

UNIVERZITA KARLOVA  
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ  
KATEDRA FARMACEUTICKÉ CHEMIE A FARMACEUTICKÉ ANALÝZY



**OVLIVNĚNÍ  $pK_a$  ROZPOZNÁVACÍ ČÁSTI  
AZAFTALOCYANINOVÝCH SENZORŮ II**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MARTINA KARLÍKOVÁ



Školitel: prof. PharmDr. Petr Zimčík, Ph.D.

Hradec Králové, 2019



„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci jsou řádně citovány. Práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové

.....



Na tomto místě bych chtěla velmi poděkovat svému školiteli prof. PharmDr. Petru Zimčíkovi, Ph.D. za obrovskou trpělivost a rady při vzniku této práce. Také bych ráda poděkovala celému kolektivu Azaphthalocyanine group za přátelské prostředí a pomoc při práci v laboratoři.

Za změření dat bych ráda poděkovala následujícím pracovníkům: Doc. PharmDr. Jiří Kuneš, CSc. (NMR spektra), Iva Vencovská (IČ spektra), Věnceslava Hronová (elementární analýzy), PharmDr. Juraj Lenčo, Ph.D. (MS spektra).

Práce vznikla za finanční podpory projektů Specifického vysokoškolského výzkumu (SVV 260 401) a Grantové agentury Univerzity Karlovy (GAUK 1168217).



# Obsah

1.	Abstrakt.....	8
2.	Abstract.....	9
3.	Seznam použitých zkratk ..... 10	10
4.	Cíl práce.....	11
5.	Teoretická část .....	12
5.1.	Charakteristika.....	12
5.2.	Použití Pc a AzaPc.....	14
5.2.1.	Průmyslové využití .....	15
5.2.2.	Fotodynamická terapie.....	16
5.2.3.	Zhášedce fluorescence .....	18
5.3.	Fluorescenční senzory .....	19
5.3.1.	ICT a PET .....	19
5.3.2.	Využití fluorescenčních senzorů.....	20
5.3.3.	AzaPc jako fluorescenční senzory .....	22
5.3.4.	Využití AzaPc fluorescenčních senzorů .....	22
6.	Experimentální část.....	25
6.1.	Příprava 1-(3-brom-4-hydroxyfenyl)ethan-1-onu (1).....	26
6.1.1.	Reakce 4-hydroxyacetofenonu s kyselinou bromovodíkovou a peroxidem vodíku .....	26
6.1.2.	Reakce 4-hydroxyacetofenonu s bromem a triethylaminem .....	26
6.1.3.	Reakce 4-hydroxyacetofenonu s bromem a octanem sodným v DCM ....	26
6.1.4.	Reakce 4-hydroxyacetofenonu s bromem a 1,4-diazabicyklo[2,2,2]oktanem.....	27
6.1.5.	Reakce 4-hydroxyacetofenonu s bromem a octanem sodným v prostředí kyseliny octové .....	27
6.1.6.	Reakce 4-hydroxyacetofenonu s bromem a methenaminem .....	27

6.2.	Příprava 4-hydroxy-3-nitroacetofenonu (4).....	29
6.3.	Příprava 3-brom-4-hydroxy-5-nitroacetofenonu (5).....	29
6.4.	Příprava 5-(4-hydroxyfenyl)pyrazin-2,3-dikarbonitrilu (6).....	30
6.5.	Příprava 5-(3-brom-4-hydroxyfenyl)pyrazin-2,3-dikarbonitrilu (7).....	31
6.6.	Příprava 5-(3-brom-4-hydroxy-5-nitrofenyl)pyrazin-2,3-dikarbonitrilu (8)	32
6.7.	Příprava 5-(3,5-di- <i>terc</i> -butyl-4-hydroxyfenyl)pyrazin-2,3-dikarbonitrilu (9).. .....	33
6.8.	Příprava 1,2-bis(4-methoxyfenyl)ethan-1,2-dionu (12).....	34
6.9.	Příprava 1,2-bis(4-hydroxyfenyl)ethan-1,2-dionu (14) .....	35
6.10.	Příprava 5,6-bis(4-hydroxyfenyl)pyrazin-2,3-dikarbonitrilu (15) .....	35
6.11.	Příprava 2-(4-hydroxyfenyl)-9,10,16,17,23,24-hexakis( <i>terc</i> -butylsulfanyl)- 1,4,8,11,15,18,22,25-(oktaaza)ftalocyaninato hořečnatého komplexu (16).....	36
6.12.	Příprava 2-(4-hydroxyfenyl)-9,10,16,17,23,24-hexakis( <i>terc</i> -butylsulfanyl)- 1,4,8,11,15,18,22,25-(oktaaza)ftalocyaninu (18) .....	38
6.13.	Příprava 2-(4-hydroxyfenyl)-9,10,16,17,23,24-hexakis( <i>terc</i> -butylsulfanyl)- 1,4,8,11,15,18,22,25-(oktaaza)ftalocyaninato zinečnatého komplexu (19).....	39
6.14.	Příprava 2-(3-brom-4-hydroxyfenyl)-9,10,16,17,23,24-hexakis( <i>terc</i> - butylsulfanyl)-1,4,8,11,15,18,22,25-(oktaaza)ftalocyaninato hořečnatého komplexu (20) .....	40
6.15.	Příprava 2-(3-brom-4-hydroxyfenyl-5-nitro)-9,10,16,17,23,24-hexakis( <i>terc</i> - butylsulfanyl)-1,4,8,11,15,18,22,25-(oktaaza)ftalocyaninato hořečnatého komplexu (21) .....	41
6.16.	Příprava 2-[3,5-di( <i>terc</i> -butyl)-4-hydroxyfenyl]-9,10,16,17,23,24- hexakis( <i>terc</i> -butylsulfanyl)-1,4,8,11,15,18,22,25-(oktaaza)ftalocyaninu (22) .....	42
6.17.	Příprava 2-[3,5-di( <i>terc</i> -butyl)-4-hydroxyfenyl]-9,10,16,17,23,24- hexakis( <i>terc</i> -butylsulfanyl)-1,4,8,11,15,18,22,25-(oktaaza)ftalocyaninato hořečnatého komplexu (23) .....	43
6.18.	Příprava 2,3-bis(4-hydroxyfenyl)-9,10,16,17,23,24-hexakis( <i>terc</i> - butylsulfanyl)-1,4,8,11,15,18,22,25-(oktaaza)ftalocyaninato hořečnatého komplexu (24) .....	44

6.19.	Příprava	2,3-bis(4-hydroxyfenyl)-9,10,16,17,23,24-hexakis( <i>tert</i> -butylsulfanyl)-1,4,8,11,15,18,22,25-(oktaaza)ftalocyaninu (25) .....	45
6.20.	Příprava	2,3-bis(4-hydroxyfenyl)-9,10,16,17,23,24-hexakis( <i>tert</i> -butylsulfanyl)-1,4,8,11,15,18,22,25-(oktaaza)ftalocyaninato zinečnatého komplexu (26) .....	46
6.21.	Příprava mikroemulzí .....		47
6.22.	Příprava liposomů.....		48
6.23.	Testování připravených látek .....		48
7.	Diskuze .....		50
7.1.	Příprava prekurzorů .....		52
7.2.	Příprava AzaPc .....		55
7.3.	Fotofyzikální vlastnosti .....		56
7.3.1.	AzaPc .....		57
7.3.2.	Prekurzory.....		60
7.3.3.	Přehled $pK_a$ pro AzaPc a prekurzory .....		62
8.	Závěr .....		64
9.	Použitá literatura .....		65
10.	Seznam příloh .....		70

# 1. Abstrakt

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy

**Kandidát:** Martina Karlíková

**Školitel:** prof. PharmDr. Petr Zimčík, Ph.D.

**Název diplomové práce:** Ovlivnění  $pK_a$  rozpoznávací části azaftalocyaninových senzorů II.

V návaznosti na předchozí činnost naší výzkumné skupiny byly v rámci této práce syntetizovány azaftalocyaniny (AzaPc) obsahující ve své rozpoznávací části jednu nebo dvě fenolické skupiny, díky kterým mohou fungovat jako fluorescenční senzory v závislosti na pH prostředí a  $pK_a$  rozpoznávací části. To může být modifikováno různými substituenty.

Syntéza AzaPc byla zahájena syntézou jejich prekurzorů. Výchozí látkou byl ve většině případů 4-hydroxyacetofenon, který byl dále vhodně modifikován elektrofilní substitucí. Produkty byly poté oxidovány na vicinální ketoaldehydy s použitím oxidu seleničitého a následně ihned kondenzovány s diaminomaleonitrilem na příslušný pyrazin-2,3-dikarbonitril. Všechny syntézy byly zakončeny cyklotetramerizační reakcí takto připraveného pyrazin-2,3-dikarbonitrilu s 5,6-bis(*terc*-butylsulfanyl)pyrazin-2,3-dikarbonitrilem za použití butanolátu hořečnatého jako iniciátoru. Takto bylo získáno šest rozdílných kongenerů, ze kterých byl sloupcovou chromatografií požadovaný kongener typu ABBB izolován. Část vzniklých AzaPc, které obsahovaly centrální hořečnatý kationt byly převedeny na bezkovové AzaPc a následně na zinečnaté komplexy.

Poté byla změřena absorpční a fluorescenční spektra AzaPc i prekurzorů v pufrách o různém pH. U AzaPc byla v kyselém pH pozorována výrazná červená fluorescence, která po ionizaci v bazickém prostředí postupně mizela. Podle fluorescence byla pro každou látku stanovena hodnota  $pK_a$  rozpoznávací části, která se pohybovala v rozsahu od 5 do 10,5. Na rozdíl od AzaPc byly pro pyrazinové prekurzory typické změny v absorpčních spektrech podle měnícího se pH, které se projevovaly rozdílným zbarvením roztoku.

## 2. Abstract

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmaceutical Chemistry and Pharmaceutical Analysis

**Candidate:** Martina Karlíková

**Supervisor:** prof. PharmDr. Petr Zimčík, Ph.D.

**Title of diploma thesis:** Modulation of  $pK_a$  of the recognition moiety of azaphthalocyanine sensors II.

Our research group recently developed the sensors based on azaphthalocyanine (AzaPc) core containing one or two phenolic groups as recognition moiety and because of them, the AzaPcs can be utilized as fluorescent sensors. The fluorescent state of the molecule depends on the pH of the environment and the  $pK_a$  of the recognition moiety. The latter can be modified by altering the substituents on phenol.

The formation of AzaPcs was initiated by the synthesis of their precursors. In most of the cases, the starting material was 4-hydroxyacetophenon that was modified by electrophilic substitution. The products were oxidized to corresponding vicinal ketoaldehydes using selenium dioxide and immediately condensed with diaminomaleonitrile to substituted pyrazine-2,3-dicarbonitriles. Synthesis were completed by the cyclotetramerization reaction of this dicarbonitrile with 5,6-bis(*tert*-butylsulfanyl)pyrazine-2,3-dicarbonitrile using magnesium butoxide as initiator.

Six different congeners were obtained by this reaction from which the required congener with one asymmetric part was isolated by the column chromatography. Some of the synthesized AzaPcs in the form of magnesium complex were converted to metal-free derivatives and subsequently to zinc complexes. Finally, fluorescence and absorbance were measured. In acidic environment, AzaPcs had intensive red fluorescence which was turned off after ionization at higher pH. Based on the fluorescence changes, the  $pK_a$  value of recognition moiety was determined for each molecule. The values ranged from 5 to 10.5. Unlike AzaPcs, pyrazine precursors showed intense changes in absorption spectra visible to the naked eye.

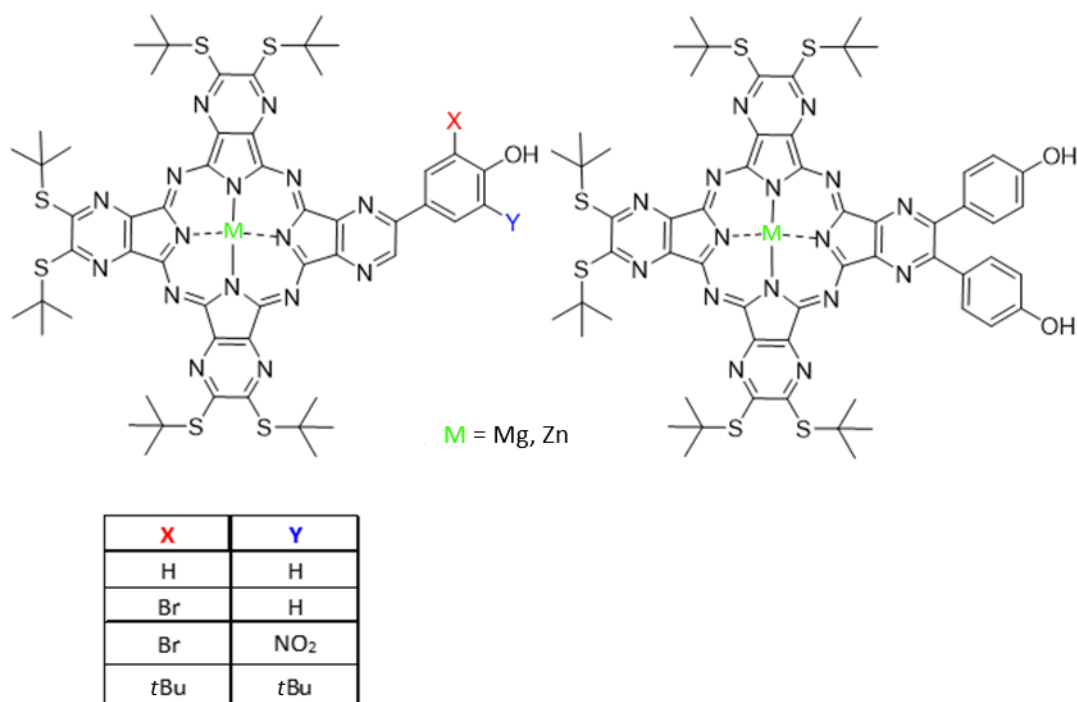
### 3. Seznam použitých zkratek

4-HA	4-hydroxyacetofenon
AcOH	kyselina octová
AzaPc	azaftalocyanin
BBIM 12	bisbenzoimidazoliový katalyzátor
DABCO	1,4-diazabicyklo[2,2,2]oktan
DAMN	diaminomaleonitril
DBU	1,8-diazabicyklo[5,4,0]undecen
DCM	dichlormethan
DOPC	dioleoylfosfatidylcholin
DMSO	dimethylsulfoxid
EtAc	ethyl-acetát
FRET	Försterův rezonanční přenos energie
HEX	hexan
ICT	intramolekulární přenos náboje
MeOH	methanol
NaOAc	octan sodný
NMR	nukleární magnetická rezonance
Pc	ftalocyanin
PCR	polymerázová řetězová reakce
PDT	fotodynamická terapie
PS	fotosenzitizér
PET	světlem vyvolaný přenos elektronu
TEA	triethylamin
THF	tetrahydrofuran
TLC	tenkovrstvá chromatografie
TOL	toluen
VIS	viditelná oblast spektra

## 4. Cíl práce

Cílem mé diplomové práce byla syntéza nesymetrických azaftalocyaninů (AzaPc), obsahujících jednu, případně dvě fenolické skupiny, a následné stanovení jejich fotofyzikálních vlastností a možného využití jako fluorescenčních senzorů. Jak již bylo zjištěno v naší výzkumné skupině dříve, tyto látky fungují jako fluorescenční senzory citlivé na změny pH, kdy ionizací fenolu senzoričké části dochází k silnému poklesu fluorescence.<sup>1</sup> Děje se tak kvůli intramolekulárnímu přenosu náboje (ICT), protože v bazickém prostředí se z fenolické skupiny, která je pouze slabým donorem stává fenolát, který je donorem silným.

V jaké oblasti pH bude senzor citlivý je určeno zejména hodnotou  $pK_a$  jeho senzoričké (rozpoznávací) části. Hodnotu  $pK_a$  fenolické rozpoznávací části lze modifikovat pomocí substituentů X a Y (Obrázek 1), kdy cílem syntéz bylo získání rozmanitého spektra senzorů a také posunutí k hodnotám  $pK_a$  vhodným pro biologické aplikace. Bylo tak navázáno na předchozí práce, protože dříve připravené senzory měly příliš nízké,<sup>1</sup> či vysoké<sup>2</sup>  $pK_a$ , které bylo pro biologické aplikace nevhodné.



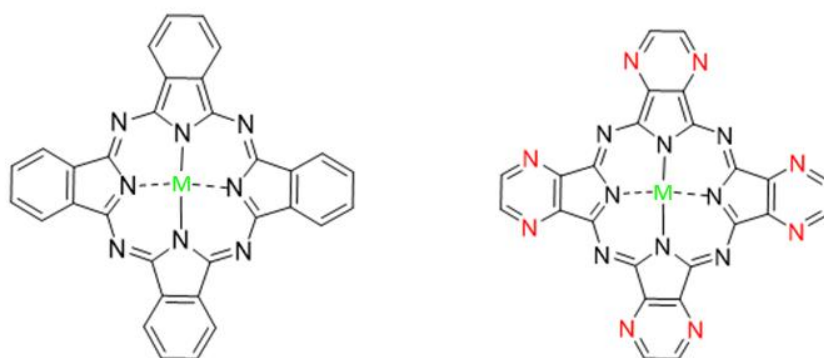
Obrázek 1: Požadované struktury cílových látek

## 5. Teoretická část

### 5.1. Charakteristika

AzaPc, a to hlavně jejich podskupina tetrapyrazinoporfyraziny, jsou nejprobádanějšími aza-analogy ftalocyaninů (Pc). Pc jsou syntetické látky, které jsou odvozeny od přírodních porfyrinů. Stejně jako porfyriny obsahují Pc, resp. AzaPc systém konjugovaných vazeb, který jim dodává různé zbarvení od zelené, přes modrou až k fialové, podle absorpce v různé oblasti světelného spektra a stejně jako porfyriny také mohou do centra své molekuly chelatovat kationt kovu.<sup>3</sup>

Makrocyklus Pc tvoří čtyři molekuly isoindolů, které jsou spojeny azomethinovými můstky.<sup>4</sup> Oproti Pc obsahují AzaPc v benzenovém kruhu namísto uhlíku atom dusíku (Obrázek 2) a podle uspořádání a počtu těchto dusíků se odvozují látky s pyridinovými, pyrazinovými jádry apod.<sup>3</sup>

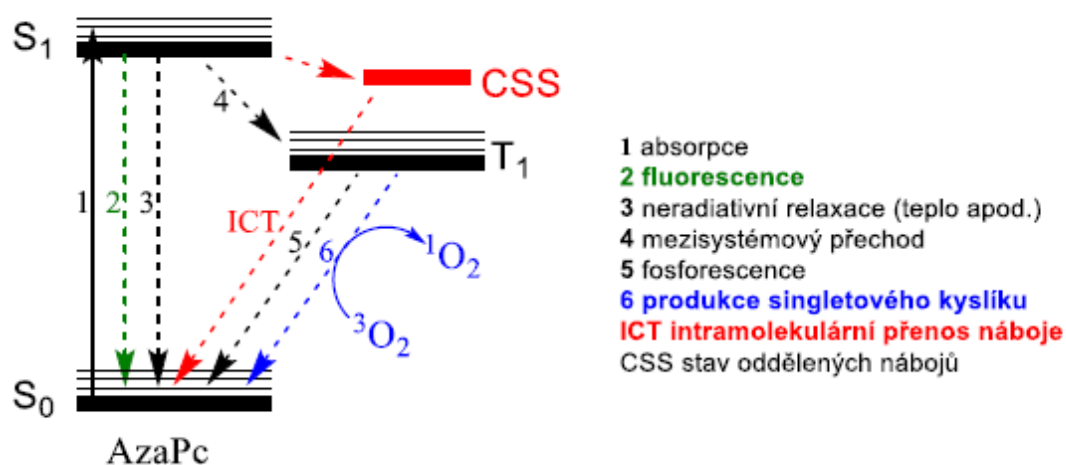


**Obrázek 2: Obecná struktura Pc (vlevo) a AzaPc (vpravo), M znázorňuje chelatovaný kationt kovu**

Nežádoucí vlastností těchto planárních makrocyklů je agregace, která znesnadňuje jejich charakterizaci a také snižuje produkci singletového kyslíku<sup>5</sup> a fluorescence<sup>1</sup>, čímž se zhoršují jejich fotofyzikální vlastnosti. Agregaci se dá zabránit navázáním vhodných substituentů na periferii, ať už objemného *tert*-butylu, který se ukázal jako vhodnější varianta, či dlouhého alkylového řetězce. Další možností, jak agregaci snížit je použití vhodného rozpouštědla, kdy se jako vhodná jeví koordinační rozpouštědla např. THF, která jsou schopna koordinovat centrální kationt. Naopak ve vodě dochází zvyšováním poměru dimer/monomer k prakticky plné agregaci. Mimo

těchto způsobů je možné agregaci ovlivnit přidáním aditiv např. DMSO. Určitý efekt má i centrální kationt, protože čím má centrální kov více koordinačních vazeb, tím se agregace snižuje.<sup>5</sup> Centrální kationt má vliv i na fotofyzikální vlastnosti AzaPc. Látky s chelatovaným hořečnatým kationtem mají lepší produkci fluorescence. Naopak AzaPc, které jako centrální atom obsahují zinečnatý kationt, mají vyšší produkci singletového kyslíku.<sup>6</sup>

Produkcí jak fluorescence, tak singletového kyslíku lze považovat za nejdůležitější a nejzkoumanější fotofyzikální vlastnosti AzaPc. AzaPc mohou díky svému systému dvojných konjugovaných vazeb absorbovat foton, čímž se dostanou do excitovaného stavu. Následuje několik možností, jak se látka může vrátit zpátky do stavu základního, jak je vidět z Jablonského diagramu (Obrázek 3).<sup>7</sup>



**Obrázek 3: Jablonského diagram** (převzato z NOVÁKOVÁ, V. Studium strukturních a fotofyzikálních aspektů azaftalocyaninů se zaměřením na jejich senzorké vlastnosti. Habilitační práce. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Hradec Králové 2014.)

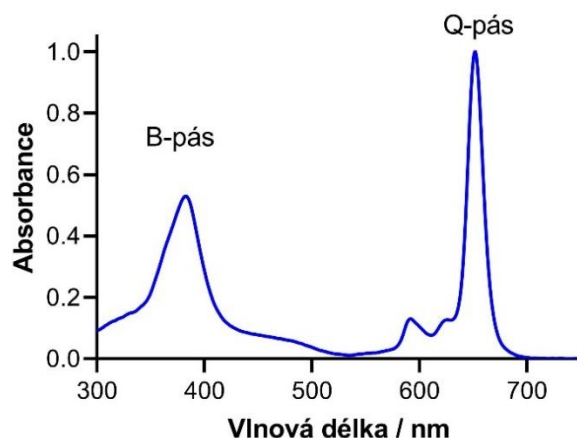
Jednou z možností je luminescence. Jedná se o zářivý proces, který se rozděluje na fluorescenci a fosforescenci. Pokud se jedná o fluorescenci, návrat do základního stavu probíhá rychlým vyzářením fotonu ze singletového excitovaného stavu. Fluorescence je typickým jevem pro molekuly s aromatickým kruhem - fluorofory, jako jsou i AzaPc. V případě fosforescence probíhá vyzářením fotonu z tripletového stavu, kam se molekula dostala mezisystémovým přechodem (dochází k inverzi spinu jednoho z vnějších elektronů) a tento návrat do základního stavu je pomalý, protože opět musí

zahrnovat inverzi spinu.<sup>7</sup> Z tripletového stavu se může molekula dostat i produkcí singletového kyslíku, čehož se využívá ve fotodynamické terapii.<sup>3</sup>

Další možností jsou nezářivé procesy, mezi které patří uvolnění tepelné energie a intramolekulární přenos náboje (intramolecular charge transfer, ICT), který je často využíván u AzaPc v návrhu fluorescenčních senzorů (viz níže).<sup>3</sup>

Zastoupení jednotlivých relaxačních přechodů ovlivňují kromě centrálních kationtů také periferní substituce a složení makrocyklu. Při srovnání makrocyklu AzaPc a Pc se obecně u Pc více objevuje produkce singletového kyslíku, zatímco AzaPc mírně preferují fluorescenci.<sup>3</sup>

Dalším charakteristickým znakem AzaPc je tvar jejich absorpčního spektra (Obrázek 4). Toto absorpční spektrum se skládá z vysokoenergetického B-pásu, který se nachází v okolí 350 nm a nízkoenergetického Q-pásu, který je lokalizován nad 650 nm. Přesnou polohu spektra ovlivňuje periferní substituce a centrální kationt. Zatímco B-pás se prakticky nemění, poloha a tvar Q-pásu, který je citlivý i k drobným změnám molekuly, pomáhá nejen k charakterizaci, ale také umožňuje předpovědět chování látky a poukazuje tak např. na agregaci,<sup>5</sup> protonizaci,<sup>8</sup> tvorbu supramolekulárních útvarů<sup>9</sup> nebo na makrocyklus neobsahující centrální kationt.<sup>10</sup>



**Obrázek 4:** Absorpční spektrum AzaPc s vyznačením B-pásu a Q-pásu

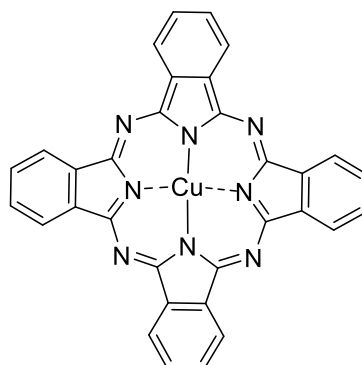
## 5.2. Použití Pc a AzaPc

Díky svým vlastnostem, hlavně chemické stabilitě a rozmanitým fotofyzikálním a spektrálním vlastnostem mají Pc resp. AzaPc široké spektrum využití. Jsou hojně

využívány jako průmyslová barviva,<sup>11</sup> své uplatnění našly ve fotodynamické terapii,<sup>5</sup> použít se mohou také jako různé senzory nebo zhasěče fluorescence.<sup>3</sup>

### 5.2.1. Průmyslové využití

Pc byly jako průmyslová barviva objeveny v roce 1928 ve firmě Scottish Dyes, kdy se při přípravě ftalimidu z kyseliny ftalové a amoniaku ve smaltované nádobě neustále objevovala zelenomodrá nečistota. Jak bylo později zjištěno, jednalo se o komplex Pc, který vznikl reakcí ftalimidu s poškozenou nádobou. V návaznosti na tento objev byly provedeny další experimenty, kterými byly získány Pc s centrálním kationtem např. Fe, Cu a Ni. Postupně byla detailněji charakterizována struktura Pc, byly zlepšovány syntetické metody a popisovány jednotlivé vlastnosti např. rozpustnost, absorpční spektra, oxidačně-redukční potenciál apod. a v roce 1935 byl uveden na trh první komerčně vyráběný měďnatý Pc (Monastral<sup>®</sup> Fast Blue),<sup>11</sup> jehož strukturu ukazuje Obrázek 5.

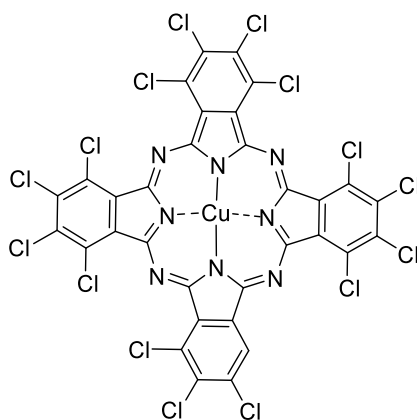


**Obrázek 5: Struktura měďnatého AzaPc**

V dnešní době jsou Pc barviva celosvětově používaná hlavně díky poměru kvality a ekonomické výhodnosti oproti ostatním barvivům. Používají se jako barvy do tiskáren, k nátěrům, potiskům na textil, barvení vláken, plastů, pro různé umělecké techniky nebo jako pigmenty v tetování. Všechna barviva a pigmenty obchodovaná na trhu jsou uvedena v Colour Indexu <https://colour-index.com/> [staženo 20. 4. 2019], kde jsou zaznamenány i jejich struktury a vlastnosti.<sup>11</sup>

Modifikacemi Pc byla postupně z nerozpustných pigmentů vytvořena rozpustná barviva, stejně tak lze modifikovat i odstín a barvu. Měďnatý Pc je modrý, navázáním chloro a bromo substituentů lze získat zelené organické pigmenty (Obrázek 6), a takto

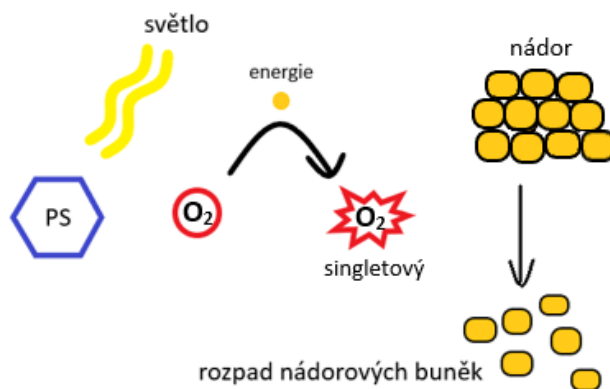
je možné získat různé odstíny od modré přes tyrkysovou až do zelené. Krystalová  $\beta$ -modifikace měďnatého Pc představuje standardní modrý odstín (cyan), který se používá v barevných tiskárnách.<sup>11</sup>



**Obrázek 6: Struktura zeleného pigmentu Green 7 vzniklého chlorací měďnatého Pc**

### 5.2.2. Fotodynamická terapie

Fotodynamická terapie (photodynamic therapy, PDT) se využívá k léčbě rakoviny, lupénky a dalších kožních onemocnění. Tato terapie využívá fotosenzitizer (PS), který absorbuje foton a dostane se tak do excitovaného singletového stavu, následuje mezisystémový přechod do tripletového stavu, ze kterého předá fotosenzitizer energii přímo kyslíku a vznikne tak singletový kyslík (Obrázek 7). Výhodou tohoto procesu je nízká toxicita pro organismus<sup>12</sup> a také vysoká selektivita, jak vyplývá z krátké životnosti singletového kyslíku, díky čemuž je ničena pouze tkáň, ke které se záření dostane.<sup>3</sup>

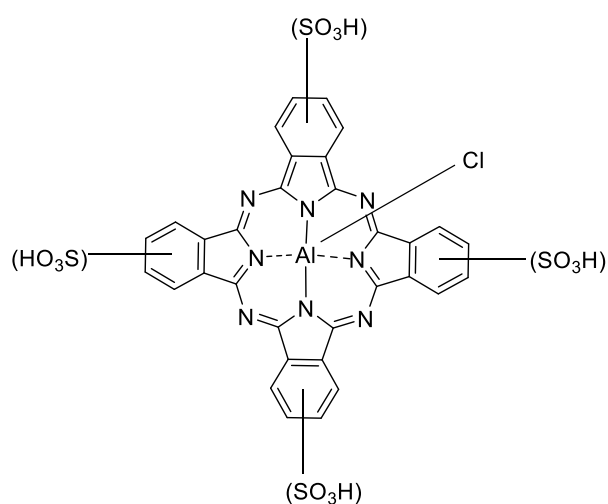


**Obrázek 7: Mechanismus PDT**

Předpoklady, které by měl vhodný PS splňovat, je silná absorpce fotonu v červené oblasti spektra (okolo 660 nm), která je nejvhodnější pro prostup biologickými tkáněmi, a následně preferovat přestup do základního stavu vyzářením singletového kyslíku na úkor ostatních zářivých či nezářivých procesů, jak už bylo popsáno výše. Limitujícím faktorem všech PS je nízká rozpustnost ve vodě a vysoká agregace molekul, která zásadním způsobem snižuje produkci singletového kyslíku. Takto jsou syntetizovány a testovány stále nové látky, ale do klinické praxe se dostane jen jejich zlomek.<sup>12</sup>

Dnes se dají PS rozdělit do tří generací. Do první generace se řadí směsi hematoporfyrinových derivátů (porfimer, (Photofrin<sup>®</sup>)), druhá generace zahrnuje jejich prekurzory (kys. aminolevulová (Levulan<sup>®</sup>)) nebo analogy (temoporfin (Foscan<sup>®</sup>), verteporfin (Visudyne<sup>®</sup>)), které mají lepší fotofyzikální a fotochemické vlastnosti. Třetí generaci představuje PS v kombinaci s cílicí molekulou (např. kys. listová, monoklonální protilátky, steroidy), což zvyšuje selektivitu k nádorovým buňkám a zlepšuje tak účinnost PDT.<sup>13</sup>

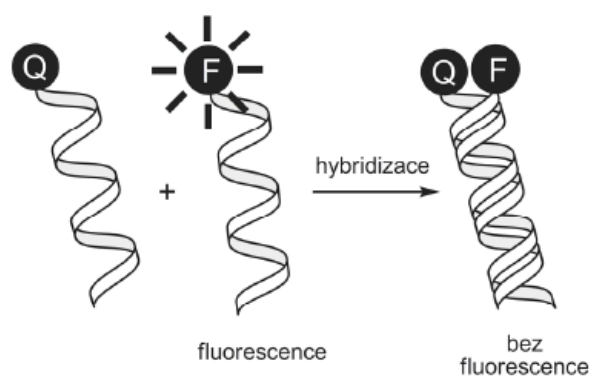
Ze strukturní skupiny Pc, je v současné době v klinické praxi jediný fotosenzitizér - směs sulfonovaných Pc s hlinitým kationtem (přibližný počet sulfonových skupin  $n = 3$ ), který je registrovaný v Rusku pod názvem Photosens<sup>®</sup> k léčbě rakoviny prsu,<sup>14</sup> hlavy a krku<sup>15</sup> (Obrázek 8).



**Obrázek 8: Pc fotosenzitizér Photosens<sup>®</sup>**

### 5.2.3. Zhášee fluorescence

Zhášení fluorescence je jedna ze základních metod při zkoumání různých procesů v biochemii, biologii, genetice apod. Tato metoda zahrnuje kombinaci dvou barviv, konkrétně fluoroforu a zhášee. Po dosažení cíle dokáže zhášec snížit intenzitu fluorescence fluoroforu, což je obecně možné dvěma mechanismy. Prvním je dynamické zhášení fluorescence, kdy dochází k Försterovu rezonančnímu přenosu energie (FRET), který se objevuje při přiblížení dvojice barviv a dojde minimálně částečně k překrytí absorpčních spekter zhášee a emisních spekter fluoroforu. Ve druhém případě dochází ke statickému zhášení, při kterém se přiblížením dvojice barviv vytvoří heterodimer (**Obrázek 9**). K tomuto mechanismu není třeba překryv spekter, stačí jejich blízké přiblížení.<sup>16</sup>



**Obrázek 9: Princip zhášení fluorescence** (převzato z ZIMČÍK, P.; Azaftalocyaniny - od syntéz přes fotochemické a fotofyzikální vlastnosti k aplikacím. *Chem. listy*, **2012**, 106, 275-282).

Ideální zhášec by neměl mít vlastní fluorescenci, proto jsou dnes syntetizovány tzv. „dark quenchers“, které vnitřní fluorescenci nemají. Ve skupině Pc a AzaPc, jsou tyto „dark quenchers“ vytvořeny alkylamino- a dialkylamino- substitucí AzaPc, které vnitřní fluorescenci nemají kvůli ICT (viz níže).<sup>17</sup> AzaPc zhášee mají ve srovnání s komerčně dostupnými „dark quenchers“ vyšší účinnost díky silné absorpci a zároveň jsou díky absorpci v širokém rozsahu vlnových délek vhodnými látkami pro praktické využití, protože účinně překrývají emisní spektra prakticky všech rutinně používaných fluoroforů. Jejich použití je ideální např. v DNA hybridizačních sondách, kde navázáním na oligodeoxynukleotid mohou být využity např. v monitorování polymerázové řetězové reakce (PCR).<sup>16</sup>

Dalším využitím Pc a AzaPc jsou např. tekuté krystaly v LCD technologiích, katalyzátory<sup>18</sup> a fluorescenční senzory kterým bude věnovaná další kapitola.

### 5.3. Fluorescenční senzory

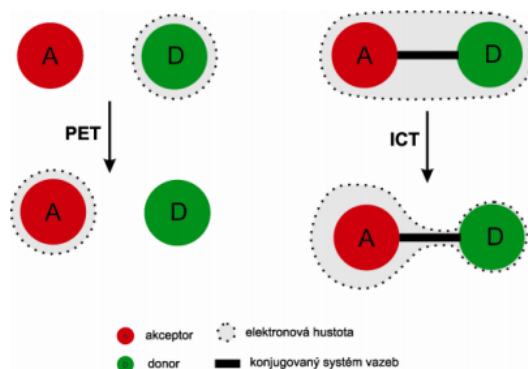
Fluorescenční senzory jsou molekuly složené z rozpoznávací části, která reaguje na změny okolního prostředí (přítomnost analytu) a signální části, zodpovědné za následné vyzáření nebo zhášení fluorescence. Jejich využití pro praktické aplikace je stále širší, a to hlavně kvůli nízké ekonomické náročnosti těchto senzorů a zároveň vysoké citlivosti při detekci fluorescence. Mezi obecně detekované analyty patří především ionty např.  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Cl}^-$ , využít se mohou k detekci  $\text{O}_2$ ,  $\text{CO}_2$  či glukózy, ale stejně tak mohou být senzory citlivé i na změny pH.<sup>7</sup>

Reakce senzorů na podnět, která se projeví změnou fluorescence může probíhat několika mechanismy. Kromě zhášení fluorescence druhou molekulou zhášeče (tzv. intermolekulární zhášení), které bylo popsáno v předchozí kapitole, mohou být senzory založeny na ICT nebo na světlem vyvolaném přenosu elektronu (PET), ke kterým dochází při přechodu z excitovaného do základního stavu. Tímto způsobem dochází ke zhášení v rámci jedné molekuly, tzn. intramolekulárně. Tyto procesy vyžadují přítomnost donoru a akceptoru elektronů v jedné molekule, přičemž rozpoznávací část senzorů se většinou koncipuje jako donor elektronů<sup>2</sup> (např. amino skupina,<sup>1</sup> fenolát). Po excitaci dochází k přesunu elektronu/elektronové hustoty od donoru k akceptoru a po návratu je přijatá energie uvolněna ve formě tepla srážkami s okolními molekulami.<sup>2</sup>

#### 5.3.1. ICT a PET

ICT nebo PET (Obrázek 10) jsou kompetitivní mechanismy relaxace excitovaného stavu k fluorescenci (Obrázek 3). Pokud se v molekule PET nebo ICT odehrává, mají díky své rychlosti přednost před všemi ostatními procesy (např. fluorescencí).<sup>3</sup> Aby mohl ICT proběhnout, musí být splněny podmínky, které závisí na složení molekuly – je nutná přítomnost volného elektronového páru, který funguje jako donor a také elektrondeficitní část, která funguje jako akceptor tohoto volného elektronového páru po excitaci. Tento proces je možné různými způsoby blokovat, čímž

je umožněno přepínání mezi ON-OFF stavem. Blokování je možné například koordinací k citlivým kationtům nebo protonizací.<sup>18</sup>



**Obrázek 10: Zjednodušený mechanismus ICT a PET** (převzato z NOVÁKOVÁ, V. Příprava a studium vlastností azaanalogů ftalocyaninů. Hradec Králové, 2011. Disertační práce. Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové)

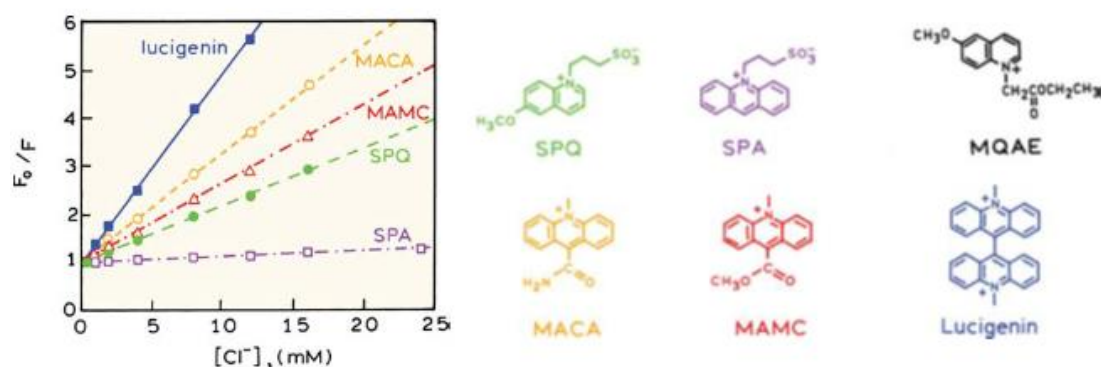
PET je také mechanismem, kterým se může elektron vrátit zpět do základního stavu, na rozdíl od ICT ale nejsou donor a akceptor v konjugaci. Po excitaci tak dochází k „přeskoku“ elektronu na různou omezenou vzdálenost. Důsledkem tohoto procesu je stejně jako u ICT zhášení fluorescence a stejně jako u ICT může docházet k přepínání mezi ON-OFF stavem protonizací nebo koordinací.<sup>19</sup>

### 5.3.2. Využití fluorescenčních senzorů

Fluorescenční senzory pro kationty našly své uplatnění v biologických analýzách např. ke zjištění hladin lithia v krvi, což je důležité u pacientů s maniodepresivní psychózou, testování hladiny těžkých kovů v rámci toxicity,<sup>20</sup> zkoumání transportu iontových kanálů nebo ke stanovení elektrolytů v krvi.<sup>21</sup>

Ze senzorů založených na detekci aniontů jsou pro biologické aplikace nejdůležitější senzory pro chloridové anionty. Tyto senzory fungují na mechanismu kolizního zhášení, což znamená, že čím je zhášení fluorescence silnější, tím větší je přítomnost zhášedce.<sup>7</sup> Prvním senzorem, který byl použit ke sledování transportu chloridových aniontů byl 6-methoxy-*N*-(3-sulfopropyl)chinolinium (SPQ), největší citlivost k chloridovým iontům však vykazuje lucigenin

(*N,N*-dimethyl-9,9-bisakridinium) a nejlepší optické vlastnosti má *N*-sulfopropylakridium (MACA),<sup>22</sup> jak ukazuje (Obrázek 11).



**Obrázek 11: Grafické porovnání jednotlivých sloučenin odvozených od chininu** (převzato z LAKOWICZ, J. R.; Principles of fluorescence spectroscopy. Vol. 3., New York: Springer, 2006, 953, ISBN 978-0-387-31278-1.

Mimo senzory založené na detekci iontů existují senzory, které snižováním a zvyšováním intenzity fluorescence reagují na změny pH. Tyto senzory jsou využívány v medicíně, biotechnologiích nebo k monitorování životního prostředí. Důležitými zkoumanými analyty jsou  $CO_2$  a  $O_2$  a jejich přítomnost v arteriální krvi, která je měřena u předčasně narozených dětí nebo u pacientů na jednotce intenzivní péče. U těchto pacientů dochází k rychlým změnám stavu, proto je potřeba rychlá a přesná interpretace výsledků. Dosavadní metody však nebyly ideální, protože byly časově náročné, a i pro personál představovaly určitá rizika např. riziko infekce virem HIV.<sup>7</sup>

Jedním z prvních senzorů citlivých na změny pH byl fluorescein, který byl také využit ke zjištění obsahu  $CO_2$  měřením hydrogenuhličitanů. Fluorescein vytváří různé formy, které jsou závislé na pH a z nichž pouze dvě aniontové formy jsou schopny fluorescence. Jeho nevýhodou však byl rychlý únik z buněk a jeho absorpce a emise v nízkých vlnových délkách okolo 450 nm, proto byly zkoumány jeho deriváty a další senzory s vhodnějšími vlastnostmi.<sup>7</sup>

### 5.3.3. AzaPc jako fluorescenční senzory

Vzhledem ke svým vlastnostem, našly AzaPc uplatnění i v oblasti fluorescenčních senzorů, kde jakožto fluorofory mohou reagovat změnami fluorescence na změny okolního prostředí, nebo na přítomnost látky, ke které jsou vnímavé.<sup>7</sup> Zatímco Pc nebyly pro senzorické použití nejvhodnější, vzhledem k málo elektrondeficitnímu jádru, které neumožňuje účinný ICT nebo PET, jejich aza-analogy měly potenciál daleko větší. Díky své schopnosti absorbovat foton v červené oblasti viditelného spektra okolo vlnových délek 630 nm a následné emisi jsou pro aplikace *in vivo* vhodné. Výhodou absorpce a emise v červené oblasti VIS je vysoká prostupnost světla tkáněmi, omezení světelného rozptylu a také se zlepšil poměr signál/šum.<sup>21</sup>

AzaPc substituované vhodnými donory (např. aminy,<sup>1</sup> fenolická skupina<sup>2</sup>) podstupují ICT, protože v tomto případě je elektron-donorová skupina přímo v konjugaci s makrocyklem, který slouží jako akceptor a po excitaci dojde k přerozdělení náboje ve prospěch akceptoru a poté k rychlému návratu do základního stavu bez vyzaření fluorescence.<sup>3</sup> Vzhledem k silně elektrondeficitnímu jádru, se AzaPc při konstrukci senzorů uplatňují jako akceptory elektronů. Makrocycklus, který je v excitovaném stavu, se může ovšem v případě PET chovat také jako donor. Takto jsou využívány například konjugáty Pc-fullerenů, díky schopnosti fullerenů přijmout elektron. Tyto systémy se pak uplatňují ve výzkumu konverze solární energie na elektrickou. Stejně zajímavé elektronové vlastnosti se objevují u konjugátů Pc-flavin nebo Pc-porfyrin.<sup>23</sup>

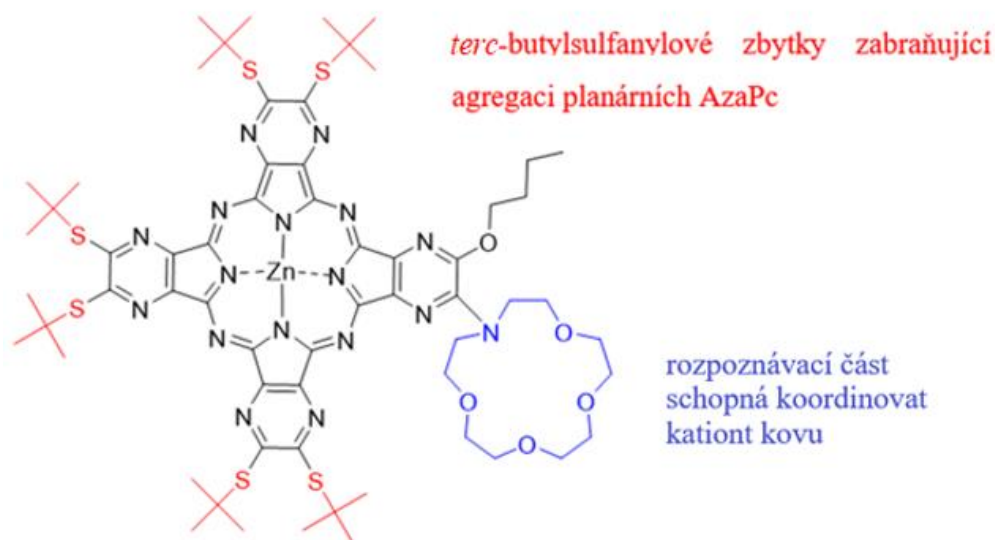
Vlastnosti senzorů ovlivňují také chelatované centrální kationty. Pro fluorescenční senzory je nejvýhodnější hořčnatý kationt, protože převládá přechod z excitovaného stavu fluorescencí na úkor singletového kyslíku.<sup>6</sup>

### 5.3.4. Využití AzaPc fluorescenčních senzorů

Senzory založené na AzaPc, které byly v rámci naší skupiny dříve syntetizovány a zkoumány byly založené na detekci kationtů nebo na změnách pH prostředí.

K detekci kationtů byly syntetizovány AzaPc senzory, které měly navázanou 1-aza-15-crown-5 skupinu (Obrázek 12), jako rozpoznávací část, která je schopna koordinovat kationt kovu. Po navázání kationtu je senzor v aktivním ON stavu, jinak

podstupuje ICT, kdy potřebný volný elektronový pár je většinou navázán na dusíku azacrownu. Těmto sensorům byly na periferii navázány *tert*-butylsulfanylové substituenty k omezení agregace. Byl studován také vliv substituentů v *ortho*-poloze k azacrownu, protože se ukázalo, že tyto substituenty mají vliv na kvantové výtěžky fluorescence. Jako nejvhodnější se ukázala navázaná butoxy- skupina.<sup>21</sup>

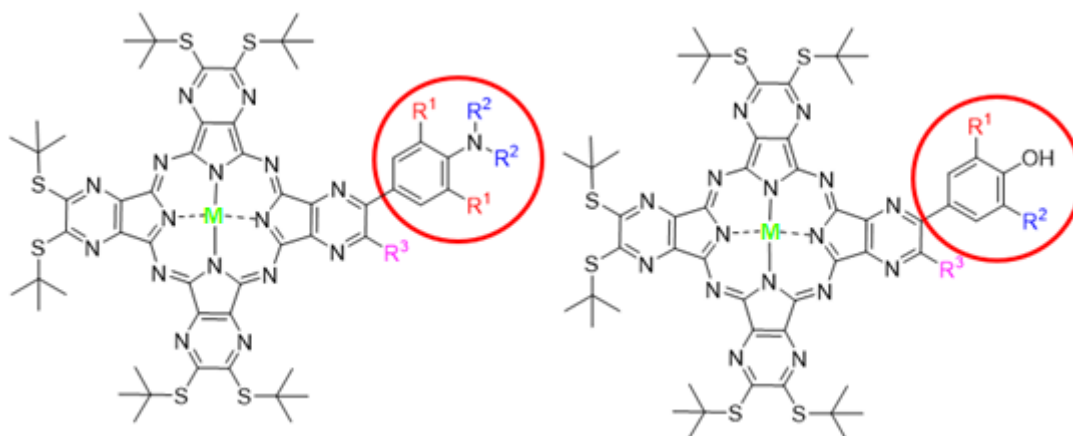


**Obrázek 12: Struktura AzaPc senzoru s navázaným azacrownem**

Testování těchto sensorů probíhalo jak v organických rozpouštědlech, tak i ve vodě po inkorporování do křemičitých nanočástic.<sup>21</sup> Bylo zjištěno, že stabilita celého makrocyclického komplexu se zvyšuje navázáním dvou molekul 1-aza-15-crown-5 v rozpoznávací části. Zvýšit se dá také selektivita k jednotlivým analytům zvolením rozpoznávací části.<sup>24</sup> V případě azacrownu se zvyšuje selektivita k  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  a  $\text{Ca}^{2+}$ . Tyto kationty jsou důležité v různých biologických procesech např. při svalové kontrakci nebo při přenosu nervového vzruchu, hladina draslíku je důležitá u pacientů s hypertenzí.<sup>20</sup>

V případě sensorů reagujících na změny pH prostředí, obsahovaly AzaPc v rozpoznávací části jako donorovou skupinu aminy<sup>1</sup> (Obrázek 13), které přepínaly fluorescenci do aktivního ON stavu v kyselém pH. Při použití fenolické skupiny (Obrázek 13) v rozpoznávací části (tyto senzory byly v rámci práce testovány), probíhalo přepínání mezi ON-OFF stavy ve více bazickém prostředí.<sup>2</sup> Výhodou AzaPc jako sensorů jsou široké možnosti, jak změnit vlastnosti navázáním specifických substituentů, čímž je umožněno posouvání přepínání mezi ON a OFF stavem mohou být syntetizovány senzory pro kyselé i bazické pH.<sup>25</sup>

Jejich nevýhodou je hlavně agregace, která vede mimo jiné k poklesu fluorescence a může vést k chybné interpretaci výsledků. Druhá nevýhoda je nerozpustnost ve vodě, která se dá také ovlivnit substitucí hydrofilními substituenty nebo inkorporací do transportních systémů (liposomy,<sup>6</sup> mikroemulze<sup>1</sup>).



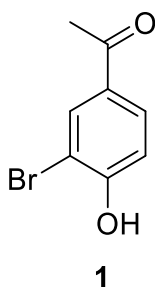
**Obrázek 13: Základní struktury senzorů s vyznačenými rozpoznávacími centry**

Rozmezí pH, na které bude senzor citlivý, závisí na vlastnostech jeho rozpoznávacího centra, jehož změnami lze vytvořit senzory vhodné pro různé aplikace. Senzory citlivé v oblastech  $\text{pH} > 10$  jsou vhodné pro detekci  $\text{CO}_2$ .<sup>25</sup> Senzory k monitorování intracelulárního pH v organelách a v cytoplasmě je vhodné mít citlivé od hodnoty 4,5 v lysozomech do 8,0 v mitochondriích. Sledování těchto změn je důležité, protože změnami hodnot pH se mohou odhalit patologické procesy, které souvisí s chybnou buněčnou funkcí, zahrnující růst, proliferaci nebo apoptózu a mohou tak odhalit např. rakovinu. Abnormální hodnoty pH mohou poukazovat i na ovlivnění nervového systému změnami signálních kaskád nebo přenosu vzruchu a poukazovat tak např. na Alzheimerovu nemoc.<sup>26,27</sup> Vzhledem ke všem těmto výhodným vlastnostem, mají fluorescenční AzaPc senzory velký potenciál využití i v budoucnu.

## 6. Experimentální část

Výchozí látky a rozpouštědla potřebná k provedení reakcí byly zakoupeny od firem Sigma-Aldrich, Acros, Penta, TCI Chemicals. Ke změření teploty tání sloučenin byl použit digitální přístroj ELECTROTHERMAL IA9200. Reakce byly monitorovány tenkovrstvou chromatografií (TLC) na deskách Merck Kieselgel 60 F254. K vyhodnocování desek byla využívána UV lampa při vlnových délkách 254 a 366 nm. Sloupcová chromatografie na stacionární fázi Merck Kieselgel 60 (0,040-0,063 mm) byla používána k čištění produktů. Složení jednotlivých mobilních fází využívaných při sloupcové chromatografii jsou uvedeny níže. Spektra UV/VIS byla měřena přístrojem Shimadzu UV-2600PC spectrophotometer. Infračervená spektra byla měřena IČ spektrofotometrem Nicolet 6700 v ATR módu.  $^1\text{H}$  NMR a  $^{13}\text{C}$  NMR spektra byla měřena na přístroji VNMR S500. Elementární analýza byla provedena pomocí přístroje Vario Micro Cube Elemental Analyzer. Měření fluorescenčních spekter probíhalo na spektrofluorimetru FS5 (Edinburgh Instruments) s fotonásobičem R928P. Hmotnostní spektrometrie (MALDI-TOF) byla stanovena na přístroji AB Sciex 4800 MALDI TOF/TOF spectrometer. Ke kalibraci přístroje bylo užito pětibodové kalibrační metody pomocí Peptide Calibration Mix1 (LaserBioLabs, Sophia-Antipolis, France). Hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením (HR MS) byla zaznamenána pomocí UHPLC systému Acquity UPLC I (Waters, Milford, USA), spojeným s hmotnostním spektrometrem s vysokým rozlišením Synapt G2Si (Waters, Manchester, UK) založeném na Q-TOF. Chromatografie pro toto HR MS měření byla provedena za použití Acquity UPLC BEH300 C4 (2,1 × 50 mm, 1,7 μm) kolony s gradientovou elucí mobilní fází složenou z acetonitrilu a 0,1% kyseliny mravenčí. Rychlost průtoku byla 0,4 ml/min. Ionizace elektrosprejem (ESI) byla provedena v pozitivním módu. ESI spektra byla zaznamenána v rozmezí 50-2000 m/z za použití leucin-enkefalinu jako referenčního vzorku a jodidu sodného pro kalibraci.

## 6.1. Příprava 1-(3-brom-4-hydroxyfenyl)ethan-1-onu (1)



Příprava látky **1** byla provedena několika způsoby s cílem najít nejselektivnější reakci. Výsledky reakcí jsou diskutovány v části Diskuze.

### 6.1.1. Reakce 4-hydroxyacetofenonu s kyselinou bromovodíkovou a peroxidem vodíku

Dle literatury<sup>28</sup> byla do prostředí dioxanu (50 ml) přidána kyselina bromovodíková (8,8 ml, 75 mmol), peroxid vodíku (5,61 ml, 55 mmol) a výchozí látka 4-hydroxyacetofenon (4-HA, 6,8 g, 50 mmol). Směs byla míchána při pokojové teplotě po dobu 24 hodin. Průběh reakce byl kontrolován pomocí TLC při použití mobilní fáze toluen (TOL)/ethyl-acetát (EtAc)/kyselina octová (AcOH) v poměru 10:1:0,2. Po 24 hodinách se na TLC stále objevovala skvrna nezreagované výchozí látky, proto byl přidán další díl peroxidu vodíku (0,5 ml) a kys. bromovodíkové (1,17 ml). Byla získána směs produktů **1** a **2**.

### 6.1.2. Reakce 4-hydroxyacetofenonu s bromem a triethylaminem

Výchozí látka 4-HA (0,3 g, 2 mmol) byla rozpuštěna v dichlormethanu (DCM, 10 ml). Poté byl po kapkách přikapáván brom (0,06 ml, 1,1 mmol) s triethylaminem (TEA, 0,3 ml, 2,2 mmol) v DCM (0,8 ml). Reakce probíhala 1 hodinu při -5 °C. Vzniklá oranžová směs byla vyhodnocena pomocí TLC se stejnou mobilní fází jako v případě výše. Vznikala směs produktů **1** a **2**, spolu s neznámou skvrnou na TLC.

### 6.1.3. Reakce 4-hydroxyacetofenonu s bromem a octanem sodným v DCM

4-HA (0,3 g, 2 mmol) byl navážen do baňky, rozpuštěn v DCM (10 ml) a po kapkách byl přikapáván brom (0,06 ml, 1,1 mmol) s AcOH (0,8 ml) a rozpuštěným bezvodým octanem sodným (NaOAc, 0,2 g, 2,2 mmol). Reakce probíhala 1 hodinu při

-5 °C a vzniklo bílé zbarvení směsi. Podle TLC s mobilní fází jako výše, vznikala směs produktů **1** a **2**.

#### 6.1.4. Reakce 4-hydroxyacetofenonu s bromem a 1,4-diazabicyklo[2,2,2]oktanem

Dle literatury<sup>29</sup> byl k přípravě bromačního činidla použit roztok bromu (1,1 ml, 20,8 mmol) v chloroformu (6,6 ml) a za stálého míchání byl přikapáván 1,4-diazabicyklo[2,2,2]oktan (DABCO, 1,1 g, 10 mmol) rozpuštěný v CHCl<sub>3</sub> (16,7 ml). Po 60-ti minutách míchání vznikla hustá žlutá suspenze, která byla zfiltrována na fritě za vzniku žlutého prášku a tento prášek byl poté smíchán se silikagelem v hmotnostním poměru 1:1 a zhomogenizován.

Bromační činidlo (0,5 g, 0,25 mmol) bylo následně použito do reakce s 4-HA (0,1 g, 1 mmol) rozpuštěným v DCM (10 ml). Reakce probíhala hodinu na magnetické míchačce za chlazení při -5 °C. TLC se stejnou mobilní fází jako výše ukázalo směs produktů **1** a **2**.

#### 6.1.5. Reakce 4-hydroxyacetofenonu s bromem a octanem sodným v prostředí kyseliny octové

Výchozí látka 4-HA (0,3 g, 2 mmol) byla rozpuštěna v AcOH (5 ml). Poté byl přikapáván brom (0,1 ml, 2,4 mmol) v AcOH (1 ml) a rozpuštěný NaOAc (0,2 g, 2,2 mmol) v AcOH (1 ml). Reakce probíhala 60 minut na magnetické míchačce při pokojové teplotě za vzniku produktů **1**, **2** a neznámé látky, jak ukázalo TLC se stejnou mobilní soustavou jako výše.

#### 6.1.6. Reakce 4-hydroxyacetofenonu s bromem a methenaminem

Příprava bromovaného methenaminu byla dle literatury<sup>30</sup> zahájena přípravou roztoku bromu (1,1 ml, 20,8 mmol) v CHCl<sub>3</sub> (16,5 ml), ke kterému byl za stálého míchání přikapáván roztok methenaminu (1,4 g, 10 mmol) v CHCl<sub>3</sub> (16,4 ml). Vzniklá žlutá sraženina byla zfiltrována za vzniku žluto-oranžového prášku, který byl použit jako bromační činidlo.

Následně byla zahájena reakce s 4-HA (0,1 g, 1 mmol), který byl rozpuštěn v DCM (10 ml) s přidáním bromačního činidla (0,23 g, 0,5 mmol). Reakce probíhala

hodinu za stálého míchání na magnetické míchačce při teplotě -5 °C. Monitorování reakce pomocí TLC se stejnou mobilní fází jako výše ukázalo směs produktů **1** a **2**.

Protože při této reakci nevznikal žádný další produkt kromě směsi produktů **1** a **2**, byla tato reakce provedena ve větším množství a použita pro přípravu požadované látky **1**.

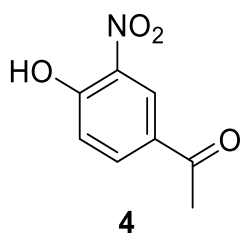
Nejprve bylo připraveno bromační činidlo, kdy byl methenamin (2,8 g, 20 mmol) rozpuštěn v CHCl<sub>3</sub> (30 ml) za stálého míchání na magnetické míchačce při pokojové teplotě. Brom (2,1 ml, 41,7 mmol) v CHCl<sub>3</sub> (30 ml) byl ke směsi přikapáván a vznikla žlutá sraženina, která byla zfiltrována a vysušena za vzniku žluto-oranžového prášku látky **3** s výtěžkem 8,91 g (97 %).

Následně byla zahájena bromace 4-HA (4 g, 29 mmol), který byl rozpuštěn v DCM (50 ml). Za stálého míchání při teplotě -5 °C za chlazení ledovou lázní s NaCl bylo přidáno bromační činidlo (8 g, 17,4 mmol) a reakce probíhala 24 hodin za vzniku žluté suspenze. Reakce byla monitorována pomocí TLC s mobilní soustavou TOL/EtAc/AcOH v poměru 10:1:0,2. Po ukončení reakce byla směs zfiltrována na fritě za vyloučení žluté sraženiny. Sraženina byla promyta DCM a filtrát byl následně vytřepán vodou s přídavkem thiosíranu sodného. Poté byl produkt v DCM vysušen bezvodým síranem sodným a zfiltrován. Rozpouštědlo bylo odpařeno na vakuové odparce za vzniku bílé pevné látky. Po provedení TLC se ukázala nutnost odseparování produktů **1** a **2**. K tomu byla využita sloupcová chromatografie s mobilní soustavou TOL/EtAc/AcOH v poměru 10:1:0,2. Po provedení sloupcové chromatografie bylo získáno 2,46 g (29 %) bílých krystalů produktu **2** a 1,51 g (24 %) bílého prášku produktu **1**.

Látka **1**: T.t.: 102–104 °C (lit.<sup>31</sup> 112–117 °C); <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 25 °C, TMS): δ=8,14 (d, *J* = 2,1 Hz, 1H, ArH), 7,86 (dd, *J* = 8,5, 2,1 Hz, 1H, ArH), 7,08 (d, *J* = 8,5 Hz, 1H, ArH), 6,43 (bs, 1H, OH), 2,57 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 25 °C, TMS): δ=195,80, 156,52, 133,02, 131,39, 129,98, 115,89, 110,57, 26,27 ppm; IR (ATR): ν = 3124 (OH), 1650 (s, CO) cm<sup>-1</sup>.

Látka **2**: T.t.: 184–186 °C (lit.<sup>31</sup> 185–187 °C); <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>COCD<sub>3</sub>, 25 °C, TMS): δ=9,38 (s, 1H, OH), 8,15 (s, 2H, ArH), 2,58 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CD<sub>3</sub>COCD<sub>3</sub>, 25 °C, TMS): δ= 194,59, 155,44, 133,55, 132,62, 111,35, 26,36 ppm; IR (ATR): ν = 3176 (OH), 1661 (s, CO) cm<sup>-1</sup>.

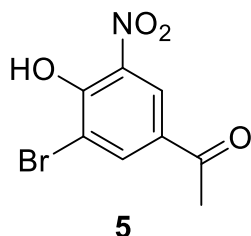
## 6.2. Příprava 4-hydroxy-3-nitroacetofenonu (4)



4-HA (2,7 g, 20 mmol) byl za chlazení ledovou lázní s NaCl při  $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$  po částech rozpouštěn v 96% kyselině sírové (30 ml). Poté byl po malých částech přidáván dusičnan draselný (2,2 g, 21,4 mmol). Před každým přidavkem se počkalo na rozpuštění předchozího množství tak, aby nedocházelo k exotermní reakci. Reakce probíhala 1 hodinu za stálého míchání na magnetické míchačce stále při chlazení ledovou lázní s NaCl při  $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Po hodině byla reakce ukončena nalitím na led a po rozpuštění ledu byl produkt zfiltrován na fritě. Podle TLC, kde byla mobilní fáze složena z hexanu (HEX)/EtAc/AcOH v poměru 20:10:3 vznikala reakcí produkt **4**, který byl dostatečně čistý do další reakce. Výtěžek byl 3,2 g (89 %) žluté, práškovité látky **4**.

T.t.:  $131,3\text{--}132,4\text{ }^{\circ}\text{C}$  (lit.<sup>32</sup>  $131\text{--}132,6\text{ }^{\circ}\text{C}$ );  $^1\text{H NMR}$  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{COCD}_3$ ,  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ , TMS):  $\delta=10,82$  (s, 1H, OH),  $8,69$  (d,  $J = 2,2$  Hz, 1H, ArH),  $8,27$  (dd,  $J = 8,8, 2,2$  Hz, 1H, ArH),  $7,32$  (d,  $J = 8,8$  Hz, 1H, ArH),  $2,64$  (s, 3H,  $\text{CH}_3$ );  $^{13}\text{C NMR}$  (125 MHz,  $\text{CD}_3\text{COCD}_3$ ,  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ , TMS):  $\delta= 195,18, 158,19, 136,98, 134,96, 130,59, 126,65, 120,99, 26,41$  ppm; IR (ATR):  $\nu = 3277$  (OH),  $3112$  (CH),  $1678$  (s, CO)  $\text{cm}^{-1}$

## 6.3. Příprava 3-brom-4-hydroxy-5-nitroacetofenonu (5)

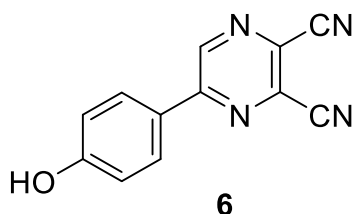


Výchozí látka **4** (3 g, 16,6 mmol) byla rozpuštěna v AcOH (100 ml). Následně byl přisypán bezvodý NaOAc (2 g, 24,8 mmol) a postupně přikapáván brom (0,8 ml, 16,6 mmol) v AcOH (10 ml). Reakce probíhala na magnetické míchačce při pokojové teplotě 2 hodiny. Poté bylo provedeno TLC s mobilní soustavou HEX/EtAc/AcOH

v poměru 20:6:1. Podle TLC byla kromě produktu přítomna i výchozí látka, proto byl přidán nadbytek bromu (0,2 ml, 3,9 mmol) a reakce byla ponechána míchat při pokojové teplotě dalších 24 hodin. Po provedení TLC byla reakce ukončena, produkt byl zbaven rozpouštědla na vakuové odparce a zbylé krystaly byly převedeny do dělicí nálevky. Následně bylo provedeno vytřepání mezi EtAc a vodu s přidavkem 1% kyseliny chlorovodíkové do kyselé reakce a thiosíranu sodného. Organická fáze byla poté vysušena bezvodým síranem sodným a produkt byl zfiltrován a zbaven rozpouštědel. K dočištění byla provedena rekrystalizace z ethanolu s vodou, krystalky ponechány 24 hodin v lednici a poté zfiltrovány na fritě za vzniku 3,7 g (87 %) žluté krystalické látky **5**.

T.t.: 134,5–135,2 °C (lit.<sup>33</sup> 136 °C); <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>SOCD<sub>3</sub>, 25 °C, TMS): δ=8.41 (d, *J* = 2,2 Hz, 1H, ArH), 8,38 (d, *J* = 2,2 Hz, 1H, ArH), 2,58 (s, 3H, CH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CD<sub>3</sub>SOCD<sub>3</sub>, 25 °C, TMS): δ= 194,63, 152,83, 137,72, 137,49, 128,80, 125,08, 114,48, 26,66 ppm; IR (ATR): ν = 3226 (OH), 3103 (CH), 1694 (s, CO) cm<sup>-1</sup>

#### 6.4. Příprava 5-(4-hydroxyfenyl)pyrazin-2,3-dikarbonitrilu (**6**)

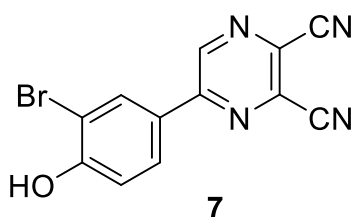


4-HA byl navážen do baňky (3 g, 22 mmol) a společně s oxidem seleničitým (7,3 g, 66,1 mmol) rozpuštěn ve směsi dioxan/H<sub>2</sub>O 9:1 (40 ml). Směs byla míchána a zahřívána při teplotě varu rozpouštědla po dobu 20 hodin. Došlo ke vzniku červeno-oranžové směsi, která byla *in situ* bez izolace ihned kondenzována s diaminomaleonitrilem (DAMN, 3 g, 27,7 mmol) za přidavku konc. HCl (2 ml). Směs byla ponechána při teplotě varu rozpouštědla 1,5 hodiny. Reakce byly monitorovány pomocí TLC s mobilní soustavou HEX/EtAc/AcOH v poměru 20:6:1. Po ukončení reakce byla rozpouštědla odpařena, produkt byl extrahován tetrahydrofuranem (THF) a následně zfiltrován. Po odpaření THF byla provedena sloupcová chromatografie se stejnou mobilní fází jako u kontrolního TLC. Byl získán žlutý produkt, který byl

následně překrystalizován z ethanolu za vzniku 2,9 g žlutého, práškovitého produktu **6** (59 %). Reakce byla provedena dle postupu již publikovaného.<sup>34</sup>

T. t.: 159,2–160,1 °C; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>SOCD<sub>3</sub>, 25 °C, TMS): δ=10,48 (s, 1H, OH), 9,56 (s, 1H, ArH), 8,14 (d, *J* = 8,9 Hz, 1H, ArH), 6,95 (d, *J* = 8,9 Hz, 1H, ArH); <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CD<sub>3</sub>SOCD<sub>3</sub>, 25 °C, TMS): δ=158,43, 152,37, 144,68, 133,06, 132,92, 130,05, 129,28, 125,28, 117,22, 114,72, 114,34, 110,84 ppm; IR (ATR): ν = 3460 (OH), 2236 (CN) cm<sup>-1</sup>; elementární analýza (%) vypočítáno pro C<sub>12</sub>H<sub>6</sub>N<sub>4</sub>O: C 64,86, H 2,72, N 25,21; nalezeno: C 65,02, H 2,67, N 24,92.

## 6.5. Příprava 5-(3-brom-4-hydroxyfenyl)pyrazin-2,3-dikarbonitrilu (**7**)



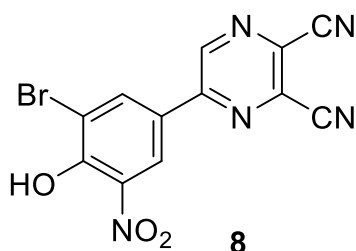
Příprava látky **7** byla provedena analogickým způsobem jako u látky **6**.

Výchozí látka **1** (1,2 g, 5,6 mmol) byla společně s oxidem seleničitým (1,9 g, 16,7 mmol) rozpuštěna ve směsi dioxanu s vodou 9:1 (40 ml) a poté byla směs zahřívána po dobu 20 hodin pod zpětným chladičem při teplotě varu rozpouštědla. Vzniklá směs byla *in situ* bez izolace použita do kondenzační reakce s DAMN (1,2 g, 11,1 mmol) za přídavku konc. HCl (1 ml). Směs byla dále zahřívána za teploty varu rozpouštědla 1,5 hodiny. Reakce byla monitorována pomocí TLC s mobilní soustavou TOL/EtAc/AcOH v poměru 8:1:0,2. Po ukončení reakce byla rozpouštědla odpařena a produkt extrahován acetonem. Poté byl produkt přefiltrován a zbaven rozpouštědlem na vakuové odparce. Přechištěním sloupcovou chromatografií s mobilní fází TOL/EtAc/AcOH v poměru 8:1:0,2 a následnou rekrystalizací z ethanolu s vodou a přídavkem aktivního uhlí bylo získáno 0,8 g (46 %) hnědo-oranžového produktu **7**.

T. t.: 189,1–190,0 °C; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>SOCD<sub>3</sub>, 25 °C, TMS): δ=11,37 (s, 1H, OH), 9,63 (s, 1H, ArH), 8,43 (d, *J* = 2,2 Hz, 1H, ArH), 8,14 (dd, *J* = 8,6, 2,3 Hz, 1H,

ArH), 7,13 (d,  $J = 8,7$  Hz, 1H, ArH);  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CD}_3\text{SOCD}_3$ , 25 °C, TMS):  $\delta=162,06, 153,67, 144,40, 133,09, 130,36, 129,35, 123,72, 116,65, 114,82, 114,41$  ppm; IR (ATR):  $\nu = 3373$  (OH), 2248 (CN)  $\text{cm}^{-1}$ ; elementární analýza (%) vypočítáno pro  $\text{C}_{12}\text{H}_5\text{BrN}_4\text{O}$ : C 47,87, H 1,67, N 18,61; nalezeno: C 47,96, H 1,56, N 18,67.

## 6.6. Příprava 5-(3-brom-4-hydroxy-5-nitrofenyl)pyrazin-2,3-dikarbonitrilu (8)

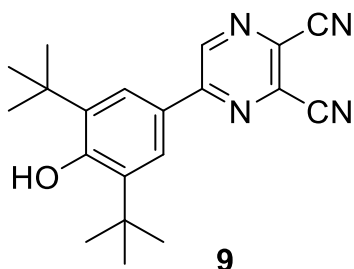


Příprava látky **8** byla provedena analogickým způsobem jako u látek **6** a **7**.

Výchozí substituovaný keton **5** (3 g, 11,6 mmol) byl společně s oxidem seleničitým (3,9 g, 34,7 mmol) navážen a rozpuštěn ve směsi dioxanu s vodou 9:1 (40 ml). Cihlově červená směs byla zahřívána po dobu 20 hodin pod zpětným chladičem při teplotě varu rozpouštědla a vzniklá směs byla *in situ* bez izolace použita do kondenzační reakce s DAMN (3 g, 27,7 mmol) za přídavku konc. HCl (2 ml). Směs byla zahřívána za teploty varu rozpouštědla 1,5 hodiny, poté byla reakce ukončena a rozpouštědla odpařena. Dále byla provedena extrakce do THF, produkt zfiltrován a rozpouštědlo odpařeno na vakuové odparce. Po provedení kontrolního TLC s mobilní fází HEX/EtAc/AcOH v poměru 20:6:1 byla provedena krystalizace z ethanolu s aktivním uhlím, kterou byly získány čisté krystalky. Matečný louh byl přechištěn sloupcovou chromatografií s mobilní fází HEX/EtAc/AcOH v poměru 20:6:1. Celkový výtěžek žluto-oranžových krystalů látky **8** byl 2,5 g (63 %).

T. t.: 215,2–215,9 °C;  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{SOCD}_3$ , 25 °C, TMS):  $\delta=9,75$  (s, 1H, ArH), 8,77 (s, 2H, ArH);  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CD}_3\text{SOCD}_3$ , 25 °C, TMS):  $\delta=152,66, 150,66, 145,15, 138,47, 136,89, 133,01, 131,05, 124,62, 124,33, 115,81, 114,53, 114,18$  ppm; IR (ATR):  $\nu = 3216$  (OH), 3081 (CH), 2251 (CN)  $\text{cm}^{-1}$ ; elementární analýza (%) vypočítáno pro  $\text{C}_{12}\text{H}_4\text{BrN}_5\text{O}_3$ : C 41,64, H 1,16, N 20,24; nalezeno: C 41,16, H 1,01, N 20,10.

## 6.7. Příprava 5-(3,5-di-*terc*-butyl-4-hydroxyfenyl)pyrazin-2,3-dikarbonitrilu (9)

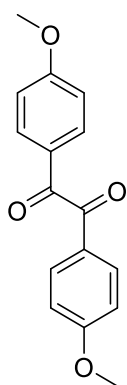


Reakce byla zahájena navážením látek **10** (1,5 g, 9 mmol), která byla připravena v laboratoři již dříve dle literatury<sup>35</sup> a **11** (4,9 g, 24 mmol), které byly následně rozpuštěny v bezvodém acetonitrilu (30 ml) pod argonem. Poté byl přidán bezvodý uhličitán draselný (6,6 g, 48 mmol) za vzniku fialového zbarvení. Reakce probíhala v bezvodém prostředí pod argonem za stálého míchání, při laboratorní teplotě po dobu 3 dnů.

Po skončení reakce byla směs převedena do kádinky a okyselena 1% HCl s vodou. Docházelo k zesvětlování fialového zbarvení až do žlutohnědého zbarvení směsi. Poté byla směs extrahována do EtAc a následně vytřepána s vodou (vodná fáze byla vždy mírně okyselena HCl). Organické fáze byly spojeny, vysušeny bezvodým síranem sodným, zfiltrány a zbaveny rozpouštědel. Následně bylo provedeno kontrolní TLC s mobilní soustavou TOL/HEX v poměru 2:1. Produkt byl vyčištěn sloupcovou chromatografií se stejnou mobilní soustavou jako u TLC. Celkový výtěžek světle žlutého, krystalického produktu **9** byl 1,28 g (42 %). Látka byla připravena, dle již publikovaného postupu.<sup>36</sup>

T. t.: 238,3–239,0 °C; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 25 °C, TMS): δ=9,18 (s, 1H, ArH), 7,95 (s, 2H, ArH), 5,85 (s, 1H, OH), 1,51 (s, 18H, CH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 25 °C, TMS): δ=158,65, 155,42, 143,51, 137,56, 133,15, 129,16, 125,53, 123,82, 113,53, 113,26, 34,61, 30,11 ppm; IR (ATR): ν = 3627 (OH), 2237 (CN) cm<sup>-1</sup>; elementární analýza (%) vypočítáno pro C<sub>20</sub>H<sub>22</sub>N<sub>4</sub>O: C 71,83, H 6,63, N 16,75; nalezeno: C 70,34, H 6,54, N 16,85.

## 6.8. Příprava 1,2-bis(4-methoxyfenyl)ethan-1,2-dionu (12)



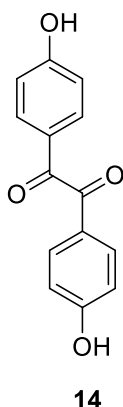
**12**

*p*-Anisaldehyd (4,5 g, 33 mmol) byl navážen do baňky, do které byla následně přidána destilovaná voda (33 ml), 1,8-diazabicyklo[5,4,0]undecen (DBU, 1 ml, 6,5 mmol) a bisbenzoimidazoliový katalyzátor (BBIM 12, 1g, 1,6 mmol). BBIM 12 byl již v laboratoři připraven dle publikovaného postupu<sup>37</sup>. Reakční směs byla míchána na magnetické míchačce při laboratorní teplotě po dobu 24 hodin. Reakce byla monitorována směsí HEX/EtAc v poměru 3:1. Vznikla hustá žlutá směs, ve které se oddělovala olejovitá fáze. Směs byla poté několikrát extrahována pomocí EtAc, organická fáze vysušena bezvodým síranem sodným a po zfiltrování byl EtAc odpařen. Vznikala látka **13**, která nebyla izolována a byla ihned prekurzorem pro následnou oxidaci.

Všechny acyloin **13** byl rozpuštěn v kyselině octové (150 ml) a následně byl přidán dusičnan amonný (3,3 g, 41,2 mmol) s octanem měďnatým (72,6 mg, 363,6  $\mu$ mol). Reakce probíhala při teplotě varu rozpouštědla za stálého míchání po dobu 2 hodin. Po jejím ukončení byla kyselina octová odpařena a směs byla extrahována THF, extrakt byl přefiltrován a poté odpařen na vakuové odparce do sucha. Provedením TLC byla zjištěna směs produktů, ze které bylo třeba produkt odseparovat sloupcovou chromatografií za použití mobilní soustavy HEX/EtAc v poměru 3:1. Bylo získáno 1,8 g (40 %) žlutého prášku látky **12**. Reakce byla provedena, dle již publikovaného postupu.<sup>34</sup>

T. t.: 129,7–131,6 °C (lit.<sup>38</sup> 130-134 °C) ;<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 25 °C, TMS):  $\delta$ =7,95 (4H, d,  $J$ =8,9 Hz, ArH), 6,97 (4H, d,  $J$ =8,9 Hz, ArH), 3,89 (6H, s, OCH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 25 °C, TMS):  $\delta$ =193,5, 164,8, 132,3, 126,3, 114,3, 55,6 ppm; IR (ATR):  $\nu$  = 3064 3031 (CH), 1655 (s, CO), 1596 (s), 1572 cm<sup>-1</sup>.

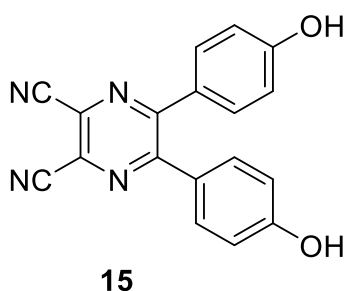
## 6.9. Příprava 1,2-bis(4-hydroxyfenyl)ethan-1,2-dionu (14)



Diketon **12** (1,8 g, 6,6 mmol) byl společně s kyselinou bromovodíkovou (3,6 ml) a kyselinou octovou (3,6 ml) zahříván při teplotě varu rozpouštědla pod zpětným chladičem po dobu 24 hodin za stálého míchání. Po ukončení reakce a vychladnutí směsi byla rozpouštědla odpařena do sucha. Pevná látka byla extrahována pomocí THF, roztok vysušen bezvodým síranem sodným a následně zfiltrován a odpařen do sucha. Provedením sloupcové chromatografie s mobilní soustavou HEX/EtAc/AcOH v poměru 20:10:1 bylo získáno 1,18 g (73 %) žlutého prášku látky **14**. Reakce byla provedena dle publikovaného postupu.<sup>34</sup>

T. t.: 248,9–249,6 °C (lit.<sup>39</sup> 250-252°C); <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>SOCD<sub>3</sub>, 25 °C, TMS): δ= 10,88 (2H, bs, OH), 7,73 (4H, d, *J*=8,7 Hz, ArH), 6,91 (4H, d, *J*=8,7 Hz, ArH); <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CD<sub>3</sub>SOCD<sub>3</sub>, 25 °C, TMS): δ=193,8, 164,3, 132,4, 124,3, 116,3 ppm; IR (ATR): ν =3396 (OH), 1641 (CO), 1597 (s), 1567 cm<sup>-1</sup>.

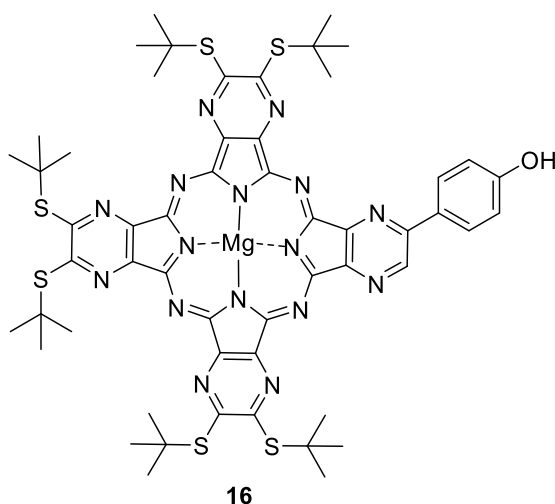
## 6.10. Příprava 5,6-bis(4-hydroxyfenyl)pyrazin-2,3-dikarbonitrilu (15)



Do baňky navážená látka **14** (1,18 g, 4,8 mmol) byla za zahřívání rozpuštěna v koncentrované kyselině octové (100 ml). Po rozpuštění byl přidán DAMN (1 g, 9,7 mmol) a směs byla zahřívána při teplotě varu rozpouštědla pod zpětným chladičem po 3 dny. Poté byla reakce ukončena a rozpouštědlo odpařeno. Směs byla extrahována THF, extrakt přefiltrován a THF odpařen za vzniku směsi produktů červenohnědé olejovité konzistence. Celá reakce byla monitorována pomocí TLC a po provedení sloupcové chromatografie s mobilní soustavou HEX/EtAc/AcOH (20:10:2) a následné krystalizaci z MeOH s aktivním uhlím bylo získáno 0,54 g (36 %) žlutého práškovitého produktu **15**. Reakce byla provedena, dle již publikovaného postupu.<sup>34</sup>

T.t. : 245 °C (dec); <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>SOCD<sub>3</sub>, 25 °C, TMS): δ=10,14 (s, 1H, OH), 7,38 (d, *J* = 8,7 Hz, 1H, ArH), 6,77 (d, *J* = 8,8 Hz, 1H, ArH); <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CD<sub>3</sub>SOCD<sub>3</sub>, 25 °C, TMS): δ=160,10, 154,08, 131,52, 128,70, 126,56, 115,75, 114,58 ppm; IR (ATR): ν = 3407 (OH), 2252 (CN) cm<sup>-1</sup>; elementární analýza (%) vypočítáno pro C<sub>18</sub>H<sub>10</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>: C 68,79, H 3,21, N 17,83; nalezeno: C 68,55, H 3,53, N 16,62.

### 6.11. Příprava 2-(4-hydroxyfenyl)-9,10,16,17,23,24-hexakis(*terc*-butylsulfanyl)-1,4,8,11,15,18,22,25-(oktaaza)ftalocyaninato hořečnatého komplexu (**16**)

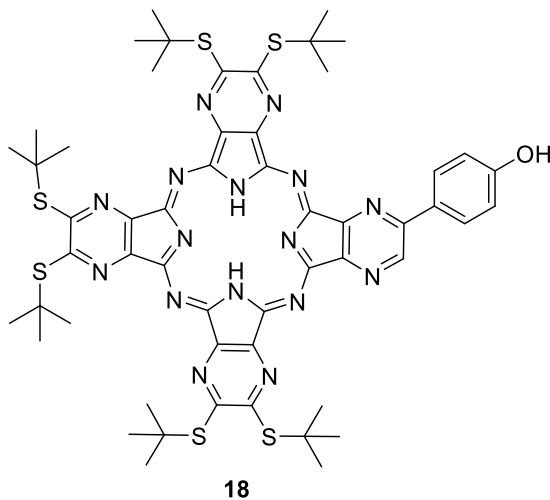


Do 100 ml baňky byl navážen hořčík (2,3 g, 94,5 mmol), přidán čerstvě predestilovaný bezvodý butanol (50 ml) a přisypáno pár zrněk jódu. Reakce byla

ponechána při teplotě varu butanolu pod zpětným chladičem za stálého míchání po dobu 3 hodin za vzniku butanolátu hořečnatého. Poté byly přidány výchozí pyraziny **6** (750 mg, 3,4 mmol) a **17** (3 g, 10,1 mmol) a reakce opět ponechána při teplotě varu rozpouštědla za stálého míchání pod zpětným chladičem 24 hodin. Reakční směs vykazovala nejprve oranžovo-červené zbarvení, které přecházelo do zeleno-černé sraženiny. Po ukončení reakce bylo rozpouštědlo odpařeno, k reakční směsi byl přilít roztok MeOH/H<sub>2</sub>O/AcOH (5:5:1, 200 ml) a směs míchána na magnetické míchače, dokud přebytečný butanolát hořečnatý nezreagoval. Poté byla směs zfiltrována, sraženina promyta vodou a produkt na filtru byl ponechán k vysušení na vzduchu. Následně byl produkt vymyt z filtru pomocí roztoku CHCl<sub>3</sub>, THF a MeOH (9:1:0,4), rozpouštědla odpařena a provedena sloupcová chromatografie nejprve s použitím mobilní soustavy CHCl<sub>3</sub>/THF (10:1) a následně s rychlejší soustavou CHCl<sub>3</sub>/THF/MeOH (9:1:0,4), ve které docházelo i k lepšímu rozdělení skvrn. Sloupcovou chromatografií bylo získáno 372 mg (9,5 %) tmavě zeleného práškovitého produktu **16**, který byl promyt hexanem.

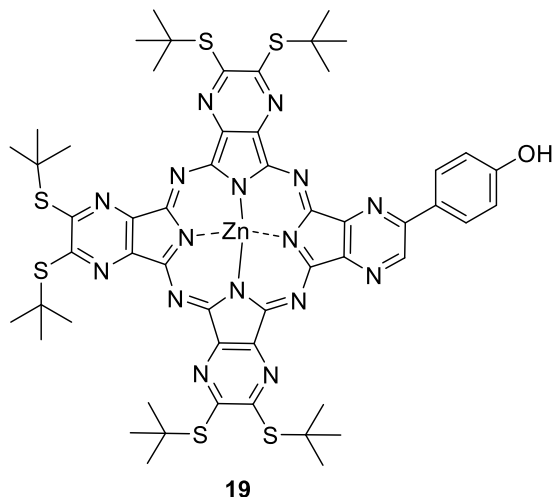
<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>: [D<sub>5</sub>]pyridine, 25 °C, TMS): δ 12,07 (s, 1H), 9,98 (s, 1H), 8,75 (d, *J* = 8,2 Hz, 2H), 7,38 (d, *J* = 8,2 Hz, 2H), 2,32 – 2,25 (m, 36H), 2,23 (s, 18H); <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>: [D<sub>5</sub>]pyridine, 25 °C, TMS): δ 161,32, 159,18, 159,01, 158,37, 158,33, 158,03, 157,84, 153,65, 151,70, 151,51, 151,30, 151,17, 150,94, 150,62, 150,47, 150,24, 147,97, 145,36, 145,25, 145,21, 145,10, 142,82, 129,97, 128,08, 125,68, 117,01, 51,48, 51,44, 51,38, 51,34, 31,14, 30,91, 30,71, 30,60, 30,23, 30,20 ppm; IR (ATR): ν = 2961, 2921 (CH), 1609, 1519, 1233, 1142 (s) cm<sup>-1</sup>; UV/Vis (THF): λ<sub>max</sub> (ε) = 652 (181 000), 592 (24 000), 381 nm (104 000 mol<sup>-1</sup> dm<sup>3</sup> cm<sup>-1</sup>); *m/z* (HR MS, EI) 1165,3395 [M+H]<sup>+</sup>, počítáno pro C<sub>54</sub>H<sub>60</sub>MgN<sub>16</sub>OS<sub>6</sub>+H<sup>+</sup>: 1165,3383.

6.12. Příprava 2-(4-hydroxyfenyl)-9,10,16,17,23,24-hexakis(*tert*-butylsulfanyl)-1,4,8,11,15,18,22,25-(oktaaza)ftalocyaninu (**18**)



Látka **16** (215 mg, 0,2 mmol) byla navážena do baňky a rozpuštěna v  $\text{CHCl}_3$  (10 ml), poté byla přidána kys. *p*-toluensulfonová (0,350 g, 1,8 mmol) rozpuštěná v THF (10 ml). Směs míchána na magnetické míchačce při pokojové teplotě 30 minut za monitorování TLC se soustavou  $\text{CHCl}_3/\text{THF}$  (10:1). Po ukončení reakce bylo rozpouštědlo odpařeno, produkt promyt vodou, zfiltrován a ponechán na filtru do 2. dne. Po vyschnutí byla látka **18** ihned použita do další reakce.

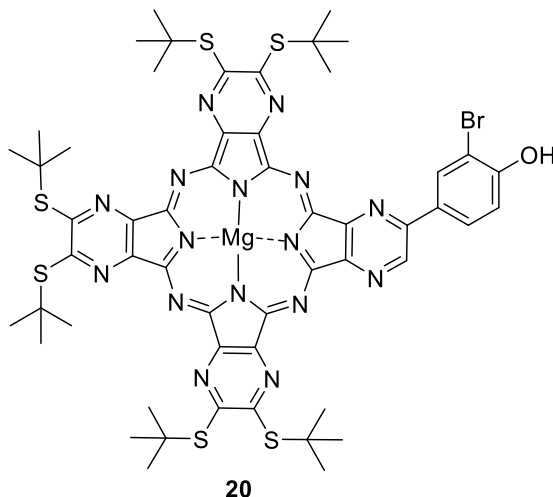
6.13. Příprava 2-(4-hydroxyfenyl)-9,10,16,17,23,24-hexakis(*tert*-butylsulfanyl)-1,4,8,11,15,18,22,25-(oktaaza)ftalocyaninato zinečnatého komplexu (**19**)



V pyridinu (30 ml) byla rozpuštěna výchozí látka **18** (199,2 mg, 0,2 mmol) s bezvodým octanem zinečnatým (319,6 mg, 1,7 mmol) a reakční směs byla po 1 hodinu za stálého míchání pod zpětným chladičem zahřívána při teplotě varu rozpouštědla. Po ukončení reakce a zchladnutí bylo rozpouštědlo odpařeno na vakuové odparce, produkt byl promyt vodou, zfiltrován a po provedení sloupcové chromatografie s mobilní soustavou CHCl<sub>3</sub>/THF/MeOH (9:0,5:0,2) bylo získáno 96,2 mg (48 %, počítáno na Mg komplex) zelenočerného produktu **19**, který byl promyt hexanem.

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>:[D<sub>5</sub>]pyridine, 25 °C, TMS): δ 12,15 (s, 1H), 9,99 (s, 1H), 8,77 (d, *J* = 8,4 Hz, 2H), 7,38 (d, *J* = 8,4 Hz, 2H), 2,30 – 2,20 (m, 54H); <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>:[D<sub>5</sub>]pyridine, 25 °C, TMS): δ 161,41, 159,46, 159,35, 158,78, 158,75, 158,52, 158,37, 153,93, 152,08, 151,91, 151,71, 151,60, 151,40, 150,92, 150,72, 150,36, 147,57, 144,86, 144,76, 144,71, 144,67, 143,06, 130,04, 129,99, 127,98, 117,03, 51,51, 51,43, 51,39, 31,04, 30,83, 30,63 ppm; IR (ATR): ν = 2963, 2925 (CH), 1520, 1233, 1143 (s) cm<sup>-1</sup>; UV/Vis (THF): λ<sub>max</sub> (ε)=650 (244 000), 590 (33 000), 376 nm (128 000 mol<sup>-1</sup> dm<sup>3</sup>cm<sup>-1</sup>); *m/z* (HR MS, EI) 1205,2826 [M+H]<sup>+</sup>, počítáno pro C<sub>54</sub>H<sub>60</sub>N<sub>16</sub>OS<sub>6</sub>Zn+H<sup>+</sup>: 1205,2824.

6.14. Příprava 2-(3-brom-4-hydroxyfenyl)-9,10,16,17,23,24-hexakis(*tert*-butylsulfanyl)-1,4,8,11,15,18,22,25-(oktaaza)ftalocyaninato hořečnatého komplexu (**20**)



Příprava látky **20** probíhala obdobným způsobem jako u látky **16**.

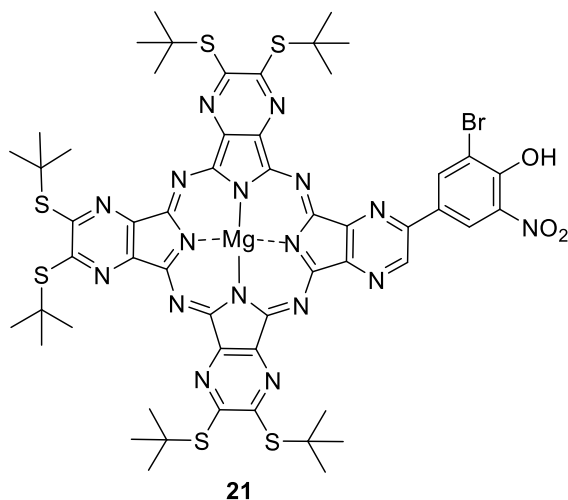
Hořčík (1,37 g, 57 mmol) byl navážen do 100 ml baňky a k němu byl přidán destilovaný bezvodý butanol (50 ml). Do baňky se přidalo pár zrněk jodu a směs byla ponechána reakci při teplotě varu butanolu, za stálého míchání pod zpětným chladičem 3 hodiny za vytvoření šedé, husté hmoty butanolátu hořečnatého. Poté byly přisypány výchozí pyraziny **7** (0,62 g, 2,04 mmol) a **17** (1,88 g, 6,13 mmol) a reakce byla za stejných podmínek ponechána 24 hodin za vzniku černozelelé sraženiny.

Další zpracování bylo stejné jako zpracování látky **16** a přečištěním sloupcovou chromatografií s mobilní soustavou CHCl<sub>3</sub>/THF/MeOH (40:1:0,5) a poté rychlejší CHCl<sub>3</sub>/THF/MeOH (20:1:0,5) bylo získáno 0,268 g (10,6 %) zelenočerného práškovitého produktu **20**. Produkt byl znovu přečištěn pro další analýzy rozpuštěním v CHCl<sub>3</sub> (0,5 ml) a nakapáním do MeOH. Směs byla ponechána 14 dní v mrazáku, poté byla zfiltrována a černý, jemný prášek extrahován CHCl<sub>3</sub>, znovu přefiltrován a rozpouštědlo odpařeno. Následně byl produkt seškrábán do MeOH a odfiltrován na fritě za vzniku černých práškových částic.

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>:[D<sub>5</sub>]pyridine, 25 °C, TMS): δ 9,94 (s, 1H), 9,35 (d, *J* = 2,2 Hz, 1H), 8,49 (dd, *J* = 8,4, 2,2 Hz, 1H), 7,37 (d, *J* = 8,4 Hz, 1H), 2,30 – 2,24 (m, 45H), 2,21 (s, 9H); <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>:[D<sub>5</sub>]pyridine, 25 °C, TMS): δ 159,02,

158,97, 158,28, 158,26, 157,94, 157,90, 157,87, 151,85, 151,80, 151,75, 151,60, 151,45, 151,23, 151,01, 150,34, 150,13, 148,16, 145,31, 145,28, 145,24, 145,21, 145,09, 142,24, 133,73, 129,37, 127,92, 117,17, 112,45, 51,64, 51,46, 51,45, 51,34, 31,15, 31,11, 30,87 ppm; IR (ATR):  $\nu = 2961, 2919$  (CH), 1518, 1477, 1363, 1234, 1142  $\text{cm}^{-1}$ ; UV/Vis (THF):  $\lambda_{\text{max}}$  ( $\epsilon$ )=652 (290 000), 591 (38 000), 382 nm (151 000  $\text{mol}^{-1} \text{dm}^3 \text{cm}^{-1}$ );  $m/z$  (HR MS, EI) 1243,2457  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , počítáno pro  $\text{C}_{54}\text{H}_{59}\text{BrMgN}_{16}\text{OS}_6+\text{H}^+$ : 1243,2489.

**6.15. Příprava 2-(3-brom-4-hydroxyfenyl-5-nitro)-  
9,10,16,17,23,24-hexakis(terc-butylsulfanyl)-  
1,4,8,11,15,18,22,25-(oktaaza)ftalocyaninato hořečnatého  
komplexu (21)**



Příprava látky **21** probíhala obdobným způsobem jako u látek **16** a **20**.

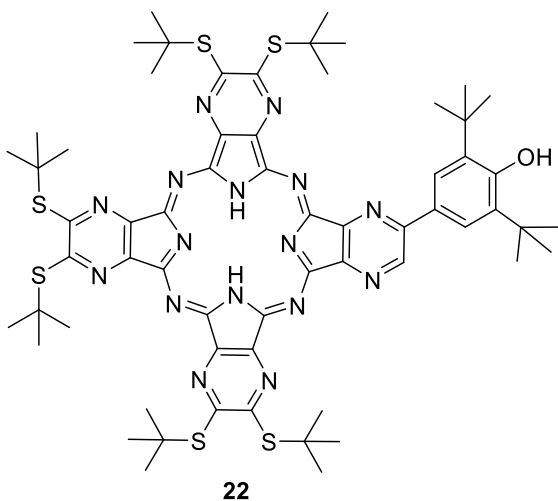
K naváženému hořčíku (2,52 g, 105,17 mmol) byl přidán čerstvě destilovaný bezvodý butanol a společně s pár zrnky jodu byla směs ponechána reakci při teplotě varu rozpouštědla za stálého míchání pod zpětným chladičem po dobu 3 hodin. Po 3 hodinách byly k reakční směsi přidány látky **8** (1,3 g, 3,76 mmol) a **17** (3,45 g, 11,27 mmol) a směs ponechána za stejných podmínek 24 hodin.

Další zpracování bylo stejné jako u látek **16** a **20** a sloupcovou chromatografií se soustavou  $\text{CHCl}_3/\text{THF}/\text{MeOH}$  (40:1:0,5) a poté rychlejší  $\text{CHCl}_3/\text{THF}/\text{MeOH}$  (20:1:0,5) bylo získáno 0,48 g (9,9 %) produktu **21**, který byl stejně jako látka **20** dočištěn pro

další analýzy rozpuštěním v  $\text{CHCl}_3$  (0,5 ml) a nakapáním do MeOH. Poté byla směs ponechána 14 dní v mrazáku, zfiltrována a černý prášek extrahován  $\text{CHCl}_3$ , znovu přefiltrován a rozpouštědlo odpařeno. Na závěr byl produkt seškrábán do methanolu, a odfiltrován na fritě za vzniku černých lesklých krystalků.

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ : $[\text{D}_5]$ pyridine, 25 °C, TMS):  $\delta$  10.00 (s, 1H), 9.80 (s, 1H), 8.88 (s, 1H), 7.54 (d,  $J = 8.9$  Hz, 1H), 2.32 – 2.24 (m, 45H), 2.22 (s, 9H);  $^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ : $[\text{D}_5]$ pyridine, 25 °C, TMS):  $\delta$  159,04, 159,01, 158,45, 158,27, 158,09, 156,40, 152,13, 152,09, 151,79, 151,75, 151,12, 150,96, 145,31, 145,25, 145,15, 141,99, 129,07, 125,29, 121,22, 51,77, 51,50, 51,38, 31,09, 31,05, 30,85 ppm; IR (ATR):  $\nu = 2961, 2920$  (CH), 1627, 1363, 1234, 1142 (s)  $\text{cm}^{-1}$ ; UV/Vis (THF):  $\lambda_{\text{max}}$  ( $\epsilon$ )=652 (235 000), 592 (31 000), 382 nm (132 000  $\text{mol}^{-1} \text{dm}^3\text{cm}^{-1}$ );  $m/z$  (HR MS, EI) 1210,3224  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , počítáno pro  $\text{C}_{54}\text{H}_{59}\text{MgN}_{17}\text{O}_3\text{S}_6+\text{H}^+$ : 1210,3234.

### 6.16. Příprava 2-[3,5-di(*tert*-butyl)-4-hydroxyfenyl]- 9,10,16,17,23,24-hexakis(*tert*-butylsulfanyl)- 1,4,8,11,15,18,22,25-(oktaaza)ftalocyaninu (22)



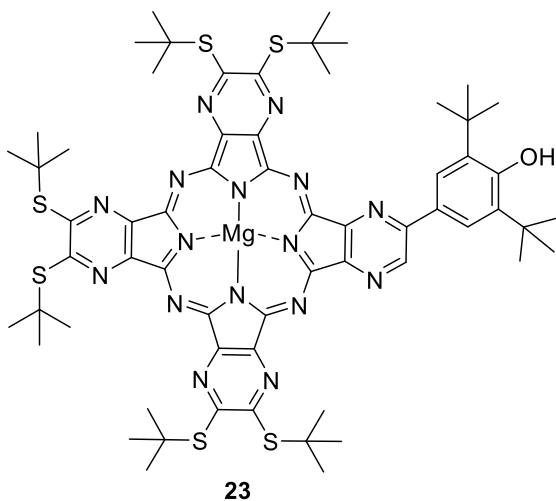
Hořík (2 g, 83,7 mmol) byl navážen do 100 ml baňky. K němu byl přidán čerstvě předestilovaný butanol (50 ml) s pár zrnky jodu. Reakce ponechána při teplotě varu rozpouštědla pod zpětným chladičem 3 hodiny. Po třech hodinách byl přidán další butanol (20 ml), byly přisypány látky **9** (1 g, 2,99 mmol) a **17** (2,75 g, 8,97 mmol)

a reakce probíhala za stejných podmínek 24 hodin za vzniku nejprve oranžového, později zelenočerného zbarvení.

Po ukončení reakce a po zchladnutí bylo rozpouštědlo odpařeno, ke směsi byl přidán roztok MeOH/H<sub>2</sub>O/AcOH (10:10:1) a vše bylo mícháno, dokud nedošlo ke zreagování přebytečného butanolátu hořečnatého. Poté byl produkt zfiltrován, několikrát promyt vodou a ponechán na filtru k vyschnutí na vzduchu.

Zelenočerná látka byla poté rozpuštěna ve směsi CHCl<sub>3</sub>/THF 1:1 (80 ml) a směs míchána na magnetické míchačce při laboratorní teplotě. Poté byla přidána kyselina *p*-toluensulfonová (5,71 g, 30 mmol) a směs byla hodinu míchána za stejných podmínek. Po ukončení reakce bylo rozpouštědlo odpařeno, ke směsi byla přidána voda, směs zfiltrována přes skládaný filtr a látka na filtru ponechána k vyschnutí. Výsledný produkt byl několikrát přečištěn sloupcovou chromatografií s mobilní soustavou TOL/CHCl<sub>3</sub> (2:1) a bylo získáno 200 mg (5,3 %) čistého zelenočerného produktu **22**. Látka nebyla charakterizována, ale použita přímo dále do další reakce.

### 6.17. Příprava 2-[3,5-di(*tert*-butyl)-4-hydroxyfenyl]- 9,10,16,17,23,24-hexakis(*tert*-butylsulfanyl)- 1,4,8,11,15,18,22,25-(oktaaza)ftalocyaninato hořečnatého komplexu (**23**)

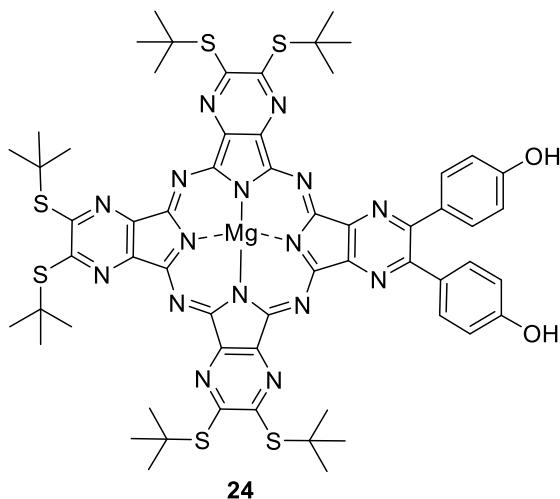


Bezkovový AzaPc **22** (200 mg, 0,159 mmol) byl rozpuštěn v pyridinu (30 ml). K němu byl přidán bezvodý octan hořečnatý (200 mg, 1,4 mmol) a reakce byla při

teplotě varu rozpouštědla zahřívána pod zpětným chladičem 30 minut. Po zchladnutí směsi byl pyridin odpařen, směs promyta vodou, a zfiltrována. Následně bylo několikrát provedeno dočištění sloupcovou chromatografií s mobilní soustavou CHCl<sub>3</sub>/THF (15:1). Výtěžek čistého zelenočerného produktu **23** byl 128,7 mg (63 %) a dalším dočištěním promytím MeOH byly získány čisté krystalky k dalším analýzám.

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>:[D<sub>5</sub>]pyridine, 25 °C, TMS): δ 10,13 (s, 1H,), 8,90 (s, 2H), 2,48 – 2,11 (m, 54H), 1,84 (s, 18H); <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>:[D<sub>5</sub>]pyridine, 25 °C, TMS): δ 158,92, 158,73, 158,37, 158,35, 158,12, 158,10, 157,50, 153,96, 151,57, 151,40, 151,23, 151,13, 150,96, 150,85, 150,52, 150,39, 148,04, 145,35, 145,28, 145,24, 145,21, 142,60, 138,36, 127,90, 125,21, 51,48, 51,44, 51,40, 51,26, 35,23, 31,15, 30,90, 30,74 ppm; IR (ATR): ν = 2960, 2918 (CH), 1558, 1250, 1143 (s) cm<sup>-1</sup>; UV/Vis (THF): λ<sub>max</sub> (ε)=652 (311 000), 591 (40 000), 383 nm (160 000 mol<sup>-1</sup> dm<sup>3</sup>cm<sup>-1</sup>); m/z (HR MS, EI) 1277,4653 [M+H]<sup>+</sup>, C<sub>62</sub>H<sub>76</sub>MgN<sub>16</sub>OS<sub>6</sub>+H<sup>+</sup>: 1277,4635.

### 6.18. Příprava 2,3-bis(4-hydroxyfenyl)-9,10,16,17,23,24-hexakis(*tert*-butylsulfanyl)-1,4,8,11,15,18,22,25-(oktaaza)ftalocyaninato hořečnatého komplexu (**24**)

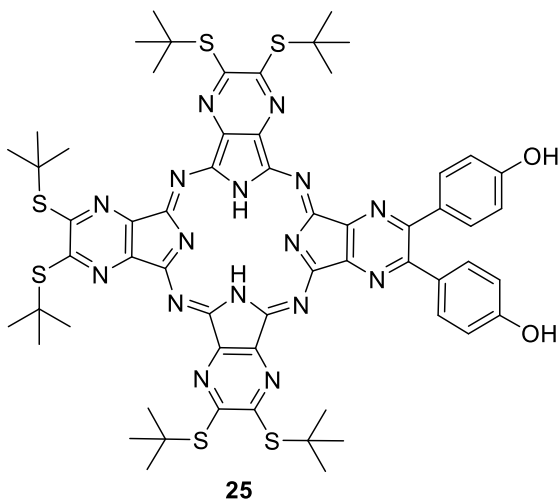


Do 100 ml baňky byl navážen hořčík (838 mg, 34,9 mmol) a byl přidán čerstvě predestilovaný bezvodý butanol (50 ml). Při teplotě varu rozpouštědla byla reakce ponechána pod zpětným chladičem 3 hodiny. Po 3 hodinách byly přidány látky **15** (392 mg, 1,25 mmol) a **17** (1,15 g, 3,74 mmol) a reakce ponechána za stejných

podmínek 24 hodin. Po ukončení reakce bylo zpracování stejné jako u látky **16** zakončené dočištěním sloupcovou chromatografií s mobilní soustavou CHCl<sub>3</sub>/THF (10:1) a poté CHCl<sub>3</sub>/THF/MeOH (9:1:0,4). Získáno bylo 121 mg (7,7 %) zelenočerného produktu **24**. Finální dočištění bylo promytí hexanem za vzniku dostatečně čistého produktu pro analýzy.

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>:[D<sub>5</sub>]pyridine, 25 °C, TMS): δ 11,74 (s, 2H), 8,15 (s, 4H), 7,19 (s, 4H), 2,27 (s, 36H), 2,18 (s, 18H); <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>:[D<sub>5</sub>]pyridine, 25 °C, TMS): δ <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 159,54, 159,07, 158,27, 157,82, 154,33, 151,24, 151,13, 151,04, 150,84, 148,08, 145,42, 145,18, 132,46, 125,67, 116,03, 51,45, 51,40, 51,31, 31,11, 30,92, 30,88 ppm; IR (ATR): ν = 2961, 2923 (CH), 1609, 1518, 1248, 1142 (s) cm<sup>-1</sup>; UV/Vis (THF): λ<sub>max</sub> (ε)=653 (192 000), 593 (26 000), 384 nm (111 000 mol<sup>-1</sup> dm<sup>3</sup>cm<sup>-1</sup>); *m/z* (HR MS, EI) 1257,3656 [M+H]<sup>+</sup>, počítáno pro C<sub>60</sub>H<sub>64</sub>MgN<sub>16</sub>O<sub>2</sub>S<sub>6</sub>+H<sup>+</sup>: 1257,3646.

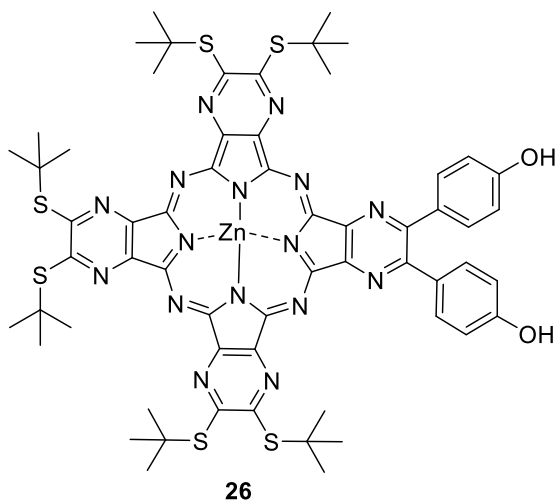
### 6.19. Příprava 2,3-bis(4-hydroxyfenyl)-9,10,16,17,23,24-hexakis(*tert*-butylsulfanyl)-1,4,8,11,15,18,22,25-(oktaaza)ftalocyaninu (**25**)



Zelenočerný AzaPc komplex **24** (54,3 mg, 0,043 mmol) byl rozpuštěn v CHCl<sub>3</sub> (10 ml) a směs míchána na magnetické míchačce při pokojové teplotě. Ke směsi byla přidána kyselina *p*-toluensulfonová (82 mg, 0,43 mmol) rozpuštěná v THF (10 ml) a směs byla za stejných podmínek míchána 1 hodinu. Následně byla rozpouštědla

odpařena, produkt byl promyt vodou, zfiltrován a sraženina na filtru byla vysušena. Vzniklá látka **25** byla ihned použita do další reakce.

## 6.20. Příprava 2,3-bis(4-hydroxyfenyl)-9,10,16,17,23,24-hexakis(*tert*-butylsulfanyl)-1,4,8,11,15,18,22,25-(oktaaza)ftalocyaninato zinečnatého komplexu (**26**)



Bezkovový komplex **25** byl rozpuštěn v pyridinu (10 ml). Následně byl přidán octan zinečnatý (137 mg, 0,749 mmol) a směs byla zahřívána při teplotě varu rozpouštědla 1 hodinu. Po ukončení reakce byl pyridin odpařen, produkt promyt vodou, zfiltrován a ponechán na vzduchu k vyschnutí. K čištění byla dále použita sloupcová chromatografie s mobilní soustavou CHCl<sub>3</sub>/THF/MeOH (9:1:0,4), kterou bylo získáno 29,8 mg (53 % počítáno na výchozí hořečnatý komplex) látky **26**. Produkt byl dále promyt hexanem pro dočištění.

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>:[D<sub>5</sub>]pyridine, 25 °C, TMS): δ 11,76 (s, 2H), 8,14 (d, *J* = 8,2 Hz, 4H), 7,19 (d, *J* = 8,2 Hz, 4H), 2,26 (s, 36H), 2,20 (s, 18H); <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>:[D<sub>5</sub>]pyridine, 25 °C, TMS): δ 159,63, 159,44, 158,67, 158,28, 154,65, 151,70, 151,59, 151,52, 151,32, 147,67, 144,92, 144,68, 144,63, 132,43, 131,10, 116,06, 51,49, 51,37, 31,04, 30,85, 30,82 ppm; IR (ATR): ν = 2959, 2918, (CH), 1609, 1518, 1249, 1142 (s) cm<sup>-1</sup>; UV/Vis (THF): λ<sub>max</sub> (ε) = 653 (122 000), 596 (23 000), 379 (93 000 mol<sup>-1</sup> dm<sup>3</sup>cm<sup>-1</sup>); *m/z* (HR MS, EI) 1297,3085 [M+H]<sup>+</sup>, počítáno pro C<sub>60</sub>H<sub>64</sub>N<sub>16</sub>O<sub>2</sub>S<sub>6</sub>Zn+H<sup>+</sup>: 1297,3087.

## 6.21. Příprava mikroemulzí

Mikroemulze byly připravovány dle již dříve publikovaného postupu.<sup>2</sup> Cremophor EL (BASF, 72 mg) a triglyceridy se střední délkou řetězce (MCT, Ecogreen Oleochemicals, 29 mg) byly rozpuštěny v CHCl<sub>3</sub> (3 ml). Do baňky bylo přidáno 2,5 ml zásobního roztoku o koncentraci 100 μM pro AzaPc (**16**, **19**, **20**, **21**, **23**, **24**, **26**) a 1 mM koncentraci pro prekurzory (**6**, **7**, **8**, **9**, **15**). Zásobní roztoky byly dříve připraveny rozpuštěním v THF. Směs po přidání zásobního roztoku byla promíchána a rozpouštědla odpařena na vakuové odparce při hlubokém vakuu za odstranění všech reziduí rozpouštědel. Následně byly přidány 4 ml Britton-Robinsonova pufru o různém pH (Tabulka 1), které bylo vybráno podle očekávaného pK<sub>a</sub> jednotlivých látek. Dále byla každá emulze homogenizována na vortexové míchačce a poté kvantitativně převedena do 5ml odměrné baňky a doplněna po rysku pufrům o příslušném pH. Stejným způsobem byla připravena i kontrolní mikroemulze bez zásobního roztoku. Tímto způsobem byly připraveny zásobní roztoky vzorků v mikroemulzi o koncentraci 50 μM pro AzaPc a 500 μM pro prekurzory.

Britton-Robinsonův pufr je směs kyselin: 0,04M H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, 0,04M CH<sub>3</sub>COOH a 0,04M H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, jejichž pH je upravováno přidáváním určitého množství base: 0,2M NaOH na požadované pH. Takto lze připravovat rozmezí pH od 2 do 12.

**Tabulka 1: Příprava mikroemulzí s Britton-Robinsonovým pufrům**

AzaPc	pufr (pH)	prekurzor	pufr (pH)
<b>16</b>	10	<b>6</b>	9
<b>19</b>	10	<b>7</b>	7,5
<b>20</b>	8,5	<b>8</b>	4,5
<b>21</b>	5,5	<b>9</b>	11
<b>23</b>	11,5	<b>15</b>	9,5
<b>24</b>	10,5		
<b>26</b>	10,5		

## 6.22. Příprava liposomů

Do 100 ml kulaté baňky byl navážen dioleoylfosfatidylcholin (DOPC, 19,7 mg), který byl následně rozpuštěn v  $\text{CHCl}_3$  (3 ml). Bylo přidáno 250  $\mu\text{l}$  zásobního roztoku AzaPc v THF o koncentraci 100  $\mu\text{M}$  a rozpouštědlo odpařeno na vakuové odparce při 37 °C. Pro odstranění reziduí všech rozpouštědel byla doba odpařování 30 minut při tlaku 5 mbar. Následně byl přidán 1 ml Britton-Robinsonova pufru o pH (Tabulka 2) a lipidy jemně smyty krouživými pohyby ze stěn baňky za vzniku multilamelárních vezikul. Směs byla poté zhomogenizována na vortexové míchačce a ponechána k bobtnání po dobu 3 hodiny. Poté byly liposomy extrudovány na stejnou velikost pomocí ručního extrudéru, ve kterém byly protlačovány tam a zpět přes dva polykarbonátové filtry s velikostí pórů 100  $\mu\text{m}$  přesně 21krát. Takto byly získány suspenze liposomů, ve kterých byly inkorporovány jednotlivé látky o koncentraci 25  $\mu\text{M}$ .

**Tabulka 2: Příprava liposomů s Britton-Robinsonovým pufrem**

AzaPc	pufr (pH)
16	11,5
19	11,5
20	9
21	8,5
23	12,1
24	11,5
26	11,5

## 6.23. Testování připravených látek

Určitý Britton-Robinsonův pufr (pH 1,7–11,7), případně Batesův a Bowerův pufr (pH 11,8–13,0) byl napipetován do kyvety (2,5 ml) a k němu byla přidána testovaná látka v mikroemulzi (50  $\mu\text{l}$ ), či v liposomech (25  $\mu\text{l}$ ) nebo v případě prekurzorů také 125  $\mu\text{l}$  zásobního roztoku prekurzoru v DMSO (finální konc. 5%).

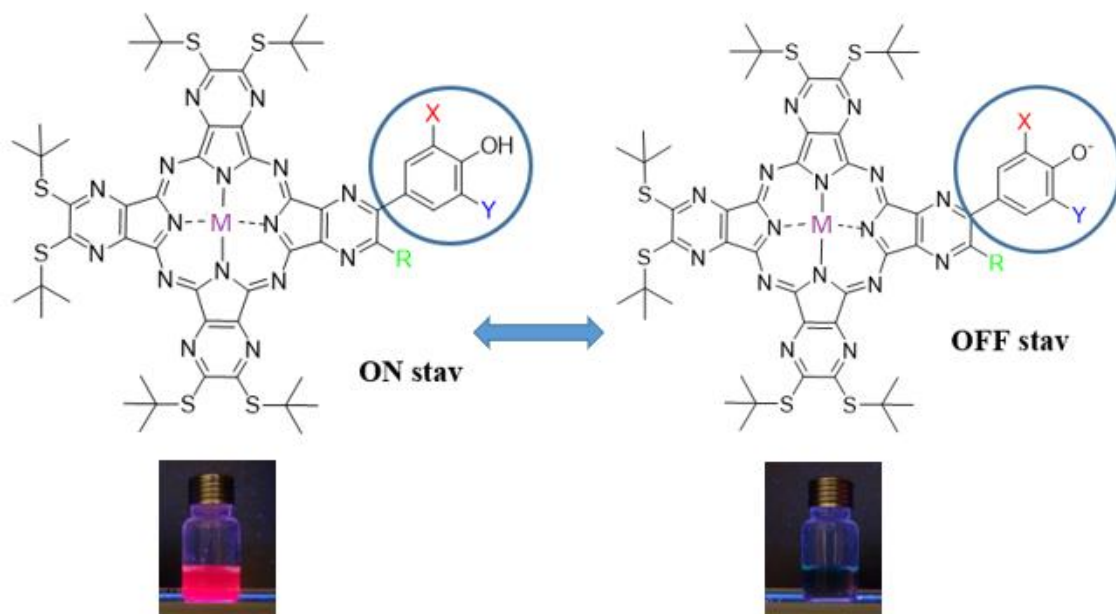
Batesův a Bowerův pufr se skládá z 0,2M KCl a přidáváním 0,2M NaOH lze upravovat pH v rozmezí 12–13.

Následně byla změřena absorpční spektra a fluorescence. Excitace pro měření fluorescence byla prováděna v izosbestickém bodě zjištěném z absorpčních spekter (u AzaPc většinou kolem 590–600 nm). Po změření byly vyneseny závislosti maxima fluorescence (AzaPc) či absorbance (prekurzory) na pH pufru. Takto získané titrační křivky odpovídaly Henderson-Hasselbalchově rovnici a umožnili vypočítat  $pK_a$  testovaných látek nelineární regresí v programu Prism 8.0 for Windows (GraphPad Inc.).

## 7. Diskuze

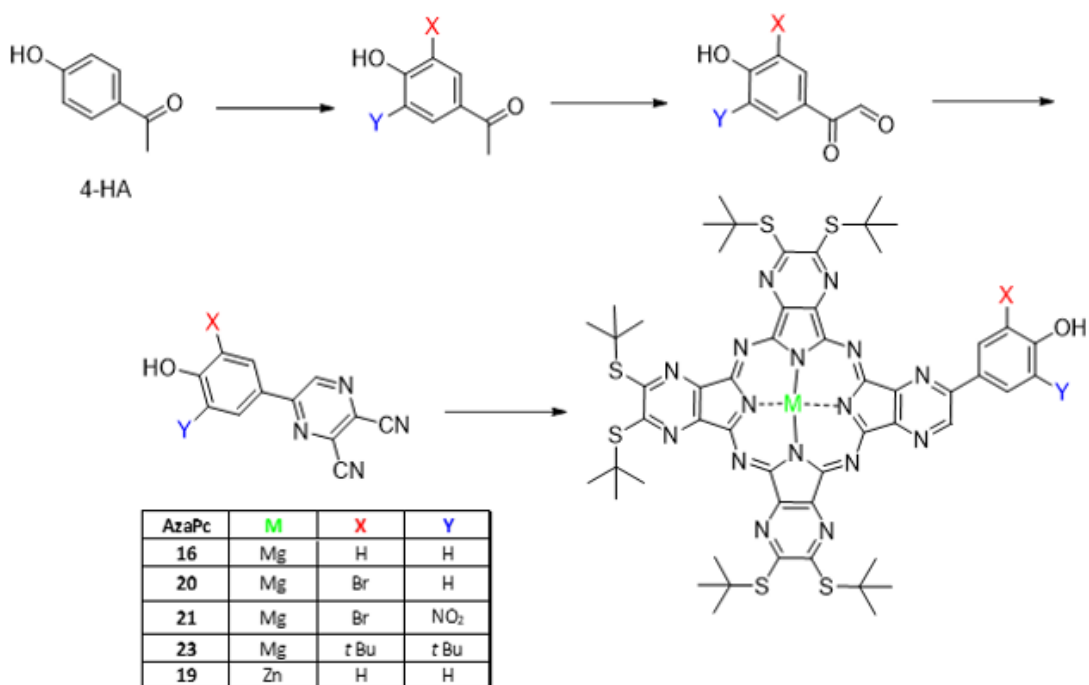
V průběhu své práce jsem se zabývala syntézou nesymetrických AzaPc, které nesou na periferii jednu, nebo dvě fenolické skupiny s rozdílnými substituenty, a následně jsem měřila fotofyzikální vlastnosti těchto molekul v mikroemulzích či liposomech, které měly simulovat jednoduchý model biologické membrány. Pokud jsou tyto AzaPc v neionizovaném stavu, jsou schopny vyzařovat fluorescenci, s jejich ionizací tato schopnost klesá (Obrázek 14). U molekul AzaPc s fenolickou skupinou dochází vlivem pH prostředí k přepínání z ON do OFF stavu, které je zapříčiněno intramolekulárním přenosem (ICT), kdy se ionizovaná periferní fenolátová skupina stává donorem pro elektrondeficitní makrocycklus AzaPc a dojde tak k poklesu fluorescence. Tento stav je reverzibilní. V jakém stavu se látka nachází je ovlivněno jednak pH prostředí, ale také  $pK_a$  rozpoznávací části molekuly, které se může modulovat přítomností jednotlivých substituentů.

Syntézou různě substituovaných AzaPc citlivých k okolnímu pH se již v minulosti naše skupina zabývala, ale pH, při kterém se tyto látky nacházely v aktivním stavu bylo příliš nízké<sup>1</sup> nebo příliš vysoké.<sup>2</sup> Cílem mojí diplomové práce tak bylo najít vhodnou substituci rozpoznávací části AzaPc, při které by bylo možné detekovat změny fluorescence při hodnotách pH blízkých fyziologickému. Modifikacemi na periferii AzaPc (substituenty X a Y, Obrázek 14) jsme chtěli získat pestrou škálu látek, u kterých docházelo ke změnám intenzity fluorescence podle měnícího se pH prostředí. Centrální kavita AzaPc může komplexovat řadu různých kationtů kovů nebo polokovů. Z hlediska fotofyzikálních parametrů jsou ovšem pro naši aplikaci nejvhodnější hořečnaté komplexy, které vykazují nejsilnější fluorescenci.<sup>6</sup> V rámci práce bylo připraveno i několik komplexů zinečnatých pro studium vlivu centrálního kationtu na  $pK_a$  senzorké části.

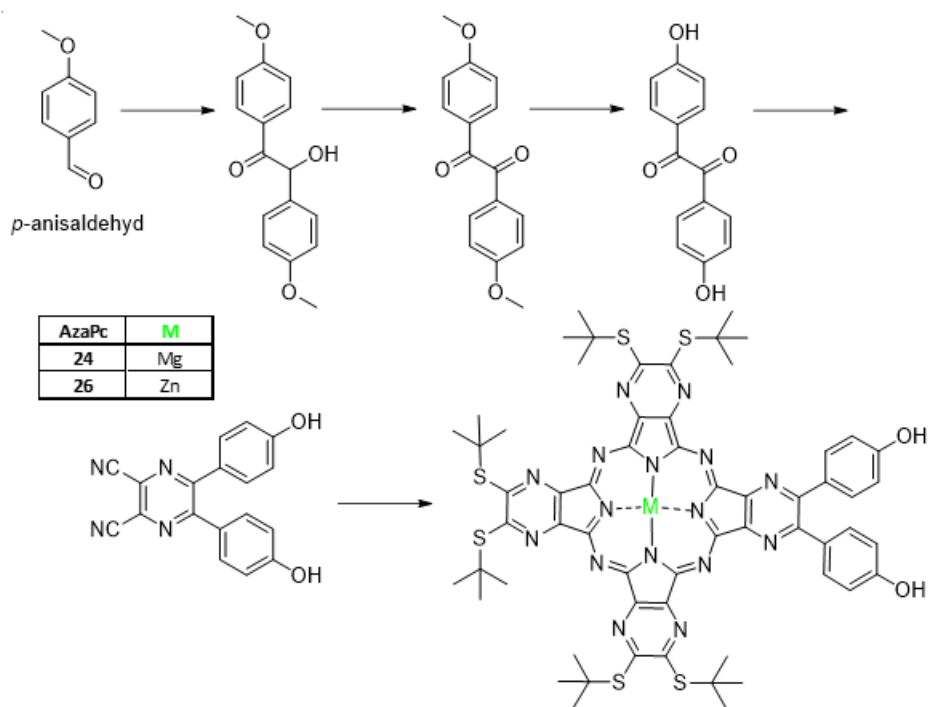


**Obrázek 14: Schéma přepínání fluorescence u připravených AzaPc**

Syntéza probíhala obecně v několika krocích, kdy bylo třeba z výchozí látky, kterou byl v případě AzaPc s jednou fenolickou skupinou 4-HA, a v případě AzaPc se dvěma fenoly *p*-anisaldehyd, připravit substituovaný pyrazin-2,3-dikarbonitril. Ten byl poté cyklotetramerizační reakcí přeměněn v požadovaný AzaPc (Schéma 1, Schéma 2).



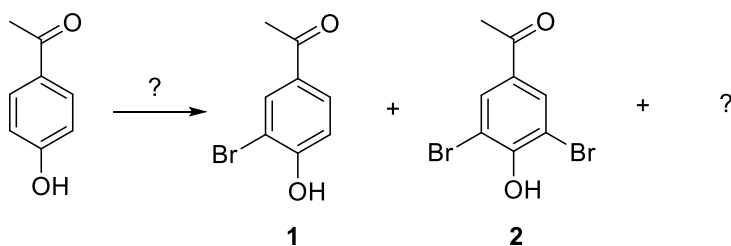
**Schéma 1: Návrh syntézy AzaPc s jednou fenolickou skupinou**



**Schéma 2: Návrh syntézy AzaPc se dvěma fenolickými skupinami**

## 7.1. Příprava prekurzorů

Příprava pyrazin-2,3-dikarbonitrilů probíhala kondenzací DAMN s ketoaldehydem nebo diketonem (Schéma 1, Schéma 2). Příslušný ketoaldehyd byl vždy připraven oxidací substituovaných 4-hydroxyacetofenonů. S výjimkou prekurzoru **6**, kdy do oxidační a následné kondenzační reakce vstupoval nesubstituovaný 4-HA, bylo třeba na 4-HA nejprve navázat požadované substituenty.



**Schéma 3: Návrh syntézy mono a dibromovaného produktu**

Pro přípravu prekurzoru **7** byla snaha najít selektivní bromační reakci, ve které by reagoval 4-HA za vzniku pouze/převážně monobromovaného produktu **1**. To se však ukázalo jako poměrně obtížné, přestože publikované postupy prezentovaly různé podmínky (Tabulka 3) jako selektivní, navíc s vysokými výtěžky. V laboratoři jsme

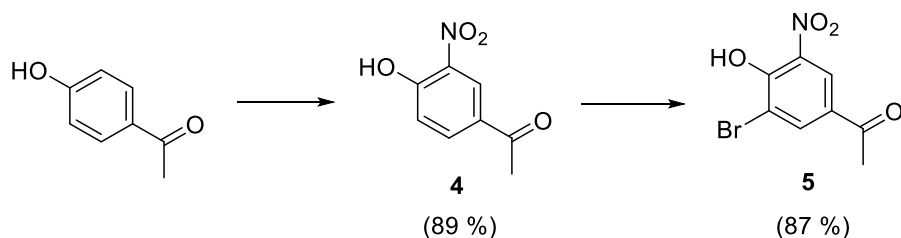
vyzkoušeli řadu reakčních podmínek a reakci zprvu monitorovali pouze na TLC k vybrání těch nejvhodnějších. Při syntéze vždy vznikala směs výchozí látky, monobromovaného produktu **1** a dibromovaného produktu **2** (Schéma 3) u některých reakcí navíc vznikal další produkt (nebyl izolován). Dle TLC analýzy byla nakonec vybrána reakce s methenaminovým bromáčním činidlem, které bylo nejprve připraveno reakcí methenaminu s bromem. Také v tomto případě vznikala směs dvou produktů, která musela být přečištěna sloupcovou chromatografií, i proto byl výtěžek hodně nízký oproti publikovanému postupu.

**Tabulka 3: Podmínky bromáčních reakcí**

Reaktanty	Rozpouštědlo	Podmínky	Publikovaný výtěžek	Skutečný výtěžek
DABCO-Br <sub>2</sub>	DCM	- 5 °C	92 % <sup>29</sup>	směs, neizolováno
Methenamin-Br <sub>2</sub>	DCM	- 5 °C	88 % <sup>30</sup>	24 %
HBr, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	dioxan	laboratorní teplota	90 % <sup>28</sup>	směs, neizolováno
Br <sub>2</sub> , TEA	DCM	-5 °C	-	směs, neizolováno
Br, NaOAc	AcOH	laboratorní teplota	-	směs, neizolováno

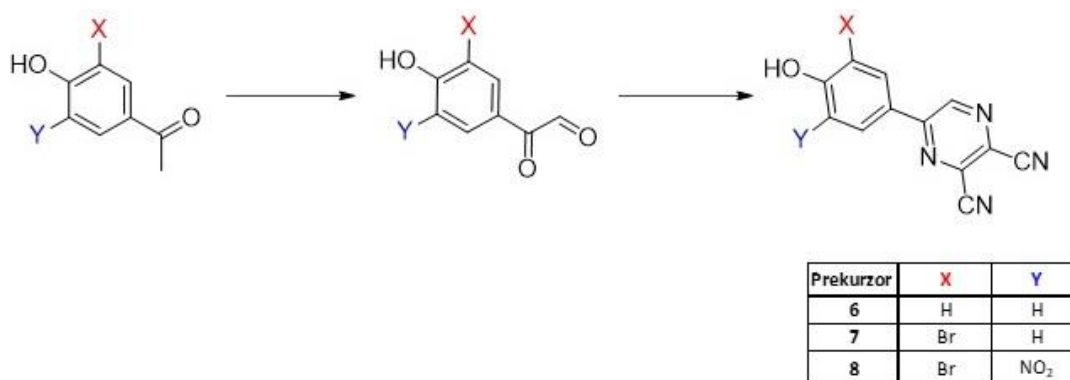
Po potížích se syntézou prekurzoru **7** bylo pro syntézu prekurzoru **8** využito opačného postupu, kde jsme s výhodou využili látky **4** (také vhodná pro tuto studii) jako meziprojektu (Schéma 4).

Nejprve tak byla navázána nitroskupina elektrofilní substitucí 4-HA pomocí KNO<sub>3</sub> v prostředí 96% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> za vzniku látky **4** ve velmi dobrém výtěžku 89 %. Následně byla provedena bromáční reakce tohoto produktu s bromem v kyselém prostředí. V tomto případě se brom vázal jen do jedné polohy i díky zápornému mezomernímu efektu nitroskupiny a bylo tak dosaženo výtěžku 87 % látky **5** i s přečištěním sloupcovou chromatografií.



#### Schéma 4: Návrh syntézy substituovaného 4-HA

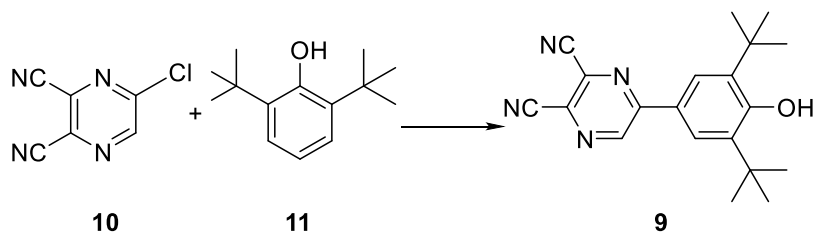
Příslušně substituované 4-hydroxyacetofenony **1**, **5** a jeden nesubstituovaný 4-HA byly dále podrobeny oxidaci pomocí  $\text{SeO}_2$  za vzniku ketoaldehydů, které nebyly z reakce izolovány, ale po přidání DAMN a okyselení okamžitě kondenzovaly za vzniku příslušných pyrazin-2,3-dikarbonitrilů **6**, **7**, **8** (Schéma 5).



#### Schéma 5: Návrh syntézy 2,3-dikarbonitrilů

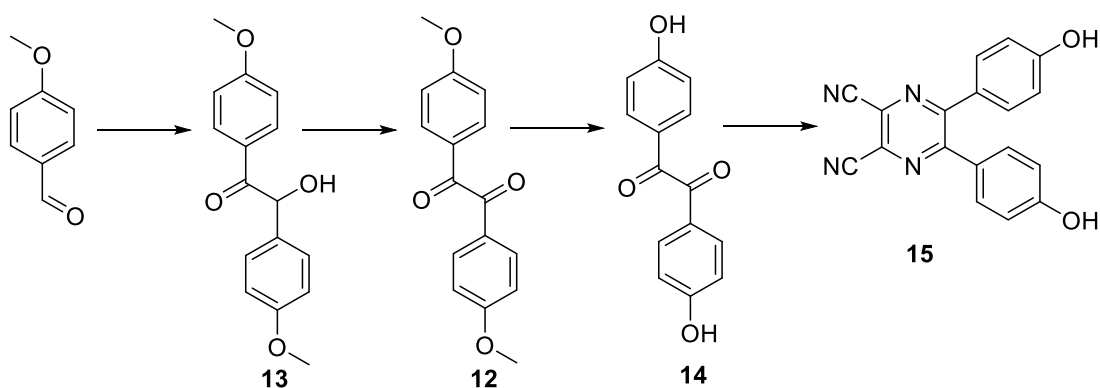
Syntéza prekurzorů **9** a **15** proběhla dle již publikovaných postupů.<sup>34,36</sup>

K přípravě prekurzoru **9** bylo využito reakce 2,6-di(*tert*-butyl)fenolu s 5-chlorpyrazin-2,3-dikarbonitrilem (Schéma 6). Zatímco u méně objemných substituentů v polohách 2 a 6 na fenolu by probíhala nukleofilní substituce *O*-nukleofilem, v případě *tert*-butylů jako substituentů, které stericky brání OH skupinu, dochází k reakci *C*-nukleofilu a tím ke vzniku pyrazin-2,3-dikarbonilu **9**, který byl přečištěn sloupcovou chromatografií a použit do další reakce.



#### Schéma 6: Návrh syntézy prekurzoru 9

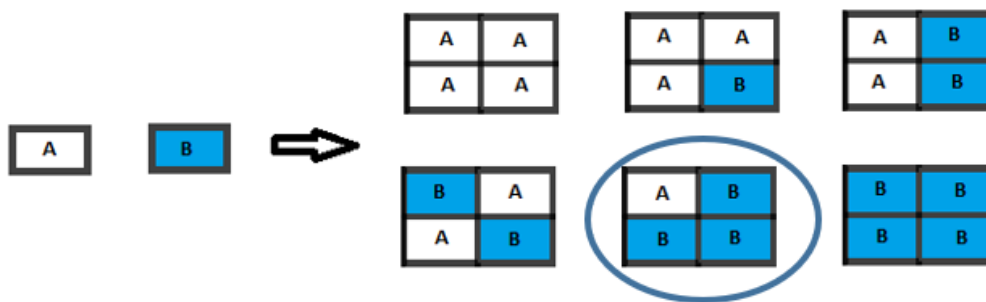
V případě přípravy prekursoru **15** bylo využito již vyzkoušených podmínek benzoinové kondenzace *p*-anisaldehydu za katalýzy bisbenzoimidazoliovým katalyzátorem (BBIM **12**), který byl připraven dle publikovaného postupu.<sup>37</sup> Po ukončení reakce a dalším zpracování byl produkt bez izolace ihned oxidován a až po této reakci byl produkt izolován ve formě diketonu **12**. Hydrolýzou kyselinou bromovodíkovou byl získán diketon **14** s volnými hydroxylovými skupinami, který byl použit do kondenzační reakce s DAMN. Izolace pyrazin-2,3-dikarbonitrilu **15** se však ukázala jako obtížnější, k přečištění se využilo jak sloupcové chromatografie, tak krystalizace z MeOH, kvůli naprosto identickým retenčním faktorům výchozího diketonu a pyrazin-2,3-dikarbonitrilu (Schéma 7).



*Schéma 7: Návrh syntézy 2,3-dikarbonitrilu se dvěma fenoly*

## 7.2. Příprava AzaPc

Všechny připravené prekursorzy byly použity ve finální cyklotetramerizační reakci za vzniku příslušných AzaPc, jejichž vznik byl iniciován butanolátem hořečnatým. Do reakce vstupoval příslušný pyrazin-2,3-dikarbonitril s navázanými fenolickými substituenty (**6**, **7**, **8**, **9** nebo **15**) a 5,6-bis(*tert*-butylsulfanyl)pyrazin-2,3-dikarbonitril **17** (prekursorzy A a B). Touto cyklotetramerizační reakcí vzniká směs šesti kongenerů, které obsahují různé kombinace prekursorů A a B (Obrázek 15). Jaké zastoupení jednotlivé kombinace budou mít je určeno stechiometrickým poměrem prekursorů, proto pro získání nesymetrického AzaPc (ABBB) v nejvyšším výtěžku bylo využito poměru složek A a B 1:3.



**Obrázek 15: Kombinace jednotlivých kongenerů vzniklých kombinací prekurzoru A a B s vyznačeným požadovaným produktem**

V reakční směsi vznikaly ovšem vždy hořčnaté komplexy všech kongenerů, u kterých bývá často problém s jejich rozdělením. V našem případě u naprosté většiny látek byly dostatečné rozdíly v retenci na silikagelu a látky bylo možno odseparovat sloupcovou chromatografií již jako hořčnaté komplexy.

U AzaPc **23** však kvůli podobným retenčním faktorům nemohl být požadovaný kongener oddělen sloupcovou chromatografií ve formě hořčnatého komplexu. Látka musela být vystavena působení kyseliny *p*-toluensulfonové, čímž došlo k odkovení za vzniku volného ligandu nazývaného bezkovový AzaPc. Následně byl kongener izolován a centrální kationt mohl být opět chelatován zpátky do centra již vyčištěného kongeneru. Tohoto reverzibilního kroku, kdy působením kyseliny dochází k odkovení centrálního kationtu, který lze následně nahradit jiným, bylo využito i v případě přípravy zinečnatých komplexů AzaPc **19** a **26**.

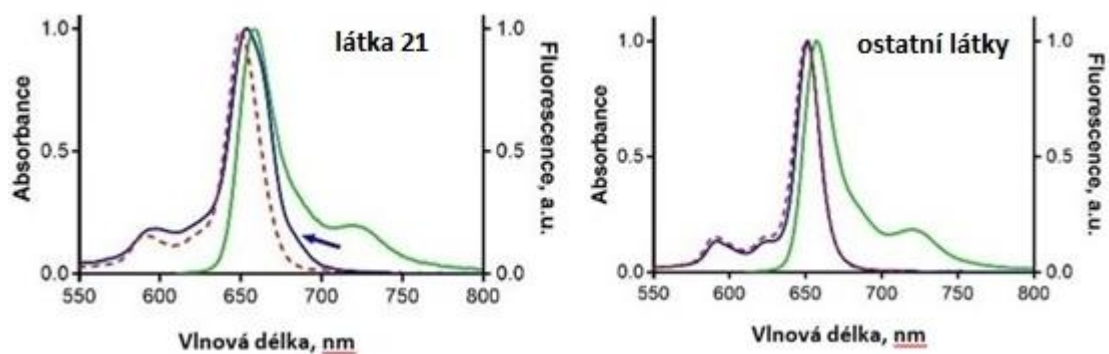
### 7.3. Fotofyzikální vlastnosti

Zatímco v organických rozpouštědlech jsou AzaPc rozpustné dobře, ve vodě rozpustné nejsou, proto musely být pro testování fotofyzikálních vlastností ve vodném prostředí inkorporovány do vhodného nosičového systému. Jedním z těchto nosičů byly mikroemulze, ve kterých byly testované látky inkorporovány do jejich olejových částecek, a druhým byly liposomy, jejichž lipidová dvojvrstva představuje jednoduchý model biomembrány. Měření fotofyzikálních vlastností AzaPc probíhalo jak v mikroemulzích, tak v liposomech, zatímco pyrazin-2,3-dikarbonitryly byly testovány pouze v mikroemulzích a následně také v pufru po naředění ze zásobního DMSO roztoku. Na základě jejich fotofyzikálních vlastností se nepředpokládá, že by byly

pyraziny využitelné přímo v biologickém prostředí, a proto testování v liposomech postrádalo význam.

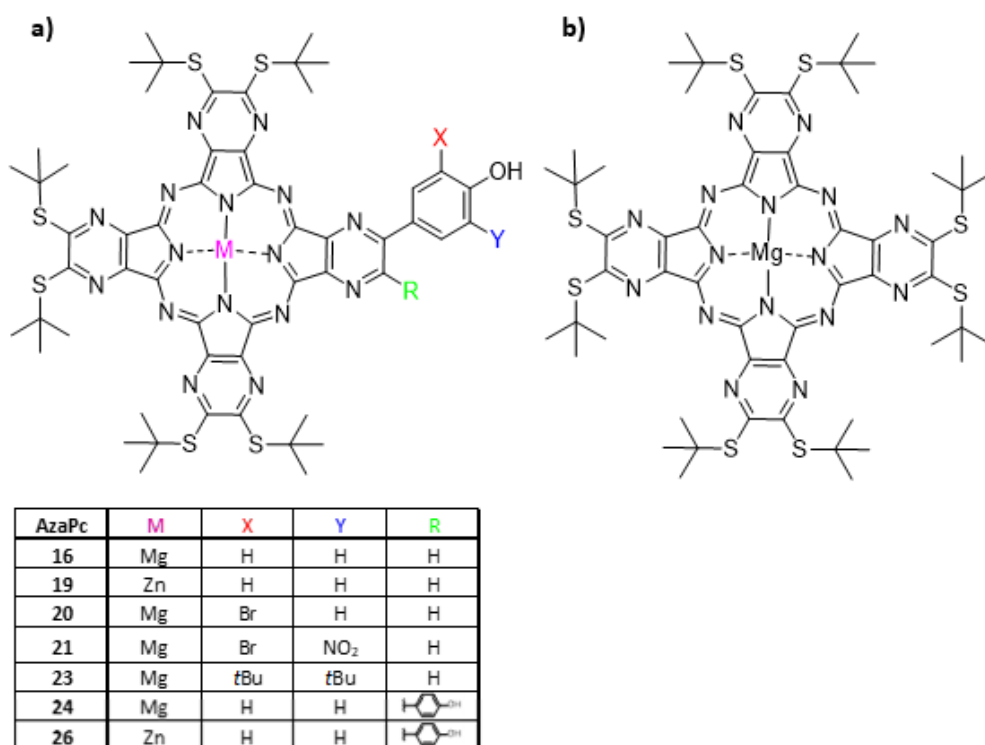
### 7.3.1. AzaPc

Pro AzaPc je typický tvar jejich absorpčního spektra, a to vysokoenergetický B-pás (cca 360 nm) a nízkoenergetický Q-pás (cca 652 nm), jak už bylo popsáno v teoretické části. Podle tvaru Q-pásu je mimo jiné možné určit, zda se látka nenachází v agregovaném stavu, protože agregace je nežádoucí jev, který může výrazně snižovat fluorescenci. Všechny testované látky byly v prostředí THF monomerní, jak bylo zjištěno měřením absorpčních spekter, pouze látka **21** vykazovala svým rozšířeným tvarem Q-pásu známky agregace (Obrázek 16).



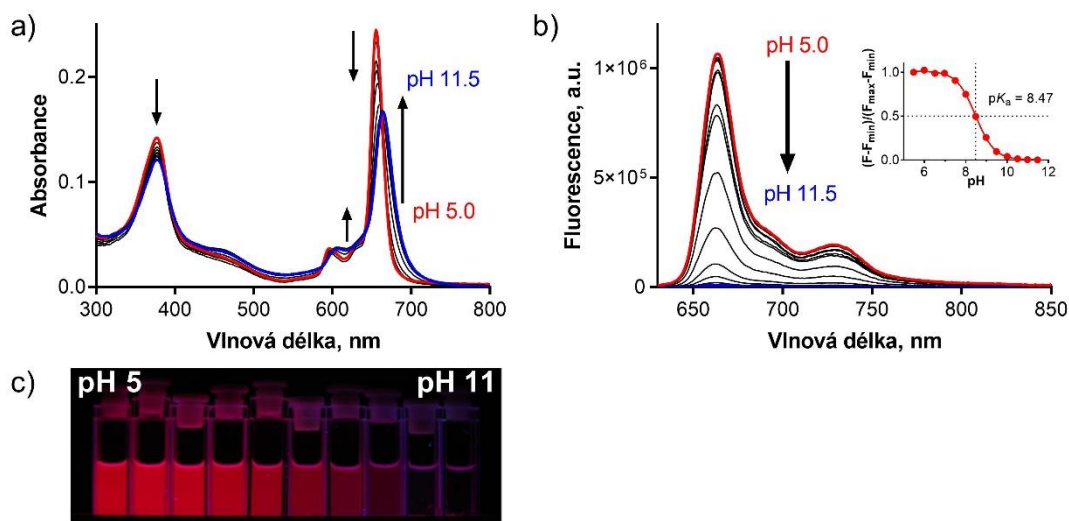
**Obrázek 16:** Důkaz agregace látky 21 oproti ostatním látkám (místo v grafu dokazující agregaci znázorňuje šipka). Spektra měřená v THF. Absorpce (modrá), emise (zelená), excitace (červená přerušovaná čára).

Spektra jednotlivých látek, (jejichž přehled je Obrázek 17) byla při měření prakticky stejná a nedocházelo k posunům v poloze absorpčního maxima, z čehož vyplývá, že substituce nesymetrické části AzaPc má pouze nepatrný vliv na absorpční spektrum. Toto tvrzení bylo podloženo použitím kontrolní látky – symetrického AzaPc **27** (Obrázek 17), který místo fenolické skupiny v rozpoznávací části obsahoval *tert*-butylsulfanylové substituenty. Absorpční spektrum i této látky bylo prakticky shodné s nesymetrickými deriváty.



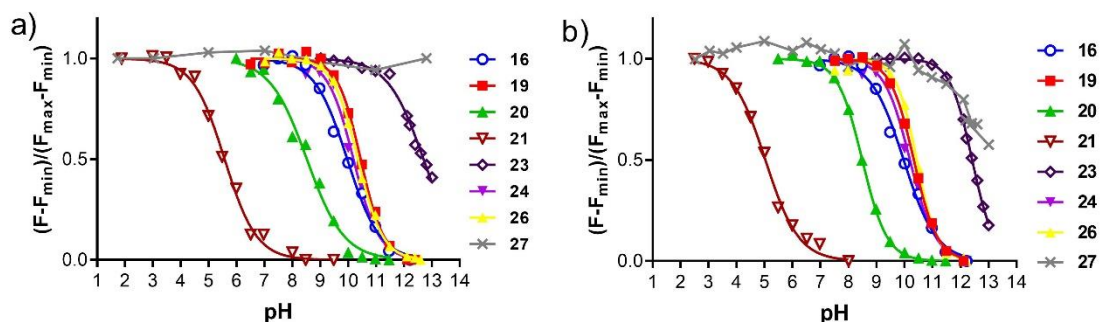
**Obrázek 17: Přehled všech syntetizovaných struktur (a), struktura kontrolní látky 27 (b)**

Měřením absorpčních spekter v mikroemulzích a liposomech bylo zjištěno, že i zde jsou rozdíly v absorpčních spektrech mezi jednotlivými látkami velmi malé. Při změnách okolního pH, dochází k drobnému bathochromnímu posunu při vyšších pH, ale tyto změny jsou tak nepatrné, že se nedají použít v praktické aplikaci. Na rozdíl od absorpčních spekter změny v intenzitě fluorescence byly často až o dva řády rozdílné, jako důsledek přechodu mezi protonizovanou (ON) a deprotonizovanou (OFF) formou, kdy dochází ke zhášení fluorescence (Obrázek 18)



**Obrázek 18:** Změny v absorpčních (a) a fluorescenčních (b) spektrech v závislosti na měnícím se pH pro látku 20 v mikroemulzi. Pás kyvet v různém pH s vlivem na fluorescenci (c). V obrázku (b) je vložený graf se stanovením pK<sub>a</sub>.

Intenzita fluorescence v emisním maximu zkoumaných látek byla následně vynesena do grafu jako závislost na pH, ze které bylo možné stanovit jejich pK<sub>a</sub>. Tyto křivky odpovídající Henderson-Hasselbachově rovnici (Obrázek 19) byly stanovovány v mikroemulzích a liposomech pro každý nosič zvlášť. V případě liposomů je předpokládáno, že podobné chování by měly látky v membránách biologických systémů.



**Obrázek 19:** Graf závislosti fluorescence na pH pro všechny látky v liposomech (a) a mikroemulzích (b)

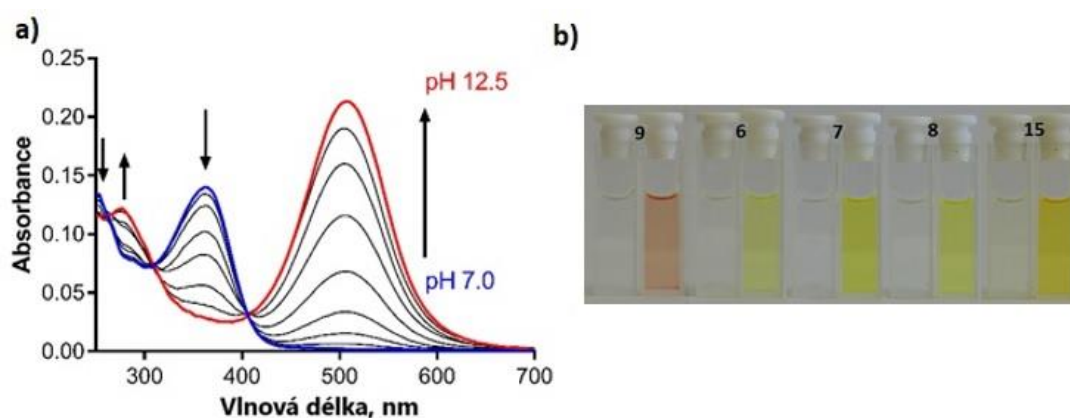
Při testování látek v pH > 12 pomocí Batsova a Bowerova pufru byly zaznamenány poklesy fluorescence v případě mikroemulzí i u kontrolního symetrického AzaPc, který byl v pufrch o nižším pH ke změnám pH inertní. Vzhledem k tomu, že v liposomech žádné poklesy fluorescence v rozmezí pH 2 – 13 zjištěny nebyly, jednalo

se pravděpodobně pouze o změny v nosiči, a proto data v mikroemulzích nad pH 12 nelze považovat za zcela relevantní.

### 7.3.2. Prekurzory

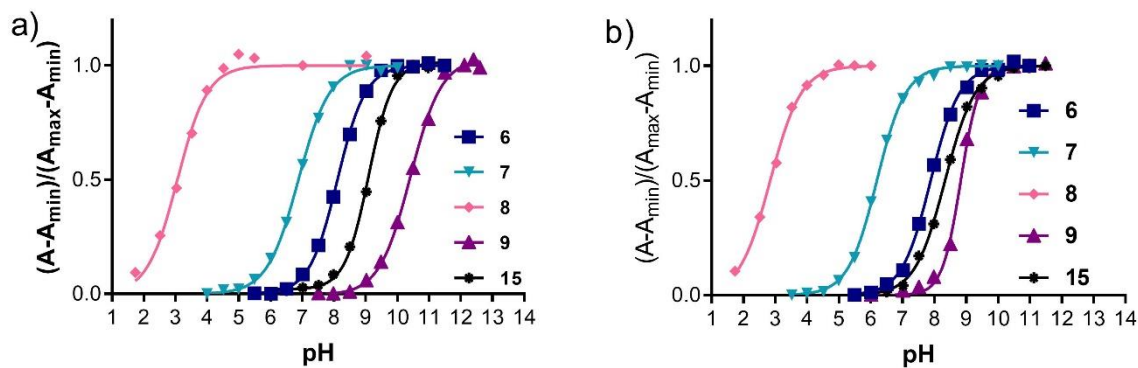
Testovány byly také příslušně substituované pyrazin-2,3-dikarbonitrily (**6**, **7**, **8**, **9**, **15**) v mikroemulzích. Tyto látky by svojí donor-akceptorovou povahou mohly být potenciálními senzory se schopností reagovat na změny pH, navíc jednodušší na přípravu než AzaPc. Jak se však ukázalo, absorpční maxima těchto látek pod 400 nm nebyla příliš vhodná pro biologickou aplikaci, taktéž slabá fluorescence, která byla obvykle pod 500 nm, proto prekurzory ani nebyly testovány v liposomech. U prekurzoru **8** navíc nebyla fluorescence vůbec detekována.

Oproti minimálním změnám fluorescence však u všech prekurzorů probíhaly velké změny absorpčních spekter v závislosti na pH (Obrázek 20), díky kterým by mohly být využity jako indikátory acidobazických titrací. Výhodou těchto indikátorů je schopnost zaznamenat ekvivalenční bod pouhým okem, kdy látky přecházely z bezbarvých v kyselém pH do žlutých (**6**, **7**, **8**), žluto-oranžových (**15**) či světle růžových (**9**) v zásaditém pH (Obrázek 20). Z tohoto důvodu byly prekurzory testovány také přímo ve vodě za přídavku DMSO, kde změny v absorpčních spektrech byly velmi podobné chování pyrazinů v mikroemulzích. Testování ve vodě za přídavku DMSO se ukázal jako možný pouze pro prekurzory, ne však pro AzaPc, které v tomto rozpouštědle silně agregovaly.



**Obrázek 20:** Absorpční spektra pyrazinu **9** v různém pH v mikroemulzi (a). Barvy roztoků studovaných pyrazinů v neionizované (levá kyveta) a ionizované (pravá kyveta) formě (b).

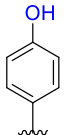
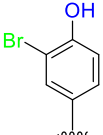
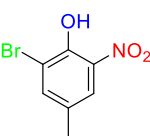
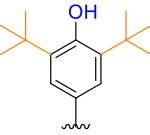
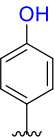
Stejně jako v případě AzaPc i u pyrazinových prekurzorů lze zjistit hodnotu  $pK_a$  pro jednotlivé látky, jen v tomto případě byla vynesena závislost absorbance ionizované formy na pH (Obrázek 21).



**Obrázek 21:** Závislost absorbance pro prekurzory v mikroemulzích (a) a ve vodě s DMSO (b)

### 7.3.3. Přehled $pK_a$ pro AzaPc a prekurzory

**Tabulka 4: Hodnoty  $pK_a$  pro prekurzory a AzaPc v různých prostředích**

Substituent	Prekurzory		AzaPc	
	mikroemulze	voda/DMSO	mikroemulze	liposomy
	8,11	7,88	10,25 Mg 10,33 Zn	9,97 Mg 10,35 Zn
	6,88	6,19	8,47	8,52
	3,06	2,84	5,03	5,59
	10,37	8,83	12,42	12,7
2 x 	9,05	8,33	10,61 Mg 10,44 Zn	10,19 Mg 10,45 Zn

Jak bylo předpokládáno v cíli práce a vyplývá ze souhrnné tabulky hodnot  $pK_a$  (Tabulka 4), substituenty na fenolu ve velké míře ovlivňují  $pK_a$  rozpoznávací části. Elektron-donorové substituenty (*tert*-butyly)  $pK_a$  molekuly zvyšují, zatímco elektron-akceptorové (nitro- skupina, brom-)  $pK_a$  snižují. Dále můžeme porovnat  $pK_a$  AzaPc a příslušného prekurzoru, kdy prekurzor má vždy nižší hodnotu  $pK_a$ . Je to dáno tím, že pyrazin-2,3-dikarbonitril je výrazným elektronovým akceptorem a zvyšuje tak kyselost fenolu více než makrocyklus AzaPc. O něco vyšší hodnoty  $pK_a$  měly také AzaPc se dvěma fenolickými skupinami, což bylo způsobeno sníženým elektronovým vlivem pyrazinu nebo AzaPc na fenolickou skupinu díky nekoplanárnímu uspořádání dvou aromatických jader, jak již bylo diskutováno v předchozí diplomové práci.<sup>34</sup>

Při porovnání hodnot měřených v mikroemulzích a liposomech, rozdíly nejsou příliš výrazné. Přesto by měření v liposomech mělo více odpovídat chování jednotlivých látek v biologickém systému.

Hořečnaté komplexy se ukázaly jako vhodnější pro syntézu fluorescenčních senzorů, protože mají vyšší kvantové výtěžky fluorescence na rozdíl od zinečnatých komplexů, které se vyznačují vyšší produkcí singletového kyslíku, jak už bylo publikováno dříve<sup>6</sup> a měřením potvrzeno. Hodnoty  $pK_a$  hořečnatých a zinečnatých komplexů se prakticky neliší, vzniklé rozdíly jsou způsobeny v rámci experimentální chyby.

## 8. Závěr

V průběhu mé práce jsem připravila nesymetrické AzaPc nesoucí ve své rozpoznávací části jednu nebo dvě fenolické skupiny. Tyto AzaPc byly z prekurzorových pyrazin-2,3-dikarbonitrilů připraveny cyklotetramerizační reakcí za vzniku hořečnatých a zinečnatých komplexů.

Syntetizované pyrazin-2,3-dikarbonitrily a AzaPc byly poté inkorporovány do vhodného nosiče, kterým byly mikroemulze a liposomy, a byla u nich měřena absorpční a fluorescenční spektra v závislosti na okolním pH pufru a stanovena hodnota  $pK_a$  rozpoznávací části. Měřením bylo zjištěno, že AzaPc fungují jako senzory citlivé na změny pH, kdy jejich vlivem docházelo k reverzibilnímu přepínání mezi ionizovaným a neionizovaným stavem a tím k vyzařování nebo zhášení fluorescence. Stejně citlivě se ke změnám pH chovaly i jejich prekurzory, které reagovaly výraznými změnami absorpčních spekter. Tato teorie o přepínání mezi ON a OFF stavem byla podpořena měřením symetrického AzaPc bez rozpoznávací fenolické části a jeho prekurzoru, u kterých ke změnám jejich spekter nedocházelo, a nacházely se stále v ON stavu.

K jakým hodnotám pH budou látky citlivé bylo určeno  $pK_a$  jejich rozpoznávací části a vhodnou modifikací substituentů tak lze připravit širokou škálu senzorů pro různorodé aplikace. AzaPc senzory s nejkyselějším  $pK_a \sim 5-6$  mohou být využity k monitorování změn pH buněčných struktur s kyselým kompartmentem jako jsou endozomy nebo lysozomy.<sup>40</sup> Senzory s  $pK_a$  okolo 7-8 mohou být využity při výzkumu mořské vody,<sup>41</sup> která má pH okolo 8 a senzory s  $pK_a > 12$  by se daly využít u  $CO_2$  senzorů.<sup>25</sup> Také pyrazinové prekurzory mohou nalézt praktické využití, a to jako acidobazické indikátory, vzhledem ke změnám v jejich absorpčních spektrech viditelných pouhým okem.

Výsledky mé práce byly společně s údaji získanými při předchozích diplomových pracích publikovány v odborném časopise. Práce je přiložena jako příloha.

## 9. Použitá literatura

1. NOVÁKOVÁ, V.; MILETÍN, M.; KOPECKÝ, K.; ZIMČÍK, P.; Red-Emitting Dyes with Photophysical and Photochemical Properties Controlled by pH. *Chem. - Eur. J.*, **2011**, *17*(50), 14273-14282.
2. NOVÁKOVÁ, V.; LÁSKOVÁ, M.; VAVŘIČKOVÁ, H.; ZIMČÍK, P.; Phenol-Substituted Tetrapyrizinoporphyrazines: pH-Dependent Fluorescence in Basic Media. *Chem. - Eur. J.*, **2015**, *21*(41), 14382–14392.
3. ZIMČÍK, P.; Azaftalocyaniny – od syntéz přes fotochemické a fotofyzikální vlastnosti k aplikacím. *Chem. listy*, **2012**, *106*(4), 275-282.
4. KADISH, K. M.; SMITH, K. M.; GUILARD, R.; *Handbook of Porphyrin Science*. Vol. 3, World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd, Singapore, **2010**, ISBN 978-981-4280-16-7.
5. KOSTKA, M.; ZIMČÍK, P.; MILETÍN, M.; KLEMER, P.; KOPECKÝ, K.; MUSIL, Z.; Comparison of aggregation properties and photodynamic activity of phthalocyanines and azaphthalocyanines, *J. Photochem. Photobiol. A.*, **2006**, *178*(1), 16-25.
6. ZIMČÍK, P.; NOVÁKOVÁ, V.; KOPECKÝ, K.; MILETÍN, M.; USLU KOBAC, R. Z.; ŠVANDRLIKOVÁ, E.; VÁCHOVÁ, L.; LANG, K.; Magnesium Azaphthalocyanines: An Emerging Family of Excellent Red-Emitting Fluorophores. *Inorg. Chem.*, **2012**, *51*(7), 4215-4223.
7. LAKOWICZ, J. R.; *Principles of fluorescence spectroscopy*. Vol. 3., New York: Springer, **2006**, 953, ISBN 978-0-387-31278-1.
8. PETRIK, P.; ZIMČÍK, P.; KOPECKÝ, K.; MUSIL, Z.; MILETÍN, M., LOUKOTOVÁ, V.; Protonation and deprotonation of nitrogens in tetrapyrizinoporphyrazine macrocycles. *J. Porphyr Phthalocyanines*. **2007**, *11*(7), 487-495.
9. NOVÁKOVÁ, V.; ZIMČÍK, P.; KOPECKÝ, K.; MILETÍN, M.; KUNEŠ, J.; LANG, K.; Self-assembled azaphthalocyanine dimers with higher fluorescence and singlet oxygen quantum yields than the corresponding monomers. *Eur. J. Org. Chem.*, **2008**, (19), 3260-3263.

10. KOPECKÝ, K.; ZIMČÍK, P.; NOVÁKOVÁ, V.; MILETÍN, M.; MUSIL, Z.; STRIBNA, J.; The synthesis and characterization of metal-free, unsymmetrical azaphthalocyanines with hydroxy groups and their complex formation with pyridine. *Dyes and Pigm.*, **2008**, *78*(3), 231–238.
11. KADISH, K. M.; SMITH, K. M.; GUILARD, R.; *The Porphyrin Handbook*, Vol. 19, Academic Press Inc, **2003**, ISBN 978-0-08-092393-2.
12. MILETÍN, M.; ZIMČÍK, P.; NOVÁKOVÁ, V.; Photodynamic properties of aza-analogues of phthalocyanines. *Photochem. Photobiol. Sci.*, **2018**, *17*, 1749-1766.
13. MUSIL, Z.; ZIMČÍK, P.; MILETÍN, M.; KOPECKÝ, K.; LINK, M.; PETRIK, P.; SCHWARZ, J; Synthesis and singlet oxygen production of azaphthalocyanines bearing functional derivatives of carboxylic acid, *J. Porphyr Phthalocyanines*, **2006**, *10*(2), 122-131.
14. VAKOULOVS KAYA, E; Photodynamic therapy and fluorescent diagnostics of breast cancer metastases with photosense and alasense. *Proc. SPIE*, **2002**, *4612*, 174-177.
15. VAKOULOVS KAYA, E.; Photodynamic therapy and fluorescent diagnostics of head and neck cancer with second-generation photosensitizers. Current Research on Laser Use in Oncology: 2000-2004, *Proc. SPIE*, **2005**, *5973*, 65-70
16. DEMUTH, J.; KUČERA, R.; KOPECKÝ, K.; HAVLÍNOVÁ, Z.; LIBRA, A.; NOVÁKOVÁ, V.; MILETÍN, M.; ZIMČÍK, P.; Efficient synthesis of wide-range absorbing azaphthalocyanine dark quencher and its application to dual-labeled oligonucleotide probes for quantitative real-time PCR. *Chem. - Eur. J.*, **2018**, *24*(38), 9658–9666.
17. KOPECKÝ, K.; NOVÁKOVÁ, V.; MILETÍN, M.; KUČERA, R.; ZIMČÍK, P.; Synthesis of new azaphthalocyanine dark quencher and evaluation of its quenching efficiency with different fluorophores. *Tetrahedron*, **2011**, *67*(33), 5956–5963.
18. CIDLINA, A.; NOVÁKOVÁ, V.; MILETÍN, M.; ZIMČÍK, P; Peripheral substitution as a tool for tuning electronaccepting properties of phthalocyanine analogs in intramolecular charge transfer. *Dalton Trans.*, **2015**, *44*(15), 6961–6971.

19. NOVÁKOVÁ, V; HLADÍK, P; FILANDROVÁ, T; ZAJÍCOVÁ, I; KREPSOVÁ, V; MILETÍN, M; LENČO, J; ZIMČÍK, P.; Structural factors influencing the intramolecular charge transfer and photoinduced electron transfer in tetrapyrazinoporphyrazines. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2014**, *16*(11), 5440-5446.
20. VALEUR B., LERAY I. Design principles of fluorescent molecular sensors for cation recognition. *Coord. Chem. Rev.*, **2000**, *205*(1), 3-40.
21. NOVÁKOVÁ, V.; LOCHMAN, L.; ZAJÍCOVÁ, I.; KOPECKÝ, K.; MILETÍN, M.; LANG, K.; KIRACKI, K.; ZIMCIK, P.; Azaphthalocyanines: Red Fluorescent Probes for Cations. *Chem. - Eur. J*, **2013**, *19*(16), 5025–5028.
22. BIWERSI, J.; TULK, B.; VERKMAN, A. S.; Long-Wavelength Chloride-Sensitive Fluorescent Indicators. *Anal. Biochem.*, **1994**, *219*(1), 139–143.
23. NOVÁKOVÁ, V; ZIMČÍK, P; MILETÍN, M; VÁCHOVÁ, L; KOPECKÝ, K; LANG, K; CHABERA, P; POLÍVKA, T; Ultrafast intramolecular charge transfer in tetrapyrazinoporphyrazines controls the quantum yields of fluorescence and singlet oxygen. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2010**, *12*(11), 2555-2563.
24. LOCHMAN, L.; ŠVEC, J.; ROH, J.; KIRACKI, K.; LANG, K.; ZIMČÍK, P.; NOVAKOVA, V.; Metal-Cation Recognition in Water by a Tetrapyrazinoporphyrazine-Based Tweezer Receptor. *Chem. - Eur. J*, **2016**, *22*(7), 2417–2426.
25. LOCHMAN, L.; ZIMČÍK, P.; KLIMANT, I.; NOVÁKOVÁ, V.; BORISOV, S. M.; Red-emitting CO<sub>2</sub> sensors with tunable dynamic range based on pH-sensitive azaphthalocyanine indicators. *Sensor. Actuat. B Chem.*, **2017**, *246*, 1100–1107.
26. HAN, J.; BURGESS, K.; Fluorescent Indicators for Intracellular pH. *Chem. Rev.*, **2010**, *110*, 2709–2728.
27. YUE, Y.; HUO, F.; LEE, S.; YIN, C.; YOON, J.; A review: the trend of progress about pH probes in cell application in recent years. *Analyst*, **2017**, *142*, 30-41.
28. VASUDHA, H. TILLU; POPAT, D. SHINDE; ASHUTOSH, V. BEDEKAR; Studies on Bromination of Active Methylene by a Mixture of Hydrobromic Acid and Hydrogen Peroxide (or TBHP). *Synth. Commun.*, **2003**, *33*, 1399-1403.

29. HERAVI, M., MAJID; DERIKVAND, F.; GHASSEMZADEH, M.; Tetrameric DABCO™-bromine: An efficient and versatile reagent for bromination of various organic compounds. *S. Afr. J. Chem.*, **2006**, *59*, 125-128.
30. HERAVI, M., MAJID; ABDOLHOSSEINI, N.; OSKOOIE, A., HOSSEIN; Regioselective and high-yielding bromination of aromatic compounds using hexamethylenetetramine–bromine. *Tetrahedron Lett.*, **2005**, *46*, 8959-8963.
31. HUANG, J.-G.; GUO, Y.; JIANG, J.-A.; LIU, H.-W.; JI, Y.-F.; An eco-friendly Co(OAc)<sub>2</sub>-catalyzed aerobic oxidation of 4-benzylphenols into 4-hydroxybenzophenones. *Res. Chem. Intermediat.*, **2015**, *41*, 7115-7124.
32. WANG, S.; YAN, J.; WANG, J.; CHEN, J.; ZHANG, T.; ZHAO, Y.; XUE, M.; Synthesis of some 5-phenylisoxazole-3-carboxylic acid derivatives as potent xanthine oxidase inhibitors. *Eur. J. Med. Chem.*, **2010**, *45*, 2663-2670.
33. SIPOS, G.; SZABÓ, R.; Über die gelenkte Bromierung von Nitro-Hydroxy-Acetophenonen. *Acta Phys. Chem.*, **1961**, *7*, 126.
34. VALER, V.; Syntéza derivátů azaftalocyaninů s fenolickou skupinou jako fluorescenčních senzorů pro pH. Diplomová práce. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Hradec Králové 2017.
35. NAKAMURA, A.; ATAKA, T.; SEGAWA, H., TAKEUCHI, Y., TAKEMATSU, T.; Studies on herbicidal 2,3-dicyanopyrazines. Part I. Structure-activity relationship of herbicidal 2,3-dicyano-5-substituted pyrazines. *Agric. Biol. Chem.*, **1983**, *47*, 1555–1560.
36. LÁSKOVÁ, M.; Syntéza azaftalocyaninů nesoucích jeden 2,6-di(terc-butyl)fenolický substituent. Diplomová práce. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Hradec Králové 2014.
37. IWAMOTO, K.; KIMURA, H.; MASAOKI, O.; MASAYUKI, Y.; Methylene-bridged Bis(benzimidazolium) Salt as a Highly Efficient Catalyst for the Benzoin Reaction in Aqueous Media. *Org. Biomol. Chem.*, **2008**, *6*, 912–915.
38. KHURANA, J. M.; LUMB, A.; CHAUDHARY, A.; NaBrO<sub>3</sub>/bmim[HSO<sub>4</sub>]: a versatile system for the selective oxidation of 1,2-diols,  $\alpha$ -hydroxyketones, and alcohols. *Monatsh. Chem.*, **2017**, *148*, 381-386.

39. ENGLAND, P.; MCDUGALL, R.H.; Approaches to heterocyclic analogues of biphenylene. Part I. The reaction of 5,6-diaryl-2,3-dihydropyrazines with alcoholic alkali. *J. Chem. Soc. (C)*, **1971**, 2685.
40. MELLMAN, I.; FUCHS, R.; HELENIUS, A.; Acidification of the endocytic and exocytic pathways. *Annu. Rev. Biochem.*, **1986**, 55, 663-700.
41. JOKIC, T.; BORISOV, S. M.; SAF, R; NIELSEN, D. A.; KUHL, M.; KLIMANT, I.; Highly Photostable Near-Infrared Fluorescent pH Indicators and Sensors Based on BF<sub>2</sub>-Chelated Tetraarylazadipyrromethene Dyes; *Anal. Chem.*, **2012**, 84, 6723-6730.

## 10. Seznam příloh

KARLIKOVA, M.; CERMAKOVA, V.; DEMUTH, J.; VALER, V.; MILETIN, M.; NOVAKOVA, V.; ZIMCIK P.; Magnesium tetrapyrazinoporphyrazines: tuning of the  $pK_a$  of red-fluorescent pH indicators, *Dalton Trans.*, **2019**, 48, 6162–6173. DOI: 10.1039/C9DT00381A.

## PAPER



Cite this: *Dalton Trans.*, 2019, **48**, 6162




Received 27th January 2019,

Accepted 21st March 2019

DOI: 10.1039/c9dt00381a

rsc.li/dalton

## Magnesium tetrapyrazinoporphyrazines: tuning of the $pK_a$ of red-fluorescent pH indicators†

Martina Karlikova, Veronika Cermakova, Jiri Demuth, Vojtech Valer, Miroslav Miletin,  Veronika Novakova \* and Petr Zimcik \*

Magnesium(II) tetrapyrazinoporphyrazines (TPyZPzs) are excellent red fluorophores ( $\lambda_F \sim 663$  nm,  $\Phi_F \sim 0.53$  in THF). In this work, a series of magnesium(II) complexes of unsymmetrical TPyZPzs bearing one or two phenol substituents was prepared. Suitable substitutions on the phenolic moiety tuned its  $pK_a$  in the range of 5.5 to 13. Deprotonation of the phenolic group at higher pH induced a strong donor (phenolate) in the macrocycle that led to pH-dependent quenching of the red fluorescence of these indicators. pH sensing was proved in water solutions after the incorporation of TPyZPzs into two delivery systems – microemulsions and liposomes. The latter also serves as a simple model of biomembranes. Finally, a wavelength-ratiometric probe was constructed by the incorporation of a TPyZPz indicator and lipophilic pH-nonsensitive BODIPY dye into liposomes. Synthetic precursors for TPyZPzs, substituted pyrazine-2,3-dicarbonitriles, also represent donor–acceptor systems and the pH-dependent changes in absorption spectra may be easily visible to the naked eye.

### Introduction

Sensing pH is important in many research applications,<sup>1</sup> e.g., in marine research<sup>2</sup> or in CO<sub>2</sub> sensors,<sup>3,4</sup> but one of the most investigated areas of sensing pH is biological applications.<sup>5</sup> A key component in any sensing is the use of an indicator whose changes in absorption spectra or fluorescence emission are responsible for the detection of pH. Absorption and emission in the red part of the visible spectrum are advantageous in monitoring pH changes in biological applications due to the lower scattering of light and low interference with autofluorescence of endogenous chromophores. For this reason, several pH sensitive chromophores have recently been developed with suitable spectral properties that fall in the red part of the spectrum, including Ru complexes,<sup>6</sup> phenoxazines,<sup>7</sup> perylene bisimide dyes,<sup>3</sup> boron dipyrromethenes,<sup>8</sup> cyanines,<sup>9</sup> porphyrinogens<sup>10</sup> or even red-fluorescent proteins.<sup>11</sup>

Some interesting dyes that have recently found their place in pH sensing (or pH activation) are phthalocyanines (Pcs) and, in particular, their aza-analogues, tetrapyrazinoporphy-

azines (TPyZPzs). TPyZPzs generally strongly absorb in the red part of the spectrum ( $\lambda_{max} > 650$  nm, typical  $\epsilon > 200\,000$  M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>). The TPyZPz or Pc chelated cation (centrally or peripherally) substantially affects the photophysics of the macrocycles.<sup>12,13</sup> In particular, high fluorescence quantum yields that are advantageous for fluorescence sensing are observed for Mg(II) TPyZPz complexes with  $\Phi_F$  typically over 0.50.<sup>13–15</sup> From the photophysical point of view, magnesium(II) TPyZPzs therefore represent a highly promising group of organic dyes for fluorescence sensing. The sensing is typically based on the reversible deprotonation/protonation of the recognition moiety with subsequent enabling/blocking of intramolecular charge transfer (ICT)<sup>16</sup> or photoinduced electron transfer (PET)<sup>17</sup> processes that quench the excited states. Electron-rich moieties, such as amine<sup>18</sup> or phenolate,<sup>19,20</sup> are used as donors for ICT or PET. Alternatively, switching ON can be achieved by cleavage of the pH sensitive bond, thus irreversibly activating the Pc at a lower pH.<sup>21</sup>

Recently, we have developed phenol-substituted pH sensitive TPyZPzs with a  $pK_a \sim 12$ .<sup>19</sup> Although these indicators appeared to be highly suitable for CO<sub>2</sub> sensing,<sup>4</sup> their high  $pK_a$  is not optimal for monitoring pH in biological systems. In this work, we present the rational design of novel magnesium(II) TPyZPzs with  $pK_a$  of a recognition moiety tunable over a very wide range, thus making them suitable for various applications. Their suitability for biological applications was studied in a model system in which the indicators were introduced into a lipidic bilayer of liposomes that represents a simple model of biomembranes.

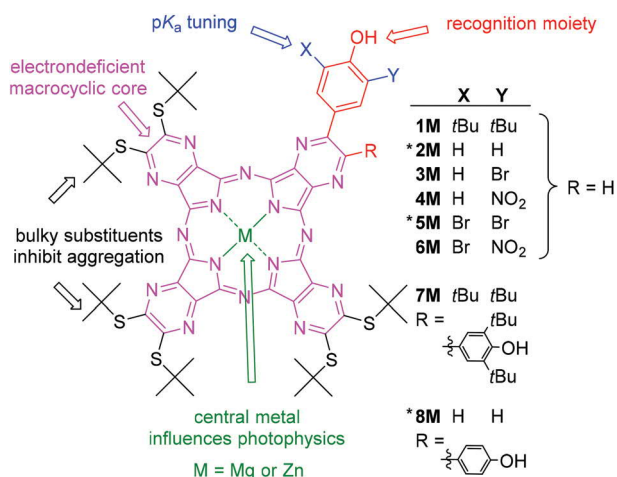
Department of Pharmaceutical Chemistry and Pharmaceutical Analysis, Faculty of Pharmacy in Hradec Kralove, Charles University, Akademika Heyrovskeho 1203, Hradec Kralove, 500 05, Czech Republic. E-mail: zimcik@faf.cuni.cz, veronika.novakova@faf.cuni.cz

† Electronic supplementary information (ESI) available: Synthetic details of the precursors; NMR spectra of TPyZPzs and synthetic precursors; absorption, emission and excitation spectra; determination of singlet oxygen in microemulsions. See DOI: 10.1039/c9dt00381a

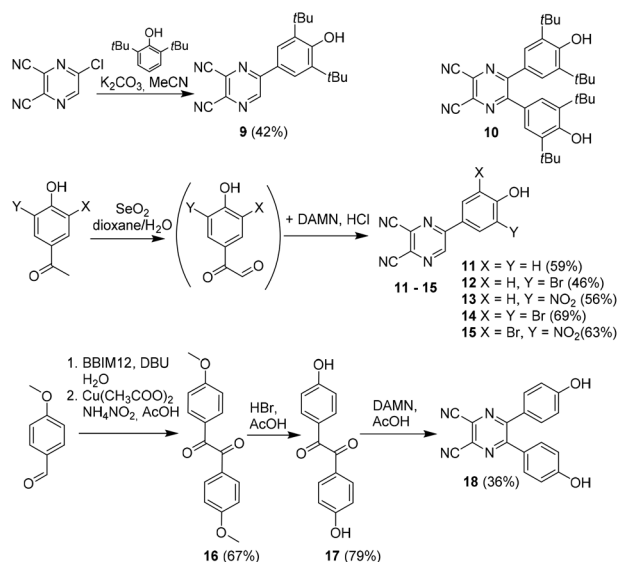
## Results and discussion

### Design and synthesis

The rational design of the indicators **1M–8M** ( $M = \text{Mg(II)}$  or  $\text{Zn(II)}$ ) is shown in Fig. 1. The electron-deficient TPyzPz core is a good electron acceptor and thus more suitable for ICT than a Pc core.<sup>22</sup> ICT is a process that quenches excited states and is responsible for the OFF state of the indicators, and as such, it should be highly efficient at limiting the background fluorescence. Bulky *tert*-butylsulfanyl substituents ensure a low level of aggregation of TPyzPz in solution. Aggregation could quench the fluorescence non-specifically and would lead to a misinterpretation of the results. The recognition moiety is the phenol directly attached to the TPyzPz core. The recognition moiety should be conjugated with the signaling moiety to ensure efficient ICT because PET (no conjugation between recognition and signaling parts) is typically a less efficient quenching process in TPyzPzs.<sup>23</sup> Deprotonation of the phenol in basic solutions switches the fluorescence OFF since the phenolate is a strong donor for ICT. The phenolic group itself is also a donor for ICT, but is very weak, and if the indicator contains only one or two phenols, it does not influence the photophysics at all.<sup>19</sup> The acidity of the phenolic moiety can be finely tuned by donating or withdrawing substituents X and Y in the *ortho* position, leading to indicators with different  $pK_a$  values. The central metal influences the photophysics by the heavy atom effect.<sup>24</sup>  $\text{Mg(II)}$  complexes were the aim of this study since they produce strong fluorescence while their inter-system crossing and subsequent singlet oxygen production is lowered.<sup>15</sup> Some of the indicators (**2Zn**, **5Zn**, **8Zn**) were also prepared as  $\text{Zn(II)}$  complexes to study the effect of the central metal on the  $pK_a$ . In addition to the indicators **1M–8M** ( $M = \text{Mg(II)}$  or  $\text{Zn(II)}$ ), the always-ON control octa(*tert*-butylsulfanyl) tetrapyrazinoporphyrazinato magnesium(II) (**20Mg**) was introduced in the study.



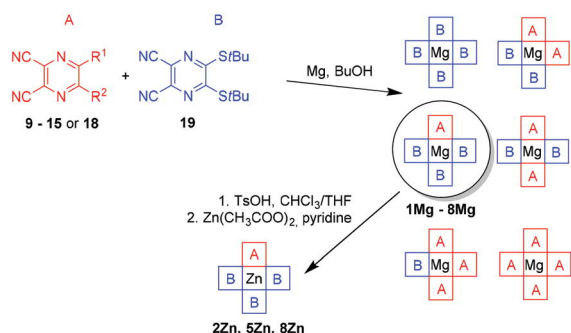
**Fig. 1** Rational design of the indicators studied in this work. All of the indicators were prepared as magnesium(II) complexes ( $M = \text{Mg(II)}$ ). The indicators with an asterisk (\*) were also prepared as zinc(II) complexes ( $M = \text{Zn(II)}$ ).



**Scheme 1** Synthetic route to the starting pyrazine-2,3-dicarbonitriles.

Scheme 1 shows the synthetic routes to the properly substituted pyrazine-2,3-dicarbonitriles that served as starting materials for the cyclotetramerization reaction. Three different synthetic approaches were applied. Compounds **9** and **10** were prepared by nucleophilic substitution of chloro-substituted pyrazine-2,3-dicarbonitriles in the presence of  $\text{K}_2\text{CO}_3$  as a base. The bulkiness of *tert*-butyls that sterically hindered the phenolic group in 2,6-di(*tert*-butyl)phenol did not allow this compound to act as an O-nucleophile, but rather as a C-nucleophile.<sup>25,26</sup> In compounds **11–15**, the pyrazine rings were formed *de novo*. Oxidation of substituted acetophenones by  $\text{SeO}_2$  gave vicinal ketoaldehydes that were not isolated but were directly *in situ* converted to pyrazines **11–15** by condensation with diaminomaleonitrile (DAMN). The substituted acetophenones were prepared by electrophilic substitution (see the ESI<sup>†</sup>). A slightly modified procedure to those published in the literature involving acyloin condensation, oxidation, deprotection of phenolic groups by HBr and condensation with DAMN was used for the synthesis of **18**.<sup>27,28</sup> Note that the purification of **18** must include a final crystallization step. Compounds **17** and **18** have the same  $R_f$  values in several different mobile phases and cannot be separated (**17** as impurity in **18** can be detected only by NMR analysis).

Scheme 2 illustrates the synthesis of the final TPyzPzs. The final TPyzPzs were prepared by mixed cyclotetramerization of the phenol-substituted pyrazine-2,3-dicarbonitriles **9–15** or **18** (precursor A) with compound **19** (precursor B), initiated by magnesium(II) butoxide. The statistical mixture of 6 congeners (AAAA, AAAB, ABAB, etc.) was then separated by column chromatography, and the desired ABBB congener was isolated. Large differences in the retention factors of precursors A and B allowed separation in the form of  $\text{Mg(II)}$  complexes, despite some tailing on silica. Only in the case of **1Mg** did the mixture of congeners have to be converted to less tailing and better separable metal-free ligands, separated and then chelated with



**Scheme 2** Synthetic route to the studied tetrapyrzazinoporphyrazines.

Mg(II) using magnesium acetate. Compound **7Mg** was prepared by chelation from the previously prepared metal-free ligand. Compounds **2Mg**, **5Mg** and **8Mg** were converted to Zn(II) complexes first by demetallation by *p*-toluenesulfonic acid (TsOH) with subsequent chelation using zinc acetate in pyridine.

### Photophysical characterization

The prepared TPyzPzs were well soluble in common organic solvents. The absorption spectra collected in THF exhibited typical characteristics for this type of compound, with a high energy B-band at approx. 380 nm and a low-energy Q-band at approx. 652 nm (Fig. S1†). The shape of the absorption Q-band indicated that these compounds were predominantly found in the monomeric form in THF, with two exceptions of **7Mg** and **8Zn**, for which the broader character of the Q-band suggested the presence of some aggregates in THF. The position of the Q-band was almost the same for all the TPyzPz indicators, as well as for the control compound **20Mg**. The substituted 4-hydroxyphenyl substituents have, therefore, only a limited effect on the absorption spectra.

In THF, the recognition moiety (phenol) is found in the protonated form (*i.e.*, ON state), and therefore, the relaxation of the excited state is not driven through ICT. As a consequence, all the compounds were fluorescent and produced

singlet oxygen as two major deactivation pathways. The emission spectra mirrored the Q-band in shape with only a small Stokes shift, typically not exceeding 10 nm. The fluorescence quantum yields ( $\Phi_F$ ) and singlet oxygen quantum yields ( $\Phi_\Delta$ ) in THF are summarized in Table 1. For those non-aggregated, the Mg(II) complexes of TPyzPz indicators were highly fluorescent and produced singlet oxygen at a rather low rate. It is known from the literature that such low singlet oxygen production of TPyzPz magnesium(II) complexes is typically non-toxic for cells in *in vitro* tests<sup>29</sup> which is advantageous for indicators that should not be harmful. The photophysical parameters were fully comparable to those of the always-ON control **20Mg**. The heavy atom effect provided by the central metal changed the preference of the deactivation pathway in zinc(II) complexes toward high  $\Phi_\Delta$ . Regardless of the central metal, the sum of the quantum yields of all compounds was close to 0.80 (including the always-ON control **20Mg**), indicating that ICT is not present as long as the recognition moiety is in the protonated state. The only exceptions were lower quantum yields of **7Mg** and **8Zn** as a result of partial aggregation. Another compound for which the sum of the quantum yields was unexpectedly low, despite its fully monomeric character in THF, was **6Mg**. Although we have no clear explanation for this behavior now, it might be connected to the quenching ability of different nitrophenyl substituents.<sup>30</sup>

Lipophilic TPyzPzs are not soluble in water directly. To study their sensing properties in water, the TPyzPzs were incorporated into oil particles of microemulsion (medium-chain triacylglycerides stabilized with Cremophor® EL). Additionally, they were also incorporated into the lipidic bilayer of liposomes that can be considered a simple model of biomembranes. The latter delivery system may mimic the behavior in a biological environment. Some of the TPyzPzs aggregated in these two delivery systems, which substantially lowered their  $\Phi_F$  (Table 1, Fig. S2 and S3†). Even those indicators that seemed to be fully monomeric based on the perfect agreement between the absorption and excitation spectra (Fig. S2 and S3†) were characterized by a lower  $\Phi_F$  than

**Table 1** Basic photophysical parameters of TPyzPzs in the ON state<sup>a</sup>

Cpd.	THF				Liposomes			Microemulsion		
	$\lambda_{\max}/\text{nm}$	$\lambda_F/\text{nm}$	$\Phi_F$	$\Phi_\Delta$	$\lambda_{\max}/\text{nm}$	$\lambda_F/\text{nm}$	$\Phi_F$	$\lambda_{\max}/\text{nm}$	$\lambda_F/\text{nm}$	$\Phi_F$
<b>1Mg</b>	652	658	0.55	0.27	657	663	0.11	657	663	0.10 <sup>b</sup>
<b>2Mg</b>	652	657	0.47	0.27	657	663	0.18	656	663	0.17
<b>2Zn</b>	650	656	0.28	0.56	656	663	0.09 <sup>b</sup>	656	661	0.05 <sup>b</sup>
<b>3Mg</b>	652	657	0.53	0.28	657	664	0.25	656	664	0.19
<b>4Mg</b>	652	657	0.47	0.25	657	663	0.20	657	663	0.07 <sup>b</sup>
<b>5Mg</b>	652	658	0.53	0.30	657	664	0.13	657	664	0.11
<b>5Zn</b>	650	656	0.28	0.58	657	663	0.06 <sup>b</sup>	656	661	0.03 <sup>b</sup>
<b>6Mg</b>	653	658	0.21	0.11	660	664	0.04	658	664	0.05 <sup>b</sup>
<b>7Mg</b>	653	659	0.36 <sup>b</sup>	0.19 <sup>b</sup>	659	664	0.14	658	664	0.15
<b>8Mg</b>	653	659	0.52	0.27	658	664	0.12	657	663	0.12
<b>8Zn</b>	653	659	0.07 <sup>b</sup>	0.21 <sup>b</sup>	659	664	0.02 <sup>b</sup>	660	665	0.04 <sup>b</sup>
<b>20Mg</b>	651	658	0.53	0.30	656	661	0.52	656	660	0.46

<sup>a</sup> Absorption maximum,  $\lambda_{\max}$ ; emission maximum,  $\lambda_F$ ; fluorescence quantum yield,  $\Phi_F$ ; singlet oxygen quantum yield,  $\Phi_\Delta$ . Data in liposomes and microemulsions were determined at pH that ensured a full ON state. <sup>b</sup> Partially aggregated as deduced from absorption spectra.

Table 2 Photophysical data connected with sensing<sup>a</sup>

Substituents	Pyrazine-2,3-dicarbonitrile							TPyzPz							Phenol <sup>b</sup> pK <sub>a</sub>
	Microemulsion				Water <sup>c</sup>			Microemulsion				Liposomes			
	Cpd.	$\lambda_{\max}/\text{nm}$	$\Delta\lambda/\text{nm}$	pK <sub>a</sub>	$\lambda_{\max}/\text{nm}$	$\Delta\lambda/\text{nm}$	pK <sub>a</sub>	Cpd.	$\Phi_{\text{F}}$	$\Delta\Phi_{\text{F}}$	pK <sub>a</sub>	$\Phi_{\text{F}}$	$\Delta\Phi_{\text{F}}$	pK <sub>a</sub>	
<i>t</i> Bu, <i>t</i> Bu	<b>9</b>	363	142	10.37	369	114	8.83	<b>1Mg</b>	0.10	a	12.42 <sup>d</sup>	0.11	a	12.7	12.16
H, H	<b>11</b>	350	65	8.11	351	68	7.88	<b>2Mg</b>	0.17	74	10.25	0.18	54	9.97	9.86
—	—	—	—	—	—	—	—	<b>2Zn</b>	0.05	47	10.33	0.09	94	10.35	—
H, Br	<b>12</b>	357	62	6.88	349	71	6.19	<b>3Mg</b>	0.19	209	8.47	0.25	117	8.52	8.43
H, NO <sub>2</sub>	<b>13</b>	331	51	5.12	330	52	4.95	<b>4Mg</b>	0.07	12	6.96	0.20	12	6.22	7.14
Br, Br	<b>14</b>	350	70	4.93	343	77	4.19	<b>5Mg</b>	0.11	195	6.20	0.13	23	5.67 <sup>e</sup>	6.89
—	—	—	—	—	—	—	—	<b>5Zn</b>	0.03	106	6.86	0.06	19	5.66	—
Br, NO <sub>2</sub>	<b>15</b>	331	64	3.06	330	51	2.84	<b>6Mg</b>	0.05	3	5.03	0.04	4	5.59	5.36
2 × ( <i>t</i> Bu, <i>t</i> Bu)	<b>10</b>	390	150	11.88	395	153	12.60	<b>7Mg</b>	0.15	<sup>f</sup>	12.86 <sup>d</sup>	0.14	<sup>f</sup>	>13 <sup>f</sup>	12.16
2 × (H, H)	<b>18</b>	385	59	9.05	372	80	8.33	<b>8Mg</b>	0.12	84	10.61	0.12	74	10.19	9.86
—	—	—	—	—	—	—	—	<b>8Zn</b>	0.04	79	10.44	0.02	15	10.45	—
<i>S</i> tBu, <i>S</i> tBu	<b>19</b>	325	0	—	331	0	—	<b>20Mg</b>	0.46	—	—	0.52	1	—	—

<sup>a</sup> Absorption maximum of the protonated form,  $\lambda_{\max}$ ; fluorescence quantum yield in the ON state,  $\Phi_{\text{F}}$ ; difference between the absorption maximum of protonated and deprotonated forms,  $\Delta\lambda$ ; ratio between fluorescence in ON and OFF states,  $\Delta\Phi_{\text{F}}$ . <sup>b</sup> Calculated using Advanced Chemistry Development (ACD/Labs) Software V11.02 for the phenol (no substitution in position 4) with the corresponding substituents. <sup>c</sup> Water containing 5% of DMSO. <sup>d</sup> Values can be affected by instability of microemulsion at pH > 12. <sup>e</sup> pK<sub>a</sub> = 6.03 for ratiometric probe (5Mg + BODIPY). <sup>f</sup> Could not be determined and the full OFF state was not reached even at pH = 13.

in the organic solvent, but this was not an obstacle in the suggested application.

The substituted pyrazine-2,3-dicarbonitriles that were used as starting materials in the synthesis also represent an interesting donor–acceptor system and have the potential to be used for pH sensing. However, the absorption maxima are in an area that is not very suitable for biological applications (under 400 nm, Table 2), and the weak fluorescence emission was typically found under 500 nm (Fig. S4†). In the cases of **13** and **15**, fluorescence was not even detected. On the other hand, substantial changes in their absorption spectra (for more, see below) with the change in pH can be utilized in acid–base titrations with naked-eye indication of the equivalent point.

### pH sensing

pH sensing was tested in several systems. Microemulsions were used for both TPyzPz and pyrazinedicarbonitrile indicators to have a direct comparison in one delivery system. Subsequently, the liposomes containing the TPyzPz indicators were tested as models of biomembranes. There was no rationale to do this for pyrazinedicarbonitriles since they are not intended to be used in biological applications due to their spectral properties. On the other hand, they have potential to be used in acid–base titrations, and for this reason, they were also directly examined in water (after dilution from DMSO stock solution). The use of water without any delivery system was not possible for TPyzPzs since they were strongly aggregated in this solvent.

The absorption spectra of TPyzPzs in both liposomes and microemulsions were characterized by only small changes when going from protonated (acidic pH) to deprotonated (basic pH) forms (Fig. 2). The small red shift in the absorption spectra that was induced by an increase in pH is, however, impractical for real applications. On the other hand, the fluo-

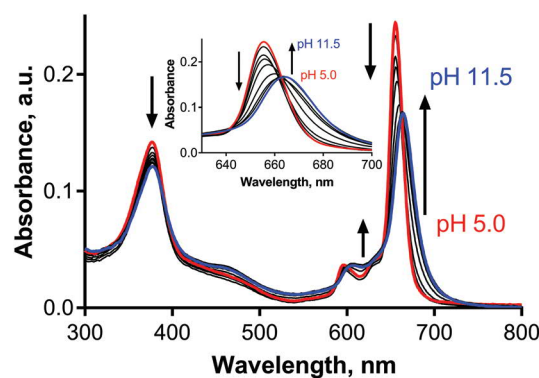
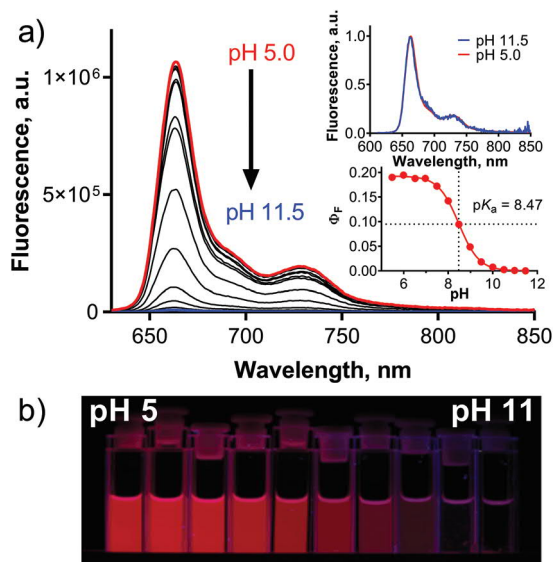


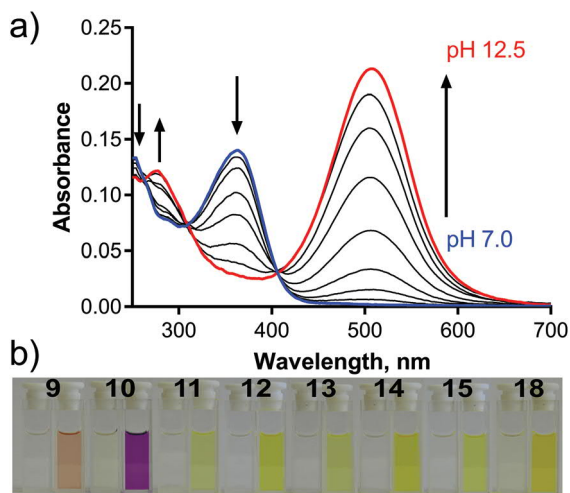
Fig. 2 Changes in the absorption spectra of **3Mg** ( $c = 1 \mu\text{M}$ ) in a microemulsion with the change in pH of the buffer. Inset: Increased area of the Q-band.

rescence emission was strongly quenched at basic pH with change in the quantum yields of fluorescence for almost two orders of magnitude between the ON and OFF states in several cases (Fig. 3 and Table 2). This change is calculated as  $\Delta\Phi_{\text{F}} = \Phi_{\text{F(ON)}}/\Phi_{\text{F(OFF)}}$  and listed with other important photophysical data in Table 2. This result is a consequence of the induction of a strong donor (phenolate) for ICT after deprotonation, which efficiently quenched the excited states of TPyzPzs. The shape of the fluorescence emission spectra did not change with pH (Fig. 3, upper inset), and the excitation spectra at all pH values corresponded well to the absorption spectra of the protonated form. This indicates that the only form that is fluorescent is the phenol form.

As briefly mentioned above, pyrazinedicarbonitriles can also be used as pH indicators. In this case, intensive changes were observed in the absorption spectra due to the strong donor–acceptor system (Fig. 4a and Fig. S5†). Typically, the



**Fig. 3** (a) Changes in the emission of **3Mg** in a microemulsion ( $\lambda_{\text{exc}} = 601$  nm, isosbestic point) with the pH. Upper inset: Normalized emission spectra at pH 5.0 (red) and at pH 11.5 (blue). Lower inset: Plot of the fluorescence intensity at 664 nm against pH used for the calculation of  $pK_a$ . (b) Fluorescence intensity of **3Mg** ( $c = 0.5$   $\mu\text{M}$ ) in a microemulsion at different pH values ( $\lambda_{\text{exc}} = 366$  nm).

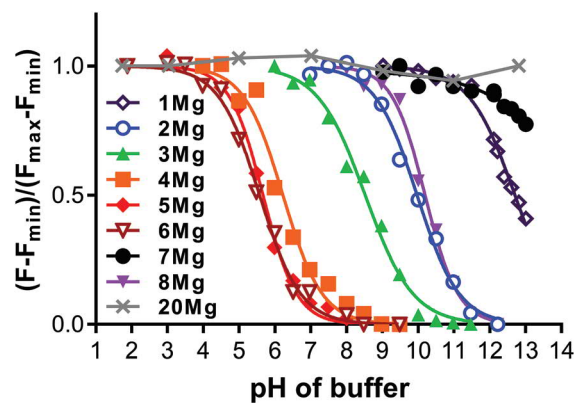


**Fig. 4** (a) Changes in the absorption spectra of **9** ( $c = 10$   $\mu\text{M}$ ) in a microemulsion with the pH. (b) Color changes of the phenol-substituted pyrazinedicarbonitriles in a microemulsion ( $c = 50$   $\mu\text{M}$ ) in the protonated form (phenol, left cuvette) and deprotonated form (phenolate, right cuvette).

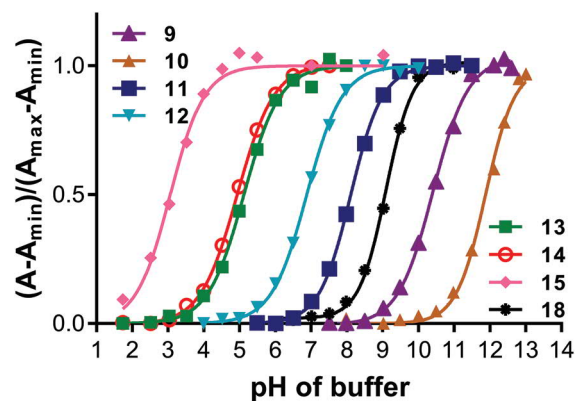
new red-shifted band appeared at a higher pH with the shift of the maximum position ( $\Delta\lambda$ ) between 50 and 150 nm (Table 2). Such a large red shift in the absorption spectra can even be detected by the naked eye. The solutions changed from colorless at an acidic pH to yellow (11–18) or orange (9) or even purple (10) at a basic pH (Fig. 4b). Note that the same change was already reported for compound **10** by other researchers.<sup>26</sup> Considering the fluorescence, similarly to TPyzPzs, only the

protonated (phenol) form was fluorescent and its intensity was decreasing at higher pH. Similar changes were observed both in microemulsions and in water (diluted from DMSO stock solution). The spectra of compound **19** (without any donor moiety) did not change with pH.

The changes in the fluorescence intensity (for TPyzPzs) or absorbance (for pyrazinedicarbonitriles) of the deprotonated form were subsequently plotted against the pH (Fig. 5, 6, Fig. S6 and S7<sup>†</sup>), and the  $pK_a$  of the recognition moiety was calculated for each indicator in the concerned delivery system. As the closest proximity of the recognition moiety may be influenced by lipids of the delivery system, these  $pK_a$  values must be considered only to be the “apparent  $pK_a$  values” for a particular delivery system. In the case of the liposomes, the behavior is expected to be close to what may be potentially found in biomembranes of living systems. Note that the fluorescence changes in microemulsions at pH > 12 may suffer from an error that is perhaps caused by the changes in the delivery system since the control compound **20Mg** was also characterized by a substantial decrease of fluorescence above this value. This problem was not observed in liposomes, in which the



**Fig. 5** Dependence of the fluorescence changes in the emission maxima of different TPyzPz indicators in liposomes on the pH.  $F_{\text{min}}$  was considered zero for **1Mg**, **7Mg** and **20Mg**.



**Fig. 6** Dependence of the absorbance of the deprotonated form of pyrazinedicarbonitriles in a microemulsion on the pH.

always-ON control (**20Mg**) did not change in a wide range of pH from pH 2–13 (Fig. 5). As anticipated, the acidity of the recognition moiety is largely affected by substituents X and Y on the 4-hydroxyphenyl ring (Fig. 1). Thus, electron-donating *tert*-butyls led to values of  $pK_a$  of TPyzPzs typically over 12, while the electron withdrawing Br or nitro group substantially increased the acidity of phenol (Table 2), with a  $pK_a = 5.03$  for the most acidic **6Mg** in microemulsion. Thus, the  $pK_a$  of the recognition moiety in the TPyzPz indicators can be finely tuned for various applications. TPyzPzs with high  $pK_a > 11$  can be used in CO<sub>2</sub> sensors.<sup>4</sup> Those with a  $pK_a$  of  $\sim 7$ –8 can be applied in marine research (the pH of sea water is  $\sim 8.1$ ),<sup>2</sup> while TPyzPzs with the most acidic  $pK_a$  of  $\sim 5$ –6 can be used to monitor changes in the subcellular pH of different acidic compartments, *e.g.*, endosomes and lysosomes.<sup>31</sup> An even wider range of pH can be monitored using the proper selection of substituted pyrazinedicarbonitriles (Fig. 6), where the  $pK_a$  values ranged from 3.06 up to 11.88 in microemulsion for **15** and **10**, respectively.

The set of determined  $pK_a$  values allowed the formulation of structure–activity relationships in the series of synthesized compounds that can be used in the future for rational design of novel indicators or photosensitizers from these families. In this paragraph, we discuss some of the most important findings that are based on the comparison of the data in microemulsions to avoid the effect of different delivery systems for TPyzPzs and pyrazinedicarbonitriles. In addition to the apparent effect of the substituents X and Y on the phenol ring caused by their electronic effects (see above), there is also a substantial effect of the strongly electron-withdrawing pyrazinedicarbonitrile moiety on the acidity of the phenol. When the  $pK_a$  values of these synthetic precursors were compared to those of the similarly substituted phenol (*i.e.*, no substitution in the *para* position), an increase in acidity is evident (Table 2). This effect is not so pronounced in the TPyzPz indicators, and their values were more or less similar to the predicted values for these *para* unsubstituted phenols, suggesting that the electron-withdrawing effect of the whole macrocyclic core is very limited (compare, *e.g.*, data for **13**, **4Mg** and the corresponding phenol with  $pK_a = 5.12$ , 6.96 and 7.14, respectively, Table 2). Therefore, the values calculated for the *para* unsubstituted phenol can very easily be used for the estimation of the  $pK_a$  of the TPyzPz recognition moiety since the dependence of calculated  $pK_a$  on the measured values in liposomes is linear with a slope very close to 1 (Fig. S8†). The electronic effect of pyrazinedicarbonitrile or TPyzPz core can be further demonstrated on the compounds with one (**9**, **11**, **1Mg**, **2Mg**) or two recognition moieties (**10**, **18**, **7Mg**, **8Mg**). The electronic effects are strongest when the affecting moiety (pyrazinedicarbonitrile or TPyzPz macrocycle) is in full conjugation with the phenol. If we consider the spatial arrangement, the pyrazine ring is expected to be coplanar with the phenol for the compounds with only one recognition moiety. This has already been demonstrated in the literature by the X-ray crystal structure of structurally very similar 5-[3,5-di(*tert*-butyl)-4-hydroxyphenyl]-6-chloropyrazine-2,3-dicarbonitrile, for which

full coplanarity was observed.<sup>26</sup> On the other hand, two phenyl rings in the *ortho* position can never adopt a coplanar arrangement. These rings are twisted from the plane of pyrazine for  $\sim 40^\circ$  in the case of the reported structure of compound **10**<sup>26</sup> or for  $\sim 40^\circ$  and  $48^\circ$  in the case of methylated **11**<sup>28</sup> and  $\sim 39^\circ$  and  $45^\circ$  in the case of benzylated **11**.<sup>27</sup> A similar arrangement is expected to be found in TPyzPz. Due to the twisted arrangement, the conjugation of phenol with the pyrazine ring is decreased, which results in a lower effect of the ring (pyrazinedicarbonitrile or TPyzPz) on the acidity of the phenol. For this reason, compounds **9** and **11**, which only have one phenol ( $pK_a = 10.37$  and 8.11, respectively), are markedly more acidic than their disubstituted analogues **10** and **18** ( $pK_a = 11.88$  and 9.05, respectively). A similar, but less manifested, effect can be observed in the corresponding monosubstituted TPyzPzs **1Mg** and **2Mg** ( $pK_a = 12.42$  and 10.25, respectively) when they are compared with disubstituted derivatives **7Mg** and **8Mg** ( $pK_a = 12.86$  and 10.61, respectively).

The central metal (Mg(II) or Zn(II)) does not substantially affect the  $pK_a$  value of TPyzPzs, and the values for both metal complexes were very similar. Therefore, the above-defined relationships can also be easily used in the design of pH-sensitive TPyzPz photosensitizers with zinc(II) as the central metal that ensures high  $\Phi_\Delta$  values. To prove this premise, the singlet oxygen production of zinc complexes **2Zn**, **5Zn**, **8Zn** and always-ON control **20Mg** was evaluated in microemulsion at different pH values. The heterogeneous system and missing value of  $\Phi_\Delta$  for the reference compound does not allow a direct determination of the absolute values of  $\Phi_\Delta$  using the method of DPBF decomposition. The data for one compound, however, can be compared to see the differences in singlet oxygen production rates at different pH values. The results indicated (Fig. S12†) that the singlet oxygen production rate is almost twice as high in the ON state (pH = 8.5) than in the OFF state (pH = 11.5) for **2Zn** and **8Zn**. Compound **5Zn** was characterized by a ten times higher singlet oxygen production rate in the ON state (pH = 5) than in the OFF state (pH = 8.5). Together with its  $pK_a = 6.86$  close to physiological pH makes it an interesting potential pH-sensitive photosensitizer for biological applications. The singlet oxygen production rate for always-ON TPyzPz **20Mg** was the same at both measured pH values 5 and 11.5 confirming thus the suggested premise.

### Wavelength-ratiometric probe

The use of single-wavelength probes typically suffers from the fact that the concentration of the probe needs to be known. This is typically solved by designing wavelength-ratiometric probes that can work independently of their concentration. Although the prepared TPyzPzs are advantageous from the photophysical point of view with good fluorescence in the red part of the spectrum and easy tuning of the requested  $pK_a$ , their usability as wavelength-ratiometric probes is rather limited. The only fluorescent form is the protonated one and the change in the absorption spectrum after deprotonation is in a range of a few nanometers, which is impractical for routine use (Fig. 2). For this reason, we combined one selected

TPyzPz (**5Mg** with suitable  $pK_a$  for potential biological applications, high  $\Phi_F$ , good  $\Delta\Phi_F$ ) with a lipophilic pH non-responsive BODIPY fluorophore (1,3,5,7-tetramethyl-8-phenyl-4,4-difluoroboradiazaindacene, CAS 194235-40-0).

Both dyes were introduced into liposomes and, due to their strongly hydrophobic character, they did not leak out from this delivery system, as judged from no changes in absorption and emission spectra in time. The particular BODIPY dye was selected due to its reported high fluorescence ( $\Phi_F = 0.90$  in toluene<sup>32</sup>) and suitable spectral properties. The spectral overlap of the BODIPY emission and TPyzPz absorption is limited, thus, no substantial energy transfer from BODIPY to TPyzPz was expected (Fig. 7). This has been proved by only a negligible decrease in the emission intensity of BODIPY and increase of **5Mg** fluorescence intensity (up to 5%) after mixing these dyes together (Fig. S9<sup>†</sup>). Judging from the unchanged shape of the absorption spectra of individual components

(Fig. 7 and Fig. S10<sup>†</sup>), they also do not form any heterodimer that would lead to non-specific fluorescence quenching in solution or in the liposomes. Care was also taken to correctly adjust the excitation wavelength to eliminate any interference with peaks of scattered light (Fig. S11<sup>†</sup>).

Subsequently, the probe was tested in buffers with different pH values. Emission of a pH-nonresponsive BODIPY dye at 511 nm remained constant and did not change with pH, while the changes in fluorescence of **5Mg** corresponded well to those observed when the indicator was in liposomes alone (Fig. 8). The ratio of fluorescence emission at 663 nm (**5Mg**) and 511 nm (BODIPY) was plotted against the pH of the buffer. Calculated  $pK_a = 6.03$  was very close to the value determined for **5Mg** in liposomes alone ( $pK_a = 5.67$ ), suggesting a limited influence of the combined system on the apparent  $pK_a$  of the combined probe. Therefore, the combination of the lipophilic dyes in the liposomes represents a suitable system for the development of a wavelength-ratiometric probe.

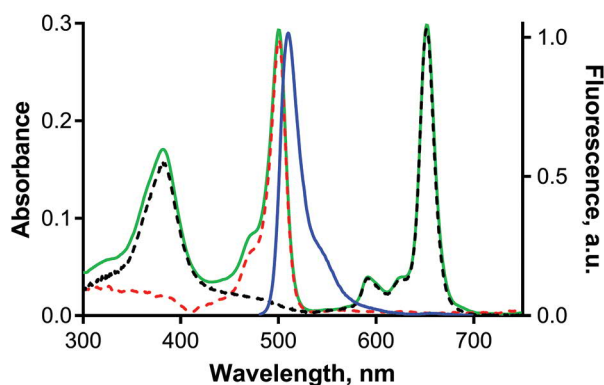


Fig. 7 Absorption spectra in THF: BODIPY (red, dashed,  $c = 3 \mu\text{M}$ ), **5Mg** (black, dashed,  $c = 1 \mu\text{M}$ ) and a mixture of these two dyes (green). The emission spectrum of BODIPY in THF is shown in blue.

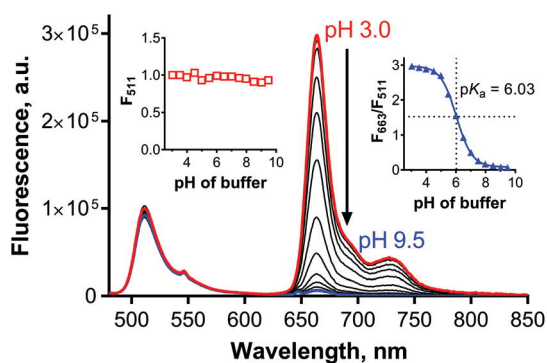


Fig. 8 Changes in the fluorescence emission spectrum ( $\lambda_{\text{exc}} = 445 \text{ nm}$ ) of BODIPY dye ( $\lambda_F = 511 \text{ nm}$ ) and **5Mg** ( $\lambda_F = 663 \text{ nm}$ ) in liposomes with the change in the pH of the buffer. The concentration of the dyes was  $1 \mu\text{M}$  each, and the concentration of DOPC lipids was  $1 \text{ mM}$ . Left inset: Changes in the fluorescence intensity at 511 nm (BODIPY) with pH. Right inset: Change in the ratio of the fluorescence intensity at 663 nm and 511 nm with pH.

## Conclusions

In this work, we designed and synthesized novel strongly fluorescent pH-sensitive magnesium(II) TPyzPz indicators using a phenol/phenolate couple as the fluorescence switch. The phenol recognition moiety was shown to be able to be easily modified to modulate the final  $pK_a$  of the indicator, making it suitable for different applications. The  $pK_a$  value of the TPyzPz indicator can be estimated using the calculated values for the corresponding *para* unsubstituted phenols. The synthetic precursors for TPyzPzs, phenol-substituted pyrazinedicarbonitriles, also represent interesting donor-acceptor systems. Deprotonation of the phenol moiety at a basic pH strongly changes the absorption spectra, which is accompanied by a substantial change in color that is visible to the naked eye and may be potentially used as an indicator for acid-base titrations. Due to a strong electron-withdrawing effect, the  $pK_a$  values of these synthetic precursors were substantially lower than those of TPyzPzs with the same recognition moiety.

The advantage of magnesium(II) TPyzPzs in sensing is their strong absorption ( $\epsilon \sim 150\text{--}300\,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) and emission ( $\Phi_F \sim 0.50$  in THF,  $\sim 0.20$  in liposomes) in the red part of the visible spectrum ( $\lambda_{\text{max}} \sim 650 \text{ nm}$ ,  $\lambda_F \sim 663 \text{ nm}$ ). These are the great advantages over the regularly used pH sensors based on fluorescein. At the same time, the  $pK_a$  is easily manipulated as we have shown in this work and can be tuned for specific applications that request different ranges of pH values to be monitored. The range of  $pK_a$  can be even enlarged or more precisely tuned by selection of proper combination of other electron withdrawing/donating substituents on the phenol. Their sensing also works well after incorporation into a liposomal bilayer, which serves as a model of biomembranes. Although they are not suitable as wavelength-ratiometric probes directly, they can be combined with properly selected pH-nonresponsive dyes (e.g., BODIPY), whose fluorescence after incorporation into a liposome is the reference for a ratiometric probe.

## Experimental section

### General

All organic solvents used in the synthesis were of analytical grade. Anhydrous butanol used for the cyclotetramerization was freshly distilled from magnesium. All other chemicals for the syntheses were purchased from certified suppliers (*i.e.*, Sigma-Aldrich, TCI Europe, Acros, and Merck) and used as received. TLC was performed on Merck aluminum sheets coated with silica gel 60 F254. Merck Kieselgel 60 (0.040–0.063 mm) was used for column chromatography. The infrared spectra were recorded using a Nicolet 6700 spectrometer in the ATR mode. The  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR spectra were recorded on a VNMR S500 NMR spectrometer. The chemical shifts are reported as  $\delta$  values in ppm and are indirectly referenced to  $\text{Si}(\text{CH}_3)_4$  *via* the signal from the solvent.  $J$  values are given in Hz. Elemental analysis was carried out using a Vario Micro Cube Elemental Analyzer (Elementar Analysensysteme GmbH, Hanau, Germany). The UV–Vis spectra were recorded using a Shimadzu UV-2600 spectrophotometer. The fluorescence spectra were recorded using an FS5 spectrofluorometer (Edinburgh Instruments). High resolution mass spectra (HR MS) were recorded using a UHPLC system, Acquity UPLC I-class (Waters, Milford, USA), coupled to a high-resolution mass spectrometer, Synapt G2Si (Waters, Manchester, UK), based on Q-TOF. Chromatography for this HR MS measurement was performed using an Acquity UPLC BEH300 C4 (2.1  $\times$  50 mm, 1.7  $\mu\text{m}$ ) column with gradient elution consisting of acetonitrile and 0.1% formic acid and a flow rate of 0.4 mL  $\text{min}^{-1}$ . Electrospray ionization was operated in positive mode. ESI spectra were recorded in the range 50–2000  $m/z$  using leucine-enkephalin as a lock mass reference and sodium iodide for calibration. Compounds **10**,<sup>19</sup> **19**<sup>33</sup> and **20Mg**<sup>34</sup> were prepared according to the literature procedures.

### General procedure for synthesis of magnesium tetrapyrrozinoporphyrazines

Magnesium turnings (28 eq.) were refluxed in freshly distilled anhydr. butanol (approx. 1 mL per 1 mmol of magnesium) with the addition of a few crystals of iodine until all magnesium was converted to butoxide (typically 3 h). The corresponding pyrazine-2,3-dicarbonitrile **9**, **11**–**15** or **18** (1 eq.) and 5,6-bis(*tert*-butylsulfanyl)pyrazine-2,3-dicarbonitrile **19** (3 eq.) were added, and the reflux was continued overnight. After that, the solvents were evaporated, and the solvent mixture consisting of MeOH/water/acetic acid 10:10:1 (v/v) was added (approx. 3 mL per 1 mmol of magnesium). The suspension was stirred until all residual magnesium butoxide was decomposed. The dark green solid was collected by filtration and washed thoroughly with the above-mentioned solvent mixture, washed with water and air-dried. The product was purified by column chromatography on silica in the mobile phases mentioned below. The second most intense green fraction was always collected and repurified at least once more by column chromatography.

**Synthesis of 2-[3,5-di(*tert*-butyl)-4-hydroxyphenyl]-9,10,16,17,23,24-hexakis(*tert*-butylsulfanyl) tetrapyrrozinoporphyrazine magnesium(n) (1Mg).** The synthesis of **1Mg** started with the general procedure for the synthesis of magnesium tetrapyrrozinoporphyrazines from **9** (1.00 g, 2.99 mmol) and **19** (2.75 g, 8.97 mmol). The mixture of magnesium congeners from statistical condensation was, however, inseparable due to very similar  $R_f$  values. For this reason, the mixture was converted to metal-free ligands. The green solid obtained after filtration was dissolved in a mixture of  $\text{CHCl}_3/\text{THF}$  1:1 (v/v, 80 mL), and *p*-toluenesulfonic acid hydrate (5.70 g, 30 mmol) was added dissolved in THF (20 mL). The mixture was stirred at rt for 1 h, the solvents were evaporated, and the dark solid was washed with water, filtered and air-dried. The metal-free ligand of  $\text{AB}_3$  type was isolated by column chromatography on silica with  $\text{CHCl}_3/\text{toluene}$  2:1 as the mobile phase ( $R_f = 0.28$ ). The isolated metal-free ligand (200 mg, 0.16 mmol) was chelated with magnesium using anhydr. magnesium acetate (200 mg, 1.40 mmol) in refluxing pyridine (30 mL) for 30 min. Then, the solvent was evaporated, and the green solid was washed with water and air-dried. The product was purified by column chromatography on silica with  $\text{CHCl}_3/\text{THF}$  15:1 as the mobile phase ( $R_f = 0.58$ ). After evaporation of the pure fractions, the product was washed with hexane. Yield: 129 mg (3.4% based on **9**) of dark green solid.  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ : [ $\text{D}_5$ ]pyridine, 25  $^\circ\text{C}$ , TMS):  $\delta$  10.13 (s, 1H), 8.90 (s, 2H), 2.48–2.11 (m, 54H), 1.84 (s, 18H);  $^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ : [ $\text{D}_5$ ]pyridine, 25  $^\circ\text{C}$ , TMS):  $\delta$  158.92, 158.73, 158.37, 158.35, 158.12, 158.10, 157.50, 153.96, 151.57, 151.40, 151.23, 151.13, 150.96, 150.85, 150.52, 150.39, 148.04, 145.35, 145.28, 145.24, 145.21, 142.60, 138.36, 127.90, 125.21, 51.48, 51.44, 51.40, 51.26, 35.23, 31.15, 30.90, 30.74 ppm; IR (ATR):  $\nu = 2960, 2918$  (CH), 1558, 1250, 1143 (s)  $\text{cm}^{-1}$ ; UV/Vis (THF):  $\lambda_{\text{max}}$  ( $\epsilon$ ) = 652 (311 000), 591 (40 000), 383 nm (160 000  $\text{mol}^{-1} \text{dm}^3 \text{cm}^{-1}$ );  $m/z$  (HR MS, EI) 1277.4653 [ $\text{M} + \text{H}$ ] $^+$ , calc. for  $\text{C}_{62}\text{H}_{76}\text{MgN}_{16}\text{O}_6 + \text{H}^+$ : 1277.4635.

**Synthesis of 2-(4-hydroxyphenyl)-9,10,16,17,23,24-hexakis(*tert*-butylsulfanyl)tetrapyrrozinoporphyrazine magnesium(n) (2Mg).** The synthesis of **2Mg** was performed following the general procedure for the synthesis of magnesium tetrapyrrozinoporphyrazines from **11** (750 mg, 3.38 mmol) and **19** (3.10 g, 10.1 mmol). The mobile phases used for purification were:  $\text{CHCl}_3/\text{THF}$  10:1 ( $R_f = 0.26$ ) and  $\text{CHCl}_3/\text{THF}/\text{MeOH}$  9:1:0.4. The purified product was washed with hexane. Yield: 372 mg (9.5%) of dark green solid.  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ : [ $\text{D}_5$ ]pyridine, 25  $^\circ\text{C}$ , TMS):  $\delta$  12.07 (s, 1H), 9.98 (s, 1H), 8.75 (d,  $J = 8.2$  Hz, 2H), 7.38 (d,  $J = 8.2$  Hz, 2H), 2.32–2.25 (m, 36H), 2.23 (s, 18H);  $^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ : [ $\text{D}_5$ ]pyridine, 25  $^\circ\text{C}$ , TMS):  $\delta$  161.32, 159.18, 159.01, 158.37, 158.33, 158.03, 157.84, 153.65, 151.70, 151.51, 151.30, 151.17, 150.94, 150.62, 150.47, 150.24, 147.97, 145.36, 145.25, 145.21, 145.10, 142.82, 129.97, 128.08, 125.68, 117.01, 51.48, 51.44, 51.38, 51.34, 31.14, 30.91, 30.71, 30.60, 30.23, 30.20 ppm; IR (ATR):  $\nu = 2961, 2921$  (CH), 1609, 1519, 1233, 1142 (s)  $\text{cm}^{-1}$ ; UV/Vis (THF):  $\lambda_{\text{max}}$  ( $\epsilon$ ) = 652 (181 000), 592 (24 000), 381 nm (104 000  $\text{mol}^{-1} \text{dm}^3 \text{cm}^{-1}$ );  $m/z$  (HR MS, EI) 1165.3395 [ $\text{M} + \text{H}$ ] $^+$ , calc. for  $\text{C}_{54}\text{H}_{60}\text{MgN}_{16}\text{O}_6 + \text{H}^+$ : 1165.3383.

**Synthesis of 2-(3-bromo-4-hydroxyphenyl)-9,10,16,17,23,24-hexakis(*tert*-butylsulfanyl)tetrapyrzino-*porphyrzine* magnesium(II) (3Mg).** The synthesis of 3Mg was performed following the general procedure for the synthesis of magnesium tetrapyrzino-*porphyrzine*s from **12** (615 mg, 2.04 mmol) and **19** (1.88 g, 6.14 mmol). The mobile phase used for purification was: CHCl<sub>3</sub>/THF/MeOH 40 : 2 : 1 (*R<sub>f</sub>* = 0.37). The purified product was washed with MeOH. Yield: 269 mg (10.6%) of dark green solid. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>: [D<sub>5</sub>]pyridine, 25 °C, TMS): δ 9.94 (s, 1H), 9.35 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H), 8.49 (dd, *J* = 8.4, 2.2 Hz, 1H), 7.37 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 2.30–2.24 (m, 45H), 2.21 (s, 9H); <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>: [D<sub>5</sub>]pyridine, 25 °C, TMS): δ 159.02, 158.97, 158.28, 158.26, 157.94, 157.90, 157.87, 151.85, 151.80, 151.75, 151.60, 151.45, 151.23, 151.01, 150.34, 150.13, 148.16, 145.31, 145.28, 145.24, 145.21, 145.09, 142.24, 133.73, 129.37, 127.92, 117.17, 112.45, 51.64, 51.46, 51.45, 51.34, 31.15, 31.11, 30.87 ppm; IR (ATR): ν = 2961, 2919 (CH), 1518, 1477, 1363, 1234, 1142 cm<sup>-1</sup>; UV/Vis (THF): λ<sub>max</sub> (ε) = 652 (290 000), 591 (38 000), 382 nm (151 000 mol<sup>-1</sup> dm<sup>3</sup> cm<sup>-1</sup>); *m/z* (HR MS, EI) 1243.2457 [M + H]<sup>+</sup>, calc. for C<sub>54</sub>H<sub>59</sub>BrMgN<sub>16</sub>O<sub>6</sub> + H<sup>+</sup>: 1243.2489.

**Synthesis of 2-(4-hydroxy-3-nitrophenyl)-9,10,16,17,23,24-hexakis(*tert*-butylsulfanyl)tetrapyrzino-*porphyrzine* magnesium(II) (4Mg).** The synthesis of 4Mg was performed following the general procedure for the synthesis of magnesium tetrapyrzino-*porphyrzine*s from **13** (330 mg, 1.26 mmol) and **19** (1.13 g, 3.69 mmol). The mobile phase used for purification was: CHCl<sub>3</sub>/THF/MeOH 40 : 2 : 1 (*R<sub>f</sub>* ~ 0.40). The purified product was washed with MeOH. Yield: 49 mg (3.3%) of dark green solid. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>: [D<sub>5</sub>]pyridine, 25 °C, TMS): δ 10.00 (s, 1H), 9.80 (s, 1H), 8.88 (s, 1H), 7.54 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H), 2.32–2.24 (m, 45H), 2.22 (s, 9H); <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>: [D<sub>5</sub>]pyridine, 25 °C, TMS): δ 159.04, 159.01, 158.45, 158.27, 158.09, 156.40, 152.13, 152.09, 151.79, 151.75, 151.12, 150.96, 145.31, 145.25, 145.15, 141.99, 129.07, 125.29, 121.22, 51.77, 51.50, 51.38, 31.09, 31.05, 30.85 ppm; IR (ATR): ν = 2961, 2920 (CH), 1627, 1363, 1234, 1142 (s) cm<sup>-1</sup>; UV/Vis (THF): λ<sub>max</sub> (ε) = 652 (235 000), 592 (31 000), 382 nm (132 000 mol<sup>-1</sup> dm<sup>3</sup> cm<sup>-1</sup>); *m/z* (HR MS, EI) 1210.3224 [M + H]<sup>+</sup>, calc. for C<sub>54</sub>H<sub>59</sub>MgN<sub>17</sub>O<sub>3</sub>S<sub>6</sub> + H<sup>+</sup>: 1210.3234.

**Synthesis of 2-(3,5-dibromo-4-hydroxyphenyl)-9,10,16,17,23,24-hexakis(*tert*-butylsulfanyl)tetrapyrzino-*porphyrzine* magnesium(II) (5Mg).** The synthesis of 5Mg was performed following the general procedure for the synthesis of magnesium tetrapyrzino-*porphyrzine*s from **14** (1.88 g, 4.95 mmol) and **19** (4.55 g, 14.8 mmol). The mobile phase used for purification was: CHCl<sub>3</sub>/THF/MeOH 40 : 2 : 0.4 (*R<sub>f</sub>* ~ 0.40). The purified product was washed with MeOH. Yield: 394 mg (6.0%) of dark green solid. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>: [D<sub>5</sub>]pyridine, 25 °C, TMS): δ 9.92 (s, 1H), 9.07 (s, 2H), 2.31–2.23 (m, 45H), 2.21 (s, 9H); <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>: [D<sub>5</sub>]pyridine, 25 °C, TMS): δ 158.94, 158.88, 158.19, 157.90, 157.78, 154.85, 152.01, 151.96, 151.71, 151.65, 151.17, 151.01, 150.19, 150.05, 148.32, 145.26, 145.24, 145.21, 145.16, 145.05, 141.91, 131.92, 130.31, 113.59, 51.67, 51.44, 51.42, 51.31, 31.13, 31.07, 30.85, 30.83, 30.82, 30.80 ppm; IR (ATR): ν = 2960, 2919 (CH), 1518, 1454,

1235, 1143 (s) cm<sup>-1</sup>; UV/Vis (THF): λ<sub>max</sub> (ε) = 652 (267 000), 592 (35 000), 382 nm (143 000 mol<sup>-1</sup> dm<sup>3</sup> cm<sup>-1</sup>); *m/z* (HR MS, EI) 1321.1578 [M + H]<sup>+</sup>, calc. for C<sub>54</sub>H<sub>58</sub>Br<sub>2</sub>MgN<sub>16</sub>O<sub>6</sub> + H<sup>+</sup>: 1321.1594.

**Synthesis of 2-(3-bromo-4-hydroxy-5-nitrophenyl)-9,10,16,17,23,24-hexakis(*tert*-butylsulfanyl)tetrapyrzino-*porphyrzine* magnesium(II) (6Mg).** The synthesis of 6Mg was performed following the general procedure for the synthesis of magnesium tetrapyrzino-*porphyrzine*s from **15** (1.3 g, 3.76 mmol) and **19** (3.45 g, 11.3 mmol). The mobile phase used for purification was: CHCl<sub>3</sub>/THF/MeOH 40 : 2 : 0.4 (*R<sub>f</sub>* = 0.19). The purified product was washed with MeOH. Yield: 481 mg (9.9%) of dark green solid. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>: [D<sub>5</sub>]pyridine, 25 °C, TMS): δ 9.97 (bs, 1H), 9.55–9.19 (broad m, 2H), 2.52–2.01 (m, 54H); <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>: [D<sub>5</sub>]pyridine, 25 °C, TMS): δ 158.27, 145.22, 51.45, 51.37, 51.31, 31.10, 30.87 ppm, aromatic signals were not detected. IR (ATR): ν = 2960, 2922 (CH), 1519, 1455, 1363, 1233, 1148 (s) cm<sup>-1</sup>; UV/Vis (THF): λ<sub>max</sub> (ε) = 653 (164 000), 594 (23 000), 381 nm (104 000 mol<sup>-1</sup> dm<sup>3</sup> cm<sup>-1</sup>); *m/z* (HR MS, EI) 1288.2308 [M + H]<sup>+</sup>, calc. for C<sub>54</sub>H<sub>58</sub>BrMgN<sub>17</sub>O<sub>3</sub>S<sub>6</sub> + H<sup>+</sup>: 1288.2339.

**Synthesis of 2,3-bis[3,5-di(*tert*-butyl)-4-hydroxyphenyl]-9,10,16,17,23,24-hexakis(*tert*-butylsulfanyl)tetrapyrzino-*porphyrzine* magnesium(II) (7Mg).** The synthesis of 7Mg was performed from the previously prepared metal-free derivative.<sup>19</sup> Thus, the metal-free ligand (20 mg, 14 μmol) was dissolved in pyridine (10 mL), and anhydr. magnesium acetate (20 mg, 140 μmol) was added. The mixture was refluxed for 30 min, and the solvent was evaporated. The solid was washed with water and purified by column chromatography on silica with CHCl<sub>3</sub> as the mobile phase. Yield: 19 mg (94%) of dark green solid. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>: [D<sub>5</sub>]pyridine, 25 °C, TMS): δ 8.21 (s, 4H), 2.42–2.11 (m, 54H), 1.64 (s, 36H); <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>: [D<sub>5</sub>]pyridine, 25 °C, TMS): δ 151.16, 151.10, 150.95, 147.75, 145.31, 145.16, 145.09, 137.35, 131.39, 127.93, 127.81, 114.09, 51.40, 51.35, 51.32, 34.90, 31.13, 30.89, 30.86, 30.64 ppm; IR (ATR): ν = 2957 (CH), 1509, 1456, 1362 cm<sup>-1</sup>; UV/Vis (THF): λ<sub>max</sub> (ε) = 653 (117 000), 592 (18 000), 383 nm (71 000 mol<sup>-1</sup> dm<sup>3</sup> cm<sup>-1</sup>); *m/z* (HR MS, EI) 1481.6146 [M + H]<sup>+</sup>, calc. for C<sub>76</sub>H<sub>96</sub>MgN<sub>16</sub>O<sub>2</sub>S<sub>6</sub> + H<sup>+</sup>: 1481.6150.

**Synthesis of 2,3-bis(4-hydroxyphenyl)-9,10,16,17,23,24-hexakis(*tert*-butylsulfanyl)tetrapyrzino-*porphyrzine* magnesium(II) (8Mg).** The synthesis of 8Mg was performed following the general procedure for the synthesis of magnesium tetrapyrzino-*porphyrzine*s from **18** (392 mg, 1.25 mmol) and **19** (1.15 g, 3.75 mmol). The mobile phases used for purification were: CHCl<sub>3</sub>/THF 10 : 1 and CHCl<sub>3</sub>/THF/MeOH 9 : 1 : 0.4 (*R<sub>f</sub>* = 0.29). The purified product was washed with hexane. Yield: 121 mg (7.7%) of dark green solid. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>: [D<sub>5</sub>]pyridine, 25 °C, TMS): δ 11.74 (s, 2H), 8.15 (s, 4H), 7.19 (s, 4H), 2.27 (s, 36H), 2.18 (s, 18H); <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>: [D<sub>5</sub>]pyridine, 25 °C, TMS): δ <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 159.54, 159.07, 158.27, 157.82, 154.33, 151.24, 151.13, 151.04, 150.84, 148.08, 145.42, 145.18, 132.46, 125.67, 116.03, 51.45, 51.40, 51.31, 31.11, 30.92, 30.88 ppm; IR (ATR): ν = 2961, 2923 (CH), 1609, 1518, 1248, 1142 (s) cm<sup>-1</sup>; UV/Vis

(THF):  $\lambda_{\max}$  ( $\epsilon$ ) = 653 (192 000), 593 (26 000), 384 nm (111 000 mol<sup>-1</sup> dm<sup>3</sup> cm<sup>-1</sup>);  $m/z$  (HR MS, EI) 1257.3656 [M + H]<sup>+</sup>, calc. for C<sub>60</sub>H<sub>64</sub>MgN<sub>16</sub>O<sub>2</sub>S<sub>6</sub> + H<sup>+</sup>: 1257.3646.

#### General procedure for synthesis of zinc tetrapyrizinoporphyrazines

The corresponding magnesium(II) tetrapyrizinoporphyrazine (1 eq.) was dissolved in CHCl<sub>3</sub>/THF 1 : 1 (v/v, approx. 1 mL per 20  $\mu$ mol of tetrapyrizinoporphyrazine), and *p*-toluenesulfonic acid hydrate (10 eq.) was added dissolved in THF (approx. 1 mL per 200  $\mu$ mol). The mixture was stirred at rt for 1 h, the solvents were evaporated, and the dark solid was washed with water, filtered and air-dried to obtain the metal-free ligand. The metal-free ligand was chelated with zinc using anhydr. zinc acetate (10 eq.) in refluxing pyridine (approx. 1 mL per 20  $\mu$ mol of tetrapyrizinoporphyrazine) for 1 h. Then, the solvent was evaporated, and the green solid was washed with water and air-dried. The product was purified by column chromatography on silica with the mobile phases mentioned below.

**Synthesis of 2-(4-hydroxyphenyl)-9,10,16,17,23,24-hexakis(tert-butylsulfanyl)tetrapyrizinoporphyrazine zinc(II) (2Zn).** The synthesis of 2Zn was performed following the general procedure for the synthesis of zinc tetrapyrizinoporphyrazines from 2Mg (215 mg, 184  $\mu$ mol). The mobile phase used for purification was: CHCl<sub>3</sub>/THF/MeOH 18 : 1 : 0.4. The purified product was washed with hexane. Yield: 96 mg (43%) of dark green solid. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>: [D<sub>5</sub>]pyridine, 25 °C, TMS):  $\delta$  12.15 (s, 1H), 9.99 (s, 1H), 8.77 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 2H), 7.38 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 2H), 2.30–2.20 (m, 54H); <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>: [D<sub>5</sub>]pyridine, 25 °C, TMS):  $\delta$  161.41, 159.46, 159.35, 158.78, 158.75, 158.52, 158.37, 153.93, 152.08, 151.91, 151.71, 151.60, 151.40, 150.92, 150.72, 150.36, 147.57, 144.86, 144.76, 144.71, 144.67, 143.06, 130.04, 129.99, 127.98, 117.03, 51.51, 51.43, 51.39, 31.04, 30.83, 30.63 ppm; IR (ATR):  $\nu$  = 2963, 2925 (CH), 1520, 1233, 1143 (s) cm<sup>-1</sup>; UV/Vis (THF):  $\lambda_{\max}$  ( $\epsilon$ ) = 650 (244 000), 590 (33 000), 376 nm (128 000 mol<sup>-1</sup> dm<sup>3</sup> cm<sup>-1</sup>);  $m/z$  (HR MS, EI) 1205.2826 [M + H]<sup>+</sup>, calc. for C<sub>54</sub>H<sub>60</sub>N<sub>16</sub>O<sub>2</sub>S<sub>6</sub>Zn + H<sup>+</sup>: 1205.2824.

**Synthesis of 2-(3,5-dibromo-4-hydroxyphenyl)-9,10,16,17,23,24-hexakis(tert-butylsulfanyl)tetrapyrizinoporphyrazine zinc(II) (5Zn).** The synthesis of 5Zn was performed following the general procedure for the synthesis of zinc tetrapyrizinoporphyrazines from 5Mg (390 mg, 295  $\mu$ mol). The mobile phase used for purification was: CHCl<sub>3</sub>/THF/AcOH 20 : 1 : 0.1. The purified product was washed with a small amount of methanol. Yield: 129 mg (32%) of dark green solid. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>: [D<sub>5</sub>]pyridine, 25 °C, TMS):  $\delta$  10.00 (s, 1H), 9.09 (s, 2H), 2.30 (s, 9H), 2.28–2.24 (m, 36H), 2.23 (s, 9H); <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>: [D<sub>5</sub>]pyridine, 25 °C, TMS):  $\delta$  159.42, 159.38, 158.90, 158.87, 158.75, 158.64, 154.96, 152.41, 152.35, 152.17, 152.06, 151.68, 151.44, 150.50, 150.33, 148.22, 144.84, 144.81, 144.79, 144.76, 144.67, 142.43, 131.96, 130.16, 113.55, 51.86, 51.58, 51.56, 51.51, 51.47, 31.10, 31.04, 30.85, 30.83, 30.81 ppm; IR (ATR):  $\nu$  = 2961, 2919 (CH), 1518, 1457, 1233, 1141 (s) cm<sup>-1</sup>; UV/Vis (THF):  $\lambda_{\max}$  ( $\epsilon$ ) =

650 (273 000), 592 (37 000), 378 nm (143 000 mol<sup>-1</sup> dm<sup>3</sup> cm<sup>-1</sup>);  $m/z$  (HR MS, EI) 1361.0995 [M + H]<sup>+</sup>, calc. for C<sub>54</sub>H<sub>58</sub>Br<sub>2</sub>N<sub>16</sub>O<sub>2</sub>S<sub>6</sub>Zn + H<sup>+</sup>: 1361.1035.

**Synthesis of 2,3-bis(4-hydroxyphenyl)-9,10,16,17,23,24-hexakis(tert-butylsulfanyl)tetrapyrizinoporphyrazine zinc(II) (8Zn).** The synthesis of 8Zn was performed following the general procedure for the synthesis of zinc tetrapyrizinoporphyrazines from 8Mg (54 mg, 43  $\mu$ mol). The mobile phase used for purification was: CHCl<sub>3</sub>/THF/MeOH 9 : 1 : 0.4. The purified product was washed with a small amount of hexane. Yield: 30 mg (54%) of dark green solid. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>: [D<sub>5</sub>]pyridine, 25 °C, TMS):  $\delta$  11.76 (s, 2H), 8.14 (d,  $J$  = 8.2 Hz, 4H), 7.19 (d,  $J$  = 8.2 Hz, 4H), 2.26 (s, 36H), 2.20 (s, 18H); <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>: [D<sub>5</sub>]pyridine, 25 °C, TMS):  $\delta$  159.63, 159.44, 158.67, 158.28, 154.65, 151.70, 151.59, 151.52, 151.32, 147.67, 144.92, 144.68, 144.63, 132.43, 131.10, 116.06, 51.49, 51.37, 31.04, 30.85, 30.82 ppm; IR (ATR):  $\nu$  = 2959, 2918, (CH), 1609, 1518, 1249, 1142 (s) cm<sup>-1</sup>; UV/Vis (THF):  $\lambda_{\max}$  ( $\epsilon$ ) = 653 (122 000), 596 (23 000), 379 (93 000 mol<sup>-1</sup> dm<sup>3</sup> cm<sup>-1</sup>);  $m/z$  (HR MS, EI) 1297.3085 [M + H]<sup>+</sup>, calc. for C<sub>60</sub>H<sub>64</sub>N<sub>16</sub>O<sub>2</sub>S<sub>6</sub>Zn + H<sup>+</sup>: 1297.3087.

#### Photophysical measurements

Fluorescence quantum yield ( $\Phi_F$ ) and singlet oxygen quantum yield ( $\Phi_\Delta$ ) were determined according to the literature method<sup>35</sup> employing unsubstituted zinc phthalocyanine as the reference compound (reference values:  $\Phi_F$  = 0.32 in THF,<sup>15</sup>  $\Phi_\Delta$  = 0.53 in THF<sup>36</sup>). Fluorescence was measured on an FS5 fluorimeter (Edinburgh Instruments) with excitation in the vibrational bands of the Q-band (typically at 600 nm) and with absorbance of the sample in the Q-band maximum below 0.1 to limit the inner filter effect. In the case of liposomes and microemulsions, the refractive index used for corrections was measured and was found to be the same as that for water ( $n$  = 1.333).

#### Preparation of liposomes

Using the suspension of multilamellar vesicles (MLVs), large unilamellar vesicles were formed by extrusion (LUVETs) using the following procedure. The lipids (dioleoylphosphatidylcholine, DOPC, 19.7 mg, 25  $\mu$ mol) were dissolved in chloroform. Then, THF stock solution (100  $\mu$ M) of the corresponding TPzPz (0.25 mL) was added, and the solution was evaporated in a 100 mL round-bottom flask on a water bath at a temperature of 37 °C. To remove all the traces of organic solvents, the thin lipid film was left on the water bath for 30 minutes at a pressure of 5 mbar. The Britton–Robinson buffer (1.0 mL) of the corresponding pH (chosen to match the expected pK<sub>a</sub>) was added, and the lipids were removed from the flask walls by gentle hand shaking. Subsequently, the suspension was vortexed for 5 min to form MLVs and was left to stand for 4 h at room temperature to allow complete swelling. LUVETs were prepared from this MLV suspension using a small hand extruder (LiposoFast Basic, Avestin). The suspension was passed back and forth 21 times through two stacked polycarbonate filters (pore size 100  $\mu$ m) at room temperature. The final

suspension of liposomes used as a stock solution contained the dye at a concentration of 25  $\mu\text{M}$  incorporated into unilamellar DOPC vesicles with a lipid concentration of 25 mM, *i.e.*, the lipid-to-dye ratio was 1000 : 1. Liposomes were characterized using dynamic light scattering (Zetasizer nano-ZS, Malvern, UK) with the approximate size (one typical experiment) of  $137.4 \pm 0.6$  nm and polydispersity index of 0.055. In the case of liposomes combining 5Mg and BODIPY dye, the BODIPY stock solution in THF (100  $\mu\text{M}$ , 0.25 mL) was added together with the TPyzPz. The final concentrations of 5Mg, BODIPY and DOPC in the wavelength-ratiometric probe stock solution were 25  $\mu\text{M}$ , 25  $\mu\text{M}$ , and 25 mM, respectively.

### Preparation of microemulsions

The medium chain triacylglycerides (29 mg, Ecogreen Oleochemicals, meeting specifications of Ph.Eur.) and Cremophor® EL (72 mg, BASF) were dissolved in chloroform (*ca.* 4 mL) and mixed with THF stock solution of the corresponding TPyzPz (100  $\mu\text{M}$ , 2.5 mL) or pyrazinedicarbonitriles (1 mM, 2.5 mL). The solvent was evaporated under reduced pressure, and the flask was kept under deep vacuum (5 mbar) for 30 min at 40 °C to remove all traces of solvent. Afterwards, the Britton–Robinson buffer of the corresponding pH (chosen to match the expected  $\text{pK}_a$ ) was added to a total volume of 5 mL, and the mixture was shaken well on a vortex and orbital shaker. The microemulsions prepared in this way contained TPyzPz at a concentration of 50  $\mu\text{M}$  or pyrazinedicarbonitriles at a concentration of 500  $\mu\text{M}$  incorporated into the oil particles. Microemulsions of such composition have already been characterized using dynamic light scattering with a size of approximately 300 nm.<sup>19</sup>

### Absorption and emission changes in buffers of different pH values

The Britton–Robinson buffer (0.04 M  $\text{H}_3\text{PO}_4$ , 0.04 M  $\text{CH}_3\text{COOH}$ , 0.04 M  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , adjusted to selected pH by 0.2 M NaOH) was used for the pH range of 1.7–11.7, and the Bates and Bower buffer (0.2 M KCl/0.2 M NaOH) was used for the pH range of 11.8–13.0. The pH was measured using a CyberScan pH510 pH meter calibrated with a three-point calibration (pH 10.00, 7.00, and 4.00) prior to use. Typically, 2.5 mL of the selected buffer was added to the cuvette, the stock solution of DOPC (25  $\mu\text{L}$ ), microemulsion (50  $\mu\text{L}$ ), or, in the case of pyrazinedicarbonitriles, DMSO stock solution (200  $\mu\text{M}$ , 125  $\mu\text{L}$ , final DMSO concentration 5%) was also added, and the absorption and fluorescence spectra were recorded. The excitation for fluorescence measurements was always conducted at the isobestic point. In the case of the wavelength-ratiometric probe combining 5Mg and BODIPY in liposomes, the excitation was performed at 445 nm.

### Conflicts of interest

There are no conflicts to declare.

### Acknowledgements

The authors would like to thank Jiří Kuneš for NMR measurements and Lucie Nováková for HR MS measurements. This work was supported by the project EFSA-CDN (No. CZ.02.1.01/0.0/0.0/16\_019/0000841) co-funded by the ERDF and by Charles University (SVV 206401).

### Notes and references

- 1 D. Wencel, T. Abel and C. McDonagh, *Anal. Chem.*, 2014, **86**, 15–29.
- 2 T. Jokic, S. M. Borisov, R. Saf, D. A. Nielsen, M. Kuhl and I. Klimant, *Anal. Chem.*, 2012, **84**, 6723–6730.
- 3 D. Pfeifer, I. Klimant and S. M. Borisov, *Chem. – Eur. J.*, 2018, **24**, 10711–10720.
- 4 L. Lochman, P. Zimcik, I. Klimant, V. Novakova and S. M. Borisov, *Sens. Actuators, B*, 2017, **246**, 1100–1107.
- 5 (a) J. Y. Han and K. Burgess, *Chem. Rev.*, 2010, **110**, 2709–2728; (b) Y. K. Yue, F. J. Huo, S. Lee, C. X. Yin and J. Yoon, *Analyst*, 2017, **142**, 30–41; (c) X. S. Zou, T. T. Pan, L. Chen, Y. Q. Tian and W. W. Zhang, *Crit. Rev. Biotechnol.*, 2017, **37**, 723–738; (d) M. Y. Yang, A. S. Jalloh, W. Wei, J. Zhao, P. Wu and P. R. Chen, *Nat. Commun.*, 2014, **5**, 4981; (e) Y. Xu, Z. Jiang, Y. Xiao, F. Z. Bi, J. Y. Miao and B. X. Zhao, *Anal. Chim. Acta*, 2014, **820**, 146–151; (f) Y. Urano, D. Asanuma, Y. Hama, Y. Koyama, T. Barrett, M. Kamiya, T. Nagano, T. Watanabe, A. Hasegawa, P. L. Choyke and H. Kobayashi, *Nat. Med.*, 2009, **15**, 104–109.
- 6 T. T. Meng, H. Wang, Z. B. Zheng and K. Z. Wang, *Inorg. Chem.*, 2017, **56**, 4775–4779.
- 7 W. Liu, R. Sun, J. F. Ge, Y. J. Xu, Y. Xu, J. M. Lu, I. Itoh and M. Ihara, *Anal. Chem.*, 2013, **85**, 7419–7425.
- 8 (a) W. J. Shi, P. C. Lo and D. K. P. Ng, *Dyes Pigm.*, 2018, **154**, 314–319; (b) H. He and D. K. P. Ng, *Org. Biomol. Chem.*, 2011, **9**, 2610–2613; (c) A. Sutter, M. Elhabiri and G. Ulrich, *Chem. – Eur. J.*, 2018, **24**, 11119–11130; (d) N. Boens, V. Leen and W. Dehaen, *Chem. Soc. Rev.*, 2012, **41**, 1130–1172.
- 9 P. Li, H. Xiao, Y. Cheng, W. Zhang, F. Huang, W. Zhang, H. Wang and B. Tang, *Chem. Commun.*, 2014, **50**, 7184–7187.
- 10 V. Březina, S. Ishihara, J. Lang, L. Hanyková, K. Ariga, J. P. Hill and J. Labuta, *ChemistryOpen*, 2018, **7**, 323–335.
- 11 Y. Shen, M. Rosendale, R. E. Campbell and D. Perrais, *J. Cell Biol.*, 2014, **207**, 419–432.
- 12 (a) M. A. Bartlett and J. Sundermeyer, *Dalton Trans.*, 2018, **47**, 16255–16263; (b) M. A. Lapshina, S. I. Norko, V. E. Baulin, A. A. Terentiev, A. Y. Tsivadze and N. F. Goldshleger, *Macroheterocycles*, 2018, **11**, 396–403; (c) H. Kuruca, B. Köksoy, B. Karapınar, M. Durmuş and M. Bulut, *J. Porphyrins Phthalocyanines*, 2018, **22**, 266–278.
- 13 V. Novakova, M. P. Donzello, C. Ercolani, P. Zimcik and P. A. Stuzhin, *Coord. Chem. Rev.*, 2018, **361**, 1–73.

- 14 E. Viola, M. P. Donzello, S. Testani, G. Luccisano, M. L. Astolfi, C. Rizzoli, L. Cong, L. Mannina, C. Ercolani and K. M. Kadish, *Inorg. Chem.*, 2019, **58**, 1120–1133.
- 15 P. Zimcik, V. Novakova, K. Kopecky, M. Miletin, R. Z. Uslu Kobak, E. Svandrlíkova, L. Váchová and K. Lang, *Inorg. Chem.*, 2012, **51**, 4215–4223.
- 16 A. Cidlina, M. Miletin, M. Fathi-Rasekh, V. N. Nemykin, P. Zimcik and V. Novakova, *Chem. – Eur. J.*, 2017, **23**, 1795–1804.
- 17 (a) X. J. Jiang, P. C. Lo, Y. M. Tsang, S. L. Yeung, W. P. Fong and D. K. P. Ng, *Chem. – Eur. J.*, 2010, **16**, 4777–4783; (b) X. J. Jiang, P. C. Lo, S. L. Yeung, W. P. Fong and D. K. P. Ng, *Chem. Commun.*, 2010, **46**, 3188–3190; (c) Q. M. Guo, L. M. Chen, S. J. Pan, D. D. Ma, X. W. Liu, X. Q. Chen, G. X. Xu, H. Q. Yang and Y. R. Peng, *Dalton Trans.*, 2018, **47**, 13164–13170.
- 18 (a) V. Novakova, M. Miletin, K. Kopecky and P. Zimcik, *Chem. – Eur. J.*, 2011, **17**, 14273–14282; (b) V. Novakova, E. H. Mørkved, M. Miletin and P. Zimcik, *J. Porphyrins Phthalocyanines*, 2010, **14**, 582–591.
- 19 V. Novakova, M. Laskova, H. Vavrickova and P. Zimcik, *Chem. – Eur. J.*, 2015, **21**, 14382–14392.
- 20 X. F. Zhang, *J. Fluoresc.*, 2011, **21**, 1559–1564.
- 21 (a) J. T. F. Lau, P.-C. Lo, X.-J. Jiang, Q. Wang and D. K. P. Ng, *J. Med. Chem.*, 2014, **57**, 4088–4097; (b) R. C. H. Wong, S. Y. S. Chow, S. Zhao, W.-P. Fong, D. K. P. Ng and P.-C. Lo, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2017, **9**, 23487–23496.
- 22 (a) L. Vachova, V. Novakova, K. Kopecky, M. Miletina and P. Zimcik, *Dalton Trans.*, 2012, **41**, 11651–11656; (b) A. Cidlina, V. Novakova, M. Miletin and P. Zimcik, *Dalton Trans.*, 2015, **44**, 6961–6971.
- 23 V. Novakova, P. Hladik, T. Filandrova, I. Zajicova, V. Krepsova, M. Miletin, J. Lenco and P. Zimcik, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2014, **16**, 5440–5446.
- 24 A. Tuhl, S. Makhseed, P. Zimcik, N. Al-Awadi, V. Novakova and J. Samuel, *J. Porphyrins Phthalocyanines*, 2012, **16**, 817–825.
- 25 G. J. Clarkson, P. Humberstone and N. B. McKeown, *Chem. Commun.*, 1997, 1979–1980.
- 26 J. P. Hill, N. K. Subbaiyan, F. D'Souza, Y. S. Xie, S. Sahu, N. M. Sanchez-Ballester, G. J. Richards, T. Mori and K. Ariga, *Chem. Commun.*, 2012, **48**, 3951–3953.
- 27 A. Tillo, D. T. Mlynarczyk, L. Popenda, B. Wicher, M. Kryjewski, W. Szczolko, S. Jurga, J. Mielcarek, M. Gdaniec, T. Goslinski and E. Tykarska, *New J. Chem.*, 2017, **41**, 3586–3594.
- 28 R. Cristiano, E. Westphal, I. H. Bechtold, A. J. Bortoluzzi and H. Gallardo, *Tetrahedron*, 2007, **63**, 2851–2858.
- 29 (a) M. Machacek, A. Cidlina, V. Novakova, J. Svec, E. Rudof, M. Miletin, R. Kucera, T. Simunek and P. Zimcik, *J. Med. Chem.*, 2015, **58**, 1736–1749; (b) B. Ghazal, M. Machacek, M. A. Shalaby, V. Novakova, P. Zimcik and S. Makhseed, *J. Med. Chem.*, 2017, **60**, 6060–6076.
- 30 H. He, P. C. Lo and D. K. P. Ng, *Chem. – Eur. J.*, 2014, **20**, 6241–6245.
- 31 I. Mellman, R. Fuchs and A. Helenius, *Annu. Rev. Biochem.*, 1986, **55**, 663–700.
- 32 C. Zhang, J. Zhao, S. Wu, Z. Wang, W. Wu, J. Ma, S. Guo and L. Huang, *J. Am. Chem. Soc.*, 2013, **135**, 10566–10578.
- 33 P. Zimcik, M. Miletin, V. Novakova, K. Kopecky, M. Nejedla, V. Stara and K. Sedlackova, *Aust. J. Chem.*, 2009, **62**, 425–433.
- 34 M. Kostka, P. Zimcik, M. Miletin, P. Klemra, K. Kopecky and Z. Musil, *J. Photochem. Photobiol., A*, 2006, **178**, 16–25.
- 35 V. Novakova, M. Miletin, T. Filandrova, J. Lenčo, A. Růžička and P. Zimcik, *J. Org. Chem.*, 2014, **79**, 2082–2093.
- 36 L. Kaestner, M. Cesson, K. Kassab, T. Christensen, P. D. Edminson, M. J. Cook, I. Chambrier and G. Jori, *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2003, **2**, 660–667.