



Akademie věd České republiky

Teze doktorské disertační práce
k získání vědeckého titulu „doktor věd“
ve skupině věd – chemické vědy

Supramolekulární chemie makrocyclických receptorů pro sacharidy a biologicky významné anionty

**Komise pro obhajoby doktorských disertací v oboru
organická a bioorganická chemie**

Vladimír Král

Vysoká škola chemicko-technologická v Praze

a

Ústav organické chemie a biochemie AV ČR Praha

Praha 2005

Obsah

1	ÚVOD	3
1.1	Přehled o současném stavu problematiky	3
2	RECEPTORY ANIONTŮ	5
2.1	Anionty	5
2.2	Typy aniontových receptorů	5
3	RECEPTORY SACHARIDŮ	8
3.1	Souhrn dosud popsaných syntetických receptorů pro sacharidy	9
4	OD RECEPTORU K SENZORŮM	11
5	VYUŽITÍ SUPRAMOLEKULÁRNÍ CHEMIE PRO SEPARACE	14
	Literatura (citované práce, cizí)	15
6	CÍL DISERTAČNÍ PRÁCE	18
6.1	Zvolené metody zpracování	18
6.2	Vlastní výsledky z oblasti využití molekulárního rozpoznání aniontů	18
6.3	Rozpoznání pomocí makrocyclických receptorů	18
6.4	Receptory sacharidů, vlastní návrhy	21
6.5	Aplikace rozpoznání a vazby aniontů pro separaci: využití nových sorbentů na bázi makrocyclických derivátů vázaných kovalentně na aminopropyl silikagel pro HPLC.	22
6.6	Nové receptorové systémy založené na heterokalixarenech	24
6.7	Nejdůležitější výsledky disertace s uvedením nových poznatků	25
6.8	Závěr	26
6.9	Literatura: Vlastní práce autora vztahující se k předkládané disertační práci	26
7	SOUHRN TEZÍ DISERTACE (ČESKY, ANGLICKY)	35
7.1	Souhrn	35
7.2	Summary	36

1 Úvod

Předložená práce se týká supramolekulární chemie, vývoje receptorů pro biologicky významné anionty a sacharidy a jejich sensorové využití

1.1 Přehled o současném stavu problematiky

Termín molekulární rozpoznání se stal v posledních letech velmi populární¹. Toto odvětví chemie se zabývá komplementaritou velikosti, tvaru a chemického povrchu obou partnerů, mezi nimiž dochází k interakci a popisuje procesy kontrolované specifickými nekovalentními interakcemi, jejichž výsledkem jsou takové jevy jako rozpoznání a vazba sledovaného analytu (substrátu), sebeskladba, vytváření organizovaných systémů, monovrstev, membrán.¹⁻¹¹

Velký rozvoj molekulárního rozpoznání a vlastně profilování supramolekulární chemie jako interdisciplinárního oboru na pomezí chemie, biologie a fyziky začíná v polovině šedesátých let, kdy molekulární rozpoznání představuje zcela novou oblast chemie. Do té doby a vlastně až do pozdních sedmdesátých let se chemici téměř výhradně zabývali tvorbou kovalentních vazeb v molekulách, kulminující zlatým věkem totálních syntéz řady přírodních látek, toto období je především spojováno se jménem Woodwarda. V nedávné době začal bouřlivý vývoj oboru, který je nyní nazýván supramolekulární chemií, či supramolekulární vědou. Tento obor jde za chemii molekul tím, že začala být soustředěna pozornost na nekovalentní síly a prostorové uspořádání mezi individuálními molekulami vedoucí ke vzniku nadmolekulárních nekovalentních supramolekulárních struktur, kde specifickým příkladem je např. komplex typu receptor-substrát nebo selektor-analyt. Znamená to tedy, že se chemici dnes zajímají nikoliv pouze o molekulární struktury, ale také o polymolekulární struktury (assembly) vzniklé na základě molekulárního rozpoznání jednotlivých molekul tvořících supramolekulární komplex. Ten je obecně tvořen dvěma a více přesně navrženými molekulárními jednotkami (species), které jsou drženy dohromady v přesném prostorovém uspořádání pomocí nekovalentních sil. Snad prvním příkladem publikovaným v této kategorii byl molekulární komplex thiomocoviny s dibenzo-18-crownetherem-6 popsán Pedersenem v roce 1971. Pionýrské práce v tomto oboru byly vykonány Pedersenem, Lehmem a Cramem, jejichž práce stojící v počátcích supramolekulární chemie byla oceněna v roce 1987 Nobelovou cenou za chemii. Zpočátku se supramolekulární chemie soustředila na komplexaci kationtů pomocí vhodně navržených makrocyclických i acyklických ligandů, vedle toho také byla navržena řada systémů pro selektivní komplexaci neutrálních molekul, např. močoviny. Teprve později došlo k designu a syntéze ligandů pro rozpoznávání a vazbu aniontů.

Již na konci 19. století (1894), Fischer navrhl základní koncept procesů molekulárního rozpoznání, který formuloval myšlenku zámku a klíče. Podle této koncepce molekulární rozpoznání je založeno na komplementaritě zámku, představující molekulární receptor, a klíče, kterým je substrát, který byl přesně rozpoznán a vede ke vzniku komplexu receptor-substrát. Architektura receptoru (vazebného místa) musí být komplementární v geometrii, nábojové distribuci, velikosti a povaze vazebných skupin receptoru a substrátu, stejně tak jako druhu jejich „povrchu“. Studium syntetických systémů, podstatně jednodušších než přírodní systémy dovoluje poznání faktorů ovlivňujících stabilitu těchto supramolekulárních komplexů. Tento koncept umožnil ve své době porozumění podstaty řady jevů odehrávajících se v přírodě a také vedl k navržení řady umělých, syntetických receptorů s fascinujícími vlastnostmi a potenciálním využitím v analytické a medicíně, stejně jako k technologickým výstupům.

Dnes již překonaná zastaralá koncepce zámku a klíče vysvětluje geometrické faktory potřebné pro enzymovou katalýzu, která je rovněž založena na principech molekulárního rozpoznání.

Nedávno byl tento koncept rigidního zámku a klíče revidován s tím, že byla ukázána řada příkladů, kdy hostitel i host, nebo receptor a substrát prochází při vazbě, vzniku komplexu řadou konformačních změn. Tento koncept je nyní nazýván indukovaný fit (vynucené přizpůsobení).

Lehn definoval molekulární rozpoznání jako proces zahrnující vazbu a selekci substrátu daným receptorem jakož i možnou specifickou funkci. Toto v sobě zahrnuje existenci přesně definovaných nevazebných interakcí, často je tento stav popisován jako komplementarita nevazebné interakce odpovědné za vznik supramolekulárních systémů. Tyto interakce jsou předně elektrostatické interakce, které mají z nekovalentních interakcí největší dosah, ale nejsou prostorově orientované, vodíkové vazby, přesně prostorově orientované představují přechod mezi kovalentními a nekovalentními interakcemi, z hlediska energie, jsou významné v nepolárních rozpouštědlech, ale ve vodě mají díky kompetici s rozpouštědlem velice malou hodnotu. Dále van der Waalsova interakce a hydrofobní interakce mající sice malou energii, ale v radě biologických systémů, především ve vodných roztocích, hrají významnou roli díky jejich počtu a kooperaci. Proto významně určují prostorové uspořádání řady biopolymerů, např. proteinů a DNK.

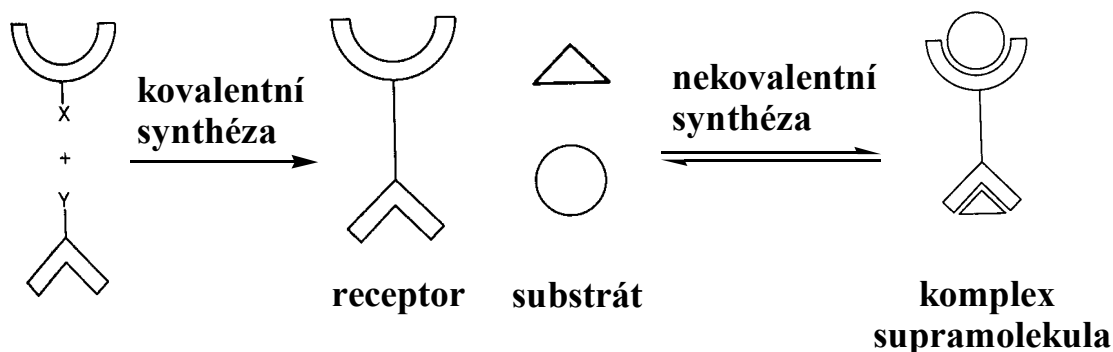
Základní aspekty molekulárního rozpoznání, kterými jsou katalýza, vytváření kopií a sebeskladby jsou soustředěny okolo intra- a intermolekulárních nekovalentních interakcí. Je tedy zřejmé, že speciální povaha chemie biologických, a nyní také umělých supramolekulárních systémů, je dána použitím definovaných a přesně navržených nekovalentních interakcí. Kooperací nevazebných interakcí jako jsou vodíkové vazby, π - π interakce, van der Waalsovy a elektrostatické interakce je dosaženo nejen požadované supramolekulární struktury, ale také funkce takto vytvořeného systému. Právě výzkum principů nekovalentních systémů a jejich využití pro tvorbu umělých systémů je jedním ze základních předmětů supramolekulární chemie.

Supramolekulární chemie se tak stala vysoce interdisciplinárním polem, které rychle rozšiřuje hranice chemických věd k fyzikálním a biologickým jevům. Její kořeny leží v několika oborech: organické chemii, poskytující syntetickou základnu, metodologii pro konstrukci ligandů a receptorů, koordinační chemii popisující komplexy kovových iontů s ligandy, analytickou chemii již dávno využívající přesně definované komplexace, jak pro důkaz, tak stanovení řady kationtů i aniontů; nyní však především ve vysoce atraktivní oblasti vývoje nových senzorů; fyzikální chemie se zabývá popisem termodynamických charakteristik vzniku nekovalentních komplexů; biochemie se dotýká této disciplíny v oblasti enzymů a struktury a vazby DNK a v neposlední řadě molekulární biologie při studiu molekulární podstaty řady biologických procesů.

2 Receptory aniontů

Obor supramolekulární chemie zahrnuje posuzování nových molekulových systémů, které se vyznačují tím, že komponenty jsou společně vázány reverzibilními intramolekulárními silami, ne však kovalentními. Chemici pracující v tomto oboru mohou o způsobu „výstavby“ receptoru pro požadovanou látku přemýšlet jako architekti, kteří stavějí nové funkční stavby.

Molekulární chemie \rightleftharpoons **Supramolekulární chemie**
kovalentně vázané formace nekovalentně vázané formace



2.1 Anionty

2.1.1 Vlastnosti aniontů

Anionty mají rozmanité a specifické rysy, které jsou využívány k efektivnímu spojení s receptory; dochází k vytvoření velice silné vazby. Vlastnosti aniontů jsou určeny jejich nábojem, velikostí, pH závislostí a schopností disociace.

Náboj: Definiujícím znakem aniontů je jejich negativní náboj. Elektrostatické interakce mohou hrát hlavní roli při zesílení aniontové koordinace a platí, že většina receptorů právě tohoto jevu využívá.

Velikost aniontů: Anionty jsou daleko většími molekulami než kationty, a proto musí být vytvořeno dostatečně velké a tvarově vhodná kavita receptoru, aby mohlo dojít ke komplexaci aniontu.

pH závislost: Na rozdíl od jednoduchých kovových kationtů, existuje řada aniontů (např. CO_3^{2-} , PO_4^{3-} , SO_4^{2-} , apod.), které jsou limitovány rozsahem pH. Při nízké hodnotě pH získávají anionty proton (H^+) a v důsledku toho pak ztrácejí svůj negativní náboj. To je zvláště důležité, jestliže se anionty vyskytují ve vodě.

2.2 Typy aniontových receptorů

Ačkoliv anionty hrají důležitou roli v chemii, biologii, medicíně, katalýze a v životním prostředí. Jejich komplexační chemie nebyla chápána jako specifický obor výzkumu, na rozdíl od komplexace kationtů. Aniontová koordinační chemie udělala v posledních letech velice významný pokrok. Rozvoj jiných receptorových molekul, které vlastní přesně definované geometrické a vazebné rysy, dovolí v budoucnu vypilovat požadavky pro aniontové rozpoznávání.

2.2.1 Základní rozdělení aniontových receptorů na základě strukturních motivů¹²⁻¹⁴

1) Aniontové receptory, které neobsahují kov:

- amidy, lineární a cyklické oligoamidové systémy
- pyroly, oligopyrolové deriváty
- deriváty močoviny a thiomčoviny
- amoniové a polyamoniové makrocykly
- guanidinové a amidiniové receptory

2) Aniontové receptory, které obsahují kovy:

- anionty koordinované na metalocentru
- metalocentra koordinovaná k π systému s hydrofóbním aniontovým receptorem
- anionty vázané k sebeskladnému systému řízeného koordinačním centrem

3) Anionty komplexované sebeskladným systémem.

V práci jsou dále popsány skupiny aniontových receptorů a jejich aplikace: lze je rozdělit do následujících skupin:

- expandované oligopyrolové makrocykly
- kalixpyrolové a kalixfyrinové receptory
- porfyriny s vhodnou periferní substitucí: guanidinové deriváty, alkaloidy,
- kvarterní amoniové skupiny, oniové porfyriny

Velký zájem o rozpoznání aniontů vzhledem k jejich významu jak biologickému, tak z hlediska monitorování znečištění životního prostředí vedl k hledání selektivních senzorů pro stanovení aniontů. Jedním z nejdůležitějších je vývoj anion-selektivních potenciometrických senzorů.

Vytvořit receptor pro anionty je komplikovanější úkol než je tomu v případě kationtů, neboť anionty mají vesměs složitější tvar, vykazují pH závislost a mají vysokou solvatační energii. Anionty mohou mít tvar koule např. chloridy či bromidy, mohou být lineární (thiokyanáty, kyanidy, azidy, hydroxidy), planární (uhličitan, dusičnan), tetraedr (fosforečnan, síran, vanadičnan, manganistan), případně mít tvar oktaedru (hexakynoželeznatan, hexakyanokobaltitan).

Další významnou komplikací je závislost na pH. V případě že se nejedná o anionty silných kyselin (dusičnan, síran, chlorid a chloristan) uplatňují se disociační rovnováhy, kdy při bazických pH je přítomen pouze aniont, ale s postupným okyselením roztoků začnou volné anionty přecházet na nedisociovanou formu kyselin, která má z hlediska tvaru a rozpoznání zcela odlišné vlastnosti. Proto je třeba udržovat vhodné pH, což není vždy jednoduché. Třetí komplikací je vysoká solvatační energie aniontů. Anionty se ve vodných roztocích nevyskytují samostatně, ale jsou obklopeny tzv. primární hydratační sférou, která se v roztoku pohybuje s nimi. Těchto několik molekul vody je z aniontu obtížně odstranitelných.

Všechny anionty lze seřadit do Hoffmeisterovy série podle jejich lipofilicity, tj. podle toho, jak ochotně přecházejí z vodné fáze do fáze organické. Protože většina senzorů je založena na organické vrstvičce, tak téměř všechny senzory vykazují selektivitu pro lipofilní část Hoffmeisterovy řady, a naopak při stanovení hydrofilních aniontů je třeba vysoce selektivních receptorů.

Klasické aniontově selektivní elektrody jsou založeny na využití kvarterních amoniových solí jako nabitých ionoforů, kde selektivita je kontrolována právě relativní lipofilicitou aniontů, Hoffmeisterovou sérií, která sleduje obecnou sekvenci: perchlorát > thiokyanát > jodid > nitrát > bromid > chlorid > bikarbonát > fluorid.

Cílem v této oblasti je vyvinout elektrody s odlišným trendem, pořadím selektivity, který je daný specifickou interakcí mezi sledovaným aniontem a ligandem. Vazebná energie komplexu, který je vytvořen asociací aniontu a receptoru redukuje přenosovou energii, která je potřeba k extrakci aniontu z vodné fáze do membrány. V kontrastu k velkému množství ionoforů, které jsou známé pro selektivní komplexaci aniontů, existuje pouze malé množství ionoforů, které jsou vhodné pro konstrukci aniontoselektivních membránových elektrod. Tyto lze rozdělit do několika typů podle interakce na které jsou založeny: elektrostatické interakce, klasická aniontová výměna; ligandy jsou dusíkaté makrocycly s protonovaným, nebo kvarterním dusíkovým atomem a guanidinové deriváty. Dalším vazebným modelem je výměna ligandu, např. u metaloporfyrinových komplexů kde bylo dosaženo zcela odlišné selektivity, než je daná Hoffmeisterovou sérií (např. pro dusitanové ionty).

Další interakce spočívá v koextrakci aniontu a kationtu receptorem (dosud ale nebyla popsána analytická aplikace), dále ve vytváření kovalentní vazby mezi receptorem a substrátem, např. trifluoroacetofenony jako neutrální kariery pro tvorbu kovalentní vazby s uhlíčitany, a dále i receptory typu Lewisovské kyseliny (boronové sloučeniny, rtuťnaté, organické sloučeniny cínu a rtuti) pro interakci se substráty typu Lewisovských bazí. Vitamín B₁₂ je znám svými koordinačními schopnostmi pro anionty. Několik hydrofobních derivátů vitamínu B₁₂ bylo použito pro vývoj iontově selektivních elektrod. Objev vazby aniontů v porfyriu podobných makrocyclech a metaloporfyrinech vedl k vývoji dusitanových selektivních elektrod a salicylát-selektivních elektrod. Bylo pozorováno, že povaha plastifikátoru ovlivňuje selektivitu elektrody, často mechanismem, který je založen na stacking interakci plastifikátoru a substrátu; toto bylo pozorováno u benzoátů.

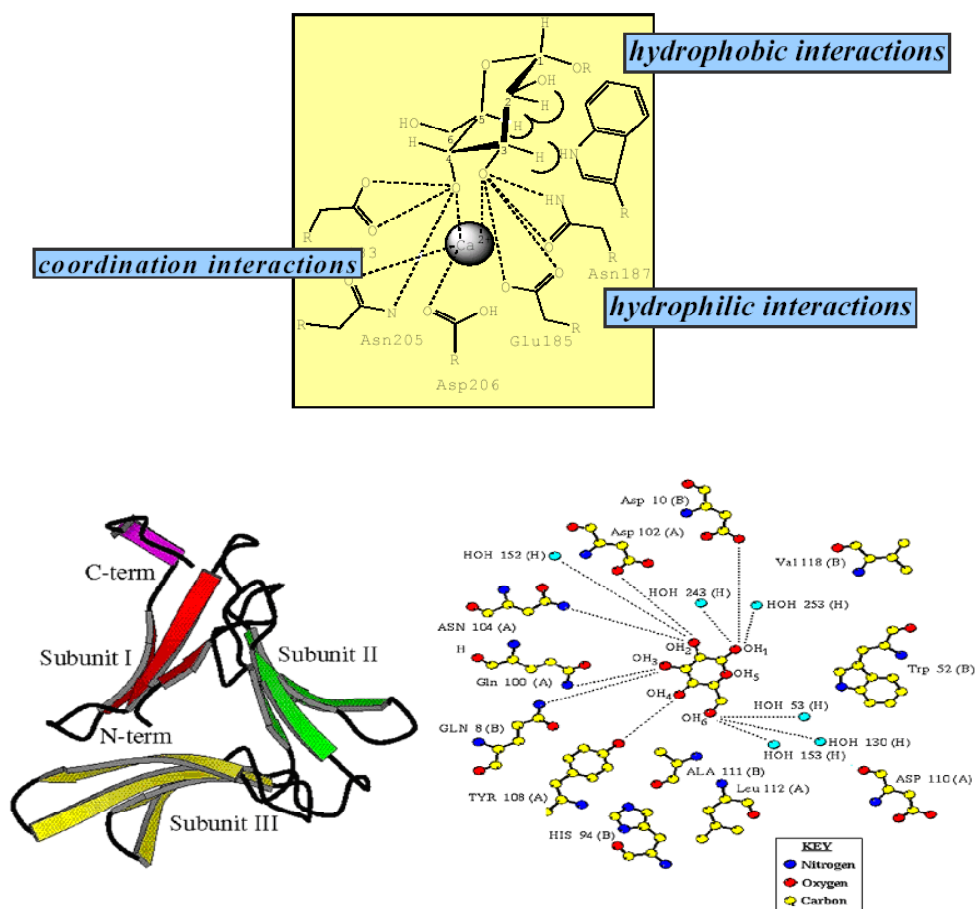
Protonované lipofilní makrocyclické polyamíny byly použity pro vývoj potenciometrických senzorů pro nukleotidy AMP, ADP a ATP ve formě jejich aniontů, resp. polyaniontů.¹⁴⁻¹⁶

V nedávné době bylo popsáno použití expandovaných porfyrinů pro rozpoznání aniontů. Tento nový přístup ke komplexaci aniontů pomocí nových pyrolových makrocyclů dovoluje podle velikosti cyklu a jeho náboje selektivní komplexaci různých aniontů. Tyto látky jsou v současné době testovány jako receptory pro vývoj aniontově selektivních elektrod s důrazem na fosfáty a nukleotidy. Další zvýšení selektivity bylo dosaženo zavedením nukleobáze (C, G) na periferii makrocycly – tyto ligandy rozpoznávají současně jak anion (fosfát), tak komplementární nukleobázi příslušného nukleotidu. Předběžné výsledky ukazují na reálnou možnost jejich využití jako senzorových elementů.¹⁷⁻²⁸

3 Receptory sacharidů

V současné době můžeme pozorovat vzrůstající zájem o funkci sacharidů v biologických systémech, která zahrnuje širokou škálu funkcí, od strukturních až po imunologické založené na molekulárním rozpoznání cizorodých komponent.

Tato práce se soustředí na roli cukrů jako molekulárních determinant, které jsou rozeznávány specifickými proteiny, lektíny, ale především na modelování funkce lektínů pomocí syntetických receptorů. Z hlediska obecných principů supramolekulární chemie představuje molekulární rozpoznání sacharidů v jejich přirozeném prostředí – ve vodě jeden z nejobtížnějších oříšků k řešení. Značná pozornost byla věnována porozumění a napodobování rozpoznávacích procesů, které jsou známy v přírodě. Selektivní komplexace sacharidů představuje velkou výzvu, také proto že sacharidy se často chovají jako chameleon díky mutarotaci, ovlivnění složitých konformačních a komplexačních rovnováh přítomností receptoru a velice kompetitivnímu prostředí, ve které má být selektivní komplexace vykonána. Proteiny selektivně vážící sacharidy představují ukázkový design, za kterým syntetické receptory zatím velice pokulhávají. Rozpoznávání sacharidů lektíny znázorněné na obrázku 1 představuje kooperativní komplementární model, kde hlavní roli hraje rozpoznání hydroxylových skupin sacharidů v poloze 3 a 4. Ale díky cele paletě interakcí které jsou využívány a shrnuty na obrázku., také ostatní skupiny (polohy 1-, 2-, a 6-) jsou využity pro komplexaci s lektínem, kde koordinace na kation Ca hraje další důležitou roli, spolu s hydrofobní interakcí. Komplexace monosacharidů je sice efektivní, ale síla komplexace stoupá s počtem monosacharidových jednotek.



Obr. 1. Druhy interakcí využité pro selektivní komplexaci sacharidů plynoucí z rentegostrukturních analýz (převzato z lit. 1)

3.1 Souhrn dosud popsaných syntetických receptorů pro sacharidy

Byla připravena celá řada receptorů sacharidů využívající různých strukturních motivů, k nejvýznamnějším patří boronové kyseliny^{29–34}.

3.1.1 Receptory založené na boronových kyselinách

Komplexy boronových kyselin a polyhydroxyderivátů byly studovány více než 50 let, díky tomu jsou dnes známy selektivní vazebné a transportní systémy založené na tvorbě tetraedráního aniontového komplexu s vicinálními dioly. Existuje celá řada strukturních motivů pro připojení boronových kyselin a tak vytvoření receptorů. Tímto způsobem byly využity deriváty difenylu, dipyridylu, 1,1'-binaftylu, anthracenu, a porfyrinu pro přípravu úspěšných receptorů mono a oligosacharidů.^{29–34}

Některé z těchto systémů jsou limitovány tím, že poskytují výše zmiňované komplexy jen v silně bazickém prostředí. Tento problém se podařilo vyřešit zavedením dusíkového substituentu (obvykle terciární amin) do blízkosti vazebné boronové kyseliny, pak je komplexace možná za podmínek blízkých fyziologickému (neutrální pH). Tvorbu komplexu se sacharidy je možné sledovat pomocí fluorescenční, UV-vis a ECD spektroskopie. Konstanty stability vznikajících cyklických komplexů byly také pozorovány pomocí řady dalších metod

zahrnujících potenciometrickou titraci, sledování změn pH, kalorimetrii, polarimetrii a voltametrii.

4 Od receptoru k senzorům

Výsledky studia mechanismu molekulárního rozpoznání aplikované do oboru analytické chemie se uplatňují především při vývoji senzorů, což je dnes „horký bod“ chemické analýzy. Selektor navržený na základě molekulárního modelování pro selektivní komplexaci analytu našeho zájmu dovoluje vývoj nových senzorových elementů. Spojení selektoru který rozpoznává daný analyt s fyzikálním převodníkem umožňuje převedení interakce na vhodný analytický signál, v principu jde tedy o konverzi chemické informace na fyzikální informaci. Existuje celá řada typů senzorů, v předkládané práci jde o nalezení vhodných selektorů pro biologicky významné aniontové analyty.

Rozpoznání analytu na úrovni interakce molekul je cesta kterou ve vydala současná analytická chemie. Z původní laboratorní vědecké kuriozity se vývoj senzorů stal předmětem širokého zájmu, a to jak na akademických, tak firemních pracovištích. Je to důsledek ohromného potenciálu, který senzory a biosenzory nabízejí pro revoluční změny analytických postupů. Přednostmi jsou vysoká selektivita, měření bez speciálních reagentů, nízké náklady a snadná obsluha. Současné odhady uvádějí, že více než 90 % stanovení v klinické praxi bude založeno na využití senzorů, především selektivních elektrod, fluorescenčních senzorů a biosenzorů.

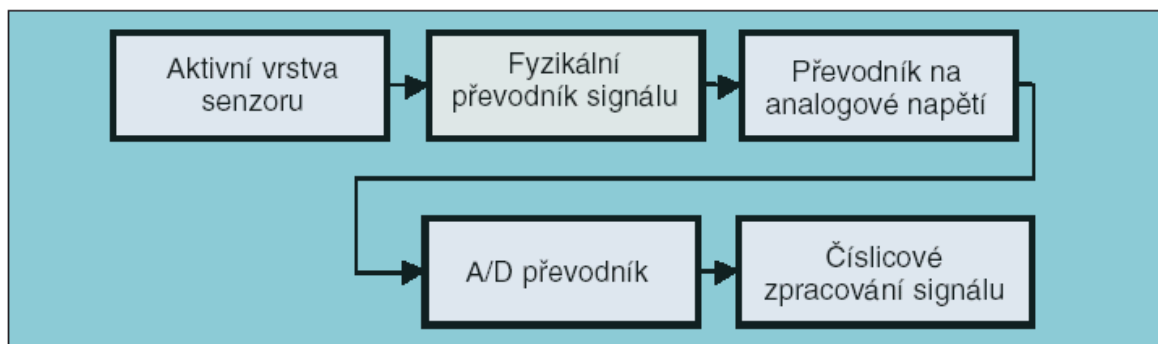
Vedle uplatnění v klinické praxi jsou stále více využívány při kontrole výrobních procesů, především v potravinářském průmyslu (*on line* analýzy), a monitorování znečištění životního prostředí, především znečištění zdrojů pitné vody.

Senzorová analýza je založena na tvorbě komplexu receptoru s analytem, který je pomocí převodníku monitorován a výsledkem tohoto procesu je analyticky užitečný signál. Toto uspořádání představuje obrovskou výhodu oproti klasickým analytickým metodám, kde činidlo se stanovovaným analytem kvantitativně reaguje a výsledkem je tedy pouze jednorázová analýza. Základním přínosem sensorové analýzy je právě to, že sensorové uspořádání umožňuje opakované (často v řádu desítek až milionů opakovaných vzorků) stanovení sledovaného analytu. To umožňuje tvorba nekovalentního komplexu a analytem a možnost prosté regenerace receptoru.

V sensorové analýze je úspěšnost metody často označována **SSS**, tedy stabilitou, sensitivitou a selektivitou vůči danému analytu. Proto je nutné pro každý nově vyvíjený receptor určit pro celou škálu analytů, které chceme potenciálním senzorem stanovovat, určit hodnotu konstant stability komplexů, pak můžeme z naměřených dat udělat závěr o selektivitě daného receptoru.

Nezbytnou podmínkou pro automatizované řízení je dostupnost informací o řízeném systému. Informace, respektive veličina, fyzikální či chemické povahy je pomocí vhodného senzoru převedena na veličinu, která je zpracovatelná (typ signálu je daný typem použitého převodníku) a se kterou je schopen pracovat rozhodovací člen automatu. Především na vlastnostech samotného senzoru záleží, jak kvalitní informace budou a jak kvalitní pak bude i vlastní řízení.

Vlastní senzor se skládá z několika částí (schéma 1).



Přítomnost analytu (detekované látky) generuje chemickou změnu v aktivní vrstvě senzoru, aby však mohl senzor úspěšně pracovat je nezbytnou podmínkou aby se tato chemická změna odrazila i ve fyzikálních vlastnostech aktivní vrstvy. Typické jsou například změny barvy, změny náboje či vodivosti. Na tuto změnu fyzikálních vlastností pak reaguje fyzikální převodník signálu, jehož výstupem je informace zpravidla v elektrické formě.

Jak již bylo řečeno, molekulární rozpoznání je jedním ze základních kamenů supramolekulární chemie. Pro daný substrát (neutrální molekulu, kation, anion) supramolekulární přístup spočívá v návrhu odpovídajícího receptoru, který má strukturní a chemické (vazebné) rysy, charakteristiky pro rozeznání požadovaného substrátu. Na základě řady ne vazebných interakcí lze při současných metodikách syntetické chemie připravit téměř jakýkoli receptor. Ovšem v praktickém smyslu i ten nejlépe propracovaný systém z hlediska komplexace substrátu je neúčinný, pokud neexistuje operátor (transducer), který by informoval o tom, že došlo ke vzniku komplexu receptor-substrát. Tak můžeme ilustrovat rozdíl mezi ligandem/receptorem na jedné straně a senzorem na druhé straně. K přeměně receptoru na senzor je nutné připojit signální skupinu, která kvantitativně monitoruje interakci receptor-substrát. A právě takové spojení specifického receptoru a podjednotky schopné signalizovat interakci receptor-substrát vytváří senzor. Efektivita senzoru pak závisí na selektivitě vazby pro daný substrát a snadnosti detekce a měření signálu (chemické informace) monitorujícího tuto vazbu. (aktivní a kontrolní jednotka spojená spojkou).

Vývoj senzorů pro organické ionty a neutrální molekuly je stimulován převážně farmaceutickým výzkumem a klinickou bioanalytickou chemií. Neutrální ligandy typu makrocyclických etherů byly použity pro vývoj senzorů pro biologicky významné kationty (guanidinium, adenosinium, amfetaminium, amoniové ionty). Lipofilní cyklodextriny byly použity pro selektivní vazbu a detekci oniových iontů a ukázaly selektivitu pro kvartérní amoniové ionty před kationtů kovů. Významná vlastnost lipofilních cyklodextrinů je jejich schopnost chirálního rozpoznání, které bylo využito pro monitorování aryl-substituovaných aminoalkoholů, kde mechanismus dělení je založen na inkluzi aromatické části molekuly. Na tomto principu byly založeny ISE pro měření enantiomerní čistoty efedrinu v přítomnosti ostatních kationtů. Sensory neutrálních organických molekul detekovaných prostřednictvím jejich protonovaných forem byly popsány v literatuře. Tento princip byl použit pro ISE na bázi substituovaných kalixarenů pro selektivní detekci primárních, sekundárních a terciárních aminů založené na tvaru molekuly.

Důležitý cíl v analytické chemii v následujícím desetiletí bude vývoj molekulárních systémů obsahujících receptorové molekuly, které budou schopné převádět chemickou interakci na molekulární úrovni na fyzikální kvanta na makroskopické úrovni. Pro takové systémy byl navržen Lehmem název molekulární elektronika, která spočívá na vytvoření molekulárního systému skladbou vhodně navržených molekul, který je pak schopen předávat

a shromažďovat informace přes chemickou interakci, fyzikální převod bude zajištěn elektronickými, nebo optickými signály. Alternativní přístup navržený Reinholdtem je založen na integraci syntetického receptoru s čipem pomocí litografické techniky nebo pomocí „naučené“ neuronové sítě. Podobná pole senzorů (sensor arrays) jsou postatou i tzv. elektronických nosů a jazyků.

5 Využití supramolekulární chemie pro separace

Molekulární rozpoznání bylo z hlediska mechanismu studováno řadou spektroskopických technik, především NMR, s cílem zjistit mechanismus komplexace, určit jaké skupiny odpovídají za vznik komplexu a jaké je jeho složení a výsledná geometrie.

Pro praktické aplikace je ovšem nohem významnější molekulární rozpoznání, které se odehrává na fázovém rozhraní. Aplikace tohoto jevu jsou dnes běžné pro použití iontově selektivních elektrod, a to jak elektropolymerních, tak membránových, optod a nepochybně také při rozpoznání analytů pomocí proteinů, či fragmentů DNK při biosenzorových aplikacích.

Další významnou oblastí, kde se uplatňují specifické interakce mezi selektorem a analytem jsou separační procesy. Přínosem supramolekulární chemie v této oblasti je návrh a aplikace nových selektivních interakcí, které vedou k dramatické zvýšení účinnosti separace, ta může být nazývána jako semi-afinitní. Tak např. zcela běžná současná metodika HPLC na reverzní fázi využívá různé typy stacionárních fází, jako např. C8, C18, a jejich modifikace jako CN, NH₂. Použitím těchto modifikovaných fází je dosaženo zlepšení separačního procesu pro danou skupinu analytů. Jaký nový prvek můžeme očekávat od aplikace molekulárního designu pro vývoj nových selektorů představujících aplikaci supramolekulárních principů, které by vedly k efektivní separaci zvolené studované skupiny analytů na základě specifické interakce selektor vybraný analyt.

Mezím příkladem je použití enzymů jako selektorů, které vedou k ke kompletní separaci (zachycení) vybraného analytu z jakkoliv pestré směsi látek, protože výběrové pravidlo pro specifickou látku je přesně zachováno na základě komplexace přirozeného substrátu a vymytí ostatních. Otázkou je jestli je možné vytvořit alternativu k afinitní chromatografii, tak překonat některé její nevýhody (z hlediska praktické aplikace často problematická fixace, která může vést ke ztrátě selektivity, či částečné denaturaci proteinu) na základě designu syntetického, vysoce selektivního receptoru, který by byl kovalentně fixován na stacionární fázi.

Myšlenkově ideální situace by byla selektivní komplexace se stabilním selektorem, kde by ovšem konstanta stability nevedla k úplnému zadržení, ale pouze zvýšení retenčního času pro sledovaný analyt a umožnila tak opakované, rychlé a vysoce účinné separace. Tento přístup, po mém soudu, mohou nabídnout racionálně navržené syntetické receptory-selektory. Výhodou toho přístupu by jistě byla dostatečná stabilita modifikovaného povrchu v širokém rozmezí pH a iontové síly, použití kationtů těžkých kovů atd., kde klasický přístup afinitní chromatografie naráží díky nestabilitě konformace proteinu na své meze.

Další výhodou tohoto přístupu je možnost „ušít“ selektorů na míru prakticky pro jakýkoliv analyt; nejsme omezeni pouze na přirozené substráty na stacionární fázi fixovaných enzymů. Aplikace tohoto principu pro HPLC a elektrochromatografii bude diskutována ve vlastních výsledcích.

Literatura (citované práce, cizí)

1. Comprehensive Supramolecular Chemistry, Molecular Recognition, J.L. Atwood, J.E.D. Davies, D.D. MacNicol, F. Vögtle, Eds. Receptors for Cationic Guest”, Pergamon, Vol. 1, Paris, France, 1996
2. Comprehensive Supramolecular Chemistry, Molecular Recognition, J.L. Atwood, J.E.D. Davies, D.D. MacNicol, F. Vögtle, Eds. Vol 2, Kap. 1: W. Weber, F. Vögtle: “Introduction and Historical Perspective”, str. 1-25
3. Ch.A.Hunter: “Meldola Lecture. The Role of Aromatic Interactions in Molecular Recognition”, Chem. Soc. Rev., 1994, 101-109
4. Comprehensive Supramolecular Chemistry, Molecular Recognition, J.L. Atwood, J.E.D. Davies, D.D. MacNicol, F. Vögtle, Eds. Vol 4, Kap. 1. CH.B. Brückner, L.Y. Xie, D. Dolphin: “Historical Perspectives and General Introduction” str 1-39
5. D.H. Busch, A.L. Vance, A.G. Kolchinskii: “Molecular Template effect: Historical View, Principles, and Perspectives”, Comprehensive Supramolecular Chemistry, J.L. Atwood, J.E.D. Davies, D.D. MacNicol, F. Vögtle, Eds. Vol. 9, 1-42
6. Ch. Seel, J. de Mendoza: “From Chloride Katapinates to Trinucleotide complexes: Developments in Molecular Recognition of Anionic Species”, “Comprehensive Supramolecular Chemistry, Molecular Recognition, J.L. Atwood, J.E.D. Davies, D.D. MacNicol, F. Vögtle, Eds. Vol 2, Kap. 17, str. 519-549
7. “Cyclodextrins”, in “Comprehensive Supramolecular Chemistry, Molecular Recognition, J.L. Atwood, J.E.D. Davies, D.D. MacNicol, F. Vögtle, Eds. Vol. 3 J. Szejtli: “Inclusion of Guest Molecules, Selectivity and Molecular Recognition by Cyclodextrins”; str. 189 J. Snopek, E. Smolková-Keulemansová, T. Cserhádi, A.M. Stalcup, K.H. Gahm: “Cyclodextrins in Analytical Separation Methods” str. 515; W.L. Hinze, F. Dai, R.P. Frankewich, K.N. Thimaiah, J. Szejtli: “Cyclodextrins as Reagents in Analytical Chemistry and Diagnostics”, str. 587
8. P.N.W. Baxter: “Metal Ion Directed Assembly of Complex Molecular Architectures and Nanostructures”, Comprehensive Supramolecular Chemistry, Vol. 9, 165-212
9. D. Voet, J.G. Voet: Biochemistry, 2nd ed. J. Wiley, NY., 1995, str. 56-277., 332.
10. Comprehensive Supramolecular Chemistry, Molecular Recognition, J.L. Atwood, J.E.D. Davies, D.D. MacNicol, F. Vögtle, Eds. Vol 10: Supramolecular technology; B. Alberts, D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, J.D. Watson: “Molecular Biology of the Cell”, Garland, New York, 1983
11. M. Anbar: “Supramolecular Structure and Function”, ed. G. Pifat-Mrzljak, Springer, Berlin, 1986, str. 142-53.
12. F.P. Schmidtchen, M. Berger: “Artificial Organic Host Molecules for Anions”, Chem. Rev. 1997, 97, 1609-1646
13. A. Bianchi, K. Bowman-James, E. García-España: “Supramolecular Chemistry of Anions”, USA 1997
14. C. Giovannangeli, J.-S. Sun, C. Héline: “Nucleic Acids: Supramolecular Structures and Rational Design of Sequence-specific Ligands”, “Comprehensive Supramolecular Chemistry, Molecular Recognition, J.L. Atwood, J.E.D. Davies, D.D. MacNicol, F. Vögtle, Eds. Vol. 4, 177-192

15. H.-J. Schneider, A.K. Mohammad-Ali: "Receptors for Organic Guest Molecules: General Principles", "Comprehensive Supramolecular Chemistry, Molecular Recognition, J.L. Atwood, J.E.D. Davies, D.D. MacNicol, F. Vögtle, Eds. Vol. 2, 69-102
16. D.S. Johnson, D.L. Boger: "DNA Binding Agents", "Comprehensive Supramolecular Chemistry, Molecular Recognition, J.L. Atwood, J.E.D. Davies, D.D. MacNicol, F. Vögtle, Eds., Vol. 4, 73-178
17. B. Meunier: Metalloporphyrins as Versatile Catalysts for Oxidation Reactions. Chem. Rev. 1992, 92, 1411-1456; H. Ogoshi, T. Mizutani: "Biomimetic Reactions Catalyzed by Metalloporphyrins", "Comprehensive Supramolecular Chemistry, Molecular Recognition, J.L. Atwood, J.E.D. Davies, D.D. MacNicol, F. Vögtle, Eds. Vol. 4, 337-386
18. Y. Murakami, J. Kikuchi, Y. Hisaeda, T. Ohno: "Artificial Enzymes with Vitamin B₆ and B₁₂ Activity", "Comprehensive Supramolecular Chemistry, Molecular Recognition, J.L. Atwood, J.E.D. Davies, D.D. MacNicol, F. Vögtle, Eds. Vol. 4, 415-472
19. J.A. Jongejan, J.A. Duine: "Supramolecular Aspects of Enzyme Enantioselectivity", "Comprehensive Supramolecular Chemistry, Molecular Recognition, J.L. Atwood, J.E.D. Davies, D.D. MacNicol, F. Vögtle, Eds. Comprehensive supramolecular Chemistry, Vol. 4, 473-502; D.H. Kim: "Supramolecular Aspects of Enzymes", Vol. 4, 503; H. Kondo: "Towards Design of Artificial Enzymes and Receptors Through Site-directed Mutagenesis of Proteins", Vol. 4, 535
20. B.A. Moyer: "Complexation and Transport", "Comprehensive Supramolecular Chemistry, Molecular Recognition, J.L. Atwood, J.E.D. Davies, D.D. MacNicol, F. Vögtle, Eds. Vol. 1, 377-416
21. T.M. Fyles, W.F. van Straaten-Nuenhuys: "Ion Channel Models", "Comprehensive Supramolecular Chemistry, Molecular Recognition, J.L. Atwood, J.E.D. Davies, D.D. MacNicol, F. Vögtle, Eds. Vol. 10, 53-78
22. J.D. Lamb, R.G. Smith: "Application of Macrocyclic Ligands to High-performance Ion Analysis", "Comprehensive Supramolecular Chemistry, Molecular Recognition, J.L. Atwood, J.E.D. Davies, D.D. MacNicol, F. Vögtle, Eds. Vol. 10, 79-112
23. R.M. Izatt, J.S. Bradshaw, R.L. Bruening, B.J. Tarret, M.L. Bruening: "Selective Separation Using Supported Devices", "Comprehensive Supramolecular Chemistry, Molecular Recognition, J.L. Atwood, J.E.D. Davies, D.D. MacNicol, F. Vögtle, Eds., Vol. 10, 1-12
24. Reichert, H. Ringsdorf, P. Schuhmacher, T. Scheybani: "Molecular Architecture and Function Based on Molecular Recognition and Self-organization", "Comprehensive Supramolecular Chemistry, Molecular Recognition, J.L. Atwood, J.E.D. Davies, D.D. MacNicol, F. Vögtle, Eds. Vol. 9, 313-350
25. T. Kunitake: "Synthetic Bilayer Membranes: Molecular Design and Molecular Organization", "Comprehensive Supramolecular Chemistry, Molecular Recognition, J.L. Atwood, J.E.D. Davies, D.D. MacNicol, F. Vögtle, Eds. Vol. 9, 351-406
26. T.R. Crompton: "Determination of Anions. A Guide for the Analytical Chemist, Springer – Verlag Berlin Heidelberg 1996
27. L. Fabrizzi, A. Poggi: Chem. Soc. rev. 1995, 197-202; J.C. Lockhart: "Comprehensive Supramolecular Chemistry, Molecular Recognition, J.L. Atwood, J.E.D. Davies, D.D. MacNicol, F. Vögtle, Eds. Vol 10, Kap. 16. str. 605-632

28. D. Ammann: "Ion-Selective Microelectrodes. Principles, Design and Applications", Springer, Berlin, 1986
29. (a)James, T. D.; Shinkai, S.. Chemistry, Topics in Current Chemistry (2002), 218, 159-200; (b)Yang, W.; Gao, X.; Wang, B. Medicinal Research Reviews (2003), 23(3), 346-368
30. Wiskur, S.L.; Ait-Haddou, H.; Lavigne, J.J.; Anslyn, E.V. Acc. Chem. Res., (2001), 34(12), 963-972.
31. (a)DiCesare, N.; Lakowicz, J. R. Journal of Physical Chemistry A (2001), 105(28), 6834-6840; (b) Cooper, C.R.; James, T.D. Proceedings of SPIE-The International Society for Optical Engineering (1999), 3602, 194-201.
32. Takeuchi, M.; Yoda, S.; Imada, T.; Shinkai, S. Tetrahedron (1997), 53(25), 8335-8348.
33. DiCesare, N.; Lakowicz, J.R. Anal. Biochem., (2001), 294(160) , 154-160
34. (a)Takeuchi, M.; Kijima, H.; Hamachi, I.; Shinkai, S. Bulletin of the Chemical Society of Japan (1997), 70(3), 699-705; (b)Hirata, O.;Masashi, S.;Kazunori, K.;Ikeda, M.;Takeuchi, M.;Shinkai, S. J. Supramol. Chem. (2003), 2(1-3), 133-142

6 Cíl disertační práce

Cílem je shrnutí výsledků předkladatele v následujících oblastech:

- a) Návrh vývoj a testování receptorů biologicky významných aniontů
- b) Návrh, příprava a testování receptorů pro sacharidy, s důrazem na oligosacharidy
- c) Sensorové aplikace: (vývoj optických a elektrochemických sensorů), aplikace připravených receptorů pro separační procesy
- d) Využití imobilizovaných receptorů pro separace

6.1 Zvolené metody zpracování

Pokud se týče metod, které jsou k dispozici pro zpracování daných témat je nasnadě celá škála metod organické a bio-organické chemie, metody spektrometrické, chiroptické, chemická analýza, testy biologické účinnosti a zkoumání některých produktů z hlediska materiálové vědy. Vlastní metodický přístup ke zpracování zvoleného tématu zahrnoval:

Design, syntézu a prostudování komplexačních vlastností řady receptorových systémů obsahujících oligopyrolový makrocyclický skelet, výběr selektivních receptorů pro konstrukci optických a elektrochemických sensorů.

6.2 Vlastní výsledky z oblasti využití molekulárního rozpoznání aniontů

Těžiště předkládané práce ovšem leží v popisu studia komplexace aniontů [1 – 37], sacharidů [38 – 52] pomocí makrocyclických oligopyrolových ligandů [1 – 31] a využití molekulárního rozpoznávání pro separaci a sensorovou analýzu [53 – 90].

Použití expandovaných porfyrinů, především safyriinových a rubyriinových derivátů pro molekulární rozpoznávání biologicky důležitých aniontů reprezentuje novou oblast supramolekulární chemie, spolu s využitím nové rodiny receptorů – heterokalixarenů – neutrálních ligandů pro komplexaci aniontů a malých neutrálních molekul.

Odkazy na jednotlivé práce jsou uvedeny v textu v závorkách, aby byly odlišeny od citací na práce jiných autorů. Pro snazší orientaci jsou uváděny i názvy článků. Práce shrnuje výsledky z oblasti rozpoznávání a transportu biologicky významných aniontů [1 – 37] a neutrálních látek [38 – 52]. Výsledky byly publikovány v renomovaných světových a národních časopisech. Vedle rozpoznání v roztoku je nyní úsilí věnováno studiu a aplikaci těchto procesů odehrávajících se na fázovém rozhraní a to pro vývoj iontově selektivních elektrod [52 – 90] a v neposlední řadě také vývoji nových chromatografických stacionárních fází pro HPLC s důrazem na chirální separaci [52 – 90].

6.3 Rozpoznání pomocí makrocyclických receptorů

V práci popisované makrocyclické sloučeniny (porfyriny, safyriiny, rubyriiny) nejsou inherentně chirální, ale syntetická strategie při jejich přípravě, či následná modifikace periferie makrocyclického skeletu dovoluje zavedení chirálních skupin. Dosud byla pozornost soustředěna na využití dvou typů stavebních chirálních bloků, a to 1,1'-binaftylových derivátů (především příslušných aldehydů a kyselin) a steroidních derivátů, kde především cholesterolové deriváty a snadno přístupné deriváty z rodiny cholových kyselin jsou výchozími látkami pro další syntézu makrocyclických sloučenin, a to příslušných derivátů porfyrinů, expandovaných porfyrinů a kalix (4) pyrolů. Stále zajímavější jsou také aplikace

syntetických enantioselektivních receptorů jako chirálních selektorů v chromatografii, kde specifická stereoselektivní interakce receptoru vázaného na silikagel dovoluje separaci racemických analytů, protože chirální rozpoznání se promítá do odlišných retenčních časů pro enantiomery (tam kde stacionární fáze obsahuje imobilizovaný opticky aktivní receptor). Popsali jsme použití jak lineárních tak cyklických safyriinových dimerů (a oligomerů – nepublikované výsledky) pro přípravu ISE a separaci racemických aminokyselin, a to jak chráněných (N, C), tak volných. Tyto deriváty byly také imobilizovány na nosiči a testy ukázali jejich potenciální využití jako CSP pro separaci aminokyselin, chirálních aminů a 1,1'-binaftolových derivátů.

Vzhledem k vynikajícím fluorescenčním vlastnostem připravených makrocyclů jsou zkoumány nyní jejich aplikace jako fluorescenčních průb pro biologicky významné substráty, a to aminokyseliny, nukleotidy, sacharidy, fragmenty DNA.

6.3.1 Anion selektivní elektrody

Oblastí s velkým potenciálem se jeví použití našich makrocyclických receptorů jako ligandů pro anion selektivní elektrody. I přes významnou vědeckou aktivitu řady týmů po celém světě v oblasti anion selektivních elektrod se dosud zdaleka nedaří dosáhnout analogických výsledků jako v oblasti kation selektivních elektrod. Klíčovou strategií pro úspěch anion selektivních elektrod je příprava nových syntetických ligandů poskytujících vysoce specifické a selektivní rozpoznání cílových aniontů a polyaniontů. V této oblasti se jeví expandované porfyriny a kalix (4) pyroly jako vysoce perspektivní, naše dosavadní výsledky [33 – 35] naznačují jejich potenciál. Zde se naše vědecká aktivita ubírá dvěma směry: a to vývojem elektropolymerních elektrod a membránových elektrod, v obou případech je aktivní rozpoznávací komponentou makrocyclická sloučenina, která v prvním případě nese periferní substituci 2-aminofenyl, či 1-aminoethylpyrolovou skupinu, která je využita pro vytvoření polyanilinového, či polypyrolového filmu elektropolymerizačním procesem. V současné době jsou testovány porfyrinové a metaloporfyrinové elektrody. Vedle toho jsou vyvíjeny potenciometrické sensory na bázi membránových ISE, kde design makrocyclických receptorů dovoluje (při dostatečném lipofilním charakteru receptoru nutném pro funkčnost membrány) zavedení mnohonásobné ne vazebné interakce s cílovým substrátem, a to jak stejného tak různého typu (kombinace vodíkových vazeb s coulombickou interakcí, vazba substrátu jako axiální ligand, hydrofobní interakce). Receptory byly navrženy pro cílové substráty na základě molekulárního modelování tak, aby došlo ke komplementaritě jak sterické, tak elektronické z hlediska druhu, počtu a prostorové orientace vazebných skupin a celkové konformace substrátu. Ve snaze získat selektivní sensorové elementy pro nukleotidy, byla studována série ligandů nesoucích kovalentně připojené nukleobáze s cílem najít vysokou selektivitu pro komplementární nukleotid. Navržené di- a tritopické ligandy kombinují elektrostatickou interakci s párováním bazí. Jednotkou pro rozpoznání fosfátu byl vedle triaminu safyriin, či jiný makrocyclus; v další generaci dále substituovaný vedle nukleobáze polyaminem, či lipofilní kvartérní amoniovou skupinou pro dosažení plné komplementarity náboje v neutrálním pH.

V nedávné době byly expandované porfyriny použity pro přípravu anion specifických sensorů. Do první skupiny patří metaloderiváty expandovaných porfyrinů a to především metalotexafyriny. Tento makrocyclus tvoří stabilní komplexy s řadou kationtů přechodových kovů, které mají schopnost vázat anionty jako axiální ligandy se selektivitou odlišnou od metaloporfyrinů. V druhé skupině je řada cyklických oligopyrolových systémů s variací spojky, kde nejslibnější pro selektivní komplexaci aniontů při fyziologickém pH se jeví safyriinové a rubyrinové deriváty. Ty jsou v současné době testovány jako sensorové elementy

pro anion selektivní elektrody, dosavadní výsledky ukazují, že dovolují detekci biologicky relevantních aniontů, jako jsou chloridy, karbonáty, karboxyláty a fosfáty.

Např. safyriinový makrocyklus vykazuje významnou selektivitu pro 5'-AMP v řadě nukleotidů. Další zvýšení selektivity bylo dosaženo kovalentním připojením nukleobáze (C, G) na periferii safyriinového makrocyklu.

Dalším typem jsou elektrochemické sensory založené na elektropolymerních organických filmech. Vedle známých poly (pyrolových) polymerů byly využity pro potenciometrickou detekci aniontů také elektropolymerní metalované porfyriinové filmy, kde především tetrakis (2-aminofenyl) porfyriin je výchozí látkou pro elektropolymeraci.

Přístup prezentovaný v této práci pro konstrukci membránových anion selektivních elektrod je založen na diskriminaci důležitých organických aniontů na základě změny potenciálu indukovaného komplexací sledovaného analytu na povrchu membrány. Potenciometrická diskriminace je založena na interakci specifických funkčních skupin organického ligandu (receptoru) s komplementárními funkčními skupinami analytu (vodíkové vazby, interakce nabitých skupin). Rozpoznání nabitých skupin je důležitý princip pro potenciometrickou diskriminaci organických látek, protože obecně zahrnuje silné elektrostatické interakce mezi jistými skupinami v molekule. Vedle metaloporfyriinů (centrální ion Co^{2+} , Fe^{3+}) byla prozkoumána řada expandovaných porfyriinů jako anion selektivních ligandů. Nejvíce prozkoumán je zatím safyriin, a to jak v roztoku, tak na fázovém rozhraní. Tento pentapyrolový makrocyklus nese při neutrálním pH pozitivní náboj díky monoprotonaci a tak kombinuje velice silnou elektrostatickou atrakci aniontů s přesně prostorově definovanými vodíkovými vazbami. S cyklickými systémy – oligosafyriiny vstupuje do hry další vazebný mód, a to tvar a velikost substrátu vedoucí k tvorbě inkluzních komplexů. Na výše uvedených skutečnostech je založen přístup k designu, syntéze a použití ligandů pro ISE. Diskriminace je založena na třech principech, a to rozpoznání analytu na základě interakce komplementárně nabitých skupin, vodíkových vazeb a tvaru molekuly. Další rozpoznávací nástroje jsou aromatické a hydrofobní interakce. Elektrody vykazují potenciometrické selektivity pro organické anionty podle počtu a orientace záporných nábojů. Zvýšení selektivity umožňuje vypracovaná syntetická strategie, která kombinuje makrocyklus, který specificky váže fosfáty s další rozpoznávací skupinou, např. cytosinovými, a guanosinovými deriváty, které zavedením dalšího rozpoznávacího modu – Watson-Crick párování bazí umožní zvýšení selektivity vazby. Funkčnost tohoto konceptu, který využívá ditopické a tritopické receptory, byla prokázána jak selektivním transportem nukleotidů přes modelovou membránu, tak aplikací těchto ligandů pro ISE, kdy bylo dosaženo vysoce selektivního rozpoznání (diskriminace) komplementárních nukleotidů umožňující navržení sensorů založených na těchto receptorech. Selektivní odpověď pro nukleotidy byla dosažena také s cytosinovými deriváty kalix (4) pyrolů a metaloporfyriinů, která nebyla pozorována pokud byl použit pouze základní makrocyklus bez této specifické substituce. Významným výsledkem je zjištění že přechod od základního makrocyklu, který reprezentuje receptor nabízející jen jeden typ interakce, (např. vodíkové vazby, nebo vazbu aniontu či neutrální molekuly jako axiální ligand) k di- a obecně polytopickým receptorům s vysokou selektivitou danou kombinací různého typu interakcí s analytem. Jejich syntéza je vcelku schůdná díky funkčním skupinám na periferii, lze dosáhnout téměř exklusivní selektivity pro požadovaný substrát a to v poměru, který plně uspokojuje požadavky analytické praxe na vývoj ISE a sensorových elementů.

Potenciometrická diskriminace dikarboxylových kyselin a enantioselektivní diskriminace zjištěná v roztoku a na modelových membránových experimentech s použitím safyriin dimeru byla také pozorována při použití cyklických oligosafyriinových ligandů. Oligosafyriinové

receptory patří do rodiny syntetických receptorů, které v poslední době zaznamenaly velký pokrok, receptorů, které mají podobu pinzety na uchopení – rozpoznání a vazbu požadovaného substrátu. Vedle flexibilních ligandů byly zkonstruovány systémy s definovanou konformací a také cyklické klecovité struktury. Tato syntetická strategie dovoluje zvyšovat selektivitu pro požadovaný substrát, navíc zahrnutí chirálních stavebních bloků do syntetického protokolu umožňuje dosažení enantiosektivního rozpoznání a separace. Rozpoznání biologicky významných molekul, jako jsou nukleotidy a aminokyseliny bylo dosaženo s pomocí chirálních oligosafyrinových derivátů.

Rozpoznání složitých organických látek, jako jsou nukleotidy (planární heteroaromatická purinová, či pyrimidinová báze, cukr a fosfát) vyžaduje několik elementů uspořádaných ve vhodné orientaci a vzdálenosti v navržené molekule receptoru. Jednou ze skupin je komplementární nukleobáze, připojená ke skupině či makrocyklu schopnému selektivního rozpoznání fosfátu. Takový systém pak dovoluje rozpoznání partnera na základě vodíkových vazeb (komplementární nukleobáze) a terciární amín, guanidinový derivát, či safyrin umožňuje selektivní vazbu fosfátu. Stabilita, stechiometrie a prostorové uspořádání komplexů vznikajících na fázovém rozhraní byla vždy předem studována pomocí moderních NMR technik a ve většině zásadních případů byla také získána data o přesném prostorovém uspořádání komplexů na základě rentgenostrukturní analýzy.

6.4 Receptory sacharidů, vlastní návrhy

Tato práce se soustředí na návrh receptorů pro sacharidy, především oligosacharidy, s konceptem chromoforní hydrofobní stavební jednotky, která dovolí přesnou konstrukci kooperujících vazebných skupin. Díky lokálně vytvořenému mikroprostředí tak mohou hrát vodíkové vazby aktivní roli při komplexaci i v konkurujícím protickém prostředí. Naše pozornost se zaměřila na vývoj takových receptorů, které by byly relevantní protein vázicím sacharidům a dosahovaly by selektivní komplexace v protickém prostředí, nejlépe za fyziologických podmínek.

6.4.1 Sacharidové receptory založené na nekovalentních interakcích

Konstrukce receptorů, které využívají kooperativity nekovalentních interakcí reprezentuje velkou výzvu, díky kompetici s rozpouštědlem. Asi v této souvislosti nelze brát příliš vážně receptory vyvinuté pro lipofilní sacharidové deriváty efektivní pouze v organických rozpouštědlech.

Nedávno jsme popsali několik sacharid vazebných motivů pro nekovalentní komplexace sacharidů v protickém prostředí, kde signální jednotkou byl porfyrinový makrocyklus dekorovaný na periferii sacharid vázicími skupinami. Obvyklý mechanismus detekce komplexace ve vodném prostředí souvisí s částečnou či úplnou deagregací po komplexaci sacharidu, či změně absorbance při tvorbě komplexu ve prostředí pufr-organické rozpouštědlo. Takové systémy zahrnují nové porfyrinové receptory, kde makrocyklus je substituovaný fosfonáty, binaftoly, oligopeptidy, cholovými kyselinami a jejich deriváty. [38 – 52]

V dalším kroku našeho studia receptorů pro sacharidy jsme vyvinuli jednoduchou kompetitivní esej (založenou na náhradě signální jednotky předřazenou rovnováhou s chromoforem) s využitím nových 1,1'-binaftyl substituovaných kalixresorcinolech. Tyto deriváty s vhodnou velikostí kavity tvoří barevné komplexy ve vodě s methylovou červení, kdy při následné komplexaci silněji vázaných sacharidů lze tento proces sledovat barevnou změnou.

Porfyrinové, safyrinové a další deriváty byly použity jako fluorescenční próby pro biologicky významné substráty, a to mono-, di- a polysacharidy, aminokyseliny, nukleotidy a oligopeptidy. Z doposud uzavřených výsledků jsou nejvýznamnější ty získané pro sacharidy s použitím porfyrinových fosfonátů. V současné době je pozornost soustředěna na vývoj molekulárních sensorů pro enantioselektivní rozpoznání, které by bylo převáděno na informaci změny barvy, či intenzity. Vývoj takových optických sensorů pro biologicky významné substráty představuje atraktivní oblast výzkumu. Design je založen na kombinaci rozpoznávajících a chromoforových stavebních jednotek. Velkou výhodou řady expandovaných porfyrinů je to, že mohou spojovat současně obě tyto funkce.

6.5 Aplikace rozpoznání a vazby aniontů pro separaci: využití nových sorbentů na bázi makrocyclických derivátů vázaných kovalentně na aminopropyl silikagel pro HPLC.

Separace biologicky významných anionických substrátů představuje významnou oblast analytické chemie. Nedávno byla objevena selektivní interakce vedoucí ke vzniku komplexů mezi protonovaným safyrimem, pentapyrolovým makrocyklem a dalšími expandovanými porfyriny s jistými anionty v roztoku, především fosfáty. Nabízela se zde možnost využít této interakce také na fázovém rozhraní pro účely separace aniontů.

Safyrimem funkcionalizovaný silikagel (vázaná fáze) byl získán reakcí safyrim-karboxylové kyseliny s aminopropylsilikagelem za tvorby amidové vazby pomocí diisopropylkarbodiimidu. Bylo zjištěno, že takto modifikovaný silikagel (po silylaci) je při možné použít jako sorbent v reverzním módu HPLC pro separaci fosforylovaných látek, především oligonukleotidů za izokratických podmínek. Také řada organických i anorganických aniontů byla úspěšně separována; za izokratických podmínek byly rozděleny substituované benzoáty a fenylfosfáty a fosfonáty. Také separace nukleotidů v závislosti na typu nukleobáze a typu počtu aniontů byla velice úspěšná za standardních podmínek, retenční čas je výrazně ovlivněn počtem nábojů, dělení mono-, di- a trifosfátů je na tomto sorbentu velice snadno dosažitelné, separační mód je založen na molekulárním rozpoznání oxyaniontů pomocí pozitivně nabitého makrocyclu, kde vedle elektrostatické atrakce hrají významnou roli také vodíkové vazby. Další zlepšení účinnosti a selektivity separace bylo dosaženo zavedením dalších vazebných modů, kdy substituent na periférii makrocyclu poskytuje významnou interakci s analytem. Na tomto principu byla založena stacionární fáze, kde cytosinový derivát safyrimu byl kovalentně připojen k aminopropylsilikagelu a použit pro separaci nukleotidů a oligonukleotidů. Receptor ukotvený na stacionární fázi poskytuje kombinaci řady vazebných modů – a to elektrostatickou vazbu aniontu, vytvoření vodíkových vazeb k aniontu, aromatické stakování a Watson-Crickovo párování bazí. Tím bylo dosaženo velice efektivního dělení sekvenčně podobných oligonukleotidů, které jsou s komerčně dostupnými kolonami obtížně dělitelné. Vedle toho bylo dosaženo separace směsi nukleotidových mono-, di- a trifosfátů za izokratických podmínek.

V kombinaci s chirálními jednotkami, a to jednak ve směsném vazebném modu, tak přímo vázanými na periférii makrocyclu bylo dosaženo enantioselektivní separace aromatických aminokyselin. Chirálními selektory, které byly použity jsou oligopeptidové deriváty, 1,1'-binaftylové deriváty a steroidní deriváty, především deriváty cholové kyseliny, kde enantioselektivní separace je dána tvarem molekuly a rozmístěním a orientací hydroxylových skupin na skeletu. Toto uspořádání se ukázalo být účinné v multivazebném modu (kombinace makrocyclu s chirálním selektorem) pro separaci, protože není závislé na chiralitě jednotlivých center, ale na tvaru molekuly. Další výhodou je to, že chirální chromatografická fáze není citlivá k racemizaci a současně poskytuje možnost predikce enantioselektivity na základě výpočtů molekulárního modelování.

Vedle safyrynu, byla použit pro separaci také Gd- a Eu-texafyrin, který díky centrálními kovovému iontu poskytuje možnost axiální ligace aniontů. Syntetická strategie byla opět založena na vytvoření amidové vazby mezi karboxylovou kyselinou metalotexafyrinu a 3-aminopropylovaným silikagelem. Silylace silanolových skupin byla obvykle provedena trimethylsilylimidazolem. Tato nová chromatografická fáze, která představuje imobilizovaný, makrocyklem komplexovaný kation přechodového kovu byla testována pro separaci aniontů, které jsou vázány jako axiální ligandy na centrální kation; separace byla testována za podmínek reverzní HPLC.

6.5.1 Interakce na fázovém rozhraní

6.5.1.1 Imobilizace receptoru na pevném nosiči

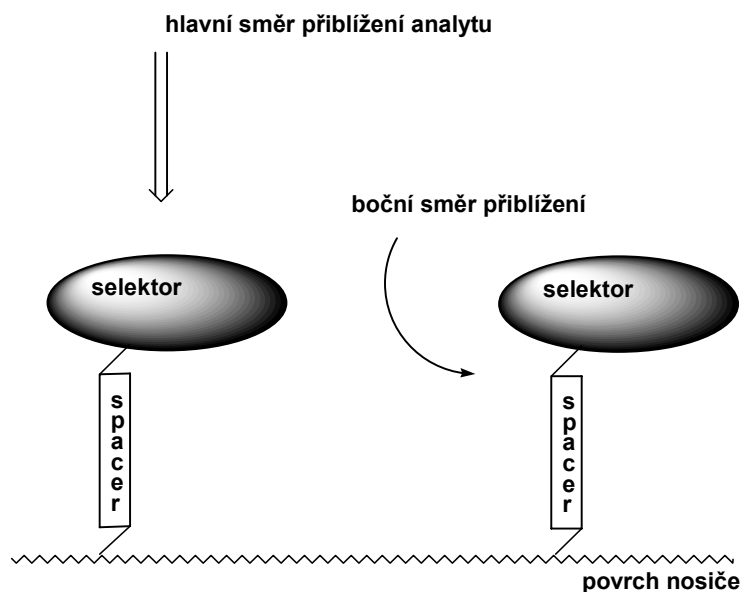
Imobilizací receptoru (selektoru) na pevném nosiči dochází k řadě změn v jeho chování, které jsou způsobeny především tím, že interakce s potenciálními analyty již neprobíhají v homogenním prostředí, ale na fázovém rozhraní.

Důvody imobilizace jsou různé a je jich celá řada. Jedním z metodických důvodů je fakt, že výsledný systém s imobilizovaným selektorem představuje věrnější model situace při interakcích v biochemii, protože k mnoha interakcím v živých systémech dochází také na fázovém rozhraní, např. interakce různých látek s receptory na povrchu buněk apod. Z pohledu aplikací v analytické chemii vede imobilizace k fázové separaci molekuly selektoru a média, ve kterém se vyskytuje analyt. Tvorbou komplexu mezi imobilizovaným selektorem a analytem dochází k oddělení analytu z roztoku vzorku (popř. k vzájemnému oddělení různých analytů přítomných ve vzorku). Je-li tvorba komplexu selektor vs. analyt reverzibilní, imobilizace selektoru umožňuje také jeho opakované použití. Těchto nesporných výhod se využívá při přípravě a aplikaci různých separačních médií nebo senzorů.

Potenciální selektory mohou být na pevném povrchu imobilizovány buď kovalentně, kdy proběhne chemická reakce selektoru s funkčními skupinami přítomnými na povrchu, nebo nekovalentně. V takovém případě je imobilizace realizována fyzikální sorpcí selektoru na povrchu nosiče. Při pohledu do současné literatury je ve všech případech, kdy je to možné, preferován způsob kovalentní imobilizace.

Dalšími důsledky kovalentní imobilizace receptoru na pevném nosiči jsou:

- Možnost ovlivnění směru interakce imobilizovaného selektoru s analytem v roztoku. V důsledku kovalentní imobilizace, je ze sterických důvodů preferován směr přiblížení analytu k selektoru z roztoku k povrchu. Nemusí to ale platit ve všech případech – pokud by byl schopen interagovat s analytem i spacer, může docházet k „boční interakci“ (obr. 2).
- Možnost sledování interakcí i v systémech, ve kterých by neimobilizovaný receptor byl nerozpustný.
- Možnost volbou rozpouštědel (polarity prostředí interakce) „vyladit“ selektivitu systému.



Obr. 2. Vliv imobilizace na směr přiblížení analytu k selektoru

6.5.1.2 Využití imobilizovaných selektorů

V následující tabulce (tab. 1) jsou uvedeny projekty založené na přípravě a imobilizaci různých selektorů, které probíhají v Laboratoři molekulárního rozpoznávání (LMR). Dvě oblasti aplikací, které jsou předmětem prezentovaných publikací, jsou vyznačeny šedivě, v současné době pracujeme v oblasti vývoje nanočástic pro separace.

Tabulka 1. Cíl aplikací řešených v rámci LMR podle typu nosiče imobilizovaných selektorů a podle oblastí uplatnění

	Silikagel	křemenná kapilára	pozlacený povrch
separace	vysokoúčinná kapalinová chromatografie	kapilární elektroforéza	nanoseparace
optické senzory		optody, vlnovody	povrchová plasmonová rezonance
elektrochemické senzory			impedanční spektroskopie

6.6 Nové receptorové systémy založené na heterokalixarenech

V rámci vyhledávání nových sensorových elementů pro biologicky významné substráty byly získány zajímavé výsledky s heterokalixareny. Zatímco kalixareny patří v současné době k nejvíce využívaným syntetickým ligandům, nebyla dosud žádná pozornost věnována heterokalixarenům, speciálně cyklickým oligopyrolovým systémům. I přesto že základní systém je znám více než 100 let (byl prvně syntetizován Bayerem v roce 1886 kondenzací pyroly s acetonem), byl zařazen do skupiny porfyrinogenů, i když svými vlastnostmi patří do rodiny heterokalixarenů. Dlouho nebyl rozeznán potenciál těchto synteticky snadno přístupných látek pro molekulární rozpoznání a aplikaci pro vývoj sensorů.

V rámci projektu syntézy nových kalix (n) pyrolových systémů a jejich derivátů se zvýšenou selektivitou pro sledovaný analyt byla připravena řada nových receptorů a sledovány jejich vlastnosti pro molekulární rozpoznání biologicky významných substrátů. Strukturální studie

kalix (4) pyrolů ukázaly, že existuje strukturní analogie v tvaru a flexibilitě molekuly s kalixareny. Byla rozeznána možnost využít kooperace čtyřech N–H skupin pro vytvoření definovaného vazebného místa na základě prostorově orientovaných vodíkových vazeb, a to jak pro některé anionty, tak pro neutrální molekuly jako jsou nukleobáze, nukleosidy a některé monosacharidy. Velkou výhodou tohoto přístupu je snadná derivatizace periferie makrocyklu a přípravy konjugátů, které umožňují dosažení vysoké selektivity ušitím ligandu na míru sledovaného analytu. Tento předpoklad se ukázal být správný a přinesl řadu zajímavých výsledků. První oblastí bylo studium vazby aniontů, kde bylo pomocí NMR titrací zjištěna selektivní komplexace anorganických aniontů, stejně jako v případě safyrinů s preferencí pro F^- . Základní kalix (4) pyrol je tedy ligand pro efektivní 1: 1 komplexaci aniontů s vysokou selektivitou pro F^- . Modifikace meso-substituentů a periferie makrocyklu dovoluje značné změny v preferenci pro jednotlivé anionty a tak dovoluje vytvoření specifického ligandu pro požadovaný analyt. V tomto směru se nejslibněji rýsuje projekt kalixpyrolů s periferní substitucí nukleobázemi s cílem selektivního rozpoznání a transportu nukleotidů. Rentgenostrukturní analýza odhalila změnu konformace spojenou s komplexací aniontů, zatímco volný ligand zaujímá alternující konformaci, komplexace aniontů vede orientaci 4 pyrolových jader stejným směrem (konická konformace), kdy čtyři NH protony vytvářejí vodíkové vazby s aniontem.

Dále bylo zjištěno že molekulární rozpoznání pomocí kalix (4) pyrolů se neomezuje na anionické substráty. Další skupinou látek, jejichž specifická komplexace pomocí kalixpyrolů byla studována jsou neutrální molekuly jako alkoholy, amidy, deriváty močoviny a nyní především nukleobáze a nukleosidy. Zjištěné vazebné konstanty nejsou vysoké, ale syntetické modifikace otevírají řadu možností k přípravě vysoce specifických receptorů založených na (a) modifikaci kyselosti pyrolových protonů díky β -substituci; (b) na vnesení dalšího vazebného modu pomocí rozpoznávacích skupin spojených kovalentní vazbou se základním makrocyklem. Výchozí látkou je zde příslušná mono- a dikarboxylová kyselina. Přestože makrocykly obsahující pyridinové jádro jsou jedny z nejrozšířenějších syntetických ligandů, dosud byl tento systém neznámý v chemii heterokalixarenů. Syntetickým cílem bylo vypracování obecného protokolu pro částečnou, či úplnou konverzi pyrolových jader kalix (4) pyrolu na kalix (4) pyridiny. Vypracovaná metodika dovoluje přípravu těchto ligandů s variací počtu donorových, či akceptorových míst vodíkových vazeb v molekule [32].

Snadná syntetická přístupnost a komplexační vlastnosti heterokalixarenů otevírají řadu možností využití těchto látek. V současné době je sledována možnost aplikace kalixpyrolů pro přípravu modifikovaných fází pro HPLC (s cílem separace nukleotidů a oligonukleotidů) a jako nových sensorových elementů pro biologicky významné analyty.

6.7 Nejdůležitější výsledky disertace s uvedením nových poznatků

V rámci této studie byla syntetizována celá řada nových typů oligopyrolových makrocyklických receptorů, především porfyrinů, expandovaných porfyrinů, kalixpyrolů a kalixfyrinů, které na tomto zvoleném strukturním motivu nese takovou periferní substituci, která dovoluje selektivní komplexaci zvolené substrátu, analytu. Nové výsledky zahrnují především přípravu a identifikaci zajímavých vlastností nových expandovaných porfyrinů, především safyrinů a dalších expandovaných porfyrinů pro komplexaci aniontů, selektivně fosfátů a biologicky významných aniontů. Připravené receptory byly úspěšně aplikovány pro HPLC a CE jako specifické selektory. Byly vypracovány nové patentované postupy pro přípravu optických a elektrochemických sensorů, transportní systémy pro oligonukleotidy, konstrukci nové skupiny inhibitorů HIV RP. K nejvýznamnějším výsledkům práce patří rozvoj supramolekulární chemie komplexace aniontů pomocí metaloporfyrinových, safyrinových, rubyrinových a kalix(4)pyrolových makrocyklů a její aplikace pro vývoj nových separačních

technik a sensorových elementů. Komplexace aniontů a sacharidů byla sledována řadou spektrálních technik, především NMR, UV-VIS a fluorescenční spektroskopií a byla také prokázána pomocí rentgenostrukturní analýzy. Makrocyclické receptory byly aplikovány po kovalentním navázání na silikagel jako nové chromatografické sorbenty pro HPLC. Nové receptory ukázaly velký potenciál jako aktivní komponenty anion-selektivních elektrod.

6.8 Závěr

6.8.1 Konkrétní závěry pro realizaci v praxi a další rozvoj vědy

Výše uvedený komentář k souboru uveřejněných prací, zpracovaný ve smyslu Směrnice Akademické rady AV ČR „Pravidla pro udělování vědeckého titulu „doktor věd“ v Akademii věd ČR“ č.j.: K – 9191/VR/03, uvádí nejdůležitější dosažené cíle a některé závěry prací jichž jsem spoluautorem. V případě prací z nejnovejší doby na tématu supramolekulárních struktur přináší i nejčerstvější výsledky, jejichž časopisecké publikování v plné podobě je souběžně připravováno. Společným rysem předloženého souboru prací je použití oligopyrolových makrocyclů pro konstrukci receptorů, sensorové využití, transportní systémy a separační procesy.

6.9 Literatura: Vlastní práce autora vztahující se k předkládané disertační práci

6.9.1 Aniontové receptory: Selektivní komplexace vybraných aniontů

- 1. Molecular Recognition via Base-pairing and Phosphate Chelation. Ditopic and Tritopic Sapphyrin-based Receptors for the Recognition and Transport of Nucleotide Monophosphates**
V. Kral, J.L. Sessler
Tetrahedron 51, 539-554, 1995
- 2. A Covalently Linked Sapphyrin Dimer. A New Receptor for Dicarboxylate Anions.**
V. Kral, A. Andrievsky, J.L. Sessler
J. Am. Chem. Soc. 117, 2953-2954, 1995
- 3. A Noncovalent Assembly for Energy Transfer Based on Anion Chelation.**
V. Kral, S.L. Springs, J.L. Sessler
J. Am. Chem. Soc. 117, 8881-8882, 1995
- 4. Oligosapphyrins: Receptors for the Recognition and Transport of Nucleotide Di- and Tri-phosphates**
V. Kral, A. Andrievsky, J.L. Sessler:
J. Chem. Soc. Chem. Commun. 2349-2351, 1995
- 5. Sapphyrin-Oligonucleotide Conjugates. Novel Sequence – Specific DNA Photomodifying Agents with Increased Binding Affinity**
J. L. Sessler, P. I. Sansom, V. Kral, D. O'Connor, B. L. Iverson
J. Am. Chem. Soc. 118, 12322-12330 (1996).
- 6. Protonated Sapphyrins. Highly Effective Phosphate Receptors**
V. Kral, H. Furuta, K. Shreder, V. Lynch, J.L. Sessler
J. Am. Chem. Soc. 118, 1595-1607 (1996).

7. **Interaction of Sapphyrin with Phosphorylated Species of Biological Interest**
B.L. Iverson, K. Shreder, V. Kral, P. Sansom, V. Lynch, J.L. Sessler
J. Am. Chem. Soc. 118, 1608-1616 (1996).
8. **Separation of Mono-, Di-, and Triphosphate Nucleotides by Cytosine Substituted, Silica-Bound Sapphyrin Solid Supports**
J. L. Sessler, J. W. Genge, V. Kral, B. L. Iverson
Supramolecular Chem. 8, 45-52 (1996)
9. **Calix[4]pyrroles: Old Yet New Anion-Binding Agents**
P.A. Gale, J.L. Sessler, V. Kral, V. Lynch
J. Am. Chem. Soc. 118, 5140-5141 (1996)
10. **Enhanced DNA Photocleavage and Binding properties of sapphyrin-Polyamine Conjugates**
J.L. Sessler, A. Andrievsky, P. I. Sansom, V. Kral, B. L. Iverson
Bioorg. Med. Chem. Lett. 7, 1433 – 1436 (1997).
11. **Chiral Recognition of Dicarboxylate Anions by Sapphyrin-Based Receptors**
J.L. Sessler, A. Andrievsky, V. Kral, V. Lynch
J. Am. Chem. Soc. 119, 9385-9392 (1997).
12. **New Generation of Positively Charged Porphyrins with Enhanced Affinity to Negatively Charged Biopolymers.**
P. Anzenbacher, Jr., V. Kriz, I. Rosenberg, Z. Tocik, I. Kavenova, K. Jursikova, V.Kral:
Chem. listy 91, 1025 (1997).
13. **Supramolekular Chemistry of Anions, Chapter 10.: Application Aspects Involving the Supramolekular Chemistry of Anions, Pp. 355 – 420**
J.L. Sessler, P. I. Sansom, A. Andrievsky, V. Kral.
Bianchi, K. Bowman-James, and E.Garcia-Espana Eds. Wiley-VCH, New York 1997,
14. **Calixpyrroles**
P.A. Gale, J. L. Sessler, V. Kral
J. Chem. Soc. Chem. Commun. 1998, 1 – 8.
15. **Calix (4) pyridine: a new arrival in the heterocalixarene family**
V. Kral, P. A. Gale, P. Anzenbacher Jr., K. Jursikova, V. Lynch, J. L. Sessler
J. Chem. Soc. Chem. Commun. 1998, 9 – 10.
16. **Anion Selectivity of a Sapphyrin-Modified Silica Gel HPLC Support**
Jonathan L. Sessler, Vladimir Kral, John W. Genge, Richard E. Thomas, and Brent L. Iverson:
Anal. Chem. 1998, 70, 2516 – 2522
17. **Energy Transfer in a Supramolecular Complex Assembled via Sapphyrin Dimer-Mediated Dicarboxylate anion Chelation**
Stacy L. Springs, Andrei Andrievsky, Vladimir Kral and Jonathan L. Sessler
J. Porphyrins Phthalocyanines 2, 315 – 325 (1998)
18. **Functionalized Calix[4] pyrroles**
Jonathan L. Sessler, Pavel Anzenbacher, Jr., Karolina Jursikova, Hidekazu Miyaji, John W. Genge, Nicolai A. Tvermoes, William E. Allen, and James A. Shriver, Philip A. Gale, Vladimir Kral
Pure Appl. chem. 1998, p. 2401 – 2408

19. **Picosecond Dynamics of Energy Transfer in Porphyrin-Sapphyrin Noncovalent Assemblies**
Stacy L. Springs, David Gosztola, Michael R. Wasielewski, Vladimir Kral, Andrei Andrievsky, and Jonathan L. Sessler
J. Am. Chem. Soc. 1999, 121, 2281 – 2289
20. **Calix[4]pyrrole-Functionalized Silica Gels: Novel Supports for the HPLC-Based Separation of Anions**
Jonathan L. Sessler, John W. Genge, Phillip A. Gale, and Vladimir Kral: Eds. G. J. Lumetta, R. D. Rogers, A. S. Golapan, 1999
Book chapter: ACS Symposium Series No. 757: Calixarenes for Separations
21. **Anion Binding: from Supramolecules to Sensors**
Vladimir Kral, Tatjana Shishkanova, Oleksandr Rusin, Radko Volf, Pavel Matejka, and Karel Volka
Chem. Listy, 93, 546 – 553 (1999)
22. **Molecular Recognition at an Organic-Aqueous Interface: Heterocalixarenes as Anion Binding Agents in Liquid Polymeric Membrane Ion-Selective Electrodes**
Vladimir Kral, Jonathan L. Sessler, Tatiana V. Shishkanova, Philip A. Gale, and Radko Volf
J. Am. Chem. Soc. 1999, 121, 8771 – 8775
23. **Porphyrin-Polyazacryptand Conjugates: Novel Receptors for Nucleotides**
Vladimir Kral, Anna Cattani, Alla Sinica, Franz P. Schmidtchen
Tetrahedron 55 7829 – 7834 (1999)
24. **Long-range assemblies on poly (dG-dC) 2 and poly (dA-dT) 2: Phosphonium cationic porphyrins and the importance of the charge**
K. Lang, P. Anzenbacher Jr., P. Kapusta, P. Kubat, V. Kral, D.M. Wagnerova
Photochem. Photobiol. 57 2000 (51 – 59)
25. **Interaction of novel cationic meso-tetraphenylporphyrins in the ground and excited states with DNA and nucleotides**
P. Kubat, K. Lang, P. Anzenbacher jr., V. Kral, B. Ehrenberg
J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1, 2000, 933 – 941
26. **Calixpyrins. Novel Macrocycles at the Intersection Between Porphyrins and Calixpyrroles**
Vladimir Kral, Jonathan L. Sessler, Rebecca S. Zimmerman, Daniel Seidel, Vincent Lynch, Bruno Andrioletti
Angew. Chem., Int. Ed., 39 (6), 1055 – 1058 (English) 2000
27. **Vibračni cirkulárni dichroismus prírodných chirálnych latek**
Vladimir Setnicka, Marie Urbanova, Vladimir Kral, Karel Volka
Chem. Listy 94, 813 – 814, 2000
28. **Synthesis of Novel Expanded Calixpyrins: Anion Binding Properties of a Calix[6]pyrin with a Deep Cavity**
Christophe Bucher, Rebecca S. Zimmerman, Vincent Lynch, Vladimir Kral, and Jonathan L. Sessler
J. Am. Chem. Soc., 123 (9), 2099 – 2100, 2001
29. **Photophysical properties of two novel tetraphenylporphyrins substituted by guanidinocarbonyl and monocyclic guanidine groups**
Kubat P., Lang K., Kral V., Schmidtchen F. P.
Intern. J. Photoenergy 3 (3), 147 – 151

- 30. Calixpyrins. Hybrid macrocycles at the structural crossroads between porphyrins and calixpyrroles**
Sessler J. L., Zimmerman R. S., Bucher C., Kral V., Adrioletti B.
Pure Appl. Chem., 73 (7) 1041 – 1057
- 31. Anion-controlled assembly of porphyrin-bicyclic guanidine conjugates**
Kral V., Schmidtchen F. P., Lang K., Berger M.
Org Lett., 4 (1) 51 – 54, 2002
- 32. Cytosine substituted calix[4]pyrroles: Neutral receptors for 5'-guanosine monophosphate**
Sessler J. L., Kral V., Shishkanova T. V., Gale P. A.
PNAS 99 (8) 4848 – 4853, 2002
- 33. Quaternized Brucine as a Novel Chiral Selector**
Zaruba, K., Kral, V.
Tetrahedron Asymmetry, 2002, 13, 2567-2570
- 34. Monoprotonated sapphyrin-pertechnetate anion interactions in aqueous media**
Gorden, A. E. V.; Davis, J.; Sessler, J. L.; Kral, V.; Keogh, D. W.; Schroeder, N. L.
Supramolecular Chemistry 16, (2) 91-100, 2004.
- 35. Cytosine-substituted metalloporphyrins: receptors for recognition of nucleotides in ion-selective electrodes**
Kral, V.; Shishkanova, T. V.; Sessler, J. L.; Brown, C. T.
Organic & Biomolecular Chemistry 2, (8) 1169-1175, 2004.
- 36. Citrate selectivity of poly (neutral red) electropolymerized films**
Broncova, G.; Shishkanova, T. V.; Matejka, P.; Volf, R.; Kral, V.
Analytica Chimica Acta 511, (2) 197-205, 2004.
- 37. Nucleoside- and Nucleobase-Substituted Oligopyrrolic Macrocycles**
Kral V.; Valik M.; Shishkanova T. V.; Sessler J. L.
Dekker Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology

6.9.2 Receptory sacharidů: Komplexace sacharidů pomocí nových receptorů, vývoj optických sensorů

- 38. Novel Macrocycles with 1,1'-Binaphthyl Substituents for the Recognition of Saccharides.**
Olexander Rusin, Vladimir Kral
J. Chem. Soc. Chem. Commun. (23), 2367 – 2368, 1999
- 39. Porphyrin Phosphonates: Novel Anionic Receptors for Saccharide Recognition**
Vladimir Kral, Oleksandr Rusin, Jana Charvatova, Pavel Anzenbacher, Jr., Jaroslav Fogl
Tetrahedron Lett 41 (51) 10147 – 10151, 2000
- 40. Interaction of metallotexaphyrins with mono- and polysaccharides.**
Alla Synytsya, Andriy Synytsya, Vladimir Kral, Karel Volka, Jana Copikova, Jonathan L. Sessler
J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2, 1876 – 1884, 2000
- 41. Nove steroidni oligopyrrolove makrocykly**
Mikaylo Dukh, Vladimir Pouzar, Ivan Cerny, Marek Urbansky, Vladimir Kral, Pavel Drasar
Chem. Listy 94, 797 – 799, 2000

42. **Novel Porphyrin-Cryptand Cyclic Systems: Receptors for Saccharide Recognition in Water**
Vladimir Kral, Oleksandr Rusin, and Franz P. Schmidtchen
Org. Lett., 3 (6), 873 -876, 2001.
43. **1,1'-Binaphthyl substituted calixresorcinols-methyl red complexes: receptors for optical saccharide sensing.**
O. Rusin, V. Kral
Tetrahedron Lett 42 (25), 4235 – 4238, 2001
44. **1,1'-Binaphthyl Subunits as Recognition Group of Novel Macrocyclic Ligands. Application for Saccharide Sensing**
Oleksandr Rusin, Vladimir Kral
Sensor Actuator B 76: (1 – 3) 331 – 335, 2001
45. **Novel porphyrin based receptors for saccharide recognition in water**
Charvatova J; Rusin O; Kral V; Volka K; Matejka P
Sensor Actuator B 76: (1-3) 366-372, 2001
46. **Novel water-soluble porphyrin-based receptors for saccharide recognition**
Rusin O., Hub M., Kral V.
Material Science & Engineering C 18, 135 – 140
47. **1,1'-binaphthyl-substituted macrocycles as receptors for saccharide recognition**
Rusin O, Lang K, Kral V
Chemistry-a European Journal 8, 655, 2002
48. **Novel Deep Cavity Calix[4]pyrroles Derived from Steroidal Ketones**
Dukh M., Drasar P., Cerny I., Pouzar V., Shriver J. A. Kral V., Sessler J. L.
Supramolecular Chemistry 14 (2 – 3) 237 – 244 (2002)
49. **Steroid-porphyrin conjugate for saccharide sensing in protic media**
Dukh M, Saman D, Lang K, Pouzar V, Cerny I, Drasar P, Kral V
Organic & Biomolecular Chemistry 1 (19): 3458 – 3463 2003
50. **A supramolecular approach to protein labeling. A novel fluorescent bioassay for concanavalin A activity**
Rusin, O.; Kral, V.; Escobedo, J. O.; Strongin, R. M.
Organic Letters 6, (9) 1373-1376, 2004.
51. **Synthesis of porphyrin receptors modified by glycosylated steroids**
Zelenka, K.; Trnka, T.; Tislerova, I.; Kral, V.; Dukh, M.; Drasar, P.
Collection of Czechoslovak Chemical Communications 69, (5) 1149-1160
52. **Novel porphyrin-cholic acid conjugates as receptors for biologically important anions**
Erkki Kolehmainen, Juha Koivukorpi, Elina Sievänen, and Vladimír Král:
Supramol. Chem. in press
- 6.9.3 Využití molekulárního rozpoznání pro separace a sensorovou analýzu:**
53. **FT Raman spectroscopy as a tool for characterization of derivatized silica gel sorbents**
Tomankova, Zuzana; Matejka, Pavel; Volka, Karel; Kral, Vladimir
Collection of Czechoslovak Chemical Communications (2005), 70 (2), 168-177

- 54. Porphyrin based affinity interactions: analytical applications with special reference to open tubular capillary electrochromatography**
Deyl, Zdenek; Miksik, Ivan; Eckhardt, Adam; Kasicka, Vaclav; Kral, Vladimir
Current Analytical Chemistry (2005) 1 (1), 103-119
- 55. Study of molecular recognition of 5,10,15,20-tetrakis (pentafluorophenyl) porphyrin-b-cyclodextrin conjugate covalently immobilized on a silica surface**
Zaruba, Kamil; Vasek, Petr; Kral, Vladimir
Supramolecular Chemistry (2004), 16 (7), 529-536
- 56. Synthesis of Functional meso-Aryl Porphomonomethenes and Porphodimethenes: Application to the Preparation of a Chiral Calix[4]pyrin Dimer**
Bernatkova, Marketa; Andrioletti, Bruno; Kral, Vladimir; Rose, Eric; Vaissermann, Jacqueline
Journal of Organic Chemistry (2004), 69 (23)
- 57. Calix[4]pyrins. Effect of Peripheral Substituents on Conformational Mobility and Structure within a Series of Related Systems**
Dolensky, Bohumil; Kroulik, Jiri; Kral, Vladimir; Sessler, Jonathan L.; Dvorakova, Hana; Bour, Petr; Bernatkova, Marketa; Bucher, Christophe; Lynch, Vincent
Journal of the American Chemical Society (2004), 126 (42)
- 58. Biodistribution assessment of a lutetium (III) texaphyrin analogue in tumor-bearing mice using NIR Fourier-transform Raman spectroscopy**
Synytsya, Alla; Kral, Vladimir; Matejka, Pavel; Pouckova, Pavla; Volka, Karel; Sessler, Jonathan L.
Photochemistry and Photobiology (2004), 79 (5), 453-460.
- 59. Biolocalisation and photochemical properties of two novel macrocyclic photosensitisers: a spectroscopic study**
Synytsya, Alla; Kral, Vladimir; Blechova, Miroslava; Volka, Karel
Journal of Photochemistry and Photobiology, B: Biology (2004), 74 (2-3), 73-84.
- 60. Citrate selectivity of poly (neutral red) electropolymerized films**
Broncova, Gabriela; Shishkanova, Tatiana V.; Matejka, Pavel; Volf, Radko; Kral, Vladimir
Analytica Chimica Acta (2004), 511 (2), 197-205
- 61. Polycyclic macrocycles containing pyrrole with directly bound steroidal substituents in meso positions as analytical sensors**
Dukh, Mykhaylo; Cerny, Ivan; Urbansky, Marek; Pouzar, Vladimir; Kral, Vladimir; Drasar, Pavel
CZ 290491 B6 20020814
- 62. Cytosine-substituted metalloporphyrins: receptors for recognition of nucleotides in ion-selective electrodes**
Kral, Vladimir; Shishkanova, Tatiana V.; Sessler, Jonathan L.; Brown, Christopher T.
Organic & Biomolecular Chemistry (2004), 2 (8)
- 63. A supramolecular approach to protein labeling. A novel fluorescent bioassay for concanavalin A activity**
Rusin, Oleksandr; Kral, Vladimir; Escobedo, Jorge O.; Strongin, Robert M.
Organic Letters (2004), 6 (9), 1373-1376

- 64. Separation of structurally related peptides by open-tubular capillary electrochromatography using (metallo) porphyrins as the adsorbed stationary phase**
Charvatova, Jana; Kasicka, Vaclav; Barth, Tomislav; Deyl, Zdenek; Miksik, Ivan; Kral, Vladimir
Collection Symposium Series (2003), 6 7-11
- 65. Separation of structurally related peptides by open-tubular capillary electrochromatography using (metallo) porphyrins as the adsorbed stationary phase**
Charvatova, Jana; Kasicka, Vaclav; Barth, Tomislav; Deyl, Zdenek; Miksik, Ivan; Kral, Vladimir
Journal of Chromatography, A (2003), 1009 (1-2), 73-80
- 66. Open tubular capillary electrochromatography of underivatized amino acids using Rh (III) tetrakis (phenoxyphenyl) porphyrinate as wall modifier**
Charvatova, Jana; Deyl, Zdenek; Kasicka, Vaclav; Kral, Vladimir
Journal of Chromatography, A (2003), 990 (1-2), 159-167
- 67. Influencing electroosmotic flow and selectivity in open tubular electrochromatography by tetrakis (pentafluorophenyl) porphyrin as capillary wall modifier**
Charvatova, Jana; Kasicka, Vaclav; Deyl, Zdenek; Kral, Vladimir
Journal of Chromatography, A (2003), 990 (1-2), 111-119
- 68. Interaction of oligopyrrole macrocycles with aromatic acids: spectroscopical, quantum chemical and chromatographic aspects**
Tomankova, Zuzana; Matejka, Pavel; Sykora, David; Kral, Vladimir
Talanta (2003), 59 (4), 817-829
- 69. In vitro interaction of macrocyclic photosensitizers with intact mitochondria: a spectroscopic study**
Synytsya, Alla; Kral, Vladimir; Synytsya, Andriy; Volka, Karel; Sessler, Jonathan L.
Biochimica et Biophysica Acta (2003), 1620 (1-3), 85-96
- 70. Quaternized brucine as a novel chiral selector**
Zaruba, Kamil; Kral, Vladimir
Tetrahedron: Asymmetry (2002), 13 (23), 2567-2570
- 71. Preparation, characterization and analytical application of electropolymerized films**
Volf, Radko; Kral, Vladimir; Hrdlicka, Jan; Shishkanova, Tatiana V.; Broncova, Gabriela; Kronak, Martin; Grotschelova, Sylvie; St'astny, Miloslav; Kroulik, Jiri; Valik, Martin; Matejka, Pavel; Volka, Karel
Solid State Ionics (2002), 154-155 57-63
- 72. Novel binding mode for fluorinated porphyrins: synthesis and fluorophilic affinity of stable atropisomers of 5,10,15,20-tetrakis[2- (perfluoroacyl) aminophenyl]-21H,23H-porphyrins**
Paleta, Oldrich; Benes, Michal; Koutnikova, Jitka; Kral, Vladimir
Tetrahedron Letters (2002), 43 (38), 6827-6831
- 73. Membrane of ion-selective electrode for determination of amino acids**
Kral, Vladimir; Siskanova, Tatana Viktorovna; Kronak, Martin; Volf, Radko; Rusin, Olexander Andrejevic; Stibor, Ivan; Holakovsk, Roman.
CZ 288381 B6 20010613 Patent written in Czech. Application: CZ 99-371

- 74. Formation of Porphyrin- and Sapphyrin-Containing Monolayers on Electrochemically Prepared Gold Substrates: A FT Raman Spectroscopic Study**
Zaruba, Kamil; Matejka, Pavel; Volf, Radko; Volka, Karel; Kral, Vladimir; Sessler, Jonathan L. *Langmuir* (2002), 18 (18), 6896-6906.
- 75. Cytosine substituted calix[4]pyrroles: neutral receptors for 5'-guanosine monophosphate**
Sessler, Jonathan L.; Kral, Vladimir; Shishkanova, Tatiana V.; Gale, Philip A. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (2002), 99 (8), 4848-4853
- 76. Capillary electrochromatographic study of the interactions of porphyrin derivatives with amino acids and oligopeptides**
Charvatova, Jana; Kasicka, Vaclav; Kral, Vladimir; Deyl, Zdenek *Journal of Chromatography, B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* (2002), 770 (1-2), 165-175
- 77. Capillary electrochromatographic separation of aromatic amino acids possessing peptides using porphyrin derivatives as the inner wall modifiers**
Charvatova, Jana; Kral, Vladimir; Deyl, Zdenek *Journal of Chromatography, B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* (2002), 770 (1-2), 155-163
- 78. Capillary electrochromatographic study of sapphyrin-organophosphoric acid derivatives interaction**
Charvatova, Jana; Kral, Vladimir; Deyl, Zdenek *Electrophoresis* (2002), 23 (2), 237-244
- 79. Novel systems for selective cation detection: application of a lipophilic carborane anion in polymeric ion-selective electrodes**
Kroncak, Martin; Volf, Radko; Kral, Vladimir *Collection of Czechoslovak Chemical Communications* (2001), 66 (11), 1659-1664.
- 80. Separation of amino acids by open tubular capillary electrochromatography in fused silica capillaries with inner surface modified by porphyrins**
Charvatova, Jana; Kral, Vladimir; Kasicka, Vaclav *Collection Symposium Series* (2001), 4 (Biologically Active Peptides), 109-112
- 81. Molecular recognition of amino acid esters in liquid polymeric membrane ion-selective electrodes**
Kroncak, Martin; Shishkanova, Tatiana V.; Holakovsky, Roman; Volf, Radko; Stibor, Ivan; Kral, Vladimir *Analytica Chimica Acta* (2001), 448 (1-2), 19-25
- 82. Analytical application of oligopyrrole macrocycles**
Zaruba, Kamil; Setnicka, Vladimir; Charvatova, Jana; Rusin, Oleksandr; Tomankova, Zuzana; Hrdlicka, Jan; Sykora, David; Kral, Vladimir *Collection of Czechoslovak Chemical Communications* (2001), 66 (5), 693-769.
- 83. Novel potentiometric sensor for determination of cysteine based on substituted poly(diphenylporphyrins and metalloporphyrins)**
Volf, Radko; Shishkanova, Tatiana V.; Kral, Vladimir *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry* (1999), 35 (1-2), 111-122.

- 84. Molecular Recognition at an Organic-Aqueous Interface: Heterocalixarenes as Anion Binding Agents in Liquid Polymeric Membrane Ion-Selective Electrodes**
Kral, Vladimir; Sessler, Jonathan L.; Shishkanova, Tatiana V.; Gale, Philip A.; Volf, Radko
Journal of the American Chemical Society (1999), 121 (38), 8771-8775
- 85. Potentiometric anion response of poly (5,15-bis (2-aminophenyl) porphyrin) electropolymerized electrodes**
Volf, Radko; Shishkanova, Tatiana V.; Matejka, Pavel; Hamplova, Monika; Kral, Vladimir
Analytica Chimica Acta (1999), 381 (2-3), 197-205
- 86. Preparation of sapphyrin derivatives, conjugates, polymers, and chromatographic supports**
Sessler, Jonathan L.; Iverson, Brent L.; Kral, Vladimir; Shreder, Kevin; Furuta, Hiroyuki; Thomas, Richard E.
US 5808059 A 19980915 Patent written in English. Application: US 95-424288 19950828.
Priority: US 92-964607 19921021; WO 93-US9994 19931018.
- 87. Anion Selectivity of a Sapphyrin-Modified Silica Gel HPLC Support**
Sessler, Jonathan L.; Kral, Vladimir; Genge, John W.; Thomas, Richard E.; Iverson, Brent L.
Analytical Chemistry (1998), 70 (13), 2516-2522
- 88. Molecular recognition with novel chromatographic phases based on combination of porphyrins and expanded porphyrins with chiral binaphthyl derivatives: application for the separation of biologically important substrates**
Kavenova, Ivana; Holakovsky, Roman; Hovorka, Martin; Kriz, Vaclav; Pavel Anzenbacher, Jr. Pavel; Matejka, Pavel; Kral, Vladimir; Genge, John W.; Sessler, Jonathan L.
Chemicke Listy (1998), 92 (2), 147-148
- 89. Anion Selectivity of a Sapphyrin-Modified Silica Gel HPLC Support**
Jonathan L. Sessler, Vladimir Kral, John W. Genge, Richard E. Thomas, and Brent L. Iverson:
Anal. Chem. 1998, 70, 2516 – 2522
- 90. Calix[4]pyrrole-Functionalized Silica Gels: Novel Supports for the HPLC-Based Separation of Anions**
Jonathan L. Sessler, John W. Genge, Phillip A. Gale, and Vladimir Kral: Eds. G. J. Lumetta, R. D. Rogers, A. S. Golapan, 1999
Book chapter: ACS Symposium Series No. 757: Calixarenes for Separations

6.9.4 Sensorová analýza

- M. Šťastný, M.Kronďák, R. Volf, V. Král, K. Hlávka: Automatizace 46 (2003), 826
M. Šťastný, M.Kronďák, R. Volf, V. Král, K. Hlávka: Automatizace 46 (2003), 758
M. Šťastný, M. Hub, M.Kronďák, R. Volf, V. Král, K. Hlávka: Automatizace 46 (2003), 690
M. Šťastný, M.Kronďák, R. Volf, V. Král, K. Hlávka: Automatizace 46 (2003), 624
M. Šťastný, M.Kronďák, R. Volf, V. Král, K. Hlávka: Automatizace 46 (2003), 533
M. Šťastný, M.Kronďák, R. Volf, V. Král: Automatizace 46 (2003), 464
M. Šťastný, M.Kronďák, R. Volf, V. Král: Automatizace 46 (2003), 405

7 Souhrn tezí disertace (česky, anglicky)

7.1 Souhrn

Předkládaná práce shrnuje výsledky autora v oblasti rozpoznání biologicky významných aniontů a sacharidů pomocí oligopyrolových makrocyclů a jejich využití v analytické a medicíně. Současně autor shrnuje výsledky po fixaci receptoru na fázovém rozhraní, vedoucí k aplikaci pro separace, především s využitím HPLC a CE. Design specifických receptorů pro vybrané cílové molekuly představuje jeden z velice atraktivních směrů současné supramolekulární chemie, který je výzvou zvláště za podmínek blízkým fyziologickým.

První skupinou látek pro které byly navrženy, syntetizovány a posléze testovány nové receptorové systémy byly biologicky významné anionty. Návrh receptorů byl založen na nábojové a prostorové komplementaritě s analytem, který byl předmětem zkoumání. Návrhu modulárního systému vycházel z několika základních stavebních bloků, které byly zvoleny tak, aby předně poskytovaly zvolenou geometrii receptoru, to zajišťoval geometrický modul scaffold (měl ve většině případů nejenom geometrickou, ale také chromoforní funkci) a dále umožňoval kooperativitu vazebných skupin na vybraných strukturních motivech zajišťujících selektivní komplexaci aniontů. Modulární systém zahrnující chromoforní skupinu umožňoval snadnou optickou detekci komplexačního procesu. Vazebnými skupinami pro komplexaci sacharidů byly: guanidiniové skupiny, mono a bicyklické guanidiniové skupiny, kvarterní amoniové soli, kvarternizované alkaloidy, pyridiniové zwitterionty.

K nejdůležitějším dosaženým výsledkům patří selektivní komplexace nukleotidů, ATP a polykarboxylátů. Řada lipofilních receptorů byla využita jako aktivní komponenta pro membránové iontově selektivní elektrody pro stanovení aniontů. Nově vyvinuté elektrody jsou testovány pro multikomponentní analýzu v elektronických nosech a jazycích.

Z důvodů umožnění kooperativity periferních vazebných skupin byly použity převážně makrocyclické systémy: porfyriny a metaloporfyriny; expandované porfyriny, safyryny, rubyriny, dále hybridní makrocyclické látky typu – kalixfyrinů. V neposlední řadě také kalixpyroly, kde makrocycklus sám, je také vlastní komplexační jednotkou; vlastním vazebným motivem pro komplexaci aniontů jsou kooperující pyrolové NH skupiny, což bylo prokázáno NMR a rentgenostrukturní analýzou.

Řada námi připravených elektropolymerních filmů vykazovala zajímavé vlastnosti anion komplexační vlastnosti, a to jak metaloporfyriny, tak nedávno studovaný elektropolymer neutrální a methylové červeně, specifické např. pro citronovou kyselinu.

Ve stejné obecné koncepci byly také navrhovány receptory oligosacharidů, kde scaffold makrocyclického systému byl využit pro prostorovou orientaci vazebných skupin sacharidů, vedle výše zmíněných ještě byly použity kalixareny a resorcinareny,

V modulárním přístupu vazebnými skupinami byly následující strukturní funkce: fosfáty, fosfonáty, binaftolové skupiny, oligopeptidy, cyklické systémy – kvarterní amoniové soli, polykarboxyláty, deriváty amidů cholových kyselin. Nejvyšší selektivitu vykazovaly cyklické bisporfyrinové sendvičové receptory.

Připravené receptory byly testovány jak v roztoku, tak pro separaci na fázovém rozhraní. Zde kromě funkčních SAM byla připravena řada nových sorbentů pro HPLC pro separaci aniontů a také pro chirální separaci (chirálním selektorem byly konjugáty porfyrinů s β -cyklodextrinem a alkaloidy, zejména brucinem), kde analyty našeho zájmu byly racemické binaftylové deriváty a některé deriváty aminokyselin, kde bylo dosaženo úspěšné separace,

zatímco komerční chirální kolony ji neposkytovaly. Modifikací stěn kapilár pro CE a OTCE bylo dosaženo výrazného zlepšení separace nukleotidů a směsí aminokyslein v porovnání s nemodifikovanou kapilárou.

Výsledky práce byly publikovány nejenom v předních světových časopisech s vysokým IF, ale také tvoří součást celé řady patentů, z nichž některé jsou připravovány k realizaci (prototyp přístroje pro elektronické nosy a jazyky byl již vyvinut a je v současnosti testován).

7.2 Summary

Presented work summarizes the results of the author in the area of molecular recognition of biologically important anions and saccharides by oligopyrrolic macrocycles and their applications in analytical and medicinal chemistry. The author resumes both the results obtained for free receptors in solution and the data acquired on the interface. Especially the latter led to various applications in the field of separation science, namely HPLC and CE.

The design of the specific receptors for selected molecules represents one of the most attractive directions of the contemporary supramolecular chemistry and is especially challenging under physiological conditions.

The first group of compounds for which we designed, synthesized and tested novel receptors was consisted of biologically important anions.

The design of the receptors was based on the spatial and charge complementarity of the receptors with the targeted analytes. The design of the modular system was based on several building blocks providing required geometry of the receptor. This was ensured by a rationally designed scaffold allowing selective interaction co-operativity between the receptor and the anions. Moreover, the modular approach also facilitated the introduction of a chromophoric unit into the scaffold for easy optical monitoring of the complexation process.

Following binding groups were utilized for the complexation: guanidinium derivatives, mono and bicyclic guanidinium derivatives, quarternary ammonium salts, quarternized alkaloids, pyridinium zwitterions.

Selective complexation of nucleotides, ATP and biologically important polycarboxylates belongs to the most important results. A number of lipophilic receptors were used for the construction of membrane ion-selective electrodes (ISE) for the determination of nucleotides, halides and carboxylates. Newly developed ISE are currently tested for multicomponent analysis with electronic noses and tongues.

In order to allow the both the co-operativity of peripheral binding units and the simultaneous introduction of chromophoric moiety macrocyclic compounds like porphyrins, metalloporphyrins, expanded porphyrins (sapphyrins, rubyrin, texaphyrin), partially conjugated macrocycles, called calixphyrins and also nonconjugated macrocycles, calixpyrroles were utilized. In the case of calixpyrroles the macrocycle itself serves as the complexation unit for anions *via* co-operation of 4-pyrrole NH groups in the cone conformation as was proved by NMR and X-Ray analysis.

A number of our prepared electropolymerized films displayed interesting anion-complexation properties, specifically metalloporphyrins and also recently studied electropolymer of neutral and methyl red showing specificity for citric acid.

The same general philosophy, i.e. the utilization of the modular approach, was also applied in the design and the development of novel receptors for saccharides. Here, the scaffold of the macrocyclic system was used for proper spatial arrangement of saccharide binding units. Beside above-mentioned macrocycles also resorcinarenes were used.

In our modular approach, the binding sites for saccharides were as follows: phosphates, phosphonates, binaphthol groups, oligopeptides, cyclic systems – quaternary ammonium salts, polycarboxylates, derivatives of amides of cholic acids. Cyclic bisporphyrin sandwich receptors demonstrated the highest affinity and selectivity.

The prepared receptors were tested in solution (preferably under the conditions close to physiological) and after their fixation on the surface.

Here, beside functioning SAM several new sorbents for HPLC were developed. The sorbents were intended for the separation of anions and for chiral separations. As chiral selectors conjugates of porphyrin with β -cyclodextrin and an alkaloid, brucine, were used. The resulting chiral stationary phases (CSP) afforded in some cases even better resolution of the selected racemic binaphthyl and amino acid derivatives than commercial CSP. Modification of the fused-silica capillary walls for CE and OTCE applications led to a significant improvement in the separation ability for nucleotides and mixtures of amino acids comparing to untreated capillaries.

The results of this work have been published not only in highly impacted journals but they formed the core of many patents. Several patents are currently under preparation (e.g., a prototype of the electronic nose and tongue instrument).

The experience and the results in the field of supramolecular chemistry and specifically in the area of complexation of anions by metalloporphyrins, expanded porphyrins and calix(4)pyrrole macrocycles and the related applications for separation and sensing represent the most valuable outputs of our research.

The complexation of anions was followed by a number of spectral techniques, mainly by NMR, UV-VIS and fluorescence spectroscopy, moreover, it was also confirmed by X-Ray analysis.

The novel ligands applied as a recognition element, developed in the course of this work, were tested not only in solution but also on the interface. The macrocyclic receptors were covalently bond on silica and used as new stationary phases for HPLC. The novel receptors showed promising potential as active components of anion-selective electrodes.