

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra anorganické chemie



DISERTAČNÍ PRÁCE

Sensitizery, akceptory, sekundární zdroje $^1\text{O}_2$
a jejich supramolekulární komplexy s cyklodextriny

Vypracovala:

Mgr. Lenka Slavětínská

Školitel:

Doc. RNDr. Jiří Mosinger, Ph.D.

Praha 2008

Prohlašuji, že jsem předloženou disertační práci vypracovala samostatně s vyznačením všech pramenů a spoluautorství.

V Praze dne

.....

Vypracovala:
Školitel:

Mgr. Lenka Slavětínská
Doc. RNDr. Jiří Mosinger, Ph.D.

Na tomto místě bych ráda poděkovala všem, kteří mi pomohli dospět k výsledkům předkládaným v této práci. V první řadě svému školiteli Doc. RNDr. Jiřímu Mosingerovi, Ph.D. za trpělivé vedení, cenné rady a volnost, kterou mi při mé práci poskytoval a celému osazenstvu laboratoře 248 za příjemnou a přátelskou atmosféru. Dále děkuji RNDr. Pavlu Kubátovi, CSc. za úsilí, které věnoval fotofyzikálnímu studiu látek.

V neposlední řadě pak děkuji celé své rodině a všem mým blízkým za jejich nedocenitelnou a nezištnou pomoc během mých studií i v civilním životě.

Seznam zkratek

1,8-DMN	1,8-dimethylnaftalen
2,6-dsDPA	disodná sůl 9,10-difenylnanthracen-2,6-disulfonové kyseliny
2,6-dsDPAO ₂	endoperoxid disodné soli 9,10-difenylnanthracen-2,6-disulfonové kyseliny
2,7-dsDPA	disodná sůl 9,10-difenylnanthracen-2,7-disulfonové kyseliny
2,7-dsDPAO ₂	endoperoxid disodné soli 9,10-difenylnanthracen-2,7-disulfonové kyseliny
ADP	3,3'-(anthracen-9,10-diyl)dipropionát disodný
AES	3,3'-(anthracen-9,10-diyl)diethansulfonát disodný
BPAA	bis (9,10-anthracen-(4-trimethylfenylammonium)dichlorid
CD	cyklodextrin
COIL	kyslíko-jodový laser - „ <i>Chemical Oxygen–Iodine Laser</i> “
CT	přenos náboje - „ <i>Charge Ttransfer</i> “
CZE	kapilární zónová elektroforéza - „ <i>Capillary Zone Electrophoresis</i> “
DABCO	1,4-diazabicyklo[2.2.2]oktan
diMeSO ₃ -β-CD	heptakis(2,3-O-dimethyl-6-O-sulfo)-β-cyklodextrin
DMAX	6-hydroxy-9-(3-karboxy-9,10-dimethyl-2-anthryl)-3 <i>H</i> -xanthen-3-on
DMF	2,5-dimethylfuran
DMN	1,4-dimethylnaftalen
DHNP	N,N'-bis(2,3-dihydroxypropyl)-3,3'-(naftalen-1,4-diyl)dipropanamid
DHNPO ₂	endoperoxid N,N'-bis(2,3-dihydroxypropyl)-3,3'-(naftalen-1,4-diyl)dipropanamidu
DPA	9,10-difenylnanthracen
DPAO ₂	endoperoxid 9,10-difenylnanthracenu
DPBF	1,3-difenyliisobenzofuran
E _A	aktivační energie

EPR	elektronová paramagnetická rezonance – „ <i>Electron Paramagnetic Resonance</i> “
ESI-MS	<i>hmotnostní spektrometrie s elektrospray ionizací</i> – „Electrospray Ionisation – mass spectrometry“
E	energie
ET	přenos elektronu - „ <i>Electron Transfer</i> “
GC	plynová chromatografie - „ <i>Gas Chromatography</i> “
HEL	heliatren
HOMO	nejvyšší obsazený molekulový orbital - „ <i>Highest Occupied Molecular Orbital</i> “
hp- β -CD	2-hydroxypropyl- β -cyklodextrin
hp- γ -CD	2-hydroxypropyl- γ -cyklodextrin
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie – „ <i>High Performance Liquid Chromatography</i> “
IC	vnitřní konverze – „ <i>Internal Conversion</i> “
IČ	infračervená spektroskopie
ISC	mezisystémový přechod – „ <i>Intersystem Crossing</i> “
K_b	vazebná konstanta
LIOAS	fotoakustická kalorimetrie – „ <i>Laser-Induced Optoacoustic Spectroscopy</i> “
m-THPBC	5,10,15,20-tetrakis-(<i>m</i> -hydroxyfenyl)bakteriochlorin
m-THPC	5,10,15,20-tetrakis-(<i>m</i> -hydroxyfenyl)chlorin
m-THPP	5,10,15,20-tetrakis-(<i>m</i> -hydroxyfenyl)porfyrin
MNDP	3,3'-(4-methyl-1,3-naftyliden)dipropionát disodný
MNEA	N,N,N-trimethyl(2-(4-methyl-naftalen-1-yl)ethyl)ammoniumchlorid
MNEAO ₂	endoperoxid N,N,N-trimethyl(2-(4-methyl-naftalen-1-yl)ethyl)ammoniumchloridu
MNP	3-(4-methyl-naftyl)propionát sodný
MNPO ₂	endoperoxid 3-(4-methyl-naftyl)propionátu sodného
MS	hmotnostní spektrometrie – „ <i>Mass Spectrometry</i> “
NDP	3,3'-(1,4-naftyliden)dipropionát disodný

NDPO ₂	endoperoxid 3,3'-(1,4-naftyliden)dipropionátu disodného
NMR	nukleární magnetická rezonance – „ <i>Nuclear Magnetic Resonance</i> “
NOESY	„ <i>Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy</i> “
PACT	„ <i>Photodynamic Antimicrobial Chemotherapy</i> “
PDT	„ <i>Photodynamic Therapy</i> “
PPDME	protoporfyrin IX dimethylester
RNO	N,N'-dimethyl- <i>p</i> -nitrosoanilin
ROESY	„ <i>Rotating Frame Overhauser Effect Spectroscopy</i> “
RTC	2,3,8,9-rubrentetrakarboxylát tetradaselný
SO ₃ -β-CD	heptakis(6-O-sulfo)-β-cyklodextrin
t _{1/2}	poločas rozpadu
TLC	tenkovrstevná chromatografie „ <i>Thin Layer Chromatography</i> “
TMPyP	<i>meso</i> -tetrakis(methylpyridyl)porfyrin
Tos	<i>p</i> -toluensulfonát
TPP	5,10,15,20-tetrafenylporfyrin
TPPS	5,10,15,20- <i>meso</i> -tetrakis(4-sulfonátofenyl)porfyrin
TPPSH ₂ ²⁺	diprotonizovaný 5,10,15,20- <i>meso</i> -tetrakis(4-sulfonátofenyl)porfyrin
triMe-β-CD	heptakis(2,3,6-tri-O-methyl)-β-cyklodextrin
TRTL	časově rozlišený „ <i>thermal lensing</i> “
ε	molární extinkční koeficient
τ	doba života
Φ	kvantový výtěžek
λ	vlnová délka
ΔH [#]	aktivační enthalpie
ΔS [#]	aktivační entropie

Obsah

1. Úvod	8
1.1. Singletový kyslík	8
1.1.1. Obecné vlastnosti singletového kyslíku	8
1.1.2. Fotosensitizovaná generace singletového kyslíku	11
1.1.3. Alternativní způsoby generace singletového kyslíku	15
1.1.4. Reakce singletového kyslíku	17
1.1.5. Detekce singletového kyslíku	19
1.1.6. Využití singletového kyslíku	25
1.2. Akceptory / sekundární zdroje singletového kyslíku	28
1.2.1. Obecné vlastnosti akceptorů $^1\text{O}_2$	28
1.2.2. Mechanismus [4+2] cykloadice $^1\text{O}_2$	30
1.2.3. Nejčastěji využívané akceptory $^1\text{O}_2$	30
1.2.4. Disociace aromatických endoperoxidů: sekundární zdroje $^1\text{O}_2$	33
1.2.5. Typy sekundárních zdrojů $^1\text{O}_2$	35
1.3. Cyklodextriny	38
1.3.1. Obecné vlastnosti cyklodextrinů	38
1.3.2. Schopnost tvorby inkluzních komplexů	42
1.3.3. Vliv cyklodextrinů na vlastnosti vázaných látek	44
1.3.4. Využití cyklodextrinů	45
2. Cíl práce	46
3. Výsledky a diskuze	47
3.1. Disulfonované deriváty 9,10-difenylanthracenu - sensitizery, akceptory a sekundární zdroje $^1\text{O}_2$ a jejich supramolekulární komplexy s cyklodextriny (Příloha 1 a 2)	48
3.2. Sensitizery TPPS a TMPyP a jejich komplexy s cyklodextriny (Příloha 3)	58
3.2.1. Interakce TMPyP:CD	58
3.2.2. Interakce TPPSH ₂ ²⁺ :CD	62
4. Závěr	65
5. Použitá literatura	68
6. Přílohy	73

1. Úvod

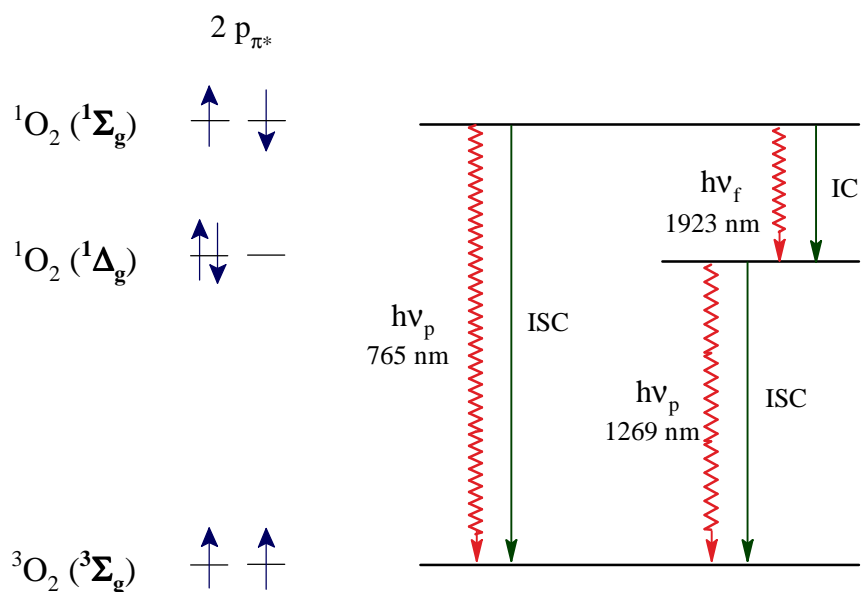
1.1. Singletový kyslík

Od experimentálního důkazu existence singletového kyslíku ($^1\text{O}_2$), molekulárního kyslíku v elektronově excitovaném stavu se všemi spárovanými elektrony, uběhlo již více než 40 let^{1,2}. Přesto je v současné době tato forma kyslíku v popředí zájmu chemiků a biologů, především díky své vysoké reaktivitě a cytotoxicitě.

1.1.1. Obecné vlastnosti singletového kyslíku

Termínem singletový kyslík $^1\text{O}_2$ jsou označovány molekuly kyslíku ve dvou nejnižších ležících excitovaných stavech $^1\text{O}_2(^1\Sigma_g)$ a $^1\text{O}_2(^1\Delta_g)$, které se od sebe liší obsazením HOMO orbitalů elektrony, energií, ale i dobou života. Mají-li dva elektrony, které zůstávají nespárované v jednotlivých orbitalech π^* opačný spin, vzniká singletový excitovaný stav $^1\text{O}_2(^1\Sigma_g)$. Obsazují-li dva elektrony s opačnými spiny jeden orbital π^* vzniká singletový excitovaný stav $^1\text{O}_2(^1\Delta_g)$. Energie singletových stavů $^1\text{O}_2(^1\Delta_g)$ a $^1\text{O}_2(^1\Sigma_g)$ je $94.1 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ a $156.9 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ ^{3,4}. Obsazení nejvyššího π^* antivazebného orbitalu spolu s diagramem energetických hladin a vzájemně si konkurujících zářivých a nezářivých přechodů mezi jednotlivými stavy kyslíku je znázorněno na Obr.1.

Elektronové přechody se změnou spinu $^1\text{O}_2(^1\Delta_g) \rightarrow ^3\text{O}_2(^3\Sigma_g)$ a $^1\text{O}_2(^1\Sigma_g) \rightarrow ^3\text{O}_2(^3\Sigma_g)$ jsou zakázanými přechody, a proto mají oba singletové stavy kyslíku relativně dlouhé doby života. Doba života excitovaných stavů je závislá na povaze rozpouštědla, jelikož perturbace molekuly způsobená solvatací zvyšuje pravděpodobnost těchto zakázaných přechodů. Spinově dovolený je přechod $^1\text{O}_2(^1\Sigma_g) \rightarrow ^1\text{O}_2(^1\Delta_g)$. Z toho vyplývá, že $^1\text{O}_2(^1\Delta_g)$ vzniká dvěma reakčními cestami - přímou a nepřímou přes energeticky bohatší meziprodukt $^1\text{O}_2(^1\Sigma_g)$ ^{3,4}.



Obr. 1 Elektronová konfigurace, přechody mezi základním a excitovanými stavy molekuly kyslíku (ISC “intersystem crossing” - mezisystémový přechod, IC “internal conversion” - vnitřní konverze, $h\nu_p$ - fosforescence, $h\nu_f$ - fluorescence)

Jak již bylo uvedeno, doba života 1O_2 , především pak doba života $^1O_2(^1\Delta_g)$, τ_{Δ} , v roztoku, výrazně závisí na povaze rozpouštědla (Tab. I). U rozpouštědel obsahujících OH skupiny jako jsou voda a alkoholy způsobující nejefektivnější zhášení $^1O_2(^1\Delta_g)$ byly naměřeny nejkratší doby života (cca 10^{-6} s). Nejdelší doby života (cca 10^{-3} s) byly pozorovány v perhalogenovaných uhlovodíkových rozpouštědlech, např. C_6F_6 , CCl_4 (výjimkou jsou jodovaná rozpouštědla, kde přítomnost „těžkého atomu“ zesiluje pravděpodobnost spinově zakázaného přechodu $^1O_2(^1\Delta_g) \rightarrow ^3O_2(^3\Sigma_g)$ a doby života proto klesají) a v deuterovaných rozpouštědlech jako např. C_6D_6 , $(CD_3)_2CO$ nebo $CDCl_3$. Vlastností rozpouštědla, mající přímý vztah k délce života $^1O_2(^1\Delta_g)$, je jeho absorbance v blízké IČ oblasti okolo 7880 cm^{-1} , která rezonuje s přechodem $^1O_2(^1\Delta_g) \rightarrow ^3O_2(^3\Sigma_g)$ do základního stavu. Doby života 1O_2 se rovněž snižují s rostoucím počtem vodíkových atomů v molekule rozpouštědla. V tabulce I je na příkladu některých rozpouštědel vidět výrazný izotopový efekt ve vztahu k době života 1O_2 ^{4,5}.

Tabulka I Vlastnosti nejnižších singletových stavů kyslíku $^1\text{O}_2(^1\Delta_g)$ a $^1\text{O}_2(^1\Sigma_g)$

	$^1\text{O}_2(^1\Delta_g)$	$^1\text{O}_2(^1\Sigma_g)$	
Energie [kJ.mol ⁻¹]	94.1	156.9	
Přechod	$^1\text{O}_2(^1\Delta_g) \rightarrow ^3\text{O}_2(^3\Sigma_g)$	$^1\text{O}_2(^1\Sigma_g) \rightarrow ^3\text{O}_2(^3\Sigma_g)$	$^1\text{O}_2(^1\Sigma_g) \rightarrow ^1\text{O}_2(^1\Delta_g)$
Vlnová délka [nm]	1269 - 1282	765	1914 - 1936
<i>Experimentální doba života $^1\text{O}_2$</i>			
Rozpouštědlo	τ_Δ^*	τ_Σ^{a*}	
H ₂ O	3,8 μs ^b	8.2 ps	
D ₂ O	62 μs ^b	42 ps	
CH ₃ OH	10 μs ^b	18 ps	
CD ₃ OD	240 μs ^c	94 ps	
(CH ₃) ₂ CO	50 μs ^b	123 ps	
(CD ₃) ₂ CO	723 μs ^b	294 ps	
CHCl ₃	264 μs ^b	1.18 ns	
CDCl ₃	740 μs ^b	2.22 ns	
CCl ₄	28 ms ^c	105 – 132 ns	
C ₆ H ₆	38 μs ^b	-	
C ₆ D ₆	795 μs ^b	-	
C ₆ F ₆	600 μs ^d	-	
C ₆ H ₁₂	17 μs ^d	-	

^a cit.⁶, ^b cit.⁷, ^c cit.⁵, ^d cit.⁸

* τ_Δ je doba života $^1\Delta_g$; τ_Σ je doba života $^1\Sigma_g$ stavu

1.1.2. Fotosensitizovaná generace singletového kyslíku

Jeden z možných způsobů, jak generovat singletový kyslík, jsou fotosensitizované reakce. O jejich problematiku v posledních letech značně vzrostl zájem, především z důvodu využití fotosensitizované reakce, fluorescence porfyrinoidních sensitizérů a cytotoxicity $^1\text{O}_2$ v medicíně při léčbě rakovinových onemocnění. Jelikož molekula kyslíku nemá v běžně přístupné oblasti UV-Vis záření výraznější absorpci, nejčastěji se excituje nepřímo prostřednictvím sensitizéru^{4,9,10,11}. Mechanismus fotosensitizované reakce je zjednodušeně znázorněn na Obr. 2 a popsán reakčním schématem 1:

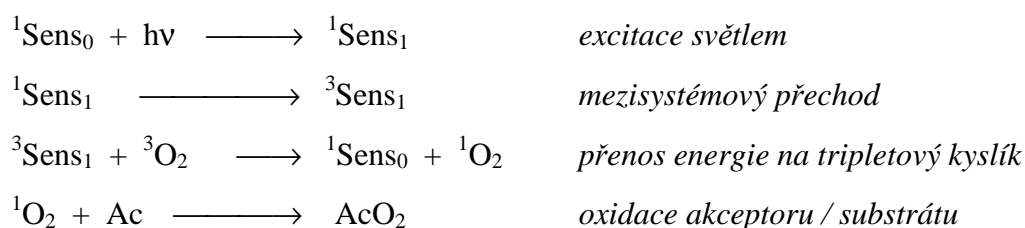
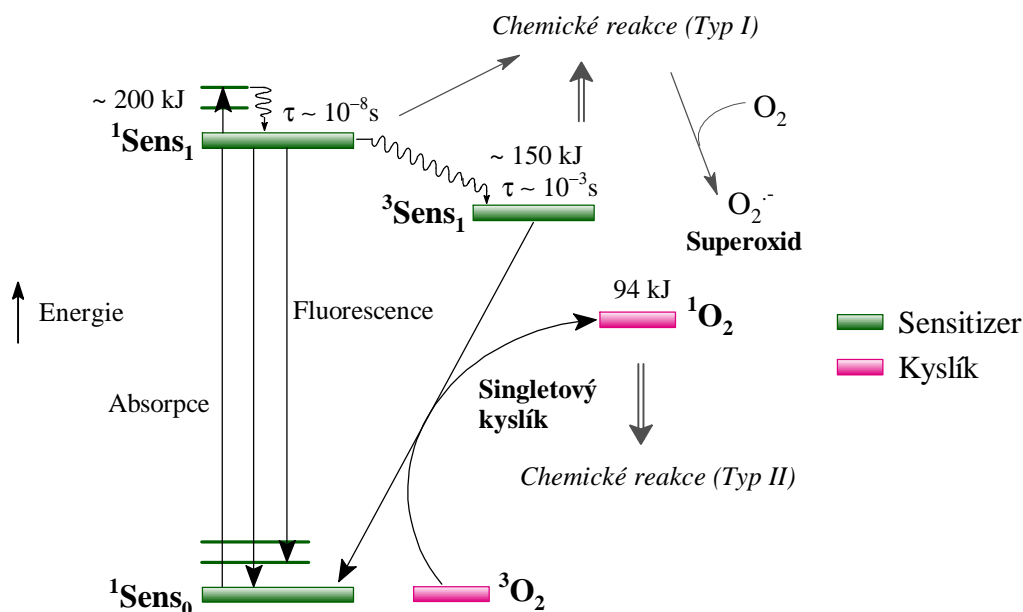


Schéma 1

Po absorpci světelného kvanta o vhodné vlnové délce se sensitizér v základním singletovém stavu ($^1\text{Sens}_0$) dostává do excitovaného singletového stavu ($^1\text{Sens}_n$), který rychlou relaxací přechází na nejnižší excitovaný singletový stav ($^1\text{Sens}_1$). Krátkodobě žijící stav $^1\text{Sens}_1$ (s obvyklou dobou života v řádu ns) se spontánně deaktivuje nezářivou konverzí („internal conversion“), zářivým přechodem (fluorescencí) nebo mezisystémovým přechodem do obvykle nejnižšího tripletového stavu sensitizéru ($^3\text{Sens}_1$). Vznik $^3\text{Sens}_1$ nastává nejčastěji během 0,1 až 10 ns. Spontánní deaktivace tripletového stavu sensitizéru mezisystémovým přechodem nebo konkurujícím zářivým přechodem tj. fosforescencí jsou zakázané přechody, a proto mají tripletové stavy sensitizérů poměrně dlouhou dobu života (v řádu ms) a mohou se tedy účastnit řady bimolekulárních reakcí. Jejich zhášení rozpuštěným kyslíkem ($^3\text{O}_2$) probíhá přenosem energie („energy transfer“, ET) z excitovaného sensitizéru na molekulu kyslíku a vede ke vzniku singletového kyslíku v obou jeho excitovaných stavech $^1\text{O}_2(^1\Delta_g)$ a $^1\text{O}_2(^1\Sigma_g)$.



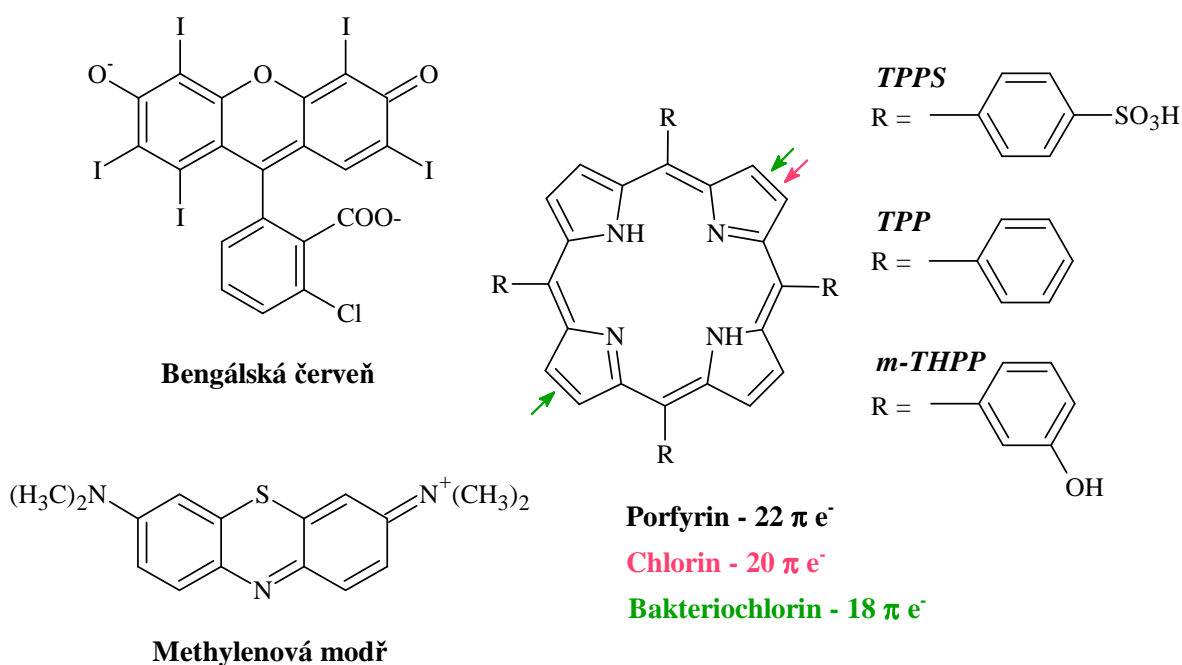
Obr. 2 Stavový diagram elektronových stavů senzitizeru a kyslíkových molekul. Schématické vyjádření generace singletového kyslíku fotosenzitizovanou reakcí.

Silně oxidativní, krátce žijící $^1\text{O}_2$ v roztoku zaniká fosforescencí nebo zhášením. Zhášení může probíhat přenosem energie na molekulu rozpouštědla či zhášedla, při kterém nedochází k chemické změně (fyzikální zhášení) nebo chemickou reakcí, při které dochází k oxidaci vhodného akceptoru/substrátu (chemické zhášení, Typ II).

V průběhu fotosenzitizované reakce mohou být excitované singletové stavy senzitizeru zhášeny kyslíkem, ale efektivita této reakce je nízká vzhledem ke krátké době života těchto stavů.

Excitovaný tripletový stav senzitizeru nemusí být nutně zhášen přenosem energie na molekulární kyslík, ale může docházet i k dalším reakcím. Excitované stavy senzitizeru mohou přímo reagovat se substrátem nebo molekulami rozpouštědla např. mechanismem přenosu náboje. Produktem těchto reakcí jsou volné radikály a ion-radikály, které mohou následně reagovat s molekulárním kyslíkem za vzniku různých oxidačních produktů, především superoxidového anion-radikálu $\text{O}_2^{\cdot-}$ (Typ I) ¹². Přenos energie nebo elektronu na kyslík jsou kompetitivní reakční cesty a záleží na fyzikálně chemických a fotofyzikálních vlastnostech a na struktuře použitého senzitizeru, která z nich převáží.

Mezi sensitizery, poskytující převážně $O_2^{\cdot -}$, patří sloučeniny s ketonovou strukturou (ketony, chinony, barviva chinonového typu) s nízkožícím tripletovým stavem (n,π^*), kde excitovaný elektron pochází z nevazebného orbitalu. Naopak sensitizery typu (π,π^*), kde excitovaný elektron pochází z π orbitalu, poskytují převážně 1O_2 . K tomuto typu náleží xanthenová barviva (fluorescein, bengálská červeň), azinová barviva (methylenová modř), triarylmethanová barviva, akridin, antracen a jejich deriváty. Sensitizer s vysokým výtěžkem 1O_2 (Φ_{Δ}), a tedy vysokou fotodynamickou účinností, jsou látky s porfyrinoidní strukturou, tj. tetrapyrrolové, resp. oligopyrrolové makrocykly (porfyriny, ftalocyaniny, chloriny a jejich metalokomplexy) ^{4,13,14,15}. Struktury některých sensitizerů, které jsou často využívány pro fotobiologické a fotomedicínské aplikace, jsou zobrazeny na Obr.3.



Obr. 3 Struktury některých nejčastěji používaných sensitizerů. TPPS (5,10,15,20-meso-tetrakis(4-sulfonátofenyl)porfyrin), TPP (tetrafenylporfyrin), m-THPP (5,10,15,20-tetrakis-(m-hydroxyfenyl)porfyrin).

Schopnost sensitizeru generovat $^1\text{O}_2$ během fotosensitizované reakce je závislá především na vlastnostech jeho nejnižšího excitovaného tripletového stavu ¹³. Proto by měl efektivní sensitizér splňovat následující charakteristiky, od kterých se přímo odvíjí i kvantové výtěžky singletového kyslíku (Φ_{Δ}):

- (a) vysoký absorpční koeficient ve spektrální oblasti excitačního světla
- (b) vhodnou energii tripletového stavu (tj. $E_T \geq 95 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$) umožňující účinný přenos energie na molekulu kyslíku v základním stavu
- (c) vysoký kvantový výtěžek ($\Phi_T > 0.4$) a dlouhou dobu života ($\tau_T > 0.1 \mu\text{s}$) tripletových stavů
- (d) vysokou fotostabilitu

Příklady některých běžně používaných organických barviv a porfyrinoidních sensitizerů spolu s jejich fotofyzikálními vlastnostmi jsou uvedeny v tabulkách II a III.

Tabulka II Příklady běžných organických barviv a jejich fotofyzikální vlastnosti¹³.

Sensitizer	Absorpční rozsah λ (nm)	Energie tripletových stavů $^3\text{Sens}_1 E_T$ ($\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$)	Kvantový výtěžek $^1\text{O}_2$ Φ_{Δ}
Bengálská červeň	480-550	175.7	0.75 (H_2O) 0.68 ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$) 0.76 (CH_3OH)
Eosin B	470-580	190.4	0.52 (H_2O) 0.37 ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$)
Methylenová modř	550-700	133.9	0.52 ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$) 0.5 (CH_3OH)

Tabulka III Příklady některých porfyrinoidních sensitizérů a jejich fotofyzikální vlastnosti¹⁶.

Sensitizer	λ_{\max} (nm)	Kvantový výtěžek $^3\text{Sens}_1$ Φ_T	Kvantový výtěžek $^1\text{O}_2$ Φ_Δ
TPPS	543	0.76	0.62 (D ₂ O)
TPP	347	0.63	0.62 (C ₆ H ₆)
PPDME	347	0.80	0.57 (C ₆ H ₆)
<i>m</i>-THPP	355	0.69	0.57 (CH ₃ OH)
<i>m</i>-THPC	355	0.89	0.43 (CD ₃ OD)
<i>m</i>-THPBC	355	0.83	0.43 (CD ₃ OD)

TPPS (5,10,15,20-meso-tetrakis(4-sulfonátofenyl)porfyrin), *TPP* (tetrafenylporfyrin), *m-THPP* (5,10,15,20-tetrakis-(*m*-hydroxyfenyl)porfyrin), *PPDME* (protoporfyrin IX dimethylester), *m-THPC* (5,10,15,20-tetrakis-(*m*-hydroxyfenyl)chlorin), *m-THPBC* ((5,10,15,20-tetrakis-(*m*-hydroxyfenyl)bakteriochlorin

1.1.3. Alternativní způsoby generace singletového kyslíku

Vedle fotosensitizovaných reakcí vzniká singletový kyslík řadou fyzikálních, chemických, fotochemických i biologických reakcí. Singletový kyslík vzniká např. mikrovlnným výbojem v kyslíkové atmosféře¹⁷. V biologických systémech je $^1\text{O}_2$ vytvářen tzv. tmavými reakcemi katalyzovanými enzymy, jako jsou některé peroxidasy (myeloperoxidasa, chloroperoxidasa, laktoperoxidasa) nebo oxygenasy (lipooxygenasa, cyklooxygenasa)^{18,19,20}. Takto vzniklý $^1\text{O}_2$ může reagovat s nenasycenými mastnými kyselinami, proteiny a DNA a podílet se na ochranných mechanismech proti virům a bakteriím.

Mezi přímé fotochemické reakce patří fotolýza ozonu probíhající zejména ve vyšších vrstvách atmosféry²¹, fotolýza komplexů s přenosem náboje kyslík - organická molekula (CT přechody)²² nebo fotoexcitace molekulárního kyslíku²³.

Singletový kyslík může být rovněž generován chemickou cestou. Klasickou metodou je reakce chlornanu s peroxidem vodíku ($\text{H}_2\text{O}_2/\text{ClO}^-$)^{2,24}. Podobně probíhá i reakce využívající rozkladu peroxomolybdenanu, peroxowolframanu nebo

peroxochromanu^{25,26}. Tyto metody generace ¹O₂ jsou založeny na disproportionaci peroxidu vodíku na vodu a kyslík v singletovém stavu. Samovolný rozklad H₂O₂ sice vede ke tvorbě ¹O₂, ale reakce je za normálních podmínek velmi pomalá. Proto se zde využívá chlornanového ClO⁻ nebo molybdenanového MoO₄²⁻ aniontu. V případě použití ClO⁻ je uváděna následující reakce (Schéma 2):

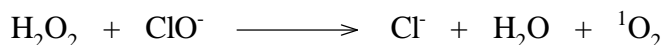


Schéma 2

Naproti tomu molybdenan reaguje s peroxidem vodíku za vzniku diperoxomolybdenanového aniontu jako meziproductu a v reakci působí jako katalyzátor (Schéma 3).

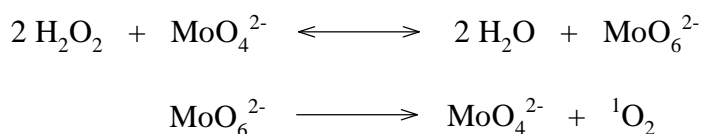


Schéma 3

Elegantní metodou generace ¹O₂ je jeho termické uvolňování z peroxidu vápenatého CaO₂. 2H₂O₂, který může být dispergován v organické fázi²⁷. Dalším příkladem využití chemické reakce, ve které rovněž vystupuje peroxid vodíku je reakce s peroxokyselinami a iminoperkyselinami v zásaditém prostředí (Schéma 4)²⁸.

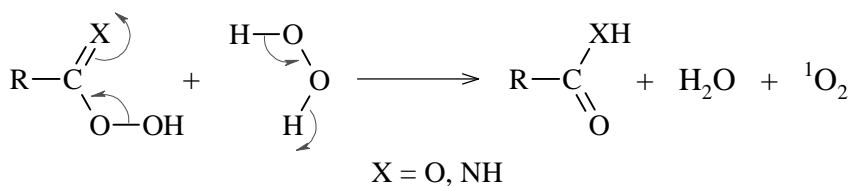


Schéma 4

K chemickým metodám generace ¹O₂ dále patří reakce ozonu a ozonidů s různými látkami²⁹, dismutace superoxidu na kyslík a peroxid¹⁸, a také tepelný rozklad endoperoxidů³⁰.

1.1.4. Reakce singletového kyslíku

Singletový kyslík $^1\text{O}_2$ je mnohem reaktivnější než kyslík $^3\text{O}_2$ v základním tripletovém stavu. Podstata vysoké reaktivity $^1\text{O}_2$ je dána skutečností, že jeho reakce s většinou chemických látek jsou na rozdíl od reakcí kyslíku v základním stavu $^3\text{O}_2$ spinově dovolené. Většina látek, např. organické sloučeniny, anorganické anionty, sloučeniny prvků hlavních podskupin a nepřechodné kovy mají v základním stavu všechny elektrony spárovány. Jsou v singletovém stavu a reakce s molekulou kyslíku v základním stavu $^3\text{O}_2$ se singletovými molekulami jsou podle pravidla zachování spinu spinově zakázané. Reakce mají vysoké aktivační energie a probíhají pomalu, a je proto nutné vytvořit podmínky pro obejití spinového zákazu. Termodynamicky jsou tyto reakce možné, mají-li záporné hodnoty Gibbsovy energie a jsou silně exotermní^{4,31,32}.

Typickými reakcemi $^1\text{O}_2$ jsou oxidace olefinů, 1,3-dienů, aromatických sloučenin či heterocyklů, při kterých dochází k adicím na dvojné vazby C=C, izolované nebo konjugované^{7,33,34}. Za základní a charakteristické lze považovat tři typy adicí: en-reakce, [2+2] cykloadice a [4+2] cykloadice, při kterých vznikají allylhydroperoxy, dioxetany a endoperoxidy (Schéma 5).

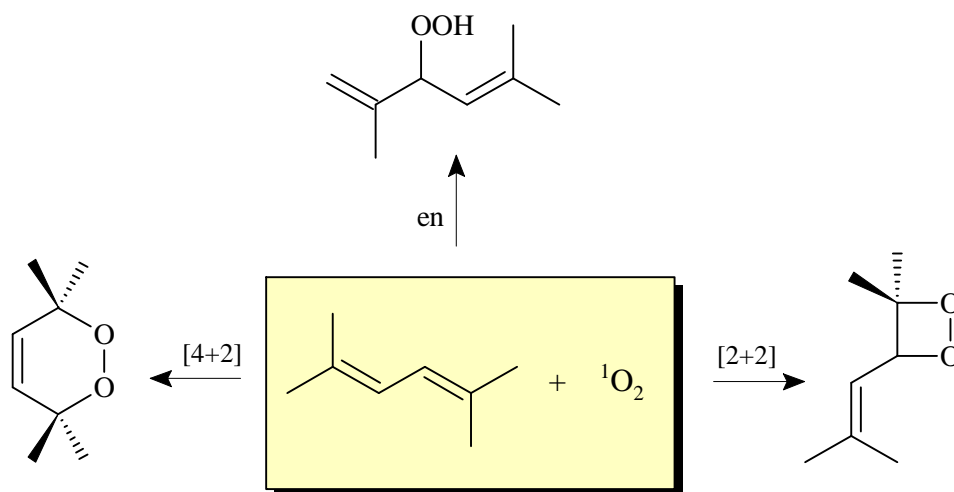


Schéma 5

Poměr těchto produktů je závislý na struktuře molekuly (např. *cis/trans* poměr, vzdálenost mezi uhlíky C₁ a C₄ dienu) a reakčních podmínkách (rozpouštědlo, teplota). Například při fotooxidaci α -terpinenu (1-methyl-4-isopropyl-1,3-cyklohexadienu) vzniká

z 90% endoperoxid a z 5% diallylhydroperoxid, zatímco α -phellandren (2-methyl-5-isopropyl-1,3-cyklohexadien) poskytuje endoperoxid a allylhydroperoxid v 65 % a 32 %^{34,35}.

Obecně lze říci, že *en-reakce* s $^1\text{O}_2$ probíhají v těch systémech, které obsahují allylový vodík a vznik allylhydroperoxidů je provázen posunutím dvojné vazby do přilehlé polohy. Reakce obvykle poskytují směs produktů, jejíž složení není ovlivněno sterickými poměry výchozího substrátu, a zároveň nejsou příliš závislé na volbě rozpouštědla³⁶. Příkladem *en-reakce* s $^1\text{O}_2$ je oxidace 1-methyl-1-cyklopentenu (Schéma 6).

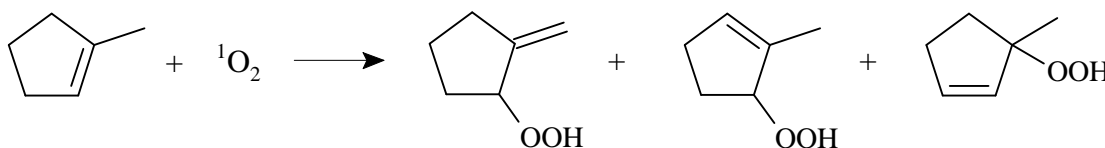


Schéma 6

Reaktivita olefinů vzrůstá s počtem alkylových substituentů, tj. se stoupající elektronovou hustotou na dvojnou vazbu³⁴.

Přímé adice, resp. *[2+2] adice* $^1\text{O}_2$, probíhají na elektronově bohatých olefinech nebo olefinech se stericky nepřístupnými allylovými vodíky. Vzniklé 1,2-dioxetany jsou však ve většině případů stabilní pouze při nízkých teplotách. Například poměrně stabilní dioxetanový meziprodukt za nízké teploty poskytuje fotooxygencí alkoxyethenu. Následným ohřátím reakční směsi pak dochází k chemiluminiscenci (Schéma 7)^{28,35}.

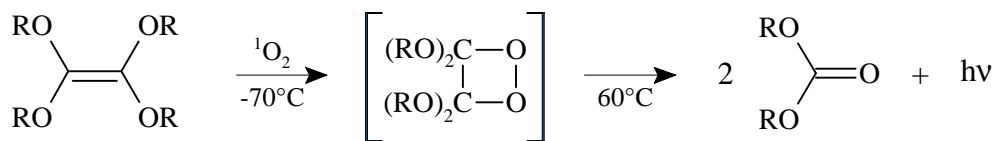


Schéma 7

Rychlost tvorby dioxetanového meziproduktu a složení reakční směsi je silně závislé na povaze rozpouštědla. Konkurenčními produkty těchto reakcí v mnoha případech bývají produkty *en-reakcí*³⁵.

[4+2] cykloadice někdy bývají označovány za analogy Diels-Alderovy adice na uhlíkatý řetězec s konjugovanými dvojnými vazbami. Tyto reakce probíhají na acyklických, cyklických i aromatických 1,3-dienech a vedou ke vzniku různě stabilních endoperoxidů. Příkladem [4+2] cykloadice je např. již zmiňovaná fotooxidace α -terpinenu při níž vzniká jako majoritní produkt stabilní endoperoxid askaridol (Schéma 8).

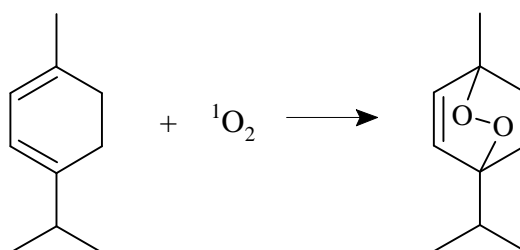


Schéma 8

Cyklické dieny jsou o několik řádů reaktivnější než acyklické dieny, jejichž fotooxidace navíc často vede ke směsi peroxidických produktů³⁷. Reaktivita acenů se zvyšuje s počtem kruhů v molekule³⁵. V organické syntéze je této reakce využíváno nejen u karbocyklických, ale i heterocyklických dienů. Tento typ reakce je pro předkládanou práci klíčový a bude proto detailněji popsán dále (viz kapitola 1.2.2.).

Další významné reakce singletového kyslíku, které jsou rovněž intenzivně studovány, jsou oxidace organických sulfidů, disulfidů a aminů^{7,38}.

1.1.5. Detekce singletového kyslíku

Jedním z rozhodujících faktorů, které zpomalily výzkum v oblasti singletového kyslíku byl nedostatek vhodných metod pro jeho detekci v plynné, a především kapalné fázi. Detekce $^1\text{O}_2$ v plynném stavu se v posledních letech zlepšila díky vývoji a aplikaci řady fyzikálních technik (emisní a fotoionizační spektroskopie, hmotnostní spektroskopie, kalorimetrie, EPR spektroskopie)⁹.

Pro detekci a stanovení výtěžků $^1\text{O}_2$ v kapalné fázi jsou však častěji využívány metody chemické, které jsou dostupnější než metody fyzikální. Chemické metody jsou založeny na reakcích $^1\text{O}_2$ s vhodnými látkami tvořícími specifické primární či sekundární

oxidační produkty. Zatímco většina oxidací tripletovým kyslíkem je teplotně závislá, oxidace singletovým kyslíkem na teplotě takřka nezávislí a často probíhají stereospecificky. Pro použití dané reakce k detekci je důležité, aby byla dostatečně selektivní pro $^1\text{O}_2$, tj. aby dovozovala odlišení vlivu $^1\text{O}_2$ od ostatních reaktivních oxo-částic (např. $\text{O}_2^{\cdot-}$, OH^{\cdot}).

Jednou z běžně užívaných chemických metod určených k diagnostice přítomnosti $^1\text{O}_2$ v komplexních reakcích jsou **zhášecí metody**. Zhášení obecně znamená interakci s okolními molekulami a nemusí vždy vést k chemické změně. Může nastávat přenosem energie na molekulu zhášeče, která ji následně rozptyluje do okolního rozpouštědla. Tento mechanismus se označuje fyzikální zhášení (během reakce není kyslík spotřebováván) a takto působí např. β -karoten, azid sodný či některé komplexy přechodných kovů^{4,11,39,40,41}. Zhášení může probíhat také chemickou reakcí, tj. oxidací reaktantu (chemické zhášení). Jako chemické zhášeče se často využívají akceptory jako např. histidin, který reaguje za vzniku příslušného endoperoxidu, 2,5-dimethylfuran (Schéma 9), tryptofan, kyselina močová nebo 1,4-diazabicyklo[2.2.2]oktan (DABCO)^{4,42}.

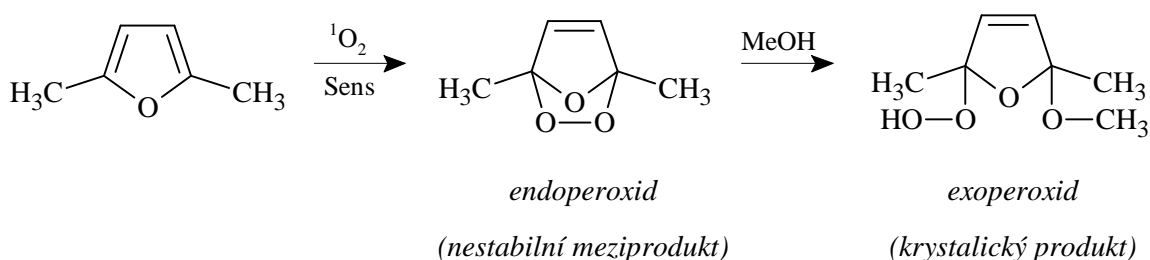


Schéma 9

Často používaným způsobem, jak diagnostikovat účast $^1\text{O}_2$ v reakci, je použití D_2O místo H_2O . Doba života singletového kyslíku je obecně v deuterovaných rozpouštědlech několikanásobně vyšší než v nedeuterovaných. V D_2O je 16× vyšší oproti H_2O (Tab. I) a pravděpodobnost chemické reakce je tedy vyšší. Přítomnost $^1\text{O}_2$ indikuje zvýšení reakční rychlosti nebo vyšší výtěžek reakčních produktů.

Je-li pro detekci $^1\text{O}_2$ použita látka barevná, lze využít tzv. **odbarvovacích „bleaching“ metod** detekce. Ty jsou jedny z nejběžnějších, především pro reakce v roztocích. Odbarvovací metody jsou založeny na skutečnosti, že během reakce s $^1\text{O}_2$ se úměrně jeho množství snižují absorpční pásy barevného substrátu. Jako substráty jsou

většinou využívány látky tvořené systémem konjugovaných dvojných vazeb, se kterými $^1\text{O}_2$ reaguje za vzniku endoperoxidů či hydroperoxidů. Během reakce dochází k porušení systému delokalizovaných vazeb chromoforového centra, a zároveň k odbarvení substrátu. Reakce lze jednoduše sledovat spektrofotometricky.

V literatuře je popsána řada odbarvovacích metod. Pro stanovení $^1\text{O}_2$ např. v některých nevodných rozpouštědlech se doporučuje použití reakce 1,3-difenylisobenzofuranu (DPBF) sledované poklesem absorbance při 440 nm^{43} . Ve vodném prostředí může být jako substrát použit např. 1,3-bis[4-(9-karboxynonyl)fenyl]-5,6-dimethyl-4,7-dihydroisobenzofuran, tryptofan, kyselina močová nebo N,N'-dimethyl-*p*-nitrosoanilin (RNO)⁴⁴. Reakce RNO s $^1\text{O}_2$ se používá i pro biologická prostředí. Pokles absorpčního pásu RNO při $\lambda = 440\text{ nm}$ je přímo úměrný celkovému množství generovaného $^1\text{O}_2$. Během reakce je nutná přítomnost histidinu nebo imidazolu, jejichž přechodný endoperoxid způsobuje měřené odbarvení.

Příkladem vhodných fluorescenčních činidel jsou sloučeniny odvozené od fluoresceinu. Například 6-hydroxy-9-(3-karboxy-9,10-dimethyl-2-anthryl)-3*H*-xanthen-3-on (DMAX) reaguje s $^1\text{O}_2$ na odpovídající endoperoxid (Schéma 10). Zatímco výchozí DMAX je slabě fluoreskující látkou, jeho endoperoxid vykazuje intenzivní fluorescenci^{4,45,46}.

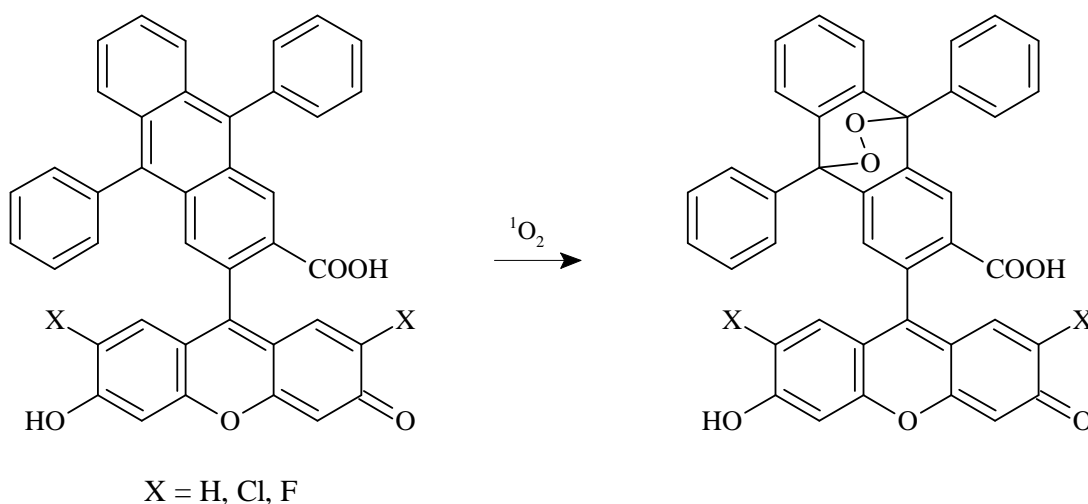


Schéma 10

Vhodným komerčním činidlem je 1-((*E*)-2-methoxyvinyl)pyren, který reakcí s $^1\text{O}_2$ tvoří dioxetanový meziprodukt rozkládající se na pyren-1-karbaldehyd spolu s chemiluminiscencí při $\lambda = 465 \text{ nm}$ (Schéma 11)^{4,47}.

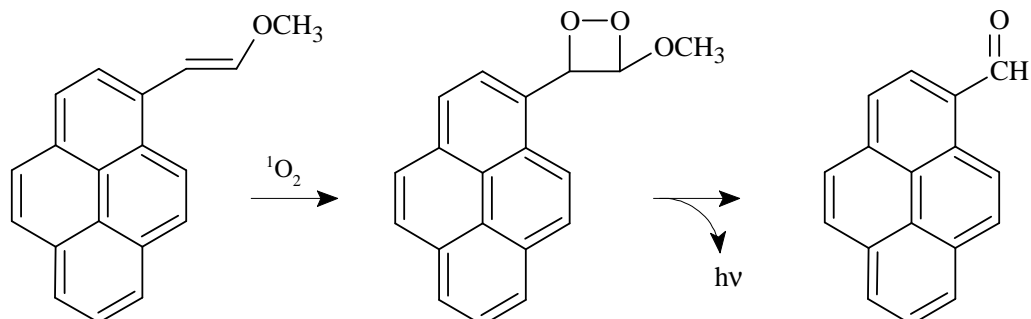
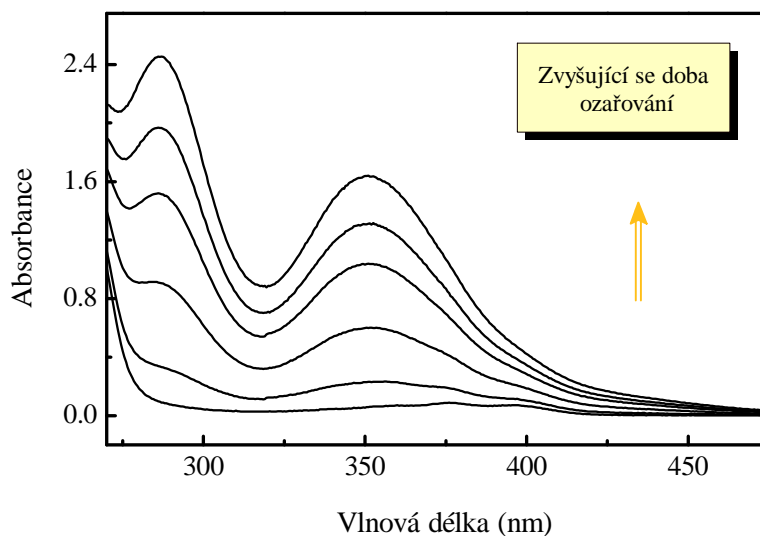


Schéma 11

K diagnostice $^1\text{O}_2$ je možné použít i reakce založené na *vzniku specifických produktů*. Tak je tomu např. u cholesterolu, který reaguje s $^1\text{O}_2$ specificky za vzniku 5-hydroperoxy-5 α -cholest-6-en-3 β -olu, 6 α -hydroperoxycholest-4-en-3 β -olu a 6 β -hydroperoxycholest-4-en-3 β -olu, zatímco reakcí s kyslíkem v základním stavu vznikají jiné hydroperoxidové produkty⁴⁸. Tato specifita činí cholesterol efektivním indikátorem $^1\text{O}_2$ *in situ* v biologickém prostředí, kde může být použít jiných detekčních technik problematické.

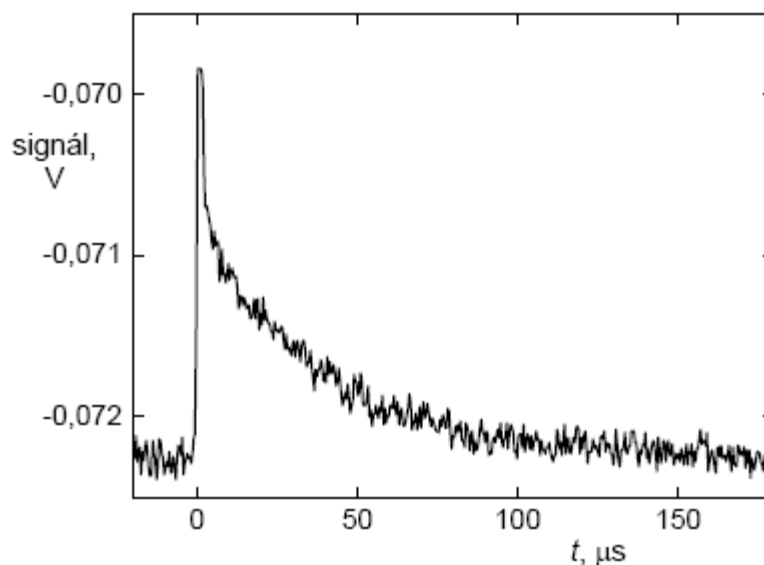
Další z metod, kterou je možné využít ve vodném prostředí, je *jodidová metoda*^{49,50}. Tato poměrně jednoduchá a citlivá metoda je založena na reakci singletového kyslíku s jodidovým anionem I^- , při níž vzniká složitým mechanismem trijodidový anion I_3^- . Jako katalyzátor zde vystupuje $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$. Trijodidový anion absorbuje v blízké ultrafialové oblasti a jeho tvorbu lze sledovat spektrofotometricky jako nárůst absorpčního pásu při $\lambda = 351 \text{ nm}$ i za podmínek vysokého přebytku substrátu (I^-) (Obr. 4). Nevýhodou metody je její nízká specifita, a naopak výhodou je její jednoduchost a vysoká citlivost.



Obr. 4 Absorpční spektrum I_3^- v přítomnosti sensitizery v jodidovém detekčním čínidle. Doba ozařování vzorku polychromatickým viditelným zářením je znázorněna šipkou.

Elegantní, i když instrumentálně náročnou metodou detekce 1O_2 je využití **elektronové paramagnetické rezonance (EPR)**. Metoda využívá reakce 1O_2 s neradikálovou sloučeninou za vzniku poměrně stabilního radikálového produktu (spinový záchyt). Na stanovení 1O_2 se používá 2,2,6,6-tetramethylpiperidin a jeho deriváty (např. 2,2,6,6-tetramethylpiperidin-4-ol, 2,2,6,6-tetramethyl-4-piperidon). Vznikající nitroxidový radikál dává EPR spektrum se třemi liniemi, jejichž intenzita je úměrná koncentraci 1O_2 v roztoku^{4,51}.

Vedle chemických metod lze k detekci 1O_2 použít řadu fyzikálních metod. Dnes již poměrně často využívanou fyzikální metodou, kterou lze s výhodou využít pro detekci singletového kyslíku jak ve stavu $O_2(^1\Delta_g)$, tak ve stavu $O_2(^1\Sigma_g^+)$ v kapalně fázi, je měření **fosforescence 1O_2** . Tato metoda je založena na monitorování odpovídajících radiačních přechodů uvedených v tabulce I a na Obr. 1. Nejpoužívanější je časově rozlišená detekce fosforescence přechodu $O_2(^1\Delta_g) \rightarrow O_2(^3\Sigma_g^-)$ při $\lambda = 1270$ nm (Obr. 5)^{52,53}. Za podmínek relativně dlouhé doby života excitovaného stavu $O_2(^1\Delta_g)$ nebo jeho vysoké koncentrace v roztoku interagují dvě molekuly za vzniku emisních pásů při $\lambda = 634$ nm a $\lambda = 703$ nm. Tyto pásy pocházejí z přechodů bimolekulárních párových stavů $(^1\Delta_g)_2 \rightarrow (^3\Sigma_g^-)_2$. Dále lze monitorovat fluorescenční přechod z $^1O_2(^1\Sigma_g)$ při $\lambda \sim 1925$ nm a fosforescenční přechod při $\lambda \sim 765$ nm⁶.



Obr. 5 Fosforescence $^1\text{O}_2$ měřená při $\lambda = 1270 \text{ nm}$, excitace Pd(II)-5,10,15,20-meso-tetrakis(4-sulfonátófenyl)porfyrinu v 0.02 M fosfátovém pufru- D_2O při $\lambda = 408 \text{ nm}$.⁴

Další možnost, jak spektrálně monitorovat $^1\text{O}_2$, je **měření absorpce $^1\text{O}_2(^1\Delta_g)$ v IČ oblasti**. Podobně jako fluorescenci přechodu $^1\text{O}_2(^1\Sigma_g^+) \rightarrow ^1\text{O}_2(^1\Delta_g)$ lze také měřit opačný proces, odpovídající absorpci $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ ⁶. Poloha maxima absorpčního pásu výrazně závisí na rozpouštědle.

Mezi fyzikální metody rovněž patří **fototermální techniky**. Ty jsou založené na uvolňování absorbované energie ve formě tepla do okolí. Teplo uvolněné během neradiačních procesů excitovanou molekulou do okolního rozpouštědla způsobuje změny indexu lomu (metoda TRTL - Časově rozlišený „thermal lensing“) a vznik tlakového rázu (metoda LIOAS - „laser-induced optoacoustic spectroscopy“)⁵⁴.

Výhodou fyzikálních metod je možnost detekce vzniku a reakcí $^1\text{O}_2$ přímo, čímž odpadá vliv vedlejších reakcí s chemickými činidly. Na druhé straně spektrální metody jsou náročné na vybavení a vyžadují použití laserových zdrojů a speciálně konstruovaných detektorů.

1.1.6. Využití singletového kyslíku

Jak již bylo naznačeno, singletový kyslík je používán v organické syntéze jako silné a selektivně působící oxidační činidlo. První technicky významnou syntézou využívající $^1\text{O}_2$ byla oxidace α -terpinenu na askaridol, což je účinné anthelmintikum (Schéma 8). Oxidační reakce $^1\text{O}_2$ s olefiny se průmyslově využívá při výrobě chuťových a vonných látek. Příkladem je syntéza rosenoxidu oxidací citronellolu za použití bengálské červeně jako sensitizeru. Během reakce za redukčních podmínek vzniká nejprve odpovídající allylalkohol a následně po konverzi v kyselém prostředí cyklický terpenoid, který je významnou komponentou používanou při výrobě parfémů (Schéma 12)^{9,55}.

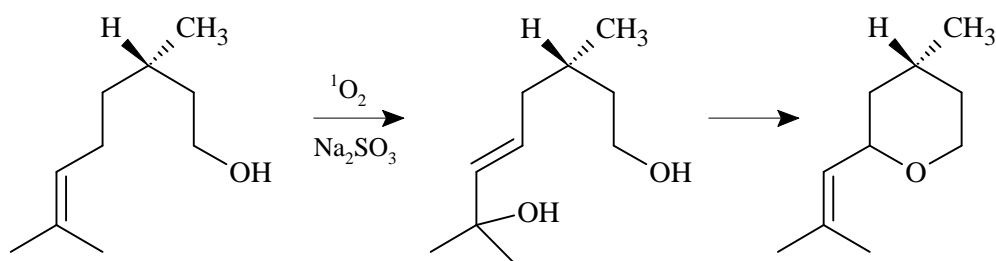
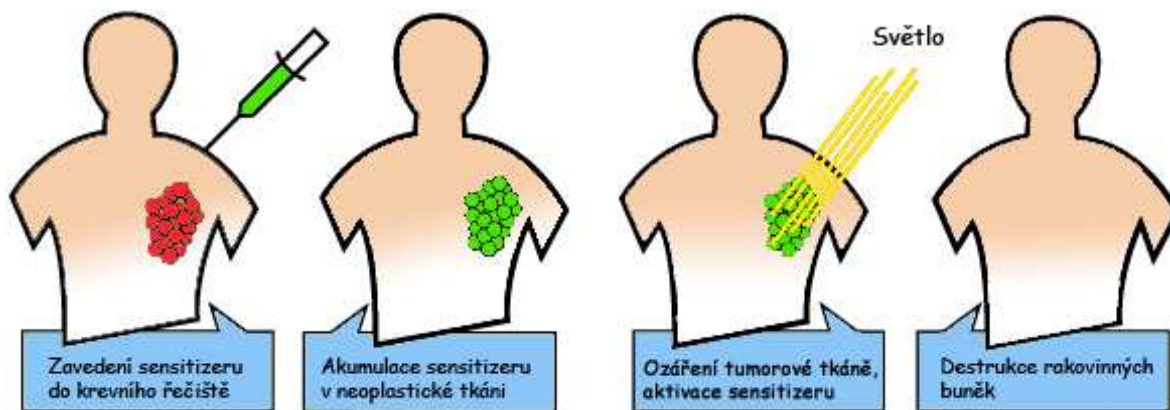


Schéma 12

Mezi další aplikace $^1\text{O}_2$ patří jeho uplatnění v chemickém kyslíko-jodovém laseru⁵⁶. Kyslíko-jodový laser (chemical oxygen–iodine laser, COIL) převádí energii chemické reakce na fotony a je založen na elektronovém přechodu mezi prvním elektronovým a základním stavem atomárního jodu $\text{I}(^2\text{P}_{1/2}) \rightarrow \text{I}(^2\text{P}_{3/2})$. Protože kontinuální laserová oscilace probíhá v blízké infračervené oblasti při vlnové délce 1,315 μm , je COIL chemickým laserem s nejkratší vlnovou délkou. V klasickém uspořádání je čerpání laseru dosaženo přenosem energie mezi $^1\text{O}_2$ a atomem jodu v základním stavu. Singletový kyslík vzniká reakcí plynného chloru a silně alkalického vodného roztoku H_2O_2 .

Fototoxicita $^1\text{O}_2$ „*in situ*“ generovaného fotosensitizovanou reakcí nalezla široké uplatnění ve fotobiologii, ve fotomedicíně při léčbě rakovinových onemocnění („photodynamic therapy“, PDT) nebo aterosklerosy, při inaktivaci bakterií a virů a vývoji nových insekticidů a herbicidů („photodynamic antimicrobial chemotherapy“, PACT).

Fotodynamická terapie je neinvazivní metoda léčby nejrůznějších typů rakoviny kombinovaným užitím viditelného či blízkého infračerveného světla a sensitizeru (Obr. 6). Využívá se zde skutečnosti, že některé sensitizery, především porfyrinové povahy, se v organismu specificky vážou na neoplastické tkáně. Tumorová tkáň s akumulovaným sensitizerem je následně ozářena světlem o vhodné vlnové délce (600-900 nm), umožňující průchod světla tkání. Světelným zdrojem bývají lasery, ale používají se i jiné světelné zdroje např. LED diody. Proběhne fotosensitizovaná reakce, při níž se tvoří silně cytotoxický krátcežijící (cca 4×10^{-6} s) $^1\text{O}_2$. Singletový kyslík, případně další reaktivní částice, vznikají přímo v tumoru a napadají především buněčné membrány ve svém bezprostředním okolí. Způsobí jejich oxidační destrukci, a tím i zánik rakovinných buněk, aniž by byla poškozována okolní zdravá tkáň^{4,9,11,13,14,15,16,57,58,59}.



Obr.6 Schématické znázornění průběhu fotodynamické léčby nádorových onemocnění

PDT se používá při léčbě kožních melanomů, rakoviny plic, mozku, ústní dutiny, jícnu, peritoneální dutiny, žaludku, střev, jater, močového měchýře, prostaty a děložního čípku^{11,60}. Fotodynamická metoda našla uplatnění také při léčbě degenerativních změn na sítnici, nemoci koronárních cév, chronického zánětu dásní a mikrobiálních infekcí^{11,60}.

Jak již bylo uvedeno, fotodynamicky generovaný $^1\text{O}_2$ je možno využít také pro fotodesinfekci. Fotodynamická inaktivace bakterií, virů, kvasinek a prvoků (PACT) je založena na stejném principu jako PDT^{11,61}. Celkový fototoxický efekt je zpravidla způsoben $^1\text{O}_2$, ale mohou k němu přispívat superoxidový anion-radikál O_2^- , hydroxylové radikály OH^\cdot , případně další radikály sensitizeru nebo jiných přítomných molekul. Zatímco při PDT se používají takřka výhradně porfyrinoidní sensitizery, pro PACT se používají

i fenothiazinová barviva (methylenová modř), aminoakridinová a xanthenová barviva (bengálská červěň). Perspektivní využití $^1\text{O}_2$ se objevuje v oblasti dezinfekce krve a krevní plasmy^{11,13,62}.

Singletový kyslík je využíván rovněž pro úpravu a čištění velkých objemů odpadních vod na úroveň pitné vody nebo alespoň na použití k zavlažování bez nebezpečí šíření infekcí. Použití $^1\text{O}_2$ k tomuto účelu umožňuje odstranění mikrobiálního znečištění i oxidativní degradaci organických polutantů např. barviv nebo fenolických látek. Pro výrobu nových herbicidů, pesticidů a insekticidů, lze rovněž s výhodou využít silně oxidačních a tedy cytotoxických účinků singletového kyslíku^{11,13,63,64}.

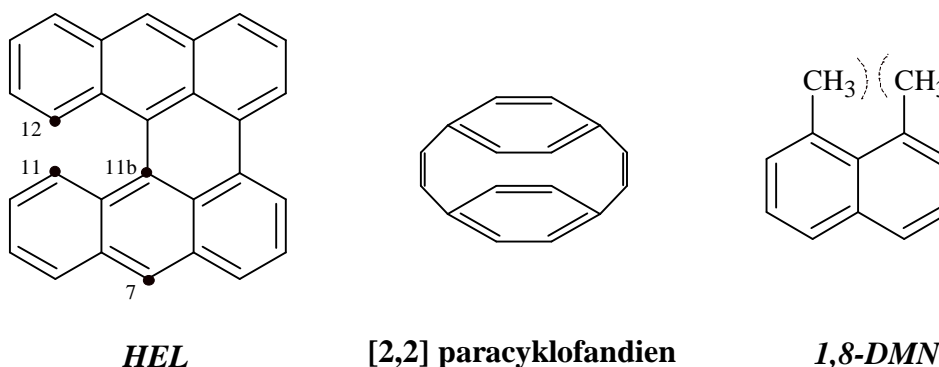
1.2. Akceptory / sekundární zdroje singletového kyslíku

1.2.1. Obecné vlastnosti akceptorů $^1\text{O}_2$

Jako akceptory singletového kyslíku se označují molekuly schopné při reakci s $^1\text{O}_2$ poskytnout specifický stabilní primární oxidační produkt. Ve většině případů se jedná o polycyklické aromatické sloučeniny, které při reakcích s $^1\text{O}_2$ vytvářejí endoperoxidy.

V literatuře bylo popsáno více než 400 endoperoxidů odvozených od uhlovodíků tvořených jedním až devíti benzenovými jádry. Většina z nich byla připravena fotosensitizovanou reakcí zahrnující [4+2] cykloadici $^1\text{O}_2$ na elektronově bohatých uhlících aromatického jádra. Avšak reaktivita jednotlivých sloučenin a stabilita vznikajících endoperoxidů se liší a je závislá na strukturních a sterických vlastnostech molekuly a na reakčních podmínkách³⁰.

Jeden z rozhodujících strukturních faktorů určující reaktivitu aromatických uhlovodíků vůči $^1\text{O}_2$ je elektronová hustota akceptoru. Ta je dána např. počtem aromatických kruhů v molekule substrátu. Z porovnání řady acenů (anthracen, tetracen a pentacen) je patrné, že reaktivita jednotlivých sloučenin vzrůstá přibližně o 2 řády s každým aromatickým jádrem. U neplanárních polycyklických aromatických uhlovodíků, je vývoj v reaktivitě složitější, avšak koreluje s π -delokalizační energií každého uhlovodíku^{30,65}. Jedna z nejreaktivnějších molekul, jejíž rychlostní konstanta [4+2] cykloadice s $^1\text{O}_2$ prakticky odpovídá difúzi ($k_r = 5 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$), je molekula heliatrenu (HEL, Obr.7)⁶⁶.



Obr. 7 Struktury vybraných aromatických uhlovodíků reagujících s $^1\text{O}_2$. HEL (heliatren), 1,8-DMN (1,8-dimethylnaftalen)

Dalším důležitým strukturním faktorem odrážejícím reaktivitu je substituce aromatické molekuly. Obecně platí, že rychlostní konstanta se zvyšuje s přítomností elektron-donorové skupiny v místě [4+2] cykloadice $^1\text{O}_2$, a to v pořadí $\text{H} < \text{C}_6\text{H}_6 < \text{CH}_3 \leq \text{OCH}_3$. Nesubstituované benzeny a naftaleny, na rozdíl od anthracenu a vyšších homologů acenenové řady, při reakci s $^1\text{O}_2$ selhávají³⁰. Například 1-methylnaftalen reaguje s $^1\text{O}_2$ na rozdíl od naftalenu samotného, který je prakticky nereaktivní. Podobně benzen, toluen, xylen nebo tri- a tetramethylbenzen nereagují s $^1\text{O}_2$, ale penta- a hexamethylbenzen poskytují odpovídající endoperoxidy jako primární oxidační produkty⁶⁷.

Důležitým sterickým faktorem, jež je parametrem jak reaktivity, tak regioselektivity [4+2] cykloadice $^1\text{O}_2$, je sterické napětí. Tak např. [2,2] paracyklofandien (Obr. 7), jehož benzenové kruhy jsou dostatečně deformované a dovolují tak reakci s $^1\text{O}_2$, dávají mono- a diendoperoxidy^{30,68}.

Vzájemná interakce mezi dvěma sousedními methylovými skupinami vázanými na polycyklický aromatický uhlovdík zvyšuje reaktivitu vůči $^1\text{O}_2$. To rovněž vysvětluje, proč je 1,8-dimethylnaftalen 4× reaktivnější než 1,5-isomer⁶⁹. Sterické efekty mohou také přispět k vysvětlení vyjímečné reaktivity HEL. Molekula HEL není planární. Vodíky na uhlíkových atomech 11 a 12 způsobují sterické bránění, které nutí dva benzenové kruhy ke zkroucení od roviny aromatického systému. Zkroucení způsobuje pnutí na dvojných vazbách na uhlících 7 a 11b, které jsou nepřítomné v molekule endoperoxidu. To vysvětluje vysokou reaktivitu HEL vůči $^1\text{O}_2$ ⁶⁶.

Na základě dřívějších experimentů se předpokládalo, že [4+2] cykloadice $^1\text{O}_2$ podobně jako analogická Diels-Alderova reakce, je prakticky nezávislá na použitém rozpouštědle^{30,70}. Novější studie zahrnující širokou paletu rozpouštědel však odhalily, že předpoklad je nesprávný. Např. rychlostní konstanty oxidace 1,4-dimethylnaftalenu jsou závislé na zvoleném rozpouštědle a rostou více než o 2 řády od cyklohexanu k formamidu. Rozpouštědlový efekt je možné vysvětlit na základě znalosti solvatochromních parametrů zahrnujících polaritu, polarizibilitu (π^*) a Hildebrandův rozpouštědlový parametr (δ_{H})^{30,71}.

1.2.2. Mechanismus [4+2] cykloadice $^1\text{O}_2$

Mechanismu [4+2] cykloadice $^1\text{O}_2$ probíhajícímu na konjugovaných systémech byla v minulosti věnována jen malá pozornost. Nedávná teoretická studie adice $^1\text{O}_2$ na benzen však objasnila rozdíly mezi [4+2] cykloadicí $^1\text{O}_2$ na aromatických sloučeninách a Diels-Alderovou reakcí^{30,72}. Jednokrokový součinný mechanismus zahrnuje tvorbu symetrické transiční struktury a je popsán reakčním schématem 13.

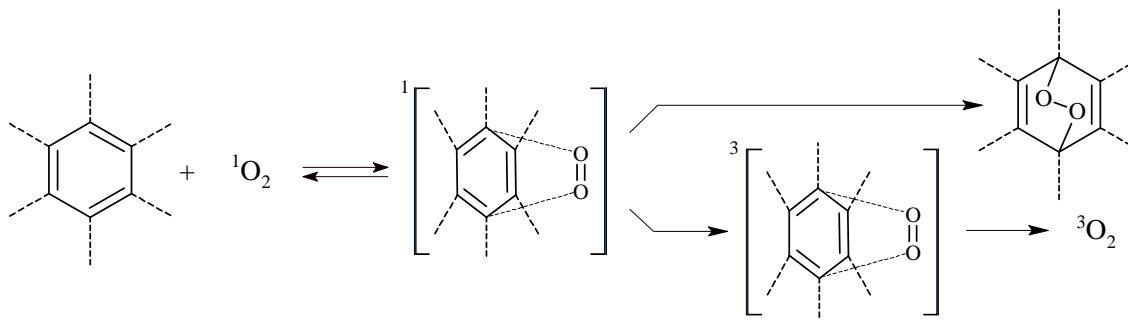


Schéma 13

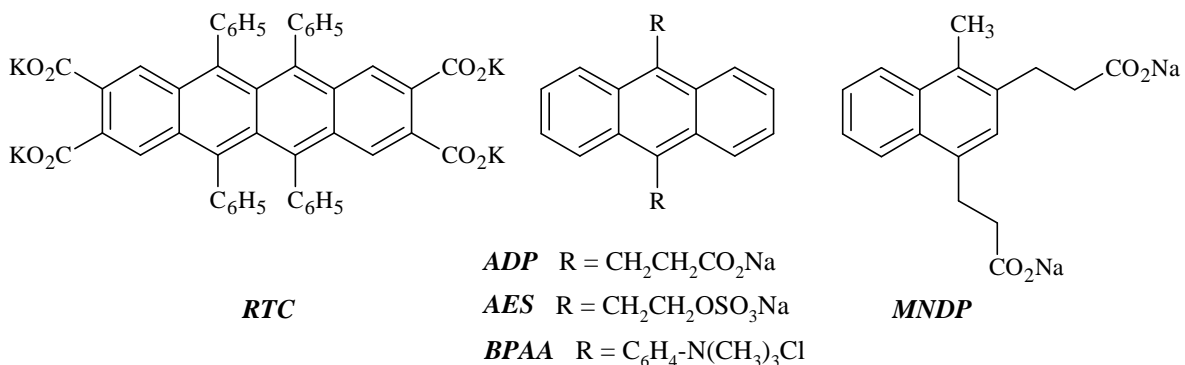
První krok reakce zahrnuje reverzibilní tvorbu exciplexu v singletovém stavu. Komplex vykazuje charge-transfer charakter díky silnému elektrofilnímu charakteru $^1\text{O}_2$. Následně solvovaný exciplex buď kolabuje a vzniká odpovídající endoperoxid (chemické zhášení), nebo podléhá spinově zakázanému mezisystémovému přechodu na tripletový stav komplexu, který disociuje na $^3\text{O}_2$ a původní molekulu (fyzikální zhášení)^{3,30,33,71,72}.

1.2.3. Nejčastěji využívané akceptory $^1\text{O}_2$

Mnoho zajímavých procesů zahrnujících $^1\text{O}_2$ probíhá ve vodném prostředí (viz kapitola 1.1.6.). Pro jejich sledování lze vedle měření fosforescence při $\lambda = 1270$ nm (viz kapitola 1.1.5.) využít aromatické akceptory $^1\text{O}_2$. Vhodný akceptor $^1\text{O}_2$ by měl splňovat tři základní předpoklady: (i) dobrou rozpustnost ve vodě (ii) vysokou reaktivitu vůči $^1\text{O}_2$ a (iii) malou reaktivitu vůči $^3\text{O}_2$ a jiným kyslíkovým derivátům (např. O_2^- nebo H_2O_2)⁷³.

Za vhodných podmínek mohou příslušné akceptory vychytat většinu dostupného $^1\text{O}_2$, dokonce i za podmínek nízkého stupně generace, neboť koncentrace vznikajícího aromatického endoperoxidu je úměrná množství $^1\text{O}_2$ generovaného při reakci. Typickými

příklady vedle již zmíněného RNO (viz kapitola 1.1.5.) jsou deriváty odvozené od rubrenu, anthracenu a naftalenu (Obr. 8)^{24,30,73}.



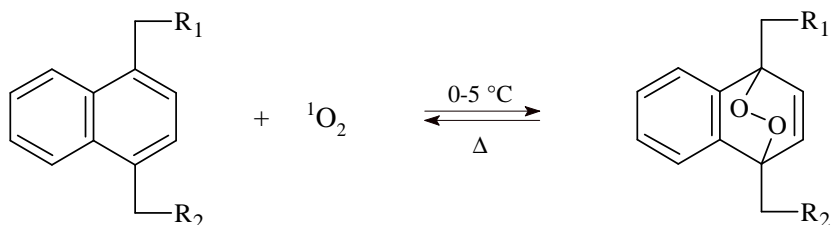
Obr. 8 Příklady některých nejčastěji využívaných vodorozpustných aromatických akceptorů ¹O₂. **RTC** (2,3,8,9-rubrentetrakarboxylát tetradraselný), **ADP** (3,3'-(anthracen-9,10-diyl)dipropionát disodný), **AES** (3,3'-(anthracen-9,10-diyl)diethansulfonát disodný), **BPAA** (bis (9,10-anthracen-(4-trimethylfenylammonium)dichlorid), **MNDP** (3,3'-(4-methyl-1,3-naftyliden)dipropionát disodný)

Například rubrenový derivát **RTC** (2,3,8,9-rubrentetrakarboxylát tetradraselný) je ve vodě rozpustný a efektivně reaguje s ¹O₂. Vznik endoperoxidu lze sledovat pomocí UV-Vis spektroskopie jako pokles absorpčního pásu při λ = 620 nm (ztráta červeného zabarvení). Tvorba oxoproduktu je však složitá a vznikající produkt je velmi fotolabilní. Absorpce **RTC** ve viditelné oblasti komplikuje jeho využití pro detekci ¹O₂ v kombinaci s barevnými sensitizery^{24,30,74}.

Mezi nejčastěji používané anthracenové akceptory ¹O₂ patří **ADP** (3,3'-(anthracen-9,10-diyl)dipropionát disodný)^{71,75}, **AES** (3,3'-(anthracen-9,10-diyl)diethansulfonát disodný)⁷³ a **BPAA** (bis (9,10-anthracen-(4-trimethylfenylammonium)dichlorid)⁷⁶, jejichž struktury jsou uvedeny na Obr.8. Příprava sloučenin je sice jednodušší, avšak v porovnání s **RTC** jsou tyto anthracenové deriváty méně reaktivní vůči ¹O₂. Díky přítomnosti polárních skupin jsou vodorozpustné a vzniklé endoperoxidy jsou stabilní^{30,77}.

Také naftalenové deriváty reagují s ¹O₂ pomaleji. Jak již bylo uvedeno, naftalen samotný nereaguje s ¹O₂, a proto je třeba přítomnosti jedné, ale spíše dvou elektron-donorových skupin v pozicích 1,4 na naftalenovém jádře. Přítomnost těchto skupin

výrazně podporuje [4+2] cykloadici $^1\text{O}_2$. Nejjednodušší a jedny z nejčastěji využívaných naftalenových akceptorů jsou deriváty obsahující propionátové skupiny NDP (3,3'-(1,4-naftyliden)dipropionát disodný), MNP (3-(4-methyl-naftyl)propionát sodný) a MNDP (3,3'-(4-methyl-1,3-naftyliden)dipropionát disodný) (Schéma 14)^{25,30}.



NDP / NDPO₂ R₁, R₂ = CH₂CO₂Na

MNP / MNPO₂ R₁ = CH₃, R₂ = CH₂CO₂Na

MNEA / MNEAO₂ R₁ = CH₃, R₂ = CH₂N(CH₃)₃Cl

DHNP / DHNPO₂ R₁, R₂ = CH₂CONHCH₂CHOHCH₂OH

Schéma 14

Vedle nižší reaktivity s $^1\text{O}_2$ oproti anthracenovým derivátům mají naftalenové akceptory $^1\text{O}_2$ další specifické rysy: neabsorbují ve viditelné oblasti spektra; tvorba endoperoxidu je charakteristická a jejich reakce s $^1\text{O}_2$ mohou být využity ke kvantifikaci $^1\text{O}_2$ generovaného při fotosensitizované reakci s použitím barevného senzitizeru. Vzniklé endoperoxidy jsou méně stabilní oproti anthracenovým endoperoxidům a přítomnost endoperoxidické vazby lze snadno prokázat zahřátím, kdy dochází ke zpětné reakci za vzniku původní sloučeniny a uvolnění kyslíku (viz dále). Dalšími efektivními akceptory $^1\text{O}_2$, využívanými v biologických médiích kvůli jejich zvýšené afinitě k polynukleotidům, jsou naftalenové deriváty mající v 1,4-polohách kvartérní amoniovou skupinu MNEA (N,N,N-trimethyl(2-(4-methyl-naftalen-1-yl)ethyl)ammonium chlorid) nebo neionické hydrofilní skupiny DHNP (N,N'-bis(2,3-dihydroxypropyl)-3,3'-(naftalen-1,4-diyl)dipropanamid) (Schéma 14)^{30,78}.

Vedle vodorozpustných akceptorů $^1\text{O}_2$ bývají podobně využívány i ve vodě nerozpustné deriváty jako 1,4-dimethylnaftalen (DMN)^{78,79,80}, 2,5-dimethylfuran (DMF)⁴², 9,10-difenylantracen (DPA)⁸¹ a 1,3-difenylisobenzofuran (DPBF)^{43,82}.

1.2.4. Disociace aromatických endoperoxidů: sekundární zdroje $^1\text{O}_2$

Pro sledování mechanismů/dějů, na kterých se podílí $^1\text{O}_2$, není vždy možné využít fotosensitizovanou reakci ani jinou z výše uvedených metod generace $^1\text{O}_2$. V takovém případě se nabízí možnost využít aromatické endoperoxidy, které mohou zahřátím na nepřiliš vysokou teplotu generovat známé kvantum čistého $^1\text{O}_2$ a odpovídající uhlovodík. Tyto sloučeniny mohou být proto označeny jako sekundární zdroje či přenašeče $^1\text{O}_2$.

Aromatické endoperoxidy se působením tepla (termolýzou) nebo záření (fotolýzou) rozkládají. Během obou těchto přeměn si mohou konkurovat dva typy reakcí (Schéma 15)^{30,83}. Buď je hlavní reakční cestou *cykloneverz*e, resp. zpětná reakce k [4+2] cykloadici, vedoucí k původnímu substrátu a kyslíku v singletovém nebo tripletovém stavu, nebo dochází k *homolytickému štěpení* peroxidické vazby. Následuje přesmyk na více či méně stabilní diepoxidy nebo dekompozice poskytující hydroxyketony či chinony. Vzájemné zastoupení reakčních procesů je závislé na struktuře endoperoxidu a na experimentálních podmínkách reakce.

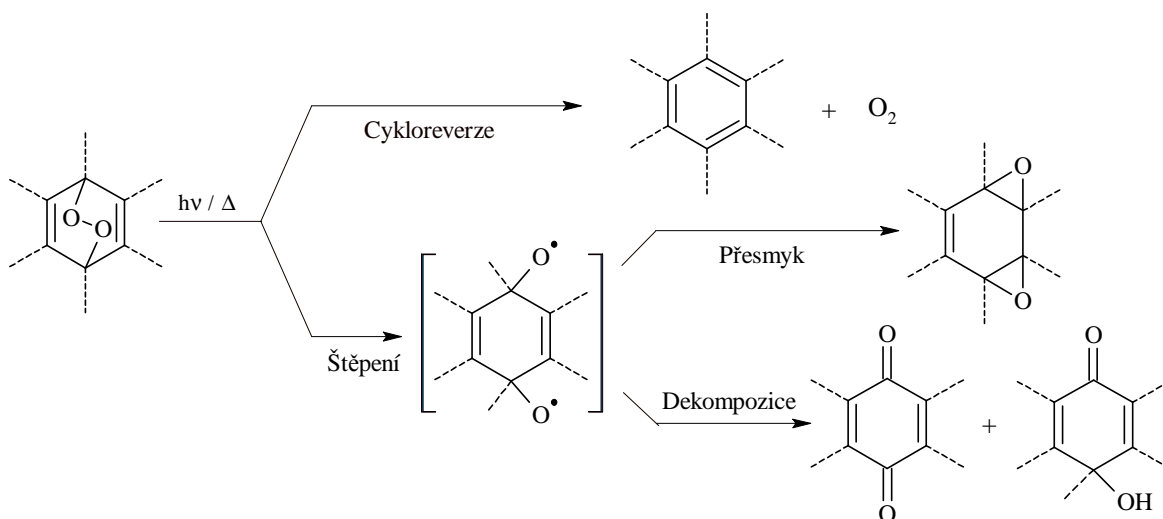
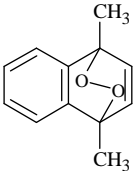
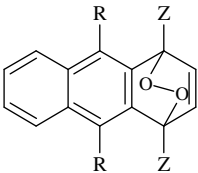
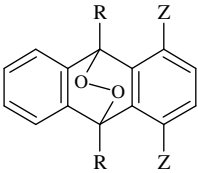
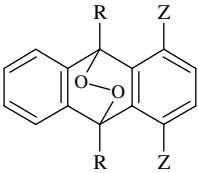
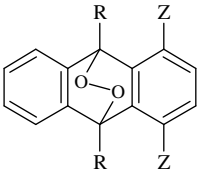


Schéma 15

Při termolýze endoperoxidů může být poměr mezi cykloneverzí a štěpením odhadnut z hodnot relativních aktivačních energií^{83,84} (Tab. IV). Obecně se aktivační enthalpie ΔH^\ddagger zvyšuje od naftalenových k anthracenovým endoperoxidům majícím endoperoxidickou vazbu na uhlících v polohách 1,4, a dále pak na uhlících v polohách 9,10. Cykloneverze je výrazně upřednostňována před štěpením v případě přítomnosti

aromatických skupin na uhlících 9,10 spojených endoperoxidickou vazbou (např. u DPAO₂ a vyšších homologů řady acénů). Výtěžky ¹O₂ jsou závislé také na hodnotách aktivační entropie ΔS[#] ^{83,84}. Jak je patrné z tabulky IV, hodnoty ΔS[#] pohybující se kolem nuly odpovídají vysokým výtěžkům ¹O₂, na rozdíl od vyšších pozitivních hodnot ΔS[#], které odpovídají uvolňování nižšího procenta singletového kyslíku.

Tabulka IV Aktivační parametry termolýzy vybraných aromatických endoperoxidů ^{30,83,84}.

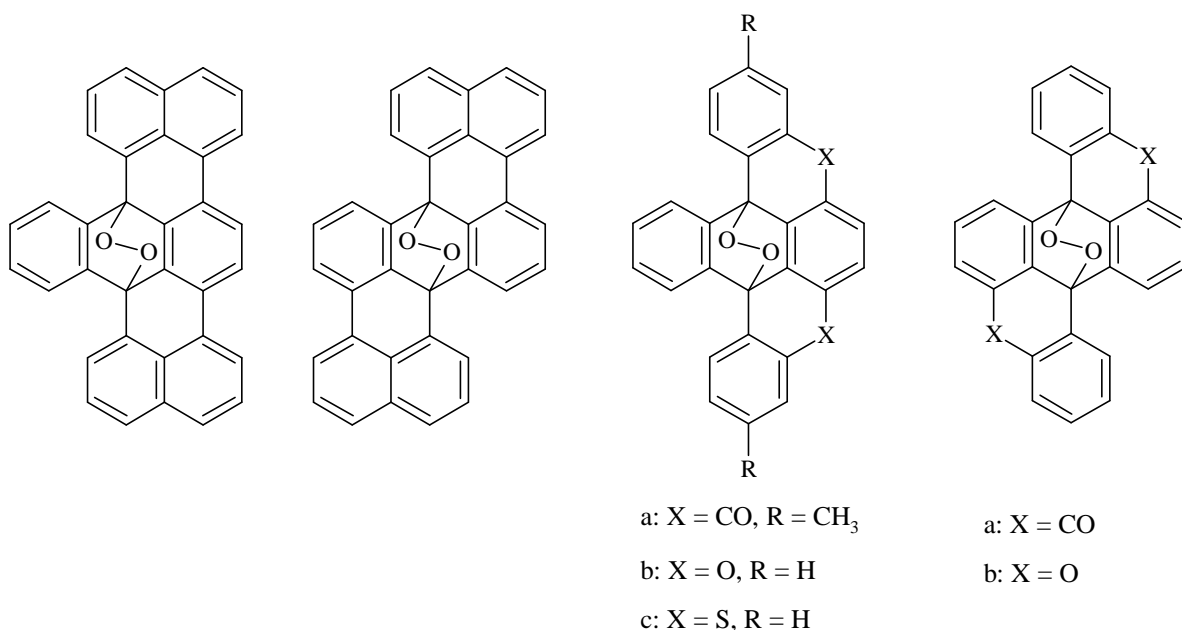
Endoperoxid	ΔH [#] (kJ.mol ⁻¹)	ΔS [#] (J.K ⁻¹ .mol ⁻¹)	¹ O ₂ (%)
 $DMNO_2$	101.1 ± 1	8.4 ± 4	76 ± 1
 R = C ₆ H ₅ Z = CH ₃	124.6 ± 1	-7.5 ± 3	92 ± 1
 R = C ₆ H ₅ Z = OCH ₃	101.1 ± 1	-1.3 ± 3	95 ± 5
 R = C ₆ H ₅ Z = H	135.8 ± 1	40.1 ± 2	32 ± 1
 R = C ₆ H ₅ Z = CH ₃	132.9 ± 1	30.9 ± 3	52 ± 4

Při fotolýze aromatických endoperoxidů soutěží stejné primární reakce jako při jejich termolýze. Například ozáření endoperoxidu DPAO₂ excitační vlnovou délkou vyšší než 250 nm ($\lambda_{exc} > 250$ nm) vede k cykloreverzi poskytující původní sloučeninu a kyslík, ale $\lambda_{exc} > 400$ nm produkuje po štěpení peroxidické vazby diepoxid, který podléhá následným ireverzibilním reakcím ^{30,85,86}.

1.2.5. Typy sekundárních zdrojů $^1\text{O}_2$

Sekundární zdroje $^1\text{O}_2$ mohou být rozděleny do několika skupin: vysoce reverzibilní fotochromatické systémy, hydrofobní sekundární zdroje $^1\text{O}_2$ a vodorozpustné sekundární zdroje $^1\text{O}_2$. Vedle těchto skupin existují ještě sekundární zdroje $^1\text{O}_2$ kotvené na polymerních nosičích.

Do skupiny vysoce reverzibilních fotochromních systémů patří sloučeniny odvozené od struktury 9,10-difenylnanthracenu (DPA) (Obr. 9)^{30,87,88}.



Obr. 9 Struktury některých vysoce reverzibilních sekundárních zdrojů $^1\text{O}_2$ odvozených od endoperoxidu 9,10-difenylnanthracenu (DPAO₂)

Planární anthracenové deriváty s rozsáhlým π elektronovým systémem jsou barevné látky vykazující intenzivní absorpci a fluorescenci. S $^1\text{O}_2$ reagují rychle za tvorby odpovídajících nefluoreskujících, bezbarvých a pozoruhodně termicky stabilních endoperoxidů. Především deriváty obsahující karbonylové skupiny vytvářejí sloučeniny s mimořádnými vlastnostmi. Například červeně a modře zbarvené karbonylové deriváty tvoří stabilní endoperoxidy mající poločasy rozpadu při 20 °C až 880 let^{87,88}.

Další skupinou látek jsou hydrofobní sekundární zdroje $^1\text{O}_2$ využívané především pro studie v organických rozpouštědlech. V posledních letech hojně využívanou

sloučeninou je endoperoxid odvozený od 1,4-dimethylnaftalenu (DMNO₂)^{30,89,90}. Tento naftalenový derivát má řadu výhod: jeho prekurzor je komerčně dostupný, vysoce reaktivní vůči ¹O₂ a odpovídající endoperoxid DMNO₂ je poměrně stabilní sloučeninou. Za mírných podmínek (t_{1/2} ≈ 5 hod při 25 °C) je DMNO₂ schopen uvolňovat kyslík z přibližně 75 % v jeho singletovém stavu. Díky těmto vlastnostem může být využíván jako standardní zdroj ¹O₂ k potvrzení účasti ¹O₂ ve fotochemických procesech a k výpočtu zhášecích rychlostních konstant organických substrátů^{89,91,92}. V některých případech může být stabilita tohoto naftalenového derivátu nedostačující. Zde lze pak využít již dříve zmiňovaný DPAO₂, jehož stabilita je vyšší (až do teplot okolo 100 °C). Procento ¹O₂ uvolněného během termolýzy je však nižší, okolo 32 %^{83,93}.

Rozpustnost sekundárních zdrojů ¹O₂ ve vodě je základním kritériem pro aplikace v biologických systémech. Tomuto problému byla věnována řada studií a byly vyvinuty generátory ¹O₂ založené na termolýze vodorozpustných anthracenových a především naftalenových endoperoxidů. Nejjednoduššími a nejčastěji v literatuře zmiňovanými endoperoxidy jsou naftalenové deriváty obsahující propionátové skupiny, NDPO₂ (endoperoxid 3,3'-(1,4-naftyliden)dipropionátu disodného)^{19,30,71,94} a MNPO₂ (endoperoxid 3-(4-methyl-1-naftyl)propionátu sodného)^{19,30,71,94,95} odvozené od příslušných akceptorů (Schéma 14, viz kap. 1.2.3.). Ty jsou používány jako sekundární zdroje ¹O₂ pro biologické systémy. Bylo prokázáno, že ¹O₂ generovaný termickou dekompozicí NDPO₂ deaktivuje mimobuněčné viry a blokuje činnost DNA-polymerasy. Tím dochází k poruchám v replikaci DNA¹⁹. Další látkou, u které byla prokázána schopnost prostupovat buněčnou membránou a deaktivovat některé typy virů je endoperoxid DHNPO₂ (endoperoxid N,N'-bis(2,3-dihydroxypropyl)-3,3'-(naftalen-1,4-diyl)dipropanamidu)^{19,77,96,97} (Schéma 14). Bylo prokázáno, že všechny známé vodorozpustné naftalenové endoperoxidy uvolňují přibližně 50 % kyslíku v jeho singletovém stavu, a to již při nízkých teplotách (30-50 °C). Jejich termolýza se řídí kinetikou prvního řádu a je charakterizována poločasem rozpadu t_{1/2} okolo 23 min při T = 37 °C¹⁹. Při teplotě -80 °C mohou být skladovány po dobu několika měsíců.

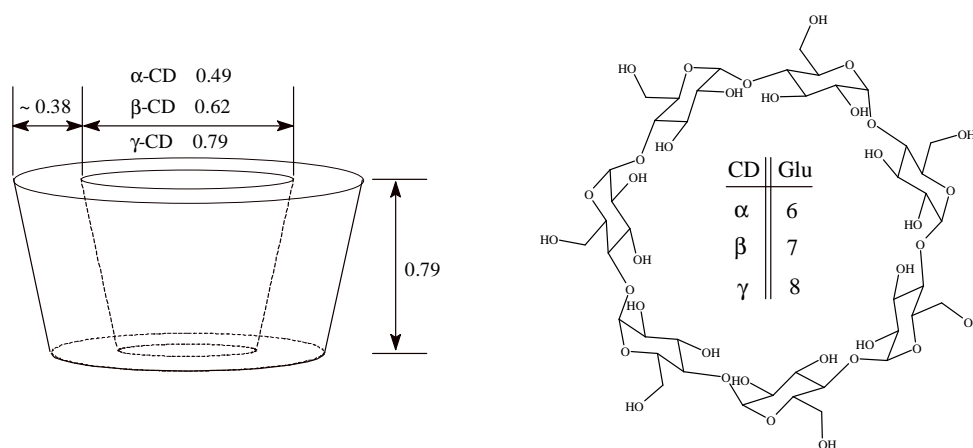
Anthracenové endoperoxidy jsou obecně stabilnější než naftalenové endoperoxidy, a to až do teplot okolo 80 °C. Výtěžky ¹O₂ jsou však v porovnání s naftalenovými endoperoxidy nižší (okolo 30 %)^{83,93}.

Jelikož termolýzou endoperoxidů je uvolňován pouze kyslík v tripletovém a singletovém stavu, a to v definovaném množství/poměru (bez přítomnosti dalších kyslíkových částic), je možné tyto látky použít pro luminiscenční experimenty nebo k určení fyzikálních a chemických rychlostních konstant zhášení $^1\text{O}_2$ měřením úbytku vodorozpustných substrátů.

1.3. Cyklodextriny

1.3.1. Obecné vlastnosti cyklodextrinů

Cyklodextriny (CD) jsou cyklické, neredukující oligosacharidy složené z šesti (α -CD), sedmi (β -CD) a osmi (γ -CD) či většího počtu α -1,4-glukopyranosových jednotek v D(+) absolutní konfiguraci a židličkové konformaci. Svým tvarem připomínají dutý kornout s různou velikostí kavity, jež odpovídá počtu navázaných glukosových jednotek v makrocyklu⁹⁸. Tvar a rozměry základních cyklodextrinů jsou uvedeny na Obr. 10. Krystalová struktura nativního β -CD je zobrazena na Obr 11.

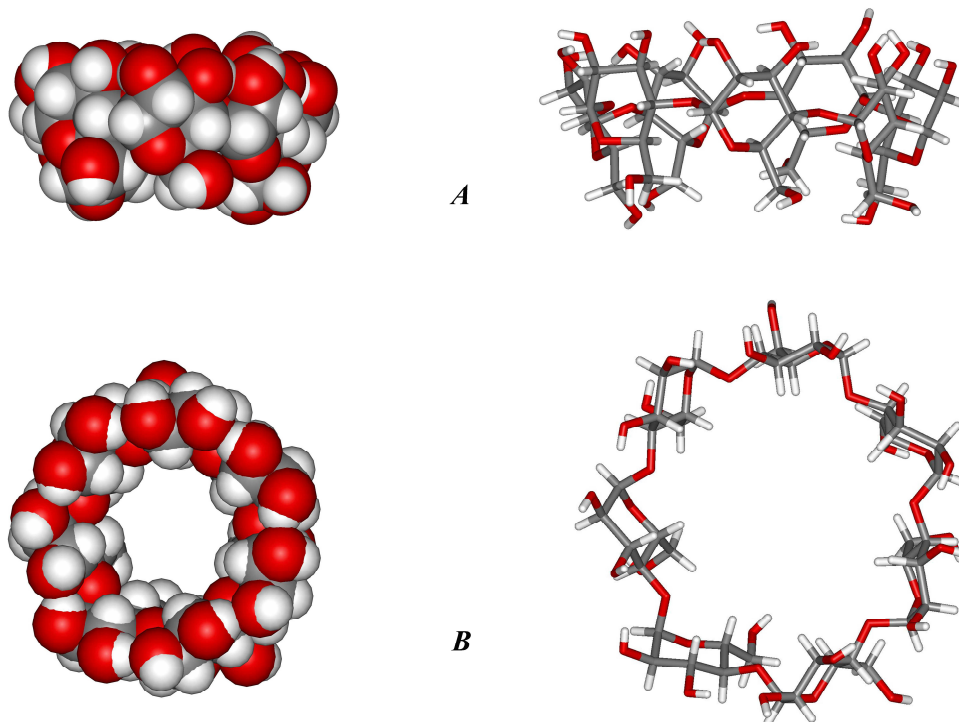


Obr. 10 Molekulární rozměry a struktura nejběžnějších nativních α -, β -, γ -CD

Cyklodextriny lze charakterizovat jako molekuly s hydrofobní kavitou a hydrofilními skupinami na povrchu. Na vnějším širším okraji („secondary face“) cyklodextrinové kavity se nacházejí sekundární hydroxylové skupiny navázané na uhlíkových atomech v polohách 2 a 3. Užší okraj („primary face“) je obklopen primárními hydroxyly v poloze 6, které mohou rotovat a způsobují tak částečné uzavření užšího konce kavity. Dutina je tvořena vodíkovými atomy, C-H vazbami a glykosidickými kyslíkovými můstky C-O-C, a má tudíž lipofilní charakter. Nevazebné elektronové páry kyslíkových můstků směřují dovnitř dutiny, a tím způsobují její vysokou elektronovou hustotu⁹⁸.

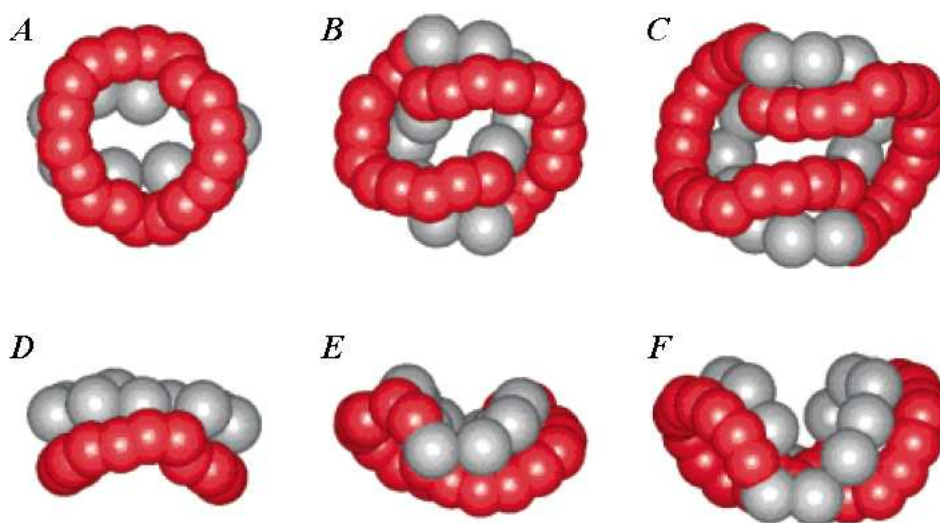
Struktura α -, β - i γ -CD cyklodextrinů je spíše rigidní, což je dáno přítomností pásu intramolekulárních vodíkových vazeb mezi hydroxylovými skupinami na uhlíkových

atomech C-2 a C-3 sousedních glukosových jednotek. Se vzrůstajícím počtem jednotek v makrocyklu od α - k γ -cyklodextrinu se vzdálenost těchto hydroxylových skupin zkracuje, čímž pevnost vodíkových vazeb roste^{98,99,100}.



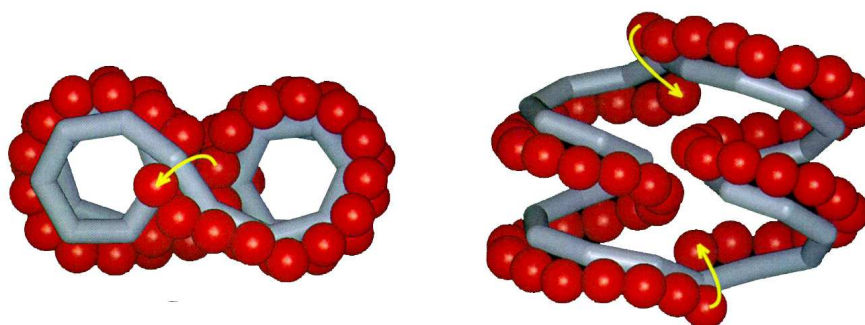
Obr. 11 CPK model a tyčkové znázornění krystalové struktury β -CD (šedá – atomy uhlíku, bílá – atomy vodíku, červená – atomy kyslíku). Pohled z boku (A) a shora (B)¹⁰¹.

Se vzrůstajícím počtem glukosových jednotek u větších cyklodextrinů vzrůstá pnutí makrocyklů, které již není dostatečně kompenzováno cyklickým pásem vodíkových vazeb. To vede k distorzi makrocyklů. Proto δ -CD (obsahující 9 glukosových jednotek) má tvar spíše elipsy a je posledním z makrocyklů mající hydroxylové skupiny orientovány na jedné straně makrocyklu^{98,102}. V případě ϵ -CD (10 jednotek) dochází k přetočení dvou protilehlých glukosových jednotek a jeho výsledný tvar připomíná spíše zlomenou elipsu. Struktury některých vyšších cyklodextrinů jsou zobrazeny na Obr. 12.



Obr.12 Schématické znázornění horního a bočního pohledu na struktury δ -CD (CD 9) (A,B), ϵ -CD (CD 10) (C,D) a cyklodextrinu složeného ze 14 glukosových jednotek (CD 14) (E,F). Pro lepší názornost jsou zobrazeny pouze sekundární hydroxylové skupiny (červené kuličky) a uhlíkové atomy C-6 (šedé kuličky)¹⁰².

Největším cyklodextrinem, jehož krystalová struktura byla zjištěna, je makrocyklus obsahující 26 glukosových jednotek. Ten tvoří dvě levotočivé šroubovice v antiparalelním uspořádání (Obr. 13). Cyklodextriny obsahující 10 a více glukosových jednotek bývají souhrnně označovány LR-CD (large-ring cyclodextrins)^{102,103,104}.



Obr.13 Schématické znázornění cyklodextrinu složeného z 26 glukosových jednotek (CD 26). Kuličky představují sekundární hydroxylové skupiny. V místech označených žlutými šipkami dochází k přetočení levotočivé šroubovice. Celková velikost CD 26 je $27 \text{ \AA} \times 15 \text{ \AA} \times 21 \text{ \AA}$ (výška)¹⁰⁴.

Cyklodextriny jsou krystalické, homogenní, netoxické, nehygroskopické látky mající charakter Lewisových bází. Jsou rozpustné ve vodě, dimethylformamidu, dimethylsulfoxidu a pyridinu, jsou stabilní a neabsorbují ve viditelné oblasti elektromagnetického spektra^{98,99,100,105}. V tabulce V jsou uvedeny některé základní vlastnosti přirozených (nativních) cyklodextrinů.

Tabulka V Základní charakteristika nativních α -, β - a γ -CD.

	α -CD	β -CD	γ -CD
Počet glukosových jednotek	6	7	8
Sumární vzorec	C ₃₆ H ₆₀ O ₃₀	C ₄₂ H ₇₀ O ₃₅	C ₄₈ H ₈₀ O ₄₀
Rozpustnost ve vodě (g/l)	145.0	18.5	232.0
Šířka kavity (nm)	0.47-0.53	0.60-0.68	0.75-0.83
Výška kavity (nm)	0.79	0.79	0.79
pK _a (25°C)	12.33	12.20	12.08
Počet molekul vody v kavitě (RTG data)	5-6	6-7	17
Objem kavity (nm ³)	0.174	0.262	0.427

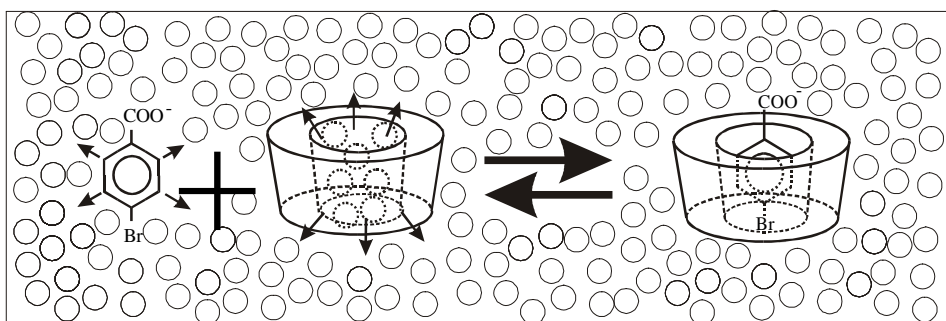
V přírodě se vyskytující nativní CD jsou složeny jen z α -1,4-D-glukopyranosových jednotek. Průmyslově se vyrábějí enzymatickou degradací škrobu (amylosy) působením cyklodextrinových glykosyltransferas (CGT), které jsou produkovány mnoha mikroorganismy, např. *Bacillus macerans*, *Bacillus circulans*, *Bacillus megaterium* a *Klebsiella oxytoca*^{98,99,106}. Tato biochemická transformace poskytuje směs cyklických a lineárních oligosacharidů obsahující šest až více než sto glukosových jednotek, avšak za optimalizovaných podmínek jsou nejvíce zastoupeny α -, β - a γ -cyklodextriny.

Nativní CD mohou být nejrůznějšími způsoby uměle modifikovány, čímž je možno cíleně měnit některé jejich fyzikálně chemické vlastnosti, jako je např. selektivita komplexace, katalytické schopnosti nebo zvýšená rozpustnost ve vodě i v organických

rozpouštědlech¹⁰⁵. Průmyslově vyráběnými deriváty cyklodextrinů jsou např. methylované CD, hydroxyalkylované CD, sulfonované CD a řada dalších.

1.3.2. Schopnost tvorby inkluzních komplexů

Charakteristickou vlastností cyklodextrinů a jejich derivátů, jež se stala předmětem intenzivního studia, je schopnost tvorby inkluzních, „host-guest“ komplexů. Inkluzní komplexy jsou makromolekulární sloučeniny, ve kterých molekula CD („host“ = cyklodextrin) prostorově uzavírá molekulu druhou („guest“)^{98,99,107}. Ve vodě rozpustné cyklodextriny mohou do své kavity pomocí hydrofobních a van der Waalsových interakcí inkludovat široké spektrum organických i anorganických molekul, které vyhovují stérickým podmínkám^{98,99,100}. Jev probíhá nejčastěji ve vodě nebo ve směsi vody a jiného polárního rozpouštědla, avšak může probíhat i na rozhraní pevné fáze. Méně hydrofilní rozpouštědla, jako je např. dimethylsulfoxid, konkurují při vazbě „guest“ molekul do kavity CD. Ve vodných roztocích je slabě hydrofobní kavita cyklodextrinu obsazena molekulami vody, které mohou být na základě hydrofobních interakcí při vhodných stérických podmínkách snadno nahrazeny jinou, méně polární, molekulou⁹⁸. (Obr.14)

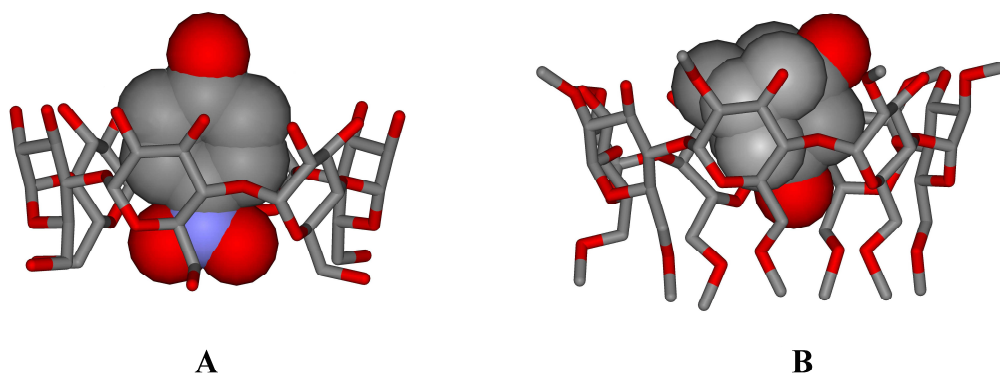


Obr. 14 Schématické znázornění tvorby inkluzního komplexu cyklodextrinu s *p*-brombenzoovou kyselinou ve vodě (kroužky).

Inkludované molekuly se v kavitě orientují tak, aby dosáhly maximálního kontaktu mezi svou hydrofobní částí a hydrofobní dutinou CD. Vznik supramolekulárního komplexu umožňuje vnést do vodného roztoku i hydrofobní látky. Je-li „guest“ molekula větší než je rozměr dutiny CD, může být tvorba komplexu omezena pouze na inkluzi určité

části molekuly. Částečně kladně polarizovaná cyklodextrinová kavita podporuje spíše vstup aniontových „guest“ molekul, které mohou být inkludovány pomocí ion-dipól nebo dipól-dipól interakcí, a naopak brání vstupu kationtových „guest“ molekul^{107,108}.

Jsou známy inkluzní komplexy nativních cyklodextrinů s uhlovodíky, alifatickými alkoholy, aminy a kyselinami, deriváty cyklohexanu, benzenu a naftalenu, steroidy, aminokyselinami, organickými azobarvivy, cukry, anorganickými ionty, vzácnými plyny a dalšími¹⁰⁸. Pro ilustraci jsou uvedeny struktury dvou komplexů: α -cyklodextrinu s 4-nitrofenolem (Obr.15 A)¹⁰⁹ a adamantan-1,3-diolu s per(2,6-di-*O*-methyl)- β -CD (Obr. 15 B)¹¹⁰.



Obr.15 Schématické znázornění krystalových struktur inkluzních komplexů 4-nitrofenolu s α -CD (A) a adamantan-1,3-diolu s per(2,6-di-*O*-methyl)- β -CD (B). „Guest“ molekuly jsou zobrazeny pomocí CPK modelu a cyklodextriny tyčinkovým modelem. (šedá - uhlík, červená – kyslík, fialová – dusík)^{109,110}.

Stechiometrie komplexů závisí na velikosti kavity a charakteru „guest“ molekuly, přičemž komplexy různých stechiometrií mohou v roztoku koexistovat v rovnováze. Nejčastěji vznikají komplexy v poměru 1:1, 1:2 a 2:1 („guest“ molekula:CD). Tvorbu inkluze mezi „guest“ molekulou a CD lze kvantitativně vyjádřit vazebnou konstantou. Stabilita inkluzního komplexu závisí na geometrické (stérické) způsobilosti molekul, polaritě hostující molekuly, prostředí a teplotě (obecně se vzrůstající teplotou se stabilita komplexu snižuje)^{99,111}.

1.3.3. Vliv cyklodextrinů na vlastnosti vázaných látek

Vytvoření inkluzního komplexu má velký vliv na fyzikální a chemické vlastnosti cyklodextrinu i hostující molekuly^{98,99}.

Hydrofobní molekuly získávají inkluzí do kavity cyklodextrinu hydrofilní charakter a stávají se lépe rozpustnými^{98,99,112}. Např. inkluzní komplexy nativních cyklodextrinů a nepolárních látek jsou zpravidla ve vodě málo rozpustné, zatímco hydroxylalkylderiváty cyklodextrinů tvoří ve vodě dobře rozpustné komplexy i s parafíny. Reaktivita „guest“ molekuly, která je efektivně chráněna „host“ molekulou CD, je ve většině případů snížena^{99,113}. Jsou však známy i případy, kdy molekula CD slouží jako katalyzátor reakce a díky vzniku inkluzního komplexu může dojít také k pozměnění reakční cesty inkludované látky. Komplexací s cyklodextriny se rovněž redukuje difúze a těkavost hostujících látek na nízký stupeň^{99,100,107,114}.

Vytvoření inkluzního komplexu má také za následek změnu spektrálních vlastností inkludovaných látek. Achirální molekula získá vnesením do kavity chirálního CD optickou aktivitu, dochází ke změnám intenzit a poloh absorpčních maxim inkludované látky v UV-Vis oblasti absorpčního spektra^{99,112,114}. Řada látek vykazuje silnou fluorescenci v organických rozpouštědlech, zatímco její intenzita ve vodném prostředí je malá. Díky vzniku „host-guest“ interakce dochází k výraznému zvýšení fluorescence, neboť fluoreskující molekula je obklopena nepolárním prostředím^{99,105}. Díky komplexaci také dochází ke změnám chemických posunů hostující látky v NMR spektru, kterých se často využívá k objasnění struktury vzniklého inkluzního komplexu^{99,115}. Změny fotofyzikálních vlastností jsou dány celou řadou faktorů, jako je omezení rotačního a torzního pohybu, omezení kontaktu s protony vody, chránící efekt před externími zhášeči, disagregační působení, možnost přenosu náboje či energie mezi cyklodextrinem a látkou¹⁰⁵. Spektrálních změn pozorovaných následkem komplexačních procesů lze využít i pro stanovení vazebných konstant komplexů, např. výpočtem vazebné izotermy nebo Benesi-Hildebrandovou metodou^{99,111}.

Vedle spektrometrických metod našly cyklodextriny, resp. jejich schopnost vytvářet „host-guest“ komplexy, uplatnění také v jiných analytických aplikacích, a to především v chromatografických (afinitivní chromatografie, HPLC, GC, TLC) a elektroforetických separacích nebo elektrochemické analýze^{100,116}. Různě substitované CD jsou využívány

jako příměsi do stacionárních i mobilních fází, v některých případech i jako detekční činidla např. pro lipidy, nasycené a nenasycené monoglyceridy, mastné kyseliny a řadu dalších¹⁰⁰.

Pomocí komplexace s cyklodextriny se mohou látky kapalné převádět do pevného stavu, mohou vznikat směsi jinak nekompatibilních látek. Dále může docházet ke změně elektrochemických vlastností původní látky^{105,107}.

1.3.4. Využití cyklodextrinů

V současné době jsou cyklodextriny využívány především ve farmaceutickém průmyslu jako nosiče farmakologicky významných látek^{114,116}. Vytvořené inkluzní komplexy mají schopnost výrazně zlepšit řadu důležitých vlastností léčiva. Komplexací s CD se zlepšuje fyzikální a chemická stabilita léčiva, které je chráněno před oxidací, vypařováním a pomaleji se rozkládá. Omezeny jsou často i vedlejší účinky. Vzniklý komplex je hydrofilní, a tím se rozšiřuje možnost aplikace díky zvýšené rozpustnosti ve vodných roztocích. Komplexací se zvyšuje i biologická aktivita léčiva z důvodu zamezení agregace¹⁰⁵.

Nejčastěji studovaným cyklodextrinem je β -CD, což je dáno převážně velikostí jeho hydrofobní dutiny. Dutina β -CD je narozdíl od dutiny α -CD dostatečně velká, aby pojala alespoň část molekuly farmaceuticky aktivních látek. Z tohoto důvodu jsou tedy pro farmaceutické účely vhodnější β -CD a také γ -CD, který se získává převážně jako vedlejší produkt při přípravě α -CD a β -CD.

Cyklodextriny našly uplatnění i v potravinářském průmyslu, kde se využívají zejména ke konzervování potravin, eliminaci nežádoucích chutí a pachů a k odstranění cholesterolu z mléčných výrobků. Cyklodextrinů se rovněž využívá v textilním průmyslu (k barvení oděvů), kosmetickém průmyslu (příspěvky do pleťových krémů, zubních past), tabákovém průmyslu (zjemňují vůni tabáku) a agrochemii (snižují toxicitu insekticidů)^{112,116}.

2. Cíl práce

Hlavním cílem disertační práce bylo objasnit vliv cyklodextrinů na fotosensitizované reakce a přenos $^1\text{O}_2$ ve vodných prostředích. Dílčí cíle byly následující:

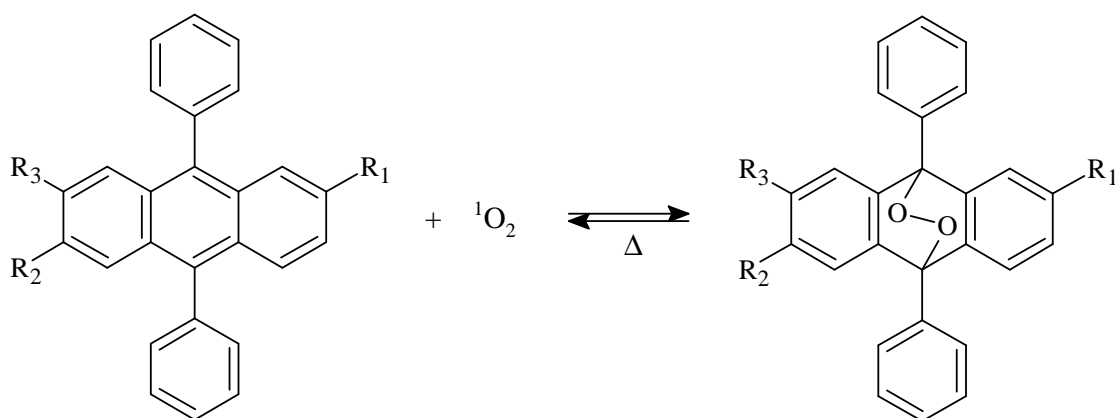
- i. Příprava vhodných vodorozpustných akceptorů $^1\text{O}_2$ poskytující reakcí s $^1\text{O}_2$ termicky stabilní endoperoxidy
- ii. Studium látek z hlediska jejich použití jako i) akceptorů $^1\text{O}_2$ (studium produktu reakce, kinetika zhášecích reakcí), ii) sekundárních zdrojů $^1\text{O}_2$ (termická stabilita endoperoxidů, výtěžek $^1\text{O}_2$) a iii) sensitizerů (výtěžek $^1\text{O}_2$)
- iii. Studium supramolekulární interakce akceptorů/sekundárních zdrojů $^1\text{O}_2$ s cyklodextriny (mod intreakce, vazebné konstanty, stechiometrie, vliv CD na akceptorové vlastnosti a termickou stabilitu endoperoxidů)
- iv. Studium sensitizerů porfyrinové povahy (fotosensitizované reakce, fotofyzikální charakteristiky)
- v. Studium supramolekulární interakce sensitizerů s cyklodextriny (mod intrakce, stechiometrie, odhad vazebných konstant, vliv CD na fotochemické a fotofyzikální vlastnosti sensitizerů)

3. Výsledky a diskuze

V této disertační práci byly studovány především dva způsoby generace $^1\text{O}_2$, jež se staly kritériem pro rozdělení výsledků do dvou kapitol. První kapitola je zaměřena na akceptory $^1\text{O}_2$, jež [4+2] cykloadicí s $^1\text{O}_2$ vytvářejí stabilní endoperoxidy. Ty při vyšších teplotách podléhají termickému rozkladu, při kterém se uvolňuje kyslík, částečně v singletovém stavu. Proto mohou být studované endoperoxidy označeny za přenašeče či sekundární zdroje $^1\text{O}_2$. Druhá kapitola je zaměřena na porfyrinové deriváty vystupující jako sensitizery ve fotosensitizovaných reakcích. Dalším předmětem práce byla schopnost tvorby supramolekulárních komplexů obou typů sloučenin, sensitizerů porfyrinové povahy a aromatických akceptorů/sekundárních zdrojů $^1\text{O}_2$, s cyklodextriny. Byl kladen důraz na popis vznikajících komplexů s využitím především UV-Vis, fluorescenční a NMR spektroskopie. V neposlední řadě byl sledován vliv tvorby supramolekulárních komplexů na chemické, fotochemické a fotofyzikální vlastnosti komplexovaných látek.

3.1. Disulfonované deriváty 9,10-difenyланthracenu – sensitizery, akceptory a sekundární zdroje $^1\text{O}_2$ a jejich supramolekulární komplexy s cyklodextriny (Příloha 1 a 2)

V této studii bylo zjištěno, že připravené ve vodě rozpustné anthracenové deriváty 2,6-dsDPA (disodná sůl 9,10-difenyланthracen-2,6-disulfonové kyseliny) a 2,7-dsDPA (disodná sůl 9,10-difenyланthracen-2,7-disulfonové kyseliny) reagují [4+2] cykloadicí se singletovým kyslíkem a vytvářejí odpovídající endoperoxidy 2,6-dsDPAO₂ a 2,7-dsDPAO₂ (Schéma 16). Sulfonované deriváty dsDPA se podobně jako samotný 9,10-difenyланthracen chovají jako akceptory $^1\text{O}_2$.

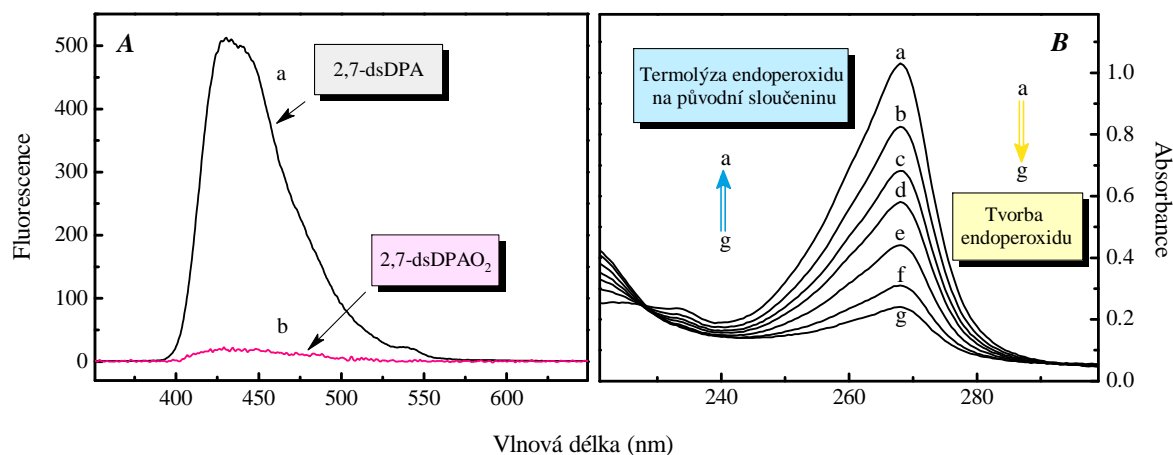


2,6-dsDPA / 2,6-dsDPAO₂: $\text{R}_1, \text{R}_2 = \text{SO}_3\text{Na}, \text{R}_3 = \text{H}$

2,7-dsDPA / 2,7-dsDPAO₂: $\text{R}_1, \text{R}_3 = \text{SO}_3\text{Na}, \text{R}_2 = \text{H}$

Schéma 16

Absorbují v UV-Vis oblasti, kde mají intenzivní absorpční pás při $\lambda = 268$ nm, a zároveň jsou silně fluoreskujícími látkami. Jejich reakce s $^1\text{O}_2$ lze proto sledovat spektrofotometricky. Tvorba endoperoxidů dsDPAO₂, resp. porušení konjugovaného systému vazeb v molekule v důsledku přítomnosti endoperoxidické vazby, má za následek pokles absorpčních i emisních pásů (Obr. 16 A, B).



Obr. 16 A: Fluorescenční emisní spektra (a) 2,7-dsDPA ($1 \times 10^{-6} M$, $\lambda_{exc} = 270 \text{ nm}$) a (b) endoperoxidu 2,7-dsDPAO₂ ($2 \times 10^{-5} M$, $\lambda_{exc} = 220 \text{ nm}$) měřená v deionizované vodě. **B:** Výřez absorpčních spekter 2,7-dsDPA ($1 \times 10^{-5} M$) v přítomnosti senzitizeru TPPS ($2 \times 10^{-6} M$) v deionizované vodě v závislosti na době ozařování polychromatickým viditelným zářením (a) 0 min, (b) 2 min, (c) 4 min, (d) 6 min, (e) 10 min, (f) 18 min a (g) 30 min. Absorpční spektrum TPPS bylo pro přehlednost odečteno.

Singletový kyslík byl generován dvěma způsoby. Fotosensitizedvanou reakcí, při které byl jako pomocný senzitizer použit TPPS (5,10,15,20-meso-tetrakis(4-sulfonátofenyl)porfyrin) a chemickou metodou využívající disproportionace H₂O₂ v přítomnosti katalyzátoru Na₂MoO₄.

Anthracenové endoperoxidy 2,6-dsDPAO₂ a 2,7-dsDPAO₂ jsou stabilní sloučeniny, avšak při vyšších teplotách (60 – 150 °C) dochází k jejich termické dekompozici. Poločasy rozpadu endoperoxidů ($t_{1/2}$) se při vyšších teplotách (nad 120 °C) pohybují řádově v desítkách minut, při teplotách nižších se jejich stabilita výrazně zvyšuje. Při laboratorní teplotě (okolo 25 °C) mohou být označeny za látky termicky stálé. V tabulce VI jsou shrnuty naměřené poločasy rozpadu ($t_{1/2}$) a aktivační energie (E_A) pro endoperoxid 2,7-dsDPAO₂ a komplex 2,7-dsDPAO₂ s hp- β -CD, který je diskutován dále.

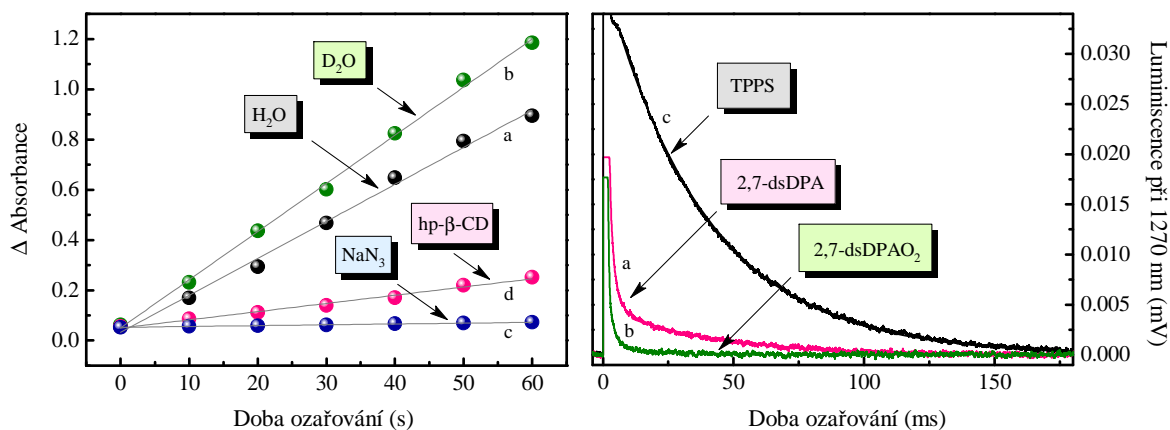
Tabulka VI Poločasy rozpadu, $t_{1/2}$, termolýzy 2,7-dsDPAO₂ a komplexu 2,7-dsDPAO₂:hp- β -CD měřených při různých teplotách a aktivační energie, E_A , vypočítané z Arrheniovy rovnice

Systém	Aktivační energie E_A (kJ.mol ⁻¹)	Poločas rozpadu $t_{1/2}$ (min)			
		150 °C	125 °C	100 °C	60 °C
2,7-dsDPAO ₂	73.3 ± 15.3	11.0	18.6	174	2.44 × 10 ⁴
2,7-dsDPAO ₂ :hp- β -CD	88.5 ± 16.0	12.7	32.3	360	>7.50 × 10 ⁴

Termolýza anthracenových endoperoxidů dsDPAO₂ probíhá mechanismem zpětné reakce k [4+2] cykloadici, při které vzniká původní anthracenový derivát dsDPA a uvolňuje se kyslík, částečně v excitovaném singletovém stavu. Proto mohou být endoperoxidy dsDPAO₂ označovány za sekundární zdroje ¹O₂ (Schéma 16). Tvorbu dsDPA termickou dekompozicí dsDPAO₂ lze sledovat jako nárůst absorpčních pásů dsDPA při vlnové délce 268 nm (Obr. 16 B). Skutečnost, že se na reakcích podílí ¹O₂, byla sledována pomocí jodidové detekční metody. Na základě množství vznikajícího trijodidového aniontu, který je úměrný množství ¹O₂ generovanému při termolýze endoperoxidů, byl odhadnut výtěžek ¹O₂ ($\Phi_{\Delta} = 32 \pm 3$ % z celkového množství uvolněného kyslíku).

Metodou časově rozlišené fosforescence odpovídající přechodu ¹O₂(¹ Δ_g) → ³O₂(³ Σ_g) při $\lambda = 1270$ nm bylo zjištěno, že dsDPA jsou, na rozdíl od endoperoxidů dsDPAO₂, senzitizery a mohou při fotosenzitizovaných reakcích generovat ¹O₂. Nalezené hodnoty kvantových výtěžků ¹O₂ pro oba deriváty dsDPA ($\Phi_{\Delta} \cong 0.08$) byly odhadnuty ze srovnání se standardem TPPS ($\Phi_{\Delta} = 0.64$) (Obr. 17 B). Jako alternativní metoda detekce ¹O₂ generovaného během fotosenzitizované reakce, kde dsDPA vystupují jako senzitizery, byla opět využita jodidová detekční metoda. Tvorba trijodidového aniontu I₃⁻ byla sledována jako nárůst absorpčních pásů při $\lambda = 351$ nm. Kinetika jeho produkce byla porovnávána v prostředí H₂O / D₂O a v přítomnosti NaN₃. V D₂O má ¹O₂ cca 16× delší dobu života oproti H₂O, naopak NaN₃ vystupuje v reakci jako jeho účinný fyzikální zhášec. V souladu s teorií bylo zjištěno, že kinetika produkce ¹O₂ (generace I₃⁻) v 65 %

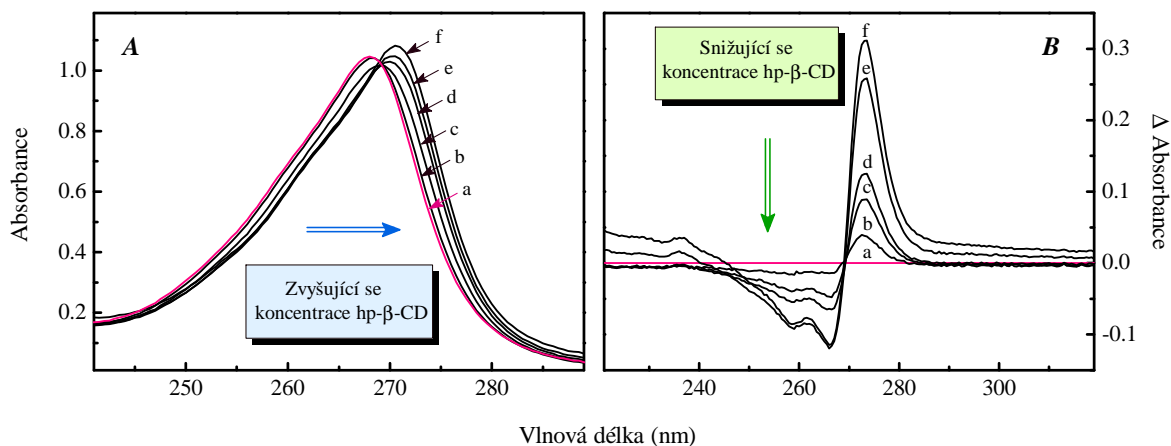
deuterované vodě je vyšší. V přítomnosti NaN_3 nedochází ke tvorbě I_3^- . Také přítomnost CD má za následek výrazné omezení fotogenerace $^1\text{O}_2$ a působení 2,7-dsDPA jako senzitizeru (viz dále). Naměřené trendy jsou vidět na Obr. 17 A.



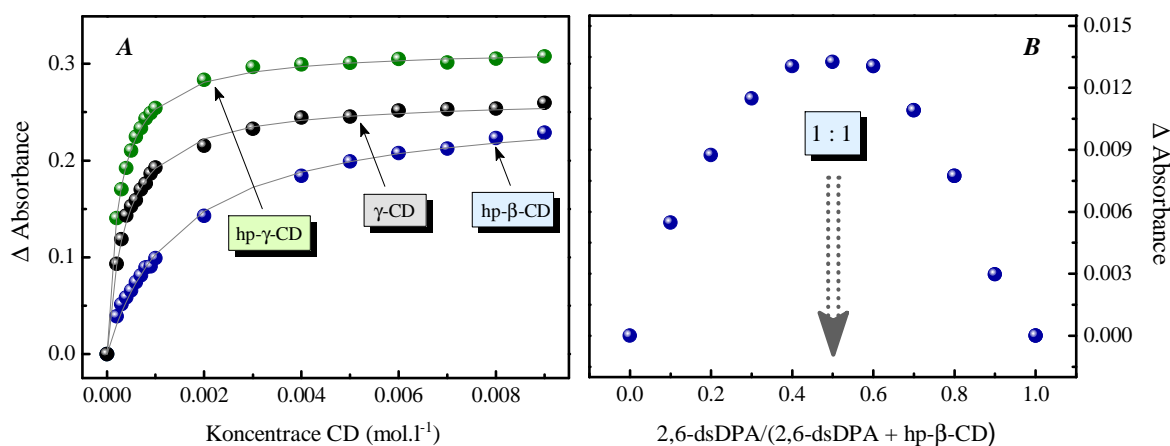
Obr. 17 Generace $^1\text{O}_2(^1\Delta_g)$ fotosenzitizovanou reakcí. **A:** Závislost absorbance I_3^- na době ozařování 2,7-dsDPA ($1 \times 10^{-5} \text{ M}$) v jodidovém detekčním činidle polychromatickým viditelným zářením (a) v deionizované vodě, (b) v přítomnosti D_2O (65 %), (c) v přítomnosti 0.01 M NaN_3 a (d) v přítomnosti hp- β -CD ($6.5 \times 10^{-3} \text{ M}$). Absorbance byla odečítána při $\lambda = 352 \text{ nm}$, pouze v případě (d) při $\lambda = 356 \text{ nm}$. **B:** Časově rozlišená luminescence při $\lambda = 1270 \text{ nm}$ v D_2O : TPPS ($2 \times 10^{-5} \text{ M}$), 2,7-dsDPA ($6 \times 10^{-4} \text{ M}$) a 2,7-dsDPAO₂ ($6 \times 10^{-4} \text{ M}$). Absorbance při $\lambda_{\text{exc}} = 308 \text{ nm}$ byla 0.156 ± 0.005 , energie laseru 4.02 mJ/puls .

Charakteristickou vlastností studovaných látek je schopnost vytvářet supramolekulární komplexy s cyklodextriny (CD). Pro studii byly vybrány nativní β -CD a γ -CD a jejich hydroxypropylované deriváty hp- β -CD a hp- γ -CD. Interakce obou disulfonovaných derivátů 9,10-difenylnthracenu s CD má za následek změny v absorpčních (Obr. 18 A) a fluorescenčních spektrech (viz Příloha 1, Obr. 7). V důsledku vzniku supramolekulárních komplexů dochází k bathochromním posunům nejintenzivnějšího absorpčního pásu při $\lambda = 268 \text{ nm}$. Jev je lépe patrný z rozdílu v diferenčních absorpčních spektr (Obr. 18 B). Z Obr. 18 A i B je patrná přítomnost jednoho izosbestického bodu, což naznačuje vznik pouze jedné rovnováhy volná \leftrightarrow komplexovaná částice. U všech systémů byl nalezen bathochromní posun $0.5 - 2.5 \text{ nm}$. U systému 2,6-dsDPA: β -CD byl zaznamenán nulový posun a nebyla nalezena interakce.

Posuny nalezené v absorpčním spektrech pro jednotlivé systémy jsou shrnuty v tabulce VII.



Obr. 18 Vliv přítomnosti *hp*- γ -CD na absorpční spektra 2,6-dsDPA. **A:** Výřez absorpčních spekter (a) 2,6-dsDPA (1×10^{-5} M) v nepřítomnosti a přítomnosti (b) 2×10^{-4} M, (c) 6×10^{-4} M, (d) 1×10^{-3} M, (e) 5×10^{-3} M a (f) 9×10^{-3} M *hp*- γ -CD. **B:** Diferenční absorpční spektrum stejného systému. 0.02 M fosfátový pufr, pH = 7.0.



Obr. 19 A: Vazebné konstanty komplexů 2,6-dsDPA s *hp*- γ -CD, γ -CD a *hp*- β -CD. **B:** Jobova křivka komplexu 2,6-dsDPA s *hp*- β -CD o celkové koncentraci 1×10^{-5} M v 0.02 M fosfátovém pufru, pH = 7.

Analýzou absorpčních spekter s rostoucí koncentrací CD byly určeny vazebné konstanty (K_b) a pomocí Jobovy metody kontinuálních variací i stechiometrie komplexů (Obr. 19 A,B). U všech sledovaných systémů byly nalezeny poměry dsDPA:CD 1:1. Hodnoty vazebných konstant se pohybovaly v rozmezí $1.2 \times 10^2 - 1.3 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$, v pořadí $\text{hp-}\beta\text{-CD} > \text{hp-}\gamma\text{-CD} > \beta\text{-CD} > \gamma\text{-CD}$ pro 2,7-dsDPA a $\text{hp-}\gamma\text{-CD} > \gamma\text{-CD} > \text{hp-}\beta\text{-CD}$ pro 2,6-dsDPA (Tab. VII). Komplexaci anthracenových endoperoxidů dsDPAO₂ nebylo možné sledovat z důvodu absence absorpčních a emisních pásů.

Tabulka VII Absorpční maxima, λ_{max} , molární absorpční koeficienty, ϵ_{max} , stechiometrie a vazebné konstanty komplexů, K_b , dsDPA s cyklodextriny získané výpočtem vazebných izoterm

System	Absorpční maximum λ_{max} (nm)	Molární absorpční koeficient ϵ_{max} ($\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)	Stechiom. poměr	Vazebná konstanta K_b (M^{-1})
2,6-dsDPA	268.0	1.12×10^5		
2,6-dsDPA:hp- γ -CD	270.5	1.13×10^5	1 : 1	4.0×10^3
2,6-dsDPA: γ -CD	270.0	1.13×10^5	1 : 1	2.6×10^3
2,6-dsDPA:hp- β -CD	270.0	1.12×10^5	1 : 1	6.6×10^2
2,6-dsDPA: β -CD	268.0	1.12×10^5	- ^a	- ^a
2,7-dsDPA	268.0	1.09×10^5		
2,7-dsDPA:hp- γ -CD	270.5	1.12×10^5	1 : 1	7.7×10^2
2,7-dsDPA: γ -CD	269.0	1.09×10^5	1 : 1	1.2×10^2
2,7-dsDPA:hp- β -CD	271.5	1.12×10^5	1 : 1	1.3×10^4
2,7-dsDPA: β -CD	269.0	1.00×10^5	1 : 1	1.4×10^2

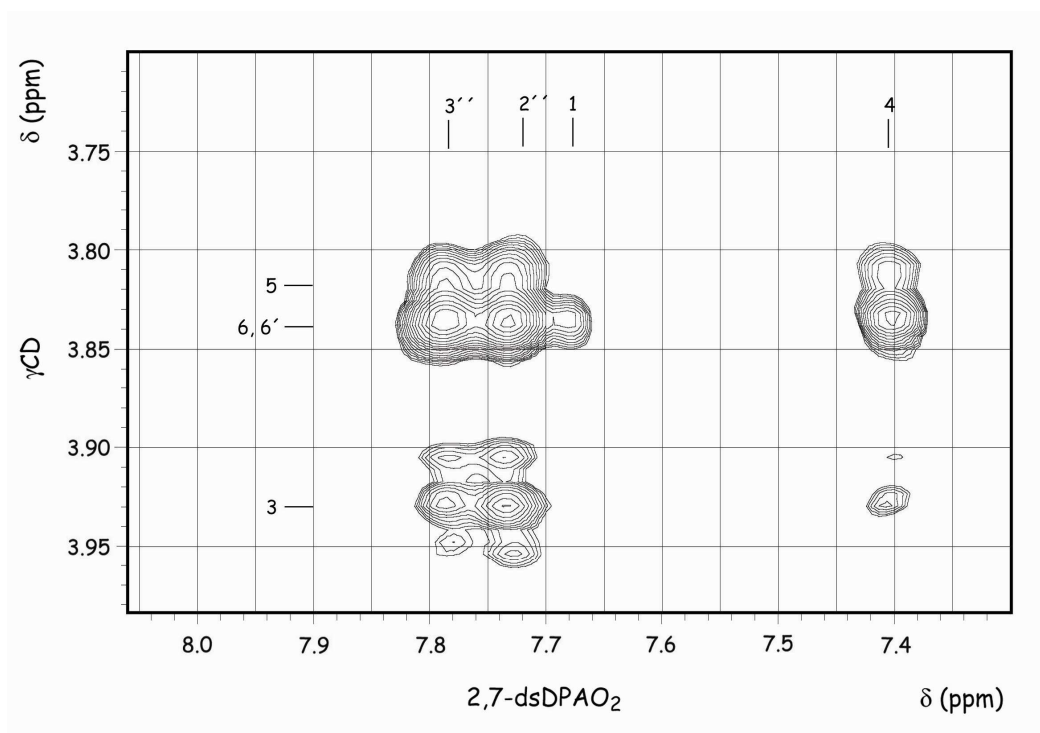
^a 2,6-dsDPA nekomplexuje s β -CD

Tvorba komplexu a určení modů interakcí bylo podrobně sledováno pomocí NMR spektroskopie (Příloha 2). Pomocí ^1H NMR lze sledovat změny v chemických posunech u protonů podílejících se přímo na tvorbě supramolekulárního komplexu. Změnu chemického posunu ($\Delta\delta$) daného protonu lze definovat jako rozdíl v chemických posunech v přítomnosti a nepřítomnosti „guest“ molekuly. K potvrzení tvorby a popisu geometrie supramolekulárních komplexů byly využity také 2D-NMR metody (ROESY a NOESY experimenty). Ty poskytly informace o prostorových interakcích vodíkových atomů v rámci jedné molekuly i více molekul. Z přítomnosti krosníků nalezených v 2D-NMR spektrech byly odhadnuty módy interakce supramolekulárních komplexů.

Na základě změn v chemických posunech v ^1H NMR bylo zjištěno, že všechny čtyři sledované anthracenové deriváty (2,6-dsDPA, 2,7-dsDPA, 2,6-dsDPAO₂, 2,7-dsDPAO₂) interagují s nativními cyklodextriny. Největší posuny byly zaznamenány u cyklodextrinových vodíků umístěných uvnitř (H-3, H-5) nebo v těsné blízkosti (H-6,6') cyklodextrinové kavity (Příloha 2, Tab. 2,3). Struktury dsDPA/dsDPAO₂ a cyklodextrinů spolu s označením pozic vodíkových atomů uvnitř a vně cyklodextrinové kavity jsou uvedeny na Obr.1 (Příloha 1, 2). To lze považovat za důkaz „host-guest“ interakce mezi anthracenovými deriváty dsDPA/dsDPAO₂ a nativními CD, která byla dále potvrzena pomocí 2D-NMR spektroskopie. Nalezené prostorové kontakty spolu s relativními intenzitami odpovídajících krosníků jsou pro všechny komplexy shrnuty v Tab. 4 a 5 (Příloha 2). Bylo zjištěno, že módy interakce jsou závislé jak na velikosti cyklodextrinové kavity tak na struktuře anthracenové derivátu, symetrii dané molekuly a umístění sulfonových skupin na anthracenovém jádře.

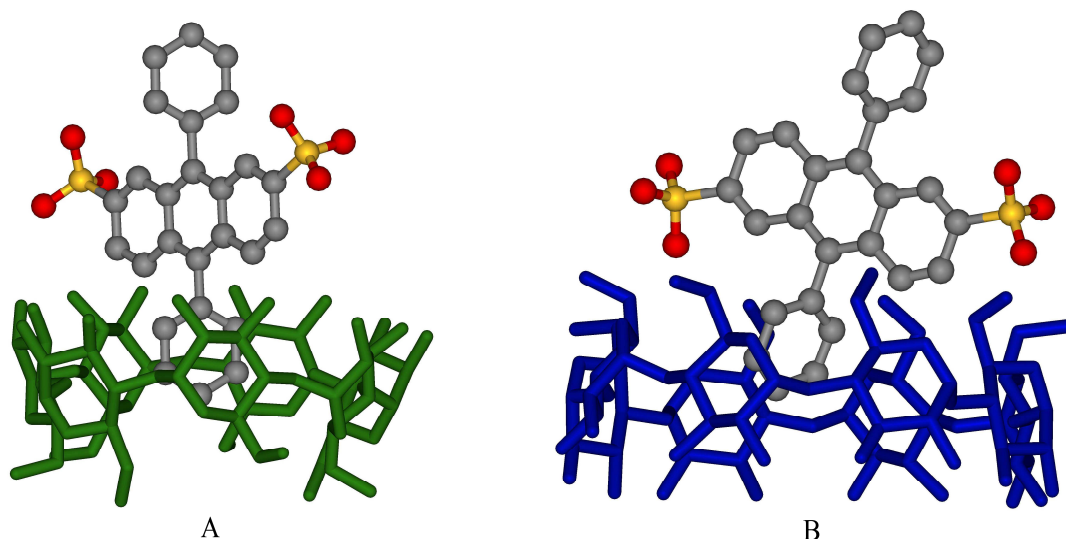
Z ^1H NMR a ROESY spekter bylo zjištěno, že 2,7-dsDPA/2,7-dsDPAO₂ vytvářejí inkluzní komplexy jak s β -CD tak γ -CD. V případě interakce 2,7-dsDPA i jeho endoperoxidu 2,7-dsDPAO₂ s β -CD převažuje komplex vznikající hlubokou inkluzí fenylové skupiny více vzdálené od sulfonových skupin do cyklodextrinové kavity její širší stranou („secondary face“) (Obr. 21). Tomu odpovídají změny v chemických posunech vnitřních vodíků CD (Příloha 2, Tab. 2) i relativně intenzivní krosníky nalezené v ROESY spektrech (Příloha 2, Tab. 4). Vedle tohoto modu interakce bylo nalezeno i malé množství komplexu vznikajícího mělkými inkluzemi téže fenylové skupiny užší stranou do cyklodextrinové kavity („primary face“). Podobně byl určen mod interakce pro komplexy 2,7-dsDPA/2,7-dsDPAO₂ s γ -CD. Zde dochází k méně hluboké inzerci fenylové skupiny

více vzdálené od sulfonované části molekuly do kavity γ -CD opět jeho užší stranou. Výřez ROESY spektra komplexu 2,7-dsDPAO₂: γ -CD je na obr. 20.



Obr. 20 Výřez 2D-NMR (ROESY) spektra „host-guest“ komplexu 2,7-dsDPAO₂ s γ -CD

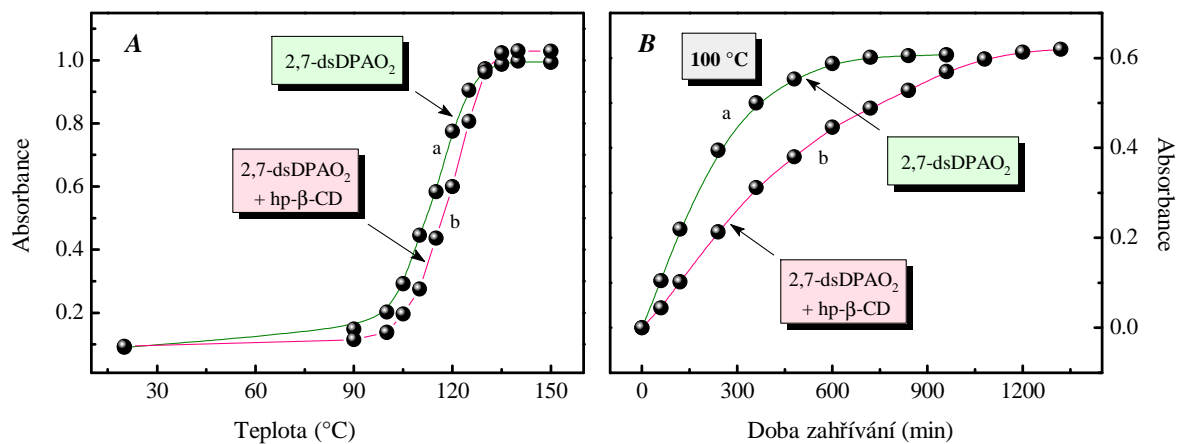
Podobně interagují i 2,6-dsDPA/2,6-dsDPAO₂ s γ -CD. I u těchto komplexů dochází k inkluzi fenylové skupiny do kavity cyklodextrinu jeho užší stranou. Avšak inkluze je oproti předcházejícímu případu hlubší, kavita je „nakloněná“ a symetricky vzdálena od obou sulfonovaných skupin antracenového derivátu (Obr. 21). Situace s komplexy s β -CD je rovněž odlišná. V ¹H NMR spektrech nebyly zaznamenány žádné rozdíly u volného a komplexovaného cyklodextrinu. Také v ROESY spektrech nebyly nalezeny žádné krosníky odpovídající prostorové interakci mezi „guest“ molekulou a cyklodextrinem. UV-Vis spektroskopií bylo též potvrzeno, že 2,6-dsDPA netvoří komplex s β -CD. U endoperoxidu 2,6-dsDPAO₂ byla NMR spektroskopií nalezena pouze slabá interakce, která naznačuje vznik inkluzního komplexu jen s minimální inzercí fenylové skupiny do kavity β -CD jeho užší stranou.



Obr. 21 Schématické znázornění „host-guest“ komplexů 2,7-dsDPA s β -CD (A) a 2,6-dsDPA s γ -CD. Podobné inkluzní komplexy byly nalezeny i pro odpovídající endoperoxidové komplexy 2,7-dsDPAO₂: β -CD a 2,6-dsDPAO₂: γ -CD.

Dále byl sledován vliv cyklodextrinů na fotofyzikální a chemické vlastnosti inkludovaných dsDPA a dsDPAO₂. Bylo zjištěno, že vznik supramolekulárních „host-guest“ komplexů snižuje reaktivitu dsDPA vůči [4+2] cykloadici s ¹O₂ a snižuje schopnost dsDPA fotogenerovat ¹O₂. To je patrné z Obr. 17 A (c), kde byl sledován vliv hp- β -CD, resp. tvorba inkluzního komplexu hp- β -CD s 2,7-dsDPA, na rychlost tvorby I₃⁻, která je znatelně zpomalena (podobně jako v přítomnosti NaN₃).

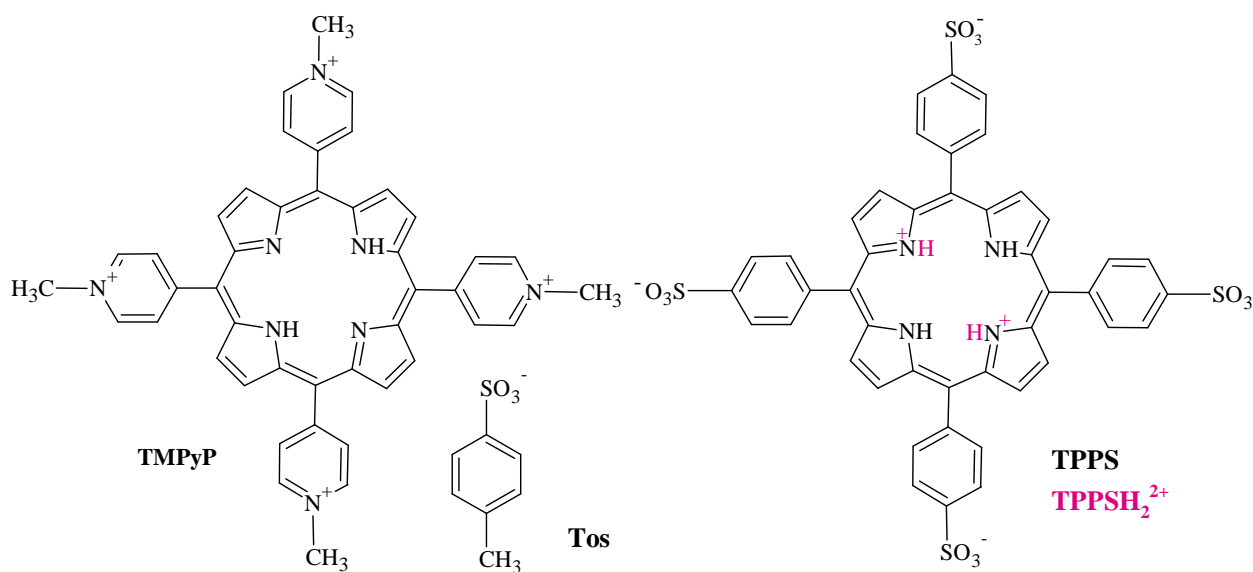
Tvorba „host-guest“ komplexů rovněž zvyšuje termickou stabilitu endoperoxidů dsDPAO₂. Efekt je nejvíce patrný při nižších teplotách (pod 100 °C), kdy dochází k výraznému nárůstu hodnot poločasů rozpadu (Tab. VI). Termolýza probíhá v porovnání s nekomplexovanými endoperoxidy pomaleji, což je vidět i na Obr. 22 A, B.



Obr. 22 Vliv cyklodextrinů na stabilitu dsDPAO₂. **A:** Termolýza endoperoxidu 2,7-dsDPAO₂ (2×10^{-5} M) (a) bez, (b) v přítomnosti hp-β-CD (8×10^{-3} M) při různých teplotách. Doba zahřívání byla 60 min. Opětný nárůst absorpčního pásu původní sloučeniny byl sledován při odpovídající λ_{max} daného systému (viz Tabulka VII). **B:** Srovnání termolýzy 2,7-dsDPAO₂ (1×10^{-5} M) při 100 °C (a) v přítomnosti a (b) nepřítomnosti hp-β-CD (9×10^{-3} M). V obou případech byly vzorky v deionizované vodě zahřívány v zatavených ampulích.

3.2. Sensitizery TPPS a TMPyP a jejich komplexy s cyklodextriny (Příloha 3)

Kationtový sensitizer *meso*-tetrakis(methylpyridyl)porfyrin tetrachlorid (TMPyP/Cl) a tetra-*p*-toluensulfonát (TMPyP/Tos) a diprotonizovaný aniontový sensitizer *meso*-tetrakis(4-sulfonátofenyl)porfyrin (TPPSH₂²⁺) vytvářejí supramolekulární komplexy s cyklodextriny. Pro studii byly vybrány nativní (α -, β -, γ -CD) a derivatizované cyklodextriny (2-hydroxypropylované hp- α -CD, hp- β -CD, hp- γ -CD, methylovaný heptakis(2,3,6-tri-O-methyl)- β -CD (triMe- β -CD), sulfonovaný heptakis(6-O-sulfo)- β -CD (SO₃- β -CD) a methylsulfonovaný heptakis(2,3-O-dimethyl-6-O-sulfo)- β -CD (diMeSO₃- β -CD)). Tvorba supramolekulárních komplexů byla prokázána pomocí NMR, MS, UV-Vis, fluorescenční spektroskopie a CZE. Struktury sensitizerů jsou uvedeny na Obr. 23.

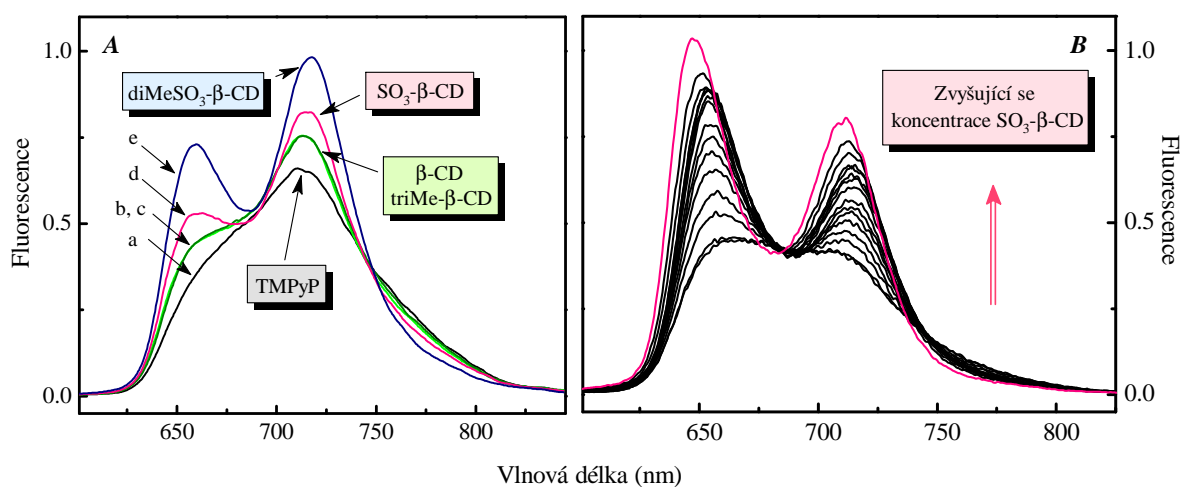


Obr. 23 Struktury používaných sensitizerů

3.2.1. Interakce TMPyP:CD

Interakce TMPyP s cyklodextriny má za následek změny jak v absorpčních, tak emisních spektrech. V UV-Vis spektrech přítomnost cyklodextrinu, resp. vznik

supramolekulárních komplexů, vede k bathochromnímu posunu Soretova pásu sensitizeru při $\lambda = 422$ nm. Posun se pohybuje v závislosti na zvoleném CD od 0.5 - 5.0 nm. Posun absorpčního pásu do červené oblasti spektra je typický pro nekovalentní interakce mezi porfyrinem a CD, a to jak pro „host-guest“ tak i externí módy interakce (Příloha 3, Tab.1). Největší posuny Soretova pásů sensitizeru byly pozorovány v přítomnosti sulfonovaného $\text{SO}_3\text{-}\beta\text{-CD}$ a dimethylsulfonovaného $\text{diMeSO}_3\text{-}\beta\text{-CD}$ cyklodextrinu. Podobné výsledky byly nalezeny i při měření fluorescenčních spekter. Emisní pás samotného sensitizeru je široký s nízkým rozlišením jednotlivých Q pásů (Q(0,0) a Q(0,1)), což je způsobeno míšením prvního excitovaného stavu a blízkého CT stavu TMPyP díky volné rotaci N-methylpyridiniové skupiny a jejím elektron-akceptorovým vlastnostem. Intenzity emisních pásů jsou vlivem studovaných cyklodextrinů zvýšeny a zároveň dochází k jejich výraznému rozlišení (Obr. 24 A). To lze vysvětlit sterickým bráněním rotace N-methylpyridiniových skupin TMPyP. Efekt je více patrný z koncentrační závislosti přidaného $\text{SO}_3\text{-}\beta\text{-CD}$ (Obr. 24 B). Bathochromní posun emisního pásu sensitizeru, typický pro přítomnost „host-guest“ interakce nebyl nalezen.



Obr. 24 A: Fluorescenční spektra TMPyP/Cl (2×10^{-6} M) (a) v nepřítomnosti a přítomnosti (b) nativního $\beta\text{-CD}$, (c) $\text{triMe-}\beta\text{-CD}$, (d) $\text{SO}_3\text{-}\beta\text{-CD}$ a (e) $\text{diMeSO}_3\text{-}\beta\text{-CD}$. Koncentrace všech cyklodextrinů byly 2×10^{-3} M. **B:** Příklad fluorescenčního spektra TMPyP (2×10^{-6} M) v přítomnosti $\text{SO}_3\text{-}\beta\text{-CD}$, $\lambda_{exc} = 518$ nm. Nárůst koncentrace $\text{SO}_3\text{-}\beta\text{-CD}$ do 5.0×10^{-3} M (červená čára) je naznačen šipkou.

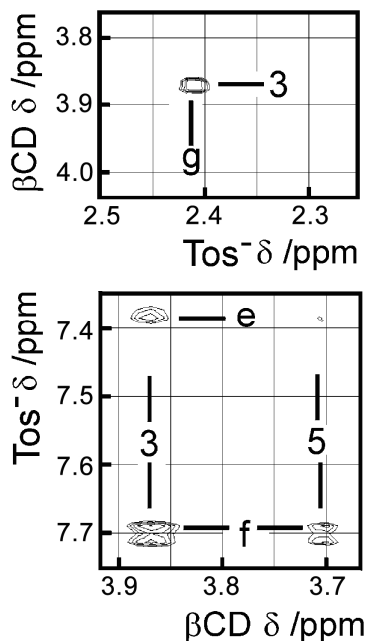
Analýzu UV-Vis spekter byly určovány stechiometrické poměry a vazebné konstanty komplexů. U všech měřených supramolekulárních komplexů byl nalezen

stechiometrický poměr TMPyP:CD 1:1 nebo 2:1. Vazebné konstanty (K_b) se pohybovaly v řádu $10^3 - 10^6 \text{ M}^{-1}$. Největší hodnoty K_b byly nalezeny u sulfonovaného $\text{SO}_3\text{-}\beta\text{-CD}$ a dimethylsulfonovaného $\text{diMeSO}_3\text{-}\beta\text{-CD}$ cyklodextrinového derivátu.

Stechiometrické poměry 1:1 pro nativní $\beta\text{-CD}$ a methylovaný derivát $\text{triMe-}\beta\text{-CD}$ byly prokázány i pomocí ESI-MS. V hmotnostním spektru byly nalezeny píky odpovídající volnému TMPyP i jeho aduktům s CD. Vedle těchto píků byl detekován i fragment odpovídající aduktu Tos-CD v poměru 1:1. Vznik supramolekulárního komplexu TMPyP/Tos s nativním $\beta\text{-CD}$ byl dále prokázán pomocí CZE. Ze získaného elektroferogramu je patrné, že tvorba komplexu má za následek zvýšení migračního času, vznikajícího komplexu oproti volnému sensitizeru.

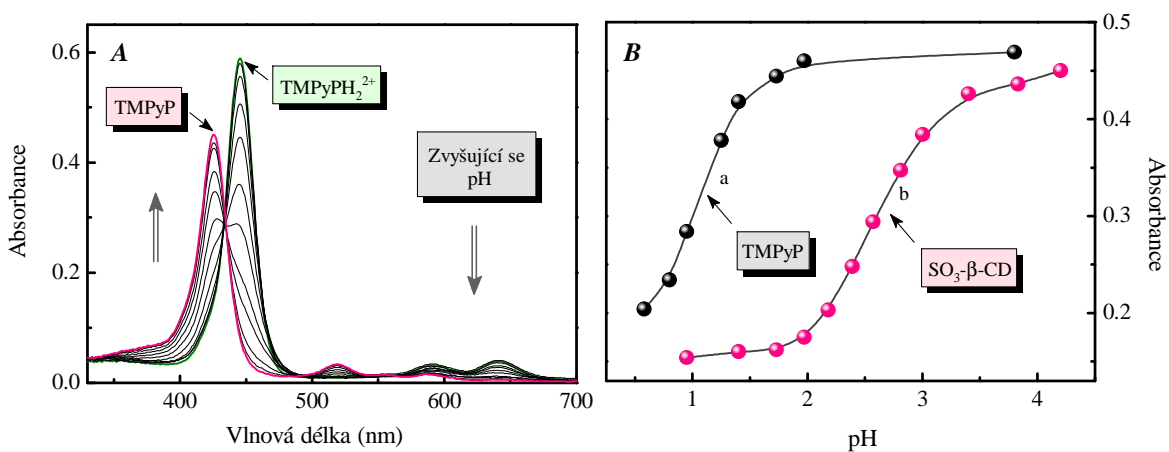
Mody interakcí supramolekulárních komplexů TMPyP s nativními CD a vliv protianiontu Tos byly studovány pomocí ^1H a 2D-NMR spektroskopie. Ze změn chemických posunů v protonových spektrech a prostorových kontaktů nalezených v ROESY (NOESY) spektrech je patrné, že TMPyP/ Cl^- vytváří komplex s nativním $\beta\text{-CD}$, a to především s externím modem interakce. Struktury sensitizeru a CD spolu s přiřazením vodíkových atomů jsou zobrazeny na Obr.1 (Příloha 3). Největší rozdíly v chemických posunech v protonových spektrech oproti volným molekulám byly pozorovány u externích cyklodextrinových vodíků (H-4, H-1, H-2). V případě sensitizeru TMPyP/Tos byly sledovány interakce s $\alpha\text{-CD}$ a $\beta\text{-CD}$. V ^1H NMR spektru obou komplexů byly, podobně jako u komplexu TMPyP/ Cl^- s $\beta\text{-CD}$, pozorovány změny v chemických posunech externích vodíků CD dokazující spolu s nalezenými prostorovými kontakty externí mod interakce mezi sensitizerem a cyklodextriny. Z hodnot změn chemických posunů a intenzit odpovídajících kropsíků je patrné, že stabilnější komplex tvoří TMPyP/Tos s $\beta\text{-CD}$. Vedle externího modu interakce je však v obou komplexech přítomna „host-guest“ interakce mezi protianiontem Tos a cyklodextriny.

Z intenzit kropsíků odpovídajících prostorovému kontaktu vnitřních cyklodextrinových vodíků s vodíky Tos lze usuzovat na poměrně vysokou stabilitu komplexů. Mody interakcí jsou přítomny dva. Inkluze Tos do cyklodextrinové kavity probíhá jak užší stranou, tak širší stranou. Shodné výsledky byly nalezeny i měřením samotného Tos s cyklodextriny (Obr. 25).



Obr. 25 Výřez 2D-NMR (ROESY) spektra „host-guest“ komplexu Tos s β -CD

Studovány byly rovněž acidobazické vlastnosti TMPyP v nepřítomnosti a přítomnosti cyklodextrinů. Analýzou absorpčních spekter při různém pH vyplynulo, že vlivem komplexace TMPyP/Tos s β -CD dochází k snížení hodnoty pK_a , naopak vlivem SO_3 - β -CD a diMe SO_3 - β -CD dochází k nárůstu hodnoty pK_a .

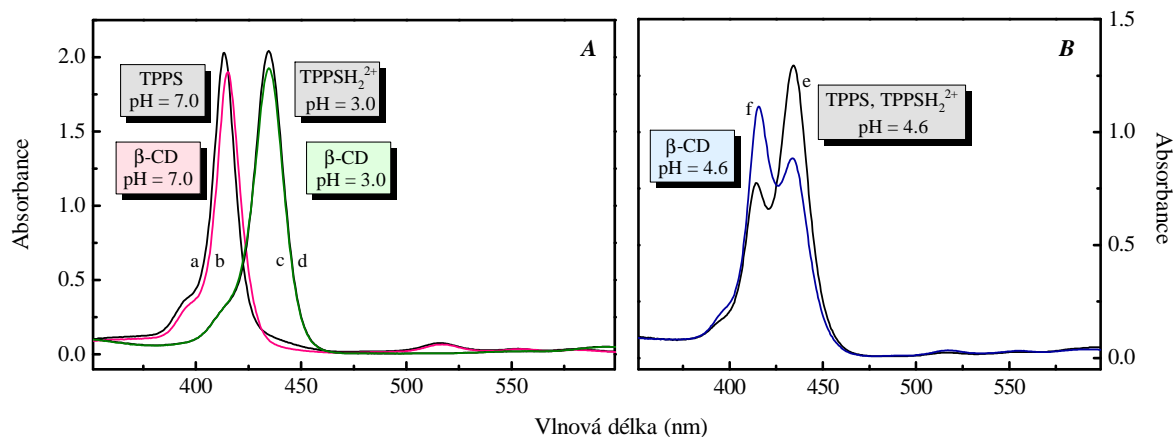


Obr. 25 A: Absorpční spektrum TMPyP (4×10^{-6} M) v přítomnosti SO_3 - β -CD (4×10^{-3} M). Přítomnost izobestického bodu ukazuje rovnováhu mezi TMPyP a jeho protonizovanou formou $TMPyPH_2^{2+}$. Rostoucí pH je naznačeno šipkami. **B:** pH titrační křivky demonstrující posun hodnoty pK_a . Absorbance TMPyP (4×10^{-6} M) byla naměřena při různých pH (a) v nepřítomnosti při $\lambda = 422$ nm a (b) v přítomnosti při $\lambda = 427$ nm SO_3 - β -CD (4×10^{-3} M).

Vliv cyklodextrinů byl pozorován i při měření časově rozlišených absorpčních spekter. Pro studie byly zvoleny β -CD a SO_3 - β -CD. Tripletové stavy TMPyP při $\lambda = 450 - 500$ nm a jsou zhaseny kyslíkem monoexponenciálně s rychlostní konstantou $1.5 \times 10^9 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$. Doba života tripletového stavu TMPyP bez přítomnosti kyslíku je 153 μs . Vliv β -CD na kinetiku $^3\text{TMPyP}$ je nepatrný. Kinetika $^3\text{TMPyP}$ v přítomnosti SO_3 - β -CD má komplikovaný charakter (Příloha 3, Obr. 4). Časově rozlišená absorpční spektra tripletového stavu TMPyP v přítomnosti TMPyP: SO_3 - β -CD v nanosekundové časové škále odpovídají $^3\text{TMPyP}$. Spektra v mikrosekundové časové škále jsou složena ze spektra $^3\text{TMPyP}$ a jeho diprotonizované formy $^3\text{TMPyPH}_2^{2+}$. To ukazuje, že děj je citlivý na protonizaci. Je zřejmé, že hodnota pK_a u TMPyP v jeho tripletovém stavu je zvýšená vznikem supramolekulárního komplexu se SO_3 - β -CD, podobně jako v singletovém stavu.

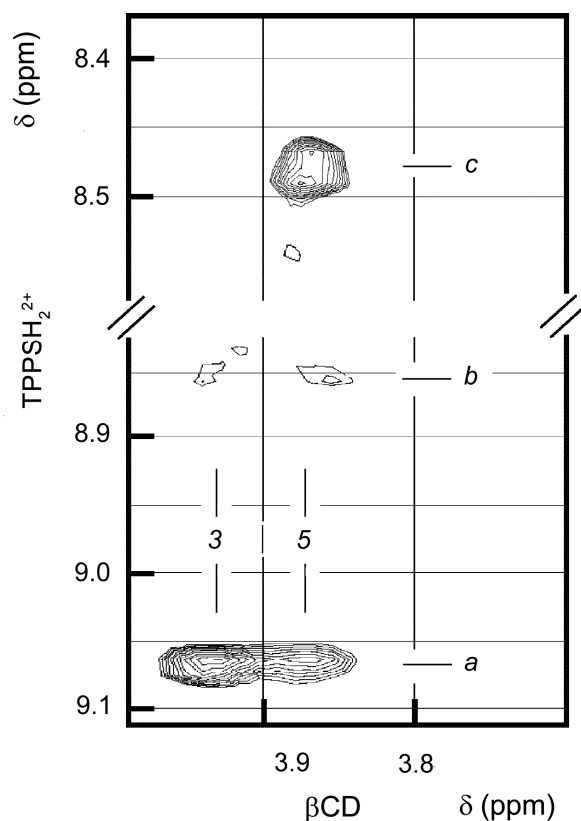
3.2.2. Interakce TPPSH_2^{2+} :CD

Diprotonizovaný aniontový TPPSH_2^{2+} vzniká ve vodném roztoku sensitizeru při $\text{pH} \leq 3$. Při vyšším pH diprotonizovaná forma TPPSH_2^{2+} postupně přechází na neprotonizovanou formu TPPS. V UV-Vis spektrech má TPPSH_2^{2+} ve vodném roztoku absorpční Soretův pás při $\lambda = 434$ nm. Přítomnost cyklodextrinů má za následek jen nepatrný bathochromní posun (0.5 - 1.0 nm) (Příloha 3, Tab. 4). Fluorescenční emisní spektra obsahují pás při $\lambda = 670$ nm. Vlivem přítomnosti β -CD v roztoku dochází k bathochromnímu posunu o zhruba 3 nm. Podobné výsledky byly pozorovány i pro neprotonizovaný TPPS¹¹⁷. Protonizace sensitizeru podstatně neovlivňuje hodnoty K_b s cyklodextriny.



Obr. 26 A, B: Výřez absorpčního spektra TPPS ($2 \times 10^{-6} M$) (Soretův pás) v přítomnosti/nepřítomnosti β -CD ($2.5 \times 10^{-3} M$) při (a)/(b) pH = 7, (c)/(d) pH = 3.0 a (e)/(f) pH = 4.6 v 0.01 M Britton-Robinsonově pufru.

Měření NMR spekter potvrdilo, že diprotonizovaný TPPSH₂²⁺ tvoří komplexy s nativními β -CD i γ -CD. V ¹H NMR spektru komplexu TPPSH₂²⁺: β -CD byly nalezeny malé rozdíly v chemických posunech oproti volným sloučeninám (Příloha 3, Tab. 2) Struktury sensitizeru a CD spolu s přiřazením vodíkových atomů jsou zobrazeny na Obr.1 (Příloha 3). V ROESY spektrech však byly zaznamenány intenzivní krospektry odpovídající prostorovým kontaktům vnitřních cyklodextrinových vodíků (H-3, H-5) se sulfonovanou fenylovou částí (H-b, H-c) i porfyrinovou částí (H-a) molekuly sensitizeru (Obr. 27), (Příloha 3, Tab. 5). Z prostorových kontaktů vyplývá, že TPPSH₂²⁺ vytváří komplexy s „host-guest“ interakcí, především inzercí fenylové části molekuly TPPSH₂²⁺ do kavity cyklodextrinu její širší stranou. Podobné módy interakce byly zjištěny pro neprotonizovanou formu sensitizeru TPPS¹¹⁷.



Obr. 27 Výřez 2D-NMR (ROESY) spektra „host-guest“ komplexu TPPSH_2^{2+} s $\beta\text{-CD}$

Detailnější změny v chemických posunech pozorované v ^1H NMR spektrech a krosníky nalezené v ROESY spektrech ukazují i na přítomnost malého množství „host-guest“ komplexu vznikajícího inkluzí fenylové části molekuly TPPSH_2^{2+} do cyklodextrinové kavity její užší stranou.

V případě komplexu TPPSH_2^{2+} s $\gamma\text{-CD}$ vzniká rovněž komplex s „host-guest“ interakcí, avšak mod interakce odpovídá inkluzi fenylové části molekuly TPPSH_2^{2+} do cyklodextrinové kavity její užší stranou („primary face“). Tomu odpovídají i změny v chemických posunech pozorované v ^1H NMR spektrech a krosníky nalezené v ROESY spektrech (Příloha 3, Tab. 2, 4).

4. Závěr

Byly připraveny disulfonované deriváty 9,10-difenylnanthracenu dsDPA (resp. 2,6-ds-DPA a 2,7-dsDPA). DsDPA reprezentují vodorozpustné sensitizery a akceptory $^1\text{O}_2$ ($^1\Delta_g$), které [4+2] cykloadicí s $^1\text{O}_2$ vytvářejí termostabilní endoperoxidy. U těchto látek byly studovány interakce s vybranými nativními a hydroxypropylovanými cyklodextriny. Bylo zjištěno, že dsDPA a endoperoxidy dsDPAO₂ vytvářejí ve vodném prostředí 1:1 supramolekulární komplexy s nativními a hydroxypropylovanými CD. Stechiometrie komplexů byla určena pomocí Jobovy metody kontinuálních variací. Za použití UV-Vis spektroskopie byly určeny stechiometrie (Jobova metoda kontinuálních variací) a vazebné konstanty (výpočtem vazebná izotermy) komplexů dsDPA s CD. Nalezené hodnoty se pohybovaly v rozmezí $10^2 - 10^4 \text{ M}^{-1}$.

Pomocí NMR spektroskopie byla potvrzena tvorba „host-guest“ komplexů dsDPA a dsDPAO₂ s nativními β -CD a γ -CD a detailnějším rozbořem/analýzou byla určena jejich geometrie (mod interakce). Změny chemických posunů v ^1H NMR spektru a 2D-NMR experimenty ukázaly dva vazebné mody interakce: (i) inkluzi „guest“ molekuly do cyklodextrinové kavity přes širší stranu („secondary face“), která je typická pro komplexy 2,7-dsDPA a 2,7-dsDPAO₂ s β -CD a (ii) inkluzi „guest“ molekuly užší stranou („primary face“) do cyklodextrinové kavity. Tento mod interakce je naopak typický pro komplexy dsDPA nebo dsDPAO₂ s γ -CD. Velikost kavity β -CD je ve srovnání s velikostí γ -CD menší, a proto je interakce prostřednictvím širší strany cyklodextrinové kavity mnohem více upřednostňována pro β -CD komplexy. Pouze 2,6-dsDPA netvoří supramolekulární komplex s β -CD, což bylo potvrzeno i měřením absorpčních spekter. Sloučeniny 2,7-dsDPA a 2,7-dsDPAO₂ tvoří s γ -CD symetrické „host-guest“ komplexy v porovnání s 2,6-dsDPA a 2,6-dsDPAO₂, které vytvářejí „asymetrické host-guest“ komplexy. Jev byl vysvětlen sterickým bráněním sulfoskupin na anthracenovém jádře. Mody interakcí a stability komplexů jsou podobné jak pro dsDPA, tak pro jejich odpovídající endoperoxidy dsDPAO₂.

Pozorovaná nekovalentní interakce mezi dsDPA a CD má za následek změnu jejich fotofyzikálních a fyzikálních vlastností, jako je bathochromní posun absorpčních pásem, změny ve fluorescenčních spektrech, snížená produkce $^1\text{O}_2$ při fotosensitizované reakci a snížená rychlost oxidace dsDPA při [4+2] cykloadicí $^1\text{O}_2$. Tvorba „host-guest“ komplexů

zvyšuje termickou stabilitu endoperoxidů dsDPAO₂, které mohou sloužit jako sekundární zdroje ¹O₂.

Lze shrnout, že shora uvedené látky lze využít jako sensitizery (producenty), akceptory i vodorozpustné sekundární zdroje, resp. přenašeče ¹O₂. Jejich vyjíměčně termicky stabilní supramolekulární komplexy s cyklodextriny mohou být využity pro studie mechanismů reakcí ¹O₂ či v organické syntéze.

Další studie byla zaměřena na sensitizery TPPSH₂²⁺ a TMPyp/Cl, Tos s rozdílnou polohou kladných nábojů (centrum - periferie). Bylo zjištěno, že diprotonizovaný aniontový sensitizer TPPSH₂²⁺ vytváří 1:1 host-guest komplexy s nativním β-CD se stejnou stechiometrií a vazebnou konstantou interakce jako jeho neprotonizovaná forma TPPS. Kladný náboj na porfyrinovém skeletu, vycházející z protonizace pyrrolových dusíkových atomů nemá prakticky žádný vliv na interakci s nativními CD. „Host-guest“ komplex vzniká inkluzí sulfonované fenylové části molekuly sensitizera do cyklodextrinové kavity její širší stranou „secondary face“. V případě inkluzního komplexu TPPSH₂²⁺ s γ-CD dochází k inzerci fenylové části molekuly sensitizera do cyklodextrinové kavity její širší stranou.

Kationtový sensitizer TMPyP/Cl, Tos se čtyřmi kladnými náboji na periferii porfyrinového skeletu tvoří 1:1 nebo 1:2 supramolekulární komplexy s nativními, 2-hydroxypropylovanými, triMe-β-CD, SO₃-β-CD a diMeSO₃-β-CD. S využitím NMR spektroskopie bylo zjištěno, že sensitizer interaguje s CD spíše externím vazebným modem. Mod intrakce byl navržen na základě rozdílů chemických posunů nalezených v ¹H NMR spektrech a pomocí 2D-NMR (ROESY, NOESY) spektroskopie. Nalezené hodnoty vazebných konstant jsou v rozmezí 6×10³ – 3×10⁶ M⁻¹ a jsou více než na velikosti cyklodextrinové kavity závislé na její funkcionalizaci. Nejstabilnější komplexy byly zjištěny u SO₃-β-CD, který má vodíkové atomy hydroxylových skupin vázaných na uhlíkových atomech C-2, C-3 a C-6 nahrazeny sulfoskupinami.

NMR studie dále ukázaly, že také Tos, vystupující jako protianion sensitizera TMPyP, je schopen vytvářet „host-guest“ komplexy s CD. U těchto komplexů byly nalezeny dva módy interakce, a to jak přes užší, tak širší stranu cyklodextrinové kavity. „Host-guest“ komplexy Tos s CD patrně vznikají i v přítomnosti sensitizera TMPyP, ale externí interakci TMPyP s cyklodextriny zřetelně neovlivňují.

Tvorba komplexů TMPyP s CD má vliv na fotofyzikální a fyzikální vlastnosti. Při měření absorpčních spekter byl zaznamenán bathochromní posun, v fluorescenčních spektrech dochází k rozlišení emisních pásů. Existence supramolekulárních komplexů byla potvrzena i pomocí ESI-MS a CZE. Komplexace TMPyP s výjimkou nativních CD výrazně zvyšuje hodnoty pK_a .

Kationtové senzitizery jsou často využívány při PACT aplikacích. Na základě shora uvedené práce se jeví možnost modulovat vlastnosti těchto sensitizerů jejich interakcí s vodorozpustnými cyklodextrinovými nosiči.

5. Použitá literatura

- ¹ Khan A. U., Kasha M.: *J. Chem. Phys.* 39, **1963**, 2105.
- ² Foote C.S., Wexler S., Ando W., Higgins R.: *J. Am. Chem. Soc.* 90, **1968**, 975.
- ³ Schweitzer C., Schmidt R.: *Chem. Rev.* 103, **2003**, 1685.
- ⁴ Lang K., Mosinger J., Wagnerová D. M.: *Chem. Listy* 99, **2005**, 211.
- ⁵ Wilkinson F., Helman W. P., Ross A. B.: *J. Phys. Chem. Ref. Data* 24, **1995**, 663.
- ⁶ Weldon D., Poulsen T. D., Mikkelsen K.V., Ogilby P. R.: *Photochem. Photobiol.* 70, **1999**, 369.
- ⁷ Foote C.S., Clennan E.L.: *Active Oxygen in Biochemistry*, Vol. 2, (Foote C.S., Valentine J. S., Greenberg A., Liebman J. F., Eds.), Blackie Academic & Professional, London **1995**, str. 105.
- ⁸ Ogilby P.R., Foote C.S.: *J. Am. Chem. Soc.* 104, **1982**, 2069.
- ⁹ Mosinger J., Mička Z.: *Chem. Listy* 88, **1994**, 212
- ¹⁰ Lang K., Mosinger J., Wagnerová D.M.: *Coord. Chem. Rev.* 248, **2004**, 321.
- ¹¹ Lang K., Mosinger J., Wagnerová D. M.: *Chem. Listy* 100, **2006**, 169.
- ¹² Foote C.S.: *Photochem. Photobiol.* 54, **1991**, 659.
- ¹³ DeRosa M.C., Crutchley R.J.: *Coord. Chem. Rev.* 233-234, **2002**, 351.
- ¹⁴ Bonnet R.: *Chem. Soc. Rev.* **1995**, 19.
- ¹⁵ MacDonald I.J., Dougherty T.J.: *J. Porphyrins Phthalocyanines* 5, **2001**, 105.
- ¹⁶ Redmond R.W., Gamlin J.N.: *Photochem. Photobiol.* 70, **1999**, 391.
- ¹⁷ Arnold S.J., Ogryzlo E.A., Wietzke H.: *J. Chem. Phys.* 40, **1964**, 1769.
- ¹⁸ Tarr M., Valenzeno D.P.: *Photochem. Photobiol. Sci.* 2, **2003**, 355.
- ¹⁹ Pierlot C., Aubry J.M., Briviba K., Sies H., Mascio P.: *Methods in Enzymology* 319, **2000**, 3.
- ²⁰ Renirie R, Pierlot C., Aubry J.M., Hartog A.F., Schoemaker H.E., Alsters P.L., Wever R.: *Adv. Synth. Catal.* 345, **2003**, 849.
- ²¹ Slinger T.G., Copeland R.A.: *Chem. Rev.* 103, **2003**, 4731.
- ²² Ogilby P.R., Kristiansen M., Clough R.L.: *Macromolecules* 23, **1990**, 2698.
- ²³ Matheson I.B.C., Lee J.: *J. Am. Chem. Soc.* 94, **1972**, 3310.
- ²⁴ Aubry J.M.: *J. Am. Chem. Soc.* 107, **1985**, 5844.
- ²⁵ Aubry J.M., Cazin B., Duprat F.: *J. Org. Chem.* 54, **1989**, 726.

-
- ²⁶ Aubry J.M., Cazin B.: *Inorg. Chem.* 27, **1988**, 2013.
- ²⁷ Pierlot C., Nardello V., Schrive J., Mabilille C., Barbillat J., Sombret B., Aubry J.M.: *J. Org. Chem.* 67, **2002**, 2418.
- ²⁸ Mach I., Vepřek-Šiška J.: *Chem. Listy* 74, **1980**, 1.
- ²⁹ Emsenhuber M., Pöchlauer P., Aubry J.M., Nardello V., Falk H.: *Monatsh. Chem.* 134, **2003**, 387.
- ³⁰ Aubry J.M., Cazin B., Rigaudy J., Schmidt R.: *Acc. Chem. Res.* 36, **2003**, 668.
- ³¹ Taube H.: *J. Gen. Physiol.* 49, **1965**, 29.
- ³² Wagnerová D.M.: *Z. Phys. Chem.* 215, **2001**, 133.
- ³³ Clennan E.D.: *Tetrahedron* 47, **1991**, 1343.
- ³⁴ Clennan E.D.: *Tetrahedron* 56, **2000**, 9151.
- ³⁵ Sevin F., McKee M.L.: *J. Am. Chem. Soc.* 123, **2001**, 4591.
- ³⁶ Foote C.S.: *Acc. Chem. Res.* 1, **1968**, 104.
- ³⁷ Manring L.E., Kanner R.C., Foote C.S.: *J. Am. Chem. Soc.* 105, **1983**, 470.
- ³⁸ Clennan E.D.: *Acc. Chem. Res.* 34, **2001**, 875.
- ³⁹ Telfer A., Dhami S., Bishop S.M., Phillips D., Barber J.: *Biochemistry* 33, **1994**, 4469.
- ⁴⁰ Bohm F., Edge R., Foley S., Lange L., Truscott T.G.: *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 65, **2001**, 177.
- ⁴¹ Baltshun D., Beutner S., Briviba K., Martin H.D., Paust J., Peters M., Röver S., Sies H., Stahl W., Steigel A., Stenhorst F.: *Liebigs Ann./Recueil* **1997**, 1887.
- ⁴² Kreitner M., Ebermann R., Alth G.: *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 36, **1996**, 109.
- ⁴³ Reddi E., Valduga G., Rodgers M.A.J., Jori G.: *Photochem. Photobiol.* 54, **1991**, 633.
- ⁴⁴ Kraljic I., El Mohsni S.: *Photochem. Photobiol.* 28, **1978**, 319.
- ⁴⁵ Tanaka K., Muira T., Umezawa N., Urano Y., Kikuchi K., Higuchi T., Nagano T.: *J. Am. Chem. Soc.* 123, **2001**, 2530.
- ⁴⁶ Umezawa N., Tanaka K., Urano Y., Kikuchi K., Higuchi T., Nagano T.: *Angew. Chem. Int. Ed.* 38, **1999**, 2899.
- ⁴⁷ Thompson A., Lever J.R., Canella K.A., Muira K., Posner G.H., Seliger H.H.: *J. Am. Chem. Soc.* 108, **1986**, 4498.
- ⁴⁸ Girotti A.W., Korytowski W.: *Methods Enzymol.* 319, **2000**, 85.
- ⁴⁹ Mosinger J., Mosinger B.: *Experientia* 51, **1994**, 106.
- ⁵⁰ Mosinger J., Mička Z.: *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* 107, **1997**, 77.

-
- ⁵¹ Falick A.M., Mahan B.H., Myers R.J.: *J. Chem. Phys.* 42, **1965**, 1837.
- ⁵² Nonell S., Braslavsky S.E.: *Methods Enzymol.* 319, **2000**, 37.
- ⁵³ Almeida E.A., Miyamoto S., Martinez G.R., Medeiros M.G.H., Di Mascio P.: *Anal. Chim. Acta* 482, **2003**, 99.
- ⁵⁴ Braslavsky S.E., Heibel G.E.: *Chem. Rev.* 92, **1992**, 1381.
- ⁵⁵ Braun A.M., Maurette M.T., Oliveros E.: *Photochemical Technology*. Wiley, Chichester **1991**.
- ⁵⁶ McDermott W.E., Pchelkin N.R., Benard D.J., Bousek R.R.: *Appl. Phys. Lett.* 32, **1978**, 469.
- ⁵⁷ Boyle R.W., Dolphin D.: *Photochem. Photobiol.* 64, **1996**, 469.
- ⁵⁸ Ochsner M.: *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 39, **1997**, 1.
- ⁵⁹ Nyman E.S., Hynninen P.H.: *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 73, **2004**, 1.
- ⁶⁰ Nilsson R., Kearns D.: *Photochem. Photobiol.* 19, **1974**, 181.
- ⁶¹ Hamblin M.R., Hasan T.: *Photochem. Photobiol. Sci.* 3, **2004**, 436.
- ⁶² Wainwright M.: *Chem. Soc. Rev.* 31, **2002**, 128.
- ⁶³ Ben Amor T., Jori G.: *Insect Biochem. Mol. Biol.* 30, **2000**, 915.
- ⁶⁴ Ben Amor T., Bortolotto L., Jori G.: *Photochem. Photobiol.* 71, **2000**, 124.
- ⁶⁵ Stevens B., Perez S.R., Ors J.A.: *J. Am. Chem. Soc.* 96, **1974**, 6846.
- ⁶⁶ Seip M, Brauer H.-D.: *J. Am. Chem. Soc.* 114, **1992**, 4486.
- ⁶⁷ Van den Heuvel C.J.M., Hofland A., Steinberg H., de Boer T.J.: *Recl. Traf. Chim. Pays-Bas* 99, **1980**, 275.
- ⁶⁸ Erden I., Gölitiz P., Näder R., de Meijere A.: *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* 93, **1981**, 605.
- ⁶⁹ Van den Heuvel C.J.M., Verhoeven J.W., de Boer T.J.: *Recl. Traf. Chim Pays-Bas* 99, **1980**, 280.
- ⁷⁰ Gollnick K., Griesbeck A.: *Tetrahedron Lett.* 25, **1984**, 725.
- ⁷¹ Aubry J.M., Mandard-Cazin B., Rougee M., Bensasson R.V.: *J. Am. Chem. Soc.* 117, **1995**, 9159.
- ⁷² Bobrowski M., Liwo A., Oldziej S., Jeziorek D., Ossowski T.: *J. Am. Chem. Soc.* 122, **2000**, 8112.
- ⁷³ Nardello V., Aubry J.M.: *Methods Enzymol.* 319, **2000**, 50.
- ⁷⁴ Nagano T., Tanaka T., Mizuki H., Hirobe M.: *Chem. Pharm. Bull.* 42, **1994**, 883.

-
- ⁷⁵ Lindig B.A., Rodgers M.A.J., Schaap A.P.: *J. Am. Chem. Soc.* 102, **1980**, 5590.
- ⁷⁶ Nardello V., Aubry J.M.: *Tetrahedron Lett.* 38, **1997**, 7361.
- ⁷⁷ Martinez G.R., Ravant J.-L., Cadet J., Miyamoto S., Medeiros M.H.G., Di Mascio P.: *J. Am. Chem. Soc.* 126, **2004**, 3056.
- ⁷⁸ Pierlot C., Hajjam S., Barthélémy C., Aubry J.M.: *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 36, **1996**, 31.
- ⁷⁹ Wasserman H.H., Larsen D.L.: *J. Chem. Soc., Chem. Comm.* 5, **1972**, 253.
- ⁸⁰ Fu Y., Krasnovsky A.A., Foote C.S.: *J. Am. Chem. Soc.* 115, **1993**, 10282.
- ⁸¹ Trabanco A.A., Montalban A.G., Rumbles G., Barrett A.G.M., Hoffman B.M.: *Synlett* 7, **2000**, 1010.
- ⁸² Wozniak M., Tanfani F., Bertoli E., Zolese G., Antosiewicz J.: *Biochimica et Biophysica Acta* 94, **1991**, 1082.
- ⁸³ Turro N.J., Chow M.F., Rigaudy J.: *J. Am. Chem. Soc.* 103, **1981**, 7218
- ⁸⁴ Schäfer-Ridder M., Brocker U., Vogel E.: *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* 15, **1976**, 228.
- ⁸⁵ Rigaudy J., Brelière C., Scribe P.: *Tetrahedron Lett.* 7, **1978**, 687.
- ⁸⁶ Drews W., Scgmidt R., Brauer H.D.: *Chem. Phys. Lett.* 70, **1980**, 84.
- ⁸⁷ Schmidt R., Drews W., Brauer H.D.: *J. Am. Chem. Soc.* 102, **1980**, 2791.
- ⁸⁸ Schmidt R., Drews W., Brauer H.D.: *J. Phys. Chem.* 86, **1982**, 4909.
- ⁸⁹ Di Mascio P., Bechara E.J.H., Rubim J.C.: *Applied Spectroscopy* 46, **1992**, 236.
- ⁹⁰ Ben-Shabat S., Itagaki Y., Jockush S., Sparrow J.R., Turro N.J., Nakanishi K.: *Angew. Chem., Int. Ed.* 41, **2002**, 814.
- ⁹¹ Di Mascio P., Medeiros M.H.G., Sies H., Bertolotti S., Braslavsky S.E., Veloso D.P., Sales B.H.L.N., Magalhaes E., Bras-Filho R., Bechara E.J.H.: *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 38, **1997**, 169.
- ⁹² Günther G., Else Lemp M., Zanocco A.L.: *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* 151, **2002**, 1.
- ⁹³ Donkers R.L., Workentin M.S.: *J. Am. Chem. Soc.* 126, **2004**, 1688.
- ⁹⁴ Saito I., Matsuura T., Inoue K.: *J. Am. Chem. Soc.* 103, **1981**, 188.
- ⁹⁵ Nakano M., Kambayashi Y., Tatsuzawa H., Komiyama T., Fujimori K.: *FEBS Letters* 432, **1998**, 9.
- ⁹⁶ Saito I., Nagata R., Moriyama H., Matsuura T., Inoue K.: *Free Radical Res. Commun.* 2, **1987**, 327.

-
- ⁹⁷ Dewilde A., Pellieux C., Pierlot C., Wattré P., Aubry J.M.: *Biol. Chem.* 379, **1998**, 1377.
- ⁹⁸ Szejtli J.: *Chem. Rev.* 98, **1998**, 1743.
- ⁹⁹ Connors K.A.: *Chem. Rev.* 97, **1997**, 1325.
- ¹⁰⁰ Mosinger J., Tománková V., Němcová I., Zýka J.: *Anal. Lett.* 34, **2001**, 1979.
- ¹⁰¹ Chiesi-Villa A., Rizzoli C., Amar G., Delcanale M., Redenti E., Ventura P.: *Supramol. Chem.* 10, **1998**, 111.
- ¹⁰² Saenger W., Jacob J., Gessler K., Steiner T., Hoffmann D., Sanbe H., Koizumi K., Smith S.M., Takaha T.: *Chem. Rev.* 98, **1998**, 1787.
- ¹⁰³ Jacob J., Gessler K., Hoffmann D., Sanbe H., Koizumi K., Smith S.M., Takaha T., Saenge W.: *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* 37, **1998**, 605.
- ¹⁰⁴ Gessler K., Usón I., Takaha T., Krauss N., Smith S.M., Okada S., Shedrick G.M., Saenger W.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, **1999**, 4246.
- ¹⁰⁵ Khan A.R., Forgo P., Stine K.J., D'Souza V.: *Chem. Rev.* 98, **1998**, 1977.
- ¹⁰⁶ Gattuso G., Nepogodiev S.A., Stoddart J.F.: *Chem. Rev.* 98, **1998**, 1919.
- ¹⁰⁷ Lipkowitz K.B.: *Chem. Rev.* 98, **1998**, 1829.
- ¹⁰⁸ Rekharsky M.V., Inoue Y.: *Chem. Rev.* 98, **1998**, 1875.
- ¹⁰⁹ Harata K.: *Chem. Rev.* 98, **1998**, 1803.
- ¹¹⁰ Czugler M., Eckle E., Stezowski, J.J.: *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1981**, 1291.
- ¹¹¹ Exner O.: *Chemometr. Intell. Lab. Sys.* 39, **1997**, 85.
- ¹¹² Hedges A.: *Chem. Rev.* 98, **1998**, 2035.
- ¹¹³ Takahashi K.: *Chem. Rev.* 98, **1998**, 2013.
- ¹¹⁴ Uekama K., Hirayama F., Irie T.: *Chem. Rev.* 98, **1998**, 2045.
- ¹¹⁵ Schneider H.J., Hacket F., Rüdiger V., Ikeda H.: *Chem. Rev.* 98, **1998**, 1755.
- ¹¹⁶ Singh M., Sharma R., Banerjee U.C.: *Biotechnology Advances* 20, **2002**, 341.
- ¹¹⁷ Mosinger J., Kliment V., Sejbal J., Kubát P., Lang K.: *J. Porphyrins Phtalocyaninines* 6, **2002**, 514.