedeno v tabulce 9.

Testovaná látka	**Fe^{2+} / Fe^{3+} ionty**	**pH**	**Poměr z metody I**	**Rozdíl mezi absorpčním maximem testované látky a jeho komplexu v nm**	**Poměr z metody II**	**Poměr z metod III a IV**	**Poměr z metod y V**
kvercetin	2+	5.5	??	64,5	1:1 ?	1:1 ?	1:1
kvercetin	2+	6.8	??	62,5	1:1	1:1 ?	1:1
kvercetin	2+	7.5	2:1 ?	74	1:1	1:1 ?	??
kvercetin	3+	4.5	??	66	1:1	1:1 ?	1:1
kvercetin	3+	5.5	??	66,5	1:1 ?	1:1 ?	1:1
kvercetin	3+	6.8	??	66,5	1:1	1:1	1:1
kvercetin	3+	7.5	??	66,5	1:1	1:1	1:1
deferipron	3+	6.8	??	12,5	3:1	??	3:1 ?
8-hydroxychinolin	2+	5.5	3:1	149	N	N	N

?? - nelze určit, ? - není jednoznačné, N - neměřeno

Tabulka 9 Porovnání vhodnosti jednotlivých metodik k odhadnutí stechiometrie komplexu.

3.4. Diskuze

Chelátory železa jsou molekuly obsahující atomy kyslíku, dusíku nebo síry, které vytvářejí komplexy s ionty těžkých kovů, a tím eliminují jejich toxicitu. Mohou být vyvinuty s vyšší afinitou pro Fe^{2+} nebo Fe^{3+}. S trojmocnými ionty vznikají většinou pevnější komplexy (35). Mezi chelátory železa řadíme celou řadu látek a to nejen syntetických. Patří k nim i flavonoidy a je pravděpodobné, že některé jejich pozitivní účinky jsou spojeny s jejich kov chelatujícím účinkem (36).

Existuje celá řada postupů ke stanovení chelatační účinnosti. Pro stanovení chelatace železnatých iontů se dá úspěšně použít ferrozinová metoda (33-34). Tato metodika ale není použitelná pro přímé stanovení chelatace železitých iontů. Ta se dá stanovit mj. přímou spektrofotometrií. Ferrozinovou metodou nelze také přesně určit stechiometrický poměr v komplexu, na který je tato diplomová práce také zaměřena.

Z výsledků vyplývá (Tab. 9), že u většiny látek, u kterých je rozdíl mezi absorpčním maximem čisté látky a jeho komplexu s železem malý (např. kvercetin: 62,5-74 nm, deferipron 12,5 nm), je nutné použít raději více metod pro zjištění přesné stechiometrie. Jako nejpřesnější se jeví metody II a V. Výsledky pomocí těchto metod jsou většinou jednoznačné. Metody III a IV jsou méně přesné. Ve většině případů se konečný poměr nedal přesně určit. Je možné, že absorpce komplexu nebyla přesně stanovena.

Při vysokém rozdílu vlnových délek (např. 8-hydroxychinolinol) stačí ke zjištění výsledného poměru nejjednodušší metoda I, kdy se pouze sleduje absorbance v maximu komplexu a není nutné stanovovat konstanty absorpce a není nutné provádět metody další.

Naměřené výsledky odpovídají dostupným pracím zaměřeným na stanovení stechiometrického poměru komplexu. Známý chelátor deferipron tvoří podle X-paprskové krystalografie komplexy 3:1 s železem (11), což je plně v souladu s výsledky této DP. Stejně i 8-hydroxychinolin chelatuje železo v poměru 3:1. Komplex 8-hydroxychinolin:železo odpovídá publikovaným datům (22).

U flavonoidů sice existuje celá řada studií zkoumající jejich interakce s železem, ale výsledky nejsou jednotné. Velkou roli zde hraje kromě zvoleného pH, i typ rozpouštědla a metodika. Nejsofistikovanější metodika (elektrosprejová ionizační hmotnostní spektrometrie (ESI-MS)) poskytla přímý důkaz vzniku komplexů různých stechiometrií, mezi nimiž poměry 1:1 a 1:2 (kov:kvercetin) byly považovány za více pravděpodobné

(38-39). V naší studii byl za testovaných podmínek stechiometrický poměr s výjimkou pH 4.5 u železnatých iontů 1:1.

V molekule kvercetinu existuje více chelatačních míst, tj. 3-hydroxyl-4-karbonylová skupina, 4-karbonyl-5-hydroxylová skupina a také 3'-4 'hydroxylová (pokud existuje) skupina (37), proto je možné, že se může tvořit komplex složitější struktury s výslednou stechiometrií 1:1. To může souviset i s energetickou stabilitou komplexu. Komplex dvou molekul kvercetinu s jedním železem je energeticky stabilnější než komplexy s jednou nebo třemi molekulami kvercetinu, ale pouze v případě třech molekul kvercetinu jsou všechny orbitaly atomu železa nasycené vytvořením kovalentních vazeb. Vytvoří se šest ortogonálních Fe-O vazeb (37).). Je tedy možné, že ve výsledném komplexu se stechiometrií 1:1 jsou všechny orbitaly atomu(ů) železa využity na vazbu s více než jednou funkční skupinou. Tuto hypotézu bude ale nutno ještě ověřit jinými metodikami.

3.5. Závěr

Cílem této diplomové práce byla snaha o vytvoření a standardizaci screeningové metodiky ke stanovení schopnosti různých látek chelatovat železnaté a železité ionty pomocí spektrofotometrie. Současně v případě pozitivity, tj. schopnosti látky chelatovat železo, měla umožnit stanovení stechiometrického poměru komplexu.

Byly vyvinuty 4 nové modifikované *in vitro* metody pro stanovení stechiometrických poměrů v komplexu železo-chelátor při různých pH (4,5, 5,5, 6,8 a 7,5) přímou UV-VIS spektrofotometrií. Základním principem těchto metod je rozdíl v absorbanci měřené látky a jejího komplexu s železem. Nejjednodušší měření založené na odečtení absorpce v maximu komplexu je užitečné pouze v omezených případech, kdy je rozdíl mezi absorpčním maximem čisté látky a jejího komplexu velký (např. 8-hydroxychinolin). Ve většině případů (kdy rozdíl mezi absorpčním maximem čisté látky a jeho komplexu s železem je malý) je zapotřebí sofistikovanější(ch) metod(y) založené na hodnocení molárního absorpčního koeficientu testované látky a jejího komplexu. Zvláště je tento přístup nadějný pro stanovení železo-chelatační aktivity flavonoidů, kde se dostupné práce liší.

Výsledky získané v této DP byly porovnány s literaturou u známého chelátoru deferipronu a také dalšího syntetického chelátoru 8-hydroxychinolinu. Tyto výsledky odpovídají publikovaným údajům a ukazují tak správnost zvolené metodiky. U flavonoidů nelze toto porovnání plně uskutečnit vzhledem k variabilním výsledkům různých studií, kde velkou roli hraje kromě zvoleného pH, i typ rozpouštědla a metodika.

4. Seznam zkratek

DFO deferoxamin

DFP deferipron

DOX doxorubicin

DEX dexrazoxan

FDO furildioxim

8HQ 8-hydroxychinolin

HA hydroxylamin chlorid

5. Literatura

1. Muñoz M, Villar I, García-Erce JA. An update on iron fysiology. World Journal of gastroenterology 2009:15(37):4617-26.

2. Oficiální stránky České lékařské společnosti J.E.Purkyně: www.clsjep.cz

3. McCrea S, Bates N, Acute iron overdose: Clinical features and management. Emergency Nurse 1999:18-19.

4. Lincová D, Farghalii H et al. Základní a aplikovaná farmakologie. Praha: Nakladatelství Galén 2007:281-282.

5. Raja KB, Simpson RJ, Peters PJ. Investigation of a role for reduction on ferric iron uptake by mouse duodenum. Biochim Biophys Acta 1992:1135(2):141-6.

6. McKie AT, Latunde-Dada GO, Miret S et al. Molecular evidence for the role of a ferric reduktase in iron transport. Biochem Soc Trans 2002:30(4):722-4.

7. Mladenka P, Hrdina R, Hubl M, Simunek T. The fate of iron in the organism and its regulatory pathways. Acta Medica (Hradec Králové) 2005:48(3-4):127-35.

8. Donovan A, Andrews NC. The molecular regulation of iron metabolism. Hematol J 2004:5(5):373-80.

9. Andrews NC. Disorders of iron metabolism. N Engl J Med 1999:341(26): 1986-95. Erratum in: N Engl J Med 2000:342(5):364.

10. Papanikolaou G, Pantopoulos K. Iron metabolism and toxicity. Toxicology and Applied Pharmacology 2005: 202(2):199-211.

11. Tam TF, Leung-Toung R, Li W, Wang Y, Karimian K, Spino M. Iron Chelator Research: Past, Present, and Future. Curr. Med. Chem. 2003:10(12):983-95.

12. Kalinowski DS and Richardson DR. Future of toxicology--iron chelators and differing modes of action and toxicity: the changing face of iron chelation therapy. Chem Res Toxicol 2007:20(5):715-20.

13. Buss JL, Greene BT, Turner J, Torti FM, Torti SV. Iron chelators in cancer chemotherapy. Curr Top Med Chem. 2004:4(15):1623–1635.

14. Hider RC, Ma Y, Molina-Holgado† F, Gaeta A, Roy S. Iron chelation as a potential therapy for neurodegenerative disease. Biochemical Society Transactions 2008:36:1304-7.

15. Lullmann H, Mohr K, Ziegler A. Atlas farmakologie. Praha: nakladatelství Grada 1994. 292.

16. Ambrosio G, Zweier JL, Jacobus WE, Weisfeldt ML, Flaherty JT. Circulation. 1987:76(4):906-15.

17. Hider RC, Kontoghiorghes GJ, Silver J. UK Patent GB2118176 1982.

18. Piga A, Roggero S, Salussolia I, Massano D, Serra M, Longo F, Deferiprone. Ann N Y Acad Sci. 2010:1202:75-8.

19. Cappellini MD, Cohen A, Piga A, et al. A phase 3 study of deferasirox (ICL670), a once-daily oral iron chelator, in patients with beta-thalassemia. Blood. 2006:107(9):3455-62.

20. www stránky farmaceutické společnosti TEVA

http://www.tapi.com/tapiteva/productPages/Deferasirox

21. Risto S, Cvetkovi´c and Lesley J. Scott. Dexrazoxane, A Review of its Use for Cardioprotection During Anthracycline Chemotherapy. Drugs 2005:65(7):1005-1024.

22. Pierre JL, Baret P, Serratrice G. Hydroxyquinolines as Iron Chelators. Current Medicinal Chemistry 2003:10(12):1077-84.

23. Cody V. Crystal and molecular structure of flavonoids, New York, NY USA 1988.

24. Harborne JB. Nature, Distribution and function of plant flavonoids, New York, NY USA 1986.

25. Moon YJ, Wang XD, Morris ME. Dietary flavonoids: Effects on xenobiotic and carcinogen metabolism, Toxicology in vitro 2006:20:187-210.

26. Cassidy A, Hanley B, Lamuela-Raventos RM. Review: Isoflavones, lignans a stilbenes-origins, metabolism and potential importance to human health, J. Sci. Food Agric. 2000:80:1044-1062.

27. Kaul N, Siveski-Iliskovic N, Hill M, Slezak J, Singal PK. Free radicals and the heart, J. Pharmacol. Toxicol. Meth. 1993:30:55-67.

28. Mora A, Paya M Rios JL, Alcaraz MJ. Structure-activity relationships of polymethoxyflavones and other flavonoids as inhibitors of non-enzymic lipid peroxidation, Biochem. Pharmacol. 1990:40:793-797.

29. Criqui MH, Ringel BL. Does diet or alcohol explain the French paradox?, Lancet. 1994:344:1719-1723.

30. Häkkinen SH, Kärenlampi SO, Heinonen IM, Mykkänen HM, Törrönen AR. "Content of the Flavonols Quercetin, Myricetin, and Kaempferol in 25 Edible Berries". Journal of Agricultural and Food Chemistry 1999:47(6):2274–9.

31. Karlíček R, Polášek M, Pospíšilová M, Solich P. Analytická chemie pro farmaceuty. Praha: nakladatelství Karolinum 2005:219-28.

32. Rendina G. Experimental Methods in Modern Biochemistry. W. B. Saunders Company: Philadelphia, PA. 1976:46-55.

33. Stookey L. Ferrozine. A new spectrophotometric reagent for iron. Anal Chem. 1970:42(7):779 – 781.

34. Mladěnka P, Macakova K, Zatloukalova L, Rehakova Z, Singh BK, Prasad AK, Parmar VS, Jahodar L, Hrdina R, Saso L. In vitro interactions of coumarins with iron. Biochimie 2010:92:1108-1114.

35. Perez CA, Tong Y, Guo M. Iron Chelators as Potential Therapeutic Agents for Parkinson's Disease. Curr Bioact Compd. 2008:4(3):150-15.

36. Filipsky T, Mladenka P, Macakova K, Zatloukalova L, Hrdina R. Iron chelating properties of flavonoids measured by direct spectrophotometry. abstrakt ve sborníku, 8th Indoitalský kongres na biologii a chemii antioxidantů

37. Ren J, Meng S, Lekka ChE, Kaxiras E. Complexation of flavonoids with Iron: Structure and optical signatures. J. Phys. Chem. B 2008:112(6):1845-1850

38. Mira L, Fernandez MT, Sandos M, Rocha R, Florencio MH, Jennings KR. Interactions of flavonoids with iron and copper ions: A mechanism for their antioxidant aktivity. Free Radical Research, 2002:36(11):1199–1208

39. Fernandez MT, Mira L, Florencio MH, Jennings KR. Iron and copper chelation by flavonoids: an electrospray mass spectrometry study. Journal of Inorganic Biochemistry 2002:92:105–111