

Stanovení termodynamických parametrů vybraných komplexů s cyklodextriny pomocí isotermální titrační mikrokolorimetrie

Hana Dubinová

Bakalářská práce
2023



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav chemie

Akademický rok: 2022/2023

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Hana Dubinová**
Osobní číslo: **T200026**
Studijní program: **B0721A210002 Technologie a hodnocení potravin**
Specializace: **Chemie a analýza potravin**
Forma studia: **Prezenční**
Téma práce: **Stanovení termodynamických parametrů vybraných komplexů s cyklodextriny pomocí isotermální titrační mikrokolorimetrie**

Zásady pro vypracování

I. Teoretická část:

1. Supramolekulární komplexy s cyklodextriny.
2. Stručná charakteristika isotermální titrační mikrokolorimetrie a oblasti využití této metody.

II. Praktická část:

1. Stanovit termodynamické parametry komplexačních reakcí cyklodextrinů s vybranými sloučeninami

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

Seznam doporučené literatury:

1. Dodziuk, Helena. Cyclodextrins and Their Complexes. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim. 2006. ISBN 3-527-31280-3.
2. Schalley, Christoph A. Analytical Methods in Supramolecular Chemistry. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim. 2007. ISBN 978-3-527-31505-5.
3. Rekharsky, Mikhail. V.; Mori, Tadashi.; Yang, Cheng.; KO, Ho.; Selvapalam, N.; Kim, Hyunuk.; Sobransingh, David.; Kaifer, Angel. E.; Liu, Simin.; Isaacs, Lyle.; Chen, Wei.; Moghaddam, Sarvin.; Gilson, Michael. K.; Kim, Kimoon.; Inoue, Yoshihisa. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2007, 104, 20737-20742. DOI: 10.1073/pnas.0706407105.

Vedoucí bakalářské práce: **Ing. Zdeňka Prucková, Ph.D.**
Ústav chemie

Datum zadání bakalářské práce: **31. prosince 2022**

Termín odevzdání bakalářské práce: **19. května 2023**

L.S.

prof. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan

doc. Ing. Michal Rouchal, Ph.D.
ředitel ústavu

Ve Zlíně dne 28. února 2023

PROHLÁŠENÍ AUTORA BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Beru na vědomí, že:

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

Prohlašuji,

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

Ve Zlíně, dne:

Jméno a příjmení studenta:

.....
podpis studenta

ABSTRAKT

Bakalářská práce se zabývá studiem vazebných poměrů mezi cyklodextrinovými makrocycly β -CD a γ -CD s vybranými ligandy metodou izotermální titrační mikrokalorimetrie. Teoretická část bakalářské práce je zaměřena na cyklodextriny, jejich vlastnosti a využití, dále se zabývá metodou izotermální titrační mikrokalorimetrie a supramolekulární chemii. Cílem experimentální části bylo za pomoci izotermální titrační mikrokalorimetrie stanovit termodynamické parametry inkluzního komplexu mezi vybranými ligandy a uvedenými cyklodextriny.

Klíčová slova: cyklodextrin, izotermální titrační mikrokalorimetr, hostitel-host

ABSTRACT

The bachelor thesis deals with the study of binding ratios between cyclodextrin macrocycles β -CD and γ -CD with selected ligands by isothermal titration microcalorimetry. The theoretical part of the bachelor thesis focuses on cyclodextrins, their properties and applications, and also deals with the method of isothermal titration microcalorimetry and supramolecular chemistry. The aim of the experimental part was to determine the thermodynamic parameters of the inclusion complex between selected ligands and cyclodextrins by means of isothermal titration microcalorimetry.

Keywords: cyclodextrin, isothermal titration microcalorimeter, host-guest

Tímto bych velice ráda poděkovala vedoucí mé bakalářské práce, paní Ing. Zdeňce Pruckové, Ph.D. za věnovaný čas, veškeré cenné rady, trpělivost a ochotu. Dále bych chtěla poděkovat Ústavu chemie FT UTB za poskytnutí vzorků ligandů a cyklodextrinů pro má měření.

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

OBSAH

ÚVOD.....	9
I TEORETICKÁ ČÁST	10
1 CYKLODEXTRIN.....	11
1.1 HISTORIE	11
1.2 CHEMICKÁ STRUKTURA A VLASTNOSTI	11
1.3 VYUŽITÍ	12
1.3.1 Potravinářství	12
1.3.2 Kosmetika	13
1.3.3 Léčiva.....	13
2 SUPRAMOLEKULÁRNÍ CHEMIE.....	15
2.1 HISTORIE	15
2.2 ZÁKLADNÍ PRINCIP	15
2.3 NEVAZEBNÉ INTERAKCE.....	15
3 ISOTERMALNÍ TITRAČNÍ MIKROKALORIMETRIE	17
3.1 PRINCIP	17
II PRAKTICKÁ ČÁST.....	20
4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	21
4.1 POUŽITÉ PŘÍSTROJE	21
4.1.1 VP-ITC Mikrokolorimetr	21
4.1.2 Thermo-Vac	21
4.2 LIGANDY	22
4.2.1 Ligand č. 1.....	22
4.2.2 Ligand č. 2.....	22
4.2.3 Ligand č. 3.....	23
4.2.4 Ligand č. 4.....	23
4.2.5 Ligand č. 5.....	24
4.2.6 Ligand č. 6.....	24
5 VÝSLEDKY A DISKUSE	25
5.1 LIGAND Č.1	25
5.2 LIGAND Č. 2.....	29
5.3 LIGAND Č. 3.....	32
5.4 LIGAND Č. 4.....	34
5.5 LIGAND Č. 5.....	38
5.6 LIGAND Č. 6.....	42
ZÁVĚR	45
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	46

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	48
SEZNAM OBRÁZKŮ	49

ÚVOD

Supramolekulární chemie se zabývá interakcemi založených na nekovalentních vazbách. Tyto vazby můžeme najít v celé řadě biologických systémů. Tak jako se váží nekovalentně enzym a substrát, tak se váže hostitel a host v supramolekulární chemii. Při vzniku nekovalentní vazby mezi hostem a hostitelem vzniká, nebo se spotřebovává teplo, které lze měřit izotermálním titračním mikrokolorimetrem. Z analýzy dat spotřebovaných nebo uvolněných tepel lze získat termodynamické parametry vznikajících vazeb, a to vazebnou konstantu, změnu Gibbsovy energie, změnu enthalpie a entropie, která doprovází vznik komplexu hostitel-host. Dále lze také získat stechiometrický poměr obou molekul.

Cyklodextriny jsou cyklické oligosacharidy obsahující α -D-glukopyranosové jednotky, které jsou navzájem spojeny glykosidickou vazbou. Mají tvar dutého komolého kužele. Do své dutiny mohou vázat látky a tvořit inkluzní komplexy hostitel-host. Díky této vlastnosti mají široké uplatnění v rozličných průmyslových odvětvích, ale také mají významné uplatnění v supramolekulární chemii, kde slouží jako hostitel řady nejen biologicky významných molekul. Nejčastěji je využíván β - a γ -cyklodextrin. Obvykle se oba tyto makrocikly chovají velmi obdobně, především při poutání stejných molekul. Je výhodou, že se do dutiny cyklodextrinů váží vhodně velké nepolární molekuly, např. typu adamantan s vazebnou konstantou v hodnotách 10^3 až 10^4 $\text{l}\cdot\text{mol}^{-1}$.

Již v dříve bylo pozorováno nejednotné chování sloučeniny s kubanovým středem, na kterém byly symetricky vázané objemnější adamantanové substituenty vůči β - a γ -cyklodextrinu. Očekávalo by se, že oba cyklodextriny se budou vázat na adamantanové konce kubanové sloučeniny, ale širší γ -cyklodextrin se překvapivě vázal na středový kubanový motiv.

Tato práce se zabývá stanovením termodynamických parametrů pomocí metody izotermální titrační mikrokolorimetrie u vybraných sloučenin s β - a γ -cyklodextrinem, přičemž bude především kladen důraz na vazebný poměr obou vazebných partnerů. Teoretické práce je zaměřena na cyklodextriny, supramolekulární chemii a izotermální titrační mikrokolorimetrii. Experimentální část práce bude obsahovat jednotlivá stanovení šesti vybraných sloučenin s β - a s γ -cyklodextrinem.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 CYKLODEXTRIN

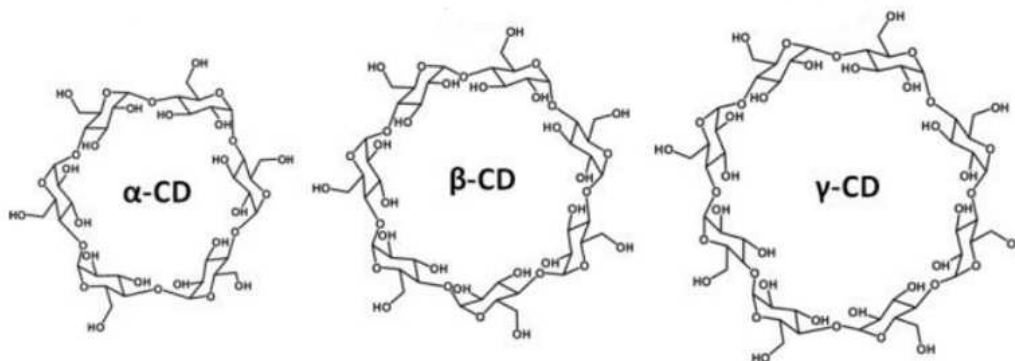
1.1 Historie

Cyklodextriny (CDs) byly poprvé popsány v roce 1891 francouzským vědcem Villiersem.¹ Ve své publikaci popisoval izolaci krystalické látky ze škrobu, který byl rozložen bakteriemi *Bacillus amylobacter*. Získanou látku pojmenoval celluosin, kvůli podobností chemických vlastností s celulózou. V letech 1903-1911 se podařilo Schardingerovi izolovat dva krystalické produkty, a to α -cyklodextrin (α -CD) i β -cyklodextrin (β -CD).² Nazval je Schardingerovy dextriny.³ Ovšem identifikovat a izolovat γ -CD se podařilo Freudenbergovi až v roce 1935. Tento vědec také navrhl, že by mohly existovat větší CD. Pro výrobu CDs bylo vyvinuto několik frakcionačních schémat. Freudenberg a spolupracovníci dokázali, že CDs jsou cyklické oligosacharidy tvořené glukózovými jednotkami. O něco později Cramer a spolupracovníci zaměřily svou pozornost na vlastnosti CDs.³ Bylo zjištěno, že CDs mohou tvořit inkluzní komplexy a mají i schopnost stabilizovat léčiva. V roce 1942 byla objasněna struktura α a β -CD pomocí rentgenové krystalografie. O šest let později byla zjištěna rentgenová struktura γ -CD.^{1,2} V roce 1953 byl vydán první patent Freudenbergovi, Cramerovi a Plieningerovi, který se týkal CDs. Ovšem čisté CDs, vhodné pro farmaceutické aplikace byli k dispozici o 25 let později. Ve stejném období byl v Japonsku uveden na trh první farmaceutický produkt, který obsahoval CD. V krátké době se začali objevovat produkty s obsahem CDs i na evropském trhu a v roce 1997 také v USA. Nadále se vyvíjejí nové technologie s CDs, a proto jsou i 100 let po objevu považovány za nové pomocné látky s neprozkoumaným potenciálem.³

1.2 Chemická struktura a vlastnosti

CDs patří do třídy cyklických oligosacharidů, které obsahují α -D-glukopyranosové jednotky, které jsou navzájem spojeny α -(1,4)-glykosidickými vazbami. Jejich tvar není válcový, protože α -D-glukopyranosové jednotky mají židličkovou konformaci. Díky této konformaci mají CDs tvar dutého komolého kužele. Na užším okraji kužele jsou primární hydroxylové skupiny a sekundární hydroxylové skupiny jsou umístěné na širším vnějším okraji kužele. Mezi nejznámější a nejdostupnější lze zařadit α -CD, který je tvořen šesti glukopyranosovými jednotkami, β -CD je tvořen sedmi glukopyranosovými jednotkami a γ -CD, který se skládá z osmi glukopyranosových podjednotek (Obrázek č. 1). CDs mají schopnost tvořit inkluzní komplex typu hostitel-host, kdy se tato schopnost využívá

v různých oblastech, například ve farmacii, kosmetice, potravinářství, výživě, při transportu léků atd.⁴



Obrázek 1: Struktura cyklodextrinu⁵

1.3 Využití

CDs, díky schopnosti tvorby inkluzních komplexů našly a stále nacházejí uplatnění v celé řadě odvětví.

1.3.1 Potravinářství

CDs mohou být v potravinářství využívány díky svému povrchu a hydrofobní dutině k přípravě stabilních emulzí jako je voda-olej, například při přípravě majonézy nebo salátového dresinku. Pomocí CDs lze stabilizovat i přírodní složky potravinářských barviv v kečupu. Kečup po přidání 0,2 % β -CD nemění svou barvu při záhřevu na 100 °C po dobu 2 h. Také díky vlastnostem CDs se může zvýšit procento zadržené vody v sýrech, mastných výrobcích nebo v emulgovaných potravinách.⁷

V potravinách se mohou CDs použít pro úpravu chuti potravin, buď jako stabilizátor chuti, nebo může docházet ke tvorbě komplexů CDs s látkami způsobujícími nežádoucí chuti, čímž se eliminuje tato chuť.⁶ Například hydrolyzát mléčného kaseinu je stravitelný zdroj bílkoviny, ale jeho hořká chuť je při konzumaci nepříjemná, a proto ji lze eliminovat přidáním β -CD k hydrolyzátu proteinu. Molekulární zapouzdření příchutí obsažených v potravinách do β -CD zajistí nejúčinnější ochranu pro chuťové složky nestabilních za vyšších teplot a také slouží jako ochrana proti jejich vypařování.⁷

Určité potravinářské produkty mají nepříjemný zápach, ale po přidání CD během jejich výroby se mezi CD a složkami potravin tvoří inkluzní komplexy, což vede ke zlepšení vůně výsledného produktu. Tento jev se využívá při výrobě potravinářských produktů jako jsou ryby, sójové mléko a sójový protein.⁹

Stabilita barviv, příchutí, nenasycených tuků a vitamínů může být zvýšena procesem molekulárního zapouzdření lipofilních složek potravin s CDs jak ve fyzikálním, tak chemickém aspektu, což pak zajišťuje prodlouženou trvanlivost produktu.⁸ CDs jsou také hojně využívány jako stabilizátory barvy potravin. Tak např. β -CD tvoří komplex s enzymem polyfenol-oxidázou, který je zodpovědný za katalytickou reakci hnědnutí, protože převádí bezbarvé polyfenoly na barevné sloučeniny. CDs mohou tvořit ochranu proti oxidační degradaci, ochranu proti tepelným změnám a rozkladu vyvolanému světlem. Díky tomu může chránit citlivé lipofilní složky.⁶

1.3.2 Kosmetika

V kosmetice se využívá interakce hostující molekuly s CDs k vytvoření vyšší energetické bariéry, aby bylo zabráněno těkání vonných složek. Tímto procesem se vytváří dlouhotrvající vůně⁸ a CD tak napomáhá ke stabilitě těkavých sloučenin, a to snížením jejich odpařování. Komplexy mohou být přidány buď v prášcích nebo ve formě kapalin. V dnešní době se v parfémoch používají i parfémové komplexy v pevné formě. Aplikace těchto suspenzí na kůži uspokojuje požadavek na dlouhotrvající účinek pomalým uvolňováním parfémů. Lze ho využít i k odstranění nepříjemných pachů. Prášková forma CDs se používá v hygienických produktech, kde chceme eliminovat nepříjemný zápach, tudíž je obsažen například v menstruačních produktech, plenkách či papírových ručnicích. CDs jsou také široce používány v přípravcích pro péči o vlasy nebo opalovacích krémech.⁹

1.3.3 Léčiva

Ve farmaceutickém průmyslu se CDs a jejich deriváty používají v lécích pro tvorbu komplexů, nebo jako pomocná aditiva ke zvýšení biologické dostupnosti špatně rozpustných léčiv⁶. Díky tomu, že CDs nejsou toxické a jsou velmi biologicky dostupné, jsou používány při maskování pachu a chuti aktivní stabilizací.⁸

CDs je široce používán ke zmírnění podráždění, které by bylo způsobeno léky. Dokáže snížit toxicitu léku díky účinnosti již při minimální dávce. Rozpustný komplex CD-léčivo také pomáhá snižovat toxicitu způsobenou krystalizací ve vodě špatně rozpustných léků. Zachycením léčiva v dutině CD na molekulární úrovni má za úkol chránit biologické membrány před přímým kontaktem léčiva, což snižuje vedlejší účinky léku i lokální podráždění, aniž by to ovlivnilo terapeutickou účinnost léku.⁹

Deriváty γ -CD ruší účinky rokuronia a vekuronie, které se podávají při celkové anestezii k vyvolání neuromuskulární blokády a svalové relaxace. Obě anestetika mají

dlouhou účinnost a mohou způsobit vedlejší účinky jako je svalová slabost po operaci a potíže s dýcháním. Aby se potížím zamezilo podává se pacientovi derivát γ -CD, který urychlí obnovu svalové funkce, tím že se naváže na molekuly léčiva a brání jim v integraci s jejich biologickým cílem.¹⁰

2 SUPRAMOLEKULÁRNÍ CHEMIE

Supramolekulární chemie je moderní obor chemie, který se zabývá tvorbou a pozorováním vlastností komplexů, které vznikají interakcí dvou a více molekul.

2.1 Historie

V roce 1968 se Jean-Marie Lehn připravil molekuly s dutinou, do které je možné zavést jinou molekulu. Povedlo se mu připravovat molekulu s definovaným tvarem dutiny a tím tak řídit typ molekul, které do ní mohou být zachyceny. Své molekuly nazval kryptandy a tím vytvořil základní poznatky pro supramolekulární chemii. Jeho definice byla „Supramolekulární chemie je obor v chemii, který se zabývá jevy molekulárního rozpoznávání většinou pod termodynamickou kontrolou.“ Supramolekulární chemie studuje mezimolekulární přitažlivé síly, které jsou nekovalentního charakteru. Charles Person připravil Crown ethery, což jsou cyklické polyethery, které jsou schopny rozpoznat iony kovů a navázat je do své dutiny a vytvořit s nimi stabilní komplex. Donald Cram byl dalším průkopníkem v oboru supramolekulární chemie. Jedna z jeho prací se zabývala převedením Pedersonových Crown etherů do třetí dimenze. Také zavedl termín hostitel-host k popisu receptoru s jeho substrátem.¹⁰

2.2 Základní princip

Supramolekulární chemie se zabývá tvorbou interakcí mezi hostitelskou molekulou a hostem. Hostitel je molekula, která do své dutiny váže jinou molekulu neboli hosta, za vzniku komplexu hostitel-host. Obvykle je hostitelem velká molekula jako např. enzym nebo syntetická cyklická sloučenina mající velkou centrální dutinu. Host může být kation, jednoduchý anorganický anion, iontový pár, ligand nebo sofistikovanější molekula, jako je např. hormon, feromon nebo neurotransmiter.¹¹

Supramolekulární systémy jsou spojeny slabými interakcemi, což způsobuje, že entropie má vliv na jejich chování.¹

2.3 Nevazebné interakce

Většinu typů nekovalentních interakcí, které přispívají ke stabilizaci supramolekulárních komplexů, fungují na základě přitažlivosti mezi částmi vazebných partnerů bohatými na elektrony a s nedostatkem elektronů.

Mezi nevazebné interakce patří vodíková vazba neboli vodíkový můstek. Ta je typem přitažlivé interakce, která se vyskytuje mezi elektronegativním atomem jako je například atom kyslíku nebo dusíku a atomem vodíku, který je kovalentně vázaný k jinému elektronegativnějšímu atomu. Vodíkové vazby přispívají ke stabilizaci proteinových struktur nebo k tvorbě dvouřetězcové DNA.

Další z nevazebných interakcí je ion-ion, který je založena na přitažlivé síle dvou iontů. Příkladem může být reakce mezi hydroxylovým aniontem a kationtem vápníku, kdy vzniká nerozpustná látka, a to hydroxid vápenatý. Tyto interakce jsou důležité také v biologických systémech, kdy hrají klíčovou roli v iontových kanálcích v biologických membrán, kde kladně nabitý iont je přitahován k záporně nabitým substituentům v kanálku.

K interakci ion-dipól dochází mezi trvale nabitými atomy nebo molekulami a polárními nenabitými molekulami. Síla vazby závisí na rozsahu přitažlivých a odpudivých silách mezi iontem a dipólem.

Do interakce dipól-dipól mohou být zapojeny dvě nebo více nenabitých, ale polárních molekul. Síla interakcí závisí na velikosti dipólových momentů a vzájemném uspořádání dipólů v prostoru.

V interakci kationt- π dochází k přitažlivým silám mezi kationtem a π elektronovým mrakem, obvykle u aromatického kruhu. Interakce jsou nejsilnější, například pokud kation sídlí přímo nad nebo pod místem aromatického systému, který představuje největší negativní potenciál. Vychýlení od toto uspořádání způsobí oslabení vazby a v důsledku toho dojde ke snížení elektrostatické přitažlivosti.

U aromatického kruhu také může nastat interakce anion- π , která závisí na elektrostatické přitažlivosti mezi aniontem a kladným potenciálem aromatického systému. Jakmile je anion dostatečně blízko, způsobí posun elektronové hustoty na opačnou stranu aromatického kruhu, čímž se vyvolá dipólový moment. To znamená že jeho kladný konec bude směřovat k aniontu.

Další nevazebná interakce je π - π interakce, která je typem mezi molekulové interakce mezi aromatickými molekulami. Aromatické systémy obsahují oblasti s pozitivními i negativními elektrostatickými potenciály podél jejich povrchů. To jim umožňuje zapojit se do elektrostatických interakcí nikoli pouze s nabitými vazebnými partnery, jako v interakcích kationt- π a aniont- π , ale také sami se sebou. Aby se tyto interakce staly přitažlivými, musí se oblasti s opačnými elektrostatickými potenciály přiblížit k sobě.¹⁰

3 ISOTERMALNÍ TITRAČNÍ MIKROKALORIMETRIE

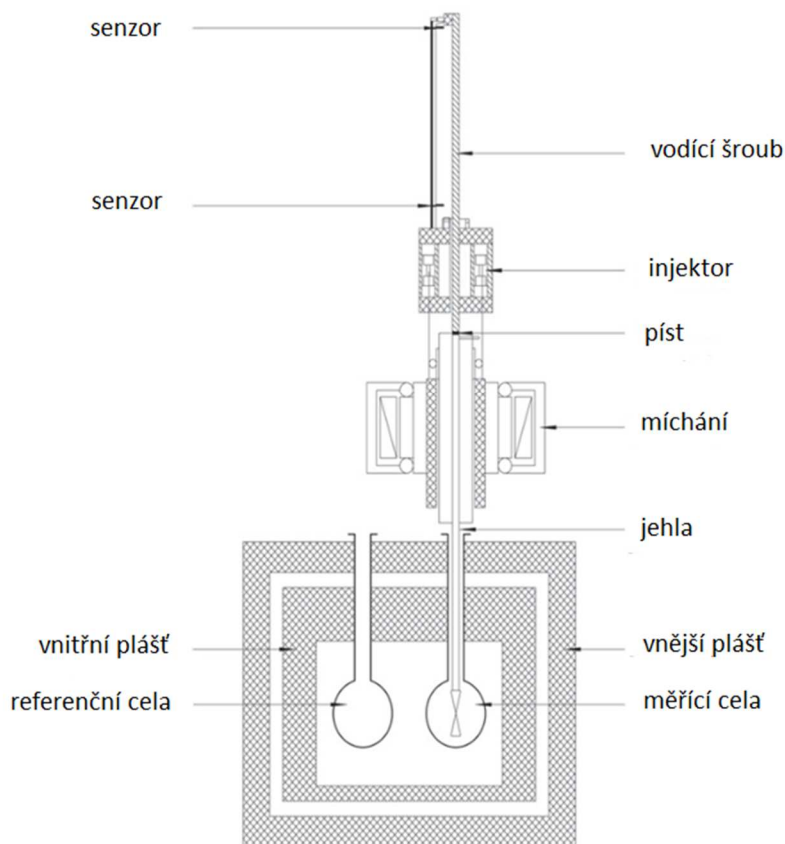
Isotermální titrační mikrokolorimetrie (ITC) je technika, kterou lze získat komplexní popis termodynamického chování a energetickou stabilitu makromolekuly a ligandu v roztoku.¹² Metodou lze během jediného měření získat entalpii (ΔH), rovnovážnou konstantu (K_v) a také stanovit stechiometrický poměr (N). Ze získaných veličin a molární plynové konstanty (R) a absolutní teploty (T) vyjádřené v Kelvinech lze vypočítat další termodynamické veličiny jako je volná Gibbsova energie (ΔG) a entropie (ΔS).¹³

$$\Delta G = R \cdot T \cdot \ln K_v$$

$$\Delta G = \Delta H - T \cdot \Delta S$$

3.1 Princip

ITC měří změnu vazebné entalpie při interakci makromolekuly a ligandu v roztoku. Přístroj se zakládá z referenční a vzorkové měřicí cely, kdy obě cely jsou ve tvaru mince. Referenční cely obsahuje pouze destilovanou vodu, popřípadě jiné používané rozpouštědlo. Do měřicí cely je nepipetován měřicí roztok, např. makrocyclu. Obě cely jsou uloženy v adiabatickém plášti a je po celou dobu měření udržována konstantní teplota obou cel. Do měřicí cely je za stálého promíchávání v průběhu měření přidáván roztok ligandu z automatické birety. Při interakci makromolekuly s ligandem v měřicí cele dochází k tepelným efektům, které se projeví rozdílem teploty referenční cely a měřicí cely. Rozdíl teplot je detekován termočlánkem umístěným v prostoru mezi celami. Termočlánek zajišťuje vyrovnání teplot obou cel.¹³

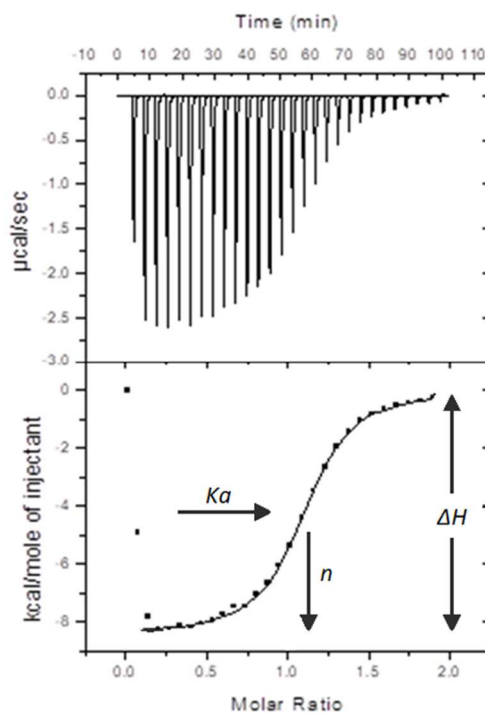


Obrázek 2: Schéma ITC titrátoru¹⁴

Při exotermické reakci dochází při vazbě molekul k uvolnění tepla, proto dochází ke snížení dodávané energie termočlánkem. U endotermické reakce je teplo pro tvorbu vazby spotřebováváno a je tedy nutné zvýšit přísun energie termočlánku. Změna dodávané energie v závislosti na čase je zaznamenána v průběhu stanovení. Korekce tepelných vlivů způsobených mícháním a ředěním v průběhu měření se provádí měřením, které probíhá za stejných podmínek, pouze měřicí cela neobsahuje vzorek, ale jen destilovanou vodu. Naměřené hodnoty jsou vyhodnoceny v programu ORIGIN 7.0 matematickým modelem, a to One Set of Sites, nebo Two Set of Sites. Výsledkem je sigmoidální křivka tvořená body, které udávají vazebnou entalpii pro každý přírůstek z automatické birety do měřicí cely.^{12,13} Pro zachycení bodu ekvivalence při měření je důležité znát komplexní stechiometrii mezi makrocylem a ligandem, aby byla zvolena vhodná koncentrace každého z měřených roztoků.¹⁰

Hodnota signálu je na počátku měření největší z důvodu velkého nadbytku molekul v měřicí cele. V průběhu měření dochází k obsazování vazebných míst a tím k snížení

tepelného signálu až do bodu, kdy dojde k nasycení vazebných míst v roztoku. Naměřená křivka s inflexním bodem udává stechiometrický poměr (n) mezi makromolekulou a ligandem. Z tvaru křivky lze určit vazebnou konstantu (K_v) a následně vypočítat volnou Gibbsovu energii (ΔG).^{12,13}



Obrázek 3: Vzorový záznam měření

II. PRAKTICKÁ ČÁST

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Použité přístroje

Pro měření interakcí mezi CD(s) a ligandy byl použit VP-ITC Mikrokolorimetr. Pro úpravu vzorků byl použit Thermo-Vac, kterým byly vzorky odplyněny.

4.1.1 VP-ITC Mikrokolorimetr

K experimentální práci byl využit izotermální titrační kalorimetr VP-ITC, od společnosti MicroCal. Přístroj je založen na principu měření energie při reakci látek o známe koncentraci. Přístroj detekuje exotermickou reakci, u které se teplo uvolňuje nebo endotermickou reakci, u které se teplo spotřebovává.

Přístroj VP-ITC se skládá ze referenční a reakční cely a automatické mikropipety, která má objem 295 μl . Do mikropipety před zahájení měření byl nasát odplyněný roztok ligandu nebo CD o přesné koncentraci. Měřící cely mají tvar mince a každá je o objemu 1,4438 ml. V referenční cele byla v průběhu měření odplyněná destilovaná voda. Reakční cela byla naplněna měřenou hostující nebo hostitelskou molekulou. Po zasunutí mikropipety do reakční cely byly počítačem dávkovány přídatky 10 μl roztoku z mikropipety do reakční cely po 210 sekundách. Během měření je nadávkováno 29 přídatků ligandu do roztoku v měřící cele. Teplota obou cel byla v průběhu měření konstantní 30 $^{\circ}\text{C}$ po celou dobu měření. Kalorimetr sleduje uvolněné nebo spotřebované teplo při každém z 29 přídatků z mikropipety.

Ke každému stanovení bylo také měřeno zředovací teplo, které bylo odečteno od tepla uvolněného při měření s hostitelkou molekulou, případně hostující molekulou. Získané údaje byly v závěru vyhodnoceny v programu ORIGIN 7.0, který používá vhodný matematický model One Set of Sites, pomocí něhož je vypočítána reakční stechiometrie (n), Enthalpii (ΔH) a vazebnou konstantu (K).

4.1.2 Thermo-Vac

Před každým experimentem byly všechny vzorky odplyněny přístrojem TermmoVac, který byl vyroben firmou MicroCal.

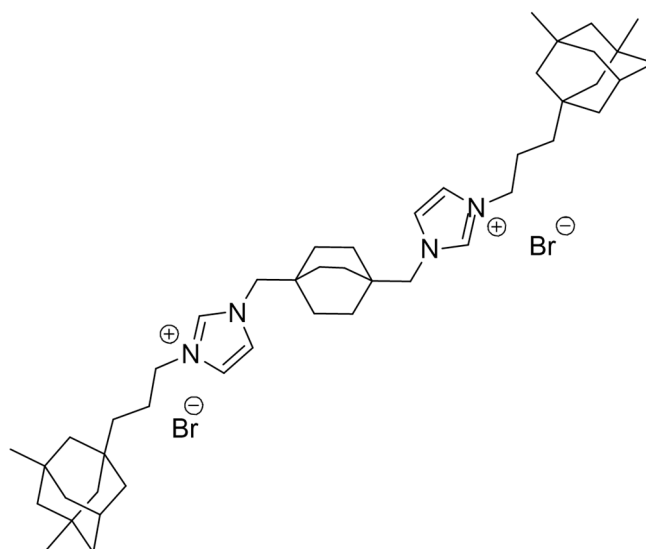
4.2 Ligandy

4.2.1 Ligand č. 1

Název: 1,4-Bis[3-(3,5-dimethyladamantan-1-yl)propyl]-1*H*-imidazolium-1-yl)methyl]bicyklo[2.2.2]oktan dibromid

Sumární vzorec: $C_{46}H_{72}Br_2N_4$

Molární hmotnost: $840,9 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$



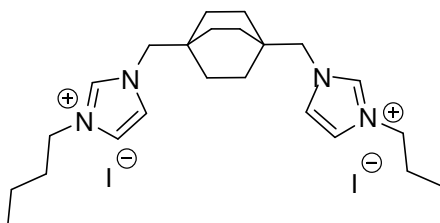
Obrázek 4: Chemická struktura ligandu č. 1

4.2.2 Ligand č. 2

Název: 1,4-Bis((3-butyl-1*H*-imidazolium-1-yl)methyl)bicyklo[2.2.2]oktan diiodid

Sumární vzorec: $C_{24}H_{41}I_2N_4$

Molární hmotnost: $639,42 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$



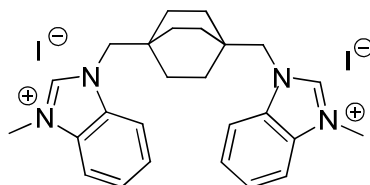
Obrázek 5: Chemická struktura ligandu č. 2

4.2.3 Ligand č. 3

Název: 1,4-Bis((3-methyl-1*H*-benzimidazolium-1-yl)methyl)bicyklo[2.2.2]oktan diiodid

Sumární vzorec: C₂₆H₃₁I₂N₄

Molární hmotnost: 653,36 g·mol⁻¹



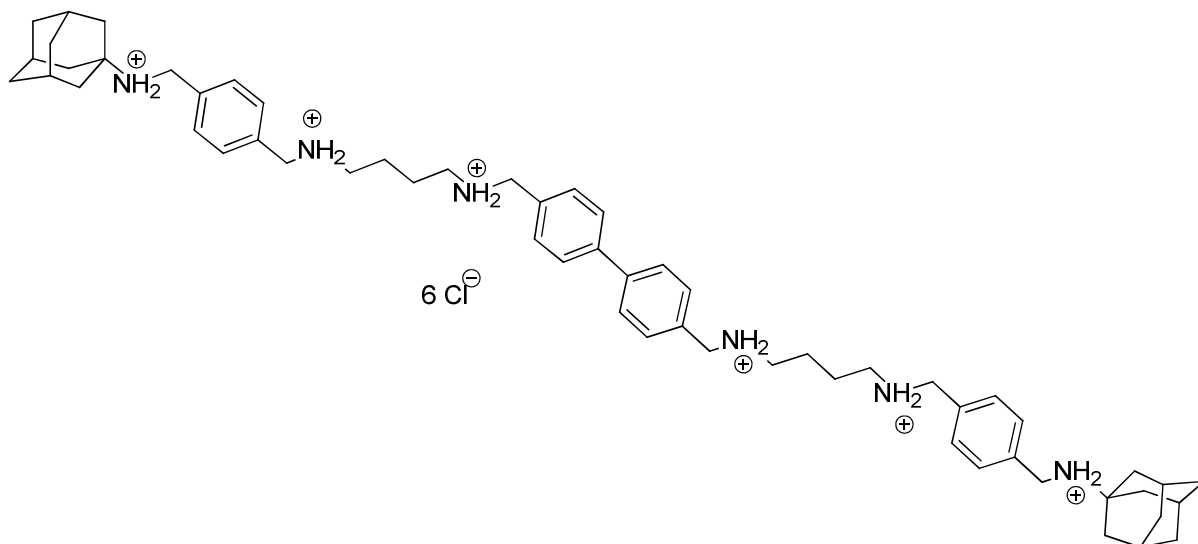
Obrázek 6: Chemická struktura ligandu č. 3

4.2.4 Ligand č. 4

Název: *N*⁴,*N*^{4'}-Bis(adamantan-1-yl)-*N*¹,*N*^{1'}-([1,1'-bifenyl]-4,4'-diylbis(methylen))bis(*N*⁴-(4-(amoniomethyl)benzyl)butan-1,4-diamonium) hexachlorid

Sumární vzorec: C₅₈H₈Cl₆N₆

Molární hmotnost: 1080,06 g·mol⁻¹



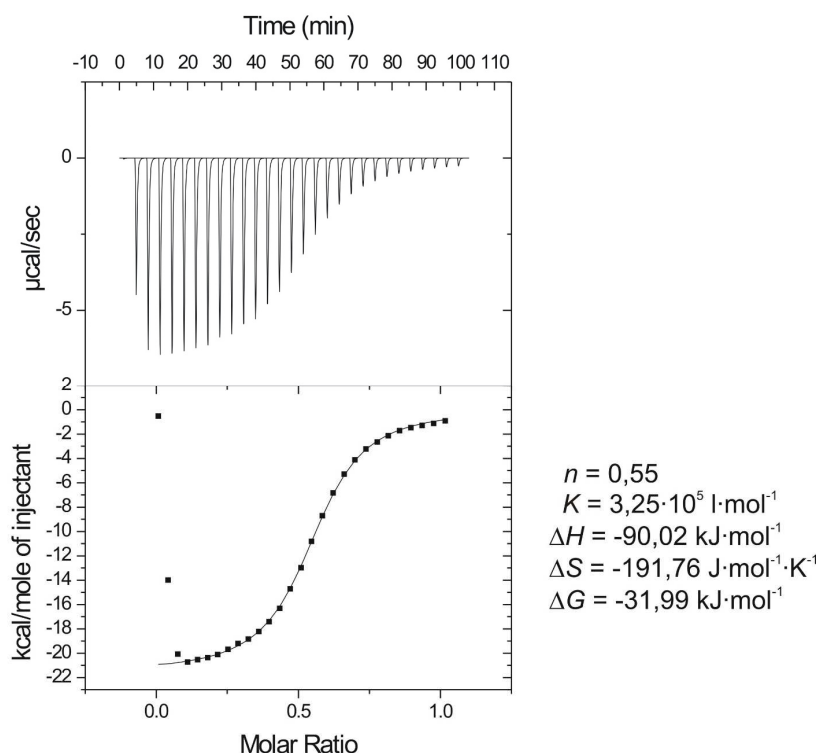
Obrázek 7: Chemická struktura ligandu č. 4

5 VÝSLEDKY A DISKUSE

Cílem této bakalářské práce bylo potvrdit nebo vyvrátit nestandardní chování vybraných ligandů s cyklodextrinovými makrocikly, β - a γ -CD. Jak se již dříve ukázalo, u některých symetrických ligandů docházelo k nezvyklému chování s γ -CD, kdy γ -CD se vázal na ligand ve stechiometrickém poměru 1:1 a ne 1:2, jak by se očekávalo. Vazbu ve stechiometrickém poměru 1:2 vykazuje β -CD, ale γ -CD nikoliv. Toto chování vykazovaly ligandy s centrálními motivy typu kuban¹⁵, spiroheptan, bifenylyl a se symetrickými koncovými adamantanovými, nebo dimethyladamantanovými motivy. Bylo proto vybráno 6 ligandů s podobnými motivy, tři bicyklooktanové, dva bifenylové a jeden modelový a byl u nich především sledován vazebný poměr s β -CD a s γ -CD.

5.1 Ligand č.1

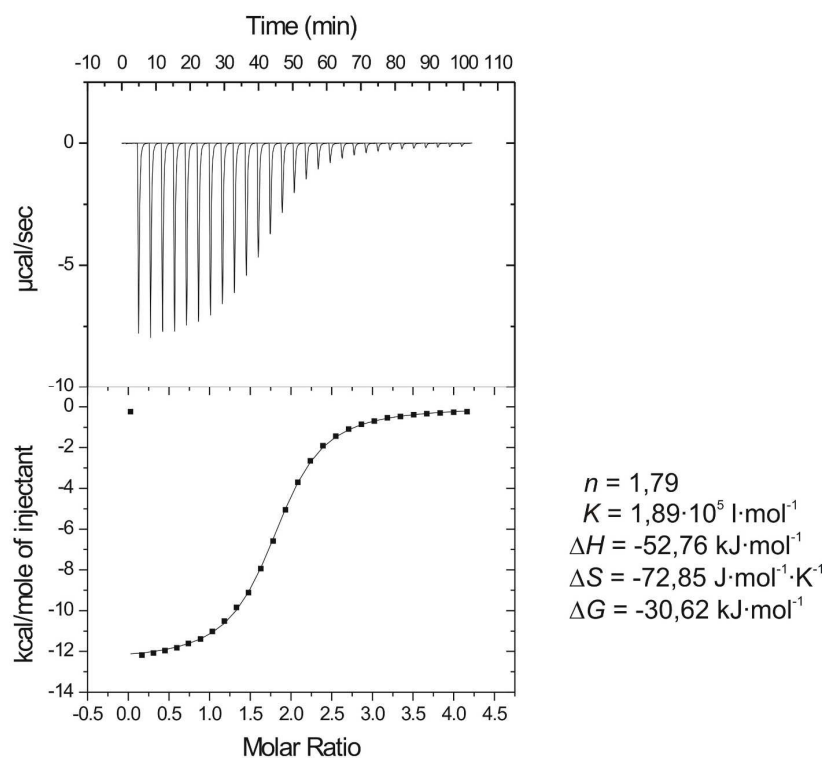
Ligand č. 1 patří do skupiny ligandů s bicyklooktanovým středem, na který je před imidazolem vázán dimethyladamantan. U takovýchto typů ligandů s centrálním bicyklooktanem a adamanty na koncích doposud nebylo posuzováno termodynamické chování. Navážka ligandu č. 1 o hmotnosti 1,219 mg byla rozpuštěna v 1,5 ml destilované vody. Vznikl roztok ligandu č. 1 o koncentraci 0,97 mM, který byl naplněn do jehly ITC a po 10 μ l byl přidáván do roztoku β -CD o koncentraci 0,20 mM.



Obrázek 10: Záznam uvolněného tepla a výsledná křivka stanovení ligandu č. 1 s β -CD

Na Obrázku č. 10 je znázorněn výsledek stanovení ligandu č. 1 s β -CD. Horní část obrázku odpovídá záznamu uvolněného tepla při přidávání ligandu č. 1 do roztoku β -CD. V dolní části obrázku je sigmoidální křivka, která odpovídá integraci hodnot z měření znázorněné v horní části. Ze záznamu a z matematického vyhodnocení je patrné, že bod ekvivalence, nastal při stechiometrickém poměru odpovídajícím hodnotě 0,55. Z toho lze usuzovat, že ligand č. 1 se váže k β -CD 1:2, tedy, že na jeden ligand připadají dvě jednotky β -CD, které se pravděpodobně váží na adamantanová místa ligandu č. 1.

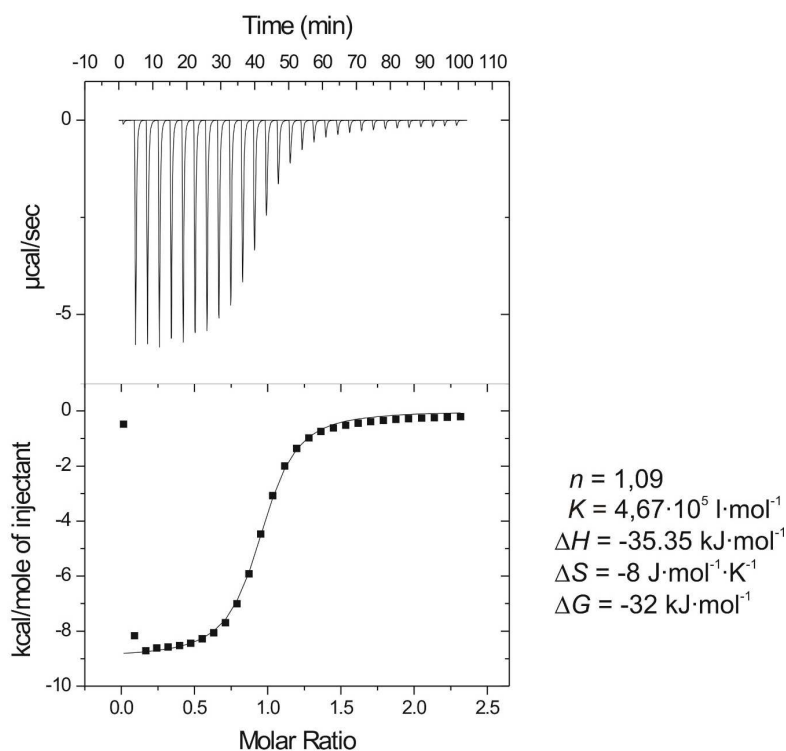
Pro ověření vazebných parametrů bylo provedeno reverzní měření s roztokem β -CD, který byl dávkován do jehly mikrokalorimetru a roztok ligandu byl v měřící cele mikrokalorimetru. Navážka β -CD o hmotnosti 2,647 mg byla rozpuštěna v 1ml destilované vody. Vznikl roztok β -CD o koncentraci 2,01 mM a byl po 10 μ l přidáván do roztoku ligandu č. 1 o koncentraci 0,10 mM.



Obrázek 11: Záznam uvolněného tepla a výsledná křivka stanovení ligandu č. 1 s β -CD v reverzním režimu

Reverzní stanovení, jehož záznam je na obrázku č. 11, potvrdilo vazebný poměr mezi ligandem č. 1 a β -CD 1:2.

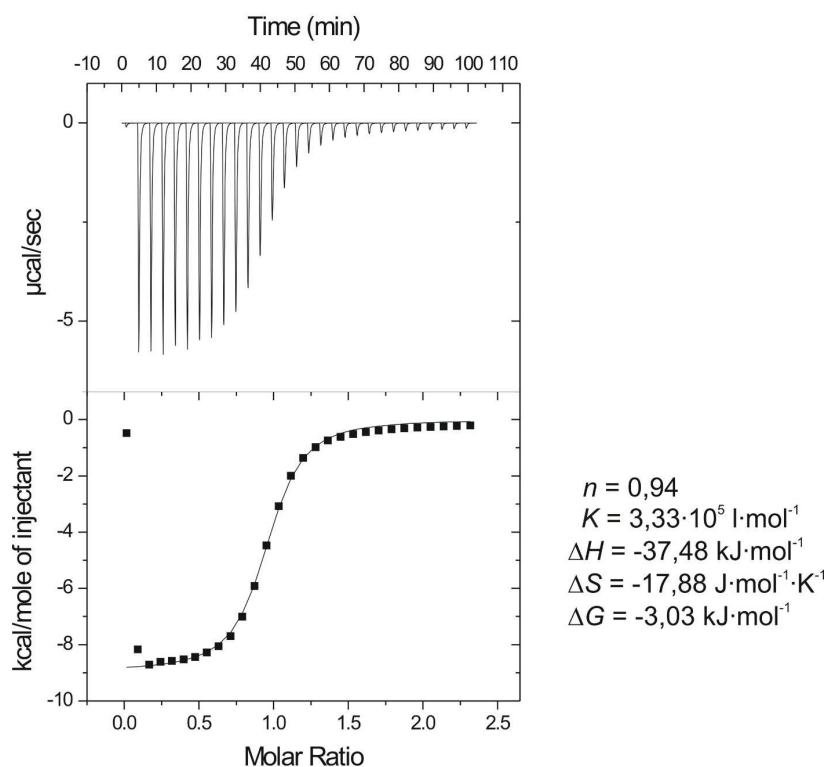
Podobně jako u předchozího stanovení s β -CD, bylo u ligandu č. 1 sledováno termodynamické chování s γ -CD. Navážka ligandu č. 1 o hmotnosti 1,219 mg byla rozpuštěna v 1,5 ml destilované vody. Vzniklý roztok ligandu č. 1 o koncentraci 0,97 mM, byl po 10 μ l přidáván do roztoku γ -CD o koncentraci 0,10 mM.



Obrázek 12: Záznam uvolněného tepla a výsledná křivka stanovení ligandu č. 1 s γ -CD

Jak už bylo zmíněno, u některých předchozích stanovení se ukázalo, že určité symetrické ligandy vykazují nestandardní chování ke γ -CD a jejich vazebný poměr je roven přibližně jedné. Ligand č. 1 má bicyklooktanový centrální motiv a u těchto ligandů s adamantany na koncových pozicích nebylo doposud sledováno termodynamické chování. Výsledek stanovení ligandu č. 1 s γ -CD je uveden na obrázku na obrázku č. 12 a lze pozorovat, že bod ekvivalence nastal při stechiometrickém poměru o hodnotě 1,09. Naměřená hodnota odpovídá stechiometrickému poměru $n=1$, kdy na jeden ligand připadá jedna molekula γ -CD. Zřejmě γ -CD se váže na střed ligandu. Toto chování bylo potvrzeno i při reverzním režimu, tak jak je zřejmé na obrázku č. 13.

Při reverzním režimu byla navážka γ -CD o hmotnosti 2,929 mg rozpuštěna v 1 ml destilované vody. Vznikl roztok γ -CD o koncentraci 2,06 mM byl dávkován do jehly mikrokolorimetru a po 10 μ l přidáván do cely, kde byl roztoku ligandu č. 1 o koncentraci 0,20 mM.

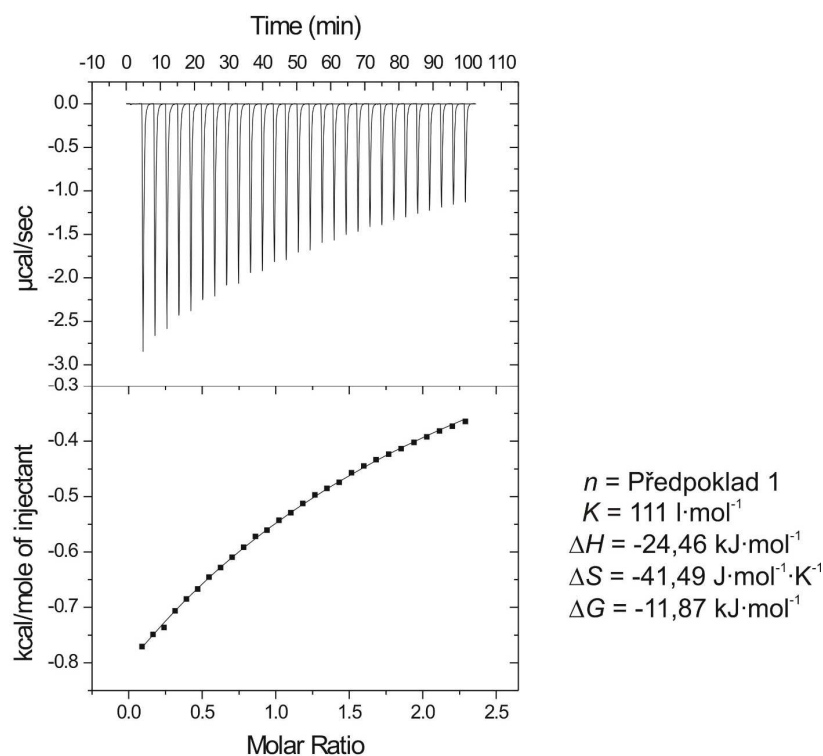


Obrázek 13: Záznam uvolněného tepla a výsledná křivka stanovení ligandu č. 1 s γ -CD v reverzním režimu

Zajímavá je skutečnost, že hodnoty vazebných konstant K pro β -CD a γ -CD jsou takřka shodné. Pro β -CD vyšla hodnota K rovna $3,25 \cdot 10^5 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1}$ a pro γ -CD $3,33 \cdot 10^5 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1}$

5.2 Ligand č. 2

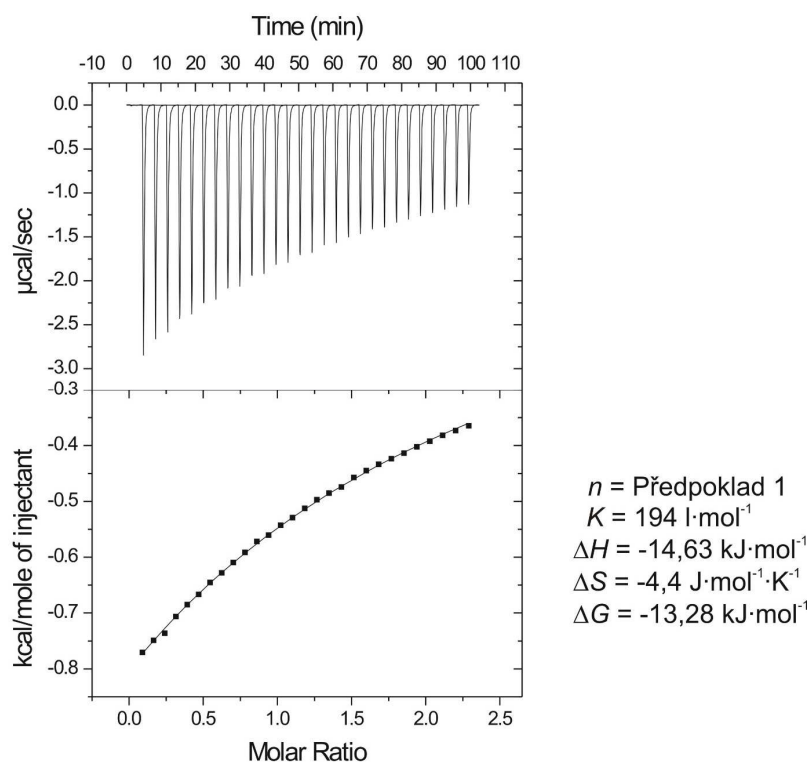
Pro další studium byly zvoleny ligandy č. 2 a č. 3., jelikož mají stejný strukturní centrální motiv, jako ligand č. 1. Termodynamické chování ligandu č. 2 bylo zkoumáno již dříve.¹⁶ V předešlých měřeních ligandu č. 2 a β -CD byla zjištěna nízká hodnota vazebné konstanty a nejspíše z tohoto důvodu limitovala hodnota molárního poměru n k nule. Proto byla pro následující stanovení zvolena vyšší koncentrace obou látek. Navážka ligandu č. 2 byla o hmotnosti 14,94 mg a byla rozpuštěna v 1 ml destilované vody. Vznikl roztok ligandu č. 2 o koncentraci 23,36 mM a byl po 10 μl přidáván do roztoku β -CD o koncentraci 1,40 mM.



Obrázek 14: Záznam uvolněného tepla a výsledná křivka stanovení ligandu č. 2 s β -CD

Měření za vysokých koncentrací nepomohlo k přesnějším výsledkům, jen se potvrdila nízká vazebná konstanta k β -CD, jak je zřejmé z výsledků měření uvedených na obrázku č. 14. Vazba ligandu k β -CD i za vyšší koncentrace byla stále slabá a měření bylo nepřesné. Z měření nelze určit, zda se jedná o stechiometrický poměr 1:1 nebo 1:2. Aby mohly být získány termodynamické parametry, byla hodnota n zafixována do hodnoty 1, která odpovídá stechiometrickému poměru 1:1.

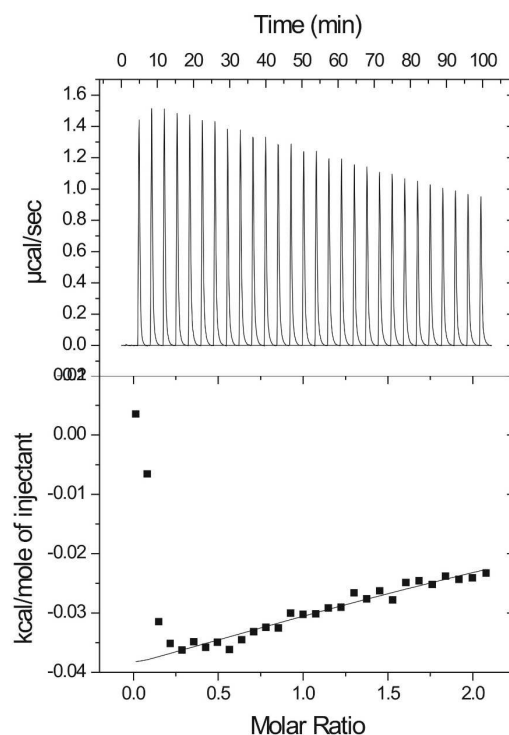
I v tomto případě bylo provedeno reverzní stanovení, kde byl roztok β -CD přidáván do roztoku ligandu č. 2. Navážka β -CD o hmotnosti 13,158 mg byla rozpuštěna v 1 ml destilované vody. Vznikl roztok β -CD o koncentraci 10,01 mM, byl po 10 μl přidáván do roztoku ligandu č. 2 o koncentraci 0,98 mM.



Obrázek 15: Záznam uvolněného tepla a výsledná křivka stanovení ligandu č. 2 s β -CD v reverzním režimu

Naměřené hodnoty jsou vyjádřeny v Obrázku č. 15. I při reverzním měření byla vazba ligandu k makrocyclyklu přibližně stejná. Z měření nelze jednoznačně určit stechiometrii. Pro získání termodynamických parametru byla hodnota n zafixována do 1, což odpovídá předpokladu stechiometrie o poměru 1:1.

Stejný ligand byl také proměřen s γ -CD. Navážka ligandu č. 2 o hmotnosti 12,180 mg byla rozpuštěna v 1 ml destilované vody. Vznikl roztok ligandu o koncentraci 19,05 mM, byl po 10 μl přidáván do roztoku γ -CD o koncentraci 1,97 mM.

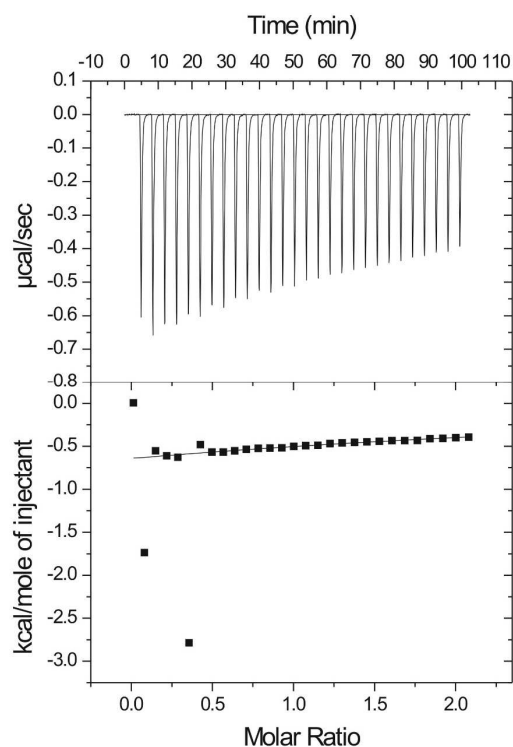


Obrázek 16: Záznam uvolněného tepla a výsledná křivka stanovení ligandu č. 2 s γ -CD

Naměřené hodnoty jsou uvedeny v Obrázku č. 16. Naměřené hodnoty neodpovídají žádné vazebné interakci mezi ligandem č. 2 a γ -CD. Toto také potvrdilo domněnku, že kavita γ -CD je pro uvedený ligand natolik široká, že se ligand do kavity neváže. Z toho důvodu nebylo prováděno reverzní měření.

5.3 Ligand č. 3

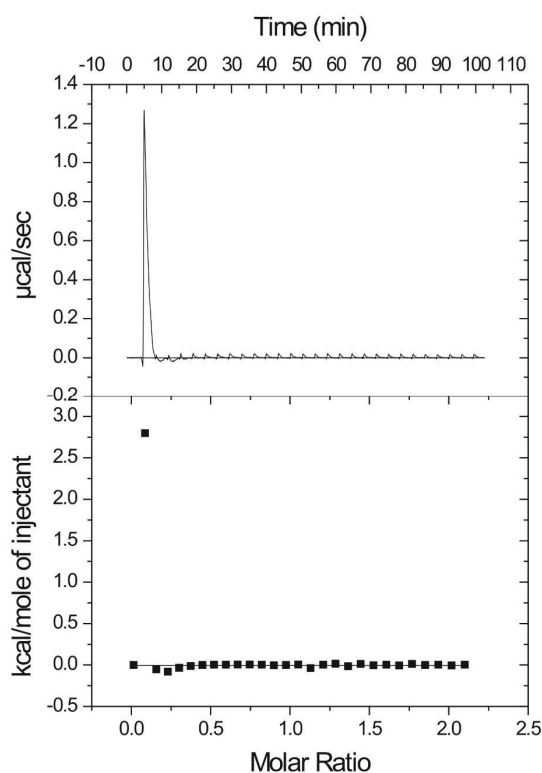
Pro další stanovení byl vybrán opět ligand s bicyklooktanovým motivem, na který je vázáno přes methylenový můstek benzimidazolium. Navážka ligandu č. 3 byla o hmotnosti 2,117 mg rozpuštěna v 1 ml destilované vody. Vznikl roztok ligandu o koncentraci 3,24 mM, byl po 10 μ l přidáván do roztoku β -CD o koncentraci 0,34 mM.



Obrázek 17: Záznam uvolněného tepla a výsledná křivka stanovení ligandu č. 3 s β -CD

Dle předpokladu by měl být ligand č. 3 natolik objemný, že se do β -CD neměl vázat. Tomu také odpovídá záznam z měření ligandu č. 3 s β -CD znázorněný na obrázku 17, kdy uvolněné teplo je velmi malé. Během titrace nedocházelo k významné změně tepla a naměřené hodnoty tak neodpovídají žádné vazebné interakci mezi ligandem č. 3 a β -CD.

Stejný ligand byl také proměřen s γ -CD. Navážka ligandu č. 3 o hmotnosti 1,967 mg byla rozpuštěna v 1 ml destilované vody. Vznikl roztok ligandu o koncentraci 3,01 mM, byl po 10 μ l přidáván do roztoku γ -CD o koncentraci 0,32 mM.

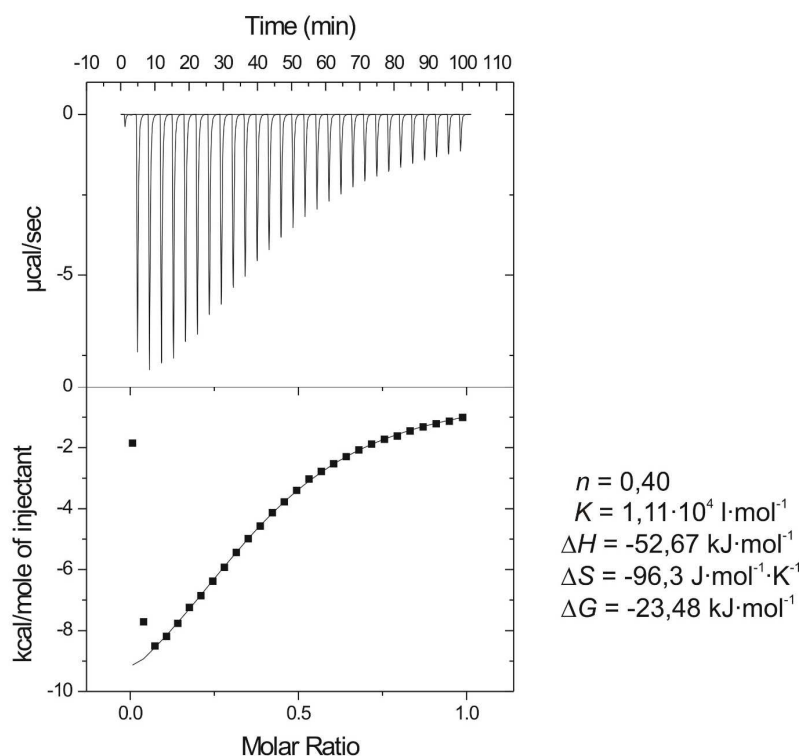


Obrázek 18: Záznam uvolněného tepla a výsledná křivka stanovení ligandu č. 3 s γ -CD

Naměřené hodnoty pro γ -CD jsou uvedeny v Obrázku č. 18. Jak je z obrázku zřejmé, nedocházelo k žádné tepelné změně a naměřené hodnoty neodpovídají žádné vazebné interakci mezi ligandem č. 3 a γ -CD. Ligand č. 3 je zřejmě natolik objemný, že se do kavity γ -CD také neváže.

5.4 Ligand č. 4

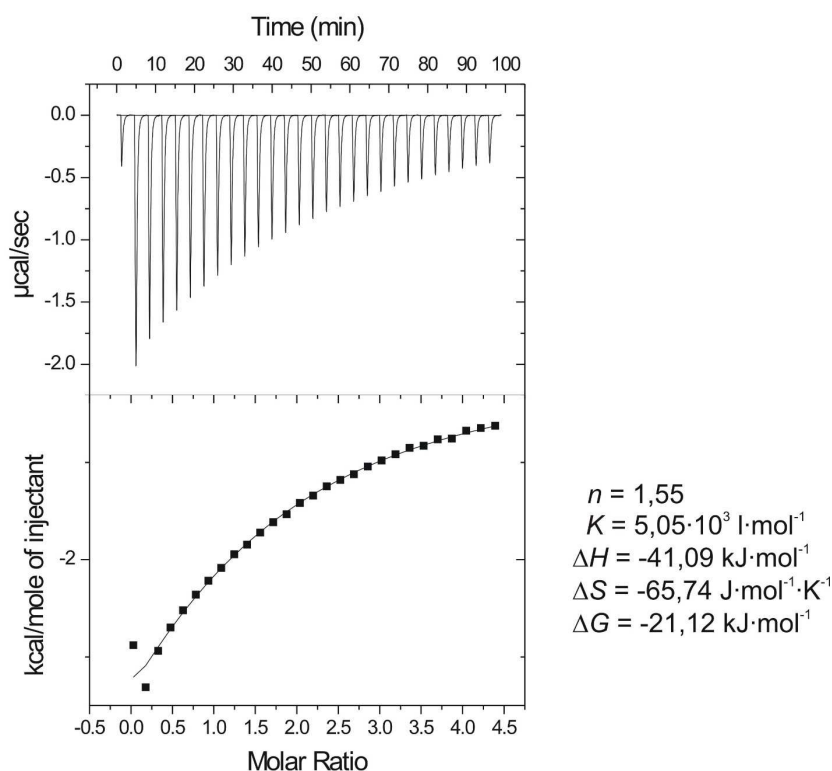
Pro další dvě měření byly vyprány ligandy s bifenylovým centrem, na který je přes dlouhá ramena s amoniiovými a *p*-xylylenovými motivy vázán adamantan (ligand č. 4), nebo dimethyladamantan (ligand č. 5). Nejprve byl ligand č. 4 proměřen s β -CD. Navážka ligandu č. 4 o hmotnosti 3,155 mg byla rozpuštěna v 1 ml destilované vody. Vznikl roztok ligandu č. 4 o koncentraci 2,92 mM, byl po 10 μ l přidáván do roztoku β -CD o koncentraci 0,60 mM.



Obrázek 19: Záznam uvolněného tepla a výsledná křivka stanovení ligandu č. 4 s β -CD

Záznam stanovení je uveden na Obrázku č. 19. Pro dané stanovení lze pozorovat, že bod ekvivalence nastal při stechiometrickém poměru odpovídajícím hodnotě 0,4. Tato hodnota není zcela jednoznačná, ale lze usuzovat, že ligand č. 4 se váže ku β -CD 1:2, tedy, že na jeden ligand připadají dvě jednotky β -CD, které se pravděpodobně váží na adamantanová místa ligandu. V klasickém režimu měření, kdy ligand je v jehle a β -CD v cele, byla stanovena vazebná konstanta odpovídající hodnotě $1,11 \cdot 10^4 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1}$.

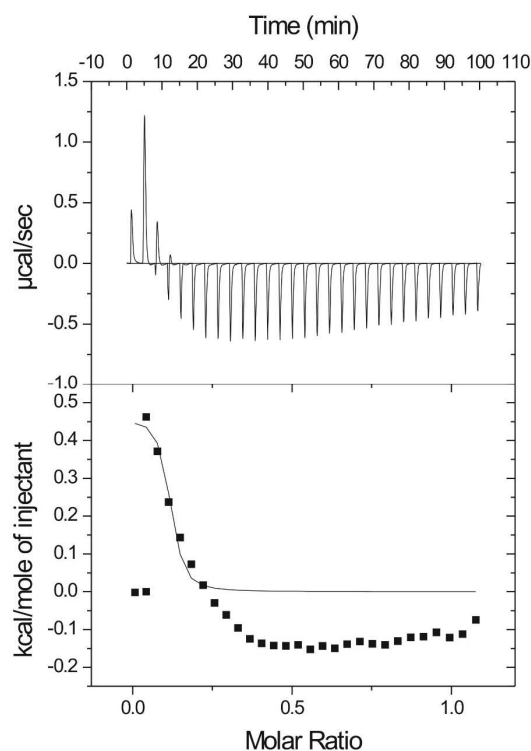
Pro zajištění přesnějších hodnoty stechiometrického poměru bylo provedeno také reverzní stanovení. Navážka β -CD o hmotnosti 2,620 mg byla rozpuštěna v 1ml destilované vody. Vznikl roztok β -CD o koncentraci 1,99 mM, byl po 10 μl přidáván do roztoku ligandu č. 1 o koncentraci 0,94 mM.



Obrázek 20: Záznam uvolněného tepla a výsledná křivka stanovení ligandu č. 4 s β -CD v reverzním režimu

Na záznamu z měření na Obrázku č. 20 lze pozorovat, že bod ekvivalence u reverzního měření ligandu č. 4 s β -CD, nastal při hodnotě 1,55. Z této hodnoty nelze jednoznačně rozhodnout o jaký stechiometrický poměr se jedná. Reverzní měření nepotvrdilo vazebnou stechiometrii z měření v klasickém režimu na obrázku č. 19.

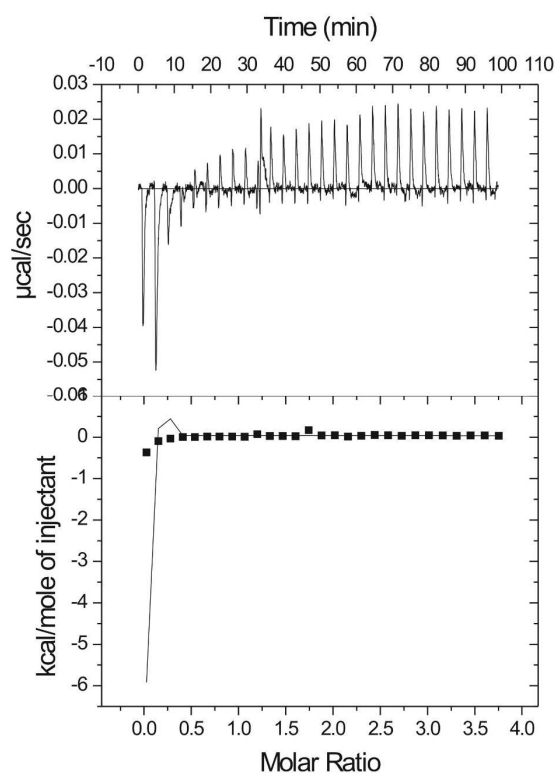
U ligandu č. 4 bylo také provedeno stanovení s γ -CD. Navážka ligandu č. 4 o hmotnosti 3,266 mg byla rozpuštěna v 1 ml destilované vody. Vznikl roztok ligandu o koncentraci 3,02 mM, byl po 10 μ l přidáván do roztoku γ -CD o koncentraci 0,60 mM.



Obrázek 21: Záznam uvolněného tepla a výsledná křivka stanovení ligandu č. 4 s γ -CD

Na Obrázku č. 21 lze pozorovat, že nedochází k žádné významné vazebné interakci mezi ligandem č. 4 a γ -CD.

Pro ujištění, že se ligand č. 4 nikterak neváže ku γ -CD, bylo provedeno také reverzní měření. Navážka γ -CD o hmotnosti 2,581 mg byla rozpuštěna v 1 ml destilované vody. Vznikl roztok γ -CD o koncentraci 1,81 mM, byl po 10 μ l přidáván do roztoku ligandu č. 1 o koncentraci 0,11 mM.

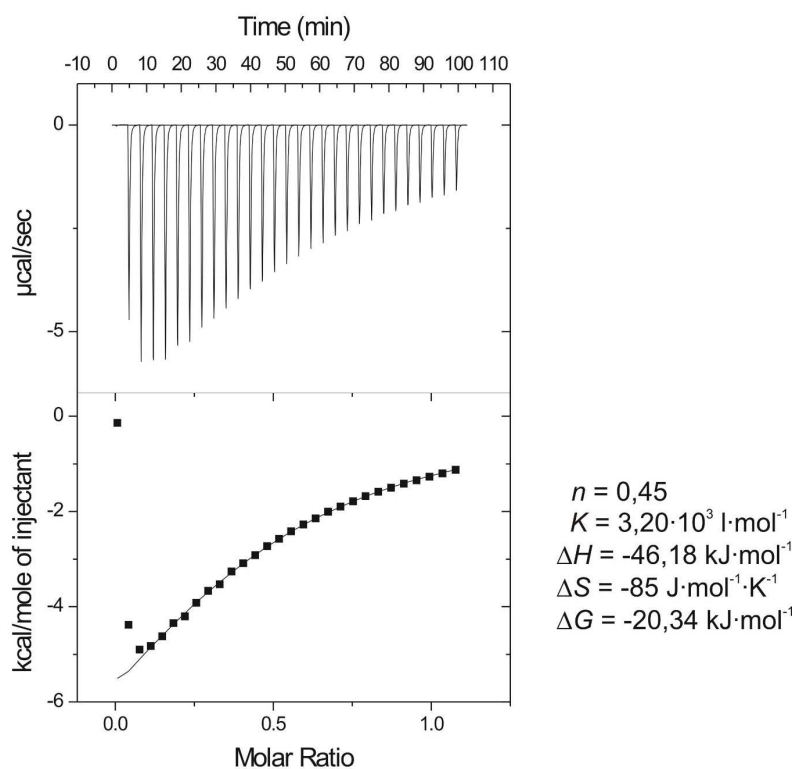


Obrázek 22: Záznam uvolněného tepla a výsledná křivka stanovení ligandu č. 4 s γ -CD v reverzním režimu

Naměřené hodnoty reverzního stanovení jsou vyjádřeny v Obrázku č. 22 a neodpovídají žádné vazebné interakci mezi ligandem č. 4 a γ -CD.

5.5 Ligand č. 5

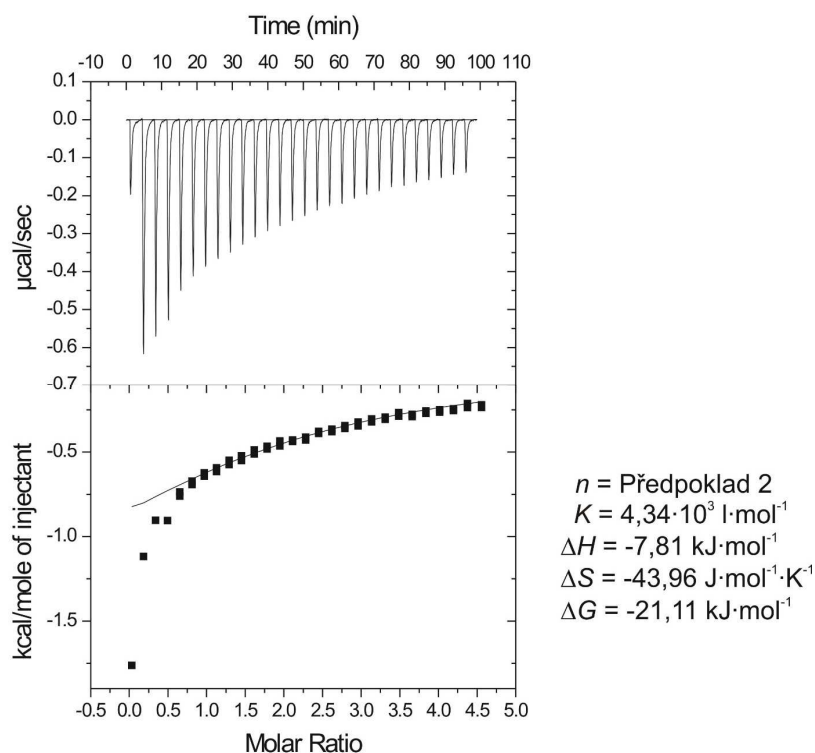
Ligand č. 5 byl velmi podobný ligandu č. 4, jen měl na koncových adamantanech dvě methylové skupiny. Nejprve byl opět proměřen s β -CD. Navážka ligandu č. 5 o hmotnosti 6,027 mg byla rozpuštěna v 1,5 ml destilované vody. Vznikl roztok ligandu o koncentraci 3,54 mM, byl po 10 μ l přidáván do roztoku β -CD o koncentraci 0,70 mM.



Obrázek 23: Záznam uvolněného tepla a výsledná křivka stanovení ligandu č. 5 s β -CD

Na Obrázku č. 23 je záznam stanovení ligandu č. 5 s β -CD Z uvedených hodnot lze pozorovat, že bod ekvivalence nastal při hodnotě 0,45. Z toho lze usuzovat že β -CD se váže na ligand č. 5 ve stechiometrickém poměru 1:2, zřejmě se dva β -CD vážou na dimethyladamantanové motivy ligandu č. 5.

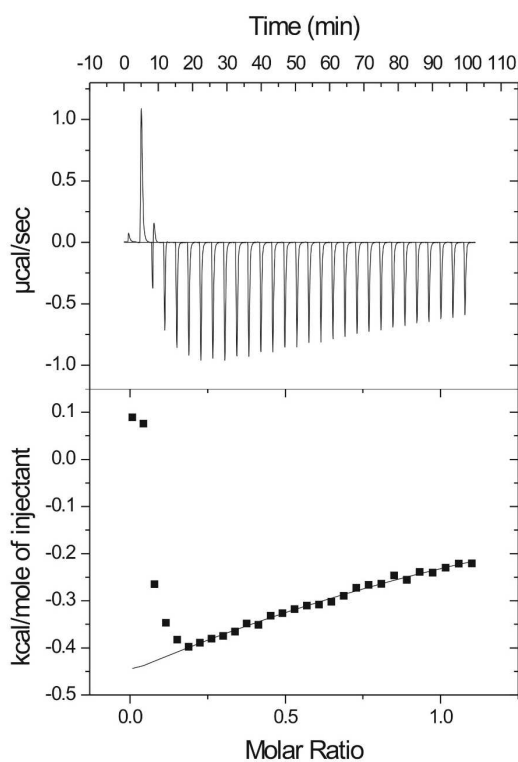
Pro ověření vazebného poměru 1:2 bylo provedeno reverzní měření. Navážka β -CD o hmotnosti 2,671 mg byla rozpuštěna v 1 ml destilované vody. Vzniklý roztok β -CD o koncentraci 2,03 mM byl po 10 μl přidáván do roztoku ligandu č. 5 o koncentraci 0,09 mM.



Obrázek 24: Záznam uvolněného tepla a výsledná křivka stanovení ligandu č. 5 s β -CD v reverzním režimu

Naměřené hodnoty jsou vyjádřeny v Obrázku č. 24. Hodnota n limituje k nule, proto nelze říct v jakém stechiometrickém poměru vzniká komplex ligandu č. 5 s β -CD. Pro určení termodynamických parametrů byla určena hodnota $n=2$. Hodnoty vazebných konstant ze standardního a reverzního měření vyšly v rozmezí 4 až $3 \cdot 10^3 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1}$.

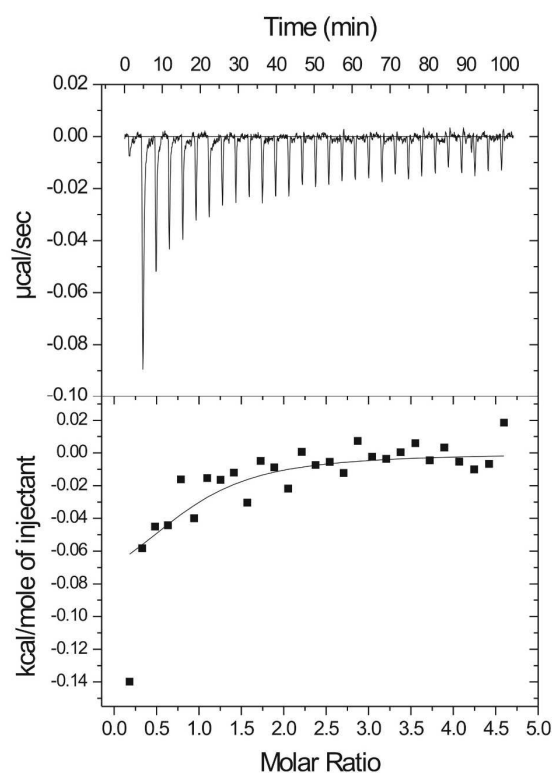
I u ligandu č. 5 bylo provedeno měření s γ -CD. Navážka ligandu č. 5 o hmotnosti 6,027 mg byla rozpuštěna v 1,5 ml destilované vody. Vzniklý roztok ligandu o koncentraci 3,54 mM byl po 10 μl přidáván do roztoku γ -CD o koncentraci 0,69 mM.



Obrázek 25: Záznam uvolněného tepla a výsledná křivka stanovení ligandu č. 5 s γ -CD

Ligand č. 5 se při stanovení s γ -CD choval podobně jako u ligandu č. 4. Jak je patrné na obrázku č. 25, uvolněná tepla při stanovení jsou velmi malá a hodnota n limituje k nule.

Ligand č. 5 byl také změřen s γ -CD v reverzním režimu. Navážka γ -CD o hmotnosti 2,648 mg byla rozpuštěna v 1 ml destilované vody. Vznikl roztok γ -CD o koncentraci 1,86 mM byl po 10 μ l přidáván do roztoku ligandu č. 5 o koncentraci 0,09 mM.

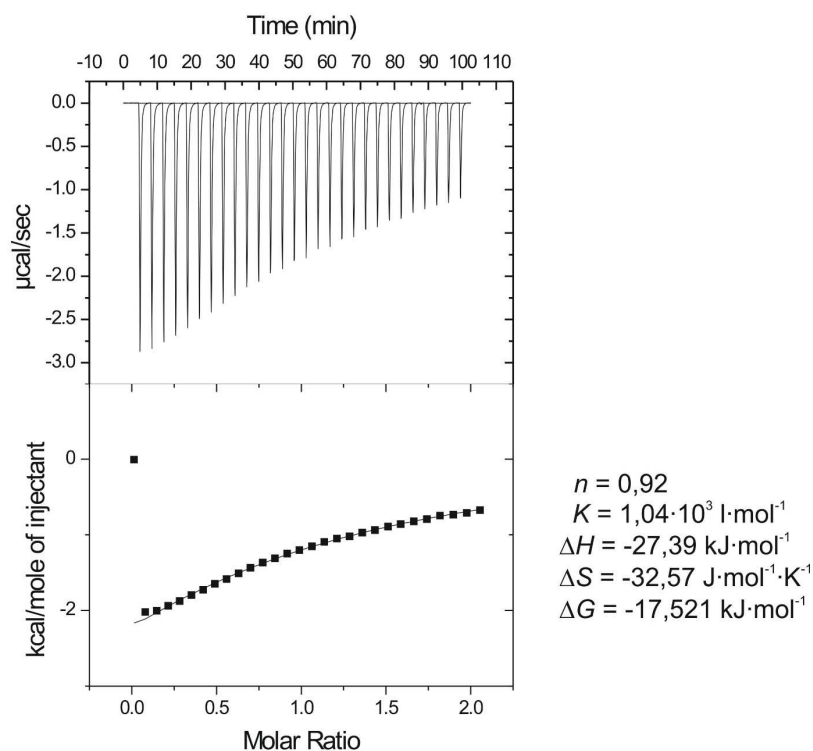


Obrázek 26: Záznam uvolněného tepla a výsledná křivka stanovení ligandu č. 5 s γ -CD v reverzním režimu

Záznam ze stanovení je uveden na Obrázku č. 26. Z hodnot uvolněných tepel a množství rozptýlených bodů kolem vyhodnocené křivky není možné určit stechiometrický poměr ligandu č. 5 s γ -CD. Uvedené stanovení je zatíženo chybou a nelze z tohoto stanovení jednoznačně vyvodit nějaký závěr.

5.6 Ligand č. 6

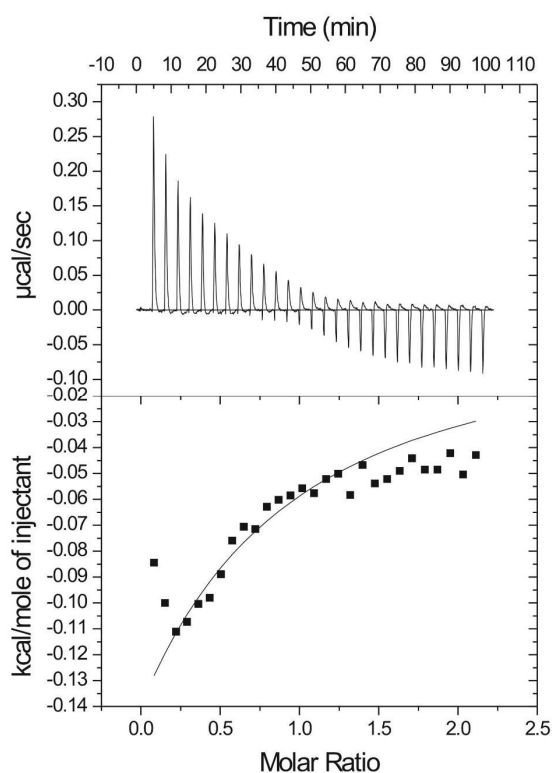
Poslední z měřených ligandů byla sloučenina, která sloužila jako standard pro ligand č. 5. Jedná se o látku s dimethyladamantánovým motivem a dvěma amonií oddělnými *p*-xylylenem. Navážka ligandu č. 6 o hmotnosti 1,850 mg byla rozpuštěna v 1 ml destilované vody. Vznikl roztok ligandu o koncentraci 4,98 mM, byl po 10 μ l přidáván do roztoku β -CD o koncentraci 0,52 mM.



Obrázek 27: Záznam uvolněného tepla a výsledná křivka stanovení ligandu č. 6 s β -CD

Nejprve bylo provedeno stanovení s β -CD. Na Obrázku č. 27, lze pozorovat, že bod ekvivalence, nastal při stechiometrickém poměru odpovídajícím hodnotě 0,92 a lze usuzovat, že ligand č. 6 se váže k β -CD 1:1, tedy, že na jeden ligand č. 6 připadá na jednu jednotka β -CD. Hodnota vazebné konstanty odpovídá $1 \cdot 10^5 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1}$.

Ligand č. 6 byl také měřen s γ -CD, stejně jako předchozí ligandy. Navážka ligandu č. 6 o hmotnosti 0,991 mg byla rozpuštěna v 0,5 ml destilované vody. Vznikl roztok ligandu o koncentraci 5,34 mM byl po 10 μl přidáván do roztoku γ -CD o koncentraci 0,51 mM.



Obrázek 28: Záznam uvolněného tepla a výsledná křivka stanovení ligandu č 6 s γ -CD

Ze stanovení ligandu č. 6 s γ -CD, které je na obrázku č. 28 nelze získat žádný jednoznačný závěr. V záznamu je patrné endotermní teplo, které od poloviny stanovení přecházelo v exotermní děj. Proložená křivka matematického modelu od poloviny měření nekopíruje integrované body a je zatížena poměrně velkou chybou. Vyhodnocená hodnota stechiometrického poměru limituje k nule. Bylo by vhodné toto měření provést ještě jednou a eliminovat endotermní děj případným snížením koncentrace.

ZÁVĚR

Cílem této bakalářské práce bylo stanovit termodynamické parametry komplexačních reakcí CD s vybranými ligandy pomocí ITC. Měření s ligandem č. 1 prokázalo nestandardní chování ve vazebném poměru k β - a γ -cyklodextrinu, kdy s β -CD se ligand č. 1 vázal v poměru 1:2 a s γ -CD se vázal v poměru 1:1. U ligandu č. 2, nebylo potvrzeno, v jakém vazebném poměru vzniká komplex mezi β -CD a ligandem č. 2. Kavita γ -CD je zřejmě pro ligand č. 2 natolik široká že mezi nimi nevzniká měřitelná interakce. Měření s ligandem č. 3 potvrdilo předpoklad, že ligand je natolik objemný, že se do kavity β -CD a γ -CD neváže. Ligand č. 4 a ligand č. 5 s bifenylovými středovými motivy se s β -CD vážou v poměru 1:2, ale s γ -CD nebyla zjištěna žádná významná vazebná interakce. Dále byl měřen modelový ligand č. 6, kde se předpokládal s CDs vazebný poměr 1:1 z důvodu jednoh vazebného adamantanového motivu. Měření ligandu č. 6 s β -CD potvrdilo vazebný poměr 1:1, u γ -CD se tato vazba nepotvrdila.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- ¹ BÜSCHMANN, Hans-Jurgen a Eckhard SCHOLLMEYER, 2002. Applications of cyclodextrins in cosmetic products. *Journal of Cosmetic Science*. Německo, (53), 185-191. Dostupné také z:
<https://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.471.8832&rep=rep1&type=pdf>
- ² DEL VALLE, E.M.Martin, 2004. Cyclodextrins and their uses: a review. *Process Biochemistry*. 39(9), 1033-1046. ISSN 13595113. Dostupné z: doi:10.1016/S0032-9592(03)00258-9
- ³ LOFTSSON, T a D DUCHENE, 2007. Cyclodextrins and their pharmaceutical applications. *International Journal of Pharmaceutics*. 329(1-2), 1-11. ISSN 03785173. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijpharm.2006.10.044
- ⁴ SHARMA, Neha a Ashish BALDI, 2016. Exploring versatile applications of cyclodextrins: an overview. *Drug Delivery*. 23(3), 729-747. ISSN 1071-7544. Dostupné z: doi:10.3109/10717544.2014.938839
- ⁵ PÉREZ, Gemma Guillén, 2019. Trabajo fin de grado: mejoras farmacotécnicas en formulaciones de antifúngicos. Facultad de farmacia universidad complutense. 12-13.G. G.
- ⁶ ASTRAY, G. et al., 2009. A review on the use of cyclodextrins in foods. *Food Hydrocolloids*. 23(7), 1631-1640. ISSN 0268005X. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodhyd.2009.01.001
- ⁷ SZENTE, Lajos a Jozsef SZEJTLI, 2004. Cyclodextrins as food ingredients. Elsevier. 15(3-4), 137-142. ISSN 09242244. Dostupné z: doi:10.1016/j.tifs.2003.09.019
- ⁸ MAAZAOU, Radhouan a Raoudha ABDERRAHIM, 2015. Aplikace cyklodextrinů: tvorba inkluzních komplexů a jejich charakterizace. *International Journal of Advanced Research* . 3 (2), 758-781. ISSN 2320-5407. Dostupné také z:
<https://www.journalijar.com/article/3386/applications-of-cyclodextrins:-formation-of-inclusion-complexes-and-their-characterization/>
- ⁹ SHARMA, Neha a Ashish BALDI, 2016. Exploring versatile applications of cyclodextrins: an overview. *Drug Delivery*. 23(3), 729-747. ISSN 1071-7544. Dostupné z: doi:10.3109/10717544.2014.938839
- ¹⁰ KUBIK, Stefan, 2021. *Supramolecular Chemistry: from concepts to applications*. ISBN 978-3-11-059561-1.

- ¹¹ STEED, Jonathan W. a Jerry L. ATWOOD, 2009. Supramolecular Chemistry. 2nd edition. ISBN 978-0-470-51233-3.
- ¹² HOFER, Ctirad, 2006. Mikrokolorimetrie biologicky významných molekul. Československý časopis pro fyziku. (5), 288-292.
- ¹³ FREIRE, Ernesto, Obdulio L. MAYORGA a Martin STRAUME, 1990. Isothermal titration calorimetry. Analytical Chemistry. 62(18), 950A-959A. ISSN 0003-2700. Dostupné z: doi:10.1021/ac00217a002
- ¹⁴ CHIAD, Khalid et al., 2009. Isothermal Titration Calorimetry: A Powerful Technique To Quantify Interactions in Polymer Hybrid Systems. Macromolecules. 42(19), 7545-7552. ISSN 0024-9297. Dostupné z: doi:10.1021/ma9008912
- ¹⁵ JELÍNKOVÁ, Kristýna. Syntéza a supramolekulární chování multitopických ligandů na bázi kvanu. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2020, 1 online zdroj (46 stran). Doctoral thesis summary. ISBN 978-80-7454-953-3. Dostupné také z: <https://digilib.k.utb.cz/handle/10563/45939>
- ¹⁶ JANOVSÁ, Petra. Studium vlivu struktury na stabilitu a uspořádání supramolekulárních komplexů 1-adamantylových ligandů a kavítandů na bázi cyklodextrinů a cucurbiturilů. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2018, 94 s.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

CDs cyklodextriny

CD cyklodextrin

β -CD β -cyklodextrin

γ -CD γ -cyklodextrin

ITC isotermální titrační mikrokalorimetrie

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Struktura cyklodextrinu ⁵	12
Obrázek 2: Schéma ITC titrátoru ¹⁴	18
Obrázek 3: Vzorový záznam měření	19
Obrázek 4: Chemická struktura ligandu č. 1.....	22
Obrázek 5: Chemická struktura ligandu č. 2.....	22
Obrázek 6: Chemická struktura ligandu č. 3.....	23
Obrázek 7: Chemická struktura ligandu č. 4.....	23
Obrázek 8: Chemická struktura ligandu č. 5.....	24
Obrázek 9: Chemická struktura ligandu č. 6.....	24
Obrázek 10: Záznam uvolněného tepla a výsledná křivka stanovení ligandu č. 1 s β -CD..	26
Obrázek 11: Záznam uvolněného tepla a výsledná křivka stanovení ligandu č. 1 s β -CD v reverzním režimu	27
Obrázek 12: Záznam uvolněného tepla a výsledná křivka stanovení ligandu č. 1 s γ -CD..	28
Obrázek 13: Záznam uvolněného tepla a výsledná křivka stanovení ligandu č. 1 s γ -CD v reverzním režimu	29
Obrázek 14: Záznam uvolněného tepla a výsledná křivka stanovení ligandu č. 2 s β -CD..	30
Obrázek 15: Záznam uvolněného tepla a výsledná křivka stanovení ligandu č. 2 s β -CD v reverzním režimu	31
Obrázek 16: Záznam uvolněného tepla a výsledná křivka stanovení ligandu č. 2 s γ -CD..	32
Obrázek 17: Záznam uvolněného tepla a výsledná křivka stanovení ligandu č. 3 s β -CD..	33
Obrázek 18: Záznam uvolněného tepla a výsledná křivka stanovení ligandu č. 3 s γ -CD..	34
Obrázek 19: Záznam uvolněného tepla a výsledná křivka stanovení ligandu č. 4 s β -CD..	35
Obrázek 20: Záznam uvolněného tepla a výsledná křivka stanovení ligandu č. 4 s β -CD v reverzním režimu	36
Obrázek 21: Záznam uvolněného tepla a výsledná křivka stanovení ligandu č. 4 s γ -CD..	37
Obrázek 22: Záznam uvolněného tepla a výsledná křivka stanovení ligandu č. 4 s γ -CD v reverzním režimu	38
Obrázek 23: Záznam uvolněného tepla a výsledná křivka stanovení ligandu č. 5 s β -CD..	39
Obrázek 24: Záznam uvolněného tepla a výsledná křivka stanovení ligandu č. 5 s β -CD v reverzním režimu	40
Obrázek 25: Záznam uvolněného tepla a výsledná křivka stanovení ligandu č. 5 s γ -CD..	41
Obrázek 26: Záznam uvolněného tepla a výsledná křivka stanovení ligandu č. 5 s γ -CD v reverzním režimu	42
Obrázek 27: Záznam uvolněného tepla a výsledná křivka stanovení ligandu č. 6 s β -CD..	43
Obrázek 28: Záznam uvolněného tepla a výsledná křivka stanovení ligandu č 6 s γ -CD...	44