

UNIVERZITA KARLOVA

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy



Vliv periferní substituce u aminoazaftalocyaninů na tvorbu J-dimerů

Rigorózní práce



Mgr. Radek Machan

Vedoucí rigorózní práce:

prof. PharmDr. Petr Zimčík, Ph.D.

Hradec Králové 2022

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracoval samostatně (pod vedením svého školitele a konzultanta). Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpal, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Děčíně, srpen 2022

.....
Mgr. Radek Machan

Úvodem této práce bych rád poděkoval vedoucímu výzkumné skupiny *Azaphthalocyanine group* a školiteli prof. PharmDr. Petru Zimčíkovi, Ph.D. za pomoc při vypracování a korekturu této rigorózní práce. Nemalý dík také náleží PharmDr. Jiřímu Demuthovi, Ph.D., který mi byl velmi nápomocen během laboratorní činnosti, a i následně při vypracování samotné práce. V neposlední řadě bych rád poděkoval celé *Azaphthalocyanine group* za vřelé přijetí v laboratoři.

ABSTRAKT

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra: Katedra farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy

Kandidát: Mgr. Radek Machan

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

Rigorózní práce: Vliv periferní substituce u aminoazaftalocyaninů na tvorbu J-dimerů

Azaftalocyaniny (AzaPcs) jsou podskupinou sloučenin z rodiny ftalocyaninů, což jsou syntetické planární makromolekuly odvozené od přírodních porfyrinů. AzaPcs jsou dusíkaté analogy ftalocyaninů, kdy v molekule dochází k izosterní záměně benzenového jádra za dusíkatá heterocyklická jádra (pyrazin, pyridin či pyridazin). AzaPcs mají díky svému rozsáhlému systému konjugovaných dvojných vazeb zajímavé fotofyzikální vlastnosti, pro které jsou využívány např. jako průmyslová barviva, fotosenzitizéry používané ve fotodynamické terapii, fluorescenční senzory, zhášedce fluorescence aj. Oktakis(dialkylamino) substituované tetrapyrazinoporfyraziny (TPyzPzs), jenž patří do rodiny AzaPcs, lze použít jako účinné zhášedce fluorescence díky jejich relaxaci z excitovaného stavu pomocí intramolekulárního přenosu náboje (ICT – intramolecular charge transfer), což vede k nulové produkci vlastní fluorescence. Tato práce se zabývá přípravou a následným studiem vlastností symetrických TPyzPzs. Především je studována schopnost TPyzPzs tvořit agregáty typu J-dimerů, kdy tento typ agregace není typický pro sloučeniny z rodiny ftalocyaninů, ale může pozitivně ovlivnit fotofyzikální vlastnosti makrocyclů. Vznik J-dimerů je zapříčiněn koordinací periferních aminoskupin na centrální zinečnatý kationt druhé molekuly a síla této interakce je velmi ovlivněna objemností použité periferní substituce, která byla studována v této práci.

ABSTRACT

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Kralove

Department: Department of Pharmaceutical Chemistry and Pharmaceutical Analysis

Author: Mgr. Radek Machan

Supervisor: prof. PharmDr. Petr Zimčik, Ph.D.

Rigorosum thesis: Aminoazaphthalocyanine peripheral substitution effect on J-dimer formation

Azaphthalocyanines (AzaPcs) are classified as subgroup of phthalocyanine family, which are planar synthetic macromolecules derived from naturally occurring porphyrins. AzaPcs are aza-analogues of phthalocyanines, where benzenes are isosterically replaced by nitrogen heterocycles (pyrazine, pyridine or pyridazine). Due to the extensive system of conjugated double bonds, AzaPcs exhibit interesting photophysical properties, for which they are commonly used as industrial dyes, photosensitisers in photodynamic therapy, fluorescent sensors, fluorescence quenchers etc. Octakis(dialkylamino) substituted tetrapyrazinoporphyrazines (TPyzPzs), which belong to the AzaPcs family, can be used as effective fluorescence quenchers due to their ability to relax from excited state by intramolecular charge transfer (ICT) that leads to zero intrinsic fluorescence. This thesis deals with the preparation and subsequent study of the properties of symmetric TPyzPzs. Above all, the ability of TPyzPzs to form aggregates of the J-dimer type is studied. Although this type of aggregation is not typical for compounds from the phthalocyanine family, it can positively affect the photophysical properties of macrocycles. The formation of J-dimers is caused by the coordination of peripheral amino groups to the central zinc cation of the second molecule. The strength of this interaction is greatly influenced by the size and bulkiness of the used peripheral substitution which was the scope of this work.

Obsah

1	Seznam použitých zkratk	13
2	Cíl práce	14
3	Teoretická část	15
3.1	Struktura ftalocyaninů a azaftalocyaninů	15
3.2	Vlastnosti ftalocyaninů a azaftalocyaninů	16
3.2.1	Fotofyzikální a fotochemické vlastnosti	18
3.2.2	Fluorescence a její zhášení	21
3.2.3	ICT a PET	21
3.3	Využití ftalocyaninů a azaftalocyaninů	22
3.3.1	Průmyslové využití	22
3.3.2	Fotodynamická terapie	23
3.3.3	Zhášeče fluorescence	25
4	Metodická část	27
4.1	Syntéza prekurzorů	27
4.2	Cyklotetramerizační reakce	27
5	Experimentální část	28
5.1	Syntéza prekurzorů	29
5.1.1	Příprava 5,6-bis(dimethylamino)pyrazin-2,3-dikarbonitrilu (1)	29
5.1.2	Příprava 5,6-bis(dibutylamino)pyrazin-2,3-dikarbonitrilu (2)	30
5.1.3	Příprava 5,6-dimorfolinopyrazin-2,3-dikarbonitrilu (3)	30
5.2	Cyklotetramerizace a chelatační reakce	31
5.2.1	Příprava 2,3,9,10,16,17,23,24-oktakis(dimethylamino)-1,4,8,11,15,18,22,25-oktaazaftalocyaninu (1H2)	31
5.2.2	Příprava zinečnatého komplexu 2,3,9,10,16,17,23,24-oktakis(dimethylamino)-1,4,8,11,15,18,22,25-oktaazaftalocyaninu (1Zn)	32
5.2.3	Příprava 2,3,9,10,16,17,23,24-oktakis(dibutylamino)-1,4,8,11,15,18,22,25-oktaazaftalocyaninu (2H2)	33

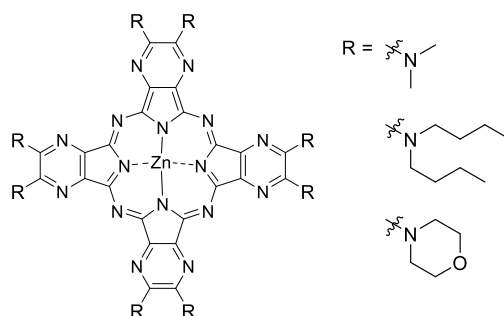
5.2.4	Příprava zinečnatého komplexu 2,3,9,10,16,17,23,24-oktakis (dibutylamino)-1,4,8,11,15,18,22,25-oktaazaftalocyaninu (2Zn)	34
5.2.5	Příprava 2,3,9,10,16,17,23,24-oktakis(morfolino)-1,4,8,11,15,18, 22,25-oktaazaftalocyaninu (3H2).....	35
5.2.6	Příprava zinečnatého komplexu 2,3,9,10,16,17,23,24-oktakis (morfolino)-1,4,8,11,15,18,22,25-oktaazaftalocyaninu (3Zn).....	36
5.3	Stanovení fotofyzikálních parametrů	36
5.3.1	Kvantový výtěžek produkce singletového kyslíku (Φ_{Δ}).....	36
5.3.2	Kvantový výtěžek fluorescence (Φ_F)	38
5.4	Studium agregace makrocyclů	39
5.4.1	Stanovení rovnovážné konstanty monomerizace pyridinem (K_P)..	39
5.4.2	Stanovení dimerizační konstanty (K_D).....	39
6	Výsledky a diskuze	41
6.1	Syntéza	41
6.2	Stanovení fotofyzikálních parametrů	42
6.3	Hodnocení tvorby <i>J</i> -dimerů	44
7	Závěr	48
8	Seznam použité literatury	49

1 Seznam použitých zkratek

AzaPc	azaftalocyanin (z angl. Azaphthalocyanine)
CuPc	měďnatý ftalocyanin
DCM	dichlormethan
DMF	dimethylformamid
DPBF	1,3-difenylisobenzofuran
HOMO	nejvyšší obsazený molekulový orbital (z angl. Highest Occupied Molecular Orbital)
HpD	hematoporfyrinový derivát
ICT	intamolekulární přenos náboje (z angl. Intramolecular charge transfer)
LUMO	nejnižší neobsazený molekulový orbital (z angl. Lowest Unoccupied Molecular Orbital)
MeOH	methanol
ODN	oligodeoxyribonukleotid
Pc	ftalocyanin (z angl. Phthalocyanine)
PDT	fotodynamická terapie (z angl. Photodynamic therapy)
PET	světlem vyvolaný přenos elektronu (z angl. Photo-induced electron transfer)
PS	fotosenzitizér (z angl. Photosensitizer)
RET	rezonanční přenos energie (z angl. Resonance Energy Transfer)
THF	tetrahydrofuran
TLC	tenkovrstvá chromatografie (z angl. Thin Layer Chromatography)
TPyzPz	tetrapyrazinoporfyrin (z angl. Tetrapyrazino-porphyrine)

2 Cíl práce

Cílem této rigorózní práce bylo studium vlivu objemnosti periferní substituce u oktakis(dialkylamino) substituovaných tetrapyrazinoporfyrazinů (TPyzPzs). První část práce zahrnovala syntézu vhodně 5,6-disubstituovaných pyrazin-2,3-diakarbonitrilů pomocí aromatické nukleofilní substituce a jejich následnou cyklotetramerizaci do finálních makrocyclů obsahujících zinečnatý kationt ve svém centru (Obr. 1). Druhá část práce se zabývala studiem fotofyzikálních vlastností TPyzPzs, jako jsou absorpce, emise a kvantové výtěžky singletového kyslíku a fluorescence. Poslední část práce studovala pomocí titrací koordinačním rozpouštědlem v toluenu stabilitu *J*-dimerů připravených TPyzPzs.

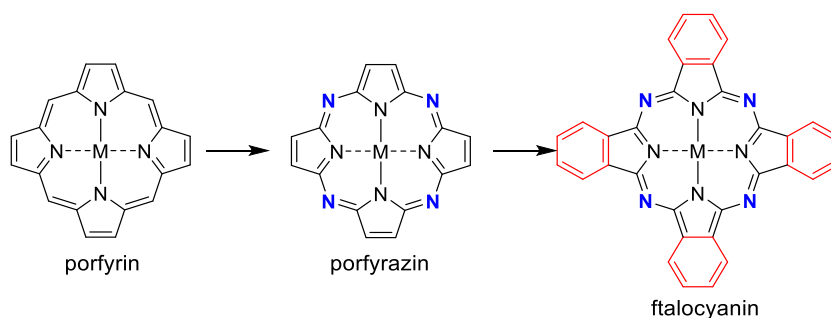


Obr. 1 Struktury cílových TPyzPzs.

3 Teoretická část

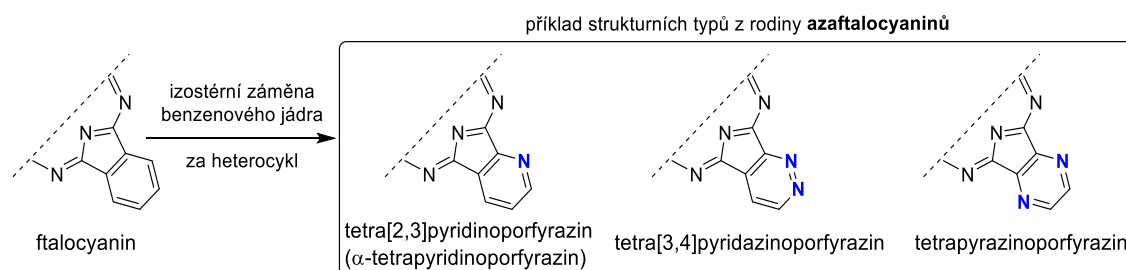
3.1 Struktura ftalocyaninů a azaftalocyaninů

Termín ftalocyanin (Pc, z angl. phthalocyanine) poprvé použil britský vědec Reginald P. Linstead (1902-1966), který se podílel v roce 1934 na objasnění struktury těchto molekul a odhalil strukturální podobnost centrálního prstence Pc s přírodními porfyriny.¹ Zájem o tyto molekuly však začal růst až během 60. let minulého století a následně v 90. letech, kde se dá mluvit o rozmachu zkoumání možností syntéz a vlastností Pc.² Ftalocyaniny lze definovat jako makrocyclické sloučeniny syntetického původu analogické přírodnímu porfyriu, od nichž jsou následně odvozené dusíkaté analogy tzv. azaftalocyaniny (AzaPcs) (Obr. 2).



Obr. 2 Obecná struktura ftalocyaninů.

Aza-analogy Pcs obsahují namísto benzenových jader v planárním makrocyklu dusíkaté heterocykly, čímž lze následně rozlišit několik druhů AzaPcs (např. tetra[2,3]pyridoporfyriziny, tetra[3,4]pyridazinoporfyriziny, tetrapyrazinoporfyriziny).^{3, 4} Jak lze z názvů usoudit, v jednotlivých strukturách je benzenové jádro isoindolové jednotky nahrazeno pyridinem, pyridazinem nebo pyrazinem (Obr. 3).

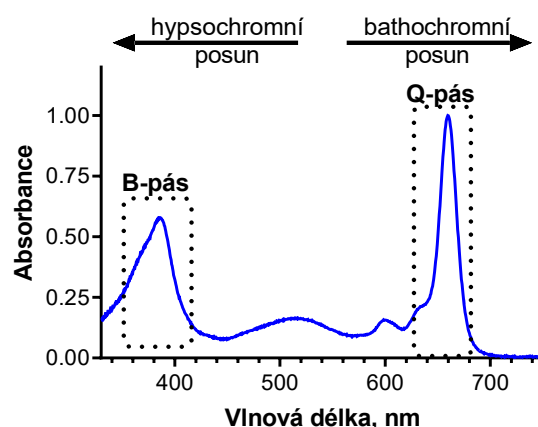


Obr. 3 Struktura aza-analogů ftalocyaninů.

Oba typy struktur (jak Pcs tak AzaPcs) vykazují díky svému systému konjugovaných vazeb intenzivní zbarvení, které se pohybuje od zelené přes modrou až po fialovou (v závislosti na jejich absorpčním pásu světelného spektra).²

3.2 Vlastnosti ftalocyaninů a azaftalocyaninů

Pcs a AzaPcs mají schopnost velmi dobře absorbovat světlo díky rozsáhlému systému konjugovaných dvojných vazeb ve své planární makrocyclické struktuře, a proto nabývají různých odstínů. Pro Pcs/AzaPcs jsou specifické dva absorpční pásy – vysokoenergetický B-pás (v oblasti kolem 360 nm) a nízkoenergetický Q-pás (v oblasti přesahující 600 nm), přičemž Q-pás je charakteristický pro každou molekulu Pc/AzaPc (Obr. 4). Jeho poloha a tvar bývají ovlivněny strukturou makrocyccklu, chováním látky v pevné fázi a v roztoku, interakcí s jinými molekulami, agregací a případně protonizací části molekuly.²



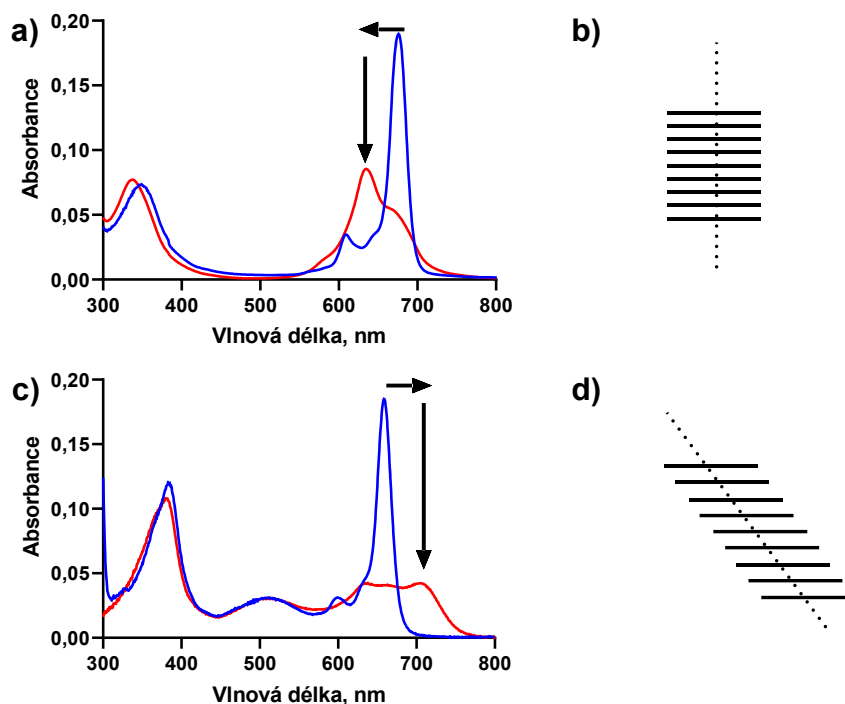
Obr. 4 Absorpční spektrum AzaPc.

Důležitou vlastností vzhledem k využití v praxi je rozpustnost, protože nesubstituované Pcs mají nízkou rozpustnost v běžně používaných rozpouštědlech.⁵ Jednou z možností pro zvýšení rozpustnosti je zavedení objemných periferních substituentů na makrocyccklus, což má i pozitivní vliv na agregaci, která je typickým jevem pro tuto skupinu sloučenin.⁶ V případě, že je pro využití Pcs/AzaPcs nutná rozpustnost ve vodě, tak se nabízí možnost zavedení různých nabitých funkčních skupin na makrocyccklus (např. karboxylátových, sulfonátových či kvarterních amoniových skupin).⁷

Dalším znakem typickým pro Pcs/AzaPcs je možnost chelatace kationtů kovů do centra molekuly, čímž tyto struktury nabývají specifických vlastností. Podle typu kationtu dochází k posunu Q-pásu v absorpčních spektrech, ovlivnění tvorby singletového kyslíku a emisi fotonů formou fluorescence (tyto jevy se týkají především komplexů zinečnatých, hořečnatých či hlinitých). V souvislosti s typem koordinačně vázaného kationtu můžeme pozorovat tzv. efekt těžkého atomu – se zvyšující se atomovou hmotností centrálního atomu dochází k upřednostnění produkce singletového kyslíku oproti vyzáření fotonu.⁸ V neposlední řadě molekula může získat oxidoredukční vlastnosti (železnaté, kobaltnaté či měďnaté komplexy).⁹

Vlastnosti molekul Pcs/AzaPcs lze dále ovlivnit periferní substitucí, přičemž zde hraje největší roli poloha substituentu (periferní a neperiferní) a typ heteroatomu, přes který jsou jednotlivé substituenty vázané k makrocyklu. U alkyloxy skupin je vyšší prevalence relaxace pomocí fluorescence, alkylsulfanyl upřednostňuje produkci singletového kyslíku. Oproti tomu alkylamino substituenty mají nízkou produkci singletového kyslíku i fluorescence.⁴

Vzhledem k planárnímu uspořádání molekul Pcs a AzaPcs dochází k π - π interakci a tvorbě agregátů.⁶ Lze rozlišovat dva typy agregace na základě orientace dipólů – H-typ a J-typ. H-typ agregátů má uspořádání monomerů tzv. „k tváři tvář“ (face-to-face), tzn. osa procházející centrálním kationtem/ centrem molekuly je kolmá k rovině makrocyklu (Obr. 5a,b); tento typ agregace je častější. U J-typu agregace jsou monomery vůči sobě v poloze tzv. „bok po boku“ (side-by-side) a osa protínající centrální kationty kovů není kolmá k rovině makrocyklu (Obr. 5c,d).^{10, 11}



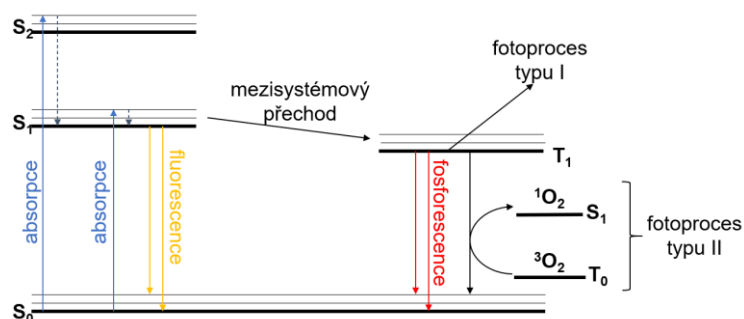
Obr. 5 Typy agregace u AzaPcs, kdy **modře** je znázorněno spektrum monomerní sloučeniny a **červeně** spektrum agregované. **a)** příklad H-typu agregace, kdy je vidět pokles a hypsochromní posun Q-pásu **b)** zjednodušené znázornění H-agregátů – tučně AzaPc makrocykly a tečkovaně osa protínající kationty kovů; **c)** příklad J-typu agregace, kdy je vidět pokles a bathochromní posun Q-pásu; **d)** zjednodušené znázornění J-agregátů – tučně AzaPc makrocykly a tečkovaně osa protínající kationty kovů.

Agregace jako taková je ve většině aplikací nežádoucí jev, jelikož negativně ovlivňuje rozpustnost, fotofyzikální a fotochemické vlastnosti molekuly (případně může ztížit proces čištění při syntéze).^{12, 13} Míru agregace lze ovlivnit zavedením objemného substituentu na periferii molekuly, čímž dochází k sterickému bránění přiblížení druhého monomeru.¹² Dalším řešením může být navázání substituentu nesoucího náboj, kdy působením elektrostatických odpuzivých sil dochází k snížení tvorby agregátů. Vliv na rozsah agregace má také použité rozpouštědlo, koncentrace sloučeniny v roztoku nebo typ centrálního atomu. Pokud má rozpouštědlo schopnost koordinovat samo sebe na centrální kationt kovu, tak je tato koordinace upřednostněna před vznikem agregátu.^{12, 13}

3.2.1 Fotofyzikální a fotochemické vlastnosti

Mezi nejdůležitější vlastnosti Pcs/AzaPcs, z nichž i plyne potenciální využití, patří fluorescence a produkce singletového kyslíku. Díky systému konjugovaných dvojných vazeb mají tyto molekuly schopnost absorbovat světlo o určitých vlnových délkách, čímž získávají charakteristické zbarvení. Děje, které následují

po přijetí světelné energie, názorně ukazuje zjednodušený **Jablonského diagram** (Obr. 6). Takto přijatá energie uvádí molekulu do excitovaného stavu (S_1). Z tohoto stavu se může molekula navrátit do základního stavu několika způsoby. K uvolnění energie může dojít pomocí vyzáření fotonu – fluorescencí. Dále můžou proběhnout tzv. nezářivé procesy (uvolnění energie převážně tepelnou formou) anebo se molekula může pomocí mezisystémového přechodu dostat do tripletového stavu T_1 . Z tripletového stavu molekula relaxuje pomocí uvolnění fotonu formou fosforescence, fotoprocesem typu I nebo fotoprocesem typu II. Z hlediska využití je důležitý proces fluorescence a po přechodu do tripletového stavu fotoproces typu II, ve kterém molekula v tripletovém stavu předává svou energii kyslíku, který se mění v reaktivní singletový kyslík, který hraje roli při fotodynamické terapii. Důležitým typem nezářivého procesu je intramolekulární přenos náboje (ICT, z angl. Intramolecular Charge Transfer). Díky tomuto efektu lze tetrapyrazinoporfyraziny (TPyzPzs, z angl. tetrapyrazinoporphyrazines) uplatnit v rámci molekulárních senzorů. ICT, v případě že v molekule probíhá, je kompetitivní s ostatními výše uvedenými ději a vzhledem ke své rychlosti převládá.²



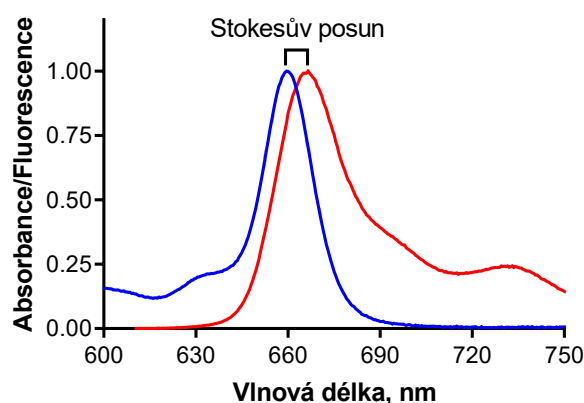
Obr. 6 Zjednodušený Jablonského diagram. Převzato z literatury a upraveno.¹⁴

Fluorescence se řadí mezi druh luminiscence; jedná se o jev, kdy po excitaci elektronu dochází při návratu do základního stavu k uvolnění přebytečné energie formou fotonu (tento děj trvá řádově ns). Látky schopné tohoto děje se nazývají fluorofory, často se jedná o aromatické molekuly.¹⁴ Míru fluorescence lze charakterizovat tzv. kvantovým výtěžkem fluorescence (Φ_F , Rovnice 1), který je definován jako poměr množství emitovaných fotonů k počtu absorbovaných fotonů a určuje pravděpodobnost fluorescence jako varianty relaxačního procesu.²

$$\Phi_F = \frac{\text{počet emitovaných fotonů}}{\text{počet absorbovaných fotonů}}$$

Rovnice 1: Kvantový výtěžek fluorescence

Fluorescenci lze dále charakterizovat intenzitou, spektrálním složením, polarizací, dobou dohasínání a koherenčními vlastnostmi. Emisní spektrum je zrcadlovým obrazem spektra absorpčního, což popisuje Franc-Condonovo pravidlo, a je vůči němu bathochromně posunuto z důvodu částečné ztráty energie před emisí fotonu.¹⁴ Tato vlastnost se nazývá Stokesův posun a lze ji použít přibližnému určení polohy emisního maxima nově zkoumané látky (Obr. 7). Stokesův posun je u Pcs většinou v řádu jednotek nanometrů, ale u J-dimerů TPyzPzs nabývá hodnot až okolo 50 nm, což je unikátní jev.



Obr. 7 Ukázka Stokesova posunu mezi **absorpčním** a **emisním** spektrem.

Singletový kyslík (1O_2) lze definovat jako vysoce reaktivní formu kyslíku, která vzniká pomocí fotosenzitizérů (např. Pcs a AzaPcs) a je využívána ve fotodynamické terapii (PDT, z angl. Photodynamic therapy). Ke vzniku této formy kyslíku dochází při absorpci světla molekulou Pc/AzaPc, kdy po excitaci molekuly do stavu S_1 následuje transformace do tripletového stavu T_1 . Molekula v tomto stavu může podléhat tzv. fotoreakci typu II, při níž makrocyclus předá svou energii molekulárnímu (tripletovému) kyslíku (3O_2), čímž dojde k jeho přeměně na singletový kyslík. Jak je zmíněno výše, jedná se o reaktivní částici a společně s dalšími reaktivními formami kyslíku, které vznikly ve fotoreakci typu I, se podílí na buněčné smrti oxidativním stresem (fotoreakce I a II jsou kompetitivní procesy, převaha jednoho z nich se odvíjí od vlastností použité látky).¹⁵ Podobně jako byla charakterizována fluorescence, je i singletový kyslík definován

kvantovým výtěžkem (Φ_{Δ} , Rovnice 2). Ten je vyjádřen jako poměr počtu vzniklých molekul singletového kyslíku vůči množství absorbovaných fotonů.²

$$\Phi_{\Delta} = \frac{\text{počet vzniklých molekul singletového kyslíku}}{\text{počet absorbovaných fotonů}}$$

Rovnice 2: Kvantový výtěžek singletového kyslíku

3.2.2 Fluorescence a její zhášení

Zhášení fluorescence je typické pro TPyzPzs, které obsahují na periferii alkylamino či dialkylamino substituenty.^{2, 16} Zhášení lze dělit dle mechanismů na statické zhášení, kolizní zhášení a rezonanční přenos energie (RET, z angl. Resonance energy transfer).

Statické zhášení probíhá tvorbou komplexu (tzv. heterodimeru) mezi donorem (excitovaná látka) a akceptorem (zhášeč), kdy po absorpci světla se takto vytvořený komplex vrací do základního stavu bez emise fotonu. U kolizního zhášení dochází k předání elektronu excitovaného donoru z nejnižšího neobsazeného molekulového orbitalu (LUMO) zhášeči. Ten obratem předá elektron z nejvyššího obsazeného molekulového orbitalu (HOMO) zpět donoru, tudíž zhášeč zůstává v excitovaném stavu. RET je charakterizována přenosem energie na malou vzdálenost. Po absorpci světla dochází mezi donorem a akceptorem k nezářivé interakci dipól-dipól, kdy akceptor následně může tuto přijatou energii vyzářit v podobě emise fotonu či jiným způsobem (např. teplem). Podmínkou RET je částečný překryv emisního spektra donoru (látky excitované) a absorpčního spektra akceptoru (zhášeče).¹⁴

3.2.3 ICT a PET

Intramolekulární přenos náboje (ICT) a světlem vyvolaný přenos energie (PET) patří mezi mechanismy, které se podílí na zhášení fluorescence fluoroforů.

ICT lze definovat jako proces, při kterém dochází k přesunu náboje z elektronově bohatého donoru na elektronově chudý akceptor v rámci jedné molekuly (donor a akceptor musí být spolu v konjugaci).¹⁷ U TPyzPzs s *N,N*-dialkylamino periferní substitucí se jako donor chová periferní atom dusíku, neboť jeho volný elektronový pár může být po excitaci přemístěn na elektron deficientní makrocyclické jádro, které slouží jako akceptor. Vlivem přerozdělení elektronů

se molekula rychle vrací do základního stavu, ICT tedy svým mechanismem umožňuje zhášení (jakožto jeden z kompetitivních procesů).^{2, 17}

ICT proces lze ovlivňovat na molekule několika způsoby a tím selektivně zapínat/vypínat fluorescenci. Prvním z nich je blokace donorové skupiny. Jako příklad lze uvést protonizaci *N,N*-dialkylamino skupiny, čímž dojde k zablokování volného elektronového páru na dusíku a tím k znemožnění ICT, což se projeví nárůstem intenzity fluorescence (tento jev můžeme považovat jako důkaz podílení se elektronového páru dusíku na ICT).¹⁶ Na základě tohoto efektu lze molekulu popsat dvěma stavy – tzv. ON (ICT je blokováno) a OFF (ICT probíhá).¹⁸ Další metodou ovlivnění ICT je polarita použitého rozpouštědla – obecně lze říci, že se zvyšující se polaritou dochází k usnadnění ICT. V neposlední řadě je míra ICT ovlivněna počtem donorových center (nicméně již jeden donor dokáže efektivně vyvolat ICT a zhášet molekulu), s přidáním dalších substituentů typu donorů následně dochází ke snižování výtěžků fluorescence a singletového kyslíku.¹⁶ Při přítomnosti více než 5 donorů je molekula již neovlivnitelná vůči změnám vnějšího prostředí. Tudíž se nachází v permanentním OFF stavu a kvantové výtěžky fluorescence a singletového kyslíku se blíží nule, čehož lze s výhodou využít při vývoji zhášečů pro DNA sondy.^{2, 19}

U fotoindukovaného přenosu elektronu (PET, z angl. Photo-induced electron transfer) vzniká při přenosu elektronu z donoru na akceptor tzv. „charge separated state“, kdy tyto dva účastníci přenosu nejsou vzájemně v konjugaci. V tomto stavu je přítomen radikálový kationt donoru a radikálový aniont akceptoru, přičemž návrat do základního stavu je doprovázen nikoli emisí fotonu, ale uvolněním v podobě tepla.¹⁴ Následně se takto předaný elektron vrací zpět k donoru. Obdobně jako je tomu v případě ICT, i PET je ovlivnitelný pomocí substituentů na periférii a protonací donorů.²⁰

3.3 Využití ftalocyaninů a azaftalocyaninů

3.3.1 Průmyslové využití

Jedno z primárních využití Pcs a AzaPcs je jako barviva (celosvětová produkce Pcs činí 80 tisíc tun, z čeho naprostá většina se využívá právě jako barviva modrá

či zelená). Tyto barvy mají uplatnění v tiskařském průmyslu (zhruba 40 %), dále jako laky a barvy (cca 30 %), na barvení plastů je použito zhruba 20 % produkce a zbytek se aplikuje při finálních barevných úpravách v různých odvětvích.²¹

Pro tyto účely bývá nejčastěji používán měďnatý Pc (CuPc). Ten je na průmyslové úrovni připravován pomocí syntézy, kdy dochází k cyklotetramerizaci derivátů ftalové kyseliny, močoviny, měďnatých solí a katalyzátoru. Tato reakce probíhá v pecích s výtěžkem 90 % při 150-300 °C, případně ve vroucím rozpouštědle (teplota je při této variantě 200 °C). Nicméně při této formě přípravy zůstává obsaženo ve finálním produktu stále vysoké procento nečistost, proto je CuPc používán pro optické, elektronické a fotoelektronické součástky připravován cyklotetramerizací ftalonitrilu jakožto výchozí suroviny. Nesubstituovaný CuPc má modrou barvu, pro docílení jiných odstínů a intenzit lze tento makrocyclus modifikovat, kdy například přidáním halogenů jako substituentů dochází k posunu barevného spektra z modré do zelené.²¹

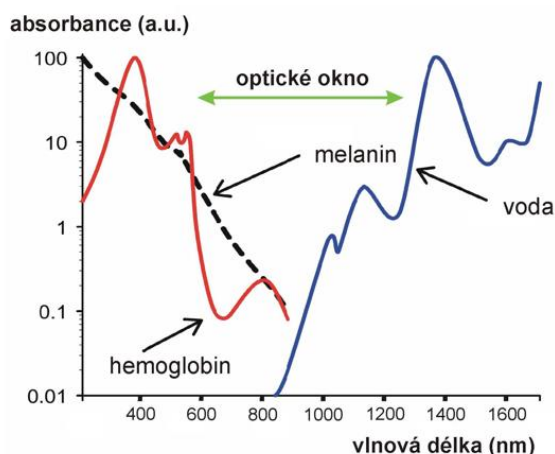
Využitelnost v rámci elektroniky a fotoelektroniky je dána semikonduktivními a fotokonduktivními vlastnostmi Pcs. CD disky obsahující Pcs pomáhají vytvořit jamky na povrchu disku, které umožňují zápis v binárním kódu a následné čtení pomocí laseru. Své uplatnění nachází Pcs i v oblasti technologií tisku – zde se primárně uplatňuje Y-modifikace titaničitěho ftalocyaninu v roli fotokonduktoru. Výhodou je zde nízká cena, vysoká fotostabilita, fotokonduktivita a absorpce ve vyšších vlnových délkách viditelného světla.²¹

3.3.2 Fotodynamická terapie

Fotodynamickou terapii lze charakterizovat jako léčebnou metodu, kde je pro cílený efekt aplikováno světlo za přítomnosti fotosenzitizéru (PS). První zmínky o využití světla lze najít již ve starověkém Egyptě. Přesto počátek PDT je datován až do roku 1903, kdy von Tappeiner and Jesionek použili eosin a světlo k léčbě kožního nádoru. Další rozmach této metody lze zaznamenat studii R. L. Lipsona a S. Schwartze v 60. letech 20. století, kdy k detekci nádorového onemocnění použili hematoporfyrinový derivát (HpD; známý později jako Photofrin®).^{22, 23} Po shromáždění dostatek informací o terapii tumorů HpD-PDT bylo zjištěno několik nevýhod této metody – dlouhodobá citlivost kůže

na sluneční záření, ne zcela dokonalá selektivita a velice nízká maximální vlnová délka potřebná pro aktivaci. Z tohoto hlediska byla snaha objevit a syntetizovat nové molekuly, které by alespoň částečně tyto nedostatky eliminovaly. PSs lze obecně dělit na dva typy – porfyrinové a neporfyrinové, přičemž první skupinu lze dále členit na tři generace. Ve třetí generaci, ve které kromě postupné snahy eliminovat výše uvedené nedostatky předchozích generací, je snaha na PSs vázat specifické částice (protilátky, lipozomy), které mají za účel selektivnější kumulaci v kýžené lokaci a tím cílenost terapie. Vývoj neporfyrinových PSs oproti porfyrinovým je méně výrazný, v popředí jsou kationické PS (methylenová či toluidinová modř), jejichž cílem jsou většinou mitochondriální struktury.^{24, 25}

Mimo porfyrinů lze mezi látky vhodné pro PDT řadit molekuly, jejichž společným znakem je silná absorpce v červené až infračervené části spektra – tzv. optické okno, kde je lidská tkáň nejvíce propustná pro světlo (Obr. 8). Řadí se sem sloučeniny ze skupiny chlorinů, bakteriochlorinů, ftalocyaninů a fenothiazinů.²⁶



Obr. 8 Optické okno biologických tkání, kde by měly absorbovat PS's.

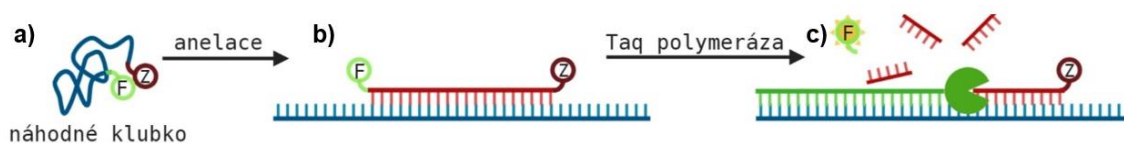
PDT tedy využívá kombinace 3 samostatně netoxických komponentů – světla, kyslíku a fotosenzitizéru. Po dopravení a kumulaci PS do cílové tkáně (týká se především nádorových buněk) je na danou oblast aplikováno světlo vhodné vlnové délky, čímž dochází k excitaci PS a z tohoto stavu může molekula přejít do tripletového stavu. Jak bylo již zmiňováno dříve, z tohoto tripletového stavu se může látka navrátit do základního stavu několika způsoby, přičemž pro PDT je v tento moment důležitý mechanismus zahrnující přenos energie na molekulu kyslíku, tím dojde k uvolnění jeho reaktivní formy (tzv. singletového kyslíku), což je hlavní účinná složka tohoto druhu léčby. Tato forma kyslíku napadá a

poškozuje buněčné struktury, což vede ke smrti buňky a kaskádovitě tak až k likvidaci nádorového útvaru.²⁷

3.3.3 Zhášecí fluorescence

Zhášení fluorescence se uplatňuje v oligodeoxynukleotidových (ODN) sondách. Jedním typem ODN sond jsou dvojitě značené sondy, které jsou tvořeny ODN vláknem s navázaným fluoroforem a zhášecím. ODN sondy nalézají uplatnění v mnoha analytických metodách v oblasti biochemie, biologie, genetické analýzy či analytické chemie.^{28, 29}

Velmi častou metodou využívající ODN sondy je polymerázová řetězová reakce (PCR, z angl. Polymerase chain reaction), u které dochází k multiplikaci původního řetězce DNA působením DNA polymerázy. Během PCR, dvojitě značená ODN sonda nasedá na komplementární vlákno DNA (Obr. 9b) a během jeho zdvojování je sonda rozštěpána na malé fragmenty exonukleázovou aktivitou DNA polymerázy, což vede k nárůstu fluorescence (c). Při zkoumání dějů, které ovlivňují ODN sonda během těchto analýz, lze pozorovat interakci dvou sloučenin – fluoroforu (tzv. reportéru) a zhášecí. Při dostatečném přiblížení nebo po vytvoření heterodimeru (fluorofor-zhášeč, Obr. 9a) dokáže zhášecí snížit intenzitu fluorescence fluoroforu, nicméně zhášecí dříve vykazovali jistou míru vlastní fluorescence, což vedlo ke snižování poměru signálu k šumu. Dnes existují nové typy zhášecí, tzv. dark quenchers (temné zhášecí), které nejsou schopny vlastní fluorescence – tím dochází ke zvýšení citlivosti některých testů (např. hybridizačních), neboť se snižuje fluorescence pozadí.^{29, 30}



Obr. 9 Schématické znázornění principu dvojitě značené sondy– fluorofor (F), zhášecí (Z), DNA polymeráza (zelená kruhová výseč).

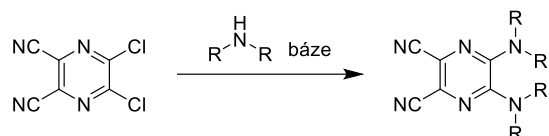
Běžně používané zhášecí vycházejí pouze z několika typů struktur a často jsou vhodné pouze pro omezené množství fluoroforů (vzhledem k překryvu absorpčních a emisních spekter – týká se především RET zhášení).¹⁹ Z tohoto důvodu je poptávka po nových, účinných a univerzálních zhášecích.

Tuto roli by potencionálně mohly zastoupit temné zhášeeče ze skupiny dialkylamino substituovaných AzaPcs, které mají téměř nulovou vlastní fluorescenci díky vysoce rychlému ICT; nehledě na jejich panchromatickou absorpci (250-750 nm). Při návrhu zhášeečů z rodiny TPyzPzs je nezbytné se držet několika pravidel. Jelikož se jedná o planární molekulu podléhající agregaci (čímž dochází k ovlivnění fotofyzikálních a fotochemických vlastností, případně také rozpustnosti, zhoršení izolace a čištění), je třeba zvolit vhodnou periferní substituci, která bude stericky objemná, a tudíž bude snižovat míru agregace. Pro umožnění ICT by tyto periferní substituenty měly být připojeny k makrocycly skrze dusík (oktakis(dialkylamin) deriváty). Stejně jako je snaha eliminovat fluorescenci z důvodu interference se sondou, je potřeba také ovlivnit výtěžek singletového kyslíku, který může poškozovat ODN část sondy. Jako centrální atom jsou zpravidla voleny zinečnaté kationty – tvoří velice stabilní komplex s AzaPc, díky čemuž zabraňují nežádoucí chelataci kationtů kovů během ODN syntézy.³⁰ Poslední zde zmíněnou podmínkou pro AzaPc zhášeeč je přítomnost vhodných funkčních skupin, které zajistí možnost propojení AzaPc molekuly s ODN řetězcem. Jednou možností je přítomnost pouze azidové funkce, která slouží pro azido-alkynovou Huisgenovu cykloadici v rámci tzv. „click“ chemie (vhodná pro selektivitu a vysoké výtěžky) na dibenzo[b,f]azacyklooktyn.³¹ Druhou možností je přítomnost dvou funkčních skupin – hydroxy a azido skupiny, kdy azidová funkce slouží pro připojení AzaPc zhášeeče k pevné fázi, na které standardně probíhá syntéza ODN řetězce. Hydroxy skupina slouží připojení AzaPc zhášeeče k ODN řetězci klasickou fosforamidovou syntézou.²⁹

4 Metodická část

4.1 Syntéza prekurzorů

Syntéza substituovaných pyrazindikarbonitrilů může probíhat dvěma způsoby – diaminomaleonitrilovou syntézou, kdy reaguje substituovaný diketon s diaminomaleonitrilem za vzniku příslušně substituovaného pyrazindikarbonitrilu. Druhou metodou přípravy, která i byla využívána v rámci této rigorózní práce, je využití komerčně dostupného 5,6-dichlorpyrazin-2,3-dikarbonitrilu, který podléhá aromatické nukleofilní substituci za vzniku příslušně substituovaného pyrazindikarbonitrilu (Obr. 10). Vlivem záporného mezomerního efektu karbonitrilových skupin a záporných indukčních efektů pyrazinového dusíku a chloru jsou atomy uhlíku v polohách 5 a 6 elektron deficientní, a proto je u této sloučeniny aromatická nukleofilní substituce velice usnadněna. Substituce probíhá za přítomnosti báze, kterou může být přebytek dialkylaminu v případě syntézy 5,6-dialkylaminopyrazin-2,3-dikarbonitrilů nebo lze použít jinou organickou bázi (pyridin, trimethylamin) či anorganickou bázi (uhlíčitan draselný, hydroxid sodný).²

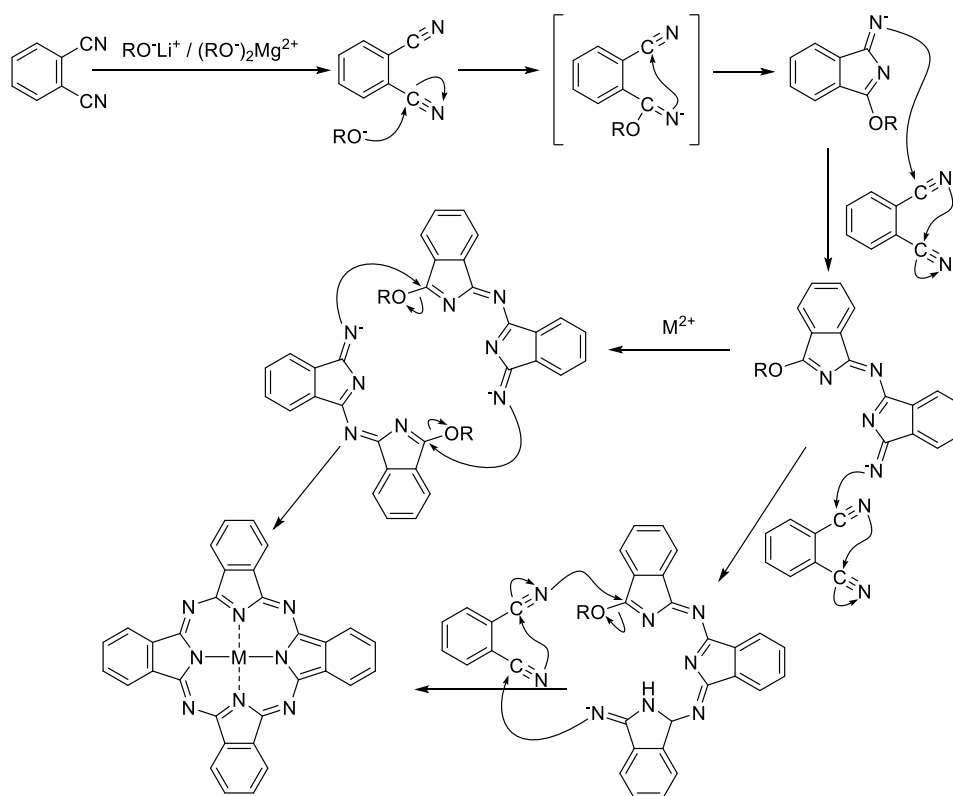


Obr. 10 Obecné schéma přípravy prekurzorů.

4.2 Cyklotetramerizační reakce

Výslednou molekulu AzaPc získáme pomocí cyklotetramerizace 4 molekul pyrazin-2,3-dikarbonitrilu. Tento krok lze provést dvěma základními způsoby. První metoda využívá tzv. templátového efektu kationtu kovu, kdy zahříváním prekurzoru ve vysoko vroucím rozpouštědle (dimethylformamid – DMF, chinolin) dochází ke spontánnímu vzniku makrocyklu po přiblížení jednotlivých pyrazin-2,3-dikarbonitrilů a seskupení kolem centrálního atomu (kationt kovu). Druhým způsobem přípravy je tzv. Linsteadova metoda (čili metoda postupné výstavby, Obr. 11).³² Tato reakce spočívá v ataku alkoholátu (nejčastěji lithného či hořečnatého) alifatických alkoholů s krátkým řetězcem na elektrondeficitní uhlík karbonitrilové skupiny. Vzniká alkykarboximidát, který dále reaguje s další

karbonitrilovou skupinou a postupně tak dochází k zacyklení a vzniku jádra AzaPc. Pomocí druhého způsobu lze dosáhnout v praxi vyšších výtěžků cyklotetramerizace než u templátové metody, nicméně některé struktury využití alkoholátu neumožňují a je tedy nutné templátovou metodu použít.²



Obr. 11 Mechanismus cyklotetramerizace Linsteadovou metodou.

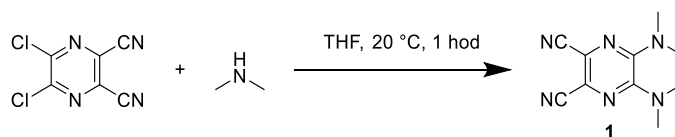
5 Experimentální část

Všechna organická rozpouštědla použitá pro syntézu byla v analytické kvalitě. Bezvodý butanol pro cyklotetramerizaci byl sušen hořčíkem a pod zpětným chladičem byl při teplotě varu oddestilován v čas potřeby. Nesubstituovaný zinečnatý ftalocyanin (ZnPc) byl zakoupen od firmy Sigma-Aldrich. Všechny ostatní chemikálie pro syntézu byly zakoupeny u certifikovaných dodavatelů (např. Sigma-Aldrich, TCI Europe, Acros, nebo Merck) a byly použity tak, jak byly dodány. Pro tenkovrstvou chromatografii (TLC) byly použity hliníkové folie pokryté silikagelem 60 F₂₅₄ (Merck). Pro čištění produktu sloupcovou chromatografií byl použit Merck Kieselgel 60 (0,040–0,063 mm). Teplota tání (t.t.) sloučenin byla měřena pomocí digitálního přístroje Electrothermal IA9200.

Infračervená spektra byla měřena na Nicolet 6700 spektrofotometru v ATR modu. ^1H a ^{13}C NMR spektra byla měřena na přístrojích VARIAN VNMR S500 (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) a Jeol JNM-ECZ600R (Jeol, Akišima, Japonsko). Zapsané chemické posuny jsou vztaženy relativně k vnitřnímu standardu $\text{Si}(\text{CH}_3)_4$. Hodnoty J jsou uváděny v Hz. UV-Vis spektra byla měřena na přístroji Shimadzu UV-2600 spektrofotometr. HR MS spektra byla měřena pomocí UHPLC systému Acquity UPLC I-class (Waters, Millford, USA) ve spojení s hmotnostním spektrometrem s vysokým rozlišením (HR MS) Synapt G2Si (Waters, Manchester, Velká Británie) založeném na Q-TOF (Quadropole Time-of-Flight). Chromatografie pro toto HR MS měření byla provedena s využitím kolony Acquity UPLC Protein BEH C4 ($2,1 \times 50$ mm; $1,7 \mu\text{m}$, 300 \AA) s gradientovou elucí acetonitrilem a 0,1% kyselinou mravenčí při průtoku $0,4 \text{ ml/min}$. K detekci byla použita ionizace elektrosprejem (ESI) v pozitivním módu. ESI spektra byla zaznamenána v rozmezí $500\text{-}5000 \text{ m/z}$ s využitím leucin-enkefalinu jako referenční látky a jodidu sodného k externí kalibraci, nebo v rozmezí $50\text{-}2000 \text{ m/z}$ s využitím leucin-enkefalinu jako referenční látky a mravenčanu sodného pro externí kalibraci. Fluorescence a transmitance byly měřeny na FS5 spektrofluorimetru (Edinburgh Instruments, Edinburgh, Velká Británie).

5.1 Syntéza prekurzorů

5.1.1 Příprava 5,6-bis(dimethylamino)pyrazin-2,3-dikarbonitrilu (1)

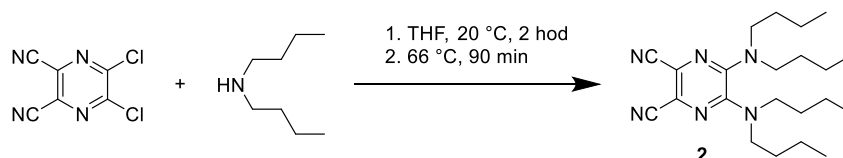


5,6-dichloropyrazin-2,3-dikarbonitril (1,00 g; 5,03 mmol) byl rozpuštěn v tetrahydrofuranu (THF, 40 ml). K této směsi bylo přidán roztok 33% dimethylaminu v ethanolu (5,38 ml, 30,13 mmol). Za stálého míchání při laboratorní teplotě se nechala reakční směs reagovat 1 hodinu. Reakce byla kontrolována pomocí tenkovrstvé chromatografie (TLC) v soustavě hexan/ethylacetát (4 : 1, $R_f = 0,61$). Následně byla směs přefiltrována, a filtrát odpařen na vakuové rotační odparce. Dalším krokem byla rekrytalizace z methanolu. Produkt byl rozpuštěn v co nejmenším množství vroucího methanolu a následně

vložen na noc do lednice. Po rekrystalizaci byl produkt přefiltrován pomocí vakuové filtrace. Výtěžek byl 933 mg (86 %) žlutých krystalů.

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 3,02 (s, 12H). ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) δ 147,64, 120,45, 114,87, 38,82. HRMS (ESI): m/z vypočítáno pro $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{N}_6$: $[\text{M}+\text{H}]^+$: 217,1196; nalezeno: 217,1206.

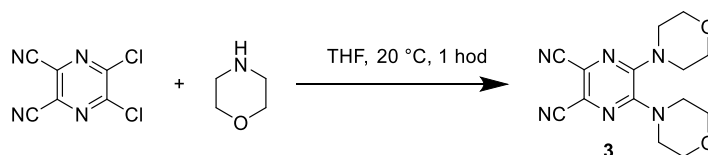
5.1.2 Příprava 5,6-bis(dibutylamino)pyrazin-2,3-dikarbonitrilu (2)



5,6-dichloropyrazin-2,3-dikarbonitril (1,00 g; 5,03 mmol) byl rozpuštěn v THF (40 ml). K této směsi byl přidán dibutylamin (5,04 ml, 30,13 mmol). Za stálého míchání se nechala směs reagovat 2 hodiny při laboratorní teplotě. Reakce byla kontrolována pomocí TLC při použití toluenu jako mobilní fáze ($R_f = 0,56$). Z důvodu nezreagované výchozí látky byla následně reakce zahřívána při teplotě varu rozpouštědla dalších 90 minut pod zpětným chladičem. Po ochlazení byla směs přefiltrována a filtrát odpařen na vakuové rotační odparce. Dalším krokem byla adsorpce na silikagel a izolace produktu pomocí sloupcové chromatografie. Jako mobilní fáze byl použit čistý toluen. Frakce obsahující produkt byly spojeny a odpařeny na vakuové rotační odparce. Výtěžek byl 1,787 g (92 %) žlutých krystalů.

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 3,43 (t, $J = 7,4$ Hz, 8H), 1,48 – 1,37 (m, 8H), 1,20 (h, $J = 7,3$ Hz, 8H), 0,88 (t, $J = 7,5$ Hz, 12H). ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) δ 146,10, 120,03, 115,10, 48,41, 29,68, 20,28, 13,75. HRMS (ESI): m/z vypočítáno pro $\text{C}_{18}\text{H}_{28}\text{N}_6$: $[\text{M}+\text{H}]^+$: 329,2448; nalezeno: 329,2455.

5.1.3 Příprava 5,6-dimorfolinopyrazin-2,3-dikarbonitrilu (3)



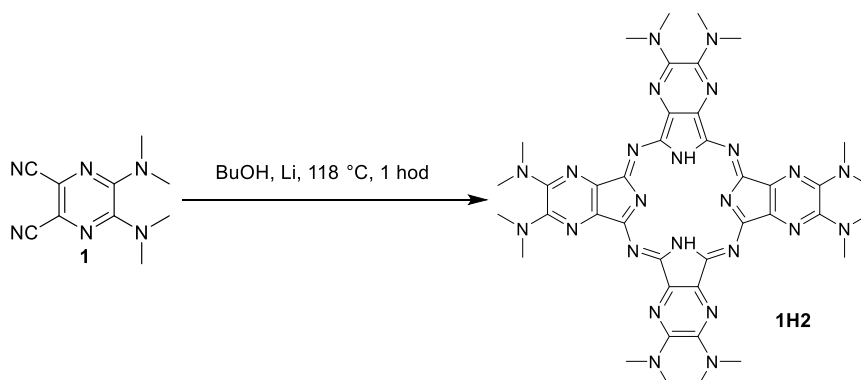
5,6-dichloropyrazin-2,3-dikarbonitril (1,00 g; 5,03 mmol) byl rozpuštěn v THF (70 ml). K této směsi byl přidán morfolin (2,64 ml, 30,16 mmol). Za stálého

míchání se nechala směs reagovat 1 hodinu při laboratorní teplotě. Reakce byla kontrolována pomocí TLC při použití ethyl-acetátu jako mobilní fáze ($R_f = 0,37$). Směs byla poté přefiltrována, propláchnuta pomocí acetonu a filtrát odpařen na vakuové rotační odparce. Dalším krokem byla rekrystalizace z methanolu. Produkt byl rozpuštěn v co nejmenším množství vroucího methanolu a následně vložen na noc do lednice. Po rekrystalizaci byl produkt přefiltrován pomocí vakuové filtrace. Výtěžek byl 720 mg (48 %) bílých krystalů.

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 3,79 (t, $J = 4,6$ Hz, 8H), 3,55 (t, $J = 4,6$ Hz, 8H). $^{13}\text{C NMR}$ (126 MHz, CDCl_3) δ 146,63, 121,61, 114,21, 66,09, 46,83. HRMS (ESI): m/z vypočítáno pro $\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{N}_6\text{O}_2$: $[\text{M}+\text{H}]^+$: 301,1408; nalezeno: 301,1418.

5.2 Cyklotetramerizace a chelatační reakce

5.2.1 Příprava 2,3,9,10,16,17,23,24-oktakis(dimethylamino)-1,4,8,11,15,18,22,25-oktaazaftalocyaninu (**1H2**)

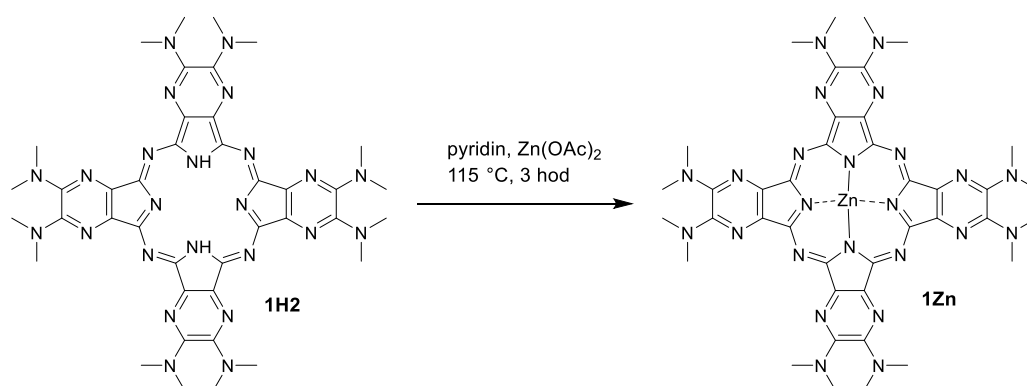


Látka **1** (0,870 g; 4,02 mmol) byla rozpuštěna v čerstvě predestilovaném bezvodém butanolu (15 ml). Do reakční baňky bylo přidáno lithium (197 mg; 28,19 mmol) a reakce byla zahřívána při teplotě varu rozpouštědla pod zpětným chladičem po dobu 1 hodiny. Reakční směs byla poté odpařena na rotační odparce. Reakční směs byla následně rozpuštěna v dichlormethanu (DCM, 50 ml) a byl přidán 1% roztok HCl (80 ml). Následně byla směs oddělena v dělicí nálevce a zbytky produktu byly z vodné fáze vyextrahovány pomocí DCM (2× 40 ml). Organické frakce byly spojeny, vysušeny bezvodým Na_2SO_4 a odpařeny na rotační vakuové odparce. Směs byla adsorbována na silikagel a byla provedena sloupcová chromatografie nejprve s mobilní fází DCM/methanol (MeOH) 25 : 1 pro eliminaci výchozí látky **1** a poté byla mobilní fáze urychlena

na 10 : 1 pro eluci sloučeniny **1H2**. Získané frakce byly odpařeny na vakuové odparce a následně přesráženy rozpuštěním v pyridinu/DCM (1 ml, 1 : 1) a nakapáním do MeOH (150 ml). Suspenze byla dekantována a filtrována vakuovou filtrací. Výtěžek byl 140 mg (16 %), fialových krystalů.

^1H NMR (500 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{pyridin-}d_5$ – 3 : 1) δ 3,40 (s, 48H), -1,46 (s, 2H). ^{13}C NMR (126 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{pyridin-}d_5$ – 3 : 1) δ 151,50, 39,51. (některé aromatické signály nebyly detekovány); HRMS (ESI): m/z vypočítáno pro $\text{C}_{40}\text{H}_{50}\text{N}_{24}$: $[\text{M}+\text{H}]^+$: 867,4723; nalezeno: 867,4711.

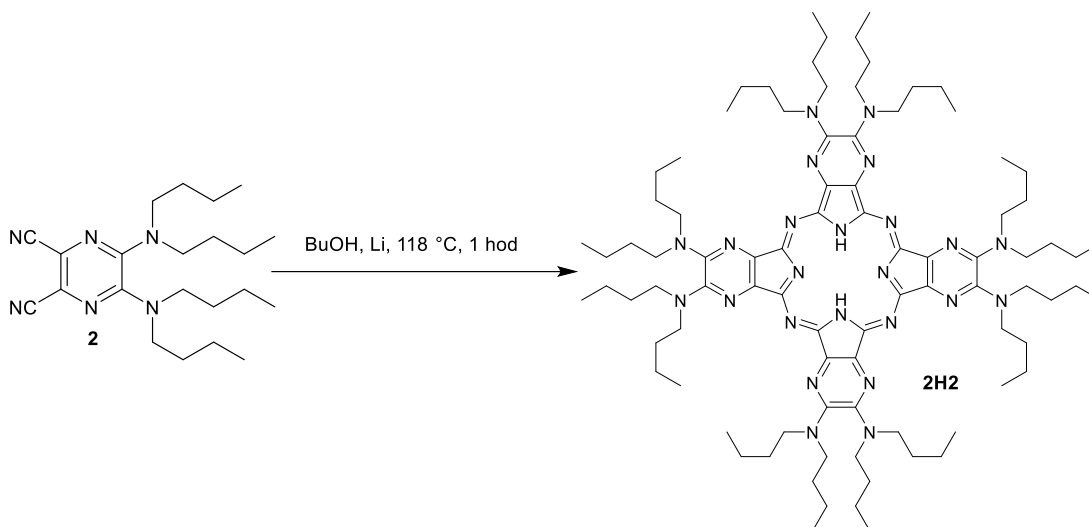
5.2.2 Příprava zinečnatého komplexu 2,3,9,10,16,17,23,24-oktakis(dimethylamino)-1,4,8,11,15,18,22,25-oktaazaftalocyaninu (**1Zn**)



Látka **1H2** (0,100 g, 0,12 mmol) byla rozpuštěna v pyridinu (10 ml). Následně k ní byl přidán bezvodý octan zinečnatý (0,127 g; 0,69 mmol) a směs byla zahřívána při teplotě varu rozpouštědla pod zpětným chladičem po dobu 3 hodin. Po dokončení reakce byl na rotační odparce ze směsi odpařen pyridin. Dále proběhla adsorpce na silikagel a přečištění pomocí sloupcové chromatografie. K dělení výchozí látky a produktu byla použita mobilní fáze DCM/MeOH (2500 : 1) s postupnou úpravou (po odstranění sloučeniny **1H2**) poměru až na 10:1, kdy byl eluován zinečnatý komplex. Frakce byly následně odpařeny a přesráženy rozpuštěním v pyridinu/DCM (1 ml, 1 : 1) a nakapáním do MeOH (150 ml). Krystaly byly odfiltrovány a vysušeny. Výtěžek byl 28 mg (26 %), modrých krystalů.

^1H NMR (600 MHz, pyridin- d_5) δ 3,21 (s, 48H). ^{13}C NMR (151 MHz, pyridin- d_5) δ 151,23, 150,92, 142,76, 39,31.

5.2.3 Příprava 2,3,9,10,16,17,23,24-oktakis(dibutylamino)-1,4,8,11,15,18,22,25-oktaazaftalocyananu (**2H2**)

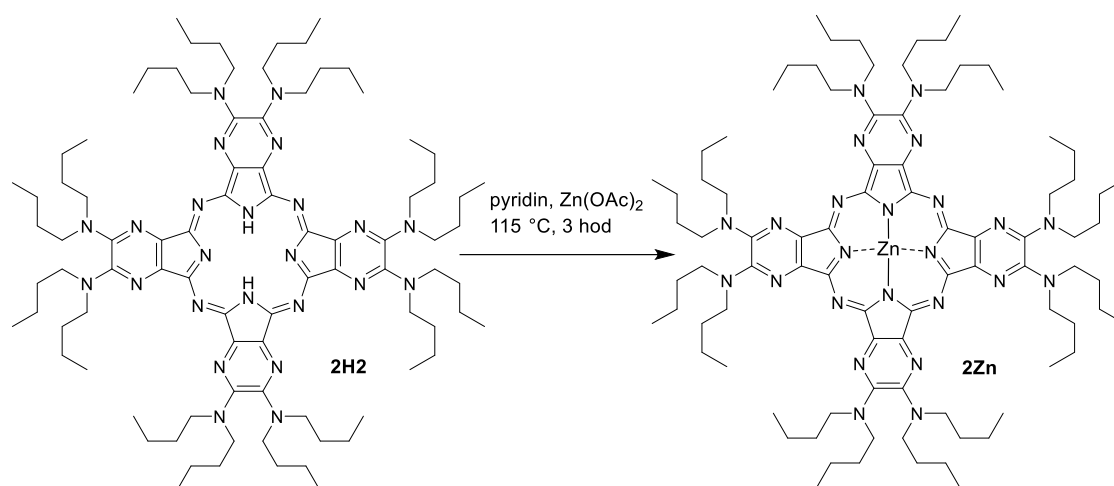


Látka **2** (1,727 g; 4,49 mmol) byla rozpuštěna v čerstvě předestilovaném bezvodém butanolu (15 ml). Směs byla zahřáta pod zpětným chladičem na teplotu varu rozpouštědla, následně bylo přidáno lithium (0,220 g; 31,43 mmol) a reakce pokračovala 1 hodinu při té samé teplotě. Reakční směs byla poté odpařena na rotační odparce. Reakční směs byla následně rozpuštěna v DCM (50 ml) a byl přidán 1% roztok HCl (80 ml). Následně byla směs oddělena v dělicí nálevce a zbytky produktu byly z vodné fáze vyextrahovány pomocí DCM (2× 40 ml). Organické frakce byly spojeny, vysušeny bezvodým Na₂SO₄ a odpařeny na rotační vakuové odparce. Při hledání vhodné mobilní fáze byla provedeno TLC, kdy bylo zjištěno téměř absolutní retence produktu na startu při použití toluenu jako mobilní fáze, ale byla eluována výchozí sloučenina **2**. Směs byla adsorbována na silikagel a provedena sloupcová chromatografie nejprve s toluenem jako mobilní fází pro eliminaci sloučeniny **2** a následně použita mobilní fáze DCM/MeOH 20 : 1 pro eluci sloučeniny **2H2**. Získané frakce byly odpařeny na vakuové odparce a následně přesráženy rozpuštěním v DCM (3 ml) a nakapáním do MeOH (150 ml). Suspenze byla filtrována vakuovou filtrací a krystaly byly vysušeny. Výtěžek byl 0,736 g (42 %) fialových krystalů.

¹H NMR (500 MHz, pyridin-*d*₅) δ 4,10 (t, J = 7,4 Hz, 32H), 1,84 (p, J = 7,5 Hz, 32H), 1,53 (h, J = 7,4 Hz, 32H), 1,02 (t, J = 7,4 Hz, 48H), -1,41 (s, 2H). ¹³C NMR (126 MHz, pyridin-*d*₅) δ 150,59, 48,93, 30,46, 21,04, 14,25. (některé aromatické

signály nebyly detekovány); HRMS (ESI): m/z vypočítáno pro $C_{88}H_{146}N_{24}$: $[M+H]^+$: 1540,2235; nalezeno: 1540,2224.

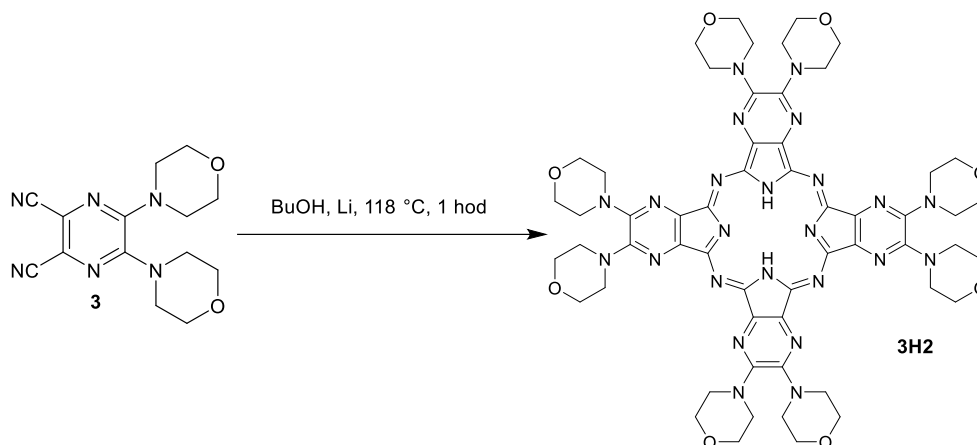
5.2.4 Příprava zinečnatého komplexu 2,3,9,10,16,17,23,24-oktakis(dibutylamino)-1,4,8,11,15,18,22,25-oktaazaftalocyaninu (**2Zn**)



Látka **2H2** (0,558 g; 0,36 mmol) byla rozpuštěna v pyridinu (10 ml) a následně k ní byl přidán bezvodý octan zinečnatý (0,399 g; 2,17 mmol). Reakční směs byla zahřívána na teplotu varu rozpouštědla pod zpětným chladičem po dobu 3 hodin. Po dokončení reakce byl na rotační odparce ze směsi odpařen pyridin. Dále proběhla adsorpce na silikagel a sloupcová chromatografie. K dělení výchozí látky a produktu byla použita mobilní fáze DCM/MeOH (2500 : 1) s postupnou úpravou (po odstranění sloučeniny **2H2**) poměru až na 10 : 1, kdy byl eluován zinečnatý komplex **2Zn**. Frakce byly následně odpařeny a přesráženy rozpuštěním v DCM (3 ml) a nakapáním do MeOH (150 ml). Krystaly byly odfiltrovány a vysušeny. Výtěžek byl 0,566 g (97 %) modrých krystalů.

^1H NMR (500 MHz, pyridin- d_5) δ 4,07 (t, $J = 7,5$ Hz, 32H), 1,80 (q, $J = 3,6$ Hz, 32H), 1,51 (h, $J = 7,4$ Hz, 32H), 0,99 (t, $J = 7,4$ Hz, 48H). ^{13}C NMR (126 MHz, pyridin- d_5) δ 151,04, 142,43, 48,77, 30,24, 20,85, 14,05. (některé aromatické signály nebyly detekovány); HRMS (ESI): m/z vypočítáno pro $C_{88}H_{144}N_{24}Zn$: $[M+H]^+$: 1602,1370; nalezeno: 1602,1343.

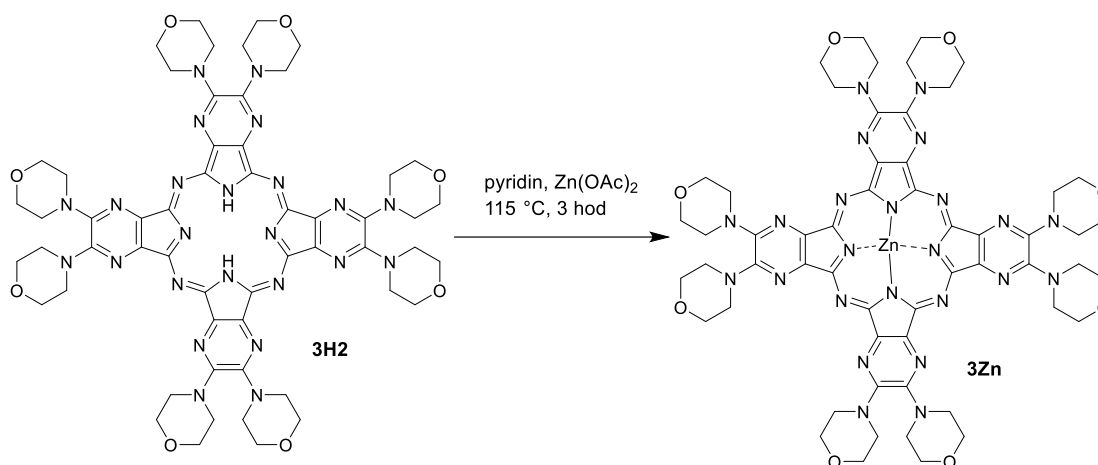
5.2.5 Příprava 2,3,9,10,16,17,23,24-oktakis(morfolino)-1,4,8,11,15,18,22,25-oktaazaftalocyaninu (**3H2**)



Látka **3** (0,677 g; 2,25 mmol) byla rozpuštěna v čerstvě předestilovaném bezvodém butanolu (15 ml). Směs byla zahřívána pod zpětným chladičem při teplotě varu rozpouštědla, během zahřívání bylo přidáno lithium (0,111 g; 15,78 mmol) a reakce pokračovala 1 hodinu. Reakční směs byla následně rozpuštěna v dichlormethanu (DCM, 40 ml) a byl přidán 1% roztok HCl (40 ml). Následně byla směs přelita do dělicí nálevky, ale během dělení docházelo k tvorbě heterogenní soustavy emulze/suspenze ve vodné fázi, tudíž nebylo možné oddělit organickou fází. Následně bylo nutně přistoupit k úplnému odpaření směsi. Dále byla provedena re-suspendace ve vodě a suspenze byla zfiltrována a krystaly na filtračním papíře promyty vodou (100 ml). Filtrační koláč byl usušen a pak rozpuštěn ve směsi DCM a pyridinu (1 : 1), přefiltrován a roztok byl odpařen. Při hledání vhodné mobilní fáze byla provedena TLC za použití soustavy DCM/MeOH (20 : 1; $R_f = 0,41$). Směs byla adsorbována na silikagel a přečištěna pomocí sloupcové chromatografie s mobilní fází DCM/MeOH 22 : 1. Získané frakce byly odpařeny na vakuové odparce a následně přesráženy rozpuštěním v DCM (1 ml) a nakapáním do hexanu (150 ml). Suspenze byla zfiltrována vakuovou filtrací a krystaly vysušeny. Výtěžek byl 76 mg (11 %) zelených krystalů.

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{pyridin-}d_5 - 2 : 1$) δ 4,57–3,06 (m, 64H), -1,49 (s, 2H).
 $^{13}\text{C NMR}$ nebylo z důvodu zhoršené rozpustnosti měřeno.
HRMS (ESI): m/z vypočítáno pro $\text{C}_{56}\text{H}_{66}\text{N}_{24}\text{O}_8$: $[\text{M}+\text{H}]^+$: 1203,5568. Nalezeno: 1203,5547.

5.2.6 Příprava zinečnatého komplexu 2,3,9,10,16,17,23,24-oktakis(morfolino)-1,4,8,11,15,18,22,25-oktaazaftalocyaninu (**3Zn**)



Látka **3H2** (0,076 g; 0,06 mmol) byla navážena a rozpuštěna v pyridinu (10 ml). Následně k ní byl přidán bezvodý octan zinečnatý (0,695 g; 0,38 mmol) a celá směs byla zahřívána při teplotě varu rozpouštědla pod zpětným chladičem po 3 hodiny. Po dokončení reakce byl na rotační odparce ze směsi odpařen pyridin. Dále proběhla adsorpce na silikagel a byla provedena sloupcová chromatografie. K dělení výchozí látky a produktu byla použita mobilní fáze DCM/pyridin (10 : 1). Frakce byly následně odpařeny a přesráženy rozpuštěním ve směsi DCM/pyridin a nakapány do hexanu. Krystaly byly odfiltrovány a vysušeny. Výtěžek byl 40 mg (50 %) tmavě modrých krystalů.

^1H NMR (500 MHz, pyridin- d_5) δ 4,12–3,70 (m, 64H), -1,49 (s, 2H). ^{13}C NMR a HRMS nebyly z důvodu zhoršené rozpustnosti sloučeniny měřeny.

5.3 Stanovení fotofyzikálních parametrů

5.3.1 Kvantový výtěžek produkce singletového kyslíku (Φ_A)

Stanovení kvantového výtěžku (Φ_A) singletového kyslíku ($^1\text{O}_2$) byla použita nepřímá metoda.³³ Při nepřímé metodě je monitorován efekt $^1\text{O}_2$ na tzv. scavenger molekulu; která je působením singletového kyslíku chemicky změněna. V tomto projektu byl jako scavenger použit 1,3-difenyliisobenzofuran (DPBF), kde při působení $^1\text{O}_2$ dochází k cykloadici na furanový cyklus (Obr. 12a), který se rozštěpí, čímž dojde k poklesu absorbance při 417 nm (Obr. 12b).³⁴

množství přijatého světla bylo spočteno pomocí Beerovy rovnice (Rovnice 3b).³⁵ Po změření hodnot v čistých rozpouštědlech bylo následně provedeno měření s přidavkem pyridinu (1 % u látky **2Zn**, 5 % u látek **1Zn** a **3Zn**) pro zjištění vlivu agregace na kvantový výtěžek singletového kyslíku.

$$a) \Phi_{\Delta}^S = \Phi_{\Delta}^R \frac{k^S I_{aT}^R}{k^R I_{aT}^S} \qquad b) I_a = I_0 (1 - e^{-2,3A})$$

Rovnice 3: **a)** výpočet kvantového výtěžku singletového kyslíku – směrnice křivky závislosti $\ln(A_0/A_t)$ na době ozáření (A_0 a A_t jsou absorpance DPBF před a po ozáření) (k), celkové množství přijatého světla ($I_a T$) (horní indexy: R – referenční sloučenina, S – vzorek) od 530 nm do 850 nm; **b)** rovnice pro výpočet množství přijatého světla – transmitance filtru při dané vlnové délce (I_0) a absorpance vzorku při dané vlnové délce (A).

Funkci referenční sloučeniny v tomto měření plnil nesubstituovaný zinečnatý ftalocyanin (ZnPc) (Φ_{Δ} je 0,56 v DMF³⁶ a 0,58 v toluenu³⁷).

5.3.2 Kvantový výtěžek fluorescence (Φ_F)

Princip stanovení kvantového výtěžku fluorescence spočívá v porovnávací metodě, kdy byly sledovány plochy pod křivkou emisních spekter roztoků referenční sloučeniny a vzorku. Excitace stanovované i referenční sloučeniny probíhala světlem stejné vlnové délky (607 nm), získané hodnoty byly posléze dosazeny do rovnice (Rovnice 4), čímž byl vypočten Φ_F vzorku.³⁵

$$\Phi_F^S = \Phi_F^R \left(\frac{F^S}{F^R} \right) \left(\frac{1 - 10^{-A^R}}{1 - 10^{-A^S}} \right) \left(\frac{n^S}{n^R} \right)^2$$

Rovnice 4: Výpočet kvantového výtěžku fluorescence; plocha pod křivkou emisního spektra (F), absorpance při excitační vlnové délce (A), index lomu rozpouštědla (n), indexy – referenční sloučenina (R), vzorek (S)

Použité rozpouštědlo ovlivňuje výsledný Φ_F , nicméně tento vliv lze korigovat indexem lomu použitých rozpouštědel. Toho lze využít v případě, kdy vzorek a referenční látka byly měřeny v jiných rozpouštědlech.

Samotné měření začínalo proměřením absorpance a fluorescence květy s čistým rozpouštědlem (2,5 ml) a následně byl do květy přidán zásobní roztok (100 μ M) jednotlivých TPyzPzs, aby absorpance dosahovala hodnot kolem 0,1 v oblast Q-pásu; opět bylo změřeno absorpční a emisní spektrum Po změření hodnot v čistých rozpouštědlech bylo následně provedeno měření s přidavkem pyridinu (1 % u látky **2Zn**, 5 % u látek **1Zn** a **3Zn**) pro zjištění vlivu agregace

na kvantový výtěžek fluorescence. Jako referenční sloučenina byl opět použit ZnPc, jehož hodnota $\Phi_F = 0,32$ v THF.³⁸

5.4 Studium agregace makrocyklů

5.4.1 Stanovení rovnovážné konstanty monomerizace pyridinem (K_P)

Tendence oktakis(dialkylamino) substituovaných TPyzPzs agregovat do supramolekulárních celků (v závislosti na koncentraci sloučeniny v roztoku či použitém rozpouštědle) byla studována v nekoordináčném rozpouštědle (toluen), kde vytváří TPyzPzs J-dimery, které je možné rozrušit přidáním koordinujícího rozpouštědla (pyridin).

Prvním krokem bylo připravení zásobních roztoků TPyzPzs v toluenu (2 μM pro **1Zn** a 100 μM pro **2Zn**). Samotný experiment začal změřením baseline kyvety s 2,5 ml toluenu (absorpční i emisní spektrum). Dále byly změřeny spektra roztoku TPyzPz v toluenu (1 μM pro **1Zn** nebo 10 μM pro **2Zn**). Roztok byl titrován postupnými přídávky pyridinu a s každým přípravkem byla změřena absorpční a emisní spektra. Přídávky pyridinu pokračovaly do dosažení fáze plateau pro dané TPyzPz. Excitační vlnová délka pro měření emisních spekter byla zvolena v isosbestickém bodě absorpčních spekter (602 nm pro **1Zn** a 588 nm pro **2Zn**), aby nebylo nutné korigovat výsledná emisní spektra na množství dodané energie. Z naměřených hodnot byla vypočtena asociační konstanta pomocí nelineární regrese z grafu závislosti množství monomeru na koncentraci pyridinu pomocí programu Prism (GraphPad Software).

5.4.2 Stanovení dimerizační konstanty (K_D)

Pomocí koncentrační závislosti

Byl připraven zásobní roztok **2Zn** (100 μM) v toluenu a následně bylo změřeno jeho absorpční spektrum v 1 mm kyvetě. Dále bylo provedeno ředění zásobního roztoku na polovinu (2 ml 100 μM roztoku a 2 ml toluenu) a změřeno absorpčního spektra 50 μM roztoku v 1 mm kyvetě. Ředění a měření absorpčních spekter v 1 mm kyvetě bylo opakováno do 12,5 μM . Od 12,5 μM do 0,78 μM roztoku byla používána kyveta 10 mm. Pro nejnižší koncentrace od 0,78 μM do 0,063 μM

roztoku byla používána kyveta 50 mm. Posledním krokem byl přepočet spekter na 1 μM rotok.

Pomocí závislosti na teplotě

Kyveta s 10 μM roztokem sloučeniny **2Zn** nebo 1 μM roztokem sloučeniny **1Zn** v toluenu byla vložena do temperovaného držáku, kde docházelo vždy po dobu 5 minut k stabilizaci teploty v rozsahu 10–100 °C, kdy po každé stabilizaci bylo změno transmittanční spektrum, které bylo nakonec převedeno na absorpční spektrum.

6 Výsledky a diskuze

6.1 Syntéza

Při přípravě prekurzorů jsme využili komerčně dostupného 5,6-dichlorpyrazin-2,3-dikarbonitrilu (DCP). Na této molekule je díky zápornému mezomernímu efektu karbonitrilových skupin umožněna nukleofilní aromatická substituce v polohách 5 a 6, čemuž i napomáhá záporný indukční efekt pyrazinových dusíků a halogenů v blízkosti atakovaného uhlíku. Rovnovážný stav této reakce lze posunout směrem k produktu vychytáváním vznikajících chloridových iontů pomocí báze např. uhličitán draselný, hydroxid sodný, trimethylamin nebo pyridin. V našem případě bylo možné jako bázi s výhodou použít nadbytek nukleofilního substituentu, protože jsme pracovali se sekundárními aminy. Z tohoto důvodu při přípravě 5,6-disubstituovaných derivátů pyrazin-2,3-dikarbonitrilu jsme použili 6 ekvivalentů sekundárního aminu namísto potřebných dvou.

Příprava sloučenin **1** a **2** probíhala bez komplikací s vysokou výtěžností reakce (nad 85 %). U sloučeniny **3** byl výtěžek 48 %, což bylo nejspíš způsobeno vysokým zadržením na silikagelu během čištění. Při syntéze prekurzoru **1** nebylo možné použít čistý dimethylamin, protože se jedná o plynnou látku, a proto byl použit 33% roztok v ethanolu. Ostatní sekundární aminy již byly kapalné látky.

Příprava TPyzPzs cyklotetramerizační reakcí našich sloučenin probíhala metodou postupné výstavby (Linsteadova metoda) – iniciace reakce probíhala pomocí ataku alkoholátu na karbonitrilovou skupinu prekurzoru. V našem případě byl použit butanolát lithný v bezvodém butanolu, u kterého vznikají nestabilní lithné TPyzPzs, které se téměř okamžitě transformují na bezkovové deriváty v přítomnosti vody. Protože vždy do reakce vstupoval pouze jeden prekurzor, tak vznikal jen jeden symetrický TPyzPz, který bylo potřeba oddělit od zbytku reakční směsi (oproti asymetrickým TPyzPzs, kdy statisticky vzniká několik kongenerů v závislosti na počtu prekurzorů). Samotná izolace TPyzPzs probíhala v jejich bezkovové formě, čímž jsme omezili jejich chvostování na silikagelu. Finální zinečnaté TPyzPzs byly připraveny následnou reakcí s octanem zinečnatým, což vedlo k chelataci zinečnatého iontu do centra makrocyklu.

Syntéza sloučeniny **2H2** a následná inserce zinečnatého kationtu probíhaly bez problémů s relativně vysokými výtěžky (**2H2** měla 42 %, **2Zn** až 97 %). Co se syntéz sloučenin **1H2** a **1Zn** týče, byla výtěžnost reakcí nižší (16 % u **1H2**, 26 % u **1Zn**), což bylo nejspíše způsobeno zhoršenou rozpustností sloučenin a vyšší tendencí k agregaci molekul. Díky těmto vlastnostech se molekuly také hůře charakterizovaly pomocí NMR/HRMS. U sloučeniny **3H2** byla komplikovaná její izolace z reakční směsi a následné přečištění. Během extrakce **3H2** do DCM po cyklotetramerizační reakci, kdy se reakční směs zbavuje nadbytku butanolátu litného přidáním 1% roztoku HCl, došlo ke vzniku soustavy emulze/suspenze ve vodné fázi, která se nechtěla rozdělit. Tuto směs jsme museli odpařit a následně resuspendovat ve vodné fázi, přefiltrovat, čímž jsme se zbavily solí. Filtrační koláč byl po uschnutí rozpuštěn v pyridinu, který má nejlepší schopnost rozpouštět TPyzPzs (empirické zkušenosti naší výzkumné skupiny). Nicméně po přečištění sloupcovou chromatografií dosáhl výtěžek reakce pouze 11 %.

6.2 Stanovení fotofyzikálních parametrů

U všech nasyntetizovaných TPyzPzs byla snaha naměřit a zjistit absorpční a emisní maxima v monomerní formě a v agregovaném stavu. Jako rozpouštědla byly vybrány DMF a toluen – DMF pro možnost porovnání s publikovanými sloučeninami a toluen, popřípadě toluen s pyridinem pro studium agregovaných forem a jejich následnou monomerizace (Tabulka 1). Nutno podotknout rozdílnou rozpustnost jednotlivých sloučenin v toluenu – u sloučeniny **1Zn** bylo z důvodu menší rozpustnosti možné připravit pouze 2 μM zásobní roztok, oproti tomu sloučenina **2Zn** byla velmi dobře rozpustná, zde bylo možno připravit standardní 100 μM zásobní roztok. Sloučenina **3Zn** byla velmi špatně rozpustná v námi použitých rozpouštědlech, což neumožnilo stanovení fotofyzikálních parametrů. Z tvarů spekter (viz např. Obr. 13a) bylo jednoznačně potvrzeno, že látky se nacházejí v monomerním stavu v DMF, pyridinu a směsi toluen+(1% nebo 5%) pyridin, kdežto v podobě J-dimerů v toluenu jako nekoordinujícím rozpouštědle.

Tabulka 1 Fotofyzikální parametry připravených TPyzPzs.

	DMF			Toluen			Toluen+pyridin ^c		
	λ_{abs} [nm]	ϵ [dm ³ ·mol ⁻¹ ·cm ⁻¹]	λ_{em} [nm]	λ_{abs} [nm]	ϵ [dm ³ ·mol ⁻¹ ·cm ⁻¹]	λ_{em} [nm]	λ_{abs} [nm]	ϵ [dm ³ ·mol ⁻¹ ·cm ⁻¹]	λ_{em} [nm]
1Zn	659 ^a	148 570 ^a	672 ^a	630/702	31 550/27 950	758	655	122 094	663
2Zn	661	184 590	667	660/709	62 546/43 574	756	660	216 986	676
3Zn	651	— ^b	698	— ^b	— ^b	735	651	— ^b	656

^a prováděno v pyridinu; ^b nelze provést vlivem špatné rozpustnosti v daném rozpouštědle;

^c 5 % pro **1Zn** a **3Zn**, 1 % pro **2Zn**

Dalšími důležitými parametry molekul z rodin ftalocyaninů a azaftalocyaninů jsou kvantové výtěžky fluorescence a singletového kyslíku. Pokud se TPyzPzs vyskytovaly v monomerní formě (rozpuštěny v DMF nebo v toluenu s pyridinem), tak vykazovaly velmi nízké kvantové výtěžky, což bylo způsobeno ICT, který je u monomerních oktakis(dialkylamino) TPyzPzs hlavním způsobem relaxace z excitovaného stavu. V případě přímého porovnání kvantových výtěžků mezi DMF a toluenem s pyridinem, tak kvantové výtěžky jsou nižší v DMF, neboť polární prostředí toho rozpouštědla podporuje ICT. Pro naměření hodnot a porovnání vlastností J-dimerů a monomerů bylo zvoleno jako rozpouštědlo toluen (pro J-dimery) a toluen s 1 nebo 5 % pyridinu (pro monomery), který v tomto množství zajistí monomerizaci sloučenin a zároveň zásadně neovlivní polaritu prostředí. Z naměřených hodnot lze vyčíst několikanásobně vyšší kvantové výtěžky J-dimerů oproti monomerní formě; tato skutečnost je dána blokadou ICT v agregovaném stavu, což je velice názorně vidět u výsledků sloučeniny **2Zn**. Hodnoty u **3Zn** naznačují, že i po přidání většího množství pyridinu se J-dimer nepovedlo rozvolnit a hodnoty kvantových výtěžků jsou srovnatelné (Tabulka 2).

Tabulka 2 Kvantové výtěžky singletového kyslíku a fluorescence.

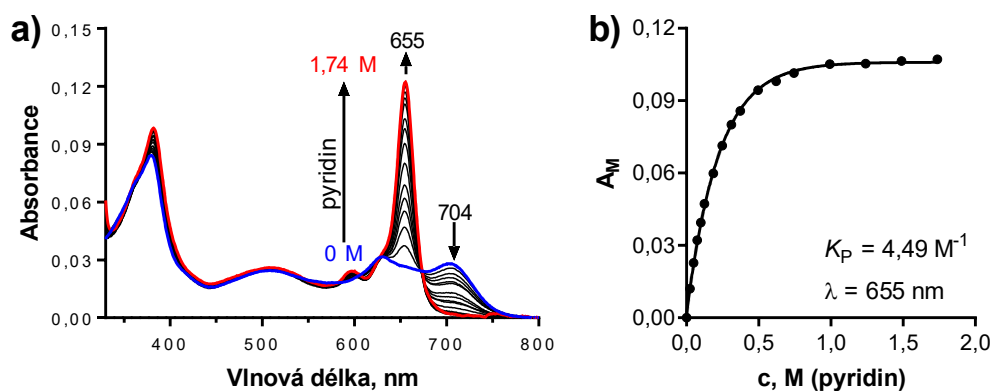
	Φ_{Δ}				Φ_F			
	DMF	TOL	TOL +5%Pyr	TOL +1%Pyr	DMF	TOL	TOL +5%Pyr	TOL +1%Pyr
1Zn	0,0033	0,0626	0,0344	— ^a	0,0005	0,0089	0,0002	— ^a
2Zn	0,0073	0,2578	— ^a	0,0807	0,0000	0,0289	— ^a	0,0067
3Zn	0,0234	0,2601	0,3304	— ^a	0,0042	0,0225	0,0281	— ^a

^a stanovení za daných podmínek nebylo prováděno

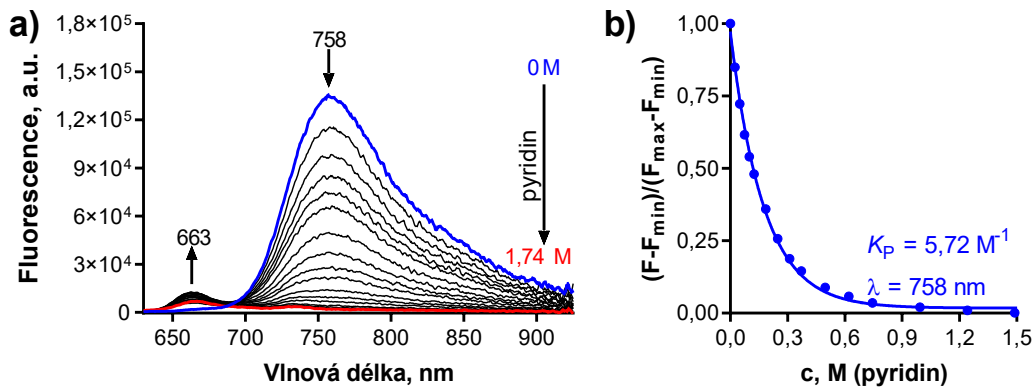
6.3 Hodnocení tvorby J-dimerů

Míra tvorby J-dimerů byla studována v toluenu (nekoordinující rozpouštědlo), kdy byl roztok postupně titrován pyridinem jakožto koordinačním rozpouštědlem. TPyzPz **3Zn** byl velice špatně rozpustný v toluenu, proto nebylo možné připravit roztok o známé koncentraci a provést studii agregace. Ochota tvořit J-dimery byla popsána těmito konstantami. Rovnovážnou konstantou monomerizace pyridinem (K_P), dimerizační konstantou (K_D) a asociační konstantou TPyzPz a pyridinu (K_1). Rovnice pro výpočet K_P , K_D a K_1 byly převzaty z publikací výzkumných skupin profesorů Kobuke³⁹ a Torres.⁴⁰

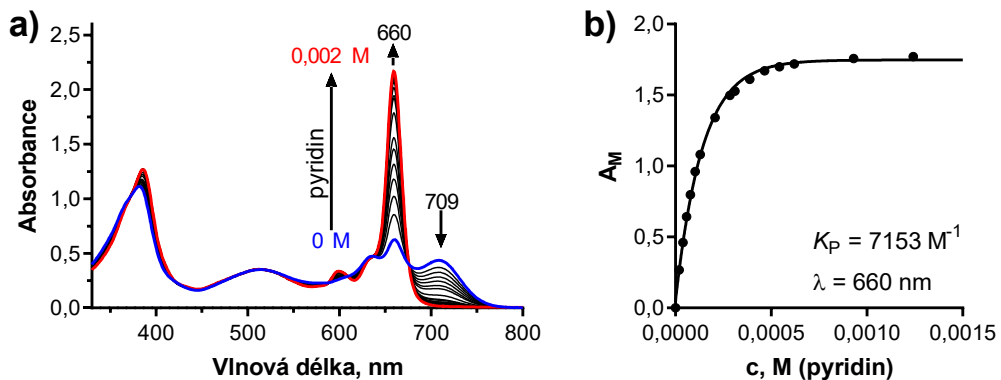
Stanovení K_P pomocí absorpčních maxim Q-pásu bylo provedeno pro sloučeniny **1Zn** ($K_P = 4,49 \text{ M}^{-1}$) a **2Zn** ($K_P = 7153 \text{ M}^{-1}$), kdy experimentálně stanovené K_P se řády, což potvrzuje předpoklad, že málo objemný periferní substituent dovoluje silnější interakci mezi jednotlivými podjednotkami (Obr. 13, Obr. 15 **Chyba! Nenalezen zdroj odkazů.**). Určení K_P lze provést i pomocí sledování fluorescenčních maxim monomeru nebo dimeru (Obr. 14, Obr. 16), kdy zjištěné hodnoty jsou řádově stejné jako hodnoty zjištěné pomocí absorpčních maxim ($K_P = 5,72 \text{ M}^{-1}$ a 7471 M^{-1} pro látky **1Zn** a **2Zn**).



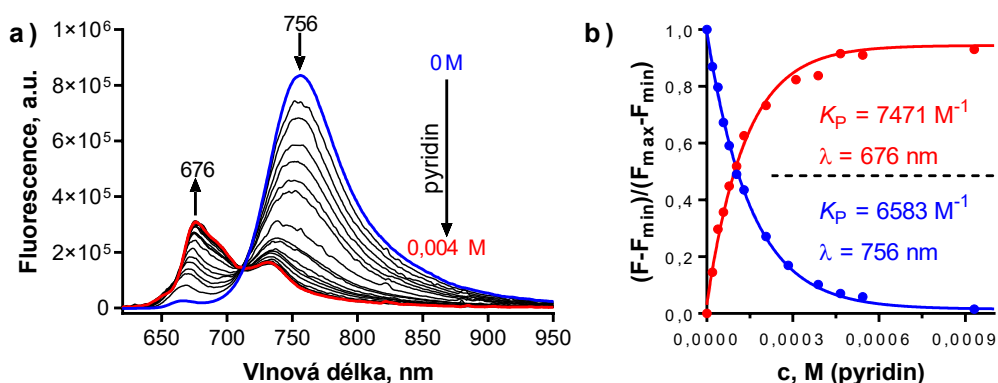
Obr. 13 Titrace 1 μM roztoku **1Zn** v toluenu pomocí pyridinu. **a)** změny v celém absorpčním spektru při přechodu z **J-dimeru** na **monomer**; **b)** křivka nárůstu absorpce monomeru (A_M) v λ_{max} během titrace pyridinem, která sloužila pro výpočet K_P pomocí nelineární regrese.



Obr. 14 Titrace $1 \mu\text{M}$ roztoku 1Zn v toluenu pomocí pyridinu. **a)** změny v celém emisním spektru při přechodu z **J-dimeru** na **monomer**; **b)** křivky poklesu fluorescence **J-dimeru** v λ_{max} během titrace pyridinem, která sloužila pro výpočet K_P pomocí nelineární regrese.

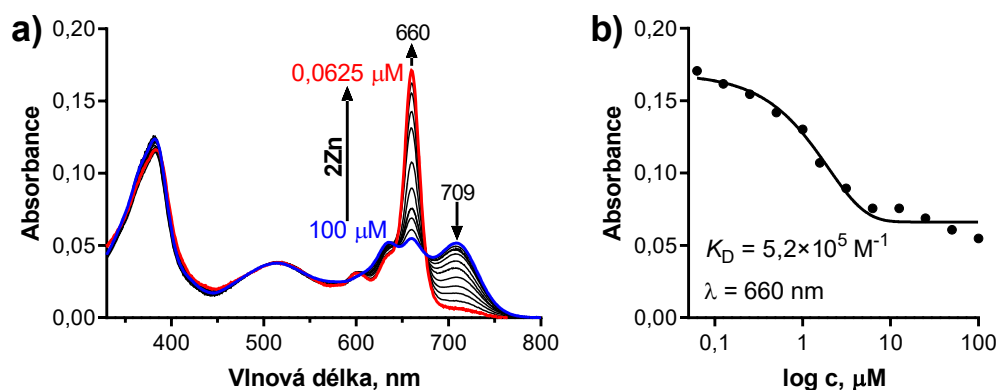


Obr. 15 Titrace $10 \mu\text{M}$ roztoku 2Zn v toluenu pomocí pyridinu. **a)** změny v celém absorpčním spektru při přechodu z **J-dimeru** na **monomer**; **b)** křivka nárůstu absorpce monomeru (A_M) v λ_{max} během titrace pyridinem, která sloužila pro výpočet K_P pomocí nelineární regrese.



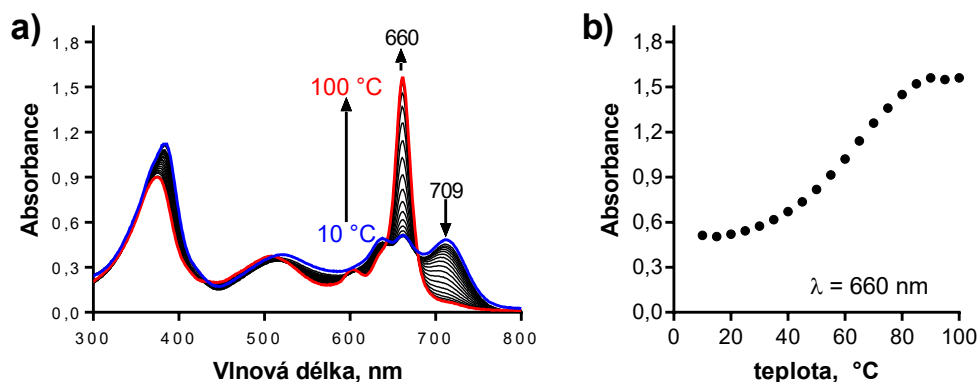
Obr. 16 Titrace $10 \mu\text{M}$ roztoku 2Zn v toluenu pomocí pyridinu. **a)** změny v celém emisním spektru při přechodu z **J-dimeru** na **monomer**; **b)** křivky nárůstu/poklesu fluorescence **J-dimeru/monomeru** v λ_{max} během titrace pyridinem, která sloužila pro výpočet K_P pomocí nelineární regrese.

Stanovení K_D bylo provedeno pouze u sloučeniny **2Zn** ($K_D = 5,2 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$), protože tvar absorpčního spektra v oblasti Q-pásu byl závislý na koncentraci měřeného roztoku – čím více byl roztok sloučeniny koncentrován, tím větší byla tendence **2Zn** tvořit *J*-dimery. Následně byla K_D spočítána na základě nelineární regrese absorpčních maxim monomeru (660 nm) pomocí programu Prism (GraphPad Software, San Diego, USA) (Obr. 17).

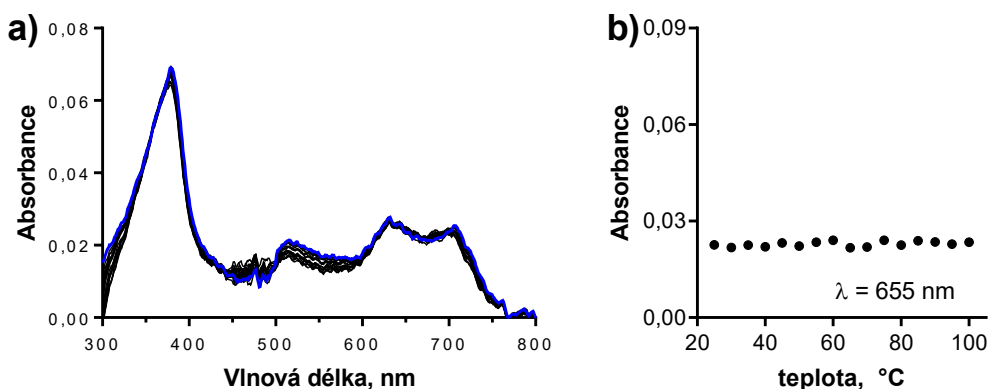


Obr. 17 Změny v absorpci TPyzPz **2Zn** v závislosti jeho koncentraci v toluenu. Spektra byla nakonec pro možnost porovnání upravena, aby odpovídaly $1 \mu\text{M}$ roztoku. **a)** změny v celém absorpčním spektru při přechodu z *J*-dimeru na monomer; **b)** křivka absorpce v λ_{max} monomeru během experimentu, která sloužila pro výpočet K_D pomocí nelineární regrese.

Podobně se chovala sloučenina **2Zn** ($10 \mu\text{M}$ roztok) i při změně teploty, kdy při vyšších teplotách dochází k rozpadu dimerů a zvýšení podílu monomeru ve vzorku (Obr. 18). Oproti tomu $1 \mu\text{M}$ roztok sloučeniny **1Zn** při změně teploty vykazoval minimální až nulové změny poměru dimeru ku monomeru, což souvisí se silnější interakcí mezi podjednotkami dimeru z důvodu malé objemnosti periferních substituentů (Obr. 19).



Obr. 18 Změny v absorpci 10 μM roztoku TPyzPz **2Zn** v toluenu v závislosti na teplotě. **a)** změny v celém absorpčním spektru při přechodu z **J-dimeru** na **monomer**; **b)** křivka absorpce v λ_{max} monomeru během experimentu.



Obr. 19 Ukázka stability J-dimeru sloučeniny **1Zn** (1 μM roztoku v toluenu) v závislosti na teplotě (25 – 100 °C). **a)** beze změny v celém absorpčním spektru (výchozí **J-dimer** při 25 °C); **b)** hodnoty absorpce v λ_{max} monomeru během experimentu.

U sloučeniny **2Zn** bylo možné vzhledem k dispozici hodnot K_D a K_P vypočítat i asociační konstantu K_1 dle Rovnice 5 převzaté z literatury:⁴⁰

$$K_1 = \sqrt{K_D \times K_P}$$

Rovnice 5 Výpočet asociační konstanty TPyzPz a pyridinu.

Zjištěná hodnota $K_1 = 6,1 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ zapadá mezi hodnoty uváděné v literatuře.⁴⁰

⁴¹ Pro názorný příklad můžeme srovnat K_1 sloučeniny **2Zn** s jejím publikovaným kyslíkovým izosterem,⁴¹ který má namísto dibutylamino periferní substituce bis(methoxyethyl)amino substituci a jeho $K_1 = 4,25 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$, což řádově naprosto odpovídá našim experimentálním hodnotám pro **2Zn**.

7 Závěr

Během syntetické části byly připraveny zinečnaté TPyzPzs s dimethylamino, dibutylamino a dimorfolino periferní substitucí, u kterých byly následně studovány jejich fotofyzikální vlastnosti a míra tvořit agregáty, konkrétně *J*-dimery.

Chování připravených molekul během stanovení kvantových výtěžků korespondovalo s již publikovanými sloučeninami, tj. byl znatelný rozdíl v kvantových výtěžcích v monomerním a agregovaném stavu v závislosti na použitém rozpouštědle. V nekoordinujícím rozpouštědle (toluen), kde se tvoří *J*-dimery, byly kvantové výtěžky singletového kyslíku a fluorescence vyšší než v koordinujícím rozpouštědle (DMF, toluen s 1–5 % pyridinu), kde jsou sloučeniny monomerní. To je způsobeno inhibicí ICT u *J*-dimerů, který slouží jako jeden z primárních způsobů relaxace molekuly. Výskyt vyšších kvantových výtěžků u agregovaných molekul je velice ojedinělý, neboť ve většině případů sloučeniny po agregaci ztrácí své fotofyzikální vlastnosti.

Dalším krokem bylo porovnání stability jednotlivých *J*-dimerů. V případě dimethylamino TPyzPz **1Zn** byla zapotřebí větší koncentrace koordinujícího rozpouštědla k rozrušení intermolekulárních koordinačních vazeb a následné monomerizaci oproti stericky objemnějšímu dibutylamino TPyzPz **2Zn**.

Dimorfolino derivát se choval atypicky jak během přípravy, tak během samotných měření, kdy bylo dosaženo velmi špatně rozpustného agregátu v nekoordinujícím rozpouštědle, čímž došlo k ovlivnění výsledků jednotlivých měření.

Výsledky zjištěné během této rigorózní práce pomohou v budoucnu naší výzkumné skupině prof. Zimčíka s návrhem molekul vhodných pro cílený vznik *J*-dimerů a jejich využití např. v senzorické oblasti.

8 Seznam použité literatury

1. R. Linstead, *J. Chem. Soc. (Resumed)*, 1934, 1016-1017.
2. P. Zimčik, *Chem. Listy*, 2012, **106**, 275-282.
3. K. Kopecky, P. Zimcik, V. Novakova, M. Miletin, Z. Musil and J. Stribna, *Dyes Pigm.*, 2008, **78**, 231-238.
4. P. Zimcik, V. Novakova, M. Miletin and K. Kopecky, *Macroheterocycles*, 2008, **1**, 21-29.
5. F. Ghani, J. Kristen and H. Riegler, *Journal of Chemical & Engineering Data*, 2012, **57**, 439-449.
6. C. G. Claessens, U. Hahn and T. Torres, *Chem. Rec.*, 2008, **8**, 75-97.
7. A. A. Chernonosov, E. A. Ermilov, B. Roder, L. I. Solovyova and O. S. Fedorova, *Bioinorganic Chemistry and Applications*, 2014, **2014**.
8. A. Tuhl, S. Makhseed, P. Zimcik, N. Al-Awadi, V. Novakova and J. Samuel, *J. Porphyrins Phthalocyanines*, 2012, **16**, 817-825.
9. M. Isaacs, M. J. Aguirre, A. Toro-Labbe, J. Costamagna, M. Paez and J. H. Zagal, *Electrochim. Acta*, 1998, **43**, 1821-1827.
10. E. T. Saka, C. Göl, M. Durmuş, H. Kantekin and Z. Bıyıklıoğlu, *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 2012, **241**, 67-78.
11. F. Wurthner, T. E. Kaiser and C. R. Saha-Moller, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2011, **50**, 3376-3410.
12. M. Kostka, P. Zimcik, M. Miletin, P. Klemra, K. Kopecky and Z. Musil, *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 2006, **178**, 16-25.
13. V. Novakova, P. Zimcik, K. Kopecky, M. Miletin, J. Kunes and K. Lang, *Eur. J. Org. Chem.*, 2008, 3260-3263.
14. J. R. Lakowicz, *Principles of fluorescence spectroscopy*, Springer Science & Business Media, 2013.
15. K. Lang, J. Mosinger and D. M. Wagnerova, *Chem. Listy*, 2005, **99**, 211-221.
16. V. Novakova, P. Zimcik, M. Miletin, L. Vachova, K. Kopecky, K. Lang, P. Chábera and T. Polívka, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2010, **12**, 2555-2563.
17. R. Misra and S. P. Bhattacharyya, *Intramolecular Charge Transfer: Theory and Applications*, John Wiley & Sons, 2018.

18. V. Novakova, M. Miletin, K. Kopecky and P. Zimcik, *Chem. – Eur. J.*, 2011, **17**, 14273-14282.
19. K. Kopecky, V. Novakova, M. Miletin, R. Kucera and P. Zimcik, *Bioconjugate Chem.*, 2010, **21**, 1872-1879.
20. V. Novakova, P. Hladik, T. Filandrova, I. Zajicova, V. Krepsova, M. Miletin, J. Lenco and P. Zimcik, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2014, **16**, 5440-5446.
21. D. Wohrle, G. Schnurpfeil, S. G. Makarov, A. Kazarin and O. N. Suvorova, *Macroheterocycles*, 2012, **5**, 191-202.
22. P. Zimčik and M. Miletín, *Ceska Slov Farm*, 2004, **53**, 219-224.
23. M. D. Daniell and J. S. Hill, *Australian and New Zealand Journal of Surgery*, 1991, **61**, 340-348.
24. S. O. McDonnell, M. J. Hall, L. T. Allen, A. Byrne, W. M. Gallagher and D. F. O'Shea, *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, **127**, 16360-16361.
25. P. Zimcik, M. Miletin, H. Radilova, V. Novakova, K. Kopecky, J. Svec and E. Rudolf, *Photochem. Photobiol.*, 2010, **86**, 168-175.
26. M. Miletin, P. Zimcik and V. Novakova, *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2018, **17**, 1749-1766.
27. P. Zimcik, M. Miletin, M. Kostka, J. Schwarz, Z. Musil and K. Kopecky, *J. Photochem. Photobiol., A*, 2004, **163**, 21-28.
28. E. Navarro, G. Serrano-Heras, M. J. Castano and J. Solera, *Clin. Chim. Acta*, 2015, **439**, 231-250.
29. J. Demuth, R. Kucera, K. Kopecky, Z. Havlinova, A. Libra, V. Novakova, M. Miletin and P. Zimcik, *Chem. – Eur. J.*, 2018, **24**, 9658-9666.
30. K. Kopecky, V. Novakova, M. Miletin, R. Kucera and P. Zimcik, *Tetrahedron*, 2011, **67**, 5956-5963.
31. J. Demuth, M. Kantor, R. Kucera, M. Miletin and V. Novakova, *Bioconjugate Chemistry*, 2022, **33**, 788-794.
32. R. P. Linstead, E. G. Noble and J. M. Wright, *J. Chem. Soc. (Resumed)*, 1937, 911-921.
33. C. Schweitzer and R. Schmidt, *Chem. Rev.*, 2003, **103**, 1685-1757.
34. X. F. Zhang and X. L. Li, *J. Lumin.*, 2011, **131**, 2263-2266.
35. V. Novakova, M. Miletin, T. Filandrová, J. Lenčo, A. Růžička and P. Zimcik, *The Journal of Organic Chemistry*, 2014, **79**, 2082-2093.
36. A. Ogunsipe and T. Nyokong, *J. Mol. Struct.*, 2004, **689**, 89-97.

37. A. Ogunsipe, D. Maree and T. Nyokong, *J. Mol. Struct.*, 2003, **650**, 131-140.
38. P. Zimcik, V. Novakova, K. Kopecky, M. Miletin, R. Z. Uslu Kobak, E. Svandrlíkova, L. Váchová and K. Lang, *Inorg. Chem.*, 2012, **51**, 4215-4223.
39. Y. Inaba and Y. Kobuke, *Tetrahedron*, 2004, **60**, 3097-3107.
40. M. Garcia-Iglesias, K. Peuntinger, A. Kahnt, J. Krausmann, P. Vazquez, D. Gonzalez-Rodriguez, D. M. Guldi and T. Torres, *J. Am. Chem. Soc.*, 2013, **135**, 19311-19318.
41. J. Demuth, M. Miletin, R. Kucera, A. Ruzicka, Z. Havlinova, A. Libra, V. Novakova and P. Zimcik, *Organic Chemistry Frontiers*, 2020, **7**, 445-456.