

UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

---

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



**Simona Haiklová**

**Spektrofotometrické stanovení konstant stability derivátů cyklodextrinů  
fenolftaleinovou metodou**

**Spectrophotometric determination of stability constants of cyclodextrin  
derivates by phenolphthalein method**

Bakalářská práce

Vedoucí práce: doc. RNDr. Juraj Dian, CSc.

Praha, 2021

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 16. srpna 2021

.....

Simona Haiklová

## Abstrakt

Předložená bakalářská práce se zabývá stanovením konstant stability cyklodextrinů (CD) a jejich derivátů při tvorbě supramolekulárních komplexů s fenolftaleinem. Cyklodextriny, makrocyclické oligosacharidy, jsou charakteristické svým tvarem komolého kužele, jehož vnitřní hydrofobní dutina může vytvářet s vhodnými látkami inkluzní komplexy typu hostitel-host (host-guest). Vznik těchto inkluzních komplexů je doprovázen změnou řady fyzikálně-chemických parametrů inkludovaných sloučenin. V této bakalářské práci byla studována změna optické absorpce fenolftaleinu, který má charakteristické fialové zbarvení v zásadité oblasti pH, při jeho interakci s vybranými CD makrocycly. Vznikem supramolekulárního komplexu docházelo k poklesu optické absorpce, který byl kvantifikován a využit pro stanovení konstant stability.

V bakalářské práci byla studována supramolekulární interakce fenolftaleinu se šesti deriváty cyklodextrinů – základní cyklodextriny  $\beta$ -CD a  $\gamma$ -CD a dva typy jejich derivátů. U vybraných derivátů těchto cyklodextrinů byly –OH skupiny v polohách 2, 3 a 6 nahrazené jednak hydroxypropylovými skupinami (hydroxypropyl- $\beta$ -CD a hydroxypropyl- $\gamma$ -CD), jednak (náhodně – random) methylovými skupinami (RaMe- $\beta$ -CD a RaMe- $\gamma$ -CD). Pro zvolené CD byly proměřeny závislosti absorpčních spekter fenolftaleinu při různých počátečních koncentracích CD v roztoku a ze závislosti intenzity spektrálního maxima optické absorpce ve viditelné oblasti byly stanoveny konstanty stability komplexů fenolftalein-CD. Stanovené hodnoty konstant stability byly v případě dostupných dat srovnány s hodnotami v odborné literatuře.

**Klíčová slova:** cyklodextrin, fenolftalein, supramolekulární interakce, konstanta stability, inkluzní komplex

## Abstract

This bachelor thesis deals with the determination of stability constants of cyclodextrins and their derivatives in the formation of supramolecular complexes with phenolphthalein. Cyclodextrins - macrocyclic oligosaccharides – are characterized by the shape of a truncated cone, whose internal hydrophobic cavity can form, with suitable substances, host-guest inclusion complexes. The formation of these inclusion complexes is accompanied by a change of a number of physicochemical parameters of the included compounds. In this bachelor thesis, the change of optical absorption of phenolphthalein, which has characteristic violet color in the alkaline area, was studied during its interaction with selected CD macrocycles. The formation of a supramolecular complex resulted in a decrease in optical absorption, which was quantified and used to determine stability constant.

In the bachelor thesis, the supramolecular interaction of phenolphthalein with six derivatives of cyclodextrins were studied – basic cyclodextrins  $\beta$ -CD and  $\gamma$ -CD and their two derivatives. In the selected derivatives of these CDs the -OH groups in positions 2, 3, and 6 were replaced either by hydroxypropyl groups (hydroxypropyl- $\beta$ -CD and hydroxypropyl- $\gamma$ -CD) or (randomly) by methyl groups (RaMe- $\beta$ -CD and RaMe- $\gamma$ -CD). For these CD derivatives, the dependencies of the absorption spectra of phenolphthalein for different initial concentrations of CD in the solution were measured, and the stability constants were determined from the dependence of the intensity of the spectral maximum of the optical absorption in the visible area. The determined values of stability constants were compared with the values that are accessible in the literature.

**Keywords:** cyclodextrin, phenolphthalein, supramolecular interaction, stability constants, inclusion complex

# Obsah

|       |  |    |
|-------|--|----|
| 1     | Úvod.....  | 7  |
| 2     | Přehled problematiky .....   | 8  |
| 2.1   | Cyklodextriny a jejich typy .....                                  | 8  |
| 2.1.1 | Historie cyklodextrinů.....  | 8  |
| 2.1.2 | Vlastnosti a struktura cyklodextrinů .....                         | 9  |
| 2.1.3 | Deriváty cyklodextrinů.....  | 11 |
| 2.2   | Vznik inkluzního komplexu .....                                    | 12 |
| 2.3   | Interakce fenolftaleinu s cyklodextriny .....                      | 13 |
| 2.3.1 | Fenolftaleinová metoda.....  | 14 |
| 2.4   | Vazebná konstanta .....  | 14 |
| 2.4.1 | Jobova metoda.....   | 16 |
| 2.5   | Chyby měření stanovovaných veličin .....                           | 17 |
| 2.5.1 | Maximální chyba měření koncentrace při měření Jobových grafů ..... | 17 |
| 2.5.2 | Chyba stanovení veličiny při nelineárním fitování.....             | 19 |
| 3     | Experimentální část.....   | 20 |
| 3.1   | Použité přístroje a chemikálie.....                                | 20 |
| 3.2   | Popis spektrofotometrické titrace .....                            | 21 |
| 3.3   | Příprava roztoků .....   | 22 |
| 3.3.1 | Příprava roztoků pro měření konstanty stability .....              | 22 |
| 3.3.2 | Roztoky pro měření Jobových grafů.....                             | 24 |
| 4     | Výsledky a diskuze.....  | 25 |
| 4.1   | Měření Jobových grafů.....   | 25 |
| 4.2   | Stanovení konstant stability cyklodextrinů s fenolftaleinem.....   | 28 |
| 5     | Závěr.....   | 34 |
| 6     | Poděkování .....   | 35 |
| 7     | Seznam literatury.....   | 36 |

## Seznam zkratek a symbolů

|                    |  |
|--------------------|--|
| CD                 | cyklodextrin                                 |
| $\alpha$ -CD       | alfa-cyklodextrin                            |
| $\beta$ -CD        | beta-cyklodextrin                            |
| $\gamma$ -CD       | gama-cyklodextrin                            |
| HP- $\beta$ -CD    | hydroxypropyl-beta-cyklodextrin              |
| HP- $\gamma$ -CD   | hydroxypropyl-gama-cyklodextrin              |
| RaMe- $\beta$ -CD  | random-methyl-beta-cyklodextrin              |
| RaMe- $\gamma$ -CD | random-methyl-gama-cyklodextrin              |
| $K$                | konstanta stability                          |
| H                  | hostitel                                     |
| G                  | host   |
| H-G komplex        | host-guest komplex                           |
| PP                 | fenolftalein                                 |
| $A_{\max}$         | maximální absorbance                         |
| $A_0$              | počáteční absorbance                         |
| HPLC               | vysokoúčinná kapalinová chromatografie       |
| NMR                | nukleární magnetická rezonance               |
| DS                 | stupeň derivatizace (degree of substitution) |
| UV                 | ultrafialová oblast                          |
| VIS                | viditelná oblast                             |

# 1 Úvod

Cyklodextriny, přírodní makrocyclické sloučeniny, jsou známé zejména díky své schopnosti tvořit inkluzní komplexy s různými hostujícími molekulami. Díky této vlastnosti je jejich aplikace široká a nacházejí uplatnění v mnoha odvětvích.

Cyklodextriny jsou vyhledávány z řady důvodů. Jsou vyrobené z obnovitelného přírodního materiálu relativně jednoduchou enzymatickou reakcí, a díky tomu nezatěžují životní prostředí. Původně vysoké ceny klesly na úroveň, která je přijatelná pro většinu průmyslových účelů. Výroba se ročně pohybuje okolo tisíce tun. Jejich toxicita je téměř zanedbatelná a lze ji úplně eliminovat výběrem vhodného typu cyklodextrinu, derivatizací či způsobem aplikace. Díky tomu jsou cyklodextriny hojně využívány ve farmaceutickém, potravinářském i kosmetickém průmyslu.

Nacházejí uplatnění při ochraně životního prostředí nebo v separačních procesech.

Cílem této práce bylo stanovit konstanty stability komplexu  $\beta$ -cyklodextrinu,  $\gamma$ -cyklodextrinu a jejich vybraných derivátů: HP- $\beta$ -CD, HP- $\gamma$ -CD, RaMe- $\beta$ -CD, RaMe- $\gamma$ -CD s fenolftaleinem pomocí absorpční spektroskopie. V literatuře existuje řada dat o konstantách stability cyklodextrinů s fenolftaleinem, které ovšem vykazují značné rozdíly naměřených hodnot. Předkládaná práce měla rovněž přispět k ujasnění původu těchto rozdílů. Vlastní práce se skládala z následujících kroků:

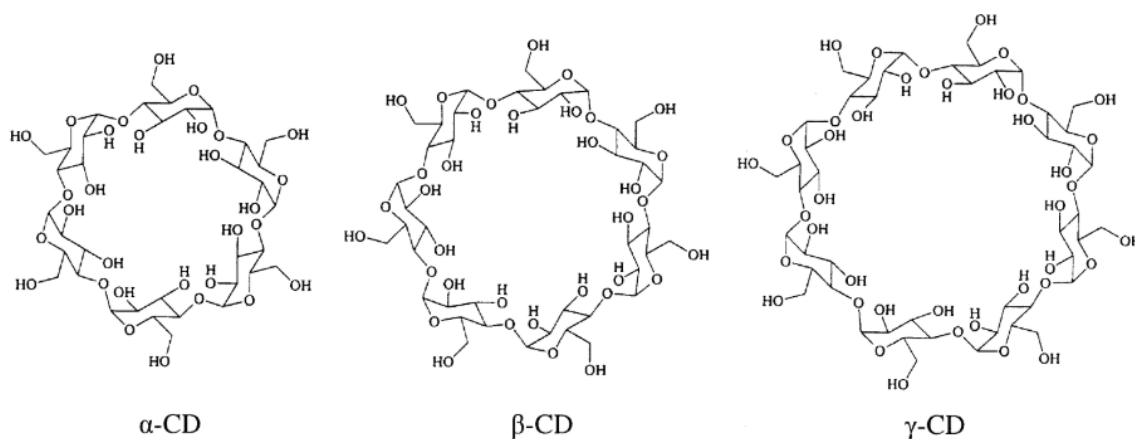
1. Příprava roztoků studovaných cyklodextrinů, fenolftaleinu, hydrogenuhličitanového pufru o pH = 10,5
2. orientační měření Jobových grafů pro vybrané CD deriváty pro určení stechiometrie komplexu host-hostitel,
3. měření konstant stability komplexů derivátů cyklodextrinů s fenolftaleinem pomocí UV/VIS absorpční spektroskopie,
4. vyhodnocení naměřených dat,
5. zhodnocení dosažených výsledků.

## 2 Přehled problematiky

### 2.1 Cyklodextriny a jejich typy

Cyklodextriny (CD) patří mezi cyklické oligosacharidy složené z podjednotek D-glukopyranosy<sup>1</sup>. Podjednotky jsou spojeny  $\alpha$ -(1,4) glykosidickou vazbou. Základní typy CD se skládají z 6, 7 nebo 8 glukopyranosových jednotek (n) nazývaných  $\alpha$ ,  $\beta$  a  $\gamma$ -CD (Obr. 2.1).

French<sup>2</sup> zjistil, že kromě těchto základních druhů existují ještě další typy CD s více glukopyranosovými jednotkami, například s devíti ( $\delta$ ), desíti ( $\epsilon$ ), jedenácti ( $\zeta$ ) nebo dvanácti ( $\eta$ )<sup>3,4</sup>. Podrobněji popsán byl pouze  $\delta$ -CD<sup>5</sup>. Avšak ani jeden z těchto druhů již netvoří symetrické struktury.



Obr. 2.1: Chemická struktura  $\alpha$ -CD,  $\beta$ -CD,  $\gamma$ -CD. (převzato z citace<sup>6</sup>)

#### 2.1.1 Historie cyklodextrinů

Historie CD se váže k roku 1891<sup>3</sup>, kdy francouzský lékárník Antoine Villiers studoval kultivaci *Bacillus amylobacter* (*Clostridium Butyricum*) v přítomnosti škrobu. Během pokusu rozkladu a redukce působením kvasinek zaznamenal tvorbu krystalů, které měly zvláštní vlastnosti. Získal poměrně malé množství krystalů<sup>1</sup>, přibližně 3 g na 1 kg škrobu. Krystalický produkt nazval cellulodin.

Na počátku 20. století rakouský bakteriolog Franz Schradinger studoval mikroorganismy, které jsou odolné vůči teplu<sup>2</sup>. V roce 1903 objevil, že tyto organismy jsou schopné degradovat škrob a produkovat krystaly podobné cellulodinu jako



vedlejší produkty. Jodometrickým testem zjistil přítomnost dvou typů dextrinů krystalické formy A a krystalické formy B.

Do historie CD významně přispěl německý chemik a biochemik Hans Pringsheim, který se zabýval strukturou pektinu a amylopektinu<sup>4</sup>. Uvedl, že Schradingerovy dextriny vznikly depolymerací škrobu na základní jednotky, amylosová frakce se štěpila na  $\alpha$ -dextriny a amylopektinová frakce na  $\beta$ -dextriny. Pomocí jodové reakce rozlišil tyto dva typy dextrinů, roztok  $\alpha$ -dextrinu reakcí poskytl žlutozelenou barvu a  $\beta$ -dextrinu barvu červenohnědou. Chybně však uvedl počet glukopyranosových jednotek. Dále stanovil molekulovou hmotnost pomocí kryoskopie.

Na počátku třicátých let 20. století dospěl Karl Johann Freudenberg se svými kolegy k závěru, že Schradingerovy dextriny se skládají z maltózových jednotek a obsahují pouze  $\alpha$ - (1,4) glykosidické vazby<sup>3</sup>. Uvedl také, že CD mají vnitřní povrch dutiny hydrofobní a jsou schopny tvořit inkluzní komplexy.

Na počátku padesátých let 20. století začaly vědecké týmy D. Frenche a F. Cramera intenzivně pracovat na enzymatické produkci CD, dělení produktů na čisté složky a na charakterizaci skutečných fyzikálně-chemických vlastností těchto látek<sup>2</sup>. Na základě jejich výzkumu vyšel v roce 1953 patent, který popisuje aplikaci CD ve farmacii.

V roce 1935 Dexter French vyslovil hypotézu, že kryoskopická metoda používaná Freudenbergem pro stanovení molekulových hmotností byla nevhodná. Pro určení molekulových hmotností v roce 1942 použil rentgenovou difrakci a určil i přesný počet glukopyranosových jednotek základních typů CD.

## 2.1.2 Vlastnosti a struktura cyklodextrinů

Cyklodextriny se vyrábí specifickou enzymovou hydrolyzou škrobu enzymem cyklodextringlukotransferasou<sup>6</sup>. Jsou řazeny mezi chelatační činidla schopné tvořit supramolekulární komplexy. Supramolekulární látky se vyznačují přítomností dutiny neboli kavity, často jsou studovány jako hostitelské molekuly pro molekuly hostující<sup>7</sup>, které jsou schopny dovnitř kavity vstoupit a vytvořit inkluzní komplex hostitel-host (H-G komplex).

Jednotlivé typy CD se díky své rozdílné velikosti vyznačují různými fyzikálně-chemickými vlastnostmi uvedenými v tabulce 2.1 (převzato z publikace<sup>8</sup>). Vazby mezi glukopyranosovými jednotkami nejsou schopny volně rotovat, z tohoto důvodu nemají

molekuly dokonale válcovitý tvar, připomínají tvar komolého kužele<sup>5</sup>. CD mají tři typy hydroxylových skupin. Základní v pozici C6, nejkyselější v pozici C2 a v pozici C3 je hydroxylová skupina nejméně přístupná. Skupiny na C2 a C3 se nacházejí na širším okraji molekuly, C6 na užším okraji. Kavita má nepolární charakter díky glykosidickým kyslíkům a vodíkovým atomům vázaných na uhlíky glukopyranos v polohách 3, 5 a částečně 6 (Obr. 2.2).

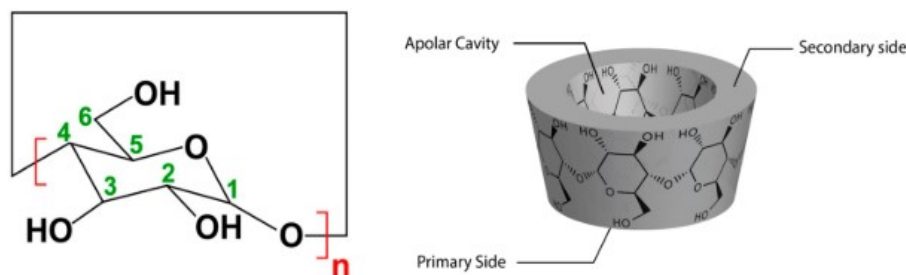
CD s nejmenší velikostí kavity je  $\alpha$ -CD, který je schopen vázat molekuly s nízkou molekulovou hmotností nebo sloučeniny s postranními alifatickými řetězci<sup>1</sup>.

Nejběžněji používaným je  $\beta$ -CD<sup>1</sup>. Je nejvíce prostudován z hlediska účinku na člověka. Do své kavity je schopen vázat aromatické látky a heterocyklické sloučeniny.

Pravděpodobně nejméně toxický ze základních typů CD je  $\gamma$ -CD, ovšem jeho komplexační vlastnosti jsou nižší než u  $\beta$ -CD. Komplexy mají tendenci se ve vodných roztocích shlukovat a může tak vznikat zákal. Vzhledem k velikosti jeho kavity je schopný pojmout větší molekuly, například makrocykly a steroidy.

Tab. 2.1: Fyzikálně-chemické vlastnosti  $\alpha$ -CD,  $\beta$ -CD,  $\gamma$ -CD.

| Fyzikálně-chemické vlastnosti        | $\alpha$ -CD                                    | $\beta$ -CD                                     | $\gamma$ -CD                                    |
|--------------------------------------|---|---|---|
| Počet D-glukopyranosových jednotek   | 6   | 7   | 8   |
| Chemický vzorec                      | C <sub>36</sub> H <sub>60</sub> O <sub>30</sub> | C <sub>42</sub> H <sub>70</sub> O <sub>35</sub> | C <sub>48</sub> H <sub>80</sub> O <sub>40</sub> |
| Molární hmotnost                     | 972   | 1135  | 1297  |
| Průměr dutiny (nm)                   | 0,5–0,6   | 0,6–0,8   | 0,8–1   |
| Vnější průměr (nm)                   | 1,4–1,5   | 1,5–1,6   | 1,7–1,8   |
| Teplota tání (°C)                    | 275   | 280   | 275   |
| pK <sub>a</sub> při 25 °C            | 12,3  | 12,2  | 12,1  |
| log P při 25 °C                      | –13   | –14   | –17   |
| Rozpustnost ve vodě při 25 °C (%w/v) | 14,5  | 1,85  | 3,2   |



Obr. 2.2 D-glukopyranosová jednotka a tvar molekuly CD. (převzato z citace<sup>3</sup>)

### 2.1.3 Deriváty cyklodextrinů

Původní typy CD ( $\alpha$ ,  $\beta$  a  $\gamma$ ) mají omezenou použitelnost vzhledem k jejich tvaru a velikosti dutiny, ale zejména kvůli dostupnosti užitečných funkčních skupin<sup>9</sup>. Cílem modifikací původních typů CD je získání derivátů, které se mohou vyznačovat lepšími vlastnostmi a stávají se tak využitelnějšími. Mezi tyto vlastnosti patří například zlepšení jejich rozpustnosti v požadovaném rozpouštědle, zvýšení<sup>5</sup> rozsahu komplexace či snížení reaktivity a mobility hosta<sup>10</sup>. Snahou derivatizace je selektivně přeměnit hydroxylové funkční skupiny na jiné funkční skupiny v závislosti na předpokládaném užití. Parametr<sup>11</sup>, který vyjadřuje průměrný počet substituovaných skupin na jednu cyklodextrinovou jednotku se nazývá stupeň derivatizace (DS). Zmíněný parametr neudává informace o poloze (2, 3 nebo 6) ani typu (primární či sekundární) substituované hydroxylové skupiny ani o druhu substituentu. Hodnotu DS lze měřit různými metodami, například měkkou ionizační hmotnostní spektrometrií, NMR spektroskopií či plynovou chromatografií. V závislosti na použité metodě vznikají rozdíly v naměřených hodnotách.

Deriváty CD nacházejí uplatnění zejména ve farmaceutickém, potravinářském průmyslu a ochraně životního prostředí<sup>12</sup>. Využívají se jako solubilizační činidla, separační činidla, enzymové modely či adsorbenty látek znečišťující životní prostředí<sup>13,14</sup>. Modifikací se nejvíce využívá u  $\beta$ -CD, který se vyznačuje nízkou rozpustností, jak udává tabulka 3.1, ale i vhodnou velikostí pro tvorbu inkluzního komplexu<sup>5</sup>.

Mezi průmyslově významné deriváty patří například ve vodě rozpustný HP- $\beta$ -CD či raMe- $\beta$ -CD. Vzhledem ke své heterogenitě<sup>15</sup> nemohou tyto deriváty CD snadno

krystalizovat, což je výhodou pro výrobu kapalných lékových forem. Derivát HP- $\beta$ -CD<sup>16</sup> je přítomný i ve vakcíně Janssen od společnosti Johnson & Johnson proti onemocnění SARS-CoV-2. HP- $\beta$ -CD<sup>17</sup> má zde údajně funkci proteinového stabilizátoru, je totiž schopný do své hydrofobní kavity navázat proteiny obsažené ve vakcíně a zabránit tak jejich agregaci a adsorpci na stěny zásobních nádob.

## 2.2 Vznik inkluzního komplexu

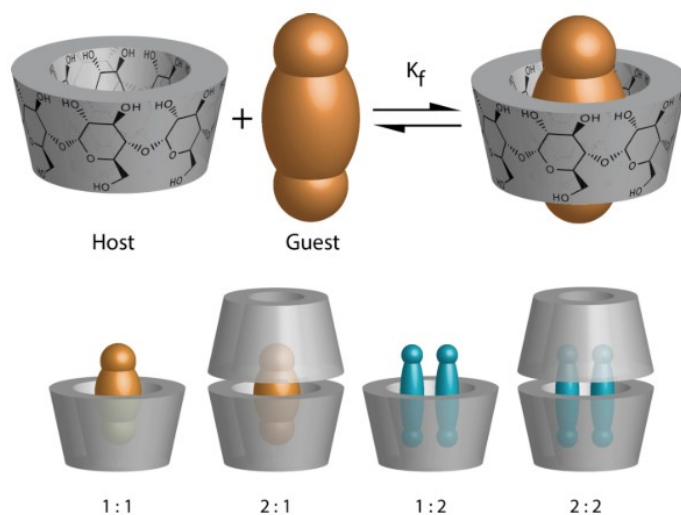
Jednou z významných vlastností CD kavity je schopnost tvorby inkluzních komplexů typu hostitel-host (H-G komplex). Vznik supramolekulárního komplexu závisí na velikosti kavity hostitele, velikosti molekuly hosta a na přítomnosti vhodných funkčních skupin hostitele i hosta<sup>1</sup>. Do určité míry mohou vznik komplexu ovlivnit i termodynamické interakce mezi různými složkami systému, a to mezi CD, hostem a rozpouštědlem. Hosty mohou být organické ale i anorganické molekuly<sup>18</sup>.

U inkluzního komplexu se jedná o mezimolekulovou interakci mezi hydrofobní kavitou CD (hostitelem) a hostem, ve které se neuplatňují žádné kovalentní vazby, přitažlivost molekul je většinou způsobena van der Waalsovými silami<sup>19</sup>. Obecně existují čtyři energeticky příznivé interakce, které pomáhají posunout rovnováhu a ve prospěch tvorby inkluzního komplexu<sup>1</sup>. Jedná se o:

1. vytěsnění polárních molekul vody z nepolární kavity cyklodextrinu,
2. zvýšení počtu vodíkových vazeb vznikajících při návratu vytlačené vody z kavity CD-hostitele do vodného prostředí,
3. snížení odpuzivých sil mezi hostem a vodným prostředím,
4. zvýšení hydrofobních interakcí, ke kterému dojde při vstupu hosta do nepolární kavity CD.

Aby mohl H-G komplex vzniknout, musí být molekula hosta méně polární než použité rozpouštědlo<sup>3</sup>. Pouze za těchto podmínek nahradí host molekuly rozpouštědla v lipofilní kavitě CD<sup>20</sup>. Molekula hosta, která obsahuje polární a nepolární část se do kavity váže van der Waalsovými silami svou nepolární částí. Hydroxylové skupiny na okraji molekuly CD tvoří vodíkové můstky s polární částí hosta.

Stechiometrický poměr komplexace H : G je ve většině případů 1 : 1. Nicméně existují i další, komplikovanější stechiometrie supramolekulárních komplexů (Obr. 2.3).

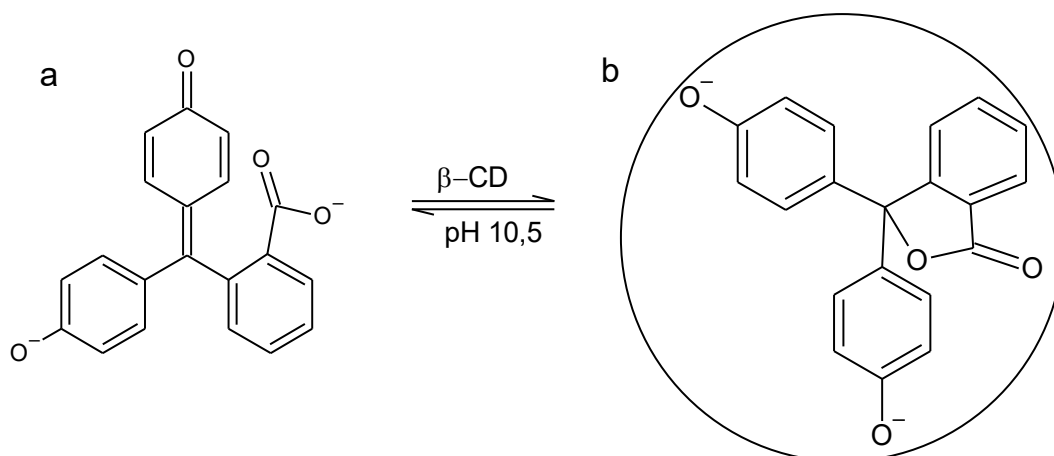


Obr. 2.3: Stechiometrie při interakci volného CD a hosta při vzniku supramolekulárního komplexu host-CD. (převzato z citace<sup>3</sup>)

## 2.3 Interakce fenolftaleinu s cyklodextriny

Fenolftalein je organická aromatická molekula málo rozpustná ve vodě, která se často využívá jako indikátor<sup>21</sup> při acidobazických titracích. Neionizovaná forma fenolftaleinu je bezbarvá, deprotonovaná forma je jasně fialová.

Tvorba komplexu  $\beta$ -CD s fenolftaleinem je naznačena na obrázku 2.4. Po přidání CD do alkalického roztoku fenolftaleinu dojde vlivem supramolekulární interakce k přesunu fenolftaleinu do kavity CD<sup>22,21</sup>. Ionizovaný fenolftalein, který je uzavřen do kavity se mění na laktonovou formu (laktonový dianion) a dochází k částečnému odbarvení původního roztoku.



Obr 2.4: Fenolftalein ve formě dianionu (a), fenolftalein ve formě laktonového dianionu v kavitě  $\beta$ -CD (b). (převzato z citace<sup>21</sup>, schéma vytvořeno v programu ChemSketch)

### 2.3.1 Fenolftaleinová metoda

Fenolftaleinová metoda je metoda stanovení vazebné konstanty a je založena na změně absorbance v důsledku tvorby inkluzního komplexu mezi CD a PP. Výhodou využití fenolftaleinu je jeho výrazná absorbance s maximem kolem 550 nm, tj. v oblasti, kde je absorbance derivátů CD, jakož i vzniklého inkluzního komplexu zanedbatelná. Pokles absorbance fenolftaleinu koreluje s hodnotou počáteční koncentrace CD. Jsou známy faktory, které ovlivňují toto stanovení<sup>23</sup>. Jedním z důležitých je čas, přesněji jaký vliv má doba mezi okamžikem přípravy H-G komplexu a odečtem absorbance. Dále je významný vliv pH a přesnost realizace koncentrací jednotlivých složek měřeného roztoku.

Absorpční spektrofotometrií inkluzního komplexu s fenolftaleinem byla stanovována i čistota  $\beta$ -CD<sup>24</sup>. Další široce používanou metodou pro stanovení čistoty CD je HPLC.

### 2.4 Vazebná konstanta

Základním parametrem pro popis komplexace mezi hostem a hostitelem je konstanta stability  $K$ , která je závislá na síle jejich nekovalentní interakce<sup>25</sup>.

Komplexace je rovnovážný proces. Konstantu stability lze určit z jakékoli vlastnosti systému závislé na komplexaci, např. z rozpustnosti, tlaku par rozpouštědla, povrchového napětí nebo optické absorpce. Nejdostupnější a zároveň přesnou metodou je absorpční spektroskopie<sup>18</sup> a je obvykle využívána ke studiu stability inkluzních sloučenin s různými barvivy.

Nejvhodnějšími veličinami pro hodnocení komplexace z termodynamického hlediska jsou entalpie ( $\Delta H$ ), entropie ( $\Delta S$ ) a Gibbsova energie ( $\Delta G$ ). Jejich vzájemný vztah popisují rovnice (2.1–2.3):

$$\Delta G = -RT \ln K \quad (2.1)$$

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (2.2)$$

$$\ln K = (-\Delta H/R) \times (T^{-1}) + (\Delta S/R) \quad (2.3)$$

kde  $R$  je molární plynová konstanta ( $8,314 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ ),  $T$  je termodynamická teplota.

Spojením rovnic (2.1) a (2.2) vzniká rovnice (2.3) – van't Hoffův vztah. Základní rovnice pro vazebnou rovnováhu, která vyjadřuje komplexaci hostitel (CD)- host (PP) vyjadřují rovnice (2.4–2.5). Rovnice (2.5) vyjadřuje vztah pro vazebnou konstantu vyjádřen pomocí Guldberg-Waagova zákona.



$$K = [\text{CD} - \text{PP}]_r / ([\text{CD}]_r^a [\text{PP}]_r^b) \quad (2.5)$$

Pro stechiometrii  $H : G$ , která je rovna  $1 : 1$  lze odvodit konstantu stability  $K$  následovně. Rovnovážné koncentrace složek z rovnice (2.5) mohou být vyjádřeny:

$$[\text{CD} - \text{PP}]_r = \alpha \quad (2.6)$$

$$[\text{CD}]_r = [\text{CD}]_0 - \alpha \quad (2.7)$$

$$[\text{PP}]_r = [\text{PP}]_0 - \alpha \quad (2.8)$$

Koncentraci vzniklého komplexu vyjadřuje symbol  $\alpha$ . Hodnotu  $\alpha$  lze získat po vložení rovnic (2.6–2.8) do rovnice (2.5). Vznikne kvadratická rovnice (2.9), jejímž řešením získáme dvě řešení, pouze hodnota  $\alpha$  odpovídající zápornému znaménku u druhého členu má fyzikálně-chemický význam.

$$\alpha = ([\text{PP}]_0 + [\text{CD}]_0 + K^{-1})/2 \pm (\sqrt{([\text{PP}]_0 + [\text{CD}]_0 + K^{-1})^2 - 4[\text{PP}]_0[\text{CD}]_0})/2 \quad (2.9)$$

Absorbance roztoku směsi H + G je u fenolftaleinové metody úměrná pouze koncentraci nevázané formy barviva. Z Lambert-Beerova zákona pak vyplývá:

$$A = A(0) \times ([\text{PP}]_r/[\text{PP}]_0) = A_0 \times (1 - \alpha/[\text{PP}]_0) \quad (2.10)$$

kde  $A(0) = A_0$  je absorbance fenolftaleinu při nulové koncentraci CD derivátu. Pro  $\alpha$  lze využít výraz z rovnice (2.9). Z naměřených hodnot absorbance pro různé koncentrace  $[\text{CD}]$  a  $[\text{PP}]$  a z počáteční hodnoty absorbance fenolftaleinu  $A_0$  lze nelineární optimalizací získat hodnotu  $K$ .

## 2.4.1 Jobova metoda

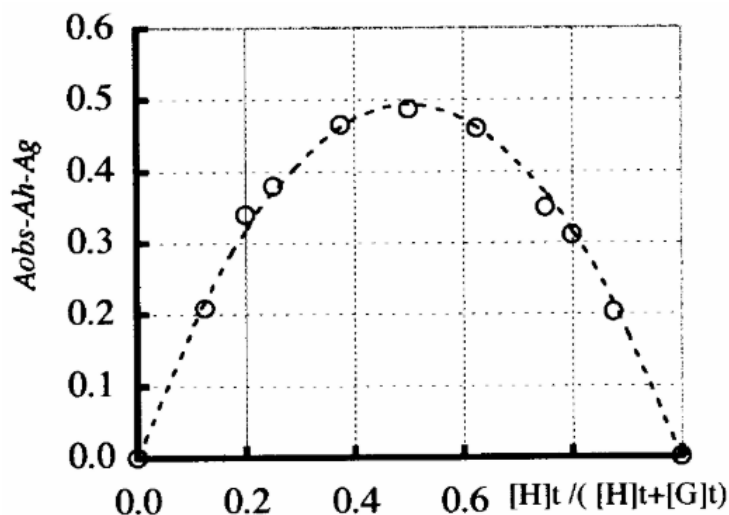
Jobova metoda<sup>26</sup>, která je také nazývána metodou kontinuálních variací je nejběžněji používanou metodou pro určení stechiometrie chemické rovnováhy.

Při experimentu je využíváno roztoků H a G o vhodných koncentracích, tak aby celková koncentrace rozpuštěných látek byla konstantní, avšak systematicky měníme poměr koncentrací obou látek<sup>27</sup>. Celková molární koncentrace dvou vazebných partnerů je tedy konstantní, liší se jejich molární zlomky. Výsledná stechiometrie se určuje z maxima křivky znázorňující obrázek 2.5. V případě stechiometrie, která odpovídá poměru 1 : 1, maximum na křivce odpovídá hodnota 0,5.

Pokud je ve vzorku přítomen více než jeden typ komplexu (kromě komplexu se stechiometrií 1 : 1), např. další komplex se stechiometrií 1 : 2 nebo 2 : 1, je zmíněná



metoda nedostačující<sup>28</sup>. Zmíněné typy komplexů [HG], [HG<sub>2</sub>] se mohou vyznačovat odlišnými fyzikálními vlastnostmi. I přes zmíněné nedostatky je Jobova metoda často upřednostňována před jinými, výhodnějšími metodami<sup>29</sup>.



Obr. 2.5: Jobův graf při tvorbě supramolekulárního komplexu o stechiometrii 1 : 1. (převzato z citace<sup>25</sup>)

## 2.5 Chyby měření stanovovaných veličin

Při určování fyzikálních veličin je potřeba vzít v úvahu způsob jejich získávání a vyhodnocování. Skutečná hodnota se může lišit od hodnoty stanovené, přičemž jejich rozdíl – chyba měření – může mít různý původ (měřený objekt, prostředí, měřicí metoda, měřicí zařízení, apod.)<sup>30</sup>. Při stanovení konstanty stability a měření Jobových grafů je proto potřebné stanovit chybu měření. V případě, že náhodné chyby nelze stanovit (nedostatečný soubor dat), je nezbytné stanovit systematickou chybu.

### 2.5.1 Maximální chyba měření koncentrace při měření Jobových grafů

Při nepřímých měřeních veličin, kdy daná veličina je určována pomocí fyzikálního vztahu z hodnot jiných veličin, lze stanovit systematickou chybu pomocí střední nebo maximální chyby měření<sup>30</sup>. Tyto chyby jsou určovány pomocí chyb stanovení jednotlivých veličin (chyb měřidel) a vztahu pro přírůstek funkce více proměnných. Pro

posouzení vlivu jednotlivých systematických chyb měřených veličin je výhodnější pracovat s maximální chybou měření. Při stanovení koncentrace HG komplexu při určování jeho stechiometrie pomocí Jobových grafů jsou měřeny tři veličiny. Uvažujme obecnou funkci  $y$  tří proměnných:

$$y = f(a, b, c) \quad (2.11)$$

Maximální chyba stanovení veličiny  $\Delta y_{max}$  je dána vztahem<sup>30</sup>:

$$\Delta y_{max} = |(\partial y)/(\partial a)|\Delta a + |(\partial y)/(\partial b)|\Delta b + |(\partial y)/(\partial c)|\Delta c \quad (2.12)$$

Rovnovážná hodnota koncentrace komplexu  $y = [HG]$  je dána rozdílem koncentrací roztoku fenolftaleinu bez CD (nominální koncentrace PP) a roztoku s přídavkem CD:

$$y = c_{PP} - c_{roztok} \quad (2.13)$$

přičemž koncentraci fenolftaleinu v roztoku lze vyjádřit pomocí absorbance a molárního extinkčního koeficientu uvážením Lambert-Beerova zákona:

$$y = c_{PP} - (A_{roztok})/(\alpha_{PP}) \quad (2.14)$$

Chyba  $\Delta y_{CD-PP}$  stanovení koncentrace PP v roztoku PP + CD je:

$$\Delta y_{CD-PP} = \Delta c_{PP}(1)/(\alpha_{PP})\Delta A + (A_{roztok})/(\alpha_{PP}^2)\Delta \alpha \quad (2.15)$$

Použití vztahu (2.12) na rovnici (2.14) vede k výrazu pro maximální chybu určení koncentrace HG komplexu:

$$\Delta y = \Delta c_{HG} = \Delta c_{PP} + (\Delta A)/(\alpha_{PP}) + (A_{roztok})/(\alpha_{PP}^2)\Delta \alpha \quad (2.16)$$

## 2.5.2 Chyba stanovení veličiny při nelineárním fitování

Konstanta stability byla určována nelineárním fitováním experimentálních dat (absorbance fenolftaleinu při 552 nm jako funkce počáteční koncentrace cyklodextrinu) pomocí programu Microcal Origin. Fitovací funkce odpovídala matematickému zápisu v rovnici (2.10), přičemž místo parametru  $\alpha$  byl použit odpovídající výraz (záporné znaménko u druhého členu) z rovnice (2.9). Fitovanými parametry byla kromě hodnoty konstanty stability  $K$  i hodnota počáteční absorbance  $A_0$ .

Matematický postup určení systematické chyby fitovaného parametru není jednoduchý, vychází se z nelineárních regresních metod. V programu Microcal Origin<sup>31</sup> se při nelineárním fitování vychází z maticové funkce:

$$Y = f(X, \beta) + \varepsilon \quad (2.17)$$

kde  $X$ ,  $Y$  jsou sloupcové matice nezávisle, resp. závisle proměnných a  $\beta$  je sloupcová matice fitovaných parametrů a  $\varepsilon$  sloupcová matice odpovídající náhodné složce chyb veličin. Standardní chyba fitovaného parametru  $\beta$  je určena jako odmocnina odpovídajícího diagonálního prvku ve varianční matici. Varianční matice je konstruována v Levenberg-Marquartově metodě pomocí Jakobího matice a nestranného odhadu parametru  $\sigma$ . Nestranný odhad parametru  $\sigma$  je dán vztahem:

$$\sigma^2 = (S_e)/(n - p) \quad (2.18)$$

kde  $S_e$  je reziduální součet čtverců odchylek,  $n$  je počet nezávisle proměnných (fitovaných dat) a  $p$  je počet parametrů.

## 3 Experimentální část

Existuje řada metod, kterými lze určit konstantu stability vzniklého komplexu<sup>28</sup>. Kromě UV/VIS spektrofotometrie lze využít i fluorescenční spektroskopii, NMR či titrační kalorimetrii. Nejuniverzálnější je kalorimetrická metoda umožňující stanovení nejen konstanty stability, ale také termodynamických funkcí. Ovšem získané hodnoty konstant stability se liší právě podle zvolené metody<sup>18</sup>.

### 3.1 Použité přístroje a chemikálie

K měření byly použity následující přístroje a pomůcky:

- světelný vláknový zdroj Avantes AvaLight DHc
- analytické váhy Denver SI-234A (přesnost 0,1 mg)
- vláknový spektrometr Avantes ULS3648TEC
- optické vlákno Avantes, core 200 nm, délka 2 m
- optické vlákno Avantes, core 600 nm, délka 25 cm
- kolimační čočky Avantes COL-UV/VIS
- pH-metr Jenway 3540 se skleněnou elektrodou
- automatické pipety Gilson M10, M100, M1000, P5000

K měření absorpčních spekter byl použit UV/VIS vláknový spektrometr Avantes ULS3648TEC spolu s halogen-deuteriovou lampou AvaLight DHc. Optické záření z AvaLight zdroje vedlo přes 2 m optické vlákno do držáku křemenné kyvety a po průchodu kyvetou bylo světlo vedeno pomocí 25 cm optického vlákna do spektrometru. Pro úpravu pH pufru byl použit pH-metr Jenway se skleněnou elektrodou. V tabulce 3.1 jsou uvedeny použité chemikálie včetně výrobce a relativní molární hmotnosti  $M_r$  studovaných derivátů cyklodextrinů.

Tab. 3.1: Použité chemikálie včetně specifikace.

| Látka              | Výrobce            | Specifikace<br>výrobce | $M_r$   | DS*  |
|--------------------|--------------------|------------------------|---------|------|
| Fenolftalein       | Sigma Aldrich      | –                      | 318,33  | –    |
| NaHCO <sub>3</sub> | Penta              | –                      | 84,01   | –    |
| NaOH               | Lachema            | –                      | 40,00   | –    |
| β-CD               | Sigma Aldrich      | –                      | 1134,98 | –    |
| γ-CD               | Sigma Aldrich      | –                      | 1297,12 | –    |
| HP-β-CD            | Cyclolab, Budapešť | B-030/15               | 1396,45 | 4,5  |
| HP-γ-CD            | Cyclolab, Budapešť | Cyl 4130               | 1576,08 | 4,8  |
| RaMe β-CD          | Cyclolab, Budapešť | B-066/18               | 1303,00 | 12,0 |
| RaMe-γ-CD          | Cyclolab, Budapešť | CY-3004.1/<br>Cyl 4687 | 1465,20 | 12,0 |
| pH pufr            | Carl Roth          | –                      | –       | –    |

\*Parametry DS (degree of substitution) převzaty z webové stránky: <https://cyclolab.hu/>

### 3.2 Popis spektrofotometrické titrace

Vlastní měření probíhalo dávkováním příslušných objemů roztoku fenolftaleinu v pufru, roztoku CD a samotného pufru do spektroskopické UV/VIS kyvety pomocí automatických pipet. Byly zvoleny optimální koncentrace CD. Během měření bylo kontrolováno, zda nejsou ve špičce pipety bublinky. Celkový objem roztoku v optické kyvetě byl 3 ml. Po nadávkování byl roztok v kyvetě míchán na magnetickým míchadlem po dobu 15 sekund. Před měřením bylo kontrolováno, zdali nejsou na stěnách kyvety bubliny a zda nejsou znečištěny stěny kyvety. Nežádoucí bublinky byly odstraňovány poklepem o sklo nebo kov, stěny kyvety byly čištěny do konstantní absorbance roztoku.

## 3.3 Příprava roztoků

### 3.3.1 Příprava roztoků pro měření konstanty stability

Hydrogenuhličitanový pufr o koncentraci 0,1 M a pH = 10,5 byl připraven navážením odpovídajícího množství hydrogenuhličitanu sodného podle tabulky 3.2. Pomocí 6 M roztoku hydroxidu sodného a Pasteurovy pipety bylo pH pomocí pH-metru nastaveno na hodnotu 10,5 při 25 °C. pH metr byl kalibrován pomocí roztoků o pH = 7 a pH = 10. Výsledná kalibrace byla testována pomocí pufru pH = 11, přesnost kalibrace byla  $\pm 0,02$ .

100 ml 0,5 mM roztoku fenolftaleinu bylo připraveno navážením odpovídajícího množství látky a rozpuštěním v hydrogenuhličitanovém pufru (pH = 10,5). Fenolftalein se rozpouštěl pomalu a roztok byl zahříván na 55 °C přibližně 22 hodin – poté byl roztok čirý. Roztok byl uchováván ve tmě, absorbance roztoku v čase postupně klesala, pro měření byly používány roztoky fenolftaleinu do jednoho týdne od přípravy.

5 mM roztoky  $\beta$ -CD,  $\gamma$ -CD, HP- $\beta$ -CD, HP- $\gamma$ -CD, RaMe- $\beta$ -CD, RaMe- $\gamma$ -CD byly připraveny navážením odpovídajících množství látek podle tabulky 3.2 a rozpuštěny v připraveném pufru v 10 ml odměrných baňkách. Roztok  $\beta$ -CD byl nejméně rozpustný; pro úplné rozpuštění  $\beta$ -CD bylo nutné zahřívání roztoku v termobloku cca 4 hodiny.

Navážka konkrétní látky  $i$  byla vypočtena pomocí rovnice (3.1).

$$m_i = n_i \times M_i = c_i \times V_r \times M_i = c_i \times M_i \times V_r \quad (3.1)$$

Všechny studované CD deriváty byly před použitím vakuově sušeny při teplotě 90°C po dobu cca 6 hodin. U HP-CD derivátů bylo uvolňování vody při snižování tlaku velice bouřlivé. Optimálním řešením pro kontrolované sušení CD derivátů bylo umístění vzorků k sušení v 2 ml vialce s pootevřeným víkem a její vložení do Schlenkovy zkumavky v termobloku.

Tab. 3.2: Koncentrace a celkové objemy připravených roztoků.

| Látka              | $c$    | $V_{\text{celk}}$<br>(ml) | $m$ navážka<br>(mg) |
|--------------------|--------|---------------------------|---------------------|
| PP                 | 0,5 mM | 100                       | 15,9                |
| NaHCO <sub>3</sub> | 0,1 M  | 1000                      | 8401,0              |
| NaOH               | 6,0 M  | 10                        | 2400,0              |
| $\beta$ -CD        | 5,0 mM | 10                        | 56,8                |
| $\gamma$ -CD       | 5,0 mM | 10                        | 64,9                |
| HP- $\beta$ -CD    | 5,0 mM | 10                        | 69,8                |
| HP- $\gamma$ -CD   | 5,0 mM | 10                        | 78,8                |
| raMe- $\beta$ -CD  | 5,0 mM | 10                        | 65,2                |
| raMe- $\gamma$ -CD | 5,0 mM | 10                        | 73,3                |

Příslušné objemy roztoků byly podle tabulky 3.3 pipetovány do 3 ml kyvety a následně byla proměřena absorbance.

Tab. 3.3: Objemy roztoků pipetované do spektroskopické kyvety.

| $c$ CD<br>(mM) | $V$ 0,5 mM PP<br>(ml) | $V$ 5 mM CD<br>(ml) | $V_{\text{pufr}}$<br>(ml) |
|----------------|-----------------------|---------------------|---------------------------|
| 0,00           | 0,18                  | 0,000               | 2,820                     |
| 0,01           | 0,18                  | 0,006               | 2,814                     |
| 0,02           | 0,18                  | 0,012               | 2,808                     |
| 0,05           | 0,18                  | 0,030               | 2,790                     |
| 0,10           | 0,18                  | 0,060               | 2,760                     |
| 0,20           | 0,18                  | 0,120               | 2,700                     |
| 0,30           | 0,18                  | 0,180               | 2,640                     |
| 0,40           | 0,18                  | 0,240               | 2,580                     |
| 0,50           | 0,18                  | 0,300               | 2,520                     |
| 1,00           | 0,18                  | 0,600               | 2,220                     |
| 2,00           | 0,18                  | 1,200               | 1,620                     |
| 4,85           | 0,18                  | 2,820               | 0,000                     |

### 3.3.2 Roztoky pro měření Jobových grafů

Pro určení koncentrace komplexu [HG] v Jobovém grafu je nutné znát hodnotu molárního absorpčního koeficientu fenolftaleinu. Tuto hodnotu lze zjistit měřením koncentrační závislosti absorbance fenolftaleinu a využitím lineární oblasti Lambert-Beerova zákona. Měření fenolftaleinu v hydrogenuhličitanovém pufru probíhalo v koncentračním rozsahu 5–40  $\mu\text{M}$ . Objemy roztoků, které byly pipetovány do kyvety jsou v tabulce 3.4.

Pro samotné měření Jobových grafů byly připraveny 50  $\mu\text{M}$  roztoky CD ředěním 5 mM zásobních roztoků a 50  $\mu\text{M}$  roztok fenolftaleinu ředěním 5 mM ethanolového roztoku. Objemy roztoků pipetované do kyvety pro měření Jobových grafů jsou v tabulce 3.5.

Tab. 3.4 Objemy roztoků pipetované do kyvety (celkový objem roztoku 2,5 ml) pro stanovení molárního absorpčního koeficientu fenolftaleinu.

| $c$ PP ( $\mu\text{M}$ ) | $V$ PP (ml) | $V$ pufr (ml) |
|--------------------------|-------------|---------------|
| 5                        | 0,25        | 2,25          |
| 10                       | 0,50        | 2,00          |
| 20                       | 1,00        | 1,50          |
| 30                       | 1,50        | 1,00          |
| 40                       | 2,00        | 0,50          |

Tab. 3.5: Objemy roztoků pipetované do kyvety pro měření Jobových grafů.

| $V$ 50 $\mu\text{M}$<br>CD (ml) | $V$ 50 $\mu\text{M}$<br>PP (ml) | $[\text{H}]_0$<br>( $\mu\text{M}$ ) | $[\text{G}]_0$<br>( $\mu\text{M}$ ) | $[\text{G}]_0/([\text{H}]_0+[\text{G}])$ |
|---------------------------------|---------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|--|
| 2,00                            | 0,50                            | 40                                  | 10                                  | 0,2                                      |
| 1,75                            | 0,75                            | 35                                  | 15                                  | 0,3                                      |
| 1,50                            | 1,00                            | 30                                  | 20                                  | 0,4                                      |
| 1,25                            | 1,25                            | 25                                  | 25                                  | 0,5                                      |
| 1,00                            | 1,50                            | 20                                  | 30                                  | 0,6                                      |
| 0,75                            | 1,75                            | 15                                  | 35                                  | 0,7                                      |
| 0,50                            | 2,00                            | 10                                  | 40                                  | 0,8                                      |

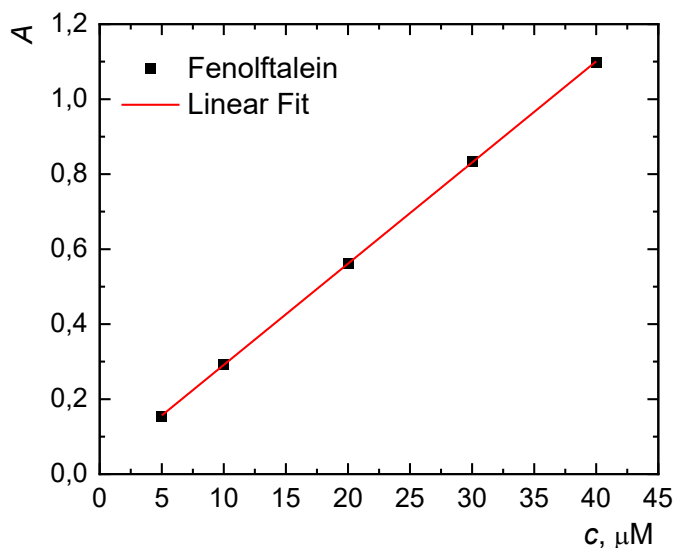


## 4 Výsledky a diskuze

### 4.1 Měření Jobových grafů

Pro určení hodnoty molárního absorpčního koeficientu byla proměřena absorbance fenolftaleinu v rozmezí koncentrací 5–40  $\mu\text{M}$ . Vzniklé roztoky o objemech 2,5 ml podle tabulky 3.4 byly míchány magnetickým míchadlem přibližně 1 minutu, následně byla změřena jejich absorbance. Pro výpočet byl uvažován koeficient lineární závislosti procházející nulou. Závislost absorbance na jednotlivých koncentracích fenolftaleinu znázorňuje obrázek 4.1. Hodnota molárního absorpčního koeficientu byla 0,0267.

Vlastní měření Jobových grafů probíhalo namícháním 2,5 ml roztoku do kyvety dle tabulky 3.4. Vzniklý roztok byl míchán magnetickým míchadlem přibližně 1 minutu, následně byla změřena absorbance. Tímto postupem byla určena stechiometrie komplexu  $\beta$ -CD-PP a  $\gamma$ -CD-PP. Jobovy grafy pro další CD deriváty nebyly z časových možností provedeny.



Obr. 4.1: Koncentrační závislost absorbance při 552 nm  $A_{552}$  pro určení molárního absorpčního koeficientu fenolftaleinu.

Systematická chyba stanovení koncentrace HG komplexu v Jobových grafech byla uvedena v teoretické části – rovnice (2.16):

$$\Delta y = \Delta c_{HG} = \Delta c_{PP} + (\Delta A)/(\alpha_{PP}) + (A_{roztok})/(\alpha_{PP}^2)\Delta\alpha \quad (4.1)$$

Tato maximální chyba byla odhadnuta pomocí chyb měřených veličin (hmotnost, objem, absorbance) a chyby molárního absorpčního koeficientu určeného nelineární regresí (viz Obr. 4.1) následovně:

$$\Delta m = 10^{-4} \text{ g}, \Delta V = 0,1 \text{ ml}, \Delta A = 0.006, \Delta\alpha = 10^{-4} \quad (4.2)$$

První člen v rovnici (2.16) lze odhadnout z definičního vztahu pro molární koncentraci:

$$c_{PP} = m/MV \quad (4.3)$$

Pro maximální chybu  $\Delta c_{PP}$  koncentrace roztoku fenolftaleinu plyne z rovnice (2.12) vztah:

$$\Delta c_{PP} = (1)/(MV) \cdot \Delta m + (m)/(MV^2\Delta V) \quad (4.4)$$

resp. pro maximální relativní chybu:

$$(\Delta c_{PP})/(c_{PP}) = (\Delta m)/(m) + (\Delta V)/(V) \quad (4.5)$$

Po dosazení odhadů z rovnice (2.17) a hodnot objemu a navážky (viz. Experimentální část) dostaneme pro první člen v rovnici (2.13) odhad:

$$\Delta c_{PP} = 500 \mu\text{M} \cdot (10^{-4}/15,9) + 0,1/100) = 0,05 \mu\text{M} \quad (4.6)$$

Pro druhý člen v rovnici (2.16) plyne:

$$(\Delta A)/(\alpha_{PP}) = (0,006)/(0,027) = 0,2 \mu\text{M} \quad (4.7)$$

a pro třetí člen:

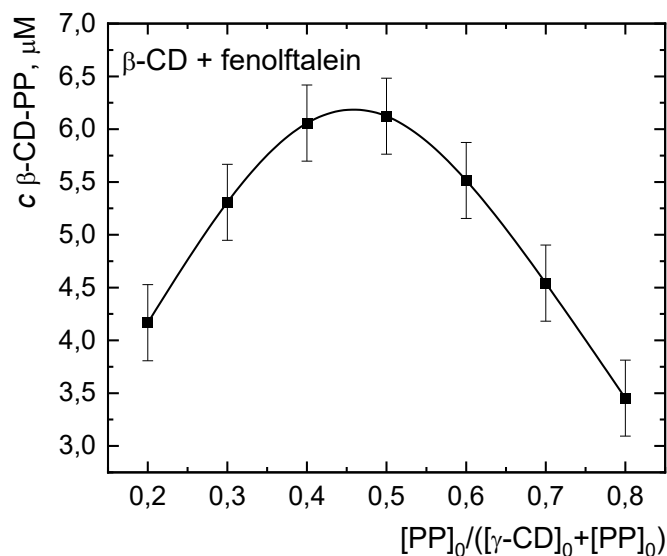
$$(A_{roztok})/(\alpha_{PP}^2)\Delta\alpha \approx 0.8/(0.027)^2 \cdot 10^{-4} = 0,11 \mu\text{M} \quad (4.8)$$

Celková systematická chyba stanovení koncentrace HG komplexu fenolftalein-CD je tedy:

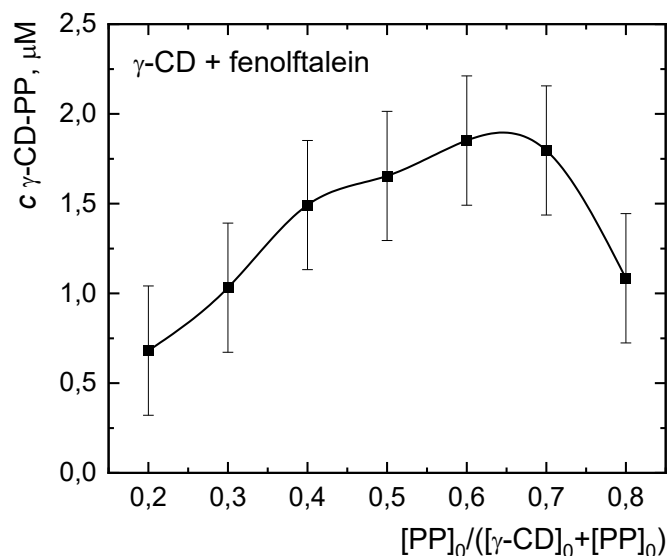
$$\Delta y_{CD-PP} = 0,36 \mu\text{M} \quad (4.9)$$

Z uvedeného rozboru plyne, že největší vliv na přesnost stanovení koncentrace má měření absorbance.

Z obrázku 4.2 vyplývá, že stechiometrie komplexu  $\beta$ -CD-PP odpovídá poměru 1 : 1. Následně byl změřen Jobův graf pro  $\gamma$ -CD-PP (Obr. 4.3), kde bylo měření ztíženo vlastnostmi  $\gamma$ -CD. Vazebná konstanta je v tomto případě nižší a nižší je proto i koncentrace komplexu HG a odpovídající změny absorbance. Bohužel vzhledem omezení přístupu k měření nebylo možné pokus opakovat. Stechiometrie komplexu  $\gamma$ -CD-PP byla v rámci maximální chyby nepřímého měření vyhodnocena rovněž jako 1 : 1.



Obr. 4.2: Jobův graf pro určení stechiometrie komplexace  $\beta$ -CD a PP.



Obr. 4.3: Jobův graf pro určení stechiometrie komplexace  $\gamma$ -CD a PP.

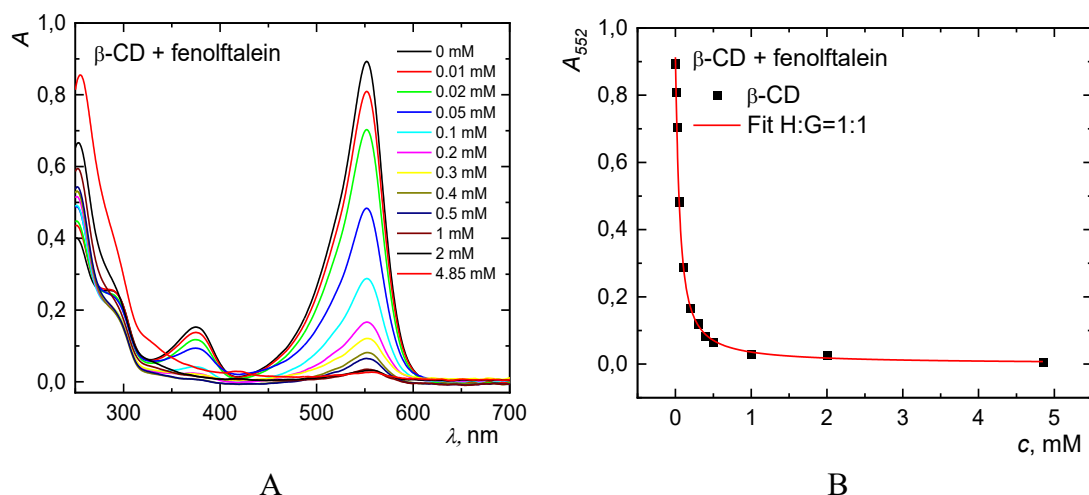
## 4.2 Stanovení konstant stability cyklodextrinů s fenolftaleinem

Byly změřeny absorbance komplexu fenolftaleinu pro různé koncentrace cyklodextrinů. Ze změřených spekter byla následně odečtena absorbance ve spektrálním maximu  $A_{\max}$  ve viditelné oblasti u vlnové délky 552 nm. Tyto hodnoty absorbance byly vyneseny do grafu jako funkce koncentrace CD. Hodnoty vazebných konstant byly vyhodnocovány za předpokladu stechiometrie H : G = 1 : 1 pomocí rovnice (2.9). Měření byla provedena pro šest různých CD derivátů.

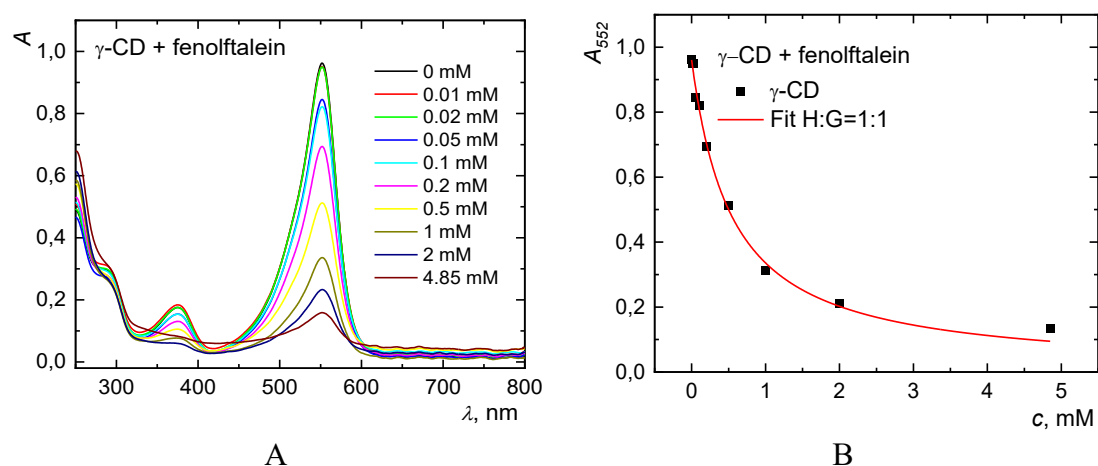
Pro upřesnění podílu optické absorpce samotných CD při vlnové délce 552 nm na celkové absorbanci roztoku byly proměřeny absorbance samotných CD bez přídavku fenolftaleinu, a to o koncentracích 1 mM, 2 mM a 5 mM. Roztoky byly připraveny ředící řadou. Získané hodnoty absorbancí CD při 552 nm byly následně odečteny od příslušných absorbancí vlastního měření, tedy od absorbancí při koncentracích 1 mM, 2 mM. U koncentrace 5 mM byla absorbance přepočítána na základě platnosti Lambert-Beerova zákona na absorbanci odpovídající koncentraci 4,85 mM. Korekce se nejvíce projevila u  $\gamma$ -CD (Tab. 4.1.).

Před každou sérií s novým vzorkem byla změřena absorbance pufru a uložena nová reference pro výpočet absorbance. Změny absorbance pufru při opakovaných měřeních se lišily o méně než 0,01 jednotek OD.

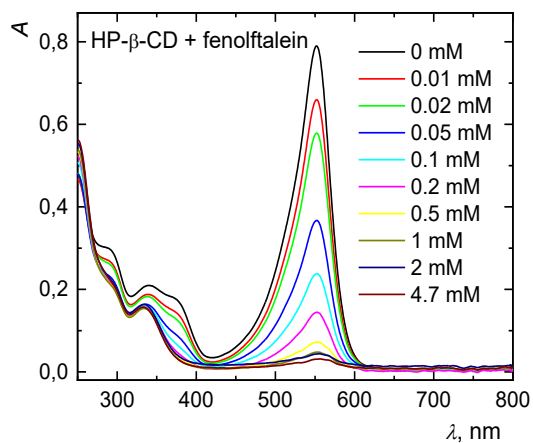
Na obr. 4.4–4.9 A jsou znázorněna absorpční spektra v závislosti na koncentraci CD pro  $[PP]_0 = 30 \mu\text{M}$  a na obr. 4.2–4.8 B jsou vyneseny závislosti absorbance roztoků  $A_{552}$  derivátů CD a fenolftaleinu pro různé koncentrace CD. Absorbance měřených roztoků klesala v závislosti na koncentraci CD v souladu s rovnicí (2.10). Z koncentračních závislostí absorbance při vlnové délce 552 nm  $A_{552}$  byly pomocí programu Microcal Origin 2016 nelineárním fitováním získány hodnoty konstant stability  $K_s$  včetně příslušné systematické chyby. Výsledky měření konstant stability jsou shrnuty v tabulce 4.1.



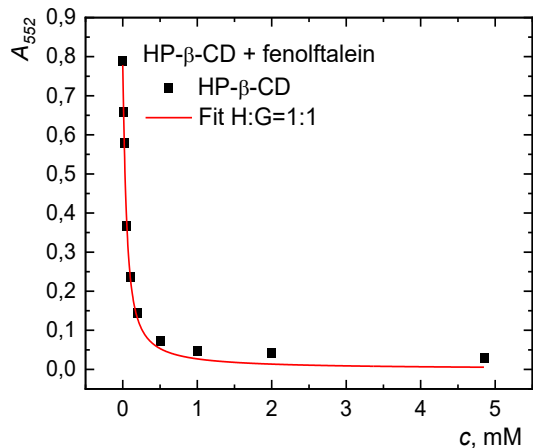
Obr. 4.4: A – Závislost absorbance  $A$  roztoku fenolftaleinu ( $[PP] = 30 \mu\text{M}$ ) pro různé koncentrace  $\beta$ -CD; B – závislost absorbance při vlnové délce 552 nm  $A_{552}$  na koncentraci  $\beta$ -CD.



Obr. 4.5: A – Závislost absorbance roztoku fenolftaleinu ( $[PP] F 30 \mu\text{M}$ ) pro různé koncentrace  $\gamma$ -CD; B – závislost absorbance při vlnové délce 552 nm  $A_{552}$  na koncentraci  $\gamma$ -CD.

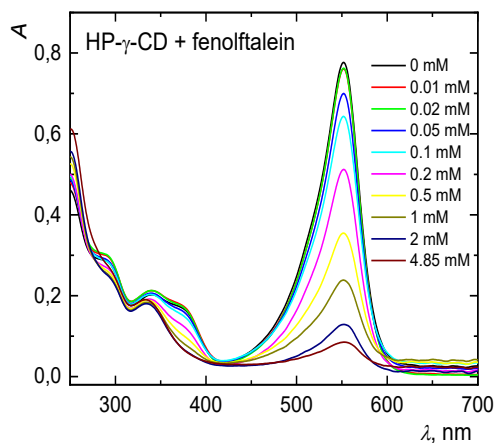


A

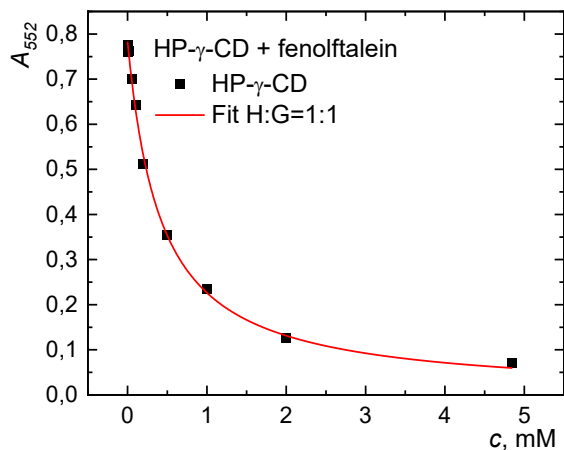


B

Obr. 4.6: A – Závislost absorbance roztoku fenolftaleinu ( $[PP] = 30 \mu\text{M}$ ) pro různé koncentrace HP- $\beta$ -CD; B – závislost absorbance při vlnové délce 552 nm na koncentraci HP- $\beta$ -CD.

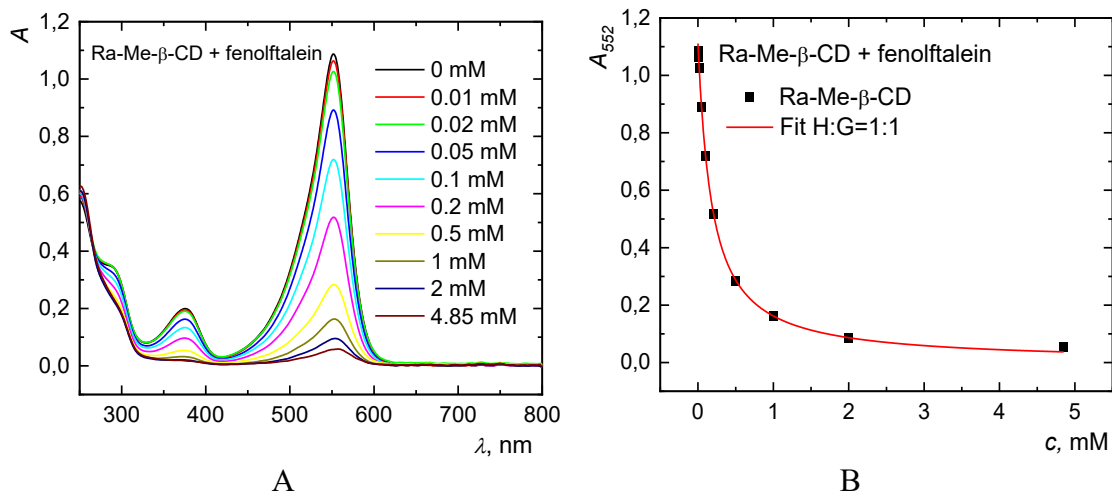


A

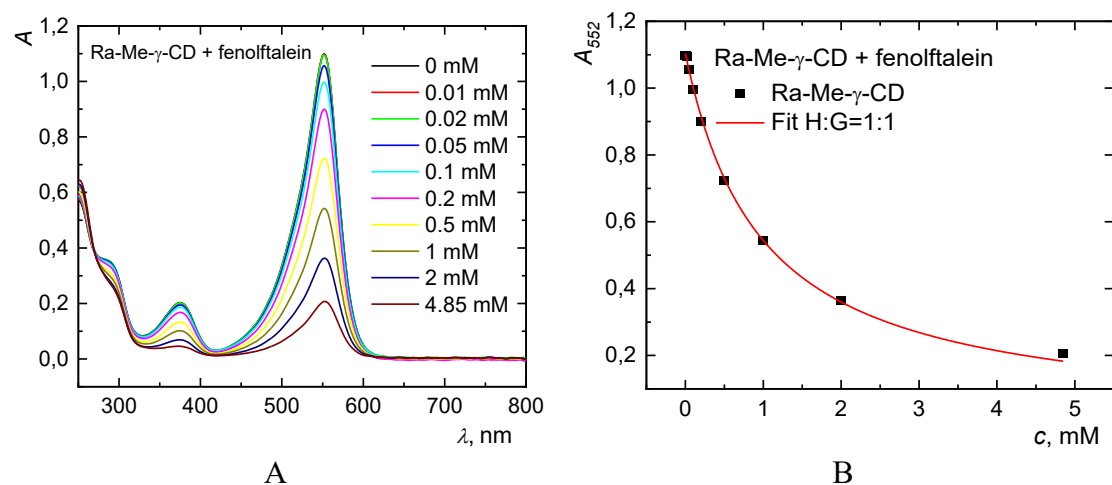


B

Obr. 4.7: A – Závislost absorbance roztoku fenolftaleinu ( $[PP] = 30 \mu\text{M}$ ) pro různé koncentrace HP- $\gamma$ -CD; B – závislost absorbance při vlnové délce 552 nm  $A_{552}$  na koncentraci HP- $\gamma$ -CD.



Obr. 4.8: A – Závislost absorbance roztoku fenolftaleinu ( $[PP] = 30 \mu\text{M}$ ) pro různé koncentrace RaMe-β-CD; B – závislost absorbance při vlnové délce 552 nm  $A_{552}$  na koncentraci RaMe-β-CD.



Obr. 4.9: A – Závislost absorbance roztoku fenolftaleinu ( $[PP] = 30 \mu\text{M}$ ) pro různé koncentrace RaMe-γ-CD; B – závislost absorbance při vlnové délce 552 nm  $A_{552}$  na koncentraci RaMe-γ-CD.

Při vyhodnocování experimentálních dat bylo zjištěno, že absorbance cyklodextrinu v pufru má u 552 nm velmi malou, nicméně nezanedbatelnou hodnotu. Bylo proto současně provedeno vyhodnocení dat s uvažováním absorbance cyklodextrinu u 522 nm a v tabulce 4.1. jsou prezentovány dvě sady hodnot konstanty stability:  $K_s$  – bez korekce a  $K_s^*$  – s korekcí na absorbanci odpovídajícího cyklodextrinu.

Tab. 4.1: Změřené konstanty stability komplexů PP s různými CD deriváty.  $K_s$  – hodnoty bez korekce na absorbanci CD,  $K_s^*$  - hodnoty korigované na absorbanci CD při 552 nm. Chyby konstanty stability byly určeny v průběhu nelineárního fitování v programu Origin.

| Měřená látka | $K_s$ [mol <sup>-1</sup> ] | $K_s^*$ [mol <sup>-1</sup> ] |
|--------------|----------------------------|------------------------------|
| β-CD         | 25 300 ± 1 200             | 25 300 ± 990                 |
| γ-CD         | 1 800 ± 140                | 1 900 ± 120                  |
| HP-β-CD      | 28 800 ± 2 600             | 28 800 ± 2 600               |
| HP-γ-CD      | 2 500 ± 120                | 2 500 ± 95                   |
| RaMe-β-CD    | 6 000 ± 230                | 6 000 ± 220                  |
| RaMe-γ-CD    | 1 050 ± 30                 | 1 040 ± 30                   |

Ze stanovených konstant stability plyne, že β-CD má mnohem vyšší hodnotu konstanty stability oproti γ-CD, podobný trend je patrný i u ostatních dvojic CD derivátů. Tento rozdíl je způsoben vhodnější velikostí kavity β-CD při interakci s fenolftaleinem. RaMe-β-CD a RaMe-γ-CD mají výrazně nižší hodnoty konstant stability, což je způsobeno substitucí polárních –OH skupin nepolárními methylovými –CH<sub>3</sub> skupinami.

Z tabulky č. 4 rovněž plyne, že relativní chyba stanovení konstanty stability se pohybuje v rozmezí 3–9 %. Tato chyba byla sice zpravidla nižší v případě zahrnutí korekce na absorbanci, nicméně ne podstatně. Pozorovaná chyba stanovení konstanty stability odpovídá možností použité metody (UV/VIS absorpce); podobné relativní chyby měření byly pozorovány i jinými skupinami<sup>18</sup>.

Mohamed popsal experiment<sup>32,29</sup>, kde se snažil odhadnout povrchově přístupná inkluzní místa kopolymerních materiálů na bázi β-CD. Roztoky CD byly připraveny v 0,1 M hydrogenuhličitanovém pufru, kvůli stabilitě a rozpustnosti byl zásobní roztok PP připraven v ethanolu. Roztoky byly spotřebovány do 24 hodin od přípravy. Měření bylo provedeno při 295 K. Průměrná hodnota konstanty stability β-CD-PP se stechiometrií 1 : 1 byla určena ze 4 nezávislých studií na  $2,66 \pm 0,3 \times 10^4$  mol<sup>-1</sup> se standardní chybou 7 %.

Buvári a Barza<sup>11</sup> provedli experiment, který se zaměřoval na určení konstanty stability HP-β-CD s fenolftaleinem v závislosti na různé hodnotě DS. Měření



probíhalo za teploty  $25 \pm 1$  °C. Pro DS s hodnotou 4,4 určila konstantu stability na  $9 \times 10^4 \text{ mol}^{-1}$ .

Další zpřesnění stanovení konstanty stability pomocí optické UV/VIS spektroskopie lze očekávat jednak opakováním měření absorbance v závislosti na koncentraci CD derivátu (alespoň tři titrační křivky<sup>29</sup>), dále úpravou UV/VIS experimentu (odstranění manipulace s optickou kyvetou v průběhu spektroskopické titrace) a kontrolou čistoty použitých činidel.

## 5 Závěr

V rámci bakalářské práce byly pomocí optické absorpce studovány projevy supramolekulární interakce fenolftaleinu a šesti derivátů cyklodextrinů –  $\beta$ -CD,  $\gamma$ -CD, HP- $\beta$ -CD, HP- $\gamma$ -CD, raMe- $\beta$ -CD a raMe- $\gamma$ -CD. Byly měřeny optická absorpční spektra v UV/VIS oblasti 30  $\mu$ M roztoku fenolftaleinu pro různé koncentrace studovaných cyklodextrinů. Měření probíhala v hydrogenuhličitanovém pufru při pH = 10,5 při teplotě  $25,0 \pm 0,5$  °C. V důsledku interakce fenolftaleinu s kavitou různých derivátů  $\beta$ - a  $\gamma$ - cyklodextrinů docházelo k poklesu optické absorpce fenolftaleinu a ze závislosti maxima absorpčního pásu ve viditelné oblasti u 552 nm byla na základě známé resp. očekávané stechiometrie interakce hostitel : host stanovena konstanta stability. Stechiometrie supramolekulární interakce byla změřena pomocí měření Jobových grafů. Pro studované cyklodextriny byly konstanty stability vyhodnoceny pro stechiometrii hostitel : host = 1 : 1, která umožnila s dostatečnou přesností proložení získaných experimentálních bodů teoretickou křivkou pro všechny sledované cyklodextriny.

Hodnoty konstant stability získané pro  $\beta$ -CD a  $\gamma$ -CD dobře odpovídají hodnotám v odborné literatuře, vyšší hodnota pro  $\beta$ -CD ve srovnání s  $\gamma$ -CD je dána vhodnější velikostí kavity  $\beta$ -CD při interakci s fenolftaleinem. Hodnoty konstant stability pro substituované cyklodextriny vykazují stejný trend, pro substituci hydroxidových skupin polárními hydroxypropylovými skupinami jsou hodnoty konstant stability mírně větší. Substituce methylovými skupinami vede k podstatně nižším hodnotám konstant stability.

V průběhu měření absorpčních spekter připravených roztoků byla zjištěna závislost výsledné hodnoty konstanty stability na řadě parametrů a faktorů. Nejdůležitější z nich byly:

1. přesnost realizace hodnoty pH použitého hydrogenuhličitanového pufru,
2. přesnost realizace požadovaných koncentrací připravených roztoků, zejména pak roztoku fenolftaleinu,
3. omezená doba použitelnosti roztoku fenolftaleinu od jeho přípravy,
4. přesnost realizace teploty.

## **6 Poděkování**

Chtěla bych poděkovat zejména doc. RNDr. Juraji Dianovi, CSc. za odborné vedení práce a cenné rady, které mi pomohly tuto práci zkompletovat. Poděkování patří mé rodině za podporu a motivaci při sepsání této práce, ale i během celého bakalářského studia.

## 7 Seznam literatury

- 1 Valle, M.: *Process Biochem.* 2004, 39, 1033.
- 2 Szejtli, J.: *Chem. Rev.* 1998, 98, 1743.
- 3 Crini, G.: *Chem. Rev.* 2014, 114, 10940.
- 4 Saenger, W.; Jacob, J.; Gessler, K.; Steiner, T.; Hoffmann, D.; Sanbe, H.; Koizumi, K.; Smith, S. M.; Tahaka, T.: *Chem. Rev.* 1998, 98, 1787
- 5 Loftsson, T.; Brewster, M. E. J.: *Pharm. Sci.* 1996, 85, 1017.
- 6 Biber, A.; Antranikian, G.: *Appl Microbiol Biotechnol* 2002, 59, 609.
- 7 Connors, K.: *Chem. Rev.* 1997, 97, 1325.
- 8 Liu, I.; Chen, I.: *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 2020, DOI: 10.1080/10408398.2020.1856035
- 9 Khan, A.: *Chemical Reviews*, 1998, 98, 1977.
- 10 Szejtli, J.: *Pure and Applied Chemistry* 76, 2004, 182.
- 11 Buvári, A.; Barcza, L.: *Journal of Inclusion Phenomena and Molecular Recognition in Chemistry* 18, 1994, 301.
- 12 Szente, L.; Szejtli, J.: *Advanced Drug Delivery Reviews* 1999, 36, 17.
- 13 Naguib, M.: *Anesth. Analg.* 2007, 104, 575.
- 14 Crini, G.: *Prog. Polym. Sci.* 2005, 30, 38.
- 15 Szejtli, J.: *Pure and Applied Chemistry* 76, 2004, 182.
- 16 Cyclolab: Cyclodextrin news – HPBCD is a unique component in Janssen’s COVID-19 vaccine candidate. Dostupné z URL: <https://cyclodextrinnews.com/2021/02/25/hpbcd-is-a-unique-component-in-janssens-covid-19-vaccine-candidate/>
- 17 Castells, M.; Phillips, J. E.: *The New England Journal of Medicine* 2021, 384, 634.
- 18 Glazyrin, A.; Grachev, M.: *Russian Journal of General Chemistry*, 2004, 74, 1922.
- 19 Rekharsky, M.: *Chem. Rev.* 1998, 98, 1875.
- 20 Loftsson, T. et al.: *International Journal of Pharmaceutics* 2019, 560, 228.
- 21 Taguchi, K. J.: *Am. Chem. Soc.* 1986, 108, 2705.
- 22 Taguchi, K. J.: *Chem. Soc.* 1992, 9, 17.

- 23 Li, W; Zhou, J.: *Anal. Lett.* 1996, 29, 1201.
- 24 Goel, A.: *Starch* 1995, 47, 399.
- 25 Hirose, K. J.: *Inclusion Phenom. Macrocyclic Chem.* 2001,39, 193.
- 26 Olson, E.; Buhlmann, P.: *Org. Chem.* 2011, 76, 8406.
- 27 Renny, J. S.; Tomasevich, L. L.; Tallmadge, E. H.; Collum, D. B.  
*Angewandte Chemie International Edition* 2013, 52, 11998.
- 28 Thordarson, P.: *Supramolecular Chemistry* 2012, DOI:  
10.1002/9780470661345.smc018
- 29 Thordarson, P.: *Chem. Soc. Rev.* 2011, 40, 1305.
- 30 Sprušil, B., Zieleniecová P.: *Úvod do teorie fyzikálních měření*, SPN Praha  
1989.
- 31 Origin Help, Theory of Nonlinear Curve Fitting, Dostupné z URL:  
<https://www.originlab.com/doc/Origin-Help/NLFit-Theory>
- 32 Mohamed, M. et al.: *Carbohydrate Polymers* 2010, 80, 186.