

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA FARMACEUTICKÉ CHEMIE A KONTROLY LÉČIV



DIPLOMOVÁ PRÁCE

Syntéza asymetrických derivátů azaftalocyaninů I.



Hradec Králové, 2007

Veronika Loukotová

*Děkuji PharmDr. Petru Zimčkoví Ph.D.,
mému trpělivému školiteli.*

Obsah

1. Seznam zkratek	5
2. Cíl práce	6
3. Teoretická část	7
3.1. Typy zhášení fluorescence	7
3.2. Metody detekce vzorků	9
3.2.1 „Adjacent probe“	10
3.2.2 „Competitive hybridization probe“	11
3.2.3 „Randomly coiled probe“	11
3.2.4 „Molecular beacon“	12
3.2.5 „Dual-labeled randomly coiled probes“	12
3.3. Fluorescenční barviva dostupná v praxi	13
3.4. V praxi používané quencherly	17
4. Metodická část	22
4.1. Syntéza nesymetrických ftalocyaninů a jejich azaanalogů	22
4.1.1 Syntéza A ₃ B ftalocyaninů	23
Metoda statistické kondenzace (Statistical Condensation)	23
Subftalocyaninová metoda (The Subphthalocyanine Approach)	25
Metoda s využitím pevné fáze (Polymeric Support Method)	26
4.1.2 Syntéza ABAB ftalocyaninů (Příčně substituované Pcs, Crosswise-Substituted Pcs)	27
4.1.3 Syntéza AABB ftalocyaninů (Souměrně substituované Pcs, Adjacent Pcs)	28
5. Výsledky a diskuze	30
6. Experimentální část	37
6.1. Příprava prekurzorů a AzaPc	38
6.1.1 Příprava 5,6-dioxo-1,4,5,6-tetrahydropyrazin-2,3-dikarbonitrilu (1).	38
6.1.2 Příprava 5,6-dichlorpyrazin-2,3-dikarbonitrilu (2)	38
6.1.3 Příprava 5,6-bis(diethylamino)-pyrazin-2,3-dikarbonitrilu (3)	39
6.1.4 Příprava 5-chlor-6-diethylaminopyrazin-2,3-dikarbonitrilu (4)	39
6.1.5 Příprava 5,6-bis-(2-hydroxyethylamino)-pyrazin-2,3-dikarbonitrilu (5)	40

6.1.6	Příprava 5,6-bis[2-(2-hydroxyethoxy)-ethylamino]-pyrazin-2,3-dikarbonitrilu (6)	40
6.1.7	Příprava 5,6-bis[bis(2-hydroxyethyl)amino]pyrazin-2,3-dikarbonitrilu (7)	41
6.1.8	Příprava 5-diethylamino-6-(2-hydroxyethylamino)-pyrazin-2,3-dikarbonitrilu (8)	42
6.1.9	Příprava 5-[bis(2-hydroxyethyl)amino]-6-diethylaminopyrazin-2,3-dikarbonitrilu (9)	42
6.1.10	Příprava 5-diethylamino-6-[2-(2-hydroxyethoxy)-ethylamino]-pyrazin-2,3-dikarbonitrilu (10)	43
6.2.	Obecný postup přípravy nesymetrických derivátů AzaPc	44
6.2.1	Příprava 2,3-bis[2-(2-hydroxyethoxy)ethylamino]-9,10,16,17,23,24-hexakis(diethylamino)-1,4,8,11,15,18,22,25-(oktaaza)ftalocyaninu (Q3-1H2)	44
6.2.2	Příprava 2-(2-hydroxyethylamino)-3,9,10,16,17,23,24-heptakis(diethylamino)-1,4,8,11,15,18,22,25-(oktaaza)ftalocyaninu (Q4-1H2)	45
6.2.3	Příprava 2-(2-hydroxyethylamino)-3,9,10,16,17,23,24-heptakis(diethylamino)-1,4,8,11,15,18,22,25-(oktaaza)ftalocyaninu (Q5-1H2)	46
6.2.4	Příprava 2-[2-(2-hydroxyethoxy)-ethylamino]-3,9,10,16,17,23,24-heptakis(diethylamino)-1,4,8,11,15,18,22,25-(oktaaza)ftalocyaninu (Q6-1H2)	47
6.3.	Reakce P1-1Mg s Q6-1H2	48
7.	Závěr	49
8.	Použitá literatura	50

1. Seznam zkratk

AzaPc	azaftalocyanin
BHQ	„Black Hole Quenchers“
FAM	karboxyfluorescein (fluorescenční barvivo)
FRET	„Förster resonance energy transfer“, „fluorescence resonance energy transfer“
HEX	6-karboxy-1,4-dichloro-2',4', 5', 7'-tetrachlorofluorescein
JOE	6-karboxy-4',5'-dichlor-2', 7'-dimethoxyfluorescein
Pcs	ftalocyaniny
PCR	„polymerization chain reaction“
PDT	„photodynamic therapy“
SubPc	subftalocyanin
TAMRA	6-karboxytetramethylrhodamine (fluorescenční barvivo)
TET	6-karboxy-1,4-dichloro-2',7'-dichlorofluorescein (fluorescenční barvivo)

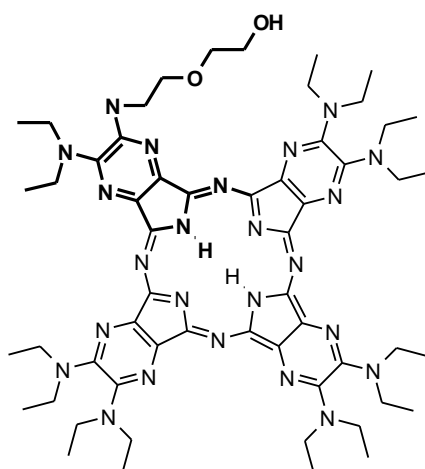
Quencher (zhášec) je látka, která převezme energii od jiné látky, čímž dojde k detekovatelným změnám v jejich emisních spektrech.

Dark quencher je látka, která se po absorpci energie excituje na energeticky vyšší hladinu. Do svého základního stavu však přejde jinými mechanismy než vyzářením fotonu (tj. fluorescencí). Výsledná fluorescence je tedy nulová.

2. Cíl práce

Cílem mé diplomové práce byla syntéza asymetrických derivátů azaftalocyaninů (příklad jedné z látek ukazuje vzorec níže) připravovaných smíšenou tetramerizací dvou různých prekurzorů. Substituenty byly vázány k makrocyclickému systému přes dusíkový atom. Tyto látky původně připravované pro použití ve fotodynamické terapii (PDT) se ukázaly jako nevhodné v tomto směru¹. Avšak při sledování jejich vlastností byla objevena nová možnost jejich využití – jako tzv. „dark quenchers“ – pro zhášení fluorescence. Jedná se o naprostou inovaci v této oblasti, protože látky podobné struktury nebyly v tomto směru ještě nikdy zkoumány. Syntézy byly vedeny s cílem získat látky s definovaným počtem periferních substituentů vhodných pro vázání na oligonukleotidické sondy.

Součástí mé práce bylo i vypracování rešerše o používaných fluorescenčních barvivech a jejich quencherech.



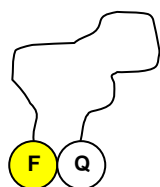
asymetrický AzaPc

3. Teoretická část

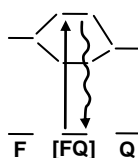
3.1. Typy zhášení fluorescence

Schopnost fluorescenčních látek předat energii absorbovanou ze světla okolním molekulám v jejich těsné blízkosti lze snadno využít k monitorování biochemických dějů², a to především jako tzv. „dvojitě značené sondy“. Ty jsou složeny z krátké oligonukleotidické sondy, na jejíž opačných koncích jsou kovalentně navázány fluorescenční barvivo a jeho quencher. Ke zhášení fluorescence může docházet několika způsoby. Podle přenosu energie mezi donorem (fluorescenční barvivo) a akceptorem (zhášecí) jsou v literatuře popsány statické a dynamické mechanismy zhášení⁵.

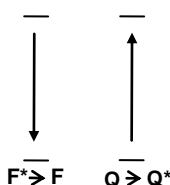
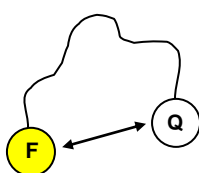
Statické zhášení



Intramolekulární dimer



Dynamické zhášení



F fluorofor
Q quencher
[FQ] komplex fluoroforu a quencheru
* excitovaný stav
— jednotlivé energetické hladiny

Obr. 1

Při *dynamickém zhášení* dochází k přenosu energie z excitovaného stavu fluoroforu (viz Obr. 1). Do této skupiny patří FRET³ (Förster resonance energy transfer) a mechanismus podle Dexter⁴, který je méně významný. Försterova teorie (pojmenovaná podle německého vědce Theodora Förstera) je založena na interakci dipól – dipól mezi donorem a akceptorem energie. Z toho vyplývá, že tento děj je silně ovlivněn vzdáleností mezi fluoroforem a quencherem (R), přičemž platí, že intenzita zhášení je funkcí vzdálenosti podle vztahu $1/R^6$. FRET se tedy může vyskytovat pouze do vzdálenosti přibližně 100 Å. Kromě vzdálenosti je tento mechanismus silně závislý i na spektrálních vlastnostech použitých látek. Podmínkou a zároveň velkým limitujícím faktorem je, aby absorpční spektrum quencheru co nejlépe překrývalo emisní spektrum fluoroforu⁵. V případě, že je jako donor i akceptor použito fluorescenční barvivo,

používá se termín „fluorescence resonance energy transfer“, i když se nejedná o přenos energie fluorescencí.

Dexterův mechanismus⁵, který je nazýván jako „kolizní“ přenos energie, vyplývá z prostorového překryvu molekulových orbitalů fluoroforu a quencheru. I zde je účinnost vázána na krátkou vzdálenost (R), přičemž k výraznému poklesu přenosu energie z fluoroforu na quencher dochází se vzdáleností podle vztahu e^{-R} .

Na rozdíl od dynamického zhášení, při *statickém (kontaktním) zhášení* dochází mezi quencherem a fluoroforem k vytvoření tzv. „komplexu v základním energetickém stavu“ (viz Obr. 1). Ten vznikne spojením donoru (fluoroforu) a akceptoru energie (zhášeče), kteří spolu vytvoří intramolekulární dimer. Komplex je stabilizován vazbou indukovaného dipólu a hydrofobními interakcemi. Tento dimer má pak naprosto nové unikátní vlastnosti, které se výrazně liší od vlastností fluoroforu a quencheru vyskytujících se samostatně. V takto vzniklém komplexu se energetické stavy elektronových hladin zúčastněných molekul sčítají a výsledné elektronové vlastnosti pak závisí na orientaci dipolových momentů⁵.

Při statickém zhášení můžeme rozlišit dva základní typy vzniklých komplexů (agregátů). H-agregáty mají absorpci posunutou k modré části spektra a fluorescence je snížena. Na druhou stranu u J-agregátů dochází k posunu směrem k červené oblasti spektra a fluorescence je naopak zvýšena. Je to způsobeno oblastí excitačního pásu, ve které je dovoleno v daném případě absorbovat^{6, 7}.

Podle typu látek použitých ke značení oligonukleotidické sondy (viz 3.2 Metody detekce vzorků) může nastat několik stavů. Jedná-li se o homodimer složený ze dvou identických fluoroforů, může být výsledná fluorescence u H-typu tohoto dimeru nulová, protože při opačných dipolových momentech stejné velikosti dojde k vykompenzování energií. U heterodimerů H-typu složených ze dvou různých fluorescenčních barviv je nepravděpodobné, že by došlo k absolutnímu vykompenzování dipolových momentů, a proto je výsledná fluorescence pouze snížena. Ke kompletnímu zhášení fluorescence může však dojít i v případě, že je heterodimer tvořen fluoroforem a „dark quencherem“ (viz dále)⁸.

Z uvedeného vyplývá, že jsou-li quencher a fluorofor ve velmi těsné blízkosti (v kontaktu), dochází ke statickému zhášení. Většina absorbované energie je vyzářena jako teplo a pouze malá část jako světlo. Dojde tak k poklesu emise fotonů jak u donorového,

tak u akceptorového fluoroforu. V případě, že mají mezi sebou určitou vzdálenost (20 – 100 Å) a nemůže tedy dojít k vytvoření intramolekulárního komplexu, hovoříme o dynamickém zhášení. V tomto případě se emise donorového fluoroforu sníží a akceptorového fluoroforu zvýší. Při kontaktním zhášení dochází navíc i ke změnám absorpčních spekter ve viditelné oblasti, kdežto u FRETu zůstává spektrum v této oblasti nezměněno⁹.

Velkou výhodou statického zhášení je to, že účinnost není vázána na překryv absorpčního spektra quencheru s emisním spektrem fluoroforu, což je velkým limitujícím faktorem u dynamického zhášení⁹. Naopak tvorba intramolekulárního dimeru typického pro statické zhášení je značně závislá na teplotě, což limituje její využití při real-time PCR, kde se dosahuje teplot okolo 60°C⁵.

Podle typu quencheru použitého pro zhášení mohou nastat různé změny v naměřené fluorescenci. Při použití fluorescenčního quencheru dojde pouze k posunu emise v absorpčních spektrech zúčastněných látek. Výhodnější se jeví skupina látek pojmenovaná jako „dark quenchers“, kdy dochází ke kompletnímu zhášení a výsledná fluorescence je tedy nulová. Podrobněji je o této problematice pojednáno v kapitole 3.4.

3.2. Metody detekce vzorků

Fluorescenční značení vzorků je dnes velmi moderní a v praxi velmi využívaná metoda². Fluorescenční barvivo může být ke specifické cílové molekule vázáno nekovalentně, ale pro vyšší specifitu stanovení je vhodnější vazba kovalentní. Ze změny intenzity fluorescence, popř. změny v emisních spektrech, lze pak určit množství stanovované látky ve vzorku¹⁰. Velkého rozvoje dosáhlo fluorescenční značení především v oblasti identifikace a kvantifikace DNA pomocí oligonukleotidických sond. Využívá se hybridizace sondy s komplementárním řetězcem stanovované DNA. Výhodou je, že není potřeba izolovat hybridizované molekuly od nehybridizovaných, protože změna fluorescence odpovídá právě pouze těm, které se hybridizovaly s použitou sondou⁹.

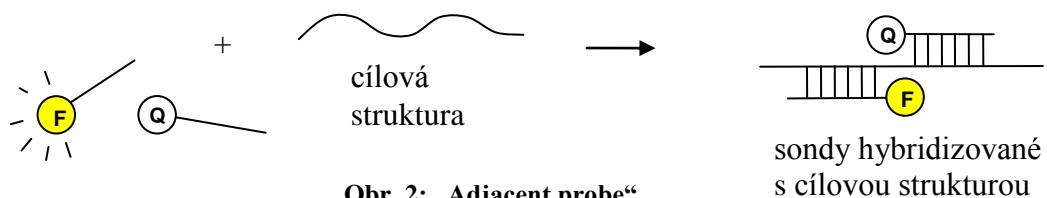
Při těchto tzv. *homogenních hybridizačních postupech* je dvojice fluoroforů kovalentně navázána na konce dvou různých oligonukleotidických sond nebo na konce

jedné stejné oligonukleotidické sondy. Po hybridizaci sondy s cílovou nukleovou kyselinou pak mohou nastat dva základní procesy. Dojde-li k přiblížení donoru k akceptoru, umožní se přenos energie, což je patrné na emisním spektru zúčastněných fluorescenčních značek. Naopak jejich vzájemné oddálení vede k zamezení přenosu energie, což je opět detekovatelné změřením emisního spektra⁹.

Možností navázání fluorescenčních značek na oligonukleotidický řetězec je více, a proto se můžeme v praxi setkat s několika typy sond a jim odpovídajícími metodami detekce.

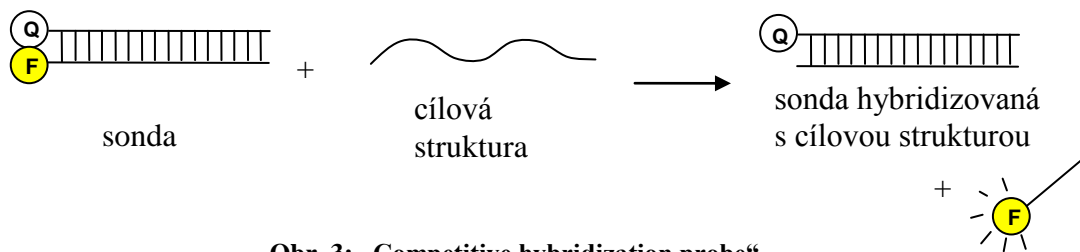
3.2.1 „Adjacent probe“

Nejstarší metoda (viz Obr. 2: „Adjacent probe“) využívá dvojice oligonukleotidických řetězců fluorescenčně značených na jejich příslušných 5' a 3' koncích. Tyto řetězce jsou vždy navrženy a konstruovány pro specifickou vazbu na jim odpovídající přilehlá místa cílového vlákna. Tím se dostane donor na velmi krátkou vzdálenost k akceptoru a dojde k ovlivnění výsledné fluorescence. Tento typ sondy je označován jako „adjacent probe“¹¹.



3.2.2 „Competitive hybridization probe“

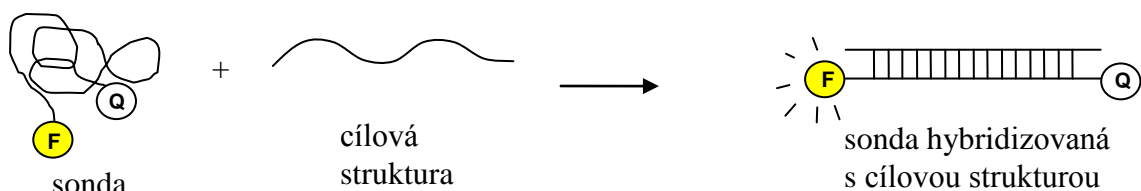
Jiným typem je využití dvou vzájemně komplementárních oligonukleotidických řetězců, z nichž jeden vystupuje jako sonda pro cílovou jednovláknovou sekvenci (viz Obr. 3: „Competitive hybridization probe“). 5' konec jednoho řetězce je označen donorem (fluorofor) a 3' konec druhého řetězce akceptorem (fluorofor nebo quencher). Na počátku jsou oligonukleotidické řetězce hybridizovány, což umožní blízký kontakt mezi donorem a akceptorem. Po přidání stanovovaného vzorku dojde ke kompetici cílové sekvence s druhým oligonukleotidickým řetězcem a ustaví se dynamická rovnováha. Tím dojde k rozdělení původně hybridizovaných řetězců. Tato sonda je označována jako „competitive hybridization probe“¹².



Obr. 3: „Competitive hybridization probe“

3.2.3 „Randomly coiled probe“

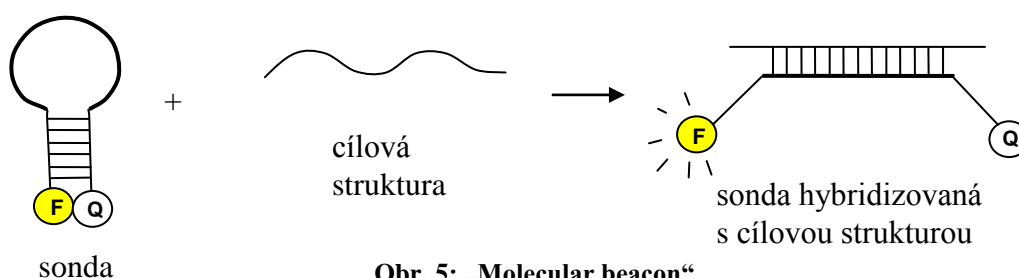
Při další metodě jsou akceptor a donor navázány na stejný oligonukleotidický řetězec (viz Obr. 4). V roztoku se tato sonda vyskytuje ve formě náhodného klubka, její konce se dostanou na těsnou vzdálenost k sobě a my můžeme detekovat změny v přenosu energie. V okamžiku, kdy dojde k hybridizaci sondy a cílové sekvence, se vytvoří rigidní uspořádání šroubovice a konce sondy se oddálí. Výsledkem je znemožnění přenosu energie mezi akceptorem a donorem a změna v naměřené fluorescenci¹³.



Obr. 4: „Randomly coiled probe“

3.2.4 „Molecular beacon“

Čtvrtý typ sondy je tvořen jednovláknovým oligonukleotidem nazývaným „molecular beacon“ (viz Obr. 5). Obsahuje kromě sekvence, která je komplementární s cílovým řetězcem, ještě krátkou přídatnou sekvenci na obou koncích sondy. Vytváří tak „stopku“ a v prostoru se orientuje do tvaru vlásenky. Poměrně pevná vazba (pevnější než vazba vlásenky) sondy s cílovým komplementárním vláknem způsobí rozpad tohoto typického tvaru sondy a oddálení donoru od akceptoru. Tím dojde k obnovení fluorescence donorového fluoroforu¹⁴.

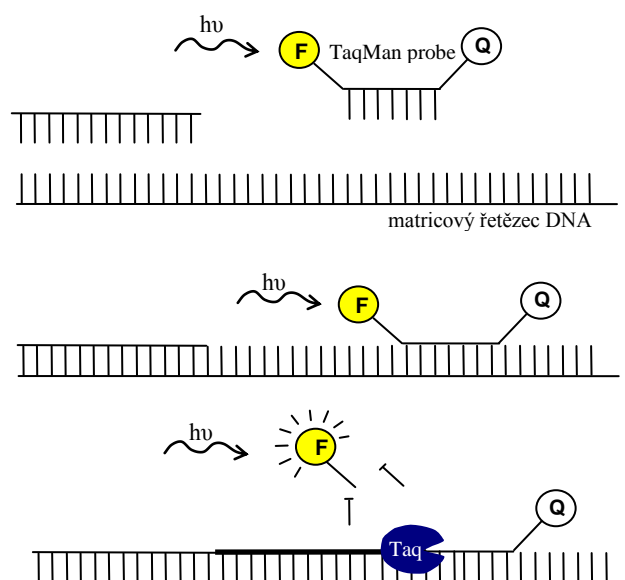


Z principů uvedených mechanismů vyplývá, že u sond založených na metodě „adjacent probe“ a „randomly coiled probe“ zůstávají fluorofory na určitou malou vzdálenost od sebe, a proto bude FRET převládajícím způsobem přenosu energie. Naopak u „competitive hybridization probe“ a „molecular beacon“ jsou fluorofory v těsné blízkosti u sebe a přenos energie se děje převážně kontaktním zhášením.

3.2.5 „Dual-labeled randomly coiled probes“

Kromě předchozích typů sond, které jsou založeny na hybridizačních postupech, se fluorescenční značení v praxi používá také u tzv. dvojitě značených sond tvaru náhodného klubka („dual-labeled randomly coiled probes“) (Obr. 6). Tyto sondy, označované jako „TaqMan probes“, se váží s matricovým řetězcem během real-time PCR a umožňují tak aktuální monitorování syntézy řetězce. V intaktním stavu je energie přenášena prostřednictvím FRETu z fluoroforu na jednom konci sondy na fluorofor na druhém konci. Po hybridizaci je vzorek citlivý na enzymatickou degradaci pomocí DNA polymerázy (Taq polymeráza), která má exonukleázovou aktivitu. Tím se

dostanou donorový a akceptorový fluorofor na velkou vzdálenost od sebe a dojde ke znemožnění přenosu energie pomocí FRETu. Stejného principu se využívá nejen při syntézách DNA, ale i při řadě reakcí zahrnujících oligodeoxyribonukleotidy značené párem fluoroforů^{14,15}.



Obr. 6: „Dual-labeled randomly coiled probes“

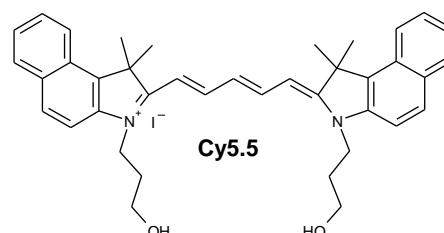
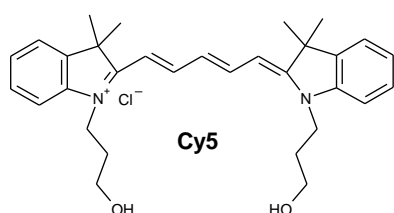
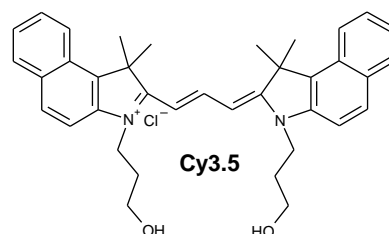
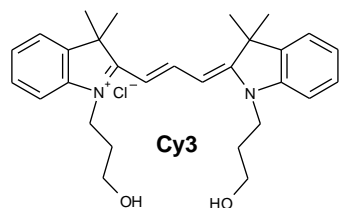
3.3. Fluorescenční barviva dostupná v praxi

Mezi nejčastěji používaná fluorescenční barviva patří např. FAM, TET, TAMRA, Alexa 350, indocyaninová barviva Cy3 a Cy5. Poslední tři jmenované látky jsou v současné době jedny z nejsilnějších fluoroforů, což umožňuje vysokou citlivost testů.

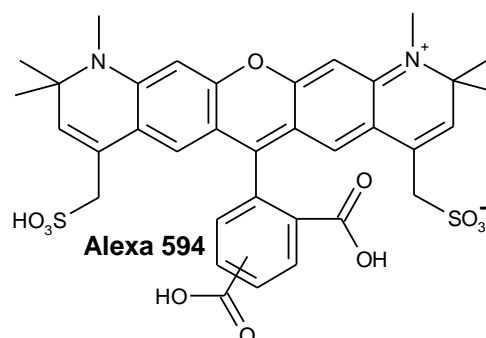
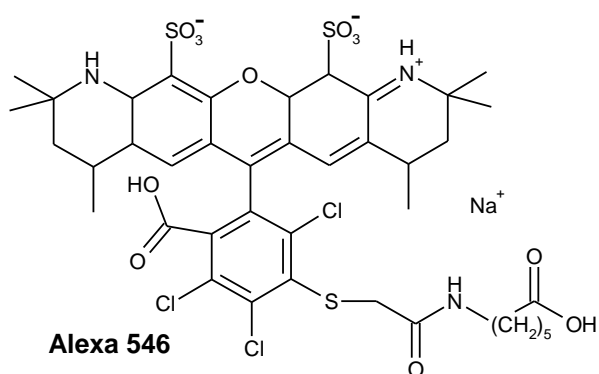
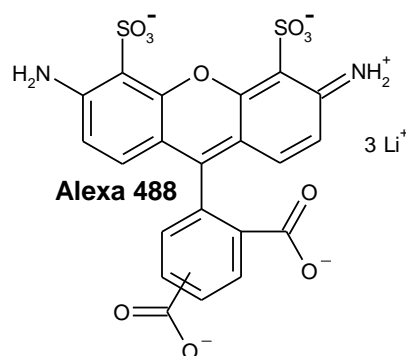
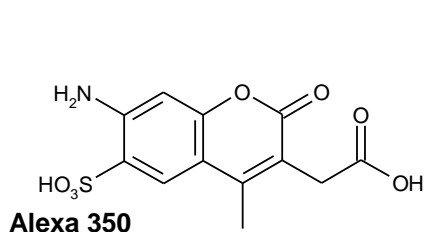
Poměrně rozsáhlou skupinu látek tvoří již zmíněná indocyaninová barviva. Původně byla připravena barviva **Cy3** a **Cy5**, později byla vyvinuta **Cy 3.5** a **Cy 5.5**, která emitují v oblasti, kam původní indocyaninová barviva nezasahovala. Základní vlastnosti této skupiny látek shrnuje následující tabulka¹⁶.

Barvivo	λ_{\max} absorpce (nm)	λ_{\max} emise (nm)	Barva
Cy3	546	564	červená
Cy3.5	588	593	nachová
Cy5	646	663	fialová
Cy5.5	683	687	tmavě modrá

Struktura indocyaninových barviv je založena na spojení dvou indolových jader řetězcem konjugovaných dvojných vazeb. Na tento základní skelet mohou být přikondenzována benzenová jádra, která posouvají jak absorpci tak emisi těchto látek k vyšším vlnovým délkám.



Poměrně rozsáhlou skupinu barviv tvoří látky známé pod označením Alexa. V praxi jsou dostupná např. **Alexa 350, 430, 488, 532, 546, 568, 594**. Číslo vyjadřuje absorpční maximum dané látky. Jejich emisní spektra zasahují do oblasti, kde emitují např. i fluorescein, rhodamin a Cy3, oproti nim mají ještě vyšší extinkční koeficient, vyšší fotostabilitu a jsou stabilní v širokém rozmezí pH 4 – 10¹⁷.

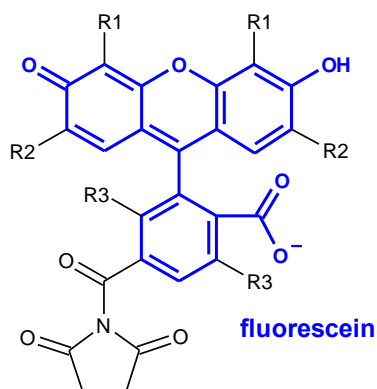


Jednotlivé látky této skupiny se značně liší svojí strukturou. Podobnost můžeme najít především v tom, že v jejich molekule je vždy obsažen 2*H*-chromen, na který jsou přikondenzovány další kruhy s různými postranními řetězci. V molekulách těchto látek najdeme opět rozsáhlý systém konjugovaných dvojných vazeb, který je předpokladem pro absorpci a emisi těchto látek při vyšších vlnových délkách.

Další skupina barviv jsou látky na bázi fluoresceinu a rhodaminu, jedná se např. o **5-FAM**, **6-FAM**, **TET**, **HEX**, **JOE**, **TAMRA** a **ROX**. Základní vlastnosti těchto látek shrnuje následující tabulka.

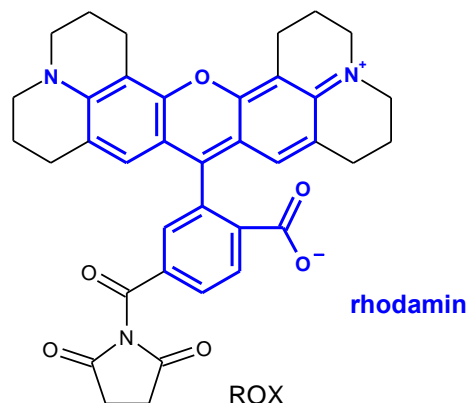
Barvivo	Systematický název	λ_{\max} absorpce (nm)	λ_{\max} emise (nm)
6-FAM	6-karboxyfluorescein	494	518
TET	6-karboxy-1,4-dichloro-2',7'-dichloro-fluorescein	521	536
HEX	6-karboxy-1,4-dichloro-2',4',5',7'-tetrachlorofluorescein	535	556
5-FAM	5-karboxyfluorescein	494	518
JOE	6-karboxy-4',5'-dichloro-2',7'-dimethoxy-fluorescein	522	550
TAMRA	6-karboxytetramethylrhodamine	555	580
ROX	6-karboxy-X-rhodamine	580	605

Fluorescein má poměrně silnou fluorescenci, absorbuje v oblasti 494 nm a emituje v oblasti 525 nm. Příprava této látky je poměrně snadná, fluorescein vzniká reakcí anhydridu kyseliny ftalové s resorcinolem v přítomnosti chloridu zinečnatého¹⁸. Vazbou halogenidů a jiných substituentů na základní skelet fluoresceinu bylo připraveno několik dalších barviv, které ukazuje následující schéma.

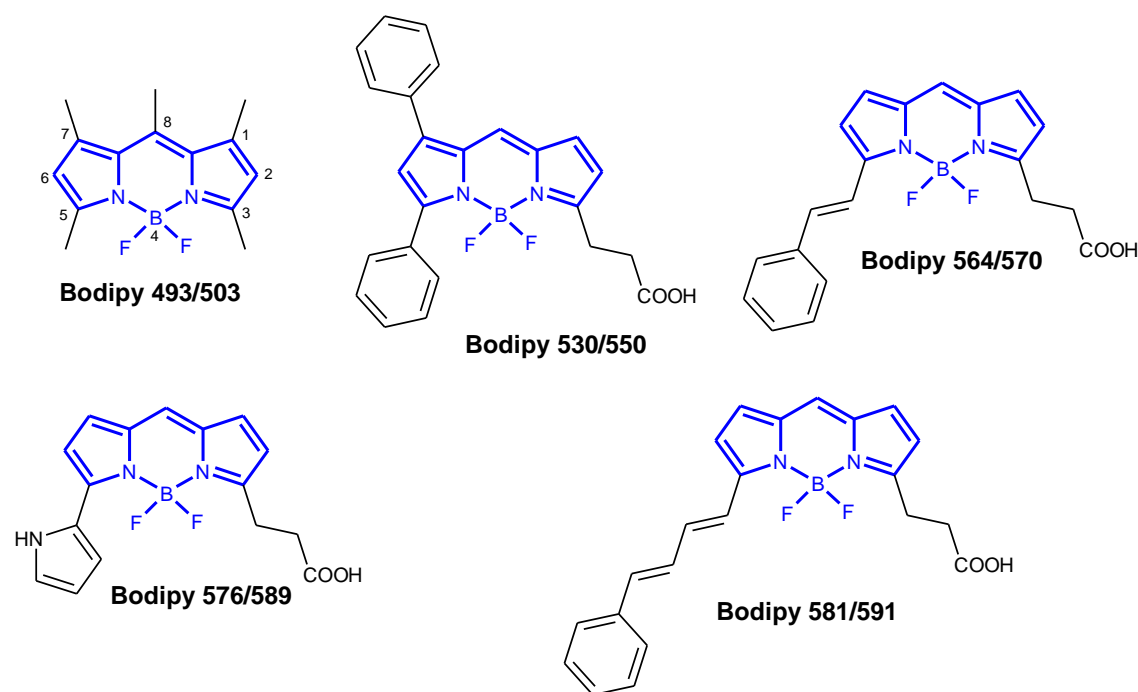


	R1	R2	R3
JOE	Cl	OCH ₃	H
HEX	Cl	Cl	Cl
TET	H	Cl	Cl
FAM	H	H	H

Rhodamin¹⁸ je označení pro skupinu několika příbuzných látek (rhodamin B, rhodamin 6G, rhodamin 123). I ve struktuře těchto látek, a látek odvozených další substitucí, je patrná rozsáhlá síť konjugovaných dvojných vazeb, která je nezbytným předpokladem pro využití těchto látek jako fluorescenčních barviv.

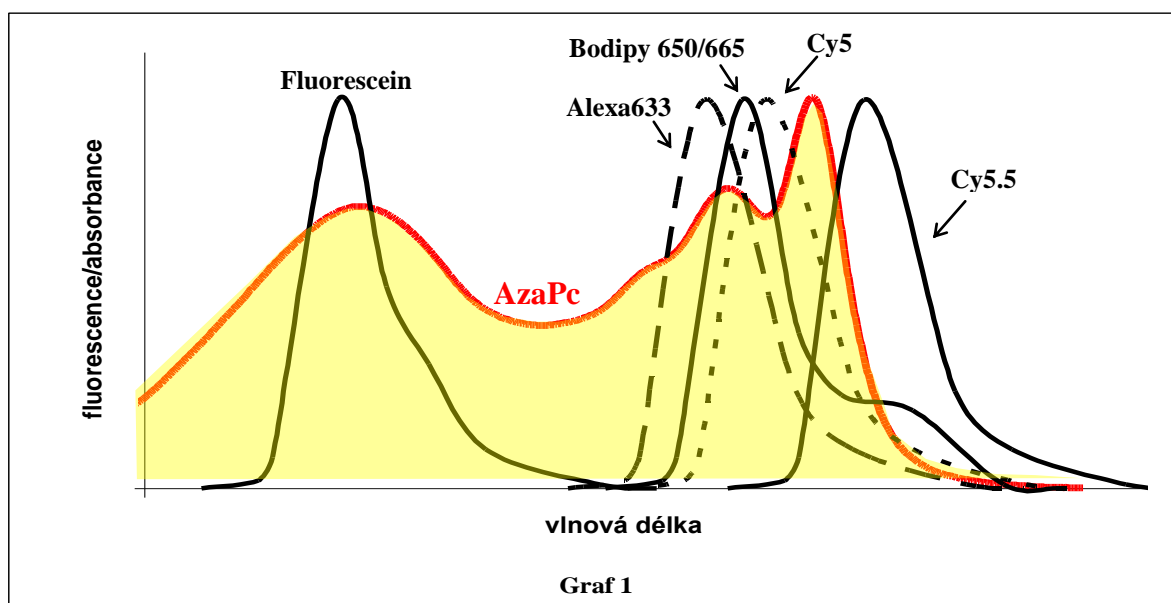


Základní struktura látek ze skupiny **Bodipy** je 4,4-difluor-4-bora-3a,4a-diaza-*s*-indacen. Tyto látky jsou neobvyklé především tím, že mají téměř nepolární charakter a jejich chromofor je elektricky neutrální. Z toho vyplývá, že velmi snadno prochází biologickými membránami. Jednotlivé deriváty jsou odvozeny substitucí nejčastěji v polohách 1, 3, 5 a 7, a to především alkyly a aryly. Čísla v názvu vyjadřují oblast absorpce a emise dané látky. V současné době v nejvyšších vlnových délkách absorbuje **Bodipy 650/665**, což je z chemického hlediska 6-(((4,4-difluor-5-(2-pyrrolyl)-4-bora-3a,4a-diaza-*s*-indacen-3-yl)styryloxy)acetyl)aminohexánová kyselina¹⁰.



Výše zmíněný výčet je pouze příkladem nejčastěji používaných fluoroforů. Jejich škála je ovšem daleko širší a zahrnuje i spoustu látek a strukturních typů zde nezmíněných¹⁰.

Na závěr této kapitoly bych chtěla zmínit, že absorpční spektrum AzaPc připravovaných v rámci mé diplomové práce odpovídá emisním spektrům v praxi dostupných fluorescenčních barviv, a proto se jeví jako jejich velmi nadějně quencher (viz Graf 1).

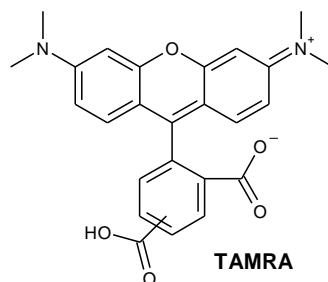


Graf 1

3.4. V praxi používané quencher

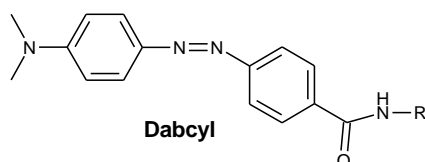
Quencher používané v praxi si můžeme rozdělit na dvě základní skupiny látek – fluorescenční a nefluorescenční.

Starší metoda využívá *fluorescenční quencher*, které absorbují energii z donorového fluoroforu, a následně přijatou energii vyzáří ve formě fotonu. Emisní spektrum akceptoru je posunuto k vyšším vlnovým délkám, a tento rozdíl umožňuje detekci nově emitované fluorescence při jiných vlnových délkách než je emisní spektrum donoru. Příkladem quencheru s vlastní fluorescencí je **TAMRA**. Jedná se o substituovaný tetramethylrhodamin.



Velkým přínosem bylo objevení nefluorescenčních barviv jako akceptorů energie. Tyto látky, označované jako „*dark quenchers*“, mají oproti předchozí skupině několik výhod. Změny v intenzitě fluorescence vzorku mohou být měřeny přímo, což značně zjednodušuje postup celé detekce. Výsledek zhášení není třeba složitě odečítat jako změnu tvaru emisního spektra. Nedochozí k rušení a šumu během měření, protože *dark quenchers* neemitují. Velkou výhodou je i to, že oblast spektra, ve které emitoval fluorescenční quencher může být využita jiným fluoroforem na detekci dalších cílových molekul, a tak můžeme během jednoho pokusu použít několik fluoroforů najednou. Celý proces se tak velice zjednoduší a urychlí.

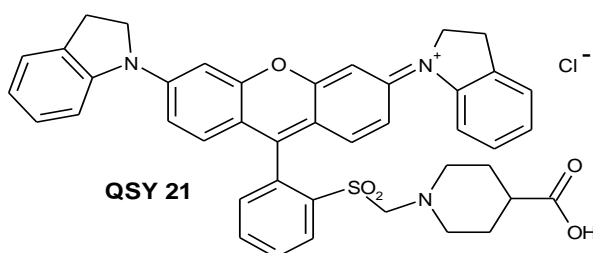
Jedním z prvních *dark quenchers* byla látka označovaná jako **Dabcyl**. Po chemické stránce se jedná o 4,4-dimethylaminoazobenzen-4'-karboxylovou kyselinu. Její absorpční maximum je v oblasti 478 nm, a je proto vhodná pro zhášení barviv, které emitují v modré a zelené oblasti VIS¹⁶.



Původní quencherů zdaleka nepokrývaly celé emisní spektrum v praxi používaných barviv, a proto bylo nutné vyvíjet další potenciální zhášeče fluorescence, které by absorbovaly především v oblasti vyšších vlnových délek. V praxi se dnes používají quencherů ze skupiny QSY (z nich má výhodné vlastnosti např. QSY 21) a především „Black Hole Quenchers™“ (BHQ).

Ve své molekule obsahuje **QSY 21** 2*H*-chromen s přikondenzovaným benzenovým jádrem, v poloze 5 tohoto základního skeletu se nachází substituovaný fenyl. V polohách 2 a 8 jsou pak navázána indolinová jádra, přičemž jedno z nich je

připojeno vazbou dvojnou. Na dusíku se tak vytváří kladný náboj, který je kompenzován záporným nábojem chloridového aniontu. Toto seskupení vytváří velmi rozsáhlou síť konjugovaných dvojných vazeb, a proto QSY 21 absorbuje až v oblasti 660 nm. Kromě této látky byly připraveny ještě **QSY 7, 9, 35**, které však absorbují pouze v oblasti 560, 562 a 472 nm.



V současnosti asi nejpoužívanější quenchery patří do skupiny **BHQ**. Jsou vhodné především pro zhášení indocyaninových barviv (viz 3.3 Barviva dostupná v praxi). Jejich vlastnosti shrnuje následující tabulka. V další tabulce jsou pak fluorescenční barviva, která mohou být použita s jednotlivými BHQ.

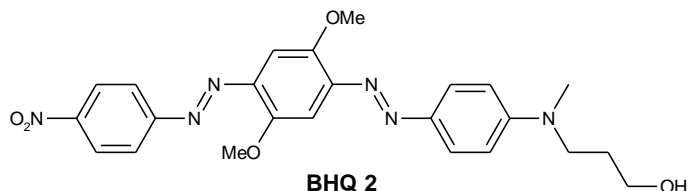
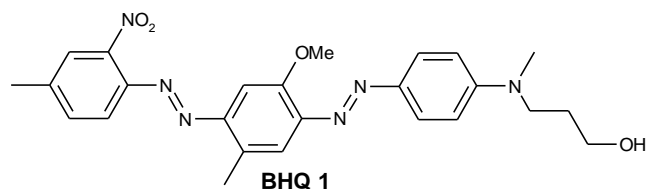
Absorpční maxima a vlnové délky zhášení BHQ¹⁹

Quencher	λ_{\max} absorpce (nm)	Oblast zhášení (nm)
BHQ-0	495	430 - 520
BHQ-1	534	480 - 580
BHQ-2	579	559 - 670
BHQ-3	680	620 - 730

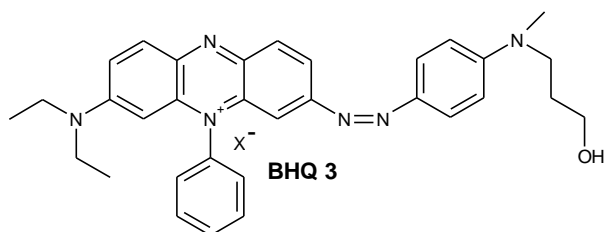
BHQ / podporované flurofory¹⁹

Quencher	Podporované fluorofory
BHQ-0	Alexa 350, akridin, Pacifik Blue, EDANS,
BHQ-1	Alexa 488 a 532, FAM, TET, JOE, HEX, Oregon Green
BHQ-2	Alexa 546, 568 a 594, rhodamin, TAMRA, ROX, Cy3, Cy3.5, Texas red, Red
BHQ-3	Alexa 647, Čy5, Cy5.5

Látky ze skupiny BHQ patří mezi azosloučeniny. Jsou tvořeny aromatickými cykly (nejčastěji benzenovými jádry) spojenými přes $-N=N-$ můstky. BHQ 1 a BHQ 2 mají strukturu velmi podobnou, v obou případech se jedná o substituovaný 1,4-bis(1-fenylazo)benzen. Systém konjugovaných dvojných vazeb rozšiřují ještě nitroskupiny vázané na benzenovém jádře.



Na rozdíl od předchozích dvou látek obsahuje BHQ 3 pouze jednu azoskupinu, která spojuje dva konjugované systémy aromatických cyklů. Výhoda této látky spočívá především v tom, že její absorpční spektrum je výrazně posunuto k vyšším vlnovým délkám (viz tabulka výše).



Salvatore a Marras se podrobně zabývali srovnáním účinnosti FRET a statického zhášení mezi jednotlivými quencheri a fluorofory⁹. Na rozlišení těchto dvou způsobů zhášení využili poznatku, že při kontaktním zhášení dochází ke snížení emise fotonů jak u donorového tak u akceptorového fluoroforu, mění se i jejich absorpční spektrum ve viditelné oblasti. Naopak při dynamickém zhášení se sníží emise u donorového fluoroforu a zvýší u akceptorového fluoroforu, přičemž ke změnám v absorpčních spektrech ve viditelné oblasti nedochází⁹.

Z jejich výsledků vyplývá, že účinnost FRETu se silně snižuje s poklesem překryvu absorpčního a emisního spektra fluoroforů, avšak tento překryv nemá žádný vliv na kontaktní způsob zhášení. Ve většině případů měření byla účinnost vyšší pokud docházelo ke statickému zhášení. Několik příkladů je uvedeno v následující tabulce. Z jejich měření také vyplynulo, že účinnost quencheru roste s jeho extinkčním koeficientem⁹.

Fluorofor	λ_{\max} emise (nm)	Dabcyl		BHQ-1		BHQ-2		Tamra		QSY-7	
		$(\lambda_{\max}$ absorpce 475 nm)		$(\lambda_{\max}$ absorpce 534 nm)		$(\lambda_{\max}$ absorpce 580 nm)		$(\lambda_{\max}$ absorpce 558 nm)		$(\lambda_{\max}$ absorpce 571 nm)	
		Q _{FRET}	Q _{contact}	Q _{FRET}	Q _{contact}	Q _{FRET}	Q _{contact}	Q _{FRET}	Q _{contact}	Q _{FRET}	Q _{contact}
Alexa	441	82	95	87	97	87	96	81	95	81	97
FAM	517	80	91	88	93	89	92	86	92	85	93
TET	540	67	89	84	91	83	91	81	90	72	93
Cy3	564	69	94	92	97	97	93	-	-	78	95
Cy5.5	687	44	82	81	96	84	95	-	77	61	74

Tabulka: účinnost zhášení v (%) při různých kombinacích quencherů a fluoroforů⁹.

V tabulce si můžeme mimo jiné všimnout toho, že u quencherů dostupných v praxi klesá účinnost FRET zhášení především u fluoroforů emitujících ve vyšších vlnových délkách (menší překryv spekter). Výhodou mnou připravených AzaPc je, že pokud by byla potvrzena jejich schopnost zhášení, pokrývaly by kromě nižších vlnových délek i oblast 690 – 710 nm, kde je v současné době dostupný pouze nižší počet vhodných quencherů (viz Graf 1 výše).

4. Metodická část

4.1. Syntéza nesymetrických ftalocyaninů a jejich azaanalogů

Ftalocyaniny (phthalocyanines, Pcs) jsou aromatické makrocykly. Ve své molekule obsahují čtyři isoindolinové jednotky spojené v polohách 1 a 3 dusíkovými můstky. Delokalizované π elektrony takto vzniklého makrocyclického útvaru dávají těmto látkám jejich jedinečné fyzikální vlastnosti využitelné v mnoha oblastech.

Struktura azaanalogů ftalocyaninů (azaphthalocyanines, AzaPc) je odvozena od Pcs izosterní náhradou methinové skupiny (-CH=) v benzenových podjednotkách dusíkovými atomy. Díky této příbuznosti vycházejí jejich syntézy z již prozkoumané skupiny ftalocyaninů. Vychází se většinou z různě 5,6-disubstituovaných derivátů pyrazin-2,3-dikarbonitrilu. Ty za použití různých postupů tetramerizují za vzniku makrocyclického systému AzaPc. AzaPc jsou tedy po chemické stránce různě substituované tetrapyrazinoporfyraziny, popř. tetrapyridinoporfyraziny apod.^{20 21}.

Na rozdíl od symetrických syntéz, kdy se pro cyklizaci jako prekurzor používá pouze jedna látka, při nesymetrických syntézách spolu reagují minimálně dva prekurzory (**A** a **B**). Tyto prekurzory se mohou lišit pouze rozdílnou substitucí v postranním řetězci a základní skelet prekurzoru zůstává shodný, nebo se do molekuly makrocycly zabudovává jednotka se strukturou zcela odlišnou od ostatních jednotek makrocycly. Nevýhodou asymetrických syntéz je vznik řady vedlejších produktů, které se při reakci tvoří. Abychom získali požadovaný produkt, musí po cyklizaci většinou následovat separační metody. S oblibou se využívají především metody chromatografické. Problém velkého počtu vedlejších produktů, a tudíž i značné snížení výtěžků, byl částečně odstraněn vyvinutím specifických metod syntéz asymetrických Pcs²².

Pro úplnost je nutno dodat, že asymetrický makrocycl získáme i při cyklizaci jednoho substituovaného prekurzoru, který není symetricky souměrný. Tato reakce vede ke směsi polohových (konstitučních) izomerů, které ukazuje následující schéma 1.

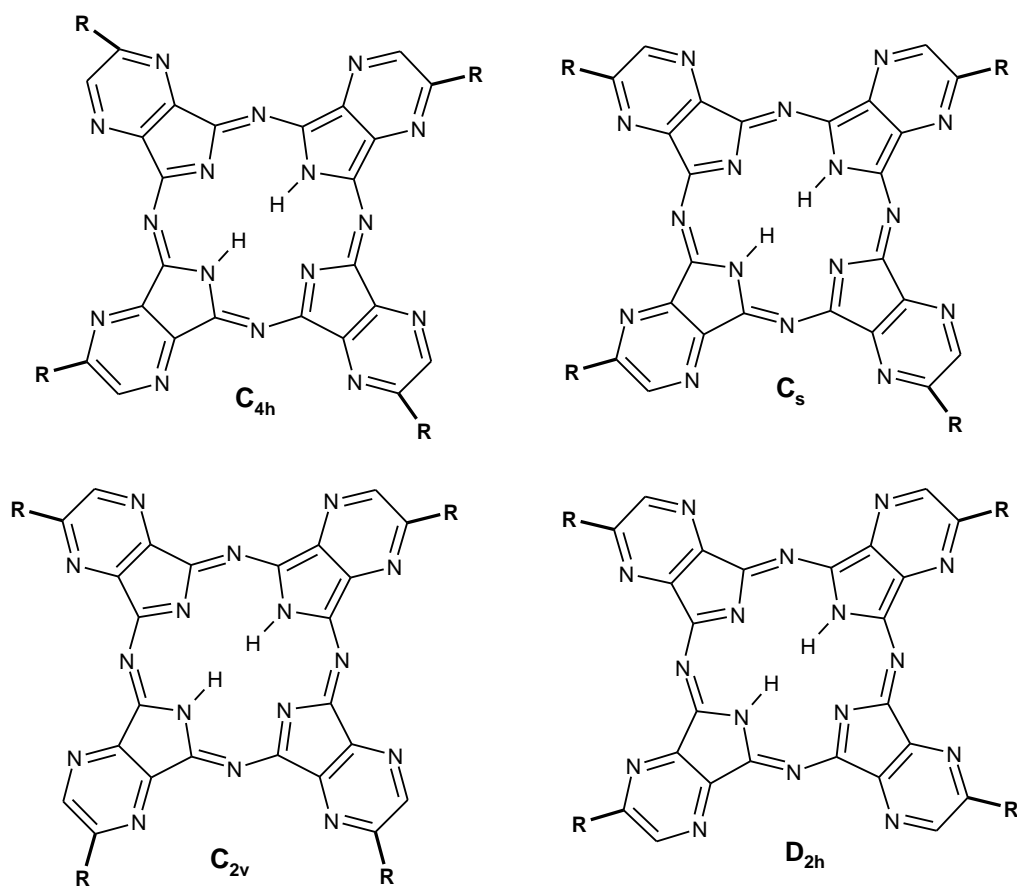


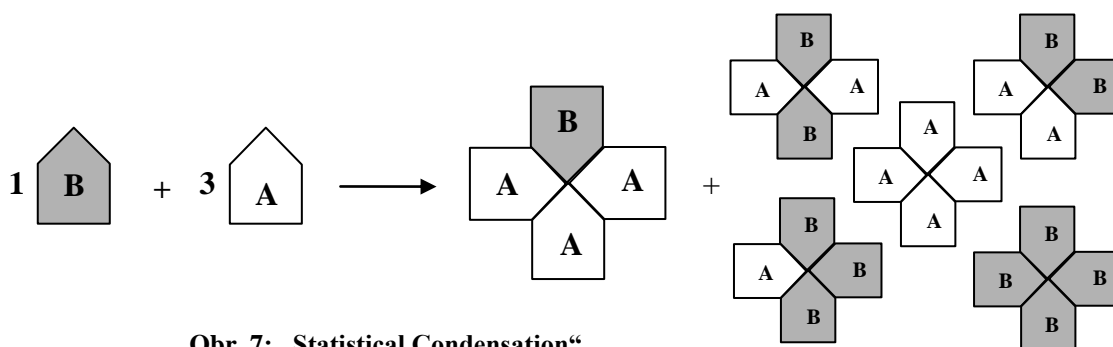
Schéma 1: Možné polohové izomery vzniklé cyklizací nesymetrického prekursoru
(R je libovolný postranní řetězec)

4.1.1 Syntéza A₃B ftalocyaninů

Ftalocyaniny složené ze tří jednotek **A** a jedné jednotky **B** lze získat několika postupy, které se výrazně liší jak reakčním schématem tak specifitou vznikajícího produktu a mírou vzniku vedlejších produktů.

Metoda statistické kondenzace (Statistical Condensation)

Tento nejjednodušší mechanismus je odvozen ze syntézy symetrických Pcs, kdy dochází k cyklické tetramerizaci výchozích prekursorů. Nesymetrické makrocykly vznikají cyklotetramerizací dvou různých prekursorů podle obecného schématu, které znázorňuje Obr. 7.



Obr. 7: „Statistical Condensation“

Z principu tohoto mechanismu vyplývá, že se jedná o neselektivní metodu, která poskytuje směs šesti produktů různě nakombinovaných prekurzorů **A** a **B** (AAAA, AAAB, AABB, ABAB, ABBA, BBBB). Složitost vzniklé směsi dokumentuje i to, že si můžeme navíc představit různé polohové izomery jednotlivých produktů pokud se jedná o nesouměrný výchozí reaktant. Tuto směs látek je pak nutno rozdělit pomocí chromatografických metod. Separace produktu může být znesnadněna tendencí těchto látek k agregaci. Jedná se totiž o molekuly s planárním uspořádáním, které snadno tvoří dimery. Tento problém lze částečně vyřešit zavedením vhodných (objemných) substituentů na periferii makrocyclu. Příkladem takovýchto substituentů mohou být např. tert-butylové skupiny^{23 24}, uhlovodíkové řetězce a dendritické substituenty²⁵. Pro usnadnění separace výsledného produktu se preferuje použití takových prekurzorů, aby se vzniklý makrocycl A_3B výrazně lišil svojí rozpustností nebo chromatografickým chováním od dalších produktů reakce. Toho lze docílit např. kombinací alkyl- a oligo(oxyethylen)- substitucí způsobující rozdílnost polarit a tedy i rozpustností²⁶.

I když se jedná o neselektivní metodu, lze použitím vhodného poměru množství výchozích prekurzorů výrazně posunout reakci ve prospěch požadovaného produktu A_3B . Ze statistických propočtů vyplývá, že pro reakci dvou prekurzorů se shodnou reaktivitou se jeví jako nejvhodnější poměr 3:1. Teoreticky tak vznikne 33% A_4 , 44% A_3B a 23% ostatních možných produktů (A_2B_2 , AB_3 , B_4)²².

Použijeme-li např. poměr 9:1, dojde sice ke zvýšení množství A_4 a snížení zisku A_3B , ale nevznikají téměř žádné jiné produkty a požadovaný produkt lze poměrně snadno izolovat. V případě, že jsou k cyklizační reakci použity prekurzory s výrazně rozdílnou reaktivitou, je nutno tomu přizpůsobit poměr jejich množství použitých pro cyklizaci, případně modifikovat reakční postup²⁴.

Subftalocyaninová metoda (The Subphthalocyanine Approach)

Tato metoda přípravy Pcs typu A_3B , kterou vyvinul Kobayashi a kol.²⁷, je založena na rozšíření kruhu subftalocyaninu (SubPc) jeho reakcí se sukcinimidem nebo derivátem diiminoisoindolinu (viz schéma 2).

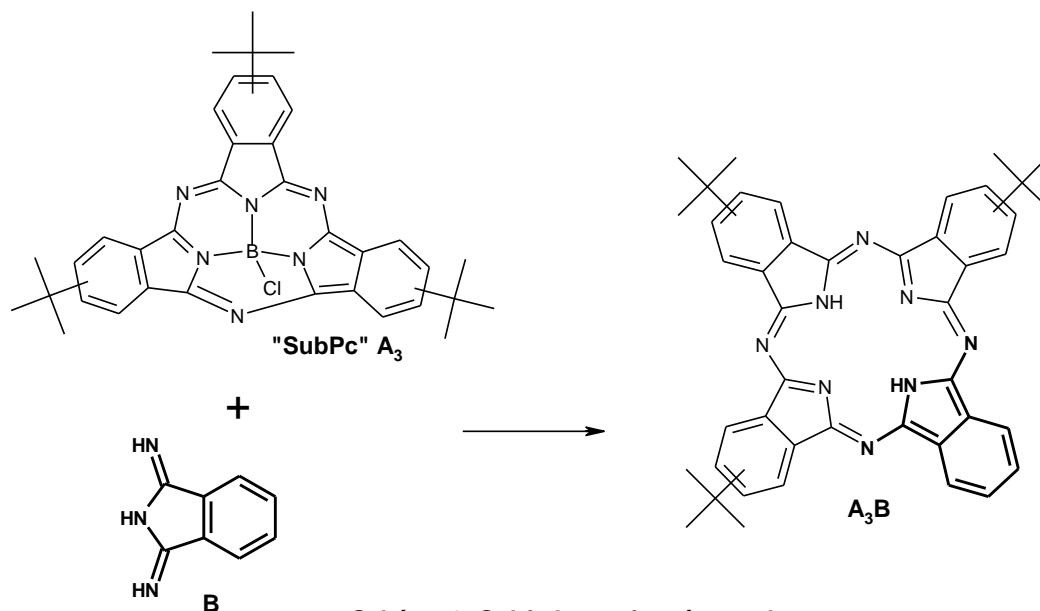


Schéma 2: Subftalocyaninová metoda

V jádru SubPc dochází ke geometrickému pnutí, z toho důvodu se SubPc v přítomnosti diiminoisoindolinu snadno rozštěpí a diiminoisoindolin je následně včleněn do struktury makrocyklu. Vzniká tak Pcs jehož struktura odpovídá typu A_3B . Tato reakce je na rozdíl od předchozí metody vysoce selektivní a umožnila přípravu Pcs, které byly dříve nedosažitelné²⁷.

Tento mechanismus důkladně prozkoumali i T. Torres a kol.²² Zjistili, že výsledek tohoto postupu je značně ovlivněn podmínkami reakce. Expanze kruhu probíhá nejlépe reaguje-li derivát diiminoisoindolinu v 6 - 9-ti násobném nadbytku oproti roztoku SubPc ve směsi DMSO/1-chlornaftalen nebo dichlorbenzenu (1:4 až 4:1) nebo (dimethylamino)ethanolu, kdy se reakční směs míchá při teplotě 80 - 100°C po dobu 5 - 12 hodin. Výtěžek se pak pohybuje mezi 3 - 90%.

I když se jedná o selektivní metodu, i zde vznikají vedlejší produkty, protože může dojít k částečné nebo úplné fragmentaci kruhu SubPc a následné statistické kondenzaci jednotlivých fragmentů poskytující směs všech šesti možných derivátů (viz schéma 3).

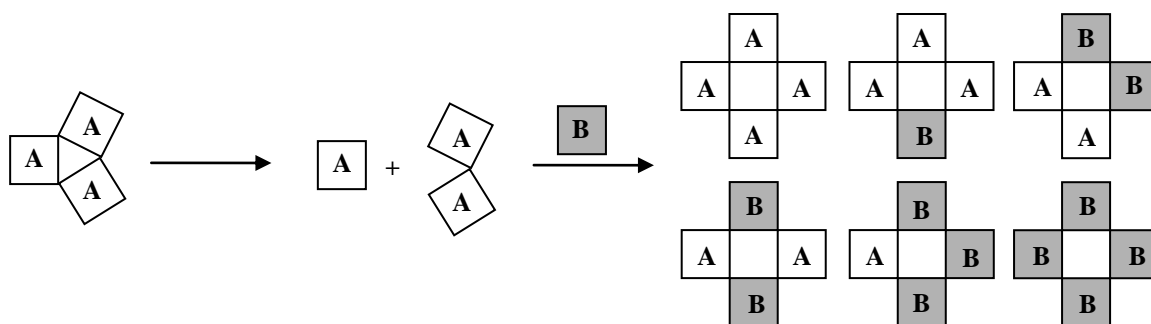


Schéma 3: Fragmentace SubPc a statistická kondenzace fragmentů

Výtěžek reakce může být zvýšen, pokud na SubPc navážeme substituenty odtažující elektrony a na diiminoisoindolin substituenty poskytující elektrony²².

Metoda s využitím pevné fáze (Polymeric Support Method)

Další selektivní metodu přípravy asymetrických Pcs vyvinul Leznoff²⁸. Vhodně substituovaný 3-amino-1-iminoisoindol (B) navázal na polymerní pevnou fázi. K tomuto nerozpustnému prekursoru přidal odlišně substituovaný volný 3-amino-1-iminoisoindol (A), čímž získal A₃B ftalocyanin navázaný na pevnou fázi (viz schéma 4). V reakční směsi současně vzniklý A₄ lze snadno oddělit promýváním pevné fáze vhodným rozpouštědlem. Požadovaný A₃B Pcs následně odštěpil z polymerní fáze. Podmínkou této metody je přítomnost vhodné funkční skupiny k navázání na pevnou fázi a následné snadné odštěpení z pevné fáze.

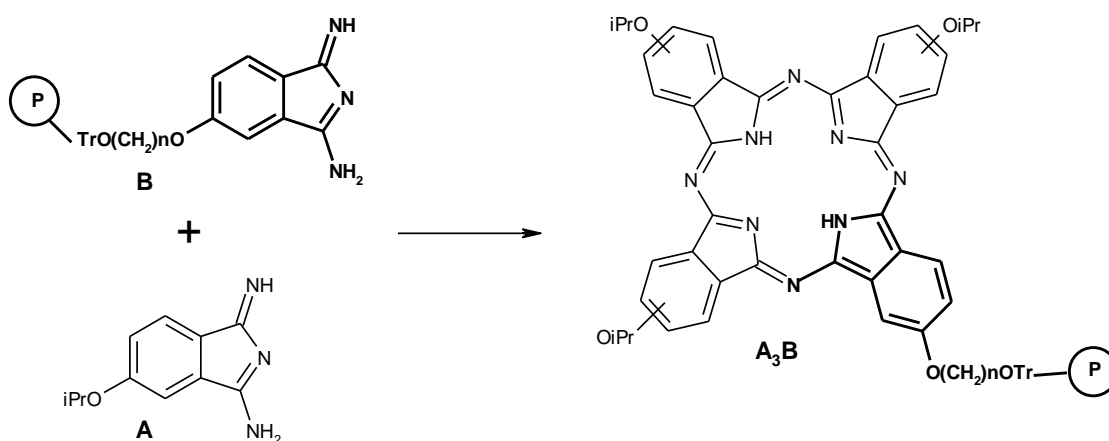
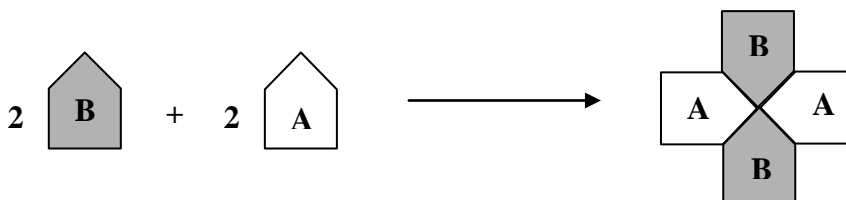


Schéma 4: Metoda s využitím pevné fáze

= vazba na pevnou fázi

Ostatní výzkumné skupiny, které se snažily zdokonalit tento postup, používaly speciálně modifikované pevné fáze pro zvýšení selektivity a výtěžnosti reakce²⁹.

4.1.2 Syntéza ABAB ftalocyaninů (Příčně substituované Pcs, Crosswise-Substituted Pcs)



Obr. 8: „Crosswise-Substituted Pcs

Jak již bylo zmíněno výše, i tyto deriváty mohou být získány *statistickou kondenzací* a následně odseparovány ze směsi. Chromatografickou separaci těchto látek však znesnadňuje přítomnost jejich polohových izomerů AABB s velice podobnými, často naprosto shodnými, chromatografickými vlastnostmi.

Byly proto vyvinuty specifické metody přípravy těchto látek. Touto problematikou se ve své práci zabývali např. Young a kol³⁰ (viz schéma 5). K reakci použili ekvivalentní množství prekurzorů 1,3-diiminoisoindolinu (A) a 1,1,3-trichlorisoindolu (B), reakce probíhala za mírných podmínek v přítomnosti base a redukčního činidla.

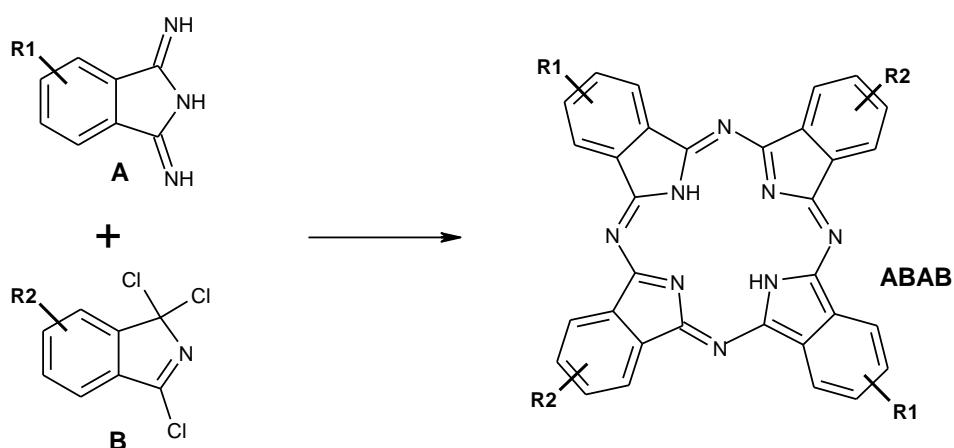


Schéma 5: Příprava ABAB AzaPc

Jinou metodu uvádí ve své práci Leznoff³¹. Provedl reakci 1,3-diiminoisoindolinu (A) s isoindolin-1,3-dithionem (B) v poměru 1:1 (viz schéma 6). Vznikl ABAB ftalocyanin se stopami dalších možných Pcs.

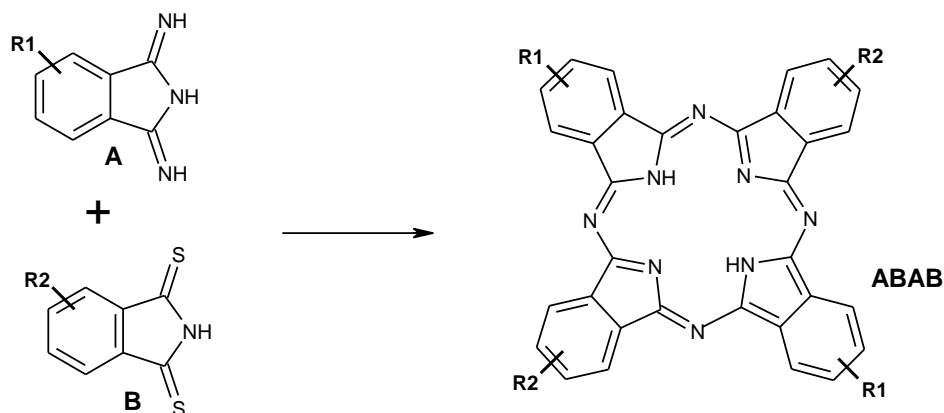


Schéma 6: Příprava ABAB AzaPc

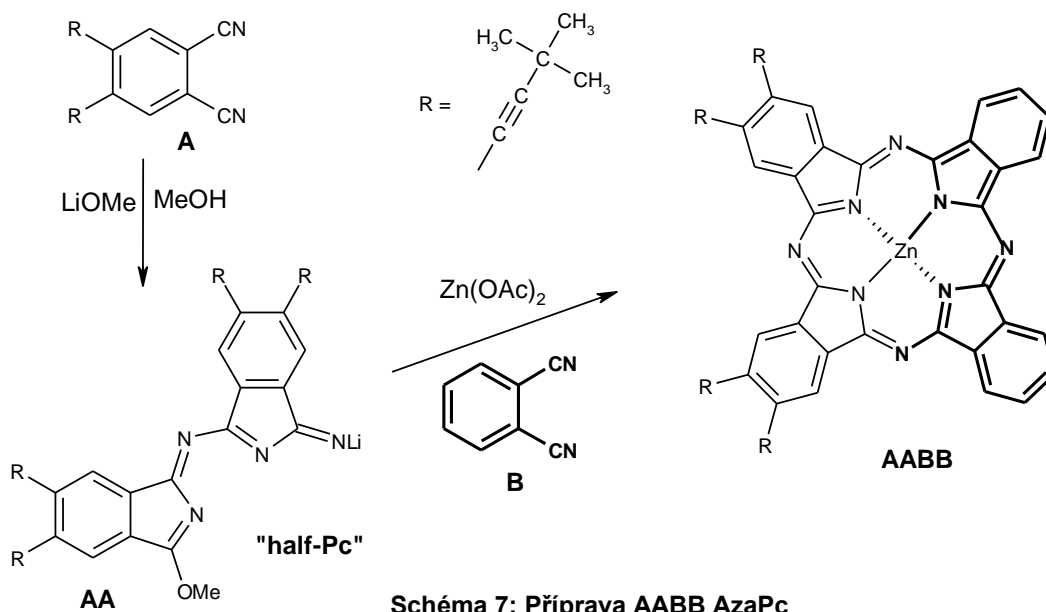
4.1.3 Syntéza AABB ftalocyaninů (Souměrně substituované Pcs, Adjacent Pcs)



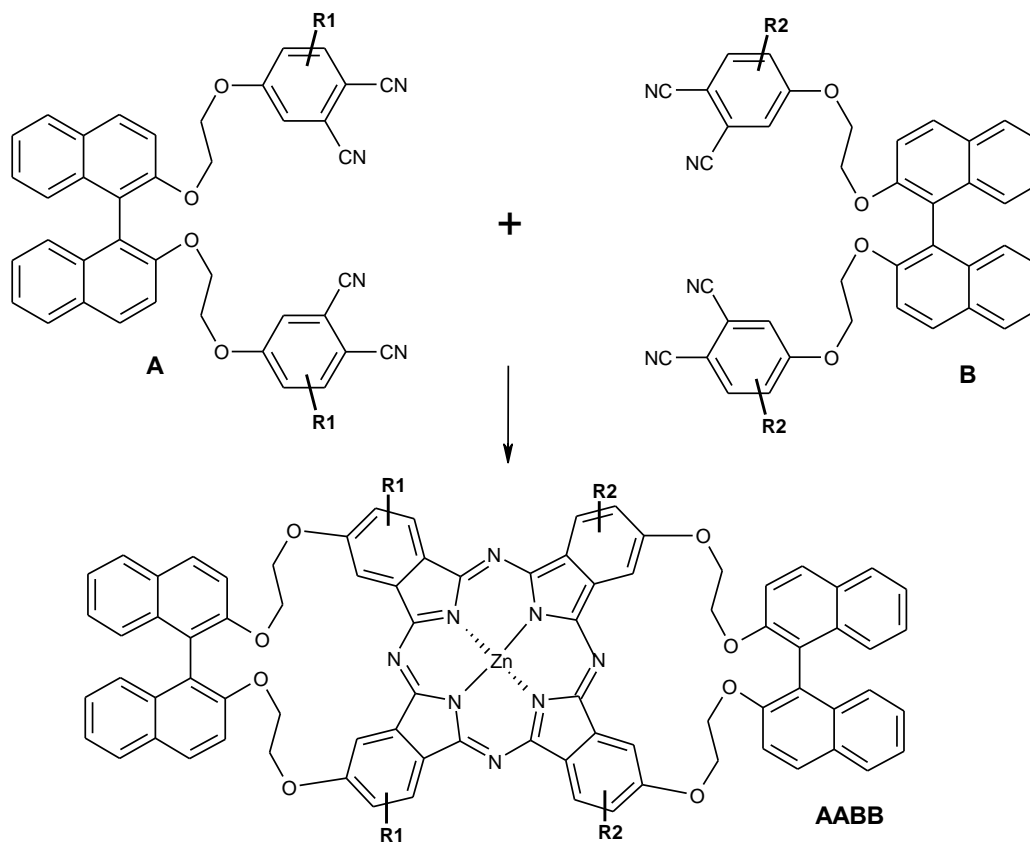
Obr. 9: „Adjacent Pcs“

Obdobně jako v kapitole 4.1.2 lze tyto látky také získat statistickou kondenzací, ale s již výše zmíněnými velice častými problémy se separací.

Leznoff a jeho spolupracovníci³² se zabývali i přípravou Pcs typu AABB. Pro jejich přípravu použili meziprodukt tzv. polovičního ftalocyninu (AA) (z angl. „half-Pc“), který byl následně podroben reakci s odlišně substituovaným ftalonitrilem (B) za velmi mírných podmínek (viz schéma 7). Příprava stabilního meziproduktu vyžaduje použití ftalonitrilů se substituenty silně odtahujícími elektrony. Leznoff použil 4,5-bis(3,3-dimethyl-1-butynyl)ftalonitril v reakci s methanolátem lithným v prostředí methanolu.



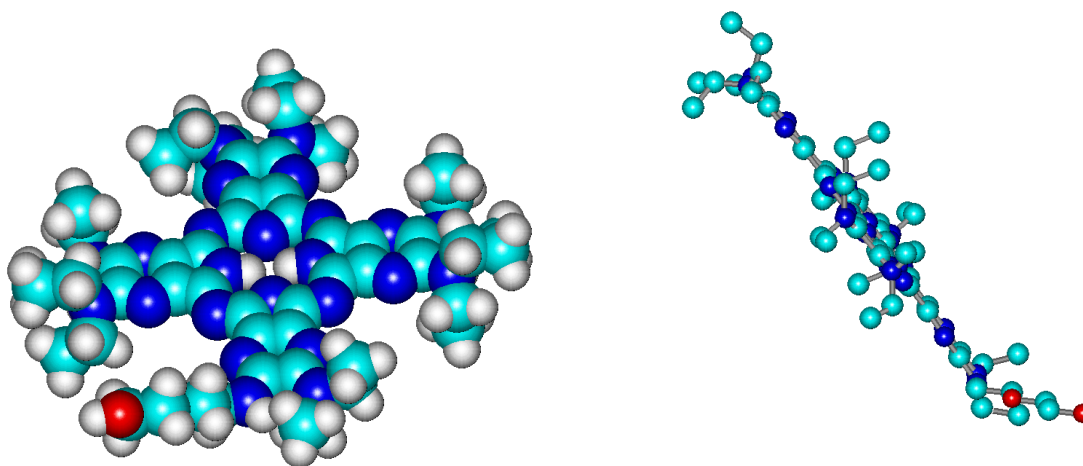
Kobayashi³³ postupoval při syntéze Pcs typu AABZ podobně. Vycházel z prekursoru bis(ftalonitrilu) spojeného přes určitý řetězec (např. 2,2'-dihydroxy-1,1'-binaftyl), aby docházelo k pnutí v molekule. Tento prekursor nechal reagovat s odlišně substituovaným ftalonitrilem, aby získal Pcs typu AABZ ve výtěžku asi 20 – 25% (viz schéma 8).



5. Výsledky a diskuze

Alkylaminosubstituované deriváty AzaPc byly pro svojí silnou absorpci především v oblasti 690 až 710 nm (ale i nižších vlnových délek – viz Graf 1 výše), prakticky nulovou produkcí singletového kyslíku a z důvodu toho, že tyto deriváty AzaPc nefluoreskují, vybrány jako nové potencionální zhášedce fluorescence. Do jejich molekuly bylo potřeba zavést definovaný počet periferních substituentů vhodných k navázání na oligonukleotidickou sondu, a proto jsem musela k jejich přípravě použít nesymetrické syntézy. Jako vhodná skupina k vazbě na oligonukleotidickou sondu se jeví např. alkoholická nebo karboxylová skupina. Já jsem proto připravila prekurzory substituované aminoalkoholy, které jsem dále cyklila za definovaných podmínek.

Základní skelet AzaPc má planární uspořádání (viz Obr. 10). Z toho vyplývá, že tyto látky mají tendenci k tvorbě dimérů. Tato agregace značně snižuje jejich rozpustnost, znesnadňuje separaci těchto látek, jejich čištění na chromatografické koloně a charakterizaci. Z tohoto důvodu jsem musela na periferii AzaPc zavést objemné periferní substituenty, které zabrání agregaci tím, že se uspořádají nad a pod rovinu základního skeletu makrocyklu. Jako nejideálnější se osvědčila substituce diethylaminy, a proto jsem je použila u všech svých prekurzorů a tedy i finálních AzaPc. Takto substituované AzaPc netvoří dimery takřka vůbec, což je dobře patrné z jejich UV-vis spekter.



Obr. 10: Molekuly AzaPc vymodelované v softwaru HyperChem5

AzaPc s periferními substituenty vázanými přes dusíkový atom mají nulovou aktivitu singletového kyslíku, což je pro jejich využití jako zhášeců fluorescence nezbytná vlastnost. Singletový kyslík je totiž vysoce reaktivní částice, která by štěpila oligonukleotidický řetězec, a znesnadnila nebo by úplně znemožnila kvantitativní průběh daného měření. S produkcí singletového kyslíku souvisí kromě periferní substituce i centrální atom kovu, který se dostává do centra makrocyklu během tetramerizace. Zjistili jsme, že AzaPc bez centrálního kovu mají aktivitu singletového kyslíku velice nízkou, daleko nižší než AzaPc s Mg, Zn, a proto je potřeba syntézy vést s cílem odstranění přítomného centrálního kovu¹. Alkalické kovy jsou centrálně chelátované velice slabě a lze je vytěsnit i velice slabou kyselinou (např. již i vodou). Jako metodu tetramerizace jsem proto použila cyklizaci v butanolu s přídavkem butanolátu lithného.

Při syntézách prekurzorů jsem vycházela z diaminomaleinonitrilu a oxalychloridu. Jejich reakcí jsem připravila 5,6-dioxo-1,2,3,4-tetrahydropyrazin-2,3-dikarbonitril (**1**), který jsem podrobila reakci s thionylchloridem za vzniku 5,6-dichlorpyrazin-2,3-dikarbonitrilu (**2**). Příprava této látky byla již podrobně zpracována v jiných pracích³⁴ a probíhala bez větších potíží s dobrými výtěžky.

Z této látky jsem nukleofilní substitucí chlorů připravila řadu prekurzorů. Podle toho, zda tento krok probíhal do prvního nebo až do druhého stupně, vznikly dvě skupiny prekurzorů. Za mírnějších podmínek (chlazení reakční směsi) a přesných množství výchozích látek daných poměrem 1:2 docházelo k substituci pouze jednoho z chlorů a v následné reakci s příslušným aminoalkoholem jsem připravila nesymetrické prekurzory s dvěma různými substituenty (látky **8**, **9** a **10**). V případě větších přebytků aminů a zahřívání pak docházelo k substituci obou chlorů rovnou do druhého stupně. Tímto způsobem jsem připravila symetrické prekurzory **3**, **5** a **6**. Všechny mnou připravené prekurzory byly charakterizovány teplotou tání, NMR a IČ spektry a jejich struktura byla jednoznačně potvrzena. Jejich souhrnný přehled ukazuje schéma 9.

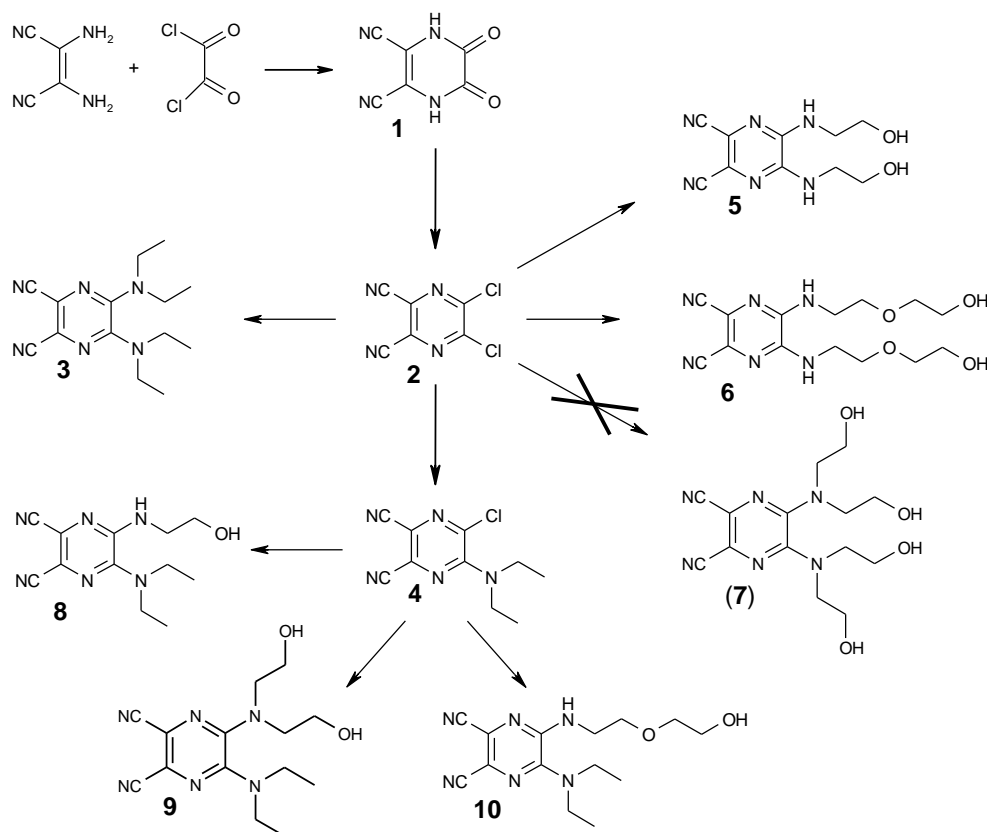


Schéma 9: Příprava prekurzorů

Při přípravě prekurzorů jsem nenarazila na výraznější obtíže. Některé reakce probíhaly s vysokými výtěžky již za pokojové teploty, jiné vyžadovaly vyšší teplotu reakční směsi. Pro čištění prekurzorů na chromatografické koloně jsem vždy našla vhodnou mobilní fázi a výsledný prekurzor jsem na závěr překrystalizovala.

Jediný problém nastal při přípravě 5,6-bis[bis(2-hydroxyethyl)amino]pyrazin-2,3-dikarbonitrilu (7). Vzhledem k tomu, že tato látka má v sousedních polohách na pyrazinovém jádře poměrně objemné substituenty, zvolila jsem pro její přípravu vyšší teplotu za použití dioxanu jako reakčního prostředí. V reakci vznikl prakticky pouze jediný produkt. NMR analýzy ovšem nepotvrdily očekávaný produkt. Neznámou látku jsme později identifikovali jako 4-(2-hydroxyethyl)-3,4-dihydro-2H-pyrazino[2,3-b][1,4]oxazin-6,7-dikarbonitril. Vysvětlením vzniku tohoto produktu je, že diethanolamin se jako sekundární amin chová jako velmi silná organická base, která ionizuje alkoholickou skupinu 5,6-dichlorpyrazin-2,3-dikarbonitrilu (2) za vzniku alkoholátu (viz schéma 10). Atom chloru vázaný na pyrazinovém jádře působí silným záporným indukčním efektem a polarizací vazby tak vytváří velmi vhodné podmínky pro nukleofilní atak. Alkoholát jako silný nukleofil napadá elektrondeficitní uhlík na pyrazinovém jádře a mechanismem substituce nukleofilní dochází k zacyklení za vzniku

nového morfolinového jádra. Předpokládaná substituce diethanolaminem do druhého stupně, kterou jsme původně chtěli docílit, probíhá daleko pomaleji díky silnému stérickému bránění. Konkurenční reakce vedoucí ke vzniku morfolinového kruhu probíhá daleko rychleji, a proto je 4-(2-hydroxyethyl)-3,4-dihydro-2H-pyrazino[2,3-b][1,4]oxazin-6,7-dikarbonitril hlavním a prakticky jediným produktem reakce.

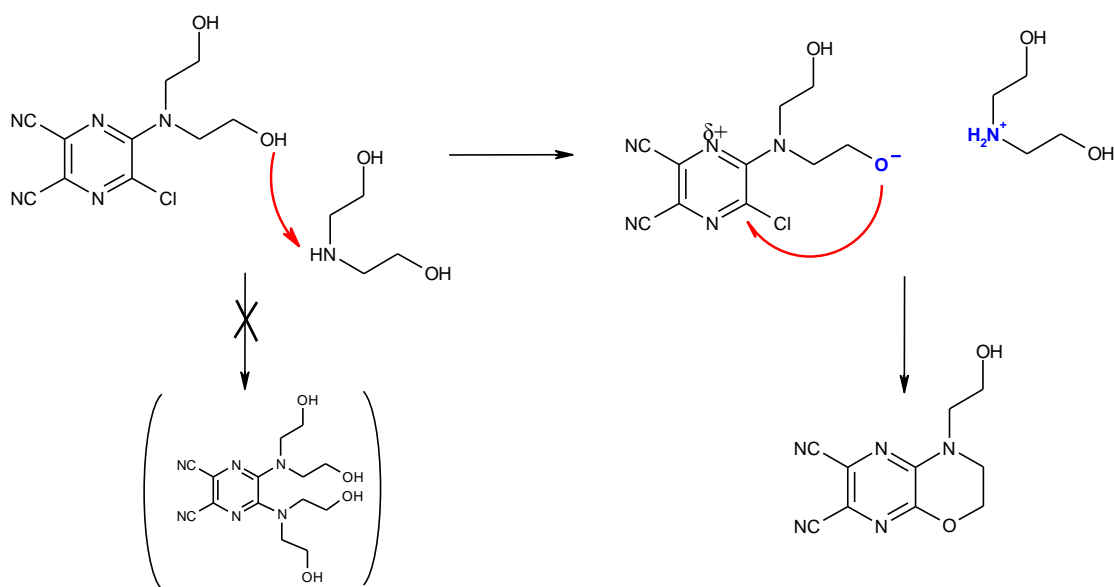


Schéma 10: Průběh nukleofilní substituce diethylaminem do druhého stupně při přípravě 5,6-bis[bis(2-hydroxyethyl)amino]pyrazin-2,3-dikarbonitrilu (7)

Získané prekurzory jsem následně podrobila cyklizaci metodou statistické kondenzace dvou různých prekurzorů (viz 4.1.1 Syntéza A_3B ftalocyaninů). Vycházela jsem z předpokladu, že mnou připravené prekurzory mají srovnatelnou reaktivitu, proto jsem do reakce použila výchozí látky v poměru 3:1. Připravené finální AzaPc ukazuje schéma 11.

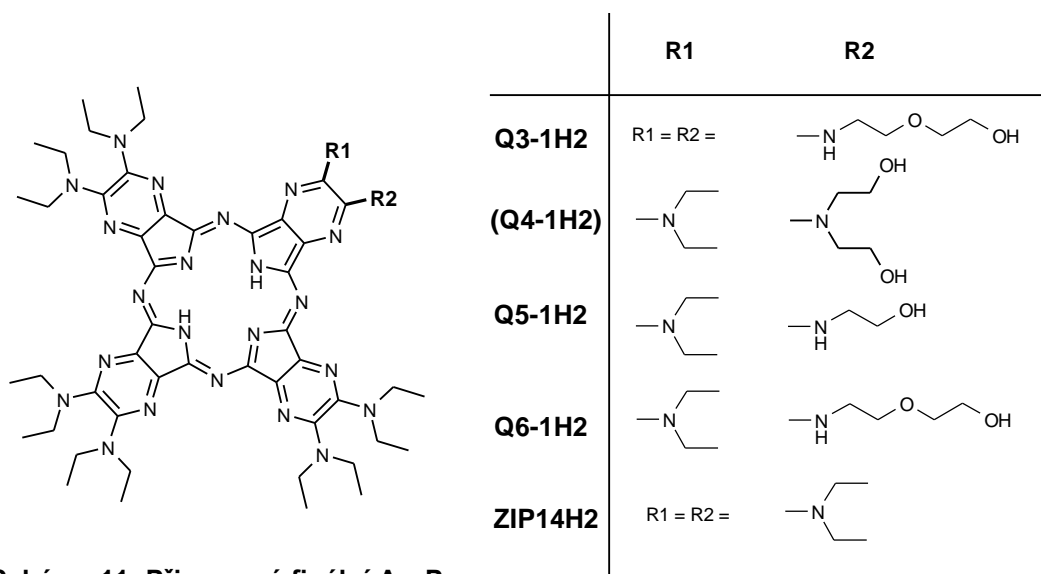


Schéma 11: Připravené finální AzaPc

Jednotlivé cyklizační reakce probíhaly bez výraznějších problémů a přibližně po 4 hodinách reakce jsem získala směs všech možných derivátů AzaPc, které vznikly různou kombinací výchozích prekurzorů. Centrální kov jsem snadno odstranila promytím směsi produktů slabou kyselinou.

Velkým překvapením bylo, že i když se jednalo o poměrně složitou směs velkého počtu látek, jejich separace na chromatografické koloně při výběru vhodné mobilní fáze probíhala velmi pěkně. Látky se od sebe dělily s ostrými skvrnami, což je naprosto netypické pro všechny AzaPc. Je to způsobeno výběrem diethylaminů jako periferních substituentů, které zabrání agregaci AzaPc a jejich zadržování na koloně. V čele se pohyboval vždy nejlipofilnější AzaPc (**ZIP14H2**). Za ním následovala nejintenzivnější skvrna AzaPc **A₃B**, který jsem izolovala od ostatních. Další deriváty AzaPc vznikaly jen v minimálním množství (viz obr. 11).



Obr 11: TLC směsi AzaPcs

Během pokusů o cyklizaci jednotlivých prekurzorů jsem narazila na zajímavý jev. Prekurzory s delšími postranními řetězci, konkrétně s aminoethoxyethanolem, se zacyklily bez větších problémů a vznikly tak AzaPc **Q3-1H2** a **Q6-1H2** v poměrně vysokých výtěžcích (okolo 10 %). Naopak cyklizace prekurzorů s krátkým řetězcem (aminoethanolem) byla značně problematictější (**Q5-1H2**). Z tenkovrstevné

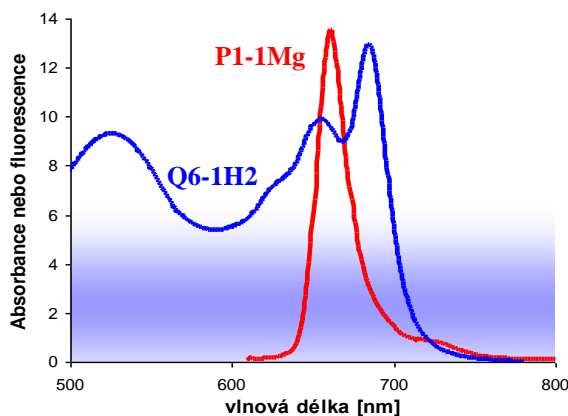
chromatografie bylo patrné, že zde vznikala řada vedlejších produktů. S největší pravděpodobností docházelo i k rozštěpení AzaPc a k odlišným cyklizacím za vzniku nedefinovatelných vedlejších produktů. Výtěžky se proto pohybovaly jen okolo 2 - 3%.

Tento jev byl pak vystupňován u 5,6-bis-(2-hydroxyethylamino)-pyrazin-2,3-dikarbonitrilu (**5**), který se mi nepodařilo zacyklit vůbec. Nevyšel ani pokus zacyklit tuto látku samotnou s cílem získat pouze symetrický AzaPc složený ze čtyř jednotek tohoto prekurzoru. Domnívám se, že to bylo způsobeno již zmíněnými problémy s prekurzory s krátkým postranním řetězcem (aminoethanolem).

Největší problém nastal při přípravě AzaPc, o kterém jsem předpokládala, že se jedná o **Q4-1H2**. NMR analýza však strukturu nepotvrdila, neodpovídaly ani poměry ani poloha vodíkových signálů v ^1H NMR spektrech. Hodnota získaná MS analýzou připravené tmavě fialové látky se navíc výrazně lišila od teoretické hodnoty vypočítané pro předpokládaný **Q4-1H2**, rozdíl mezi těmito hodnotami činil 73. Ze zjištěných údajů se nám bohužel ani nepodařilo tento hlavní produkt cyklizace identifikovat.

Na závěr své práce jsem se pokusila prokázat předpokládaný účinek mnou připravených AzaPc. Vytvořili jsme proto hypotézu, že spojíme-li tyto AzaPc nějakou snadno rozštěpitelnou vazbou s fluorescenčním barvivem, mělo by dojít ke zhašení a naměřená intenzita fluorescence by měla být nulová. Pak bychom vazbu opět rozštěpili a výsledkem by mělo být obnovení fluorescence vzhledem k přítomnosti volného fluorescenčního barviva v roztoku. Protože v praxi dostupné fluorofory jsou finančně poměrně náročné, rozhodli jsme se využít AzaPc připravovaných pro fotodynamickou terapii na Katedře farmaceutické chemie a kontroly léčiv, které mají fluorescenční emisní spektrum podobné indocyaninovým barvivům. Jako velmi vhodný se jevil P1-1Mg (viz Graf 2 dále).

Tato látka se liší od mnohdy připravovaných AzaPc především periferní substitucí, jedná se o 2-(5-karboxypentylamino)-3,9,10,16,17,23,24-heptakis(tert-butylsulfanyl)-1,4,8,11,15,18,22,25-(oktaaza)ftalocyaninato hořečnatý komplex.



Graf 2

Pokusila jsem se spojit alkoholický hydroxyl **Q6-1H2** s karboxylovou skupinou látky **P1-1Mg** pomocí esterové vazby, která je lehce štěpitelná. Postupovala jsem podle dostupné literatury³⁵ (viz schéma 12). Provedla jsem dva různé postupy reakce s katalyzátorem karbonyldiimidazolem v prostředí reaktivního halidu (viz 6. Experimentální část), jako rozpouštědlo jsem však použila dichlormethan, který je pro tyto deriváty AzaPc vhodnější než chloroform. Průběh reakce jsem sledovala pomocí TLC, ale ani v jednom případě k reakci nedošlo ani po několika dnech. Mohlo to být způsobeno tím, že jsem pracovala s velmi malým množstvím výchozích látek a i minimum vody přítomné v rozpouštědlech mohlo reakci zamezit. Proto jsem se rozhodla provést tuto reakci pod argonovou atmosférou, tentokrát v prostředí bezvodého tetrahydrofuranu. Bohužel ani v tomto případě k reakci nedošlo.

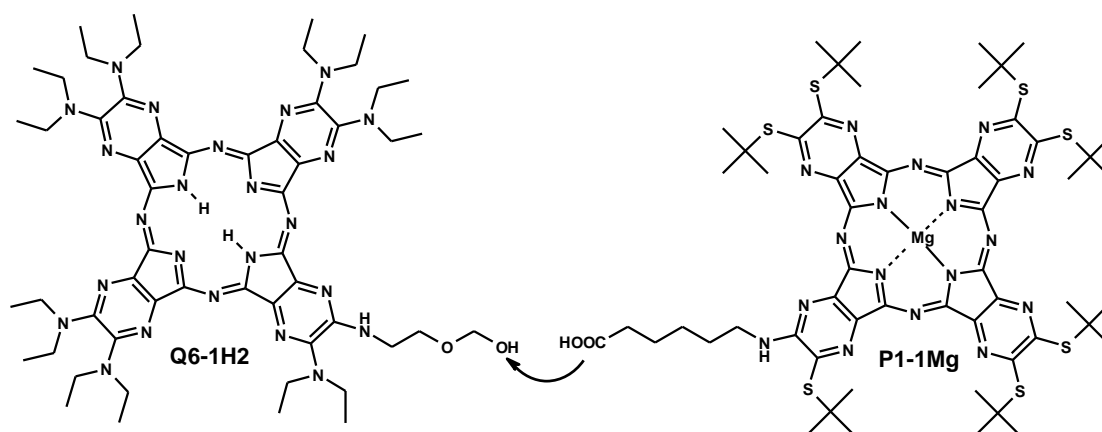


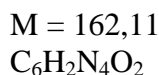
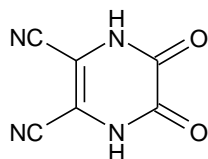
Schéma 12: Reakce Q6-1H2 s P1-1Mg

6. Experimentální část

Teploty tání byly stanoveny na digitálním přístroji pro stanovování teplot tání ELECTROTHERMAL IA9200 a jsou nekorigovány. Průběh reakcí a čistota produktů a meziproduktů byly kontrolovány tenkovrstvou chromatografií na deskách Merck Silikagel 60 F254. Detekce byla prováděna světlem vlnové délky 254 nm a 366 nm. Vytvájecí soustavy jsou uvedeny u jednotlivých reakcí. Sloupcová chromatografie byla prováděna na silikagelu Merck Kieselgel 60 (0,040-0,063 mm). Infračervená spektra (IČ) byla měřena IČ spektrofotometrem NICOLET IMPACT 400 na KAOCH FaF UK v Hradci Králové. Vlnočty jsou uvedeny v cm^{-1} . NMR spektra byla měřena na přístroji VARIAN MERCURY VxBB 300 na KAOCH FaF UK v Hradci Králové. Měření bylo prováděno při frekvenci 299.95 MHz (^1H NMR) a 75.43 MHz (^{13}C NMR). Posuny jsou vztaženy k vnitřnímu standardu $\text{Si}(\text{CH}_3)_4$. Spektrum ve viditelné oblasti bylo změřeno na přístroji SHIMADZU UV 2401 PC: UV-VIS recording spectrophotometer. Hmotnostní spektra byla měřena na přístroji Quattro MicroTM API (Waters, Milford, Massachusetts, USA) v režimu ESI MS. Jako rozpouštědlo byl použit acetonitril (pro sloučeninu ZIP14H2) a methanol (pro všechny ostatní látky). Pro zvýšení ionizace dané látky byla před měřením jejího hmotnostního spektra přidána kyselina mravenčí. Adukty s kyselinou mravenčí se pak ve spektru objevily jako minoritní pík. Dioxan byl sušen pomocí bezvodého chloridu vápenatého, předestilován a dosušen nad sodíkem. Butanol byl předestilován a sušen hořčíkem.

6.1. Příprava prekurzorů a AzaPc

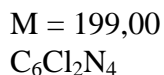
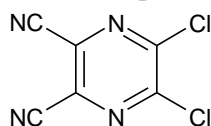
6.1.1 Příprava 5,6-dioxo-1,4,5,6-tetrahydropyrazin-2,3-dikarbonitrilu (1)



Oxalylchlorid (20 ml, 233 mmol) jsem rozpustila v bezvodém dioxanu (200 ml) a velmi pomalu přikapávala suspenzi diaminomaleinonitrilu (10 g, 93 mmol) v bezvodém dioxanu (600 ml). Doba přikapávání činila 3 hod , přičemž jsem postupně zvyšovala teplotu až na 50 °C. Po smísení obou reaktantů jsem směs míchala další 3 hodiny při teplotě 50 °C. Pak jsem obsah baňky zahustila na rotační vakuové odparce a odfiltrovala. Produkt jsem přečistila krystalizací z vody s aktivním uhlím a vysušila. Výtěžek 9,28 g nažloutlých krystalů (tj. 62 % teoretického výtěžku).

T.t. 245-278 °C za rozkladu (lit.³⁴ 240-280).

6.1.2 Příprava 5,6-dichlorpyrazin-2,3-dikarbonitrilu (2)

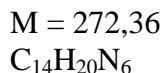
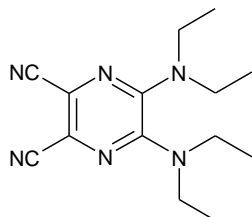


5,6-dioxo-1,4,5,6-tetrahydropyrazin-2,3-dikarbonitril (1) (9,28 g, 57 mmol) jsem pomalu sypala do směsi bezvodého dioxanu (400 ml) s thionylchloridem (22 ml, 303 mmol) a důkladně rozmíchala. Po dobu jedné hodiny jsem směs zahřívala při teplotě 60 °C pod zpětným chladičem opatřeným sušící rourkou. K suspenzi jsem přidala dimethylformamid (10 ml) a vzniklou tmavou směs jsem zahřívala dalších 90 minut. Poté jsem odpařila rozpouštědlo na vakuové rotační odparce. Produkt jsem dále třikrát extrahovala horkým toluenem (600 ml). Toluén jsem odpařila, vzniklý produkt překrystalizovala z chloroformu a získané krystaly (6,77 g) vysušila . Odpařila jsem rozpouštědlo matečného louhu a směs (2,12 g) rozdělila pomocí flash chromatografie s toluenem jako mobilní fází. Podíl produktu získaného z matečného louhu jsem vysušila a opět překrystalizovala z chloroformu. Získala jsem takto ještě 1,23 g 5,6-dichlorpyrazin-2,3-dikarbonitrilu, který jsem přidala k hlavnímu podílu. Získala jsem tak celkem 8,0 g drobných nažloutlých krystalů (tj. 70,2 % teoretického výtěžku).

T.t. 180,2 °C (lit.³⁶ 188-190, lit.³⁴ 179-180).

¹³C NMR (CD₃COCD₃) δ 113,1; 131,2; 152,2.

6.1.3 Příprava 5,6-bis(diethylamino)-pyrazin-2,3-dikarbonitrilu (3)



Diethylamin (8,83 g, 120 mmol) jsem po kapkách přidala k roztoku 5,6-dichlorpyrazin-2,3-dikarbonitrilu (2) (4,0 g, 20 mmol) v tetrahydrofuranu (100 ml), poté jsem směs vařila pod zpětným chladičem po dobu šesti hodin. Průběh reakce jsem sledovala pomocí tenkovrstevné chromatografie s mobilní fází hexan/ethylacetát 4:1. Reakční směs jsem ochladila a vysráženou sůl (hydrochlorid diethylaminu) odfiltrovala. Rozpouštědlo jsem odpařila a produkt třikrát překrystalovala z methanolu. Původně tmavě žlutá látka se vyčistila na jasně žlutou. Matečný louh z krystalizace jsem odpařila na rotační vakuové odparce a přečistila sloupcovou chromatografií za použití hexanu/ethylacetátu 4:1 jako mobilní fáze. Na závěr jsem frakce s krystalizace a chromatografie spojila a znovu překrystalizovala z methanolu. Výtěžek 4,66g nažloutlých krystalů (tj. 85 % teoretického výtěžku).

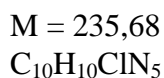
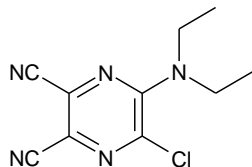
T.t. 93-94°C (lit.³⁷ 94°C).

¹³C NMR (CDCl₃) δ 146,1; 120,3; 115,0; 42,8 a 12,7.

¹H NMR (CDCl₃) δ 3,48 (q; 8H; *J* = 7,1 Hz; CH₂); 1,07 (t; 12H; *J* = 7,1 Hz; CH₃).

IČ (KBr) ν 2978, 2935, 2876, 2228 (CN), 1518, 1489, 1347 a 1253.

6.1.4 Příprava 5-chlor-6-diethylaminopyrazin-2,3-dikarbonitrilu (4)



5,6-dichlorpyrazin-2,3-dikarbonitril (2) (2,4 g, 12 mmol) jsem rozpustila v tetrahydrofuranu (100 ml), ochladila na teplotu -12°C pomocí směsi led/sůl a za stálého míchání jsem postupně přikapávala diethylamin (2,48 ml, 24 mmol). Reakční směs jsem nechala pozvolna ohřát na pokojovou teplotu a vzniklou sůl (hydrochlorid diethylaminu) jsem odfiltrovala. Zbytek jsem odpařila za sníženého tlaku. Vzniklou červenohnědou olejovitou látku jsem vyčistila pomocí sloupcové chromatografie

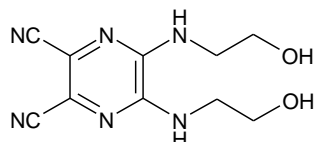
s mobilní fází hexan/ethylacetát 4:1. Výtěžek 2,6 g žluté olejovité látky (tj. 92 % teoretického výtěžku).

^{13}C NMR (CDCl_3) δ 151,3; 135,0; 139,4; 117,3; 113,2; 113,0; 45,5 a 13,0.

^1H NMR (CDCl_3) δ 3,75 (q; 4H; $J = 7,1$ Hz; CH_2); 1,31 (t; 6H; $J = 7,0$ Hz; CH_3).

IČ (KBr) v 2987, 2939, 2876, 2233 (CN), 1553, 1507, 1439, 1386 a 1358.

6.1.5 Příprava 5,6-bis-(2-hydroxyethylamino)-pyrazin-2,3-dikarbonitrilu (5)



$M = 248,25$

$\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{N}_6\text{O}_2$

K roztoku 5,6-dichlorpyrazin-2,3-dikarbonitrilu (2) (1,0 g, 5 mmol) v tetrahydrofuranu (100 ml) jsem po kapkách přidala 2-aminoethanol (1,56 ml, 26 mmol). Reakční směs jsem dále míchala při pokojové teplotě po dobu jedné hodiny. Vzniklou směs jsem dekantovala, abych odstranila olej, který se oddělil z roztoku. Rozpouštědlo jsem odpařila na vakuové rotační odparce a produkt překrystalizovala z vody. Vzniklé krystaly jsem odfiltrovala a přečistila sloupcovou chromatografií, jako mobilní fází jsem použila soustavu ethylacetát/methanol v poměru 5:1. Pomocí tenkovrstevné chromatografie jsem zjistila, že produkt stále není čistý, a proto jsem ho ještě překrystalizovala z acetonu. Výtěžek 1,115 g bílých krystalů (tj. 89,5 % teoretického výtěžku).

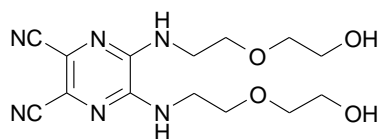
T.t. 185,5 – 186 °C za rozkladu.

^{13}C NMR (CD_3SOCD_3) δ 144,3; 118,3; 116,5; 58,7 a 44,1.

^1H NMR (CD_3SOCD_3) δ 7,95 (s; 2H; NH); 4,87 (s; 2H; OH); 3,58 (t; 4H; $J = 5,5$ Hz; CH_2O); 3,44 (br s; 4H; CH_2N).

IČ (KBr) v 3483, 3347, 3289, 3196, 3091, 2950, 2937, 2889, 2229 (CN), 1604, 1560, 1518, 1460, 1396, 1076 and 1060.

6.1.6 Příprava 5,6-bis[2-(2-hydroxyethoxy)-ethylamino]-pyrazin-2,3-dikarbonitrilu (6)



$M = 336,35$

$\text{C}_{14}\text{H}_{20}\text{N}_6\text{O}_4$

Roztok 5,6-dichlorpyrazin-2,3-dikarbonitrilu (2) (500 mg, 2,5 mmol) v tetrahydrofuranu (50 ml) jsem míchala při pokojové teplotě. Pomalu jsem k němu přikapávala 2-(2-aminoethoxy)ethanol (1,12 g, 10,7 mmol). Reakci jsem dále ponechala

běžet za stejných podmínek po dobu dalších tří hodin. Roztok jsem dekantovala, abych odstranila olejovitou fázi, která se z reakce oddělila. Za sníženého tlaku jsem odpařila rozpouštědlo a produkt přečistila sloupcovou chromatografií za použití ethylacetátu/methanolu 8:1 jako mobilní fáze. Takto získaný produkt jsem ještě překrytalizovala ze směsi ethanol/voda. Získala jsem 410 mg bílých krystalů (tj. 49 % teoretického výtěžku).

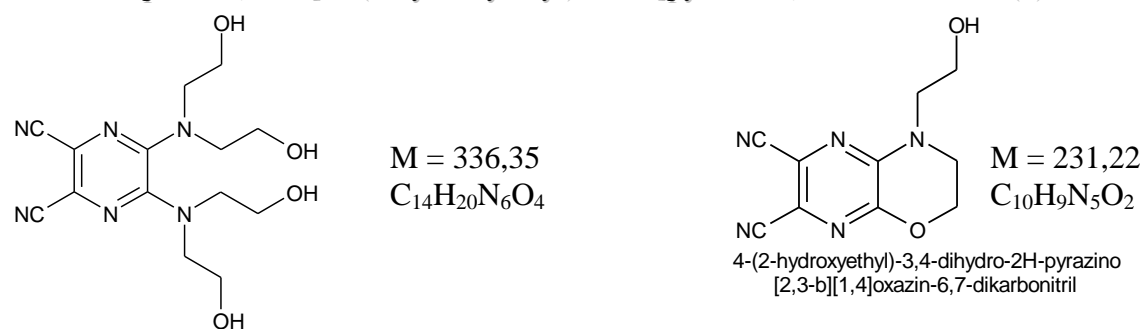
T.t. 169,5 – 170,8 °C.

^{13}C NMR (CD_3SOCD_3) δ 144,2; 118,4; 116,4; 72,4; 68,1; 60,4 a 41,4.

^1H NMR (CD_3SOCD_3) δ 7,94 (s; 2H; NH); 4,60 (s; 2H; OH) a 3,65-3,40 (m; 16H; CH_2).

IČ (KBr) ν 3343, 2925, 2897, 2876, 2226 (CN), 1623, 1563, 1524, 1398, 1135 a 1069.

6.1.7 Příprava 5,6-bis[bis(2-hydroxyethyl)amino]pyrazin-2,3-dikarbonitrilu (7)

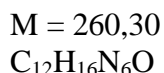
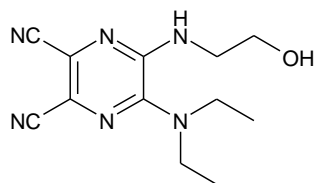


K 5,6-dichlorpyrazin-2,3-dikarbonitrilu (2) (0,99 g, 5 mmol) rozpuštěnému v dioxanu jsem přikapala diethanolamin (3,17 g, 30 mmol) a ponechala vařit při teplotě 120°C pod zpětným chladičem po dobu čtyř hodin. Průběh reakce jsem sledovala pomocí tenkovrstevné chromatografie s mobilní fází ethylacetát/aceton 1:1. Za sníženého tlaku jsem odpařila rozpouštědlo a přečistila sloupcovou chromatografií s mobilní fází ethylacetát/aceton v poměru 1:1. Poté jsem látku rozpustila v methanolu, povařila s aktivním uhlím, přefiltrovala a odpařila rozpouštědlo. Získané bílé krystalky tají při 90 – 92 °C. NMR analýza nepotvrdila očekávaný produkt. Neznámou látku jsme později identifikovali jako 4-(2-hydroxyethyl)-3,4-dihydro-2H-pyrazino[2,3-b][1,4]oxazin-6,7-dikarbonitril.

^{13}C NMR (CD_3COCD_3) δ 149,6; 145,8; 126,2; 117,0; 115,6; 115,3; 65,6 59,3 51,5 47,5.

^1H NMR (CD_3COCD_3) δ 4,60 (t; 2H; $J = 4,6$ Hz; O- CH_2); 4,08 – 4,00 (m; 1H; OH); 3,95 (t; 2H; $J = 4,95$ Hz; CH_2 -OH); 3,80-3,88 (m; 4H; N- CH_2).

6.1.8 Příprava 5-diethylamino-6-(2-hydroxyethylamino)-pyrazin-2,3-dikarbonitrilu (8)



Rozpustila jsem 5-chlor-6-diethylaminopyrazin-2,3-dikarbonitril (4) (1,0 g, 4,25 mmol) v tetrahydrofuranu (50 ml) a za stálého míchání jsem po kapkách přidala 2-aminoethanol (0,78 g, 12,75 mmol). Reakce pokračovala dalších 5 hodin při pokojové teplotě. Poté jsem za sníženého tlaku odpařila rozpouštědlo, vzniklý oranžový olej rozpustila v chloroformu a třikrát extrahovala vodou. Organickou vrstvu jsem vysušila bezvodým síranem sodným, odpařila na rotační vakuové odparce a přečistila sloupcovou chromatografií za použití směsi dichlormethan/acetone 3:1 jako mobilní fáze. Výtěžek 840 mg nažloutlých krystalů (tj. 76 % teoretického výtěžku).

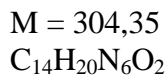
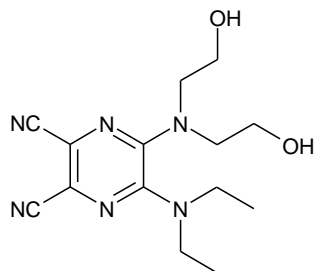
T.t. 102 – 103 °C.

^{13}C NMR (CD_3COCD_3) δ 148,9; 148,5; 124,0; 118,7; 116,2; 116,0; 60,2; 44,5; 44,1 a 12,9.

1H NMR (CD_3COCD_3) δ 6,64 (br s; 1H; NH); 4,07 (t; 1H; $J = 5,5$ Hz, OH); 3,79 (q; 2H; $J = 5,5$ Hz, CH_2-O); 3,60 (q; 2H; $J = 5,6$ Hz, CH_2-NH); 3,45 (q; 4H; $J = 7,2$ Hz, CH_2-N) a 1,14 (t; 6H; $J = 7,1$ Hz, CH_3).

IČ (KBr) v 3493, 3320, 2974, 2229 (CN), 1557, 1532, 1426, 1270 a 1049.

6.1.9 Příprava 5-[bis(2-hydroxyethyl)amino]-6-diethylaminopyrazin-2,3-dikarbonitrilu (9)



5-chlor-6-diethylaminopyrazin-2,3-dikarbonitril (4) (1,1 g, 4,7 mmol) a diethanolamin (2,0 g, 19 mmol) jsem rozpustila v dioxanu, smíchala a vařila po dobu čtyř hodin pod zpětným chladičem za stálého míchání při teplotě 120°C. Vzniklou směs jsem dekantovala, odpařila a rozdělila sloupcovou chromatografií. Jako mobilní fázi jsem použila soustavu ethylacetát/kyselina octová v poměru 10:1. Poté jsem reakční směs překrystalizovala z vody s aktivním uhlím. Ani po krystalizaci nebyl produkt

dostatečně čistý, a proto jsem ho čistila znovu sloupcovou chromatografií. Tentokrát jsem jako mobilní fázi použila směs ethylacetát/aceton v poměru 1:1. Na závěr jsem produkt překrystalizovala z vody. Výtěžek 360 mg (tj. 25 % teoretického výtěžku).

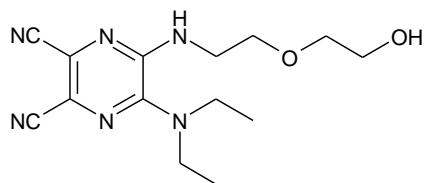
T.t. 132,5-133,5°C.

^{13}C NMR (CD_3COCD_3) δ 148,4; 147,1; 120,5;120,1; 116,2; 116,2; 59,8; 51,9; 43,4; 12,9.

^1H NMR (CD_3COCD_3) δ 3,83 (t; 2H; $J = 5,5$ Hz, OH); 3,79 – 3,72 (m; 4H; $\text{CH}_2\text{-OH}$); 3,72 – 3,65 (m; 4H; $\text{N-CH}_2\text{CH}_2\text{-OH}$); 3,59 (q; 4H; $J = 7,1$ Hz; N-CH_2) a 1,07 (t; 6H; $J = 7,0$ Hz; CH_3)

IČ (KBr) v 3431, 2935, 2224 (CN), 1538, 1491, 1218 a 1059

6.1.10 Příprava 5-diethylamino-6-[2-(2-hydroxyetoxy)-ethylamino]-pyrazin-2,3-dikarbonitrilu (10)



M = 304,35

$\text{C}_{14}\text{H}_{20}\text{N}_6\text{O}_2$

K roztoku 5-chlor-6-diethylaminopyrazin-2,3-dikarbonitrilu (4) (1,0 g, 4,25 mmol) v tetrahydrofuranu (50 ml) jsem pomalu přikapala 2-(2-aminoethoxy)ethanol (1,34 g, 12,75 mmol) a nechala míchat ještě 5 hodin při pokojové teplotě. Směs jsem odpařila na rotační vakuové odparce, vzniklý žlutý olej jsem rozpustila v chloroformu a třikrát extrahovala vodou. Organickou vrstvou jsem poté vysušila bezvodým síranem sodným, odpařila za sníženého tlaku a přečistila pomocí sloupcové chromatografie. Jako mobilní fázi jsem použila dichlormethan/aceton v poměru 3:1. Výtěžek 996 mg žluté olejovité látky (tj. 77 % teoretického výtěžku).

^{13}C NMR (CD_3COCD_3) δ 148,6; 148,4; 123,8; 118,8; 116,2; 116,0; 73,2; 69,0; 62,0; 44,1; 41,9 a 12,9.

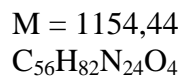
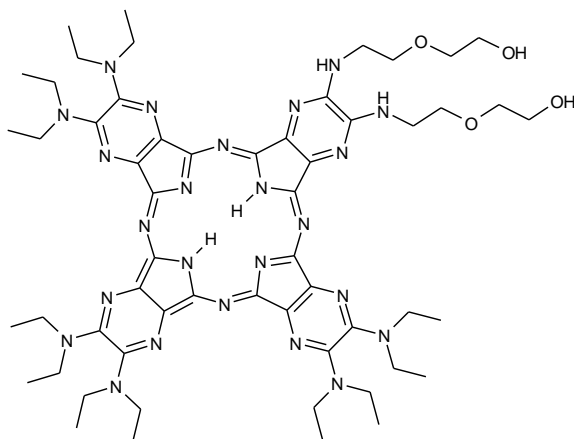
^1H NMR (CD_3COCD_3) δ 6,65 (br s; 1H; NH); 3,73 (t; 2H; $J = 5,5$ Hz; CH_2O); 3,70 - 3,61 (m; 4H; $\text{CH}_2\text{-O}$); 3,61-3,53 (m; 2H; $\text{CH}_2\text{-NH}$); 3,45 (q; 4H; $J = 7,1$ Hz, $\text{CH}_2\text{-N}$) a 1,15 (t; 6H; $J = 7,1$ Hz, CH_3).

IČ (KBr) v 3424, 2974, 2935, 2875, 2231 (CN), 1560, 1537, 1504, 1457, 1436, 1358 a 1265.

6.2. Obecný postup přípravy nesymetrických derivátů AzaPc

V bezvodém butanolu jsem rozpustila 5,6-bis(diethylamino)pyrazin-2,3-dikarbonitril (**3**) a druhý prekurzor (přesné hodnoty jsou u jednotlivých příprav). Směs jsem pod zpětným chladičem zahřála na teplotu 130°C a přidala na kousky nakrájené lithium. Reakci jsem nechala běžet za stejných podmínek po dobu čtyř hodin. Poté jsem za sníženého tlaku odpařila rozpouštědlo a přidala kyselinu octovou (50 % v/v, 30 ml). Odfiltrovala jsem vzniklou sraženinu, kterou jsem dále propláchnula vodou a důkladně vysušila. Tuto směs jsem následně čistila chromatografickými a krystalizačními metodami (viz jednotlivé přípravy).

6.2.1 Příprava 2,3-bis[2-(2-hydroxyethoxy)ethylamino]-9,10,16,17,23,24-hexakis(diethylamino)-1,4,8,11,15,18,22,25-(oktaaza)ftalocyaninu (**Q3-1H2**)



Tuto látku jsem připravila reakcí 5,6-bis(diethylamino)-pyrazin-2,3-dikarbonitrilu (**3**) (200 mg, 0,6 mmol) s 5,6-bis[2-(2-hydroxyethoxy)-ethylamino]-pyrazin-2,3-dikarbonitrilem (**6**) (486 mg, 1,8 mmol) a lithiem (117 mg, 16,8 mmol) podle obecného postupu syntézy nesymetrických AzaPc. Jako mobilní fázi pro sloupcovou chromatografii jsem použila nejprve chloroform/aceton/methanol v poměru 9:1:1. Když se ze sloupce eluovala první fialová frakce (**ZIP14H2**), změnila jsem soustavu na více polární, tedy chloroform/aceton/methanol 9:1:2 a jímala následující intenzivní fialovou frakci (**Q3-1H2**). Takto získaný AzaPc jsem překrystalizovala rozpuštěním látky v malém množství dichlormetanu a nakapáním do hexanu. Po 24 hod. v lednici vypadla sraženina, kterou jsem odfiltrovala. Produkt ani poté ještě nebyl dostatečně čistý, a proto jsem ho ještě jednou přečistila sloupcovou chromatografií s tetrahydrofuranem jako mobilní fází. Výtěžek 80 mg tmavě fialové pevné látky (tj. 11,6 % teoretického výtěžku).

^{13}C NMR ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) δ 153,5; 153,1; 151,0; 150,5; 150,4; 147,4; 143,3; 143,2; 142,8; 141,2; 139,2; 138,1; 73,3; 69,5; 61,5; 43,1; 43,0; 42,8; 42,7; 13,2; 13,1 a 13,0.

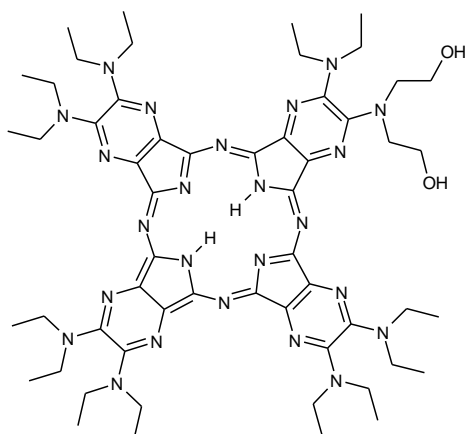
^1H NMR ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) δ 13,63 (br s; 2H; OH); 8,13 (br s; 2H; NH); 4,36-4,26 (m; 4H; $\text{CH}_2\text{-OH}$); 4,01-3,79 (m; 32H; $\text{CH}_2\text{-N}$ + $\text{CH}_2\text{-O}$); 3,71-3,61 (m; 4H; $\text{CH}_2\text{-NH}$) a 1,30-1,08 (m; 36H; CH_3).

IČ (KBr) v 2968, 2930, 2871 a 1641.

UV-vis (THF) λ_{max} (ϵ) 675 (86200), 644 (67200), 618sh, 592sh, 510 (61300) a 363 (102800).

MS ESI m/z 1156 $[\text{M} + \text{H}]^+$.

6.2.2 Příprava 2-(2-hydroxyethylamino)-3,9,10,16,17,23,24-heptakis(diethylamino)-1,4,8,11,15,18,22,25-(oktaaza)ftalocyaninu (**Q4-1H2**)



$M = 1123,44$

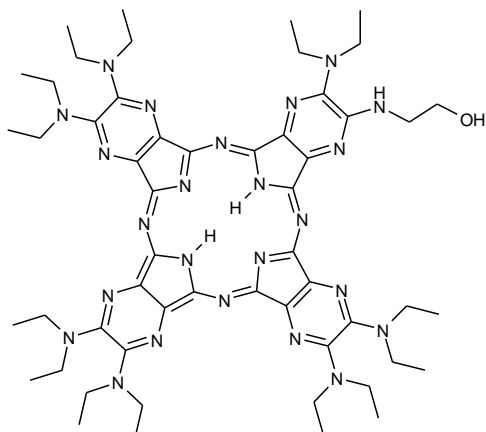
$\text{C}_{56}\text{H}_{82}\text{N}_{24}\text{O}_2$

Jako prekurzory jsem do reakce použila 5-[bis(2-hydroxyethyl)amino]-6-diethylaminopyrazin-2,3-dikarbonitril (**9**) (150 mg, 0,5 mmol) a 5,6-bis(diethylamino)pyrazin-2,3-dikarbonitril (**3**) (840 mg, 3,0 mmol) s lithiem (180 mg, 25,7 mmol). Postupovala jsem podle obecného postupu přípravy nesymetrických AzaPc. Pro rozdělení směsi produktů jsem použila sloupcovou chromatografii s mobilní fází chloroform/aceton 8:1, poté následovala další sloupcová chromatografie s mobilní fází tetrahydrofuranu/chloroform/hexan 1:1:1. Na závěr jsem připravený AzaPc povařila s aktivním uhlím, zfiltrovala a odpařila rozpouštědlo. Získala jsem 54 mg tmavě fialové pevné látky. (tj. 2,2 % teoretického výtěžku). NMR ani MS analýza nepotvrdily předpokládanou strukturu.

IČ (KBr) v 2965; 2930; 2870; 1676; 1642; 1510; 1423; 1376; 1344; 1288; 1250; 1160 a 1141.

MS ESI m/z 1050 $[\text{M} + \text{H}]^+$. Vypočteno pro $\text{C}_{56}\text{H}_{82}\text{N}_{24}\text{O}_2$: 1123,44.

6.2.3 Příprava 2-(2-hydroxyethylamino)-3,9,10,16,17,23,24-heptakis(diethylamino)-1,4,8,11,15,18,22,25-(oktaaza)ftalocyaninu (**Q5-1H2**)



M = 1079,38
C₅₄H₇₈N₂₄O

Jako prekurzory jsem do reakce použila 5-diethylamino-6-(2-hydroxyethylamino)-pyrazin-2,3-dikarbonitril (**8**) (200 mg, 0,7 mmol) a 5,6-bis(diethylamino)-pyrazin-2,3-dikarbonitril (**3**) (628 mg, 2,3 mmol) s lithiem (150 mg, 21 mmol). Postupovala jsem dle obecného postupu přípravy asymetrických AzaPc. Směs jsem rozdělila pomocí sloupcové chromatografie s mobilní fází chloroform/aceton 6:1. Pokračovala jsem v čištění další sloupcovou chromatografií se směsí chloroform/aceton/methanol 9:1:0,5 jako mobilní fáze.

Protože se stále jednalo o směs látek musela jsem pokračovat v čištění. Tentokrát jsem použila mobilní fázi tetrahydrofuran/chloroform/hexan 3:3:1. Získaný AzaPc jsem považila v dichlormethanu s aktivním uhlím, přefiltrovala a odpařila rozpouštědlo. AzaPc jsem dále rozpustila v minimálním množství dichlormethanu, nakapala do hexanu a odfiltrovala. Tuto sraženinu jsem rozpustila v methanolu, nakapala do vody a opět odfiltrovala. Nakonec jsem látku ještě jednou rozpustila v dichlormethanu, nakapala do hexanu, odfiltrovala a vysušila v sušící pistolí. Výtěžek 22 mg tmavě fialové pevné látky (tj. 2,7 % teoretického výtěžku).

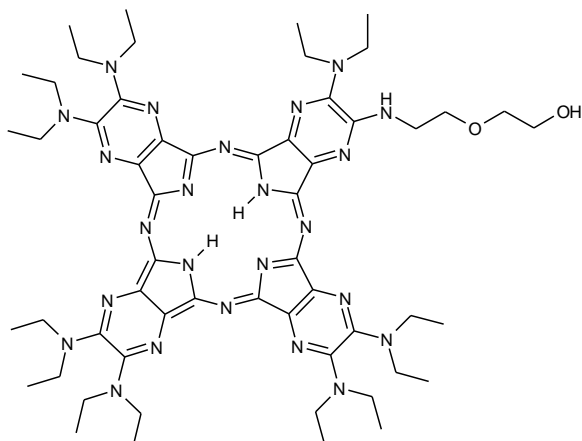
¹³C NMR (C₅D₅N) δ 152,2; 150,6; 149,1; 148,2; 144,4; 141,5; 141,0; 140,9; 137,3; 60,9; 45,0; 44,5; 43,0; 42,8 a 13,1.

¹H NMR (C₅D₅N) δ 13,74 (br s; 1H; OH); 7,64-7,54 (m; 1H; NH); 4,49-4,33 (m; 2H; CH₂-OH); 4,06-3,72 (m; 26H; CH₂-N + CH₂-NH); 3,63 (q; 4H; J = 6,8 Hz; CH₂-N) a 1,30-1,05 (m; 42H; CH₃).

IČ (KBr) ν 2967, 2931, 2871 a 1640.

UV-vis (THF) λ_{max} (ε) 678 (88300), 647 (64800), 618sh, 592sh, 507 (56100) a 364 (104600). MS ESI m/z 1080 [M + H]⁺.

6.2.4 Příprava 2-[2-(2-hydroxyethoxy)-ethylamino]-3,9,10,16,17,23,24-heptakis(diethylamino)-1,4,8,11,15,18,22,25-(oktaaza)ftalocyaninu (**Q6-1H2**)



M = 1123,44
C₅₆H₈₂N₂₄O₂

Při této reakci reagoval 5-diethylamino-6-[2-(2-hydroxyetoxy)-ethylamino]-pyrazin-2,3-dikarbonitril (**10**) (200 mg, 0,66 mmol) s 5,6-bis(diethylamino)-pyrazin-2,3-dikarbonitrilem (**3**) (537 mg, 1,9 mmol) a lithiem (129 mg, 18,4 mmol) za podmínek popsaných v obecném postupu přípravy asymetrických AzaPc. Tuto látku jsem čistila stejným postupem jako látku předchozí (**Q5-1H2**). Výtěžek 64,5 mg tmavě fialové pevné látky (tj. 9 % teoretického výtěžku).

¹³C NMR (C₅D₅N) δ 151,9; 150,6; 148,2; 146,6; 144,3; 141,5; 141,1; 140,9; 137,4; 73,6; 69,9; 61,7; 44,5; 43,0; 42,8 a 13,1.

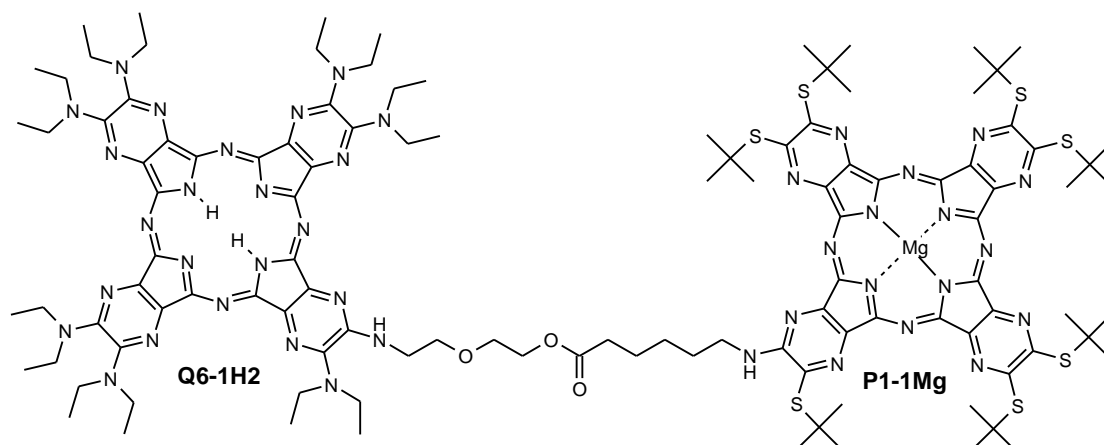
¹H NMR (C₅D₅N) δ 13,74 (br s; 1H; OH); 7,43 (t; 1H; J = 5,3 Hz; NH); 4,34 (q; 2H; J = 5,2 Hz; CH₂-OH); 4,10 (t; 2H; J = 5,1 Hz; CH₂-O); 4,05 (t; 2H; J = 5,1 Hz; CH₂-O); 4,00-3,72 (m; 26H; CH₂-N + CH₂-NH); 3,62 (q; 4H; J = 7,1 Hz; CH₂-N) a 1,36-0,93 (m; 42H; CH₃).

IČ (KBr) ν 2969, 2931, 2872 a 1640.

UV-vis (THF) λ_{max} (ε) 677 (95300), 647 (69500), 617sh, 591sh, 508 (58400) a 365 (108000).

MS ESI m/z 1124 [M + H]⁺.

6.3. Reakce P1-1Mg s Q6-1H2



METODA A: **P1-1Mg** (1,5 mg, 1,2 μmol) jsem rozpustila v bezvodém dichlormethanu a přidala roztoky karbonyldiimidazolu (0,2 mg, 1,2 μmol) a CH_3I (0,82 mg, 0,6 μmol) v bezvodém dichlormethanu. Tuto směs jsem míchala při pokojové teplotě po dobu jedné hodiny. Poté jsem přidala **Q6-1H2** (1,3 mg, 1,2 μmol) a 17 hodin nechala běžet za stejných podmínek. Průběh reakce jsem sledovala pomocí TLC s mobilní fází chloroform/aceton/methanol v poměru 30:1:1.

METODA B: Karbonyldiimidazol (0,26 g, 1,6 mmol) jsem rozpustila v bezvodém dichlormethanu, přidala jsem CH_3I (0,45 mg, 3,2 mmol) a míchala při pokojové teplotě po dobu dvou hodin. Pak jsem přikapala roztok **P1-1Mg** (1,5 mg, 1,2 μmol) a **Q6-1H2** (1,3 mg, 1,2 μmol) v dichlormethanu. Reakční směs jsem míchala při pokojové teplotě po dobu pěti dnů. Průběh reakce jsem sledovala pomocí tenkovrstevné chromatografie s mobilní fází chloroform/aceton/methanol v poměru 30:1:1. Poté jsem směs extrahovala mírně okyselenou vodou a organické rozpouštědlo odpařila.

METODA C: Při tomto pokusu o esterifikaci jsem pracovala pod argonovou atmosférou. Karbonyldiimidazol (0,26 g, 1,6 mmol) jsem rozpustila v bezvodém tetrahydrofuranu, smísila s CH_3I (0,45 mg, 3,2 mmol) a 4 hodiny míchala při pokojové teplotě. Poté jsem přidala **P1-1Mg** (1,29 mg, 1 μmol). Po jedné hodině míchání za pokojové teploty jsem přidala **Q6-1H2** (1,13 mg, 1 μmol) a reakci nechala běžet za stejných podmínek po dobu 16-ti hodin. Průběh reakce jsem sledovala pomocí tenkovrstevné chromatografie s mobilní fází chloroform/aceton/methanol v poměru 30:1:1.

7. Závěr

V rámci mé diplomové práce jsem připravila tyto prekurzory AzaPc:

- 5,6-bis(diethylamino)-pyrazin-2,3-dikarbonitril (**3**)
- 5-chlor-6-diethylaminopyrazin-2,3-dikarbonitril (**4**)
- 5,6-bis-(2-hydroxyethylamino)-pyrazin-2,3-dikarbonitril (**5**)
- 5,6-bis[2-(2-hydroxyethoxy)-ethylamino]-pyrazin-2,3-dikarbonitril (**6**)
- 4-(2-hydroxyethyl)-3,4-dihydro-2H-pyrazino[2,3-b][1,4]oxazin-6,7-dikarbonitril (**7**)
- 5-diethylamino-6-(2-hydroxyethylamino)-pyrazin-2,3-dikarbonitril (**8**)
- 5-[bis(2-hydroxyethyl)amino]-6-diethylaminopyrazin-2,3-dikarbonitril (**9**)
- 5-diethylamino-6-[2-(2-hydroxyethoxy)-ethylamino]-pyrazin-2,3-dikarbonitril (**10**)

Všechny tyto látky byly charakterizovány teplotou tání, NMR a IČ spektry.

Cyklizací těchto prekurzorů se mi podařilo připravit tyto asymetrické AzaPc bez centrálního atomu kovu:

- 2,3-bis[2-(2-hydroxyethoxy)ethylamino]-9,10,16,17,23,24-hexakis(diethylamino)-1,4,8,11,15,18,22,25-(oktaaza)ftalocyanin (**Q3-1H2**)
- 2-(2-hydroxyethylamino)-3,9,10,16,17,23,24-heptakis(diethylamino)-1,4,8,11,15,18,22,25-(oktaaza)ftalocyanin (**Q5-1H2**)
- 2-[2-(2-hydroxyethoxy)-ethylamino]-3,9,10,16,17,23,24-heptakis(diethylamino)-1,4,8,11,15,18,22,25-(oktaaza)ftalocyanin (**Q6-1H2**)

8. Použitá literatura

- 1 P. Zimčík, M. Miletín, M. Kostka, J. Schwarz, Z. Musil a K. Kopecký, *J. Photochem. Photobiol. A-Chem.*, 2004, **163**, 21 – 28.
- 2 J. R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Plenum, New York, 2nd ed., 1999.
- 3 T. Förster, *Ann. Phys.*, 1948, **2**, 55 – 75.
- 4 D. L. Dexter, *J. Phys. Chem.*, 1953, **21**, 836.
- 5 M. K. Johansson a R. M. Cook, *Chem.-Eur. J.*, 2003, **9**, 3466-3471.
- 6 G. Z. Scheibe, *Angew. Chem* 1936, **49**, 563.
- 7 E. E. Jelley, *Nature* 1936, **138**, 1009.
- 8 M. K. Johansson, H. Fidder D. Dick, R. M. Cook, *J. Am. Chem. Soc.* 2002, **124**, 6950.
- 9 S. A. E. Marras, F. R. Kamer a S. Tyagi, *Nucleic Acids Res.*, 2002, **30**, No. 21 e122.
- 10 R. P. Haugland, *Handbook of Fluorescent Probes and Research Products*, Molecular Probes Inc., Eugene, OR, 2002.
- 11 R. A. Cardullo, S. Agrawal, C. Flores, P. C. Zamecnik, a D. E. Wolf, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1988, **85**, 8790-8794.
- 12 L. E. Morrison, T. C. Halder a L. M., *Anal. Biochem.*, 1989, **183**, 231-244.
- 13 K. M. Parkhurst a L. J. Parkhurst, *Biochemistry*, 1995, **34**, 285-292.
- 14 S. Tyagi a F. R. Kamer, *Nat. Biotechnol.*, 1996, **14**, 303-308.
- 15 Veterinary Sciences Tomorrow [online], posl. revize leden 2001 [cit. 2006-6-11]. Dostupné z: www.vetscite.org/issue1/tools/leute_2_0800.htm
- 16 Glen Research Corportion [online], posl. revize 13.9.2004 [cit. 2006-10-11]. Dostupné z: www.glenres.com/index.html?/GlenReports/GR17-14.html.
- 17 N. Panchuk–Voloshina, Rosaria P. Hauglanda, Janell Bishop–Stewart, Mahesh K. Bhalgata, Paul J. Millarda, Fei Maa, Wai-Yee Leunga, and Richard P. Haugland, *J. Histochem. Cytochem.* 1999, **47**, 1179 – 1188.
- 18 Encyklopedie Wikipedia [online] (2006), posl. revize 31.10.2006 [cit. 2006-11-11]. Dostupné z: en.wikipedia.org/wiki/Fluorescein.
- 19 Biosearch Technologies [online] (2006), [cit. 2006-9-9]. Dostupné z: www.biosearchtech.com.
- 20 S.V. Kudrevich, J.E. Van Lier, *Coord. Chem. Rev.*, 1996, **156**, 163-182.
- 21 K. Kopecký, Diplomová práce, Syntéza potenciálních fotodynamicky aktivních látek typu dusíkatých analogů ftalocyaninů II, Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická Fakulta v Hradci Králové, 2004.
- 22 G. de la Torre, C. G. Claessens a T. Torres, *Eur. J. Org. Chem.*, 2000, 2821-2830
- 23 Zimcik, P., M. Miletin, Z. Musil, K. Kopecky, L. Kubza, D. Brault, *J. Photochem. Photobiol. A-Chem.*, 2006, **183**, 59-69.
- 24 Musil, Z., P. Zimcik, M. Miletin, K. Kopecky, P. Petrik, J. Lenco., *J. Photochem. Photobiol. A-Chem.*, in press, [doi:10.1016/j.jphotochem.2006.08.024](https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2006.08.024)
- 25 M. Brewis, G. J. Clarkson, A. M. Holder, N. B. McKeown, *Chem. Commun.*, 1998, 1979 – 1980.
- 26 G. J. Clarkson, N. B. McKeown, K. E. Treacher, *J. Chem. Soc., Perkin Trans.1*, 1995, 1817 – 1823.

-
- 27 N. Kobayashi, T. Rondo, S.-I. Nakajima, T. Osa, *J. Am. Chem. Soc.*, 1990, **112**, 9640 – 9641.
- 28 C. C. Leznoff, T. W. Hall, *Tetrahedron Lett.*, 1982, **23**, 3023 – 3026.
- 29 A. Hirth, A. K. Sobbi, D. Wöhrle, *J. Porphyrins Phthalocyanines* 1997, **1**, 275 – 279.
- 30 J. Young, W. Onyebuagu, *J. Org. Chem.*, 1990, **55**, 2155 – 2159.
- 31 C. C. Leznoff, S. Greenberg, B. Khouw, A. B. P. Lever, *Can. J. Chem.*, 1987, **65**, 1705 – 1713.
- 32 K. J. M. Nolan, M. Hu, C. C. Leznoff, *Synlett*, 1997, 593 – 594.
- 33 N. Kobayashi, *Chem. Commun.*, 1998, 487 – 488.
- 34 E.H. Mørkved, L.T. Holmaas, H. Kjösen, G. Hvistendahl, *Acta Chemica Scandinavica*, 1996, **50**, 1153-1156.
- 35 T. Kamijo, H. Harada, K. Iizuka, *Chem. Pharm. Bull.*, 1984, **32**, 5044-5047.
- 36 Suzuki et al, *J. Heterocycl. Chem.*, 1986, **23**, 1419.
- 37 W.Ried a G.Tsotis, *Liebigs Ann. Chem.*, 1988, 1197-1199