

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

**SYNTÉZA ARYLOXYLOVÝCH DERIVÁTŮ
AZAFTALOCYANINŮ**
DIPLOMOVÁ PRÁCE



HRADEC KRÁLOVÉ, 2011

DOMINIKA FICNEROVÁ

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych na tomto místě vyjádřila poděkování svému školiteli PharmDr. Kamilu Kopeckému, Ph.D. za jeho podporu, cenné rady a připomínky, díky kterým mohla tato práce vzniknout. Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Veronice Novákové, která mi byla vždy nápomocna při řešení jakéhokoliv problému.

PROHLÁŠENÍ

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

Hradec Králové

Podpis:

Dominika Ficnerová

Tato práce vznikla za podpory specifického vzdělávacího projektu Univerzity Karlovy v Praze (SVV 263 001).

Obsah

Prohlášení.....	3
Seznam zkratk	6
Abstrakt.....	7
Abstract.....	8
1 Cíl práce.....	9
2 Teoretická část.....	10
2.1 Fluorescence	10
2.2 Přehled fluoroforů	12
2.2.1 Fluorescein a jeho deriváty.....	12
2.2.2 Rhodamin a jeho deriváty	14
2.2.3 Bodipy	15
2.2.4 Indocyaniny	16
2.2.5 Další struktury.....	17
3 Metodická část.....	19
3.1 Obecné metody syntézy ftalocyaninů.....	19
3.1.1 Ftalocyaniny bez centrálního atomu kovu	19
3.1.2 Nesymetrické ftalocyaniny	19
3.2 Obecné vlastnosti ftalocyaninů	22
3.2.1 Reaktivita ftalocyaninů.....	22
3.3 Syntéza ftalocyaninů	22
3.3.1 Deriváty kyseliny ftalové	23
3.3.2 Deriváty anhydridů kyseliny ftalové	24
3.3.3 Deriváty ftalimidů	24
3.3.4 Deriváty kyanobenzamidů	25
3.3.5 Deriváty ftalonitrilů	25
3.3.6 Deriváty isoindolindiiminu	25

3.4	Syntéza azaanalogů ftalocyaninů	26
4	Experimentální část	27
4.1	Schéma prováděných reakcí:.....	28
4.2	Příprava 5-methyl-6-oxo-1,6-dihydropyrazin-2,3-dikarbonitrilu	31
4.3	Příprava 5-chlor-6-methylpyrazin-2,3-dikarbonitrilu	32
4.4	Příprava 5-[4-(hydroxymethyl)fenoxy]-6-methylpyrazin-2,3-dikarbonitrilu (metoda a)	33
4.5	Příprava 5-[4-(hydroxymethyl)fenoxy]-6-methylpyrazin-2,3-dikarbonitrilu (metoda b)	34
4.6	Příprava 5-[4-(hydroxymethyl)fenoxy]-6-methylpyrazin-2,3-dikarbonitrilu (metoda c)	36
4.7	Příprava 5,6-bis-(2,6-diisopropylfenoxy)pyrazin-2,3-dikarbonitrilu (ZIP 87)	37
4.8	Příprava 5-chlor-6-[4-(hydroxymethyl)fenoxy]pyrazin-2,3-dikarbonitrilu	38
4.9	Příprava 5-chlor-6-(2,6-diisopropylfenoxy)pyrazin-2,3-dikarbonitrilu ...	39
4.10	Příprava 6-[4-(hydroxymethyl)fenoxy]-5-(2,6-diisopropylfenoxy)pyrazin-2,3-dikarbonitrilu (ZIP 134).....	41
4.11	Příprava 6-(2,6-diisopropylfenoxy)-5-oxo-1,6-dihydropyrazin-2,3-dikarbonitrilu	43
4.12	Cyklizace 5-[4-(hydroxymethyl)fenoxy]-6-(2,6-diisopropylfenoxy)pyrazin-2,3-dikarbonitrilu.....	44
4.13	Příprava zinečnatého komplexu 2-[5,4-(hydroxymethyl)fenoxy]-3,9,10,16,17,23,24-heptakis-(2,6-diisopropylfenoxy)-1,4,8,11,15,18,22,25-(oktaaza)ftalocyaninu	46
5	Diskuze:	48
6	Závěr:.....	52
7	Literatura:.....	53

SEZNAM ZKRATEK

DBU	1,8-diazobicyklo[5.4.0]undec-7-en
DTAF	fluorescein dichlortriazin
FISH	fluorescenční <i>in-situ</i> hybridizace
FITC	fluorescein isothiokyanát
HEX	6-karboxy-2',4,4',5',7,7'-hexachlorofluorescein
JOE	6-karboxy-4',5'-dichloro-2',7'-dimethoxyfluorescein
TET	6-karboxy-2',4,7,7'-tetrachlorofluorescein
THF	tetrahydrofuran
TLC	tenkovrstevná chromatografie
ZIP 87	5,6-(2,6-diisopropylfenoxy)pyrazin-2,3-dikarbonitril
ZIP 134	6-[4-(hydroxymethyl)fenoxy]-5-(2,6-diisopropylfenoxy)pyrazin-2,3-dikarbonitril
ZIP 134B	6-(2,6-diisopropylfenoxy)-5-oxo-1,6-dihydropyrazin-2,3-dikarbonitril

ABSTRAKT

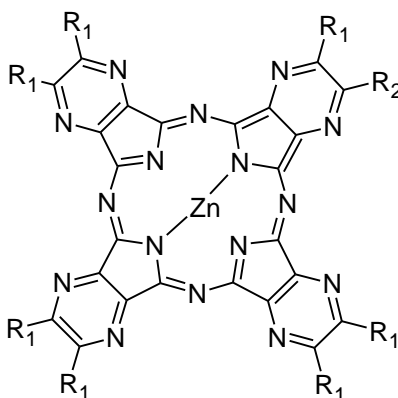
Tato práce se zabývá problematikou syntézy aryloxylových derivátů azaftalocyaninů. V teoretické části pojednává o vlastnostech, výhodách, nevýhodách a využití jednotlivých typů fluoroforů a současně je dělí do jednotlivých skupin dle jejich chemické struktury. Metodická část popisuje způsoby, kterými je možno ftalocyaniny i jejich azaanaloga připravit, dále stručně popisuje vlastnosti a reaktivitu těchto látek. V experimentální části práce jsou popsány způsoby a postupy, kterými lze prekurzory pro přípravu azaftalocyaninů připravit. Dále je popsán postup při samotné cyklizační reakci, kterou se azaftalocyaniny připravují. Produkty byly charakterizovány pomocí teploty tání, NMR, a IČ spekter. U produktů cyklizačních reakcí byly změřeny hodnoty fluorescence a produkce singletového kyslíku.

ABSTRACT

This work deals with the synthesis of aryloxyderivatives of azaphthalocyanines. The theoretical part discusses the characteristics, advantages, disadvantages and use different types of fluorophores. At the same time is divided into different groups according to their chemical structure. Methodology section describes the ways in which it is possible to prepare phthalocyanines azaanalogues and the work also briefly describes the properties and reactivity of these substances. In the experimental part of this work is described, which methods and procedures can be precursors for the preparation azaphthalocyanines prepare. It is also described how to proceed with the actual cyclization reaction, which can be prepared azaphthalocyanines. Products were characterized by melting point, NMR, and IR spectra. The cyclization reaction products were measured value of fluorescence and singlet oxygen production.

1 CÍL PRÁCE

Cílem diplomové práce bylo připravit aryloxyderivát azaftalocyaninu nesymetrické struktury s jednou funkční skupinou. Ta má možnost vazby biomolekul na strukturu azaftalocyaninu. Pro tuto vazbu byla zvolena skupina hydroxylová, protože je vhodná k navázání na oligonukleotidy. Aryloxyderivát má předpoklad vysoké fluorescence, tudíž možnost využít ho jako fluorescenční značku. U aryloxy substituovaného derivátu je předpoklad nižšího výtěžku singletového kyslíku než u alkylsulfanylových derivátů. Jako aryloxy substituent byl zvolen propofol z důvodu své objemnosti, za účelem snížení agregace¹⁵⁾.

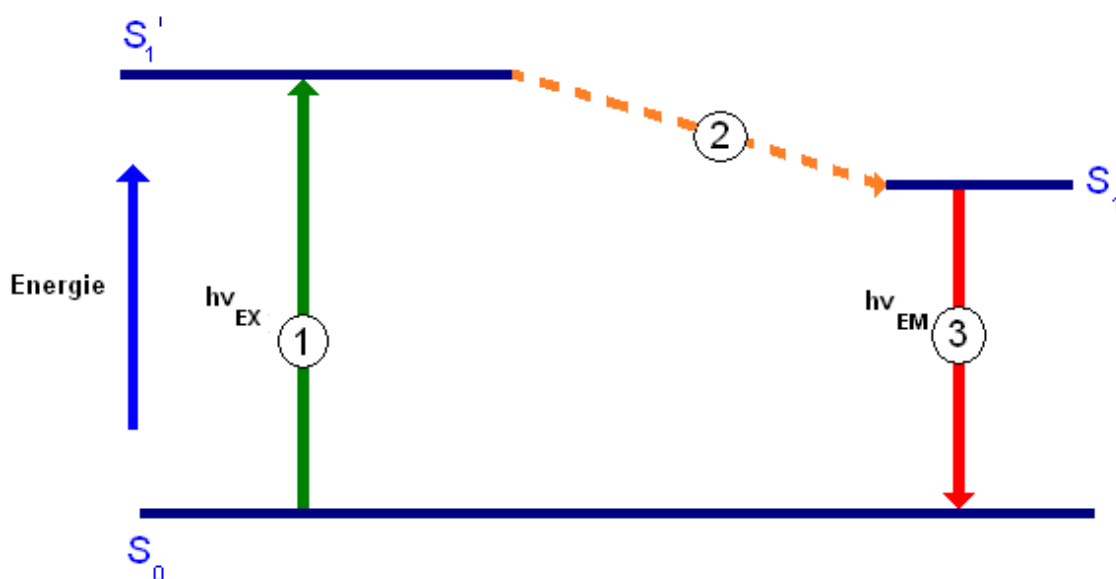


Obrázek 1: Nesymetrický azaftalocyanin

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Fluorescence

Fluorescence je jeden z druhů luminiscenčního záření, při němž dochází k absorpci světla o určité vlnové délce (excitační) a následné emisi světla o vyšší vlnové délce (emisní)¹⁶⁾. Jedná se o třífázový děj, kterého jsou schopny molekuly polyaromatické nebo heteroaromatické. První fáze (1) je excitační, kdy dochází k absorpci fotonu fluoroforem a následnému přechodu molekuly z normálního (S_0) do excitovaného stavu (S_1'). Následuje fáze nazývaná excitovaný stav (2), kdy proběhnou konformační změny a vnitřní interakce v molekule. Tato fáze trvá pouze několik nanosekund. Během třetí fáze (3) fluorescenčního procesu je vyzářena energie ve formě fotonu a fluorofor se vrací do výchozího stavu. Nemusí to ovšem platit pro všechny molekuly. Část z nich může podléhat jiným dějům (S_1). Průběh procesu fluorescence lze vyjádřit pomocí Jablonského diagramu. Pokud během excitovaného stavu nedojde ke zničení fluoroforu, je možné proces excitace a poté i detekce opakovat. S fluorescencí je neodmyslitelně spjat také pojem Stokesův posun. Jedná se o rozdíl mezi energií excitační ($h\nu_{EX}$), která je vyšší a energií emisní, která je nižší. ($h\nu_{EM}$). Při kvantifikaci vlnových délek se hodnoty projeví přesně naopak (λ_{EX} je nižší a λ_{EM} je vyšší)¹⁾.



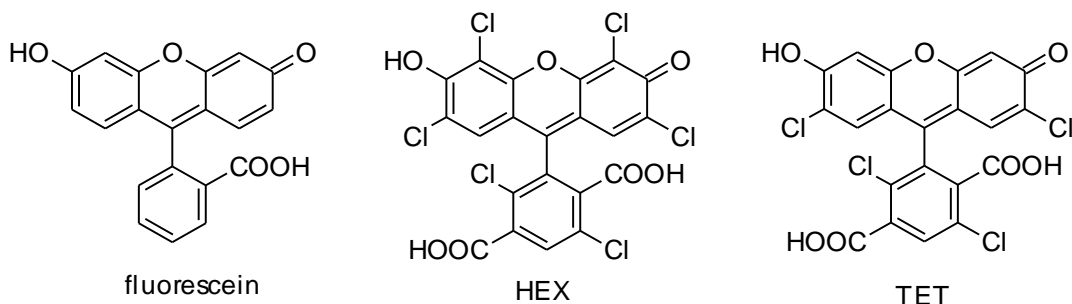
Obrázek 2: Jablonskiho diagram

Fluorofory jsou molekuly, respektive části molekul, schopné fluorescence, a díky tomu se využívají ke značení látek nebo jejich částí. Používají se při přípravě biochemických konjugátů a své uplatnění nacházejí i ve FISH (fluorescenční *in-situ* hybridizaci). Fluorofory, používané jako značící sondy, se vyskytují v různých obměnách, ať už excitačních vlnových délek, Stokesova posunu nebo šíře spektra. Intenzita fluorescence závisí na schopnostech každého fluoroforu pohlcovat a následně emitovat fotony. Tento děj může být i cyklický a každá látka je schopna cyklus opakovat po určitou dobu dle svého charakteru a vlastností.

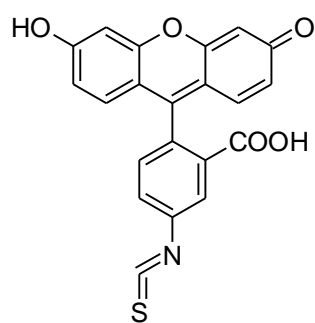
Fluorofory je možno dělit dle různých kritérií např.: použití, oblasti absorpce či emise světla, chemické struktury atd. Dalším kritériem pro dělení může být způsob jejich použití. Mezi takzvané vnější fluorofory patří fluorescenční značky a fluorescenční sondy. Rozdíl mezi nimi je ve způsobu vazby na substrát¹⁸⁾. Značky se váží kovalentně a jedná se nejčastěji o vazbu na proteiny nebo nukleové kyseliny. Mají vysokou intenzitu fluorescence a jsou stabilní i při dlouhodobém ozařování. Další jejich výhodou je, že nemění charakter molekuly, na kterou se váží. Jako zástupce lze zmínit např. vazbu s histidinem. Fluorescenční sondy se potom váží nekovalentně a dochází ke změně jejich fluorescenčních vlastností v závislosti na tom, zda jsou vázány či nikoliv. Méně využívané jsou vnitřní fluorofory, ačkoliv jsou to látky s přirozeným výskytem. Patří sem např. aromatické aminokyseliny (tryptofan, tyrosin nebo fenylalanin)⁹⁾. V této práci jsou fluorofory děleny dle chemické struktury.

2.2 Přehled fluoroforů

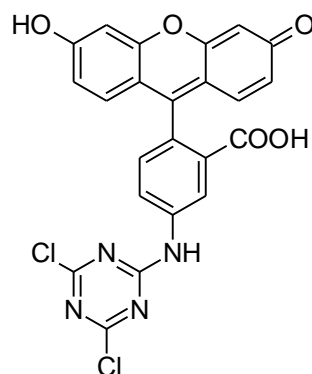
2.2.1 Fluorescein a jeho deriváty



Fluorescein je v současné době hojně využíván k diagnostickým metodám v medicíně např. k fluorescenční angiografii²⁰⁾. Stále více se ale uplatňují i jeho deriváty, nejčastěji amin reaktivní nebo thiolové deriváty. Váží se na substrát kovalentně a nejvíce jsou využívány při analýze proteinů. Deriváty fluoresceinu, používané v genetice k sekvenování DNA, vznikají strukturální modifikací xanthenového kruhu fluoresceinu⁸⁾. V závislosti na této strukturální obměně lze sledovat i změny hodnot absorpčních a emisních energií. Pro značku JOE jsou tyto hodnoty 520 a 548 nm, pro TET 521 a 536 nm a pro HEX 535 a 556 nm. Dalším derivátem je fluorescein isothiokyanát (FITC), aminoreaktivní derivát používající se k značení oligonukleotidů a peptidů. Absorbuje v oblasti 494 nm a emituje v oblasti 518 nm. Nevýhodou však je, že během skladování často dochází k jeho rozkladu. Co se týče dalších strukturálních obměn fluoresceinu, většina jeho derivátů jsou strukturálními izomery. Například FITC vykazuje izomerii na uhlících číslo 5 a 6. Pro značení molekul s hydroxylovými skupinami je výhodnější použití derivátu typu dichlortriazinu (DTAF). Jedná se o ester fluoresceinu, který je schopen vazby s polysacharidy. Dále je výhodný i z pohledu silnější vaznosti na proteiny. Bohužel ho nelze použít při vazbě na alkoholy, na rozdíl od aminů nebo thiolů. Oblast absorpce a emise energie je v tomto případě shodná s FITC¹⁾.

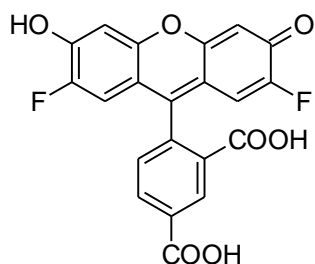


FITC

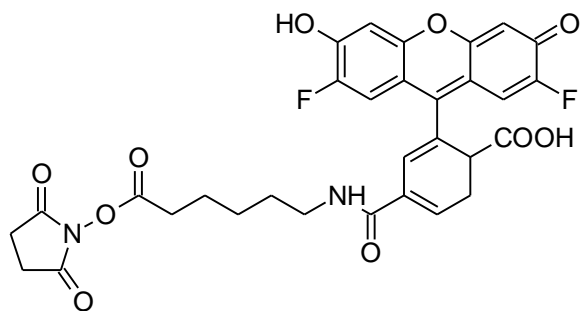


DTAF

Skupina derivátů odvozených od fluoresceinu má poměrně mnoho nevýhod. Patří mezi ně značná citlivost na změny pH, nižší stabilita, velice široké fluorescenční emisní spektrum a také tzv. „photobleaching“, což je ireversibilní destrukce fluoroforu v excitovaném stavu. Jedná se o poměrně častý důvod, proč nelze použít intenzivnější metodu excitace fluorescence. Dalším problémem je široké fluorescenční spektrum, které brání použití těchto látek v „multicolor“ aplikaci. V současnosti je snaha rozšířit paletu používaných látek o fluorofory s výhodnějšími vlastnostmi. Z tohoto pohledu se jeví jako vhodnější například značky typu Oregon Green. Ačkoli jde o látky také odvozené od fluoresceinu, jsou výhodnější hlavně z hlediska citlivosti na pH prostředí a stability. Na druhou stranu se poměrně hůře váží na proteiny. Jejich emisní a absorpční spektra se téměř naprosto shodují se spektry fluoresceinu. Například Oregon Green 488 absorbuje okolo 496 nm a emituje v oblasti 524 nm. Výhodou může být nižší hodnota pK_a , od které se potom odvíjí i nižší citlivost na změny pH. Zajímavostí je, že tyto sondy lze použít i jako pH indikátory v organelách živých buněk. Co se týče jejich chemické struktury, nejčastěji se používají karboxylové kyseliny (Oregon Green 488) nebo sukcinimidyl estery těchto kyselin (Oregon Green 488-X) ¹⁾.



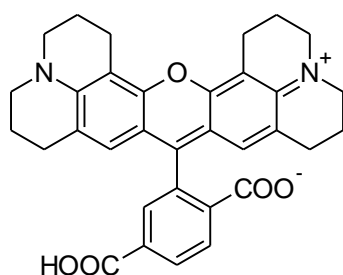
Oregon Green 488



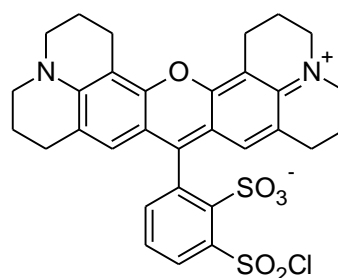
Oregon Green 488 ester

2.2.2 Rhodamin a jeho deriváty

Poměrně dobrou fotostabilitu mají také deriváty odvozené od rhodaminu. Nejsou pH citlivé a mají vysoký extinkční koeficient. Jsou vhodné pro takzvanou „multicolor“ aplikaci, jako je například sekvenování DNA nebo *in-situ* hybridizace. Jedná se o barviva absorbující při vlnové délce okolo 520 nm a emitující okolo 600 nm. Nejčastěji se používají tetramethylrhodaminy, ať už ve formě isothiokyanátu, nebo karboxylové kyseliny. Dále se také využívají takzvané X-rhodaminy. Sem patří například Texas Red-X deriváty. Emitují při vyšší vlnové délce okolo 590 nm. Své uplatnění nachází ve vazbě na proteiny a nukleové baze. Používají se v podobě sulfonfylchloridů nebo sukcinimidyl esterů. Estery jsou lépe rozpustné a lze je použít i pro přípravu biokonjugátů¹⁾.



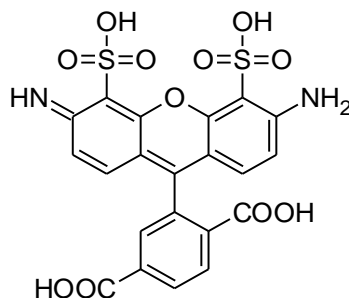
Texas Red X, karboxylová kyselina



Texas Red X, sulfonfyl chlori

Dalším typem používaných značek, které mají základní strukturu odvozenou od rhodaminu, jsou barviva Alexa Fluor. Mezi jejich největší výhody patří velice

intenzivní fluorescence, nejsou tolik citlivé na pH jako deriváty fluoresceinu a mají jednoznačně nejlepší fotostabilitu ze všech používaných typů látek. Lze je použít i *in vivo*. Další jejich nespornou výhodou je dobrá rozpustnost ve vodě, takže není nutné používat organická rozpouštědla¹²⁾. Absorbují jak v oblastech vlnové délky viditelného světla (Alexa Fluor 488 absorbuje v oblasti 495nm a emituje okolo 519 nm), tak i v oblastech UV záření (Alexa Fluor 350 absorbuje okolo 346 nm a emituje v oblasti 442 nm)¹⁾.



Alexa Fluor 488

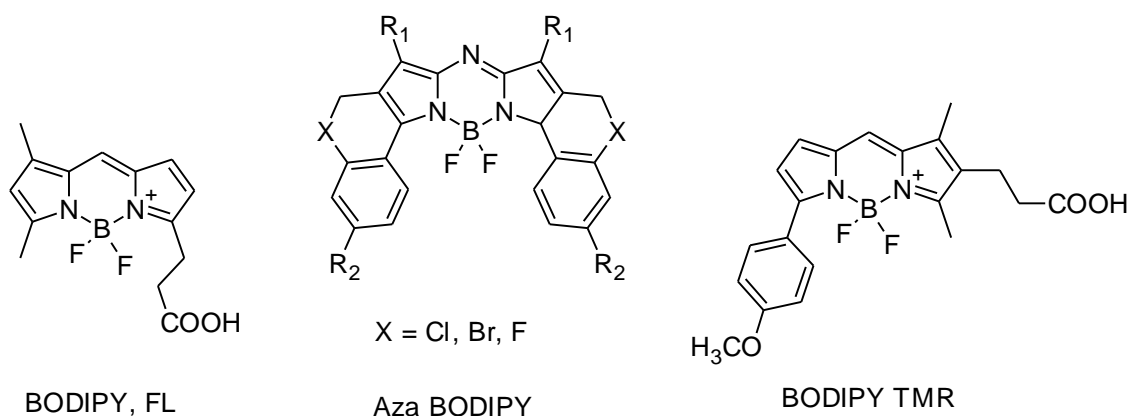
2.2.3 Bodipy

Jedná se o fluorofory využitelné pro výrobu téměř všech typů fluorescenčních konjugátů. Nejčastěji jsou používány pro označení nízkomolekulárních látek, aminokyselin a nukleotidů⁸⁾. Mezi jejich výhody patří, že díky svému téměř nepolárnímu charakteru dobře prostupují do živých buněk a jsou poměrně snadno detekovatelné. Jedná se o deriváty boru, které jsou velice stabilní. Nejsou pH citlivé, a ani polarita prostředí není pro jejich použití rozhodující. Mají úzké emisní spektrum, čehož lze využít, pokud je třeba rozlišit více fluorescenčních značek ve vzorku. Také jejich malý Stokesův posun je přínosem. Nevýhodou je, že překryv emisního a absorpčního spektra často vede k jejich samozhášení¹⁹⁾. Nejčastěji k tomuto jevu dochází při použití příliš vysoké koncentrace fluoroforu nebo denzity značení. Další nespornou výhodou je jejich vysoký extinkční koeficient. Strukturou se jedná o látky typu esterů, karboxylových kyselin nebo sukcinimidyl esterů. Jsou vhodné i pro konjugaci s lipidy, steroidy, toxiny, nukleotidy a oligonukleotidy. Jejich devízou je i možnost navázání na takové struktury jako je bovinní sérový albumin, dextran nebo *Escherichia coli* a *Staphylococcus aureus*. Ani navázání na některá léčiva

není problémem, např. verapamil, prazosin, glibenklamid a mnohá další. Z hlediska absorpčních a emisních spekter se jedná o velice různorodou skupinu. Pro přehlednost je tedy často součástí názvu barviva i číselné označení absorpčních a emisních vlnových délek. (např. BODIPY 558/568)¹⁾.

	Absorpční vlnová délka	Emisní vlnová délka
BODIPY FL	505 nm	513 nm
BODIPY R6G	528 nm	550 nm
BODIPY TMR	542 nm	574 nm
BODIPY TR	589 nm	617 nm

Tabulka 1: Hodnoty absorpčních a emisních vlnových délek vybraných značek typu BODIPY



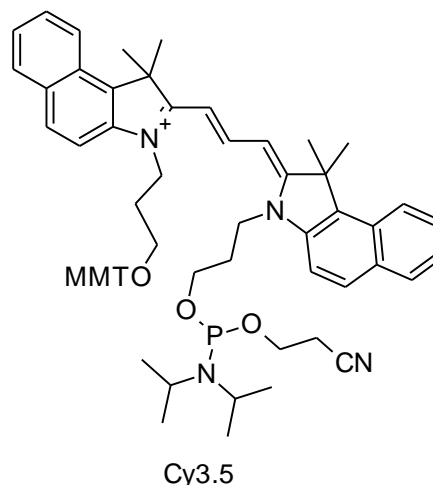
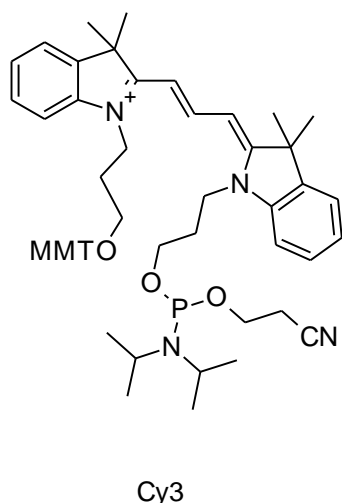
2.2.4 Indocyaniny

Jedná se o kationická barviva s velice vysokou hodnotou fluorescence, tudíž je jejich využití jako fluoreskujících značek velmi výhodné. Jejich fluorescenční vlastnosti jsou často vázány na rozpuštění v polárním rozpouštědle¹³⁾. Jsou schopny vázat se na proteiny, nukleové kyseliny, oligonukleotidy, lipidy i protilátky. Lze je použít při syntéze nebo sekvenování DNA i při *in-situ* hybridizaci. Mají poměrně dobrou stabilitu, nejsou citlivé na pH a jsou dobře rozpustné ve vodě¹¹⁾. Jelikož se jedná o novější látky, je u nich snížena i fototoxicita. Obecně je možno charakterizovat indocyaniny jako látky absorbující a emitující v oblasti viditelného světla se Stokesovým posunem okolo 20nm¹⁰⁾. Deriváty lze rozdělit podle počtu uhlíků ve spojovacím řetězci na Cy3 nebo Cy5.

Pokud je přikondenzováno další benzenové jádro, používá se značení Cy3.5 a Cy5.5. Dle struktury se mění i jejich absorpční i emisní spektra a také barva⁷⁾.

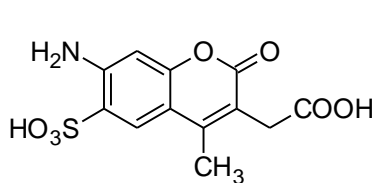
	Absorpční vlnová délka	Emisní vlnová délka	Barva
Cy3	546 nm	563 nm	červená
Cy3.5	588 nm	604 nm	purpurová
Cy5	646 nm	662 nm	fialová
Cy5.5	683 nm	707 nm	tmavě modrá

Tabulka 2: Hodnoty absorpčních a emisních vlnových délek indocyaninových barviv

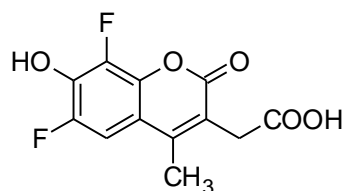


2.2.5 Další struktury

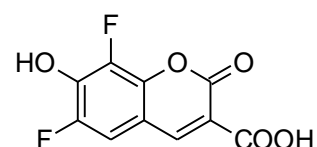
Předním zástupcem odvozeným od kumarinu je Alexa Fluor 350. Jedná se o barvivo absorbující v oblasti okolo 346 nm a emitující okolo 442 nm, a tak má vysokou hodnotu Stokesova posunu. Deriváty obsahující sulfonovou skupinu nebo sukcinimidyl estery jsou velice dobře rozpustné ve vodě. Používají se k přípravě konjugátů s proteiny a nukleovými kyselinami. Dále se používají Marina Blue (absorbuje okolo 365 nm) a Pacific Blue (absorbuje okolo 415 nm), značky, které emitují v oblasti 460 nm. V podobě sukcinimidyl esterů se mohou vázat na aminy, oligodeoxynukleotidy a fosfolipidy.



Alexa Fluor 350

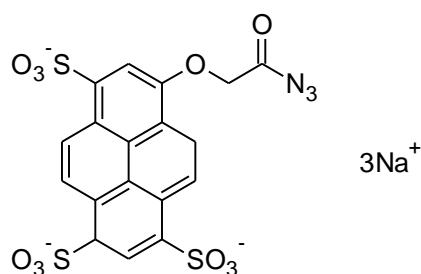


Marina Blue



Pacific Blue

Další strukturní skupinou jsou deriváty odvozeny od pyrenu. Významným představitelem této skupiny je Cascade Blue barvivo. Jedná se o aminoreaktivní derivát, který se svojí strukturou zcela liší od výše uvedených typů barviv. Absorbuje světlo o vlnové délce okolo 400 nm a emituje jej s poměrně malým Stokesovým posunem asi 20 nm. Jedná se o sůl s vysokou polaritou, což mírně komplikuje jeho použití¹⁾. Výhodou je však její dobrá rozpustnost ve vodě a možnost „multicolor“ aplikace⁸⁾. V praxi se můžeme setkat ještě s jinými strukturními typy látek, ale výše zmíněné látky se používají nejčastěji.



Cascade Blue

3 METODICKÁ ČÁST

3.1 Obecné metody syntézy ftalocyaninů.

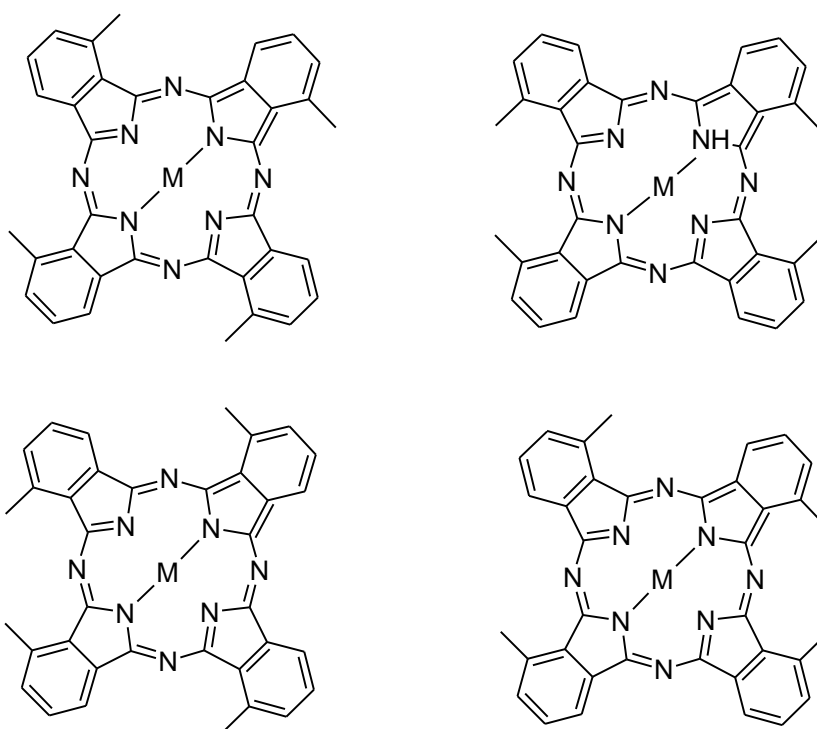
Lze popsat dva možné způsoby formování struktury ftalocyaninů. Jedna možnost (tzv. templátový model) je použití derivátů kyseliny ftalové (např. ftalonitrily) a močoviny. Látky se poté za varu tetramerizují. Pokud je přidána sůl kovu, je produktem ftalocyanin s centrálním atomem kovu. Samotný mechanismus, kterým tato reakce probíhá, je velice složitý a nebyl ještě detailně popsán. Druhou možností je postupné přikondenzování. Využívá se především u syntézy nekovových ftalocyaninů, protože ty nelze templátově připravit. Není přítomen centrální atom kovu, který by tvořil koordinační centrum. Vychází se nejčastěji z ftalonitrilů za použití polárního rozpouštědla (hydroxylová nebo alkoxy skupina). Jedná se o cyklokondenzační typ reakce²⁾.

3.1.1 Ftalocyaniny bez centrálního atomu kovu

Jejich syntéza vychází nejčastěji z nitrilů. Reakce může probíhat i bez použití rozpouštědla. Donorem atomů vodíku bývá nejčastěji pentan-1-ol nebo 2-(dimethylamino)ethanol. Pro zvýšení výtěžku je možné reakci katalyzovat pomocí amoniaku nebo 1,8-diazobicyklo[5.4.0]undec-7-enu (DBU). Podobným způsobem lze připravit i ftalocyaniny s centrálním alkalickým kovem, který je potom možno jednoduše nahradit jiným atomem kovu²⁾.

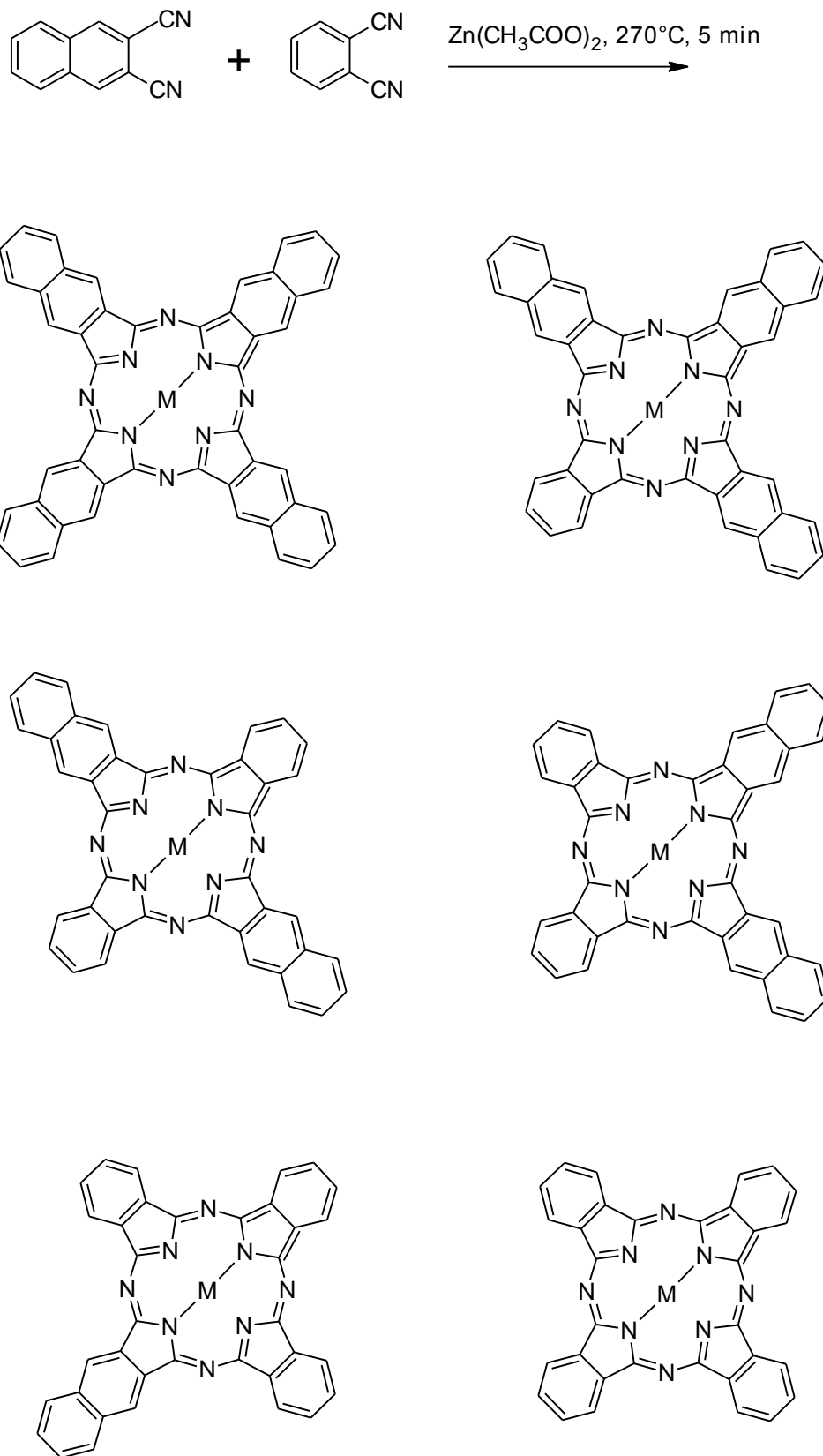
3.1.2 Nesymetrické ftalocyaniny

Výchozí látkou pro jejich syntézu mohou být nesymetricky substituované ftalonitrily nebo dva rozdílné ftalonitrily. Při použití nesymetrických monosubstituovaných ftalonitrilů lze očekávat, že výsledný produkt reakce bude kombinací čtyř různých strukturních izomerů tetrasubstituovaných ftalocyaninů.



Obrázek 3: čtyři strukturální isomery tetrasubstituovaných ftalocyaninů

Při kondenzaci dvou rozdílných ftalonitrilů lze očekávat směs 6 rozdílných ftalocyaninů²⁾.



Obrázek 4: šest isomerů ftalocyaninů vzniklých kondenzací dvou rozdílných ftalonitrilů

3.2 Obecné vlastnosti ftalocyaninů

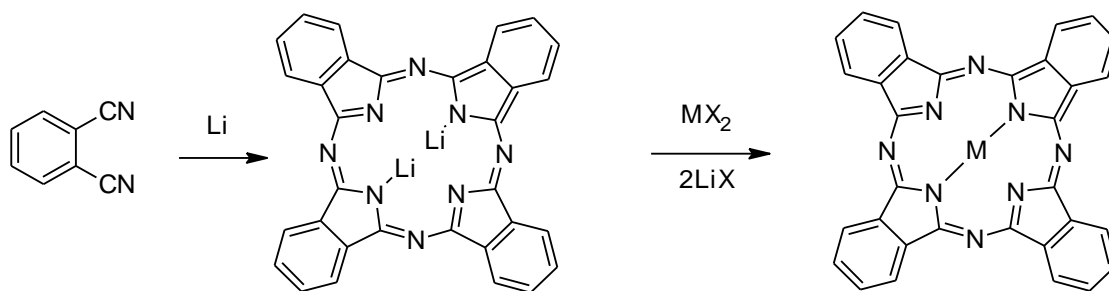
Mezi nejvýraznější vlastnosti látek struktury ftalocyaninů patří silná fluorescence a produkce singletového kyslíku. Produkce singletového kyslíku je vyšší u sloučenin obsahujících atom síry než u sloučenin s atomy kyslíku. Na základě přítomnosti nebo absence substituentů lze pozorovat další vlastnost typickou pro ftalocyaniny a tou je agregace. Pokud je molekula substituovaná objemným substituentem, lze zabránit případné agregaci, která by vedla ke změně fotofyzikálních a fotochemických vlastností. Ftalocyaniny jsou špatně rozpustné v organických rozpouštědlech i ve vodě⁶⁾.

3.2.1 Reaktivita ftalocyaninů

Převážně se jedná o stabilní sloučeniny, které si zachovávají svoji strukturu během většiny chemických reakcí. K narušení makrocyclické struktury může dojít pouze za extrémních podmínek a produkty těchto reakcí nebývají nijak zvlášť využitelné. Reakce mohou probíhat na centrálním atomu, a v tom případě velice záleží na jeho vlastnostech. Další možností je reakce probíhající na substituentech či polymerizační reakce²⁾.

3.3 Syntéza ftalocyaninů

Možností syntézy ftalocyaninů je cyklizační reakce derivátů kyseliny ftalové s kovy, respektive solemi kovů. Jedná se o reakci probíhající v jednom kroku a lze použít poměrně širokou škálu různých kovů (Cu, Zn, Ni, Pt, Pd, Co). Deriváty kyseliny ftalové mohou být anhydridy, ftalimidy, ftalonitrily či isoindolindiiminy. Tato reakce probíhá za účasti vysokovroucího rozpouštědla nebo zahříváním samotných reaktantů. Druhou možností je příprava látek obsahujících alkalický kov a jeho následná výměna. Pokud použijeme sůl jiného kovu, dojde ke vzniku ftalocyaninu s centrálním atomem kovu. Pokud použijeme pouze látku, která má charakter donoru protonů (kyselina chlorovodíková, voda, methanol), dostaneme ftalocyanin bez centrálního atomu kovu²⁾.

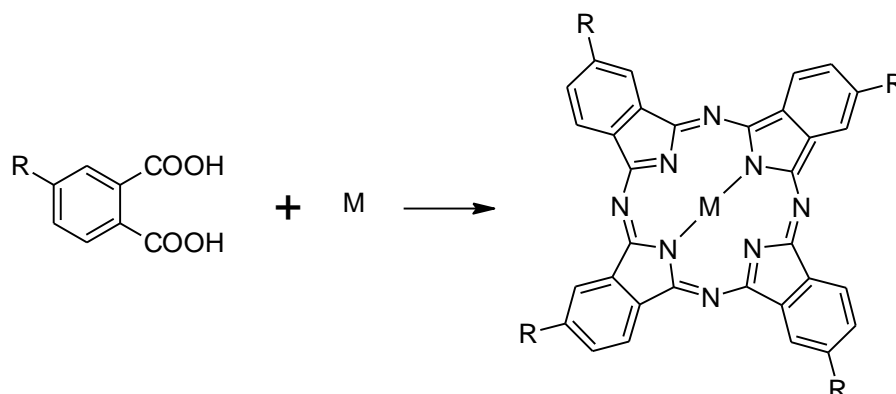


Obrázek 5: Syntéza ftalocyaninů náhradou atomu lithia atomem kovu

Další možnosti syntézy jsou elektrochemické metody a reakce probíhající pod vysokým tlakem. Mechanismus vzniku ftalocyaninů je obecně velice složitý. Většinou probíhá za vysoké teploty a spektrum možných výchozích látek a reakčních podmínek je poměrně široké, proto nebyl mechanismus ještě zcela objasněn. Reakční podmínky často závisí na charakteru atomu kovu, který má být do struktury inkorporován, ale ani povaha substituentů vázaných na okraji makrocyklu není zanedbatelná. Obecně lze říci, že substituované ftalocyaniny jsou lépe rozpustné než nesubstituované, a tudíž jejich syntéza probíhá za mírnějších podmínek²⁾.

3.3.1 Deriváty kyseliny ftalové

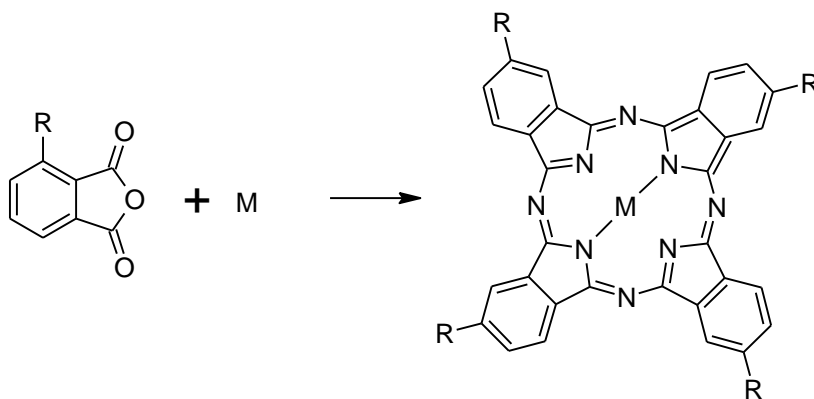
Příprava probíhá za použití substituované kyseliny ftalové, sloučeniny kovu a močoviny. Pro průběh reakce je důležitá vysoká teplota, čas reakce závisí na vlastnostech atomu kovu, nejčastěji se používají soli vanadu nebo kobaltu.



Obrázek 6: Syntéza ftalocyaninů z derivátů kyseliny ftalové

3.3.2 Deriváty anhydridů kyseliny ftalové

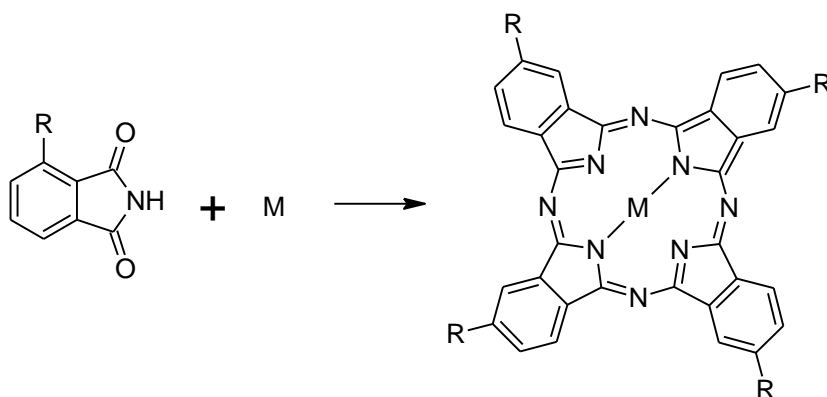
Nejedná se o typické prekurzory pro přípravu ftalocyaninů. Jejich použití je výhodou, pokud jejich substituenty zabrání konverzi na ftalimidy nebo ftalonitrily. Z kovů se při této syntéze nejčastěji používá vanad nebo měď. Opět musí být reakce účastna močovina.



Obrázek 7: Syntéza ftalocyaninů z derivátů anhydridu kyseliny ftalové

3.3.3 Deriváty ftalimidů

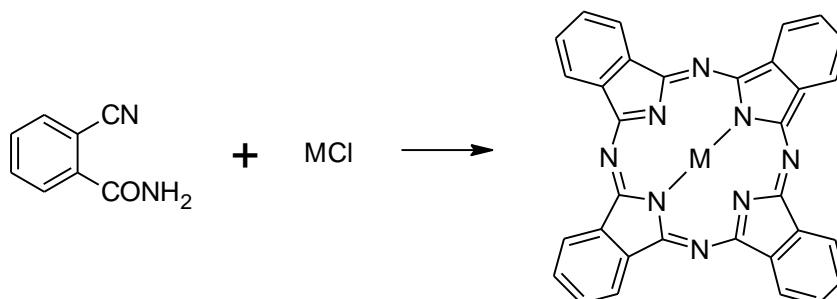
Pro syntézu ftalocyaninů se nejedná o typickou výchozí látku. Vazba mezi kyslíkem a kovem zvyšuje nároky na teplotu při reakci. Jako centrální atom se v tomto případě používá nejčastěji měď nebo paladium.



Obrázek 8: Syntéza ftalocyaninů z derivátů ftalimidů

3.3.4 Deriváty kyanobenzamidů

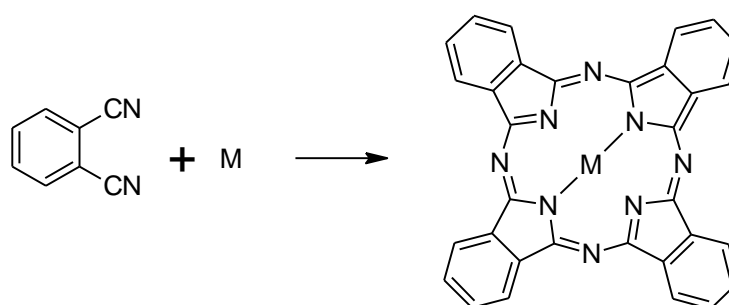
Lze připravit pouze nesubstituované ftalocyaniny. Pro přípravu se jako prekurzor používá 2-kyanobenzamid. Jako centrální atom kovu je možné použít například osmium, křemík či rhodium.



Obrázek 9: Syntéza ftalocyaninů z derivátů kyanobenzamidů

3.3.5 Deriváty ftalonitrilů

Nesubstituované ftalocyaniny lze připravit reakcí derivátů ftalonitrilů s kovy. Nejčastěji lze použít chrom, rhenium nebo bismut. Je možné použít i koordinčně-kovalentní sloučeniny nebo soli příslušných kovů. Tyto reakce lze realizovat i bez přítomnosti rozpouštědla. Deriváty ftalonitrilů mohou být různě substituované.

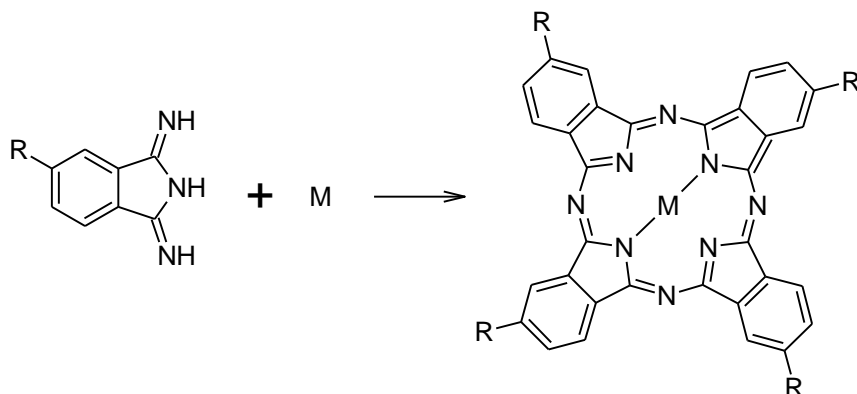


Obrázek 10: Syntéza ftalocyaninů z derivátů ftalonitrilů

3.3.6 Deriváty isoindolindiiminu

Jedná se o adiční produkty reakce ftalonitrilu s amoniakem, jako katalyzátor se při této reakci používá methoxid sodný⁵⁾. Za vysoké teploty dochází k jejich

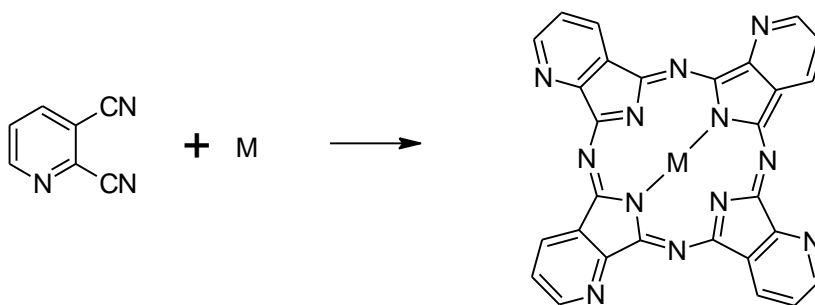
kondenzaci. Pokud použijeme monosubstituovaný isoindolindiimin, produktem cyklizační reakce jsou tetrasubstituované ftalocyaniny vyskytující se ve čtyřech izomerech. Reakční podmínky jsou v porovnání s jinými deriváty mírnější²⁾.



Obrázek 11: Syntéza ftalocyaninů z derivátů isoindolindiiminy

3.4 Syntéza azaanalogů ftalocyaninů

Azaanaloga ftalocyaninů jsou tvořena kombinací čtyř typů strukturálních izomerů. Tetraazaftalocyaniny vznikají cyklotetramerizační reakcí, které se mohou účastnit pyridin-2,3-dikarbonitrily, pyridin-2,3-dikarboxylové kyseliny nebo 2-kyanopyridin-3-karboxamidy. Lze použít i jiné druhy heterocyklů (pyrazin, pyridazin), ale ty reagují většinou podobně⁴⁾.



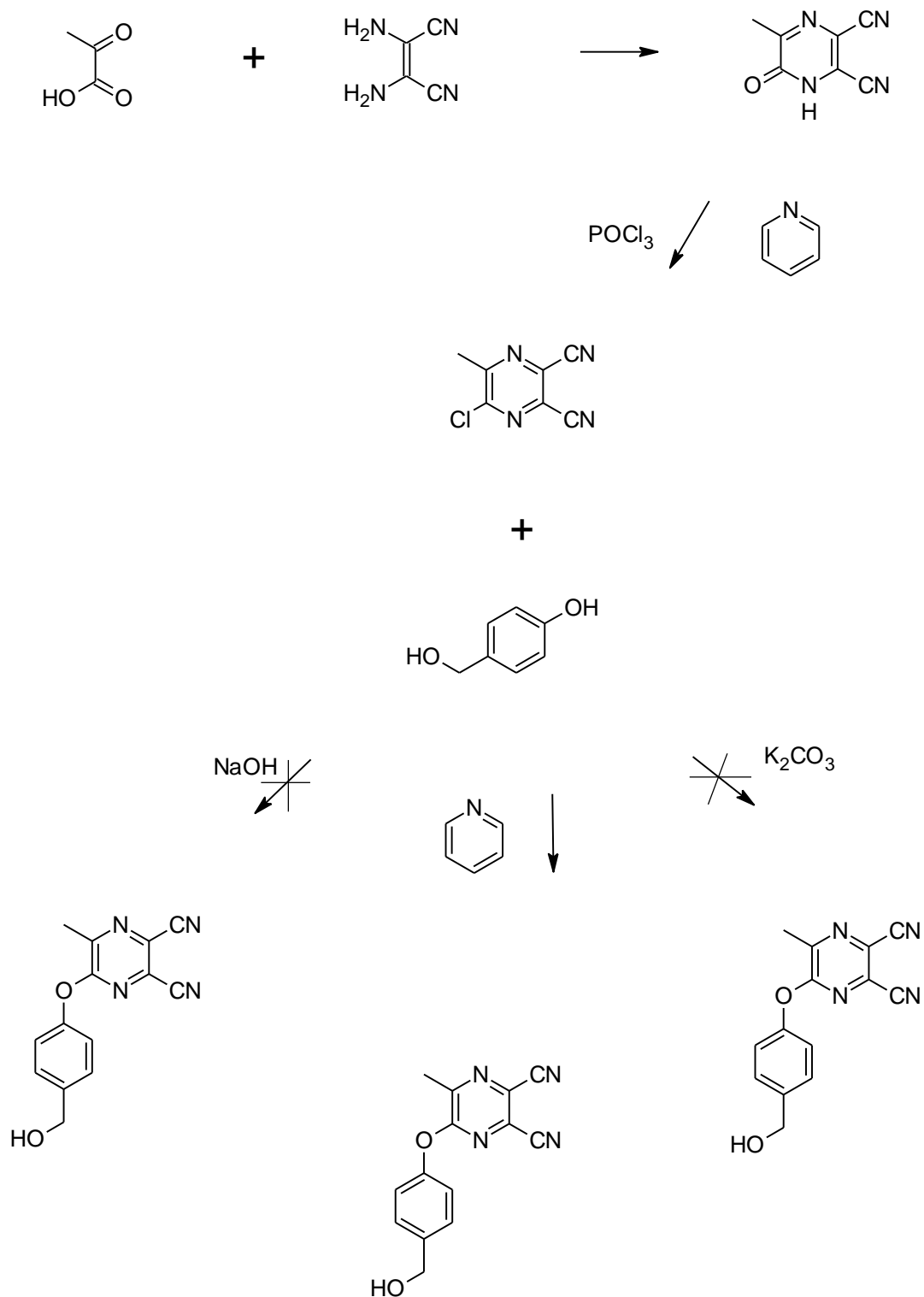
Obrázek 12: Syntéza azaanalogů ftalocyaninů

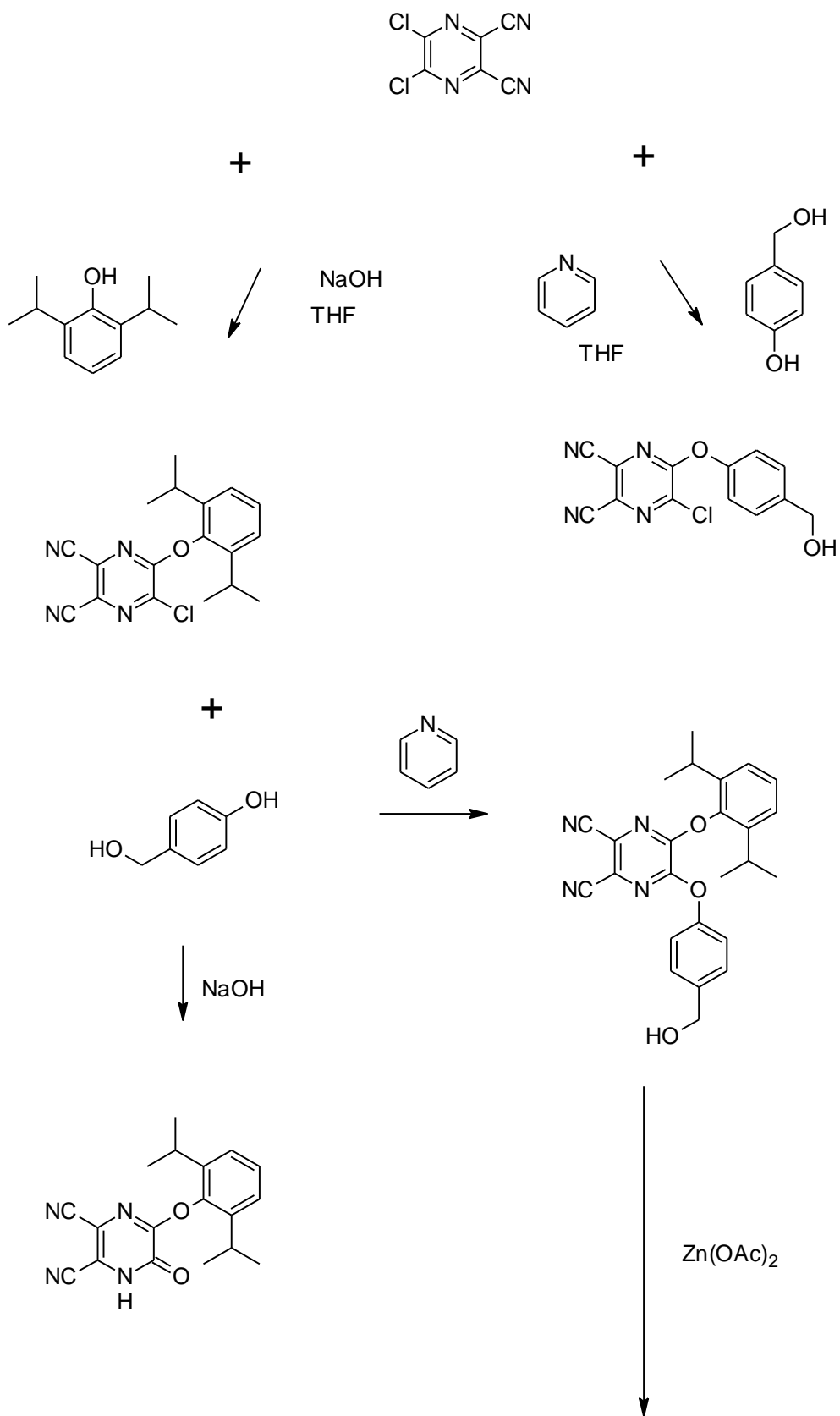
Další možností jejich vzniku je náhrada centrálního atomu, který je tvořen alkalickým kovem. Také lze využít modifikaci již připraveného azaftalocyaninu²⁾.

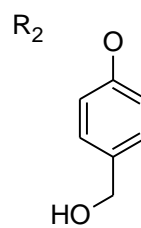
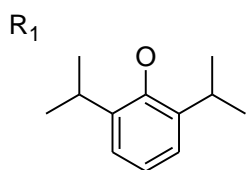
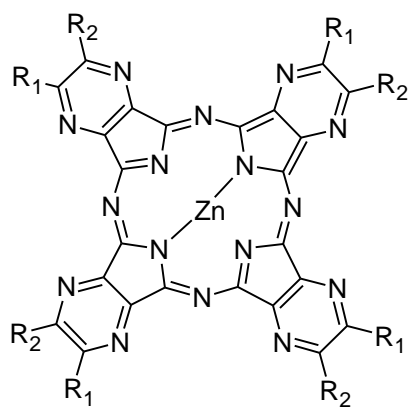
4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Všechny použité výchozí suroviny byly použity přímo v kvalitě výrobce a nebyly dále čištěny. Tenkovrstvá chromatografie (TLC) byla prováděna na deskách Silica gel 60 F₂₅₄ (Merck, Darmstadt, Německo). Pro sloupcovou chromatografii byl použit silikagel Merck Kieselgel 60 (0,040-0,063 mm). Teploty tání byly měřeny na přístroji Electrothermal IA9000 Series Digital Melting point Apparatus (Electrothermal Engineering Ltd., Southend-on-Sea, Essex, Velká Británie) a nejsou korigovány. IČ spektra byla měřena na spektrofotometru NICOLET 6700 metodou ATR-Ge. Vlnočty jsou uváděny v cm⁻¹. ¹H a ¹³C NMR spektra byla měřena na přístroji Varian Mercury-Vx BB 300 (299,95 MHz-¹H a 75,43 MHz-¹³C), chemický posun je udáván relativně k signálu vnitřního standardu Si(CH₃). UV-Vis spektra byla naměřena na spektrofotometru UV-2401PC, Shimadzu Europa GmbH (Duisburg, Německo). Hmotnostní spektra byla změřena na přístroji Voyager-DE STR (Applied Biosystems, Framingham, Massachusetts, USA) v pozitivním refletronovém módu (MS-MALDI-TOF). Vzorky pro MS-MALDI-TOF byly připraveny smísením 10 μl roztoku vzorku a 10 μl matrice a nanesením 5 μl směsi na destičku, vysušením na vzduchu. Matrice se skládala z 1 mg *trans*-2-[3-(4-*tert*-butylfenyl)-2-methyl-2-propenyliden]-malononitril v 1 ml dichlormethanu. Přístroj byl kalibrován za použití externího pětibodového kalibračního standardu Peptide Calibration Mix1 (LaserBio Labs, Sophia-Antipolis, Francie).

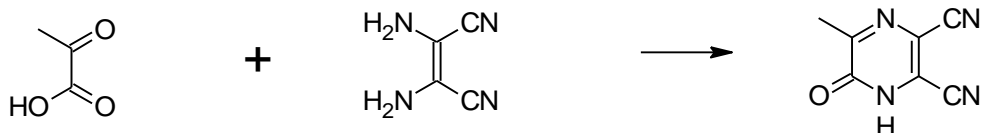
4.1 Schéma prováděných reakcí:







4.2 Příprava 5-methyl-6-oxo-1,6-dihydropyrazin-2,3-dikarbonitrilu



2,2 g (0,025 mol) kyseliny pyruvové

2,7 g (0,025 mol) diaminomaleodinitrilu

60 ml methanolu

10 ml kyseliny chlorovodíkové (15%)

Diaminomaleodinitril byl rozpuštěn v methanolu a k němu byla přidána kyselina pyruvová, následně pak 15% kyselina chlorovodíková. Reakce probíhala za stálého míchání asi 4 hodiny. Poté byl odpařen methanol na 20 ml a přidáno 40 ml horké destilované vody. Směs byla zchlazena a z roztoku začala vypadávat krystalická látka. Ta byla poté zfiltrována. Produkt byl vyčištěn sloupcovou chromatografií, kde byla jako mobilní fáze použita směs benzín / ethylacetát / kyselina octová v poměru 4 : 2 : 1. Tato látka byla již dříve připravena na katedře farmaceutické chemie a kontroly léčiv³⁾.

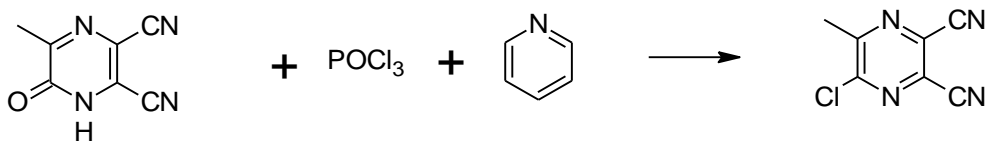
Výtěžek: 2,71 g (tj. 67,75 % teoretického výtěžku)

Popis: světle hnědá krystalická látka

¹³C NMR (75 MHz, aceton-*d*₆) δ 20,28; 113,84; 115,08; 122,80; 128,29; 154,52; 159,43 ppm.

¹H NMR (300 MHz, aceton-*d*₆) δ 2,53 (s, 3H) ppm.

4.3 Příprava 5-chlor-6-methylpyrazin-2,3-dikarbonitrilu



2,71 g (0,01 mol) 5-methyl-6-oxo-1,6-dihydropyrazin-2,3-dikarbonitrilu

6,24 ml (0,04 mol) fosforylchloridu

1,75 ml (0,014 mol) pyridinu

5-methyl-6-oxo-1,6-dihydropyrazin-2,3-dikarbonitril byl rozpuštěn ve fosforylchloridu a zchlazen na 0 °C. Poté byl pomalu přikapáván pyridin, který katalyzoval exotermní reakci. Po jejím konci byla směs 2 hodiny zahřívána na vodní lázni při 90 °C. Zbylý fosforylchlorid byl odpařen a poté byla provedena několiknásobná extrakce toluenem. Následně byl odpařen zbytek rozpouštědla a produkt překrystalizován z chloroformu. Následovala filtrace přes fritu a vysušení v exsikátoru.

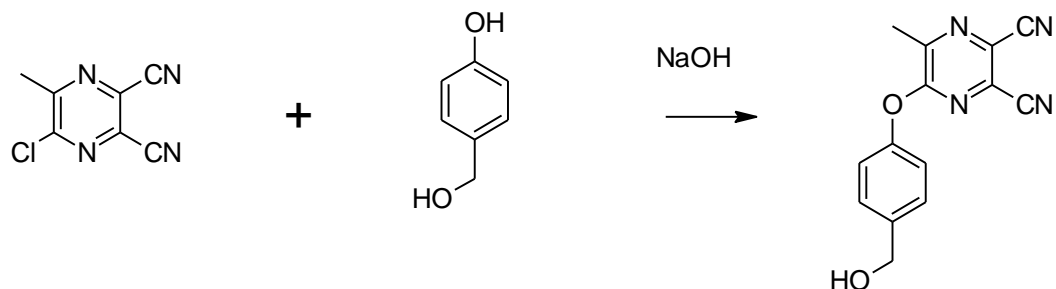
Výtěžek: 1,84 g (tj. 60,7 % teoretického výtěžku)

Popis: Bílá krystalická látka

¹³C NMR (75 MHz, aceton-d₆) δ 23,13; 113,68; 114,08; 130,89; 131,74; 152,68; 160,16 ppm.

¹H NMR (300 MHz, aceton-d₆) δ 2,82 (s, 3H) ppm

4.4 Příprava 5-[4-(hydroxymethyl)fenoxy]-6-methylpyrazin-2,3-dikarbonitrilu (metoda a)



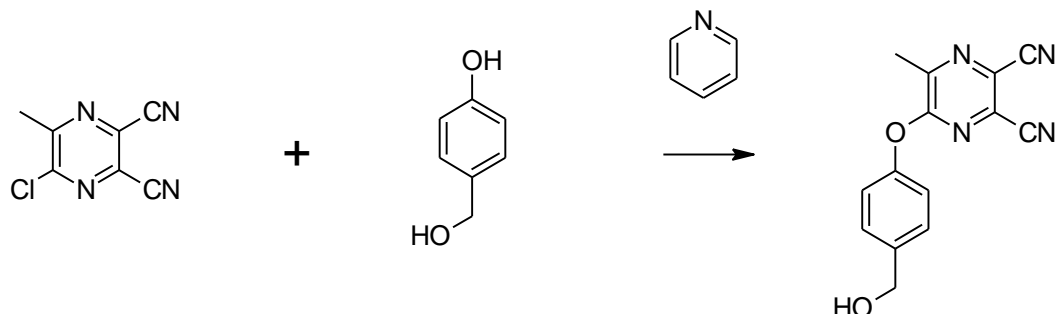
0,178 g (1 mmol) 5-chlor-6-methylpyrazin-2,3-dikarbonitrilu

0,149 g (1,2 mmol) 4-hydroxybenzylalkohol

1,16 ml (1,2 mmol) 1M hydroxidu sodného

5-chlor-6-methyl-pyrazin-2,3-dikarbonitril byl rozpuštěn v THF. 4-hydroxybenzylalkohol byl rozpuštěn v roztoku 1M hydroxidu sodného. Po smíchání obou těchto směsí vznikl roztok intenzivně červeného zabarvení. Asi 30 minut se směs míchala. Následně byla reakční směs zahuštěna na vakuové odparce a vytřepána ve směsi voda-ethylacetát. Poté byla organická frakce vytřepána vodou s chloridem sodným a pro odstranění zbytků vody přidán bezvodý síran sodný. Produkt byl zfiltrován a rozpouštědlo bylo oddestilováno za sníženého tlaku. Reakce byla kontrolována pomocí TLC. Jako mobilní fáze byla použita směs benzín / ethylacetát v poměru 2 : 3. Dle TLC se pravděpodobně nejednalo o očekávaný produkt

4.5 Příprava 5-[4-(hydroxymethyl)fenoxy]-6-methylpyrazin-2,3-dikarbonitrilu (metoda b)



0,178 g (1 mmol) 5-chlor-6-methylpyrazin-2,3-dikarbonitrilu

0,310 g (2,5 mmol) 4-hydroxybenzylalkohol

0,2 ml (2,5 mmol) pyridinu

V THF byl rozpuštěn 5-chlor-6-methyl-pyrazin-2,3-dikarbonitril a 4-hydroxybenzylalkohol. Následně byl postupně přikapáván pyridin. Směs se nechala míchat. Po 20 minutách byla provedena kontrolní TLC chromatografie, při které byla jako mobilní fáze použita směs chloroform / aceton v poměru 50 : 1. Žádaný produkt vznikal, ale stále nebyla většina výchozích látek zreagována, takže reakce se nechala probíhat asi ještě týden. Po té bylo do reakce ještě přidáno stejné množství (2,5 mmol) 4-hydroxybenzylalkoholu rozpuštěného v pyridinu. Byla provedena kontrolní TLC chromatografie. Jako mobilní fáze byla použita směs chloroform / aceton v poměru 50 : 1. Látka byla přečištěna pomocí sloupcové chromatografie. Jako mobilní fáze byla opět použita směs chloroform / aceton v poměru 50 : 1. Produkt byl zfiltrován a rozpouštědlo oddestilováno za sníženého tlaku.

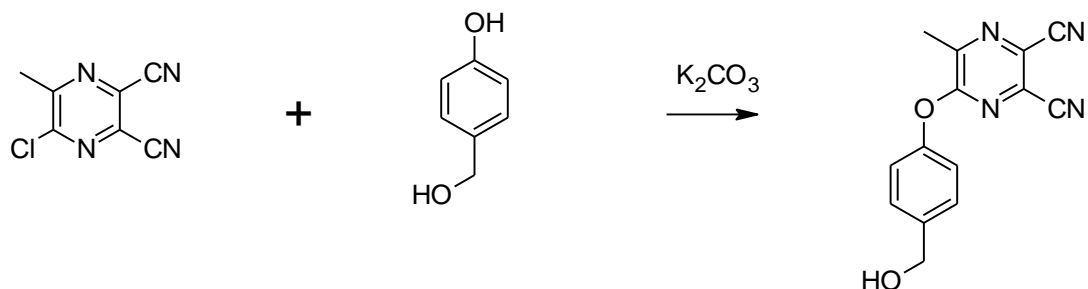
Výtěžek: 0,150 g (tj. 56,4 % teoretického výtěžku)

Popis: světle žlutá olejovitá kapalina

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 20, 14; 64,46; 112,62; 113,16; 115,35; 121,21; 125,99; 128,53; 128,86; 139,58; 150,50; 151,67; 158,61 ppm.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 2,79 (s, 3H, CH_3); 4,75 (s, 2H, CH_2); 7,12 (d, 2H, $J = 8,6$ Hz); 7,48 (d, 2H, $J = 8,4$ Hz) ppm.

4.6 Příprava 5-[4-(hydroxymethyl)fenoxy]-6-methylpyrazin-2,3-dikarbonitrilu (metoda c)



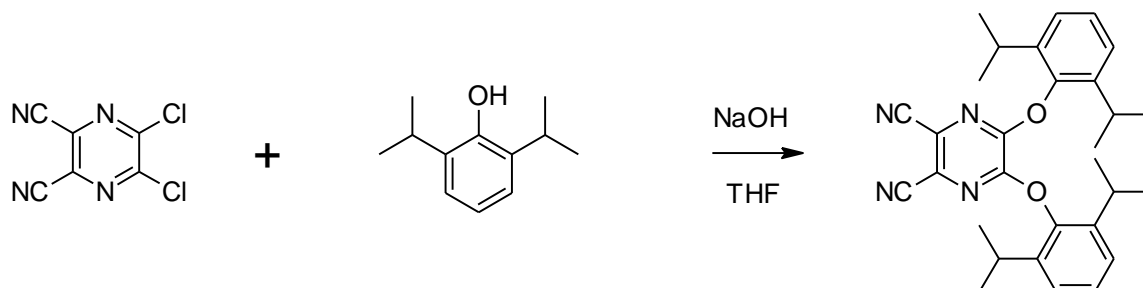
0,178 g (1 mmol) 5-chlor-6-methylpyrazin-2,3-dikarbonitrilu

0,310 g (2,5 mmol) 4-hydroxybenzylalkohol

0,173 g (0,5 mmol) uhličitanu draselného

5-Chlor-6-methyl-pyrazin-2,3-dikarbonitril a 4-hydroxybenzylalkohol byl rozpuštěn asi ve 12 ml THF a potom byl ke směsi postupně přidáván uhličitan draselný. Reakce se nechala míchat a průběžně byl monitorován vznik produktu pomocí TLC chromatografie. Jako mobilní fáze byla použita směs chloroform / aceton v poměru 50 : 1. S ohledem na velký podíl výchozích látek oproti menšímu množství předpokládaného produktu byla reakce ponechána v průběhu ještě několik dní. Poté bylo odpařeno rozpouštědlo a produkt reakce byl vytřepán mezi vodu a chloroform. Dle TLC bylo zjištěno, že se nejedná o očekávaný produkt.

4.7 Příprava 5,6-bis-(2,6-diisopropylfenoxy)pyrazin-2,3-dikarbonitrilu (ZIP 87)



24 ml (1,4 mmol) 1M hydroxidu sodného

4,64 ml (2,5 mmol) 2,6-diisopropylfenolu

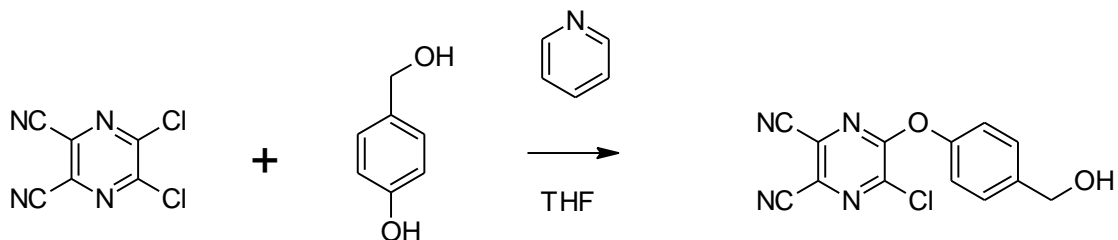
2 g (1 mmol) 5,6-dichlorpyrazin-2,3-dikarbonitrilu

5,6-Dichlorpyrazin-2,3-dikarbonitril byl rozpuštěn v THF a smíchán se směsí 1M hydroxidu sodného a 2,6-diisopropylfenolu. Reakce probíhala za stálého míchání asi půl hodiny. Po té byla reakční směs zfiltrována a promyta vodou. Následně bylo odpařeno rozpouštědlo a reakční směs byla dvakrát překrystalována z methanolu. Průběh reakce byl monitorován pomocí TLC. Jako mobilní fáze byla použita směs toluen / benzín v poměru 1 : 1.

Výtěžek: 3,44 g (tj. 70,6 % teoretického výtěžku)

Popis: bílá krystalická látka

4.8 Příprava 5-chlor-6-[4-(hydroxymethyl)fenoxy]pyrazin-2,3-dikarbonitrilu



0,2 g (0,1 mmol) 5,6-dichloropyrazin-2,3-dikarbonitrilu

0,137 g (0,1 mmol) 4-hydroxybenzylalkohol

0,08 (1 mmol) ml pyridinu

5,6-Dichloropyrazin-2,3-dikarbonitril a 4-hydroxybenzylalkohol byl rozpuštěn přibližně v 10 ml THF, poté byl přidán pyridin a směs se nechala míchat do druhého dne, kdy bylo přidáno ještě 0,07 g 4-hydroxybenzylalkoholu. Průběžně byla reakce monitorována pomocí TLC chromatografie, kdy jako mobilní fáze byla použita směs benzínu a ethylacetátu v poměru 2 : 5. Produkt byl přečištěn pomocí sloupcové chromatografie. Opět byla jako mobilní fáze použita směs benzín / ethylacetát v poměru 2 : 3. Rozpouštědlo bylo oddestilováno za sníženého tlaku.

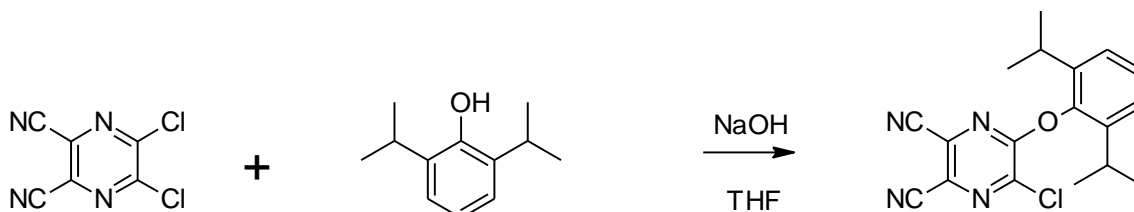
Výtěžek: 60 mg (tj. 20,7 % teoretického výtěžku)

Popis: světle žlutá olejovitá kapalina

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 64,34; 111,84; 111,90; 120,93; 125,32; 128,61; 128,81; 129,63; 140,16; 142,95; 150,24; 157,02 ppm.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 4,77 (s, 2H, CH_2); 7,15 (d, 2H, $J = 8,7$ Hz); 7,50 (d, 2H, $J = 8,8$ Hz) ppm.

4.9 Příprava 5-chlor-6-(2,6-diisopropylfenoxy)pyrazin-2,3-dikarbonitrilu



1 g (0,5 mmol) 5,6-dichloropyrazin-2,3-dikarbonitrilu

930 (0,5 mmol) μ l 2,6-diisopropylfenolu

5 ml (0,125 mmol) 1M hydroxidu sodného

5,6-Dichloropyrazin-2,3-dikarbonitril byl rozpuštěn v 50 ml THF a za současného chlazení směsí ledu a chloridu sodného byla pomalu (asi deset minut) přikapávána směs 2,6-diisopropylfenolu a 1M hydroxidu sodného. Reakce probíhala za stálého míchání asi hodinu a půl. Poté byla reakční směs nalita na led z destilované vody a vytřepána do chloroformu. Dále byla vysušena bezvodým síranem sodným. Rozpouštědlo bylo oddestilováno za sníženého tlaku. Průběh reakce byl monitorován pomocí TLC chromatografie. Jako mobilní fázi byla použita soustava benzín / ethylacetát v poměru 6 : 1. Látka byla přečištěna pomocí preparativního chromatografu za použití stejné mobilní fáze jako u TLC.

Výtěžek: 1,311g (tj. 76,1 % teoretického výtěžku)

Popis: nažloutlá krystalická látka

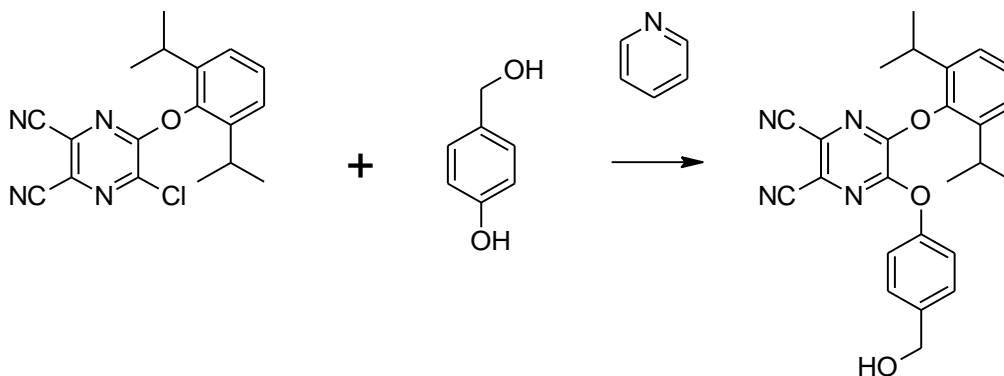
t.t. 143,1-143,3 °C

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 22,38; 23,91; 27,86; 111,77; 111,95; 124,77; 125,36; 127,94; 129,16; 139,61; 142,37; 146,21; 157,02 ppm.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 1,17 (dd, 12H, $J = \text{Hz}$, $J = \text{Hz}$, CH_3) ppm.

IČ (ATR) ν 2968; 2929; 2869; 2241 (CN); 1537; 1519; 1427; 1369; 1228; 1153;
1145; 1135; 1089; 1057; 827 cm^{-1} .

4.10 Příprava 6-[4-(hydroxymethyl)fenoxy]-5-(2,6-diisopropylfenoxy)pyrazin-2,3-dikarbonitrilu (ZIP 134)



0,43 g (0,25 mmol) 5-chlor-6-(2,6-diisopropylfenoxy)pyrazin-2,3-dikarbonitrilu

0,31 g (0,5 mmol) 4-hydroxybenzylalkohol

0,2 ml (0,5 mmol) pyridinu

5-Chlor-6-(2,6-diisopropylfenoxy)pyrazin-2,3-dikarbonitril byl rozpuštěn v bezvodém THF. K němu byl poté přidán 4-hydroxybenzylalkohol rozpuštěný také v bezvodém THF a postupně byl přikapáván pyridin. Směs se nechala míchat a pod zpětným chladičem byla zahřívána na 90 °C. Látka byla přečištěna pomocí sloupcové chromatografie. Jako mobilní fáze byla použita směs benzín / ethylacetát v poměru 2 : 1. Produkt byl zfiltrován a za sníženého tlaku bylo oddestilováno rozpouštědlo.

Výtěžek 0,153 g (tj. 28,3 % teoretického výtěžku)

Popis: světle žlutá krystalická látka

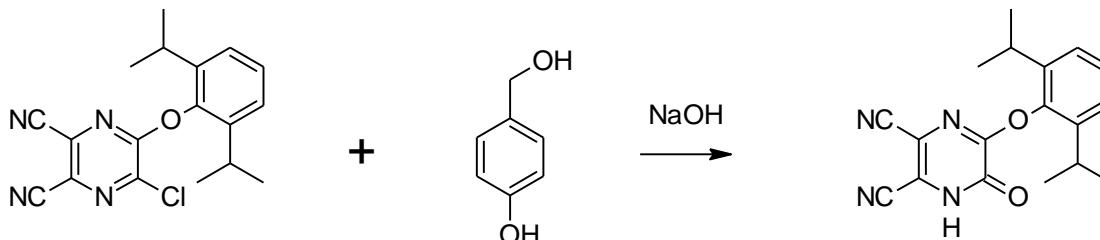
t.t. 196,4-197,6 °C

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 23,23; 64,51; 112,54; 112,69; 121,26; 123,81; 124,28; 124,28; 124,68; 127,63; 128,51; 139,75; 139,90; 146,26; 150,56; 150,95; 151,49 ppm.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 1,21 (d, 12H, $J = 7$ Hz, CH_3); 2,79 (p, 2H, $J = 7$ Hz, CH); 4,79 (s, 2H, CH_2); 7,31-7,23 (m, 5H); 7,53 (d, 2H, $J = 9$ Hz) ppm.

IČ (ATR) ν 3589; 2967; 2929; 2873; 2237 (CN); 1544; 1502; 1455; 1357; 1235; 1141; 1016; 855; 772 cm^{-1} .

4.11 Příprava 6-(2,6-diisopropylfenoxy)-5-oxo-1,6-dihydropyrazin-2,3-dikarbonitrilu



0,180 g (0,5 mmol)) 5-chlor-6-(2,6-diisopropylfenoxy)pyrazin-2,3-dikarbonitrilu

0,26 g (2 mmol) 4-hydroxybenzylalkoholu

2,1 ml (50 mmol) 1M hydroxidu sodného

ZIP 129 byl rozpuštěn v THF a poté k němu byl postupně přikapán 4-hydroxybenzylalkohol rozpuštěný v 1M hydroxidu sodném. Reakce probíhala asi 7 hodin za varu. Průběh reakce byl monitorován pomocí TLC chromatografie. Jako mobilní fáze byla použita směs benzín / ethylacetát v poměru 2 : 1. Následně byl produkt vyčištěn pomocí sloupcové chromatografie. Použita byla stejná mobilní fáze jako v případě TLC chromatografie. Čistá frakce byla zfiltrována.

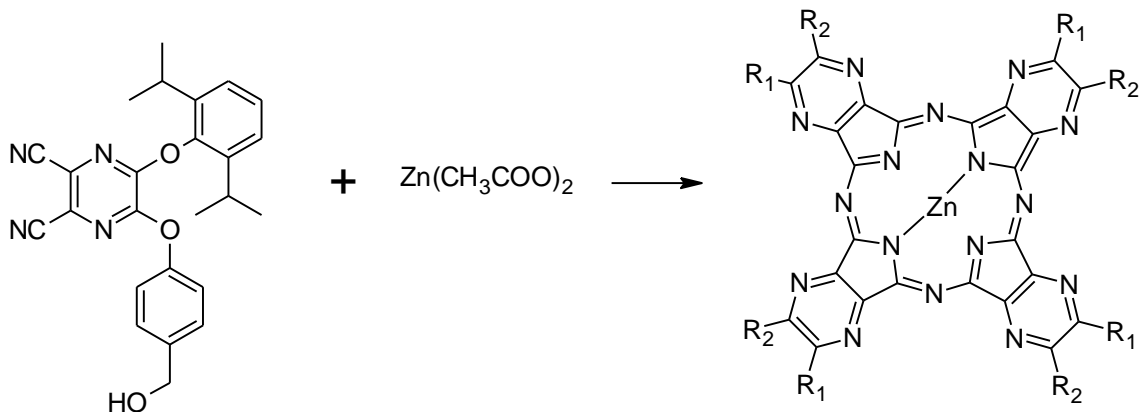
Výtěžek: 0,063 g (tj. 27,8 % teoretického výtěžku)

^{13}C NMR (75 MHz, aceton- d_6) δ 23,68; 27,80; 111,37; 115,75; 116,64; 124,84; 127,10; 128,62; 141,33; 148,16; 155,38; 159,74 ppm.

^1H NMR (300 MHz, aceton- d_6) δ 1,07 (d, 12H, $J = 7$ Hz, CH_3); 2,88 (p, 2H, $J = 7$ Hz, CH); 3,33 (bs, NH); 7,20 (s, 3H) ppm.

IČ (ATR) v 2966; 2869; 2233(CN); 1710; 1600; 1565; 1531; 1506; 1398; 1363; 1311; 1252; 1215; 1091; 921; 797; 770; 730; 689 cm^{-1} .

4.12 Cyklizace 5-[4-(hydroxymethyl)fenoxy]-6-(2,6-diisopropylfenoxy)pyrazin-2,3-dikarbonitrilu



86 mg (0,2 mmol) 5-[4-(hydroxymethyl)fenoxy]-6-(2,6-diisopropylfenoxy)pyrazin-2,3-dikarbonitrilu

10 mg (0,05 mmol) Zn(CH₃COO)₂

3 ml chinolinu

Všechny složky reakce byly důkladně vysušeny při teplotě 76 °C a tlaku 10 mbar po dobu 3 hodin. Lázeň byla předem vyhřáta na 160 °C. Chladič i baňka byly profouknuty dusíkem. Do baňky byl navážen ZIP 134 a octan zinečnatý. Následně byl k reakční směsi přikapáván čerstvě predestilovaný chinolin. Reakce se nechala probíhat 24 hodin při 160 °C. Po uplynutí této doby bylo ukončeno zahřívání a reakční směs se nechala zchladnout. Po té byla přidána směs ethanolu a vody v poměru 1:1. Reakční směs byla zfiltrována a následně promyta směsí ethanolu a vody. Filtrát byl po krátkém pobytu v lednici vytřepán do chloroformu, protože produkt reakce zůstal částečně rozpuštěn ve vodě. Za sníženého tlaku byla oddestilována rozpouštědla. Dle TLC byla zjištěna přítomnost očekávaného produktu. Jako mobilní fáze byla použita směs toluen / chloroform / aceton / pyridin v poměru 5 : 5 : 2 : 0,2. Po přečištění pomocí sloupcové chromatografie, filtraci a odpaření rozpouštědel byly získány dvě frakce, z nichž jedna byla očekávaným produktem reakce.

Výtěžek: 25 mg

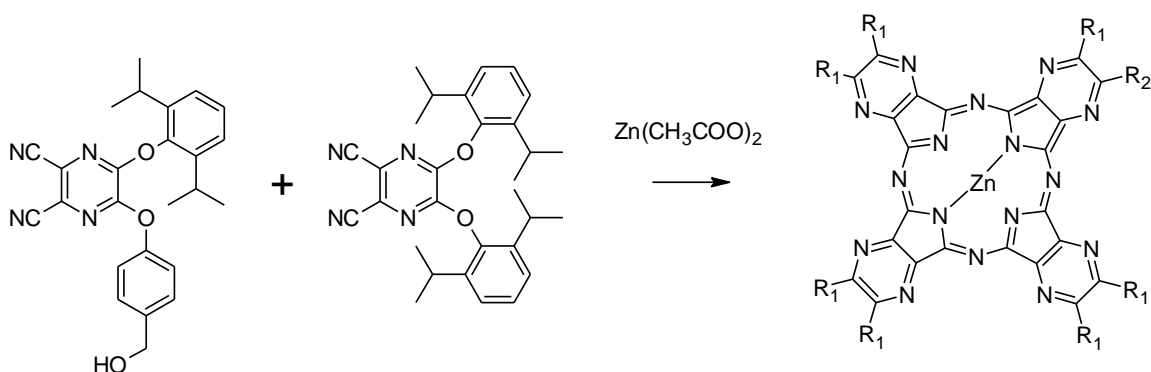
Popis: tmavě zelená pevná látka.

Vlastnosti: rozpustnost v acetonu, methanolu, pyridinu a špatně v chloroformu

MALDI-TOF MS: $m/z = 1777 [M]^+$.

UV (frakce A): λ 659, 628, 572, 366 nm.

4.13 Příprava zinečnatého komplexu 2-[5,4-hydroxymethyl)fenoxy]-3,9,10,16,17,23,24-heptakis-(2,6-diisoproylfenoxy)-1,4,8,11,15,18,22,25-(oktaaza)ftalocyaninu



21 mg (0,2 mmol) 5-[4-(hydroxymethyl)fenoxy]-6-(2,6-diisoproylfenoxy)pyrazin-2,3-dikarbonitrilu

63 mg 5,6-(2,6-diisoproylfenoxy)pyrazin-2,3-dikarbonitrilu

3ml chinolinu

10 mg $Zn(CH_3COO)_2$

Vysušené ZIP 134, ZIP 87 a octan zinečnatý byly smíchány v baňce předem profouknuté dusíkem a byl k nim přidán čerstvě predestilovaný chinolin. Směs se nechala míchat v lázni předem vyhřáté na 160 °C asi 24 hodin. Reakční směs byla po zchlazení nalita do asi 100 ml směsi ethanolu a vody (1 : 1) a zfiltrována za normálního tlaku. Poté byl produkt touto směsí opět promyt a vytřepán do chloroformu. Produkt reakce zůstal v organické frakci a ta byla následně vytřepána slanou vodou, vysušena bezvodým síranem sodným a zfiltrována. Z látky byl stále cítit chinolin, takže bylo ke směsi přidáno malé množství benzínu. Směs byla poté vložena do mrazáku. Poté byla směs zfiltrována. Následně byla provedena separace frakcí na TLC předpokládaných jako produkt reakce. Jako mobilní fáze byla použita směs chloroform / aceton /

pyridin v poměru 5 : 5 : 1. Jednotlivé frakce byly extrahovány z TLC, zfiltrvány a následně byla odpařena rozpouštědla. Dle TLC, při které byla použita stejná mobilní fáze, byly izolovány dvě frakce ($R_{fA}=0,75$, $R_{fB}=0,55$) a ty byly vystaveny další analýze. Frakce A dle MALDI-TOF-MS odpovídala molekulové hmotnosti žádaného produktu, frakce B na MS vůbec neionizovala.

Popis: zelené krystalky

Vlastnosti: rozpustnost ve vodě, ethanolu, acetonu, chloroformu.

MALDI-TOF MS frakce A: $m/z = 1940 [M+H]^+$.

UV (frakce A): λ 630, 572, 365 nm.

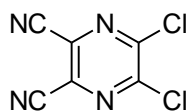
5 DISKUZE:

Tato práce byla zaměřena na přípravu látek typu aryloxylových derivátů azaftalocyaninů, které by bylo možné použít jako fluorescenční značky. Nejdříve bylo potřeba připravit prekurzory pro tetramerizační reakci, která vede ke vzniku azaftalocyaninů. Strukturně se jednalo o aryloxylové deriváty pyrazin-2,3-dikarbonitrilu. V prvním kroku syntézy byl připraven 5-methyl-6-oxo-1,6-dihydropyrazin-2,3-dikarbonitril. Ten byl poté použit pro přípravu 5-chlor-6-methyl-pyrazin-2,3-dikarbonitrilu v prostředí pyridinu, který v této reakci (nukleofilní substituce¹⁷⁾) vystupoval jako báze, donorem chloru byl POCl₃.



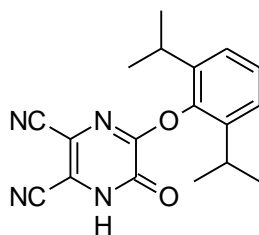
Obrázek 13: Připravené aryloxylové deriváty pyrazin-2,3-dikarbonitrilu

Tyto dvě reakce proběhly dle očekávání s výtěžkem asi 60 % teoretického výtěžku. Problém nastal při zavádění aryloxylové skupiny na pyrazinové jádro náhradou chloru. Jako báze pro tuto reakci byly vyzkoušeny tři látky. První metodou bylo použití hydroxidu sodného, který *in situ* reakcí s 4-hydroxybenzylalkoholem vytvořil fenolát sodný. Původně bylo zamýšleno navázat tento substituent do polohy 5, ale pravděpodobně došlo k vzniku (dle NMR) jiné látky. I dle TLC se nejednalo o očekávaný produkt. Druhou volbou bylo použít jako bázi uhličitan draselný, ale ani tato metoda nevedla dle TLC k očekávanému produktu. Jako třetí možnost báze byl použit pyridin, jehož přítomnost v reakci již vedla k očekávanému produktu. Výtěžek reakce se pohyboval okolo 56 % teoretického výtěžku. Nakonec bylo od těchto látek upuštěno z důvodu jejich špatné separace od vedlejších produktů, špatné ionizace, a tím pádem i nemožnosti provedení MS-analýzy pro potvrzení struktury. Dle NMR analýzy nebylo zcela jasné, zda se skutečně jedná o požadovaný produkt. Jako nová výchozí sloučenina pro další postup byl zvolen 5,6-dichlorpyrazin-2,3-dikarbonitril.



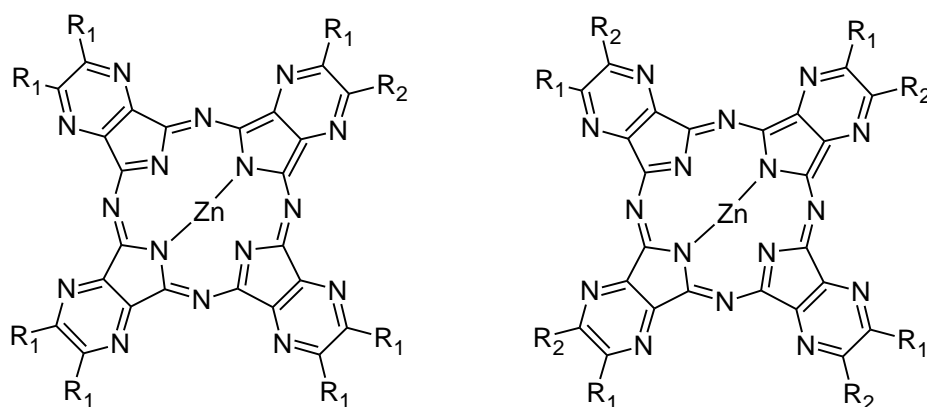
Obrázek 14: 5,6-Dichlorpyrazin-2,3-dikarbonitril

Jeho reakcí s propofolem v přítomnosti hydroxidu sodného a THF byla připravena symetricky substituovaná sloučenina (5,6-bis-(2,6-diisopropylfenoxy)pyrazin-2,3-dikarbonitril), která byla dále použita pro nesymetrickou tetramerizační reakci. Výtěžek této reakce se pohyboval kolem 70 % teoretického výtěžku. Dále byl připraven 5-chlor-6-[4-(hydroxymethyl)fenoxy]pyrazin-2,3-dikarbonitril reakcí 5,6-dichlorpyrazin-2,3-dikarbonitrilu s 4-hydroxybenzylalkoholem. Jako báze byl použit pyridin. Výtěžek této reakce byl asi 20 % teoretického výtěžku. S ohledem na nízký výtěžek reakce, špatné možnosti čištění a separace těchto látek, bylo od této možnosti syntézy upuštěno. Dále se tedy postupovalo tak, že nejprve byl na pyrazin navázán do polohy 6 propofol, a teprve poté do polohy 5 4-hydroxybenzylalkohol. Byl tedy připraven 5-chlor-6-(2,6-diisopropylfenoxy)pyrazin-2,3-dikarbonitril reakcí 5,6-dichlorpyrazin-2,3-dikarbonitrilu s propofolem. Jako báze byl použit hydroxid sodný. Tato sloučenina byla poté použita na přípravu 6-[4-(hydroxymethyl)fenoxy]-5-(2,6-diisopropylfenoxy)pyrazin-2,3-dikarbonitrilu (ZIP 134), který byl následně podroben tetramerizační reakci. Nejdříve byla snaha jako bázi použít hydroxid sodný (jednou v molárním poměru k ZIP 129 1 : 1,5 a druhý pokus v poměru 1 : 4). Látka vzniklá z druhé varianty, po vyčištění byla podrobena dalším analýzám. Pravděpodobně se jednalo o látku struktury 6-(2,6-diisopropylfenoxy)-5-oxo-1,6-dihydropyrazin-2,3-dikarbonitrilu. Hmotnostní spektrum nemohlo být naměřeno z důvodu špatné ionizace látky a ani elementární analýza neposkytla průkazné výsledky. ¹H NMR spektrum bylo velice překvapivé vzhledem k tomu, že vodíky vázané na aromatickou část molekuly dávaly signál singletu, což není příliš obvyklé pro sloučeninu této struktury. Byly provedeny pokročilé NMR analýzy pro potvrzení struktury.



Obrázek 15: 6-(2,6-Diisopropylfenoxy)-5-oxo-1,6-dihydropyrazin-2,3-dikarbonitril

Pro přípravu 6-[4-(hydroxymethyl)fenoxy]-5-(2,6-diisopropylfenoxy)pyrazin-2,3-dikarbonitrilu (ZIP 134) byl jako báze nakonec použit pyridin. Výtěžek reakce se po vyčištění pohyboval okolo 28 % teoretického výtěžku. Pravděpodobně větší část produktu zůstávala na chromatografickém sloupci. Metodika samotné tetramerizační reakce v prostředí chinolinu byla převzata z již dříve publikované práce na katedře farmaceutické chemie a kontroly léčiv¹⁴). Oproti dřívější práci byl použit k substituci pyrazinu propofol s ohledem na podobnou teplotu tání, a tudíž i očekávání podobné reaktivity a vlastností jako látka tvořící další část makrocyklu (ZIP-87). Dále byly u této látky změřeny fotochemické a fotofyzikální vlastnosti ($\Phi_F = 0,169$ a $\Phi_\Delta = 0,259$). Dále byl připraven nesymetrický azaftalocyanin, který nebyl charakterizován jinými metodami než MS analýzou s ohledem na nízký výtěžek reakce. U nesymetrického azaftalocyaninu nebylo možné fotochemické a fotofyzikální vlastnosti naměřit, protože látka nebyla dostatečně čistá.



Obrázek 16: Nesymetrický a symetrický azaftalocyanin

Po zhodnocení průběhu práce bylo možno konstatovat, že syntéza není příliš efektivní, ale látky této struktury je možné připravit. Vlastnosti připravených látek, nebyly až tak výhodné, jak bylo zamýšleno. Hodnota fluorescence byla poměrně nízká a naopak hodnota singletového kyslíku poměrně vysoká, aby bylo možné uvažovat o navázání těchto látek na oligonukleotidy, aniž by došlo k rozbití samotné sondy. Pro praxi by tedy bylo jejich použití příliš složité.

6 ZÁVĚR:

V rámci této práce byly připraveny prekurzory pro přípravu azaftalocyaninů:

- 5-[4-(hydroxymethyl)fenoxy]-6-methylpyrazin-2,3-dikarbonitril
- 5-chlor-6-[4-(hydroxymethyl)fenoxy]pyrazin-2,3-dikarbonitril
- 5-chlor-6-(2,6-diisopropylfenoxy)pyrazin-2,3-dikarbonitril
- 6-[4-(hydroxymethyl)fenoxy]-5-(2,6-diisopropylfenoxy)pyrazin-2,3-dikarbonitril
- 6-(2,6-diisopropylfenoxy)-5-oxo-1,6-dihydropyrazin-2,3-dikarbonitril

Látky byly charakterizovány pomocí teploty tání, NMR a IČ spekter.

Dále byl připraven symetrický azaftalocyanin vzniklý cyklizací 6-[4-(hydroxymethyl)fenoxy]-5-(2,6-diisopropylfenoxy)pyrazin-2,3-dikarbonitrilu.

Nesymetrický azaftalocyanin byl připraven cyklizací 6-[4-(hydroxymethyl)fenoxy]-5-(2,6-diisopropylfenoxy)pyrazin-2,3-dikarbonitrilu a 5,6-(2,6-diisopropylfenoxy)pyrazin-2,3-dikarbonitrilu.

Jedná se o látky s vyšší fluorescencí a nižší produkcí singletového kyslíku než u alkylsulfanylových derivátů, což bylo ověřeno změřením fotofyzikálních parametrů (Φ_F a Φ_Δ) připravených sloučenin.

7 LITERATURA:

- 1) HAUGLAND, Richard P. *Handbook of fluorescent probes*. ninth edition. [s.l.] : [s.n.], **2002**. 966 s. ISBN 0-9710636-1-3.
- 2) ALTENBACH, H. J., et al. *Houben-Weyl - Methods of organic chemistry : Heterenes IV*. 4th edition. Stuttgart: Georg Thieme Verlag , **1998**. ISBN 3-13-101614-0.
- 3) PONEC, Jan. *Deriváty dusíkatých heterocyklů jako potencionální biologicky aktivní látky*. Hradec Králové, **2000**. 78 s. Diplomová práce. Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové.
- 4) NOVÁKOVÁ, Veronika, et al. The synthesis, photochemical and photophysical properties of zinc aryloxy- and alkyloxy azaphthalocyanines. *Dyes Pigment*. **2010**, 2, s. 173-179.
- 5) KOPECKÝ, Kamil. *Syntéza potenciálních fotodynamicky aktivních látek typu disíkatých analogů ftalocyaninů*. Hradec Králové, **2004**. 55 s. Diplomová práce. Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové.
- 6) ZIMČÍK, Petr; MILETÍN, Miroslav. Fotodynamická terapie jako nová perspektivní metoda léčby nádorových onemocnění. *Česká a slovenská farmacie*. **2004**, 6, s. 271-279.
- 7) *Glen Research, Products for DNA research* [online]. **2011** [cit. 2011-04-26]. Products. Dostupné z WWW: <<http://www.glenresearch.com/Catalog/index1.html>>.
- 8) *East Port, A-GeneTiCs* [online]. **2010** [cit. 2011-04-26]. Fluorofory a jejich amino-reaktivní deriváty. Dostupné z WWW: <<http://www.eastport.cz/dodavatele-1-fluorofory-a-jejich-amino-reaktivni-derivaty-805.html?PHPSESSID=53654e8464b0ece711bc0a4d80c31249>>.
- 9) FIŠAR, Zdeněk. *Fluorescenční spektroskopie v neurovědách* [online]. **2009** [cit. 2011-04-26]. Principy fluorescenční spektroskopie. Dostupné z WWW: <<http://www1.lf1.cuni.cz/~zfishar/fluorescence/Default.htm>>.
- 10) RATNAKAR, B., et al. Cyanine Dye Labeling Reagents: Sulfoindocyanine Succinimidyl Esters. *Bioconjugate Chemistry*. **1993**, 2, s. 105-111.
- 11) KORMOSH, Zholt, et al. The state and chemical-analytical properties of certain polymethine dyes in aqueous solutions. *Acta Chim. Slov*. **2002**, 49, s. 795-804.

- 12) *Invitrogen* [online]. **2011** [cit. 2011-04-26]. Fluorophores and Their Amine-Reactive Derivatives. Dostupné z WWW:
<http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/References/Molecular-Probes-The-Handbook/Technical-Notes-and-Product-Highlights/The-Alexa-Fluor-Dye-Series.html>
- 13) SUBHANAKAR, Chatterje, et al. Photochemistry of Carbocyanine Alkyltriphenylborate Salts: Intra-Ion-Pair Electron Transfer and the Chemistry of Boranyl Radicals
Photochemistry of Carbocyanine Alkyltriphenylborate Salts: Intra-Ion-Pair Electron Transfer and the Chemistry of Boranyl Radicals . *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, 112, s. 6329-6338.
- 14) FRANZOVÁ, Šárka. *Studie syntéz nesymetrických aryloxy substituovaných azafthalocyaninů*. Hradec Králové, **2010**. 65 s. Diplomová práce. Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové.
- 15) ZIMČÍK, Petr, et al. Synthesis and comparison of photodynamic activity of alkylheteroatom substituted azaphthalocyanines. *Journal of Photochemistry and Photobiology*. **2004**, 163, s. 21-28.
- 16) PAVLÍK, Dušan. *Měření spektrálních charakteristik fluorescenčních napětově-citlivých barviv*. Brno, **2009**. 48 s. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně.
- 17) MAKSHEED, Saad; SAMUEL, Jacob; IBRAHIM, Fadi. Synthesis and characterization of non-aggregating octa-substituted azaphthalocyanines bearing bulky phenoxy substituents. *Tetrahedron*. **2008**, 64, s. 8871-8877.
- 18) LAKOWICZ, J.R. *Principles of fluorescence spectroscopy*. third edition. New York: Springer Business media, **2006**.
- 19) ZIESSEL, Raymond, et al. The chemistry of bodipy: A new El Dorado for fluorescence tools. *New J. Chem.* **2007**, 31, s. 496-501.
- 20) *Věkem podmíněná makulární degenerace - principy a léčba - Oftalmologie* [online]. **2010** [cit. 2011-05-09]. Postgraduální medicína - ZDN. Dostupné z WWW:
<<http://www.zdn.cz/clanek/postgradualni-medicina/vekem-podminena-makularni-degenerace-principy-a-lecba-450134>>.