



TECHNICKÁ UNIVERZITA V LIBERCI  
Fakulta mechatroniky, informatiky  
a mezioborových studií ■

# SYNTÉZA DERIVÁTŮ CYKLODEXTRINŮ VHODNÝCH PRO NAVÁZÁNÍ NA MAGNETICKÉ NANOČÁSTICE.

**Bakalářská práce**

*Studijní program:* B3942 – Nanotechnologie  
*Studijní obor:* 3942R002 – Nanomateriály  
*Autor práce:* **Michael Kalát**  
*Vedoucí práce:* RNDr. Michal Řezanka, Ph.D.





TECHNICAL UNIVERSITY OF LIBEREC  
Faculty of Mechatronics, Informatics  
and Interdisciplinary Studies ■

# SYNTHESIS OF CYCLODEXTRIN DERIVATIVES SUITABLE FOR CONJUGATION WITH MAGNETIC NANOPARTICLES.

**Bachelor thesis**

*Study programme:* B3942 – Nanotechnology

*Study branch:* 3942R002 – Nanomaterials

*Author:* **Michael Kalát**

*Supervisor:* RNDr. Michal Řezanka, Ph.D.



TECHNICKÁ UNIVERZITA V LIBERCI  
Fakulta mechatroniky, informatiky a mezioborových studií  
Akademický rok: 2012/2013

## ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: Michael Kalát  
Osobní číslo: M11000049  
Studijní program: B3942 Nanotechnologie  
Studijní obor: Nanomateriály  
Název tématu: Syntéza derivátů cyklodextrinů vhodných pro navázání na magnetické nanočástice.  
Zadávací katedra: Katedra chemie

### Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

1. Vypracovat literární rešerši o možnostech navázání cyklodextrinů na magnetické nanočástice.
2. Připravit alespoň dva cyklodextrinové deriváty vhodné pro navázání na tyto nanočástice.
3. Charakterizovat připravené cyklodextriny spektrálními metodami.

Rozsah grafických prací:

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

1. Liu, Y. et al. Thermodynamic Origin of Molecular Selective Binding of Bile Salts by Aminated beta-Cyclodextrins. *J. Phys. Chem. B* 107, 14130-14139 (2003).
2. Zhong, N., Byun, H.-S. & Bittman, R. An improved synthesis of 6-O-monotosyl-6-deoxy-[beta]-cyclodextrin. *Tetrahedron Lett.* 39, 2919-2920 (1998).

Vedoucí bakalářské práce:

**RNDr. Michal Řezanka, Ph.D.**

Katedra chemie

Datum zadání bakalářské práce:

**4. dubna 2013**

Termín odevzdání bakalářské práce:

**16. května 2014**



prof. Ing. Václav Kopecký, CSc.  
děkan



prof. Ing. Josef Šedlbauer, Ph.D.  
vedoucí katedry

V Liberci dne 4. dubna 2013

## Prohlášení

Byl jsem seznámen s tím, že na mou bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., o právu autorském, zejména § 60 – školní dílo.

Beru na vědomí, že Technická univerzita v Liberci (TUL) nezasahuje do mých autorských práv užitím mé bakalářské práce pro vnitřní potřebu TUL.

Užiji-li bakalářskou práci nebo poskytnu-li licenci k jejímu využití, jsem si vědom povinnosti informovat o této skutečnosti TUL; v tomto případě má TUL právo ode mne požadovat úhradu nákladů, které vynaložila na vytvoření díla, až do jejich skutečné výše.

Bakalářskou práci jsem vypracoval samostatně s použitím uvedené literatury a na základě konzultací s vedoucím mé bakalářské práce a konzultantem.

Současně čestně prohlašuji, že tištěná verze práce se shoduje s elektronickou verzí, vloženou do IS STAG.

Datum:

27. 8. 2014

Podpis:



## **Poděkování**

Rád bych tímto poděkoval všem, kteří se zasloužili o vytvoření mé bakalářské práce, především pak RNDr. Michalu Řezankovi, Ph.D. za trpělivé vedení při osvojování základů organické syntézy a mnoho cenných rad spojených s tvorbou této práce. Poděkování patří také Ing. Markétě Zajícové za naměření NMR spekter připravených derivátů cyklodextrinů.

Dále si velmi vážím vytváření příjemné atmosféry v laboratoři a pomoci nejrůznějšího druhu při experimentech od Mgr. Jany Karpíškové, prof. Ing. Ivana Stibora, Csc., Mohameda Said Darwishe, Ph.D. a dalších kolegů z řad studentů.

V neposlední řadě děkuji svým rodičům, sestře Michaele i ostatním členům rodiny za podporu během mého dosavadního studia.

## Abstrakt

V rámci této bakalářské práce byly připraveny 3 vybrané monosubstituované deriváty  $\beta$ -cyklodextrinu (CD) vhodné pro navázání na magnetické nanočástice. Jedná se o 6<sup>I</sup>-*O*-tosyl- $\beta$ -CD, 6<sup>I</sup>-(karboxymethyl)amino-6<sup>I</sup>-deoxy- $\beta$ -CD a 6<sup>I</sup>-(karboxyethyl)-amino-6<sup>I</sup>-deoxy- $\beta$ -CD. Příprava posledně jmenovaného nebyla doposud publikována.

Literární rešerše je zaměřena na cyklodextriny, jejich vlastnosti, metody přípravy a možnosti využití v praxi. Následně je stručně pojednáno o magnetických nanočásticích a poslední kapitola teoretické části se zabývá především potenciálním aplikačním polem magnetických nanočástic modifikovaných deriváty  $\beta$ -cyklodextrinů.

Příprava sloučenin byla pro získání věrohodnějších výsledků vždy minimálně dvakrát zopakována. Struktura produktů byla stanovena nukleární magnetickou rezonancí (NMR).

Klíčová slova: cyklodextriny, magnetické nanočástice, aminokyseliny

## **Abstract**

The aim of this bachelor thesis was to prepare three selected monosubstituted derivatives of  $\beta$ -cyclodextrin (CD) suitable for conjugation with magnetic nanoparticles, specifically 6<sup>I</sup>-*O*-tosyl- $\beta$ -CD, 6<sup>I</sup>-carboxymethylamino-6<sup>I</sup>-deoxy- $\beta$ -CD and 6<sup>I</sup>-carboxyethylamino-6<sup>I</sup>-deoxy- $\beta$ -CD. To the best of author's knowledge preparation of 6<sup>I</sup>-carboxyethylamino-6<sup>I</sup>-deoxy- $\beta$ -CD has not been published yet.

The literature research is focused on cyclodextrins, their properties, ways of their preparations and usage followed by short treatise about magnetic nanoparticles. The end of theoretical part is concerned with potential applications of magnetic nanoparticles functionalized by  $\beta$ -cyclodextrine derivatives.

Each experiment was done at least twice in order to ensure that the results were correct. The structures of products were determined by nuclear magnetic resonance (NMR)

Keywords: cyclodextrins, magnetic nanoparticles, amino acids



## **Kurzfassung**

Im Rahmen dieser Bachelorarbeit wurden drei ausgewählte monosubstituierende Derivate des  $\beta$ -Cyclodextrines (CD) vorbereitet, die für die Anknüpfung an magnetische Nanopartikeln geeignet sind. Es handelt sich um 6<sup>1</sup>-*O*-tosyl- $\beta$ -CD, 6<sup>1</sup>-carboxymethylamino-6<sup>1</sup>-deoxy- $\beta$ -CD und 6<sup>1</sup>-carboxy-ethylamino-6<sup>1</sup>-deoxy- $\beta$ -CD. Die Vorbereitung der letztgenannten war noch nicht publiziert.

Die Literaturrecherche orientiert sich an Cyclodextrinen, ihren Eigenschaften, Methoden ihrer Vorbereitung und praktische Anwendung. Im Anschluss werden die magnetische Nanopartikeln kurz behandelt und das letzte Kapitel des theoretischen Teils widmet sich vor allem den potenziellen Applikationsmöglichkeiten der magnetische Nanopartikeln, die mit Derivaten des  $\beta$ -Cyclodextrines funktionalisiert sind.

Die Vorbereitung der Verbindungen wurde aus dem Grund der besseren Interpretation der Ergebnisse jedes Mal mindestens zweimal wiederholt. Die Struktur der Produkte wurde bei der Kernspinresonanz (NMR) bestimmt.

Schlüsselwörter: Cyclodextrine, magnetische Nanopartikeln, Aminosäuren

# Obsah

Seznam zkratk .....	12
1 Úvod .....	14
2 Teoretická část .....	15
2.1 Cyklodextriny .....	15
2.1.1 Vlastnosti cyklodextrinů .....	17
2.1.2 Supramolekulární a další útvary .....	18
2.1.3 Výroba cyklodextrinů .....	20
2.1.4 Využití cyklodextrinů .....	21
2.2 Vybrané deriváty cyklodextrinů .....	22
2.2.1 6 <sup>1</sup> -O-tosyl-β-CD .....	23
2.2.2 Deriváty β-CD nesoucí aminokyselinový zbytek .....	24
2.3 Magnetické nanočástice .....	25
2.3.1 Vlastnosti MNPs .....	25
2.3.2 Příprava MNPs .....	26
2.3.3 Využití MNPs .....	26
2.3.4 Nedávné úspěchy a výhled do budoucna ve výzkumu MNPs .....	27
2.4 Cyklodextriny navázané na magnetické nanočástice CD-MNPs .....	27
2.4.1 Vlastnosti CD-MNPs .....	27
2.4.2 Příprava CD-MNPs .....	28
2.4.3 Využití CD-MNPs .....	29
3 Experimentální část .....	32
3.1 Příprava tosylnanhydridu .....	32
3.2 Příprava 6 <sup>1</sup> -O-tosyl-β-CD .....	32
3.3 Příprava 6 <sup>1</sup> -(karboxymethyl)amino-6 <sup>1</sup> -deoxy-β-CD .....	33

3.4	Příprava 6 <sup>I</sup> -(karboxyethyl)amino-6 <sup>I</sup> -deoxy-β-CD.....	33
4	Výsledky a diskuse .....	35
4.1	Příprava TsO-CD .....	35
4.2	Aminokyselinové deriváty β-CD .....	36
5	Závěr.....	39
	Seznam literatury .....	40
	Seznam obrázků.....	42

## Seznam zkratek

AAS	atomová absorpční spektroskopie
Ac	acetyl
APTS	3-aminopropyltriethoxysilan
CD	cyklodextrin
CD-MNPs	cyklodextriny navázané na magnetické nanočástice
CGT-asa	cyklomaltodextrin glukanotransferasa
DLS	dynamický rozptyl světla (dynamic light scattering)
DMSO	dimethylsulfoxid
Et	ethyl
FDA	US Food and Drug Administration
GABA	kyselina $\gamma$ -aminomáselná ( $\gamma$ -Aminobutyric acid)
GSH	glutathion
HP	2-hydroxypropyl
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie (high performance liquid chromatography)
LD <sub>50</sub>	smrtná dávka pro 50 % jedinců (lethal dose)
Me	methyl
MNPs	magnetické nanočástice (magnetic nanoparticles)
MW	molekulová hmotnost (molecular weight)
MWCNT	vícevrstvé uhlíkové nanotrubičky (multi wall carbon nanotubes)
NMR	nukleární magnetická rezonance
PEG	polyethylenglykol
Pr	propyl
R <sub>f</sub>	retenční faktor
TEA	triethylamin
TEM	transmisní elektronová mikroskopie

TGA	termogravimetrická analýza (thermogravimetric analysis)
TLC	tenkovrstvá chromatografie (thin layer chromatography)
Ts	tosyl
TsO-CD	6 <sup>1</sup> -O-tosyl-β-cyklodextrin
RVO	rotační vakuová odparka
XRD	rentgenová krystalografie (X-ray diffraction)

# 1 Úvod

Přestože se studiem cyklodextrinů<sup>1-5</sup> zabývá už přes sto let mnoho odborníků po celém světě, stále je chemie cyklodextrinů a jejich nové aplikace velkou výzvou. S napětím je očekáváno především preklinické a klinické testování cíleného transportu léčiv a hypotermální léčby tumorů.<sup>1,2,6,7</sup> Produktů s cyklodextriny dnes najdeme díky vhodným vlastnostem, dostupnosti a netoxicitě poměrně hodně v potravinářském a kosmetickém průmyslu.<sup>8-10</sup>

V poslední dekádě lze pozorovat zvyšující se zájem o magnetické nanočástice<sup>11-14</sup> (MNPs), který je dokumentován rostoucím počtem publikací na toto téma. Ústředním motivem se stala chemická úprava (funkcionalizace) povrchu MNPs za účelem získání požadovaných vlastností pro konkrétní použití.<sup>15,16</sup> Studií zabývajících se magnetickými nanočásticemi funkcionizovanými cyklodextriny nebylo doposud provedeno mnoho (např. lit.<sup>7,16,17</sup>). Ty publikované jsou realizovány pouze v laboratorním měřítku a jejich zavedení do praxe bude předcházet dlouhá řada testů, jak opakovatelnosti dosažených výsledků ve větší kvantitě výchozích látek, tak škodlivosti pro životní prostředí.<sup>18-20</sup> Ta, jak je všeobecně známo, může být u nanomateriálů značná<sup>21</sup>, přesto neexistuje žádný ucelený koncept, jak tato rizika hodnotit.

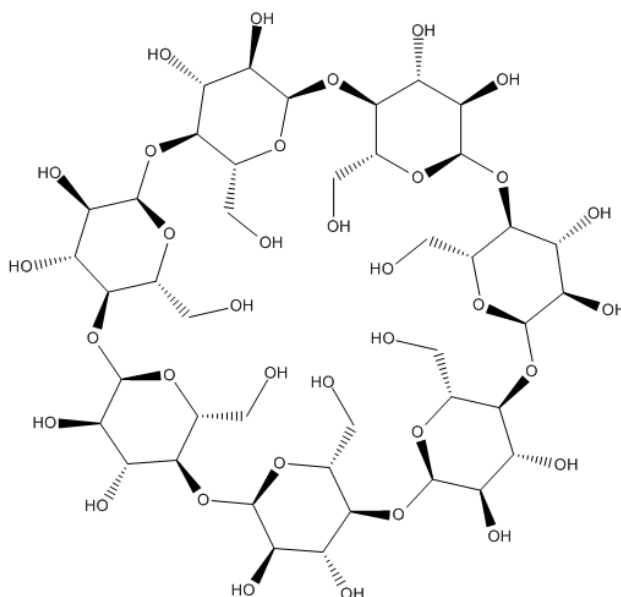
Tato práce je zaměřena na přípravu vhodných derivátů cyklodextrinů, jež mohou být v rámci dalších studií navázány na magnetické nanočástice a použity v biotechnologických aplikacích.<sup>12,16,20,22-26</sup> K důležitým cílům práce patří ověření realizovatelnosti postupů přípravy již známých derivátů cyklodextrinů derivátů a použití těchto postupů na syntézu další doposud nepublikované sloučeniny.

## 2 Teoretická část

### 2.1 Cyklodextriny

Pod tímto pojmem rozumíme cyklické oligosacharidy tvořené pěti a více jednotkami  $\alpha$ -D-glukopyranosy spojených vzájemně  $\alpha(1\rightarrow4)$  glykosidickými vazbami. Cyklodextriny (výjimečně též nazývány cykloamylózy) jsou značeny pomocí písmen řecké abecedy ( $\alpha$ -CD,  $\beta$ -CD, ...), přičemž majoritní pozici zaujímají CD se 6, 7, resp. 8 monomery glukosy (obr. 1).

Základy chemie cyklodextrinů položil již v roce 1891 francouzský badatel Villiers.<sup>27</sup> Ten studoval degradaci škrobu pomocí mikroorganismů (*Bacillus amylobacter*) a podařilo se mu izolovat krystalický produkt ve výtěžku přibližně 0,3 %. Ten nazval „cellulosine“, neboť mu některými svými vlastnostmi připomínal tehdy již přes padesát let známou celulózu. V produktu pozoroval dvě různé látky, které se mírně lišily strukturou. S největší pravděpodobností se jednalo o směs několika cyklodextrinů.



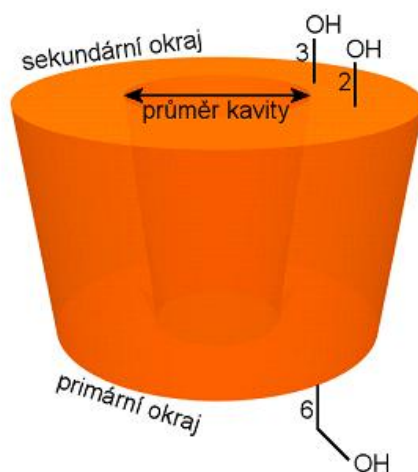
Obrázek 1: Struktura  $\beta$ -cyklodextrinu.

O další milník ve výzkumu se zasloužil Schardinger<sup>28</sup>, podle nějž byly cyklodextriny v odborné literatuře někdy nazývány Schardingerovy dextriny. Ve dvacátých letech

20. století připravil produkt odpovídající vlastnostmi a strukturou Villiersovu celulosinu. Pokračováním ve studiu objevil možnost snadného analytického rozlišení obou látek ve směsi pomocí reakce s roztokem jódu.

V následujícím půlstoletí se podařilo několika skupinám vědců určit fyzikální a chemické vlastnosti cyclodextrinů, objevit jejich komplexační schopnosti a připravit CD tvořené osmi a více monomery glukopyranosy. Vývoj v této době se však zpomalil vzhledem k publikaci článku o jejich toxicitě. Ledabyle provedená studie poukázala na naprostou nevhodnost pro použití ve výrobcích pro lidi a utlumila tak rostoucí zájem o cyclodextriny. Trvalo dlouhá desetiletí, než se podařilo tento omyl vyvrátit a opět nastartovat výzkum, převážně zaměřený na inkluzní komplexy a deriváty cyclodextrinů.

V literatuře je možné se dočíst také o méně běžných homolozích jako  $\delta$ -CD,  $\epsilon$ -CD i dalších.<sup>3,29,30</sup> Jakékoliv reakce s nimi však znesnadňuje rostoucí počet OH skupin ve skeletu. Navíc od  $\delta$ -CD již dochází k vzájemnému natočení glukózových jednotek tvořících cyklus a tím také k deformaci vnitřní kavity, čímž se obvykle znesnadní tvorba komplexů. Největší CD, jehož strukturu se podařilo stanovit, obsahuje 26 monomerů glukózy, prakticky již bylo zařazeno do cyklu až přes 100 takovýchto jednotek.<sup>4</sup>



Obrázek 2: Tvar cyclodextrinu. Převzato z lit.<sup>32</sup>.

Dnes se s cyclodextriny setkáme téměř v každém odvětví lidské činnosti, průmyslově se jich vyrábí tisíce tun ročně.<sup>1</sup> Přeměna škrobu na CD je téměř kvantitativní a i díky



tomu se cyklodextriny staly snadno dostupné. Tržní cena cyklodextrinů se odvíjí hlavně od jejich typu, oblasti využití a množství, přičemž nejlevnější lze pořídit již od desítek amerických centů za gram.<sup>31</sup> (Od roku 1984 se pravidelně konají mezinárodní konference o cyklodextrinech a od roku 2009 pořádá Evropská cyklodextrinová společnost (European Cyclodextrin Society) konferenci na toto téma každé dva roky. Ta poslední se konala zkráj podzimu loňského roku v turecké Antalyi, ústředním tématem bylo potenciální využití cyklodextrinů ve farmacii, biomedicině a kosmetice.<sup>32</sup>

### 2.1.1 Vlastnosti cyklodextrinů

Cyklodextriny jsou za normálních podmínek bílé práškovité struktury a jsou chemicky poměrně stálé proti degradaci. Jejich odolnost proti hydrolýze s klesajícím pH však klesá.<sup>33</sup> Díky vhodnému uspořádání glykosidických jednotek ve  ${}^4C_1$  židličkové konformaci, připomíná jejich tvar dutý komolý kužel (obr. 2). Na jeho menším, primárním okraji se nacházejí primární OH skupiny (uhlík C-6), zatímco větší, sekundární okraj nese sekundární OH skupiny (C-2, C-3). Vnitřní a vnější stěna komolého kužele je tvořena odlišnými funkčními skupinami, a tudíž i jejich vlastnosti se odlišují. Nejmarkantnější je rozdíl v afinitě k vodě. Zatímco dutina (často nazývaná též kavita) je hydrofobní (ohraničena glykosidickými kyslíkovými můstky a vazbami C-H), vnější stěna je díky přítomným OH skupinám hydrofilní.

Od svých analogických acyklických oligosacharidů se cyklodextriny výrazně liší v rozpustnosti ve vodě. Díky tvorbě vodíkových můstků jsou cyklické sloučeniny méně rozpustné, nejvýrazněji se tento fakt projevuje u  $\beta$ -CD, u kterého jsou všechny vodíkové můstky v jedné rovině, a vazby jsou tudíž nejpevnější. Obdobně jako ostatní CD se při zahřátí rozkládá a průměr jeho kavity v nanometrech je 0,60 pro primární a 0,64 pro sekundární okraj.<sup>33</sup> Obdobně jako jiné větší makromolekuly mají CD a jejich deriváty velkou MW, což znesnadňuje jejich charakterizaci spektrálními metodami.

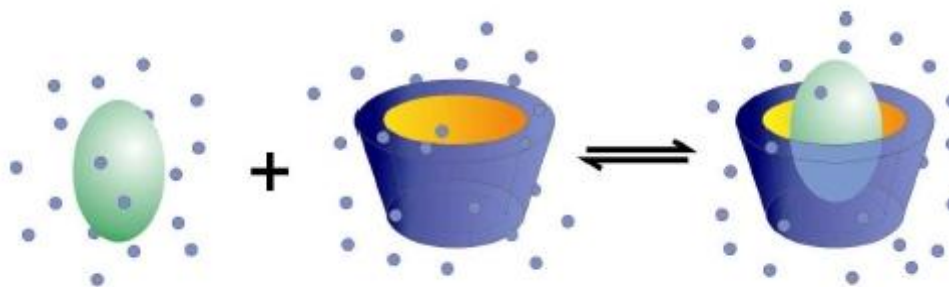
S rostoucím počtem povolení k aplikacím cyklodextrinů v lékařství a potravinářském průmyslu klesá nedůvěra v jejich nebezpečnost. Toxikologické studie FDA (US Food and Drug Administration) poukazují na škodlivý vliv  $\alpha$ - a  $\beta$ -CD a jejich alkylovaných derivátů na ledviny a jejich schopnost narušovat biologické membrány pouze při dávkování ve vysokých koncentracích.<sup>34</sup> Obecně platí, že nejsou-li cyklodextriny

podávány v nadměrných množstvích, je jejich používání bezproblémové a nekumulují se ani v životním prostředí, neboť jsou biodegradabilní. Perorální LD<sub>50</sub> u myši nabývá hodnoty 12,5 g na kilogram jejich tělesné váhy<sup>8</sup>. Rozsáhlé toxikologické studie o CD jsou dostupné v lit.<sup>34,35</sup>

### 2.1.2 Supramolekulární a další útvary

Jak je nastíněno výše, tvorba inkluzních komplexů (obr. 3) hraje v chemii cyklodextrinů výsostnou roli.<sup>1–3,22,23,25,36</sup> Jedná se o vztah hostitel – host (z angl. host – guest), kde CD poskytuje ve své kavitě prostředí pro jiné, především lipofilní, látky. Hostem může být látka plynná, kapalná i pevná, přičemž komplex je v naprosté většině případů v poměru hostitel: host 1:1. Tvorbou komplexu může dojít k významné změně vlastností molekuly hosta. Především se zvýší její odolnost před degradací a rozpustnost ve vodě (s výjimkou nativních CD inkludujících nepolární látky, které nejsou ve vodě příliš rozpustné). Dochází též ke změně spektrálních vlastností a poklesu reaktivity hosta. Jsou zaznamenány i případy vzniku intramolekulárního komplexu (CD a jeho host tvoří dohromady jednu molekulu).<sup>4</sup>

Tvorba komplexu je reversibilní a má dynamický charakter, to znamená, že dochází k neustálému vzniku a zániku nekovalentních vazeb mezi oběma komponenty. Důležitý



Obrázek 3: Tvorba inkluzního komplexu CD a hostující molekuly ve vodném prostředí.  
Převzato z lit.<sup>50</sup>, upraveno.

vliv na sílu vzniklého komplexu má velikost dané molekuly a objem kavity CD, které si musí vzájemně odpovídat. V opačném případě se molekula v dutině nezachytí nebo se do ní nevejde. Nejstabilnější známý komplex tvoří per(6<sup>1</sup>-deoxy-6<sup>1</sup>-(karboxyethyl)sulfonyl)- $\gamma$ -CD s rocuroniumbromidem ( $K \approx 10^7$  dm<sup>3</sup>/mol, kde  $K$  je konstanta

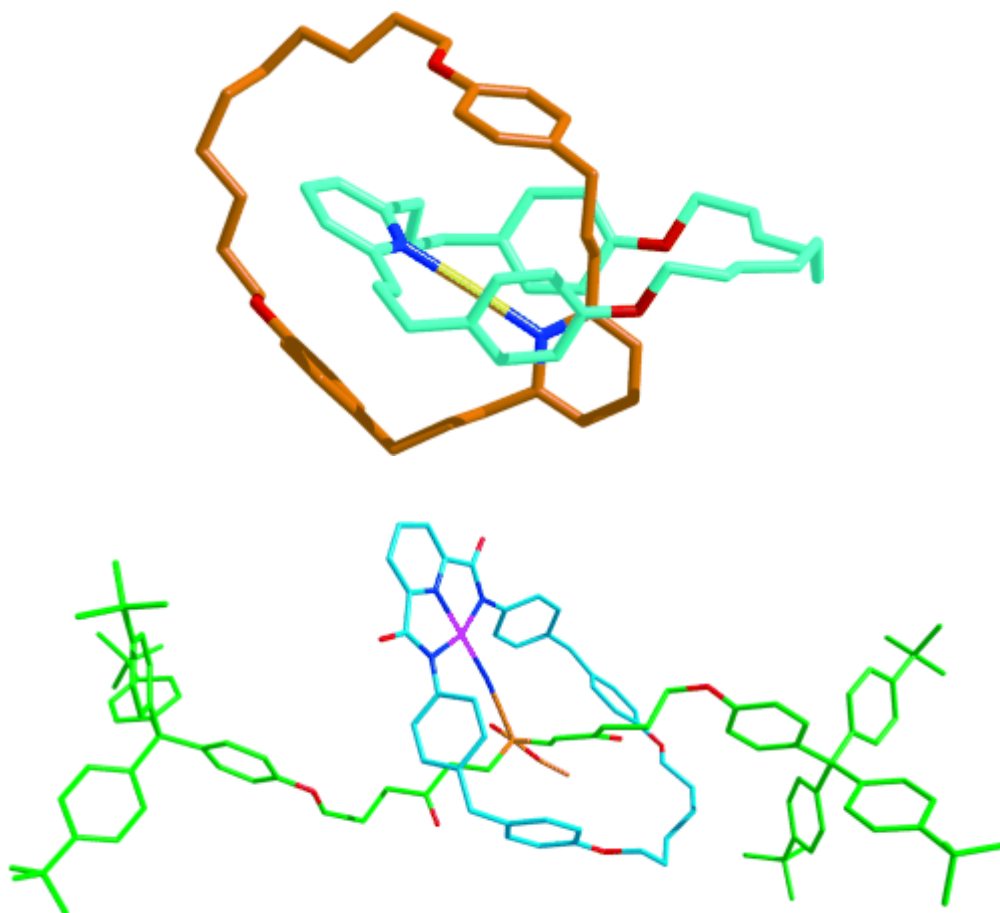
stability).<sup>4</sup>  $\beta$ -CD tvoří velmi stabilní komplexy s adamantanem a jeho deriváty ( $K$  může být až  $10^5$  dm<sup>3</sup>/mol).

Termodynamická měření potvrdila, že hnacími silami pro tvorbu nekovalentní vazby mezi hostem a hostitelem jsou elektrostatické interakce, přesun náboje, snížení napětí struktur a tvorba vodíkových a van der Walsových vazeb. Názor na vliv vypuzení polárních molekul vody z lipofilní dutiny do okolního vodného prostředí na tvorbu komplexu není ani v dnešní době jednoznačný.<sup>1</sup>

Poslední dobou jsou velmi atraktivní oblastí ve farmaceutickém výzkumu terciární komplexy s cyklodextriny. Jedná se o makromolekulární strukturu tvořenou cyklodextrinem, vybraným léčivem a další látkou. Tou může být například kovový či organický iont, polymer (chitosan, PEG aj.), popřípadě další lék nebo CD. Obvykle to bývá taková látka, která zvýší efektivitu vstřebání léčiva v těle, a sníží tak spotřebu medikamentu se stejným výsledným účinkem.

Mezi další útvary, jejichž součástí mohou být cyklodextriny patří katenany a rotaxany (obr. 4).<sup>4,37,38</sup> Jedná se o větší molekulární útvary tvořené dvěma a více makrocycly. V poslední době se především v zahraniční literatuře vžil pro jejich spojení pojem mechanická vazba. Nespádají tedy již do supramolekulární chemie, neboť molekuly jsou navzájem spojeny a nemohou být odděleny bez porušení některé z kovalentních vazeb.

Rotaxany jsou obvykle tvořeny lineární molekulou, která v tomto případě, prochází dutinou cyklodextrinu a na obou koncích je opatřena dalšími prostorově objemnými molekulami. Ty často tvoří pro CD nepřekonatelnou energetickou bariéru, a proto jsou rotaxany stabilní. CD katenany jsou tvořeny dvěma vzájemně propojenými cyklodextriny. Jejich výskyt však není běžný, neboť jejich vznik podmiňuje uzavření cyklického dextrinu až poté, co je na něj navlečen jiný CD. Obě výše zmíněné struktury mohou vzácně tvořit též polymery.



Obrázek 4: Příklad molekuly katenanu (nahore) a rotaxanu. Převzato z lit.<sup>36, 37</sup>

### 2.1.3 Výroba cyklodextrinů

CD se vyrábí výhradně degradací škrobu mikroorganismy z domény bakterií (*Bacillus macerans*, *Bacillus amylobacter*, aj.)<sup>1,3</sup> Za vznik cyklického produktu s  $\alpha(1\rightarrow4)$  glykosidickou vazbou je zodpovědný amylytický enzym cyklomaltodextrin glukanotransferasa, který štěpí  $\alpha(1\rightarrow4)$  glykosidické vazby v  $\alpha$ -glukanech (zde škrobu) za vzniku stabilních kovalentních glykosidových intermediátů. Jednotlivé intermediáty se spojují se svými vlastními konci na OH skupině a vytváří cyklický produkt. Výsledkem enzymatické degradace je směs několika různých cyklodextrinů, v níž z termodynamických důvodů převládá  $\beta$ -CD. Konkrétní poměr vzniklých cykloamyloz závisí na době reakce a teplotě. Z výsledné směsi lze požadovaný CD izolovat například

pomocí HPLC, selektivnost lze také zajistit přidáním komplexačního činidla (pro  $\beta$ -CD se osvědčil toluen),<sup>10</sup> které způsobí vznik nerozpustného komplexu s daným CD.

Díky výše uvedenému je v největším množství produkován, při současně nejnižších nákladech,  $\beta$ -CD, následovaný  $\alpha$ - a  $\gamma$ -CD<sup>1,8</sup>. Postupy pro přípravu cyklodextrinů se neustále vylepšují, kromě úpravy CGT-as pro lepší selektivnost při výrobě konkrétního CD, je možné při výrobě využít látek obsažených například v bramborách či rajčatech.

Pro využití  $\beta$ -CD v potravinářství je třeba jeho vysoká čistota ( $\geq 98\%$ ).<sup>10</sup> Za výhodný postup výroby takového je považována enzymatická degradace geneticky modifikované *Escherichie coli* K12 za přítomnosti toluenu jako komplexačního činidla. Ten se z produktu odstraňuje dekantací a destilací a jeho zbytkové množství pak nepřesahuje 1 ppm (hodnota akceptovaná i pro pitnou vodu). Neboť existuje jen několik mikroorganismů, které by se živily CD, není k jejich uchování v pevném stavu obvykle třeba konzervačních látek.

#### 2.1.4 Využití cyklodextrinů

Dominantní vlastností cyklodextrinů, díky které vzbuzují velký zájem na poli výzkumu, je schopnost tvorby inkluzních komplexů (viz 2.1.2). Lipofilní látky s nízkou rozpustností ve vodě se mohou usídlit uvnitř kavity a vnější hydrofilní schránka cyklodextrinu umožní snadné rozpuštění celého komplexu ve vodě. Této schopnosti se využívá v celé řadě biotechnologických aplikací (tab. 1), doslova zázraky se dají očekávat ve farmacii od cíleného transportu léků<sup>2</sup>. Zvýšit účinnost a usnadnit proveditelnost je navíc možné navázáním cyklodextrinů na magnetické nanočástice (viz 2.4).

Jako vhodné aplikační pole se nabízí také potravinářský a kosmetický průmysl<sup>8,9,14</sup>. Například francouzská společnost Roquette ([www.roquette-food.com](http://www.roquette-food.com)), která působí také v České republice, nabízí výrobek Kleptose<sup>®</sup> alias  $\beta$ -CD vhodný pro zvýšení stability, rozpustnosti látek a k zamaskování nepříjemných, respektive přenosu žádaných chutí a vůní. Mezi potravinami však není použití CD tolik rozšířené, neboť uvedené funkce jsou schopny nahradit cenově dostupnější látky.

**Tabulka 1 Příklady produktů s CD na trhu<sup>39</sup>.**

<b>Farmaceutikum</b>	<b>Obchodní název</b>	<b>Trh</b>
Alprostadir ( $\alpha$ -CD)	Prostavastin	EU, USA, Japonsko
Cefotiam Hexetil ( $\alpha$ -CD)	Pansporin T	Japonsko
Dexamethasone ( $\beta$ -CD)	Glymesason	Japonsko
Iodine ( $\beta$ -CD)	Mena-Gargle	Japonsko
Nicotine ( $\beta$ -CD)	Nicorette	Evropa
Omeprazol ( $\beta$ -CD)	Omebeta	Evropa
Tiaprofenic acid ( $\beta$ -CD)	Surgamyl	Evropa
Hydrocortisone (HP- $\beta$ -CD)	Dexocort	Evropa
Mitomycin (HP- $\beta$ -CD)	Mitozytrex	USA
Diclofenac sodium (HP- $\gamma$ -CD)	Voltaren	Evropa

Z výše jmenovaných důvodů jsou CD používány i v kosmetice. S výhodou se využívá schopnosti zvýšit rozpustnost olejů a dalších látek (např. mentolu) ve vodě, zabránit hygroscopicitě a stabilizovat emulze. K neaktivnějším v používání CD na tyto účely patří společnost Lipo Chemicals Inc. (NJ, USA).

Další uplatnění nacházejí CD v analytické chemii, kde je lze využít jako chirálního selektoru přidávaného k nosnému elektrolytu pro enantioselektivní kapilární elektroforézu a dále HPLC, pro plynovou chromatografii a jiné. CD mohou katalyzovat nebo inhibovat chemické reakce tím, že chrání funkční skupiny jejich uchycením v dutině, zajišťují mezifázový přenos reaktantů (funkce tzv. katalyzátoru fázového přenosu) anebo účastí některé z jejich OH skupin při reakci.

## **2.2 Vybrané deriváty cyklodextrinů**

Od počátku minulého století až do dnešní doby bylo připraveno velké množství různých derivátů cyklodextrinů<sup>1,2</sup>, které se více či méně osvědčily v odlišných odvětvích napříč všemi směry lidské činnosti. Hlavním záměrem příprav derivátů je zlepšení jejich rozpustnosti ve vodném prostředí a úprava dalších vlastností přirozených CD odpovídající konkrétnímu použití. Deriváty mohou být mono-, persubstituované nebo

několikanásobně cíleně či náhodně substituované\*. Příprava definovaných čistých derivátů CD je v mnoha případech nesnadná. Důvodem je velký a s přibývajícými glukózovými monomery v cyklu rostoucí počet reaktivních OH skupin. Nejběžněji se CD funkcionalizuje elektrofilní substitucí na kyslíku hydroxylové skupiny alkylačními či acylačními činidly za vzniku příslušných etherů, popř. esterů. Možný je však také nukleofilní atak C-OH vazby. Naopak elektrofilní štěpení glykosidické vazby by způsobilo rozevření kruhu CD.

V této studii jsou zkoumány modifikované cyklodextriny z důvodu jejich potenciálního použití v biotechnologiích. Připravené struktury jsou vhodné pro navázání na magnetické nanočástice (MNPs). Praktická část díla je zaměřena na deriváty CD monosubstituovaných na uhlíku C-6. Jejich syntéza je oproti zbylým možnostem monosubstituce (na uhlíku C-2 nebo C-3), pro jejichž přípravu je často nutné ostatní skupiny chránit, poměrně snadná. Mimo jiné proto, že primární OH skupiny jsou ze jmenovaných uhlíků nejzásaditější a jsou méně stericky bráněny oproti sekundárním.

### 2.2.1 6<sup>1</sup>-O-tosyl-β-CD

6<sup>1</sup>-O-tosyl-β-CD, často též zjednodušeně TsO-CD, je jeden z nejrozšířenějších derivátů β-CD, neboť slouží jako prekurzor pro syntézu dalších látek nukleofilní substitucí tosyly. Jeho rozpustnost ve vodě je dokonce nižší než u nativních CD, při 25 °C je tato pouhých 0,04 g/100 ml H<sub>2</sub>O.<sup>40</sup>

Pro přípravu zmíněného derivátu existuje více postupů. Mezi ty nejběžnější se řadí substituční reakce β-CD s TsCl, Ts<sub>2</sub>O nebo tosylimidazolem v bazickém prostředí (obvykle vodný roztok hydroxidu sodného nebo pyridin).<sup>41,42</sup> Výtěžek takovéto reakce bývá do 30 %. Kromě žádaného produktu totiž vznikají di- a tri- substituované CD

---

\* Mezi náhodně substituované CD se řadí ty, které jsou substituované na různých pozicích s různým stupněm substituce. Konkrétní strukturu a podíl jednotlivých substituentů tvořící směs náhodně substituovaných CD nelze předem stanovit. K specificky substituovaným CD patří jednak persubstituované CD se stejným substituentem ve všech pozicích, jednak CD persubstituované na pozici 2, 3 nebo 6 se stejným substituentem v jedné z uvedených pozic a dále vícesubstituované s daným substituentem v konkrétní pozici. Poslední skupinu cíleně substituovaných CD tvoří CD monosubstituované, tj. s pouze jedním substituentem v celé molekule CD.<sup>39</sup>

a ve směsi zůstává také nezreagovaný CD a kyselina *p*-toluensulfonová, popř. její chlorid, resp. anhydrid, resp. imidazol. Poměrně nedávno byl zveřejněn alternativní postup přípravy s ještě vyšším výtěžkem a navíc bez použití toxických organických rozpouštědel<sup>40</sup>. Článek zveřejněný v tomto roce navíc poukazuje na možnost získání čistého TsO-CD (ve výtěžku 26 %) opakovanou rekrystalizací ve směsi rozpouštědel MeOH : H<sub>2</sub>O v poměru 1 : 1. Tím se lze vyhnout zdlouhavému čištění chromatografií.

Tvorba vícesubstituovaných derivátů je minimalizována, tvoří-li činidlo pevný inkluzní komplex s CD. Typickým příkladem je reakce β-CD s Ts<sub>2</sub>O v roztoku NaOH. Výtěžek reakce po přečištění přesto zpravidla nepřesahuje 30 %. 61% výtěžek uvedený v lit.<sup>43</sup> se zdá být nereálný.<sup>42</sup>

### 2.2.2 Deriváty β-CD nesoucí aminokyselinový zbytek

Jak je uvedeno v úvodu této kapitoly, záměrem laboratorní syntézy bylo modifikovat β-CD pro jeho snadné ukotvení na MNPs. Jedna z možností přípravy vhodných derivátů je za pomoci aminokyselin<sup>41</sup>. Aminoskupinu na jedné straně řetězce lze poměrně snadno navázat na CD. Druhý konec uhlíkové kostry aminokyseliny je obsazen karboxylovou skupinou, která je žádoucí pro uchycení derivátu na povrch magnetických nanočástic.

Nukleofilní substituce tosylové funkční skupiny za zbytek od aminoethanové kyseliny (glycinu) je jedinou doposud popsanou reakcí TsO-CD s aminokyselinami.<sup>41</sup> Použitím dalších aminokyselin, kde je karboxylová a aminová funkční skupina od sebe vzdálena vždy o jeden atom uhlíku více lze připravit další deriváty, a tak sledovat vliv délky řetězce mezi CD a MNP na vlastnosti výsledné nanočástice. Vzhledem k očekávanému obdobnému chování 3-aminopropanové kyseliny (β-alaninu) jako v případě zbytku od glycinu, lze pro syntézu s β-alaninem použít též postup jako ve výše uvedené substituční reakci.

Ani jedna ze zmíněných aminokyselin nemá stereogenní centrum, a proto existuje jediná možnost jejich navázání na šestý uhlík glukózy příslušného cyklodextrinu.



## 2.3 Magnetické nanočástice

Magnetické nanočástice patří již po několik desetiletí k oblíbeným a slibným předmětům studia mnoha vědců po celém světě.<sup>14</sup> Přesto dosavadní vývoj nepřinesl jejich výraznější zavedení do praxe. Jedná se o částice, které mají všechny své rozměry v nanometrech (dle definice EU 1-100 nm, tzv. 0D nanoútvary) a vykazují odezvu na vnější magnetické pole. Za počátek slavné éry MNPs se dá považovat konec první poloviny 20. století, kdy proběhly úvodní pokusy o odstranění polutantů ze znečištěné vody pomocí magnetického pole.

Následující text je stručným přehledem o MNPs. Podrobnější informace jsou k nalezení v mnoha publikacích, například v lit.<sup>14,44</sup>.

### 2.3.1 Vlastnosti MNPs

Rozhodujícími dvěma vlastnostmi pro chování MNPs jsou jejich velikost a povrch, který se různě modifikuje z důvodu stabilizace nebo snadnější vazby s biomolekulami. Stabilizací nedochází tak rychle k aglomeraci částic, jež je následkem ztráty nanorozměrů a tím i některých kvantově-mechanických vlastností, nežádoucí. Pro aplikace uvedené v dalším textu se nejlépe hodí částice o průměru v desítkách nanometrů. Na magnetické vlastnosti má dominantní vliv materiál, ze kterého jsou MNPs stvořeny, nejčastěji se jedná o prvky Fe, Ni, Co a jejich oxidy (magnetit, různé ferity aj.) Za vyšší teploty, než je pro daný materiál tzv. blokovácí teplota (z angl. blocking temperature), má každá magnetická nanočástice vlastní magnetický moment a zpravidla superparamagnetické vlastnosti, čímž je zpomalen proces jejich shlukování po odstínění vnějšího magnetického pole. Přesto v dlouhodobém horizontu dochází k oxidaci částic a tím ke ztrátě jejich magnetických vlastností a aglomeraci.

Jako u jiných typů nanomateriálů je potřeba i u MNPs vnímat jejich zdravotní rizika.<sup>45</sup> Na škodlivost částic pro živou přírodu má významný vliv velikost, tvar, složení částic a jejich povrch. Ten se pro snížení toxicity, reaktivity a zlepšení biokompatibility často pokrývá organickými (tenzidy, polymery) i anorganickými (Si, Au) materiály. Jak je zmíněno výše, dochází tím zároveň k ochraně částic před oxidací a aglomerací.

Pro ověření uvedených vlastností a charakterizaci MNPs se používá mnoho spektrálních metod. K těm nejdůležitějším patří vizualizace pomocí TEM (transmisního elektronového mikroskopu), měření distribuce velikosti částic metodou DLS (dynamického rozptylu světla), určení chemického složení pomocí AAS (atomové absorpční spektroskopie), určení struktury pomocí XRD (rentgenové krystalografie) či stanovení stupně modifikace organickými činidly pomocí termogravimetrické analýzy (TGA).

### 2.3.2 Příprava MNPs

Takřka všechny syntetické metody pro přípravu MNPs spadají do kategorie bottom-up, tj. dochází k agregaci atomů nebo molekul za vzniku příslušných nanočástic (často jde o molekulární „self-assembly“). K nejběžnějším postupům patří vysrážení částic z roztoku, koprecipitace, rozklad organických látek za vysokých teplot a další.

Již v polovině 70. let 20. století objevil R. P. Blakemore\* magnetotaktické bakterie<sup>47</sup>, které jsou schopny zpracovat magnetosomy za produkce MNPs, nejčastěji ve formě magnetitu ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) nebo gregitu ( $\text{Fe}_3\text{S}_4$ ). Postupem času se podobná schopnost odhalila i u dalších mikroorganismů. Produkované MNPs jsou velmi pravidelné krystalické struktury, jejíž napodobení je při syntéze takřka nadlidský úkol.

### 2.3.3 Využití MNPs

Je známo mnoho oblastí potenciálního využití MNPs<sup>11–14</sup>. Dnes se již běžně aplikují při magnetické rezonanci jako kontrastní činidla. Zavedení do praxe v ostatních oborech však vyžaduje další výzkum. Slibné, povětšinou preklinické testy byly provedeny v oblasti separace biomolekul, hypotermální léčby nádorů a cíleného dávkování léčiv. Obzvláště perspektivní jsou poslední dvě jmenovaná využití. Umístěním vhodných MNPs do nádoru a následnou aplikací vnějšího vysokofrekvenčního magnetického pole (dle vyhlášky FDA o magnetické indukci až 8 T) dojde k jejich zahřátí na teplotu, která je pro nádor smrtící. Cílené dávkování léčiv může být zajištěno přichycením

---

\* První zmínku o magnetotaktických bakteriích lze nalézt již v článku Belliniho z roku 1963.<sup>46</sup> Vzhledem k jeho uveřejnění v italštině se však delší dobu nerozšířil po vědeckém světě. Pravděpodobně také proto se častěji za objevitele považuje Blakemore.

medikamentu na MNPs následované jejich umístěním na požadované místo a po ukončení terapie opětovným odstraněním z těla pacienta pomocí vnějšího magnetického pole. Hlavní výhody tohoto způsobu podání léků tkví ve snížení množství a četnosti jejich podávání a výrazném snížení vedlejších efektů. S rostoucí vzdáleností postiženého místa od povrchu těla však rapidně klesá možnost vpravit látku na žádané místo.

Počet realizovaných projektů je nezanedbatelný také v oblasti sanace životního prostředí, především v čištění kontaminovaných vod.<sup>48,49</sup> S uplatněním MNPs se dále počítá v úložných médiích a při katalýze.<sup>20,26</sup> Pro poslední zmíněné je zajímavý zejména nový typ katalýzy zajištěný MNPs se strukturou jádro-plášť. Plášť je tvořen katalyticky aktivní látkou a magnetické jádro umožní separaci vnějším magnetickým polem a opětovné použití katalyzátoru. Lze předpokládat, že v průběhu dalšího výzkumu se podaří uplatnění MNPs ještě rozšířit.

### **2.3.4 Nedávné úspěchy a výhled do budoucna ve výzkumu MNPs**

Pro zavedení MNPs do všedního života stojí před vědci stále mnoho výzev. Týkají se stability, biokompatibility a zachycení biomolekul, popř. léků na povrchu MNPs. Nadějně výsledky přinesly první testy v boji proti cystické fibróze a při lokalizaci nádorů.<sup>12</sup> Jak je zmíněno výše, cílené dávkování léků dále od povrchu těla je obtížné, neboť v těchto místech dominují hydrodynamické síly v těle nad vnějšími magnetickými. Při jednom z prvních pokusů, jak překonat tuto nesnáz, byl využit ferromagnetický implantát ve spojení s částicemi a vnějším magnetickým polem (v anglické literatuře známo pod názvem „implant assisted magnetic drug targeting”).<sup>14</sup> Příprava kvalitních nanočástic pro použití v bioaplikacích je však finančně velmi náročná.

## **2.4 Cyklodextriny navázané na magnetické nanočástice CD-MNPs**

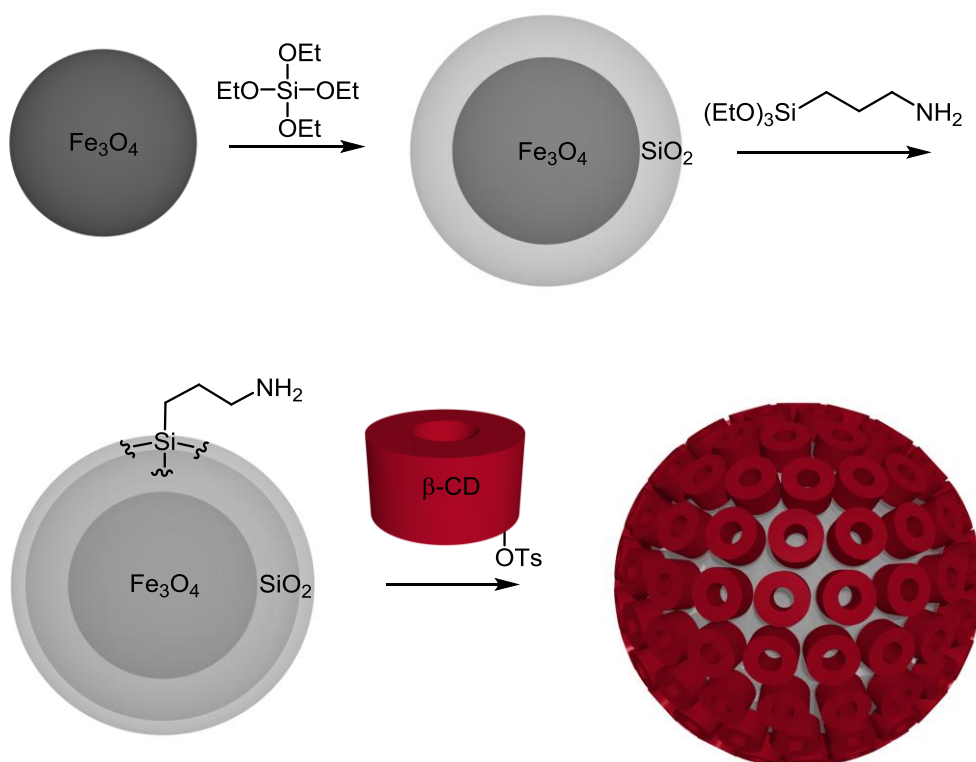
### **2.4.1 Vlastnosti CD-MNPs**

Sloučením obou látek charakterizovaných v kapitolách 2.2, respektive 2.3 lze získat ještě účinnější nástroj pro mnoho již zmíněných použití. Jako výhodná se jeví zejména schopnost CD dispergovat ve vodném prostředí a hostit lipofilní látky ve své kavitě.

Přítomnost MNPs potom umožňuje snadnou separaci z aplikačního prostředí, a tak opětovné použití CD-MNPs. Vzájemným navázáním se obě látky stabilizují.

## 2.4.2 Příprava CD-MNPs

Nejčastější metody přípravy CD-MNPs lze nalézt v literatuře<sup>14</sup>. V obecném případě se nejdříve vhodně modifikují povrchy magnetických nanočástic a cyklodextrinů tak, aby následnou reakcí, obvykle nukleofilní substitucí, došlo k navázání CD na MNPs (obr. 5). S touto prací a výhledovým pokračováním syntézy s připravenými cyklodextriny nejlépe koresponduje postup uvedený v lit.<sup>15</sup>, kde je TsO-CD navázán na 3-aminopropyltriethoxysilanem (APTS) modifikované nanočástice. Elementární analýzou bylo v uvedené studii zjištěno 0,042 mmol (48 mg)  $\beta$ -CD navázaného na 1 gram APTS-MNPs. K nejčastěji připravované a analyzované dvojici CD-MNP patří  $\beta$ -CD a magnetit.



Obrázek 5: Schéma potenciální reakce připraveného TsO-CD s MNPs.

### 2.4.3 Využití CD-MNPs

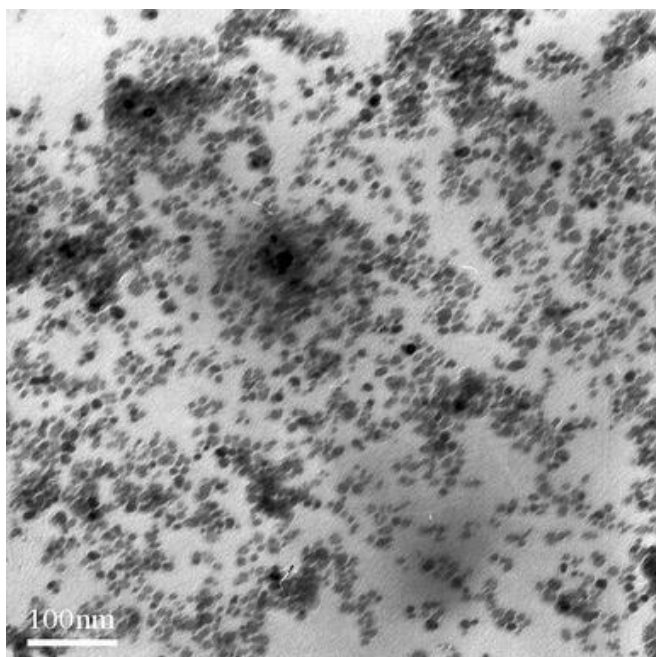
Jak je v textu již uvedeno, cyklodextrin má schopnost pohlcovat svou kavitou lipofilní látky. Množství z nich patří ke znečišťovatelům životního prostředí a pomocí cyklodextrinů lze z něj tyto cizorodé látky efektivně odstranit<sup>26</sup>. Bylo uveřejněno několik článků studujících potenciál CD při čištění vod od barviv, popř. těžkých kovů.<sup>24</sup> *In vitro* pokusy na odstranění azobarviv z vodného prostředí dosahují téměř 100% účinnosti<sup>22</sup>. Pro odstranění těžkých kovů se využívá jejich snadného navázání na OH skupinách vnějšího okraje CD. Navíc se povrch CD často funkcionalizuje, čímž efektivita dále roste. Obzvláště výhodná je přítomnost karboxylové skupiny, např. v karboxymethyl- $\beta$ -CD<sup>24</sup>. Díky magnetickým jádrům nanočástic se následně látky jednoduše odstraní z vody a po promytí komplexů vhodnými rozpouštědly lze CD-MNPs opětovně použít. Pokusy v kontaminované vodě prokázaly absorpci 47,2 mg  $\text{Cu}^{2+}$  iontů v jednom gramu takovýchto částic při 25 °C. Pro zlepšení sorpčních vlastností je dále možné konjugovat magnetické nanočástice se zeolity, MWCNT (multi wall carbon nanotubes, vícevrstvé uhlíkové nanotrubičky) a dalšími nanomateriály. Jako velmi slibné pro boj s organickými látkami znečištěnou vodou se zdá využití MNPs se strukturou jádro-plášť modifikovaných cyklodextrinů. Je-li takováto částice tvořena magnetitovým jádrem a slupkou z  $\text{TiO}_2$ , dojde ve vodném prostředí ke snadné dispergaci díky CD a při ozáření roztoku UV světlem je oxid titaničitý schopen organické sloučeniny degradovat (fotokatalýza).

Život široké veřejnosti by mohl pozitivně ovlivnit nanonosič pro cílený transport léků. Laboratorní studie popsaná a analyzovaná v lit.<sup>25</sup> pracuje s MNPs pokrytými arabskou gumou. Arabská guma je jako přírodní pryskyřice lidským tělem dobře přijímána a umožňuje selektivní dávkování do některých orgánů. K takovému povrchu připojený CD potom umožní přenos hydrofobních léků a jejich postupné uvolňování až po dobu přesahující 12 hodin.

CD-APTS-MNPs zmíněné v kapitole 2.4.2 se v pilotních studiích ukázaly jako vhodné pro asistované skládání proteinů. Touto metodou by bylo možné napravit nedokonale vytvořené proteiny v těle a léčit tak neurologické nemoci jako Alzheimerovu chorobu a další. CD je díky své kavitě schopen „rozpoznávat“ molekuly (z angl. molecular

recognition) na základě strukturní shody dutiny a příslušné látky, popř. vlivem elektrostatických, van der Walsových a dalších sil<sup>16</sup>. Například  $\beta$ -CD-PEG-MNPs (obr. 6) byly použity na detekci dopaminu, jehož množství v lidském těle slouží mj. jako indikátor některých neurologických problémů. Dále je v lékařství možné na obdobném principu, jaký je uveden v úvodním odstavci této kapitoly, provádět hemoperfúzi a detoxikaci jiných tělních tekutin.<sup>50</sup>

V některých případech může CD modifikovaný pomocí MNPs sloužit jako katalyzátor. Tuto jeho funkci potvrdily například studie o chemiluminiscenci při oxidaci luminolu za přítomnosti  $\beta$ -CD a magnetických nanočástic  $\text{MnFe}_2\text{O}_4$ , resp.  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$ <sup>19,23</sup>. Bylo prokázáno, že zásluhou  $\beta$ -CD/ $\text{MnFe}_2\text{O}_4$  MNPs došlo v kyselém prostředí ke zkrácení doby potřebné pro detekci GSH (přibližně desetkrát) a zvýšení intenzity chemiluminiscence luminolu (9 $\times$ ). CD zde slouží mj. jako stabilizátor vznikajících



**Obrázek 6: TEM snímek  $\beta$  CD PEG MNPs dispergovaných ve vodě. Převzato z lit.<sup>16</sup>**

intermediátů před jejich oxidací. Výsledky studie přislíbily budoucí aplikaci tohoto katalyzátoru v medicíně pro snadné a přesné měření množství GSH (jeho zvýšená hladina může být indikátorem některých chorob) v krvi metodami HPLC či kapilární elektroforézou.

Katalyzátor tvořený CD-MNPs lze použít také při selektivní oxidaci alkoholů<sup>18</sup>. Tato schopnost byla odhalena před mnoha lety u samotných CD, ale až kombinací s MNPs byla umožněna snadná recyklace katalyzátoru. Často se v tomto směru mluví o pseudohomogenní reakci, kde CD slouží jako tzv. mezifázový katalyzátor. Například benzylalkohol je v jeho přítomnosti možné oxidovat pomocí NaOCl ve vodném prostředí, a vyhnout se tak toxickým organickým rozpouštědlům. Jako v jiných případech tvorby komplexů, lze tuto metodu použít jen pro alkoholy stericky odpovídajících kavitě CD. Některé inkluzní komplexy CD-MNPs mohou být využity k přípravě ferrotekutin<sup>36</sup>, což jsou koloidní disperze, v tomto případě CD-MNPs, ve vhodném rozpouštědle.

### 3 Experimentální část

Výchozí látky a rozpouštědla byly zakoupeny od běžných dodavatelů. Při filtracích byla použita fritra 3, s velikostí pórů 20-30  $\mu\text{m}$  a membránová vývěva. Pro kontrolu proběhnutí reakce, popř. čistoty produktů byla po každé syntéze provedena TLC na hliníkových destičkách se silikagelem 60 F<sub>254</sub> (Merck, Německo). V některých případech byla provedena též reversní TLC, pro ni byly použity hliníkové destičky se silikagelem 60 RP-18 F<sub>254</sub>S (Merck, Německo). Není-li uvedeno jinak, pak byla jako mobilní fáze pro TLC použita směs *n*-PrOH:H<sub>2</sub>O:EtOAc:NH<sub>4</sub>OH v poměru 6:3:1:1.<sup>43</sup> TLC destičky byly následně vyvíjeny ponořením do 50% vodného roztoku H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a karbonizací horkovzdušnou pistolí. Sloupcová chromatografie byla prováděna za použití směsi rozpouštědel CHCl<sub>3</sub>:MeOH:H<sub>2</sub>O v poměru 10:11:3.

<sup>1</sup>H NMR spektra byla měřena na přístroji Varian Gemini 300 HC při pracovní frekvenci 300 MHz. Vzorčky jednotlivých produktů byly pro měření rozpuštěny v deuterovaných rozpouštědlech.

#### 3.1 Příprava tosylanhydridu

Syntéza Ts<sub>2</sub>O byla provedena podle upraveného postupu uvedeného v literatuře.<sup>43</sup> Tosyl chlorid (40 g, 0,21 mol) byl rozpuštěn v dichlormethanu (260 ml) a následně byl roztok po přidání kyseliny *p*-toluensulfonové (10 g, 0,05 mol) míchán přes noc při laboratorní teplotě. Po odfiltrování nerozpuštěných zbytků byl k filtrátu přidán hexan (210 ml) pro vysrážení tosyl anhydridu a ten následně odfiltrován. Byl získán bílý produkt (29 g, výtěžek 73 %). Průběh reakce byl sledován pomocí TLC s UV detekcí,  $\lambda = 254 \text{ nm}$ . <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  7.96 - 7.90 (m, 4 H), 7.45 - 7.37 (m, 4 H), 2.49 (s, 6 H) ppm.

#### 3.2 Příprava 6<sup>l</sup>-O-tosyl- $\beta$ -CD

Syntéza TsO-CD byla provedena podle upraveného postupu uvedeného ve Zhong et al.<sup>43</sup>  $\beta$ -CD (10 g, 9 mmol) byl rozpuštěn ve vodě (220 ml) a následně byl k roztoku přidán Ts<sub>2</sub>O (4,3 g, 13 mmol). Po dvou hodinách míchání při pokojové teplotě byl



ke směsi nalit 10% vodný roztok NaOH (50 ml) a po dalších 10 minutách byl nezreagovaný Ts<sub>2</sub>O odfiltrován. Přidáním NH<sub>4</sub>Cl (58 g, 1,1 mol) bylo pH filtrátu upraveno na ~8 a roztok byl nechán krystalovat přes noc v lednici. Po odfiltrování a promytí studenou vodou (10 ml) byl produkt třikrát rekrystalizován v 50% vodném roztoku MeOH (vždy v 10-ti násobku hmotnosti suchého produktu).<sup>42</sup> Pro vykrytalizování TsO-CD byl roztok ve všech případech ponechán při laboratorní teplotě. Byly provedeny dvě takovéto syntézy za zisku bílého prášku (1,4 g, výtěžek 14 % a 3,1 g, výtěžek 31 %). <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ = 7.75 (d, *J* = 7.9 Hz, 1 H, H-2'), 7.37 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, H-3'), 5.83 - 5.57 (m, 14 H, 7 × OH-2, 7 × OH-3), 4.84 - 4.73 (m, 7 H, 7 × H-1), 4.59 - 4.10 (m, 8 H, 6 × OH-6, 2 × H-6<sup>1</sup>), 3.86 - 2.90 (m, 49 H, 7 × H-2, 7 × H-3, 7 × H-4, 7 × H-5, 12 × H-6, překrytí signálu s H<sub>2</sub>O), 2.48 (s, 3H, 3 × H-5') ppm.

### 3.3 Příprava 6<sup>1</sup>-(karboxymethyl)amino-6<sup>1</sup>-deoxy-β-CD

Syntéza byla provedena upraveným postupem podle lit.<sup>41</sup> a její průběh byl nejprve ověřen při pilotní reakci. Glycin (100 mg, 1,3 mmol) a TsO-CD (500 mg, 0,4 mmol) byly rozpuštěny v H<sub>2</sub>O (3,8 ml) a TEA (2,5 ml) a přes noc míchány a refluxovány za teploty 108 °C pod inertní atmosférou dusíku. Poté byla směs zředěna vodou (5 ml) a pro vysrážení produktu nakapána do acetonu (220 ml). Po odfiltrování měl produkt nežádanou hnědou barvu, a proto byl třikrát rekrystalizován z 90% vodného roztoku MeOH. Získán byl světle hnědý až bílý prášek (89 mg, výtěžek 18 %). <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, D<sub>2</sub>O) δ 4.85 (m, 7 H, překrytí signálu s HDO), 3.75 - 2.83 (m, 44 H) ppm.

### 3.4 Příprava 6<sup>1</sup>-(karboxyethyl)amino-6<sup>1</sup>-deoxy-β-CD

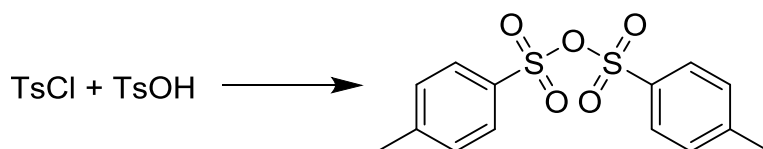
Syntéza byla provedena upraveným postupem pro přípravu 6<sup>1</sup>-(karboxymethyl)-amino-6<sup>1</sup>-deoxy-β-CD publikovaným Liuem et al.<sup>41</sup> a její průběh byl nejprve ověřen při pilotní reakci. β-alanin (100 mg, 1,1 mmol) a TsO-CD (500 mg, 0,4 mmol) byly rozpuštěny v H<sub>2</sub>O (3,8 ml) a TEA (2,5 ml) a přes noc míchány a refluxovány za teploty 108 °C pod inertní atmosférou argonu. Poté byla směs zředěna vodou (5 ml) a pro vysrážení produktu nakapána do absolutního EtOH (220 ml) a chlazená po dobu 1 hodiny při teplotě -10 °C. Následně byl EtOH odpařen na RVO, produkt rekrystalizován v 50% vodném roztoku MeOH (1 ml) a uložen přes noc do mrazáku (-10 °C). Podle

TLC neměla ani opakovaná rekrytalizace na čistotu produktu žádný vliv. K zisku 6<sup>1</sup>-(karboxyethyl)amino-6<sup>1</sup>-deoxy-β-CD byla provedena sloupcová chromatografie, čistý produkt se však přesto nepodařilo izolovat.

## 4 Výsledky a diskuse

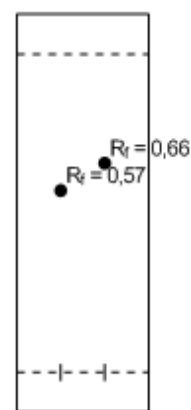
### 4.1 Příprava TsO-CD

6<sup>1</sup>-*O*-tosyl- $\beta$ -CD patří k nejčastěji využívaným intermediátům pro přípravu monosubstituovaných derivátů CD na uhlíku C-6, resp. C-2. Metod jeho syntézy najdeme v literatuře mnoho, jako inspirace pro tuto práci byl vybrán Zhongův postup<sup>43</sup> (obr. 7), neboť slibuje vysoký výtěžek reakce. Pro přípravu TsO-CD bylo použito jeden a půl násobné látkové množství Ts<sub>2</sub>O oproti  $\beta$ -CD, za účelem téměř kompletního zreagování CD, jako cenově nákladnější komponenty. Postup použitý pro přípravu TsO-CD je koncipován tak, aby vznikal přednostně monosubstituovaný tosylderivát na uhlíku v poloze 6. Během syntézy vznikají v minoritním množství také di- a vícesubstituované deriváty cyklodextrinu. Kromě toho zbývá v roztoku původní nezreagovaný  $\beta$ -CD.



Obrázek 7: Schéma reakce pro přípravu Ts<sub>2</sub>O.

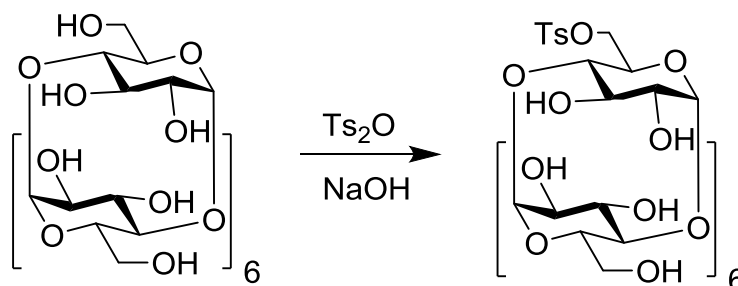
Při úvodní syntéze tosylanhydridu podle Zhonga et al.<sup>43</sup> byl získán bílý prášek ve výtěžku 73 %, avšak následně provedená <sup>1</sup>H NMR nekorespondovala s daty uvedenými pro Ts<sub>2</sub>O v literatuře. Vzhledem k výrazné odlišnosti obou spektrálních analýz také po několikanásobně provedené rekrystalizaci v 50% MeOH bylo ustoupeno od další snahy o očištění produktu. Příčinou selhání syntézy byly zřejmě nekvalitní (staré) výchozí sloučiny.



Obrázek 8: TLC, zleva vzorek  $\beta$ -CD a TsO-CD.

Celá příprava byla zopakována, přičemž byl mírně upraven prvotní postup. K vysrážení požadovaného anhydridu nebyl použit hexan, nýbrž byl veškerý  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  odpařen na RVO. Tím byl získán  $\text{Ts}_2\text{O}$  ve výtěžku 95 %, oproti 88 % získanému Zhongem et al.<sup>43</sup> za použití hexanu. Proběhnutí reakce bylo ověřováno pomocí TLC (obr. 8). S cílem objevení vhodného eluentu byla destička vyvíjena v  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , ve směsi  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  a MeOH v poměru 10:1 a ve směsi  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  a acetonu 10:1. Poslední uvedená eluční soustava se osvědčila nejlépe. Sloučeniny bylo navíc díky přítomnému aromatickému jádru možné na rozdíl od cyklodextrinu pozorovat pod UV lampou.

Prvně připravený tosyľanhydrid byl přes své evidentní znečištění vyzkoušen pro přípravu  $\text{TsO-CD}$ , neboť bylo uvaženo, že po jeho přidání do vodného roztoku  $\beta\text{-CD}$ , dojde k vzájemné reakci pouze mezi ním a cyklodextrinem a ostatní nečistoty nebudou reakci vadit. Z TLC však bylo patrné, že spolu obě látky vůbec nezreagovaly. Kvůli praktické i finanční stránce byl poté  $\beta\text{-CD}$  ze směsi izolován rekrystalizací z 30 ml vody.



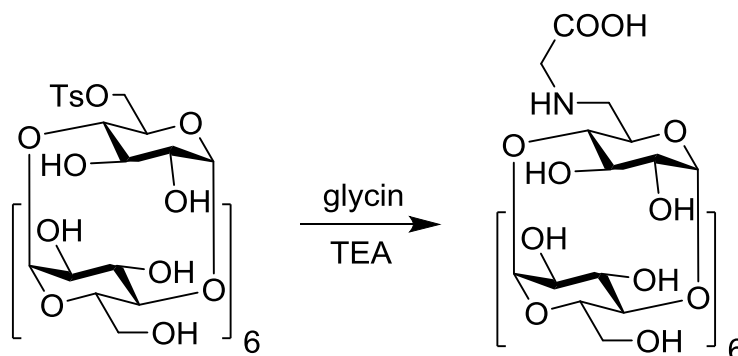
Obrázek 9: Schéma reakce pro přípravu  $\text{TsO-CD}$ .

$\text{TsO-CD}$  byl následně dvakrát syntetizován z výchozích 10 g  $\beta\text{-CD}$  a odpovídajícího množství zbylých komponent. Po vysušení produktů na vzduchu při laboratorní teplotě byly obdrženy bílé prášky ve výtěžcích 14, resp. 31 %.

## 4.2 Aminokyselinové deriváty $\beta\text{-CD}$

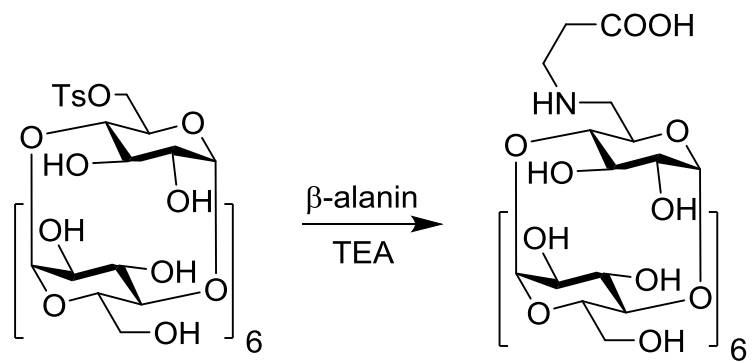
Postup pro syntézu 6<sup>1</sup>-(karboxymethyl)amino-6<sup>1</sup>-deoxy- $\beta\text{-CD}$  (obr. 10) byl inspirován Liuem et al.<sup>41</sup> Přípravě aminoderivátů cyklodextrinů vždy předcházela pilotní reakce a všechny syntézy byl prováděny pod inertní atmosférou, aby se zabránilo oxidaci

aminoskupin. Získaný produkt byl z důvodu zjištění ideálního poměru rekrystalizační směsi pro jeho očištění rekrystalizován v 50% vodném roztoku MeOH a v dalších směsích MeOH s H<sub>2</sub>O v poměrech 8:2, 9:1 a 95:5. Za nejlepší byl zvolen předposledně uvedený poměr. Pro vykrytalizování produktu byl roztok umístěn do mrazničky (~ -10 °C) a po odfiltrování a vysušení byl získán světle hnědý prášek ve výtěžku 18 %.



Obrázek 10: Schéma reakce pro přípravu 6<sup>1</sup>-(karboxymethyl)amino-6<sup>1</sup>-deoxy-β-CD.

Jak je již uvedeno v úvodu této práce, příprava 6<sup>1</sup>-(karboxyethyl)amino-6<sup>1</sup>-deoxy-β-CD nebyla doposud publikována. Proto bylo s výhodou využito obdobných vlastností β-alaninu jako glycinu při elektrofilní substituci a pro přípravu produktu bylo postupováno po vzoru Liua et al.<sup>41</sup> (obr. 11). Žádaná látka byla čištěna sloupcovou chromatografií ve směsi CHCl<sub>3</sub>:MeOH:H<sub>2</sub>O v poměru 10:11:3, produkt se však přesto nepodařilo izolovat. Bylo by pravděpodobně zapotřebí použití jiné směsi rozpouštědel, popř. podstatně delší stacionární fáze sloupcové chromatografie.



Obrázek 11: Schéma reakce pro přípravu 6'-(karboxyethyl)amino-6'-deoxy-β-CD.

## 5 Závěr

Literární rešerše předkládané bakalářské práce je zaměřena především na vlastnosti, přípravu a použití cyklodextrinů. V navazující podkapitole jsou představeny magnetické nanočástice a jejich potenciál pro praktická využití. Závěr teoretické části se pak věnuje MNPs modifikovaným pomocí derivátů  $\beta$ -CD.

V rámci experimentální části této práce byly připraveny 3 monosubstituované deriváty cyklodextrinů ( $6^I$ -*O*-tosyl- $\beta$ -CD,  $6^I$ -(karboxymethyl)amino- $6^I$ -deoxy- $\beta$ -CD a  $6^I$ -(karboxyethyl)amino- $6^I$ -deoxy- $\beta$ -CD) vhodné pro další použití k modifikaci povrchu magnetických nanočástic. Bez závažnějších odchylek či nesrovnalostí byly ověřeny postupy přípravy derivátů cyklodextrinů uvedených v literatuře. Při přípravě tosylnhydridu se podařilo mírnou úpravou postupu izolovat produkt ve vyšším výtěžku, než je uvedeno v literatuře. Obdobným postupem použitým pro přípravu  $6^I$ -(karboxymethyl)amino- $6^I$ -deoxy- $\beta$ -CD byl připraven  $6^I$ -(karboxyethyl)-amino- $6^I$ -deoxy- $\beta$ -CD, jež se však nepodařilo izolovat v čistém stavu.

Lze předpokládat, že obdobným způsobem lze připravit také sloučeniny s delším uhlíkatým řetězcem navázaným mezi CD a karboxylovou funkční skupinou. Místo glycinu, resp.  $\beta$ -alaninu by se v příslušném kroku reakce použila GABA (kyselina  $\gamma$ -aminomáselná), kyselina  $\delta$ -aminovalerová atd.

## Seznam literatury

- (1) Kurkov, S. V.; Loftsson, T. *Int. J. Pharm.* **2013**, *453*, 167–180.
- (2) Del Valle, E. M. M. *Process Biochem.* **2004**, *39*, 1033–1046.
- (3) Szejtli, J. *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 1743–1754.
- (4) Kraus T. *Cyklodextriny*, **2004**.  
[http://www.uochb.cas.cz/Zpravy/PostGrad2004/8\\_Kraus.pdf](http://www.uochb.cas.cz/Zpravy/PostGrad2004/8_Kraus.pdf) (staženo 08/2013)
- (5) Loftsson T. What are cyclodextrins?  
[http://www.eurocdsoc.com/index.php?option=com\\_content&view=article&id=67](http://www.eurocdsoc.com/index.php?option=com_content&view=article&id=67):  
(staženo 08/2013).
- (6) Kanwar, J. R.; Long, B. M.; Kanwar, R. K. *Curr. Med. Chem.* **2011**, *18*, 2079–2085.
- (7) Zhu, J.; He, J.; Du, X.; Lu, R.; Huang, L.; Ge, X. *Appl. Surf. Sci.* **2011**, *257*, 9056–9062.
- (8) Scriba, G. K. E. V. *J. Sep. Sci.* **2008**, *31*, 1991–2011.
- (9) Buschmann, H.-J.; Schollmeyer, E. *J. Cosmet. Sci.* **2002**, *53*, 185–191.
- (10) Nutrition, C. for F. S. and A. GRAS Notice Inventory  
<http://www.fda.gov/Food/IngredientsPackagingLabeling/GRAS/NoticeInventory/ucm154182.htm> (staženo 08/2014).
- (11) Arruebo, M.; Fernández-Pacheco, R.; Ibarra, M. R.; Santamaría, J. *Nano Today* **2007**, *2*, 22–32.
- (12) McBain, S. C.; Yiu, H. H.; Dobson, J. *Int. J. Nanomedicine* **2008**, *3*, 169–180.
- (13) Lu, A.-H.; Salabas, E. L.; Schüth, F. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 1222–1244.
- (14) T. K. Indira, P. K. L. Magnetic Nanoparticles - A Review, **2010**.  
[http://ijpsnonline.com/Issues/1035\\_full.pdf](http://ijpsnonline.com/Issues/1035_full.pdf) (staženo 09/2013)
- (15) Badruddoza, A. Z. M.; Hidajat, K.; Uddin, M. S. *J. Colloid Interface Sci.* **2010**, *346*, 337–346.
- (16) Wu, Y.; Zuo, F.; Zheng, Z.; Ding, X.; Peng, Y. *Nanoscale Res. Lett.* **2009**, *4*, 738–747.
- (17) Arslan, M.; Sayin, S.; Yilmaz, M. *Tetrahedron Asymmetry* **2013**, *24*, 982–989.
- (18) Zhu, J.; Wang, P.; Lu, M. *J. Braz. Chem. Soc.* **2013**, *24*, 171–176.
- (19) He, S.; Shi, W.; Zhang, X.; Li, J.; Huang, Y. *Talanta* **2010**, *82*, 377–383.
- (20) Chalasani, R.; Vasudevan, S. *ACS Nano* **2013**, *7*, 4093–4104.
- (21) Sharifi, S.; Behzadi, S.; Laurent, S.; Forrest, M. L.; Stroeve, P.; Mahmoudi, M. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 2323–2343.
- (22) Arslan, M.; Sayin, S.; Yilmaz, M. *Water. Air. Soil Pollut.* **2013**, *224*.
- (23) Rezaei, B.; Ensafi, A. A.; Haghghatnia, F.; Aalaye, S. E. *J. Braz. Chem. Soc.* **2012**, *23*, 2248–2257.
- (24) Badruddoza, A. Z. M.; Tay, A. S. H.; Tan, P. Y.; Hidajat, K.; Uddin, M. S. *J. Hazard. Mater.* **2011**, *185*, 1177–1186.
- (25) Banerjee, S. S.; Chen, D.-H. *Int. J. Appl. Ceram. Technol.* **2010**, *7*, 111–118.
- (26) Landy, D.; Mallard, I.; Ponchel, A.; Monflier, E.; Fourmentin, S. *Environ. Chem. Lett.* **2012**, *10*, 225–237.
- (27) Villiers, A. *Compt. Rend.* **1891**, *112*, 536.
- (28) Schardinger F. *Zentralbl. Bakteriolog. Parasitenk.* **2 1905**, *14*, 772.
- (29) Wistuba, D.; Bogdanski, A.; Larsen, K. L.; Schurig, V. *Electrophoresis* **2006**, *27*, 4359–4363.



- (30) Endo, T.; Nagase, H.; Ueda, H.; Kobayashi, S.; Nagai, T. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* **1997**, *45*, 532–536.
- (31) www.cyclodex.com <http://www.cyclodex.com/> (staženo 08/2014).
- (32) European Conference on Cyclodextrins **2013**, Seminar & Summit Antalya, Turkey <http://10times.com/european-conference-on-cyclodextrins> (staženo 08/2014).
- (33) Řezanka M., Disertační práce, Univerzita Karlova, Praha, 2012.
- (34) Stella, V. J.; He, Q. *Toxicol. Pathol.* **2008**, *36*, 30–42.
- (35) Ms F D Pollitt. 843. beta-Cyclodextrin (WHO Food Additives Series 35) <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v35je12.htm> (staženo 09/2013).
- (36) Bocanegra-Diaz, A.; Mohallem, N. D. S.; Sinisterra, R. D. *J. Braz. Chem. Soc.* **2003**, *14*, 936–941.
- (37) Goldup, S. M.; Leigh, D. A.; Lusby, P. J.; McBurney, R. T.; Slawin, A. M. Z. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 3381–3384.
- (38) Goldup, S. M.; Leigh, D. A.; Lusby, P. J.; McBurney, R. T.; Slawin, A. M. Z. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 6999–7003.
- (39) Řezanka, P.; Navrátilová, K.; Řezanka, M.; Král, V.; Sýkora, D. *Electrophoresis* **2014**, *v tisku*, DOI: 10.1002/elps.201400145
- (40) Tripodo, G.; Wischke, C.; Neffe, A. T.; Lendlein, A. *Carbohydr. Res.* **2013**, *381*, 59–63.
- (41) Liu, Y.; Yang, Y.-W.; Cao, R.; Song, S.-H.; Zhang, H.-Y.; Wang, L.-H. *J. Phys. Chem. B* **2003**, *107*, 14130–14139.
- (42) Popr, M.; Hybelbauerová, S.; Jindřich, J. *Beilstein J. Org. Chem.* **2014**, *10*, 1390–1396.
- (43) Zhong, N.; Byun, H.-S.; Bittman, R. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 2919–2920.
- (44) Badruddoza, A. Z. M.; Junwen, L.; Hidajat, K.; Uddin, M. S. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2012**, *92*, 223–231.
- (45) Kim, J. S.; Yoon, T.-J.; Yu, K. N.; Kim, B. G.; Park, S. J.; Kim, H. W.; Lee, K. H.; Park, S. B.; Lee, J.-K.; Cho, M. H. *Toxicol. Sci.* **2006**, *89*, 338–347.
- (46) Bellini, S. *Inst. Microbiol. Dell'Universita Pavia* **1963**. <http://www.calpoly.edu/~rfrankel/Bellini.1.pdf> (staženo 08/2014)
- (47) Xie, J.; Chen, K.; Chen, X. *Nano Res.* **2009**, *2*, 261–278.
- (48) Crini, G.; Morcellet, M. *J. Sep. Sci.* **2002**, *25*, 789–813.
- (49) Li, L.; Fan, L.; Sun, M.; Qiu, H.; Li, X.; Duan, H.; Luo, C. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2013**, *107*, 76–83.
- (50) Cai, K.; Li, J.; Luo, Z.; Hu, Y.; Hou, Y.; Ding, X. *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 7719.
- (51) K. Hager, Kampf dem Schweißgeruch. [http://www.ua-bw.de/pub/beitrag.asp?subid=0&Thema\\_ID=3&ID=1242&Pdf=No&lang=DE](http://www.ua-bw.de/pub/beitrag.asp?subid=0&Thema_ID=3&ID=1242&Pdf=No&lang=DE) (staženo 07/2014).
- (52) Ch. Rodgers. A synthesis of Rotaxanes and Catenanes [http://rogers.org.uk/oldsite/research/CREST\\_full.htm](http://rogers.org.uk/oldsite/research/CREST_full.htm) (staženo 07/2014).

## Seznam obrázků

Obrázek 1: Struktura $\beta$ -cyklodextrinu.....	15
Obrázek 2: Tvar cyclodextrinu. ....	16
Obrázek 3: Tvorba inkluzního komplexu CD a hostující molekuly ve vodném prostředí.....	18
Obrázek 4: Příklad molekuly katenanu a rotaxanu. ....	20
Obrázek 5: Schéma potenciální reakce připraveného TsO-CD s MNPs. ....	28
Obrázek 6: TEM snímek $\beta$ CD PEG MNPs dispergovaných ve vodě. ....	30
Obrázek 7: Schéma reakce pro přípravu Ts <sub>2</sub> O. ....	35
Obrázek 8: TLC $\beta$ -CD a TsO-CD. ....	35
Obrázek 9: Schéma reakce pro přípravu TsO-CD. ....	36
Obrázek 10: Schéma reakce pro přípravu 6 <sup>l</sup> -(karboxymethyl)amino-6 <sup>l</sup> -deoxy- $\beta$ -CD. ....	37
Obrázek 11: Schéma reakce pro přípravu 6 <sup>l</sup> -(karboxyethyl)amino-6 <sup>l</sup> -deoxy- $\beta$ -CD. ....	38