

Vývoj metodiky pro stanovování termodynamických parametrů host-guest systémů pomocí ITC

Bc. Petra Branná

Diplomová práce
2011



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav chemie
akademický rok: 2010/2011

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Petra BRANNÁ**

Osobní číslo: **T09637**

Studijní program: **N 2901 Chemie a technologie potravin**

Studijní obor: **Chemie potravin a bioaktivních látek**

Téma práce: **Vývoj metodiky pro stanovení termodynamických parametrů host-guest systémů pomocí ITC**

Zásady pro vypracování:

I. Teoretická část

1. Struktura a vlastnosti cyklodextrinů.
2. Technika ITC.

II. Praktická část

1. Zjistit experimentální podmínky a technické parametry titračních experimentů pro isothermální kalorimetrickou titraci umožňující stanovení termodynamických parametrů komplexačních reakcí cyklodextrinů a daných skupin ligandů.

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná/elektronická**

Seznam odborné literatury:

[1]Hans-Joerg Scheiner, Anatholy Yatsimirsky: Principles and methods in supramolecular chemistry, John Wiley & Sons, LTD, 2000, ISBN 0-471-97253-3

[2]Helena Dodziuk: Cyclodextrins and their complexes, John Wiley & Sons, LTD, 2006, ISBN 3-527-31280-3

[3]Chemical Reviews 1998, voleme 98, celé číslo 5.

Vedoucí diplomové práce: **Mgr. Robert Vícha, Ph.D.**

Ústav chemie

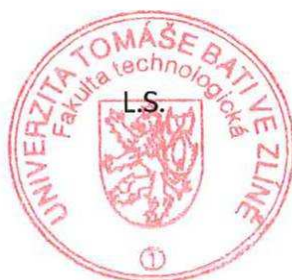
Datum zadání diplomové práce: **14. února 2011**

Termín odevzdání diplomové práce: **9. května 2011**

Ve Zlíně dne 14. února 2011



doc. Ing. Petr Hlaváček, CSc.
děkan



prof. Ing. Antonín Klásek, DrSc.
ředitel ústavu

Příjmení a jméno: *BRANNA' PETRA*

Obor: *CHTP - BIO*

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové/bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby ¹⁾;
- beru na vědomí, že diplomová/bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové/bakalářské práce bude uložen na příslušném ústavu Fakulty technologické UTB ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byl/a jsem seznámen/a s tím, že na moji diplomovou/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 ²⁾;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 1 autorského zákona má UTB ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 2 a 3 mohu užít své dílo – diplomovou/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);
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování diplomové/bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tedy pouze k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové/bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové/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.

Ve Zlíně *3 5 2011*

..... *Branna*

¹⁾ zákon č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, § 47 Zveřejňování závěrečných prací:

(1) Vysoká škola nevdělečně zveřejňuje disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce, u kterých proběhla obhajoba, včetně posudků oponentů a výsledku obhajoby prostřednictvím databáze kvalifikačních prací, kterou spravuje. Způsob zveřejnění stanoví vnitřní předpis vysoké školy.

(2) Disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce odevzdané uchazečem k obhajobě musí být též nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněny k nahlížení veřejnosti v místě určeném vnitřním předpisem vysoké školy nebo není-li tak určeno, v místě pracoviště vysoké školy, kde se má konat obhajoba práce. Každý si může ze zveřejněné práce pořizovat na své náklady výpisy, opisy nebo rozmnoženiny.

(3) Platí, že odevzdáním práce autor souhlasí se zveřejněním své práce podle tohoto zákona, bez ohledu na výsledek obhajoby.

²⁾ 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, § 35 odst. 3:

(3) Do práva autorského také nezasahuje škola nebo školské či vzdělávací zařízení, užije-li nikoli za účelem přímého nebo nepřímého hospodářského nebo obchodního prospěchu k výuce nebo k vlastní potřebě dílo vytvořené žákem nebo studentem ke splnění školních nebo studijních povinností vyplývajících z jeho právního vztahu ke škole nebo školskému či vzdělávacímu zařízení (školní dílo).

³⁾ 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, § 60 Školní dílo:

(1) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení mají za obvyklých podmínek právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla (§ 35 odst. 3). Odpírá-li autor takového díla udělit svolení bez vážného důvodu, mohou se tyto osoby domáhat nahrazení chybějícího projevu jeho vůle u soudu. Ustanovení § 35 odst. 3 zůstává nedotčeno.

(2) Není-li sjednáno jinak, může autor školního díla své dílo užít či poskytnout jinému licenci, není-li to v rozporu s oprávněnými zájmy školy nebo školského či vzdělávacího zařízení.

(3) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení jsou oprávněny požadovat, aby jim autor školního díla z výdělku jím dosaženého v souvislosti s užitím díla či poskytnutím licence podle odstavce 2 přiměřeně přispěl na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložily, a to podle okolností až do jejich skutečné výše; přitom se přihlédne k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

ABSTRAKT

Předmětem výzkumu bylo studium inkluzních supramolekulárních komplexů adamantanových ligandů s cyklodextriny a cucurbiturily. Byly studovány termodynamické parametry inkluzních komplexů, za které zodpovídá řada vazebných interakcí. Dalším úkolem bylo zjistit, jak ligandy pronikají do kavity hostitelských molekul. Úkolem bylo především optimalizovat podmínky experimentu, za kterých by bylo možné měřit série adamantanových ligandů, s možností srovnání naměřených hodnot. Pro stanovení asociačních konstant a termodynamických parametrů komplexačních reakcí byla použita metoda ITC.

Klíčová slova:

Cyklodextriny, Cucurbiturily, inkluzní komplexy, asociační konstanty, host-guest systém, ITC

ABSTRACT

The subject of research was the study of inclusion supramolecular host-guest complexes of adamantane-based ligands with cyclodextrins and cucurbiturils. Thermodynamic parameters of inclusion complexes which is affected by many bonding interactions were studied. Another task of the work was to find out how ligands penetrate cavity of host molecules. In the first place experiment options were optimised so all series of adamantane-based ligands could be measured and matched. The isothermal titration calorimetry was used for determination of association constants and other thermodynamic parameters of complexation.

Keywords:

Cyclodextrins, Cucurbiturils, inclusion complexes, association constants, host-guest systems, ITC

Ráda bych poděkovala vedoucímu mé diplomové práce Mgr. Robertu Víchovi, Ph.D. za vedení při práci, odbornou pomoc a za čas, který mi věnoval. Nemalý dík patří kolektivu laboratoře č. 433 na ústavu chemie, především ing. J. Černochové za poskytnutí látek k měření a mé rodině a příteli za psychickou podporu.

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

OBSAH

| | |
|--|-----------|
| ÚVOD | 3 |
| I TEORETICKÁ ČÁST | 4 |
| 1 CYKLODEXTRINY | 5 |
| 1.1 STRUKTURA A VLASTNOSTI CYKLODEXTRINŮ..... | 5 |
| 1.2 MODIFIKOVANÉ CYKLODEXTRINY | 7 |
| 1.3 INKLUZNÍ KOMPLEXY | 7 |
| 1.4 CYKLODEXTRINY JAKO NOSIČE LÉČIV | 9 |
| 1.4.1 Solubilizační schopnost CD (Analýza fázové rozpustnosti)..... | 12 |
| 2 CUCURBIT[n]URILY | 13 |
| 2.1 STRUKTURA A FYZIKÁLNÍ VLASTNOSTI..... | 13 |
| 2.1.1 Rozpustnost..... | 14 |
| 2.2 MODIFIKOVANÉ CB[n] | 15 |
| 2.3 SYNTÉZA CB[n] | 16 |
| 2.4 SYNTÉZA MODIFIKOVANÝCH CB[n] | 18 |
| 2.4.1 Syntéza částečně substituovaných CB[n]..... | 19 |
| 2.5 SUPRAMOLEKULÁRNÍ VLASTNOSTI | 19 |
| 2.5.1 Rozdíly v hostitelské chemii mezi CB a CD..... | 20 |
| 3 TERMODYNAMICKÁ CHARAKTERIZACE INTERAKCE MAKROMOLEKUL | 22 |
| 3.1 INTERAKCE ODPOVĚDNÉ ZA STABILIZACI INKLUZNÍCH KOMPLEXŮ | 22 |
| 3.1.1 Základy termodynamiky komplexačních reakcí..... | 23 |
| 3.2 INTERPRETACE ITC EXPERIMENTU | 25 |
| 3.3 DALŠÍ METODY STUDIA TERMODYNAMICKÝCH PARAMETRŮ KOMPLEXAČNÍCH REAKCÍ | 26 |
| II PRAKTICKÁ ČÁST | 28 |
| 4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST | 29 |
| 4.1 PŘÍSTROJE A VYBAVENÍ..... | 29 |
| 4.2 PŘÍPRAVA TRIS-HCL PUFRU..... | 30 |
| 4.3 INKLUZNÍ KOMPLEXY B-CD S 1-ADAMANTYLANILINY..... | 30 |
| 4.4 INKLUZNÍ KOMPLEXY B-CD S IMIDAZOLIOVÝMI SOLEMI..... | 33 |
| 4.5 INKLUZNÍ KOMPLEXY B-CD S BENZIMIDAZOLIOVÝMI SOLEMI | 36 |
| 4.6 INKLUZNÍ KOMPLEXY Me ₆ CB[6] S BENZIMIDAZOLIOVÝMI SOLEMI | 39 |
| 4.7 INKLUZNÍ KOMPLEXY CB[7] S BENZIMIDAZOLIOVÝMI SOLEMI | 39 |
| 5 DISKUZE A VÝSLEDKY | 40 |

| | | |
|---|--|-----------|
| 5.1 | SUPRAMOLEKULÁRNÍ KOMPLEXY β -CD S 1-ADAMANTYLANILINÝ | 44 |
| 5.2 | SUPRAMOLEKULÁRNÍ KOMPLEXY β -CD S IMIDAZOLIOVÝMI SOLEMI | 45 |
| 5.2.1 | Kompenzační entalpie-entropie závislost | 46 |
| 5.3 | VLIV TEPLoty NA TVORBU A STABILITU KOMPLEXU β -CD S 1-(1-ADAMANTYL-METHYL)-3-METHYLBENZIMIDAZOLIUM JODIDEM | 48 |
| 5.3.1 | Závislost ΔH na teplotě | 49 |
| 5.4 | SUPRAMOLEKULÁRNÍ KOMPLEXY S CB[n] | 51 |
| ZÁVĚR | | 56 |
| SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK | | 58 |
| SEZNAM OBRÁZKŮ | | 59 |
| SEZNAM TABULEK | | 60 |
| SEZNAM PŘÍLOH | | 61 |

ÚVOD

Díky technologickému pokroku došlo v posledním desetiletí ke zvýšení citlivosti mikrokalorimetrických technik na úroveň, která umožňuje jejich rutinní použití pro získání komplexní charakterizace termodynamického chování biologicky významných molekul v roztoku. Mikrokalorimetrické metody jsou schopny přímo sledovat interakci makromolekul a popisovat jejich energetickou stabilitu. Přímé stanovení termodynamických parametrů vazby molekul umožňuje využívání mikrokalorimetrických technik při farmakokinetických studiích.¹

Tato práce se zabývá studiem termodynamiky inkluzních komplexů adamantanových ligandů s cyklodextriny a cucurbiturily. V teoretické části budou charakterizovány cyklodextriny, cucurbiturily a jejich využití v oblasti farmakochemie. Dále budou popsány vazebné interakce, které ovlivňují stabilitu inkluzních komplexů a základní vztahy v termodynamice. Nakonec budou uvedeny metody, které lze použít k zjištění termodynamických parametrů komplexačních reakcí.

V praktické části bude popsán postup přípravy roztoků ligandů a hostitelských makromolekul. Následně budou uvedeny výsledky měření termodynamických parametrů inkluzních komplexů β -CD, CB[7] a Me₆CB[6] s adamantanovými ligandy (1-adamantylaniliny a imidazoliové soli), které byly studovány pomocí izotermální titrační kalorimetrie (ITC).

I. TEORETICKÁ ČÁST

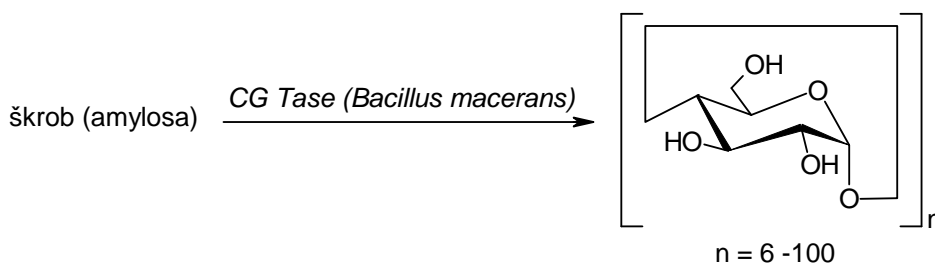
1 CYKLODEXTRINY

Cyklodextrin (CD) byl poprvé izolován jako produkt rozkladu škrobu A. Villiersem v roce 1891 a látku, kterou získal nazval „celulosin“. Až v letech 1935-1955 K. Freudenberg, F. Cramer a jejich spolupracovníci určili chemickou strukturu cyklodextrinů a jejich obecné fyzikálně-chemické vlastnosti a schopnosti inkludovat jiné molekuly uvnitř svých chirálních dutých kavit, čímž přitahují pozornost chemiků dodnes.²

CD jsou vyráběny z obnovitelných zdrojů (škrob), jejich toxicita je nízká a jsou biologicky degradabilní. Nativní cyklodextriny byly také chemicky modifikovány, aby bylo docíleno lepších komplexačních nebo katalytických vlastností a aby byla zvýšena jejich rozpustnost. Zároveň se staly velmi zkoumanými stavebními bloky v supramolekulární chemii.³

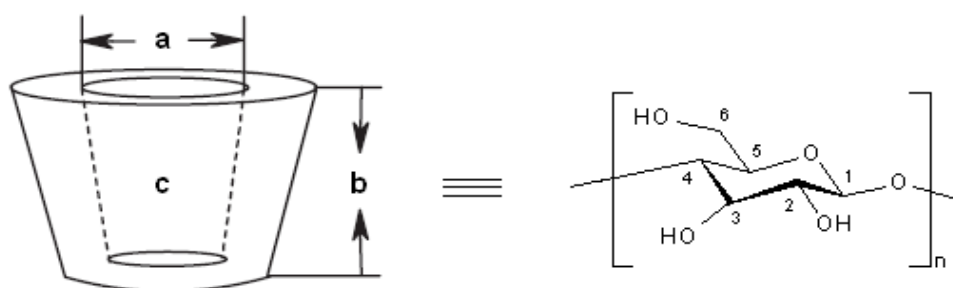
1.1 Struktura a vlastnosti cyklodextrinů

Nativní cyklodextriny jsou cyklické oligosacharidy skládající se z α -1,4 spojených D-glukopyranosových jednotek, které vznikají enzymatickou degradací škrobu (amylosy) glukosyltransferasami (CG Tase) bakteriálního původu (*Bacillus macerans*).⁴ Uvedená biochemická přeměna na Obr. 1 poskytuje směs cyklických a lineárních oligosacharidů, které obsahují šest až více než sto glukosových jednotek. Za optimalizovaných podmínek jsou nejvíce zastoupeny makrocykly se šesti, sedmi a osmi jednotkami, které jsou označovány jako α -, β - a γ -cyklodextrin. Tyto tři komerčně dostupné makrocykly se ze směsi izolují selektivním vysrážením organickými látkami (hexan, fluorbenzen, anthracen), se kterými tvoří málo rozpustné inkluzní komplexy.³



Obr. 1 - Vznik cyklodextrinu degradací amylosy

Struktura cyklodextrinů byla zkoumána v roztoku i v pevné fázi. V krystalech bylo pro každý ze tří uvedených homologů zjištěno několik strukturních forem, které se liší počtem přítomných vod a geometrií molekul.⁵ V důsledku 4C_1 židličkové konformace glukopyranonových jednotek přebírá makrocyklus CD tvar komolého kužele nebo dutého kornoutu (viz. Obr. 2), jehož vnější širší okraj obklopují sekundární hydroxylové skupiny a užší okraj obklopují primární hydroxyly.⁶



Obr. 2 - Tvar molekuly α -, β - a γ -CD

Tab. 1. Fyzikálně-chemické vlastnosti a rozměry kavit α -, β - a γ -CD

| fyz.-chem. vlastnosti a rozměry kavit | α -CD | β -CD | γ -CD |
|---|--------------|-------------|--------------|
| n - počet glukosových jednotek | 6 | 7 | 8 |
| M_r [g.mol⁻¹] | 972,9 | 1135,0 | 1297,14 |
| rozpustnost v H₂O [g.dm⁻³] při 25 °C | 14,5 | 1,9 | 23,2 |
| a - vnitřní průměr kavity [Å, mezi H3] | 5,2-5,7 | 6,4-7,8 | 7,5-9,5 |
| b - hloubka kavity [Å] | 8,0 | 8,0 | 8,0 |
| c - vnitřní objem kavity [Å] | 174 | 262 | 472 |

V důsledku toho je vnější strana kavity hydrofilní, naopak vnitřní strana, kam jsou orientovány etherické kyslíky O4 a vodíky H3, H5 a H6, má lipofilní charakter. Neutronovou difrakcí bylo zjištěno, že makrocyklus α -, β - a γ -CD je stabilizován pásem vodíkových vazeb mezi kyslíky O2_(n) a O3_(n-1) OH-skupin sousedních glukosových jednotek. Se vzrůstajícím počtem jednotek v makrocyklu od α až k γ -CD se zmenšuje vzdálenost těchto OH-skupin, takže pevnost vodíkových vazeb roste.³ Ve vodných roztocích tvoří OH-skupiny vodíkové vazby s okolními molekulami vody, což vede k vytvoření hydratačního obalu okolo molekuly CD.²

1.2 Modifikované cyklodextriny

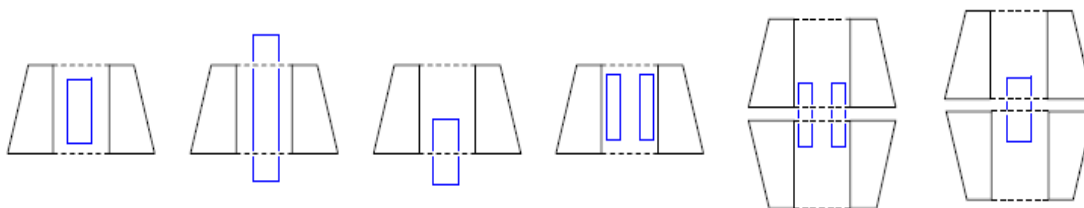
Chemickou modifikací lze cíleně měnit fyzikálně-chemické vlastnosti CDs. Bylo vynaloženo velké úsilí na přípravu derivátů, které vykazují lepší rozpustnost ve vodě i v organických rozpouštědlech. Především byla optimalizována velikost a tvar kavity pro inkudovanou molekulu.⁷ Přes značnou obtížnost přípravy modifikovaných derivátů se některé z nich již vyrábějí a používají v průmyslovém měřítku. Na rozdíl od jiných makrocyklů (např. kalixarenů), kde může být často modifikace provedena již při přípravě stavebních bloků před vlastní makrocyklizací, při syntéze modifikovaných CD se prakticky vždy vychází z nativního makrocyklu.³

Deriváty je možno rozdělit podle počtu substituovaných jednotek glukosy na monosubstituované, několikanásobně substituované definovaným způsobem poskytující jeden chemicky homogenní produkt, persubstituované a směsi statisticky substituovaných produktů.⁸

Na každé jednotce glukosy jsou k dispozici tři OH-skupiny s rozdílnou reaktivitou. Nejvíce reaktivní je primární hydroxylová skupina v poloze C6, která má nejvyšší bazicitu a je nejméně stericky bráněná. Nejkyselejší a v pořadí reaktivity druhé jsou sekundární hydroxyly v poloze C2. Nejméně reaktivní jsou sekundární hydroxylové skupiny v poloze C3, které mohou být selektivně substituovány až po modifikaci nebo dočasném chránění hydroxylů v polohách C2 a C6. Volbou reakčního činidla a chránícími skupinami je pak možné substituovat pouze vybrané hydroxylové skupiny.⁹ Nejčastěji používané substituenty pro modifikaci CDs jsou: maltosyl, sulfobuthylether, hydroxylová a methylová skupina.

1.3 Inkluzní komplexy

Cyklodextriny mají díky své struktuře a tvaru molekuly schopnost vytvářet inkluze nadmolekulární povahy tím, že se do jejich centrální kavity inkluduje organická či anorganická molekula.¹⁰ Tento jev probíhá nejčastěji ve vodě nebo ve směsi vody a jiného polárního rozpouštědla, může však probíhat i na rozhraní pevné a plynné fáze. Stechiometrie komplexů závisí především na velikosti kavity hostitele a charakteru hosta (Obr. 3).⁵ Směsi zahrnující CD s hydrofobními molekulami jsou schopné proniknout do tkáně těla a tam uvolnit biologicky aktivní látku.¹¹

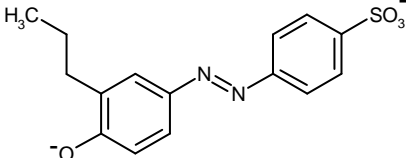
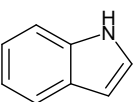
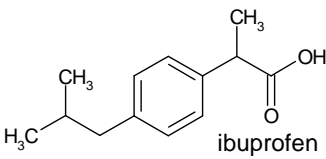
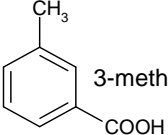
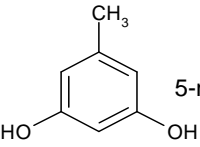
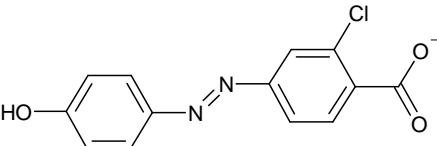


Obr. 3 - Schématické znázornění komplexů možných stechiometrií³

Fyzikálně-chemickými metodami byly stanoveny asociační konstanty a termodynamické parametry několika tisíc inkluzních komplexů převážně nativních cyklodextrinů. Orientaci hosta v kavitě lze v roztoku většinou zjistit detekcí dipolárních interakcí vhodnou metodou NMR, např. ROESY nebo NOESY.³

Lze říci, že byly připraveny inkluzní komplexy nativních cyklodextrinů s téměř všemi molekulami, které se do kavity vejdou, tj. s uhlovodíky, alifatickými alkoholy, aminy a kyselinami, deriváty cyklohexanu, benzenu a naftalenu, steroidy, aminokyselinami, organickými azobarvivy, cukry, anorganickými ionty, vzácnými plyny a dalšími. Adamantan a jeho deriváty tvoří silné komplexy s β -cyklodextrinem ($K \leq \sim 10^6 \text{ M}^{-1}$). Mnohem méně byly studovány inkluzní komplexy modifikovaných cyklodextrinů, patrně pro jejich obtížnější syntetickou dostupnost.³ Pro ilustraci jsou v Tab. 2 uvedeny nejslabší a nejsilnější konstanty stability komplexů s α -, β - a γ -CD.¹²

Tab. 2 - Konstanty stability vybraných inkluzních komplexů α -, β - a γ -CD¹²

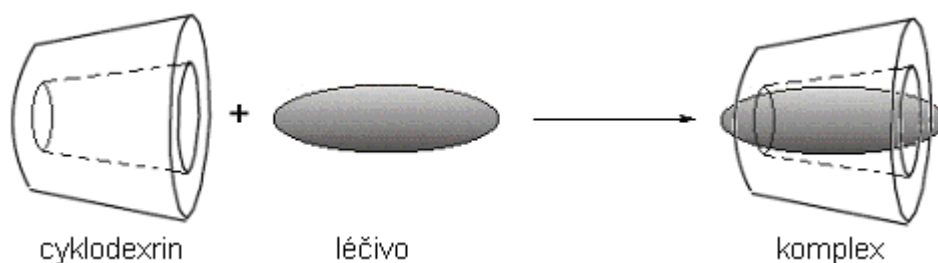
| host | guest | solvent | K [M ⁻¹]. |
|--------------|---|--|--|
| α -CD |  4-[(4-hydroxy-3-propylfenyl)-azobenzensulfonát | H ₂ O (pH 12; 0,1M NaCl) | 1,99.10 ⁻²⁶ ^{uv} |
| |  indol | H ₂ O | 6,31.10 ⁶ ± 0,1 ^{cal} |
| β -CD |  ibuprofen | H ₂ O (pH 2) | 5,01 ⁻³⁴ ± 0,02 ^{sol} |
| |  3-methylbenzoová kyselina | H ₂ O | 1,26.10 ⁶ ± 0,1 ^{cal} |
| γ -CD |  5-methylresorcinol | H ₂ O | 5,37 ± 0,01 ^{cal} |
| |  2-chlor-4[(4-hydroxyfenyl)azol]benzoát | H ₂ O | 1,99.10 ⁴ ± 0,17 ^{cal} |

^{uv} měřeno spektrofotometricky, ^{cal} měřeno kalorimetricky, ^{sol} měřeno pomocí rozpustnosti

1.4 Cyklodextriny jako nosiče léčiv

Jednou z důležitých vlastností cyklodextrinů je tvorba komplexů v roztoku i v pevném stavu, ve kterých je alespoň část hostujících molekul obklopena hydrofobním prostředím kavity cyklodextrinu.¹³ Při vývoji nových léčiv je limitujícím faktorem schopnost léčiva dosáhnout místa svého působení, zajištění postupného uvolňování léčiva a častý požadavek na rozpustnost léčiva ve vodě. Jedna z možností jak zlepšit farmakokinetické vlastnosti léčiv je navázat ho na speciální molekulu nosiče. Tyto vlastnosti vykazují cyklodextriny a jejich deriváty, které prostřednictvím inkluzního komplexu zvyšují

jí rozpustnost léčiv ve vodě.¹⁴ Inkluze vznikají již při přípravě lékové formy technologiemi, jako je vlhká granulace nebo rozpuštění s následným sušením vzniklého komplexu, případně vznikají *in situ*, kdy se ze suché směsi inkluzní komplex vytvoří až po styku s vodnou fází lékové formy nebo až s trávicí tekutinou. Léčivá látka se obvykle z komplexu snadno a úplně uvolní, takže komplexace přiměřeným množstvím vhodného cyklodextrinu zpravidla zvyšuje biologickou dostupnost léčiva.¹⁵ Cyklodextriny pozitivně ovlivňují biologickou dostupnost i v léčích aplikovaných na kůži nebo sliznici a urychlují permeaci léčivých látek nejen zlepšením rozpustnosti, ale i zvyšováním propustnosti bariérových membrán. Testují se proto například k nasální aplikaci inzulínu na zvířatech.¹⁶ Dalším atributem rozpouštění je schopnost vytváření neinkluzních komplexů, vytváření agregátů a příbuzných domén a schopnost cyklodextrinů tvořit a stabilizovat přesycené medicínské roztoky. Navíc mohou být CD používány ke snížení nebo prevenci gastrointestinálních a očních zánětů (podrážděnosti), ke snížení nebo odstranění nepříjemných pachů nebo chutí, k prevenci vzájemného působení lék ↔ lék nebo lék ↔ přísada stejně jako k přeměně olejových a kapalných léků na mikrokrystalické nebo amorfní prášky. Množství produktů založených na bázi cyklodextrinů se dostalo na trh kvůli své schopnosti zakrýt nežádoucí fyzikálně-chemické vlastnosti.²



Obr. 4 - Schématické znázornění CD jako nosiče léčiva

Využití přírodních CD, zejména β -CD, jako nositelů léčiv je omezeno jejich relativně špatnou rozpustností ve vodě. Předpokládá se, že je to kvůli relativně silnému intramolekulárnímu vodíkovému propojení v krystalické mřížce. Substitucí kteréhokoliv vodíku OH-skupiny, dokonce i lipofilními substituenty, vede k výraznému zvýšení jejich rozpustnosti ve vodě.¹⁷ Deriváty CD, o které se zajímá farmaceutický průmysl (viz Tab.3), jsou 2-hydroxypropylové deriváty β -CD a γ -CD (tj. HP- β -CD a HP- γ -CD), nepravidelně methylovaný β -CD (RM- β -CD), sulfobuthylether β -CD (SBE- β -CD) a tzv. rozvětvené CD jako 6-O-Maltosyl- β -CD (G₂- β -CD).²

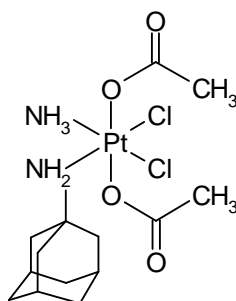
Tab. 3 - Struktura a vlastnosti CD využívaných ve farmacii

| Cyklodextrin | n | R = H nebo | Substituce ^a | Rozpustnost v H ₂ O ^b [mg.ml ⁻¹] |
|--|---|---|-------------------------|--|
| α -CD | 0 | -H | 0 | 145 |
| β -CD | 1 | -H | 0 | 18.5 |
| HP- β -CD; Kleptose [®] | 1 | -CH ₂ CHOHCH ₃ | 0,65 | >600 |
| SBE- β -CD sodná sůl; Captisol [®] | 1 | -(CH ₂) ₄ SO ₃ -Na ⁺ | 0,9 | >500 |
| RM- β -CD | 1 | -CH ₃ | 1,8 | >500 |
| G ₂ - β -CD | 1 | maltosyl- | 0 | >1500 |
| γ -CD | 2 | -H | 0 | 232 |
| HP- γ -CD | 2 | -CH ₂ CHOHCH ₃ | 0,6 | >500 |

^a Průměrný počet substituentů na jednotku glukózy.

^b Rozpustnost v čisté vodě při teplotě cca 25 °C.

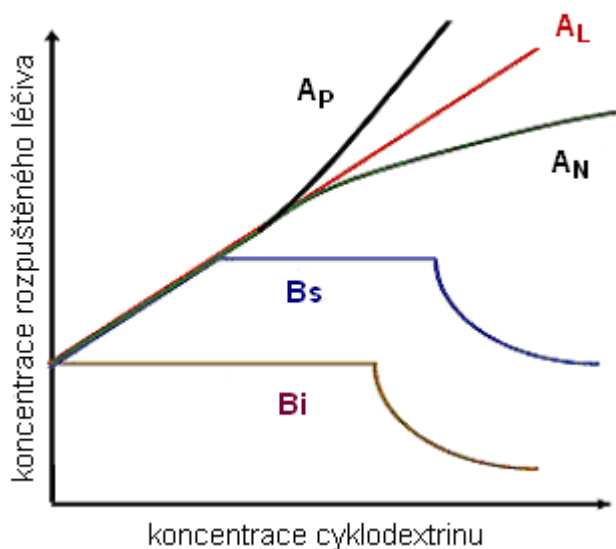
Využití cyklodextrinů se ukázalo jako výhodné např. při přípravě lékové formy s obsahem originálního českého cytostatika na bázi čtyřmocné platiny s označením LA-12 (Lachema) viz Obr. 5. Čtyřmocná platina je na rozdíl od dvojmocné méně toxická, vykazuje vyšší protinádorový efekt, ale je velmi špatně rozpustná ve vodě. Perorální léková forma se připravila rozpuštěním léčivé látky v acetonu. Po přidání HP- β -CD se roztok lyofilizoval a vzniklý lyofilizát se plnil do tvrdých želatinových tobolek. Stejná účinná látka se ve směsi použije i k tvorbě suchých injekcí. Látka LA-12 se zde asepticky smísí s HP- β -CD a směs se použije k přípravě injekce *in situ* nebo se připraví společný roztok ze směsi LA-12 s HP- β -CD, který se sprejově suší, či lyofilizuje.¹⁵



Obr. 5 - Cytostatikum LA 12

1.4.1 Solubilizační schopnost CD (Analýza fázové rozpustnosti)

Solubilizační schopnost cyklodextrinů může být kvantitativně vyhodnocena metodou Higuchiho-Connorsova. Diagram rozpustnosti, nebo-li grafické znázornění rozpustnosti molekuly hosta jako funkce koncentrace cyklodextrinu je znázorněno na Obr. 6. Křivky jsou obecně klasifikovány jako typ **A** (vytváří se rozpustný komplex) nebo typ **B** (vytváří se komplex s omezenou rozpustností).²

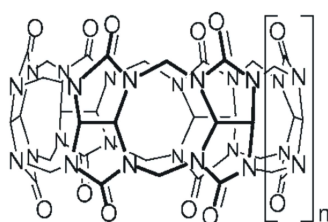


Obr. 6 – Diagram rozpustnosti

Typ **A** je dále rozčleněn do tří podtypů. **A_L** systém, kde se rozpustnost hosta zvyšuje lineárně s koncentrací cyklodextrinu, **A_P** systém indikuje izotermu, v níž se křivka odchyluje v kladném směru od linearitu (tzn. rozpouštědlo je úměrně efektivnější ve vyšších koncentracích) a **A_N** systém indikuje zápornou odchylku od linearitu (tzn. CD je úměrně méně efektivní ve vyšších koncentracích). Tvorbu komplexu se stechiometrií 1:1, znázorňuje **A_L** systém. Na vytvoření komplexu vyššího řádu se podílí více než jedna molekula cyklodextrinu, což znázorňuje **A_P** systém. Mechanismus vzniku systému **A_N** je komplikovanější, protože se na tvorbě komplexu významně podílí interakce rozpouštěná látka-rozpouštědlo. V případě systému **B_S**, je počáteční vzestupná část rozpustnosti změněna v oblast plošiny, která je následována poklesem rozpustnosti ve vyšších koncentracích cyklodextrinu, doprovázející mikrokrytalickým srážením komplexu. **B_I** systém svědčí o vzniku nerozpustného komplexu ve vodě.^{2, 13}

2 CUCURBIT[n]URILY

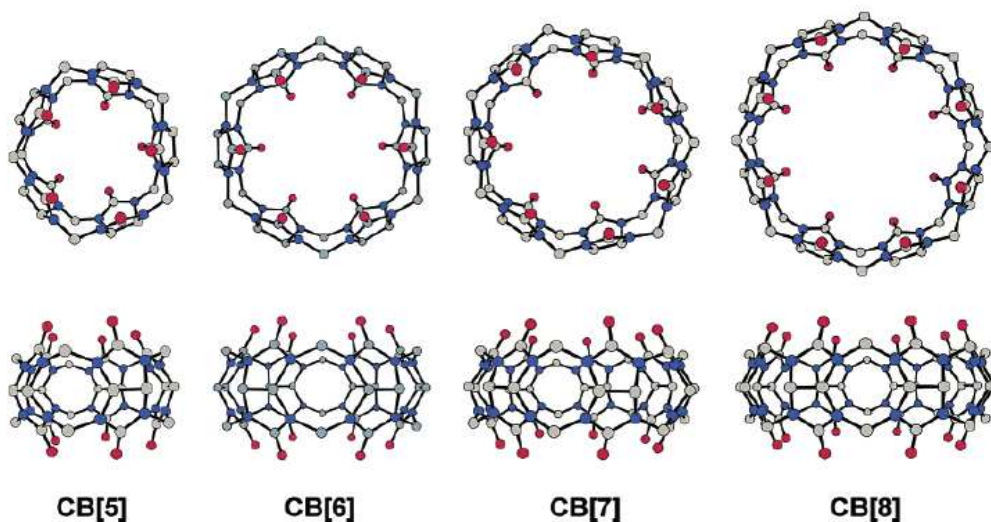
Cucurbiturily (CB[n]) jsou makrocyclické sloučeniny (Obr.7) uplatňující se jako hostitelské molekuly v supramolekulární chemii, symbol [n] udává počet glykolurilových jednotek v makrocyklu.¹⁸ CB[n] mají kulový tvar s kavitou uvnitř, nejlépe jejich podobu vystihuje vydlabaná dýně. CB[n] tvoří velmi stabilní host-guest komplexy s kladně nabitými molekulami jako je bipyridinium, amonium, imidazolium a s koordinačně nenasycenými kovovými ionty. Tyto komplexy se vážou přes vodíkovou vazbu, náboj-dipól a hydrofobní interakce.¹⁹



Obr. 7 - CB[n], n = 5-10

2.1 Struktura a fyzikální vlastnosti

Cucurbiturily jsou makrocycly s různým počtem glykolurilových jednotek vázaných přes dusík methylenovými můstky. CB[n] homology CB[5]-CB[8] byly zcela charakterizovány různými spektroskopickými metodami a RTG difrakcí (Obr. 8). Pokud jde o velikost kavity CB[6], CB[7] a CB[8] jsou obdobné jako u α -, β - a γ -CD.²⁰



Obr. 8 - Rentgenové krystalové struktury CB[n] (n = 5-8)²⁰

S rostoucím počtem jednotek v makrocyklu CB[n] se zvětšuje i rozměr vnitřní kavity. Zatímco se výška makrocyklu od CB[5] k CB[8] nemění, průměr vstupního otvoru se zvětší více než 2,5krát. V Tab. 4 jsou uvedeny některé strukturní parametry CB[n] homologů. CB[n] mají vysokou tepelnou stabilitu v pevném stavu, k rozkladu dochází až při 420 °C u CB[n] (n = 5, 6 a 8), CB[7] se však začíná rozkládat již při nižší teplotě (370 °C).²¹

Tab. 4 - Strukturní parametry CB[n] (n = 5-8)

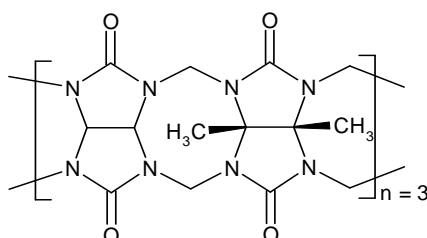
| | | CB[5] | CB[6] | CB[7] | CB[8] |
|--------------------------------|---|-------|-------|-------|-------|
| vnější průměr [Å] | a | 13,1 | 14,4 | 16,0 | 17,5 |
| průměr kavity [Å] | b | 4,4 | 5,8 | 7,3 | 8,8 |
| průměr portálu [Å] | c | 2,4 | 3,9 | 5,4 | 6,9 |
| výška [Å] | d | 9,1 | 9,1 | 9,1 | 9,1 |
| objem kavity [Å ³] | - | 82 | 164 | 279 | 479 |

2.1.1 Rozpustnost

Největší nevýhodou CB[n], a důvodem proč se s nimi relativně špatně pracuje, je jejich nízká rozpustnost v běžných rozpouštědlech ($< 10^{-5}$ M) s výjimkou silně kyselých vodných roztoků. Většina hostitel-host chemie CB[6], byla proto studována ve směsi kyseliny mravenčí a vody (1:1). Rozpustnost CB[n] je obecně nižší než u cyklodextrinů. CB[6] a CB[8] je v podstatě ve vodě nerozpustný, CB[5] a CB[7] mají nízkou rozpustnost ve vodě ($2-3 \times 10^{-2}$ M), což je srovnatelné s β -CD ($1,6 \times 10^{-2}$ M).²² Rozpustnost CB[n] ve vodě se zvyšuje v přítomnosti solí kovů tím, že iont kovu se koordinuje na karbonylové skupiny a ještě je solvatován vodou.²³ Karbonylové skupiny lemující portály CB[n] jsou slabé báze: (pKa = 3,02) pro CB[6]. Ačkoli pKa hodnoty pro CB[5]-CB[8] nebyly změřeny, je pravděpodobné, že jsou podobné s hodnotou pKa pro CB[6]. V důsledku toho se výrazně zvyšuje rozpustnost CB[5]-CB[8] ve vodném roztoku koncentrované kyseliny (např. 61 mM pro CB[6] v HCO₂H:H₂O (1:1), 60 mM pro CB[5], 700 mM pro CB[7], a asi 1,5 mM pro CB[8] v 3M HCl).²⁴

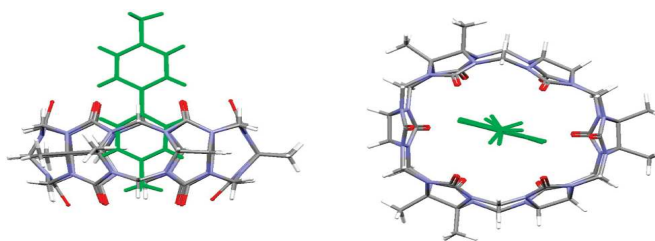
2.2 Modifikované CB[n]

Špatná rozpustnost v běžných rozpouštědlech a obtížná modifikace omezovala použití CB[n]. Tyto problémy byly překonány K. Kimem a jeho skupinou, kteří připravili hydroxylované CB[n]. Hydroxylované CB[n] prokázaly dobrou rozpustnost v DMSO. Existuje několik dalších příkladů modifikovaných derivátů CB homologů, kde je jeden nebo více atomů vodíku na okraji nahrazen různými skupinami obsahující methyl, fenyl, nebo cyklohexyl.²⁵ Hexametylovaný cucurbit[6]uril ($\text{Me}_6\text{CB}[6]$) byl poprvé syntetizován a charakterizován pomocí ^1H a ^{13}C NMR spektroskopie A. I. Dayem a skupinou pracovníků v roce 2003.²⁶



Obr. 9 - $\text{Me}_6\text{CB}[6]$

Bylo zjištěno, že je vysoce rozpustný v polárních organických rozpouštědlech - acetonitrilu, DMSO a trifluorethanolu, vždy však vyžaduje přidání malého množství vody. Rozpustnost ve směsi voda-acetonitril (1:1) je 7,5 g na 100 ml, podobnou rozpustnost vykazuje v trifluorethanolu s přídavkem 5–10 % vody.²⁶ Od té doby byl $\text{Me}_6\text{CB}[6]$ použit ve dvou případech pro přípravu pevných inkluzních komplexů. Byla zkoumána interakce mezi $\text{Me}_6\text{CB}[6]$ a N, N-dimethyl-4, 4'-bipyridinium (MeV^{2+}) z následujících důvodů: (1) $\text{Me}_6\text{CB}[6]$ reprezentuje analog CB[6] s podobnou velikostí kavity, (2) $\text{Me}_6\text{CB}[6]$ je dobře rozpustný ve vodě, což umožňuje studovat jeho asociaci s molekulami hostů ve vodném prostředí bez přítomnosti solí, (3) MeV^{2+} a jeho derivát byly značně zkoumány jako vhodné guest-molekuly pro asociaci s CB[n], včetně CB[6].²⁵

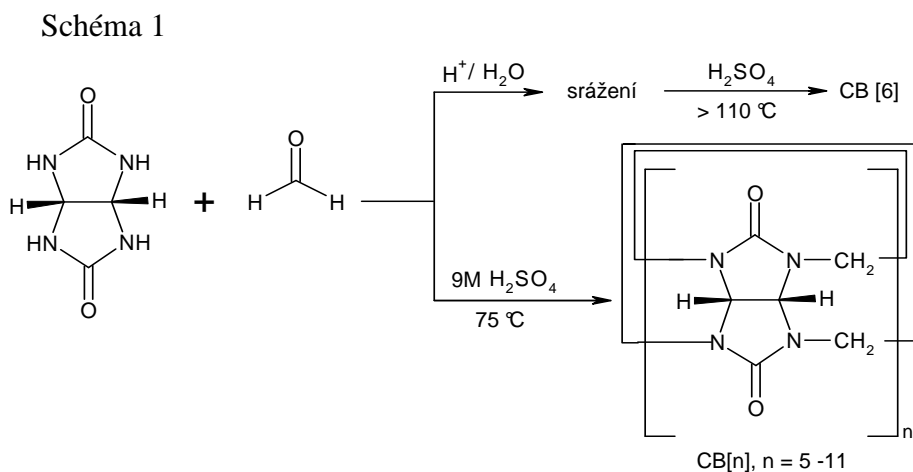


Obr. 10 - Drátový model $\text{MeV}^{2+}\text{-Me}_6\text{CB}[6]$ komplexu²⁵

2.3 Syntéza CB[n]

První syntézu CB[n] provedl již v roce 1905 R. Behrend, když nechal reagovat glykoluril s paraformaldehydem v koncentrované HCl. Produkt rekrystalizoval z H₂SO₄ a izoloval nerozpustnou polymerní látku, která tvořila překvapivě rozmanitou škálu krystalických komplexů s organickými i anorganickými látkami, například s KMnO₄, AgNO₃, H₂PtCl₆ nebo NaAuCl₄. V té době však nebyla k dispozici dostupná technika, která by umožnila objasnit strukturu této látky, a v práci proto nepokračoval. Syntézu zopakovali W. L. Mock a W. A. Freeman až v roce 1981, kdy objasnili strukturu pomocí RTG difrakce a identifikovali ji jako CB[6].²⁷ Tento makrocyklus je složený z šesti glykolurilových jednotek navzájem propojených dvěma methylenovými můstky. Až v roce 2000 K. Kim syntetizoval a izoloval další homology CB[n], zahájil tím sérii prací zkoumajících vlastnosti CB[n] a jejich možné aplikace.²⁸

CB[n] se připravují kondenzační reakcí glykolurilu s formaldehydem v kyselém prostředí 9M H₂SO₄ nebo konc. HCl. Výsledkem reakce je směs CB[n] homologů, které se od sebe následně oddělují frakční krystalizací a rozpuštěním nebo chromatografií.²² Reakce glykolurilu a formaldehydu nejprve vytváří lineární oligomery, které pak cyklizují.²⁰ Reakcí v 9M kyselině sírové při teplotě 75 °C po dobu 24 h a pak 100 °C po dobu 12 h vzniká směs CB[n], (n = 5–11), klíčová je především nižší reakční teplota, než se používá u konvenční syntézy CB[6], která umožňuje vznik velkého množství CB homologů.²⁸



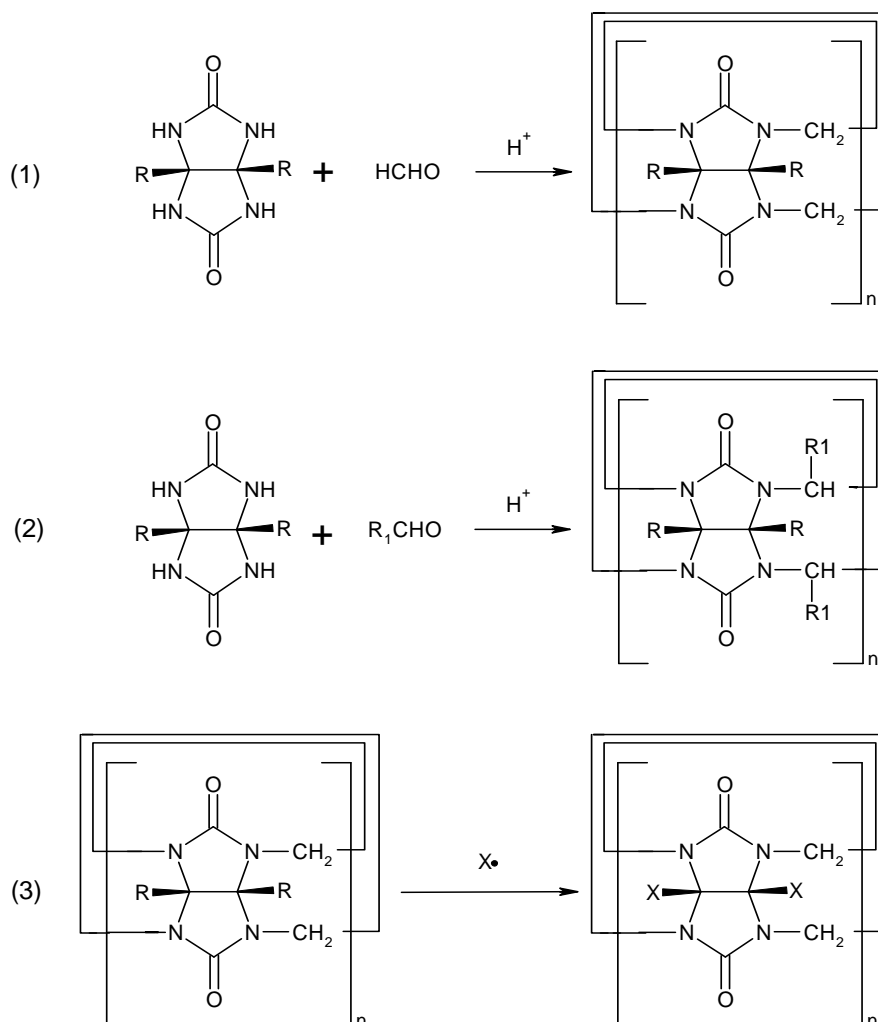
Reakční směs byla přidána do roztoku aceton/voda, vzniklá sraženina byla oddělena dekantací, promyta směsí aceton/voda (1:4) a zfiltrována. CB[6] byl oddělen od směsi částečným rozpuštěním ostatních CB[n] homologů ve směsi aceton/voda (1:2). Z rozpustného podílu byly izolovány CB[5] a CB[7] a dále odděleny frakční krystalizací, srážením a rekrystalizací. Je třeba poznamenat, že oddělení homologů je ovlivněno stopami kyseliny přítomné ve směsi, jakož i NH_4^+ ionty, které mohou být tvořeny z tepelného rozkladu glykolurilu. CB[8] byl izolován ze směsi CB[n] homologů, která byla připravena modifikovaným postupem. Reakcí glykolurilu a formaldehydu v přítomnosti HCl ve vysokotlakém reaktoru při 115 °C po dobu 24 h vzniká bílý prášek, který byl poté zahříván s 7,5M H_2SO_4 . Tato syntéza poskytuje směs CB[n] s mírně vyšším obsahem CB[7] a CB[8].²⁸

NMR a ESI hmotnostní studie potvrdily, že reakční směs obsahuje kromě CB[6] skupinu homologů, s typickým obsahem CB[5] ~ 10-15%, CB[6] ~ 50-60%, CB[7], ~ 20-25%, a CB[8] ~ 10-15%. Stopové množství vyšších homologů (CB[n], n = 9-11) byly rovněž zjištěny pomocí hmotnostní spektrometrie.²⁰

2.4 Syntéza modifikovaných CB[n]

V zásadě existují tři způsoby, jak zavést funkční skupiny na okraj CB[n] (Schéma 2): (1) kondenzací glykolurilových derivátů, nesoucí substituenty v 'můstkové' pozici, s formaldehydem poskytují CB[n] deriváty se substituenty v "ekvatorální" poloze; (2) kondenzací glykolurilu s různými aldehydy jako např. trifluoracetaldehyd zavádí substituenty na methylenové můstky CB[n]; (3) přímé zavedení substituentu do "ekvatoriální" poloh(y) nebo na methylenový(é) můstek(y) CB[n] poskytuje CB[n] deriváty.²²

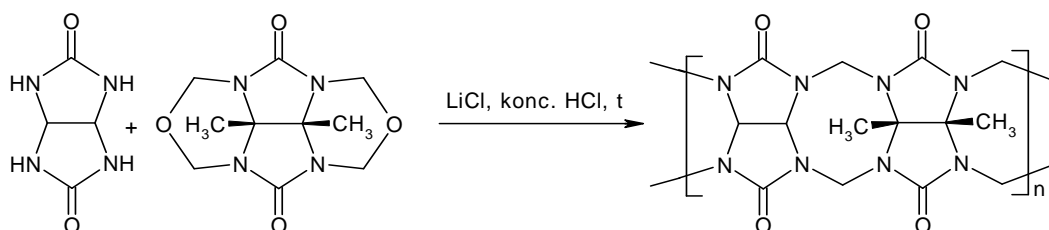
Schéma 2



2.4.1 Syntéza částečně substituovaných CB[n]

A. I. Day a skupina pracovníků studovali reakci mezi glykolurilem a dimethylglykolurilem bis(cyklickým etherem), což je ekvivalent dimethylglykolurilu a formaldehydu. Kondenzace ekvimolárního množství glykolurilu a dimethylglykolurilu bis(cyklického etheru) za přidání LiCl a koncentrované HCl probíhá při teplotě 100 °C po dobu 2h. Reakce poskytuje směs částečně substituovaných CB[n] ($n = 5-7$), včetně jejich polo-hových isomerů, o čemž svědčí ESI hmotnostní spektrometrie a NMR. Směs frakcí obvykle obsahuje 55-60 % substituovaných CB[6] a 10-15 % substituovaných CB[7]. Hlavním produktem je Me₆CB[6] s výtěžností 10 %, který byl izolován iontově-výměnnou chromatografií a následně rekrystalizací.²⁶

Schéma 3

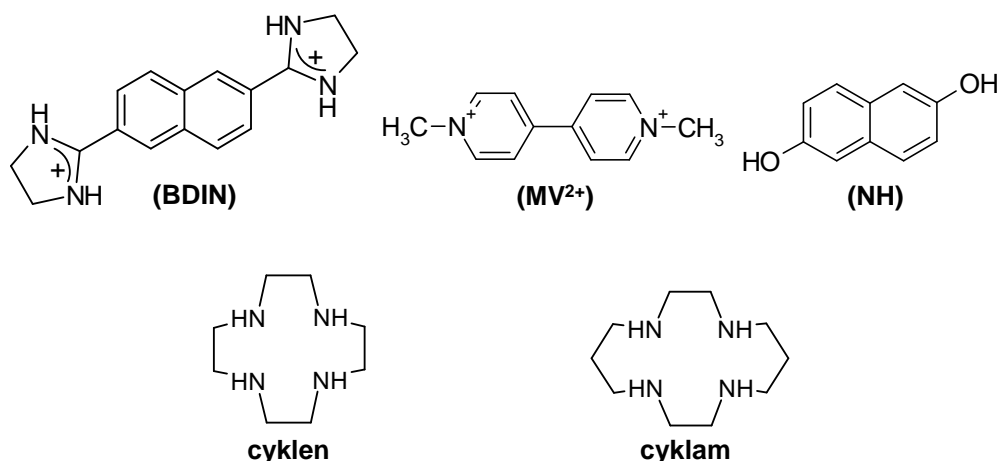


2.5 Supramolekulární vlastnosti

Ačkoli všechny CB[n] homology sdílí charakteristické rysy CB[6], jako je hydrofobní kavita a polární karbonylové skupiny v okolí portálů, jejich různé velikosti kavit a portálů vedou k pozoruhodným molekulárním rozpoznávacím vlastnostem odlišných od CB[6].²⁰ Nejmenší homolog CB[5] váže uvnitř kavity pouze malé molekuly, jako jsou acetylen, N₂, O₂ a vzácné plyny, silně váže kationty, jako je NH₄⁺ a Pb²⁺.²⁹ Tyto ionty nemohou vstoupit do kavity, ale zůstávají vázány na kyslík karbonylu portálu. Dva NH₄⁺ ionty mohou zablokovat otvor na obou stranách CB[5]. CB[6] tvoří velmi stabilní komplexy s alkyl amonnými ionty, zejména s α , ω -alkyl diamonium ionty s různou délkou řetězce (${}^+\text{NH}_3(\text{CH}_2)_n\text{NH}_3^+$, $n = 4-7$, $K = 10^5-10^6 \text{ M}^{-1}$ měřeno v HCO₂H/H₂O) a méně stabilní komplexy s protonovanými aromatickými aminy, jako je *p*-methylbenzylamin ($K \sim 3 \times 10^2 \text{ M}^{-1}$). Také může zapouzdřit neutrální molekuly tetrahydrofuranu nebo benzenu ve vodném roztoku. CB[7] vytváří podobné komplexy jako CB[6], CB[7] však vytváří s aromatickými sloučeninami stabilnější komplexy,

rychlost vzniku komplexu je rychlejší. CB[7] s alifatickými molekulami vytváří méně stabilní komplexy než CB[6]. Na rozdíl od CB[6] je CB[7] schopen vázat rozměrnější molekuly. Např. CB[7] tvoří 1:1 komplex s 2,6-bis (4,5-dihydro-1*H*-imidazol-2-yl)naftalen (**BDIN**), s protonovanými adamantylaminy nebo s methylviologenem N,N-dimethyl-4,4'-bipyridiniem (**MV²⁺**). Neutrální molekuly, jako jsou ferocenové deriváty a karboran se mohou snadno zapouzdřit ve vodném roztoku CB[7]. Kavita CB[8] je dostatečně velká pro dvě molekuly **BDIN**, mohou se tvořit 1:2 komplexy, nebo s dvěmi různými hostujícími molekulami jako **MV²⁺** a 2,6-dihydroxynaftalen (**HN**) může tvořit komplex 1:1:1. Molekula CB[8] je schopna vytvářet komplexy i s jinými rozměrnými makrocykly jako je cyklén a cyklám a jejich komplexy přechodných kovů.^{20,}

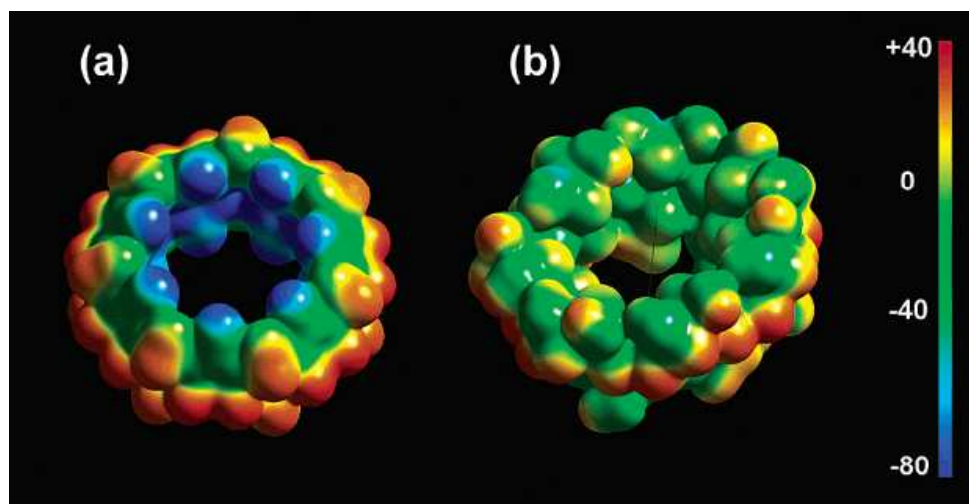
22



2.5.1 Rozdíly v hostitelské chemii mezi CB a CD

Elektrostatické efekty mohou hrát zásadní roli v molekulárních rozpoznávacích jevech ve vodných i organických roztocích.³⁰ Komplexace molekul hostů s CB[n] různých velikostí je obdobná cyklodextrinům, ale tyto dvě hostitelské soustavy se zásadně liší v host-guest interakcích vycházejících z odlišných funkčních skupin lemující vstupní okraj kavit. OH-skupiny, které lemují vchod do kavity cyklodextrinu mohou přispět k navázání hosta zejména prostřednictvím vodíkové vazby, karbonylové skupiny na okrajích CB[n] umožňují interakce typu náboj-dipól, hosté jsou také schopni přes vodíkové vazby koordinace na kovové ionty. Z Obr. 11 jsou patrné rozdíly v hodnotách elektrostatického potenciálu (ESP) mezi CB[7] a β -CD. U CB[7] bylo zjištěno, že ESP v oblasti kolem karbonylových kyslíků je výrazně negativní. Všimněte si, že

vnitřní plocha kavity je také negativní, zatímco vnější povrch je pozitivní. Na druhou stranu okraj a kavita CD jsou téměř neutrální. V důsledku toho, CB[n] přednostně váží hosty s kladným nábojem, CD raději neutrální molekuly nebo se záporným nábojem. Je třeba zdůraznit, že vysoká strukturální rigidita CB[n] ve srovnání s CD umožňuje vysoce selektivní rozpoznávací procesy.²⁰



Obr. 11 - Elektrostatický potenciál povrchu (a) CB[7] a (b) β -CD²⁰

3 TERMODYNAMICKÁ CHARAKTERIZACE INTERAKCE MAKROMOLEKUL

Molekulární rozpoznávací jevy v chemii a biologii se týkají jen nekovalentních vazebných interakcí, jako jsou elektrostatické (ion-ion, ion-dipól, dipól-dipól, dipól-indukovaný dipól a vyššího řádu), van der Waalsovy vazby, hydrofobní interakce, vodíkové vazby, přenos náboje, π - π interakce a sterický efekt.¹² Energetické příspěvky těchto interakcí jsou relativně malé, ale díky jejich velkému množství a často kooperativnímu působení mají výrazný vliv na způsob a rychlost molekulární asociace.³¹

3.1 Interakce odpovědné za stabilizaci inkluzních komplexů

U molekulárních rozpoznávacích procesů a zejména v biologických systémech (například u proteinů či NK), hrají tyto interakce ústřední roli v řízení struktury komplexů hostitel-host, umožňující přepínání supramolekulárních funkcí.³¹ V případě relativně malých molekul cyklodextrinů, které nejsou tak „předorganizované“, nebo dostatečně flexibilní aby u nich mohlo docházet k alosterickým konformačním změnám, které jsou příznačné pro biologické supramolekulární systémy.¹²

Předpokládá se, že nejvýznamnější vazebné příspěvky k tvorbě komplexu cyklodextrinů pochází **(a)** z pronikání hydrofobní části molekuly hosta do kavity cyklodextrinu a **(b)** z dehydratace organického hosta.^{12, 32} Vzhledem k tomu, že kavita cyklodextrinu je vysoce hydrofobní, převod hydrofobní části molekuly hosta z vody do kavity cyklodextrinu je proces, který zahrnuje děje **(a)** i **(b)** a může být srovnán s typickými hydrofobními interakcemi, například přenos organické molekuly z vodné fáze do organické fáze a být kvantifikován Hanschovým parametrem hydrofobnosti π .¹² Ačkoliv bývá obvykle hydrofobní efekt spojován s příspěvkem **(a i b)**, bývá někdy **(a)** efekt popisován zvlášť jako „čistá“ van der Waalsova interakce.³³

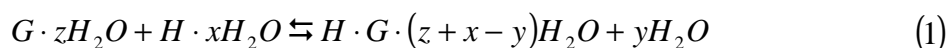
Nabité skupiny, jako je amonium či karboxylát,³² nebo hydrofilní skupiny, jako je hydroxyl, amino skupina nebo karboxylová skupina,¹² zůstávají vystaveny rozpouštědлу vně kavity CD i po proniknutí hydrofobní části ligandu do vnitřního prostoru kavity. Výjimkou z obecného pravidla jsou aromatické hydroxylové skupiny, které mohou proniknout hluboko do kavity CD, kde jsou stabilizovány H-vazbou na některou z periferních OH skupin CD.³² Pro hosty obsahující v molekule vhodně orientované

polární substituenty neplatí jednoduchý model „hydrofilní vně – lipofilní uvnitř“ model, popsany výše, a jako třetí příspěvek k vazebné interakci je nutno zahrnout H-vazbu (c).³⁴

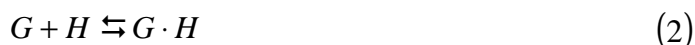
Existují další dva faktory, které přispívají k tvorbě komplexů, které se liší od klasického hydrofobního efektu a to (d) uvolnění molekul vody, které byly původně součástí kavity cyklodextrinu a jejich integrace do okolní vody a (e) konformační změny nebo uvolnění napětí při tvorbě komplexu. Není přesně známo, kolik molekul vody se vyskytuje v kavitě přírodních cyklodextrinů x , ani kolik molekul vody je uvolněno z kavity při tvorbě komplexu y , ale pro α -cyklodextrin jsou čísla x a y odhadnuta na 2 nebo 3, eventuálně ≤ 2 . RTG difrakční analýza struktury ukazuje, že se v kavitě α -cyklodextrinu vyskytuje pět až šest molekul vody, z nichž dvě jsou vázány vodíkovou vazbou k okrajovým hydroxylovým skupinám. V β -cyklodextrinu je šest až sedm molekul vody rozloženo uvnitř kavity.¹²

3.1.1 Základy termodynamiky komplexačních reakcí

Při zahrnutí molekul vody do komplexační reakce, za předpokladu vzniku komplexů 1:1, lze při reakci hosta G s CD-hostitelem H zapsat rovnicí (rovnice 1):



kde z představuje počet molekul vody interagující s volnými hosty, x počet pevně vázaných molekul vody uvnitř kavity CD a y počet uvolněných molekul vody při tvorbě komplexu. Výše je uvedeno, že nejsou k dispozici přesné informace týkající se hodnot z , x , a y v roztoku a proto se obvykle molekuly vody do souhrnné rovnice komplexace nezahrnují,¹² takže zjednodušeně lze zapsat rovnicí (rovnice 2):



vztah pro rovnovážnou konstantu K lze zapsat ve zjednodušeném tvaru (rovnice 3):

$$K = \frac{[H \cdot G]}{[G][H]} \quad (3)$$

Kombinací dvou základních vztahů pro Gibbsovu energii (rovnice 4) lze vyjádřit vztah mezi rovnovážnou konstantou, entalpií a entropií reakce:

$$\Delta G = -RT \ln K = \Delta H - T\Delta S \quad (4)$$

Z rovnice 4 lze odvodit vztah pro výpočet jediné přímo neměřitelné veličiny – reakční entropie:

$$\Delta S = \frac{RT \ln K - \Delta H}{T} \quad (5)$$

Vazebná entalpie ΔH je z molekulárního hlediska teplo spojené se vznikem, zánikem a deformací chemických vazeb. Vazebná entalpie obvykle popisuje změny počtu a typu vodíkových můstků. Hodnota ΔH je negativní, jestliže během vzájemné vazby molekul dochází k celkovému zvýšení množství a zesílení vodíkových můstků; ΔH je naopak pozitivní, jestliže dojde k zániku nebo zeslabení vodíkových můstků.³⁵

Pro měření termodynamických veličin makromolekulárních interakcí je výhodné jejich vyjádření pomocí tepelné kapacity, kterou lze experimentálně určovat. Tepelná kapacita C_p udává teplo, které je nutno dodat za konstantního tlaku soustavě, aby se ohřála o jeden stupeň. Vazebná entalpie H při ději za stálého tlaku je zapsána pomocí tepelné kapacity.³⁶

$$\Delta H = \int_{poc}^{kon} C_p dT \quad (6)$$

Změna entropie ΔS při dané teplotě T je spojena se změnou v uspořádanosti systému molekul. Změna entropie je pozitivní, jestliže při vzájemné vazbě makromolekul dojde k uvolnění molekul vody vázaných na povrchu makromolekul z prostoru vazebného místa do volného roztoku.¹ Zvýší se neuspořádanost systému molekul a dojde ke

zvýšení celkové entropie. Negativní změna entropie většinou provází změny, při kterých dochází k omezení možných konformačních stavů makromolekul.³⁵

$$\Delta S = \int_{poc}^{kon} \frac{C_p}{T} dT \quad (7)$$

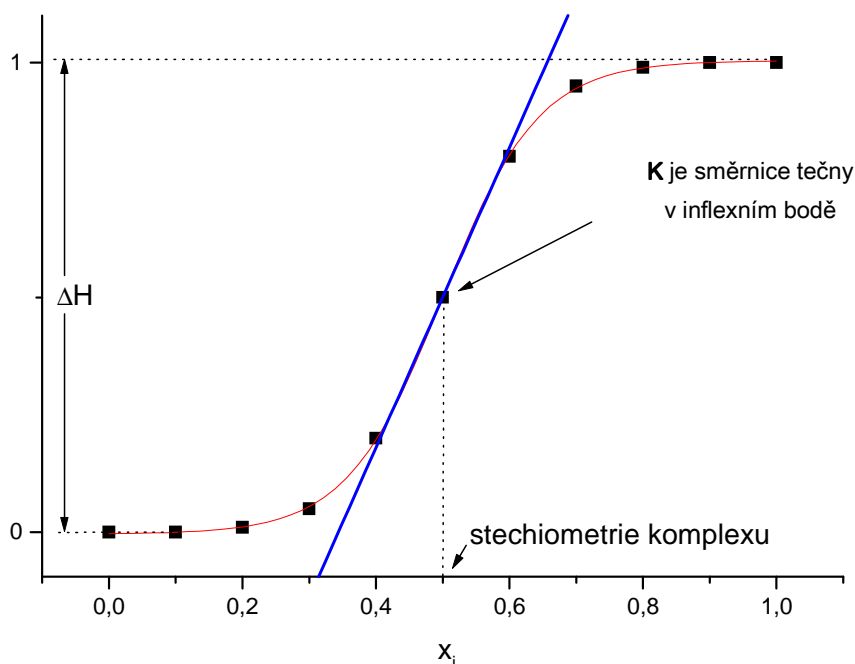
Jestliže po vzájemné vazbě makromolekul dojde k pozitivní změně entropie ΔS , která je doprovázena negativní změnou tepelné kapacity ΔC_p , je to známka toho, že se při vazbě uplatnily hydrofobní interakce. V tomto případě se při vazbě makromolekul do volného roztoku uvolňují molekuly vody, které byly původně uspořádány do vrstev kolem později vzájemně reagujících hydrofobních částí makromolekul. To má za následek snížení schopnosti celého systému molekul přijímat teplo, což se projeví celkovým snížením tepelné kapacity.¹

3.2 Interpretace ITC experimentu

Izotermální titrační kalorimetrie ITC (ITC z angl. *Isothermal Titration Calorimetry*) je termodynamická technika, která přímo měří množství uvolněného nebo spotřebovaného tepla při interakci molekul. Měření tohoto tepla umožňuje přesné stanovení rovnovážných konstant (K), reakční stechiometrie (n), vazebné entalpie (ΔH) a pouze entropie (ΔS) není přímo měřitelná,³⁶ ale dopočítá se podle rovnice 5. ITC tak poskytl komplexní termodynamický profil molekulární interakce v jediném experimentu. Právě schopnost určit přímo stechiometrii vazby makromolekul činí z ITC jedinečný nástroj pro studium interakce multimerních molekulových komplexů, kdy je stanovení vzájemného poměru reagujících molekul často složité.

Při interakci hostujících makromolekul s ligandem dochází k tepelným efektům, které se projeví rozdílem teploty referenční cely a cely se vzorkem. Rozdíl teplot je detekován speciálně tvarovaným termočlánkem umístěným v prostoru mezi celami. Termočlánek je spojen s okruhem, který při známé tepelné kapacitě cely vypočte dle rovnice 6 tepelný rozdíl a zajistí změnu přísunu elektrické energie pro vyrovnání teplot obou cel. Při exotermické reakci, kdy se při vazbě molekul uvolňuje teplo, je přísun energie snížen, v případě endotermické reakce je to naopak. Změna dodávané energie v závislosti na čase je zaznamenávána a je vztažena k okamžité koncentraci jednotlivých složek v reakční cele.³⁶

Vynesením (integrací) tepel uvolněných po jednotlivých přídavicích ligandu do reakce získáme sigmoidální křivku kde rozdíl mezi limitními hodnotami na vertikální ose odpovídá reakční entalpii, poloha inflexního bodu křivky udává stechiometrii komplexu a směrnice tečny v inflexním bodě je rovnovážná konstanta.



Obr. 12 – Modelová sigmoidální titrační křivka

3.3 Další metody studia termodynamických parametrů komplexačních reakcí

Pro určení termodynamických parametrů komplexačních reakcí CD s nízkomolekulárními ligandy je k dispozici široký výběr experimentálních metod, které zahrnují různé druhy mikrokolorimetrií: diskontinuální, průtoková, titrační „makro“ kalorimetrie a již diskutovaná titrační mikrokolorimetrie. Mezi další techniky dále patří elektronová absorpce v UV–Vis oblasti, cirkulární dichroismus, fluorescenční spektroskopie, nukleární magnetická rezonance (NMR) a elektronová spinová rezonance (ESR), plynová a kapalinová chromatografie, kapilární elektroforéza, pH potenciometrie.¹²

Kalorimetrie je jediná přímá metoda pro stanovení reakční entalpie (ΔH), nicméně není nejpoužívanější metodou pro studium termodynamiky komplexačních reakcí malých molekul. To může být způsobeno kombinací několika faktorů – potřeba poměrně velkého množství vzorku, sofistikovanost, extrémní citlivost a cena zařízení a také značné nároky na přesnost a pečlivost provádění samotných experimentů.¹²

Spektroskopické metody jsou využívány k určení rovnovážné konstanty komplexačních reakcí CD. Výběr metody a experimentální postup závisí na spektrálních vlastnostech ligandů a/nebo hostitelské molekuly. V případě alifatických ligandů, kdy chybí intenzivní absorpční pásy v dosažitelné UV–Vis oblasti, lze stanovovat rovnovážné konstanty diferenční spektroskopii, přidáním vhodného konkurenčního chromoforního ligandu. Interakce cyklodextrinu (hostitel) s aromatickými sloučeninami (host), které vykazují silné absorpční pásy v UV-Vis oblasti, lze studovat přímo. Termodynamické veličiny lze pak stanovit na základě znalosti rovnovážných konstant komplexačních reakcí při různých teplotách pomocí van't Hoffovy rovnice (za předpokladu konstantní tepelné kapacity v daném intervalu).¹²

NMR se může použít k získání termodynamických parametrů komplexačních reakcí cyklodextrinu jen za předpokladu, pokud jsou rozdíly mezi chemickými posuny konkrétních protonů v čistých látkách a v komplexu dostatečně velké.¹²

ESR spektroskopie se používá při měření rovnovážných konstant mezi stabilními radikály a cyklodextriny.¹²

Církulární dichroismus je jedna z nejlepších metod pro pozorování chování komplexních chromoforních ligandů s cyklodextriny, protože všechny přírodní cyklodextriny jsou chirální a spektrální změny způsobené inkludací hostujících molekul, spektra této metody jsou preferovány více než UV spektra.¹²

Termodynamické parametry lze také určit pomocí plynové nebo kapalinové chromatografie z teplotní závislosti retenčního času hostující molekuly, které se váží na cyklodextriny imobilizované na stacionární fázi nebo přidané do mobilní fáze.¹²

II. PRAKTICKÁ ČÁST

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Přístroje a vybavení

Pro mikrokaloimetrické experimenty byl použit izotermální titrační kalorimetr **VP-ITC** od firmy MicroCal, LLC (USA). Měřicí část **VP-ITC** zahrnuje automatickou mikropipetu o objemu 295 μl , referenční a reakční měřicí celu ve tvaru mince o objemu 1,8 ml, ale pracovním objemu 1,4 ml. Všechny vzorky byly před měřením odplyněny na odplyňovacím přístroji s termostatem **ThermoVac** od firmy MicroCal, LLC (USA) vždy při nižší teplotě než byl prováděn samotný experiment. Vyhodnocení experimentů (prokládání bodů regresní křivkou) bylo provedeno v programu **ORIGIN 7.0**, který je přizpůsoben pro datovou analýzu ITC.

Měření jednotlivých experimentů na přístroji VP-ITC bylo provedeno tak, že připravený vzorek ligandu byl nasát do automatické mikropipety a počítačově řízeným pístem bylo postupně v časovém intervalu 210 sec přidáván za stálého míchání 29 nebo až 36 přídaveků vázající se molekuly ligandu. Do reakční cely obsahující roztok hostitelských makromolekul (β -CD nebo $\text{Me}_6\text{CB}[6]$ a $\text{CB}[7]$) byl přidán první přídavek o menším objemu 2 μl a ostatní o objemu 7 nebo 10 μl . Teplota u obou cel byla během experimentů udržována konstantní. V průběhu experimentu bylo uvolněné teplo při interakci měřeno v závislosti na čase. Jednotlivé píky reprezentují teplotní změny, které byly vyvolány postupnými přídávky malého množství ligandu do reakční cely.

pH roztoků pufrů bylo měřeno na přístroji pH-meter Elleca CPM52, který byl kalibrován pomocí tří komerčních pufrů.

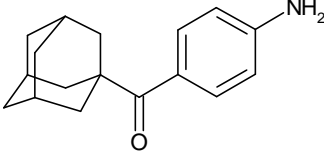
Ke komplexačním reakcím byl použit β -CD získaný z komerčních zdrojů, který byl sušen do $\Delta m=0$ při $T = 328,0 \text{ K}$ a tlaku 27,0 hPa. $\text{CB}[n]$ k měření poskytl doc. ing. V. Šindelář, Ph.D. z PřF MU v Brně. Použité ligandy byly připraveny v laboratoři na ÚCH FT UTB ve Zlíně, především děkuji ing. J. Černochové za poskytnutí solí imidazolia a benzimidazolia, ing. Z. Kozubkové a ing. M. Rouchalovi za poskytnutí 1-adamantylanilinových ligandů. K přípravě rozpouštědel byly použity látky o čistotě p.a. bez další úpravy, tris (hydroxymethyl)aminomethan je komerční od firmy Aldrich a ligand $\text{AdNH}_3^+\text{Cl}^-$ od firmy Lachema.

4.2 Příprava TRIS-HCl pufru

Při přípravě TRIS-HCl pufru byla rozpuštěna cca v 400 cm³ destilované vody báze tris(hydroxymethyl)aminomethanu v 500 cm³ kádince. Následně byla provedena úprava pH připravenou směsí konc. HCl/H₂O (1/1, v/v), směs byla po kapkách přidávána k roztoku pufru za stálého míchání do dosažení požadovaného pH v rozmezí 7,0-7,3. Nakonec byl pufr kvantitativně převeden do odměrné baňky o objemu 500 cm³, doplněn po rysku destilovanou vodou a pH bylo ověřeno na pH-metru.

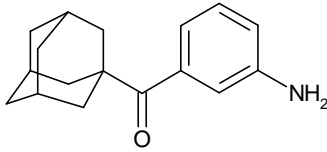
4.3 Inkluzní komplexy β -CD s 1-adamantylaniliny

- Roztok ligandu byl připraven v odměrné baňce o objemu 5 cm³ rozpuštěním 9,017 mg (0,0353 mmol) 1-adamantyl-(4-aminofenyl)methanonu ve směsi DMSO/H₂O (3/1, v/v) a doplněno po rysku.

| 1-adamantyl-(4-aminofenyl)methanon | | (1) |
|--|--|------------|
| Sum. vzorec: C ₁₇ H ₂₁ NO |  | |
| M_r: 255,361 g.mol ⁻¹ | | |
| Vzhled: žlutý krystalický prášek | | |

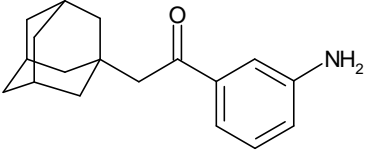
Roztok cyklodextrinu byl připraven: v odměrné baňce o objemu 25 cm³ bylo rozpuštěno 18,311 mg (0,0161 mmol) CD ve směsi DMSO/H₂O (3/1, v/v) a doplněno po rysku.

- Roztok ligandu byl připraven v odměrné baňce o objemu 5 cm³ rozpuštěním 8,730 mg (0,0342 mmol) 1-adamantyl-(3-aminofenyl)methanonu ve směsi DMSO/H₂O (3/1, v/v) a doplněno po rysku.

| 1-adamantyl-(3-aminofenyl)methanon | | (2) |
|--|--|------------|
| Sum. vzorec: C ₁₇ H ₂₁ NO |  | |
| M_r: 255,361 g.mol ⁻¹ | | |
| Vzhled: bezbarvý krystalický prášek | | |

Roztok cyklodextrinu byl připraven: v odměrné baňce o objemu 25 cm³ bylo rozpuštěno 18,716 mg (0,0165 mmol) CD ve směsi DMSO/H₂O (3/1, v/v) a doplněno po rysku.

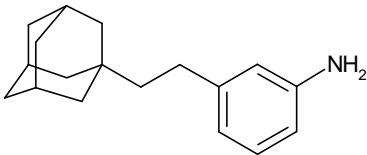
- Roztok ligandu byl připraven v odměrné baňce o objemu 5 cm³ rozpuštěním 9,444 mg (0,0351 mmol) 2-(1-adamantyl)-1-(3-aminofenyl)ethan-1-onu ve směsi DMSO/H₂O (3/1, v/v) a doplněno po rysku.

| 2-(1-adamantyl)-1-(3-aminofenyl)ethan-1-on | | (3) |
|--|--|------------|
| Sum. vzorec: C ₁₈ H ₂₃ ON |  | |
| M_r: 269,381 g.mol ⁻¹ | | |
| Vzhled: oranžový krystalický prášek | | |

Roztok cyklodextrinu byl připraven: v odměrné baňce o objemu 25 cm³ bylo rozpuštěno 18,164 mg (0,0160 mmol) CD ve směsi DMSO/H₂O (3/1, v/v) a doplněno po rysku.

- V 400 cm³ kádince bylo rozpuštěno 100 mg (0,3426 mmol) 3-[2-(1-adamantyl)ethyl]anilin hydrochloridu ve 20cm³ připraveného 5% roztoku NaOH a převeden na 3-[2-(1-adamantyl)ethyl]anilin. Směs byla opakovaně extrahována 4 × 10 cm³ DEE a spojené organické podíly byly vysušeny nad Na₂SO₄. Rozpouštědlo bylo odpařeno na RVO a získaný produkt byl rozpuštěn v mobilní fázi PE:EA (4:1) a přečištěn na koloně, průběh dělení byl sledován na TLC vrstvě. Látka byla identifikována pomocí GC MS.

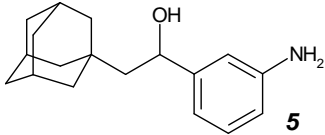
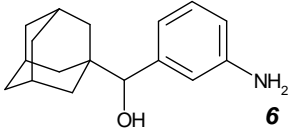
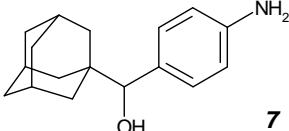
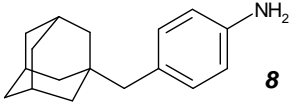
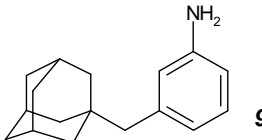
Roztok ligandu byl připraven rozpuštěním 3,585 mg (0,0140 mmol) 3-[2-(1-adamantyl)ethyl]anilinu v 2 cm³ směsi DMSO/H₂O (3/1, v/v) a doplněno po rysku.

| 3-[2-(1-adamantyl)ethyl]anilin | | (4) |
|---|--|------------|
| Sum. vzorec: C ₁₈ H ₂₅ N |  | |
| M_r: 255,405 g.mol ⁻¹ | | |
| Vzhled: nažloutlý olej | | |

Roztok cyklodextrinu byl připraven: v odměrné baňce o objemu 25 cm³ bylo rozpuštěno 18,165 mg (0,0160 mmol) CD ve směsi DMSO/H₂O (3/1, v/v) a doplněno po rysku.

- V Tab. 5 jsou uvedeny zbývající 1-adamantylaniliny, které byly měřeny, ale výsledky nebylo možno analyzovat. Roztoky ligandů i β -CD byly připraveny stejným postupem, jak je výše uvedeno. K jejich přípravě byla použita směs rozpouštědel DMSO/H₂O (3/1, v/v).

Tab. 5 - 1-adamantylaniliny použité k měření

| <i>ligand</i> | Sum. vz. | Mr [g.mol ⁻¹] | <i>c_{lig}</i> [mM] | <i>c_{CD}</i> [mM] |
|---|------------------------------------|---------------------------|-----------------------------|----------------------------|
|  5 | C ₁₈ H ₂₅ NO | 271,404 | 7,0038 | 0,6402 |
| | | | 21,0083 | 1,9198 |
|  6 | C ₁₇ H ₂₃ NO | 257,377 | 6,9983 | 0,6405 |
|  7 | C ₁₇ H ₂₃ NO | 257,377 | 6,6300 | 0,6388 |
|  8 | C ₁₇ H ₂₃ N | 241,378 | 7,0131 | 0,6401 |
|  9 | C ₁₇ H ₂₃ N | 241,378 | 7,0810 | 0,6403 |
| | | | 3,5405 | 0,3202 |

4.4 Inkluzní komplexy β -CD s imidazoliiovými solemi

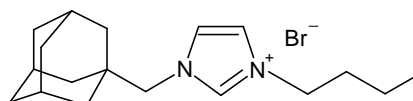
- Roztok ligandu byl připraven rozpuštěním 3,092 mg (0,0088 mmol) 1-(1-adamantylmethyl)-3-butylimidazolium bromidu v 2 cm³ směsi MeOH/TRIS-HCl pufr (1/1, v/v). K přípravě rozpouštědla byl použit pufr o pH=7,21.

1-(1-adamantylmethyl)-3-butylimidazolium bromid (10)

Sum. vzorec: C₁₈H₂₉N₂Br

M_r: 353,348 g.mol⁻¹

Vzhled: hnědý olej



Roztok cyklodextrinu byl připraven: v odměrné baňce o objemu 10 cm³ bylo rozpuštěno 4,539 mg (mmol) cyklodextrinu ve směsi MeOH/TRIS-HCl pufr (1/1, v/v) a doplněno po rysku.

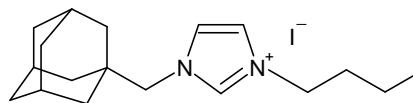
- Roztok ligandu byl připraven rozpuštěním 5,620 mg (0,0140 mmol) 1-(1-adamantylmethyl)-3-butylimidazolium jodidu v 2 cm³ směsi MeOH/TRIS-HCl pufr (1/1, v/v). K přípravě rozpouštědla byl použit pufr o pH=7,31.

1-(1-adamantylmethyl)-3-butylimidazolium jodid (11)

Sum. vzorec: C₁₈H₂₉N₂I

M_r: 401,15 g.mol⁻¹

Vzhled: oranžovo-žlutý olej



Roztok cyklodextrinu byl připraven: v odměrné baňce o objemu 10 cm³ bylo rozpuštěno 7,264 mg (0,0064 mmol) cyklodextrinu ve směsi MeOH/TRIS-HCl pufr (1/1, v/v) a doplněno po rysku.

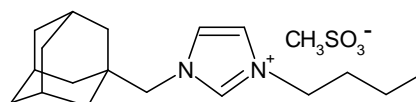
- Roztok ligandu byl připraven rozpuštěním 1,287 mg (0,0035 mmol) 1-(1-adamantylmethyl)-3-butylimidazolium mesylátu v 2 cm³ směsi MeOH/TRIS-HCl pufr (1/1, v/v). K přípravě rozpouštědla byl použit pufr o pH=7,21.

1-(1-adamantylmethyl)-3-butylimidazolium mesylát (12)

Sum. vzorec: C₁₉H₃₂N₂O₃S

M_r: 368,542 g.mol⁻¹

Vzhled: bílý prášek



Roztok cyklodextrinu byl připraven: v odměrné baňce o objemu 10 cm³ bylo rozpuštěno 1,815 mg (0,1599 mmol) cyklodextrinu ve směsi MeOH/TRIS-HCl pufr (1/1, v/v) a doplněno po rysku.

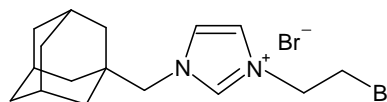
- Roztok ligandu byl připraven rozpuštěním 5,650 mg (0,0140 mmol) 1-(1-adamantylmethyl)-3-(2-bromoethyl)imidazolium bromidu v 2 cm³ směsi MeOH/TRIS-HCl pufr (1/1, v/v). K přípravě rozpouštědla byl použit pufr o pH=7,31.

1-(1-adamantylmethyl)-3-(2-bromoethyl)imidazolium bromid (13)

Sum. vzorec: C₁₆H₂₄N₂Br

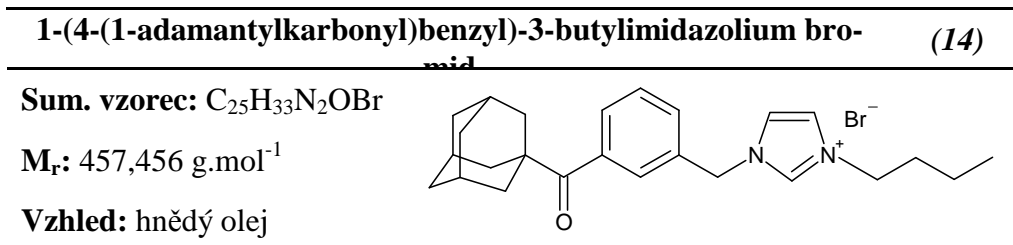
M_r: 404,19 g.mol⁻¹

Vzhled: bílý prášek



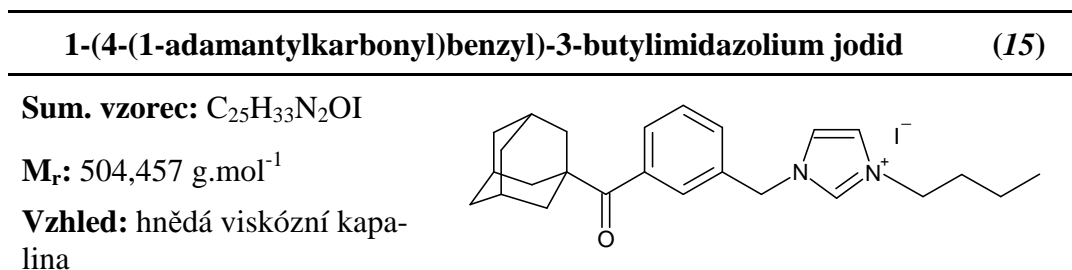
Roztok cyklodextrinu byl připraven: v odměrné baňce o objemu 10 cm³ bylo rozpuštěno 7,260 mg (0,0064 mmol) cyklodextrinu ve směsi MeOH/TRIS-HCl pufr (1/1, v/v) a doplněno po rysku.

- Roztok ligandu byl připraven rozpuštěním 2,402 mg (0,0053 mmol) 1-(4-(1-adamantylkarbonyl)benzyl)-3-butyylimidazolium bromidu v 2 cm³ směsi MeOH/TRIS-HCl pufr (1/1, v/v). K přípravě rozpouštědla byl použit pufr o pH=7,31.



Roztok cyklodextrinu byl připraven: v odměrné baňce o objemu 10 cm³ bylo rozpuštěno 2,725 mg (0,0024 mmol) cyklodextrinu ve směsi MeOH/TRIS-HCl pufr (1/1, v/v) a doplněno po rysku.

- Roztok ligandu byl připraven rozpuštěním 1,770 mg (0,0035 mmol) 1-(4-(1-adamantylkarbonyl)benzyl)-3-butyylimidazolium jodidu v 2 cm³ směsi MeOH/TRIS-HCl pufr (1/1, v/v). K přípravě rozpouštědla byl použit pufr o pH=7,31.



Roztok cyklodextrinu byl připraven: v odměrné baňce o objemu 25 cm³ bylo rozpuštěno 4,541 mg (0,0040 mmol) cyklodextrinu ve směsi MeOH/TRIS-HCl pufr (1/1, v/v) a doplněn po rysku.

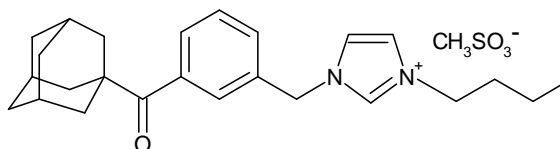
- Roztok ligandu byl připraven rozpuštěním 1,657 mg (0,0035 mmol) 1-(4-(1-adamantylkarbonyl)benzyl)-3-butylimidazolium mesylátu v 2 cm³ směsi MeOH/TRIS-HCl pufr (1/1, v/v). K přípravě rozpouštědla byl použit pufr o pH=6,99.

1-(4-(1-adamantylkarbonyl)benzyl)-3-butylimidazolium mesylát (16)

Sum. vzorec: C₂₆H₃₆N₂O₄S

M_r: 472,65 g.mol⁻¹

Vzhled: bílý olej



Roztok cyklodextrinu byl připraven: v odměrné baňce o objemu 10 cm³ bylo rozpuštěno 1,816 mg (0,0016 mmol) cyklodextrinu ve směsi MeOH/TRIS-HCl pufr (1/1, v/v) a doplněno po rysku.

4.5 Inkluzní komplexy β-CD s benzimidazoliiovými solemi

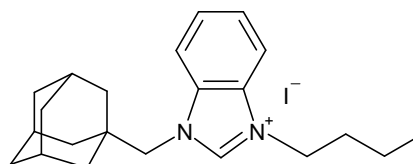
- Roztok ligandu byl připraven rozpuštěním 6,301mg (0,0140 mmol) 1-(1-adamantylmethyl)-3-butylbenzimidazolium jodidu v 2 cm³ směsi MeOH/TRIS-HCl pufr (1/1, v/v). K přípravě rozpouštědla byl použit pufr o pH=7,31.

1-(1-adamantylmethyl)-3-butylbenzimidazolium jodid (17)

Sum. vzorec: C₂₂H₃₁N₂I

M_r: 450,409 g.mol⁻¹

Vzhled: žlutý prášek



Roztok cyklodextrinu byl připraven: v odměrné baňce o objemu 10 cm³ bylo rozpuštěno 7,264 mg (0,0064 mmol) cyklodextrinu ve směsi MeOH/TRIS-HCl pufr (1/1, v/v) a doplněno po rysku.

- Roztok ligandu byl připraven rozpuštěním 6,308 mg (0,0140 mmol) látky **17** v 2 cm³ TRIS-HCl pufru (pH=7,02). Roztok cyklodextrinu byl připraven: v odměrné baňce o objemu 10 cm³ bylo rozpuštěno 7,272 mg (0,0064 mmol) cyklodextrinu v TRIS-HCl pufru (pH=7,02) a doplněno po rysku.

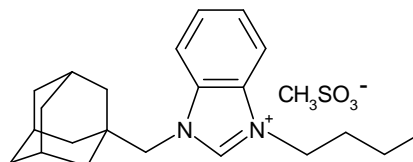
- Roztok ligandu byl připraven rozpuštěním 5,864 mg (0,0140 mmol) 1-(1-adamantylmethyl)-3-butylbenzimidazolium mesylátu v 2 cm³ směsi MeOH/TRIS-HCl pufr (1/1, v/v). K přípravě rozpouštědla byl použit pufr o pH=7,31.

1-(1-adamantylmethyl)-3-butylbenzimidazolium mesylát (18)

Sum. vzorec: C₂₃H₃₄N₂O₃S

M_r: 418,602 g.mol⁻¹

Vzhled: bílý prášek



Roztok cyklodextrinu byl připraven: v odměrné baňce o objemu 10 cm³ bylo rozpuštěno 7,265 mg (0,0064 mmol) cyklodextrinu ve směsi MeOH/TRIS-HCl pufr (1/1, v/v) a doplněno po rysku.

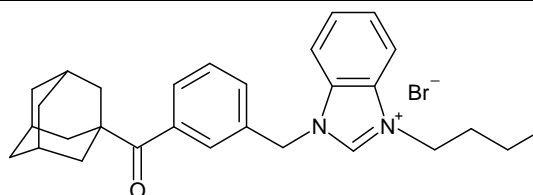
- Roztok ligandu byl připraven rozpuštěním 1,778 mg (0,0035 mmol) 1-(4-(1-adamantylkarbonyl)benzyl)-3-butylbenzimidazolium bromidu v 2 cm³ směsi MeOH/TRIS-HCl pufr (1/1, v/v). K přípravě rozpouštědla byl použit pufr o pH=6,99.

1-(4-(1-adamantylkarbonyl)benzyl)-3-butylbenzimidazolium bromid (19)

Sum. vzorec: C₂₉H₃₅N₂OBr

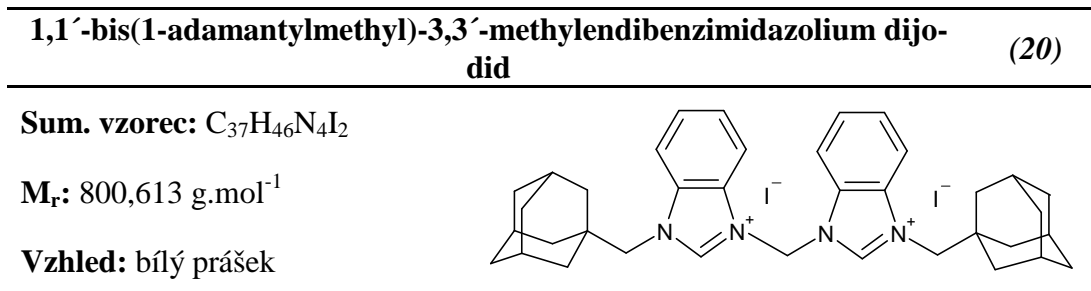
M_r: 507,516 g.mol⁻¹

Vzhled: hnědý prášek



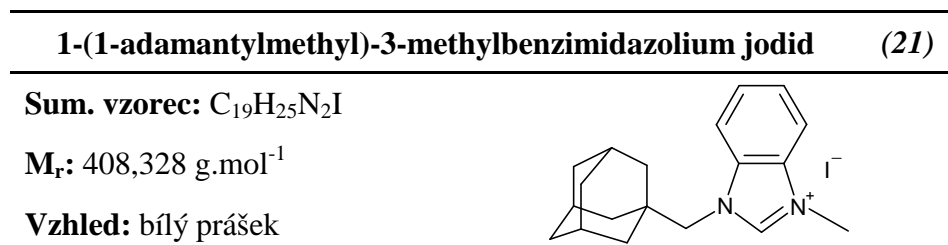
Roztok cyklodextrinu byl připraven: v odměrné baňce o objemu 10 cm³ bylo rozpuštěno 1,817 mg (0,0016 mmol) cyklodextrinu ve směsi MeOH/TRIS-HCl pufr (1/1, v/v) a doplněno po rysku.

- Roztok ligandu byl připraven rozpuštěním 0,547 mg (0,0007 mmol) **20** v 2 cm³ TRIS-HCl pufru (pH=6,99).



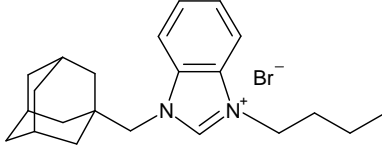
Roztok cyklodextrinu byl připraven: v odměrné baňce o objemu 25 cm³ bylo rozpuštěno 1,066 mg (0,0009 mmol) cyklodextrinu v TRIS-HCl pufru (pH=6,99) a doplněno po rysku.

- Pro měření teplotní závislosti byly připraveny roztoky ligandu 1-(1-adamantylmethyl)-3-methylbenzimidazolium jodidu vždy před každým měřením, v 2 cm³ TRIS-HCl pufru (pH=7,21) bylo rozpuštěno 2,858 mg (0,0069 mmol).



Dále byl připraven zásobní roztok cyklodextrinu: v baňce o objemu 50 cm³ bylo rozpuštěno 18,163 mg (0,0160 mmol) cyklodextrinu v TRIS-HCl pufru (pH=7,21) a doplněno po rysku.

- Zde je uveden benzimidazoliový ligand u, kterého se nepodařilo naměřit termodynamické parametry interakce s cyklodextrinem.

| | |
|---|--|
| 1-(1-adamantylmethyl)-3-butylbenzimidazolium bromid (22) | |
| Sum. vzorec: C ₂₂ H ₃₁ N ₂ Br |  |
| M_r: 403,408 g.mol ⁻¹ | |
| Vzhled: šedý prášek | |

4.6 Inkluzní komplexy Me₆CB[6] s benzimidazoliovými solemi

- Roztok ligandu byl připraven rozpuštěním 0,613 mg (0,0014 mmol) látky **17** v 2 cm³ TRIS-HCl pufru (pH=6,99). Roztok cucurbiturilu byl připraven: v odměrné baňce o objemu 25 cm³ bylo rozpuštěno 2,028 mg (0,0019 mmol) Me₆CB[6] v TRIS-HCl pufru (pH=6,99) a doplněno po rysku.
- Roztok ligandu byl připraven rozpuštěním 0,556 mg (0,0014 mmol) látky **21** v 2 cm³ TRIS-HCl pufru (pH=7,21). Roztok cucurbiturilu byl připraven: v odměrné baňce o objemu 10 cm³ bylo rozpuštěno 0,811 mg (0,0008 mmol) Me₆CB[6] v TRIS-HCl pufru (pH=7,21) a doplněno po rysku.

4.7 Inkluzní komplexy CB[7] s benzimidazoliovými solemi

- Roztok ligandu byl připraven rozpuštěním 0,279 mg (0,0007 mmol) látky **21** v 2 cm³ TRIS-HCl pufru (pH=7,21). Roztok cucurbiturilu byl připraven: v odměrné baňce o objemu 10 cm³ bylo rozpuštěno 0,436 mg (0,0004 mmol) CB[7] v TRIS-HCl pufru (pH=7,21) a doplněno po rysku.
- Roztok ligandu byl připraven rozpuštěním mg (mmol) látky **20** v 2 cm³ TRIS-HCl pufru (pH=7,21). Roztok cucurbiturilu byl připraven: v odměrné baňce o objemu 10 cm³ bylo rozpuštěno mg (mmol) CB[7] v TRIS-HCl pufru (pH=7,21) a doplněno po rysku.

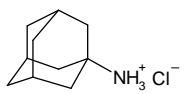
5 DISKUZE A VÝSLEDKY

Cílem této práce bylo především nalézt vhodné podmínky titrace umožňující stanovení široké série látek. Zachování stejných podmínek je klíčové pro vyvozování závěrů v oblasti vztahu struktury ligandů a termodynamických parametrů komplexačních reakcí. Protože vazebné chování je silně ovlivněno teplotou, složením rozpouštědla a někdy i samotnými koncentracemi komponent. ITC technikou byly studovány tyto skupiny ligandů; 1-adamantylaniliny, soli imidazolia a benzimidazolia s jodidovým, bromidovým a mesylátovým anionem, jako hostitelské molekuly byly použity makromolekuly; β -CD, Me₆CB[6], CB[7].

Na začátku vývoje ITC metodiky bylo nutné nejprve provést standardní testovací měření (voda-voda test a EDTA test). Tyto měření se provádí se záměrem seznámení se základními rysy hardwaru a softwaru VP-ITC přístroje. Stejně tak mají za úkol poskytnout zkušenosti s manipulací přístroje, které musí získat každý uživatel.

Po úspěšném zvládnutí standardních testovacích experimentů bylo přikročeno k měření známých termodynamických parametrů komplexace adamantan-1-amonium chloridu s β -cyklodextrinem ve fosfátovém pufru. Naměřené hodnoty termodynamických parametrů odpovídají publikovaným výsledkům,³⁷ jak je možno porovnat v Tab. 6. Po tomto ověření zvládnutí samotné náročné experimentální techniky bylo přikročeno k měření parametrů komplexačních reakcí dosud nepublikovaných adamantanových ligandů.

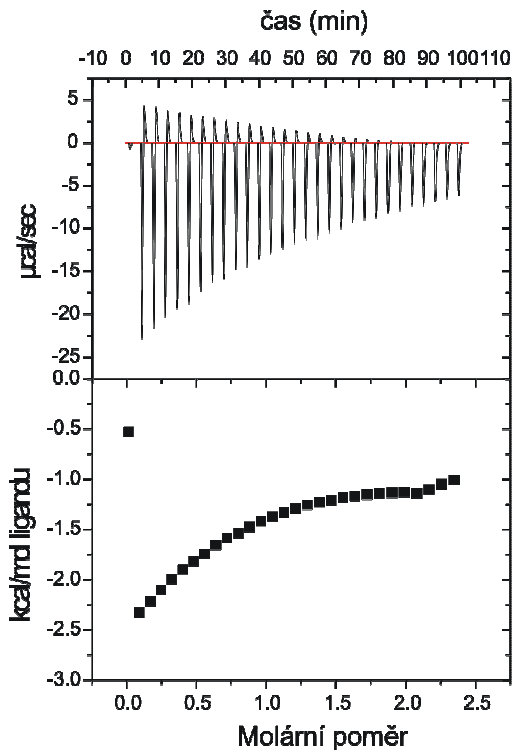
Tab. 6 - Experimentální a publikované hodnoty parametrů interakce AdNH₃⁺Cl⁻ s β -CD

|  | parametry | n | K [M ⁻¹] | $-\Delta H$ [kJ.mol ⁻¹] | $-\Delta S$ [J.K ⁻¹ mol ⁻¹] |
|---|----------------|---------------|----------------------|-------------------------------------|--|
| | experimentální | 0,939 ± 0,002 | 6960 ± 29 | 23,72 ± 0,05 | 4,61 |
| | publikované | - | 8396 ± 300 | 22,15 ± 0,15 | 0,84 |

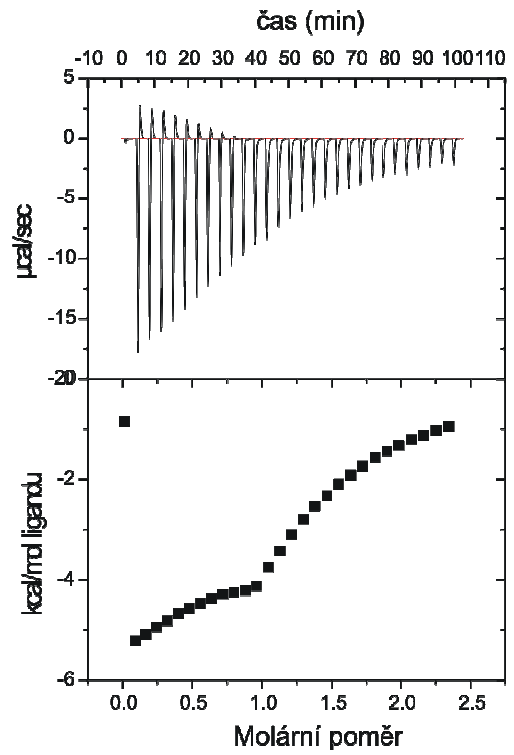
Zde budou uvedeny a diskutovány nejčastější problémy, které se vyskytovaly při provádění isothermálních kalorimetrických titrací.

Na Obr **13.a** je znázorněn dodatečný tepelný efekt, který pravděpodobně plyne z dalšího agregačního děje (disociace, rozklad,...). Tento problém komplikoval měření velmi často, v řadě případů byl odstraněn snížením koncentrací obou měřených roztoků. Na obr **13.b** je uveden případ dalšího dodatečného teleného efektu, ke kterému docházelo při měření experimentů v systému MeOH/H₂O (1/1, v/v), tento problém se podařilo omezit nebo odstranit ve většině případů nahrazením H₂O pufrům. Dodatečný tepelný efekt v tomto případě byl pravděpodobně vyvolán snížením koncentrace MeOH ve směsi rozpouštědla MeOH/H₂O nebo MeOH/TRIS-HCl pufr. Ke snížení koncentrace MeOH v rozpouštědle mohlo dojít jeho částečným odpařením při přípravě roztoků k měření nebo během odplynování vzorků. Vliv změny prostředí se projevil i při zřed'ovacích experimentech, kdy bylo uvolňováno větší teplo než při samotné titraci, což postrádá fyzikální smysl. Je třeba tedy provádět měření s extrémní opatrností, protože i nepatrná změna podmínek (složení roztoků) může ovlivnit výsledek experimentu.

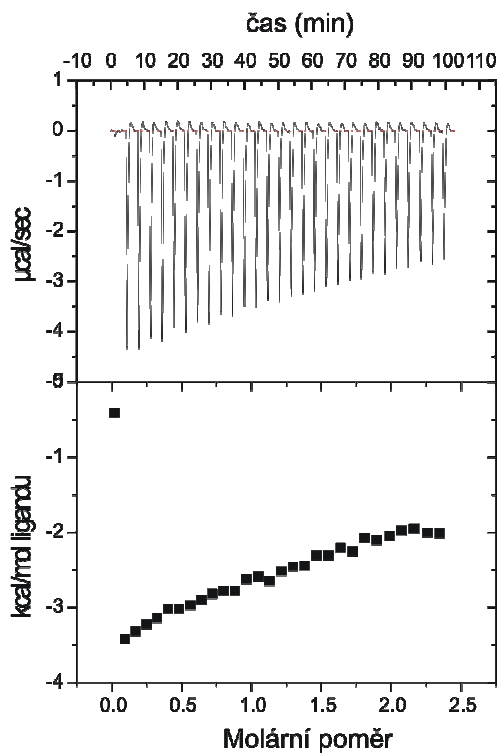
Na Obr. **13.c** je uveden případ, kdy byl během celého měření zaznamenán dodatečný tepelný efekt stejné intenzity od začátku do konce, jehož příčinou mohou být další agregační děje v měřeném systému nebo nedostatečné odplynění roztoků před měřením. Na Obr. **13.d** je uveden příklad, kdy při měření docházelo k další reakci v měřeném systému, doprovázené pomalou ekvilibrací. Následkem čehož přechází jeden pík v druhý bez dosažení base line.



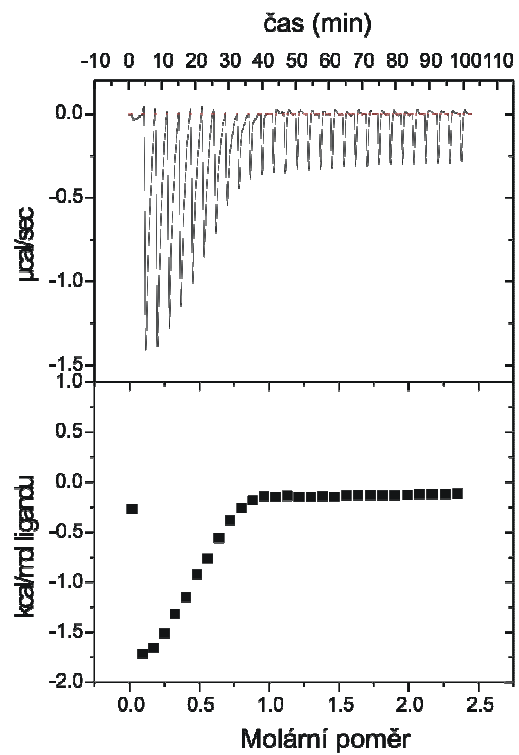
13.a



13.b



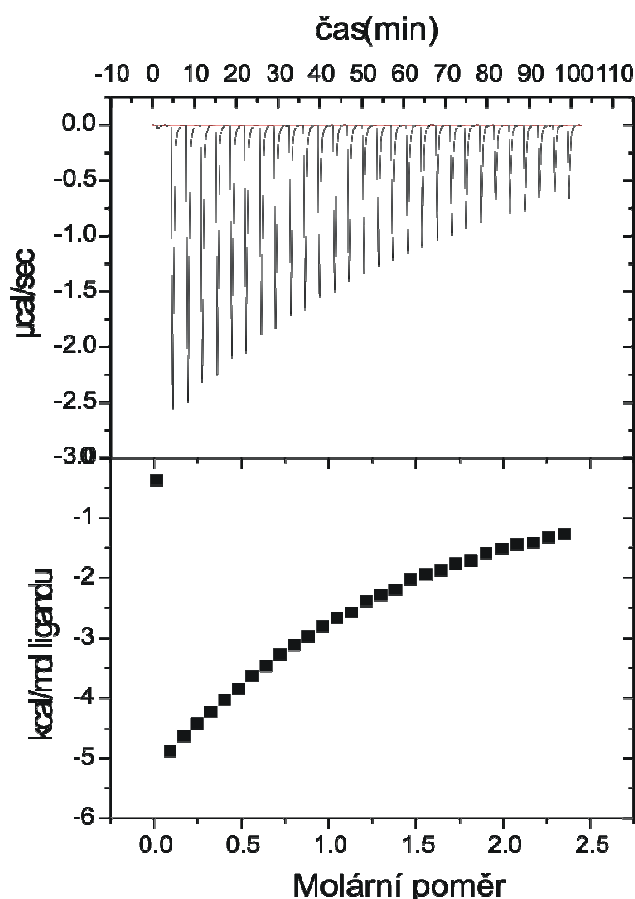
13.c



13.d

Obr. 13 – Komplikace p\u0159i m\u011b\u0159en\u00ed

Na Obr.14 je uveden typický korektní výsledek úspěšného experimentu tvorby komplexu 1:1, kdy stechiometrie $n=1$. Vrchní část grafu reprezentují surová data, která vyjadřují závislost změny tepelné kapacity na čase. Hodnota signálu je největší na počátku titrace, kdy je v roztoku velký nadbytek makromolekul. V průběhu titrace dochází postupně k obsazování vazebných míst hostitele ligandem a odpovídajícímu snižování tepelného signálu až do stavu, kdy dojde k nasycení vazebných míst a v roztoku se nachází volný ligand. Následně je provedena korekce na tepelné vlivy spojené se zředěním ligandu, odečtením referenční křivky získané při měření za identických podmínek, avšak bez přítomnosti hostitelských makromolekul v reakční cele. K vyhodnocení ITC experimentu byly použity integrované hodnoty (dolní část grafu).



Obr. 14 –Korektní výsledek ITC experimentu

5.1 Supramolekulární komplexy β -CD s 1-adamantylaniliny

Byla provedena série ITC měření látek na bázi 1-adamantylanilinu s β -CD. U některých látek této skupiny, které jsou uvedeny v Tab. 5 v experimentální části, nebyly stanoveny hodnoty termodynamických parametrů, protože se při měření vyskytly problémy, které se nepodařilo odstranit (dodatečný tepelný efekt, velmi pomalá ekvilibrace a další agregační děje,...).

U této skupiny látek byly titrace prováděny ve směsi DMSO/H₂O (3/1, v/v), výsledky uvedené v Tab. 7 jsou součástí publikace přijaté do tisku v časopise *Supramolecular Chemistry*.

Mikrokalorimetrickou titrací bylo zjištěno, že mezi *ortho* a *meta* isomerem 1-adamantyl-(4-aminofenyl)methanonu nebyly pozorovány rozdíly v termodynamickém chování. Z toho lze usoudit, že poloha NH₂ skupiny nemá vliv na tvorbu komplexu. Z výsledků je zřejmé, že 3-[2-(1-adamantyl)ethyl]anilin tvoří nejstabilnější komplex s β -CD z uvedených 1-adamantylanilinů. Z hlediska stability studovaných komplexů jsou tedy výhodnější ligandy s delším nepolárním řetězcem mezi adamantanovým skeletem a zbytkem molekuly.

Tab. 7 - Termodynamické parametry komplexů β -CD s 1 adamantylaminy v DMSO/H₂O (3/1, v/v) při 303,15 K

| <i>ligand</i> | <i>n</i> | <i>K</i> [M ⁻¹] | $-\Delta H$ [kJ.mol ⁻¹] | $-\Delta S$ [J.K ⁻¹ mol ⁻¹] | <i>c</i> _{CD} [mM] | <i>c</i> _{lig} [mM] |
|---------------|---------------|-----------------------------|-------------------------------------|--|-----------------------------|------------------------------|
| 1 | 1,07 ± 0,36 | 186 ± 23 | 34,94 ± 14,16 | 71,60 | 0,6453 | 7,0622 |
| 2 | 1,02 ± 0,27 | 226 ± 25 | 45,68 ± 14,98 | 105,51 | 0,6596 | 6,8374 |
| 3 | 0,998 ± 0,359 | 313 ± 55 | 37,50 ± 16,97 | 76,20 | 0,6401 | 7,0116 |
| 4 | 0,931 ± 0,049 | 694 ± 28 | 43,54 ± 2,96 | 89,18 | 0,6402 | 7,0182 |

5.2 Supramolekulární komplexy β -CD s imidazoliiovými solemi

Jako nejvhodnější prostředí pro měření komplexačních reakcí imidazoliiových solí byla po mnoha pokusech zvolena směs MeOH/TRIS-HCl pufr (1/1, v/v). Výsledky uvedené v Tab. 8 ukazují na jisté rozdíly ve stabilitě komplexů způsobené odlišnou strukturou látek a rozdílnými protianionty.

Zatímco hodnoty asociačních konstant pro 1-(1-adamantylmethyl)-3-butyylimidazolium jodid a bromid se v podstatě neliší, mesylát tvoří nepatrně stabilnější komplex s β -CD. Hodnota asociační konstanty pro 1-(1-adamantylmethyl)-3-butylobenzimidazolium mesylát je dvakrát větší než pro jodid. Termodynamické parametry komplexace β -CD s 1-(1-adamantylmethyl)-3-butylobenzimidazolium bromidem **22** se nepodařilo naměřit, příliš velká tepla uvolněná při zředovacím experimentu a dodatečný tepelný efekt znemožňuje interpretaci naměřených výsledků. Nutno podotknout, že měření bylo provedeno opakovaně se stejným výsledkem, čímž byla vyloučena nahodilá chyba – například bubliny v reakční cele nebo změna koncentrace MeOH při špatné manipulaci s roztoky ligandu a CD. Přítomnost rozdílných aniontů při tvorbě komplexů β -CD s 1-(4-(1-adamantylkarbonyl)-benzyl)-3-butyylimidazoliiovými solemi nemá prokazatelně žádný vliv na jejich stabilitu, asociační konstanta u všech dosahuje řádově $K \sim 4 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$.

Dále byly naměřeny termodynamické parametry komplexačních reakcí ligandů **17** a **20**, kde jako prostředí pro titrace byl použit pouze TRIS-HCl pufr. Použití čistého pufru jako rozpouštědla u jiných studovaných ligandů bylo znemožněno jejich velmi omezenou rozpustností ve vodě. Vzhledem k tomu, že jednou z hlavních předpokládaných hnacích sil při vytváření komplexu nepolárního adamantanu s β -CD je desolvatace povrchu adamantanu při vstupu do nepolární kavity CD, vykazují deriváty adamantanu vyšší tendenci tvorby inkluzních komplexů v polárnějším prostředí (vodě). Z tohoto důvodu nepřekvapuje pozorování značného nárůstu hodnoty asociační konstanty komplexace ligandu **17** v samotném pufru oproti směsi MeOH/ TRIS-HCl pufr. Dále byly naměřeny termodynamické parametry komplexu β -CD s benzimidazoliiovou „činkou“ **20**. Hodnota parametru n v tomto případě naznačuje tvorbu komplexu v poměru 1:1. Vzhledem k poněkud nižší hodnotě (0,77) než by odpovídalo uvedené stechiometrii – což může být způsobeno chybou při navažování nebo nedostatečně vysušenými látkami – bude nutné tento experiment opakovat a/nebo ověřit stechiometrii jinou nezávislou metodou, například NMR. Pokud by však ligand **20**

tvořil s β -CD komplex se stechiometrií 1:2 a obě vazebné pozice na molekule „činky“ by se vzájemně neovlivňovaly, měla by být hodnota parametru n rovna 0,5. Tento ligand byl použit i k měření komplexu s CB[7], což bude diskutováno později.

Tab. 8 - Termodynamické parametry komplexace imidazoliových ligandů s β -CD v soustavě MeOH/TRIS-HCl pufr (1/1, v/v) a čistém pufru při 303,15 K.

| <i>ligand</i> | <i>n</i> | <i>K</i> [M ⁻¹] | $-\Delta H$ [kJ.mol ⁻¹] | $-\Delta S$ [J.K ⁻¹ .mol ⁻¹] | $-\Delta AS$ [kJ.mol ⁻¹] | <i>c</i> _{CD} [mM] | <i>c</i> _{lig} [mM] |
|------------------------|-------------------|---------------------------------------|-------------------------------------|---|--------------------------------------|-----------------------------|------------------------------|
| <i>10</i> ^a | 1,14 ± 0,05 | 1230 ± 68 | 36,87 ± 2,47 | 62,39 | 18,91 | 0,3999 | 4,3753 |
| <i>11</i> ^b | 1,28 ± 0,02 | 1180 ± 38 | 31,94 ± 0,93 | 46,48 | 14,09 | 0,6400 | 7,0043 |
| <i>12</i> ^a | 1,00 ^f | 1550 ± 55 | 42,41 ± 1,03 | 78,72 | 23,86 | 0,1599 | 1,7461 |
| <i>13</i> ^b | 0,76 ± 0,02 | 1650 ± 45 | 41,84 ± 1,50 | 76,62 | 23,23 | 0,6397 | 6,9893 |
| <i>14</i> ^b | 1,12 ± 0,02 | 4280 ± 129 | 34,75 ± 0,78 | 45,22 | 13,71 | 0,2401 | 2,6254 |
| <i>15</i> ^b | 1,00 ± 0,03 | 4400 ± 162 | 50,83 ± 2,02 | 97,98 | 29,70 | 0,1600 | 1,7544 |
| <i>16</i> ^c | 1,20 ± 0,05 | 4290 ± 309 | 42,12 ± 2,76 | 69,50 | 21,07 | 0,1600 | 1,7529 |
| <i>17</i> ^b | 0,95 ± 0,07 | 874 ± 55 | 50,66 ± 4,87 | 110,96 | 33,64 | 0,6400 | 6,9948 |
| <i>17</i> ^d | 0,83 ± 0,02 | 1830 ± 69 | 25,15 ± 0,87 | 20,47 | 6,21 | 0,6407 | 7,0025 |
| <i>18</i> ^b | 0,94 ± 0,01 | 1690 ± 35 | 23,69 ± 0,42 | 16,37 | 4,96 | 0,6401 | 7,0043 |
| <i>19</i> ^c | 1,14 ± 0,07 | 3810 ± 342 | 45,51 ± 4,27 | 81,65 | 24,75 | 0,1601 | 1,7517 |
| <i>20</i> ^e | 0,77 ± 0,01 | 8.10 ⁴ ± 2.10 ³ | 48,86 ± 0,70 | 67,41 | 20,44 | 0,0376 | 0,3416 |

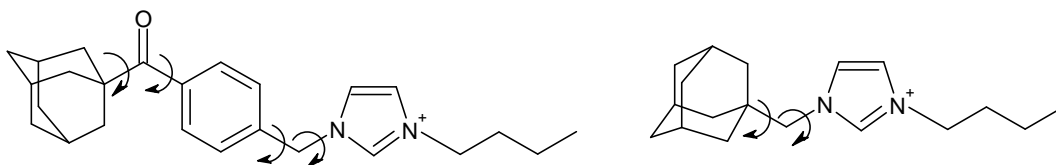
Solvent MeOH/TRIS-HCl pufr (1/1, v/v): ^a pufr (pH=7,21), ^b pufr (pH=7,31), ^c pufr (pH=6,99).

Solvent pouze TRIS-HCl pufr: ^d (pH=7,02), ^e (pH=6,99), ^f invariantní hodnota.

5.2.1 Kompenzační entalpie-entropie závislost

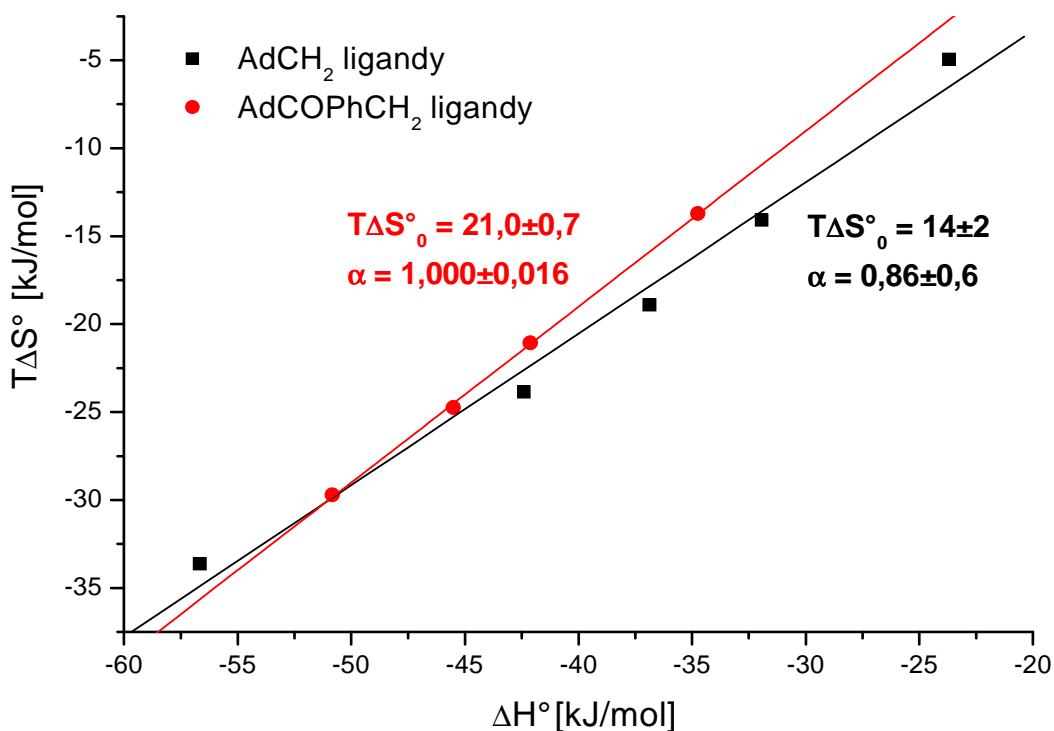
Směrnice α a $T\Delta S^\circ$ versus ΔH° grafická závislost indikuje do jaké míry entalpický zisk $\Delta\Delta H^\circ$ je rušený doprovodnou entropickou ztrátou $\Delta\Delta S^\circ$, z nichž obě jsou vyvolány změnou molekul hostitele, hosta a rozpouštědla. Jinými slovy i nepatrný entalpický příspěvek $(1 - \alpha)$ může přispět ke zvýšení stability komplexu. Na druhou stranu intercept ($T\Delta S^\circ_0$) představuje přirozenou stabilitu komplexu (ΔG°) při $H^\circ = 0$, což znamená, že komplex je stabilizován dokonce v nepřítomnosti entalpického zisku ($T\Delta S^\circ_0$ je pozitivní). Směrnice (α) a intercept ($T\Delta S^\circ_0$) regresní přímky je spojen se změnou konformačních stavů a mírou desolvatace při komplexaci.³⁸

Ze srovnávací analýzy termodynamických dat pro komplexy β -CD s imidazoliiovými ligandy byla určena směrnice α a intercept ($T\Delta S^\circ_0$). Ze získaných výsledků je zřejmé, že stupeň konformační změny AdCH₂ ligandů při komplexaci β -CD má méně stupňů volnosti než AdCOPhCH₂ ligandy, což souvisí s hodnotou směrnice α , pro AdCH₂ ligandy ($\alpha = 1,000 \pm 0,016$) a pro AdCOPhCH₂ ligandy ($\alpha = 0,86 \pm 0,6$). Při komplexaci AdCOPhCH₂ ligandů s β -CD dochází k výraznější desolvataci než při komplexaci s AdCH₂ ligandy, molekuly vody vázané na povrchu ligandů se uvolňují z prostoru vazebného místa cyklo-dextrinu do volného roztoku, čímž se zvyšuje neuspořádanost systému molekul a dochází k nárůstu celkové entropie.



Obr. 15 – Možné konformační změny na AdCOPhCH₂ a AdCH₂ ligandech

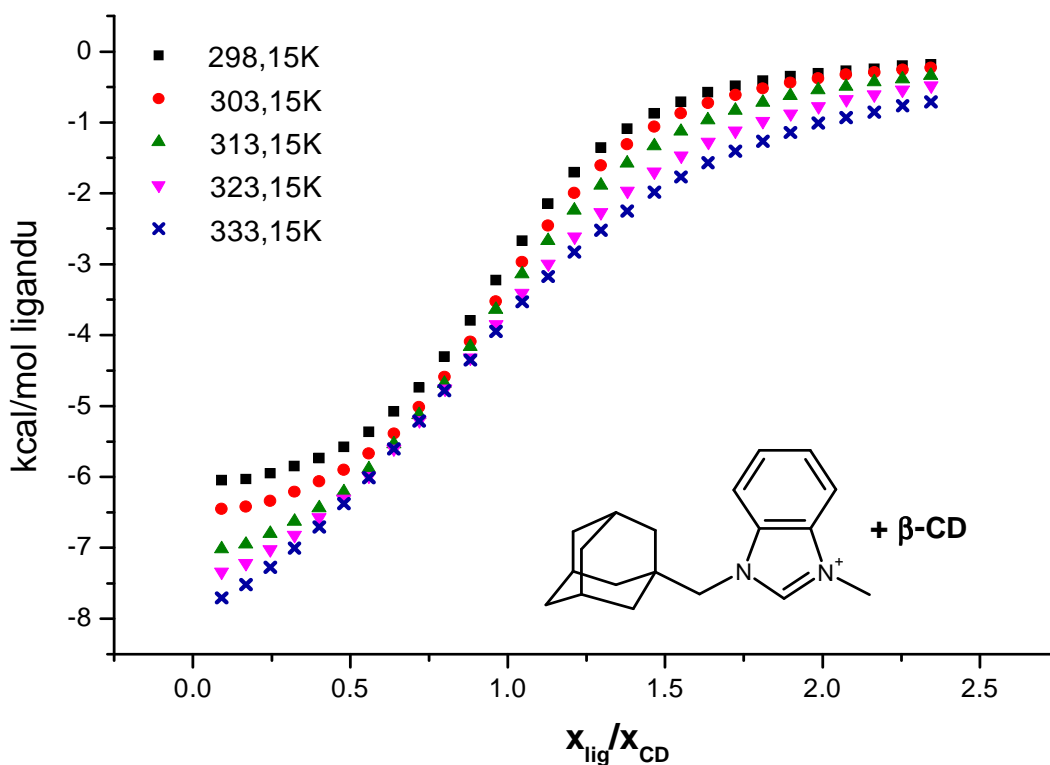
Graf 1 - Entalpie-Entropie kompenzační závislost β -CD komplexů se solemi imidazolia



5.3 Vliv teploty na tvorbu a stabilitu komplexu β -CD s 1-(1-adamantylmethyl)-3-methylbenzimidazolium jodidem

Vzhledem k velmi omezené rozpustnosti imidazoliových solí ve vodě, byl ke studiu vlivu teploty na komplexaci molekul vybrán 1-(1-adamantylmethyl)-3-methylbenzimidazolium jodid (**21**). Na systému β -CD s **21** v TRIS-HCl pufru (pH=7,21) byl pozorován vliv změny teploty na tvorbu supramolekulárního komplexu a jeho stabilitu. Termodynamické parametry komplexace jsou uvedeny v Tab. 9. Změna entropie ΔS při daných teplotách T je spojena se změnou v uspořádanosti systému molekul, se zvyšující se teplotou roste neuspořádanost systému. Molekuly imidazolia **21** se při vyšší teplotě pohybují s větší rychlostí, což ztěžuje inkudaci molekuly ligandu do kavity β -CD. Hodnota asociační konstanty klesá úměrně s rostoucí teplotou, tvoří se tedy méně stabilní komplexy. Z **Grafu 2** lze také pozorovat, jak se změnou teploty dochází k změně sklonu sigmoidální křivky, s rostoucí teplotou se snižuje strmota a křivka se narovňuje.

Graf 2 – Závislost integrovaných tepel na X_{lig} přidávaného k roztoku CD při různých T



Tab. 9 – Termodynamické parametry komplexace benzimidazoliového ligandu s β -CD v TRIS-HCl pufru (pH=7,21) v závislosti na T

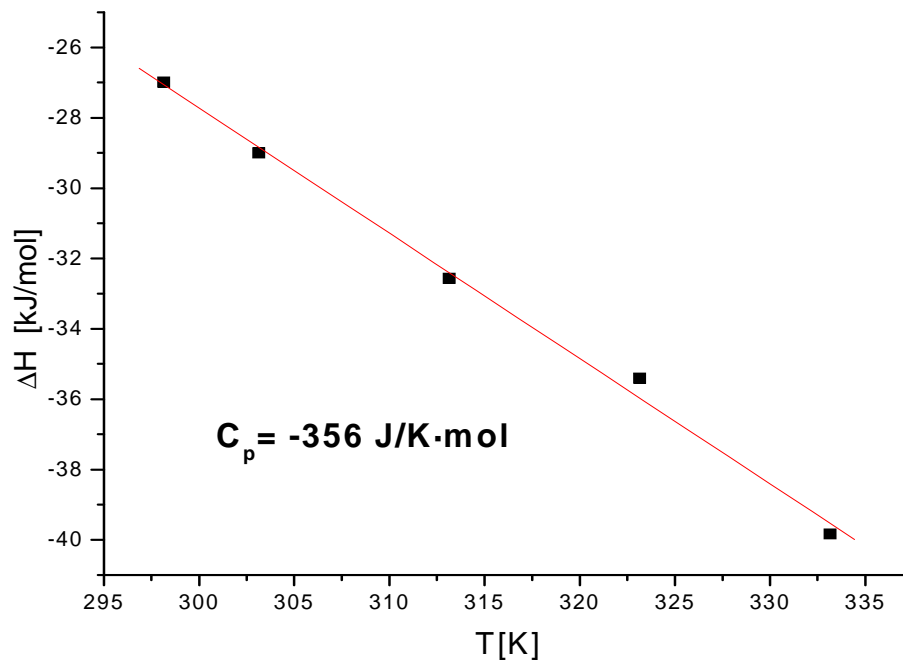
| T [K] | n | K · 10 ⁴ [M ⁻¹] | - ΔH [kJ.mol ⁻¹] | - ΔS [J.K ⁻¹ mol ⁻¹] | c _{CD} [mM] | c _{lig} [mM] |
|--------|---------------|--|--------------------------------------|---|----------------------|-----------------------|
| 298,15 | 0,988 ± 0,001 | 6,1 ± 0,6 | 26,99 ± 0,04 | 1,09 | 3,4996 | 0,3201 |
| 303,15 | 1,010 ± 0,001 | 5,2 ± 0,4 | 29,00 ± 0,04 | 5,40 | 3,4996 | 0,3201 |
| 313,15 | 0,996 ± 0,014 | 3,4 ± 0,3 | 32,57 ± 0,06 | 17,21 | 3,4996 | 0,3201 |
| 323,15 | 1,020 ± 0,001 | 2,29 ± 0,13 | 35,41 ± 0,05 | 26,17 | 3,5009 | 0,3201 |
| 333,15 | 1,010 ± 0,002 | 1,49 ± 0,13 | 39,84 ± 0,11 | 39,73 | 3,4996 | 0,3201 |

5.3.1 Závislost ΔH na teplotě

Z Grafu 3 závislosti změny asociační entalpie na teplotě je možné odečíst (dle diferenciálního tvaru rovnice 6, za předpokladu konstantní tepelné kapacity v daném teplotním rozsahu) tepelnou kapacitu asociace jakožto směrnici proložené přímkou. Bylo prokázáno,³⁹ že tato tepelná kapacita má vztah k procesům, které nastávají během tvorby inkluzních komplexů. Pokud je vznik komplexu provázen dehydratací nepolárního ligandu, který vstupuje do kavity hostitelské molekuly, je zjištěná tepelná kapacita výrazně záporná.⁴⁰

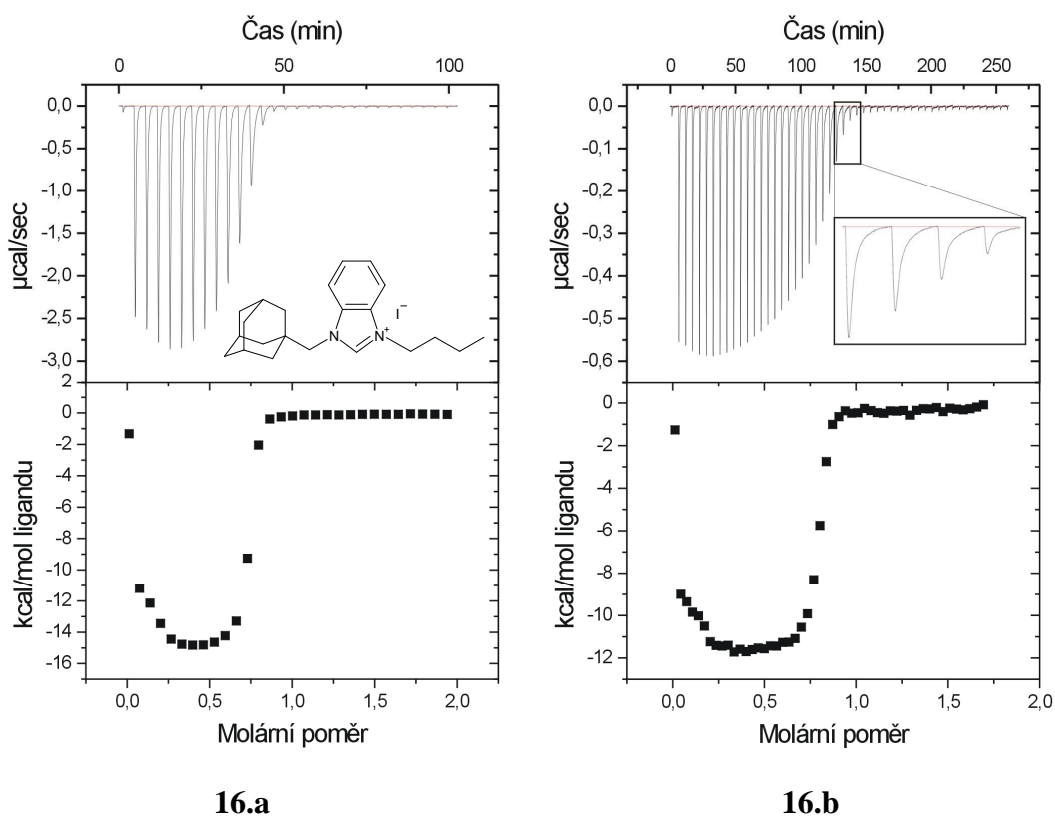
Povrch molekuly adamantanu je silně hydratovaný, při přechodu do nepolární kavity CD dochází k desolvataci a s tím souvisejícímu nárůstu entropie. Aby mohly molekuly vody přijít do kontaktu s nepolárním povrchem, musí být ve vodě přerušeny vodíkové vazby. Velká záporná hodnota ΔC_p naznačuje, že značná část, ne-li celý povrch hosta (adamantanu) je během komplexační reakce desolvatován a v komplexu je v přímém kontaktu s vnitřní částí kavity cyklodextrinu. V našem případě byla naměřena tepelná kapacita $\Delta C_p = -356 \text{ J.K}^{-1}.\text{mol}^{-1}$ asociace β -CD s 1-(1-adamantylmethyl)-3-methylbenzimidazolium jodidem v TRIS/HCl-pufu (pH = 7,21), což je porovnatelné s hodnotou tepelné kapacity $\Delta C_p = -625 \text{ J.K}^{-1}.\text{mol}^{-1}$ asociace α -CD s (+)-kafrem v H₂O(ref.⁴⁰).

Graf 3 - Závislost ΔH na T při komplexaci β -CD s 1-(1-adamantylmethyl)-3-methylbenzimidazolium jodidem v TRIS/HCl pufru (pH=7,21)



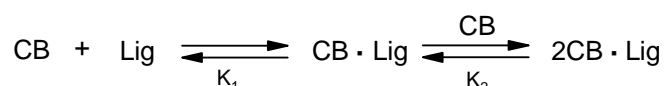
5.4 Supramolekulární komplexy s CB[n]

Bylo zjištěno, že mezi CB[7] a 1-(1-adamantylmethyl)-3-butylbenzimidazolium jodidem v TRIS/HCl pufru (pH=6,99) dochází k tvorbě supramolekulárního komplexu. Na Obr. 16 je v případě **16.a** znázorněn průběh titrace za běžných podmínek. Na Obr. **16.b** je uveden výsledek interakce stejného ligandu **17** s CB[7], ale za rozdílných podmínek (nižší koncentrace, menší objem a tím i zvýšený počet jednotlivých přidavků a delší interval mezi jednotlivými přidavky). Snížení objemu přidavků bylo provedeno za účelem omezení nebo odstranění pomalého ustavování rovnováhy, tak aby píky po jednotlivých přidavcích dosáhly base line. V tomto případě byly naměřeny významné tepelné efekty pro jednotlivé přidavky ligandu k roztoku CB[7] asociační konstanta pro tuto reakci činí řádově $K \sim 10^7 \text{ M}^{-1}$, což vypovídá o vysoké stabilitě vytvořeného komplexu. Interpretaci ostatních termodynamických parametrů však znemožňuje podstatně opožděná ekvilibrace, jak lze vidět na Obr. **16.b** (dochází k propojení ploch jednotlivých píků). Po modifikaci podmínek experimentu (koncentrace, typ a složení rozpouštědla, velikost přidavků,...) bude snad možné změřit přesně termodynamické parametry této komplexační reakce.

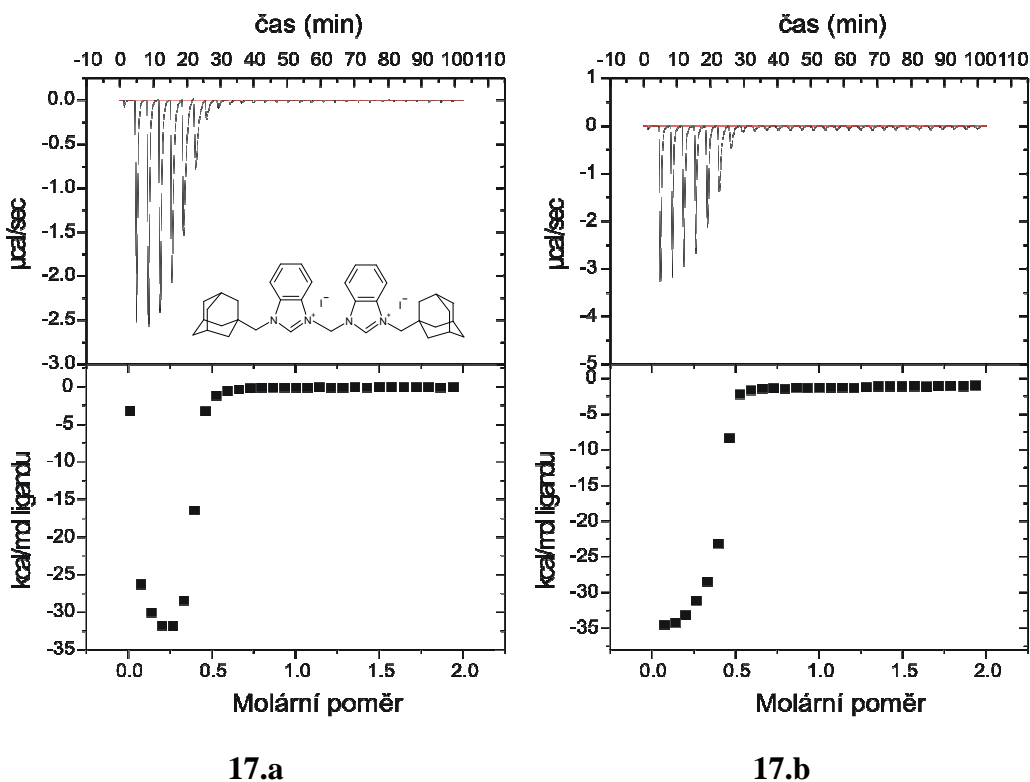


Obr. 16 – Komplex CB[7] s benzimidazoliovou solí **17**

ITC měřením bylo zjištěno, že mezi benzimidazoliovou „činkou“ **20** a CB[7] v TRIS/HCl pufru (pH=6,99) dochází k tvorbě supramolekulárního komplexu. Výběr modelu k vyhodnocení experimentu je závislý na počtu a charakteru vazebných míst molekuly ligandu **20**. Reakci lze analyzovat za použití běžného modelu tvorby komplexu 1:2, i když tomu výsledek měření na Obr.17 neodpovídá. Pokud je naše hypotéza správná, tak jsou obě vazebná místa na molekule **20** identická, takže se molekula CB[7] váže na obě místa se stejnou silou, tedy asociační konstanta $K_1 = K_2 \sim 10^7 \text{ M}^{-1}$.

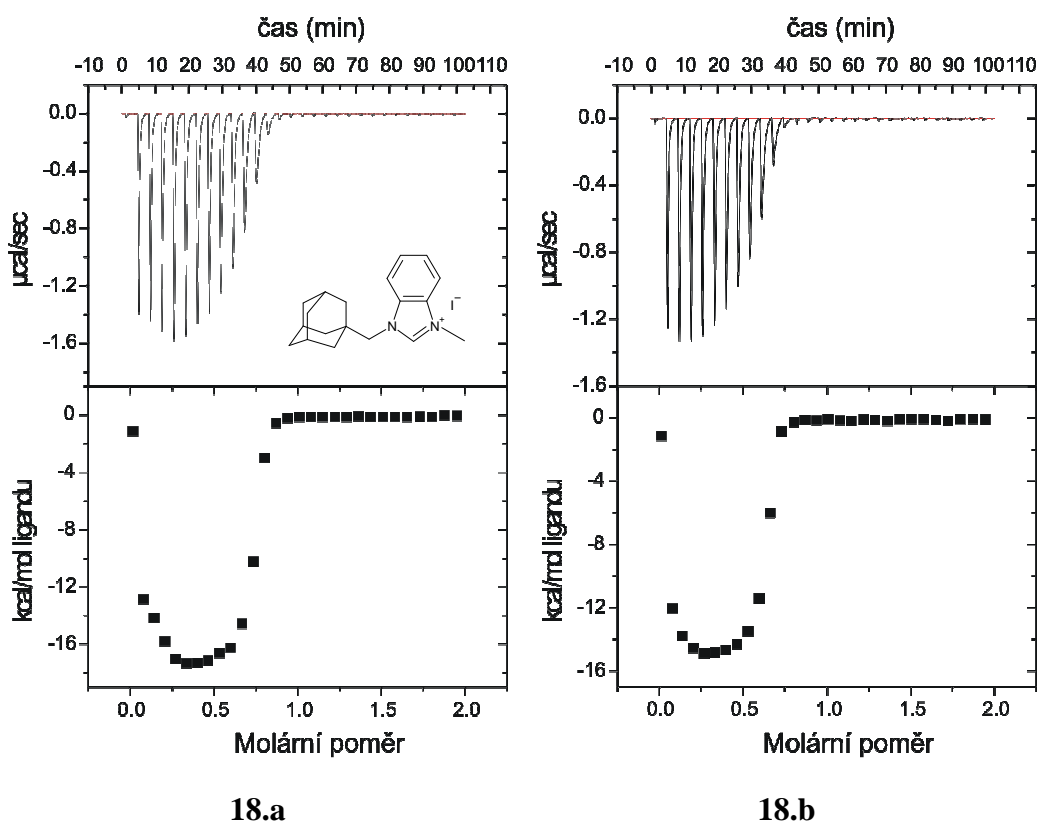


Stejně jako v předešlém experimentu na Obr.17.a je jednou z příčin neúspěšné titrace velmi pomalé ustanovování rovnováhy (ekvilibrace). V návaznosti na toto měření byl proveden experiment se stejným ligandem za identických podmínek (rozpuštědlo teplota, koncentrace, ...), ale s rozdílnou hostitelskou makromolekulou (β -CD), v tomto případě dochází jednoznačně k tvorbě komplexu 1:1. Další snahou bylo upravit složení roztoku rozpuštědla, k pufru byl přidán DMSO v poměru (1:9) DMSO/TRIS/HCl pufr a následně (3:7) Obr.17.b, ale ani tato změna nevedla k výraznému zlepšení.



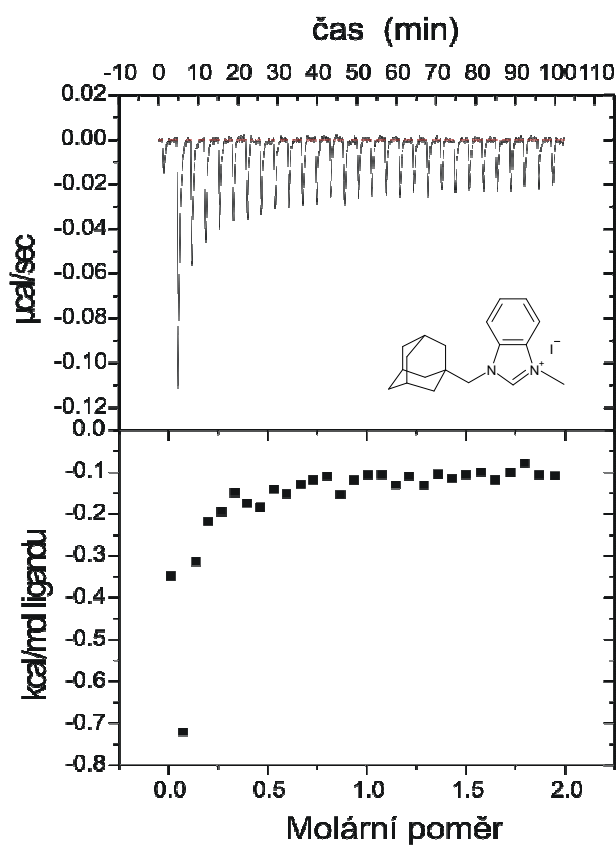
Obr. 17 – Komplex CB[7] s benzimidazoliovou „činkou“

Také byla měřena interakce mezi CB[7] a molekulou 1-(1-adamantylmethyl)-3-methylbenzimidazolium jodidem, která byla vyrobena jako modelový ligand ke studiu komplexačních reakcí s cucurbiturily. Bylo zjištěno, že CB[7] tvoří s **21** v TRIS/HCl pufru (pH=7,21) supramolekulární komplex. Velmi pomalé ustavování rovnováhy (ekvilibrace) neumožnilo vyhodnotit všechny termodynamické parametry, ale hodnota asociační konstanty lze odhadnout řádově na $K \sim 10^7 \text{ M}^{-1}$. Z tohoto důvodu byly upraveny podmínky měření, nejdřív změnou koncentrace ligandu i CB[7], poté úpravou složení rozpouštědla přidávkem NaCl (50mM NaCl v TRIS/HCl pufru). Modifikací podmínek měření, při kterých byl experiment proveden, došlo jen k nepatrnému zlepšení, jak lze pozorovat na Obr.18.



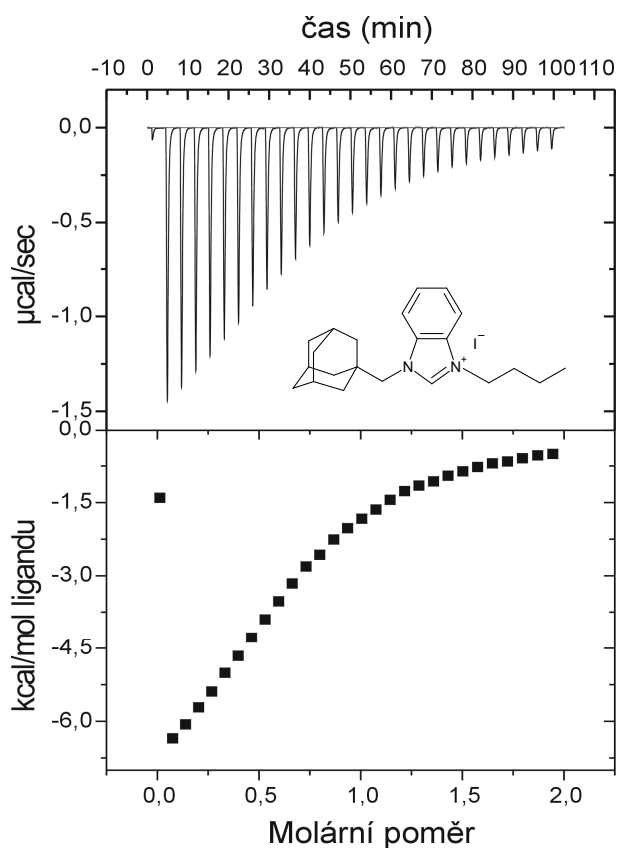
Obr. 18 – Komplex CB[7] s benzimidazoliovou solí **21**

V návaznosti na předchozí experiment s CB[7] byla měřena mezi Me₆CB[6] a ligandem **21**. Při vzájemné interakci molekul bylo uvolněno jen velmi malé reakční teplo, což je viditelné z poměru píků a změn velmi nestabilní základní čáry (base line) na Obr. 19. Z praktického hlediska vzato mezi molekulami nedochází k měřitelné interakci. Tento experiment potvrdil předem očekávaný výsledek. Rozměry kavity Me₆CB[6] neumožní inklu-daci molekuly hosta **21**, pro adamantanový skelet je kavita Me₆CB[6] příliš malá a na opačném konci molekuly je délka funkční skupiny (methyl) příliš krátká, aby se na ní moh-la navázat molekula Me₆CB[6]. A tedy k tvorbě komplexu nedochází.



Obr. 19 – Výsledek měření interakce mezi Me₆CB[6] a benzimidazoliovou solí **21**

Z výsledků experimentu bylo zjištěno, že mezi $\text{Me}_6\text{CB}[6]$ a molekulou hosta **17** v TRIS/HCl pufru ($\text{pH}=6,99$) dochází k tvorbě supramolekulárního komplexu. V tomto případě byly naměřeny významné tepelné efekty pro jednotlivé přídavky ligandu k roztoku $\text{Me}_6\text{CB}[6]$. Reakce byla analyzovaná za použití běžného modelu tvorby komplexu 1:1, nízká hodnota stechiometrie n komplexu ($n = 0,675 \pm 0,003$) je patrně způsobená špatným navažováním nebo nedostatečným vysušením $\text{Me}_6\text{CB}[6]$. Pro tento komplex byly naměřeny tyto hodnoty termodynamických parametrů: $K = 6,2 \pm 0,9 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$, $\Delta H = -34,9 \pm 0,2 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ a $\Delta S = -23 \text{ J} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$.



Obr. 20 – Komplex $\text{Me}_6\text{CB}[6]$
s benzimidazoliovou solí

ZÁVĚR

Pomocí metody ITC se podařilo ve směsi DMSO/H₂O (3/1, v/v) prokázat vznik očekávaných supramolekulárních komplexů 1-adamantylaminů s β -CD. Z hlediska stability studovaných komplexů jsou tedy výhodnější ligandy s delším nepolárním řetězcem mezi adamantanovým skeletem a zbytkem molekuly. Naměřené termodynamické parametry komplexačních reakcí jsou součástí publikace přijaté do tisku v časopise *Supramolecular Chemistry*.

Dále byly studovány pomocí ITC techniky interakce β -CD se solemi imidazolia a benzimidazolia s jodidovým, bromidovým a mesylátovým aniontem. Metodou ITC byly stanoveny termodynamické parametry téměř všech solí imidazolia, výjimku tvoří pouze 1-(1-adamantylmethyl)-3-butylbenzimidazolium bromid. ITC metodou bylo zjištěno, že přítomnost rozdílných aniontů u 1-(4-(1-adamantylkarbonyl)-benzyl)-3-butylimidazoliových solí při tvorbě komplexů s β -CD nemá prokazatelně žádný vliv na jejich stabilitu, asociační konstanta u všech dosahuje řádově $K \sim 4 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$. Zatímco hodnoty asociačních konstant pro 1-(1-adamantylmethyl)-3-butylimidazolium jodid a bromid se v podstatě neliší, mesylát tvoří nepatrně stabilnější komplex s β -CD asociační konstanta pro 1-(1-adamantylmethyl)-3-butylbenzimidazolium mesylát je dvakrát větší než pro jodid. Dále byly stanoveny termodynamické parametry komplexačních reakcí benzimidazoliových ligandů, kde jako prostředí pro titrace byl použit pouze TRIS-HCl pufr. ITC měřením bylo prokázáno, že deriváty adamantanu mají vyšší tendenci tvorby inkluzních komplexů v polárnějším prostředí (vodě) – hodnota asociační konstanty pro komplex 1-(1-adamantylmethyl)-3-butylbenzimidazolium jodidu s β -CD měřená v čistém pufru je dvakrát větší než ve směsi TRIS/HCl pufr.

Měřením interakce mezi β -CD a 1-(1-adamantylmethyl)-3-methylbenzimidazolium jodidem za různých teplot bylo zjištěno, že hodnota asociační konstanty klesá úměrně s rostoucí teplotou, tedy dochází ke snížení stability komplexu.

Dále byly měřeny interakce mezi CB[n] (CB[7] a Me₆CB[6]) a benzimidazoliovými solemi v čistém TRIS-HCl pufru. Úspěšným měřením byl prokázán vznik supramolekulárního komplexu Me₆CB[6] s 1-(1-adamantylmethyl)-3-butylbenzimidazolium jodidem. Také byly měřeny interakce benzimidazoliových ligandů s CB[7], interpretaci naměřených výsledků však komplikovala velmi pomalá ekvilibrace (jeden pík přechází plynule v druhý

bez dosažení base line). Pomalé ustavování rovnováhy neumožnilo vyhodnotit všechny termodynamické parametry, ale hodnota asociační konstanty lze odhadnout řádově na $K \sim 10^7 \text{ M}^{-1}$. Z výsledků studia interakcí mezi CB[n] a adamantanovými ligandy lze usoudit na vysoce specifický způsob vazby jednotlivých komponent, kdy malá kavita $\text{Me}_6\text{CB}[6]$ nekomplexuje adamantanový skelet ani methylový substituent. Na druhou stranu větší kavita CB[7] váže selektivně adamantanový substituent. Do budoucna bude tedy hlavním úkolem nalezení alternativních podmínek pro měření všech termodynamických parametrů komplexačních reakcí s CB[7] (např. úprava složení rozpouštědla nebo nalezení vhodnějšího rozpouštědla a další modifikací procesních podmínek). Protože 1-(1-adamantylmethyl)-3-methylbenzimidazolium jodid interaguje pouze s CB[7] a ne s $\text{Me}_6\text{CB}[6]$ mohl by se použít jako templát pro syntézu CB[7].

Benzimidazoliová „činka“ tvoří β -CD komplex v poměru 1:1, ale bude to třeba ještě ověřit jinou nezávislou metodou, například NMR s CB[7] tvoří komplex 1:2 s jedinou asociační konstantou ($K_1 = K_2$). Z čehož plyne, že obě místa na benzimidazoliové „čince“ jsou identická.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

| | |
|-------|---|
| CD | Cyklodextrin |
| CB[n] | Cucurbit[n]uril, kde n udává počet jednotek glykolurilu |
| ITC | Izotermální titrační kalorimetrie |
| DMSO | dimethylsulfoxid |
| TRIS | tris(hydroxymethyl)aminomethan - $C_4H_{11}NO_3$ |
| PE | petrolether |
| DEE | diethylether |
| EA | ethyl-acetát |
| RVO | rotační vakuová odparka |
| TLC | chromatografie na tenké vrstvě |

SEZNAM OBRÁZKŮ

| | |
|---|----|
| Obr. 1 - Vznik cyclodextrinu degradací amylosy | 5 |
| Obr. 2 - Tvar molekuly α -, β - a γ -CD | 6 |
| Obr. 3 - Schématické znázornění komplexů možných stechiometrií ³ | 8 |
| Obr. 4 - Schématické znázornění CD jako nosiče léčiva..... | 10 |
| Obr. 5 - Cytostatikum LA 12 | 11 |
| Obr. 6 – Diagram rozpustnosti..... | 12 |
| Obr. 7 - CB[n], n = 5-10 | 13 |
| Obr. 8 - Rentgenové krystalové struktury CB[n] (n = 5-8) ¹⁹ | 13 |
| Obr. 9 - Me ₆ CB[6] | 15 |
| Obr. 10 - Drátový model MeV ²⁺ Me ₆ CB[6] komplexu ²⁴ | 15 |
| Obr. 11 - Elektrostatický potenciál povrchu (a) CB[7] a (b) β -CD ¹⁹ | 21 |
| Obr. 12 – Modelová sigmoidální titrační křivka..... | 26 |
| Obr. 13 – Komplikace při měření | 42 |
| Obr. 14 –Korektní výsledek ITC experimentu..... | 43 |
| Obr. 15 – Možné konformační změny na AdCOPhCH ₂ a AdCH ₂ ligandech..... | 47 |
| Obr. 16 – Komplex CB[7] s benzimidazoliovou solí 17 | 51 |
| Obr. 17 – Komplex CB[7] s benzimidazoliovou „činkou“ | 52 |
| Obr. 18 – Komplex CB[7] s benzimidazoliovou solí 21 | 53 |
| Obr. 19 – Výsledek měření interakce mezi..... | 54 |
| Obr. 20 – Komplex Me ₆ CB[6]..... | 55 |

SEZNAM TABULEK

| | |
|--|----|
| Tab. 1. Fyzikálně-chemické vlastnosti a rozměry kavit α -, β - a γ -CD..... | 6 |
| Tab. 2 - Konstanty stability vybraných inkluzních komplexů α -, β - a γ -CD ¹² | 9 |
| Tab. 3 - Struktura a vlastnosti CD využívaných ve farmacii | 11 |
| Tab. 4 - Strukturní parametry CB[n] (n = 5-8) | 14 |
| Tab. 5 - 1-adamantylaniliny použité k měření | 32 |
| Tab. 6 - Experimentální a publikované hodnoty parametrů interakce AdNH ₃ ⁺ Cl ⁻ s β - CD | 40 |
| Tab. 7 - Termodynamické parametry komplexů β -CD s 1 adamantylaminy v DMSO/H ₂ O (3/1, v/v) při 303,15 K..... | 44 |
| Tab. 8 - Termodynamické parametry komplexace imidazoliových ligandů s β -CD v soustavě MeOH/TRIS-HCl pufr (1/1, v/v) a čistém pufru při 303,15 K..... | 46 |
| Tab. 9 – Termodynamické parametry komplexace benzimidazoliového ligandu s β - CD v TRIS-HCl pufru (pH=7,21) v závislosti na T | 49 |

SEZNAM PŘÍLOH

Příloha 1 - Abstrakt článku

PŘÍLOHA P I: ABSTRAKT ČLÁNKU

(manuskript článku se nachází na CD přiloženém k Diplomové práci)

Novel Adamantane-Bearing Anilines and Properties of Their Supramolecular Complexes with β -Cyclodextrin

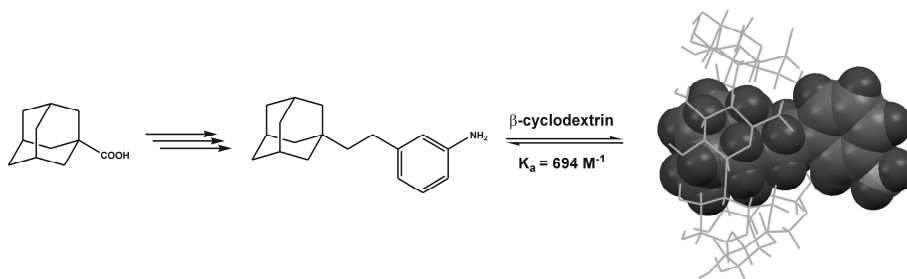
Robert Vícha^{a,*}, Michal Rouchal^a, Zuzana Kozubková^a, Ivo Kuřitka^b, Radek Marek^{c,d}, Petra Branná^a and Richard Čmelík^e

^a) Department of Chemistry, Faculty of Technology, Tomas Bata University in Zlín, Náměstí T. G. Masaryka 275, 76001 Zlín, Czech Republic ^b) Polymer Centre, Faculty of Technology, Tomas Bata University in Zlín, Náměstí T. G. Masaryka 275, 76001 Zlín, Czech Republic ^c) National Centre for Biomolecular Research, Masaryk University, Kamenice 5/A4, 62500 Brno, Czech Republic ^d) Central European Institute of Technology (CEITEC), Masaryk University, Kamenice 5/A4, 62500 Brno, Czech Republic ^e) Institute of Analytical Chemistry of the ASCR, v.v.i., Veverčí 97, 60200 Brno, Czech Republic

Abstract

Several novel anilines bearing 1-adamantyl substituents that are useful for drug modification were synthesised from the corresponding 1-adamantyl (nitrophenyl) ketones. The host-guest systems of these prepared ligands with β -cyclodextrin were studied using ESI-MS, NMR spectroscopy, titration calorimetry, and semi-empirical calculations. The complexes with 1:1 stoichiometry were found to predominantly exist as pseudorotaxane-like threaded structures with the adamantane cage sitting deep in the cavity of β -cyclodextrin close to the wider rim. Such geometry was observed for all examined amines and is independent of their structure and/or presence of protic substituents.

Keywords: adamantane; amines; cyclodextrins; host-guest systems



Accepted for *Supramolecular Chemistry* on April 11th, 2011.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- ¹ C. Hofr., *Čes. čas. fyz.*, **2006**, *56*, 288-292.
- ² M. E. Brewster, T. Loftsson, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **2007**, *59*, 645–666.
- ³ Postgraduální kurs Supramolekulární chemie I., Kapitola 8, UOCHB AVČR Praha, **2004**.
- ⁴ G. Crini, M. Morcellet, *J. Sep. Sci.*, **2002**, *25*, 789–813.
- ⁵ K. Harata, *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 1803-1827.
- ⁶ J. Szejtli, *Pure Appl. Chem.*, **2004**, *76*, 1825–1845.
- ⁷ H. Dodziuk: *Cyclodextrins and their complexes: chemistry, analytical methods, applications*. Weinheim: Wiley-VCH, **2006**, Kapitola 2, ISBN 3-527-31280-3.
- ⁸ Ch. J. Easton, S. F. Lincoln: *Modified Cyclodextrins – Scaffolds and Templates for Supramolecular Chemistry*, Imperial College Press, London, **1999**, ISBN 978-1-86094-144-3.
- ⁹ A. R. Khan, P. Forgo, K. J. Stine, and V. T. D'Souza, *J. Macromol. Sci., Part A, Chem. Rev.* **1998**, *98*, 1977-1996.
- ¹⁰ K. Kawakami, K. Miyoshi, Y. Ida, *J. Pharm. Sci.*, **2004**, *93*, 1471.
- ¹¹ M. Otyepka, V. Kryštof, L. Havlíček, V. Siglerová, M. Strnad, J. Koča *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 13, 2506-2513.
- ¹² M. V. Rekharsky, Y. Inoue: *Chem. Rev.* **1998**, *5*, 1875–1917.
- ¹³ U. Kaneto, H. Fumitoshi, and I. Tetsumi, *Chem. Rev.*, **1998**, *5*, 2045-2076.
- ¹⁴ S. A. Charman, C. S. Perry, F. C. K. Chiu, K. A. Mcintos, R. J. Pranker, W. N. Charman, *J. Pharm. Sci.*, *95*, **2005**, T. Schlupe, J. Cheng, K. T. Khin, M. E. Davis, *Cancer Chemother. Pharmacol.*, *57*, **2006**, K. Uekama, *Chem. Pharm. Bull.* *52*, **2004**.
- ¹⁵ L. Okáčová, D. Vetchý, A. Franc, M. Rabišková, *Chem. Listy*, **2011**, *105*, 34-40.
- ¹⁶ F. W. H. M. Merkus, J. C. Verhoef, S. G. Romeijn, N. G. M. Schipper: *Pharm. Res.*, **1991** *8*, 588.
- ¹⁷ J. Szejtli, *Kluwer Academic Publisher*, Dordrecht, **1988**.
- ¹⁸ A. Chakraborty, A. Wu, D. Witt, J. Lagona, J. C. Fetting, and L. Isaacs, *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, *124*, 8297.

-
- ¹⁹ Y. Liu, X.-Y. Li, H.-Y. Zhang, Ch.-J. Li, and F. Ding, *J. Org. Chem.*, **2007**, *72*, 3640-3645.
- ²⁰ J. W. Lee, S. Samal, N. Selvapalam, H. J. Kim, and K. Kim, *Acc. Chem. Res.*, **2003**, *36*, 621-630.
- ²¹ A. Day, A. P. Arnold, R. J. Blanch, B. Snushall, *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 8094-8100.
- ²² K. Kim, N. Selvapalam, Y. H. Ko, K. M. Park, D. Kim, J. Kim *Chem. Soc. Rev.*, **2007**, *36*, 267-279.
- ²³ Y.-M. Jeon, J. Kim, D. Whang, K. Kim, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 9790-9791.
- ²⁴ J. Lagona, P. Mukhopadhyay, S. Chakrabarti, and L. Isaacs, *Angew. Chem.* **2005**, *44*, 4844-4870.
- ²⁵ M. S. A. Khan, D. Heger, M. Necas, and V. Sindelar, *J. Phys. Chem. B*, **2009**, *113*, 11054–11057.
- ²⁶ A. I. Day, A. P. Arnold, R. J. Blanch, *Molecules*, **2003**, *8*, 74–84.
- ²⁷ W. A. Freeman, W. L. Mock, N.-Y. Shih, *J. Am. Chem. Soc.*, **1981**, *103*, 7367.
- ²⁸ J. Kim, I.-S. Jung, S.-Y. Kim; E. Lee, J.-K. Kang, S. Sakamoto, K. Yamaguchi, K. Kim, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 540-541.
- ²⁹ H.-J. Buschmann, E. Cleve, K. Jansen, E. Schollmeyer, *Anal. Chem. Acta*, **2001**, *437*, 157.
- ³⁰ B. Honig, A. Nicholls, *Science* **1995**, *268*, 1144–1149.
- ³¹ Y. Inoue; T. Wada, *Adv. in Supramolecular Chemistry*; **1997**, *4*, 55-96.
- ³² P. D. Ross; M. V. Rekharsky, *Biophys. J.* **1996**, *71*, 2144-2154.
- ³³ D. Hallén, A. Schön, I. Shehatta, I. Wadsö, *J. Chem. Soc.*, **1992**, *88*, 2859-2863.
- ³⁴ M. Bastos, L.-E. Briggner, I. Shehatta, I. Wadsö, *J. Chem. Thermodyn.* **1990**, *22*, 1181-1190.
- ³⁵ J. McMurry, *Organická chemie. Vyd. 1.* Brno: VUTIUM, **2007**, ISBN 978-80-214-3291-8.
- ³⁶ Ch. Schalley, *Analytical Methods in Supramolecular Chemistry*, Kapitola 3, Weinheim: Wiley-VCH, **2007**, ISBN 978-3-527-31505-5.
- ³⁷ M. Weickenmeier, G. Wenz: *Macromol. Rapid Commun.* **1996**, *17*, 731–736.

-
- ³⁸ H. Dodziuk: *Cyclodextrins and their complexes : chemistry, analytical methods, applications.*, Kapitola 8, Weinheim : Wiley-VCH, **2006**, ISBN 3-527-31280-3.
- ³⁹ N. T. Southall and K. A. Dill, *J. Phys. Chem. B*, **2000**, *104*, 1331.
- ⁴⁰ F. P. Schmidtchen, *Chem. Eur. J.* **2002**, *8*, 3522-3529.

Publikační výstupy:

1. J. Černochová, M. Rouchal, P. Branná, R. Marek, I. Kuřitka, R. Vícha: Synthesis of imidazolium salts bearing 1-adamantyl substituent and properties of their complexes with β -cyclodextrin *Conference Plastko, Zlín* **2010**, page 249, ISBN 978-80-7318-909-9
2. R. Vícha, M. Rouchal, Z. Kozubková, I. Kuřitka, R. Marek, P. Branná a R. Čmelík: Novel Adamantane-Bearing Aniline and Properties of Their Supramolecular Complexes with β -Cyclodextrin, *Supramolecular chemistry*, **2011**