

Příprava a supramolekulární vlastnosti 1,8,13,20-tetraazaikosanu

Bc. Michaela Matejková

Diplomová práce
2024



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav chemie

Akademický rok: 2023/2024

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: Bc. Michaela Matejková
Osobní číslo: T22404
Studijní program: N0721A210005 Chemie potravin a bioaktivních látek
Forma studia: Prezenční
Téma práce: Příprava a supramolekulární vlastnosti 1,8,13,20-tetraazaikosanu.

Zásady pro vypracování

- 1) Zpracovat rešerši na téma stability komplexů derivátů alifatických, případně aromatických uhlovodíků a cucurbit[6]urilu.
- 2) Navrhnout a prakticky ověřit přípravu titulního ligandu.
- 3) Prostudovat základní supramolekulární vlastnosti v systémech s cucurbiturily a cyklodextriny.

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

Seznam doporučené literatury:

- a) S. Barrow et al. Chemical Reviews 2015, 115, 12320-12406. DOI: 10.1021/acs.chemrev.5b00341
- b) K. Assaf, W. Nau Chemical Society Reviews 2015, 44, 394-418. DOI: 10.1039/C4CS00273C

Vedoucí diplomové práce: **doc. Mgr. Robert Vícha, Ph.D.**
Ústav chemie

Datum zadání diplomové práce: **2. ledna 2024**

Termín odevzdání diplomové práce: **10. května 2024**

L.S.

prof. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan

doc. Ing. Michal Rouchal, Ph.D.
ředitel ústavu

Ve Zlíně dne 20. února 2024

PROHLÁŠENÍ AUTORKY DIPLOMOVÉ PRÁCE

Beru na vědomí, že:

- diplomová práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému a dostupná k nahlédnutí;
- na moji diplomovou 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. 3;
- podle § 60 odst. 1 autorského zákona má Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- podle § 60 odst. 2 a 3 autorského zákona mohu užít své dílo – diplomovou 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);
- pokud bylo k vypracování diplomové práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tj. k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové práce využít ke komerčním účelům;
- pokud je výstupem diplomové 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.

Prohlašuji,

- že jsem na diplomové práci pracovala samostatně a použitou literaturu jsem citovala. V případě publikace výsledků budu uvedena jako spoluautorka.
- že odevzdaná verze diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou obsahově totožné.

Ve Zlíně dne:

Jméno a příjmení studentky:

.....
podpis studentky

ABSTRAKT

Cílem této práce bylo připravit dosud nepopsaný ligand 1,8,13,20-tetraazaikosan, jehož struktura vykazuje jistou analogií se sperminem, který s cucurbit[6]urilem tvoří vysoce afinitní komplexy s hodnotou K_a až 10^{10} M^{-1} . Celkem byly vyzkoušeny dva syntetické postupy. V prvním vystupoval jako klíčový intermediát diamid kyseliny jantarové, který se nám ovšem nepodařilo zredukovat na požadovaný amin. Během druhé syntetické strategie, zahrnující jako klíčový krok reakci 1,4-dibrombutanu s monochráněným hexamethyldiaminem, se objevily další překážky, které představovaly problémy se separací produktu od výchozí látky. Po nalezení účinné separační metody byl izolován a charakterizován čistý produkt, jehož struktura ovšem neodpovídala titulnímu ligandu. Pro objasnění strukturní povahy připravené sloučeniny, byly provedeny supramolekulární experimenty pomocí NMR, ITC a ESI-MS. V budoucnu bude nezbytné modifikovat podmínky S_N reakce, a to například úpravou poměru reakčních komponent, zvýšením teploty či prodloužením reakční doby.

Klíčová slova: polyaminy, supramolekulární chemie, systém hostitel–host, tetraazaikosan a cucurbit[*n*]urily

ABSTRACT

This work aimed to prepare a previously undescribed ligand, 1,8,13,20-tetrazaeicosane, whose structure shows some analogy to spermine, which forms high-affinity complexes with K_a cucurbit[6]uril with values up to 10^{10} M^{-1} . Two alternative synthetic procedures leading to the title ligand were tested. A diamide of succinic acid was a key intermediate in the first approach. Unfortunately, we were not able to reduce it to the desired diamine. During the second synthetic strategy, additional obstacles were encountered that presented problems in the efficient separation of the product from the starting material. After finding an efficient separation method, a pure product was isolated whose structure didn't match that of the title ligand. To elucidate nature of the prepared compound, supramolecular experiments were performed using NMR, ITC and ESI-MS. In the future, it will be necessary to modify the conditions of the S_N reaction, for example, by adjusting the ratio of the reaction components, increasing the temperature or increasing the reaction time.

Keywords: polyamines, supramolecular chemistry, system host–guest, tetrazaeicosane and cucurbit[*n*]urils

V první řadě bych chtěla poděkovat vedoucímu mé diplomové práce doc. Mgr. Robertu Víchovi, Ph.D. především za trpělivost a odborné rady, které mi během této práce věnoval. Dále bych chtěla velice poděkovat doc. Ing. Michalu Rouchalovi, Ph.D. za provedení ESI-MS analýz a Ing. Zdeňce Pruckové, Ph.D. za pomoc při ITC experimentech. Také bych chtěla bezmezně poděkovat celému Ústavu chemie za vytvoření skvělého pracovního prostředí a ochotu vždy pomoci. Děkuji mým spolužačkám za jejich věčně pozitivní přístup. A v neposlední řadě děkuji mému skvělému příteli a své rodině za jejich neutuchající podporu a porozumění.

OBSAH

ÚVOD	10
I TEORETICKÁ ČÁST	11
1 PŘÍRODNÍ POLYAMINY	12
1.1 PUTRESCIN	15
1.2 SPERMIDIN	15
1.3 SPERMIN.....	16
1.4 POLYAMINY V POTRAVINÁCH.....	16
2 SYNTETICKÉ POLYAMINY	19
2.1 DIETHYLENTRIAMIN	19
2.2 POLYETHYLENIMIN	21
2.3 MEPAKRIN.....	22
3 SUPRAMOLEKULÁRNÍ CHEMIE	24
3.1 HOSTITELSKÉ MOLEKULY.....	26
3.1.1 Cucurbit[<i>n</i>]urily.....	26
3.1.2 Další příklady makrocyclů.....	30
3.2 SUPRAMOLEKULÁRNÍ KOMPLEXY S CUCURBIT[6]URILEM	32
II EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	36
4 POUŽITÉ PŘÍSTROJE	37
5 SYNTÉZA JEDNOTLIVÝCH LÁTEK	38
5.1 <i>N</i> -BOC-1,6-DIAMINOHEXAN (1).....	38
5.2 STRATEGIE A.....	38
5.2.1 Dichlorid kyseliny jantarové (2)	38
5.2.2 <i>N,N'</i> -[bis(<i>N''</i> -Boc-6-aminohexan-1-yl)]butandiamid (3)	39
5.2.3 <i>N,N'</i> -[bis(6-aminohexan-1-yl)]butandiamid (4).....	40
5.2.4 <i>N,N'</i> -[bis(6-aminohexan-1-yl)]butan-1,4-diamin (5).....	40
5.2.5 <i>N,N'</i> -[bis(<i>N''</i> -Boc-6-aminohexan-1-yl)]butan-1,4-diamin (7)	41
5.3 STRATEGIE B.....	42
5.3.1 <i>N,N'</i> -[bis(<i>N''</i> -Boc-6-aminohexan-1-yl)]butan-1,4-diamin (7)	42
5.3.2 <i>N,N'</i> -[bis(6-aminohexan-1-yl)]butan-1,4-diamin (5).....	42
5.3.3 <i>N,N'</i> -[bis(6-aminohexan-1-yl)]butan-1,4-diamin tetrahydrochlorid (6)	43
III VÝSLEDKY A DISKUZE	44
6 DISKUZE	45
6.1 OCHRÁNĚNÍ 1,6-DIAMINOHEXANU	47
6.2 STRATEGIE A.....	48
6.2.1 Chlorace kyseliny jantarové	48
6.2.2 Kondenzace <i>N</i> -Boc-1,6-diaminohexanu (1).....	49

6.2.3	Odchránění N,N' -[bis(N'' -Boc-6-aminohexan-1-yl)]butandiamidu (3)	50
6.2.4	Redukce N,N' -[bis(6-aminohexan-1-yl)]butan-1,4-diaminu (4).....	51
6.2.5	Redukce N,N' -[bis(N'' -Boc-6-aminohexan-1-yl)]butandiamidu.....	52
6.3	STRATEGIE B.....	53
6.3.1	Nukleofilní substituce N -Boc-hexan-1,6-diaminu	53
6.3.2	Odchránění N,N' -[bis(N'' -Boc-6-aminohexan-1-yl)]butan-1,4-diaminu.....	56
6.3.3	Převod ligandu na hydrochlorid	60
7	DISKUZE K SUPRAMOLEKULÁRNÍM EXPERIMENTŮM.....	65
7.1	^1H NMR TITRACE.....	65
7.2	ISOTERMÁLNÍ TITRAČNÍ MIKROKALORIMETRIE	69
7.3	ELEKTROSPREJOVÁ IONIZACE S HMOTNOSTNÍM DETEKTOREM	72
	ZÁVĚR	74
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	76
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	82
	SEZNAM OBRÁZKŮ	83
	SEZNAM TABULEK.....	85
	SEZNAM PŘÍLOH.....	86
	PŘÍLOHY	87

ÚVOD

Předložená diplomová práce představuje syntézu doposud nepopsaného ligandu, a sice 1,8,13,20-tetraazaikosanu, který lze pojmenovat také jako *N,N'*-[bis(6-aminohexan-1-yl)]butan-1,4-diamin. Tetraazaikosan patří do skupiny polyaminů, jejichž chemická struktura obsahuje dvě či více aminoskupin. Polyaminy jsou při fyziologickém pH protonované, což jim umožňuje interagovat s opačně nabitými molekulami (DNA) při různých biochemických procesech.

Mezi nejdůležitější zástupce polyaminů, které jsou součástí biosyntézy v prokaryotických či eukaryotických buňkách, patří putrescin, spermidin a spermin. První polyamin byl objeven už v roce 1678, když krystaly jeho fosfátové soli shlédl svým vlastnoručně sestaveným primitivním mikroskopem nizozemský přírodovědec Antonie van Leeuwenhoek. První polyamin byl tedy objeven přibližně o 200 let dříve než nukleové kyseliny.

Samotná biosyntéza polyaminů a jejich regulace, je velice složitá a doposud zůstává jen částečně prozkoumaná. Je ovšem všeobecně známo, že zvýšená hladina polyaminů v organismu může naznačovat přítomnost nádorového onemocnění. Z tohoto důvodu jsou polyaminy předmětem výzkumu jako potenciální terapeutické cíle a diagnostické biomarkery. Nicméně pozornost si zaslouží také syntetické polyaminy, které jsou připravovány za různými účely. Tyto syntetické aminy mohou sloužit jako univerzální templáty, které jsou schopné interagovat s různými proteinovými receptory nebo enzymy.

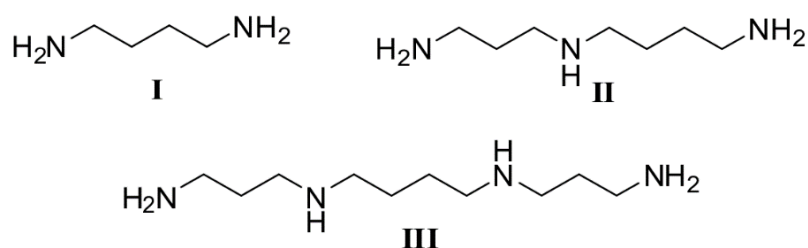
O polyaminech je známo, že tvoří stabilní systémy hostitel–host s cucurbit[6]urilem. Proto je tato práce zaměřená na studium supramolekulárních vlastností navrženého ligandu právě s tímto makrocyklem, kde je předpokládána stechiometrie 2:1, jelikož tetraazaikosan disponuje dvěma vazebnými místy. Ze strukturálního hlediska je titulní ligand podobný sperminu, jenž s cucurbit[6]urilem vytváří stabilní supramolekulární komplexy s afinitou až 10^{10} M^{-1} .

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 PŘÍRODNÍ POLYAMINY

Pod označením polyaminy (PA) si lze představit sloučeniny, které ve své struktuře obsahují dvě nebo více aminoskupin.¹ PA lze rozdělit do dvou skupin, a to na látky přirozeně se vyskytující a synteticky připravené, které budou blíže popsány v kapitole 2.

Mezi nejvýznamnější přirozeně se vyskytující PA patří putrescin (**I**), spermidin (**II**) a spermin (**III**), jejichž strukturní vzorce jsou znázorněny na **Obrázku 1**.



Obrázek 1 Chemická struktura putrescinu (**I**), spermidinu (**II**) a sperminu (**III**).

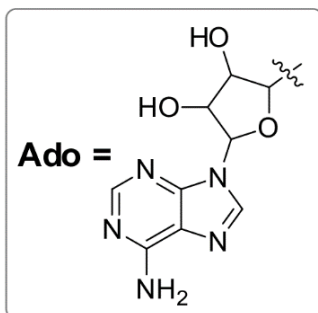
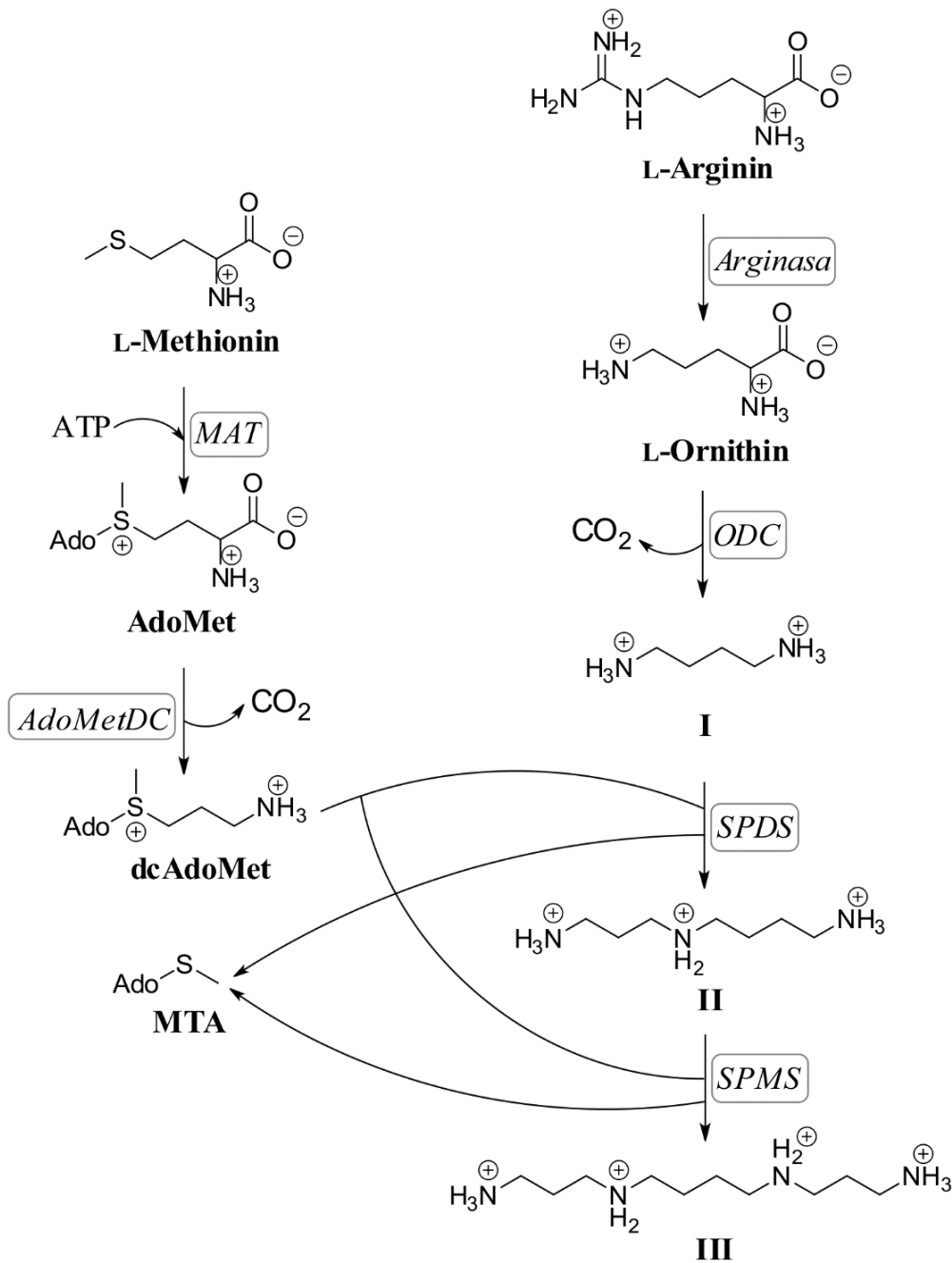
PA jsou alifatické aminy, které se při fyziologickém pH vyskytují v protonované formě. Alifatické aminy disponují vysokými hodnotami pK_a jejichž hodnota je okolo 10, což je činí silnými bázemi oproti aromatickým aminům ($pK_a \approx 4$). Za zásaditý charakter zodpovídá atom dusíku z aminoskupiny, který vykazuje, díky volnému elektronovému páru zásaditý charakter, a tím pádem velmi ochotně přijímá proton z okolí. Jakmile atom dusíku proton přijme, stane se kladně nabitým a následně se může vázat na negativně nabitě molekuly, jako kupříkladu na DNA nebo RNA.² Uhlovodíkové zbytky alifatických aminů mají záporný indukční efekt, který zodpovídá za vysokou elektronovou hustotu na atomu dusíku aminoskupiny, což z těchto látek činí velmi silné báze ve srovnání s aromatickými aminy, kde je volný elektronový pár na N-atomu zapojen do konjugace mezomerním efektem. PA jsou považovány za zprostředkovatele klíčových buněčných funkcí, jako je proliferace, migrace a diferenciací.³ Koncentrace PA je v organismu vysoce regulovaná, kdy jejich zvýšená koncentrace může značit přítomnost nádorového onemocnění. PA jsou dále schopné vyvolat apoptózu,⁴ což je geneticky naprogramovaná forma buněčné smrti, kterou buňka spustí v případě, že je poškozena molekula obzvláště důležitá pro život buňky. Takovou typickou nezbytnou molekulou pro život organismu je DNA. V tomto případě poškození DNA spustí kaspasovou kaskádu.⁵ Kaspasy jsou proteolytické enzymy, které aktivují buněčnou smrt uvnitř buňky. Apoptóza je důležitou součástí embryonálního vývoje i homeostáze a její mechanismus se využívá pro léčbu nádorů.⁶

PA jsou známy pro svůj antioxidační a protizánětlivý účinek, a mohou tak sloužit k prevenci různých chronických onemocnění, jako jsou kardiovaskulární onemocnění.⁷

PA lze nalézt ve všech živých buňkách v milimolárních koncentracích⁸ a mohou vznikat biosyntézou z proteinogenních aminokyselin L-Argininu nebo L-Methioninu (**Obrázek 2**).⁹ Kromě biosyntézy mohou být PA u savců přijímány z potravy nebo mohou vznikat mikrobiální syntézou ve střevě.

V případě biosyntézy PA z L-Argininu se do reakce jako první zapojuje enzym arginasa, který způsobí hydrolyzu na L-Ornithin. Enzym arginasa se v savčích buňkách vyskytuje ve dvou formách, které jsou kódovány jinými geny a liší se molekulárními vlastnostmi.¹⁰ První formou je arginasa I, zde se jedná o cytosolový enzym, jenž je exprimován v játrech. Další formou je arginasa II, což je mitochondriální enzym. Obě zmíněné formy by měly být schopny poskytovat L-Ornithin, avšak PA přednostně poskytuje arginasa I, kdežto arginasa II produkuje spíše prolin a glutamát.¹¹ Diamin putrescin (**I**) je biosyntetizován z L-Ornithinu pomocí enzymu ornithindekarboxylasy (*ODC*), který limituje rychlost biologické syntézy.¹² K přeměně putrescinu na vyšší PA je potřebný L-Methionin, který ve své struktuře obsahuje důležitý aminopropylový řetězec. L-Methionin je dále pomocí methionin adenosyltransferasy (*MAT*) přeměněn na *S*-adenosyl-L-Methionin, který je poté dekarboxylován adenosylmethionin dekarboxylasou (*AdoMetDC*) za vzniku *S*-adenosyl-(5')-3-methylthiopropylaminu.¹³

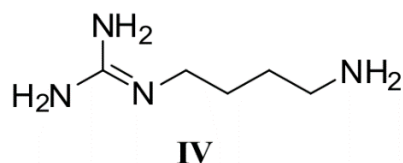
Spermidin (**II**) je syntetizován z putrescinu spermidinsyntasou (*SPDS*) přenosem aminopropylové části z dekarboxylovaného *S*-adenosyl-L-Methioninu na aminoskupinu putrescinu. Spermin (**III**) se tvoří přidáním aminopropylové části na aminobutylový řetězec spermidinu sperminsyntasou (*SPMS*).¹⁴



MAT... methionin adenosyltransferasa
AdoMetDC... adenosylmethionin dekarboxylasa
ODC... ornithindekarboxylasa
SPDS... spermidinsyntasa
SPMS... sperminsyntasa
 ATP... adenosintrifosfát
AdoMet... S-adenosyl-L-Methionin
dcAdoMet... S-adenosyl-(5')-3-methylthiopropylamin
MTA... 5'-methylthioadenosin

Obrázek 2 Biosyntéza polyaminů u savců.¹⁵

U rostlin a některých bakterií vzniká kromě putrescinu, spermidinu a sperminu (**Obrázek 1**), také agmatin (**Obrázek 3**), což je dekarboxylovaný L-Arginin.¹⁶



Obrázek 3 Chemická struktura agmatinu (IV).

1.1 Putrescin

Putrescin (PUT) je alifatický diamin (**I, Obrázek 1**), jehož systematický název je butan-1,4-diamin. Alifatický diamin byl poprvé izolován ze shnilého hovězího masa v roce 1885 německým chemikem Ludwigem Briegerem.¹⁷ PUT patří mezi nejběžnější biogenní aminy vyskytující se v potravinách. Vyšší množství biogenních aminů lze nalézt ve fermentovaných potravinách, kde vznikají působením mikroorganismů, jako je například kysané zelí nebo sýry. Vyšší příjem biogenních aminů může způsobovat bolest hlavy či zvýšení tepové frekvence. PUT lze nalézt i pod označením mrtvolný jed, jelikož vzniká při hnití masa a způsobuje jeho silný zápach.

1.2 Spermidin

Spermidin (SPD) je alifatický PA (**II, Obrázek 1**), který lze systematicky pojmenovat jako 1,5,10-triazadekan nebo také *N*-(3-aminopropan-1-yl)butan-1,4-diamin. SPD je často popisován jako látka, která podporuje dlouhověkost, což je pravděpodobně zapříčiněno autofagií, která brání organismu stárnout. Konkrétně autofagie v organismu způsobuje rozklad poškozených proteinů, nefunkčních organel a virů, přičemž vzniklé látky jsou dále využity pro získání energie.¹⁸ Zda má polyamin SPD opravdu pozitivní vliv na dlouhověkost bylo v posledním desetiletí podrobeno několika studiím. Studie probíhaly na modelových organismech, a to na kvasinkách *Saccharomyces cerevisiae*, hárčátkách *Caenorhabditis elegans*, ovocných muškách *Drosophila melanogaster*¹⁹ a také samozřejmě na myších, kde u všech organismů došlo po suplementaci triazadekanu k prodloužení délky života. SPD pravděpodobně ovlivňuje rozvoj rakoviny, k čemuž přispívá také apoptóza a přesná regulace metabolismu PA. Zdá se tedy, že zvýšený příjem SPD potlačuje tumorigenezi, ale také urychluje růst již vzniklých tumorů. Z výše již zmíněných pozorování plyne, že by SPD mohl být využíván jako klinický diagnostický biomarker rakoviny.²⁰

1.3 Spermin

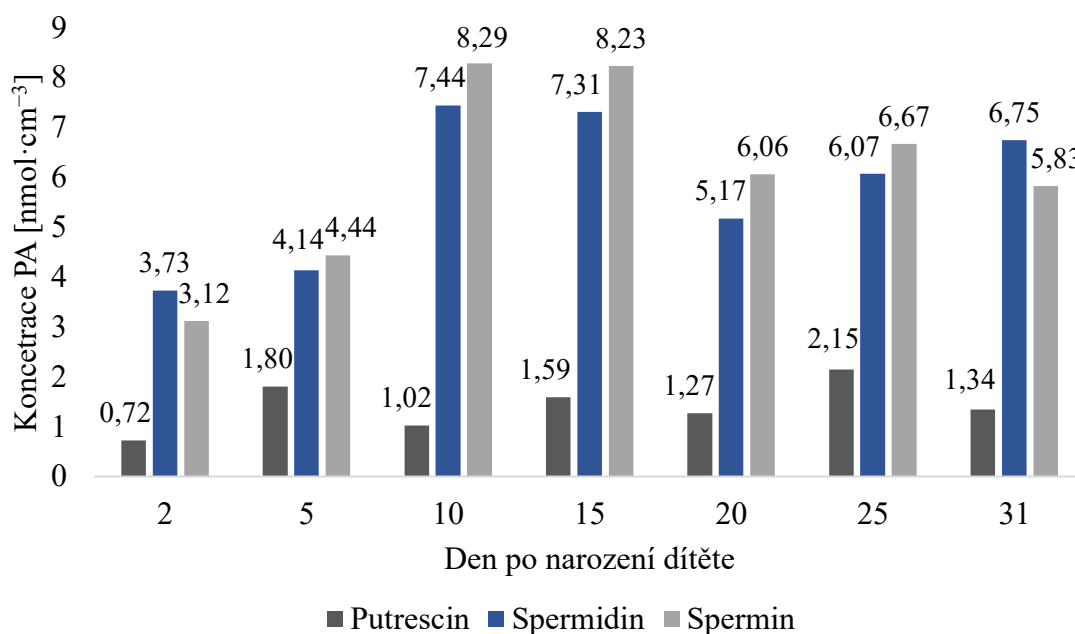
Spermin (SPE) je alifatický tetraamin (**III, Obrázek 1**), jenž má systematický název 1,5,10,14-tetraazatetradekan, případně *N,N'*-bis(3-aminopropan-1-yl)butan-1,4-diamin. Nejdříve byl SPE popsán ve formě krystalů, které se vytvořily po několika dnech ve vzorku lidského spermatu. Krystaly neznámé látky jako první objevil nizozemský přírodovědec Antonie van Leeuwenhoek v roce 1678,²¹ který krystaly shlédl svým primitivním mikroskopem sestaveným v roce 1674. Pro porovnání časového horizontu je to zhruba o 200 let dříve, než Friedrich Miescher objevil existenci nukleových kyselin. V roce 1791 Louis Nicolas Vauquelin zjistil, že vzniklé krystaly jsou ve skutečnosti fosfáty sperminu.²² Dnes víme, že sperminfosfát lze získat uvolněním anorganického fosfátu, který vzniká enzymatickou hydrolýzou fosforylcholinu. Fosforylcholin se nachází v semenné tekutině, která je produkovaná semennými vajíčky a prostatou.

Název spermin poprvé použili chemici Albert Ladenburg a John Jacob Abel v roce 1888²³ a molekulární strukturu sperminu nakonec objasnil Otto Rosenheim až v roce 1924.²⁴ SPE se ukázal jako silný aktivátor aktivity kaspasy v leukemických buňkách.²⁵

1.4 Polyaminy v potravinách

PA se nacházejí v potravinách živočišného i rostlinného původu, kde se mohou vyskytovat ve volné či konjugované formě. Volné PA jsou přítomny v buněčném nebo extracelulárním prostoru, kdežto konjugované PA mohou být navázané nejčastěji na nukleové kyseliny nebo, v potravinách rostlinného původu, na fenolické látky.²⁶

S PA v potravinách se lze setkat již po narození, jelikož se nachází v mateřském mléce. V minulosti byla provedena studie,²⁷ kde byla zaznamenána koncentrace PA v mateřském mléce během 2 až 31 dní po narození dítěte (**Obrázek 4**). Druhý den byl v mateřském mléce dominantní výskyt SPD v koncentraci $3,73 \text{ nmol} \cdot \text{cm}^{-3}$ a SPE $3,12 \text{ nmol} \cdot \text{cm}^{-3}$. PUT se v mléce vyskytoval v menším množství a to $0,72 \text{ nmol} \cdot \text{cm}^{-3}$. Z uvedených dní na **Obrázku 4** byl nejvyšší obsah SPD a SPE v mateřském mléce zpozorován 10. den, kdežto nejvyšší koncentrace PUT byla zaznamenána až 25. den. Poslední uvedený den, 31. den po narození dítěte, se obsah PA v mateřském mléce oproti 2. dne výrazně zvýšil, kde koncentrace SPD byla $6,75 \text{ nmol} \cdot \text{cm}^{-3}$, SPE $5,83 \text{ nmol} \cdot \text{cm}^{-3}$ a PUT $1,34 \text{ nmol} \cdot \text{cm}^{-3}$.



Obrázek 4 Obsah polyaminů v mateřském mléce po narození dítěte ve vybraných dnech.

Další výzkumy byly zaměřeny na obsah PA v mateřském mléce matek předčasně narozených dětí ve srovnání s „donošenými“ dětmi²⁸ a také se zabýval mateřským mlékem obézních matek.²⁹ V mateřském mléce matek předčasně narozených dětí byly zjištěny vyšší koncentrace PA, kdežto u obézních matek byl obsah PA nižší, ve srovnání s mlékem od matek s normální váhou.

PA se nacházejí téměř ve všech potravinách rostlinného původu a jejich obsah se liší v závislosti na druhu dané potraviny (**Tabulka 1**).³⁰ V rostlinné stravě se PUT nejhojněji vyskytuje v pomerančích, kde je uvedené množství 1330 nmol·g⁻¹ a v kukuřici 980 nmol·g⁻¹. Nejvíce SPD lze nalézt v sójových bobech, a to až 1430 nmol·g⁻¹. V asijské houbě shiitake, která roste na stromu pasania, se nachází SPD v koncentraci 890 nmol·g⁻¹.

V případě fermentovaných potravin, lze očekávat nejvyšší koncentraci z PA, zejména u PUT, jelikož během fermentace dochází k dekarboxylaci aminokyselin, což je běžný způsob, kterým vznikají PA. A právě PUT jako jediný z výše uvedených přírodních zástupců PA vzniká přímo z aminokyseliny, konkrétně L-Ornithinu (**Obrázek 2**). Vysoký obsah PUT ve fermentovaných výrobcích lze nalézt hlavně v sójových omáčkách,³⁰ a to například v omáčce tamari, kde se jeho koncentrace pohybovala v rozmezí 1640 až 5530 nmol·g⁻¹.

Tabulka 1 Obsah volných a vázaných polyaminů v rostlinných potravinách.³⁰

Potravina	Průměrný obsah PA [nmol·g ⁻¹]					
	PUT	SPD	SPE	c-PUT	c-SPD	c-SPE
Rýže	<10	27	<20	ND	10	34
Kukuřice	980	240	ND	46	13	<5
Brambor	200	93	ND	ND	ND	ND
Špenát	29	120	<5	42	22	ND
Mrkev	40	55	ND	ND	ND	ND
Rajče	120	12	ND	ND	ND	ND
Sójové boby	470	1430	340	ND	ND	53
Houba shiitake	29	890	ND	ND	24	<5
Pomeranč	1330	13	8	ND	ND	ND
Jablko	ND	7	ND	ND	ND	ND
Zelený čajový list	547	851	524	89	58	80

c = konjugovaná forma polyaminu

ND = nezjištěná koncentrace polyaminu

V živočišné stravě je obsah PA oproti rostlinné stravě velice proměnlivý (**Tabulka 2**). Z **Tabulky 2** je patrné, že v mase se vyskytuje nejvyšší koncentrace SPE, a to především v kuřecím mase, kde je jeho koncentrace přibližně dvojnásobná na rozdíl od hovězího a vepřového masa.

Tabulka 2 Obsah volných a vázaných polyaminů v živočišných potravinách.³⁰

Potravina	Průměrný obsah PA [nmol·g ⁻¹]					
	PUT	SPD	SPE	c-PUT	c-SPD	c-SPE
Vepřové maso	13	32	140	19	ND	21
Hovězí maso	6	18	140	<10	14	77
Kuřecí maso	<5	20	310	30	11	<10
Tuňák	ND	30	34	ND	ND	33
Slepičí vejce	<5	<10	<5	ND	ND	ND
Kravné mléko	ND	ND	ND	ND	ND	ND

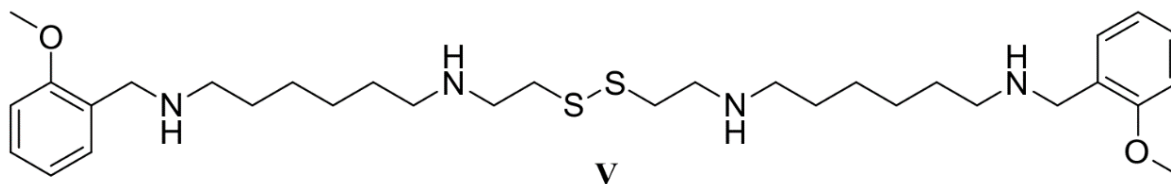
c = konjugovaná forma polyaminu

ND = nezjištěná koncentrace polyaminu

Metody pro stanovení PA v potravinách jsou založeny v první řadě na chromatografické separaci s různou detekcí. Především se uplatňuje vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC), a také se využívá ultra vysokoúčinná chromatografie (UHPLC) s iontoměničovými kolonami nebo kolonami s reverzní fází.³¹

2 SYNTETICKÉ POLYAMINY

PA se snadno vážou na různé receptory, především dobře interagují s aspartamovými, glutamovými a aromatickými zbytky daného receptoru nebo enzymu, prostřednictvím tvorby iontových vazeb.³² Při fyziologickém pH jsou aminoskupiny téměř úplně protonované, jak je již blíže specifikováno v kapitole 1, díky čemuž lze protonované PA využít jako univerzální templát, který je schopný rozpoznat různé receptorové systémy a enzymy. Pro vylepšení afinity a selektivity k receptoru lze PA synteticky modifikovat buď navázáním vhodného substituentu na aminoskupinu nebo změnou délky alifatického řetězce, který je součástí polyaminového řetězce. Cílem této designové strategie je objevit silné a selektivní PA, které jsou schopné vázat se na receptory neurotransmiterů a enzymové proteiny. Výchozí sloučeninou pro syntézu nových univerzálních templátů je benextramin (**Obrázek 5**), který kromě antagonistického účinku na α -adrenoreceptory, vykazuje také antagonistické účinky na cholinergní systém muskarinových receptorů.^{33,34}

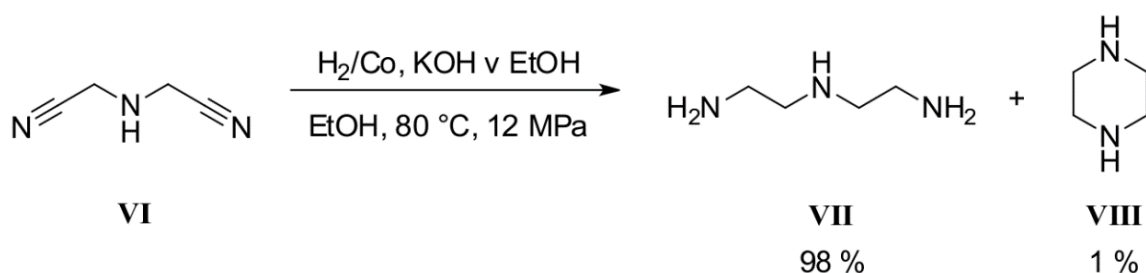


Obrázek 5 Chemická struktura benextraminu (V).

Mezi další syntetické PA patří diethylentriamin, pentamethyldiethylentriamin, polyethylenimin a mepakrin, které jsou blíže popsány v následujících podkapitolách.

2.1 Diethylentriamin

Diethylentriamin (**VII**, DETA) se systematickým názvem 1,4,7-triazaheptan, lze připravit hydrogenací iminodiacetonitrilu (**VI**, IDAN) za vzniku vedlejšího produktu piperazinu (**VIII**).



Obrázek 6 Syntéza diethylentriaminu (**VII**).

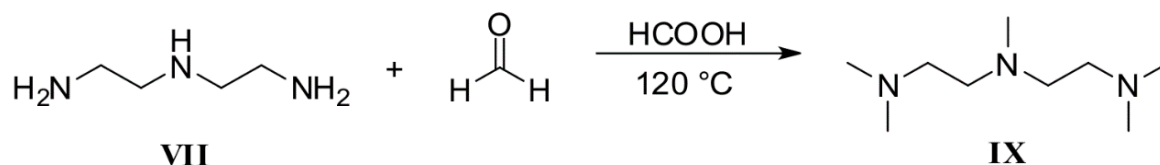
Jedna z popsaných syntéz DETA³⁵ (**Obrázek 6**) proběhla v nerezovém reaktoru, kde byla smíchána transformovaná aniontoměničová pryskyřice, molekulové síto, Raneyův kobalt, IDAN a ethanol. Do roztoku byl dále přidán 5% hydroxid draselný v ethanolu, který sloužil k aktivaci katalyzátoru, což vedlo ke zvýšení účinnosti reakce. Poté byl do reaktoru přidán inertní plyn, konkrétně dusík. Do reaktoru byl přiveden vodík a konečně reakce začala probíhat po přidání kapalného amoniaku. Syntéza probíhala při teplotě 80 °C a tlaku 12 MPa. Průběh reakce byl analyzován pomocí plynové chromatografie. Podle analýzy provedené na plynovém chromatografu se vzniklá směs skládala z 98% DETA a z 1% piperazinu, jakožto vedlejšího produktu.

DETA patří mezi syntetická chelatační činidla, která tvoří stabilní komplexy s kovy. Používají se při peroxidovém a ozonovém bělení buničiny s cílem odstranit atom železa či manganu.³⁶ DETA má hojné využití v různých průmyslových odvětvích, například se využívá jako vytvrzovací činidlo pro epoxidové pryskyřice. Epoxidové pryskyřice jsou polymery, které vznikají reakcí epoxidových monomerů (např. bisfenol A) s vytvrzovacím činidlem (DETA). Reakce způsobí otevření epoxidového kruhu a následnou polymerizaci, čímž se vytvoří trojrozměrná polymerní síť. Vytvrzované epoxidové pryskyřice vytváří pevné, odolné a trvanlivé materiály, jejichž využití lze nalézt v různých aplikacích, jako jsou lepidla nebo nátěrové hmoty.³⁷

DETA byl zkoumán jako alternativa k vodným ethanolaminovým roztokům (MEA), které se používají k zachycování CO₂ po spalování fosilních paliv. DETA je v této oblasti zajímavým kandidátem, jelikož ve své struktuře obsahuje dvě primární a jednu sekundární aminoskupinu, které jsou schopny na sebe vázat CO₂ za vzniku karbamátu. Přítomnost vody v roztocích DETA může rovněž přispět k tvorbě karbamátu. Díky výskytu třech aminoskupin ve struktuře triaminu, lze očekávat vyšší absorpční kapacitu CO₂. Proto se rozhodl Ardi Hartono společně se svými kolegy³⁸ prozkoumat kinetiku absorpce CO₂ s vodnými roztoky DETA o koncentracích v rozmezí 1,0 až 2,9 kmol·m⁻³ a při teplotách od 25 do 59 °C. Hartono a spol. zjistili, že DETA poskytuje mnohem vyšší absorpční rychlost než MEA, což dokazuje, že vodný roztok DETA je slibné rozpouštědlo pro zachycování CO₂.

Mezi další významné syntetické polyaminy můžeme zařadit derivát DETA s názvem pentamethyldiethylentriamin (**IX**), známý pod zkratkou PMDTA, který lze syntetizovat z DETA (**VII**) pomocí Eschweilerovy–Clarkeovy reakce.³⁹ Eschweilerova–Clarkeova

reakce je chemická reakce, při které je primární a/nebo sekundární aminoskupina methylovaná přebytkem formaldehydu a kyseliny mravenčí. (**Obrázek 7**).

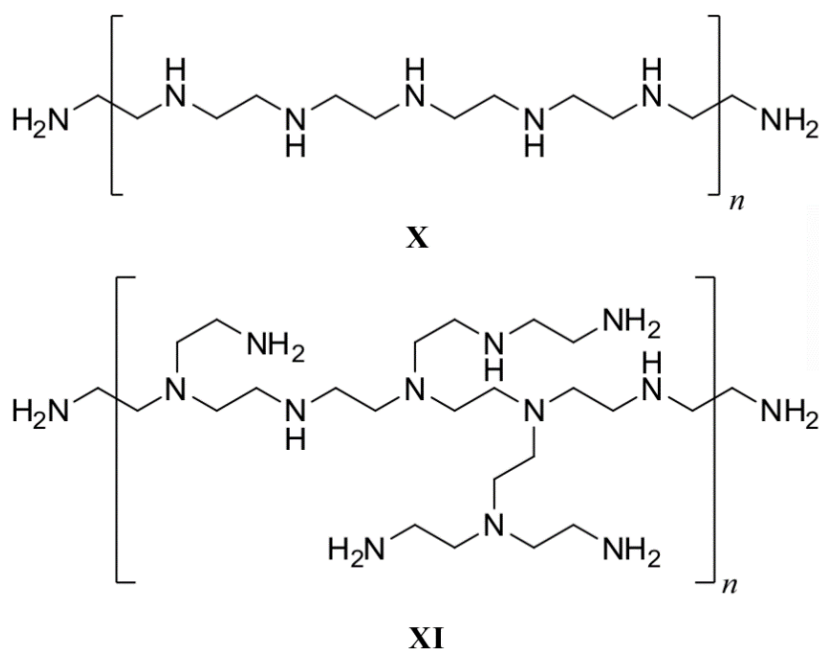


Obrázek 7 Syntéza pentamethyldiethylentriaminu (IX).

PMDTA disponuje tridentátním charakterem, který mu umožňuje koordinovat kovové ionty, čehož lze využít v katalytických reakcích.⁴⁰

2.2 Polyethylenimin

Polyethylenimin (PEI) je stabilní kationtový polymer, jehož struktura může být lineární nebo větvená (**Obrázek 8**) a je složená z opakujících se monomerních jednotek ethyleniminu.



Obrázek 8 Příklad lineárního (X) a rozvětveného (XI) fragmentu polyethyleniminu.

PEI byl průmyslově vyráběn od roku 1938 v Německu firmou BASF a v USA korporací Chemirad.⁴¹ Využívá se jako přísada do motorových paliv⁴², ve slévárenství⁴³ a při výrobě anexových pryskyřic.⁴⁴ PEI lze připravit polymerací aziridinu, tepelným rozkladem 2-oxooxazolidinu nebo kondenzací ethylendiaminu.⁴¹

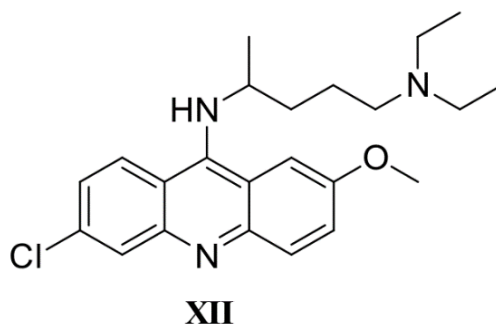
PEI má využití již několik let zejména v genovém inženýrství, kde je jedním z nejznámějších činidel pro transfekci buněk.⁴⁵ Pod pojmem transfekce si lze představit přenášení DNA do eukaryotické buňky za účelem studia genů nebo léčby genetických onemocnění. Ke vzniku komplexu mezi DNA–PEI dochází kondenzací DNA pomocí PEI. PEI disponuje kladně nabitými částicemi, které se vážou na záporně nabitě buněčné povrchy. Poté vzniklý komplex vstoupí do buňky díky endocytóze. Během endocytózy se komplex DNA–PEI obalí membránou a vytvoří se endosom, což je membránový váček. A poté se DNA uvolní do cytoplazmy.⁴⁶

2.3 Mepakrin

Mepakrin (**XII, Obrázek 9**) též známý jako chinakrin, nebo pod obchodním označením Atabrin, má systematický název 6-chlor-9-[(4-diethylamin-1-methylbutyl)amin]-2-methoxyakridin. Mepakrin je derivátem methylenové modři a považuje se za první synteticky připravené antimalarikum.⁴⁷ Atabrin byl dostupný ve formě dihydrochloridu, jednalo se o žlutou tabletu s celkovým obsahem mepakrinu 80 %.⁴⁸

Atabrin má velice zajímavou a dlouhou historii. Byl vyvinut ve 20. letech 20. století německou chemickou společností I.G. Farbenindustrie AG, a ve 30. letech 20. století byl představen jako antimalarikum.⁴⁹ Během první světové války, kdy Japonsko provedlo invazi do jihozápadního Pacifiku, byla přerušena dodávka chininu, který sloužil americkým vojákům k prevenci malárie. Milióny amerických vojáků začalo užívat 100 mg atabrinu denně jako prevenci proti malárii a jeho účinky na vojácích sledovali američtí zdravotníci, díky čemuž se atabrin v té době řadil jako jedno z nejméně prozkoumaných léčiv.⁵⁰

Jedním z nežádoucích účinků atabrinu byl výskyt žlutých skvrn na kůži a sliznicích, což se v některých případech zaměňovalo se žloutenkou⁵¹ a vzácně vyvolával reverzibilní edém rohovky.⁵² Atabrin se dnes již nepoužívá, jelikož způsobuje toxickou psychózu, která zahrnuje psychotické stavy či halucinace.⁵³



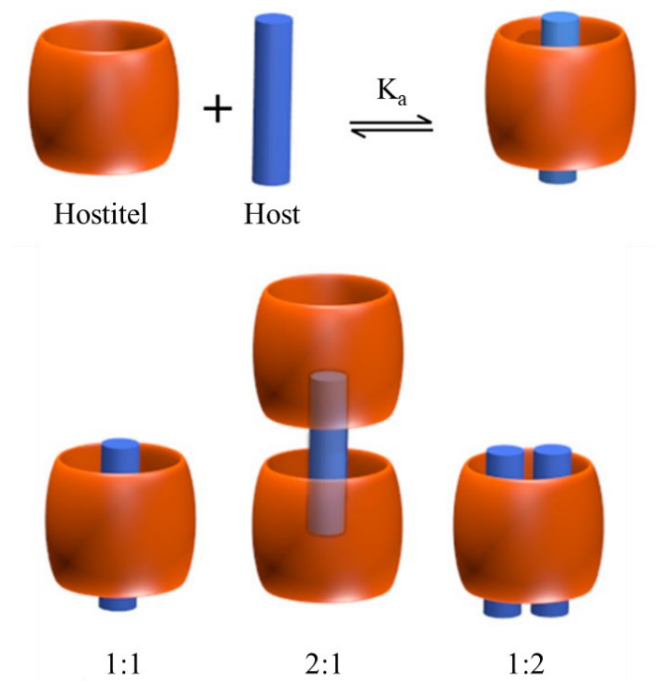
Obrázek 9 Chemická struktura mepacrinu (**XII**).

3 SUPRAMOLEKULÁRNÍ CHEMIE

Za jednoho ze zakladatelů supramolekulární chemie se považuje Jean-Marie Lehn, který ve své publikaci z roku 1988⁵⁴ uvedl, že tento obor lze popsat jako „*chemistry beyond the molecule*“, což volně přeloženo znamená chemie za molekulou. Lehn společně s Charlesem Johnem Pedersenem⁵⁵ a Donaldem Jamesem Cramem⁵⁶ získali Nobelovu cenu za chemii v roce 1987, čímž odstartovali rozsáhlé výzkumy v tomto oboru. Supramolekulární chemie je multidisciplinární obor, který se zabývá studiem organizovaných entit vyšší složitosti, které vznikají spojením dvou a více chemických složek, držených pohromadě nekovalentními vazebnými interakcemi. Mezi nekovalentní interakce uplatňující se (nejen) v supramolekulární chemii patří například vodíkové vazby, iontové, dipólové nebo π - π interakce, Van der Waalsovy síly či hydrofobní efekt.⁵⁷ Supramolekulární struktury lze nalézt i v přírodě, a to konkrétně například u DNA, která má strukturu dvoušroubovice, ve které jsou dva propletené polyfosfátové řetězce drženy pohromadě díky π - π interakcím a vodíkovým vazbám mezi komplementárními páry bází.

Nekovalentní interakce jsou obecně slabší než ty kovalentní, a proto tedy supramolekulární struktury mohou podléhat termodynamickým přeměnám, díky čemuž mohou tyto struktury přecházet mezi různými konformačními nebo konfiguračními stavy. Indukované přeměny lze studovat z hlediska dynamiky a adaptability těchto systémů, díky čemuž lze konstruovat různé supramolekulární struktury s laditelnými vlastnostmi a funkcemi. Takové systémy našly uplatnění v luminiscenčních materiálech,⁵⁸ polymerních gelech⁵⁹ či biologických zobrazovacích sondách.⁶⁰

Jednou z oblastí supramolekulární chemie je hostitel–host chemie. Tento obor chemie zkoumá tvorbu a stabilitu komplexů typu hostitel–host neboli inkluzních komplexů. Hostitelská molekula většinou disponuje kavitou, jejíž charakter souvisí s vysokou afinitou a selektivitou pro hostující molekuly. Aby vznikl výsledný komplex, tak všechny komponenty musí mít komplementární tvar, což znamená, že velikost hostitelské molekuly je kompatibilní s molekulou hosta. Pro vznik inkluzního komplexu je dále nezbytné, aby všechny přítomné molekuly byly stericky dostupné a měly nastaveny správné podmínky prostředí (teplota, pH nebo rozpouštědlo).⁶¹ Komplexy hostitel–host vznikají v určitém stechiometrickém poměru (**Obrázek 10**) nejčastěji interaguje hostitel (H) s hostem (G) v poměru 1:1. Ale existují také supramolekulární systémy s vyšší stechiometrií, například 1:2 nebo 2:1.⁶²



Obrázek 10 Znárodnění inkluzních komplexů v různých stechiometrických poměrech.⁶³

Vznik samotného komplexu HG ve stechiometrickém poměru 1:1, jak lze vidět na **Obrázku 10**, je uveden v rovnici (1). V rovnici (2) je vyjádřena příslušná asociační konstanta (K_a) definující míru interakce mezi H a G, která se vypočte z jednotlivých koncentrací všech komponent.



$$K_a^{1:1} = \frac{[HG]}{[G] \cdot [H]} \quad (2)$$

Nejsilnějším přirozeně se vyskytujícím nekovalentním interakčním párem je komplex biotin–avidin, pro který byla stanovena hodnota $K_a \approx 10^{15} \text{ M}^{-1}$.⁶⁴ V roce 2014 byl publikován doposud nejsilnější syntetický hostitel–host pár, konkrétně se jednalo o CB7 inkludující do své kavity diamoniový derivát na bázi 4,9-disubstituovaného diamantanu, pro který byla v čisté vodě stanovena hodnota $K_a = 7,2 \cdot 10^{17} \text{ M}^{-1}$.⁶⁵ Hodnota vazebné konstanty synteticky připraveného komplexu je tedy přibližně o dva řady vyšší než K_a přirozeně se vyskytujícího páru biotin–avidin.

Inkluzní komplexy lze využít ve farmaceutickém průmyslu, konkrétně v modulační terapii pro přenos genů do imunitního systému⁶⁶ a ve fotodynamické terapii sloužící k léčbě

nádorových onemocnění.⁶⁷ V oblasti potravin lze supramolekulární systémy použít pro ochranu nestabilních složek potravin před chemickými či fyzikálními vlivy, například ke snížení enzymatického hnědnutí ovoce.⁶⁸

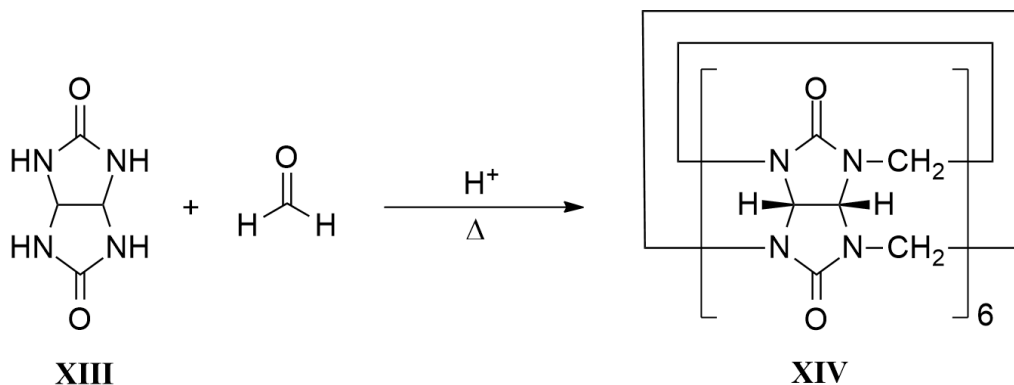
3.1 Hostitelské molekuly

Hostitelské molekuly v supramolekulární chemii jsou makrocyclické sloučeniny, které mají schopnost vytvářet inkluzní komplexy s hostujícími molekulami. Makrocykly jsou zpravidla cyklické oligomery obsahující pravidelně se opakující jednotky. Nevýhodou většiny makrocyclů je omezená rozpustnost ve vodě, což značně zpomaluje rozvoj supramolekulární chemie, hlavně tedy v biologických vědách. Zvýšit rozpustnost těchto látek lze modifikací struktury hostitelských molekul, a to třeba zavedením hydrofilní funkční skupiny.

Mezi nejvýznamnější skupiny makrocyclických sloučenin se řadí cucurbit[*n*]urily, cyklodextriny, calix[*n*]areny, pillar[*n*]areny, nebo crown ethery.

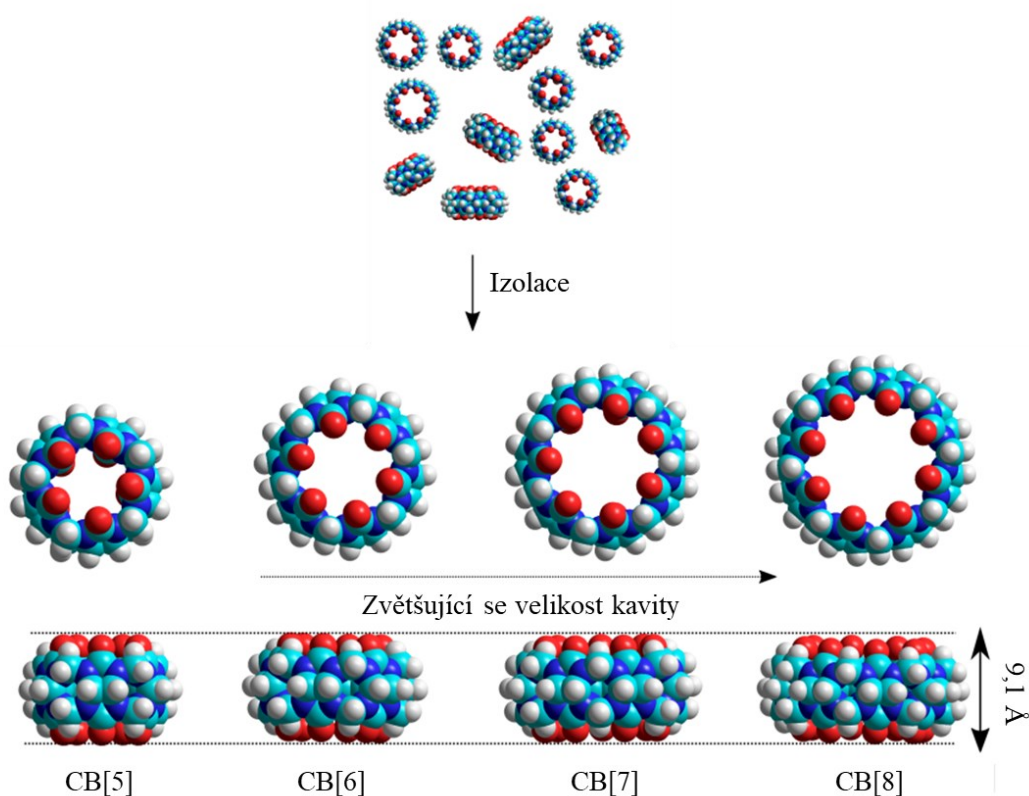
3.1.1 Cucurbit[*n*]urily

Cucurbit[*n*]urily (CB*n*) jsou tvořeny monomery glykolurilu spojenými methylenovými můstky (**Obrázek 11**). V roce 1905 se povedlo Robertu Behrendovi a jeho kolegům připravit prvního zástupce z rodiny CB*n*.⁶⁹ Tento produkt kyselé katalyzované kondenzační reakce glykolurilu (**XIII**) s formaldehydem obsahoval šest glykolurilových jednotek spojených dvanácti páry methylenových můstků (**XIV**). Struktura však byla určena až v roce 1981, kdy Mock a spolupracovníci reprodukovali původní syntetický protokol a připravili monokrystal produktu.⁷⁰ Prvním syntetizovaným a identifikovaným zástupcem tak byl CB6. Produkt kondenzace byl nazván cucurbituril, jelikož jeho tvar připomíná dýni, která patří do čeledi *cucurbitaceae*.



Obrázek 11 Syntéza cucurbit[6]urilu (**XIV**).

Jaehoon Kim a jeho spolupracovníci se na začátku 21. století pokusili optimalizovat reakční podmínky původní syntézy CB6, čímž získali nové homology CB n .⁷¹ Kimovi a spol. se podařilo úspěšně izolovat a charakterizovat CB5, CB7 a CB8 obsahující pět, sedm a osm glykolurilových jednotek (**Obrázek 12**). Nejdříve provedli reakci katalyzovanou 9M H₂SO₄ při 75 °C po dobu 24 hodin, poté při 100 °C a 12 hodin. Z této reakční směsi se jim povedlo izolovat přibližně 60 % CB6, 10 % CB5, 20 % CB7, a 10 % větších homologů CB n ($n = 8-11$). Následně se pokusili reakci katalyzovat HCl při 115 °C po dobu 24 hodin, přičemž získali vyšší výtěžky CB7 a CB8.



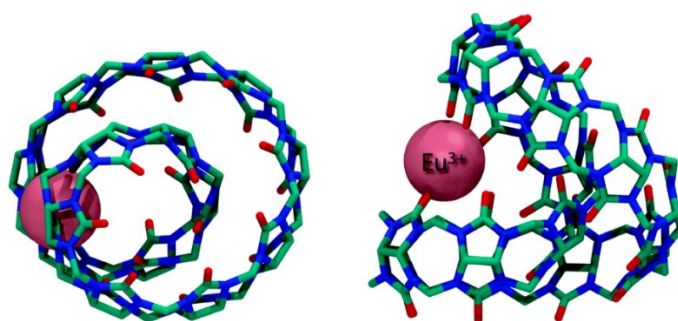
Obrázek 12 Vybraní zástupci cucurbit[n]urilů.⁶³

Tabulka 3 Rozměry vybraných cucurbit[n]urilů.⁷¹

Vlastnosti	CB5	CB6	CB7	CB8
Výška [Å]	9,1	9,1	9,1	9,1
Průměr portálu [Å]	2,4	3,9	5,4	6,9
Vnější průměr [Å]	13,1	14,4	16,0	17,5
Průměr dutiny [Å]	4,4	5,8	7,3	8,8
Objem dutiny [Å ³]	82	164	279	479

Jak je vidět na **Obrázku 12** a v **Tabulce 3** všechny uvedené homology CB_n disponují stejnou výškou, a to 9,1 Å. Objem dutiny jednotlivých CB_n se pohybuje od 82 do 479 Å³, v důsledku čehož lze odhadnout, jaké ligandy budou s daným derivátem CB_n komplexovat. Nejmenší zástupce, v jehož struktuře se vyskytuje pět glykolurilových jednotek, je ideální zejména pro enkapsulaci plynů,⁷² CB_6 váže alkylové řetězce,⁷³ CB_7 se svou velikostí zvládne pojmout menší aromatické sloučeniny a polycyklické klecové uhlovodíky.⁷⁴ CB_8 je již natolik objemný, že zvládne pojmout až dva různé ligandy a tvoří tak například heteroternární komplexy, jejichž stechiometrický poměr bude 1:1:1.⁷⁵

Důležitým objevem v chemii CB_n byla příprava CB_{14} , jenž disponuje 14 glykoluril-methylenovými jednotkami v pásu stočeném o 360°.⁷⁶ V důsledku stočení má CB_{14} oproti menším homologům jinou dutinu a má vzhled složené osmičky (**Obrázek 13**). Struktura CB_{14} obsahuje dvě dutiny, které jsou větší než dutina CB_6 a může pojmout až tři koordinačně vázaná kovová jádra. CB_{14} lze připravit pouze ve velmi nízkých výtěžcích, jelikož u CB_{14} dochází k vysokému stupni polymerace. O pár let později byly izolovány další členové rodiny CB_n se zkroucenou strukturou, a to CB_{13} a CB_{15} .⁷⁷

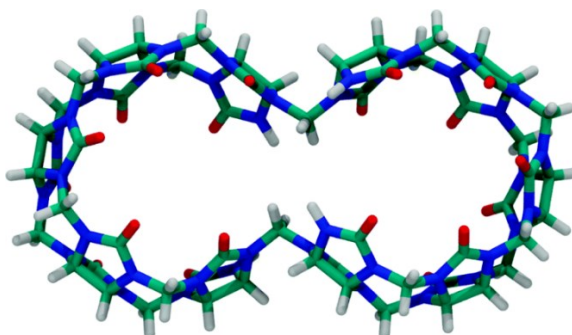


Obrázek 13 Röntgenova struktura komplexu $Eu^{3+} CB_{14}$.⁷⁸

Je všeobecně známo, že zástupci rodiny CB_n jsou špatně rozpustní ve vodě, což znesnadňuje jejich použití v různých biologických oblastech. O velmi nízké rozpustnosti lze hovořit v případě CB_6 a CB_8 , jejichž hodnota rozpustnosti je menší než 10⁻² mM. Zatímco CB_7 je ve vodě středně rozpustný a jeho hodnota rozpustnosti se pohybuje v rozmezí 20–30 mM.⁷⁹ To je jeden z hlavních důvodů, proč se CB_n začaly různě funkcionalizovat. Další nevýhodou těchto makrocyklů je inertnost, tedy malá reaktivita. Proto jejich modifikování nemusí být snadno proveditelné. Ale CB_n jsou díky svým vlastnostem a schopnostem pro vědce natolik atraktivní, že se povedlo k dnešnímu dni připravit více než 30 funkčních derivátů, které našly své uplatnění například v biomedicínských aplikacích.

První příprava modifikovaného CB_n byla publikována v roce 1992 Fraserem Stoddartem a jeho kolegy,⁸⁰ kteří připravili plně ekvatoriálně methylenovaný CB_5 v 16% výtěžku. Přibližně o 10 let později se povedlo Kimmovi a spol.⁸¹ přímou modifikací přeměnit CB_n na plně hydroxylovaný CB_n pomocí $K_2S_2O_8$ při teplotě $85\text{ }^\circ\text{C}$ za drsných podmínek, jelikož vnější vazby $C-H$ jsou relativně citlivé na oxidaci. Následně se povedlo hydroxylové skupiny z perhydroxyl- CB_n za extrémně kyselých podmínek nahradit jinými funkčními skupinami pomocí nitrilových či alkoholových nukleofilů, díky čemuž vznikly deriváty CB_n s reaktivními funkčními skupinami.⁸² A navíc tyto reakce poskytovaly vysoké výtěžky. Vzniklé deriváty makrocyclů lze konjugovat s enzymy, což lze uplatnit v proteinovém blotování a zároveň tato příprava otevírá nové možnosti pro rozšíření syntézy dalších makrocyclů jako jsou bambus[n]jurily,⁸³ které taktéž obsahují glykolurilové jednotky.

Lyle Isaacs a spol. navrhli přípravu monofunkcionalizovaných CB_7 derivátů, a to konkrétně dimethylovaného (Me_2CB_7) a cyklicky substituovaného CB_7 ($CyCB_7$).⁸⁴ Výsledné deriváty jsou vysoce rozpustné ve vodě, rozpustnost pro Me_2CB_7 je 264 mM a u $CyCB_7$ byla zjištěna hodnota rozpustnosti 181 mM. Monofunkcionalizované deriváty CB_7 byly syntetizovány z acyklického hexameru glykolurilu s glykolurilem bis(cyklickým etherem).⁸⁵ Mezi další významné modifikované $CB(n)$, na jejichž syntéze se podílela skupina Lyle Isaacs, patří bis-*nor-seco*- CB_{10} ⁸⁶ a *nor-seco*- CB_6 .⁸⁷ Derivát CB_{10} postrádá dva methylenové můstky, díky čemuž má dvě symetricky propojené dutiny (**Obrázek 14**). Kdežto derivát CB_6 postrádá jeden methylenový můstek.



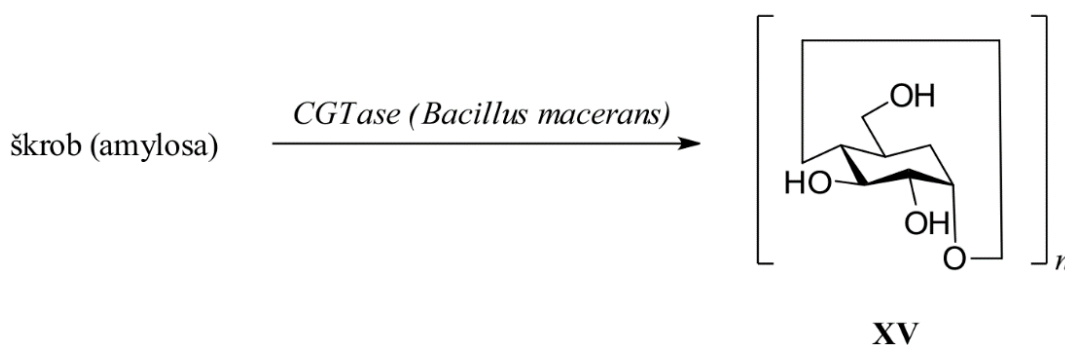
Obrázek 14 Röntgenova struktura bis-*nor-seco*- CB_{10} .⁷⁸

3.1.2 Další příklady makrocyklů

Cyklodextriny

Historie cyklodextrinů (CD) se píše od roku 1891, kdy Antoin Villiers popsal krystalickou látku, která vznikala fermentací škrobu bakterií *Bacillus amylobacter*.⁸⁸ Jelikož Villiers viděl jisté podobnosti ve vlastnostech výsledného produktu fermentace a celulosy, neznámou sloučeninu pojmenoval jako celulosin. Obě látky vykazovaly odolnost proti kyselé hydrolyze a nedisponovaly redukujícími funkčními skupinami. Cyklická struktura byla odhalena až po 40 letech od vydání první publikace o těchto oligosacharidech.⁸⁹

V současné době je známo, že CD jsou cyklické oligosacharidy složené z glukosových jednotek spojených α -1,4-glykosidickou vazbou a jejich tvar připomíná komolý kužel. Mezi přirozeně se vyskytující CD se řadí α -, β - a γ -CD, které lze odlišit počtem 6, 7 a 8 opakujících se glukosových jednotek. CD jsou i dnes připravovány enzymatickým rozkladem škrobu (**Obrázek 15**).



Obrázek 15 Enzymatická příprava cyklodextrinu (XV).

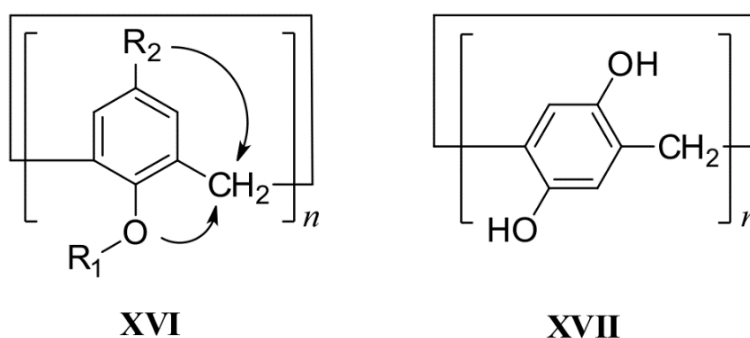
CD patří mezi nejrozšířenější makrocyklické molekuly užívané v potravinářském⁹⁰ či farmaceutickém⁹¹ průmyslu, a to zejména pro svou relativně přijatelnou cenu. Všechny tři typy přirozeně se vyskytujících CD se mohou dokonce pyšnit statusem GRAS, což je označení používané v USA úřadem pro bezpečnost potravin a léčiv (FDA), pro takové látky, které jsou bezpečné a mohou se tedy používat v potravinách.^{92,93,94}

CD je výtečná hostitelská molekula, především díky své hydrofobní kavitě, která umožňuje vytvářet inkluzní komplexy s různými ligandy. Takovým příkladem může být supramolekulární systém β -CD s různými deriváty na bázi adamantanu jejichž hodnoty K_a dosahují 10^4 – 10^6 M^{-1} .⁹⁵

Calix[n]areny a pillar[n]areny

Calix[n]areny jsou tvořeny fenolovými a methylenovými jednotkami. Calix[n]areny, připomínající kalich, mohou existovat v různých konformacích kvůli dvěma možným rotačním režimům fenolové jednotky. Buďto může probíhat rotace atomu kyslíku nebo *para* substituentu skrz prstence, oba případy rotace jsou znázorněny na **Obrázku 16** u sloučeniny označené **XVI**. Díky dvěma rotačním režimům lze získat velké množství kavít lišících se velikostí a tvarem.⁹⁶

Pillar[n]areny jsou složeny z hydrochinonových jednotek, spojených v *para* poloze methylenovými můstky. Nejvýznamnější pillar[n]arenem je pravděpodobně 1,4-dimethoxypillar[5]aren, jehož syntéza byla publikovaná Tomokim Ogoshim a jeho kolegy v roce 2008.⁹⁷ Substituovaný pillararen byl ve 20% výtěžku připraven pomocí kondenzační reakce 1,4-dimethoxybenzenu s paraformaldehydem katalyzované Lewisovou kyselinou. Výsledný symetrický hostitel pillar[5]aren je, co se týče velikosti, téměř totožný s α -CD. Součástí studie Ogoshima a spol. byl také výzkum schopnosti tvorby supramolekulárních komplexů nového hostitele s alkyl pyridiniem a dialkyl viologenem (dialkyl bispiridinium). Výsledkem byl vznik inkluzních komplexů ve stechiometrickém poměru 1:1 pro oba typy ligandu.

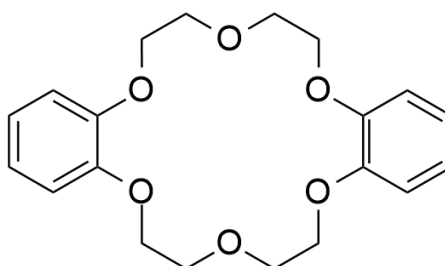


Obrázek 16 Chemická struktura calix[n]arenů (**XVI**) a pillar[n]arenů (**XVII**).

Crown ethery

V neposlední řadě je nezbytné zmínit hostitelské molekuly, které se nazývají crown ethery. Uvedené makrocykly jsou cyklické sloučeniny složené z několika etherových skupin. Za jejich objevitele se považuje Charles Pedersen, který byl za tento objev také oceněn Nobelovou cenou.⁵⁵ Pedersenovým prvním připraveným crown etherem byl 2,3,11,12-dibenzo-1,4,7,10,13,16-hexaoxacyklooktadeca-2,11-dien, nebo také označován jako dibenzo[18]crown-6 jehož struktura je znázorněna na **Obrázku 17**. Výchozími látkami pro

syntézu hostitelské molekuly dibenzo[18]crown-6 je pyrokatechol a bis(2-chlorethyl)ether. Reakce probíhá v přítomnosti NaOH.



XVIII

Obrázek 17 Chemická struktura dibenzo[18]crown-6 (XVIII).

Struktura makrocyklu vytváří centrální hydrofilní dutinu tvořenou elektronegativními atomy kyslíku. Crown ethery vážou široké spektrum kationtů. Za účelem snadnějšího navázání daného iontu podléhají výrazným konformačním změnám. Změny v jejich konformaci jsou způsobeny rotací dvou jednoduchých vazeb v crown etherovém kruhu. Crown ethery mezi ostatními makrocykly dominují zejména silnou afinitou k iontům alkalických kovů a kovů alkalických zemin.⁹⁸

3.2 Supramolekulární komplexy s cucurbit[6]urilem

CB n jsou v chemii hostitel–host velmi oblíbené, vytváří binární a ternární komplexy s různými kladně nabitými organickými sloučeninami, za což si vysloužily rozsáhlý vědecký výzkum. Tyto synteticky připravené makrocykly obecně vytváří velmi stabilní komplexy s hodnotami K_a v rozmezí 10^7 – 10^{17} M⁻¹.

CB6 je prvním izolovaným a zároveň nejhojněji se vyskytujícím typem CB n . CB6 disponuje průměrem portálu 3,9 Å (Tabulka 3), což mu umožňuje vytvářet stabilní supramolekulární komplexy, zejména s alifatickými aminy s relativně krátkými řetězci. CB6 se používá jako komponenta při sestavování supramolekulárních prepínačů,⁹⁹ polyrotaxanů¹⁰⁰ a katenanů.¹⁰¹

William Mock a Neng-Yang Shih, jako první opublikovali studium komplexace alkyl- a aryl-substituovaných alkylamoniových a alkyldiamoniových iontů ve vodné kyselině mravenčí.¹⁰² Kyselina mravenčí byla použita pro zvýšení rozpustnosti CB6. Touto studií prokázali tvorbu stabilních komplexů CB6 s aminy, což je následek silných interakcí mezi

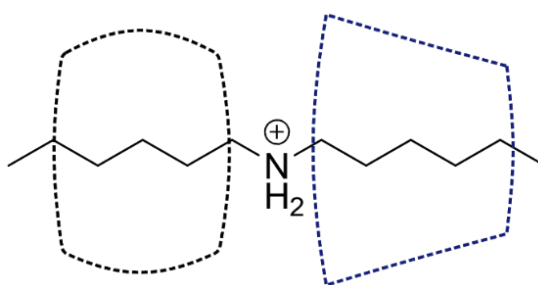
kladně nabitými aminoskupinami a šesti elektronegativními kyslíkovými atomy karbonylových skupin na každém portálu CB6. Čím blíže je aminoskupina portálům CB n , tím stabilnější komplex je tvořen. Kavita CB n má hydrofobní neboli nepolární povahu, díky čemuž se považuje za ideální hostitelskou molekulu pro ligandy, které mají ve své struktuře nepolární alifatickou část.

Mock se svým kolegou se rozhodli ve studiu supramolekulárních systémů s CB6 pokračovat. Autoři publikace se rozhodli jako hostující molekuly využít substituované amonné kationty.¹⁰³ Pozoruhodné výsledky enkapsulace s makrocylem byly zaregistrovány u přirozeně se vyskytujících PA (putrescin, spermidin a spermin). Tyto PA jsou blíže specifikovány v kapitole 1. Interakce mezi hostitelem a hostem nacházejícími se v 50% roztoku kyseliny mravenčí, byly studovány pomocí NMR a UV/VIS titrace. Z těchto tří zástupců PA se nejsilněji v kavitě CB6 vázal spermin, který měl hodnotu K_a $7,6 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}$, pro systém se spermidinem byla výsledná hodnota K_a $7,4 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$. Nejnižší hodnota K_a byla zaznamenána u komplexu CB6 s putrescinem, a to $6,5 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$. O 20 let později byly publikovány výsledky měření sperminu a spermidinu v 50 mM NaCl,¹⁰⁴ kde se afinita obou PA zvýšila o jeden řád. Systém CB6–spermin disponoval hodnotou K_a $3,3 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}$. Komplexace CB6 se sperminem byla také studována ve 200 mM LiCl. Z ITC měření bylo zjištěno, že systém je v prostředí LiCl vázán pevněji ($K_a = 5,4 \cdot 10^{10} \text{ M}^{-1}$) než v roztoku NaCl. Těmito experimenty lze názorně dokázat, že hodnotu K_a ovlivňuje prostředí, ve kterém se daný systém nachází.

V oblasti hostitel–host chemie proběhla řada experimentů, které se zabývaly velmi důležitou oblastí supramolekulární chemie, kterou je kinetika inkluze. Jedna ze studií se věnovala měření rychlosti tvorby komplexu CB6 s cyklohexylmethylaminem ve formě volné báze a jeho soli v závislosti na pH.¹⁰⁵ Z výzkumu vyplývá, že cyklohexylmethylamin v prostředí s hodnotou pH 11 vstupuje do kavity hostitele přímo a dvacetinásobně vyšší rychlostí než protonovaný ligand při pH 8. Výše popsany systém hostitel–host lze přirovnat ke „kinetickému spínači“, který reaguje na pH. Takové systémy se často označují jako pH rezponzivní. Možnost ovládní rychlosti disociace a vzniku komplexu má velkou perspektivu zejména ve farmaceutickém průmyslu, v oblasti řízeného dodávání léčiv.¹⁰⁶ Takový komplex by mohl zrychlit nebo zpomalit uvolňování léčiva v potřebném časovém horizontu buď přirozeně, nebo reakcí na vnější podnět.

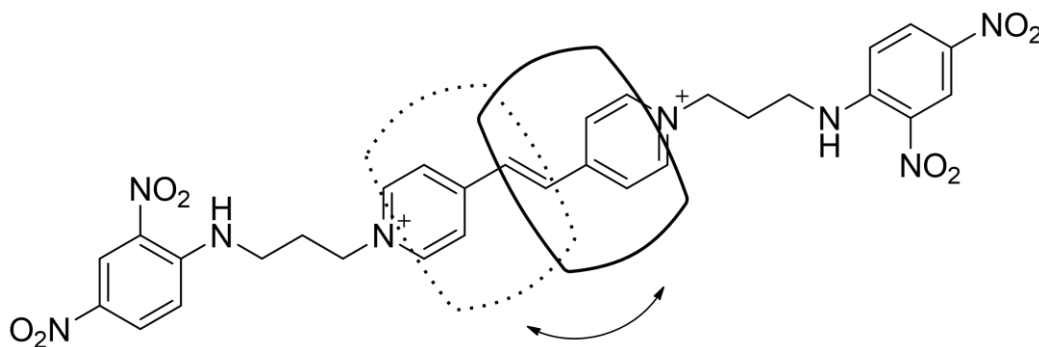
V roce 2006 se povedlo vytvořit unikátní ternární komplex (**Obrázek 18**) s asociační konstantou $2,2 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$ v roztoku sodné soli. Jako hostitelské molekuly byly použity CB6

s přirozeně se vyskytujícími CD (α -, β - a γ -CD). Hostem použitým v této studii byl dihexylamonium (DHA),¹⁰⁷ jenž silně interaguje s CB6 za vzniku hostitel–host komplexu ve stechiometrickém poměru 1:1. Jakmile se k binárnímu komplexu CB6–DHA přidal β -CD, došlo k vytvoření stabilního ternárního komplexu se stechiometrií 1:1:1, zatímco samotný β -CD s hexylamoniem tvoří slabý komplex s $K_a = 6,5 \cdot 10^1 \text{ M}^{-1}$. Tato studie ukazuje, že přidáním CB6 se významně zvýšila vazebná afinita β -CD k hexylamoniovému řetězci. Vzniklý ternární komplex je stabilizován pomocí laterárních interakcí mezi oběma makrocikly prostřednictvím vodíkových vazeb mezi hydroxyly CD a karbonyly CBn. Tento princip pozitivní kooperace byl do té doby známý v souvislosti s koordinací kovových iontů.¹⁰⁸



Obrázek 18 Ternární komplex DHA s CB6 a β -CD.

Publikace z roku 2011 pojednává o vzniku velmi zajímavého komplexu mezi CB6 a bispyridinium ethylenem nebo také 4,4'-diazastilbendium ethylenem sloužícímu ke konstrukci rotaxanu.¹⁰⁹ Již dříve byla publikována studie, která se zabývala komplexací CB6 s dimethylviologinem,¹¹⁰ ale vzhledem k malé velikosti hostitele se do dutiny inkludovalo pouze jedno aromatické jádro ligandu. CB6 s ligandem *N,N'*-dimethyldipyridyliumethylenem v roztoku NaCl, vytvořil stabilní inkluzní komplex se stechiometrií 1:1 s $K_a = 2,1 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$. Tento komplex byl autory použit na přípravu rotaxanu (**Obrázek 19**). Připravený rotaxan byl analyzován pomocí 1D a 2D NMR. Tyto experimenty odhalily, že hostitel vykazuje specifické chování tzv. kyvadla, tím že se pohybuje mezi dvěma stejnými částmi ligandu, což je znázorněno na **Obrázku 19**.



Obrázek 19 Struktura připraveného rotaxanu a znázornění kyvadlového chování CB6.

Dále bylo nezbytné objasnit vliv vodíkových vazeb pocházejících z molekuly vody, jakožto rozpouštědla, na stabilitu supramolekulárního systému. A proto byla provedena korelační studie, kde se autoři zabývali zkoumáním interakcí CB6 s různými α,ω -alkyldiamonnými hosty, jako je hexamethyldiamin. Experimenty probíhaly ve vodném roztoku kyseliny mravenčí a následně v plynné fázi.¹¹¹ Chování komplexů bylo monitorováno pomocí ITC, NMR a ESI-MS. Studie ukázala, že korelace mezi jednotlivými fázemi existuje, ale liší se výsledná stabilita komplexu. Za rozdílnou stabilitu je zřejmě zodpovědný výskyt vodíkových vazeb, jejichž poskytovatelem je hlavně voda. V případě plynné fáze dochází ke strukturní deformaci hosta, za což jsou zodpovědné převažující iont–dipolové interakce a chybějící vodíkové vazby.

Aktuálnější publikace pak popisuje syntézu nového ligandu, který je opatřen spiroheptanovým centrálním motivem a zkoumáním jeho vazebného chování s CB6 v roztoku NaCl.¹¹² Hlavním úkolem tohoto výzkumu bylo najít nový vazebný motiv pro CB6, který bude poskytovat více vazebných míst pro hostující molekuly. A tak byly připraveny dosud nepopsané ligandy, konkrétně bisimidazoliová sůl a diamoniová sůl na bázi spiro[3.3]heptanu, kde první z nich tvořila s CB6, komplex s hodnotou K_a $1,4 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$ a systém s diamoniovou solí vykazovala hodnotu K_a $4,0 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$. Kinetická studie odhalila, že u systému s bisimidazoliovou solí se rovnováha ustálila až za několik hodin, zatímco u komplexu s diamoniovou solí došlo k ustanovení rovnováhy již za několik sekund.

II. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4 POUŽITÉ PŘÍSTROJE

Měření spekter **nukleární magnetické resonance** (NMR) byla prováděna na přístroji JEOL JNM-ECZ 400R/S3, pracujícím na frekvenci 399,78 MHz (^1H) a 100,53 MHz (^{13}C). Hodnoty chemického posunu (δ) v ^1H a ^{13}C NMR spektrech jsou uváděny v jednotkách ppm. Ve výpisech spekter jsou použity zkratky pro multiplicitu signálů: s (singlet), t (triplet) a m (multiplet). Jako interní standardy pro ^1H měření byla použita rozpouštědla: $\delta(\text{CHCl}_3) = 7,27$ ppm; $\delta(\text{D}_2\text{O}) = 4,75$ ppm; $\delta(\text{DMSO-}d_5) = 2,50$ ppm a $\delta(\text{CHD}_2\text{CN}) = 1,94$ ppm. Pro měření ^{13}C spekter: $\delta(\text{CDCl}_3) = 77,00$ ppm.

K měření **isotermální titrační mikrokolorimetrie** (ITC) byl využit přístroj VP-ITC, firmy MicroCal. Součástí mikrokolorimetru je automatická $0,295\text{ cm}^3$ mikropipeta. Dalšími částmi jsou referenční (srovnávací) a reakční (měřicí) cely ve tvaru mince o objemu $1,4438\text{ cm}^3$. Teplota obou cel byla po celou dobu experimentu počítačově udržována na $30\text{ }^\circ\text{C}$. Experiment byl vyhodnocen v programu ORIGIN 7.0 s matematickým modelem („One set of Sites“) pro vyhodnocení interakční stechiometrie (n), vazebnou konstantu (K), enthalpii (ΔH) a entropii (ΔS). Vzorky byly před měřením odplyněny na přístroji ThermoVac od firmy MicroCal.

ESI-MS experimenty byly prováděny na hmotnostním spektrometru s iontovou pastí amaZon X (Bruker Daltonics) za použití elektrospreje jako iontového zdroje. Měření byla prováděna v pozitivním skenovacím módu. Do iontového zdroje byly vzorky přiváděny kovovou kapilárou při konstantním průtoku $3\text{ mm}^3\cdot\text{min}^{-1}$. Parametry měření samotných ligandů a komplexů hostitel–host byly odlišné, proto jsou uvedeny separátně. *Samotné ligandy*: koncentrace vzorku $0,5\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$, použité rozpouštědlo MeOH:H₂O 1:1 (v:v) nebo W (100 %), napětí na kapiláře $-4,2\text{ kV}$, napětí na konci kapiláry 140 V , teplota sušícího plynu $220\text{ }^\circ\text{C}$, průtok sušícího plynu $6\text{ dm}^3\cdot\text{min}^{-1}$ a tlak rozprašovacího plynu $55,16\text{ kPa}$. *Komplexy hostitel–host*: koncentrace hosta i hostitele $12,5\text{ }\mu\text{M}$, rozpouštědlo H₂O, napětí na kapiláře $-4,0\text{ kV}$, napětí na konci kapiláry 140 V , teplota sušícího plynu $300\text{ }^\circ\text{C}$, průtok sušícího plynu $6\text{ dm}^3\cdot\text{min}^{-1}$, tlak rozprašovacího plynu $206,84\text{ kPa}$. Jako sušící a rozprašovací plyn byl použit dusík. Tandemová hmotnostní spektra byla, po izolaci vybraného iontu, měřena za pomoci kolizní indukované disociace (CID), přičemž jako kolizní plyn bylo použito helium.

Rozpouštědla byla získána z komerčních zdrojů a byla používána bez dalších úprav.

5 SYNTÉZA JEDNOTLIVÝCH LÁTEK

Připravované sloučeniny v této práci jsou pojmenovány generickým, a nikoliv systematickým názvoslovím, jelikož by názvy sloučenin byly velice dlouhé a srozumitelnost textu by mohla být významně snížena. Připravované látky jsou rozděleny do dvou kategorií (strategie A a B), dle cest, kterými byly syntetizovány.

5.1 *N*-Boc-1,6-diaminohexan (1)

Do baňky o objemu 500 cm³ bylo naváženo přibližně 10 g (86,05 mmol) hexamethyldiaminu, který byl následně rozpuštěn ve 200 cm³ bezvodého CH₂Cl₂. Do vzniklého roztoku byl přiváděn inertní plyn (Ar). Mezitím byl nachystán roztok s chránicí skupinou. Do 50 cm³ baňky bylo pomocí Pasteurovy pipety přidáno 3,8 g (17,41 mmol) vytemperovaného di-*tert*-butyl dikarbonátu, který byl rozpuštěn ve 25 cm³ bezvodého CH₂Cl₂. Takto připravená směs byla přelita do prikápávací nálevky, která byla připojena na baňku s hexamethyldiaminem. Za chlazení v ledové lázni byl po dobu 5 hodin prikápáván di-*tert*-butyl dikarbonát v CH₂Cl₂. Směs byla poté opatřena chlorkalciovým uzávěrem a míchána dalších 25 hodin při laboratorní teplotě. Po ukončení reakce byla reakční směs s CH₂Cl₂ promyta 4×150 cm³ destilované vody. Celá organická fáze byla sušena nad Na₂SO₄ do dalšího dne, a poté byl CH₂Cl₂ odpařen na vakuové rotační odparce (RVO). Titulní látky bylo získáno 3,62 g (výtěžek 95 %) v podobě nahnědlé olejovité kapaliny.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, 303 K): δ 4,55 (s, 1H); 3,10 (m, 2H); 2,67 (t, 2H, *J* = 13,76 Hz); 1,49–1,43 (m, 13H); 1,33–1,26 (m, 4H) ppm.

5.2 Strategie A

5.2.1 Dichlorid kyseliny jantarové (2)

Kyselina jantarová se vyskytuje ve formě hrubých krystalů, které bylo nutné před samotným navážením rozetřít ve třecí misce na jemný prášek z důvodu snadnějšího rozpuštění výchozí látky. Do baňky o objemu 50 cm³ bylo naváženo 1,2 g (10,16 mmol) kyseliny jantarové. K navážce kyseliny bylo přidáno pomocí pipety 10 cm³ (137,85 mmol) SOCl₂. Reakční směs byla refluxována při teplotě 80 °C v olejové lázni po dobu 6 hodin do úplného rozpuštění výchozí kyseliny. Během prvních 20 minut byl do reakce přiváděn argon, a poté byl připojen chlorkalciový uzávěr. Po oddestilování přebytečného SOCl₂

vznikl bílý prášek, který byl identifikován jako anhydrid kyseliny jantarové (hmotnost 0,97 g a výtěžek 95 %).

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , 303 K): δ 3,01 (s, 4H) ppm.

$^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CDCl_3 , 303 K): δ 170,6; 28,3 ppm.

Reakce byla optimalizována přidáním katalyzátoru DMF. Do baňky ke směsi 11 g (93,15 mmol) rozdrcené kyseliny jantarové a 50 cm^3 (689,25 mmol) SOCl_2 byly pomocí Pasteurovy pipety přidány tři kapky dimethylformamidu (DMF). Oproti předchozí reakci bylo už ze začátku zpozorováno okamžité rozpuštění kyseliny jantarové. Vznikla směs černé tuhé látky v kapalině. Požadovaný produkt byl získán vakuovou destilací (při tlaku 8 torru a bodě varu 78 °C) ve formě nažloutlé kapaliny v izolovaném výtěžku 35 % (5,07 g).

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , 303 K): δ 3,27 (s, 4H) ppm.

$^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CDCl_3 , 303 K): δ 171,9; 41,5 ppm.

5.2.2 *N,N'*-[bis(*N''*-Boc-6-aminohexan-1-yl)]butandiamid (3)

Do 50 cm^3 baňky s kulatým dnem bylo naváženo 100 mg (0,46 mmol) ochráněného diaminohexanu **1**. Baňka byla opatřena septem a propláchnuta inertním plynem (Ar). Následně bylo přes septum, pomocí injekční stříkačky, přidáno 10 cm^3 bezvodého CH_2Cl_2 a 0,09 cm^3 (0,65 mmol) Et_3N . Do další baňky bylo přidáno 32,62 mg (0,21 mmol) dichloridu kyseliny jantarové a 2 cm^3 CH_2Cl_2 . Roztok dichloridu **2** byl pomocí injekční stříkačky, po dobu 30 minut za chlazení (led, voda a NaCl), postupně vpravován ke směsi chráněného hexamethylendiaminu **1** s Et_3N v CH_2Cl_2 . Reakce probíhala pod argonem. Po dokapání dichloridu kyseliny jantarové bylo odstaveno chlazení a dalších 25 hodin byla reakce míchána při laboratorní teplotě. Reakční směs v CH_2Cl_2 byla po ukončení reakce promyta 3×5 cm^3 10% NaHCO_3 , a nakonec ještě 1×4 cm^3 nasyceným roztokem NaCl. Organická fáze byla sušena nad Na_2SO_4 , a poté bylo rozpouštědlo odpařeno na RVO. Takto bylo získáno 48 mg (výtěžek 44 %) nažloutlé pevné látky, která byla identifikována jako *N,N'*-[bis(*N''*-Boc-6-aminohexan-1-yl)]butandiamid.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , 303 K): δ 6,11 (s, 2H); 4,57 (s, 2H); 3,23 (q, $J = 19,48$ Hz, 4H); 3,11 (m, 4H); 2,51 (s, 4H); 1,54–1,45 (m, 26H); 1,34–1,27 (m, 8H) ppm.

5.2.3 *N,N'*-[bis(6-aminohexan-1-yl)]butandiamid (4)

Do baňky s 47,5 mg (0,09 mmol) ochráněného diamidu **3** bylo pomocí injekční stříkačky přidáno 1 cm³ bezvodého CH₂Cl₂ a 1 cm³ (13,46 mmol) CF₃COOH. Reakce probíhala v inertní atmosféře (Ar) při laboratorní teplotě po dobu 3 hodin za stálého míchání na magnetické míchačce. Z reakční směsi bylo následně odpařeno rozpouštědlo s CF₃COOH. Surový produkt reakce byl rozpuštěn v 10 cm³ EtOAc. K produktu v EtOAc bylo přidáno 10 cm³ 10 % NaOH, a poté byl samotný roztok NaOH promyt 3×7 cm³ EtOAc. Na závěr byly všechny organické podíly spojeny a promyty 1×5 cm³ nasyceným roztokem NaCl. Produkt v EtOAc byl sušen nad bezvodým Na₂SO₄. Rozpouštědlo bylo po jednom dni odpařeno a byla získána nahnědlá olejovitá látka.

Další pokus o ochránění byl proveden za pomoci AcCl v MeOH. 239 mg (0,46 mmol) ochráněného diamidu **3** bylo rozpuštěno v baňce o objemu 50 cm³ v 10 cm³ bezvodého MeOH. Baňka byla opatřena septem a propláchnuta Ar. V mezičase bylo do vedlejší 25 cm³ baňky automatickou pipetou přidáno 0,3 cm³ AcCl (4,20 mmol) a 10 cm³ MeOH. K rozpuštěnému produktu byl v průběhu 30 minut za chlazení ledovou lázní přikapáván injekční stříkačkou roztok, který po reakci AcCl s MeOH obsahoval HCl, MeOAc a MeOH. Poté bylo chlazení odstaveno a reakční směs byla míchána při laboratorní teplotě přibližně 4,5 hodiny. Následoval odpaření MeOH pomocí RVO. Po odpaření MeOH se v baňce nacházela žlutá mazlavá hmota, která byla rozpuštěna v 10 cm³ CH₂Cl₂. Roztok byl zalkalizován přidáním 5 cm³ 10% NaOH (kontrolováno pH papírky). Takto připravená směs byla před extrakcí míchána zhruba 30 minut při 0 °C. Anorganická část byla promyta celkem 3×7 cm³ CH₂Cl₂. Spojené organické podíly byly sušeny nad bezvodým Na₂SO₄. Po odpaření CH₂Cl₂ byla izolována nahnědlá olejovitá látka. Produkt byl bez dalšího čištění použit v dalším kroku.

5.2.4 *N,N'*-[bis(6-aminohexan-1-yl)]butan-1,4-diamin (5)

Do baňky vysušené argonem, bylo naváženo 60 mg (0,21 mmol) LiAlH₄. Baňka s LiAlH₄ byla ponořena do ledové lázně a proplachována proudem argonu přes septum. Do baňky bylo přidáno 10 cm³ destilovaného dimethoxyethanu (DME). Do jiné baňky bylo naváženo 50 mg (0,16 mmol) látky po ochránění, která byla rozpuštěna ve 2 cm³ DME. Následně byla směs odebrána pomocí injekční stříkačky a přes septum za chlazení (led, voda a NaCl) přidána k rozpuštěnému redukčnímu činidlu. Po přidání veškeré výchozí látky byla vyměněna ledová lázeň za olejovou a směs se nechala zahřívát při teplotě 85 °C. Po

uplynutí 7 hodin byla reakční směs zfiltrována na Büchnerově nálevce pomocí vakuové vývěvy. Pevný podíl byl promyt 5×2 cm³ DME a získaný filtrát byl odpařen na RVO. Odparek byl rozpuštěn v 10 cm³ CH₂Cl₂, roztok byl přelit do dělicí nálevky a bylo přidáno 5 cm³ 10% NaOH. Vodná fáze byla extrahována celkem 4×8 cm³ CH₂Cl₂. Spojené organické podíly byly sušeny bezvodým Na₂SO₄ a rozpouštědlo bylo odpařeno na RVO. Po odpaření CH₂Cl₂ vznikla nažloutlá mazlavá hmota.

5.2.5 *N,N'*-[bis(*N''*-Boc-6-aminohexan-1-yl)]butan-1,4-diamin (7)

Do baňky bylo naváženo 100 mg (0,19 mmol) ochráněného diamidu **3**, který byl rozpuštěn v 7 cm³ bezvodého *n*-PrOH. Do reakční směsi bylo přidáno 290 mg (12,61 mmol) sodíku, který byl nejdřív opláchnut v toluenu. Jelikož se sodík pomalu rozpouštěl, byl přidán ještě *n*-PrOH dle potřeby. Směs byla míchána při laboratorní teplotě 3 hodiny. Po skončení reakce byl *n*-PrOH odpařen na RVO. Poté byl produkt rozpuštěn v 5 cm³ CH₂Cl₂ a k roztoku bylo přidáno 5 cm³ destilované vody. Vodná fáze byla promyta ještě 2×5 cm³ CH₂Cl₂. Organické podíly byly spojeny a sušeny do druhého dne nad Na₂SO₄, a poté bylo rozpouštědlo odpařeno. Z reakce byl izolován produkt ve formě hnědého oleje.

Ve vyžíhané trojhrdlé baňce bylo v 10 cm³ destilovaného tetrahydrofuranu (THF) rozpuštěno 177 mg (0,34 mmol) sloučeniny **3**. Krajiní hrdla baňky byla uzavřena septem a skleněnou zátkou, na prostřední hrdlo byl připojen zpětný chladič. Do aparatury byl přiveden argon. Pomocí injekční stříkačky bylo za chlazení (led, voda a NaCl), do směsi přidáno 4,7 cm³ (49,11 mmol) komplexu BH₃·THF. Po přidání veškerého činidla byla ledová lázeň vyměněna za olejovou a směs byla zahřívána na teplotu 70 °C po dobu 18 hodin. Během reakce bylo nutné do reakční směsi přidat další dvě porce 4,7 cm³ komplexu BH₃·THF. THF byl odpařen na RVO, k surovému produktu bylo přidáno 10 cm³ CH₂Cl₂ spolu s 5 cm³ 10% NaHCO₃. Roztok NaHCO₃ byl následně promyt ještě 2×10 cm³ CH₂Cl₂ a při poslední extrakci byly spojené organické podíly promyty 10 cm³ 10% NaOH. Všechny CH₂Cl₂ podíly byly vysušeny nad Na₂SO₄, a poté následovalo odpaření CH₂Cl₂ na RVO. Nakonec byla získána nahnědlá olejovitá látka.

Do baňky o objemu 50 cm³, která byla řádně vysušena argonem, bylo naváženo 83 mg (2,18 mmol) LiAlH₄. Baňka byla přes septum napojena na inertní plyn (Ar) a důkladně chlazená směsí ledu, vody a NaCl. Pomocí stříkačky bylo přes septum vpraveno 10 cm³ bezvodého THF. 100 mg (0,19 mmol) ochráněného diamidu **3** bylo rozpuštěno v 5 cm³ THF a roztok byl injekční stříkačkou za chlazení opatrně přidáván k redukčnímu činidlu.

Poté bylo chlazení odstaveno a reakce se zahřívala při teplotě 70 °C po dobu 17 hodin. Během reakční doby bylo nutné ke směsi přidat dalších 50 mg (1,32 mmol) LiAlH₄. Po 17 hodinách byl produkt v THF promyt 3×5 cm³ 10% NaOH. Organická fáze byla poté sušena nad bezvodým Na₂SO₄ a rozpouštědlo bylo odpařeno pomocí RVO. Izolován byl produkt ve formě hnědého oleje.

5.3 Strategie B

5.3.1 *N,N'*-[bis(*N'*-Boc-6-aminohexan-1-yl)]butan-1,4-diamin (7)

Baňka o objemu 100 cm³ obsahovala 3,21 g (14,82 mmol) ochráněného diaminohexanu **1**, který byl rozpuštěn ve 35 cm³ destilovaného MeCN. K získanému roztoku bylo přidáno 0,89 cm³ 1,4-dibrombutanu (7,41 mmol) a 0,89 cm³ (6,35 mmol) Et₃N. Do reakce byl po dobu 20 minut přiváděn argon a po zbytek reakčního času byla reakce před vlhkostí chráněna chlorkalciovým uzávěrem. Reakce probíhala 16 hodin při teplotě 85 °C. Po ukončení reakce byl odpařen MeCN a surový produkt byl rozpuštěn ve 25 cm³ CH₂Cl₂, ke vzniklému roztoku bylo přidáno 15 cm³ 10% NaOH. Vodná fáze byla extrahována 3×20 cm³ CH₂Cl₂. Spojené organické podíly byly sušeny nad bezvodým Na₂SO₄. Průběh reakce byl monitorován tenkovrstvou chromatografií (TLC), přičemž byla použita destička, obsahující SiO₂, která byla vyvíjena v mobilní fázi MeOH:Et₃N v poměru 100:1 (v:v). Nahnědlá olejovitá látka izolovaná pomocí sloupcové chromatografie ve výtěžku 51 % (1,34 g) byla později identifikována jako *N*-(*N'*-Boc-6-aminohexan-1-yl)-4-brombutan-1-amin (**7a**).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, 303 K): δ 4,56 (s, 1H); 3,08 (m, 2H); 2,54 (m, 4H); 2,45 (m, 2H); 1,79 (m, 4H); 1,58–1,42 (m, 13H); 1,31 (m, 4H) ppm.

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃, 303 K): δ 156,0; 78,9, 56,4; 54,1; 40,5; 29, 9; 28,5; 28,4; 27,2; 26,6; 23,3 ppm.

5.3.2 *N,N'*-[bis(6-aminohexan-1-yl)]butan-1,4-diamin (5)

Výchozí ochráněná sloučenina **7** (405 mg; 0,83 mmol) byla rozpuštěna v 5 cm³ destilovaného CH₂Cl₂, ke kterému bylo napipetováno 5 cm³ CF₃COOH (67,31 mmol). Reakce probíhala v inertní atmosféře (Ar) po dobu 3 hodin. Po dokončení reakce byla přebytečná CF₃COOH oddestilována. Poté bylo k produktu přidáno 10 cm³ CH₂Cl₂ a 5 cm³ 10% NaOH. Roztok s NaOH byl promyt 3×10 cm³ CH₂Cl₂. Organické podíly byly spojeny a vysušeny nad Na₂SO₄.

Sloučenina **7** byla ochráněna také pomocí AcCl v MeOH. Do 100 cm³ baňky bylo odměřeno 10 cm³ bezvodého MeOH, který byl chlazen ledovou lázní asi 30 minut. Poté bylo k vychlazenému MeOH přidáno 0,89 cm³ AcCl (12,60 mmol). Směs byla za chlazení směsi ledu, vody a NaCl, míchána dalších 30 minut. Po uplynutí potřebné doby byla k roztoku, injekční stříkačkou postupně přidávána rozpuštěná navážka 409 mg (0,84 mmol) sloučeniny **7** v 10 cm³ bezvodého MeOH. Po přidání veškeré výchozí látky byla odstraněna ledová lázeň a vzniklý roztok byl míchán při laboratorní teplotě 4 hodiny. Z reakční směsi byl odpařen MeOH, produkt reakce byl rozpuštěn ve 25 cm³ CH₂Cl₂ a k roztoku bylo přidáno 15 cm³ 10% NaOH. Takto připravená směs byla míchána 30 minut při 30 °C. Vodná fáze byla promyta 3×20 cm³ CH₂Cl₂. Veškerý CH₂Cl₂ byl sušen nad Na₂SO₄. Průběh reakce byl monitorován pomocí TLC, přičemž v tomto případě byla použita destička z Al₂O₃ a jako mobilní fáze byla použita směs MeOH:Et₃N v poměru 100:1 (v:v). Byla izolována olejovitá látka ve výtěžku 84 % (245 mg), která byla posléze identifikována jako *N*-(6-aminohexan-1-yl)-4-brombutan-1-amin (**5a**).

¹H NMR (400 MHz, D₂O, 303 K): δ 2,67 (t, *J* = 13,76 Hz, 2H); 2,48 (m, 4H); 2,41 (m, 2H); 1,76 (m, 4H); 1,53–1,40 (m, 4H); m 1,33 (4H) ppm.

5.3.3 *N,N'*-[bis(6-aminohexan-1-yl)]butan-1,4-diamin tetrahydrochlorid (**6**)

Látka získaná podle předchozího postupu byla následně převedena na hydrochlorid. Navážka 360 mg byla v 50 cm³ baňce rozpuštěna ve 3 cm³ destilovaného Et₂O. Ke vzniklému roztoku byl pomocí Pasteurovy pipety přidáván roztok HCl·Et₂O, do vzniku sraženiny. Poté byl roztok se sraženinou přemístěn do centrifugační zkumavky a suspenze se sraženinou byla odstředěna při 1000 ot·min⁻¹. Následně byl Pasteurovou pipetou odebrán roztok Et₂O nad sraženinou a opět byl přidán čistý Et₂O. Sraženina byla promyta celkem 5×. Dále byla sraženina společně s čistým Et₂O převedena ze zkumavky do 50 cm³ baňky a rozpouštědlo bylo odpařeno na RVO. Takto bylo získáno 207 mg (44 %) hydrochloridu ve formě nahnědlé lepkavé hmoty. Tato látka byla posléze identifikována jako *N*-(6-aminohexan-1-yl)-4-brombutan-1-aminu dihydrochlorid (**6a**).

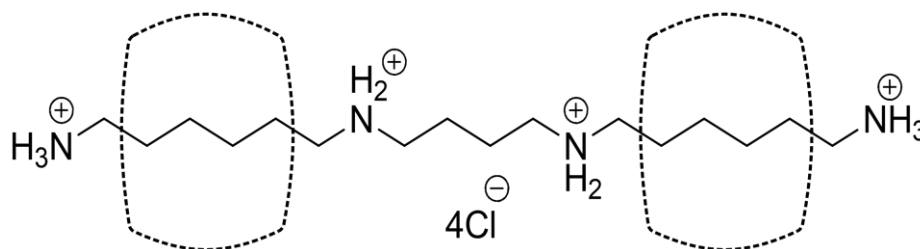
¹H NMR (400 MHz, D₂O, 303 K): δ 3,08 (m, 4H); 2,94 (m, 2H); 2,92 (t, *J* = 14,88 Hz, 2H); 1,92 (m, 4H); 1,63–1,51 (m, 4H); 1,33 (m, 4H) ppm.

¹³C NMR (101 MHz, D₂O, 303 K): δ 55,2; 53,9; 39,8; 28,2; 25,9; 25,7; 25,4; 22,8 ppm.

III. VÝSLEDKY A DISKUZE

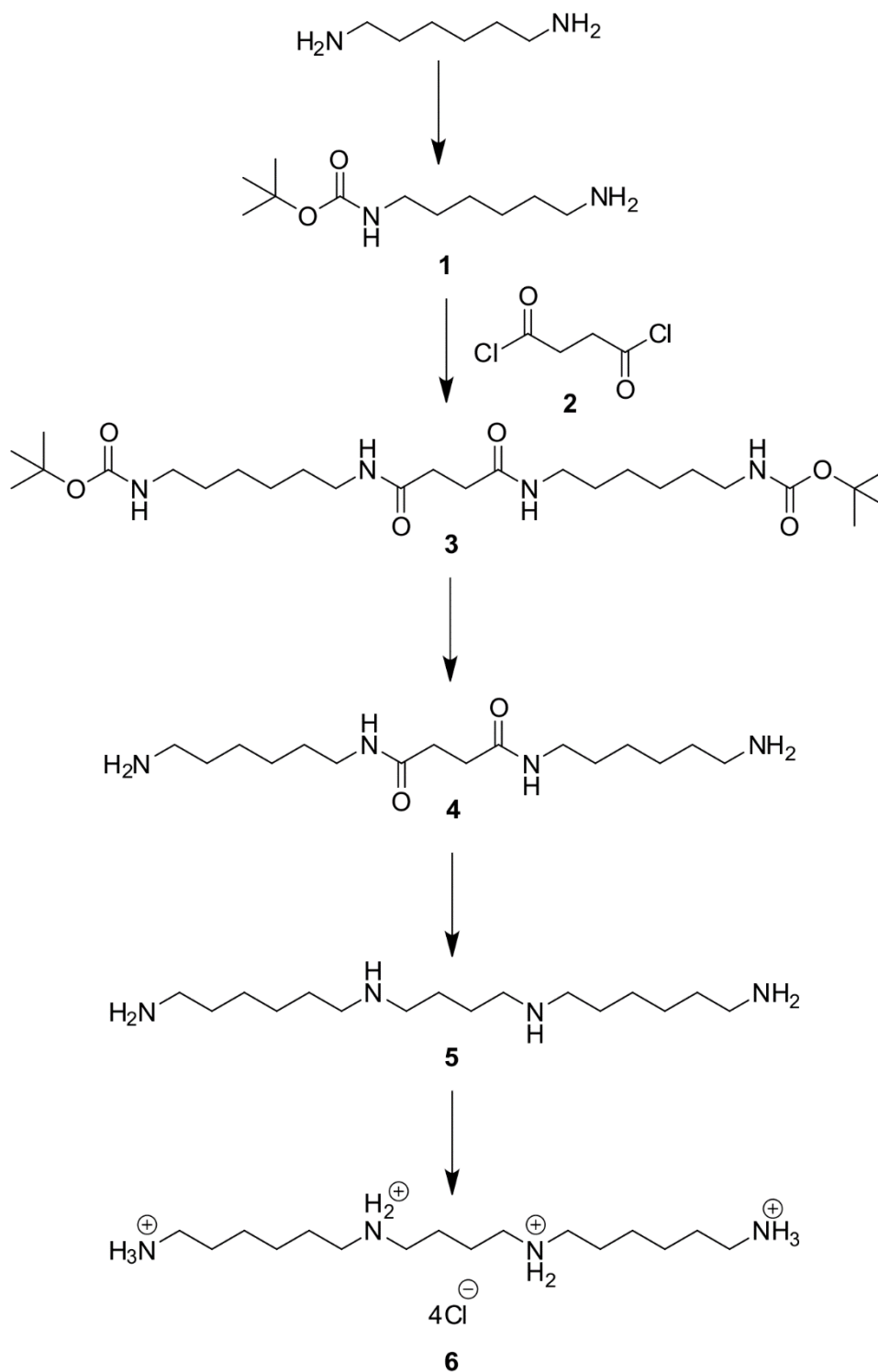
6 DISKUZE

Tématem této diplomové práce je syntéza 1,8,13,20-tetraazaikosanu, nebo také *N,N'*-[bis(6-aminohexan-1-yl)]butan-1,4-diaminu a následné sledování jeho supramolekulárních vlastností s makrocyclickými sloučeninami, a to zejména s CB6. Syntetizovaný ligand, který disponuje dvěma hexamethyldiaminovými vazebnými místy, zahajuje novou studii v rámci výzkumné skupiny doc. Roberta Vichy. Základní otázka, kterou je třeba vyřešit, spočívá v nejistotě, zda oddělení hexamethylenových míst tetramethylenovou spojkou je dostatečné na to, aby ligand mohl vytvořit komplex s CB6 v poměru 2:1 (**Obrázek 20**). Pokud se tento předpoklad potvrdí, bude titulní ligand následně prodlužován o další alifatické řetězce s aminoskupinami, což povede k vytvoření molekuly s více vazebnými místy. Výsledný komplex by mohl najít uplatnění při mechanicky řízeném transmembránovém přenosu chemického signálu, který v přírodě zajišťují některé transmembránové proteiny. Doposud nebyla publikována žádná práce, která by popisovala řízení přenosu chemického signálu přes membránu pomocí syntetických transmembránových struktur.

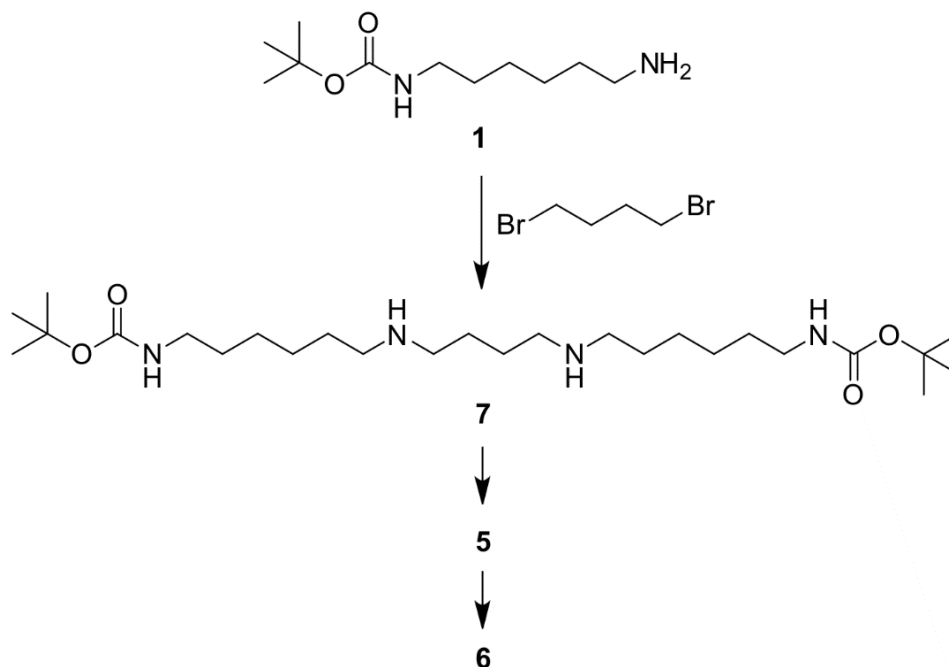


Obrázek 20 Předpokládaný komplex 2:1 CB6 s připravovaným ligandem.

Návrh původní syntézy cílového ligandu je znázorněn na **Obrázku 21**. Ovšem tento způsob přípravy pravděpodobně fungoval pouze do syntézy sloučeniny **3**. Sloučeninu **4** se již připravit nepodařilo. Proto bylo rozhodnuto vyzkoušet redukcí oxo skupiny již na sloučenině **3**, ovšem i tento pokus byl neúspěšný. To vedlo k navržení alternativního syntetického postupu potenciálně vedoucího k získání titulního ligandu (**Obrázek 22**). Nová syntetická strategie je na rozdíl od původně navrhovaného postupu (**Obrázek 21**) časově méně náročná, a navíc neobsahuje problémovou redukcí amidu. Ovšem nová syntetická strategie s sebou přinesla i nové překážky. Jednalo se především o výskyt vysokého přebytku výchozí látky, který znesnadňoval izolaci a identifikaci produktů v průběhu syntéz. Postupně bylo vyzkoušeno několik možných způsobů, a úprav reakčních podmínek vedoucí k odstranění výchozí látky z produktu.



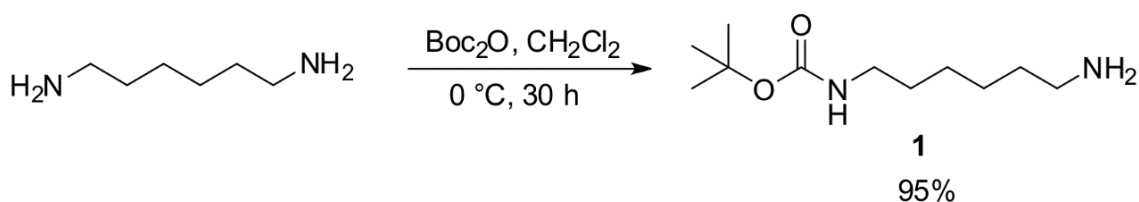
Obrázek 21 Obecné schéma syntetické strategie A.



Obrázek 22 Obecné schéma syntetické strategie B.

6.1 Ochránění 1,6-diaminohexanu

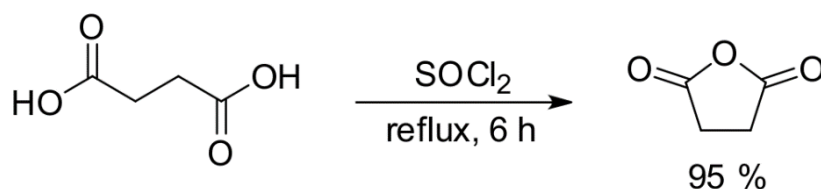
Monochráněný hexamethyldiamin je společný prekurzor pro obě syntetické strategie. Nejdříve tedy bylo nutné provést ochránění jedné ze dvou primárních aminoskupin v molekule hexamethyldiaminu. Vzhledem k zamýšleným dalším transformacím byla zvolena chránící skupina Boc. Ochránění aminoskupiny bylo provedeno za použití di-*tert*-butyl dikarbonátu, který byl k roztoku diaminohexanu postupně přidáván po dobu 5 hodin za chlazení. Obě komponenty byly rozpuštěny v bezvodém CH_2Cl_2 a po uplynulých 5 hodinách bylo odstaveno chlazení a zbylých 25 hodin se směs ponechala míchat při laboratorní teplotě (Obrázek 23). Struktura byla ověřena pomocí ^1H NMR spektra (Příloha 1) a výtěžek této reakce byl 95 %. Tato syntéza již byla popsána v literatuře,¹¹³ kde se autorům podařilo připravit *N*-Boc-1,6-diaminohexan ve výtěžku 96 %. Což je obdobný výsledek jako v našem případě.

Obrázek 23 Syntéza *N*-Boc-1,6-diaminohexanu.

6.2 Strategie A

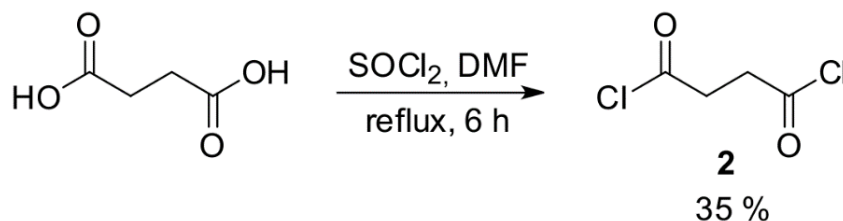
6.2.1 Chlorace kyseliny jantarové

Pro následnou kondenzaci ochráněného hexan-1,6-diaminu bylo nutné připravit dichlorid kyseliny jantarové reakcí kyseliny jantarové s SOCl_2 . Chloraci jsme provedli dvěma mírně odlišnými způsoby. Nejprve jsme postupovali dle literatury,¹¹⁴ a to rozpuštěním kyseliny jantarové v SOCl_2 . Vzniklá směs byla zahřívána na teplotu $80\text{ }^\circ\text{C}$ po dobu přibližně 6 hodin (**Obrázek 24**). Po dokončení reakce bylo nezbytné oddestilovat přebývající SOCl_2 . Po odstranění SOCl_2 vznikl produkt ve formě bílého prášku. Po vizuální kontrole a změřených ^1H a ^{13}C NMR spekter (**Příloha 2 a 3**) bylo zjištěno, že s největší pravděpodobností vznikl anhydrid kyseliny jantarové, jehož struktura je znázorněná na **Obrázku 24** a nikoliv požadovaná sloučenina **2**.



Obrázek 24 Neúspěšný pokus o přípravu dichloridu kyseliny jantarové.

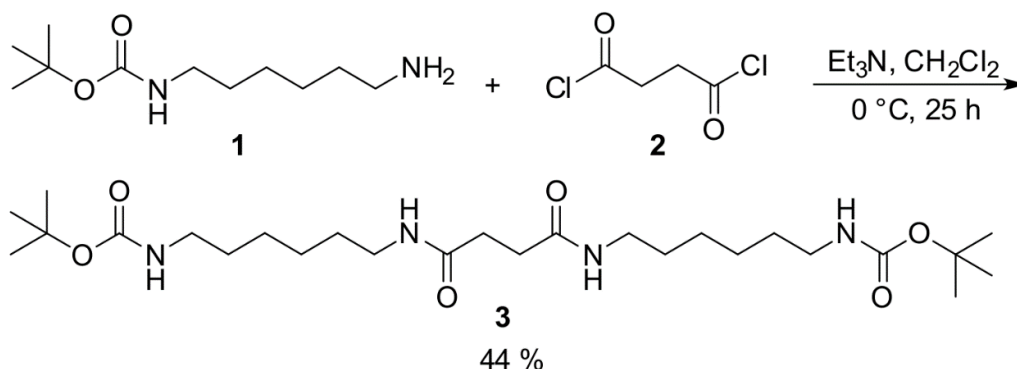
Proto bylo nezbytné reakci optimalizovat, a z tohoto důvodu byl přidán katalyzátor DMF, který je hojně využíván také jako rozpouštědlo. Nejdříve jsme několik minut refluxovali směs obsahující SOCl_2 a DMF, a poté byla přidána kyselina jantarová. Syntéza dichloridu kyseliny jantarové dále probíhala již za stejných podmínek, jako v prvním případě tzn. reflux 6 hodin (**Obrázek 25**). Přítomnost DMF vedla ke vzniku směsi černé tuhé látky v kapalině, a proto bylo nutné produkt oddestilovat za sníženého tlaku. Po sestavení destilační aparatury byla provedena zkouška její těsnosti. Tlak při samotné destilaci byl nastaven na 8 torr. Destilace trvala dvě hodiny a celkem byly jímány dvě frakce. První frakce byla sbíraná již od $30\text{ }^\circ\text{C}$ do $75\text{ }^\circ\text{C}$ při vakuu, zde se nejspíše oddestiloval zbytek SOCl_2 . Od $75\text{ }^\circ\text{C}$ byla jímána druhá frakce, kde se nacházel požadovaný produkt reakce, což bylo potvrzeno ^1H a ^{13}C spektry (**Příloha 4 a 5**). Izolovaný výtěžek požadovaného dichloridu **2** v podobě nažloutlé kapaliny byl 35 %.



Obrázek 25 Chlorace kyseliny jantarové.

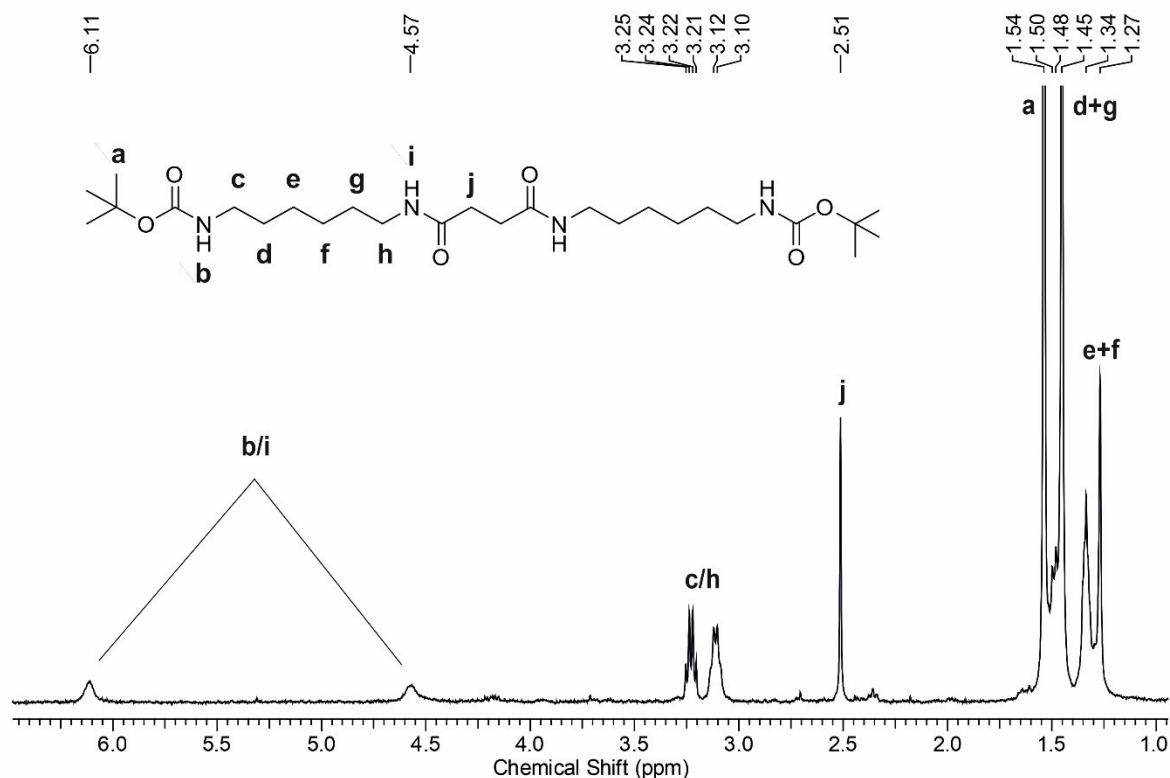
6.2.2 Kondenzace *N*-Boc-1,6-diaminohexanu (1)

K ochráněnému diaminohexanu, který byl rozpuštěn v bezvodém CH_2Cl_2 byl během 30 minut za chlazení přidáván roztok obsahující dichlorid kyseliny jantarové a bázi Et_3N v CH_2Cl_2 (Obrázek 26). Po smíchání všech komponent byla reakční směs míchána při laboratorní teplotě.



Obrázek 26 Příprava ochráněného diamidu 3 pomocí kondenzace.

Struktura produktu kondenzace byla ověřena pomocí ^1H NMR spektra (Obrázek 27). Následně byly přiřazeny signály vzniklého diamidu. První dva singlety s chemickým posunem 6,11 a 4,57 ppm budou pravděpodobně patřit atomům vodíku navázaným na amidový a karbamátový dusíkový atom. Následující signály, konkrétně kvartet ($\delta = 3,23$ ppm) a multiplet ($\delta = 3,11$ ppm) náleží methylenovým skupinám nacházejícím se nejbližší atomům dusíku. Singlet s chemickým posunem 2,51 ppm patří vodíkovým atomům z centrálního čtyřuhlíkatého řetězce. Kromě již zmíněných signálů se v alifatické oblasti nachází také signály atomů vodíku z methylových skupin patřící chránící skupině a atomy vodíků z methylenových skupin vyskytujících se ve středu šestiuhlíkatého alifatického řetězce.



Obrázek 27 ¹H NMR spektrum ochráněného diamidu **3** (CDCl₃, 303 K).

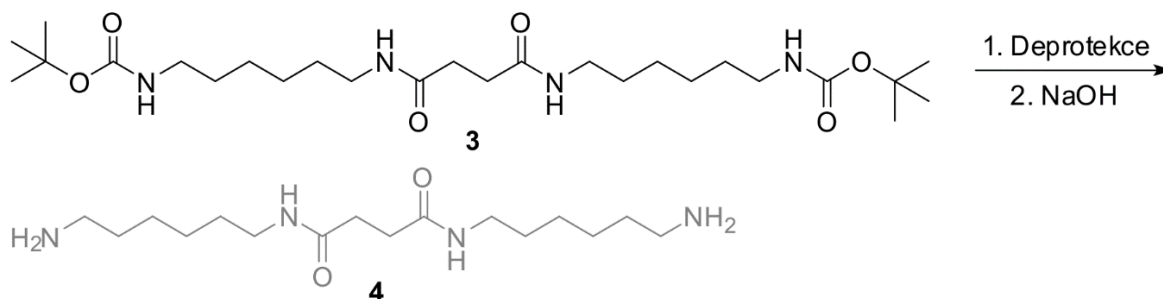
6.2.3 Odchránění *N*,*N'*-[bis(*N*''-Boc-6-aminohexan-1-yl)]butandiamidu (**3**)

V dalším kroku bylo nutné odchránit vzniklý produkt kondenzace **3** (**Obrázek 28**). Odstranění *tert*-butylkarbamátu, lze obecně provést v kyselém prostředí. V této práci bylo vyzkoušeno odstranění chránící skupiny pomocí CF₃COOH v CH₂Cl₂ nebo pomocí HCl *in situ* generované reakcí AcCl s MeOH.

Nejdříve byla reakce uskutečněna s CF₃COOH v CH₂Cl₂, a to tak že se směs nechala míchat při laboratorní teplotě po dobu 3 hodin. V ¹H NMR však byly stále přítomny signály methylových skupin patřící chránící skupině. Z tohoto důvodu byl vyzkoušen další způsob odchránění a to reakcí s HCl v MeOH. Roztok, který již obsahoval HCl, MeOAc a MeOH, byl po dobu 30 minut při 0 °C přidávan ke sloučenině **3** v MeOH. Při této reakci vzniká produkt ve formě hydrochloridu a je tedy nutné výsledný produkt převést na volnou bázi. Po odpaření MeOH, MeOAc a případného HCl na RVO byl k alkalizaci použit 10% NaOH. V tomto případě již v ¹H NMR spektru nebyly signály z *tert*-butylkarbamátu pozorovány. Kromě toho ale také nebyly nalezeny všechny signály požadované sloučeniny. Je možné, ačkoliv při teplotě kolem 0 °C málo pravděpodobné, že během extrakce došlo k hydrolyze. Podmínky obou typu reakcí jsou znázorněny v **Tabulce 4**.

Tabulka 4 Podmínky reakcí k odstranění Boc chránící skupiny.

Činidlo	Rozpouštědlo	Reakční podmínky
CF ₃ COOH	CH ₂ Cl ₂	laboratorní teplota, 3 h
AcCl	MeOH	0 °C, 5 h

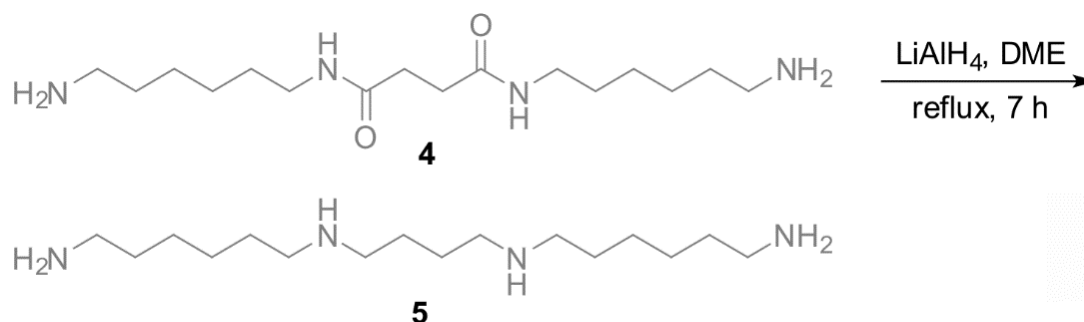


Obrázek 28 Neúspěšný pokus o odchránění diamidu 3.

6.2.4 Redukce *N,N'*-[bis(6-aminohexan-1-yl)]butan-1,4-diaminu (4)

I přesto, že po odchránění sloučeniny **3** (reakcí s HCl v MeOH) požadovaná látka **4** nevznikla, rozhodli jsme se neznámý produkt podrobit redukcí. Jako redukční činidlo byl použit vysoce reaktivní LiAlH₄, který je používán k redukcí různých funkčních skupin, jako například karbonylové sloučeniny, mezi které patří amidy či karboxylové kyseliny.

Při použití LiAlH₄ je poněkud omezen výběr rozpouštědla na aprotická, relativně málo polární, jako je Et₂O nebo THF. Ovšem produkt předchozí reakce nebyl ve zmíněných rozpouštědlech rozpustný. Proto bylo nutné použít DME. Po smíchání všech komponent byla reakční směs zahřívána přibližně 7 hodin (**Obrázek 29**). Očekávaný produkt 1,8,13,20-tetraazaikosan dle ¹H NMR spektra nevznikl.



Obrázek 29 Nezdařená redukce produktu odchránění.

6.2.5 Redukce *N,N'*-[bis(*N''*-Boc-6-aminohexan-1-yl)]butandiamidu

Kvůli problémům s ochráněním jsme se rozhodli obrátit pořadí redukce a odstranění chránící skupiny a provést redukci rovnou na sloučenině **3** (Obrázek 30) za použití tří různých redukčních činidel za odlišných podmínek (Tabulka 5).

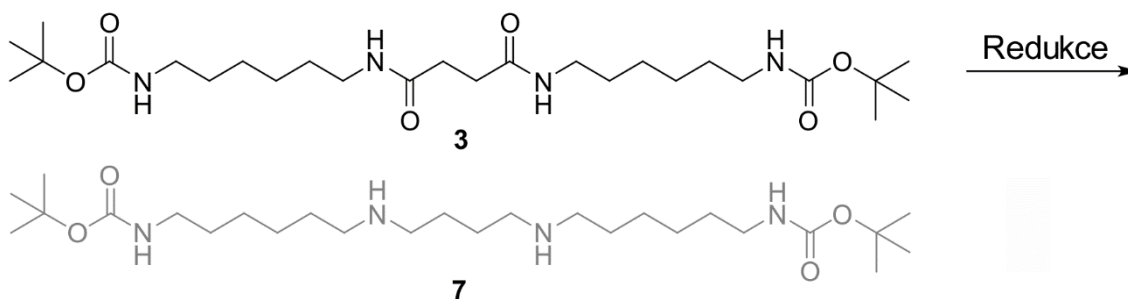
Tabulka 5 Reakční podmínky jednotlivých redukcí.

Činidlo	Rozpouštědlo	Reakční podmínky
Na	<i>n</i> -PrOH	laboratorní teplota, 3 h
BH ₃ ·THF	THF	reflux, 18 h
LiAlH ₄	THF	reflux, 17 h

První redukce probíhala po smíchání sloučeniny **3** s Na v *n*-PrOH, při laboratorní teplotě téměř 4 hodiny. Z ¹H NMR spektra bylo patrné, že reakce vůbec neproběhla.

Další pokus o redukci se uskutečnil přidáním komplexu BH₃·THF k sloučenině **3** v THF. Směs byla zahřívána pod zpětným chladičem okolo 17 hodin a průběh reakce byl monitorován pomocí ¹H NMR a TLC. V ¹H NMR spektru se objevila nová sada signálů, která by mohla náležet nově vzniklým methylenovým skupinám po redukci oxoskupiny. Ale reakce probíhala velmi pomalu a spotřeba redukčního činidla byla velmi vysoká, proto bylo rozhodnuto, že se redukce ukončí a provede se jiným způsobem.

Nakonec byl opět vyzkoušen LiAlH₄ i pro sloučeninu **3** v THF, ale ani tato redukce nebyla úspěšná. V této fázi již docházely možnosti redukcí, a proto nezbývalo nic jiného než syntetickou cestu k výslednému ligandu upravit. A tak byla naplánována nová cesta syntézy.

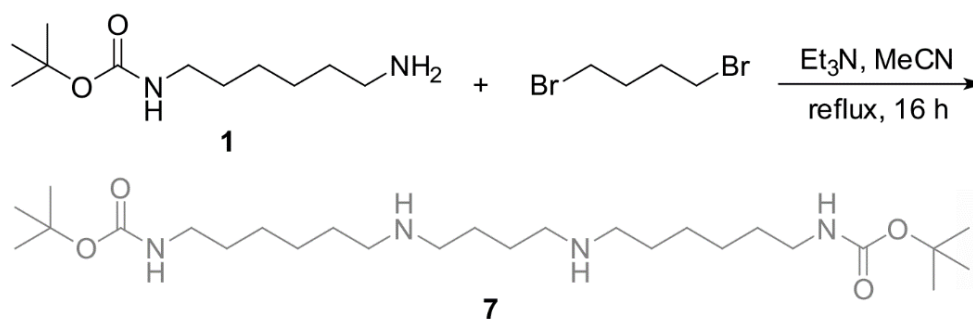


Obrázek 30 Nezdařené redukce ochráněného diamidu **3**.

6.3 Strategie B

6.3.1 Nukleofilní substituce *N*-Boc-hexan-1,6-diaminu

Nukleofilní substituce (S_N) je již součástí nového syntetického plánu, vedoucímu k získání titulu ligandu. Po rozpuštění sloučeniny **1** v bezvodém MeCN byl k roztoku přidán dibrombutan a reakční směs byla refluxována po dobu 16 hodin (**Obrázek 31**). Průběh reakce byl sledován pomocí ^1H NMR a TLC. Z důvodu výskytu celkem dvou aminoskupin ve struktuře sloučeniny **7**, bylo nutné přidat minimálně 2 ekvivalenty výchozí látky (**1**). A protože výchozí látka sloužila také jako báze, bylo potřeba použít další dva ekvivalenty sloučeniny **1**. Jednotlivé ekvivalenty výchozích látek S_N byly několikrát upraveny, jelikož se v ^1H spektrech nacházel produkt ve směsi s výchozím ochráněným diaminohexanem (**1**).



Obrázek 31 Neúspěšná příprava sloučeniny **7** pomocí nukleofilní substituce.

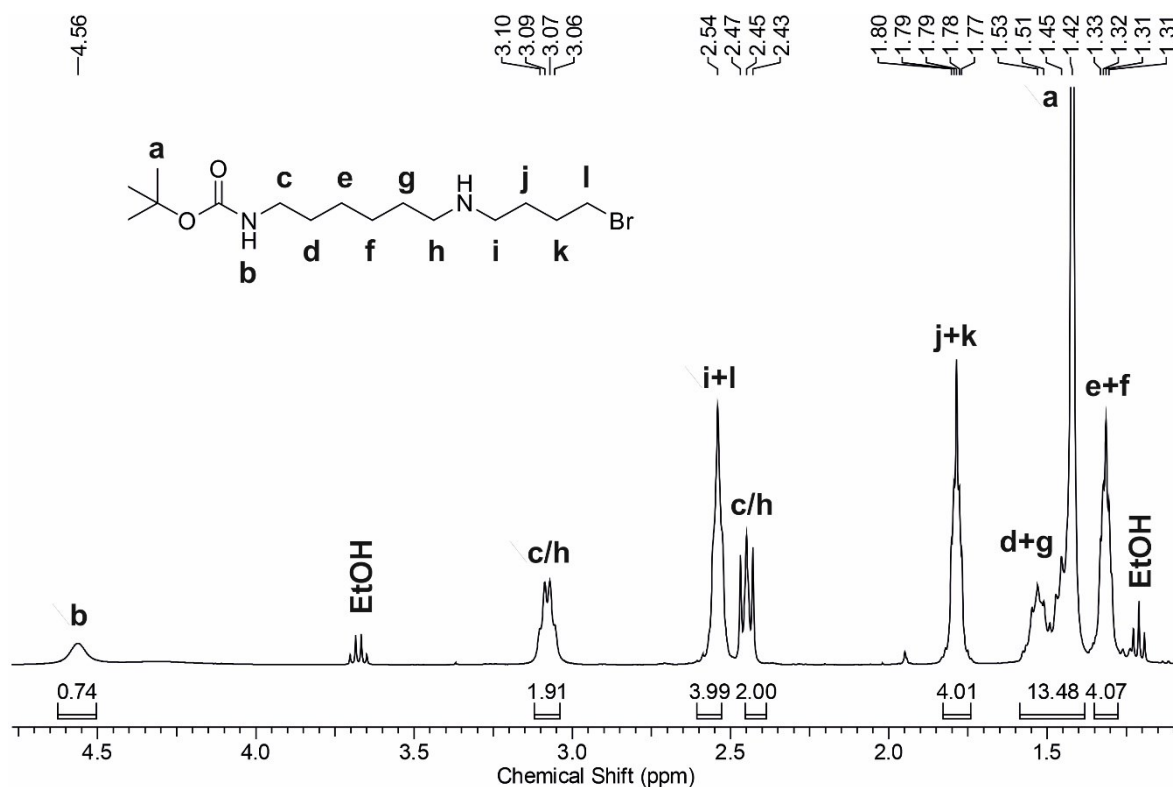
V prvních pokusech byla S_N reakce provedena v desetinásobném molárním přebytku výchozího *N*-Boc-1,6-diaminohexanu vůči 1,4-dibrombutanu. Nicméně v ^1H NMR spektru S_N produktu (**Příloha 6**) byl patrný vysoký obsah výchozí látky **1** vůči sloučenině **7**.

Za účelem snížení množství výchozí látky **1** byl v reakci molární poměr *N*-Boc-1,6-diaminohexanu (**1**) vůči 1,4-dibrombutanu snížen na 5:1. Množství sloučeniny **1** se snížit ve směsi podařilo, ale pořád byl její obsah vysoký (**Příloha 7**).

Po uvážení předešlých zkušeností byla S_N provedena v minimálním možném poměru 2:1, ale to znamenalo, že již nebylo přítomno dostatečné množství sloučeniny **1**, aby mohla vystupovat zároveň jako báze. Jako báze byl tedy do reakční směsi přidán Et_3N (**Obrázek 31**), který byl vybrán díky kladným zkušenostem z předešlých reakcí. Ovšem i v tomto případě se produkt reakce nacházel stále ve směsi s výchozí látkou **1** (**Příloha 8**), ale

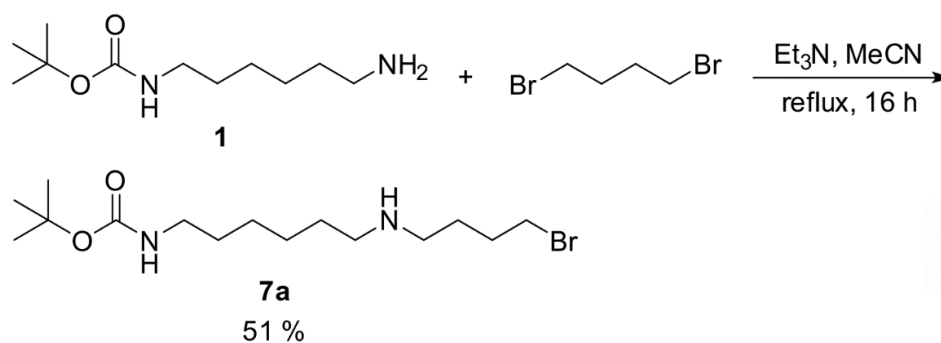
poměr výchozí látky k produktu reakce byl již mnohem menší. Ovšem i přesto bylo nutné sloučeninu **1** od sloučeniny **7** oddělit.

Proto byla hledána vhodná mobilní fáze, ve které by se produkt S_N oddělil od výchozí látky. Byla vyzkoušena směs EtOH s EtOAc v poměru 2:1 (v:v) s přidavkem 1 % Et₃N, díky čemuž se směs při TLC analýze rozdělila. Průběh sloupcové chromatografie byl monitorován tenkovrstvou chromatografií, dle které se směs rozdělila na dvě samostatné látky. Ovšem i po odstranění výchozí látky od produktu reakce se v ¹H NMR spektru (**Obrázek 32**) vyskytoval větší počet signálů, než by odpovídalo symetrické sloučenině **7**. Tak bylo zjištěno že ¹H NMR spektrum na **Obrázku 32** přísluší *N*-(*N'*-Boc-6-aminohexan-1-yl)-4-brombutan-1-aminu (**7a**). Signál s nejvyšší hodnotou chemického posunu patří atomu vodíku na chráněném atomu dusíku (Boc—NH—). Signály s chemickým posunem 3,08 a 2,45 ppm náležejí vodíkovým atomům hexylového řetězce nejbližší aminoskupinám. Mezi těmito signály se nachází multiplet, který představuje některé signály butylového řetězce, konkrétně H_i a H_j. Signál s hodnotou chemického posunu 1,79 ppm, patří vodíkovým atomům methylenových skupin ze středu butylu. Zbývající signály v alifatické části, pak náležejí chránicí skupině (H_a) a vnitřní části hexylu. Struktura produktu **7a** izolovaného pomocí sloupcové chromatografie byla ověřena také změřením ¹³C NMR spektra (**Příloha 9**).



Obrázek 32 ^1H NMR spektrum produktu nukleofilní substituce (CDCl_3 , 303 K).

To tedy znamená, že S_{N} pravděpodobně proběhla pouze na jednom konci dibrombutanového prekursoru za vzniku látky **7a**, jak je naznačeno na **Obrázku 33**. Je tedy možné, že se v předchozích pokusech o provedení S_{N} , kde jsme původně vyhodnotili surový produkt jako sloučeninu **7** ve směsi s výchozím *N*-Boc-1,6-diaminohexanem (**1**) se ve skutečnosti jednalo o sloučeninu **7a** ve směsi s výchozí látkou **1**. Pro úspěšnou syntézu sloučeniny **7** bude v budoucnu nezbytné použít buď vyšší podíl *N*-Boc-1,6-diaminohexanu (**1**) oproti dibrombutanu, prodloužit reakční dobu, případně jinak zvýšit rychlost reakce (vyšší teplota, MW). Po přepočtu molárních hmotností byl zjištěn výtěžek látky **7a** po sloupcové chromatografii 51 %.



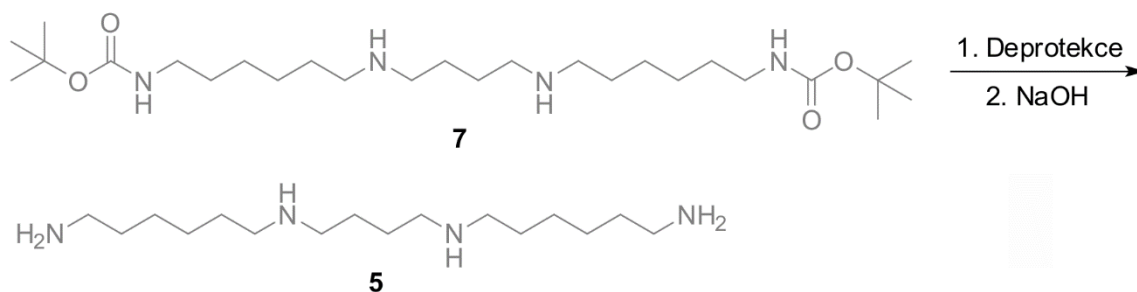
Obrázek 33 Pravděpodobně připravený produkt nukleofilní substituce **7a**.

6.3.2 Odchránění N,N' -[bis(N'' -Boc-6-aminohexan-1-yl)]butan-1,4-diaminu

Ještě předtím, než jsme zjistili že izolovaný produkt po S_N je pravděpodobně sloučenina **7a** bylo provedeno ochránění s předpokladem, že se jedná o sloučeninu **7** ve směsi s výchozí látkou **1**. Odchránění uvažované sloučeniny **7** bylo provedeno za stejných podmínek, jako je již dříve popsáno při pokusech o odchránění sloučeniny **3** (kapitola 6.2.3). Vyzkoušeli jsme dva postupy s CF_3COOH v CH_2Cl_2 a $AcCl$ v $MeOH$ (Obrázek 34) za podmínek v Tabulce 6. Přičemž v obou případech vznikl stejný produkt. Při odchránění většího množství uvažované látky **7** pomocí CF_3COOH v CH_2Cl_2 reakce neproběhla, jelikož v 1H NMR se i nadále vyskytoval signál chránící skupiny. Tudíž se stále jednalo o ochráněný produkt S_N . Kvůli tomuto nezdaru byla upřednostňována reakce s $AcCl$ v $MeOH$. Nejdříve byl vychlazen a probublán argonem samotný $MeOH$ a po 30 minutách byl k vychlazenému rozpouštědлу napipetován $AcCl$. Vzniklý roztok byl míchán dalších 30 minut, a poté byl ke směsi přidán produkt S_N , rozpuštěný v $MeOH$. Po smíchání všech komponent byla reakční směs míchána při laboratorní teplotě zhruba 4 hodiny (Tabulka 6). Po 5 hodinách byla reakce ukončena a opět byl výsledný hydrochlorid převeden na volnou bázi alkalizací 10% $NaOH$.

Tabulka 6 Podmínky reakcí k odstranění Boc chránící skupiny.

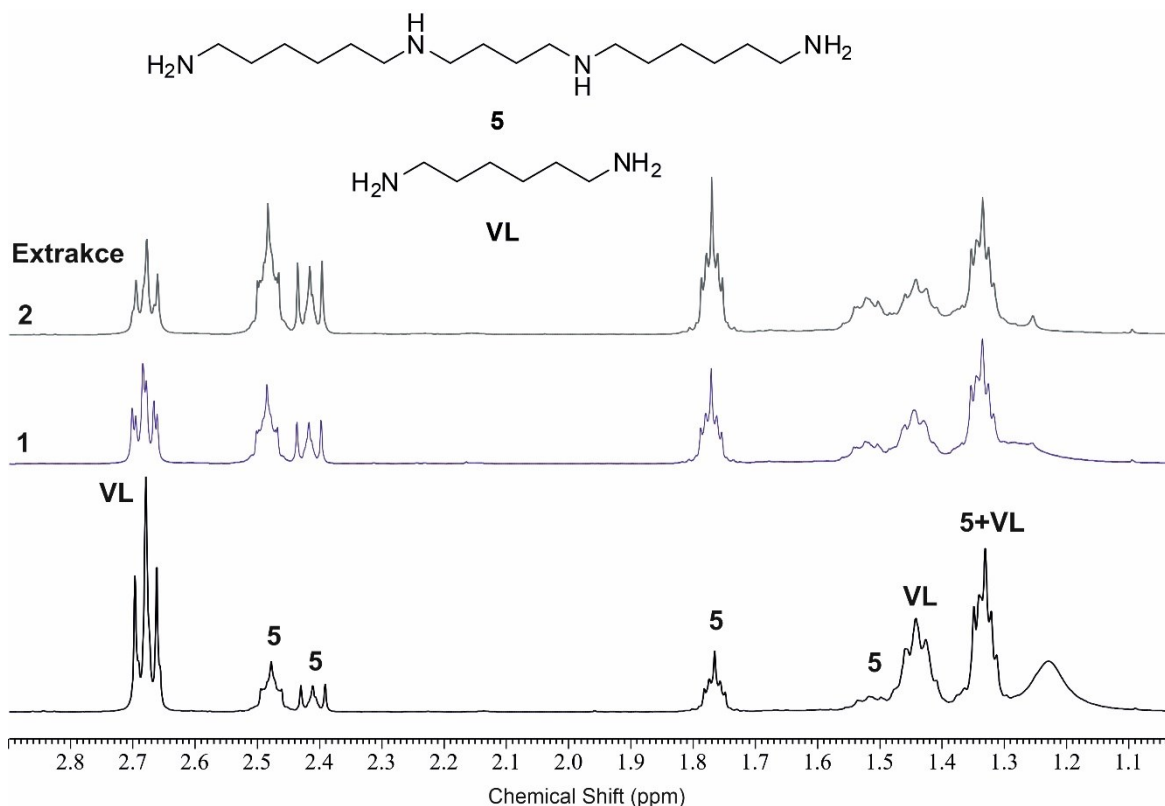
Činidlo	Rozpouštědlo	Reakční podmínky
CF_3COOH	CH_2Cl_2	laboratorní teplota, 3 h
$AcCl$	$MeOH$	0 °C, 5 h



Obrázek 34 Neúspěšné odchránění sloučeniny **7**.

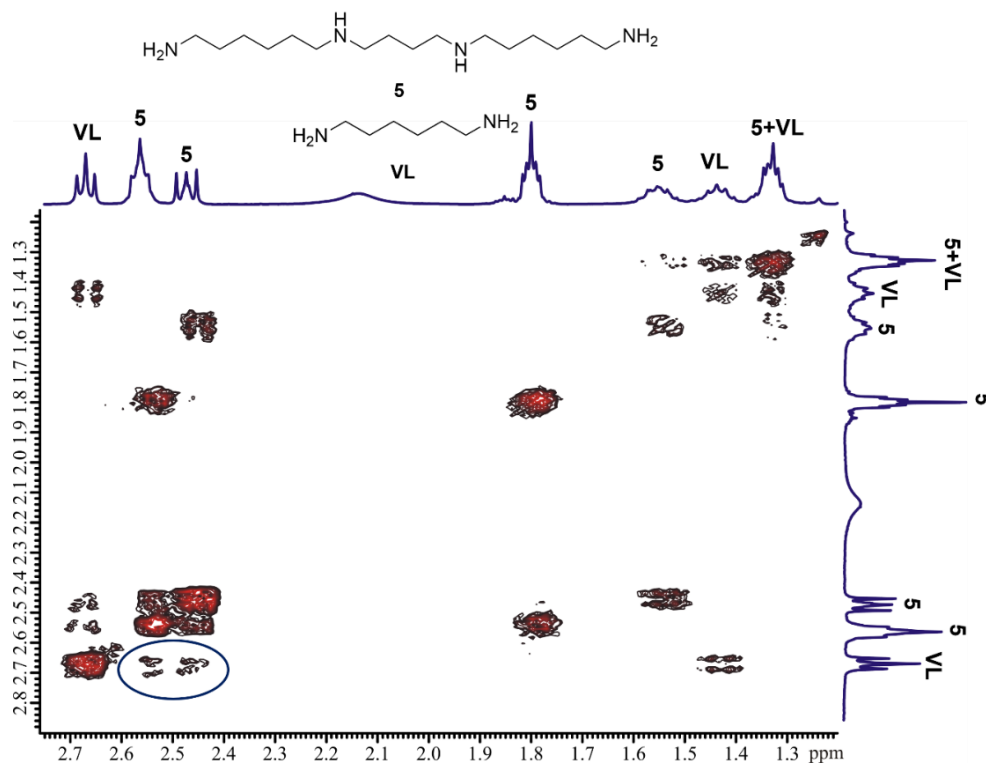
A tak byl surový produkt **7**, který byl připraven S_N provedenou v molárním poměru 5:1 (výchozí látky **1** vůči dibrombutanu), podroben odchránění. Na odchráněném produktu **5** bylo následně provedeno mnoho pokusů o vymytí výchozího diaminohexanu, se kterým se nacházel ve směsi (Obrázek 35). Odchráněný produkt S_N byl rozpuštěn v 10 cm³ CH_2Cl_2 a

následně byl promyt $8 \times 7 \text{ cm}^3$ 10% roztokem NaOH. Před každou extrakcí v dělicí nálevce byl roztok míchán na magnetické míchačce přibližně 20 minut. Tento postup byl zopakován celkem 3×. V momentě, kdy byly v ^1H NMR spektru signály diaminohexanu vůči signálům látky **5** ve stejném poměru, se množství výchozí látky vůči produktu již dalšími extrakcemi nesnižovalo.



Obrázek 35 ^1H NMR spektra postupného vymývání výchozí látky od uvažovaného produktu **5** (CDCl_3 , 303 K).

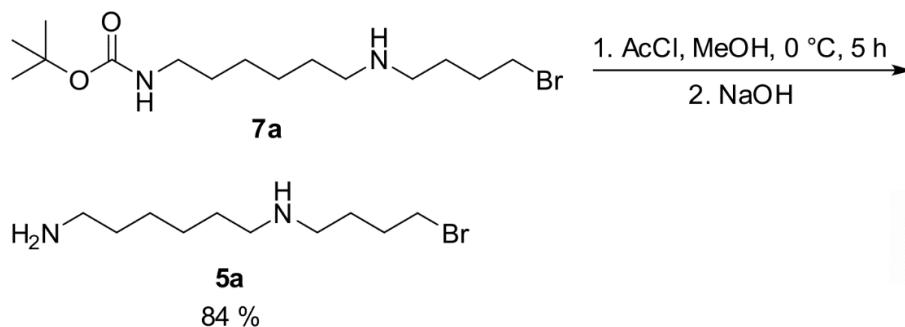
Z tohoto důvodu bylo nutné ověřit, zda se signály výchozí látky nepřekrývají se signály produktu, což je možné očekávat vzhledem k podobnosti struktur látek. Proto byly změřeny homonukleární (COSY a TOCSY) a heteronukleární (HSQC a HMBC) 2D NMR experimenty s cílem přiřadit jednotlivé signály v ^1H a ^{13}C NMR spektrech. Provedené 2D experimenty (**Obrázek 36**) prokázaly interakce (označeno modrým kroužkem) mezi atomy vodíku, které původně patřily výchozí látce, a atomy vodíku, náležící produktu. Tato skutečnost poukazuje na to, že signály výchozí látky se překrývají s atomy vodíku produktu po extrakci.



Obrázek 36 2D COSY NMR spektrum produktu po extrakci (CDCl_3 , 303 K).

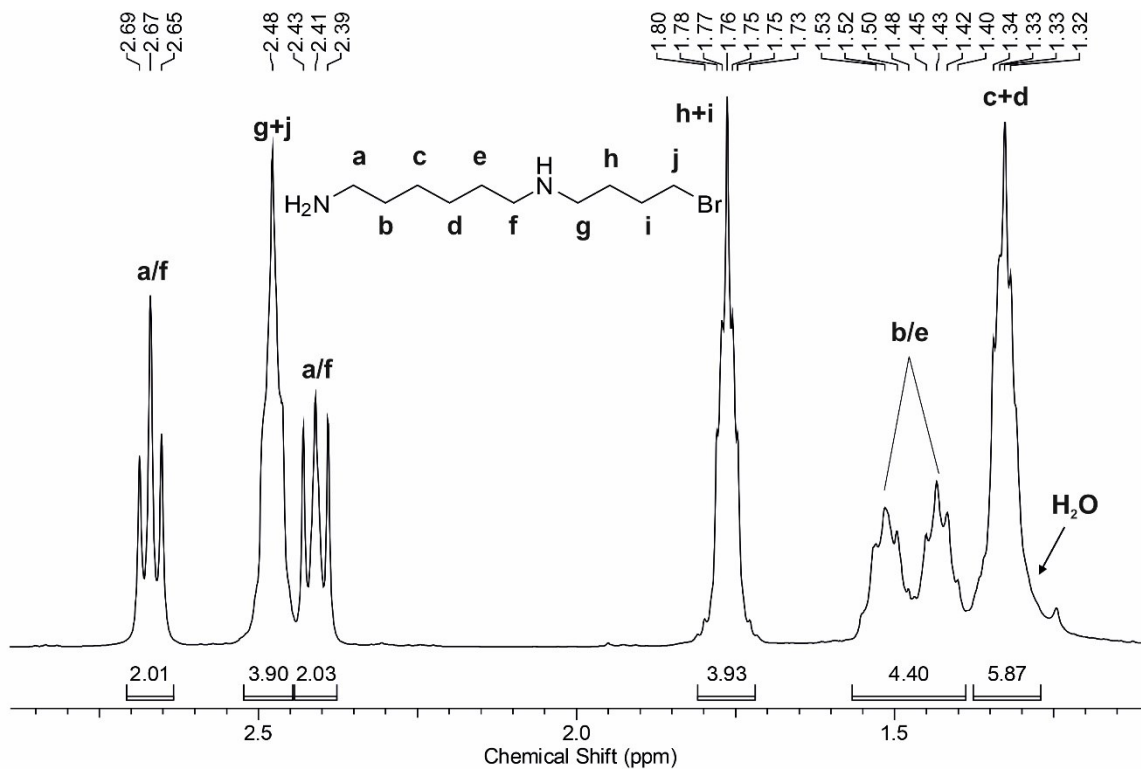
Avšak po provedení několika extrakcí v dělicí nálevce byla zřetelná nízká míra efektivity této metody. Zejména časová náročnost a nízká čistota produktu nás vedla k myšlence, že je potřebné zvolit alternativní možnost izolace čistého produktu, vhodného pro identifikaci. Nabízela se sloupcová chromatografie, nicméně na TLC destičce se od sebe výchozí diaminohexan a produkt po odchránění **5** rozdělit nepovedlo. Vzhledem k nezdaru se separací odchráněných aminů, byla tentokrát separace provedena již s ochráněným produktem **7** (viz předchozí kapitola 6.3.1) nikoliv s odchráněnou sloučeninou **5**.

Produkt S_N izolovaný pomocí sloupcové chromatografie byl tedy odchráněn s HCl v MeOH, kdy reakce proběhla za stejných podmínek jako u odchránění uvažovaného produktu **5** (Tabulka 7). Na **Obrázku 37** je znázorněno reakční schéma pravděpodobného průběhu odchránění, kde byl získán *N*-(6-aminohexan-1-yl)-4-brombutan-1-amin (**5a**) ve výtěžku 84 %.



Obrázek 37 Odchránění sloučeniny 7a.

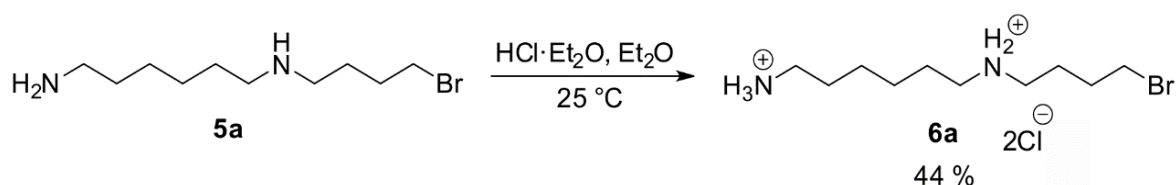
Na **Obrázku 38** je již znázorněno ^1H NMR spektrum, které odpovídalo předpokládané struktuře *N*-(6-aminohexan-1-yl)-4-brombutan-1-aminu. Píky s chemickým posunem 2,48 ppm a 1,76 ppm patří kratšímu alifatickému řetězci. V levé části spektra jsou pozorovány dva signály, náležící methylenovým skupinám, které jsou součástí hexylu a nacházejí se vedle atomů dusíku. Mezi chemickými posuny 1,80–1,32 ppm se vyskytují zbylé signály H-atomů šestiuhlíkatého řetězce.

Obrázek 38 ^1H NMR spektrum sloučeniny 5a (CDCl_3 , 303 K).

Pro definitivní potvrzení struktury *N*-(6-aminohexan-1-yl)-4-brombutan-1-aminu (**5a**), bylo nezbytné dokázat přítomnost atomu bromu. A tak jsme se rozhodli provést Lassaigneovou zkoušku. Lassaigneova zkouška,¹¹⁵ patří mezi kvalitativní elementární analýzy, jejichž princip spočívá v tavení organického vzorku se sodíkem a následným důkazem halogenu. Současně s analyzovaným vzorkem byl prováděn i slepý pokus bez přítomnosti sloučeniny **5a**. Do zkumavky bylo naváženo 30 mg *N*-(6-aminohexan-1-yl)-4-brombutan-1-aminu (**5a**), ke kterému byl opatrně přidán malý kus sodíku, tak aby nebyl v kontaktu se sloučeninou **5a**. Jelikož látka **5a** ve své struktuře obsahuje atom N, dá se předpokládat, že při této reakci vzniká HCN. Zkumavka byla zahřívána nad kahanem, dokud se sodík zcela nerozpustil. Jakmile byla zkumavka řádně zahřáta, byla ponořena do kádinky s destilovanou vodou, kde následně praskla. Zbytek sodíku reagoval prudce s vodou, a poté byla provedena filtrace směsi. Alkalický filtrát byl okyselen HNO₃ a vzápětí opatrně zahříván do polovičního objemu roztoku, což mělo odstranit těkavý HCN. Poté byl ke směsi přidán 1% AgNO₃, kde by v případě přítomnosti halogenu měla vzniknout bílá nebo žlutá sraženina. V našem případě nebyla zpozorována žádná sraženina, tudíž pro sloučeninu **5a** byla Lassaigneova zkouška neprůkazná.

6.3.3 Převod ligandu na hydrochlorid

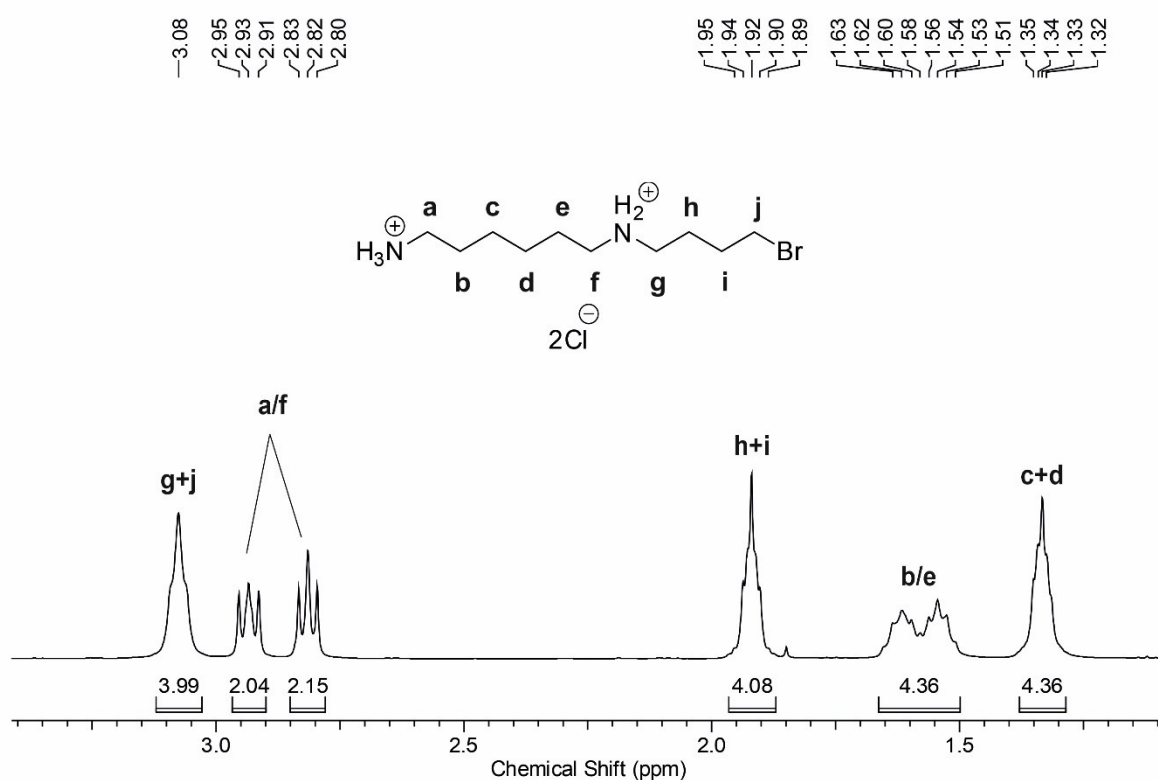
Nicméně i tak jsme se rozhodli provést základní studii supramolekulárního chování připraveného ligandu **5a**. Největší pochybnosti panovaly v otázce struktury ligandu, byla tu možnost jak lineární, tak cyklické formy. V případě že by se jednalo o cyklickou strukturu, ligand by s C_{Bn} nevytvářel žádné komplexy. Jelikož jsou hydrochloridy obecně stabilnější, byl před zahájením supramolekulárních experimentů *N*-(6-aminohexan-1-yl)-4-brombutan-1-amin (**5a**) převeden na dihydrochlorid (**Obrázek 39**).



Obrázek 39 Převod sloučeniny **5a** na dihydrochlorid.

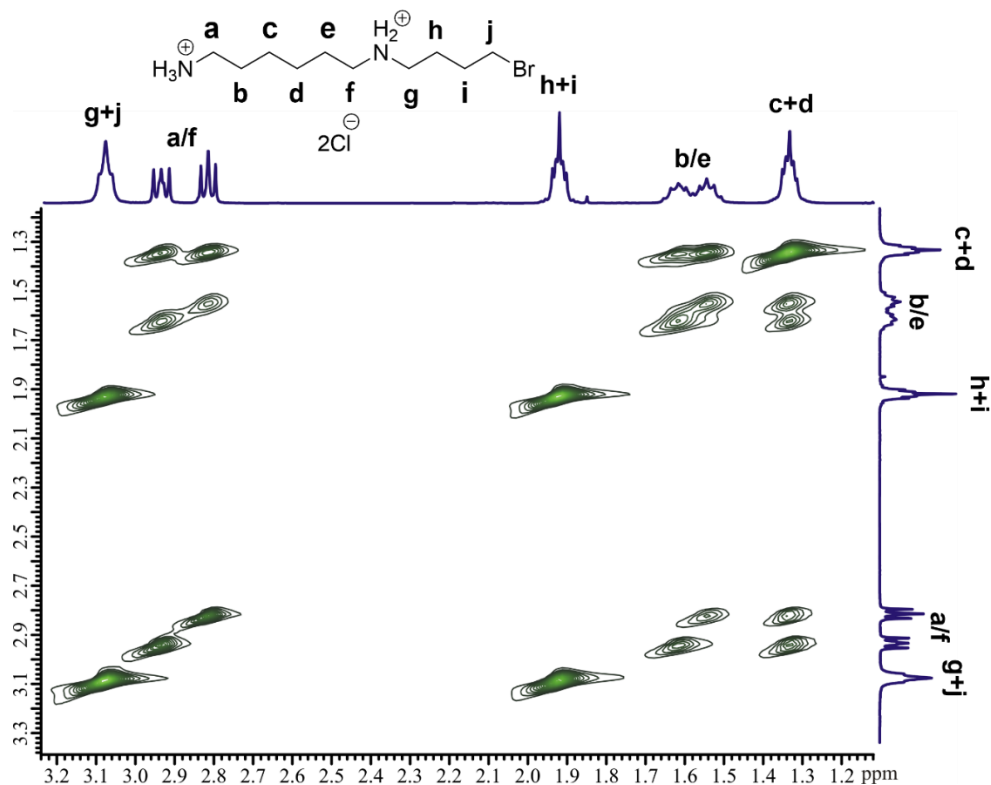
Nejdříve byla látka **5a** rozpuštěna v destilovaném Et₂O, ke kterému byl opatrně přikapáván HCl·Et₂O do vzniku viditelné sraženiny. Sraženina byla společně s roztokem přemístěna do skleněné centrifugační zkumavky a směs byla odstředěna při 1000 ot·min⁻¹ po dobu

přibližně 3 minut. Po oddělení sraženiny od pevného podílu byla kapalina odsáta pipetou a ke sraženině byl přidán čistý Et₂O. Postup byl 2× zopakován a takto byla získána sloučenina **6a**, jejíž ¹H NMR spektrum je uvedeno na **Obrázku 40**. Po převodu sloučeniny **5a** na dihydrochlorid má nyní nejvyšší hodnotu chemického posunu signál H_{g+j}. V jeho blízkosti se nachází signály vodíkových atomů z methylenových skupin, které se vyskytují vedle aminoskupin. Zbytek signálů v alifatické části zůstává obdobný jako v případě ¹H NMR spektra volné báze (**Obrázek 38**). Kromě ¹H NMR spektra bylo změřeno také ¹³C spektrum (**Příloha 10**).



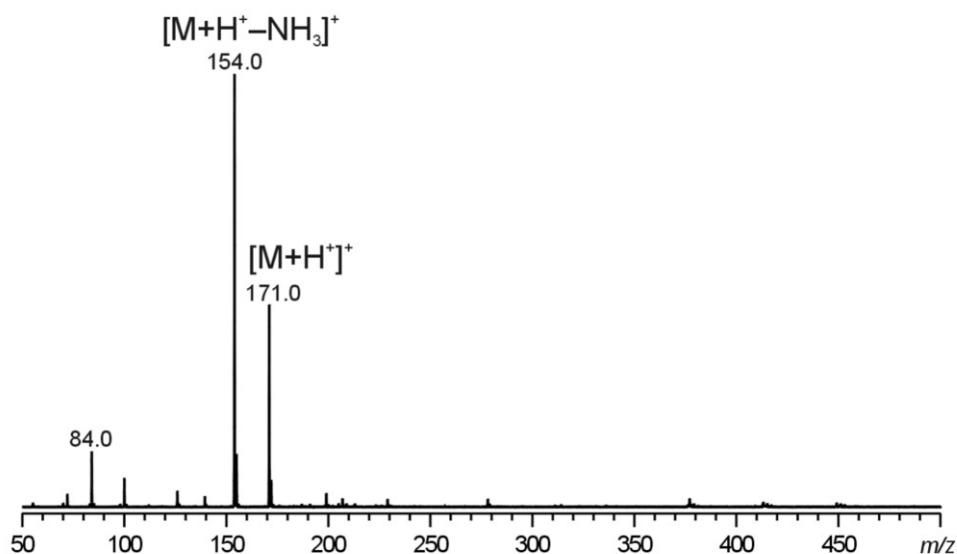
Obrázek 40 ¹H NMR spektrum sloučeniny **6a** v (D₂O, 303 K).

Dihydrochlorid byl podroben také 2D NMR měřením, které nám napomohly k přiřazení jednotlivých signálů. Z 2D experimentů bylo změřeno COSY, TOCSY a HSQC. V TOCSY spektru sloučeniny **6a** (**Obrázek 41**) byly pozorovány interakce mezi vodíky z methylenových skupin patřící butylovému řetězci H(g+j) s H(h+i), a interakce mezi vodíky, vyskytující se v hexylovém řetězci.

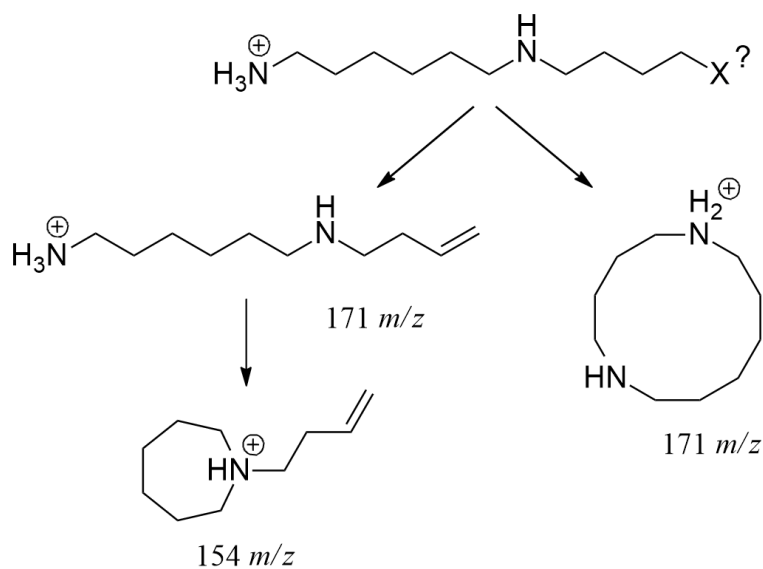


Obrázek 41 2D TOCSY NMR spektrum **6a** (D₂O, 303 K).

Sloučeninu **6a** jsme se rozhodli podrobit také ESI-MS analýze, abychom blíže určili strukturu titulního ligandu další nezávislou metodou. Doufali jsme, že experiment potvrdí přítomnost atomu bromu, nacházející se ve struktuře předmětného ligandu. Přítomnost atomu bromu jsme se pokusili dokázat již Lassaigneovou zkouškou, popsanou v kapitole 6.3.2, která však byla neprůkazná. Vzhledem k tomu, že titulní ligand vykazuje kationtový charakter, tak ESI-MS měření bylo prováděno v pozitivním skenovacím módu. V hmotnostním spektru ilustrovaném na **Obrázku 42** nebyla pozorována protonovaná forma sloučeniny **6a**, jejíž hodnota m/z by činila 251 m/z ani její případně dvakrát protonovaná forma s hodnotou m/z 126. Byly pozorovány pouze její fragmenty, jejichž strukturu jsme se pokusili navrhnout. K eliminaci došlo pravděpodobně již v iontovém zdroji („*in-source fragmentation*“) nebo v jeho blízkosti. V ESI-MS spektru (**Obrázek 42**) lze vidět iont o hodnotě 171 m/z , který může náležet buďto lineární formě fragmentu (alkenu), nebo cyklické formě fragmentu produktu (**Obrázek 43**). V případě že by iont o hodnotě 171 m/z patřil lineární formě fragmentu, mohl by jeho další fragmentací vznikat ion 154 m/z , jehož uvažovaná struktura je znázorněna na **Obrázku 43**.



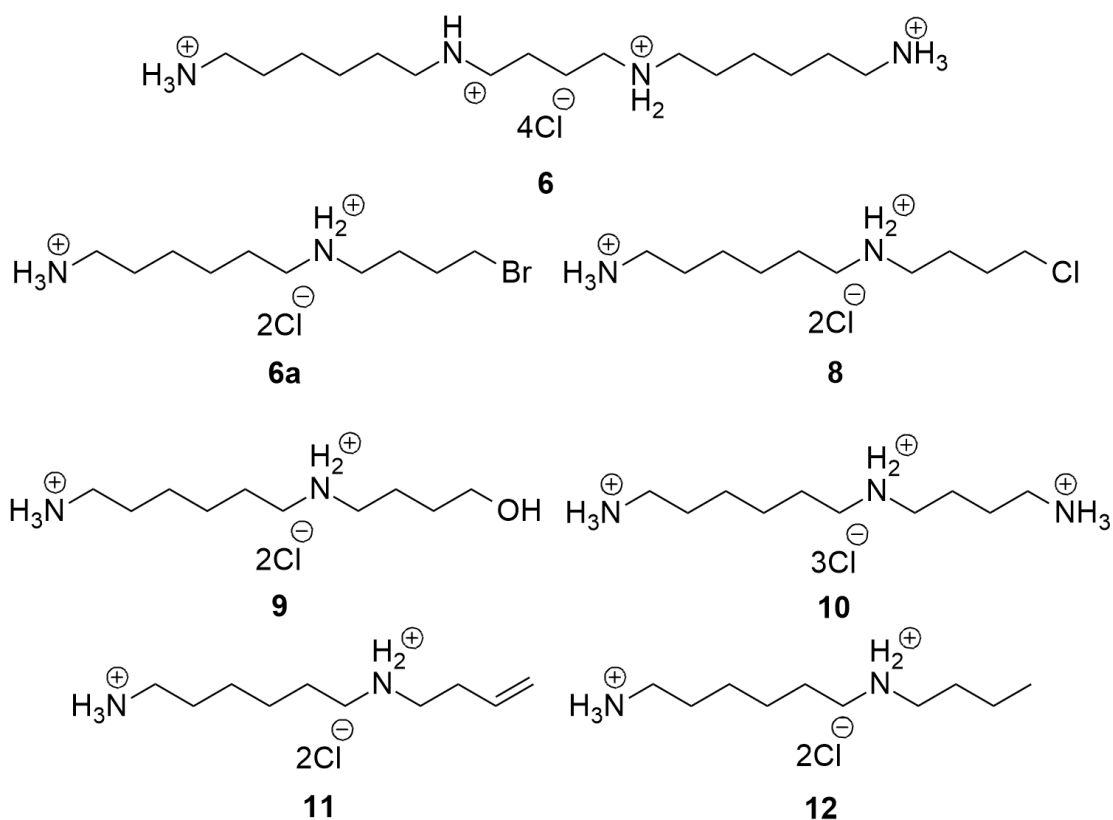
Obrázek 42 Hmotnostní spektrum fragmentu ligandu.



Obrázek 43 Návrh možné fragmentace ligandu.

Krátce před odevzdáním této závěrečné práce byly zjištěny výsledky elementární analýzy (EA), které měly sloužit ke standardizaci molární hmotnosti ligandu. Experimentální výsledky EA CHN činily 50,15/10,40/11,81. Na základě výsledků EA byly navrženy různé chemické struktury (**Obrázek 44**), které by nastínily možnou podobu ligandu. Zároveň v **Tabulce 7** jsou vypočteny teoretické hodnoty zastoupení daných atomů v navržených chemických strukturách. Data, která byla zjištěna z experimentů, se nejvíce blížila spočteným teoretickým hodnotám nenasyceného produktu eliminace **11**. Tato struktura, ale

neodpovídá izolovanému produktu, jelikož ^1H , ^{13}C ani Dept-Q135 NMR spektra nenaznačují výskyt alkenů ani methylové skupiny, čímž lze zavrhnout také strukturu číslo **12**. Dále jsme uvažovali o struktuře alkoholu **9**, jehož vznik by teoreticky mohla zapříčinit hydrolýza během některé z reakcí nebo při zpracování reakční směsi. A proto bylo změřeno IR spektrum, kde by v případě výskytu O–H skupiny byl viditelný vibrační pás s vlnočtem 3200–3600 cm^{-1} . Ovšem tento pás se v IR spektru nenacházel, tudíž struktura zkoumaného ligandu zůstává neobjasněna.



Obrázek 44 Chemické struktury možných podob titulního ligandu.

Tabulka 7 Teoretické procentuální zastoupení atomů v navržených strukturách.

Sloučenina	C [%]	H [%]	N [%]	Cl [%]	Br [%]	O [%]	M [$\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$]
ED	50,15	10,40	11,81				
6	44,45	9,79	12,96	32,8	/	/	432,34
6a	37,06	7,77	8,64	21,88	24,65	/	324,13
8	42,94	9,01	10,02	38,03	/	/	279,68
9	45,98	10,03	10,72	27,14	/	6,12	261,23
10	40,48	9,51	14,16	35,38	/	/	296,71
11	49,38	9,95	11,52	29,15	/	/	243,22
12	48,98	10,69	11,42	28,91	/	/	245,23

ED = experimentální data

7 DISKUZE K SUPRAMOLEKULÁRNÍM EXPERIMENTŮM

Cílem této práce byla syntéza *N,N'*-[bis(6-aminohexan-1-yl)]butan-1,4-diaminu (**5**) a zkoumání jeho supramolekulárních vlastností s CB6, kde jsme předpokládali vznik komplexu ve stechiometrickém poměru 2:1. Jak je již podrobně popsáno v syntetické části (kapitola 6.3), místo titulního ligandu se nám povedlo připravit pravděpodobně *N*-(6-aminohexan-1-yl)-4-brombutan-1-amin (**5a**). Ovšem i přesto jsme se rozhodli provést studium hostitel–host na sloučenině **5a**, která byla následně převedena na dihydrochlorid (**6a**). Supramolekulární experimenty jsme se rozhodli provést také vzhledem k jistým pochybnostem o struktuře ligandu. Konkrétně zda se jedná o látku v cyklické či lineární formě. Pokud by se jednalo o cyklickou sloučeninu, netvořila by supramolekulární komplexy s CB6 a CB7. Uvažovaná molární hmotnost připraveného ligandu byla $324,13 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$.

Pro inkluzi dihydrochloridu *N*-(6-aminohexan-1-yl)-4-brombutan-1-aminu byly využity hostitelské sloučeniny CB6 a CB7. Pro CB6 se uvádí molární hmotnost $996,82 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ a v případě CB7 se jedná o hodnotu $1162,96 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$. Oba makrocykly byly získány z komerčních zdrojů.

Vznik hostitel–host systémů byl sledován pomocí ^1H NMR titrace, ITC a ESI-MS.

7.1 ^1H NMR titrace

^1H NMR titrace je analytická metoda, která zkoumá interakce systému hostitel–host. Tyto existující interakce vedou ke změně rozložení elektronové hustoty, což se projeví změnou chemických posunů jednotlivých signálů ligandu a makrocyklu. V závislosti na pracovní frekvenci NMR spektrometru, lze ve spektrech ^1H NMR titrace rozlišit pomalou či rychlou výměnu. V této práci byl použit NMR spektrometr pracující na frekvenci 400 MHz pro ^1H . Byly studovány komplexy pouze se zástupci CB_n , pro které je typická pomalá výměna.

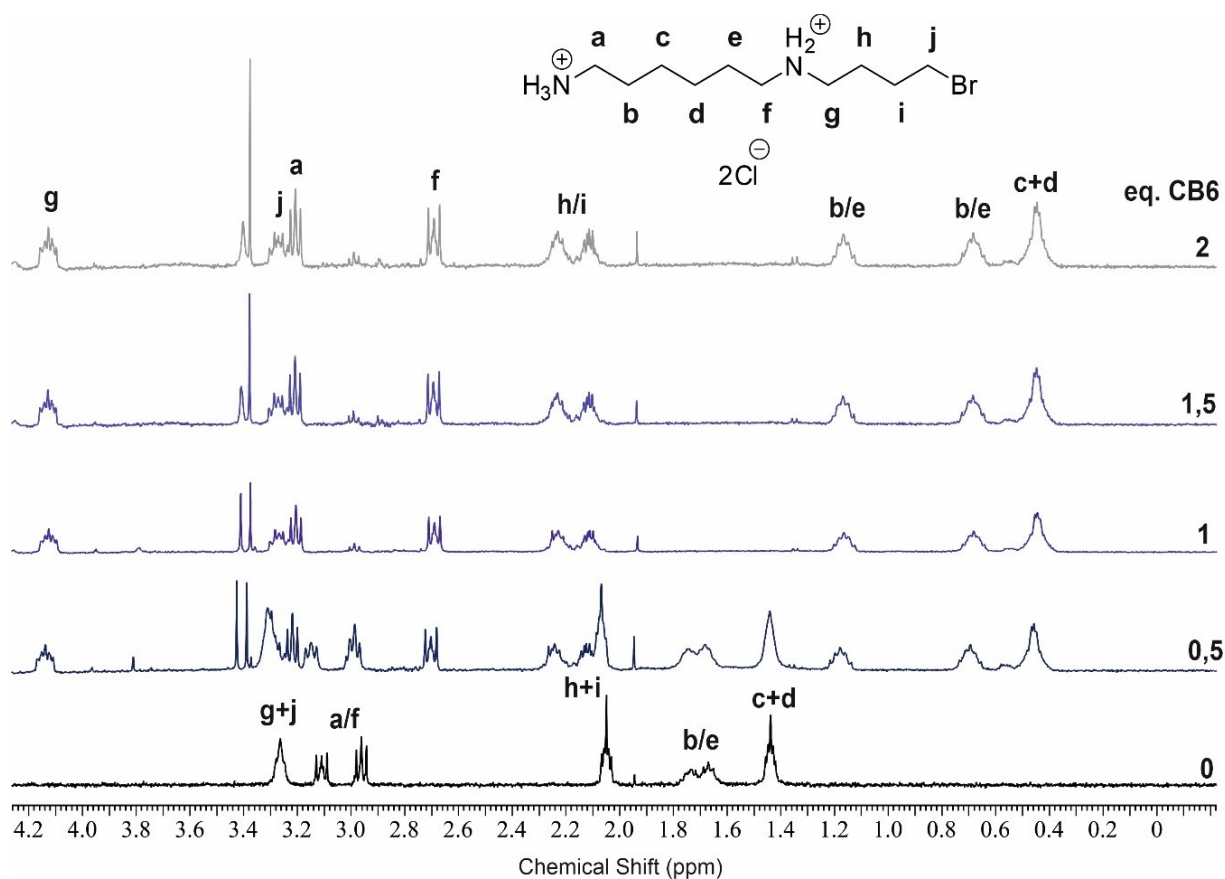
Při pomalé výměně jsou ve spektrech zpravidla pozorovatelné signály vázané a nevázané formy obou komponent účastnících se enkapsulace. Pokud komplex vzniká, ve spektrech se po přidání CB_n objeví nová sada signálů. Z titrace lze zjistit také stechiometrii daného systému dle množství přidaného hostitele. Dále lze odlišit, zda jsou signály odstíněné či zastíněné. Pokud se signály ligandu posouvají směrem k vyšším hodnotám chemického posunu, pak se jedná o odstíněné H-atomy, které se nacházejí blízko portálu CB_n . Kdežto signály zastíněných H-atomů se posouvají směrem k nižším hodnotám chemického posunu

a víme, že se dané atomy vodíku nacházejí uvnitř kavity CB_n . Díky výše popsaným informacím, které nám dokáže poskytnout 1H NMR titrace je možné odhadnout orientaci ligandu v CB_n .

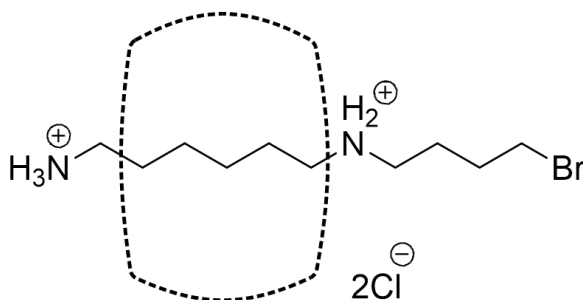
Experimenty probíhaly v 50 mM roztoku NaCl, jelikož je CB_6 v čisté vodě špatně rozpustný. Za účelem zachování totožných podmínek byla titrace s CB_7 rovněž provedena ve stejně koncentrovaném solném roztoku.

Před samotnou titrací bylo nutné provést standardizaci ligandu a CB_n za použití kyseliny maleinové. Standardizace pro 1H NMR titrací s CB_6 , byla provedena ve dvou samotných kyvetách, které obsahovaly 2,12 μmol ligandu **6a** a 4,48 μmol CB_6 . Následně bylo do obou kyvet přidáno 11,28 μmol kyseliny maleinové, jakožto standardu. Standardizace experimentu s CB_7 proběhla obdobným způsobem jako pro měření s CB_6 , s tím že látkové množství ligandu **6a** bylo 2,06 μmol , CB_7 4,44 μmol a kyseliny maleinové 12,58 μmol . Pomocí integrálních intenzit signálů ligandu a hostitelských látek zjištěných z 1H NMR spekter, byly spočítány skutečné objemové poměry zásobních roztoků, odpovídající požadovaným molárním poměrům. Vzhledem k přetrvávající nejistotě stran struktury ligandu **6a** není takto jistá molární koncentrace, ale molární poměry titrovaných komponent jsou správné. Po standardizaci byla provedena titrace ligandu **6a** s CB_n . Všechny komponenty se nacházely v roztoku o stejném látkovém množství jako v případě standardizace.

Na **Obrázku 45** je zaznamenaný průběh 1H NMR titrace ligandu **6a**, hostitelem CB_6 . Spektrum označené černou barvou, znázorňuje spektrum čistého ligandu. Ke sloučenině **6a** byly postupně pipetovány 2 ekvivalenty CB_6 po krocích 0,5 ekvivalentu. Jakmile byl k ligandu přidán první přírůstek makrocyklu ve spektru se objevila nová sada signálů, což poukazuje na pomalou chemickou výměnu. Vznik systému CB_6 –**6a** ve stechiometrickém poměru 1:1 naznačuje vymizení signálů nekomplexované formy po přidání jednoho ekvivalentu CB_6 . Ve spektrech je možné pozorovat, že atomy H_g a H_a jsou odstíněné, což znamená, že se nacházejí v blízkosti portálu CB_6 . Naproti tomu o atomech H_f , $H_{b/e}$ a H_{c+d} lze tvrdit, že se pravděpodobně vyskytují uvnitř CB_6 . U signálů H_j a H_{h+i} nedochází ke změně chemického posunu, proto jsou komplexací nejméně ovlivněny. CB_6 bude mít přednostně vyšší afinitu k hexylovému řetězci než k butylovému.¹⁰³ Podoba vzniklého komplexu CB_6 –**6a** je znázorněna na **Obrázku 46**. Jelikož již první provedený experiment poukazuje na vznik komplexu, lze zavrhnout možnost cyklické struktury studovaného ligandu.



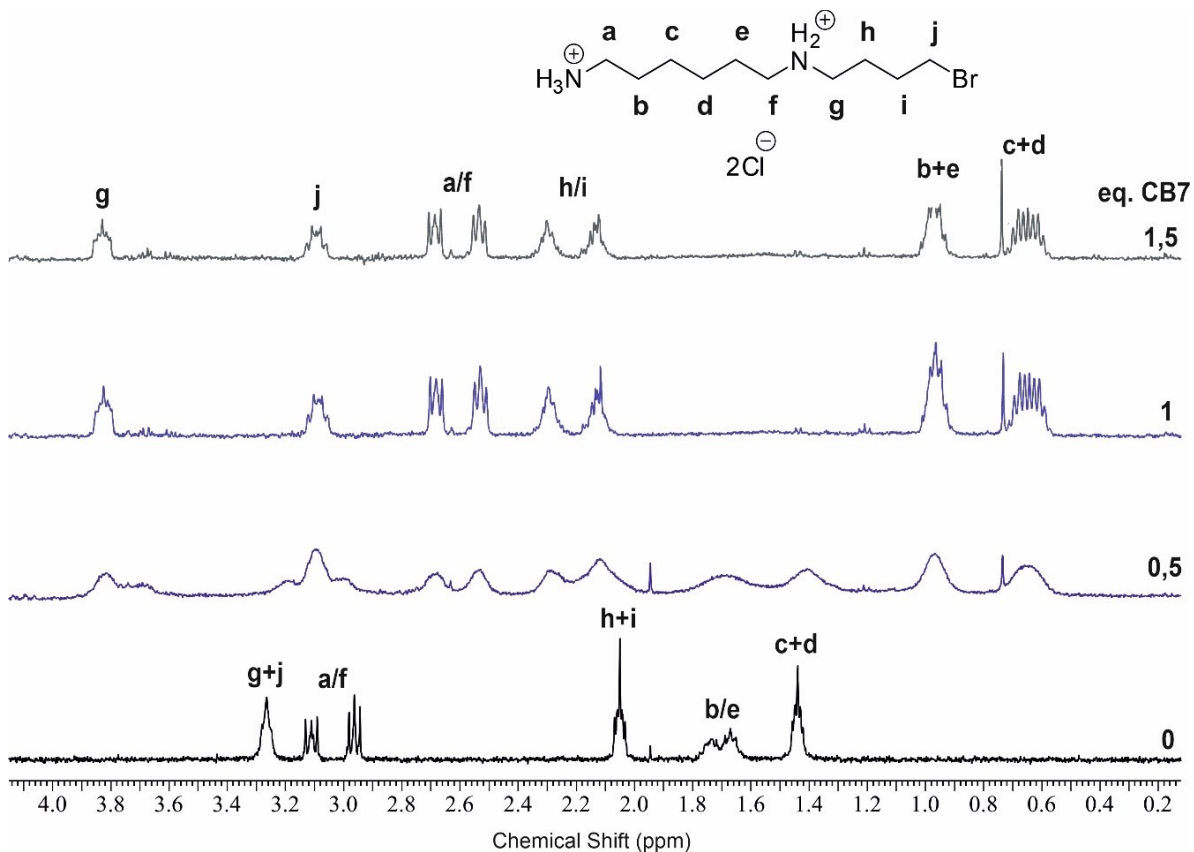
Obrázek 45 ^1H NMR titrace ligandu **6a** s CB6 (NaCl, 303 K).



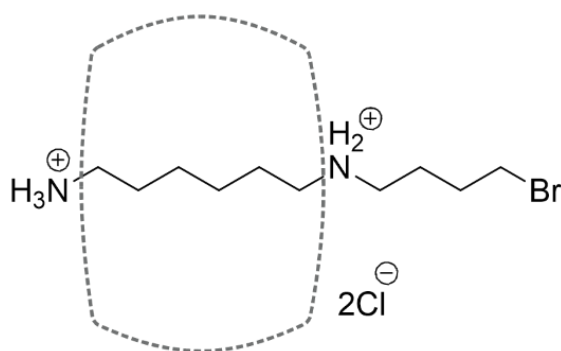
Obrázek 46 Komplex CB6–**6a** ve stechiometrii 1:1 dle ^1H NMR titrace.

^1H NMR titrace byla provedená také s CB7 (**Obrázek 47**). K čistému ligandu **6a** bylo přidáno celkem 1,5 ekvivalentu CB7. Obdobně jako u systému s CB6, i komplex CB7–**6a** vykazuje stechiometrii 1:1, což je patrné z vymizení sady původních signálů ligandu po přidavku jednoho ekvivalentu hostitele. Z titrace s CB7 vyplývá, že v blízkosti portálu hostitele se bude vyskytovat pouze atom H_g , žádný jiný odstíněný atom vodíku ve spektru zpozorovaný nebyl. Nicméně uvnitř dutiny se budou, obdobně jako u titrace s CB6, nacházet signály ze středu hexylového řetězce a to $\text{H}_{b/e}$ a také H_{c+d} s H_f . Vzhledem k tomu,

že CB7 má ve své struktuře o jednu glykolurilovou jednotku navíc oproti CB6, zvládne do své dutiny pojmout také atom H_a. Strukturální podoba navrhovaného komplexu CB7–**6a** je uvedena na **Obrázku 48**.



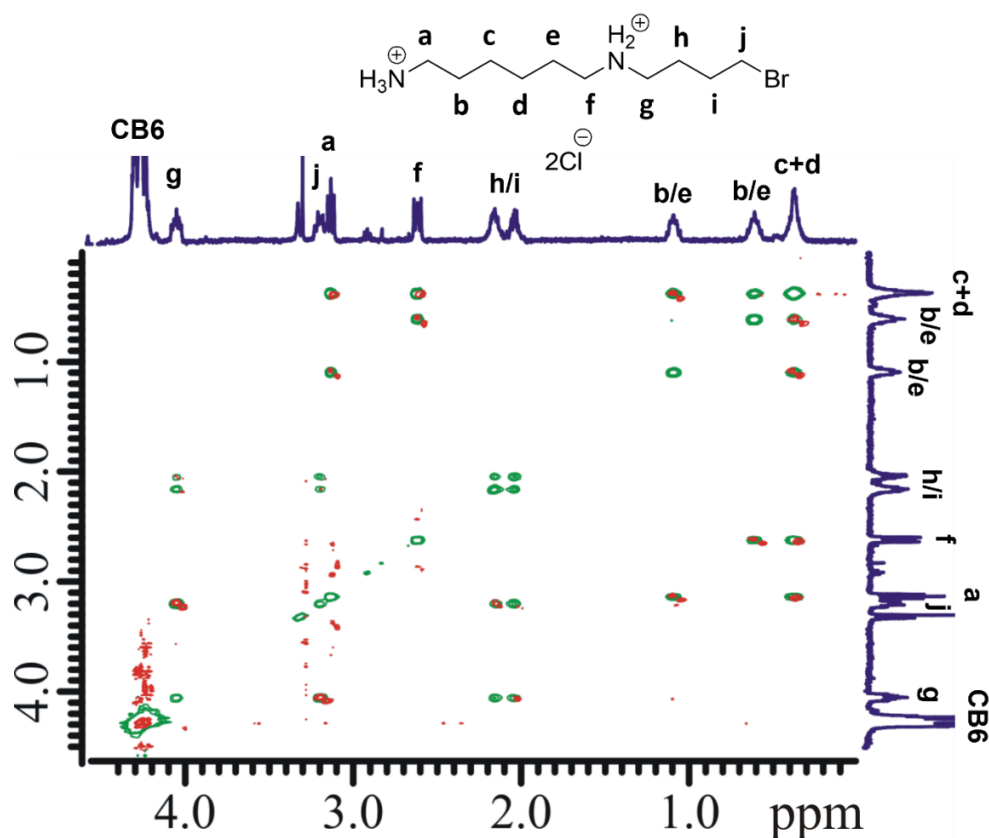
Obrázek 47 ¹H NMR titrace ligandu **6a** s CB7 při 30 °C (NaCl, 303 K).



Obrázek 48 Komplex CB7–**6a** ve stechiometrii 1:1 dle ¹H NMR titrace.

Pro správné přiřazení nové sady signálů ligandu **6a**, byly provedeny 2D ¹H–¹H NMR experimenty TOCSY a ROESY titrovaného ligandu **6a** s CB6. Zeleně označené krosníky patří TOCSY experimentu, pomocí kterého bylo možné identifikovat vodíkové atomy

příslušející izolovaným spinovým systémům butylového a hexylové řetězce. ROESY spektrum (červené krosníky) pak identifikuje sousedící methylenové skupiny.

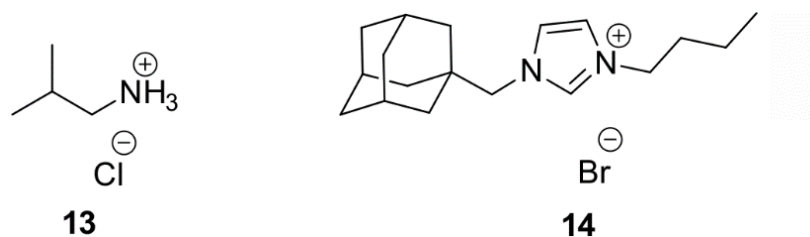


Obrázek 49 2D NMR experimenty TOCSY (zelené krosníky) s ROESY (červené krosníky).

7.2 Isotermální titrační mikrokolorimetrie

Isotermální titrační mikrokolorimetrie (ITC) je další velmi důležitou metodou pro popis supramolekulárních systémů. Mikrokolorimetrie se zabývá měřením uvolněného či spotřebovaného tepla, souvisejícího s interakcemi mezi hostitelem a hostem. ITC poskytuje důležité termodynamické parametry daného komplexu a to stechiometrii, vazebnou konstantu, změnu enthalpie a změnu entropie.

Stanovení komplexu CB6–6a a CB7–6a probíhalo v 50 mM NaCl při 303 K, pokud není dále uvedeno jinak. Ke komponentě v reakční cele bylo vždy přidáno celkem 28 přidavků po 10 mm³ druhé komponenty (první přidavek byl 2 mm³). Jelikož sloučenina 6a vykazovala vysokou afinitu k CB6, bylo nutné použít kompetitor (Obrázek 50). V Tabulce 8 jsou uvedeny koncentrace ligandu, CBn a kompetitorů použitých pro jednotlivá měření. Oba kompetitory byly již dříve připraveny v laboratořích na Ústavu chemie.



Obrázek 50 Chemické struktury kompetitorů pro měření s CB6.

Tabulka 8 Koncentrace jednotlivých komponent vystupujících v ITC měření.

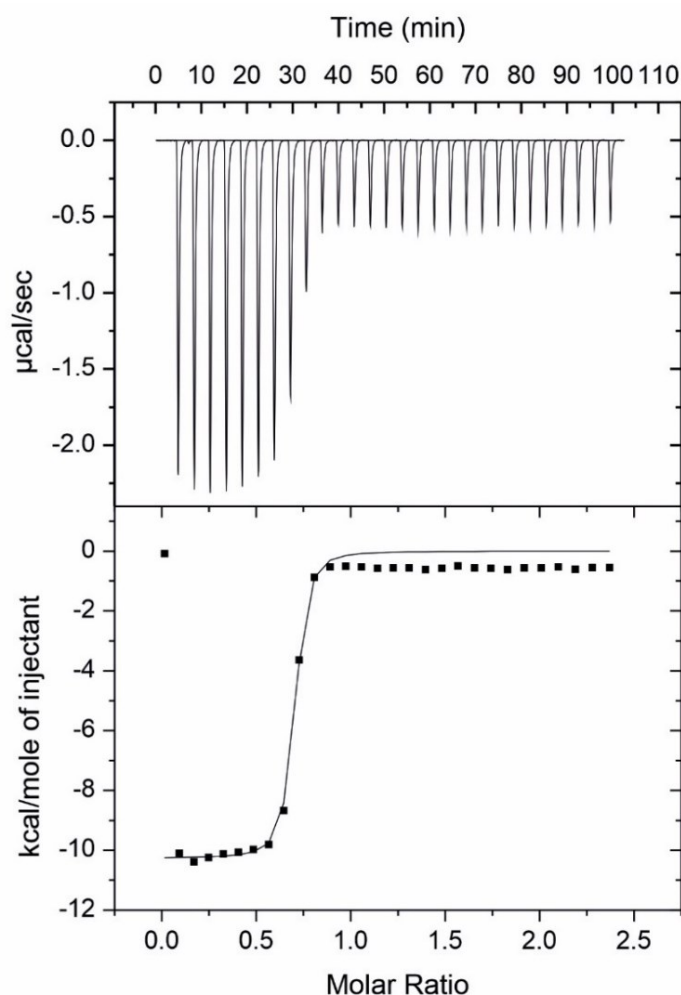
Makrocyklus	Kompetitor	Koncentrace ligandu [mM]	Koncentrace CBn [mM]	Koncentrace kompetitoru [mM]
CB6	/	0,56	0,05	/
CB7	/	0,56	0,05	/
CB6	13	0,56	0,05	0,10
*CB7	/	0,49	0,05	/
CB7	/	0,04	0,34	/
CB6	14	0,56	0,05	0,08
CB6	14	0,56	0,05	0,8
CB6	14	0,56	0,05	7,1

*Měřeno v H₂O

Při výběru vhodného kompetitoru bylo nutné znát jeho hodnotu asociační konstanty k CB6. Tato hodnota by měla být v ideálním případě o tři řády nižší než K_a studovaného komplexu, jelikož během titrace je kompetitor s nižší afinitou vytlačen ligandem **6a** z dutiny CB6. U titulního ligandu **6a** jsme předpokládali vazebnou konstantu 10^7 – 10^9 M⁻¹, jelikož v tomto rozmezí jsou uváděny K_a komplexů CB6 s alkyldiamoniovými ionty, které nesou jistou strukturní podobnost s připraveným ligandem.¹⁰² A proto jsme vyzkoušeli kompetitor **13**, který vykazuje s CB6 v 2,5 mM NaCl hodnotu $K_a = 5,33 \cdot 10^5$ M⁻¹. Bohužel se ukázalo, že sloučenina **13** není pro tento typ měření vhodná, jelikož kompetitor se k CB6 vázal silněji než ligand. Proto byl použit systém CB6 se sloučeninou **14**, jejíž asociační konstanta je velmi podobná předchozímu ligandu a to $2,99 \cdot 10^5$ M⁻¹ v 2,5 mM NaCl.¹¹⁶ Navzdory třem opakovaným měřením, kde jsme vždy desetinasobně zvýšili koncentraci kompetitoru **14**, se nám nepodařilo dosáhnout reprodukovatelných výsledků.

Na **Obrázku 51** lze vidět ITC záznam z měření ligandu **6a** s CB6 po odečtení zředovacího tepla. Na první pohled si lze všimnout, že se teplo produkované daným systémem uvolňuje i po dosažení ekvivalence, což není pro páry hostitel–host obvyklé. Proto jsme se rozhodli

podmínky měření modifikovat. Pro následující měření s CB7 jsme místo 50 mM NaCl experiment uskutečnili v destilované vodě. Také jsme vyzkoušeli reverzní měření, kde jsme titrovali ligand makrocylem. Nicméně, i přes tyto různé pokusy, jsme v ITC záznamech neustále pozorovali dodatečné uvolňování tepla po dosažení ekvivalence. V systémech CB6 a CB7 s ligandem **6a** se tedy pravděpodobně odehrává další jev, který nelze metodou ITC identifikovat. S velkou pravděpodobností by mohl během titrace makrocylus potlačovat disociaci ligandu, což by mohlo vysvětlit doplňkové teplo po ekvivalenci. Vzhledem k nereprodukovatelnosti ITC experimentů a přítomnosti dalších neidentifikovaných procesů spojených s uvolňováním tepla nelze získat žádné věrohodné termodynamické parametry těchto komplexací. Každopádně ze strmosti křivky (**Obrázek 51**) lze o komplexu CB6–**6a** konstatovat, že K_a bude zřejmě větší než 10^7 M^{-1} . Obdobně, afinita ligandu k CB7 bude pravděpodobně menší než pro systém CB6–**6a**.



Obrázek 51 ITC záznam pro komplex CB6–**6a** (NaCl, 303 K).

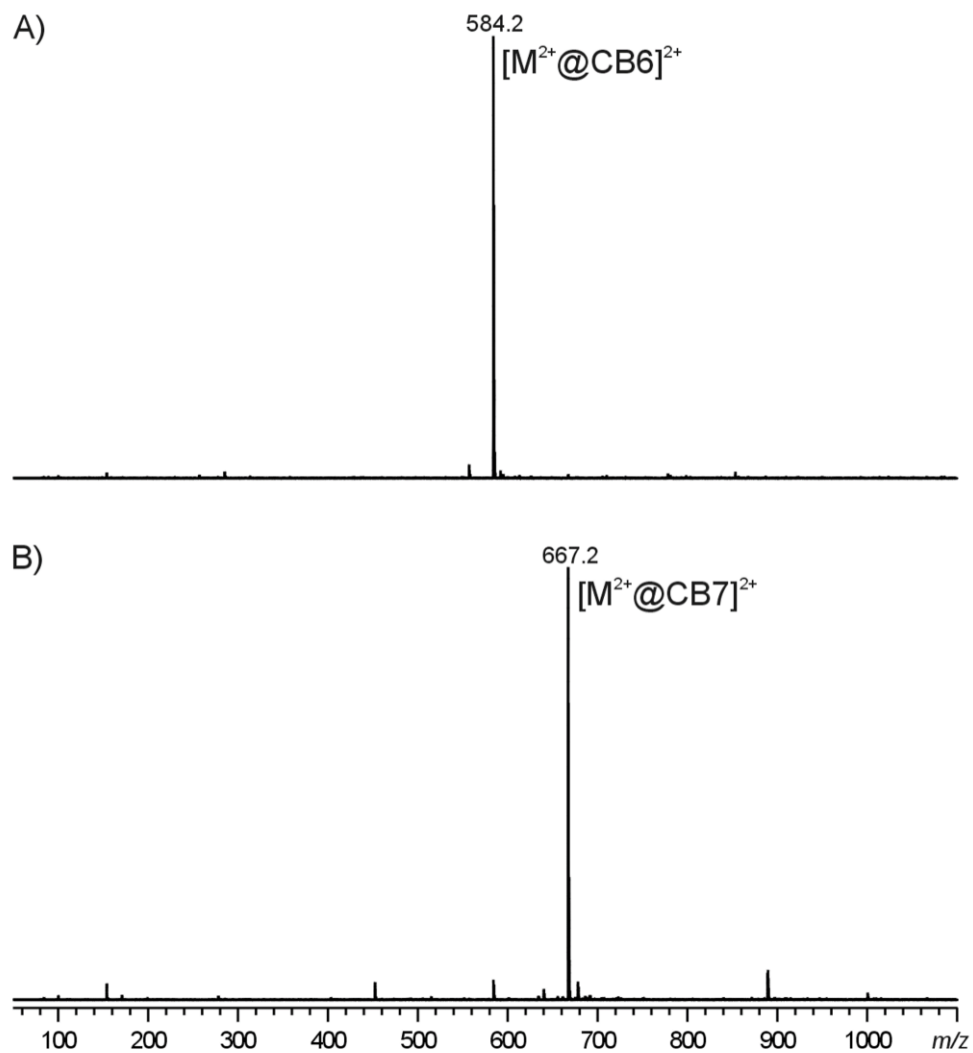
7.3 Elektrosprejová ionizace s hmotnostním detektorem

Vznik supramolekulárních komplexů **6a**·CB6/7 byl ověřen třetí nezávislou metodou, a to hmotnostní spektrometrií s elektrosprejovou ionizací (ESI-MS). MS slouží k analýze vzorku tím, že měří poměr hmotnosti k náboji (m/z) iontů, jež jsou vytvořeny určitou ionizační technikou. V tomto případě se jedná o ESI, což je příklad měkké ionizační techniky vhodné pro analýzu středně až silně polárních látek.

ESI-MS experimenty probíhaly v pozitivním skenovacím módu a v čisté vodě. Koncentrace hostitele i hosta ve vzorku byla vždy 12,5 μM .

Jak je popsáno v kapitole 6.3.3, v hmotnostním spektru patřícímu samotnému ligandu (**Obrázek 42**), nebyl pozorován molekulový ion, který by náležel protonované molekule **6a**. V ESI-MS spektrech byl spatřen pouze fragment o hodnotě 171 m/z , který vystupuje také v případě měření s CB n . Tento fragment by mohl náležet iontu s lineární nebo cyklickou strukturou (**Obrázek 43**). Jelikož jsme ^1H NMR titraci prokázali vznik komplexu, možnost cyklického fragmentu můžeme nyní zavrhnout.

Na **Obrázku 52** jsou znázorněna hmotnostní spektra směsi ligandu **6a** s CB6 a CB7. V ESI-MS spektru označeném písmenem A, lze pozorovat jako dominantní dvakrát nabitý ion o hodnotě 584 m/z . Tato hodnota odpovídá vzniku komplexu dvojnásobně protonovaného produktu eliminace $(\text{M}+2\cdot\text{H}^+)^{2+}$ s CB6 v poměru 1:1 $[\text{M}^{2+}\cdot\text{CB6}]^{2+}$. V hmotnostním spektru označeném písmenem B, je ilustrován výsledek analýzy ekvimolární směsi ligandu **6a** s CB7. Ve spektru prvního řádu byl opět pozorován jeden dominantní dvojnásobně nabitý ion s hodnotou 662 m/z , který odpovídá vzniku komplexu dvojnásobně protonovaného produktu eliminace s CB7 v poměru 1:1 $[\text{M}^{2+}\cdot\text{CB7}]^{2+}$.



Obrázek 52 Hmotnostní spektra směsí ligandu **6a** s CB6 (A) a CB7 (B).

ZÁVĚR

Cílem diplomové práce byla příprava 1,8,13,20-tetraazaikosanu a následné zkoumání jeho supramolekulárních vlastností s CB6.

První navržený plán syntézy zahrnoval jako intermediát diamid kyseliny jantarové **3**. Zatímco tato látka byla úspěšně připravena, následná redukce amidových skupin na amin se nezdařila. Z tohoto důvodu byla navržena alternativní strategie syntézy, jenž se ubírala cestou nukleofilní substituce, při které jsme se potýkali s výskytem výchozí látky ve směsi s produktem po S_N .

Jako nejefektivnější metoda pro izolaci čistého produktu se ukázala sloupcová chromatografie. Ovšem po detailnější identifikaci izolované látky jsme zjistili, že se po odchránění pravděpodobně jedná o *N*-(6-aminohexan-1-yl)-4-brombutan-1-amin, a nikoliv o titulní ligand.

I přesto jsme se rozhodli provést studium supramolekulárního chování připraveného ligandu s CB6 a CB7 pomocí ^1H NMR titrace, ITC a ESI-MS. Tento krok byl zejména důležitý pro objasnění strukturní povahy ligandu, zda je lineární nebo cyklický.

Již ^1H NMR titrace připraveného ligandu s CB6 i CB7, odhalila vznik komplexů ve stechiometrickém poměru 1:1. Na základě čehož lze vyvrátit možnost cyklické struktury ligandu.

Z ITC experimentů nebylo možné získat žádné termodynamické parametry, jelikož ligand s oběma hostiteli (CB6 a CB7) vykazoval doplňkové teplo po dosažení ekvivalence, což může značit potlačenou disociaci ligandu makrocyklem. Nicméně z měření bylo vypořazováno, že systém s CB6 má hodnotu K_a větší než 10^7 M^{-1} a afinita CB6 k ligandu je větší než afinita CB7.

Třetí použitou nezávislou metodou je ESI-MS. Z hmotnostního spektra ligandu **6a** bylo evidentní, že ligand kvantitativně podléhá eliminaci nejpozději v iontovém zdroji. Což má za následek, že v ESI-MS spektru nelze vidět protonovanou molekulu, ale fragmentový ion 171 *m/z*. V hmotnostních spektrech studovaných komplexů tvořil produkt eliminace s CB6 i CB7 dvakrát nabitý systém se stechiometrií 1:1. Dle zaznamenaných intenzit v ESI-MS spektrech je komplex s CB6 stabilnější než s CB7.

Později byla zjištěna experimentální data z EA, která nesouhlasila s teoreticky vypočteným zastoupením jednotlivých prvků ve struktuře ligandu. Experimentální data se nejvíce

shodovala s vypočtenými hodnotami odpovídající struktuře eliminovaného produktu. Ovšem možný vznik alkenů je vyvrácen NMR měřením.

K úspěšné syntéze 1,8,13,20-tetraazaikosanu by mohla vést úprava reakčních podmínek S_N . Zvýšení molárního poměru výchozí látky **1** vůči dibrombutanu, případně směs refluxovat při vyšší teplotě. Dále by mohlo pomoci výrazně prodloužit reakční dobu nebo použít jiné rozpouštědlo.

Titulní ligand bude následně postupně prodlužován o další alifatické řetězce s aminoskupinami, díky čemuž vznikne sloučenina s více vazebnými místy.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- ¹ Y. Y. Lenis, M. A. Elmetwally, J. G. Maldonado-Estrada, F. W. Bazer. *Zygote*. **2017**, 25, 244–255.
- ² U. Bachrach. *Curr. Protein Pept. Sci.* **2005**, 6, 559–566.
- ³ D. H. Bae, D. J. R. Lane, P. J. Jansson, D. R. Richardson. *Biochim Biophys Acta Gen Subj.* **2018**, 1862, 2053–2068.
- ⁴ C. Stefanelli, F. Bonavita, I. Stanic, M. Mignani, A. Facchini, C. Pignatti, F. Flamigni, C. M. Caldarera. *FEBS Lett*, **1998**, 437, 233–236.
- ⁵ A. Haunstetter, S. Izumo. *Circ. Res.* **1998**, 82, 1111–1129.
- ⁶ S. Fulda, K. M. Debatin. *Biochim Biophys. Acta*. **2004**, 1705, 27–41.
- ⁷ K. Soda. *Med Hypotheses*. **2010**, 75, 299–301.
- ⁸ A. E. Pegg. *J. Biol. Chem.* **2016**, 291, 14904–14912.
- ⁹ A. J. Michael, J. M. Furze, M. J. C. Rhodes, D. Burtin. *Biochem. J.* **1996**, 314, 241–248.
- ¹⁰ C. P. Jenkinson, W. W. Grody, S. D. Cederbaum. *Comp Biochem Physiol.* **1996**, 114, 107–132.
- ¹¹ H. Li, C. J. Meininger, J. R. Hawker, T. E. Haynes, D. Kepka-Lenhart, S. K. Mistry, S. M. Morris, G. Wu. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* **2001**, 280, 75–82.
- ¹² X. Wang, W. Ying, K. A. Dunlap, G. Lin, M. C. Satterfield, R. C. Burghardt, G. Wu, F. W. Bazer. *Biol. Reprod.* **2014**, 90, 1–15.
- ¹³ A. E. Pegg, Y. Ikeguchi, T. Skarina, S. Beasley, C. Arrowsmith, A. Edwards, A. Joachimiak, A. E. Pegg, A. Savchenko. *Cancer Res.* **1988**, 48, 759–774.
- ¹⁴ Y. Ikeguchi, M. Bewley, A. E. Pegg. *J Biochem.* **2006**, 139, 1–9.
- ¹⁵ R. A. Hillary, A. E. Pegg. *Biochim Biophys Acta.* **2003**, 1647, 161–166.
- ¹⁶ C. S. Coleman, G. Hu, A. E. Pegg. *Biochem J.* **2004**, 379, 849–855.
- ¹⁷ L. Brieger: Weitere Untersuchungen über Ptomaine, A. Hirschwald. **1885**.
- ¹⁸ O. Yamaguchi, K. Otsu. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **2012**, 60, 242–247.
- ¹⁹ T. Eisenberg, H. Knauer, A. Schauer, S. Büttner, C. Ruckenstuhl, D. Carmona-Gutierrez, J. Ring, S. Schroeder, C. Magnes, L. Antonacci, H. Fussi, L. Deszcz, R. Hartl, E. Schraml, A. Criollo, E. Megalou, D. Weiskopf, P. Laun, G. Heeren, M. Breitenbach, B. Grubeck-Loebenstein, E. Herker, B. Fahrenkrog, K. U. Fröhlich, F. Sinner, N. Tavernarakis, N. Minois, G. Kroemer, F. Madeo. *Nat. Cell Biol.* **2009**, 11, 1305–1314.
- ²⁰ J. Fana, Z. Fengb, N. Chen. *Pharmacol. Res.* **2020**, 159, 104943.

- ²¹ A. van Leeuwenhoeck. *Phil. Trans.* **1678**, *12*, 1040–1043.
- ²² L. N. Vauquelin. *Ann. Chim.* **1791**, *9*, 64–80.
- ²³ A. Ladenburg, J. Abel. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1888**, *21*, 758–766.
- ²⁴ O. Rosenheim. *Biochem. J.* **1924**, *18*, 1253–1262.
- ²⁵ C. Stefanelli, F. Bonavita, I. Stanic, M. Mignani, A. Facchini, C. Pignatti, F. Flamigni, C. M. Caldarera. *FEBS Lett.* **1998**, *437*, 233–236.
- ²⁶ C. Gómez Gallego, G. Ros Berruezo, M. J. Bernal Cava, D. Pérez Conesa, M. J. Periago Castón. *Arch. Lat. Am. Nutr.* **2008**, *58*, 117–25.
- ²⁷ N. Roman, G. Dandrifosse, F. Jeusette, P. Forget. *Pediatr. Res.* **1992**, *32*, 58–63.
- ²⁸ M. Atiya Ali, B. Strandvik, K. G. Sabel, C. Palme Kilander, R. Strömberg, A. Yngve. *J. Hum. Nutr. Diet.* **2014**, *27*, 459–467.
- ²⁹ M. Atiya Ali, B. Strandvik, C. Palme Kilander, A. Yngve. *J. Hum. Nutr. Diet.* **2013**, *26*, 164–170.
- ³⁰ A. Okamoto, E. Sugi, Y. Koizumi, F. Yanadiga, S. Udaka. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **1997**, *61*, 1582–1584.
- ³¹ N. N. AL-Hadithi, B. Saad. *Anal Lett.* **2011**, *44*, 2245–6224.
- ³² A. Minarini, A. Milelli, V. Tumiatti, M. Rosini, M. L. Bolognesi, C. Melchiorre. *Amino Acids.* **2010**, *38*, 383–392.
- ³³ B. G. Benfey, M. S. Yong, B. Belleau, C. Melchiorre. *Can. J. Physiol Pharmacol.* **1979**, *57*, 41–47.
- ³⁴ B. G. Benfey, B. Belleau, L. Brasili, M. Giannella, C. Melchiorre. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **1980**, *58*, 1477–1483.
- ³⁵ F. Li, Y. Li, K. Ding, W. Zhao, X. Yu, W. Hua. EP2684862A1, **2014**.
- ³⁶ M. L. Hinck, J. Ferguson, J. Puhaakka. *Water Sci. Technol.* **1997**, *35*, 25–31.
- ³⁷ A. Shundo, S. Yamamoto, K. Tanaka. *JACS Au.* **2022**, *2*, 1522–1542.
- ³⁸ A. Hartono, E. F. da Silva, H. F. Svendsen. *Chem. Eng. Sci.* **2009**, *64*, 3205–3213.
- ³⁹ A. Marxer, K. Miescher. *Helv. Chim. Acta.* **1951**, *34*, 924–931.
- ⁴⁰ C. Strohmam, V. H. Gessner. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 4566–4569.
- ⁴¹ D. S. Zhuk, P. A Gembitskii, V. A. Kargin. *Russ. Chem. Rev.* **1965**, *34*, 515.
- ⁴² C. J. Barr. *Chem. Abs.* **1961**, *55*, 4964.
- ⁴³ T. J. West, J. L. Dewey. *Chem. Abs.* **1962**, *57*, 8289
- ⁴⁴ G. Manecke, K. H. Heller. *Chem. Abs.* **1964**, *60*, 9440a.

- ⁴⁵ O. Boussif, F. Lezoualc'h, M. A. Zanta, M. D. Mergny, D. Scherman, B. Demeneix, J. P. Behr. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **1995**, *92*, 7297–7301.
- ⁴⁶ N. D. Sonawane, F. C. Szoka, A. S. Verkman. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 44826–44831.
- ⁴⁷ H. C. Wood. *Proc. Phila. Co. Med. Soc.* **1904**, *25*, 281–286.
- ⁴⁸ Package insert: Atabrine hydrochloride. *Winthrop-Breon Laboratories*, New York. **1984**.
- ⁴⁹ R. Green. *Lancet*. **1932**, *1*, 826–829.
- ⁵⁰ D. J. Wallace. *Semin. Arthritis. Rheum.* **1989**, *18*, 282–297.
- ⁵¹ E. A. Rovelstad, M. H. Stauffer, H. L. Mason, R. M. Steinhilber. *Gastroenterology*. **1957**, *33*, 937–947.
- ⁵² W. P. Chamberlain, D. J. Boles. *Arch Ophthalmol.* **1946**, *35*, 120–134.
- ⁵³ P. J. Weina. *Mil. Med.* **1998**, *163*, 635–639.
- ⁵⁴ J. M. Lehn. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1988**, *27*, 89–112.
- ⁵⁵ C. J. Pedersen. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1988**, *27*, 1021–1027.
- ⁵⁶ D. J. Cram. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1988**, *27*, 1009–1020.
- ⁵⁷ J. M. Lehn. *Sci.* **2002**, 2400.
- ⁵⁸ R. Laishram, S. Bhowmik, U. Maitra. *J. Mater. Chem. C*. **2015**, *3*, 5885–5889.
- ⁵⁹ P. Sutar, T. K. Maji. *Chem. Commun.* **2016**, *52*, 8055–8074.
- ⁶⁰ E. M. Surender, S. Comby, B. L. Cavanagh, O. Brennan, T. C. Lee, T. Gunnlaugsson. *Chem.* **2016**, *1*, 438–455.
- ⁶¹ J. Karkalas, S. Ma, W. R. Morrison, R. A. Pethrick. *Carbohydr. Res.* **1995**, *268*, 233–247.
- ⁶² F. Ulatowski, K. Dabrova, T. Balakier, J. Jurczak. *J. Org. Chem.* **2016**, *81*, 1746–1756.
- ⁶³ S. J. Barrow, S. Kasera, M. J. Rowland, J. del Barrio, O. A. Scherman. *Chem. Rev.* **2015**, *115*, 12320–12406.
- ⁶⁴ M. J. Swamy. *Biochem. Mol. Biol. Int.* **1995**, *36*, 219–225.
- ⁶⁵ L. Cao, M. Šekutor, P. Y. Zavalij, K. Mlinarić-Majerski, R. Glaser, L. Isaacs. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 988–993.
- ⁶⁶ H. Bai, J. Wang, Z. Li, G. Tang. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 2097.
- ⁶⁷ G. Raffaini, F. A. Ganazzoli. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 4831.
- ⁶⁸ Y. Liu, Y. Chen, X. Gao, J. Fu, L. Hu. *Crit. Rev. Food. Sci. Nutr.* **2022**, *62*, 2627–2640.
- ⁶⁹ R. Behrend, R. Meyer, F. I. Rusche: Ueber Condensationsproducte aus Glycoluril und Formaldehyd. Ph.D. thesis, Heidelberg University, **1905**.

- ⁷⁰ W. A. Freeman, W. L. Mock, N. Y. Shih. *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 7367–7368.
- ⁷¹ J. Kim, I. S. Jung, S. Y. Kim, E. Lee, J. K. Kang, S. Sakamoto, K. Yamaguchi, K. Kim, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 540.
- ⁷² Y. Miyahara, K. Abe, T. Inazu. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 3020–3023.
- ⁷³ M. V. Rekharsky, Y. Ho Ko, N. Selvapalam, K. Kim, Y. Inoue. *Supramol. Chem.* **2007**, *19*, 39–46.
- ⁷⁴ N. Saleh, M. S. Bufaroosha, Z. Moussa, R. Bojesomo, H. Al-Amodi, A. Al-Ahdal. *Mol.* **2020**, *25*, 3702.
- ⁷⁵ F. Lutz, N. Lorenzo-Parodi, T. C. Schmidt, J. Niemeyer. *Chem. Commun.* **2021**, *57*, 2887.
- ⁷⁶ X. J. Cheng, L. L. Liang, K. Chen, N. N. Ji, X. Xiao, J. X. Zhang, Y. Q. Zhang, S. F. Xue, Q. J. Zhu, X. L. Ni, Z. Tao. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2013**, *52*, 7252–7255.
- ⁷⁷ Q. Li, S. C. Qiu, J. Zhang, K. Chen, Y. Huang, X. Xiao, Y. Zhang, F. Li, Y. Q. Zhang, S. F. Xue, Q. J. Zhu, Z. Tao, L. F. Lindo, G. Wei. *Org Lett.* **2016**, *18*, 4020–4023.
- ⁷⁸ K. I. Assafa, W. M. Nau. *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44*, 394–418.
- ⁷⁹ D. Shetty, J. K. Khedkar, K. Min Park, K. Kim. *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44*, 8747–8761.
- ⁸⁰ A. Flinn, G. C. Hough, J. F. Stoddart, D. J. Williams. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1992**, *31*, 1475.
- ⁸¹ S. Y. Jon, N. Selvapalam, D. H. Oh, J. K. Kang, S. Y. Kim, Y. J. Jeon, J. W. Lee, K. Kim. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 10186–10187.
- ⁸² S. K. Ghosh, A. Dhamija, Y. H. Ko, J. An, M. Y. Hur, D. R. Boraste, J. Seo, E. Lee, K. M. Park, K. Kim. *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, *141*, 17503–17506.
- ⁸³ V. Havel, J. Svec, M. Wimmerova, M. Dusek, M. Pojarova, V. Sindelar. *Org. Lett.* **2011**, *13*, 4000.
- ⁸⁴ B. Vinciguerra, L. Cao, J. R. Cannon, P. Y. Zavalij, C. Fenselau, L. Isaacs. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 13133–13140.
- ⁸⁵ J. Lagona, J. C. Fettinger, L. Isaacs. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 10381–10392.
- ⁸⁶ W. H. Huang, S. M. Liu, P. Y. Zavalij, L. Isaacs. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 14744.
- ⁸⁷ W. H. Huang, P. Y. Zavalij, L. Isaacs. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2007**, *46*, 7425.
- ⁸⁸ A. Villiers. *Compt. Rend. Fr. Acad. Sci.* **1891**, *112*, 435–438.
- ⁸⁹ K. Freudenberg, H. Boppel, M. Meyer-Delius. *Naturwissenschaften.* **1938**, *26*, 123–124.
- ⁹⁰ L. Szente, J. Szejtli. *Trends. Food Sci. Technol.* **2004**, *15*, 137–142.

- ⁹¹ T. Loftsson, M. E. Brewster. *J. Pharm. Sci.* **1996**, *85*, 1017–1025.
- ⁹² Gras notice no. Grn 000155: alpha-cyclodextrin, U.S. Food and Drug Administration, Silver Spring, MD. **2004**.
- ⁹³ Gras notice no. Grn 000074: beta-cyclodextrin, U.S. Food and Drug Administration, Silver Spring, MD. **2001**.
- ⁹⁴ Gras notice no. Grn 000046: gamma-cyclodextrin, U.S. Food and Drug Administration, Silver Spring, MD. **2000**.
- ⁹⁵ M. V. Rekharsky, Y. Inoue. *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 1875–1918.
- ⁹⁶ A. Ikeda, S. Shinkai. *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 1713–1734.
- ⁹⁷ T. Ogoshi, S. Kanai, S. Fujinami, T. Yamagishi, Y. Nakamoto. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 5022–5023.
- ⁹⁸ J. J. Christensen, D. J. Eatough, R. M. Izatt. *Chem. Rev.* **1974**, *74*, 351–384.
- ⁹⁹ W. L. Mock. F. Vögtle (Ed.), *Comprehensive Supramolecular Chemistry*, vol. 2, Pergamon Press, Oxford. **1996**, 477–493.
- ¹⁰⁰ C. Meschke, H. J. Buschmann, E. Schollmeyer, *Polymer* **1998**, *40*, 945–949.
- ¹⁰¹ S. G. Roh, K. M. Park, G. J. Park, S. Sakamoto, K. Yamaguchi, K. Kim. *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 671–675.
- ¹⁰² W. L. Mock, N. Y. Shih. *J. Org. Chem.* **1983**, *48*, 3618–3619.
- ¹⁰³ W. L. Mock, N. Y. Shin. *J. Org. Chem.* **1986**, *51*, 4440–4446.
- ¹⁰⁴ M. V. Rekharsky, Y. Ho Ko, N. Selvapalam, K. Kim, Y. Inoue. *Supramol. Chem.* **2007**, *19*, 39–46.
- ¹⁰⁵ C. Marquez, W. M. Nau. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 3155–3160.
- ¹⁰⁶ G. Wenz. *Clin. Drug Invest.* **2000**, *19*, 21–25.
- ¹⁰⁷ M. V. Rekharsky, H. Yamamura, M. Kawai, I. Osaka, R. Arakawa, A. Sato, Y. Ho Ko, N. Selvapalam, K. Kim, Y. Inoue. *Org. Lett.* **2006**, *8*, 815–818.
- ¹⁰⁸ K. Campbell, C. J. Kuehl, M. J. Ferguson, P. J. Stang, R. R. Tykwinski. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 7266–7267.
- ¹⁰⁹ V. Kolman, M. S. A. Khan, M. Babinský, R. Marek, V. Šindelář. *Org. Lett.* **2011**, *13*, 6148–6151.
- ¹¹⁰ M. S. A. Khan, D. Heger, M. Nečas, V. Šindelář. *Phys. Chem. B.* **2009**, *113*, 11054–11057.

- ¹¹¹ S. J. C. Lee, J. W. Lee, H. H. Lee, J. Seo, D. H. No, Y. Ho Ko, K. Kim, H. I. Kim. *J. Phys. Chem. B.* **2013**, *117*, 8855–8864.
- ¹¹² K. Jelínková, A. Závodná, J. Kaleta, P. Janovský, F. Zatloukal, M. Nečas, Z. Prucková, L. Dastychová, M. Rouchal, R. Vícha. *J. Org. Chem.* **2023**, *88*, 15615–15625.
- ¹¹³ N. Xie, K. Feng, B. Chen, M. Zhao, S. Peng, L. P. Zhang, C. H. Tungb, L. Z. Wu. *J. Mater. Chem. B.* **2014**, *2*, 502–510.
- ¹¹⁴ T. M. Subrahmanya, N. S. Naik, M. Padaki, R. Geetha Balakrishna, M. S. Jyothi, S. Yadav, W. S. Hung. *J. Appl. Polym. Sci.* **2019**, *136*, 48254.
- ¹¹⁵ L. M. harwood, C. J. Moody, J. M. Percy: *Experimental organic chemistry: standard and microscale*. 2nd ed. Oxford: Blackwell Science, 1999. ISBN 0632048190.
- ¹¹⁶ P. Branná, J. Černochová, M. Rouchal, P. Kulhánek, M. Babinský, R. Marek, M. Nečas, Ivo Kuřitka, R. Vícha. *J. Org. Chem.* **2016**, *81*, 9595–9604.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

PA	polyaminy
PUT	putrescin
SPD	spermidin
SPE	spermin
DETA	diethylentriamin
MEA	ethanolamin
PMDTA	pentamethyldiethylentriamin
PEI	polyethylenimin
K_a	asociační konstanta
CB n	cucurbit[n]uril
CD	cyklodextrin
ITC	isotermální titrační mikrokalorimetrie
NMR	nukleární magnetická resonance
ESI-MS	elektrosprejová ionizace s hmotnostním detektorem
CDCl ₃	deuterovaný chloroform
D ₂ O	deuterovaná voda
δ	chemický posun
RVO	rotační vakuová odparka
DMF	dimethylformamid
THF	tetrahydrofuran
DME	dimethoxyethan
TLC	tenkovrstvá chromatografie
S _N	nukleofilní substituce
EA	elementární analýza

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 Chemická struktura putrescinu (I), spermidinu (II) a sperminu (III).	12
Obrázek 2 Biosyntéza polyaminů u savců.....	14
Obrázek 3 Chemická struktura agmatinu (IV).	15
Obrázek 4 Obsah polyaminů v mateřském mléce po narození dítěte ve vybraných dnech.	17
Obrázek 5 Chemická struktura benextraminu (V).....	19
Obrázek 6 Syntéza diethylentriaminu (VII).....	19
Obrázek 7 Syntéza pentamethyldiethylentriaminu (IX).....	21
Obrázek 8 Příklad lineárního (X) a rozvětveného (XI) fragmentu polyethyleniminu.	21
Obrázek 9 Chemická struktura mepakrinu (XII).	23
Obrázek 10 Znázornění inkluzních komplexů v různých stechiometrických poměrech....	25
Obrázek 11 Syntéza cucurbit[6]urilu (XIV).....	26
Obrázek 12 Vybraní zástupci cucurbit[<i>n</i>]urilů. ⁶³	27
Obrázek 13 Röntgenova struktura komplexu Eu ³⁺ CB14.....	28
Obrázek 14 Röntgenova struktura bis- <i>nor-seco</i> -CB10. ⁷⁸	29
Obrázek 15 Enzymatická příprava cyklodextrinu (XV).....	30
Obrázek 16 Chemická struktura calix[<i>n</i>]arenů (XVI) a pillar[<i>n</i>]arenů (XVII).....	31
Obrázek 17 Chemická struktura dibenzo[18]crown-6 (XVIII).	32
Obrázek 18 Ternární komplex DHA s CB6 a β-CD.	34
Obrázek 19 Struktura připraveného rotaxanu a znázornění kyvadlového chování CB6....	35
Obrázek 20 Předpokládaný komplex 2:1 CB6 s připravovaným ligandem.	45
Obrázek 21 Obecné schéma syntetické strategie A.....	46
Obrázek 22 Obecné schéma syntetické strategie B.....	47
Obrázek 23 Syntéza <i>N</i> -Boc-1,6-diaminohexanu.	47
Obrázek 24 Neúspěšný pokus o přípravu dichloridu kyseliny jantarové.	48
Obrázek 25 Chlorace kyseliny jantarové.....	49
Obrázek 26 Příprava ochráněného diamidu 3 pomocí kondenzace.....	49
Obrázek 27 ¹ H NMR spektrum ochráněného diamidu 3 (CDCl ₃ , 303 K).....	50
Obrázek 28 Neúspěšný pokus o ochránění diamidu 3	51
Obrázek 29 Nezdařená redukce produktu ochránění.....	51
Obrázek 30 Nezdařené redukce ochráněného diamidu 3	52
Obrázek 31 Neúspěšná příprava sloučeniny 7 pomocí nukleofilní substituce.	53
Obrázek 32 ¹ H NMR spektrum produktu nukleofilní substituce (CDCl ₃ , 303 K).	55
Obrázek 33 Pravděpodobně připravený produkt nukleofilní substituce 7a	55

Obrázek 34 Neúspěšné odchránění sloučeniny 7	56
Obrázek 35 ^1H NMR spektra postupného vymývání výchozí látky od uvažovaného produktu 5 (CDCl_3 , 303 K).	57
Obrázek 36 2D COSY NMR spektrum produktu po extrakci (CDCl_3 , 303 K).	58
Obrázek 37 Odchránění sloučeniny 7a	59
Obrázek 38 ^1H NMR spektrum sloučeniny 5a (CDCl_3 , 303 K).	59
Obrázek 39 Převod sloučeniny 5a na dihydrochlorid.	60
Obrázek 40 ^1H NMR spektrum sloučeniny 6a v (D_2O , 303 K).	61
Obrázek 41 2D TOCSY NMR spektrum 6a (D_2O , 303 K).	62
Obrázek 42 Hmotnostní spektrum fragmentu ligandu.	63
Obrázek 43 Návrh možné fragmentace ligandu.	63
Obrázek 44 Chemické struktury možných podob titulního ligandu.	64
Obrázek 45 ^1H NMR titrace ligandu 6a s CB6 (NaCl , 303 K)	67
Obrázek 46 Komplex CB6– 6a ve stechiometrii 1:1 dle ^1H NMR titrace.	67
Obrázek 47 ^1H NMR titrace ligandu 6a s CB7 při 30 °C (NaCl , 303 K).	68
Obrázek 48 Komplex CB7– 6a ve stechiometrii 1:1 dle ^1H NMR titrace.	68
Obrázek 49 2D NMR experimenty TOCSY (zelené krosníky) s ROESY (červené krosníky).	69
Obrázek 50 Chemické struktury kompetitorů pro měření s CB6.	70
Obrázek 51 ITC záznam pro komplex CB6– 6a (NaCl , 303 K).	71
Obrázek 52 Hmotnostní spektra směsí ligandu 6a s CB6 (A) a CB7 (B).	73

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 Obsah volných a vázaných polyaminů v rostlinných potravinách. ³⁰	18
Tabulka 2 Obsah volných a vázaných polyaminů v živočišných potravinách. ³⁰	18
Tabulka 3 Rozměry vybraných cucurbit[<i>n</i>]urilů. ⁷¹	27
Tabulka 4 Podmínky reakcí k odstranění Boc chránicí skupiny.	51
Tabulka 5 Reakční podmínky jednotlivých redukcí.....	52
Tabulka 6 Podmínky reakcí k odstranění Boc chránicí skupiny.	56
Tabulka 7 Teoretické procentuální zastoupení atomů v navržených strukturách.	64
Tabulka 8 Koncentrace jednotlivých komponent vystupujících v ITC měření.....	70

SEZNAM PŘÍLOH

Příloha 1 ^1H NMR spektrum sloučeniny **1** (CDCl_3 , 303 K).

Příloha 2 ^1H NMR spektrum anhydridu kyseliny jantarové (CDCl_3 , 303 K).

Příloha 3 ^{13}C NMR spektrum anhydridu kyseliny jantarové (CDCl_3 , 303 K).

Příloha 4 ^1H NMR spektrum sloučeniny **2** (CDCl_3 , 303 K).

Příloha 5 ^{13}C NMR spektrum sloučeniny **2** (CDCl_3 , 303 K).

Příloha 6 ^1H NMR spektrum S_N produktu po reakci v poměru 10:1 (CDCl_3 , 303 K).

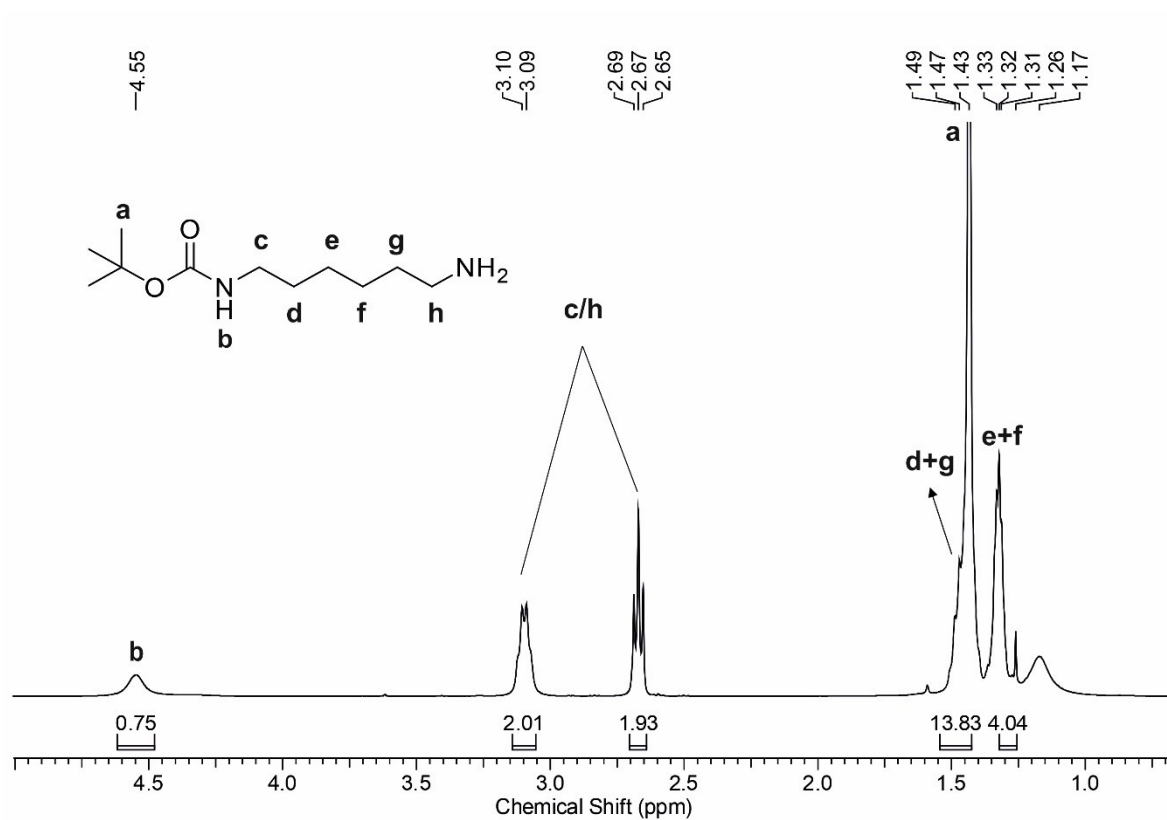
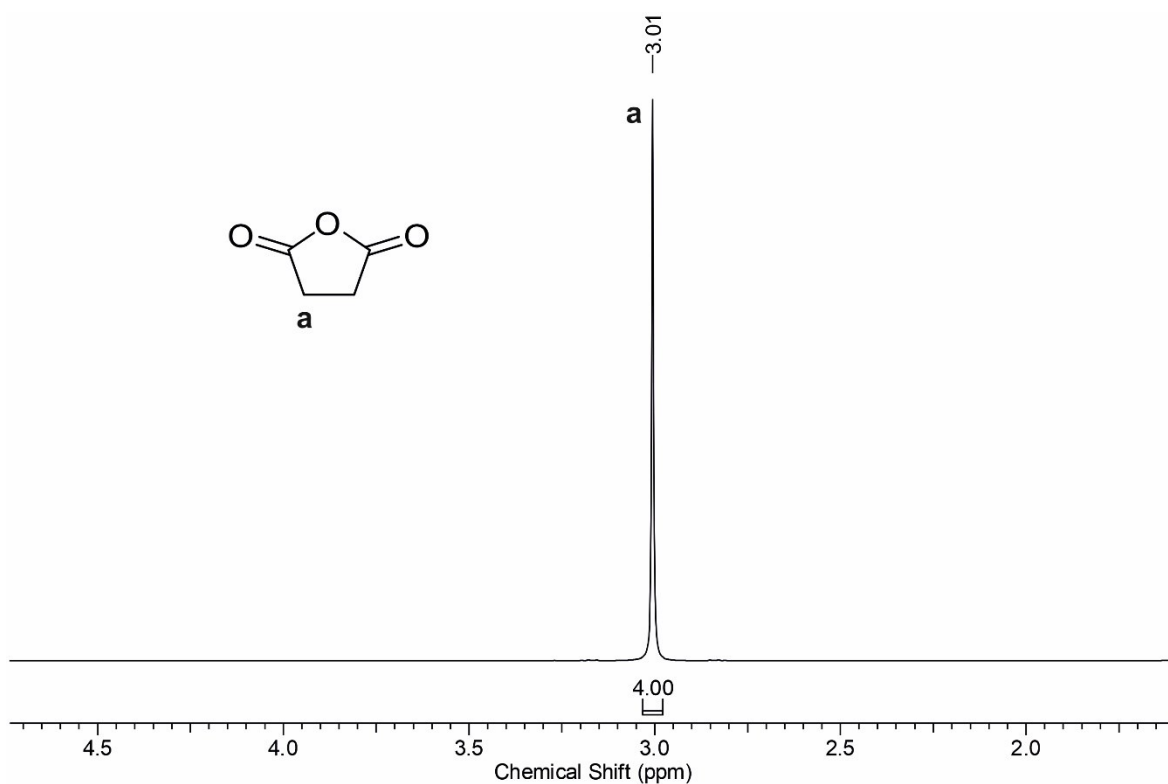
Příloha 7 ^1H NMR spektrum S_N produktu po reakci v poměru 5:1 (CDCl_3 , 303 K).

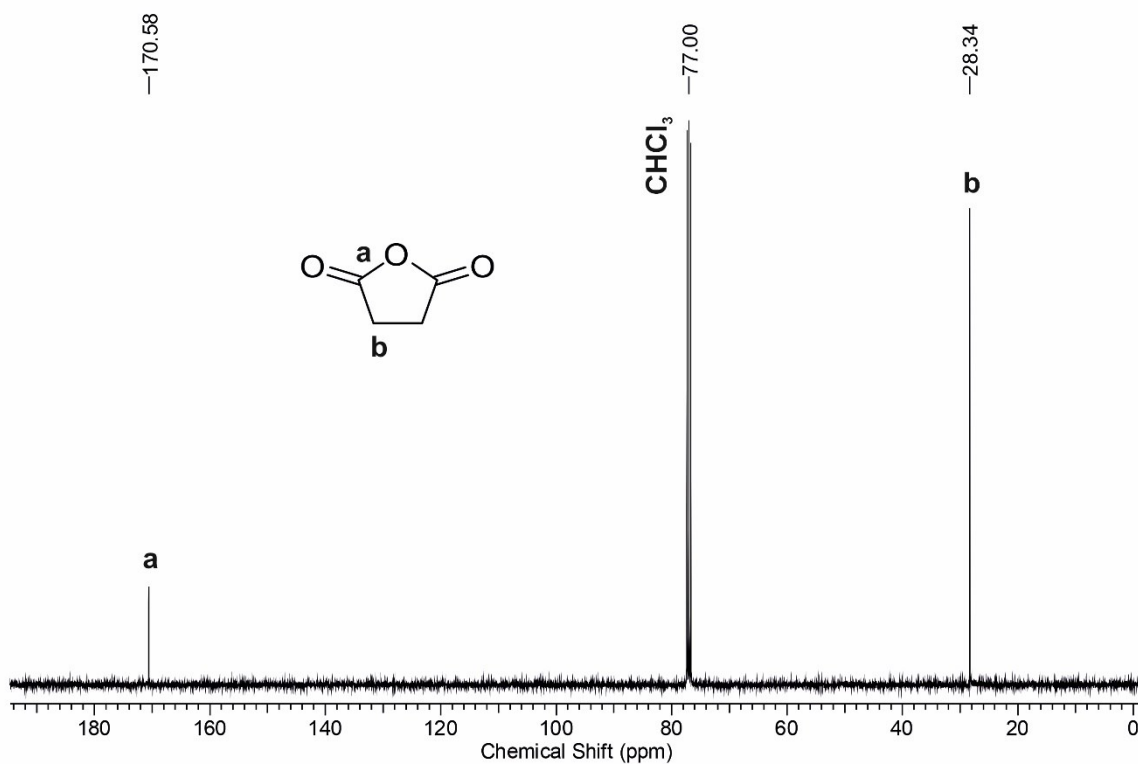
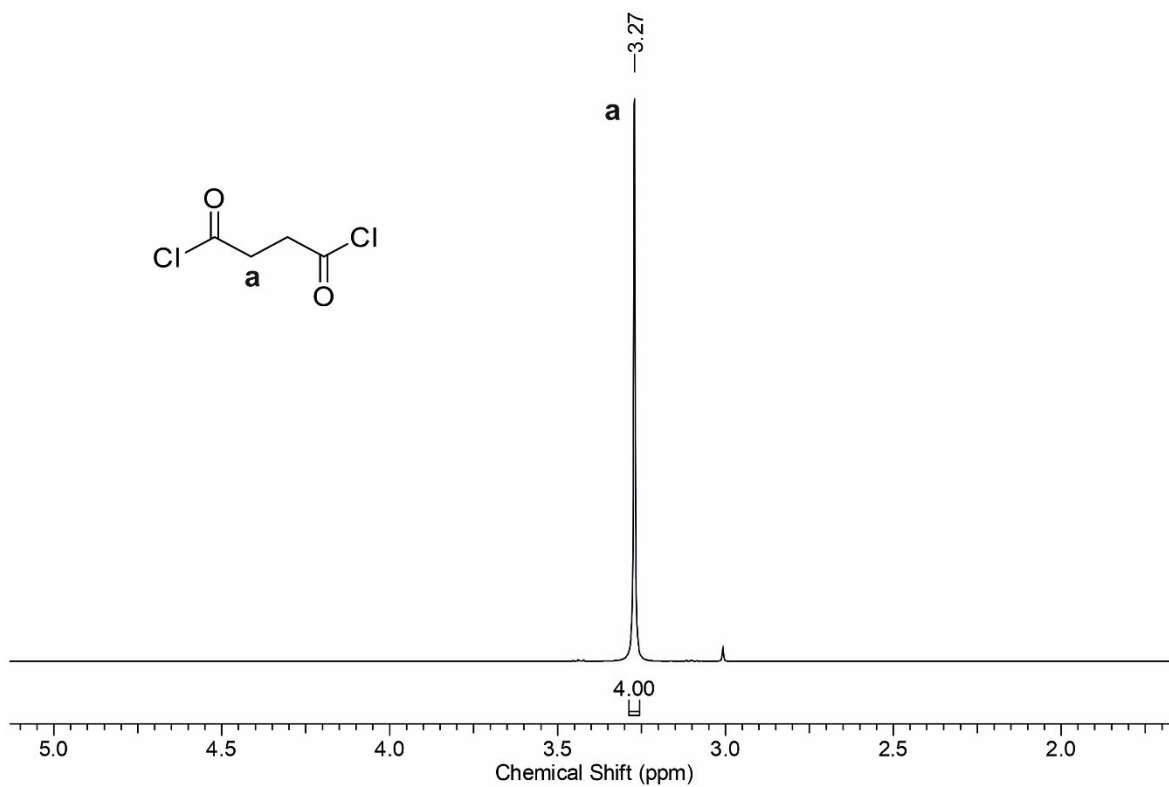
Příloha 8 ^1H NMR spektrum S_N produktu po reakci v poměru 2:1 (CDCl_3 , 303 K).

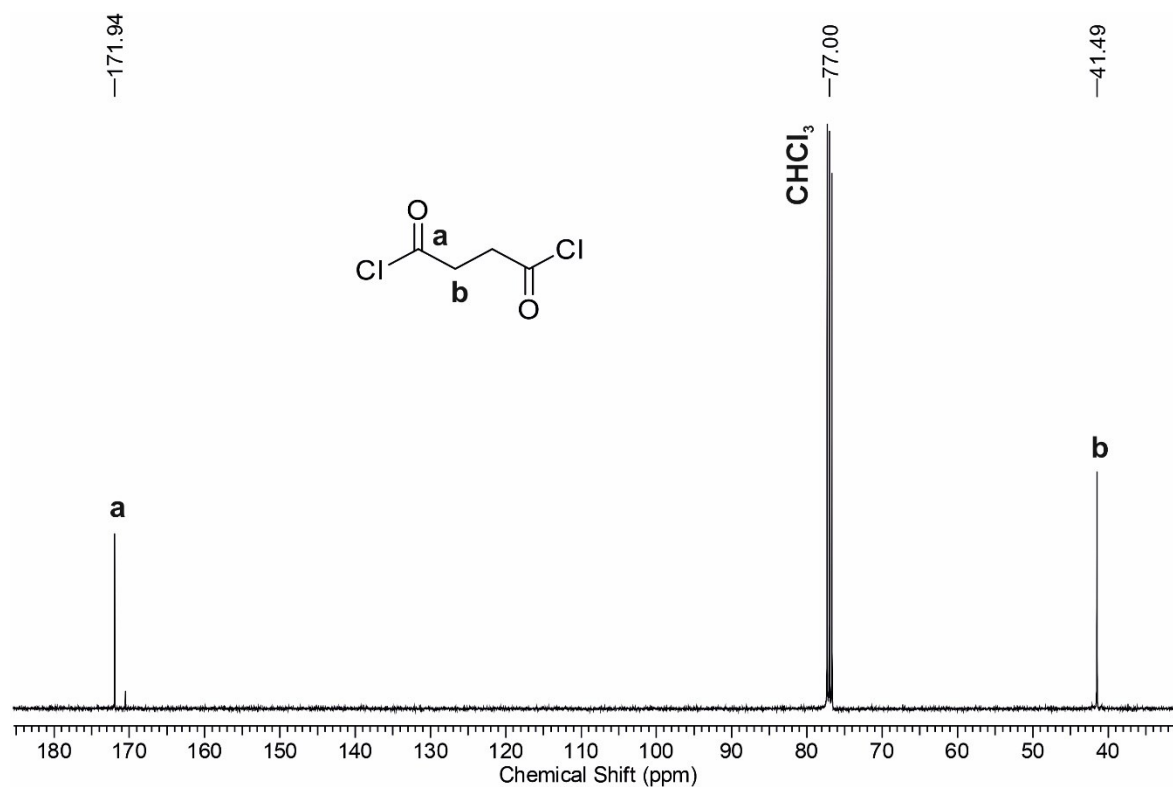
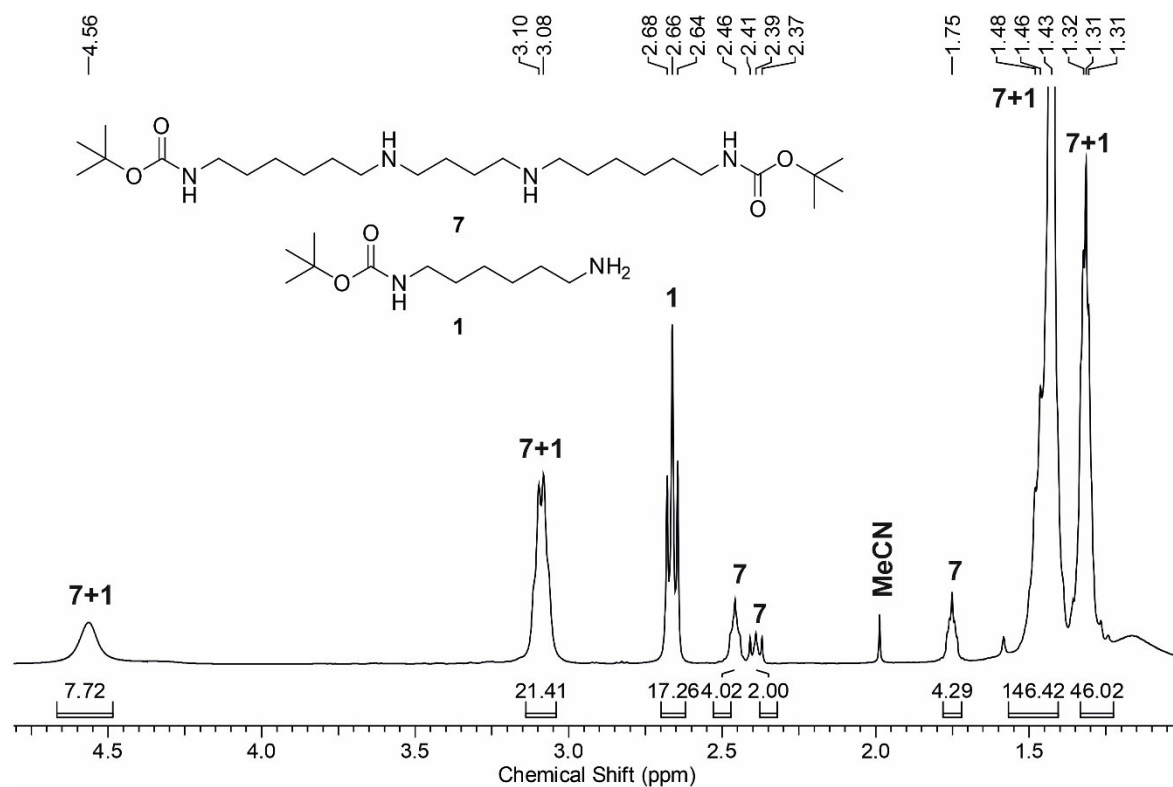
Příloha 9 ^{13}C NMR spektrum sloučeniny **7a** (CDCl_3 , 303 K).

Příloha 10 ^{13}C NMR spektrum sloučeniny **6a** (D_2O , 303 K).

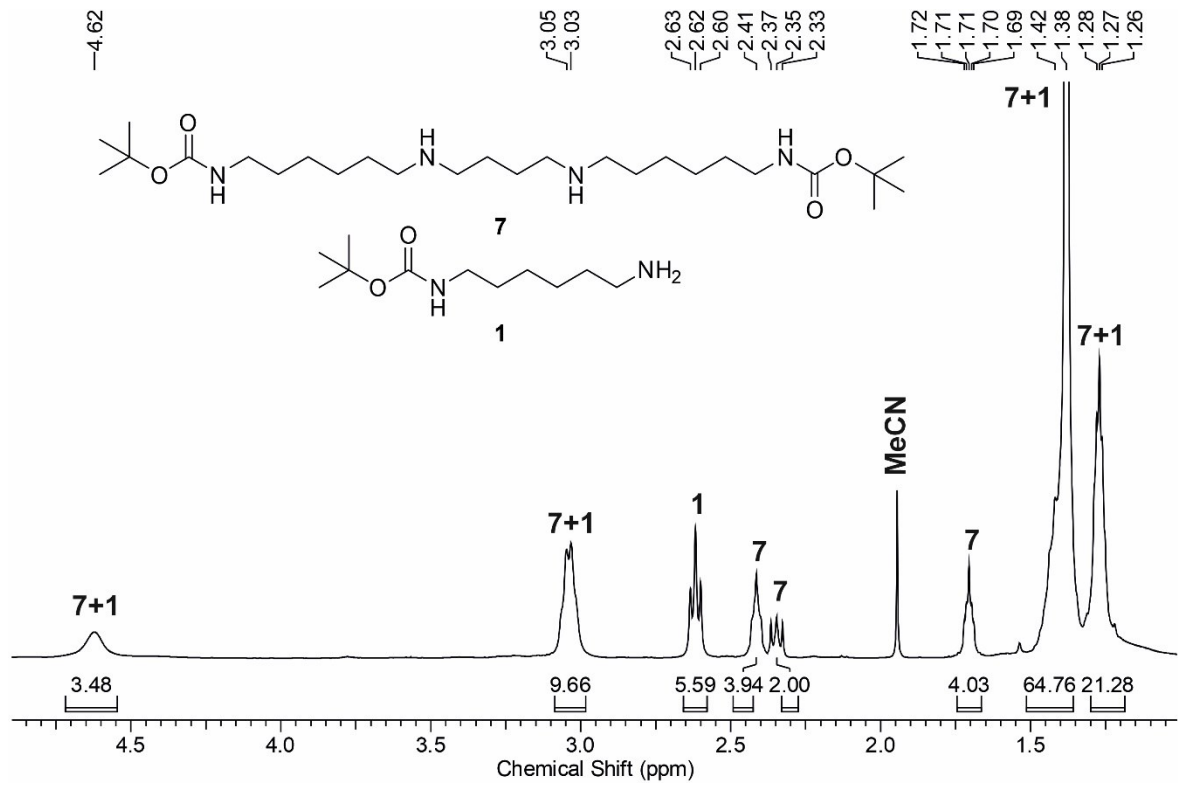
PŘÍLOHY

Příloha 1 ^1H NMR spektrum sloučeniny 1 (CDCl_3 , 303 K).Příloha 2 ^1H NMR spektrum anhydridu kyseliny jantarové (CDCl_3 , 303 K).

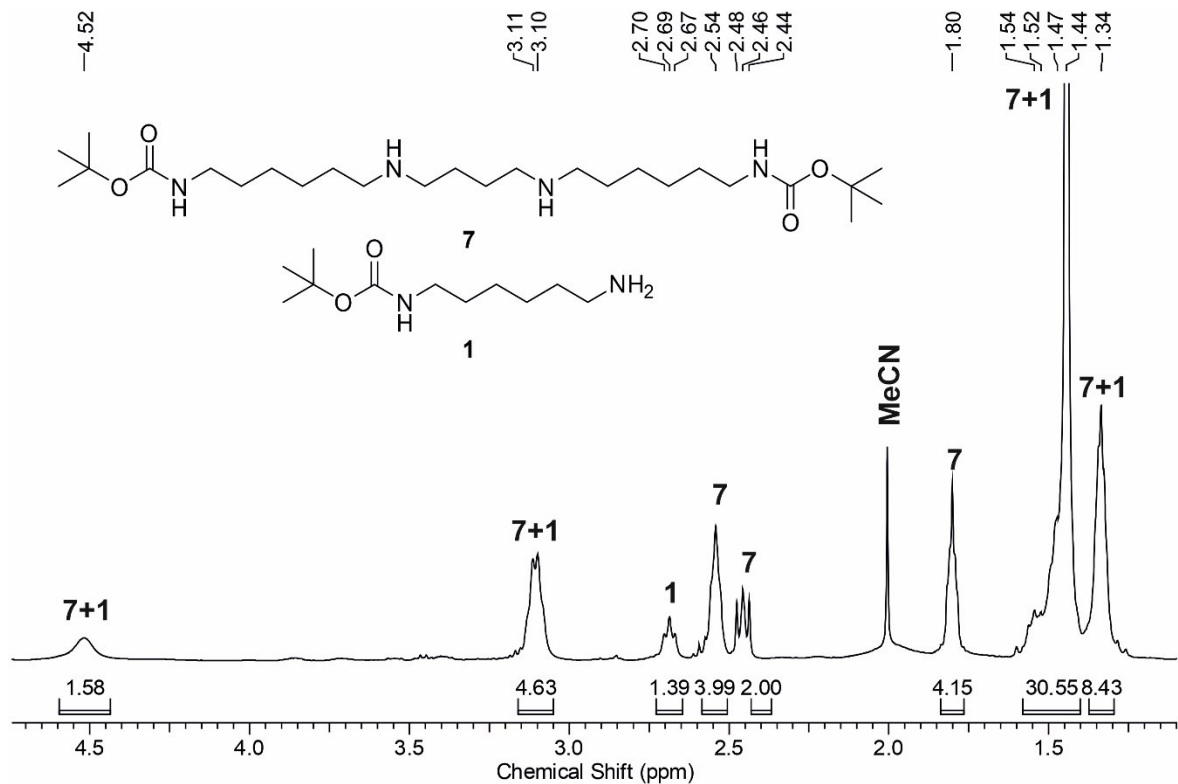
Příloha 3 ^{13}C NMR spektrum anhydridu kyseliny jantarové (CDCl_3 , 303 K).Příloha 4 ^1H NMR spektrum sloučeniny 2 (CDCl_3 , 303 K).

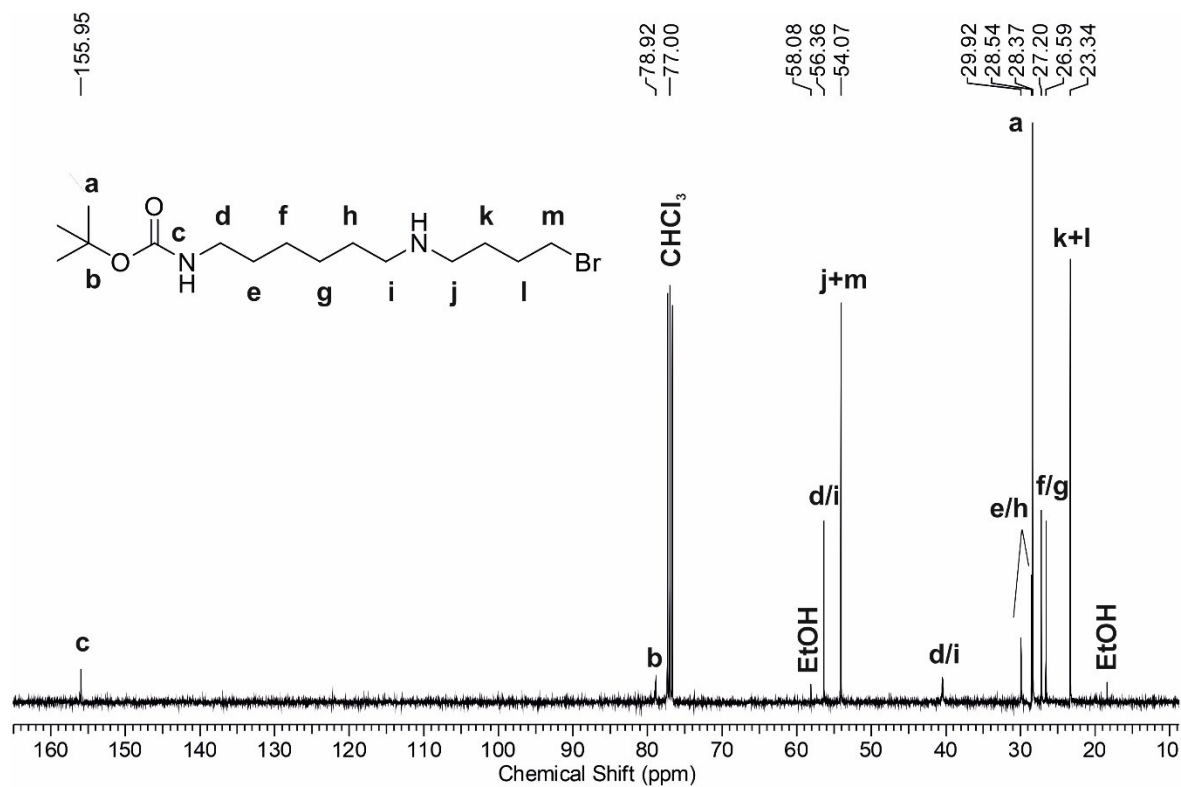
Příloha 5 ^{13}C NMR spektrum sloučeniny **2** (CDCl_3 , 303 K).Příloha 6 ^1H NMR spektrum S_N produktu po reakci v poměru 10:1 (CDCl_3 , 303 K).

Příloha 7 ^1H NMR spektrum S_N produktu po reakci v poměru 5:1 (CDCl_3 , 303 K).



Příloha 8 ^1H NMR spektrum S_N produktu po reakci v poměru 2:1 (CDCl_3 , 303 K).



Příloha 9 ^{13}C NMR spektrum sloučeniny **7a** (CDCl_3 , 303 K).Příloha 10 ^{13}C NMR spektrum sloučeniny **6a** (D_2O , 303 K).