

Univerzita Karlova
Pedagogická fakulta
Katedra chemie a didaktiky chemie

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Experimenty s makrocyclickými sloučeninami ve výuce chemie
Experiments with macrocyclic compounds in chemistry teaching

Jakub Mužík

Vedoucí práce: prof. Ing. Karel Kolář, CSc.
Studijní program: Specializace v pedagogice (B7507)
Studijní obor: Biologie, geologie a environmentalistika se zaměřením na
vzdělávání — Chemie se zaměřením na vzdělávání (B BI-CH)

Odevzdáním této bakalářské práce na téma Výukové experimenty s makrocyclickými sloučeninami potvrzuji, že jsem ji vypracoval pod vedením vedoucího práce samostatně za použití v práci uvedených pramenů a literatury. Dále potvrzuji, že tato práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Praha, 2020

Rád bych poděkovat svému vedoucímu bakalářské práce prof. Ing. Karlu Koláři, CSc. za odborné vedení, vstřícnost a cenné rady, které velmi napomohly k vytvoření této práce. Dále chci poděkovat Ing. Petru Hajflerovi, Viktoru Göllovi a Lubomíru Mužíkovi, kteří se významnou měrou podíleli na realizaci materiálního modelu „guest-host“ komplexu.

ABSTRAKT

Bakalářská práce je zaměřena na makrocyclické sloučeniny a jejich aplikaci ve výuce chemie. Hlavním cílem bylo využití makrocyclických sloučenin pro tvorbu bioorganických modelů aktivního centra enzymu za účelem jejich aplikace ve výuce chemie na vysoké škole vzdělávající učitele případně na gymnáziu. Jednalo se o návrh modelu, který pomůže žákům pochopit jaké vlivy působí na vznik enzym-substrátového komplexu. V tomto ohledu navazuje práce na výzkum Kazua Taguchiho, který popsal interakci β -cyklodextrinu s fenolftaleinem a Michaela Tausche, který je autorem experimentální výukové úlohy s těmito látkami.

Teoretická část práce slouží k seznámení se supramolekulární chemií, makrocycly, konkrétně cyklodextriny a crown-ethery, s jejich schopností tvořit „guest-host“ komplexy a s jejich aplikací ve výuce jako modelů aktivních center enzymů.

Praktická část se zabývá výzkumem reakcí β -cyklodextrinu s modelovou řadou acidobazických indikátorů. Rychlost vzniku jednotlivých komplexů potvrzuje hypotézu, že na průběh reakce má velký vliv sterický efekt. Na základě uvedené skutečnosti byla vytvořena experimentální výuková úloha, také bylo potvrzeno, že dochází k interakcím vzniklých komplexů s indikátorem s větší afinitou k β -cyklodextrinu, což umožnilo vytvořit inovaci původní úlohy s možností aplikace ve výuce. Experimentální část práce je doplněna návrhem a realizací materiálního modelu molekuly β -cyklodextrinu, který je využitelný pro modelování tvorby komplexu hostitel-host prostřednictvím materiálních (kalotových) modelů molekul příslušných acidobazických indikátorů. Materiální model tvoří vhodný doplněk vlastních experimentálních úloh, sloužící k vizualizaci mezimolekulárních interakcí při tvorbě komplexu.

Díky výsledkům experimentů bylo možno vytvořit dvě výukové úlohy, které jsou příspěvkem do oblasti edukace v biochemii, konkrétně modelaci aktivního centra enzymu a kompetitivní inhibice.

KLÍČOVÁ SLOVA

Makrocyclické sloučeniny, cyklodextriny, crown-ethery, aktivní místo enzymu, modely aktivních center enzymu, supramolekulární chemie

ABSTRACT

This bachelor's thesis is focused on macrocyclic compounds and their application in the teaching of chemistry. The main goal was to use macrocyclic compounds to create bioorganic models of the active center of the enzyme for the purpose of their application in the teaching of chemistry at university for educating teachers or in grammar school. It involved the design of a model to help students understand what affects the formation of the enzyme-substrate complex. In this regard, this thesis follows the research of Kazu Taguchi, who described the interaction of β -cyclodextrin with phenolphthalein, and Michael Tausch, who is the author of an experimental teaching assignment with these substances.

The theoretical part of the work introduces supramolecular chemistry, macrocycles, specifically cyclodextrins and crown-ethers, with their ability to form "guest-host" complexes and their application in teaching as models of active centers of enzymes.

The practical part deals with the research of β -cyclodextrin reactions with a model series of acid-base indicators. The speed of the formation of individual complexes confirms the hypothesis that the course of the reaction is greatly influenced by the steric effect. Based on this fact, an experimental teaching assignment was created, and it confirmed that the resulting complexes interact with the indicator with greater affinity for β -cyclodextrin, allowing the original assignment to be innovated for use in lessons. The experimental part of the work has been supplemented by the proposal and implementation of a material model of the β -cyclodextrin molecule, which can be used to model the formation of a guest-host complex through material (calotte) models of molecules of the appropriate acid-base indicators. The material model provides a suitable complement to our own experimental tasks, used to visualize intermolecular interactions in the formation of the complex.

The results of these experiments made it possible to create two teaching assignments that are a contribution to the field of education in biochemistry, namely the modeling of the active center of the enzyme and competitive inhibition.

KEYWORDS

Macrocyclic compounds, cyclodextrines, crown-ethers, enzyme active site, models of the active site of the enzyme, supramolecular chemistry

Obsah

1	Úvod	10
2	Teoretická část	12
2.1	Charakteristika aktivních center v biomakromolekulách	12
2.2	Bioorganické modely aktivních center	14
2.3	Supramolekulární chemie	15
2.4	Makrocikly-cyklodextriny, crownethery jako modely aktivních center	16
2.4.1	Cyklodextriny	16
2.4.2	Historie cyklodextrinů	16
2.4.3	Vlastnosti cyklodextrinů	17
2.4.4	Cyklodextriny jako modely aktivních center	19
2.4.5	Crown-ethery, jejich objev a použití	21
2.4.6	Vlastnosti crown-etherů	21
2.4.7	Crown-ethery jako modely aktivních center	23
2.5	Aplikace modelů aktivních center ve výuce	24
3	Cíl práce	26
4	Praktická část	27
4.1	Použité chemikálie	27
4.1.1	Charakteristika použitých látek	28
4.2	Použitá laboratorní technika	32
4.3	Metodika realizace výukových experimentů	33
4.4	Přehled námětů experimentálních úloh	34
4.5	Přehled realizovaných experimentů	35
4.5.1	1. Shrnutí výsledků prováděných experimentů zaměřených na vznik komplexů vybraných acidobazických indikátorů a β -cyklodextrinu	35

4.5.2	Příprava a reakce modelové řady fenolftalein-kresolftalein-thymolftalein...	37
4.5.3	Příprava modelové řady fenolová červeň-kresolová červeň-thymolová modř 38	
4.5.4	Shrnutí:	39
4.5.5	2. Shrnutí výsledků prováděných experimentů zaměřených na vznik komplexů vybraných acidobazických indikátorů a β -cyklodextrinu.....	40
5	Výsledky a diskuze	41
6	Seznam použitých informačních zdrojů	43
7	Přílohy	47
7.1	Experimentální úlohy zaměřené na demonstraci aktivních center	51
7.2	Obrazová dokumentace experimentů.....	62
7.3	Multimediální soubory prováděných pokusů.....	66
7.4	Materiální model aktivního centra	67

1 Úvod

Biochemie se v posledních letech stává stále vyhledávanějším oborem. Tato interdisciplinární věda je opředena řadou podivuhodných reakcí, z nichž řada fascinuje vědce i veřejnost a mnoho jich doposud nebylo objasněno.

Jednou z mnoha zajímavých oblastí, kterou se biochemie zabývá jsou enzymy a jejich funkce v organismu. Je známo, že enzymy jsou látky bílkovinné povahy schopné katalyzovat přeměnu substrátu na produkt, který je dále využíván živými organismy, popřípadě viry, čímž výrazně urychlují metabolické přeměny. Otázkou však zůstává, jakým způsobem interaguje enzym se substrátem, jaké je aktivní místo enzymu, ve kterém je vázán substrát, jaké interakce vazbu zprostředkovávají, jak je důležitý tvar a velikost molekuly substrátu v závislosti na tvaru a velikosti aktivního místa. Na základě této skutečnosti se práce zaměřuje na vytvoření experimentálních úloh, které by pomohly studentům uvedené otázky zodpovědět.

V dnešní době existuje několik modelů demonstrujících, jak vazba substrátu na enzym probíhá, zde byly vybrány čtyři nejdůležitější, kterými jsou lock-key, keyhole-lock-key, induced-fit a selected-fit modely, které poukazují na různé konformační změny při vzniku enzym substrátového komplexu.

Prováděné experimenty se zaměřují přímo na demonstraci aktivního místa enzymu, a k tomu je nutno mít látky, které svými vlastnostmi aktivní centrum napodobují a zároveň mají mnohem jednodušší strukturu, za účelem zvýšení názornosti a snazšího chápání zmíněné problematiky. Právě proto byly zvoleny makrocyclické sloučeniny (cyklodextriny, crownethery), jejichž unikátní vlastnosti umožňují vznik „guest-host“ komplexu, což znamená, že makrocykly jsou schopné vázat do své kavity jiné molekuly, přičemž navázaná molekula je hostem a makrocyclus jejím hostitelem.

Přímo pro experimenty byl použit β -cyklodextrin, který tvořil komplex s různými acidobazickými indikátory. Jako nejefektivnější se v interakci s β -cyklodextrinem ukázala řada fenolftalein – o-kresolftalein-thymolftalein. Doba trvání vzniku komplexů jednotlivých sloučenin, se odráží v jejich struktuře, což potvrdilo hypotézu sterického bránění, ale také důležitost hydrofobního efektu při interakcích jednotlivých součástí indikátoru s β -

cyklodextrinovým kruhem. Další poznatek ukázal, jak je důležitá selektivita a afinita při interakci β -cyklodextrinu s indikátory, když fenolftalein dokázal „vypudit“ ostatní dva indikátory se vzniklých komplexů. Nejdůležitější však je, že všechny změny při vzniku komplexu indikátoru s makrocyklem jsou viditelné pouhým okem, a sice jako barevnou změnu.

Další součástí práce bylo vytvoření materiálního modelu aktivního centra, který se skládá z β -cyklodextrinového kruhu a molekuly indikátoru vytvořené ze stavebnice modelů. Model může napomoci při vizualizaci interakce mezi molekulami během řešení navrhovaných úloh.

2 Teoretická část

2.1 Charakteristika aktivních center v biomakromolekulách

Pokud chceme charakterizovat aktivní centrum v biologicky aktivních makromolekulárních látkách, budeme jej hledat u enzymů, které jako jediné mají ve své struktuře takzvané aktivní vazebné a aktivní katalytické místo.(1) Aktivní vazebné místo reprezentuje určitou oblast enzymu, kde se nekovalentními interakcemi specificky váže substrát na enzym, v katalytickém aktivním centru probíhají přímo chemické reakce přeměňující navázaný substrát na výsledný produkt. Aktivní centrum může vypadat jako *štěrbina, prohlubeň, jamka*, ve které se nachází malý počet aminokyselin, které mohou být v řetězci od sebe málo, ale i velice vzdáleny a tyto pak zprostředkovávají tvorbu specifického enzym-substrátového komplexu.(2) Obecnou charakteristiku aktivního centra lze definovat v těchto pěti bodech:

- „1. Aktivní místo enzymu reprezentuje jen malou část prostoru, který zaujímá enzym.
2. Aktivní místo je trojrozměrné- tzn. že aminokyseliny a kofaktory nacházející se v aktivním místě jsou přesně prostorově orientovány tak, aby byly v ideálním postavení jedna vůči druhé a zároveň korespondovaly s molekulou navázaného substrátu.
3. Ve většině případů jsou interakce při vazbě substrátu na enzym nekovalentní a reprezentují je různé typy tzv. slabých mezimolekulárních interakcí (vodíkové vazby, dispersní interakce, dipolární interakce apod.).
4. Vazebná místa se obvykle nacházejí v miniaturních prostorách, vyskytujících se v molekule enzymu. Důvodem jejich umístění je odstranění solventu, to znamená vody ze substrátu, který by mohl mít za následek sníženou katalytickou aktivitu enzymu. Jinými slovy, molekula substrátu je před navázáním zbavena solventu a před opětovnou solvatací ji chrání přímo aktivní centrum enzymu. Solvatace vodou je nahrazena vazbou na protein.
5. Specifika vzniku enzym-substrátového komplexu závisí na přesném uspořádání atomů přímo v aktivním centru enzymu, které je komplementární se způsobem uspořádání atomů v molekule substrátu.“ (2)

Pohledy na specifiku vazby substrátu na enzym jsou odlišné, v dnešní době se setkáváme se třemi modely, znázorňujícími možnost interakce jednotlivých komponent. Jedná se o systém „lock-key“(3), známý jako model klíče a zámku, rozšířený o „keyhole-lock-key“model (4), který doplňuje původní „lock-key systém“ o pohyb substrátu v dutině enzymu, dále „induced-fit“ model „ruky a rukavice“ je založený na změně a přizpůsobení tvaru aktivního centra enzymu navázanému substrátu(5) a „selected-fit“, model, který je založený na myšlence, že enzymy se nacházejí v rovnováze, v různých konformačních stavech a pouze některé z nich jsou schopné navázání a katalytické přeměny substrátu.(6)

„Lock-key“ model

Na konci devatenáctého století přišel na základě řady experimentů německý chemik Emil Fischer s teorií „zámku a klíče“ , která byla založena na vysoké stereospecifitě a komplementaritě substrátu k enzymu.(2) Aktivní místo enzymu v tomto případě demonstruje zámek a substrát klíč, který do něj přesně zapadá.(viz obr.č.1) Pokud bychom chtěli znázornit specifické interakce aktivního místa, byl by model dostačující, ovšem přihlédneme-li k faktu, že celý enzym-substrátový komplex je dynamický, je daný model nedostačující.(4)

„Induced-fit“ model

Za předpokladu, že množství informací, které přinesl „lock-key“ model je nedostačující pro znázornění dynamiky aktivního centra, přišel v roce 1958 David Koshland Jr. s návrhem, že je nutné zahrnout do modelování flexibilitu změny konformace aktivního centra při tvorbě komplexu se substrátem.(4)(viz obr.č.1) Hlavní rozdíl mezi oběma modely je, že na rozdíl od „lock-key“ modelu nemá aktivní místo tvar, který přesně odpovídá tvaru vázajícího se substrátu, nýbrž se svým tvarem navázané molekule přizpůsobí, čili jak z názvu vyplývá indukuje změnu tvaru.(4)

„Selected-fit“ model

Na rozdíl od „induced-fit“ modelu předpokládá vybraný model změnu konformace již před navázáním ligandu, a sice počítá s jistým rovnovážným stavem enzymů v různých

konformačních uspořádáních, kde si je schopen sám ligand vybrat enzym, který je pro jeho navázání vhodný, a tím stabilizovat enzym-substrátový komplex.(4)(viz obr.č.1)

„Keyhole-lock-key“ model

Novinkou v oblasti je propojení dá se říci všech výše uvedených modelů, což přináší nový pohled na aktivitu enzymů obecně. Problematika „keyhole-lock-key“ modelu je nově popsána takto: „Jako rozšíření tradičních modelů enzymatické katalýzy navrhujeme „keyhole-lock-key“ model pro znázornění katalytické funkce enzymů, které mají aktivní místo situované do centra enzymu, přičemž je toto aktivní místo propojeno s povrchem enzymu přístupovými cestami (*tunely*). V tomto modelu demonstruje aktivní místo enzymu zámek, přístupová cesta klíčovou dírkou a substrát klíč. Tento model poukazuje na důležitost vstupování substrátu a uvolňování produktu v závislosti na aktivitě enzymu, specifitě vazby a stereoselektivitě. Velikost, tvar, fyzikálně chemické vlastnosti a dynamika přístupových *tunelů-klíčových dírek*, umožňuje selektivní výběr vstupujícího substrátu a uvolňujícího se produktu. Předpokládáme, že komplementarita mezi vázajícími se ligandy a přístupovými cestami může být tak důležitá pro substrátovou specifitu, jako komplementarita mezi substrátem a aktivním místem. (vizobr.č.2) Tuto vzájemnou interakci lze popsat dvěma kroky:

1.Průchod substrátu *tunelem*

2. Přizpůsobení substrátu aktivnímu místu. Fakt, že jsou propojovací *tunely* postiženy častěji konformačními defekty a dalšími vlivy, než aktivní místa přináší nové paradigma v proteinovém inženýrství se širokým praktickým využitím.“ (4)

2.2 Bioorganické modely aktivních center

Již od doby, kdy byly objeveny první enzymy se člověk snažil pochopit jejich účel a jejich primární funkci v organismu. Poté co byly enzymy podrobně prozkoumány a byla v nich identifikována důležitá místa, která ovlivňují jejich aktivitu, zbyla už jen otázka, jakým způsobem aktivní místa enzymu fungují. V první řadě bylo nutno zjistit jaké reakce v těchto složitých biomakromolekulách probíhají a následně vytvořit simplexní model, který by zjednodušeně demonstroval, na základě, jakých vlivů je schopen celý systém fungovat.

Vědci se zaměřili na aktivní centrum enzymu,(7) kde probíhají nejdůležitější reakce, a sice dochází zde ke vzniku enzym-substrátového komplexu, který je podmíněn řadou fyzikálně-chemických interakcí.

Hlavním představitelem zabývajícím se oborem „biomimetic chemistry“ byl americký chemik Ronald Charles D. Breslow(8), který navrhl mnoho modelů, demonstrujících enzymatickou aktivitu, a to s různými molekulami tvořícími „host-guest“ komplexy (9). Breslow se zabýval především chemickými reakcemi, probíhajícími v aktivním centru enzymu, neopomněl však ani sterický efekt a co je nejdůležitější, logicky popsal sled jednotlivých reakcí, které byl schopen realizovat díky použití nově nasyntetizovaných makrocyklických sloučenin, což umožnilo vysvětlit z jakého důvodu a v jakém pořadí probíhají reakce, ve vztahu k dané biochemické funkci enzymu. Oblastí, kterou se v poslední době nejvíce zabýval byly nukleové kyseliny, jejich enzymatická aktivita a enzymy důležité pro jejich funkci.(9)

2.3 Supramolekulární chemie

V několika posledních desetiletích jsou vědci fascinováni supramolekulární chemií. Za objevení této poměrně rané vědní disciplíny byla v roce 1987 udělena Nobelova cena za chemii Charlesi Johnu Pedersenovi(10), Donaldu Jamesi Cramovi(10) a Jean-Marie Lehnovi(10). Supramolekulární chemie se zabývá syntézou a vývojem složitých funkčních struktur nanoskopických rozměrů. Dnes můžeme hovořit de facto o interdisciplinární vědě, která propojuje chemii, fyziku a biologii. Hlavní funkcí je vytváření různých sloučenin s fascinujícími fyzikálními (magnetické, fotochemické, optické), chemickými(katalytické) i biologickými (aktivita a působení v organismech) vlastnostmi, především pro využití ve farmaceutickém, potravinářském a chemickém průmyslu.

Přelom nastal po objevení koronandů, kryptandů, sfeandrů, klathrátů, kalixarenů, konkrétně crownetherů, cyklodextrinů a dalších makrocyklických sloučenin, ke kterému došlo v posledních padesáti letech. Hlavní zájem supramolekulární chemie je směřován na síly, díky kterým mohou vznikat složité komplexy s unikátními vlastnostmi, lišícími se od jejich základních stavebních kamenů, těmito silami jsou vodíkové můstky, koordinační vazby, π - π interakce a v neposlední řadě hydrofobní efekt který představují disperzní interakce. Na základě těchto interakcí jsou tzv. makrocykly schopny vytvářet složité supramolekulární

komplexy, které mohou obklopovat, vázat do kavity, či jinak interagovat s různými molekulami a díky těmto vlastnostem vykazují možnost např. transportovat nebo naopak vychytávat různé látky v různých prostředích. Do určité míry tedy připomínají enzymy, a proto byla pro výzkum, který má edukačně přiblížit funkci enzymů a poukázat na příčiny, které mohou ovlivňovat vznik různých enzymových komplexů, použita skupina cyklodextrinů, ty jsou schopny do své kavity vázat různé molekuly s odlišnou rychlostí komplexace a afinitou.

2.4 Makrocykly-cyklodextriny, crownethery jako modely aktivních center

Pro modelování aktivních center enzymů se z důvodu menších nákladů a větší dostupnosti používají crownethery a cyklodextriny. Výzkum, který byl v této oblasti proveden navazuje na práci japonského vědce Kazua Taguchiho, který objevil a popsal komplexaci β -cyklodextrinem a fenolftaleinem.

Na jeho práci navazuje německý didaktik chemie prof. Michael W. Tausch Dr., který pokračuje v problematice vzniku komplexu a vytváří první úlohy, za účelem jejich využití ve výuce.

2.4.1 Cyklodextriny

2.4.2 Historie cyklodextrinů

Historie cyklodextrinů sahá do roku 1891, kdy Villers publikoval práci, kde popisuje vykrytalizovaný produkt bakterie *Bacillus amylobacter*, sestavil jeho sumární vzorec jako $(C_6H_{10}O_5)_2 \cdot 5H_2O$ a pojmenoval ho „celulosin“, protože vykazoval chemické vlastnosti de facto totožné jako celulóza.(11)

O dvanáct let později se však Schardinger začal intenzivněji do hloubky zajímat o bakterie, které cyklodextrin syntetizují a zjistil, že ve Villersově případě nešlo o čistou kulturu, nýbrž se v ní objevil další druh bakterie a sice *Bacillus macerans*, kde hlavní produkt tvořila látka pojmenovaná jako α -dextrin, posléze objevil také β -dextrin, a to díky odlišným reakcím obou

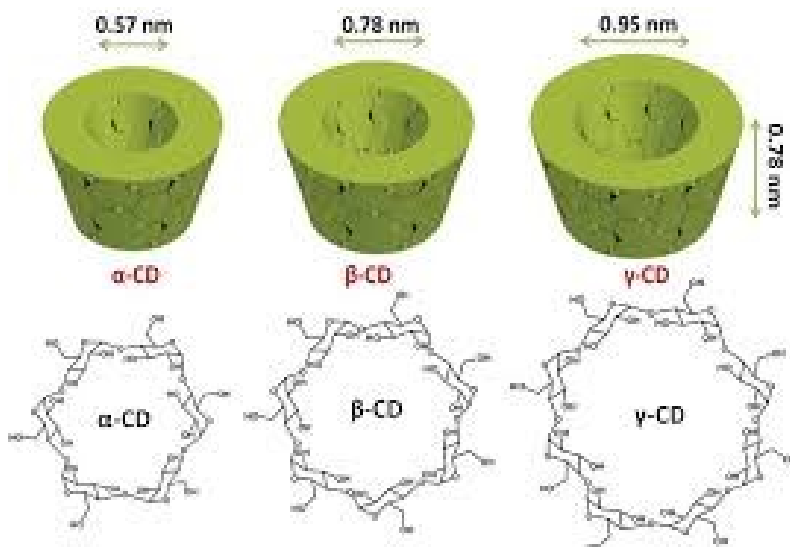
zmíněných látek s jódem. Dá se tedy říci, že základy chemie cyklodextrinů položil Schardinger. (2)

V dalších dekádách docházelo k prohlubování informací o cyklodextrinech a jejich fyzikálních, chemických i biologických vlastnostech. K největšímu rozmachu ovšem došlo v osmdesátých letech, kdy vzniká obor supramolekulární chemie.(11)

V dalších dekádách docházelo k prohlubování informací o cyklodextrinech a jejich fyzikálních, chemických i biologických vlastnostech. K největšímu rozmachu ovšem došlo v osmdesátých letech, kdy vzniká obor supramolekulární chemie.(11)

2.4.3 Vlastnosti cyklodextrinů

Pokud bychom chtěli zařadit cyklodextriny do nějaké skupiny oligosacharidů, pak hovoříme o tzv. přírodních maltodextrinech vznikajících enzymatickou reakcí pomocí enzymu 4- α -glukantransferasy, který patří do skupiny transferas, jejichž funkcí je přenos určité charakteristické (funkční) skupiny z jedné molekuly zvané donor na molekulu druhou zvanou akceptor. Struktura cyklodextrinu je tvořena α -(1-4)glukopyranosovými podjednotkami,(12) které jsou uspořádány do tvaru komolého kužele s válcovitou dutinou-kavitou, přičemž hydroxylové skupiny směřují vně makrocyklu a dávají tak vzniknout hydrofilním vlastnostem vnějšímu molekuly(12), na rozdíl od kavity, která je silně hydrofobní(12), jelikož obsahuje uhlíkové skelety dextrinů, které jsou navzájem spojeny glykosidickou vazbou (12). Mezi nejznámější cyklodextriny patří α -cyklodextrin neboli také: „Schardingerův α -dextrin, cyklomaltohexosa, cyklohexaglukan, cyklohexaamylosa, α -CD, ACD, C6A“(11) obsahující šest glukopyranosových jednotek, dále β -cyklodextrin, neboli:„ Schardingerův β -dextrin, cyklomaltoheptosa, cykloheptaglukan, cykloheptaamylosa, β -CD, BCD, C7A“(11) skládající se ze sedmi glukopyranosových podjednotek a γ -cyklodextrin známý také jako: „Schardingerův γ -dextrin, cyklomaltooktosa, cyklooktoglukan, cyklooktaamylosa, γ -CD, GCD, C8A“(11), který obsahuje osm dextrinových podjednotek.(11) (Viz. obr.č.1)



Obrázek 1 α , β , γ -cyklodextrin dostupné z:

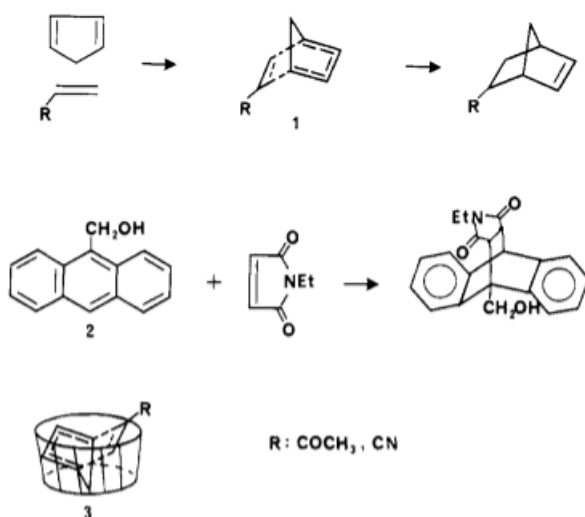
<https://www.google.com/url?sa=i&url=https%3A%2F%2Frepozitorij.pharma.unizg.hr%2Fislandora%2Fobject%2Fpharma%253A416%2Fdatastream%2FPDF%2Fview&psig=AOvVaw2kBLKjB5oYAHrGNPWPQZbT&ust=1586821831417000&source=images&>

Jelikož jsou cyklodextriny schopny vytvářet řadu inkluzivních komplexů s hostitelskými molekulami, je jejich použití velmi široké a to např. ve farmacii(13), v zemědělství, v potravinářství, v celé řadě oborů chemického průmyslu „(stabilizace látek citlivých na světlo a kyslík, modifikace reaktivity navázaných molekul, interakce s těkavými složkami, zlepšení rozpustnosti látek, přeměna kapalných složek na krystalické, ochrana proti degradaci látek působením mikroorganismů, maskování zápachu a chuti, katalytická aktivita s interagujícími molekulami) (14) i v enviromentalistice, a to díky širokému spektru molekul, které jsou schopny vázat a sice: „mastné kyseliny a estery, aromatické sloučeniny, alifatické alkoholy, antibiotika a proteiny s aromatickými aminokyselinovými zbytky.“(12) Co se týče komerčně používaných cyklodextrinů, jsou to látky s vhodně navázanými funkčními skupinami, které jejich vlastnosti mění. Jelikož jsou cyklodextriny schopny existovat jako samostatné makromolekuly, ale také mohou tvořit inkluzivní polymerní řetězce, mají využití také jako např.: „stacionární fáze chromatografických kolon, chemické senzory, speciální filtry, transportní molekuly léčiv a další.“(12)

2.4.4 Cyklodextriny jako modely aktivních center

Se vznikem supramolekulární chemie a zjištěním výjimečných vlastností cyklodextrinů, vázat do své kavity jiné molekuly přišel rozmach v oblasti modelování enzymatických reakcí tzv. enzym mimics reaction.(7) Se zajímavou myšlenkou, že by β -cyklodextrin mohl sloužit jako model aktivního centra, jelikož se do jeho kavity váže molekula fenoltaleinu, přišel, jak již bylo uvedeno v osmdesátých letech Kazuo Taguchi(15) a další vědec, který hojně využíval cyklodextriny k vytváření bioorganických modelů byl Ronald Charles D. Breslow(9). Důvodem jejich využitelnosti v této oblasti jsou vlastnosti, prostřednictvím kterých je možné demonstrovat chování aktivního centra enzymu. Pokud má enzym správně fungovat, musí vzniknout komplex s adekvátně navázaným substrátem čili musí mít náležitou velikost, orientaci funkční skupiny a tvar. Všechny tyto atributy cyklodextriny mají a pokud je možné najít vhodnou molekulu, která má optimální velikost pro to, aby se umístila do kavity daného cyklodextrinu, je možné jej využít jako model aktivního centra a ukázat si problematiku vzniku komplexu.

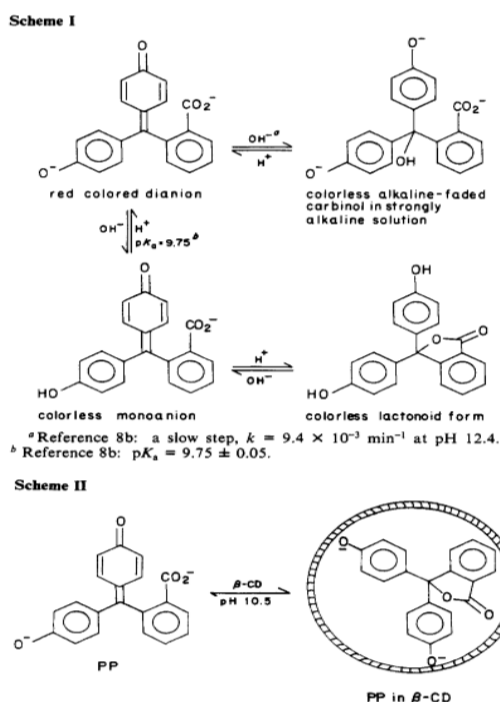
Jako příklad Breslowovy práce je možno uvést model, který ukazuje na hydrofobní akceleraci při Diels-Alderově reakci, kde poukazuje na rozdílnou rychlost vzniku komplexu v závislosti na prostředí, ve kterém reakce probíhá, na velikost cyklodextrinového kruhu a především na důležitost hydrofobního charakteru molekuly β -cyklodextrinu.(16) (viz. obr.č.2)



Obrázek 2 R. Breslow, hydrofobní akcelerace při Diels-Alderově reakci, dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ja00546a048>

Taguchiho výzkum vzniku komplexu β -cyklodextrinu s fenolftaleinem

Základním kamenem úspěšného výzkumu bylo zvolit vhodné reakční komponenty. Jakmile byly objeveny látky splňující příslušné požadavky a interakce mezi nimi byla pozitivní, bylo nutno vysvětlit jakým způsobem do sebe jednotlivé molekuly zapadají. Pomocí ^{13}C NMR Taguchi zjistil, jakým způsobem se umístí molekula fenolftaleinu do β -cyklodextrinového kruhu a popsal vzniklý komplex následovně: „Jakmile je β -cyklodextrin přidán k fialovému alkalickému roztoku fenolftaleinu, dochází k okamžitému odbarvení. V tomto článku, na základě ^{13}C NMR, ukazujeme, že pokud je červená ionizovaná forma umístěna v β -cyklodextrinovém kruhu, formuje se do laktonové formy, avšak s protonovanými fenolickými zbytky“.(15) Tato teorie by potvrdovala skutečnost, že se v případě vzniku komplexu chová jako enzym: „Cyclodextrin se zde chová podobně jako enzym, ve smyslu zvýšení rychlosti reakce“.(15) Lze tedy předpokládat, že vlivem různé distribuce elektronové hustoty v molekule cyklodextrinu může docházet k různému rozložení náboje ve vázané molekule. (viz. obr.č.3)



Obrázek 3 Transient Binding Mode of Phenolphthalein- β -Cyclodextrin Complex: An Example of Induced Geometrical Distortion dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/ja00270a03>

2.4.5 Crown-ethery, jejich objev a použití

Jako první byly crown-ethery objeveny německým chemikem Arthurem Lüttringhausem, který se zabýval vznikem metalokomplexů s makrocyclickými sloučeninami.(17) „Zkoumal tehdy reakci, při které objevil dvacetičlennou kruhovou látku po reakci monosubstituovaného derivátu resorcinolu v přítomnosti uhličitanu vápenatého apentan-1-olu.“(18) V roce 1967 publikoval Pedersen, působící v oblasti průmyslového výzkumu práci, kde pojmenoval tyto cyklické ethery jako „crown-ethery“ a popsal jejich vlastnost tvořit komplexy s alkalickými kovy a kovy alkalických zemin. V dalších letech zjistil Pedersen, že heteroatomy vázané v molekule těchto polycyklických etherů nemusí být pouze atomy kyslíku, nýbrž jako další vhodné elektronové donory se ukázaly i atomy dusíku síry, fosforu a selenu.(3) V dnešní době je použití crown-etherů rozšířeno především v oblastech zdravotnictví a farmacie, v chemickém průmyslu a biochemii.(19)

2.4.6 Vlastnosti crown-etherů

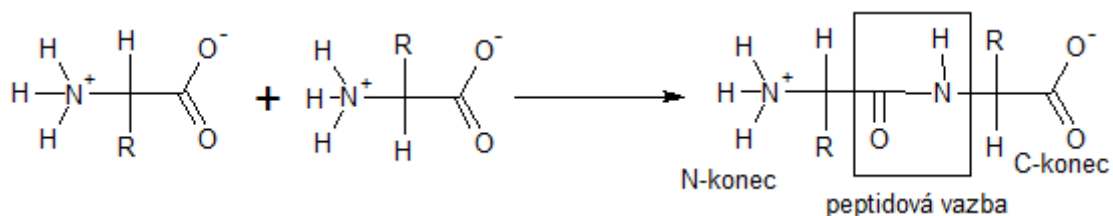
Crown-ethery jsou cyklické sloučeniny, které obsahují několik atomů kyslíku tvořící v makrocyclech etherovou vazbu.(20) Primárně jsou crown-ethery složeny z opakujících se etherových jednotek, atom kyslíku však může být nahrazen jinými vhodnými heteroatomy jako např. dusíkem, pak hovoříme o tzv. azocrown-etherech (pokud jsou nahrazeny některé atomy kyslíku atomy dusíku), azocrowny (pokud jsou nahrazeny všechny atomy kyslíku atomy dusíku),(9) sírou,(21) tyto látky nazýváme jako polythioethery(7), nebo thiocrown-ethery (v případě že jsou nahrazeny některé atomy kyslíku atomem síry), thiocrowny (pokud jsou nahrazeny všechny atomy kyslíku atomy síry), pokud obsahují všechny tři druhy heteroatomů, hovoříme o thioazocrown-etherech. Mezi další heteroatomy patří např. fosfor a selen.(3) Existuje mnoho derivátů těchto sloučenin, což je způsobeno možností navázání dalších molekul do cyklu, mezi které patří ku příkladu: benzenová jádra, jádra furanu, thiofenu ,či pyridinu,(18) popřípadě se na molekulu váží různé charakteristické skupiny, které zlepšují jejich vlastnosti při chemických reakcích. Podle množství, velikosti a prostorového uspořádání etherových kruhů můžeme rozdělit tyto látky do několika skupin, a sice na crown- ethery, koronandy, kalixareny, kryptandy, polyethery, podandy a sferandy.(21) (viz. obr.č.4)

různé kationty solí rozpustné v polárních rozpouštědlech, umožňují překonat fázové rozhraní (jedná se o tzv. fázovou katalýzu). Známým příkladem tohoto typu je tvorba komplexu draselného kationtu s 18-crown-6 etherem, jehož vznik umožňuje rozpustit manganistan draselný např. v benzenu.(22) Další vlastností crown-etherů je, že s různě velkými etherovými kruhy interagují různě velké kationty, čehož se využívá v iontově selektivních elektrodách, které díky této vlastnosti mohou fungovat.(23) Specificky upravené syntetické crown-ethery patřící ku příkladu do skupiny kryptandů jsou schopny vázat do své kavity i anionty.(3) V neposlední řadě je třeba zmínit interakci crown-etherů s neutrálními molekulami, kde se uplatňují vodíkové vazby, což má za následek sníženou stabilitu vzniklého komplexu.(3) Tvorba komplexu s anionty a neutrálními molekulami se uplatňuje především v bioorganických a biomedicínských odvětvích, kdy fungují crown-ethery jako látky schopné označit různé molekuly, nebo jako transportní molekuly. (14)

2.4.7 Crown-ethery jako modely aktivních center

Crown-ethery, obdobně jako cyklodextriny, jsou cyklické molekuly, které mají kavitu, do té se mohou vázat různé molekuly. Komplexy, které vytvářejí nejsou založené na vazbě komplementární molekuly na základě hydrofobního charakteru jejich kavity. Crown ethery tvoří donor-akceptorové komplexy, čehož se využívá k vytváření modelů enzym-substrátových komplexů. Molekula, která interaguje s kavitou crown-etheru je ve většině případů kationt, méně často elektroneutrální sloučenina, která se koordinačně váže do kavity crown-etheru a na zbytku molekuly, která se nachází mimo kavitu crown – etheru probíhají různé chemické reakce, tudíž po uvolnění molekuly z komplexu vzniká strukturně odlišný produkt, podobně jako při enzymatických reakcích. (24) Na základě těchto faktů byl vytvořen kupříkladu model enzymatické reakce demonstrující vznik peptidů. Jedná se o reakci, do které vstupuje více substrátů a substituovaný crown-ether s navázanou HS-skupinou, přičemž vznik komplexu (navázání prvního substrátu) umožňuje interakci s druhým substrátem za vzniku nového produktu.(24) Zjednodušeně řečeno, po vzniku komplexu je umožněna reakce při které vzniká nový řetězec spojený peptidovou vazbou obdobně jako při katalytické enzymatické reakci vzniku polypeptidového řetězce.(24) (viz obr.č.5) Podobných modelů založených na těchto interakcích existuje celá řada, ale cílem

této práce není popsát všechny alikvótní modely, nýbrž přiblížit si na jakých principech vytvářené modelové systémy fungují.



Obrázek 5 Vznik peptidového řetězce dostupné z:

https://www.google.com/url?sa=i&url=https%3A%2F%2Fwww.mojechemie.cz%2FBiochemie%3AB%25C3%25ADlkoviny&psig=AOvVaw2KquZgrgdNFcyvdRmWC-Y5&ust=1587760700301000&source=images&cd=vfe&ved=0CAIQjRxqFwoTCMC58-Oz_-gCFQAAAAAdA

2.5 Aplikace modelů aktivních center ve výuce

Modely aktivních center umožňují lépe pochopit složité reakce probíhající v enzymech. Zjednodušení celé problematiky umožňují makrocyclické sloučeniny, které vykazují specifickou afinitu k molekule, která se váže do jejich kavity. (42) Díky modelům je možno popsát hlavní interakce na základě, kterých je stabilizována vázaná molekula, obdobně jako substrát v aktivním centru enzymu. Hlavním záměrem je, aby studenti byli seznámeni s tím, jaké reakce probíhají při vazbě substrátu na enzym a byli schopni je identifikovat, popsát je a porozumět jim. Hlavní oblast použití modelů je ve výuce biochemie, přesněji v učivu o enzymatických reakcích. Nutno dodat, že navrhované modely popisují více chemickou podstatu problematiky nežli biologickou, ovšem proto, aby byli studenti schopni pochopit, na jakém principu funguje enzymatická reakce, je nutné seznámit je s interakcemi na atomární úrovni. Modely určené pro výuku mohou mít řadu podob. Mohou to být modely materiální, počítačové nebo experimentální modely, ve kterých jsou enzymy nahrazeny strukturně jednoduššími molekulami, ty ale umožňují poznat podstatu fungování aktivních center enzymů. Inovace v této oblasti výuky tak spočívá v propojení aplikovatelných metod, tedy použít obrázkový model v návaznosti na něj provést experiment v podobě jednoduchých chemických reakcí a následně interakci prozkoumat pomocí materiálního modelu, jelikož zhmotnění abstrakce výrazně napomáhá pochopení zkoumaného problému.

Tauschův výzkum a výukový experiment

Profesor Tausch zpracoval téma o několik let později, kdy již existoval přesný název pro vznikající komplex, a sice Guest-Host-Komplex neboli komplex hostitel-host. Na základě výsledků studia pomocí UV-VIS spektroskopie a došel k závěru, že fenolftalein se nachází v komplexu s β -cyklodextrinem ve formě dianiontu, a to vzhledem k vodíkovým můstkům, přičemž přímo tvrdí: „Díky těmto mezimolekulárním interakcím je molekula fenolftaleinu významně stočena kolem centrálního atomu uhlíku. To má vliv na delokalizaci konjugovaného systému π -elektronů, a toto se projeví odbarvením.“ (25)(42)

Simone Krees z pracovního týmu university ve Wuppertalu k řešené problematice dokládá výsledky z měření ^1H NMR spekter, které názor na strukturu komplexu ještě korigují. (26)

Z výsledků výzkumu, který byl publikován v Journal of the Brazilian Chemical Society(X) ovšem vychází, že laktonová forma při vzniku komplexu je energeticky výhodnější. (27)

Bez ohledu na to, jakým způsobem vidí Tausch geometrii vzniklého komplexu je jeho úloha zcela funkční. (viz. příloha č.1,2,3)

3 Cíl práce

Makrocyclické sloučeniny (např. cyklodextriny, crown-ethery) jsou látky, používané v řadě oborů. Cyklodextriny jsou využívány v lékařství (transport léčiv v organismu) nebo potravinářském průmyslu (stabilizátory), crown-ethery kupříkladu v chemickém průmyslu (fázové katalyzátory). Důležitou okolností je, že oba typy látek tvoří tzv. host-guest komplexy, na základě, kterých je možné vytvořit např. model aktivního centra enzymu. Jedná se tedy o jednoduchý způsob demonstrace procesů, spojených s katalytickým působením enzymů.

Cílem práce je na základě provedených pokusů s jednotlivými makrocyclickými sloučeninami dosáhnout názorné prezentace funkce aktivního centra enzymu, a to prostřednictvím výukových experimentálních úloh. Jednotlivé experimentální úlohy jsou založeny na barevných změnách, které ukazují na tvorbu příslušných komplexů mezi makrocyclem a substrátem. Konkrétním makrocyclem bude β -cyklodextrin, substrát bude simulován fenolftaleinem a jeho deriváty. Záměrem je též demonstrovat interakce probíhající v aktivním centru pomocí materiálního modelu β -cyklodextrinu a ukázat na vliv struktury substrátu na tvorbu komplexů. Vybrané experimenty pak budou ověřeny ve výuce.

Návody experimentálních úloh jsou určeny obzvláště pro workshopy a praktická cvičení na vysoké školy vzdělávající učitele i střední školy všeobecně-vzdělávacího typu.

4 Praktická část

Experimentální část je založena na určení přesných reakčních podmínek pokusů, na základě kterých jsou vytvořeny výukové experimentální úlohy, doplněné příloženým materiálním modelem pro názornou ukázkou vzniku komplexu host-guest, a také pro vysvětlení jevů, které vzniku supramolekulárních komplexů brání, nebo naopak podporují vznik takto složitých biochemických agregátů. Je více než zřejmé, že v enzymech probíhají reakce tohoto typu mnohem složitěji, nicméně z toho důvodu je zapotřebí celou problematiku zjednodušit na uchopitelnou úroveň pro žáky a studenty, a pokud se podíváme na chování zvolených acidobazických indikátorů FFT, KFT a TFT v prostředí B-CD, zjistíme, že na nich lze ukázat možnosti vzniku komplexů, síly, které tyto reakce ovlivňují, sterický efekt na základě různé velikosti jednotlivých molekul, význam hydrofobního charakteru molekul a distribuce parciálních nábojů, pohyb π -elektronů, vznik přechodných dianiontů a především to, že celý systém je velmi dynamický.

4.1 Použité chemikálie

β -Cyklodextrin, ALDRICH, USA

Fenolftalein, LACHEMA Brno, Česká republika

o – Kresolftalein, Spolek pro chemickou a hutní výrobu, Czechoslovakia

Thymolftalein, LACHEMA Brno, Česká republika

Fenolová červeň, LACHEMA Brno, Česká republika

Kresolová červeň, Spolek pro chemickou a hutní výrobu, Czechoslovakia

Thymolová modř, LACHEMA Brno, Česká republika

Hydroxid sodný, p.a., Lach-Ner, Česká republika

Ethanol-technický, Severochema, Česká republika

Destilovaná voda

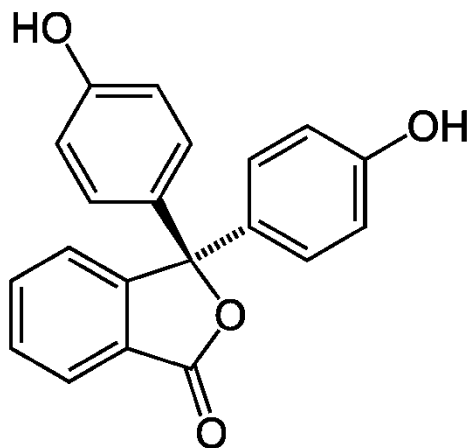
4.1.1 Charakteristika použitých látek

β -cyklodextrin

Jedná se o chemickou sloučeninu řadící se mezi cyklické oligosacharidy. Skládá se ze sedmi dextrinových podjednotek. Na základě své nízké toxicity jsou používány především ve farmaceutickém, potravinářském průmyslu a v lékařství. (28)

Fenolftalein

Fenolftalein se používá v laboratořích jako acidobazický indikátor, jehož oblast aktivity je v rozmezí pH 8,2-9,8, kdy má fialovo-růžovou barvu. (29) V extrémně kyselém prostředí má barvu červenou, v oblasti pH 0-8,2 i pro pH větší než 9,2 je bezbarvý.(29) Ve vodném roztoku reaguje kyselé. Fenolftalein má projímavé účinky a také způsobuje ochabování svalů, pro své podezření s karcinogenity se však nepoužívá v lékařství.(30) Jeho název dle nomenklatury IUPAC je „3,3-bis (4-hydroxyfenyl) -2-benzofuran-1-on“. (30) Strukturální vzorec je na obrázku č. 6.

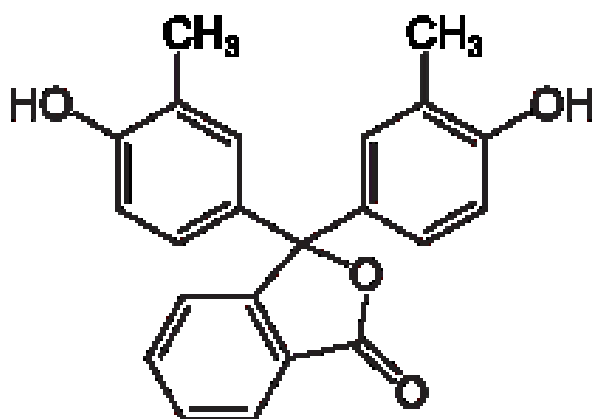


Obrázek 6 Fenolftalein, dostupné z:

https://www.google.com/url?sa=i&url=https%3A%2F%2Fen.wikipedia.org%2Fwiki%2FPhenolphthalein&psig=AOvVaw3QHK8ga5xN4z900chFtdsl&ust=1587762472692000&source=images&cd=vfe&ved=0CAIQjRxqFwoTCMjQwZu6_-gCFQAAAAAdAAAAABAD

***o*-Kresolftalein**

o-kresolftalein je rovněž acidobazický indikátor používaný v laboratořích např. k stanovení vápníku.(31) Oblast jeho aktivity je v rozmezí od 8,2-9,8 kdy má sytě červenofialovou barvu.(32) Od fenolftaleinu se liší navázanou methylovou skupinou v *ortho*-poloze. Systematický název podle IUPAC je: „3,3-bis(4-hydroxy-3-methylphenyl)-1(3H)-isobenzofuranon“. (32) Strukturní vzorec je na obrázku č. 7.

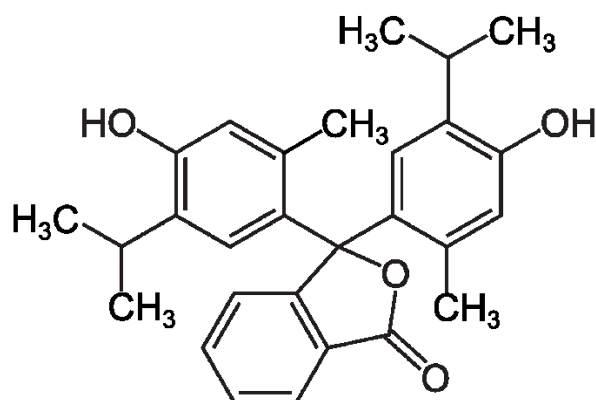


Obrázek 7 *o*-kresolftalein, dostupné z:

https://www.google.com/url?sa=i&url=https%3A%2F%2Fcs.qwe.wiki%2Fwiki%2FO-Cresolphthalein&psig=AOvVaw3uK114yx4YeTPPrf7sbe9B&ust=1587762623474000&source=images&cd=vfe&ved=0CAIQjRxqFwoTCKDRjdy6_gCFQAAAAAAdAAAAABAD

Thymolftalein

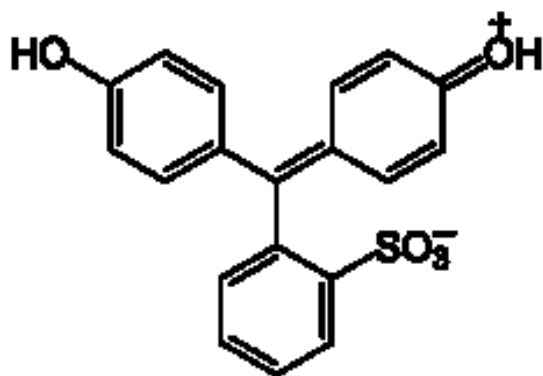
Thymolftalein patří také mezi acidobazické indikátory s aktivitou v oblasti pH 9,3-10,5.(33) V extrémně kyselém prostředí je červený a při pH 0-9,3 je bezbarvý. (33) Od *o*-kresolftaleinu se liší umístěním methylových skupin v poloze 2-a přítomností isopropylových skupin v poloze 5-. Systematický název podle IUPAC zní: (30)3,3-bis(4-hydroxy-2-methyl-5-propan-2-ylfenyl)-2-benzofuran-1-on“(34) Strukturní vzorec je na obrázku č. 8.



Obrázek 8 Thymolftalein, dostupné z: By NEUROtiker - Own work, Public Domain, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=3888608>

Fenolová červeň

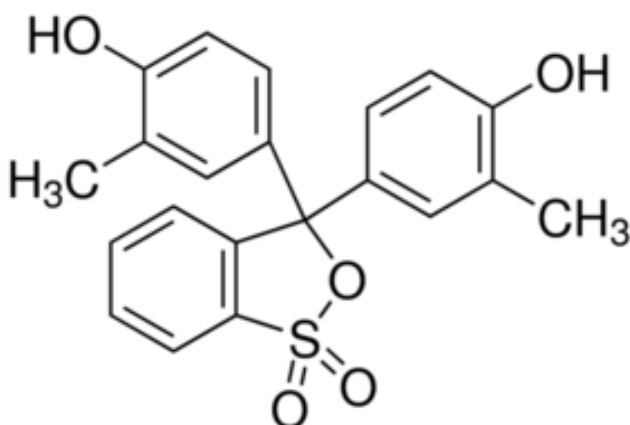
Fenolová červeň (fenolsulfoftalein) patří do skupiny acidobazických indikátorů, obsahující ve své molekule atom síry v podobě sulfoskupiny. Používá se hojně v bioorganických laboratořích při kultivaci buněk, v testovacích sadách na indikaci pH v bazénech, v minulosti byl používán pro indikaci průtoku krve ledvinami. Jeho aktivní oblast je od pH 6,8, kdy je žlutý až do pH 8,2, kdy má jasně růžovou barvu. (35) Systematický název podle IUPAC zní: „4- [3- (4-hydroxyfenyl) -1,1-dioxo-2,1λ 6 -benzoxathiol-3-yl] fenol“ (36), (strukturní vzorec viz. obrázek č.9).



Obrázek 9 Fenolová červeň, dostupné z: <https://www.google.com/url?sa=i&url=http%3A%2F%2Fm.slobodavockovani.sk%2Fnews%2Ffenolova-cerven%2F&psig=AOvVaw1tPCOMexhh5KjaXygXRsi3&ust=1587829970536000&source=images&cd=vfe&ved=0CAIQjRxqFwoTCPCm3NOIgekCFQAAAAAdAAAAABAJ>

Kresolová červeně

Kresolová červeně neboli také *o*-kresolsulfoftalein od fenolové červeně liší navázanými metylovými zbytky v *ortho* – poloze. Jedná se o acidobazický indikátor s aktivní oblastí pH od 7,2, kdy má žlutou barvu po 8,8, kdy má velmi intenzivní fialovou barvu. Používá se především v biochemických laboratořích a pro indikaci pH v akváriích.(37) Systematický název podle IUPAC zní: „4- [3- (4-hydroxy-3-methylfenyl) -1,1-dioxo-2,1λ 6 -benzoxathiol-3-yl] -2-methylfenol,“(38) (strukturní vzorec viz. Obrázek č.10).



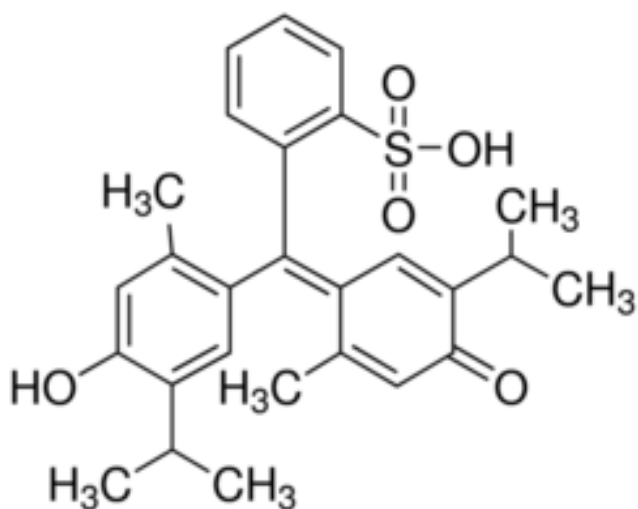
Obrázek 10 Kresolová červeně, dostupné z:

<https://www.google.com/url?sa=i&url=https%3A%2F%2Fwww.sigmaaldrich.com%2Fcatalog%2Fproduct%2Fsia%2F114472%3Fflang%3Den%26region%3DUS&psig=AOvVaw3DFGaMRZ0B2pfc4iH8hXnb&ust=1587830140994000&source=images&cd=vfe&ved=0CAIQjRxqF>

Thymolová modř

Thymolová modř známá také jako thymolsulfoftalein se používá jako acidobazický indikátor. Od fenolové červeně se liší substitucí methylovou skupinou a isopropylovou skupinou na benzenovém kruhu. Při pH nižším než 1,2 má barvu červenou, při pH 1,2-2,8 přechází plynule z červené do žluté, žlutou barvu má až po pH 8,0 a od pH 8,0 až po 9,6 přechází plynule ze žluté do modré a v oblasti nad 9,6 pH je sytě modrý. (39) Systematický název podle IUPAC zní:

„4-[3-(4-hydroxy-2-methyl-5-propan-2-ylphenyl)-1,1-dioxo-2,1λ6benzoxathiol-3-yl]-5-methyl-2-propan-2-ylphenol.“ (40), (strukturní vzorec, viz. obrázek č.11).



Obrázek 11 Thymolová modř, dostupné z:
<https://www.google.com/url?sa=i&url=https%3A%2F%2Fwww.sigmaaldrich.com%2Fcatalog%2Fproduct%2Fsi%2F114545%3Fflang%3Den%26region%3DUS&psig=AOvVawljV4j8d-jGnruLC2oyEkmV&ust=1587830326892000&source=images&cd=vfe&ved=0CAIQjRxqFwo>

4.2 Použitá laboratorní technika

hodinové sklo (3x)

odměrná baňka 100cm³ (1x)

odměrná baňka 10cm³ (4x)

Navažovací lodička

Násypka

Špachtle, kopistka

Analytická váha, předvážka

Držák zkumavek+ zkumavka (6x)

plastová pipetka (3cm³) (7x)

Filtrační papír

4.3 Metodika realizace výukových experimentů

Základním metodologickým nástrojem výzkumu byl experiment, a to s makrocyclickými látkami (cyklodextriny) a acidobazickými indikátory (fenolftalein, *o*-kresolftalein, thymolftalein). Hlavním cílem v první etapě bylo vymezení potřebné koncentrace reakčních komponent tak, aby se dala vytvořit úloha, na základě, které by bylo možno demonstrovat interakce v aktivním centru enzymu. Základní myšlenkou bylo vytvořit modelovou řadu, která by poukazovala na vliv sterického efektu při vazbě substrátu do aktivního místa enzymu. Z toho důvodu byly vybrány acidobazické indikátory lišící se vždy o jednu navázanou funkční skupinu, jako první byl použit nesubstituovaný fenolftalein, druhý v řadě byl kresolftalein se substituenty methylovými skupinami a posledním indikátor představoval thymolftalein, který v molekule, kromě methylových skupin, obsahuje ještě další dvě isopropylové skupiny.

Experimenty byly prováděny se třemi různými koncentracemi acidobazických indikátorů, přičemž nejvíce se osvědčila 0,1% koncentrace všech tří indikátorů. Dalším důležitým krokem bylo definovat roztok β -cyklodextrinu, jelikož výrobce neuvádí na výrobku počet molekul krystalicky vázané vody, bylo nutné řídit se údaji o rozpustnosti a vytvořit za studena nasycený roztok. Rozpustnost β -cyklodextrinu při 25 °C ve 100ml je 1,85g, v tomto případě byl připraven za studena nasycený roztok, tak že bylo rozpouštěno 0,2 g β -cyklodextrinu ve 100cm³ H₂O po dobu šedesáti minut. Za 60 minut během, kterých se β -cyklodextrin rozpouštěl bylo stále vidět malé množství nerozpuštěné látky na dně odměrné baňky z čehož lze usoudit, že roztok byl nasycený, navíc po přidání malého množství β -cyklodextrinu nedocházelo již k žádnému dalšímu rozpouštění přidané látky. Pokusy byly testovány také na strukturně blízké trojici indikátorů: fenolová červeň, kresolová červeň a thymolová modř.

Experimentální část k úloze č.1 (postup)

Navážka acidobazických indikátorů byla rozpuštěna v 10cm³ ethanolu. Rozpustnost indikátorů v etanolu klesala od thymolftaleinu, přes kresolftalein k fenolftaleinu. Doba rozpuštění činila přibližně 30 minut. (0,1% roztok)

Navážka na přípravu 0,2M roztoku hydroxidu sodného byla rozpuštěna v odměrné baňce a doplněna vodou na 100cm³.

Do tří zkumavek bylo odpipetováno stejné množství roztoku všech tří indikátorů (1,5 cm³) a ke všem indikátorům bylo přidáno stejné množství 0,01M roztoku hydroxidu sodného (3cm³). Byla pozorována změna zbarvení indikátorů – fenolftalein se zbarvil do fialovo-růžové barvy, kresolftalein do červenofialové barvy a thymolftalein do sytě modré barvy.

Na laboratorní stůl byl umístěn filtrační papír, aby bylo možno snáze pozorovat interakce mezi β -cyklodextrinem a jednotlivými indikátory, na papír byla umístěna tři malá hodinová skla ($r = \max. 2,5\text{cm}$). Na každé sklíčko bylo odpipetováno cca 6ml za studena nasyceného roztoku β -cyklodextrinu, na první sklíčko byly přidány 3 kapky fenolftaleinu, na druhé sklíčko 3 kapky kresolftaleinu a na třetí sklíčko 3 kapky thymolftaleinu. Byla sledována doba, za kterou se se indikátory odbarvily.

Experimentální část k úloze č.2 (postup)

Primární postup je totožný jako v předchozí úloze, a to až po odbarvení všech tří roztoků, když všechny indikátory vytvořily komplex s β -cyklodextrinem. Poté bylo přidáno 5-6 kapek fenolftaleinu ke všem vzniklým komplexům a byly pozorovány změny, které naznačují, jakým způsobem funguje kompetitivní inhibice a jak ji lze ovlivnit zvýšením koncentrace substrátu s nejvyšší afinitou k enzymu.

4.4 Přehled námětů experimentálních úloh

Vzhledem k výsledkům experimentu byly zvoleny dva náměty experimentálních úloh. Jeden demonstruje přímo fungování aktivního centra enzymu a druhý kompetitivní inhibici při vazbě substrátu na enzym. Oba náměty vyplývají z vlastností použitých látek vytvářet komplexy. Hlavním důvodem tvorby těchto úloh je, že ve většině případů je možné znázornění vzniku enzym-substrátového komplexu, popřípadě reakcí, které tento vznik

ovlivňují, zde přímo kompetitivní inhibice, pouze schematicky pomocí obrázků. Proto je snahou na základě navržených experimentů znázornit enzymatickou aktivitu prostřednictvím jednoduchých chemických reakcí s pomocí materiálního modelu a doplňujících obrázkových schémat.

Námětem první úlohy je tedy, aby se po krátkém úvodu student seznámil s problematikou enzymů a příslušnými modely aktivních center enzymů. Následuje část, která seznamuje studenta s cyklodextriny, a také vysvětluje proč právě tyto makrocyclické látky mohou sloužit k demonstraci aktivního místa enzymu. Dalším krokem je samotný experiment, který provádí sám student. Na základě pozorovaných změn pak může zodpovědět položené otázky. Pro efektivnější vizualizaci je do úlohy začleněn materiální model, díky kterému je možné nahlédnout přímo do té části molekuly, kde dochází k interakci mezi aktivním místem enzymu a substrátem.

Námět druhé úlohy je zaměřen na kompetitivní inhibici. V úvodu se student seznámí s pojmem specifické vazby substrátu na enzym, dále zjistí, jakým způsobem funguje kompetitivní inhibice a jak je možné pomocí interakce β -cyklodextrinu s použitými indikátory tuto situaci demonstrovat. Na teoretickou část plynule navazuje praktický experiment, při kterém student pozoruje změny při reakcích a na základě předchozích informací zodpovídá otázky. I zde je přiložen materiální model, který může pomoci lépe si představit k jakému procesu během probíhajících reakcí dochází.

4.5 Přehled realizovaných experimentů

4.5.1 1. Shrnutí výsledků prováděných experimentů zaměřených na vznik komplexů vybraných acidobazických indikátorů a β -cyklodextrinu

Obecný úvod:

Problematika řešená v této práci vyžaduje přesné vymezení koncentrací daných reakčních komponent, detailní popis postupu reakcí a jejich dobrou reprodukovatelnost, aby mohly být pokusy použitelné ve výuce, pochopitelné pro žáky a studenty s možností adekvátně vysvětlit podstatu experimentu, a to na základě několikanásobného ověření. Všechny indikátory byly rozpuštěny a připraveny roztoky o přesných koncentracích

a roztok β -cyklodextrinu byl definován jako „za studena nasycený“. U prováděných pokusů byla změřena doba komplexace, která přímo ukazovala jejich afinitu k hydrofobní kavitě β -cyklodextrinu, a také poukazovala na přítomné sterické bránění způsobené přítomností různě velkých alifatických zbytků v molekulách indikátorů.

Tabulka 1 Indikátory obsahující v molekule benzofuran, aktivita v bazické oblasti pH

Indikátor	Koncentrace ($\frac{m}{m}$) %	Čas odbarvení	Změna po přidání 0,01 M NaOH (3 kapky)	Zpětné odbarvení
Fenolftalein	0,10 %	Okamžitě	Beze změny	—
Kresolftalein	0,10 %	5-10 min.	Fialovočervené zbarvení	cca po 2 minutách
Thymolftalein	0,10 %	10-15 min.	Modré zbarvení	cca po 2 minutách

Indikátor	Koncentrace ($\frac{m}{m}$) %	Čas odbarvení	Změna po přidání 0,01 M NaOH (3 kapky)	Zpětné odbarvení
Fenolftalein	1,00 %	Okamžitě	Světle fialová	V řádu desítek sekund
Kresolftalein	1,00 %	10-15 min.	Fialovočervené zbarvení	cca po 2 minutách
Thymolftalein	1,00 %	20-25 min.	Modré zbarvení	cca po 2 minutách

Tabulka 2 Indikátory obsahující sulfoskupinu, aktivita v kyselé oblasti pH

Indikátor	Koncentrace ($\frac{m}{m}$) %	Čas odbarvení	Změna po přidání 0,01 M NaOH (3 kapky)	Zpětné odbarvení
Fenolová červeň	0,01 %	25-35 min	Světle červenofialová	30 minut
Kresolová červeň	0,01 %	10-20 min	Tmavě červená	15 minut
Thymolová modř	0,01 %	5-10 min	Modrá	5 minut

4.5.2 Příprava a reakce modelové řady fenolftalein-kresolftalein-thymolftalein

Na základě dílčích poznatků byly připraveny roztoky výše zmíněných indikátorů o hmotnostní koncentraci 0,1 %, 1,0 % a roztok 0,01 M hydroxidu sodného. Fenolftalein, *o*-kresolftalein i thymolftalein byly rozpuštěny v etanolu. Dále byl připraven za studena nasycený roztok β -cyklodextrinu, zvolení tohoto způsobu přípravy roztoku souvisí s použitou látkou, u které není uveden přesný údaj o krystalicky vázané vodě v její molekule. Na tři malá hodinová skla bylo předloženo cca 3cm³ tohoto roztoku. Ve zkumavkách byly připraveny alkalické roztoky indikátorů. Pomocí pipety byly přidány k jednotlivým roztokům β -cyklodextrinu předem připravené roztoky indikátorů, a sice 1-2 kapky. Pozorované změny byly zaznamenávány pomocí fotoaparátu a byl vytvořen také videozáznam.

Průběh reakcí nebyl totožný (viz. Tab.1). Dle očekávání vykazoval největší afinitu k β -cyklodextrinu fenolftalein, který neobsahuje ve své molekule žádný alifatický zbytek. Ostatní dva indikátory vstupovaly do komplexu na základě velikosti jejich uhlovodíkových zbytků, čili ochotněji kresolftalein, méně ochotně pak thymolftalein, čímž bylo potvrzeno sterické bránění, které bylo navíc ověřeno reakcí obou těchto indikátorů s fenolftaleinem, přičemž po přidání fenolftaleinu ke vzniklým komplexům thymolftaleinu a kresolftaleinu s β -cyklodextrinem došlo k narušení komplexu a dané indikátory byly vypuzeny, což bylo možné pozorovat na změně barvy roztoku, v případě *o*-kresolftaleinu z bezbarvého na fialový a v případě thymolftaleinu z bezbarvého na modrý.

Pokusy byly prováděny se dvěma různými koncentracemi. Bylo potvrzeno, že vyšší koncentrace indikátoru ovlivní rychlost vzniku komplexu. Po přidání tří kapek hydroxidu sodného ke vzniklým komplexům dochází ihned k obarvení roztoků.

Interakce s fenolftaleinem

Fenolftalein interagoval s β -cyklodextrinem okamžitě, a to v jakékoliv koncentraci, čímž se potvrdila jeho vysoká afinita k dané látce, a také vznik „host-guest“ komplexu, kdy β -cyklodextrin působí jako hostitel, v tomto případě s hydrofobní dutinou, a fenolftalein jako host, který svou nepolární částí molekuly vstupuje do dutiny-kavity, přičemž dochází k uzavření laktonového cyklu a ke změně konstituce, z planárního trigonálního uspořádání

na cyklické tetragonální, což má za následek změnu barvy roztoku z fialového na bezbarvý. Po přidání tří kapek hydroxidu sodného nebyly pozorovány žádné změny, ty nastaly až s mnohonásobně větším objemem hydroxidu, kdy se roztok obarvil na fialovo, došlo tedy k narušení komplexu. Tento jev je způsoben tím, že v alkalickém prostředí přechází laktonová (cyklická) bezbarvá forma fenolftaleinu na necyklickou barevnou formu s typickým fialovým zbarvením.

Interakce s *o*-kresolftaleinem

Na základě sterického bránění, díky přítomné metylové skupině, interagoval kresolftalein s β -cyklodextrinem pomaleji než fenolftalein. K jeho zakomplexování ovšem také došlo. V nižší koncentraci cca po osmi minutách, ve vyšší cca po patnácti minutách. Reakcí s hydroxidem sodným se komplex rozpadal a roztok byl opět zbarven světle fialově, která vymizela cca po dvou minutách. Jakmile byl ke vzniklému komplexu β -cyklodextrinu a kresolftaleinu přidán fenolftalein, došlo k okamžitému vypuzení kresolftaleinu z komplexu a roztok se obarvil na fialovo.

Interakce s thymolftaleinem

V molekule thymolftaleinu nacházíme navíc dvě isopropylové a skupiny, které mají stejný efekt jako metylová skupina v případě kresolftaleinu, a tudíž na základě sterického bránění tato sloučenina vstupovala do komplexu velmi neochotně, a byla z komplexu vypuzena jak fenolftaleinem, tak kresolftaleinem i po přidání roztoku hydroxidu sodného a její zpětná komplexace v případě reakce s hydroxidem sodným byla velmi zdlouhavá.

Tato látka byla ponechána v nadbytku thymolftaleinu týden ve tmě, aby nedošlo k narušení komplexu vlivem UV záření, a došlo k jejímu úplnému odbarvení. Po následném přidání pár kapek hydroxidu sodného se roztok zbarvil do světle fialova, a tudíž lze usoudit, že vznikl pseudo-komplex, který po přidání dalšího množství hydroxidu sodného nevykazoval žádné změny.

4.5.3 Příprava modelové řady fenolová červeň-kresolová červeň-thymolová modř

Podobně jako v předchozím případě byly připraveny roztoky indikátorů, Za předpokladu, že sulfoskupina přítomná v těchto látkách je rozměrově větší a vykazuje

vyšší polaritu než karboxylová skupina, u modelové řady fenolftaleinu byly připraveny pouze roztoky o nižší koncentraci 0,01 %. Postup experimentu byl totožný jako u předchozí řady indikátorů (viz. odstavec-Příprava a reakce modelové řady fenolftalein-kresolftalein-thymolftalein). Velmi obtížné bylo rozpustit dané indikátory v ethanolu, a to kvůli vysoké polaritě sulfoskupiny. V případě sulfoftaleinů byl barevný přechod po přidání NaOH ze žlutooranžové barvy na, v případě fenolové červeně světle červenofialovou, v případě kresolové červeně tmavě červenofialovou a v případě thymolové modří na tmavě modrou.

Interakce s fenolovou červení

Dle velikosti molekuly by tato látka měla ze skupiny sulfoftaleinů tvořit nejochotněji komplex, protože je nejmenší, ale opak je pravdou. Vytvoření komplexu trvalo cca 30 minut. Při vytěsňování pomocí hydroxidu sodného reagoval nejochotněji, a tudíž došlo k rychlému přechodu na červenofialovou barvu. Následné odbarvení trvalo dlouhou dobu, přibližně stejně jako při prvním přidání fenolové červeně, tedy cca 30minut.

Interakce s kresolovou červení

Kresolová červen se chovala jako látka, nacházející se mezi fenolovou červení a thymolovou modří. Doba vzniku komplexu se pohybovala mezi 15-20 minutami. Při reakci s hydroxidem sodným došlo k rychlému obarvení roztoku na tmavě červenofialovou, odbarvení trvalo 15 minut.

Interakce s thymolovou modří

Thymolová modř je svou strukturou nejpodobnější thymolftaleinu, přesto vykazovala největší afinitu k β -cyklodextrinu. Tvorba komplexu trvala 5-10 minut. Po přidání hydroxidu sodného docházelo k obtížnému vytěsnění látky z komplexu, úspěšné bylo až při přidání většího množství hydroxidu, kdy roztok intenzivně zmodral, doba odbarvení byla 2 minuty.

4.5.4 Shrnutí:

Na základě provedených pokusů byla zvolena, jako nejvhodnější, modelová řada fenolftaleinu, protože ta nejlépe vystihuje systém tvorby komplexu „host-guest“, a proto bude na základě tohoto komplexu vytvořen materiální model reálné podoby, na kterém bude

možno vidět a vysvětlit celou problematiku tvorby těchto sloučenin, především vliv navázaných uhlovodíkových zbytků (sterický efekt) a hydrofobní efekt. Výsledek těchto experimentů bude propojen s enzymatickou funkcí a bude poukázáno na důležitost struktury substrátu interagujícího s aktivním centrem enzymu.

4.5.5 2. Shrnutí výsledků prováděných experimentů zaměřených na vznik komplexů vybraných acidobazických indikátorů a β -cyklodextrinu

Podobně jako v předchozím experimentování byly pozorovány různé změny tvorby komplexu acidobazických indikátorů s β -cyklodextrinem, měly ovšem odlišný průběh. V případě vzniku komplexu fenolftalein- β -cyklodextrin probíhalo vše totožně, jako v předchozím případě, ovšem, co se týče chování kresolftaleinu a thymolftaleinu, to bylo odlišné. Koncentrace indikátorů byla stanovena na 0,1%, jelikož při těchto podmínkách probíhaly pokusy optimálně, došlo však ke změně rychlosti odbarvení kresolftaleinu a thymolftaleinu. Kresolftalein se odbarvoval zřetelně pomaleji než thymolftalein. Tento jev mohl být způsoben zásaditějším prostředím, které bylo pro efektivitu pokusu zvoleno, případně změnou koncentrace β -cyklodextrinu, kdy zvolená navážka 0,2g β -cyklodextrinu byla rozpouštěna v 10cm³ H₂O.

Tabulka 3 Indikátory obsahující v molekule benzofuran, aktivita v bazické oblasti pH

Indikátor	Koncentrace ($\frac{m}{m}$) %	Čas odbarvení	Změna po přidání 0,01 M NaOH (5 kapek)	Zpětné odbarvení
Fenolftalein	0,1 %	Okamžitě	Beze změny	—
Kresolftalein	0,1 %	15-20 min.	Fialovočervené zbarvení	cca po 15 minutách
Thymolftalein	0,1 %	5 min.	Modré zbarvení	cca po 3 minutách

5 Výsledky a diskuze

Cílem bakalářské práce bylo vytvořit transparentní experimentální úlohy pro rozšíření výuky v oblasti enzymatické aktivity, které by znázorňovaly aktivní centrum enzymu, a navíc by studenty seznamovaly s makrocyclickými sloučeninami, které nás každodenně obklopují, ale jsou ve velmi malém povědomí.

Na základě výzkumu se podařilo navrhnout dvě úlohy. První experimentální úloha navazuje na předchozí studie a potvrzuje hypotézu významu sterického bránění při tvorbě „guest-host“ komplexu. Jak jsme předpokládali rychlost interakce mezi β -cyklodextrinem a modelovou řadou indikátorů-fenolftalein, *o*-kresolftalein, thymolftalein byla s rostoucí velikostí molekuly pomalejší.

Ve většině případů se roztoky odbarvovaly postupně, existovaly však výjimky, kdy neměla reakce předpokládaný průběh, a proto bylo nutné optimalizovat koncentrace roztoků, z těch pak vybrat koncentraci, při které reakce probíhala v souladu s hypotézou.

Výzkum pokračoval v návaznosti na první experiment, a bylo zjištěno, že molekula s větší afinitou k β -cyklodextrinu „vypudí“ molekulu jinou z již vzniklého komplexu, vše se pak projeví změnou barvy roztoku. Díky tomuto zjištění se oblast použití experimentu rozšířila až do oblasti inhibice enzymatických reakcí. Na základě návrhu nových reakcí bylo tedy možno vytvořit úlohu znázorňující kompetitivní inhibici, která je závislá na koncentraci a afinitě molekuly substrátu k vazebnému místu enzymu.

Vzhledem k dalšímu zvýšení názornosti probíhajících interakcí se výzkum zabýval také tvorbou materiálního modelu, který přinesl zajímavé výsledky. Vzniklý model, zhotovený podle reálných rozměrů makrocyclu napomáhá vizualizovat způsob vzniku jednotlivých komplexů, částečně též dynamiku reakce a také z jakého důvodu dochází k barevným změnám při probíhajících reakcích.

V rámci provádění experimentu byly realizovány také reakce s acidobazickými indikátory obsahujícími v molekule atom síry-fenolová červeň, kresolová červeň, thymolová modř. Tato řada se bohužel neosvědčila, jelikož průběh reakce nebyl pro tvorbu výukových úloh dostatečně transparentní.

Předmětem diskuze však stále zůstává, jakým způsobem vlastně interaguje molekula fenolftaleinu a ostatních indikátorů s β -cyklodextrinem. Výzkum Taguchiho ukazuje, že fenolftalein je při vzniku „host-guest“ komplexu v tetraedrickém uspořádání, tedy centrální atom uhlíku spojující fenolové zbytky s laktonovým kruhem je v sp^3 hybridním stavu, ovšem molekula není elektroneutrální, nýbrž díky přesunům π -elektronů má charakter přechodného dianiontu.(15) Naproti tomu profesor Tausch tvrdí, že molekula vstupující do kavity β -cyklodextrinu je planární čili zmiňovaný centrální atom uhlíku nesoucí fenolové zbytky je v hybridním stavu sp^2 a při tvorbě komplexu je molekula deformována ("pootočena"), což způsobí změnu barvy. V tomto uspořádání je molekula také ve stavu dianiontu.(25). (39). Na základě faktu, že barevná změna indikátoru závisí na změně konstituce jeho molekuly, a také díky výzkumu publikovaném v Journal of Brazilian Chemical Society, který potvrzuje, že laktonová forma (tetraedrická) je energeticky výhodnější (12) se víceméně přikláníme k Taguchiho variantě. Také se ukázalo během práce s materiálním modelem, že laktonová forma fenolftaleinu se snáze umístí do kavity β -cyklodextrinu než druhá strukturní varianta, což vzhledem k řadě zjednodušení, ke kterému při takovém způsobu modelování dochází není zcela směřodonné. V této situaci je ale rozhodující, že komplex se tvoří (je známa i stechiometrie 1:1) a systém experimentů, založených na tvorbě komplexu je vhodně použitelný pro naplnění záměru bakalářské práce – zpracovat dvě výukové experimentální úlohy za účelem jejich použití v různých formách výuky na vysoké škole, vzdělávající učitele i na střední škole všeobecně-vzdělávacího zaměření.

6 Seznam použitých informačních zdrojů

1. *Active site* [online]. 2020 [vid. 2020-03-29]. Dostupné z: https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Active_site&oldid=945469973
2. COPELAND, Robert Allen. *Enzymes: a practical introduction to structure, mechanism, and data analysis*. 2nd ed. New York: Wiley, 2000. ISBN 978-0-471-35929-6.
3. HIRAOKA, M. *Crown Ethers and Analogous Compounds*. B.m.: Elsevier, 2016. ISBN 978-1-4832-9087-4.
4. PROKOP, Zbynek, Artur GORA, Jan BREZOVSKY, Radka CHALOUPKOVA a Veronika STEPANKOVA. Engineering of Protein Tunnels: Keyhole-Lock-Key Model for Catalysis by Enzymes with Buried Active Sites. *Protein Engineering Handbook*. 2012, 3, 43.
5. AL, N. Lyu et. *Recognition of PDL1/L2 by different induced-fit mechanisms of PDI: a comparative study of molecular dynamics simulations* | *Kopernio* [online]. [vid. 2020-03-28]. Dostupné z: <https://kopernio.com/viewer?doi=10.1039%2FC9CP05531B&token=WzE5NzM2OTksIjEwLjEwMzkvQzldUDA1NTMxQiJd.R0-tQRnvCwGJfOW9siI1vg6ORIo>
6. COPELAND, Robert A. *Evaluation of Enzyme Inhibitors in Drug Discovery: A Guide for Medicinal Chemists and Pharmacologists*. B.m.: John Wiley & Sons, 2013. ISBN 978-1-118-54028-2.
7. KIRBY, A. J. *Enzyme Mimics* | *Kopernio* [online]. [vid. 2020-03-28]. Dostupné z: <https://kopernio.com/viewer?doi=10.1002%2Fanie.199405511&token=WzE5NzM2OTksIjEwLjEwMDIvYW5pZS4xOTk0MDU1MTEiXQ.c-FXQQGmUQ7KraGFDFwpGkCEzRA>
8. *Ronald Breslow* [online]. 2020 [vid. 2020-03-28]. Dostupné z: https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Ronald_Breslow&oldid=944531381
9. BRESLOW, R. *Biomimetic Chemistry: Biology as an Inspiration* | *Kopernio* [online]. [vid. 2020-03-27]. Dostupné z: <https://kopernio.com/viewer?doi=10.1074%2Fjbc.X800011200&token=WzE5NzM2OTksIjEwLjEwNzQvamJlIlg4MDAwMTEyMDAiXQ.Wdiploen7sH5hm6mm0DbfwF9tIA>
10. The Nobel Prize in Chemistry 1987. *NobelPrize.org* [online]. [vid. 2020-03-13]. Dostupné z: <https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/1987/lehn/biographical/>
11. SZEJTLI, József. Introduction and General Overview of Cyclodextrin Chemistry. *Chemical Reviews* [online]. 1998, 98(5), 1743–1754. ISSN 0009-2665, 1520-6890. Dostupné z: [doi:10.1021/cr970022c](https://doi.org/10.1021/cr970022c)

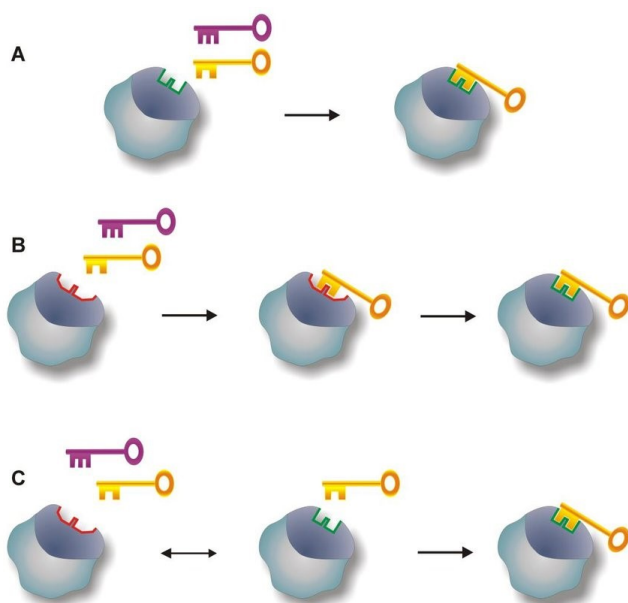
12. ABBEHAUSEN, Camilla, André L. B. FORMIGA, Edvaldo SABADINI a Inez V. P. YOSHIDA. A- β -cyclodextrin/siloxane hybrid polymer: synthesis, characterization and inclusion complexes. *Journal of the Brazilian Chemical Society* [online]. 2010, **21**(10), 1867–1876. ISSN 0103-5053. Dostupné z: doi:10.1590/S0103-50532010001000011
13. STELLA, Valentino J. a Quanren HE. Cyclodextrins. *Toxicologic pathology*. 2008, **36**(1), 30–42.
14. DEL VALLE, EM Martin. Cyclodextrins and their uses: a review. *Process biochemistry*. 2004, **39**(9), 1033–1046.
15. TAGUCHI, Kazuo. *Transient binding of phenolphthalein-.beta.-cyclodextrin complex: an example of induced geometrical distortion* [online]. 1. květen 2002 [vid. 2020-03-13]. Dostupné z: doi:10.1021/ja00270a032
16. RIDEOUT, Darryl C. a Ronald BRESLOW. Hydrophobic acceleration of Diels-Alder reactions. *Journal of the American Chemical Society* [online]. 1980, **102**(26), 7816–7817. ISSN 0002-7863. Dostupné z: doi:10.1021/ja00546a048
17. PRINZBACH, Horst. Erinnerungen an Arthur Lüttringhaus (1906–1992). *European Journal of Organic Chemistry* [online]. 1998, **1998**(4), 735–743. ISSN 1099-0690. Dostupné z: doi:10.1002/(SICI)1099-0690(199804)1998:4<735::AID-EJOC735>3.0.CO;2-N
18. WEBER, E., Saul PATAI a Zvi RAPPOPORT, ed. *Crown ethers and analogs*. Chichester ; New York: Wiley, 1989. Updates from the Chemistry of the functional groups. ISBN 978-0-471-91707-6.
19. BAHMANI, G. Chehardoli and A. *The role of crown ethers in drug delivery* | *Kopernio* [online]. [vid. 2020-03-27]. Dostupné z: <https://kopernio.com/viewer?doi=10.1080%2F10610278.2019.1568432&token=WzE5NmZmOTksIjEwLjEwODAvMTA2MTAyNzguMjAxOS4xNTY4NDMyIl0.tlt-rJCJuR85kPBwKXKqZ9Llydg>
20. *Crown ether* [online]. 2019 [vid. 2020-03-26]. Dostupné z: https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Crown_ether&oldid=929519727
21. VÖGTLE, F. a E. WEBER. *Host Guest Complex Chemistry Macrocycles: Synthesis, Structures, Applications*. B.m.: Springer Science & Business Media, 2012. ISBN 978-3-642-70108-5.
22. INOUE. *Cation Binding by Macrocycles: Complexation of Cationic Species by Crown Ethers*. B.m.: Routledge, 2018. ISBN 978-1-351-46223-5.
23. LIU, C.-C. Su and M.-C. Chang and L. K. *New Ag⁺- and Pb²⁺-selective electrodes with lariat crown ethers as ionophores* | *Kopernio* [online]. [vid. 2020-03-27]. Dostupné z: <https://kopernio.com/viewer?doi=10.1016%2FS0003-2670%2800%2901375->

1&token=WzE5NzM2OTksIjEwLjEwMTYvUzAwMDMtMjY3MCgwMCkwMTM3NS0xII0.wbP-r5t0HyYWIrdHycHw3v1Wzk

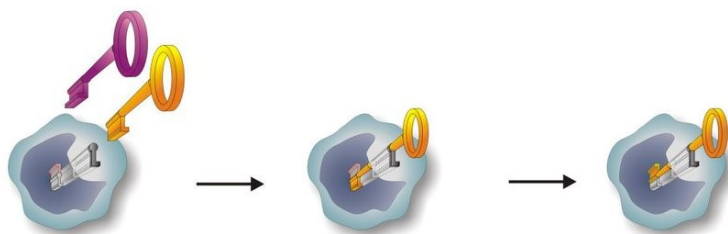
24. KOGA, S. Sasaki and M. Shionoya and K. *Functionalized crown ethers as an approach to the enzyme model for the synthesis of peptides* | *Kopernio* [online]. [vid. 2020-03-30]. Dostupné z: <https://kopernio.com/viewer?doi=10.1021%2Fja00297a066&token=WzE5NzM2OTksIjEwLjEwMjEwMDI5N2EwNjYiXQ.ySDN0tIQ1BrSIMVC1QkRGCL2MkU>
25. *Versuche* [online]. [vid. 2020-03-14]. Dostupné z: https://chemiedidaktik.uni-wuppertal.de/fileadmin/Chemie/chemiedidaktik/disido/cyde/exp/nav/nav_exp_de.html
26. *Simone Krees - Didaktik der Chemie - BERGISCHE UNIVERSITÄT WUPPERTAL* [online]. [vid. 2020-04-30]. Dostupné z: <https://chemiedidaktik.uni-wuppertal.de/index.php?id=4605&L=0>
27. ABBEHAUSEN, Camilla, André L. B. FORMIGA, Edvaldo SABADINI a Inez V. P. YOSHIDA. A- β -cyclodextrin/siloxane hybrid polymer: synthesis, characterization and inclusion complexes. *Journal of the Brazilian Chemical Society* [online]. 2010, **21**(10), 1867–1876. ISSN 0103-5053. Dostupné z: doi:10.1590/S0103-50532010001000011
28. FOURMENTIN, Sophie, Grégorio CRINI a Eric LICHTFOUSE. *Cyclodextrin Fundamentals, Reactivity and Analysis*. B.m.: Springer, 2018. ISBN 978-3-319-76159-6.
29. *Fenolftalein* [online]. 2020 [vid. 2020-04-02]. Dostupné z: <https://cs.wikipedia.org/w/index.php?title=Fenolftalein&oldid=18051294>
30. PUBCHEM. *Phenolphthalein* [online]. [vid. 2020-04-02]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/4764>
31. *o-Cresolphthalein C85778*. *Sigma-Aldrich* [online]. [vid. 2020-04-02]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/c85778>
32. *o-Cresolphthalein* [online]. 2020 [vid. 2020-04-02]. Dostupné z: <https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=O-Cresolphthalein&oldid=945719445>
33. *Thymolphthalein* [online]. 2019 [vid. 2020-04-02]. Dostupné z: <https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Thymolphthalein&oldid=929776337>
34. PUBCHEM. *Thymolphthalein* [online]. [vid. 2020-04-02]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/31316>
35. *Phenol red* [online]. 2019 [vid. 2020-04-02]. Dostupné z: https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Phenol_red&oldid=926743226

36. PUBCHEM. *Phenol red* [online]. [vid. 2020-04-02]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/4766>
37. *Cresol Red* [online]. 2020 [vid. 2020-04-02]. Dostupné z: https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Cresol_Red&oldid=938397598
38. PUBCHEM. *Cresol red* [online]. [vid. 2020-04-02]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/73013>
39. *Thymol blue* [online]. 2019 [vid. 2020-04-02]. Dostupné z: https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Thymol_blue&oldid=925232340
40. PUBCHEM. *Thymol blue* [online]. [vid. 2020-04-02]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/65565>
41. KREES, Simone. Wirt-Gast-Komplexe mit Cyclodextrinen-Strukturelle Merkmale und didaktisches Potenzial. 2018. PhD Thesis. Universität Wuppertal, Fakultät für Mathematik und Naturwissenschaften»Chemie» Dissertationen.
42. KARÁSKOVÁ, N., Myška, K., Kolář, K.: Jednoduché experimenty s makrocyclickými sloučeninami (2), *Biologie- Chemie- Zeměpis*, 24, (2015), s. 236-238

7 Přílohy



Obrázek 12 Znáznornění A) key-lock, B) induced-fit a C) selected-fit modelu dostupné z: https://www.researchgate.net/figure/Traditional-models-of-enzymatic-catalysis-lock-key-model-A-induced-fit-model-B_fig7_294848183



Obrázek 13 keyhole-lock-key model dostupné z: https://www.researchgate.net/figure/Keyhole-lock-key-model-for-enzymatic-catalysis-Two-step-process-composed-of-a-passage-of_fig2_294848183

6. Wirt-Gast-Komplex β -Cyclodextrin und Phenolphthalein

↑ ↓ 1 Materialien, Chemikalien, Zeitbedarf

- Waage
- Spatel
- Bechergläser (50 mL)
- Bechergläser (20 mL)
- Magnetrührer
- Rührstäbchen
- Pipetten
- Indikatorpapier
- Uhrglas

- β -Cyclodextrin
- destilliertes Wasser
- ethanolische Phenolphthalein-Lösung, $w = 1\%$ E
- Natronlauge $c = 0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ C

Sind die Lösungen vorbereitet, kann der Versuch innerhalb von 10 – 15 Minuten durchgeführt werden. Es bieten sich Folgeversuche an (Austausch des Gastmoleküls und Dissoziation des Komplexes).

↑ ↓ 2 Versuchsdurchführung und -beobachtung

Für die nachfolgenden Versuchsvarianten wird eine ethanolische Phenolphthalein-Lösung, $w = 1\%$, benötigt. 10 mL Natronlauge, $c = 0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, werden mit 5 Tropfen der Phenolphthalein-Lösung versetzt.

Variante I: Man gibt eine Portion festes β -Cyclodextrin auf ein Uhrglas und versetzt tropfenweise mit der vorbereiteten alkalischen Phenolphthalein-Lösung.

Variante II: Zunächst stellt man aus 0,2 g β -Cyclodextrin und 20 mL Wasser eine β -Cyclodextrin-Lösung her. Dazu wird alkalische Phenolphthalein-Lösung zugetropft, bis eine schwache, bleibende Rosafärbung eintritt. Nun testet man den pH-Wert der Lösung mit Indikatorpapier. Zum Vergleich versetzt man 20 mL destilliertes Wasser mit dem gleichen Volumen der alkalischen Phenolphthalein-Lösung und testet anschließend den pH-Wert der Lösung (Video zum Versuch).

Variante I: Die stark magentafarbene Phenolphthalein-Lösung entfärbt sich rasch, wenn sie auf β -Cyclodextrin getropft wird.

Příloha 1 Experiment profesora Tausche, dostupné z: https://chemiedidaktik.uni-wuppertal.de/fileadmin/Chemie/chemiedidaktik/disido/cyde/exp/nav/nav_exp_de.html

Variante II: Bei Zugabe der magentafarbenen Phenolphthalein-Lösung zur β -Cyclodextrin-Lösung verschwindet die Farbe sofort. Auch nach Zugabe von 5 mL Phenolphthalein-Lösung ist weiterhin eine sofortige Entfärbung der Lösung zu beobachten. Der pH-Wert der Lösung liegt bei pH = 10 - 11. Versetzt man das gleiche Volumen Wasser mit 5 mL alkalischer Phenolphthalein-Lösung, ist diese deutlich rosa gefärbt und zeigt einen pH-Wert von 10 – 11.

Gibt man zu der β -Cyclodextrin-Lösung weitere 5 mL alkalische Phenolphthalein-Lösung, so ist eine schwache, bleibende Rosafärbung der Lösung zu beobachten.



Abb. 2.13: Ergebnis der Versuchs-Variante II

↕ 3 Versuchsauswertung

Die Entfärbung der Phenolphthalein-Lösung in den beiden Varianten kann nicht auf die Verschiebung des pH-Werts in den sauren Bereich zurückgeführt werden, denn die Suspension bzw. die Lösung ist nachweislich alkalisch (pH = 10 – 11). Bei Zugabe der magentafarbenen Phenolphthalein-Lösung zu β -Cyclodextrin bzw. zur β -Cyclodextrin-Lösung bildet sich ein Wirt-Gast-Komplex mit dem konusförmigen β -Cyclodextrin, das das Gastmolekül Phenolphthalein in seinem Hohlraum über van-der-Waals-Wechselwirkungen komplexiert. Da die im sauren und neutralen vorliegende Molekülstruktur nichtionisch und damit weniger polar ist, könnte vermutet werden, dass das Phenolphthalein in dieser Form komplexiert wird, womit auch die Entfärbung der Lösung erklärt wäre.

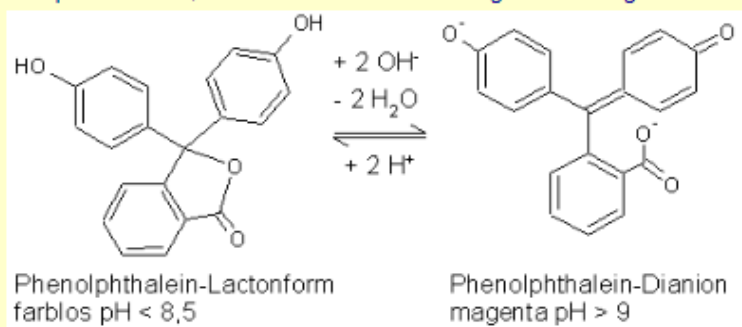


Abb. 2.14: Molekülstrukturen von Phenolphthalein bei pH < 8,5 und pH > 9

Doch die Aufnahme von UV-VIS-Spektren der verschiedenen Stoffe und des Komplexes haben gezeigt, dass das Phenolphthalein im Cyclodextrin in der Dianion-Form vorliegt. Bei der Bildung des Wirt-Gast-Komplexes wird das Phenolphthalein-Dianion durch Ausbildung von drei Wasserstoffbrücken-Bindungen zum Cyclodextrin-Molekül komplexiert. Bei diesem Komplex sind also nicht die van-der-Waals-Kräfte zwischen dem Gast-Molekül und der unpolaren Kavität des Cyclodextrins wesentliche Kräfte.

Priloha 2 Experiment profesora Tausche, dostupné z: https://chemiedidaktik.uni-wuppertal.de/fileadmin/Chemie/chemiedidaktik/disido/cyde/exp/nav/nav_exp_de.html

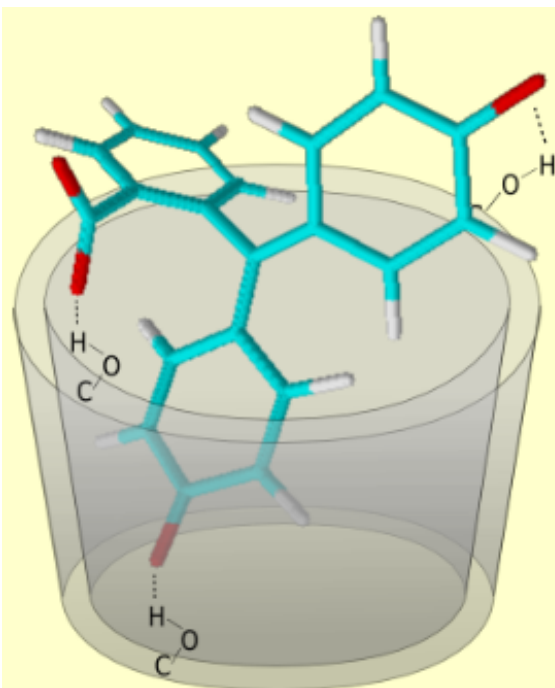


Abb. 2.15: Schematische Darstellung der Wasserstoffbrückenbindungen zwischen dem β -Cyclodextrin-Molekül und dem Phenolphthalein-Dianion

Aufgrund dieser zwischenmolekularen Wechselwirkungen wird das Phenolphthalein-Molekül um das zentrale Kohlenstoffatom stärker verdrillt. Dadurch wird die Delokalisierung des konjugierten π -Elektronensystems beeinträchtigt, was sich im Verschwinden der Farbigkeit bemerkbar macht.

↕ 4 Tipps und Anmerkungen

↕ 5 Ergänzende Sachinformationen

Die Beobachtung, dass sich Phenolphthalein trotz der alkalischen Lösung bei Anwesenheit von Cyclodextrin entfärbt, ist Grundlage einer analytischen Methode für die Bestimmung des Cyclodextrin-Gehalts. In UV-VIS-Spektren kann über die Absorption bei 550 nm, bei der das Phenolphthalein-Dianion die stärkste Absorptionsbande aufweist, der Gehalt an Cyclodextrin bestimmt werden.

Über die Entfärbung der Phenolphthalein-Lösung werden in weiteren Versuchen Cyclodextrine nachgewiesen. So können Textilerfrischer mit Hilfe dieses einfachen Versuchs (Gewinnung aus Textilerfrischern und Nachweis von Cyclodextrinen) auf Cyclodextrine getestet werden. Außerdem wird der mit Cyclodextrinen ausgerüstete Baumwollstoff auf diese Weise getestet (Cyclodextrine in der Textilausrüstung). Entfärbt sich die rotviolette Lösung auch noch dann, wenn die Stoffprobe mit Wasser gewaschen wurde, kann man sicher sein, dass die Cyclodextrin-Moleküle über das Anker-molekül kovalent an der Baumwollfaser gebunden sind.

Priloha 3 Experiment profesora Tausche, dostupné z: https://chemiedidaktik.uni-wuppertal.de/fileadmin/Chemie/chemiedidaktik/disido/cyde/exp/nav/nav_exp_de.html

7.1 Experimentální úlohy zaměřené na demonstraci aktivních center

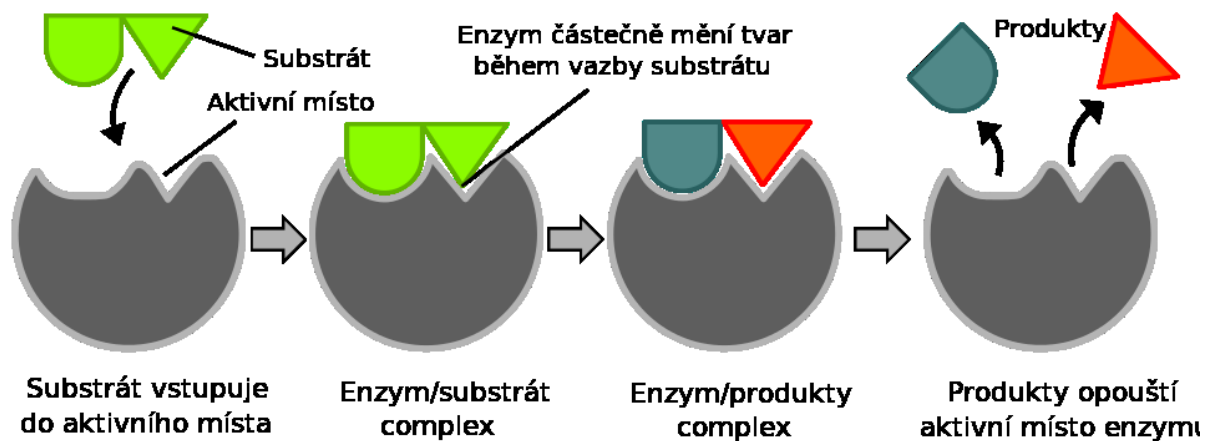
Úloha č.1

Experimenty s makrocyclickými sloučeninami

Teoretická část:

Aktivní místo enzymu

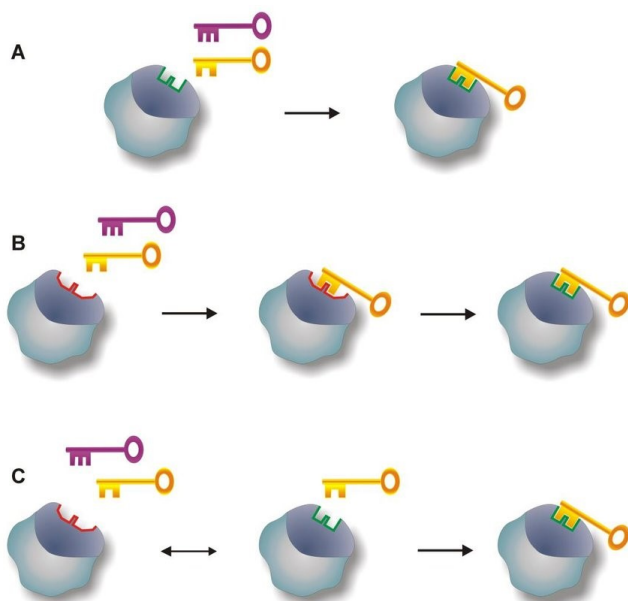
Enzymy jsou makromolekulární látky bílkovinné povahy, které slouží jako biokatalyzátory ve všech živých organismech a virech. Jako všechny katalyzátory snižují aktivační energii, a tím mnohonásobně urychlují biochemické reakce. Asi 1/3 z celého objemu zaujímá aktivní centrum enzymu, do kterého se s vysokou specifitou váže substrát. Aktivní centrum může mít tvar různých prohlubní a záhybů a dochází v něm k desolvataci substrátu a k vazbě substrátu. V oblasti aktivního místa se nachází ještě místo katalytické, na kterém probíhá přímo chemická reakce přeměny substrátu na produkt.(2)



Obrázek 14 Induced-fit model enzymu dostupné z:
https://cs.wikipedia.org/wiki/Enzym#/media/Soubor:Induced_fit_diagram_cs.svg

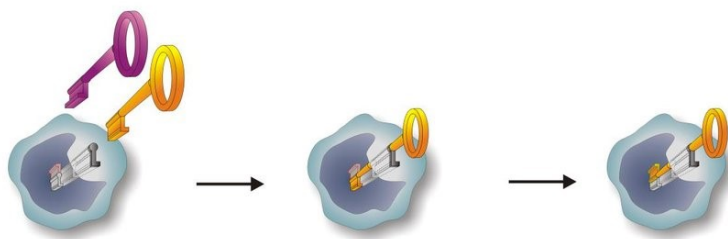
Modely aktivních center

Pro bližší porozumění vzniku enzym-substrátového komplexu byly vytvořeny modely, které znázorňují, k jakým změnám, při reakci dochází. Hlavní ideou je, že konformace aktivního místa enzymu a tvar substrátu se shodují (lock-key model)(3), popřípadě se aktivní místo přizpůsobí tvaru substrátu (induced-fit model)(5), nebo má substrát schopnost selektivního výběru a ve velkém množství enzymů si vybere, ten který je aktivní a komplementární k němu (selected-fit model)(41) a jednou z nejnovějších koncepcí je, že v molekule enzymu existuje spleť tunelů, kterými cestuje substrát k aktivnímu místu a teprve tam se selektivně naváže (keyhole-lock-key model)(41).



Obrázek 15 A) key-lock, B) induced-fit a C) selected-fit modelu dostupné :

https://www.researchgate.net/figure/Traditional-models-of-enzymatic-catalysis-lock-key-model-A-induced-fit-model-B_fig7_294848183



Obrázek 16 keyhole-lock-key model dostupné z: https://www.researchgate.net/figure/Keyhole-lock-key-model-for-enzymatic-catalysis-Two-step-process-composed-of-a-passage-of_fig2_294848183

Demonstrace aktivního centra pomocí cyklodextrinů – guest-host komplex

Cyklodextriny jsou cyklické sacharidy složené z dextrinových podjednotek, jedná se v podstatě o oligosacharidy. Jejich unikátní vlastností je, že ve své molekule obsahují hydrofobní dutinu-kavitu, do které jsou schopny vázat různé molekuly.(14) Vzniklý komplex se nazývá guest-host komplex, přičemž molekula cyklodextrinu slouží jako hostitel a navázaná molekula je jejím hostem.(15) Obdobně jako v případě enzymů jsou veškeré interakce mezi molekulou hostitele a hosta nekovalentní, jedná se o hydrofobní efekt, sterické bránění, vodíkové můstky, dipolární interakce apod..(21)

V pokusu se budeme zabývat sterickým bráněním a pomocí materiálního modelu se pokusíme demonstrovat, jakým způsobem vzniká guest-host komplex mezi molekulou β -cyklodextrinu a acidobazickými indikátory seřazenými podle velikosti rostoucího počtu alkylových skupin na základním skeletu (fenolftalein-kresolftalein, thymolftalein).

Praktická část:

Pomůcky a chemikálie:

hodinové sklo (o $r = \max. 2,5 \text{ cm}$) 3x, pipeta (3 cm^3) (7x), bílý papír, zkumavka (3x)

0,1% roztoky fenolftaleinu, kresolftaleinu a thymolftaleinu v etanolu, 0,01M roztok NaOH, za studena nasycený roztok β -cyklodextrinu

Postup experimentu:

1. Do tří zkumavek odpipetujte $1,5\text{cm}^3$ z připravených roztoků indikátorů.
2. Ke každému indikátoru přidejte 3cm^3 $0,01\text{M}$ NaOH.
3. Na stůl položte bílý papír a na něj umístěte tři hodinová sklíčka (o $r=\text{max } 2,5\text{cm}$).
4. Na každé sklíčko odpipetujte cca 6cm^3 roztoku za studena nasyceného β -cyklodextrinu.
5. Na jednotlivá sklíčka s β -cyklodextrinem postupně přidávejte po 3 kapkách alkalických roztoků (0,01%) fenolftaleinu, kresolftaleinu a thymolftaleinu a pozorujte případné změny vzhledu reakční směsi.

Otázky a úkoly:

1. Jaká změna nastala po přidání NaOH k indikátorům?
2. Co se stalo po přidání indikátorů k roztoku β -cyklodextrinu?
3. Jakým způsobem lze vysvětlit odlišnost rychlosti jednotlivých reakcí?
4. Co by se stalo, pokud bychom přidali k vzniklým komplexům roztok NaOH a jakou vlastnost enzymu by tato reakce mohla potvrdit?

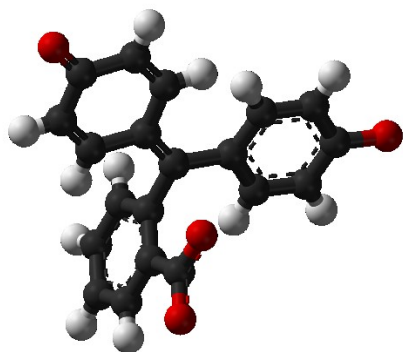
Postup práce s modelem:

1. Pomocí stavebnice sestavte model molekuly fenolftaleinu v barevné i bezbarvé formě a popište rozdíly v prostorovém uspořádání.
2. Dále modifikujte model dvěma methylovými a dvěma isopropylovými skupinami.
3. Pokuste se vložit postupně obě molekuly do β -cyklodextrinového kruhu.
4. Zkoumejte na základě vlastností obou molekul, jakým způsobem by mohl vznikat guest-host komplex.
5. Do polohy *ortho* – na fenylové zbytky přidejte methylové skupiny a pokuste se vložit molekulu do kavity β -cyklodextrinu.
6. Podle přiloženého obrázku vzorce thymolftaleinu upravte molekulu *o* – kresolftaleinu, přidejte isopropylové zbytky a pokuste se molekulu vložit do kavity β -cyklodextrinu.

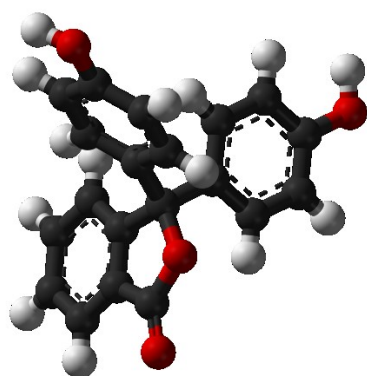
Otázky:

1. Jaký je rozdíl mezi laktonovou(cyklickou) a necyklickou formou indikátorů?
2. Jakým způsobem ovlivňují navázané skupiny tvorbu komplexu?
3. Má reakce vzniku komplexu spíše statický, nebo dynamický charakter?
4. Jaké interakce stabilizují vznikající komplexy?
5. K jakému z výše uvedených modelů lze vznik komplexu přiřadit?

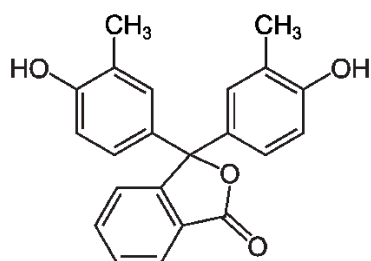
Přílohy:



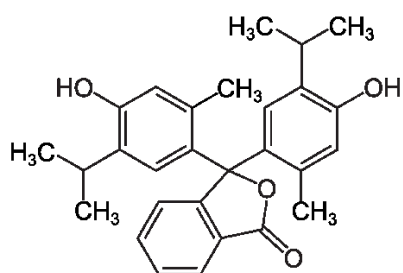
Obrázek 17 barevná forma fenolftaleinu (necyklická), dostupné z: <https://en.wikipedia.org/wiki/Phenolphthalein#/media/File:Phenolphthalein-red-mid-pH-3D-balls.png>



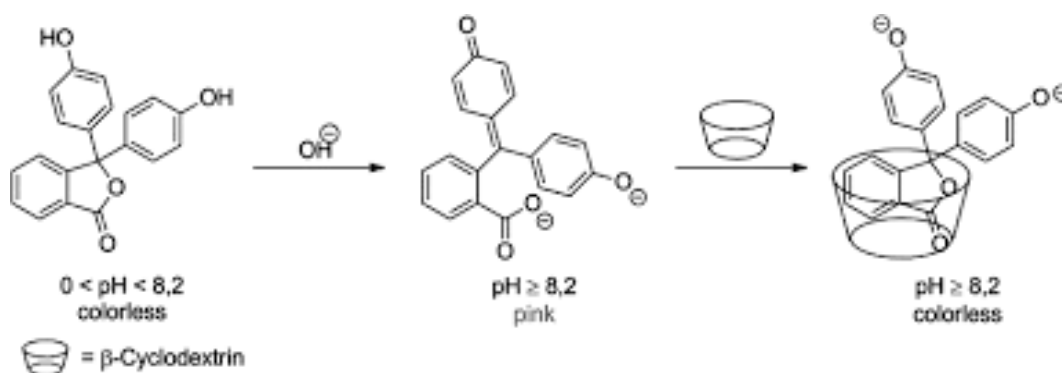
Obrázek 18 laktonová forma fenolftaleinu (cyklická) bezbarvá, dostupné z: <https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/e/e3/Phenolphthalein-colourless-low-pH-3D-balls.png>



Obrázek 19 Ortho-kresolftalein, dostupné z: <https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/c/c4/O-Kresolphthalein.svg/1280px-O-Kresolphthalein.svg.png>



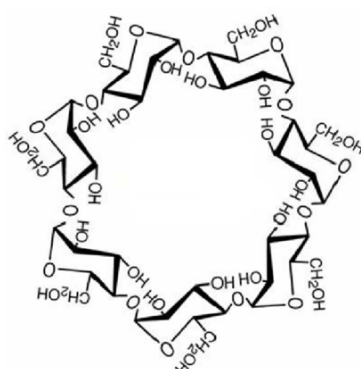
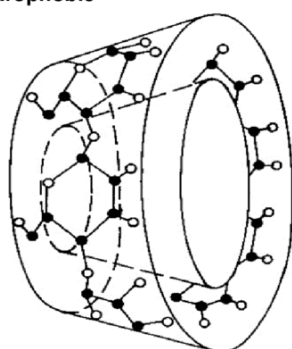
Obrázek 20 Thymolftalein, dostupné z: <https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/1/17/Thymolphthalein.svg/1280px-Thymolphthalein.svg.png>



Obrázek 21 Vznik host-guest komplexu mezi fenolftaleinem a beta-cyklodextrinem, dostupné z: <https://encrypted-tbn0.gstatic.com/images?q=tbn%3AANd9GcRO-sNS2UXAqwpEQ25R8R0DqcfMNV5Letum9rOJ4yunvMbN5ZP&usqp=CAU>

The outer surface of the cone is hydrophilic and the center cavity is hydrophobic

β Cyclodextrin:



Obrázek 22 Beta-cyklodextrin, dostupné z: https://www.google.com/url?sa=i&url=https%3A%2F%2Fwww.researchgate.net%2Ffigure%2FStructure-for-a-beta-cyclodextrin-molecule-PROCEDURES-The-methods-used-for-this-work-are_fig1_283533569&psig=AOvVaw1BhJobEiHz2MpPKc2v9JXA&us

Zdroje:

1. COPELAND, Robert Allen. *Enzymes: a practical introduction to structure, mechanism, and data analysis*. 2nd ed. New York: Wiley, 2000. ISBN 978-0-471-35929-6.
2. HIRAOKA, M. *Crown Ethers and Analogous Compounds*. B.m.: Elsevier, 2016. ISBN 978-1-4832-9087-4.
3. AL, N. Lyu et. *Recognition of PDL1/L2 by different induced-fit mechanisms of PDL1: a comparative study of molecular dynamics simulations* | *Kopernio* [online]. [vid. 2020-03-28]. Dostupné z: <https://kopernio.com/viewer?doi=10.1039%2FC9CP05531B&token=WzE5NzM2OTksIjEwLjEwMzkvQzldUDA1NTMxQiJd.R0-tQRnvCwGJfOW9siI1vg6ORIo>
4. PROKOP, Zbynek, Artur GORA, Jan BREZOVSKY, Radka CHALOUPKOVA a Veronika STEPANKOVA. Engineering of Protein Tunnels: Keyhole-Lock-Key Model for Catalysis by Enzymes with Buried Active Sites. *Protein Engineering Handbook*. 2012, **3**, 43.
5. DEL VALLE, EM Martin. Cyclodextrins and their uses: a review. *Process biochemistry*. 2004, **39**(9), 1033–1046.
6. TAGUCHI, Kazuo. *Transient binding of phenolphthalein-.beta.-cyclodextrin complex: an example of induced geometrical distortion* [online]. 1. květen 2002 [vid. 2020-03-13]. Dostupné z: doi:10.1021/ja00270a032
7. VÖGTLE, F. a E. WEBER. *Host Guest Complex Chemistry Macrocycles: Synthesis, Structures, Applications*. B.m.: Springer Science & Business Media, 2012. ISBN 978-3-642-70108-5.

Úloha č.2

Experimenty s makrocyclickými sloučeninami

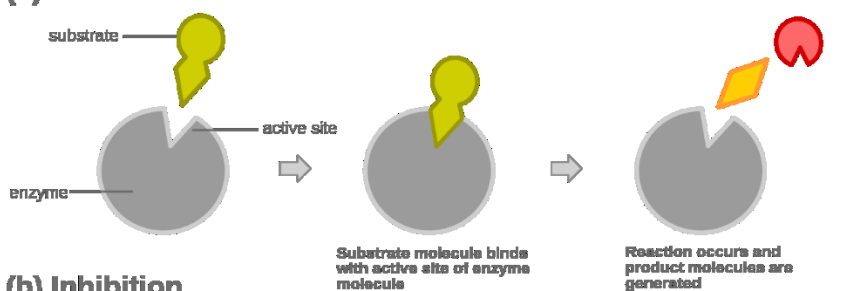
Teoretická část:

Afinita substrátu k enzymu a kompetitivní inhibice

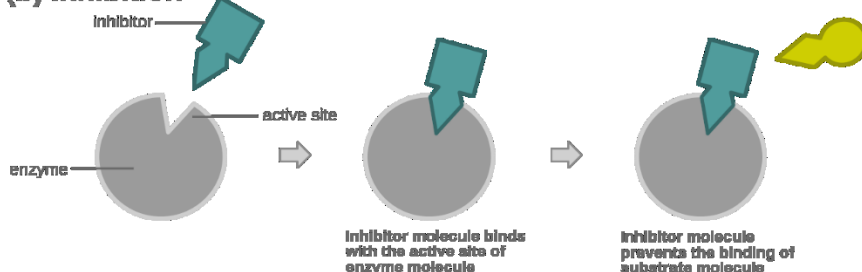
Enzymy jsou typické svou vazbou se substrátem, přičemž tato vazba je silně specifická. Záleží na prostorové orientaci substrátu, tvaru aktivního místa, teplotě, pH a v neposlední řadě také na koncentraci substrátu. Jako jeden z mnoha regulačních mechanismů existuje v případě enzymů tzv. inhibice, díky které je možno regulovat katalytickou aktivitu enzymu, ale také může ku příkladu zablokovat enzymatickou funkci nebo ji alespoň zpomalit. (2)

Kompetitivní inhibice je založena na faktu, že se molekula inhibitoru nápadně podobá molekule substrátu, není však schopna tvořit s enzymem komplex, který je katalyticky aktivní, a tudíž nevzniká po navázání inhibitoru produkt, nýbrž dochází k omezení nebo úplnému zamezení funkce enzymu. (2)

(a) Reaction



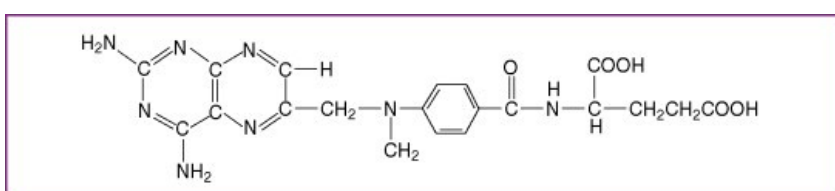
(b) Inhibition



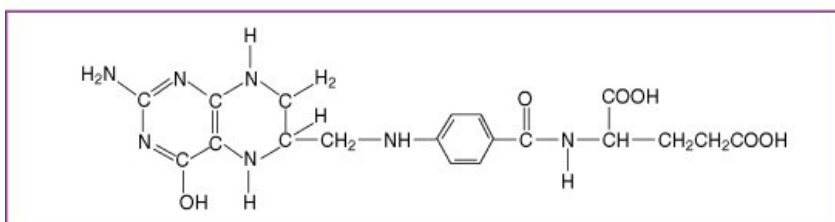
Obrázek 23 Kompetitivní inhibice, dostupné z:

https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/f/fb/Comp_inhib.svg/1280px-Comp_inhib.svg.png

Kompetitivní inhibice je ve velké míře způsobena zvýšenou koncentrací inhibitoru, který se přednostně váže na aktivní místo enzymu a tím zamezuje navázání substrátu. To, že není inhibitor schopen dále reagovat s enzymem potvrzuje model induced-fit, podle kterého se aktivní místo enzymu např. změnou tvaru, přizpůsobí tvaru substrátu, který ovšem musí korespondovat s aminokyselinami umístěnými v aktivním centru enzymu a k tomu nestačí pouze tvarové přizpůsobení molekuly enzymu, ale také rotace substrátu, které není inhibitor schopen, a to kupříkladu z důvodu nevhodně navázaných funkčních skupin nebo atomů (sterický efekt)(viz. obr. č.2).(2) (5)



A



B

Obrázek 24 Kompetitivní inhibice, A molekula substrátu, B molekula inhibitoru, dostupné z: <https://www.google.com/url?sa=i&url=https%3A%2F%2Fwww.sciencedirect.com%2Ftopics%2Fneuroscience%2Fcompetitive-inhibitor&psig=AOvVaw2BfkaHXFVWLpH4kFuQiuFY&ust=15864688651490>

Použití β -cyklodextrinu a modelové řady fenolftalein, kresolftalein, thymolftalein k demonstraci afinity substrátu k enzymu a ke kompetitivní inhibici

Cyklický oligosacharid složený ze sedmi dextrinových jednotek- β -cyklodextrin obsahuje ve své molekule hydrofobní kavitu, do které se s různou obtížností vážou molekuly substrátu, které představují molekuly acidobazických indikátory fenolftalein, *o*-kresolftalein a thymolftalein. Pro některý z indikátorů je vazba specifitější, pro jiný méně, což umožňuje zjednodušené znázornění kompetitivní inhibice enzymu.

Praktická část:

Pomůcky a chemikálie

hodinové sklo (o r=max.2,5cm) (3x), pipeta (3cm³) (7x), bílý papír, zkuševka (3x)

0,1% roztoky fenolftaleinu, kresolftaleinu a thymolftaleinu v etanolu, 0,01M roztok NaOH, za studena nasycený roztok β -cyklodextrinu

Postup experimentu:

1. Do tří zkumavek odpipetujte 1,5cm³ z připravených roztoků indikátorů.
2. Ke každému indikátoru přidejte 3 cm³ 0,01M NaOH.
3. Na stůl položte bílý papír a na něj umístěte tři hodinová sklíčka (o r=max 2,5cm).
4. Do každého sklíčka odpipetujte cca 6ml roztoku za studena nasyceného β -cyklodextrinu.
5. Na jednotlivá sklíčka s β -cyklodextrinem postupně přidávejte po 3 kapkách alkalických roztoků (0,01%) fenolftaleinu, kresolftaleinu a thymolftaleinu.
6. Po úplném odbarvení přidávejte postupně na všechna sklíčka 3 kapky fenolftaleinu.
7. Pozorujte změny a vysvětlete.

Otázky a úkoly:

1. Který z indikátorů má největší afinitu k β -cyklodextrinu?
2. Který indikátor bychom mohli považovat za substrát a který za inhibitor?
3. K jakým změnám dochází po přidání fenolftaleinu na všechna sklíčka?
4. Co je kromě specifické vazby hnací silou při narušení kompetitivní inhibice?
5. Jaký vliv mají navázané funkční skupiny na rotaci molekul indikátorů?
6. Jaké síly souvisí se specifickou vazbou substrátu na enzym?

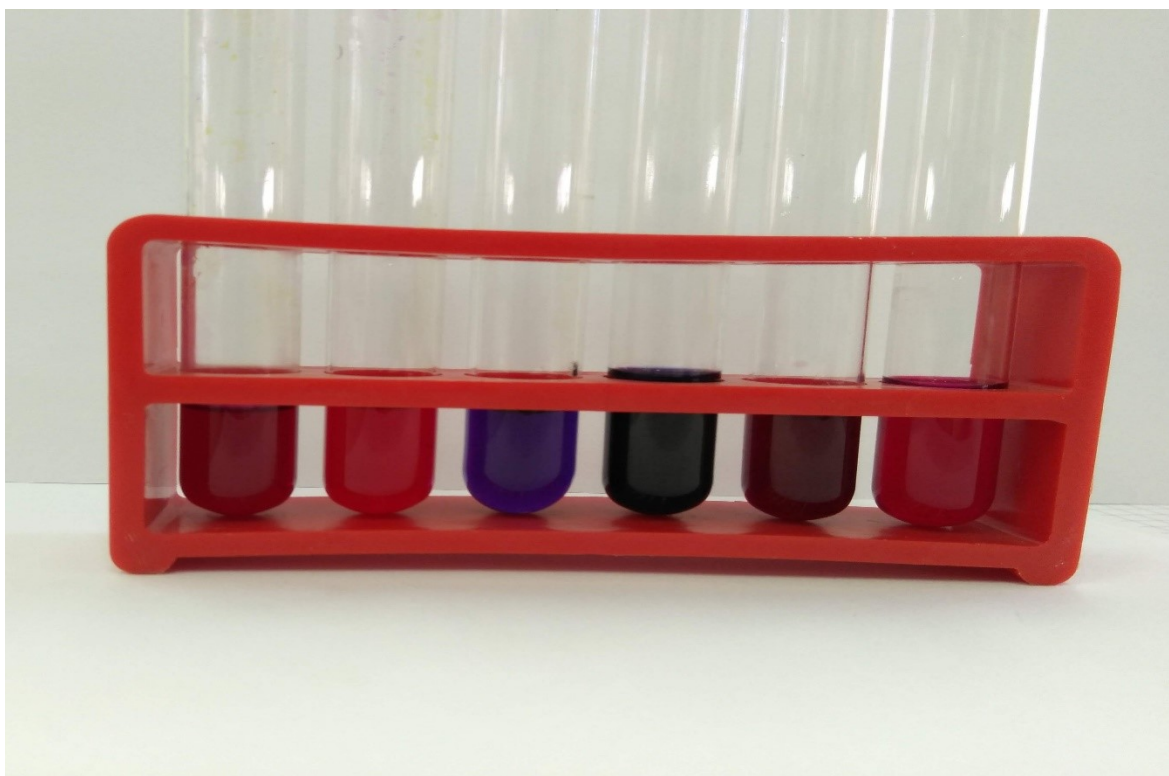
Zdroje:

1. COPELAND, Robert Allen. *Enzymes: a practical introduction to structure, mechanism, and data analysis*. 2nd ed. New York: Wiley, 2000. ISBN 978-0-471-35929-6.
2. AL, N. Lyu et. *Recognition of PDL1/L2 by different induced-fit mechanisms of PDI: a comparative study of molecular dynamics simulations* | *Kopernio* [online]. [vid. 2020-03-28]. Dostupné z: <https://kopernio.com/viewer?doi=10.1039%2FC9CP05531B&token=WzE5NzM2OTksIjEwLjEwMzQzLDUDA1NTMxQiJd.R0-tQRnvCwGJfOW9siI1vg6ORI>

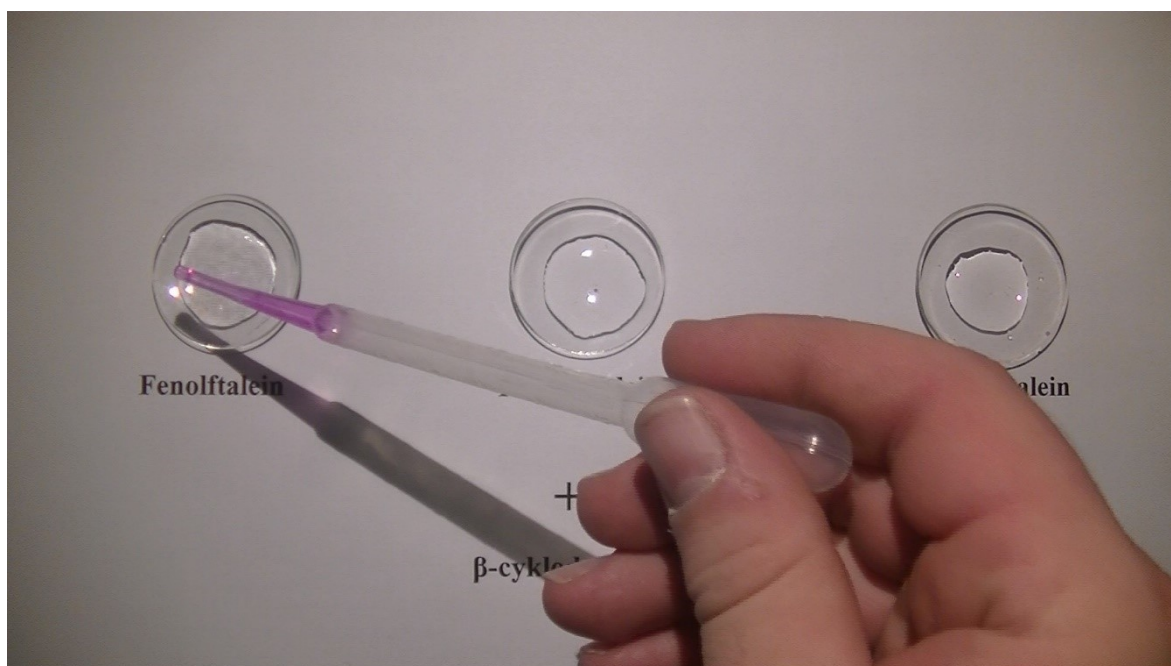
7.2 Obrazová dokumentace experimentů



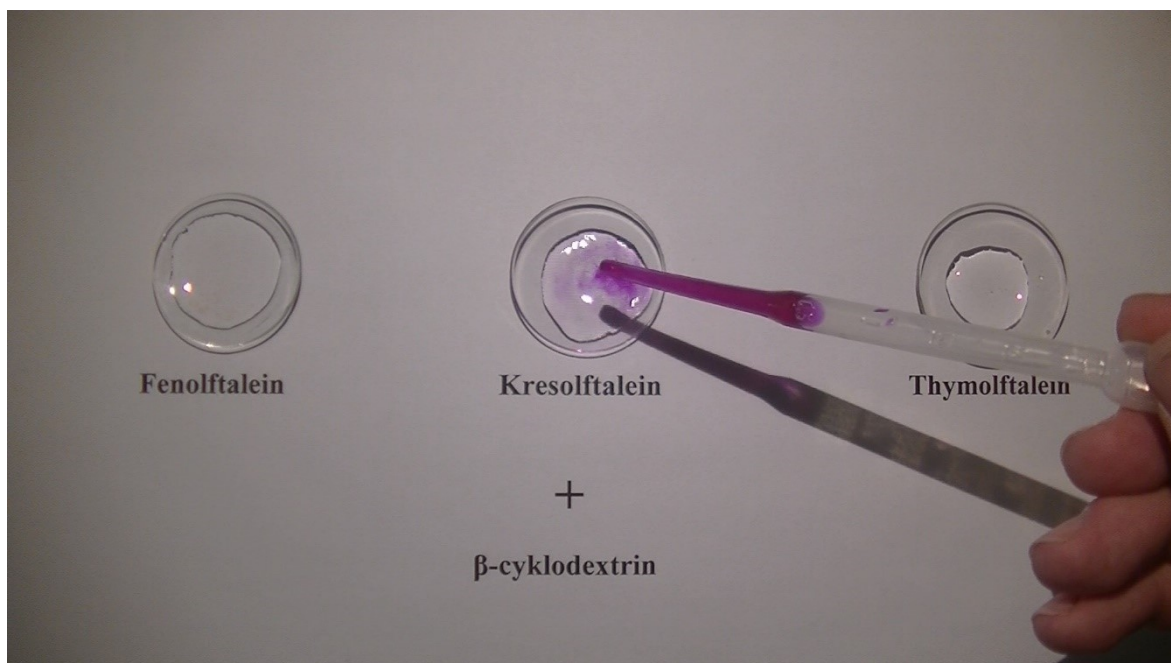
Obrázek 25 Fenolftalein, kresolftalein, thymolftalein v alkalickém prostředí



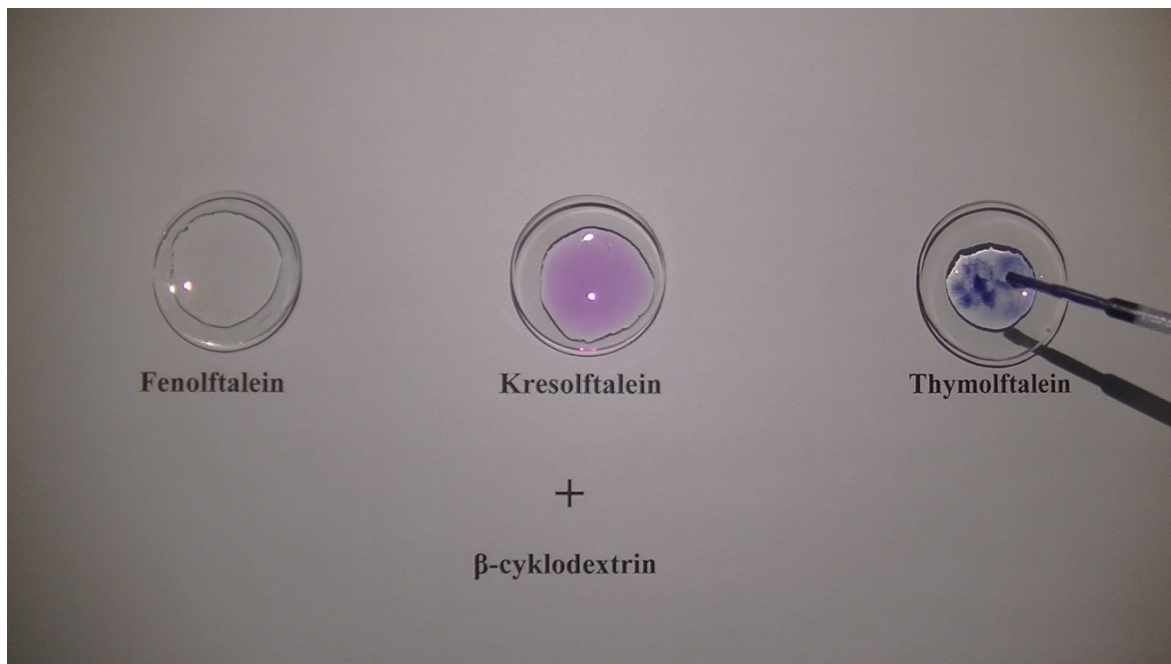
Obrázek 26 levo fenolftalein, kresolftalein, thymolftalein, thymolová modř, kresolová červeň, fenolová červeň v alkalickém prostředí



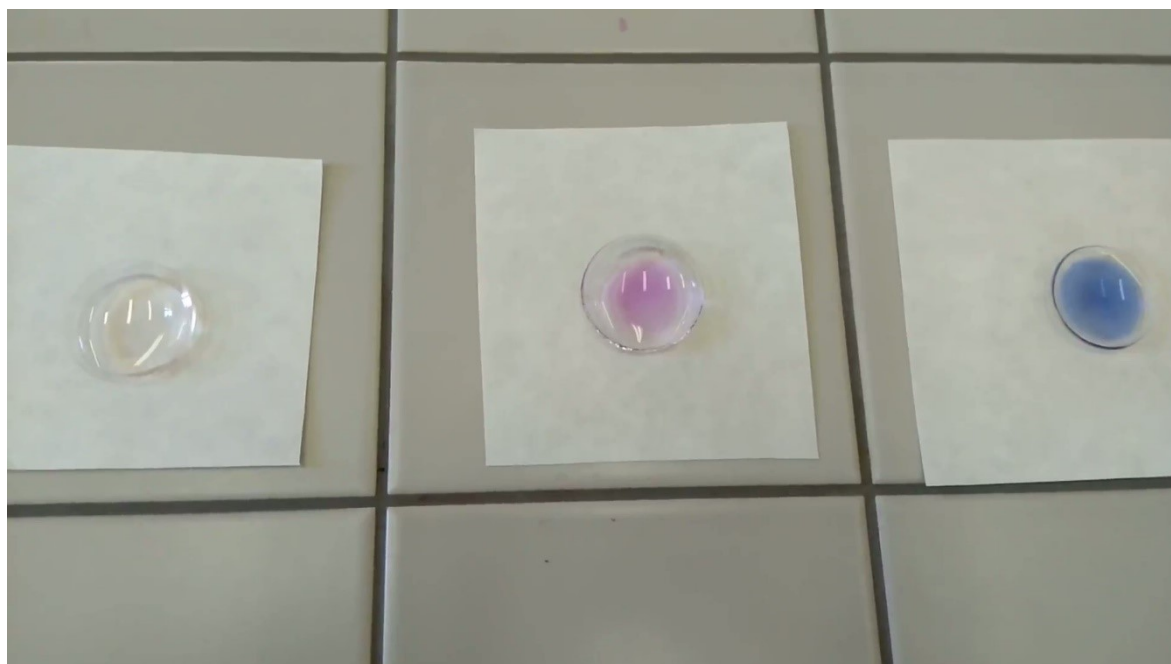
Obrázek 27 Fenolftalein + beta-cyklodextrin



Obrázek 28 Kresolftalein + beta-cyklodextrin



Obrázek 29 Thymolftalein + beta-cyklodextrin



Obrázek 30 Vzniklé komplexy po reakci indikátorů s beta-cyklodextrinem



Obrázek 31 Fenolová červen, kresolová červen, thymolová modř + beta-cyklodextrin

7.3 Multimediální soubory prováděných pokusů

7.4 Materiální model aktivního centra

Na základě zjištěných délek vazeb ze dvou různých modelů chemických molekul, ze švédského kalotového modelu a modelu Biochemie od firmy Molymod byl vytvořen model aktivního centra enzymu typ „guest-host“, který sestává z molekuly acidobazického indikátoru sestaveného z molekulární stavebnice a cyklodextrinového kruhu vyrobeného z polyamidového plastu POMA. Bylo zjištěno, že délky vazeb obou modelů jsou téměř stejné, liší se pouze ve velikosti objemu daného atomu, přičemž švédský model je přesnější, jelikož je vyroben na základě Van der Waalsových poloměrů, které nejvíce odpovídají realitě. Co se však týče demonstrace pokusu, postačí i druhý model od firmy Molymod. (viz obrázky č.36,37)

Výsledky měření a projekce modelu

Podle délky vazby mezi atomy C-C v modelech byla určena vzdálenost mezi středy atomů aromatického systému na 2,235cm, jelikož se reálně nedá určit s absolutní přesností daná délka, byl použit, tak jak se běžně uvádí, aritmetický průměr jednoduché a dvojné vazby mezi atomy C-C, který činí 0,144nm a na základě tohoto rozměru byla vypočítána velikost β -cyklodextrinového kruhu, jehož rozměry byly zjištěny u firmy, která se zabývá výrobou těchto cyklických oligosacharidů. Volba délky byla vybrána tak, aby byl zajištěn kompromis v rámci délek vazeb celého systému, navíc nelze přesně určit veškeré vzdálenosti, jelikož dochází neustále k vibracím vazeb a supramolekulární systémy typu, který je pro tento pokus použit, jsou velmi dynamické, přičemž dodnes není přesně známo, jakým způsobem se striktně „přelévají“ elektrony při vzniku komplexu v molekule, což dává za vznik speciálním dianiontovým strukturám, které se za standarních podmínek netvoří.

Úkolem materiálního modelu není ovšem popis, nebo znázornění podobně složitých interakcí v rámci jedné molekuly, nýbrž interakce dvou látek a názorná ukázka hlavních sil a překážek, které se odehrávají v aktivním centru enzymu čili hydrofobní síly, vliv navázaných uhlovodíkových zbytků (sterický efekt), a díky možné rotaci jednotlivých součástí modelu i částečně dynamiku celého systému.

Výpočty a měření

1. Molybden

Tabulka 4 Naměřené hodnoty molybden

Průměr atomu	23mm
Průměr atomu v místě vazby	21,25mm
Délka dílu jednoduché vazby	1,85mm
Délka dílu dvojně vazby	3,6mm
Délka jednoduché vazby (mezi středy atomů)	21,45mm
Délka dvojně vazby (mezi středy atomů)	23,20mm
Aritmetický průměr obou vazeb	22,33mm

1. Aritmetický průměr jednoduché a dvojně vazby

$$\frac{23,20 + 21,45}{2} \doteq 22,33mm$$

2. Délka jednotlivých vazeb v modelu

0,144nm.....22,33mm

1nm..... x

$$x = \frac{22,33 \cdot 1}{0,144} \doteq 155,2\text{mm}$$

1nm..... 155,2mm

1,53nm..... x

$$x = \frac{15,52 \cdot 1,53}{1} \doteq 237,5\text{mm}$$

1nm..... 155,2mm

0,78nm..... x

$$x = \frac{155,2 \cdot 0,78}{1} \doteq 121,0\text{mm}$$

1nm.....155,2mm

0,79nm..... x

$$x = \frac{155,2 \cdot 0,79}{1} \doteq 122,6\text{mm}$$

2. Kalotový model

Tabulka 5 Naměřené hodnoty kalotového model

Průměr atomu	33,35mm
Délka vazby při spojení dvou atomů	22,35mm

Z výše uvedených výpočtů tedy vyplývá, že i zde představuje 1nm délku 155,2mm a tudíž i ostatní parametry jsou shodné.

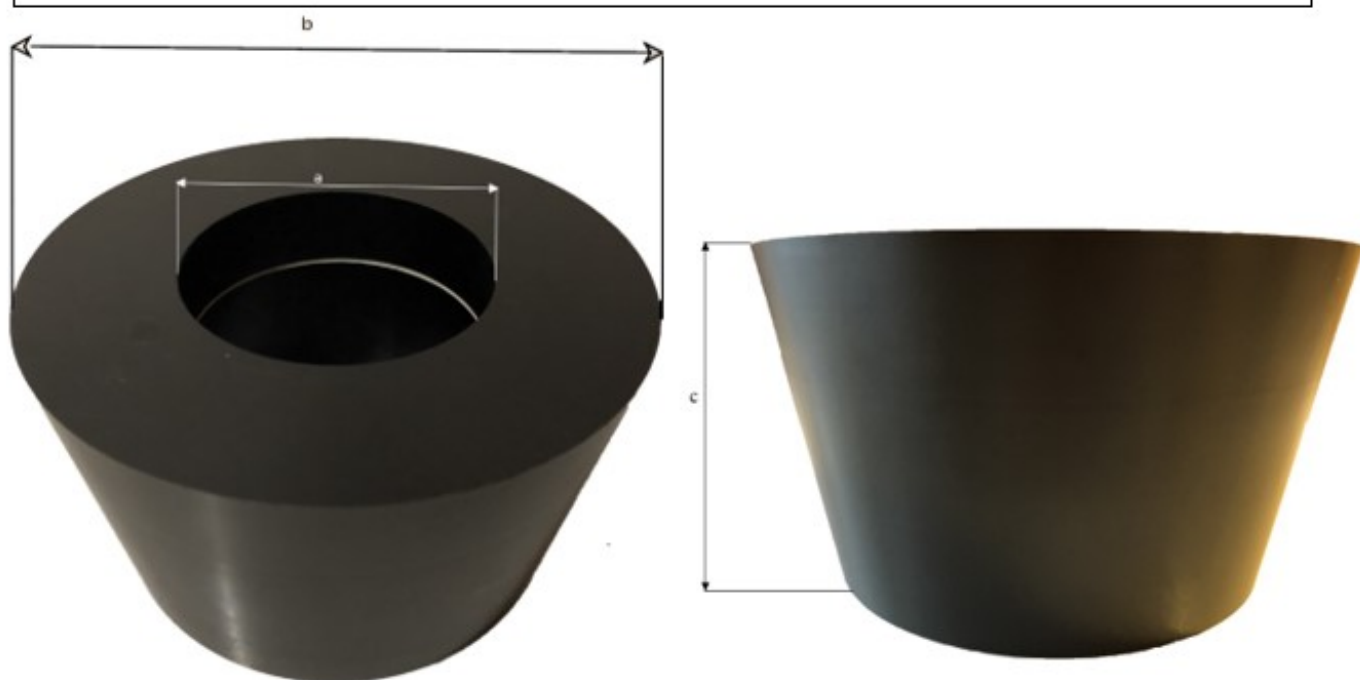
Tabulka 6 Počet a typ atomů nutný k sestavení modelu

Typ atomu	Počet
Uhlík tetraedrický-4vazby	9
Uhlík triedrický-3vazby	20
Kyslík dvojnásobný-2vazby	3
Kyslík s dvojnásobnou vazbou-1vazba	2
Vodík-jedna vazba	30

Model β -cyklodextrin

Průměrná délka vazby c-c = 0,144nm

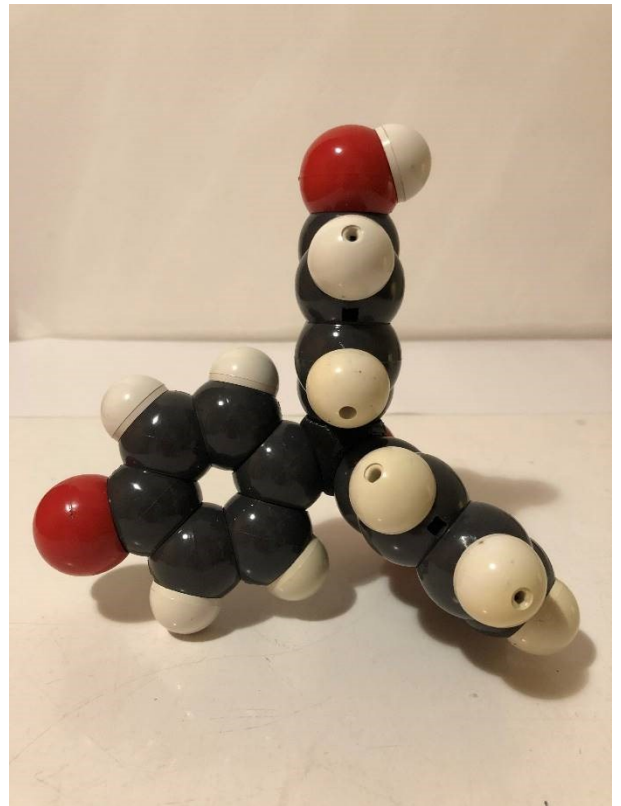
a= 0,78nm	kavita	12,1cm
b= 1,53nm	vnější průměr kruhu	23,75cm
c=0,79nm	výška kruhu	12,26cm



Obrázek 32 model β -cyklodextrinu



Obrázek 33 SWE kalotový model- fenolftalein, laktonová forma 1



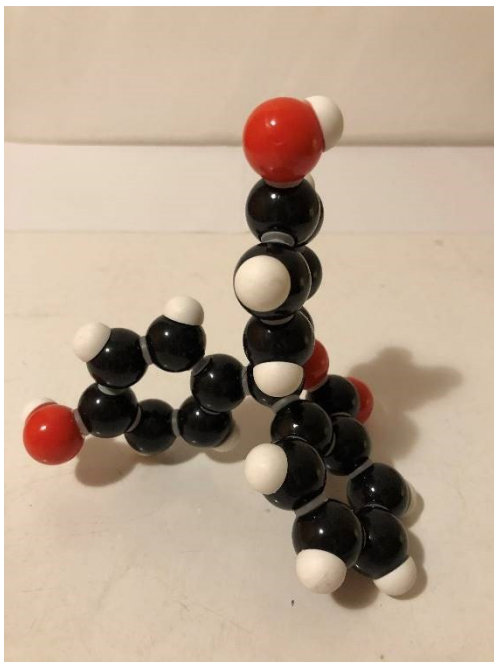
Obrázek 33 SWE kalotový model- fenolftalein, laktonová forma 2



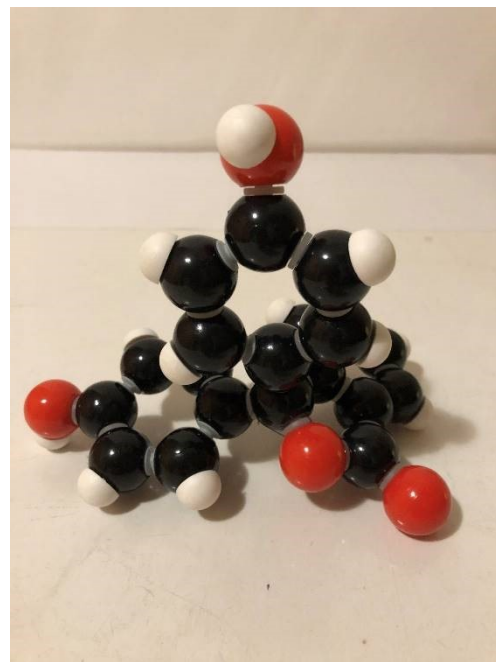
Obrázek 34 Molekulární stavebnice molymod, dostupné z: <http://www.molymod.com/biochemistrv.html>



Obrázek 35 Molymod-barevná forma fenolftaleinu



Obrázek 36 Molymod- laktonová forma
ifenolftaleinu 1



Obrázek 37 Molymod- laktonová forma
fenolftaleinu 2



Obrázek 39 Komplex fenolftalein- β -cyklodextrin(SWE model)



Obrázek 40 Komplex fenolftalein- β -cyklodextrin (Molymod)



Obrázek 41 Interakce β -cyklodextrinu s barevnou formou fenolftaleinu (Molymod)

Seznam obrázků

Obrázek 1 α , β , γ -cyklodextrin dostupné z:

<https://www.google.com/url?sa=i&url=https%3A%2F%2Frepozitorij.pharma.unizg.hr%2Fislandora%2Fobject%2Fpharma%253A416%2Fdatastream%2FPDF%2Fview&psig=AOvVaw2kBLKjB5oYAHrGNPWPQZbT&ust=1586821831417000&source=images&.....> 18

Obrázek 2 R. Breslow, hydrofobní akcelerace při Diels-Alderově reakci, dostupné z:

<https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ja00546a048> 19

Obrázek 3 Transient Binding Mode of Phenolphthalein- α -Cyclodextrin Complex: An Example of Induced Geometrical Distortion dostupné z:

<https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/ja00270a032>..... 20

Obrázek 4 Crown-ethery dostupné z:

<https://www.google.com/url?sa=i&url=https%3A%2F%2Fwww.semanticscholar.org%2Fpaper%2FEmergence-of-symmetry-and-chirality-in-crown-ether-Mart%25C3%25ADnez-Haya-Hurtado%2F774afc334d478c61154b802c7781e63efe59f4f3%2Ffigure%2F4&psig.....> 22

Obrázek 5 Vznik peptidového řetězce dostupné z:

https://www.google.com/url?sa=i&url=https%3A%2F%2Fwww.mojechemie.cz%2FBiochemie%3AB%25C3%25ADlkoviny&psig=AOvVaw2KquZgrgdNFcyvdRmWC-Y5&ust=1587760700301000&source=images&cd=vfe&ved=0CAIQjRxqFwoTCMC58-Oz_-gCFQAAAAAdA 24

Obrázek 6 Fenolftalein, dostupné z:

https://www.google.com/url?sa=i&url=https%3A%2F%2Fen.wikipedia.org%2Fwiki%2FPhenolphthalein&psig=AOvVaw3QHK8ga5xN4z900chFtdsl&ust=1587762472692000&source=images&cd=vfe&ved=0CAIQjRxqFwoTCMjQwZu6_-gCFQAAAAAdAAAAABAD 28

Obrázek 7 O-kresolftalein, dostupné z:

https://www.google.com/url?sa=i&url=https%3A%2F%2Fcs.qwe.wiki%2Fwiki%2FO-Cresolphthalein&psig=AOvVaw3uK114yx4YeTPPrf7sbe9B&ust=1587762623474000&source=images&cd=vfe&ved=0CAIQjRxqFwoTCKDRjdy6_-gCFQAAAAAdAAAAABAD 29

Obrázek 8 Thymolftalein, dostupné z: By NEUROtiker - Own work, Public Domain, https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=3888608	30
Obrázek 9 Fenolová červeň, dostupné z: https://www.google.com/url?sa=i&url=http%3A%2F%2Fm.slobodavockovani.sk%2Fnews%2Ffenolova-cerven%2F&psig=A0vVaw1tPCOMexhh5KjaXygXRsi3&ust=1587829970536000&source=images&cd=vfe&ved=0CAIQjRxqFwoTCPCm3NO1gekCFQAAAAAdAAAAABAJ	30
Obrázek 10 Kresolová červeň, dostupné z: https://www.google.com/url?sa=i&url=https%3A%2F%2Fwww.sigmaaldrich.com%2Fcatalog%2Fproduct%2Fsial%2F114472%3Flang%3Den%26region%3DUS&psig=A0vVaw3DFGaMRZ0B2pfc4iH8hXnb&ust=1587830140994000&source=images&cd=vfe&ved=0CAIQjRxqF	31
Obrázek 11 Thymolová modř, dostupné z: https://www.google.com/url?sa=i&url=https%3A%2F%2Fwww.sigmaaldrich.com%2Fcatalog%2Fproduct%2Fsial%2F114545%3Flang%3Den%26region%3DUS&psig=A0vVaw1jV4j8d-jGnruLC2oyEkmV&ust=1587830326892000&source=images&cd=vfe&ved=0CAIQjRxqFwo	32
Obrázek 12 Znázornění A) key-lock, B) induced-fit a C) selected-fit modelu dostupné z: https://www.researchgate.net/figure/Traditional-models-of-enzymatic-catalysis-lock-key-model-A-induced-fit-model-B_fig7_294848183	47
Obrázek 13 keyhole-lock-key model dostupné z: https://www.researchgate.net/figure/Keyhole-lock-key-model-for-enzymatic-catalysis-Two-step-process-composed-of-a-passage-of_fig2_294848183	47
Obrázek 14 Induced-fit model enzymu dostupné z: https://cs.wikipedia.org/wiki/Enzym#/media/Soubor:Induced_fit_diagram_cs.svg	51
Obrázek 15 A) key-lock, B) induced-fit a C) selected-fit modelu dostupné z: https://www.researchgate.net/figure/Traditional-models-of-enzymatic-catalysis-lock-key-model-A-induced-fit-model-B_fig7_294848183	52

Obrázek 16 keyhole-lock-key model dostupné z: https://www.researchgate.net/figure/Keyhole-lock-key-model-for-enzymatic-catalysis-Two-step-process-composed-of-a-passage-of_fig2_294848183	53
Obrázek 17 barevná forma fenolftaleinu (necyklická), dostupné z: https://en.wikipedia.org/wiki/Phenolphthalein#/media/File:Phenolphthalein-red-mid-pH-3D-balls.png	56
Obrázek 18 laktonová forma fenolftaleinu (cyklická) bezbarvá, dostupné z: https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/e/e3/Phenolphthalein-colourless-low-pH-3D-balls.png	56
Obrázek 19 Ortho-kresolftalein, dostupné z: https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/c/c4/O-Kresolphthalein.svg/1280px-O-Kresolphthalein.svg.png	56
Obrázek 20 Thymolftalein, dostupné z: https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/1/17/Thymolphthalein.svg/1280px-Thymolphthalein.svg.png	57
Obrázek 21 Vznik host guest komplexu mezi fenolftaleinem a beta-cyklodextrinem, dostupné z: https://encrypted-tbn0.gstatic.com/images?q=tbn%3AANd9GcRO-sNS2UXAqwpEQ25R8R0DqcfMNV5Letum9rOJ4yunvvMbN5ZP&usqp=CAU	57
Obrázek 22 Beta-cyklodextrin, dostupné z: https://www.google.com/url?sa=i&url=https%3A%2F%2Fwww.researchgate.net%2Ffigure%2Fstructure-for-a-beta-cyclodextrin-molecule-PROCEDURES-The-methods-used-for-this-work-are_fig1_283533569&psig=AOvVaw1BhJobEiHz2MpPKc2v9JXA&us	57
Obrázek 23 Kompetitivní inhibice, dostupné z: https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/f/fb/Comp_inhib.svg/1280px-Comp_inhib.svg.png	59
Obrázek 24 Kompetitivní inhibice, A molekula substrátu, B molekula inhibitoru, dostupné z: https://www.google.com/url?sa=i&url=https%3A%2F%2Fwww.sciencedirect.com%2Ftopics%2Fneuroscience%2Fcompetitive-inhibitor&psig=AOvVaw2BfkaHXFVWLpH4kFuQiufY&ust=15864688651490	60
Obrázek 25 Fenolftalein, kresolftalein, thymolftalein v alkalickém prostředí	62

Obrázek 26	leva fenolftalein, kresolftalein, thymolftalein, thymolová modř, kresolová červeň, fenolová červeň v alkalickém prostředí	62
Obrázek 27	Fenolftalein + beta-cyklodextrin.....	63
Obrázek 28	Kresolftalein + beta-cyklodextrin	63
Obrázek 29	Thymolftalein + beta-cyklodextrin	64
Obrázek 30	Vzniklé komplexy po reakci indikátorů s beta-cyklodextrinem	64
Obrázek 31	Fenolová červeň, kresolová červeň, thymolová modř + beta-cyklodextrin	65
Obrázek 32	model β -cyklodextrinu	71
Obrázek 33	SWE kalotový model- fenolftalein, laktonová forma 2	72
Obrázek 34	Molekulární stavebnice molymod, dostupné z: http://www.molymod.com/biochemistry.html	72
Obrázek 35	Molymod-barevná forma fenolftaleinu.....	72
Obrázek 36	Molymod- laktonová forma fenolftaleinu 1	73
Obrázek 37	Molymod- laktonová forma fenolftaleinu 2.....	73
Obrázek 38	Molymod- laktonová forma fenolftaleinu 1	73
Obrázek 39	Komplex fenolftalein- β -cyklodextrin(SWE model)	73
Obrázek 40	Komplex fenolftalein- β -cyklodextrin (Molymod).....	73
Obrázek 41	Interakce β -cyklodextrinu s barevnou formou fenolftaleinu (Molymod).....	74

Seznam tabulek

Tabulka 1	Indikátory obsahující v molekule benzofuran, aktivita v bazické oblasti pH	36
Tabulka 2	Indikátory obsahující sulfoskupinu, aktivita v kyselé oblasti pH.....	36
Tabulka 3	Indikátory obsahující v molekule benzofuran, aktivita v bazické oblasti pH	40
Tabulka 4	Naměřené hodnoty molymod	68
Tabulka 5	Naměřené hodnoty kalotového model.....	70
Tabulka 6	Počet a typ atomů nutný k sestavení modelu.....	70