

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Chemie



Zdislava Pechrová

Fluorometrická detekce sacharidů pomocí fenyloboronových kyselin

Fluorometric detection of sacharides based on phenylboronic acids

Bakalářská práce

Vedoucí práce:

RNDr. Pavel Matějček, Ph.D.

Konzultant:

Ing. Mariusz Marcin Uchman, Ph.D.

Praha, 2017

Prohlášení

Já, Zdislava Pechrová, prohlašuji, že bakalářskou práci na téma Fluorimetrická detekce sacharidů pomocí fenylboronových kyselin jsem vypracovala samostatně a všechny použité zdroje jsem uvedla.

V Praze dne 22. 5. 2017

Poděkování

Děkuji panu RNDr. Pavlu Matějčkovi, Ph.D. za jeho cenné rady a pomoc při vypracování této bakalářské práce. Dále děkuji konzultantovi panu Ing. Mariusz Marcin Uchman, Ph.D. za připomínky. Poděkování také patří Mgr. Davidu Vrbatovi za syntézu značky Click-fluor a polymeru glc-PEG-glc.

Abstrakt

Práce se zabývá vlivem fruktosy, glukoronové kyseliny, glukosy a manosy na fluorescenční charakteristiky sondy Click fluor pomocí stacionární a časově rozlišené fluorescenční spektroskopie. Měřila se detailně spektra pro široký rozsah koncentrací sacharidů (do 3M). Změna intenzity fluorescence po přidání sacharidů se využila pro výpočet vazné konstanty komplexu Click-fluor/sacharid. Pro glukosu a fruktosu se také změřily křivky dohasínání fluorescence. Posledním tématem byla vazba značky Click-fluor na poly(ethylen glykolový), PEG, polymerní řetězec s navázanými molekulami glukosy jako koncovými skupinami, glc-PEG-glc.

Z měření vyplývá, že největší afinitu má značka Click-fluor na fruktosu, kdežto tvorba esteru s glukosou je velmi slabá. V emisním spektru byly pozorovány celkem tři pásy. Jeden odpovídá nenavázané značce, druhý nestabilní formě esteru s cukrem a třetí stabilní cyklické formě esteru s cukrem. V časově rozlišené fluorescenci značky Click-fluor sice byly patrné změny u vlnových délek odpovídajícím esteru s glukosou, ne však příliš výrazné. Z emisních spekter komplexu Click-fluor a polymer glc-PEG-glc. i z hodnot středních dob života fluorescence vyplývá, že dochází k relativně silné vazbě značky na glukosou modifikovaný polymer.

Hlavním zjištěním je, že tato sonda není příliš vhodná pro detekci volné glukosy, ale vazba na další studované sacharidy byla pomocí stacionární fluorescenční spektroskopie detekovatelná.

Klíčová slova: fenyloboronové kyseliny, fluorescence, sacharidy

Abstract

This paper deals with influence of fructose, glucuronic acid, glucose and mannose on the fluorescence characteristics of probe Click fluor using stationary and time resolved fluorescence spectroscopy. The spectra were measured for a wide range of concentrations (up to 3M), and the change in fluorescence intensity after the addition of carbohydrate was used to calculate the binding constants of the Click fluor/saccharide complex. Also time resolved fluorescence was measured for glucose and fructose, The last topic was the linking of Click-fluor to poly(ethylene glycol), PEG, with glucose at the end of the chain, glc-PEG-glc.

The measurements show that the affinity of the Click-fluor for fructose is the greatest, on the other hand formation of the ester with glucose is very weak. Three strips were observed in the emission spectrum. One corresponds to the unbound probe, the second unstable ester form with sugar, and the third stable cyclic form of the sugar ester. In the time-resolved fluorescence of Click-fluor, changes in the wavelengths corresponding to the carbohydrate ester were seen, but not too pronounced. From the emission spectra of complex Click-fluor/glc-PEG-glc polymer and even lifetime fluorescence values, suggests that there is relatively strong binding of the probe to the glucose-modified polymer.

The main finding is that this probe is not suitable for detection of free glucose, but the binding to other studied carbohydrates was detected by stationary fluorescence spectroscopy.

Key words: phenylboronic acid, fluorescence, carbohydrates

OBSAH

Úvod a Cíle práce	6
Přehled řešené problematiky	8
<i>Sacharidy.....</i>	8
<i>Fluorescence</i>	10
<i>Fluorescenční zobrazování</i>	12
<i>Časově rozlišená fluorometrie</i>	12
<i>Sacharidové senzory.....</i>	13
<i>Click-fluor</i>	16
<i>Výpočet vazebné konstanty.....</i>	17
Materiál a Metody	19
<i>Materiál.....</i>	19
<i>Příprava vzorků.....</i>	21
<i>Metody.....</i>	23
Výsledky a diskuze.....	24
<i>Fluorescence značky Click-fluor – vliv sacharidů</i>	24
<i>Porovnání všech cukrů</i>	29
<i>Výpočet vazebné konstanty Click-fluor/sacharid</i>	30
<i>Dohasínání fluorescence značky Click-fluor – vliv sacharidů.....</i>	32
<i>Vazba značky Click-fluor na polymer glc-PEG-glc</i>	34
Shrnutí a Závěr	36
Přehled literatury	37

Úvod a Cíle práce

Sledování hladiny sacharidů v těle je důležité v diagnostice a léčbě různých nemocí především diabetu. Sacharidy jsou organické hydroxysloučeniny obsahující v molekule karbonylovou skupinu. Přítomny jsou ve všech organismech, kde plní významné funkce. Tvoří energetickou zásobu organismů a jsou jednou ze základních živin heterotrofních organismů.

Fluorescenční značky jsou známy jako účinné sondy, které slouží k zobrazování a také k monitorování vlastností studovaných systémů na molekulární úrovni. Důvodem je citlivost fluorescenčních značek na polaritu, viskozitu, pH, přítomnosti některých iontů a dalších sloučenin ve svém okolí. Všechny tyto vlastnosti dělají z fluorescence jednu z nejpoužívanějších metod pro studování fyzikálně chemických a biofyzikálních procesů v nano- a mikro-systémech.

Fenylboronová kyselina a její deriváty jsou významným senzorem pro detekci zejména sacharidů pomocí elektrochemických, fluorescenčních a kolorimetrických technik. Důvodem je skutečnost, že při fyziologickém rozsahu pH se dobře váží s dioly za vzniku cyklických esterů. V případě fluorescenční detekce se řada prací zabývající se fenylboronovými kyselinami soustřeďuje na procesy spojené s procesy zhášení a přenosu excitační energie. Dalšími důležitým tématem je otázka selektivity vzhledem k sacharidům, jelikož většina známých značek má afinity k fruktose mnohem větší než ke glukose. Dále je snaha posunout konstanty kyselosti fenylboronových kyselin do oblasti fyziologického pH pomocí syntézy nových derivátů.

Předložená práce se zabývá fluorescenčním chováním sondy Click-fluor pomocí stacionární a časově rozlišené fluorescenční spektroskopie. Jelikož tato sonda vytváří estery se sacharidy, byl studován vliv glukosy, manosy, fruktosy a glukuronové kyseliny na fluorescenční charakteristiky značky Click-fluor. Toho bylo využito pro výpočet vazné konstanty Click-fluor/sacharid. Posledním tématem je vazba značky Click-fluor na poly(ethylen glykolový), PEG, polymerní řetězec s navázanými molekulami glukosy jako koncovými skupinami, glc-PEG-glc. Toho lze využít při studiu nanostruktur, které tento polymer vytváří pomocí fluorescenční spektroskopie, zejména pro lokalizaci molekul glukosy v těchto nanostrukturách.

Práci jsem vypracovala během bakalářského studia na Katedře fyzikální a makromolekulární chemie, PŘF UK, pod vedením Dr. Pavla Matějčka. Můj příspěvek spočíval v přípravě vzorků, měření fluorescenčních spekter a časově rozlišených křivek dohasínání fluorescence a následné

zpracování naměřených dat pod dohledem svého školitele a konzultanta. Vliv některých sacharidů na fluorescenční spektra značky Click-fluor byl již v literatuře popsán, časově rozlišené měření však dosud publikováno nebylo. Značka Click-fluor a polymer glc-PEG-glc byly syntetizovány Mgr. Davidem Vrbatou, za což bych mu chtěla poděkovat. Vlastní práce je rozdělena na tři části: první část je přehled řešené problematiky od základních vlastností cukrů po vazbu fenyloboronových kyselin na sacharidy. Druhá část popisuje experimentální část práce a třetí část se shrnuje naměřené výsledky a jejich interpretaci.

Přehled řešené problematiky

Sacharidy

Sacharidy jsou organické hydroxysloučeniny obsahující v molekule karbonylovou (aldehydovou nebo ketonovou) skupinu a jejich deriváty (deoxycukry, aldonové, alduronové kyseliny a glykosidy). Přítomny jsou ve všech organismech, kde plní významné funkce. Tvoří základ některých strukturních molekul. Jsou také součástí (deoxy)ribonukleotidů v molekulách DNA, RNA nebo enzymů (ATP). Tvoří energetickou zásobu organismů a jsou jednou ze základních živin heterotrofních organismů.

Základní dělení sacharidů je na monosacharidy, oligosacharidy a polysacharidy. Monosacharidy jsou základní sacharidy, které již nelze dělit bez rozštěpení C-C vazby. Podle počtu uhlíkových atomů se monosacharidy dělí na triosy, tetrosy, pentosy, hexosy a heptosy. Monosacharidy se dále můžou vázat glykosidovými vazbami na oligosacharidy (2-10 monosacharidových jednotek) nebo polysacharidy (10 a více jednotek).

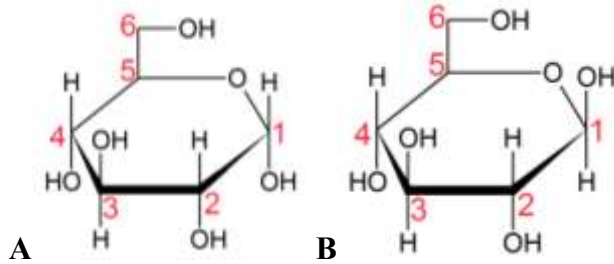
Monosacharidy se dále dělí na aldosity a ketosy. Aldosity obsahují aldehydovou skupinu. Mezi biologicky nejdůležitější patří D-glukosa, D-manosa a D-ribosa. Ketosy obsahují ketoskupinu a mezi biologicky nejdůležitější patří D-fruktosa.

Protože chemie sacharidů a jejich derivátů hraje důležitou roli při metabolických cestách, detekování jejich přítomnosti a koncentrace je nezbytné pro různé procesy v medicíně a průmyslu. Především detekování glukosy má velký význam, když transport glukosy v lidském organismu je spojen s určitými chorobami: cystická fibróza, diabetes a rakovina. Nedávné výzkumy potvrdily, že přesná kontrola hladiny glukosy v krvi u diabetiků snižuje riziko dlouhodobých následků, jako jsou slepota, selhání ledvin, infarkt a gangréna. Průmyslové aplikace jsou široké, od kontroly fermentačního procesu po potvrzení enantiomerní čistoty syntetických léků.^{1,2}

Glukosa

D-Glukosa, někdy nazývána jako hroznový cukr, dextrosa patří mezi aldohexosy (Obrázek 1). α -D-glukosa má pouze hydroxylové skupiny na 1. a 2. uhlíku a 2. a 4. uhlíku mířící stejným směrem. Druhá forma β má hydroxylové skupiny na 1 a 3 uhlíku a 2. a 4. uhlíku mířící na stejnou stranu kruhu. Ostatní hydroxylové skupiny míří na jinou stranu kruhu. Ve vodném roztoku se ustavuje rovnováha se složením 36% α -D-glukosa a 64% β -D-glukosa. Glukosa je

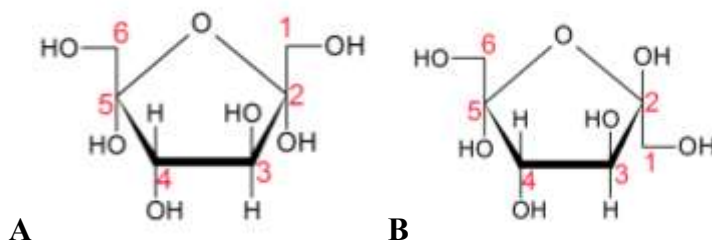
stavební složkou mnoha oligosacharidů a polysacharidů. Vzniká v rostlinách při fotosyntéze a je významným zdrojem energie savců.



Obrázek 1: Struktura (A) α -D-glukosy a (B) β -D-glukosy.

Fruktosa

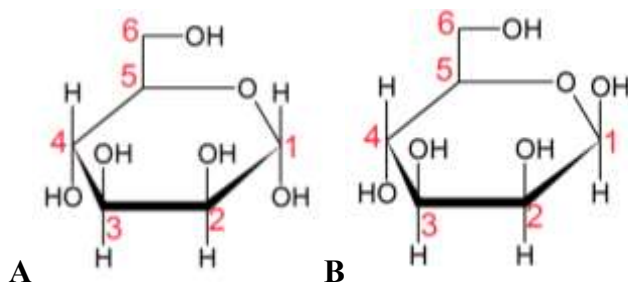
Fruktosa je nejrozšířenější ketohexosou a také nejsladším cukrem (Obrázek 2). α -D-fruktofuranosa má hydroxylové skupiny na 1. a 3. uhlíku, 2. a 4. uhlíku, také 4. a 5. uhlíku mířící na stejnou stranu kruhu. β -D-fruktofuranosa má skupiny na 2. a 3. uhlíku a 4. a 5. uhlíku mířící na stejnou stranu kruhu.



Obrázek 2: Struktura (A) α -D-fruktofuranosy a (B) β -D-fruktofuranosy.

Manosa

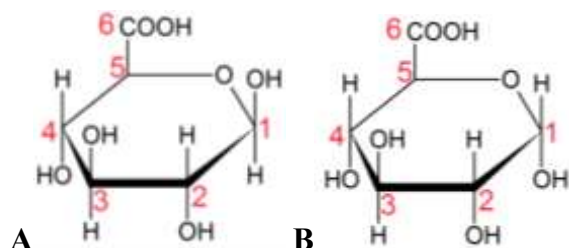
Manosa je epimer glukosy (Obrázek 3). To znamená, že se liší konfigurací OH skupiny na druhém uhlíku. U α -D-manosy hydroxylové skupiny na 2. a 3. uhlíku mířící na stejnou stranu kruhu. Na druhou stranu β -D-manosy míří hydroxylové skupiny na 1. a 2. uhlíku, 1. a 3. uhlíku, 2. a 3. uhlíku mířící stejnou stranu kruhu. V roztoku v rovnovážném stavu je 67% α -D-manosy a 33% β -D-manosy.



Obrázek 3: Struktura (A) α -D-manosy a (B) β -D-manosy.

Glukuronová kyselina

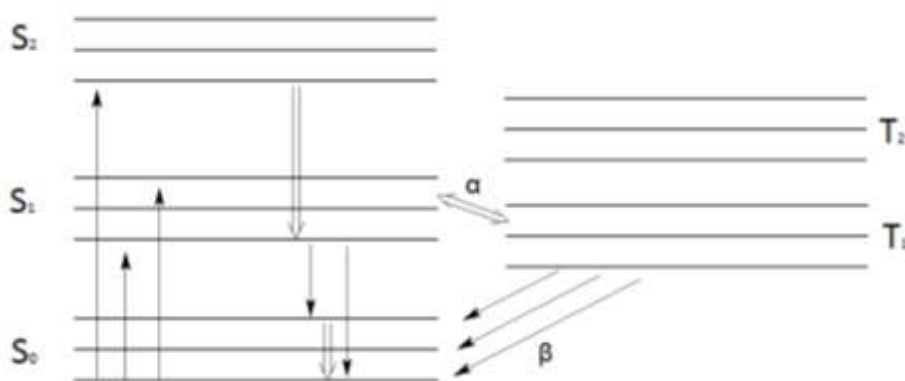
Glukuronová kyselina je jedním z derivátů glukosy (Obrázek 4). Vzniká oxidací uhlíku v poloze 6. Její α forma má hydroxylové skupiny na 1. a 3. uhlíku a 2. a 4. uhlíku mířící na stejnou stranu kruhu; β forma má skupinu na 1. a 2. uhlíku, 2. a 4. uhlíku mířící na stejnou stranu kruhu.



Obrázek 4: Struktura (A) α -D-glukuronové kyseliny a (B) β -D-glukuronové kyseliny.

Fluorescence

Emise záření, ke kterému dochází při spinově dovolenému přechodu z některé vibrační hladiny excitovaného singletového stavu S_n , do některé vibrační hladiny energeticky nižšího stavu S_1 se nazývá Fluorescence. Podle Kashova pravidla obvykle dochází před emisí k relaxaci vibrační energie a vnitřní konverzi, takže fluorescenční přechod nastává ze základní vibrační hladiny prvního excitovaného stavu S_1 do některé vibrační hladiny základního stavu S_0 . Emitované záření je charakterizováno větší vlnovou délkou a nižší energií než záření excitační (tzv. Stokesův posun).



Obrázek 5: Zjednodušené schéma Jablonského diagramu (význam symbolů je uveden v textu).

Energetické přechody popisuje takzvaný Jablonského diagram (Obrázek 5), kde S_x představuje singletové stavy, T_x tripletové a vodorovné čáry představují vibrační hladiny. Plné šipky směřující nahoru představují potenciální absorpční přechod mezi singletovými stavy. Plné šipky směřující dolů, představují určité fluorescenční přechody. Prázdné šipky znázorňují

vnitřní konverzi. Dvojitá šipka α , představuje mezisystémové křížení (směr vpravo) a opožděnou fluorescenci (směr vlevo). Šipky označené β představují fosforescenci.

Výběrové pravidlo řídí možné přechody z nulového vibračního stavu jednoho elektronového stavu do vibračního stavu jiného elektronového stavu. Ale ne všechny přechody jsou upřednostňovány. Pravděpodobnost přechodu záleží na překrytí vibračních vlnových funkcí těchto dvou stavů (Franckův-Condonův princip).

Emise fotonu ve velkém souboru excitovaných molekul je zcela náhodná. Pravděpodobnost emise je pro všechny molekuly stejná. Pro tyto soubory je počet molekul, které emitují foton za jednotku času, dN/dt , přímo úměrný počtu molekul, N , které zůstávají excitované. Platí tato diferenciální rovnice popisující děje, které se řídí kinetikou 1. řádu

$$\frac{dN}{dt} = -kN, \quad (1)$$

kde k je kladná konstanta úměrnosti a má význam rychlostní konstanty. Řešení rovnice vede k exponenciálnímu poklesu intenzity fluorescence $I(t)$ v čase t z počáteční intenzity I_0 v počátečním čase t_0 .

$$I(t) = I_0 e^{(-\frac{t}{\tau_0})}, \quad (2)$$

kde τ_0 je střední doba života fluorescence. Pro většinu fluoroforů se střední doba života fluorescence pohybuje v řádu jednotek až desítek nanosekund.

Když emise fotonu je jediný proces, při kterém dochází k deexcitaci, pak je střední doba života nepřímo úměrná rychlostní konstantě emise:

$$\tau_0 = \frac{1}{k_e}, \quad (3)$$

kde k_e je rychlostní konstanta emisních přechodů.

Často fluorescenční křivka dohasínání (křivka intenzity fluorescence proti času) nemůže být vyjádřena jednou exponenciálou. To může být způsobeno přítomností nečistot, ale není to vždy pravidlem. K deexcitaci může docházet také vlivem zhášecích procesů, přenosem energie na akceptor, apod. V takovém případě se intenzita fluorescence vyjadřuje jako součet několika exponenciálních funkcí a celková intenzita se rovná:

$$I(t) = \sum_i a_i \cdot e^{-\frac{t}{\tau_i}}, \quad (4)$$

kde, a_i značí předexponenciální faktor jednotlivých exponenciál a τ_i jsou jednotlivé doby života. V takovém případě můžeme vyjádřit střední dobu života τ_m jako vážený průměr jednotlivých složek τ_i , (které však obecně nemusí mít fyzikální význam!), kde vahou je příslušná frakční intenzita $F_i = a_i \tau_i / \sum_i (a_i \tau_i)$

$$\tau_m = \sum_i F_i \tau_i, \quad (5)$$

Fluorescenční zobrazování

Fluorescenční značky mají velký význam v zobrazovacích technikách, např. v konfokální fluorescenční mikroskopii. Metoda je využitelná pro přímé prozkoumání chemie buňky a porozumění jejich funkcí. Má řadu výhod, jako velká citlivost, zobrazení v reálném čase, relativně jednoduchou přípravu vzorků, apod. V medicínských aplikacích jsou důležité zobrazovací techniky zejména v blízké infračervené oblasti (NIR) a hluboké červené oblasti (deep/far red), protože může projít až několika centimetry tkáně. Tohoto se dá využít při detekci rakoviny a dalších nemocích ještě v raném stádiu.⁴

Časově rozlišená fluorometrie

Časově rozlišená fluorometrie studuje kinetiku dohasínání fluorescence. Po krátkém pulsu, kdy dochází k excitaci, se intenzita fluorescence v čase mění v závislosti na deexcitačních procesech. Nejčastěji se používá metoda časově korelovaného čítání fotonů. Používají se pulsní lasery nebo diody, které produkují velice krátký a rychle se opakující puls. K detekci je nutný citlivý fotonásobič. Měřením excitačního pulsu a prvního emitovaného fotonu umožňují detektory určit čas mezi těmito ději. Měřená škola času je rozdělena na 10^3 až 10^4 intervalu. Každému intervalu odpovídá kanál, do něhož se zaznamenává počet registrovaných fotonů. Pro přesné měření je nutné registrovat 10^8 až 10^9 fotonů.

Samotné měření se provádí nepřímo formou histogramu, který se konstruuje při mnohonásobném opakování experimentu, při kterém se měří doba od okamžiku excitace do registrace prvního emitovaného fotonu. Intenzita excitace musí být během experimentu nízká. Další nutnou podmínkou je relativně nízká frekvence excitačních pulzů. Takto se zabrání registraci dvou fotonů zároveň, a potom naměřený histogram představuje závislost dohasínání fluorescence na čase. Při měření se kromě Poissonova šumu (šum při počítání fotonů) objevují i systematické chyby. Ty mohou pocházet od excitačního zdroje a elektroniky, mrtvý čas detektoru nebo nahromadění pulzů.

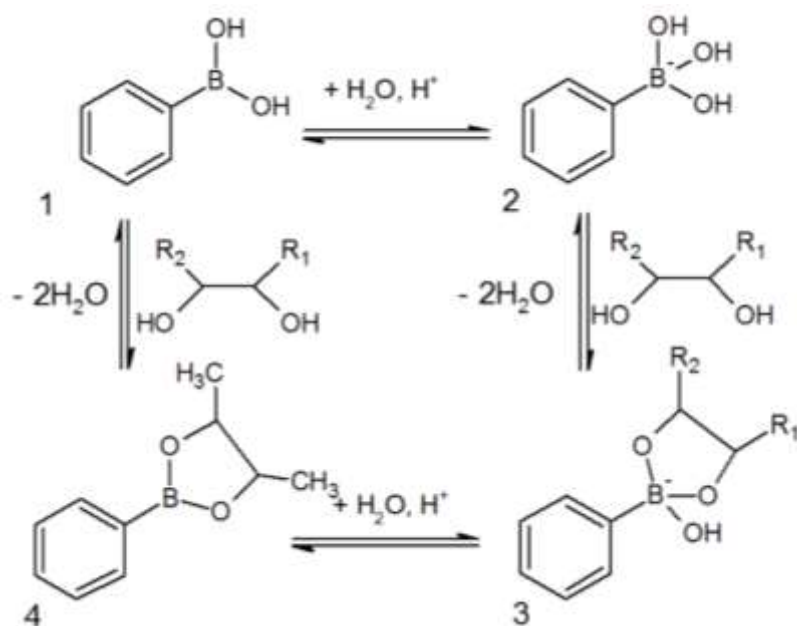
Sacharidové senzory

Mnoho polymerních systémů detekce sacharidů je enzymatická, kde glukoso-oxidáza nebo glukoso-dehydrogenáza je imobilizována v membráně propustné pro molekuly glukosy. To má však několik nevýhod. Za prvé detekce je specifická jenom pro několik sacharidů a za druhé enzymatické senzory jsou příliš citlivé na vnější podmínky a dochází k jejich rozkladu.⁵

Další možnosti detekce sacharidů jsou založeny na nekovalentních interakcích, především na vodíkových vazbách. V tomto případě však zejména při malých koncentracích cukrů je limitujícím faktorem značná solvatace senzorů, což znesnadňuje vazbu sacharidu.^{2,6}

Fenylboronová kyselina je velice využívaným chemo/biosenzorem pro detekci sacharidů a dalších polyolů elektrochemickými, fluorescenčními a dalšími metodami. Především proto, že při fyziologickém rozsahu pH se dobře váže na dioly za vzniku cyklických esterů. Fenylboronová kyselina v bazickém roztoku kovalentně reaguje s cis 1,2 nebo 1,3-dioly a vytvoří pěti nebo šestičlenný kruh. Tato reakce je reversibilní a nespotřebovává se při ní analyt, což ji dělá ideální pro design senzorů. Boronové kyseliny se dobře váží nejenom s monosacharidy ale i s oligo- a polysacharidy přítomné ve vnější buněčné membráně. Hlavní problém tkví ve zhášení značek, kterému se často nedá vyhnout.⁷

K pochopení interakce mezi fenylboronovou kyselinou a diolem je důležité znát strukturu kyseliny a jednotlivé rovnováhy při vazbě boronové kyseliny k diolu (viz Obrázek 6). Boronové kyseliny jsou slabé Lewisovy kyseliny, kde na elektroneficientní atom bóru dochází k vazbě molekuly vody za současného uvolnění protonu. Podobně se mohou vázat i další Lewisovské báze. Trigonální forma je neutrální s hybridizací sp^2 , ale tetraedrická forma je záporně nabitá s hybridizací sp^3 . Fenylboronová kyselina může reversibilně vytvářet cyklické estery s dioly, jak je znázorněno na Obrázku 6 dole.⁸



Obrázek 6 – Acidobazické reakce fenyloboronových kyselin a jejich vazba s dioly. Číslo 1 je fenyloboronová kyselina, 2 je záporně nabitá tetraedrická forma, 3 záporně nabitý tetraedr esteru, který je kyselější než samotná fenyloboronová kyselina (má hybridizaci sp^3), 4 je ester fenyloboronové kyseliny v trigonální formě (hybridizace sp^2)

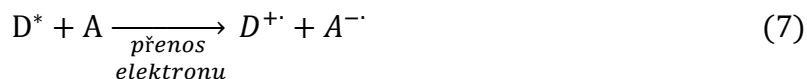
Optimální podmínky pro reakce znázorněné na Obrázku 6 jsou stále předmětem intenzivního studia. Zprv, optimální pH pro vytvoření vazby mezi fenyloboronovou kyselinou a diolem je nad hodnotou pK_a samotné fenyloboronové kyseliny. U běžných značek založených na fenyloboronové kyselině k tomu dochází při značně alkalickém $pH > 12$, což je pro bio-aplikace nepříznivé. Je známo, že snížením pK_a kyseliny vzroste vazební konstanta vzniku esteru. Snížit pK_a kyseliny lze například tím, že se v blízkosti boronové skupiny naváže terciální amin, ten nejenom sníží pK_a , ale také sníží úhel O-B-O, který dále zvýší Lewisovskou kyselost fenyloboronové kyseliny. Zadruhé, změna boronové kyseliny na její ester vede k snížení pK_a a za třetí, pufr nemá žádný vliv na vazebnou konstantu a tím pádem na celou reakci.

Vazná konstanta fenyloboronových kyselin s jednotlivými cukry a používanými fluorescenčními značkami pro detekci cukrů (například Alizarin S) se liší. Pro většinu značek je pořadí stability s cukry v tomto pořadí: fruktosa > galaktosa > manosa > glukosa.⁹

Dva nejdůležitější mechanismy pro vytváření efektivních sacharidových značek je fotoindukovaný elektronový transfer (Photoninduced electron transfer – PET)^{10,11} a vnitřní přenos náboje (internal charge transfer – ICT)^{12,13}

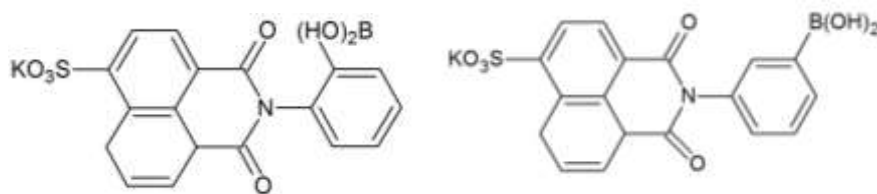
Světlem indukovaný elektronový transfer (PET) je přenos elektronu mezi molekulou donoru (D) a molekulou akceptoru (A) po navázání sacharidu na senzor. Před samotným přenosem

elektronu je donor světelně excitován. Při přenosu dochází k redukci donoru a oxidaci akceptoru a tím pádem se z donoru stane radikál kation a z akceptoru radikál anion.



K elektronovému transferu dochází, když HOMO (nejvyšší obsazený molekulový orbital) má o něco větší energii než HOMO orbital akceptoru.^{14,15}

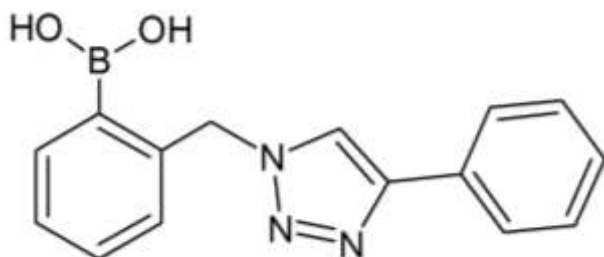
Výzkum v oblasti senzorů cukrů se soustřeďuje na syntézu značek selektivních pro glukosu. Zhi Cao a kol. (2009) syntetizoval dvě sacharidové značky, které jsou rozpustné ve vodě a velice dobře se vážou na glukosu (Obrázek 7). Dobře se k ní váží i při pH = 7,4, kdy se intenzita fluorescence zvýšila až 2-5 krát. Hlavním problémem je stále výrazná afinita těchto značek k fruktose.¹⁶



Obrázek 7 –Příklady fluorescenčních značek založených na fenyloboronové kyselině s velkou afinitou ke glukose.

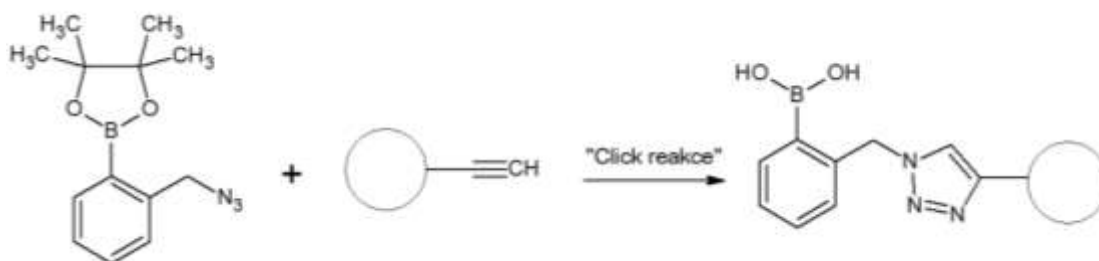
Diboronové značky začínají mít větší význam než značky s jednou boronovou kyselinou kvůli většímu počtu vazebných míst. To vede k větší vazebné afinitě a tudíž lepšímu označení nebo zobrazování. Selektivita k různým cukrům se dá upravit podle vzdálenosti mezi boronovými kyselinami nebo volbou vhodného fluoroforu. Diboronové kyseliny se především používají jako značku pro glukosu. Značka s glukosou vytváří 1:1 cyklický ester a využívá strukturní vlastnost glukosy, že se může k boronové kyselině vázat na dvou místech. Mezi nevýhody diboronových kyseliny patří především náročná výroba a špatná rozpustnost ve vodě.¹⁷

Click-fluor



Obrázek 8 – Struktura značky "Click-fluor"

Název „Click-fluor“ navrhl Scafton a kol., který tak pojmenoval generaci fluoroforů, které vznikají z nefluorescenčních částí takzvanou „click reakcí“. Obecně jsou tyto typy reakcí založeny na reakci mezi azidem a terminálním alkinem katalyzované měďnými ionty, kdy se vytvoří 1,2,3-triazolový kruh (Obrázek 8 a 9). Výhodou reakce je její spolehlivost, specifická a biokompatibilita. Tato reakce má velké využití nejenom při vytváření fluorescenčních značek, ale i při vytváření léků nebo nových materiálů. „Click chemistry“ má potenciál rychle vytvářet fluorescenční senzory pro sacharidy z azidů boronové kyseliny a jakéhokoliv fluoroforu nesoucího terminální alkyň.¹⁸



Obrázek 9 – Obecné schéma tvorby fluorescenční značky pomocí „click reakce“. Kruh představuje jakýkoliv fluorofor.

Systematický název zkoumané značky je 2-((4-fenyl-1H-1,2,3-triazol-1-yl)methyl)fenylboronová kyselina. Její excitační vlnová délka je 276 nm. Tato značka sama o sobě má malou fluorescenci (malý kvantový výtěžek), která však prudce vzroste po přidání cukru a vzniku příslušného esteru s fenylboronovou kyselinou.

Zvýšení fluorescence při přidání cukru může být vysvětleno tím, že při normální fluorescenci lokálně excitovaného stavu 1,2,3 triazolového donoru senzoru je potlačeno přenosem energie na neutrální fenylboronový akceptor, na slabou Lewisovskou kyselinu. Když se přidá sacharid, na boronovém centru dojde ke zvýšení kyselosti a tvorbě záporně nabitě tetragonální formy. Při

těchto podmínkách, přenos energie z 1,2,3-triazolového kruhu je nevýhodný a fluorescence značky Click-fluor vázané na cukr se obnoví.

Pořadí vazby na základě vazebné konstanty jednotlivých cukrů se oproti výše popsanému liší. Podle Scratfon a col. je stabilita komplexu Click-fluor/cukr v pořadí manosa > fruktosa > galactosa > glukosa. Scratfon přisuzuje změnu v selektivitě přítomností akceptoru vodíkové vazby na 1,2,3 triazolovém kruhu.¹⁹

Výpočet vazebné konstanty

Pro výpočet vazebné konstanty K_a se používá Benesi-Hildebrandova rovnice. Ustavuje se rovnováha:



kde $[B]$ je koncentrace boronové kyseliny, $[C]$ je koncentrace cukru a $[BC]$ je koncentrace boronového esteru. Při stanovení K_a se hodnota $[C]$ mění, avšak $[B]$ je konstantní. Při předpokladu, že $[C] \gg [B]$ se definuje vazebná konstanta jako

$$K_a = \frac{[BC]}{[B][C]} \quad (10)$$

Dále platí: $[B]_0 = [B] + [BC]$ (koncentrace fenyloboronových kyselin ve všech formách) a $[Q]_0 = [C] + [BC]$ (koncentrace cukrů ve všech formách).

$$K_a = \frac{[BC]}{\{[B]_0 - [BC]\} - \{[Q]_0 - [BC]\}} \quad (11)$$

Když $[C] \gg [B]$, tak $[C]_0 - [BC] \approx [C]_0 \approx [C]$ a když I_0 je intenzita fluorescence před přidáním cukru a ΔI je změna intenzity po přidání cukru, tak platí:

$$[B] \propto I_0 \Rightarrow [B] = mI_0 \quad (12)$$

$$[BC] \propto \Delta I \Rightarrow [BC] = n\Delta I, \quad (13)$$

Kde m a n jsou konstanty, která závisejí na teplotě, molární koncentraci fenyloboronové kyseliny a optické dráze excitačního paprsku. Po dosazení vztahů (12) a (13) se dostane rovnice

$$\frac{n\Delta I}{I_0} = \frac{m[C]K_a}{1 + [C]K_a} \Rightarrow \frac{I_0}{n\Delta I} = \frac{1 + [C]K_a}{m[C]K_a} \quad (14)$$

Úpravou se dostane lineární tvar

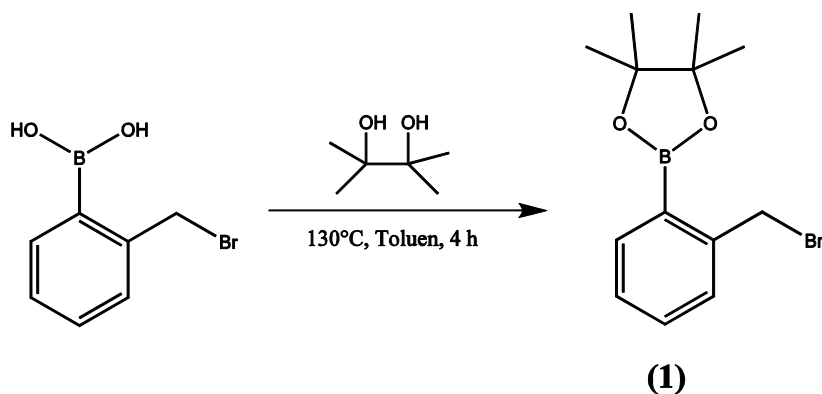
$$\frac{I_0}{\Delta I} = \frac{n}{mK_a} \times \frac{1}{[C]} + \frac{n}{m} \quad (15)$$

Vynesení grafu závislosti $I_0/\Delta I$ na $1/[C]$ lze experimentálně určit vazebnou konstantu K_a jako podíl směrnice:úsek.⁹

Materiál a Metody

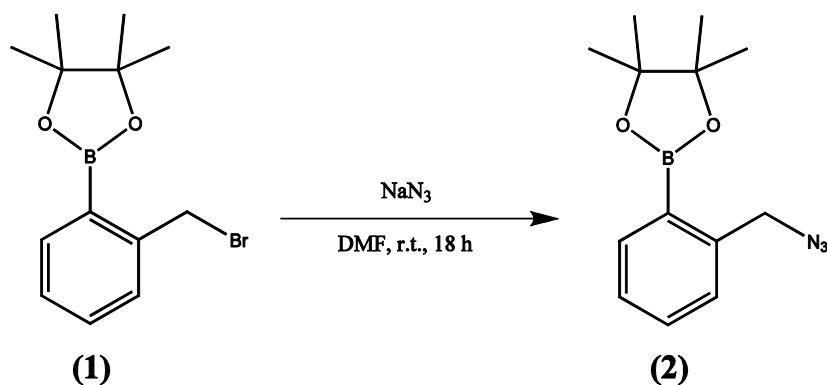
Materiál

Fluorescenční značka Click-fluor byla připravena v naší laboratoři Mgr. Davidem Vrbatou podle jím navrženého postupu:



Obrázek 10 – První reakční krok.

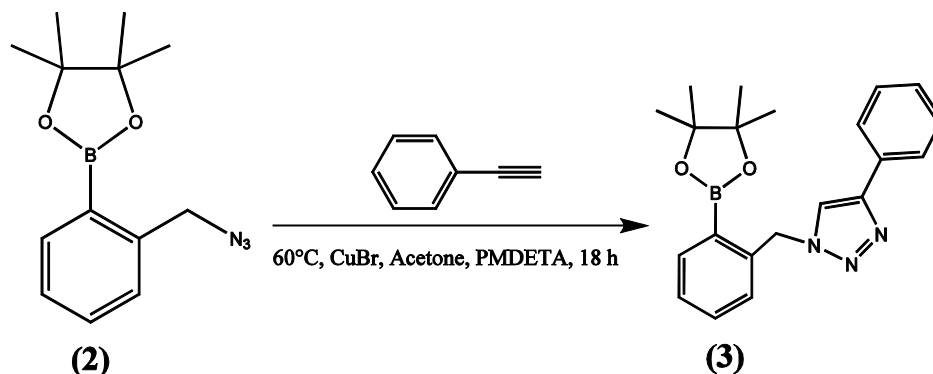
Syntéza 1: 1,00 g (4,67 mmol) brommethyl fenylboronové kyseliny a 0,55 g (4,74 mmol) pinakolu bylo odváženo do 100 ml baňky a rozpuštěno v 50 ml toluenu. Baňka byla opatřena aparaturou podle Dean-Starka a reakční směs byla ponechána při 130°C po dobu 4 h. Po vychladnutí bylo přebytečné rozpouštědlo odpařeno a produkt byl rekrystalizován ve směsi EtOH/H₂O 1/2. Vysušený produkt byl bezbarvá krystalická látka o hmotnosti 1,31 g (95 %). Struktura produktu byla ověřena pomocí ¹H-NMR.



Obrázek 11 – Druhý reakční krok.

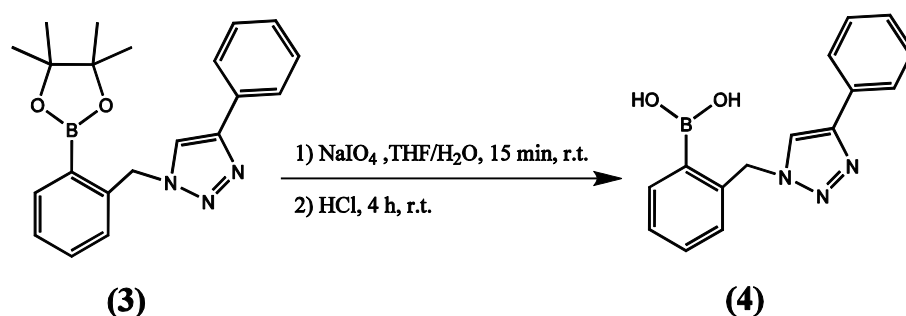
Syntéza 2: 1,31 g (4,37 mmol) **1** a 0,34 g NaN₃ bylo odváženo do 50 ml baňky a obsah byl rozpuštěn v 10 ml DMF. Reakční směs byla ponechána při laboratorní teplotě po dobu 24 h. Reakční směs byla přefiltrována (NaBr) a filtrát byl zahuštěn na vakuové odparce. Odparek byl dále rozpuštěn v malém množství DCM (20 ml) a 3× vytřepán s nasyceným roztokem NaCl.

Organická fáze byla zakoncentrována na vakuové odparce a přečištěna chromatograficky (Silikagel, Eluent - Hex/EtOAc, 5/1, $R_f = 0,94$). Produkt byl jemně nažloutlá viskózní kapalina o hmotnosti 1,02 g (89 %). Struktura produktu byla ověřena pomocí $^1\text{H-NMR}$.



Obrázek 12 – Třetí reakční krok.

Syntéza **3**: 245 mg (0,95 mmol) látky **2** bylo odváženo společně se 115 mg fenylacetylenem a 20 mg PMDETA do oválné 100 ml baňky uzavřené trojcestným kohoutem. Reakční směs byla po dobu 20 min promývána argonem a poté bylo přidáno, proti pozitivnímu tlaku inertního plynu (Ar), 10 ml acetonu. Reakční směs byla odplyněna třemi vymrazovacími cykly s tekutým dusíkem. Uzavřená baňka byla přesunuta do Gloveboxu a pod inertním plynem (N_2) bylo přidáno 5 mg ($3,5 \times 10^{-2}$ mmol) katalyzátoru CuBr. Uzavřená reakční směs byla vložena do bloku vyhřátého na 55°C a ponechána po dobu 18 h. Po vychladnutí byla reakční směs dvakrát přefiltrována přes malý sloupec bazické aluminy a filtrát byl zahuštěn na vakuové odparce. Odparek byl čištěn pomocí kolonové chromatografie (Silikagel, Eluent: Hex/EtOAc, 7/3, $R_f = 0,80$). Produkt byl bílá krystalická látka o hmotnosti 310 mg (91 %).



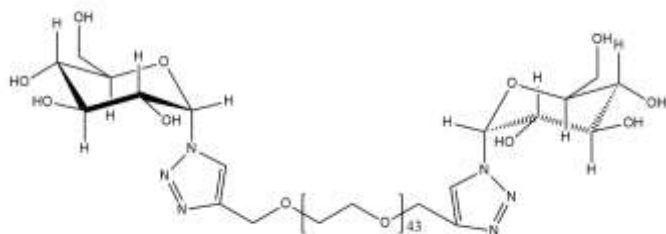
Obrázek 13 – Čtvrtý reakční krok.

Deprotekce **3**: 269 mg (0,75 mmol) bylo naváženo do 25 ml baňky a rozpuštěno ve 2 ml směsi THF/ H_2O (1/1). Do reakční směsi bylo za laboratorní teploty přisypáno 214 mg (0,11 mmol) NaIO_4 a po 15 min. bylo přidáno 1 ml 1M HCl a reakční směs byla ponechána po dobu 4 h. Výsledná reakční směs byla extrahována ethylacetátem ($3 \times 5\text{ml}$), organické fáze byly sloučeny

a extrahovány nasyceným roztokem NaCl (3×15ml). Organická fáze byla vysušena nad bezvodým MgSO₄ a zakoncentrována na vakuové odparce. Odparek byl 2× rekrystalizován z acetonu. Produkt byl bílá krystalická látka o hmotnosti 130 mg (72%).

Poté byla značka Click-fluor rozpuštěna v 19 ml fosfátového pufru (0,01 M fosfátový pufr; 0,0027 M KCl; 0,13 M NaCl, pH=8,44, vyrobeno firmou Sigma-Aldrich) a 24 ml methanolu, koncentrace zásobního roztoku byla $1,53 \times 10^{-4}$ mol/l.

Polymer poly(ethylen glykol) s koncovými glukosovými skupinami glc-PEG-glc byl syntetizován Mgr. Davidem Vrbatou [informace o syntéze a charakterizaci polymeru je ochoten sdělit osobně]. Struktura polymeru je zobrazena ve Schématu 5:



Obrázek 14 – Struktura polymeru glc-PEG-glc.

Všechny cukry (D-glukosa, D-manosa, D-fruktosa, D-glukoronová kyselina) byla zakoupeny od firmy Sigma-Aldrich s čistotou >99%.

Příprava vzorků

Rozpuštěním 1,8019 g glukosy, manosy a fruktosy v 10 ml fosfátového pufru se připravily jednotlivé zásobní roztoky o koncentraci 1 M. Rozpuštěním 1,9414 g glukoronové kyseliny se připravil její 1 M roztok. Ze zásobních roztoků se připravily jednotlivé vzorky podle Tabulky 1 do celkového objemu 0,4 ml.

Tabulka 1 - objemy a koncentrace cukru, pufru a značky použité pro přípravu vzorků

c cukr [M]	V cukr [μl]	c Click-fluor [M]	V Click-fluor [μl]	V pufru [μl]
0,1	40	$1,67 \cdot 10^{-6}$	4,4	355
0,2	80			315
0,3	120			275
0,4	160			235
0,5	200			195
0,6	240			155
0,7	280			115
0,8	320			75
0,9	360			35

Zásobní roztoky s koncentrací 3 M byly připraveny rozpuštěním 5,4047 g glukosy, fruktosy a manosy v 10 ml fosfátového pufru. 1,7 M zásobní roztok glukuronové kyseliny se připravil z 5,8242 g a 15 ml fosfátového pufru. Z těchto roztoků se poté připravily jednotlivé vzorky pro glukosu, fruktosu a manosu podle Tabulky 2 na celkový objem 0,5 ml.

Tabulka 2 - objemy a koncentrace cukrů, pufru a značky použité pro přípravu koncentrovanějších vzorků

c cukru [M]	V cukru [μl]	c Click-fluor [M]	V Click-fluor [μl]	V pufru [μl]
3	500	$1,67 \cdot 10^{-6}$	5,5	0
2,5	417			83
2	333			167
1,5	250			250
1	167			333

Vzorky pro glukuronovou kyselinu se připravily podle následující Tabulky 3.

Tabulka 3 - objemy, koncentrace glukuronové kyseliny, pufru a značky pro přípravu koncentrovanějších vzorků

c cukru [M]	V cukru [μl]	c Click-fluor [M]	V Click-fluor [μl]	V pufru [μl]
1,7	481	$1,67 \cdot 10^{-6}$	5,5	19
1,5	425			75
1,3	368			132
1,1	312			188
1	283			217

Metody

Stacionární fluorescenční spektroskopie

Měření fluorescence probíhalo na přístroji Horiba Yobin Ivon. Excitace byla nastavena na 276 nm, excitační štěrba 8 nm. Emise se měřila v oblasti 295-500 nm a emisní štěrba 6 nm. Měřilo se zároveň nekorigované i korigované spektrum. Optická dráha v kyvetě byla 10 mm.

Časově rozlišená fluorescenční spektroskopie

Pro měření časově rozlišené fluorescence se připravily nové vzorky pouze s glukosou a fruktosou podle Tabulky 4.

Tabulka 4 - koncentrace, objemy a hmotnost cukru, značky a pufru pro přípravu vzorků pro časově rozlišenou fluorimetrii

c cukr [M]	m cukr [mg]	V Click-fluor [μl]	V pufr [ml]
0,25	22,5	4,34	0,5
0,5	45,0		
0,75	67,5		
1	90,0		
2	180,0		

Měřilo se na přístroji Horiba Yobin Ivon vybavené časově korelovaným modulem pro čítání jednotlivých fotonů a NanoLED excitačním zdrojem. Měření se načítalo do 1000 kanálů a ukončilo se při načtení 5000 fotonů v maximu. Pro vzorky s fruktosou se měřily dvě emisní délky 310 a 420 nm a pro vzorky s glukosou se měřily tři emisní délky – 310 nm, 350 nm a 420 nm. Šířka štěrby byla nastavena na 8 nm. Pro naměření profilu excitačního profilu laserové diody byla použita disperze polystyrenového latexu, excitační i emisní vlnová délka byla 282 nm a šířka štěrby 2 nm.

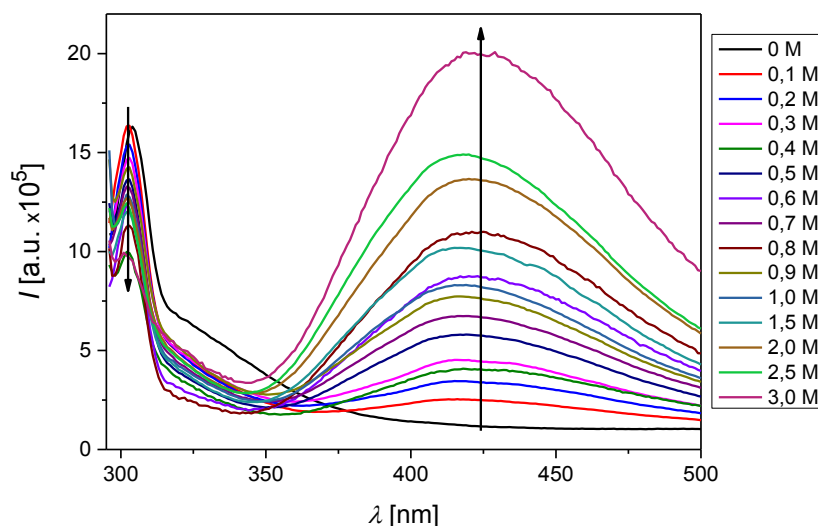
Výsledky a diskuze

Fluorescence značky Click-fluor – vliv sacharidů

Smícháním jednotlivých roztoků cukrů a roztoku značky „Click-fluor“ byly připraveny roztoky o různých koncentracích cukrů, ale konstantní koncentrace fluoroforu (viz Tabulky 1-3). Poté se u všech vzorků proměřilo fluorescenční spektrum s excitační vlnovou délkou 295 nm a emisní délkou od 295 do 500 nm. Práce se zaměřila na proměření závislosti publikovaných dříve (Citace č. 19). Zvláštní pozornost se věnovalo vazbě značky Click-fluor na glukosu s ohledem pro využití při studiu polymeru glc-PEG-glc (viz Obrázek 14). Vazba fenyloboronové kyseliny na dioly je především ovlivněna povahou cukru, jestli hydroxylové skupiny směřují na stejnou stranu kruhu, jinak není vazba tak silná. Také počet míst, na která se fenyloboronová kyselina může navázat je důležitý. Rozdílné afinity k cukrům, lze taky vysvětlit vznikem vodíkových vazeb mezi značkou a cukrem.

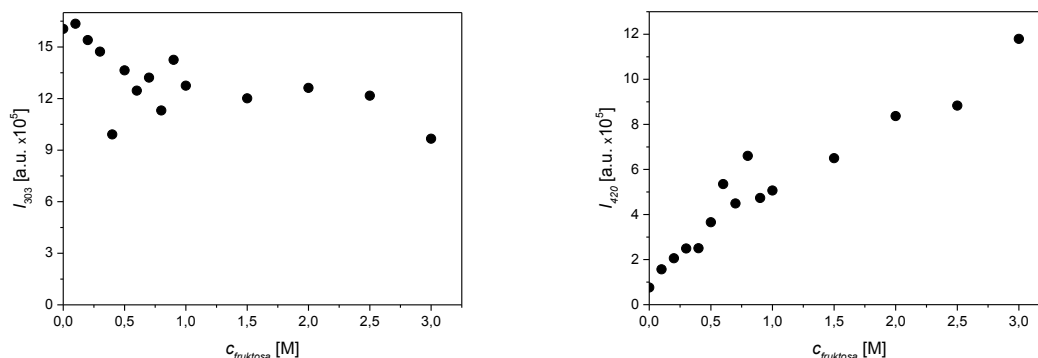
Fruktosa

Obecně většina sacharidových fluorescenčních značek má nejlepší afinitu k fruktose, která také vykazuje největší intenzitu při vysokých koncentracích. Stejně je to v případě značky Click-fluor. Korigované fluorescenční spektrum je na Obrázku 15. Intenzita vykazuje dvě maxima. Jedno při vlnové délce 303 nm a druhé maximum při 420 nm.



Obrázek 15 – Korigované emisní spektrum značky Click-fluor po přidání fruktosy (koncentrace uvedeny v grafu).

Závislosti intenzity na koncentraci se v každém maximu liší. Při emisní délce 303 nm je nejvyšší intenzita fluorescence při nulové koncentraci cukru a minimální při koncentraci 3 M. Z něho je také patrné, že, až na nepřesnosti, intenzita monotónně klesá s koncentrací (Obrázek 16).



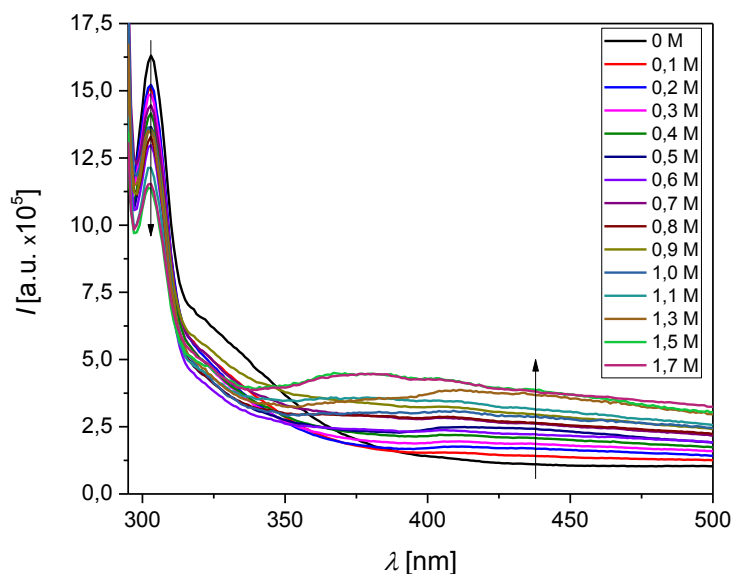
Obrázky 16 a 17 – Změna intenzity fluorescence při 303 nm (vlevo) a 420 nm (vpravo) značky Click-fluor po přidání fruktosy.

V druhém maximu, emisní délky 420 nm, je průběh závislosti jiný (Obrázek 17). Nejmenší intenzitu má značka bez přítomnosti cukru a největší při koncentraci cukru 2,5 M. (Intenzita při 3 M je statisticky odlehlý výsledek.) Průběh závislosti je hyperbolický s asymptotou. Při koncentraci vyšší než 2,5 M se intenzita mění málo.

Průběh závislostí v jednotlivých maximech ukazuje, že někde musí být izosbestický bod, ve kterém je intenzita fluorescence při všech koncentracích cukru stejná. I přes experimentální nepřesnosti je tento bod patrný při 353 nm. Z toho plyne, že v systému jsou přítomny minimálně dvě formy značky Click-fluor: První má pás při 303 nm a odpovídá volné značce. Druhá forma odpovídá esteru značky se sacharidem a má emisní maximum při 420 nm.

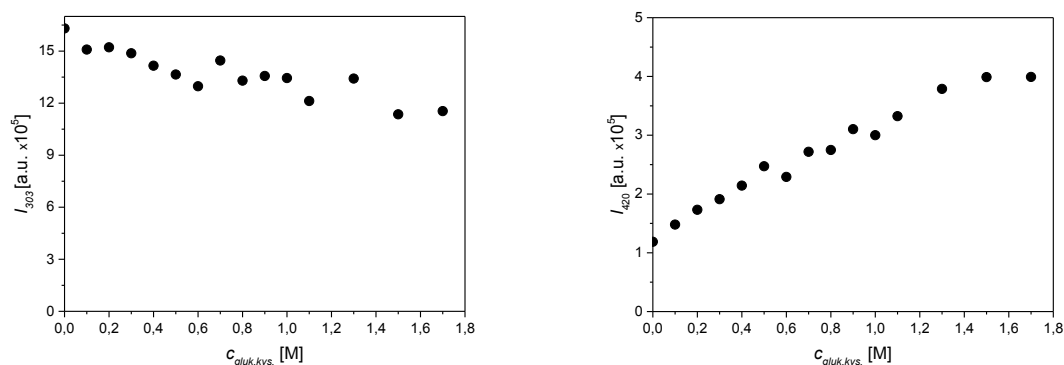
Glukuronová kyselina

Odlíšné fluorescenční spektrum má značka navázaná na glukuronovou kyselinu. Její spektrum obsahuje jenom jedno výrazné maximum při 303 nm, jinak je intenzita fluorescence relativně nízká, jak je vidět na Obrázku 18.



Obrázek 18 – Korigované emisní spektrum značky Click-fluor po přidání glukuronové kyseliny (koncentrace uvedeny v grafu).

Při emisní vlnové délce 303 nm je závislost na přítomnosti cukru podobná jako v případě fruktosy, lineárně klesá (Obrázek 19). Maximální intenzita je při nulové koncentraci cukru a minimální při koncentraci 1,5 M. Tento pás odpovídá volné značce.

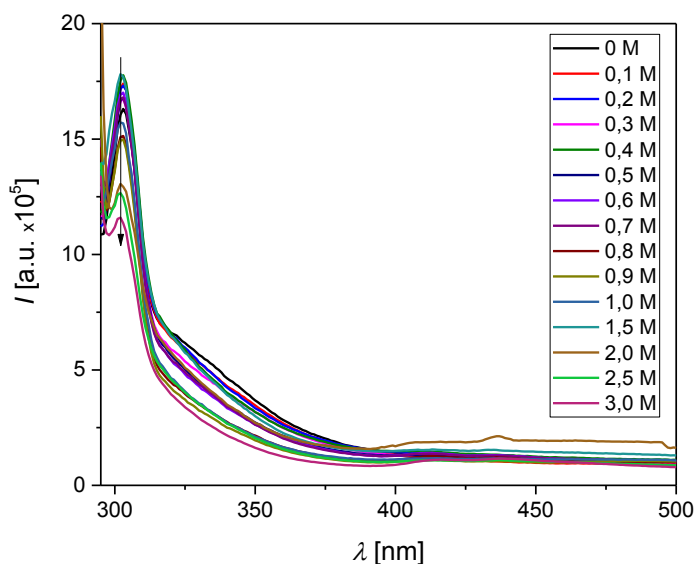


Obrázky 19 a 20 – Změna intenzity fluorescence při 303 nm (vlevo) a 420 (vpravo) značky Click-fluor po přidání glukuronové kyseliny.

Pro porovnání se lze podívat i na závislost intenzity na koncentraci cukru při 420 nm (Obrázek 20), což je pás značky navázané na glukuronovou kyselinu. Závislost je podobná jako v případě fruktosy, avšak nárůst intenzity není tak výrazný. Při malých koncentracích je lineární a poté se sklápí. Celkový průběh závislosti je hyperbolický s asymptotou při koncentraci 1,5 M a dále se pravděpodobně intenzita nemění, na určení není dostatek dat.

Glukosa

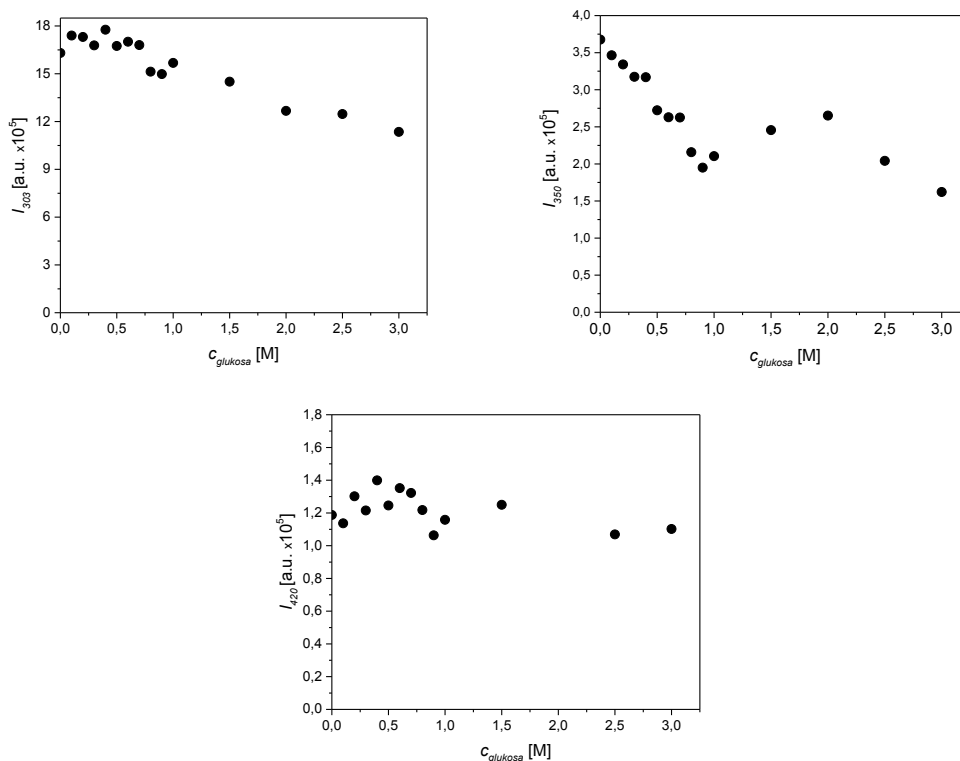
Korigované spektrum s glukosou se od korigovaného spektra s glukoronovou kyselinou příliš neliší (Obrázek 21). Což se dá očekávat, když glukoronová kyselina je derivátem glukosy. Také obsahuje jedno výrazné maximum při vlnové délce 303 nm a dále intenzita klesá.



Obrázek 21 – Korigované emisní spektrum značky Click-fluor po přidání glukosy (koncentrace uvedeny v grafu).

Korigované spektrum se hodně liší od nekorigovaného (neuvedeno, lze poskytnout na žádost recenzenta), v něm se objevují tři pásy s třemi maximy. Jedno je při vlnové délce 303 nm (volná značka), druhé při 350 nm a třetí při 420 nm (značka navázaná na sacharid). Hypotetický pás při 350 nm je patrný také u ostatních sacharidů, ale není tak výrazný. Pás může odpovídat vibronickému pásu volné značky, nebo nějaké formě komplexu značky s cukrem (např. vazba pouze s jednou hydroxylovou skupinou, popř. trigonální forma esteru s cukrem).

Obrázek 22 zobrazuje závislost intenzity na koncentraci při 303 nm. Jak je patrné, intenzita s koncentrací lineárně klesá. V druhém maximu při 350 nm je situace složitější (Obrázek 23). Při nižších koncentracích intenzita strmě lineárně klesá. Poté přibližně u koncentrace 1 M je předěl a intenzita roste do maxima při 2,0 M koncentraci a poté znovu klesá. V případě, že pás při 350 nm odpovídá jistě formě Click-fluoru, pak koncentrace této klesá s koncentrací glukosy. Mohl by to být ester značky pouze s jednou OH-skupinou, který s rostoucí koncentrací cukru přechází na cyklickou formu esteru (pás 420 nm).

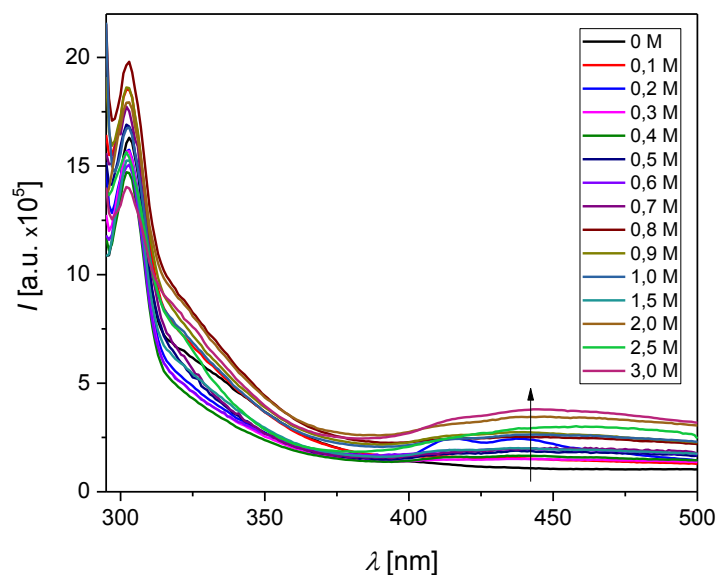


Obrázky 22, 23, 24 – Změna intenzity fluorescence při 303 nm (nahore vlevo), 350nm (nahore vpravo) a 420 nm (dole uprostřed) značky Click-fluor po přidání glukosy.

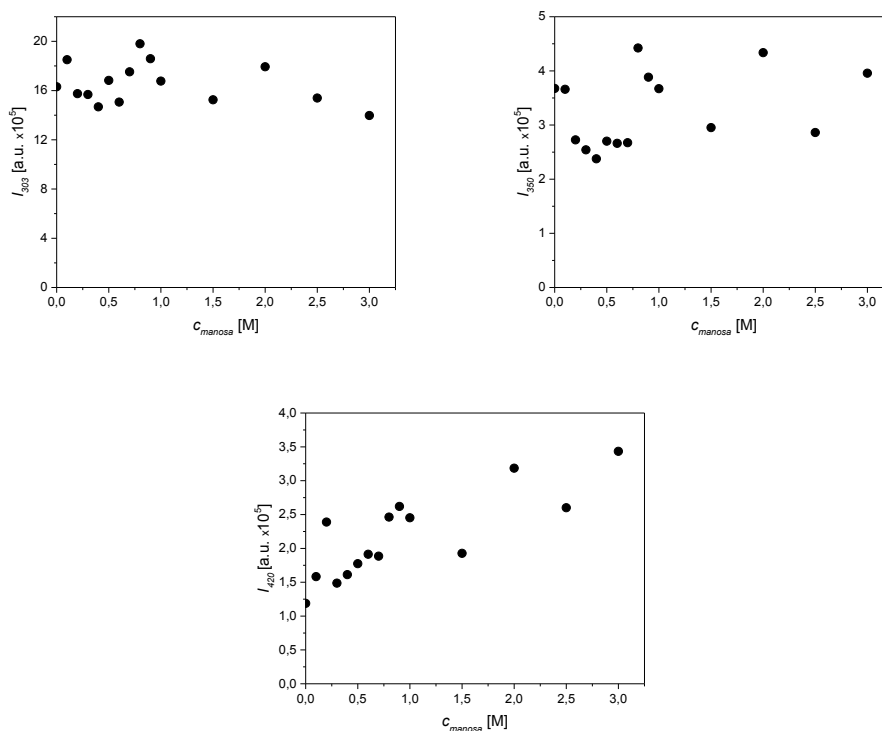
Poslední maximum je při vlnové délce 420 nm, kdy je závislost také zajímavá (Obrázek 24). Bod 2 M je statisticky odlehlý. Intenzita nejdříve stoupá až do maxima při koncentraci 0,7 M a poté mírně klesá. Z toho plyne, že cyklický ester značky s glukosou sice vzniká, avšak pouze v omezeném množství a nárůst intenzity fluorescence je zatížen šumem a není proto tak patrný.

Manosa

Poslední spektrum je spektrum komplexu značky s manosou (Obrázek 25). Průběh závislosti intenzity na vlnové délce je velmi podobný jako u ostatních cukrů kromě fruktosy. Stejně jako glukosa tak nekorigovaná spektra manosa mají tři pásy s maximy v 303 nm, 350 nm, 420 nm. Při emisní vlnové délce 303 nm není patrný téměř žádný trend v závislosti intenzity na koncentraci (Obrázek 26). Také při vlnové délce 350 není patrný žádný výrazný trend (Obrázek 27). Poslední maximum je při 420 nm (Obrázek 28). Zde je patrný trend stejný jako u ostatních cukrů – hyperbola s asymptotou, která objeví okolo koncentrace 3,0 M.



Obrázek 25 – Korigované emisní spektrum značky Click-fluor po přidání mannosy (koncentrace uvedeny v grafu).

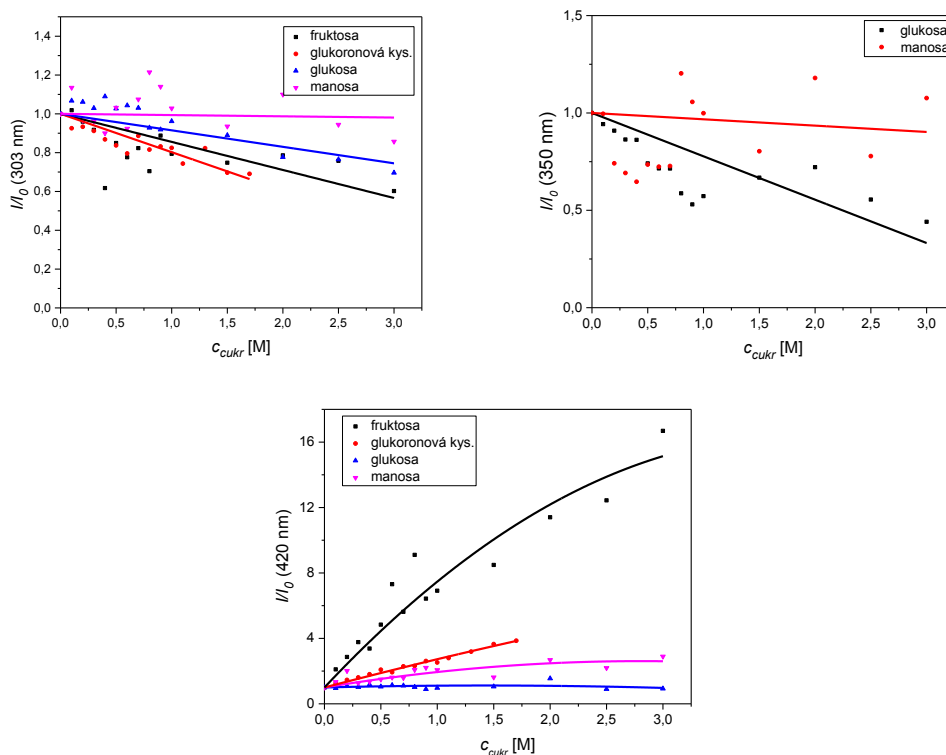


Obrázky 26, 27, 28 – Změna intenzity fluorescence při 303 nm (nahore vlevo), 350nm (nahore vpravo) a 420 nm (dole uprostřed) značky Click-fluor po přidání mannosy.

Porovnání všech cukrů

Na Obrázku 29 je relativní intenzita fluorescence (poměr intenzity fluorescenci v přítomnosti cukru ku intenzitě při nulové koncentraci cukru) při vlnové délce 303 nm, což odpovídá emisi

čisté značky Click-fluor. Z něho lze zjistit, které cukry jsou nejvíce ovlivněny přítomností cukru. Nejvýraznější pokles pásu při 303 nm byl pozorován pro fruktosu (Obrázek 29, černá křivka), intenzita se snížila až na 60% původní nulové intenzity, dále pak pro glukuronovou kyselinu. Hodnoty jsou však značně zatíženy chybou měření (šumem).



Obrázky 29, 30, 31 – Změna relativní intenzity fluorescence při 303 nm (nahore vlevo), 350nm (nahore vpravo) a 420 nm (dole uprostřed) značky Click-fluor pro studované sacharidy.

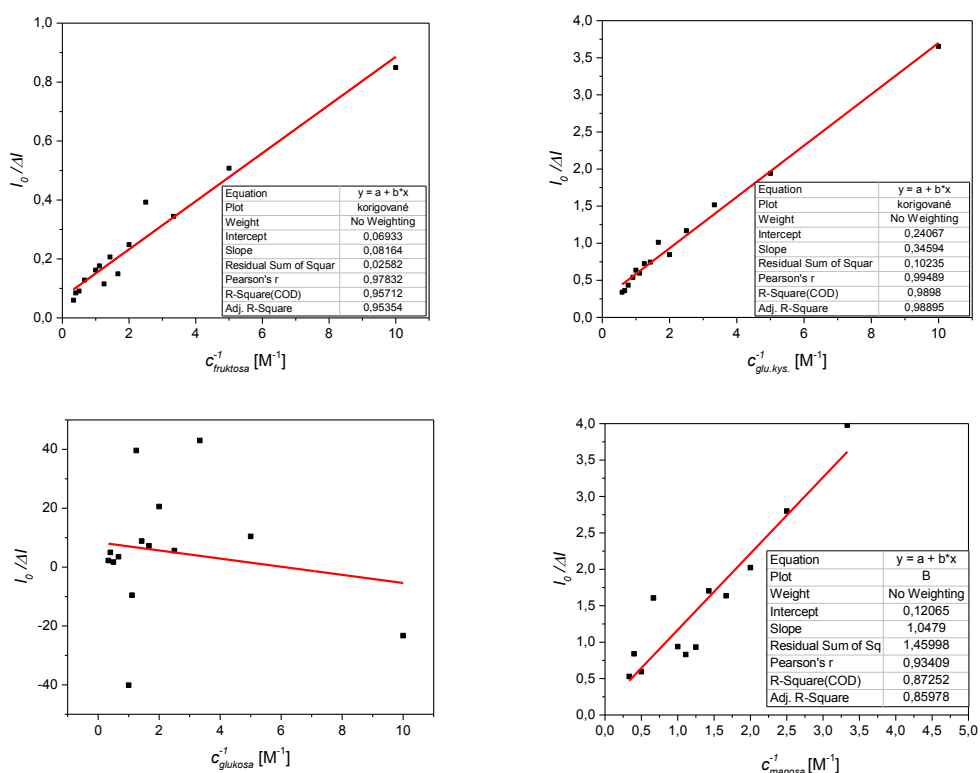
Při vlnové délce 350 nm, což odpovídá hypotetické formě esteru značky s cukrem, je nejvýraznější pokles intenzity pozorován pro glukosu (Obrázek 30, černá křivka) a to až na 40% původní intenzity. Pokles tohoto pásu je výraznější než v případě pásu při 303 nm.

Nejdůležitějším ukazatelem tvorby esteru značky Click-fluor se sacharidy je zvýšení intenzity fluorescence při vlnové délce 420 nm (Obrázek 31). Nejmenší efekt je u glukosy a manosy, kdy se intenzita zvětší pouze 1-2 krát. Intenzita pro glukuronovou kyselinu se zvětší pouze 3 krát. Zdaleka největší zvětšení fluorescence je u fruktosy, jak se ostatně předpokládalo.¹⁹ Relativní intenzita fluorescence se zvětší až 13-krát.

Výpočet vazebné konstanty Click-fluor/sacharid

Pro výpočet vazebné konstanty značky Click-fluor na sacharidy jsme použili rovnici (15). Kdy se sestrojil graf závislosti hodnoty $I/\Delta I$ na recipročné hodnotě koncentrace cukru c^{-1} . K výpočtu

jsme použili nárůst intenzity při emisní vlnové délce 420 nm, která odpovídá vzniku cyklického esteru značky s příslušným sacharidem. Přiložené grafy (Obrázky 32-35) ukazují, že všechny závislosti jsou v principu lineární, avšak graf pro glukosu je nevyhodnotitelný z důvodu velké chyby u relativních intenzit fluorescence, kde malé rozdíly v intenzitách vedly k nesmyslně velkým hodnotám $I_0/\Delta I$. Naměřené grafy proto bylo možné proložit lineární funkcí s použitím rovnice 15. Z parametrů prokladu lze vypočítat vaznou konstantu K_a jako podíl úsek/směrnice. Při fitování pro manosu nebyly staticky odlehle výsledky zahrnuty do výpočtu. Jak je vidět z příslušného grafu, vazebnou konstantu pro glukosu nebylo možné určit. Z vazebných konstant (viz Tabulka 5) je zřejmé, že největší vaznost na značku Click-fluor má fruktosa.



Obrázky 32, 33, 34, 35 – Výnos dle rovnice 15 pro vazbu značky Click-fluor s fruktózou (nahore vlevo), glukuronovou kyselinou (nahore vpravo), glukosou (dole vlevo) a manosou (dole vpravo).

Tabulka 5 - Vazebné konstanta pro komplex cukr/Click-fluor

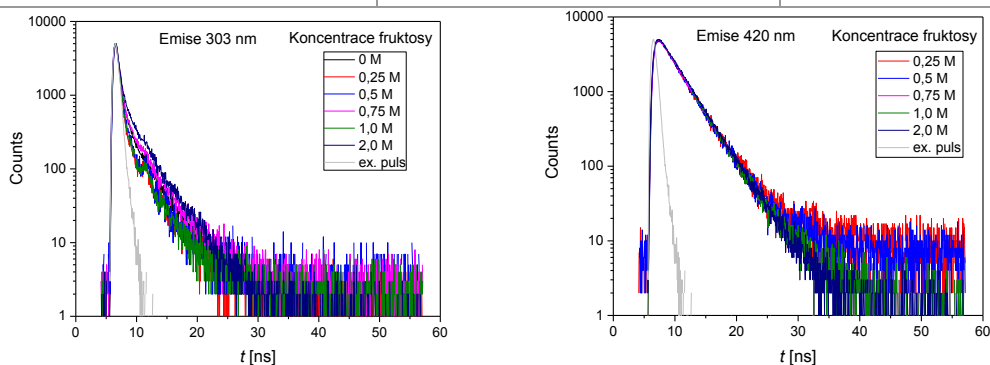
cukr	K_a [M]
fruktosa	0,848
glukoronová kys.	0,698
glukosa	-
manosa	0,115

Dohasínání fluorescence značky Click-fluor – vliv sacharidů

Časově rozlišenou fluorescenci značky Click-fluor jsme měřily pouze pro dva sacharidy: glukosu a fruktosu (složení vzorků uvedeno v Tabulce 4). Důvodem byl fakt, že fruktosa vykazuje největší změny ve fluorescenčním spektru a glukosa naopak nejmenší. Cílem bylo důkladně prostudovat fotofyzikální chování jednotlivých forem značky Click-fluor, jak byly detekovány ve fluorescenčních spektrech (pásky při 310 nm, 350 nm a 420 nm). Výsledné křivky dohasínání fluorescence byly proloženy exponenciální funkcí (Rovnice 2), ve složitějších případech součtem několika exponenciál dle Rovnice 4. Proklad se prováděl tak, aby parametr χ^2 byl co nejbližší 1 a aby residua prokladu byla rovnoměrně rozložena v podobě šumu. Křivky dohasínání jsou uvedeny na Obrázcích 31-35. Vyhodnocené doby života a frakční intenzity jsou shrnuty v Tabulkách 6-8.

Tabulka 6 – Doby života fluorescence pro značku Click-fluor s fruktosou

koncentrace fruktosy [M]	Doba života [ns]	
	emise při 310 nm	emise při 420 nm
0	3,13	-
0,25	3,49	3,13
0,5	3,09	3,14
0,75	3,19	3,18
1	3,18	3,19
2	3,13	3,21



Obrázky 36, 37 – Dohasínání fluorescence značky Click-fluor v přítomnosti fruktosy při emisních vlnových délkách 310 nm (vlevo) a 420 nm (vpravo).

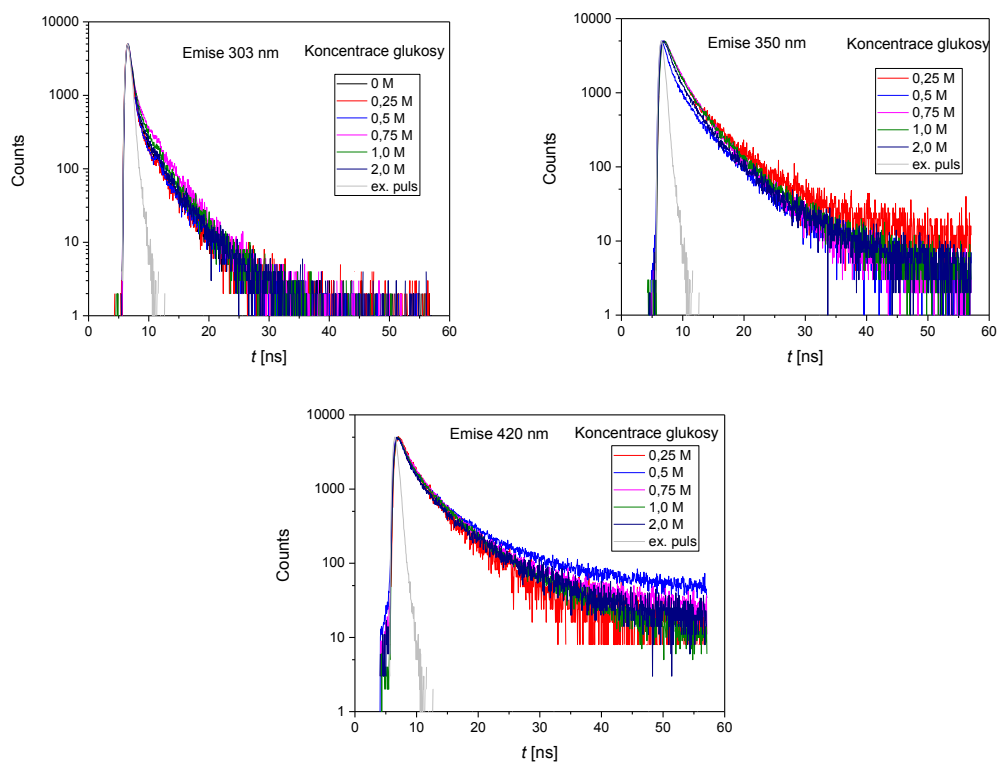
Na křivkách dohasínání fluorescence je patrný výrazný příspěvek rozptylu světla k signálu fluorescence (tvar křivky totožný s tvarem excitačního pulzu). Při vyhodnocování se to projevilo nutností prokládat křivky exponenciálou s dobou života výrazně nižší než 1 ns. Tato

složka je však artefakt a není zahrnuta do výsledků v Tabulkách 6-8. Z toho důvodu byla emise při 310 nm, aby se minimalizoval vliv rozptylu.

Z výsledků pro fruktosu (Obrázky 36, 37 a Tabulka 6) je patrné, že doba života čisté značky se nemění s koncentrací cukru a je přibližně 3,2 ns a všechny křivky jsou jedno-exponenciální. Minimální jsou také rozdíly při vlnové délce 420 nm odpovídající značce navázané na fruktosu. Také tady jsou všechny křivky exponenciální s jednou složkou doby života fluorescence. To značí, že v systému je jen jedna forma cyklického esteru s konstantní dobou života.

Tabulka 7 – Doby života fluorescence pro značku Click-fluor s glukosou

koncentrace glukosy [M]	Doba života [ns]				
	emise při 310 nm	emise při 350 nm		emise při 420 nm	
0	3,13	-	-	-	-
0,25	3,27	1,04	5,01	1,10	5,11
0,5	3,29	1,60	5,36	1,64	5,21
0,75	3,12	1,25	4,58	1,29	6,26
1	2,93	1,15	4,90	1,16	6,43
2	2,82	1,93	5,93	1,11	6,62



Obrázky 38, 39, 40 - Dohasínání fluorescence značky Click-fluor v přítomnosti glukosy při emisních vlnových délkách 310 nm (vlevo nahoře), 350 nm (vpravo nahoře) a 420 nm (dole).

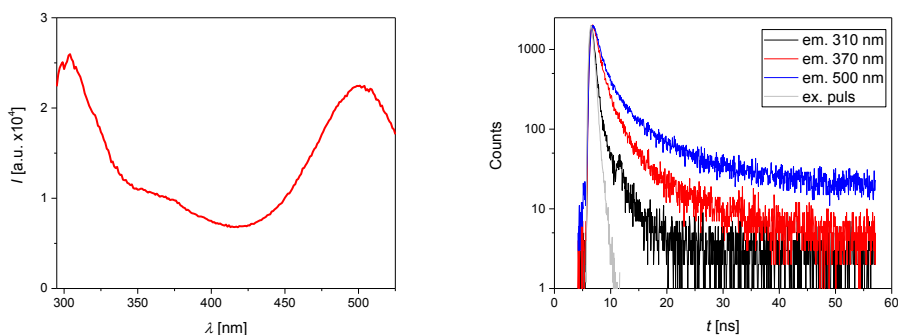
Na obrázcích 38-40 a v Tabulkách 7 a 8 jsou shrnuty výsledky pro časově rozlišená měření Click-fluoru v přítomnosti glukosy. Jsou zde uvedeny doby života pro glukosu ve všech třech emisních maximech (310 nm – čistá značka; 350 nm – hypotetická forma esteru s glukosou; 420 nm – cyklická forma esteru s glukosou). Z tabulky i z jednotlivých grafů je patrné, že se doba života čisté značky nemění s koncentrací glukosy (emise měřené při 310 nm). Při vlnových délkách 350 nm a 420 nm jsou průběhy složitější a museli se prokládat dvěma exponenciálami. V Tabulce 8 jsou uvedeny frakční intenzity při obou vlnových délkách (v tabulce odpovídají hodnotám doby života) a také průměrná doba života, která se vypočítala podle vztahu (5). Změny jsou poměrně malé a data je obtížné interpretovat. V tomto případě je tvorba esteru značky s glukosou nízká, v roztoku existuje několik forem, jejichž podíl se s koncentrací cukru mění. To se odráží v mírných změnách středních dob života.

Tabulka 8 – Frakční intenzity a střední doby života fluorescence pro značku Click-fluor s glukosou pro dohasínání proložená dvojexponenciální funkcí.

koncentrace [M]	Frakční intenzita [%]				Střední doba života [ns]	
	emise při 350nm		emise při 420nm		emise při 350 nm	emise při 420 nm
0,25	40,10	59,90	37,20	62,80	3,41	3,61
0,5	45,50	54,50	38,24	61,75	3,64	3,84
0,75	43,32	56,68	37,56	32,45	3,14	4,39
1	43,42	56,58	37,57	62,43	3,27	4,45
2	57,13	42,87	41,64	58,31	3,64	4,32

Vazba značky Click-fluor na polymer glc-PEG-glc

Fluorescenční spektrum značky Click-fluor v přítomnosti polymeru glc-PEG-glc s dvěma navázanými molekulami glukosy na koncích se výrazně odlišuje od spektra Click-fluoru s nízkomolekulární glukosou (Obrázek 41). První rozdíl je v samotné intenzitě fluorescence, kde vzorek s polymerem má intenzitu nižší asi o 3 řády. Koncentrace polymeru glc-PEG-glc byla navržena tak, aby koncentrace molekul glukosy byla 1 M, aby byly výsledky porovnatelné s experimentem s glukosou. Z důvodu malého množství připraveného polymeru nebylo možno proměřit větší počet koncentrací. Druhý rozdíl je v posunu maxim emisních pásů oproti spektrům s nízkomolekulární glukosou. Ve spektru jsou patrné tři pásy. První se objevuje při vlnové délce 306 nm (odpovídá čisté značce, posun spektra je nevýrazný). Další maxima jsou při vlnových délkách 370 nm (buď vibronický pás čisté značky, nebo jistá forma komplexu s glukosou) a 500 nm, což by mělo odpovídat cyklickému esteru značky Click-fluor s glukosou. V případě pásů odpovídajícím esterům s polymerem je posun spekter výrazný.



Obrázky 41, 42 - Korigované fluorescenční spektrum (vlevo) a dohasínání fluorescence (vpravo) značky Click-fluor v přítomnosti polymeru glc-PEG-glc o koncentraci molekul glukosy 1 M a koncentraci polymeru 327 g/l.

Výsledky časově rozlišené fluorescence jsou uvedeny na Obrázku 42 a střední doby života pro jednotlivé emisní pásy jsou uvedeny v Tabulce 9. Doba života čisté značky je stejná jako ve všech předešlých případech (asi 3,1 ns), což ukazuje, že přítomnost polymeru v roztoku nemá vliv na spektrální chování čisté značky. Střední doby života pro pásy 370 nm a 500 nm, jsou výrazně nižší než u nízkomolekulární glukosy. Navázaný řetězec polymeru má zřejmě vliv na elektronovou strukturu značky a můžou zde hrát roli i zhášecí mechanismy (snížení dob života). Výrazně odlišné doby života pro emisní vlnovou délku 350-370 nm naznačuje, že tento pás skutečně odpovídá jisté formě esteru s cukrem.

Tabulka 9 – doby života fluorescence značky Click-fluor v přítomnosti polymeru Click-fluor pro různé vlnové délky emise.

Vlnová délka [nm]	Střední doba života [ns]
310	3,08
370	2,43
500	2,02

Shrnutí a Závěr

V předložené bakalářské práci byl studován vliv sacharidů (glukosa, manosa, fruktosa a glukuronová kyselina) na spektrální chování fluorescenční značky Click-fluor. Tato sonda obsahuje ve své struktuře fenyloboronovou kyselinu a může proto sloužit jako senzor cukrů. Byla detailně proměřena emisní spektra pro široký rozsah koncentrací cukrů (do 3 M). Změna intenzity fluorescence po přidání sacharidů byla použita pro výpočet vazné konstanty Click-fluor/sacharid. Pro fruktosu a glukosu byly dále změřeny křivky dohasínání fluorescence. Spektrální chování značky Click-fluor bylo také změřeno pro roztok polymeru glc-PEG-glc, který obsahuje molekuly glukosy na koncích polymerního řetězce.

Z naměřených fluorescenčních charakteristik vyplývá, že největší afinitu má značka Click-fluor na fruktosu, kdežto tvorba esteru s glukosou je velmi slabá. V emisním spektru byly pozorovány celkem tři pásy. Jeden odpovídá nenavázané značce, druhý nestabilní formě esteru s cukrem a třetí stabilní cyklické formě esteru s cukrem. Z nárůstu intenzity fluorescence poslední zmíněné formy lze vypočítat vaznou konstantu značky na sacharid. V případě příliš malého nárůstu intenzity jako je tomu u glukosy, však nelze tuto konstantu vyhodnotit. V časově rozlišené fluorescenci značky Click-fluor sice byly patrné změny u vlnových délek odpovídajícím esteru se sacharidem. Pozorované změny však nejsou příliš výrazné a jejich interpretace není jednoznačná. Posledním studovaným systémem byla vazba značky Click-fluor na polymer glc-PEG-glc. Z emisních spekter i z hodnot středních dob života fluorescence vyplývá, že dochází k relativně silné vazbě značky na glukosou modifikovaný polymer.

Závěrem lze konstatovat, že značka Click-fluor není příliš vhodná pro detekci volné glukosy, ale vazba na další studované sacharidy byla pomocí stacionární fluorescenční spektroskopie detekovatelná. Časově rozlišená měření nepřináší příliš nových informací o vazbě značky na sacharidy. Ve spektrech však byla detekována nová forma esteru značky s cukry. Velmi slibné výsledky však přinesla studie vazby Click-fluoru na polymer s navázaným sacharidem. To otvírá nové možnosti pro studium polymerních nanostruktur obsahující sacharidy pomocí fluorescenční spektroskopie do budoucna.

Přehled literatury

- ¹ Kodíček, M.; Valentová A.; Hynek R. *Biochemie: chemický pohled na biologický svět*; Vysoká škola chemicko-technologická v Praze: Praha, **2015**. ISBN 978-80-7080-927-3.
- ² Arimori, S.; Bell, M. L.; Oh, C. S.; James, T. D. *Organic Letters* **2002**, 4 (24), 4249–4251.
- ³ Berlman, I. B. *Handbook of fluorescence spectra of aromatic molecules*; Academic Press: New York, **1971**.
- ⁴ Sun, X.; Zhai, W.; Fossey, J. S.; James, T. D. *ChemInform* **2016**, 47 (14)
- ⁵ Phillips, M. D.; James, T. D. *Journal of Fluorescence* **2004**, 14 (5), 549–559.
- ⁶ Davis, A.P.; Wareham, R.S. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, 38, 2978-2996.
- ⁷ Karnati, V. V.; Gao, X.; Gao, S.; Yang, W.; Ni, W.; Sankar, S.; Wang, B. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2002**, 12 (23), 3373–3377.
- ⁸ Springsteen, G.; Wang, B. *Tetrahedron Letters* **2002**, 5291-5300.
- ⁹ H.S., G.; Melavanki, R.; D., N.; P., B.; Kusanur, R. *Journal of Molecular Liquids* 2017, 227, 37–43.
- ¹⁰ Wang, Z.; Zhang, D.; Zhu, D. *The Journal of Organic Chemistry* **2005**, 70 (14), 5729–5732.
- ¹¹ James, T. D. *Creative Chemical Sensor Systems Topics in Current Chemistry* **1995**, 8982-8987.
- ¹² Arimori, S.; Bosch, L. I.; Ward, C. J.; James, T. D. *Tetrahedron Letters* **2001**, 42 (27), 4553–4555.
- ¹³ Hosseinzadeh, R.; Mohadjerani, M.; Pooryousef, M. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2016**, 408 (7), 1901–1908.
- ¹⁴ Silva, A. P. D.; Moody, T. S.; Wright, G. D. *The Analyst* **2009**, 134 (12), 2385.
- ¹⁵ Mattay, J.; Khairutdinov, R. F. *Photoinduced Electron Transfer I*; Springer: Berlin, **1992**.
- ¹⁶ Cao, Z.; Nandhikonda, P.; Heagy, M. D. *The Journal of Organic Chemistry* **2009**, 74 (9), 3544–3546.
- ¹⁷ Wang, C.; Li, Y.; Wei, Y. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2017**, No. 27, 595–601
- ¹⁸ Moses, J. E.; Moorhouse, A. D. *ChemInform* **2007**, 38 (44).
- ¹⁹ Scafton, D. K.; Taylor, J. E.; Mahon, M. F.; Fossey, J. S.; James, T. D. *J. Org. Chem.* **2008**, 73, 2871–2874.