

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



Diplomová práce

**Syntéza potenciálně fotodynamicky aktivních látek,
odvozených od dusíkatých heterocyklů VIII.**



Školitel: PharmDr. Miroslav Miletín, Ph.D.

Autor: Vilma Trtílková, 5. ročník
v Hradci Králové roku 2010

CHARLES UNIVERSITY IN PRAGUE
FACULTY OF PHARMACY IN HRADEC KRALOVE
DEPARTMENT OF PHARMACEUTICAL CHEMISTRY AND DRUG CONTROL



Diploma work

**Synthesis of potentially photodynamic active substances,
derived from nitrogen containing heterocycles VIII.**



Supervisor: PharmDr. Miroslav Miletín, Ph.D.

Author: **Vilma Trtílková** 5th year
in Hradec Kralove 2010

Prohlašuji:

tato diplomová práce je mým autorským dílem, jež jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a další zdroje informací, z nichž jsem při zpracování této práce čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci jsou řádně citovány. Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající z autorského zákona č. 121/2000 Sb.

Diplomová práce vznikla za podpory grantu SVV-20-261-001

Vilma Trtílková v Hradci králové roku 2010

Poděkování:

Chtěla bych touto cestou velmi poděkovat především svému školiteli PharmDr. Miroslavu Miletínovi Ph.D. za odborné vedení, pomoc a velkou trpělivost, které se mnou při vypracovávání této diplomové práce měl. Děkuji tímto i všem ostatním členům katedry farmaceutické chemie a kontroly léčiv za poskytnutí cenných rad, zkušeností, prostor, přístrojů a pomůcek potřebných k vypracování této práce.

Také bych zde chtěla poděkovat své rodině a svému příteli Stanislavu Krčmovi za pomoc a podporu po celou dobu studia. Zvláštní poděkování patří MVDr. Ivaně Koláčkové Ph.D a Pavle Hanzlíkové.

Abstrakt

Tato diplomová práce se zabývá přípravou potenciálních nefluoreskujících zhášeců fluorescence. Tyto zhášecy jsou odvozeny od nesymetricky substituovaných alkylaminoderivátů tetrapyrazinoporpyrazinů – azaftalokyaninů.

Aby mohly nové sloučeniny vzniknout, bylo třeba si předem připravit podle již známých postupů potřebné prekurzory např. 2,3-dikyaninoxalin-6-karboxylovou kyselinu.

Konečné produkty byly syntetizovány cyklotetramerizací, pomocí metody statické kondenzace, ke které byli jako výchozí látky použity dva strukturně rozdílné prekurzory.

V této diplomové práci byly jako výchozí látky zvoleny N-(3-azidopropyl)-2,3-dikyaninoxalin-6-karboxamid spolu s 5,6-bis(diethylamino)pyrazin-2,3-dikarbonitrem a ty byly cyklizovány v poměru 1:3. Cílem bylo vytvořit finální látku, obsahující periferní funkční skupinu, kterou byl zvolen azid. Sloučeninu se bohužel touto cestou připravit nepodařilo. Po dvou neúspěšných pokusech bylo patrné, že touto cestou to nepůjde a byla tedy vyzkoušena cyklotetramerizace s původní kyselinou 2,3-dikyaninoxalin-6-karboxylovou. Ani tato cesta ovšem nebyla úspěšná, sloučenina se po přidání azidu rozpadla.

Dále byla na periferii již dříve na katedře připravené kyseliny Q18-1H2 přidána periferní skupina azidu a centrálně komplexován atom zinku.

Získané látky byly charakterizovány NMR a UV-VIS spektry. Lze je využít pro zhášení fluorescence jako tzv. „dark quencher“. Zinečnatý komplex byl navázán na oligonukleotidovou sondu.

Abstract

This diploma work deals with preparation potentially non-fluorescent quenchers of fluorescence. These quenchers are derived from asymmetrically substituted alkylaminoderivatives of tetrapyrazinoporphyrazines – azaphthalocyanines.

We had to prepare necessary precursors, for example 2,3-dicyanoquinoxaline-6-carboxylic acid, by known reaction methodologies, for synthesis of new compound.

Final products were synthesised by cyclotetramerization reaction and using statistic condensation method. Two structural different precursors were used as initial substances. As two initial substances N-(3-azidopropyl)-2,3-dicyanoquinoxaline-6-carboxamide and 5,6-bis(diethylamino)pyrazine-2,3-dicarbonitrile were selected in this thesis.

These two products reacted in ratio 1:3. The aim was to prepare final substance with peripheral functional moieties. Azide group was selected as peripheral moiety .

This synthesis was not successful. Two unsuccessful trials for preparation this substance showed, that we have to take the other way.

Therefore, the 2,3-dicyanoquinoxaline-6-carboxylic was used for the cyclotetramerisation reaction. However, this way was not successful too. Compound crumbled when the azide moiety was added.

Further Q18-1H2 porphyrazine carboxylic acid, formerly prepared at the department, was derivatized by the azido moiety and zinc was complexed as the central metal into the modified compound.

Products were characterized NMR and UV-vis spectra. These products we can use for quenching of fluorescence such as dark quenchers. Zinc complex was attached to oligonucleotide probes.

Obsah

1	Teoretická část.....	8
1.1	Fotodynamická terapie	8
1.1.1	Úvod.....	8
1.1.2	Princip PDT	8
1.1.3	Výhody PDT	9
1.1.4	Nevýhody PDT	9
1.1.5	Využití PDT	9
1.1.6	Historický vývoj PDT	10
1.2	Luminiscence a fluorescence	12
1.3	Fluorofory používané v praxi	17
1.3.1	Deriváty 4,4-difluor-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacenu	17
1.3.2	Deriváty xanthenu	18
1.3.3	Barviva s indocyaninovým skeletem.....	20
1.3.4	Další fluorescenční barviva	21
1.4	Zhášeče používané v praxi.....	22
1.5	Oligonukleotidové sondy.....	26
1.5.1	Jednoduše značené sondy („mono-labeled probes“)	27
1.5.2	Dvojitě značené sondy („dual-labeled probes“)	27
1.5.3	Speciální typy sond	29
2	Cíl práce	30
3	Metodická část.....	31
3.1	Syntéza nesymetrických ftalocyaninů a jejich azaanalogů	32
3.1.1	Syntéza A ₃ B ftalokyaninů	33
4	Experimentální část.....	37
4.1	Použité metody.....	37
4.2	Použité komponenty mobilních fází	37
4.3	Další užitá chemikálie	38
4.4	Použité přístroje a materiály	39
4.5	Schéma prováděných reakcí	40
4.6	Vlastní syntéza	44
4.6.1	Syntéza 1	44
4.6.2	Syntéza 2	46
4.6.3	Syntéza 3	52
4.6.4	Syntéza 4	54
4.6.5	Syntéza 5	58
4.6.6	Syntéza 6	61
4.6.7	Syntéza 7	64
4.6.8	Syntéza 8	66
4.6.9	Syntéza 9	69
4.6.10	Click reakce s připraveným Q18-Zn-azidem	71
5	Výsledky a diskuze	73
	Závěr.....	77
	Literatura.....	78
	Seznam obrázků	82
	Seznam zkratk	83
	Přílohy	86
	Údaje pro knihovnickou databázi.....	91

1 Teoretická část

1.1 Fotodynamická terapie

1.1.1 Úvod

Fotodynamická terapie (photodynamic therapy PDT) je nová perspektivní diagnostická a léčebná metoda využívaná v klinické praxi zejména při léčbě tumorů. [1] [2] Tato nová léčebná metoda se vyznačuje vysokou účinností. [2] Je založená na podání fotosenzitivní látky, jež se po aplikaci hromadí přednostně v nejrychleji proliferujících buňkách a po ozáření světlem určitého spektra způsobí smrt odpovídajících buněk. [1]

1.1.2 Princip PDT

PDT je novou nadějnou léčbou nejen nádorových onemocnění. [3] Je založena na spolupůsobení složek, jež samy o sobě nejsou toxické a neprojevují žádné biologické efekty. Jedná se o kombinaci fotodynamicky aktivní sloučeniny, světla a molekulárního kyslíku. [1] Touto kombinací dochází k produkci cytotoxických agens, jež ničí nádorové buňky. [3] Fotosenzitizér je aplikován v zásadě trojím způsobem. Buďto ve formě masti, obsahující příslušnou látku, nebo je zaveden intravenózně či intralezionálně. Koncentrace fotosenzitizéru v postižených buňkách dosahuje optimální hodnoty v různých časech od 5 minut až po 72 hodin v závislosti na způsobu aplikace a druhu použité látky. Jeho kumulace a koncentrace v tkáních spolu s dávkou ozáření je hlavním faktorem určujícím účinek PDT. Intracelulární lokalizace fotosenzitizéru a jeho následná fotodynamická aktivita závisí především na jeho struktuře, lipofilitě, substituentech a jeho náboji.

Účinnost PDT je dána osvětlením tumoru světlem vhodné vlnové délky, kdy molekuly fotosenzitizéru absorbují fotony a přechází do singletového a následně tripletového excitovaného stavu. Dále dochází nejčastěji k přenosu energie z molekuly fotosenzitizéru na molekulu kyslíku. Takováto excitovaná molekula kyslíku je asi 1000 krát reaktivnější než jeho základní molekulární stav. Singletový kyslík (a ostatní formy aktivního kyslíku, např. superoxidový radikál, hydroperoxidový a hydroxylový radikál) pak reaguje s buněčnými membránami za vzniku lipidperoxidového radikálu a následné nekrózy či apoptózy buněk. Na destrukci maligní tkáně a nádorových buněk se podílí také cévní poškození, které znemožňuje

zásobení tkáně krví a živinami dochází k ischemii tumoru, nastupuje fagocytární imunita a vzniká zánět. Fotosenzitizér se během celého fotodynamického procesu ve tkáni zpětně regeneruje, a proto jedna molekula fotosenzitizéru může způsobit vznik většího množství reaktivního singletového kyslíku. Účinek PDT na nádorovou tkáň se díky této regeneraci fotosenzitizéru znásobuje. Poměr apoptotické a nekrotické smrti buněk závisí na typu nádoru, ale především na koncentraci fotosensibilizátoru a dávce ozáření. Nižší dávky fotosenzibilizátoru a záření způsobují apoptózu, vyšší nekrózu, ovšem při každé aplikaci dochází k oběma typům smrti buněk. [1]

1.1.3 Výhody PDT

Výhodou fotodynamické terapie je téměř nulová toxicita použité látky, bez přístupu světla, takže je možno ji v krátkém čase mnohokrát opakovat, narozdíl od chemo- či radioterapie. Použití některých PS se vyznačuje poměrně přesnou selekcí nádorových buněk, která je založena na rozdílu v koncentraci seztizéru mezi normální a cílovou tkání. Metoda tedy ničí především nádorové buňky a okolní zdravé zůstanou neporušeny. Protože dochází k úplné likvidaci poškozené tkáně, aniž by byly zasaženy zdravé buňky, je zajištěn i dobrý kosmetický efekt. Jedná se o metodu neinvazivní a tedy bezpečnou vůči pacientovi. [1] Lze ji používat i u pacientů, u kterých by byl chirurgický zákrok kontraindikován (např. porucha koagulace), a lze ji kombinovat s kryoterapií i radioterapií. [4]

1.1.4 Nevýhody PDT

Mezi nevýhody PDT patří omezená možnost použití, neboť světlo používané k aktivaci fotosenzitizéru proniká nejvýše 1cm do tkáně a tuto metodu lze tedy použít pouze na povrchu těla, případně na části orgánů dostupné pomocí endoskopů a katetrů. Metoda vpichu optického vlákna s aktivizujícím světlem přímo do tkáně se zatím příliš nepoužívá. Nevýhodou při nitrožilní aplikaci fotosenzitizéru je několik hodin až týdnů trvající fotosenzitivita kůže po léčbě; pacient se tedy musí vyvarovat pobytu na slunci a vystavení silného světelného záření. Dále sem můžeme přiřadit také časovou náročnost, nutnost často zákrok opakovat, u citlivých jedinců pocit bolesti a pálení při ozařování. Nežádoucí účinky se projevují edémem a erytémem tkáně po ozáření a v některých případech povrchovou kožní infekcí. [1]

1.1.5 Využití PDT

Nejvýznamnější uplatnění nalézá fotodynamická terapie při léčbě maligních (zhoubných) i benigních (nezhoubných) tumorů. Většinou se zatím jedná o paliativní

(udržovací) nebo doplňkovou léčbu, nejčastěji chirurgického zásahu. Jak již bylo zmíněno výše, největším omezením fotodynamické terapie je průchod aktivizujícího světla nejvýše 1cm do hloubky tkáně. Přesto byla s úspěchem použita pro léčbu nádorů žaludku, tlustého střeva, hlavy a krku, ústní a nosních dutin, hrtanu, hltanu, jícnu, plic, močového měchýře, jater, prsu, genitálií i mozku. Nejčastěji se ovšem používá pro léčbu nejrůznějších povrchových kožních tumorů a lézí; např. T-lymfom. V kožním lékařství se používá také k léčbě lupénky, bradavic, [1] vitiliga, leukodermy [2] nebo v estetické medicíně k vyhlazení jizev či vrásek, kdy aktivuje fibroblasty k novotvorbě kolagenu. [1] Využití nachází metoda také v oftalmologii při léčbě senilní degenerace makuly (AMD). [5] Velmi nadějnou aplikací je čištění kostní dřevě od leukemických buněk, kdy se pacientovi odebere kostní dřevě, vyčistí se metodou fotodynamické terapie a coby autologní štěp vrátí zpět pacientovi. [1] PDT ovlivňuje významným způsobem i imunitní systém (aktivace, suprese) a tudíž se dá využít i v léčbě některých autoimunitních onemocnění např. (revmatoidní artritida – RA). [6] [7]

1.1.6 Historický vývoj PDT

Počátky využití světla jako terapeutického agens se datují ještě několik tisíc let před Kristem. Již starověké civilizace, zahrnující Egypt, Indii a Čínu, používali světlo k léčbě některých kožních onemocnění, ke kterým se řadí např. vitiligo, psoriáza, rakovina, také při terapii ricketsových infekcí či psychóz. [2] I v době antiky byly tyto znalosti rozšiřovány, např. u helioterapie, kde sledovali vliv světla na obnovu lidského zdraví. Již v této době lidé znali pozitivní efekty slunečního záření i jeho škodlivý potenciál. [3]

K velkému rozvoji fototerapie došlo až na přelomu 19. a 20. století, kdy dánský lékař Niels Finsen popsal působení červeného světla na zlepšení praskání neštovic. [8]

Metoda PUVA (psoraleny aktivované UV zářením a světlem) byla rozvíjena v 70. letech 20. století k léčbě lupénky. Dnes se užívá také k léčbě vitiliga a v imunoterapii. [2]

V průběhu 19. století se objevilo mnoho zajímavých prací, významných pro budoucí výzkum PDT: objev struktury, funkce a vlastnosti krevního barviva hemu a strukturální základy budoucích klinicky významných fotosenzitizérů. Dalším krokem německých vědců bylo odstranění železa z hemu a následná modifikace struktury,

jejímž výsledkem byl hematoporfyrin. [9] [10]. Roku 1903 Jesionek a von Tappeiner provedli na kožní klinice v Mnichově topickou léčbu kožního tumoru eosinem a bílým světlem. [11] Následně von Tappeiner s Jodlbauerem dokázali, že i kyslík je potřebným prvkem ve fotosensitické reakci. Poprvé použili termín „fotodynamický efekt“(1907). [12] [13]

Do současnosti nejvíce sledované a studované fotosenzitizéry jsou porfiriny, které byly objeveny a popsány již v polovině 19. století. První pozorování fotodynamické aktivity u těchto derivátů byly posány a provedeny v průběhu let 1908 - 1911. Tomuto tématu se věnoval Hausmann, který zjistil, že kombinace hematoporfyrinu a světla zabíjí prvky rodu *Paramecium* a červené krvinky. [14]

Myšlenka k použití hematoporfyrinu jako fotodynamického agens vyvstal z výkladu onemocnění zvaném porfyrie (porucha metabolismu porfyriu - vrozená vada syntézy hemu). Tento typ onemocnění je doprovázen značnou fotosenzitivitou. Pacienti s tímto onemocněním produkovali velké množství různých typů porfyriu, některé se chovaly jako endogenní fotosenzitizéry, kumulující se v tkáních, nejčastěji v kůži. [15]

Hematoporfyriny se dále zabývali Schwartz s Lipsonem. Jejich úspěchem byl vývoj čistších a aktivnějších forem hematoporfyrinu, který byl připraven v roce 1955 a nazván „hematoporfyrin Derivate“ (HpD). Vyznačoval se daleko vyšší účinností a byl použit jako první pro diagnostické metody lidských nádorů. Tato látka se později stala základem pro v současné době nejrozšířenější fotosenzitizér – Photofrin.[®] Z nejasných důvodů se ve zvýšené míře kumuloval v neoplastické tkáni. [16] Po úspěšné léčbě nádorů na myších byl aplikován i v humánní medicíně k terapii nádoru močového měchýře. [17] Experimentální studie provedené roku 1970 potvrdily hypotézu von Tappeinera, že singletový kyslík je hlavním cytotoxickým činitelem ve fotodynamické léčbě [18] HpD a světlo v červené oblasti světelného spektra mohou selektivně ničit nádorové buňky bez poškození okolní zdravé tkáně a rozeběhly další studie na použití PDT nejen k léčbě nádorů kůže, močového měchýře, ale i dalších, např. rakoviny plic, jícnu, konečníku a mozkových nádorů [19] [20] [21] [22] pro značný počet jeho vedlejších účinků a nežádoucích vlastností pro PDT, se další vývoj a výzkum zaměřuje na nové typy fotosenzitizérů tzv. „II. generace“, kde se hledají látky s vlastnostmi výhodnějšími. [23]

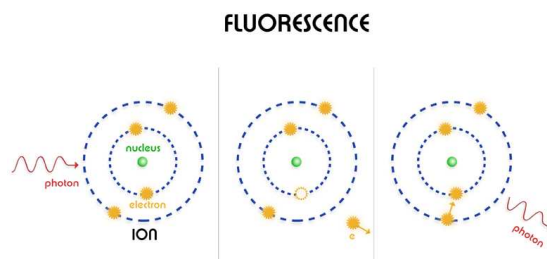
1.2 Luminiscence a fluorescence

Luminiscence je emise záření spontánně nastávajícího při přechodu molekuly z excitovaného stavu do stavu základního. [24] Typem luminiscenčního záření je fluorescence.

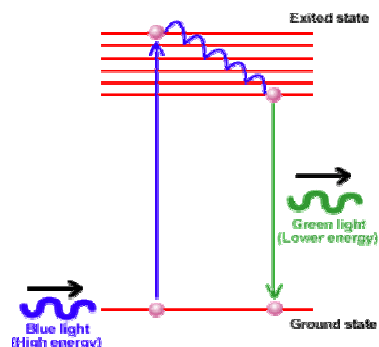


Obr. 1 – Fluorescence [25]

Toto záření není spontánní. K emisi elektromagnetického záření je třeba, aby příslušná látka absorbovala záření určité vlnové délky. [26] Existuje krátkou dobu. To znamená, že fluorescence je vytvářena, když látka absorbuje světelnou energii při nízké vlnové délce (vyšší energii) a poté emituje světelnou energii při vyšší vlnové délce (nižší energii). [28]

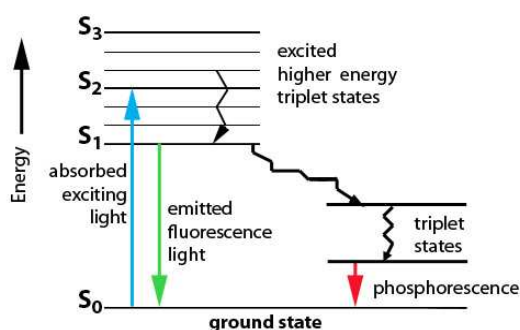


Obr. 2 – Fluorescence [27]



Obr. 3 – Energetický přechod [29]

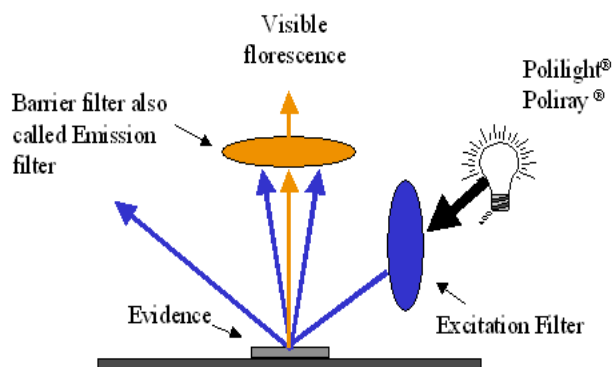
Doba trvání excitovaného stavu molekuly je určena průměrným časem, který látka setrvává ve vzbuzeném stavu před návratem do stavu základního. Obecně je doba trvání fluorescence kolem 10^{-8} s. [30]



Na obr. 4 je zobrazena molekula fluoroforu v základním stavu S_0 a je převedena do excitovaného singletového stavu, S_2' absorpcí energie o specifické vlnové délce. Uvolněním některé z absorbované energie přejde molekula do relaxovaného singletového stavu S_1 . Nakonec se molekula vrátí do svého základního energetického stavu uvolněním zbývající energie. [28]

Obr. 4 – Jablonskeho diagram[31]

Foton darované energie $h\nu_{ex}$ je získán z okolního zdroje, například z laseru nebo lampy. (Obr. 5.) Fluorescenční molekula nacházející se ve svém základním energetickém stavu S_0 absorbuje energii v podobě fotonu, který tvoří excitovaný elektronový singletový stav molekuly S_1' (viz Jablonského diagram obr. 4). Tento vzbuzený stav trvá omezenou dobu, obvykle jednu až deset nanosekund. V průběhu tohoto krátkého času fluorescenční molekula (fluorofor) podstoupí změny v konformaci a často podléhá potenciálním interakcím se svým okolím. V první fázi druhého stupně je rozptýlena část z absorbované energie fluoroforu. Molekula tvoří relaxovaný singletový stav S_1 . V tomto stavu fluorofor vstoupí do druhé fáze druhého stupně tzv. - emise energie, $h\nu_{em}$. Nakonec, ve třetímu stupni, se fluorofor vrátí do svého základního stavu S_0 . [28]



Obr. 5 – Princip fluorescenční lampy [32]

Doba života fluoroforu za nepřítomnosti neradiačních zhašecích molekul se nazývá vnitřní (též přirozená, radiační) doba života. Vnitřní dobu života lze v principu spočítat z absorpčního spektra, extinkčního koeficientu a fluorescenčního spektra. Za

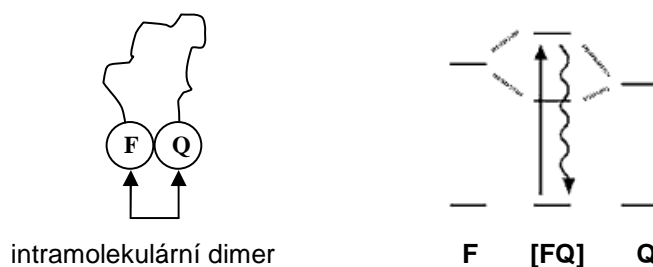
určitých podmínek lze vnitřní dobu života spočítat také jako poměr změřené doby života a kvantového výtěžku fluorescence.

Zhášení fluorescence

Zhášení fluorescence lze definovat jako proces dvou molekul, který snižuje kvantový výtěžek fluorescence bez změny fluorescenčního emisního spektra. [30] Molekula se ze vzbuzeného stavu vrací do základního stavu nezářivým přechodem v důsledku srážky s molekulou zhášedla např. O₂, halogeny (Br, I) [24]

Energie může být předávána mezi dvěma barvivy, donorem a akceptorem, nezářivě. Zhášení může být statické nebo dynamické. [33]

Statické zhášení: vytváří se nefluoreskující komplex v základním energetickém stavu („ground state complex“). Donorová a akceptorová část vytvoří intramolekulární dimer. [30] [33]

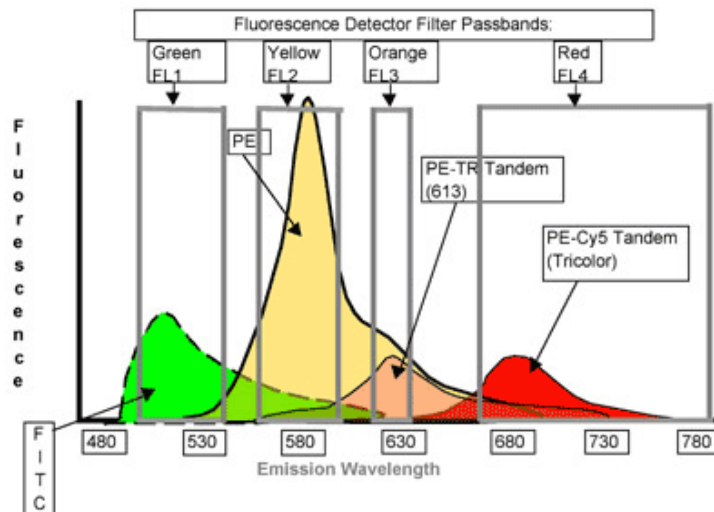


Obr. 6 – Znárodnění statického zhášení

(Fluorofor **F** vytvoří se zhášedlem („quencherem“) **Q** „komplex v základním energetickém stavu“ **[FQ]**)

Vzniklé agregáty jsou děleny na H-agregáty a J-agregáty dle toho, zda je absorpce posunuta k horní (H-agregáty) či spodní (J-agregáty) oblasti excitačního pásu. H-agregáty mají absorpci posunutou k modré oblasti spektra a mají často významně sníženou fluorescenci. J-agregáty mají oproti předchozím absorpci posunutou k červené oblasti spektra. [34] Typickými statickými zhášedly jsou báze nukleových kyselin, nikotinamid, guanin, těžké kovy. [30]

Dynamické zhášení: bývá označován též jako fluorescenčně rezonanční přenos energie („fluorescence-resonance energy transfer“, FRET) [35] Při tomto typu zhášení je donor energie po ozáření excitován a předává energii akceptoru, což způsobí jeho excitaci a současně přechod donoru do základního energetického stavu. Následně excitovaný akceptor (jiný fluorofor nebo látka nemající fluorescenci), vyzáří energii ve formě fotonu nebo tepla. [36] [37] Nejčastějším zhášedlem fluorescence je molekulární kyslík, atomy halogenů či akrylamid. [30]



Obr. 7 – Fluorescenční vlnové délky [38]

Snížení intenzity fluorescence dynamickým zhášením je popsáno Sternovou-Volmerovou rovnicí:

$$F_0/F = t_0/t = 1 + k_q \times t_0 \times C_q,$$

- F_0 je kvantový výtěžek fluorescence za nepřítomnosti zhášedce,
- F je kvantový výtěžek fluorescence za přítomnosti zhášedce o koncentraci C_q ,
- t_0 je doba dohasínání fluorescence bez zhášedce,
- t je doba dohasínání v přítomnosti zhášedce
- k_q je bimolekulární zhášecí konstanta (neboli bimolekulární rychlostní konstanta určená difúzí, vynásobená účinností zhášení). [30]

FRET může být diferencován na dva způsoby zhášení fluorescence. Na tzv. Försterův a Dexterův mechanismus zhášení.

Försterův mechanismus (Coulombův): je založen na interakcích dipól-dipól mezi tranzitními dipóly donoru a akceptoru. Tento mechanismus zhášení je extrémně závislý na vzdálenosti donoru a akceptoru energie (R), vyjádřené vztahem $1/R^6$. Försterův model přenosu energie se vyskytuje typicky ve vzdálenosti 20 – 60 Å (2 - 6 nm), maximálně 100 Å (10 nm). Fluorofory a zhášedce (donory a akceptory) musí být vybírány tak, aby se emisní spektrum fluoroforu a absorpční spektrum zhášedce překrývaly.

Dexterův mechanismus (výměnný nebo srážecí přenos energie): může existovat pouze v případech, kdy jsou fluorofor a zhášedce v dostatečně krátké vzdálenosti, aby mohlo dojít k překryvu jejich molekulových orbitalů. Efektivita Dexterova přenosu

energie se snižuje a to podle vztahu e^{-R} , kde R je vzdálenost fluoroforu a zhášeče. [33] [34]



Obr. 8 – Znárodnění dynamického zhášení

(Mezi fluoroforem F a zhášečem („quencherem“) Q dochází k neradiačnímu přenosu energie při excitovaném stavu (*) fluoroforu.)

U akceptoru přeneseného do blízkosti donoru tedy vzdálenosti v rozmezí 20 – 100 Å (2 – 10 nm), dochází k dynamickému přenosu energie, což se projeví snížením intenzity fluorescence donoru. Jestliže jsou k sobě donor a akceptor přeneseny blíže, dojde k tzv. zhášení statickému neboli kontaktnímu. U oligonukleotidových sond lze tedy uplatnit jeden z uvedených mechanismů zhášení v závislosti na velikosti vzdálenosti fluoroforu a zhášeče. [39]

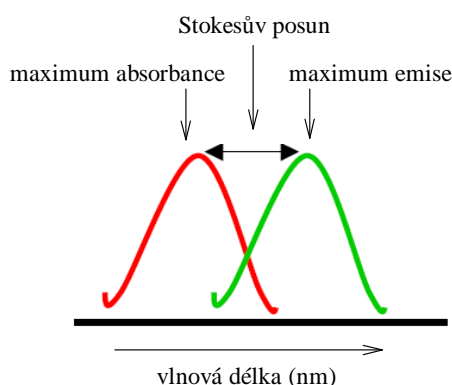
Fotofyzikální vlastnosti většiny fluorescenčních sond závisejí na fyzikálních a chemických vlastnostech okolí. To může vést ke zbytkové fluorescenci, jestliže se prostředí, ve kterém jsou sondy umístěny, významně mění v průběhu daného biologického procesu. [40]

FRET je jedna z mála používaných metod pro měření vzdáleností v řádu nanometrů i změn v těchto vzdálenostech. Tento nástroj lze užít *in vitro* i *in vivo*. [36] [40]

Fluorescenční značení je široce využíváno v biochemických testech na molekulárních sondách [33] Fluorescenční techniky jsou důležitým nástrojem pro zkoumání struktury a dynamiky nukleových kyselin, například v real-time PCR (polymerázové řetězové reakci) se využívají k monitorování procesu amplifikace. Okruh využití v posledních letech výrazně vzrostl. [40][41]

1.3 Fluorofory používané v praxi

Molekuly, které produkují fluorescenci se nazývají fluorofory. Každá z těchto molekul má charakteristické absorpční (excitační) a emisní spektrum. Specifická vlnová délka, při které molekula fluoroforu nejefektivněji absorbuje energii, se nazývá maximum absorbance, a ta, při které nejefektivněji emituje energii, se nazývá maximum emise. Rozdíl mezi maximem absorbance a maximem emise je známý jako Stokesův posun. [28]



Obr. 9 - Absorpční a emisní spektra fluoroforu – Stokesův posun

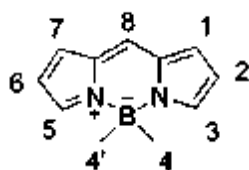
Fluorofory podléhají dynamickému procesu, ve kterém molekuly fluorochromů podstupují foto-indukovanou chemickou destrukci (oxidaci nebo redukci) po expozici excitačním světlem, čímž ztratí svou schopnost fluoreskovat (tzv. fotobleaching). [42]

Využití fluoroforů je detekce a znázornění buněčné organizace a distribuce chemikálií ve vzorcích tkání. Emisní spektrum fluoroforů se může měnit vlivem faktorů prostředí. [43]

1.3.1 Deriváty 4,4-difluor-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacenu

Bodipy

Jedná se o deriváty 4,4-difluor-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacenu. [44] Jejich výhodou je vysoký kvantový výtěžek fluorescence, mají emise v širokém rozmezí (510 - 675 nm) a vysoký extinkční koeficient. Jejich nevýhodou je malý Stokesův posun [30] Mají nanosekundovou dobu života excitovaného stavu, obrovský rozsah barev a zlepšenou fotostabilitu ve srovnání s fluoresceinem. [44]



Obr. 10 – 4,4-difluor-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen

Používají se pro značení proteinů, nukleotidů, oligonukleotidů a dextranů, enzymových substrátů, mastných kyselin, fosfolipidů, lipopolysacharidů, receptorových ligandů a polystyrénových mikrokuliček. [30] Jsou také použitelnými reagensii pro HPLC a kapilární elektroforézu. [45]

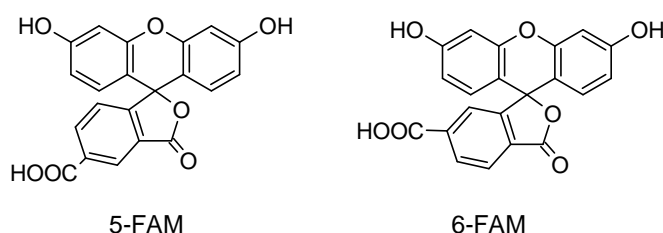
1.3.2 Deriváty xanthenu

Fluorescein byl jedním z prvním fluoroforů. Má relativně vysokou absorbanci, výborný kvantový výtěžek fluorescence a dobrou rozpustnost ve vodě. Díky svému excitačnímu maximu je významným fluoroforem pro aplikace v konfokální laserové skenovací mikroskopii a průtokové cytometrii.

Barviva založená na fluoresceinu mají relativně vysoký fotobleaching. Jejich fluorescence je pH senzitivní a mají relativně široké emisní spektrum fluorescence. Kvantitativní měření s tímto fluoroforem je obtížně proveditelné.

Novější barviva jsou fotostabilnější než fluorescein a mají menší nebo žádnou pH senzitivitu v rozmezí fyziologického pH.

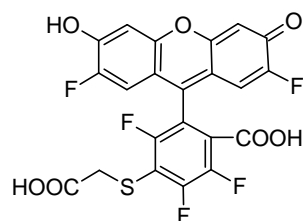
Lze zmínit jednotlivé izomery sukcinimidylesteru karboxyfluoresceinu, 5-FAM a 6-FAM. [45]



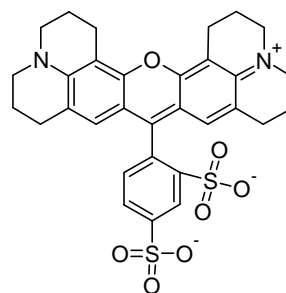
Obr. 11– Deriváty xantinu 5-FAM a 6-FAM

Oregon Green, Rhodamine Green, Texas Red

Oregon Green 488 a Oregon Green 514 jsou fluorovanými analogy fluoresceinů s vyšší fotostabilitou než fluorescein a fluorescencí významně pH necitlivou v rozmezí fyziologického pH. Texas Red fluorofor emituje při vyšších vlnových délkách. Rhodamine Green má dobrou fotostabilitu, vysokým extinkčním koeficient a vysoký kvantový výtěžek fluorescence. [45]



Oregon Green 514

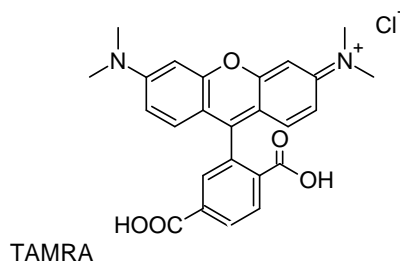


Texas Red

Obr. 12 – Oregon Green a Texas Red

Tetramethylrhodamin

Tetramethylrhodamin (TMR = TAMRA) je důležitým fluoroforem pro přípravu konjugátů, pro značení oligonukleotidů a automatizovanou DNA sekvenci. [45]

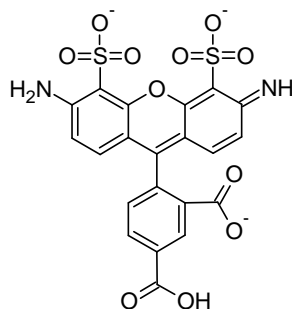


Obr. 13 – Tetramethylrhodamin

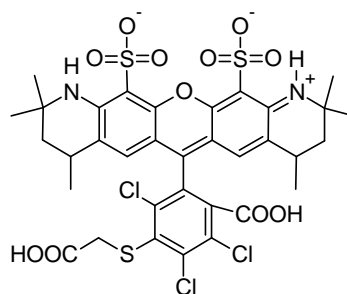
Alexa Fluor

Alexa Fluor 350 apod. jsou jedny z novějších fluoroforů. Čísla v názvech Alexa Fluor barviv vyjadřují přibližné vlnové délky excitačního maxima v nm. [46] Pokrývají celé spektrum od ultrafialové po červenou. [47] Tato barviva vykazují necitlivost svých spekter v širokém rozmezí pH, nejčastěji mezi 4 – 10. [45] [47]

Proteinové konjugáty Alexa Fluor 350 jsou optimálně excitovány při 346 nm a vykazují zářivou modrou fluorescenci (při 442 nm). Alexa Fluor 488 je zeleně fluoreskující barvivo. Alexa Fluor 532, 546, 555, 568, 594, 610 jsou žlutě, oranžově až červeně fluoreskující barviva. Celkově jsou často používány v kombinaci se zeleně-fluoreskujícími barvivy.



Alexa Fluor 488



Alexa Fluor 546

Obr. 14 – Alexa Fluor

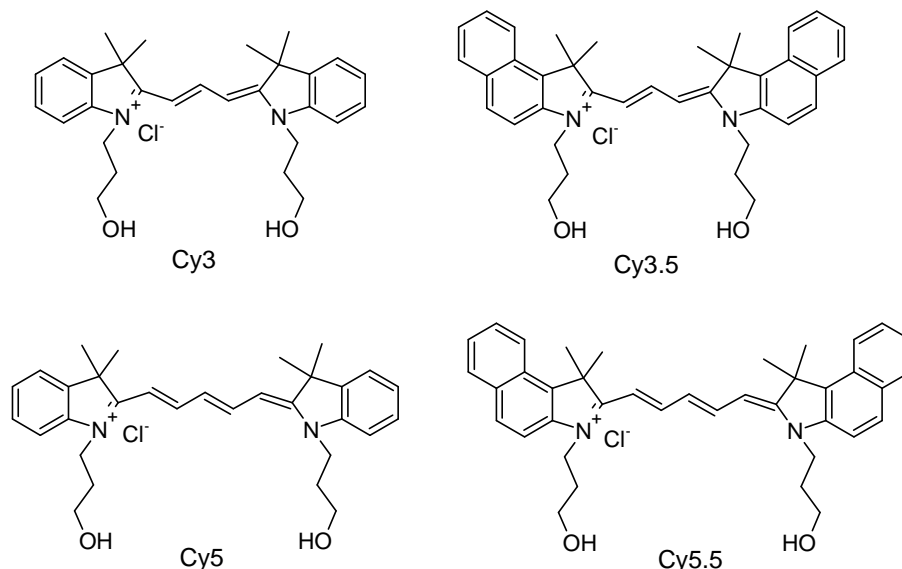
1.3.3 Barviva s indocyaninovým skeletem

Cyaninová barviva

Cyaninová barviva se skládají ze dvou kvartérních heteroaromatických bazí spojených polymethinovým řetězcem. Tyto fluorofory jsou efektivními reagenty pro kovalentní značení proteinů, mají vysoký extinkční koeficient, ale nižší fotostabilitu. [48]

Barviva Cy3, Cy5 a Cy5.5 jsou používána ve fluorescenční mikroskopii, průtokové cytometrii a v detekčních metodách založených na identifikaci nukleových kyselin. [46]

Cy3 barviva jsou žluto-oranžová, zatímco Cy5 fluoreskují v červené oblasti. Jsou obvykle substituována reaktivními skupinami buď na jedné či obou dusíkových stranách řetězců tak, že mohou být chemicky navázány k nukleové kyselině či molekule proteinu. [49] Přikondenzování benzenového kruhu k indocyaninovým barvivům posouvá absorpci barviva k vyšším vlnovým délkám a zvyšuje kvantový výtěžek. [50]



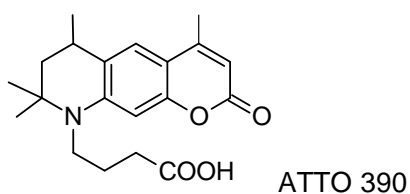
Obr. 15 - Cyaniny

1.3.4 Další fluorescenční barviva

ATTO fluorescenční značky

Mohou být použity jako fluorescenční značky pro velký okruh biomolekul, například proteinů a nukleotidů. Mezi jejich charakteristické vlastnosti patří vysoký extinkční koeficient, vysoký kvantový výtěžek fluorescence a vysoká fotostabilita.

ATTO 390 - základem je kumarinová struktura. Mezi jeho vlastnosti patří velký Stokesův posun a vysoká stabilita při fyziologickém pH. Je mírně hydrofilní a efektivně je excitován v rozmezí 360 - 410 nm. [51]



Obr. 16 – ATTO fluorescenční značky

Výčet fluoroforů uvedený v této kapitole je pouze příkladem těch nejčastěji používaných. [45]

1.4 Zhášeeče používané v praxi

Volba zhášeečího barviva závisí na typu fluorescenčního barviva, respektive na jeho emisním spektru. [52] Zhášeeče mohou být samy o sobě fluorescenční, emitující foton při vyšších vlnových délkách než akceptorový fluorofor, nebo nefluorescenční. [53] Mezi fluorescenční akceptory patří ROX (6-karboxy-X-rhodamin) a TAMRA (6-karboxytetramethylrhodamin). [45]

„Dark quencher“ jsou nefluorescenční chromofory, které při mechanismu FRET mohou absorbovat energii z excitovaného stavu fluoroforu, zabraňující emisi fotonu fluorescence. Excitovaný „dark quencher“ se vrátí do základního stavu uvolněním energie nejčastěji ve formě tepla. Při kontaktním zhášení tvoří „dark quencher“ s fluoroforem nefluorescenční komplex v základním energetickém stavu maskující jeho fluorescenci až do rozpadu komplexu hybridizací. [53]

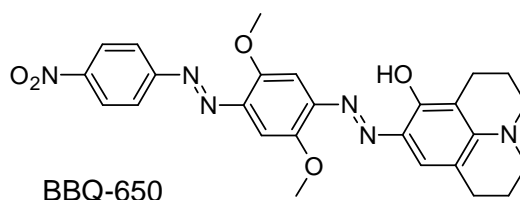
Do oligonukleotidů mohou být inkorporovány například Dabcyl, Black Hole Quenchers™ atd. [54]

ATTO zhášeeče

Novějšími zhášeeči fluorescence jsou ATTO 580Q a ATTO 612Q. Jejich charakteristickými rysy jsou výrazná absorpce, vysoká teplotní stabilita a fotostabilita. Tato barviva jsou mírně hydrofilní. Jejich N-hydroxysukcinimidylestery vykazují výbornou rozpustnost v polárních rozpouštědlech jako DMSO či acetonitril. [55] [56] [57]

BlackBerry™ Quencher 650

BlackBerry™ Quencher 650 (BBQ-650) je také jedním z novějších „dark quencherů“. Jedná se o zhášeeč fluorescence vyšších vlnových délek pomocí FRET i kontaktním mechanismem zhášení. [53]

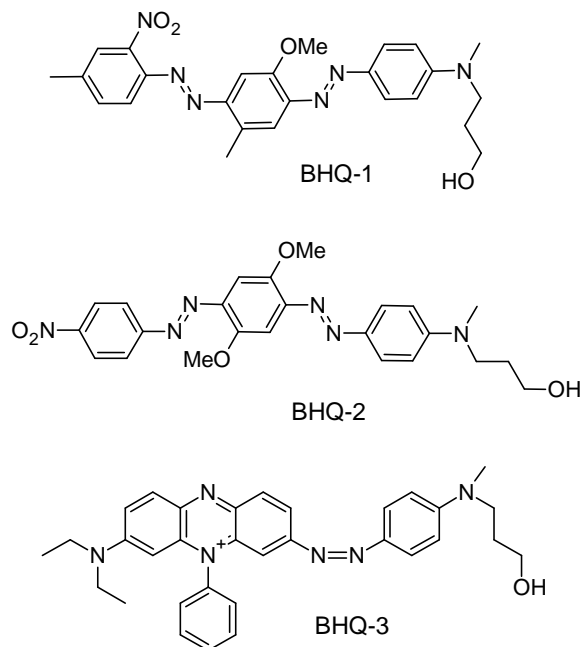


Obr. 17 – BlackBerry Quencher

Black Hole Quenchers (BHQ)

Black Hole Quenchers (BHQ) mají polyaromatický azoskelet.

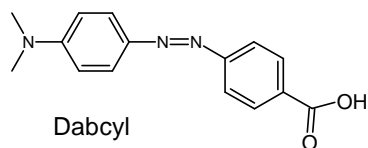
Absorpční maxima BHQ jsou upravována vhodným výběrem elektron-donorových a elektron-akceptorových substituentů na aromatických kruzích. BHQ-1 s absorpčním maximem při 534 nm je efektivním zhasěčem pro více fluoroforů. [58]



Obr. 18 – BHQ – Black Hole Quenchers

Dabcyl

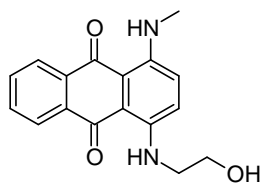
Dabcyl byl prvním běžně používaným „dark quencherem“ v duálně značených sondách („dual-labeled probes“). [59] [60] Dabcyl je relativně slabý „dark quencher“ a hodí se nejlépe pro použití v „molecular beacons“, kde jsou fluorofor a zhasěč umístěny v těsné blízkosti díky struktuře vlásenky. [58]



Obr. 19 – Dabcyl

Disperse Blue

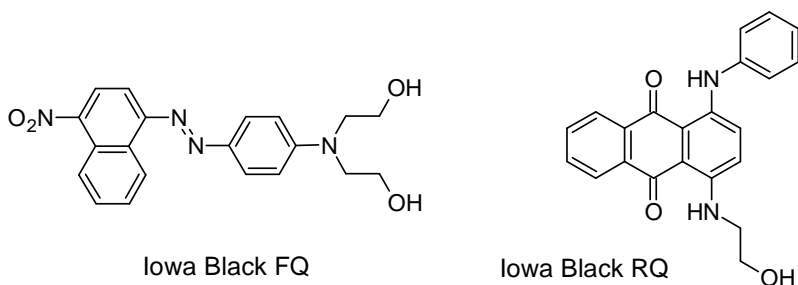
Disperse Blue je „dark quencher“, jehož strukturním základem je 1,4-diaminoanthrachinon. Má rozsáhlou absorpci v rozmezí 550 - 700 nm oblasti viditelného spektra. [61]



Obr. 20 – Disperse Blue

Iowa Black zlášeče

Iowa Black™ zlášeče mají výborné vlastnosti pro použití v sondách zlášejících fluorescenci. Jsou stabilní v širokém okruhu podmínek, včetně pH a tepla. Tento zlášeč je ideální pro použití s fluoresceinem a dalšími fluorescenčními barvivy, které emitují v zelené až rúžové oblasti spektra. [62]

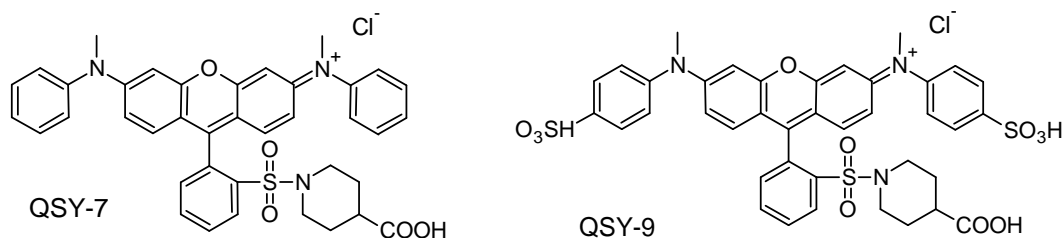


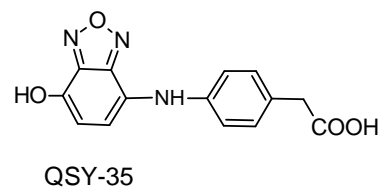
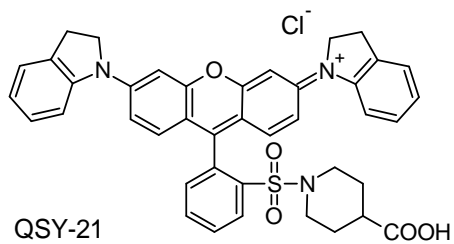
Obr. 21 – Iowa Black zlášeče

QSY zlášeče

QSY zlášeče jsou analogy fluoresceinu [56] QSY 7, QSY 9, QSY 21 a QSY 35 barviva mohou být inkorporována do proteinových konjugátů či konjugátů s nukleovými kyselinami za využití amino-reaktivních sukcinimidylesterů. [63] Rozdílná je rozpustnost jejich konjugátů ve vodě.

QSY zlášeče lze použít v různých FRET aplikacích, například při automatizované DNA sekvenaci, detekci hybridizace nukleových kyselin či v real-time PCR.

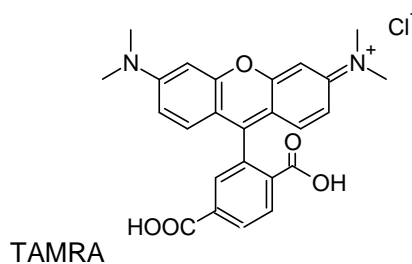




Obr. 22– QSY zhášeeče

Tamra

Díky své autofluorescenci má příliš vysoké pozadí. [52] Sondy FAM-TAMRA s FAM jako fluoroforem a TAMRA jako zhášeečem byly široce využívány až do zavedení BHQ barviv [59]



Obr. 23 – TAMRA

1.5 Oligonukleotidové sondy

Fluorescenční oligonukleotidové sondy jsou potřebnou a používanou metodou pro genetické analýzy (metody zahrnující genovou kvantifikaci, alelovou diskriminaci či analýzu exprese) a udávají nový směr pro moderní objevování léčiv a medicínu založenou na farmakogenetice. [33] [34] Oligonukleotidy jsou značené fluorescenčními molekulami vázanými kovalentní vazbou. [34] Duálně značené oligonukleotidové sondy („dual-labeled“), které zhasíjí fluorescenci, se užívají jako důležitá reagentia v genetice, především v kvantitativní PCR. [33] Metoda real-time PCR se používá pro kvantifikaci a detekci DNA sekvencí. Její detekční systémy obsahují fluorescenční sondu v reakční směsi, která detekuje množství PCR produktu během reakce zvýšením své fluorescenční aktivity. Sondy lze dělit podle různých vlastností.

Oligonukleotidové sondy s navázaným fluorescenčním barvivem určují specifitu detekčních systémů vůči amplifikované sekvenci. Většina sond využívá principu FRET mezi fluorescenčním barvivem (fluoroforem) a zhasičem („quencherem“). Nárůst fluorescenční aktivity je zapříčiněn zvýšením relativní vzdálenosti mezi molekulou fluoroforu a zhasiče. [52]

Fluorofor a zhasič mohou být navázány buď na dvou samostatných oligonukleotidech (fluorofor na konci jednoho, zhasič na opačném konci druhého oligonukleotidového vlákna), pak se jedná o tzv. jednoduše značené sondy („mono-labeled probes“), nebo obou současně na jediném oligonukleotidovém řetězci. Pak jde o tzv. duálně značené sondy („dual-labeled probes“). Duálně značené sondy nesou obvykle fluorescenční barvivo na 5'-konci a na 3'-konci je navázán zhasič. K aktivaci sondy a nárůstu fluorescenční aktivity dochází po hybridizaci. [39][52]

Máme sondy lineární, tvaru vlásenky nebo mají složitější uspořádání. Při výrobě nových sond se využívá nejen uspořádání sondy, ale i vlastností fluoroforů, například jejich umístění, počet a vlastnosti. [64]

V praxi se užívá několik typů molekulárních sond, a to „adjacent probes“, „amplifluor primers“, „competitive hybridization probes“, „light-up probes“, „molecular beacons“, „scorpion primers“ a „TaqMan probes“ („5'-nuclease probes“).

1.5.1 Jednoduše značené sondy („mono-labeled probes“)

„Adjacent probes“

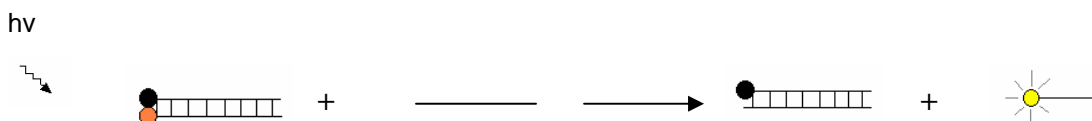
Tyto sondy využívají dva oligonukleotidové řetězce, které se naváží k opačným stranám cílové struktury. Vzdálenost mezi sondami bývá v rozmezí 10 – 100 Å (1 – 10 nm), aby po hybridizaci mohlo dojít k efektivnímu přenosu energie z donoru na akceptor. Dále je třeba, aby se fluorescenční emisní spektrum donoru a absorpční spektrum akceptoru překrývaly. Přenos energie se nemůže vyskytovat, jsou-li dvě sondy od sebe oddělené a jsou-li volně v roztoku. Výhodou těchto sond je relativně vysoká specifita. [65]



Obr. 24 – *Adjacent probes*

„Competitive hybridization probes“

Tento typ je založen na interakci dvou komplementárních oligonukleotidových řetězců, přičemž donor (fluorofor) je na 5'-konci jednoho řetězce a akceptor (fluorofor či zhášec) je na 3'-konci druhého řetězce. Nejprve jsou oba řetězce hybridizovány, čímž dojde k blízkému kontaktu mezi donorem a akceptorem. Po přidání stanovovaného vzorku dojde ke kompetici sekvence cílové struktury s oligonukleotidovým řetězcem a ustaví se dynamická rovnováha. To vede k rozdělení původně hybridizovaných řetězců. [66]



Obr. 25 – *Competitive hybridization probes*

1.5.2 Dvojitě značené sondy („dual-labeled probes“)

„Molecular beacons“

„Molecular beacons“ jsou sondy nukleových kyselin tvaru vlásenky. Jsou to oligonukleotidy tvořené jedním vláknem. Fluorofor je kovalentně navázán na jeden konec a nefluorescenční zhášecí část je kovalentně navázána k druhému konci oligonukleotidu. Sekvence komplementární k cílové struktuře je umístěna ve smyčce vlásenky a krátká přídatná sekvence tvořící stopku se nachází na obou koncích sondy (dlouhá obvykle 5 – 6 nukleotidů). [65][67] Volná sonda se tedy formuje do

jakési struktury, ve které jsou fluorofor a zhášec poutány těsně k sobě, a dochází tak ke statickému zhášení [41][65] Při kontaktu „molecular beacon“ s cílovou strukturou se vytvoří rigidní hybrid sonda-cíl, který je delší a stabilnější než hybrid stopky. „Molecular beacon“ díky tomu spontánně změní svou konformaci, která přinutí hybrid stopky k disociaci, díky čemuž dojde k vzájemnému oddálení fluoroforu a zhášeče za obnovení fluorescence. [65]

„Molecular beacons“ mohou obsahovat několik různě zbarvených fluoroforů, což umožňuje provádět testy, ve kterých může docházet k simultánní detekci několika různých cílových struktur v jediné reakci. [68]



Obr. 26 – Molecular beacons

Na podobném principu jako „molecular beacons“ jsou založeny i jiné molekulové sondy. Mezi ně řadíme například „amplifluor primers“, což jsou značené primery se strukturou vlásenky („hairpin-primers“), které slouží k přímé detekci amplifikovaných produktů. [65] „Scorpion primers“ slouží jako primery v PCR reakci. „Sunrise primers“ mají strukturu podobnou vlásence. [41] [65]



Obr. 27 – Amplifluor primers



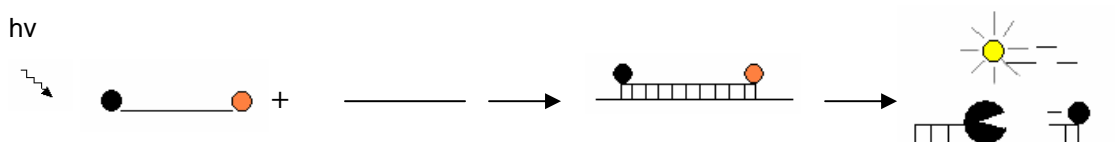
Obr. 28. – Scorpion primers



Obr. 29 – Sunrise primers

„TaqMan probes“ („5'-nuclease probes“)

Využití 5'→3' nukleázové aktivity Taq DNA polymerázy, popisuje metoda, ve které jsou lineární DNA sondy nazývané „5'-nuclease probes“ (známé také jako „TaqMan probes“) rozštěpeny při specifické hybridizaci, aby shlukovaly PCR produkty. Pro real-time monitoring amplifikačních reakcí bývají tyto sondy značeny donorovým fluoroforem na jednom konci a akceptorovým fluoroforem na druhém konci, které vzájemně interagují pomocí FRET. Sonda je upravena tak, aby hybridizovala k jednomu vláknku molekuly DNA ve stejném čase jako PCR primer. Nejprve Taq DNA polymeráza prodlouží primer a poté, co dospěje k sondě, dojde následkem 5'-nukleázové aktivity k rozštěpení této sondy. Rozštěpení sondy vede k oddělení donoru a akceptoru a tím dojde k zvýšení intenzity signálu fluorescence. [65]

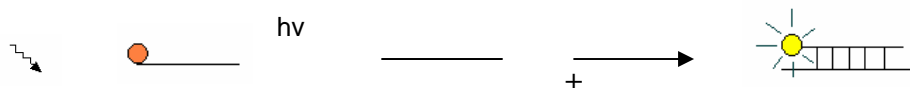


Obr. 30 – TaqMan probes

1.5.3 Speciální typy sond

„Light-up probes“

„Light-up probes“ jsou popsány jako krátké peptidové nukleové kyseliny (PNA), které využívají jako fluorofor thiazolovou oranž. [41][65] Zhášec není v tomto případě vyžadován. K nárůstu ve fluorescenci dojde snížením rotace vazby mezi aromatickým systémem thiazolové oranže, což sníží nezářivý přenos energie. „Light-up probes“ nevykazují fluorescenci, jsou-li volně v roztoku. Lze je využít k monitorování amplifikačních reakcí, například v real-time PCR nebo k identifikaci specifické mRNA v živých buňkách. [67]



Obr. 31 – Light-up probes

„Adjacent probes“ a „TaqMan probes“ mají donorové a akceptorové části ve vzdálenosti zhášení FRET. V „competitive hybridization probes“ a „molecular beacons“, když nejsou hybridizovány k cílovým strukturám, jsou fluorofor a zhášec semknuty těsně k sobě a převládá mechanismus statického zhášení. [39] [65] Sondy založené na FRET jsou používány *in vitro* a *in vivo* v mnoha aplikacích k monitorování různých typů DNA a RNA reakcí.

2 Cíl práce

Cílem této diplomové práce byla příprava periferně substituovaných sloučenin ze skupiny nesymetrických derivátů azaftalocyaninů.

V rámci řešení práce bylo třeba podle již známých postupů a metodik připravit potřebné meziprodukty např. 2,3-dikyanchinoxalin-6-karboxylovou kyselinu, které byly dále použity v syntézách dalších prekurzorů a finálních látek. Zvolenými prekurzory v rámci této diplomové práce byly N-(3-azidopropyl)-2,3-dikyanchinoxalin-6-karboxamid a 5,6-bis(diethylamino)pyrazin-2,3-dikarbonitril s cílem připravit azaftalocyanin nesoucí jeden periferní substituent s azidovou skupinou.

Dílčím cílem práce bylo z již dříve na katedře připravené cyklické sloučeniny s periferním substituentem v podobě karboxylové kyseliny (Q18-1H2) vytvořit azid, z něho pak dále připravit zinečnatý komplex a ten následně navázat na oligonukleotidovou sondu modifikovanou alkynylovou skupinou.

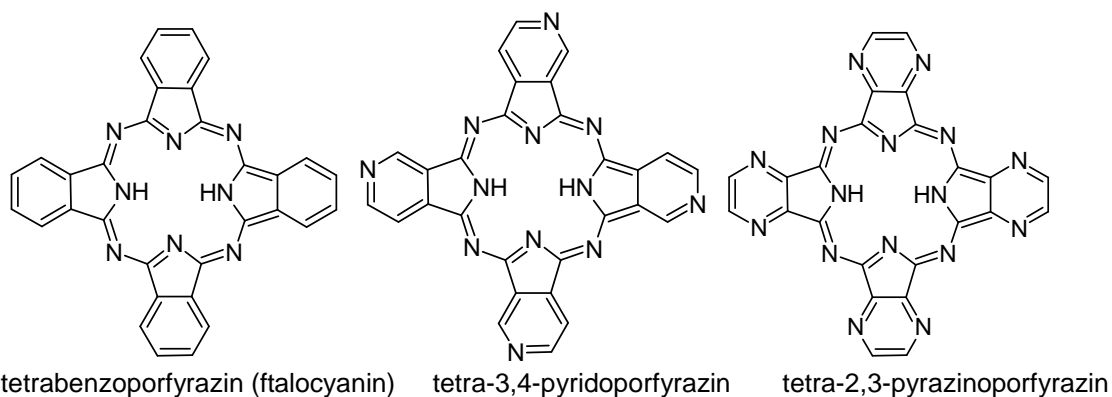
Součástí práce bylo také charakterizovat všechny nově vzniklé látky pomocí NMR a UV spektrofotometrií.

3 Metodická část

Tato diplomová práce se zabývá přípravou látek ze skupiny nesymetrických azaftalocyandinů. Azaftalocyandiny (AzaPcs) jsou využívány jako barviva a pigmenty, pro kontrolu růstu mikroorganismů, materiály pro elektrochromní displeje a média pro optické uchování dat s obrovskou paměťovou kapacitou. [69] Jsou velmi podobné ftalocyandinům. Proto jsou využívány jako dobré fotosenzitizéry a některé z nich jsou vhodnými činidly pro fotodynamickou terapii (PDT). [70]

Ftalocyandiny a azaftalocyandiny mají i nežádoucí vlastnosti, které se snažíme minimalizovat. Mají např. schopnost agregace za tvorby dimerů a oligomerů v roztoku, díky čemuž jsou nerozpustné, těžko se čistí a obtížně se charakterizují. Tato vlastnost snižuje a znesnadňuje jejich výrobu a využití. Proto se tyto sloučeniny neustále obměňují. Na periférii se zavádějí dlouhé řetězce nebo objemné substituenty, což může nechtěnou agregaci snižovat. [70]

Benzenové kruhy těchto sloučenin mohou být substituovány různými heterocykly např. thiofenem, pyridinem nebo pyrazinem. Pro centrální kruh systému molekuly ftalocyandinu se používá termín porfyrizin, individuální sloučeniny jsou pojmenovány připojením příslušné předpony. [71]



Obr. 32 – Strukturní typy porfyrizínů

3.1 Syntéza nesymetrických ftalocyaninů a jejich azaanalogů

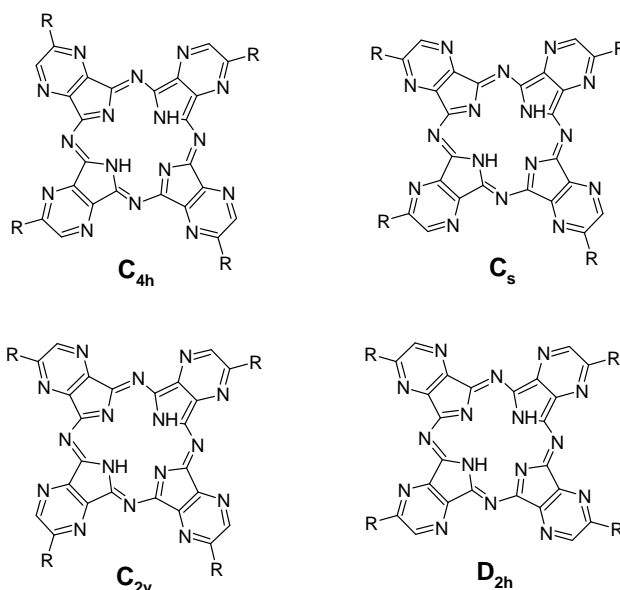
Ftalocyaniny jsou aromatické makrocykly obsahující čtyři isoindolové jednotky spojené přes jejich polohy 1 a 3 pomocí dusíkových můstků. Delokalizované π -elektrony způsobují unikátní fyzikální vlastnosti těchto látek. Ftalocyaniny jsou chemicky a termicky stabilní a vykazují mimořádné optické a elektrické vlastnosti.

Na ftalocyaninovém kruhu může být provedena řada strukturních obměn, které mohou zlepšit jeho vlastnosti.

Ftalocyaniny mohou inkorporovat do své centrální dutiny ve středu kruhu až 70 různých druhů kovových či nekovových kationtů. Na periférii makrocyklické sloučeniny je možné připojit rozmanité druhy substituentů, což může změnit elektronovou strukturu systému. [71] Hlavním cílem této substituce je zlepšit velmi omezenou rozpustnost ftalocyaninů. [72] Jsou-li tyto substituenty hydrofobní, tedy objemné či s dlouhým řetězcem, mohou zvýšit rozpustnost ftalocyaninů v organických rozpouštědlech.

Syntézy nesubstituovaných či symetricky substituovaných ftalocyaninů se provádí cyklotetramerizačními reakcemi ftalyl-derivátů. Výtěžky této reakce nejsou moc vysoké.

Mohou vznikat čtyři typy konstitučních izomerů C_s , D_{2h} , C_{2v} a C_{4h} symetriemi. Statistická směs těchto čtyř izomerů obsahuje 12,5% izomeru D_{2h} , 12,5% izomeru C_{4h} , 25% izomeru C_{2v} a 50% izomeru C_s . [71]



Obr. 33 – Konstituční izomery ftalokyaninů

Byly vyvinuty selektivní výrobní postupy syntézy nesymetricky substituovaných ftalocyaninů, především obsahujících dvě strukturně různé isoindolové podjednotky (A a B). Mohou být použity různé postupy pro přípravu požadované sloučeniny podle typu produktu, který si přejeme získat. [71]

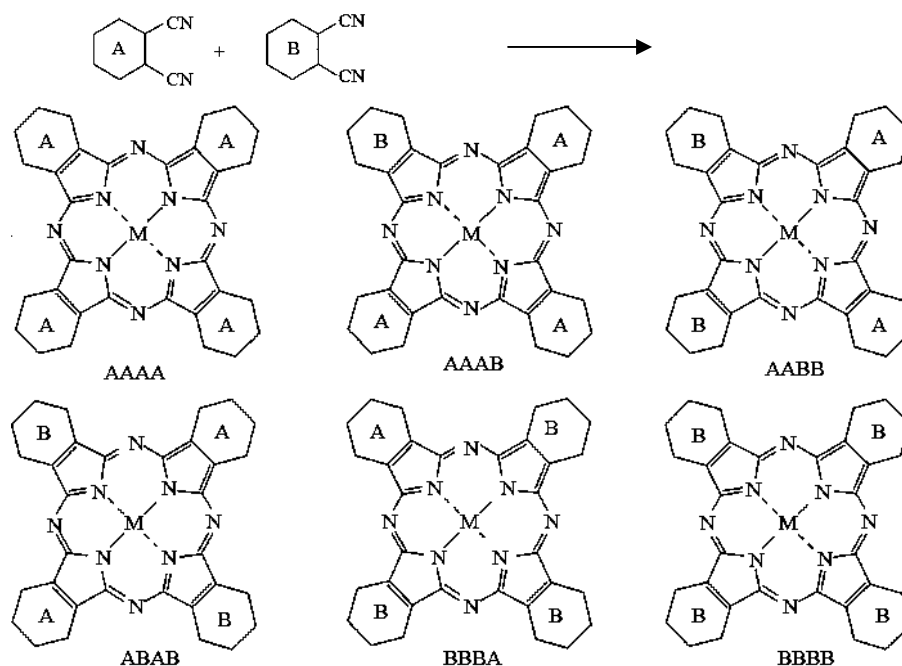
V této diplomové práci byla předmětem zájmu je především syntéza ftalocyaninů složených ze tří identických jednotek (A) a jedné odlišné isoindolové jednotky (B). Jedná se o typ ftalocyaninu A_3B . Často obsahují jednu funkční skupinu a jsou potenciálně využitelné pro další modifikace. Přítomnost reaktivní funkční skupiny může být důležitá zejména pro možnost kovalentní vazby ftalocyaninové části k vhodné nosné molekule např. oligonukleotidové sondě. [73]

3.1.1 Syntéza A_3B ftalokyaninů

Metody syntézy tohoto typu nesymetricky substituovaných ftalokyaninů jsou metoda statistické kondenzace dvou různě substituovaných prekurzorů, subftalocyaninová metoda a metoda syntézy na pevné fázi. [75]

Metoda statistické kondenzace

V této diplomové práci byla využita k přípravě nesymetrického azaftalokyaninu především metoda statické kondenzace dvou odlišně substituovaných prekurzorů, která je nejjednodušší cestou k syntéze ftalocyaninů. Jedná se o neselektivní metodu poskytující směs šesti různých sloučenin. K izolaci a čištění požadovaných makrocyclických sloučenin musí být užity chromatografické techniky. V této diplomové práci se jednalo především o metodu TLC a sloupcové chromatografie. Vzhledem k již výše zmíněné agregaci ftalocyaninů je separace statistické směsi velmi obtížná.



Obr. 34 – Směs vzniklých sloučenin

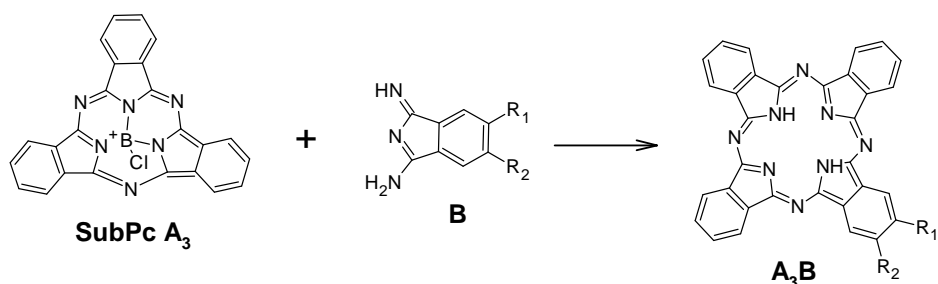
Pro zvýšení výtěžku derivátu A_3B , je nutné použít vhodný stechiometrický poměr reaktantů A a B. Statistické výpočty vypočítávají, že reakcí dvou různých ftalyl-derivátů o stejné reaktivitě ve stechiometrickém poměru 3:1 bude vznikat směs produktů v procentuálním zastoupení složek A_4 33%, A_3B 44% a 23% dalších možných produktů kondenzace. Obecně poskytuje molární poměr prekurzorů 3 : 1 požadovanou sloučeninu A_3B ve výtěžcích v rozmezí 10 až 20%. Tento poměr reaktantů byl v této diplomové práci užit nejčastěji. Je preferováno použití ftalonitrilů s různými solubilizačními charakteristikami, neboť to dovoluje čištění a oddělení nesymetrických ftalocyaninů na základě odlišných rozpustností.

Dále lze použít poměr těchto dvou prekurzorů 9 : 1. Tento poměr vede sice k nárůstu množství produktu A_4 a snížení množství požadovaného A_3B , ovšem další produkty kondenzace nejsou tvořeny prakticky vůbec a požadovaná sloučenina A_3B může být tedy snadněji separována z této směsi. Tato stechiometrie 9 : 1 je používána, je-li prekurzor B reaktivnější než prekurzor A. [71] V této diplomové práci byl užit poměr reaktantů 5 : 1.

Subftalocyaninový přístup

Dále by bylo možno užít další metody přípravy nesymetrických azaftalocyaninů. Tento způsob ale nebyl v této diplomové práci vyzkoušen. Subftalocyaninový způsob selektivní syntézy nesymetricky substituovaných ftalocyaninů typu A_3B zahrnuje zvětšení kruhu subftalocyaninu (SubPc) pomocí derivátu sukcinimidu nebo

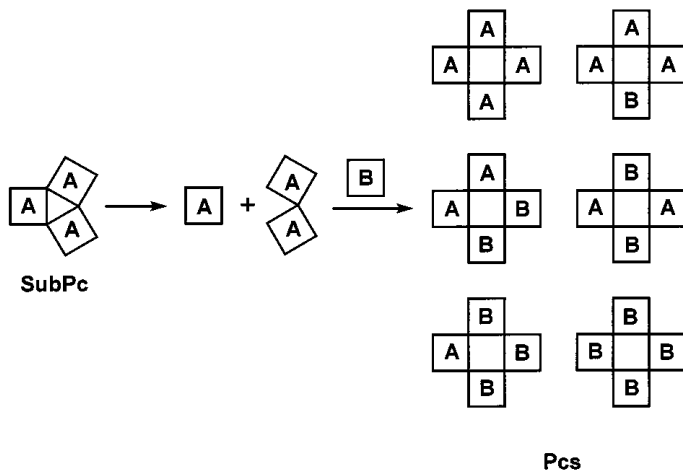
diiminoisoindolinu. Geometrické prnutí v subftalocyaninovém jádře způsobí, že toto jádro je ochotně rozštěpeno v přítomnosti diiminoisoindolinové jednotky, která je potom vložena do jeho skeletu tak, že formuje derivát ftalocyaninu typu A_3B . Tato reakce je velmi selektivní, efektivní a umožňuje syntézu ftalokyaninů, které dříve byly získávány jen s největšími obtížemi nebo vůbec. [71]



Obr. 35 – Subftalokyaninový přístup

Rozšíření kruhu o další jednotku velmi záleží na původu substituentů, reaktivitě diiminoisoindolinu, rozpouštědla a reakčních podmínkách. [74] Typická expanze kruhu se provádí přidáním 6 - 9 ti násobku molárního nadbytku derivátu diiminoisoindolinu k roztoku subftalocyaninu v dimethylsulfoxidu:1-chlor-naftalenu či dichlorbenzenu v poměrech 1 : 4 až 4 : 1 nebo v dimethylaminoethanolu. Reakční směs je zahřívána po dobu 5 - 12 h při teplotě 80 - 100°C. Výtěžek požadovaných nesymetricky substituovaných ftalocyaninů se pohybuje od 3 do 90%.

Bylo prokázáno, že reakce probíhá přes částečnou nebo úplnou fragmentaci subftalocyaninového kruhu a následné uzavření fragmentů do kruhu za vzniku statistické směsi všech možných ftalocyaninů obsahujících různé kombinace výchozích diiminoisoindolinových jednotek. [71]



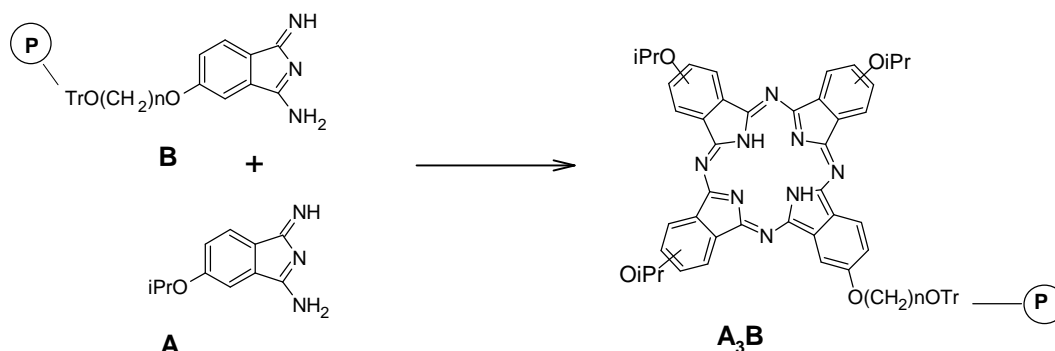
Obr. 36 – Fragmentace subftalokyaninového kruhu a uzavření fragmentů

Přídavek kovového templátu k reakční směsi zvyšuje výtěžky jak požadovaného A_3B nesymetricky substituovaného ftalocyaninu, tak i vedlejších produktů. Také se ukázalo, že subftalocyaniny mohou reagovat s méně reaktivními deriváty ftalonitrilu v přítomnosti silné baze jako DBU (1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-enu) za dobrých výtěžků A_3B Pcs. [75]

Subftalocyaninová metoda má vedle statistické kondenzační metody několik výhod. Kromě lepších výtěžků je to i snadnější čištění asymetrických ftalokyaninů sloupcovou chromatografií. [76]

Metoda syntézy na pevné fázi („Polymeric support method“)

Dalším přístupem pro selektivní přípravu A_3B ftalocyaninů je syntéza na pevné fázi. V této metodě je jeden z vhodně substituovaných ftalocyaninových prekurzorů kovalentně vázán na pevnou fázi, nejčastěji na polymer nebo modifikovaný silikagel. [71] [75] Následuje cyklizace. Ftalocyanin vázaný na polymer je získán filtrací, vazba k polymeru je rozštěpena a je získán čistý 3 : 1 nesymetricky substituovaný ftalocyanin. Ačkoli se tato metoda úspěšně používá k přípravě čistých nesymetricky substituovaných ftalocyaninů, je omezena počtem funkčních skupin, které se mohou kovalentně reverzibilně vázat na pevnou fázi. [74] Ani tento způsob přípravy nebyl v této diplomové práci užit.



Obr. 37 – Metoda syntézy na pevné fázi

4 Experimentální část

4.1 Použité metody

- NMR,
- Sloupcová chromatografie,
- Tenkovrstvá chromatografie,
- UV/VIS spektrofotometrie.

4.2 Použité komponenty mobilních fází

- Aceton čistý (Penta, Ing. Petr Švec),
- Benzen p.a. (Penta, Ing. Petr Švec),
- Benzin lékařský RN ČL 2009 (Penta, Ing. Petr Švec),
- Butanol – pro syntézu,
- Cyklohexan p.a. (Penta, Ing. Petr Švec),
- Dichlormethan p.a. (Penta, Ing. Petr Švec),
- Ethylacetát čistý (Penta, Ing. Petr Švec),
- Hexanol – pro syntézu,
- Chloroform čistý (Penta, Ing. Petr Švec),
- Kyselina octová 99% (Penta, Ing. Petr Švec),
- Methanol p.a. (Penta, Ing. Petr Švec),
- Propanol – pro syntézu,
- Toluen čistý (Penta, Ing. Petr Švec),
- Voda destilovaná.

4.3 Další užité chemikálie

- 2,3-dichlor-5,6-dicyan-p-benzochinon 97 % – (TCI Europe nv),
- 3,4–diaminobenzoová kyselina (pro syntézu),
- 3-bromopropylamin hydrobromid 98 % (SIGMA Aldrich Chemie),
- 4-Dimethylaminopyridin 99,0 % (Fluka Chemie GmbH),
- 5,6-bis(diethylamino)pyrazin-2,3-dikarbonitril – připraveno na katedře,
- Acetonitril 99,9 % Extra Dry (Acros Organics),
- Azid sodný 99,0 % (Fluka Chemie, Gemische Fabrik),
- Butanol bezvodý – nejprve smísený s K_2CO_3 , poté sušený hořčíkem, před použitím čerstvě destilovaný,
- Diaminomaleinonitril 98 % (TCI Europe nv.),
- Diethylether (Ether solvens) (Penta, Ing. Petr Švec),
- Hydroxid draselný dle ČL 97 (RNDr. Jan Kulich),
- Jodid měďný 98 % (SIGMA Aldrich Chemie),
- Kyselina octová 99 % (Penta, Ing. Petr Švec),
- Lithium kovové čisté (Lachema Brno),
- N,N-Diisopropylethylamin 99 % (SIGMA Aldrich Chemie),
- N,N-Dimethylformamid bezvodý - Extra Dry water < 50 ppm (Acros Organics),
- O-(benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluroniumhexafluorofosfát (HBTU) 98 % (TCI Europe nv),
- Octan zinečnatý bezvodý – čerstvě vysušený před použitím,
- Síran sodný bezvodý p.a.(Penta, Ing. Petr Švec),
- Tetrahydrofuran bezvodý – nejprve smísený s NaOH a poté sušen sodíkem, čerstvě predestilovaný před použitím,
- Thionylchlorid – čerstvě predestilovaný před použitím,
- Toluén bezvodý – nejprve smísený s $CaCl_2$, poté sušený sodíkem, čerstvě predestilovaný před použitím,
- Trifluoroctová kyselina (FluoroChem),
- Voda destilovaná.

4.4 Použité přístroje a materiály

Průběh reakcí a čistota produktů a meziproductů byly kontrolovány tenkovrstvou chromatografií na deskách Merck Silikagel 60 F254 (Merck, D).

Detekce byla prováděna světlem vlnové délky 254 nm a 366 nm na UV lampě DDHM Camag 19964.

Vyvíjecí soustavy jsou uvedeny u jednotlivých syntéz.

Sloupcová chromatografie byla prováděna na silikagelu Merck Kieselgel 60 (0,040-0,063 mm). (Merck, D)

Čištění oligonukleotidové sondy bylo provedeno na sephadexu Centri Pure N10, Hydrated gel filtration column for nucleic acid purification. (Emp Biotech).

Odpařování bylo prováděno na rotační vakuové odparce Heidolph Laborota 4000.

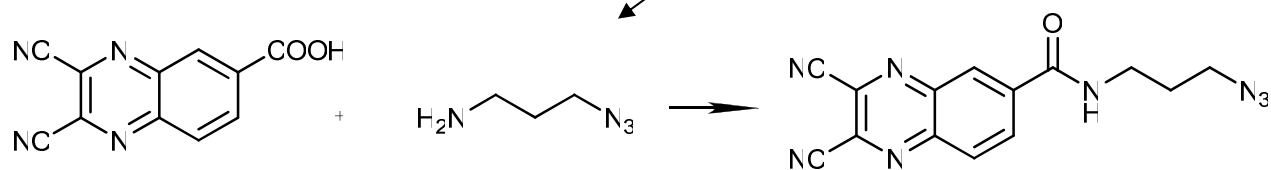
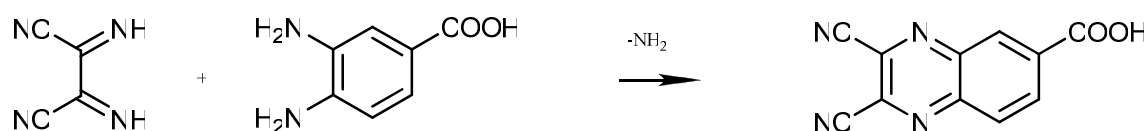
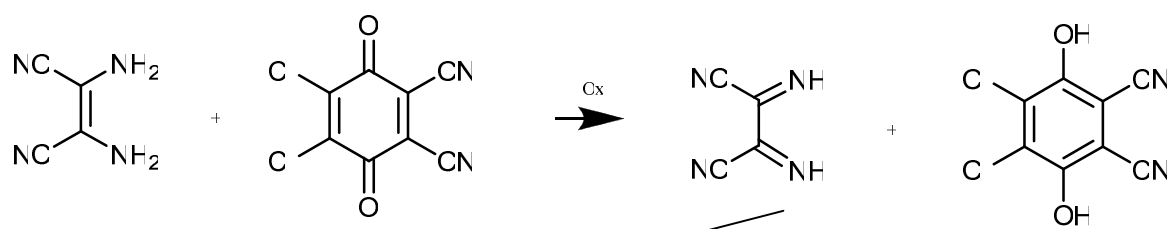
Na centrifugaci byla použita centrifuga IEC CL31R Multispeed Thermo Electron Corporation.

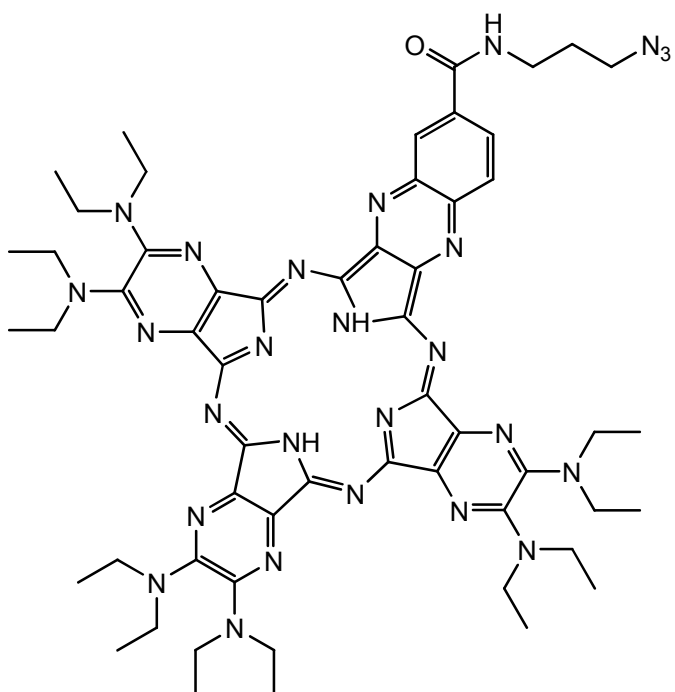
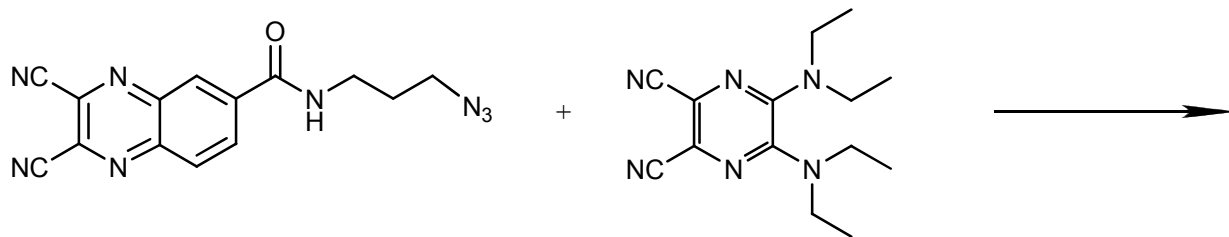
Hmotnostní spektra byla měřena na MALDI-TOF Bruker Autoflex II mass spectrometru.

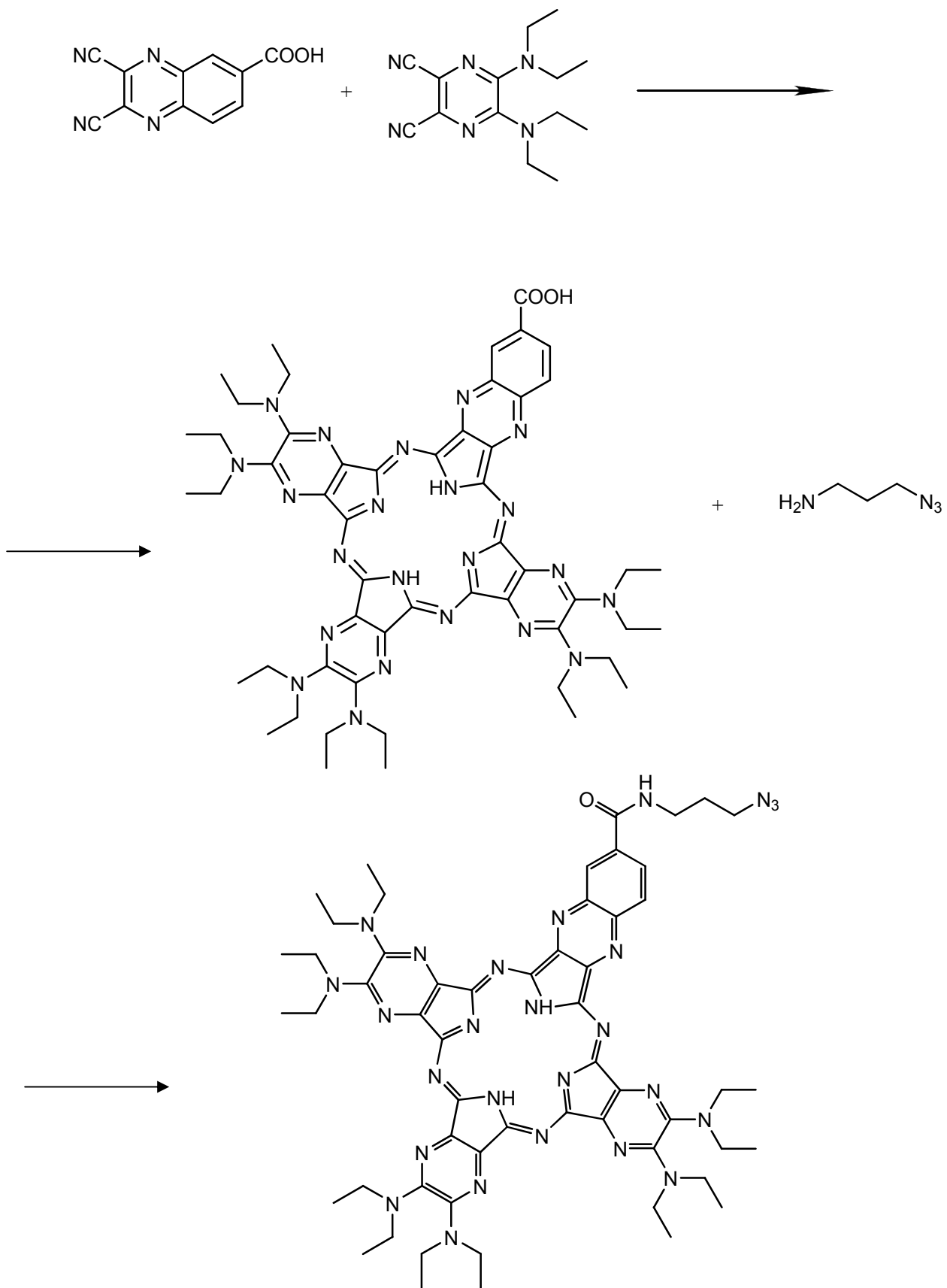
K měření spektra ve viditelné oblasti bylo použito přístroje SHIMADZU UV 240 1 PC: UV-VIS recording spectrophotometer.

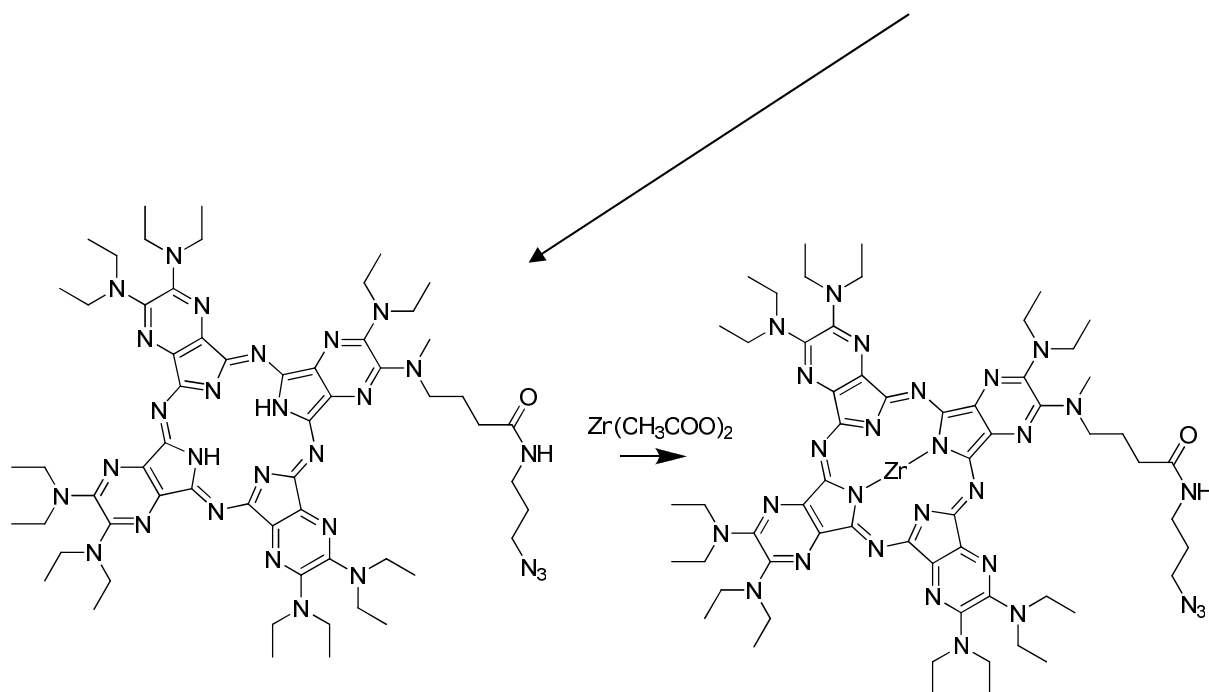
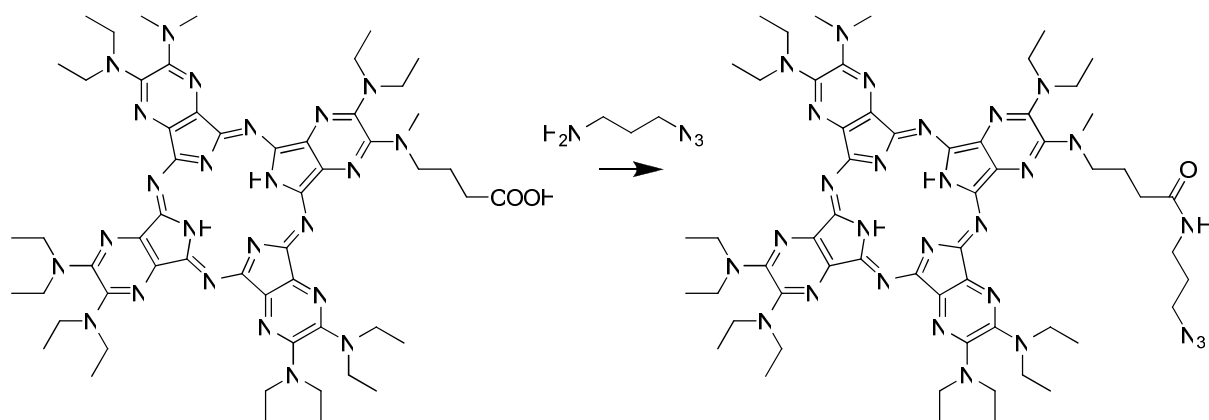
Měření ^1H a ^{13}C NMR spektra bylo provedeno na Varian Mercury – Vx BB 300 (299.95 MHz – ^1H and 75.43 MHz – ^{13}C)

4.5 Schéma prováděných reakcí







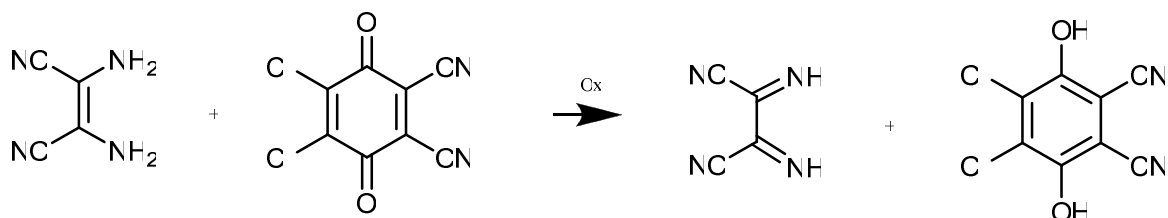


4.6 Vlastní syntéza

4.6.1 Syntéza 1

Reakce: **Oxidace diaminomaleinonitrilu na diimidosukcinylnitril**

Princip:



C₄H₂N₄

Použité chemikálie:

- Diaminomaleinonitril,
- 2,3- dichlor-5,6-dikyan-p-benzochinon,
- Acetonitril.

Postup práce:

Bylo naváženo 2,89 g (10 mmol) diaminomaleinonitrilu s 3,65 g (10 mmol) dichlordikyanobenzochinonu. Po přidání 50 ml acetonitrilu se roztok míchal při teplotě 20-25 °C asi 30 minut. Jako produkty vznikly žádaný diimidosukcinylnitril (DISN) a vedlejší 2,3-dichlor-5,6-dikyanohydrochinon (DDQ). Získaná tekutina spolu se sraženinou byla zfiltrována přes skládaný papírový filtr. Potřebný DISN zůstává v roztoku a DDQ se zachytává na filtračním papíře. Filtrát byl vysušen na vakuové odparce a bylo získáno 2,6 g DISN.

Výtěžek: 2,6 g diimidosukcinylnitrilu což je 91,67% teoretického výtěžku (2,84 g)

Molární hmotnost: 106,1 g/mol

Ověření: Porovnáno se standardem dostupným na katedře pomocí TLC a světla vlnové délky 254 a 366nm.

Tato syntéza byla provedena celkem dvakrát.

Syntéza 1- druhý pokus

Navážky byly zvýšeny na 5,4 g (30 mmol) diaminomaleinonitrilu, 6,81g (30 mmol) dichlordikyanobenzochinonu, 120ml acetonitrilu.

Postup přípravy zůstal stejný jako v předchozí reakci.

DISN zůstal v roztoku a DDQ se zachytával na filtračním papíře.

Fitrát byl odpařen na vakuové odparce a získáno 8,13 g DISN.

Výtěžek: 8,13 g diimidokcinitrilu, což je 153,39% teoretického výtěžku (5,3 g) – což bylo zřejmě způsobeno přítomností vedlejších produktů.

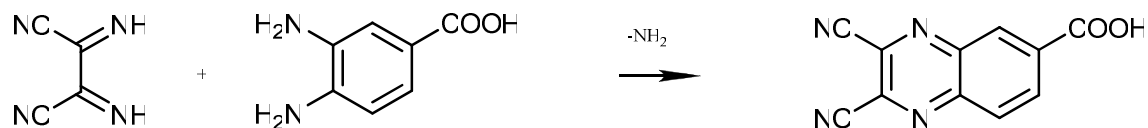
Molekulová hmotnost: 106,10 g/mol.

Ověření: Porovnáno se standardem dostupným na katedře pomocí TLC a světla vlnové délky 254 a 366nm.

4.6.2 Syntéza 2

Reakce: **Deaminace – příprava 2,3-dikyaninoxalin-6-karboxylové kyseliny**

Princip:



C₁₁H₁₀O₂N₄

Použité chemikálie:

- 3,4 – diaminobenzoová kyselina,
- Diimidosukcinylnitril,
- Trifluoroctová kyselina.

Postup práce:

Vzniklých 2,6 g (25 mmol) diimidosukcinylnitrilu a 1,98 g (13 mmol) kyseliny 3,4-diaminobenzoové (DABA) bylo rozpuštěno v 15 ml trifluoroctové kyseliny (TFA) a ponecháno přes noc míchat při teplotě asi 22 °C. Větší část TFA byla druhý den z roztoku odstraněna za použití vakuové odpařky. Zbytek byl rozpuštěn v ethanolu. V roztoku byl dle detekce pomocí TLC přítomen žádaný produkt 2,3-dikyaninoxalin-6-karboxylová kyselina (ZIP-1). Ke vzniklému roztoku bylo přidáno malé množství vody a těkavé látky byly znovu za vakua oddestilovány. Tím byly odstraněny poslední zbytky TFA. Po přidání další vody vznikla v roztoku sraženina. Ta byla zachycena na skládaném filtru (prozatím blíže neidentifikována). Filtrát byl za vakua odpařen a výtěžek zvážen. Po odpaření bylo získáno 0,341 g produktu.

Výtěžek: 0.341g 2,3-dikyaninoxalin-6-karboxylové kyseliny což je 11,7% teoretického výtěžku (2,917g)

Popis: oranžovohnědé krystalky

Molekulová hmotnost: 224,18 g/mol

Ověření: Porovnáno se standardem pomocí TLC a světla vlnové délky 254 a 366nm.

Jelikož v baňce zůstalo po odpaření tekutiny málo produktu, byla na TLC dále identifikována nahnědlá sraženina, která ulpěla na filtru. Bylo zachyceno 2,365 g látky.

Čištění 1 – Zkoušení rozpustnosti látek v dichlormethanu, ethanolu a acetonitrilu

0,2 g látky bylo rozváženo do tří zkumavek a rozpuštěno ve 25 ml dichlormethanu (DCM), 25 ml acetonitrilu a 25 ml etanolu. V ethanolu a acetonitrilu se šedavé krystalky rychle rozpustily. Na TLC pod UV světlem o vlnové délce 254 nm zhášely 4 látky. Mezi nimi byl identifikován i žádaný produkt. Skvrna byla výrazná, což nasvědčovalo tomu, že by ho tam mohlo být větší množství. V DCM byl sice produkt také patrný, ale intenzita zhášení skvrny produktu byla menší, takže se ho zřejmě rozpustila jen malá část. Většina nečistot se také nerozpustila, což by bylo žádoucí pro následné čištění.

Čištění 2 – Srážení nečistot

Zkumavky s roztokem a sraženinou v acetonitrilu i ethanolu byly dále zkoušeny a používány. Pro srážení a následné odstranění nečistot u vzorku rozpuštěného v acetonitrilu byla polovina smíchána s horkým etanolem a druhá polovina s horkým propanolem a obě rychle zchlazeny na 2-8 °C. K tvorbě sraženiny ale nedošlo. Část propanolu byla proto ještě dále smíšena s DCM, další část s etherem, což také nevyvolalo požadované srážení. K vytvoření sraženiny došlo až po smísení s hexanem a k výraznému srážení nečistot došlo po přidání chloroformu.

Sražené tekutiny byly zfiltrovány a filtráty detekovány na TLC. Část nečistot zmizela.

Čištění 3 – Zkoušení vhodné mobilní fáze pro čištění na sloupcové chromatografii 1.

Jako nejvhodnější metodou ke stanovení mobilní fáze na sloupcovou chromatografii byla užita metoda tenkovrstvé chromatografie (TLC), pomocí níž byly zkoušeny různé kombinace rozpouštědel.

Použité komponenty mobilní fáze:

dichlormethan, ethylacetát, kyselina octová, benzen, lékařský benzin, toluen, methanol, chloroform, cyklohexan, butanol, voda, hexanol, propanol.

Zkoušené poměry a kombinace vyvíjecích soustav na TLC:

a) **dichlormethan : ethylacetát : kyselina octová**

Zkoušené poměry:

5:2:0,2; 8:2:1; 7:2:0,2; 10:2:0,2

b) **benzín : ethylacetát : kyselina octová**

Zkoušené poměry:

4:2:1; 8:2:1

Detekce:

Produkt ZIP-1 zháší 254 nm UV záření.

Dle získaných chromatogramů byl zvolen jako nejvhodnější poměr vyvíjecí soustavy kombinace rozpouštědel **dichlormethan : ethylacetát : kyselina octová** v poměru **10 : 2 : 0,2**

Příprava kolony:

Nečistý produkt ZIP-1 byl rozpuštěn v ethanolu, dán do předem zvážené baňky a promísen asi s 10 g silikagelu. Směs byla do sucha odpařena. Poté byl sestaven chromatografický sloupec. Kolona byla naplněna stacionární fází silikagelem promíseným s rozpouštědlem dichlormethanem. Na vrchol sloupce (start) byla opatrně vsypána směs silikagelu se znečištěným vzorkem. Vyvíjená vrstva byla ponechána usadit a po chvíli byla pomalu přidávána zvolená mobilní fáze.

Postupně byly jednotlivé frakce odchyťovány do označených zkumavek. Poté byly všechny vzorky ve zkumavkách podrobeny detekci pomocí TLC a UV pro zjištění obsahu a čistoty přečištěného produktu ZIP-1. Stále se s ním držela nějaká nečistota. Zkumavky s produktem byly odpařeny za vakua s výtěžkem asi 1,45 g.

Výtěžek: 1,45g 2,3-dikyanchinoxalin-6-karboxylové kyseliny což je 49,7% teoretického výtěžku (2,917g)

Popis: žluté krystalky

Molekulová hmotnost: 224,18g/mol

Ověření: Porovnáno se standardem dostupným na katedře pomocí TLC a světla vlnové délky 254 a 366nm

Čištění 4 - Zkoušení vhodné mobilní fáze pro čištění na sloupcové chromatografii 2.

Pro odstranění přetrvávajících nečistot, byly zkoušeny pomocí TLC a UV další kombinace vyvíjecích směsí.

Zkoušené poměry a kombinace vyvíjecích soustav na TLC:

a) toluen : methanol : kyselina octová

Zkoušené poměry:

11:2:1; 25:5:1

b) toluen: aceton: kyselina octová

Zkoušené poměry:

25:5:1; 10:2:1

c) kyselina octová : butanol : voda

Zkoušené poměry:

3:15:1

d) dichlormethan: ethylacetát : kyselina octová

Zkoušené poměry:

60:10:1

Dále byl testován samostatný **hexanol, butanol, amylalkohol, propanol**

Nejlepší výsledky měl samotný hexanol.

Produkt stále nebyl úplně čistý.

Čištění 5 - Pokus o čištění reakcí s uhličitánem draselným.

Produkt byl smísen s ethanolem a uhličitanem draselným v nadbytku. Poté byl neutralizován nadbytek uhličitanu kyselinou chlorovodíkovou až k neutrálnímu pH.

Vodná fáze byla pak postupně vytřepávána s ethylacetátem.

Na TLC bylo znovu detekováno, zda-li došlo k odstranění nečistot.

Vyvíjecí směsí byl samotný hexanol, na druhém TLC směs dichlormethan + kyselina octová + ethylacetát. K zásadním změnám v čistotě to ovšem nevedlo.

Syntéza 2 – druhý pokus

Navážky 8,13 g (80 mmol) diimidosukcinylnitrilu a 5,6 g (40 mmol) kyseliny 3,4-diaminobenzoové (DABA) bylo rozpouštěno v trifluoroctové kyselině (TFA)

Postup stejný jako u prvního pokusu. V tomto případě se ale produkt po přidání ethanolu a vody nesrazil. Po odpaření v baňce výtěžek 12,1 g.

Čištění 6 – Srážení produktu a sloupcová chromatografie.

Protože nedošlo k vysrážení produktu, byla část směsi rozpuštěna ve 30 ml acetonitrilu (asi 9 g vzorku) a zbytek v baňce v 60 ml ethanolu. Směsi byly ponechány přes noc při chladničkové teplotě. Následným přidáním vody došlo k částečnému sražení nečistot, produkt zůstal ve směsi.

Směs byla jako u minulé syntézy přečištěna užitím metody sloupcové chromatografie.

Použitá soustava: dichlormethan: ethylacetát: kyselina octová (12:2:0.2). Výtěžek po chromatografii po odpaření byl asi 2,1 g. Nečistoty byly stále přítomny.

Výtěžek: 2,1 g 2,3-dikyanchinoxalin-6-karboxylové kyseliny, což je 25 % z teoretického výtěžku (8,2307 g).

Popis: žluté krystalky

Molekulová hmotnost: 224,18 g/mol.

Ověření: Porovnáno se standardem dostupným na katedře pomocí TLC a světla vlnové délky 254 a 366nm.

Čištění 7 – Zkoušení vhodné mobilní fáze pro čištění na sloupcové chromatografii 3.

Produkty z obou syntéz byly spojeny, rozpuštěny v ethanolu a po přidání asi 15 g silikagelu odpařeny do sucha. Jako vhodné mobilní fáze byly zkoušeny **hexanol, dichlormethan, kombinace DCM + methanol a DCM + kyselina octová**. Hexanol lépe oddělil skvrnu produktu a nečistoty než samotný DCM i jeho kombinace s methanolem. K požadovanému oddělení skvrn ovšem došlo až při použití kombinace DCM a kyseliny octové v poměru 50:0,5 s R_f asi 0,5.

Čištění 8 – Sloupcová chromatografie

Byl sestaven chromatografický sloupec se stacionární fází silikagelem (250-300 ml) promíseným s rozpouštědlem dichlormethanem a mobilní fází byla směs 10 ml kyseliny octové a 1000 ml dichlormethanu.

Jednotlivé frakce se postupně oddělily a byly odchyťovány do označených zkumavek.

Poté byl ve všech zkumavkách detekován produkt pomocí TLC a UV lampy.

Produkt se jevil od zkumavky 13 zcela bez nečistot. Obsah zkumavek číslo 13 až 45 byl spojen a odpařen do sucha.

4.6.3 Syntéza 3

Reakce: **Příprava 3- azidpropan-1-aminu**

Princip:



C₃H₈N₄

Použité chemikálie:

- Azid sodný,
- 3-bromopropylamin hydrobromid 98%,
- Voda,
- Hydroxid draselný,
- Diethylether,
- Síran sodný bezvodý.

Postup práce:

4,5 g azidu sodného (69 mmol) bylo rozpuštěno v 15 ml vody. 5 g (23 mmol) hydrobromidu 3-bromopropylaminu bylo také rozpuštěno v 10 ml vody a oba roztoky byly smíseny. Vzniklý roztok byl zahříván k varu při 90 °C přes noc. Roztok byl pak postupně alkalizován asi 15 g KOH do oddělení dvou vrstev - horní olejovitě nažloutlé a spodní průhledné. Vzniklá směs byla třikrát vytřepána v dělicí baňce s 20 ml diethyletheru. Organické fáze byly sloučeny. Přebytečná voda byla odstraněna přidáním asi 10 g bezvodého síranu sodného. Vzniklá suspenze byla zfiltrována přes skládaný papírový filtr a odpařena na vakuové odparce v předem zvážené odpařovací baňce. Vznikla nažloutlá olejovitá tekutina. Většina byla použita do další syntézy a zbytek skladován ve formě hydrochloridu.

Výtěžek reakce byl 1,2 g, což je 17,39 % teoretického výtěžku (6,9 g).

Tato syntéza byla prováděna celkem třikrát. Při druhém pokusu byl výtěžek menší než v prvním případě a to 0,05 g což je 1 % teoretického výtěžku. Proto byla pro třetí syntézu zvýšena navážka azidu na 5 g a hydrobromidu 3-bromopropylaminu na 5,5 g

a také reakční teplota z 90 na 130 °C. Výtěžek reakce byl 0,8 g nažloutlé olejovité kapaliny, což je asi 10 % teoretického výtěžku (7,6 g).

Výtěžky: 1,2 g, (17,39 %), 0,05 g (1 %), 0,8 g (10 %)

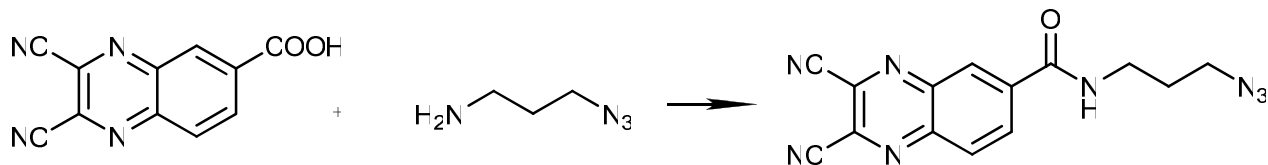
Popis: žlutohnědá olejovitá kapalina

Molekulová hmotnost: 100 g/mol.

4.6.4 Syntéza 4

Reakce: **Příprava N-(3-azidopropyl)-2,3-dikyanchinoxalin-6-karboxamidu**

Princip:



C₁₄H₇ON₈

Použité chemikálie:

- 2,3-dikyanchinoxalin-6-karboxylová kyselina,
- Tetrahydrofuran bezvodý,
- Thionylchlorid,
- Toluén bezvodý,
- 3-azidopropan-1-amin,
- Voda,
- Ethylacetát.

Postup práce:

0,6 g (2,7 mmol) 2,3-dikyanchinoxalin-6-karboxylové kyseliny, připravené v syntéze 2, bylo rozpuštěno ve 14 ml bezvodém tetrahydrofuranu. Thionylchlorid o hmotnosti 3,3 g tedy 2 ml (27 mmol) byl rozpuštěn v 10 ml bezvodého toluenu a poté přidán k roztoku kyseliny. Vzniklá směs byla zahřívána k varu na glycerínové lázni při 100°C po dobu tří hodin. Posléze byl odpařen na vakuové odparce nadbytečný thionylchlorid a rozpouštědla. Vzniklý hnědý olej byl rozpuštěn v 10 ml bezvodého tetrahydrofuranu. Vzniklý amin ze syntézy 3, tedy 3-azidopropan-1-amin, byl jako volná báze v množství 0,8 g (8 mmol) rozpuštěn ve 3 ml bezvodého tetrahydrofuranu. Po kapkách byl tento roztok injekční stříkačkou za stálého míchání vpraven do chloridu 2,3-dikyanchinoxalin-6-karboxylové kyselinyrozpuštěného v THF. Vzniklá směs byla pod zpětným chladičem za stálého míchání zahřívána k varu na glycerínové lázni při 80 °C po dobu 3 hodin. Poté byl produkt vysušen na vakuové odparce, smísen s 20 ml vody a třikrát extrahován s 10 ml ethylacetátu. Organická fáze byla vytřepána s roztokem NaCl (5 g / 20 g H₂O). Protože k oddělení organické

a vodné fáze nedošlo, produkt s nečistotami byl rozpuštěn v ethanolu, smísen se silikagelem v množství asi 10g a čištěn na sloupcové chromatografii. Jako nejvhodnější mobilní fáze byla zvolena kombinace rozpouštědel DCM:EA v poměru 5:1. Bylo získáno 0,12 g látky. Ta byla použita k následné cyklizaci a tvorbě nesymetrického produktu.

Výtěžek: 0,12 g což odpovídá 16,2 % teoretického výtěžku (0,74 g).

Popis: světle žluté krystalky

Molekulová hmotnost: 275 g/mol

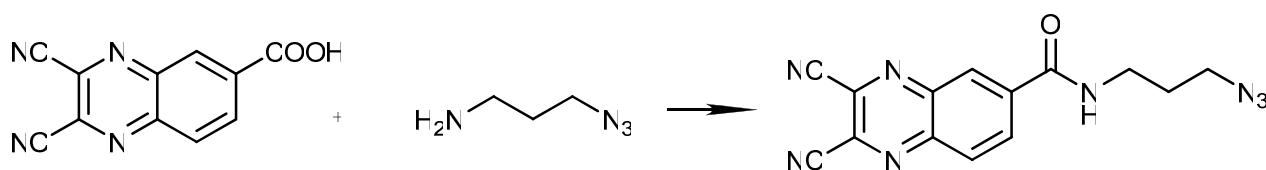
Ověření: srovnáno se standardem dostupným na katedře pomocí TLC a světla vlnové délky 254 a 366nm

Pokus o cyklizaci ale nebyl úspěšný. Místo nesymetrického produktu vznikl produkt symetrický, zřejmě v důsledku nedostatečného množství N-(3-azidopropyl)-2,3-dikyanochinoxalin-6-karboxamidu. Syntéza tohoto produktu byla opakována s jiným postupem.

Syntéza 4 – druhý pokus

Reakce: **Příprava N-(3-azidopropyl)-2,3-dikyanochinoxalin-6-karboxamidu**

Princip:



C₁₄H₇ON₆

Použité chemikálie:

- 2,3-dikyanochinoxalin-6-karboxylová kyselina (ZIP-1)
- 3-azidopropan-1-amin
- 2-(1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-hexafluorofosfát (HBTU)
- N,N-Dimethylaminopyridin (DMAP)
- Bezvodý N,N-dimethylformamid

Postup práce:

Bylo naváženo 50 mg (0,226 mmol) 2,3-dikyanoxalin-6-karboxylové kyseliny, 85,88 mg HBTU (0,226 mmol), 55,24 mg N,N-dimethylaminopyridinu, což odpovídá 0,452 mmol, 50 mg vzniklého 3-azidopropan-1-aminu (0,452 mmol) a toto vše bylo rozpuštěno v asi 10 ml bezvodého N,N-dimethylformamidu. Po několika hodinovém míchání byla směs diagnostikována na TLC, kde byl patrný vznikající N-(3-azidopropyl)-2,3-dikyanoxalin -6-karboxamid. Množství ale nebylo dostatečné, proto byl vyroben další 3-azido-propyl-1-amin a přidáno dalších 50 mg (tedy 0,452mmol) do reakce spolu se stejným množstvím HBTU (88,85 mg). Takto připravená směs byla ponechána přes víkend míchat.

Na TLC tentokrát nebyla původní kyselina vůbec patrná, skvrna s produktem se oproti porovnávacímu standardu jevila výrazná. Následovalo obvyklé hledání vhodné mobilní fáze pro čištění na sloupcové chromatografii.

Zkoušené kombinace:

DCM:EA:KO

V poměru 60:10:1

DCM:EA

V poměru 7:1

DCM:AC

V poměru 1:1

BEN:EA

V poměru 1:1, 2:1, 2,5:1, 3:1

Nejlépe došlo k oddělení nečistot v soustavě **benzin:ethylacetát** v poměru 2:1 a 3:1. Pro odstranění bezvodého dimethylformamidu byla k roztoku přidána vody. Došlo k zakalení a směs byla inkubována přes noc při chladničkové teplotě. Vytvořila se jemná, ale nefiltrovatelná sraženina, která neměla ani po centrifugaci tendenci sedimentovat. Nakonec byla voda i dimethylformamid odpařeny na vakuové odparce.

Byl sestaven chromatografický sloupec se stacionární fází silikagelem (asi 10 g) a mobilní fází **benzin:ethylacetát** v poměru 3:1. Směs se vzorkem byla promísena se silikagelem a přidána na vrchol sloupce. Pomalu byla přidána mobilní fáze a vyvíjeny jednotlivé frakce. Po odstranění prvních nečistot bylo složení mobilní fáze změněno

na poměr 2:1. Po oddělení dalších nečistot byl snížen obsah benzínu v mobilní fázi na poměr 1:1. Produkt byl odchycen do 8 zkumavek a byl čistý. Rozpouštědla byla za vakua odpařena. Poté byly ze vzorku s toluenem azeotropně oddestilovány zbytky vlhkosti a produkt byl opět vysušen.

Výtěžek: 15,4 mg což je 25 % teoretického výtěžku (61,3 mg).

Popis: jemné žluté krystalky

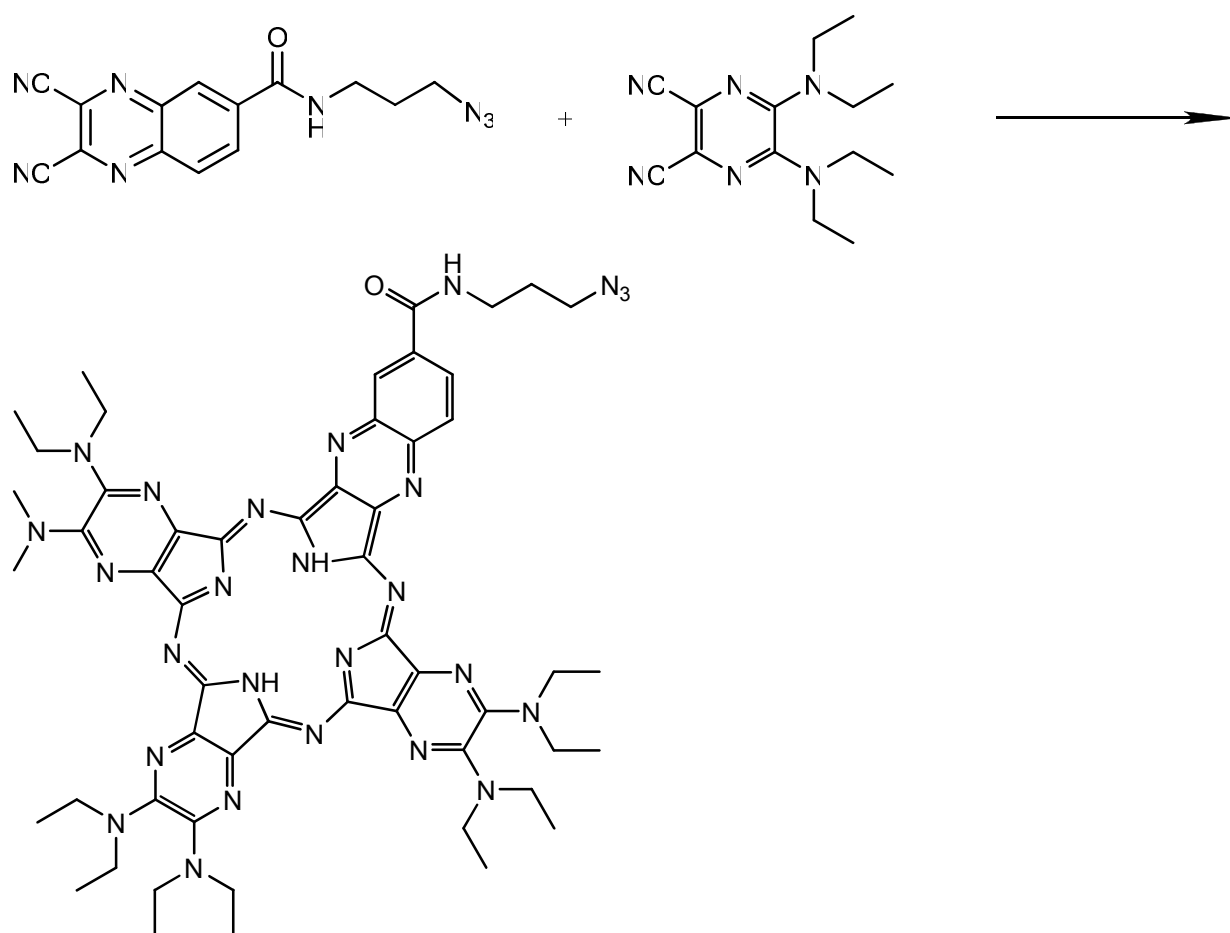
Molekulová hmotnost: 275 g/mol

Ověření: srovnáno se standardem dostupným na katedře pomocí TLC a světla vlnové délky 254 a 366 nm

4.6.5 Syntéza 5

Reakce: **Cyklotetramerizace a vznik nesymetrického {1-[(3-azidopropyl)karboxamido]benzo}[3.4-b]-9,10,16,17,23,24-hexakis(diethylamino)-1,4,8,11,15,18,22,25-(oktaaza)ftalocyaninu**

Princip:



C₅₅H₆₇N₂₅O

Použité chemikálie:

- N-(3-azidopropyl)-2,3-dikyanchinoxalin-6-karboxamid
- 5,6-bis(diethylamino)pyrazin-2,3-dikarbonitril
- Butanol bezvodý
- Lithium
- Kyselina octová 50%

Postup práce:

Bylo použito 0,12 g (0,4 mmol) produktu vzniklého v syntéze 3. Dále bylo přidáno 0,324 mg (1,2 mmol) ZIP-14 a 10 ml bezvodého butanolu. Ke směsi bylo přivážno ještě lithium 0,0786 mg (11,2 mmol). Toto vše bylo zahříváno 3 hodiny na glycerinové vodní lázni pod zpětným chladičem při teplotě kolem 120 °C.

Po té byla vzniklá směs odpařena na vakuové odparce. Vznikly intenzivně zelené krystalky. Bylo přidáno 25 ml kyseliny octové 50% na kompletní odstranění lithia z roztoku i z produktu a krystalky změnil zbarvení na fialovo. Tmavá fialová sraženina byla přefiltrována přes skládaný papírový filtr, vymyta vodou, rozpuštěna v dichlormethanu do baňky a odpařena za vakua. Diagnostika na TLC ukázala, že žádaný produkt nevznikl. Po porovnání s cyklickým symetrickým standardem bylo zjištěno, že místo nesymetrického azaftalocyaninu byl připraven pouze standardu podobný symetrický azaftalocyanin.

Syntéza 5 – druhý pokus

Použité chemikálie:

- N-(3-azidopropyl)-2,3-dikyanchinoxalin-6-karboxamid
- 5,6-bis(diethylamino)pyrazin-2,3-dikarbonitril
- Butanol bezvodý
- Lithium
- Kyselina octová 50%

Postup práce:

15,4 mg produktu vzniklého v syntéze 4, dobře vysušeného, což je 0,056 mmol bylo smícháno se 75,6 mg ZIP-14, což odpovídá 0,28 mmol (v molárním poměru 1:5) a 6 ml bezvodého butanolu. Ke směsi bylo přivážno ještě lithium 11,1 mg, což odpovídá 1,5 mmol. Tato směs byla zahřívána 4 hodiny na glycerinové vodní lázni pod zpětným chladičem při teplotě kolem 130°C. Vznikla zelenohnědá olejovitá tekutina. Poté byl přebytečný butanol odpařen za vakua. Výsledkem byla hnědozelená olejovitá vrstvička, která nešla dále odpařit. Po přidání 20 ml 50% kyseliny octové se roztok zbarvil červeno hnědě s patrnými kousky sraženiny. Roztok byl přefiltrován přes jemný skládaný filtr a malé množství sraženiny detekováno.

K cyklizaci zřejmě nedošlo nebo se produkt ihned rozložil. Jednalo se o látku šedavě nafialovělou. Fialová součást byla zřejmě stopová množství zacyklené ZIP-14. Zbytek byla neidentifikovaná látka, ve VIS bezbarvá, dobře zhasěla pod UV. Nejednalo se ani o jeden z použitých prekurzorů.

K cyklizaci nedošlo.

Bylo zváženo 7,4 mg neznámého produktu.

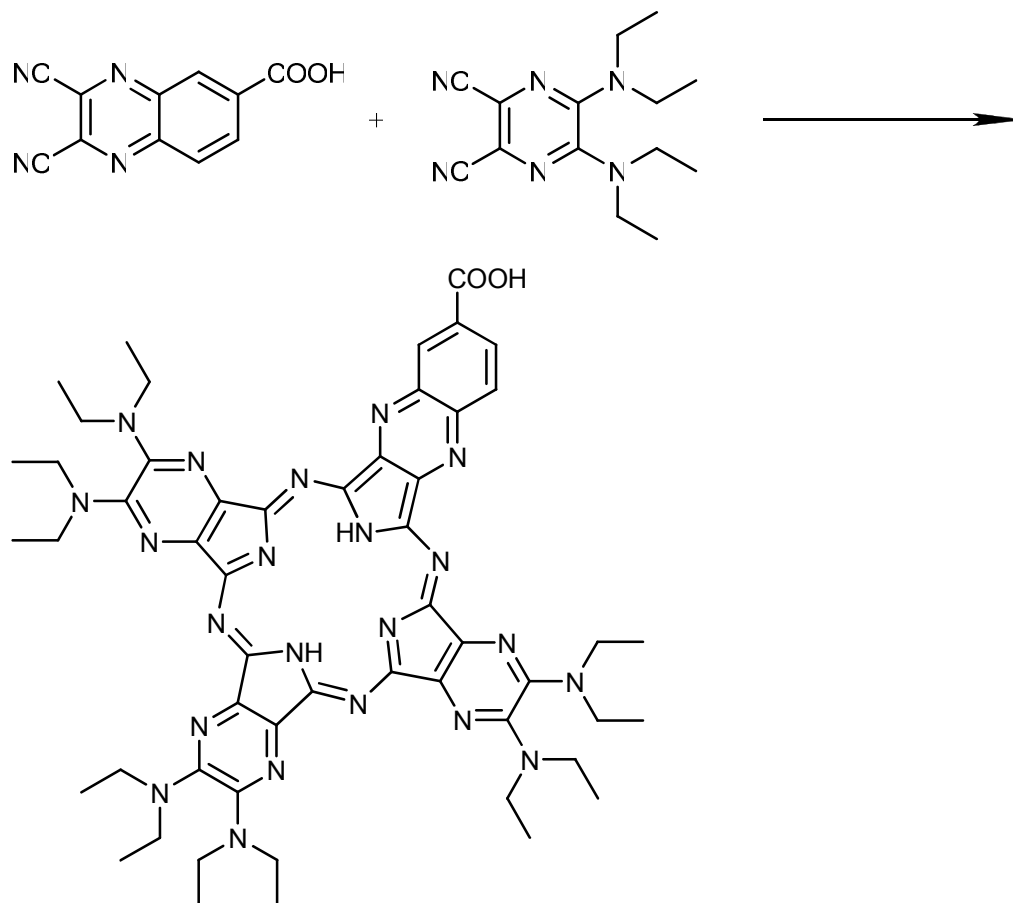
Popis: šedavé krystalky

Ověření: pomocí TLC a světla vlnové délky 254 a 366 nm

4.6.6 Syntéza 6

Reakce: **Cyklotetramerizace kyseliny 2,3-dikyanoxalin-6-karboxylové a 5,6-bis (diethylamino)pyrazin-2,3-dikarbonitrilu za vzniku {1-(karboxy)benzo[3,4-b]}-9,10,16,17,23,24-hexakis(diethylamino)-1,4,8,11,15,18,22,25-(oktaaza) ftalocyaninu**

Princip:



C₅₃H₆₃N₂₁O₂

Použité chemikálie:

- Kyselina 2,3-dikyanoxalin-6-karboxylová (ZIP-1)
- 5,6-bis (diethylamino)pyrazin-2,3-dikarbonitril(ZIP-14)
- Butanol bezvodý
- Lithium
- Kyselina octová 50%
- Dichlormethan

Postup práce:

Bylo naváženo 30mg kyseliny 2,3-dikyaninoxalin-6-karboxylové (0,1338 mmol) a třímolární přebytek 5,6-bis(diethylamino)pyrazin-2,3-dikarbonitrilu 109,8 mg (0,4014 mmol). To bylo rozpuštěno v 10 ml čerstvě nadestilovaného bezvodého butanolu a bylo přidáno na kousky nakrájené lithium 26,225 mg (3,7464 mmol). Roztok po chvíli změnil barvu ze žluté na temně zelenou a byl ponechán 4 hodiny pod zpětným chladičem a za stálého míchání zahřívát k varu. Poté byl přebytečný butanol z roztoku odpařen do sucha. Zelené krystalky byly zbaveny přebytečného lithia přidáním 25 ml 50% kyseliny octové. Vznikl hnědočervený hustý roztok, ve kterém se srazily fialové krystalky produktu. Tekutina byla odstraněna filtrací a produkt na filtru několikrát promyt vodou. Krystalky byly vymyty dichlormethanem do vytárované baňky a za vakua odpařeno rozpouštědlo. Výtěžek byl 99,89 mg. Na TLC diagnostikováno asi 5 látek, mj. i cyklický symetrický azaftalocyanin a hledaná kyselina.

Čištění:

Pomocí TLC bylo testováno vhodné složení mobilní fáze:

DCM:EA:MeOH v poměru 50:1:1 symetrický produkt postupuje v čele, vzorek zůstává na startu.

DCM:EA:MeOH:KO v poměru 50:1:1:1 látky se oddělují, symetrický produkt stále v čele a vzorek se díky kyselině pohnul RF asi 0,6.

DCM:MeOH:KO v poměru 50:1:0,5 skvrny lépe odděleny. Zvolena jako první mobilní fáze.

DCM:KO v poměru 50:1

Čištění probíhalo opět na sloupcové chromatografii. Náplň byla tvořena silikagelem promíseným s dichlormethanem. Silikagel se vzorkem byl vpraven na start. Nejprve byla zvolena mobilní fáze ve složení DCM:MeOH:KO. Odstraněny nečistoty v čele. Poté následovala mobilní fáze DCM:KO, kde došlo k vymytí dalších nečistot před vzorkem. Poté byl vzorek vytlačen původní mobilní fází DCM:MeOH:KO. Následná TLC prokázala znečištění symetrickým azaftalocyaninem. V dalším kroku byla zvolena fáze DCM:EA:MeOH, která nejprve oddělila symetrický azaftalocyanin (jímán do zvláštních zkumavek, odpařen a uschován). Poté byla vymyta výsledná kyselina výměnnou mobilní fází za

DCM:MeOH:KO. Produkt byl za vakua vysušen ve vytárované baňce a použit k další reakci. Přítomnost a čistota produktu byla ověřena UV spektrofotometricky viz příloha 1.

Výtěžek reakce: 14,2 mg kyseliny což je 10,14% teoretického výtěžku (138,085 mg).

Molekulová hmotnost: 1026,20766 g/mol.

Popis: modrofialové krystalky

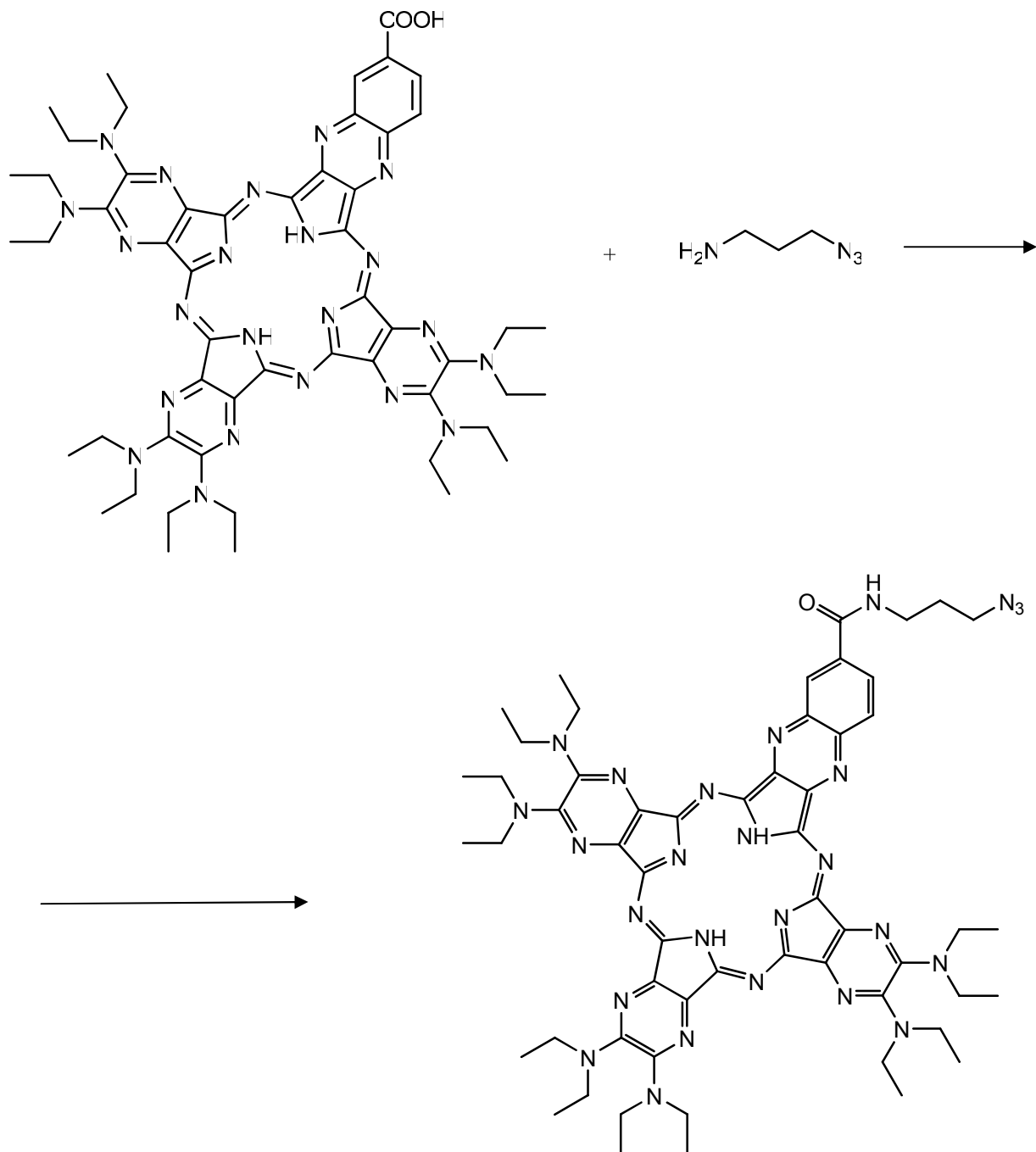
Ověření: srovnáno se standardem dostupným na ktedře pomocí TLC a světla vlnové délky 254 a 366 nm

UV spektrofotometrie – viz příloha 1, absorpční maxima ve viditelné oblasti: 370, 564, 669 a 707 nm.

4.6.7 Syntéza 7

Reakce: **Syntéza {1-[(3-azidopropyl)karboxamido]benzo}[3.4-b]-9,10,16,17,23,24-hexakis(diethylamino)-1,4,8,11,15,18,22,25-(oktaaza) ftalocyaninu**

Princip:



C₅₅H₆₇N₂₅O

Použité chemikálie:

- {1-(karboxy)benzo[3,4-b]}-9,10,16,17,23,24-hexakis(diethylamino)-1,4,8,11,15,18,22,25-(oktaaza)ftalocyanin

- 2-(1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3- hexafluorofosfát (HBTU)
- N,N-Dimethylaminopyridin (DMAP)
- N,N-Dimethylformamid bezvodý (DMFA)
- Diisopropylethylamin (DIEA)
- 3-azidopropan-1-amin

Postup práce:

Produkt z předchozí reakce (14,2 mg cyklické kyseliny, což odpovídá 0,0138 mmol) byl dále smísen s 3-azidopropan-1-aminem ve stejném molárním poměru, tedy asi se 2 mg (0,0138 mmol).

Dále bylo přidáno 5,244 mg HBTU (0,0138 mmol), asi 2 mg N,N-dimethylaminopyridinu (0,0138 mmol) a 71,76 ml diisopropylethylaminu (0,414 mmol). Toto vše bylo rozpuštěno v 10 ml bezvodého N,N-dimethylformamidu a ponecháno míchat přes noc. Vznikla průhledná modravězelená tekutina. Z toho bylo patrné, že se náš produkt rozložil. Ze záznamu měření UV vyplývá (viz. příloha 3), že tento roztok žádný azaftalocyanin neobsahoval.

Výtěžek reakce: žádný

Teoretická molekulová hmotnost: 1094,28838 g/mol

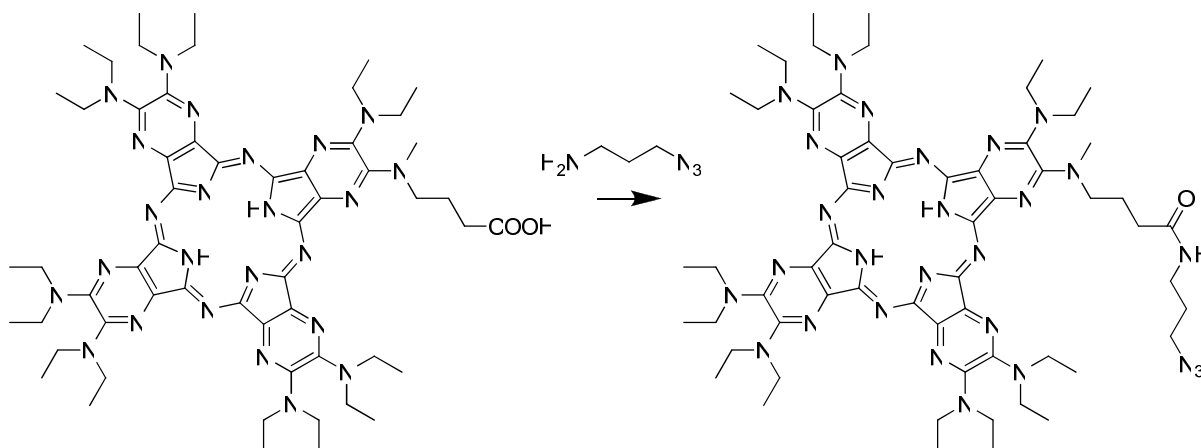
Ověření: pomocí TLC a světla vlnové délky 254 a 366 nm

UV spektrofotometrie, absorpční maxima viz příloha 3

4.6.8 Syntéza 8

Reakce: Příprava 2-[[[(3-azidopropyl)-(3-karboxamidopropyl)]methylamino]-3,9,10,16,17,23,24-heptakis(diethylamino)-1,4,8,11,15,18,22,25-(oktaaza)ftalocyaninu

Princip:



C₆₀H₈₈N₂₈O

Použité chemikálie:

- 2-[(4-karboxypropyl)methylamino]-3,9,10,16,17,23,24-heptakis(diethylamino)-1,4,8,11,15,18,22,25-(oktaaza)ftalocyanin (Q18-1H₂)
- 2-(1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-hexafluorofosfát (HBTU)
- N,N-Dimethylaminopyridin (DMAP)
- N,N-Dimethylformamid bezvodý
- Diisopropylethylamin (DIEA)
- 3-azidopropan-1-amin

Postup práce:

V baňce bylo smíseno 114 mg 2-[(4-karboxypropyl)methylamino]-3,9,10,16,17,23,24-heptakis(diethylamino)-1,4,8,11,15,18,22,25-(oktaaza)ftalocyaninu (Q18-1H₂), což představuje 0,1 mmol, s 38 mg HBTU (0,1 mmol), 12,22 mg N,N-dimethylaminopyridinu (0,1 mmol) a toto vše bylo rozpuštěno v 10 ml bezvodého N,N-dimethylformamidu. Dále bylo přidáno 520 μl (3 mmol) diisopropylethylaminu a 12 mg (0,1 mmol) čerstvě vyrobeného 3-azidopropan-1-aminu.

Směs byla v baňce zabalena do alobalu, jelikož se vzniklá sloučenina na světle snadno rozkládá a ponechána přes noc míchat. Vzniklo fialové barvivo, jehož totožnost byla ověřena tenkovrstvou chromatografií. Na chromatogramu byly patrné ještě skvrny původní kyseliny a vedlejší produkt, pro jeho odstranění byly testovány kombinace rozpouštědel **DCM:MeOH:AC** v poměru 50:1:1, **DCM:EA** 5:1, **DCM:KO** 50:0,5.

V soustavě DCM:MeOH:AC se produkt se snadno oddělil od zbytku výchozí látky. Poté byla k roztoku přidána destilovaná voda, ale při očekávané krystalizaci vznikly částičky velmi malých rozměrů, které nebylo možno zfiltrovat. Rozpouštědla byla tedy odpařena a látka zakoncentrována. Vysrážely se částičky látky. Ty byly zfiltrovány přes skládaný filtr s velkou hustotou pórů. Odstranily se nečistoty v podobě nahnědlé tekutiny. Látka byla dále čištěna. Na TLC byl diagnostikován vzniklý produkt. Porovnání s původním vzorkem kyseliny Q18 – 1H₂ ukázalo, že se jedná o jinou látku, s jiným R_f, tudíž reakce proběhla v pořádku. Na chromatogramu bylo ovšem patrné ještě malé množství původní látky a nějaké nečistoty. Konečné složení mobilní fáze bylo DCM:EAC:MeOH 50:1:1. Byl připraven sloupec ze silikagelu vlhčeného DCM. Protože TLC ukázalo rušivé působení nějakého rozpouštědla, byla látka nejprve promyta samotným DCM. Poté byla látka dále eluována původně zvolenou mobilní fází. Produkt byl odchycen do zkumavek 1-4, dále bylo jeho množství nevýznamné. Ovšem nečistota stále byla v těsné blízkosti produktu a nedošlo k jejímu oddělení. Pro druhé čištění byla zvolena jiná vhodná mobilní fáze. Vrstva silikagelu byla promývána benzínem, na povrch byla přidána barevná čištěná vrstva silikagelu se vzorkem a nejprve byla chvíli vymývána samotným benzínem. Tím se odstranila část nečistot. Pak byla přidána vyvíjecí soustava BEN:AC v poměru 1:1. Vzešlý azid byl detekován na TLC. Jelikož se jevil jako čistý, byl použit k další syntéze.

Výtěžek reakce: 38 mg, což je 31 % teoretického výtěžku (122,24 mg).

Molekulová hmotnost: 1217,53 g/mol.

Popis: temně fialové krystalky

Ověření: pomocí TLC a světla vlnové délky 254 a 366 nm

NMR spectrum - δ ¹H NMR (300 MHz, [D₅] pyridin):

8. 738 (t, ³J(H,H)=14 Hz, 1H; NH amid)

4.029-3.791 (m, 28H, N-CH₂-)

4.007 (t, $^3J(\text{H,H})=14$ Hz, 2H; -CH₂-N₃)

3.210 (t, $^3J(\text{H,H})=14$ Hz, 2H; CH₂-NCH₃)

3.320 (s, 3H; N-CH₃)

3.526-3.461 (q, $^3J(\text{H,H})=19$ Hz, 2H; CH₂-NH-CO)

2.605 (t, $J(\text{H,H})=14$ Hz, 2H; CH₂-CONH)

2.315-2.219 ppm (m, 2H; CH₂-CH₂-CH₂ postranní řetězec amin-amid).

1.754-1.613 ppm (m, 2H; CH₂-CH₂-CH₂ postranní řetězec amid-azid).

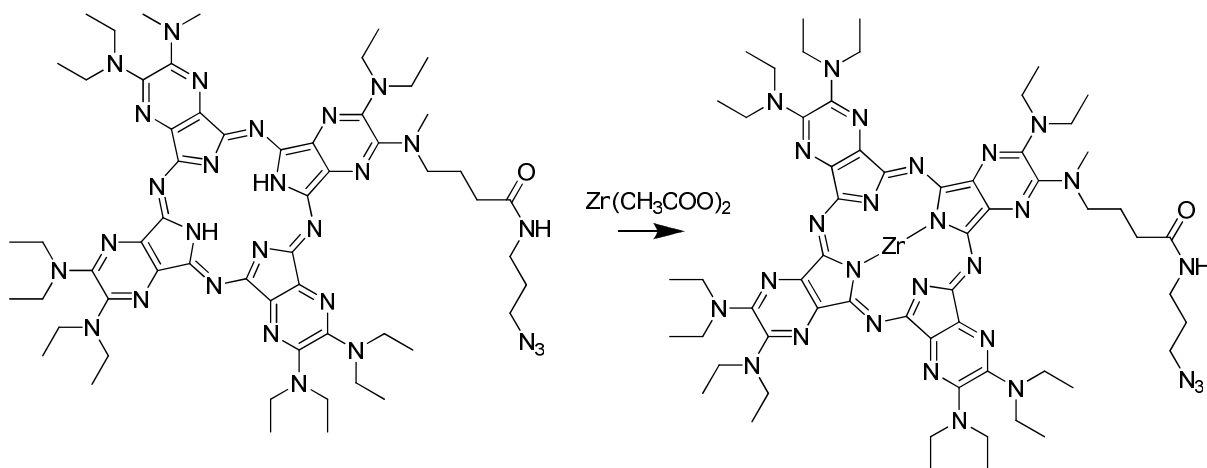
1.324-1.117 ppm (m, 42H; CH₃)

¹³C NMR (75 MHz, [D₅] pyridin): δ = 172.453, 151.592, 150.708, 150.682, 150.242, 150.059, 149.881, 149.524, 149.221, 141.401, 141.147, 136.176, 135.835, 135.509, 135.179, 134.818, 124.160, 123.830, 123.500, 123.170, 122.882, 122.783, 49.308, 43.010, 42.695, 37.546, 36.950, 34.124, 29.984, 29.415, 23.898, 13.176, 13.130, 12.956.

4.6.9 Syntéza 9

Reakce: Vložení centrálního atomu zinku - vznik 2-[[[(3-azidopropyl)-(3-karboxamidopropyl)]methylamino]-3,9,10,16,17,23,24-heptakis(diethylamino)-1,4,8,11,15, 18,22,25-(oktaaza)ftalocyaninato zinečnatého komplexu.

Princip:



$C_{60}H_{86}N_{28}OZn$

Použité chemikálie:

- 2-[[[(3-azidopropyl)-(3-karboxamidopropyl)]methylamino]-3,9,10,16,17,23,24-heptakis (diethylamino) -1,4,8,11,15,18,22,25-(oktaaza)ftalocyanin
- Octan zinečnatý bezvodý
- N,N-Dimethylformamid bezvodý

Postup práce:

38 mg (0,0312 mmol) 2-[(3-azidopropyl)-(4-karbamoylpropyl)methylamino]-3,9,10,16,17,23,24-heptakis(diethylamino)-1,4,8,11,15,18,22,25-(oktaaza)ftalocyaninu a 40 mg (0,2185 mmol) bezvodého octanu zinečnatého bylo rozpuštěno v 10 ml bezvodého N,N-dimethylformamidu. Směs byla ponechána míchat za nepřístupu světla přes noc a poté zahuštěna na vakuové odparce. K získanému produktu byla přidána destilovaná voda, díky které produkt vykristalizoval. Vzniklá suspenze byla přefiltrována přes fritu s jemnými póry a několikrát za sebou promyta vodou. Produkt na fritě byl ponechán samovolně vyschnout. Pak byl rozpuštěn v DCM a přemístěn

do předem vytárované odpařovací baňky a na vakuové odparce vysušen do sucha a zvážen. Přítomnost čistého produktu 2-[[3-azidopropyl)-(3-karboxamidopropyl)]methylamino]-3,9,10,16,17,23,24 -heptakis(diethylamino)-1,4,8,11,15,18,22,25-(oktaaza) ftalocyaninato zinečnatého komplexu byla detekována na TLC a byl pořízen záznam na UV spektrofotometru viz. příloha 2.

Výtěžek reakce: 40,60 mg, což je 100,25 % teoretického výtěžku (39,96 mg)

Molekulová hmotnost: 1280,92 g/mol

Popis: fialovomodré krystalky

Ověření: pomocí TLC a světla vlnové délky 254 a 366 nm

UV spektrofotometrie: viz příloha 2, absorpční maxima ve viditelné oblasti: 395, 512, 606 a 659 nm

NMR spektrum - δ ^1H NMR (300 MHz, $[\text{D}_5]$ pyridin):

13.727 (s, 2H; central NH)

8.637 (t, $^3J(\text{H,H})=12$ Hz, 1H; NH amid)

4.026 (t, $^3J(\text{H,H})=14$ Hz, 2H; -CH₂-N₃)

3.903-3.856 (m, 28H, N-CH₂)

3.498-3.433 (q, $^3J(\text{H,H})=19$ Hz, 2H; CH₂-NH-CO)

3.227 (t, $^3J(\text{H,H})=14$ Hz, 2H; CH₂-NHCH₃)

3.352 (s, 3H; N-CH₃)

2.530 (t, $J(\text{H,H})=15$ Hz, 2H; CH₂-CONH)

2.320-2.212 ppm (m, 2H; CH₂-CH₂-CH₂ postranní řetězec amin-amid).

1.743-1.653 ppm (m, 2H; CH₂-CH₂-CH₂ postranní řetězec amid-azid).

1.218-1.171 ppm (m, 42H; CH₃)

^{13}C NMR (75 MHz, $[\text{D}_5]$ pyridin): δ = 172.639, 151.513, 151.479, 151.437, 151.308, 151.281, 151.145, 150.234, 149.874, 149.517, 142.957, 142.847, 142.581, 136.184, 135.839, 135.509, 135.179, 134.898, 134.814, 124.160, 123.830, 123.500, 123.170, 122.901, 122.787, 50.765, 49.312, 42.941, 42.634, 37.497, 36.973, 34.423, 29.423, 23.936, 13.176, 13.119, 12.933.

4.6.10 *Click reakce s připraveným Q18-Zn-azidem*

Použité chemikálie

- Oligonukleotidová sonda modifikovaná hexynylovou skupinou
- 2-[[[(3-azidopropyl)-(3-karboxamidopropyl)]methylamino]-3,9,10,16,17,23,24-heptakis(diethylamino)-1,4,8,11,15,18,22,25-(oktaaza)ftalocyaninato zinečnatý komplex
- Jodid měďný
- N,N-Diisopropylethylamin 99 %
- Tetrahydrofuran
- Amoniak 32 %

Postup práce:

1,670 mg (1,3 μmol) připraveného 2-[[[(3-azidopropyl)-(3-karboxamidopropyl)]methylamino]-3,9,10,16,17,23,24-heptakis(diethylamino)-1,4,8,11,15,18,22,25-(oktaaza) ftalocyaninatozinečnatého komplexu (mmol) bylo smíseno s 0,275 mg (1,4 μmol) CuI, 2,7 mg (50 nmol) oligonukleotidové sondy a 7 μl DIPEA. Toto vše bylo rozpuštěno ve 250 ml THF a ponecháno míchat po dobu 24 hodin. Poté byla směs dvakrát promyta dichlormethanem a třikrát tetrahydrofuranem. Odblokování bylo provedeno přidáním 1 ml 32 % amoniaku a uskladněno při laboratorní teplotě a v temnu 5 hodin. Čištění bylo provedeno přes speciální filtrační sloupec naplněný hydratovaným gelem (sephadex). Sloupec byl nejprve promyt asi 15 ml vody. Poté byl na jeho filtrační vrstvu postupně přidán roztok amoniaku a modifikované oligonukleotidové sondy se zkoušeným zinečnatým komplexem. Přidáním 0,5 ml destilované vody byl barevný vzorek vstřebán do gelu a připraven k odchytu do vialky. Přidáním dalšího 1 ml vody byl vzorek kompletně eluován.

Zároveň se vzorkem byl připraven ještě roztok samotné hexynylovou skupinou modifikované oligonukleotidové sondy a 1 ml amoniaku. Také vpraven na sloupec a přečištěn stejným způsobem.

U obou roztoků byla následně změřena absorbance na UV-VIS spektrofotometru.

Do kyvet byly vpraveny 3 ml vody a 50 μl barevného komplexu s oligonukleotidovou sondou. Absorbance oligonukleotidu při vlnové délce 264 nm

byla 0,184 jak v případě samotného oligonukleotidu, tak i komplexu sondy a Q18-Zn-azidu. Záznam UV-VIS spektra je uveden v příloze 4 a 5.

Výsledné molární množství oligonukleotidové sondy bylo 47 nmol, stejně jako množství oligonukleotidové sondy s navázaným Q18-Zn-azidem. V porovnání s původními 50 nm byl výsledek velmi dobrý. Množství navázaného Q18-Zn-azidu bude změřeno hmotnostní spektrofotometrií a prezentováno při ústní obhajobě diplomové práce.

5 Výsledky a diskuze

Syntéza 1

Při syntéze prvního prekursoru, tedy diimidosukcinylnitrilu, jsem vycházela z výchozích látek diaminomaleinonitrilu a 2,3-dichlor-5,6-dicyan-p-benzochinonu v reakčním prostředí acetonitrilu. V této oxidační reakci došlo k tvorbě sloučeniny diimidosukcinylnitrilu a redukovaného 2,3-dichlor-5,6-dikyanohydrochinonu. Tuto reakci jsem prováděla celkem dvakrát. Proběhla s výtěžky 2,6 g (91,67 %) a 8,13 g (153,29 %). Ve druhém případě vzniklo zřejmě větší množství nečistot. Výtěžky reakcí byly dobré.

Syntéza 2

U syntézy 2,3-dikyanochinoxalin-6-karboxylové kyseliny byly užity tyto reaktanty: 3,4 – diaminobenzoová kyselina a diimidosukcinylnitril v prostředí trifluoroctové kyseliny. Reakce sama nebyla nikterak složitá. Velkým problémem však bylo následné čištění látky, jelikož vzniklo velké množství různých vedlejších produktů, které se nedaly snadno odstranit. Ideální soustava nebyla nalezena, na vymytí všech nečistot muselo být použito několik rozdílných mobilních fází. Látka byla čištěna pomocí metody sloupcové chromatografie. I tato reakce byla za účelem získání většího množství produktu do dalších syntéz provedena dvakrát. Výtěžky byly 1,45 g (61,4 %) a 2,1 g což odpovídá 25 % z teoretického výtěžku. Ke ztrátám mohlo dojít například vznikem velkého množství vedlejších produktů a několikanásobným čištěním.

Syntéza 3

Při přípravě prekursoru 3-azidopropan-1-aminu byly jako výchozí látky použity azid sodný a 3-bromopropylamin hydrobromid 98 % ve vodných roztocích. Po zahřátí byl roztok alkalizován hydroxidem draselným za vzniku horní olejovité žlutohnědé vrstvy, která byla vytřepána s etherem a organická fáze vysušena od zbytků vody bezvodým síranem sodným. Po odpaření byly výtěžky 1,2 g, 0,05 g a 0,8 g tedy 17,39 %, 1 % a 10 % z teoretických výtěžků. Malé výtěžky reakcí mohla zapříčinit nízká teplota nebo krátká reakční doba.

Syntéza 4

Syntézu N-(3-azidopropyl)-2,3-dikyaninoxalin-6-karboxamidu bylo nutno provést dvakrát, protože veškerý produkt z prvního pokusu byl použit na následnou cyklizaci, která bohužel nebyla úspěšná. Byly použity dva různé postupy přípravy. Nejprve reakcí 2,3-dikyaninoxalin-6-karboxylové kyseliny v bezvodém tetrahydrofuranu s thionylchloridem v toluenu. Nakonec byl přidán 3-azidopropan-1-amin. Výtěžek této reakce byl 0,12g tedy 16,2 % teoretického výtěžku. Ztráty mohly být způsobeny nedostatečným zreagováním výchozích látek či chybou v pracovním postupu. Druhý pokus probíhal jinou metodou. Byly smíseny 2,3-dikyaninoxalin-6-karboxylová kyselina, 3-azidopropan-1-amin, 2-(1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-hexafluorofosfát, dimethylaminopyridin a bezvodý dimethylformamid. Tato směs byla ponechána přes noc míchat a byl průběžně kontrolován průběh reakce. Poté byla čištěna na sloupcové chromatografii za použití několika mobilních fází. V této reakci byl výtěžek o něco vyšší, 15,4 mg tedy 25 % z teoretického výtěžku. Ke ztrátám mohlo dojít při čištění a vznikem vedlejších produktů při reakci.

Syntéza 5

Cyklotetramerizace a vznik nesymetrického {1-[(3-azidopropyl) karboxamido] benzo}[3.4-b]-9,10,16,17,23,24-hexakis(diethylamino)-1,4,8,11,15,18,22,25-(oktaaza) ftalocyaninu. V této reakci byly použity prekurzory N-(3-azidopropyl)-2,3-dikyaninoxalin-6-karboxamid a 5,6-bis(diethylamino)pyrazin-2,3-dikarbonitril v poměru 1:3 v prostředí bezvodého butanolu a lithia. Tato reakce se z neznámého důvodu nedařila. Při prvním pokusu vznikly zelenohnědé krystalky, které po odkovování kyselinou octovou změnilly zbarvení na temně fialovou. Po bližší detekci bylo ale zjištěno, že se nejednalo o nesymetrický azaftalokyanin, ale o symetrický. Cyklizovaly pouze 4 molekuly 5,6-bis(diethylamino)pyrazin-2,3-dikarbonitrilu. Molekula N-(3-azidopropyl)-2,3-dikyaninoxalin-6-karboxamidu se do cyklizace vůbec nezapojila, což nebývá obvyklé. Neúspěch této reakce mohlo způsobit nedostatečné odstranění vlhkosti z reakčního prostředí, či snadný rozklad tohoto cyklu. Ve druhém pokusu o reakci i s pětinasobným přebytkem 5,6-bis(diethylamino)pyrazin-2,3-dikarbonitrilu k cyklizaci téměř nedošlo. Výtěžek byl jen 7,4 mg, ale diagnostika na TLC neprokázala přítomnost žádané látky. Vznikl neidentifikovaný produkt se stopami symetrického azaftalocyaninu. Příčinu

neúspěšné cyklizace by mohla objasnit identifikace vzniklých produktů např. hmotnostní spektrofotometrií.

Syntéza 6

V tomto případě byl zvolen postup cyklotetramerizace původní kyseliny 2,3-dikyaninoxalin-6-karboxylové s 5,6-bis(diethylamino)pyrazin-2,3-dikarbonitrilem v poměru 1:3 v prostředí bezvodého butanolu s přidavkem nadbytku lithia. Po odpaření vznikly zelené krystalky. Po odkovení kyselinou octovou vznikly intenzivně fialové krystalky {1-(karboxy)benzo[3,4-b]}-9,10,16,17,23,24-hexakis(diethylamino)-1,4,8,11,15,18,22,25-(oktaaza)ftalocyaninu. Látka byla čištěna sloupcovou chromatografií. Byly použity celkem tři mobilní fáze. Žádaná kyselina se na TLC jevila jako čistá. Bylo získáno 14 mg, což je 10,14 % teoretického výtěžku. 10% není mnoho, ale ztráty mohou být způsobeny čištěním a vznikem několika strukturních izomerů, vznikem symetrického cyklu a rozkladem látky. UV spektrofotometrický záznam ukazuje na přítomnost bezkovového nesymetrického azaftalocyaninu (viz. příloha 1).

Syntéza 7

Příprava azoamidu z kyseliny {1-(karboxy)benzo[3,4-b]}-9,10,16,17,23,24-hexakis(diethylamino)-1,4,8,11,15,18,22,25-(oktaaza)ftalocyaninu. Kyselina byla smíšena s 2-(1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-hexafluorofosfátem, dimethylaminopyridinem, rozpuštěna v bezvodém dimethylformamidu, dále byly přimíšeny diisopropylethylamin a 3-azidopropan-1-amin. Předpokládá se vznik {1-[(3-azidopropyl)karboxamido]benzo}[3,4-b]-9,10,16,17,23,24-hexakis(diethylamino)-1,4,8,11,15,18,22,25-(oktaaza)ftalocyaninu, který se ale ihned rozložil. Záznam UV spektrofotometrické identifikace (příloha č. 3) ukazuje, že roztok po rozkladu neobsahoval cyklický produkt.

Syntéza 8

Příprava 2-[[[(3-azidopropyl)-(3-karboxamidopropyl)]methylamino]-3,9,10,16,17,23,24-heptakis(diethylamino)-1,4,8,11,15,18,22,25-(oktaaza) ftalocyaninu z již dříve připravené cyklické kyseliny 2-[(4-karboxypropyl) methylamino]-3,9,10,16,17,23,24-heptakis(diethylamino)-1,4,8,11,15,18,22,25-(oktaaza)ftalocyaninu (Q18-1H₂), za užití 2-(1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-hexafluorofosfátu, dimethylaminopyridinu,

bezvodého dimethylformamidu, diisopropylethylaminu a 3-azidopropan-1-aminu. Reakce proběhla s výtěžkem 31% (38 mg). Ne všechny molekuly sloučeniny zreagovaly, vznikla řada nečistot a část se ztratila při čištění.

Syntéza 9

Získaných 38 mg 2-[[[(3-azidopropyl)-(3-karboxamidopropyl)]methylamino]-3,9,10,16,17,23,24-heptakis(diethylamino)-1,4,8,11,15,18,22,25-(oktaaza) ftalocyaninu bylo smíseno s bezvodým octanem zinečnatým, v prostředí dimethylformamidu a ponecháno míchat. Vznikl 100% výtěžek (40 mg) komplexu 2-[[[(3-azidopropyl)-(3-karboxamidopropyl)]methylamino]-3,9,10,16,17,23,24-heptakis (diethylamino)-1,4,8,11,15,18,22,25-(oktaaza)ftalocyaninato zinečnatého. Tato reakce proběhla dobře, čištění nebylo vzhledem k čistotě třeba. UV spektrofotometrický záznam kovového komplexu je v příloze 2.

Click reakce s připraveným Q18-Zn-azidem

Click reakce oligonukleotidové sondy a připraveného zinečnatého komplexu probíhala v prostředí tetrahydrofuranu a N,N-diisopropylethylaminu. Směs s jodidem měďným byla ponechána mísit 24 hodin. Poté byla několikrát promyta s DCM a THF a odblokována následným smísením s 1 ml amoniaku 32 %. Po přečištění na sephadexu byla změřena absorbance tohoto roztoku. Absorbance oligonukleotidu byla při vlnové délce 264 nm 0,184. Záznamy UV spektrofotografie jsou k nahlédnutí v příloze 4 a 5. Z původního molárního množství 50 nmol bylo výsledné množství oligonukleotidové sondy 47 nmol, což lze považovat za dobrý výsledek. Výsledné množství Q18-Zn-modifikovaného oligonukleotidu bude zmíněno až při ústní obhajobě diplomové práce.

Závěr

Tato diplomová práce se zabývala hledáním a přípravou látek ze skupiny azaftalokyaninů.

V rámci řešení práce byly připraveny tyto prekurzory:

- ❖ Diimidodisukcinylnitril
- ❖ 3-azidopropan-1-amin
- ❖ 2,3-dikyanchinoxalin-6-karboxylová kyselina
- ❖ N-(3-azidopropyl)-2,3-dikyanchinoxalin-6-karboxamid

Cyklizací prekurzorů kyseliny 2,3-dikyanchinoxalin-6-karboxylové a N-(3-azidopropyl)-2,3-dikyanchinoxalin-6-karboxamidu se podařilo připravit asymetrický {1-(karboxy)benzo[3,4-b]}-9,10,16,17,23,24-hexakis(diethylamino)-1,4,8,11,15,18,22,25-(oktaaza)ftalocyanin.

Cyklus s periferní skupinou azidu se připravit bohužel nepodařilo. Produkt byl zřejmě nestabilní.

Z již dříve na katedře připraveného azaftalocyaninu s periferně vázanou karboxylovou skupinou (Q18-1H₂) byl syntetizován azid: 2-[[3-azidopropyl)-(3-karboxamidopropyl)]methylamino}-3,9,10,16,17,23,24-heptakis(diethylamino)-1,4,8,11,15,18,22,25-(oktaaza)ftalocyanin, který byl následně vložením atomu zinku převeden na 2-[[3-azidopropyl)-(3-karboxamidopropyl)]methylamino}-3,9,10,16,17,23,24-heptakis(diethylamino)-1,4,8,11,15,18,22,25-(oktaaza)ftalocyaninato zinečnatý komplex.

Všechny nově vyrobené látky byly charakterizovány NMR a UV-VIS spektry. Zinečnatý komplex byl navázán na oligonukleotidovou sondu.

Literatura

- [1] Wikipedie otevrena encyklopedie CR [online] (2010) poslední revize 4. 10. 2009, staž. 10. 4. 2010: Fotodynamická terapie, dostupné na http://cs.wikipedia.org/wiki/Fotodynamick%C3%A1_terapie
- [2] EPSTEIN, J.M.: N. Engl. J.M. 1990; 32, 1149
- [3] ACKROYD, A., KELTY, C., BROWN, N., REED, M.: Photochem. Photobiol., 2001; 74, 656
- [4] Zdravotnicke noviny CZ [on-line] Naposledy aktualizovano 10. 4. 2008, stazeno 10. 4. 2010 dostupné na <http://www.zdn.cz/clanek/sestra/fotodynamicka-terapie-u-nonmelanomovych-nadoru-kuze-356475>
- [5] MITTRA, R.A., SINGERMAN, L.J.: Optom. Vis.Sci., 2002; 79, 218
- [6] REDDAN, J. C., ANDERSON, C. Y., XIU, H., HRABOVSKY, S., FREYE, K., FAIRCHILD, R., TUBESING, K. A., ELEMENTS, C. A.: Photochem. Photobiol., 1999; 70, 72
- [7] TRAUNER, K. B., GANDOUR-EDWARDS, R., BAMBERG, M., SHORTKROFF, S., SLEDGE, C., HASAN, T.: Photchem. Photobiol., 1998; 67, 133
- [8] FINSEN, N.R.: Phototherapy (Arnold, E., ed.), London, 1901. In: ACKROYD, A., KELTY, C., BROWN, N., REED M.: Photochem. Photobiol., 2001; 74, 656.
- [9] SCHERER, H. (1841). Chemisch-physiologische untersuchungen. *Ann. Chem. Pharm.*, 40,1
- [10] RAAB, O. (1900); Uber die Wirkung fluoreszierender Stoffe auf Infusorien. *Z. Biol.*, 39, 524-546
- [11] VON TAPPEINER, H. AND JESIONEK, A. (1903); Therapeutische Versuche mit fluoreszierenden Stoffen. *Münch. Med. Wochenschr.*, 47, 2042-2044
- [12] VON TRAPPEINER, H. AND JODLBAUER, A. (1904); Uber Wirkung der photodynamischen (fluoreszierenden) Stoffe auf Protozan und Enzyme. *Dtsch. Arch. Klin. Med.*, 80, 427- 487
- [13] VON TAPPEINER, H. AND JODLBAUER, A.: Die Sensibilisierende Wirkung fluoreszierender Substanzer. Gesamnte Untersuchungen uber die photodynamische Erscheinung. Leipzig: F. C. W. VOGEL; 1907
- [14] HAUSMANN, W.: Biochem.Z., 1911; 30, 276
- [15] MEYER-BETZ, F.; Untersuchungen uber die Biologische (photodynamische) Wirkung des Haematoporphyrins und anderer Derivative des Blut und Galenfarbstoffs. *Dtsch. Arch. Klin. Med.* 1913, 112, 476-503
- [16] LIPSON, R. L., BALDES, E.J.: Arch. Dermatol., 1960; 82, 508
- [17] KELLY, J.F., SNELL, M. E.: Urol., 1976; 115, 150
- [18] WEISHAUP, K.R., GOMER, C. J. and DOUGHERTY, T. J. (1976). Identification of singlet oxygen as the cytotoxic agent in photoinactivation of a murine tumor; *Cancer Res*, 36, 2326-2329
- [19] HAYATA, Y., KONAKA, C., TAKIZAWA, N. and KATO, H. (1982); Hematoporphyrin Derivative and Laser Photoradiation in the Treatment of Lung-Cancer. *Chest*, 81, 269-277.
- [20] MCCAUGHAN, J. S., HICKS, W., LAUFMAN, L., MAY, E. and ROACH, R. (1984); Palliation of Esophageal Malignancy with Photoradiation Therapy; *Cancer*; 54, 2905-2910
- [21] BARR, H., KRASNER, N., BOULOS, P. B., CHATLANI, P. AND BOWN, S. G. (1990); Photodynamic Therapy for Colorectal-Cancer - a Quantitative Pilot-Study. *Br. J. Surg.*, 77, 93-96.
- [22] LAWS, E. R., CORTESE, D. A., KINSEY, J. H., EAGAN, R. T. and ANDERSON,

- R. E. (1981). Photoradiation Therapy in the Treatment of Malignant Brain-Tumors - a Phase-I (Feasibility) Study. *Neurosurgery*, 9, 672-678
- [23] SHARMAN, W. M., ALLEN, C.M., VAN LIER, J.E.: *Drug Discov. Today*, 1999; 4, 507
- [24] SKOUMALOVA, VITASEK, SRBOVA-Fluorescence a chemiluminiscence, ppt, staženo 10. 4. 2010, dostupné na:
www.lf2.cuni.cz/Ustavy/biochemie/vyuka/Fluorescence.ppt
- [25] Wiki-visual, Wikipedia free encyclopedia, Fluorescence, poslední revize 22. 11. 2006, staženo 10. 4. 2010, <http://en.wikivisual.com/index.php/Fluorescent>
- [26] Wikipedia, The Free Encyklopedia, Fluorescence, poslední revize 10. 5. 2010, staženo dne 10. 4. 2010, dostupné na: <http://en.wikipedia.org/wiki/Fluorescence>
- [27] Chandra-X-RAY observatory, CXC, operand for NASA by saw, Fotoalbum, Poslední revize 16. 7. 2008, staženo 10. 4. 2010 dostupné na:
<http://chandra.harvard.edu/photo/2005/felines/more.html>
- [28] BEHLKE, M., HUANG, L., BOGH, L., ROSE, S., a DEVOR, E. J.: Fluorescence and Fluorescence Applications, ©2005 Integrated DNA Technologies, dostupné na http://eu.idtdna.com/Support/Technical/TechnicalBulletinPDF/Fluorescence_and_Fluorescence_Applications.pdf
- [29] Science blogs [online]Two photon mouse air hockey, poslední revize 6. 11. 2007, staženo 10. 4. 2010, dostupné na:
http://scienceblogs.com/purepedantry/2007/11/two_photon.php
- [30] FIŠAR, Z., Fluorescenční spektroskopie v neurovědách, posl. revize 3/2004, dostupné na <http://www1.lf1.cuni.cz/~zfishar/fluorescence/Default.htm>.
- [31] University of Victoria, Imaging laboratory, EPI-fluorescence with microscopy, poslední revize 21. 9. 2005, staženo 10. 4. 2010 dostupné na:
<http://web.uvic.ca/ail/techniques/epi-fluorescence.html>
- [32] MARSHALL, S., BENNETT, A., FRAVAL, H., Locating semen live skin using virble Fluorescence, poslední revize 30. 2. 2006, staženo 10. 4. 2010 , dostupné na:
http://www.bvda.com/EN/prdctinf/semen_fluo.html
- [33] JOHANSSON, M. K., a COOK, R. M.: Intramolecular Dimers: A New Design Strategy for Fluorescence-Quenched Probes, *Chem. Eur. J.*, 2003, 9, 3466 – 3471
- [34] JOHANSSON, M. K., FIDDER, H., DICK, D., a COOK R. M.: Intramolecular Dimers: A New Strategy to Fluorescence Quenching in Dual-Labeled Oligonucleotide Probes, *J. Am. Chem. Soc.*, 2002, 124, 6950-6956
- [35] FÖRSTER, T., Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. *Ann. Phys.*, 1948, 2, 55-75
- [36] SELVIN, P. R., The Renaissance of fluorescence resonance energy transfer, *nature structural biology*, 2000, Vol. 7, No. 9, 730-734 dostupné na <http://structbio.nature.com>.
- [37] OKAMURA, Y., KONDO, S., SASE, I., SUGA, T., MISE, K., FURUSAWA, I., KAWAKAMI, S. a WATANABE, Y.: Double-labeled donor probe can enhance the signal of fluorescence resonance energy transfer (FRET) in detection of nucleic acid hybridization, *Nucleic Acids Research*, 2000, Vol. 28, No. 24 e107, 1-6
- [38] Flow cytometric facility, Fluorescence compensation, [on-line], staženo 10. 4. 2010, dostupné na: <http://biology.berkeley.edu/crl/compensation.html>
- [39] MARRAS, S. A. E., KRAMER F. R. a TYAGI, S.: Efficiencies of fluorescence resonance energy transfer and contact-mediated quenching in oligonucleotide probes, *Nucleic Acids Research*, 2002, Vol. 30, No. 21 e122, 1-8
- [40] SANBORN, M. E., CONNOLLY, B. K., GURUNATHAN, K. a LEVITUS, M.: Fluorescence Properties and Photophysics of the Sulfoindocyanine Cy3 Linked

- Covalently to DNA, J. Phys. Chem. B, 2007, 111, 11064 – 11074
- [41] WILHELM, J., a PINGOUD A., Real-Time Polymerase Chain Reaction, ChemBioChem, 2003, 4, 1120 – 1128
- [42] SONG, L., HENNINK, E. J., YOUNG, I. T., a TANKE, H. J.: Photobleaching Kinetics of Fluorescein in Quantitative Fluorescence Microscopy, Biophys. J., 1995, 68, 2588-2600
- [43] BRISMAR, H., TREPTE, O. a ULFHAKE, B.: Spectra and Fluorescence Lifetimes of Lissamine Rhodamine, Tetramethylrhodamine Isothiocyanate, Texas Red, and Cyanine 3.18 Fluorophores: Influences of Some Environmental Factors Recorded with a Confocal Laser Scanning Microscope, J. Histochem. Cytochem., 1995, 43, 699-707
- [44] ULRICH, G., ZIESSEL, R., and HARRIMAN, A., The Chemistry of Fluorescent Bodipy Dyes: Versatility Unsurpassed, Angew. Chem. Int. Ed., 2008, 47, 1184-1201.
- [45] HAUGLAND, R. P., Handbook of Fluorescent Probes and Research Products, Molecular Probes, Eugene, OR, 9th edition, 2002
- [46] BERLIER, J. E., ROTHE, A., BULLER, G., BRADFORD, J., GRAY, D. R., FILANOSKI, B. J., TELFORD, W. G., YUE, S., LIU, J., CHEUNG, CH.-Y., CHANG, W., Hirsch, J. D., Beechem, J. M., Haugland, R. P., a Haugland R. P.: Quantitative Comparison of Long-wavelength Alexa Fluor Dyes to Cy Dyes: Fluorescence of the Dyes and Their Bioconjugates, J. Histochem. Cytochem., 2003, 51, 1699-1712
- [47] PANCHUK-VOLOSHINA, N., HAUGHLAND, R. P., BISHOP-STEWARD, J., BHALGAT, M. K., MILLARD, P. J., MAO, LEUNG, W. J. a HAUGHLAND, R. P.: Dyes, a Series of New Fluorescent Dyes that Yield Exceptionally Bright, Photostable Conjugates, J. Histochem. Cytochem., 1999, 47, 1179-1188
- [48] ERNST, L. A., GUPTA, R. K., MUJUMDAR, R. B., a WAGGONER, A. S., Cyanine Dye Labeling Reagents for Sulfhydryl Groups, Cytometry, 1989, 10, 3-10
- [49] Encyklopedie Wikipedia [online], poslední revize 23.4.2010, staž. 9.5.2010, dostupné na <http://en.wikipedia.org/wiki/Cyanine>.
- [50] MUJUMDAR, S. R., MUJUMDAR, R. B., GRANT, CH. M., a WAGGONER, A. S.: Cyanine-Labeling Reagents: Sulfobenzindocyanine Succinimidyl Esters, Bioconjugate Chem., 1996, 7, 356-362
- [51] ATTO-TEC, *Fluorescent Labels and Dyes*, katalog 2007/2008, aktualizace 3. 2. 2010 staž. 9. 5. 2010, dostupné na <http://www.atto-tec.com/ATTO-TEC.com/Products/documents/catalogue.pdf>
- [52] Duálně značené hydrolyzační sondy, staž. 9. 5. 2009, dostupné na http://www.generi-biotech.com/firstpage_data/stalo_se_pdf/poster_GB_dualne_znacene_sondy.pdf.
- [53] Berry&Associates [online], Chemistry from Berry&Associates, Vol. 1, zima 2006, BlackBerry™ Quencher 650 – A new dark quencher of fluorescence, staž. 10. 5. 2010, dostupné na <http://www.berryassoc.com/literature/BerryNews1-1.pdf>.
- [54] Integrated DNA Technologies, Inc [online], © Copyright 2010, staž. 10. 5. 2010, dostupné na <http://eu.idtdna.com/Catalog/DNAProbes/Page1.aspx>.
- [55] ATTO Technologies [online], ATTO 540Q, posl. revize 3. 2. 2010, staž. 10. 5. 2010, dostupné na http://www.atto-tec.com/ATTO-TEC.com/Products/ATTO540Q_1.html.
- [56] ATTO Technologies [online], ATTO 580Q, posl. revize 3. 2. 2010, staž. 10. 5. 2010, dostupné na http://www.atto-tec.com/ATTO-TEC.com/Products/ATTO580Q_1.html.
- [57] ATTO Technologies [online], ATTO 612Q, posl. revize 3. 2. 2010, staž. 10. 5. 2010, dostupné na <http://www.atto-tec.com/ATTO-TEC.com/Products/ATTO612Q>

_1.html

- [57] Integrated DNA Technologies, Inc [online] © Copyright 2010, staž. 10. 5. 2010, dostupné na <http://eu.idtdna.com/catalog/Modifications/Modifications.aspx?catid=5>
- [59] Biosearch Technologies [online], DNA Synthesis Reagents Catalog, An Introduction to Black Hole Quencher Dyes, staž. 10. 5. 2010, dostupné na http://www.biosearchtech.com/download/catalogs/bticatalog_dna_syn_reagents.pdf.
- [60] TriLink BioTechnologies [online], Quenchers, staž. 10. 5. 2010, dostupné na http://www.trilinkbiotech.com/tech/tech_articles/quenchers.pdf.
- [61] MAY, J. P., BROWN, L. J., VAN DELFT, I., THELWELL, N., HARLEY, K. a BROWN, T., Synthesis and evaluation of a new non-fluorescent quencher in fluorogenic oligonucleotide probes for real-time PCR, *Org. Biomol. Chem.*, 2005, 3, 2534-2542
- [62] Integrated DNA Technologies, Inc [online] © Copyright 2009, staž. 10. 5. 2010, dostupné na <http://eu.idtdna.com/catalog/Modifications/Modifications.aspx?catid=4>.
- [63] Invitrogen (online), A New Generation of FRET Acceptors, staž. 10. 5. 2010, dostupné na <http://www.invitrogen.com/etc/medialib/en/filelibrary/pdf/bioprob/ bioprobes 44.Par.73886.File.dat/6.pdf>.
- [64] DIDENKO, V. V., DNA Probes Using Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET): Designs and Applications, *Biotechniques*, 2001 31(5), 1106-1121
- [65] MARRAS, S. A. E., TYAGI, S., KRAMER, F. R., Real-time assays with molecular beacons and other fluorescent nucleic acid hybridization probes, *Clinica Chimica Acta*, 2006, 363, 48-60
- [66] MORRISON, L. E., HALDER, T. C. a STOLS, L. M., Solution-phase detection of polynucleotides using interacting fluorescent labels and competitive hybridization, *Anal. Biochem.*, 1989, 183, 231-244
- [67] TYAGI, S., KRAMER, F. R., Molecular beacons: Probes that fluoresce upon hybridization, *Nat. biotechnol.*, 1996, 14, 303-308
- [68] TYAGI, S., BRATU, D. P. a KRAMER, F. R., Multicolor molecular beacons for allele discrimination, *Nat. biotechnol.*, 1998, 16, 49-53
- [69] KUDREVICH, S. V., VAN LIER, J. E., Azaanalogs of phthalocyanine: syntheses and properties, *Coordination Chemistry Reviews*, 1996, 156, 163-182
- [70] ZIMCIK, P., MILETIN, M., PONEC, J., KOSTKA, M., FIEDLER, Z., Synthesis and studies on photodynamic activity of new water-soluble azaphthalocyanines, *J. Photochem. Photobiol. A Chem.*, 2003, 155, 127-131
- [71] DE LA TORRE, G., CLAESSENS, CH. G. a TORRES, T., Phthalocyanines: The Need for Selective Synthetic Approaches, *Eur. J. Org. Chem.*, 2000, 2821-2830
- [72] YOUNG, J. G., a ONYEBUAGU, W.: Synthesis and Characterization of Di-disubstituted Phthalocyanines, *J. Org. Chem.*, 1990, 55, 2155-2159
- [75] COSIMELLI, B., RONCUCCI, G., DEI, D., FANTETTI, L., FERRONI, F., RICCI, M., a SPINELLI, R., Synthesis and antimycotic activity of new unsymmetrical substituted zinc phthalocyanines, *Tetrahedron*, 2003, 59, 10025-10030
- [74] SHARMAN, W. M., a VAN LIER, J. E., Synthesis and Photodynamic Activity of Novel Asymmetrically Substituted Fluorinated Phthalocyanines, *Bioconjugate Chem.*, 2005, 16, 1166-1175
- [75] WEITEMEYER, A., KLIESCH, H., WÖHRLE, D., *J. Org. Chem.*, 1996, 60, 4900 – 4904
- [76] SASTRE, A., DEL REY, B. a TORRES, T., Synthesis of Novel Unsymmetrically Substituted Push-Pull Phthalocyanines, *J. Org. Chem.*, 1996, 61, 8591-8597.

Seznam obrázků

Obr. 1 – Fluorescence [25]	12
Obr. 2 – Fluorescence [27]	12
Obr. 3 – Energetický přechod [29]	12
Obr. 4 – Jablonskeho diagram[31].....	13
Obr. 5 – Princip fluorescenční lampy [32].....	13
Obr. 6 – Znázornění statického zhášení	14
Obr. 7 – Fluorescenční vlnové délky [38]	15
Obr. 8 – Znázornění dynamického zhášení	16
Obr. 9 - Absorpční a emisní spektra fluoroforu – Stokesův posun	17
Obr. 10 – 4,4-difluor-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen.....	18
Obr. 11– Deriváty xantinu 5-FAM a 6-FAM	18
Obr. 12 – Oregon Green a Texas Red.....	19
Obr. 13 – Tetramethylrhodanin	19
Obr. 14 – Alexa Fluor.....	20
Obr. 15 - Cyaniny	21
Obr. 16 – ATTO fluorescenční značky	21
Obr. 17 – BlackBerry Quencher.....	22
Obr. 18 – BHQ – Black Hole Quenchers	23
Obr. 19 – Dabcyl.....	23
Obr. 20 – Disperse Blue	24
Obr. 21 – Iowa Black zhášeče	24
Obr. 22– QSY zhášeče.....	25
Obr. 23 – TAMRA	25
Obr. 24 – Adjacent probes	27
Obr. 25 – Competitive hybridization probes.....	27
Obr. 26 – Molecular beacons.....	28
Obr. 27 – Amplifluor primers	28
Obr. 28. – Scorpion primers.....	28
Obr. 29 – Sunrise primers	28
Obr. 30 – TaqMan probes	29
Obr. 31 – Light-up probes.....	29
Obr. 32 – Strukturní typy porfyrinů	31
Obr. 33 – Konstituční izomery ftalokyaninů	32
Obr. 34 – Směs vzniklých sloučenin.....	34
Obr. 35 – Subftalokyaninový přístup.....	35
Obr. 36 – Fragmentace subftalokyaninového kruhu a uzavření fragmentů	35
Obr. 37 – Metoda syntézy na pevné fázi	36

Seznam zkratek

AC - aceton

ACN - acetonitril

AMD - senilní degenerace makuly (Age related Macular Degeneration)

AzaPcs - azaftalocyaniny („azaphthalocyanines“)

BBQ - BlackBerry Quencher

BEN – benzin lékařský

BHQ - Black Hole Quenchers

DABA - 3,4-diaminobenzoová kyselina

DCM - dichlormethan

DDQ - 2,3-dichlor-5,6-dikyanhydrochinon

DIEA – diisopropylethylamin

DIPEA – N,N-diisopropylethylamin

DISN - diimidosukcinylnitril

DMF – dimethylformamid

DMAP - dimethylaminopyridin

DMSO - dimethylsulfoxid

DNA - deoxyribonukleová kyselina

EA - ethylacetát

FAM - karboxyfluorescein

FITC - fluorescein-isothiokyanát

FRET - „fluorescence-resonance energy transfer“

HBTU - 2-(1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3- hexafluorofosfát

HEX - 6-karboxy-1,4-dichloro-2',4',5',7'-tetrachlorofluorescein

IBTMFQ - Iowa BlackTMFQ

IBTMRQ - Iowa BlackTMRQ

JOE - 6-karboxy-4',5'-dichlor-2'7'-dimethoxyfluorescein

KO – kyselina octová

KOH – hydroxid draselný

MeOH - methanol

NLO - nelineární optika

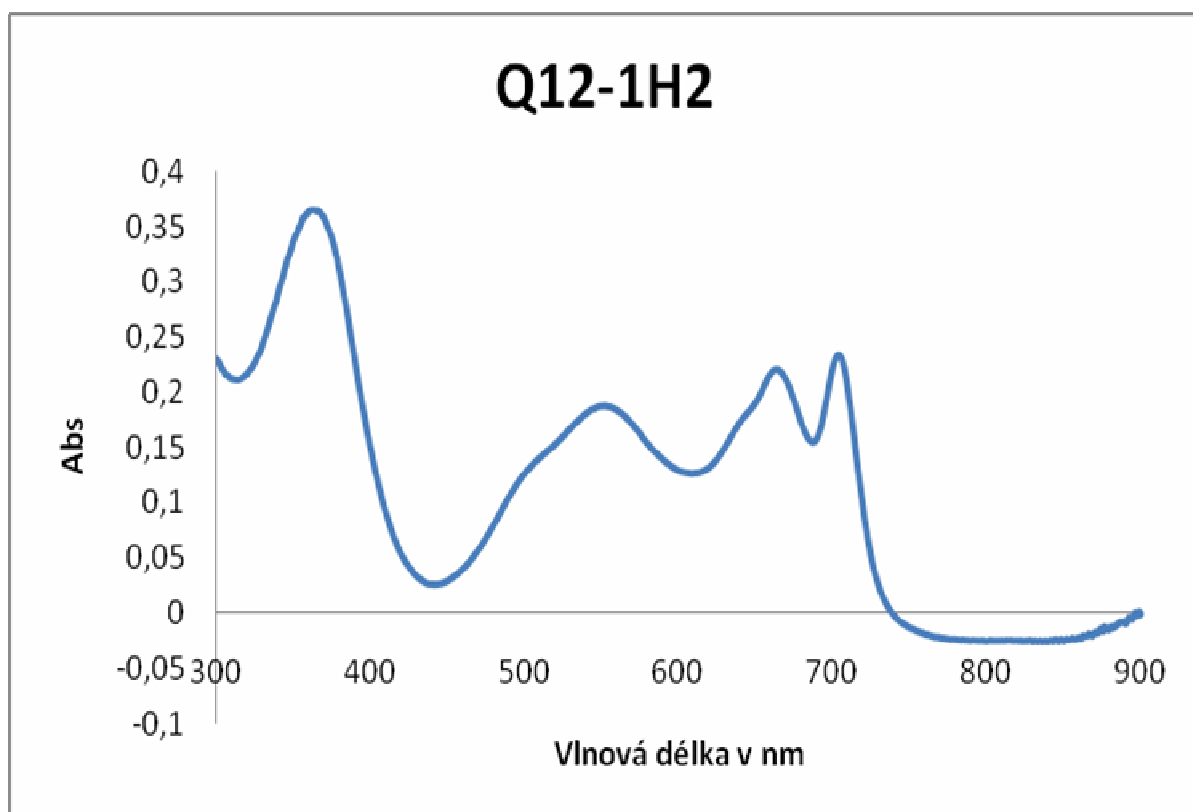
PCR - polymerázová řetězová reakce

Pcs - ftalocyaniny („phthalocyanines“)

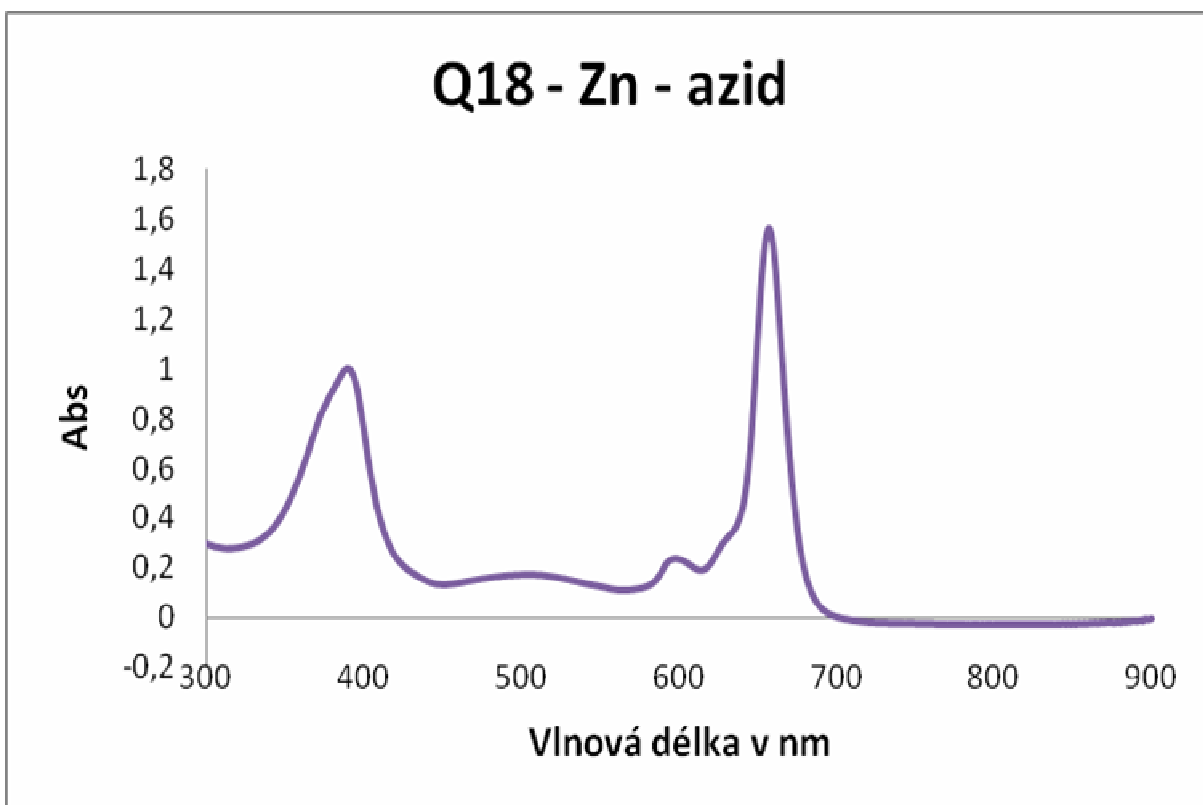
PDT - fotodynamická terapie (photodynamic therapy)
PNA - peptidická nukleová kyselina
PS – fotosenzitizér (Photosensitizer)
PUVA - psoraleny aktivované UV a světlem
Q 18 – 1H2 - 2-[(4-karboxypropyl)methylamino]-3,9,10,16,17,23,24-heptakis (diethyl - amino) -1,4,8,11,15,18,22,25-(oktaaza)ftalocyanin
Q18-Zn-Azid - 2-[[3-azidopropyl)-(3-karboxamidopropyl)]methylamino}-3,9,10,16,17, 23,24-heptakis(diethylamino)-1,4,8,11,15,18,22,25-(oktaaza) ftalocyaninato zinečnatý komplex
RA – revmatoidní artritida (Rheumatoid arthritis)
RNA - ribonukleová kyselina
ROX - 6-karboxy-X-rhodamin
SubPcs - subftalocyaniny („subphthalocyanines“)
TAMRA - 6-karboxytetramethylrhodamin
TET - 6-karboxy-1,4-dichloro-2'7'-dichlorofluorescein
TFA - trifluoroctová kyselina
THF – tetrahydrofuran
TLC – tenkovrstvá chromatografie
TMR – tetramethylrhodamin
ZIP-1 - 2,3-dikyanchinoxalin-6-karboxylová kyselina
ZIP-14 - 5,6-bis(diethylamino)pyrazin-2,3-dikarbonitril
ZIP - 112 - N-(3-azidopropyl)-2,3-dikyanchinoxalin-6-karboxamid

Přílohy

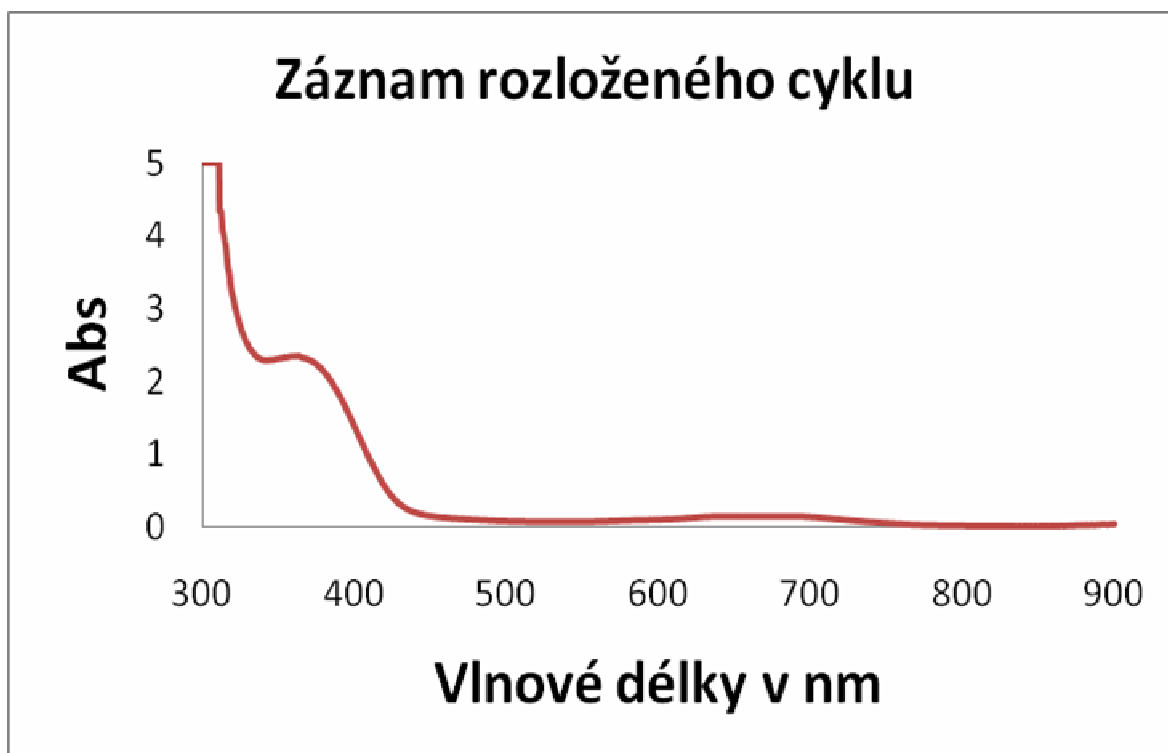
Příloha 1 – Záznam UV spektrofotometrie cyklické kyseliny ze syntézy 6: Q12-1H2. ({1-(karboxy)benzo[3,4-b]}-9,10,16,17,23,24-hexakis(diethylamino)-1,4,8,11,15,18,22,25-(oktaaza)ftalocyaninu). Cyklický azaftalocyanin s periferní skupinou karboxylu by měl absorbovat při vlnových délkách 300, 500 a dvě maxima až přes 600 nm. Na tomto záznamu jsou patrná absorpční maxima při vlnových délkách 370, 564, 669 a 707 nm.



Příloha 2 - Záznam UV spektrofotometrie cyklického zinečnatého komplexu Q18-Zn-azidu (2-[[[(3-azidopropyl)-(3-karboxamidopropyl)]methylamino]-3,9,10,16,17,23,24-heptakis (diethylamino)-1,4,8,11,15,18,22,25-(oktaaza)ftalocyaninato zinečnatého komplexu). Absorbční maxima se u kovových cyklických komplexů mají pohybovat při vlnových délkách asi 400, 500, 600 a 700 nm. Vzniklý zinečnatý komplex absorboval při vlnových délkách 395, 512, 606 a 659 nm.



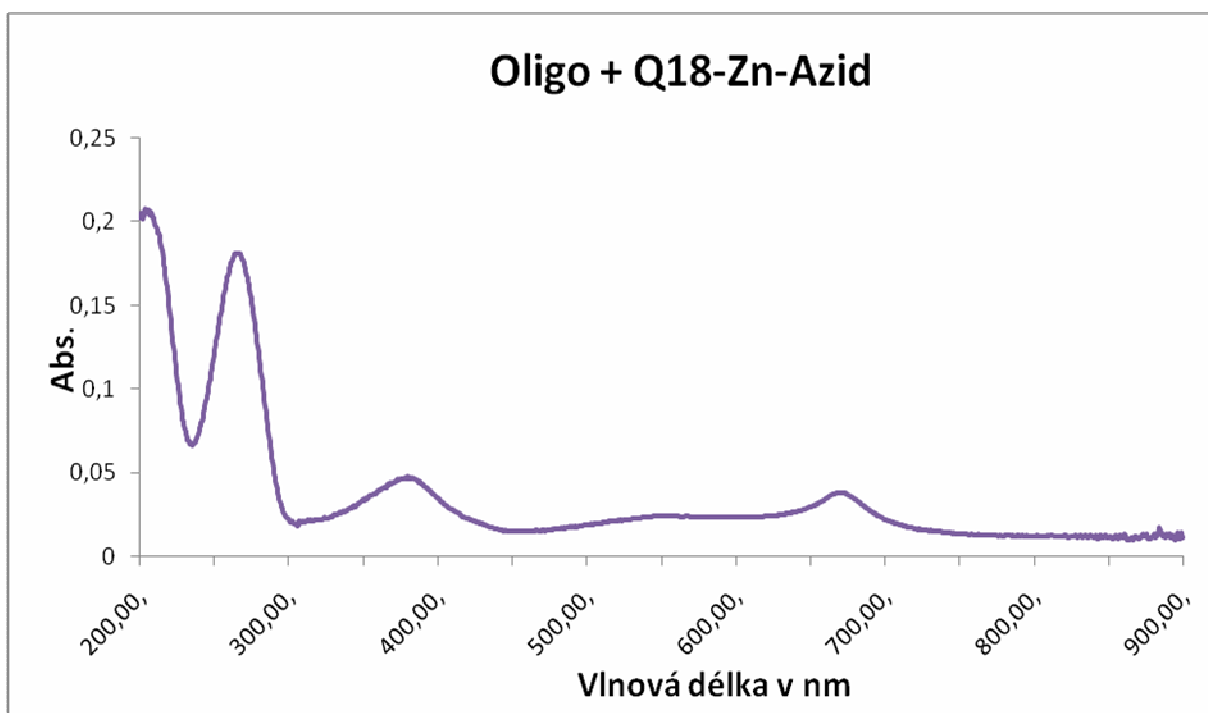
Příloha 3 – Záznam UV spektrofotometrie rozloženého cyklu ze syntézy 5 a 7: {1-[(3-azidopropyl) karboxamido]benzo}[3.4-b]-9,10,16,17,23,24-hexakis(diethylamino)-1,4,8,11,15,18, 22,25-(oktaaza) ftalocyaninu. Absorbční maxima cyklu se měly pohybovat při vlnových délkách kolem 300, 500 a 600 nm. Na tomto pořízeném spektru je patrné, že cyklický azaftalocyanin není v roztoku obsažen. Maximum se pohybuje při vlnové délce 374 nm.



Příloha 4 – Záznam UV spektrofotometrie oligonukleotidové sondy modifikované hexynylem. Maximum absorbance modifikované oligonukleotidové sondy se má pohybovat v rozmezí 200-300 nm. U oligonukleotidu modifikovaného hexanolem bylo maximum absorbance 0,184 při vlnové délce 264 nm.



Příloha 5 – Záznam UV spektrofotometrie oligonukleotidové sondy modifikované hexynylem a Q18-Zn-Azidu. Maximum absorbance modifikované oligonukleotidové sondy se má pohybovat v rozmezí 200-300 nm. U sondy modifikované hexynylem bylo maximum absorbance při vlnové délce 263 nm rovno 0,184. Do spektra se zde promítl i Q18-Zn-azid, jehož maximum absorbance se má pohybovat kolem 400 a 700 nm. U Q18-Zn-azidu bylo maximum absorbance při 663 nm 0,0365 a 377 nm 0,0465.



Údaje pro knihovnickou databázi

Název práce: Syntéza potenciálně fotodynamicky aktivních látek, odvozených od dusíkatých heterocyklů VIII.

Autor práce: Vilma Trtílková

Obor: Farmacie

Rok obhajoby: 2010

Školitel: PharmDr. Miroslav Miletín Ph.D.

Anotace: Příprava nových potenciálních nefluoreskujících zhášeců fluorescence ze skupiny nesymetrických derivátů azaftalokyaninů.

Klíčová slova: azaftalokyanin, fotodynamická terapie, fluorescence, oligonukleotidová sonda, syntéza, zhášení, zhášec.