

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Chemie
Studijní obor: Medicinální chemie



Ondřej Smolka

Syntéza fluoroforů s permanentními kladnými náboji pro konstrukci chemosenzorů na pevné fázi

Synthesis of fluorophores with permanent positive charges for construction of chemosensors on solid phase

Bakalářská práce

Vedoucí závěrečné práce/Školitel: doc. RNDr. Jindřich Jindřich, CSc.

Praha, 2018

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 18.5.2018

Podpis

Abstrakt

Bakalářská práce se týká syntézy fluoroforů na bázi 1,2,3-triazolů s dvěma permanentními pozitivními náboji. Zabývá se optimalizací syntézy těchto nabitých fluoroforů a jejich charakterizací. Dále se zaměřuje na zkoumání jejich optických vlastností a supramolekulárních interakcí s cyklodextrinem.

Klíčová slova: 1,2,3-triazoly, nabité fluorofory, kladné náboje, cyklodextriny, komplexace

Abstract

This bachelor work is focused on the synthesis of fluorophores with two positive charges based on 1,2,3-triazole motive. The work deals with optimization of their synthetic processes and characterization of the compounds. Optical properties of the double charged fluorophores and their complexation ability with β -cyclodextrin were studied.

Key words: 1,2,3-triazoles, charged fluorophores, positive charges, cyclodextrines, complexation

Obsah

Použité zkratky	6
1. Úvod	7
2. Cíle práce	8
3. Přehled problematiky	9
3.1. Fluorofory	9
3.2. 1,2,3-Triazoly	11
3.2.1. Syntéza	11
3.3. Cyklodextriny	13
3.4. Klik-reakce	16
3.5. Vazebná konstanta	16
3.5.1. Stanovení vazebné konstanty pomocí UV spektrometrie	17
4. Výsledky a diskuse	20
4.1. Koncept syntézy	20
4.2. Syntéza pozitivně nabitě kotvy	22
4.3. Syntéza hydrazonů	23
4.4. Syntéza fluoroforů	24
4.5. Syntéza nabitých fluoroforů	26
4.6. Měření absorpčních a fluorescenčních spekter	27
4.7. Měření vazebných konstant UV spektroskopii	29
4.7.1. Kalibrační závislosti absorbance na koncentraci u nabitých fluoroforů 8a-8d	29
4.7.2. Stanovení stechiometrie	32
5. Experimentální práce	34
5.1. Obecné postupy a chemikálie	34
5.2. Syntéza pozitivně nabitě kotvy	35
5.3. Obecný postup syntézy hydrazonů 6a-6d (OP1)	38
5.4. Syntéza hydrazonů	38
5.5. Obecný postup syntézy fluoroforů 7a-7d (OP2)	39
5.6. Syntéza fluoroforů	40
5.7. Obecný postup syntézy nabitých fluoroforů 8a-8d (OP3)	42
5.8. Syntéza nabitých fluoroforů	43
5.9. Kalibrační závislost absorbance na koncentraci nabitých fluoroforů 8a-8d	46
5.10. Stanovení stechiometrie supramolekulárního komplexu pomocí Job plot	46
6. Závěr	48

7. Poděkování	49
8. Literatura	50

Použité zkratky

AATEG – amino-azido-tetraethylglykolový linker

Ac – acetyl

CD – cyklodextrin

BODIPY – 4,4-difluor-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen

DCM – dichlormethan

DMSO – dimethylsulfoxid

Et – ethyl

ESI – ionizace elektrosprejem (Electrospray Ionization)

konc. HCl – koncentrovaná kyselina chlorovodíková (35%)

HRMS – hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením (High Resolution Mass Spectrometry)

t-Bu – *terc*-butyl

Tf – triflyl (acyl od kyseliny trifluormethansulfonové)

THF – tetrahydrofuran

TLC – chromatografie na tenké vrstvě (Thin Layer Chromatography)

TLC-2D – chromatografie na tenké vrstvě ve 2 směrech

Ts – tosyl

Me – methyl

MS – hmotnostní spektrometrie (Mass Spectrometry)

MeOH(Ar) – methanol probubláný argonem

RP silikagel – reversní silikagel (Reversed Phase)

UV – ultrafialové záření

1. Úvod

1,2,3-Triazoly jsou známé již více než 100 let a zájem o jejich přípravu se v posledních letech zvýšil.¹⁻⁶ Tyto látky jsou použitelné jako linkery v biologických systémech, protože odolávají metabolické degradaci a jsou schopné vodíkových a kovalentních vazeb s biomolekulami.⁷ Dále vykazují protinádorové⁸, antibakteriální⁹ a antivirové¹⁰ účinky. Jejich *N*(2)-deriváty vykazují fluorescenci v modré oblasti.¹¹

Cyklodextriny jsou syntetické sloučeniny získávané při enzymatické degradaci polysacharidu škrobu. Známé jsou již více jak 120 let, ale k výraznému nárůstu zájmu došlo v 80. letech 20. století. Od roku 1984 jsou produkovány ve vysoce čisté formě, čímž došlo k výraznému poklesu ceny a byl umožněn širší výzkum.¹² Nacházejí uplatnění v mnoha odvětvích průmyslu, například ve farmacii¹³, potravinářství¹⁴, chemii¹⁵, katalýze¹⁶, biotechnologii¹⁷ a kosmetice¹⁸.

Tato bakalářská práce se zabývá syntézou fluoroforů na bázi 1,2,3-triazolového motivu, které obsahují dva kladné náboje. Pozitivní náboj molekul umožňuje jejich rozpouštění ve vodě a také se díky němu mohou elektrostaticky vázat k záporně nabitému povrchu. Dále jsou studovány optické vlastnosti těchto nabitých látek a stanovení komplexační konstanty s β -cyklodextrinem. Nabité fluorofory by mohly najít uplatnění při konstrukci chemosenzorů na pevné fázi založených na změně fluorescence způsobené supramolekulárními interakcemi fluoroforu a analytu s cyklodextrinem.

2. Cíle práce

Cíle mé bakalářské práce jsou následující:

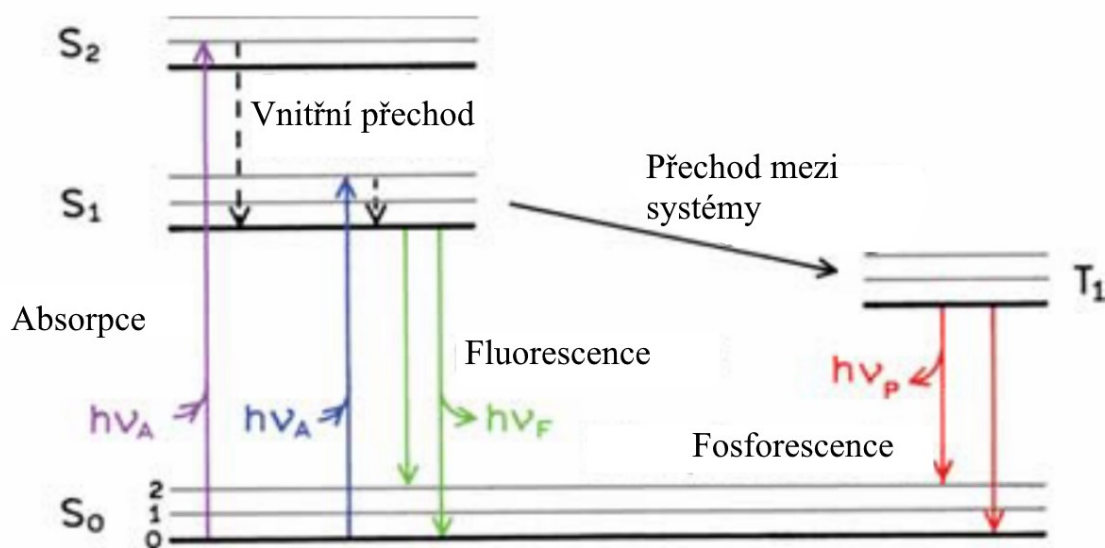
- I. Syntetizovat kotvu s pozitivním nábojem, která by umožnila navázání molekuly na pevný povrch nesoucí záporný náboj.
- II. Syntetizovat čtyři fluorofory založené na 1,2,3-triazolovém motivu lišící se substituentem (methoxy-, *terc*-butyl-, kyano- a chlor-) v *p*- poloze na benzenovém jádře.
- III. Propojit fluorofory s kladně nabitou kotvou.
- IV. Stanovení optických vlastností (UV, fluorescenční spektra) fluoroforů.
- V. Změřit vazebné konstanty nabitých fluoroforů s β -cyklodextrinem.

3. Přehled problematiky

3.1. Fluorofory

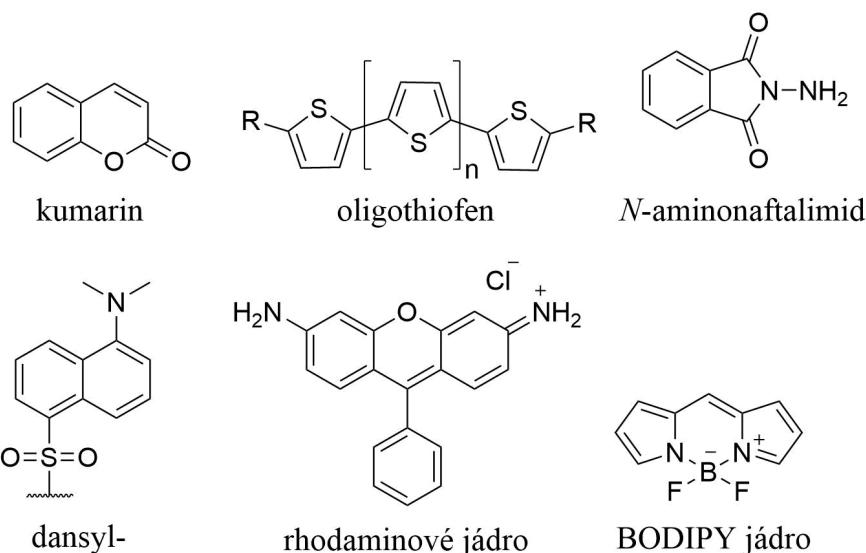
Fluorofory jsou látky schopné fluorescence. Fluorescence je děj, kdy molekula přijme energii záření a dostane se ze základního elektronového stavu S_0 (anglicky *singlet ground state*) do některé vibrační hladiny excitovaného elektronového stavu S_n (nejčastěji S_1 (anglicky *singlet first state*)). Elektron v S_n má opačný spin než elektron v hladině S_0 . Excitovaná molekula naráží do okolních molekul, v důsledku čehož přichází o energii (neradiativním způsobem) a její excitovaný elektron klesá po vibračních hladinách až na tu nejnižší excitační hladinu v S_1 . Okolní molekuly nemohou přijmout tak velké množství energie, aby mohlo dojít k navrácení excitovaného elektronu do S_0 . Dojde ke spontánnímu vyzáření energie (radiativním způsobem) ve formě světla a k návratu molekuly do S_0 . Fluorescenční záření má nižší energii (vyšší vlnovou délku) než záření absorbované. Tento rozdíl se nazývá Stokesův posuv.^{19,20}

Molekula, jejíž excitovaný elektron se nachází v S_1 , může projít tzv. přechodem mezi systémy (anglicky *intersystem crossing*), kdy se elektron z S_1 přesune to tripletového stavu T_1 (anglicky *triplet state*). Elektrony nacházející se v T_1 a S_0 mají stejný spin. Aby se elektron mohl dostat zpět do S_0 musí dojít k emisi záření, které se v tomto případě nazývá fosforescence a má nižší energii (vyšší vlnovou délku) než fluorescenční záření. Přechod mezi systémy nejčastěji probíhá v molekulách, které obsahují těžké atomy, jako jsou například brom a jod. Obrázek 1 zobrazuje Jablonského diagram, který ilustruje elektronové stavy (S_n , T_1) molekuly a přechody mezi nimi. Přechod, kdy elektron přijme nebo odevzdá energii radiativním způsobem je zobrazen barevně. Neradiativní přechody jsou zobrazeny černou plnou a přerušovanou šipkou^{19,20}



Obrázek 1: Zjednodušený Jablonského diagram. S_n a T_1 jsou jednotlivé elektronové stavy. Přechody elektronu při absorpci nebo emisi energie záření jsou zobrazeny barevně. Nezářivé přechody elektronu jsou zobrazeny černou plnou a přerušovanou šipkou.²⁰

Podle literatury²¹ je možné dělit fluorofory na základě rostoucí vlnové délky jejich emisního záření. První skupinou jsou látky, které emitují záření do 500 nm. Sem patří fluorofory s heterocykly obsahujícími kyslík (kumariny^{22,23}, benzofurany^{24,25}, naftofurany^{24,25}), síru (oligothiofeny^{26,27}), dusík (benzooxadizoly^{28,29}, 2H-1,2,3-triazoly^{11,30}, aminonaftalimidy^{31,32}). Dále také fluorofory založené na naftalenovém motivu (dansylové deriváty), u kterých se zkoumalo jejich využití pro značení aminokyselin, peptidů a proteinů.^{33,34} Druhou skupinou jsou fluorofory emitující nad 500 nm. Sem patří fluoresceiny (jsou běžně využívány pro značení v biologických aplikacích³⁵⁻³⁷), rhodaminy (jedny z nejstarších syntetických fluoroforů používaných pro barvení látek^{38,39}), BODIPY (používá se pro značení biomolekul³⁵), sqvariny (selektivní detekce biomolekul v blízké infračervené oblasti^{40,41}) a kyaniny (nelinární optické materiály⁴², značení biomolekul^{43,44}). Obrázek 2 zachycuje struktury některých zmíněných fluoroforů.

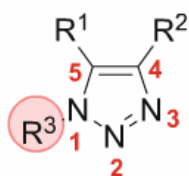


Obrázek 2: Struktury některých výše zmíněných fluoroforů

3.2. 1,2,3-Triazoly

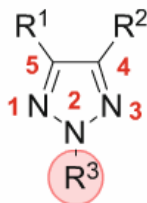
Nesymetricky substituované 1,2,3-triazoly lze rozdělit do tří skupin v závislosti na pozici substituentu na dusíkovém atomu (obrázek 3). Všechny tři dusíkové atomy mohou podléhat elektrofilní substituci.⁴⁵⁻⁴⁸

1*H*-1,2,3-Triazol



3.2.-1

2*H*-1,2,3-Triazol



3.2.-2

3(1)*H*-1,2,3-Triazol



3.2.-3

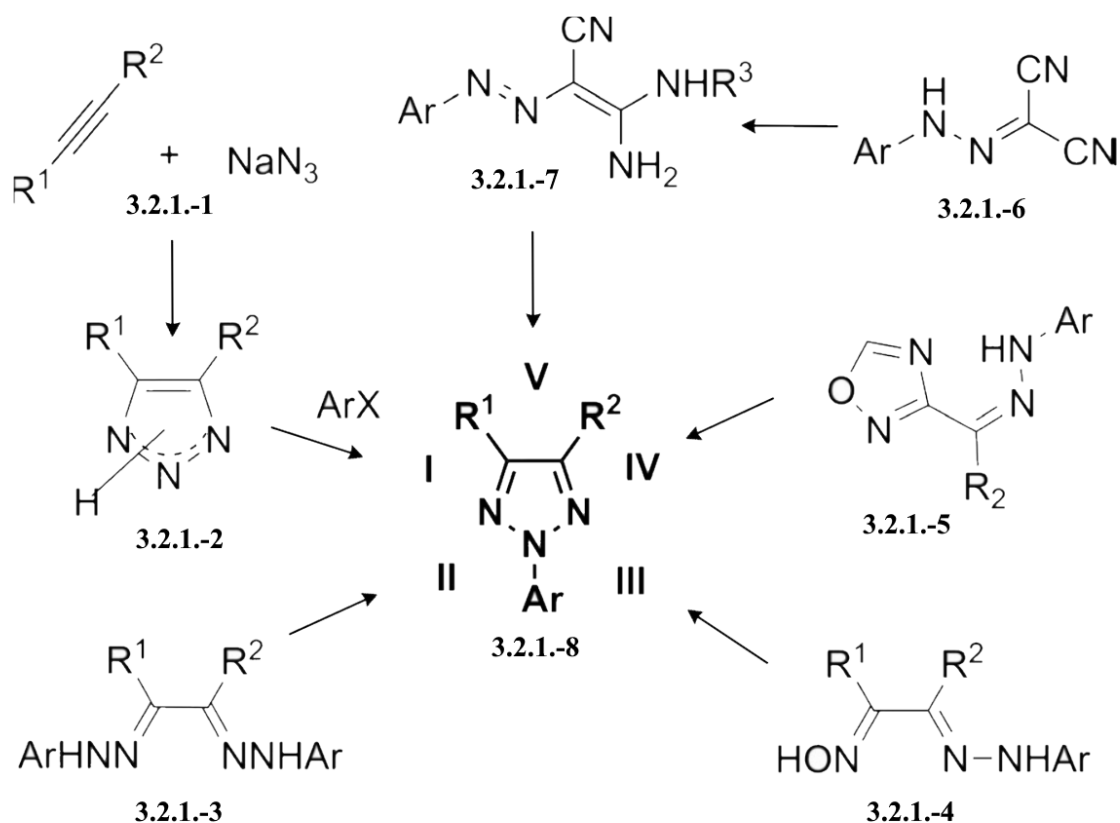
Obrázek 3: Rozdělení 1,2,3-triazolů podle pozice substituentu na dusíkovém atomu a jejich číslování²

N(1)-aryl-1,2,3-triazoly a *N*(2)-aryl-1,2,3-triazoly absorbují záření o vlnové délce 330 nm, ale pouze *N*(2)-deriváty vykazují silnou emisi fluorescenčního záření v UV modré oblasti s vysokou účinností v závislosti na rozpouštědlech.⁴⁹⁻⁵⁵ *N*(2)-deriváty jsou dále efektivními ligandy, které jsou schopné tvořit koordinované polymerní řetězce.⁵⁶

3.2.1. Syntéza

Nejběžnější a nejpoužívanější cesta k *N*(2)-derivátům vede přes Huisgenovu dipolární cykloadici azidu na alkyln s následnou arylací NH-triazolu **3.1.2.-2** (obrázek 4, cesta **I**). Tato metoda byla později vylepšena použitím Cu nebo Ru jako katalyzátorů.^{57,58} Hlavní omezení

této cesty spočívá v neselektivní arylaci, kdy vznikají *N*(1)- i *N*(2)-deriváty, jejichž rozdělení představuje výraznou komplikaci.²



Obrázek 4: Známé cesty pro syntézu 2-aryl-1,2,3-triazolů³⁰

Dále je možné připravit 2-aryl-1,2,3-triazoly pomocí kondenzace/oxidace α -bis-hydrazonů **3.2.1-3** (obrázek 4, cesta **II**).⁵⁹⁻⁶¹ Tato metoda je ovšem spojena s technickými problémy a to především s malou dostupností výchozích sloučenin, např. arylhydrazinů, čímž dochází k omezení použitelnosti této metody.³⁰

O něco příznivější je metoda, kdy se používají oxim nebo amidoxim arylhydrazony **3.2.1-4** (obrázek 4, cesta **III**). Zde ovšem dochází k nižším výtěžkům vlivem tvorby oxazolů nebo přesmykem produktu na odpovídající 1,2,4-triazol.⁶²⁻⁶⁴

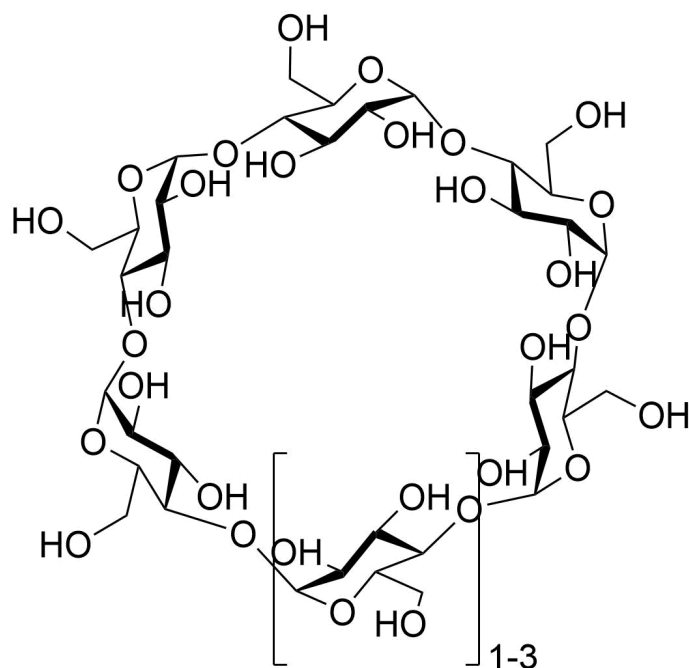
Tepelně, nebo bazicky indukovaný přesmyk arylhydrazonu nesoucího 1,2,4-oxadiazolový kruh **3.2.1-5** poskytuje 4-(acylamino)-2-aryl-2*H*-1,2,3-triazol **3.1.2-8** (obrázek 4, cesta **IV**). Výtěžky požadovaného triazolu závisí na struktuře výchozí látky a na reakčních podmínkách.⁶⁵⁻⁶⁹

Posledním způsobem je syntéza vycházející z arylhydrazonomalononitrilu **3.1.2-6**, který reakcí s příslušným aminem přechází na arylhydrazonokynoacetamidin v azo-tautomerní

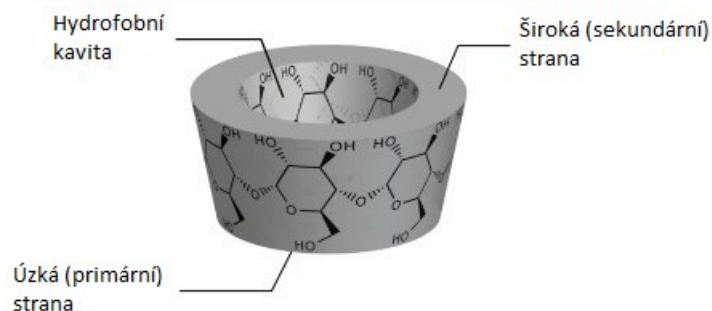
formě 2-(arylazo)ethen-1,1-diamin **3.1.2.-7**. Tento krok umožňuje použití rozmanitých funkčních skupin např. chlor-, fluor-, methoxy-, *tert*-butyl-, kyano-, primární a sekundární aminy. Také lze nahradit jednu kyano- skupinu z malononitrilu v arylhydrazonu **3.1.2.-6** např. skupinou ethoxykarbonyl- nebo 4-chlorbenzoyl-. Následuje oxidativní cyklizace látky **3.1.2.-7** na 2-aryl-2*H*-1,2,3-triazol **3.1.2.-8** (obrázek 4, cesta V). Při použití této metody vzniká jako hlavní produkt *N*(2)-substituovaný derivát.^{11,30,70}

3.3. Cyklodextriny

Cyklodextriny (CD) jsou cyklické oligosacharidy složené z *D*-glukopyranosových jednotek. Obrázek 5 zobrazuje strukturní vzorec molekuly CD a obrázek 6 zachycuje její prostorový tvar. Nejběžnější jsou α -, β - a γ -CD, které mají 6, 7 a 8 glukopyranosových jednotek. Tyto jednotky jsou pospojované α -(1 \rightarrow 4)-glykosidickými vazbami. Molekula cyklodextrinu má tvar komolého kužele, kdy se na širší straně kavity nacházejí sekundární OH skupiny a na užší straně kavity se nacházejí primární OH skupiny. Rozdíly mezi primárními a sekundárními OH skupinami umožňují selektivní derivatizaci široké a úzké strany kavity.⁷¹⁻⁷³



Obrázek 5: Struktura molekuly cyklodextrinu

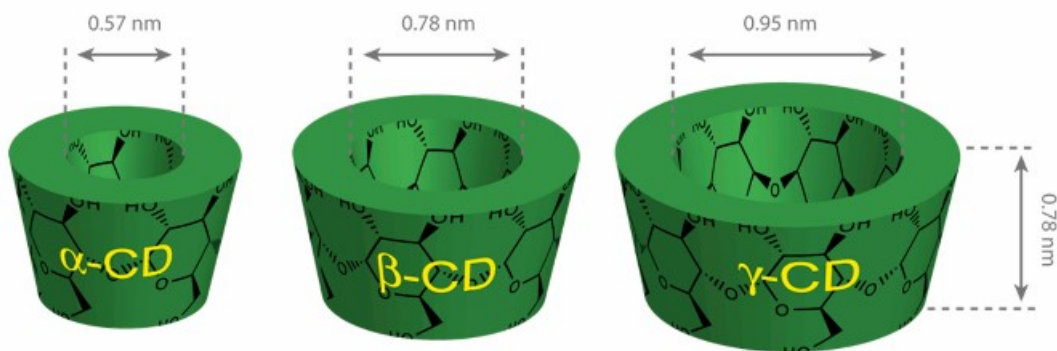


Obrázek 6: Kuželovitá struktura CD¹²

Důležitou vlastností cyklodextrinů je, že mají hydrofilní povrch a hydrofobní kavitu. Cyklodextriny mohou ve vodných roztocích vystupovat jako hostitelské molekuly (anglicky *host*) při tvorbě supramolekulárních komplexů typu hostitel-host (anglicky *host-guest*) právě díky své hydrofobní kavitě, do které mohou přijímat hydrofobní hosty (anglicky *guest*). Velikosti kavity, které se liší podle počtu glukopyranosových jednotek, shrnuje tabulka 1. Kavita α -CD je schopna pojmout benzenový kruh a kavita β -CD i molekulu naftalenu. γ -CD může přijmout do své kavity větší molekuly hostů jako fulleren (vmezeřený mezi 2 molekuly γ -CD; komplex typu hostitel:host 2:1 viz obrázek 8) nebo dvě aromatické molekuly.^{74,75} Grafické porovnání rozměrů α -, β - a γ -CD znázorňuje obrázek 7.

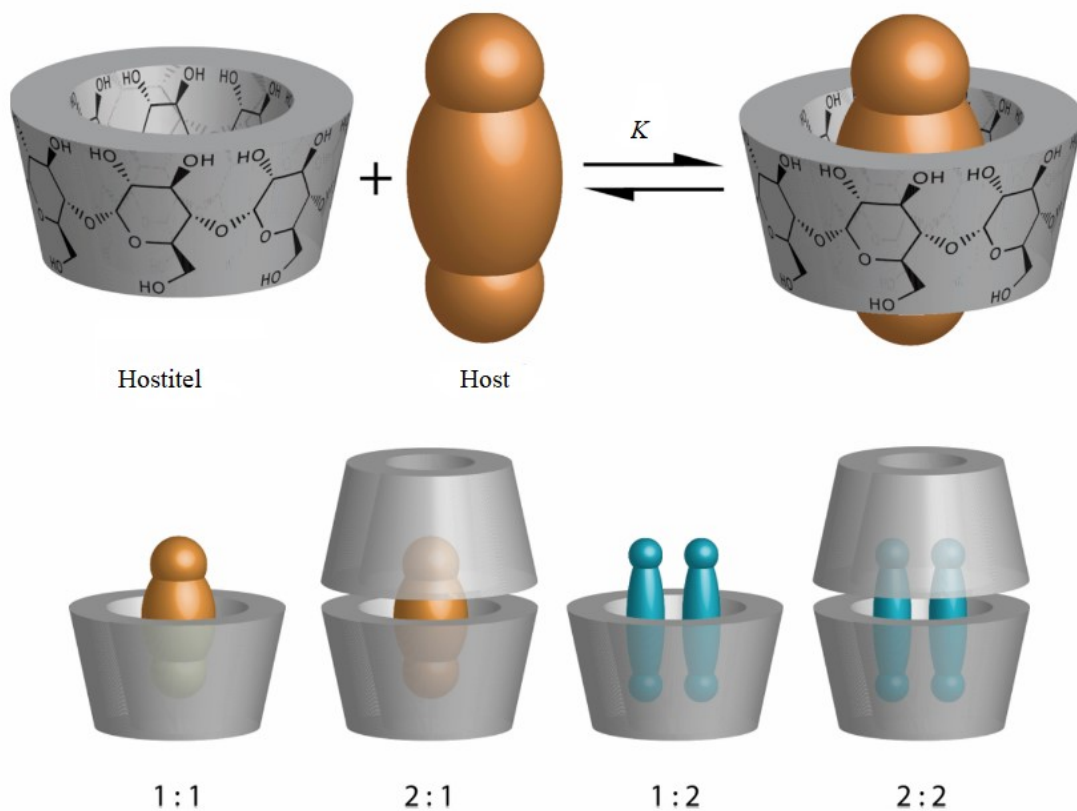
Tabulka 1: Fyzikální vlastnosti a rozměry běžných molekul CD^{12,76}

	α -CD	β -CD	γ -CD
Počet glukosových jednotek	6	7	8
Molekulová hmotnost [g.mol⁻¹]	972,86	1135,01	1297,15
Rozpustnost ve vodě při 25 °C [g.l⁻¹]	145	18,5	232
Šířka kavity [nm]	0,57	0,78	0,95
Výška molekuly [nm]	0,78	0,78	0,78



Obrázek 7: Grafické znázornění struktury základních CD včetně rozměru kavity a výšky molekuly¹²

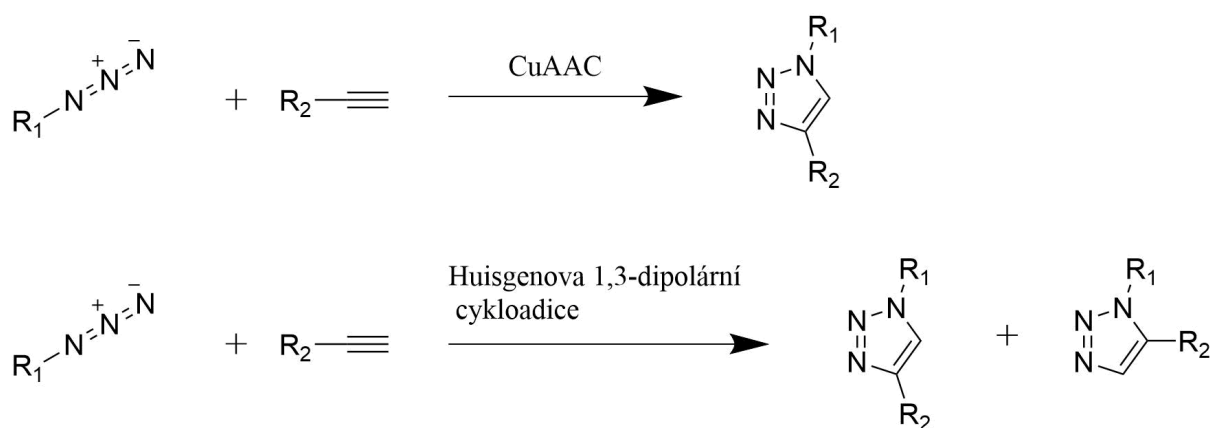
Při tvorbě supramolekulárních komplexů typu hostitel-host dochází k pozměnění chemických, fyzikálních a/nebo biologických vlastností molekuly hosta.¹² Molekula hosta je uvnitř vázána slabými nekovalentními interakcemi (van der Waalsovy síly, hydrofobní efekt, příp. vodíkové vazby), takže je vznik komplexu reverzibilní. Komplex host-hostitel je v dynamické rovnováze s molekulami hosta a hostitele (obrázek 8 nahoře). Typ komplexu, který vznikne při chycení hosta do kavity CD, se nazývá inkluzní komplex (obrázek 8 dole). Dochází-li k interakci CD s hostem mimo kavitu, pak se vzniklý komplex nazývá asociativní.⁷⁷



Obrázek 8: Tvorba supramolekulárních inkluzních komplexů. Nahoře – dynamická rovnováha disociovaných komponent a komplexu s asociační konstantou K . Dole – znázornění inkluzních komplexů při různých poměrech molekul hostitel:host¹²

3.4. Klik-reakce

V roce 2001 Kolb, Finn a Sharpless definovali koncept klik reakce. Jedná se o rychlou, snadnou a selektivní reakci dvou molekul, která poskytuje vysoké výtěžky, a tedy má málo nebo žádné vedlejší produkty.⁵⁸ Reakce nachází využití při například značení biomolekul nebo anorganických iontů *in vivo*.⁷⁸ Typickým zástupcem klik-reakcí je mědi katalyzovaná cykloadice azidu na alkyne (CuAAC), jejímž produktem jsou 1,2,3-triazoly.^{79–82} Reakce jsou založeny na Huisgenově dipolární cykloadici.⁵⁷ Rozdíl mezi Huisgenovou reakcí a CuAAC spočívá, kromě katalýzy, ve struktuře produktů. CuAAC poskytuje pouze 1,4-izomer jako produkt (obrázek 9 nahoře), kdežto druhá reakce poskytuje směs izomerů 1,4- a 1,5- (obrázek 9 dole), které se obtížně separují. Reakce bez katalýzy mědi probíhá pomalu a musí se zahřívat.^{83,84}



Obrázek 9: Mědi katalyzovaná cykloadice azidu na alkyne (CuAAC) a Huisgenova dipolární cykloadice

3.5. Vazebná konstanta

Termodynamická vazebná konstanta komplexu hostitel-host je speciálním druhem termodynamické rovnovážné konstanty K . Rovnovážná konstanta bývá vyjadřována pomocí koncentrací komponent a má tedy jednotku $\text{dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$. Vznik komplexu hostitel-host lze popsat rovnicí (1) se stechiometrickými koeficienty a a b , pro kterou platí rovnovážná konstanta K podle rovnice (2). Čím vyšší je hodnota K , tím vyšší je koncentrace komplexu hostitel-host $[C]$ oproti koncentracím samostatných komponent - hostitele $[H]$ a hosta $[G]$. Velmi vysoká hodnota K tedy říká, že komplex je velmi stabilní. Rovnice (3) udává počáteční (celkovou) koncentraci molekuly hostitele $[H]_0$ a rovnice (4) tedy udává počáteční (celkovou) koncentraci molekul hosta $[G]_0$.⁸⁵



$$K = \frac{[C]}{[H]^a \cdot [G]^b} \quad (2)$$

$$[H]_0 = [H] + a \cdot [C] \quad (3)$$

$$[G]_0 = [G] + b \cdot [C] \quad (4)$$

Pomocí rovnic (2)-(4) lze odvodit rovnici (5), ze které je možné vypočítat rovnovážnou konstantu.⁸⁵

$$K = \frac{[C]}{([H]_0 - a \cdot [C])^a \cdot ([G]_0 - b \cdot [C])^b} \quad (5)$$

Vznikem inkluzního komplexu dochází ke změnám spektrálních vlastností, rozpustnosti a reaktivity molekul hostitele i hosta. Především díky změně spektrálních vlastností lze pomocí UV spektrometrie stanovit hodnotu vazebné konstanty K .⁸⁵

3.5.1. Stanovení vazebné konstanty pomocí UV spektrometrie

Aktivitní koeficienty složek obvykle bývají neznámé, a proto se v rámci zjednodušení zanedbávají a pro stanovení K se využívá pouze rovnovážných koncentrací jednotlivých komponent. Pro určení vazebné konstanty je potřeba provést následující kroky⁸⁵:

- určení stechiometrických koeficientu a a b molekul hosta a hostitele (Job plot)
- změření UV spekter pro sérii vzorků s vhodně zvolenými počátečními koncentracemi hostitele a hosta
- zpracování dat

3.5.1.1. Určení stechiometrie (Job plot)

Pro stanovení stechiometrie je potřeba, aby byl součet $[H]_0$ a $[G]_0$ držen konstantní během měření. Proveďte sérii měření absorbance vzorků, kdy se mění molární zlomek hosta x_G od 0 do 1. Naměřená absorbance A_{obs} se skládá z absorbance hostitele A_H , absorbance hosta A_G a absorbance komplexu hostitel-host A_C podle rovnice (6) s příslušnými molárními absorpčními koeficienty ε_H , ε_G a ε_C (rovnice (7)-(9)).⁸⁵

$$A_{\text{obs}} = A_H + A_G + A_C \quad (6)$$

$$A_H = \varepsilon_H \cdot [H] = \varepsilon_H \cdot ([H]_0 - a \cdot [C]) \quad (7)$$

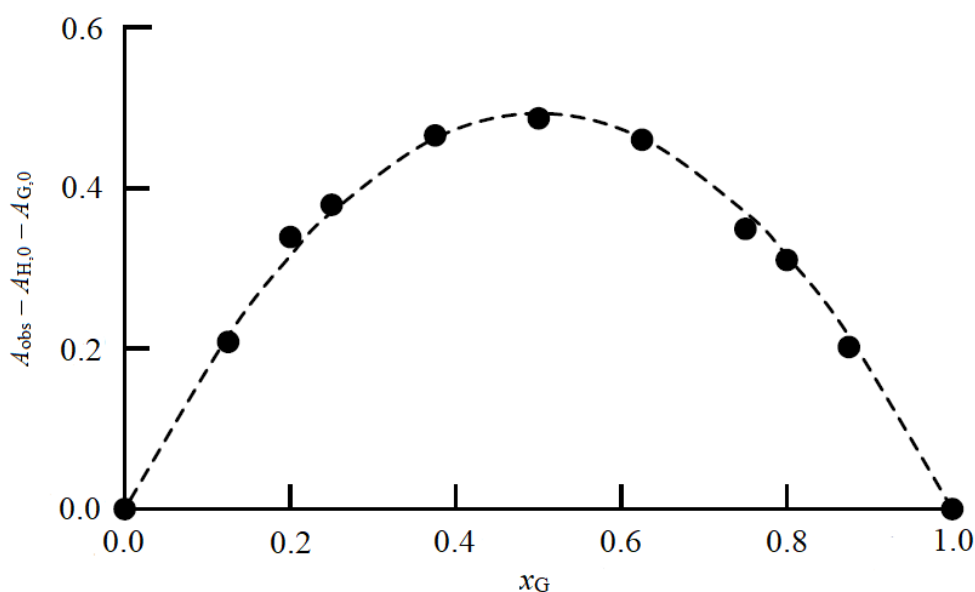
$$A_G = \varepsilon_G \cdot [G] = \varepsilon_G \cdot ([G]_0 - b \cdot [C]) \quad (8)$$

$$A_C = \varepsilon_C \cdot [C] \quad (9)$$

Použitím rovnic (6)-(9) získáme rovnici (10), ze které vyplývá, že hodnotu $[C]$ na ose y v grafu Job plot můžeme nahradit $A_{\text{obs}} - \varepsilon_{\text{H}} \cdot [\text{H}]_0 - \varepsilon_{\text{G}} \cdot [\text{G}]_0$, protože $(\varepsilon_{\text{C}} - a \cdot \varepsilon_{\text{H}} - b \cdot \varepsilon_{\text{G}})$ je konstantní. Tato substituce je nutná, protože obvykle nelze přímo stanovit koncentraci supramolekulárního komplexu $[C]$.⁸⁵

$$A_{\text{obs}} - \varepsilon_{\text{H}} \cdot [\text{H}]_0 - \varepsilon_{\text{G}} \cdot [\text{G}]_0 = (\varepsilon_{\text{C}} - a \cdot \varepsilon_{\text{H}} - b \cdot \varepsilon_{\text{G}}) \cdot [C] \quad (10)$$

Vynese-li se do grafu závislost $A_{\text{obs}} - A_{\text{H}} - A_{\text{G}}$ na molárním zlomku x_{G} získáme tak modifikovaný Job plot (graf 1). Nachází-li se maximum křivky v grafu u hodnoty $x_{\text{G}} = 0.5$, pak dochází ke vzniku komplexu hostitel:host v poměru 1:1.⁸⁵



Graf 1: Modifikovaný Job's plot. Čárkovaně jsou hodnoty vypočtené a černé body hodnoty naměřené.⁸⁶

Další možností je nahrazení $[C]$ rozdílem absorpčních ΔA , který se vypočítá jako rozdíl absorpance naměřené A_{obs} mínus absorpance vypočtené A_{calc} , Vypočtená absorpance A_{calc} se získá podle rovnice (11). $A_{\text{H},0}$ a $A_{\text{G},0}$ jsou absorpance čistého hosta a hostitele.⁸⁵

$$A_{\text{calc}} = A_{\text{H},0} \cdot (1 - x_{\text{G}}) + A_{\text{G},0} \cdot x_{\text{G}} \quad (11)$$

Stanovení stechiometrie UV spektrometrií pomocí Job plot se nedá použít, pokud dochází ke vzniku více komplexů v roztoku (například tvorba agregátů hosta nebo hostitele).^{87,88} Dále se tato metoda nedá použít, pokud dochází pouze k malým změnám UV absorpčních spekter při tvorbě supramolekulárního komplexu.⁸⁷

3.5.1.2. Stanovení vazebné konstanty

Proměřením absorpance série vzorků s konstantní celkovou koncentrací molekul hosta $[G]_0$ a s rostoucí celkovou koncentrací molekul hostitele $[H]_0$ lze získat konstantu komplexace (rovnice (12)). A je absorpance roztoku, který obsahuje komplex hostitel-host. A_0 je absorpance roztoku čistého hosta a A_C je absorpance roztoku plně komplexovaného hosta, tedy roztoku s největším nadbytkem hostitele. Linearizací rovnice (12) získáme rovnici (13). Grafickým znázorněním závislosti A na $\frac{A-A_0}{[H]}$ je v ideálním případě přímka se směrnici $-\frac{1}{K}$. Jedná se o metodu Benesi-Hildebrand⁸⁹. Úskalí této metody spočívá v použití aproximací. Lze použít pouze experimentální hodnoty, pro které platí podmínka $[H]_0 \gg [G]_0$. Je-li tato podmínka splněna, lze nahradit koncentraci volného hostitele $[H]$ celkovou koncentrací hostitele $[H]_0$.⁸⁷ Lineární transformace porušuje některé základní předpoklady lineární regrese a zkresluje tak experimentální chybu.⁹⁰

$$K = \frac{(A - A_0)}{(A_C - A) \cdot [H]} \quad (12)$$

$$A = A_C - \frac{1}{K} \cdot \frac{A - A_0}{[H]} \quad (13)$$

4. Výsledky a diskuse

4.1. Koncept syntézy

Cílem této bakalářské práce byla syntéza fluoroforů s permanentními kladnými náboji. Výsledné sloučeniny se skládají ze 2 částí, kterými jsou nabitá kotva a fluorofory s 2*H*-1,2,3-triazolovým motivem.

Výchozí látkou pro syntézu nabité kotvy je triol s neopentanovým skeletem. Prvním krokem je zavedení acetonu jako chránicí skupiny pro dvě sousední OH skupiny za vzniku ketalu **1** (schéma 1). Ochránění dvou sousedních OH skupin umožňuje selektivní propargylaci zbylé OH skupiny za vzniku propargylovaného ketalu **2**. Dalším krokem je odstranění ketalové chránicí skupiny přidáním koncentrované HCl za vzniku diolu **3**. Následuje esterifikace anhydridem kyseliny trifluormethansulfonové, čímž je získán triflát **4**. Posledním krokem přípravy nabité kotvy je reakce bistriflátu **4** s pyridinem za vzniku bispyridiniové sloučeniny **5**.

Výchozí látky pro syntézu fluoroforů jsou deriváty anilinu s methoxy, *tert*-butyl (*t*-Bu-), chlor a kyano substituenty v *para*-poloze. V prvním kroku syntézy reagují výchozí aminy s koncentrovanou HCl za vzniku amoniové soli, která je ihned podrobena diazotaci pomocí NaNO₂ za vzniku diazoniové soli. Diazoniová sůl následně reaguje s malononitrilem za vzniku hydrazonů **6a-6d** (schéma 1). Hydrazony jsou použity v dalším kroku při reakci s amino-azido-tetraethylenglykolovým linkerem (AATEG) za vzniku fluoroforů s 2*H*-1,2,3-triazolovým motivem **7a-7d**.

Posledním krokem syntézy je reakce nabité kotvy **5** s fluorofory **7a-7d**. Reakce probíhá s katalyzátorem CuI a poskytuje nabité fluorofory **8a-8d** (schéma 1).

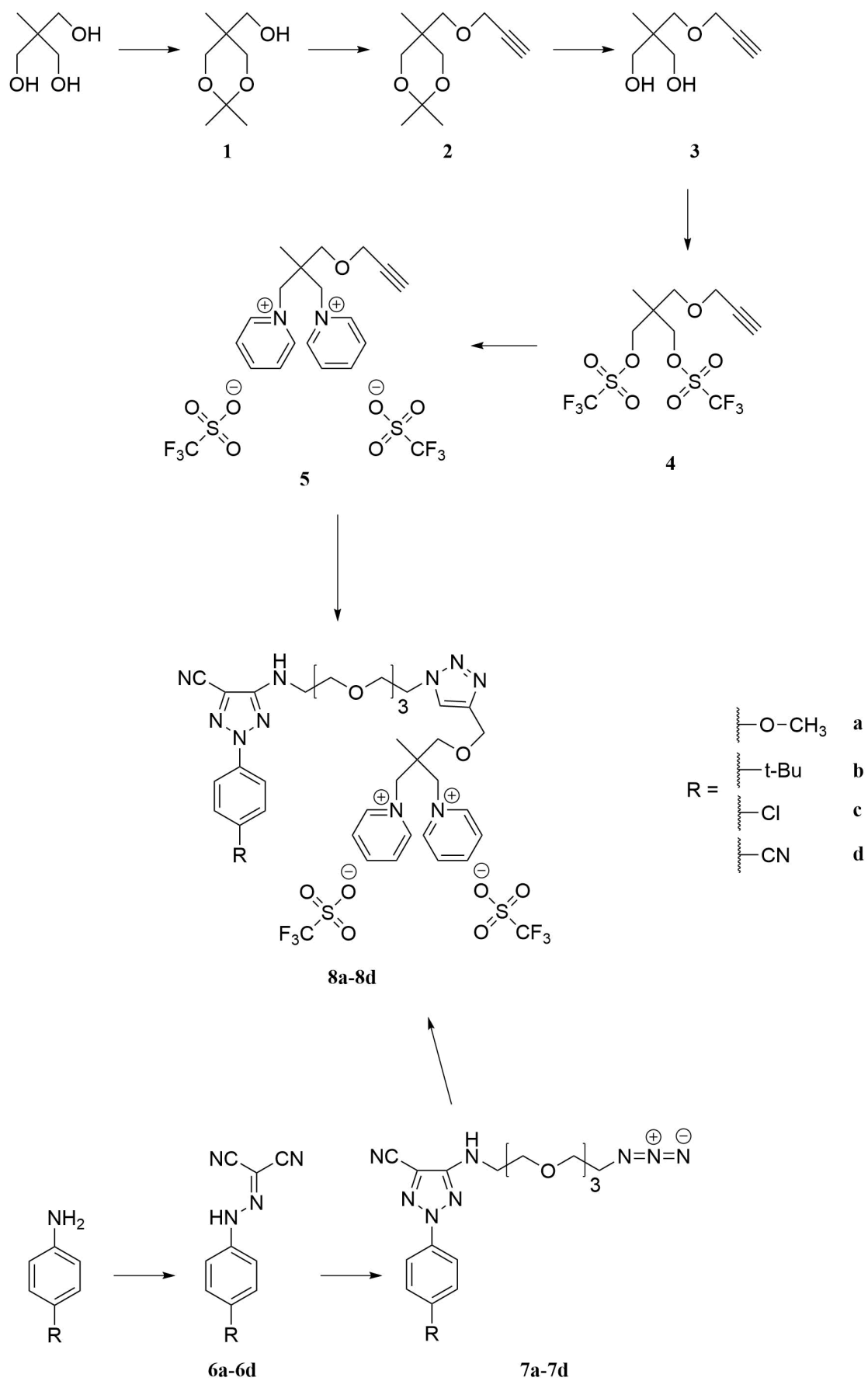


Schéma 1: Koncept syntézy

4.2. Syntéza pozitivně nabité kotvy

Syntézu nabité kotvy optimalizoval Mgr. Petr Kasal ze skupiny školitele. Mým úkolem bylo jím vypracovaný postup zreprodukovat.

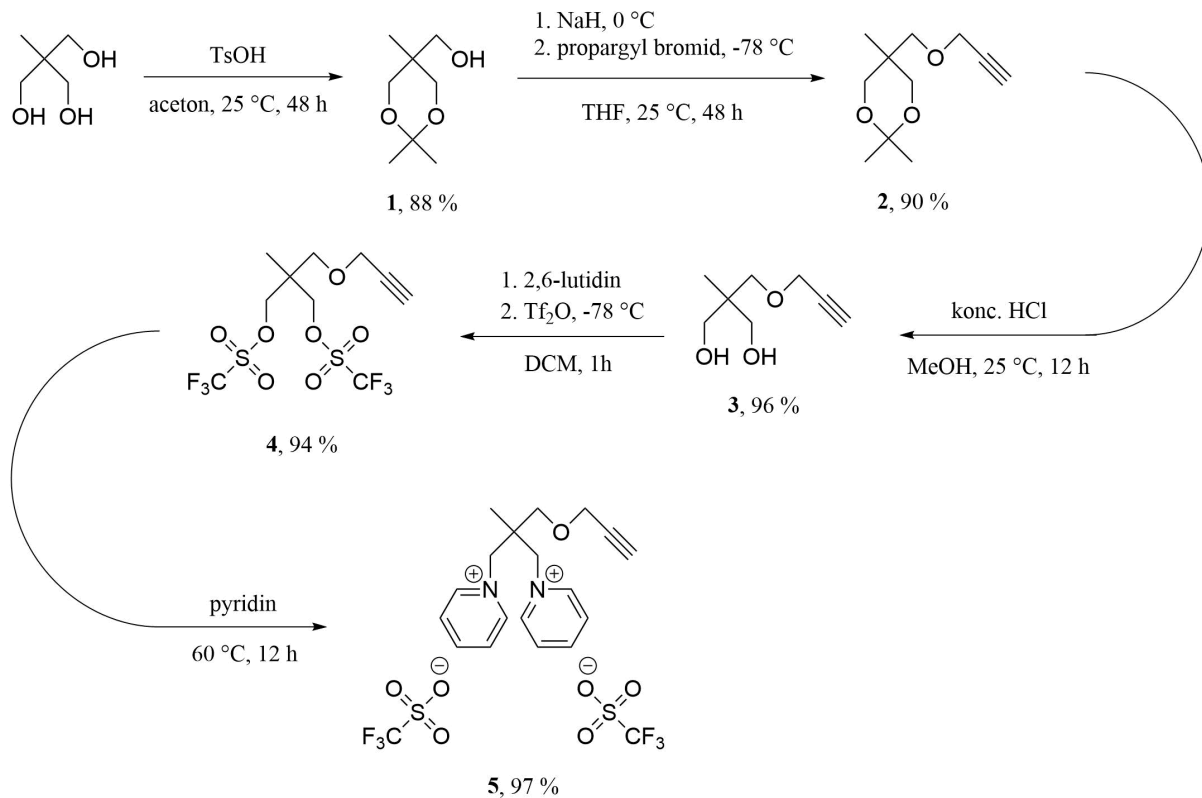


Schéma 2: Jednotlivé kroky syntézy nabité kotvy 5

Látka 1 byla připravena podle literatury⁹¹ (schéma 2). Protože jde o tvorbu ketalu, která je katalyzována kyselé, bylo použito katalytické množství *p*-toluensulfonové kyseliny (TsOH). Jak bylo zmíněno v odstavci 4.1, zavedení isopropylidenová chránící skupiny je důležité kvůli dalšímu kroku, kterým je propargylace. Pokud by nebyla použita isopropylidenová chránící skupina, došlo by k navázání propargylové skupiny na více OH skupin a výtěžek reakce by byl podstatně nižší.

Látky 2 a 3 byly připraveny podle literatury⁹² (schéma 2). Díky použití isopropylidenové chránící skupiny došlo k selektivnímu navázání propargylové skupiny na volnou OH skupinu. V literatuře používali k odstranění chránící skupiny DOWEX 50W (silný katex) místo koncentrované HCl. Kyselina byla použita proto, že se nedařilo dosáhnout úplné konverze za použití silného katexu.

Látka **4** byla připravena podle literatury⁹³ (schéma 2). Oproti literatuře byl použit 2,6-lutidin místo triethylaminu. Triethylamin reagoval se vznikajícím triflátem za tvorby kvartérní amoniové soli, jako je látka **5** (s triethylaminem místo pyridinu).

Látka **5** byla připravena podle postupu Mgr. Petra Kasala (schéma 2). Pyridin použitý pro substituci triflátů vystupoval zároveň jako rozpouštědlo. Ve vzniklé bispyridiniové soli byly jako protiionty odstupující triflátové skupiny.

4.3. Syntéza hydrazonů

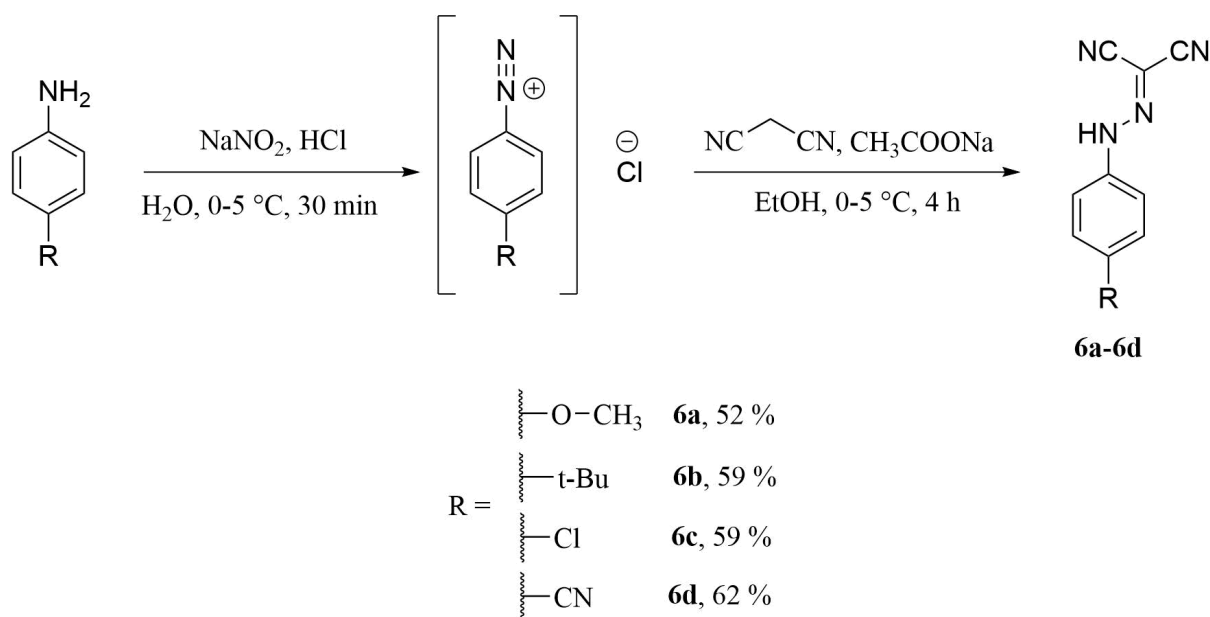


Schéma 3: Syntéza hydrazonů

Hydrazony **6a-6d** byly připraveny podle literatury⁹⁴ (schéma 3). Látky **6a,6c** a **6d** jsou pospány a látka **6b** byla nově připravená.

Nižší výtěžky hydrazonů mohou být způsobeny nízkou stabilitou meziprojektu (diazoniové soli). Diazoniová sůl se musí přidávat pomalu k roztoku malononitrilu, aby nedocházelo k přílišnému zahřívání směsi. Octan sodný pufruje nadbytek HCl. Dále za nižší výtěžky může proces čištění – krystalizace. Při opakované krystalizaci matečného louhu docházelo k rozkladu látek **6a-6d**. Bylo vyzkoušeno i čištění hydrazonů na koloně, ale zde také docházelo k rozkladu. Tento jev může být způsoben kyselou povahou silikagelu, protože hydrazony jsou poměrně citlivé na kyselé prostředí.⁹⁵

4.4. Syntéza fluoroforů

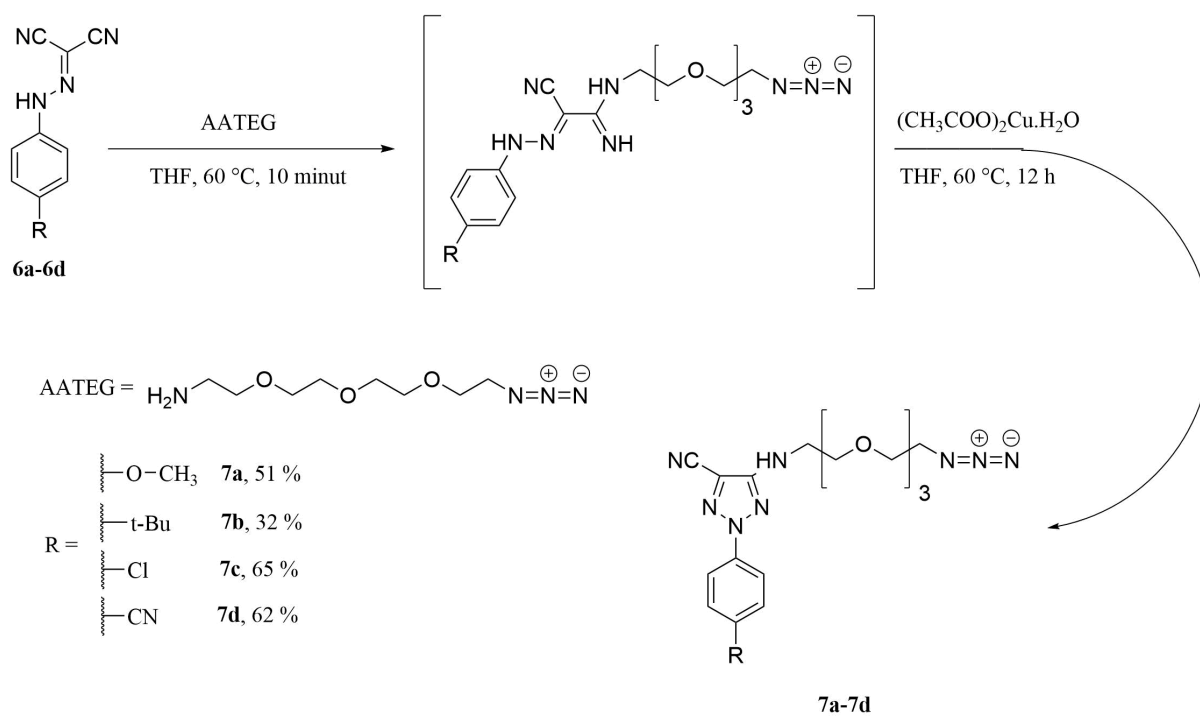
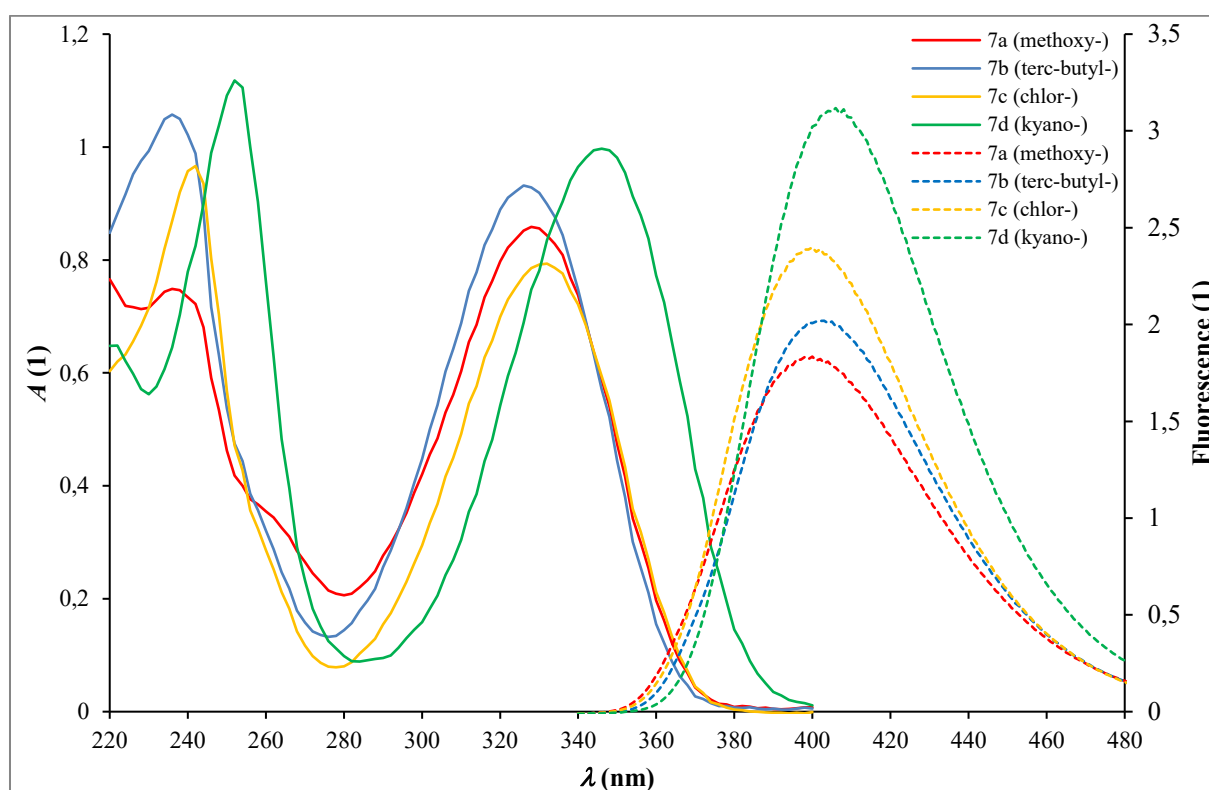


Schéma 4: Syntéza fluoroforů **7a-7d**

Látky **7a-7d** byly připraveny analogicky jako v literatuře³⁰ (schéma 4), jedná se ale o nové látky. AATEG byl připraven podle literatury⁹⁶⁻⁹⁸ ve skupině školitele Mgr. Petrem Kasalem. Na základě reakčního mechanismu z literatury² byl navržen mechanismus vzniku fluoroforů s 2H-1,2,3-triazolovým motivem (schéma 5). Nutno podotknout, že v literatuře se též jedná pouze o návrh mechanismu.

4.6. Měření absorpčních a fluorescenčních spekter

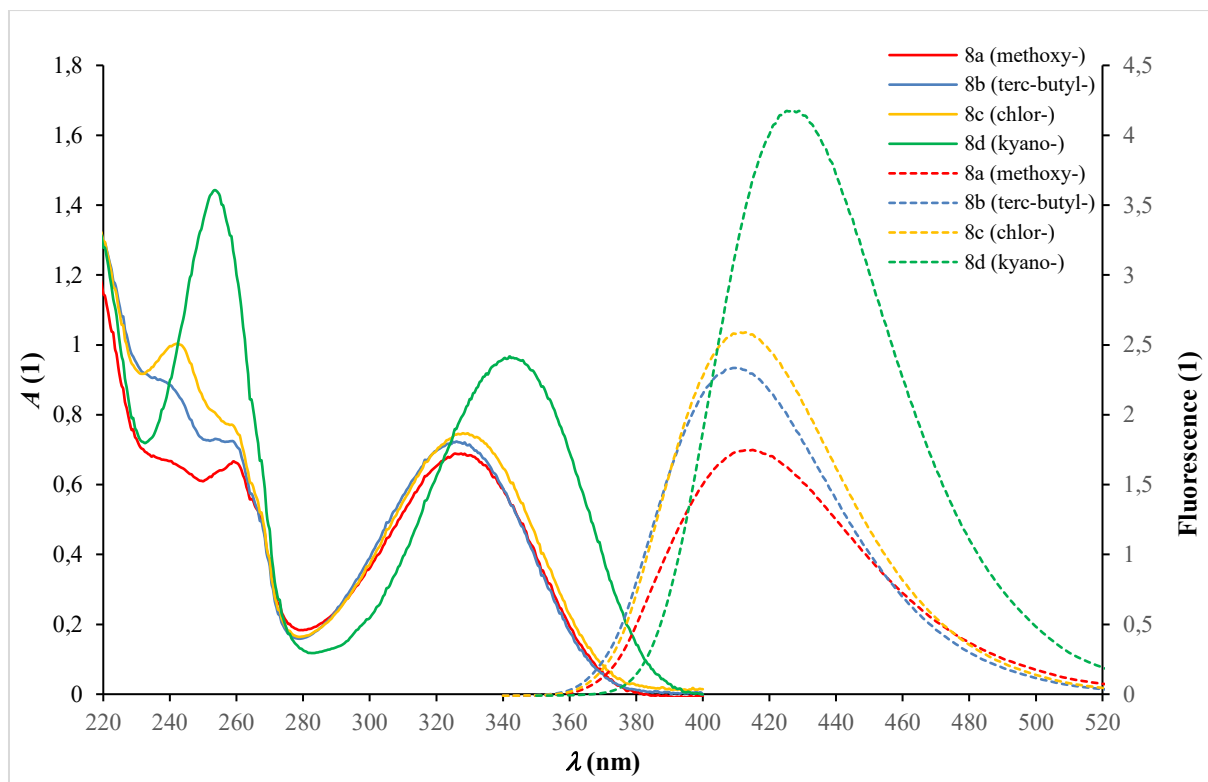
Měření absorpčních a fluorescenčních spekter fluoroforů **7a-7d** bylo prováděno v methanolu při koncentraci 5×10^{-5} M (graf 2). S rostoucí polaritou substituentu na benzenovém jádře v *para*- poloze dochází k posouvání maxima (kolem hodnoty 330 nm) směrem do viditelné oblasti. Největší posun je u kyano-derivátu (látka **7d**), což bude způsobeno konjugací trojné vazby nitrilové skupiny s benzenovým jádrem. Fluorescenční spektra byla měřena při excitační vlnové délce odpovídající $\lambda_{\max 2}$ (tabulka 2). Kyano-derivát **7d** vykazoval výrazně vyšší fluorescenci (skoro dvojnásobek oproti methoxy-derivátu **7a**), i když rozdíl v absorpenci nebyl až tak vysoký (cca 0,2).



Graf 2: UV absorpční (plná čára) a fluorescenční (přerušovaná čára) spektra látek **7a-7d**. Měřeno v methanolu při koncentraci 5×10^{-5} M. Pro měření fluorescence byla použita maxima odpovídající $\lambda_{\max 2}$ (Tabulka 2) a napětí na detektoru bylo nastaveno na 420 V.

Absorpční a fluorescenční spektra látek **8a-8d** byla měřena v deionizované vodě při koncentraci 5×10^{-5} M (graf 3). Zde se absorpční spektra příliš neliší, až na derivát s nitrilovou skupinou **8d**. Látka **8d** má výrazná absorpční maxima při 254 nm a 341 nm. Oproti ostatním látkám (maximum kolem 326 nm) dochází k výraznému posunutí absorpčního maxima do viditelné oblasti a také k výrazně vyšší absorpci. Fluorescenční spektra byla měřena při

excitační vlnové délce odpovídající $\lambda_{\max 2}$ (tabulka 2). Díky vyšší absorpci záření má látka **8d** také mnohem vyšší intenzitu fluorescence.



Graf 3: UV absorpční (plná čára) a fluorescenční (přerušovaná čára) spektra látek 8a-8d. Měřeno v deionizované vodě při koncentraci 5×10^{-5} M. Pro měření fluorescence byla použita maxima odpovídající $\lambda_{\max 2}$ (Tabulka 2) a napětí na detektoru bylo nastaveno na 520 V.

Za použití dat získaných při měření UV absorpčních a fluorescenčních spekter byla vytvořena tabulka 2 s optickými vlastnostmi látek **7a-7d** a **8a-8d**.

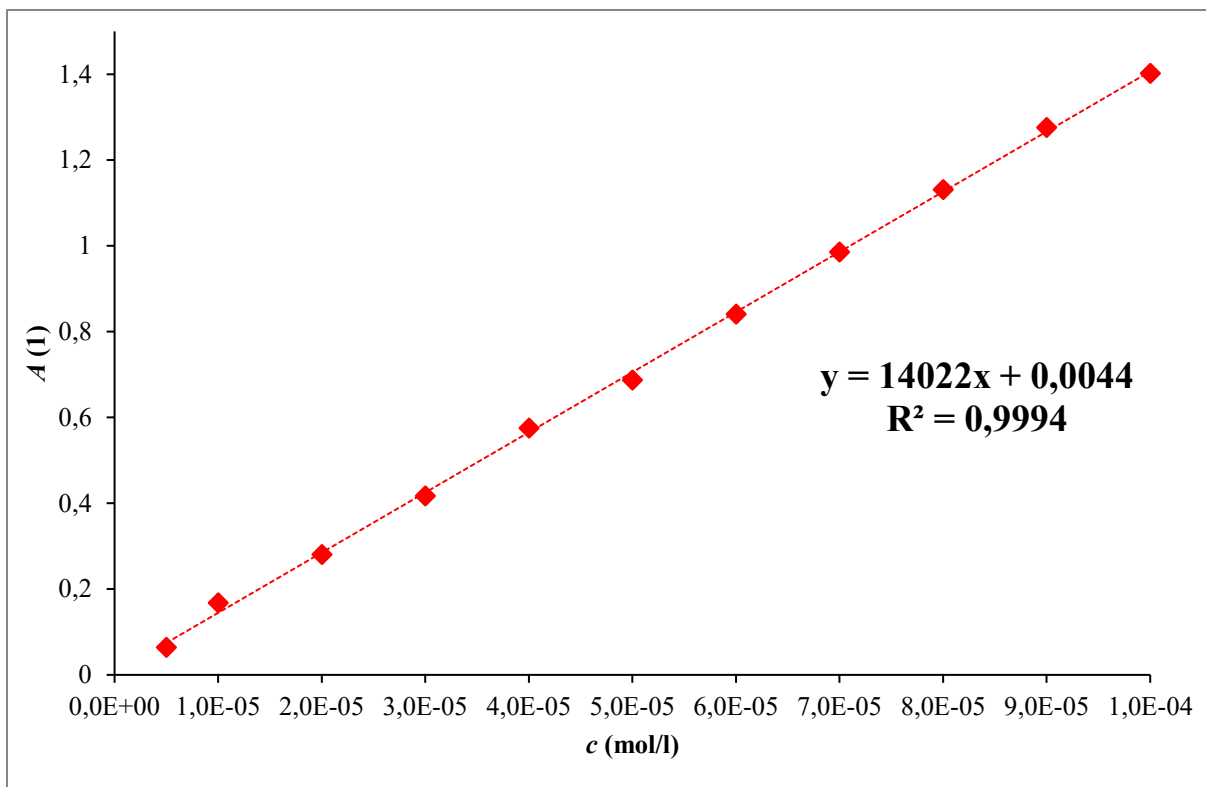
Tabulka 2: Optické vlastnosti látek 7a-7d a 8a-8d.

Derivát	Látka	$\lambda_{\max 1}$ (nm)	$\lambda_{\max 2}$ (nm)	λ_{em} (nm)	Stokesův posun (nm)	$\epsilon_{\lambda_{\max 2}}$ (L \times mol $^{-1}\times$ cm $^{-1}$)
methoxy-	7a	238	328	400	72	-
	8a	260	326	415	89	14025 \pm 168 ($s_r = 1,6\%$)
terc-butyl-	7b	238	325	403	78	-
	8b	-	326	411	85	14544 \pm 171 ($s_r = 1,7\%$)
chlor-	7c	242	332	400	68	-
	8c	242	327	411	84	14576 \pm 201 ($s_r = 1,9\%$)
kyano-	7d	252	346	406	60	-
	8d	254	341	427	86	19190 \pm 144 ($s_r = 1,0\%$)

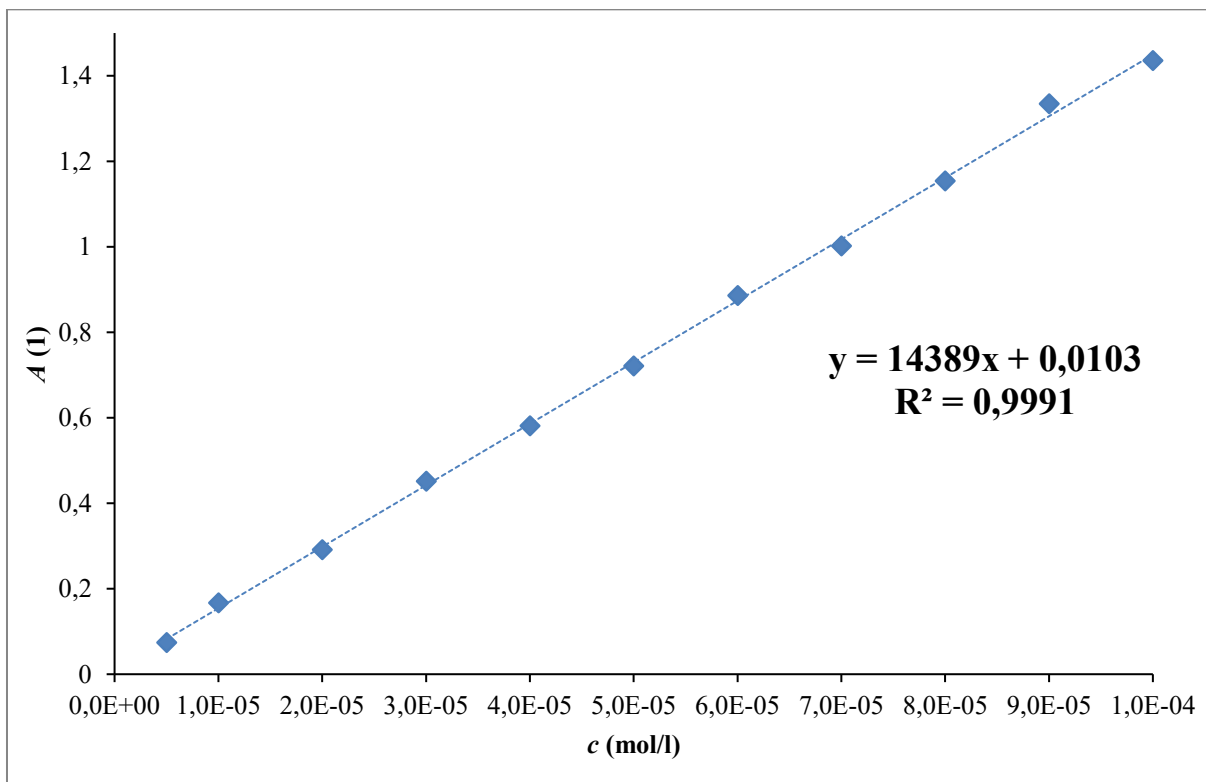
4.7. Měření vazebných konstant UV spektroskopii

4.7.1. Kalibrační závislosti absorbance na koncentraci u nabitých fluoroforů 8a-8d

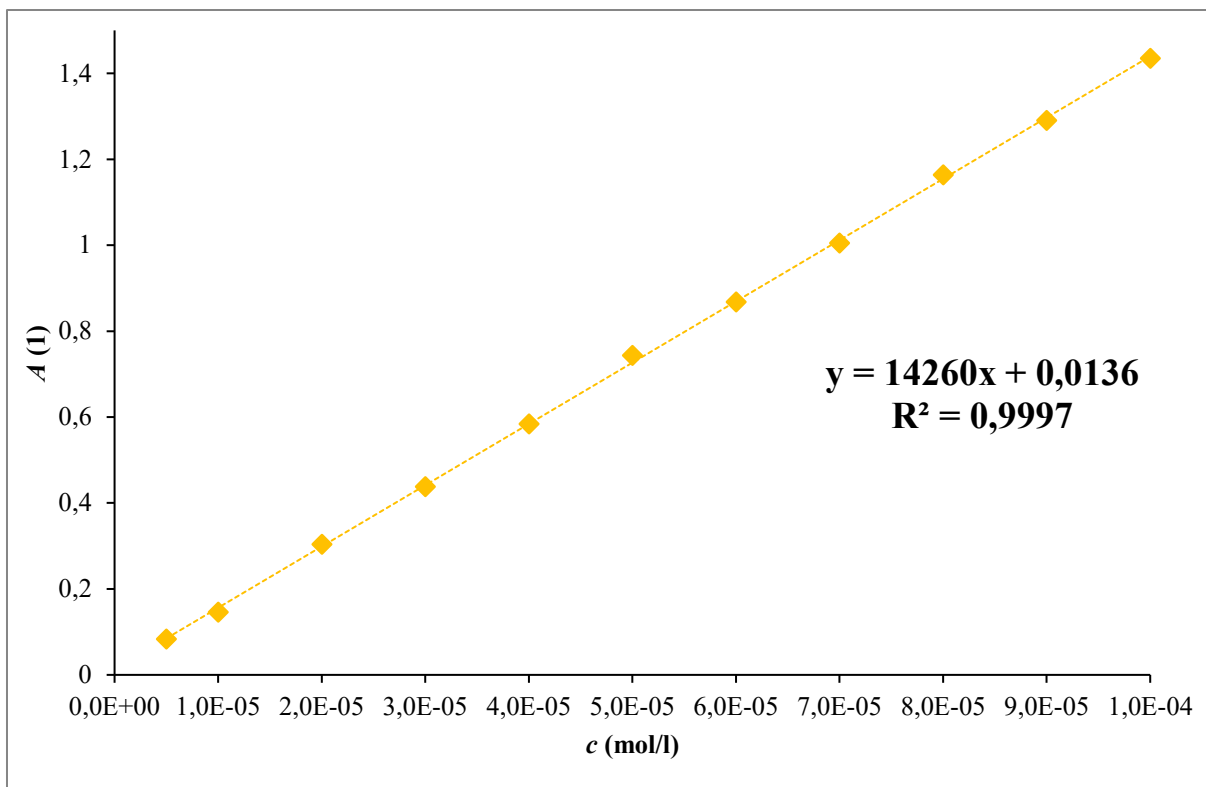
Byla změřena závislost A na c pro látky **8a-8d**. Měření se provádělo kvůli stanovení oblasti linearity, aby bylo možné vybrat vhodnou koncentraci pro další měření. Ze získaných dat byly vypočítány molární absorpční koeficienty ϵ (tabulka 2). Graf 4-7 Graf 7 zobrazují kalibrační závislosti látek **8a-8d**.



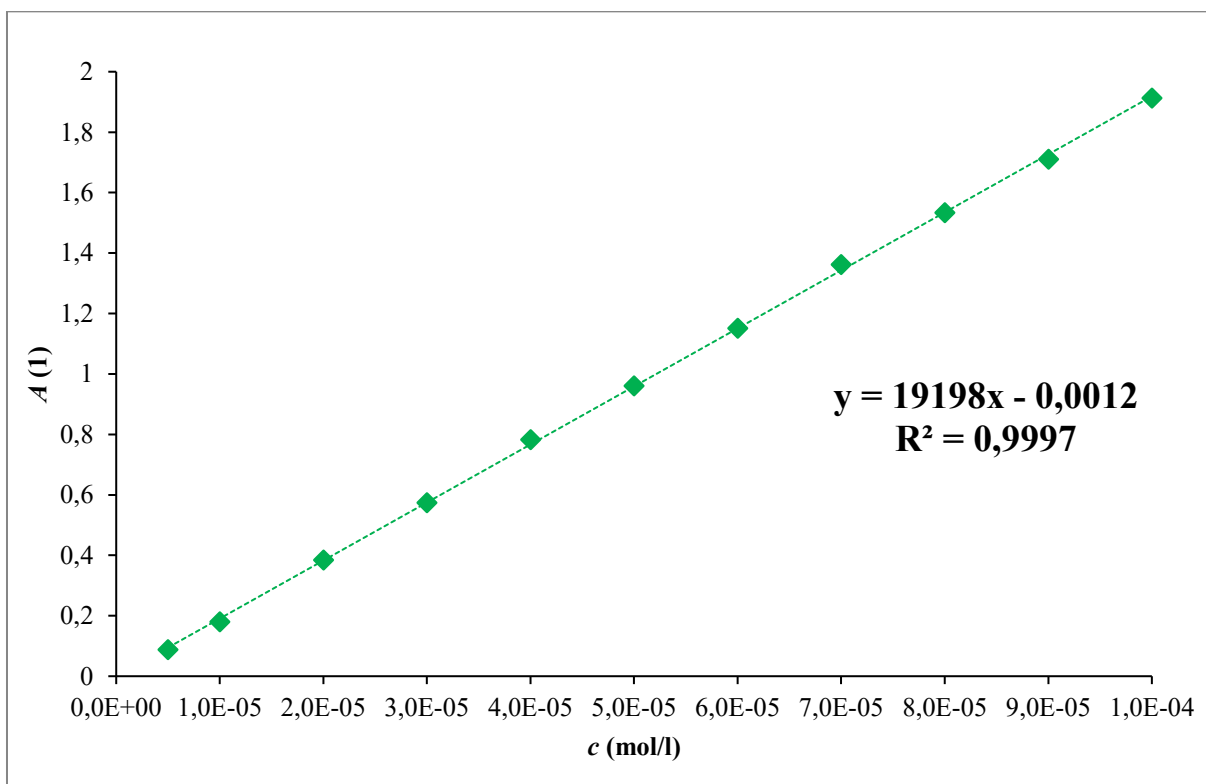
Graf 4: Kalibrační závislost látky 8a měřená v deionizované vodě.



Graf 5: Kalibrační závislost látky 8b měřená v deionizované vodě.



Graf 6: Kalibrační závislost látky 8c měřená v deionizované vodě.



Graf 7: Kalibrační závislost látky 8d měřená v deionizované vodě.

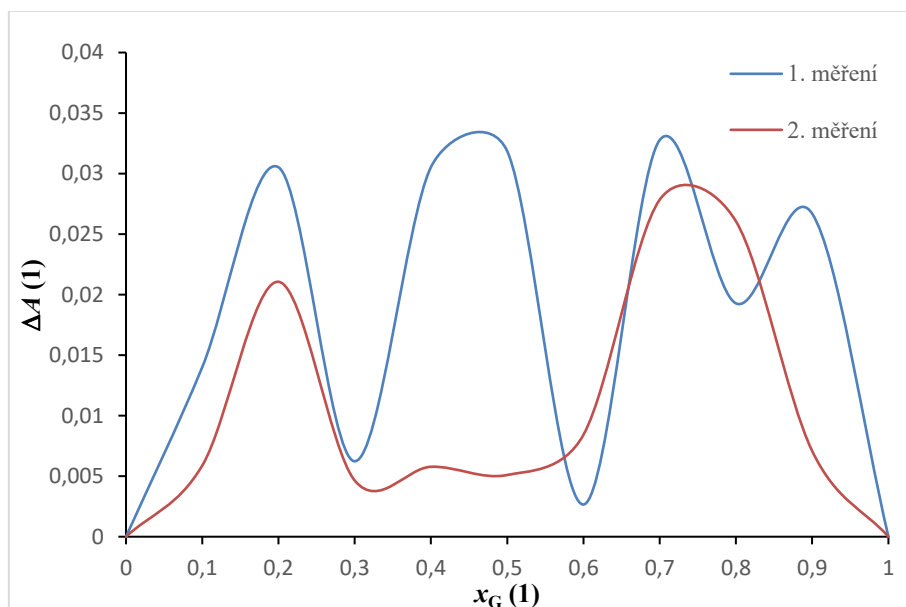
Tabulka 3 shrnuje koncentrace, které byly vybrány pro další měření.

Tabulka 3: Vybrané molární koncentrace látek 8a-8d použité pro další měření.

Látka	c [mol/l]
8a	$6,00 \times 10^{-5}$
8b	$5,00 \times 10^{-5}$
8c	$6,00 \times 10^{-5}$
8d	$4,00 \times 10^{-5}$

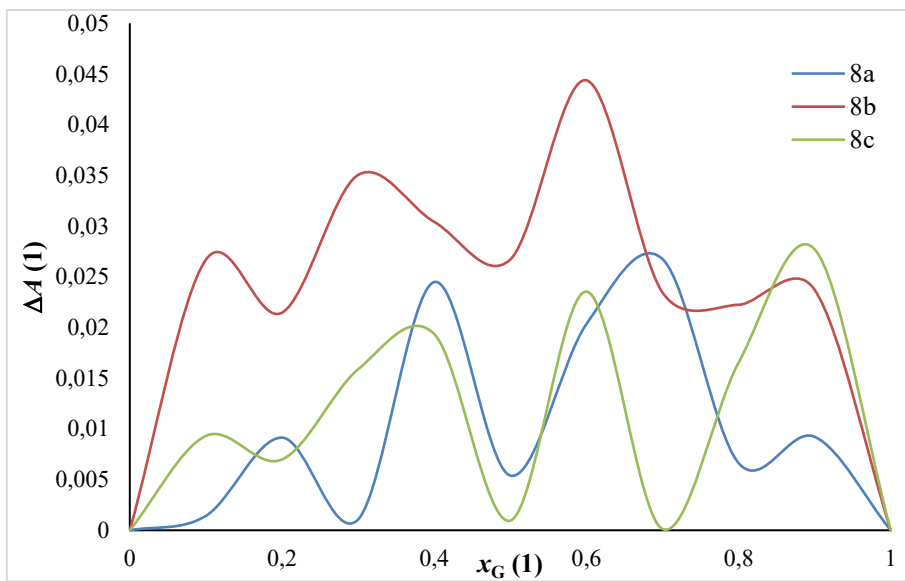
4.7.2. Stanovení stechiometrie

Job plot u všech látek vycházel při každém měření trochu jinak. Tento jev byl způsoben tím, že rozdíl naměřené a vypočtené absorbance se pohyboval ve velmi nízkých hodnotách (graf 8). Z toho důvodu se nepodařilo u látek **8a-8d** určit stechiometrii komplexu host-hostitel s β -CD. V kapitole 3.5.1.1 bylo zmíněno, že toto měření nemusí vyjít, pokud v roztoku dochází k tvorbě více různých komplexů a také pokud vlivem supramolekulárních interakcí dochází pouze k malým změnám v absorbanci (graf 8).^{87,88,100}



Graf 8: Modifikovaný Job plot látky 8d zobrazující rozdílné výsledky měření vlivem malé změny A

Graf 9 zobrazuje nezdařený Job plot u látek **8a-8c**.



Graf 9: Porovnání modifikovaného Job plotu pro látky 8a-8c

5. Experimentální práce

5.1. Obecné postupy a chemikálie

β -Cyklodextrin byl zakoupen od firmy Wako Chemicals. Běžné chemikálie byly zakoupeny od firmy Lach-ner a Penta, speciální chemikálie pak od firmy Sigma-Aldrich. Amino-azido-tetraethylglykolový linker (AATEG) byl připraven podle literatury⁹⁶⁻⁹⁸ ve skupině školitele Mgr. Petrem Kasalem. Rozpouštědla používaná v reakcích byla před použitím predestilována. Voda byla používána redestilovaná. Rozpouštědla byla odpařována na rotační vakuové odparce firmy Büchi a Heidolph při teplotách do 50 °C. K vyvíjení TLC byly použity tyto mobilní fáze:

- S1: CHCl₃/MeOH v poměru 20/1
- S2: hexan/EtOAc v poměru 5/1
- S3: hexan/EtOAc v poměru 1/1
- S4: hexan/EtOAc v poměru 10/1
- S5: MeOH/(kyselina octová)/(1% vodný roztok NH₄OAc) v poměru 10/1/9

Pro detekci látek na TLC byla použita následující činidla:

- D1: směs připravená z tetrahydrátu síranu ceričitého (0,5 g), tetrahydrátu molybdenanu amonného (2,5 g), kyseliny sírové (5 ml) a vody (45 ml)
- D2: bazický roztok KMnO₄
- D3: 1% roztok 4-(4-nitrobenzyl)pyridinu v ethanolu
- D4: detekce pomocí UV lampy při vlnové délce 254 nm (látky zhášející fluorescenci) a 366 nm (fluoreskující látky)

Preparativní sloupcová chromatografie byla prováděna na Silikagelu 60 (40–63 μ m) a na reversním silikagelu LiChroprep RP-18 (40–63 μ m), které byly zakoupeny od firmy Merck. Pro monitorování reakcí byly používány aluminiové TLC destičky pokryté silikagelem 60 F₂₅₄ nebo reversním silikagelem 60 RP-18 F₂₅₄S, oboje od firmy Merck.

MS spektra byla měřena na přístroji LCMS 2020 Shimadzu, jako rozpouštědlo byl použit methanol nebo acetonitril (oboje HPLC kvalita). HRMS spektra byla měřena fakultním MS servisem.

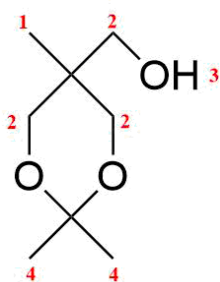
NMR spektra popsanych látek byla měřena na přístroji Varian NMR System 300 MHz. Pro nově syntetizované látky byl použit přístroj Bruker Avance III HD 400.

UV absorpční spektra byla měřena na přístroji Thermo Scientific Evolution 60. Fluorescenční emisní spektra byla měřena na přístroji Thermo Spectronic Aminco Bowman Series 2.

Struktury produktů uvedené v popisech jejich přípravy jsou číslovány pro přiřazení signálů ^1H a ^{13}C NMR.

5.2. Syntéza pozitivně nabitě kotvy

(2,2,5-Trimethyl-1,3-dioxan-5-yl)methanol (1). 2-(Hydroxymethyl)-2-methylpropan-1,3-

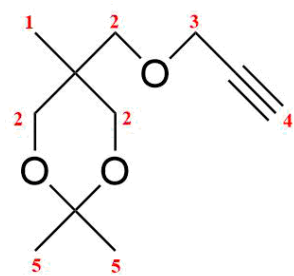


diol (40 g, 333 mmol) byl rozpuštěn ve vysušeném acetonu (400 ml) pod argonovou atmosférou. Ke směsi byla přidána *p*-toluensulfonová kyselina (40 mg, 210 μmol). Roztok byl míchán přes víkend. Průběh reakce byl sledován pomocí TLC ve směsi S1. Produkt má vyšší R_F než výchozí látka. K detekci byla použita směs D1 s následným zahřátím. Směs byla neutralizována uhličitanem draselným (1 g, 3,24 mmol). Směs byla

přefiltrována přes fritu. Z filtrátu byl odpařen aceton na rotační vakuové odparce. Odparek byl predestilován při teplotě 130 °C a tlaku 150 Pa. Bezbarvý produkt s olejovitou konzistencí o hmotnosti 46,9 g byl získán ve výtěžku 88 %.

^1H -NMR (300 MHz, CDCl_3): δ = 0.82 (s, 3H, CH_3 , H-1); 1.39 (s, 3H, CH_3 , H-4); 1.43 (s, 3H, CH_3 , H-4); 2.07 (t, J = 5.5 Hz, 1H, OH, H-3); 3.58 – 3.69 (m, 6H, $3 \times \text{CH}_2$, H-2) ppm. Spektrum je shodné s literaturou.⁹¹

2,2,5-Trimethyl-5-((prop-2-yn-1-yloxy)methyl)-1,3-dioxan (2). Látka 1 (46,9 g, 293 mmol)



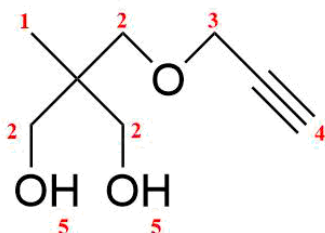
byla rozpuštěna v suchém THF (410 ml). Směs byla pod argonovou atmosférou ochlazená na 0 °C. K roztoku byl přidán NaH (17,6 g, 440 mmol; 60% olejová suspenze) a směs byla míchána 2 hodiny. Směs byla podchlazená na -78 °C a během 30 minut byl přikapán propargyl bromid (49 ml, 440 mmol; 80% roztok v toluenu). Směs byla míchána přes víkend při laboratorní teplotě pod argonovou atmosférou. Průběh

reakce byl sledován pomocí TLC ve směsi S2. K detekci byla použita směs D1 s následným zahřátím. Reakční směs byla odsáta na fritě. Filtrát byl odpařen na rotační vakuové odparce. Odparek byl predestilován při teplotě 115 °C a tlaku 1,5 mbar. Bylo získáno 52,5 g lehce nažloutlého olejovitého produktu ve výtěžku 90 %.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): $\delta = 0.86$ (s, 3H, CH_3 , H-1); 1.38 (s, 3H, CH_3 , H-5); 1.41 (s, 3H, CH_3 , H-5); 2.40 (t, $J = 2.4$ Hz, 1H, CH, H-4); 3.51 – 3.70 (m, 6H, $3 \times \text{CH}_2$, H-2); 4.14 (d, $J = 2.4$ Hz, 2H, CH_2 , H-3) ppm. Spektrum je shodné s literaturou.⁹²

Pro $\text{C}_{11}\text{H}_{18}\text{NaO}_3^+$ vypočteno Mr: 221.1; ESI-MS: m/z 221.1 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

2-Methyl-2-((prop-2-yn-1-yloxy)methyl)propane-1,3-diol (3). Látka 2 (52,5 g, 265 mmol)

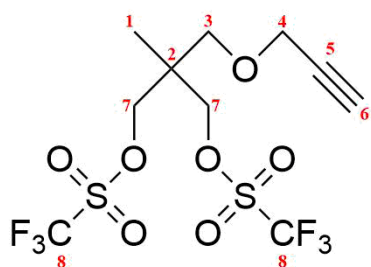


byla rozpuštěna v methanolu (310 ml) a byla přidána koncentrovaná kyselina chlorovodíková (22 ml, 265 mmol). Směs byla míchána přes noc. Průběh reakce byl sledován pomocí TLC ve směsi S3. Detekce byla provedena směsí D1 s následným zahřátím. Směs byla neutralizována 20% roztokem hydroxidu sodného. Po dokončení reakce byla reakční směs přefiltrována přes fritu a filtrát byl odpařen na rotační vakuové odparce. Odparek byl rozpuštěn v chloroformu a vzniklá suspenze byla přefiltrována přes fritu. Surový produkt byl rozpuštěn v chloroformu a přečištěn na chromatografické koloně ze 420 g silikagelu. Jako mobilní fáze byla použita směs $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 30/1. Produkt byl sledován na TLC ve směsi hexan/EtOAc 1/1 a detegován stejnou detekční směsí jako u látky 1. Frakce s produktem byly odpařeny na rotační vakuové odparce. Zbytky rozpouštědel byly odstraněny sušením za sníženého tlaku při 40 °C po dobu 10 hodin. Bylo připraveno 40,2 g nažloutlé olejovité látky ve výtěžku 96 %.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): $\delta = 0.83$ (s, 3H, CH_3 , H-1); 2.45 (t, $J = 2.4$ Hz, 1H, CH, H-4); 2.77 (s, 2H, $2 \times \text{OH}$, H-5); 3.51 – 3.67 (m, 6H, $3 \times \text{CH}_2$, H-2); 4.14 (d, $J = 2.4$ Hz, 2H, CH_2 , H-3) ppm. Spektrum je shodné s literaturou.⁹²

Pro $\text{C}_8\text{H}_{14}\text{NaO}_3^+$ vypočteno Mr: 181.1; ESI-MS: m/z 181.0 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

2-Methyl-2-((prop-2-yn-1-yloxy)methyl)propan-1,3-diyl-bis(trifluormethansulfonát) (4).



Látka 3 (5,02 g, 31,7 mmol) byla rozpuštěna ve 150 ml DCM. Do roztoku byl přidán 2,6-lutidin (7,4 ml, 63,5 mmol). Vzniklá směs byla vychlazená na -70 °C. Postupně byl přikapán anhydrid kyseliny trifluormethansulfonové (10,7 ml, 63,5 mmol). Směs byla míchána hodinu. Reakce byla monitorována pomocí TLC ve směsi S3 pro výchozí látku a ve směsi S4 pro produkt. Výchozí látka byla detegována D2 s následným zahřátím. Produkt byl detegován ponořením do D3 s následným zahřátím a ponořením do koncentrovaného vodného roztoku

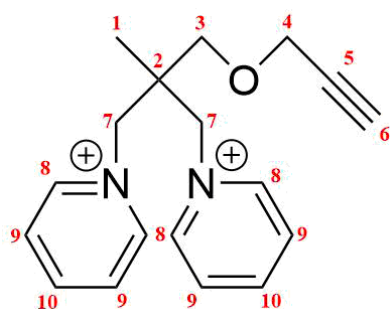
NH₃. Reakční směs byla vytřepána mezi diethylether (300 ml) a vodu (200 ml). Organická fáze byla postupně vytřepána HCl (1M, 200 ml), nasyceným roztokem NaHCO₃ (200 ml) a nasyceným roztokem NaCl (200 ml). Organická fáze byla vysušena přidáním MgSO₄ (5 g). Sušidlo bylo odstraněno přefiltrováním směsi přes fritu a filtrát byl odpařen na rotační vakuové odparce při 30 °C. Zbytky rozpouštědel byly odstraněny odsátím vakuovou pumpou při 30 °C. Bylo připraveno 12,57 g červené olejovité látky ve výtěžku 94 %.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 1.17 (s, 3H, CH₃, **H-1**); 2.48 (t, *J* = 2.4 Hz, 1H, CH, **H-6**); 3.48 (s, 2H, CH₂, **H-3**); 4.17 (d, *J* = 2.4 Hz, 2H, CH₂, **H-4**); 4.45 (s, 4H, 2×CH₂, **H-7**) ppm.

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 16.34 (**C-1**); 40.63 (**C-2**); 58.80 (**C-4**); 67.74 (**C-3**); 75.76 (**C-6**); 76.68 (2×C, **C-7**); 78.44 (**C-5**); 118.72 (q, *J* = 319.7 Hz, 2×C, **C-8**) ppm.

Pro C₁₀H₁₂F₆NaO₇S₂⁺ vypočteno Mr: 444.9821; ESI-HRMS: *m/z* 444.9816 [M+Na]⁺.

1,1'-(2-Methyl-2-((prop-2-yn-1-yloxy)methyl)propan-1,3-diyl)bis(pyridin-1-ium)-bis(trifluormethansulfonát) (5). Látka **4** (3,00 g, 7,11 mmol) byla rozpuštěna v 60 ml



pyridinu. Směs byla zahřívána pod argonem na 60 °C přes noc. Reakce byla monitorována pomocí TLC ve směsi S5. Látky byly detegovány směsí D2 s následným zahřátím. Pyridin byl oddestilován pod vakuem při 70 °C. Destilační zbytek byl vytřepán mezi CHCl₃ (75 ml) a vodu (75 ml). Organická fáze byla vytřepána ještě jednou vodou (75 ml).

Vodné fáze byly spojeny a odpařeny na rotační vakuové odparce při 50 °C. Bylo připraveno 4,02 g červenohnědé husté olejovité látky ve výtěžku 97 %.

¹H-NMR (300 MHz, D₂O): δ = 1.01 (s, 3H, CH₃, **H-1**); 2.94 (t, *J* = 2.4 Hz, 1H, **H-6**); 3.18 (s, 2H, CH₂, **H-3**); 4.23 (d, *J* = 2.4 Hz, 2H, CH₂, **H-4**); 4.68 (d, *J* = 13.6 Hz, 2H, CH₂, **H-7**); 4.95 (d, *J* = 13.6 Hz, 2H, CH₂, **H-7**); 8.12 (dd, *J* = 8.0, 6.6 Hz, 4H, 4×CH, **H-9**); 8.62 (tt, *J* = 7.9, 1.4 Hz, 2H, 2×CH, **H-10**); 8.83 (m, 4H, 4×CH, **H-8**) ppm.

¹³C-NMR (100 MHz, D₂O, tBuOH): δ = 17.01 (**C-1**); 30.29 (tBuOH); 42.20 (**C-2**); 58.52 (**C-4**); 64.65 (2×C, **C-7**); 67.99 (**C-3**); 70.48 (tBuOH); 77.76 (**C-6**); 79.27 (**C-5**); 129.11 (4×C, **C-9**); 146.53 (4×C, **C-8**); 147.55 (2×C, **C-10**) ppm.

Pro C₁₈H₂₂N₂O²⁺ vypočteno Mr: 141.0861; ESI-HRMS: *m/z* 141.0849 [M]²⁺.

5.3. Obecný postup syntézy hydrazonů 6a-6d (OP1)

Výchozí *p*-anisidin (9,23 g, 75 mmol) byl rozpuštěn ve vodě (150 ml) s koncentrovanou HCl (10 ml, 113 mmol). Vzniklý roztok byl ochlazen na 0-5 °C. Postupně byl přikapán vodný roztok NaNO₂ (5,2 g, 75 mmol, 60 ml destilované vody), přičemž byla udržována teplota v reakční směsi v rozmezí 0-5 °C. Roztok byl následně přikapán do vodného ethanolickeho roztoku (200 ml, EtOH/H₂O 3/1) obsahujícím malononitril (5 g, 75 mmol) a octan sodný (6,1 g, 75 mmol) a teplota reakční směsi byla udržována v rozmezí 0-5 °C. Poté byla směs míchána 4 hodiny při laboratorní teplotě. Vzniklá žlutá sraženina byla odsáta na fritě a promyta vodou. Následně byla rekrystalizována ze směsi EtOH/H₂O 4/1 (300 ml). Vzniklé krystalky byly odsáty na fritě a promyty vodou. Krystalky byly vysušeny při tlaku 150 Pa a 60 °C během 8 hodin.

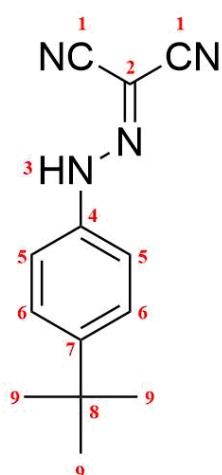
5.4. Syntéza hydrazonů

***N*-(4-Methoxyfenyl)karbonohydrasonoyl dikyanid (6a).** Látka byla připravena podle OP1. Bylo připraveno 7,77 g vínových jehlicovitých krystalků ve výtěžku 52 %.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 3.76 (s, 3H, CH₃); 6.99 (d, *J* = 9 Hz; 2H, 2×CH); 7.42 (d, *J* = 9.2 Hz, 2H, 2×CH); 12.97 (s, 1H, NH) ppm. Spektrum je shodné s literaturou.¹⁰¹

Pro C₁₁H₁₃N₄O₂⁺ vypočteno Mr: 233.1033; ESI-HRMS: *m/z* 233.1031 [M+CH₃OH+H]⁺.

***N*-(4-(*tert*-Butyl)fenyl)karbonohydrasonoyl dikyanid (6b).** Látka byla připravena podle



OP1. 4-(*tert*-Butyl)anilin (5,04 g, 34 mmol); destilovaná voda (100 ml); konc. HCl (4,5 ml, 51 mmol); NaNO₂ (2,33 g, 34 mmol, 30 ml destilované vody). Vodný ethanolickeý roztok (60 ml); malononitril (2,23 g, 34 mmol); octan sodný (2,77 g, 34 mmol). Rekrystalizace ze 100 ml směsi EtOH/H₂O 4/1. Bylo připraveno 4,50 g žlutých jehlicovitých krystalků ve výtěžku 59 %.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 1.27 (s, 9H, 3×CH₃, H-9); 7.38-7.46 (m; 4H, 4×CH, H-5 a H-6); 12.99 (s, 1H, NH) ppm.

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 31.04 (3×C, C-9); 34.27 (C-8); 83.78 (C-2); 110.06 (C-1); 114.51 (C-1); 116.21 (2×C, C-6); 126.23 (2×C, C-5); 139.06 (C-7); 148.56 (C-4) ppm.

Organická fáze byla odpařena na rotační vakuové odparce při 40 °C. Odparek (4,0 g) byl rozpuštěn v CHCl₃ a adsorbován na silikagel (20 g). Látka adsorbovaná na silikagelu byla přečištěna na koloně (100 g silikagelu). Jako mobilní fáze byla použita směs hexan/EtOAc 1/1. Frakce s produktem byly odpařeny na rotační vakuové odparce při 40 °C. Odparek (1,68 g) byl nanesen na kolonu z 50 g RP silikagelu, jako mobilní fáze byla použita směs MeOH/voda 5/1. Frakce s produktem byly odpařeny na rotační vakuové odparce při 50 °C. Odparek byl dosušen při tlaku 150 Pa a 60 °C během 6 hodin.

5.6. Syntéza fluoroforů

5-((2-(2-(2-(2-Azidoethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl)amino)-2-(4-methoxyfenyl)-2H-1,2,3-triazol-4-karbonitril (7a). Látka byla připravena podle OP2. Bylo připraveno 1,18 g žluté olejovité látky ve výtěžku 51 %.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 3.39 (t, *J* = 5 Hz, 2H, CH₂, H-1); 3.56-3.60 (m, 2H, CH₂, H-3); 3.69-3.74 (m, 12H, 6×CH₂, H-2); 3.85 (s, 3H, CH₃, H-12); 4.84 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H, NH, H-4); 6.96 (d, *J* = 9 Hz, 2H, CH, H-9); 7.87 (d, *J* = 9.3 Hz, 2H, CH, H-10) ppm.

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 44.04 (C-3); 50.82 (C-1); 55.75 (C-12); 69.33-70.88 (6× C, C-2); 106.91 (C-7); 112.68 (C-6); 114.51 (2×C, C-9); 120.33 (2×C, C-10); 133.02 (C-8); 157.03 (C-5); 159.52 (C-11) ppm.

Pro C₁₈H₂₅N₈O₄⁺ vypočteno Mr: 417.1993; ESI-HRMS: *m/z* 417.1993 [M+H]⁺ a 439.1812 [M+Na]⁺.

UV absorpce: λ_{max1} = 238 nm; λ_{max2} = 328 nm.

Fluorescence: λ_{em} = 400 nm; Stokesův posun = 72 nm.

5-((2-(2-(2-(2-Azidoethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl)amino)-2-(4-(*tert*-butyl)fenyl)-2H-1,2,3-triazol-4-karbonitril (7b). Látka byla připravena podle OP2. Látka **6b** (1,04 g, 4,59 mmol); THF (55 ml); AATEG (1,50 g, 6,89 mmol); monohydrát octanu měďnatého (1,83 g, 9,18 mmol). Na adsorpci 3,04 g látky bylo použito 15 g silikagelu a na kolonu 75 g silikagelu. 1,03 g látky bylo nanesen na kolonu z 50 g RP silikagelu. Jako mobilní fáze byla použita směs MeOH/voda 10/1. Bylo připraveno 0,64 g žluté olejovité látky ve výtěžku 32 %.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ = 1.34 (s, 9H, $3\times\text{CH}_3$, **H-13**); 3.39 (t, J = 5 Hz, 2H, CH_2 , **H-1**); 3.57-3.61 (m, 2H, CH_2 , **H-3**); 3.67-3.74 (m, 12H, $6\times\text{CH}_2$, **H-2**); 4.85 (t, J = 5.7 Hz, 1H, NH, **H-4**); 7.46 (d, J = 9 Hz, 2H, $2\times\text{CH}$, **H-9**); 7.86 (d, J = 9 Hz, 2H, $2\times\text{CH}$, **H-10**) ppm.

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ = 31.40 (**C-13**); 34.86 (**C-12**); 44.04 (**C-3**); 50.82 (**C-1**); 69.31-70.89 ($6\times\text{C}$, **C-2**); 107.38 (**C-7**); 112.60 (**C-6**); 118.55 ($2\times\text{C}$, **C-10**); 126.33 ($2\times\text{C}$, **C-9**); 136.91 (**C-8**); 151.53 (**C-11**); 156.98 (**C-5**) ppm.

Pro $\text{C}_{21}\text{H}_{31}\text{N}_8\text{O}_3^+$ vypočteno Mr: 443.2514; ESI-HRMS: m/z 443.2510 $[\text{M}+\text{H}]^+$ a 465.2328 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

UV absorpce: $\lambda_{\text{max}1}$ = 238 nm; $\lambda_{\text{max}2}$ = 325 nm.

Fluorescence: λ_{em} = 403 nm; Stokesův posun = 78 nm.

5-((2-(2-(2-(2-Azidoethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl)amino)-2-(4-chlorfenyl)-2H-1,2,3-triazol-4-carbonitril (7c). Látka byla připravena podle **OP2**. Látka **6c** (0,99 g, 4,85 mmol); THF (60 ml); AATEG (1,59 g, 7,27 mmol); monohydrát octanu měďnatého (1,93 g, 9,69 mmol). Na adsorpci 2,78 g látky bylo použito 14 g silikagelu a na kolonu 70 g silikagelu. 1,59 g látky bylo naneseno na kolonu z 50 g RP silikagelu. Jako mobilní fáze byla použita směs MeOH/voda 5/1. Bylo připraveno 1,32 g žluté olejovité látky ve výtěžku 65 %.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ = 3.39 (t, J = 5 Hz, 2H, CH_2 , **H-1**); 3.56-3.60 (m, 2H, CH_2 , **H-3**); 3.67-3.74 (m, 12H, $6\times\text{CH}_2$, **H-2**); 4.93 (t, J = 5.6 Hz, 1H, NH, **H-4**); 7.43 (d, J = 9 Hz, 2H, $2\times\text{CH}$, **H-9**); 7.90 (d, J = 8.8 Hz, 2H, $2\times\text{CH}$, **H-10**) ppm.

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ = 44.02 (**C-3**); 50.83 (**C-1**); 69.23-70.90 ($6\times\text{C}$, **C-2**); 108.20 (**C-7**); 112.23 (**C-6**); 120.01 ($2\times\text{C}$, **C-10**); 129.61 ($2\times\text{C}$, **C-9**); 133.85 (**C-11**); 137.68 (**C-8**); 157.05 (**C-5**) ppm.

Pro $\text{C}_{17}\text{H}_{22}\text{ClN}_8\text{O}_3^+$ vypočteno Mr: 421.1498; ESI-HRMS: m/z 421.1496 $[\text{M}+\text{H}]^+$ a 443.1314 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

UV absorpce: $\lambda_{\text{max}1}$ = 242 nm; $\lambda_{\text{max}2}$ = 332 nm.

Fluorescence: λ_{em} = 400 nm; Stokesův posun = 68 nm.

5-((2-(2-(2-(2-Azidoethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl)amino)-2-(4-kyanofenyl)-2H-1,2,3-triazol-4-karbonitril (7d). Látka byla připravena podle **OP2**. Látka **6d** (1,00 g, 5,13 mmol); THF (60 ml); AATEG (1,68 g, 7,70 mmol); monohydrát octanu měďnatého (2,05 g, 10,26 mmol). Na adsorpci 2,59 g látky bylo použito 13 g silikagelu a na kolonu 70 g silikagelu. 1,91 g látky bylo nanášeno na kolonu z 50 g RP silikagelu. Jako mobilní fáze byla použita směs MeOH/voda 3/1. Bylo připraveno 1,31 g žluté olejovité látky ve výtěžku 62 %.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 3.39$ (t, $J = 5$ Hz, 2H, CH_2 , **H-1**); 3.57-3.61 (m, 2H, CH_2 , **H-3**); 3.67-3.76 (m, 12H, $6 \times \text{CH}_2$, **H-2**); 5.06 (t, $J = 5.6$ Hz, 1H, NH, **H-4**); 7.76 (d, $J = 9$ Hz, 2H, $2 \times \text{CH}$, **H-9**); 8.08 (d, $J = 9$ Hz, 2H, $2 \times \text{CH}$, **H-10**) ppm.

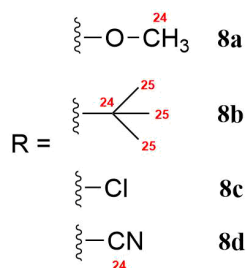
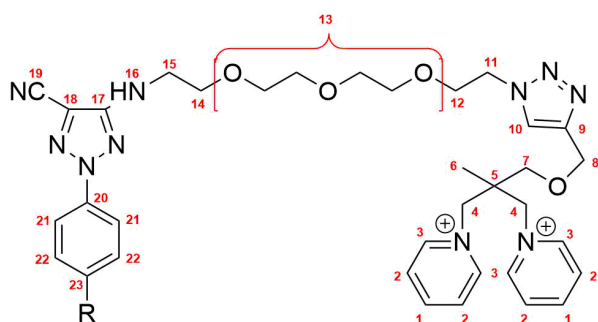
^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): $\delta = 44.00$ (**C-3**); 50.82 (**C-1**); 69.07-70.83 ($6 \times \text{C}$, **C-2**); 109.87 (**C-7**); 111.39 (**C-12**); 111.72 (**C-6**); 118.20 (**C-11**); 119.08 ($2 \times \text{C}$, **C-10**); 133.64 ($2 \times \text{C}$, **C-9**); 141.63 (**C-8**); 157.10 (**C-5**) ppm.

Pro $\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{N}_9\text{O}_3^+$ vypočteno Mr: 412.1840; ESI-HRMS: m/z 412.1840 $[\text{M}+\text{H}]^+$ a 434.1657 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

UV absorpce: $\lambda_{\text{max}1} = 252$ nm; $\lambda_{\text{max}2} = 346$ nm.

Fluorescence: $\lambda_{\text{em}} = 406$ nm; Stokesův posun = 60 nm.

5.7. Obecný postup syntézy nabitých fluoroforů 8a-8d (OP3)



Nabitá kotva **5** (120,6 mg, 0,21 mmol) byla rozpuštěna v MeOH(Ar) (methanol probubláný Ar 5 hodin; 3,5 ml). Byl přidán fluorofor **7a** (103,8 mg, 0,25 mmol) a CuI (40,4 mg, 0,21 mmol) Směs byla zahřívána na 80 °C pod argonovou atmosférou 12 hodin. Průběh reakce byl sledován pomocí TLC ve směsi S5. Látky byly detegovány pomocí D4. Reakční směs byla přefiltrována od CuI a filtrát byl odpařen na rotační vakuové odparce při 50 °C. Odparek byl roztřepán mezi toluen (10 ml) a vodu (10 ml).

Docházelo k obtížnému dělení fází, takže dělení probíhalo přes noc. Vodná fáze byla odpařena na rotační vakuové odparce při 50 °C. Odparek (274,6 mg) byl rozpuštěn ve vodě a nanesen na kolonu z RP silikagelu (5,5 g). Eluce látek probíhala gradientově ve vodném roztoku MeOH, kdy produkt vytékal v 10% MeOH. Frakce s produktem byly odpařeny na rotační vakuové odparce při 50 °C. Odparek byl následně dosušen při tlaku 150 Pa a 60 °C během 6 hodin.

5.8. Syntéza nabitých fluoroforů

1,1'-(2-(((1-(2-(2-(2-(2-((5-Kyano-2-(4-methoxyfenyl)-2H-1,2,3-triazol-4-yl)amino)ethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methoxy)methyl)-2-methylpropan-1,3-diyl)bis(pyridin-1-ium)-bis(trifluormethansulfonát) (8a). Látka byla připravena podle OP3. Bylo připraveno 130,5 mg lehce nažloutlé pryskyřicovité látky ve výtěžku 63 %.

¹H NMR (400 MHz, CD₃OD): δ = 1.02 (s, 3H, CH₃, H-6); 3.21 (s, 2H, CH₂, H-7); 3.53 (t, J = 5.4 Hz, 2H, CH₂, H-15); 3.60-3.65 (m, 8H, 4×CH₂, H-13); 3.70 (t, J = 5.4 Hz, 2H, CH₂, H-14); 3.85 (s, 3H, CH₃, H-25) 3.92 (t, J = 5.6 Hz, 2H, CH₂, H-12); 4.61 (t, J = 5.6 Hz, 2H, CH₂, H-11); 4.63 (s, 2H, CH₂, H-8); 4.73-4.97 (m, 4H, 2×CH₂, H-4); 7.04 (d, J = 9 Hz, 2H, 2×CH, H-21); 7.86 (d, J = 9.3 Hz, 2H, 2×CH, H-22); 8.07 (s, 1H, CH, H-10); 8.13 (m, 4H, 4×CH, H-2); 8.67 (tt, J = 7.8, 1.3 Hz, 2H, 2×CH, H-1); 8.87 (d, J = 6.8 Hz, 4H, 4×CH, H-3) ppm.

¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD): δ = 17.60 (C-6); 42.94 (C-5); 51.41 (C-11); 44.69 (C-15); 56.15 (C-24); 64.41 (C-8); 65.53 (2×C, C-4); 70.23 (C-7); 70.41 (C-12); 71.25-71.47 (5×C, C-13 a C-14); 107.50 (C-19); 113.63 (C-18); 115.60 (2×C, C-21); 121.16 (2×C, C-22); 126.57 (C-10); 129.64 (4×C, C-2); 134.06 (C-20); 143.91 (C-9); 147.36 (4×C, C-3); 148.11 (C-1); 158.50 (C-17); 161.1 (C-23) ppm.

Pro C₃₆H₄₆N₁₀O₅²⁺ vypočteno Mr: 698.3642; ESI-HRMS: m/z 349.21 [M]²⁺.

UV absorpce: $\lambda_{\max 1}$ = 260 nm; $\lambda_{\max 2}$ = 328 nm.

Fluorescence: λ_{em} = 415 nm; Stokesův posun = 89 nm.

1,1'-(2-(((1-(2-(2-(2-(2-((2-(4-(*terc*-Butyl)fenyl)-5-kyano-2H-1,2,3-triazol-4-yl)amino)ethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methoxy)methyl)-2-methylpropan-1,3-diyl)bis(pyridin-1-ium)-bis(trifluormethansulfonát) (8b). Látka byla připravena podle OP3. Látka **5** (301,6 mg, 0,52 mmol); látka **7b** (275,9 mg, 0,62 mmol);

MeOH(Ar) (5 ml); CuI (508 mg, 5,20 mmol). Odparek byl vytřepán mezi 40 ml toluenu a 40 ml vody. 689 mg látky bylo nanášeno na kolonu z 12 g RP silikagelu. Produkt vytékal v 20% MeOH. Bylo připraveno 428,8 mg žluté pryskyřicovité látky ve výtěžku 81 %.

^1H NMR (400 MHz, CD_3OD): δ = 1.02 (s, 3H, CH_3 , H-6); 1.36 (s, 9H, $3\times\text{CH}_3$, H-25); 3.22 (s, 2H, CH_2 , H-7); 3.54 (t, J = 5.4 Hz, 2H, CH_2 , H-15); 3.61-3.64 (m, 8H, $4\times\text{CH}_2$, H-13); 3.71 (t, J = 5.7 Hz, 2H, CH_2 , H-14); 3.92 (t, J = 5.6 Hz, 2H, CH_2 , H-12); 4.61 (t, J = 5.5 Hz, 2H, CH_2 , H-11); 4.64 (s, 2H, CH_2 , H-8); 4.74-4.97 (m, 4H, $2\times\text{CH}_2$, H-4); 7.55 (d, J = 9 Hz, 2H, $2\times\text{CH}$, H-21); 7.87 (d, J = 9 Hz, 2H, $2\times\text{CH}$, H-22); 8.08 (s, 1H, CH, H-10); 8.13 (m, 4H, $4\times\text{CH}$, H-2); 8.67 (tt, J = 7.8, 1.3 Hz, 2H, $2\times\text{CH}$, H-1); 8.87 (d, J = 6.8 Hz, 4H, $4\times\text{CH}$, H-3) ppm.

^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD): δ = ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD): δ = 17.61 (C-6); 31.65 ($3\times\text{C}$, C-25) 35.61 (C-24); 42.94 (C-5); 51.40 (C-11); 44.70 (C-15); 64.41 (C-8); 65.54 ($2\times\text{C}$, C-4); 70.22 (C-7); 70.41 (C-12); 71.25-71.47 ($5\times\text{C}$, C-13 a C-14); 107.98 (C-19); 113.42 (C-18); 127.47 ($2\times\text{C}$, C-21); 119.31 ($2\times\text{C}$, C-22); 126.58 (C-10); 129.65 ($4\times\text{C}$, C-2); 138.12 (C-20); 143.91 (C-9); 147.35 ($4\times\text{C}$, C-3); 148.11 (C-1); 158.46 (C-17); 115.79 (C-23) ppm.

Pro $\text{C}_{39}\text{H}_{52}\text{N}_{10}\text{O}_4^{2+}$ vypočteno Mr: 724.4162; ESI-HRMS: m/z 362.24 $[\text{M}]^{2+}$.

UV absorpce: λ_{max} = 326 nm.

Fluorescence: λ_{em} = 411 nm; Stokesův posun = 85 nm.

1,1'-(2-(((1-(2-(2-(2-(2-(4-Chlorfenyl)-5-kyano-2H-1,2,3-triazol-4-yl)amino)ethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methoxy)methyl)-2-methylpropan-1,3-diyl)bis(pyridin-1-ium)-bis(trifluormethansulfonát) (8c). Látka byla připravena podle OP3. Látka 5 (399,2 mg, 0,69 mmol); látka 7c (347,3 mg, 0,83 mmol); MeOH(Ar) (5 ml); CuI (402 mg, 2,07 mmol). Odparek byl vytřepán mezi 20 ml toluenu a 20 ml vody. 862 mg látky bylo nanášeno na kolonu z 17 g RP silikagelu. Produkt vytékal v 20% MeOH. Bylo připraveno 569,5 mg žluté pryskyřicovité látky ve výtěžku 83 %.

^1H NMR (400 MHz, CD_3OD): δ = 1.02 (s, 3H, CH_3 , H-6); 3.22 (s, 2H, CH_2 , H-7); 3.53 (t, J = 5.4 Hz, 2H, CH_2 , H-15); 3.60-3.66 (m, 8H, $4\times\text{CH}_2$, H-13); 3.70 (t, J = 5.4 Hz, 2H, CH_2 , H-14); 3.92 (t, J = 5.6 Hz, 2H, CH_2 , H-12); 4.61 (t, J = 5.6 Hz, 2H, CH_2 , H-11); 4.63 (s, 2H, CH_2 , H-8); 4.74-4.97 (m, 4H, $2\times\text{CH}_2$, H-4); 7.52 (d, J = 9.3 Hz, 2H, $2\times\text{CH}$, H-21); 7.94 (d, J = 9.3 Hz,

2H, 2×CH, **H-22**); 8.07 (s, 1H, CH, **H-10**); 8.13 (m, 4H, 4×CH, **H-2**); 8.67 (tt, $J = 7.8, 1.3$ Hz, 2H, 2×CH, **H-1**); 8.87 (d, $J = 6.8$ Hz, 4H, 4×CH, **H-3**) ppm.

^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD): $\delta = 17.61$ (**C-6**); 42.94 (**C-5**); 51.40 (**C-11**); 44.67 (**C-15**); 64.41 (**C-8**); 65.55 (2×C, **C-4**); 70.24 (**C-7**); 70.32 (**C-12**); 71.26-71.46 (5×C, **C-13** a **C-14**); 108.91 (**C-19**); 113.10 (**C-18**); 130.68 (2×C, **C-21**); 121.04 (2×C, **C-22**); 126.57 (**C-10**); 129.65 (4×C, **C-2**); 139.01 (**C-20**); 144.91 (**C-9**); 147.36 (4×C, **C-3**); 148.11 (**C-1**); 158.52 (**C-17**); 134.74 (**C-23**) ppm.

Pro $\text{C}_{35}\text{H}_{43}\text{ClN}_{10}\text{O}_4^{2+}$ vypočteno Mr: 702.3146; ESI-HRMS: m/z 351.15 $[\text{M}]^{2+}$.

UV absorpce: $\lambda_{\text{max}1} = 242$ nm; $\lambda_{\text{max}2} = 327$ nm.

Fluorescence: $\lambda_{\text{em}} = 411$ nm; Stokesův posun = 84 nm.

1,1'-(2-(((1-(2-(2-(2-(2-((5-Kyano-2-(4-kyanophenyl)-2H-1,2,3-triazol-4-yl)amino)ethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methoxy)methyl)-2-methylpropan-1,3-diyl)bis(pyridin-1-ium)-bis(trifluormethansulfonát) (8d). Látka byla připravena podle **OP3**. Látka **5** (242,0 mg, 0,42 mmol); Látka **7d** (205,8 mg, 0,50 mmol); MeOH(Ar) (5 ml); CuI (81,0 mg). Odparek byl vytřepán mezi 10 ml toluenu a 10 ml vody. 421 mg látky bylo nanášeno na kolonu z 8,5 g RP silikagelu. Produkt vytékal v 10% MeOH. Bylo připraveno 173,5 mg nažloutlé pryskyřicovité látky ve výtěžku 42 %.

^1H NMR (400 MHz, CD_3OD): $\delta = 1.03$ (s, 3H, CH_3 , **H-6**); 3.23 (s, 2H, CH_2 , **H-7**); 3.55 (t, $J = 5.4$ Hz, 2H, CH_2 , **H-15**); 3.60-3.65 (m, 8H, 4× CH_2 , **H-13**); 3.71 (t, $J = 5.4$ Hz, 2H, CH_2 , **H-14**); 3.92 (t, $J = 5.6$ Hz, 2H, CH_2 , **H-12**); 4.61 (t, $J = 5.5$ Hz, 2H, CH_2 , **H-11**); 4.64 (s, 2H, CH_2 , **H-8**); 4.74-4.98 (m, 4H, 2× CH_2 , **H-4**); 7.89 (d, $J = 9$ Hz, 2H, 2×CH, **H-21**); 8.13 (d, $J = 9$ Hz, 2H, 2×CH, **H-22**); 8.08 (s, 1H, CH, **H-10**); 8.14 (m, 4H, 4×CH, **H-2**); 8.67 (tt, $J = 7.9, 1.4$ Hz, 2H, 2×CH, **H-1**); 8.88 (d, $J = 6.8$ Hz, 4H, 4×CH, **H-3**) ppm.

^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD): $\delta = 17.60$ (**C-6**); 42.94 (**C-5**); 51.40 (**C-11**); 44.65 (**C-15**); 64.41 (**C-8**); 65.55 (2×C, **C-4**); 70.25 (2×C, **C-7** a **C-12**); 71.26-71.48 (5×C, **C-13** a **C-14**); 110.55 (**C-19**); 112.25 (**C-24**); 112.71 (**C-18**); 134.92 (2×C, **C-21**); 120.06 (2×C, **C-22**); 126.58 (**C-10**); 129.65 (4×C, **C-2**); 142.92 (**C-20**); 144.03 (**C-9**); 147.37 (4×C, **C-3**); 148.11 (**C-1**); 158.57 (**C-17**); 119.05 (**C-23**) ppm.

Pro $\text{C}_{36}\text{H}_{43}\text{N}_{11}\text{O}_4^{2+}$ vypočteno Mr: 693.3489; ESI-HRMS: m/z 362.71 $[\text{M}+\text{CH}_3\text{OH}]^{2+}$.

UV absorpce: $\lambda_{\max 1} = 254 \text{ nm}$; $\lambda_{\max 2} = 341 \text{ nm}$.

Fluorescence: $\lambda_{\text{em}} = 427 \text{ nm}$; Stokesův posun = 86 nm.

5.9. Kalibrační závislost absorbance na koncentraci nabitých fluoroforů 8a-8d

Koncentrační závislost byla stanovena pomocí UV spektrometrie. Byl připraven zásobní roztok příslušného nabitého fluoroforu o koncentraci $1 \times 10^{-4} \text{ M}$. Zásobní roztok byl následně pipetován ($V_{\text{zás}}$, tabulka 4) do kyvet a ředěn deionizovanou vodou (V_{vod} , tabulka 4).

Tabulka 4: Příprava vzorků pro měření koncentrační závislosti látek 8a-8d

Číslo vzorku	c [mol/l]	$V_{\text{zás}}$ [ml]	V_{vod} [ml]
1	$1,00 \times 10^{-4}$	2,0	0,0
2	$9,00 \times 10^{-5}$	1,8	0,2
3	$8,00 \times 10^{-5}$	1,6	0,4
4	$7,00 \times 10^{-5}$	1,4	0,6
5	$6,00 \times 10^{-5}$	1,2	0,8
6	$5,00 \times 10^{-5}$	1,0	1,0
7	$4,00 \times 10^{-5}$	0,8	1,2
8	$3,00 \times 10^{-5}$	0,6	1,4
9	$2,00 \times 10^{-5}$	0,4	1,6
10	$1,00 \times 10^{-5}$	0,2	1,8

5.10. Stanovení stechiometrie supramolekulárního komplexu pomocí Job plot

Stechiometrie komplexu byla stanovována pomocí UV absorpční spektrometrie. Byly připraveny zásobní roztoky nabitých fluoroforů (c_G , tabulka 5) a β -cyklodextrinu (c_H , tabulka 5).

Tabulka 5: Koncentrace zásobních roztoků pro měření Job plot.

Látka	c_G [mol/l]	c_H [mol/l]
8a	$1,2 \times 10^{-4}$	$1,2 \times 10^{-4}$
8b	$1,0 \times 10^{-4}$	$1,0 \times 10^{-4}$
8c	$1,2 \times 10^{-4}$	$1,2 \times 10^{-4}$
8d	$8,0 \times 10^{-5}$	$8,0 \times 10^{-5}$

Roztoky pro měření byly připraveny ze zásobních roztoků přímým mícháním do kyvety. Objemy jednotlivých komponent udává tabulka 6. x_G odpovídá molárnímu zlomku nabitého fluoroforu, V_G je objem pipetovaného objemu zásobního roztoku fluoroforu a V_H je objem pipetovaného objemu zásobního roztoku β -CD.

Tabulka 6: Objemy roztoků pro měření Job plot

Vzorek č.	x_G [l]	V_G [ml]	V_H [ml]
1	1,0	2,0	0,0
2	0,9	1,8	0,2
3	0,8	1,6	0,4
4	0,7	1,4	0,6
5	0,6	1,2	0,8
6	0,5	1,0	1,0
7	0,4	0,8	1,2
8	0,3	0,6	1,4
9	0,2	0,4	1,6
10	0,1	0,2	1,8
11	0,0	0,0	2,0

6. Závěr

Byla připravena nabitá kotva **5** ve formě bis(pyridiniové) soli. Molekula obsahuje dva permanentní kladné náboje a trojnou vazbu, která slouží k připojení fluoroforu přes azidovou skupinu pomocí CuAAC. Došlo k ověření přípravy vyvinuté ve skupině školitele.

Byly připraveny 4 hydrazony **6a-6d**. U hydrazonu **6b** (*tert*-butyl- v *p*- poloze) se jedná o novou látku.

Z hydrazonů **6a-6d** byly připraveny 4 nové fluorofory s amino-azido-tetraethylglykolovým linkerem **7a-7d**. Byla optimalizována metoda přípravy 2*H*-1,2,3-triazolů použitím 2 ekvivalentů monohydrátu octanu měďnatého.

Nabitě fluorofory byly připraveny reakcí typu CuAAC z nabitě kotvy **5** a fluoroforů **7a-7d**. Kladný náboj v molekule vede k dobré rozpustnosti látek ve vodě a také umožňuje vázání molekul k záporně nabitému povrchu. Při použití práškové mědi jako katalyzátoru při CuAAC docházelo k destrukci trojné vazby nabitě kotvy, proto byla nahrazena jodidem měďným.

Byly změřeny optické vlastnosti nenabitých **7a-7d** i nabitých **8a-8d** látek. Přítomnost polární skupiny na benzenovém jádře u látek **7a,c,d** vede k posunu absorpčního maxima směrem do viditelné oblasti oproti látce **7b** (*tert*-butyl- derivát). Zároveň s rostoucí polaritou substituentu klesá absorbance. Tento jev neplatí pro látku **7d** (kyano- derivát), kde naopak dochází k nárůstu absorbance oproti látce **7b**. Toto je pravděpodobně způsobeno konjugací trojné vazby nitrilové skupiny s benzenovým jádrem. Absorpční spektra látek **8a-8c** mají podobný vzhled. Zde se opět vymyká látka **8d** s nitrilovou skupinou, která má skoro o 0,2 vyšší absorbanci než látky **8a-8c**. U fluorescence látek **7a-7d** a **8a-8d** nelze posoudit vliv substituentu na výslednou intenzitu a vzhled spektra, kromě látek s nitrilovou skupinou, které vykazují v obou případech výrazně vyšší fluorescenci, což je způsobeno vyšší absorpcí látek **7d** a **8d**.

Nepodařilo se stanovit komplexační konstantu nabitých fluoroforů **8a-8d** s β -cyklodextrinem pomocí UV spektrometrie. Během měření Job plot docházelo k příliš malým změnám absorbance, takže se nepodařila stanovit stechiometrie vzniku supramolekulárního komplexu. Metoda stanovení komplexační konstanty pomocí UV spektrometrie nejspíš není vhodná pro tyto látky.

7. Poděkování

Na tomto místě bych rád poděkoval svému školiteli doc. RNDr. Jindřichu Jindřichovi, CSc. za vedení této bakalářské práce a za cenné rady při řešení problémů. Rád bych poděkoval kolegům z laboratoří 135 a 131 za vytvoření příjemného pracovního prostředí.

Dále bych chtěl poděkovat Mgr. Petrovi Kasalovi za praktické rady v laboratoři, poskytnutí pracovních postupů pro syntézu nabité kotvy, měření NMR 400 MHz spekter a za asistenci při řešení 2D-NMR spekter. Také bych chtěl poděkovat RNDr. Martinu Štíchovi za měření HRMS spekter a RNDr. Simoně Hybelbauerové, PhD. za zaučení na přístroji Varian NMR System 300 MHz. Mé díky patří také doc. RNDr. Ivanu Jelínkovi, CSc. za zaučení a umožnění přístupu k UV spektrometru a panu RNDr. Jakubu Hraníčkoví, PhD. za zaučení a umožnění měření na fluorescenčním spektrometru.

Na závěr bych chtěl poděkovat mé rodině a přátelům za podporu a trpělivost během mého studia a při vypracování této práce.

8. Literatura

- (1) Pokhodylo, N. In *Chemistry of 1,2,3-triazoles*; Springer, 2015; Vol. 40, pp 269–324.
- (2) Belskaya, N.; Subbotina, J.; Lesogorova, S. *Synthesis of 2H-1,2,3-Triazoles*; Springer International Publishing, 2014.
- (3) Schulze, B.; Schubert, U. S. *Chem. Soc. Rev.* **2014**, *43*, 2522–2571.
- (4) Thirumurugan, P.; Matosiuk, D.; Jozwiak, K. *Chem. Rev.* **2013**, *113*, 4905–4979.
- (5) Buckley, B.; Heaney, H. *Mechanistic Investigations of Copper(I)-Catalysed Alkyne–Azide Cycloaddition Reactions*; Springer, 2012; Vol. 28.
- (6) Mignani, S.; Zhou, Y.; Lecourt, T.; Micouin, L. *Recent Developments in the Synthesis 1,4,5-Trisubstituted Triazoles*; Springer, 2012; Vol. 28.
- (7) Zheng, T.; Rouhanifard, S. H.; Jalloh, A. S.; Wu, P. In *Click Triazoles*; Springer, 2012; Vol. 28.
- (8) Bolden, J. E.; Peart, M. J.; Johnstone, R. W. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2006**, *5*, 769–784.
- (9) Chen, P. C.; Patil, V.; Guerrant, W.; Green, P.; Oyelere, A. K. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 4839–4853.
- (10) Canzoneri, J. C.; Chen, P. C.; Oyelere, A. K. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 6588–6590.
- (11) Gavlik, K. D.; Sukhorukova, E. S.; Shafran, Y. M.; Slepukhin, P. A.; Benassi, E.; Belskaya, N. P. *Dyes Pigments* **2017**, *136*, 229–242.
- (12) Crini, G. *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 10940–10975.
- (13) Uekama, K.; Hirayama, F.; Irie, T. *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 2045–2076.
- (14) Astray, G.; Gonzalez-Barreiro, C.; Mejuto, J. C.; Rial-Otero, R.; Simal-Gándara, J. *Food Hydrocoll.* **2009**, *23*, 1631–1640.
- (15) Hedges, A. R. *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 2035–2044.
- (16) Takahashi, K. *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 2013–2034.
- (17) Singh, A.; Kaler, A.; Singh, V.; Patil, R.; Banerjee, U. C. *Cyclodextrins and Biotechnological Applications*; Wiley, 2011.
- (18) Tarimci, N. *Cyclodextrins in the Cosmetic Field*; Wiley, 2011.
- (19) Atkins, P.; de Paula, J. *Physical Chemistry*, 9th ed.; Oxford University Press, 2010.
- (20) Lakowicz, J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 3rd ed.; Springer Science+Business Media, 2006.
- (21) Gonçalves, S. M. *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 190–212.
- (22) Gikas, E.; Parissi-Poulou, M.; Kazanis, M.; Vavagianis, A. *Anal. Chim. Acta* **2003**, *489*, 153–163.
- (23) Toyo’oka, T. *Anal. Chim. Acta* **2002**, *465*, 111–130.
- (24) Piloto, A. M.; Costa, S. P. G.; Gonçalves, M. S. T. *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 4757–4760.
- (25) Piloto, A. M.; Fonseca, A. S. C.; Costa, S. P. G.; Gonçalves, M. S. T. *Tetrahedron* **2006**, *62*, 9258–9267.
- (26) Doré, K.; Dubus, S.; Ho, H.-A.; Lévesque, I.; Brunette, M.; Corbeil, G.; Boissinot, M.; Boivin, G.; Bergeron, M. G.; Boudreau, D.; et al. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 4240–4244.
- (27) Joussetme, B.; Blanchard, P.; Levillain, E.; Delaunay, J.; Allain, M.; Richomme, P.; Rondeau, D.; Gallego-Planas, N.; Roncali, J. Crown-Annelated Oligothiophenes as Model Compounds for Molecular Actuation. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125* (5), 1363–1370.
- (28) Uchiyama, S.; Takehira, K.; Kohtani, S.; Imai, K.; Nakagaki, R.; Tobita, S.; Santa, T. Fluorescence On–off Switching Mechanism of Benzofurazans. *Org. Biomol. Chem.* **2003**, *1* (6), 1067–1072.

- (29) Gatti, R.; Gioia, M. G.; Di Pietra, A. M. *Anal. Chim. Acta* **2002**, *474*, 11–20.
- (30) Gavlik, K. D.; Lesogorova, S. G.; Sukhorukova, E. S.; Subbotina, J. O.; Slepukhin, P. A.; Benassi, E.; Belskaya, N. P. *Eur J Org Chem* **2016**, *2016*, 2700–2710.
- (31) Soujanya, T.; Krishna, T. S. R.; Samanta, A. *J. Phys. Chem.* **1992**, *96*.
- (32) Saroja, G.; Soujanya, T.; Ramachandram, B.; Samanta, A. *J. Fluoresc.* **1998**, *8*, 405–410.
- (33) Chersi, A.; di Modugno, F.; Rosanò, L. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* **1997**, *1336*, 83–88.
- (34) Chersi, A.; Sezzi, M. L.; Romano, T. F.; Evangelista, M.; Nista, A. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* **1990**, *1034*, 333–336.
- (35) Haugland, R. P. *Handbook of Fluorescent Probes and Research Products*; Molecular Probes, 2002.
- (36) Vivès, E.; Lebleu, B. *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 5389–5391.
- (37) Kei Lau, S.; Zaccardo, F.; Little, M.; Banks, P. *J. Chromatogr. A* **1998**, *809*, 203–210.
- (38) Amat-Guerri, F.; Costela, A.; Figuera, J. M.; Florido, F.; Sastre, R. *Chem. Phys. Lett.* **1993**, *209*, 352–356.
- (39) Arbeloa, I. L.; Ojeda, P. R. *Chem. Phys. Lett.* **1981**, *79* (2), 347–350.
- (40) Oswald, B.; Lehmann, F.; Simon, L.; Terpetschnig, E.; Wolfbeis, O. S. *Anal. Biochem.* **2000**, *280*, 272–277.
- (41) Kukrer, B.; Akkaya, E. U. *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 9125–9128.
- (42) Williams, D. J. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1984**, *23*, 690–703.
- (43) Patonay, G.; Salon, J.; Sowell, J.; Strekowski, L. *Molecules* **2004**, *9*, 40–49.
- (44) Tung, C.-H. *Pept. Sci.* *76*, 391–403.
- (45) Wamhoff, H. *Elsevier* **1984**.
- (46) Tome, A. In *Science of Synthesis: Houben-Weyl Methods of Molecular Transformations Vol. 13*; Thieme Verlag, 2004.
- (47) Krivopalov, V.; Shkurko, O. *Russ. Chem. Rev.* **2005**.
- (48) Yet, L. In *Modern Heterocyclic Chemistry*; Wiley-Blackwell, 2011; pp 989–1045.
- (49) Singh, H.; Sindhu, J.; Khurana, J. M. *J. Lumin.* **2015**, 340–350.
- (50) Singh, H.; Sindhu, J.; Khurana, J. M.; Sharma, C.; Aneja, K. R. *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, *77*, 145–154.
- (51) Singh, H.; Sindhu, J.; Khurana, J. M. *Sens. Actuators B Chem.* **2014**, *192*, 536–542.
- (52) Padalkar, V. S.; Lanke, S. K.; Chemate, S. B.; Sekar, N. *J. Fluoresc.* **2015**, *25*, 985–996.
- (53) Zhang, Y.; Ye, X.; Petersen, J. L.; Li, M.; Shi, X. *J. Org. Chem.* **2015**, 3664–3669.
- (54) Liu, Y.; Yan, W.; Chen, Y.; Petersen, J. L.; Shi, X. *Org. Lett.* **2008**, 5389–5392.
- (55) Yan, W.; Wang, Q.; Lin, Q.; Li, M.; Petersen, J. L.; Shi, X. *Chem. – Eur. J.* **2011**, *17*, 5011–5018.
- (56) Chen, Y.; Wu, J.; Ma, S.; Zhou, S.; Meng, X.; Jia, L.; Pan, Z. *J. Mol. Struct.* **2015**, *1089*, 1–8.
- (57) Huisgen, R. *Angew. Chem. Int Ed* **1963**, *2*, 565–598.
- (58) Kolb, H. C.; Finn, M.; Sharpless, B. K. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2001**, *40*, 2004–2021.
- (59) Guru, M. M.; Punniyamurthy, T. *J Org Chem* **2012**, *77*, 5063–5073.
- (60) Chevallier, F.; Blin, T.; Nagaradja, E.; Lassagne, F.; Roisnel, T.; Halauko, Y. S.; Matulis, V. E.; Ivashkevich, O. A.; Mongin, F. *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10*, 4878–4885.
- (61) María, D.; Claramunt, R. M.; Bobosik, V.; Torralba, C. M.; Torres, R. M.; Alkorta, I.; Elguero, J. *Tetrahedron* **2013**, *69*, 3027–3038.
- (62) Mitchell, W.; of Organic, P.-R. *Ark. Online J. Org. Chem.* **2010**, 34–54.

- (63) Liu, W.; Li, Y.; Xu, B.; Kuang, C. *Org. Lett.* **2013**, *15*, 2342–2345.
- (64) Behbehani, H.; Ibrahim, H. M.; Makhseed, S. *Arkivoc* **2010**, *2010*, 267–282.
- (65) Bakulev, V. A.; Beryozkina, T.; Thomas, J.; Dehaen, W. *Eur. J. Org. Chem.* **2017**, 262–294.
- (66) Francesca, D.; Frenna, V.; Lanza, C.; Macaluso, G.; Marullo, S.; Spinelli, D.; Spisani, R.; Petrillo, G. *Tetrahedron* **2010**, *66*, 5442–5450.
- (67) Belskaya, N.; Koksharov, A.; Lesogorova, S.; Slepukhin, P.; Bakulev, V. *Russ Chem B* **2011**, *60*, 889–895.
- (68) Francesca, D.; Marullo, S.; Vitale, P.; Noto, R. *Eur. J. Org. Chem.* **2011**, *2011*, 5681–5689.
- (69) Maurizio, D.; Frenna, V.; Marullo, S.; Racioppi, R.; Spinelli, D.; Viggiani, L. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2012**, *11*, 1383–1388.
- (70) Belskaya, N. P.; Demina, M. A.; Sapognikova, S. G.; Fan, Z.-J.; Zhang, H.-K.; Dehaen, W.; Bakulev, V. A. *Arkivoc* **2008**, *2008*, 9–21.
- (71) Gattuso, G.; Nepogodiev, S. A.; Stoddart, J. F. *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 1919–1958.
- (72) Khan, A. R.; Forgo, P.; Stine, K. J.; T, D., Valerian. *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 1977–1996.
- (73) Engeldinger, E.; Armspach, D.; Matt, D. *Chem Rev* **2003**, *103*, 4147–4173.
- (74) Rekharsky, M. V.; Inoue, Y. *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 1875–1918.
- (75) Connors, K. A. *Chem Rev* **1997**, *97*, 1325–1358.
- (76) Ogoshi, T.; Harada, A. *Sensors* **2008**, *8*, 4961–4982.
- (77) Dodziuk, H.; Danikiewicz, W.; Grabner, G.; Krois, D.; Brinker, U. H.; Bilewicz, R.; Chmurski, K.; Kunitake, M.; Ohira, A. *Cyclodextrins and Their Complexes: Chemistry, Analytical Methods, Applications*; Wiley, 2006.
- (78) Carell, T.; Vrabel, M. *Top Curr Chem* **2016**, *374*, 9.
- (79) Hein, J. E.; Fokin, V. V. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 1302–1315.
- (80) Zhu, L.; Brassard, C. J.; Zhang, X.; Guha, P. M.; Clark, R. J. *Chem. Rec.* **2016**, *16*, 1501–1517.
- (81) Liang, L.; Astruc, D. *Coord. Chem. Rev.* **2011**, *255*, 2933–2945.
- (82) Meldal, M.; Tornøe, C. W. *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 2952–3015.
- (83) Tornøe, C. W.; Christensen, C.; Meldal, M. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 3057–3064.
- (84) Rostovtsev, V. V.; Green, L. G.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B. *ChemInform* **2002**, *33*, 45–45.
- (85) Hirose, K. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **2001**, *39*, 193–209.
- (86) Schalley, C. A. *Analytical Methods In Supramolecular Chemistry*; Wiley, 2007.
- (87) Thordarson, P. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *40*, 1305–1323.
- (88) Schneider, H.-J.; Yatsimirsky, A. K. *Principles and Methods in Supramolecular Chemistry*; 2000.
- (89) Benesi, H. A.; Hildebrand, J. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1949**, *71*, 2703–2707.
- (90) Motulsky, H.; Christopoulos, A. In *Fitting Models to Biological Data Using Linear and Nonlinear Regression*; GraphPad, 2004; pp 47–57.
- (91) Ouchi, M.; Inoue, Y.; Wada, K.; Iketani, S.; Hakushi, T.; Weber, E. *J. Org. Chem.* **1987**, *52*, 2420–2427.
- (92) Jia, Z.; Lonsdale, D. E.; Kulis, J.; Monteiro, M. J. *ACS Macro Lett.* **2012**, *1*, 780–783.
- (93) Pinto, S. M.; Lourenço, M. A.; Calvete, M. J.; Abreu, A. R.; Rosado, M. T.; Burrows, H. D.; Pereira, M. M. *Inorg. Chem.* **2011**, *50*, 7916–7918.
- (94) Gazit, A.; Yaish, P.; Gilon, C.; Levitzki, A. *J Med Chem* **1989**, *32*, 2344–2352.
- (95) Kalia, J.; Raines, R. T. *Angew. Chem. Int Ed* **2008**, *47*, 7523–7526.
- (96) Hadzima, M. Fluorescenčně Značené Ligandy μ -Opioidních Receptorů. Bakalářská práce, Univerzita Karlova v Praze: Praha, 2016.

- (97) Bednářová, E. Příprava Derivátů Cyklodextrinů Použitelných pro Modifikace Pevných Povrchů. Diplomová práce, Univerzita Karlova v Praze: Praha, 2014.
- (98) Bongers, K. M.; van den Berg, R. J. B. H. N.; Heitman, L. H.; IJzerman, A. P.; Oosterom, J.; Timmers, C. M.; Overkleeft, H. S.; van der Marel, G. A. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 4841–4856.
- (99) Chen, Y.; Zhuo, Z.-J.; Cui, D.-M.; Zhang, C. *J. Organomet. Chem.* **2014**, *749*, 215–218.
- (100) Sanders, J. In *Comprehensive Supramolecular Chemistry*; Atwood, J., Davies, J., Macnicol, D., Vöggele, F., Eds.; 1996.
- (101) Jacq, J.; Pasau, P. *Chem. – Eur. J.* **2014**, *20*, 12223–12233.
- (102) Hamad, A.-M.; Khalil, K.; Doa'a, A.-D.; Elnagdi, M. *Molecules* **2010**, *15*, 3302–3310.
- (103) Zhu, X.; Chen, Y.; Chen, Y.; Wang, J.; Su, W. *Lett. Org. Chem.* **2014**, *11*, 621–626.