



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

# Příprava monosubstituovaných cyklodextrinů selektivní deacetylací

## Bakalářská práce

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





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

# Synthesis of monosubstituted cyclodextrins by selective deacetylation

## Bachelor thesis

*Study programme:* B3942 – Nanotechnology  
*Study branch:* 3942R002 – Nanomaterials

*Author:* **Marcel Havrda**  
*Supervisor:* RNDr. Michal Řezanka, Ph.D.



## ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Marcel Havrda**  
Osobní číslo: **M14000137**  
Studijní program: **B3942 Nanotechnologie**  
Studijní obor: **Nanomateriály**  
Název tématu: **Příprava monosubstituovaných cyklodextrinů selektivní deacetylací**  
Zadávací katedra: **Katedra chemie**

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

1. Provést literární rešerši o selektivním odchraňování persubstituovaných cyklodextrinů.
2. Provéřit možnost selektivní deacetylace peracetylovaných cyklodextrinů a optimalizovat podmínky syntézy.

Rozsah grafických prací: **dle potřeby**

Rozsah pracovní zprávy: **40-50 stran**

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

1. B. du Roizel, J.-P. Baltaze, P. Sinay, Tetrahedron Lett. 2002, 43, 2371.
2. A. J. Pearce, P. Sinay, Angew. Chem. Int. Ed. 2000, 39, 36103612; Angew. Chem. 2000, 112, 3756.
3. N. Sakairi, H. Kuzuhara, T. Okamoto, M. Yajima, Bioorg. Med. Chem. 1996, 4, 2187.

Vedoucí bakalářské práce: **RNDr. Michal Řezanka, Ph.D.**

Katedra chemie

Datum zadání bakalářské práce: **10. října 2016**

Termín odevzdání bakalářské práce: **15. května 2017**

prof. Ing. Zdeněk Pliva, Ph.D.

děkan



prof. Ing. Josef Šedlbauer, Ph.D.

vedoucí katedry

V Liberci dne 10. října 2016

## Prohlášení

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

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

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

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

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

Datum: 8.5.2017

Podpis: 

## Poděkování

Chtěl bych touto cestou poděkovat všem, kteří se jakoukoliv měrou podíleli na vzniku mé bakalářské práce. Velký dík patří především vedoucímu RNDr. Michalu Řezankovi, Ph.D., který mi vtiskl základní návyky při práci v laboratoři a byl mi vždy ku pomoci. Děkuji také jeho ženě Ing. Markétě Řezankové za měření NMR spekter a Mgr. Vítu Novotnému za měření MS a HPLC spekter.

Bezpochyby by se mi nepracovalo tak dobře, nebýt příjemné atmosféry, kterou tvořili všichni členové laboratoře. Jmenovitě bych rád poděkoval prof. Ivanu Štiborovi, CSc., Mgr. Janě Karpíškové, M.Sc. Sumitě Swar, Mgr. Veronice Zajícové, Ph.D., Ing. Janu Lukáškoví a svým kolegům z řad spolužáků Haně Šinkorové a Bc. Michaelu Kalátovi.

Velmi si vážím pomoci, které se mi dostávalo od mé milující manželky Elišky Havrdové. Rád bych vyjádřil dík za podporu, nejen při studiu, svým rodičům, bratru Josefovi a sestře Mileně i všem dalším členům mé početné rodiny.

## Abstrakt

Tato bakalářská práce se zabývá syntézou monosubstituovaných derivátů cyklodextrinů (CD) pomocí regioselektivní deacetylace.

Pro optimalizování přípravy derivátů byly nejprve provedeny pilotní studie, kde byly výtěžky sledovány pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC). Vybraná činidla byla použita pro deacetylaci per-*O*-acetyl- $\beta$ -CD ve větším měřítku, a takto byly získány dva monosubstituované deriváty. Jedná se o per-*O*-acetyl-2<sup>A</sup>-hydroxy- $\beta$ -CD a per-*O*-acetyl-6<sup>A</sup>-hydroxy- $\beta$ -CD. Výsledné produkty byly charakterizovány pomocí nukleární magnetické rezonance (NMR) a hmotnostní spektrometrie (MS). Příprava prvně jmenovaného derivátu nebyla doposud publikována.

Úvod literární rešerše je zaměřen na historii, strukturu, vlastnosti, výrobu a využití cyklodextrinů v praxi. Ve druhé části jsou stručně shrnuty metody selektivního odchraňování persubstituovaných CD a poslední kapitola se věnuje teorii selektivní deacetylace.

Klíčová slova: cyklodextriny, monosubstituovaný derivát, selektivní deacetylace

## Abstract

This bachelor thesis deals with synthesis of monosubstituted cyclodextrin (CD) derivatives by regioselective deacetylation.

At first, preliminary study was done for optimization of the derivatives preparation. The reaction was monitored by high performance liquid chromatography (HPLC) and the most promising reagents were used for deacetylation of *per-O*-acetyl- $\beta$ -CD on a larger scale. The reactions furnished two monosubstituted derivatives: *per-O*-acetyl-2<sup>A</sup>-hydroxy- $\beta$ -CD and *per-O*-acetyl-6<sup>A</sup>-hydroxy- $\beta$ -CD. The products were characterized by nuclear magnetic resonance (NMR) and mass spectrometry (MS). The preparation of the first derivative has not been published yet.

The introduction is focused on the history, structure, properties, production and the use of cyclodextrins. In the second part, methods for selective deprotection of persubstituted CDs are briefly summarized and the next chapter deals with the selective deacetylation.

Keywords: cyclodextrins, monosubstituted derivative, selective deacetylation



# Obsah

Seznam zkratk	10
1 Úvod	12
2 Teoretická část	13
2.1 Cyklodextriny	13
2.1.1 Struktura a vlastnosti	14
2.1.2 Inkluzní komplexy	17
2.1.3 Výroba	18
2.1.4 Využití	19
2.2 Monosubstituované deriváty cyklodextrinů	20
2.2.1 Selektivní demethylace	23
2.2.2 Selektivní debenzylace	25
2.2.3 Selektivní debenzoylace	26
2.2.4 Selektivní deacetylace	27
3 Experimentální část	30
3.1 Příprava per- <i>O</i> -acetyl- $\beta$ -CD	31
3.2 Pilotní studie deacetylačních reakcí	31
3.3 Příprava per- <i>O</i> -acetyl-6 <sup>A</sup> -hydroxy- $\beta$ -CD	31
3.4 Příprava per- <i>O</i> -acetyl-2 <sup>A</sup> -hydroxy- $\beta$ -CD	32
3.5 Příprava vzorků na HPLC	33
4 Výsledky a diskuze	34
5 Závěr	41
Seznam literatury	42

## Seznam zkratek

Ac	acetyl
ACN	acetonitril
Bn	benzyl
Bz	benzoyl
CD	cyklodextrin(y)
CGTáza	cyklodextrin glykosyltransferáza
COSY	correlation spectroscopy
d.	den
DIBAL	diisobutylaluminium hydrid
DMSO	dimethylsulfoxid
ekv.	ekvivalent
h.	hodina
HMBC	heteronuclear multiple bond correlation
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie (high-performance liquid chromatography)
HSQC	heteronuclear single-quantum correlation
LD <sub>50</sub>	smrtebná dávka pro 50 % jedinců (lethal dose, 50 %)
Me	methyl
min.	minuta
MS	hmotnostní spektrometrie (mass spectrometry)
NMR	nukleární magnetická rezonance (nuclear magnetic resonance)
r.t.	laboratorní teplota (room temperature)
$r_t$	retenční čas
RVO	rotační vakuová odparka
TBDMS	<i>tert</i> -butyldimethylsilyl

THF	tetrahydrofuran
TLC	tenkovrstvá chromatografie (thin layer chromatography)

# 1 Úvod

Od objevení cyklodextrinů<sup>1,2</sup> uplynula již řada let, ale přesto jsou určitá odvětví těchto cyklických oligosacharidů pro vědce stále velkou neznámou. Důvodem bádání a získávání nových poznatků, může být široké využití těchto látek v praxi. Díky svým unikátním fyzikálně-chemickým vlastnostem, schopnostem tvořit inkluzní komplexy a velmi nízké toxicitě, našly cyklodextriny i jejich deriváty široké využití v nejrůznějších odvětvích, jako například v potravinářském,<sup>3,4</sup> kosmetickém,<sup>5</sup> farmaceutickém,<sup>6-8</sup> zemědělském<sup>9</sup> nebo textilním průmyslu.<sup>10</sup>

Tato bakalářská práce si klade za cíl prozkoumání nové metodologie přípravy derivátů cyklodextrinů pomocí regioselektivní deacetylace. Motivací pro optimalizování této metody je ve výsledku snadná, časově a finančně nenáročná cesta, která vede k přípravě vhodných derivátů, díky nimž bychom mohli v blízké době modifikovat celou řadu nanomateriálů. Využití by takto připravené deriváty našly i jako velmi užitečné prekurzory pro další chemické syntézy.

## 2 Teoretická část

### 2.1 Cyklodextriny

První zmínky o cyklodextrinech (CD) se objevují již v 19. století. Za prvního objevitele této látky je považován francouzský chemik a lékárník Antoine Villiers,<sup>1</sup> který se zabýval aspekty chemie přírodních látek, především pak sacharidů a alkaloidů. V roce 1891 se mu podařilo získat krystalickou látku pomocí enzymatické degradace škrobu za působení *Bacillus amylobacter* (tato kultura zřejmě nebyla čistá a mohla obsahovat také *Bacillus macerans*).<sup>11</sup> Látku získal v nízkém výtěžku – přibližně 0,3 %. Výsledný produkt měl podobné vlastnosti jako celulóza, jelikož byl také odolný proti kyselé hydrolyze a měl neredukující vlastnosti. Na základě objevených znaků byla tato látka nazvána „cellulosin“. Vzorec nově objeveného produktu byl chybně stanoven  $[(C_6H_{10}O_5)_2 + 3H_2O]$ . Později vědci Philip C. Manor a Wolfram Saenger<sup>12</sup> prokázali, že se nejednalo o čistý CD, ale o směs  $\alpha$ - a  $\beta$ -CD. Na základě nových objevů upravili původní vzorec na  $[(C_6H_{10}O_5)_6 + H_2O]$ .

V roce 1903 panovalo podezření, že kmeny teplotně odolných mikroorganismů mohou vést k otravě z jídla. To motivovalo rakouského chemika a bakteriologa Franze Schardingera<sup>13</sup> ke studiu těchto kmenů. Štěpení škrobu, které prováděl pomocí *Bacillus macerans*,<sup>14</sup> vedlo ke vzniku dvou různých krystalických produktů ve výtěžku 25 – 30 %, tyto látky se zdály být velmi podobné té, kterou pojmenoval Villiers jako „cellulosin“. Proto se Schardinger rozhodl, že podrobněji prozkoumá vznikající látky, a dal tak základ chemii cyklodextrinů. Pomocí reakce s jodem, se mu podařilo rozlišit dva typy cyklodextrinů, které nazval „krystalický dextrin A a B“.

Mezi lety 1905 až 1911 detailně popsal přípravu, separaci a čištění „cellulosinu“. Dále pak zmapoval jeho chování v přítomnosti alkoholů, chloroformu a roztoku jodu, kde se poprvé projevila schopnost tvořit komplexy.<sup>15</sup>

Schopnost tvořit komplexy s některými organickými sloučeninami potvrdil v roce 1930 německý chemik a biochemik Hans Pringheim.<sup>16</sup> Je důležité poznamenat, že do této doby nebyla struktura dextrinů stanovena. Rovněž nebylo známo, že škrob je makromolekula složená z několika glukopyranosových jednotek. Strukturu CD se podařilo popsat, až v druhé polovině 30. let 20. století skupině

vědců, v čele s Karl J. Freudenbergem.<sup>17</sup> Tito vědci zjistili, že krystalické Schardingerovy dextriny jsou postaveny z glukopyranosových jednotek a obsahují pouze  $\alpha(1\rightarrow4)$  glykosidické vazby. Popsali též postup pro izolaci čistého CD a v roce 1936 postulovali cyklickou strukturu těchto krystalických dextrinů.<sup>18</sup> První patent<sup>19</sup> týkající se CD získali v roce 1953 Karl Freudenberg, Friedrich Cramer a Hans Plieninger. Tento dokument obsahoval prakticky veškeré doposud vyzkoumané aspekty CD. Patent zahrnoval objevy spojené především s komplexací CD, jako je zlepšení rozpustnosti léčiv, ochrany proti atmosférické oxidaci a snížení odpařování vysoce těkavých látek. Po těchto objevech se CD zpopularizovaly a začaly se jimi zabývat vědci, jako například John A. Thoman, Lynn Stewart,<sup>20</sup> nebo George V. Caesar.<sup>21</sup> Bohužel zájem o CD hned v počátcích klesl, jelikož roku 1957 sepsal Dexter French<sup>22</sup> první přehledný článek o CD, ve kterém uvedl dezinformaci o vysoké toxicitě CD. Za úhyn zvířat, na kterých probíhalo testování, mohly s velkou pravděpodobností nečistoty v podávaných CD. Trvalo téměř 25 let, než byly tyto mylné informace vyvráceny a popularita CD opět stoupla.

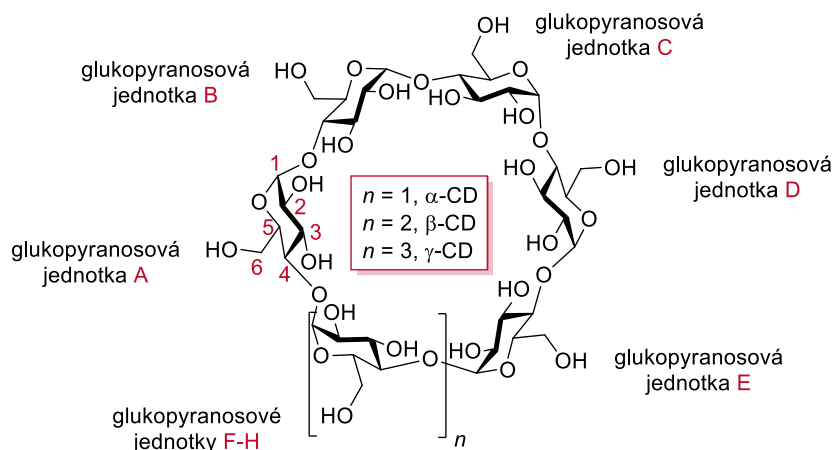
Stoupající trend zájmu o CD můžeme pozorovat i v dnešní době, což podtrhuje přibývajícím počet vědců, kteří se touto problematikou zabývají. V roce 2016 bylo zveřejněno přes 2 500 impaktovaných vědeckých publikací zabývajících se nejrůznějšími tématy CD. Důležitou roli hraje i uplatnění CD v praxi, a to v různých odvětvích – například v průmyslu farmaceutickém, kosmetickém, potravinářském, textilním atd. (viz níže).

### 2.1.1 Struktura a vlastnosti

Cyklodextriny (CD),<sup>23,24</sup> dříve známé též pod názvem cykloamylosy nebo cyklomaltodextriny, jsou cyklické oligosacharidy, jejichž základní stavební jednotkou jsou  $\alpha$ -D-glukopyranosové jednotky v židličkové konformaci  ${}^4C_1$ , které jsou do prstence vzájemně propojeny  $\alpha(1\rightarrow4)$  glykosidickými vazbami. Ke vzniku této vazby dochází při enzymatické degradaci amylosy za působení enzymů cyklomaltodextrin glykosyltransferáz – CGTáz, které jsou bakteriálního původu (např. produkované *Bacillus macerans* nebo *Bacillus stearothermophilus*).<sup>25</sup>

Podle počtu glukopyranosových jednotek, jež jsou propojeny v kruhu, dělíme CD na  $\alpha$ -CD (6 jednotek),  $\beta$ -CD (7 jednotek) a  $\gamma$ -CD (8 jednotek), jak můžeme vidět na obrázku 1. Tyto tři typy patří k nejčastěji využívaným, protože mají prostorově

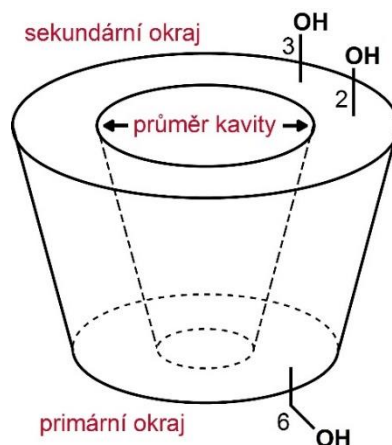
výhodnou konformaci, která jim zajišťuje dobré komplexační vlastnosti. Kromě těchto tří typů byl již vyroben pre- $\alpha$ -CD, jehož struktura je tvořena pěti glukopyranosovými jednotkami. Zároveň jsou známy typy obsahující větší počet jednotek:  $\delta$ -CD (9 jednotek),  $\epsilon$ -CD (10 jednotek) a některé z nich mohou být tvořeny až sto jednotkami.<sup>26</sup>



**Obrázek 1 – Struktura cyklodextrinů.**

Cyklodextriny mají v trojdimenzionálním prostoru tvar dutého komolého kužele (obrázek 2), kde se na sekundárním okraji nacházejí sekundární hydroxylové skupiny (OH skupiny), které jsou navázány na atomech uhlíku v polohách 2 a 3 na glukosové jednotce. Kdežto na primárním okraji nalezneme primární hydroxylové skupiny, jež jsou navázány na atomech uhlíku v polohách 6. Do kavity jsou orientovány nepolární C-H vazby vodíků H-3, H-5 a H-6, stejně jako atomy kyslíku z glykosidických vazeb. To způsobuje lipofilní charakter kavity. Naopak velký počet hydroxylových skupin s orientací ven z CD má na svědomí rozpustnost ve vodě a jiných polárních rozpouštědlech.

Cyklodextriny jsou za běžných podmínek bílé krystalické látky a mají zpravidla rigidní charakter. Tento charakter je dán možností vzniku intramolekulární vodíkové vazby mezi hydroxylovými skupinami na C-2 glukopyranosové jednotky a hydroxylovými skupinami na C-3 přilehlé glukopyranosové jednotky. V  $\beta$ -CD tvoří vodíkové můstky celý pás, což pravděpodobně zapříčiňuje nižší rozpustnost ve vodě oproti ostatním typům CD (viz tabulka 1).



**Obrázek 2 – Tvar cyklodextrinů.**

Cyklodextriny jsou stabilní v alkalických roztocích a do jisté míry také odolné proti kyselé hydrolyze, avšak s klesajícím pH nižším než 3,5 a teplotou vyšší než 60 °C dochází k rozkladu. Struktura odolává účinkům infračerveného, viditelného i ultrafialového záření.<sup>23</sup>

**Tabulka 1: Rozměry a základní vlastnosti  $\alpha$ -,  $\beta$ - a  $\gamma$ -CD.<sup>2,27</sup>**

	$\alpha$ -CD	$\beta$ -CD	$\gamma$ -CD
Počet glukosových jednotek	6	7	8
Molární hmotnost [g.mol <sup>-1</sup> ]	973	1135	1297
Rozpustnost ve vodě při 25 °C [g/100 ml]	14,5	1,85	23,2
Průměr kavity (primární/sekundární okraj) [nm]	0,47/0,52	0,60/0,64	0,75/0,83
Výška kavity [nm]	0,79	0,79	0,79
Přibližný objem kavit v 1 g CD [ml]	0,10	0,14	0,20
Krystalová voda [hmotnostní %]	10,2	13,2-14,5	8,1-17,7

S rostoucí mírou využití CD ve farmaceutickém a potravinářském průmyslu se nabízí otázka, zda jsou CD zdravotně nezávadné. Obecně jsou v dnešní době CD považovány za netoxické, jsou nedráždivé pro pokožku, oči a sliznice při inhalaci. LD<sub>50</sub> při perorálním podání u myši, krys a psů nabývá hodnot 12,5, 18,8 a 5 g na kg jejich tělesné váhy. Výhodou je, že jsou CD biodegradabilní, tedy nedochází k jejich kumulaci v životním prostředí. Toxikologické studie ovšem ukázaly, že některé deriváty CD mají škodlivý vliv na živé organismy. Například methylované deriváty CD mohou způsobit podráždění očí a alkylované deriváty mají škodlivé účinky



na ledviny a biologické membrány. Témata, zabývající se toxicitou látek, by neměla být brána na lehkou váhu a jsou stále velmi aktuální i v dnešní době.<sup>28–30</sup>

### 2.1.2 Inkluzní komplexy

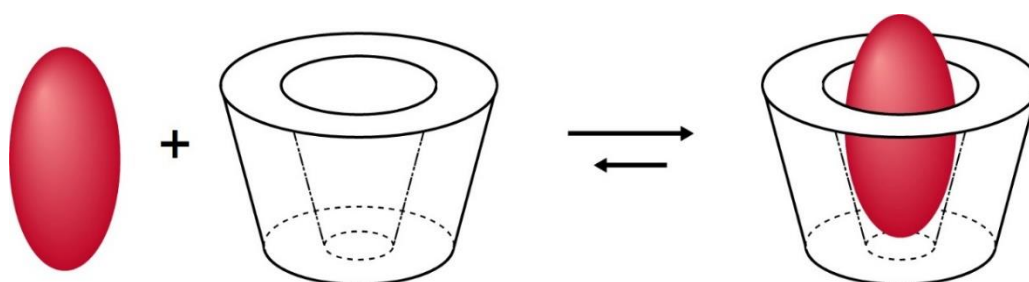
Jedním z pozoruhodných znaků CD je schopnost tvořit pevné inkluzní komplexy (hostitel-host z angl. host-guest) s velmi širokou škálou pevných, kapalných i plynných látek.<sup>31</sup> Inkluzní komplexy jsou dočasné útvary složené z hostitelské molekuly v našem případě molekuly CD a hosta, který musí vynikat odpovídající velikostí, strukturou i vlastnostmi. Lipofilní, neboli hydrofobní dutina CD (hostitele) poskytuje ideální mikroprostředí, které může být obsazeno vyhovující nepolární skupinou (host) za vzniku inkluzního komplexu (obrázek 3).

Stechiometrie komplexů hostitel:host může nabývat různých hodnot, ale ve většině případů nabývá poměru 1:1. Méně časté jsou pak poměry 1:2, 2:1 a 2:2.<sup>32–35</sup> Další typy supramolekulárních útvarů mohou nabývat velmi složitých a rozvětvených struktur, jako jsou například katenany, rotaxany, polyrotaxany a pseudorotaxany.<sup>36,37</sup>

Během tvorby inkluzního komplexu nevznikají, ani nezanikají žádné kovalentní vazby. Proces tvorby je reverzibilní a má dynamický charakter, to znamená, že dochází k neustálému vzniku a zániku nekovalentních vazeb mezi hostitelem a hostem. Za hlavní hnací sílu při tvorbě komplexu byla dlouhou dobu považována tzv. vysoko energetická voda, která měla být vypuzována z lipofilní dutiny CD. To mělo mít za následek získání stabilnějšího stavu s nižší energií. Na základě termodynamických pozorování byla tato teorie napadena a při nových studiích bylo zjištěno, že teorie vzniku komplexu je mnohem složitější, než bylo předpokládáno. Dnes již víme, že za tvorbu komplexu je odpovědné více typů interakcí především elektrostatické, van der Waalsovy interakce, indukční a disperzní síly i vodíková vazba. Neměli bychom opomenout vhodný tvar molekuly hosta. Důležitostí jednotlivých hnacích sil se v dnešní době zabývá především teoretické modelování a simulace tzv. QSAR (z angl. quantitative structure–activity relationship). Tyto modely jsou obvykle užitečné k předpovídání vazebné konstanty komplexu a k určení, jaká hnací síla je nejdůležitější v určitém komplexním systému.<sup>38</sup>

Vhodným hostem ke vzniku komplexu s CD z pohledu organické chemie může být široké spektrum organických lipofilních látek, jako jsou lineární či větvené uhlovodíkové řetězce, aldehydy, ketony a další.

Komplexace cyklodextriny má velký význam, především díky vlivu na fyzikálně-chemické vlastnosti hostující molekuly. Těmito vlastnostmi mohou být: zvýšení rozpustnosti vysoce nerozpustných látek, stabilizace látek citlivých na viditelné, UV záření nebo teplo, kontrola těkavosti a sublimace látek či ochrana proti oxidaci. Velká řada těchto vlastností má své praktické využití v různých průmyslových odvětvích.<sup>32</sup>



**Obrázek 3 – Vznik inkluzního komplexu.**

### 2.1.3 Výroba

S rostoucím využitím CD se v dnešní době zvyšuje poptávka a s ní i nároky na levnou a efektivní výrobu. Každoročně se této bílé krystalické látky vyrobí řádově tisíce tun a tento trend stále roste.

Prvním krokem při výrobě CD je rozpuštění škrobu při zvýšené teplotě, a poté následuje částečná hydrolýza. Takto připravený škrob nesmí obsahovat glukózu, nebo nízkomolekulární oligosacharidy, protože by došlo ke snížení výtěžku výsledných CD. Následuje přidání enzymu cyklomaltodextrin glukanotransferázy (EC 2.4.1.19).

Tento enzym je produkován širokou škálou mikroorganismů: *Bacillus macerans*, *B. megaterium*, *B. careus*, *B. stearothermophilus*, *B. circulans*, *Klebsiella pneumoniae*, *K. oxytoca*, *Micrococcus leuteus*, *Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes* a další.<sup>39</sup>

CGT-asy štěpí  $\alpha(1\rightarrow4)$  glykosidické vazby v  $\alpha$ -glukanech. (oligosacharidy či polysacharidy složené z opakujících se glukozových jednotek), čímž vznikne stabilní kovalentní glykosylový meziprodukt. Glykosylový meziprodukt se poté spojí

s vlastním neredukujícím koncem na hydroxylové skupině na C-4, a tím dojde ke vzniku nové  $\alpha(1\rightarrow4)$  glykosidické vazby. Tento proces není selektivní a vede k tvorbě směsi různých typů CD, které musí být následně separovány. Vyšší selektivnost reakce se může zajistit, přidáním komplexačního činidla. Pro maximální vznik  $\alpha$ -CD je do reakce přidán dekan-1-ol, pro  $\beta$ -CD toluen a pro  $\gamma$ -CD cyklohexadekanol. Volba komplexotvorné látky závisí na ceně, toxicitě a především možnosti odstranění této látky z konečného krystalického produktu.

V dnešní době jsou již známi postupy, jak vyrobit  $\alpha$ -,  $\beta$ - i  $\gamma$ -CD v čistotě vyšší než 98 %, což je důležité především pro potravinářský průmysl. Výtěžky některých výrobních postupů přesahují i 95 %.<sup>2,40</sup>

#### 2.1.4 Využití

Jak již bylo napsáno výše, CD se běžně využívají v různých odvětvích průmyslu, což je dáno především jejich unikátními vlastnostmi. Hlavní předností je tvorba inkluzních komplexů (viz kapitola 2.1.2) a tím ovlivnění fyzikálně-chemických vlastností jiných látek. Velmi důležitá je také zdravotní nezávadnost. Možná si to neuvědomujeme, ale v potravinářských a kosmetických produktech se s CD můžeme setkat každý den.

Cyklodextriny se často využívají v potravinářském průmyslu jako přídatné látky neboli aditiva. Například  $\beta$ -CD můžeme v potravinách nalézt pod označením E 459. Cyklodextriny se používají jako stabilizátory barviv, chutí a vitamínů. Často se CD využívají k pohlcení užitelsky nepříjemných hořkých chutí. Další využití je při odstraňování kofeinu z kávy či čaje. Cyklodextriny tvoří komplexy s cholesterolem, čehož je využíváno při odstraňování této látky z vajec nebo z mléka. S CD se můžeme setkat nejen v potravinách, ale také v obalech, ve kterých jsou potraviny uchovávány. V obalech tvoří CD komplexy především s těkavými látkami, které by mohly kontaminovat potraviny. Další důležitou vlastností je, že v obalech zlepšují bariérové vlastnosti tzn. omezení rychlosti difuze a prostupnost částic obalem.<sup>4,31</sup>

Počet patentů, zajišťujících výsadní právo k průmyslovým postupům a využití CD v kosmetickém průmyslu rok od roku roste. Příkladem může být použití CD v Tea tree oleji. Čistý olej je stabilní v řádu měsíců ovšem s podmínkou absence světla a kyslíku. V opačném případě začnou terpeny obsažené v oleji reagovat za

vzniku 4-isopropyltoluenu, který je pro pokožku dráždivý. Po přidání CD a komplexaci je Tea tree olej stabilní proti působení světla i kyslíku, a tak je tvorbě nežádoucích látek zabráněno. Přitom jsou zachovány antimikrobiální i protizánětlivé vlastnosti oleje. Často jsou také CD přidávány do parfémů a deodorantů, kde zabraňují rychlému vypaření vonných látek, a tím zajišťují delší účinek.<sup>5</sup>

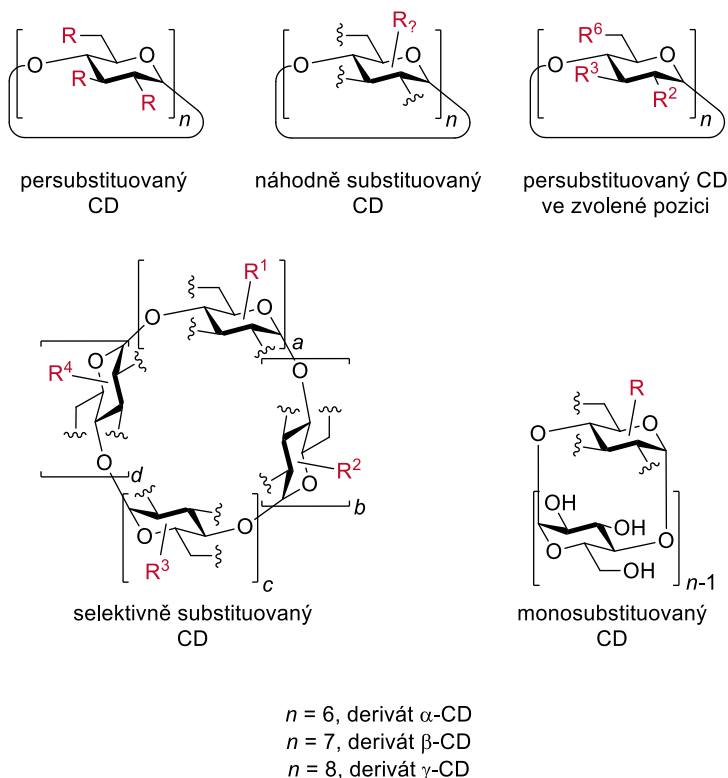
Ve farmaceutickém průmyslu se CD využívají ke stabilizaci a ovlivnění rozpustnosti léčiv v těle pacienta. Cyklodextriny zajišťují lepší biologickou dostupnost a efektivnější vstřebávání medikamentů. Je prokázáno, že zmírňují nežádoucí vlastnosti léků, ať už jsou do těla podávány perorálně, rektálně, nebo dalšími způsoby. Další důležitou roli hrají CD ve zdravotnických textiliích, kde se objevují na antibakteriálních a antialergických obvazech, ale i běžném textilu, například na tričkách, kalhotách, ponožkách, pyžamech atd. Nejnovější aplikace využívají CD jako tkáňový nosič, na kterém následně „rostou“ umělé cévní náhrady, stenty, náhražky šlach a chirurgických vláken.<sup>41,42</sup>

Bohužel v bakalářské práci nelze obsáhnout všechny možnosti využití různých typů CD, proto bych rád doporučil v případě zájmu čtenáře následující literaturu, která se zabývá využitím CD v chemosensorech,<sup>43</sup> separačních metodách,<sup>44</sup> textilním,<sup>10</sup> a zemědělském průmyslu.<sup>9</sup>

## 2.2 Monosubstituované deriváty cyklodextrinů

Tam, kde přestávají CD stačit, se na řadu dostávají jejich deriváty, čímž se ještě zvyšuje využitelnost.<sup>2</sup> Základní typy CD obsahují 18 ( $\alpha$ -CD), 21 ( $\beta$ -CD) a 24 ( $\gamma$ -CD) hydroxylových skupin, které lze libovolně modifikovat, a tak dostáváme široké spektrum nových derivátů rozličných vlastností. Počet známých derivátů CD je obrovský: při vyhledávání v databázi SciFinder<sup>®</sup> se dozvídáme o existenci více než 2000 známých derivátů  $\alpha$ -CD, téměř 8000 derivátů  $\beta$ -CD, a také více než 1000 derivátů  $\gamma$ -CD. Většina dosud syntetizovaných derivátů však nenašla své uplatnění, protože zahrnují složité kroky syntéz, což má za následek nízké výtěžky a vysokou cenu. Aby bylo možné deriváty CD využít v praxi, musí být zachována jejich zdravotní nezávadnost a komplexační vlastnosti. Komerčně dostupné deriváty CD našly své uplatnění především v chromatografických, diagnostických metodách a také jako intermediáty pro další chemické syntézy.<sup>43,44</sup>

Reakcí CD s reaktantem dochází k modifikaci hydroxylových skupin, a tím vzniká směs izomerů s různým stupněm substituce: mono-, di-, tri- i více substituované deriváty. Jednotlivé izomery se liší polohou substituentu/ů v rámci jedné glukopyranosové jednotky, ale i umístěním glukopyranosové jednotky v celém CD. Proto rozlišujeme různé druhy derivátů CD: persubstituované CD, náhodně substituované CD, persubstituované CD ve zvolené pozici, selektivně substituované CD a monosubstituované CD (obrázek 4).



**Obrázek 4 – Jednotlivé typy derivátů CD.**

Vzniklé směsi jednotlivých izomerů je po syntéze nutné separovat, což může být velmi obtížné. Pro monosubstituované deriváty je možný vznik tří různých izomerů, pro disubstituované deriváty je možný vznik desítek izomerů a pro tri- a více substituované deriváty toto číslo ještě více roste. Z tohoto důvodu je výhodná příprava především persubstituovaných a monosubstituovaných derivátů.

Monosubstituované deriváty se připravují derivatizací vodíku na hydroxylové skupině. Velké množství hydroxylových skupin v polohách 2, 3 a 6, které si navzájem konkurují, však znesnadňuje substituci na cílené OH skupině. Možností, jak docílit regioselektivní modifikace CD je využít odlišných vlastností hydroxylových skupin v různých polohách.<sup>45-47</sup>

Hydroxylové skupiny v poloze 6 jsou díky svému umístění na primárním okraji CD nejlépe přístupné, a nejméně kyselé ( $pK_a = 15-16$ ). Díky tomu OH skupiny v této poloze velmi dobře reagují s elektrofilními činidly, čehož se využívá například při reakci CD a tosylchloridu v pyridinu. Výsledkem reakce je vznik monosubstituovaného 6<sup>A</sup>-*O*-tosyl-cyklodextrinu.<sup>46</sup>

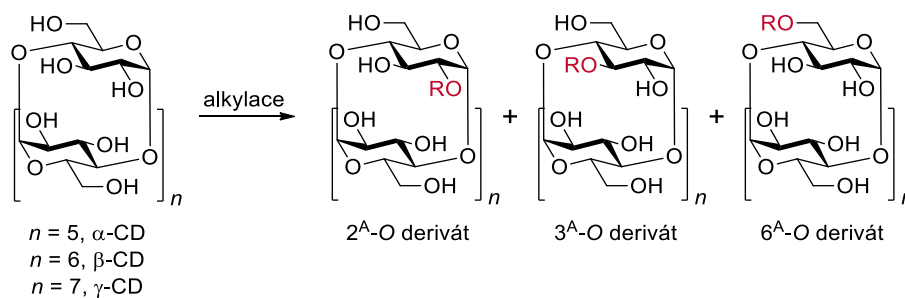
Nejméně reaktivní hydroxylové skupiny jsou v poloze 3. Nevýhodou této polohy je špatná přístupnost, a proto se pro získání většiny derivátů v poloze 3 musíme spokojit s nízkým výtěžkem. Ve většině případů tyto deriváty získáváme jako vedlejší produkty při výrobě 2-*O* nebo 6-*O* derivátů.

Nejkyslejší hydroxylové skupiny jsou v poloze 2 ( $pK_a = 12,2$ ). Při reakci s bází jsou tyto OH skupiny deprotonovány jako první za vzniku oxyaniontu, který je navíc stabilizován již zmíněnou vodíkovou vazbou. Vytvořený oxyanion je nukleofilnější než ostatní nedeprotonované hydroxylové skupiny. Komplikace nastávají s přenosem protonu (např. kationt vodíku  $H^+$ ) mezi polohami 2 a 6. To se projevilo při syntéze 2<sup>A</sup>-*O*-tosyl- $\beta$ -cyklodextrinu, který vznikl jako produkt ve směsi s 6<sup>A</sup>-*O*-tosyl- $\beta$ -CD.

Další důležitou roli hrají použitá rozpouštědla. Ta mohou ovlivnit nukleofilitu oxyaniontu, stejně tak sílu a orientaci komplexu substitučního činidla s CD. V případě, že je komplex silný, je tvorba daného derivátu řízena především prostorovou orientací činidla, v opačném případě je více ovlivněna nukleofilitou OH skupin.

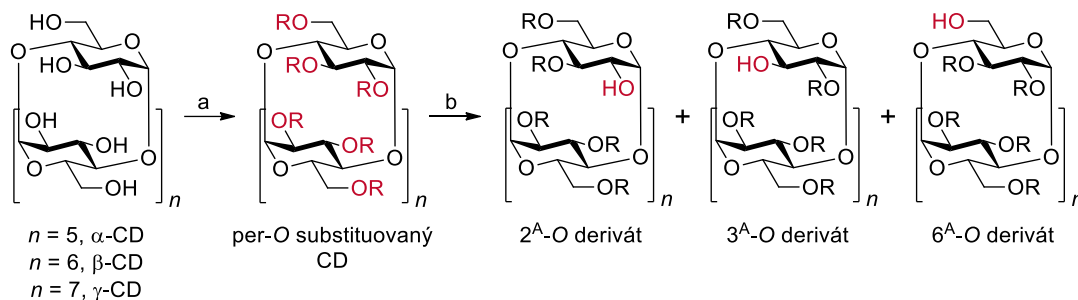
Metody pro vznik selektivních monosubstituovaných derivátů můžeme rozdělit do dvou kategorií: metody přímé a nepřímé.<sup>45</sup>

Přímé metody (obrázek 5) se využívají především díky získání výsledného produktu zpravidla jedнокrokovou syntézou. Výchozí látkou pro tyto metody je neupravený cyklodextrin. Při přímých metodách se často využívají unikátní fyzikálně-chemické vlastnosti CD. Mezi výhody přímých metod patří především již zmíněná jedнокroková syntéza produktu. Naopak nevýhodou je vznik izomerů. Jelikož mají výsledné deriváty modifikovanou pouze jednu hydroxylovou skupinu, ostatní OH skupiny mohou dále zasahovat do dalších reakcí, což je nežádoucí.



**Obrázek 5 – Princip přímé metody vzniku monosubstituovaného derivátu CD.**

Principem nepřímých metod je nejprve ochránění všech hydroxylových skupin (obrázek 6a). Per-*O* substituovaný CD lze připravit obvykle jednoduchými chemickými reakcemi s výtěžky blížícími se ke 100 %. Dalším krokem je selektivní ochránění chránicí skupiny (např. methylové) na příslušné pozici (obrázek 6b). Výhodou nepřímých metod je variabilnější použití, protože dále reagovat může pouze jedna specifická OH skupina, která může být dále upravena standardními reakcemi na téměř jakýkoli požadovaný monosubstituovaný derivát CD. Za nevýhody lze považovat více reakčních kroků. Je důležité upozornit na to, že v této práci se monosubstituovanými deriváty rozumí i deriváty, které mají pouze jednu OH skupinu a všechny ostatní OH skupiny jsou ochráněny (např. acetylovány, benzylovány, methylovány apod.).



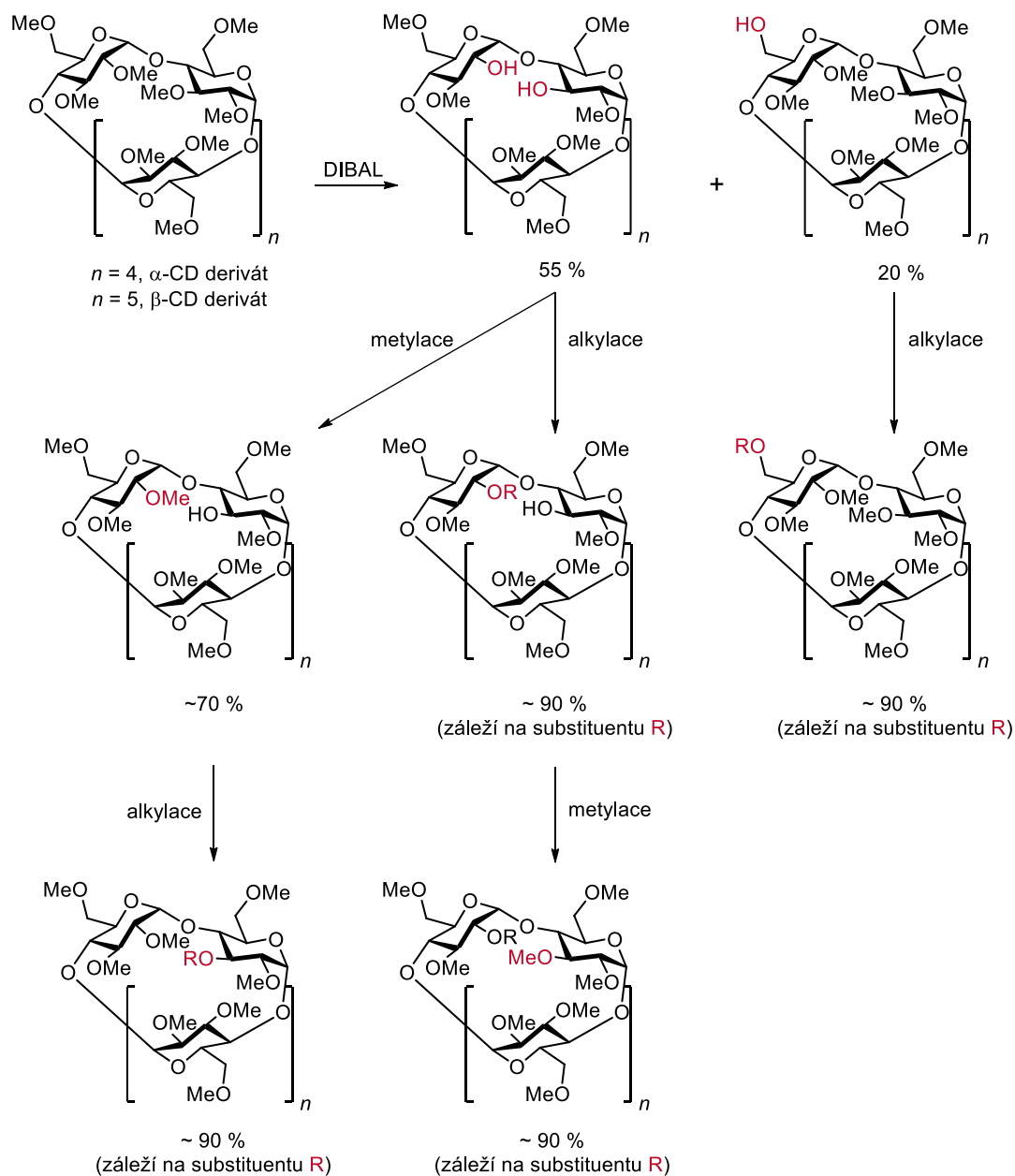
**Obrázek 6 – Princip nepřímé metody vzniku monosubstituovaného derivátu CD.**

Ve své bakalářské práci jsem se vydal cestou nepřímých metod přípravy monosubstituovaných derivátů CD. Nechal jsem se inspirovat odbornými články, ve kterých již byly popsány některé postupy selektivního odchránění persubstituovaných CD.

### 2.2.1 Selektivní demethylace

Jedním z hlavních důvodů přípravy methylovaných derivátů CD byla lepší rozpustnost těchto derivátů i jejich komplexů ve vodě nebo v organických

rozpouštědlech. V průběhu let byla vyzkoumána metoda, která je založena na regioselektivním odchránění permethylovaného CD za použití diisobutylaluminium hydridu (DIBAL). Díky této metodě je dnes možná příprava všech tří izomerů permethylovaných monosubstituovaných derivátů CD (obrázek 7).<sup>48,49</sup>



**Obrázek 7 – Schéma selektivní de-O-methylace CD.<sup>45</sup>**

Výchozí látkou pro selektivní de-O-methylaci je komerčně dostupný permethylovaný  $\alpha$ -CD nebo  $\beta$ -CD. Do reakce se následně přidá přebytek DIBAL v toluenu a reakce je míchána při teplotě 50 °C po dobu 3 hodin. Jako hlavní produkt je získán v 55% výtěžku permethylovaný 2<sup>A</sup>,3<sup>B</sup>-dihydroxy  $\alpha$ - či  $\beta$ -CD a minoritním



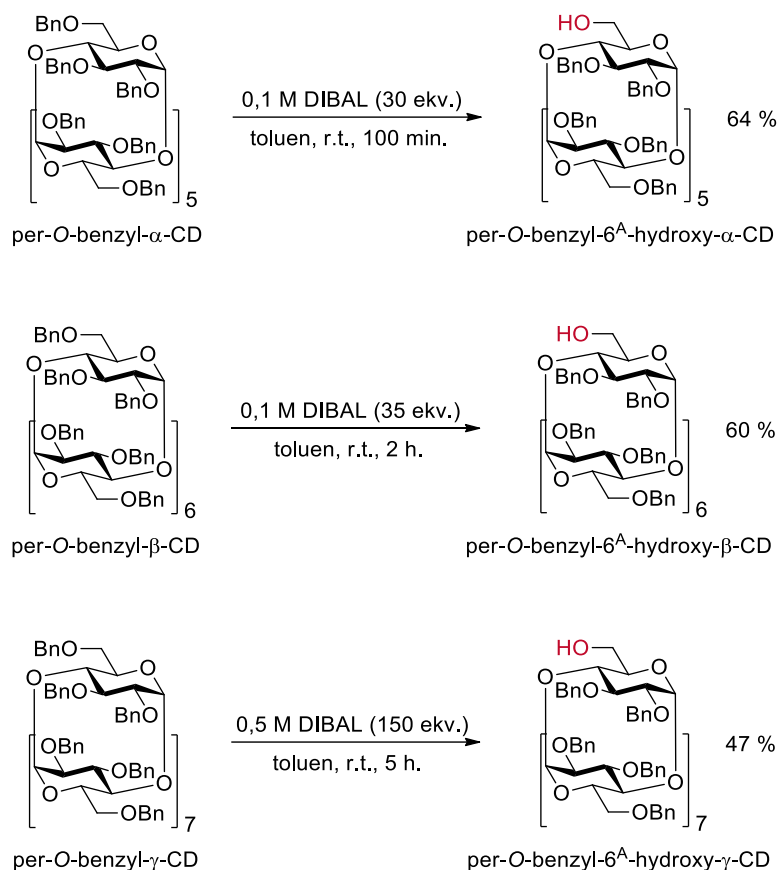
produktem je v 20% výtěžku 6<sup>A</sup>-hydroxy  $\alpha$ - či  $\beta$ -CD. Jednotlivé deriváty získáváme ve směsi, a proto je nutné je od sebe oddělit například pomocí sloupcové chromatografie. Další reakcí můžeme 2<sup>A</sup>,3<sup>B</sup>-dihydroxy derivát methylovat v poloze 2<sup>A</sup> za vzniku 3<sup>A</sup>-hydroxy derivátu nebo nejprve alkylovat v poloze 2<sup>A</sup> a následně methylovat v poloze 3<sup>B</sup> za tvorby permethylovaných 2<sup>A</sup>-alkylových derivátů. Obě tyto možnosti využívají vyšší reaktivitu hydroxylové skupiny v poloze 2, o které již bylo psáno výše. Díky této metodě lze syntetizovat permethylované 2<sup>A</sup>-O, 3<sup>A</sup>-O nebo 6<sup>A</sup>-O deriváty, bez ohledu na to, jaké alkylační činidlo je používáno.

### 2.2.2 Selektivní debenzylace

Další metoda, která využívá DIBAL je selektivní de-O-benzylace perbenzylovaných  $\alpha$ -,  $\beta$ - nebo  $\gamma$ -CD. Primární využití našla tato metoda především při přípravě diolů, ovšem lze ji použít i pro syntézu monosubstituovaných 6<sup>A</sup>-hydroxy derivátů. Výtěžky se pohybují okolo 60 %, pro  $\gamma$ -CD pak 47 % (obrázek 8). Deriváty připravené touto metodou našly využití jako prekurzory pro přípravu umělých enzymů nebo systémů podporujících lepší dávkování léčiv.<sup>45,50</sup>

Syntéza se provádí přidáním určitého množství DIBAL k výchozí látce, kterou je v tomto případě perbenzylovaný  $\alpha$ -,  $\beta$ - nebo  $\gamma$ -CD. Reakční směs je nadále míchána za laboratorní teploty po různou dobu.

Tyto deriváty mohou být použity pro následnou alkylaci, kde se výtěžky pohybují kolem 90 %. Vždy však záleží na substituentu a zvolených podmínkách při alkylaci. Alkylační činidlo musí být kompatibilní s odchraňovací reakcí, kdy jsou odstraněny všechny zbylé benzylové skupiny. Při odchraňování se často využívají redukce vodíkem za katalýzy přechodnými kovy či jejich oxidy – kupříkladu H<sub>2</sub> s Pd.

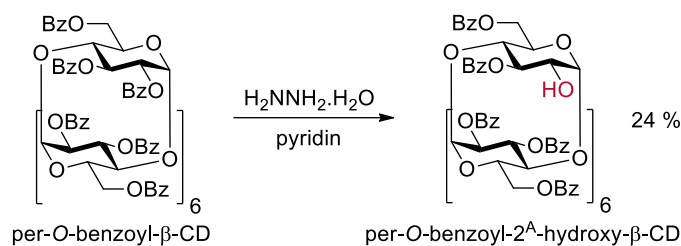


Obrázek 8 – Schéma selektivní de-*O*-benzylace CD působením DIBAL.<sup>50</sup>

### 2.2.3 Selektivní debenzoylace

Čtenář by se neměl nechat zmást tím, že se název selektivní debenzoylace (obrázek 9) liší od selektivní de-*O*-benzylace pouze jedním písmenem. Ačkoli jsou obě selektivní metody obdobné, nalezneme u nich řadu rozdílů.

Odlišná není pouze benzoylová chránicí skupina, kterou tvoří ester, ale také je při této metodě použit jiný reaktant (hydrazin) i jiné rozpouštědlo (pyridin). Hlavním rozdílem je pak tvorba 2<sup>A</sup>-hydroxy derivátu. Jak je zvykem u nepřímých metod, výchozí látka je vždy obdobná – v tomto případě per-*O*-benzoyl-β-CD. Po selektivním odchránění je získáno 24 % výsledného produktu: per-*O*-benzoyl-2<sup>A</sup>-hydroxy-β-CD.<sup>51</sup> Výtěžek reakce není nijak velký, nicméně vhodnější metoda pro vznik stejných derivátů dosud nebyla popsána.

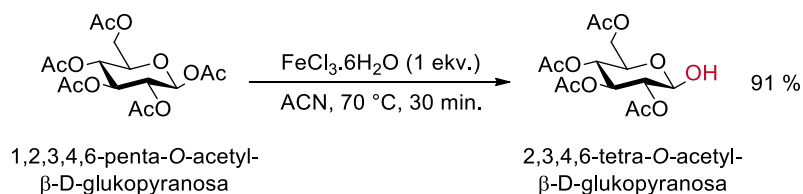


Obrázek 9 – Schéma selektivní debenzoylace CD pomocí hydrazinu.<sup>45</sup>

## 2.2.4 Selektivní deacetylace

Selektivní deacetylace by v budoucnu mohla být další metodou, pomocí které bychom mohli být schopni připravit monosubstituované deriváty v přijatelných výtěžcích. Do této doby však nebyl publikován žádný postup zabývající se selektivním odchraňováním peracetylovaných CD. V literatuře<sup>52–54</sup> byly popsány pouze reakce, které vedly k odstranění acetylové skupiny z derivátů glukosy, monosacharidů, disacharidů atd., nikoliv však z cyklodextrinů.

V následujících publikacích byly zveřejněny postupy k selektivnímu odchraňování monosacharidů a disacharidů. Literatura<sup>53</sup> uvádí postup selektivního odchraňování 1,2,3,4,6-penta-*O*-acetyl- $\beta$ -D-glukopyranosy. Jako odchraňovací činidlo byl použit octan zinečnatý a reakce probíhala v methanolu. Výsledkem bylo získání 2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-D-glukopyranosy ve výtěžku 75 %. Obdobnou reakci popsal v roce 2008 vědec Guohua Wei.<sup>52</sup> Ten aplikoval k odchraňování 1,2,3,4,6-penta-*O*-acetyl- $\beta$ -D-glukopyranosy deacetylující činidlo  $\text{FeCl}_3\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ . Jako rozpouštědlo v tomto postupu využil ACN a reakce byla míchána půl hodiny za teploty 70 °C. Výsledkem byl vznik 2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- $\beta$ -D-glukopyranosy ve výtěžku 91 % (obrázek 10).

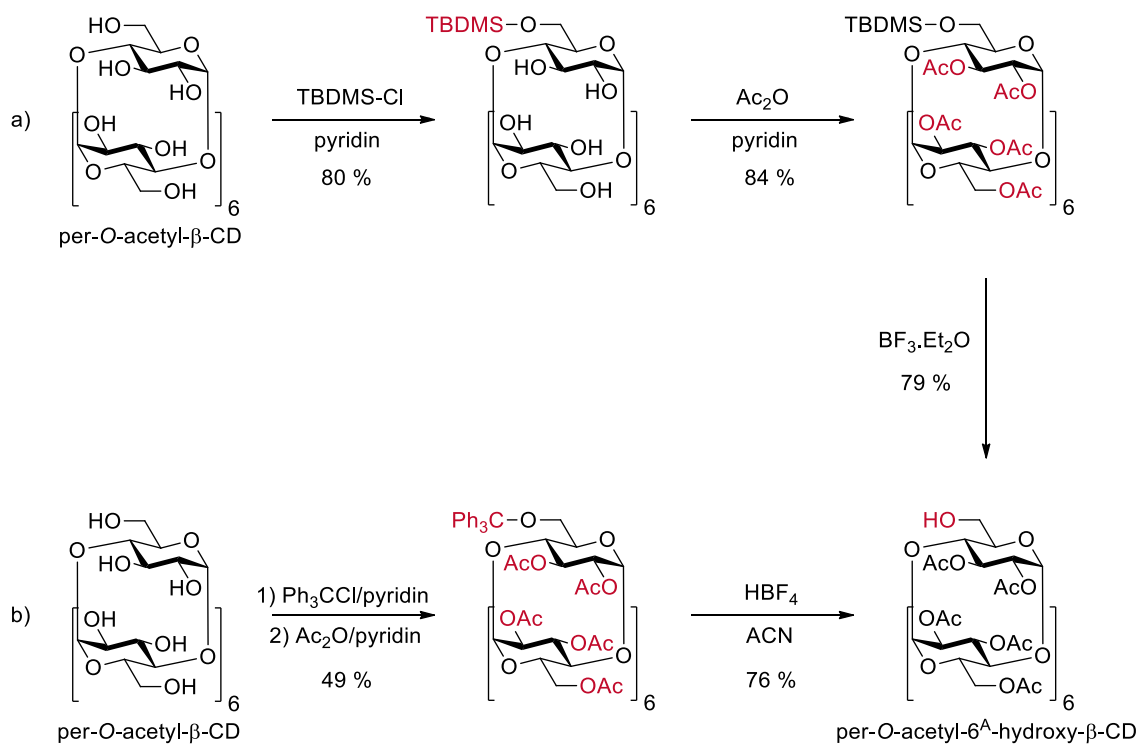


Obrázek 10 – Schéma selektivní deacetylace glukopyranosy.<sup>52</sup>

Vrátíme-li se zpět k monosubstituovaným derivátům CD, je důležité uvést, že per-*O*-acetyl-6<sup>A</sup>-hydroxy- $\beta$ -CD již byl (na rozdíl od izomerů v polohách 2 a 3)

syntetizován. Nejednalo se však o selektivní deacetylaci, ale o složitý proces zahrnující několik chránících a odchránovacích reakčních kroků.

Dle literatury<sup>55</sup> (obrázek 10a) bylo nejprve nutné na  $\beta$ -CD ochránit hydroxylovou skupinu v poloze 6 a to za pomoci TBDMS chránící skupiny. Následovala reakce, při které byly acetylovány zbývající hydroxylové skupiny, a poté přišla na řadu reakce, jež odstranila chránící TBDMS skupinu v poloze 6. Výsledkem je vznik per-*O*-acetyl-6<sup>A</sup>-hydroxy- $\beta$ -CD s celkovým výtěžkem 53 %. Tento derivát je také možné připravit obdobným způsobem (obrázek 10b), kdy je použit trityl jako chránící skupina pro polohu 6.<sup>56</sup> Tímto postupem byl získán požadovaný produkt v celkovém výtěžku 37 %.



**Obrázek 10 – Příprava per-*O*-acetyl-6<sup>A</sup>-hydroxy- $\beta$ -CD.**

Od regioselektivní deacetylace se očekává, že usnadní přípravu a zvýší výtěžky acetylovaných derivátů CD. Výhodou může být již příprava peracetylovaného CD, která je velmi jednoduchá, finančně nenáročná a s výtěžky blízkými se ke 100 %. Další nespornou výhodou je přesné a jednoduché určení polohy substituentu monosubstituovaného CD pouze pomocí <sup>1</sup>H NMR spektra (běžně je nutné použít 2D NMR). Metodu pro zjištění polohy pomocí <sup>1</sup>H NMR navrhli vědci Michal Řezanka

a Jindřich Jindřich<sup>57</sup> a je založena na specifickém posunu signálu atomu vodíku v různých polohách. Lze takto tedy rozlišit všechny tři typy peracetylovaných mono-*O*-substituovaných derivátů  $\alpha$ -,  $\beta$ - i  $\gamma$ -CD.

Díky těmto výhodám popisované regioselektivní odchraňovací reakce lze předpokládat perspektivní využití této metody i do budoucna. Z tohoto důvodu jsem se ve své bakalářské práci zabýval právě přípravou monosubstituovaných derivátů CD selektivní deacetylací.

### 3 Experimentální část

Použité chemikálie a rozpouštědla v reakcích byly zakoupeny od běžných komerčních dodavatelů Sigma-Aldrich, s.r.o., Ing. Petr Švec – Penta, s.r.o. a Lach-Ner, s.r.o. Při práci v inertní atmosféře byl použit argon.

$^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  a 2D NMR experimenty byly měřeny na přístrojích Varian Gemini 300 HC (s pracovní frekvencí 300 MHz pro  $^1\text{H}$  NMR a 75 MHz pro  $^{13}\text{C}$  NMR) a Agilent 400-MR DDR2 (s pracovní frekvencí 400 MHz pro  $^1\text{H}$  NMR a 100 MHz pro  $^{13}\text{C}$  NMR). Chemické posuny jsou uvedeny v ppm a jsou referencovány na signál rozpouštědla, případně TMS jako interního standardu. Interakční konstanty jsou uvedeny v Hz. Přiřazení signálů bylo v případě nutnosti upřesněno pomocí 2D NMR technik se standardními pulzními sekvencemi firmy Agilent. Komerční deuterovaná rozpouštědla byla použita bez dalšího čištění.

Průběh reakce a vznik dílčích izomerů byl kontrolován pomocí tenkovrstvé chromatografie (TLC) na hliníkových destičkách se silikagelem 60 F<sub>254</sub> (Merck, Německo). U některých vzorků byla též provedena reversní TLC, pro kterou byly použity hliníkové destičky se silikagelem 60 RP-18 F<sub>254</sub>S (Merck, Německo). Po nanesení vzorku na TLC byla (pokud není uvedeno jinak) použita mobilní fáze ve složení  $\text{CHCl}_3$ :MeOH v poměru 20:1. Po vyvinutí byly TLC destičky smočeny v 50% vodném roztoku kyseliny sírové a karbonizovány zahřátím horkovzdušnou pistolí.

Pro sloupcovou chromatografii byl použit silikagel s velikostí částic 40 – 60  $\mu\text{m}$ . Mobilní fáze složená z  $\text{CHCl}_3$ :MeOH byla volena v rozmezí 20:1 až 100:1. Silikagel s velikostí částic 40 – 63  $\mu\text{m}$  byl využíván pro reverzní sloupcovou chromatografii a eluentem byl roztok  $\text{H}_2\text{O}$ : ACN v poměru 4:3.

K separaci složek vzorků byl použit HPLC systém Ultimate 3000 firmy Dionex s připojeným UV-VIS diode array detektorem Dionex Ultimate a ELSD detektorem Varian 385-LC. Separace probíhala na koloně Kinetex 2,6  $\mu\text{m}$  C18 100 Å s délkou 150 mm a vnitřním průměrem 4,6 mm od firmy Phenomenex. Organická složka mobilní fáze byla tvořena čistým ACN, vodná fáze obsahovala 5% ACN, do kolony byly nanášeny obě složky v poměru 1:1. Přístroj byl ovládán softwarem Chromeleon verze 6.80 SR12.

K měření hmotnostních spekter byl použit hmotnostní spektrometr AB Sciex 3200 QTRAP a kapalinový chromatograf Dionex Ultimate 3000. Bylo manuálně nastříkováno 5  $\mu$ l vzorku dávkovací smyčkou do proudu nosného roztoku. Nosný roztok měl složení 0,1% kyseliny mravenčí v 90% methanolu. Průtok nosného roztoku činil 0,2 ml/min. Byl použit ESI iontový zdroj se sprejovacím napětím +5500 V, tlak curtain gas 30 psi, tlak gas 1 a 2 40 psi a teplota iontového zdroje byla stanovena na 300 °C. Spektra byla měřena v pozitivním režimu.

### 3.1 Příprava per-*O*-acetyl- $\beta$ -CD

$\beta$ -CD (3 g, 2,64 mmol) byl suspendován v Ac<sub>2</sub>O (15 ml) a Et<sub>3</sub>N (15 ml). Reakční směs byla míchána přes noc (14 h.) při teplotě 80 °C. Poté byl produkt vytřepán mezi CHCl<sub>3</sub> (300 ml) a 5% HCl (300 ml). Vzniklý per-*O*-acetyl- $\beta$ -CD přešel do chloroformové fáze, která byla odpařena na rotační vakuové odparce (RVO). K odparku byl následně přidán toluen, aby došlo k odpaření kyseliny octové vznikající při reakci. Žlutohnědý produkt byl přečištěn pomocí sloupcové chromatografie na 100 g silikagelu. Jako mobilní fáze byl použit roztok CHCl<sub>3</sub>:MeOH v poměru 100:1 (750 ml), 50:1 (500 ml) a 20:1 (500 ml). Po odpaření frakcí na RVO byl získán lehce nažloutlý produkt (4,9 g, výtěžek 92 %). Naměřené <sup>1</sup>H NMR spektrum souhlasí s literaturou.<sup>58</sup>

### 3.2 Pilotní studie deacetylačních reakcí

Per-*O*-acetyl- $\beta$ -CD (20 mg, 0,01 mmol) byl rozpuštěn v 0,5 ml příslušného rozpouštědla (tabulka 2). Dále bylo do reakce přidáno ochraňovací činidlo a reakce byla míchána za konstantní teploty po určitou dobu (viz tabulka 2). Průběh reakcí byl sledován pomocí TLC, MS a HPLC.

### 3.3 Příprava per-*O*-acetyl-6<sup>A</sup>-hydroxy- $\beta$ -CD

Syntéza tohoto produktu byla inspirována a) lit.<sup>52</sup> a za b) lit.<sup>50</sup>

a) Per-*O*-acetyl- $\beta$ -CD (1 g, 0,5 mmol) byl rozpuštěn v ACN (25 ml). Dále byl do reakční směsi přidán FeCl<sub>3</sub>.6 H<sub>2</sub>O (135 mg, 0,5 mmol) a reakční směs byla míchána 6 dní při r.t. Průběh reakce byl sledován pomocí TLC. Následně byla směs vytřepána mezi CH<sub>3</sub>Cl (200 ml) s H<sub>2</sub>O (200 ml) a organická fáze odpařena RVO. Surový produkt byl čištěn na 50 g

silikagelu a jako mobilní fáze byla použita směs  $\text{CHCl}_3$ :MeOH v poměru 60:1 (2 l). Čisté frakce byly odpařeny na RVO. Směsné frakce byly naneseny do kolony a proběhla druhá chromatografie na 30 g silikagelu se stejným eluentem  $\text{CHCl}_3$ :MeOH v poměru 60:1 (1,2 l). Po odpaření byly čisté frakce spojeny a naposledy naneseny na kolonu s 10 g silikagelu, s mobilní fází  $\text{CHCl}_3$ :MeOH v poměru 10:1 (1,2 l). Po odpaření pomocí RVO a olejové vývěvy byl získán produkt per-*O*-acetyl-6<sup>A</sup>-hydroxy- $\beta$ -CD (172 mg, výtěžek 17 %).

- b) Syntéza byla provedena pod inertním plynem (argon). Byl navážen per-*O*-acetyl- $\beta$ -CD (1 g, 0,50 mmol), vzorek byl rozpuštěn v sušeném toluenu (25 ml) a následně byl přidán roztok DIBAL v toluenu 1 M (5 ml, 10 ekv.). Reakce byla míchaná v inertní atmosféře při r.t. 1 hodinu. Reakce byla kontrolována pomocí TLC. Po ukončení reakce byl vzorek vytřepán mezi  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (200 ml) s  $\text{H}_2\text{O}$  (200 ml) a chloroformová váže odpařena na RVO. Poté bylo přistoupeno k chromatografii na 30 g silikagelu a jako mobilní fáze byl použit roztok  $\text{CHCl}_3$ :MeOH v poměru 60:1 (1,5 l). Čisté frakce byly spojeny a po odpaření na RVO byl získán per-*O*-acetyl-6<sup>A</sup>-hydroxy- $\beta$ -CD (112 mg, výtěžek 11 %).

### 3.4 Příprava per-*O*-acetyl-2<sup>A</sup>-hydroxy- $\beta$ -CD

Z předchozí reakce (viz kapitola 3.2, postup a) byl po dvou chromatografiích získán také jako vedlejší produkt 2<sup>A</sup>-derivát, ten byl ještě přečištěn sloupcovou chromatografií na 8 g reverzního silikagelu, v tomto případě byla jako mobilní fáze použita směs rozpouštědel  $\text{H}_2\text{O}$ :ACN v poměru 4:3. V konečném důsledku byl získán vedlejší produkt per-*O*-acetyl-2<sup>A</sup>-hydroxy- $\beta$ -CD (39 mg, výtěžek 4 %). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  5.35–5.24 (m, 7 H, H-3), 5.14–5.03 (m, 7 H, H-1), 4.86–4.74 (m, 6 H, H-2), 4.40 (dd,  $J = 12.4, 3.9$  Hz, 1 H, H-2), 4.64–3.63 (m, 28 H, 7  $\times$  H-5, 14  $\times$  H-6, 7  $\times$  H-4), 2.14–2.02 (m, 60 H, 20  $\times$   $\text{CH}_3$ ) ppm. <sup>13</sup>C NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  170.89–169.30 (20  $\times$  C=O), 96.97–96.66 (7  $\times$  C-1), 77.14–69.43 (7  $\times$  C-2, 7  $\times$  C-3, 7  $\times$  C-4, 7  $\times$  C-5), 63.07–61.37 (7  $\times$  C-6), 20.77–20.74 (20  $\times$   $\text{CH}_3$ ) ppm. MS (ESI):  $[\text{M}+\text{NH}_4]^+ = 1992$ .

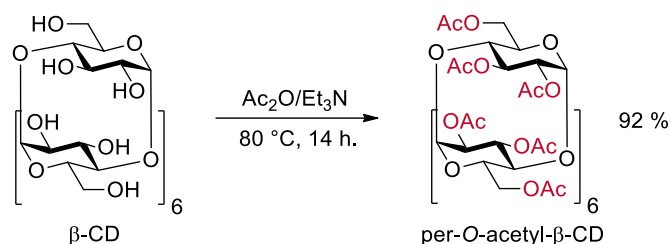


### **3.5 Příprava vzorků na HPLC**

Příprava vzorků, které byly měřeny pomocí HPLC, probíhala následujícím způsobem. Z reakce bylo odebráno vždy příslušné množství, aby po odpaření rozpouštědla a opětovném rozpuštění vzorku v ACN (550  $\mu$ l) a H<sub>2</sub>O (450  $\mu$ l) byla finální koncentrace 1 mg látky na 1 ml rozpouštědla.

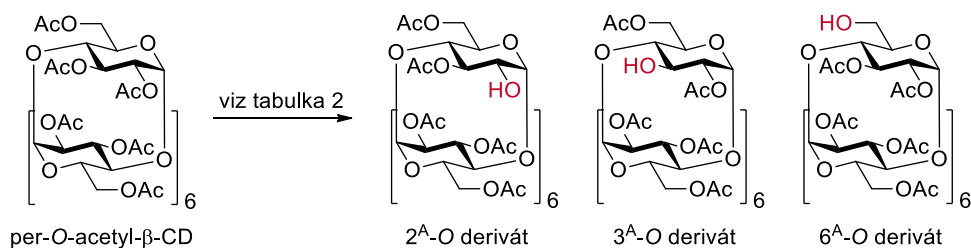
## 4 Výsledky a diskuze

Aby bylo možné syntetizovat monosubstituované deriváty CD pomocí selektivní deacetylace, bylo nejprve nutné připravit výchozí látku – per-*O*-acetylovaný  $\beta$ -CD (obrázek 11). Jako výchozí látka pro tuto reakci byl zakoupen komerčně dostupný  $\beta$ -CD, k němuž byl do reakce v přebytku přidán anhydrid kyseliny octové a triethylamin. Vzniklý peracetylovaný- $\beta$ -CD byl bez problémů přečištěn pomocí sloupcové chromatografie. Během testování odchraňovacích reakcí, bylo zjištěno, že per-*O*-acetylovaný- $\beta$ -CD lze velmi snadno a efektivně rekrystalovat z MeOH. Takto přečištěný per-*O*-acetylovaný- $\beta$ -CD byl využit především v reakcích sledovaných pomocí HPLC. Od připraveného produktu bylo naměřeno  $^1\text{H}$  NMR spektrum, které bylo porovnáno se spektrem v literatuře.<sup>58</sup> Ačkoliv byly obě přípravy provedeny odlišně, naměřené  $^1\text{H}$  NMR spektrum se shodovalo se spektrem per-*O*-acetyl- $\beta$ -cyklodextrinu uvedeném v článku.



Obrázek 11 – Příprava per-*O*-acetyl- $\beta$ -cyklodextrinu.

Po přípravě výchozí látky pro selektivní deacetylaci byly provedeny pilotní odchraňovací studie s nižší navázkou (obrázek 12). Per-*O*-acetylovaný- $\beta$ -CD byl vždy rozpuštěn v příslušném rozpouštědle, dále bylo do reakce přidáno odchraňovací činidlo a reakční směs byla míchána po určitou dobu za konstantní teploty. Průběh reakce byl zprvu kontrolován pomocí TLC a hmotnostní spektrometrie. Po zjištění retenčních faktorů monosubstituovaných derivátů na TLC byla ke sledování průběhu reakce používána primárně metoda TLC.



Obrázek 12 – Schéma selektivní deacetylace.

**Tabulka 2: Testované odchraňovací reakce.**

<b>reaktant*</b>	<b>teplota</b>	<b>čas</b>	<b>rozpuštědlo</b>
H <sub>2</sub> NNH <sub>2</sub> .H <sub>2</sub> O	r.t.	22 h.	ACN
H <sub>2</sub> NNH <sub>2</sub> .H <sub>2</sub> O	r.t.	30 h.	THF
H <sub>2</sub> NNH <sub>2</sub> .H <sub>2</sub> O	r.t.	45 h.	pyridin
H <sub>2</sub> NNH <sub>2</sub> .H <sub>2</sub> O	r.t.	48 h.	THF
H <sub>2</sub> NNH <sub>2</sub> .H <sub>2</sub> O	r.t.	68 h.	DMF
H <sub>2</sub> NNH <sub>2</sub> .H <sub>2</sub> O	r.t.	68 h.	MeOH
H <sub>2</sub> NNH <sub>2</sub> .H <sub>2</sub> O	r.t.	6 d.	pyridin
H <sub>2</sub> NNH <sub>2</sub> .H <sub>2</sub> O	50 °C	23 h.	MeOH
H <sub>2</sub> NNH <sub>2</sub> .H <sub>2</sub> O	70 °C	72 h.	DMSO
H <sub>2</sub> NNH <sub>2</sub> .H <sub>2</sub> O	70 °C	96 h.	ACN
H <sub>2</sub> NNH <sub>2</sub> .H <sub>2</sub> O	70 °C	96 h.	DMSO
H <sub>2</sub> NNH <sub>2</sub> .H <sub>2</sub> O (2 ekv.)	r.t.	21 h.	DMF
H <sub>2</sub> NNH <sub>2</sub> .H <sub>2</sub> O (2 ekv.)	r.t.	21 h.	MeOH
H <sub>2</sub> NNH <sub>2</sub> .H <sub>2</sub> O (2 ekv.)	50 °C	20 h.	MeOH
hydrazin + kys. octová	r.t.	22 h.	pyridin
H <sub>2</sub> NNH <sub>2</sub> .HCl	50 °C	96 h.	MeOH
H <sub>2</sub> NNH <sub>2</sub> .HCl	70 °C	96 h.	DMSO
H <sub>2</sub> NNH <sub>2</sub> .HCl	70 °C	6 d.	DMSO
fenylhydrazin	50 °C	20 h.	MeOH
fenylhydrazin	70 °C	13 d.	DMSO
fenylhydrazin (6 ekv.)	r.t.	45 h.	THF
fenylhydrazin (6 ekv.)	r.t.	45 h.	pyridin
fenylhydrazin (62 ekv.)	70 °C	5 d.	DMSO
tosylhydrazin	50 °C	96 h.	MeOH
tosylhydrazin	70 °C	96 h.	DMSO
DIBAL	r.t.	3 h.	toluen
DIBAL	0 °C	1 h.	toluen
DIBAL	-80 °C	1 h.	toluen
DIBAL (10 ekv.)	r.t.	1 h.	toluen
DIBAL (10 ekv.)	r.t.	3 h.	toluen
DIBAL (10 ekv.)	0 °C	1 h.	toluen
DIBAL (10 ekv.)	-80 °C	1 h.	toluen
FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	r.t.	96 h.	ACN

FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	r.t.	5 d.	ACN
FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	r.t.	6 d.	ACN
FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	r.t.	7 d.	ACN
FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	r.t.	8 d.	ACN
FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	50 °C	24 h.	ACN
FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	70 °C	6 d.	ACN
<i>N,N</i> -diisopropylethylamin	r.t.	48 h.	THF
<i>N,N</i> -diisopropylethylamin	r.t.	72 h.	ACN
<i>N,N</i> -diisopropylethylamin (2 ekv.)	r.t.	72 h.	ACN + H <sub>2</sub> O
<i>N,N</i> -diisopropylethylamin (50 ekv.)	r.t.	72 h.	ACN + H <sub>2</sub> O
K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	r.t.	5 d.	ACN + H <sub>2</sub> O
K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	r.t.	6 d.	ACN + H <sub>2</sub> O
K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (10 ekv.)	r.t.	48 h.	ACN + H <sub>2</sub> O
imidazol	40 °C	20 h.	MeOH
imidazol	40 °C	7 d.	MeOH
NH <sub>3</sub> 25%	r.t.	48 h.	ACN
NH <sub>3</sub> 25%	r.t.	5 d.	THF + MeOH
trifenyfosfin	r.t.	72 h.	ACN
trifenyfosfin	r.t.	72 h.	THF
Cs <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	r.t.	2 d.	ACN + H <sub>2</sub> O
<i>tecr</i> -butoxid draselný	r.t.	20 h.	THF

\*není-li uvedeno jinak množství reaktantu bylo stanoveno na 1 ekvivalent

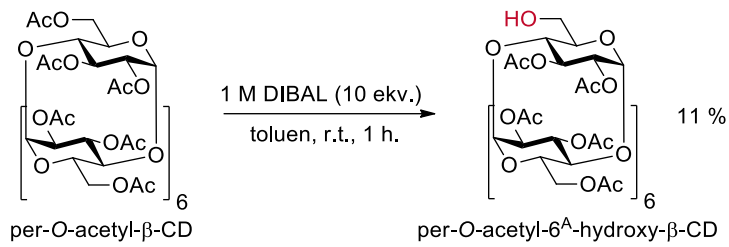
Zprvu bylo cíleno převážně na 2<sup>A</sup>-*O* monosubstituovaný derivát, protože tento derivát dosud nebyl syntetizován. Inspirací byl článek<sup>51</sup> ve kterém autoři využili k selektivnímu odchránění benzoylové skupiny na 2 uhlíku hydrazin. Reakce peracetylovaného β-CD s H<sub>2</sub>NNH<sub>2</sub>.H<sub>2</sub>O za použití rozpouštědla pyridinu však nepřinesla kýžený výsledek. Proto bylo přistoupeno k testování řady dostupných rozpouštědel místo pyridinu a současně využito i komplexačních vlastností výchozí látky – pro selektivní odchránění byl vyzkoušen různě modifikovaný hydrazin (např. fenylhydrazin, tosylhydrazin, viz tabulka 2). U některých reakcí bylo s vidinou lepšího výtěžku též přidáno více odchraňovacího činidla nebo byla měněna teplota či reakční doba. Po porovnání pilotních reakcí byla opakována reakce s H<sub>2</sub>NNH<sub>2</sub>.H<sub>2</sub>O v DMSO při teplotě 70 °C a s reakční dobou 72 hodin s vyšší navázkou 100 mg peracetylovaného-β-CD. Vzniklý produkt byl

směsí několika derivátů, které bylo nutné od sebe odseparovat. Proto proběhla nejprve sloupcová chromatografie na silikagelu, a takto se podařilo oddělit směs 2<sup>A</sup>- a 6<sup>A</sup>-*O* derivátů. Následovala chromatografie na 10 g reverzního silikagelu, která byla provedena dvakrát po sobě. Ačkoliv byly obě chromatografie na reverzním silikagelu časově náročné, nepodařilo se získat čistý per-*O*-acetyl-2<sup>A</sup>-hydroxy-β-CD.

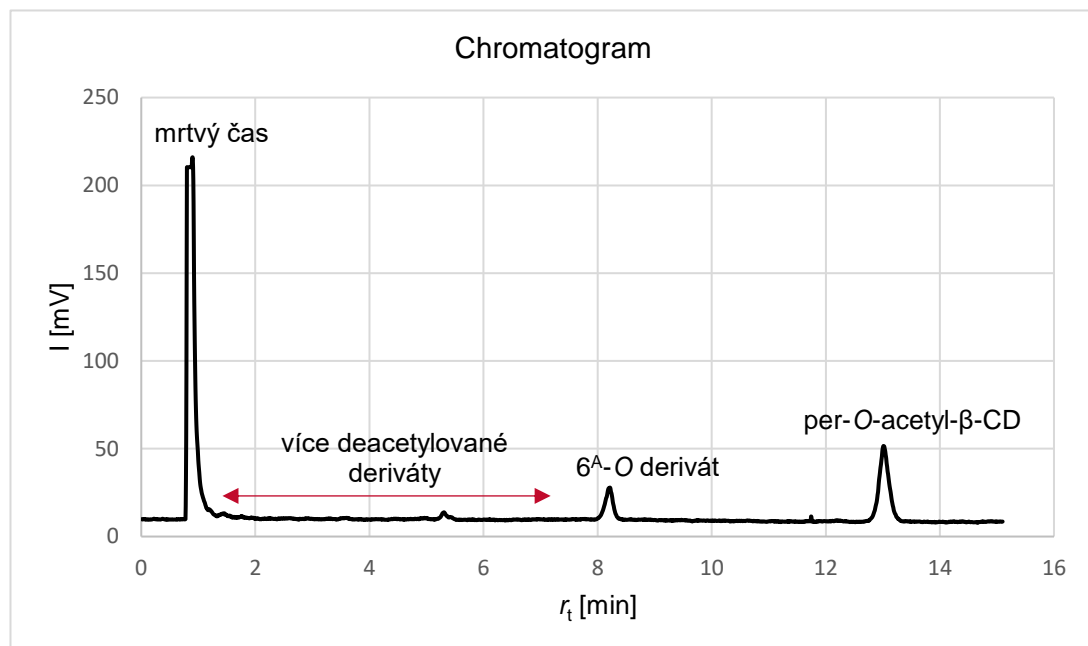
Neúspěch přípravy 2<sup>A</sup>-*O* derivátu však nezavdal příčinu ke chmurám a bylo přistoupeno k přípravě 6<sup>A</sup>-*O* derivátu. V tomto případě bylo využito znalostí z vědeckých publikací,<sup>48-50</sup> které popisují selektivní ochránění menthylové a benzylové skupiny za pomoci DIBAL. Reakce probíhaly pod inertním plynem argonem. Jako ochraňovací látka byl použit 1 M roztok DIBAL v toluenu a z tohoto důvodu byl jako rozpouštědlo použit také toluen. Pilotní studie ukázala, že se s velkou pravděpodobností jedná o selektivní reakci, protože na TLC byl vidět z monosubstituovaných derivátů pouze 6<sup>A</sup>-*O* derivát. Vznikalo však velké množství více deacetylovaných derivátů. Pro zvýšení selektivity reakce směrem k monosubstituovanému derivátu bylo přistoupeno ke snížení reakční teploty na 0 °C či dokonce na -80 °C. Ukázalo se však, že reakční teplota nemá na vznik monosubstituovaných derivátů významnější vliv.

To ovšem nelze říci o množství DIBAL v reakci. Reakce s 10 ekvivalenty měly dle TLC lepší předpoklad na vyšší výtěžek požadovaného derivátu. Selektivitu reakce nám potvrdil i graf získaný prostřednictvím HPLC (graf 1). Bohužel se nepodařilo HPLC správně nakalibrovat a proto z grafu nelze vyčíst reálné množství vzniku 6<sup>A</sup>-*O* derivátu, ale pouze poměr výchozí látky a konečného produktu. Přestože byl tento poměr 5:1 v neprospěch požadované látky, výhodou této metody zůstala selektivnost. Bylo tedy přistoupeno ke zopakování syntézy s 1g množstvím peracetylovaného β-CD, (obrázek 13). Po přečištění produktu pomocí sloupcové chromatografie na silikagelu bylo výsledkem bezproblémové separování 110 mg per-*O*-acetyl-6<sup>A</sup>-hydroxy-β-CD. Výtěžek reakce činil 11 %. Výtěžek patří sice k těm nižším, avšak výhodou je jednoduchá separace, jelikož nevznikají žádné další monosubstituované produkty.

Produkt byl charakterizován pomocí MS a NMR (včetně 2D) a spektroskopická data se shodovala s literaturou.<sup>55</sup>

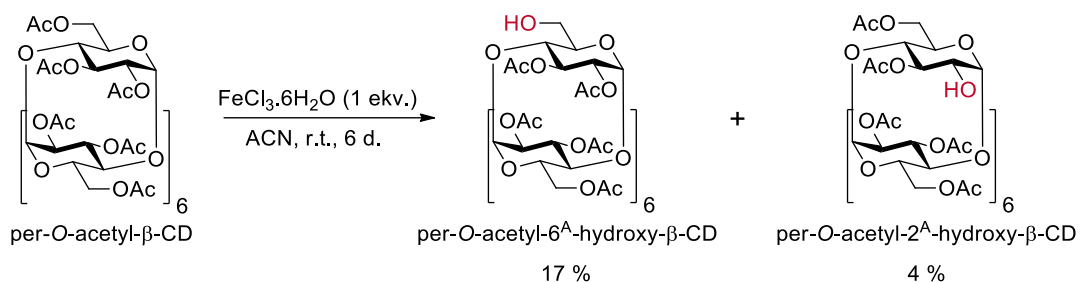


Obrázek 13 – Schéma selektivní deacetylace působením DIBAL.

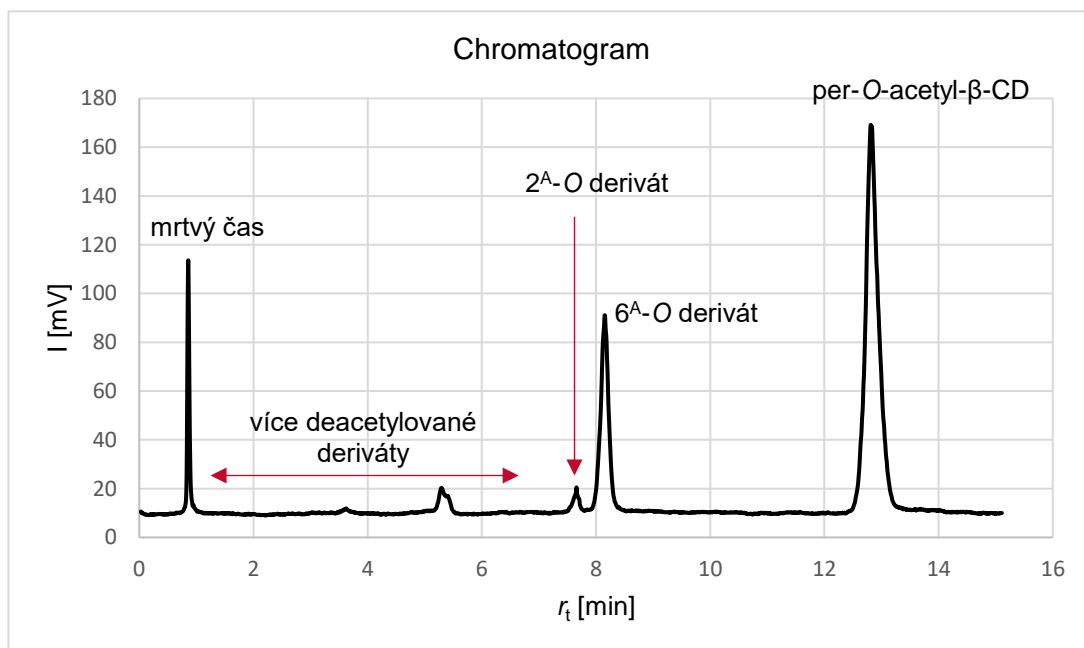


Graf 1 – Chromatogram selektivní deacetylace působením DIBAL.

Pro další odchraňovací reakce posloužily informace z literatury,<sup>52,53</sup> která se zabývala selektivní deacetylací glukosy, monosacharidů, disacharidů atd. Výsledkem bylo velké množství reakcí, při kterých byla použita řada různých odchraňovacích činidel, ale i rozpouštědel – viz tabulka 2. V závislosti na průběhu reakce byla upravována teplota i reakční doba. Většina vyzkoušených reakcí však nebyla podle TLC vhodná pro selektivní odchraňování peracetylovaného  $\beta$ -CD. Některé reakce neposkytovaly kýžené monosubstituované deriváty, jiné jen ve velmi nízkém výtěžku. V úvahu přicházela pouze reakce, při které byl jako odchraňovací činidlo použit  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ . Z TLC bylo zjištěno, že vznikají 2 monosubstituované deriváty a z toho jeden v nadbytku. Toto podezření potvrdil chromatogram z HPLC, na kterém je vidět přítomnost dvou monosubstituovaných derivátů (graf 2). Pro zjištění izolovatelných výtěžků byla tato reakce zopakována s navázkou 1 g výchozí látky, která byla rozpuštěna v ACN (obrázek 14). Do reakce byl přidán 1 ekvivalent  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  a reakce probíhala za laboratorní teploty 6 dnů.



**Obrázek 14 – Schéma selektivní deacetylace působením  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ .**

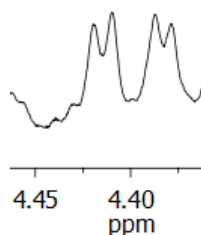


**Graf 2 – Chromatogram selektivní de-O-acetylace působením  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ .**

Vzniklé monosubstituované deriváty bylo nutné odseparovat a zároveň odstranit výchozí látku a více deacetylované produkty. Z tohoto důvodu byla provedena sloupcová chromatografie na silikagelu, během které se podařilo získat směs 2<sup>A</sup>- a 6<sup>A</sup>-O derivátů. Směs bylo třeba dále rozdělit na jednotlivé izomery, proto bylo přistoupeno k další chromatografii na 30 g silikagelu. Po odpaření frakcí vykazovaly izolované deriváty stále známky nečistot. Z tohoto důvodu byl 6<sup>A</sup>-O derivát přečištěn na silikagelu a 2<sup>A</sup>-O derivát na reverzním silikagelu. Výsledkem reakce bylo připravení 172 mg per-O-acetyl-6<sup>A</sup>-hydroxy- $\beta$ -CD (17 %) a 39 mg per-O-acetyl-2<sup>A</sup>-hydroxy- $\beta$ -CD (4 %). Výtěžek 6<sup>A</sup>-O derivátu při této reakci je vyšší, než u reakce s použitím DIBAL, avšak nevýhodou tohoto postupu je nutnost separovat 2<sup>A</sup>- a 6<sup>A</sup>-O deriváty, které lze rozdělit jen velmi obtížně.

Poloha substituentů byla určena pomocí metody, kterou navrhli vědci Michal Řezanka a Jindřich Jindřich.<sup>45</sup> Touto metodou lze určit polohu substituentu na

peracetylovaném mono-*O*-substituovaném derivátu CD pouze pomocí  $^1\text{H}$  NMR spektra měřeného v  $\text{CDCl}_3$ . 2-*O* derivát se podařilo určit pomocí specifického signálu dd ( $J = 12,4$  a  $3,9$  Hz), který je posunut přibližně na hodnotu 4.40 ppm (obrázek 15). Zároveň se následkem posunu tohoto signálu snížila integrální intenzita ostatních H-2 vodíků, což je opět charakteristickým znakem pro peracetylované CD monosubstituované v poloze 2.



**Obrázek 15 – Charakteristický NMR signál 2<sup>A</sup>-*O* derivátu.**



## 5 Závěr

V teoretické části této bakalářské práce byla vypracována literární rešerše, která pojednává o základní problematice cyklodextrinů. V první části se čtenář může dozvědět zajímavé informace o objevení, struktuře, vlastnostech, nebo například o využití cyklodextrinů. Ve druhé části jsou stručně popsány jednotlivé známé metody selektivního odchraňování persubstituovaných CD.

Experimentální část práce je zaměřena na optimalizaci regioselektivní deacetylace. Nejprve byly provedeny pilotní studie, během kterých byla vyzkoušena řada různých experimentálních podmínek. Po zjištění vhodných reakcí byly tyto reakce opakovány s vyšší navázkou. Výsledkem je příprava dvou monosubstituovaných derivátů cyklodextrinů: *per-O*-acetyl-2<sup>A</sup>-hydroxy-β-CD a *per-O*-acetyl-6<sup>A</sup>-hydroxy-β-CD. První z uvedených derivátů zatím nikdo neizoloval ani necharakterizoval. Druhý z derivátů je známý z literatury, avšak zde byl připraven novou reakční cestou. Připravené deriváty byly charakterizovány pomocí <sup>1</sup>H NMR, <sup>13</sup>C NMR, COSY, HSQC, HMBC a MS.

Připravené monosubstituované deriváty budou dále využity k reakci s pyrrolovým derivátem. Takto substituovaný CD bude sloužit k modifikaci vláken a pomocí komplexačních vlastností budou k CD navázány vhodné biomolekuly. Výsledkem by mělo být vytvoření nosičů pro tkáňové inženýrství.

## Seznam literatury

- (1) Villiers, A. *Compt. Rend.* **1891**, 112, 536–538.
- (2) Szejtli, J. *Chem. Rev.* **1998**, 98, 1743–1753.
- (3) Szente, L.; Szejtli, J. *Trends Food Sci. Technol.* **2004**, 15, 137–142.
- (4) Astray, G.; Gonzalez-Barreiro, C.; Mejuto, J. C.; Rial-Otero, R.; Simal-Gandara, J. *Food Hydrocoll.* **2009**, 23, 1631–1640.
- (5) Buschmann, H. J.; Schollmeyer, E. *J. Cosmet. Sci.* **2002**, 53, 185–191.
- (6) Hashimoto, H. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **2002**, 44, 57–62.
- (7) Hedges, A. R. *Chem. Rev.* **1998**, 98, 2035–2044.
- (8) Loftsson, T.; Duchene, D. *Int. J. Pharm.* **2007**, 329, 1–11.
- (9) Del Valle, E. M. M. *Process Biochem.* **2004**, 39, 1033–1046.
- (10) Buschmann, H. J.; Knittel, D.; Schollmeyer, E. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **2001**, 40, 169–172.
- (11) Strohecker, R. *Chem.-Ztg.* **1920**, 120, 744.
- (12) Manor, P. C.; Saenger, W. *Nature* **1972**, 237, 392–393.
- (13) Schardinger, F. *Z. Unters. Nahr. Genussm.* **1903**, 6, 865–880.
- (14) Schardinger, F. *Wien. Klin. Wochenschr.* **1904**, 17, 207.
- (15) Schardinger, F. *Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infekt. Hyg., Abt. 2* **1911**, 29, 188.
- (16) Pringsheim, H. *Science* **1928**, 68, 603.
- (17) Freudenberg, K. *Meyer-Delius, M. Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1938**, 71, 1596–1600.
- (18) Freudenberg, K.; Blomquist, G.; Ewald, L.; Soff, K. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1936**, 69, 1258.
- (19) Freudenberg, K.; Crame, F.; Plieninger, H. Ger. Patent. DE 895769 C, 1953.
- (20) Thoma, J. A.; Stewart, L. *Starch, Chemistry and Technology*; Academic Press: New York, 1965.
- (21) Caesar, G. V. *Starch and its Derivatives*; Chapman and Hall: London, 1986.
- (22) French, D. *Advances in Carbohydrate Chemistry*; Academic Press Inc.: New York, 1957.
- (23) Li, S.; Purdy, W. *Chem. Rev.* **1992**, 92, 1457–1470.
- (24) Endo, T. *Trends Glycosci. Glycotechnol.* **2011**, 23, 79–92.
- (25) Larsen, K. L. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **2002**, 43, 1–13.
- (26) Frank, H. H. *Crystalline Molecular Complexes and Compounds: Structures and Principles*; Oxford University Press: Oxford, 2005.
- (27) Jambhekar, S. S.; Breen, P. *Drug Discov. Today* **2016**, 21, 356–362.
- (28) Irie, T.; Uekama, K. *J. Pharm. Sci.* **1997**, 86, 147–162.

- (29) Cal, K.; Centkowska, K. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2008**, *68*, 467–478.
- (30) Stella, V. J.; He, Q. *Toxicol. Pathol.* **2008**, *36*, 30–42.
- (31) Singh, M.; Sharma, R.; Banerjee, U. C. *Biotechnol. Adv.* **2002**, *20*, 341–359.
- (32) Rekharsky, M. V.; Inoue, Y. *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 1875–1917.
- (33) Funasaki, N.; Ishikawa, S.; Neya, S. *J. Phys. Chem. B* **2004**, *108*, 9593–9598.
- (34) Shen, X. H.; Belletete, M.; Durocher, G. *J. Phys. Chem. B* **1998**, *102*, 1877–1883.
- (35) Liu, Y.; Chen, G. S.; Zhang, H. Y.; Song, H. B.; Ding, F. *Carbohydr. Res.* **2004**, *339*, 1649–1654.
- (36) Nakashima, N.; Kawabuchi, A.; Murakami, H. *J. Incl. Phenom. Mol. Recognit. Chem.* **1998**, *32*, 363–373.
- (37) Harada, A.; Hashidzume, A.; Yamaguchi, H.; Takashima, Y. *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 5974–6023.
- (38) Liu, L.; Guo, Q. X. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **2002**, *42*, 1–14.
- (39) Tonkova, A. *Enzyme Microb. Technol.* **1998**, *22*, 678–686.
- (40) Leemhuis, H.; Kelly, R. M.; Dijkhuizen, L. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2010**, *85*, 823–835.
- (41) Vyas, A.; Saraf, S.; Saraf, S. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **2008**, *62*, 23–42.
- (42) Radu, C.-D.; Parteni, O.; Ochiuz, L. *J. Controlled Release* **2016**, *224*, 146–157.
- (43) Ogoshi, T.; Harada, A. *Sensors* **2008**, *8*, 4961–4982.
- (44) Cucinotta, V.; Contino, A.; Giuffrida, A.; Maccarrone, G.; Messina, M. *J. Chromatogr. A* **2010**, *1217*, 953–967.
- (45) Rezanka, M. *Eur. J. Org. Chem.* **2016**, *2016*, 5322–5334.
- (46) Rong, D.; Dsouza, V. *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 4275–4278.
- (47) Khan, A. R.; Forgo, P.; Stine, K. J.; D'Souza, V. T. *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 1977–1996.
- (48) du Roizel, B.; Baltaze, J. P.; Sinay, P. *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 2371–2373.
- (49) Xiao, S.; Yang, M.; Sinay, P.; Bleriot, Y.; Sollogoub, M.; Zhang, Y. *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, *2010*, 1510–1516.
- (50) Pearce, A. J.; Sinay, P. *Angew. Chem.-Int. Ed.* **2000**, *39*, 3610–3612.
- (51) Sakairi, N.; Kuzuhara, H.; Okamoto, T.; Yajima, M. *Bioorg. Med. Chem.* **1996**, *4*, 2187–2192.
- (52) Wei, G.; Zhang, L.; Cai, C.; Cheng, S.; Du, Y. *Tetrahedron Lett.* **2008**, *49*, 5488–5491.
- (53) Kaya, E.; Sonmez, F.; Kucukislamoglu, M.; Nebioglu, M. *Chem. Pap.* **2012**, *66*, 312–315.
- (54) Li, Y. W.; Li, Y. X.; Wei, Z.; Guan, H. S. *Chin. J. Chem.* **2004**, *22*, 117–118.
- (55) Diakur, J.; Zuo, Z.; Wiebe, L. I. *J. Carbohydr. Chem.* **1999**, *18*, 209–223.

- (56) Cottaz, S.; Driguez, H. *Synthesis* **1989**, 1989, 755–758.
- (57) Rezanka, M.; Jindrich, J. *Carbohydr. Res.* **2011**, 346, 2374–2379.
- (58) Chen, C. T.; Kuo, J. H.; Pawar, V. D.; Munot, Y. S.; Weng, S. S.; Ku, C. H.; Liu, C. Y. *J. Org. Chem.* **2005**, 70, 1188–1197.