



**VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ**

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

**FAKULTA CHEMICKÁ**

FACULTY OF CHEMISTRY

**ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE**

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

**PŘÍPRAVA A CHARAKTERIZACE KOMPLEXŮ ŽELEZA S  
AMINOKYSELINAMI**

PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF IRON COMPLEXES WITH AMINO ACIDS

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

BACHELOR'S THESIS

**AUTOR PRÁCE**

AUTHOR

**Paula Bednárová**

**VEDOUCÍ PRÁCE**

SUPERVISOR

**Ing. Michal Kalina, Ph.D.**

**BRNO 2017**

## Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1126/2016  
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie  
Studentka: **Paula Bednárová**  
Studijní program: Chemie a chemické technologie  
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace  
Vedoucí práce: **Ing. Michal Kalina, Ph.D.**  
Akademický rok: 2016/17

### Název bakalářské práce:

Příprava a charakterizace komplexů železa s aminokyselinami

### Zadání bakalářské práce:

- 1) Připravit literární rešerši na téma tvorba komplexů aminokyselin se železem, jejich vlastnosti a využití
- 2) Na základě literární rešerše zvolit vhodné metody studia tvorby komplexů aminokyselin s železem
- 3) Vlastní laboratorní experimenty s využitím vybraných zástupců aminokyselin
- 4) Popis a diskuze vzniku komplexů
- 5) Posouzení získaných výsledků a vlastní závěry

### Termín odevzdání bakalářské práce: 26.5.2017

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí bakalářské práce.

Paula Bednárová  
student(ka)

Ing. Michal Kalina, Ph.D.  
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.  
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2017

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.  
děkan

## **Abstrakt**

Táto bakalárska práca sa zameriava na prípravu a charakterizáciu komplexov železa s aminokyselinami. Práca je v teoretickej časti sústredená na rozobratie železa ako esenciálneho prvku v organizmoch, na jeho schopnosť tvoriť komplexy a na rozmanité biologické vlastnosti týchto komplexov, ktoré môžu byť prirodzené až vedúce k rôznym poruchám ich metabolizmu. Preštudovaná literatúra v práci sa orientuje na prípravu komplexov Fe(III) s aminokyselinami. V experimentálnej časti práce sa venujeme titračným stanovenia zeta potenciálu a kritickej agregáčnej koncentrácii, ktorá bola stanovená len pri aminokyselinách L-lyzín a kyseline asparágovej. Taktiež sa venujeme zrážacím reakciám, ktoré mali malú výťažnosť vo väčšine zvolených aminokyselinách okrem cysteínu, ktorého množstvo bolo po úprave podmienok dokonca dvojnásobné. Konštatovali sme, že výsledný výťažok závisí hlavne od druhu použitej aminokyseliny, tak isto aj od použitého rozpúšťadla a aj jeho množstva využitého v syntéze.

**Kľúčové slová:** Komplex Fe(III) s aminokyselinami, zeta potenciál, veľkosť častíc, zrážacie experimenty, agregácia

## **Abstract**

This bachelor thesis focuses on the preparation and characterization of iron complexes with amino acids. The work in the theoretical part is focused on specification of iron as an essential element in living organisms, on his abilities to build complexes and on its wide range of biological attributes of these complexes, which can be natural or leading to various disorders of their metabolism. The studied literature is oriented on preparation of Fe(III) complexes with amino acids. In the experimental part of work we deal with titrational setting of zeta potential and critical aggregation concentration which were set only for amino acids L-lysine and an Aspartic acid. We also deal with coagulation reactions that had low yield in most of the selected amino acids except cystein, which doubled its amount after the modification of the conditions. We have stated that the resulting yield depends mainly on the type of used amino acid as well as on the used solvent and its amount used in synthesis.

**Keywords:** Fe(III) complex with amino acids, zeta potential, particle size, coagual experiments, aggregation

BEDNÁROVÁ, P. *Príprava a charakterizace komplexů železa s aminokyselinami*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2017. 35 s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Michal Kalina Ph.D..

## **PREHLÁSENIE**

Prehlasujem, že som bakalársku prácu vypracovala samostatne a že všetky použité literárne zdroje som správne a úplne citovala. Bakalárska práca je z hľadiska obsahu majetkom Fakulty chemickej VUT v Brne a môže byť použitá ku komerčným účelom len so súhlasom vedúceho bakalárskej práce a dekana FCH VUT.

.....  
podpis študenta

Týmto by som chcela poďakovať svojmu vedúcemu bakalárskej práce Ing. Michalovi Kalinovi, Ph.D. za odborné vedenie, pomoc, trpezlivosť a ochotu v priebehu práce.

# OBSAH

1	ÚVOD.....	6
2	TEORETICKÁ ČASŤ.....	7
2.1	Všeobecné vlastnosti železa a jeho zlúčenín.....	7
2.1.1	Zlúčeniny chloridov železa.....	8
2.1.2	Komplexné zlúčeniny železa.....	8
2.2	Funkcia železa v biosystémoch.....	9
2.2.1	Esenciálny prvok v organizmoch.....	9
2.2.2	Bioorganické zlúčeniny železa.....	10
2.3	Aminokyseliny.....	11
2.3.1	Vlastnosti aminokyselín.....	11
2.3.2	Aminokyseliny vo funkcii ligandu s centrálnym atómom železa.....	12
2.3.3	Biosyntéza a metabolické premeny vybraných aminokyselín.....	14
2.3.4	Patobiochémia.....	15
2.3.5	Možnosti využitia chelátov železo-aminokyselina.....	16
2.4	Metódy rozptylu svetla.....	17
2.4.1	Dynamický rozptyl svetla.....	17
2.4.2	Elektroforetický rozptyl svetla.....	18
3	SÚČASNÝ STAV RIEŠENEJ PROBLEMATIKY.....	22
4	EXPERIMENTÁLNA ČASŤ.....	24
4.1	Použité chemikálie.....	24
4.2	Použité meracie prístroje a pomôcky.....	24
4.3	Postupy prípravy.....	24
4.3.1	Postup prípravy roztokov.....	24
4.3.2	Postup merania na prístroji Zetasizer Nano ZS.....	24
4.3.3	Postup prípravy zrážacích reakcií.....	25
4.3.4	Termogravimetrická analýza.....	25
5	VÝSLEDKY A DISKUSIA.....	26
5.1	Meranie na prístroji Zetasizer Nano SZ.....	26
5.2	Realizácia zrážacích reakcií.....	29
5.3	Vyhodnotenie termogravimetrickej analýzy.....	29
6	Záver.....	31
7	Zoznam použitej literatúry.....	32
8	Zoznam skratiek a značiek.....	35

# 1 ÚVOD

Železo ako ho poznáme má všeobecné využitie. Väčšina z nás si ho predstaví v úlohe využitia k výrobe väčšiny základných technických prostriedkov používaných človekom. Významné sú taktiež jeho zlúčeniny anorganické, organické alebo komplexné. Železo je tiež dôležitým biogénnym prvkom v organizme, ktoré sa vyskytuje v červenom krvnom farbive hemoglobín. Výskumu vzájomného vzťahu železa s hemoglobínom bolo venovaných mnoho vedeckých publikácií. K problematike produkcie komplexov železa môže prispieť ďalšia nevyhnutná stavebná jednotka organizmu a to je aminokyselina. Môžeme o nich hovoriť ako o bioanorganických komplexoch, ktoré majú odlišnú stabilitu v závislosti od aminokyseliny a taktiež podmienok. Pri skúmaní komplexov vedci prišli na to, že vznikajú rôzne nové štruktúry, ktorými môžu obohatiť kryštalografickú databázu a využiť ich vlastnosti aj vo farmaceutickom priemysle.

Priaznivé účinky komplexov boli potvrdené pri kombinácii s aminokyselinou glycín, ktorá je využívaná pri liečbe anémie, ale tak isto ako výživový doplnok. Dokonca aj pridávanie týchto komplexov do výživy rastlín dokázalo, že vplývajú na lepšiu rast, vývin a vývoj.

Pri skúmaní ľudského organizmu boli objavené nanočastice železa v mozgu pacientov trpiacich na Parkinsonovu chorobu. Vedci hľadali príčinu vzniku a mechanizmu týchto nanočastíc, kde sú pravdepodobne zapojené aj komplexy železa s aminokyselinami. Železo je spojené s inými neurodegeneratívnymi chorobami, ako je Huntingtonova alebo Alzheimerova choroba. Alzheimerova choroba je spájaná so vzájomnou reakciou železa s neurotransmitermi. Mnohokrát ju môže vyvolať tzv. oxidatívny stres, čo má za následok aj rast rakovinových buniek.

Zistenia v mnohých vedeckých prácach naznačovali dôležitú úlohu železa v rôznych mechanizmoch v ľudskom tele, tak aj táto práca bude mať zámer skúmať a opísať interakcie železa s jednotlivými aminokyselinami.

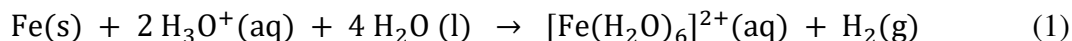
## 2 TEORETICKÁ ČASŤ

### 2.1 Všeobecné vlastnosti železa a jeho zlúčenín

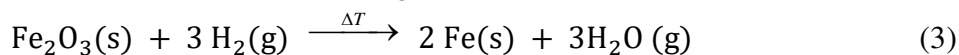
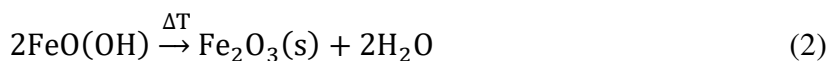
Železo je najrozšírenejší kov na Zemi. V zemskej kôre je však obsiahnutý len v podobe zlúčenín. V horninách tvoriacich zemský povrch sa železo v rýdzom stave nachádza len veľmi zriedka.

Železo má bežné oxidačné stupne II a III, ale sú známe zlúčeniny železa aj s inými oxidačnými stupňami, napr. -II v  $\text{Fe}(\text{CO})_4^{2-}$ , V  $\text{FeO}_4^{3-}$  a VI v  $\text{FeO}_4^{2-}$ . Zlúčeniny v týchto oxidačných stupňoch sú však veľmi zriedkavé. Zaraďujeme ho do 8.skupiny periodickej sústavy prvkov. Atómy železa v základnom stave majú elektrónovú konfiguráciu  $(n-1)d^6ns^2$ . Podľa elektrónovej konfigurácie patrí medzi prechodné prvky [1]. Pre relatívne vysoké hodnoty ionizačných energií a nízke hodnoty elektronegativít sa atómy železa v zlúčeninách nenachádzajú vo forme kationov, ale sú viazané zväčša kovalentnými väzbami s viac alebo menej polárnym charakterom, ktorý narastá so znižujúcim sa oxidačným číslom príslušného atómu. Atómy Fe často vystupujú ako centrálné atómy v rôznych komplexoch. Koordináčne čísla týchto atómov sú 4 a 6, sú však známe zlúčeniny s koordináčnym číslom 5, 7, 8, 10.

Železo je prvkom, ktorý má v tuhom skupenstve pri laboratórnej teplote typickú kovovú štruktúru ( $\alpha$ -Fe) kubickú priestorovo centrovanú mriežku. Vystupuje v troch alotropických modifikáciách. Železo je pomerne mäkké, ľahko sa kuje a valcuje. Chemicky je železo neušľachtilý kov, ktorý so zriedenými neoxidujúcimi kyselinami reaguje za vzniku hexaakvaželeznatých kationov a divodíka [2]

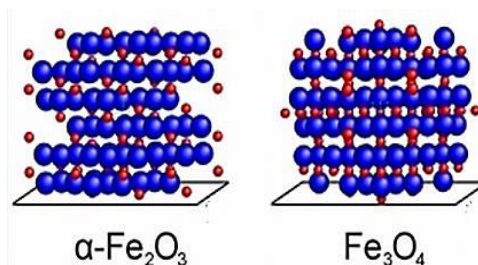


Čisté železo možno pripraviť elektrolýzou vodných roztokov železnatých solí, alebo redukciou oxidov a hydroxidov vodíkom



V prírode je veľmi rozšírené a mnoho minerálov mu vďačí za svoju farbu. Za dôležité rudy železa sa však považujú len hematit  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ , magnetit  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  a siderit  $\text{FeCO}_3$ .

Pri železe sú známe tri oxidy ideálneho zloženia  $\text{FeO}$ ,  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  a  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , ktoré v skutočnosti nie sú celkom stechiometrické. Oxid železnatý, tiež známy ako čierny prášok, je pripravený zahrievaním šľavelanu železnateho za neprítomnosti vzduchu. Oxid železitý je známy v dvoch modifikáciách. Červenohnedý  $\alpha$ - $\text{Fe}_2\text{O}_3$  má štruktúru korundu, v ktorej oxidačné ióny sú v najtesnejšom hexagonálnom usporiadaní. V druhej forme,  $\gamma$ - $\text{Fe}_2\text{O}_3$ , zaujímajú oxidačné ióny najtesnejšie kubické usporiadanie. Čierny  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  sa vyskytuje v prírode ako minerál magnetit, pripravuje sa aj v laboratóriu žiňaním oxidu železitého [3].



Obr. 1 Porovnanie štruktúry  $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$  a  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  [4]

Z binárnych zlúčenín železa a síry sú významné sulfid železnatý a disulfid železnatý. Obidva možno pripraviť priamym zlučováním síry a železa. Sulfid železnatý sa pripravuje v podobe čiernej zrazeniny zo železnatých solí zrážaným sulfidom amónnym. Je dobre rozpustný

v kyselinách. Obdobne ako oxid, aj sulfid železnatý má charakter bertolidu. Disulfid železnatý  $\text{FeS}_2$ , tzv. pyrit, je kubický, v prírode veľmi rozšírený minerál. Používa sa najmä ako východisková surovina pri príprave kyseliny sírovej. Existuje aj ortorombická modifikácia disulfidu železnateho, tzv. markazit. Pyrit a markazit tvoria žlté kryštály kovového lesku [1].

### 2.1.1 Zlúčeniny chloridov železa

Z chloridov železa sú najznámejšie chlorid železnatý a chlorid železitý, ale ako ďalší príklad sa môže uviesť aj hexahydrát chloridu železitého.

Chlorid železnatý  $\text{FeCl}_2$  je v bezvodnom stave ako pevná látka sivej farby. Z vodných roztokov kryštalizuje ako tetrahydrát  $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  v podobe zelených kryštálov. Táto zlúčenina je pomerne reaktívna, čomu nasvedčuje fakt, že stáť na vzduchu oxiduje na červenohnedý chlorid železitý. Laboratórne ho možno pripraviť reakciou železa s kyselinou chlorovodíkovou v inertnej atmosfére. Avšak alternatívnou metódou prípravy je reakcia chloridu železitého s chlórbenzénom. V organickej chémii sa využíva ako redukčné činidlo a priemyselne sa používa pri čistení odpadových vôd, kde odstraňuje toxické chrómany [2].

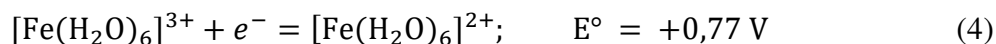
Chlorid železitý  $\text{FeCl}_3$  je svetlohnedá zlúčenina, ktorá sa pri pôsobení vlhkosti vzduchu samovoľne rozteká. Pripravuje sa priamou syntézou chlóru a železa za neprítomnosti vlhkosti a je to typická kovalentná zlúčenina, ktorá v rozmedzí teplôt 220–300°C sublimuje. Jeho pary sa skladajú z molekúl  $\text{Fe}_2\text{Cl}_6$ . Roztoky chloridu železitého sa používajú v elektrotechnike, za istých podmienok jeho kyslejšie roztoky sú schopné rozpúšťať aj kovové zlato. Taktiež sa používa pri čistení odpadových vôd alebo sa z neho vyrábajú farbivá [1].

Ďalšou zlúčeninou je hexahydrát chloridu železitého  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , ktorý je hnedožltej farby. Lahko sa rozpúšťa vo vode na roztok hnedastej farby, ktorá pochádza od hydroxoželezitých komplexov prítomných v dôsledku hydrolyzy. Pripravuje sa rozpúšťaním železa v kyseline chlorovodíkovej za súčasného pôsobenia chlóru a následnou kryštalizáciou.

### 2.1.2 Komplexné zlúčeniny železa

Najtypickejším koordinačným číslom koordinačných zlúčenín  $\text{Fe}^{\text{II}}$  je šesť pri oktaédrickom usporiadaní ligandov. Známe sú však aj tetraédrické komplexy  $\text{Fe}^{\text{II}}$ , napr. niektoré komplexy všeobecného vzorca  $\text{FeX}_4^{2-}$ . Komplexné ióny  $\text{Fe}^{\text{III}}$  sa často redukujú na analogické komplexné ióny  $\text{Fe}^{\text{II}}$ .

Môžeme uviesť aj príklady s údajmi štandardných oxidačno-redukčných potenciálov, ktoré poukazujú na závislosť oxidačno-redukčných vlastností komplexov od zloženia ich koordinačnej sféry.



Príkladom veľkej tendencie tvoriť koordinačné zlúčeniny pri  $\text{Fe}^{\text{II}}$  je vznik hexakynoželeznatanového iónu  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ . Pôsobením kyanidových iónov na roztoky železnatých solí ihneď vzniká tento komplexný anión. Konštanta nestálosti tohto aniónu poukazuje na jeho vysokú termodynamickú stabilitu.

$$K_{\text{nest}} = \frac{[\text{Fe}^{2+}][\text{CN}^-]^6}{[[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}]} = 1 \times 10^{-37} \quad (6)$$

Vysokou stabilitou tohto aniónu možno vysvetliť, prečo sa nepodarilo izolovať napr. čistý kyanid železnatý. O vysokej stabilite aniónu  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$  svedčí aj to, že v roztokoch, obsahujúcich tento anión, nemožno bežnými analytickými postupmi kvalitatívne dokázať prítomnosť ani železnateho aniónu.

Najbežnejšou látkou v laboratóriách, obsahujúcou ión  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ , je trihydrát hexakynoželeznatanu draselného  $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ , tzv. žltá krvná soľ.

Hexakynoželezatan draselný je príkladom nízkospinového oktaédrického komplexu  $\text{Fe}^{\text{II}}$ , kde sa v dôsledku silného ligandového poľa na centrálnom atóme vytvorila konfigurácia  $(t_{2g})^6$  [1].

Dôležitou podvojnou soľou je Mohrova soľ  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \cdot \text{FeSO}_4 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ , ktorá je stála voči oxidácii vzduchom, ale aj strate vody. Používa sa v odmernej analýze k príprave štandardných roztokov dvojmocného železa a jeho kalibračných látok pri magnetických meraniach [5].

Aj  $\text{Fe}^{\text{III}}$  tvorí prevažne oktaédrické komplexy a zriedkavejšie komplexy s tetraédrickou stavbou, napr.  $\text{FeCl}_4^-$ . Najčastejšie komplexy  $\text{Fe}^{\text{III}}$  sú také, v ktorých je centrálny atóm viazaný s ligandmi atómu kyslíka. Pri trojmocnom železe je laboratórne najčastejšou draselná soľ, ktorá obsahuje hexakynoželezitanový anión, hexakynoželezitan draselný  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ , tzv. červená krvná soľ. Ide o soľ, ktorej komplexný anión  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$  sa vo vodnom roztoku ionizuje len nepatrne. Na rozdiel od aniónu  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$  je vysoko toxický. Obidva anióny reagujú s iónmi ťažkých kovov za vzniku veľmi málo rozpustných zrazenín. Hexakynoželezatan draselný reaguje so železitými soľami a hexakynoželezitan draselný so železnatými soľami za vzniku málo rozpustných modrých zrazenín. Prvá z nich má triviálny názov berlínska modrá, druhá sa nazýva Turnbullova modrá.

Sú známe aj koordinačné zlúčeniny železa, ktoré sú odvodené náhradou jednej kyanoskupiny v komplexných iónoch  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$  a  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$  ligandmi ako  $\text{NO}$ ,  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{SO}_3^{2-}$ ,  $\text{CO}$  a iné. Zachováva sa pritom koordinačné číslo šesť, oktaédrické usporiadanie ligandov a nízkospinový charakter komplexu. Najznámejšou zlúčeninou tohto typu je pentakyno-nitrozylželezitan (2-)sodný, tzv. nitroprusidsodný  $\text{Na}_2[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}]$ , ktorý sa získava pôsobením asi 30% kyseliny dusičnej na hexakynoželezatan alebo hexakynoželezitan sodný. Z vodného roztoku kryštalizuje v podobe tmavočervených kryštálov. Červenohnedé roztoky nitroprusidu sodného reagujú so sulfidovými iónmi za vzniku iónu  $[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NOS}]^{4-}$  a v súvislosti s tým sa farba roztoku mení na červenofialovú. Táto reakcia sa používa na kvalitatívny dôkaz sulfidov. So siričitanmi dáva červené sfarbenie. Túto reakciu možno využiť na odlíšenie siričitanov od tiosíranov, ktoré s nitroprusidmi takto nereagujú [1].

## 2.2 Funkcia železa v biosystémoch

### 2.2.1 Esenciálny prvok v organizmoch

Železo patrí medzi mikrobiogénne prvky, ktoré tvoria obvykle menej než 0,005 % hmotnosti. V ľudskom tele sa nachádza asi 3–4 gramy železa. Ióny železa sú nevyhnutné pre všetky formy života, lebo sa zúčastňujú na elektrón transportných systémoch v dýchanom reťazci. U živočíchov má okrem železa ako súčasť hemoglobínu a myoglobínu významnú úlohu pri reverzibilnej väzbe a uvoľňovaní molekulového kyslíka [6].

Kým u novorodenca je celkové množstvo železa v organizme len 0,2–0,3 g, u dospelého človeka 3–5 g. Denne prijíma ľudský organizmus asi 1 mg železa, a to najmä vo forme  $\text{Fe}^{2+}$ , ktorý sa resorbuje lepšie ako  $\text{Fe}^{3+}$ . Straty železa sú asi 0,5–1 mg za deň, u žien väčšie straty 1,5–2 mg majú príčinu v menštruácii. Odporúčaná denná dávka je 20 mg. Minimálny denný príjem železa nevyhnutný pre krvotvorbu je 10 až 15 mg.

Najväčšia časť, asi 70 %, sa nachádza v červenom krvnom farbive hemoglobíne, 15–30 % pripadá na zásobné železo, ktoré je viazané na bielkoviny feritín a hemosiderín 3–4 % v myoglobíne, asi 1 % v enzýmoch a 0,1 % je tzv. transportné železo.

Železo zvyšuje odolnosť organizmu voči chorobám, ovplyvňuje látkovú premenu glukózy v bunkách, produkciu protilátok, detoxikáciu liekov v pečeni, premenu karoténu na vitamín A, podporuje rast a navracia pokožke dobré napätie [7].

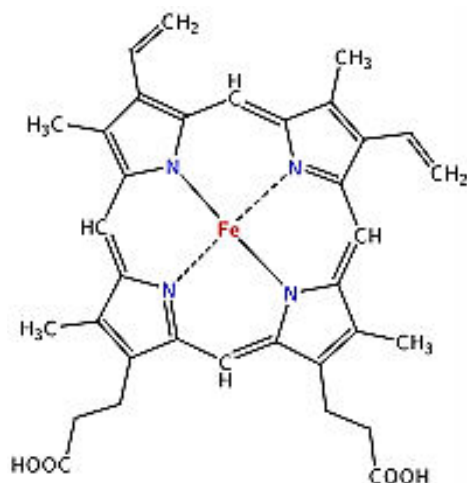
Poruchy metabolizmu železa sú vzhľadom na jeho optimálne využívanie, transport a uskladňovanie, pomerne zriedkavé. Vyskytuje sa dedičný nedostatok transferínu a porucha mobilizácie zásobných foriem železa pri určitých zápalových ochoreniach [6]. Anémia z nedostatku železa patrí medzi najčastejšiu nutričnú deficienciu na svete. Existujú rôzne faktory, ktoré zvyšujú riziko nízkeho obsahu železa v organizme, ako napr. zle vyvážená vegetariánska strava alebo nedostatočné vstrebávanie železa v dôsledku klinických porúch, ako je celiakia. Hlavným zdrojom železa v potrave je mäso, predovšetkým vnútornosti, ako pečeň, srdce a slezina, ale aj listová zelenina, huby a niektoré ovocie ako jahody [7].

## 2.2.2 Bioanorganické zlúčeniny železa

Ióny železa sú nevyhnutné pre všetky formy života, lebo sa zúčastňujú na elektrón transportných systémoch v dýchacom reťazci. U živočíchov má okrem toho železo ako súčasť hemoglobínu a myoglobínu významnú funkciu pri reverzibilnej väzbe a uvoľňovaní molekulového kyslíka. Najväčšia časť, asi 70 %, sa nachádza v červenom krvnom farbive hemoglobíne, okolo 15 % v transportných, resp. zásobných bielkovinových komplexoch feritíne a hemosideríne, v menších množstvách v cytochrómoch a Fe-poryfrínových enzýmoch, ako aj vo forme transportnej Fe-bielkoviny v krvnom sére transferíne. Medzi nehémové Fe-bielkoviny patrí oxidačno-redukčná bielkovina dýchacieho reťazca a fotosyntetického transportu elektrónov feredoxín [6].

Z veľkého počtu biokomplexov môžeme uviesť siderochrómy, feritíny, hemoglobín, myoglobín a Fe-S proteíny. Siderochrómy sú komplexy  $\text{Fe}^{\text{III}}$  s veľkými hodnotami konstanty stálosti, ktorými sa dostáva železo do organizmov. Feritín sa v živočíšnych organizmoch nachádza najmä v bunkách pečene a pankreasu. Molekula feritínu sa skladá z jadra a bielkovinového obalu. V jadre sa nachádza asi 4500 atómov železa, viazaných ako  $\text{Fe}(\text{O})\text{OH}$  a  $\text{Fe}(\text{O})\text{H}_2\text{PO}_4$ . Z obalu sa  $\text{Fe}^{\text{III}}$  uvoľňuje po redukcii na  $\text{Fe}^{\text{II}}$  kyselinou askorbovou, resp. inými organickými redukčnými látkami.

Hemoglobíny a myoglobíny sú najrozšírenejšími prenášačmi a aktivátormi molekúl  $\text{O}_2$ . Atómy železa v komplexoch, ktoré neobsahujú molekulu  $\text{O}_2$  sú pentakoordinované. Okrem štyroch donorových atómov dusíka z porfyfrínového kruhu je v axiálnej polohe koordinovaný atóm dusíka z imidazolového kruhu histidínového zvyšku bielkovinovej časti molekuly.



Obr. 2 Štruktúrny vzorec hemoglobínu [8]

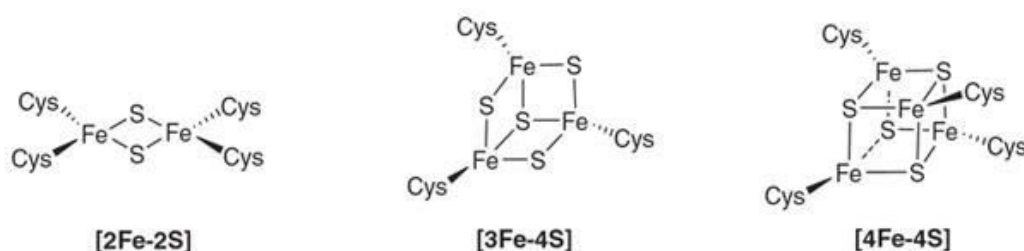
Hemoglobín prenáša v organizme  $\text{O}_2$  od pľúc k svalom, kde ho odovzdáva myoglobínu, ktorý má k nemu väčšiu afinitu. Hemoglobín za pomoci aminoskupín viaže  $\text{CO}_2$  vytvorený v organizme a prenáša ho späť k pľúcami [2]. Chemicky je hemoglobín tvorený porfyfrínovým

skeletom zloženým zo 4 pyrolových jadier, ktorých dusíkaté atómy smerujú do stredu kruhu a komplexne viažu atóm železa. Hlavným nositeľom hemoglobínu v krvi sú červené krvinky. Dôležitý fakt je, že väzbová energia medzi atómom železa a molekulou kyslíka je relatívne nízka a tak môže hemoglobín v tkanivách s nízkym obsahom kyslíka uvoľniť jeho molekulu a naopak v pľúcach bohatých na kyslík molekulu kyslíka viazať a transportovať ďalej [7].

Hemoglobín sa taktiež môže zlučovať s CO, CN<sup>-</sup> a ďalšími ligandmi, i keď je nepravdepodobné, že tieto molekuly atakujú atóm železa v rovnakej polohe ako O<sub>2</sub>, zabraňujú príjmu kyslíka. Ďalšími dôležitými hemoproteínmi sú cytochrómy, ktoré sa od hemoglobínu líšia spôsobom substitúcie v hémovom kruhu a štruktúrou bielkovín. Taktiež sa líšia funkčne, lebo kyslík rýchlo redukujú bez toho, aby ho prenášali, ako to robí hemoglobín [5].

Biokomplexy železa obsahujúce síru, Fe-S-proteíny, pôsobia vo všetkých známych formách života ako katalyzátory redoxných reakcií. Zúčastňujú sa napr. reakcií fotosyntézy, fixácie a redukcie dusíka, redoxných reakcií v mitochondriách. Tieto proteíny sú vysokomolekulové zlúčeniny, obsahujúce 1 až 8 atómov železa, sulfidickú síru a síru viazanú v organickej časti molekuly cysteín. Atóm železa v týchto zlúčeninách má oxidačné číslo II alebo III a je tetraédricky koordinovaný atómami síry [2].

Najjednoduchší polymetalický systém, Fe<sub>2</sub>S<sub>2</sub> cluster, je tvorený dvoma iónmi železa premostenými dvoma sulfidovými iónmi a koordinovaný štyrmi cysteinovými ligandmi alebo dvoma cysteínmi a dvoma histidínmi. Oxidované proteíny obsahujú dva Fe<sup>3+</sup> ióny, pričom redukované proteíny obsahujú jeden Fe<sup>3+</sup> a Fe<sup>2+</sup> ión. Tieto druhy existujú v dvoch oxidačných stavoch (Fe<sup>III</sup>)<sub>2</sub> a Fe<sup>III</sup>Fe<sup>II</sup>. Existujú aj ďalšie štruktúry týchto proteínov ako napr. Fe<sub>4</sub>S<sub>4</sub>, Fe<sub>3</sub>S<sub>4</sub>, 7Fe a 8Fe clustre v nitrogeináze [9].



Obr. 3 Štruktúrne vzorce Fe-S vyskytujúcich sa v rôznych typoch feredoxínov [10]

## 2.3 Aminokyseliny

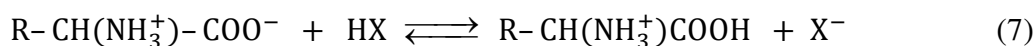
### 2.3.1 Vlastnosti aminokyselín

Aminokyseliny sa delia do viacerých skupín, možno ich rozdeliť podľa kyslosti a zásaditosti. Medzi zásadité patria napríklad L-lyzín a arginín, ku kyslým zaradujeme kys. asparágovú a glutámovú. Ďalej sa aminokyseliny môžu rozdeľovať podľa druhu postranného reťazca. K aminokyselinám s alifatickým postranným reťazcom patria glycín a alanín a ku aminokyselinám s aromatickým postranným reťazcom členíme napríklad tryptofán a tyrozín. V praktickej časti boli vybraný zástupcovia z každej spomínanej skupiny.

Aminokyseliny sú stavebné kamene bielkovín. V bielkovinách sa pravidelne vyskytuje 20 rozličných aminokyselín. Z chemického hľadiska sú aminokyseliny organické kyseliny, v ktorých je jeden alebo viac atómov vodíka nahradených aminoskupinou -NH<sub>2</sub>. Okrem toho sa niektoré atómy vodíka v ich molekulách môžu nahradiť aj inými funkčnými skupinami, napr. skupinou -OH, -SH, fenylovou skupinou apod. Každá aminokyselina, okrem prolínu, má najmenej jednu kyslú karboxylovú skupinu -COOH a jednu zásaditú aminoskupinu -NH<sub>2</sub>. V aminokyselinách, ktoré sa prirodzene vyskytujú, aminoskupina zvyčajne nahrádza vodík, nachádzajúci sa na uhlíku susediacom s karboxylovou skupinou ( $\alpha$ -aminokyseliny).

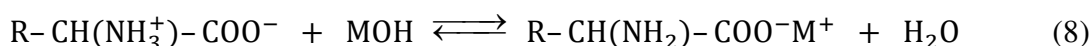
Aminokyseliny, ktoré sa vyskytujú v bielkovinách, majú zo sférického hľadiska L-konfiguráciu, čo znamená, že priestorové usporiadanie ich atómov v okolí asymetrického uhlíka je také isté ako pri základnej zlúčenine tohto radu- L-glyceraldehyde.

Prírodné aminokyseliny sú bezfarebné kryštalické látky, väčšinou dobre rozpustné vo vode. Rozpúšťajú sa aj v zriedených kyselinách a zásadách a vznikajú soli. Monokarboxylové monoaminokyseliny reagujú vo vodných roztokoch neutrálne, lebo ich kyslá aj zásaditá skupina je intramolekulovo neutralizovaná. No v silne kyslom prostredí tieto aminokyseliny vytvárajú kationy, lebo je potlačená disociácia karboxylových skupín



(HX je všeobecný vzorec pre kyselinu – donor protónov).

V silne alkalickom prostredí je zasa potlačená disociácia aminoskupín a vytvárajú sa anióny



(MOH je všeobecný vzorec pre zásadu – akceptor protónov).

Pri určitej hodnote pH sa v roztoku nachádza v prevažnej miere neutrálna forma aminokyseliny, kým kationová a aniónová forma sa vyskytuje len v stopových množstvách. Túto hodnotu pH označujeme ako izoelektrický bod. V izoelektrickom bode je polarita aminokyselín najmenšia a v dôsledku toho majú aj najnižšiu rozpustnosť vo vodných roztokoch [11].

### 2.3.2 Aminokyseliny vo funkcii ligandu s centrálnym atómom železa

Chovanie aminokyselín je zreteľne ovplyvnené tvorbou zwitter-iónu v ich izoelektrickom bode, ktorý bol spomínaný v predošlej kapitole. V kyslom roztoku je aminokyselina protonovaná a existuje väčšinou vo forme kationu. V zásaditom roztoku je deprotonovaná a teda sa aminokyselina formuje do aniónu.

Izoelektrický bod akejkoľvek aminokyseliny závisí na jej štruktúre. Pätnásť aminokyselín s neutrálnym alebo slabým kyslým postranným reťazcom má izoelektrický bod (pI) v skoro neutrálnej oblasti, na hranici pH od 5 až 6,5. Tri aminokyseliny s zásaditou skupinou v reťazci majú pI pri vyššom pH, kedy je potlačená protonizácia druhej aminoskupiny. Izoelektrický bod sa skladá z priemeru dvoch disociačných konštánt v neutrálnom zwitter-ióne. Na aminokyseliny s kyslým alebo neutrálnym postranným reťazcom sa vzťahujú najnižšie hodnoty pKa, naopak pri aminokyselinách so zásaditým reťazcom platia najvyššie hodnoty pKa [12].

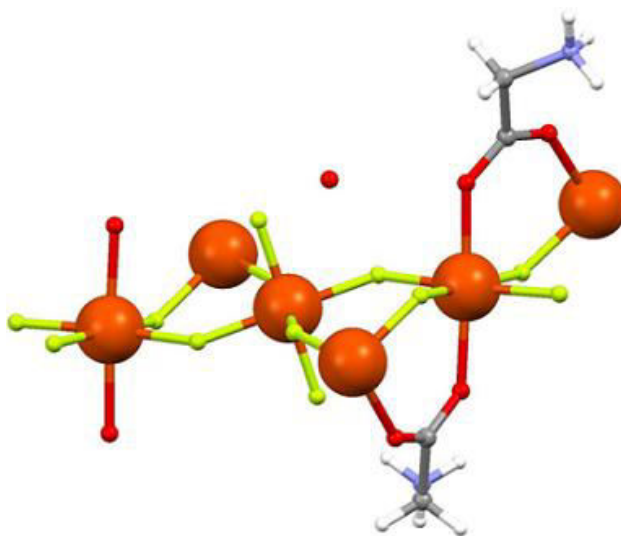
Niektoré aminokyseliny majú viac protolyticky aktívnych látok a teda sa s aminokyselinami stretáme aj v prípade kombinovaných protolytických rovnováh. Ako najjednoduchší príklad si môžeme uviesť aminokyselinu glycín  $NH_2CH_2COOH$ , ktorá sa dá protonizovať na atóme dusíka aminoskupiny za tvorby kationu  $^+NH_3CH_2COOH$ , následne môže nastať deprotonizácia karboxylovej skupiny za vzniku aniónu  $NH_2CH_2COO^-$ . V roztoku však nemožno vylúčiť aj súbežný priebeh oboch dejov, kedy vznikne zwitter-ión  $^+NH_3CH_2COO^-$ . Bližšie informácie je možné nájsť v literatúre [14, 15].

Protolytické rovnováhy dokazujú existenciu takých komplexov v roztokoch. Mnoho experimentov sa upriamuje na funkciu, reakcie aj metabolizmus týchto komplexov, keďže doposiaľ nie sú veľmi objasnené [13]. Ako napríklad práca [16] venovaná železným komplexom so zmiešaným ligandom odvodeným od 8-hydroxychinolínu a aminokyselín L-alanín a metionín, syntetizovaných pod spätným chladičom v alkalickom roztoku. Roztok  $FeCl_3$ , 8-hydroxychinolínu v metanole a aminokyseliny bol zahrievaný pri  $60^\circ C$  za neustáleho miešania pod spätným chladičom. Zrazenina sa vytvorila pri pH 8 pri zmiešaní s roztokom hydroxidu sodného, ktorý zvýšil deprotonizáciu hydroxylovej skupiny pre vznik chelátu. Boli skúmané rôzne základné vlastnosti týchto komplexov. Výsledky

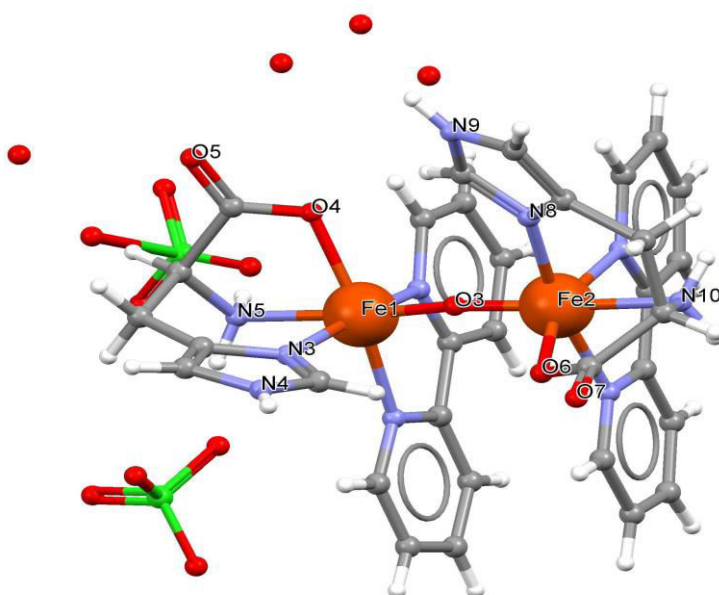
zo spektroskopie, elementárnej analýzy a molárne parametre magnetickej susceptability ukazujú, že geometria komplexov železa je naozaj oktaédrická. Komplexy vykazujú dobrú inhibíciu na štandardné testovacie mikroorganizmy.

V publikácii [17] boli rozoberané účinky komplexov železa s aminokyselinami glycín, arginín a histidín ako doplnok výživy pre lepšiu rast a vývoj paradajok pri hydroponickom pestovaní rastlín. Roztok aminokyseliny s roztokom síranu železnatého nechali voľne reagovať, následne bol miešaný 2 hodiny pod refluxom. Po postupnom odparení rozpúšťadla z roztoku dostali hnedé kryštáliky.

Zwitter-ión glycínu bol zachytený v katene komplexu železa so železom catena- (Oxonium bis( $\mu_2$ -glycine-O,O')-hexakis( $\mu_2$ -fluoro-tri-iron(ii,ii,iii))). Štruktúra zwitter-iónu v pevnom stave bola potvrdená meraniami neutrónovej difrakcie [16].



Obr. 4 Katena fluoridokomplexu glycínu so železom



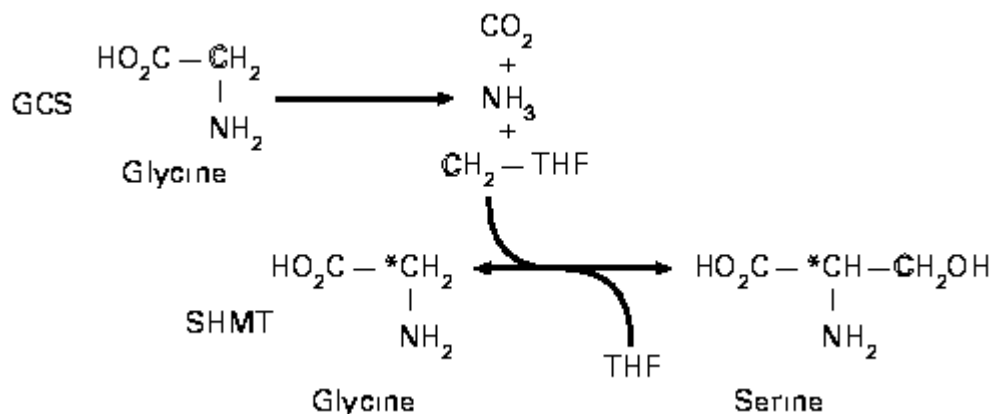
Obr. 5 Dvojjadrový komplex železa a histidínu

Pochopenie špeciácie železa je rozhodujúce pre posúdenie jej biologickej dostupnosti v rôznych prostrediach: živých buniek, vodných a suchozemských prostrediach. Špeciácia železa (III) a nepriamo aj železa (II) vo vodnom roztoku L-asparárovej kyseliny a zmesi kyseliny asparagínovej s glycínom bola skúmaná pomocou voltametrie štvorcových vln (Squarewave voltammetry-SWV) na statickej ortuťovej kvapkovej elektróde. V roztoku so zmesou aminokyselín, kyselinou asparágovou a glycínom, bol objavený zmiešaný komplex (Fe(III)-aspartát-glycín). Pri redukčných reakciách bolo zistené, že sú reverzibilné. Výsledkom tejto práce boli konštanty stability komplexov železo-aspartát ( $\text{Fe(Asp)}_2^-$ ,  $\text{FeAspOH}^0$  a  $\text{FeAsp(OH)}_2^-$ ) železo-aspartát-glycín komplexov. Na základe stanovených hodnôt konštant stability a distribúcie pH sa ukázali tieto komplexy ako stabilné pre živé systémy. Samostatná kyselina asparágová, ale aj jej zmesi s glycínom môžu zabráňovať hydrolyze Fe(III) [18].

### 2.3.3 Biosyntéza a metabolické premeny vybraných aminokyselín

Prvoradý význam biosyntézy aminokyselín tkvie v tom, že tieto látky sú základnými prekurzormi pri výstavbe bielkovín. Navyiac niektoré z nich slúžia ako prekurzory pri biosyntéze ďalších nevyhnutných bunkových zložiek, ako sú hormóny, hém alebo rôzne koenzyémy. Organizmy sa líšia v schopnosti syntetizovať širokú paletu potrebných aminokyselín, a tiež v tom, akú formu dusíku pre to využijú.

Vyššie živočíchy sú schopné vytvárať len desať z dvadsiatich aminokyselín potrebných k výstavbe bielkovín, to sú neesenciálne aminokyseliny. Ostatné aminokyseliny, esenciálne, musí získať z vonkajších zdrojov. Vyššie rastliny naopak sú schopné syntetizovať všetky aminokyseliny potrebné pre tvorbu svojich bielkovín. Jednotlivé mikroorganizmy sa v schopnosti syntetizovať aminokyseliny veľmi líšia. Jednotlivé aminokyseliny nie sú však metabolizované celkom izolované, ale tvoria určité skupiny, akési „rodiny“ aminokyselín, ktoré majú podobnú štruktúru a sú mnohokrát spojené spoločnými metabolizmami, takže môžu medzi sebou navzájom prechádzať [6].



Obr. 6 Schéma metabolizmu aminokyselín serín a glycín [19]

**Cysteín** je zdrojom všetkých zlúčenín síry v živočíšnom organizme. Je to semiesenciálna aminokyselina, ktorá sa môže vytvárať len vtedy, ak má dostatočný prísun aminokyseliny metionín. Pri biosyntéze cysteínu je dôležitý serín, dodávajúci uhlíkovú kostru, a metionín, ktorý je zdrojom síry. Pri tomto procese je metionín najprv spracovaný na S-adenosylmetionín a následne premenený na homocysteín. Enzým cystathionin beta-syntáza potom prepojí homocysteín a serín za vzniku cystathionínu, z ktorého sa odštiepi amoníak,  $\alpha$ -ketoglukurát a cysteín. Degradácia cysteínu súvisí preto s celkovým metabolizmom tohto prvku. Priama transaminácia na  $\epsilon$ -merkaptopyruvát s nasledujúcou redukčnou desulfuráciou má len veľmi

obmedzený význam. Odbúravaniu cysteínu predchádza transaminácia oxidácie sulfhydrylovej skupiny za vzniku cysteínsulfínátu. Transamináciou tejto aminokyseliny vzniká 3-sulfynilpyruvát, ktorý sa štiepi na pyruvát a siričitanový ión [20].

**Lyzín**, kyselina diaminokapronová, aminokyselina bázického charakteru, ktorú organizmus získava potravou alebo štiepením vlastných bielkovín. Na  $\epsilon$ -aminoskupinu lyzínových zbytkov v proteínoch sa viaže ubiquitin. Po inkorporácii lyzínu do peptidového reťazca kolagénu vzniká pomocou lysylhydroxylázy hydroxylyzín. Lyzín je nevyhnutný pre syntézu karnitínu, jeho nevratnou dekarboxyláciou vzniká biogénny amín kadaverín. Hlavná cesta odbúravania lyzínu začína jeho kondenzáciou s  $\alpha$ -ketoglutarátom za vzniku sacharopinu, ktorý sa štiepi na kyselinu glutámovú a allyzin ( $\alpha$ -aminoadipát-6-semialdehyd). Z allyzinu vzniká oxidáciou  $\alpha$ -aminoadipát, ktorý je v rade dekarboxylačných a dehydrogenačných reakcií premenený na acetyl-CoA [21].

**Glycín** vzniká transamináciou glyoxalátu. Oxidáciou opäť poskytuje glyoxalát. Jedným zo spôsobov katabolizmu glycínu je oxidačná dekarboxylácia, uvoľnenie amoniaku a prenos zvyšného  $\alpha$ -uhlíka na kyselinu tetrahydrolistovú, pričom vzniká jej metylénderivát, z ktorého kondenzáciou s ďalšou molekulou glycínu vzniká serín. Z glycínu sa syntetizuje veľké množstvo látok, napr. puríny, pyrolové farbivá, porfobilinogén. V mitochondriálnom matrici sukcinyl-CoA kondenzuje s glycínom na kyselinu  $\delta$ -aminolevulónovú, z ktorej sa tvorí prekursor porfyrínov – porfobilinogén a z neho postupne uroporfyrinogén a protoporfyrín, do ktorého sa pôsobením protohemferolyázy vnesie  $Fe^{2+}$  a vzniká hém [11].

**Tryptofán** patrí medzi esenciálne aminokyseliny, ktorých biosyntéza začína kondenzáciou fosfoenolpyruvátu a erytróza-4-fosfátu. Ďalej cez radu medziproduktov vzniká šikimát, ktorý reaguje s ďalším fosfoenolpyruvátom na chorizmát. Z chorizmátu vzniká atranilát a jeho reakciou s fosforibosyldifosfátom vzniká tryptofán. Odbúravanie tryptofánu začína oxidačným štiepením pyrrolového kruhu za vzniku N-formylkynurenínu, ktorý je transaminovaný na kynurenát alebo na alanín a semialdehyd 2-amino-3-karboxymukonát. Z tohto medziproduktu následne môže dôjsť ku kompletnému oxidačnému odbúraniu na  $CO_2$  a  $H_2O$  cez acetyl-CoA a citrátový cyklus. Medziprodukt môže viesť aj ku spontánnej cyklizácii k  $NAD^+$  [22].

**Kyselina asparágová** patrí medzi glukoplastické aminokyseliny, ktoré organizmus získava z proteínov potravy, rozpadom endogénnych bielkovín a syntézou oxalacetátu. Z oxalacetátu vzniká aspartát transaminačnou reakciou, v ktorej je kofaktor pyridoxalfosfát a zdrojom aminoskupiny je glutamát. Táto reakcie je taktiež zvratná. Oxalacetát vstupuje do Krebsovho cyklu, môže byť použitý aj pri syntéze glukózy. Biosyntézy kyseliny asparágovej z oxalacetátu je významným medzikrokom pre syntézu ďalších molekúl, napríklad ako aminokyseliny arginín, metionín, treonín [21].

#### 2.3.4 Patobiochémia

Aminokyseliny patria medzi základné stavebné jednotky v ľudskom organizme. Organizmus ich potrebuje pre správny rast a stálu obnovu biologických štruktúr. Príčinou chorobných procesov na molekulovej úrovni sú zmeny v mechanizmoch premeny jednotlivých substrátov štruktúrneho, energetického a funkčného významu, rôzne poruchy mechanizmov a teda ich nervovej a hormonálnej regulácie [6].

Mnohé neurologické degeneratívne ochorenia vznikajú narušením kynurenínovej dráhy (KD), čo je vlastne metabolická cesta vedúca k produkcii nikotínamid adenín dinukleotid ( $NAD^+$ ) z degradácie esenciálnej aminokyseliny tryptofán. Nerovnováha v absolútnych aj relatívnych úrovniach KD metabolitov boli silne spojené s neurodegeneratívnymi ochoreniami, ako Huntingtonova, Alzheimerova a Parkinsonova choroba. KD sa tiež podieľa na patogenéze iných mozgových porúch, ako je schizofrénia, bipolárna porucha, rovnako niekoľko autoimunitných chorôb. Pri genetickej manipulácii tejto dráhy bolo preukázané, že došlo

k zlepšeniu neurodegeneratívnych fenotypov v modelových organizmoch. Tento postup sa ukázal ako možný spôsob pri liečbe týchto ochorení.

Huntingtonova choroba je autozomálne dominantné dedičné ochorenie, spôsobené expanziou CAG traktu v exóne 1 v géne huntingtín (HTT), ktorý kóduje polyglutamínový úsek v HTT proteíne. Bolo naznačované, že zacelenie KD môže byť relevantné pre HD. Hladiny 3-hydroxykynurenínu (3-HK) a kyseliny chinolínovej (QUIN) sú zvýšené v kôre mozgu pacientov v skorých štádiách progresie ochorenia. U myši boli hladiny 3-HK a QUIN tiež zvýšené a korelujú s nástupom HD fenotypov. Redulácia z IDO1 transkripcie bola pozorovaná v modeli myši YAC 128, kde bola určená ako príčina zvýšeného podielu 1-KYN/ TRP v krvi pacientov. Zvýšená aktivita kynurenínovej monooxygenázy (KMO) bola taktiež zdrojom zvýšenej hladiny 3-HK u myši. Táto kombinácia faktorov naznačuje, že prebytok 1-KYN vedie k vysokému toku cez 3-HK/QUIN rameno. Možno preto predpokladať, že nerovnováha v neurotoxických a neuroproteínových kynurenínových metabolitoch hrá kauzálnu úlohu v patogenéze HD [23].

Mikroglie sú primárnymi mediátormi pri imunitnej odpovedi CNS a ich aktivácia koreluje s progresiou HD. Transkripčné regulačné poruchy spôsobené mHTT expresiou bolo zistené, že aktivujú KD v mikroglíách in vivo aj in vitro. V skutočnosti zvýšená hladina 3-HK a zvýšená aktivita KMO v primárnych mikroglíách a mozgov myši modelu R6/2 sa môže normalizovať pomocou deacetylázy histónu (HDAC). Sú to inhibítory, ktoré modelujú expresiu génu. Okrem toho sa zistilo, že HDAC inhibícia vo WT myšiach na zmiernenie zvýšenej hladiny L-KYN a 3-HK hladiny, ako aj KMO aktivity indukovanej LPS stimuláciou, nemala žiaden vplyv na KD metabolity v neliečených WT myšiach. To poskytuje silnú väzbu medzi neuroinflamáciou, aktiváciou mikroglíí a transkripčnou dysreguláciou Huntingtonovej choroby s ohľadom na KD.

Stále rastie počet dôkazov zapletenia KD metabolitov v patológii mnohých neurokognitívnych a neurodegeneratívnych porúch. Nedávne genetické a farmakologické prístupy k modelovým organizmom boli doplnené o predchádzajúce štúdie pacientov, ktoré hovorili o tom, že normalizovanie toku cez KD môže byť platný terapeutický postup pri týchto poruchách.

### **2.3.5 Možnosti využitia chelátov železo-aminokyselina**

Dôležitá úloha železa v organizmoch bola mnohokrát dokázaná, keďže je potrebná pre rad veľmi zložitých procesov, ktoré prebiehajú kontinuálne na molekulárnej úrovni a teda sú nevyhnutné pre život.

Znížený obsah železa u rastlín je najčastejším nedostatkom mikroživín. Na zvýšenie prítomnosti železa v rastlinách začali vedci používať Fe-cheláty ako Fe-EDTA a Fe-DTPA. Taktiež sa používajú na udržanie žiadúcej koncentrácie tohto prvku pre rastliny v kultúrach živných roztokov. Najčastejšie používaný zdroj Fe použitý v živných roztokoch je Fe(III) a EDTA. Hoci EDTA udržuje rozpustnosť Fe v hydroponických roztokoch, po kovovom odchytení rastlinou sa koncentrácia voľných ligandov zvyšuje a tým sa zvyšuje aj možnosť vytvorenia voľných ligandov s inými stopovými prvkami. Okrem toho, EDTA a DTPA cheláty sú citlivé na fotodegradáciu. Ich fotodegradácia vedie k produkcii niektorých zlúčenín, ktoré sú škodlivé pre rast rastlín a znižuje dostupnosť železa pre rastliny jeho zrážaním. Aminokyseliny majú schopnosť koordinovať kovové ióny ich amínovou a karboxylovou skupinou. Taktiež sú menej citlivé na fotodegradáciu.

Skúmala sa salinita, čo je jeden z najdôležitejších abiotických stresov, ktoré ovplyvňujú výnos a kvalitu poľnohospodárskych rastlín po celom svete. Môže mať vplyv na koreňový príjem, presun na výhonky a fyziologické využitie Fe v rastline. Cheláty železo-aminokyselina zmierňujú solný stres vyvolávaný oxidačnými škodami na paradajkách pestovaných v živných roztokoch. Tieto cheláty boli syntetizované a použité na určenie ich účinku na solné poškodenie v paradajkách. V pokusoch boli použité dve odrody paradajok a Fe (II), EDTA,

[Fe(Arg)<sub>2</sub>], [Fe(Gly)<sub>2</sub>], [Fe(His)<sub>2</sub>], ako zdroj železa na troch úrovniach slanosti. Bez ohľadu na odrody paradajok a úroveň slanosti, prídanie chelátov železo-aminokyselina do živného roztoku zvyšuje obsah železa a spôsobuje lepší rast paradajok v porovnaní s používaním Fe-EDTA. Podľa získaných výsledkov sa cheláty môžu použiť ako nový zdroj pre zvýšenie tolerancie voči soľnému stresu v hydroponických roztokoch [24].

Metabolizmus železa v cicavčích druhoch organizmov môže ovplyvňovať vitamín C, ktorý zvyšuje nehémové vstrebávanie železa v črevách a môže regulovať jeho príjem. Askorbát (Asc) moduluje metabolizmus železa tak, že stimuluje syntézu feritínu a teda môže stimulovať mobilizáciu železa z endozómov do buniek. Schopnosť Asc regulovať príjem železa by mohlo dopomôcť k liečbe anémia [25].

## 2.4 Metódy rozptylu svetla

Tieto metódy sa rozdeľujú na dynamický (DLS), elektroforetický (ELS) a statický rozptyl svetla. DLS a ELS sme využívali pri meraní práce a teoretickými základmi týchto metód sa budeme zaoberať v nasledujúcich kapitolách.

### 2.4.1 Dynamický rozptyl svetla

Dynamický rozptyl svetla (DLS), rovnako nazývaný aj ako fotónová korelačná spektroskopia (PCS), je metóda vhodná pre meranie veľkosti častíc v submikrónovej oblasti. DLS metóda poskytuje komplexnú analýzu dát, okrem toho je aj neinvazívna, vyžaduje minimálnu prípravu vzorky a žiadnu predbežnú kalibráciu [26].

Základom tejto neinvazívnej techniky je meranie fluktuácie intenzity rozptýleného svetla z laserového zdroja okolo jej priemernej hodnoty. Táto fluktuácia súvisí s interferenčným zoslabovaním a zosilňovaním rozptýleného svetla na nestacionárnych časticách disperznej fázy podliehajúcich Brownovmu pohybu. Čím rýchlejšie sa častica pohybuje, tým rýchlejšie sa intenzita rozptýleného svetla mení. Rýchlosť týchto zmien je teda priamo závislá na pohybe danej molekuly. Okamžitú hodnotu fluktuácie intenzity v čase  $\tau$  popisuje pre monodisperzný systém autokorelačná funkcia  $g(\tau)$  definovaná vzťahom:

$$g(t) = \exp\left(-\frac{t}{\tau_c}\right) \quad (9)$$

kde  $\tau_c$  je relaxačný čas, ktorý je charakterizovaný ako potrebná doba k návratu fluktuácie k priemernej hodnote intenzity rozptýleného svetla. Hodnota relaxačného času je v blízkom vzťahu k difúznemu koeficientu  $D$  rozptyľujúcich sa častíc, ktoré sa môžu vyjadriť prostredníctvom rovnice:

$$\tau_c = \frac{1}{Dq^2} \quad (10)$$

kde  $q$  je absolútna hodnota vlnového vektoru, ktorá je daná vlnovou dĺžkou primárneho svetelného žiarenia  $\lambda$  a uhlom  $\theta$ , pri ktorom je meraná intenzita rozptýleného svetla:  $q = (4\pi/\lambda) \sin(\theta/2)$ . Veľkosť častíc sa môže vypočítať pomocou translačného difúzneho koeficientu  $D$  cez Stokesov- Einsteinov vzťah:

$$d(H) = \frac{kT}{3\pi\eta D} \quad (11)$$

kde  $d(H)$  je hydrodynamický priemer častice,  $D$  je translačný koeficient,  $k$  je Boltzmanova konštanta,  $T$  je absolútna teplota a  $\eta$  je viskozita disperzného prostredia.

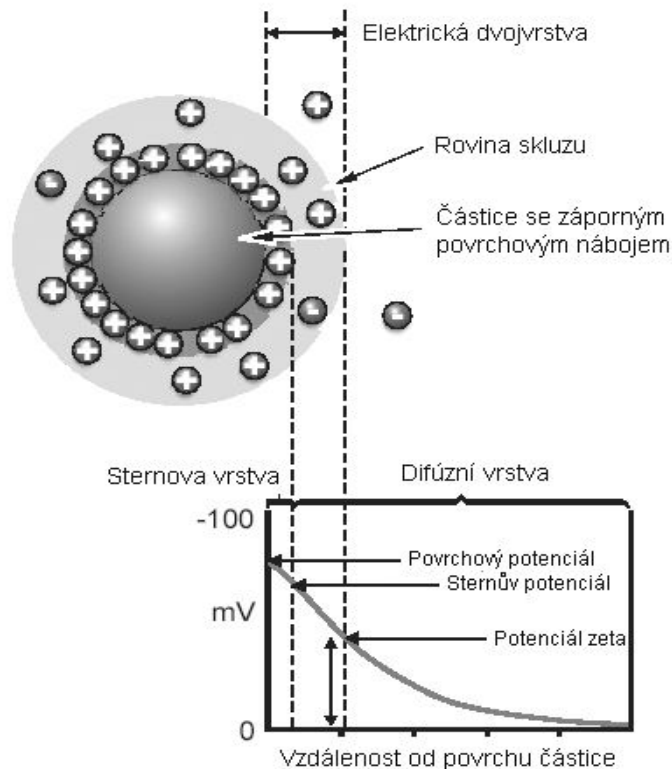
Výhodami tejto metódy je rýchly a jednoduchý priebeh merania, ktorý trvá priemerne od niekoľkých sekúnd do 10 minút. Rozbor veľkosti častíc potrebuje len veľmi malé množstvo vzorky a meracie zariadenie je komerčne dostupné s automatizáciou vrátane dátovej analýzy. Veľkosť meraných častíc môže byť už od niekoľkých nanometrov až do 2  $\mu\text{m}$ .

Kritickým krokom pri aplikácii DLS je čistenie a plnenie meracej kvety, do ktorej je vedená vzorka. V roztoku sa môžu objaviť častičky prachu alebo mikrobubliny, vtedy môže dôjsť k narušeniu alebo dokonca k prekrytiu signálu daného analytu a následne je meranie zaťažené artefaktami. Kvôli tomu je nutné, aby sa pred meraním vykonávala filtrácia všetkých využívaných kvapalín a čistili sa taktiež aj všetky používané kvety [27].

Dynamický rozptyl svetla je metódou vhodnou pre presné stanovenie veľkosti častíc v suspenziách, emulziách, micelách, lipozómoch, latexe a pigmentoch. Táto metóda má široké uplatnenie a využíva sa aj v mikrobiologickej a biologickej oblasti, ktorá pracuje s materiálom, ako proteíny, vírusy, baktérie a DNA. Metóda dynamického rozptylu svetla má širokú praktickú využiteľnosť [28].

#### **2.4.2 Elektroforetický rozptyl svetla**

Pre správne chápanie princípu elektroforetického rozptylu svetla je veľmi dôležité objasniť pojmy, ako elektrická dvojvrstva a zeta potenciál. Rovnako ako pri malých jednoduchých iónoch obklopených vrstvou iónov opačného náboja, tak aj okolo nabitých koloidných častíc sa tvoria tieto „obaly“ protiiónov, čo vedie ku vzniku dvoch protikladne nabitých vrstiev na povrchu týchto častíc. Tieto dve vrstvy nazývame elektrická dvojvrstva. Ako prvý znázornil model elektrickej dvojvrstvy Hermann von Helmholtz, ktorý popísal, že ide o dve rovnobežné dosky nabitého kondenzátora, ktoré k sebe navzájom priliehajú. Ióny, ktoré sa nachádzajú na povrchu pevnej fázy a ktoré určujú potenciál danej vrstvy, tvorí jednu dosku a druhú dosku tvoria opačne nabité ióny pochádzajúce z kvapalnej fázy. Helmholtzova predstava avšak neuvažovala o tepelnom pohybe molekúl v disperznom prostredí, takže bola o niekoľko rokov prepracovaná Goüyom a Chapmanem. Títo dvaja vedci nezávisle od seba vypracovali teóriu o difúznej dvojvrstve, ktorá mala taktiež veľa nedostatkov a preto ju upravil nemecký fyzik Otto Stern. V súčasnosti je táto teória považovaná za tú najsprávnejšiu. Stern tvrdil, že elektrickú dvojvrstvu tvoria dve základné časti. V kompaktnnej časti (Sternovej vrstve) bližšie k povrchu častice pôsobia adsorpčné a elektrostatické sily, kde v difúznej vrstve ďalej od povrchu častice možno adsorpčné a elektrostatické sily zanedbať. Za rozhraním týchto dvoch vrstiev sa vyskytuje oblasť nazývaná rovina sklzu. Medzi kvapalnou fázou a povrchom koloidných častíc sa vďaka ich povrchovému náboju nachádza iný potenciálový rozdiel. Z obrázku 7 je jasné, že existujú tri druhy rozdielov potenciálov. Ako prvý je elektrochemický (povrchový) potenciál, ktorý udáva hodnotu rozdielu potenciálu na povrchu častice a v objeme kvapaliny. Druhý potenciál (Sternov potenciál) sa nachádza na rozhraní Sternovej a difúznej vrstvy. Posledným je elektrokinetický potenciál, označovaný  $\zeta$  potenciál (zeta potenciál), ktorý je daný potenciálovým rozdielom medzi rovinou sklzu a objemom kvapaliny [28].



Obr.7 Schéma elektrickej dvojrstvy častíc podľa Sternovej teórie [29]

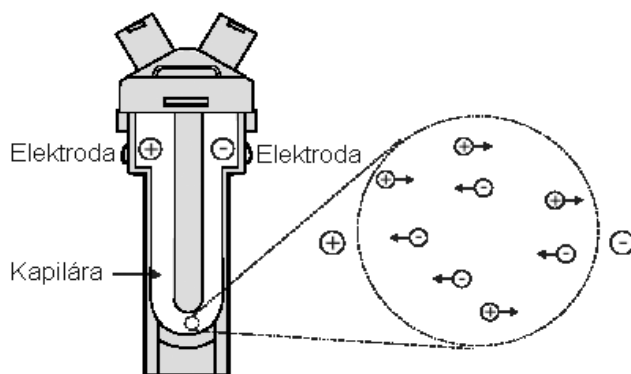
Zeta potenciál závisí na rozpúšťadle a jeho pH, prípadne na iónovej sile roztoku, keďže štruktúra a hrúbka elektrickej dvojrstvy je ovplyvnená koncentráciou voľných iónov. Po pridaní elektrolytu do systému dôjde k zmršteniu difúznej vrstvy, zatiaľ čo protióny sa budú zhromažďovať v Sternovej vrstve. Zeta potenciál sa kvôli tomu bude blížiť k nule, to znamená, že častice budú bez náboja a nastane agregácia. V bode, kedy je zeta potenciál rovný 0 mV, sa ustáli adsorpčná hodnota  $H^+$  a  $OH^-$  iónov. Tento okamih sa nazýva tzv. izoelektrický bod. V opačnom prípade, teda pri riedení roztoku, sa hrúbka difúznej vrstvy zväčší, bude vzrastať aj zeta potenciál a častice budú mať menšiu tendenciu sa zhlukovať.

Cez zeta potenciál možno určiť stabilitu roztoku nanočastíc a koloidných systémov, pretože súvisí s elektrostatickým odpudzovaním jednotlivých častíc. Ak sú častice od seba v dostatočnej vzdialenosti, pôsobia na ne van der Waalsove sily, zatiaľ čo odpudivá sila je zanedbateľná. Po prekrytí elektrických dvojrstiev sa zväčší odpudivá sila. Podľa toho, ktorá z týchto síl bude prevažujúca sa častice budú buď zhlukovať, alebo naopak budú dispergovať. V prípade, že súčet energií všetkých častíc v roztoku by bol kladný, bude dochádzať k agregácii. Ak by bola suma týchto energií záporná, tak by sa častice rozptýlili po roztoku a vytvorili medzi nimi tzv. energetickú bariéru, ktorá znemožní ich ďalšiu aglomeráciu. Po celkovej sumarizácii možno povedať, že stabilný koloidný roztok vykazuje odolnosť voči zmenám pri pôsobení rôznych síl, ako napríklad gravitačná, príťažlivá, odstredivá apod. Zeta potenciál častíc má vysokú kladnú alebo zápornú hodnotu, a preto dochádza k ich agregácii. Pri nestabilných koloidných roztokoch dochádza k maximálnemu zníženiu voľnej energie na fázovom rozhraní, čo sa prejavuje agregáciou, koaguláciou alebo sedimentáciou. Zeta potenciál takého roztoku má veľmi nízku absolútnu hodnotu zeta potenciálu, teda blížiacemu sa k nule. Pre rozbor stability roztoku je medzi týmito dvoma rozdielnymi stavmi všeobecne daná hranica hodnôt zeta potenciálu  $\pm 30$  mV [28].

Zeta potenciál je mierou náboja roviny sklzu v difúznej časti elektrickej dvojvrstvy. Vďaka elektrokinetickým javom (kinetickým javom, ktoré sú zapríčinené pôsobením elektrického poľa na koloidnú sústavu) býva často nazývaný ako elektrokinetický potenciál. Špecifikujú sa štyri základné typy elektrokinetických javov, ktorými možno izoelektrický potenciál stanoviť a to elektroforéza, elektroosmóza, sedimentačný potenciál a potenciál prúdenia. Najviac sa však aplikuje elektroforetická metóda. Elektroforézou sa rozumie jav, pri ktorom vplyvom elektrického poľa dochádza k pohybu nabitých častíc kvapalinou k elektróde s nábojom opačného znamienka. Rýchlosť tohto pohybu sa označuje ako elektroforetická pohyblivosť. Zeta potenciál možno získať pomocou Henryovej rovnice:

$$U_E = \frac{2 \cdot \varepsilon \cdot z \cdot f(ka)}{3 \cdot \eta}$$

Metóda na stanovenie elektrokinetického potenciálu pomocou elektroforetickej pohyblivosti častíc roztoku s využitím rozptylu svetla na týchto časticiach sa nazýva elektroforetický rozptyl svetla (ELS), niekde je tiež uvádzaná ako laserová Dopplerova velocimetria.



Obr. 8 Zobrazenie kyvety využívanej pri meraní rozptylu svetla [29]

Pri použití prístroja Zetasizer Nano ZS je zeta potenciál meraný opticky využitím laserového žiarenia. Zo zdroja žiarenia je svetelné žiarenie ďalej smerované do deliča, kde je deliacou optikou rozložený na dve žiarenia, ktoré následne putujú odlišnými smermi. Jeden ako žiarenie smerujúce ku kyvete so vzorkou a druhý ako referenčné žiarenie. Pred kyvetou sa nachádza tzv. zoslabovač. Jeho úlohou je zníženie intenzity žiarenia, aby detektor, ktorý rozptýlené svetlo zachytuje, nebol veľmi preťažovaný. Výhodou tohto prístroja je to, že všetko funguje automaticky. Po preniknutí žiarenia stredom kyvety dôjde na časticiach vo vzorke k jeho rozptýleniu, ktoré je snímané pod uhlom  $17^\circ$ . Ak sa do roztoku vloží elektrické pole, stane sa to, že snímaná intenzita rozptýleného svetla bude vďaka pohybujúcim sa časticiam fluktuovať. Frekvencia tejto fluktuácie by mala byť úmerná rýchlosti častíc. Referenčné a laserové žiarenie ďalej putuje do zlučovacej optickej sústavy, ktorá pozostáva z viacerých šošoviek. Tieto šošovky ho dopravujú k detektoru. Detektor doručí informáciu o svetelnom žiarení do digitálneho procesoru signálu a následne do počítača, kde na základe Dopplerového funkčného posunu laserového žiarenia dôjde k výpočtu elektroforetickej pohyblivosti aj zeta potenciálu. Úlohou detektora spravidla zastávajú fotodiódy alebo fotonásobiče. Pri meraní zeta potenciálu pomocou tohto prístroja sa najčastejšie využíva sklenená alebo kremiková kyveta, do ktorých sa oproti meraniu veľkosti a distribúcie častíc a molekulovej hmotnosti mimo iné vkladá Zeta Dip cela s elektródami [29].

Meranie zeta potenciálu pomocou elektroforetického rozptylu svetla možno využiť vo farmaceutickom priemysle. Cieľom býva pripraviť fyzikálne stabilné disperzné liečivá, ktorých stabilita výrazne ovplyvňuje dávkovanie a trvanlivosť. Zeta potenciál má taktiež dôležitú úlohu v odvetví biológie. Poskytuje údaje o povrchu rôznych biologických systémov, na ktorých prebiehajú dôležité biologické deje. Napríklad zmena zeta potenciálu krvných elementov, cievnych stien, alebo zložiek telových tekutín môže vyvolať metabolické zmeny, zmeny vo vlastnostiach prietoku krvi alebo bunkovú agregáciu. Okrem toho meranie zeta potenciálu nachádza uplatnenie aj v niekoľkých ďalších oblastiach, napríklad pri sledovaní vzdušnosti či prietoku vôd, poprípade zadržovaní vlhkosti a živín v pôdach, ale aj pri čírení piva a vína.

### 3 SÚČASNÝ STAV RIEŠENEJ PROBLEMATIKY

Táto kapitola je zameraná na súčasné riešenie problematiky a na štúdium príprav komplexov železa s aminokyselinami v rôznych vedeckých prácach.

Autori práce [30] sa zaoberali štúdiom superparamagnetických nanočastíc oxidov železa (SPIONs). Zamerali sa na výskum ich povrchových vlastností, stabilizáciu vodných suspenzií v aminokyselinách. Široké spektrum druhov aminokyselín poskytuje príležitosť na zmenu vlastností týchto nanočastíc, ako napríklad povrchový náboj. Je všeobecne známe, že sa aminokyseliny spoja s oxidom železa za vzniku chemickej väzby vo forme chelátu, ktorý obsahuje povrchové bázy železa a karboxylovú skupinu. Z aminokyselín bola vybraná kyselina asparágová a lyzín. SPIONs boli syntetizované so železom  $\text{Fe}^{2+}$  a  $\text{Fe}^{3+}$  vo vodnom roztoku amoniaku. Na prípravu suspenzie sa zmiešalo 2,89 g aminokyseliny a 450 ml vodného roztoku oxidu železitého. Kyselina asparágová bola zmiešaná s amoniakom a lyzín s kyselinou chlorovodíkovou. Oba roztoky boli zriedené tak, aby ich pH sa rovnalo približne 2. Suspenzie sa miešali 5 hodín. Neskôr sa pH roztoku kyseliny asparágovej s amoniakom zvýšil na hodnotu 11 a roztok lyzínu s HCl na hodnotu 4. Neabsorbovaná aminokyselina bola premytá 300 ml zriedeným roztokom s rovnakým pH ako pôvodná suspenzia. Na adsorpciu bola pripravená hlavná suspenzia o koncentrácii 2,2 mg/ml zmiešaním SPIONs s destilovanou vodou. Táto suspenzia bola rozdelená do sklenených skúmaviek po 45 ml suspenzie obsahujúcej 0,1 g nanočastíc. V týchto roztokoch boli rozpustené aminokyseliny, kde sa pH udržiavalo na určitej hodnote pomocou amoniaku a HCl. Celá zmes sa miešala týždeň, aby sa dosiahla dostatočná rovnováha a bola skúmaná pomocou HPLC. Vlastnosti suspenzií boli charakterizované pomocou zeta potenciálu metódou dynamického rozptylu svetla. Zeta potenciál sa meral v suspenziách zriedených s destilovanou vodou, ktoré obsahovali 0,4 mg/ml nanočastíc. Suspenzia bola titrovaná s NaOH pri vyššom pH a pomocou HCl pri nižších hodnotách pH. Na meranie DLS bol použitý prístroj Fritsch, ANALYSETTE 12 Dynasizer. Meranie prebiehalo pri uhle rozptylu  $135^\circ$  a vlnovej dĺžke 658 nm v tenkej vrstve suspenzie. Vedci zistili, že pri stabilnej suspenzii je tvar nanočastíc guľovitý a meraný špecifický povrch je menší ako predpokladali, teda len  $129 \text{ m}^2/\text{g}$ . Keďže nanočastice boli syntetizované za prítomnosti vzduchu, železo  $\text{Fe}^{2+}$  takmer úplne zoxidovalo a nanočastice môžu byť nazvané ako magnetit. Tento predpoklad bol potvrdený Rammanovou spektroskopiou. Obe aminokyseliny využité v práci adsorbujú na SPIONs vo veľmi vysokých povrchových koncentráciách. Hustota adsorpcie sa zvyšuje takmer lineárne. Hodnoty zeta potenciálov boli namerané okolo -28 mV, kde obe suspenzie boli stabilné aj napriek tejto nízkej absolútnej hodnote. Hydrodynamická veľkosť meraná pomocou DLS bola väčšia ako veľkosť ich anorganických jadier, čo naznačuje ďalšiu sférickú stabilizáciu suspenzie pomocou aminokyselín prítomných na povrchu nanočastíc.

Ďalšia práca [31] bola taktiež venovaná štúdiu nanočastíc oxidov železa a meraniu efektívneho nanášania aminokyselín lyzín a tyrozín na povrch nanočastíc oxidov železa pomocou metódy katodického elektrochemického nanášania (Cathodic electrochemical deposition-CED). Na merania sa pripravil roztok  $\text{FeCl}_2$  s  $\text{FeCl}_3$  s koncentráciou 0,005 M v pomere 1:2 a tyrozín a lyzín boli aminokyseliny použité na obtiahnutie povrchu nanočastíc v množstve 1 g. Proces elektrosyntézy trval 30 minút. Čierna zrazenina sa premývala destilovanou vodou, potom etanolom na odstránenie voľných molekúl aminokyselín. Čierna usadenina boli dispergované v etanole, centrifugované pri 6000 otáčkach za minútu po dobu 30 minút. Čierny prášok bol oddelený od etanolového roztoku pomocou magnetu a vysušený vo vákuovej peci. Pri analýze bola využitá metóda DLS pri vlnovej dĺžke 632 nm vo vodnom roztoku a výsledky bolo získané pomocou teoretického indexu lomu magnetitu, ktorého hodnota je rovná 2,42. Aminokyseliny môžu byť chemisorbované na povrchu nanočastíc oxidu železitého  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ,

ktoré robia tieto častice hydrofilnými a dispergovateľnými vo vode. Zvýšenie veľkosti nanočastíc jasne preukázalo prítomnosť vrstiev aminokyselín na ich povrchu. Celá práca bola venovaná hlavne využitiu nového prístupu merania pomocou metódy CED, ktorá sa ukázala ako veľmi výhodná v procese prípravy povlaku aminokyselín na povrchu  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ .

V práci [17], ktorá bola zameraná na výskum účinku komplexov železa s aminokyselinou, boli tieto komplexy využívané ako doplnok výživy paradajok pri hydroponickom pestovaní rastlín. Komplexy boli pripravené z aminokyselín glycín, histidín a arginín. Roztok bol pripravený z aminokyseliny o koncentrácii 2 mM pridanej do 5 ml destilovanej vody a postupne bol pridaný roztok obsahujúci železo, ktorý bol pripravený zmiešaním 2 ml destilovanej vody a síranu železnatého  $\text{FeSO}_4$  o koncentrácii 1 mM. Takto pripravený roztok bol ohrievaný 2 hodiny pod refluxom za stáleho miešania. Po odparení rozpúšťadla vznikli hnedé kryštály komplexov Fe-AK. Produkt bol premytý studeným etanolom, dietyléterom a následne sušený na vzduchu pri izbovej teplote.

## 4 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

### 4.1 Použité chemikálie

- Chlorid železitý  $\text{FeCl}_3$  (Sigma-Aldrich, USA)
- Hydroxid sodný  $\text{NaOH}$  (Sigma-Aldrich, USA)
- Glycín  $\text{C}_2\text{H}_5\text{NO}_2$  (PENTA, ČR)
- Cysteín  $\text{C}_3\text{H}_7\text{NO}_2\text{S}$  (Lachema, ČR)
- Tryptofán  $\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_2$  (Sigma-Aldrich, USA)
- L-lyzín  $\text{C}_6\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_2$  (Sigma-Aldrich, USA)
- Kyselina asparágová  $\text{C}_4\text{H}_7\text{NO}_4$  (Reanal Labor, Budapest Hungary)

### 4.2 Použité meracie prístroje a pomôcky

- Zetasizer Nano ZS s automatickým titrátorom MPT-2 (Malvern, UK)
- Elektrické miešadlo s ohrevom (Heidolph MR Hei-Standard, DE)
- SevenMulti<sup>TM</sup> pH meter (Mettler-Toledo, USA)
- Analytické váhy (Denver Instrument, USA)
- Sušiareň
- Bežné laboratórne pomôcky

### 4.3 Postupy prípravy

#### 4.3.1 Postup prípravy roztokov

Na experimenty boli využité roztoky železa (III) a rôznych druhov aminokyselín. Ako zdroj železa sa využíval chlorid železitý ( $\text{FeCl}_3$ ). Z neho bol pripravený zásobný roztok o koncentrácii 30 mM. Na analytických váhach sa odvážilo vypočítané množstvo  $\text{FeCl}_3$ , ktoré bolo zmiešané s destilovanou vodou v presnom pomere do 100 ml odmernej banky, aby výsledný roztok mal požadovanú koncentráciu 30 mM. Na prípravu roztokov aminokyselín sa zvolili zástupcovia z každej skupiny. Z bázičných aminokyselín bol vybraný lyzín a z kyslých bola vybraná kyselina asparágová. Ďalej bol vybraný glycín, ako zástupca alifatického postranného reťazca a tryptofán bol zástupcom s aromatickým postranným reťazcom. Aminokyselina cysteín bola vybraná, pretože obsahuje vo svojom reťazci atóm síry vo forme SH skupiny. Roztoky jednotlivých aminokyselín sa pripravovali postupne a to vždy na sadu troch opakovaní na každú titráciu. Rovnako ako pri zásobnom roztoku, tak aj roztoky aminokyselín mali mať koncentráciu 30 mM. Presné množstvo bolo odvážené na analytických váhach a zriedené s destilovanou vodou v odmernej banke s objemom 50 ml. Všetky roztoky boli pripravované vždy minimálne deň pred meraním a uskladnené v chladničke.

#### 4.3.2 Postup merania na prístroji Zetasizer Nano ZS

Pred začiatkom merania na prístroji sa najprv pripravila vzorka aminokyseliny, ktorá bola prefiltrovaná cez mikrofilter CA 0,22  $\mu\text{m}$  a v množstve 10 ml pipetovaná do plastovej titračnej nádoby vhodnej pre prístroj. Zásobný roztok  $\text{FeCl}_3$  v koncentrácii 30 mM bol preliaty do rovnakej plastovej titračnej nádoby v potrebnom množstve. Pred každým meraním bol celý systém prístroja premývaný najprv dostatočným množstvom destilovanej vody, etanolu a opäť destilovanou vodou. Každé meranie prebiehalo dvakrát a opakované bolo trikrát pri teplote 25°C a bolo urobených 10 skenov každých 10 sekúnd. Pri lyzíne sme prístroj nastavili v rozsahu 0–10 mM s prírastkom 1 mM. Tryptofán bol meraný v rozsahu 0–0,5 mM s prírastkom 0,05 mM. Kyselina asparágová, glycín a cysteín boli namerané v rozsahu 0–2,2 mM s prírastkom 0,2 mM. Pred začiatkom merania bolo vždy do nádobky obsahujúcej roztok

príslušnej aminokyseliny vložené magnetické miešadlo a celá nádobka bola pripevnená k titrátoru. Do prístroja sme vložili kyvetu vhodnú pre tento prístroj na meranie zeta potenciálu. Počas celého procesu sme merali pH výsledného roztoku, veľkosť častíc, zeta potenciál. Zo získaných dát bol následne stanovený izoelektrický bod, odpovedajúci prídavku  $\text{FeCl}_3$ , pri ktorom bol na meranej vzorke aminokyseliny dosiahnutý nulový náboj. Táto hodnota indikuje počiatok agregácie systému v dôsledku elektrostatickej destabilizácie.

### 4.3.3 Postup prípravy zrážacích reakcií

Pri zrážacích reakciách sa používali roztoky železa a aminokyselín v pomere 1:3. Na reakciu bolo potrebné pripraviť roztok  $\text{FeCl}_3$  o koncentrácii 10mM a roztoky aminokyselín o koncentrácii 30 mM. Príprava roztokov bola rovnaká ako v predchádzajúcej kapitole. V kadičke sa zmiešalo 25 ml roztoku  $\text{FeCl}_3$  a 25 ml roztoku aminokyseliny, vložilo sa magnetické miešadlo a zmes sa ohrievala po dobu 30 minút pri teplote  $60^\circ\text{C}$  za stáleho miešania. Potom sa zmes ochladila a prefiltrovala cez Buchnerovu nálevku s filtračným papierom. Filtrát sa premyl 25 ml destilovanej vody a bol vysušený v sušiarňi 2 dni pri teplote  $60^\circ\text{C}$ . Získaný výťažok bol následne zvážený a podrobený ďalším analýzám (viz Kapitola 4.3.4). Následne bol výťažok zvážený, prevedený do nádoby Eppendorf a pripravený na vykonanie termogravimetrickej analýzy.

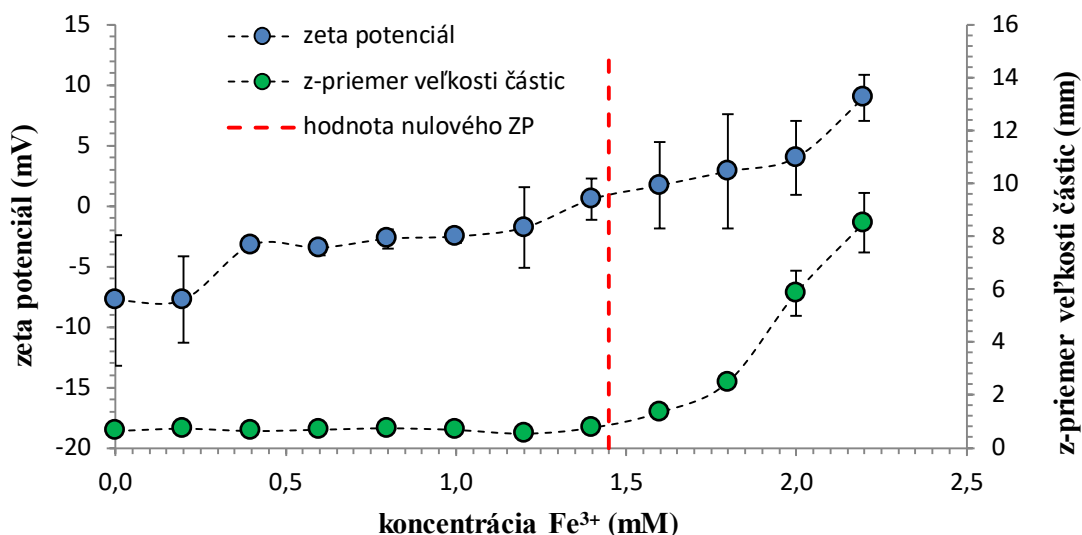
### 4.3.4 Termogravimetrická analýza

Získané zrazeniny Fe-AK komplexov boli podrobené charakterizácii pomocou termogravimetrickej (TGA Q5000, TA Instruments) analýzy. Touto metódou bol pri jednotlivých vzorkách zrazenín v kyslíkovej atmosfére ( $25\text{--}1\,000^\circ\text{C}$ ) stanovený obsah popolovín (nespáliteľné anorganické prímеси).

## 5 VÝSLEDKY A DISKUSIA

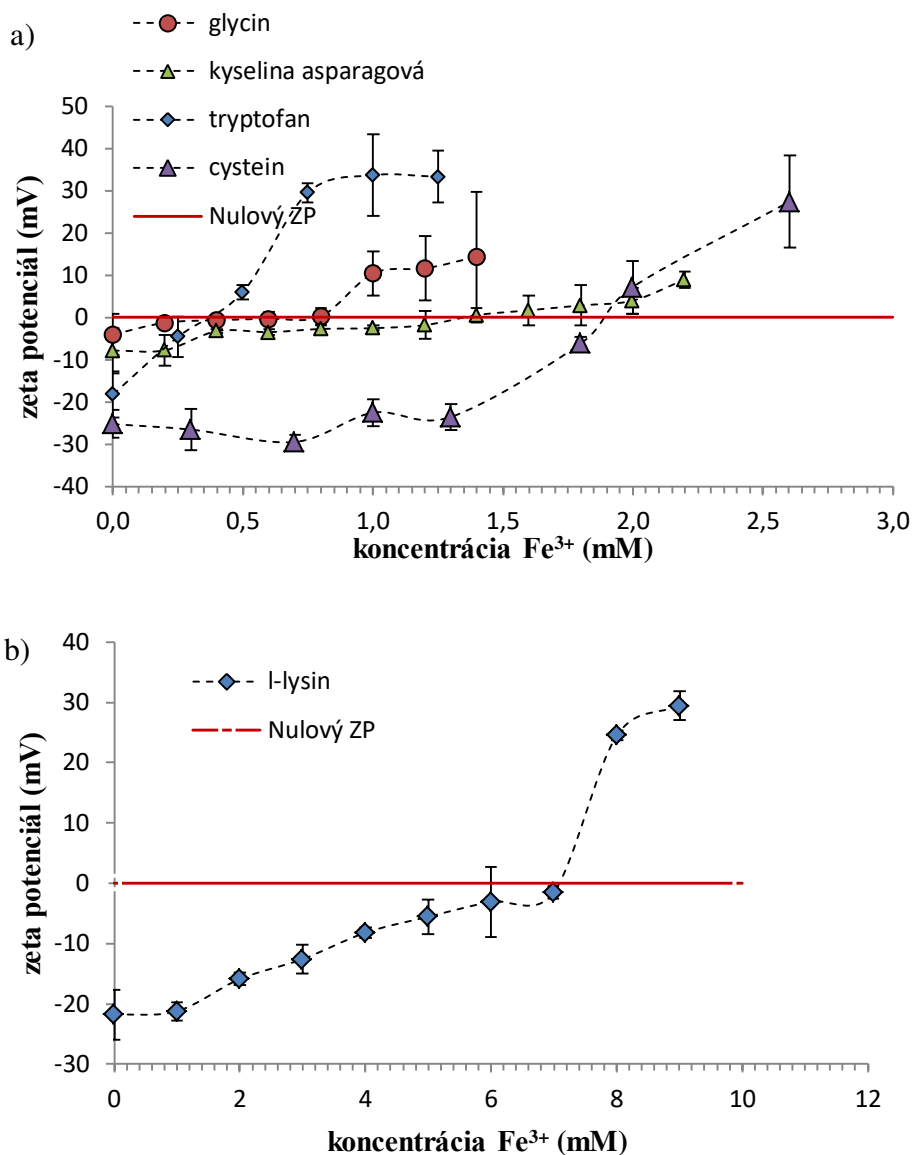
### 5.1 Meranie na prístroji Zetasizer Nano SZ

Pre správne pochopenie jednotlivých meraní, spomínaných v kapitole 4.3.2 sa môže uviesť základný graf merania na Zetasizeri Nano ZS. Tento graf udáva závislosť nameraných zeta potenciálov disperzného systému a veľkosť častíc, alebo inak povedané Z-priemeru veľkosti častíc, na koncentráciu pridaných iónov  $\text{Fe}^{3+}$  do vzorky aminokyseliny.



Obrázok 9: Ukážkový graf pre titráciu  $\text{Fe}^{3+}$  do roztoku kyseliny asparágovej

V grafe môžeme vidieť, že prídavkom opačne nabitých iónov  $\text{Fe}^{3+}$  do roztoku aminokyseliny dochádza postupne k znižovaniu nameranej hodnoty zeta potenciálu aminokyseliny smerom k nule, teda dochádza k postupnému znižovaniu povrchového náboja tejto aminokyseliny v dôsledku prídavku  $\text{Fe}^{3+}$  a dochádza k destabilizácii aminokyseliny. Hodnota nulového náboja v tomto prípade u kyseliny asparágovej bola stanovená pri koncentrácii  $\text{Fe}^{3+}$  ( $1,3 \pm 0,4$ ) mM. Hodnota nulového zeta potenciálu indikuje destabilizáciu aminokyseliny a s ďalším prídavkom by malo dochádzať k agregácii v systéme. V prípade tejto aminokyseliny sa to potvrdilo, ako je vidieť, pri ďalšom prídavku  $\text{Fe}^{3+}$  dochádza k agregácii aminokyseliny a teda k výraznému nárastu veľkosti častíc. Rovnaký priebeh bol očakávaný aj pri ostatných aminokyselinách použitých v tejto práci, avšak vo všetkých prípadoch sa to nepotvrdilo. Agregácia po dosiahnutí nulového zeta potenciálu (ZP) bola pozorovaná aj pri aminokyseline L-lyzín, kde prebehla ešte pred bodom nulového ZP. Porovnanie nameraných závislostí vývoja ZP jednotlivých aminokyselín s prídavkom  $\text{Fe}^{3+}$  iónov je zobrazený na Obrázku 10. Všetky aminokyseliny, ktoré boli v práci využité sú zhrnuté do jedného grafu okrem lyzínu. Jeho titračné rozmedzie bolo v rozdielnom rozsahu a z tohto dôvodu boli dáta vynesené do samostatného grafu.



Obrázok 10: a) Graf pre titráciu Fe<sup>3+</sup> do roztoku aminokyseliny lyzín, b) Graf pre titráciu Fe<sup>3+</sup> do roztoku aminokyselín cysteín, tryptofán, glycín a kyseliny asparágovej

Rovnako ako aj v predchádzajúcom grafe, tak aj v týchto so zvyšujúcim sa prídavkom Fe<sup>3+</sup> do roztoku aminokyselín dochádza k znižovaniu ZP k nule a tým pádom k destabilizácii vzorky. Pri glycíne a kyseline asparágovej je takmer lineárne rastúca krivka, kde pri aminokyseline cysteín krivka rastie postupne. Nameraná závislosť ZP na koncentrácii pridaných Fe<sup>3+</sup> iónov pre tryptofán postupne rástla až do určitého bodu, v ktorom sa začali hodnoty ustáľovať. Krivka pri lyzíne rástla lineárne, kde po dosiahnutí hodnoty nulového ZP nastal náhly rast.

Dosiahnutie nulového ZP bolo pozorované najskôr u aminokyseliny glycín hneď na začiatku merania. Rovnaký priebeh bol sledovaný pri tryptofáne. Aminokyseliny cysteín a kyselina asparagová prekročili túto hodnotu približne pri podobnej koncentrácii pridaných Fe<sup>3+</sup> iónov. Ako posledná aminokyselina, ktorá dosiahla nulovú hodnotu ZP bol L-lyzín.

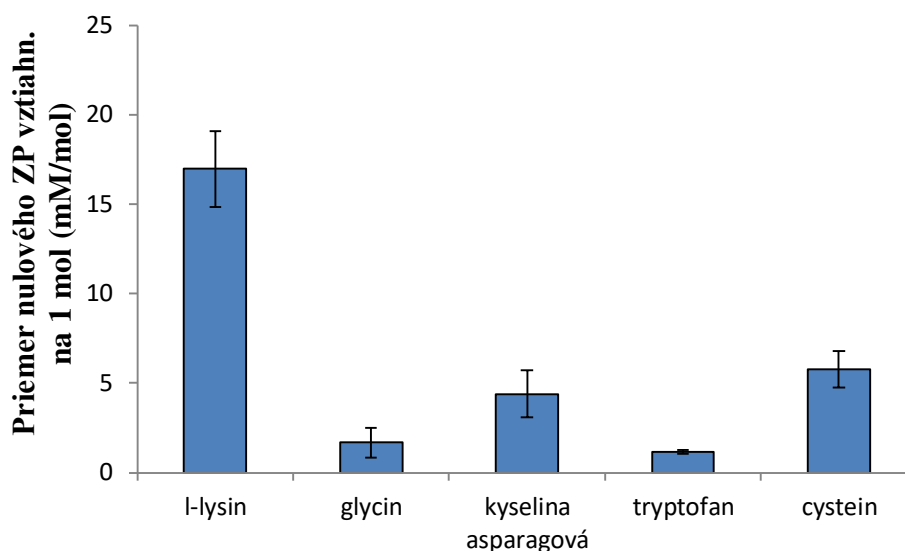
Pomocou softwaru Zetasizer Nano ZS boli určené pre jednotlivé titračné krivky koncentrácie Fe<sup>3+</sup>, pri ktorých boli dosiahnuté hodnoty nulového ZP v meraných vzorkách. Ďalej boli

namerané priemerové hodnoty vrátane smerodajných odchýlok a stanovené hodnoty boli následne prepočítané na 1 mol aminokyseliny. Všetky namerané údaje sú zhrnuté v tabuľke (viz Tabuľka 1).

Tabuľka 1: Súhrn hodnôt titračného stanovenia nulového náboja na aminokyselinách

AK	Hodnoty nulového ZP		Hodnoty nulového ZP vzťahnuté na 1 mol AK	
	priemer (mM)	odchýlka (mM)	priemer (mM/mol)	odchýlka (mM/mol)
l-lysin	5,090	0,640	16,967	2,133
glycin	0,503	0,252	1,676	0,839
kyselina asparagová	1,319	0,388	4,397	1,294
tryptofan	0,343	0,029	1,142	0,096
cystein	1,727	0,308	5,755	1,027

Pre lepšiu názornosť boli stanovené hodnoty pre jednotlivé študované aminokyseliny vynesené do grafickej závislosti (viz Obrázok 11).



Obrázok 11: Graf závislosti priemeru systému nulového ZP vzťahnutého na 1 mol meranej aminokyseliny

Podľa pôvodného predpokladu mali tieto hodnoty stanovených nulových zeta potenciálov na jednotlivých aminokyselinách odpovedať kritickým agregáčnym koncentráciám CAC), ale ako už bolo opísané vyššie, agregácie po dosiahnutí nulového ZP boli pozorované len pri aminokyseline L-lyzín a kyseline asparágovej. Z toho vyplýva, že by bolo vhodné zvážiť zmenu prevedenia experimentu v naväzujúcich prácach, venujúcich sa príprave komplexov železa s aminokyselinami. Na dosiahnutie lepších výsledkov by bolo vhodné zmeniť postup v príprave roztokov, ako napríklad zmeniť pomer železa a aminokyseliny v roztoku, zvýšiť pH celého roztoku alebo zvážiť použitie viacero zdrojov železa, porovnať jednotlivé výsledky a tým pádom nájsť vhodný druh zlúčeniny železa, ktorý by dosahoval najlepšie hodnoty kritickej agregáčnej koncentrácie.

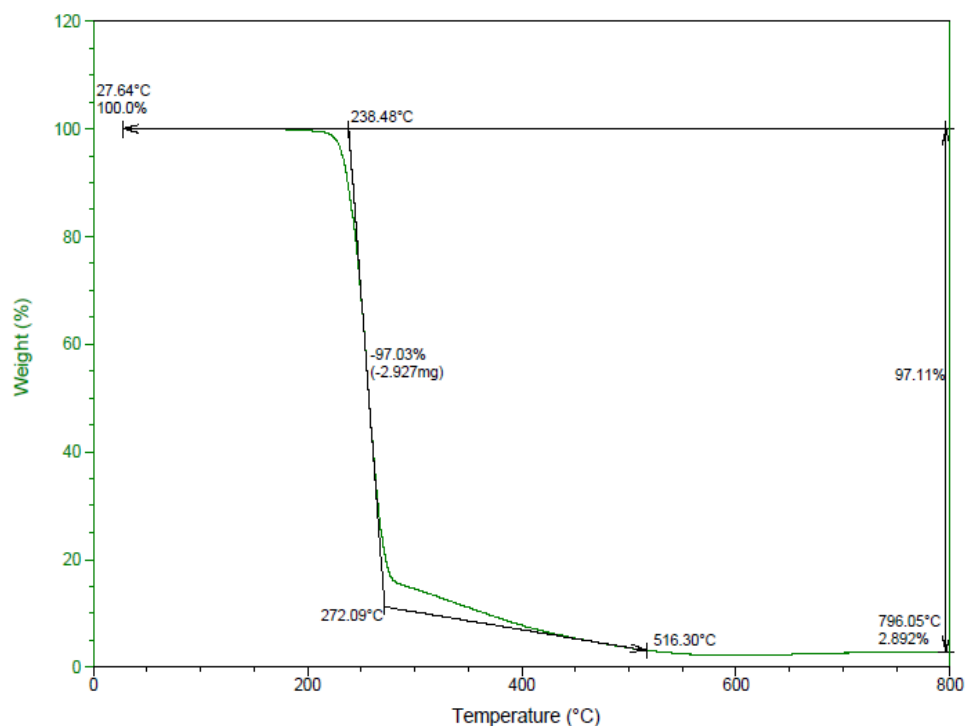
## 5.2 Realizácia zrážacích reakcií

V ďalšej časti práce bolo pôvodným zámerom podľa výsledkov predchádzajúcej kapitoly pripraviť jednoduchou kadičkovou metódou zrážacie experimenty a následne analyzovať vzniknuté zrazeniny. Jednotlivé vzorky boli pripravené podľa postupu uvedenom v kapitole 4.3.3.

Roztoky aminokyselín so železom, pripravených pre zrážacie reakcie mali tehlovohnedú farbu takmer vo všetkých prípadoch, len roztok s aminokyselinou glycín mal pred začiatkom zahrievania oranžovú farbu a zmes cysteínu žlté sfarbenie. Všetky roztoky boli číre, až na cysteín, ktorý pred varom nebol dostatočne rozpustený a v roztoku boli viditeľné biele častice. Po zahrievaní všetky zmesi dosiahli tmavohnedé sfarbenie. Ochladením a filtrovaním reakčných zmesí sme dostali merateľný výťažok len pri aminokyseline cysteín, ktorý bol vo forme bieleho prášku v množstve 0,169 g. Pre dosiahnutie lepších výsledných produktov sme sa rozhodli zväčšiť množstvo na 5násobok a zmeniť pH vody na hodnotu približne 9 pridaním 0,01 M roztoku hydroxidu sodného NaOH. Ani v tomto prípade sme nedosiahli požadované výťažky, ktoré by sme mohli ďalej spracovať pomocou termogravimetrickej analýzy. Naopak produkt cysteínu vážil 0,372 g, čo je viac než dvojnásobok množstva, ktoré bolo získané v prvej reakcii. To naznačuje, že podmienky syntézy boli pre túto aminokyselinu dostatočné. Postup zrážacích reakcií nie je univerzálny pri všetkých aminokyselinách, ich rozpustnosť v roztoku sa taktiež líšila a je samozrejmé, že pri ostatných používaných aminokyselinách je potrebná zmena podmienok reakcií. Jednou zo zmien by mohla byť aj zmena rozpúšťadla alebo jeho použitého objemu, ktorý môže mať vplyv na množstvo získaného výťažku. Taktiež teplota ohrevu má vplyv na odparenie rozpúšťadla z roztoku, čiže pri zvýšení teploty by nastalo vyparenie rozpúšťadla vo väčšom množstve, čo by malo za následok väčší výťažok. Filtráty každej aminokyseliny mali tmavohnedú farbu, ktorá naznačuje, že väčšinu produktu sme nemali rozpustený a teda by bolo vhodné, ak by sme každý filtrát nechali odstáť a neskôr opätovne prefiltrovali cez filtračný papier s menšími pórmami. Ak by ani po opätovnom filtrovaní nebol dosiahnutý výťažok, tak je zrejmé, že žiadna zrazenina nevznikla. Ďalšou z možností je po zahriatí nechať zmesi odstáť dlhšiu dobu alebo uskladniť do chladničky cez noc a následne prefiltrovať.

## 5.3 Vyhodnotenie termogravimetrickej analýzy

V tejto kapitole sme sa zamerali na vyhodnotenie zrazenín zo zrážacích reakcií pomocou termogravimetrie, kde sme stanovili hodnoty popola. Na obrázku 12 je zobrazená vzorka cysteínu s hmotnosťou 0,372 g spracovaná touto metódou.



Obrázok 12: Vyhodnotenie termogravimetrie cysteínu 2

Priebeh analýzy oboch vzoriek cysteínu bol pomerne rovnaký. Na začiatok sa zo vzoriek vyparovala voda, ktorá odchádza pri teplote do 110°C. Ako je vidieť z obrázku, nenastal žiaden úbytok váhy a teda boli vzorky dobre vysušené. Organická hmota odchádza zo vzoriek približne do 600°C. Zbytok, ktorý ostal vo vzorkách je čistá anorganická hmota (popol). V našom prípade je v anorganickej hmote aj využívané železo, aj keď jeho množstvo je pomerne malé, čo naznačuje malé naviazanie. Stanovenie hodnoty popola cysteínu 2 je 2,892 %, čo je nízka hodnota, aj keď v porovnaní so vzorkou cysteínu 1 je vysoká. Cysteín 1 mal dvakrát menšie množstvo ako cysteín 2, ale jeho hodnota popola je len 0,1464 %. Obe hodnoty vzoriek len potvrdili náš predpoklad, že sa naviazalo malé množstvo železa.

## 6 Záver

Cieľom tejto práce bola príprava a charakterizácia komplexov železa s aminokyselinami. Boli študované reakcie jednotlivých aminokyselín so železitými iónmi pri určitých experimentálnych podmienkach s úmyslom nájsť vhodné podmienky pre určenie kritickej agregáčnej koncentrácie. Taktiež určiť vhodné parametre na uskutočnenie syntéz komplexov, aby sme dostali dostatočné množstvo produktov, ktoré by postačovalo na charakterizáciu dostupnými metódami. Ako zdroj železa bol použitý chlorid železitý a zdrojom aminokyselín boli glycín, tryptofán, cysteín, lyzín a kyselina asparágová.

Meraním komplexov Fe-AK na prístroji Zetasizer Nano ZS sme zistili, že prídavkom železitých iónov do roztoku aminokyseliny sa znižuje hodnota zeta potenciálu až sa blíži k nule, čo nasvedčuje destabilizácii aminokyseliny a následne dochádza k agregácii v systéme. K agregácii došlo len pri aminokyseline L-lyzín a kyseline asparágovej. Všetky hodnoty boli vynesené do grafov a spracované do tabuľky.

Pri zrážacích reakciách sme mali malú úspešnosť v dosiahnutí výt'azkov, až na aminokyselinu cysteín, ktorá bola v dostatočnom množstve na prevedenie ďalších analýz. Pri dvoch vzorkách sme pomocou termogravimetrickej analýzy stanovili obsah popola v zrazenine, aj keď vyšli tieto hodnoty veľmi nízke a poukazovali na slabé naviazanie železa. V prípade ostatných aminokyselín sme navrhli zmeny v postupoch prípravy roztokov, ale aj postupov pri samotnom prevedení reakcií pre prevedenia naväzujúcich prác v príprave týchto komplexov.

V tejto práci boli vypracované postupy prípravy komplexov a ich následné spracovanie. Tieto komplexy majú uplatnenie v poľnohospodárstve, kde boli pridané do hnojív za účelom vyššej a kvalitnejšej produkcie. Hlavné uplatnenie majú v medicíne pri skúmaní rôznych neurodegeneratívnych chorôb.

## 7 Zoznam použitej literatúry

- [1] GAŽO, Ján. *Všeobecná a anorganická chémia*. 3. Bratislava: Vyd. ALFA – Vydavateľstvo technickej a ekonomickej literatúry, 1981. ISBN 63-557-81
- [2] ONDREJOVIČ, Gregor. *Anorganická chémia 2*. 2.uprav.vyd. Bratislava: Slovenská technická univerzita, 1995. ISBN 80-227-0740-6.
- [3] HESLOP, R. B. a Kenneth JONES. *Anorganická chemie*. Preložil Karel DOSTÁL, preložil František JURSIK. Praha: SNTL - Nakladatelství technické literatury, 1982.
- [4] SPENCER, Elinor C., Nancy L. ROSS, Rebecca E. OLSEN, Baiyu HUANG, Alexander I. KOLESNIKOV a Brian F. WOODFIELD. Thermodynamic Properties of  $\alpha$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> and Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> Nanoparticles. *The Journal of Physical Chemistry C* [online]. 2015, 119(17), 9609-9616 [cit. 2017-05-23]. DOI: 10.1021/acs.jpcc.5b01481. ISSN 1932-7447. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acs.jpcc.5b01481>.
- [5] COTTON, F. A. a G. WILKINSON. *Anorganická chemie*. Preložil J. MASEK. Praha: Academia, 1973.
- [6] JINDRA, Antonín. *Biochémia : Molekulárnobiologické a farmaceutické aspekty*. 1. vyd. Martin: Osveta, 1985. 560 s.
- [7] Železo [online]. [cit.2017-05-23]. Dostupné z: <http://cs.wikipedia.org/wiki/%C5%BDzelezo>
- [8] *Hém* [online]. [cit. 2017-05-23]. Dostupné z: <http://www.wikiskripta.eu/index.php/Hem>
- [9] *Iron-sulfur protein* [online]. [cit. 2017-05-23]. Dostupné z: [http://en.wikipedia.org/wiki/Iron-sulfur\\_protein](http://en.wikipedia.org/wiki/Iron-sulfur_protein)
- [10] *Die Sache mit der Ursuppe* [online]. [cit. 2017-05-23]. Dostupné z: <https://substantiaalba.wordpress.com/tag/wachtershauser/>
- [11] ŠKÁRKA, Bohumil a Miroslav FERENČÍK. *Biochémia*. 2. přeprac. vyd. Bratislava: Alfa, 1987.
- [12] MCMURRY, John. *Organic chemistry*. 6th ed. Belmont, CA: Thomson-Brooks/Cole, c2004. ISBN 05-343-8999-6.
- [13] Valigura, D. 07. Seminár: Protolytické rovnováhy – Systém viacerých rovnováh II
- [14] Perrin, D.D. – Sharma, V.S. J. 1967. *Chem. Soc. (A)*, 1967. s.724
- [15] Albert, A. 1953. *Biochem J*, 1953. s.54,646
- [16] AMOLEGBE, Saliu A., Sheriff ADEWUYI, Caroline A. AKINREMI, Johnson F. ADEDIJI, Amudat LAWAL, Adijat O. ATAYESE a Joshua A. OBALEYE. Iron(III) and copper(II) complexes bearing 8-quinolinol with amino-acids mixed ligands: Synthesis, characterization and antibacterial investigation. *Arabian Journal of Chemistry*. 2015, 8(5), 742-747. DOI: 10.1016/j.arabjch.2014.11.040. ISSN 18785352. Dostupné z:

také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1878535214003177>.

- [17] GHASEMI, Somayeh, Amir H. KHOSHGOFTARMANESH, Hassan HADADZADEH a Mehran JAFARI. Synthesis of Iron-Amino Acid Chelates and Evaluation of Their Efficacy as Iron Source and Growth Stimulator for Tomato in Nutrient Solution Culture. DOI: 10.1007/s00344-012-9259-7. ISBN 10.1007/s00344-012-9259-7. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s00344-012-9259-7>.
- [18] VUKOSAV, Petra a Marina MLAKAR. Speciation of biochemically important iron complexes with amino acids: L-aspartic acid and L-aspartic acid - glycine mixture. *Electrochimica Acta*. 2014, 139, 29-35. DOI: 10.1016/j.electacta.2014.07.006. ISSN 00134686. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0013468614013826>.
- [19] Serine and Glycine Metabolism in Hepatocytes from Mid Gestation Fetal Lambs [online]. [cit. 2017-05-23]. Dostupné z: [http://www.nature.com/pr/journal/v39/n6/fig\\_tab/pr19962573f2.html](http://www.nature.com/pr/journal/v39/n6/fig_tab/pr19962573f2.html)
- [20] VODRÁŽKA, Zdeněk. *Biochemie*. 2. oprav. vyd. Praha: Academia, 1996. ISBN 978-80-200-0600-4.
- [21] HOLEČEK, Milan. *Regulace metabolismu cukrů, tuků, bílkovin a aminokyselin*. Praha: Grada, 2006. ISBN 80-247-1562-7.
- [22] [online]. [cit. 2017-05-23]. Dostupné z: <http://ciselniky.dasta.mzcr.cz/cd/hypertext/KPAAN.htm>
- [23] MADDISON, Daniel C. a Flaviano GIORGINI. The kynurenine pathway and neurodegenerative disease. DOI: 10.1016/j.semcd.2015.03.002. ISBN 10.1016/j.semcd.2015.03.002. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1084952115000452>
- [24] GHASEMI, Somayeh, Amir Hossein KHOSHGOFTARMANESH, Majid AFYUNI a Hassan HADADZADEH. Iron(II)-amino acid chelates alleviate salt-stress induced oxidative damages on tomato grown in nutrient solution culture. *Scientia Horticulturae*. 2014, 165, 91-98. DOI: 10.1016/j.scienta.2013.10.037. ISSN 03044238. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304423813005633>
- [25] LANE, Darius J.R. a Des R. RICHARDSON. The active role of vitamin C in mammalian iron metabolism: Much more than just enhanced iron absorption!. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2014.07.007. ISBN 10.1016/j.freeradbiomed.2014.07.007. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0891584914003220>
- [26] BHATTACHARJEE, Sourav. DLS and zeta potential – What they are and what they are not? *Journal of Controlled Release*. 2016, 235, 337-351. DOI: 10.1016/j.jconrel.2016.06.017. ISSN 01683659. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168365916303832>
- [27] ŠEVČÍKOVÁ, Petra; KAŠPÁRKOVÁ, Věra; KREJČÍ, Jiří, Vltavská Pavlína DYNAMICKÝ ROZPTYL SVĚTLA V ANALÝZE KOLOIDNÍCH SYSTÉMŮ. *Chemické listy* [online]. 2014 [cit. 17.2.2017]

- [28] *STUDIUM STABILITY BIOPOLYMERŮ POMOCÍ TECHNIK ROZPTYLU SVĚTLA*. Brno, 2015. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně Fakulta chemická.
- [29] *Zeta potenciál* [online]. [cit. 2017-04-19]. Dostupné z: <https://www.xray.cz/kfkl-osa/eng/zetasizer/zeta.htm>
- [30] PUŠNIK, Klementina, Mojca PETERLIN, Irena Kralj CIGIĆ, Gregor MAROLT, Ksenija KOGEJ, Alenka MERTELJ, Sašo GYERGYEK a Darko MAKOVEC. *Adsorption of Amino Acids, Aspartic Acid, and Lysine onto Iron-Oxide Nanoparticles*. DOI: 10.1021/acs.jpcc.6b03180. ISBN 10.1021/acs.jpcc.6b03180. Dostupné také z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acs.jpcc.6b03180>
- [31] KARIMZADEH, Isa, Mustafa AGHAZADEH, Taher DOROUDI, Mohammad Reza GANJALI, Peir Hossein KOLIVAND a Davoud GHARAILOU. Amino Acid Coated Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles for Biomedical Applications Through a Novel Efficient Preparation Method. *Journal of Cluster Science*. 2017, **28**(3), 1259-1271. DOI: 10.1007/s10876-016-1139-z. ISSN 1040-7278. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/s10876-016-1139-z>

## 8 Zoznam skratiek a značiek

1-KYN	1-kynurenín
3-HK	3-hydroxykynurenín
$\alpha_i$	zlomková koncentrácia častíc
ATP	adenozín trifosfát
CAG	promótor syntézy
CNS	Centrálne nervová sústava
DTPA	kyselina dietyléntriaminopentaoctová
EDTA	kyselinaetyléndiaminotetraoctová
Gly	glycín
HD	Huntingtonova choroba
HDAC	deacetyláza histónu
HTT	gén huntingtín
IDO1	indolamino-2,3-dioxygenáza
KD	kynurenínová dráha
KMO	kynurenínová monooxygenáza
LPS	lipopolysacharidy
mHTT	mutant génu huntingtín
NAD <sup>+</sup>	nikotínamid adenín nukleotid
pI	izoelektrický bod
QUIN	kyselina chinolínová
TRP	tryptofán
SWV	Squarewave voltammetry
ZP	zeta potenciál