

Studium tvorby supramolekulárních komplexů azobarviv na bázi adamantanu s cucurbit[n]urily pomocí ESI-MS

Jana Mátlová

Bakalářská práce
2020



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky

Akademický rok: 2019/2020

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Jana Mátlová**
Osobní číslo: **T17150**
Studijní program: **B2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Technologie výroby tuků, kosmetiky a detergentů**
Forma studia: **Prezenční**
Téma práce: **Studium tvorby supramolekulárních komplexů azobarviv na bázi adamantanu s cucurbit[n]urily pomocí ESI-MS**

Zásady pro vypracování

I. Teoretická část

1. Stručná charakteristika hmotnostní spektrometrie a azobarviv.
2. Makrocyclické sloučeniny používané v supramolekulární chemii.
3. Supramolekulární komplexy typu azobarvivo-cucurbit[n]uril.

II. Praktická část

1. Provést sérii experimentů s cílem ověřit supramolekulární chování azobarviv na bázi adamantanu s cucurbit[n]urily v plynné fázi.
2. Získané výsledky vyhodnotit a vhodně interpretovat.

Forma zpracování bakalářské práce: **Tištěná/elektronická**

Seznam doporučené literatury:

- [1] DODZIUK, H.: Cyclodextrins and Their Complexes. Weingim: WILEY-VCH Verlag GmbH Co., 2006. ISBN: 3-527-31280-3.
[2] SCHALLEY, CH. A.: Analytical Methods in Supramolecular Chemistry. WILEY-VCH Verlag GmbH Co., 2012. ISBN: 978-3527239823.
[3] SCHALLEY, CH. A., SPRINGER, A.: Mass Spectrometry and Gas-Phase Chemistry of Non-Covalent Complexes. WILEY-VCH Verlag GmbH Co. 2009. ISBN: 978-0-470-13115-2.

Vedoucí bakalářské práce: **Ing. Michal Rouchal, Ph.D.**
Ústav chemie

Datum zadání bakalářské práce: **2. ledna 2020**
Termín odevzdání bakalářské práce: **22. května 2020**

L.S.

prof. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan

doc. Ing. Marián Lehocký, Ph.D.
ředitel ústavu

Ve Zlíně dne 20. února 2020

PROHLÁŠENÍ AUTORA BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Beru na vědomí, že:

- bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému a dostupná k nahlédnutí;
- na moji bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3;
- podle § 60 odst. 1 autorského zákona má Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- podle § 60 odst. 2 a 3 autorského zákona mohu užít své dílo – bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- pokud bylo k vypracování bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tj. k nekomerčnímu využití), nelze výsledky bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- pokud je výstupem bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Prohlašuji,

- že jsem na bakalářské práci pracoval samostatně a použitou literaturu jsem citoval. V případě publikace výsledků budu uveden jako spoluautor.
- že odevzdaná verze bakalářské práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou obsahově totožné.

Ve Zlíně, dne:

Jméno a příjmení studenta:

.....
podpis studenta

ABSTRAKT

Náplní teoretické části bakalářské práce bylo stručně charakterizovat hmotnostní spektrometrii, popsat z jakých částí se skládá hmotnostní spektrometr a stručně charakterizovat ionizaci elektrosprejem a iontovou past, neboť tyto jsou součástí hmotnostního spektrometru, na kterém byly prováděny analýzy popsané v experimentální části. Významnou částí této práce je kapitola věnující se cyklodextrinům a cucurbiturilům, makrocyclickým molekulám, jež jsou hojně využívány v oboru supramolekulární chemie a jsou rovněž studovány i výzkumnou skupinou doc. Roberta Víchy, tudíž mají své místo i v této bakalářské práci. Zbývající kapitola stručně pojednává o azobarvivech a jsou zde také zmíněny konkrétní příklady komplexů typu azobarvivo-cyklodextrin a azobarvivo-cucurbituril. Experimentální část je pak věnována nejen charakterizaci samotných azobarviv pomocí analýz ESI-MS, ale zejména pak jejich schopnosti vytvářet supramolekulární komplexy s cucurbiturily a v případě prokázání vzniku daného komplexu také studiu jeho chování v plynné fázi.

Klíčová slova: hmotnostní spektrometrie, iontová past, ionizace elektrosprejem, cyklodextrin, cucurbituril, azobarvivo, komplexy hostitel-host

ABSTRACT

The content of the theoretical part of the bachelor thesis was the brief characterization of mass spectrometry, the clarification of the mass spectrometer elements and the concise description of electrospray ionization and ion trap, as these are components of the mass spectrometer on which the analyzes described in the experimental part were performed. An important part of this work is a chapter devoted to cyclodextrins and cucurbiturils, macrocyclic molecules, which are widely used in the field of supramolecular chemistry and they are also studied by research group led by doc. Robert Vícha, therefore they are included in this bachelor's thesis. The remaining chapter briefly discusses azo dyes and there are also mentioned specific examples of complexes such as azo dye-cyclodextrin and azo dye-cucurbituril. The experimental part is then devoted to the characterization of both azo dyes themselves and azo dye-cucurbituril complexes using ESI-MS analyzes. The experimental part then focuses on azo dyes characterization by ESI-MS analysis, with main emphasis on their ability to create supramolecular complexes with cucurbiturils. If the existence of said complexes was proven, its behavior in the gas phase was further analysed.

Keywords: mass spectrometry, ion trap, electrospray ionization, cyclodextrin, cucurbituril, azo dye, host-guest complexes

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému vedoucímu Ing. Michalovi Rouchalovi Ph.D. za odborné vedení, cenné rady a připomínky, trpělivost a ochotu v průběhu celé práce.

Prohlašuji, že odevzdaná verze bakalářské/diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou totožné.

OBSAH

ÚVOD	10
I TEORETICKÁ ČÁST	11
1 HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE	12
1.1 INSTRUMENTACE	12
1.1.1 Vakuový systém	12
1.1.2 Iontový zdroj	13
1.1.3 Hmotnostní analyzátor	14
1.1.4 Detektor	15
1.2 HMOTNOSTNÍ SPEKTRUM.....	16
2 MAKROCYKLICKÉ SLOUČENINY POUŽÍVANÉ V SUPRAMOLEKULÁRNÍ CHEMII	17
2.1.1 Historie objevu cyklodextrinů	18
2.1.2 Charakteristika cyklodextrinů	19
2.1.3 Rozměry jednotlivých homologů	21
2.1.4 Modifikované cyklodextriny	21
2.1.5 Příprava cyklodextrinů	23
2.1.6 Způsoby výroby cyklodextrinů	24
2.1.7 Cyklodextriny v roli hostitelských molekul	24
2.2 CUCURBITURILY	26
2.2.1 Historie objevu cucurbiturilů	27
2.2.2 Charakteristika cucurbit[n]urilů	29
2.2.3 Rozměry jednotlivých homologů	30
2.2.4 Příprava cucurbiturilů	31
2.2.5 Cucurbiturily v roli hostitelských molekul	32
3 AZOSLOUČENINY A JEJICH KOMPLEXY S CUCURBITURILY A CYKLODEXTRINY	34
3.1 SUPRAMOLEKULÁRNÍ KOMPLEXY AZOBARVIV S CYKLODEXTRINY	36
3.2 SUPRAMOLEKULÁRNÍ KOMPLEXY AZOBARVIV S CUCURBITURILY	37
3.3 SUPRAMOLEKULÁRNÍ KOMPLEXY AZOBARVIV S CYKLODEXTRINY A CUCURBITURILY	38
II PRAKTICKÁ ČÁST	40
4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	41
4.1 CHARAKTERISTIKA POUŽITÝCH LIGANDŮ A HOSTITELSKÝCH MOLEKUL.....	41
4.1.1 Ligandy	41
4.1.2 Hostitelské molekuly	42
4.2 ESI-MS ANALÝZA SAMOTNÝCH LIGANDŮ.....	43
4.3 ESI-MS ANALÝZA INKLUZNÍCH KOMPLEXŮ	44
ZÁVĚR	54
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	55

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	59
SEZNAM OBRÁZKŮ	60
SEZNAM TABULEK.....	61

ÚVOD

Éra supramolekulární chemie se začala psát v roce 1987, kdy Donald J. Cram, Jean-Marie Lehn a Charles Pedersen získali Nobelovu cenu za chemii. V dnešní době je tento obor chemie jedním z nejaktivnějších.

Supramolekulární chemie se zaměřuje na studium nekovalentních vazeb, jakými jsou například vodíková vazba, π - π interakce, hydrofobní interakce a elektrostatické a van der Waalsovy interakce. Jedna z částí supramolekulární chemie se zabývá tvorbou komplexů typu hostitel-host. Typickými hostitelskými molekulami jsou například cryptandy, cavitandy, crown-ethery, cucurbiturily, calixareny, cyklodextriny či pillareny. Během posledních dvou desetiletí měla klíčovou roli především rodina cucurbiturilů. Ačkoliv první z rodiny, CB6, byl syntetizován již v roce 1905, trvalo ještě velmi dlouho, než se tato skupina hostitelských molekul rozrostla o další homology. Všechny tyto homology byly syntetizovány až o téměř 100 let později, po roce 2000.

Schopnost cucurbiturilů vytvářet komplexy typu hostitel-host velmi závisí na objemu kavity daného homologu. Od objemu kavity se pak následně odvíjí i možná velikost molekuly hosta, který má být v kavitě inkludován.

Studiem komplexačních schopností homologů CB6, CB7 a CB8 se zabývá praktická část této práce, přičemž v roli ligandů zde vystupují azobarviva na bázi adamantanu, kdy není nezajímavé, že se aktuálně jedná vůbec o první azobarviva obsahující tento polycyklický uhlovodík. Analýzy byly prováděny pomocí hmotnostního spektrometru s elektrospřejovou ionizací a iontovou pastí.

I. TEORETICKÁ ČÁST

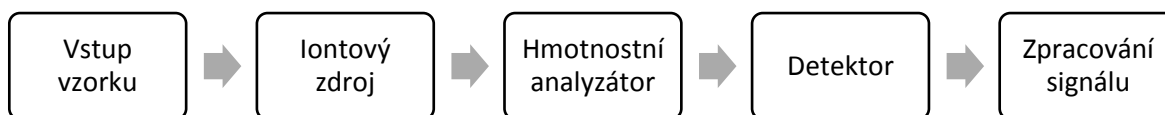
1 HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE

Hmotnostní spektrometrie (*Mass Spectrometry*, MS) je fyzikálně chemická metoda, která je založená na rozdělení iontů v plynné fázi podle jejich poměru hmotnosti a náboje „ m/z “ (bezrozměrná veličina) a analýze jejich četnosti. Ionty (kladné nebo záporné) vznikají z atomů, molekul nebo jejich částí ionizací. (1; 2) Tato metoda má velmi dobrou vypovídací schopnost o struktuře analyzovaných látek. (2) Hmotnosti iontů se vyjadřují pomocí unifikované atomové hmotnostní jednotky, jejíž jednotka u (dříve se používala zkratka „ amu “ z angl. atomic mass unit) odpovídá hmotnosti jedné dvanáctiny nuklidu ^{12}C . Molekulovou hmotnost lze také vyjádřit v jednotkách dalton (Da), přičemž hodnota této jednotky odpovídá jednotce u . Nutno podotknout, že jednotky Da se používají pro větší molekuly jako jsou např. proteiny či enzymy. (1)

Hmotnostní spektrometr lze využít také v kombinaci s plynovou či kapalinovou chromatografií (nebo jinou analytickou separační technikou). Hmotnostní spektrometr zde vystupuje jako strukturně selektivní detektor, který umožňuje nejen detekci přítomného analytu, ale také jeho identifikaci na základě zaznamenaného hmotnostního spektra. (2)

1.1 Instrumentace

Každý hmotnostní spektrometr je složen ze tří základních částí, kterými jsou iontový zdroj, hmotnostní analyzátor a detektor. Nezbytnou součástí hmotnostního spektrometru je řada periférií, jako např. vakuový systém (v podobě externě umístěné membránové vývěvy a interně umístěné turbomolekulární pumpy), zdroj inertního plynu, počítač a software pro ovládání a vyhodnocování analýz. (1; 2) Obecné schéma hmotnostního spektrometru je uvedeno na **Obrázku 1**.



Obrázek 1. Obecné schéma hmotnostního spektrometru.

1.1.1 Vakuový systém

Vysoké vakuum je základním předpokladem pro úspěšnou separaci iontů a jeho kvalita výrazně ovlivňuje kvalitu spekter. (1; 2) Přítomnost vysokého vakua je vždy nutná v hmotnostním analyzátoru. Vstup vzorku, popřípadě také ionizace se nemusí odehrávat

pouze ve vakuu, ale je možné je provést i za atmosférického tlaku, záleží na typu ionizace. Tlak se obvykle pohybuje v rozmezí 10^{-3} až 10^{-5} Pa. Za těchto podmínek nedochází k výměně energie mezi jednotlivými částicemi, jelikož nedochází k jejich vzájemným kolizím. (1)

Čerpací systém je ve většině případů dvoustupňový – k předčerpání se využívají běžné mechanické rotační vývěvy, dočerpání se provádí pomocí difuzní nebo turbomolekulární pumpy. (2)

1.1.2 Iontový zdroj

Iontový zdroj slouží k převedení neutrálních částic analyzované látky na částice nabitě (tzv. ionizace). Během tohoto procesu se vzniklé ionty mohou následně rozpadat na tzv. fragmentové ionty. (1; 2) Ionizace je naprosto nezbytným předpokladem analýzy. Její energetická náročnost závisí na typu analyzované látky. Prahová ionizační energie se pro většinu organických látek pohybuje v rozmezí 7 až 16 eV. (2)

Jak již bylo uvedeno, v této části hmotnostního spektrometru již mohou nastat fragmentační reakce, při kterých dochází k destrukci chemických vazeb vzniklého iontu. Tento proces souvisí s množstvím energie, která je molekule dodána. Pokud totiž tato energie výrazně převyšuje první ionizační energii molekuly, pak může dojít ke spotřebování nadbytečné vibračně-rotační energie fragmentací vzniklého iontu. (2) Přítomnost a četnost jednotlivých fragmentů lze ovlivnit výběrem ionizační metody. (1)

Podle množství dodané energie se ionizační techniky dělí na tzv. měkké a tvrdé. (3) U měkkých ionizačních technik je energetický přebytek dodaný ionizované molekule malý, pravděpodobnost fragmentace je tedy nízká. (2) Důsledkem potlačení fragmentace je zvýšení intenzity signálu molekulového iontu ve spektru. (1) U tvrdých ionizačních technik je množství dodané energie natolik velké, že postačuje k rozsáhlejší fragmentaci primárně vzniklého iontu. (2)

Množství iontových zdrojů je v dnešní době značené, proto budou v níže uvedeném výčtu zmíněny jen ty nejběžnější ionizační techniky:

- ▶ elektronová ionizace (*Electron Ionization*, EI),
- ▶ chemická ionizace (*Chemical Ionization*, CI),
- ▶ ionizace nárazem atomů (*Fast Atom Bombardment*, FAB),

- ▶ ionizace laserem za účasti matrice (*Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization*, MALDI) a
- ▶ sprejové ionizační techniky, mezi které patří termosprejová ionizace (*Thermospray*, TS), elektrosprejová ionizace (*Electrospray Ionization*, ESI) a chemické ionizace za atmosférického tlaku (*Atmospheric Pressure Chemical Ionization*, APCI). (1; 2)

Ionizace elektrosprejem (*Electrospray Ionization*, ESI) je v současnosti nejčastěji používaným iontovým zdrojem pro kombinaci LC-MS. Kapalná fáze přivedená do kovové kapiláry je rozprášena vlivem nehomogenního elektrického pole mezi ústím této kapiláry, na níž je přivedeno vysoké napětí (2 až 5 kV), a protielektrodou, která je uzemněna. Při tomto procesu je kapalná fáze roztržena na velmi drobné kapičky, které mají vysokou hustotu povrchového náboje. Tyto kapičky procházejí proudem inertního plynu (nejčastěji se jedná o dusík o teplotě asi 200 °C), dochází k rychlému odpaření rozpouštědla a zmenšování jejich velikosti. V průběhu odpaření analytu z povrchu kapičky dochází k jeho ionizaci. (1; 2; 3)

V závislosti na polaritě napětí vloženého na kapiláru a povahy analytu lze měřit v kladném (ESI+) nebo záporném (ESI-) skenovacím módu. V pozitivním módu jsou obvykle pozorovány ionty typu $[M+H]^+$ a poměrně běžně také adukty jako $[M+Na]^+$ a $[M+K]^+$. V negativním módu se lze nejčastěji setkat s ionty typu $[M-H]^-$. (1) Vzniklé ionty se následně vedou vstupní štěrbinou přes iontovou optiku do hmotnostního analyzátoru. (2)

Výhodou ESI je skutečnost, že umožňuje ionizaci nejen nízkomolekulárních, ale také vysokomolekulárních látek včetně bílkovin. Nejedná se však o univerzální iontový zdroj, neboť ESI je vhodný pouze pro ionizaci polárních látek. (1)

1.1.3 Hmotnostní analyzátor

Hmotnostní analyzátor slouží k rozdělení směsi iontů o různých poměrech hmotnosti ku náboji (m/z), která je produkována v iontovém zdroji. (2)

Hmotnostních analyzátorů existuje několik typů. Jako příklad lze uvést magnetický hmotnostní analyzátor, kvadrupólový analyzátor (*Quadrupole*, Q), iontovou past (*Ion Trap*, IT), průletový analyzátor (*Time Of Flight*, TOF), cyklotronový separátor a orbitrap. (1; 2)

Iontová past je 3D obdobou kvadrupólového analyzátoru. Pomocí střídavého elektrického pole umožňuje uzavřít ionty v ohraničeném prostoru. Iontová past sestává ze

vstupní a výstupní kruhové elektrody hyperbolického průřezu a z prstencové středové elektrody. Na středovou elektrodu je přiváděno vysokofrekvenční napětí s proměnnou amplitudou.

Do iontové pasti jsou otvorem ve vstupní kruhové elektrodě přivedeny molekuly analyzované látky a následně je provedena ionizace pulsem elektronů. Ionizaci je rovněž možno provést v externím iontovém zdroji, což znamená, že do vnitřního prostoru iontové pasti je přiváděna analyzovaná látka již v ionizovaném stavu. (2)

V prostoru prstencové elektrody ionty vlivem proměnlivého elektrostatického pole oscilují. Následuje fáze akumulace, během níž je na prstencovou elektrodu přiváděno střídavé napětí o malé amplitudě. Následně se amplituda střídavého napětí zvyšuje a s její rostoucí hodnotou jsou postupně ionty s rostoucím m/z vypuzeny přes otvor výstupní kruhové elektrody vypuzeny z iontové pasti do detektoru. (1; 2) Do iontové pasti je pro snížení oscilací zachycených iontů ve směru osy Z přiváděno helium v nízké koncentraci. Díky tomu dochází ke zvýšení hodnoty dosahovaných rozlišení. (1)

1.1.4 Detektor

Detektor, na který dopadá proud iontů po průchodu hmotnostním analyzátozem, poskytuje analogový signál, který je úměrný počtu dopadajících iontů. Analogový signál je po digitalizaci převeden do počítače a následně za pomoci vhodného softwaru zpracován do formy hmotnostních spekter.

Detektory používané v MS je možné rozdělit do dvou kategorií – detektory pro přímá měření a násobičové detektory.

Detektory pro přímá měření detekují elektrický proud vznikající přímým dopadem iontů. Tyto detektory jsou nezbytné například pro měření přesného izotopového zastoupení prvků při určování stáří hornin.

Násobičové detektory využívají efektu násobení elektronů vzniklých po dopadu iontů. Tyto detektory poskytují měřitelné signály i pro jednotlivé ionty. Jsou běžně využívány u veškeré komerční instrumentace. Tento typ detektorů lze dále rozdělit na detektory fotonásobičové a elektronnásobičové. (2)

1.2 Hmotnostní spektrum

Hmotnostní spektrum je základním informačním výstupem hmotnostního spektrometru a umožňuje určit strukturu analyzované látky. (2) Obvykle má podobu čárového grafu, kde je na vodorovné ose vynesena hodnota m/z , osa svislá nám podává informaci o odezvě detektoru, která je úměrná intenzitě iontového proudu (četnost iontů, tj. počet iontů, o daném m/z , které dopadají na detektor). (2; 4) Hodnoty na svislé ose většinou představují relativní intenzitu iontového proudu v procentech. Nejintenzivnějšímu iontu ve spektru je přiřazena hodnota 100 %. (2) Tento se pak nazývá základním píkem (*base peak*). (4)

Typ pozorovaných iontů, jakož i počet elektronů v nich obsažený, je závislý na typu použitého způsobu ionizace a typu hmotnostního analyzátoru. V případě použití elektronové ionizace v kombinaci s jednoduchým kvadrupólem budou ve spektrech prvního řádu nejčastěji vznikat kation radikály, tedy kladně nabitě ionty s lichým počtem elektronů. (2; 4) Pouze pokud je ve struktuře analyzované látky přítomen vysoce elektronegativní prvek (např. halogen), dochází k výraznému zvýšení pravděpodobnosti elektronového záchytu, vedoucímu ke vzniku anion radikálů. Ve spektru budou rovněž pozorovány rozsáhlé fragmentační reakce, neboť EI je typickým zástupcem skupiny zdrojů s tvrdou ionizací. (2) Oproti tomu při použití elektrosprejové ionizace v kombinaci s iontovou pastí budou pozorovány ionty se sudým počtem elektronů (např. protonovaná molekula či aduktové ionty). K fragmentačním reakcím bude docházet jen výjimečně. (1; 2)

2 MAKROCYKlickÉ SLOUČENINY POUŽÍVANÉ V SUPRAMOLEKULÁRNÍ CHEMII

Supramolekulární chemie se zaměřuje na studium nekovalentních vazeb, mezi které například patří vodíková vazba, π - π interakce, hydrofobní interakce a elektrostatické a van der Waalsovy interakce. Jedna z částí supramolekulární chemie se zabývá tvorbou komplexů typu hostitel-host. Mezi typické hostitelské molekuly využívané v supramolekulární chemii patří crown ethery, pillareny, cyklodextriny, calixareny a cucurbiturily. (5; 6) Poměrně novou skupinu makrocyklických molekul pak představují bambusurily, objevené na Přírodovědecké fakultě Masarykovy univerzity výzkumnou skupinou prof. Vladimíra Šindeláře. (7)

V následující části této kapitoly se zaměřím na cyklodextriny a cucurbiturily. Tyto makrocyklické molekuly jsou nejčastěji využívány pro komplexaci s azobarvivy a také jsou studovány ve výzkumné skupině doc. Roberta Víchy, tudíž byly zařazeny i do této bakalářské práce.

2.1 Cyklodextriny

Cyklodextriny (CDs) jsou syntetické organické sloučeniny získávané enzymatickou degradací škrobu, (8) za použití cyklodextrin glucosyl transferázy (CGTasa) a částečně α -amylázy. Jedná se o cyklické oligosacharidy, složené z glukosylových zbytků, které jsou vzájemně vázány pomocí α -1,4-glykosidických vazeb. (9)

Tyto látky se řadí mezi významné hostitelské molekuly, za což vděčí své hydrofobní kavitě, ve které mohou být enkapsulovány jiné molekuly. Díky enkapsulaci jiné molekuly do kavity cyklodextrinu, může dojít u molekuly hosta ke změně fyzikálních, chemických i biologických vlastností. Třemi nejznámějšími CDs (označovanými také jako nativní) jsou α -, β - a γ -CD, které se vzájemně liší počtem glukózových jednotek tvořících molekulu cyklodextrinu. (8) Cyklodextriny nacházejí praktické využití v mnoha odvětvích. Významné jsou jejich aplikace ve farmacii, kosmetice, textilním průmyslu a také v průmyslu zemědělském a potravinářském. (8) Uplatnění cyklodextrinů v těchto oborech je založeno na faktu, že hostující molekuly, které jsou enkapsulovány v kavitě CD, jsou vyčleněny z interakcí v roztoku. Tímto způsobem pak může být např. potlačena trpká chuť či zápach různých příměsí. Může být také dosaženo lepšího farmakologického profilu léčiva inkudovaného do kavity cyklodextrinu, ve srovnání s použitím léčiva samotného. (10)

Jednou z výhod CDs je jejich dnes již poměrně nízká cena, díky čemuž se staly využívané v průmyslovém měřítku. Ve prospěch cyklodextrinů hovoří také skutečnost, že jsou vyráběny z přírodního zdroje, škrobu. (11)

2.1.1 Historie objevu cyklodextrinů

Historie cyklodextrinů se začala psát koncem 19. století. V této době se francouzský chemik a lékárník Antoine Villiers zabýval působením enzymů na různé uhlovodíky. V roce 1891 přichází s prací, ve které popisuje degradaci bramborového škrobu pomocí *Bacillus amylobacter*. (8) Pravděpodobně se však nejednalo o čistou kulturu, ale o kulturu, která obsahovala teplotně rezistentní spory *Bacillus macerans*. Kromě různých dextrinů (termín dextriny byl v té době používán k popisu produktů a/nebo meziproduktů degradace škrobu) se mu rovněž povedlo vyizolovat malé množství vedlejších produktů. Jedním z těchto produktů byla vysoce krystalická látka, jejíž krystaly byly nalezeny v alkoholu, který byl použit pro srážení dextrinu. Z 1000 g škrobu se mu povedlo vyizolovat 3 g této látky. (11) Vyizolovanou bílou krystalickou látku pojmenoval „cellulosin“ a určil její sumární vzorec jako $(C_6H_{10}O_5)_2 \cdot 3 H_2O$. Název cellulosin odkazoval na podobnost izolované látky a celulózy. Tato podobnost spočívala v odolnosti vůči kyselé hydrolyze a absenci redukujících cukrů. (8)

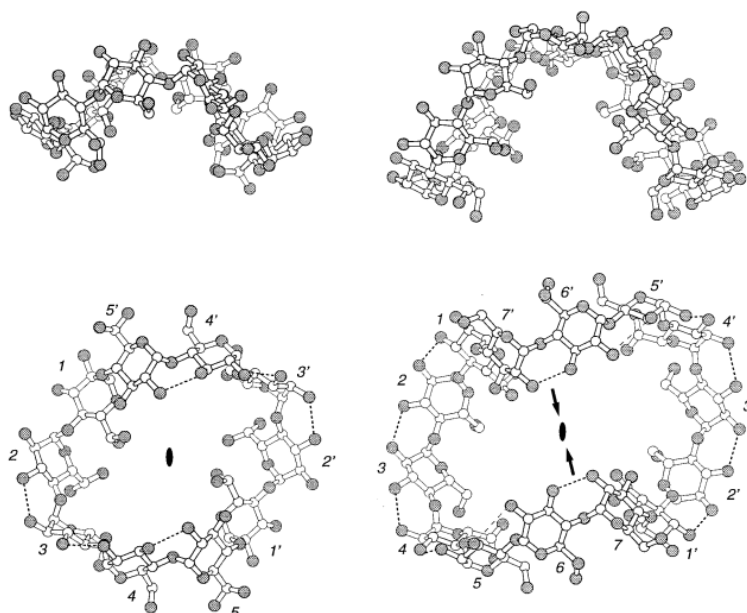
Další významnou osobností, spojenou s objevem cyklodextrinů, byl rakouský chemik a bakteriolog Franz Schardinger. Ten se začátkem minulého století zabýval studiem tepelně odolných mikroorganismů, které mohou způsobovat otravu z jídla. V roce 1903 zjistil, že jeden typ extrémně tepelně odolného mikroorganismu je schopen rozpustit škrob a tvořit krystalické vedlejší produkty, které byly velmi podobné Villiersovu cellulosinu. Pomocí jodového testu zjistil přítomnost dvou typů polysacharidů, které později nazval α -dextrin a β -dextrin. Při jodovém testu se α -dextrin v suchém stavu barví šedozeleň, v přítomnosti vody modře. β -dextrin se barví červenohnědě. V roce 1904 se Schardingerovi povedlo izolovat nový mikroorganismus, který pojmenoval *Bacillus macerans*. V letech 1905 až 1911 byla Schardingerem popsána příprava, separace a čištění již výše zmíněných krystalických produktů. Zjistil také, že tyto látky je možné získávat hned z několika zdrojů – brambory, rýže a pšenice. Schardinger také předpokládal, že tyto látky mají cyklickou strukturu, což bylo potvrzeno v polovině 30. let minulého století Freudenbergem. (8)

Německý chemik Karl Johann Freudenberg je další významnou osobností spojenou s výzkumem cyklodextrinů. V roce 1935 popsal způsob syntézy Schardingerových dextrinů,

který zajišťoval jejich vysokou čistotu. Povedlo se mu rovněž dokázat, že molekuly mají cyklickou strukturu. Zároveň jako první předpokládal, že vnitřní část (kavita) dextrinu bude hydrofobní. V roce 1947 Freudenberg a jeho tým popsali schéma izolace čistých frakcí. O rok později objevili γ -dextrin, jehož strukturu se jim povedlo objasnit v letech 1948 až 1950. Rovněž byla navržena možná existence cyklodextrinů obsahujících ve své struktuře 9 nebo 10 glukózových jednotek. (8)

2.1.2 Charakteristika cyklodextrinů

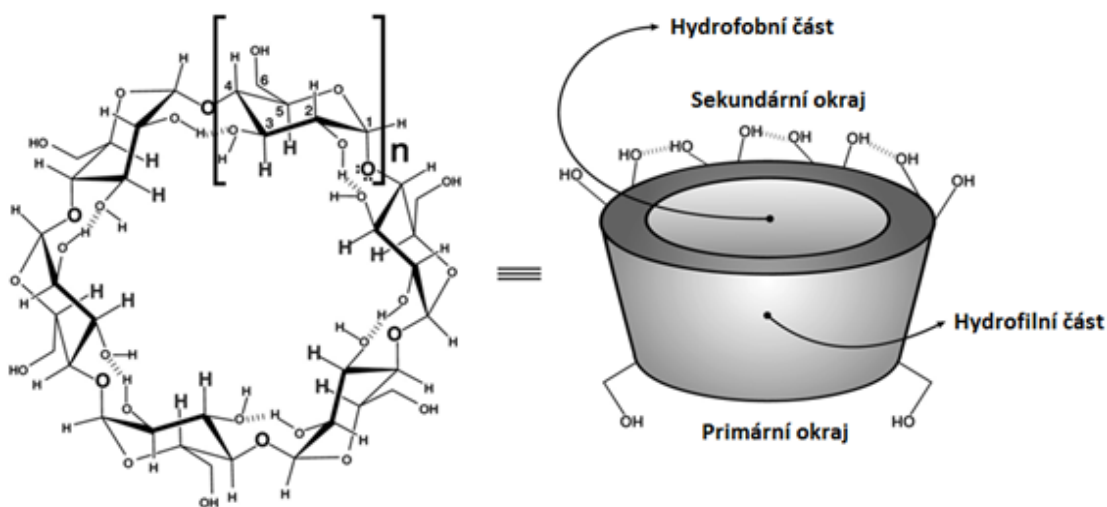
Cyklodextriny svým tvarem připomínají dutý komolý kužel. (9) Výjimkou jsou pouze CDs tvořené více jednotkami, jejichž tvar již není pravidelný. (11) Cyklodextrin tvořený 9 jednotkami (δ -CD) se svou strukturou již mírně odlišuje od nativních CDs. Ačkoliv je jeho struktura mírně deformovaná, zachovává si stále tvar dutého komolého kužele. Oproti tomu cyklodextriny s 10 či 14 jednotkami (ϵ -CD respektive ι -CD) již tento tvar nemají. Molekuly těchto homologů jsou rozděleny na dvě části, centrální dutina není otevřená a kulatá jako u menších homologů, jedná se spíše o štěrbinu. Tvar těchto molekul by se dal připodobnit ke tvaru těla motýla a je znázorněn na **Obrázku 2**. (12)



Obrázek 2. Struktura ϵ -CD a ι -CD. (12)

Molekula CDs je lemována hydroxylovými skupinami. Primární hydroxylové skupiny jsou umístěny na užším okraji molekuly, na uhlících C6. Sekundární hydroxylové skupiny jsou umístěny na okraji širším, na uhlících C2 a C3. (10) Tento rozdíl v průměru portálů kavity je způsoben volnou rotací primárních hydroxylových skupin. Tato rotace

snižuje efektivní průměr kavity. (11) Na **Obrázku 3** je znázorněna struktura CDs včetně polohy primárních a sekundárních hydroxylových skupin.



Obrázek 3. Schematické znázornění struktury CDs. (13)

Vnitřní část molekuly CDs je hydrofobní, zatímco vnější část je hydrofilní. To je způsobeno již výše popsaným umístěním hydroxylových skupin. Polarita v dutině CDs klesá s jejím objemem, tzn. od γ -CD po α -CD. Nižší polarita uvnitř kavity CDs přispívá k jejich schopnosti vytvářet inkluzní komplexy. Molekuly hosta pak vstupují (přínejmenším částečně) do jejich kavity. Tato schopnost je klíčová pro většinu jejich aplikací. (10)

Rozpustnost CDs ve vodě se u jednotlivých homologů významně liší. Zatímco α -CD a γ -CD mají poměrně vysokou rozpustnost, β -CD je podstatně méně rozpustný. Rozpustnost jednotlivých homologů je uvedena v **Tabulce 1**.

Tabulka 1. Rozpustnost jednotlivých homologů CDs. (9)

Cyklodextrin	Rozpustnost ve vodě [mg·ml ⁻¹]
α -CD	145
β -CD	18,5
γ -CD	232

Kavita CDs je lemována atomy vodíku a kyslíku glykosidické vazby. Nevazebné elektronové páry těchto atomů kyslíku směřují dovnitř kavity, ve které je tak zvýšená elektronová hustota. Hydroxylová skupina umístěná na uhlíku C2 v první glukosylové jednotce se může vázat s hydroxylovou skupinou umístěnou na uhlíku C3 v sousední glukosylové jednotce. Takto vzniklý pás vodíkových vazeb je u β -CD kompletní, a proto má

tento homolog spíše rigidní strukturu a nejnižší rozpustnost ve vodě ze všech CDs. V α -CD je tento pás vodíkových vazeb neúplný z důvodu jiné polohy jedné z glukosylových jednotek. Místo 6 možných vodíkových vazeb se v molekule α -CD vyskytují pouze 4 tyto vazby. γ -CD má pružnější strukturu, proto je ze všech CDs ve vodě nejrozpuštěnější. (11)

2.1.3 Rozměry jednotlivých homologů

Jak již bylo zmíněno výše, mezi hlavní představitele rodiny cyklodextrinů patří α -CD, β -CD a γ -CD (tzv. nativní CDs). Jedná se o krystalické, nehygroskopické látky, jejichž struktura je tvořena glukosylovými jednotkami spojenými do kruhu. Nejmenším z rodiny nativních CDs je α -CD, který ve své molekule obsahuje 6 jednotek glukózy. Zbývající CDs obsahují 7 jednotek (β -CD), resp. 8 jednotek (γ -CD). (11) Rozměry jednotlivých homologů jsou uvedeny v **Tabulce 2**.

Tabulka 2. Rozměry nativních CDs. (10)

	α -CD	β -CD	γ -CD
Počet glukosylových jednotek	6	7	8
Výška molekuly [nm]	0,78	0,78	0,78
Vnější průměr, širší okraj [nm]	1,37	1,53	1,69
Vnitřní průměr, širší okraj [nm]	0,57	0,68	0,95
Vnější průměr, užší okraj [nm]	1,32	1,49	1,61
Vnitřní průměr, užší okraj [nm]	0,45	0,61	0,77
Objem kavity [nm³]	0,174	0,262	0,427

Kromě výše zmíněných existují také CDs tvořené více jednotkami glukózy. Příkladem může být δ -CD, který je tvořen 9 jednotkami. Rozpustnost tohoto CD je vyšší než u β -CD, ale nižší než u α -CD a γ -CD. (11) Příprava a čištění jsou u těchto CDs obtížné. (10)

Cyklodextriny s menším počtem glukosylových jednotek enzymaticky nevznikají. Důvodem je značné pnutí v kruhu cyklodextrinu, nicméně CD s 5 jednotkami glukózy byl v nedávné době připraven synteticky. Jedná se o tzv. pre- α -cyklodextrin. (10)

2.1.4 Modifikované cyklodextriny

Kromě přirozeně se vyskytujících CDs bylo syntetizováno také mnoho jejich derivátů. Tyto deriváty se obvykle vyrábějí aminací, esterifikací nebo etherifikací primární a/nebo sekundární hydroxylové skupiny v molekule CDs. (14) A jelikož α -CD obsahuje 18,

β -CD 21 a γ -CD 24 hydroxylových skupin, které mohou být substituovány, počet možných derivátů je takřka neomezený. Od roku 1997 byly publikovány možnosti syntézy více než 1500 derivátů. Většina těchto derivátů však nebude mít nikdy žádné využití, jelikož jejich syntéza je příliš komplikovaná, a výsledný produkt by tak byl drahý. Pro průmyslovou výrobu je klíčová zejména jednoduchost reakce, přijatelná cena produktu, přičemž tento produkt musí být netoxický a měl by mít zvláště výhodné vlastnosti pro konkrétní aplikaci. (11)

Rozpustnost těchto derivátů CDs závisí na druhu substituentu, obvykle se liší od rozpustnosti rodičovských cyklodextrinů. (14) Významně se pak uplatňuje modifikace především u β -CD, který má ze všech nativních CDs nejmenší rozpustnost ve vodě. Díky methylovanosti či hydroxyalkylaci hydroxylových skupin v molekule tohoto cyklodextrinu tak dochází ke zvýšení jeho rozpustnosti. (15) Například u methylovaného β -CD dochází nejdříve se zvyšujícím se stupněm methylovanosti k postupnému nárůstu rozpustnosti, přičemž maximální rozpustnosti je dosaženo při methylovanosti 14 hydroxylových skupin. Pokud již je methylovanost modifikována více hydroxylových skupin, dochází k mírnému snížení rozpustnosti. Nejnižší rozpustnost pak má derivát se všemi (tj. 21) methylovanými hydroxylovými skupinami. Rozpustnost tohoto derivátu je však stále vyšší než rozpustnost nativního β -CD. (16) Kromě zlepšení rozpustnosti ve vodě může také dojít ke zlepšení stability vůči světlu či kyslíku a tyto modifikované CDs také pomáhají kontrolovat chemickou aktivitu molekuly hosta. Díky modifikacím dochází k rozšíření možností aplikací CDs. (14)

Modifikované CDs mohou napodobovat enzymy, jelikož substituovaná funkční skupina má vliv na molekulární rozpoznávání. Těto vlastnosti se využívá také při cílené distribuci léčiv. (14)

Příkladem modifikovaných CDs mohou být hydroxypropylované deriváty, které se získávají reakcí CDs s propylenoxidem, karboxymethylované deriváty, získávané reakcí CDs s monochloroctovou kyselinou či náhodně methylované deriváty získávané reakcí CDs s jodmethanem či sulfobutylethery CDs získávané reakcí CDs s 1,4-butansulfonem. (17)

V **Tabulce 3** jsou uvedeny deriváty CDs, které lze v současné době nalézt ve farmaceutických výrobcích uvedených na trhu. U daných derivátů je uvedena jejich rozpustnost ve vodě. Z tabulky je patrné, že rozpustnost modifikovaných CDs je mnohonásobně vyšší než rozpustnost nativních CDs. (17)

Tabulka 3. Modifikované cyklodextriny používané ve farmaceutických výrobcích. (17)

Cyklodextrin	Rozpustnost ve vodě [mg·ml ⁻¹]
α -CD	145
β -CD	18,5
2-hydroxypropyl- β -CD (HP- β -CD)	>600
sulfobutylether β -CD sodný	>500
náhodně methylovaný β -CD (RM- β -CD)	>600
γ -CD	232
2-hydroxypropyl- γ -CD (HP- γ -CD)	>500

2.1.5 Příprava cyklodextrinů

Existuje řada enzymů umožňujících převést škrob na produkty, které je možno využít v průmyslových aplikacích. (9) Klíčovým enzymem přeměny škrobu na CDs je enzym cyklodextrin glucosyl transferáza, zkráceně CGTasa (číselný kód EC 2.4.1.19). (9; 11) Tento enzym je schopen produkovat neredukující cyklické dextriny ze škrobu, amylozy a jiných polysacharidů. (9) CGTasa je produkována velkým množstvím mikroorganismů, jako např. *Bacillus macerans*, *Klebsiella oxytoca* a *Bacillus circulans*. Tento enzym byl rovněž objeven u skupiny prokaryotických jednobuněčných organismů zvaných archaea. (11) Vlastnosti enzymu závisí na druhu mikroorganismu, ze kterého je extrahován. V dnešní době je tento enzym geneticky modifikován. Jeho molekulová hmotnost se pohybuje mezi 60 a 110 kDa. (9)

Pro výrobu CDs je výchozí surovinou škrob. Tento polysacharid je složen z amylopektinu a amylozy. Obě tyto složky mohou sloužit jako suroviny pro výrobu, nicméně amylopektin poskytuje vyšší výtěžky CDs než amyulóza. Čistý amylopektin je však příliš drahý pro průmyslové využití. Pro vysoký výtěžek a bezproblémové čištění je nutné, aby množství obsažených nečistot bylo malé. V průmyslu se uplatňuje zejména škrob bramborový. Kukuřičný a pšeničný škrob obsahuje vyšší procento amylozy a více nečistot. Ideální výchozí surovinou by byl např. škrob tapiokový, jelikož je tvořen prakticky jen amylopektinem. Nevýhodou je však jeho cena a/nebo také nedostupnost v dostatečné kvalitě a množství. (9)

2.1.6 Způsoby výroby cyklodextrinů

Obecně platí, že existují 2 typy výrobních procesů. U prvního způsobu výroby se organickým komplexotvorným činidlem vysráží selektivně jeden typ CD. Při enzymatické přeměně škrobu pak dochází k tvorbě hlavně tohoto typu CD. Komplexotvorným činidlem bývá toluen, ethanol nebo aceton. Při průmyslové výrobě CDs se uplatňuje především tento způsob výroby.

U druhého způsobu výroby se žádné komplexotvorné činidlo nepřidává. Výsledkem enzymatické přeměny škrobu je směs různých CDs. Poměr jednotlivých homologů závisí na použitém enzymu a na reakčních podmínkách. Tento způsob výroby je možné použít pro výrobu β -CD, který je málo rozpustný ve vodě, a tudíž lze pro jeho čištění účinně využít krystalizaci. Takto získané CDs lze využít v potravinářském průmyslu bez omezení, na rozdíl od CDs vyrobených za přídavku komplexotvorného činidla. (9)

2.1.7 Cyklodextriny v roli hostitelských molekul

Nejvýznamnější vlastností cyklodextrinů je jejich schopnost vytvářet inkluzní komplexy typu hostitel-host. V těchto komplexech je molekula hosta enkapsulována v hostitelské molekule cyklodextrinu. To je dáno skutečností, že kavita CDs je nepolární. Do této kavity tedy mohou (alespoň částečně) vstoupit nepolární molekuly hosta o vhodné velikosti. (14) Při vzniku inkluzního komplexu nedochází k zániku či vzniku kovalentních vazeb. (17)

Ke vzniku komplexu může docházet buď v roztoku, nebo také v krystalickém stavu. K tvorbě komplexu dochází rychleji, pokud je látka, která má sloužit jako host, buď v rozpustné formě, nebo je dispergovaná ve formě jemných částic. Pokud jsou výchozí látky v krystalickém stavu, dochází ke komplexaci pouze mezi povrchovými molekulami. Pokud budou dané látky rozpuštěny ve vhodném rozpouštědle, bude k dispozici více molekul, které budou schopny tvořit komplex. Vliv na tvorbu komplexu má také teplota. Díky zahřívání dochází ke zvýšení rozpustnosti molekul CDs i molekul hosta, což ve výsledku zvyšuje pravděpodobnost tvorby komplexu. Zahřívání však současně komplex destabilizuje, je proto zapotřebí tyto účinky vyvážit. (14)

Nejčastěji používaným rozpouštědlem, ve kterém se komplexace provádí, je voda. Čím rozpustnější je daný homolog ve vodě, tím více molekul cyklodextrinu je dostupných pro komplexaci. Nicméně pokud je koncentrace roztoku cyklodextrinu a dané látky již příliš nízká, molekuly těchto látek se již nemusí dostat tak snadno do kontaktu. Je tedy žádoucí

zachovat množství vody takové, aby komplexace probíhala stále dostatečně rychle. Molekula hosta musí být schopna nahradit rozpouštědlo v kavitě CDs, pokud spolu toto rozpouštědlo a daný cyklodextrin tvoří komplex. Například voda může být nahrazena velmi snadno. (14)

Ne všechny látky, které mohou sloužit jako hostující molekuly, jsou dobře rozpustné ve vodě. Komplexace je pak buď velmi pomalá, nebo i nemožná. V takových případech je žádoucí použití organického rozpouštědla, které dokáže danou látku rozpustit. Rozpouštědlo by nemělo tvořit s CDs komplexy a mělo by být možné jej snadno odstranit odpařením. Takovými rozpouštědly jsou například ethanol či diethylether. (14)

Při vzniku komplexu je hlavní hnací silou uvolňování molekul vody o vysoké energii z kavity cyklodextrinu. (14) Kavita CDs je ve vodném roztoku obsazena molekulami vody. Jelikož je kavita mírně nepolární a molekuly vody jsou polární, není tento energetický stav výhodný. Z těchto důvodů mohou být molekuly vody v kavitě snadno nahrazeny vhodnými molekulami (hosty), jejichž polarita je menší než polarita vody. Rozpuštěný cyklodextrin tedy slouží jako hostitelská molekula. (11) Síla vazby závisí na skutečnosti, jak dobře zapadne molekula hosta do kavity cyklodextrinu a na specifických místních interakcích mezi povrchovými atomy. (14) Při tvorbě komplexu s CDs se uplatňují hlavně van der Waalsovy síly či vodíkové vazby. (12)

Vznik komplexu typu hostitel-host má výrazný účinek na fyzikálně-chemické vlastnosti hostujících molekul. Mezi tyto vlastnosti patří například zvýšení rozpustnosti vysoce nerozpustných hostů, stabilizace molekul citlivých k degradaci účinkem oxidace, tepla a viditelného či UV světla, fixace velmi těkavých látek, maskování chutí a nepříjemných pachů, maskování pigmentu či barvy a kontrolované uvolňování léčiv. (14)

Schopnost cyklodextrinu tvořit inkluzní komplex s molekulou hosta závisí na dvou klíčových faktorech. Prvním je faktor sterický, který závisí na relativní velikosti CDs a velikosti molekuly hosta, respektive na velikosti určité klíčové funkční skupiny v rámci molekuly hosta. Pokud bude mít molekula hosta nevhodnou velikost, nebude správně „sedět“ v kavitě cyklodextrinu. Zatímco výška kavity je stejná pro všechny nativní CDs, vnitřní průměr a objem kavity je určen počtem glukosylových jednotek. Podle těchto rozměrů se následně odvíjí velikost molekuly hosta. (14) Pokud je pro danou molekulu hosta kavita cyklodextrinu příliš malá, jednoduše se do kavity nevejde a ke vzniku inkluzního komplexu nedojde. Pokud je naopak kavita cyklodextrinu příliš velká, bude v ní molekula hosta vázána volněji. (18) Druhým kritickým faktorem jsou termodynamické interakce mezi

různými součástmi systému (cyklodextrin, host, rozpouštědlo). Pro vytvoření komplexu je nezbytná síla, která táhne molekuly hosta do kavity cyklodextrinu. (14)

Seznam potenciálních hostů pro molekulární enkapsulaci v CDs je velmi rozmanitý. α -CD typicky tvoří komplexy s hosty o nízké molekulové hmotnosti či sloučeninami s alifatickými postranními řetězci. β -CD tvoří komplexy s hosty aromatickými či heterocyklickými a γ -CD je schopen tvořit komplexy s většími molekulami, jako jsou například makrocikly či steroidy. (14)

Nejčastěji je poměr molekul hostitel-host 1:1. Jedná se o nejjednodušší případ molekulární enkapsulace. (11) Pokud budou mít molekuly hosta relativně malou molekulovou hmotnost, je možné, že kavita CDs bude schopna těchto molekul enkapsulovat více. Naopak pokud bude molekula hosta obsahovat více vazebných míst a mít dostatečnou velikost, je možné že tato molekula bude enkapsulována více než jednou molekulou cyklodextrinu. Pro vytvoření komplexu stačí v zásadě pouze částečné zapadnutí molekuly hosta do kavity cyklodextrinu. V důsledku toho tedy mohou vznikat komplexy v různém poměru molekul hostitel-host. (14)

V roztoku jsou vázané molekuly hosta v dynamické rovnováze s volnými molekulami hosta. (17) Disociace inkluzního komplexu je relativně rychlá. Tento proces je obvykle řízen velkým nárůstem počtu molekul vody v okolním prostředí. (14) K uvolňování molekul může také docházet díky soupeření s jinou látkou o místo v kavitě CDs. Takovými látkami jsou například žlučové kyseliny a lipidy v gastrointestinálním traktu. (17)

2.2 Cucurbiturily

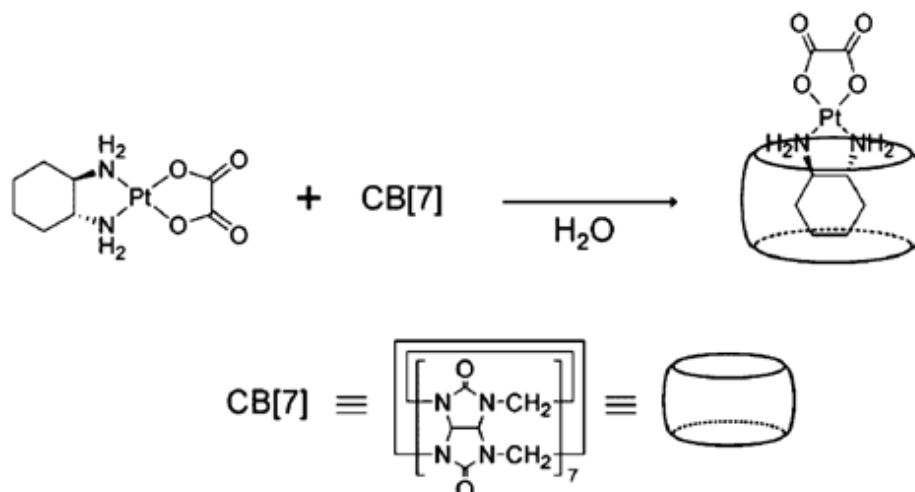
Cucurbit[n]urily (CB[n], kde $n = 5-8, 10, 13-15$), zkráceně také jako CBs, jsou makrocyclické molekuly (5; 19) složené z glykolurilových jednotek vzájemně spojených methylenovými můstky. (20)

Jednou ze základních charakteristik těchto molekul je schopnost tvořit stabilní komplexy s kladně nabitými molekulami a kationty. V supramolekulárních komplexech typu hostitel-host vystupují cucurbiturily jako hostitelské molekuly. (21)

Kromě supramolekulární chemie našly cucurbiturily využití i v dalších oblastech. Jednou z nich je například čištění odpadních vod od organických barviv, jakými jsou například azobarviva. Azobarviva patří mezi nejčastěji používaná organická barviva,

a kromě komplexů s cucurbiturily mohou také tvořit komplexy s cyklodextriny či calixareny. (21; 22)

CBn by mohly také sloužit k odstranění zápachu a pomalému uvolňování vůní. S ohledem na jejich biokompatibilitu by mohly rovněž sloužit jako nosiče léčiv. (23) Například v roce 2005 Kimoon Kim a jeho spolupracovníci zjistili, že oxaliplatina (lék proti rakovině) tvoří s CB7 stabilní inkluzní komplex v poměru 1:1. Vznik tohoto inkluzního komplexu má za následek velké zvýšení stability oxaliplatiny, mírné snížení reaktivity vůči guanosinu, ale především silný pokles reaktivity vůči L-methioninu. Tato skutečnost naznačuje, že díky enkapsulaci je možné snížit nežádoucí vedlejší účinky, které jsou způsobeny vazbou proteinu na oxaliplatinu. (19; 24) Tvorba tohoto inkluzního komplexu je znázorněna na **Obrázku 4**.



Obrázek 4. Tvorba inkluzního komplexu oxaliplatiny s CB7 ve vodě. (24)

Cucurbiturily lze, stejně jako cyklodextriny, efektivně využít v oblasti organické syntézy, kdy bylo např. zjištěno, že cykloadiční reakce probíhají podstatně rychleji, odehrávají-li se v kavitě cucurbiturilu, v tomto konkrétním případě v kavitě CB6. (21) Dalšími oblastmi využití jsou fluorescenční spektroskopie či nanotechnologie. (25)

U většiny cucurbiturilů a jejich známých derivátů nebyla prokázána jejich toxicita, alespoň pokud jde o *in vitro* testy. (23)

2.2.1 Historie objevu cucurbiturilů

První syntéza cucurbiturilů byla popsána již v roce 1905 německým chemikem Robertem Behrendem a jeho spolupracovníky. Produktem reakce glykolurilu

a formaldehydu v prostředí HCl byla nerozpustná polymerní látka, tzv. Behrendův polymer. (5; 26) Behrend a jeho spolupracovníci byli schopni po rekrystalizaci této látky z H_2SO_4 dosáhnout poměrně dobrého výtěžku (40 až 70 %). (20) Předpokládalo se, že tato látka obsahuje nejméně 3 molekuly glykolurilu, které kondenzovaly s dvojnásobným množstvím formaldehydu. Na základě toho byl navržen vzorec $\text{C}_{18}\text{H}_{18}\text{N}_{12}\text{O}_6$. Dnes již víme, že tento vzorec není správný. (5)

Chemická povaha a struktura této látky však byla dlouho neznámá. Až po téměř 80 letech, v roce 1981, bylo Williamem L. Mockem a jeho spolupracovníky zjištěno, že tato látka má makrocyclickou strukturu sestávající z 6 glykolurilových jednotek a z 12 methylenových můstků. (20) Jelikož se struktura této látky podobala dýni, byla pojmenována cucurbituril (dýně patří do čeledi tykvovitých, latinsky *Cucurbitaceae*). (26) Cucurbiturily složené z jiného počtu glykolurilových jednotek (5, 7 či 8) nebyly v produktu této reakce objeveny. (20)

Mock se také zabýval komplexy typu hostitel-host, které byl tento cucurbituril schopen tvořit. Zjistil, že různé alkyl(di)-amoniové soli tvoří s CB6 silné inkluzní komplexy se stechiometrií 1:1, přičemž vazebná afinita a specifita CB6 je vyšší ve srovnání s jinými hostitelskými molekulami, jakými jsou cyklodextriny, calixareny a crown-ethery. Ačkoliv tedy CBn prokazovaly určitý potenciál, stále nebyly coby hostitelské molekuly v oblasti zájmu. Hlavní nevýhodou byla skutečnost, že v té době byl znám pouze CB6, což značně omezovalo aplikační možnosti cucurbiturilů. V popředí zájmu se tak stále držely cyklodextriny (homology tvořené 6 až 8 jednotkami glukózy) a calixareny (homology tvořené 4 až 6 fenolickými zbytky). Velkou nevýhodou CB6 byl také fakt, že je prakticky nerozpustný ve vodě. (5)

Během let 2000 až 2002 byla provedena celá reakce podle Behrenda znovu za upravených vstupních podmínek. Hlavním produktem reakce byl CB6, nicméně díky pečlivé regulaci teploty došlo rovněž ke vzniku homologů s jiným počtem glykolurilových jednotek. Do rodiny cucurbiturilů tak přibyl CB5, CB7 a CB8. V roce 2002 Anthony Day a jeho spolupracovníci úspěšně izolovali CB5@CB10 (homolog CB5 enkapsulovaný v kavitě homologu CB10). Struktura byla objasněna pomocí rentgenové difrakční analýzy. Samotný CB10 byl izolován z tohoto komplexu Lyle Isaacsem a jeho spolupracovníky. (5; 20; 23; 27; 28; 29)

V posledních letech byly objeveny cucurbiturily se 13–15 glykolurilovými jednotkami. Jejich struktura je však zakroucená, v důsledku čehož jejich kavita nedosahuje

takových rozměrů, jak by se dalo očekávat. (19) Například v kavitě CB14 mohou být inkludovány stejně velké molekuly jako v kavitě CB6. To naznačuje, že kavita CB14 je větší než kavita CB5 a CB6, ale menší než kavita CB8 a CB10. Zástupcem s největším objemem kavity tak i nadále zůstává CB10. (30)

2.2.2 Charakteristika cucurbit[n]urilů

Molekuly CB_n obsahují ve své struktuře dva symetrické karbonylové portály, které lemují vstup do jejich hydrofobní kavity. Jelikož karbonylové skupiny obsahují 2 volné elektronové páry a mají tudíž zvýšenou elektronovou hustotu, projevuje se zde zvýšená preference interagovat s kladně nabitou molekulou hosta. (20) Touto vlastností se cucurbiturily odlišují od cyklodextrinů, které dávají přednost vazbě s neutrálními či záporně nabitými hosty. (5) Obecně jsou konstanty stability komplexů typu hostitel-host, kde cucurbiturily vystupují jako hostitelské molekuly vyšší, než u komplexů, kde v roli hostitelských molekul vystupují cyklodextriny. Molekula hosta je přitom v obou komplexech stejná. Je-li molekula hosta kladně nabitá, je konstanta stability tohoto komplexu u cucurbiturilů vyšší i o několik řádů. (31) Například Jeon a kol. studovali tvorbu inkluzních komplexů mezi CB7 a ferrocenem a jeho deriváty. Bylo zjištěno, že všechny neutrálně a kladně nabitě molekuly hostů tvoří s CB7 vysoce stabilní inkluzní komplexy, jejichž konstanta stability se pohybuje v rozmezí 10^9 až 10^{10} M^{-1} pro neutrální molekuly a v rozmezí 10^{12} až 10^{13} M^{-1} pro kladně nabitě molekuly. Negativně nabitý ferrocenkarboxylát nebyl s CB7 vázán vůbec. Oproti tomu β -CD tvořil stabilní inkluzní komplex se všemi molekulami hostů, přičemž se konstanta stabilita těchto komplexů pohybovala v rozmezí 10^3 až 10^4 M^{-1} . (32)

Karbonylové skupiny jsou vazebnými místy pro nekovalentní interakce, včetně reakce ion–dipól a vodíkových vazeb. Vnitřní hydrofobní kavita je vhodným místem pro enkapsulaci hydrofobních skupin a neutrálních molekul. (19)

V pevném stavu se CB_n vyznačují vysokou tepelnou stabilitou (CB5, CB6 a C8 do 420 °C, CB7 do 370 °C). (21)

Jednou z nevýhod cucurbiturilů je jejich relativně nízká rozpustnost ve vodě. (20) Obecně platí, že cucurbiturily s lichým počtem glykolurilových jednotek (CB5, CB7) jsou ve vodě o něco lépe rozpustné než cucurbiturily se sudým počtem glykolurilových jednotek (CB6, CB8). Rozpustnost CB5 a CB7 je srovnatelná s rozpustností β -CD (16 mmol/dm^3). (21; 23) Rozpustnost jednotlivých homologů je uvedena v **Tabulce 4**.

Tabulka 4. Rozpustnost jednotlivých homologů CBn. (20)

Cucurbituril	Rozpustnost [mmol/dm ³]
CB5	20–30
CB6	0,018
CB7	20–30
CB8	<0,01

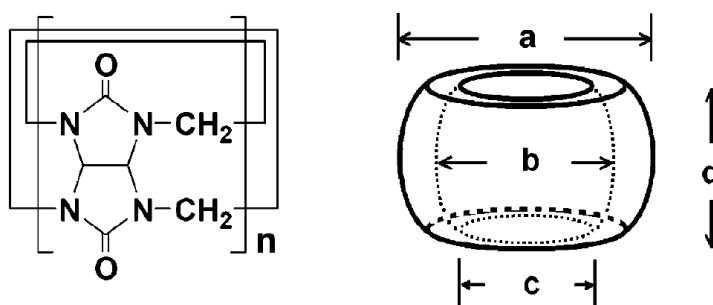
Dobré rozpustnosti je dosaženo ve vodném roztoku solí alkalických kovů (pravděpodobně díky koordinaci kovových iontů s karbonylovými skupinami) a ve vodném silně kyselém roztoku. Přesto je většina experimentů, při nichž je studována tvorba supramolekulárních komplexů typu hostitel-host, v nichž v roli hostitele vystupuje některý s CBn, prováděna ve vodném prostředí, případně v roztocích s malým podílem kyseliny mravenčí či v přítomnosti octanu sodného. (21)

2.2.3 Rozměry jednotlivých homologů

Jednotlivé homology se liší počtem glykolurilových jednotek. Jejich počet udává symbol „n“. S počtem těchto jednotek se mění i rozměry jednotlivých homologů. Přehled je uveden v **Tabulce 5**, struktura cucurbiturilů je pak uvedena na **Obrázku 5**. (21)

Tabulka 5. Rozměry vybraných CBn. (21)

		CB5	CB6	CB7	CB8
Vnější průměr [nm]	a	1,31	1,44	1,60	1,75
Průměr kavity [nm]	b	0,44	0,58	0,73	0,88
Průměr portálu [nm]	c	0,24	0,39	0,54	0,69
Výška [nm]	d	0,91	0,91	0,91	0,91
Objem kavity [nm³]	-	0,082	0,164	0,279	0,479



Obrázek 5. Schematické znázornění molekuly cucurbiturilu. (21)

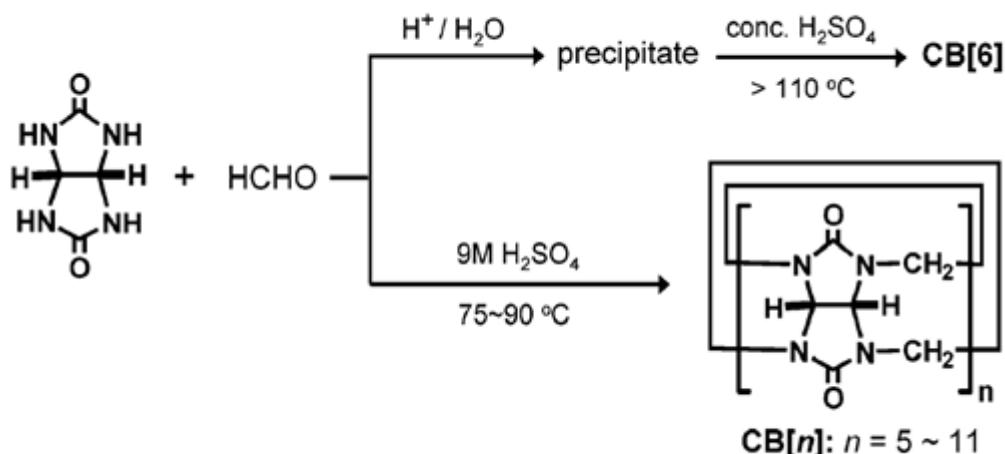
Z přehledu je patrné, že výška jednotlivých homologů je stále stejná a s počtem glykolurilových jednotek se nemění. V ostatních rozměrech se však jednotlivé homology liší. (20) Pokud jde o velikost kavity, CB6, CB7 a CB8 jsou téměř analogické s α -CD ($0,174 \text{ nm}^3$), β -CD ($0,262 \text{ nm}^3$) a γ -CD ($0,427 \text{ nm}^3$). (21)

2.2.4 Příprava cucurbiturilů

Syntéza ostatních homologů cucurbiturilů se příliš neliší od syntézy, kterou provedl roku 1905 Robert Behrend, a jejímž jediným produktem byl homolog CB6. Reakcí glykolurilu s formaldehydem v 9 M kyselině sírové při teplotě $75\text{--}90 \text{ }^\circ\text{C}$ po dobu 24 hodin lze připravit směs různých CBn (**Obrázek 6**). Pro získání různých homologů je klíčovým faktorem právě teplota, která je nižší, než teplota používaná pro syntézu CB6 ($110 \text{ }^\circ\text{C}$).

Pomocí běžných metod strukturní analýzy, jako jsou hmotnostní spektrometrie a nukleární magnetická rezonance, bylo potvrzeno, že reakční směs obsahuje různé homology, od CB5 až po CB8. Typický obsah těchto homologů činil 10–15 % CB5, 50–60 % CB6, 20–25 % CB7 a 10–15 % CB8. Pomocí hmotnostní spektrometrie byly také detekovány vyšší homology CB[n], kde $n = 9\text{--}11$. Jejich množství však bylo pouze stopové.

Jednotlivé homology jsou následně separovány pomocí frakční krystalizace a rozpouštění. (21)



Obrázek 6. Reakční schéma přípravy cucurbiturilů. (21)

2.2.5 Cucurbiturily v roli hostitelských molekul

Důležitým aspektem při tvorbě supramolekulárních komplexů typu hostitel-host je objem kavity cucurbiturilu, od něhož se pak odvíjí možná velikost molekuly hosta, který má být v kavitě inkludován.

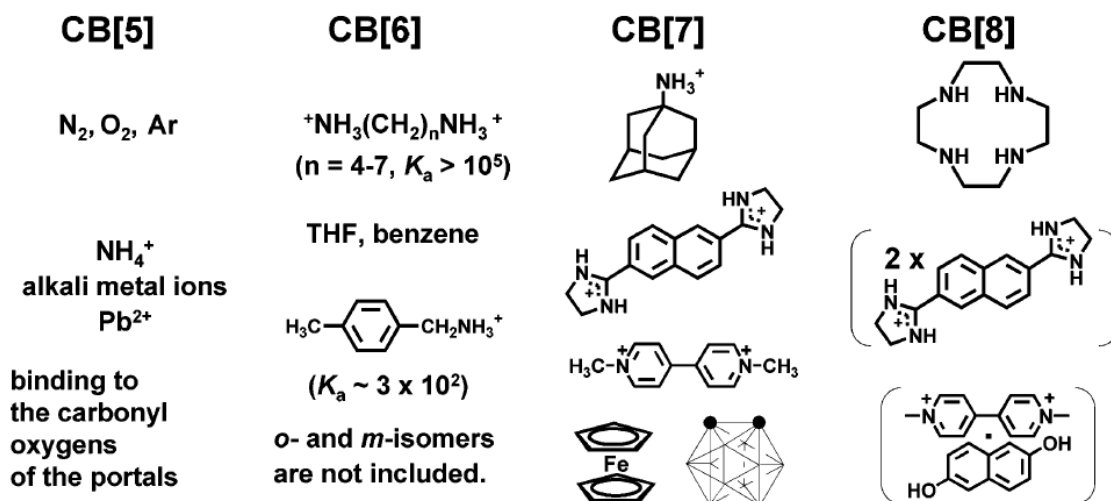
Vazebné schopnosti nejmenšího homologu z rodiny cucurbiturilů CB5 jsou omezeny kvůli malému objemu jeho kavity. Nemůže tedy docházet k enkapsulaci velkých molekul, nicméně CB5 je schopen enkapsulovat molekuly plynné. Bylo prokázáno, že dekamethylovaný CB5 je schopen enkapsulovat molekuly plynu jak ve vodném prostředí, tak v pevné formě. Plyny jako N_2 , O_2 , Ar, N_2O , CO a CO_2 mohou být enkapsulovány v práškové i vodné formě dekamethylovaného CB5, zatímco He, Ne, H_2 , Kr, Xe a CH_4 mohou být enkapsulovány pouze ve vodném prostředí, přičemž Kr, Xe a CH_4 vyžadují zahřívání vzorku. Dále je CB5 schopen vytvářet komplexy s kationty jako NH_4^+ a Pb^{2+} . Tyto ionty nejsou enkapsulovány v kavitě cucurbiturilu, ale vytváří interakce s karbonylovými skupinami umístěnými na portálech CB5 a tvoří tak externí (neboli nespecifický) komplex. Dva NH_4^+ ionty tak mohou zcela utěsnit oba karbonylové portály CB5.

CB6 je schopen enkapsulovat alkylové skupin, s ionty diaminoalkanů ($NH_3^+-(CH_2)_n-NH_3^+$) tvoří velmi stabilní komplexy a s ionty aromatických aminů (např. *p*-methylbenzylamin) středně stabilní komplexy. Ve vodném roztoku je CB6 rovněž schopen enkapsulovat neutrální molekuly jako je tetrahydrofuran či benzen.

Další homolog, CB7, tvoří komplexy s většími hostujícími molekulami. Příkladem může být 1-adamantylamin, se kterým tvoří komplex v poměru 1:1. Ve vodném roztoku je schopen enkapsulovat neutrální molekuly jako ferrocen nebo karboran.

Kavita CB8 už je prostorná natolik, že je schopna, v některých případech, enkapsulovat dvě molekuly hosta. Tento homolog je rovněž schopen tvořit komplex s makrocyclickými látkami, jako jsou 1,4,7,10-tetraazacyklododekan a 1,4,8,11-tetraazacyklotetradekan.

Homolog CB10 je schopen enkapsulovat homolog CB5. (21; 23; 27; 31) Na **Obrázku 7** jsou uvedeny příklady molekul hostů pro různé homology CBn.



Obrázek 7. Příklady molekul hostů pro různé homology CBn. (21)

3 AZOSLOUČENINY A JEJICH KOMPLEXY S CUCURBITURILY A CYKLODEXTRINY

Azosloučeniny jsou organické sloučeniny skládající se ze dvou uhlovodíkových zbytků, které jsou vzájemně spojeny charakteristickou funkční skupinou (tzv. azoskupinou). Jejich obecný vzorec je $R-N=N-R'$, přičemž substituenty R a R' mohou být stejné nebo rozdílné. (33)

Jelikož charakteristickým rysem azosloučenin je jejich barevnost, jsou mnohé z nich využívány jako barviva (azobarviva). (34) Tato barevnost je zapříčiněna jejich chemickou strukturou, díky které absorbují světlo ve viditelné části spektra. (35) Azobarviva jsou nejdůležitějšími syntetickými barvivy a představují jedny z nejvíce vyráběných a používaných barviv vůbec. Přibližně 70 % průmyslově využívaných barviv tvoří právě azobarviva. (34)

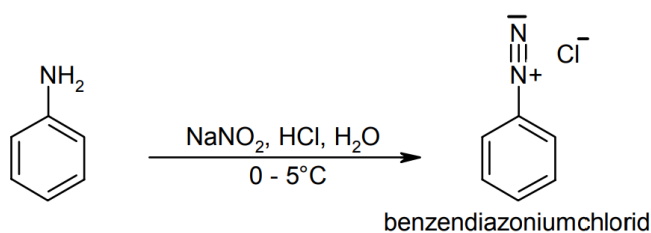
Podle počtu azoskupin můžeme azobarviva rozdělit do několika skupin. V systému Colour Index (CI) jsou pak azobarvivům přiřazena čísla 11 000 až 39 999. (34) Rozdělení do skupin včetně daných CI jsou uvedeny v **Tabulce 6**.

Tabulka 6. Dělení azobarviv podle počtu charakteristických funkčních skupin. (34)

Skupina azobarviv	Colour Index
Monoazo	11 000–19 999
Disazo	20 000–29 999
Trisazo	30 000–34 999
Polyazo	35 000–36 999
Azoická barviva	37 000–39 999

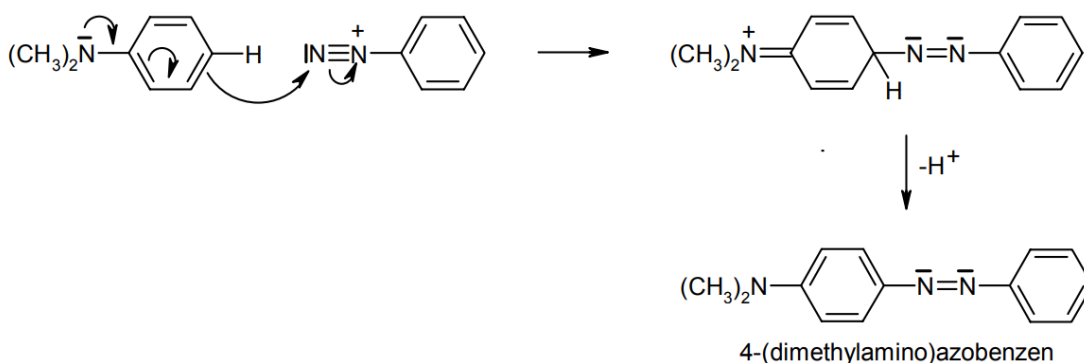
Tato barviva jsou syntetizována jednoduchou metodou diazotace a kopulace. Principem diazotace je převedení primárního aminu na diazoniovou sůl. Při nitrosaci primárního aminu reaguje primárně vzniklý N-nitrosoamin dále, konečným produktem reakce je pak diazoniová sůl. Pokud je primárním aminem alkylamin, dochází ke vzniku alkyldiazoniových solí. Tyto soli jsou velmi nestálé, jelikož alkylová skupina má pouze slabý induktivní efekt a kladný náboj na atomu dusíku tedy není stabilizován. Pokud je primárním aminem arylamin, dochází ke vzniku aryldiazoniových solí, které jsou v důsledku

konjugace diazoniové skupiny s aromatickým jádrem stabilnější. (33) Reakční schéma vzniku aryldiazoniové soli je znázorněno na **Obrázku 8**.



Obrázek 8. Schématické znázornění diazotace. (33)

Aryldiazoniový kation nese kladný náboj, který je však do značné míry delokalizován, v důsledku čehož jsou aryldiazoniové kationty poměrně slabými, málo reaktivními elektrofilů. To znamená, že jsou při elektrofilní substituci schopny reagovat pouze s velmi silně aktivovanými aromáty, jako jsou arylaminy nebo fenoly. Aryldiazoniový ion je velmi objemný, vstupuje tedy přednostně do *p*-polohy aromatického jádra. Tato reakce je označována jako kopulace a jejím produktem jsou azosloučeniny, které obsahují dva aromatické zbytky spojené azoskupinou. (33) Reakční schéma kopulační reakce aryldiazoniové soli s arylaminem je znázorněno na **Obrázku 9**.



Obrázek 9. Schématické znázornění kopulační reakce. (33)

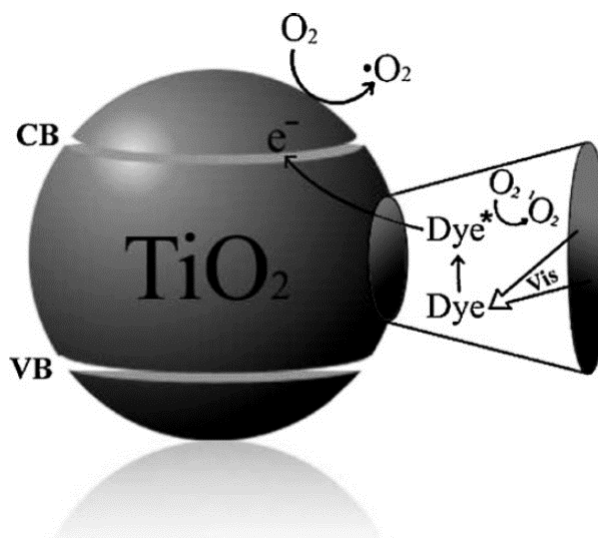
Své využití našla azobarviva v mnoha odvětvích. Kromě využití v textilním, kožedělném, papírenském a polygrafickém průmyslu lze tato barviva využít také v kosmetice, potravinářství či farmacii. (34; 35) Používají se k barvení prakticky všech přírodních, chemických a syntetických vláken, plastů, usní, papíru, výrobků z pryže a dalších. (36)

Velkou nevýhodou azobarviv je jejich dopad na životní prostředí. Jak již bylo zmíněno výše, azobarviva jsou nejvíce využívanými průmyslovými barvivy. Při úpravě

odpadních vod v textilním průmyslu tak představují jeden z hlavních problémů. Vypouštění azobarviv do životního prostředí je nežádoucí nejen z estetických důvodů, ale zejména proto, že mnohá azobarviva a produkty jejich degradace jsou toxické a/nebo karcinogenní. (37) Pro odstraňování azobarviv z odpadních vod se mohou využívat jak fyzikálně-chemické, tak biologické metody. (35)

3.1 Supramolekulární komplexy azobarviv s cyklodextriny

Zhang a kol. se zabývali novým hybridním nanomateriálem $\text{TiO}_2/\beta\text{-CD}$. Tento hybridní nanomateriál vykazoval vysokou fotoaktivitu při ozáření viditelným světlem ($\lambda \geq 400 \text{ nm}$ a/nebo $\lambda \geq 420 \text{ nm}$) a simulovaným slunečním zářením ($\lambda \geq 365 \text{ nm}$). Fotodegradace barviva Orange II se řídila Langmuirovým-Hinshelwoodovým modelem. Počáteční rychlost degradace R_0 tohoto barviva se při ozařování světlem o $\lambda \geq 420 \text{ nm}$ zvýšila 6,9krát, při $\lambda \geq 400 \text{ nm}$ se zvýšila 2,6krát a při $\lambda \geq 365 \text{ nm}$ se zvýšila 1,9krát. Díky $\beta\text{-CD}$ došlo k prodloužení pobytu molekuly hosta v excitovaném stavu a byl tak usnadněn přenos elektronů z barviva v excitovaném stavu do vodivostního pásma TiO_2 , což způsobilo lepší degradaci molekul barviva. Bylo také zjištěno, že degradaci barviva Orange II při ozáření viditelným světlem způsobují superoxidové radikály. Proces fotokatalytické degradace znázorňuje **Obrázek 10**. (38)



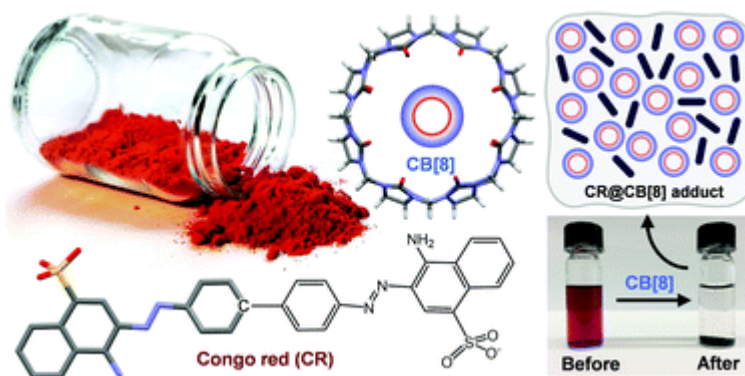
Obrázek 10. Fotokatalytická degradace molekul barviva zprostředkovaná hybridním nanomateriálem $\text{TiO}_2/\beta\text{-CD}$ při ozáření viditelným zářením. (38)

Chen a kol. studovali odstraňování azobarviva Congo red (CR) z vody pomocí supramolekulárního sorbentu $\text{SiO}_2\text{-CD}$ za využití adsorpce, desorpce a elektrolýzy. Azobarviva patří mezi významné polutanty. Lze se s nimi setkat v mnoha důležitých

průmyslových odvětvích, jako je textilní průmysl, výroba kosmetiky, tisk či je můžeme využít jako potravinářská barviva. Odstraňování těchto látek z odpadních vod je tedy klíčové. Bylo prokázáno, že adsorpce CR na daný sorbent se řídila Langmuirovým modelem. Regenerace sorbentu byla jednoduše provedena pomocí β -cyklodextrinu (β -CD) a hydroxypropyl- β -CD (HP- β -CD), které slouží jako desorpční činidla. Účinnost desorpce CR silně závisela na koncentraci tohoto činidla a také na teplotě. Bylo zjištěno, že kombinace adsorpce, kondenzace a elektrochemické degradace může usnadnit čištění velkých objemů odpadních vod, ve kterých je barvivo přítomno v nízké koncentraci. (28)

3.2 Supramolekulární komplexy azobarviv s cucurbiturily

Costa a kol. studovali supramolekulární interakce mezi cucurbiturily (CB7 a CB8) a barvivem Congo red (CR) pomocí elektrosprejové ionizační hmotnostní spektrometrie (ESI-MS), ^1H NMR a rovněž prováděli charakterizaci izolovaných komplexů v pevném stavu. V případě hmotnostní spektrometrie (ESI-MS) nebyla ve spektrech získaných v kladném skenovacím módu pozorována tvorba komplexů typu hostitel-host, což naznačuje, že anionty CR neinteragují s portály ani s kavitou molekul CBn. Naopak v případě záporného skenovacího módu byly ve spektrech prvního řádu detekovány komplexy CR@CB7 a CR@CB8 se stechiometrií 1:1 a vyšší (1:2, 2:1, 3:1 a 2:2), což je připisováno interakci mezi CR a vnějšími povrchovými atomy vodíku CBn. Supramolekulární komplexy byly vyizolovány a následně také charakterizovány za využití termogravimetrické analýzy, práškové rentgenové difrakční analýzy a spektroskopických metod. Využití CBn při odbarvování vodného roztoku CR je zajímavé především z hlediska environmentálního, jelikož představuje perspektivu, jak odstraňovat barviva z odpadních vod. (39)



Obrázek 11. Interakce barviva Congo red a CB8. (39)

He a kol. studovali, jakým způsobem bude Methyloranž (MO) s cucurbiturilem tvořit inkluzní komplex pomocí monokrystalové rentgenové difrakce (Single Crystal X-ray Diffraction) a NMR spektroskopie. Podrobné studium intermolekulárních interakcí bylo provedeno pomocí Hirshfeldovy povrchové analýzy. Komplexace je ovlivněna mnoha faktory, zvláště významné je pak rozmístění náboje u MO. Podoba vzniklého komplexu je pak dána výsledkem všech druhů slabých intermolekulárních interakcí. (22)

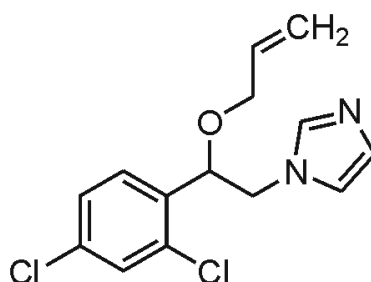
3.3 Supramolekulární komplexy azobarviv s cyklodextriny a cucurbiturily

Buschmann a kol. v roce 1997 studovali tvorbu komplexů neutrálních organických molekul s cucurbiturilem (není uvedeno, o který konkrétní homolog se jednalo) a β -CD v kyselině mravenčí pomocí spektrofotometrických titrací. V případě β -CD nemělo složení rozpouštědla prakticky žádný vliv na stabilitu vytvořených komplexů. U cucurbiturilu byla situace zcela odlišná. Díky interakci cucurbiturilu s protony došlo ke změnám konstanty stability vzniklých komplexů, přičemž konstanta stability rostla s klesající koncentrací kyseliny. Při nízkých koncentracích kyseliny tvořil cucurbituril stabilnější komplexy s organickými molekulami než β -CD. Jako hostující molekuly byly použity 4-methylbenzylamin, 1,4-fenylen diamin, Methyloranž, Orange II, Orange IV, Direct Orange 39 a Direct Orange 40. Konstanty stability K [$\text{dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$] pro komplex cucurbiturilu s daným barvivem při 25 °C a různých koncentracích kyseliny mravenčí jsou uvedeny v **Tabulce 7**. (40)

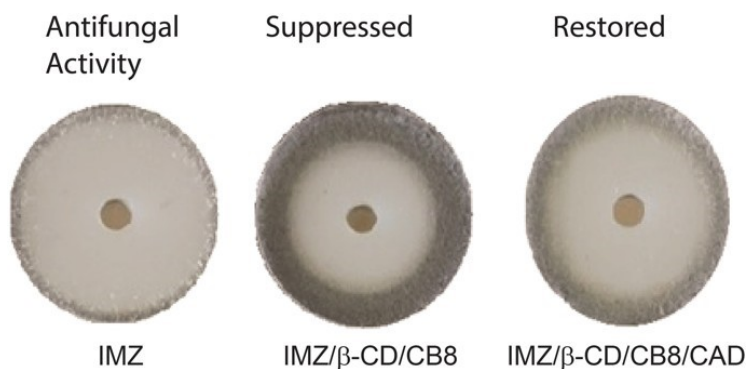
Tabulka 7. Konstanty stability komplexů barviv s cucurbiturilem. (40)

Molekula hosta	Koncentrace kyseliny mravenčí [vol. %]					
	10	15	20	25	30	40
Direct Orange 39	3,02	2,80	2,32	2,22	1,99	1,93
Direct Orange 40	3,17	-	2,53	-	2,16	1,80
Orange II	2,83	-	-	-	1,86	1,61
Orange IV	2,97	-	2,49	-	2,16	2,06
Methyloranž	-	-	-	-	2,24	1,76

Al-Dubaili a kol. studovali komplexy imazalilu (IMZ), jehož strukturní vzorec je na **Obrázku 12**, s β -CD a CB8 a jejich účinek na celkem 7 důležitých patogenních rostlinných hub, které způsobují zemědělsky významné choroby po celém světě. Při enkapsulaci léku do kavity makrocyklu byla potlačena jeho aktivita, po následném přidání kadaverinu (CAD) došlo k jejímu účinnému obnovení. Výsledky této práce umožňují vědcům zabývajícím se mykologií a patologií rostlin inhibovat nebo redukovat růst plísní „na vyžádání“. Na **Obrázku 13** je schematické znázornění účinku IMZ proti *Thielaviopsis punctulata*, přičemž aktivita IMZ je ovlivněna stimulací CAD. (41)



Obrázek 12. Strukturní vzorec imazalilu.



Obrázek 13. Schematické znázornění účinku IMZ proti *Thielaviopsis punctulata*. (41)

II. PRAKTICKÁ ČÁST

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Charakteristika použitých ligandů a hostitelských molekul

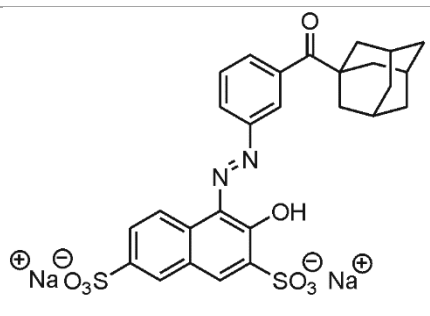
V následujících dvou podkapitolách budou charakterizovány ligandy (azobarviva) a makrocyclické sloučeniny použité v praktické části této bakalářské práce.

4.1.1 Ligandy

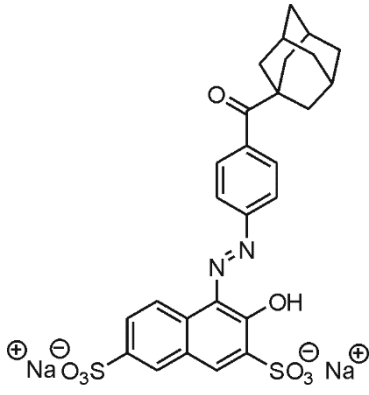
Azobarviva vystupující v této práci v roli hostujících molekul (ligandů) byla připravena péčí Davida Gergely v rámci jeho doktorského studia a poskytnuta z laboratorních zásob. Nebylo tedy nutné tyto sloučeniny syntetizovat ani nikterak upravovat před jejich samotným použitím. Jejich struktura byla před provedením experimentů zabývajících se jejich schopností vytvářet supramolekulární komplexy s cucurbiturily nejprve ověřena pomocí hmotnostní spektrometrie.

Strukturní vzorce obou použitých ligandů (v práci dále uváděných pod zkratkami „L1“ a „L2“) a jejich základní fyzikálně-chemické parametry, jsou uvedeny v **Tabulce 8** a **9**.

Tabulka 8. Strukturní vzorec a základní charakteristika sloučeniny L1.

	
Systematický název:	4-{2-[3-(1-adamantyl)karbonyl]fenyl]diazenyl}-3-hydroxynaftalen-2,7-disulfonát disodný
Molární hmotnost:	614,598
Exaktní hmotnost:	614,077 u
Teplota tání:	>340 °C
Vzhled:	tmavě červený krystalický prášek

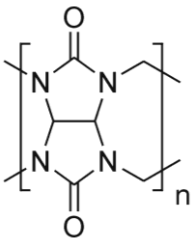
Tabulka 9. Strukturální vzorec a základní charakteristika sloučeniny L2.

	
Systematický název:	4-{2-[4-(1-adamantyl)karbonyl]fenyl]diazenyl}-3-hydroxynaftalen-2,7-disulfonát disodný
Molární hmotnost:	614,598
Exaktní hmotnost:	614,077 u
Teplota tání:	>340 °C
Vzhled:	tmavě červený krystalický prášek

4.1.2 Hostitelské molekuly

Molekuly vystupující v této práci v roli hostitelských sloučenin (**Tabulka 10**) byly zakoupeny z komerčních zdrojů v čistotě nevyžadující žádnou další purifikaci.

Tabulka 10. Hostitelské molekuly použité v této studii.

Obecný vzorec	Sloučenina	n	Sumární vzorec	Molární hmotnost	Exaktní hmotnost
	CB6	6	C ₃₆ H ₃₆ N ₂₄ O ₁₂	996,825	996,294 u
	CB7	7	C ₄₂ H ₄₂ N ₂₈ O ₁₄	1162,926	1162,344 u
	CB8	8	C ₄₈ H ₄₈ N ₃₂ O ₁₆	1329,100	1328,393 u

4.2 ESI-MS analýza samotných ligandů

ESI-MS analýzy zaměřené na potvrzení molekulární struktury použitých ligandů byly prováděny na hmotnostním spektrometru s iontovou pastí amaZon X vybaveném elektrosprejovým ionizačním zdrojem. Jednotlivé vzorky byly připravovány bezprostředně před samotnou analýzou.

4.2.1 Specifikace hmotnostního spektrometru

Název:	amaZon X (Bruker Daltonics)
Ionizační zdroj:	Elektrosprej
Hmotnostní analyzátor:	iontová past
Sušící a rozprašovací plyn:	Dusík
Způsob fragmentace iontů:	kolizí indukovaná disociace (CID)
Kolizní plyn:	Helium
Software:	Trap Control, Data Analysis

4.2.2 Parametry ESI-MS analýz samotných ligandů

Do iontového zdroje byly vzorky o koncentraci $0,5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ přiváděny v podobě roztoku $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ (1/1, v/v) kovovou kapilárou při konstantním průtoku $3 \mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$. Analýzy byly prováděny jak v pozitivním, tak v negativním skenovacím módu. Níže jsou uvedeny nejvýznamnější parametry měření:

Skenování mód:	Enhanced resolution ($8\ 100\ m/z\cdot\text{s}^{-1}$)
Napětí na kapiláře:	$\pm 4,2\ \text{kV}$
Napětí na konci kapiláry:	$\pm 140\ \text{V}$
Tlak rozprašovacího plynu:	$55,16\ \text{kPa}$
Průtok sušícího plynu:	$6\ \text{dm}^3\cdot\text{min}^{-1}$
Teplota sušícího plynu:	$220\ ^\circ\text{C}$
ICC (maximální počet iontů v pasti):	200 000 (ESI+), 70 000 (ESI-)
Maximální akumulací čas:	20 ms
Rozpětí m/z :	50–2000
Tandemová spektra:	MS/MS

Ostatní parametry měření, jako např. fokusace na příslušnou hodnotu m/z či nastavení amplitudy v průběhu provádění ESI-MS/MS experimentů, byly nastavovány a podle potřeby upravovány v průběhu provádění samotné analýzy.

4.2.3 Příprava vzorků pro ESI-MS analýzy samotných ligandů

Do vialky o objemu 1,5 cm³ (Eppendorf® microtube 3810X) byl navážen 1 mg příslušného ligandu který byl následně rozpuštěn v 1 cm³ methanolu (v kvalitě LC-MS). Z takto připraveného zásobního roztoku bylo pomocí mikropipety odebráno odpovídající množství ligandu do roztoku CH₃OH/H₂O (1/1, v/v) tak, aby výsledná koncentrace roztoku použitého pro samotnou analýzu činila 0,5 µg·ml⁻¹.

4.3 ESI-MS analýza inkluzních komplexů

ESI-MS analýzy zaměřené na studium tvorby inkluzních komplexů předmětných azobarviv s cucurbiturily byly prováděny na hmotnostním spektrometru s iontovou pastí amaZon X vybaveném elektrosprejovým ionizačním zdrojem. Jednotlivé vzorky byly připravovány bezprostředně před samotnou analýzou.

4.3.1 Specifikace hmotnostního spektrometru

Název:	amaZon X (Bruker Daltonics)
Ionizační zdroj:	Elektrosprej
Hmotnostní analyzátor:	iontová past
Sušící a rozprašovací plyn:	Dusík
Způsob fragmentace iontů:	kolizí indukovaná disociace (CID)
Kolizní plyn:	Helium
Software:	Trap Control, Data Analysis

4.3.2 Parametry ESI-MS analýz inkluzních komplexů

Do iontového zdroje byly vzorky o koncentraci 10 µM přiváděny v podobě roztoku CH₃OH/H₂O (1/1, v/v) nebo H₂O kovovou kapilárou při konstantním průtoku 3 µl·min⁻¹. Analýzy byly prováděny jak v pozitivním, tak v negativním skenovacím módu. Níže jsou uvedeny nejvýznamnější parametry měření:

Skenování mód:	Enhanced resolution (8 100 $m/z \cdot s^{-1}$)
Napětí na kapiláře:	±4,0 kV
Napětí na konci kapiláry:	±140 V
Tlak rozprašovacího plynu:	206,84 kPa
Průtok sušícího plynu:	6 dm ³ ·min ⁻¹
Teplota sušícího plynu:	300 °C

ICC (maximální počet iontů v pasti):	200 000 (ESI+), 70 000 (ESI-)
Maximální akumulací čas:	20 ms
Rozpětí m/z :	50–3000
Tandemová spektra:	MS/MS

Ostatní parametry měření, jako např. fokusace na příslušnou hodnotu m/z či nastavení amplitudy v průběhu provádění ESI-MS/MS experimentů, byly nastavovány a podle potřeby upravovány v průběhu provádění samotné analýzy.

4.3.3 Příprava vzorků pro ESI-MS analýzy inkluzních komplexů

Do vialky o objemu $1,5 \text{ cm}^3$ (Eppendorf® microtube 3810X) byl navážen 1 mg příslušného ligandu, který byl následně rozpuštěn v 1 cm^3 methanolu (v kvalitě LC-MS). Stejným způsobem byly připraveny zásobní roztoky cucurbiturilů (CB6, CB7, CB8) s tím rozdílem, že jako rozpouštědlo byla použita voda (opět v kvalitě LC-MS). Z takto připravených zásobních roztoků bylo pomocí mikropipety odebráno odpovídající množství ligandu a makrocyclu do roztoku $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ (1/1, v/v) nebo do vody tak, aby výsledná koncentrace roztoku použitého pro samotnou analýzu činila $10 \mu\text{M}$.

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

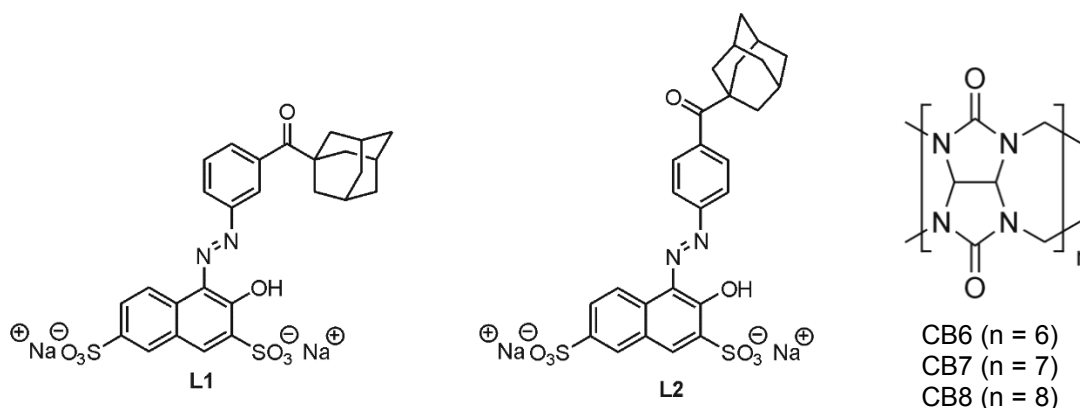
5.1 Komentář k diskuzní části

Předložená bakalářská práce svojí tematikou zapadá do problematiky, jíž je roky věnována pozornost ve výzkumné skupině doc. Roberta Vichy a volně navazuje na diplomovou práci Evy Achbergerové. (42) Práce je tedy orientována do oblasti studie supramolekulárních komplexů typu hostitel-host, a to pomocí hmotnostní spektrometrie, která vhodně doplňuje ostatní analytické metody (např. nukleární magnetickou rezonanci, izotermální titrační mikrokolorimetrii či UV-Vis spektrofotometrii), které se běžně pro tento typ studií používají. Na rozdíl od výše uvedených, pracuje hmotnostní spektrometrie v plynné, nikoliv v kapalně fázi.

Ligandy použité v této práci byly syntetizovány péčí Davida Gergely v rámci jeho doktorského studia a představují toho času první azobarviva obsahující ve své struktuře adamantanový motiv. Struktura obou v práci používaných azobarviv byla velmi pečlivě navržena s ohledem na záměr studovat jejich schopnost vytvářet stabilní komplexy typu hostitel-host s cyklodextriny a cucurbiturily. Molekula ligandů sestává z centrální azoskupiny, na kterou je z jedné strany navázán fenylový kruh spojený s adamantanovým skeletem prostřednictvím karbonylové skupiny a ze strany druhé 3-hydroxynaftalen-2,7-disulfonát disodný. Tento substituent byl zvolen ze dvou důvodů: za prvé se jedná o stericky objemnou skupinu (řeč je o disulfonátu disodném), která de facto znemožňuje navlečení molekuly hosta do kavity makrocyklu jiným způsobem než přes adamantanový motiv, což bylo již prokázáno v případě jejího použití při přípravě rotaxanu s β -CD (43), a za druhé vysoce polární disulfonátová funkční skupina zvyšuje polaritu každého ligandu do té míry, že je umožněno provádět studie ve vodných roztocích.

Jelikož se naše pozornost v minulých letech upírala pouze na studium komplexů azobarviv s cyklodextriny, rozhodli jsme se v tomto ohledu studii zkompletovat popsáním supramolekulárního chování připravených ligandů také s dalším typem hostitelských molekul, a sice cucurbiturily. Konkrétně se pak jednalo o CB6, CB7 a CB8.

Strukturní vzorce obou v práci použitých ligandů, jakož i struktura hostitelských molekul, jsou uvedeny na **Obrázku 14**.



Obrázek 14. Ligandy (L1 a L2) a hostitelské molekuly (CB_n) použité v této práci.

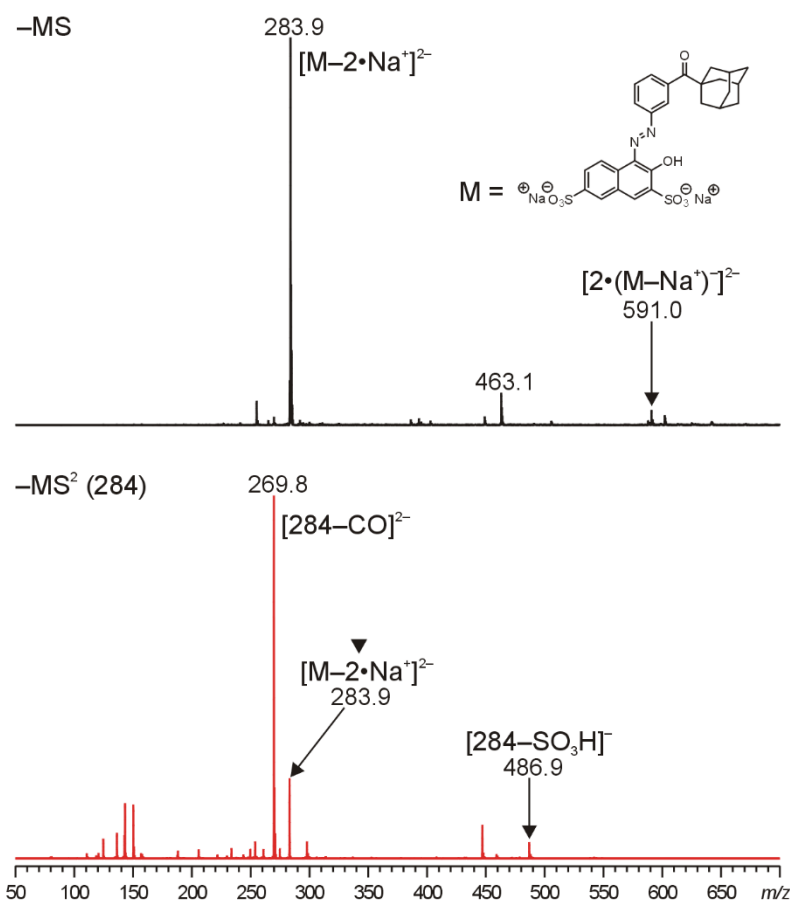
5.2 ESI-MS analýzy studovaných ligandů

Před započítím studia schopnosti sloučenin L1 a L2 vytvářet stabilní supramolekulární komplexy s cucurbiturily, bylo přistoupeno k ověření jejich struktury, a to analýzou obou sloučenin pomocí hmotnostní spektrometrie s elektrosprejovou ionizací. Důvodem nebylo pouhé ověření struktury, ale také záměr získat hmotnostní spektra samotných ligandů, která by mohla být v další experimentální činnosti srovnávána se spektry směsi studovaných ligandů s cucurbiturily.

Ve spektrech prvního řádu změřených v kladném skenovacím módu, nebyly, podle očekávání, pozorovány žádné relevantní signály. Tato skutečnost vyplývá z chemické struktury obou ligandů, kdy předpokladem nebyla tvorba kladně, ale záporně nabitých iontů.

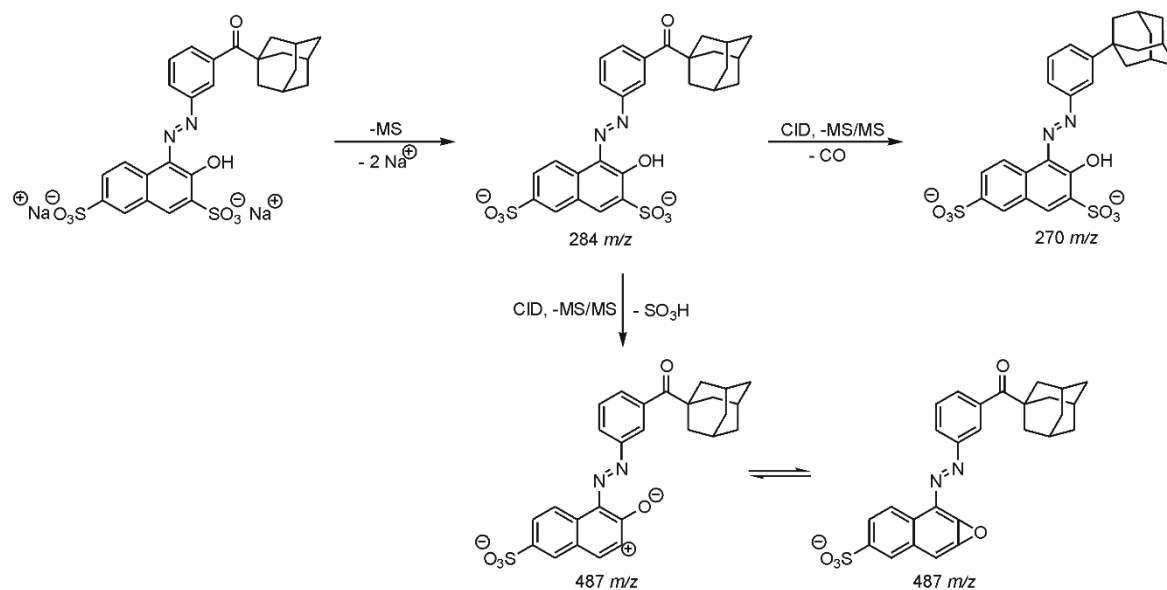
Ve spektrech prvního řádu obou ligandů získaných v negativní skenovacím módu byl jako dominantní pozorován dvakrát záporně nabitý ion o m/z 284. Jelikož se jednalo o dvakrát nabitý ion, bylo zřejmé, že jeho skutečná exaktní hmotnost činí 568 u, což odpovídá ztrátě dvou sodných kationtů z původní molekuly ligandu $[M-2\cdot Na^+]^{2-}$. Dále byl ve spektru obou sloučenin pozorován dvakrát nabitý ion, jehož hodnota m/z činila 591, kdy reálná hodnota toho iontu odpovídá hodnotě 1182 m/z . To odpovídá dimeru příslušného ligandu po ztrátě jednoho sodného kationtu. Tento ion lze tedy vyjádřit jako $[2\cdot (M-Na^+)]^{2-}$. Posledním ve spektrech obou studovaných ligandů pozorovaným signálem byl jedenkrát nabitý ion s hodnotou m/z 463. Struktura tohoto iontu se, bohužel, navrhnout nepodařila, jelikož jeho izolace a následná fragmentace za podmínek kolizí indukované

disociace (CID), nebyla úspěšná. ESI-MS spektrum prvního řádu sloučeniny **L1** je uvedeno na **Obrázku 15**.



Obrázek 15. ESI-MS/MS spektra sloučeniny **L1** naměřená v negativním skenovacím módu.

Tandemová hmotnostní spektra se však podařilo naměřit pro ion $[M-2\cdot Na^+]^{2-}$ (m/z 284), a to v případě obou studovaných ligandů. V obou případech byly v MS/MS spektrech opět pozorovány ionty se stejnými hodnotami m/z , což značí, že ligandy **L1** a **L2** podléhají stejným fragmentačním reakcím (**Obrázek 15**). Dominantním byl dvakrát záporně nabitý ion o m/z 270, což značí neutrální ztrátu 28 m/z . Z toho lze usuzovat na destrukci karbonylového linkeru mezi adamantanovým a aromatickým kruhem za ztráty oxidu uhelnatého (CO). Druhou, v MS/MS spektrech pozorovanou fragmentační reakcí, byla ztráta iontu o m/z 81 značící odstoupení funkční skupiny SO_3H . Návrh fragmentace iontu 284 m/z je schematicky znázorněn na **Obrázku 16**.



Obrázek 16. Návrh fragmentace iontu $[M-2\cdot Na^+]^{2-}$ sloučeniny **L1**.

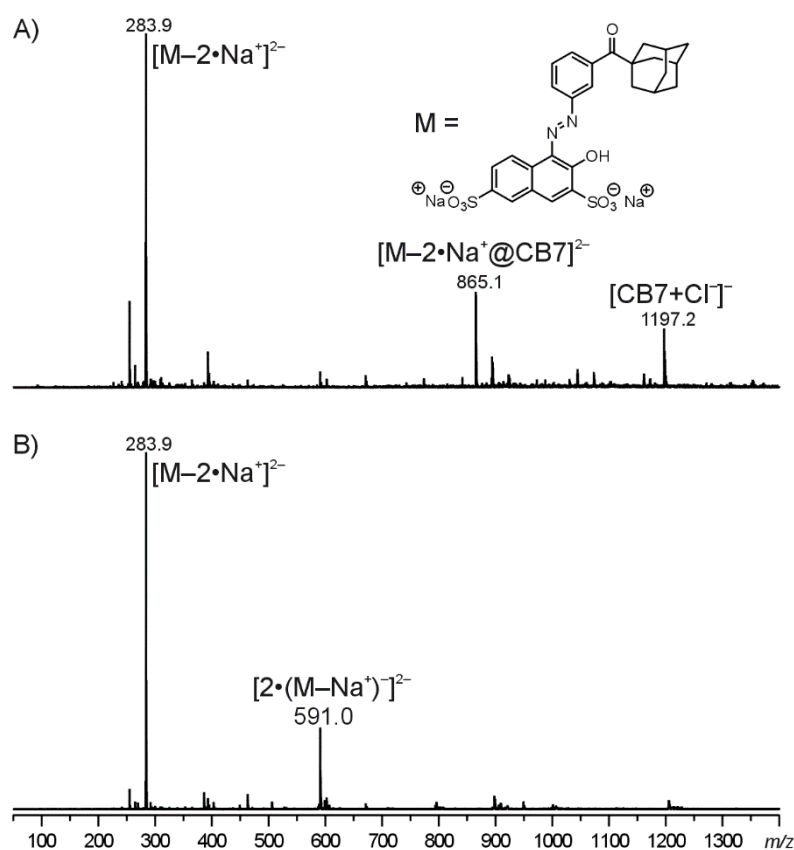
5.3 ESI-MS analýzy komplexů typu ligand@cucurbit[n]uril

Po ověření struktury sloučenin **L1** a **L2** mohlo být přistoupeno k experimentům, jejichž cílem bylo prozkoumat schopnost těchto látek vytvářet supramolekulární komplexy typu hostitel-host s cucurbiturily v plynné fázi a dále pak, v případě tvorby příslušného komplexu, provést izolaci a následnou fragmentaci daného iontu. Jako hostitelské molekuly byly použity CB6, CB7 a CB8.

Jelikož tato práce navazuje na diplomovou práci Evy Achbergerové, která studovala tvorbu komplexů sloučenin **L1** a **L2** s α - a β -cyklodextrinem, a disertační práci Davida Gergely, byly nejprve zvoleny stejné podmínky měření ESI-MS spekter směsí typu **L1/2@CB6/7/8**, včetně volby prostředí, tedy směsi methanol/voda (1/1, v/v), jako tomu bylo v diplomové práci Evy Achbergerové. Na rozdíl od cyklodextrinů, které jsou ve směsi methanol/voda (1/1, v/v) relativně dobře rozpustné, se v případě cucurbiturilů ukázalo být toto prostředí jako problematické, v závislosti na typu použitého hostitele.

To, že nebyl pozorován vznik komplexu sloučenin **L1** a **L2** s CB6 nebylo žádným velkým překvapením, a to s ohledem na rozměry adamantanového skeletu a kavity hostitele. Naopak, byl-li by vznik tohoto typu komplexu pozorován, bylo by to v nesouladu s výsledky získanými pomocí experimentů prováděných v kapalně fázi (ITC, NMR) a bylo by tedy zřejmé, že se je nejedná o komplex inkluze, ale nespecifický.

V případě dvou objemnějších hostitelů, tedy CB7 a CB8 už bylo nasnadě se domnívat, že by komplexy vznikat měly. Nejprve byla analyzována ekvimolární směs sloučeniny **L1** s CB7. Ze spektra uvedeného na **Obrázku 17A** je patrné, že byly pozorovány celkem tři významné ionty, a to dvakrát nabitý ion o m/z 284 odpovídající molekule hosta postrádající dva sodné kationty, dále to byl jedenkrát nabitý ion, z jehož vzhledu (resp. ze vzhledu molekulárního klastru jako celku) bylo patrné, že obsahuje jeden atom chloru, kdy hodnota m/z činila 1197, což značí na přítomnost agregátu CB7 s chloridovým aniontem. V neposlední řadě byl ve spektru prvního řádu pozorován dvakrát záporně nabitý ion, jehož hodnota m/z (865) odpovídala komplexu **L1@CB7**, resp. $[M-2\cdot Na^+@CB7]^{2-}$. Nutno podotknout, že se ve spektru nacházela řada dalších signálů s intenzitou na úrovni šumu, jejichž identitu se nepodařilo určit. Obdobné výsledky byly získány také při analýze směsi sloučeniny **L2** s CB7.



Obrázek 17. ESI-MS spektra prvního řádu směsi **L1** s CB7 (A) a **L1** s CB8 (B) v prostředí MeOH/H₂O (1:1, v/v).

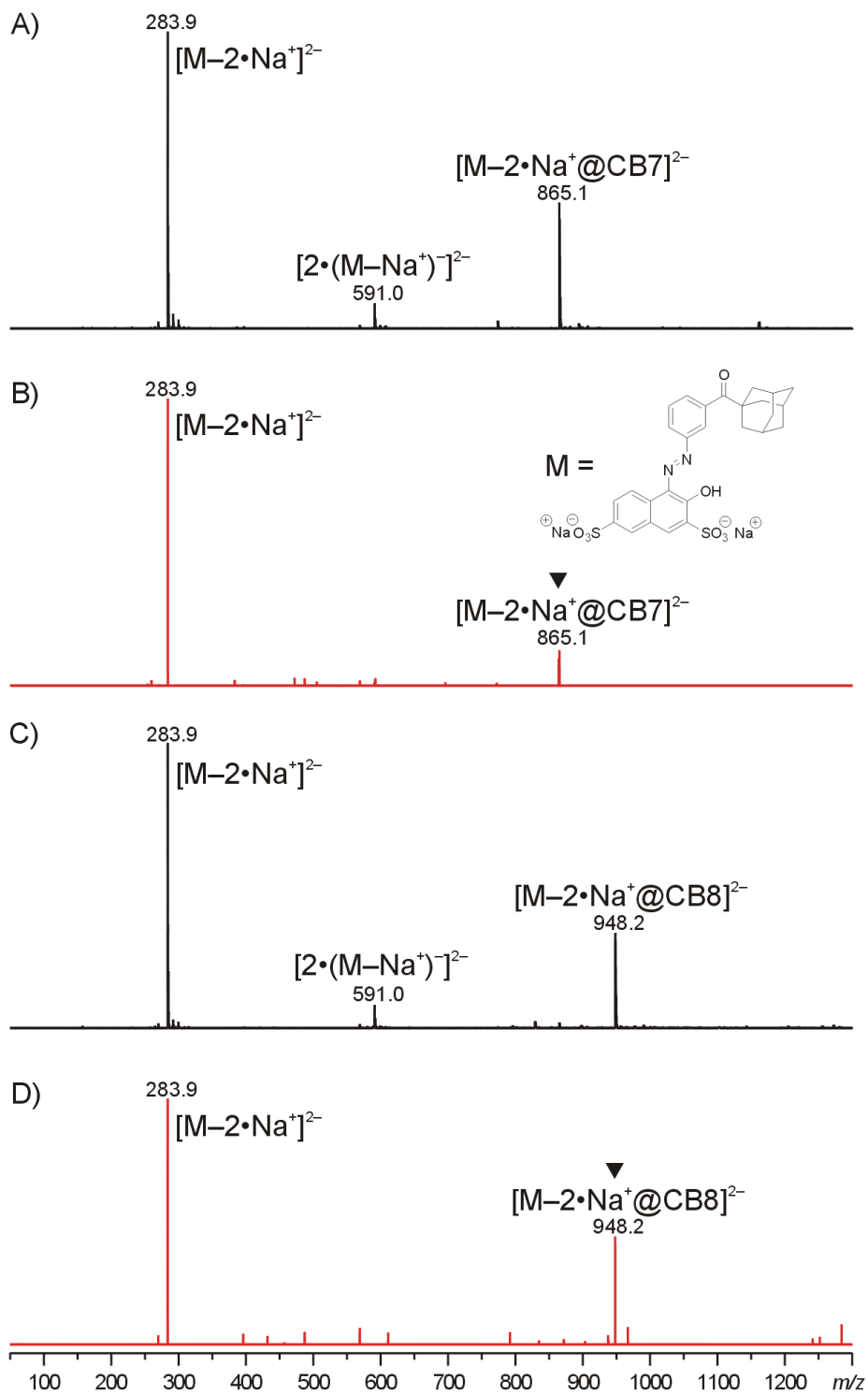
Při analýze směsi sloučeniny **L1** s CB8 se ve spektru prvního řádu vyskytovaly pouze signály pocházející z molekuly hosta (284 a 591 m/z), nikoliv ty odpovídající hostitelské molekule nebo dokonce očekávanému supramolekulárnímu komplexu (**Obrázek 17B**). Absence tohoto typu signálů pravděpodobně souvisí s omezenou rozpustností molekuly CB8 v prostředí methanol/voda. Naprosto stejný výsledek byl získán také při analýze směsi sloučeniny **L2** s CB8.

S ohledem na výše uvedené bylo rozhodnuto změnit prostředí ze směsi methanol/voda (1/1, v/v) na vodu. Umožňuje to jednak povaha molekul hostů, které jakožto iontové sloučeniny ve vodě rozpustné jsou a dále schopnost hostitelských molekul se taktéž ve vodném prostředí rozpouštět, byť v omezené míře, zejména pak v případě CB8.

Analýzou ekvimolární směsi sloučeniny **L1** s CB7 ve vodné prostředí, byly ve spektru prvního řádu získané v záporném skenovacím módu pozorovány celkem tři signály. Dominantním byl dvakrát záporně nabitý ion odpovídající molekule hosta postrádající dva sodné kationty (284 m/z), který byl doprovázen dvakrát nabitým iontem o m/z 591, který odpovídá dimeru molekuly hosta, z níž byl odstraněn jeden sodný kation $[2 \cdot (M - Na^+)]^{2-}$. Jako poslední se ve spektru vyskytoval taktéž dvakrát záporně nabitý ion, jehož hodnota m/z naznačovala, se jedná o komplex typu **L1@CB7** (**Obrázek 18A**). Z hodnoty m/z bylo možné usuzovat, že se jedná o binární komplex se stechiometrií 1:1. Izolací a následnou fragmentací tohoto iontu ($-MS/MS$) za podmínek kolizí indukované disociace byla tvorba komplexu potvrzena. Jak je patrné z **Obrázku 18B** jediným produktovým iontem ve spektru se vyskytujícím, byl signál o m/z 284 odpovídající iontu $[M - 2 \cdot Na^+]^{2-}$. To znamená, že došlo k vyvlečení hostující molekuly z kavity molekuly hosta (případně k rozpadu hostitelské molekuly, což však není, s ohledem na hodnotu amplitudy (0,35) zajišťující rozpad komplexu příliš pravděpodobné). Samotný CB7, jakožto neutrální sloučenina pak nemůže být ve spektru pozorován.

V ESI-MS spektru ekvimolární směsi sloučeniny **L1** s CB8 ve vodném prostředí, byly pozorovány úplně stejné typy iontů, jako v případě shora uvedeném (**Obrázek 18C,D**). Toto budiž jednoznačným důkazem toho, že předpoklad vzniku komplexu **L1@CB8** byl oprávněný a že prostředí, v němž se daný experiment provádí, může mít zásadní vliv za získaný výsledek. Změna prostředí pro provádění samotné analýzy se tak ukázala správným rozhodnutím.

Při analýze směsi sloučeniny **L2**@CB7/8 ve vodném prostředí byly získány stejné výsledky, jako tomu bylo v případě sloučeniny **L1**, a to jak ve spektrech prvního řádu, tak také ve spektrech tandemových (–MS/MS).



Obrázek 18. ESI-MS spektra sloučeniny **L1** s CB7/8 ve vodném prostředí. (A) –MS směsi **L1** s CB7; (B) –MS/MS iontu 865 m/z ; (C) –MS směsi **L1** s CB8; (D) –MS/MS iontu 948 m/z .

Na tomto místě se jeví býti vhodné provést komplexní shrnutí dosažených výsledků. Komplexace sloučenin **L1** a **L2** s nejmenší z hostitelských molekul, CB6, prokázána nebyla, což je v souladu s výsledky získanými v kapalně fázi. Tvorba komplexů mezi oběma ligandy a CB7 či CB8 naopak potvrzena byla. Jako vhodnější prostředí pro provádění experimentů se ukázala být voda, namísto směsi methanol/voda (1/1, v/v), a to pravděpodobně z důvodu nedostatečné rozpustnosti hostitelských molekul v tomto prostředí. Nemá bez zajímavosti, že v případě cyklodextrinů, nebyl vznik komplexů prostředím methanol/voda nikterak ovlivněn.

Shrnutí dosažených výsledků je předloženo v **Tabulce 11**, kde jsou uvedeny teoretické a experimentálně získané hodnoty m/z odpovídající očekávaným/pozorovaným typům iontů vznikajících při komplexaci sloučenin **L1** a **L2** s CB6/7/8.

Tabulka 11. Teoretické a experimentálně získané hodnoty m/z komplexů hostitel-host.

Sloučenina	$[M-2\cdot Na^+@CB6]^{2-}$		$[M-2\cdot Na^+]@CB7]^{2-}$		$[M-2\cdot Na^+]@CB8]^{2-}$	
	teor. m/z	exp. m/z	teor. m/z	exp. m/z	teor. m/z	exp. m/z
L1	782,2	ND	865,2	865,1	948,3	948,2
L2	782,2	ND	865,2	865,1	948,3	948,2

ND = nebyl detekován

ZÁVĚR

Prvním krokem experimentální části bakalářské práce bylo ověření struktury ligandů, jež byly syntetizovány Davidem Gergelou v rámci jeho doktorského studia. Jednalo se o azobarviva, která obsahovala ve své struktuře adamantanový motiv. Druhým krokem pak bylo studium schopností těchto ligandů tvořit supramolekulární komplexy typu hostitel-host s cucurbiturily (CBn). Jako hostitelské molekuly byly zvoleny CB6, CB7 a CB8.

Nejprve bylo přistoupeno k analýze sloučenin **L1** a **L2** pomocí hmotnostní spektrometrie s elektrosprejovou ionizací. Ve spektrech prvního řádu měřených v kladném skenovacím módu nebyly dle očekávání pozorovány žádné signály. Ve spektrech první řádu měřených v negativním skenovacím módu byl pozorován vznik aduktů $[M-2\cdot Na^+]^{2-}$ a $[2\cdot(M-Na^+)]^2$. Ve spektru obou studovaných ligandů byl rovněž pozorován jedenkrát nabitý ion s hodnotou m/z 463, jehož strukturu se bohužel navrhnout nepodařilo.

Po ověření struktury obou ligandů bylo přistoupeno ke studiu schopnosti těchto ligandů tvořit komplexy typu hostitel-host s příslušnými hostitelskými molekulami. Nejprve byla jako reakční prostředí zvolena směs methanol/voda (1/1, v/v). Jak se později ukázalo, toto prostředí nebylo příliš vhodné, pravděpodobně kvůli omezené rozpustnosti cucurbiturilů (zvláště pak CB8) v tomto prostředí.

Podle předpokladu komplexace mezi CB6 a příslušnými ligandy nenastala, jelikož objem kavity CB6 není dostačující pro enkapsulaci adamantanového motivu. U objemnějších hostitelských molekul, jakými jsou CB7 a CB8, existoval předpoklad, že by ke komplexaci dojít mohlo. Oba ligandy v prostředí methanol/voda tvořily komplex s CB7, s CB8 k tvorbě komplexu nedošlo.

Z těchto důvodů bylo rozhodnuto o změně reakčního prostředí, kterým byla nyní pouze voda. Dle očekávání, stejně jako v předchozím případě, nedošlo ke komplexaci ligandů s CB6. Oproti analýze v prostředí methanol/voda však již byla pozorována tvorba komplexů jak s CB7, tak s CB8. Tato skutečnost potvrzuje, že nově zvolené reakční prostředí bylo pro komplexaci vhodnější.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. **Záruba , Kamil, a další.** *Analytická chemie*. Praha : Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2016. ISBN 978-80-7080-950-1.
2. **Štulík, Karel, a další.** *Analytické separační metody*. Praha : Karolinum, 2004. ISBN 80-246-0852-9.
3. **Friedecký, David a Lemr, Karel.** Úvod do hmotnostní spektrometrie. *Klinická biochemie a metabolismus*. 2012, vol. 20, no. 3, stránky 152–157.
4. **McMurry, John.** *Organická chemie*. Brno : Vysoké učení technické v Brně, nakladatelství VUTIUM, 2015. ISBN 978-80-7080-930-3.
5. **Hur, Moon Young, Hwang, Ilha a Kim, Kimoon.** Chapter 1. Introduction: History and Development. [autor knihy] Kimoon Kim. *Cucurbiturils and Related Macrocycles*. Cambridge : Royal Society of Chemistry, 2019, stránky 1–14.
6. **Ogoshi, Tomoki, Yamagishi, Tada-aki a Nakamoto, Yoshiaki.** Pillar-Shaped Macrocyclic Hosts Pillar[n]arenes: New Key Players for Supramolecular Chemistry. *Chemical Reviews*. 2016, vol. 116, no. 14, stránky 7937–8002.
7. **Havel, Vaclav, a další.** Bambus[n]urils: a New Family of Macrocyclic Anion Receptors. *Organic Letters*. 2011, vol. 13, no. 15.
8. **Crini, Grégorio.** Review: A History of Cyclodextrins. *Chemical Reviews*. 2014, vol. 114, no. 21, stránky 10940–10975.
9. **Biwer, A., Antranikian, G. a Heinzle, E.** Enzymatic production of cyclodextrins. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2002, vol. 59, no. 6, stránky 609–617.
10. **Horský, Jiří a Jindřich, Jindřich.** Cyklodextriny ve světě polymerů. *Chemické listy*. 2013, vol. 107, no. 10, stránky 769–776.
11. **Szejtli, József.** Introduction and General Overview of Cyclodextrin Chemistry. *Chemical Reviews*. 1998, vol. 98, no. 5, stránky 1743–1754.
12. **Saenger, Wolfram, a další.** Structures of the Common Cyclodextrins and Their Larger Analogues Beyond the Doughnut. *Chemical Reviews*. 1998, vol. 98, no. 5, stránky 1787–1802.
13. **Linde, Giani Andrea, Laverde, Antonio a Colauto, Nelson Barros.** Changes to Taste Perception in the Food Industry. [autor knihy] Victor R. Preedy, Ronald Ross Watson a Colin R. Martin. *Handbook of Behavior, Food and Nutrition*. New York, NY : Springer New York, 2011, stránky 99–118.

14. **Del Valle, E.M.Martin.** Cyclodextrins and their uses: a review. *Process Biochemistry*. 2004, vol. 39, no. 9, stránky 1033–1046.
15. **Uekama, Kaneto, Hirayama, Fumitoshi a Irie, Tetsumi.** Cyclodextrin Drug Carrier Systems. *Chemical Reviews*. 1998, vol. 98, no. 5, stránky 2045–2076.
16. **Szejtli, József.** Cyclodextrins and molecular encapsulation. *Chimica oggi*. 1987, vol. 3, stránky 17–21.
17. **Jansook, Phatsawee, Ogawa, Noriko a Loftsson, Thorsteinn.** Cyclodextrins: structure, physicochemical properties and pharmaceutical applications. *International Journal of Pharmaceutics*. 2018, vol. 535, no. 1–2, stránky 272–284.
18. **Morrison, Peter W. J., Connon, Che J. a Khutoryanskiy, Vitaliy V.** Cyclodextrin-Mediated Enhancement of Riboflavin Solubility and Corneal Permeability. *Molecular Pharmaceutics*. 2013, vol. 10, no. 2, stránky 756–762.
19. **Yang, Xiran, a další.** Cucurbit[10]uril-based chemistry. *Chinese Chemical Letters*. 2018, vol. 29, no. 11, stránky 1560–1566.
20. **Lagona, Jason, a další.** The Cucurbit[n]uril Family. *Angewandte Chemie International Edition*. 2005, vol. 44, no. 31, stránky 4844–4870.
21. **Lee, Jae Wook, a další.** Cucurbituril Homologues and Derivatives: New Opportunities in Supramolecular Chemistry. *Accounts of Chemical Research*. 2003, vol. 36, no. 8, stránky 621–630.
22. **He, Suhang, Sun, Xuzhuo a Zhang, Haibo.** Influence of the protonation state on the binding mode of methyl orange with cucurbiturils. *Journal of Molecular Structure*. 2016, vol. 1107, no. 5, stránky 182–188.
23. **Kim, Kimoon, a další.** Functionalized cucurbiturils and their applications. *Chemical Society Reviews*. 2007, vol. 36, no. 2, stránky 267–279.
24. **Jin Jeon, Young, a další.** Novel molecular drug carrier: encapsulation of oxaliplatin in cucurbit[7]uril and its effects on stability and reactivity of the drug. *Organic & Biomolecular Chemistry*. 2005, vol. 3, no. 11, stránky 2122–2125.
25. **You, Yi, a další.** Measuring Binding Constants of Cucurbituril-Based Host–Guest Interactions at the Single-Molecule Level with Nanopores. *ACS Sensors*. 2019, vol. 4, no. 3, stránky 774–779.
26. **Freeman, W. A., Mock, W. L. a Shih, N. Y.** Cucurbituril. *Journal of the American Chemical Society*. 1981, vol. 103, no. 24, stránky 7367–7368.
27. **Barrow, Steven J., a další.** Cucurbituril-Based Molecular Recognition. *Chemical Reviews*. 2015, vol. 115, no. 22, stránky 12320–12406.

28. **Chen, Ming, a další.** Removal of Azo Dyes from Water by Combined Techniques of Adsorption, Desorption, and Electrolysis Based on a Supramolecular Sorbent. *Industrial & Engineering Chemistry Research*. 2013, vol. 52, no. 6, stránky 2403–2411.
29. **Assaf, Khaleel I. a Nau, Werner M.** Cucurbiturils: from synthesis to high-affinity binding and catalysis. *Chemical Society Reviews*. 2015, vol. 44, no. 2, stránky 394–418.
30. **Cheng, Xiao-Jie, a další.** Twisted Cucurbit[14]uril. *Angewandte Chemie International Edition*. 2013, vol. 52, no. 28, stránky 7252–7255.
31. **Bhasikuttan, Achikanath C., Pal, Haridas a Mohanty, Jyotirmayee.** Cucurbit[n]uril based supramolecular assemblies: tunable physico-chemical properties and their prospects. *Chemical Communications*. 2011, vol. 47, no. 36, stránky 9959–9971.
32. **Jeon, Woo Sung, a další.** Complexation of Ferrocene Derivatives by the Cucurbit[7]uril Host: A Comparative Study of the Cucurbituril and Cyclodextrin Host Families. *Journal of the American Chemical Society*. 2005, vol. 127, no. 37, stránky 12984–12989.
33. **Svoboda, Jiří.** *Organická chemie I*. Praha : Vysoká škola chemicko-technologická, 2005. ISBN 80-7080-561-7.
34. **Benkhaya, Said, M'rabet, Souad a El Harfi, Ahmed.** Classifications, properties, recent synthesis and applications of azo dyes. *Heliyon*. 2020, vol. 6, no. 1.
35. **Saratale, R.G., a další.** Bacterial decolorization and degradation of azo dyes: A review. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*. 2011, vol. 42, no. 1, stránky 138–157.
36. **Borodkin, V.F.** *Chemie organických barviv*. Praha : SNTL-Nakladatelství technické literatury, 1987. ISBN 04-621-87.
37. **Alabdraba, Waleed Mohammed Sheet a Albayati , Mohammed Burhan Ali .** Biodegradation of Azo Dyes a Review. *International Journal of Environmental Engineering and Natural Resources*. 2014, vol. 1, no. 4, stránky 179–189.
38. **Zhang, Xu, Wu, Feng a Deng, Nansheng.** Efficient photodegradation of dyes using light-induced self assembly TiO₂/β-cyclodextrin hybrid nanoparticles under visible light irradiation. *Journal of Hazardous Materials*. 2011, vol. 185, no. 1, stránky 117–123.
39. **Costa, Ana L., a další.** Evaluation of the supramolecular interaction of Congo red with cucurbiturils using mass spectrometry and spectroscopic methods. *New Journal of Chemistry*. 2020, vol. 44, no. 6, stránky 2587–2596.
40. **Buschmann, H.-J. a Schollmeyer, E.** Cucurbituril and β-Cyclodextrin as Hosts for the Complexation of Organic Dyes. *Journal of Inclusion Phenomena and Molecular Recognition in Chemistry*. 1997, vol. 29, stránky 167–174.

41. **Al-Dubaili, Naji, El-Tarabily, Khaled a Saleh, Na'il.** Host-guest complexes of imazalil with cucurbit[8]uril and β -cyclodextrin and their effect on plant pathogenic fungi. *Scientific Reports*. 2018, vol. 8, no. 1.
42. **Achbergerová, Eva.** Sulfonované azosloučeniny substituované 1-adamantylem: syntéza a studium komplexace s cyklodextriny. *Diplomová práce (Ing.)*. Zlín, 2013 : Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická.
43. **Anderson, Sally, Claridge, Tim D. W. a Anderson, Harry L.** Azo-Dye Rotaxanes. *Angewandte Chemie International Edition in English*. 1997, vol. 36, no. 12, stránky 1310–1313.
44. **Gerasko, Ol'ga A, Samsonenko, Denis G a Fedin, Vladimir P.** Supramolecular chemistry of cucurbiturils. *Russian Chemical Reviews*. 2002, vol. 71, no. 9, stránky 741–760.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

CD	cyklodextrin
α -CD	α -cyklodextrin
β -CD	β -cyklodextrin
γ -CD	γ -cyklodextrin
δ -CD	δ -cyklodextrin
ε -CD	ε -cyklodextrin
ι -CD	ι -cyklodextrin
HP- β -CD	2-hydroxypropyl- β -CD
RM- β -CD	náhodně methylovaný β -CD
HP- γ -CD	2-hydroxypropyl- γ -CD
CB	cucurbituril
CGTasa	cyklodextrin glucosyl transferáza
MS	hmotnostní spektrometrie (z anglického <i>Mass Spectrometry</i>)
LC-MS	kapalinová chromatografie s hmotnostně-spektrometrickou detekcí
ESI	elektrosprejová ionizace (z anglického <i>Electrospray Ionization</i>)
IT	iontová past (z anglického <i>Ion Trap</i>)
m/z	hmotnost iontu ku velikosti náboje
CI	Colour index
CR	Congo Red
MO	methyloranž
IMZ	imazalil
CAD	kadaverin

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1. Obecné schéma hmotnostního spektrometru.	12
Obrázek 2. Struktura ϵ -CD a ι -CD. (12).....	19
Obrázek 3. Schematické znázornění struktury CDs. (13)	20
Obrázek 4. Tvorba inkluzního komplexu oxaliplatinu s CB7 ve vodě. (24).....	27
Obrázek 5. Schematické znázornění molekuly cucurbiturilu. (21)	31
Obrázek 6. Reakční schéma přípravy cucurbiturilů. (21).....	32
Obrázek 7. Příklady molekul hostů pro různé homology CBn. (21).....	33
Obrázek 8. Schématické znázornění diazotace. (33).....	35
Obrázek 9. Schématické znázornění kopulační reakce. (33).....	35
Obrázek 10. Fotokatalytická degradace molekul barviva zprostředkovaná hybridním nanomateriálem TiO ₂ / β -CD při ozáření viditelným zářením. (38).....	36
Obrázek 11. Interakce barviva Congo red a CB8. (39)	37
Obrázek 12. Strukturální vzorec imazalilu.....	39
Obrázek 13. Schematické znázornění účinku IMZ proti <i>Thielaviopsis punctulata</i> . (41)...	39
Obrázek 14. Ligandy (L1 a L2) a hostitelské molekuly (CBn) použité v této práci.....	47
Obrázek 15. ESI-MS/MS spektra sloučeniny L1 naměřená v negativním skenovacím módu.	48
Obrázek 16. Návrh fragmentace iontu $[M-2\cdot Na^+]^{2-}$ sloučeniny L1.	49
Obrázek 17. ESI-MS spektra prvního řádu směsí L1 s CB7 (A) a L1 s CB8 (B) v prostředí MeOH/H ₂ O (1:1, v/v).	50
Obrázek 18. ESI-MS spektra sloučeniny L1 s CB7/8 ve vodném prostředí. (A) –MS směsi L1 s CB7; (B) –MS/MS iontu 865 <i>m/z</i> ; (C) –MS směsi L1 s CB8; (D) –MS/MS iontu 948 <i>m/z</i>	52

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1. Rozpustnost jednotlivých homologů CDs. (9)	20
Tabulka 2. Rozměry nativních CDs. (10).....	21
Tabulka 3. Modifikované cyklodextriny používané ve farmaceutických výrobcích. (17)..	23
Tabulka 4. Rozpustnost jednotlivých homologů CBn. (20)	30
Tabulka 5. Rozměry vybraných CBn. (21)	30
Tabulka 6. Dělení azobarviv podle počtu charakteristických funkčních skupin. (34)	34
Tabulka 7. Konstanty stability komplexů barviv s cucurbiturilem. (40).....	38
Tabulka 8. Strukturní vzorec a základní charakteristika sloučeniny L1.	41
Tabulka 9. Strukturní vzorec a základní charakteristika sloučeniny L2.	42
Tabulka 10. Hostitelské molekuly použité v této studii.	42
Tabulka 11. Teoretické a experimentálně získané hodnoty m/z komplexů hostitel-host...	53