

Mikrokalorimetrická stanovení supramolekulárních komplexů vybraných aminokyselin s cucurbiturily

Nikol Jakubicová

Bakalářská práce
2025



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav chemie

Akademický rok: 2024/2025

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení:	Nikol Jakubicová
Osobní číslo:	T22191
Studijní program:	B0721A210002 Technologie a hodnocení potravin
Specializace:	Chemie a analýza potravin
Forma studia:	Prezenční
Téma práce:	Mikrokalorimetrická stanovení supramolekulárních komplexů vybraných aminokyselin s cucurbiturily

Zásady pro vypracování

I. Teoretická část:

- Stručná charakteristika supramolekulární chemie.
- Metody stanovení supramolekulárních komplexů.
- Aminokyseliny v supramolekulární chemii.

II. Praktická část:

- Analýzujte a vyhodnotte komplexační reakce vybraných aminokyselin s cucurbiturily.

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

Seznam doporučené literatury:

1. Kubik, S.: *Supramolecular Chemistry: From Concepts to Applications*. Berlin: De Gruyter, **2021**, ISBN 978-3-11-059560-4.
2. Dodziuk, H.: *Cyclodextrins and Their Complexes*. WILEY-VCH Verlag GmbH, Weinheim. **2006**, ISBN 3-527-31280-3.
3. Barrow, S. J., Kaseva, S., Rowland, M. J., del Barrio, J., & Scherman, O. A.: Cucurbituril-Based Molecular Recognition. *Chemical Reviews*, **2015**, 115, 22, 12320-12406.

Vedoucí bakalářské práce: **Ing. Zdeňka Prucková, Ph.D.**
Ústav chemie

Datum zadání bakalářské práce: **2. ledna 2025**
Termín odevzdání bakalářské práce: **16. května 2025**

L.S.

prof. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan

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

Ve Zlíně dne 20. února 2025

PROHLÁŠENÍ AUTORA BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Beru na vědomí, že

- odevzdáním bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb., v platném znění bez ohledu na výsledek obhajoby;
- bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému a bude dostupná k nahlédnutí;
- jedno vyhotovení bakalářské práce v listinné podobě bude ponecháno Univerzitě Tomáše Bati ve Zlíně k uložení;
- na moji bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 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 mohu užít své dílo – bakalářskou práci – nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- pokud bylo k vypracování bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tj. k nekomerčnímu využití), nelze výsledky bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- pokud je výstupem bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá; neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Prohlašuji, že

- jsem na bakalářské práci pracoval(a) samostatně a použitou literaturu jsem řádně citoval(a); v případě publikace výsledků budu uveden(a) jako spoluautor;
- odevzdaná verze bakalářské práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou obsahově totožné.

Ve Zlíně, dne

.....
podpis autora

ABSTRAKT

Bakalářská práce je zaměřena na sledování a zhodnocení komplexačních reakcí vybraných aminokyselin a cucurbit[7]urilu pomocí izotermální titrační mikrokolorimetrie. Teoretická část se zabývá supramolekulární chemií, metodami stanovení supramolekulárních komplexů a aminokyselinami. Experimentální část se věnuje stanovení a zhodnocení komplexačních reakcí v interakci hostitel-host mezi vybranými aminokyselinami a cucurbit[7]urilem.

Klíčová slova: hostitel-host, cucurbit[7]uril, aminokyseliny, izotermální titrační mikrokolorimetrie

ABSTRACT

The bachelor's thesis is focused on monitoring and evaluation of complexation reactions of selected amino acids and cucurbit[7]uril using isothermal titration microcalorimetry. The theoretical part deals with supramolecular chemistry, methods of determining supramolecular complexes, and amino acids. The experimental part is devoted to the determination and evaluation of complexation reactions in the host-guest interaction between amino acids and cucurbit[7]uril.

Keywords: host-guest, cucurbit[7]uril, amino acids, isothermal titration microcalorimetry

Na tomto místě bych ráda poděkovala všem, kteří mě během psaní této bakalářské práce a po dobu celého studia podporovali a motivovali.

Mé poděkování patří především vedoucí mé práce, paní Ing. Zdeňce Pruckové, Ph.D., za odborné vedení, cenné rady, trpělivost při zodpovídání spousty dotazů a čas který mi věnovala. Dále děkuji všem vyučujícím a pracovníkům FT UTB, kteří mě během studia obohatili o znalosti a zkušenosti.

Velké díky patří také mé rodině a blízkým za jejich neustálou podporu, pochopení a povzbuzení v průběhu celého studia.

Všem, kteří mi jakýmkoli způsobem pomohli, upřímně děkuji.

OBSAH

ÚVOD.....	11
I TEORETICKÁ ČÁST	12
1 SUPRAMOLEKULÁRNÍ CHEMIE.....	13
1.1 INTERAKCE HOSTITEL-HOST	13
1.2 CUCURBITURILY	14
1.2.1 Historie	15
1.2.2 Význam cucurbiturilů.....	16
1.2.3 Cucurbit[7]uril.....	17
2 METODY STANOVENÍ SUPRAMOLEKULÁRNÍCH KOMPLEXŮ	18
2.1 SOFTWARE PRO STANOVENÍ KONSTANT STABILITY	19
2.2 TITRACE V SUPRAMOLEKULÁRNÍ CHEMII	19
2.2.1 Izotermální titrační kalorimetrie (ITC)	19
2.2.2 NMR spektroskopie	21
2.2.3 UV-Vis spektroskopie	21
2.2.4 Fluorescenční spektroskopie	22
3 AMINOKYSELINY V SUPRAMOLEKULÁRNÍ CHEMII	24
3.1 ROZDĚLENÍ AMINOKYSELIN	24
3.2 ROZPOZNÁVÁNÍ RECEPTOREM.....	25
3.3 INTERAKCE S CUCURBITURILY	26
3.4 APLIKACE AMINOKYSELIN V SUPRAMOLEKULÁRNÍ CHEMII	26
II PRAKTICKÁ ČÁST	28
4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	29
4.1 PŘÍSTROJE	29
4.1.1 ThermoVac.....	29
4.1.2 Izotermální titrační mikrokalorimetr.....	29
4.2 MAKROCYKLUS.....	30
4.3 VYBRANÉ AMINOKYSELINY.....	30
4.4 ŘEDÍCÍ MÉDIA.....	34
5 VÝSLEDKY A DISKUSE	36
5.1 TRYPTOFAN.....	36
5.2 LEUCIN.....	37
5.3 PROLIN	38
5.4 KYSELINA CITRÓNOVÁ	39
5.5 SERIN	40
5.6 LYSIN HYDROCHLORID	42

5.7	TYROSIN.....	43
5.8	METHIONIN	44
5.9	CYSTIN	45
5.10	HYDROXYPROLIN	46
5.11	KYSELINA GLUTAMOVÁ	47
5.12	KYSELINA ASPARAGOVÁ	47
5.13	GLYCIN.....	48
ZÁVĚR.....		50
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY		51
SEZNAM OBRÁZKŮ		54
SEZNAM TABULEK.....		56
SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK		57

ÚVOD

Aminokyseliny jsou nedílnou součástí života každého z nás. Ať už si to uvědomujeme více či méně jejich přítomnost je nezbytná pro správné fungování lidského těla. Významné jsou zejména biogenní aminokyseliny, které slouží jako základní stavební bloky peptidů a proteinů. Některé jsou esenciální a musíme je přijímat v potravě, jiné si lidské tělo dokáže v dostatečné míře z dostupných zdrojů syntetizovat samo. Z hlediska supramolekulární chemie představují díky různorodosti svých postranních řetězců zajímavé hosty pro molekulární kontejnery. Pozorování komplexačních interakcí mezi nimi nám umožní získat důležité informace o mechanismech molekulového rozpoznávání a termodynamické stránce těchto procesů s potenciální aplikací při transportu léčiv.

Mezi zajímavé molekulární kontejnery patří cucurbiturily. Konkrétně pak cucurbit[7]uril, kterému se jako hostitelskému makrocycly věnuje tato bakalářská práce. Cucurbiturily tvořené glykourilovými jednotkami disponují symetrickou kavitou schopnou přijmout různé hosty a na základě jejich velikosti, tvaru a polarity. Cucurbit[7]uril disponuje vysokou afinitou k celé řadě biomedicínsky významných látek, dobrou rozpustností a stabilitou.

Cílem této práce je stanovit a charakterizovat komplexační interakce mezi vybranými aminokyselinami a cucurbit[7]urilem pomocí izotermální titrační mikrokolorimetrie, která umožňuje sledovat tepelné zabarvení chemických interakcí a určit termodynamické parametry, jako jsou vazebná konstanta (K), změna entalpie (ΔH) a entropie (ΔS). To může přispět k hlubšímu pochopení supramolekulárních komplexačních mezi aminokyselinami a cucurbiturily a ověřit využitelnost mikrokolorimetrie jako nástroje pro detailní charakterizaci těchto systémů. Získané poznatky mohou být využity pro výběr vhodných aminokyselin jako kompetitorů při komplexačních reakcích s cucurbit[7]urilem.

I TEORETICKÁ ČÁST

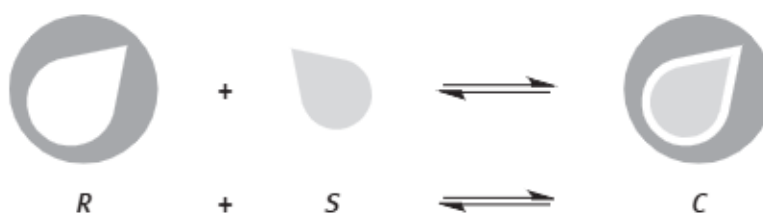
1 SUPRAMOLEKULÁRNÍ CHEMIE

Supramolekulární chemie je relativně nový vědní obor, jehož vývoj sahá až do roku 1987, kdy Lehn, Cram a Pedersen získali Nobelovu cenu za své průlomové objevy v oblasti systémů hostitel-host, které jsou založeny na reakci mezi molekulárním receptorem (hostitel) a ligandem (host). Podstatou vazby hostitel-host jsou především nekovalentní interakce, mezi které patří například vodíkové vazby, π - π interakce, ale také hydrofobní, elektrostatické a Van der Waalsovy síly. Tyto interakce řídí molekulární rozpoznávání a sebeskládání.^{1,2}

Hlavním cílem supramolekulární chemie je získání kontroly nad intramolekulárními vazbami. To přitahuje pozornost především chemiků, biologů a materiálových vědců, kteří využívají tyto interakce k vysvětlení nekovalentních systémů. Dalším důležitým objektem zájmu tohoto oboru je vytvoření systémů, které lidem pomohou imitovat a porozumět biologickým procesům. Mnoho z výzkumů v supramolekulární chemii bylo provedeno pouze ze zvědavosti, bez toho, aniž by bylo uvažováno nad jejich specifickým využitím.^{2,3}

1.1 Interakce hostitel-host

Termín hostitel-host zavedl Donald J. Cram pro popis interakce receptoru se substrátem. Využívá se dodnes díky tomu, že výstižně znázorňuje přijímání substrátu (host) receptorem (hostitel).³



Obrázek 1: Schéma přijímání substrátu receptorem³

Prostřednictvím interakce hostitel-host spolu mohou vratně reagovat dvě i více chemických látek, což poskytuje mnoho možností pro konstrukci nových supramolekulárních komplexů.²

Hostitel je obvykle chemické individuum větších rozměrů, jako například enzym nebo makrocyclus, který disponuje vhodným hostitelským místem, jako je kavita a má konvergentní vazebná místa. Host je naproti tomu menší, než je jeho hostitel. Může se jednat

o molekulu nebo pouze o jednoatomový ion nebo rozměrnější látky jako jsou hormony, feromony nebo neurotransmitery. Hosté mají na rozdíl od hostitelů divergentní vazebná místa. Samotné spojení do komplexu nebo supermolekuly vznikne pomocí nekovalentních interakcí mezi hostem a hostitelem.⁴

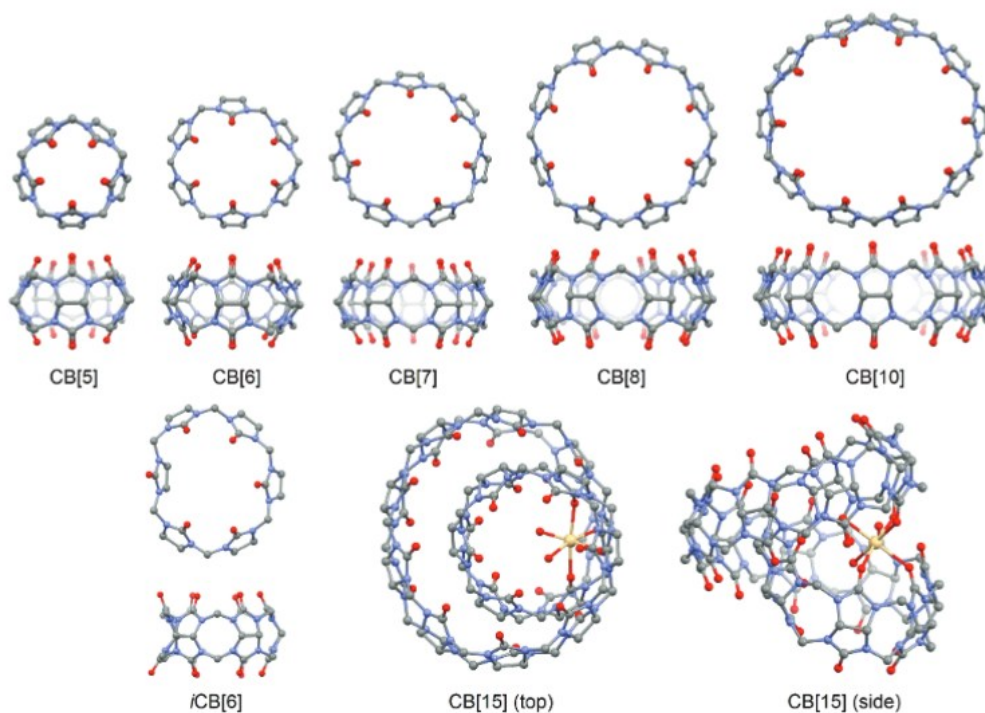
Během posledních desetiletí bylo vyvinuto několik makrocyclických molekul a jejich derivátů, např. Calixareny, cyklodextriny, crown ethery, cucurbit[n]urily, pillar[n]areny a další. Všechny tyto makrocykly disponují kavitou, do které mohou vázat případného hosta nebo hosty. Jejich vnější strana obvykle preferuje interakce s rozpouštědlem, zatímco ta vnitřní s hostem prostřednictvím nekovalentních interakcí.²

Nejběžnější případ je ten, kdy je do hydrofobní kavity makrocyklu přijata hydrofobní molekula hosta ve vodném prostředí. Takové komplexy jsou poměrně stabilní. Například vazebná konstanta (K) pro host–hostitelské komplexy založené na cyklodextrinech, které jsou makrocyclické oligosacharidy uplatňující se jako molekulární kontejnery pro látky organické i anorganické povahy, může dosáhnout hodnoty 10^4 M^{-1} , zatímco u komplexů založených na cucurbiturilech může být až 10^{15} M^{-1} .^{2,5}

1.2 Cucurbiturily

Cucurbiturily (CBs) jsou rodina makrocyclických hostitelských molekul, které získávají stále na větším významu. Skládají se z n molekul glykourilu, které jsou spojeny do kruhovitěho tvaru přes methylenové můstky. Mají tvar připomínající dýni. Přestože jejich syntéza pomocí kyselé kondenzace byla objevena před stoletím, izolace hlavních členů této rodiny byla dosažena až v posledních desetiletích.^{1,2,6}

Cucurbiturily mají několik vlastností, díky kterým mohou tvořit velmi stabilní komplexy typu hostitel-host. Důležitá je zejména blízkost velmi polarizovaného vstupního portálu a nepolární hydrofobní kavity, které usnadňují ion-dipólové a hydrofobní interakce. Dalším důležitým faktorem je velikost kavity a vhodný tvar kavity pro maximální účinky Van der Walsových sil mezi stěnou kavity a hostem. Rigidnost kavity také pomáhá stabilizovat vzniklý komplex.¹

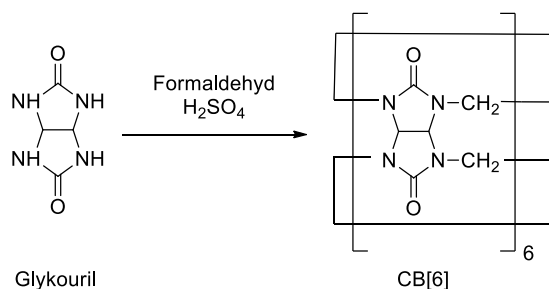


Obrázek 2: Krystalová struktura cucurbiturilů (CB[15] tvoří komplex s Cd^{2+})¹

1.2.1 Historie

V roce 1905 skupina Rolfa Behrenda v Hannoveru provedla kondenzaci glykourilu a formaldehydu za kyselých podmínek.² Podařilo se jim izolovat bílou krystalickou látku, která se ukázala jako velmi stabilní a nerozpustná ve vodě. Byla, ale schopná tvořit komplexy se solemi, avšak chemická struktura získané sloučeniny zůstala neodhalena. Produkt byl pojmenován Behrendův polymer.³

William L. Mock a jeho kolegové v roce 1981 znovu syntetizovali Behrendův polymer a vytvořili komplex se síranem vápenatým² a pomocí tehdejších moderních analytických metod dokázali, že Behrendův polymer je ve skutečnosti makrocyklus, který se skládá z šesti glykourilových jednotek navázaných přes atomy dusíku prostřednictvím methylenových jednotek³



Obrázek 3: Schéma syntézy CB[6] z glykourilu

Mock navrhl pojmenovat tento makrocyklus cucurbituril a to díky jeho podobnosti s dýní. (rod cucurbitaceae)²

Zpočátku byla známa existence dalších homologů (tj. CB[5], CB[7] a CB[8]), avšak jejich izolace a identifikace byla provedena až kolem roku 2000. Vědecké skupině Kimoona Kima se podařilo izolovat CB[5], CB[7] a CB[8], skupina Anthonyho Daye syntetizovala a izolovala CB[5], který byl zachycen v dutině CB[10]. Následně Issaacs a jeho kolegové získali CB[10] nahrazením CB[5] melamin-diaminem.^{2,3}

1.2.2 Význam cucurbiturilů

Cucurbiturily mají schopnost enkapsulace hostitelských molekul ve své kavitě, a to může způsobit katalýzu nebo inhibici chemických reakcí. Kombinace hydrofobní kavity a hydrofilních portálů omezuje možnost pohybu hosta, která ovlivňuje nejenom reaktivitu, ale i stereoselektivitu. Díky enkapsulaci dokáží také stabilizovat jinak nestálá chemická individua.

Mezi možné využití patří provedení Diels-Alderovy reakce v dutině CB[8] a CB[7], kdy reakce sice probíhá i bez přítomnosti cucurbiturilů, ale v jejich přítomnosti dojde k významnému až 9,5násobnému urychlení. Kavita těchto makrocyklů je také ideálním místem pro fotochemické reakce. Umožňují kontrolovat stereoselektivitu, regioselektivitu a také dokáží chránit substrát před molekulami rozpouštědla. Další výhodou je to, že při vlnových délkách v oblasti UV-Vis světla jsou transparentní, takže reakce může probíhat v kavitě bez ovlivnění spektrofotometrického měření makrocyklem. Mohou katalyzovat solvolýzu a stabilizovat jinak nestabilní látky. Díky vysoké specifitě interakcí hostitel-host nacházejí využití i jako základ senzorických zařízení.¹

Velkou pozornost si ale získali zejména díky svým aplikacím v biomedicině. Tyto makrocykly jsou obecně šetrné k biologickému prostředí a vykazují dobrou biokompatibilitu. Překážkou pro využití v biomedicině je jejich omezená rozpustnost ve vodě, která je podobná jako u β -cyklodextrinu. Rozpustnost cucurbiturilů může být částečně zvýšena v kyselém prostředí nebo v přítomnosti iontů alkalických kovů. Vědci se také zaměřili na modifikaci struktury samotných cucurbiturilů. S cílem zvýšit rozpustnost a změnit vlastnosti makrocyklů jsou do jejich struktury včleňovány funkční skupiny. Dnes už existuje několik zavedených strategií pro funkční modifikaci CBs, včetně přímé kondenzace s deriváty glykourilu nebo karbonylovými deriváty nesoucími funkční skupiny během tvorby CBs. Výsledkem je žádaný modifikovaný cucurbituril. Další možností je

postsyntetická úprava (postgrafting). Nejprve se připraví klasický CBs a následně se na něj naváží funkční skupiny.²

1.2.3 Cucurbit[7]uril

Cucurbit[7]uril (CB[7]) vyčnívá mezi ostatními cucurbiturily díky tomu, že vykazuje jedny z nejvyšších vazebných konstant, které byli doposud naměřeny pro syntetické páry typu hostitel-host. Průměr portálu je 5,4 Å a průměr kavity 7,3 Å. Objem kavity je 279 Å³, což umožňuje pojmout hodně různých kladně nabitých hostů, včetně těch s difúzně pozitivními náboji s vazebnou konstantou kolem 10⁶ M⁻¹.^{1,6}

Rozpustnost ve vodě je 30 mM, což je mnohem více než u jiných cucurbiturilů, např. CB[8] má rozpustnost pouze 0,01 mM. Tato hodnota rozpustnosti ve vodě také umožnila výzkum chemických interakcí hostitel-host s biomolekulami kdy jsou vhodné především aromatické aminokyseliny jako je fenylalanin. Při odpovídajícím pH mají pozitivně nabitou amino skupinu pro interakce s portálem a hydrofobní skupinu k zaplnění kavity a dochází tak k vytvoření stabilních komplexů.^{1,6}

2 METODY STANOVENÍ SUPRAMOLEKULÁRNÍCH KOMPLEXŮ

Supramolekulární chemie popisuje interakce, kde dochází ke vzniku komplexních útvarů díky asociaci chemických individuí, které se poutají intermolekulárními vazbami. Komplexy existují díky nekovalentním interakcím s neutrální i nabitými individui. Komplexy mohou mít různou stabilitu i stechiometrii.⁷

Pro popis supramolekulárních komplexů jsou důležité termodynamické parametry, díky nimž je možné stanovit jejich stabilitu a rozhodnout o možnostech jejich využití. Mezi nejdůležitější parametry, které se k popisu běžně využívají patří rovnovážná konstanta, volná energie, entalpie a entropie. Zásadní vlastností při komplexaci je také selektivita, která popisuje schopnost hostitelské molekuly rozlišovat mezi různými hosty. Poměr vazebných konstant jednotlivých systémů hostitel-host lze považovat za jistou míru selektivity. Znalost vazebných konstant je tedy základním předpokladem pro správné stanovení supramolekulárních komplexů. Dále je také důležité mít představu o tepelné závislosti selektivity. U některých supramolekulárních systémů hraje teplota opravdu významnou roli. Může se objevovat i teplotně závislá inverze enantioselektivity.^{7,8}

Obecný způsob, jak určit vazebnou konstantu je založený na jednoduchém modelu vazebné rovnováhy (vzorec 1). Pojmy vazebná konstanta, rovnovážná konstanta a konstanta stability jsou vzájemnými synonymy. Obecný postup stanovení parametrů má čtyři části. Jako první by měly být stanoveny stechiometrické koeficienty, dále je důležité zjistit v jaké koncentraci je přítomen komplex a při jakých podmínkách (termodynamické parametry). Čtvrtým krokem je samotné zpracování získaných dat.⁸



a,b: stechiometrické koeficienty

H: Hostitel

G: host

C: komplex

2.1 Software pro stanovení konstant stability

Konstanty stability supramolekulárních komplexů se dnes určují pomocí počítačových programů z dat získaných experimentálním měřením. Ale je však možné využít i klasických výpočetních metod. K získání experimentálních dat se používají fyzikálně-chemické metody jako potenciometrie, kalorimetrie, spektrofotometrie, NMR spektroskopie, konduktometrie a jiné. Stanovení konstant stability je v dnešní době velmi přesné a spolehlivé. Díky tomu se stalo již rutinní záležitostí.⁷

Informace o prvním programu pro výpočet chemických rovnováh se objevily v roce 1962. Program se jmenoval LetaGrop a jeho zdrojový kód obsahoval 400 řádků v jazyce ALGOL. Jeho plná verze byla zveřejněna v roce 1965. Od té doby vytvořeno mnoho dalších softwarů, mezi které patří například Hyperquad, ChemEqui nebo Best.⁷

2.2 Titrace v supramolekulární chemii

Nejběžnějším způsobem pro zhodnocení interakcí v supramolekulární chemii je titrace, kdy se host přidává do roztoku s hostitelem, případně naopak. Následné změny v roztoku jsou pak pozorovány pomocí jiných metod, např. NMR nebo UV-Vis. Získané informace jsou porovnány s vazebnými modely za účelem získání údajů, jako je vazebná konstanta K , termodynamické parametry (ΔG , ΔH a ΔS) a stechiometrie reakce.⁹

2.2.1 Izotermální titrační kalorimetrie (ITC)

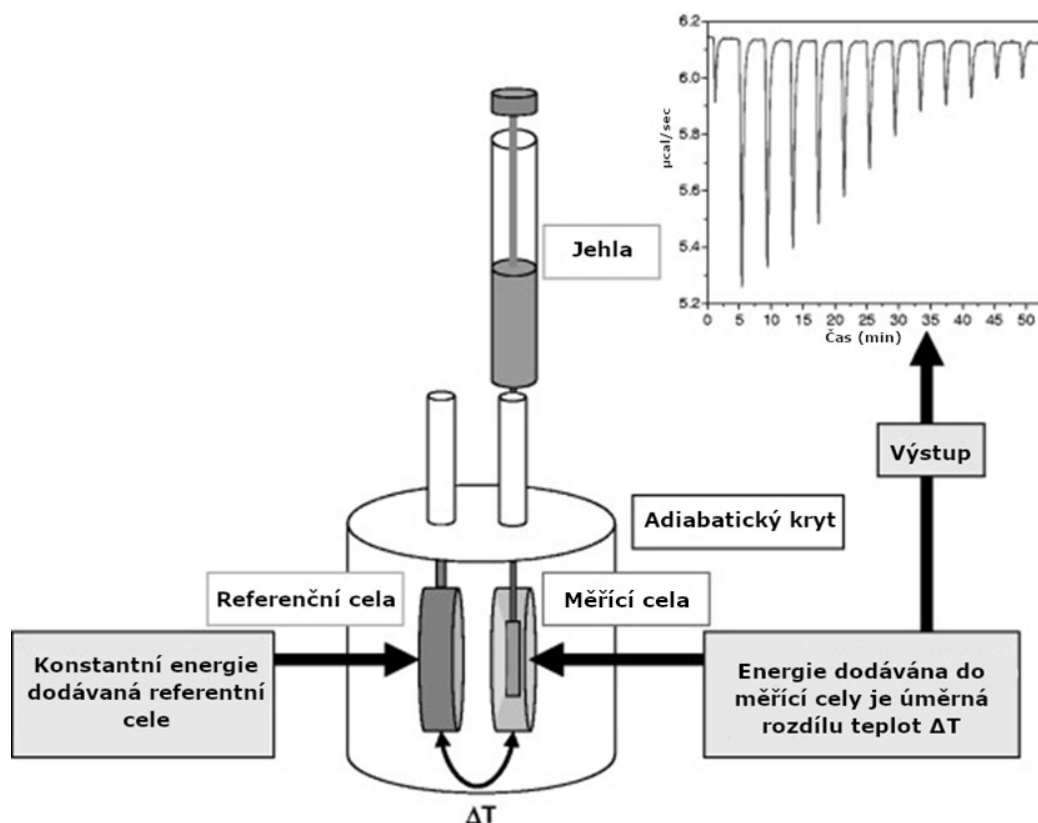
Izotermální titrační kalorimetrie (ITC) je jedna z nejběžnějších technik, protože velká většina chemických reakcí je doprovázena tepelnými efekty. Teoreticky by bylo možno říct, že v roztoku každá jeho složka nějakým způsobem interaguje s ostatními složkami roztoku. Intenzita těchto interakcí se však v čase může měnit v relativně velkém rozsahu. Vše záleží na chemické povaze a koncentraci jednotlivých látek přítomných v roztoku.^{7,8}

Mezi důležité supramolekulární interakce patří vznik reverzibilních komplexů, zánik vazeb mezi individui, ale i reorganizace solvatačního obalu, ke které dochází vlivem sekundárních interakcí jako je solvofobní agregace. Tepelné efekty, které tyto děje provázejí mohou být exotermní i endotermní a jsou integrálním výsledkem mnoha simultánních událostí.⁸

Izotermální titrační kalorimetrie umožňuje získat termodynamické parametry, asociační konstanty a stechiometrie komplexů při dosažení rovnováhy v roztoku s vysokou

přesností. Oproti jiným metodám, jako např. NMR, umožňuje stanovit stechiometrii i termodynamické parametry v jednom jediném experimentu. Tento experiment je založený na postupném záznamu tepelných změn v průběhu titrace roztoku v cele kalorimetru přesně danými objemy titrační látky z automatizované jehly. To umožňuje získat informace o interakcích mezi látkami. Kromě sledování těchto reakcí je také možné studovat jednosložkové systémy, kde se koncentrovaný roztok sloučeniny, která má schopnost samoskládání do větších celků, titruje pomocí jehly do rozpouštědla v cele. Pokud je konečná koncentrace dostatečně nízká, supramolekulární struktury se rozpadají a uvolněné teplo odpovídá právě této disociaci.^{10,11}

Velkou výhodou izotermální titrační kalorimetrie je také to, že umožňuje vyhnout se zdoluhavé van't Hoffově analýze, která je založená na teplotní závislosti rovnovážných konstant, jež je v jiných případech důležitá k získání konstant stability a hodnot entropie a entalpie. ITC je využíváno v široké míře při studiu biologických systémů s proteiny, ale také interakcí hostitel-host se syntetickými receptory jako jsou cucurbiturily. Je možné studovat také procesy oligomerace a polymerace pomocí vodíkových vazeb nebo interakce mezi kovem a ligandem v koordinační chemii.¹⁰

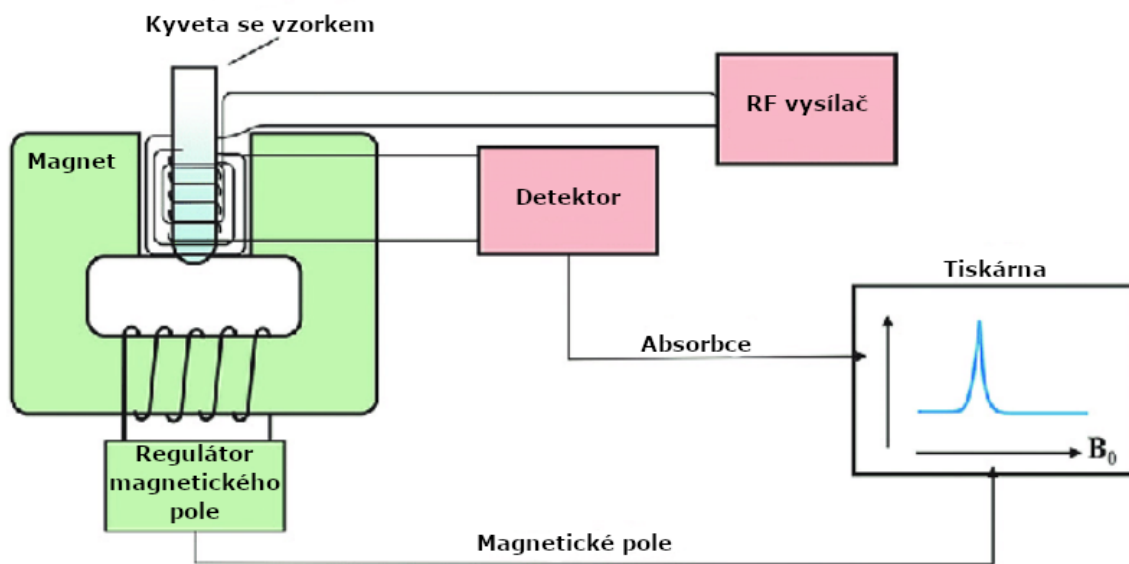


Obrázek 4: Schéma izotermálního titračního kalorimetru¹²

2.2.2 NMR spektroskopie

V oblasti supramolekulární chemie bývá častým problémem určení struktury komplexů. Pokud jsou dostatečně stabilní, je možné získat poměrně dobré informace o struktuře s pomocí rentgenové krystalografie. Tato možnost však není vhodná, pokud je stabilita nižší. Samotný proces krystalizace je náročnější a výsledný krystal nemusí dobře reflektovat skutečnou situaci v roztoku. Proto je pro tyto komplexy vhodnější zvolit metodu stanovení pomocí NMR.¹³

Nejvýhodnější je využít ^1H NMR, ale lze však využít i jiné. Pomocí NMR je možné získat jak kvantitativní informace o stavu vzorku, tak tak informaci o relativních posunech a změnách symetrie, což umožňuje získat přehled nad tím, jak spolu hostitel s hostem interagují a případnou stechiometrii reakce. Díky vývoji v této oblasti analýzy dokážeme získat kvalitní spektra již při velmi nízkých koncentracích. NMR má však velké omezení v tom, že je nutno vzít v úvahu, jak rychle se sledované látky vážou a uvolňují. Rovnovážná konstanta totiž s rychlostní úzce souvisí. Proto je důležité vědět, jestli se systém nachází v rychlé nebo pomalé výměně při podmínkách daného experimentu.⁹



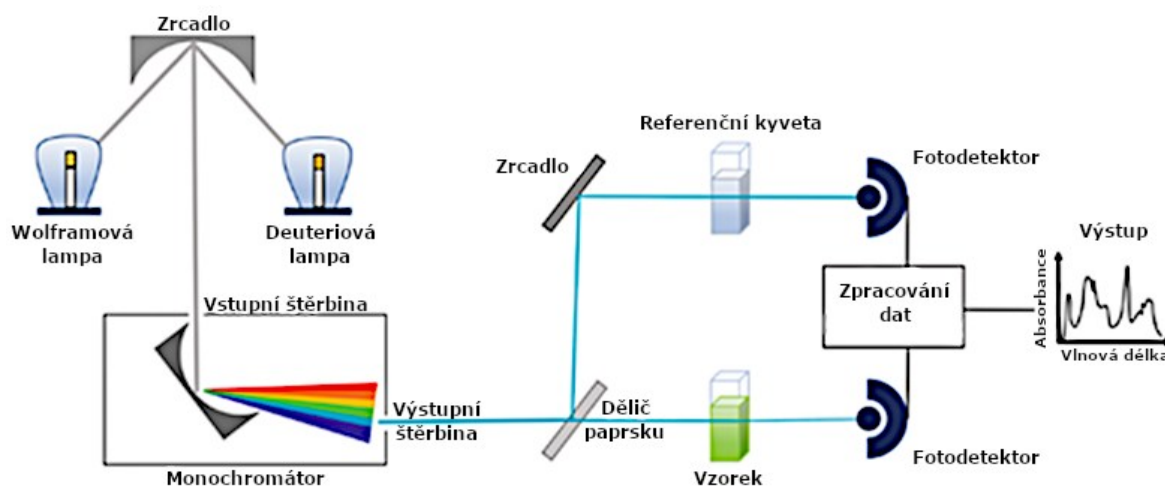
Obrázek 5: Schéma Nukleární Magnetické Rezonance¹⁴

2.2.3 UV-Vis spektroskopie

Další běžně využívanou metodou pozorování změn při titraci v supramolekulární chemii je UV-Vis. Jedná se o jednu z levnějších a rychlých možností instrumentace, která je velmi flexibilní a nedestruktivní. Při použití této analytické metody dochází k měření absorbance

nebo transmittance procházejícího světla. Pokud je přítomen vhodný chromofor (poriny) je možné tuto metodu využít již pro velmi nízké koncentrace (cca 10^{-7} mol/l). Díky UV-Vis lze získat vazebné konstanty až do hodnoty 10^9 M⁻¹. Pro úspěch experimentu je nutné, aby koncentrace použitých chemických individuí spadala do rozsahu, ve kterém absorpční píky hostitele i jeho komplexu odpovídají Lambert-Beerově zákonu. Je také žádoucí, aby hostující látka neabsorbovala ve sledované vlnové délce žádné světlo, což je v případě hostů v supramolekulární chemii často splněno. Samotná změna ve spektru při komplexaci by pak měla být, pokud možno co největší, jelikož předpoklad velké změny je ve své podstatě důvodem pro volbu této metody.^{9,15}

Mezi nevýhody patří vysoká citlivost na přítomnost nečistot, změny teploty a případné zředění. Je tedy nutná kontrola teploty a vysoká přesnost při přípravě vzorků z výchozích látek v nejvyšší čistotě, aby bylo možno určit co nejpřesnější koncentrace.⁹

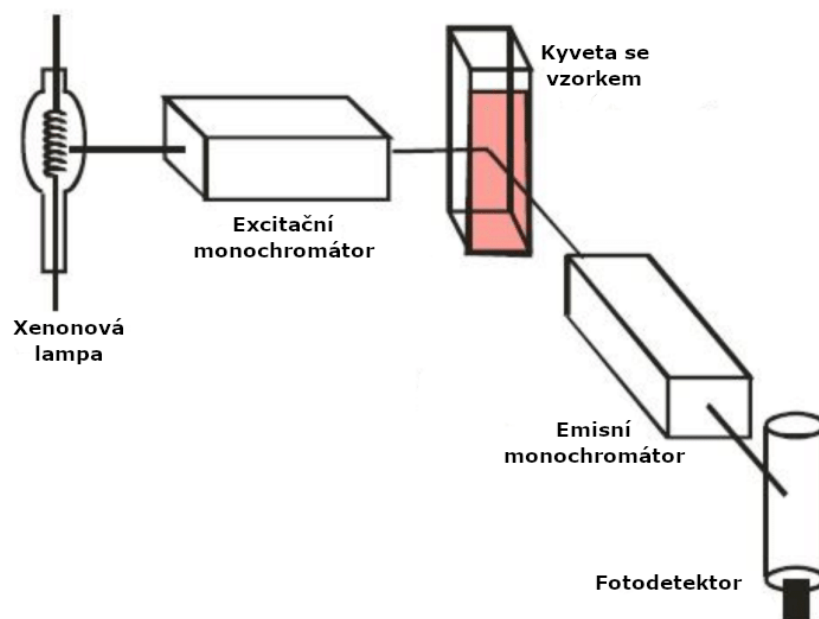


Obrázek 6: Schéma UV-Vis spektrofotometru¹⁵

2.2.4 Fluorescenční spektroskopie

Fluorescenční spektroskopie oproti NMR a UV-Vis je mnohem citlivější a umožňuje provádět experiment i v nanomolárních koncentracích. Je ideální pro měření větších konstant stabilit (více než 10^6 M⁻¹). Fluorescenční titrace musí být provedena při nízké koncentraci, ideálně tak aby absorbance při excitační vlnové délce byla menší než 0,05. Pokud je větší, tak výsledek experimentu už nebude mít lineární závislost na absorbovaném

světla. Tato metoda je vhodná, pokud je v roztoku fluorescenčně aktivní pouze jedna jeho složka. Fluorescenční látka má schopnost absorbovat světlo o dané vlnové délce. Po určitém čase začne ono pohlcené světlo emitovat na jiné vlnové délce, která je obvykle vyšší. Při komplexaci pak dochází buď aktivaci této složky („on“) nebo ke zhášení („off“). Pokud dojde ke zhášení, je nutno rozlišit statické zhášení, ke kterému dojde při vzniku komplexu hostitel-host a dynamické zhášení, které způsobují nárazy molekul.^{9,16}



Obrázek 7: Schéma spektrofluorimetru¹⁷

3 AMINOKYSELINY V SUPRAMOLEKULÁRNÍ CHEMII

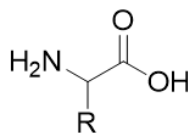
Aminokyseliny jsou základní stavební jednotkou proteinů a peptidů. Samy o sobě jsou důležité, protože hrají klíčovou roli při regulaci různých procesů souvisejících s genovou expresí, včetně modulace funkce proteinů, které zprostředkovávají translaci *mRNA*. Jsou nezbytné pro tvorbu bílkovin a pokud chybí, syntéza proteinů neprobíhá. To může vést k onemocněním způsobených nedostatkem bílkovin s vážnými následky.^{18,19}

Jedním z hlavních důvodů, proč je důležité studovat interakce aminokyselin se supramolekulárními látkami, přestože se jedná o velmi náročný proces, je molekulární rozpoznávání. Jedná se o jeden ze základních procesů, které probíhají v biologických systémech. Molekuly hostů se vážou spolu s molekulami hostitelů pomocí specifických nekovalentních interakcí s relativně velkou afinitou. Jejich velkou výhodou je jejich biokompatibilita, biologická vstřebatelnost, nízká cena a snadná produkce. Většina aminokyselin s výjimkou aromatických nedokáže v roztoku vytvářet uspořádané molekulární struktury, protože interakce mezi nimi nejsou dostatečně silné, aby překonaly solvatační efekt.²⁰

Mezi cíle v oblasti supramolekulární chemie patří vytvoření supramolekulárních receptorů, které dokážou aminokyseliny přesně rozpoznat a pevně navázat. To je klíčový krok k vývoji receptorů schopných cíleně vázat celé peptidy. Rozlišit jednotlivé volné aminokyseliny však není snadné, protože některé mají velmi podobné postranní řetězce. Zajímavé jsou také jako stavební bloky biomateriálů. Zde se uplatňují zejména oligopeptidy, které mají díky své jednoduché struktuře velký potenciál pro vývoj cenově dostupných nanostruktur a bioaktivních materiálů.^{18,20}

3.1 Rozdělení aminokyselin

Dnes je popsáno již více než 300 aminokyselin, ale pouze 20 z nich je proteinogenních. Obsahují funkční skupinu karboxylovou ($-\text{COOH}$) a aminovou ($-\text{NH}_2$). S výjimkou prolinu, který má specifickou strukturu se všechny proteinogenní aminokyseliny liší pouze v postranním řetězci R.^{19,21}



Obrázek 8: Obecná struktura aminokyselin; R – postranní řetězec²¹

Aminokyseliny se dělí na kyselé, zásadité a neutrální. Některé aminokyseliny si tělo nedokáže samo syntetizovat a je nutné je přijímat ve stravě – tyto aminokyseliny se nazývají esenciální. Jiné aminokyseliny jsou v těle syntetizovány, takže není nutné je získávat z potravy – tyto se nazývají neesenciální aminokyseliny. Existují také aminokyseliny, které si tělo syntetizuje, ale v nedostatečném množství – tyto se označují jako poloesenciální aminokyseliny.^{19,21}

Tabulka 1: Rozdělení 20 základních aminokyselin²¹

Esenciální aminokyseliny	Neesenciální aminokyseliny	Ploesenciální aminokyseliny
Valin	Alanin	Arginin
Leucin	Glycin	Histidin
Izoleucin	Prolin	
Lysin	Cystein	
Methionin	Kyselina asparagová	
Threonin	Kyselina glutamová	
Tryptofan	Serin	
Fenylalanin	Tyrosin	
	Asparagin	
	Glutamin	

3.2 Rozpoznávání receptorem

Molekulární rozpoznávání je proces kdy se jedna molekula asociuje s jinou prostřednictvím specifických nekovalentních interakcí. Díky specifičnosti těchto interakcí dochází k sestavení molekul způsobem, který předem určují jejich vlastnosti, jako je velikost, tvar a jiné.²²

Genetický kód určuje složení proteinů z dvaceti běžných stavebních bloků aminokyselin. Ačkoli je strukturální rozmanitost mezi aminokyselinami dostatečná k produkci nesčetných globulárních a strukturálních proteinových produktů, většina rozmanitosti vychází z variací v sekvenčních kombinacích. Na úrovni jednotlivé aminokyseliny představuje relativně minimální rozmanitost ve strukturách dvaceti postranních řetězců velkou výzvu pro molekulární rozpoznávání. Například pro receptor, který se váže na hydrofobní hosty (tj. cyklodextriny), jsou boční řetězce alaninu, valinu, leucinu, isoleucinu, prolinu, fenylalaninu a tryptofanu všichni potenciálními hosty. Nuance tedy budou určovat selektivní interakci s jedinou aminokyselinou nebo malým podmnožstvím aminokyselin.²²

Dalším krokem po rozpoznávání jednotlivých aminokyselin je rozpoznávání delších řetězců, jako jsou peptidy a proteiny. Peptidy se strukturálně liší od aminokyselin několika způsoby. Kromě své zvýšené velikosti mají peptidy oligoamidový skelet s pouze jednou amoniovou skupinou na N-konci a jednou karboxylovou skupinou na C-konci a mají více (někdy i četné) postranní řetězce a jejich struktura závisí na sekvenci aminokyselin. Tyto vlastnosti vytvářejí jak výzvy, tak také příležitosti pro molekulární rozpoznávání. Jedním z hlavních cílů při detekci proteinů je rozpoznání klíčových prvků, nejčastěji na jejich povrchu, protože tato oblast je nejdostupnější pro vazbu. U malých peptidů jsou většinou jejich zbytky snadno přístupné pro vazbu, což také usnadňuje výběr cílové oblasti pro detekci. V obou případech je nejefektivnější metodou rozpoznávání postranních řetězců peptidů nebo C- a N-koncových aminokyselinových zbytků.^{18,22}

Makrocyclické receptory obecně vytvářejí komplexy s opačně nabitými látkami. Hlavní hnací silou pro tvorbu komplexu jsou elektrostatické síly ve vodném prostředí, zatímco nekovalentní interakce pomáhají vazbu stabilizovat. Dobrými receptory pro aminokyseliny jsou například cyklodextriny, které vykazují afinitu k fenylalaninu, avšak oproti jiným receptorům se k peptidům vážou poměrně slabě. Naproti tomu cucurbiturily, které jsou selektivní pro hydrofobní a bazické aminokyseliny, dokáží tvořit velmi stabilní komplexy.¹⁸

3.3 Interakce s cucurbiturily

Cucurbiturily jsou rodina syntetických hostitelských makrocyclů, které mají schopnost vázat organické hosty. Patří mezi jedny z nejslibnějších supramolekulárních receptorů pro interakce s biologickými molekulami s afinitami a selektivitou nezbytnou pro in vivo aplikace.²²

Hlavní hnací silou přispívající ke stabilitě při tvorbě komplexů je uvolnění vysoce energetických molekul vody z dutiny makrocyclu. Ion-dipólové a vodíkové vazebné interakce mezi karbonylovými portály receptoru a specifickými funkčními skupinami přítomnými v molekule hosta se na celkové vazebné energii podílejí v menší míře, ale mohou hrát rozhodující roli v pozorované selektivitě.¹⁸

3.4 Aplikace aminokyselin v supramolekulární chemii

Jednou z mnoha moderních aplikací jsou supramolekulární hydrogely založené na aminokyselinách se stříbrnými ionty, které zajišťují lepší antibakteriální vlastnosti

hydrogelu. K výzkumu v této oblasti vedla potřeba vývinu nových antimikrobních látek v důsledku resistance mikroorganismů k těm stávajícím díky nadužívání antibiotik. Peptidy tvořené aminokyselinami si v odvětví léčby bakteriálních infekcí získávají čím dál větší pozornost. Obrovský aplikační potenciál mají aminokyseliny konjugované s fluorenylmethyloxykarbonylem, které disponují schopností tvořit již zmíněné supramolekulární hydrogely. Nicméně nejsou příliš účinné proti gram-negativním bakteriím, což lze změnit díky přidavku různých organických nebo anorganických látek do hydrogelu.²³

Další zajímavou oblastí, kde lze narazit na využití aminokyselin v supramolekulární chemii je výzkum transportu pomocí nosiče přes kapalné membrány, kdy jako nosič lze využít například calix[6]aren, který vytvoří komplex s aminokyselinou pomocí nekovalentních interakcí.²⁴

Své místo mají i při biomedicínských aplikacích jako je bioluminiscenční zobrazování, které umožňuje neinvazivně sledovat biologické procesy a transplantaci buněk. Při této metodě se často používá D-luciferin jako bioluminiscenční sonda, která je však limitována svou nedostatečnou životností. Aminokyselinami kódované stavební bloky napomáhají vytvoření shluků D-luciferinu a prodlužují jeho životnost uvnitř nádorových buněk. Dochází ke vzniku nanostruktur, které vykazují velmi kvalitní dlouhotrvající signál a dobrou biokompatibilitu. Supramolekulární sebeskládání kódované aminokyselinami má velký potenciál pro vývoj nových sond pro bioluminiscenční zobrazování.²⁵

II PRAKTICKÁ ČÁST

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Přístroje

4.1.1 ThermoVac

Přístroj od společnosti MicroCal s možností nastavení teploty i rychlosti míchání byl využit k odplynění všech roztoků použitých při mikrokolorimetrické titraci.



Obrázek 9: ThermoVac

4.1.2 Izotermální titrační mikrokolorimetr

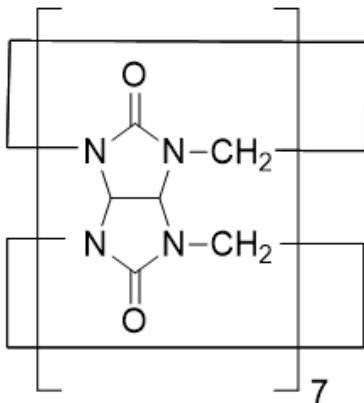
Pro stanovení supramolekulárních komplexačních reakcí mezi CB[7] a aminokyselinami byl použit mikrokolorimetr VP-ITC od firmy MicroCal, který umožnil sledovat tepelné zabarvení probíhajících chemických interakcí.

Mikrokolorimetr samotný má dvě cely. Jedna je referenční a druhá měřicí, která je před zahájením měření naplněna roztokem s jedním z reakčních partnerů a následně je do ní jehlou dávkován roztok s druhým reakčním partnerem. Obě cely jsou umístěny uvnitř adiabatického pláště, aby bylo zabráněno úniku tepla do prostoru. Přístroj zaznamenává v programu VPViewer pohlcené případně uvolněné teplo po každém přidavku titrantu z jehly do měrné cely.

Pro měření byla zvolena metoda s 29 přidavky, každý po 210 sekundách. Pro každé měření interakce s aminokyselinou bylo zaznamenáno i tzv. zřed'ování, což byla interakce pouze aminokyseliny a rozpouštědla. Zřed'ování bylo následně při vyhodnocení v programu ORIGIN 7.0 odečteno od měření s CB[7], aby ve výsledcích nefigurovali vlivy rozpouštědla, ale pouze dvou žádaných reakčních partnerů. Jako matematický model pro výpočet termodynamických parametrů interakcí byl použit One Set of Sites.

4.2 Makrocyklus

- Cucurbit[7]uril



Obrázek 10: Struktura CB[7]

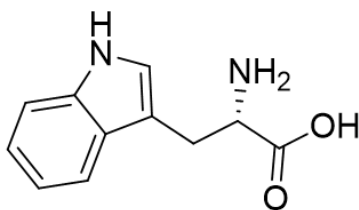
Sumární vzorec: $C_{42}H_{42}N_{28}O_{14}$

Molární hmotnost: 1163,0 g/mol

4.3 Vybrané aminokyseliny

Aminokyseliny byly vybrány na základě předpokladu schopnosti vytvořit komplex s CB[7] a jejich přítomnosti ve skladu chemikálií na FT UTB.

- Tryptofan



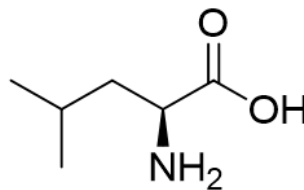
Obrázek 11: Struktura tryptofanu

Systematický název: (2*S*)-2-amino-3-(1*H*-indol-3-yl)propanová kyselina

Sumární vzorec: $C_{11}H_{12}N_2O_2$

Molární hmotnost: 204,23 g/mol

- **Leucin**



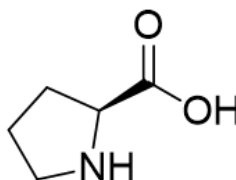
Obrázek 12: Struktura leucinu

Systematický název: 2-amino-4-methylpentanová kyselina

Sumární vzorec: $C_6H_{13}NO_2$

Molární hmotnost: 131,18 g/mol

- **Prolin**



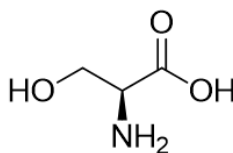
Obrázek 13: Struktura prolinu

Systematický název: (2*S*)-pyrrolidin-2-karboxylová kyselina

Sumární vzorec: $C_5H_9NO_2$

Molární hmotnost: 115,13 g/mol

- **Serin**



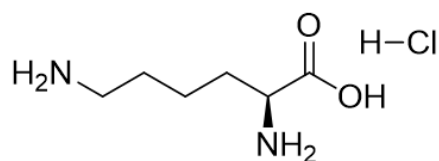
Obrázek 14: Struktura serinu

Systematický název: (2*S*)-2-amino-3-hydroxypropanová kyselina

Sumární vzorec: $C_3H_7NO_3$

Molární hmotnost: 105,09 g/mol

- **Lysin hydrochlorid**



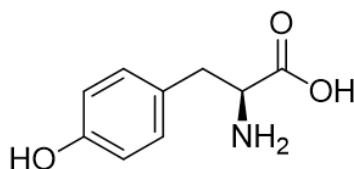
Obrázek 15: Struktura lysinu hydrochloridu

Systematický název: (2*S*)-2,6-diaminohexanová kyselina hydrochlorid

Sumární vzorec: $C_6H_{15}ClN_2O_2$

Molární hmotnost: 182,648 g/mol

- **Tyrosin**



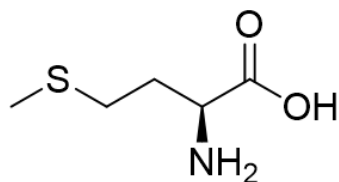
Obrázek 16: Struktura tyrosinu

Systematický název: (2*S*)-2-amino-3-(4-hydroxyfenyl)propanová kyselina

Sumární vzorec: $C_9H_{11}NO_3$

Molární hmotnost: 181,19 g/mol

- **Methionin**



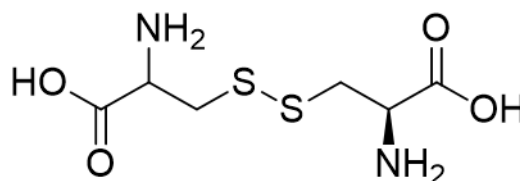
Obrázek 17: Struktura methioninu

Systematický název: (2*S*)-2-amino-4-(methylsulfanyl)butanová kyselina

Sumární vzorec: $C_5H_{11}NO_2S$

Molární hmotnost: 149,21 g/mol

- **Cystin**



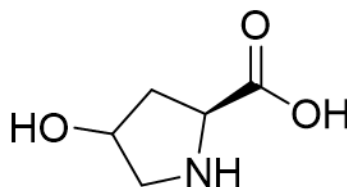
Obrázek 18: Struktura cystinu

Systematický název: 3,3'-dithiobis(2-aminopropionová kyselina)

Sumární vzorec: $C_6H_{12}N_2O_4S_2$

Molární hmotnost: 240,3 g/mol

- **Hydroxyprolin**



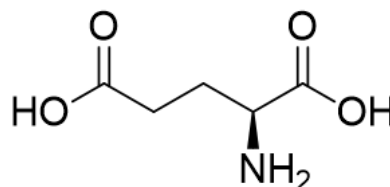
Obrázek 19: Struktura hydroxyprolinu

Systematický název: (2*S*,4*R*)-4-hydroxypyrrolidin-2-karboxylová kyselina

Sumární vzorec: $C_5H_9NO_3$

Molární hmotnost: 131,13 g/mol

- **Kyselina glutamová**



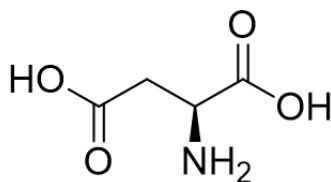
Obrázek 20: Struktura kyseliny glutamové

Systematický název: kyselina (2*S*)-2-aminopentandiová

Sumární vzorec: $C_5H_9NO_4$

Molární hmotnost: 147,130 g/mol

- **Kyselina asparagová**



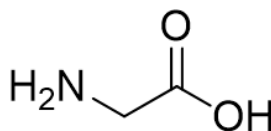
Obrázek 21: Struktura kyseliny asparagové

Systematický název: (2*S*)-2-aminobutandiová kyselina

Sumární vzorec: $C_4H_7NO_4$

Molární hmotnost: 133,10 g/mol

- **Glycin**



Obrázek 22: Struktura glycinu

Systematický název: aminoethanová kyselina

Sumární vzorec: $C_2H_5NO_2$

Molární hmotnost: 75,07 g/mol

4.4 Ředící média

- **Demineralizovaná voda**

Voda, která prošla procesem demineralizace je jedno z běžných hojně používaných chemických rozpouštědel. Má nižší obsah iontů než voda kohoutková. Je velmi dostupná a s neutrálním pH kolem 7, případně o něco méně je vhodná pro většinu chemických experimentů.

- **Citrátový pufr**

Jedná se o pufrovací roztok z kyseliny citrónové a jejích solích. Úlohou pufru je udržet stabilní pH po přidavku kyselin i zásad. Výhodou citrátového pufru je nízká cena jeho složek a vhodnost pro využití v medicíně a biochemii díky jeho netoxické povaze.

Bylo připraveno 500 ml 10 mM citrátového pufru smícháním 0,3451 g kyseliny citrónové, 0,9282 g dihydrátu citrátu sodného a doplněním demineralizovanou vodou do objemu 500 ml v odměrné baňce. Pufr byl mírně dokyselen přidavkem pár kapek koncentrované HCl na pH 5,05.

Výpočet navážky pro pufr byl proveden pomocí Henderson-Hasselbalchovy rovnice (2), díky které bylo zjištěno, že zásady musí být 1,698krát více než kyseliny. Poměr byl následně využit k přepočtu 10 mM pufr a na objem 500 ml.

$$pH = pK_A + \log \frac{c_B}{c_A} \quad (2)$$

pH: výsledné pH pufru [5]

pK_A : disociační konstanta konjugované kyseliny pufru [4,77]

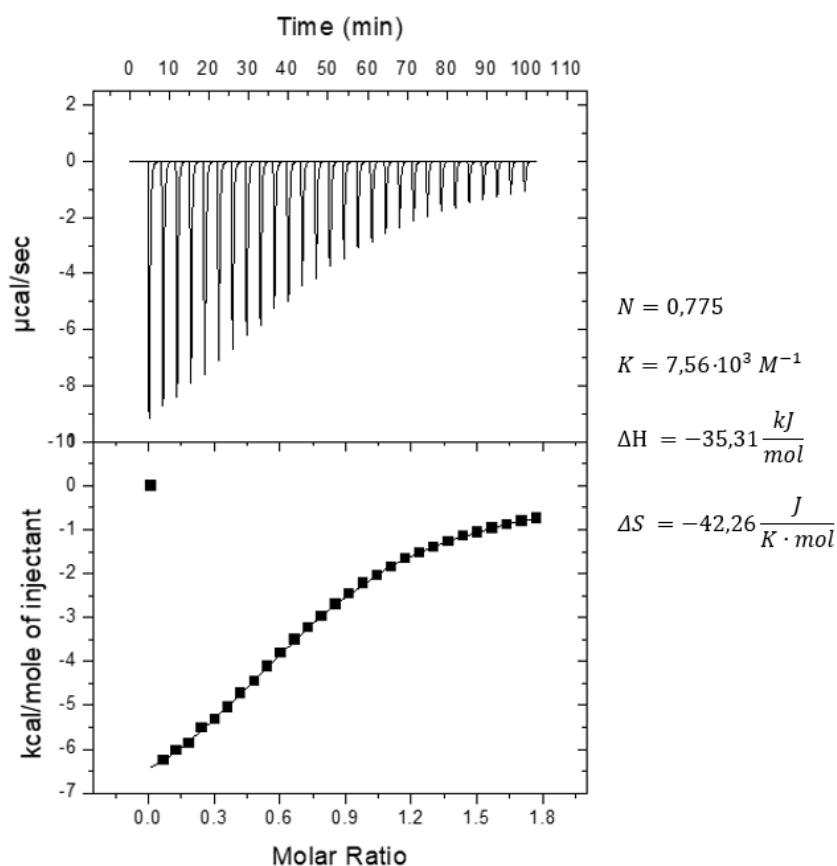
c_A , c_B : rovnovážné koncentrace konjugované kyseliny a zásady

5 VÝSLEDKY A DISKUSE

Experimentální část bakalářské práce se zabývá stanovením supramolekulárních komplexů vybraných aminokyselin s CB[7] pomocí izotermální titrační kalorimetrie. Při každém stanovení bylo pozorováno tepelné zabarvení reakce a pokud došlo ke komplexaci byly určeny termodynamické parametry reakce, a to stechiometrický poměr n , vazebná konstanta K a entalpie ΔH . Entropie byla matematickým modelem dopočítána z hodnoty vazebné konstanty.

5.1 Tryptofan

Vodný roztok tryptofanu o koncentraci 4,48 mmol/l byl připraven rozpuštěním 0,915 mg látky v 1 ml demineralizované vody. Roztok byl jehlou dávkován do měřicí cely, která byla naplněná vodným roztokem CB[7] o koncentraci 0,54 mmol/l.



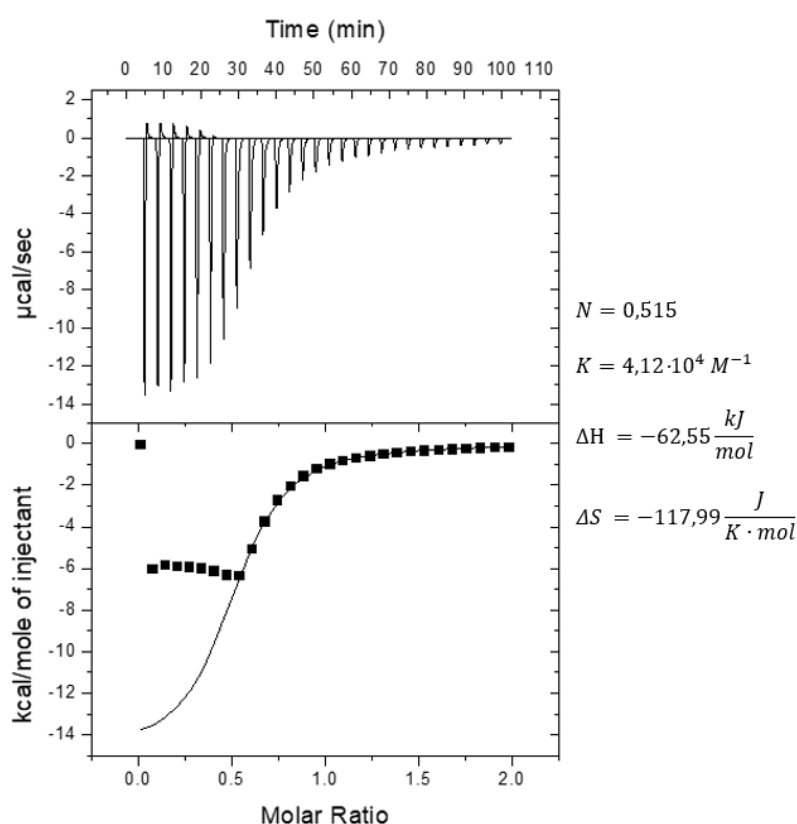
Obrázek 23: Tepelné zabarvení a stanovení interakce CB[7] a tryptofanu

Byla pozorována komplexační reakce tryptofanu a CB[7] se stechiometrickým poměrem 0,775. Reakce měla exotermický průběh a oproti ostatním reakcím kde byla zaznamenána komplexace s nižší vazebnou konstantou. Získané hodnoty odpovídají

literatuře, kdy při pH 7 byla naměřena vazebná konstanta $1,2 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$ ve fosfátovém pufru.²⁶ Hodnota sice není stejná, ale je poměrně blízká a lze říci, že v demineralizované vodě mohla být afinita tryptofanu k CB[7] o něco vyšší než v pufru.

5.2 Leucin

Z jehly byl do měrné cely postupně dávkován vodný roztok leucinu o koncentraci 5,01 mmol/l připravený rozpuštěním 0,809 mg látky v 1,230 ml demineralizované vody. Měřicí ceta byla naplněna vodným roztokem CB[7] o koncentraci 0,54 mmol/l.

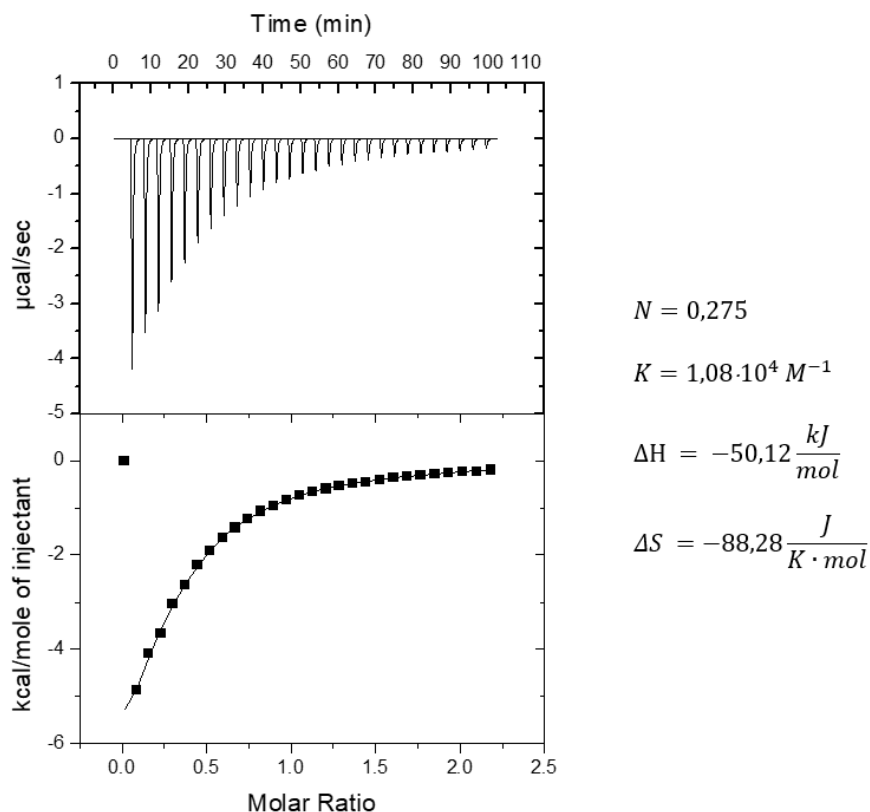


Obrázek 24: Tepelné zabarvení a stanovení interakce CB[7] a leucinu

Dle stechiometrického poměru dochází ke komplexaci v poměru 1:2 s dosti vysokou vazebnou konstantou, klesající entropií a za uvolnění tepelné energie. Nicméně aby bylo možné měřením získané body proložit křivkou za použití matematického modelu One Set of Sites muselo být vynecháno poměrně hodně bodů. Dle všeho docházelo do bodu ekvivalence k jiným efektům, které uvolňovaly teplo, než je komplexace leucinu do kavity CB[7]. Pro další stanovení by bylo vhodné snížit koncentraci na poloviční hodnotu, čímž by se mohlo předejít nežádoucím jevům.

5.3 Prolin

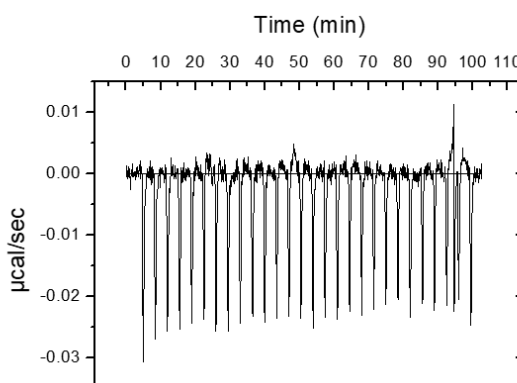
Navážka 0,476 mg prolínu byla rozpuštěna v 1,5 ml demineralizované vody. Vzniklý roztok o koncentraci 2,76 mmol/l byl natažen do jehly a postupně po 10 μ l ve 29 přidavcích dávkován do měřicí cely naplněné roztokem CB[7] v demineralizované vodě o koncentraci 0,27 mmol/l.



Obrázek 25: Tepelné zabarvení a stanovení interakce CB[7] a prolínu

Stechiometrický poměr 0,275 udává, že na jednu molekulu CB[7] připadá 0,275 molekuly prolínu, nebo že na jednu molekulu prolínu se váží 3 jednotky CB[7]. To naznačuje, že nedochází ke komplexaci 1:1. V dostupné literatuře nebylo dohledáno, zda se prolín komplexuje do kavity CB[7]. Molekula prolínu je poměrně malá a je možné, že se v dutině CB[7] nezachytí. A je také možné, že se prolín váže nespecifickou vazbou k povrchu makrocyclu CB[7], čemuž by odpovídal nízký vazebný poměr. K potvrzení těchto domněnek by bylo nutno analyzovat komplexaci prolínu k CB[7] jinou metodou, např. NMR. Vazebná konstanta $1,08 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$ naznačuje, že se jedná o poměrně silnou vazbu. Došlo k uvolnění 50,12 kJ/mol tepelné energie a vazba prolínu k CB[7] tudíž probíhala exotermně.

Interakce prolinu s CB[7] byla pozorována také v citrátovém pufru. 0,501 mg prolinu bylo rozpuštěno v citrátovém pufru. Vzniklý roztok o koncentraci 2,90 mmol/l byl umístěn do jehly. Měřicí cela byla naplněna roztokem CB[7] v citrátovém pufru o koncentraci 0,07 mmol/l.

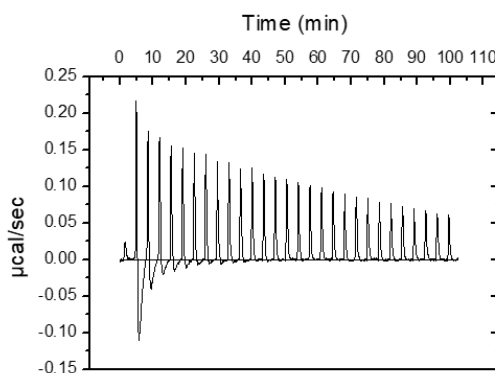


Obrázek 26: Tepelné zabarvení interakce CB[7] a prolinu v pufru

Bylo pozorováno malé exotermní teplo (obrázek 26), které bylo skoro stejné po každém přidavku s mírně snižující se tendencí. Toto bylo překvapující, jelikož při snížení pH roztoku bylo očekáváno zvýšení afinity hosta k hostiteli, nikoliv absence komplexační reakce. Proto bylo provedeno ověření interference kyseliny citrónové, která je složkou citrátového pufru, s CB[7].

5.4 Kyselina citrónová

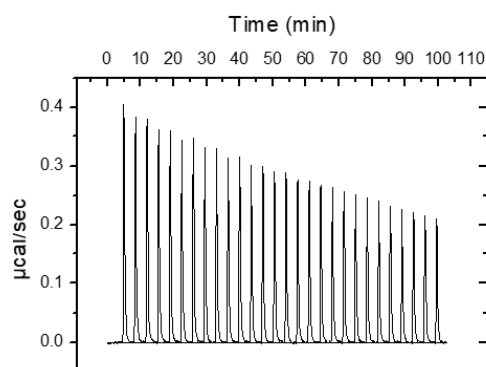
Kyselina citrónová monohydrát o hmotnosti 0,702 mg byla rozpuštěna v 1,5 ml demineralizované vody. Vzniklý roztok o koncentraci 2,23 mmol/l byl převeden do jehly a dávkován do měřicí cely naplněné roztokem CB[7] v demineralizované vodě o koncentraci 0,25 mmol/l.



Obrázek 27: Tepelné zabarvení interakce CB[7] a kyseliny citrónové ve vodě

Na obrázku 27 je výstup titračního mikrokolorimetrického měření a naznačuje, že došlo k mírně endotermní reakci mezi kyselinou citrónovou a CB[7]. Hodnoty uvolněného tepla však nenaznačují, že by docházelo ke komplexaci mezi kyselinou citrónovou a CB[7]. Kavita by tudíž měla zůstat neobsazena. Pro potvrzení bylo provedeno ještě měření interakce kyseliny citrónové monohydrátu v citrátovém pufru.

V 1,178 ml citrátového pufru bylo rozpuštěno 0,619 mg kyseliny citrónové. Tím byl získán roztok o koncentraci 2,5 mmol/l, který byl natažen do jehly. Cěla byla naplněna roztokem CB[7] o koncentraci 0,07 mmol/l.

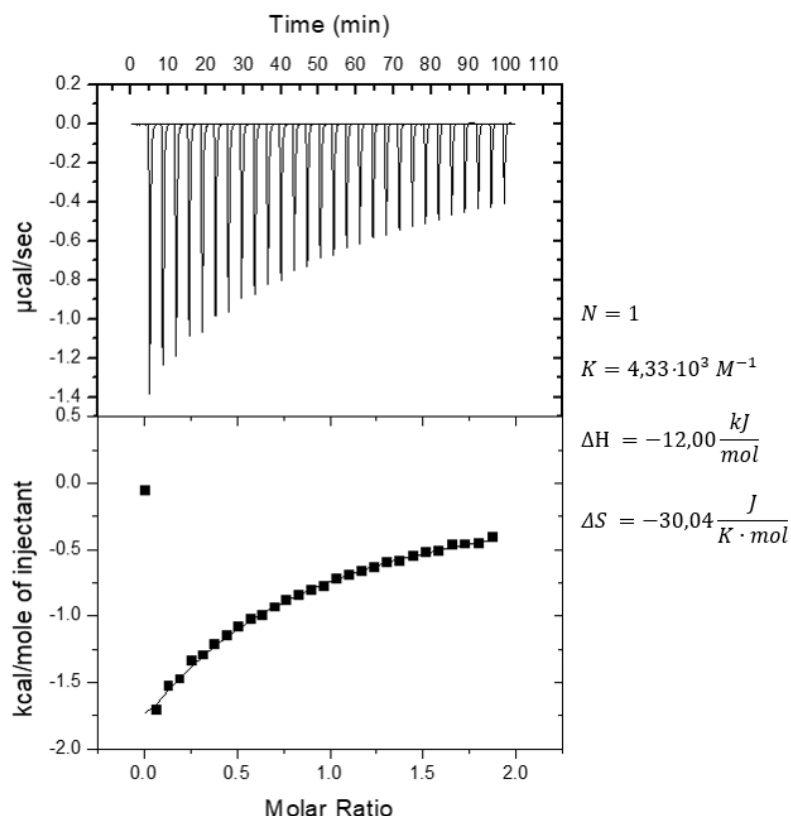


Obrázek 28: Tepelné zabarvení interakce CB[7] a kyseliny citrónové v pufru

Z grafu lze vyčíst, že endotermní teplo se mírně zvýšilo a s každým přidavkem mělo mírně klesající tendenci, nicméně stále nic nenasvědčuje, že by docházelo ke komplexaci s makrocylem. Tuto možnost tedy můžeme vyloučit.

5.5 Serin

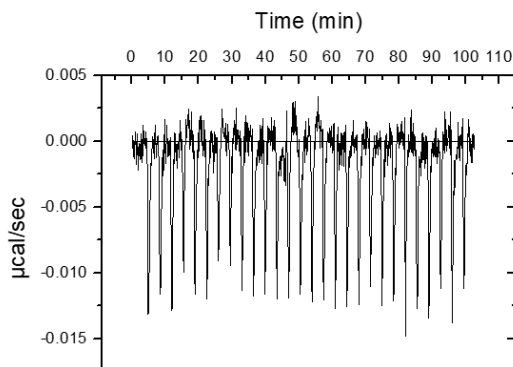
Navážka 0,372 mg serinu byla rozpuštěna v 1,5 ml demineralizované vody. Do jehly byl následně nasán vzniklý roztok o koncentraci 2,36 mmol/l. Cěla byla naplněna roztokem CB[7] ve vodě o koncentraci 0,27 mmol/l.



Obrázek 29: Tepelné zabarvení a stanovení interakce CB[7] a serinu

V grafu tohoto měření můžeme vidět, že se jedná o exotermickou reakci o poměrně nízkém uvolněném teple. Hodnoty se povedlo proložit křivkou, nicméně pokud byly proloženy co nejpřesněji, výsledné termodynamické parametry byly nesmyslné a odchylky byly řádově vyšší než výsledek samotného stanovení a hodnota vazebného poměru limitovala k hodnotě 0. Proto byl jako stechiometrický poměr nastaveno číslo 1. Tak byla stejná získána křivka s reálnými parametry. Stejně jako v případě prolinu nejde odhadnout, zda je kavita CB[7] pro serin velká, nebo že se jedná o nespecifickou vazbu k povrchu makrocyclu CB[7].

Pro zajímavost bylo provedeno i stanovení v citrátovém pufru, kdy v jehle byl přítomen serin připravený rozpuštěním 0,403 mg v 1,5 ml pufru. V měřicí cele pak roztok CB[7] o koncentraci 0,07 mmol/l také v pufru.

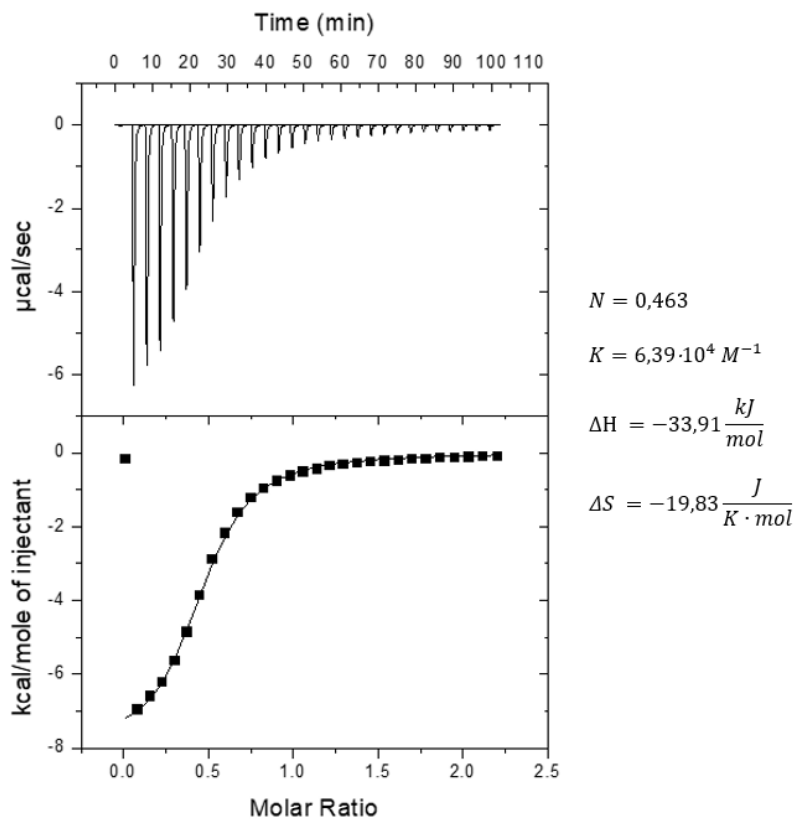


Obrázek 30: Tepelné zabarvení interakce CB[7] a serinu v pufru

Jak se dalo očekávat (obrázek 30) ke komplexaci nedošlo a zaznamenané teplo bylo opravdu extrémně malé a neodpovídalo komplexaci

5.6 Lysin hydrochlorid

Do měřicí cely byl stříkačkou vpraven roztok CB[7] v demineralizované vodě o koncentraci 0,27 mmol/l. V jehle byl lysin hydrochlorid o koncentraci 2,78 mmol/l. Vzniklý rozpuštěním 0,508 mg lysinu hydrochloridu v 1ml demineralizované vody.

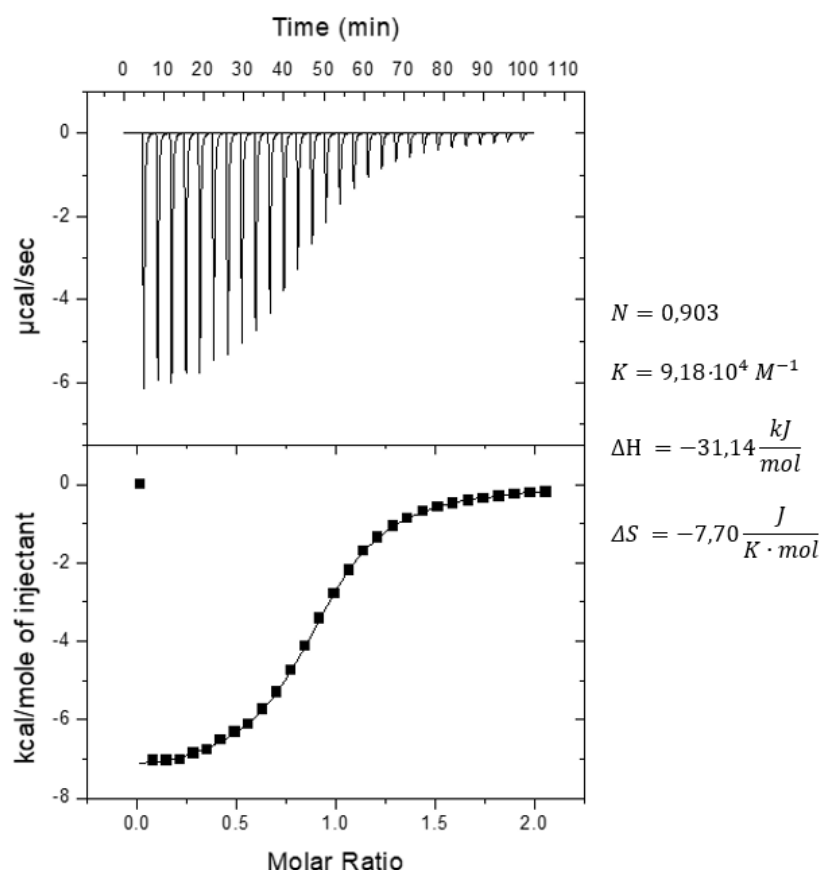


Obrázek 31: Tepelné zabarvení a stanovení interakce CB[7] a lysinu hydrochloridu

Na obrázku 31 je možno vidět, že ke komplexaci nejspíše došlo. Podle stechiometrického poměru připadá na 1 makrocyclus 0,463 lysinu hydrochloridu, tedy by se mohly vázat dvě molekuly lysinu do kavity CB[7]. Vazebná konstanta je též poměrně velká. Asi 6krát větší než u prolinu. Záporná entalpie poukazuje na exotermický průběh reakce a záporná entalpie na zvyšující se uspořádanost, což z podstaty odpovídá komplexaci. Dle literatury je vazebná konstanta lysinu $2,1 \cdot 10^2 \text{ M}^{-1}$, kdy bylo ale stanovení provedeno ve fosfátovém pufru o pH 7.²⁶ Lze tedy usoudit, že lysin hydrochlorid, který obsahuje kationt na atomu dusíku má lepší vlastnosti pro komplexaci s CB[7].

5.7 Tyrosin

Z jehly byl do měřicí cely dávkován vodný roztok tyrosinu o koncentraci 2,60 mmol/l připravený rozpuštěním 0,471 mg látky v 1 ml demineralizované vody. V měřicí cele byl vodný roztok CB[7] o koncentraci 0,27 mmol/l.



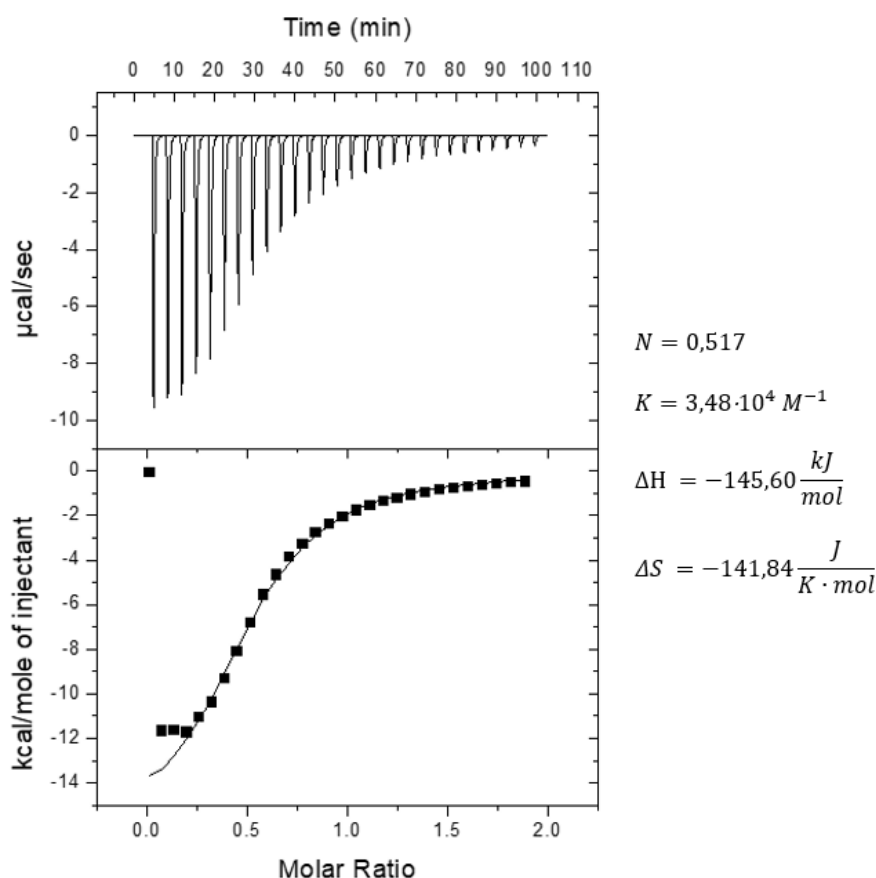
Obrázek 32: Tepelné zabarvení a stanovení interakce CB[7] a tyrosinu

V této exotermické interakci se stechiometrický poměr se blíží hodnotě 1 to značí, že do kavity makrocyclu vstupuje 1 molekula tyrosinu. Vazebná konstanta, která má hodnotu

$9,18 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$ naznačuje že host s hostitelem k sobě mají poměrně vysokou afinitu. Lze říci, že komplexace zde úspěšně proběhla. Dle literatury je vazebná konstanta $1,6 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$ při pH 7 ve fosfátovém pufru²⁶, což je hodnota poměrně blízká a rozdíl je pravděpodobně způsoben zvoleným ředícím médiem.

5.8 Methionin

Byl vytvořen vodný roztok o koncentraci 2,39 mmol/l rozpuštěním 0,356 mg methioninu v 1 ml demineralizované vody. Roztok byl následně jehlou mikrokolorimetru dávkován do měřicí cely, ve které byl vodný roztok CB[7] o koncentraci 0,27 mmol/l.

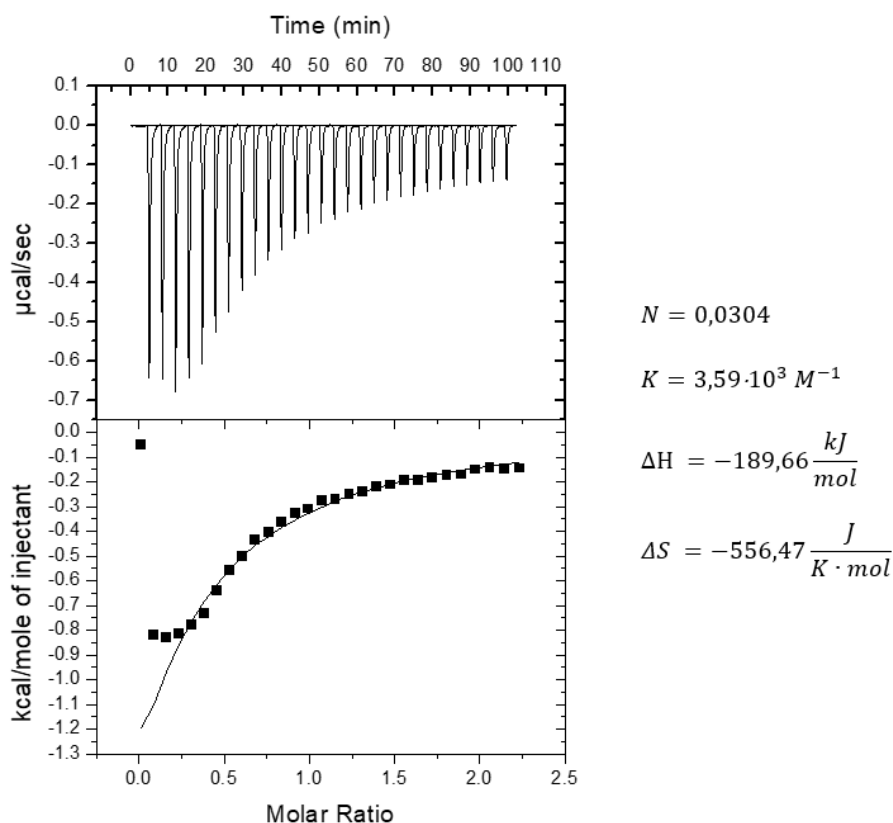


Obrázek 33: Tepelné zabarvení a stanovení interakce CB[7] a methioninu

Komplexační interakce mezi methioninem a CB[7] má exotermický charakter se stechiometrickým poměrem 0,517. tento vazebný poměr by odpovídal vázání dvou molekul do kavity CB[7]. Vazebná konstanta $3,48 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$ je vyšší než u prolinu, ale nižší než u tyrosinu a lysinu hydrochloridu. Změna entropie byla poměrně vyšší oproti ostatním interakcím, kde byla doposud zaznamenána komplexace.

5.9 Cystin

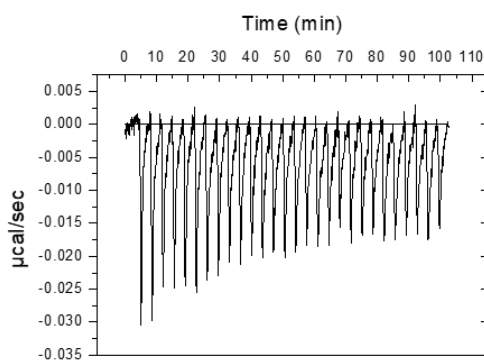
By připraven vodný roztok cystinu smísením 0,937 mg cystinu s 1,5 ml demineralizované vody. Měřicí cela byla naplněna roztokem CB[7] o koncentraci 0,25 mmol/l.



Obrázek 34: Tepelné zabarvení a stanovení interakce CB[7] a cystinu

Z grafu na obrázku 34 je patrné, že uvolněné teplo je relativně malé. Tomu také odpovídá vyhodnocený vazebný poměr, který limituje k hodnotě 0 a kdy proložená křivka matematickým modelem opisuje skoro všechny body. Pokud by se změnila hodnota vazebného poměru na hodnotu 1 nebo 0,5, nelze výslednou křivkou proložit body grafu a vyhodnocení není správné. Lze tedy předpokládat, že se nejedná o vznik komplexu cystinu a makrocyclu, ale že uvolněné teplo odpovídá nějaké jiné nespecifické interakci.

Interakce cystinu s CB[7] byly prověřeny i v citrátovém pufru. Kdy byl do jehly naplněn roztok připravený rozpuštěním 0,937 mg cystinu v citrátovém pufru. Vzorek byl rozpuštěn pomocí ultrazvuku. V měřicí cele byl roztok CB[7] v pufru o koncentraci 0,07 mmol/l.

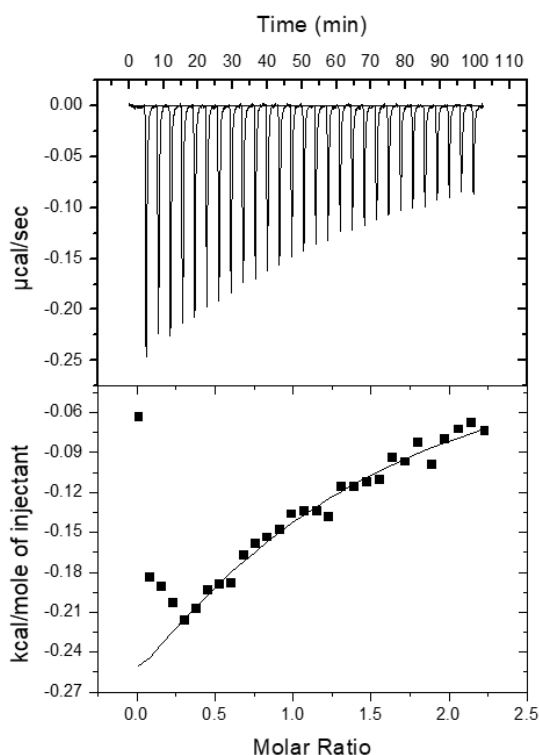


Obrázek 35: Tepelné zabarvení interakce CB[7] a cystinu v pufru

Jak je patrné z obrázku 35, bylo uvolněno velmi malé exotermické teplo, které se s každým přidavkem mírně snižovalo. Přesto ale lze usuzovat, že nedošlo k žádné interakci cystinu a CB[7] v citrátovém pufru.

5.10 Hydroxyprolin

Při měření pomocí titračního mikrokalořimetru byl z jehly do měřicí cely postupně dávkován roztok hydroxyprolinu o koncentraci 2,60 mmol/l připravený rozpuštěním 0,511 mg látky v 1,5 ml demineralizované vody. V měrné cele byl vodný roztok CB[7] o koncentraci 0,25 mmol/l.



$$N = 1,07$$

$$K = 2,49 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$$

$$\Delta H = -2,64 \frac{\text{kJ}}{\text{mol}}$$

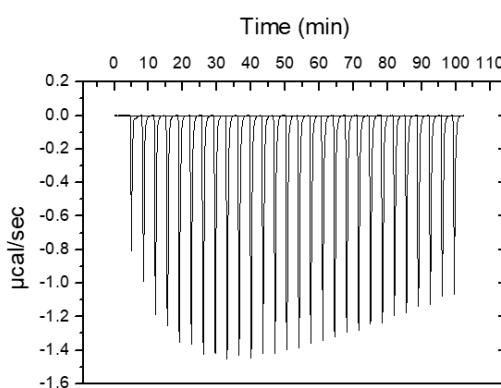
$$\Delta S = -56,48 \frac{\text{J}}{\text{K} \cdot \text{mol}}$$

Obrázek 36: Tepelné zabarvení a stanovení interakce CB[7] a hydroxyprolinu

Stechiometrický poměr je velmi blízko hodnotě 1. Reakce byla mírně exotermního charakteru s malou změnou entalpie. Vazebná konstanta byla stanovena $1,49 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$. Co je zajímavé tak došlo ke zvýšení entropie. Tento efekt může vzniknout, když je z makrocyklu vytlačena molekula vody. pro lepší výsledek, by bylo dobré provést toto stanovení ještě jednou s vyšší koncentrací hydroxyprolinu a CB[7].

5.11 Kyselina glutamová

Vodný roztok kyseliny glutamové o koncentraci 2,56 mmol/l. byl připraven rozpuštěním 0,565 mg látky v 1,5 ml demineralizované vody a natažen do mikrokaloimetrické jehly. Měřicí cela byla naplněna roztokem CB[7] o koncentraci 0,25 mmol/l.

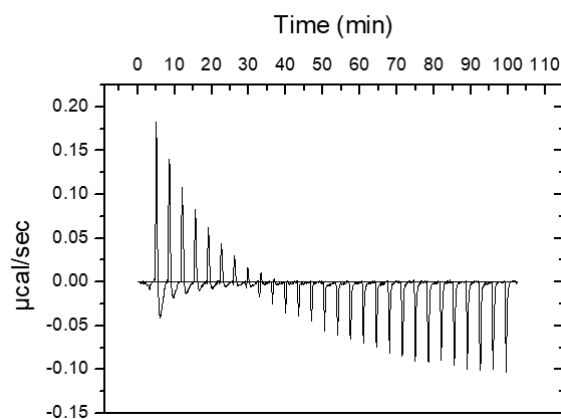


Obrázek 37: Tepelné zabarvení interakce CB[7] a kyseliny glutamové

Jak je patrné z obrázku 37, byla při tomto stanovení pozorována exotermická reakce. Vydaná tepelná energie se nejdříve zvyšovala a před polovinou měření se začala snižovat. Ke komplexaci nedošlo.

5.12 Kyselina asparagová

Do mikrokaloimetrické jehly byl natažen vodný roztok kyseliny asparagové o koncentraci 2,47 mmol/l připravený rozpuštěním 0,493mg látky v 1,5 ml demineralizované vody. Roztok byl jehlou dávkován do měrné cely s vodným roztokem CB[7] o koncentraci 0,25 mmol/l.

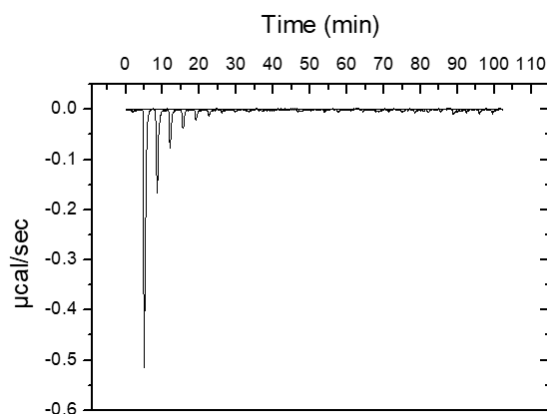


Obrázek 38: Tepelné zabarvení interakce CB[7] a kyseliny asparagové

Jak je patrné z obrázku 38, ke komplexační reakci mezi kyselinou asparagovou a CB[7] nedošlo. Nicméně byl pozorován zajímavý jev, kdy se teplo nejdříve spotřebovávalo a následně uvolňovalo. Toto bylo jediné z provedených měření, kde se tento jev vyskytoval. U ostatních došlo k čistě endotermické nebo exotermické reakci.

5.13 Glycin

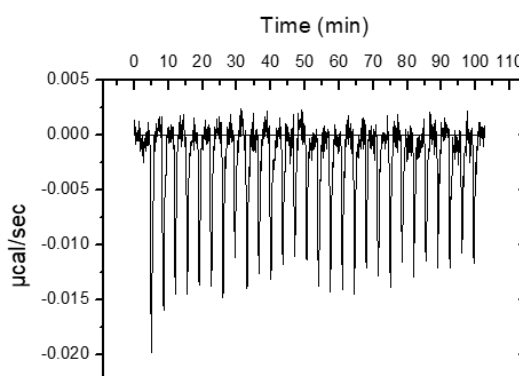
U stanovení komplexační reakce mezi glycinem a CB[7] se vznik komplexu nepředpokládal a měření bylo spíše doplňkové. Do jehly byl natažen vodný roztok glycinu o koncentraci 2,53 mmol/l, který vznikl rozpuštěním 0,285 mg glycinu v 1,5 ml demineralizované vody. Vodný roztok byl v průběhu měření přidáván do měřicí cely s roztokem CB[7] o koncentraci 0,25 mmol/l.



Obrázek 39: Tepelné zabarvení interakce CB[7] a glycinu

Výstupem měření je graf (obrázek 39) zachycující exotermickou reakci, kdy během 6 přidavků došlo k viditelnému uvolnění tepla a při dalších přidavcích bylo uvolněné teplo sotva znatelné.

Měření bylo provedeno i v citrátovém pufru kdy byl do cely s roztokem CB[7] v pufru o koncentraci 0,07 mmol/l postupně dávkován roztok glycinu vzniklý rozpuštěním 0,257 mg látky v 1,5 ml pufru.



Obrázek 40: Tepelné zabarvení interakce CB[7] a glycinu v pufru

Při měření v citrátovém pufru došlo k uvolnění malého exotermického tepla. Došlo k potvrzení, že mezi CB[7] a glycinem ke komplexační reakci nedochází.

ZÁVĚR

Cílem bakalářské práce bylo stanovení supramolekulárních komplexů vybraných aminokyselin s CB[7]. Interakce, ve kterých došlo k vytvoření komplexu jsou uvedeny v tabulce níže spolu s hodnotami vazebného poměru a vazebné konstanty

Tabulka 2: Výsledky měření

<i>Aminokyselina</i>	<i>Stechiometrický poměr N</i>	<i>vazebná konstanta K [M⁻¹]</i>
<i>Tryptofan</i>	0,775	7,56·10 ³
<i>Leucin</i>	0,515	4,12·10 ⁴
<i>Prolin</i>	0,275	1,08·10 ⁴
<i>Serin</i>	1	4,33·10 ³
<i>Lysin hydrochlorid</i>	0,463	6,39·10 ⁴
<i>Tyrosin</i>	0,903	9,18·10 ⁴
<i>Methionin</i>	0,517	3,48·10 ⁴
<i>Hydroxyprolin</i>	1,07	2,49·10 ³

Tvorba komplexu byla pomocí izotermální titrační mikrokolorimetrie spolehlivě zaznamenána u 8 aminokyselin. Kdy nejvyšší vazebná konstanta byla stanovena u tyrosinu a nejnižší u hydroxyprolinu, což může být způsobeno jeho cyklickou strukturou, která je značně rigidní. U cystinu byl při vyhodnocení stechiometrický poměr limitován k 0. Ke vzniku komplexu tedy nejspíše nedošlo, ale uvolněné teplo naznačuje vznik jiné nespecifické exotermické interakce.

Hodnoty u tryptofanu, tyrosinu a lysinu byly porovnány s literaturou a bylo zjištěno, že hodnoty jsou řádově stejné, ale o něco vyšší. Rozdíl může být způsoben jinou volbou ředícího média. Práce potvrdila využitelnost mikrokolorimetrie pro detailní charakterizaci těchto systémů.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] KIM, Kimoon; KO, Young Ho; SELVAPALAM, Narayanan; MURRAY, James a HWANG, Ilha. *Cucurbiturils: Chemistry, Supramolecular Chemistry And Applications: Chemistry, Supramolecular Chemistry And Applications*. New Jersey: World Scientific Publishing Europe, 2018/01/01/2018. ISBN 9781848164109. Dostupné také z: <https://research.ebsco.com/linkprocessor/plink?id=14442611-4f48-3f19-afa8-2e9686b38e20>.
- [2] MA, Xing and Yanli ZHAO, 2014. Biomedical applications of supramolecular systems based on Host–Guest interactions. *Chemical Reviews* [online]. **115**(15), 7794–7839. Dostupné z: doi:10.1021/cr500392w
- [3] KUBIK, Stefan, 2021. *Supramolecular chemistry: From Concepts to Applications*. B.m.: de Gruyter. ISBN 978-3-11-059560-4.
- [4] STEED, Jonathan W. a ATWOOD, J. L. *Supramolecular chemistry*. Third edition. Hoboken, NJ: Wiley, 2022. ISBN 978-1-119-58251-9.
- [5] Dodziuk, H.: *Cyclodextrins and Their Complexes*. WILEY-VCH Verlag GmbH, Weinheim. 2006, ISBN 3-527-31280-3.
- [6] Barrow, S. J., Kasera, S., Rowland, M. J., del Barrio, J., & Scherman, O. A.: Cucurbituril-Based Molecular Recognition. *Chemical Reviews*, 2015, 115, 22, 12320-12406.
- [7] SOLOV'EV, V. P. and A. Yu. TSIVADZE, 2015. Supramolecular complexes: Determination of stability constants on the basis of various experimental methods. *Protection of Metals and Physical Chemistry of Surfaces* [online]. **51**(1), 1–35. Dostupné z: doi:10.1134/s2070205115010153
- [8] SCHALLEY, Christoph A. (ed.). *Analytical methods in supramolecular chemistry*. Weinheim: Wiley-VCH, 2007. ISBN 978-3-527-31505-5.
- [9] THORDARSON, Pall, 2010. Determining association constants from titration experiments in supramolecular chemistry. *Chemical Society Reviews* [online]. **40**(3), 1305–1323. Dostupné z: doi:10.1039/c0cs00062k
- [10] DEL ROSSO, Maria G., Artur CIESIELSKI, Silvia COLELLA, Jack M. HARROWFIELD and Paolo SAMORÌ, 2014. Isothermal Titration Calorimetry Study of a Bistable Supramolecular System: Reversible Complexation of Cryptand[2.2.2] with

- Potassium Ions. *ChemPhysChem* [online]. **15**(13), 2743–2748. Dostupné z: doi:10.1002/cphc.201402296
- [11] ARNAUD, Alix and Laurent BOUTEILLER, 2004. Isothermal titration calorimetry of supramolecular polymers. *Langmuir* [online]. **20**(16), 6858–6863. Dostupné z: doi:10.1021/la049365d
- [12] FREYER, Matthew W. and Edwin A. LEWIS, 2007. Isothermal titration Calorimetry: experimental design, data analysis, and probing Macromolecule/Ligand binding and kinetic interactions. *Methods in Cell Biology* [online]. 79–113. Dostupné z: doi:10.1016/s0091-679x(07)84004-0
- [13] HUNTER, Christopher A. a PACKER, Martin J. Complexation-Induced Changes in ¹H NMR Chemical Shift for Supramolecular Structure Determination. *Chemistry – A European Journal*. 1999/06/04, roč. 5, č. 6, s. 1891-1897. ISSN 0947-6539. Dostupné z: [https://doi.org/https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-3765\(19990604\)5:61891::AID-CHEM18913.0.CO;2-G](https://doi.org/https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-3765(19990604)5:61891::AID-CHEM18913.0.CO;2-G).
- [14] ZIA, Komal, Talal SIDDIQUI, Saqib ALI, Imran FAROOQ, Muhammad Sohail ZAFAR and Zohaib KHURSHID, 2019b. Nuclear magnetic resonance Spectroscopy for medical and dental applications: A Comprehensive review. *European Journal of Dentistry* [online]. **13**(01), 124–128. Dostupné z: doi:10.1055/s-0039-1688654
- [15] ROCHA, Fellipy S., Anderson J. GOMES, Claire N. LUNARDI, Serge KALIAGUINE and Gregory S. PATIENCE, 2018. Experimental methods in chemical engineering: Ultraviolet visible spectroscopy—UV-Vis. *The Canadian Journal of Chemical Engineering* [online]. **96**(12), 2512–2517. Dostupné z: doi:10.1002/cjce.23344
- [16] CRONEY, John C., David M. JAMESON and Robert P. LEARMONTH, 2001. Fluorescence spectroscopy in biochemistry: teaching basic principles with visual demonstrations. *Biochemistry and Molecular Biology Education* [online]. **29**(2), 60–65. Dostupné z: doi:10.1111/j.1539-3429.2001.tb00071.x
- [17] VILLALVA, Denise. *DEVELOPMENT OF NEW LIPOSOME BASED SENSORS*. 2015/12/16. Dostupné z: <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.26454.55366>.
- [18] MARTINS, Joana N., João Carlos LIMA and Nuno BASÍLIO, 2020. Selective recognition of amino acids and peptides by small supramolecular receptors. *Molecules* [online]. **26**(1), 106. Dostupné z: doi:10.3390/molecules26010106

- [19] AKRAM, Muhammad; ASIF, Muhammad; UZAIR, Muhmmad; NAVEED, Akhtar; MADNI, Muhammad Asadullah et al. Amino acids: A review article: A review article. *Journal of Medicinal Plants Research*. 2011/09/09, roč. 5, s. 3997-4000.
- [20] NIE, Shuaishuai, He ZHAO, Jiayi SUN, Qingtao LIU, Yongming CUI and Wen LI, 2024. Amino Acid-Derived supramolecular assembly and soft materials. *Molecules* [online]. **29**(19), 4705. Dostupné z: doi:10.3390/molecules29194705
- [21] LOPEZ, Michael J. and Shamim S. MOHIUDDIN, 2024b. Biochemistry, essential amino acids. *StatPearls – NCBI Bookshelf* [online].
Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/books/NBK557845/>
- [22] URBACH, Adam R. and Vijayakumar RAMALINGAM, 2011. Molecular Recognition of Amino Acids, Peptides, and Proteins by Cucurbit[n]uril Receptors. *Israel Journal of Chemistry* [online]. **51**(5–6), 664–678. Dostupné z: doi:10.1002/ijch.201100035
- [23] ZHAO, Xue-Qing; WAHID, Fazli; ZHAO, Xiang-Jun; WANG, Feng-Ping; WANG, Teng-Fei et al. Fabrication of amino acid-based supramolecular hydrogel with silver ions for improved antibacterial properties. *Materials Letters*. 2021, roč. 300, s. 130161. ISSN 0167-577X.
Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.matlet.2021.130161>.
- [24] RAIZADA, P; VYAS, V a SHARMA, U. Liquid membrane extraction and transport of amino acids using calix[6]arene. *INDIAN JOURNAL OF CHEMICAL TECHNOLOGY*. JUL, roč. 17, č. 4, s. 267-273. ISSN 0971-457X.
- [25] HUANG, Yifan, Zian YU, Jiancheng PENG, Qin YU, Hao XU, Miaomiao YANG, Sijie YUAN, Qianzijing ZHANG, Yanyun YANG, Jin GAO and Yue YUAN, 2024b. Amino-Acid-Encoded supramolecular nanostructures for persistent bioluminescence imaging of tumor. *Advanced Healthcare Materials* [online].
Dostupné z: doi:10.1002/adhm.202401244
- [26] LEE, Jong Wha, Hyun Hee L. LEE, Young Ho KO, Kimoon KIM and Hugh I. KIM, 2015. Deciphering the Specific High-Affinity Binding of Cucurbit[7]uril to Amino Acids in Water. *The Journal of Physical Chemistry B* [online]. **119**(13), 4628–4636. Dostupné z: doi:10.1021/acs.jpcb.5b00743

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Schéma přijímání substrátu receptorem ³	13
Obrázek 2: Krystalová struktura cucurbiturilů (CB[15] tvoří komplex s Cd^{2+}) ¹	15
Obrázek 3: Schéma syntézy CB[6] z glykourilu	15
Obrázek 4: Schéma izotermálního titračního kalorimetru ¹²	20
Obrázek 5: Schéma Nukleární Magnetické Rezonance ¹⁴	21
Obrázek 6: Schéma UV-Vis spektrofotometru ¹⁵	22
Obrázek 7: Schéma spektrofluorimetru ¹⁷	23
Obrázek 8: Obecná struktura aminokyselin; R – postranní řetězec ²¹	24
Obrázek 9: ThermoVac	29
Obrázek 10: Struktura CB[7]	30
Obrázek 11: Struktura tryptofanu	30
Obrázek 12: Struktura leucinu	31
Obrázek 13: Struktura prolinu	31
Obrázek 14: Struktura serinu	31
Obrázek 15: Struktura lysinu hydrochloridu	32
Obrázek 16: Struktura tyrosinu	32
Obrázek 17: Struktura methioninu	32
Obrázek 18: Struktura cystinu	33
Obrázek 19: Struktura hydroxyprolinu	33
Obrázek 20: Struktura kyseliny glutamové	33
Obrázek 21: Struktura kyseliny asparagové	34
Obrázek 22: Struktura glycinu	34
Obrázek 23: Tepelné zabarvení a stanovení interakce CB[7] a tryptofanu	36
Obrázek 24: Tepelné zabarvení a stanovení interakce CB[7] a leucinu	37
Obrázek 25: Tepelné zabarvení a stanovení interakce CB[7] a prolinu	38
Obrázek 26: Tepelné zabarvení interakce CB[7] a prolinu v pufru	39
Obrázek 27: Tepelné zabarvení interakce CB[7] a kyseliny citrónové ve vodě	39
Obrázek 28: Tepelné zabarvení interakce CB[7] a kyseliny citrónové v pufru	40
Obrázek 29: Tepelné zabarvení a stanovení interakce CB[7] a serinu	41
Obrázek 30: Tepelné zabarvení interakce CB[7] a serinu v pufru	42
Obrázek 31: Tepelné zabarvení a stanovení interakce CB[7] a lysinu hydrochloridu	42
Obrázek 32: Tepelné zabarvení a stanovení interakce CB[7] a tyrosinu	43
Obrázek 33: Tepelné zabarvení a stanovení interakce CB[7] a methioninu	44
Obrázek 34: Tepelné zabarvení a stanovení interakce CB[7] a cystinu	45

Obrázek 35: Tepelné zabarvení interakce CB[7] a cystinu v pufru.....	46
Obrázek 36: Tepelné zabarvení a stanovení interakce CB[7] a hydroxyprolinu	46
Obrázek 37: Tepelné zabarvení interakce CB[7] a kyseliny glutamové	47
Obrázek 38: Tepelné zabarvení interakce CB[7] a kyseliny asparagové	48
Obrázek 39: Tepelné zabarvení interakce CB[7] a glycinu	48
Obrázek 40: Tepelné zabarvení interakce CB[7] a glycinu v pufru	49

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Rozdělení 20 základních aminokyselin ²¹	25
Tabulka 2: Výsledky měření	50

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

K	Vazebná konstanta
ΔH	Změna entalpie
ΔS	Změna entropie
CBs	Cucurbiturily
CB[5]	Cucurbit[5]uril
CB[6]	Cucurbit[6]uril
CB[7]	Cucurbit[7]uril
CB[8]	Cucurbit[8]uril
CB[10]	Cucurbit[7]uril
<i>i</i> CB[6]	Modifikovaný cucurbit[6]uril
CB[15]	Cucurbit[15]uril
UV-Vis	Ultrafialovo-viditelná spektroskopie
NMR	Nukleární magnetická rezonance
<i>m</i> RNA	Messenger RNA
RF	Vysokofrekvenční
ITC	Izotermální titrační kalorimetrie