

Studium tvorby supramolekulárních komplexů 6,9-disubstituovaných purinů s cyklodextriny v plynné fázi

Lucie Režná

Bakalářská práce
2018



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav technologie potravin

akademický rok: 2017/2018

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Lucie Režná**
Osobní číslo: **T15178**
Studijní program: **B2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Chemie a technologie potravin**
Forma studia: **prezenční**

Téma práce: **Studium tvorby supramolekulárních komplexů
6,9-disubstituovaných purinů s cyklodextriny v plynné fázi**

Zásady pro vypracování:

I. Teoretická část

1. Stručná charakteristika purinových sloučenin a cyklodextrinů.
2. Princip a podstata hmotnostní spektrometrie.
3. Zpracovat rešerši na téma supramolekulární chemie v plynné fázi.

II. Praktická část

1. Provést sérii experimentů s cílem ověřit tvorbu supramolekulárních komplexů mezi vybranými 6,9-disubstituovanými puriny a cyklodextriny v plynné fázi.
2. Získané výsledky zpracovat, vyhodnotit a provést jejich interpretaci.

Rozsah bakalářské práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

[1] SCHALLEY, C. *Analytical Methods in Supramolecular Chemistry*. 2007. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim. ISBN: 978-3-527-31505-5.

[2] SCHALLEY, C., SPRINGER, A. *Mass Spectrometry and Gas-Phase Chemistry of Non-Covalent Complexes*. 2009. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim. ISBN: 978-0-470-13115-2.

[3] Dle zpracování literární rešerše s využitím databází Scopus a SciFinder.

Vedoucí bakalářské práce:

Ing. Michal Rouchal, Ph.D.

Ústav chemie

Datum zadání bakalářské práce:

2. února 2018

Termín odevzdání bakalářské práce:

3. května 2018

Ve Zlíně dne 2. února 2018


doc. Ing. František Buňka, Ph.D.
děkan




doc. Ing. František Buňka, Ph.D.
ředitel ústavu

Příjmení a jméno: Režná Lucie

Obor: CHTP

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové/bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby¹⁾;
- beru na vědomí, že diplomová/bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové/bakalářské práce bude uložen na příslušném ústavu Fakulty technologické UTB ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byl/a jsem seznámen/a s tím, že na moji diplomovou/bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3²⁾;
- beru na vědomí, že podle § 60³⁾ odst. 1 autorského zákona má UTB ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- beru na vědomí, že podle § 60³⁾ odst. 2 a 3 mohu užít své dílo – diplomovou/bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování diplomové/bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tedy pouze k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové/bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové/bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Ve Zlíně 26.4.2018

Režná

¹⁾ zákon č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, § 47 Zveřejňování závěrečných prací:

(1) Vysoká škola nevydávlečně zveřejňuje disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce, u kterých proběhla obhajoba, včetně posudků oponentů a výsledku obhajoby prostřednictvím databáze kvalifikačních prací, kterou spravuje. Způsob zveřejnění stanoví vnitřní předpis vysoké školy.

(2) Disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce odevzdané uchazečem k obhajobě musí být též nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněny k nahlížení veřejnosti v místě určeném vnitřním předpisem vysoké školy nebo není-li tak určeno, v místě pracoviště vysoké školy, kde se má konat obhajoba práce. Každý si může ze zveřejněné práce pořizovat na své náklady výpisy, opisy nebo rozmnoženiny.

(3) Platí, že odevzdáním práce autor souhlasí se zveřejněním své práce podle tohoto zákona, bez ohledu na výsledek obhajoby.

²⁾ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 35 odst. 3:

(3) Do práva autorského také nezasahuje škola nebo školské či vzdělávací zařízení, užije-li nikoli za účelem přímého nebo nepřímého hospodářského nebo obchodního prospěchu k výuce nebo k vlastní potřebě dílo vytvořené žákem nebo studentem ke splnění školních nebo studijních povinností vyplývajících z jeho právního vztahu ke škole nebo školskému či vzdělávacímu zařízení (školní dílo).

³⁾ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 60 Školní dílo:

(1) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení mají za obvyklých podmínek právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla (§ 35 odst. 3). Odpírá-li autor takového díla udělit svolení bez vážného důvodu, mohou se tyto osoby domáhat nahrazení chybějícího projevu jeho vůle u soudu. Ustanovení § 35 odst. 3 zůstává nedotčeno.

(2) Není-li sjednáno jinak, může autor školního díla své dílo užít či poskytnout jinému licenci, není-li to v rozporu s oprávněnými zájmy školy nebo školského či vzdělávacího zařízení.

(3) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení jsou oprávněny požadovat, aby jim autor školního díla z výdělku jím dosaženého v souvislosti s užitím díla či poskytnutím licence podle odstavce 2 přiměřeně přispěl na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložily, a to podle okolností až do jejich skutečné výše; přitom se přihlídí k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

ABSTRAKT

Bakalářská práce se v teoretické části zabývá stručnou charakteristikou purinů a cyklodextrinů, dále popisuje princip hmotnostní spektrometrie a v neposlední řadě tvorbu supramolekulárních komplexů v plynné fázi. Cílem praktické části této práce bylo studium tvorby supramolekulárních komplexů mezi vybranými 6,9-disubstituovanými puriny obsahujícími adamantanový skelet a nativními cyklodextriny. Schopnost vytvářet komplexy byla studována pomocí hmotnostní spektrometrie s elektrosprejovou ionizací.

Klíčová slova: adamantan, purin, cyklodextrin, supramolekulární komplex, hmotnostní spektrometrie, plynná fáze

ABSTRACT

In the theoretical part of this bachelor thesis brief characterization of purines and cyclodextrins, principle of mass spectrometry as well as creation of supramolecular complexes in the gas phase, is described. The aim of the practical part was to study the formation of supramolecular complexes between selected purine compounds bearing adamantane moiety and native cyclodextrins. The ability to form complexes was studied using electrospray ionization mass spectrometry.

Keywords: adamantane, purine, cyclodextrin, supramolecular complex, mass spectrometry, gas phase

Na tomto místě bych velmi ráda poděkovala svému vedoucímu bakalářské práce Ing. Michalovi Rouchalovi, Ph.D. za cenné rady, odborný přístup, vstřícnost a zejména čas, který mi věnoval při tvorbě této práce.

Rovněž děkuji svému příteli, rodině a přátelům za podporu a trpělivost během celého trvání mého studia.

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

OBSAH

ÚVOD.....	10
I TEORETICKÁ ČÁST	12
1 PURINY	13
1.1 CHEMICKÁ STRUKTURA PURINŮ	13
1.2 HISTORIE	13
1.2.1 Nobelova cena	14
1.3 VÝSKYT PURINŮ	14
1.3.1 Dusíkatá barviva.....	14
1.3.2 Purinové alkaloidy	15
1.3.3 Heterocyklické báze DNA a RNA	15
1.4 VYUŽITÍ PURINŮ V CHEMII LÉČIV	16
2 CYKLODEXTRINY	18
2.1 HISTORIE OBJEVU STRUKTURY CYKLODEXTRINŮ	18
2.2 STRUKTURA A CHARAKTERISTIKA CYKLODEXTRINŮ	18
2.3 FYZIKÁLNĚ-CHEMICKÉ VLASTNOSTI CYKLODEXTRINŮ.....	19
2.4 VYUŽITÍ CYKLODEXTRINŮ.....	20
2.4.1 Využití cyklodextrinů v potravinářském průmyslu.....	21
3 HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE.....	22
3.1 FYZIKÁLNÍ PODSTATA A INSTRUMENTACE HMOTNOSTNÍHO SPEKTROMETRU	22
3.1.1 Iontový zdroj	22
Elektronová ionizace.....	23
Chemická ionizace.....	23
Ionizace elektrosprejem	23
Ostatní ionizační techniky	24
3.1.2 Hmotnostní analyzátory	25
Iontová past.....	25
3.1.3 Detekční systém hmotnostního spektrometru	26
4 SUPRAMOLEKULÁRNÍ CHEMIE V PLYNNÉ FÁZI.....	27
4.1 SUPRAMOLEKULÁRNÍ KOMPLEXY TYPU LIGAND@CYKLODEXTRIN	28
4.2 SUPRAMOLEKULÁRNÍ KOMPLEXY TYPU LIGAND@KUKURBIT[N]URIL	31
II PRAKTICKÁ ČÁST.....	34
5 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	35
5.1 PŘÍSTROJE A VYBAVENÍ.....	35
5.2 SPECIFIKACE POUŽITÝCH LIGANDŮ	35
5.3 ESI-MS ANALÝZA SAMOTNÝCH LIGANDŮ.....	37
5.3.1 Parametry ESI-MS analýz.....	37
5.3.2 Příprava vzorků	38

5.4	ESI-MS ANALÝZA SUPRAMOLEKULÁRNÍCH KOMPLEXŮ.....	38
5.4.1	Parametry ESI-MS analýz.....	38
5.4.2	Příprava vzorků	39
6	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	40
6.1	ESI-MS ANALÝZA SAMOTNÝCH LIGANDŮ.....	40
6.2	STUDIUM VZNIKU INKLUZNÍCH KOMPLEXŮ MEZI LIGANDY A CYKLODEXTRINY V PLYNNÉ FÁZI	43
6.2.1	Komplexace sloučenin L1 a L2 s cyklodextriny.....	43
6.2.2	Komplexace sloučenin L3 a L4 s cyklodextriny.....	48
6.3	SUMARIZACE ZÍSKANÝCH VÝSLEDKŮ	51
	ZÁVĚR	52
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	54
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	58
	SEZNAM OBRÁZKŮ	60
	SEZNAM TABULEK.....	62

ÚVOD

Mnohé sloučeniny na bázi purinu, tedy nejen puriny samotné, ale také jeho bioisostery, vykazují široké spektrum biologické aktivity, a to nejen z toho důvodu, že samotný purin je součástí nukleových kyselin. Purinové deriváty mají zásadní roli při řízení pochodů v živém organismu a při přenosu genetické informace. Díky těmto vlastnostem, se tyto sloučeniny staly předmětem zkoumání a vývoje nových léčiv, přičemž během posledních sedmdesáti let bylo objeveno velké množství terapeuticky využitelných sloučenin na bázi purinu. Zavedením vysoce nepolárního polycyklického uhlovodíku, jenž je známý pod triviální názvem adamantan, může vést k lepšímu farmakologickému profilu připravené sloučeniny, ve srovnání s lákou modelou (obecně v praxi používaným léčivem, či látkou podstupující hodnocení v rámci klinického testování). Tento fakt je důvodem, proč se mnohé výzkumné skupiny pokouší připravit nové biologicky aktivní látky obsahující ve své molekule adamantanový skelet.

Supramolekulární komplexy typu „host-hostitel“ vznikají prostřednictvím nekovalentních vazeb mezi jednotlivými molekulami. Komplexace vzniká na principu zapouzdření hosta uvnitř kavity hostitele, přičemž tyto komplexy mohou přinášet celou řadu výhod. V případě biologicky aktivních látek je jednou z nich zvýšení rozpustnosti předmětné sloučeniny ve vodných médiích (tedy i v živých organismech) při zachování její biologické aktivity. Mezi významné a často používané molekuly hostitele patří například cyklodextriny a kukurbiturily, které díky svému tvaru poskytují jiným molekulám prostor pro vznik supramolekulárních komplexů typu „host-hostitel“.

Teoretická část této bakalářské práce obsahuje čtyři hlavní kapitoly, kdy první kapitola se zabývá stručnou charakterizací purinů, jejich chemickou strukturou, výskytem těchto sloučenin a zejména jejich využitím v chemii léčiv. Následuje kapitola, ve které se objevuje stručná charakteristika cyklodextrinů, fyzikálně-chemické vlastnosti těchto sloučenin a také jejich využití. Ve třetí kapitole se pojednává o fyzikální podstatě a instrumentaci hmotnostního spektrometru, pomocí něhož byly analyzovány zkoumané komplexy. Teoretická část je ukončena literární rešerší o současných poznacích z oblasti supramolekulární chemie v plynné fázi.

Předmětem praktické části této práce bylo studium tvorby inkluzních komplexů mezi vybranými purinovými sloučeninami a nativními cyklodextriny. Analýza těchto komplexů

byla provedena na hmotnostním spektrometru s elektrosprejovou ionizací a s hmotnostním analyzátozem na principu iontové pasti.

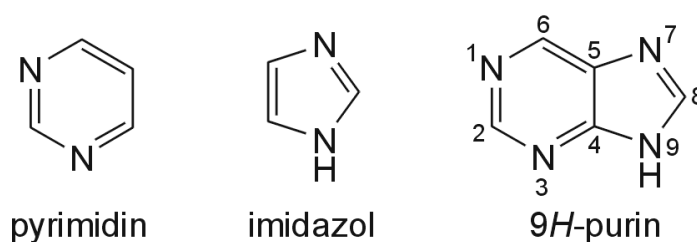
I. TEORETICKÁ ČÁST

1 PURINY

Puriny z biologického hlediska patří mezi nejdůležitější heterocyklické systémy. Jsou to kondenzované heterocykly, které obsahují čtyři atomy dusíku v molekule. Tři atomy dusíku mají bazický charakter a jejich ne vazebné elektronové páry v orbitalech sp^2 se nachází v rovině kruhu. Poslední atom dusíku poskytuje ne vazebný elektronový pár π -elektronovému aromatickému systému. [1]

1.1 Chemická struktura purinů

Puriny se řadí do skupiny sloučenin, v nichž jsou kondenzovaná dvě heterocyklická jádra. Prvním z nich je pyrimidin (**Obrázek 1**, vlevo), šestičlenný heterocyklus se dvěma heteroatomy dusíku v molekule, jehož systematický název je 1,3-diazin. Druhým heterocyklem tvořícím purinový skelet, je imidazol (**Obrázek 1**, uprostřed), který patří mezi pětičlenné heterocykly, rovněž obsahující dva atomy dusíku. Pomyslným sloučením těchto dvou jednoduchých heterocyklických sloučenin vzniká purin. Dle názvoslovných pravidel mají purinové sloučeniny specifické číslování (**Obrázek 1**, vpravo). [2]

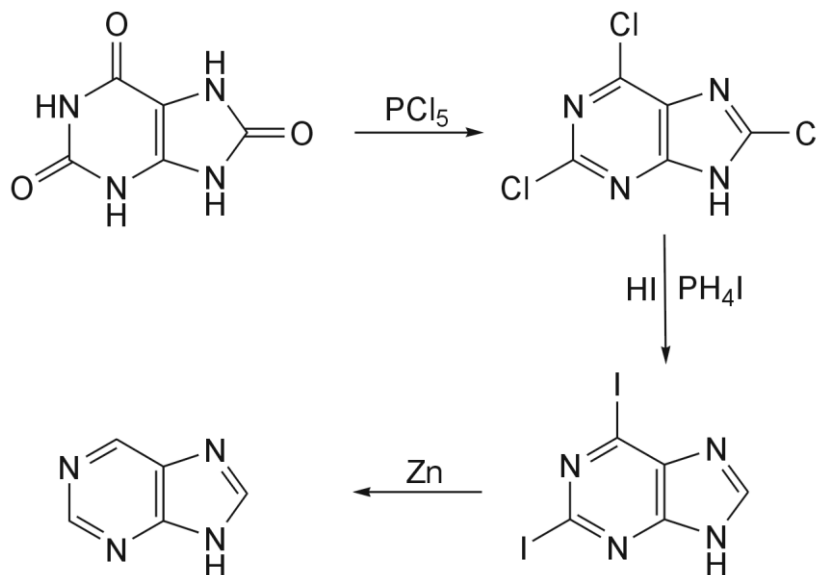


Obrázek 1. Strukturní vzorce pyrimidinu (vlevo), imidazolu (uprostřed) a 9H-purinu spolu s číslováním purinového kruhu (vpravo).

1.2 Historie

Na izolaci purinu nese zásluhu Emil Fischer, který v roce 1899 jako první syntetizoval bezbarvou krystalickou látku a následně ji pojmenoval *purum uricum*. Tento název vyplývá ze spojení slov *purum*, což znamená čistý a *acidum uricum*, což je latinský název kyseliny močové, kterou lze pojmenovat jako 2,6,8-trioxopurin. [3,4] Kyselinu močovou izoloval již v roce 1776 ze žlučových kamenů C. W. Scheele. Z kyseliny močové, jakožto výchozí látky, lze několika stupňovou syntézou připravit purin, jak je naznačeno na **Obrázku 2**. [3]

V prvním kroku reaguje kyselina močová s PCl_5 za vzniku 2,6,8-trichlorpurinu. Ten lze následně přeměnit pomocí jodidu fosfonia ($[\text{PH}_4]^+\text{I}^-$) a HI na 2,6-dijodpurin, který je v závěrečném kroku redukován zinkovým prachem na purin. [3]



Obrázek 2. Schéma syntézy purinu z kyseliny močové.

1.2.1 Nobelova cena

V roce 1902 získal Hermann Emil Fischer Nobelovu cenu jako uznání jeho mimořádných služeb, které při své práci na syntéze purinů a cukrů poskytl. V roce 1877 vyprodukoval fenylhydrazin, který následně pomohl při odhalování struktur molekul cukrů. Bylo pochopeno, že sacharidy, včetně cukrů, jsou v živých organismech rozhodující pro biologické procesy. Také dusíkaté látky, puriny nevyjímaje, patří mezi skupinu sloučenin s důležitými biologickými funkcemi. Již Emil Fischer ukázal, že právě purinový skelet tvoří základní strukturu například kofeinu, jenž je obsažen v kávě. [5]

1.3 Výskyt purinů

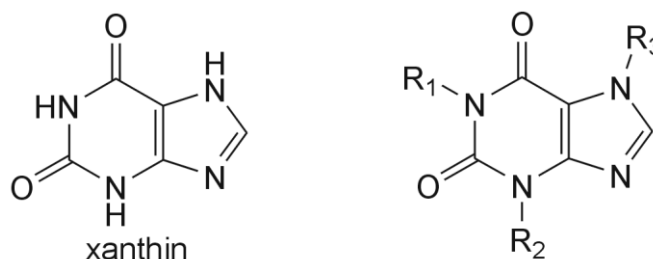
1.3.1 Dusíkatá barviva

V potravinách se kromě tetrapyrrolových barviv vyskytuje také spousta dusíkatých pigmentů. Mohou to být sloučeniny odvozené od isochinolinu, indolu nebo pyrimidinu. A právě substituované pyrimidiny představují významnou skupinu pigmentů. Tři hlavní skupiny, které ve své molekule obsahují čtyři atomy dusíku, jsou puriny, isoalloxaziny a pteriny. [6]

Pigmenty odvozené od purinu patří mezi významné pigmenty živočišné říše. Tyto sloučeniny, jako například xanthin, guanin a kyselina močová, jsou samy o sobě bezbarvé. Avšak jako granule či krystaly tvoří krémové až stříbřité pigmenty, což lze pozorovat například v rybích šupinách. [6]

1.3.2 Purinové alkaloidy

Purinové alkaloidy patří mezi nejrozšířenější alkaloidy v potravinách. Jedná se o methylové deriváty xanthinu, což je produkt oxidace purinu. Mezi nejrozšířenější a nejznámější patří 1,3,5-trimethylxanthin, známý pod triviálním názvem kofein. Kofein se nachází v listech, semenech a také ovoci u více než šedesáti druhů rostlin. Mezi další známé purinové alkaloidy patří dimethylxanthiny (theobromin, theofyllin či paraxanthin) a rovněž monomethylxanthiny (methylmočové kyseliny, heteroxanthin). [6] Strukturní vzorec xanthinu a jeho vybraných methylovaných derivátů je uveden na **Obrázku 3**.

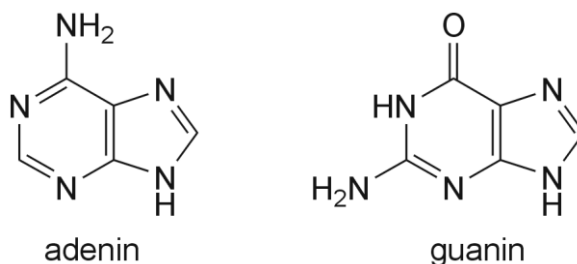


Substituent	Název sloučeniny				
	Kofein	Theobromin	Theofyllin	Paraxanthin	Heteroxanthin
R ₁	CH ₃	H	CH ₃	CH ₃	H
R ₂	CH ₃	CH ₃	CH ₃	H	H
R ₃	CH ₃	CH ₃	H	CH ₃	CH ₃

Obrázek 3. Strukturní vzorec xanthinu (vlevo) a jeho vybraných derivátů (vpravo).

1.3.3 Heterocyklické báze DNA a RNA

Nukleové kyseliny, jakožto biopolymery, se skládají z nukleotidů tvořících dlouhé řetězce. Každý nukleotid je složen z cukerné složky, fosfátové skupiny a heterocyklické báze. DNA obsahuje čtyři různé druhy heterocyklických bází a právě dvě z nich jsou substituční deriváty purinu. Jedná se o báze adenin a guanin (**Obrázek 4**), které jsou také součástí RNA. Pomocí jednotlivých bází se určuje sekvence nukleotidů v řetězcích, které se k sobě váží na principu komplementarity bází. [1]



Obrázek 4. Strukturní vzorce adeninu a guaninu.

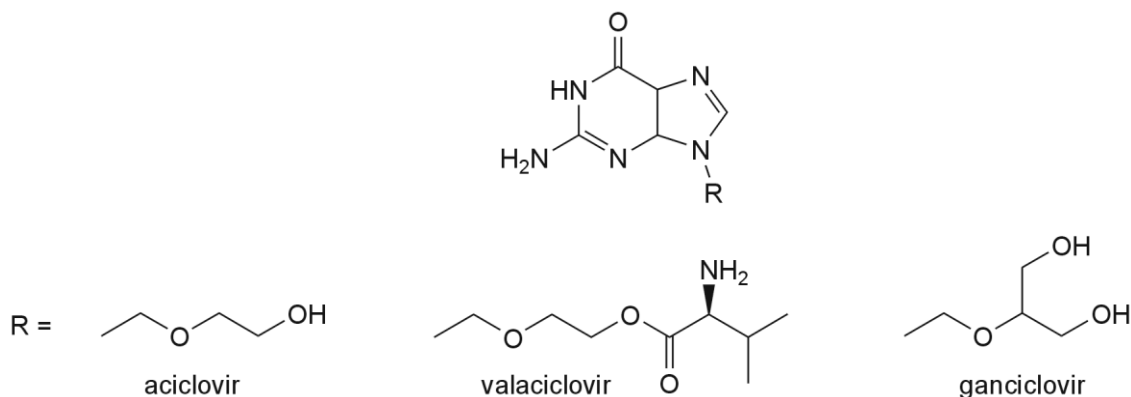
V případě DNA se její struktura skládá ze dvou polynukleotidových vláken, která jsou stočena do helixu. I když jsou plochy obou bází relativně neutrální, jejich okraje mohou být kladně či záporně nabitě, což se uplatňuje při jejich párování, kdy se oblasti s protichůdným nábojem dostávají k sobě a mohou tak vytvářet vodíkové můstky. Vzájemně poutané báze jsou v rámci struktury šroubovice orientovány směrem dovnitř. [1]

1.4 Využití purinů v chemii léčiv

Deriváty purinu mají opravdu široké využití. Například *N*-glykosidované puriny patří mezi přírodní biologicky aktivní sloučeniny, jež jsou považovány za přírodní purinová antibiotika. Některé z těchto látek byly izolovány před mnoha lety, avšak komplexní struktury byly objasněny poměrně nedávno. Mnohé z těchto sloučenin jsou považovány za relativně zajímavé, zejména ve smyslu vývoje nových chemoterapeutických látek. [7]

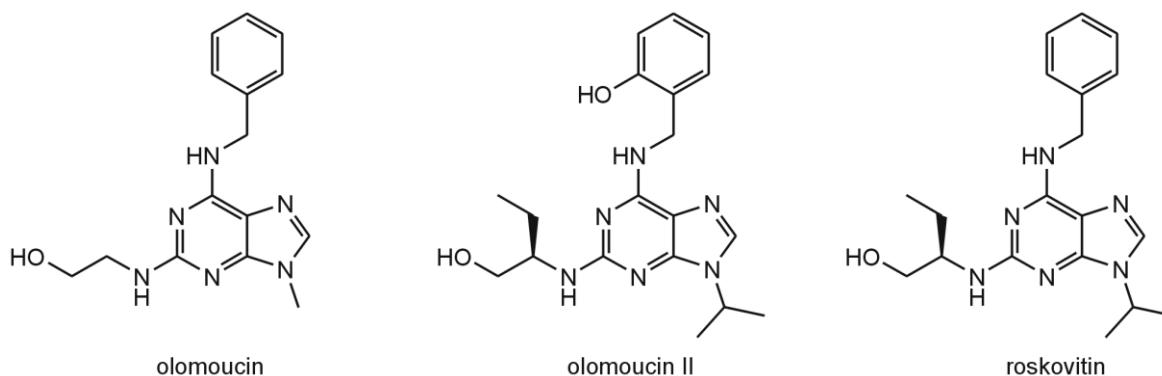
Mezi alkylované sloučeniny purinu lze zařadit například cytokininy, což jsou substituované adeniny, ať už ve volné formě či vázané v nukleotidech. Nejintenzivněji studovaným cytokininem je kinetin, který vykazuje vysokou stimulační aktivitu. [8]

Mezi biologicky aktivní látky na bázi purinu se řadí také některá antivirotika, která jsou schopna inhibovat syntézu nukleových kyselin virů. Konkrétně se jedná o modifikované nukleosidy a nukleotidy, jež se mohou začlenit do RNA virů a tím zabránit jejich replikaci. Jako příklady takových látek lze uvést acyclovir, valaciclovir a ganciclovir, které působí proti virům herpetickým. Ganciclovir je také hojně využíván při léčbě, přesněji řečeno za účelem zmírnění příznaků, pacientů trpících AIDS (z angl. Acquired Immunodeficiency Syndrome) a také při léčbě cytomegalovirů. [9,10] Strukturní vzorce uvedených látek jsou uvedeny na **Obrázku 5**.



Obrázek 5. Strukturní vzorce vybraných antivirotik s purinovým skeletem.

Neméně důležitou vlastností purinových derivátů je jejich schopnost selektivně inhibovat vybrané cyklin-dependentní kinázy (CDK). Tyto proteinkinázy zastupují významnou roli v průběhu buněčného dělení. Na CDK je možno navázat specializované bílkoviny (cykliny), které vykazují regulační funkci a schopnost přeměnit CDK na aktivní formu, díky změně jejich konformace. Těto vlastnosti je hojně využíváno při léčbě rakovinných onemocnění, kardiovaskulárních onemocnění, virových infekcí (HIV, cytomegaloviry, papilomaviry, herpes) a také při léčbě nemocí nervového systému. Do této skupiny purinových derivátů lze zařadit např. olomoucín, olomoucín II či roskovitin (**Obrázek 6**). [10,11,12]



Obrázek 6. Strukturní vzorce vybraných inhibitorů CDK na bázi purinu.

2 CYKLODEXTRINY

Bakterie určitých rodů jsou schopny díky svým enzymatickým systémům způsobovat enzymatickou degradaci amylosy za vzniku směsi lineárních a cyklických oligosacharidů, tzv. cyklodextrinů (CD). Tyto makrocykly jsou tvořeny různým počtem D-glukopyranosových jednotek, jejichž počet se pohybuje v rozmezí šest až sto. Glukosové jednotky jsou navzájem propojeny α -1,4-glykosidovými vazbami. [13,14,15]

2.1 Historie objevu struktury cyklodextrinů

Podle profesora Józsefa Szejtliho lze vývoj cyklodextrinů rozdělit do tří etap, a to na období objevu, průzkumné období a období využití. Za počátek období objevu je považován rok 1891, ze kterého pochází první záznam o cyklodextrinech. Zásahu na objevu má francouzský vědec A. Villiers, který izoloval 3 g krystalické látky, vzniklé bakteriálním štěpením z 1000 g škrobu. Kvůli podobným vlastnostem izolované látky jakými oplývala celuloza, což bylo například nevykazování redukujících vlastností, byla látka označena pojmem „celulosin“. Následně rakouský mikrobiolog Franz Schardinger dokázal izolovat dvě krystalické sloučeniny, přičemž získal pouze malé množství látky „A“ a podstatně větší množství látky „B“. Na základě jeho myšlenky, že označení látky „krystalický dextrin“ je přesnější než název „celulosin“, získaly tyto látky označení α -dextrin a β -dextrin. Až v roce 1935 byl objeven γ -cyklodextrin a také vyřčena domněnka, že mohou existovat i mnohem větší cyklodextriny. [16,17,18,19]

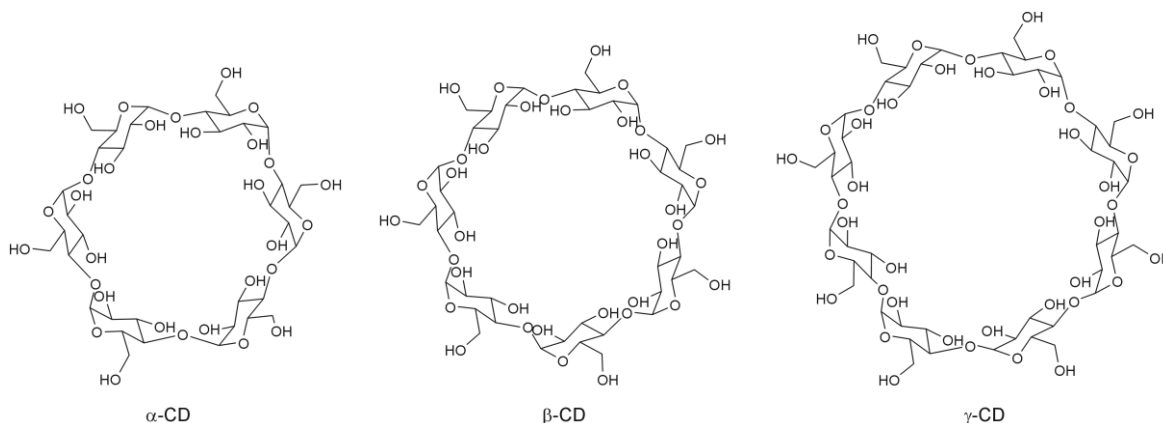
2.2 Struktura a charakteristika cyklodextrinů

Jak bylo zmíněno již v úvodu této kapitoly, směs lineárních a cyklických oligosacharidů vzniká za pomoci enzymatických systémů. Jedná se o bakteriální enzymy nazývané glukosyltransferasy, jež produkují například bakterie *Micrococcus luteus* či *Bacillus macerans*. Ze vzniklé směsi lze cyklodextriny izolovat pomocí organických látek, které s nimi tvoří inkluzní a obtížně rozpustné komplexy. K této selektivní precipitaci lze využít například fluorbenzen, hexan či anthracen. Cyklodextriny lze rozlišovat podle počtu glukopyranosových jednotek tvořících molekulu. [13,16,20,21]

Zpravidla se jedná o minimálně šest jednotek, jelikož u méně než šesti jednotek se v kruhu tvoří pnutí, kvůli kterému tyto struktury nevznikají. Maximální běžně se vyskytující počet

jednotek je osm. Cyklodextriny s větším počtem jednotek lze syntetizovat, avšak v tomto případě je velmi složitá příprava a čištění. [22]

Nejvíce zastoupeny jsou tedy makrocycly se šesti, sedmi a osmi glukosovými jednotkami, jinak nazývané α -cyklodextrin, β -cyklodextrin a γ -cyklodextrin (**Obrázek 7**), z nichž nejdostupnější je právě β -cyklodextrin. Tyto sloučeniny jsou někdy také označovány jako mateřské cyklodextriny nebo také cyklodextriny první generace. [13,15,22,23]



Obrázek 7. Strukturální vzorce α -, β - a γ -cyklodextrinu.

Struktura cyklodextrinů byla studována jak v pevné fázi, tak v roztoku, kde bylo zjištěno, že jejich konformace jsou téměř shodné s krystalickým stavem. [22,24] U každého ze tří krystalických homologů bylo pozorováno několik forem, které se lišily svou geometrií a také počtem přítomných molekul vody. [13]

Molekuly cyklodextrinů mají obecně tvar komolého kužele, a jelikož jsou duté, lze jejich strukturu přirovnat k šálku bez dna. Polární interakce kužele jsou způsobeny hydrofilním charakterem vnější části, způsobené volnými hydroxylovými a sekundárními hydroxylovými skupinami umístěnými na okrajích kavity. Naopak schopnost komplexace jiných molekul uvnitř kavity cyklodextrinu je způsobena nepolárním charakterem vnitřní části kavity, kde dochází k hydrofobním interakcím. Nepolární charakter vnitřní části je způsoben atomy vodíku a také etherickými atomy kyslíku. [13,22,23,25,26,27]

2.3 Fyzikálně-chemické vlastnosti cyklodextrinů

Cyklické cyklodextriny vykazují díky své struktuře velmi vysokou odolnost vůči neenzymatické hydrolýze. V porovnání s lineárními deriváty cyklodextriny se uvádí až pětikrát větší stabilita. Za použití silných minerálních kyselin (kyselá hydrolýza)

se cyklodextriny hydrolyzují na směs glukosy a lineárních oligosacharidů, avšak jsou odolnější například než škrob. U kyselé hydrolyzy platí pomalejší rozvolnění cyklu u menší kavity (α -CD), naopak čím větší kavita, tím se rychlost rozvolnění cyklu zvyšuje. Při udržení cyklodextrinů v pevném skupenství lze tyto látky skladovat i několik let při pokojové teplotě. [17,18]

Jak již bylo zmíněno výše, cyklodextriny jsou dobře rozpustné ve vodě, a to díky hydroxylovým skupinám nacházejícím se na vnějším okraji jejich molekuly. [13,26,27]

Na tomto místě nelze nezmínit, že α - a γ -CD vykazují téměř desetkrát lepší rozpustnost ve vodě, než je tomu v případě β -CD. Je to způsobeno intramolekulárními vazbami v krystalické mřížce β -CD, které jsou poměrně silné. Rozpustnost všech nativních cyklodextrinů lze poměrně výrazně ovlivnit řadou faktorů, jako například teplotou či použitým rozpouštědlem. Snadno rozpustné jsou v některých polárních protických rozpouštědlech, například v již zmiňované vodě, popřípadě směsi vody s ethanolem. Cyklodextriny se relativně dobře rozpouští také v aprotických polárních rozpouštědlech (např. v DMSO). Naopak v organických nepolárních rozpouštědlech cyklodextriny rozpustné nejsou. [17,24,27]

Rozpustnost cyklodextrinů ovlivňuje také přítomnost jiné molekuly, obecně označované jako ligand, se kterou tvoří komplex. Ve vodě obtížně rozpustný ligand může snížit i míru rozpouštění samotného cyklodextrinu. Naopak snadno rozpustná molekula ligandu, zakomplexovaná uvnitř kavity, může rapidně zvýšit rozpustnost celého systému, ve srovnání se samotným cyklodextrinem. [17]

2.4 Využití cyklodextrinů

Mezi významnou vlastnost cyklodextrinů se řadí schopnost vytvářet supramolekulární komplexy s jinými molekulami, které se obecně nazývají jako komplexy typu „hostitel–host“ (z angl. „host–guest“). Cyklodextriny díky jejich struktuře plní roli hostitele a roli hosta zastávají různé anorganické či organické sloučeniny. [13]

Schopnosti cyklodextrinů tvořit supramolekulární komplexy s jinými molekulami se velmi hojně využívá, a to například pro ovlivnění rozpustnosti hostujících molekul, ochranu látek před působením mikroorganismů (inhibice rozvoje kolonií plísní), eliminaci či potlačení nežádoucích vůní a chutí, zafixování těkavých látek apod. [28,29]

2.4.1 Využití cyklodextrinů v potravinářském průmyslu

Jelikož jsou cyklodextriny zcela degradovány mikroflórou tlustého střeva, kdy jsou rozštěpeny na molekuly glukosy, a rovněž nedochází k absorpci ve střevě tenkém, lze je využít v potravinářství a považovat je za přídatné látky. Jediným českou legislativou akceptovatelným cyklodextrinem, který může být použit v potravinářském průmyslu, je β -cyklodextrin. Dle vyhlášky č. 4/2008 Sb. je β -cyklodextrin považován za stabilizátor a nosič, kdy jeho nejvyšší povolená koncentrace ve výrobku činí $1000 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$. Tato látka nese označení E 459, na rozdíl od α -CD a γ -CD, které svůj E kód přidělen prozatím nemají. [29,30]

Možnosti využití cyklodextrinů v potravinářství jsou široké. Jejich aplikace by mohla vést k lepší rozpustnosti vitamínů a barviv, k inhibici či potlačení vůní a chutí, které jsou v potravinách nežádoucí. Použití cyklodextrinů by mohlo mít ale i jiný účel, např. stabilizaci vůní, chutí či vitamínů, případně ochranu složek potravinářských výrobků, které mají lipofilní povahu a jsou proto citlivé na působení kyslíku. [15,24,28]

Díky vlastnosti cyklodextrinů vytvářet relativně stabilní supramolekulární komplexy s celou řadou „potravinářsky významných“ sloučenin, je možné tyto makrocyclické sloučeniny v potravinářství využít např. jako enkapsulační činidla. Tato činidla mají široké uplatnění například v technologii tuků, kdy pomocí CD jsou odstraněny volné mastné kyseliny, čímž dojde k rapidnímu poklesu oxidace tuků a jejich žluknutí. Jako další z odstraňovaných látek, tentokrát z živočišných výrobků, lze uvést cholesterol, který je ve větší míře zastoupen například ve vejcích, másle a mléce. Naopak u určitého typu látek, jako jsou například látky těkavé, je žádané jejich zakoncentrování a tudíž zachování jejich senzorických vlastností. [31,32,33]

3 HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE

Hmotnostní spektrometrie (MS; z angl. Mass Spectrometry) patří mezi instrumentální analytické metody, kdy se touto metodou běžně analyzují biologicky významné látky. Její využívání se datuje již od 19. století, avšak do dnešní doby prošla značným zdokonalením. Aplikační potenciál hmotnostní spektrometrie je značně široký (analýza potravin, „omikové“ metody, forenzní chemie, supramolekulární chemie atd.), také proto se tato metoda běžně označuje jako „robustní“. Pomocí této metody lze provést stopovou analýzu, identifikovat komponenty vzorku ze složité matrice či určit strukturu analyzovaných látek. [34,35,36,37]

3.1 Fyzikální podstata a instrumentace hmotnostního spektrometru

Principem této fyzikálně-chemické metody je určení relativní hmotnosti molekul, jejich částí nebo atomů. Pro toto zjištění musí být analyzovaný vzorek převeden na záporné či kladné ionty. [35]

I když mohou jednotlivé přístroje být velmi rozmanité, u všech se vyskytují velmi podobné prvky, které zajišťují vždy žádané základní požadavky pro MS. Jedná se o iontový zdroj, který zajišťuje požadavek na převedení analyzované sloučeniny do plynného stavu. Jako další vyskytující se prvek patří hmotnostní analyzátor, který rozlišuje ionty podle jejich poměrů hmotností a náboje. V neposlední řadě zde zastává důležitou roli detektor. Neméně důležitou součástí je vakuový systém, který umožňuje udržení nízkého tlaku při provozních podmínkách. Tato součást je pro MS velmi důležitá, jelikož tento přístroj pracuje za velmi nízkých tlaků. [34,35,38]

3.1.1 Iontový zdroj

Jelikož hmotnostní spektrometr poskytuje informace pouze o částicích nesoucích náboj, je ionizace analyzovaného vzorku nezbytná. Převedení zkoumané látky do iontového stavu je uskutečňováno za dodání ionizační energie, jejíž hodnota se liší v závislosti na typu analyzované látky, avšak obvyklá hodnota se nachází v rozmezí 7–16 eV. Aplikační možnosti metody jsou značně ovlivněny použitým způsobem ionizace. Důležité je množství molekule dodávané energie, které je potřebné pro její ionizaci, kdy při nadbytku dodané energie může docházet k fragmentaci již vzniklého iontu. Ionizační techniky lze dělit na měkké a tvrdé, a to podle množství přebytku dodané energie, přičemž

u měkkých technik k fragmentaci ve spektrech prvního řádu zpravidla nedochází, zatímco u tvrdých technik k fragmentaci vzniklých iontů docházet může, jelikož přebytek energie je k tomu již dostačující. [34,38]

Elektronová ionizace

Mezi tvrdé ionizační techniky patří elektronová ionizace (EI; z angl. Electron Ionization), která probíhá za vakua. Tvorba iontů, obecně v podobě kation radikálů, je uskutečňována pomocí proudu urychlených elektronů interagujících s analyzovanou látkou. Díky dokonale propracovanému způsobu ionizace, se tato metoda dlouhá léta řadila mezi nejběžněji používané, nicméně v posledních letech jsou upřednostňovány ionizační techniky měkké. [34,38,39]

Chemická ionizace

Jako příklad měkké ionizační techniky z plynné fáze lze uvést chemickou ionizaci (CI; z angl. Chemical Ionization), která je spolu s výše uvedenou elektronovou ionizací hojně využívána v kombinaci s plynovou chromatografií (GC-MS, z angl. Gas Chromatography-Mass Spectrometry). Ke vzniku iontů u této metody dochází rovněž za pomoci proudu urychlených částic, avšak energie potřebná k ionizaci není přenášena přímo na analyzovanou látku, nýbrž prochází přes reakční médium. Toto médium, které je umístěno v ionizační komoře za zvýšeného tlaku, může představovat plyn či kapalina s nízkým bodem varu. Přítomnost zvýšeného tlaku je zde žádaná z důvodu zvýšení pravděpodobnosti meziiontových a mezimolekulárních interakcí. Následně molekuly analyzovaného vzorku spolu s částicemi plynu tvoří protonizované ionty, které lze nazývat protonované molekuly, obecně značeny $[M+H]^+$. Takto vzniklý iont je stabilnější, než je tomu v případě elektronové ionizace. [34,38,39]

Ionizace elektrosprejem

Pro účely měření této bakalářské práce byla využita ionizace elektrosprejem (ESI; z angl. Electrospray Ionization), která se spolu s chemickou ionizací za atmosférického tlaku, fotoionizací za atmosférického tlaku a ionizací laserem za atmosférického tlaku řadí mezi tzv. sprejové ionizační techniky. Ty jsou řazeny mezi měkké ionizační techniky v kapalně fázi a jejich využití je vhodné v kombinaci s kapalinovou chromatografií (LC; z angl. Liquid Chromatography). [34,40]

Jelikož u ionizace elektrosprejem se ionty přenáší z roztoku do plynné fáze, jedná se o metodu, která je doprovázena značnou spotřebou tepelné energie. Tento způsob ionizace se vyznačuje poskytováním záporných i kladných iontů, kdy v závislosti na vloženém napětí a jeho polaritě vznikají jak deprotonované tak protonované molekuly. Začátek samotného měření spočívá v přivedení zředěného roztoku vzorku do rozprašovací komůrky pomocí kapiláry, která je zhotovena z vodivého materiálu. V rozprašovací komůrce dochází vlivem nehomogenního elektrického napětí k rozprášení kapalně fáze na drobné kapičky, které mají vysokou hustotu povrchového náboje. Následně začne docházet k odpařování rozpouštědla z částic vzniklého aerosolu, tím se ještě víc navýší hustota náboje, až dojde k „prasknutí“ částic, kdy vznikají částice ještě menších rozměrů, tudíž i odpařování rozpouštědla probíhá ještě rychleji. K tomuto ději, tedy vypaření rozpouštědla, napomáhá sušící plyn (N_2), který dosahuje teplot 200–300 °C. V závislosti na vloženém módu napětí vznikají buďto kladně, nebo záporně nabitě ionty. V pozitivním skenovacím módu vznikají primárně protonované molekuly $[M+H]^+$, kdy onen proton prochází z použitého rozpouštědla. Dále dochází k tvorbě aduktových iontů jako například $[M+Na]^+$ či $[M+K]^+$ nebo také vyšší asociáty $[2\cdot M+Na]^+$ či $[2\cdot M+H]^+$. V negativním skenovacím módu mohou vznikat ionty $[M-H]^-$, $[M+Cl]^-$, případně vyšší asociáty typu $[2\cdot M-H]^-$, $[2\cdot M-2\cdot H+Na]^-$, apod. [34,36,41,42]

Elektrosprejovou ionizaci lze považovat za nejměkčí ze všech ionizačních technik. Pomocí ESI lze pokrýt studium od středně polárních látek po sloučeniny iontového charakteru, kdy u nepolárních či málo polárních sloučenin může docházet k problémům s jejich ionizací. Za zmínku stojí vlastnost elektrosprejové ionizace, kdy ji lze aplikovat pro hodnoty poměru m/z až do 100 000. [34,43]

Ostatní ionizační techniky

Jako další ionizační techniku lze uvést ionizaci laserem za účasti matrice (MALDI; z angl. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization), která slouží pro analýzu převážně velkých molekul, zejména biomakromolekul, jako jsou polymery, proteiny a peptidy. Tato ionizační technika je řazena mezi měkké techniky, kdy ihned po ESI jde o nejšetrnější metodu. [41,43]

V neposlední řadě lze zmínit ambientní ionizační techniky, kdy v současnosti jich je popsáno cca 30. U těchto technik je analyt přítomen vně hmotnostního spektrometru, kdy na jeho povrch je namířen ionizační impulz, což má za následek desorpci analytu

a jeho ionizaci. Následuje převedení ionizovaného analytu přímým vstupem do hmotnostního spektrometru. Nepopíratelnou výhodou ambientních ionizačních technik je fakt, že při jejich použití nedochází, na rozdíl od zbylých ionizačních technik, k destrukci analyzovaného vzorku, čehož lze s výhodou nejen při analýze potravin či léčiv, ale také ve forenzní chemii (např. při analýze drog v bankovkách). [44,45]

3.1.2 Hmotnostní analyzátory

Již ionizované látky vstupují do další části spektrometru, kterou je hmotnostní analyzátor. V dnešní době je běžně využíváno například průletového analyzátoru, kvadrupólového analyzátoru, orbitrapu, iontové cyklotronové rezonance a v neposlední řadě iontové pasti. V této části jsou ionty přicházející z iontového zdroje selektovány na základě poměru m/z , tedy dle jejich poměru hmotnosti a náboje. V této kapitole bude blíže popsána pouze iontová past, jelikož v praktické části této bakalářské práce byl použit hmotnostní spektrometr, jehož hmotnostním analyzátozem je právě iontová past. [34,41,43,46]

Iontová past

Iontová past (IT; z angl. Ion-trap) je založena na schopnosti soustředit ionty v uzavřeném prostoru, k čemuž je využíváno střídavého elektrického pole. V soustavě se nachází tři elektrody, z nichž dvě jsou kruhové s hyperbolickým průřezem a třetí s proměnlivou amplitudou, na niž je přiváděno vysokofrekvenční napětí. Jedná se o elektrodu vstupní, středovou a výstupní. Přes vstupní elektrodu je zavedena analyzovaná molekula, přičemž je pomocí pulzu elektronů ionizována. Během tohoto procesu se dostatečné množství iontů akumuluje v iontové pasti, což může trvat 10 μ s až 200 ms. Následně dochází k postupnému zvyšování amplitudy střídavého napětí, při kterém jsou vypuzovány z pasti přes otvor výstupní elektrody ionty s rostoucím poměrem m/z . [34]

Největší předností iontové pasti vůči jiným analyzátorům představuje její schopnost měřit tandemová spektra (MS^n), jejichž princip spočívá v izolaci požadovaného iontu a jeho následné fragmentaci za vniku tzv. dceřiných iontů. Podle schopnosti konkrétního přístroje je možno tyto procesy n -krát opakovat. Tato schopnost má zásadní vliv na získání nových informací o chování iontů v plynné fázi. [47]

3.1.3 Detekční systém hmotnostního spektrometru

U hmotnostního spektrometru bývají používány dva typy detektorů. V první řadě jde o násobičové detektory, které mohou být fotonásobičové či elektronásobičové. Jsou založeny na efektu násobení elektronů vznikajících po dopadu iontů. Tyto detektory jsou schopny poskytovat signály i pro jednotlivé ionty. Druhým typem jsou detektory pro přímá měření. Ty jsou schopny již detekovat elektrický proud vznikající přímo dopadajícími ionty. [34]

4 SUPRAMOLEKULÁRNÍ CHEMIE V PLYNNÉ FÁZI

Plynná fáze poskytuje jedinečné poznatky, které vhodně doplňují informace získané v kapalně fázi. Tyto poznatky jsou cenné zejména s ohledem na studium významu rozpouštědla a protiiontových účinků v supramolekulární chemii. V plynné fázi lze jak rozpouštědlo, tak i protiiont zcela odstranit, což umožňuje, v porovnání s kapalnou fází, studovat nejen vliv rozpouštědla, ale protiiontu. Bez studia v plynné fázi by bylo velmi obtížné zjistit, jak tyto faktory, jež z kapalně fáze nelze odstranit, mohou ovlivňovat příslušný supramolekulární systém. [48]

V plynné fázi může být velmi podrobně prozkoumána vnitřní chemie komplexů a porovnána s předpoklady. Mimo jiné je o chování těchto komplexů v plynné fázi samo o sobě velký zájem, protože systémy s nekovalentními vazbami, jako jsou komplexy protein-ligand, mají v dnešní době velký význam a zájem o jejich převedení do plynné fáze roste z důvodu obtížnosti jejich charakterizace. [48]

Studie v plynné fázi, které obvykle využívají metody hmotnostní spektrometrie, vyžadují jen nepatrné množství vzorku (typicky několik mikrolitrů roztoku v mikromolárních koncentracích), dále vyžadují minimální čištění, jelikož toho lze snadno dosáhnout díky vlastnostem hmotnostní spektrometrie dokonale rozdělovat látky na základě jejich exaktních hmotností. Uvedené vlastnosti představují velkou výhodu, jelikož mnoho systémů, které jsou předmětem zájmu supramolekulární chemie, je obtížné charakterizovat jakoukoli jinou metodou. Jako příklad lze uvést rentgenovou difrakční analýzu, k jejíž aplikaci je nezbytné mít k dispozici kvalitní monokrystal supramolekulárního komplexu, který bude difraktovat. Bohužel u velkého množství supramolekulárních komplexů se nepodaří vypěstovat vhodné monokrystaly, čímž je použití rentgenové difrakční analýzy vyloučeno - a tím i získání unikátních informací o struktuře příslušného komplexu v pevné fázi. V některých případech se jako nepříliš použitelná jeví i nukleární magnetické rezonance (NMR; z angl. Nuclear Magnetic Resonance) a to zejména kvůli problémům s rozpustností (zpravidla ligandu) nebo v důsledku přítomnosti magnetických jader. [48]

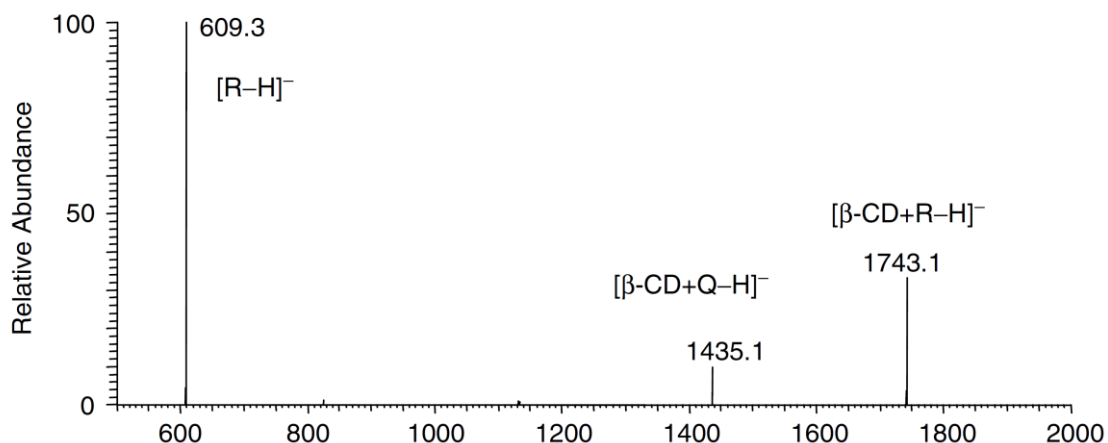
Při studiích supramolekulárních systémů je důležitá také schopnost rozpoznat geometrické uspořádání komplexů či určit jejich vazebnou konstantu. Proto je velmi časté, že zjištění exaktní hmotnosti komplexu, což je většinou počáteční cíl v hmotnostně-spektrometrických experimentech, neposkytuje dostatečnou informaci pro možnost rozlišit potenciálně cenný supramolekulární komplex od nespecifického aduktu. Proto je pro

úspěšnou a plnou charakterizaci supramolekulárních komplexů v plynné fázi často aplikována tzv. tandemová hmotnostní spektrometrie, tedy technika, při níž dochází k izolaci a následné fragmentaci příslušného iontu. Výsledky takových experimentů nejenže mohou poskytnout cennou informaci o tom, zda se skutečně jedná o supramolekulární komplex či nespécifický agregát, ale také mohou přispět k rozpoznání geometrického uspořádání daného komplexu či jeho stability. Tyto informace pak mohou být porovnány s experimenty, které byly provedeny v roztoku (NMR či isothermální titrační mikrokolorimetrie). [48]

4.1 Supramolekulární komplexy typu ligand@cyklodextrin

O supramolekulárních komplexech s cyklodextriny a jejich následném využití bylo napsáno již velké množství publikací. Níže jsou uvedeny poznatky ze tří vybraných prací, v nichž se autoři zabývali studiem vzniku a chování supramolekulárních komplexů jimi vybraných ligandů s nativními cyklodextriny v plynné fázi.

V první z vybraných publikací byly zkoumány supramolekulární komplexy mezi α -, β - a γ -cyklodextrinem a rutinem, což je látka sestávající z cukerné části- rutinosy a aglykonové části, kterou představuje kvercetin. Rutin má velmi různorodou biologickou aktivitu, přičemž mezi nejdůležitější patří antioxidační aktivita, protirakovinové účinky či inhibice agregace trombocytů. Avšak díky špatné rozpustnosti rutinu ve vodných médiích a také jeho špatné stabilitě se jako velmi vhodná jeví jeho komplexace s cyklodextriny. Přesvědčivý důkaz tvorby specifických inkluzních komplexů mezi rutinem a CD poskytla fragmentace komplexu (za podmínek kolizí indukované disociace), v důsledku které došlo ke štěpení kovalentní vazby mezi cukernou a aglykonovou částí molekuly rutinu. Zatímco glykosidická část molekuly rutinu se odštěpila ve formě neutrální částice, tak deprotonovaný kvercetin zůstal navázán na CD. Na **Obrázku 8** je jako příklad uvedeno MS/MS spektrum komplexu rutin- β -CD získané v negativním skenovacím módu, kdy jako nejzajímavější se jeví signál o m/z 1435, kteří autoři práce označují jako komplex β -CD a deprotonované molekuly kvercetinu. Tyto inkluzní komplexy mohou mít celou řadu využití. Jako příklad lze uvést potravinářský, farmaceutický či kosmetický průmysl. [49]



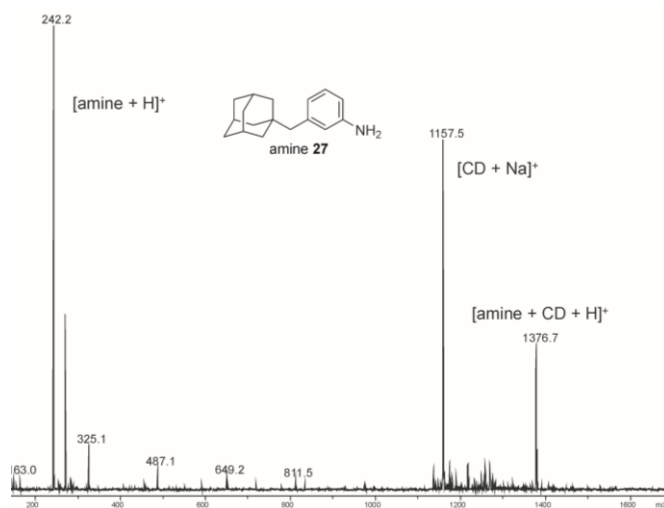
Obrázek 8. Tandemové hmotnostní spektrum komplexu rutin·β-CD získané v negativním skenovacím módu. [49]

V následujících dvou publikacích byly jako ligandy použity sloučeniny, jež lze zjednodušeně označit jako aminy (odvozené od anilinu či benzylaminu) obsahující ve své molekule adamantanový skelet, kterýžto má ideální vlastnosti (vysoká lipofilita) a rozměry pro tvorbu relativně stabilních komplexů s cyklodextriny. Značná lipofilita adamantanu usnadňuje jako přestup molekul obsahujících tento polycyklický uhlovodík přes buněčné membrány, čehož lze s výhodou využít např. v chemii léčiv. Ona lipofilita s sebou však přináší také určitá omezení, přičemž jedním z těch nejzávažnějších je velmi omezená rozpustnost neutrálních sloučenin obsahujících adamantanový skelet ve vodě. Zlepšit rozpustnost těchto látek ve vodě je možné např. jejich zakomplexováním do kavity některého z cyklodextrinů. [50]

Umístění adamantanového skeletu může nevhodně ovlivnit biologickou aktivitu finální sloučeniny, a to v případě, je-li tento objemný substituent umístěn příliš blízko aktivnímu místu potencionálního léčiva (tzv. farmakoforu). Proto je nutné zvážit vlastnosti a přípravu nových stavebních prvků. V předmětné publikaci byly nově připraveny potenciálně vhodné stavební bloky pro přípravu nových biologicky aktivních látek a následně zkoumána jejich schopnost vytvářet komplexy s β-CD pomocí ESI-MS, NMR a titrační kalorimetrie. [50]

Na **Obrázku 9** je pro ilustraci uvedeno hmotnostní spektrum prvního řádu jednoho z připravených aromatických aminů (v publikaci označeného jako látka 27) s β-CD v pozitivním skenovacím módu, přičemž je patrné, že ve spektru byly pozorovány celkem tři významné signály. Jednalo se o protonovaný amin (242 m/z), sodný adukt β-CD

(1157 m/z) a zejména pak komplex amin $\cdot\beta$ -CD (1377 m/z), přičemž tvorba komplexu byla nejen v tomto, ale také ve všech ostatních případech potvrzena pomocí izolace a následné fragmentace iontu, jehož hodnota m/z odpovídala příslušného typu supramolekulárního komplexu. [50]

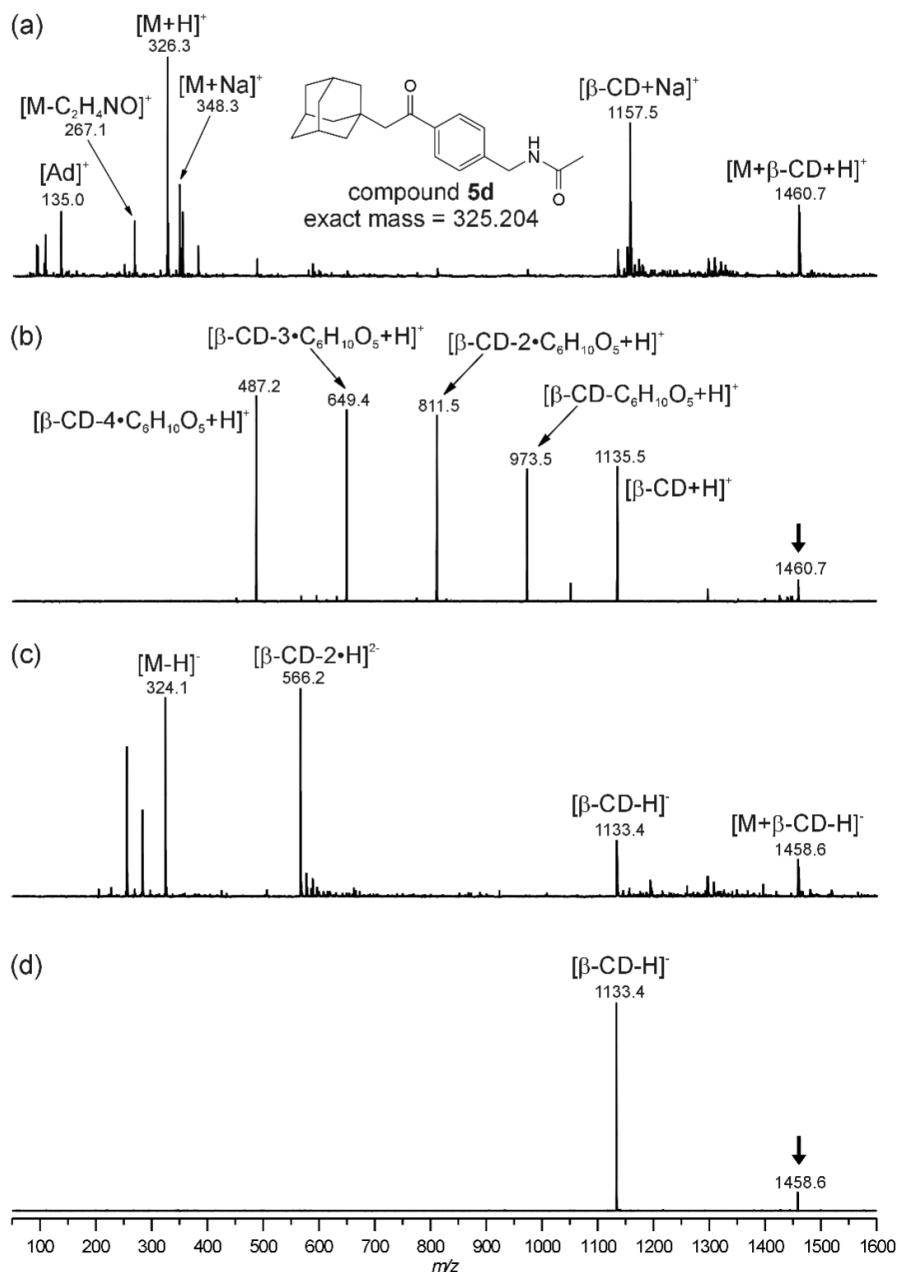


Obrázek 9. Hmotnostní spektrum aminu s β -CD. [50]

V poslední z vybraných publikací byly připraveny ligandy na bázi adamantanu, přičemž v tomto případě se nejednalo o deriváty „anilinu“, nýbrž pak „benzylaminu“. Jak autoři v práci uvádějí, jednotlivé benzylaminy byly z důvodu jejich nepříliš značné stability (při laboratorní teplotě docházelo k jejich rozkladu za vzniku směsi sloučenin, jejichž strukturu se nepodařilo určit) tyto sloučeniny převedeny jednoduchou reakcí příslušného aminu s acetanhydridem v prostředí pyridinu na odpovídající benzylamidy. Po úplné strukturální charakterizaci těchto ligandů, přistoupili autoři práce k následnému studiu jejich supramolekulárních vlastností. U těchto benzylamidů tak byly studovány vazebné vlastnosti vůči β -CD pomocí MS, NMR, izotermické titrační kalorimetrie a semi-empirických výpočtů. U všech zkoumaných ligandů byla pozorována tvorba inkluzních komplexů, přičemž nejsilnější vazbu v kavitě β -CD vykazoval ligand obsahující mezi adamantanovým skeletem a aromatickým jádrem delší „linker“. [51]

Na **Obrázku 10** jsou pro větší názornost uvedena hmotnostní spektra komplexu jedné z připravených sloučenin a β -CD. Na **Obrázku 10a** je spektrum prvního řádu získané v pozitivním skenovacím módu, v němž byl, vyjma signálů pocházejících z ligandu a makrocyklu, detekován také jedenkrát nabitý ion o m/z 1461 odpovídající protonovanému komplexu typu ligand $\cdot\beta$ -CD. Izolací a následnou fragmentací tohoto iontu (**Obrázek 10b**) bylo potvrzeno, že skutečně jedná o příslušný supramolekulární komplex.

Na **Obrázcích 10c** a **10d** jsou pak znázorněna spektra získaná v negativním skenovacím módu, přičemž i v tomto případě byl očekávaný komplex pozorován. [51]

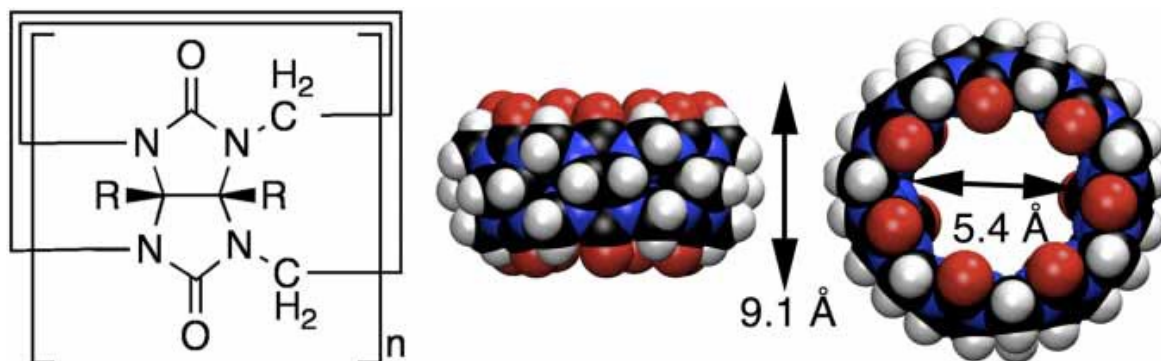


Obrázek 10. Hmotnostní spektra (MS a MS/MS)komplexu typu benzylamid- β -CD. [51]

4.2 Supramolekulární komplexy typu ligand@kukurbit[n]uril

Kukurbit[n]urily (CB) jsou makrocyclické sloučeniny sestávající z „n“ ($n = 5, 6, 7, 8$ a 10) glykolurilových jednotek spojených dvěma methylenovými můstky. Jedná se o vysoce rigidní molekulu svým tvarem připomínající soudek. (**Obrázek 11**). Vzhledem k jedinečným schopnostem kukurbit[n]urilů vytvářet vysoce afinitní supramolekulární

systemy typu hostitel-host, vykazují komplexy obsahující tento makrocyklus významné schopnosti molekulárního rozpoznávání a mají tak určitý potenciál jakožto nástroj pro distribuci léčiv. [52]



Obrázek 11. Obecný vzorec kukurbit[n]urilů (vlevo) a znázornění struktury CB7 (uprostřed a vpravo). [53]

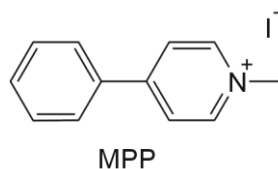
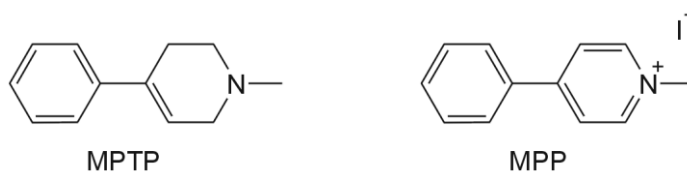
V posledních letech bylo publikováno mnoho odborných prací založených na studiu supramolekulárních komplexů typu ligand@cucurbit[n]uril v plynné fázi.

Za pomoci ESI-MS byla zkoumána tvorba komplexů mezi kukurbit[6]urilem (CB6) a peptidy, kdy CB6 vykazoval vysoké upřednostnění vazby na lysin (lys) za vzniku CB6-peptidového komplexu. Vzhledem k velkým rozměrům CB6 a jejich silné vazebné síle na protonovaný boční řetězec lysinu, zůstávaly i po kolizí indukované disociaci (CID, z angl. Collision Induced Dissociation) CB6 a lysin ve formě komplexu (Lys@CB6). Zkoumána byla také vazba kukurbit[7]urilu na *N*-terminální aromatické zbytky aminokyselin. U tohoto typu komplexu poskytovala kolizí indukovaná disociace mnohem více fragmentů ve srovnání s nekomplexovanými peptidy. Obě studie demonstrují nový, vysoce inovativní a perspektivní přístup ke zlepšení analýzy peptidů a proteinů za pomoci právě kukurbit[n]urilů. [54,55,56]

Kukurbit[n]urily lze využít také pro poměrně rychlou a přesnou analýzu biogenních polyaminů, která přináší řadu výhod oproti metodám využívaným doposud, kdy tyto zahrnovaly derivatizaci, zakoncentrování a čištění zkoumaných vzorků. Toto stanovení je možné například u destilovaných nápojů (putrescin v destilátech z hroznových výlisků), kdy jsou biogenní aminy nejprve natráveny kyselinou a následně zapouzdřeny pomocí kukurbit[n]urilů. Tento komplex lze následně stanovit za použití ESI-MS. [52,53]

Své využití našly kukurbit[n]urily také při inhibici neurodegenerace, kdy jsou považovány za blokátory neurotoxinů MPTP (*N*-methyl-4-fenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin) a MPP (*N*-

methyl-4-fenylpyridinium-jodid) (**Obrázek 12**), jež jsou zodpovědné za Parkinsonovu chorobu. Tyto neurotoxiny mohou být zapouzdřeny kukurbit[n]urily ve vodném prostředí s poměrně velkou afinitou. Získané výsledky naznačují, že CB mají obrovský potenciál působit jako neuroprotektivní činitelé proti neurotoxinům. [56,57]



Obrázek 12. Strukturní vzorce neurotoxinů MPTP a MPP.

II. PRAKTICKÁ ČÁST

5 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

5.1 Přístroje a vybavení

Pro hmotnostně-spektrometrické experimenty byl použit hmotnostní spektrometr amaZon X (Bruker Daltonics, Brémy, Německo) vybavený elektrosprejovým ionizačním zdrojem a iontovou pastí jakožto hmotnostním analyzátozem. Veškerá měření byla provedena v pozitivním a negativním skenovacím módu. Jako sušící a rozprašovací plyn byl použit dusík. Tandemová hmotnostní spektra byla, po izolaci příslušného iontu, měřena pomocí kolizí indukované disociace (z angl. Collision-induced Dissociation, CID). Jako kolizní plyn bylo použito helium. V průběhu provádění analýz byl používán software Trap Control, k vyhodnocování provedených experimentů byl použit software Data Analysis.

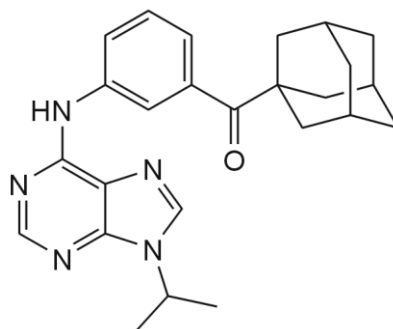
Pro potřeby této práce byly použity čtyři purinové ligandy (viz kapitola 5.2), které byly získány z laboratorních zásob a jež dříve nasyntetizoval Ing. David Gergela. Tyto látky byly pro potvrzení jejich struktury analyzovány pomocí ESI-MS a dále používány bez nutnosti jakékoliv další purifikace. Makrocyclické sloučeniny sloužící jako hostitelské molekuly, tedy α -, β - a γ -cyklodextrin byly zakoupeny z komerčních zdrojů a použity bez jakékoliv další purifikace. Veškerá rozpouštědla (chloroform, methanol a voda) byla zakoupena z komerčních zdrojů, kdy tato byla v odpovídající kvalitě (LC-MS).

5.2 Specifikace použitých ligandů

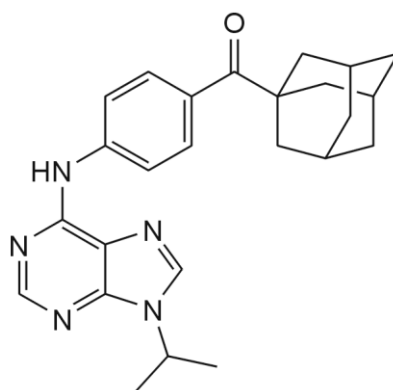
Ligandy, u nichž byla v rámci předložené bakalářské práce studována schopnost vytvářet supramolekulární komplexy s cyklodextriny v plynné fázi, byly, jak je zmíněno výše, připraveny Ing. Davidem Gergelou a použity s jeho laskavým svolením. Jedná se o sérii 6,9-disubstituovaných purinových sloučenin obsahujících v poloze 9 neobjemný nepolární alifatický uhlovodík a v poloze 6 sekundární aromatický amin obsahující vysoce lipofilní a relativně stericky objemný adamantanový skelet. Bližší charakteristika použitých ligandů, včetně jejich strukturních vzorců je uvedena níže. Jednotlivé ligandy byly pro potřeby této práce očíslovány (**L1–L4**) a z důvodu snazší orientace případného čtenáře v samotném rukopise.

(1-Adamantyl){3-[(9-isopropyl-9H-purin-6-yl)amino]fenyl}methanon(1)Sumární vzorec: $C_{25}H_{29}N_5O$

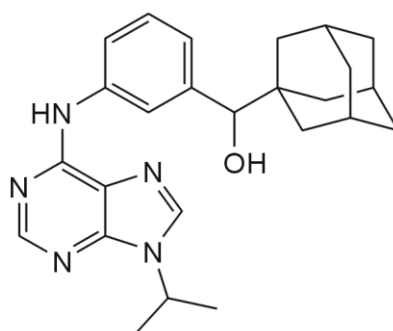
Exaktní hmotnost[u]: 415,237

Vzhled: bezbarvý krystalický
prášek**(1-Adamantyl){4-[(9-isopropyl-9H-purin-6-yl)amino]fenyl}methanon(2)**Sumární vzorec: $C_{25}H_{29}N_5O$

Exaktní hmotnost[u]: 415,237

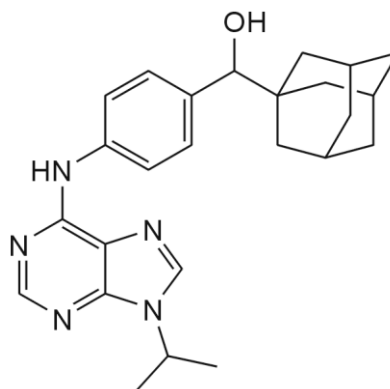
Vzhled: světle žlutý
krystalický prášek**(1-Adamantyl){3-[(9-isopropyl-9H-purin-6-yl)amino]fenyl}methanol(3)**Sumární vzorec: $C_{25}H_{31}N_5O$

Exaktní hmotnost[u]: 417,253

Vzhled: světle žlutý
krystalický prášek

(1-Adamantyl){4-[(9-isopropyl-9H-purin-6-yl)amino]fenyl}methanol(4)Sumární vzorec: $C_{25}H_{31}N_5O$

Exaktní hmotnost[u]: 417,253

Vzhled: bezbarvý krystalický
prášek**5.3 ESI-MS analýza samotných ligandů****5.3.1 Parametry ESI-MS analýz**

Jednotlivé vzorky v podobě roztoku $CH_3OH:H_2O$ (1:1, v:v), o koncentraci $500 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$, byly přiváděny do iontového zdroje kovovou kapilárou při konstantním průtoku $3 \text{ }\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$. Jednotlivé analýzy byly provedeny jak v pozitivním, tak v negativním skenovacím módu. Nejvýznamnější parametry měření byly následující:

Skenovací mód: Enhanced resolution ($8\ 100 \text{ m/z}\cdot\text{s}^{-1}$)Napětí na kapiláře: $\pm 4,2 \text{ kV}$ Napětí na konci kapiláry: $\pm 140 \text{ V}$ Tlak rozprašovacího plynu: $55,16 \text{ kPa}$ Průtok sušícího plynu: $6 \text{ dm}^3\cdot\text{min}^{-1}$ Teplota sušícího plynu: $220 \text{ }^\circ\text{C}$

ICC (maximální počet iontů v pasti): 200 000 (+MS), 70 000 (-MS)

Maximální akumulací čas: 20 ms

Rozpětí m/z : 0–2000

Tandemová spektra: MS/MS

5.3.2 Příprava vzorků

Příslušný ligand (sloučenina **L1–L4**) byl v množství 1 mg navážen do vialky o objemu 1,5 cm³ a následně rozpuštěn v 1 cm³ chloroformu. Z takto připraveného zásobního roztoku bylo odebráno 5 µl a napipetováno do vialky obsahující 500 µl methanolu a 500 µl vody, čímž vznikl roztok o koncentraci 5 µg·ml⁻¹. Z tohoto roztoku bylo odebráno 100 µl a napipetováno do vialky obsahující 450 µl methanolu a 450 µl vody, čímž vznikl roztok o koncentraci 500 ng·ml⁻¹, který byl následně nastříknut do hmotnostního spektrometru. Jednotlivé roztoky byly připravovány bezprostředně před samotnou analýzou.

5.4 ESI-MS analýza supramolekulárních komplexů

5.4.1 Parametry ESI-MS analýz

Jednotlivé vzorky v podobě roztoku CH₃OH:H₂O (1:1, v:v) obsahující ekvimolární množství příslušného ligandu a cyklodextriny (o koncentraci 25 µM), byly přiváděny do iontového zdroje kovovou kapilárou při konstantním průtoku 3 µl·min⁻¹. Jednotlivé analýzy byly provedeny jak v pozitivním, tak v negativním skenovacím módu. Nejvýznamnější parametry měření byly následující:

Skenovací mód: Enhanced resolution (8 100 m/z·s⁻¹)

Napětí na kapiláře: ±4,0 kV

Napětí na konci kapiláry: -5 až -30 V

Tlak rozprašovacího plynu: 206,84 kPa

Průtok sušícího plynu: 6 dm³·min⁻¹

Teplota sušícího plynu: 300 °C

ICC (maximální počet iontů v pasti): 200 000 (+MS), 70 000 (-MS)

Maximální akumulací čas: 20 ms

Rozpětí *m/z*: 0–3000

Tandemová spektra: MS/MS

5.4.2 Příprava vzorků

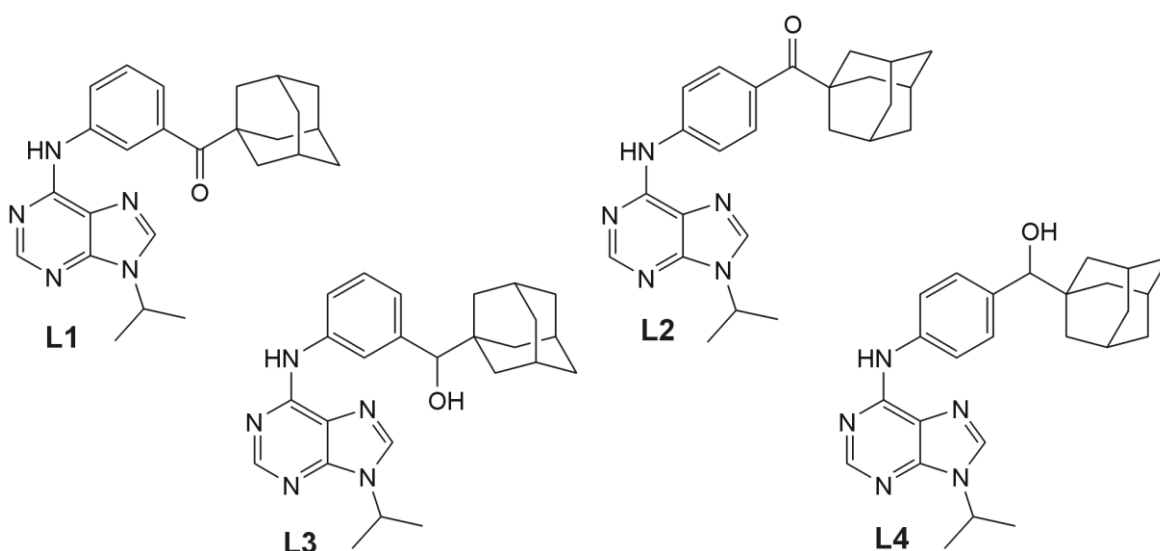
Příslušný ligand (sloučenina 1–4) byl v množství 1 mg navážen do vialky o objemu 1,5 cm³ a následně rozpuštěn v 1 cm³ chloroformu. Analogicky byly připraveny zásobní roztoky každé hostitelské molekuly, tedy α -, β - a γ -cyklodextrinu s tím rozdílem, že tyto byly rozpuštěny v 1 cm³ vody. Následně z takto připravených roztoků byla mikropipetou odebrána odpovídající množství ligandu a makrocyklu do vialky s roztokem CH₃OH:H₂O (1:1, v:v) tak, aby výsledná koncentrace roztoku činila 25 μ M.

6 VÝSLEDKY A DISKUZE

V této budou, pokud možno co nejsrozumitelnější formou, komentovány veškeré výsledky, kterých bylo v průběhu řešení této bakalářské práce dosaženo. Kapitola bude strukturována ve stejném duchu, jako tomu bylo v experimentální části, což by mělo přispět ke snadnější orientaci případného čtenáře v předloženém textu. Nejprve tak bude podán komentář k analýze samotných purinových ligandů, následovaný podrobnou diskuzí týkající se studia schopnosti těchto látek vytvářet supramolekulární komplexy s cyklodextriny v plynné fázi.

6.1 ESI-MS analýza samotných ligandů

Jak bylo zmíněno již v experimentální části, ligandy, které byly použity v této práci, představují čtyři různé 6,9-disubstituované purinové sloučeniny, pro potřeby této práce označovány jako látky **L1** až **L4** (**Obrázek 13**), které byly dříve syntetizovány na Ústavu chemie. Důvodem přípravy těchto sloučenin je úmysl prostudovat jejich možnou biologickou aktivitu, a to konkrétně jakožto možných inhibitorů cyklin-dependentních kináz, což jsou heterodimerní komplexy, jejichž hlavním úkolem je regulace buněčného cyklu, případně jiných kináz, např. CRK3/CYC6, tedy protein kinázy, která je významným regulátorem buněčného cyklu cizopasných prvků způsobujících závažná onemocnění.



Obrázek 13. Strukturální vzorce ligandů použitých v této práci.

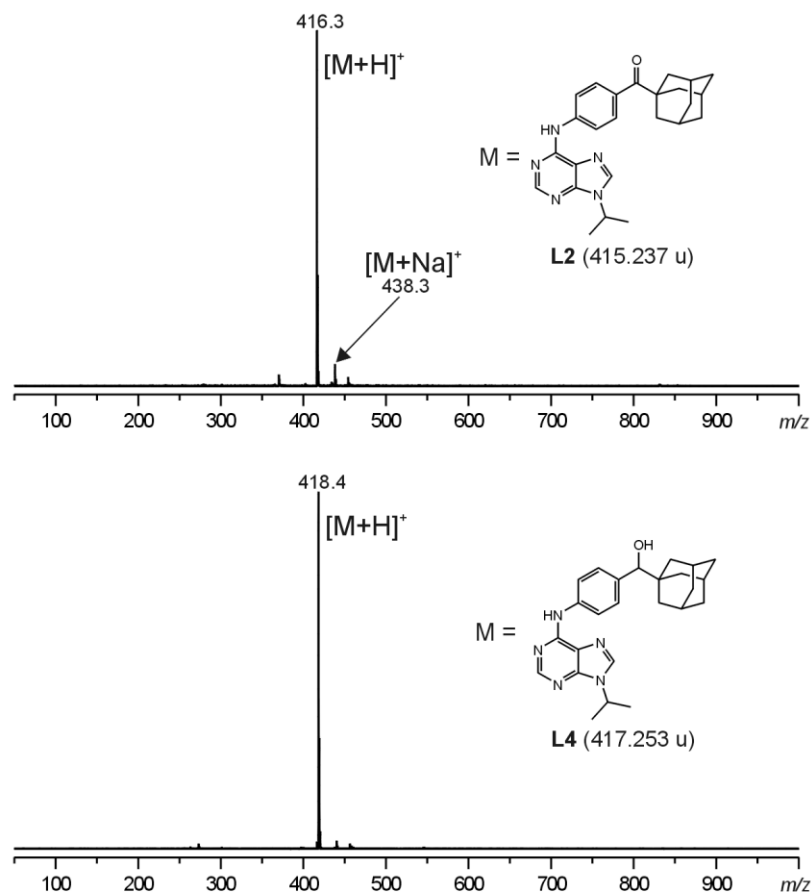
S ohledem na molekulární strukturu výše uvedených ligandů lze předpokládat, že budou velmi omezeně rozpustné ve vodných médiích. To je způsobeno zejména přítomností silně lipofilního adamantanového skeletu. Na druhou stranu, přítomnost tohoto polycyklického

uhlovodíku umožňuje uvažovat o schopnosti těchto látek vytvářet supramolekulární komplexy s cyklodextriny, čímž by mohlo být dosaženo vyšší rozpustnosti vzniklého komplexu ve vodě, ve srovnání se samotným ligandem. Otázkou tedy zůstává, zda jsou sloučeniny **L1** až **L4** schopny tyto komplexy vytvářet či nikoliv. Pakliže by byla tvorba komplexů potvrzena, a to nejen v plynné fázi, což bylo předmětem této práce, ale také v roztoku, je namístě podrobit testování biologické aktivity nejen samotné sloučeniny **L1** až **L4**, ale rovněž pak jejich směsi s cyklodextriny. Z výsledků takových testů by pak mohlo být patrné, zda a případně jaký vliv má na biologickou aktivitu přítomnost příslušné makrocyclické sloučeniny.

Protože byly ligandy použité v této práci již dříve nasyntetizovány a byla provedena jejich úplná strukturní charakteristika [58], byly v rámci této práce pouze „pro jistotu“ přeměřeny pomocí ESI-MS, aby bylo zřejmé, že se skutečně jedná o uvažované sloučeniny. Všechny experimenty byly provedeny jak v pozitivním, tak negativním skenovacím módu.

Ve spektru prvního řádu sloučenin **L1** a **L2** obsahujících mezi aromatickým jádrem a adamantanovým skeletem karbonylovou skupinu získaných v pozitivním skenovacím módu byl jako dominantní pozorován jedenkrát nabitý ion o m/z 416,3 odpovídající protonované molekule purinů **L1** a **L2**. Tento ion byl doprovázen dvěma jedenkrát nabitými ionty o m/z 438,3 a 454,3, které byly charakterizovány jako sodný, resp. draselný adukt příslušné molekuly. V případě negativního skenovacího módu byly dva signály, a sice deprotonovaná molekula (m/z 414,3) a ion o m/z 851,4 odpovídající sodnému aduktu dvou deprotonovaných molekul $[2 \cdot M - 2 \cdot H + Na]^-$.

V případě sloučenin **L3** a **L4**, které mezi aromatickým kruhem a adamantanovým skeletem obsahují hydroxylovou skupinu, byl ve spektru prvního řádu získaného v pozitivním skenovacím módu pozorován pouze jediný ion určený jako protonovaná molekula, kdy hodnota tohoto jedenkrát nabitého iontu činila 418,3 m/z . V negativním skenovacím módu pak byly v obou případech pozorovány dva signály, dominantní o m/z 416,3 odpovídající deprotonované molekule a dále pak jedenkrát nabitý signál o m/z 855,4, který byl pozorován také ve spektrech sloučenin **L1** a **L2**, tedy sodný adukt dvou deprotonovaných molekul. Na **Obrázku 14** jsou pro ilustraci uvedena +MS spektra prvního řádu sloučenin **L2** a **L4**.



Obrázek 14. ESI-MS spektra prvního řádu sloučenin **L2** a **L4** získaná v pozitivním skenovacím módu.

Pro větší přehlednost je rovněž v Tabulce 1 uvedeno shrnutí všech pozorovaných typů iontů ve spektrech prvního řádu jednotlivých ligandů, a to jak v pozitivním tak negativním skenovacím módu. U každého typu iontu je uvedena jak vypočítaná hodnota m/z , která by měla být teoreticky pozorována, tak také hodnota experimentálně změřená.

Tabulka 1. Výsledky ESI-MS analýz samotných ligandů **L1–L4**

Slč.	+MS						-MS			
	$[M+H]^+$		$[M+Na]^+$		$[M+K]^+$		$[M-H]^-$		$[2 \cdot M - 2 \cdot H + Na]^-$	
	vyp.	exp.	vyp.	exp.	vyp.	exp.	vyp.	exp.	vyp.	exp.
L1	416,3	416,3	438,2	438,3	454,2	454,3	414,2	414,3	851,5	851,4
L2	416,3	416,3	438,2	438,3	454,2	454,3	414,2	414,3	851,5	851,4
L3	418,3	418,3	440,2	n.d.	456,2	n.d.	416,3	416,3	855,5	855,4
L4	418,3	418,4	440,2	n.d.	456,2	n.d.	416,3	416,3	855,5	855,5

n.d. (nebyl detekován)

Jelikož v této práci nebylo cílem studovat chování samotných ligandů v plynné fázi, ale pouze potvrdit jejich strukturu, nebudou na tomto místě výsledky získané pomocí kolizí indukované disociace blíže komentovány.

6.2 Studium vzniku inkluzních komplexů mezi ligandy a cyklodextriny v plynné fázi

V následujících podkapitolách budou diskutovány výsledky experimentů, které představovaly nejvýznamnější část předložené bakalářské práce. Jednalo se o studium vzniku supramolekulárních komplexů typu ligand·cyklodextrin, přičemž jako ligandy byly použity sloučeniny **L1** až **L4** a jako hostitelské molekuly α -, β - a γ -cyklodextrin. Z důvodu lepší přehlednosti pro případného čtenáře budou získané výsledky komentovány vždy pro dvojici ligandů obsahujících mezi adamantanovým skeletem a aromatickým kruhem stejný „linker“, tedy buďto karbonylovou (**L1** a **L2**), nebo hydroxylovou (**L3** a **L4**) skupinu.

Na úvod by bylo nasnadě podotknout, že všechny níže uvedené výsledky byly získány za stejných podmínek (viz Experimentální část), nicméně cesta vedoucí k jejich optimalizaci nebyla úplně hladká a jednoduchá. Prvotní experimenty byly prováděny ve vodném prostředí, bohužel však s výsledky nepoukazujícími na vznik supramolekulárních komplexů, a to ani v případě β -CD, což se zdálo být přinejmenším překvapivé. Z tohoto důvodu bylo přistoupeno ke změně rozpouštědla a samotná voda byla nahrazena směsí voda/methanol (1/1, v/v), která se ukázala být vhodnější.

6.2.1 Komplexace sloučenin **L1** a **L2** s cyklodextriny

V této kapitole budou postupně komentovány výsledky ESI-MS analýz ligandů **L1** a **L2** s α -, β - a γ -cyklodextrinem.

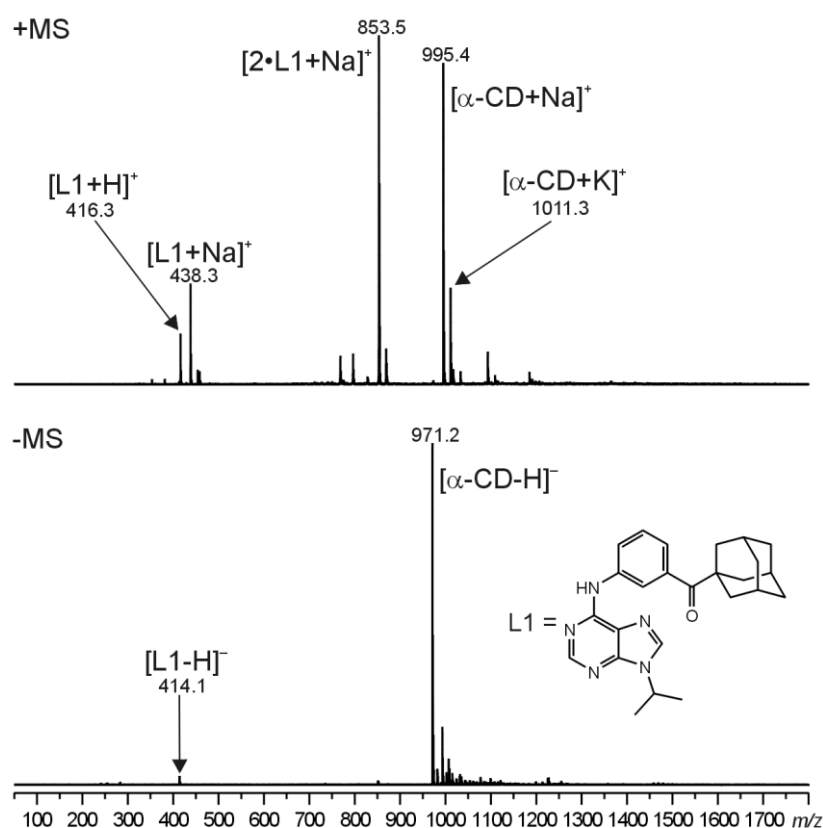
Studium supramolekulárních komplexů s α -cyklodextrinem

V případě experimentů, během nichž byly studovány ekvimolární směsi příslušného ligandu a α -cyklodextrinu bylo ve spektrech prvního řádu získaných v pozitivním skenovacím módu pozorováno celkem pět signálů (v obou případech se tyto shodovaly hodnotami m/z a lišily relativní intenzitou), které pocházely buď z příslušného ligandu, nebo α -cyklodextrinu. Tři z pěti pozorovaných iontů náležely molekule hosta a byly určeny jako protonovaná molekula ligandu $[L1/L2+H]^+$ (416 m/z), sodný adukt ligandu

$[L1/L2+Na]^+$ ($438m/z$) a sodný adukt dimeru příslušného ligandu $[2\cdot L1/L2+Na]^+$ ($853m/z$). Zbylé dva signály o m/z 995 a 1011 byly identifikovány jako sodný, respektive draselný adukt hostitelské molekuly $[\alpha\text{-CD}+Na/K]^+$. Ani v jednom případě nebyl ve spektru prvního řádu získaného v pozitivním skenovacím módu pozorován signál, jehož hodnota m/z by odpovídala vznikajícímu supramolekulárnímu komplexu. Tato skutečnost může být způsobena tím, že rozměr kavity $\alpha\text{-CD}$ je příliš malý na to, aby v ní mohl být inkludován adamantanový skelet. V některých případech dochází v plynné fázi ke vzniku tzv. nespecifických agregátů, tedy uskupení, která nelze považovat za supramolekulární, neboli inkluzní komplex, neboť nedochází ke komplexaci ligandu uvnitř dutiny makrocyclu. Tyto typy agregátů jsou někdy označovány také jako tzv. externí komplexy.

Ve spektrech pozorovaných v negativním skenovacím módu se v obou případech vyskytovaly dva signály, a sice ion o m/z 414 odpovídající deprotonované molekule hosta a signál o m/z 971, který byl určen jako deprotonovaná molekula $\alpha\text{-CD}$.

Spektra prvního řádu (+MS a -MS) ekvimolární směsi sloučeniny **L1** a $\alpha\text{-CD}$ jsou znázorněna na **Obrázku 15**.



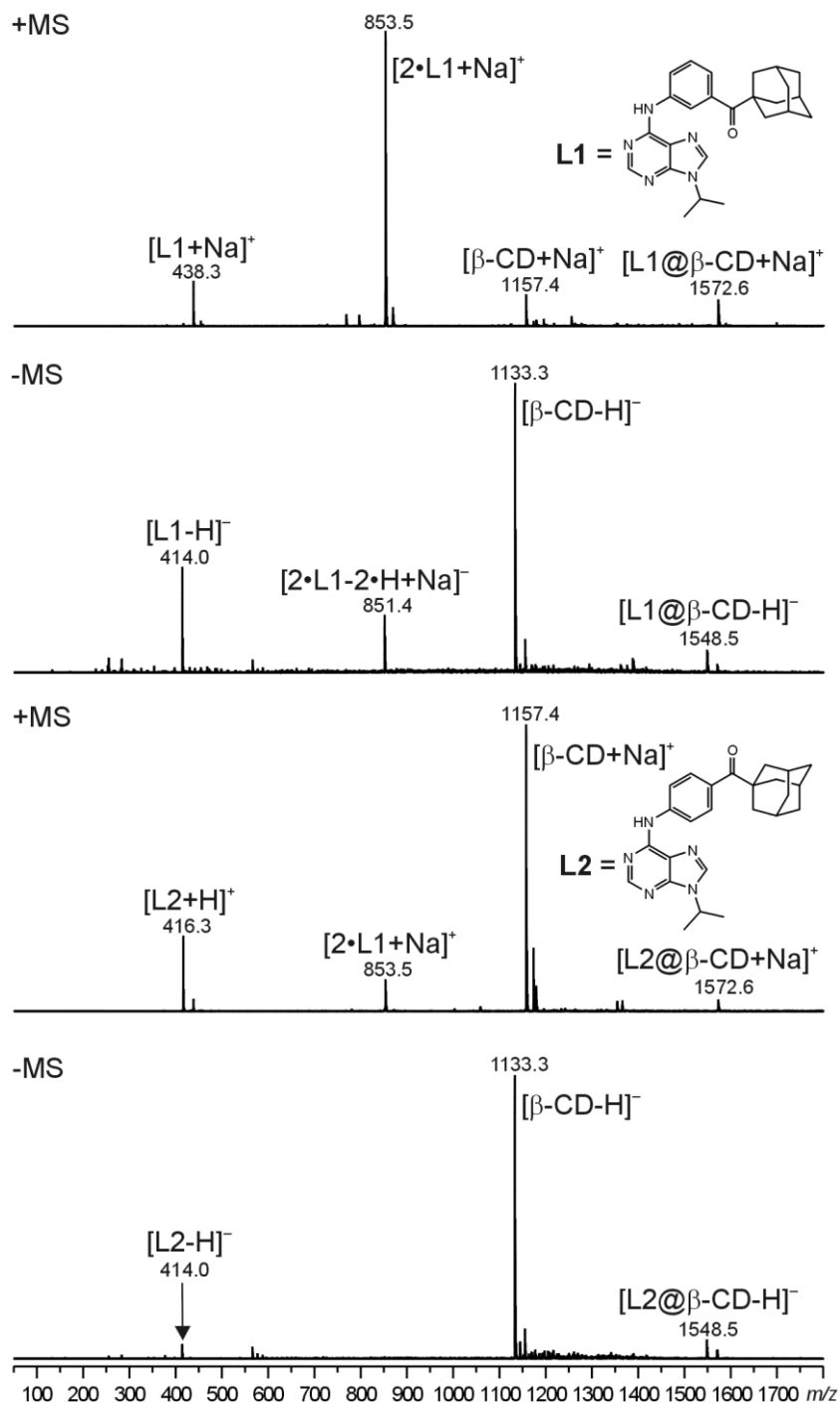
Obrázek 15. ESI-MS spektra prvního řádu ekvimolární směsi **L1**· $\alpha\text{-CD}$ získaná v pozitivním a negativním skenovacím módu.

Studium supramolekulárních komplexů s β -cyklodextrinem

V případě komplexace sloučenin **L1** a **L2** s makrocyklem obsahujícím o jednu glukosovou jednotku více, než tomu bylo ve výše komentovaném případě, tedy β -CD byly získané výsledky odlišné. Vyjma signálů, pocházejících z molekuly hosta (protonovaná molekula, její sodný adukt či dimer sodného aduktu), případně hostitele (sodný adukt β -CD), byl ve spektrech prvního řádu získaných v pozitivním skenovacím módu obou analyzovaných směsí, pozorován také jedenkrát nabitý ion, s monoisotopickým píkem o m/z 1572,6 odpovídající supramolekulárnímu komplexu, pro něhož byla navržena struktura $[L1/L2@\beta\text{-CD}+\text{Na}]^+$ (**Obrázek 16**). Přestože se ani v jednom případě nepodařilo tento ion vyizolovat a následně podrobit fragmentaci za podmínek kolizí indukované disociace, lze se s velkou pravděpodobností domnívat, že se skutečně jedná o supramolekulární komplex, nikoliv o komplex nespecifický. Tato domněnka vyplývá ze zkušeností, které byly při studiu podobných systémů získány v minulých letech.

Neúspěch spojený s izolací iontu o m/z 1576 lze přičíst několika faktorům. Jednak z nízké relativní intenzity iontu, kterou lze snadno vyzorovat na příslušných obrázcích, je zřejmé, že počet iontů, o jejich izolaci v iontové pasti bylo usilováno, byl velmi malý. Dalším faktorem může být relativně nízká stabilita a z ní plynoucí obtížnější fragmentace iontů, které jsou sodnými adukty, což platí i pro tento případ. Ideální by bylo, kdyby se jednalo o komplex, jehož kladný náboj by byl dán přítomností atomu vodíku. V takovém případě by možná byl vzniklý ion stabilnější, což by umožnilo nejen jeho izolaci, ale i následnou fragmentaci.

Ve spektrech prvního řádu získaných v negativním skenovacím módu byly opět pozorovány jak signály pocházející jak z molekuly hosta (deprotonovaná molekula, případně sodný adukt dimeru postrádajícího dva atomy vodíku), tak z molekuly hostitele (deprotonovaná molekula β -CD). Navíc byl ve spektrech obou analyzovaných směsí pozorován signál o m/z 1548, který byl určen jako deprotonovaný komplex příslušného ligandu s β -CD $[L1/L2@\beta\text{-CD-H}]^-$ (**Obrázek 16**). Ani v tomto případě se nepodařilo tento ion vyizolovat a podrobit fragmentaci za podmínek kolizí indukované disociace.



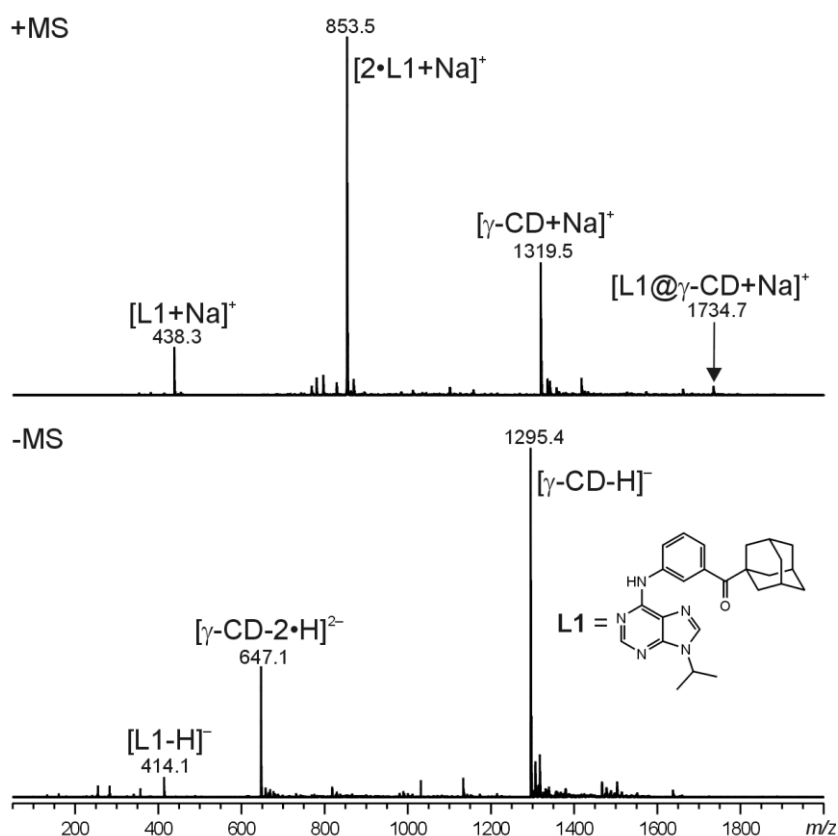
Obrázek 16. ESI-MS spektra prvního řádu ekvimolární směsi L1/L2·β-CD získaná v pozitivním a negativním skenovacím módu.

Studium supramolekulárních komplexů s γ-cyklodextrinem

Posledním makrocylem, který byl použit pro potřeby této bakalářské práce jako hostitelská molekula, byl γ-cyklodextrin. Jedná se o nativní cyklodextrin sestávající z osmi glukosových jednotek a obsahující tak nejobemnější kavitu, jejíž rozměry umožňují inkludaci adamantanového skeletu, nicméně s tím, že kavita není zcela vyplněna, z čehož

vyplývá, že stabilita takového komplexu může být menší, než by tomu bylo v případě komplexace analogického ligandu s β -cyklodextrinem, jehož rozměry, resp. rozměry jeho kavity, jsou pro adamantanový skelet v podstatě ideální.

Ekvimolární směsi příslušného ligandu a γ -cyklodextrinu studované pomocí ESI-MS v pozitivním skenovacím módu poskytovaly ve spektru prvního řádu signály, které byly určeny jako sodný adukt příslušného ligandu $[L1/L2+Na]^+$, sodný adukt dimeru ligandu $[2\cdot L1/L2+Na]^+$, sodný adukt γ -cyklodextrinu a rovněž pak signál o m/z 1734, pro něhož byla navržena struktura $[L1/L2@ \gamma\text{-CD}+Na]^+$ (**Obrázek 17**). Relativní intenzita tohoto signálu byla relativně nízká, což mohlo být důsledkem toho, že se jej nepodařilo vyizolovat a následně podrobit fragmentaci.



Obrázek 17. ESI-MS spektra prvního řádu ekvimolární směsi **L1**· γ -CD získaná v pozitivním a negativním skenovacím módu.

Stejně jako ve všech předchozích případech, také v tomto bylo přistoupeno k analýze nejen v pozitivním, ale také v negativním skenovacím módu. Za zmínku stojí zejména fakt, že zatímco v „pozitivu“ byl u obou ligandů pozorován vznik komplexu (byť v malé relativní intenzitě), pak v „negativu“ se signál, jehož hodnota m/z by odpovídala tvorbě

supramolekulárního komplexu, detekovat nepodařilo, a to ani u jednoho ze studovaných ligandů.

6.2.2 Komplexace sloučenin L3 a L4 s cyklodextriny

V této kapitole budou postupně komentovány výsledky ESI-MS analýz ligandů L3 a L4 s α -, β - a γ -cyklodextrinem.

Studium supramolekulárních komplexů s α -cyklodextrinem

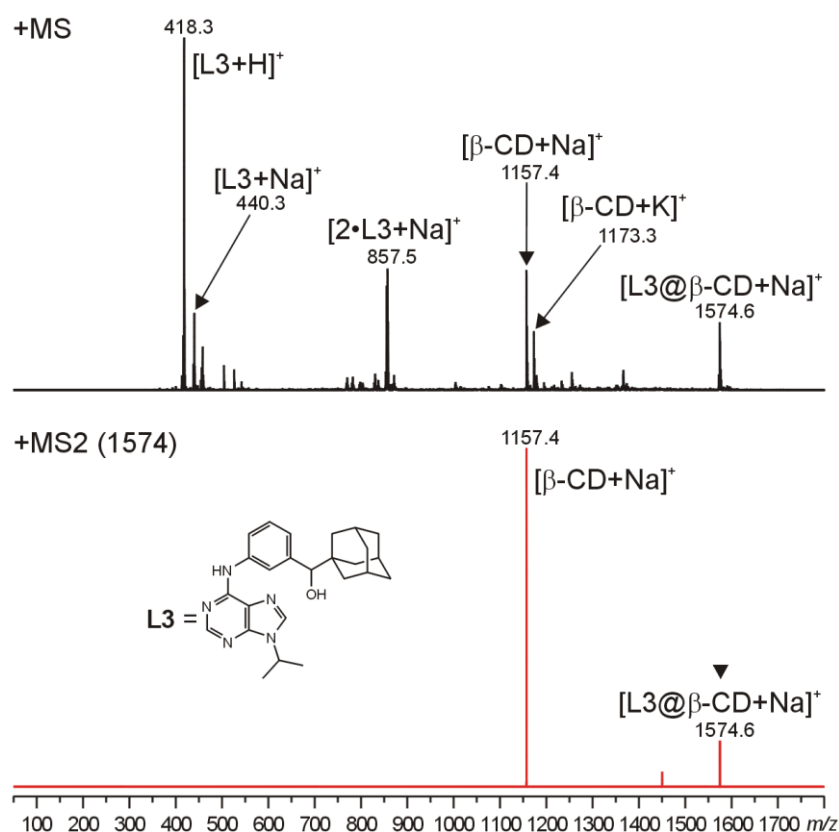
V experimentech, během nichž byly studovány ekvimolární směsi příslušných ligandů s α -cyklodextrinem byly ve spektrech prvního řádu získaných v pozitivním skenovacím módu pozorovány celek čtyři signály, z nichž tři pocházely z molekuly hosta a jeden z molekuly hostitele. Signály odpovídající příslušnému ligandu byly určeny jako protonovaná molekula (418 m/z), sodný adukt ligandu (440 m/z) a sodný adukt dimeru příslušného ligandu (857 m/z). V případě hostitelského makrocyklu, tedy α -CD, byl pozorován signál o m/z 995 odpovídající sodnému aduktu této molekuly. Stejně jako u sloučenin L1 a L2, ani v případě látek L3 a L4 nebyl ve spektru prvního řádu získaného v pozitivním skenovacím módu pozorován žádný signál, jehož hodnota m/z by odpovídala vznikajícímu supramolekulárnímu komplexu. Jak již bylo uvedeno v předcházející kapitole, může to být způsobeno malým rozměrem kavity α -CD nevhodným pro inkudaci adamantanového skeletu.

Ve spektrech prvního řádu získaných v negativním skenovacím módu se v obou případech vyskytovaly dva signály, jeden pocházející z molekuly hosta, druhý z makrocyklické sloučeniny, přičemž v obou případech se jednalo o deprotonovanou molekulu. Ani v negativním módu nebyly pozorovány signály, jejichž hodnota m/z by odpovídala vzniku příslušného supramolekulárního komplexu.

Studium supramolekulárních komplexů s β -cyklodextrinem

V případě komplexace sloučenin L3 a L4 s makrocyklem obsahujícím sedm glukosových jednotek, tedy β -CD, byly získané výsledky opět odlišné od α -CD. Vyjma signálů, pocházejících z molekuly hosta (protonovaná molekula, její sodný adukt či dimer sodného aduktu), případně hostitele (sodný a draselný adukt β -CD), byl ve spektrech prvního řádu získaných v pozitivním skenovacím módu obou analyzovaných směsí, pozorován také jedenkrát nabitý ion, s monoisotopickým píkem o m/z 1574,6 odpovídající

supramolekulárnímu komplexu, pro něhož byla navržena struktura $[L1/L2@\beta\text{-CD}+\text{Na}]^+$ (**Obrázek 18**). Navržená struktura komplexu byla následně potvrzena pomocí izolace a následné fragmentace iontu $[L1/L2@\beta\text{-CD}+\text{Na}]^+$ za podmínek kolizí indukované disociace, kdy docházelo ke vzniku jednoho produktového iontu o m/z 1157, který byl určen jako sodný adukt $\beta\text{-CD}$. Jinými slovy, v průběhu fragmentace supramolekulárního komplexu docházelo k neutrální ztrátě molekuly hosta, který nebyl, jakožto neutrální částice, ve spektru pozorován.



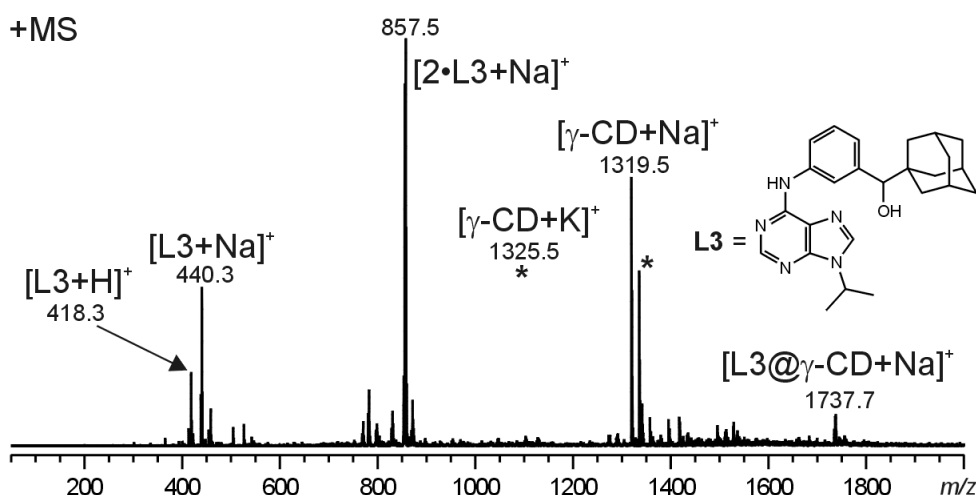
Obrázek 18. ESI-MS/MS spektra prvního řádu ekvimolární směsi $L3\cdot\beta\text{-CD}$ získaná v pozitivním skenovacím módu.

Ve spektrech prvního řádu získaných v negativním skenovacím módu byly opět pozorovány nejen signály pocházející z molekuly hosta, pro něž byla navržena struktura $[M-H]^-$ a $[2\cdot M-2\cdot H+\text{Na}]^-$, ale také z molekuly hostitele (deprotonovaná molekula $\beta\text{-CD}$). Navíc byl ve spektrech obou analyzovaných směsí pozorován signál o m/z 1550, který byl určen jako deprotonovaný komplex příslušného ligandu s $\beta\text{-CD}$ $[L1/L2@\beta\text{-CD}-H]^-$. Ani v jednom případě se nepodařilo tento iont vyizolovat a podrobit fragmentaci za podmínek kolizí indukované disociace.

Studium supramolekulárních komplexů s γ -cyklodextrinem

Posledním makrocylem, u něhož byla studována možnost komplexace s ligandy **L3** a **L4** byl, jak již bylo řečeno, γ -cyklodextrin, sestávající se z osmi glukosových jednotek.

Ekvimolární směsi příslušného ligandu a γ -cyklodextrinu studované pomocí ESI-MS v pozitivním skenovacím módu poskytovaly ve spektru prvního řádu signály, které byly určeny jako protonovaná molekula $[L3/L4+H]^+$, sodný adukt příslušného ligandu $[L3/L4+Na]^+$, sodný adukt dimeru ligandu $[2 \cdot L3/L4+Na]^+$, sodný a draselný adukt γ -cyklodextrinu $[\gamma\text{-CD}+Na/K]^+$ a rovněž pak signál o m/z 1737, pro něhož byla navržena struktura $[L3/L4@ \gamma\text{-CD}+Na]^+$ (**Obrázek 19**). Pokusy o izolaci a následnou fragmentaci tohoto iontu, nebyly ani v jednom případě úspěšné.



Obrázek 19. ESI-MS spektrum prvního řádu ekvimolární směsi **L3**· γ -CD získané v pozitivním skenovacím módu.

Stejně jako ve všech předchozích případech, také v tomto bylo přistoupeno k analýze nejen v pozitivním, ale také v negativním skenovacím módu. Stejně jako tomu bylo v případě ligandů **L1** a **L2**, tak ani u ligandů **L3** a **L4** nebyl ve spektru pozorován signál odpovídající supramolekulárnímu komplexu.

6.3 Sumarizace získaných výsledků

V této podkapitole jsou shrnuty veškeré získané výsledky, kdy pro větší přehlednost a srozumitelnost jsou uvedeny v souhrnné tabulce níže (**Tabulka 2**). Z této tabulky lze lehce vypožorovat, zda jednotlivé sloučeniny (**L1–L4**) tvořily komplex s příslušným makrocylem (α -, β -, γ -CD) či nikoliv, a to jak v případě pozitivní, tak také negativní ionizace. Je patrné, že žádný ze studovaných ligandů nevykazoval schopnost vytvářet supramolekulární komplex s α -CD v plynné fázi, a to jak v negativním, tak pozitivním skenovacím módu. Naopak u β -CD byla prokázána tvorba inkluzních komplexů u všech vybraných sloučenin v obou skenovacích módech, a tím se ukázal být jako nejvhodnější, pravděpodobně díky optimální velikosti své kavity. U posledního použitého makrocylu, tedy γ -CD, byly u všech ligandů detekovány v pozitivním skenovacím módu signály, které odpovídaly svou hodnotou m/z příslušnému komplexu, avšak v negativním skenovacím módu tyto signály pozorovány nebyly.

Tabulka 2. Sumarizace ESI-MS analýz inkluzních komplexů

Ligand		Makrocylus					
		α -CD		β -CD		γ -CD	
Sloučenina	Substituce	+MS	-MS	+MS	-MS	+MS	-MS
L1	<i>para</i> -keton	✗	✗	✓	✓	✓	✗
L2	<i>meta</i> -keton	✗	✗	✓	✓	✓	✗
L3	<i>para</i> -alkohol	✗	✗	✓	✓	✓	✗
L4	<i>meta</i> -alkohol	✗	✗	✓	✓	✓	✗

ZÁVĚR

Jak je patrné již z názvu této bakalářské práce, hlavním cílem bylo studium tvorby inkluzních komplexů mezi vybranými purinovými sloučeninami a mezi cyklodextriny první generace (α -, β - a γ -CD). O purinových sloučeninách a zejména jejich využití v chemii léčiv, pojednává část teoretické rešerše, kde jsou následně charakterizovány i cyklodextriny. V poslední části rešerše je pojednáno o tvorbě supramolekulárních komplexů mezi vybranými ligandy a různými typy hostitelských molekul. V rámci experimentální části této práce byly analýzám podrobeny purinové sloučeniny, které obsahovaly mezi adamantanovým skeletem a aromatickým kruhem stejný „linker“, tedy buďto karbonylovou skupinu u ligandů **L1** a **L2**, nebo hydroxylovou skupinu u ligandů **L3** a **L4**. Molekulu hostitelského makrocyklu představovaly α -, β - a γ -cyklodextriny, které byly získané z komerčních zdrojů.

Před samotným studiem tvorby inkluzních komplexů, byly podrobeny ESI-MS analýze purinové ligandy, čímž byla potvrzena jejich struktura. Následovala série experimentů, kdy schopnost tvořit inkluzní komplexy mezi vybranými sloučeninami byla studována v plynné fázi pomocí hmotnostního spektrometru s elektrosprejovou ionizací a iontovou pastí.

Jak již bylo zmíněno v předchozí kapitole, měření bylo prováděno jak v pozitivním tak v negativním skenovacím módu, avšak ne u všech použitých makrocyklů byly pozorovány signály, které by odpovídaly daným komplexům. Nejméně vhodnou hostitelskou molekulu představoval α -cyklodextrin, jelikož netvořil komplex s žádným z vybraných ligandů, a to jak v pozitivním, tak v negativním skenovacím módu, a to pravděpodobně v důsledku nedostatečné velikosti jeho kavity. Naopak u β -cyklodextrinu se ukázala největší vhodnost pro komplexaci s danými ligandy. V ESI-MS spektrech byly detekovány signály, jejichž hodnota m/z odpovídala komplexům typu $[L@\beta\text{-CD}+\text{Na}]^+$, a to v obou skenovacích módech u všech použitých ligandů. V případě *meta* substituovaného alkoholu, tedy ligandu uváděném v práci pod označením **L3** byla navíc tvorba vzniku supramolekulárního komplexu v plynné fázi potvrzena pomocí tandemové hmotnostní spektrometrie (ESI-MS/MS). U posledního makrocyklu, tedy γ -cyklodextrinu, se podařilo detekovat signály odpovídající danému komplexu v „pozitivu“, avšak o poměrně nízké relativní intenzitě, což může být důsledkem nezdařené izolace a následné fragmentace. V „negativu“ při této analýze nebyla detekována tvorba inkluzního komplexu.

Ze získaných výsledků se jako nejvhodnější jeví pro tvorbu inkluzních komplexů právě β -cyklodextrin, což může být připisováno takřka ideálním rozměrům jeho kavity, do níž adamantanový skelet téměř ideálně „zapadá“.

Nutno podotknout, že předmětná práce se zaměřovala pouze na studium vzniku komplexů v plynné fázi a pro získání ucelených informací bude nutné provedené experimenty doplnit dalšími, tentokrát ve fázi kapalně. Jedná se zejména o analýzy, které budou provedeny pomocí nukleární magnetické rezonance a izotermální titrační mikrokalorimetrie, přičemž získané výsledky by mohly přinést řadu dalších cenných informací nejen o geometrii, ale také o pevnosti vznikajících komplexů.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] McMurry, J. *Organická chemie*. 1. vydání. Brno: VUT, **2015**. ISBN 978-80-214-4769-1.
- [2] Liška, F. *Konstituce, konformace, konfigurace v názvech organických sloučenin*. 1. vydání. Praha: VŠCHT, **2008**. ISBN 978-80-7080-640-1.
- [3] Rosemeyer, H. *Chemistry & Biodiversity*, **2004**, 1, 361.
- [4] Brown, E. G. *Ring nitrogen and key biomolecules: the biochemistry of N-heterocycles*. Boston: Springer, **1998**. 242 s. ISBN 04-128-3570-3.
- [5] All Nobel Prizes in Chemistry. [online]. [cit 2018-03-28]. Dostupné z: <https://www.nobelprize.org/>
- [6] Velíšek, J. *Chemie potravin 2*. 2. vydání. Tábor, **2002**. ISBN 80-86659-01-1
- [7] Boeck L. D., Clem, G. M., Wilson, M. M., Westhead, J. E. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **1973**, 3, 49.
- [8] Seela F., Hasselmann D. *Chemische Berichte*, **1979**, 112, 3072.
- [9] Hampl, F., Rádl, S., Paleček, J. *Farmakochemie*. 2. vydání. Praha: VŠCHT Praha, **2007**. ISBN 978-80-7080-639-5
- [10] Holý, A. *Principy bioorganické chemie ve vývoji antivirotik a cytostatik*. 1. vydání. Olomouc: UP v Olomouci, **2004**. ISBN 80-244-0855-4
- [11] Rouchal, M. *Cílená modifikace biologicky aktivních látek*. Zlín, **2011**. Disertační práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Technologická fakulta, Obor chemie a technologie potravin. Školitel prof. Antonín Klásek.
- [12] Legraverend, M., Grierson S., D. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **2006**, 14, 3987-4006.
- [13] Kraus, T. Postgraduální kurs Supramolekulární chemie I., Kapitola 8, UOCHB AVČR Praha, **2004**.
- [14] Loftsson, T., Jarho, P., Másson, M., Järvinen, T. *Expert Opinion on Drug Delivery*, **2005**, 2, 335 – 351.
- [15] Del Valle, M., E. M. *Process Biochemistry*, **2004**, 39, 1033–1046.

- [16] Loftsson, T., Duchêne, D. *International Journal of Pharmaceutics*, **2007**, 329, 1–11.
- [17] Das, S. K., Rajabalaya, R., David, S., Gani, N., Khanam, J., Nanda, A. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, **2013**, 4, 1694–1720.
- [18] Rak, J., Tkadlecová, M., Cígler, P., Král, V. *Chemické Listy*, **2008**, 102, 209–212.
- [19] Loftsson, T., Kurkov, S. V. *International Journal of Pharmaceutics*, **2013**, 453, 167–180.
- [20] Sicard, J., Sainez, M.-H. Biosynthesis of cycloglycosyltransferase and obtention of enzymatic reaction products. *Cyclodextrins and Their Industrial Uses*, Editions de Santé, Paris, **1987**, 77–103.
- [21] Loftsson, T., Masson, M. *International Journal of Pharmaceutics*, **2001**, 255, 15–30.
- [22] Horský J., Jindřich J. *Chemické listy*, **2013**, 107, 769–776.
- [23] Dodziuk, H. *Cyclodextrins and Their Complexes*. 1st. ed.; WILEY–VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim, **2006**, ISBN 3-527-31280-3.
- [24] Astray, G., Gonzalez-Bareiro, C., Mejuto, C. J., Rial-Otero, R., Simal-Gándara, J. *Food Hydrocolloids*, **2009**, 23, 1631–1640.
- [25] DelValle, M., Cyclodextrins and their uses: A Review. *Process Biochemistry*, **2003**.
- [26] Manakker, F., Vermonden, T., Nonstrum, C. F., Hennink, W. E. *American Chemical Society*, **2009**, 10, 3158–3175.
- [27] Valente, A. J. M., Söderman, O. *Advances in Colloid and Interface Science*, **2014**, 205, 156–176.
- [28] Huang, J.; Ren, J.; Chen, Y. *Polymer International*, **2008**, 57, 714–721.
- [29] Szente, L., Szejtli, J. *Trends in Food Science & Technology*, **2004**, 15, 137–142.
- [30] Zákony pro lidi. Vyhláška č. 4/2008 Sb., kterou se stanoví druhy a podmínky použité přídatných látek a extrakčních rozpouštědel při výrobě potravin, Příloha 2 a 8. [Online]. [cit. 2018-03-29]. Dostupné z: <https://www.zakonyprolidi.cz/cs/2008-4>
- [31] Szejtli, J. *Chemical Reviews*, **1998**, 98, 1743–1753.

- [32] Hedges, R. *Chemical Reviews*, **1998**, 98, 2035-2044.
- [33] Sojo, M., Nunez-Delicado, E., Garcia-Carmona, F., Sanchez-Ferrer, A. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **1999**, 47, 518-523.
- [34] Štulík, K. *Analytické separační metody*. Karolinum: Praha, **2004**, ISBN 80-246-0852-9
- [35] Kalous, V. *Základy fyzikálně chemických metod*. 2. vydání. SNTL: Praha, **1975**, s. 480
- [36] Hanuš, V., Herman, Z., Lemr, K. *Vesmír*, **2003**, 82, 312
- [37] Vacek, J. *Klinická biochemie a metabolismus*, **2006**, 4, 194
- [38] Milata, V., Segřa, P. *Spektrálnemetódy v chémii*. STU: Bratislava, **2004**, s. 327, ISBN 80-227-2049-6
- [39] Beyermann, K. *Organická stopová analýza*. SNTL: Praha, **1987**, s. 309
- [40] Abian, J. *Journal of Mass Spectrometry*, **1999**, 34, 157
- [41] Bramer, S. E. V. *Anintroduction to mass spectrometry*. Chester: Widener University, **1997**
- [42] Holčapek, M.; Jandera, P.: *Chemické listy*, **1998**, 92, 278
- [43] Holčapek, M., Jirásko, R., Lísa, M. *Journal of Chromatography A*, **2010**, 1217, 3908
- [44] Volný, M. *Chemické listy*, **2011**, 105, 230
- [45] Weston, J. D. *Analyst (Cambridge, U.K.)*. **2010**, 135, 662 – 668
- [46] Hao, Ch., Zhao, X., Yang, P. *Trends in Analytical Chemistry*, **2007**, 6, 569 – 580
- [47] Peng, Y., Austin E. D. *Trends in Analytical Chemistry*, **2011**, 30, 1560
- [48] Steed, J. W., Atwood, J. L. *Supramolecular Chemistry*, 2nd ed.; Wiley: Chichester, UK, **2009**.
- [49] MingguanGuo, Fengrui Song, ZhiqiangLiu, ShuyingLiu. *Journal of Mass Spectrometry*, **2004**, 39, 594-599
- [50] Vícha, R., Rouchal M., Kozubková, Z., Kuřitka, I., Marek, R., Branná, P., Čmelík, R. *Supramolecular Chemistry*, **2011**, 23:10, 663-677

- [51] Rouchal, M., Matelová, A., Pires de Carvalho, F., Bernat, R., Grbić, D., Kuřitka, I., Babinský, M., Marek, R., Čmelík, R., Vícha, R. *Supramolecular Chemistry*, **2013**, 25:6, 349-361
- [52] Barrow, S. J., Kasera, S., Rowland, M. J., delBarrio, J., Scherman, O. A. *Chemical Reviews*, **2015**, 115, 12320–12406.
- [53] Yang, F., Dearden, V. D. *Supramolecular Chemistry*, **2011**, 23, 53-58
- [54] Heo, S. W., Choi, T. S., Park, K. M., Ko, Y. H., Kim, S. B., Kim, K., Kim, H. I. *Analytical Chemistry*, **2011**, 83, 7916–7923.
- [55] Lee, J. W., Shin, M. H., Mobley, W., Urbach, A. R., Kim, H. I. *American Chemical Society*, **2015**, 137, 15322–15329.
- [56] Galego, L. R., Rodrigues, M. A. A., Mendes, D. C., Jockusch, S., Da Silva, J. P. *Rapid Communications in Mass Spectrom.* **2016**, 30, 1963–1968.
- [57] Li, S., Chen, H., Yang, X., Bardelang, D., Wyman, I. W., Wan, J., Lee, S. M. Y., Lee, R. *ACS Medicinal Chemistry Letters*, **2015**, 6, 1174–1178.
- [58] Gergela, D. *Příprava 6,9-disubstituovaných purinů s adamantanovým skeletem*. Zlín, **2013**. Diplomová práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická, Ústav chemie.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

α -CD	α -cyklodextrin
AIDS	syndrom získaného selhání imunity
β -CD	β -cyklodextrin
CB	kukurbit[n]uril
CB6	kukurbit[6]uril
CD	cyklodextrin
CDK	cyklin-dependentní kináza
CI	chemická ionizace
CID	kolizí indukovaná disociace
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EI	elektronová ionizace
ESI	elektrosprejová ionizace
GC	plynová chromatografie
γ -CD	γ -cyklodextrin
HIV	virus lidské imunitní nedostatečnosti
IT	iontová past
LC	kapalinová chromatografie
Lys	lysin
MALDI	ionizace laserem za účasti matrice
MPP	<i>N</i> -methyl-4-fenylpyridinium-jodid
MPTP	<i>N</i> -methyl-4-fenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin
MS	hmotnostní spektrometrie
<i>m/z</i>	hmotnost/náboj

NMR nukleární magnetická rezonance

RNA ribonukleová kyselina

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1. Strukturní vzorce pyrimidinu (vlevo), imidazolu (uprostřed) a 9 <i>H</i> -purinu spolu s číslováním purinového kruhu (vpravo).....	13
Obrázek 2. Schéma syntézy purinu z kyseliny močové.	14
Obrázek 3. Strukturní vzorec xanthinu (vlevo) a jeho vybraných derivátů (vpravo).....	15
Obrázek 4. Strukturní vzorce adeninu a guaninu.	16
Obrázek 5. Strukturní vzorce vybraných antivirotik s purinovým skeletem.	17
Obrázek 6. Strukturní vzorce vybraných inhibitorů CDK na bázi purinu.....	17
Obrázek 7. Strukturní vzorce α -, β - a γ -cyklodextrinu.	19
Obrázek 8. Tandemové hmotnostní spektrum komplexu rutin· β -CD získané v negativním skenovacím módu.	29
Obrázek 9. Hmotnostní spektrum aminu s β -CD.	30
Obrázek 10. Hmotnostní spektra (MS a MS/MS)komplexu typu benzylamid· β -CD.	31
Obrázek 11. Obecný vzorec kukuribit[<i>n</i>]urilů (vlevo) a znázornění struktury CB7 (uprostřed a vpravo).	32
Obrázek 12. Strukturní vzorce neurotoxinů MPTP a MPP.	33
Obrázek 13. Strukturní vzorce ligandů použitých v této práci.....	40
Obrázek 14. ESI-MS spektra prvního řádu sloučenin L2 a L4 získaná v pozitivním skenovacím módu.....	42
Obrázek 15. ESI-MS spektra prvního řádu ekvimolární směsi L1 · α -CD získaná v pozitivním a negativním skenovacím módu.	44
Obrázek 16. ESI-MS spektra prvního řádu ekvimolární směsi L1/L2 · β -CD získaná v pozitivním a negativním skenovacím módu.	46

- Obrázek 17.** ESI-MS spektra prvního řádu ekvimolární směsi **L1**· γ -CD získaná v pozitivním a negativním skenovacím módu. 47
- Obrázek 18.** ESI-MS/MS spektra prvního řádu ekvimolární směsi **L3**· β -CD získaná v pozitivním skenovacím módu. 49
- Obrázek 19.** ESI-MS spektrum prvního řádu ekvimolární směsi **L3**· γ -CD získané v pozitivním skenovacím módu. 50

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1. Výsledky ESI-MS analýz samotných ligandů L1–L4	42
Tabulka 2. Sumarizace ESI-MS analýz inkluzních komplexů	51