Studium tvorby inkluzních komplexů vybraných flavonoidů s cyklodextriny

Bc. Adriana Ščurková

Diplomová práce
2017

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav technologie potravin
akademický rok: 2016/2017

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení:	**Bc. Adriana Ščurková**
Osobní číslo:	**T15307**
Studijní program:	**N2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor:	**Technologie potravin**
Forma studia:	**prezenční**
Téma práce:	**Studium tvorby inkluzních komplexů vybraných flavonoidů s cyklodextriny**

Zásady pro vypracování:

I. Teoretická část:

1. Stručná charakteristika flavonoidů a cyklodextrinů.
2. Metody stanovení supramolekulárních komplexů.
3. Zpracování literární rešerše o doposud popsaných typech supramolekulárních komplexů mezi flavony a cyklodextriny.

II. Praktická část:

1. Syntetizovat flavon a provést jeho úplnou strukturní charakterizaci.
2. Připravit a uskutečnit sérii experimentů s cílem popsat možnosti tvorby a fyzikálně-chemické vlastnosti supramolekulárních komplexů mezi cyklodextriny a flavonoidy.
3. Získané výsledky zpracovat, vyhodnotit a provést jejich interpretaci.

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

[1] ANDERSEN, O. M., MARKHAM, K. R. Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications. 2006, CRC Press, Taylor & Francis. ISBN 0-8493-2021-6.
[2] DODZIUK, H. Cyclodextrins and Their Complexes. 2006. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim. ISBN 3-527-31280-3.
[3] SCHALLEY, C. Analytical Methods in Supramolecular Chemistry. 2007. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim. ISBN 978-3-527-31505-5.

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

Datum zadání diplomové práce: **3. února 2017**

Termín odevzdání diplomové práce: **28. dubna 2017**

Ve Zlíně dne 3. února 2017

L.S.

UNIVERZITA TOMÁŠE BATI VE ZLÍNĚ Fakulta technologická

doc. Ing. František Buňka, Ph.D.
děkan

doc. Ing. František Buňka, Ph.D.
ředitel ústavu

Příjmení a jméno: ŠČURKOVÁ ADRIANA Obor: TECHNOLOGIE POTRAVIN

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 10.4.2017 A. Ščurková

[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 nevýdělečně 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 vzdělávacího 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

Diplomová práce se v teoretické části zabývá charakteristikou flavonoidů, cyklodextrinů a tvorbou supramolekulárních komplexů mezi těmito látkami. Cílem experimentální části byla syntéza flavonu a jeho úplná charakterizace pomocí IR, GC-MS, ESI-MS a NMR. Flavon spolu s kvercetinem představují ligandy, u kterých byla pomocí hmotnostní spektrometrie studována schopnost vytvářet supramolekulární komplexy s cyklodextriny. Kvercetin představuje významný antioxidant, a proto byla spektrofotometricky provedena analýza antioxidační aktivity samotného kvercetinu a jeho komplexů s nativními cyklodextriny.

Klíčová slova: flavonoidy, cyklodextriny, inkluzní komplex, supramolekulární, flavon, kvercetin, hmotnostní spektrometrie, antioxidační aktivita

ABSTRACT

In the theoretical part of this diploma thesis the characterization of flavonoids and cyclodextrins as well as the formation of supramolecular complexes between these substances, is described. The first aim of the experimental part was to synthesize flavone and make its complete structural characterization by IR, GC-MS, ESI-MS and NMR. The ability of both flavone and quercetin formed supramolecular complexes with native cyclodextrins have been subsequently studied using mass spectrometry. Finally, the antioxidant activity of quercetin and its complexes with native cyclodextrins was studied by spectrophotometric analysis.

Keys words: flavonoids, cyclodextrins, inclusion complex, supramolecular, flavone, quercetin, mass spectrometry, antioxidant activity

Poděkování

Na tomto místě bych velmi ráda poděkovala svému vedoucímu Ing. Michalovi Rouchalovi Ph.D. za odborné vedení, cenné rady, trpělivost a ochotu v průběhu celé práce. Dále pak Mgr. Robertovi Víchovi Ph.D. za měření NMR spekter na Ústavu chemie Přírodovědné fakulty MU v Brně. Děkuji také Ing. Lence Fojtíkové za konzultace při měření antioxidační aktivity, paní Haně Geržové za asistenci při měření IR spekter a celému kolektivu z laboratoře č. 409 za ochotu kdykoli pomoci.

Ještě jednou všem mnohokrát děkuji za čas, který mi věnovali, neboť čas je to nejcennější, co člověk může druhému darovat.

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

OBSAH

ÚVOD **10**
I TEORETICKÁ ČÁST **11**
1 FLAVONOIDY **12**
1.1 CHEMICKÁ STRUKTURA FLAVONOIDŮ 13
1.2 KLASIFIKACE FLAVONOIDŮ 14
1.2.1 Flavonoly 14
1.2.2 Flavony 15
1.2.3 Flavanony 16
1.2.4 Flavanoly 17
1.2.5 Isoflavony 18
1.2.6 Anthokyanidiny 18
1.3 BIOLOGICKÁ AKTIVITA FLAVONOIDŮ 20
1.3.1 Antioxidační aktivita 20
1.3.2 Antimikrobiální aktivita flavonoidů 21
2 CYKLODEXTRINY **23**
2.1 HISTORIE OBJEVU A OBJASNĚNÍ STRUKTURY CYKLODEXTRINŮ 23
2.2 CHARAKTERISTIKA A STRUKTURA CYKLODEXTRINŮ 24
2.3 FYZIKÁLNĚ-CHEMICKÉ VLASTNOSTI CYKLODEXTRINŮ 25
2.4 TVORBA SUPRAMOLEKULÁRNÍCH KOMPLEXŮ 26
2.5 METODY STANOVENÍ SUPRAMOLEKULÁRNÍCH KOMPLEXŮ 28
2.5.1 Hmotnostní spektrometrie 29
2.5.2 Nukleární magnetická rezonance 30
2.5.3 Infračervená spektrometrie 30
2.5.4 Izotermální titrační kalorimetrie 31
2.6 APLIKACE CYKLODEXTRINŮ VE VYBRANÝCH OBLASTECH 31
2.6.1 Aplikace cyklodextrinů v potravinářském průmyslu 31
2.6.2 Aplikace cyklodextrinů ve farmaceutickém průmyslu 32
2.6.3 Ostatní využití cyklodextrinů 33
3 CHARAKTERISTIKA SUPRAMOLEKULÁRNÍCH KOMPLEXŮ MEZI VYBRANÝMI FLAVONOIDY A CYKLODEXTRINY **34**
3.1 SUPRAMOLEKULÁRNÍ KOMPLEXY FLAVANOLŮ S CYKLODEXTRINY 34
3.2 SUPRAMOLEKULÁRNÍ KOMPLEXY FLAVONOLŮ S CYKLODEXTRINY 36
3.3 SUPRAMOLEKULÁRNÍ KOMPLEXY FLAVANONŮ S CYKLODEXTRINY 37
3.4 SUPRAMOLEKULÁRNÍ KOMPLEXY FLAVONŮ S CYKLODEXTRINY 38
II PRAKTICKÁ ČÁST **39**
4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST **40**
4.1 SYNTÉZA FLAVONU 40
4.1.1 Přístroje a vybavení 40
4.1.2 Příprava 2-acetylfenyl-benzoátu 41

4.1.3 Syntéza 1-(2-hydroxyfenyl)-3-fenylpropan-1,3-dionu 42
4.1.4 Příprava flavonu 42
4.2 ESI-MS ANALÝZY INKLUZNÍCH KOMPLEXŮ 43
4.2.1 Specifikace hmotnostního spektrometru 43
4.2.2 Parametry ESI-MS analýz inkluzních komplexů 44
4.2.3 Příprava vzorků pro ESI-MS analýzy inkluzních komplexů 44
4.3 SPEKTROFOTOMETRICKÉ STANOVENÍ ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITY 45
5 VÝSLEDKY A DISKUZE 46
5.1 SYNTÉZA FLAVONU 46
5.1.1 Příprava 2-acetylfenyl-benzoátu 46
5.1.2 Syntéza 1-(2-hydroxylfenyl)-3-fenylpropan-1,3-dionu 48
5.1.3 Syntéza flavonu 51
5.2 ESI-MS ANALÝZY INKLUZNÍCH KOMPLEXŮ 52
5.2.1 Výsledky ESI-MS analýz samotných ligandů 53
5.2.2 ESI-MS analýza hostitelských sloučenin 54
5.2.3 Studium vzniku supramolekulárních komplexů flavonu s CD v plynné fázi 55
5.2.4 Studium vzniku supramolekulárních komplexů kvercetinu s CD v plynné fázi 57
5.3 SPEKTROFOTOMETRICKÉ STANOVENÍ ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITY KVERCETINU A JEHO KOMPLEXŮ S CD 63
ZÁVĚR 65
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY 67
SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK 76
SEZNAM OBRÁZKŮ 78
SEZNAM TABULEK 80

ÚVOD

Rostliny sehrávají důležitou roli pro život na Zemi, neboť jsou to organizmy, které přeměňují anorganické sloučeniny na organické látky. Představují také nevyčerpatelné zdroje biologicky aktivních látek, které vznikají jejich sekundárním metabolismem. Mezi takové látky patří například flavonoidy, které se v rostlinách podílí na chuti, pigmentaci a slouží rovněž jako ochrana proti UV-záření, mikrobiálnímu napadení a také chrání rostliny před reaktivními kyslíkatými radikály. Flavonoidy jsou také významné pro jejich protizánětlivé, antimikrobiální a antioxidační vlastnosti, a proto nachází uplatnění v potravinářském, kosmetickém a farmaceutickém průmyslu.

Supramolekulární chemie je obor zabývající se intermolekulárními interakcemi prostřednictvím nekovalentních vazeb. Supramolekulární komplexy typu „hostitel-host“ vznikají zapouzdřením molekuly hosta do kavity hostitele. Mezi významné hostitelské molekuly patří např. cyklodextriny, které jsou schopny do své kavity pojmout jiné molekuly, např. právě flavonoidy. Tvorba supramolekulárních komplexů může vést ke změně fyzikálních, chemických či biologických vlastností jak hostující, tak i hostitelské molekuly.

Teoretická části diplomové práce obsahuje tři kapitoly, přičemž ta první se zabývá charakteristikou flavonoidů, jejich chemickou strukturou a biologickou aktivitou. Cyklodextriny, supramolekulární komplexy a analytické metody vhodné ke stanovení těchto komplexů jsou popsány v druhé kapitole. Teoretickou část uzavírá literární rešerše pojednávající o doposud popsaných supramolekulárních komplexech mezi vybranými flavonoidy a cyklodextriny.

V praktické části byla studována tvorba supramolekulárních komplexů vybraných flavonoidů s nativními cyklodextriny pomocí hmotnostního spektrometru s iontovou pastí a elektrosprejovou ionizací. Nejdříve však byla provedena třístupňová syntéza flavonu, jakožto jednoho ze dvou ligandů. Druhým studovaným ligandem byl kvercetin, který je významný např. pro jeho relativně silnou antioxidační aktivitu. To, zda může zapouzdření molekuly kvercetinu do kavity cyklodextrinu ovlivnit antioxidační aktivitu, bylo zjišťováno spektrofotometricky pomocí metody DPPH.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 FLAVONOIDY

Flavonoidy lze definovat jako skupinu přírodních polyfenolických látek, které vznikají sekundárním metabolismem rostlin. Jelikož se svými vlastnostmi liší od jiných fenolových látek, jsou uváděny jako samostatná skupina. Flavonoidy se podílí na chuti a pigmentaci rostlin. Významnou vlastností flavonoidů je jejich biologická aktivita, kdy jim jsou připisovány antioxidační, antimikrobiální, antialergické a antikarcinogenní účinky. [1]

Název flavonoidy je odvozen z latinského „*flavus*“, což znamená žlutý. Z toho vyplývá, že většina zástupců má vliv na žluté zbarvení rostlinných částí, jako jsou listy, semena, kořeny či květy. [2] V podzimním období, kdy dochází k odbarvování zelených listů, se pigmenty flavonoidů stávají pestřejšími. Je to dáno degradací chlorofylových barviv, která jinak v listech převládají a potlačují tak ostatní barviva. Na žlutém a oranžovém zbarvení listů se podílí flavonoidy spolu s karotenoidy. Přítomnost anthokyanových barviv má za následek červené a fialové odstíny podzimního listí. [3]

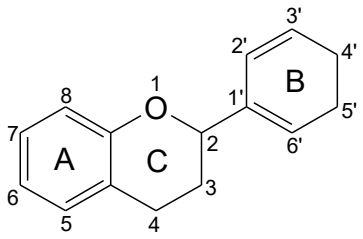
Flavonoidy v rostlinách slouží rovněž jako ochrana proti ultrafialovému záření, mikrobiálnímu napadení a také chrání rostliny před reaktivními kyslíkatými radikály. Některé flavonoidy jsou charakteristické trpkou a svíravou chutí, díky čemuž mohou být rostliny chráněny před konzumací býložravci. [2]

Za objevitele flavonoidů je považován Dr. Albert Szent-Györgyi, který se svými spolupracovníky roku 1936 izoloval z kůry citrusových plodů látku, kterou pojmenovali vitamin P. O necelých 50 let později byl oficiálně pro tuto skupinu látek zaveden název flavonoidy. Tento významný maďarský vědec získal v roce 1937 Nobelovu cenu za objevy týkající se biologické oxidace ve spojitosti s vitaminem C a katalýzou kyseliny fumarové. [4]

V potravinářském průmyslu se flavonoidy využívají pro jejich dobré technologické vlastnosti. Pro svou stálou barevnost jsou uplatňovány jako přírodní potravinářská barviva, nebo jsou využívány jako antioxidanty tuků a olejů. [5]

1.1 Chemická struktura flavonoidů

Základní chemická struktura flavonoidů je tvořena patnácti atomy uhlíku, přičemž se skládá ze dvou benzenových kruhů (Obrázek 1, kruh A, B), které jsou spojeny heterocyklickým pyranovým kruhem (Obrázek 1, kruh C). Tato molekula je nazývána flavan, systematicky 3,4-dihydro-2-fenyl-2*H*-1-benzopyran, a představuje základní skelet flavonoidních sloučenin. [1]



Obrázek 1. Strukturní vzorec flavanu.

Jak již bylo zmíněno výše, flavonoidy jsou fenolické látky, které vznikají v důsledku sekundárního metabolismu rostlin. Tvorba těchto látek je zapříčiněna kombinací dvou metabolických drah. Ty využívají jako základní vstupní látky aromatické aminokyseliny fenylalanin, tyrosin nebo tryptofan, za účasti enzymu fenylalaninamoniaklyázy. Jedná se o polyketidovou cestu, při které je syntetizován kruh A. Druhou, tzv. šikimátovou cestou, dochází k tvorbě kruhů B a C. [6]

Skupiny flavonoidů se vzájemně liší substitucí hydroxylových a methoxylových skupin na jednotlivých kruzích flavanu. Spíše než ve volné formě, se flavonoidy v přírodě vyskytují převážně jako glykosidy. Jejich molekula je tak tvořena cukernou a necukernou složkou. Sacharidová část je často tvořena D-glukózou, ale mohou se vyskytovat i flavonoidy obsahující substituovanou D-galaktózu, L-arabinózu, D-xylózu nebo kyselinu D-glukuronovou. Tyto sacharidy jsou obvykle vázány v polohách C-7, C-5, C-4′, C-3′. [7]

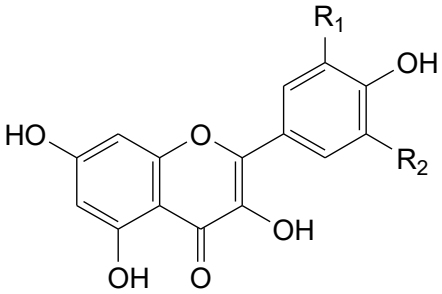
Rozpustnost flavonoidů je významně ovlivněna jejich strukturou. Molekuly obsahující glykosidickou složku a hydroxylové skupiny vykazují mnohem vyšší rozpustnost ve vodných médiích, než molekuly obsahující methylové a isopentylové (3-methylbutan-1-ylové) jednotky. [8]

1.2 Klasifikace flavonoidů

Flavonoidy tvoří velice obsáhlou a rozmanitou skupinu chemických látek, které lze rozdělit na základě struktury do několika skupin. V této práci budou flavonoidy popsány dle Claudine Manach, která je rozdělila do šesti základních skupin, kterými jsou flavonoly, flavony, flavanony, flavanoly, isoflavony a anthokyanidiny. [9]

1.2.1 Flavonoly

Flavonoly tvoří velmi rozšířenou skupinu žlutých barviv vyskytujících se v celé rostlinné říši, vyjma hub a řas. Hlavními zástupci této skupiny jsou myricetin, kvercetin a kemferol (Obrázek 2). Ty se vyskytují hlavně jako *O*-glykosidy. Flavonoly obsahují v polohách C-3, C-5, C-7 hydroxylovou skupinu a vzájemně se mohou lišit substitucí v polohách C-3´, C-4´ a C-5´. [8]



Flavonol	Substituent	
	R_1	R_2
kvercetin	OH	H
kemferol	H	H
myricetin	OH	OH

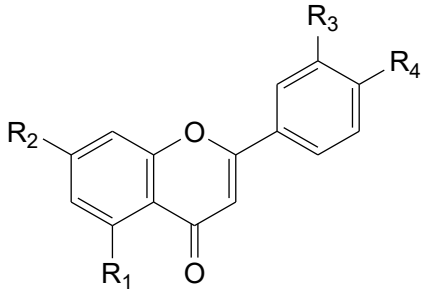
Obrázek 2. Strukturní vzorce vybraných flavonolů.

Z flavonolových glykosidů se v přírodě vyskytují spíše 3-glykosidy než 7-glykosidy, přičemž nejvíce rozšířené jsou glykosidy odvozené od kvercetinu a kemferolu, glykosidy myricetinu se vyskytují nejméně. [7]

Kvercetin a jeho glykosidy představují relativně zajímavé látky, neboť vykazují silnou antioxidační aktivitu a podílejí se na pružnosti a permeabilitě krevních kapilár. Ve vysokých koncentracích se hromadí uvnitř vnějších tkání rostlin, a to z toho důvodu, že jejich biosyntéza je katalyzována slunečním světlem. Bohatým zdrojem kvercetinu je například žlutá cibule, ve které se kvercetin vyskytuje ve formě kvercetin-4-*O*-glukosidu a kvercetin-3,4-*O*-diglukosidu. Významným glykosidickým derivátem je také kvercetin-3-β-rutinosid, známý jako rutin, který se hojně nachází v pohance a příznivě ovlivňuje kvalitu krevních kapilár. [9]

1.2.2 Flavony

Flavony tvoří velmi rozsáhlou skupinu světle žlutých rostlinných barviv. Molekuly flavonů objevující se v potravinách jsou běžně substituovány hydroxylovými a methoxylovými skupinami v polohách C-5, C-7, C-3′, C-4′ a C-5′. Mezi flavony obsahující v molekule hydroxylové skupiny patří apigenin a luteolin, které se hojně vyskytují v celerové a petrželové nati. Citrusové plody jsou bohatým zdrojem tangeretinu a nobiletinu, což jsou flavony obsahující methoxylové skupiny na kruhu A i B. Hispidulin je zástupce flavonu substituovaného methoxylovou skupinou na kruhu A, který byl detekován v rostlinách jako je šalvěj, pelyněk a arnika. Mezi flavony obsahující methoxylovou skupinu na kruhu B patří acacetin, diosmetin a chrysoeriol. Struktura vybraných flavonů je znázorněna na Obrázku 3. [7, 8]



Flavon	Substituent			
	R_1	R_2	R_3	R_4
apigenin	OH	OH	H	OH
luteolin	OH	OH	OH	OH
acacetin	OH	OH	H	OCH_3
flavon	H	H	H	H

Obrázek 3. Strukturní vzorce vybraných flavonů.

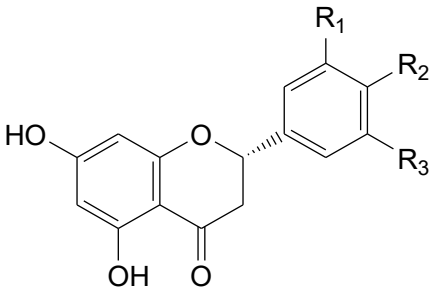
Apigenin je velmi rozšířený flavon vyskytující se jak v ovoci, zelenině a obilovinách, tak i v bylinách. Z ovoce lze zmínit například jablka a hrozny révy vinné, ze zeleniny zase květák, celer či cibuli. U apigeninu byly prokázány protizánětlivé účinky, jelikož inhibuje enzym cyklooxygenázu a eliminuje syntézu oxidu dusnatého. [10]

Luteolin je dalším významným flavonem, jehož největší množství se nachází v paprice, celeru, petrželi a v heřmánku pravém. Rostliny bohaté na luteolin se používají v tradiční čínské medicíně pro léčbu různých onemocnění, například hypertenzi. Tento flavon je v oboru molekulární a translační medicíny zkoumán pro jeho možné příznivé účinky v léčbě nádorových onemocnění. Za následek má i antialergické a protizánětlivé vlastnosti vlivem inhibice enzymu tyrosinkynázy. [11]

Nesubstituovaný flavon vykazuje ze všech flavonolů a flavonů nejslabší antioxidační aktivitu, avšak konzumace potravin bohatých na flavony přispívá k prevenci proti vzniku aterosklerózy. V potravinách se s ním lze setkat v zelených částech rostlin, jako jsou zeleninové natě, kopr či fenykl. Bylinným zástupcem je například tymián. [12]

1.2.3 Flavanony

Flavanony tvoří další skupinu flavonoidních látek, pro které je charakteristická přítomnost stereogenního centra na atomu uhlíku C-2 a absence dvojné vazby mezi atomy uhlíků C-2 a C-3. Flavanonová struktura je vysoce reaktivní a podléhá hydroxylaci, glykosylaci a *O*-methylaci. Hlavní zástupce tvoří glykosidy odvozené od 5,7-dihydroxyflavanonů, které se od sebe liší substitucí na kruhu B. Molekulární struktura vybraných flavanonů je znázorněna na Obrázku 4. [7, 8]



Flavanon	Substituent		
	R_1	R_2	R_3
naringenin	H	OH	H
hesperetin	OH	H	OCH_3
neohesperedin	H	OCH_3	OH

Obrázek 4. Strukturní vzorce vybraných flavanonů.

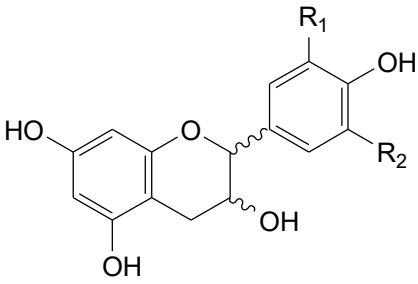
Vysoká koncentrace flavanonů byla prokázána v citrusových plodech. V těch se nachází například naringenin, hesperetin, eriodiktyol, dále pak glykosidy poncirin, citrifolisoid, naringin, hesperidin a ericitrin. [5]

V pomerančových a citrónových plodech se nejvíce vyskytuje hesperetin, jehož obsah v 1 l šťávy se pohybuje v rozmezí od 0,54 do 1,18 g. Vzhledem k nízké rozpustnosti ve vodě, se může po určité době vyskytovat v krystalické formě. Grapefruity obsahují jako hlavní flavanonovou látku naringin, který je, na rozdíl od hesperetinu, intenzivně hořký. Hořké jsou i ostatní flavanony, které ve své molekule obsahují neohesperidózu (2-*O*-α-L-rhamnozyl-D-glukopyranóza) v poloze C-7. Pokud je v této poloze navázána rutinóza (6-*O*-α-L-rhamnozyl-D-glukopyranóza), jsou tyto látky bez chuti, právě tak jako příslušný aglykon naringenin. [5]

Obsah popsaných flavanonů v pomerančích i grapefruitech během vegetace vzrůstá. Maximálních hodnot dosahují v době, kdy jsou plody větší než 5 centimetrů v průměru, poté je jejich obsah konstantní a pohybuje se v rozmezí od 1 do 6 g v jednom plodu. V citrusech se flavanony vyskytují především v albedu (bílá vrstva pod slupkou). [5, 7]

1.2.4 Flavanoly

Flavonoly tvoří velmi komplexní skupinu flavonoidů, která obsahuje látky od jednoduchých monomerů (+)-katechinu a jeho isomeru (-)-epikatechinu, tak i oligomerní a polymerní proanthokyanidiny, které jsou označovány jako kondenzované třísloviny. Molekula flavan-3-olu obsahuje dvě stereogenní centra na atomech uhlíků C-2 a C-3 a tím umožňuje vznik čtyř stereoisomerů pro každý stupeň hydroxylace B-kruhu. Nejrozšířenější jsou (+)-katechin a (-)-epikatechin. Oligomerní a polymerní proanthokyanidiny ve své molekule obsahují ještě další stereogenní centrum na atomu uhlíku C-4. [8] Na Obrázku 5 je znázorněna struktura vybraných flavanolů.



Flavanol	Substituent	
	R_1	R_2
katechin	OH	H
epikatechin	H	OH
gallokatechin	OH	OH

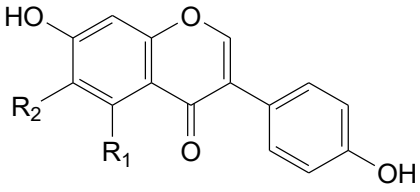
Obrázek 5. Strukturní vzorce vybraných flavanolů.

Z flavonoidních látek jsou flavanoly nejvíce konzumovány, jelikož se nachází v mnoha potravinách, jako je například ovoce, zelenina, luštěniny a kakaové boby. Z nápojů je to čaj, pivo a víno. Například hořká čokoláda s vysokým obsahem kakaových bobů je výborným zdrojem katechinů, jež se v ní vyskytují v obsahu až 61 mg/100 g. Mezi ovoce bohaté na katechiny patří jablka, hrušky, třešně či hrozny. Červená vína, v závislosti na druhu, obsahují okolo 270 mg/l katechinů. [10]

Proanthokyanidiny, neboli kondenzované třísloviny, jsou charakteristické svou trpkou a svíravou chutí. To se projevuje například u organoleptických vlastností piva, do kterého se tyto látky dostávají extrakcí z chmele. Velmi bohatým zdrojem flavanolů je černý a zelený čaj, ve kterém se vyskytují katechiny ve formě esterů kyseliny gallové. Mezi tyto látky patří (-)-epigallokatechin, (-)-epigallokatechin gallát a (-)-epikatechin gallát. Ve srovnání s černým čajem, zelený čaj obsahuje těchto látek až o polovinu více, neboť při technologickém zpracování nepodléhá oxidaci, která má vliv na celkový obsah fenolických látek. Při výrobě čajů vznikají z třísloviny enzymatickým hnědnutím pigmenty theaflavin (oranžovo-červený) a thearubigin (oranžovo-hnědý). [10, 13, 14]

1.2.5 Isoflavony

Isoflavony jsou flavonoidy, které se od ostatních skupin liší polohou B-kruhu v základní chemické struktuře (Obrázek 1), kdy tento benzenový kruh se nenachází v poloze C-2, nýbrž v poloze C-3. Hlavními zástupci této skupiny jsou genistein, daidzein, glycitein a fomononetin. Struktura vybraných isoflavonů je znázorněna na Obrázku 6. [8]



Isoflavon	Substituent	
	R_1	R_2
daidzein	H	H
genistein	OH	H
glycitein	H	OCH_3

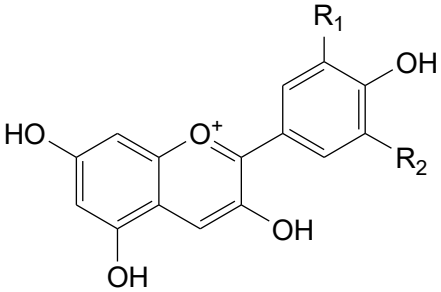
Obrázek 6. Strukturní vzorce vybraných isoflavonů.

Isoflavony jsou přirozeně se vyskytující rostlinné chemické látky, které jsou také řazeny do třídy fytoestrogenů. V současné době jsou podrobně zkoumány, neboť mají významný potenciál v léčbě rakoviny prsu a prostaty, mohou příznivě ovlivňovat menopauzální symptomy, a slouží jako prevence kardiovaskulárních chorob a osteoporózy. [15] Nejvyšší koncentrace isoflavonů se nachází v luštěninách, konkrétně v sojových bobech a ve výrobcích z nich, například miso, tempeh, tofu či sojový nápoj. [9]

Isoflavony se také mohou vyskytovat v krmivech obsahující luštěniny a v jetelovinách, jejichž konzumace může ovlivňovat reprodukci pasoucích se zvířat, jako jsou krávy a ovce. Tyto fytoestrogeny mají dostatečnou estrogenní aktivitu, která napodobuje steroidní hormon estradiol, který blokuje ovulaci. [8]

1.2.6 Anthokyanidiny

Anthokyanidiny představují velmi rozsáhlou skupinu ve vodě rozpustných pigmentů odpovědných za modré, fialové a červené zbarvení mnoha rostlinných tkání. Vyskytují se především jako glykosidy, přičemž sacharidová složka v tomto systému je tvořena buď D-glukózou, D-galaktózou, L-rhamnózou, L-arabinózou či D-xylózou. Ty mohou být vázány v poloze C-3 nebo C-5, ve výjimečných případech i v poloze C-7, a to jak ve formě monoglykosidů, tak di- i triglykosidů. Tyto glykosidy jsou pak označovány jako anthokyaniny, resp. anthokyanová barviva. Mezi nejvíce se vyskytující anthokyanidiny v přírodě náleží kyanidin, delfinidin, petunidin, peonidin, pelargonidin a malvidin. Chemická struktura vybraných anthokyanidinů je znázorněna na Obrázku 7. [16, 17]

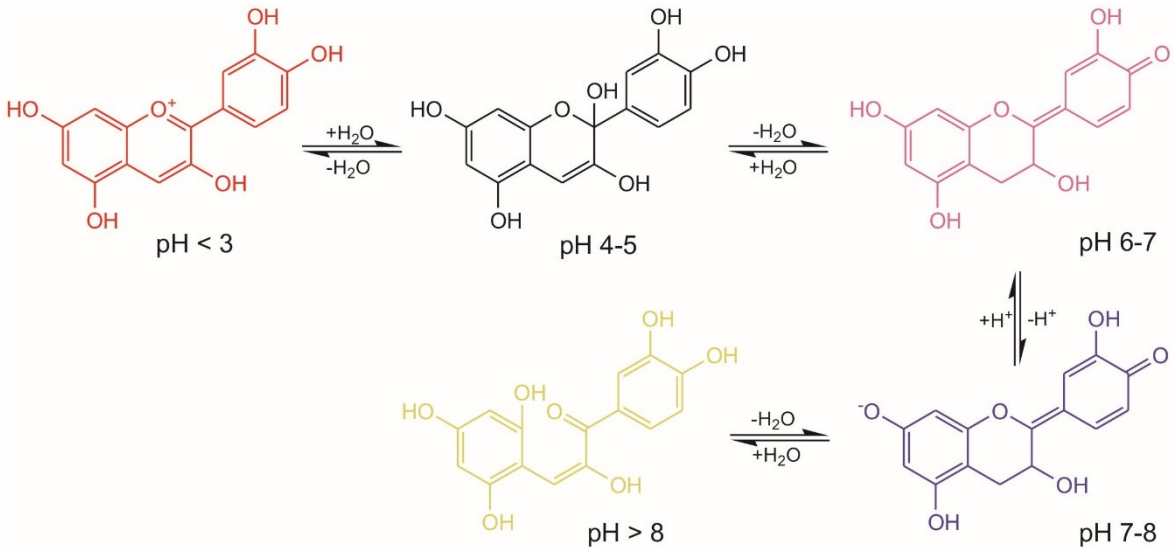


Anthokyanidin	Substituent	
	R_1	R_2
pelargonidin	H	H
kyanidin	OH	H
delfinidin	OH	OH

Obrázek 7. Strukturní vzorce vybraných antokyanidinů.

Anthokyanidiny jsou přítomny v mnoha druzích rostlin, ve kterých jsou lokalizovány v buněčných vakuolách. Velmi kvalitním zdrojem jsou hrozny révy vinné, švestky, maliny, jahody, borůvky, červené zelí, lilek a spousta dalších. V podstatě lze konstatovat, že se tento typ flavonoidů vyskytuje ve všech rostlinných materiálech, které jsou, byť jen trochu zbarvené do růžova, červena a fialova. [7] Pelargonidin, kyanidin a peonidin se podílí na oranžovo-červeném zbarvení rostlin. Delfinidin, petunidin a malvidin naopak vykazují modro-červené zbarvení. [17, 18]

V závislosti na hodnotách pH prostředí a molekulové struktuře, vykazují anthokyanidiny jiná zabarvení. Červené barvy dosahují ve velmi kyselém prostředí (pH < 3), modré barvy při pH buď v rozmezí 2–4 nebo v alkalickém prostředí při pH 7–8. Anthokyanidiny se mohou vyskytovat i jako bezbarvé látky, a to hlavně v prostředí při pH 4–6. Na barvu má také vliv acylace či methylace hydroxylových skupin na kruhu A a B. [18] Na Obrázku 8 je příklad molekulární transformace kyanidinu v závislosti na pH. [18, 19]



Obrázek 8. Strukturní vzorce kyanidinu v závislosti na pH.

1.3 Biologická aktivita flavonoidů

1.3.1 Antioxidační aktivita

Antioxidanty jsou látky inhibující nebo zpomalující oxidační pochody, které jsou v živých biologických systémech nezbytné pro získávání energie. Nežádoucí je však příliš rychlá oxidace anebo oxidace velkého rozsahu. Kyslík je jedním z nejdůležitějších prvků nezbytných pro život, ale při výrazné nadprodukci reaktivních sloučenin kyslíku, dochází k tzv. oxidačnímu stresu. Antioxidanty jsou tedy přirozené obranné látky, které slouží organismu k boji proti volným radikálům, neboť je mohou neutralizovat a pomáhají tak udržet buňky v nepoškozeném stavu. [20]

Antioxidanty lze rozdělit do dvou kategorií, a to na přírodní a syntetické. Syntetické antioxidanty jsou zpravidla sloučeniny s fenolovou strukturou, která je v různých stupních alkylována. Syntetickými antioxidanty jsou například butylhydroxyanisol a butylhydroxytoluen. Mezi významné přírodní antioxidanty patří jak fenolické sloučeniny (flavonoidy, fenolové kyseliny), tak i vitaminy (vitamin E, vitamin C, vitamin A), sloučeniny dusíku (alkaloidy, aminokyseliny, aminy) a přírodní barviva (karotenoidy, anthokyaniny). [20]

Mechanismus poškození buňky volnými radikály spočívá v peroxidaci nenasycených mastných kyselin v lipidové dvojvsrtvě buněčné membrány, což způsobí řetězovou reakci peroxidaci lipidů. Tím dojde k poškození buněčné membrány s následnou oxidací membránových lipidů a proteinů. Dochází tak k poškození obsahu buněk, včetně DNA. Antioxidační aktivita flavonoidů závisí na uspořádání funkčních skupin v jejich molekulové struktuře. [1]

Mezi základní mechanismy antioxidačního působení flavonoidů patří zhášení volných radikálů, chelatace přechodných kovů a schopnost inhibovat prooxidační enzymy. Flavonoidy poskytují elektron radikálu za současného vytvoření stabilnější a méně reaktivní radikálové struktury. Zhášecí aktivita roste s počtem hydroxylových skupin v molekule. Například proanthokyanidiny, neboli kondenzované třísloviny ze skupiny flavanolů (Obrázek 5, str. 17), vykazují vysoký antioxidační potenciál díky vysokému stupni hydroxylace aromatických kruhů. [14]

Další významnou schopností flavonoidů je chelatace. Přechodné kovy, například železo a měď, v organismu plní řadu fyziologických funkcí. Důležitou funkci sehrávají jako součást kofaktorů antioxidačních enzymů, kdy jsou většinou vázány na proteiny (ferritin nebo ceruloplazmin). Pokud se však vyskytují volně, mohou katalyzovat radikálové reakce. Jako příklad lze uvést Fentonovu reakci:

$$Fe^{2+} + H_2O_2 \longrightarrow Fe^{3+} + OH^{\cdot} + OH^{-} \quad (1)$$

Vzniklé kationty Fe^{3+} mohou dále vstupovat do reakce s H_2O_2 a hydroperoxylovým radikálem, čímž dojde k regeneraci Fe^{2+}:

$$Fe^{3+} + H_2O_2 \longrightarrow Fe^{2+} + H^{+} + OOH^{\cdot} \quad (2)$$

$$Fe^{3+} + OOH^{\cdot} \longrightarrow Fe^{2+} + O_2 + H^{+} \quad (3)$$

Flavonoidy izolované z hroznů révy vinné a z čajů se podílí na chelataci železa a inhibují Fentonovu reakci. Mezi tyto látky lze zařadit proanthokyanidiny, anthokyanidiny a katechiny. Další antioxidační vlastností je také schopnost inhibice prooxidačních enzymů. Flavonoly, flavanony, flavanoly a anthokyanidiny mohou snižovat tvorbu oxidu dusnatého právě inhibicí enzymu cyklooxygenázy. [14, 21]

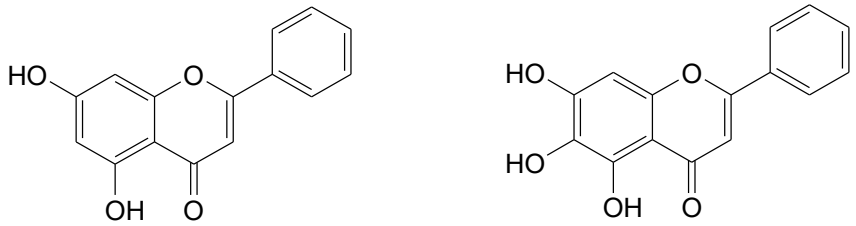
1.3.2 Antimikrobiální aktivita flavonoidů

Antimikrobiální aktivita je další příznivou schopností flavonoidů. Řadí se sem antibakteriální, antifungální a antivirové účinky. [22] Flavonoidy, jakožto sekundární metabolity rostlin, se sice nepodílí na primárních metabolických procesech, jako je respirace nebo fotosyntéza, jejich role v rostlinách je však také důležitá. Napomáhají rostlinám např. reagovat na změny podmínek životního prostředí nebo je chránit před napadením patogeny. [1, 2, 22]

Lze předpokládat, že antimikrobiální aktivita flavonoidů je založena na schopnosti interakce těchto látek s extracelulárními proteiny v buněčné stěně mikroorganizmů. To pak vede k degradaci buněčné stěny, nebo k narušení funkce cytoplazmatické membrány mikroorganizmů. [23]

Ali a kol. publikovali práci, ve které studovali antimikrobiální aktivitu vybraných flavonoidů a došli k závěru, že chrysin (5,7-dihydroxyflavon), vyskytující se hlavně v medu, inhibuje růst bakterií *Escherichia coli* a *Pseudomonas aeruginosa* stejnou

rychlostí, jako antibiotikum streptomycin. U baicaleinu (5,6,7-trihydroxyflavon), který obsahuje oproti chrysinu další hydroxylovou skupinu v poloze C-6, byl prokázán inhibiční účinek pouze u G+ bakterií (*Staphylococcus aureus* a *Bacillus subtilis*). Antivirová aktivita baicaleinu je specifická inhibicí reverzní transkriptázy, což je enzym katalyzující proces přepisu genetické informace ribonukleové kyseliny (RNA) do deoxyribonukleové kyseliny (DNA). Bohatým zdrojem baicaleinu jsou kořeny rostlin šišáku bajkalského (*Scutellaria baicalensis*) a šišáku stranokvětého (*Scutellaria lateriflora*). [24, 25, 26] Strukturní vzorce chrysinu a baicaleinu jsou znázorněny na Obrázku 9.



Obrázek 9. Strukturní vzorce chrysinu a baicaleinu.

Kvercetin vykazuje silné inhibiční účinky proti mnoha druhům bakterií. Jako příklady lze uvést bakterie *Salmonella enteritidis*, *Bacillus cereus* a *Bacillus subtilis*. [27] Antifungální účinky kvercetinu byly prokázány vůči houbám *Alternarai alternata, Aspergillus fumigatus, Aspergillus niger, Penicillium citrii* a *Macrophomina phaseolina*. [28] Kvercetin a jeho deriváty (např. kvercetagenin) působí také jako inhibitory DNA polymerázy-β a DNA polymerázy *I*. [26]

Katechiny, jakožto významné flavonoidy čajových lístků, inhibují bakterie *Streptococcus mutans*, *Vibrio cholerae* a bakterie rodu *Shigella*. [23] Anthokyanová barviva, která jsou přítomna téměř ve všech barevných plodech a květech, působí antimikrobiálně vůči bakteriím *Bacillus cereus*, *Micrococcus luteus* a *Listeria monocytogenes*. [29]

2 CYKLODEXTRINY

Cyklodextriny (CD) lze definovat jako cyklické oligosacharidy, jejichž molekula je složena z několika D-glukopyranózových jednotek. Primárně vznikají enzymatickou degradací, kdy výchozí látku představuje škrob. Cyklodextriny jsou významné pro svou nízkou toxicitu, biologickou odbouratelnost, ale hlavně se vyznačují schopností tvořit inkluzní komplexy typu „hostitel-host“, kde zastávají roli hostitele. [30]

Vznik komplexů může vést ke změně fyzikálních či chemických vlastností jak hostujících, tak i hostitelských molekul. Této schopnosti se využívá v mnoha odvětvích, např. ve farmaceutickém, potravinářském, kosmetickém a chemickém průmyslu. [31]

2.1 Historie objevu a objasnění struktury cyklodextrinů

Historie cyklodextrinů sahá až do roku 1891, kdy francouzských vědec Antoine Villiers publikoval práci, ve které popisuje izolaci krystalické látky ze škrobu natráveného bakteriemi *Bacillus amylobacter*. Získané látce určil sumární vzorec $(C_6H_{10}O_5) \cdot 3\ H_2O$ a přiřadil název „cellulosine“, jelikož se svými chemickými vlastnostmi podobala celulóze, a to hlavně v odolnosti vůči kyselé hydrolýze. [30, 32, 33]

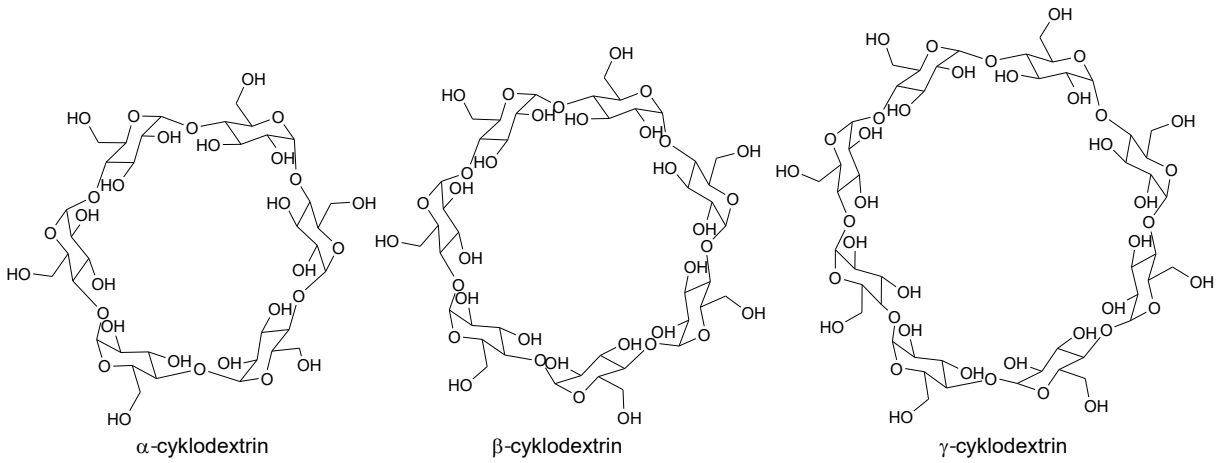
Významnou osobností, ve spojitosti s objevem cyklodextrinů, je rovněž rakouský mikrobiolog Franz Schardinger, který pracoval v institutu pro potravinový výzkum. Zabýval se studiem bakterií způsobující kažení potravinářských výrobků, včetně škrobu. V roce 1903 izoloval Schardinger bakteriální kmen vyznačující se enzymatickou degradací škrobu za vzniku cyklodextrinů. Tento kmen pak pojmenoval jako *Bacillus macerans*. Schardinger poukázal na to, že za použití těchto bakterií lze získat ze škrobu dvě složky lišící se barvou na základě jodového testu, které označil jako krystalický α-dextrin a krystalický β-dextrin. Dalším jeho tvrzením bylo, že lze tyto dextriny izolovat nejen ze samotného škrobu, ale i z potravin bohatých na škrob, jako jsou brambory, rýže nebo pšenice. [32, 33, 34]

Chemickou strukturou cyklodextrinů se zabýval Karl Johann Freudenberg se svými spolupracovníky, kteří v letech 1935–1955 objasnili strukturu krystalických frakcí α- a β-dextrinu. Tyto látky pak přejmenovaly na α-cyklodextrin a β-cyklodextrin. Freudenberg prokázal, že molekuly cyklodextrinů obsahují centrální kavitu a jsou tvořeny z glukózových jednotek spojených α-(1→4) glykosidickými vazbami. V roce 1948 se tomuto týmu podařilo popsat i chemickou strukturu γ-cyklodextrinu. [32, 33]

2.2 Charakteristika a struktura cyklodextrinů

Jak už bylo popsáno výše, cyklodextriny jsou oligosacharidy tvořené glukózovými jednotkami spojenými α-(1→4) glykosidickými vazbami. Nativní cyklodextriny vznikají ze škrobu enzymatickou degradací cyklodextrin glukosyltransferázami (CGTase), což jsou enzymy bakteriálního původu. Mezi bakterie produkující tento enzym patří například *Bacillus macerans*, *Micrococcus luteus* či *Klebsiella oxytoca.* Vlivem tohoto biochemického procesu vzniká směs cyklických a lineárních oligosacharidů, které obsahují šest až více než sto glukózových jednotek. [31, 32, 35]

Komerční cyklodextriny se ze směsi izolují selektivní precipitací organickými látkami, se kterými tvoří málo rozpustné inkluzní komplexy. Mezi takové látky patří hexan, anthracen a fluorbenzen. Na základě počtu glukopyranózových jednotek lze cyklodextriny rozlišovat. Nejvíce jsou rozšířeny cyklodextriny se šesti, sedmi a osmi jednotkami, obecně známé jako α-, β- a γ-cyklodextrin. [31, 34, 36] Strukturní vzorce těchto látek jsou znázorněny na Obrázku 10.



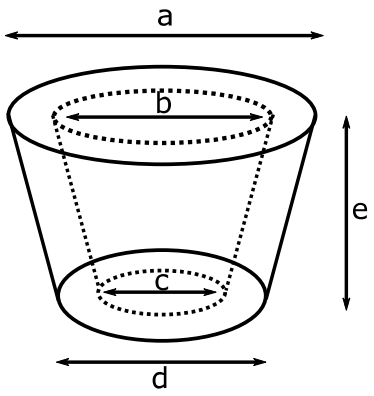
Obrázek 10. Strukturní vzorce α-, β- a γ-cyklodextrinu.

Cyklodextriny obsahující méně než šest glukopyranózových jednotek enzymatickou degradací, z důvodu značného pnutí v kruhu, nevznikají. Nicméně se podařilo synteticky připravit „pre-α-cyklodextrin“ neboli cyklopentakis-[α-1,4-glukopyranosyl] obsahující pět glukózových jednotek. Na druhou stranu, cyklodextriny s více než osmi glukopyranózovými jednotkami nasyntetizovat lze, ovšem jejich příprava a čištění je poměrně náročná, a proto se tolik nevyužívají. [30]

Molekula cyklodextrinů tvarem připomíná dutý komolý kužel. Vnější část molekuly má hydrofilní charakter a umožňuje tak polární interakce. Je to dáno přítomností volných hydroxylových skupin na užším okraji a sekundárních hydroxylových skupin na širším okraji kavity. Vnitřní část molekuly naopak vykazuje nepolární charakter, jelikož jsou do této části orientovány etherické atomy kyslíku a atomy vodíku. Díky tomu dochází k hydrofobním interakcím a komplexaci molekuly hosta v kavitě CD. Vnější širší okraj CD je označován jako sekundární část, a vnitřní užší jako primární část. [31, 37, 38]

Molekuly α-, β- a γ-cyklodextrinu jsou stabilizovány pásem vodíkových vazeb mezi atomy kyslíku $O2_{(n)}$ a $O3_{(n-1)}$ hydroxylových skupin sousedních glukopyranózových jednotek. Čím je vyšší počet jednotek v makrocyklu, tím se zkracuje vzdálenost hydroxylových skupin a pevnost vodíkových vazeb tak roste. Struktura cyklodextrinů byla studována jak v roztoku, tak i v pevné fázi a bylo prokázáno, že konformace cyklodextrinů v roztoku je téměř shodná s konformací v krystalickém stavu. Glukopyranózové jednotky se v nativních cyklodextrinech vyskytují v tzv. židličkové konformaci. [31]

Jednotlivé cyklodextriny se liší také geometrickými rozměry, které jsou znázorněny na Obrázku 11. [30, 33]



	Rozměry [nm]				
	a	**b**	**c**	**d**	**e**
α-CD	1,37	0,57	0,45	1,32	0,78
β-CD	1,53	0,78	0,61	1,49	0,78
γ-CD	1,69	0,95	0,77	1,61	0,78

Obrázek 11. Znázornění geometrických parametrů α-, β-, a γ-CD.

2.3 Fyzikálně-chemické vlastnosti cyklodextrinů

Cyklodextriny, jakožto bezbarvé krystalické látky, jsou stabilní v alkalických vodných roztocích a citlivé na hydrolytické štěpení za silně kyselých podmínek. Hydrolýzou pak vznikají molekuly glukózy, maltózy a dlouhé řetězce lineárních a rozvětvených dextrinů. Avšak v porovnání s lineárními dextriny jsou cyklodextriny odolnější vůči neenzymatické a enzymatické hydrolýze. Například působení některých amyláz, které štěpí glykosidické vazby, je mnohem pomalejší u cyklických dextrinů než u lineárních. [34]

Rozpustnost nativních CD ve vodě je ve srovnání s lineárními či rozvětvenými dextriny nižší. Z uvedených typů je nejméně ve vodě rozpustný β-cyklodextrin. Uvádí se, že je to způsobeno silnými mezimolekulovými vazbami v krystalické mřížce. Strukturní modifikace nativních cyklodextrinů vede ke zlepšení fyzikálně-chemických vlastností, jako je právě rozpustnost ve vodě a v organických rozpouštědlech. [34, 39] V Tabulce 1 jsou uvedeny vybrané fyzikálně-chemické parametry nativních CD.

Cyklodextriny nejsou rozpustné v nepolárních organických rozpouštědlech. Dobře rozpustné jsou spíše v polárních rozpouštědlech, jako je voda, methanol nebo dimethylsulfoxid. Rozpustnost závisí na mnoha faktorech, ať už je to teplota, druh rozpouštědla nebo typ komplexu „hostitel-host“. Například, pokud je hostující molekula dobře rozpustná, je pravděpodobné, že i celý inkluzní komplex bude vykazovat vyšší rozpustnost než samotný cyklodextrin. To platí i obráceně. Pokud je inkluzní komplex složen z hostující molekuly se špatnou rozpustností, bude celková rozpustnost nižší než rozpustnost samotného cyklodextrinu. [40]

Tabulka 1. Vybrané fyzikálně-chemické vlastnosti nativních CD. [30]

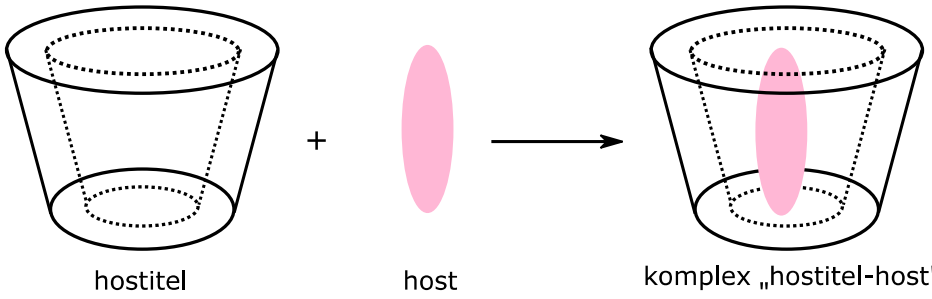
Vlastnosti	Cyklodextrin		
	α	β	γ
Počet glukózových jednotek	6	7	8
Molární hmotnost [$g \cdot mol^{-1}$]	973	1135	1297
Rozpustnost ve vodě při 25°C [$g \cdot (100\ cm^3)^{-1}$]	14,5	1,85	8,19
Objem kavity [nm^3]	0,174	0,262	0,427
Specifický objem kavity [$cm^3 \cdot g^{-1}$]	0,10	0,14	0,20

2.4 Tvorba supramolekulárních komplexů

Významnou vlastností cyklodextrinů je schopnost tvořit s jinými molekulami supramolekulární komplexy typu „hostitel-host“. V takovém komplexu mohou být v dutině cyklodextrinu (hostitel) inkludovány organické či anorganické molekuly (host). [31] Lipofilní dutina cyklodextrinu poskytuje prostředí, do kterého mohou vstoupit příslušně velké nepolární látky a vytvořit tak supramolekulární komplex. [38] Mezi takové látky patří alifatické uhlovodíky a alkoholy, aromatické uhlovodíky, aminy, aminokyseliny, anorganické ionty, vzácné plyny a mnoho dalších. Tvorba komplexu

nejčastěji probíhá ve vodě nebo ve směsi vody a jiného polárního rozpouštědla, nicméně také na rozhraní plynné a pevné fáze. Molekula hosta je v makrocyklu stabilizována nekovalentními vazbami, kterými jsou van der Waalsovy síly, disperzní a vodíkové vazby anebo elektrostatické síly. [31, 41]

Vazba mezi molekulou hosta a hostitelem není pevná či dokonce trvalá, ale závisí především na dynamické rovnováze a na tom, jak dobře je molekula hosta schopna interagovat s hostitelem. Hlavní hnací silou tvorby komplexu je hydrofobní efekt, který spočívá v uvolnění nepolární molekuly hosta z vodného prostředí a jeho přesunu do dutiny cyklodextrinu. Jakmile se dostane molekula hosta do kavity cyklodextrinu, dojde k přesunu molekul vody do okolní kapaliny, čímž se dosáhne stabilního nižšího energetického stavu. [38, 42] Na Obrázku 12 je jednoduchou formou znázorněna tvorba binárního komplexu typu „hostitel-host“.



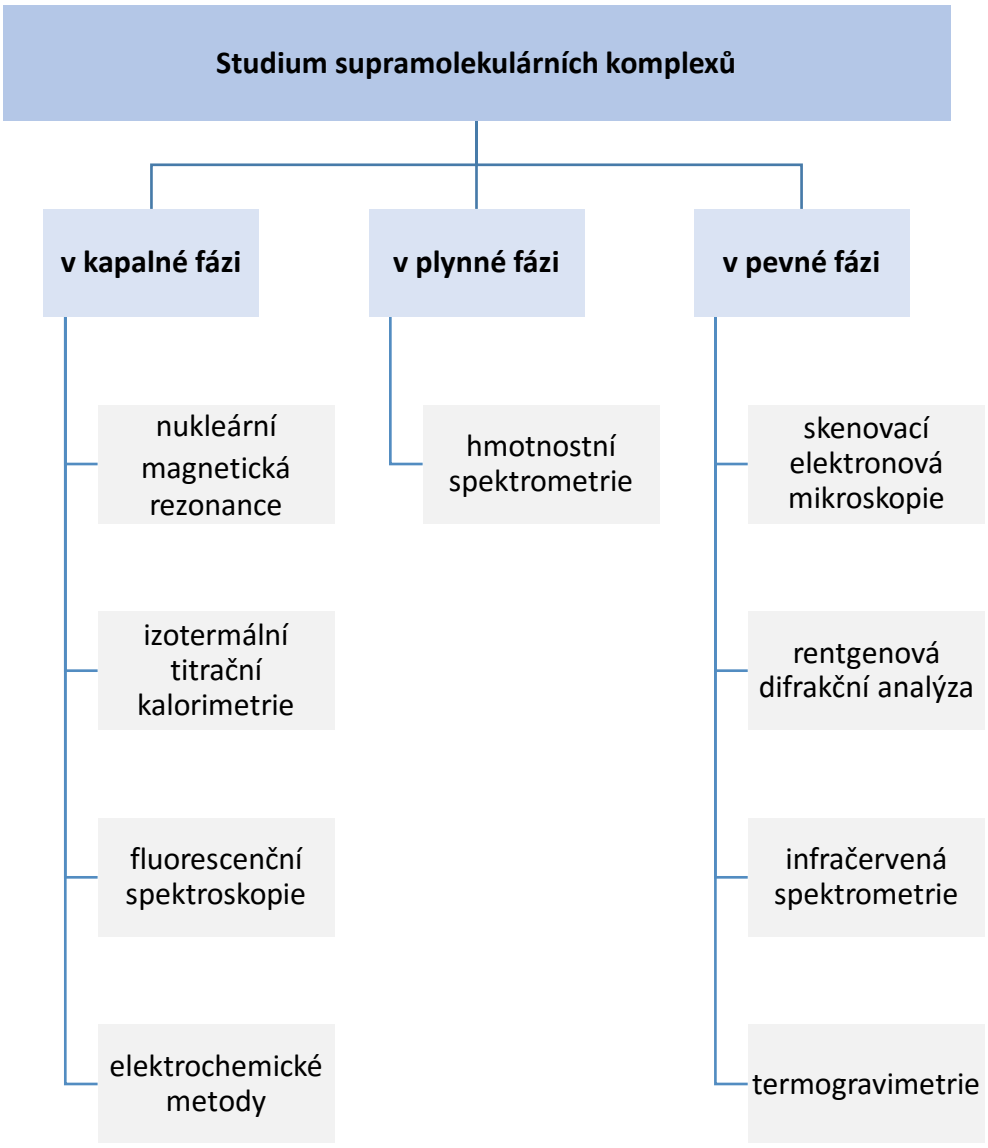
Obrázek 12. Vznik supramolekulárního komplexu typu „hostitel-host“.

Schopnost cyklodextrinu vytvořit inkluzní komplex s molekulou hosta závisí taktéž na relativní velikosti cyklodextrinu a hostující molekuly. V případě, že má molekula hosta nesprávnou velikost a tvar (geometrii), nemusí dojít k tvorbě komplexu typu „hostitel-host“. Dalším důležitým faktorem jsou termodynamické interakce mezi jednotlivými složkami systému (cyklodextrin, host, rozpouštědlo). Aby se vytvořil komplex, musí existovat energetická hnací síla, která táhne hosta do dutiny cyklodextrinu. [38, 43]

Výška kavity α-, β- a γ-CD je shodná a činí 0,78 nm. Počet glukózových jednotek určuje vnitřní průměr kavity a její objem. Na základě těchto rozměrů může α-cyklodextrin vytvářet supramolekulární komplexy s molekulami o nízké molekulové hmotnosti nebo se sloučeninami s alifatickými postranními řetězci. β-CD je vhodný pro komplexaci s alifatickými, aromatickými a heterocyklickými sloučeninami. Nejvyšší počet glukózových jednotek a tím pádem největší objem kavity má γ-cyklodextrin, který díky tomu může pojmout i větší molekuly, např. steroidy. [1]

2.5 Metody stanovení supramolekulárních komplexů

Supramolekulární komplexy lze studovat jak v roztoku, tak i v pevné a plynné fázi, za použití metod, které jsou uvedeny na Obrázku 13. [44] Některé z nich pak budou v následujících kapitolách stručně popsány.



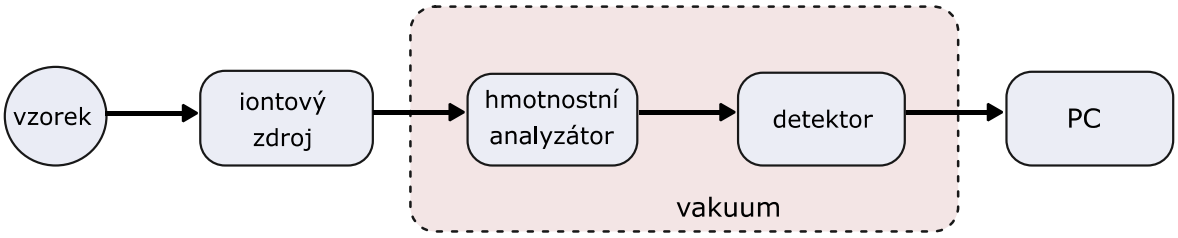
Obrázek 13. Přehled metod vhodných k charakterizaci supramolekulárních komplexů.

2.5.1 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie (MS; z angl. *Mass Spectrometry*) je analytická metoda, která slouží k převedení molekul na ionty, rozlišení těchto iontů podle poměru hmotnosti a náboje (*m/z*) a následnému záznamu relativních intenzit jednotlivých iontů. Výstupem měření je hmotnostní spektrum, což je graf závislosti intenzity proudu iontů na hodnotách *m/z*. [37, 45, 46, 47]

Aby se zabránilo rozrušování nekovalentních vazeb v inkluzním komplexu, využívají se pro měření tzv. měkké ionizační techniky. Jejich aplikace nezpůsobuje narušení vzájemných interakcí mezi molekulou hosta a hostitele. [37, 48]

Elektrosprejová ionizace (ESI; z angl. *Electrospray Ionization*) je jednou z měkkých ionizačních technik, které se využívají k měření supramolekulárních komplexů. Princip spočívá v přenesení iontů z roztoku do plynné fáze za vzniku jak kladně, tak záporně nabitých iontů. Měřený analyt, který je rozpuštěn ve vhodném rozpouštědle, je zaváděn kapilárou do rozprašovací komůrky. K rozprášení kapalné fáze dochází vlivem nehomogenního elektrického pole. V procesu elektrosprejování vznikají drobné kapičky s vysokou hustotou povrchového náboje. Ty jsou protiproudem horkého sušícího plynu, nejčastěji dusíkem o teplotě asi 200 °C, rychle vysušeny a zbaveny rozpouštědla. Disociované látky přechází do plynné fáze a vzniklé ionty jsou vedeny vstupní štěrbinou přes iontovou optiku do hmotnostního analyzátoru, kde na základě fyzikálních principů dochází k jejich rozdělení. Po průchodu iontů hmotnostním analyzátorem následuje detektor, který poskytuje analogový signál úměrný počtu dopadajících iontů. Tento signál je pak po digitalizaci převeden do počítače a vhodným programovým vybavením je zpracován do formy hmotnostních spekter. [46, 47, 48] Základní části hmotnostního spektrometru jsou uvedeny na Obrázku 14. [46]



Obrázek 14. Schéma hmotnostního spektrometru s ionizací za atmosférického tlaku.

2.5.2 Nukleární magnetická rezonance

Nukleární magnetická rezonance (NMR; z angl. *Nuclear Magnetic Resonance*) je metoda založená na interakci elektromagnetického záření s atomovými jádry vzorku umístěného v silném magnetickém poli. Obecně vzato slouží NMR k identifikaci a strukturní analýze organických látek. Může být však využita také v kvantitativní analýze ke stanovení obsahu a čistoty látky ve vzorku. V oboru supramolekulární chemie představuje NMR jednu ze základních metod sloužící k určení stechiometrie, geometrie a vazebné konstanty supramolekulárních komplexů. [45, 49]

Měření spočívá v umístění vzorku do rotující skleněné kyvety, která se nachází v silném homogenním magnetickém poli s jižním a severním pólem. Magnetické pole vytváří u moderních přístrojů elektromagnet na bázi supravodivosti. Zdrojem proměnného vysokofrekvenčního pole je radiofrekvenční vysílač. Jako detektor slouží radiofrekvenční přijímač, což je cívka vinutá kolem kyvety kolmo jak na směr siločar magnetického pole, tak na směr osy cívky zdroje. Radiofrekvenční signál je vyhodnocen vhodným zařízením. Výstupem měření je spektrum NMR, což je graf závislosti intenzity naměřeného signálu na chemickém posunu δ (relativní vyjádření rozdílu mezi polohou signálu standardu a měřené látky v hodnotách ppm). [45, 49, 50, 51]

2.5.3 Infračervená spektrometrie

Infračervená spektrometrie (IR; z angl. *Infrared Spectrometry*) se využívá ke strukturní analýze a identifikaci organických i anorganických sloučenin. Podstatou této analýzy je absorpce infračerveného záření molekulami látek. Výstupem měření je spektrum, jakožto grafické znázornění závislosti transmitance nebo absorbance na vlnové délce dopadajícího záření nebo vlnočtu. Infračervené záření má větší vlnovou délku a nižší energii než záření ultrafialové a viditelné. Infračervená oblast odpovídá elektromagnetickému záření o velikosti vlnových délek 0,78–1000 μm a vlnočtu 13000–10 cm^{-1}. Tuto oblast spektra lze rozdělit do tří intervalů:

- blízká infračervená oblast: 13000–500 cm^{-1};
- střední infračervená oblast: 5000–200 cm^{-1};
- vzdálená infračervená oblast: 200–10 cm^{-1}. [45, 52]

Největší význam při identifikaci organických sloučenin má oblast spektra v intervalu vlnočtů 4000–400 cm^{-1}. V této oblasti se organické sloučeniny projevují největším počtem absorpčních pásů. [53, 54]

2.5.4 Izotermální titrační kalorimetrie

Izotermální titrační kalorimetrie (ITC; z angl. *Isothermal Titration Calorimetry*) je termodynamická technika spočívající v měření množství uvolněného nebo spotřebovaného tepla při interakci molekul. ITC poskytuje komplexní termodynamický profil molekulární interakce. Umožňuje stanovit hodnoty vazebné konstanty, reakční stechiometrii, vazebnou entalpii a entropii. [48]

Analýza pomocí ITC se provádí za konstantní teploty a měří se pouze změny tepla vyvolané přídavkem ligandu k reakční směsi. Reakce je aktivována změnou chemického složení vzorku pomocí titrace požadovaným reaktantem. Teplo uvolněné při přídavku jedné složky ke druhé je následně měřeno. Výsledkem měření je pak vazebná izoterma, což je křivka závislosti entalpie na molárním poměru roztoku. [55]

2.6 Aplikace cyklodextrinů ve vybraných oblastech

Zapouzdření molekuly hosta do kavity cyklodextrinu může vést ke změně fyzikálních a chemických vlastností jak hostující, tak i hostitelské molekuly. [31]

Využití schopnosti cyklodextrinu zapouzdřit jinou molekulu nabízí následující výhody:

- zlepšení rozpustnosti ligandů;
- změna chemické reaktivity hostujících molekul;
- fixace velmi těkavých látek;
- ochrana látek proti působením mikroorganizmů;
- potlačení nežádoucích chutí a vůní;
- stabilizace barviv, vitaminů, esenciálních olejů a mnoho dalších. [38]

2.6.1 Aplikace cyklodextrinů v potravinářském průmyslu

V potravinářském průmyslu lze aplikovat jako přídatné látky všechny tři základní druhy cyklodextrinů. Jsou to látky netoxické povahy, které nejsou absorbovány v tenkém střevě gastrointestinálního traktu, ale jsou zcela metabolizovány mikroflórou tlustého střeva. [56] Použití β-CD v potravinářství je definováno vyhláškou č. 4/2008 Sb., kterou se stanoví

druhy a podmínky použití přídatných látek a extrakčních rozpouštědel při výrobě potravin. Dle této vyhlášky má β-CD přidělen kód E 459, je zařazen do skupiny stabilizátorů a nosičů a jeho maximální povolená koncentrace v potravinovém výrobku je 1000 $mg \cdot kg^{-1}$. α-CD a γ-CD nemají přidělený E kód. [57]

Schopnost vytvářet supramolekulární komplexy může být využívána např. pro ochranu aroma, barvy, chuti nebo vitaminů, kde cyklodextriny mohou sloužit jako enkapsulační činidla. Většina přírodních, ale i umělých aromat jsou těkavé oleje či kapaliny, a právě zapouzdření těchto látek do kavity CD umožňuje tyto látky ochránit před vytěkáním. Jako stabilizátory lze cyklodextriny aplikovat při výrobě studených omáček a margarínů, nebo mohou být využívány jako pomůcky při odstraňování cholesterolu z živočišných produktů, jako je mléko, máslo a vejce. [58] Z olejů mohou být také pomocí CD odstraněny volné mastné kyseliny, čímž lze zlepšit vlastnosti olejů (např. snížit tvorbu kouře a menší pěnivost při smažení nebo zpomalit oxidaci a žluknutí). [59, 60]

2.6.2 Aplikace cyklodextrinů ve farmaceutickém průmyslu

Léčivé látky v přípravcích by měly vykazovat určitý stupeň rozpustnosti ve vodě, ale zároveň by měly být i dostatečně hydrofobní, aby mohly pronikat přes buněčné membrány. Jednou z významných vlastností cyklodextrinů je právě schopnost zvýšit permeaci léčivých látek přes buněčné membrány. Samotná propustnost molekul cyklodextrinů přes membrány je poněkud obtížná, vzhledem k jejich poměrně velké molekulové hmotnosti (Tabulka 1, str. 26) a hydrofilnímu vnějšímu povrchu. [39, 61] V tomto případě tedy lipofilní kavita cyklodextrinů působí jako nosič hydrofobních molekul a zajišťuje jejich doručení na povrch biologické membrány (např. kůže, sliznice nebo rohovka). [32]

Jak již bylo zmíněno výše, většina chemoterapeutik nevykazuje dostatečnou rozpustnost ve vodě. Obvykle se tento problém řeší pomocí organických rozpouštědel, povrchově aktivních látek nebo vytvořením extrémních podmínek pH. To však může mít za následek nežádoucí vedlejší účinky na lidský organismus. Zavedení cyklodextrinů ve farmacii nabízí zřetelné výhody, neboť se jedná o látky netoxické, biologicky degradabilní, a hlavně díky své schopnosti tvořit supramolekulární komplexy jsou multifunkčně aplikovatelné. Cyklodextriny lze využívat jako stabilizátory biologicky aktivních a těkavých látek. Dále se používají k potlačení hořké chuti, nepříjemného zápachu a dráždivého efektu léčiva. [58, 59, 61] Vzhledem k omezené rozpustnosti nativních cyklodextrinů se ve farmacii

využívají spíše modifikované CD, jako např. maltosyl-β-CD, sulfbutylether-β-CD (SBE-β-CD), hydroxypropyl-β-CD (HP-β-CD) či hydroxypropyl-γ-CD (HP-γ-CD). [62]

2.6.3 Ostatní využití cyklodextrinů

Díky schopnosti vytvářet stabilní supramolekulární komplexy s jinými molekulami nachází CD uplatnění i v dalších oblastech jako je zemědělský, kosmetický či chemický průmysl, makromolekulární chemie, biotechnologie a životní prostředí. [63]

V oblasti životního prostředí lze cyklodextriny aplikovat pro odstranění organických znečišťujících látek a těžkých kovů z půdy či vody. Z průmyslových odpadních vod mohou být komplexací odstraňovány např. ekologicky škodlivé aromatické látky, jako je fenol a *p*-chlorfenol. Pro tyto úkony se nejčastěji používají modifikované β-CD. [63]

Cyklodextriny nacházejí své uplatnění také v organické syntéze, kde mohou ovlivňovat průběh (zrychlení nebo změnu selektivity) chemických reakcí. Podle mechanismu účinku cyklodextrinu je možno rozlišit několik typů reakcí, při nichž cyklodextrin:

- má funkci „reakční nádoby“, která řídí selektivitu reakce sterickým bráněním části inkludované molekuly;
- urychluje reakci participací hydroxylové nebo připojené skupiny;
- přenáší reakční činidla mezi fázemi. [31]

3 CHARAKTERISTIKA SUPRAMOLEKULÁRNÍCH KOMPLEXŮ MEZI VYBRANÝMI FLAVONOIDY A CYKLODEXTRINY

Na rostliny lze pohlížet i jako na nevyčerpatelné zdroje biologicky aktivních látek, které nachází uplatnění v potravinářském, kosmetickém a farmaceutickém průmyslu. Aplikace přírodních látek místo syntetických nabízí některé výhody, jako je nízká toxicita a vysoká biokompatibilita. Mezi takové látky patří již zmíněné flavonoidy, fenolické kyseliny nebo alkaloidy. [64]

Flavonoidy jsou zkoumány především pro jejich protizánětlivé, antimikrobiální a antioxidační vlastnosti. Na druhou stranu, tato skupina látek vykazuje omezenou rozpustnost ve vodě, nízkou biologickou dostupnost a relativně vysokou citlivost vůči některým okolním vlivům, jako je např. teplota, pH a UV-záření. Díky tomu je jejich aplikační potenciál značně omezen. Tvorba supramolekulárních komplexů s cyklodextriny může (ale nemusí) významně ovlivnit některé z vlastností flavonoidů. [64, 65] Cílem této kapitoly je shrnout informace z recentních publikací, které se zabývají studiem tvorby supramolekulárních komplexů mezi flavonoidy a cyklodextriny, a případně také vlivem komplexace na vybrané parametry.

3.1 Supramolekulární komplexy flavanolů s cyklodextriny

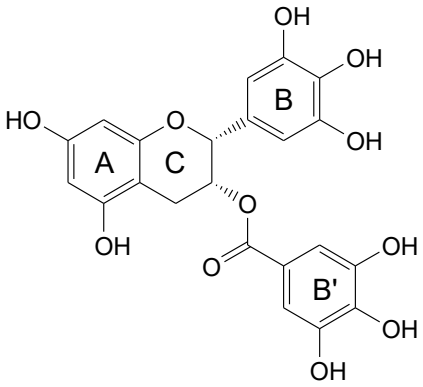
Katechin, epikatechin a epigallokatechin gallát jsou flavanoly vyskytující se ve velkém množství v listech čajovníku čínském a jsou významné nejen antioxidačními účinky, ale působí i jako přírodní antidiabetika. [66]

Folch-Cano a kol. studovali tvorbu a stabilitu supramolekulárních komplexů (-)-epigallokatechin gallátu (EGCG; Obrázek 15) s β-CD, HP-β-CD a heptakis(2,6-di-*O*-methyl)-β-CD (DM-β-CD). U vzniklých komplexů stanovovali pomocí fluorescenční spektroskopie konstanty stability (K_S) v závislosti na teplotě (298, 303, 308 a 313 K). Z naměřených hodnot, které jsou uvedeny v Tabulce 2 vyplývá, že u komplexů EGCG@HP-β-CD a EGCG@DM-β-CD se konstanta stability se zvyšující se teplotou snižuje, zatímco u komplexu EGCG@β-CD se zvyšuje. Čím vyšší hodnota K_S, tím je komplex stabilnější. Na základě těchto hodnot dospěli autoři k závěru, že nejstabilnější komplexy vytváří EGCG s DM-β-CD, jelikož konstanta stability nabývala nejvyšších hodnot při nejnižší teplotě. [67]

Tabulka 2. Asociační konstanty při různých teplotách komplexů EGCG@CD.

T [K]	K_S [M^{-1}]		
	EGCG@HP-β-CD	**EGCG@DM-β-CD**	**EGCG@β-CD**
298	$1{,}02 \cdot 10^4$	$2{,}27 \cdot 10^4$	$6{,}34 \cdot 10^3$
303	$8{,}52 \cdot 10^3$	$2{,}01 \cdot 10^4$	$7{,}47 \cdot 10^3$
308	$6{,}17 \cdot 10^3$	$1{,}82 \cdot 10^4$	$8{,}38 \cdot 10^3$
313	$5{,}64 \cdot 10^3$	$1{,}53 \cdot 10^4$	$8{,}92 \cdot 10^3$

Výsledky z NMR analýzy potvrdily výskyt mezimolekulárních interakcí mezi CD a EGCG, přičemž uvnitř kavity CD byl inkludován benzenový a pyranový kruh (Obrázek 15, kruh A a C) molekuly EGCG. Aromatické kruhy B a B´ byly orientovány k sekundárnímu okraji molekuly cyklodextrinu. [67]



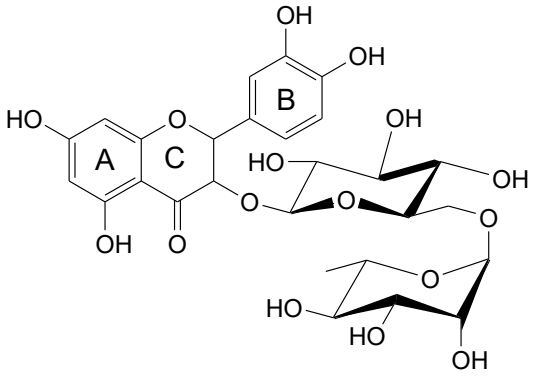
Obrázek 15. Strukturní vzorec (-)-epigallokatechin gallátu.

Dias a kol. studovali supramolekulární komplex katechinu (Obrázek 5, str. 17) s β-CD. U vzniklého komplexu byly provedeny testy rozpustnosti dle metod Higuchiho a Connorse [68] a zjištěny konstanty stability K_S v závislosti na teplotě (300, 308, 315 a 320 K). Nejstabilnější komplex katechin@β-CD byl pozorován při nejnižší teplotě (300 K) s hodnotou $K_S = 211$ M^{-1}. Se vzrůstající teplotou hodnoty K_S klesaly. NMR spektroskopií sledovali pravděpodobnou strukturu komplexu katechin@β-CD a výsledky měření potvrdily, že molekula katechinu vstupuje do kavity cyklodextrinu benzenovým kruhem B. [69] NMR analýzu inkluzního komplexu katechin@β-CD provedl i Takashi, který ve své práci uvádí, že molekula katechinu může vstupovat do cyklodextrinu kruhy B, C a částečně okupovat kavitu β-CD i benzenovým kruhem A. [70]

3.2 Supramolekulární komplexy flavonolů s cyklodextriny

Rutin, systematicky kvercetin-3-β-rutinosid (Obrázek 16), tvoří zpravidla základní složku léčivých přípravků k léčbě cévních onemocnění. Zapouzdření této molekuly do kavity β-CD, HP-β-CD a HP-γ-CD bylo popsáno různými autory, kteří studovali vliv supramolekulárních komplexů na rozpustnost a antioxidační aktivitu rutinu. [71]

Nguen a kol. ve své publikaci předkládají důkazy, že rutin může tvořit binární komplexy s β-CD, HP-β-CD i HP-γ-CD. Stabilitu vzniklých komplexů vyjadřovali konstantou stability K_S, kterou vypočetli z fázového diagramu rozpustnosti. Jednotlivým komplexům odpovídali následující hodnoty: HP-γ-CD (405,3 M^{-1}) > HP-β-CD (390,6 M^{-1}) > β-CD (250,3 M^{-1}) > HP-α-CD (24,3 M^{-1}). Toto pořadí lze odůvodnit rozdílem velikosti kavity CD vzhledem k velikosti molekuly rutinu. Velikost kavity HP-α-CD je nejmenší ze všech typů (0,45–0,57 nm) a zdá se být příliš malá pro relativně velkou molekulu rutinu. Zřejmě proto byla hodnota K_S tohoto komplexu nejnižší. Přítomnost hydroxypropylových skupin HP-β-CD a HP-γ-CD významně zlepšuje schopnost zachytit molekulu rutinu, a proto byly tyto komplexy nejstabilnější. Z fázového grafu rozpustnosti, který udává Nguen ve své publikaci je patrné, že tvorbou inkluzních komplexů se rozpustnost rutinu značně navýšila. Metodami založenými na eliminaci radikálů (DPPH a ABTS metody) sledoval Nguen změnu antioxidační kapacity při skladování rutinu a komplexu rutin@HP-β-CD. Tvorba inkluzního komplexu významně chrání molekulu rutinu před tepelnou a UV degradací. Z výsledků NMR analýzy autoři usoudili, že do kavity cyklodextrinu vstupuje molekula rutinu benzenovým kruhem A. [72]



Obrázek 16. Strukturní vzorec rutinu.

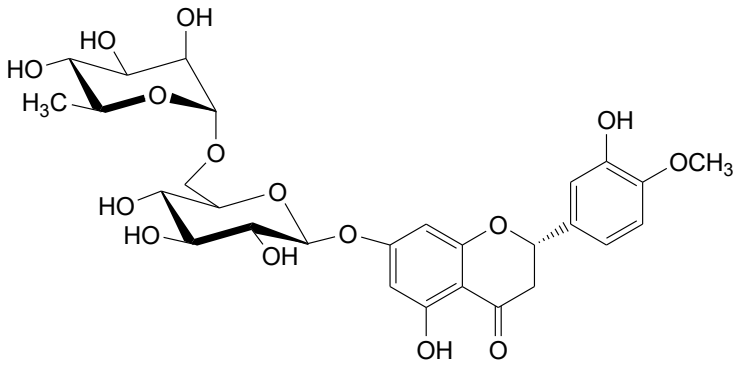
Dalším významným zástupcem flavonolů je kvercetin (KVT, Obrázek 2, str. 14), jehož použití v oblasti výroby léčiv je omezené z důvodu jeho nízké rozpustnosti ve vodě. Jullian a kol. ve své práci popsala tvorbu binárních komplexů kvercetinu s β-CD, HP-β-CD a se SBE-β-CD. Stabilitu komplexů vyjádřili pomocí konstant stability K_S, které získaly z fázových diagramů rozpustnosti. Nejstabilnější komplex tvořil kvercetin se SBE-β-CD, jelikož konstanta stability nabývala nejvyšších hodnot ($K_S = 4{,}0 \cdot 10^3$ M^{-1}). Další v pořadí byl komplex KVT@HP-β-CD s hodnotou $K_S = 1{,}4 \cdot 10^3$ M^{-1}. Nejnižší K_S byla stanovena pro KVT@β-CD s hodnotou $K_S = 602$ M^{-1}. Dále Jullian studovala závislost rozpustnosti kvercetinu na koncentraci vybraných CD. Došla k závěru, že rozpustnost kvercetinu roste se zvyšující se koncentrací CD v následujícím pořadí: β-CD < HP-β-CD < SBE-β-CD. Metodou DPPH byla srovnávána antioxidační aktivita samotného kvercetinu a jeho komplexů s β-CD, HP-β-CD a SBE-β-CD. Nejsilnější antioxidační aktivita byla naměřena u komplexu KVT@SBE-β-CD. [73]

3.3 Supramolekulární komplexy flavanonů s cyklodextriny

Naringenin (Obrázek 4, str. 16) je flavanon s dobrou antioxidační kapacitou a schopností snižovat hladinu cholesterolu v krevní plazmě. Tvorba supramolekulárních komplexů mezi naringeninem a β-CD, HP-β-CD, DM-β-CD a s methylovaným-β-CD byla popsána několika autory. Shulman a kol. popsali tvorbu inkluzního komplexu naringenin@HP-β-CD a prokázali, že rozpustnost tohoto komplexu je 400krát vyšší, než je tomu u samotného naringeninu. Zkoumali také schopnost transportu naringeninu a jeho komplexu s HP-β-CD přes model lidského střevního epitelu (Caco-2 buňky) v závislosti na čase. Až 11krát rychlejší prostup látky přes buněčnou vrstvu vykazoval naringenin v přítomnosti HP-β-CD. To může být využíváno ve farmaceutickém průmyslu při výrobě léků k léčbě diabetu a dyslipidémie. [74] Yang a kol. provedli NMR analýzu inkluzních komplexů naringeninu s β-CD, DM-β-CD a heptakis(2,3,6-tri-*O*-methyl)-β-CD (TM-β-CD). Ze získaných hodnot autoři zjistili, že molekula naringeninu vstupuje do kavity cyklodextrinu benzenovým kruhem B. [75]

Ficarra a Tommasini se svým kolektivem zkoumali rozpustnost komplexů hesperetinu (Obrázek 4, str. 16) a hesperidinu (Obrázek 17) s β-CD a HP-β-CD. Rozpustnost a chemická stabilita byla zlepšena jak u komplexů hesperetinu s β-CD a HP-β-CD, tak i u komplexů hesperidinu s β-CD a HP-β-CD. U komplexu hesperetin@HP-β-CD byla stanovena vyšší hodnota K_S ($2{,}1 \cdot 10^4$ M^{-1}) ve srovnání s K_S hesperidin@HP-β-CD (90 M^{-1}).

Takto velký rozdíl autoři vysvětlují tím, že molekula hesperetinu je mnohem menší, méně polární a je vhodnější k interakci s hydrofobní kavitou CD. Metodou založenou na vychytávání OH-radikálů zjistili, že antioxidační kapacita těchto flavanonů v komplexu s HP-β-CD byla navýšena. [76, 77]



Obrázek 17. Strukturní vzorec hesperidinu.

3.4 Supramolekulární komplexy flavonů s cyklodextriny

Jullian a kol. studovali tvorbu binárních komplexů luteolinu (LU, Obrázek 3, str. 15) s β-CD, HP-β-CD a DM-β-CD. Spektrofotometrickou titrací byla pro každý komplex zjištěna konstanta stability K_S. Nejstabilnější komplex tvořil luteolin s HP-β-CD ($K_S = 5{,}1 \cdot 10^3$ M^{-1}) dále pak s DM-β-CD ($K_S = 1{,}6 \cdot 10^3$ M^{-1}) a nejnižší K_S byla zjištěna u komplexu LU@β-CD (602 M^{-1}). NMR analýzou byly získány informace o pravděpodobné geometrii studovaných komplexů. Zatímco molekula luteolinu v komplexech s β-CD a HP-β-CD byla začleněna do kavity CD tak, že vyčnívající B kruh byl orientován k primárnímu okraji CD, u komplexu LU@DM-β-CD byl tento kruh orientován směrem k sekundárnímu okraji. Výsledky měření antioxidační aktivity metodou DPPH potvrdily, že luteolin byl v komplexu odolnější vůči oxidačnímu stresu v tomto pořadí: LU@HP-β-CD > LU@DM-β-CD > LU@β-CD > LU. [78]

Hyunmyung zkoumal supramolekulární komplexy CD s vybranými flavony ve vodném roztoku a měřili rozpustnost daných komplexů. Pro experiment vybrali flavony chrysin (Obrázek 9, str. 22), luteolin a apigenin (Obrázek 3, str. 15), a makrocykly β-CD, DM-β-CD a HP-β-CD. Z lineární části fázového diagramu rozpustnosti stanovili konstanty stability K_S a potvrdili zlepšení rozpustnosti flavonů v komplexech s CD v následujícím pořadí: HP-β-CD > DM-β-CD > β-CD. [79]

II. PRAKTICKÁ ČÁST

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Syntéza flavonu

4.1.1 Přístroje a vybavení

Teploty tání (t_t) byly měřeny na přístroji Büchi Melting Point B–540 a nejsou korigovány. TLC analýzy byly prováděny na deskách typu TLC Silica gel $60F_{254}$ firmy Merck KgaA. Jako mobilní fáze byla použita směs rozpouštědel petrolether/ethylacetát (4/1, v/v). Výsledky TLC analýzy jsou vyjádřeny retenčními faktory (R_f). NMR spektra byla měřena na přístroji Bruker Avance 500 při frekvenci 500,13 MHz (^{1}H). Jako interní standard bylo používáno rozpouštědlo (^{1}H: δ(DMSO-d_5) = 2,50 ppm. Při interpretaci protonových spekter bylo použito následujících zkratek: s (singlet), d (dublet), t (triplet), m (multiplet). Infračervená spektra byla měřena na přístroji Spektrometr FTIR ALPHA – T, Bruker v podobě KBr tablet. Při vypisování spekter byly použity následující zkratky značící intenzitu absorpčního pásu: w (slabá), m (střední), s (silná), případně také jeho šířku: b (široký pás). Kvantitativní analýza reakčních směsí byla měřena na plynovém chromatografu s hmotnostní detekcí Shimadzu GCMS-QP2010 vybaveným kvadrupólovým hmotnostním analyzátorem. Chromatografická kolona: Equity-1 (30 m; 1 mm); nosný plyn: helium (konstantní průtok 203 $cm \cdot s^{-1}$); teplotní program: 100 °C/7 min, 25 °C/min zvýšení na teplotu 250 °C, která byla držena patřičně dlouhou dobu; teplota nástřiku: 250 °C; iontový zdroj: 200 °C, 70 eV. Při vypisování hmotnostních spekter byly brány v úvahu signály s relativním zastoupením alespoň 5 % (neplatí pro molekulové ionty). Charakterizace vybraných fragmentů pozorovaných v hmotnostních spektrech je uváděna v závorce za hodnotou *m/z*. ESI-IT-MS analýzy byly prováděny na hmotnostním spektrometru s iontovou pastí amaZon X (Bruker Daltonics) vybaveném elektrosprejovým ionizačním zdrojem. Veškerá měření byla provedena v pozitivním a negativním skenovacím módu. Do iontového zdroje byly vzorky přiváděny v podobě roztoku CH_3OH/H_2O (1/1, v/v) o koncentraci 0,5 $\mu g \cdot ml^{-1}$ kovovou kapilárou při konstantním průtoku 3 $\mu l \cdot min^{-1}$. Ostatní parametry byly následující: napětí na kapiláře: ±4,2 kV; teplota sušícího plynu (220 °C); průtok sušícího plynu (6 $dm^3 \cdot min^{-1}$); tlak rozprašovacího plynu (55,16 kPa). Jako sušící a rozprašovací plyn byl použit dusík. Případné další parametry byly optimalizovány během jednotlivých experimentů. Tandemová hmotnostní spektra byla, po izolaci příslušného iontu, měřena pomocí kolizí

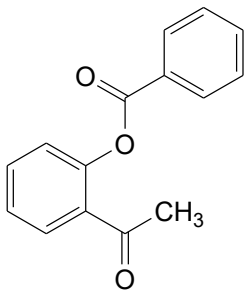
indukované disociace (CID; z angl. *collision-induced dissociation*). Jako kolizní plyn bylo použito helium.

Všechny použité reaktanty, činidla a rozpouštědla byly zakoupeny z komerčních zdrojů a nadále nebyly nijak dodatečně čištěny.

4.1.2 Příprava 2-acetylfenyl-benzoátu

V baňce s kulatým dnem o objemu 25 cm^3 bylo rozpuštěno 2,4 cm^3 (20 mmol) 2-hydroxyacetofenonu v 5 cm^3 pyridinu. Následně byl přidán benzoylchlorid v množství 3,5 cm^3 (30 mmol). Baňka byla uzavřena chlorkalciovým uzávěrem a směs intenzivně míchána magnetickou míchačkou. Jakmile se směs přestala samovolně zahřívat, v míchání se pokračovalo ještě dalších 20 minut. Za intenzivního míchání byla reakční směs nalévána do 250 cm^3 kádinky, ve které byla připravena směs 120 cm^3 3% HCl a 40 g drceného ledu. Vysrážené pevné podíly byly odfiltrovány za sníženého tlaku a následně promyty 4 cm^3 chladného methanolu a 5 cm^3 vody. Surový produkt byl po vysušení překrystalizován z methanolu. Výtěžek reakce činil 4,21 g (88 %).

Název produktu:	2-acetylfenyl-benzoát
Sumární vzorec:	$C_{15}H_{12}O_3$
Molární hmotnost:	240,25 $g \cdot mol^{-1}$
Vzhled:	bezbarvá krystalická látka
Teplota tání:	86–88 °C (lit. 87–88 °C) [80]
R_f	0,25



^{1}H NMR (DMSO-d_6): δ 1,91 (s, 3H, CH_3); 6,94 (d, 1H, J = 7,7 Hz); 7,27 (s, 1H); 7,44 – 7,59 (m, 4H); 7,82 (s, 1H); 8,01 (m, 2H) ppm. IR (KBr): 2997 (w), 1736 (s), 1685 (s), 1602 (m), 1451 (m), 1361 (m), 1271 (s), 1203 (s), 1063 (s), 1026 (m), 767 (m), 705 (s), 608 (m) cm^{-1}. GC-MS: (t_R = 14,91 min); *m/z*(%): 240 (M^+, 3), 105 (100), 77 (37), 51 (8). ESI-MS (pos.) *m/z*(%): 503,0 $[2 \cdot M+Na]^+$ (23), 380,0 $[3 \cdot M+H+K]^{2+}$ (8), 278,9 $[M+K]^+$ (5), 263,0 $[M+Na]^+$ (100).

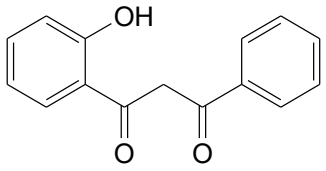
4.1.3 Syntéza 1-(2-hydroxyfenyl)-3-fenylpropan-1,3-dionu

V kádince o objemu 50 cm^3 bylo rozpuštěno 2,4 g (10 mmol) 2-acetylfenyl-benzoátu v 8 cm^3 pyridinu. Jakmile byl vzniklý roztok zahřát na 50 °C, bylo do něj přidáno 0,85 g jemně drceného KOH a reakční směs byla intenzivně míchána přibližně 15 minut. Po vysrážení žluté sraženiny draselné soli produktu byla směs ochlazena na laboratorní teplotu a bylo do ní přidáno 15 cm^3 10% CH_3COOH. Vyloučený produkt byl odfiltrován za sníženého tlaku a vysušen prosáváním vzduchu přes filtrační koláč. Poté byl dalších 6 hodin sušen pomocí vakua. Výtěžek reakce činil 1,99 g (83 %). Získaný produkt byl do další reakce použit bez nutnosti jakékoliv purifikace.

Název produktu: 1-(2-hydroxyfenyl)-3-fenylpropan-1,3-dion

Sumární vzorec: $C_{15}H_{12}O_3$

Molární hmotnost: 240,25 $g \cdot mol^{-1}$



Vzhled: světle žlutá krystalická látka

Teplota tání: 111–113 °C (lit. 121–122 °C) [81]

R_f 0,56

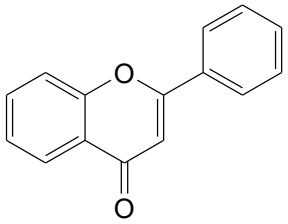
^{1}H NMR (DMSO-d_6): δ 4,65 (s, 2H); 7,38 (d, 1H, J = 8,5 Hz); 7,48 (t, 1H, J = 8,0 Hz); 7,63 (t, 2H, J = 7,5 Hz); 7,70 (t, 1H, J = 8,0); 7,77 (t, 1H, J = 7,5 Hz); 7,98 (d, 1H, J = 7,5 Hz); 8,14 (d, 2H, J = 7,5 Hz) ppm. IR (KBr): 3063 (w), 1608 (s), 1573 (s), 1490 (s), 1333 (m), 1301 (s), 1199 (s), 1023 (s), 1063 (s), 901 (m), 732 (s), 620 (m), 527 (w), 453 (w) cm^{-1}. ESI-MS (pos.) *m/z*(%): 519,1 $[2 \cdot M+K]^+$ (9), 503,1 $[2 \cdot M+Na]^+$ (38), 380,0 $[3 \cdot M+H+K]^{2+}$ (10), 279,0 $[M+K]^+$ (7), 263,0 $[M+Na]^+$ (100), 241,0 $[M+H]^+$ (9). ESI-MS (neg.) *m/z*(%): 238,8 $[M–H]^-$ (100).

4.1.4 Příprava flavonu

V baňce s kulatým dnem o objemu 25 cm^3 bylo rozpuštěno 1,2 g (5 mmol) 1-(2-hydroxyfenyl)-3-fenylpropan-1,3-dionu v 7 cm^3 ledové CH_3COOH. Za stálého míchání bylo do směsi po kapkách přidáno 0,25 cm^3 koncentrované H_2SO_4. Baňka byla připojena na zpětný chladič a na vodní lázni byla zahřívána při teplotě 90 °C po dobu 1 hodiny. Po uplynutí této doby byla reakční směs za intenzivního míchání nalita na směs drceného ledu s vodou (40 g ledu a 100 cm^3 vody). Po roztání ledu byl vysrážený produkt odfiltrován za

sníženého tlaku na fritě. Z filtračního koláče byla kyselina vymyta vodou. Surový produkt byl překrystalizován z hexanu a izolován ve výtěžku 866 mg (78 %).

Název produktu:	flavon (2-fenyl-4*H*-chromen-4-on)
Sumární vzorec:	$C_{15}H_{10}O_2$
Molární hmotnost:	222,24 g·mol^{-1}
Vzhled:	bezbarvé jehličky
Teplota tání:	95–97 °C (lit. 94–97 °C) [82]
R_f	0,29



^{1}H NMR (DMSO-d_6): δ 7,49 (t, 1H, J = 7,5 Hz); 7,58 (m, 3H); 7,76 (d, 1H, J = 8,0 Hz); 7,81 (t, 1H, J = 7,0); 8,04 (d, 1H, J = 8,0 Hz); 8,09 (d, 2H, J = 6,5 Hz) ppm. IR (KBr): 3072 (w), 1647 (s), 1466 (s), 1377 (s), 1226 (m), 1130 (m), 1029 (m), 769 (s), 673 (m), 606 (w), 529 (w), 457 (w) cm^{-1}. GC-MS: (t_R = 17,54 min); *m/z*(%): 223 (M^+, 16), 222 (100), 221 (35), 195 (7), 194 (50), 165 (13), 121 (8), 120 (97), 102 (18), 97 (29), 93 (5), 92 (78), 82 (23), 77 (9), 76 (14), 75 (7), 74 (7), 64 (32), 63 (28), 62 (5), 51 (11), 50 (10). ESI-MS (pos.) *m/z*(%): 483,0 $[2\cdot M+K]^+$ (14), 467,1 $[2\cdot M+Na]^+$ (90), 464,1 $[3\cdot M+H+K]^{2+}$ (44), 456,2 $[3\cdot M+H+Na]^{2+}$ (5), 445,1 $[2\cdot M+Na]^+$ (26), 261,0 $[M+K]^+$ (31), 245,1 $[M+Na]^+$ (29), 223,1 $[M+H]^+$ (100).

4.2 ESI-MS analýzy inkluzních komplexů

ESI-MS analýzy zaměřené na studium tvorby inkluzních komplexů flavonu a kvercetinu s cyklodextriny (α-, β- a γ-) byly prováděny na hmotnostním spektrometru s iontovou pastí amaZon X vybaveného elektrosprejovým ionizačním zdrojem. Jednotlivé vzorky byly připravovány bezprostředně před samotnou analýzou. Flavon byl připraven vícekrokovou syntézou a použit pro tyto experimenty až po jeho úplné strukturní charakterizaci. Kvercetin byl získán ze zásob kolegů z Ústavu analýzy a chemie potravin. Cyklodextriny byly zakoupeny z komerčních zdrojů.

4.2.1 Specifikace hmotnostního spektrometru

Název:	amaZon X (Bruker Daltonics)
Ionizační zdroj:	elektrosprej

Hmotnostní analyzátor:	iontová past
Rozsah *m/z*:	50–3000
Sušící a rozprašovací plyn:	dusík
Způsob fragmentace iontů:	kolizí indukovaná disociace (CID)
Kolizní plyn:	helium
Software:	Trap Control, Data Analysis

4.2.2 Parametry ESI-MS analýz inkluzních komplexů

Do iontového zdroje byly vzorky o koncentraci 25 μM přiváděny v podobě roztoku CH_3OH/H_2O (1/1, v/v) kovovou kapilárou při konstantním průtoku 3 $\mu l \cdot min^{-1}$. Analýzy byly prováděny jak v pozitivním, tak v negativním skenovacím módu. Níže jsou uvedeny nejvýznamnější parametry měření:

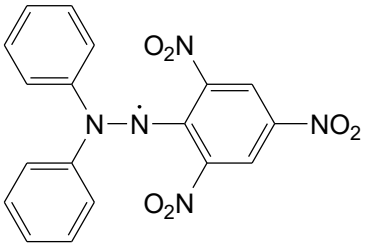
Skenovaní mód:	Enhanced resolution (8 100 $m/z \cdot s^{-1}$)
Napětí na kapiláře:	±4,0 kV
Napětí na konci kapiláry:	±140 V
Tlak rozprašovacího plynu:	206,84 kPa
Průtok sušícího plynu:	6 $dm^3 \cdot min^{-1}$
Teplota sušícího plynu:	300 °C
ICC (maximální počet iontů v pasti):	200 000
Maximální akumulační čas:	20 ms
Rozpětí *m/z*:	50–3000
Tandemová spektra:	MS/MS

4.2.3 Příprava vzorků pro ESI-MS analýzy inkluzních komplexů

Do vialky o objemu 1,5 cm^3 (Eppendorf® microtube 3810X) byl navážen 1 mg příslušného ligandu (flavon nebo kvercetin), který byl následně rozpuštěn v 1 cm^3 methanolu (v kvalitě LC-MS). Zásobní roztoky flavonoidů byly z důvodu zabránění nežádoucím fotooxidačním reakcím uchovávány v temnu (vialka byla obalena hliníkovou fólií). Stejným způsobem byly připraveny zásobní roztoky cyklodextrinů (α-, β-, γ-) s tím rozdílem, že jako rozpouštědlo byla použita voda (opět v kvalitě LC-MS). Z takto připravených zásobních roztoků bylo pomocí mikropipety odebráno odpovídající množství ligandu a makrocyklu do roztoku CH_3OH/H_2O (1/1, v/v) tak, aby výsledná koncentrace roztoku použitého pro samotnou analýzu činila 25 μM.

4.3 Spektrofotometrické stanovení antioxidační aktivity

Antioxidační aktivita kvercetinu a jeho komplexů s α-, β- a γ-CD byla měřena na jednopaprskovém spektrofotometrickém přístroji Libra S6 (Biochrom) analýzou hodnotící schopnost eliminovat radikály, tzv. metodou DPPH. Na přípravu zásobního roztoku DPPH (2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyl, Obrázek 18) bylo naváženo 12 mg DPPH a převedeno do odměrné baňky o objemu 50 cm^3, která byla doplněna po rysku methanolem. Z tohoto zásobního roztoku byl připraven pracovní roztok. Do kádinky bylo napipetováno 20 cm^3 zásobního roztoku DPPH a přidáno 90 cm^3 methanolu. Vzorek kvercetinu byl připraven rozpuštěním 1 mg kvercetinu v 1 cm^3 methanolu s následným ředěním tak, aby výsledná koncentrace roztoku použitého pro samotnou analýzu činila 25 μM. Vzorky komplexů kvercetinu s příslušným CD byly připraveny způsobem uvedeným v kapitole 4.2.3. Následně byly pro každý vzorek připraveny 4 zkumavky, do kterých bylo napipetováno 4 cm^3 pracovního roztoku DPPH a 210 μl příslušného vzorku. Směs se nechala 60 minut reagovat v temnu. Po uplynutí této doby byla změřena absorbance pracovního roztoku DPPH a všech vzorků při vlnové délce $\lambda = 515$ nm proti methanolu. Měření každého vzorku se tedy opakovalo čtyřikrát.



Obrázek 18. Strukturní vzorec DPPH.

V methanolovém roztoku se DPPH nachází v barevné radikálové formě DPPH·, v níž vykazuje silnou absorpci v oblasti UV. Redukce DPPH antioxidantem se projevuje odbarvením roztoku, které je měřeno spektrofotometricky a z naměřených hodnot je stanoven úbytek absorbance:

$$Úbytek\ absorbance\ [\%] = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \cdot 100 \qquad (4)$$

kde:

A_0 – absorbance pracovního roztoku DPPH

A_1 – absorbance vzorku

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 Syntéza flavonu

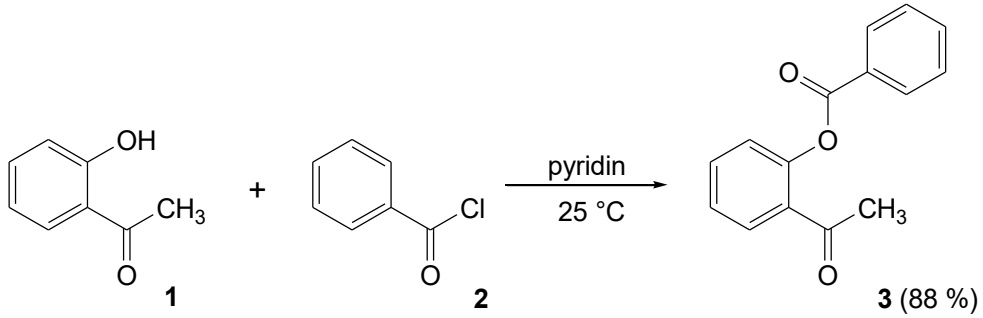
V následujících kapitolách bude diskutována trojstupňová syntéza flavonu (**5**), který byl pro potřeby této diplomové práce zvolen jakožto jeden ze dvou ligandů, u kterých byla studována schopnost vytvářet supramolekulární komplexy s cyklodextriny v plynné fázi (kapitola 5.2). Přestože lze tuto sloučeninu zakoupit z komerčních zdrojů (např. u společnosti Sigma-Aldrich lze 5 g flavonu pořídit za 2 691,- Kč bez DPH), bylo rozhodnuto si jej z dostupných chemikálií připravit.

V současné době je známo několik metod vedoucích k přípravě flavonů ve vysokých výtěžcích, čistotě a odpovídající kvalitě. Flavony mohou být připravovány pomocí mnoha syntetických cest, mezi něž patří Claisenova-Schmidtova kondenzace [83], Vilsmeierova-Haackova reakce [84] nebo mikrovlnná syntéza za použití iontových kapalin [85]. Pro potřeby této práce byla zvolena metoda zahrnující konverzi 2-hydroxyacetofenonu (**1**) na ester **3** (kapitola 5.1.1), který následně podléhá Bakerově-Venkataramanově přesmyku za vzniku β-diketonu **4** (kapitola 5.1.2), jenž je podroben kysele katalyzované cyklodehydrataci za vniku flavonu (**5**, kapitola 5.1.3). [86]

5.1.1 Příprava 2-acetylfenyl-benzoátu

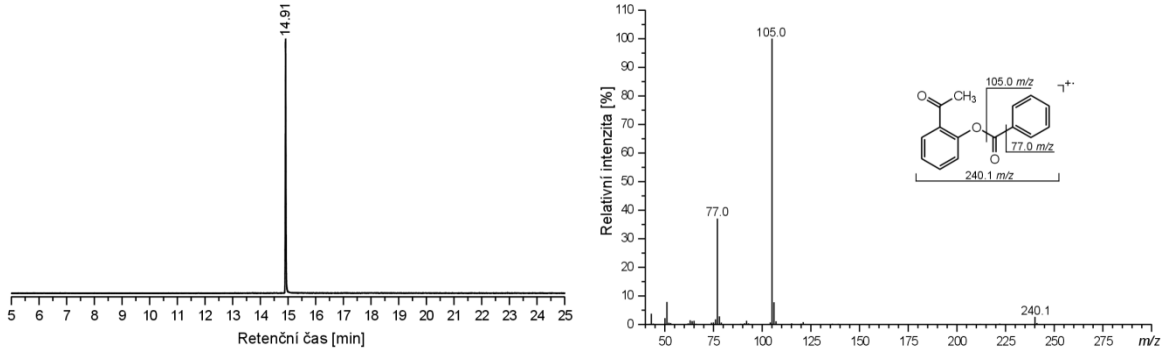
V prvním kroku vedoucím k přípravě požadovaného flavonu byla provedena reakce 2-hydroxyacetofenonu (**1**) s benzoylchloridem (**2**) v pyridinu (Schéma 1). Reakce byla doprovázena samovolným zahříváním, které přibližně po 1 hodině odeznělo. Získaný surový produkt byl překrystalizován z methanolu za vzniku požadovaného produktu ve velmi dobrém výtěžku 88 %.

Schéma 1



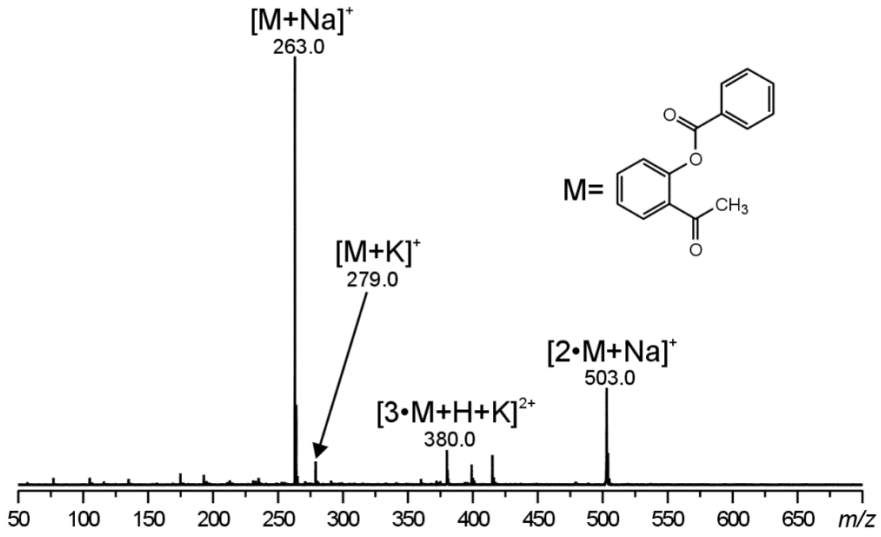
Čistota a struktura esteru **3** byla potvrzena pomocí běžně používaných analytických metod, jako je GC-MS, ESI-MS a ^{1}H-NMR.

V chromatogramu získaném pomocí techniky GC-MS byl pozorován jediný pík s retenčním časem 14,91 minuty (Obrázek 19 vlevo). V hmotnostním spektru získaném pomocí ionizace elektrony (EI-MS, Obrázek 19 vpravo), byl detekován molekulový ion (v podobě kationradikálu) o *m/z* 240, z jehož relativní intenzity (< 3 %) lze usuzovat na nízkou stabilitu tohoto iontu. Naopak iont s nejvyšší intenzitou představoval signál o *m/z* 105.



Obrázek 19. Část záznamu GC-MS (vlevo) a EI-MS spektrum (vpravo) sloučeniny **3**.

Ve spektru prvního řádu získaného technikou ESI-MS (Obrázek 20) byl jako hlavní pozorován signál o *m/z* 263,0 odpovídající sodnému aduktu sloučeniny **3** $[M+Na]^+$. Tento signál byl doprovázen dvěma vyššími agregáty, jedenkrát nabitým iontem o *m/z* 503,0 odpovídající sodnému aduktu dimeru sloučeniny **3** $[2\cdot M+Na]^+$ a dvakrát nabitému iontu o *m/z* 380,0, jehož struktura byla určena jako $[3\cdot M+H+K]^{2+}$.

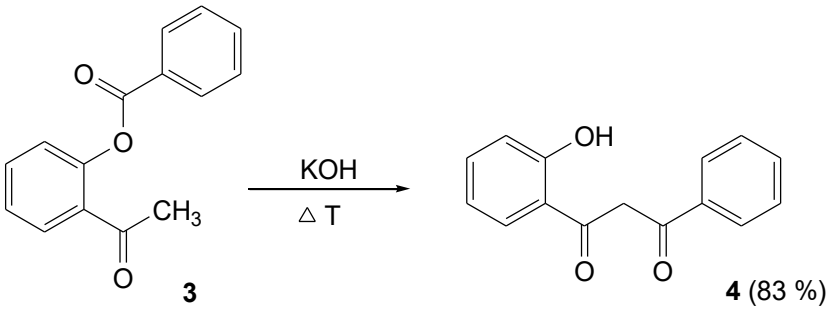


Obrázek 20. ESI-MS spektrum první řádu sloučeniny **3**.

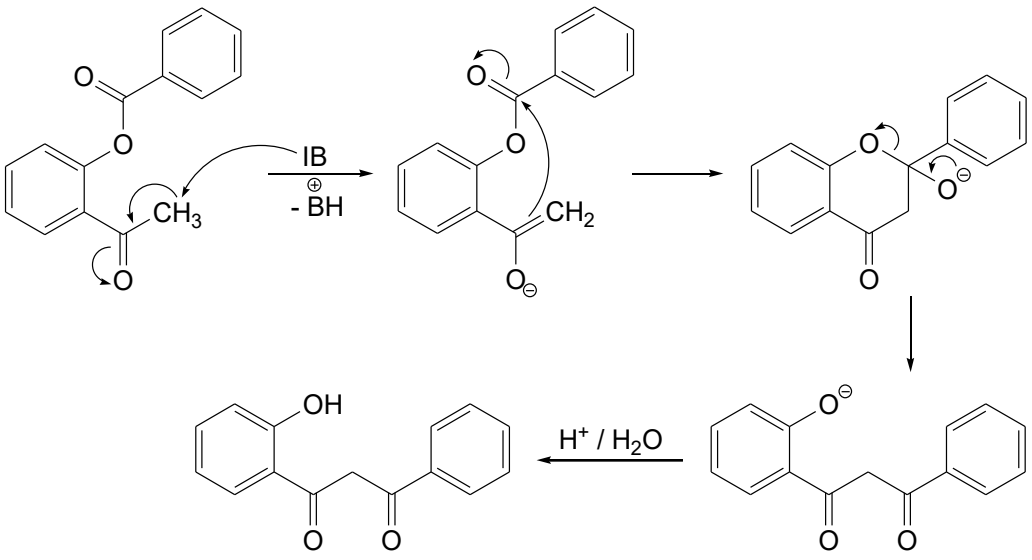
5.1.2 Syntéza 1-(2-hydroxylfenyl)-3-fenylpropan-1,3-dionu

V dalším kroku byl 2-acetylfenyl-benzoát (**3**) podroben bazicky katalyzovanému intramolekulárnímu přesmyku za vzniku dionu **4**, který byl získán ve výtěžku 83 % a v čistotě nevyžadující jakoukoliv další purifikaci (Schéma 2).

Schéma 2



Samotná reakce je pravděpodobně zahájena atakem báze na atom vodíku atomu uhlíku v poloze α vůči karbonylové skupině za vzniku enolátu. Následně je atakován „karbonylový atom uhlíku“ esterové funkční skupiny elektrony z nově vzniklé dvojné vazby za vniku cyklického alkoxidu. V dalším kroku dochází k otevření cyklického intermediátu za vzniku stabilnějšího enolátu, z něhož v důsledku protonace kyselinou použitou při zpracování reakce vzniká požadovaný produkt. Mechanismus Bakerova-Venkataramanova přesmyku je schematicky znázorněn na Obrázku 21.



Obrázek 21. Mechanismus Bakerova-Venkataramanova přesmyku 2-acetylfenyl-benzoátu.

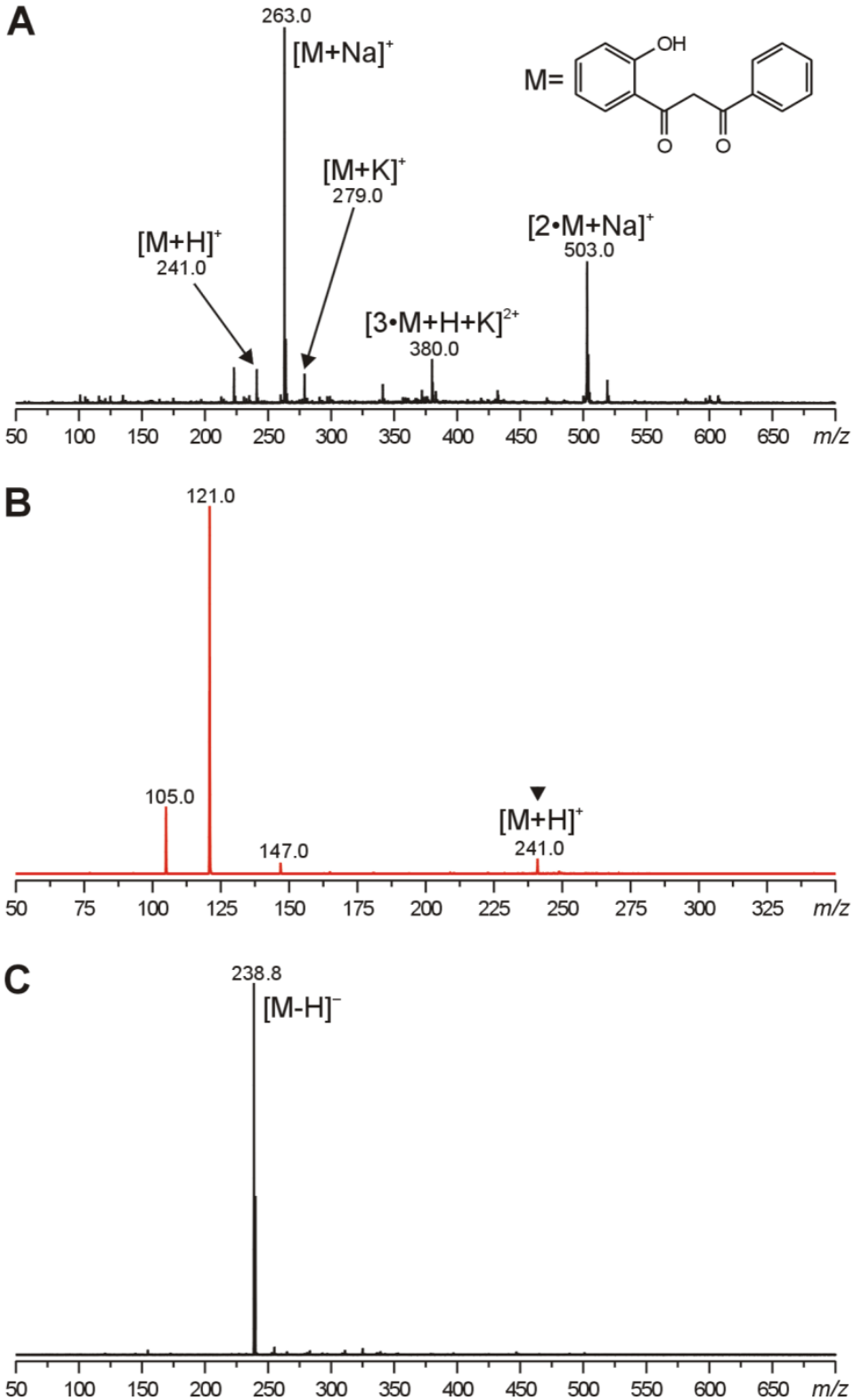
Struktura sloučeniny **4** byla navržena pomocí běžných spektrálních metod. V ^{1}H-NMR spektru této látky nebyl, na rozdíl od spektra sloučeniny **3**, pozorován singlet v oblasti 1,91 ppm odpovídající methylové skupině. Naopak v oblasti 4,65 ppm byl pozorován singlet, jehož integrací bylo zjištěno, že se jedná o dva atomy vodíku pocházející z nově vytvořeného methylenového můstku spojujícího ve struktuře sloučeniny **4** dvě karbonylové skupiny, na něž jsou dále navázány oba aromatické kruhy. Signály pocházející z atomů vodíku obou aromatických kruhů byly pozorovány v oblasti 7,38–8,14 ppm.

V ESI-MS spektru prvního řádu sloučeniny **4**, získaného v pozitivním skenovacím módu (Obrázek 22A), byl jako dominantní pozorován signál o m/z 263,0 odpovídající sodnému aduktu $[M+Na]^+$ sloučeniny **4**. Ve spektru první řádu byly dále detekovány dva jedenkrát nabité signály o *m/z* 503,1 a 519,1, které byly určeny jakožto sodný, respektive draselný adukt dimeru sloučeniny **4**. V neposlední řadě byl v +MS pozorován iont $[M+H]^+$ o *m/z* 241,0. V –MS spektru (Obrázek 22C) pak byl pozorován jedenkrát nabitý signál o *m/z* 238,8 vznikající deprotonací hydroxylové skupiny sloučeniny **4** $[M–H]^–$.

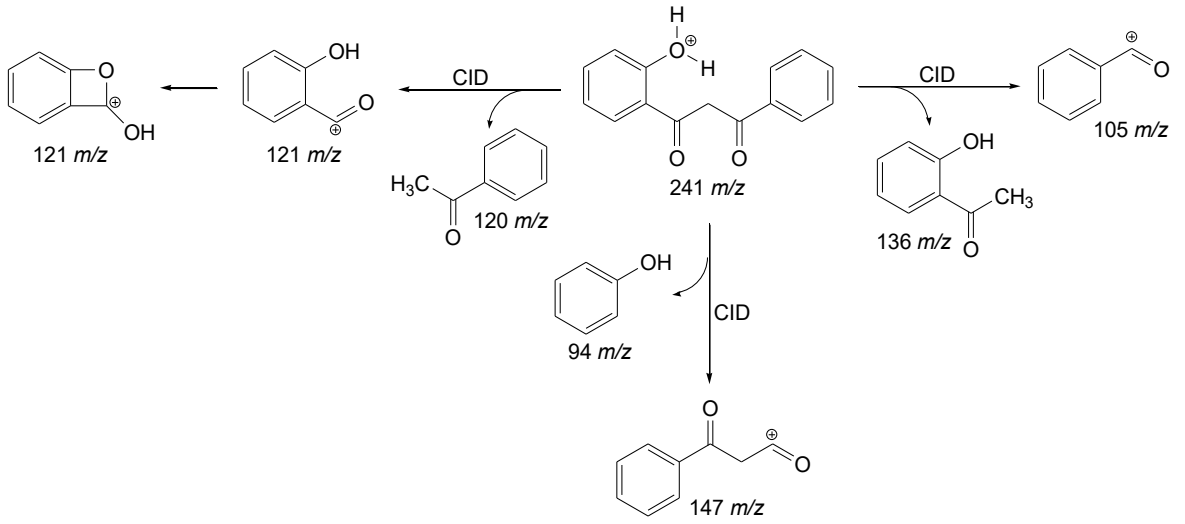
Iont $[M+H]^+$ byl vyizolován a následně podroben fragmentaci za podmínek kolizí indukované disociace (CID). V MS/MS spektru iontu $[M+H]^+$ (Obrázek 22B) byly pozorovány tři signály (147, 121 a 105 *m/z*) vznikající pravděpodobně v důsledku tří různých fragmentačních drah:

- neutrální ztrátou fenolu (94 *m/z*) vzniká iont o *m/z* 147
- neutrální ztrátou fenyl(methyl)ketonu (120 *m/z*) vzniká iont o *m/z* 121
- neutrální ztrátou 1-(2-hydroxyfenyl)ethanonu (136 *m/z*) vzniká iont o *m/z* 105

Zatímco z intenzit iontů 147 a 105 *m/z* lze usuzovat na jejich relativně nízkou stabilitu, u iontu s nejvyšší intenzitou (121 *m/z*) lze uvažovat o intramolekulárním přesmyku původně vznikajícího sekundárního karbokationtu na stabilnější karbokation terciární za vzniku sloučeniny obsahující benzo[*b*]oxetové uskupení. Návrh fragmentačních drah iontu $[M+H]^+$ je uveden na Obrázku 23.



Obrázek 22. ESI-MS sloučeniny **4**. (A) +MS; (B) +MS/MS iontu 241 m/z; (C) –MS

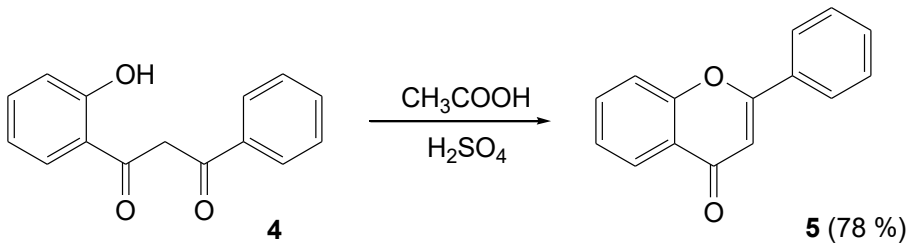


Obrázek 23. Návrh fragmentace iontu 241 *m/z* za podmínek CID.

5.1.3 Syntéza flavonu

Poslední krok vedoucí k syntéze požadované sloučeniny **5** představovala kysele katalyzovaná cyklodehydratační reakce výchozího dionu **4** (Schéma 3), který byl rozpuštěn v ledové kyselině octové, a do vzniklého roztoku bylo po kapkách přidáno předem vypočítané množství kyseliny sírové. Reakční směs byla následně 60 minut zahřívána při teplotě 90 °C. Krystalizací surového produktu z hexanu byla požadovaná sloučenina získána v podobě bezbarvých jehliček ve výtěžku 78 %.

Schéma 3



Čistota a struktura sloučeniny **5** byla potvrzena pomocí GC-MS, NMR a ESI-MS. V ^{1}H NMR spektru sloučeniny **5** bylo pozorováno celkem sedm signálů, přičemž všechny vykazovaly chemický posun v oblasti 7,02–8,01 ppm, tedy v oblasti typické pro aromatické atomy vodíku. Získaná data plně korespondují s daty uvedenými v recentní odborné literatuře [87]

V ESI-MS spektru prvního řádu bylo pozorováno relativně velké množství jedenkrát či dvakrát nabitých signálů, přičemž dominantními byly ion o *m/z* 223,1 odpovídající

protonované molekule $[M+H]^+$ a signál 467,1 *m/z* identifikovaný jako sodný adukt dimeru sloučeniny **5** $[2\cdot M+Na]^+$. Výčet všech pozorovaných typů iontů, je spolu se srovnáním vypočítané a experimentálně zjištěné exaktní hmotnosti, a zjištěnou odchylkou, uveden v Tabulce 3.

Tabulka 3. Vypočítané a experimentální exaktní hmotnosti iontů detekovaných v ESI-MS spektru prvního řádu sloučeniny **5**.

Typ iontu	Exaktní hmotnost [u]		Odchylka [u]
	Vypočítaná	Experimentální	
$[M+H]^+$	223,068	223,064	-0,004
$[M+Na]^+$	245,068	245,057	-0,011
$[M+K]^+$	261,068	261,022	-0,046
$[2\cdot M+H]^+$	445,136	445,078	-0,058
$[4\cdot M+H+Na]^{2+}$	456,136	456,164	+0,028
$[4\cdot M+H+K]^{2+}$	464,136	464,145	+0,009
$[2\cdot M+Na]^+$	467,136	467,109	-0,027
$[2\cdot M+K]^+$	483,136	483,023	-0,113
$[5\cdot M+H+K]^{2+}$	575,170	575,125	-0,045

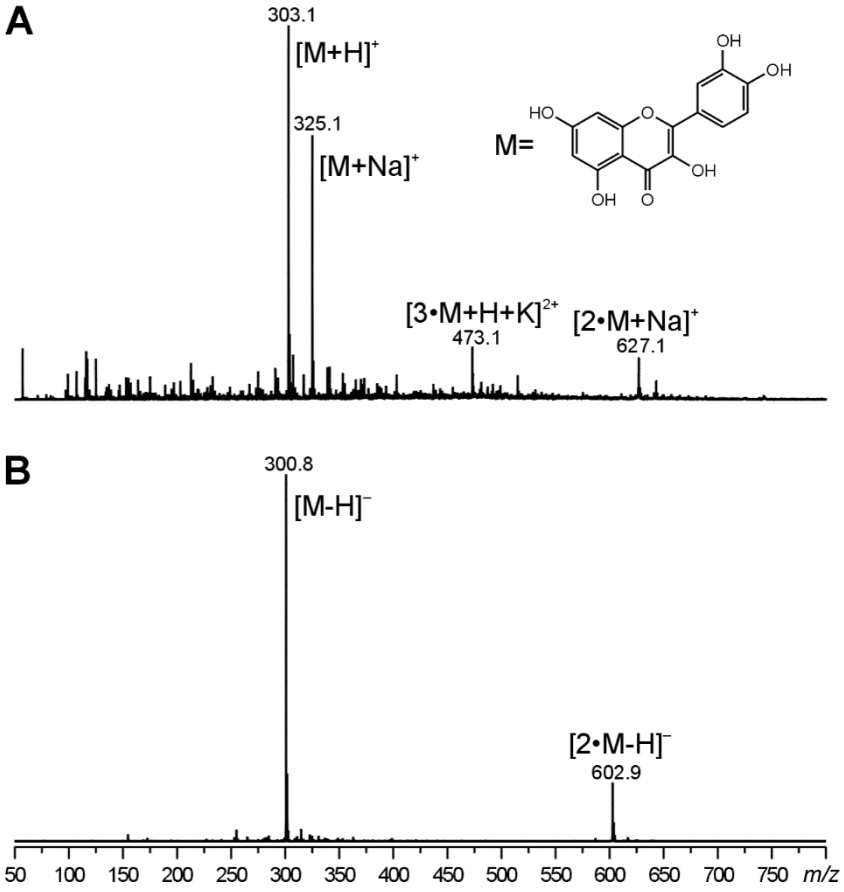
Z Tabulky 3 je patrné, že vyjma iontů sestávajících z jedné molekuly sloučeniny **5**, se ve spektru prvního řádu vyskytovaly také signály, ať už jedenkrát či dvakrát kladně nabité, odpovídající vyšším agregátům, např. dimerům, tetramerům a dokonce pentameru. S ohledem na strukturu sloučeniny **5** lze předpokládat, že by tyto agregáty mohly být v plynné fázi stabilizovány prostřednictvím π–π interakcí, tedy nekovalentních mezimolekulových interakcí toliko typických pro sloučeniny obsahující aromatický (např. benzenový) kruh.

5.2 ESI-MS analýzy inkluzních komplexů

Schopnost dvou vybraných ligandů ze skupiny flavonoidů, a sice flavonu (**5**) a kvercetinu (KVT) vytvářet stabilní supramolekulární komplexy s vybranými typy cyklodextrinů byla studována v plynné fázi, a to pomocí hmotnostního spektrometru s iontovou pastí a elektrosprejovou ionizací (ESI-IT-MS). Před tím, než byly provedeny klíčové experimenty potvrzující či vyvracující tvorbu komplexů „hostitel-host“, bylo přistoupeno k analýze samotných ligandů a hostitelských molekul.

5.2.1 Výsledky ESI-MS analýz samotných ligandů

Výsledky ESI-MS analýzy flavonu jsou popsány v kapitole 5.1.3, proto bude v této kapitole blíže diskutována pouze ESI-MS analýza kvercetinu. Samotná analýza byla provedena ve směsi CH_3OH:H_2O (1:1, v:v) přímým nástřikem vzorku o koncentraci 0,5 $\mu g \cdot ml^{-1}$ do hmotnostního spektrometru. ESI-MS analýza byla provedena jak v pozitivním, tak negativním skenovacím módu. Ve spektru prvního řádu získaném pozitivní ionizací (Obrázek 24A) bylo pozorováno celkem pět signálů, přičemž dominantním byl jedenkrát nabitý iont o *m/z* 303,1 odpovídající protonované molekule $[M+H]^+$, který byl doprovázen sodným aduktem $[M+Na]^+$ o *m/z* 325,1. Dále byly ve spektru prvního řádu pozorovány jedenkrát a dvakrát kladně nabité signály o *m/z* 473,1 $[3 \cdot M+H+K]^{2+}$, 627,1 $[2 \cdot M+Na]^+$ a 643,1 $[2 \cdot M+K]^+$. Ve spektru prvního řádu získaném negativní ionizací (Obrázek 24B) byly pozorovány dva jedenkrát nabité signály určené jako deprotonovaná molekula $[M–H]^–$ (300,8 *m/z*) a deprotonovaný dimer kvercetinu $[2 \cdot M–H]^–$ (602,9 *m/z*).



Obrázek 24. ESI-MS spektra prvního řádu kvercetinu získaná pozitivní (A) a negativní (B) ionizací.

5.2.2 ESI-MS analýza hostitelských sloučenin

Sloučeniny, které v rámci této práce vystupovaly v roli hostitelských makrocyklů, byly α-, β- a γ-cyklodextrin. Jedná se o tzv. nativní cyklodextriny vzájemně se lišící počtem glukózových jednotek tvořících makrocyklus a tedy i různou velikostí kavity, do níž mohou vstupovat molekuly hosta.

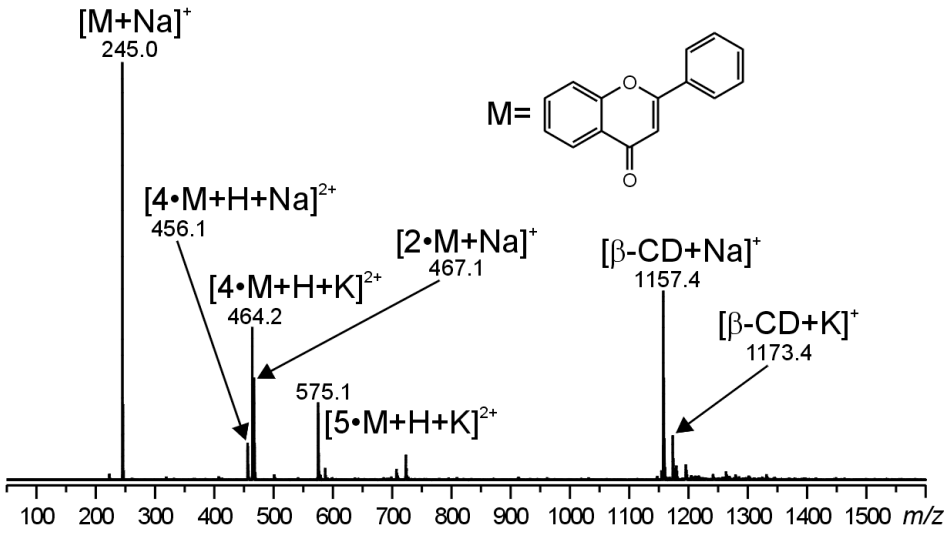
ESI-MS analýzy samotných makrocyklických sloučenin byly provedeny nejen v pozitivním, ale s ohledem na molekulární strukturu jednoho z ligandů (konkrétně kvercetinu), také v negativním skenovacím módu. V +ESI-MS spektru prvního řádu všech tří typů cyklodextrinů byl jako dominantní pozorován dvakrát nabitý ion $[CD+H+K]^{2+}$, který byl doprovázen jedenkrát nabitým sodným aduktem příslušného cyklodextrinu $[CD+Na]^{+}$. Skutečnost, že ve spektrech prvního řádu nebyl detekován ion odpovídající protonované molekule CD není nikterak překvapivá. Nutno podotknout, že se v +MS spektrech všech tří makrocyklů vyskytoval také ion určený jako $[CD+K]^{+}$, nicméně ve velmi nízké intenzitě (< 5 %). Ve spektrech prvního řádu získaných pomocí negativní ionizace byly pozorovány ve všech případech tři signály, které byly identifikovány jako dvojnásobně deprotonovaná molekula $[CD–2\cdot H]^{2–}$, jedenkrát nabitá deprotonovaná molekula $[CD–H]^{–}$ a v neposlední řadě také chloridový adukt cyklodextrinu $[CD+Cl]^{–}$. Výčet všech pozorovaných typů iontů v ±MS, jejich vypočítané a experimentální exaktní hmotnosti, jsou přehledně uvedeny v Tabulce 4.

Tabulka 4. Vypočítané a experimentální exaktní hmotnosti iontů detekovaných v ±MS příslušných cyklodextrinů.

CD	ESI-MS (positiv)				ESI-MS (negativ)					
	$[CD+H+K]^{2+}$		$[CD+Na]^{+}$		$[CD–2\cdot H]^{2–}$		$[CD–H]^{–}$		$[CD+Cl]^{–}$	
	vyp.	exp.	vyp.	exp.	vyp.	exp.	vyp.	exp.	vyp.	exp.
α	506,1	506,2	995,3	995,3	485,2	485,4	971,3	971,4	1007,3	1007,2
β	587,2	587,2	1157,4	1157,4	566,2	566,3	1133,4	1133,5	1169,4	1169,5
γ	668,2	668,3	1319,4	1319,5	647,2	647,1	1295,4	1295,3	1331,4	1331,3

5.2.3 Studium vzniku supramolekulárních komplexů flavonu s CD v plynné fázi

Schopnost vytvářet supramolekulární komplexy v plynné fázi byla nejprve studována na systému **5**·CD. Iniciační experimenty byly provedeny s β-CD, jelikož velikost jeho kavity představuje jakýsi průměr ze všech tří, v této studii použitých, makrocyklických sloučenin a také proto, že je takřka ideální pro inkludaci molekul obsahujících ve své struktuře benzenový kruh (byť substitutovaný hydroxylovými skupinami). Jako první byla provedena ESI-MS analýza systému **5**·β-CD v molárním poměru 1:1, ve směsi methanol:voda (1:1, v:v) a 25 μM koncentraci. Ve spektru prvního řádu získaného v pozitivním skenovacím módu (Obrázek 25) byly pozorovány signály o *m/z* 245, 456, 464, 467 a 575 pocházející z molekuly hosta (bližší charakterizace jednotlivých iontů je uvedena v Tabulce 3 na str. 52) a jedenkrát nabité signály o *m/z* 1157 a 1173 určené jako sodný $[\beta\text{-CD+Na}]^+$ a draselný $[\beta\text{-CD+K}]^+$ adukt hostitele. Žádný signál odpovídající supramolekulárnímu komplexu **5**@β-CD ve spektru nebyl detekován, a to ani v případě upravení některých parametrů měření, např. napětí na konci skleněné kapiláry (CE; z angl. *Capillary Exit*).



Obrázek 25. ESI-MS spektrum prvního řádu směsi **5**·β-CD.

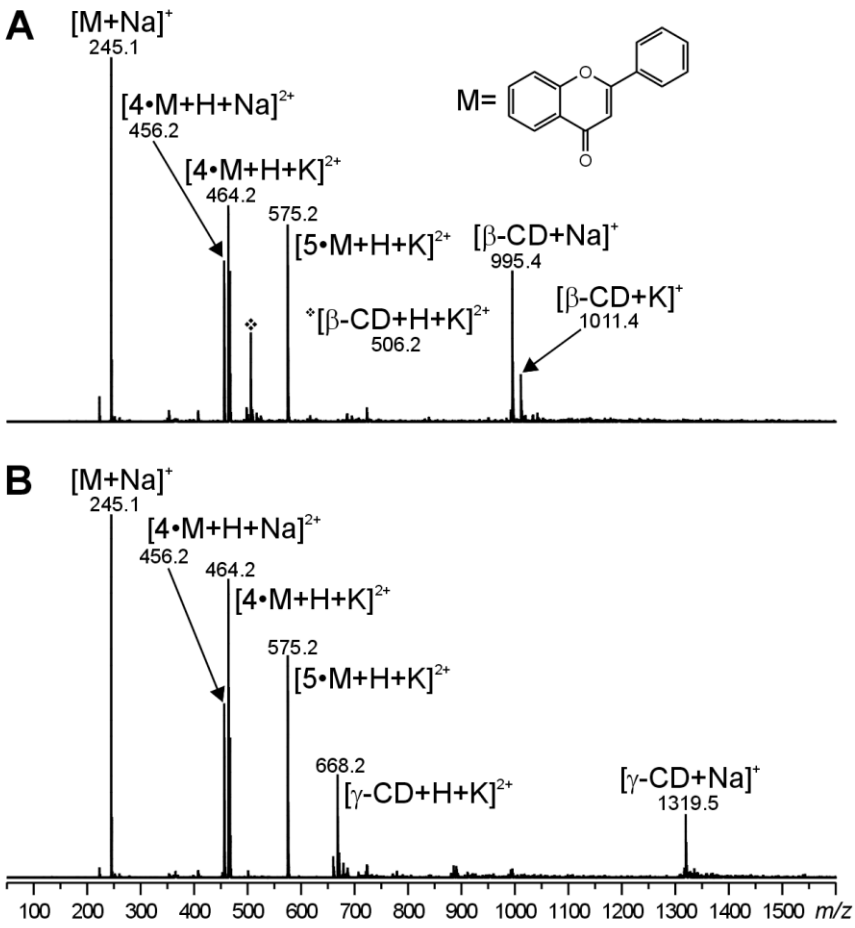
Analýza byla provedena také v negativním skenovacím módu, přičemž ve spektru prvního řádu byly pozorovány pouze signály pocházející z β-CD, což nebylo, s ohledem na strukturu molekuly hosta, nikterak překvapivé. Konkrétně se jednalo o jedenkrát nabitý signál deprotované molekuly $[\beta\text{-CD–H}]^-$ (1133 *m/z*) a dvakrát nabitý signál odpovídající molekule β-CD postrádající dva protony $[\beta\text{-CD–2·H}]^{2-}$ (566 *m/z*).

V dalším kroku bylo přistoupeno k analýze směsi, ve které byl β-CD použit v 5,0 molárním přebytku. Avšak ani takto rapidní navýšení koncentrace hostitelské molekuly ve vzorku nevedlo ke kýženému a do jisté míry předpokládanému cíli, tedy tvorbě inkluzního komplexu.

S ohledem na získané výsledky bylo usouzeno, že se ve směsi nenachází dostatečné množství „volných" protonů (H^+), které by mohly dodávat vznikajícímu komplexu kladný náboj. Proto bylo přistoupeno k provedení ESI-MS experimentu systému **5**·β-CD v molárním poměru 1:1, ve směsi methanol:voda (1:1, v:v) za přídavku 2 μl kyseliny mravenčí. Vyšší počet „volných" protonů se však projevil pouze zvýšením relativní intenzity signálu o *m/z* 223, který odpovídá protonované molekule hosta.

Protože ani kyselejší prostředí, a z toho plynoucí vyšší distribuce protonů v systému, nevedly k tvorbě komplexu **5@**β-CD, byla provedena analýza ekvimolární směsi flavonu (**5**) s β-CD v prostředí 50 mM vodného roztoku octanu sodného (AcONa) s cílem zvýšit v prostředí koncentraci sodných kationtů, s nimiž β-CD vytváří v plynné fázi adukty, jejichž tvorba je upřednostňována před vznikem protonované formy β-CD. Výsledkem však byla pouze tvorba série jedenkrát nabitých signálů, které byly identifikovány jako agregáty typu $[(AcONa)_n+Na^+]^+$, např. 187 *m/z* (n = 2), 269 *m/z* (n = 3), 433 *m/z* (n = 5) apod.

Po provedení výše uvedených ESI-MS analýz bylo přistoupeno k ověření schopnosti tvorby supramolekulárních komplexů flavonu (**5**) s α-CD (Obrázek 26A) a γ-CD (Obrázek 26B). V těchto případech byly analýzy uskutečňovány v ekvimolárním poměru jednotlivých komponent, ve směsi methanol:voda (1:1, v:v) a 25 μM koncentraci. V obou případech byly ve spektrech prvního řádu získaných v pozitivním skenovacím módu pozorovány pouze signály pocházející z molekuly hosta, případně hostitele. Signál odpovídající příslušnému supramolekulárnímu komplexu nebyl ve spektrech detekován.



Obrázek 26. ESI-MS spektra prvního řádu směsi **5**·α-CD (A) a směsi **5**·γ-CD (B).

Závěrem této kapitoly lze konstatovat, že schopnost flavonu (**5**) vytvářet stabilní supramolekulární komplexy v plynné fázi s nativními CD nebyla prokázána. Nutno podotknout, že ani v odborné literatuře se nepodařilo dohledat studii, v rámci níž by byla tvorba komplexů typu „hostitel-host" mezi flavonem a CD, ať už v roztoku, pevné či plynné fázi, popsána.

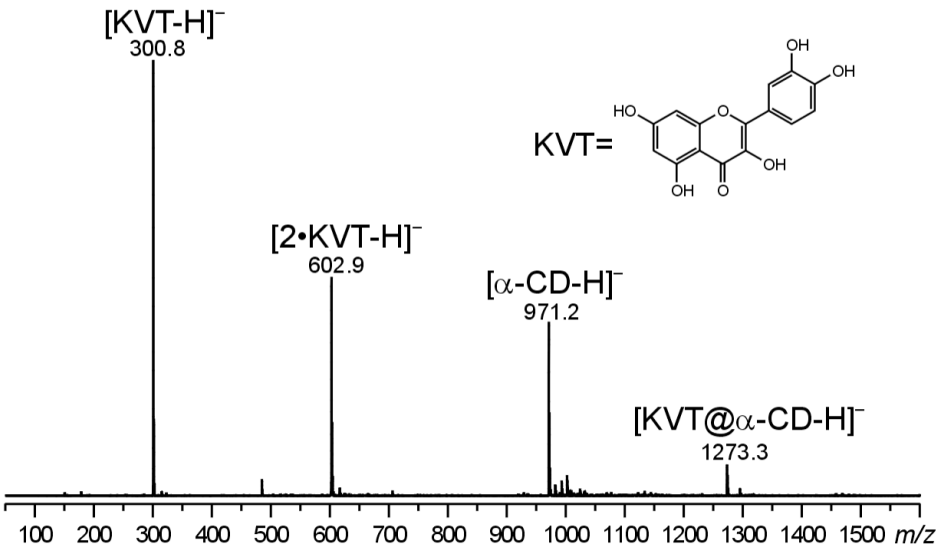
5.2.4 Studium vzniku supramolekulárních komplexů kvercetinu s CD v plynné fázi

Druhou molekulou, která v této práci vystupovala v roli hosta, byl kvercetin (KVT). Ve spektrech prvního řádu získaných v pozitivním skenovacím módu, nebyl ani v jedné ze studovaných ekvimolárních směsí KVT·CD pozorován signál odpovídající hodnotou *m/z* příslušnému typu komplexu. Detekovány tak byly pouze ionty pocházející z molekuly hosta a hostitele.

S ohledem na skutečnost, že molekula hosta (KVT) obsahuje ve své struktuře hned pět hydroxylových skupin, byla pozornost od pozitivního skenovacího módu odvrácena

a fokusována na mód negativní. Ostatně, již výsledky získané při ESI-MS analýze samotného KVT (Obrázek 24B) dávaly tomuto rozhodnutí „zelenou“.

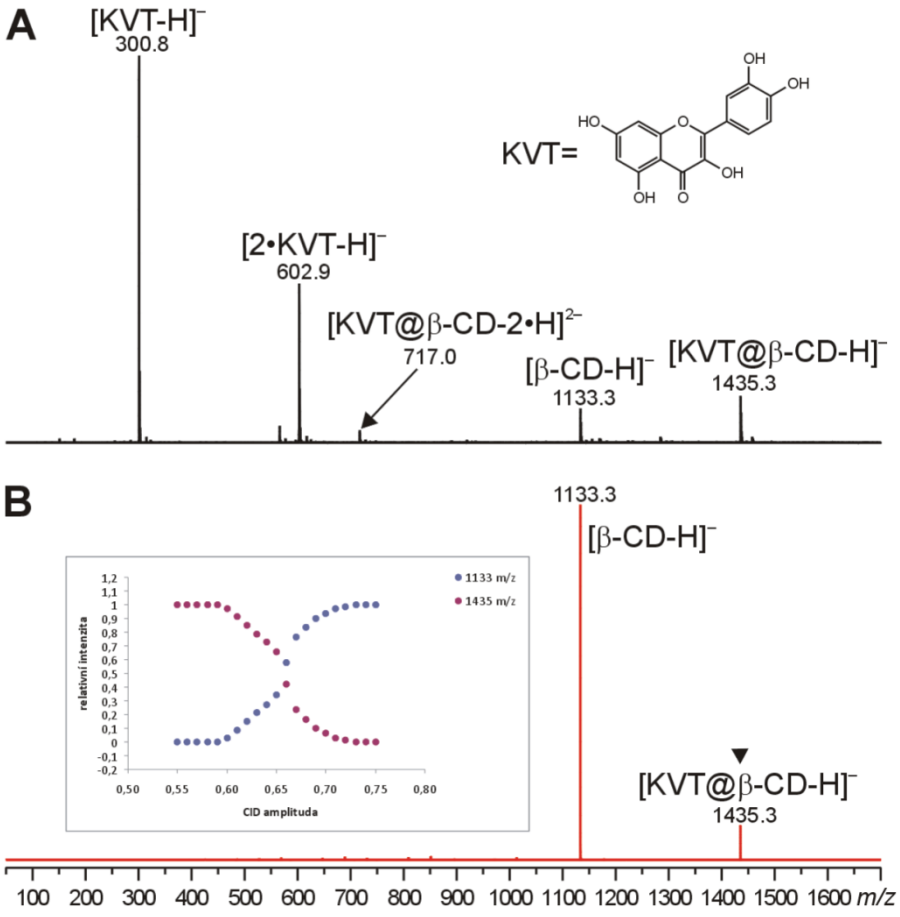
Ve spektru prvního řádu (–MS) ekvimolární směsi KVT·α-CD (methanol:voda, 1:1, v:v) byly pozorovány celkem čtyři signály (Obrázek 27). Dominantním byl ion o *m/z* 300,8 odpovídající deprotonované molekule hosta $[KVT–H]^-$, který byl doprovázen jedenkrát nabitým signálem o *m/z* 602,9 určeným jako deprotonovaný dimer hosta $[2·KVT–H]^-$. Dále byla –MS pozorována deprotonovaná molekula hostitelského makrocyklu $[α\text{-}CD–H]^-$ (971,2 *m/z*). V neposlední řadě se v –MS nacházel jedenkrát nabitý signál, jehož hodnota *m/z* (1273,3) odpovídala deprotonovanému binárnímu komplexu kvercetinu s α-CD $[KVT@α\text{-}CD–H]^-$. Pokusy o izolaci a následnou fragmentaci tohoto iontu naneštěstí nebyly úspěšné, což může poukazovat buďto na nízkou stabilitu inkluzního komplexu nebo také na to, že se nejedná o inkluzní, ale o nespecifický (externí) komplex.



Obrázek 27. ESI-MS spektrum prvního řádu směsi KVT·α-CD.

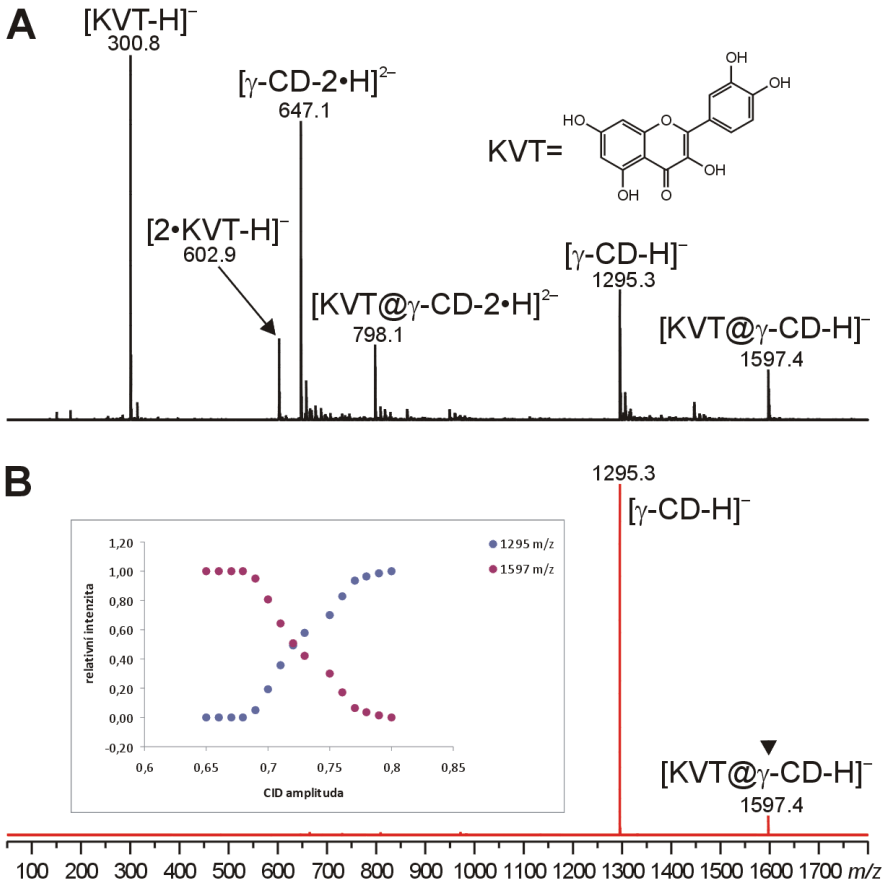
Jako další byla ESI-MS analýze podrobena ekvimolární směs KVT·β-CD (methanol:voda, 1:1, v:v). Ve spektru prvního řádu získaného v negativním skenovacím módu byly, vyjma signálů pocházejících z molekuly hosta (300,8 a 602,9 *m/z*) a hostitele (1333,3 *m/z*), pozorovány také dva signály odpovídající binárním inkluzním komplexům KVT@β-CD (Obrázek 28A). Prvním byl jedenkrát nabitý ion o *m/z* 1435,3 odpovídající deprotonovanému komplexu $[KVT@β\text{-}CD–H]^-$, druhým, s podstatně nižší relativní intenzitou, pak dvakrát nabitý ion komplexu postrádajícího dva protony $[KVT@β\text{-}CD–2·H]^{2–}$. Izolací a následnou fragmentací iontu $[KVT@β\text{-}CD–H]^-$ za podmínek CID

(Obrázek 28B) bylo studováno chování vzniklého komplexu v plynné fázi, přičemž byla pozorována tvorba jediného produktového iontu o *m/z* 1133,3 odpovídajícího deprotonované molekule hostitele [β-CD–H]⁻. To znamená, že v průběhu fragmentace komplexu docházelo k neutrální ztrátě molekuly hosta (302 *m/z*). V rámci studia chování iontu [KVT@β-CD–H]⁻ v plynné fázi byla rovněž provedena detailní fragmentační analýza, kdy byl nejprve předmětný ion vyizolován v iontové pasti a následně byla postupně zvyšována CID amplituda (kolizní energie způsobující fragmentaci prekurzovového iontu), přičemž v každém kroku byla kolizní energie navyšována o 0,01 amplitudy, a to v intervalu 0,55–0,75. Získaná data byla zpracována a vynesena do grafu, z něhož si lze udělat ucelenou představu o průběhu fragmentace v závislosti na hodnotě CID amplitudy (Obrázek 28B). V průběhu fragmentace docházelo k postupnému snižování intenzity prekurzorového iontu za současné tvorby jediného produktového iontu, jehož intenzita s rostoucí hodnotou kolizní energie narůstala.



Obrázek 28. ESI-MS směsi KVT·β-CD. (A) –MS; (B) –MS/MS iontu 1435 *m/z*.

Jako poslední byla ESI-MS analýze podrobena ekvimolární směs KVT·γ-CD (methanol:voda, 1:1, v:v). Ve spektru prvního řádu (–MS) byly, stejně jako ve výše uvedených případech pozorovány nejen signály pocházející z molekuly hosta (300,8 a 602,9 *m/z*) a hostitele (1295,3 a 647,1 *m/z*), ale také dva signály odpovídající binárním inkluzním komplexům KVT@γ-CD (Obrázek 29A). Prvním byl jedenkrát nabitý ion o *m/z* 1597,4 odpovídající deprotonovanému komplexu $[KVT@\gamma\text{-CD}–H]^-$, druhým dvakrát nabitý ion komplexu postrádajícího dva protony $[KVT@\gamma\text{-CD}–2\cdot H]^{2-}$. Izolací a následnou fragmentací iontu 1597 *m/z* za podmínek CID (Obrázek 29B) bylo studováno chování vzniklého komplexu v plynné fázi, přičemž stejně jako v případě komplexu KVT@β-CD byla pozorována tvorba jediného produktového iontu, tentokrát o *m/z* 1295,3 odpovídající deprotonované molekule hostitele $[\gamma\text{-CD}–H]^-$. Také v tomto případě tedy docházelo k neutrální ztrátě molekuly hosta (302 *m/z*). V rámci studia chování iontu $[KVT@\gamma\text{-CD}–H]^-$ v plynné fázi byla rovněž provedena detailní fragmentační analýza. Získaná data byla zpracována a vynesena do grafu, z něhož si lze udělat ucelenou představu o průběhu fragmentace v závislosti na hodnotě CID amplitudy (Obrázek 29B).



Obrázek 29. ESI-MS směsi KVT·γ-CD. (A) –MS; (B) –MS/MS iontu 1597 *m/z*.

S cílem porovnat stabilitu pozorovaných supramolekulárních komplexů v plynné fázi, byl jak pro komplex KVT@β-CD, tak také KVT@γ-CD, v obou případech reprezentovaný iontem $[KVT@CD–H]^-$, stanoven iontový výtěžek, představující vhodné kvantitativní měřítko k vyhodnocení efektivity fragmentace. Iontový výtěžek je definován vztahem:

$$IV = \frac{I_F}{I_F + \sum I_P} \tag{5}$$

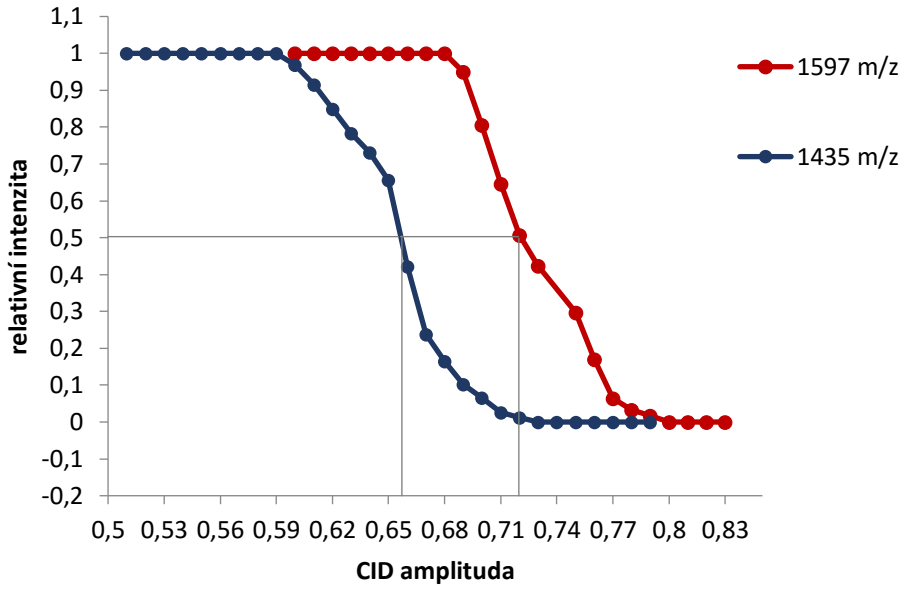
kde:

IV – iontový výtěžek

I_F – intenzita fragmentovaného iontu

$\sum I_P$ – suma intenzit všech produktových iontů

V souvislosti s určováním iontového výtěžku se také přistupuje ke stanovení charakteristické kolizní energie (CCE; z angl. *Characteristic Collision Energy*), která je představována hodnotou, při níž se intenzita fragmentovaného iontu rovná součtu intenzit všech iontů produktových (tzn. při 50% fragmentaci). Získaná a zpracovaná data byla vynesena do grafu (Obrázek 30), z něhož je patrné, že hodnota CCE pro komplex KVT@β-CD ($CCE_{KVT@β\text{-}CD}$ = 0,66) je, ve srovnání s hodnotou pro komplex KVT@γ-CD ($CCE_{KVT@γ\text{-}CD}$ = 0,72), nepatrně, ale přeci jen nižší. To může být dáno odlišným geometrickým uspořádáním molekuly KVT v kavitě γ-CD (ve srovnání s geometrií komplexu KVT@β-CD), které může souviset s větším objemem kavity γ-CD a z toho plynoucí možností molekuly KVT zaujmout „výhodnější“ polohu v kavitě hostitelské molekuly. Jednoznačný důkaz by bezpochyby přinesla rentgenová difrakční analýza monokrystalů obou studovaných komplexů, určitý náhled by pak mohl být získán rovněž pomocí metod molekulového modelování.

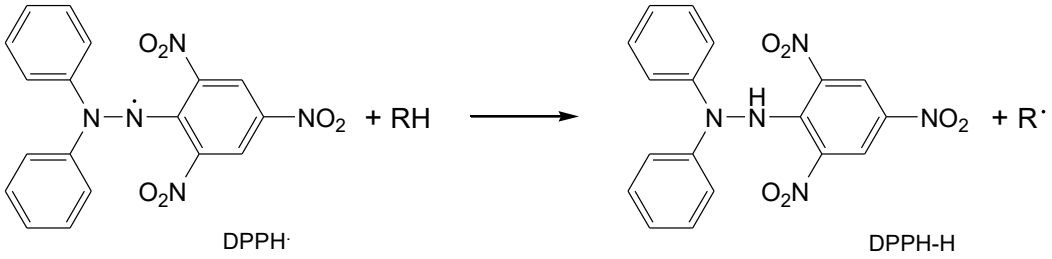


Obrázek 30. Stanovení iontových výtěžků komplexů KVT@β-CD a KVT@γ-CD.

Závěrem této kapitoly lze uvést, že byla prokázána tvorba supramolekulárních komplexů kvercetinu s α-, β- a γ-CD stabilních v plynné fázi. Ve všech případech byly pozorovány komplexy se stechiometrií 1:1. Výše uvedené výsledky představují, dle provedeného detailního průzkumu odborné literatury, vůbec první studii zabývající se existencí a chováním komplexů typu „hostitel-host“ mezi kvercetinem a cyklodextriny v plynné fázi. Doposud byly tyto typy komplexů studovány pouze v roztoku (nukleární magnetická resonance) nebo v pevné fázi (skenovací elektronová mikroskopie, prášková rentgenová difraktometrie či infračervená spektrometrie). [73, 91]

5.3 Spektrofotometrické stanovení antioxidační aktivity kvercetinu a jeho komplexů s CD

Antioxidační kapacita kvercetinu a jeho komplexů s α-, β- a γ-CD byla stanovena spektrofotemetrickou metodou s využitím DPPH. Reakcí antioxidantu se stabilním radikálem DPPH dochází k redukci radikálu za vzniku difenylpikrylhydrazinu (DPPH-H). Redukce DPPH je schematicky znázorněna na Obrázku 31.



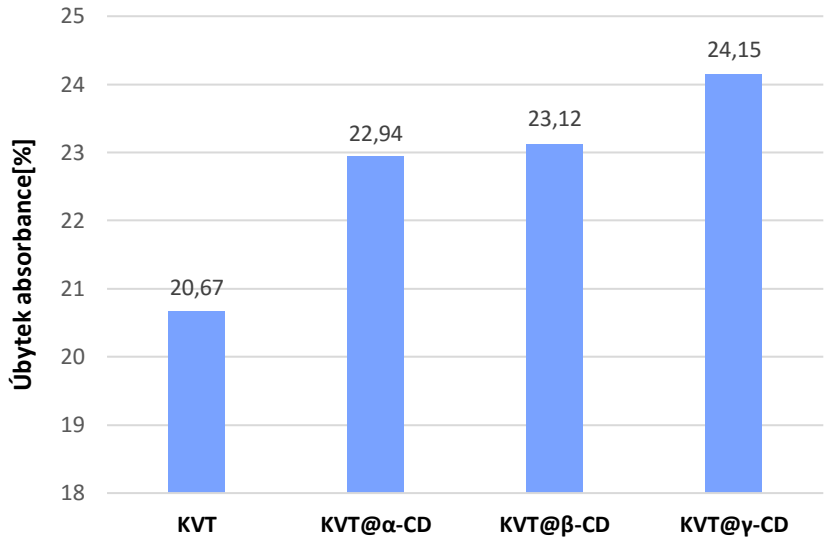
Obrázek 31. Redukce radikálu DPPH na DPPH-H antioxidantem RH.

Reakce se projevovala odbarvením roztoku, u kterého byla měřena absorbance při vlnové délce λ = 515 nm. Průměrná hodnota naměřené absorbance roztoku DPPH činila 1,136. Z naměřených hodnot absorbance byl pro každý vzorek vypočítán úbytek absorbance v % (rovnice 4, str. 45). Výsledné hodnoty jsou uvedeny v Tabulce 5.

Tabulka 5. Hodnoty absorbance a úbytku absorbance pro jednotlivé vzorky.

Vzorek	A_1 [1]	A_2 [1]	A_3 [1]	A_4 [1]	Úbytek absorbance [%]
KVT	0,894	0,921	0,891	0,897	20,67±1,05
KVT@α-CD	0,871	0,869	0,870	0,890	22,94±0,80
KVT@β-CD	0,877	0,875	0,872	0,868	23,12±0,30
KVT@γ-CD	0,862	0,869	0,848	0,866	24,15±0,70

Čím vyšší je hodnota úbytku absorbance, tím je antioxidační aktivita vzorku silnější. [88] Z Tabulky 5 je tedy patrné, že kvercetin vykazuje slabší antioxidační aktivitu, než když je v inkluzním komplexu s příslušným CD. Pro lepší přehlednost byla získaná a zpracovaná data vynesena do sloupcového grafu (Obrázek 32), který zobrazuje srovnání antioxidační aktivity vzorků, vyjádřené jako procentní úbytek absorbance DPPH.



Obrázek 32. Grafické vyjádření procentního úbytku absorbance DPPH vzorků.

Nejsilnější antioxidační aktivita byla naměřena u inkluzního komplexu KVT@γ-CD, jelikož vypočtená hodnota absorbančního úbytku byla ze všech nejvyšší (24,15±0,70 %). Dalším v pořadí byl komplex KVT@β-CD s absorbančním úbytkem 23,12±0,30 %, dále pak KVT@α-CD (22,94±0,80 %). Samotný kvercetin snížil absorbanci roztoku radikálu DPPH o 20,67±1,05 %.

Antioxidační aktivita kvercetinu byla popsána několika autory. Například Dangles se svými spolupracovníky sledoval mechanismus zhášení radikálu DPPH působením kvercetinu. Ve své práci předkládají, že odštěpením atomu vodíku a jeho přenosem na radikál DPPH vzniká z antioxidantu aryloxylový radikál, tzv. semichinon, který může být další molekulou DPPH oxidován na chinon. Dále prokázali, že pro antioxidační působení kvercetinu je zásadní hydroxylová skupina v poloze C-3, neboť umožňuje tvorbu *p*-chinonů. Ty pak reagují s jednoelektronovými oxidanty, čímž se prodlužuje antioxidační aktivita. [89] Zlepšení antioxidační aktivity kvercetinu po jeho zapouzdření do kavity cyklodextrinu zjistili např. Alvarez-Parrilla a kol., kteří měřili antioxidační kapacitu komplexu KVT@β-CD metodou FRAP (z angl. *ferric reducting antioxidant potential*). Autoři si tento závěr vysvětlují zřejmou modifikací redoxního chování flavonoidu po vytvoření supramolekulárního komplexu. [90] Také Jullian a Mercader-Ros potvrdili silnější antioxidační aktivitu komplexu KVT@β-CD, KVT@HP-β-CD a KVT@SBE-β-CD. [73, 91]

ZÁVĚR

Jak už napovídá název této diplomové práce, jejím cílem bylo studium tvorby inkluzních komplexů vybraných flavonoidů s cyklodextriny. Co jsou to flavonoidy, a proč je dobré konzumovat potraviny na ně bohaté, je náplní teoretické části, spolu s charakteristikou cyklodextriny (CD) a popisu vybraných příkladů supramolekulárních komplexů mezi flavonoidy a cyklodextriny. Pro experimentální část byly vybrány dvě flavonoidní látky. Jednou z nich je flavon, látka hojně se vyskytující v zelených částech rostlin a sloužící k prevenci aterosklerózy. Druhým zástupcem byl kvercetin (KVT), který je významný pro své silné antioxidační účinky, a jako jeho zdroje lze zmínit např. hrozny révy vinné či žlutá cibule. Jako hostitelské makrocykly byly použity tzv. nativní cyklodextriny, konkrétně α-, β- a γ-CD.

Cyklodextriny a kvercetin byly pro experimentální účely získány z komerčních zdrojů a flavon byl z dostupných chemikálií v laboratorních podmínkách syntetizován. Syntéza flavonu se skládala ze tří reakcí, přičemž každý produkt byl získán v relativně vysokém výtěžku a podroben strukturní analýze metodami IR, GC-MS, NMR a ESI-MS. Schopnost tvořit inkluzní komplexy flavonu a kvercetinu s příslušnými cyklodextriny byla studována v plynné fázi na hmotnostním spektrometru s elektrosprejovou ionizací. Pomocí této metody nebyla potvrzena tvorba inkluzního komplexu flavonu se všemi typy CD, neboť nebyly ve spektrech detekovány signály odpovídající daným komplexům, a to jak v pozitivním, tak v negativním skenovacím módu. Tuto skutečnost lze zřejmě odůvodnit chemickou strukturou molekuly flavonu, neboť neobsahuje žádnou hydroxylovou skupinu, která by vytvářela mezimolekulární interakce uvnitř kavity cyklodextrinu. Naopak při zkoumání tvorby inkluzních komplexů kvercetinu s příslušnými cyklodextriny, byla pozorována inkludace molekuly kvercetinu do dutiny α-, β- i γ-CD, a to výhradně v negativním skenovacím módu. Ve své chemické struktuře obsahuje molekula kvercetinu pět hydroxylových skupin, a proto je vyšší pravděpodobnost hydrofobních interakcí než u molekuly flavonu.

Na základě potvrzení komplexace kvercetinu s cyklodextriny, bylo provedeno metodou DPPH spektrofotometrické stanovení antioxidační aktivity samotného kvercetinu a jeho komplexů s nativními CD. Výsledky analýzy ukázaly, že nejvyšší antioxidační aktivitu vykazoval komplex KVT@γ-CD. Také u ostatních dvou typů komplexů, tedy KVT@β-CD

a KVT@α-CD, byla pozorována vyšší antioxidační aktivita, ve srovnání se samotným KVT.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

[1] MILLER, A., Antioxidant Flavonoids: Structure, Function. *Alternative Medicine Review*. 1996, vol. 1, 103-11.

[2] MIRANDA, C., MAIER, C., STEVENS, J., Flavonoids. Wiley Online Library, 2012. [Online]. Dostupné z: http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9780470015902.a0003068.pub2/abstract

[3] Compound Interest. [Online]. Dostupné z: http://www.compoundchem.com/2014/09/11/autumnleaves/

[4] Prize, Nobel. The official Web Site of the Nobel Prize. [Online]. Dostupné z: http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1937/szent-gyorgyi-bio.html

[5] DAVÍDEK, J., JANÍČEK, G., POKORNÝ, J., Chemie potravin. Vyd. Praha: ALFA, 1983, 629 s.

[6] VERMERRIS, W., NICHOLSON, R., Phenolic Compound Biochemistry. Vyd. Dordrecht: Springer, 2006, 285 s.

[7] VELÍŠEK, J., Chemie potravin 3. 1. Vyd. Tábor: OSSIS, 1999, 368 s, ISBN 80-902391-5-3.

[8] CROZIER, A., CLIFFORD, M., ASHIHARA, H., Plant Secondary Metabolites: Occurrence, Structure and Role in the Human Diet. 1. Vyd. Blackwell Publishing Ltd, 2006, 383 s, ISBN 978-1-4051-2509-3.

[9] MANACH, C., SCALBERT, A., MORAND, CH., JIMÉNEZ, L., Polyphenols: Food Sources and Bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2004, vol. 79, 727-747.

[10] YAO, L., JIANG, Y., SHI, A., TOMÁS-BARBERÁN, F., DATTA, N., SINGANUSONG, R., CHEN, S., Flavonoids in Food and Their Health Benefits. *Plant Foods for Human Nutrition*. 2004, vol. 59, 113-122.

[11] LIN, Y., SHI, R., WANG, X., SHEN, H., Luteolin, a flavonoid with potencials for cancer prevention and therapy. *Curr Cancer Drug Targets*. 2009, vol. 8, 634-646.

[12] NARAYANA, K., REDDY, M., CHALUVADI, M., KRISHNA, D., Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effect and therapeutic potential. *Indian Journal of Pharmacology*. 2001, vol. 33, 2-16.

[13] SCALBERT, A., WILLIAMSON, G., Dietary Intake and Bioavailability of Polyphenols. *The Journal of Nutrition*. 2000, vol. 130, 2073-2085.

[14] KOLEČKÁŘ, V., ŘEHÁKOVÁ, Z., BROJEROVÁ, E., KUČA, K., JUN, D., MACÁKOVÁ, K., OPLETAL, L., DRAŠAR, P., JAHODÁŘ, L., CHLEBEK, J., CAHLÍKOVÁ, L., Proanthocyanidiny a jejich antioxidační aktivita. *Chemické Listy*. 2012, vol. 106, 113-121.

[15] SETCHELL, K., CASSIDY, A., Dietary Isoflavones: Biological Effects and Relevance to Human Health. *The Journal Of Nutrition*. 1999, vol. 129, 758-767.

[16] WU, X., BEECHER, G., HOLDEN, J., HAYTOWITZ, D., GEBHARDT, S., PRIOR, R., Concentrations of Anthocyanins in Common Foods in the United States and Estimation of Normal Consumption. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2006, vol. 54, 4069-4075.

[17] BARTL, P., TREMLOVÁ, B., OŠŤADALOVÁ, M., POKORNÁ, J., ŽĎÁRSKÝ, M., Kvalitativní a kvantitativní stanovení anthokyanů v kultivarech pšenice s modrým a purpurovým zrnem. *Potravinárstvo*. 2013, vol. 7, 145-148.

[18] MIGUEL, M., Anthocyanins: Antioxidant and/or anti-inflammatory activities. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 2011, vol. 06, 7-15.

[19] ANANGA, A., GEORGIEV, V., OCHIENG, J., PHILLS, B., TSOLOVA, V., Production of Anthocyanins in Grape Cell Cultures: A Potential Source of Raw Material for Pharmaceutical, Food, and Cosmetic Industries. *The Mediterranean Genetic Code - Grapevine and Olive*. 2013. [Online]. Dostupné z: http://www.intechopen.com/books/the-mediterranean-genetic-code-grapevine-and-olive/production-of-anthocyanins-in-grape-cell-cultures-a-potential-source-of-raw-material-for-pharmaceuti

[20] VELIOGLU, Y., MAZZA, G., GAO, L., OOMAH, B., Antioxidant Activity and Total Phenolics i Selected Fruits, Vegetables, and Grain Products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1998, vol. 46, 4113-4117.

[21] Umar, M., Aziz, A., Yusoff, S., Trends in the use of Fenton, electro-Fenton and photo-Fenton for the treatment of landfill leachate. *Waste Management*. 2010, vol. 30, 2113–2121.

[22] CUSHNIE, T., LAMB, A., Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents.* 2005, vol. 26, 343–356.

[23] COWAN, M., Plant products as microbial agents. *Clinical Microbiology Reviews*. 1999, vol. 12, 564-582.

[24] ALI, M., HOUGHTON, J., RAMAN, A., HOULT, S., Antimicrobial and anti-inflammatory activities od extracs and constituents of Oroxylum indicum. *Phytomedicine*. 1998, vol. 5, 375-381.

[25] MIN HUI, K., WANG, X., XUE, H., Interaction of Flavones from the Roots of Scutellaria baicaleinsis with the Benzodiazepine Site. *Planta Medica*. 2000, vol. 66(1), 91-93.

[26] Schinazi, F., Hughes, H., Chen, C., In vitro anti-HIV activity of biflavonoids isolated from *Rhus succedanea* and *Garcinia multiflora*. *Journal of Natural Products*. 1997, vol. 60, 884-888.

[27] FORMICA, V., REGELSON, W., Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. *Food and Chemical Toxicology*. 1995, vol. 33, 1061-1080.

[28] KANWAL, Q., HUSSAIN, I., LATIF SIDDIQUI, H., JAVAID, A., Antifungal activity of flavonoids isolated from mango (*Mangifera indica* L.) leaves. *Natural Product Research Journal Impact & Description*. 2010, vol. 24, 1907-1914.

[29] VISKELIS, P., RUBINSKIENE, M., JASUTIENE, I., ŠARKINAS, A., DAUBARAS, R., ČESONIENE, L., Anthocyanins, Antioxidative, and Antimicrobial Properties of American Cranberry (*Vaccinium macrocarpon* Ait.) and their Press Cakes. *Journal of Food Science*. 2009, vol. 74, 157-161.

[30] HORSKÝ, J., JINDŘICH, J., Cyklodextriny ve světě polymerů. *Chemické listy*. 2013, vol. 107, 769-776.

[31] KRAUS, T., Postgraduální kurs Supramolekulární chemie I., Kapitola 8, UOCHB AVČR Praha, 2004.

[32] LOFTSSON, T., DUCHENE, D., Cyclodextrins and their pharmaceutical applications. *International Journal of Pharmaceutics*. 2007, vol. 329, 1-11.

[33] ZHENG-YU, J., Cyclodextrin chemistry: Preparation and Application. Singaporc: World Stiencific Publishing Co. Pte. Ltd. 2013, 269 s.

[34] LOFTSSON, T., MASSON, M., Cyclodextrins in topical drug formulations: theory and practice. *International Journal of Pharmacetutics*. 2001, vol. 255, 15-30.

[35] SICARD, J., SAINEZ, M.-H., Biosynthesis of cycloglycosyltransferase and obtention of enzymatic reaction products. Cyclodextrins and Their Industrial Uses. Editions de Santé, Paris, 1987, 77–103.

[36] STELLA, J., RAJEWSKI, A., Cyclodextrins: their future in drug formulation and delivery. *Pharmaceutical research*. 1997, vol. 14, 556–567.

[37] DODZIUK, H., Cyklodextrins and Their Complexes. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. 2006, ISBN 3-527-31280-3.

[38] DEL VALLE, M., Cyclodextrins and their uses: A Review. *Process Biochemistry*. 2003.

[39] LOFTSSON, T., Increasing the cyclodextrin complexation of drugs and drug biovailability through addition of watersoluble polymers. *Pharmazie*. 1998, vol. 53, 733-740.

[40] KUMAR DAS, S., RAJABALAYA, R., DAVIS, S., GANI, N., KHANAM, J., NANDA, A., Cyclodextrins - The Molecular Container. *Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical*. 2013, vol. 4, 1694-1720.

[41] MUNOZ-BOTELLA, S., CASTILLO, B, MARTYN, A., Cyclodextrin properties and applications of inclusion complex formation. *Ars Pharmaceutica*. 1995, vol. 36, 187–98.

[42] SCHMID, G., Cyclodextrin glucanotransferse production: yield enhancement by overexpression of cloned genes. *Trends in Biotechnology*. 1989, vol. 7, 244–8.

[43] FRÖMMING, H., SZEJTLI, J., Cyclodextrins in pharmacy. Topics in inclusion science. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. 1994, ISBN 0-7923-2139-1.

[44] SINGH, R., BHARTI, N., MADAN, J., HIREMATH, N., Characterization of cyclodextrin inclusion complexes – a review. *Journal of Pharmaceutical Science and Technology*. 2010, vol. 2(3), 171-183.

[45] KLOUDA, P., Moderní analytické metody. 2. Vyd. Ostrava: Nakl. Pavel Klouda. 2003, ISBN 80-86369-07.

[46] ŠTULÍK, K., Analytické separační metody. 1. Vyd. Praha: Nakl. Karolinum. 2005, 264 s.

[47] FRIEDECKÝ, D., LEMR, K., Úvod do hmotnostní spektrometrie. *Klinická biochemie a metabolismus*. 2012, vol. 20 (41), 152-157.

[48] SCHALLEY, C., Analytical Methods in Supramolecular Chemistry. 1. Vyd. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim. 2007, ISBN 978-3-527-31505-5.

[49] EDWARDS, J., Principles of NMR. [online]. Dostupné z http://www.process-nmr.com/pdfs/NMR%20Overview.pdf

[50] FRIEDL, Z., NMR Spektroskopie. VUT Brno, Fakulta Chemická. [online]. Dostupné z: http://www.fch.vut.cz/ictep/studijni_materialy/ISA-NMR/NMR%20praktikum.pdf

[51] Laboratoř, NMR Spektroskopie. [online]. Dostupné z: http://nmrlab.chemi.muni.cz/img/NMR.pdf

[52] HORÁK, M., PAPOUŠEK, D., Infračervená spektra a struktura molekul: Použití vibrační spektroskopie při určování struktury molekul. Vyd. 1. Praha: Acadeia. 1976, 836 s.

[53] IR a UV VIS Spektroskopie. [online]. Dostupné z: http://physics.ujep.cz/~mkormund/P219/NanoMataChar-prednaska3.pdf

[54] ZÝKA, J., Analytická příručka. 2., dopl. a upr. vyd. Praha: SNTL. 1972, 1037 s.

[55] ĎURECH, M., TRČKA, F., VOJTĚŠEK, B., MÜLLER, P., Metody pro studium protein-proteinových a protein-ligandových interakcí. *Klin Onkol*. 2014, vol. 27, 75-81

[56] SZENTE, L., SZEJTLI, J., Cyclodextrins as food ingredients. *Trends in Food Science & Technology.* 2004, vol. 15, 137-142.

[57] Zákony pro lidi. Vyhláška č. 4/2008 Sb., kterou se stanoví druhy a podmínky použité přídatných látek a extrakčních rozpouštědel při výrobě potravin, Příloha 2 a 8. [Online]. Dostupné z: https://www.zakonyprolidi.cz/cs/2008-4#p11

[58] SZETJLI, J., Introduction and general overview of cyclodextrin chemistry. *Chemical Reviews*. 1998, vol 98, 1743-1753.

[59] HEDGES, R., Industrial applications of cyclodextrins. *Chemical Reviews*. 1998, vol. 98, 2035-2044.

[60] SOJO, M., NUNEZ-DELICADO, E., GARCIA-CARMONA, F., SANCHEZ-FERRER, A., Cyclodextrins as activator and inhibitor of latent banana pulp polyphenol oxidase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1999, vol. 47, 518-523.

[61] RAJEWSKI, R., STELLA, V., Pharmaceutical Applications of Cyclodextrins. 2. In Vivo Drug Delivery. *Journal od Pharmaceutical Sciences*. 1996, vol. 85, 1142-1168.

[62] LOFTSSON, T., BREWSTER, M., Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2007, vol. 30, 59(7), 645-666.

[63] SINGH, M., SHARMA, R., BANERJEE, U., Biotechnological applications of cyclodextrins. *Biotechnology Advances*. 2002, vol. 20, 341-359.

[64] FANG, Z., BHANDARI, B., Encapsulation of polyphenols - A Review. *Trends in Food Science & Technology*. 2010, vol. 21(10), 510-523.

[65] MUNIN, A., EDWARDS-LÉVY, F., Encapsulations of natural polyphenolic compounds: A Review. *Pharmaceutics*. 2011, vol. 3(4), 793-829.

[66] KRISHNASWAMY, K., ORSAT, V., THANGAVEL, K., Synthesis and characterization of nano-encapsulated catechin by molecular inclusion with β-cyclodextrin. *Journal of Food Engineering*. 2012, vol. 111(2), 255–264.

[67] FOLCH-CANO, C., GUERRERO, J., SPEISKY, H., JULLIAN, C., OLEA.AZAR, C., NMR and molecular fluorescence spectroscopic study of the structure and thermodynamic parameters of EGCG/β-cyclodextrin inclusion complexes with potential antioxidant activity. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*. 2014, vol. 78, 287-298.

[68] HIGUCHI, T., CONNORS, K., Phase solubility techniques. *Advances in Analytical Chemistry and Instrumentation*. 1965, vol. 4, 117-212.

[69] DIAS, K., NIKOLAOU, S., GIOVANI, W., Synthesis and spectral investigation of Al(III) catechin/β-cyclodextrin and A(III) quercetin/β-cyclodextrin inclusion copounds. *Spectrochimica Acta Part* A. 2008, vol. 80, 154-161.

[70] TAKASHI, I., KANAKO, K., HIDEJ, Y., NMR Study of the Solution Structures of the Inclusion Complexes of *β*-Cyclodextrin with (+)-Catechin and (-)-Epicatechin. *The Journal of Physical Chemistry*. 1999, vol. 103, 8992-8997.

[71] PINHO, E., GROOTVELD, M., SOARES, G., HENRIQUES, M., Cyclodextrins as encapsulation agents for plant bioactive compounds. *Carbohydrate Polymers*. 2014, vol. 101, 121-135.

[72] NGUEN, T., LIU, B., ZHAO, J., THOMAS, D., HOOK, J., An investigation into the supramolecular structure, solubility, stability and antioxidant activity of rutin/cyclodextrin inclusion complex. *Food Chemistry*. 2013, vol. 136, 186-192.

[73] JULLIAN, C., MOYANO, L., YANEZ, C., OLEA-AZAR, C., Complexation of quercetin with three kinds of cyclodextrins: An antioxidant study. *Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2007, vol. 67(1), 230-234.

[74] SHULMAN, M., COHEN, M., SOTO-GUTIERREZ, A., YAGI, H., WANG, H., GOLD-WASSER, J., Enhancement of naringenin bioavailability by complexation with hydroxypropyl-β-cyclodextrin. *PloS one*. 2011, vol. 6.

[75] YANG, L., MA, S., ZHOU, S., CHEN, W., YUAN, M., YIN, Y., Preparation and characterization of inclusion complexes of naringin with β-cyclodextrin or its derivate. *Carbohydrate Polymers*. 2013, vol. 98(1), 816-869.

[76] FICARRA, R., TOMMASINI, S., RANERI, D., CALABRO, M., DI BELLA, M., RUSTICHELLI, C., Study of flavonoids/β-cyclodextrins inclusion complexes by NMR, FT-IR, DSC, X-Ray investigation. *Journal od Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2005, vol. 29(6), 1005-1014.

[77] TOMMASINI, S., CALABRO, M. L., STANCANELLI, R., DONATO, P., COSTA, C., CATANIA, S., The inclusion complexes of hesperetin and its 7-rhamnoglucoside with (2-hydroxypropyl)-β-cyclodextrin. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2005, vol. 39, 572-580.

[78] JULLIAN, C., CIFUENTES, C., ALFARO, M., MIRANDA, S., BARRIGA, G., OLEA-AZAR, C., Spectroscopis characterization of the inclusion complexes of luteolin with native and derivatized β-cyclodextrin. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2010, vol. 18, 5025-5031.

[79] HYUNMYUNG, K., HYUN-WON, K., SEUNHO, J., Aqueous Solubility Enhancement of Some Flavones by Complexation with Cyclodextrins. *Bulletin of the Korean Chemical Society*. 2008, vol. 29, 590-594.

[80] DAS, J., GHOSH, S., A new synthesis of flavones and pyranoflavone by intramolecular photochemical Witting reaction in water. *Tetrahedron letters*. 2011, vol. 52, 7189-7194.

[81] KRAYUSHKIN, M., LEVCHENKO, K., YAROVENKO, V., CHROSTOFOROVA, L., BARACHEVSKY, V., PUANKOV, Y., VALOVA, T., KOBELOVA, O., LYSSENKO, K., Synthesis and reaktivity of 1-aryl-9*H*-thieno[3,4-*b*]chromon-9-ones. *New Journal of Chemistry*. 2009, vol. 33, 2267-2277.

[82] FOROUMADI, A., ESMATI, N., ARDEASTANI, SK., EMAMI, S., AJDARI, S., DAVOODI, J., SHAFIEE, A., Halogenated flavones as potential apoptosis-inducing agents: synthesis and biological activity evaluation. *Europen Journal of Medicinal Chemistry*. 2012, vol. 58, 573-580.

[83] SASHIDARA, K., AVULA, S., PALNATI, G., SINGH, S., SRIVASTAVA, K., PURI, S., SAXENA,J., Synthesis and in vitro evaluation of new chloroquine-chalcone hybrids against chloroquine-resistant strain of *Plasmodium falciparum*. *Bioorganic&Medicinal Chemistry Letters*. 2012, vol. 22, 5455-5459.

[84] SU, W., ZHU, X., LI, Z., First Vilsmeier-Haack synthesis of flavones using bis-(trichloromethyl) carbonate/dimethylformamide. *Organic Preparations and Procedures International*. 2009, vol. 41, 69-75.

[85] SARDA, S., PATHAN, M., PAIKE, V., PACHMASE, P., JADHAV, W., PAWAR, R., A facile synthesis of flavones using recyclable ionic liquid under microwave irradiation. *Arkivoc*. 2006, vol. 16, 43-48.

[86] SINGH, M., KAUR, M., SILAKARI, O., Flavones: An important scaffold for medicinal chemistry. *Europen Journal of Medicinal Chemistry*. 2014, vol. 84, 206-239

[87] LIU, R., ZHANG, Y., XU, K., TAN, G., Silica-gel-supported $Ce(SO_4)_2 \cdot 4H_2O$-mediated cyclization of 2′-amino and 2′-hydroxychalcones under solvent-free conditions. *Synthetic Communications*. 2016, vol. 47, 1-9.

[87] LIU, R., ZHANG, Y., XU, K., TAN, G., Silica-gel-supported $Ce(SO_4)_2 \cdot 4H_2O$-mediated cyclization of 2′-amino and 2′-hydroxychalcones under solvent-free conditions. *Synthetic Communications*. 2016, vol. 47, 1-9.

[88] BRAND-WILLIAMS, W., CUVELIER, M., BERSET, C., Use od a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*. 1995, vol. 28, 25-30.

[89] DANGLES, O., FARGEIS, G., DUFOUR, C., One-electron oxidation of quercetin and quercetin derivates in protic and non protic media. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions*. 1999, vol. 2, 1387-1395.

[90] ALVAREZ-PARRILA, E., DE LA ROSA, L., TORRES-RIVAS, F., RODRIGO-GARCIA, J., GONZALES-AGUILAR, G., Complexation of Apple Antioxidants: Chlorogenic Acid, Quercetin and Rutin by β-Cyclodextrin. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemisry*. 2005, vol. 53, 121-129.

[91] MERCADER-ROS, M., LUCAS-ABELLAN, C., FORTEA, M., GABALDON, J., DELICADO-NUNEZ, E., Effect of HP-β-cyclodextrins complexation on the antioxidant aktivity of flavonols. *Food Chemistry*. 2010, vol. 118, 769-773.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

CCE	charakteristická kolizní energie
CD	cyklodextriny
CE	capillary exit
CGTasa	cyklodextrin glukosyltransferáza
CID	kolizní indukovaná disociace
DM-β-CD	heptakis(2,6-di-*O*-methyl)-β-cyklodextrin
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DPPH	2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyl
EGCG	(-)-epigallokatechin gallát.
ESI	elektrosprejová ionizace
FRAP	ferric reducting antioxidant potential
HP-α-CD	hydroxypropyl-α-cyklodextrin
HP-β-CD	hydroxypropyl-β-cyklodextrin
HP-γ-CD	hydroxypropyl-γ-cyklodextrin
IR	infračervená spektrometrie
ITC	izotermální titrační kalorimetrie
KVT	kvercetin
LU	luteolin
MS	hmotnostní spektrometrie
m/z	hmotnost iontu ku velikosti náboje
NMR	nukleární magnetická rezonance
RNA	ribonukleová kyselina
SBE-β-CD	sulfbutylether-β-cyklodextrin
TLC	tenkovrstvá chromatografie

TM-β-CD	heptakis(2,3,6-tri-*O*-methyl)-β-cyklodextrin
UV	ultrafialová oblast
VIS	viditelná oblast

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1. Strukturní vzorec flavanu. 13
Obrázek 2. Strukturní vzorce vybraných flavonolů. 14
Obrázek 3. Strukturní vzorce vybraných flavonů. 15
Obrázek 4. Strukturní vzorce vybraných flavanonů. 16
Obrázek 5. Strukturní vzorce vybraných flavanolů. 17
Obrázek 6. Strukturní vzorce vybraných isoflavonů. 18
Obrázek 7. Strukturní vzorce vybraných antokyanidinů. 19
Obrázek 8. Strukturní vzorce kyanidinu v závislosti na pH. 19
Obrázek 9. Strukturní vzorce chrysinu a baicaleinu. 22
Obrázek 10. Strukturní vzorce α-, β- a γ-cyklodextrinu. 24
Obrázek 11. Znázornění geometrických parametrů α-, β-, a γ-CD. 25
Obrázek 12. Vznik supramolekulárního komplexu typu „hostitel-host“. 27
Obrázek 13. Přehled metod vhodných k charakterizaci supramolekulárních komplexů. 28
Obrázek 14. Schéma hmotnostního spektrometru s ionizací za atmosférického tlaku. 29
Obrázek 15. Strukturní vzorec (-)-epigallokatechin gallátu. 35
Obrázek 16. Strukturní vzorec rutinu. 36
Obrázek 17. Strukturní vzorec hesperidinu. 38
Obrázek 18. Strukturní vzorec DPPH. 45
Obrázek 19. Část záznamu GC-MS (vlevo) a EI-MS spektrum (vpravo) sloučeniny 3. 47
Obrázek 20. ESI-MS spektrum první řádu sloučeniny 3. 47
Obrázek 21. Mechanismus Bakerova-Venkataramanova přesmyku 2-acetylfenyl-benzoátu. 48
Obrázek 22. ESI-MS sloučeniny 4. (a) +MS; (b) +MS/MS iontu 241 m/z; (c) –MS 50
Obrázek 23. Návrh fragmentace iontu 241 m/z za podmínek CID. 51
Obrázek 24. ESI-MS spektra prvního řádu kvercetinu získaná pozitivní (a) a negativní (b) ionizací. 53
Obrázek 25. ESI-MS spektrum prvního řádu směsi 5·β-CD. 55
Obrázek 26. ESI-MS spektra prvního řádu směsi 5·α-CD (a) a směsi 5·γ-CD (b) 57
Obrázek 27. ESI-MS spektrum prvního řádu směsi KVT·α-CD. 58
Obrázek 28. ESI-MS směsi KVT·β-CD. (a) –MS; (b) –MS/MS iontu 1435 m/z 59

Obrázek 29. ESI-MS směsi KVT·γ-CD. (a) –MS; (b) –MS/MS iontu 1597 m/z..... 60
Obrázek 30. Stanovení iontových výtěžků komplexů KVT@β-CD a KVT@γ-CD. 62
Obrázek 31. Redukce radikálu DPPH na DPPH-H antioxidantem RH. 63
Obrázek 32. Grafické vyjádření procentního úbytku absorbance DPPH vzorků. 64

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1. Vybrané fyzikálně-chemické vlastnosti nativních CD. 26
Tabulka 2. Asociační konstanty při různých teplotách komplexů EGCG@CD. 35
Tabulka 3. Vypočítané a experimentální exaktní hmotnosti iontů detekovaných v ESI-MS spektru prvního řádu sloučeniny 5. 52
Tabulka 4. Vypočítané a experimentální exaktní hmotnosti iontů detekovaných v ±MS příslušných cyklodextrinů. 54
Tabulka 5. Hodnoty absorbance a úbytku absorbance pro jednotlivé vzorky. 63