

# UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra organické a jaderné chemie



**Bakalářská práce**

SYNTÉZA MONOSUBSTITUOVANÝCH DERIVÁTŮ  
 $\beta$ -CYKLODEXTRINU A STANOVENÍ JEJICH  
KOMPLEXAČNÍCH KONSTANT

Klinická a toxikologická analýza

Martin Popr

Praha 2008

Tato bakalářská práce vznikla v souvislosti s řešením výzkumného záměru MSM0021620857.

### Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracoval samostatně, pod vedením školitele Doc. RNDr. Jindřicha Jindřicha, CSc., a že jsem všechny použité prameny řádně citoval.

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

V Praze dne **XX. května 2008.**

# Obsah

<b>Obsah</b> .....	3
<b>Použité zkratky</b> .....	4
<b>1. Cíl práce</b> .....	5
<b>2. Úvod</b> .....	6
<b>3. Přehled problematiky</b> .....	7
3.1 Cyklodextriny – vlastnosti a struktura .....	7
3.2 Tvorba inkluzních komplexů.....	8
3.3 Deriváty cyklodextrinů.....	9
3.3.1 Regioselektivní modifikace v poloze 3.....	9
3.4 Metody pro stanovení komplexačních konstant.....	9
<b>4. Metodika práce, výsledky, diskuze</b> .....	11
4.1 Koncepce syntézy.....	11
4.2 Syntéza derivátů $\beta$ -CD pro měření komplexace.....	11
4.2.1 Regioselektivní monomodifikace $\beta$ -CD.....	11
4.2.2 Peracetylace.....	13
4.2.3 Oxidace.....	13
4.2.4 Deacetylace.....	14
4.2.5 Spojení CD-derivátu s 1-adamantylaminem.....	15
4.3 Měření komplexačních konstant derivátů $\beta$ -CD s <i>p</i> ABA.....	15
4.3.1 Vznik inkluzního komplexu.....	16
4.3.2 Metodika měření a výpočtu komplexační konstanty.....	16
4.3.3 Výsledky měření.....	18
4.3.4 Diskuze.....	22
<b>5. Experimentální práce</b> .....	24
5.1 Obecné postupy, chemikálie.....	24
5.2 Pracovní postupy.....	24
5.2.1 Syntéza derivátů $\beta$ -CD.....	24
5.2.2 Příprava roztoků pro měření komplexace.....	26
<b>6. Závěr</b> .....	28
<b>7. Poděkování</b> .....	29
<b>8. Seznam použité literatury</b> .....	30

## Použité zkratky

Ac	acetyl
Ac <sub>2</sub> O	anhydrid kyseliny octové
CD	cyklodextrin
Cin	cinnamyl (3-fenyl-prop-2-enyl)
Et	ethyl
Glc	α-D-glukopyranosa
NMR	nukleární magnetická rezonance
Me	methyl
<i>p</i> ABA	kyselina <i>p</i> -aminobenzoová
TLC	tenkovrstevná chromatografie (thin layer chromatography)

# 1. Cíl práce

Cílem této práce bylo:

- syntetizovat sérii regiosektivně monosubstituovaných derivátů  $\beta$ -cyklodextrinu ( $\beta$ -CD) v poloze 3.
- ověřit metodiku určování komplexačních konstant ( $K$ ) pomocí UV/vis absorpční spektrofotometrie
- určit hodnoty  $K$  pro jednotlivé deriváty  $\beta$ -CD
- určit vliv substituce jednotlivých derivátů na velikost  $K$

## 2. Úvod

Cyklodextriny<sup>1</sup> jsou cyklické oligosacharidy, složené z šesti až osmi D-glukopyranosových jednotek, které jsou spojené  $\alpha(1\rightarrow4)$  glykosidickými vazbami. Jsou to přírodní látky, které vznikají enzymatickou degradací škrobu.

Cyklodextriny díky svým speciálním vlastnostem nacházejí řadu uplatnění v chemickém a farmaceutickém průmyslu. Mezi nejvýznamnější a nejvyužívanější vlastnosti patří jejich schopnost nekovalentně vázat molekuly ve své hydrofobní kavitě ve vodném prostředí. Této vlastnosti se využívá například pro zapouzdření léčiv, které jsou špatně nebo omezeně rozpustné ve vodě. Dále se v běžné praxi hojně využívají jako chirální separátory, nebo enzymové modely. Jejich výhodou je také relativně nízká cena, daná víceméně kvantitativním výrobním postupem.

Unikátní schopnost komplexovat organické i anorganické hydrofobní molekuly o vhodné velikosti, je dána velikostí a strukturou jejich molekuly, a také rozložením hydroxylových vazeb. Tvorbou nekovalentních komplexů se zabývá obor supramolekulární chemie, který v posledních letech dosahuje velké pozornosti.

Chemickou modifikací nativních cyklodextrinů lze cíleně měnit jejich chemické a fyzikální vlastnosti. Derivatizací lze ovlivňovat jejich rozpustnost ve vodě, ale také schopnost tvořit inkluzní komplexy s lipofilními látkami. Dále je také možné na molekulu cyklodextrinu navázat reaktivní funkční skupinu (tzv. raménko), pomocí kterého se může navázat na pevnou fázi, nebo na značkovací fluorescenční molekulu.

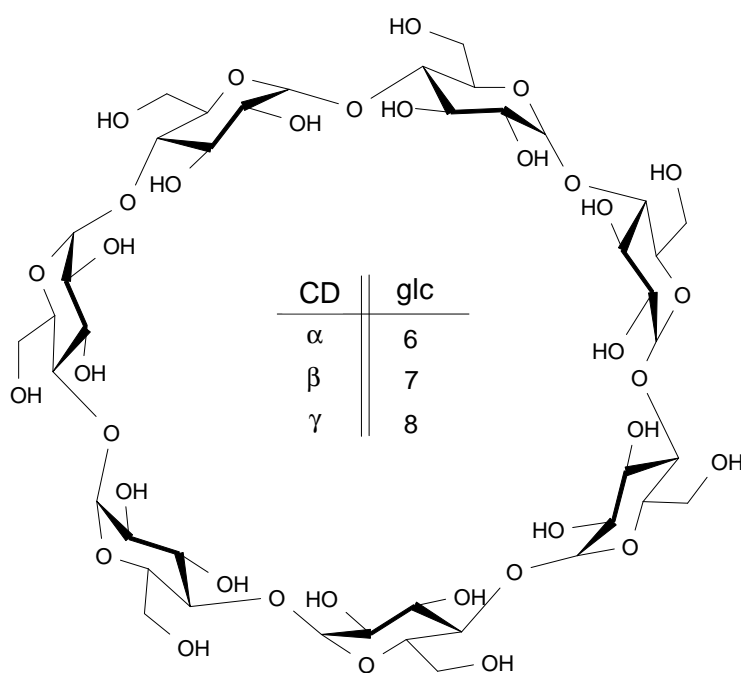
V posledních letech vědci věnují patřičnou pozornost zkoumání termodynamiky procesu tvorby inkluzních komplexů. Jsou vyvíjeny nové metody pro určování koncentrace komplexů, stechiometrie a vazebných konstant mezi hostitelskou a hostující molekulou. Při vzniku inkluzních komplexů dochází v roztoku ke změně spektroskopických veličin, což předurčuje jejich kvantifikaci pomocí spektrálních metod. V literatuře jsou popsány metody, jak určit vazebné konstanty pomocí UV/vis molekulové absorpční spektrofotometrie, fluorimetrie, semiempirických kvantových výpočtů, NMR a skenovací elektronové mikroskopie (SEM)<sup>2</sup>.

Právě syntézou série monosubstituovaných derivátů  $\beta$ -cyklodextrinu a následným ověřením metodiky určování jejich vazebných konstant s hostující molekulou pomocí UV absorpční spektrofotometrie se zabývá tato práce.

### 3. Přehled problematiky

#### 3.1 Cyklodextriny – vlastnosti a struktura

Mezi nejvýznamnější cyklodextriny (CD) patří  $\alpha$ -CD,  $\beta$ -CD a  $\gamma$ -CD s počtem glukosových jednotek 6, 7 a 8. V literatuře se také objevují pod názvy Schardingerovy dextriny, cykloglukany, cykloamylosy nebo cykloglukopyranosy<sup>3</sup>. Přírodní cyklodextriny s méně než šesti jednotkami se ze sterických důvodů nevyskytují, ale byly připraveny synteticky<sup>4</sup>. Molekulu CD tvoří do cyklu spojené glukopyranosové jednotky, které jsou propojené  $\alpha(1\rightarrow4)$ -O-glykosidickými vazbami (Obr. 1). Poprvé byly popsány Villiersem<sup>5</sup> v roce 1899.

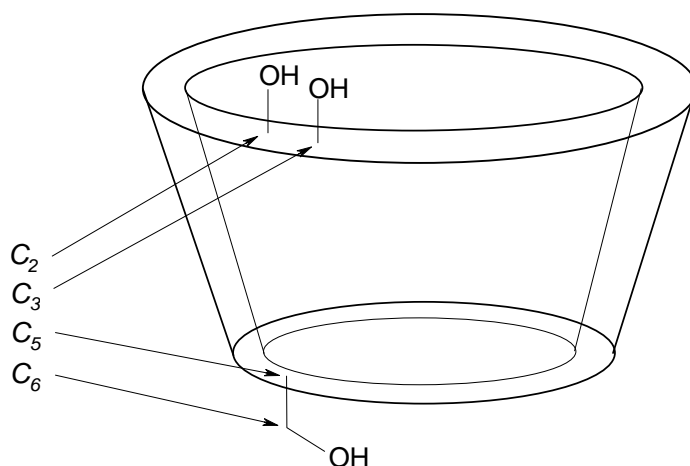


Obr. 1 Struktura molekuly cyklodextrinu

Glukosové jednotky jsou v molekule CD propojeny takovým způsobem, že v prostoru tvoří kónickou strukturu. Vnitřek molekuly tvoří hydrofobní dutina, kdežto povrch je hydrofilní. To je dáno orientací vazeb C-O-C a C-H směrem dovnitř molekuly a hydroxylových vazeb směrem na povrch. Hydroxylové skupiny na uhlících C2 a C3 se nacházejí na širším okraji molekuly. Mezi těmito skupinami sousedních glukosových jednotek dochází u  $\alpha$ -,  $\beta$ - a  $\gamma$ -CD ke tvorbě pásu vodíkových vazeb, které zvyšují celkovou rigiditu

cyklodextrinového jádra. Tento jev je nejsilnější u  $\beta$ -CD, kde se tvoří vodíkové vazby mezi každými C2 a C3 hydroxylovými skupinami sousedních glukosových jednotek, což vysvětluje jeho nejvyšší rigiditu, a také sníženou rozpustnost ve vodě. Při laboratorní teplotě se ve 100 ml vody se rozpustí zhruba 14 g  $\alpha$ -CD, 23 g  $\gamma$ -CD, ale pouze 1,8 g  $\beta$ -CD<sup>3</sup>.

Primární hydroxylové skupiny na uhlících C6 se nacházejí na užším okraji makrocylu (Obr. 2) a mají schopnost rotovat kolem vazby mezi uhlíky C5 a C6. Za normálních podmínek pak směřují do středu molekuly.



Obr. 2 Umístění hydroxylových skupin v molekule CD

### 3.2 Tvorba inkluzních komplexů

Do hydrofobní kavity cyklodextrinů (hostitel) se může ve vodném prostředí nebo v prostředí jiného rozpouštědla komplexovat široká škála organických i anorganických látek (host). Rozhodujícím faktorem pro tento děj je velikost a tvar hostující molekuly, a také výskyt hydrofobních skupin. Do kavity  $\alpha$ -CD se ochotně komplexují látky s alifatickým řetězcem,  $\beta$ -CD poskytuje inkluzní komplexy s malými aromatickými sloučeninami, jako jsou *p*-aminobenzoová kyselina,  $\beta$ -naftol nebo naftalensulfonylchlorid a  $\gamma$ -CD s molekulami větších rozměrů.

Při tvorbě komplexu dochází k výměně molekul vody z hydrofobní kavity za hostující molekulu. Tento jev je samovolný přechod do energeticky výhodnějšího stavu a vyznačuje se zvýšením entalpie. Skládá se z několika příspěvků. Hlavní z nich jsou hydrofobní efekt,



elektrostatické a van der Waalsovy interakce a sterické efekty. Dochází také přeuspořádání původní sítě vodíkových můstků v molekule CD<sup>6</sup>.

### 3.3 Deriváty cyklodextrinů

Nativní cyklodextriny jsou omezeně rozpustné ve většině dostupných rozpouštědel a také obsahují pouze jeden typ funkčních skupin. Tyto nedostatky s úspěchem vyřeší jejich chemická modifikace. Hydrofobní kavita a hydroxylové skupiny na okrajích makrocyklu mohou být derivatizovány<sup>7</sup>. Vzhledem k vysokému počtu reakčních míst je obtížné připravit čisté deriváty. Při syntéze modifikovaných CD se ve většině případů vychází z nativního oligosacharidu. K syntéze definovaných derivátů se využívají také reakční činidla, která se částí molekuly komplexují do kavity CD, tím je docílena orientace reaktivní skupiny ke konkrétní hydroxylové skupině, která se má modifikovat.

#### 3.3.1 Regioselektivní modifikace v poloze 3

Při monomodifikaci v poloze 3 se používá elektrofilního činidla, které reaguje s nukleofilní hydroxylovou skupinou. Tato je ze všech možných poloh (2, 3 a 6) nejvíce stericky bráněna, proto je reakce elektrofilního činidla v této poloze nejméně pravděpodobná. Hydroxyl v poloze 6 je nejbazičtější a také nejvíce reaktivní. Aby bylo zabráněno nežádoucí reakci na ostatních hydroxylech, než v poloze 3 je třeba zvolit takové elektrofilní činidlo, které bude s molekulou  $\beta$ -CD tvořit inkluzní komplex a bude orientováno reagující skupinou směrem k hydroxylové skupině v poloze 3.

### 3.4 Metody pro stanovení komplexačních konstant

Vznik inkluzního komplexu vede k nezanedbatelným změnám fyzikálně-chemických veličin hostitelské i hostující molekuly. Dochází ke změnám spektrálních vlastností a difuze hostující látky. Mění se také její reaktivita a rozpustnost. Díky těmto změnám lze stanovit velikost komplexační konstanty ( $K$ ) pomocí UV spektrometrie, spektrofotometrie, NMR a dalších fyzikálně-chemických metod.

Obecně se pro určení  $K$  využívá rovnovážného modelu, který uvažuje vznik komplexu interakcí mezi hostitelskou a hostující molekulou<sup>12</sup>. Aktivitní koeficienty jednotlivých složek nejsou ovykle známé, proto se v rámci zjednodušení problému zanedbávají a při stanovování  $K$  se uplatňují rovnovážné koncentrace daných složek. Typický proces zjišťování  $K$  se podle zdroje<sup>12</sup> skládá z následujících kroků:

- určení stechiometrických koeficientů jednotlivých komponent, které se účastní komplexace (Job's plot)
- určení koncentrace komplexu (pomocí výše uvedených spektrálních metod)
- nastavení vhodné koncentrace pro hostitelskou a hostující molekulu
- zpracování dat

Určování koncentrace komplexu pomocí UV/vis spektrometrie je výhodné v jeho dostupnosti a rychlosti provedení. Nevýhodou je nutnost velmi přesného pipetování měřených roztoků. Proto se také oproti ostatním spektrálním metodám vyznačuje nižší přesností. Hodnota  $K$  je poté vypočítána z absorbancí série roztoků obsahující určitou koncentraci hostující a hostitelské molekuly.

NMR spektroskopii lze použít v případě, kdy se absorpční pásy jednotlivých komponent částečně nebo zcela překrývají. Spektrum volné hostitelské molekuly a komplexu lze zaznamenat do jednoho NMR spektra, nebo každé zvlášť<sup>12</sup>. Koncentrace komplexu je pak vypočítána z integračních poměrů jednotlivých píků.

## 4. Metodika práce, výsledky, diskuze

### 4.1 Koncepce syntézy

Pro syntézu série monosubstituovaných derivátů  $\beta$ -CD bylo použito cinnamylbromidu a  $\beta$ -CD jako výchozích látek. Produktu 3<sup>1</sup>-*O*-formylmethyl- $\beta$ -CD bylo dosaženo použitím série reakčních kroků, které jsou již popsány v literatuře<sup>8,9</sup> a v případě nutnosti byly modifikovány. Získané směsi látek byly separovány pomocí kolonové kapalinové chromatografie se silikagelem jako stacionární fází. Průběh reakcí byl průběžně sledován pomocí TLC.

Syntéza produktu 3<sup>1</sup>-*O*-formylmethyl- $\beta$ -CD byla provedena v následujících krocích:

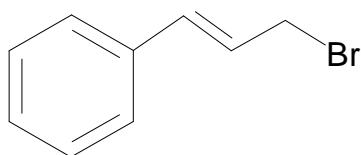
1. Regioselektivní monomodifikace hydroxyly v poloze 3 pomocí cinnamylbromidu
2. Peracetylace (chránění ostatních hydroxylových skupin)
3. Oxidace dvojně vazby ozonolýzou cinnamylové skupiny za vzniku aldehydové skupiny
4. Deacetylace (odchránění hydroxylových skupin)

Posledním krokem bylo navázání 1-adamantylaminu na předem vytvořenou formylmethylovou skupinu redukční aminací.

### 4.2 Syntéza derivátů $\beta$ -CD pro měření komplexace

#### 4.2.1 Regioselektivní monomodifikace $\beta$ -CD

Prvním reakčním krokem byla příprava 3<sup>1</sup>-*O*-derivátu  $\beta$ -cyklodextrinu. Jako nejpřijatelnější způsob je v literatuře<sup>10</sup> popsán postup, který využívá k modifikaci polohy 3  $\beta$ -CD takového elektrofilního činidla, které je schopné tvořit v hydrofobní kavitě  $\beta$ -CD inkluzní komplex. Vznik tohoto komplexu ve vodném prostředí zajistí orientaci reaktivní části molekuly činidla směrem k hydroxyly v poloze 3. Činidlem splňující výše uvedené nároky, a tím pádem poskytující přednostně derivát CD v poloze 3 je (E)-cinnamylbromid (obr. 3). Další předností tohoto činidla je přítomnost dvojně vazby allylového typu, jejímž oxidativním štěpením lze získat karbonylovou nebo karboxylovou skupinu. Ta je poté velmi výhodná pro navázání další molekuly např. pomocí amidové vazby.



Obr. 3 (E)-cinnamylbromid

Reakce  $\beta$ -CD **1** s cinnamylbromidem byla provedena v prostředí vodného roztoku NaOH (viz schéma 1). Pro tuto reakci byla použita jako rozpouštědlo směs acetonitril-voda v poměru 1:3. Bylo tak dosaženo vyšší rozpustnosti nativního  $\beta$ -CD než ve vodě. Přestože byly reakční podmínky optimalizovány (koncentrace NaOH, vhodný molární poměr  $\beta$ -CD a cinBr), byla podle TLC výsledkem reakce směs látek. Ve směsi byl zastoupen jak požadovaný produkt 3<sup>1</sup>-O-cinnamyl- $\beta$ -CD **2**, tak i nezreagovaný nativní  $\beta$ -CD a výšesubstituované deriváty cyklodextrinu v poměru zhruba 2:2:1. Tuto směs bylo nutné použitím vhodných separačních technik rozdělit a dosáhnout tak čistého produktu. Reakční směs byla rozdělena na dvě části, za účelem nalezení vhodného způsobu separování produktu bez použití sloupcové chromatografie, která je z hlediska časového, finančního i kapacitního nevýhodná.

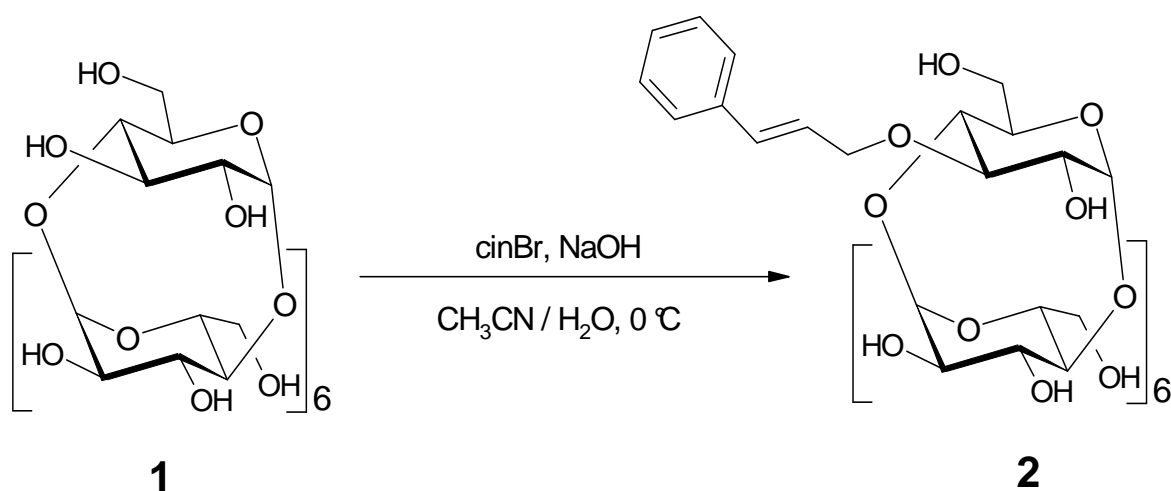


Schéma 1. Reakce  $\beta$ -CD s (E)-cinnamylbromidem

První část reakční směsi byla extrahována horkým methanolem, čímž bylo docíleno oddělení substituovaných produktů od nezreagovaného  $\beta$ -CD. Nezreagovaný  $\beta$ -CD byl regenerován rekrystalizací z destilované vody a mohl být použit pro další reakce. Methanolvé extrakty, obsahující požadovaný produkt 3<sup>1</sup>-O-cinnamyl- $\beta$ -CD a výšesubstituované deriváty, byly odpařeny a směs byla následně rozdělena na sloupci silikagelu. Čistého produktu bylo dosaženo rekrystalizací v nadbytku vody.

U druhé části reakční směsi byla zkoumána možnost extrakce výšesubstituovaných derivátů do směsi n-propanolu a terc-butanolu v poměru 60:1. Ukázalo se, že tento způsob nebude vyhovující, protože extrakce není dostatečně účinná. Vyšší extrakční účinnosti nebylo dosaženo ani změnou poměru výše uvedených rozpouštědel. Bylo spočítáno, že extrakci by bylo nutné opakovat 20×, nebo by bylo nutné použít některý ze způsobů kontinuální extrakce např. Soxhletův extraktor. Z tohoto důvodu bylo od extrakce upuštěno a produkt byl získán již ověřeným postupem, pomocí chromatografie a následné rekrystalizace.

#### 4.2.2 Peracetylace

Druhým reakčním krokem byla peracetylace 3<sup>1</sup>-O-cinnamyl-β-CD **2**. Reakce byla provedena za účelem ochránění zbývajících nesubstituovaných hydroxylových skupin. Tento krok nutně předchází následujícímu reakčnímu kroku, kterým je oxidace. Peracetylace byla provedena standardním postupem, a to použitím acetanhydridu (dále Ac<sub>2</sub>O) v pyridinu (viz. schéma 2).

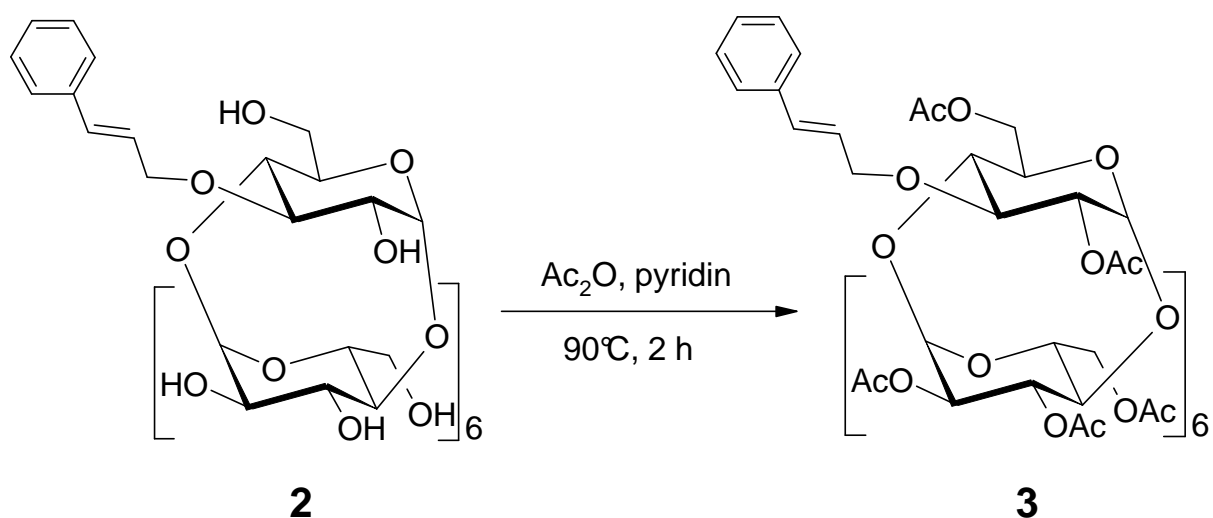


Schéma 2. Peracetylace - zavedení chránících skupin

#### 4.2.3 Oxidace

Třetím reakčním krokem bylo oxidativní štěpení dvojně vazby v cinnamylovém zbytku látky **3** pomocí ozonolýzy v methanolu (viz schéma 3). Reakce byla provedena při -40 °C. Vzniklý ozonid byl rozštěpen pomocí dimethylsulfidu, čímž bylo dosaženo přednostného vzniku 3<sup>1</sup>-O-formylmethyl-β-cyklodextrinu **4**, který je kýženým produktem. Nepodařilo se

však zabránit vzniku dalších reakčních produktů. Ty byly od produktu úspěšně odděleny pomocí sloupcové chromatografie na silikagelu s ethylacetátem jako mobilní fází.

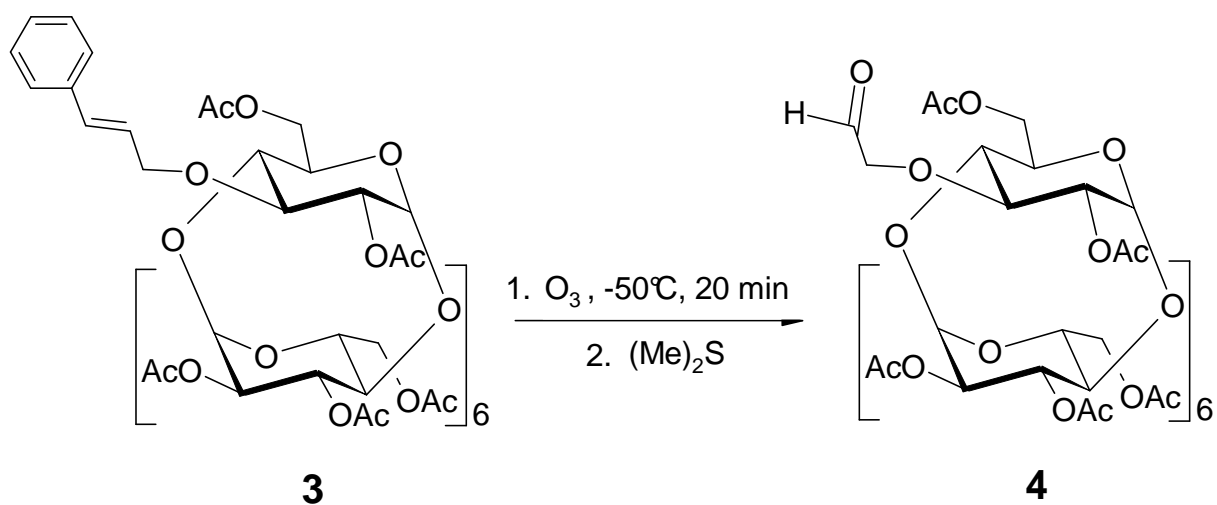


Schéma 3. Ozonolýza dvojně vazby cinnamylové skupiny

#### 4.2.4 Deacetylace

Deacetylace produktu per-*O*-acetyl-3<sup>1</sup>-*O*-formylmethyl-β-CD **4** byla provedena standardním postupem, a to použitím roztoku methanolátu sodného v methanolu (viz schéma 4). Sodné ionty byly separovány použitím iontoměniče Dowex 50 v H<sup>+</sup> cyklu.

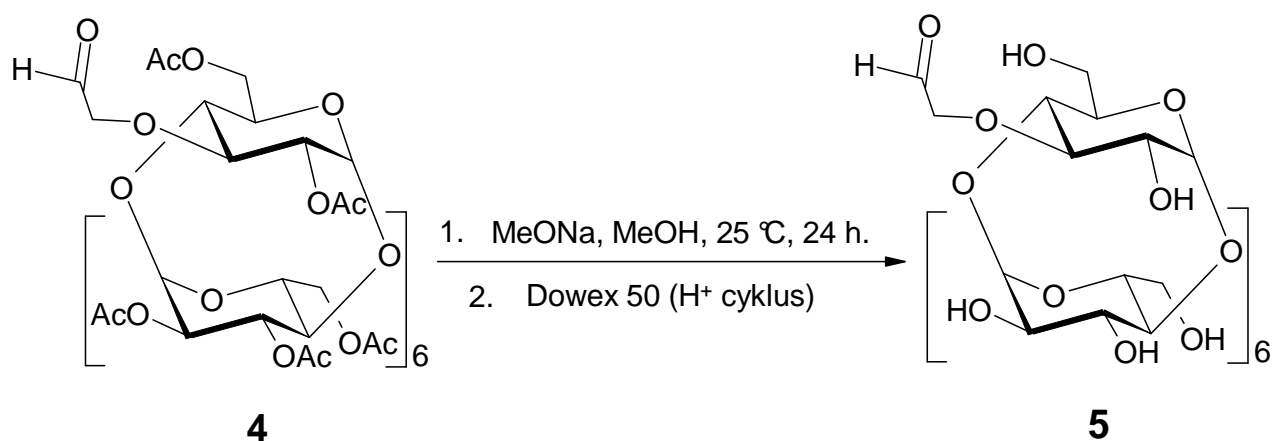


Schéma 4. Deacetylace

## 4.2.5 Spojení CD-derivátu s 1-adamantylaminem

Získaná látka **5** s aldehydovou skupinou je vhodná pro navázání další molekuly pomocí redukční aminace. Jako vhodná látka pro navázání byl zvolen 1-adamantylamin, jehož výhodou je jeho rozpustnost ve vodě (při nízkém pH) a vhodná velikost molekuly, která by mohla stericky ovlivnit komplexaci hostující molekuly. Pro reakci byl zvolen postup redukční aminace uvedený v literatuře<sup>11</sup>, který popisuje syntézu podobných látek. Reakce byla provedena v prostředí acetátového pufru (pH = 4,4), za použití NaBH<sub>3</sub>CN jako redukčního činidla (viz schéma 5).

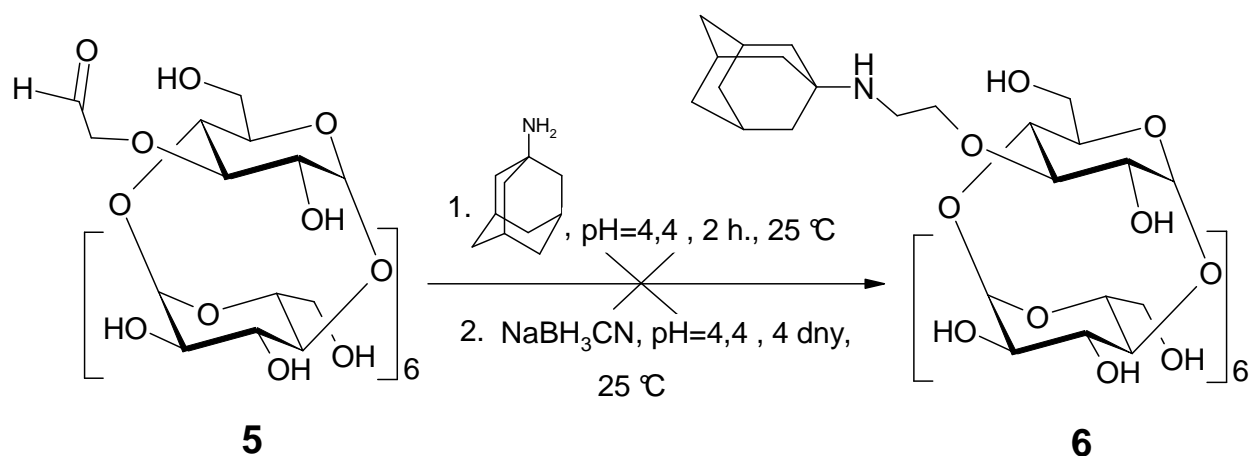


Schéma 5. Redukční aminace

Podle kontrolních TLC nedocházelo ke vzniku produktu. Látka **6** v reakční směsi nebyla bohužel potvrzena ani pomocí MS. Kvůli nedostatku času bylo další zkoumání této reakce a alternativních postupů zanecháno a bude naplní některé z dalších prací.

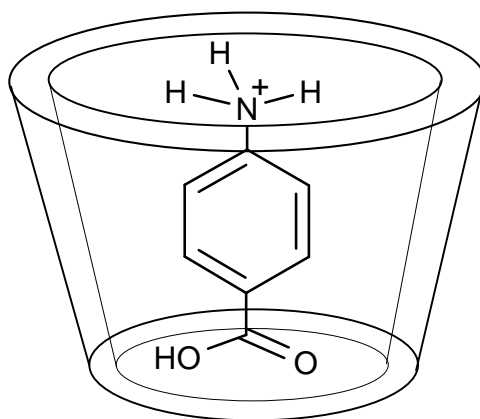
## 4.3 Měření komplexačních konstant derivátů $\beta$ -CD s *p*ABA

Pro určení velikosti komplexačních konstant  $K$  (též vazebné nebo rovnovážné konstanty) bylo použito metody, která využívá UV/vis absorpční spektrofotometrii. Byla zaznamenávána změna absorbance hostující molekuly – kyselina *p*-aminobenzoová (*p*ABA) v jejím absorpčním maximu po přidání  $\beta$ -CD nebo jeho derivátu o určité koncentraci do roztoku. Tato změna je zapříčiněna vytvořením inkluzního komplexu v hostitelské molekule. Ze získaných dat byla vypočítána přibližná hodnota komplexační konstanty. V literatuře<sup>12</sup> je

výše popsaná metoda označena jako méně přesná (než např. NMR nebo spektrofluorimetrie) a tudíž se vyznačuje poměrně vysokou chybou stanovení (zdroj<sup>13</sup> publikuje relativní odchylky až 30 %). Z tohoto důvodu byla spíše ověřována metodika určování vazebných konstant pomocí této metody, nežli jejich přesná číselná hodnota. Na druhou stranu není instrumentálně náročná a tudíž je dostupná.

### 4.3.1 Vznik inkluzního komplexu

Kyselina *p*-aminobenzoová tvoří v roztoku s  $\beta$ -CD a jeho deriváty inkluzní komplex (viz obr. 4), ve stechiometrickém poměru 1:1<sup>2</sup>.



Obr. 4 Inkluzní komplex kationtu *p*ABA s  $\beta$ -CD

V literatuře<sup>14</sup> se uvádí, že k největšímu zvýšení absorpance (tzn. molárního absorpčního koeficientu) po vytvoření inkluzního komplexu dochází, pokud je *p*ABA ve své protonované formě. Proto bylo měření komplexačních konstant provedeno se zásobním roztokem *p*ABA, jehož pH bylo upraveno na hodnotu 2. Při této hodnotě pH je komplexační konstanta nejvyšší, a také nejlépe měřitelná.

### 4.3.2 Metodika měření a výpočtu komplexační konstanty

Pro měření byla připravena série vodných roztoků, které obsahovaly konstantní koncentraci *p*ABA a proměnnou koncentrací  $\beta$ -CD (nebo jeho derivátů) viz tab. 1.

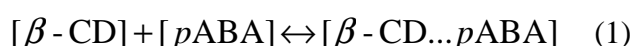


**Tab. 1 Složení roztoků pro měření komplex. konstanty**

ozn. baňky	c ( $\beta$ -CD)/mol $\times$ dm <sup>-3</sup>	c ( <i>p</i> ABA)/mol $\times$ dm <sup>-3</sup>
Blank	0	0
1	0	5 $\times$ 10 <sup>-5</sup>
2	2 $\times$ 10 <sup>-4</sup>	5 $\times$ 10 <sup>-5</sup>
3	3 $\times$ 10 <sup>-4</sup>	5 $\times$ 10 <sup>-5</sup>
4	6 $\times$ 10 <sup>-4</sup>	5 $\times$ 10 <sup>-5</sup>
5	3 $\times$ 10 <sup>-3</sup>	5 $\times$ 10 <sup>-5</sup>
6	6 $\times$ 10 <sup>-3</sup>	5 $\times$ 10 <sup>-5</sup>

Byly proměřeny UV spektra těchto roztoků v rozsahu vlnových délek 200-400 nm a byly zaznamenány hodnoty maxima vlnové délky ( $\lambda_{\max}$ ) a absorbance ( $A$ ) v  $\lambda_{\max}$ , která odpovídá vlnové délce absorpce benzenového jádra *p*ABA. Tabelovaná hodnota je 285,5 nm. Toto maximum bylo vybráno z toho důvodu, že v okolí této vlnové délky neabsorbují molekula  $\beta$ -CD. To znamená, že změna absorbance při zvyšování koncentrace  $\beta$ -CD odpovídá striktně příslušné změně uspořádání v hostující molekule (*p*ABA), která je zapříčiněna vznikem inkluzního komplexu.

Hodnota komplexační konstanty  $K$  byla vypočítána z naměřených absorbancí a koncentrací roztoků pomocí modifikované Benesi-Hildebrandovy rovnice<sup>15</sup> (5) s přihlédnutím ke zdroji<sup>16</sup>. Vznik inkluzního komplexu popisuje rovnice (1).



$[\beta\text{-CD}]$  a  $[p\text{ABA}]$  vyjadřují rovnovážné koncentrace nekomplexovaných forem  $\beta$ -CD a *p*ABA.  $[\beta\text{-CD} \dots p\text{ABA}]$  je rovnovážná koncentrace inkluzního komplexu v roztoku. Komplexační konstanta je definována (2):

$$K = \frac{[\beta - \text{CD} \dots p\text{ABA}]}{[\beta - \text{CD}][p\text{ABA}]} \quad (2)$$

S použitím Lambert-Beerova zákona<sup>17</sup> (3) a vyjádření rovnovážných koncentrací pomocí okamžitých molárních koncentrací hostitelské a hostující molekuly v roztoku byla získána rovnice (4) jejíž transformací do lineární formy (5) lze získat  $K$ .

$$A = c \cdot \varepsilon \cdot l \quad (3)$$

Kde  $A$  je absorbance,  $c$  je molární koncentrace látky v roztoku,  $\varepsilon$  je molární absorpční koeficient a  $l$  je délka kyvety.

$$K = \frac{(A - A_0)}{(A_\infty - A_0) C_b} \quad (4)$$

Kde  $A$  je absorbance daného ředění,  $A_0$  je absorbance roztoku obsahující nulovou koncentraci  $\beta$ -CD (nebo jeho derivátu),  $A_\infty$  je absorbance s vysokým nadbytkem hostitelské molekuly ( $\beta$ -CD) a  $C_b$  je molární koncentrace  $\beta$ -CD.

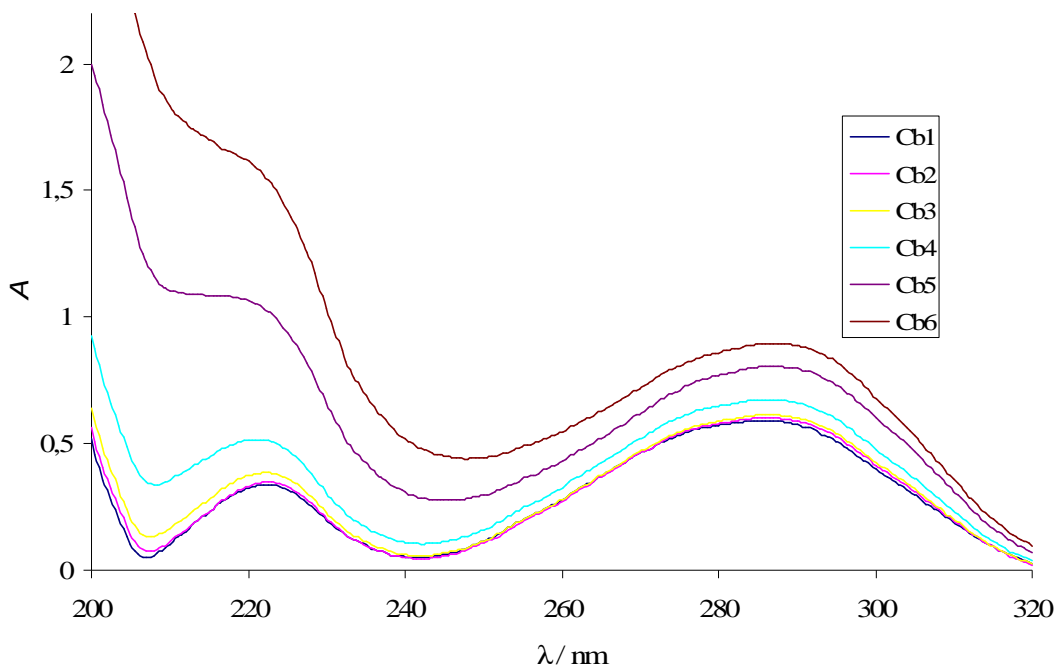
$$A = A_\infty - \frac{1}{K} \left( \frac{(A - A_0)}{C_b} \right) \quad (5)$$

Z rovnice (5) je patrné, že vynesáním závislosti  $A$  na  $\left( \frac{(A - A_0)}{C_b} \right)$  do grafu získáme přímku, jejíž směrnice má hodnotu  $-1/K$ .

### 4.3.3 Výsledky měření

#### 1. Nativní $\beta$ -CD

Byly proměřeny UV spektra roztoků nativního  $\beta$ -CD s *p*ABA (viz. graf 1.) podle výše uvedeného postupu, o koncentracích dle tab. 1.



**Graf 1. Absorpční spektra roztoků  $\beta$ -CD s pABA**

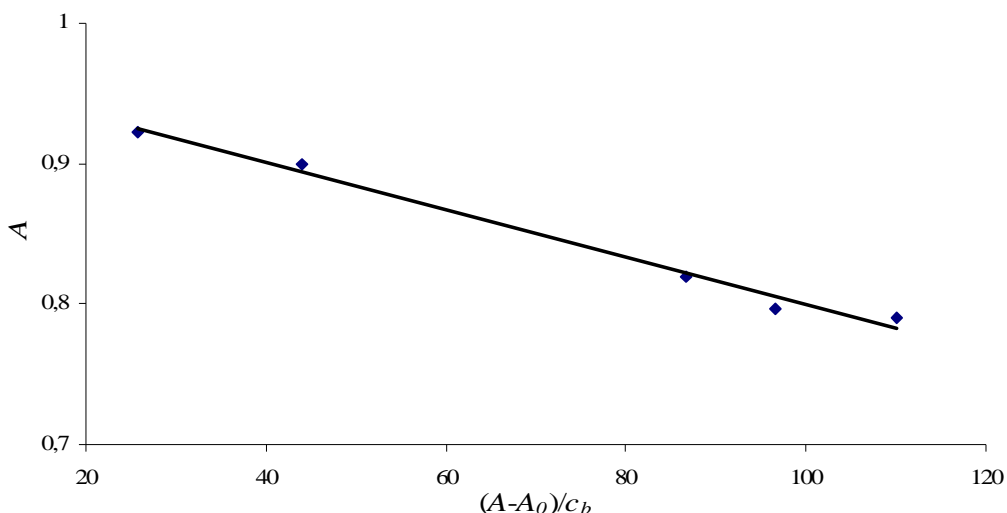
(Cb1 je vzorek s nulovou koncentrací  $\beta$ -CD, Cb6 je vzorek s nejvyšší koncentrací  $\beta$ -CD)

Byly zaznamenány vlnové délky maximální absorpce a hodnoty absorpance v těchto maximech (viz tab. 2).

**Tabulka 2. Vlnové délky maxim a příslušné hodnoty absorpance roztoků nativního  $\beta$ -CD s pABA**

Ozn. baňky	$\lambda_{\max}$ / nm	A
blank	-	-
1	285,0	0,789
2	284,5	0,790
3	285,0	0,797
4	286,0	0,820
5	287,0	0,900
6	287,0	0,923

S použitím naměřených hodnot byla sestrojena přímka (viz graf 2), z jejíž směrnice byla vypočítána komplexační konstanta  $\beta$ -CD.



**Graf 2. Závislost  $A$  na  $(A-A_0)/C_b$  pro roztoky nativního  $\beta$ -CD s  $p$ ABA**

Vypočtená hodnota  $K = 588 \text{ dm}^3 \times \text{mol}^{-1} (\text{M}^{-1})$ . Směrodatná odchylka směrnice je 35,7. Relativní směrodatná odchylka je 6,1 %.

### 2. 3<sup>1</sup>-*O*-cinnamyl- $\beta$ -CD

Naměřená data nemohla být použita pro stanovení komplexační konstanty metodou UV/vis spektrometrie, a to z toho důvodu, že daný derivát  $\beta$ -CD absorbuje při stejné vlnové délce jako  $p$ ABA (oblast absorpce benzenového jádra). Nárůst absorbance se zvyšující se koncentrací derivátu  $\beta$ -CD tím pádem neodpovídá pouze vznikajícímu komplexu v roztoku. Pro toto měření by musela být použita některá z jiných metod určování vazebných konstant.

### 3. per-*O*-acetyl-3<sup>1</sup>-*O*-cinnamyl- $\beta$ -CD (viz 2.)

### 4. per-*O*-acetyl-3<sup>1</sup>-*O*-formylmethyl- $\beta$ -CD

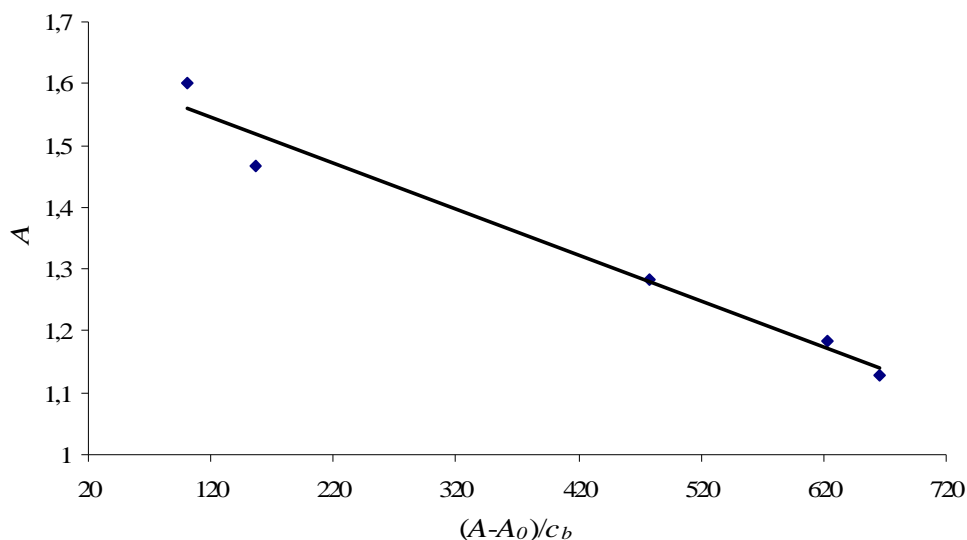
Peracetylovaný derivát není rozpustný ve vodě, tudíž nebylo možné připravit roztoky pro měření komplexace ve vodném prostředí. Jako alternativní rozpouštědlo byl zvolen MeOH, ve kterém se tento produkt dobře rozpouští. Bylo zkoumáno, zda bude docházet ke vzniku inkluzního komplexu i v tomto nevodném prostředí.

Byly zaznamenány vlnové délky maximální absorpce a hodnoty absorbance v těchto maximech (viz tab. 3).

**Tabulka 3. Vlnové délky maxim a příslušné hodnoty absorbancí roztoků per-*O*-acetyl-3<sup>I</sup>-*O*-formylmethyl-β-CD s *p*ABA v MeOH**

Ozn. baňky	$\lambda_{\max}$ / nm	<i>A</i>
blank	-	-
1	288,5	0,996
2	289,5	1,129
3	289,0	1,183
4	288,5	1,283
5	288,0	1,467
6	289,5	1,601

S použitím naměřených hodnot byla sestrojena přímka (viz graf 3), z jejíž směrnice byla vypočítána komplexační konstanta per-*O*-acetyl-3<sup>I</sup>-*O*-formylmethyl-β-CD s *p*ABA v MeOH.



**Graf 3. Závislost *A* na  $(A-A_0)/C_b$  pro roztoky per-*O*-acetyl-3<sup>I</sup>-*O*-formylmethyl-β-CD s *p*ABA v MeOH**

Vypočtená hodnota  $K = 1344 \text{ M}^{-1}$ . Směrodatná odchylka směrnice je 134,1. Relativní Směrodatná odchylka je 10,0 %.

### 5. 3<sup>I</sup>-*O*-formylmethyl-β-CD

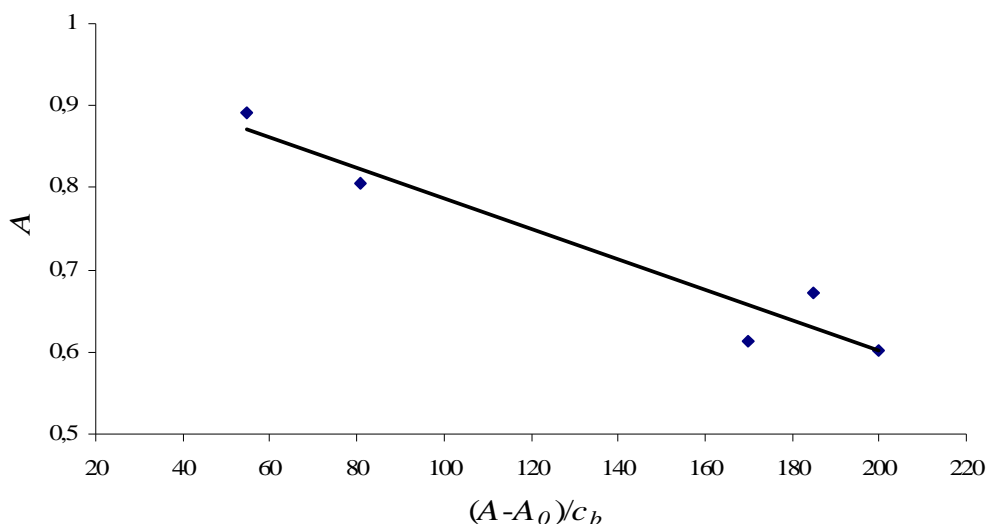
Látka 5 je již ve vodě rozpustná, proto bylo měření provedeno ve vodném roztoku podle standardního postupu.

Byly zaznamenány vlnové délky maximální absorpce a hodnoty absorbance v těchto maximech (viz tab. 4).

**Tabulka 4. Vlnové délky maxim a příslušné hodnoty absorbancí roztoků 3<sup>I</sup>-*O*-formylmethyl-β-CD s *p*ABA**

Ozn. baňky	$\lambda_{\max}$ / nm	<i>A</i>
blank	-	-
1	285,5	0,592
2	286,0	0,602
3	286,0	0,613
4	287,0	0,673
5	287,0	0,805
6	286,0	0,894

S použitím naměřených hodnot byla sestrojena přímka (viz graf 4), z jejíž směrnice byla vypočítána komplexační konstanta 3<sup>I</sup>-*O*-formylmethyl-β-CD s *p*ABA ve vodném roztoku.



**Graf 4. Závislost *A* na  $(A-A_0)/C_b$  pro roztoky 3<sup>I</sup>-*O*-formylmethyl-β-CD s *p*ABA v MeOH**

Vypočtená hodnota  $K = 538 \text{ M}^{-1}$ . Směrodatná odchylka směrnice je 86,1. Relativní Směrodatná odchylka je 16,0 %.

#### 4.3.4 Diskuze

Na základě výsledků měření bylo zjištěno, že ke komplexaci *p*ABA do hydrofobní kavity β-CD a jeho monosubstituovaných derivátů dochází jak ve vodném prostředí, tak v prostředí MeOH. V tomto prostředí je hodnota komplexační konstanty zhruba dvojnásobně vyšší než ve vodě. Dále bylo zjištěno, že derivatizací nativního β-CD formylmethylovým

zbytkem nedochází k významné změně v pevnosti komplexace hostující molekuly. To je patrně zapříčiněno malým rozměrem substituentu, který nijak stericky nebrání vzniku komplexu. K závažnějšímu ovlivnění komplexační konstanty by pravděpodobně došlo po navázání substituentu o vyšší molekulové hmotnosti, čemuž bude věnováno další úsilí.

Z důvodu malého množství nasyntetizovaných CD derivátů nebylo možné provést měření duplicitně.

## 5. Experimentální část

### 5.1 Obecné postupy, chemikálie

Tenkvrstevná chromatografie (TLC) byla prováděna na silikagelových deskách DC-Alufolien Keisegel 60 F<sub>265</sub> (Merck, Darmstadt, Germany). K vyvíjení byly použity následující mobilní fáze:

S<sub>1</sub> : *n*-propanol, voda, ethylacetát, konc. amoniak v poměru 6:3:1:1

S<sub>2</sub> : chloroform, methanol v poměru 20:1

S<sub>3</sub> : ethylacetát

Pro detekci látek na TLC byla použita UV-lampa (254 nm) (pro látky obsahující benzenové jádro) a karbonizace v 50 % H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> s následným zahřátím (pro ostatní látky).

Preparativní sloupcová chromatografie byla prováděna na silikagelu Fluka Silica gel 60 (40 – 63 μm).

Hodnoty pH byly zjišťovány pomocí pH-metru Testo 206 pH-1.

NMR spektra byla měřena na přístroji Varian <sup>UNITY</sup> INOVA 400 při frekvenci 399,95 MHz (<sup>1</sup>H), v CDCl<sub>3</sub> jako rozpouštědla (s výjimkou látek obsahující volné hydroxylové skupiny, ty byly rozpuštěny DMSO-D<sub>6</sub> s přídavkem CD<sub>3</sub>COOD).

ESI hmotnostní spektra byla měřena na přístroji Esquire 3000 firmy Bruker v pozitivním módu.

UV/vis absorpční spektra byla měřena na přístroji Helios firmy Thermo Electron, s použitím PC softwaru Vision pro.

Rozpouštědla byla odpařována na rotační vakuové odparce firmy Büchi, při teplotách do 50 °C.

### 5.2 Pracovní postupy

#### 5.2.1 Syntéza derivátů β-CD

**3<sup>l</sup>-*O*-Cinnamyl-β-CD (2).** β-CD **1** (5,6 g, 4,5 mmol) byl rozpuštěn ve směsi vody (150 ml) a acetonitrilu (50 ml). Reakční směs byla ochlazená na 0 °C a následně byl přidán 1,5 M roztok cinnamylbromidu v acetonitrilu (3,0 ml, 4,5 mmol). Po pěti minutách míchání za stálého chlazení změnila směs barvu z čiré na mléčně bílou. Ihned poté byl přidán 36 % roztok NaOH (1,0 ml, 9 mmol). Směs byla míchána přes noc při laboratorní teplotě. Poté byla



reakce ukončena přidáním 3,6 ml koncentrované kyseliny octové. Průběh reakce byl sledován pomocí TLC v soustavě  $S_1$ . Neutralizovaná směs byla odpařena. Odparek byl extrahován horkým methanolem ( $3 \times 100$  ml). Methanolvé extrakty byly spojeny a odpařeny. Z pevného zbytku byl regenerován nezreagovaný  $\beta$ -CD rekrystalizací z vody. K odparku byl přidán silikagel (30 g) a destilovaná voda (200 ml). Tato směs byla refluxována za stálého míchání po dobu 1 hodiny. Poté byla směs opět odpařena a takto naadsorbovaná na silikagelu byla nanesena na sloupec a chromatograficky rozdělena v mobilní fázi azeotrop *n*-propanol-voda, amoniak, *n*-propanol v poměru 10:1:1. Frakce obsahující monoderivát byly spojeny a odpařeny. Odparek byl přečištěn rekrystalizací z vody. Výtěžek byl 1,5 g (24,7 %).  $R_f$  produktu **1** v soustavě  $S_1$  se shoduje s  $R_f$  standardu (0,33).

**Per-O-acetyl-3<sup>1</sup>-O-cinnamyl- $\beta$ -CD (3).** Látka **2** (1,3 g, 1,04 mmol) byla rozpuštěna v pyridinu (12,7 ml) a byl přidán acetanhydrid (12,7 ml). Reakční směs byla míchána 2 hodiny při teplotě 90 °C. Poté byla směs opakovaně kódestilována s toluenem ( $5 \times 20$  ml) do konstantní hmotnosti. Směs byla odpařena a odparek poté lyofilizován při teplotě 90 °C. Výtěžek látky **3** činil 1,2 g (56,8 %).  $R_f$  produktu **2** v soustavě  $S_2$  se shoduje s  $R_f$  standardu (0,85).

**Per-O-acetyl-3<sup>1</sup>-O-formylmethyl- $\beta$ -CD (4).** Látka **3** (3,3 g, 1,58 mmol) byla rozpuštěna v chloroformu (33 ml) a byl přidán methanol (33 ml). Reakční směs byla ochlazená suchým ledem v acetonu na -40 °C. Do směsi byl po dobu 20 minut zaváděn ozon. Směs změnila barvu ze žluté na namodralou. Poté bylo přidáno pět kapek dimethylsulfidu. Průběh reakce byl sledován v soustavě  $S_2$  a  $S_3$ . Směs byla odpařena, nanesena na sloupec silikagelu a chromatografována s použitím ethylacetátu jako mobilní fáze. Frakce obsahující látku **4** byly spojeny a odpařeny. Výtěžek látky **4** činil 2,4 g (76,53 %).  $R_f$  produktu **4** v soustavě  $S_2$  se shoduje s  $R_f$  standardu (0,62). <sup>1</sup>H-NMR: 1,99-2,14 m, 60 H ( $20 \times \text{COCH}_3$ ); 3,64-5,40 m, 50 H (cyklodextrin + H-1'a, H-1'b); 5,49 dd (10,1, 8,9), 1 H (H-3<sup>1</sup>); 9,69 s, 1 H (CHO). Pro  $\text{C}_{84}\text{H}_{112}\text{O}_{56}$  vypočteno:  $M_r$  2017,8, ESI MS:  $m/z$  2039,2 [ $M + \text{Na}$ ]<sup>+</sup>. Pro  $\text{C}_{84}\text{H}_{112}\text{O}_{56}$  (2017,8) vypočteno 50,00% C, 5,59% H; nalezeno: 48,24% C, 5,56% H.

**3<sup>1</sup>-O-Formylmethyl- $\beta$ -CD (5).** Látka **4** (1,9 g, 0,94 mmol) byla rozpuštěna v 0,1 M roztoku methoxidu sodného v methanolu (38 ml). Směs byla míchána přes noc při laboratorní teplotě. Došlo ke změně barvy reakční směsi z čiré na mléčně bílou. Ke směsi byla přidána voda (65 ml) a Dowex 50 v H<sup>+</sup> cyklu (6,5 g). Ten byl předtím nacyklován promytím

300 ml 5% NaOH, poté vodou do neutrální reakce, dále 300 ml 5% HCl a nakonec opět vodou do neutrální reakce. Směs byla zfiltrována a odpařena. Odparek byl rozpuštěn ve vodě (65 ml) a byl opět přidán Dowex 50 v H<sup>+</sup> cyklu (6,5 g). Směs byla zfiltrována a odpařena. Výtěžek látky **5** činil 0,77 g (67%). **NMR + MS**

**3<sup>1</sup>-O-[2-(Adamant-1-yl)ethyl]-β-CD (6). Pokus o přípravu.** Látka **5** (500 mg, 0,42 mmol) byla rozpuštěna v acetátovém pufru (20 ml, pH=4,4) a byl přidán 1-adamantylamin (1,08 g, 7,13 mmol) v acetátovém pufru (50 ml, pH=4,4). Směs byla míchána při teplotě 25 °C po dobu 1 hodiny. Poté byl přidán NaBH<sub>3</sub>CN (0,185 g, 2,94 mmol). Reakce probíhala 4 dny při teplotě 25 °C. Reakce byla sledována pomocí TLC. Produkt **6** při reakci, pravděpodobně ze sterických důvodů, nevznikl. Jeho přítomnost nebyla prokázána ani pomocí MS. V MS spektru byla patrná zredukovaná látka **4** (3<sup>1</sup>-O-hydroxyethyl-β-CD).

### 5.2.2 Příprava roztoků pro měření komplexace

Roztoky pro měření UV/vis spekter byly připraveny smísením zásobních roztoků β-CD (nebo jeho derivátů) o koncentraci 0,01 M a roztoku *p*ABA o koncentraci 5×10<sup>-4</sup> M, pH = 2 (hodnoty pH roztoků byly upraveny pomocí zředěné HCl). Byly pipetovány objemy (viz. tab. 5) a doplněny na objem 10 ml.

**Tabulka 5. Pipetované objemy zásobních roztoků**

Ozn. baňky	V (β-CD)/ml	V ( <i>p</i> ABA)/ml
blank	0	0
1	0	1,0
2	0,2	1,0
3	0,3	1,0
4	0,6	1,0
5	3,0	1,0
6	6,0	1,0

Zásobní roztoky byly ponechány jeden den při laboratorní teplotě, jelikož jejich rozpouštění probíhá relativně pomalu.

Měření absorpčních spekter bylo provedeno v křemenné kyvetě o optické tloušťce 1 cm. Jako blank bylo použito čisté rozpouštědlo.

## 6. Závěr

Byla úspěšně syntetizována série regioselektivně monosubstituovaných derivátů  $\beta$ -CD v poloze 3. Syntéza byla provedena v pěti krocích, z nichž první 3 byly reprodukcí již ověřených postupů popsanych v literatuře<sup>7,8</sup>. Poslední krok syntézy, kterým je navázání 1-adamantylaminu na aldehydovou skupinu 3<sup>1</sup>-*O*-formylmethyl- $\beta$ -cyklodextrinu **4** byl proveden s přihlédnutím k publikovanému postupu<sup>10</sup>, který popisuje syntézu podobných látek. Kýžený produkt **6** však při reakci nevznikl.

Byla ověřena metodika měření komplexačních konstant inkluzních komplexů pomocí UV/vis spektrometrie. U látek **2**, **5** a nativního  $\beta$ -CD byly určeny hodnoty komplexačních konstant s vhodnou hostující molekulou (*p*ABA) ve vodném prostředí. U látky **4**, jež se nerozpouští ve vodě byla zkoumána možnost vzniku inkluzního komplexu v prostředí MeOH a byla určena hodnota komplexační konstanty v tomto médiu. Bylo zjištěno, že hodnoty komplexačních konstant nativního  $\beta$ -CD a jeho monosubstituovaných derivátů v poloze 3, opatřených substituentem do molekulové hmotnosti 43 g·mol<sup>-1</sup>, ve vodném prostředí se výrazně neliší. Naopak v prostředí MeOH je pevnost nekovalentní vazby mezi hostem a hostitelem zhruba dvojnásobně vyšší než ve vodném prostředí.

Syntéze dalších derivátů  $\beta$ -CD, s připojeným substituentem o vyšší molekulové hmotnosti, který by mohl stericky ovlivňovat vznik inkluzního komplexu a ověřování dalších metod určování komplexačních konstant bude věnována příští práci.

## 7. Poděkování

Na závěr bych rád poděkoval všem, kteří přispěli ke vzniku této práce. Na prvním místě svému školiteli Doc. RNDr. Jindřichu Jindřichovi CSc., za vedení bakalářské práce. Dále pak všem spolupracovníkům z laboratoře 135, za podnětné rady a vytvoření příjemného pracovního prostředí. V neposlední řadě bych chtěl poděkovat RNDr. Stanislavu Hilgardovi, CSc., za umožnění měření UV spekter v jeho laboratoři a RNDr. Martinu Štíchovi za měření MS spekter.

## 8. Seznam použité literatury

---

1. Szejtli J.: Chem. Rev. **1998**, 98, 1743-1754.
2. Rajendiran N., Shanthi B., Stalin T., Vasantha Rani P.: J. Incl. Phen. **2006**, 55, 21-29.
3. Fromming K.-H., Szejtli J.: Cyclodextrins in pharmacy **1994**, 1-2.
4. Andini S., Gastrunuovo G., Elia V., Gallotta.: Carb. res. **1991**, 217, 87-97.
5. Villiers A.: Compt. Rend. **1891**, 112, 536.
6. Inoue Y., Hakushi T., Liu Y., Tong L.H., Shen B.: J. Am. Chem. Soc. **1993**, 115, 475-486.
7. Jiczinszky L., Fenyvesi E., Hasimoto H., Ueno A., Szejtli J., Osa T.: Compr. Supramol. Chem. **1996**, 3, 57-127.
8. Jindřich J., Tišlerová I.: J. Org. Chem. **2005**, 70, 9054-9055.
9. Kusák M.: Diplomová práce, PřF UK, **2002**.
10. Fujita K., Tahara T., Imoto T., Koga T.: J. Am. Chem. Soc. **1986**, 108, 2030.
11. Prabakaran M., Mano J. F.: Carb. Pol. **2006**, 63, 153-166.
12. Hirose K.: J. of Incl. Phen.: **2001**, 39, 193-209.
13. Loftsson T., Hreinsdóttir D., Másson M.: Int. J. Pharm. **2005**, 302, 18-28.
14. Shaomin S., Yu Y., Jinghao P.: Anal. Chim. Acta **2002**, 458, 305-310.
15. Benesi H. A., Hildebrand J. H.: J. Am. Chem. Soc. **1949**, 71(8), 2703-2707.
16. Yorozu T., Hoshino M., Imamura M.: J. Phys. Chem. **1982**, 86, 4422-4426.
17. Koenig J. F., Martel D.: Thin Sol. Films **2008**, 516(12), 3865-3872.