

Univerzita Karlova v Praze  
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové  
Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv

---



## RIGORÓZNÍ PRÁCE

Syntéza asymetrických derivátů azaftalocyaninů a tvorba jejich komplexů s pyridinem

HRADEC KRÁLOVÉ 2008..... MGR. JANA ŽIŽKOVSKÁ

<b>1.</b>	<b>SEZNAM ZKRATEK.....</b>	<b>4</b>
<b>2.</b>	<b>ÚVOD.....</b>	<b>5</b>
<b>3.</b>	<b>TEORETICKÁ ČÁST.....</b>	<b>6</b>
3.1.	ZHÁŠENÍ FLUORESCENCE.....	6
3.1.1.	<i>Dynamické zhášení.....</i>	7
3.1.2.	<i>Statické zhášení.....</i>	8
3.2.	FLUORESCENČNÍ BARVIVA.....	9
3.2.1.	<i>Indocyaninová barviva.....</i>	10
3.2.2.	<i>Alexa.....</i>	10
3.2.3.	<i>Fluoresceinová barviva.....</i>	11
3.2.4.	<i>Bodípy.....</i>	11
3.3.	QUENCHERY.....	13
3.3.1.	<i>Fluorescenční quenchery.....</i>	13
3.3.2.	<i>Nefluorescenční quenchery.....</i>	14
<b>4.</b>	<b>CÍL PRÁCE.....</b>	<b>18</b>
<b>5.</b>	<b>METODICKÁ ČÁST.....</b>	<b>19</b>
5.1.	SYNTEZA NESYMETRICKÝCH FTALOCYANINŮ (PC).....	19
5.1.1.	<i>Nesymetrický prekurzor.....</i>	19
5.1.2.	<i>Dva různé prekurzory.....</i>	20
<b>6.</b>	<b>EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....</b>	<b>26</b>
6.1.	SCHÉMA PROVÁDĚNÝCH REAKCÍ.....	27
6.1.1.	<i>Syntetická část.....</i>	27
6.1.2.	<i>AzaPc použité při měření kinetiky tvorby komplexů.....</i>	28
6.2.	SYNETICKÁ ČÁST.....	29
6.2.1.	<i>Příprava 5-diethylamino-6-[2-(4,4'-dimethoxytrifenyloxy)-ethylamino]pyrazin-2,3-dikarbonitrilu (2).....</i>	29
6.2.2.	<i>Příprava 2-(2-hydroxyethylamino)-3,9,10,16,17,23,24-heptakis(diethylamino)-1,4,8,11,15,18,22,25-oktaazaftalocyaninu (Q5).....</i>	30
6.2.3.	<i>Příprava 5-diethylamino-6-[2-(4,4'-dimethoxytrifenyloxy)-ethylmethylamino]pyrazin-2,3-dikarbonitrilu (6).....</i>	32
6.2.4.	<i>Příprava 2-(2-hydroxyethylmethylamino)-3,9,10,16,17,23,24-heptakis(diethylamino)-1,4,8,11,15,18,22,25-oktaazaftalocyaninu (Q10).....</i>	33
6.3.	KINETIKY TVORBY KOMPLEXU AZAFTALOCYANINŮ S PYRIDINEM.....	35
<b>7.</b>	<b>DISKUSE.....</b>	<b>40</b>
<b>8.</b>	<b>ZÁVĚR.....</b>	<b>43</b>
<b>9.</b>	<b>PŘÍLOHY.....</b>	<b>44</b>
<b>10.</b>	<b>SUMMARY.....</b>	<b>45</b>
<b>11.</b>	<b>SOUHRN.....</b>	<b>46</b>

## Poděkování

Děkuji PharmDr. Petru Zimčíkovi, PhD. a Mgr. Kamilu Kopeckému za jejich pomoc a hlavně trpělivost při vypracovávání této práce.

## 1. Seznam zkratek

$A_{\max}$ .....	absorpční maximum
AzaPc.....	azaftalocyanin
BBQ.....	"Black-berry Quencher"
BHQ.....	"Black Hole Quenchers"
DQ.....	nefluorescenční quencher ("dark quencher")
FRET.....	Försterova teorie zhášení (Förster resonance energy transfer)
IB.....	"Iowa Black"
Pc.....	ftalocyanin
PDT.....	fotodynamická terapie
Q.....	quencher
THF.....	tetrahydrofuran

## 2. Úvod

Ftalocyaniny (Pc) jsou látky strukturou podobné porfyrinu, rozdíl je v odlišné vazbě pyrrolových jader - methinové můstky nahrazuje dusík. Kromě toho jsou na pyrrolová jádra přikondenzována jádra benzenová, která posouvají absorpční maximum Pc až k 700 nm a zároveň zesilují absorpci při této vlnové délce. Uvnitř celého cyklu se vyskytují chelatované kovy nebo polokovy (hlavně Zn, Al, Si), které také umožní těmto látkám zvýšit jejich účinnost. Azaftalocyaniny (AzaPc) jsou dusíkaté analogy těchto Pc.

Jak Pc tak i AzaPc jsou v současné době nejvíce používány ve fotodynamické terapii (PDT). Během přípravy nových látek tohoto typu se u některých struktur zjistil zanedbatelný účinek potřebný pro PDT, na druhou stranu byly objeveny vlastnosti nové. Důležitou nově objevenou vlastností je jejich schopnost zhašení fluorescence, což nachází nemalé uplatnění v biochemii.

### **3. Teoretická část**

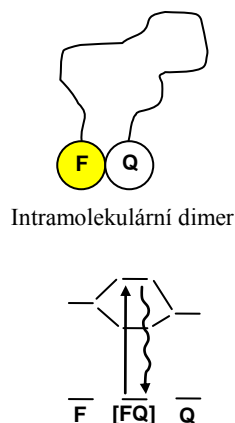
#### **3.1. Zhášení fluorescence**

Značení vzorků fluorescenčními barvivy má dnes v praxi bohaté využití. Barvivo se nejprve ke stanovovanému vzorku naváže kovalentní vazbou, možná je i vazba nekovalentní, ale její nevýhodou je nižší specifita stanovení. Množství látky ve vzorku pak určíme pomocí změny intenzity fluorescence. Tuto metodu dnes využíváme obzvláště pro stanovení nebo i samotnou identifikaci DNA řetězců.

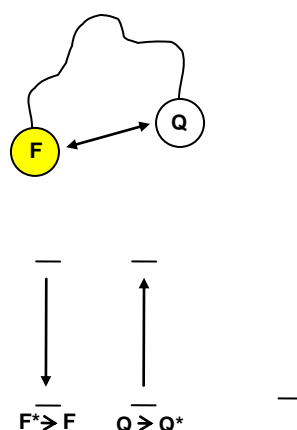
Ke zhášení fluorescence se používají látky, které jsou schopné přijmout energii z fluorescenční molekuly. Nazýváme je zhášeče fluorescence neboli quenchery. Quencher (akceptor energie) a fluorescenční látka (donor energie) se napojí každý na jeden oligonukleotidický řetězec, popř. na opačnou stranu jednoho řetězce a teprve při kontaktu nebo při přenosu energie z excitovaného stavu dochází ke zhášení. Tento proces nachází uplatnění především v monitorování biochemických dějů<sup>1</sup>.

Rozlišujeme 2 hlavní způsoby zhášení, statické a dynamické.

### Statické zhášení



### Dynamické zhášení



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

Obr.1: Znázornění 2 základních typů zhášení<sup>1</sup>

#### 3.1.1. Dynamické zhášení

Při tomto zhášení dochází k přenosu energie z excitovaného stavu fluoroforu. Známe 2 různé mechanismy: Försterův a Dexterův. Z Försterovy teorie, založené na interakci dipól-dipól, vyplývá význam závislosti zhášení na vzájemné vzdálenosti mezi akceptorem a donorem<sup>2</sup> (rozmezí zpravidla 10-100 Å). Dále hrají velkou roli spektrální vlastnosti přítomných látek (kompatibilita - nezbytné je dostatečné překrytí absorpčního spektra akceptoru a emisního spektra donoru) a také orientace dipólových momentů obou molekul<sup>3</sup>.

Dexterova teorie je založená na prostorovém překrytí orbitalů donoru a akceptoru. Základní vlastnosti donorů a akceptorů, jako je tvar jejich absorpčního a fluorescenčního spektra jsou pro obě tyto teorie stejně důležité. Častěji se však v praxi využívá Försterovy teorie zhášení (FRET - Förster resonance energy transfer)<sup>1</sup>.

### 3.1.2. Statické zhášení

Ke statickému zhášení dochází pokud se donor i akceptor nachází v těsné blízkosti. Většina absorbované energie je vyzářena jako teplo, pouze malá část jako světlo. Při statickém zhášení nepřechází fluorofor do excitovaného stavu, ale dochází k vytvoření komplexu akceptor-donor, což je vysvětlováno jak hydrofóbními interakcemi, kdy se látky snaží minimalizovat kontakt s vodou, nebo také díky stérickému a elektrostatickému působení mezi molekulami. Tento intramolekulární dimer má pak velmi specifické vlastnosti (důležitou úlohu zde hraje dipól moment obou látek). Narozdíl od dynamického zhášení zde není nezbytné, aby se emisní spektrum fluoroforu překrývalo s emisním spektrem quencheru<sup>4</sup>. Nevýhodou ale může být závislost tvorby dimeru na okolní teplotě<sup>1</sup>.

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<sup>1</sup>.

Podle typu látek použitých ke značení oligonukleotidické sondy 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“ DQ (nefluorescenční quencher - viz dále).



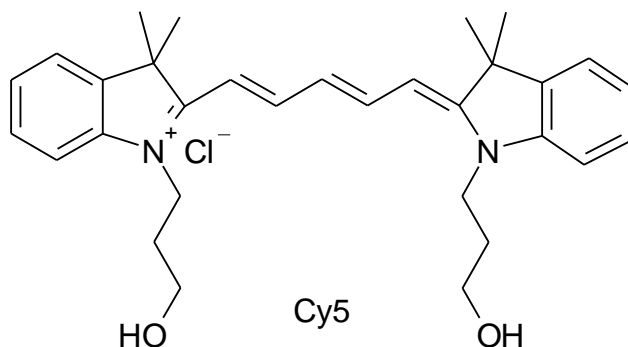
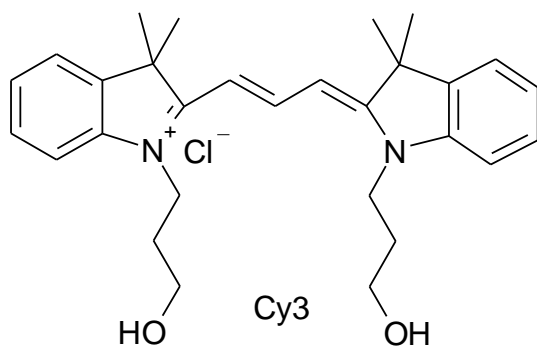
### 3.2. Fluorescenční barviva

Barviva	$\lambda_{\max}$ absorpce (nm)	$\lambda_{\max}$ emise (nm)
<b>Indocyaninová barviva</b>		
Cy3	546	564
Cy 3,5	588	593
Cy 5	646	663
Cy 5,5	683	687
<b>Alexa</b>		
Alexa 350	350	441
Alexa 430	430	535
Alexa 488	488	517
Alexa 532	532	551
Alexa 546	546	570
Alexa 568	568	599
Alexa 594	594	612
<b>Fluoresceinová barviva</b>		
5-FAM	494	518
6-FAM	494	518
TET	521	536
HEX	535	556
JOE	522	550
TAMRA	555	580
ROX	580	605
<b>Bodipy</b>		
Bodipy 493/503	493	503
Bodipy 530/550	530	550
Bodipy 564/570	564	570
Bodipy 576/570	576	589
Bodipy 581/591	581	591
Bodipy 650/665	650	665

Tab. 1: Přehled v praxi nejpoužívanějších fluorescenčních barviv a vlnových délek, při nichž je jejich absorpce, popř. emise maximální.

### 3.2.1. Indocyaninová barviva

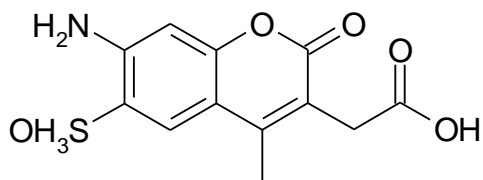
Indocyaninová barviva jsou složena ze dvou indolových jader, spojených řetězcem konjugovaných vazeb. Přikondenzováním dalších jader na tuto základní strukturu dojde k posunu absorpce k vyšším vlnovým délkám. V praxi nejčastěji jsou používány Cy3 a Cy5.



### 3.2.2. Alexa

Barviva ze skupiny Alexa mají ve své molekule 2H-chromen, na který jsou připojeny další kruhy a postranní řetězce. Důležitý je systém konjugovaných dvojných vazeb. Číslo vyjadřuje absorpční maximum dané

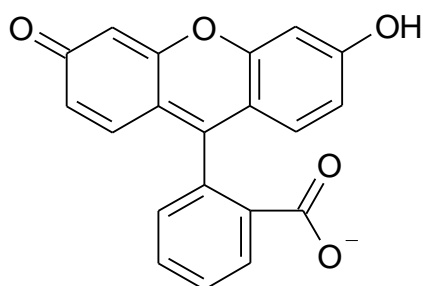
látky. Obecně lze říct, že jsou to látky poměrně stabilní (v závislosti na světle nebo pH prostředí).



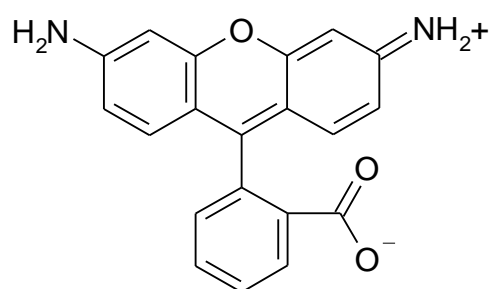
Alexa 350

### 3.2.3. Fluoresceinová barviva

Základní strukturou těchto barviv je fluorescein, popř. rhodamin. Opět má na absorpci těchto látek nezanedbatelný význam systém konjugovaných dvojných vazeb.



Fluorescein

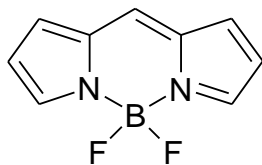


Rhodamin

### 3.2.4. Bodipy

Základní struktura: 4,4-difluor-bora-3a,4a-diaza-s-indacen. Deriváty získáváme hlavně substitucí alkyly nebo arily v poloze 1, 3, 5 a 7. Vlnovou

délku, při níž je jak absorpce tak emise maximální, vyjadřují čísla v názvu. Zvláštností těchto látek je jejich nepolární charakter i to, že chromofor je elektricky neutrální, proto jsou schopné docela snadno procházet biologickými membránami.



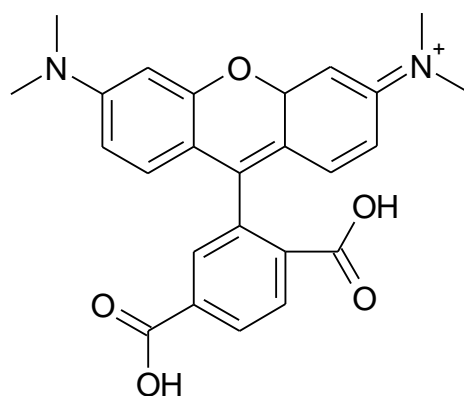
Bodipy

### 3.3. Quenchery

Rozlišujeme 2 základní typy quencherů (zhášeců): fluorescenční quenchery a nefluorescenční quenchery ("dark quenchers"). Rozdíl spočívá v chování obou látek po přijetí určitého množství energie. U fluorescenčních quencherů dojde k zdatelným změnám emisního spektra (vlivem vyzářeného fotonu), kdežto u nefluorescenčních "dark quencherů" molekula při přechodu z excitovaného stavu do svého základního nevyzáří foton, konečná fluorescence je tedy nulová. DQ dnes téměř své starší předchůdce z praxe vytlačili a to díky několika výhodám. Protože DQ neemitují energii ve formě fotonů, nedochází ani ke zkreslování vlastního měření následkem šumu. Samotnou detekci zjednoduší to, že lze změny v intenzitě fluorescence odečítat přímo a ne z tvaru emisního spektra. Další velkou výhodou je, že na rozdíl od fluorescenčních quencherů lze DQ při jednom experimentu použít více najednou a detekovat tak více cílových molekul v jednom vzorku.

#### 3.3.1. Fluorescenční quenchery

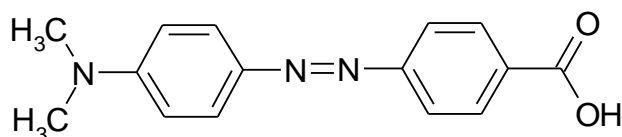
##### TAMRA



TAMRA je substituovaný tetramethylrhodamin. Nevýhodou je jeho vlastní emise, která znesnadňuje celkové hodnocení výsledků a je s ní nutno počítat. Ačkoli účinnost této molekuly oproti molekulám fluoresceinového typu je sotva čtvrtinová, výhoda spočívá v její daleko vyšší fotostabilitě

### 3.3.2. Nefluorescenční quenchery

#### Dabcyl



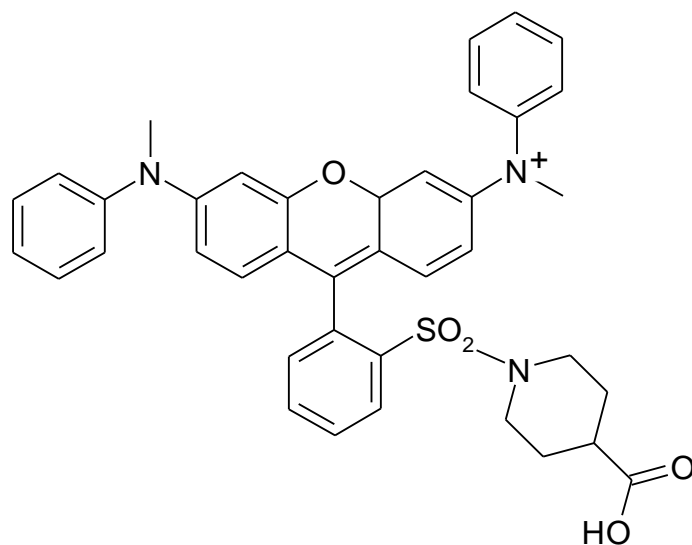
Dabcyl (4,4-dimethylaminoazobenzen-4'-karboxylová kyselina) je jedním z nejstarších DQ. Absorbuje při 453 nm, využívá se tedy hlavně pro zhasnutí látek emitujících ve viditelné oblasti světelného záření (hlavně modrá a zelená oblast).

#### Dabsyl

Molekulou (sulfonylchlorid) i vlastnostmi podobný dabcylu, absorpční maximum se posouvá na 466 nm.

Malachitová zeleň - absorpční maximum = 628 nm

## QSY<sup>TM</sup>



QSY jsou analogy fluoresceinu. Snahou bylo, aby se absorpce posunula k vyšším vlnovým délkám. Absorpční maximum se pohybuje mezi 560 - 660 nm, extinkční koeficient kolem  $90.000 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ , pH = 4-10.

Tyto látky jsou dostatečně chemicky stabilní, výhodnou se zdá být i jejich odolnost vůči tzv. "photobleachingu" (vyblednutí - ztráta intenzity absorpce či emise způsobená světlem).

Práva na prodej všech těchto molekul a jejich využití jako fluorescenční quenchery patří firmě Molecular Probes, Inc., USA<sup>5</sup>.

QSY 7 - absorpční maximum kolem 560 nm

QSY 9 - absorpční maximum kolem 562 nm, podobná látka jako QSY 7, pouze posílena rozpustnost ve vodě

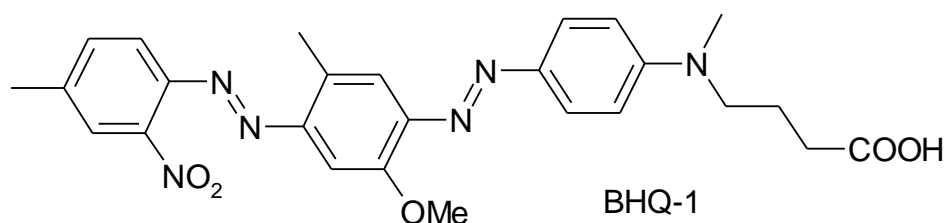
QSY 21 - absorpční maximum 661 nm, červená až téměř infračervená oblast (posun je způsobený širokou sítí konjugovaných dvojných vazeb)

QSY 35 - absorpční maximum kolem 475 nm, spektrálně velmi podobný dabcyly.

## Eclipse™

Molekula Eclipse™ byla uvedena na trh společností Epoch Biosciences, Inc.. Absorpční maximum se pohybuje okolo 522 nm. Molekula je vysoce stabilní a nedostatek elektronů oproti dabcyly způsobuje, že jeho potenciální využití se rozšířilo na daleko větší spektrum barviv (oblast 390 - 625 nm).

## BHQ™ (Black Hole Quenchers)



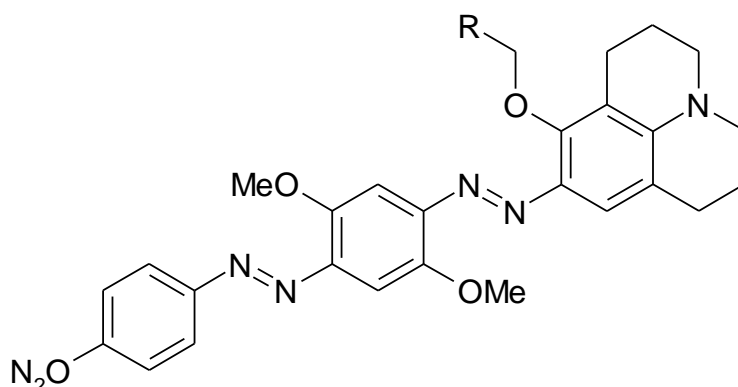
BHQ jsou odolné dark quenchery, které mají oproti ostatním poměrně vysoký extinkční koeficient a vykazují dobré vazebné schopnosti (lepší využití při statickém zhášení). Je možné je navázat jak na 3' nebo 5' konec, tak i doprostřed oligonukleotidické sondy. Absorpční maxima se pohybují v oblasti 480 - 730 nm. V praxi víceméně nahradily dříve používané quenchery - hlavně dabcyly (lepší překryv) nebo TAMRU (žádná vlastní fluorescence → snadnější vyhodnocení)<sup>6</sup>.

Quencher	Fluorofor
BHQ-1	FAM, TET, JOE, HEX, Oregon Green <sup>®</sup>
BHQ-2	TAMRA, ROX, Cy3, Cy3,5
BHQ-3	Cy5, Cy5,5

Tab. 2: Vhodná barviva pro jednotlivé BHQ



### BBQ-650 (BlackBerry™ Quencher 650)



BBQ-650 - absorpční maximum se pohybuje okolo 650 nm (liší se podle použité oligonukleotidické sondy), vhodný pro více typů fluorescenčních barviv (TAMRA, Texas Red, Cy5) a pro oba typy zhášení<sup>7</sup>.

### Iowa Black (IB™FQ a IB™RQ)

Iowa Black™ uvedla na trh firma Integrated DNA Technologies, Inc. IB má velmi dobré vlastnosti jako DQ (stabilní při měnícím se pH nebo teplotě), zároveň hydrofóbní vlastnosti celé molekuly usnadňují o její čištění pomocí HPLC.

IB™FQ - absorpční spektrum se pohybuje mezi 420 - 620 nm,  $A_{\max} = 531$  nm.

IB™RQ - absorpční spektrum se pohybuje mezi 500 - 700 nm,  $A_{\max} = 656$  nm

## 4. Cíl práce

Prvním cílem mé práce bylo připravit nové nesymetrické AzaPc. K tomu měly být použity dva různé prekurzory, ze kterých statistickou kondenzací vznikne směs 6 různých kongenerů. Vzájemný poměr výchozích látek byl upraven na 3:1 za účelem vzniku převážně kongeneru A<sub>3</sub>B. Ten jsem následně měla z celé směsi izolovat pomocí sloupcové chromatografie. Celý proces měl být opakován ještě jednou, ovšem jeden z prekurzorů měl být zaměněn.

Výsledné produkty svou strukturou připomínají látky využívané v PDT. Pravdou je, že se tyto látky v PDT příliš neuplatnily. Jejich vlastností lze ale využít při zhášení fluorescence, proto se začaly cíleně připravovat jako DQ s určitým počtem substituentů vhodných pro navázání oligonukleotidické sondy.

Dalším úkolem mé práce bylo vysledovat kinetiku tvorby komplexů již připravených látek s molekulou pyridinu a následně získané výsledky měření vyhodnotit.

## 5. Metodická část

### 5.1. Syntéza nesymetrických ftalocyaninů (Pc)

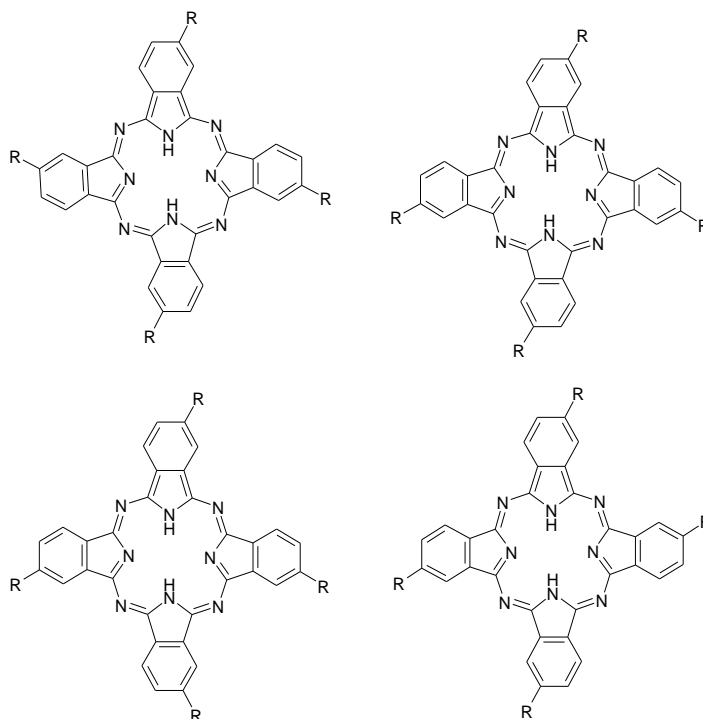
Symetrické Pc se skládají ze čtyř stejných isoindolových kruhů spojených dohromady přes atomy dusíku. V poslední době je pozornost více než na syntézu symetrických Pc zaměřena spíše na syntézu nesymetrických molekul. Důvodem je snaha o změnu fyzikálních a chemických vlastností např. rozpustnost, posun v UV-vis, a zejména možnost specificky vázat molekulu Pc na daný nosič. Známe dva základní způsoby přípravy nesymetrických Pc v závislosti na typu prekurzoru:

1. nesymetrický prekurzor
2. dva různé prekurzory

#### 5.1.1. Nesymetrický prekurzor

Pokud je prekurzorem nesymetricky substituovaný (např.: monosubstituovaný ftalonitril), získáme směs 4 různých izomerů. Jednotlivé konstituční izomery nelze až na výjimky<sup>8</sup> dost dobře charakterizovat a ani efektivně rozdělit díky jejich takřka shodným fyzikálně - chemickým vlastnostem.

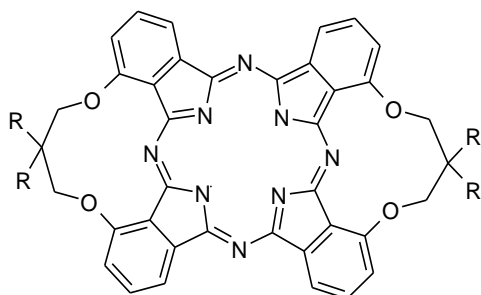
Účinnější se zdá



Obr. 2: 4 konstituční izomery

využití selektivní syntézy, která vede ke vzniku pouze jednoho ze čtyř možných izomerů.

Při statistickém přístupu ("statistical approach") lze po úpravě reakčních podmínek vyprodukovat pouze jeden z možných izomerů<sup>9</sup>. Mezi tyto úpravy zahrnujeme především snížení reakční teploty, přidání katalyzátoru (např.: alkoholát lithný), který usměrní reakci žadaným směrem, nebo přidání kovového nosiče, jako je např.:  $Zn^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ .

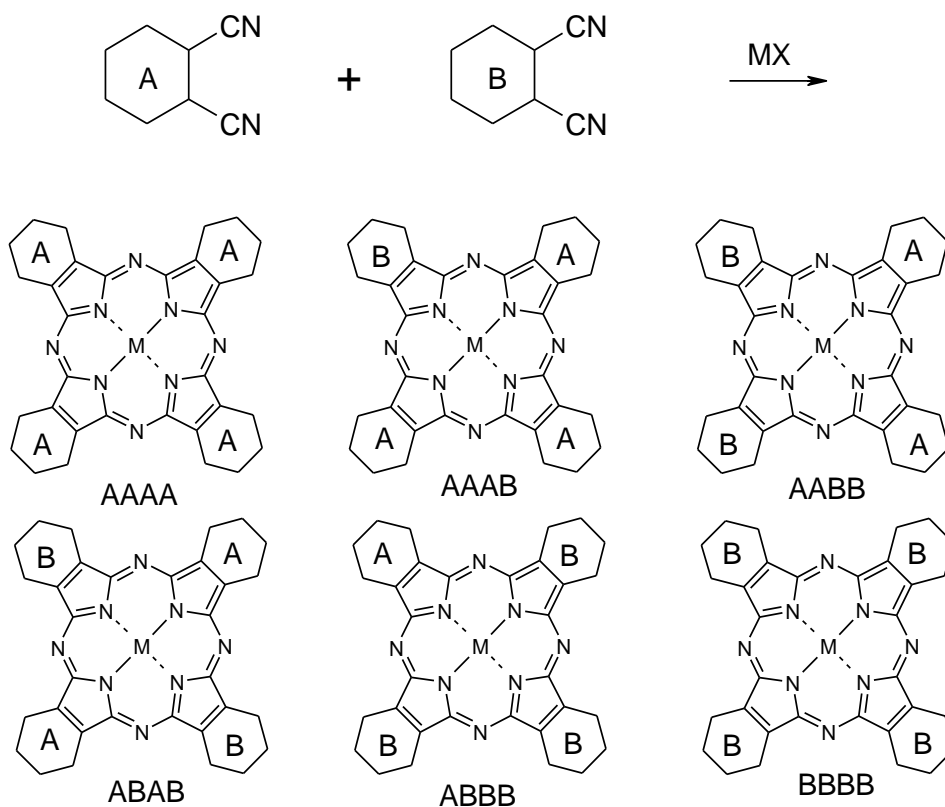


Obr. 3: Dimer složený ze 2 ftalonitrilových jednotek

Další přístup ("directed approach") spočívá v racionální konstrukci molekuly prekurzoru. Dvě molekuly ftalonitrilu jsou jednoduše spojeny vhodným spojovacím můstkem ("spacer"). Tím zaručíme syntézu pouze jednoho typu izomeru<sup>10</sup>.

### 5.1.2. Dva různé prekurzory

Základní reakcí je tzv. statistická kondenzace, kdy za přítomnosti kovu nebo silné báze (DBU) vzniká ze dvou odlišných prekurzorů šest různých molekul - "kongenerů" (AAAA, AAAB, AABB, ABAB, ABAB, BBBB)<sup>11</sup>, z toho dvě molekuly jsou symetrické (AAAA a BBBB). Odlišný typ symetrie vykazují molekuly ABAB a AABB, které představují dva různé izomery  $A_2B_2$  ftalocyaninů. Pokud jsou stejné jednotky proti sobě (ABAB), označuje se tento izomer jako "opposite" (trans izomerie), pokud spolu stejné jednotky sousedí (AABB), nazýváme tento izomer jako "adjacent" (cis izomerie). Oba mají obdobné fyzikálně-chemické vlastnosti, tudíž je jejich separace velmi komplikovaná, ne však nemožná<sup>12</sup>.

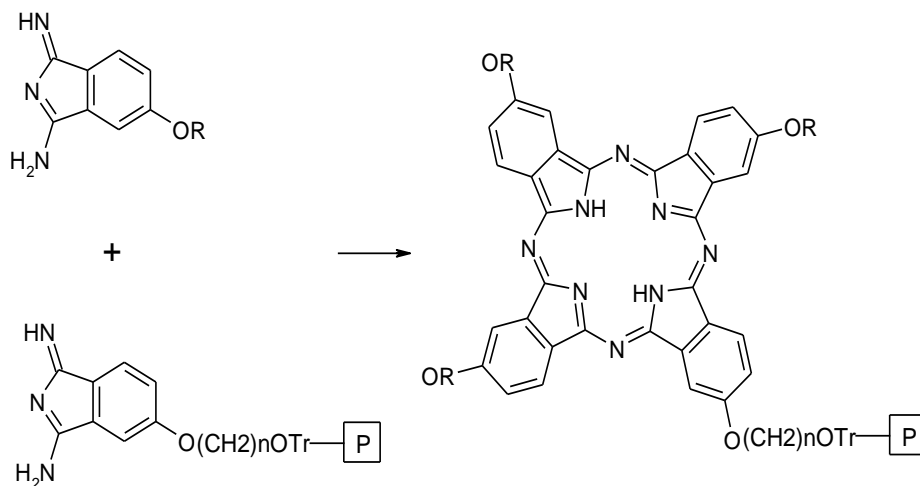


Obr. 4: 6 různých kongenerů

Většinou je vynaložena snaha o to, aby měl jeden z kongenerů ve vzniklé směsi dominantní zastoupení. a výsledná směs byla snadno dělitelná. Toho lze docílit několika způsoby:

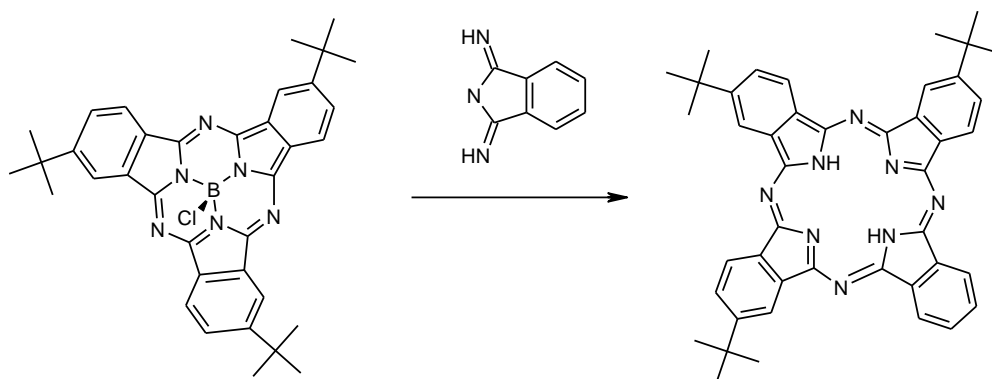
- upravením poměru výchozích látek ve prospěch jednoho prekurzoru (pokud použijeme nadbytek látky A zhruba v poměru 3:1, obvykle 44% z celkového výtěžku tvoří látka A<sub>3</sub>B). Velký nadbytek jednoho z reaktantů se používá i v případech, kdy druhý prekurzor je příliš reaktivní.
- objemný substituent na prekurzoru B (např. substituovaný fenyl) redukuje počet možných Pc a zároveň zamezuje jejich agregaci. Většinou vzniknou A<sub>4</sub>, A<sub>3</sub>B nebo ABAB, naopak A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>, AB<sub>3</sub> a B<sub>4</sub> vznikají v zanedbatelném množství, jelikož jsou stericky bráněné.

Další variantou je metoda objevena Leznoffem. Prekurzor (B) navázaný na polymer spolu s "volným" reaktantem (A) dávají vzniknout ftalocyaninu A<sub>3</sub>B vázanému na polymer<sup>13</sup>.



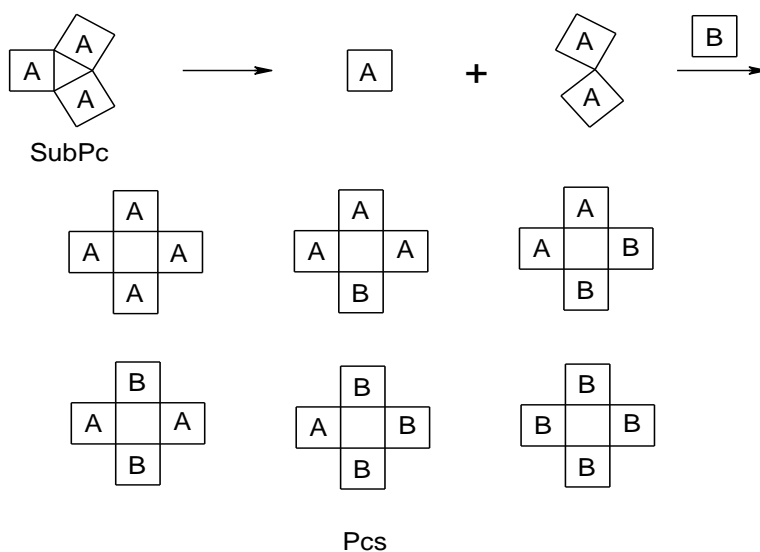
Obr. 5: Syntéza Pc vázaného na polymer

Dnes daleko více využívanou metodu objevil na konci 80. let Kobayashi<sup>14</sup>. Je založena na expanzi subftalocyaninového kruhu (subPc jsou nižší homology ftalocyaninů složené ze tří isoindolových podjednotek s borem jako centrálním atomem) při reakci se sukcinimidem nebo s diiminoisoindolinovými deriváty. Tato reakce je velmi selektivní při vzniku některých A<sub>3</sub>B ftalocyaninů a dokonce se ukázala jako účinná při vývoji doposud nepřipravitelných derivátů (subPc reagují s méně reaktivními ftalonitrilovými deriváty v přítomnosti silné báze jako je např. DBU)<sup>15</sup>. Výsledek celé reakce závisí především na reakčních podmínkách a na charakteru výchozích prekurzorů. Výhodou této metody je poměrně vysoký výtěžek, který se dá ještě zvýšit přidáním kovového kationtu, snadné čištění produktu sloupcovou chromatografií a především selektivita celé reakce.<sup>16</sup>



Obr. 6: Expanze SubPc kruhu

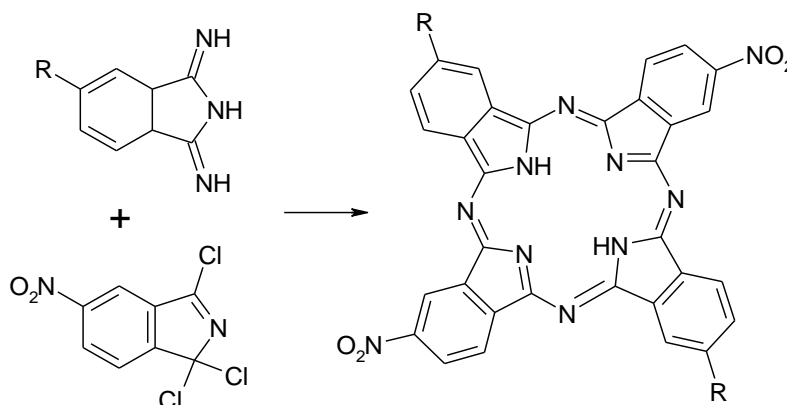
Na druhou stranu, částečnou nebo úplnou fragmentací subPc AAA můžeme dostat segmenty A nebo AA a následnou kondenzací s diiminoisoindolinovými deriváty všech 6 možných struktur Pc (obr. 20). Tudíž ani tato metoda není stoprocentně selektivní.



Obr. 7: Fragmentace SubPc kruhu

Dalším postupem použitelným k získání nesymetrických Pc je tzv. „cross coupling“ (obr. 21), což je záměrná syntéza při níž vzniká pouze produkt typu ABAB. V tomto případě se využívá reakce substituovaného 1,1,3-trichlorisoindolu s 1,3-diiminoisoindolinem<sup>9</sup>. Tato syntéza probíhá za velmi

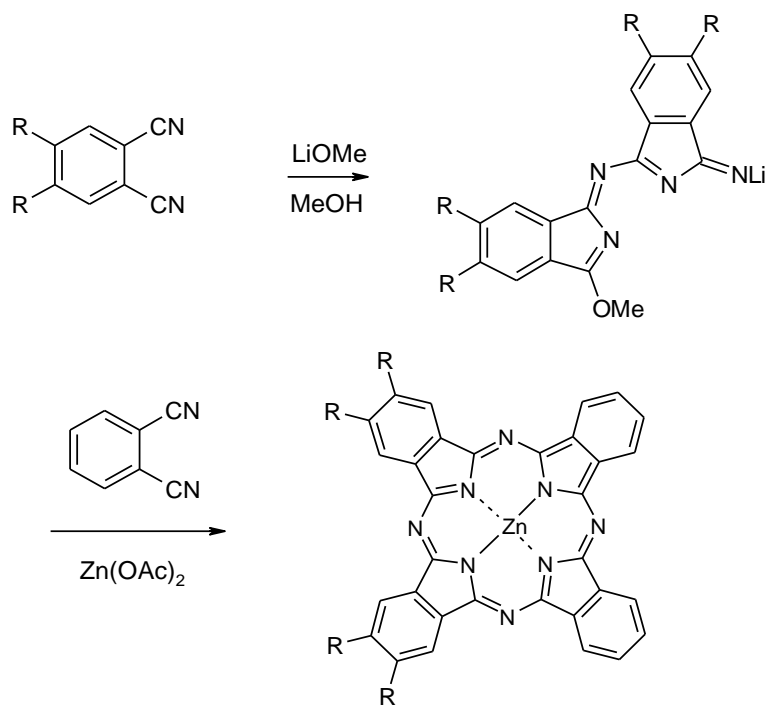
mírných podmínkách za přítomnosti báze a redukčního činidla, přičemž výtěžek bývá poměrně vysoký<sup>17</sup>.



Obr. 8: cross coupling

K získání AABB izomeru (podle Leznoffa) se používá tzv. "half-Pc intermediát" (obr. 22). Tento reaktant následně kondenzuje s "klasickým" ftalonitrilem za velmi mírných podmínek. Nevýhodou tohoto přístupu je fakt, že stabilní a izolovatelný "half-Pc intermediát" musí být substituován pouze silně elektronegativní skupinou. Další varianta jak získat pouze izomer AABB je metoda, kdy použijeme 2 stejné jednotky (např. AA) spojené "spacerem" (viz. "directed approach")<sup>15</sup>.





Obr. 9: Použití half-Pc intermediátu

## 6. Experimentální část

Teploty tání byly stanoveny na digitálním přístroji pro stanovování teplot tání ELECTROTHERMAL IA9200 a nejsou korigovány.

Průběh reakcí a čistota produktů a meziproduktů byly kontrolovány tenkovrstvou chromatografií na deskách Silikagel 60 F<sub>254</sub> (Merck,) s detekcí UV světlem vlnové délky 254 nm a 366 nm. Vyvíjecí soustavy jsou uvedeny u jednotlivých příprav.

NMR spektra byla naměřena na přístroji VARIAN MERCURY VxBB 300 na KAOCH FaF UK v Hradci Králové. Měření bylo prováděno při frekvenci 299,95 MHz (<sup>1</sup>H NMR) a 75,43 MHz (<sup>13</sup>C NMR). Posuny jsou vztaženy k vnitřnímu standardu Si (CH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>.

Spektrum ve viditelné oblasti bylo změřeno na přístroji SHIMADZU UV 240 1 PC: UV-VIS recording spectrophotometer.

Infračervená (IČ) spektra byla měřena IČ spektrofotometrem Nicolet Impact 400 v KBr peletách na KAOCH FaF UK v Hradci Králové.

Prekurzory 1, 3, 4 a azaftalocyaniny Q6 a Q3 14H2 byly připraveny již dříve na KFCHKL.

Di(*p*-methoxyfenyl)fenylmethylchlorid (DMTrCl, dimethoxytritylchlorid) byl zakoupen od firmy ChemGenes Corporation

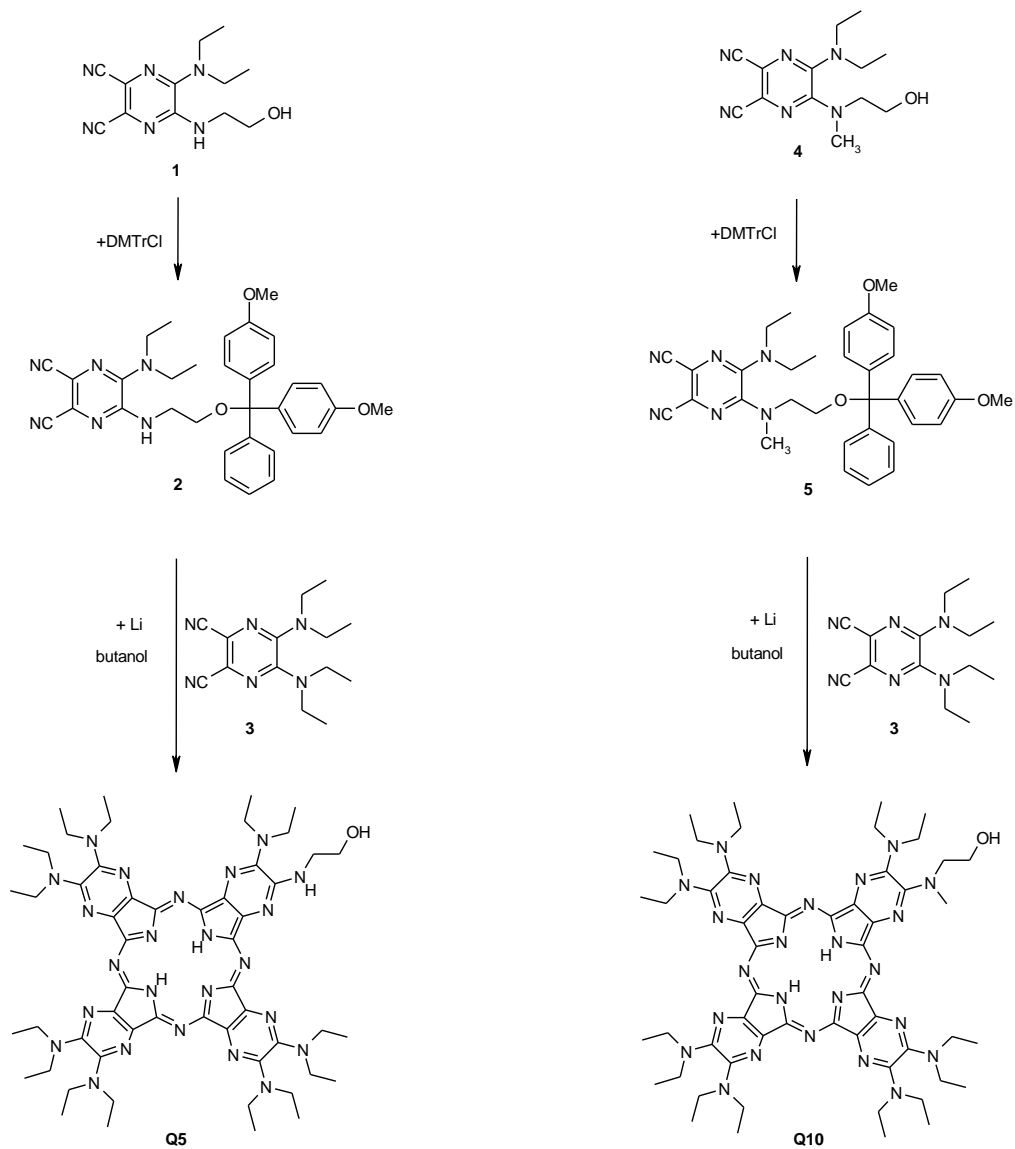
Bezvodý butanol byl sušen pomocí K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, predestilován a dosušen nad Mg. Byl skladován nad Mg a oddestilován v čase potřeby.

Pyridin p.a. používaný k tvorbě komplexů byl získán od firmy Lach-Ner.

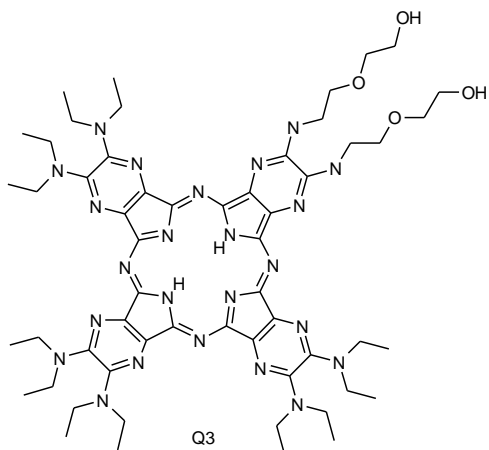
Bezvodý pyridin pro syntézu byl sušen nad KOH a následně oddestilován.

## 6.1. Schéma prováděných reakcí

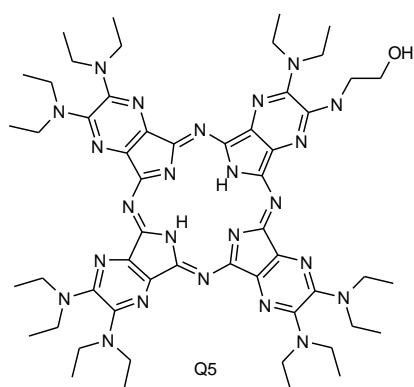
### 6.1.1. Syntetická část



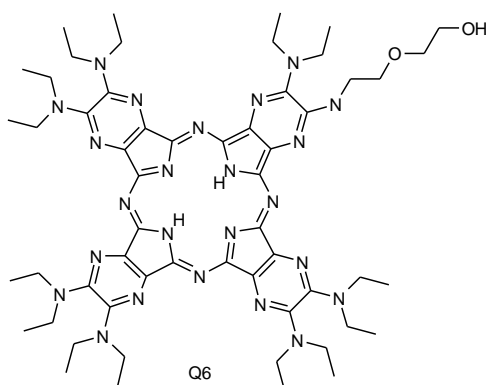
## 6.1.2. AzaPc použité při měření kinetiky tvorby komplexů



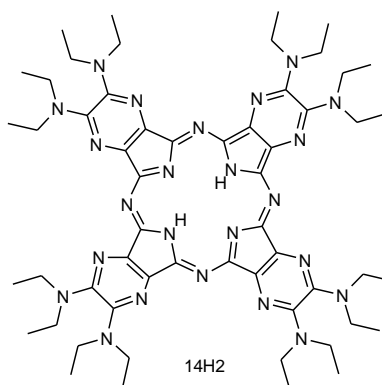
2,3-bis(2-(2-hydroxyethoxy)-ethylamino)-9,10,16,17,-  
23,24-hexakis(diethylamino)-1,4,8,11,15,18,22,25-  
(oktaaza)ftalocyanin



2-(2-(2-hydroxyethylamino)-3,9,10,16,17,23,24-  
heptakis(diethylamino)-1,4,8,11,15,18,22,25-  
(oktaaza)ftalocyanin



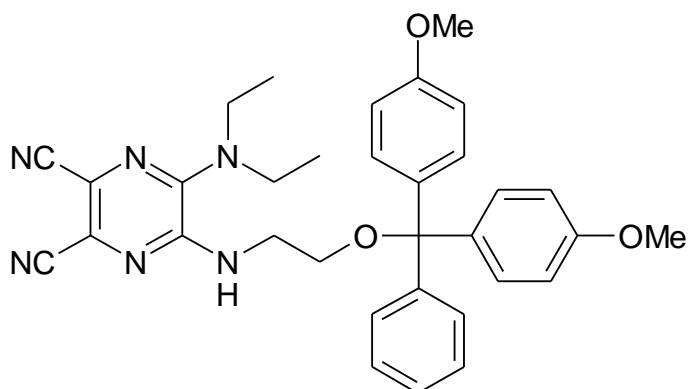
2-(2-(2-hydroxyethoxy)-ethylamino)-3,9,10,16,17,23,-  
24-heptakis(diethylamino)-1,4,8,11,15,18,22,25-  
(oktaaza)ftalocyanin



2,3,9,10,16,17,23,24-oktakis(diethylamino)-  
1,4,8,11,15,18,22,25-(oktaaza)ftalocyanin

## 6.2. Syntetická část

### 6.2.1. Příprava 5-diethylamino-6-[2-(4,4'-dimethoxytrifenylmethoxy)-ethylamino]pyrazin-2,3-dikarbonitrilu (2)



Asi 418 mg (1 mmol) 5-diethylamino-6-(2-hydroxyethylamino)pyrazin-2,3-dikarbonitrilu (**1**) jsem rozpustila v bezvodém pyridinu (10 ml). Následně jsem přidala katalytické množství 4-(dimethylamino)pyridinu (0,1 mmol; 12 mg). Spolu se 654 mg (1,2 mmol) DMTrCl jsem nechala směs míchat při pokojové teplotě přes noc. Ráno po odpaření rozpouštědla jsem produkt vyčistila pomocí sloupcové chromatografie, kdy jako mobilní fáze byla použita směs toluen/pyridin v poměru 30:1. Získala jsem 468 mg (51,8 %) látky (**2**).

T.t. = 54,8 - 58,6 °C.

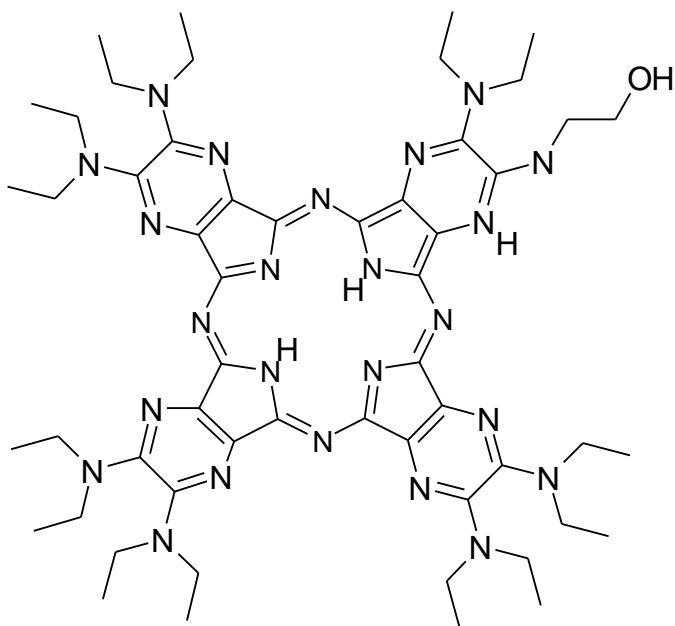
IČ (KBr)  $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) 3064; 2964; 2933; 2875; 2836; 2226; 1608; 1560; 1534; 1508; 1458; 1359; 1250; 1176; 1079; 1033.

$^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 158,55, 147,39; 147,29; 144,49; 135,51; 129,79; 129,07; 127,79; 126,92; 123,52; 118,73; 115,07; 114,83; 113,10; 86,39; 60,64; 55,19; 43,38; 41,80; 12,97.

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm) 7,39 (d; 2H;  $J=7,2$  Hz; aromH); 7,32-7,14 (m, 7H, aromH); 6,86-6,76 (m, 4H, aromH); 5,72 (t; 1H;  $J=5,2$  Hz; NH); 3,79 (s, 6H,

OCH<sub>3</sub>); 3,64 (q, 2H, *J*=5,1 Hz; NHCH<sub>2</sub>); 3,37 (t, 2H, *J*= 4,9 Hz; OCH<sub>2</sub>); 3,32 (q; 4H; NCH<sub>2</sub>); 1,13 (t; 6H; *J*=7,0 Hz; CH<sub>3</sub>).

### 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 (Q5)



Směs 393 mg (0,7 mmol) látky **2** a 571 mg (2,1 mmol) 5,6-bis(diethylamino)pyrazin-2,3-dikarbonitrilu (**3**) jsem zahřála k varu v bezvodém butanolu (10 ml), poté jsem přidala 140 mg (20 mmol) lithia. Celou směs jsem míchala 3 hodiny na olejové lázni předehřáté na 130 °C. Poté jsem oddestilovala rozpouštědlo a celou směs míchala ve zředěné kys. octové (50%, v/v) po dobu 30 minut. Sraženinu produktu jsem odfiltrovala a promyla na filtru zředěnou kys. octovou a vodou. Pak jsem produkt rozpustila v acetonu a přidala asi 0,5 ml kyseliny trifluoroctové, která měla za úkol odštěpit z molekuly případné zbytky chránící skupiny (DMTr). Rozpouštědla jsem

odpařila a pevný zbytek jsem promývala vodou, abych odstranila zbytky kyseliny trifluoroctové. Výsledná směs obsahovala 6 různých kongenerů, já jsem se soustředila na izolaci kongeneru A<sub>3</sub>B. Dělení jsem prováděla pomocí sloupcové chromatografie. Jako mobilní fáze byla použita rozpouštědla dichlormethan/acetone nejprve v poměru 10:1, poté co se eluovala frakce nejlipofilnějšího kongeneru AAAA jsem změnila poměr na 6:1. Získanou frakci A<sub>3</sub>B jsem nadále čistila na sloupci za použití mobilní fáze dichlormetan/tetrahydrofuran/lékařský benzín v poměru 3:1:1. Získala jsem 54,4 mg (7,2 %) produktu A<sub>3</sub>B.

IČ (KBr)  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>) 2967, 2931, 2871, 1640.

<sup>13</sup>C NMR (pyridin-d<sub>5</sub>)  $\delta$  (ppm) 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; 13,1.

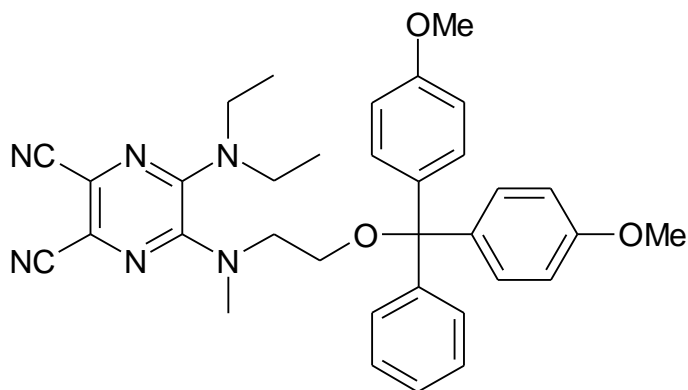
<sup>1</sup>H NMR (pyridin-d<sub>5</sub>)  $\delta$  (ppm) 13,74 (1H, br s, OH); 7,64-7,54 (1H, m, NH); 4,49-4,33 (2H, m, CH<sub>2</sub>-OH); 4,06-3,72 (26H, m, CH<sub>2</sub>-N+CH<sub>2</sub>-NH); 3,63 (4H, q,  $J$  = 6,8 Hz, CH<sub>2</sub>-N); 1,30-1,05 (42H, m, CH<sub>3</sub>).

MS (ESI)  $m/z$  1080 ([M+H]<sup>+</sup>).

UV-vis  $\lambda_{\max}$  (nm) ( $\epsilon$ ) v THF: 678 (88,300), 647 (64,800), 618sh, 592sh, 507 (56,100), 364 (104,600).

Element. analýza vypočítáno pro C<sub>54</sub>H<sub>78</sub>N<sub>24</sub>O + 3H<sub>2</sub>O: C 57,22; H 7,47; N 29,67%, nalezeno: C 57,04; H 7,53; N 29,59%.

### 6.2.3. Příprava 5-diethylamino-6-[2-(4,4'-dimethoxytrifenylmethoxy)-ethylmethylamino]pyrazin-2,3-dikarbonitrilu (6)



Asi 261 mg (1 mmol) 5-diethylamino-6-(2-hydroxyethylmethylamino)pyrazin-2,3-dikarbonitrilu (5) jsem rozpustila v bezvodém pyridinu (10 ml). Následně jsem přidala katalytické množství 4-(dimethylamino)pyridinu (0,1 mmol). Spolu se 387 mg (1,2 mmol) DMTrCl jsem nechala směs míchat při pokojové teplotě přes noc. Ráno po odpaření rozpouštědla jsem produkt vyčistila pomocí sloupcové chromatografie, kdy jako mobilní fáze byla použita směs toluen/pyridin v poměru 30:1. Získala jsem 547,2 mg (99,9 %) látky (6).

T. t. = 121,3 - 125,6 °C.

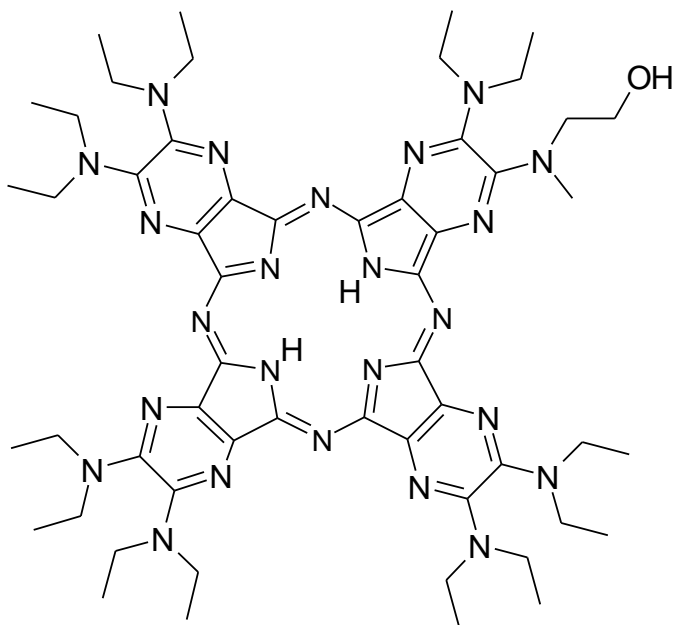
IČ (KBr) 3034; 2964; 2932; 1874; 2838; 2225; 1608; 1582; 1520; 1494; 1446; 1405; 1343; 1250; 1177; 1157; 1080; 1032.

<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>) 158,47; 147,78; 145,83; 144,08; 135,43; 129,64; 129,08; 127,80; 126,90; 120,60; 120,09; 115,09; 114,97; 113,11; 86,26; 59,41; 55,22; 50,03; 42,63; 37,04; 12,68.

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) 7,32-7,02 (m, 13H, arom H); 3,81 (s; 6H; OCH<sub>3</sub>); 3,74 (t; 2H; J=4,8 Hz; NCH<sub>2</sub>); 3,60-3,40 (m; 4H; NCH<sub>2</sub>); 3,19 (t, 2H, J= 4,9 Hz; OCH<sub>2</sub>); 2,92 (s; 3H; NCH<sub>3</sub>); 1,11 (t; 6H; J=7,0 Hz; CH<sub>3</sub>).



#### 6.2.4. Příprava 2-(2-hydroxyethylmethylamino)-3,9,10,16,17,23,24-heptakis(diethylamino)-1,4,8,11,15,18,22,25-oktaaza)ftalocyaninu (Q10)



Směs 403 mg (0,7 mmol) látky **6** a 571 mg (2,1 mmol) 5,6-bis(diethylamino)pyrazin-2,3-dikarbonitrilu **3** jsem zahřála k varu v bezvodém butanolu (10 ml), poté jsem přidala 140 mg (20 mmol) lithia. Celou směs jsem míchala 3 hodiny na olejové lázni předehřáté na 130 °C. Poté jsem oddestilovala rozpouštědlo a celou směs jsem míchala ve zředěné kys. octové (50%, v/v) po dobu 30 minut. Sraženinu produktu jsem odfiltrovala a promyla na filtru zředěnou kys. octovou a vodou. Pak jsem produkt rozpustila v acetonu a přidala asi 0,5 ml kyseliny trifluoroctové, která měla za úkol odštěpit z molekuly případné zbytky chránící skupiny (DMTr). Rozpouštědla jsem odpařila a pevný zbytek jsem promývala vodou, abych odstranila zbytky kyseliny trifluoroctové. Směs jsem rozpustila v dichlormethanu a sledovala pomocí TLC (dichlormethan/aceton 10:1 a 6:1) vzniklé produkty. Bohužel

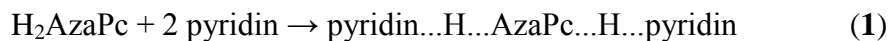
výsledný produkt nebyl příliš stabilní a s postupem času se rozkládal. Proto jsem již dále nepostupovala.

### 6.3. Kinetiky tvorby komplexu azaftalocyaninů s pyridinem

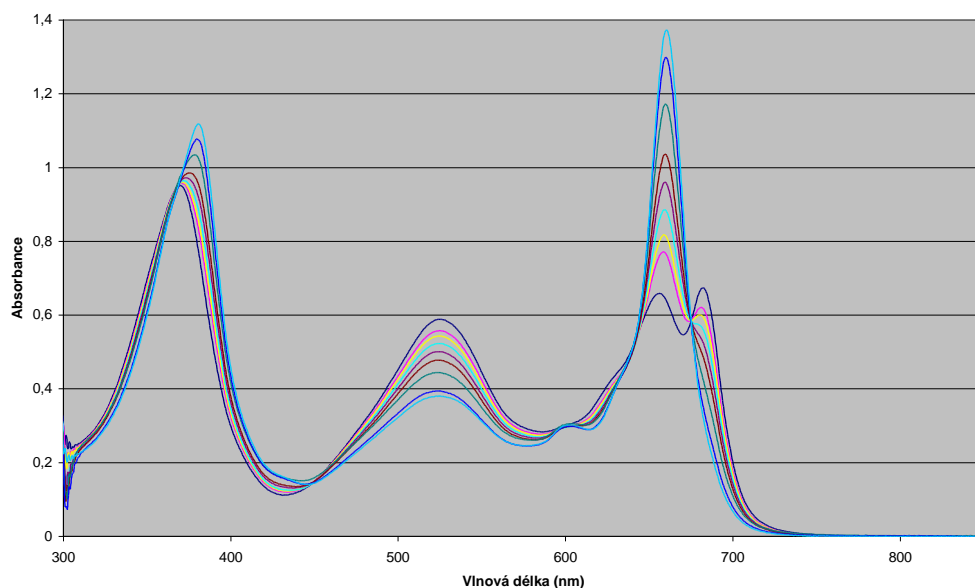
Pro toto měření jsme zvolili 3 AzaPc - **Q3**, **Q5**, **Q10**, u kterých jsme chtěli porovnat jejich schopnost tvorby komplexu s pyridinem. Nejprve bylo potřeba připravit roztok (10 mM) námi zvoleného AzaPc v pyridinu. Ihned po naředění jsem roztoky přelila do kyvety (10×10 mm) z křemenného skla, zavřela zátkou a umístila do temna, kde jsem roztoky uchovávala po celou dobu měření. Úkolem bylo měřit absorpční spektra v různých časových intervalech (0 až 24 hodin, v některých případech až 50h), přičemž první spektrum jsem změřila hned po naředění roztoku, tedy zhruba po 3 minutách od času 0.

Druhé měření jsem prováděla s látkou **14H2**. Látka **14H2** byla rozpuštěna nejprve v samotném pyridinu, pak i v pyridinu s přídavkem 1% (v/v) *n*-oktanolu nebo ethanolu. Celé měření probíhalo obdobně jako měření první.

Bezkovové AzaPc se chovají jako slabé N-kyseliny, proto v přítomnosti báze dochází k jejich deprotonaci a zároveň ke změně zbarvení. Ovšem v přítomnosti pyridinu AzaPc o své vodíky nepřijde, jen dojde k vytvoření proton-transfer komplexu, což probíhá podle následující reakce:



Tím, jak dochází k tvorbě proton-transfer komplexu, mění se postupně i měřená absorpční spektra. Za všechny je uveden příklad spektra pro látku **Q3**, změny ve tvaru spekter ostatních látek byly prakticky stejné.



Obr. 10: Změny spekter v průběhu času u látky **Q3** v pyridinu (0-24 hod).

Pyridin je v reakci ve velkém nadbytku, jeho koncentrace zůstává prakticky konstantní, a proto reakce (1) probíhá kinetikou pseudoprvního řádu:

$$A_t = A_0 + (A_{\max} - A_0)(1 - e^{-k_r t}) \quad (2),$$

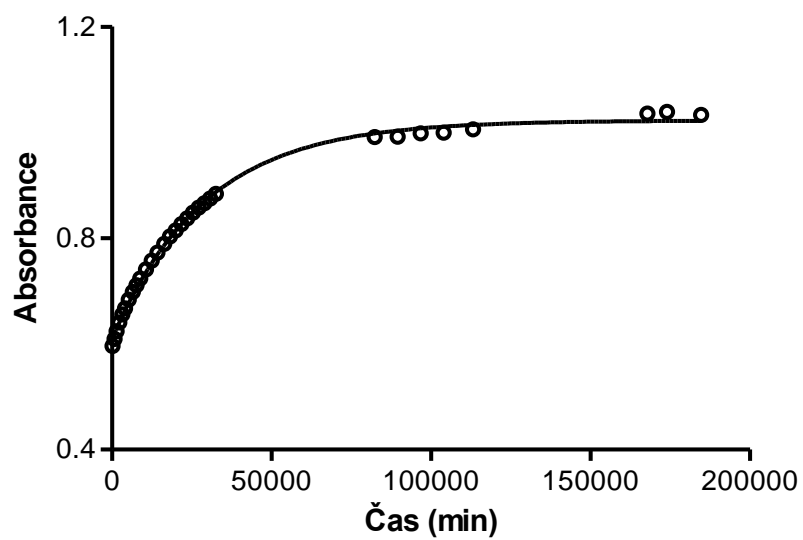
kde  $A_t$  je absorbance v čase  $t$ ,  $A_{\max}$  je absorbance po ustavení rovnováhy,  $A_0$  je absorbance v čase 0 a  $k_r$  je rychlostní konstanta. Absorbance jsou měřeny při jedné definované vlnové délce, odpovídající maximu vznikajícího komplexu.

Kinetika tvorby komplexu může být sledována jako přírůstek absorbance při vlnové délce odpovídající tvořenému komplexu (viz. Tab. 3). V tabulce jsou uvedena spektrální data v THF odpovídající nekomplexovanému AzaPc a v pyridinu po ukončení tvorby komplexu.

	$k_r$ ( $s^{-1}$ )	$\lambda_{max}$ ( $\epsilon$ ) v THF	$\lambda_{max}$ ( $\epsilon$ ) v pyridinu
Q3	$6,05 \times 10^{-5}$	675 (86,200), 644 (67,200)	661 (137,300)
Q5	$3,00 \times 10^{-5}$	678 (88,300), 647 (64,800)	662 (108,800)
Q6	$1,71 \times 10^{-4}$	678 (95,300), 647 (69,500)	662 (138,600)
<b>3</b> v pyridinu	$1,62 \times 10^{-4}$	679 (93,700), 649 (68,600)	663 (131,500)
<b>3</b> v pyridinu + n- oktanol	$1,82 \times 10^{-4}$	-	663 (150,700)
<b>3</b> v pyridinu + ethanol	$2,45 \times 10^{-4}$	-	663 (151,400)

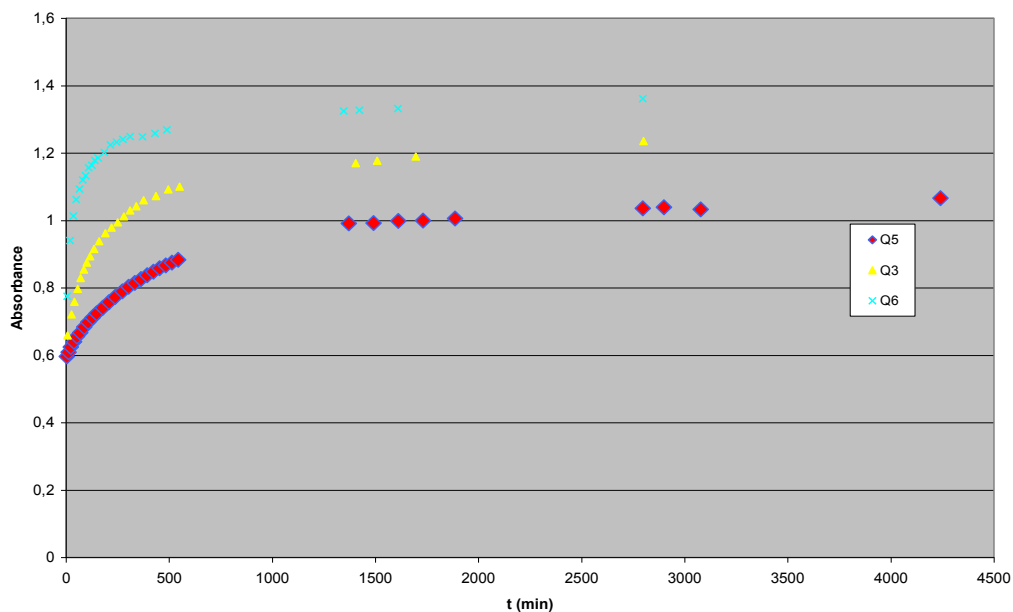
Tab. 3: Spektrální data v THF odpovídající nekomplexovanému AzaPc a v pyridinu po ukončení tvorby komplexu + rychlostní konstanty získané nelineární regresí.

Zároveň tabulka uvádí rychlostní konstanty, které jsme získali nelineární regresí. Výsledky byly získány pomocí programu GraphPad Prism 5. Příklad nelineární regrese uvádí obr. 11.

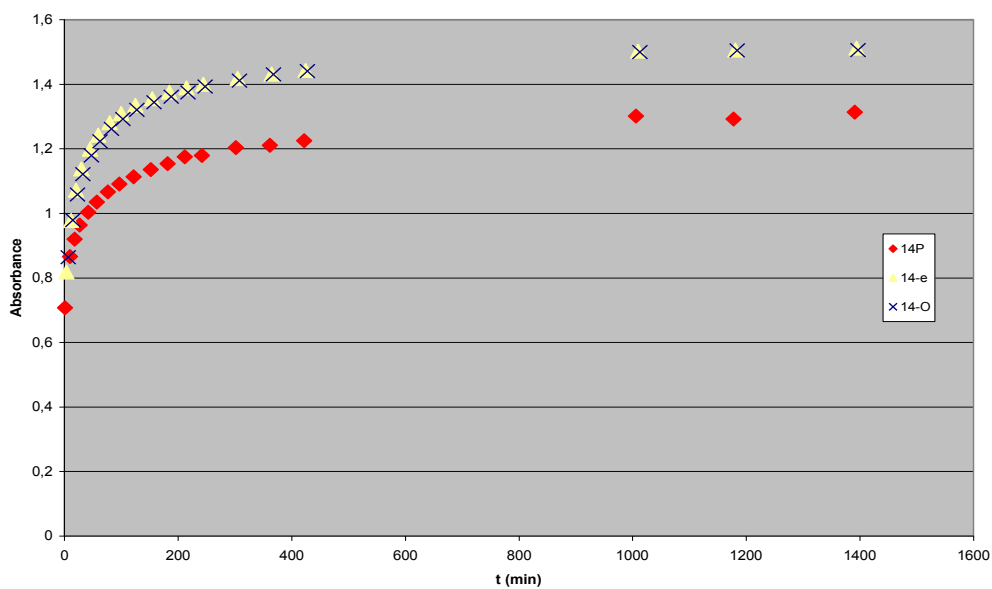


*Obr. 11* : Příklad výsledků nelineární regrese. Plná čára – odpovídá výsledné rovnici po nelineární regresi,  $\circ$  odpovídá naměřeným hodnotám. Sledována je změna absorbance při vlnové délce maxima vznikajícího komplexu.

Závislosti absorbance v maximu tvořeného komplexu na čase (kinetika reakce) jsou znázorněny na následujících obrázcích.



Obr. 12: Kinetika tvorby proton-transfer komplexu u látek Q3, Q5, Q6.



Obr. 13: Kinetika tvorby proton-transfer komplexu látky 14H2 v pyridinu, v pyridinu s přídavkem 1% (v/v) *n*-oktanolu a ethanolu.

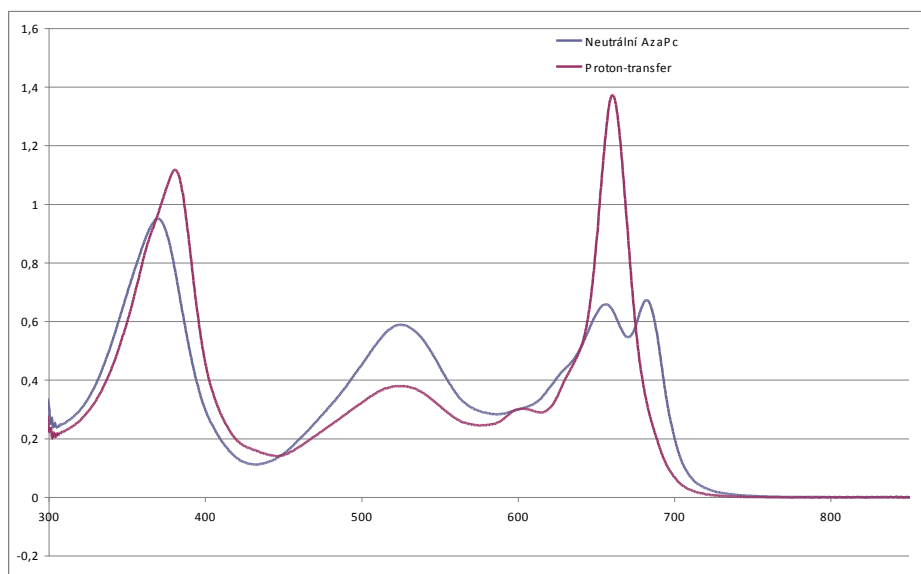
## 7. Diskuse

V první části mé práce jsem se pokusila o syntézu nových nesymetrických AzaPc, u kterých by se na základě jejich struktury dalo předpokládat jejich využití při zhášení fluorescence. Vzhledem k předchozím zkušenostem jsem nejprve krátký postranní řetězec s hydroxylem chránila pomocí tritylové skupiny, abych tím zabránila častému vzniku vedlejších rozkladných produktů. V jednom z dalších kroků syntézy jsem trityl v kyselém prostředí poměrně snadno odstranila. Ukázalo se však, že použití této chránicí skupiny nemělo podstatný význam a k rozkladům přesto docházelo. Mechanismus rozkladu je tedy pravděpodobně jiný než jsme původně předpokládali a nesouvisí s přítomností hydroxylové skupiny.

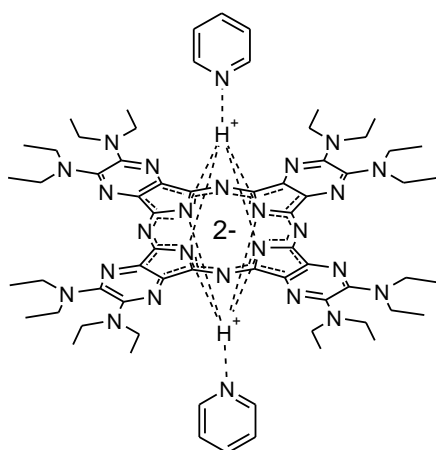
Syntézou jsem získala dva nové AzaPc - **Q5** a **Q10**. Látku **Q5** se následně podařilo charakterizovat pomocí IČ, NMR a MS, posléze byla využita v druhé části mé práce. Látka **Q10** se ukázala jako nepříliš stabilní, docházelo k rozkladům, proto nebyla ani charakterizována.

V druhé části práce jsem sledovala kinetiku tvorby komplexu AzaPc s pyridinem. Centrální vodík AzaPc jsou mírně kyselé, proto v přítomnosti báze dochází k deprotonaci a tím i změně symetrie celé molekuly. To se projeví i změnou výsledného spektra. Podobná změna nastává i v přítomnosti pyridinu (viz obr.14), kdy ale nedochází k deprotonaci, ale k tvorbě proton-transfer komplexu mezi AzaPc a dvěma molekulami pyridinu, jak je znázorněno na obr. 15.





Obr.14: Porovnání absorpční křivky neutr. AzaPc a AzaPc v komplexu s pyridinem.



Obr. 15: Komplex AzaPc s pyridinem.

Tvorba komplexu neprobíhá vždy stejnou rychlostí, proto bylo mým úkolem zjistit, do jaké míry dokáže hydroxylová skupina na periferii ovlivnit rychlostní konstantu reakce. K měření jsem použila 3 různé AzaPc a sledovala,

jak se v závislosti na čase mění spektra jednotlivých komplexů. Toto měření vliv OH skupiny na změnu rychlostní konstanty neprokázalo.

Dále jsem vybraný AzaPc rozpustila v odlišném prostředí - v pyridinu, v pyridinu s přídavkem 1% *n*-oktanolu a v pyridinu s přídavkem 1% ethanolu. Bylo zjištěno, že ani přidání alkoholu do pyridinu nemá prokazatelný vliv na změnu rychlostní konstanty.

## 8. Závěr

V rámci své rigorózní práce jsem připravila tyto prekurzory AzaPc:

5-diethylamino-6-[2-(4,4' dimethoxytrifenyloxy)-ethylamino]pyrazin-2,3-dikarbonitril (**2**)

5-diethylamino-6-[2-(4,4' dimethoxytrifenyloxy)-ethylmethylamino]pyrazin-2,3-dikarbonitril (**6**)

Obě tyto látky byly charakterizovány pomocí teploty tání, NMR a IČ spekter.

Cyklizací těchto prekurzorů jsme připravila tyto nesymetrické AzaPc:

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

2-(2-hydroxyethylmethylamino)-3,9,10,16,17,23,24-heptakis(diethylamino)-1,4,8,11,15,18,22,25-oktaaza)ftalocyanin (**Q10**)

Látka **Q5** byla charakterizována pomocí NMR, IČ spekter, MS. Látka **Q10** nebyla příliš stabilní proto jsem v její separaci ani charakterizaci nepokračovala.

Z výsledků druhé části práce je patrné, že rychlost tvorby komplexu AzaPc s pyridinem neovlivňuje ani hydroxylová skupina na periférii, ani přidání dvou různých alkoholů do pyridinu.

## **9. Přílohy**

Na konci práce přikládám článek, ve kterém jsou mimo jiné publikovány výsledky této rigorózní práce.

## 10. Summary

### **Synthesis of unsymmetrical derivatives of azaphthalocyanines and their complex formation with pyridine**

Mgr. Jana Žižková

*Department of Pharmaceutical Chemistry and Drug Control  
Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Charles University in Prague*

I prepared the mixture of six possible products (AAAA, AAAB, ABAB, AABB, ABBB, BBBB) using a statistical condensation starting from two different precursors - 5,6-bis(diethylamino)pyrazine-2,3-dicarbonitrile (A) and 5-diethylamino-6-[2-(4,4'-dimethoxytrifenyloxy)-ethylamino]pyrazine-2,3-dicarbonitrile (B). Only compound of AAAB type was isolated by column chromatography from the mixture, purified and was characterized by NMR, IR, MS, UV-VIS spectroscopy.

The precursor (B) was changed - 5-diethylamino-6-[2-(4,4'-dimethoxytrifenyloxy)-ethylmethylamino]pyrazine-2,3-dicarbonitrile - and the statistical condensation was done the same way. Unfortunately the desired AAAB product was unstable and therefore the work was finished.

In another part of this work I have studied a formation of proton-transfer complex with two molecules of pyridine. Three different AzaPc with hydroxy groups on periphery were used in this study. The influence of hydroxy groups on the rate constant was not confirmed. Then I used only one AzaPc - 2,3,9,10,16,17,23,24-oktakis(diethylamino)-1,4,8,11,15,18,22,25-(oktaaza)phthalocyanine - but different medium (pyridine with 1% of ethanol or *n*-octan-1-ol). The influence of different medium on the rate constant was not confirmed.

## 11. Souhrn

### Syntéza asymetrických derivátů azaftalocyaninů a tvorba jejich komplexů s pyridinem

Mgr. Jana Žižková

*Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv*

*Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova v Praze*

Statistickou kondenzací ze dvou různých prekurzorů - 5,6-bis(diethylamino)pyrazin-2,3-dikarbonitrilu (A) a 5-diethylamino-6-[2-(4,4'-dimethoxytrifenyloxy)-ethylamino]pyrazin-2,3-dikarbonitrilu (B) - jsem připravila směs šesti různých kongenerů (AAAA, AAAB, ABAB, AABB, ABBB, BBBB). Ze směsi byla separována pomocí sloupcové chromatografie pouze látka AAAB, která byla následně charakterizována za použití NMR, IČ, MS a UV-vis spekter.

Poté jsem zaměnila prekurzor (B) za 5-diethylamino-6-[2-(4,4'-dimethoxytrifenyloxy)-ethylmethylamino]pyrazin-2,3-dikarbonitril a statistickou kondenzací provedla stejným způsobem. Bohužel výsledný produkt AAAB nebyl příliš stabilní, proto jsem dále nepokračovala.

V další části této práce jsem sledovala tvorbu proton-transfer komplexu AzaPc s dvěma molekulami pyridinu. K měření jsem použila 3 různé AzaPc s hydroxylovými skupinami na periferii. Toto měření vliv OH skupiny na změnu rychlostní konstanty neprokázalo. Dále jsem vybraný AzaPc - 2,3,9,10,16,17,23,24-oktakis(diethylamino)-1,4,8,11,15,18,22,25-(oktaaza)ftalocyanin - rozpustila v odlišném prostředí (pyridin s přídavkem 1% ethanolu a *n*-oktan-1-olu). Bylo zjištěno, že ani přidání alkoholu do pyridinu nemá prokazatelný vliv na změnu rychlostní konstanty.

- 
- <sup>1</sup> Johansson, M. K., Cook, R., M., (2003): *Chem. Eur. J.* **9**, 3466-3471.
- <sup>2</sup> Behlke, M., Huang, L., Bogh, L., Rose, S., Devor, E., J. [online](2008)[cit. 2008-07-28]: [http://eu.idtdna.com/Support/Technical/TechnicalBulletinPDF/Fluorescence\\_and\\_Fluorescence\\_Applications.pdf](http://eu.idtdna.com/Support/Technical/TechnicalBulletinPDF/Fluorescence_and_Fluorescence_Applications.pdf)
- <sup>3</sup> Takakusa, H., Kikuchi, K., Urano, Y., Kojima, H., Nagano, T. (2003): *Chem. Eur. J.*, **9**, 1479-85.
- <sup>4</sup> Marras, S. A. E., Kramer, F. R., Tyagi, S. (2002): *Nucleic Acids Res.* **30**, e122.
- <sup>5</sup> Molecular Probes, Inc. [online](2008)[cit. 2008-01-29] Dostupné z: <http://www.probes.com>.
- <sup>6</sup> Biosearch Technologies, Inc. [online](2008)[cit. 2008-01-29] Dostupné z: <http://www.biosearchtech.com>.
- <sup>7</sup> Berry&Associates [online](2007)[cit. 2007-12-30]. Dostupné z: <http://www.berryassoc.com/blackberry.asp>
- <sup>8</sup> Hanack, M., Schmid, G., Sommerauer, M. (1993) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **32**, 1422-1424.
- <sup>9</sup> Leznoff, C. C., Hu, M., Nolan, K. J. M., (1996) *Chem. Commun.*, 1245-1246.
- <sup>10</sup> Kobayashi, N., Kobayashi, Y., Osa, T. (1993) *J. Am. Chem. Soc.* **115**, 10994-10995.
- <sup>11</sup> Maizlish, V. E., Kulinich, V. P., Shaposhnikov, G. P. (2004) *Russ. J. Gen. Chem.* **74**, 1801-1817.
- <sup>12</sup> Zimčík, P., Miletín, M., Musil, Z., Kopecky, K., Kubza, L., Brault, D. (2006) *J. Photobiol. Photochem. A. Chem.* **183**, 59-69.
- <sup>13</sup> Leznoff, C. C., Hall, T. W. (1982) *Tetrahedron Lett.* **23**, 3023-3026.
- <sup>14</sup> Kobayashi, N., Kondo, R. Nakajima, S.-I., Osa, T. (1990) *J. Am. Chem. Soc.* **112**, 9640-9641.
- <sup>15</sup> Torre, G. de la, Claessens, Ch. G., Torres, T. (2000) *Eur. J. Org. Chem.* **16**, 2821-2831.
- <sup>16</sup> Torres, T. (2000) *J. Porphyrines Phtalocyanines* **4**, 325-330.
- <sup>17</sup> Dabak, S., Bekaroglu, O. (1997) *New J. Chem.* **21**, 267-271.