

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

KATEDRA FARMACEUTICKÉ CHEMIE A KONTROLY LÉČIV



DIPLOMOVÁ PRÁCE

Syntéza symetrických derivátů azaftalocyaninů substituovaných objemnými
aromatickými substituenty



HRADEC KRÁLOVÉ 2015

Hana Vavříčková

„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 jsou řádně citovány. Práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové 30. 4. 2015

Podpis:

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala především svému školiteli Doc. PharmDr. Petru Zimčíkovi, Ph.D. za odborné vedení při práci, za výbornou atmosféru během celé práce v laboratoři a za přátelský přístup. Dále bych také chtěla poděkovat Doc. PharmDr. Veronice Novákové, Ph.D. za odborné rady, ale i přátelské jednání. V neposlední řadě patří dík i ostatním členům AzaPc group, Mgr. Antonínu Cidlinovi, Mgr. Lukášovi Lochmanovi a Mgr. Janu Švecovi, Ph.D.

Za změření dat bych ráda poděkovala následujícím pracovníkům: Doc. PharmDr. Jiří Kuneš, CSc. (NMR spektra), Iva Vencovská (IČ spektra), Věnceslava Hronová (elementární analýzy), PharmDr. Juraj Lenčo, Ph.D. (MS spektra).

Za finanční podporu děkuji projektu SVV 260 183.

ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv

Kandidát **Hana Vavříčková**

Školitel **Doc. PharmDr. Petr Zimčík, Ph.D.**

Název diplomové práce Syntéza symetrických derivátů azaftalocyaninů substituovaných objemnými aromatickými substituenty

V této práci jsem se zabývala syntézou dvou nových typů azaftalocyaninů (AzaPc) s objemnými substituenty se stabilní C-C vazbou a následným zkoumáním jejich vlastností. Byly připraveny dva AzaPc, každý ve formě bezkovového derivátu, zinečnatého a hořečnatého komplexu.

První AzaPc (**8**) nese na periférii 8 fenolických skupin, které jsou stericky chráněné *terc*-butylovými substituenty v *ortho* polohách. Tyto kyselé hydroxy skupiny mohou být ionizovány (stává se z nich fenolátový ion), což způsobí intramolekulární přenos náboje (ICT) a dojde ke zhášení fluorescence. Díky tomuto jevu by mohla najít sloučenina **8** potenciální uplatnění jako fluorescenční senzor. Druhý AzaPc (**7**) nese na periférii 8 methoxy skupin obklopených isopropyly v *ortho* polohách. Tato sloučenina slouží jako kontrolní molekula, protože zde nedochází k ionizaci skupin, takže ani k ICT.

Prekurzor pro AzaPc **8** byl připraven nukleofilní substitucí 5,6-dichlorpyrazinu-2,3-dikarbonitrilu 2,6-di(*terc*-butyl)fenolátem. Objemné *terc*-butyly chrání fenolátový ion, aby nedošlo k *O*-substituci a silný M⁺ efekt fenolátového iontu umožňuje, aby se uhlík v *para* poloze choval jako C-nukleofil. Prekurzor pro AzaPc **7** byl syntetizován kondenzací diaminomaleonitrilu s příslušným diketonem, který byl připraven z výchozího aldehydu přes benzoinovou kondenzaci a následnou oxidaci. Substituované pyrazin-2,3-dikarbonitrily byly cyklotetramerizovány v prostředí butanolátu hořečnatého. Následně byly zkoumány fotofyzikální vlastnosti obou AzaPc.

Díky fotofyzikálnímu měření bylo potvrzeno, že fenolická skupina se chová jako slabý donor. Po přidavku base dojde k deprotonizaci AzaPc **8**, ke vzniku fenolátu, a tím se stane ICT preferovanějším dějem. Dále byla také potvrzena závislost AzaPc **8** na polaritě rozpouštědla, kdy v nejvíce polárním rozpouštědle klesl kvantový výtěžek fluorescence téměř na nulu.

ABSTRACT

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department Department of Pharmaceutical Chemistry and Drug Control

Candidate **Hana Vavříčková**

Supervisor **Doc. PharmDr. Petr Zimčík, Ph.D.**

Title of Thesis Synthesis of symmetrical azaphthalocyanines substituted with bulky aromatic substituents

In this work, I dealt with synthesis of two types of azaphthalocyanine (AzaPc) with bulky peripheral substituents attached through stable C-C bond. Synthesis was followed by investigation of their photophysical properties. Each AzaPc was prepared in the metal-free form and as complexes with zinc or magnesium cations.

The first AzaPc (**8**) carried eight peripheral phenolic groups sterically hindered by adjacent *tert*-butyl substituents in *ortho* positions. These acidic hydroxy groups can be ionized and the resulting negative charge can cause an intramolecular charge transfer (ICT) and quench the fluorescence of this compound. This behavior may find its potential in sensoric applications. Second AzaPc (**7**) carried eight peripheral methoxy groups with adjacent isopropyl substituents in *ortho* positions. This AzaPc served as the ICT-negative control.

The precursor for **8** was prepared *via* nucleophilic substitution of 5,6-dichloropyrazine-2,3-dicarbonitrile with 2,6-di(*tert*-butyl)phenolate. Bulky *tert*-butyls hindered the phenolate fully from *O*-substitution and strong M⁺ effect of the phenolate rendered the carbon in position 4 a sufficiently strong *C*-nucleophile. The precursor for **7** was synthesized *via* condensation of diaminomaleonitrile with corresponding vicinal diketone prepared from aldehyde by benzoin condensation and oxidation. The substituted pyrazin-2,3-dicarbonitriles were cyclotetramerized using magnesium butoxide. Photophysical properties of AzaPcs were studied.

Photophysical measurements confirmed that the phenolic group behaves as a weak donor. After the addition of a base, AzaPc **8** deprotonated, phenolate ion was formed and ICT became a more preferred process. Furthermore, dependence of AzaPc **8** on solvent polarity was confirmed. The quantum yield of fluorescence dropped nearly to zero in the most polar solvent.

OBSAH

2.	SEZNAM ZKRATEK	8
3.	CÍL PRÁCE	9
4.	TEORETICKÁ ČÁST	10
4.1	Fluorescence.....	10
4.2	Fluorescenční senzory.....	11
4.3	Fluorescenční senzory s fenolickou skupinou na periferii	13
5.	METODOLOGICKÁ ČÁST	16
5.1	Aromatická nukleofilní substituce za využití 2,6-di(terc-butyl)fenolu.....	16
5.2	Ftalocyaniny a jejich aza-analogy s fenolickými skupinami na periferii	19
5.3	Porfyriny s 2,6-di(terc-butyl)fenolem na periferii	22
5.4	Subporfyriny s fenolickými skupinami na periferii a jejich oxidovanou formou.....	23
6.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	25
6.1	Syntéza 4-hydroxy-3,5-diisopropylbenzaldehydu (1).....	25
6.2	Syntéza 3,5-diisopropyl-4-methoxybenzaldehydu (2).....	26
6.3	Syntéza 1,2-bis(3,5-diisopropyl-4-methoxyfenyl)-2-hydroxy-ethan-1-onu (3)	27
6.4	Syntéza 1,2-bis(3,5-diisopropyl-4-methoxyfenyl)ethan-1,2-dionu (4).....	28
6.5	Syntéza 5,6-bis(3,5-diisopropyl-4-methoxyfenyl)pyrazin-2,3-dikarbonitrilu (5)	29
6.6	Syntéza 5,6-bis[3,5-di(terc-butyl)-4-hydroxyfenyl]pyrazin-2,3-dikarbonitrilu (6)	30
6.7	Syntéza 2,3,9,10,16,17,23,24-oktakis(3,5-diisopropyl-4-methoxyfenyl)tetrapyrazinoporfyrazinato hořečnatého komplexu (7Mg)	31
6.8	Syntéza 2,3,9,10,16,17,23,24-oktakis(3,5-diisopropyl-4-methoxyfenyl)tetrapyrazinoporfyrazinu (7H).....	32
6.9	Syntéza 2,3,9,10,16,17,23,24-oktakis(3,5-diisopropyl-4-methoxyfenyl)tetrapyrazinoporfyrazinato zinečnatého komplexu (7Zn)	33
6.10	Syntéza 2,3,9,10,16,17,23,24-oktakis[3,5-di(terc-butyl)-4-hydroxyfenyl]tetrapyrazinoporfyrazinato hořečnatého komplexu (8Mg)	34
6.11	Syntéza 2,3,9,10,16,17,23,24-oktakis[3,5-di(terc-butyl)-4-hydroxyfenyl]tetrapyrazinoporfyrazinu (8H)	35
6.12	Syntéza 2,3,9,10,16,17,23,24-oktakis[3,5-di(terc-butyl)-4-hydroxyfenyl]tetrapyrazinoporfyrazinato zinečnatého komplexu (8Zn).....	36
6.13	Stanovení kvantového výtěžku fluorescence	36
6.14	Stanovení kvantového výtěžku singletového kyslíku	37

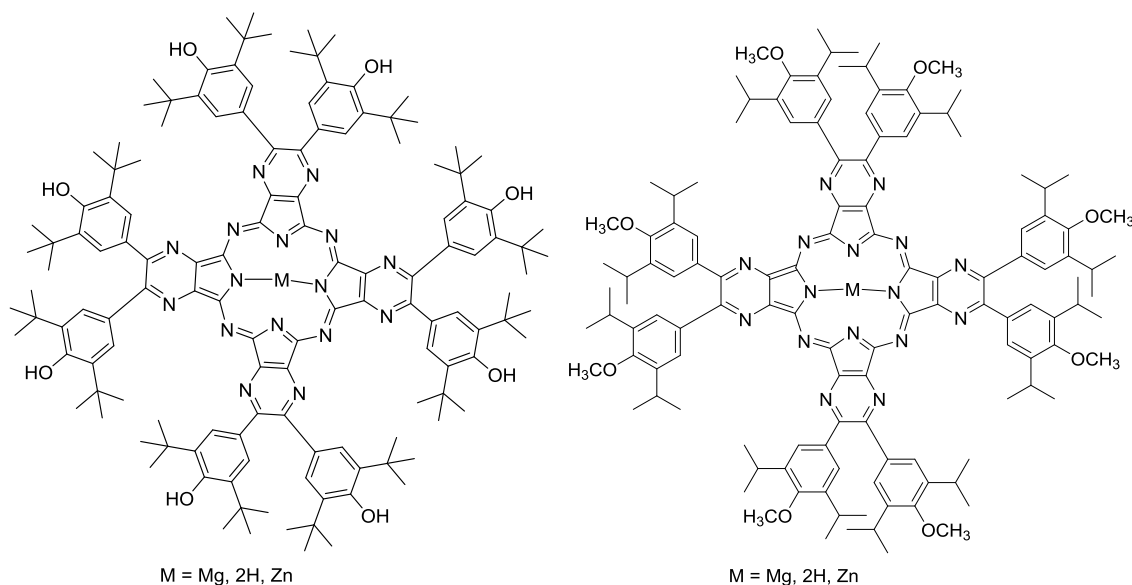
6.15	Titrace	38
7.	DISKUZE	39
7.1	Syntéza.....	39
7.2	Fotofyzikální vlastnosti a UV/Vis spektrofotometrie	42
8.	ZÁVĚR.....	50
9.	POUŽITÁ LITERATURA	51

2. SEZNAM ZKRATEK

ACN	Acetonitril
AzaPc	Azaftalocyaniny
aza-BODIPY	Dusíkaté analogy bor-dípyrromethanových barviv
DBU	1,8-Diazabicyklo[5.4.0]undec-7-en
DMAC	Dimethylacetamid
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
HPTS	8-Hydroxypyren-1,3,6-trisulfonát
ICT	Intramolekulární přenos náboje
IČ	Infračervená oblast záření světla
LT	Laboratorní teplota
NIR	Near-infrared (blízká oblast infračerveného světla)
Pc	Ftalocyaniny
SNAFLs	Seminaftofluorescein
SNARFs	Seminaftorhodafluor
TBAH	Tetrabutylammonium-hydroxid
THF	Tetrahydrofuran
TLC	Tenkovrstvá chromatografie
UV	Ultrafialová oblast světla
Vis	Viditelná oblast světla
Φ_{Δ}	Kvantový výtěžek singletového kyslíku
Φ_F	Kvantový výtěžek fluorescence

3. CÍL PRÁCE

Cílem této práce bylo připravit azaftalocyanin (AzaPc), který bude nést na periférii donorovou skupinu nového typu (fenol/fenolát). Přítomnost donorové skupiny podmíní vznik intramolekulárního přenosu náboje (ICT) a je tu možnost potenciálního využití těchto látek jako pH senzoru. Struktura byla navržena tak, aby AzaPc nesl fenolické skupiny na objemném aromatickém substituentu (Obr. 1). Objemnost brání agregaci planárních AzaPc, která by ovlivňovala fotofyzikální vlastnosti a neumožnila přiřadit sledované efekty čistě ICT. Pro kontrolu v rámci fotofyzikálních experimentů byla navržena i látka, která bude mít donorové centrum zablokované. Cílem práce nebyla pouze syntéza, ale i následné fotofyzikální hodnocení připravených látek za účelem vyhodnocení, zda by tento AzaPc mohl najít příslušné uplatnění jako pH senzor.

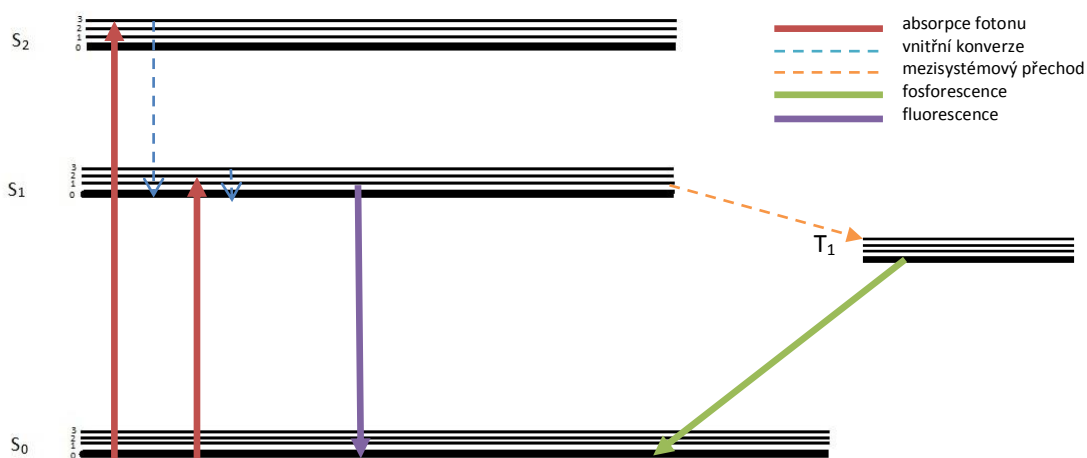


Obr. 1 Navržené struktury nových AzaPc.

4. TEORETICKÁ ČÁST

4.1 *Fluorescence*

Fluorescence je děj, který patří mezi luminiscenční jevy (dochází k emisi světla z látky). Pokud molekula absorbuje foton, následně se dostane do excitovaného stavu (stav S_1 nebo S_2-S_n , případně vibrační hladiny jednotlivých excitovaných stavů) přibližně za 10^{-15} s. Vnitřní konverzí, kdy dochází k částečné ztrátě energie, se dostává molekula z vyšších excitovaných stavů S_2-S_n do nejnižší vibrační hladiny S_1 stavu. Při přechodu z excitovaného stavu S_1 zpět do základního stavu S_0 dochází ke ztrátě energie emisí fotonu, což je jev zvaný fluorescence (trvá přibližně 10^{-8} s). Pokud molekula mezisystémovým přechodem přejde do tripletového stavu (T_1) a následně z něj dochází k vyzáření fotonu a návratu do základního stavu, dojde k jevu zvanému fosforescence ($10^{-3} - 10^0$ s; Obr. 2).¹ Dalším relaxačním procesem T_1 stavu je interakce s kyslíkem, kdy dochází po předání energie ke vzniku singletového kyslíku.



Obr. 2 Jablonského diagram - S_0 -základní stav; S_1 , S_2 -excitované stavy; T_1 -tripletový stav; každý stav (S_0 , S_1 , S_2 , T_1) má vibrační energetické hladiny (0, 1, 2, 3, atd.).

Důležitou charakteristikou těchto procesů jsou kvantové výtěžky. V našem případě nás budou zajímat především kvantové výtěžky fluorescence (Φ_F) a singletového kyslíku (Φ_A), které charakterizují hlavní relaxační procesy v látkách typu AzaPc. Kvantový výtěžek fluorescence je definován jako podíl počtu emitovaných fotonů ku počtu absorbovaných fotonů, kvantový výtěžek singletového kyslíku je pak definován jako počet molekul vzniklého singletového kyslíku ku počtu absorbovaných fotonů.¹

Mezi hlavní procesy přechodu z excitovaného stavu patří fluorescence a mezisystémový přechod. Méně častým jevem je ICT, který je nezářivý proces a je silně kompetitivní k výše uvedeným přechodům (je výrazně rychlejší). V důsledku to znamená, že pokud k němu dojde, stává se preferovaným procesem kvůli své rychlosti.³⁰ Podmínkou pro vznik ICT je, aby molekula nesla donorovou a akceptorovou část, které musí být ve vzájemné konjugaci. Velmi silným donorem u AzaPc se dříve ukázala být dialkylaminová skupina na periférii, díky které se ICT stává hlavním procesem. Důkazem byly kvantové výtěžky, které měly u dialkylamino AzaPc velmi nízké hodnoty, blízké nule. Pokud se tato donorová centra zablokovala, kvantové výtěžky opět stouply, tudíž ICT již nebylo preferovaným procesem.² Tento způsob přepínání mezi ON a OFF stavy molekuly lze využít pro návrh nových senzorů.^{3,4}

4.2 *Fluorescenční senzory*

Fluorescenční senzory můžeme definovat jako molekuly, u kterých dochází ke fotofyzikálním změnám, pokud jsou vystaveny určitým podmínkám, iontům nebo molekulám. Detekční část senzoru reaguje na příslušné změny v prostředí, což způsobí změnu fluorescence.⁵

Podle mechanismu působení je můžeme rozdělit na 3 základní typy. Prvním typem je *vnitřní fluorescenční sonda*, kdy interakce analytu s ligandem, který je součástí π -systému fluoroforu, způsobí přenos signálu. Druhým typem jsou *vnější fluorescenční sondy*, kdy část fluoroforu a receptoru jsou kovalentně spojeny, ale zároveň jsou elektronově nezávislé. Syntéza může tedy být provedena tak, že se zvlášť připraví část fluoroforu, část receptoru, a ty se následně kovalentně spojí. Při interakci analytu s receptorovou částí dojde ke změně i v části fluoroforu, a tím se změní i fluorescence. Třetím typem je "*celek reagující na chemickou změnu*"ⁱ, kdy celek receptor-fluorofor se po přidání vhodného kompetitivního analytu disociuje. Tento analyt cíleně reaguje s receptorem, a tím dochází k detekovatelné odpovědi fluoroforu.⁶

Další rozdělení fluorescenčních sond může být podle typu, kterým působí. Mohou to být zhašecí sondy, fluorogenické sondy, sondy reagující na dvě vlnové délky, sondy založené na Försterově rezonančním přenosu energie a sondy založené na světlem

ⁱ "chemosensing ensemble"

indukovaném přenosu elektronu.⁷ Posledně zmiňovaný proces je v principu velice podobný ICT, jen u něj není nutná konjugace donoru s akceptorem.²

Jednou z nejrozšířenějších aplikací pro senzory je měření pH. Jako velmi výhodné kvůli svým vlastnostem se jeví optické pH senzory, jelikož jsou stabilní, změnu pH lze rozpoznat i pouhým okem a i jejich příprava není náročná. Nejprve byly popsány fluorescenční senzory působící na principu jedné vlnové délky. Ty využívají především protonace/deprotonace citlivého centra (amin, fenol). Kolísání pH poblíž určité hodnoty pK_a způsobí změnu v intenzitě fluorescence nebo změnu absorpčního spektra. Další alternativou jsou pak pH citlivé polymery, kdy změnou pH poblíž určité hodnoty pK_a způsobí agregaci ve vodném prostředí, a tím se změní i intenzita emise.

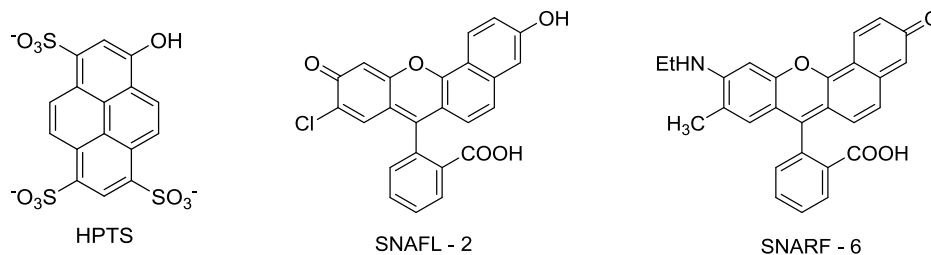
Nevýhodou senzorů založených na jedné vlnové délce je závislost na koncentraci fluoroforu. Proto se začaly zkoumat nové pH senzory, které budou založeny na bázi poměrových změn emisní intenzity a pH dvou nebo více fluoroforů (tzv. "ratiometric probes"). Jeden fluorofor není citlivý (nebo je jinak citlivý) na změnu okolního pH a slouží jako tzv. referenční látka pro citlivý fluorofor. Jako tzv. referenční fluorofor se zdají být poslední dobou vhodné "kvantové tečky"^{ii,8} vzhledem k jejich velikosti, snadné ovlivnitelnosti emisní vlnové délky a vysokému kvantovému výtěžku fluorescence.

Stále více prostoru v oblasti fluorescenčních senzorů dostávají také konjugované polymery díky výborným optickým vlastnostem, jako je získávání světla (tzv. light-harvesting⁶), a schopnosti delokalizovat elektrony, což přispívá k zesílení signálu. Navíc jejich další konjugace s iontovými skupinami způsobí změnu na polyelektrolyty, které mají výborné předpoklady pro snímání, zobrazování a další použití. Použitím konjugovaných polymerů se rozšířily možnosti na přípravu nových senzorů. pH senzory zaměřené na poměrové změny se mohou připravit kovalentní nebo nekovalentní fixací fluoroforů na polymerní matrix, ta pak bude emitovat při různých vlnových délkách. Příprava konjugovaných polymerů však nebyla natolik výhodná a jednoduchá, jak se předpokládalo. Proto probíhají stále další studie vlastností a využití konjugovaných polymerů jako pH senzorů.⁹

ⁱⁱ "kvantové tečky" (quantum dots) - nanokrystal polovodiče, který je schopen fluorescence; produkují barvy v závislosti na velikosti částic

Fluorescein (levá část Obr. 4) nachází uplatnění jako ratiometrická sonda. U absorpčního spektra vidíme posun k vyšším vlnovým délkám s pK_a kolem 6,5.

Další sonda, 8-hydroxypyren-1,3,6-trisulfonát (HPTS, Obr. 5), se ukázala jako vhodnější vzhledem ke svým vlastnostem. Díky sulfonovým skupinám je lépe rozpustná ve vodě a hydroxylové skupiny reagují na změny pH. HPTS reaguje velmi dobře na změny pH – se zvyšujícím se pH roste absorbance při 450 nm a současně klesá při 420 nm (horní pravá část Obr. 4). Je to způsobeno ionizací hydroxylových skupin vlivem pH. Díky svému pK_a kolem 7,5 nachází dobré uplatnění v klinické praxi, i přes relativně nízkou vlnovou délku excitace a emise. Další uplatnění HPTS může být také jako senzor pro měření pCO_2 . Excitační spektrum sondy HPTS (pravá část Obr. 4) bylo měřeno s fosfátovým pufrům o koncentraci 0,07 M. Excitace při měření emisního spektra byla při 454 nm.



Obr. 5 Vzorce sond HPTS, SNAFL a SNARF.

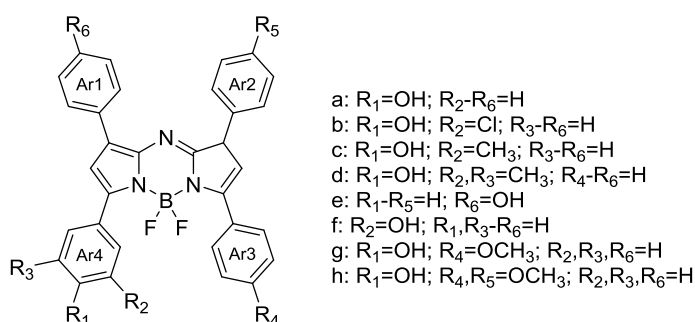
V 90. letech minulého století se objevily zdokonalené sondy na základě seminaftofluoresceinu (SNAFLs) a seminaftorhodafluoru (SNARFs, Obr. 5). Jejich důležitou vlastností je, že vykazují změny jak v absorpčním, tak i fluorescenčním spektru s pK_a 7,6 - 7,9. Vzhledem k tomu, že kyselá i zásaditá forma sondy vykazuje fluorescenci, mohou najít uplatnění jako "lifetime" ⁱⁱⁱ sondy. Např. u SNARF-6 je doba života fluorescence bazické formy kratší než kyselé formy. Měření pH založené na "lifetime" sondách může poskytnout sledování pro delší časové období.¹

Dosud známé pH senzory - jako HPTS, karboxyfluoresceinové deriváty, SNARFs a hydroxykumariny - se potýkají s jejich nízkým využitím kvůli jejich vlastnostem. Každý z nich má specifické omezení, které limituje jeho použití např. v biologické oblasti. Proto bylo vhodné najít senzor, který např. absorbuje/emituje záření v infračervené (IČ) oblasti nebo alespoň v její blízkosti (near-infrared - NIR). V IČ oblasti je totiž omezena fluorescence biogenních molekul (autofluorescence), světlo

ⁱⁱⁱ "lifetime" sonda – doba života fluorescence je závislá na hodnotě pH

těchto vlnových délek je méně rozptylováno, a proto celkově proniká hlouběji do biologických tkání. Cyaninová barviva jsou známá jako NIR chromofory, ale jako pH indikátory uplatnění nenašly. Kdežto BF₂-chelatuující tetraarylazadipyrrromethanová barviva nesoucí amino nebo hydroxy skupiny na periferii mají dobré fotofyzikální vlastnosti. Proto by mohly najít využití jako pH indikátory, avšak pouze v kyselém nebo lehce neutrálním prostředí.¹⁰

Jokic et. al. připravili osm derivátů BF₂-chelatuujících tetraarylazadipyrrromethanových barviv (aza-BODIPY barviv, Obr. 6). Jejich fotofyzikální vlastnosti se zkoumaly v roztoku barviv v ethanolu a vody (poměr 1:1). Z absorpčních křivek lze odvodit, že kruhy 3 a 4 konjugují s chromoforem aza-BODIPY. Konjugace je pravděpodobně způsobena vodíkovou vazbou z fluoridového iontu a *ortho* polohou na kruhu 3 a 4, kde je volný vodíkový atom. Elektrondonorová skupina (hydroxy, methoxy) ovlivňuje absorpční spektrum pouze v kruhu 3 a 4. V kruzích 1 a 2 žádný vliv nemá. Je to způsobeno konjugací kruhů 3 a 4, které jsou lépe konjugovány s BODIPY jádrem. Kvantové výtěžky fluorescence se pohybovaly v rozmezí 0,14-0,17 v THF.



Obr. 6 Osm derivátů BF₂-chelatuujících tetraarylazadipyrrromethanových barviv.

Citlivost látek na pH se měřila v pufru ethanol/voda (1:1) a v hydrogelu D4 (založený na polyuretanu), v koncentracích 0,02 M a 0,15 M. Přítomnost chloru v *meta* poloze na Ar₄ (**b**) sníží hodnotu pK_a na 7,00 oproti základním aza-BODIPY pouze s hydroxylovou skupinou v *para* poloze (**a**) s pK_a 8,35. Pokud je hydroxylová skupina na kruhu Ar₁ (**e**), který je méně konjugován s BODIPY jádrem, pK_a vzroste na 9,69. Nejvyšší hodnotu pK_a má derivát, který nese v *meta* poloze na Ar₄ hydroxylové skupiny (**f**), což je způsobeno vznikem vodíkové vazby mezi fluorem a hydroxy skupinou. Vliv methoxy skupiny na ostatních kruzích (Ar₂ a Ar₃) není tolik výrazný. Závěrem lze říci, že díky rozmanitosti pK_a lze uvažovat u aza-BODIPY o pH senzorech na konkrétní prostředí.¹⁰

5. METODOLOGICKÁ ČÁST

Při syntéze cílových látek v diplomové práci jsme s výhodou využili metod analogických těm, které jsou popsány v literatuře. Jedná se zejména o poněkud netradiční nukleofilní substituce, kde elektrondeficitní centrum atakuje C-nukleofil na aromátu. V této kapitole se proto věnuji krátké rešerši na toto téma.

5.1 *Aromatická nukleofilní substituce za využití 2,6-di(terc-butyl)fenolu*

Stericky objemné *terc*-butyly v 2,6-di(*terc*-butyl)fenolu jsou již delší dobu známy tím, že zabraňují této látce chovat se jako *O*-nukleofil. Místo toho silně elektrondonorová fenolátová skupina vzniklá v bazickém prostředí zvyšuje elektronovou hustotu na uhlíku v poloze 4 a umožňuje 2,6-di(*terc*-butyl)fenolu chovat se jako *C*-nukleofil v nukleofilní substituci.

Tento fakt popsal poprvé Kornblum N. a Seltzer R. v roce 1961 pro syntézu 4-isopropyl-2,6-di(*terc*-butyl)fenolu (Schéma 1).¹¹

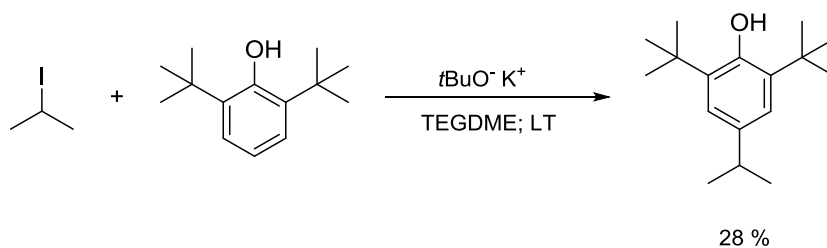


Schéma 1 První aromatická nukleofilní substituce 2,6-di(*terc*-butyl)fenolu (TEGDME=tetraethylglykol dimethyl ether).

V roce 1971 popsal Le Noble et al. další nukleofilní substituci, kdy se alkylhalogen naváže opět do *para* polohy 2,6-di(*tert*-butyl)fenolu (Schéma 2).¹²

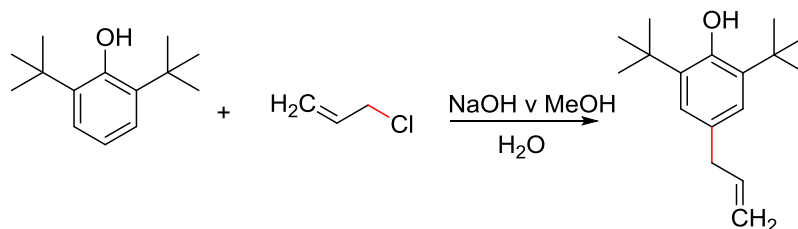


Schéma 2

V dalších letech popsal podobné reakce např. Stahly, který je využil pro nukleofilní substituce v řadě disubstituovaných benzenů (Schéma 3).¹³

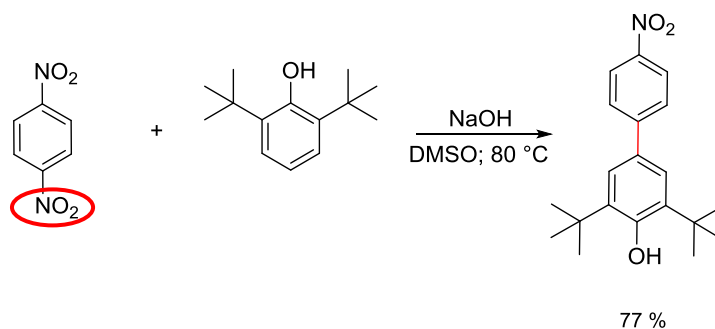


Schéma 3

Podobně postupoval také Alam et al., kteří získali bifenylovou strukturu, ale za odlišných podmínek. Reakce zde probíhala za elektrolytických podmínek, jinak by bifenyl nevznikl (Schéma 4).¹⁴

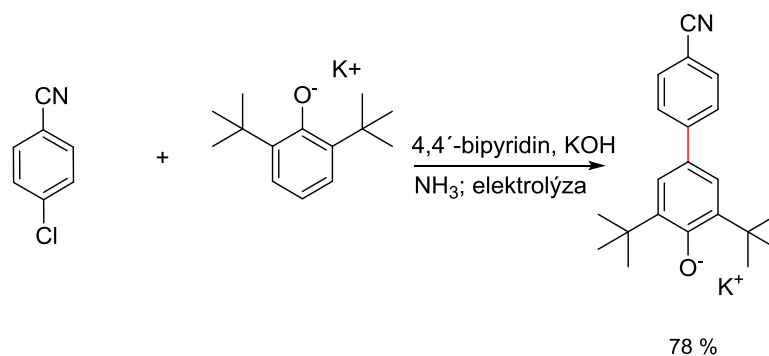


Schéma 4

Důležitost výrazné objemnosti *tert*-butylových substituentů pro vznik *C*-nukleofilu je zřejmá z analogické reakce s 2,6-diisopropylfenolem. V tomto případě je fenolátová skupina stericky přístupná a majoritním produktem (75 %) je substituovaný difenylether (Schéma 5).¹⁵

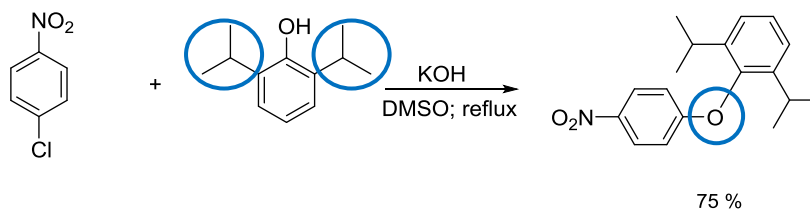


Schéma 5

Stejný difenylether byl připraven P. G. Sammesem et al., kdy byla použita jiná výchozí látka a reakce probíhala za odlišných podmínek (Schéma 6). Výtěžek této reakce byl téměř stejný (76 %).¹⁶

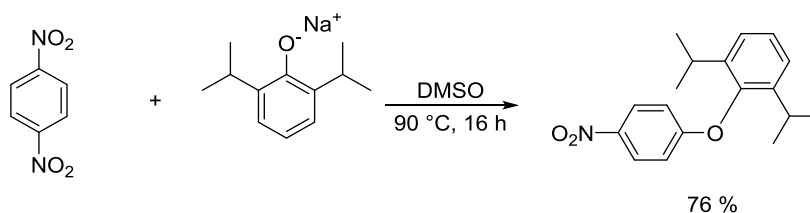


Schéma 6

Naopak překonat sterické bránění *tert*-butylových substituentů lze při reakci s isosterním 2,6-di(*tert*-butyl)thiofenolem (Schéma 7). V tomto případě vzniká jako jediný produkt analog thioetheru (tzn. v reakci se uplatňuje *S*-nukleofil a ne *C*-nukleofil). Důvodem může být výrazně větší atom síry, který není tolik stericky bráněn a tudíž je přístupnější pro reakci.¹⁷

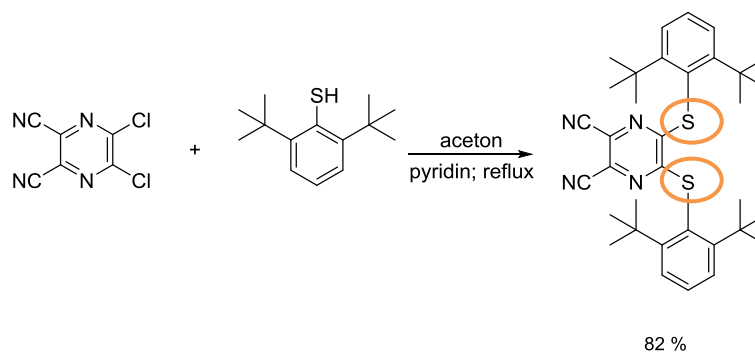


Schéma 7

5.2 Ftalocyaniny a jejich aza-analogy s fenolickými skupinami na periferii

Výše uvedené reakce za využití C-nukleofilů byly využity i v přípravě prekurzorů pro ftalocyaniny (Pc). Jako výchozí látky byly použity 2,6-diisopropylfenol, 2,6-di(*tert*-butyl)fenol, které reagovaly s 4-nitroftalonitrilem v dimethylformamidu (DMF) za teploty 50-70 °C. Z této reakce byly získány 2 deriváty ftalonitrilů - 4-(2,6-diisopropylfenoxy)ftalonitril a 4-[1-hydroxy-2,6-di(*tert*-butyl)fen-4-yl]ftalonitril. Rozdíl mezi jednotlivými deriváty je způsoben objemností substituentů v polohách 2 a 6, jak již bylo naznačeno výše. V případě 2,6-di(*tert*-butyl)fenolu se tato molekula chová jako C-nukleofil, 2,6-diisopropylfenol reaguje jako O-nukleofil (Schéma 8).¹⁸

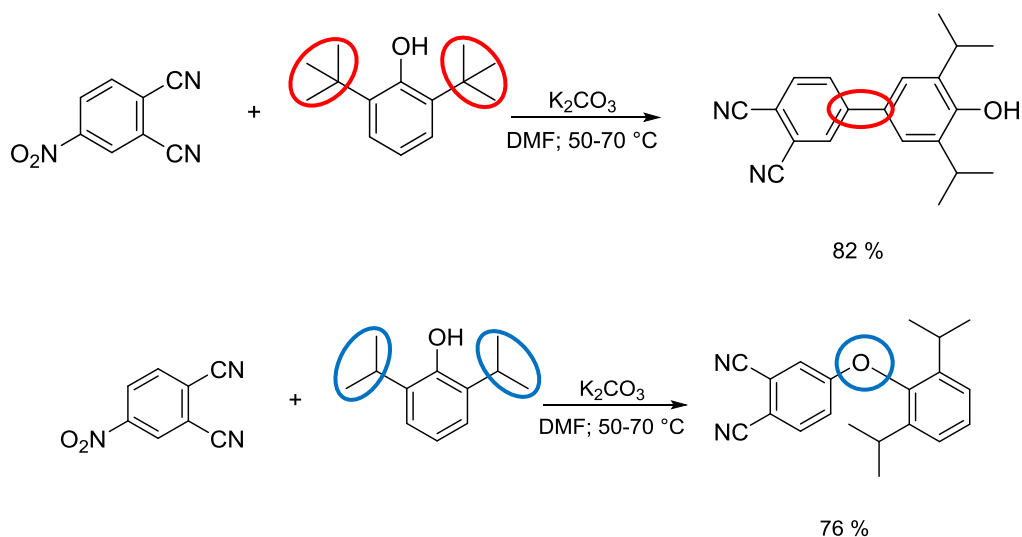


Schéma 8

Za stejných podmínek lze připravit obdobné sloučeniny, reakcí 3-nitroftalonitrilu, avšak s nižším výtěžkem (Schéma 9).¹⁸

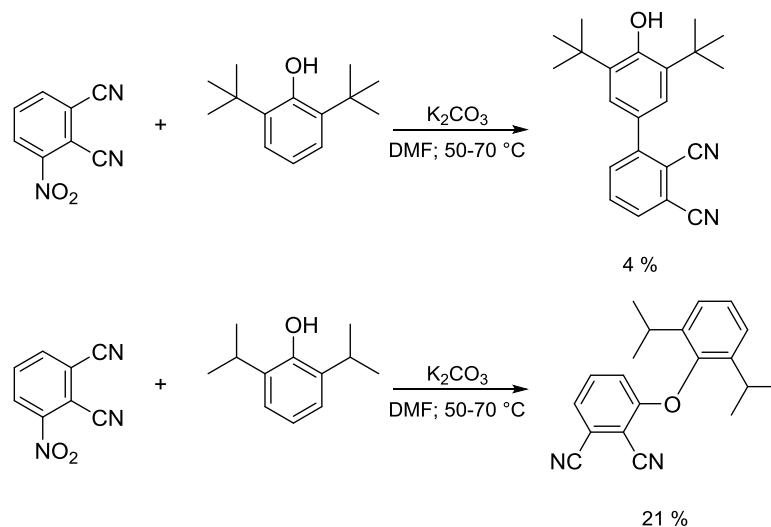


Schéma 9

Po syntéze prekurzorů následovala jejich cyklotetramerizace, která proběhla v prostředí lithia a pentanolu za teploty 135 °C (získají se bezkovové Pc). Výsledné Pc byly získány ve 4 regioisomerech, což bylo potvrzeno díky 1H NMR (Schéma 10).

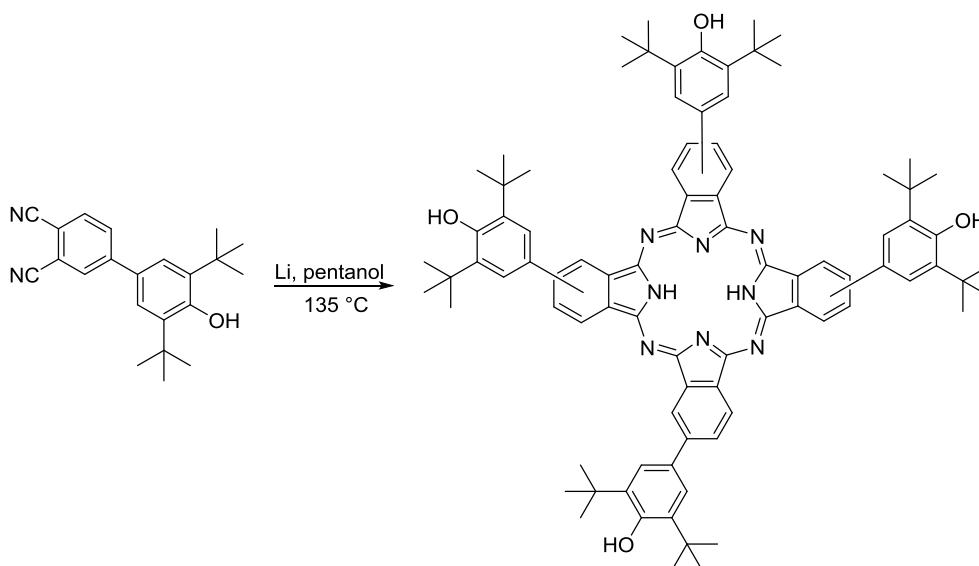


Schéma 10 Cyklotetramerizace prekurzoru.

Výsledné Pc byly použity k fotofyzikálnímu měření, kdy byla přidávána base tetrabutylammonium-hydroxid (TBAH), což mělo za následek změnu absorpčního spektra (došlo ke zmenšení intenzity a posunu maxima). Dalším zjištěním bylo, že díky

objemným *tert*-butylům došlo ke značnému snížení agregace v roztoku oproti méně objemnějším substituentům.¹⁸

V jiné práci se Hill et al. zabývali přípravou aza-analogů Pc. Příprava tetrapyrazinoporfyrazinu s 2,6-di(*tert*-butyl)fenolovými skupinami na periferii byla především za účelem potenciálního využití jako senzoru. Syntéza se skládala ze dvou kroků - z přípravy prekurzoru a jeho následné cyklotetramerizace (Schéma 11).

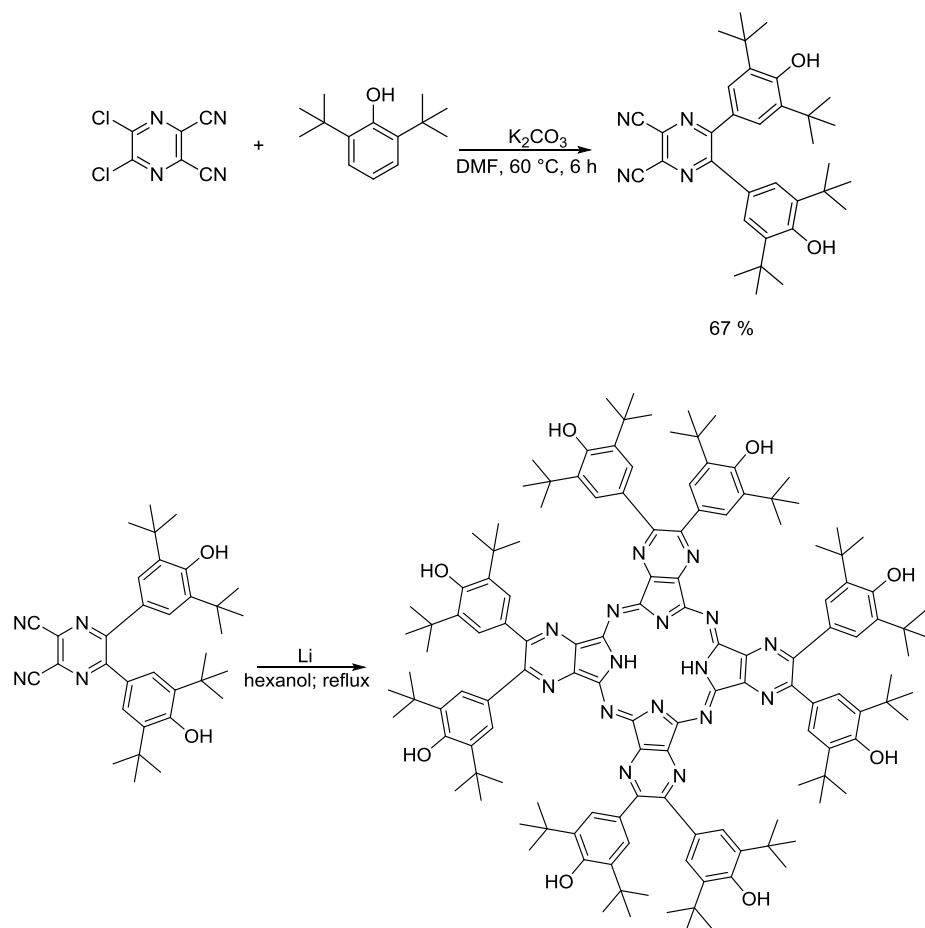


Schéma 11 Příprava prekurzoru s fenolickými skupinami na periferii a jeho následná cyklotetramerizace.

Po syntéze následovalo zkoumání vlastností připraveného AzaPc. Fenolické skupiny reagují v přítomnosti zásaditých iontů, kdy dochází k jejich deprotonizaci. Vizuálně lze přítomnost fluoridových aniontů pozorovat v roztoku AzaPc (roztok organického rozpouštědla), kdy dochází ke změně barvy z šedomodré do zelena. Po přidání fluoridových iontů do roztoku lze na absorpčním i fluorescenčním spektru pozorovat změny. Pozorovaly se i vlastnosti prekurzoru výše uvedeného AzaPc, který také reagoval na přidávky fluoridových iontů.

Na závěr lze říci, že AzaPc s 8 fenolickými skupinami na periferii lze potenciálně využít jako senzor na bazické ionty, především na fluoridové, acetátové, ale i fosfátové.¹⁹

5.3 Porfyriny s 2,6-di(*tert*-butyl)fenolem na periferii

Porfyriny s fenolickými skupinami jsou známe tím, že u nich dochází ke strukturálním změnám v závislosti na jejich stavech protonace nebo schopností oxidovat. Také se zde mohou objevit tautomerní struktury - především se jedná o redox systém hydrochinon/chinon.

Porfyrin **A** nesoucí v polohách 5, 15 fenolické skupiny podléhá fotoindukované vzdušné oxidaci na porfyrin **B** (Schéma 12). Mezi těmito tautomery může docházet k reverzní změně na sloučeninu **A** díky přidavku triethylaminu.²⁰

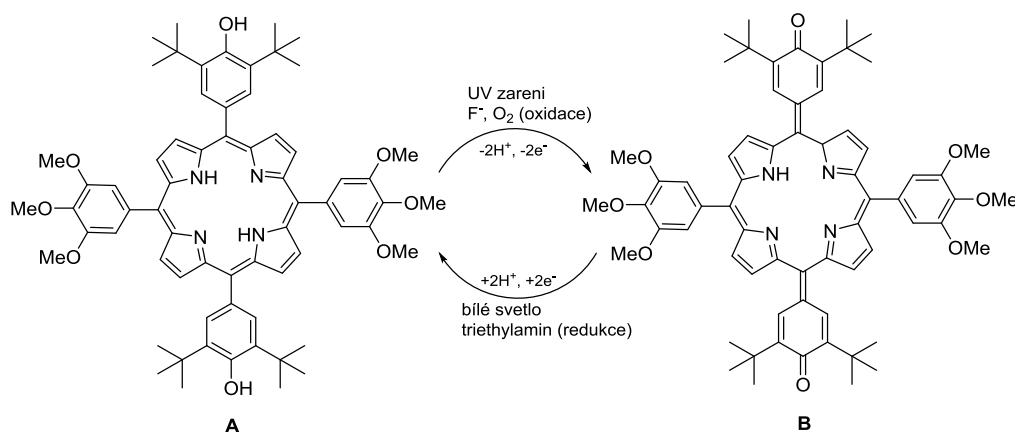
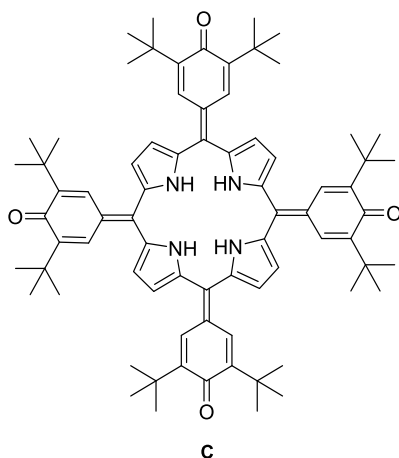


Schéma 12 Struktura porfyrinů s fenolickými skupinami.

Porfyriny s 2,6-di(*tert*-butyl)fenolovými skupinami se zabývali také Shundo A. et al., kteří se zaměřili hlavně na vizualizaci acidobazické rovnováhy v nepolárním rozpouštědle (dichlormethanu). Rozpustnost v nepolárních rozpouštědlech je způsobena ochranou fenolických skupin díky objemnosti *tert*-butylů. Pro změny acidobazických vlastností prostředí byla použita base DBU a trifluoroctová kyselina. Jako indikátor si autoři vybrali oxoporfyrinogen **C** (Obr. 7), protože jeho kolorimetrické vlastnosti jsou silně ovlivněny vodíkovými vazbami vodíků na pyrrolech. Po přidání base DBU do roztoku porfyrinu **C** zůstává zbarvení modré. Pokud se roztok postupnými přidávkami kyseliny trifluoroctové okyseluje, dochází k přechodu barev přes purpurovou na červenou až zelenou. Tento fakt byl využit pro přípravu matic, které nesou

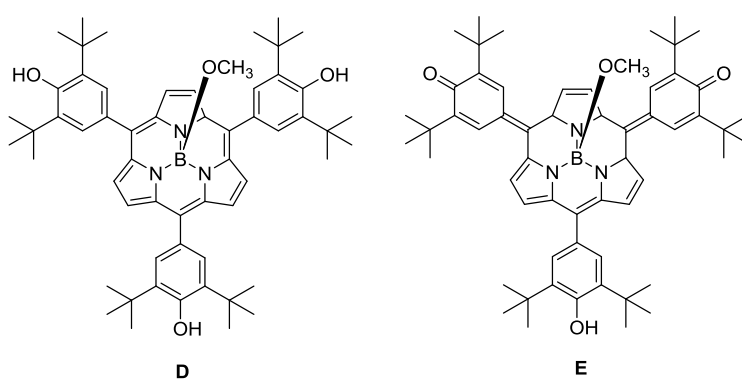
oxoporfyrinogen citlivý na kyselé prostředí. V přítomnosti kyselin (kyselých par) dojde k viditelnému zbarvení, které je možno rozeznat pouhým okem.²¹



Obr. 7 Struktura oxoporfyrinogenu.

5.4 *Subporfyriny s fenolickými skupinami na periferii a jejich oxidovanou formou*

Struktura subporfyrinu je charakteristická aromatickým systémem se 14π elektrony a miskovitým tvarem. Další důležitou vlastností subporfyrinů je silná absorpce a fluorescence v zelené oblasti. Také u těchto látek bylo publikováno zavedení 2,6-di(*tert*-butyl)fenolu do struktury (Obr. 8), i když ne za využití C-nukleofilu.



Obr. 8 Subporfyriny s fenolickými skupinami na periferii.

Subporfyrin **D** byl připraven reakcí pyridin-tri(*N*-pyrrol)boranu²² s 3,5-di(*tert*-butyl)-4-hydroxybenzaldehydem, kdy výtěžek byl pouze 1,9 % (Schéma 13). Miskovitá struktura produktu byla potvrzena rentgenovou difrakční analýzou.

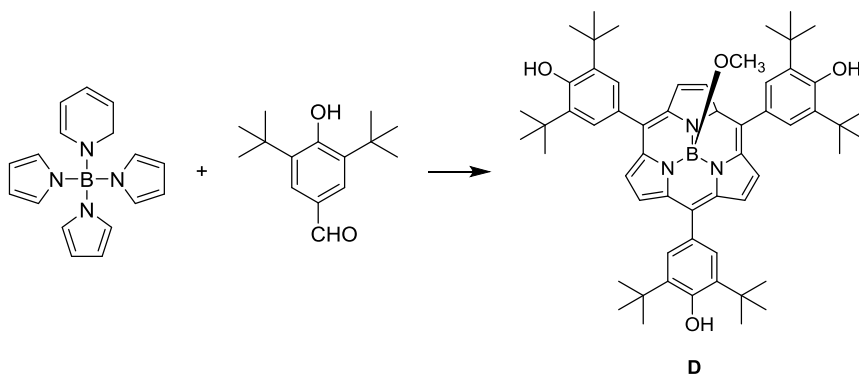


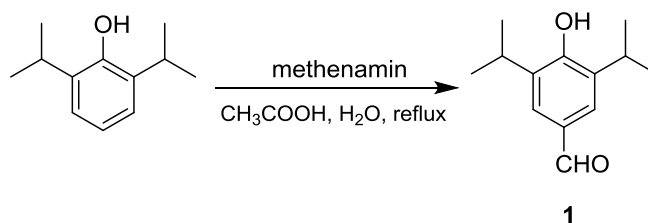
Schéma 13 Syntéza subporfyrinu s fenolickými skupinami na periferii.

Dále autoři provedli oxidace této sloučeniny na chinoidní strukturu **E** pomocí MnO₂ a sledovali změny absorpčních a fluorescenčních spekter.²³

6. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Výchozí látky a rozpouštědla pro reakce byly zakoupeny od firem Lach-Ner, Penta, Sigma-Aldrich nebo Acros. Teplota tání sloučenin byla měřena pomocí digitálního přístroje ELECTROTHERMAL IA9200. Průběh reakcí a čistota výsledných produktů byly sledovány pomocí tenkovrstvé chromatografie (TLC) na deskách Merck Kieselgel 60 F254, detekce UV lampou probíhaly při vlnové délce 254 nm nebo 366 nm. Čištění produktů bylo prováděno pomocí sloupcové chromatografie na stacionární fázi Merck Kieselgel 60 (0,040-0,063 mm). Mobilní fáze, které byly použity, jsou popsány u jednotlivých reakcí níže. Infračervená spektra byla měřena IČ spektrofotometrem Nicolet 6700 v ATR módu na Katedře anorganické a organické chemie. ^1H NMR a ^{13}C NMR spektra byla měřena na přístroji Varian Mercury Vx BB 300 nebo VNMR S500 na Katedře anorganické a organické chemie. Elementární analýza byla provedena pomocí přístroje Automatic Microanalyser EA1110CE. Spektra UV/Vis byla měřena pomocí přístroje Shimadzu UV-2600 spectrophotometer na Katedře farmaceutické chemie a kontroly léčiv. Fluorescenční spektra byla získána na AMINCO-Bowman Series 2 Luminescence Spectrometer na Katedře biofyziky a fyzikální chemie. Hmotnostní spektrometrie (MALDI-TOF) byla provedena na přístroji AB Sciex 4800 MALDI TOF/TOF spectrometer. Přístroj byl kalibrován externě pětibodovou kalibrační metodou pomocí Peptide Calibration Mix1 (LaserBioLabs, Sophia-Antipolis, France). Roztok měřeného vzorku v dichlormethanu (přibližně 10 μM , 1,5 μl) byl smíchán s matricí (*trans*-2-[3-(4-*tert*-butylfenyl)-2-metyl-2-propenyliden]-malononitril) v dichlormethanu, nanesen na destičku a důkladně vysušen.

6.1 Syntéza 4-hydroxy-3,5-diisopropylbenzaldehydu (1)

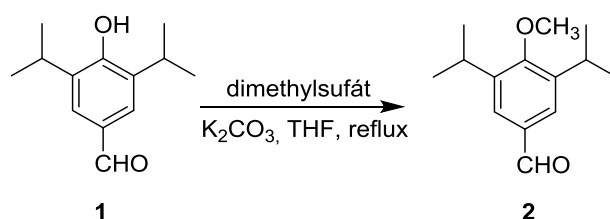


2,6-Diisopropylfenol (8,9 g; 9,3 ml; 49,93 mmol; $\rho=0,962$ g/ml) byl rozpuštěn v kyselině octové (41 ml) a byla přidána voda (8,5 ml). Po chvíli byl přidán methenamin

(14 g; 99,86 mmol) a celá směs reagovala na olejové lázni pod zpětným chladičem při teplotě varu rozpouštědla. Za 10 minut byl vyměněn chladič za sestupný, bylo oddestilováno přibližně 5 ml vody a reakce pokračovala dál 2,5 hodiny pod zpětným chladičem. Reakční směs postupně změnila barvu do červena. Po ukončení reakce byla přidána voda do ochlazené reakční směsi a vše bylo vloženo na hodinu do ledničky. Vyloučené krystaly byly odfiltrovány. Bylo získáno 7,8 g (76%) nažloutlých krystalů. Reakce byla provedena dle publikovaného postupu.²⁴ Dle TLC (hexan/diethylether 3:2) byl produkt dostatečně čistý pro další reakci. Analytický vzorek byl překrystalizován z isopropanolu.

T. t. 105,8 - 106,5 °C. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 9,86 (s, 1 H, CHO), 7,63 (s, 2 H, ArH), 5,67 (s, 1 H, OH), 3,20 (hept, *J* = 6,8 Hz, 2 H, CH), 1,30 (d, *J* = 6,8 Hz, 12 H, CH₃). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 191,7; 155,9; 134,4; 129,7; 126,2; 27,1; 22,5.

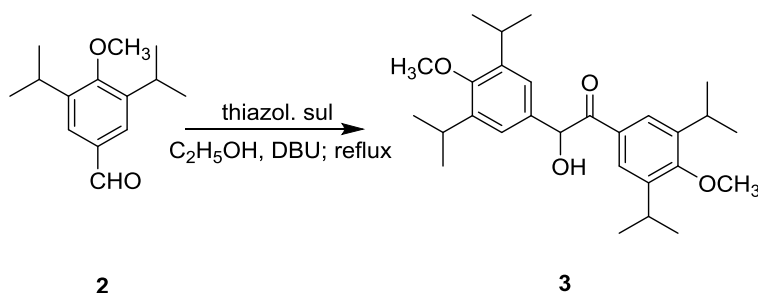
6.2 Syntéza 3,5-diisopropyl-4-methoxybenzaldehydu (2)



Aldehyd **1** (7,82 g; 37,91 mmol) byl rozpuštěn v předestilovaném tetrahydrofuranu (THF, 80 ml) a poté byl přidán bezvodý uhličitán draselný (7,86 g; 56,87 mmol). Směs byla zahřáta k teplotě varu a po 15 minutách byl přidán dimethylsulfát (6,1 ml; 64,45 mmol; ρ=1,33 g/ml). Reakční směs byla dále zahřívána při teplotě varu rozpouštědla pod zpětným chladičem přibližně 21 hodin. Po ukončení reakce byl přidán další THF a směs byla přefiltrována. Filtrát byl odpařen na rotační vakuové odparce a následně byl 3× vytřepán se směsí chloroform/voda. Organická vrstva byla vysušena pomocí bezvodého síranu sodného, přefiltrována a odpařena. Produkt byl dále čištěn pomocí sloupcové chromatografie v soustavě toluen. V této reakci bylo získáno 6,6 g oranžového oleje, což odpovídá 79 %. Reakce byla provedena dle publikovaného postupu.²⁵

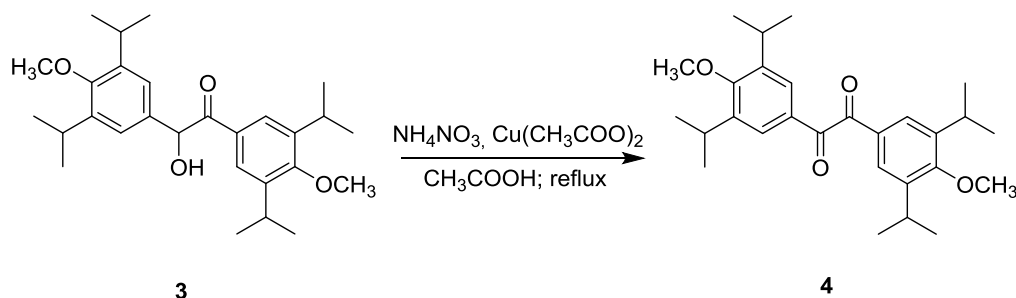
^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 9,93 (s, 1 H, CHO), 7,65 (s, 2 H, ArH), 3,79 (s, 3 H, CH_3), 3,35 (hept, $J = 6.8$ Hz, 2 H, CH), 1,27 (d, $J = 6.8$ Hz, 12 H, CH_3). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 191,9; 160,1; 143,0; 133,0; 126,3; 62,2; 26,6; 23,8; 23,8.

6.3 *Syntéza 1,2-bis(3,5-diisopropyl-4-methoxyfenyl)-2-hydroxy-ethan-1-onu (3)*



Aldehyd **2** (6,6 g; 29,96 mmol) byl rozpuštěn v bezvodém ethanolu (cca 75 ml). Dále byl přidán 5-(2-hydroxyethyl)-3,4-dimethylthiazolium jodid (427,1 mg; 1,50 mmol) a 1,8-diazabicyklo[5.4.0]undec-7-en (DBU; 0,23 ml; 1,50 mmol; $\rho=1,019$ g/ml). Reakce probíhala 3 hodiny při teplotě varu rozpouštědla pod zpětným chladičem. Během reakce docházelo ke změně barev, kdy z počátku byla směs červená, ale postupně se odbarvovala do žlutooranžova. Rozpouštědla byla následně odpařena a směs vytřepána směsí ethyl-acetát/voda. Organická vrstva byla vysušena síranem sodným, přefiltrována a odpařena. Výtěžek této reakce byl 6,28 g. Produkt nebyl dále charakterizován a byl využit přímo pro následující krok.

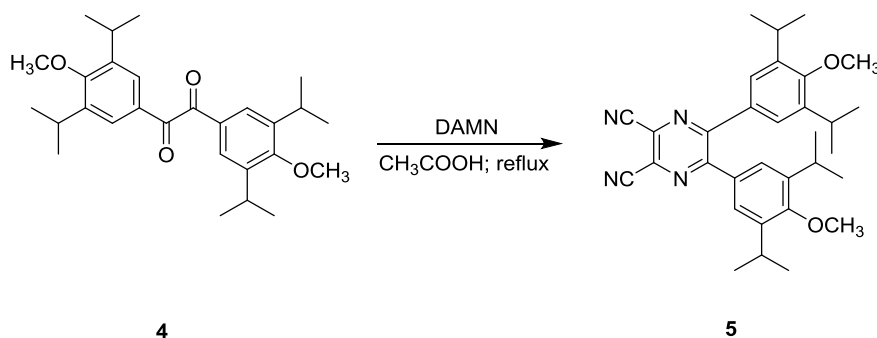
6.4 Syntéza 1,2-bis(3,5-diisopropyl-4-methoxyfenyl)ethan-1,2-dionu (4)



Acyloin **3** (6,28 g, cca 14,25 mmol) byl rozpuštěn v kyseliny octové (50 ml), dále byl přidán dusičnan amonný (1,44 g; 17,97 mmol) a octan měďnatý (29,9 mg; 0,15 mmol). Reakce probíhala 4 hodiny při teplotě varu rozpouštědla pod zpětným chladičem. Během reakce se změnilo zbarvení z počáteční zelené přes žlutou až na žlutozelenou. Po ukončení reakce byla kyselina octová odpařena, a zbytek vytřepán mezi ethyl-acetát a vodu. Organická vrstva byla vysušena síranem sodným, přefiltrována a na závěr odpařena. V dalším kroku byl produkt rozpuštěn v minimálním množství chloroformu, baňka byla doplněna benzínem (200 ml) a byla vložena na 5 dní do mrazničky. Po 5 dnech byla suspenze odfiltrována a získaná pevná látka byla dočištěna pomocí sloupcové chromatografie za použití soustavy toluen/chloroform 4:1. Bylo získáno 1,39 g čistého produktu ve formě nažloutlého prášku, což odpovídá výtěžku 21 % (po dvou krocích).

T. t. 162,6 - 163,9 °C. IČ (ATR): ν_{max} = 2966, 2931, 2871, 1663 (CO), 1593, 1461, 1418, 1364, 1305, 1163, 1112, 1005 cm^{-1} . ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 7,75 (s, 4 H, ArH), 3,80 (s, 6 H, OCH_3), 3,34 (hept, $J = 6.9$ Hz, 4 H, CH), 1,24 (d, $J = 6.9$ Hz, 24 H, CH_3). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 194,1; 160,5; 142,9; 129,8; 126,7; 62,3; 26,7; 23,8. Elementární analýza (%) vypočítáno pro $\text{C}_{28}\text{H}_{38}\text{O}_4$: C 76,68; H 8,73; nalezeno: C 76,49; H 9,44.

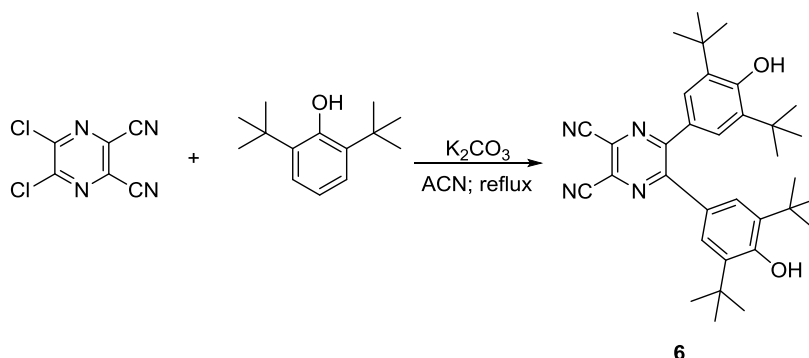
6.5 Syntéza 5,6-bis(3,5-diisopropyl-4-methoxyfenyl)pyrazin-2,3-dikarbonitrilu (5)



Diketon **4** (1,5 g, 3,42 mmol) byl rozpuštěn v kyselině octové (27 ml) a byl přidán diaminomaleonitril (1,45 g; 13,68 mmol). Reakce se zabarvila do červenooranžové barvy a probíhala 3 hodiny za teploty varu rozpouštědla pod zpětným chladičem. Po skončení reakce byla kyselina octová odpařena a produkt byl extrahován do acetonu. Produkt byl dále vyčištěn pomocí sloupcové chromatografie v soustavě benzín/ethylacetát 9:1 a překrystalizován ze směsi chloroform/benzín, kdy směs byla dána na několik dní do mrazničky. Výtěžek produktu byl 0,6 g světle žlutého prášku, což odpovídá 34 %.

T. t. 241,0 - 242,3 °C. IČ (ATR): ν_{max} = 2964, 2873, 2240 (CN), 1603, 1516, 1474, 1382, 1327, 1301, 1279, 1250, 1194, 1167, 1102, 1003 cm^{-1} . ^1H NMR (500 MHz, aceton- d_6) δ (ppm) 7,27 (s, 4 H, ArH), 3,72 (s, 6 H, OCH_3), 3,28 (hept, $J = 6.9$ Hz, 4 H, CH), 1,07 (d, $J = 6.9$ Hz, 24 H, CH_3). ^{13}C NMR (125 MHz, aceton- d_6) δ (ppm) 157,38; 157,36; 143,04; 133,21; 130,54; 127,05; 114,88; 62,54; 27,14; 24,06. Elementární analýza (%) vypočítáno pro $\text{C}_{32}\text{H}_{38}\text{N}_4\text{O}_2$: C 75,26; H 7,50; N 10,97; nalezeno: C 74,91; H 7,65; N 11,21.

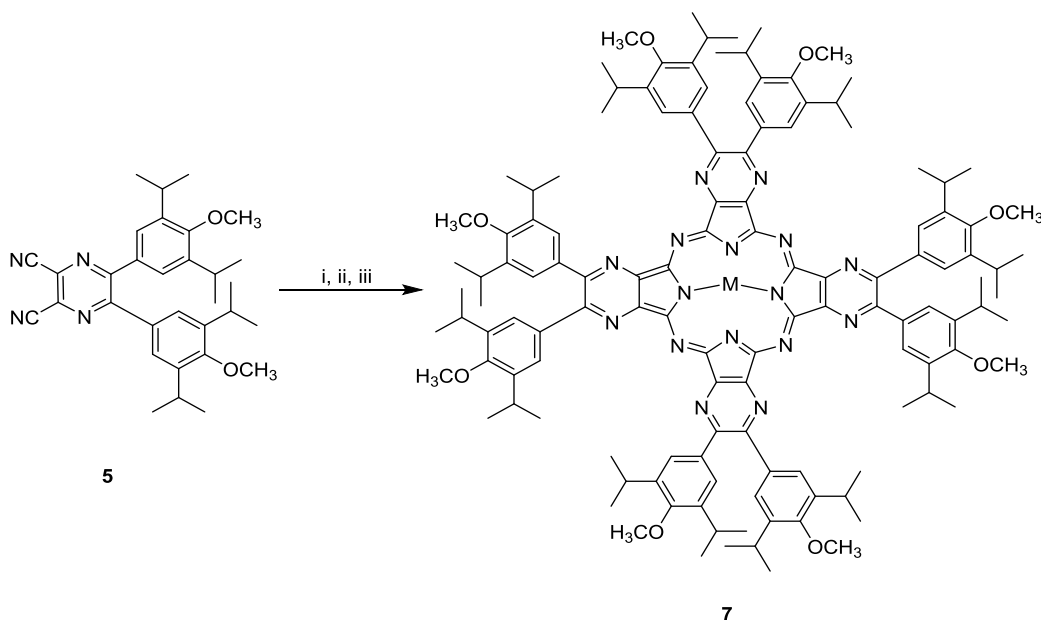
6.6 Syntéza 5,6-bis[3,5-di(*tert*-butyl)-4-hydroxyfenyl]pyrazin-2,3-dikarbonitrilu (6)



5,6-Dichloropyrazin-2,3-dikarbonitril (2 g; 10,05 mmol) byl rozpuštěn v bezvodém acetonitrilu (40 ml), byl přidán 2,6-di(*tert*-butyl)fenol (6,21 g; 30,15 mmol) a bezvodý uhličitán draselný (8,321 g; 60,30 mmol). Reakce probíhala pod argonem při teplotě varu rozpouštědla 25 hodin. Reakce se postupně zbarvila do tmavě fialové. Během reakce byly prováděny kontrolní TLC v soustavě toluen/*n*-hexan 2:1. Po skončení reakce byla směs nalita do vody a byla přidávána 1% HCl do kyselé reakce (došlo k zežloutnutí fialové směsi). Produkt byl následně extrahován do ethyl-acetátu, organická vrstva byla vysušena síranem sodným, zfiltrována a odpařena. Dále byl produkt vyčištěn pomocí sloupcové chromatografie (soustava toluen/*n*-hexan 2:1) a překrystalizován ze směsi chloroform/*n*-hexan, kdy směs byla dána na několik dní do mrazničky. Celkem bylo získáno 1,2 g žlutých krystalů, což odpovídá výtěžku 22 %. Reakce byla provedena dle publikovaného postupu s drobnými úpravami.¹⁹

T. t. 334,0 - 335,6 °C. IČ (ATR): ν_{max} = 3600 (OH), 2970, 2952, 2237 (CN), 1597, 1511, 1445, 1371, 1323, 1240, 1219, 1153 cm^{-1} . 1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 7,35 (s, 4 H, ArH), 5,54 (s, 2 H, OH), 1,32 (s, 36 H, CH_3). ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 156,3; 156,2; 136,5; 128,6; 126,9; 126,8; 113,6.

6.7 *Syntéza 2,3,9,10,16,17,23,24-oktakis(3,5-diisopropyl-4-methoxyfenyl)tetrapyrazinoporfyrazinato hořečnatého komplexu (7Mg)*



M = Mg, 2H, Zn
 i = Mg, BuOH, reflux
 ii = *p*-toluensulfonová kyselina, THF, LT
 iii = Zn(CH₃COO)₂, pyridin, reflux

Do destilační baňky byl k bezvodému butanolu (12 ml) přidán hořčík (85,9 mg; 3,5 mmol) a zrnko I₂. Reakce probíhala cca 3 hodiny při teplotě varu rozpouštědla pod zpětným chladičem, dokud veškerý hořčík nezreagoval na butanolát hořečnatý. Poté byl přidán dikarbonitril **5** (257,4 mg; 0,50 mmol) a reakce probíhala dále za stejných podmínek cca 20 hodin. Po ukončení byla reakce přelita do směsi methanol/voda/kyselina octová 10:10:1 (100 ml), zelená sraženina byla odfiltrována, a na filtru promyta tou samou směsí a následně vodou a methanolem. Dále následovala sloupcová chromatografie v soustavě chloroform/THF 50:1 a po ní druhá chromatografie v soustavě chloroform/THF 20:1. Celkem jsme získali 137 mg zelené pevné látky, což odpovídá výtěžku 53 %.

IČ (ATR): ν_{max} = 2962, 2871, 2828, 1632, 1536, 1462, 1366, 1311, 1286, 1254, 1236, 1197, 1168, 1099, 1061, 1013 cm⁻¹. MS (MALDI-TOF): m/z 2065,0 [M]⁺, vypočítáno pro C₁₂₈H₁₅₂MgN₁₆O₈: 2065,2. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃/pyridin-d₅) δ (ppm) 7,83 (s, 16 H, ArH), 3,89 (s, 24 H, OCH₃), 3,50 (hept, J = 6.8 Hz, 16 H, CH), 1,31 (d, J = 6.8

Hz, 96 H, CH₃). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃/pyridin-d₅) δ (ppm) 156,0; 155,3; 151,2; 148,9; 142,1; 136,1; 127,3; 62,4; 26,7; 24,3. UV/Vis (THF): λ_{max} (ε) = 651 (385 400), 624 (43 600), 591 (46 400), 383 nm (176 100 dm³ mol⁻¹ cm⁻¹). Elementární analýza (%) vypočítáno pro C₁₂₈H₁₅₂MgN₁₆O₈ + 3 H₂O: C 72,48; H 7,51; N 10,57; nalezeno: C 72,36; H 8,01; N 10,51.

6.8 *Syntéza 2,3,9,10,16,17,23,24-oktakis(3,5-diisopropyl-4-methoxyfenyl)tetrapyrazinoporfyrazinu (7H)*

Hořecnatý komplex **7Mg** (87,7 mg; 0,043 mmol) byl rozpuštěn v chloroformu (10 ml). V druhé kádince byla rozpuštěna kyselina *p*-toluensulfonová (81,6 mg; 0,423 mmol) v THF (10 ml) a byla přidána k chloroformovému roztoku. Reakce byla míchána za laboratorní teploty, a její průběh byl sledován pomocí TLC (soustava chloroform/THF 50:1). Přibližně po hodině byla rozpouštědla odpařena a produkt byl promyt vodou a následně přefiltrován. Dále následovala sloupcová chromatografie v soustavě chloroform/toluen/THF 25:25:1, po níž jsme získali 77 mg (88 %) zelené pevné látky.

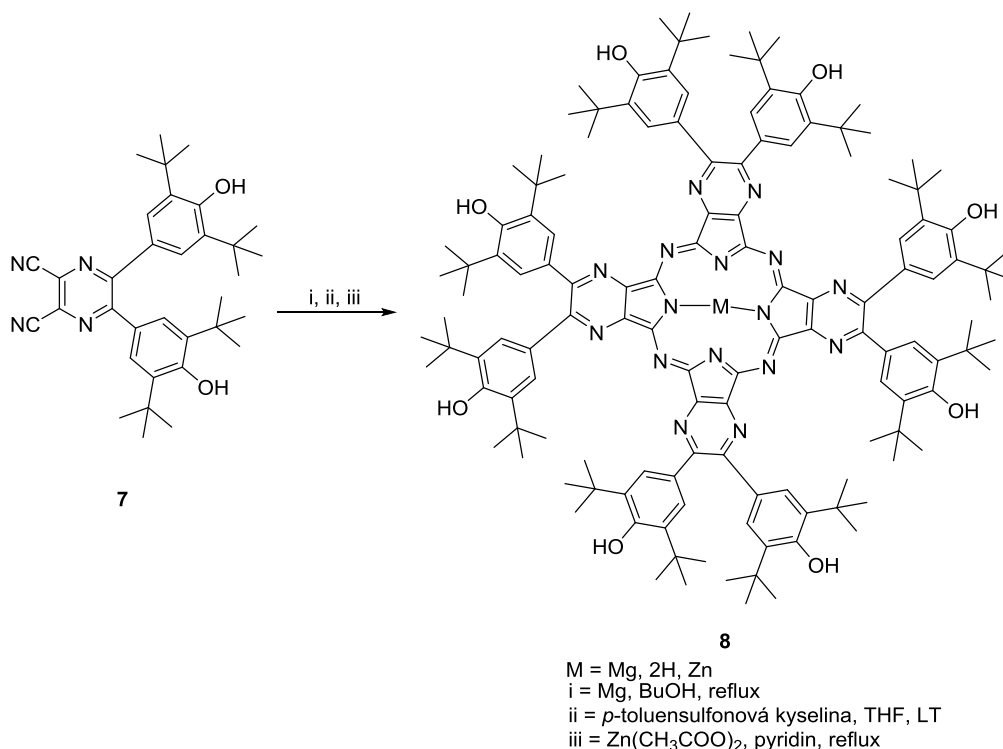
IČ (ATR): ν_{max} = 3305 (NH), 2964, 2870, 2829, 1633, 1543, 1460, 1364, 1311, 1286, 1225, 1200, 1169, 1011 cm⁻¹. MS (MALDI-TOF): m/z 2043,1 [M]⁺, vypočítáno pro C₁₂₈H₁₅₄N₁₆O₈: 2043,2. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃/pyridin-d₅) δ (ppm) 7,84 (s, 16 H; ArH), 3,88 (s, 24 H, OCH₃), 3,49 (hept, J = 6.9 Hz, 16 H, CH), 1,30 (d, J = 6.9 Hz, 96 H, CH₃), -0.77 (bs, 2 H, NH). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃/pyridin-d₅) δ (ppm) 157,8; 155,7; 146,7; 142,3; 135,6; 127,3; 62,4; 26,8; 24,2 (jeden aromatický signál nebyl detekován). UV/Vis (THF): λ_{max}(ε) = 668 (146 400), 639 (121 700), 612 (41 200), 588 (31 800), 470 (42 400), 369 nm (113 700 dm³ mol⁻¹ cm⁻¹). Elementární analýza (%) vypočítáno pro C₁₂₈H₁₅₄N₁₆O₈ + 3 H₂O: C 73,25; H 7,68; N 10,68; nalezeno: C 73,52; H 8,13; N 10,79.

6.9 *Syntéza 2,3,9,10,16,17,23,24-oktakis(3,5-diisopropyl-4-methoxyfenyl)tetrapyrazinoporfyrazinato zinečnatého komplexu (7Zn)*

Bezkovový derivát **7H** (35 mg; 0,017 mmol) byl rozpuštěn v pyridinu (5 ml). Poté byl přidán bezvodý octan zinečnatý (31,7 mg; 0,173 mmol) a reakce byla zahřívána hodinu za teploty varu rozpouštědla pod zpětným chladičem. Po ukončení reakce byl pyridin odpařen, byla přidána voda a produkt byl odfiltrován. Dále následovala sloupcová chromatografie v soustavě chloroform/toluen/THF 25:25:1, po níž jsme získali 32 mg (89 %) zelené pevné látky.

IČ (ATR): ν_{max} = 3962, 2870, 2831, 1633, 1537, 1461, 1369, 1310, 1286, 1236, 1197, 1168, 1099, 1061, 1012 cm^{-1} . MS (MALDI-TOF): m/z 2105,0 $[\text{M}]^+$, vypočítáno pro $\text{C}_{128}\text{H}_{152}\text{N}_{16}\text{O}_8\text{Zn}$: 2105,1. ^1H NMR (300 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{pyridin-d}_5$) δ (ppm) 7,79 (s, 16 H, ArH), 3,84 (s, 24 H, OCH_3), 3,53-3,36 (m, 16 H, CH), 1,25 (d, J = 6.8 Hz, 96 H, CH_3). ^{13}C NMR (75 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{pyridin-d}_5$) δ (ppm) 156,4; 155,3; 151,7; 148,3; 142,0; 135,9; 127,2; 62,3; 26,6; 24,1. UV/Vis (THF): $\lambda_{max}(\epsilon)$ = 648 (330 600), 588 (42 000), 375 nm ($153\,200\, \text{dm}^3\, \text{mol}^{-1}\, \text{cm}^{-1}$). Elementární analýza (%) vypočítáno pro $\text{C}_{128}\text{H}_{152}\text{N}_{16}\text{O}_8\text{Zn} + 5\, \text{H}_2\text{O}$: C 69,94; H 7,43; N 10,20; nalezeno: C 70,18; H 7,93; N 9,60.

6.10 *Syntéza 2,3,9,10,16,17,23,24-oktakis[3,5-di(terc-butyl)-4-hydroxyfenyl]tetrapyrazinoporfyrazinato hořečnatého komplexu (8Mg)*



K hořčiku (315,8 mg; 12,99 mmol) byl přidán bezvodý butanol (66 ml) a zrnko I₂. Reakce probíhala cca 3 hodiny při teplotě varu rozpouštědla pod zpětným chladičem, dokud veškerý hořčík nezreagoval na butanolát hořečnatý. Poté byl přidán dikarbonitril 7 (1 g; 1,86 mmol) a reakce probíhala dál za stejných podmínek cca 19 hodin. Po ukončení byla reakce přelita do směsi methanol/voda/kyselina octová 10:10:1 (300 ml), zelená sraženina byla odfiltrována a na filtru promyta tou samou směsí a následně vodou. Filtr byl poté vysušen za laboratorní teploty. Dále následovala sloupcová chromatografie v soustavě chloroform/THF 20:1 a produkt byl překrystalizován ze směsi chloroform/*n*-hexan, kdy směs byla dána na několik dní do mrazničky. Celkem bylo získáno 676,5 mg (67 %) zelené pevné látky.

IČ (ATR): ν_{max} = 3630 (OH), 2956, 1636, 1437, 1393, 1355, 1319, 1239, 1198, 1159, 11010, 1004 cm⁻¹. MS (MALDI-TOF): m/z 2177,1 [M]⁺, vypočítáno pro C₁₃₆H₁₆₈MgN₁₆O₈: 2177,3. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃/pyridin-d₅) δ (ppm) 8,03 (s, 16 H, ArH), 1,61 (s, 144 H, CH₃). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃/pyridin-d₅) nebyly

detekovány žádné signály. UV/Vis (THF): $\lambda_{\max} (\epsilon) = 657 (364\ 900), 596 (45\ 600), 465 (27\ 000), 391\ \text{nm} (171\ 000\ \text{dm}^3\ \text{mol}^{-1}\ \text{cm}^{-1})$. Elementární analýza (%) vypočítáno pro $\text{C}_{136}\text{H}_{168}\text{MgN}_{16}\text{O}_8 + 6\ \text{H}_2\text{O}$: C 71,41; H 7,93; N 9,80; nalezeno: C 71,21; H 8,28; N 9,53.

6.11 *Syntéza 2,3,9,10,16,17,23,24-oktakis[3,5-di(terc-butyl)-4-hydroxyfenyl]tetrapyrazinoporfyrazinu (8H)*

Hořečnatý komplex **8Mg** (175 mg; 0,08 mmol) byl rozpuštěn v chloroformu (10 ml). V druhé kádince byla rozpuštěna kyselina *p*-toluensulfonová (152,7 mg; 0,80 mmol) v THF (10 ml) a byla přidána k chloroformovému roztoku. Reakce probíhala za laboratorní teploty, a průběh reakce byl sledován pomocí TLC (chloroform/THF 25:1). Přibližně po 4 hodinách byla rozpouštědla odpařena, byla přidána voda a zelená sraženina odfiltrována a promyta vodou. Filtr byl poté vysušen za laboratorní teploty. Čištění bylo provedeno pomocí sloupcové chromatografie v soustavě chloroform/THF (50:1). Produkt byl nakonec rozpuštěn v minimálním množství chloroformu a vysrážen přidáním *n*-hexanu. Bylo získáno celkem 159 mg (92 %) zelené pevné látky.

IČ (ATR): $\nu_{\max} = 3633\ (\text{OH}), 3301\ (\text{NH}), 2955, 2871, 1635, 1598, 1541, 1434, 1400, 1353, 1319, 1255, 1238, 1223, 1150, 1110, 1015\ \text{cm}^{-1}$. MS (MALDI-TOF): $m/z\ 2155,2\ [\text{M}]^+$, vypočítáno pro $\text{C}_{136}\text{H}_{170}\text{N}_{16}\text{O}_8$: 2155,3. $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{pyridin-d}_5$) δ (ppm) 8,07 (s, 16 H, ArH), 6,78 (bs, 8 H, OH), 1,64 (s, 144 H, CH_3), -0.69 (bs, 2 H, NH). $^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{pyridin-d}_5$) δ (ppm) 158,0; 155,7; 146,2; 137,5; 131,0; 128,2; 34,9; 30,7 (jeden aromatický signál nebyl detekován). UV/Vis (THF): $\lambda_{\max} (\epsilon) = 676 (174\ 500), 650 (128\ 300), 621 (47\ 200), 599 (38\ 400), 519 (45\ 600), 384\ \text{nm} (118\ 400\ \text{dm}^3\ \text{mol}^{-1}\ \text{cm}^{-1})$. Elementární analýza (%) vypočítáno pro $\text{C}_{136}\text{H}_{170}\text{N}_{16}\text{O}_8 + 4\ \text{H}_2\text{O}$: C 73,28; H 8,05; N 10,05; nalezeno: C 73,66; H 8,42; N 9,71.

6.12 *Syntéza 2,3,9,10,16,17,23,24-oktakis[3,5-di(terc-butyl)-4-hydroxyfenyl]tetrapyrazinoporfyrazinato zinečnatého komplexu (8Zn)*

Bezkovový derivát **8H** (78 mg; 0,036 mmol) byl rozpuštěn v pyridinu (10 ml). Poté byl přidán bezvodý octan zinečnatý (66,2 mg; 0,36 mmol) a reakce byla zahřívána hodinu za teploty varu rozpouštědla pod zpětným chladičem. Po ukončení reakce byl pyridin odpařen, byla přidána voda a produkt byl odfiltrován. Čištění bylo provedeno pomocí sloupcové chromatografie v soustavě chloroform/THF 25:1. Bylo získáno celkem 43 mg (54 %) zelené pevné látky.

IČ (ATR): ν_{max} = 3639 (OH), 2956, 2871, 1635, 1601, 1540, 1440, 1356, 1318, 1238, 1159, 1103, 1005 cm^{-1} . MS (MALDI-TOF): m/z 2217,1 $[\text{M}]^+$, vypočítáno pro $\text{C}_{136}\text{H}_{168}\text{N}_{16}\text{O}_8\text{Zn}$: 2217,3. ^1H NMR (300 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{pyridin-}d_5$) δ (ppm) 8,06 (s, 16 H, ArH), 7,49 (s, 8 H, OH), 1,63 (s, 144 H, CH_3). ^{13}C NMR (75 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{pyridin-}d_5$) δ (ppm) 34,4; 30,1 (aromatické signály nebyly detekovány). UV/Vis (THF): λ_{max} (ϵ) = 654 (325 500), 595 (42 300), 460 (28 300), 384 nm (147 800 $\text{dm}^3 \text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$). Elementární analýza (%) vypočítáno pro $\text{C}_{136}\text{H}_{168}\text{N}_{16}\text{O}_8\text{Zn} + 3 \text{H}_2\text{O}$: C 71,82; H 7,71; N 9,85; nalezeno: C 71,76; H 8,28; N 9,64.

6.13 *Stanovení kvantového výtěžku fluorescence*

Kvantový výtěžek fluorescence byl měřen v různých rozpouštědlech. Bylo dbáno na to, aby absorbance roztoku v Q-pásmu byla vždy nižší než 0,1 a absorbance při excitační vlnové délce byla vždy nižší než 0,05, aby se omezilo zkreslení výsledků reabsorpcí emitovaného světla (tzv. „inner-filter effect“). Výpočet byl proveden podle následující rovnice (Rovnice 1)²⁶:

$$\Phi_F = \Phi_{FR} \left(\frac{F}{F_R} \right) \left(\frac{1 - 10^{-A_R}}{1 - 10^{-A}} \right) \left(\frac{n}{n_R} \right)^2$$

Rovnice 1 Rovnice pro stanovení kvantového výtěžku fluorescence.

Φ_F je kvantový výtěžek fluorescence, F je plocha pod křivkou emisního spektra, A je absorbance při vlnové délce excitace, n je index lomu rozpouštědla. Dolní index R značí

referenční vzorek, bez indexu znamená zkoumaný vzorek. Jako referenční látka byl použit nesubstituovaný zinečnatý ftalocyanin (Sigma-Aldrich) v THF ($\Phi_{FR} = 0,32$).²⁷ Emisní spektra byla korigována na odpověď detektoru přístroje.

6.14 Stanovení kvantového výtěžku singletového kyslíku

Měření kvantového výtěžku singletového kyslíku bylo provedeno v roztoku THF. Metoda měření je založena na detekci singletového kyslíku rozkladem specifické sondy 1,3-difenyliisobenzofuranu (DPBF). Jako referenční vzorek byl použit nesubstituovaný zinečnatý ftalocyanin v THF ($\Phi_{\Delta(\text{THF})}=0,53$)²⁸. Zásobní roztok DPBF (2,5 ml, 5×10^{-5} M) byl převeden do kyvety (10 mm \times 10 mm) a roztok byl sycen kyslíkem po dobu 1 minuty. Poté bylo přidáno určité množství vzorku zkoumaného roztoku, aby výsledná hodnota absorbance v Q-pásmu byla přibližně 0,1. Následně byl roztok míchán na magnetické míchačce a po určený čas ozařován světlem z xenonové lampy (100 W, Newport). Světlo procházelo přes 2 filtry - vodní filtr (6 cm), a filtr OG530, díky kterým bylo odstraněno teplo z lampy a světlo o nižší vlnové délce než 523 nm. Pokles absorbance DPBF v roztoku po dobu ozařování byl monitorován při 415 nm a výpočet byl proveden dle rovnice 2. Všechna měření byla provedena třikrát, kdy odchylka měření byla $\pm 10 \%$.²⁹

$$\Phi_{\Delta}^S = \Phi_{\Delta}^R \frac{k^S I_{aT}^R}{k^R I_{aT}^S}$$

Rovnice 2 Rovnice pro stanovení kvantového výtěžku singletového kyslíku.

Φ_{Δ} je kvantový výtěžek singletového kyslíku; k je směrnice závislosti $\ln(A_0/A_t)$ na čase ozařování t, kde A_0 a A_t jsou absorbance DPBF při 415 nm před ozářením a po čase ozářením t; I_{aT} je celkové množství absorbovaného světla sloučeninou; indexy R a S značí referenční vzorek a zkoušený vzorek.

I_{aT} se vypočítá jako součet intenzit absorbovaného světla I_a v rozmezí vlnových délek od 523 do 850 nm (po 0,5 nm). Světlo pod 523 nm je zcela pohlceno filtrem OG530 a světlo nad 850 nm není absorbováno zkoušenými sloučeninami. I_a bylo vypočítáno podle Beerova zákona (Rovnice 3):

$$I_a = I_0(1 - e^{-2,3 A})$$

Rovnice 3 Beerův zákon.

Kde I_0 je transmitance filtru při určité vlnové délce, A je absorbance měřeného vzorku při této vlnové délce.

6.15 *Titrace*

Zkoumání vlivu fenolátového iontu na absorpční a fluorescenční vlastnosti AzaPc bylo provedeno pomocí titrací roztoků zkoumaných AzaPc organickou bází TBAH. Nejprve byl připraven zásobní roztok TBAH (5 mM) v acetonitrilu (ACN, Merck). Zásobní roztok zkoumaných vzorků byl připraven rozpuštěním **7Zn** a **8Zn** v THF, roztok byl mírně zahřát a přefiltrován do vialky. K 2,5 ml ACN v kyvetě s míchadlem bylo přidáno potřebné množství (cca 10 - 30 μ l) zásobního roztoku **7Zn** nebo **8Zn**, tak aby dle absorpčního spektra byla výsledná koncentrace měřených roztoků 1 μ M. Poté byl tento roztok míchán na magnetické míchačce a byla měřena absorpční a emisní spektra po 7 μ l přidavcích zásobního TBAH. Na závěr bylo přidáno 7 μ l 99% kyseliny octové.

7. DISKUZE

Tato práce se zabývá AzaPc, což je označení pro aza-analogy ftalocyaninů (zde se jedná o tetrapyrazinoporfyraziny). AzaPc nacházejí využití ve fotodynamické terapii, dále jako zhášče fluorescence a senzory.³⁰

Po přijetí kvanta energie ve formě fotonu se dostávají AzaPc do excitovaného stavu. Při přechodu z tohoto stavu zpět do základního může dojít k emisi fotonu (jev nazývaný fluorescence) nebo dojde k předání energie jiné molekule. Pokud AzaPc obsahuje na periférii donorový atom (např. dialkylamino skupiny), dochází k ICT. Pro ICT je důležité, aby donorová část byla v konjugaci s akceptorem (jádro AzaPc). ICT je ovlivněno prostředím a jak již bylo řečeno, strukturou molekuly. Naši skupinou byly v minulosti zkoumány rozsáhle dialkylamino skupiny jako donory.² Jako další potenciální donorová skupina je v literatuře zmiňován fenol a zejména pak fenolátový ion (viz Teoretická část), jejichž přechody mezi sebou umožňují přepínání mezi ON a OFF stavy u senzorů. Proto jsme se rozhodli pro přípravu aza-analogů s fenolickou skupinou přímo konjugovanou s akceptorovým systémem.

Cílem mé práce bylo připravit 2 prekurzory, které poslouží pro přípravu finálních AzaPc. První AzaPc (**8**) obsahuje na periférii 8 fenolických skupin, což znamená, že může docházet k ICT. Kdežto u druhého AzaPc (**7**) se nachází na periférii 8 methylovaných fenolických skupin. Tím došlo k zablokování donorového kyslíkového atomu. Tato látka byla využita jako negativní kontrola při našich experimentech.

7.1 *Syntéza*

Syntetická část se skládala ze dvou hlavních kroků - syntéza prekurzorů a jejich následná cyklotetramerizace.

První prekurzor (**6**) byl připraven reakcí 5,6-dichlorpyrazin-2,3-dikarbonitrilu s 2,6-di(*tert*-butyl)fenolem (Schéma 14). Vzhledem k objemným substituentům v *ortho* poloze je fenolická skupina zablokována (kyslík se v tomto případě nechová jako *O*-nukleofil). Probíhá tedy substituce v *para* poloze, kde je zde výrazný parciální náboj δ^- .¹³ Při reakci s 5,6-dichlorpyrazin-2,3-dikarbonitrem, který má silně elektrondeficitní uhlíky v polohách 2 a 3, tak vzniká prekurzor s periferním substituentem připojeným

C-C vazbou. Naší snahou byla úprava reakčních podmínek za účelem vyšších výtěžků. Měnili jsme zejména rozpouštědlo - pyridin, bezvodý DMF a bezvodý ACN. Reakce s pyridinem a DMF měly nízké výtěžky, proto jsme se rozhodli pro první krok, kde byl rozpouštědlem bezvodý ACN. Výtěžek této reakce byl 22 %.

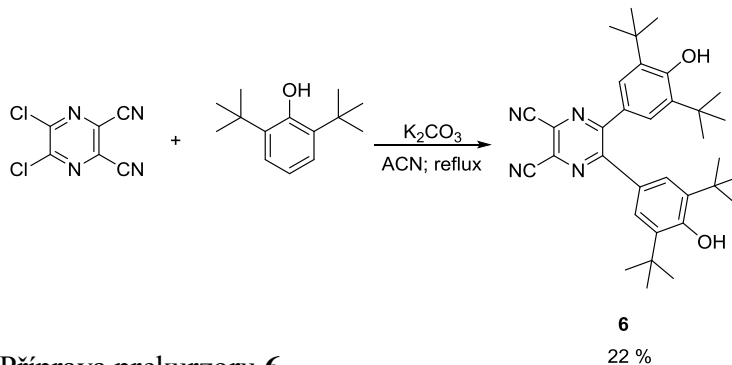


Schéma 14 Příprava prekurzoru **6**.

Dalším naším krokem bylo připravit druhý prekurzor, který bude mít fenolickou skupinu zablokovanou alkylem. Rozhodli jsme se pro přípravu prekurzoru **5**, který bude nést méně objemné isopropyly v polohách 2 a 3 (Schéma 15). Avšak syntéza nebyla jednoduchá jako u prvního prekurzoru. Pokud by se analogicky nechal reagovat 5,6-dichlorpyrazin-2,3-dikarbonitril s 2,6-diisopropylfenolem, fenolická skupina by se chovala jako *O*-nukleofil, což bylo nežádoucí¹⁵. Tato reakce byla již dříve popsána v několika publikacích a vždy docházelo pouze ke vzniku substituovaného etheru.^{31,32,33} Proto jsme zvolili alternativní postup zahrnující kondenzaci vhodně substituovaného diketonu s diaminomaleonitrilem (DAMN). Na začátku byl připraven aldehyd **1** pomocí Vielsmeier-Haackovy formylace methenaminem. Aldehyd **1** byl následně methylován pomocí dimethylsulfátu. Dalším krokem byla benzoinová kondenzace s thiazoliovou solí jako katalyzátorem, kdy vznikl acyloin **3**. Při pokusu jej izolovat sloupcovou chromatografií ovšem docházelo postupně k oxidaci na diketon, a proto jsme se rozhodli izolovat až ten. Celá směs byla proto zoxidována na diketon **4**. Závěrečným krokem byla kondenzace diketonu **4** s DAMN v kyselém prostředí za vzniku námi požadovaného dikarbonitrilu **5**.

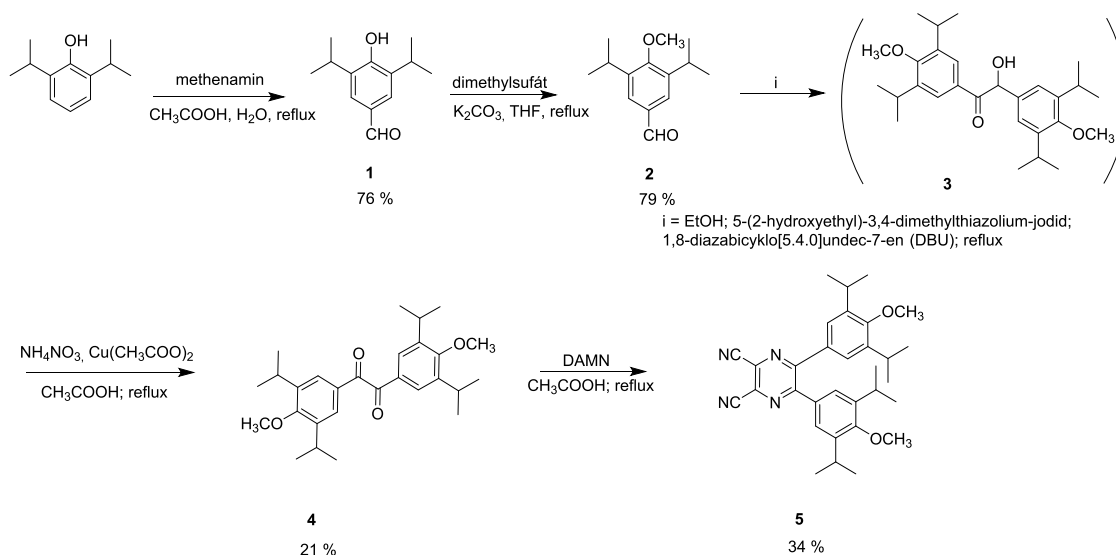


Schéma 15 Příprava prekursoru **5**.

Když jsme měli připravené oba prekuzory, následovala jejich cyklotetramerizace (Schéma 16). Oba prekuzory, **5** a **6**, poskytly s butanolátem hořečnatým jako iniciátorem reakce příslušné hořečnaté AzaPc (**7Mg**, **8Mg**). **7Mg** a **8Mg** byly odkoveny pomocí kyseliny *p*-toluensulfonové za vzniku bezkovového komplexu (**7H**, **8H**). Bezkovové komplexy **7H** a **8H** byly převedeny na příslušné zinečnaté komplexy (**7Zn**, **8Zn**) reakcí s octanem zinečnatým v pyridinu. Všechny komplexy posloužily následně k fotofyzikálnímu měření.

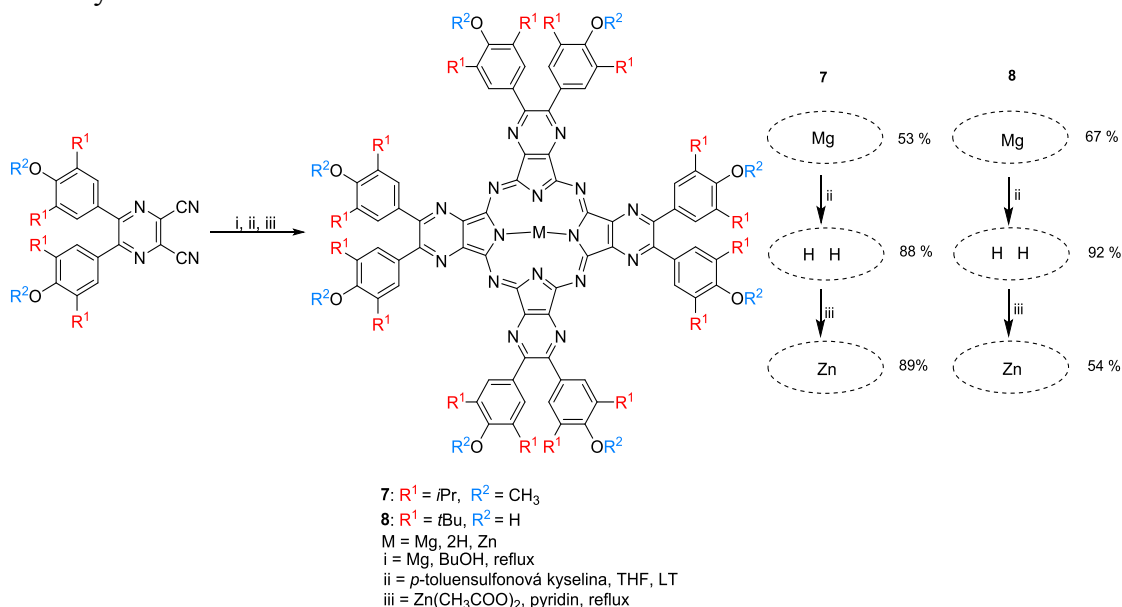
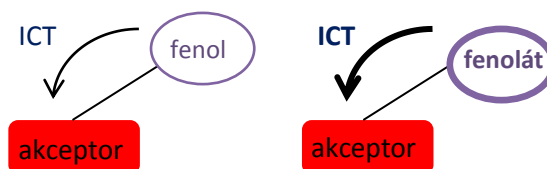


Schéma 16 Cyklotetramerizace prekuzorů a syntéza příslušných komplexů.

7.2 Fotofyzikální vlastnosti a UV/Vis spektrofotometrie

Celá tato práce se zabývá předpokladem, že fenolická skupina se chová jako slabý donor a může tedy potenciálně docházet k ICT, i když velice slabému. Po převedení na fenolát by pak síla donoru vzrostla, což by se projevilo snížením fluorescence (Obr. 9).



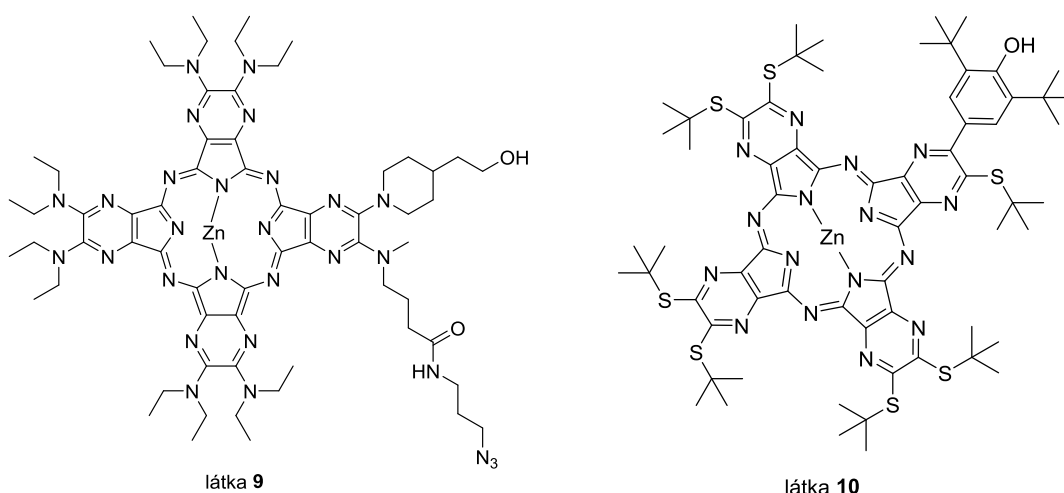
Obr. 9 ICT - znázornění skupin, u kterých dochází k ICT. Fenolickou skupinu označujeme jako slabý donor, protože je možno vidět mírný pokles fluorescence. Kdežto fenolát můžeme označit silným donorem, jelikož fluorescence je zde velmi slabá a ICT se stává preferovaným dějem.

Sledovali jsme chování AzaPc v různých rozpouštědlech o rozdílné polaritě, dále jsme měřili kvantové výtěžky fluorescence a singletového kyslíku a provedli titrace s organickou bází TBAH. Do fotofyzikálního měření jsme zahrnuli oba připravené AzaPc (**7Mg, H, Zn; 8Mg, H, Zn**), kdy první AzaPc sloužil jako negativní kontrola, kde ICT neprobíhá.

U komplexů látek **7** a **8** byly měřeny kvantové výtěžky fluorescence a singletového kyslíku v THF. Za ideálních podmínek by součet kvantových výtěžků fluorescence a singletového kyslíku měl být roven 1, pokud by nedocházelo k dalším deaktivacím procesům. Z dat v Tabulce 1 můžeme usoudit, že u komplexů **8** dochází ke slabému ICT. Součty kvantových výtěžků jsou totiž vždy nižší než u odpovídajících derivátů **7**, které nesou na periferii zablockované fenolické skupiny. V porovnání s látkou **9** (Obr. 10)³⁴, která má na periferii dialkylaminové skupiny a chová se jako silný donor, je ale ICT u **8** extrémně slabý. Součet Φ_F a Φ_A je u látky **9** téměř nula, kdežto u **8Zn** (nesoucí fenolické skupiny na periferii) je přibližně 27× vyšší. U bezkovových derivátů jsou nízké součty kvantových výtěžků z jiného důvodu než kvůli ICT z periferních substituentů. Je to typické i pro jiné AzaPc²⁷, i když tyto důvody ještě nebyly zcela objasněny.

Tabulka 1 Fotofyzikální data všech derivátů **7**, **8** (měřeno v THF) a látky **9**.

Látka	λ_{\max} (ϵ)	λ_F	Φ_F	Φ_A	Φ_{F+A}
8Mg	657 (364 900)	662	0,604	0,215	0,819
7Mg	651 (385 400)	656	0,701	0,258	0,959
8H	676 (174 500)	663	0,0016	0,005	0,007
	650 (120 300)				
7H	668 (146 400)	672	0,254	0,096	0,350
	639 (121 700)				
8Zn	654 (325 500)	661	0,250	0,440	0,690
7Zn	648 (330 600)	654	0,320	0,560	0,880
9	-	-	0	0,025	0,025



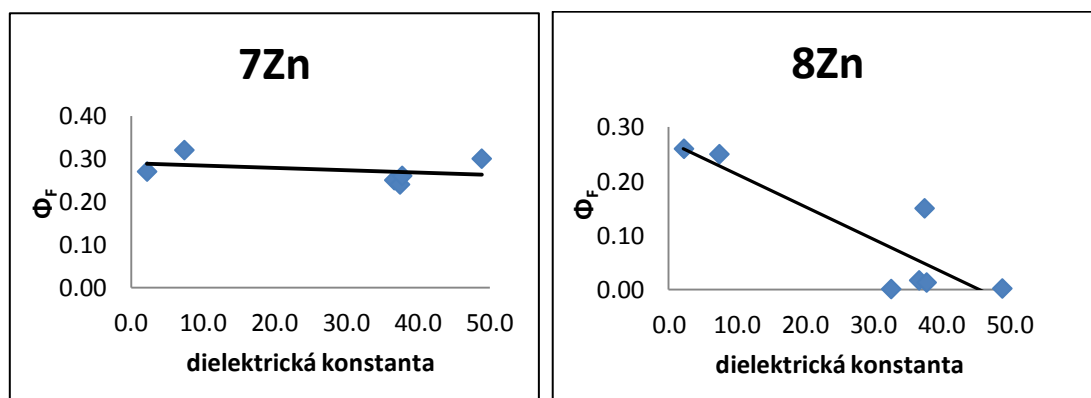
Obr. 10 Struktury dalších diskutovaných AzaPc.^{34,35}

Jak jsem zmínila v úvodu, ICT je ovlivněno prostředím, daleko snáze probíhá v polárním prostředí³⁶, tzn. dá se očekávat pokles kvantových výtěžků se zvyšující se polaritou. Abychom dále potvrdili, že fenol se opravdu chová jako slabý donor, sledovali jsme vliv rozpouštědel o různé polaritě na Φ_F u látek **7Zn** a **8Zn** (Graf 1, Tabulka 2). Pro porovnání je zde uvedena i látka **10** s jednou fenolickou skupinou na periferii (připravena v rámci jiné diplomové práce³⁵). Když se podíváme na hodnoty Φ_F v jednotlivých rozpouštědlech, tak vidíme, že u nejméně polárního dioxanu se prakticky hodnoty Φ_F studovaných látek neliší. Kdežto u polárnějšího DMF vidíme, že u komplexu **8Zn** je pokles kvantového výtěžku fluorescence přibližně 10× větší než u komplexu s jednou fenolickou skupinou (látka **10**, Obr. 10), u látky **7Zn** se hodnoty Φ_F

změnily jen nepatrně oproti dioxanu. Pokud porovnáme nejvíce polární DMSO s nejméně polárním dioxanem, u **8Zn** je zde pokles téměř na nulu, kdežto u **7Zn** se hodnota kvantového výtěžku fluorescence téměř nezměnila. Obecně můžeme tedy říci, že na **7Zn** neměla polarita rozpouštědla vliv, kdežto u **8Zn** je vliv jasně viditelný. U látky **10** je vliv polarity také detekovatelný, ovšem není tak výrazný díky přítomnosti pouze jedné fenolické skupiny. Tyto experimenty nepřímo potvrdily, že fenolická skupina je slabým donorem.

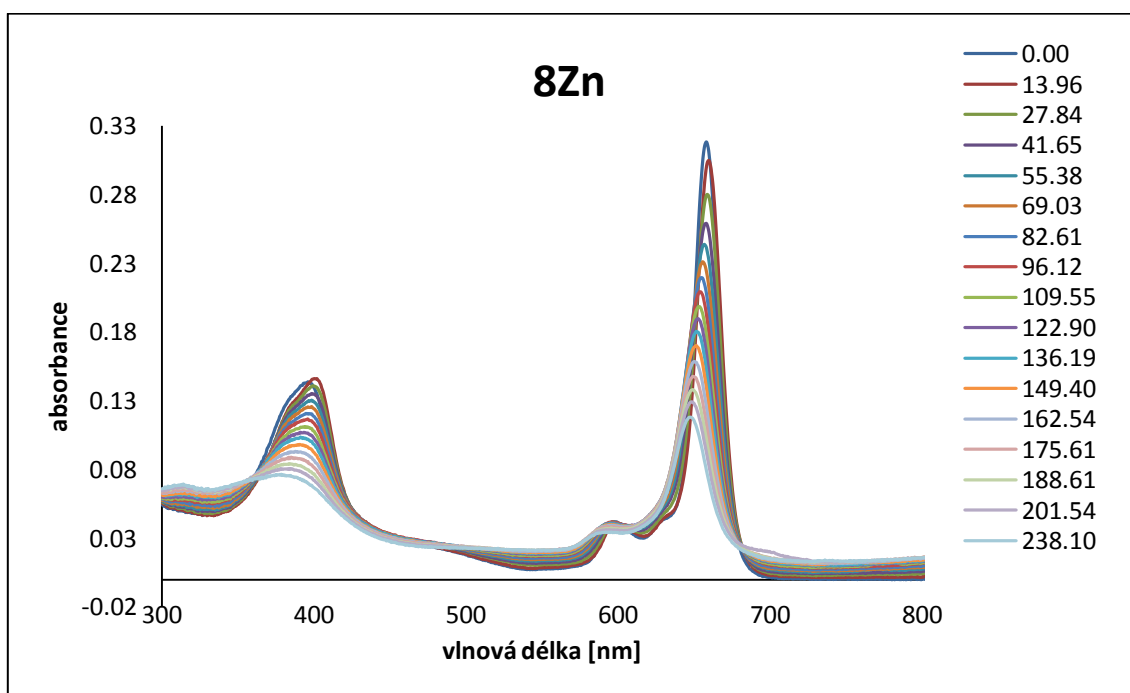
Tabulka 2 Závislost polarity rozpouštědla na kvantových výtěžcích fluorescence u zinečnatých derivátů **7**, **8** a látky **10**.

	dielektrická konstanta	Látka 10	8Zn	7Zn
dioxan	2,2	0,25	0,26	0,27
THF	7,4	0,28	0,32	0,32
Methanol	32,6	-	0,001	-
DMF	36,7	0,16	0,017	0,25
ACN	37,5	0,22	0,15	0,24
DMAC	37,8	0,14	0,013	0,26
DMSO	48,9	0,04	0,002	0,30

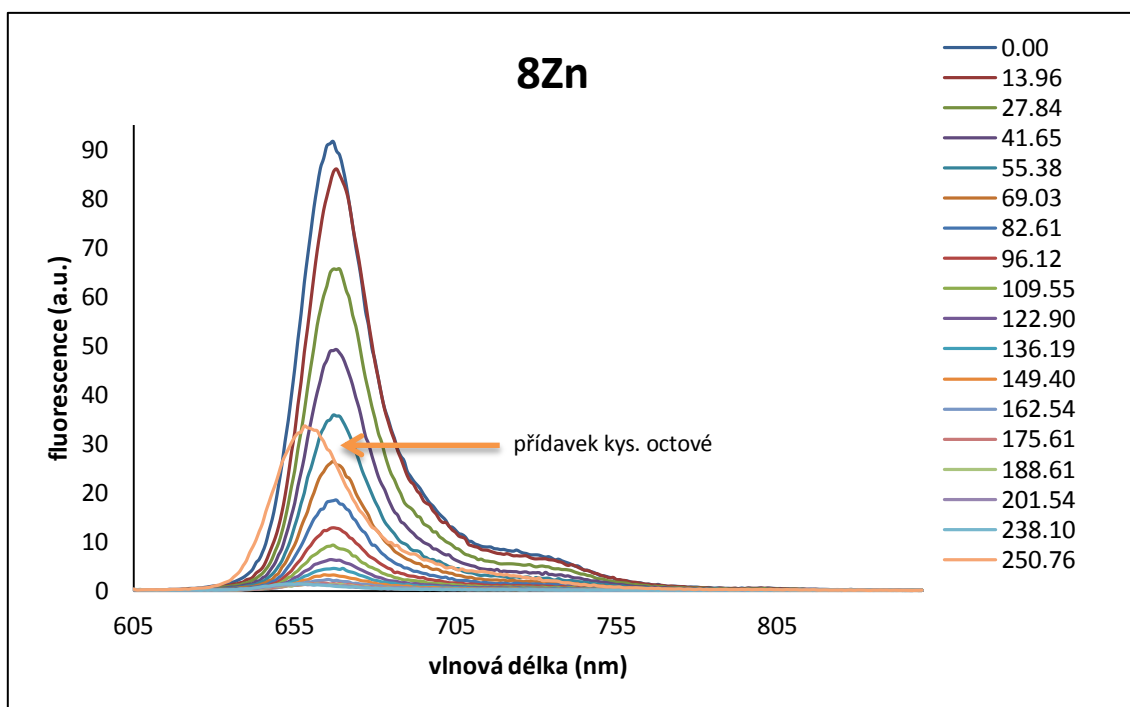


Graf 1 Závislost kvantových výtěžků fluorescence na polaritě různých rozpouštědel.

Předchozí experimenty potvrdily, že fenolická skupina se chová jako slabý donor. Proto jsme se rozhodli, že dalším krokem bude snaha zvýšit sílu donoru převedením na fenolát. Rozhodli jsme se pro titraci komplexů **7Zn** a **8Zn** v prostředí ACN, za přídavku baze TBAH. Po přídavcích TBAH došlo ke změnám jak v absorpčním, tak i fluorescenčním spektru. V absorpčním spektru dochází k poklesu hlavního absorpčního Q-pásu a jeho hypsochromnímu posunu. Nejsou zde jednoznačně viditelné isosbestické body, což vypovídá o tom, že se nejedná o jednoduchou rovnováhu pouze dvou forem (Graf 2). Předpokládáme, že po přídavcích TBAH dochází k postupné ionizaci jednotlivých fenolických skupin, tím pádem je teoreticky možná existence 9 forem o různém stupni ionizace (1 neionizovaná, 8 ionizovaných). Forem je samozřejmě výrazně více, pokud budeme brát v potaz i různé polohy ionizovaných skupin. U fluorescenčního spektra došlo pouze k poklesu intenzity prakticky k nule (Graf 3), tvar spektra a poloha fluorescenčního maxima se prakticky neměnily.

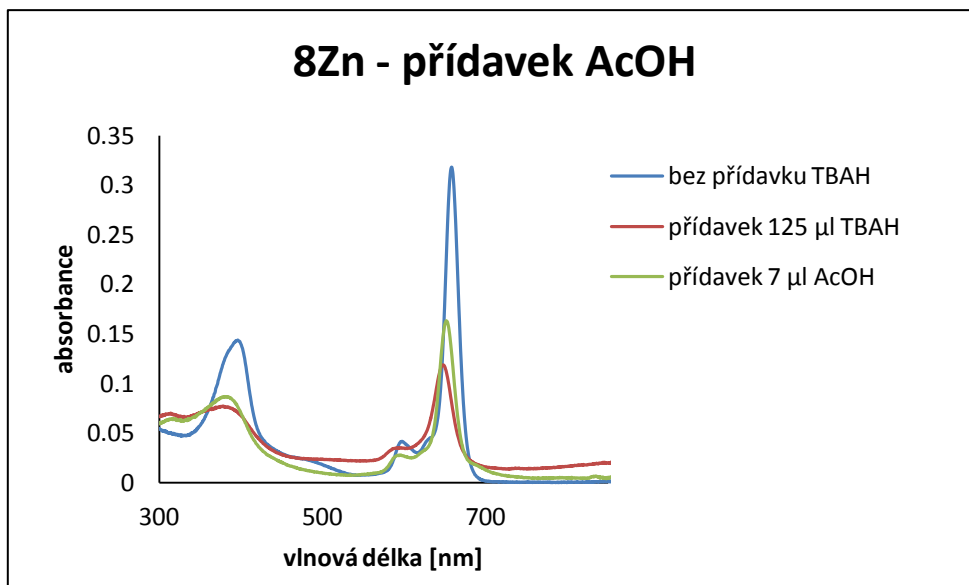


Graf 2 Změny v absorpčních spektrech **8Zn** v ACN při titraci bází TBAH (uvedené hodnoty jsou koncentrace TBAH v měřeném vzorku [μM]).



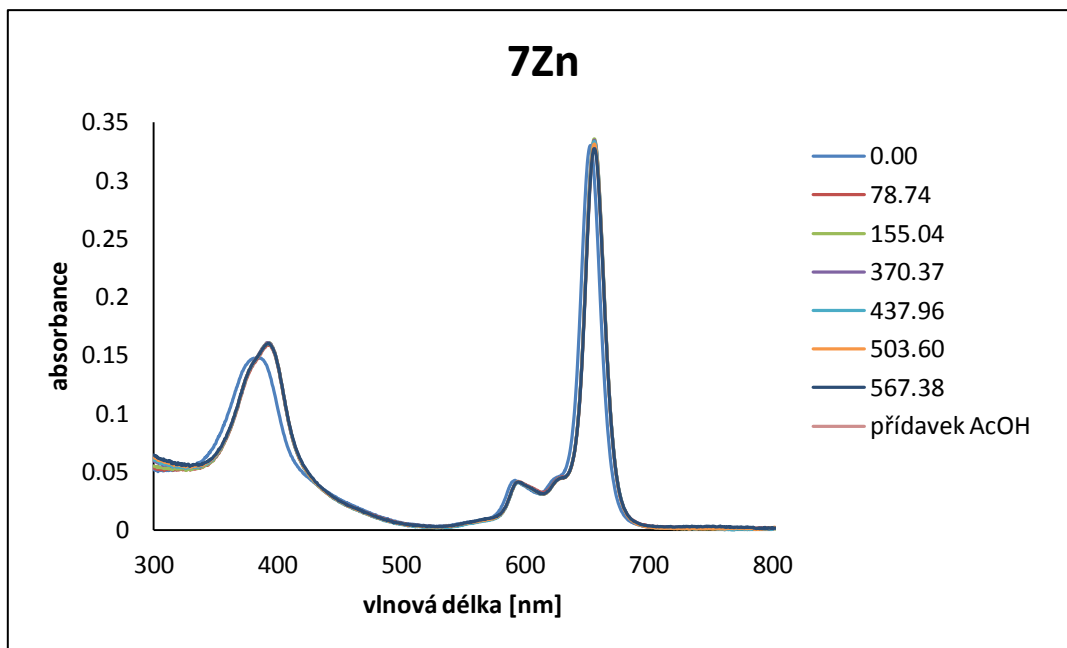
Graf 3 Změny ve fluorescenčních spektrech **8Zn** v ACN při titraci bazí TBAH (uvedené hodnoty jsou koncentrace TBAH v měřeném vzorku [μM]).

Po ukončení přidavků TBAH jsme na závěr přidali kyselinu octovou v přebytku (dojde zpět k protonizaci fenolátu) a pozorovali jsme, zda jsou změny indukované TBAH reverzibilní (Graf 3, Graf 4). U absorpčního spektra se hodnoty vrátily přibližně na původní třetinu, kdežto u fluorescenčního spektra můžeme vidět viditelnou změnu spektra – jak pokles intenzity, tak změna tvaru spektra. Obě pozorování naznačují, že změny indukované TBAH nejsou reverzibilní.

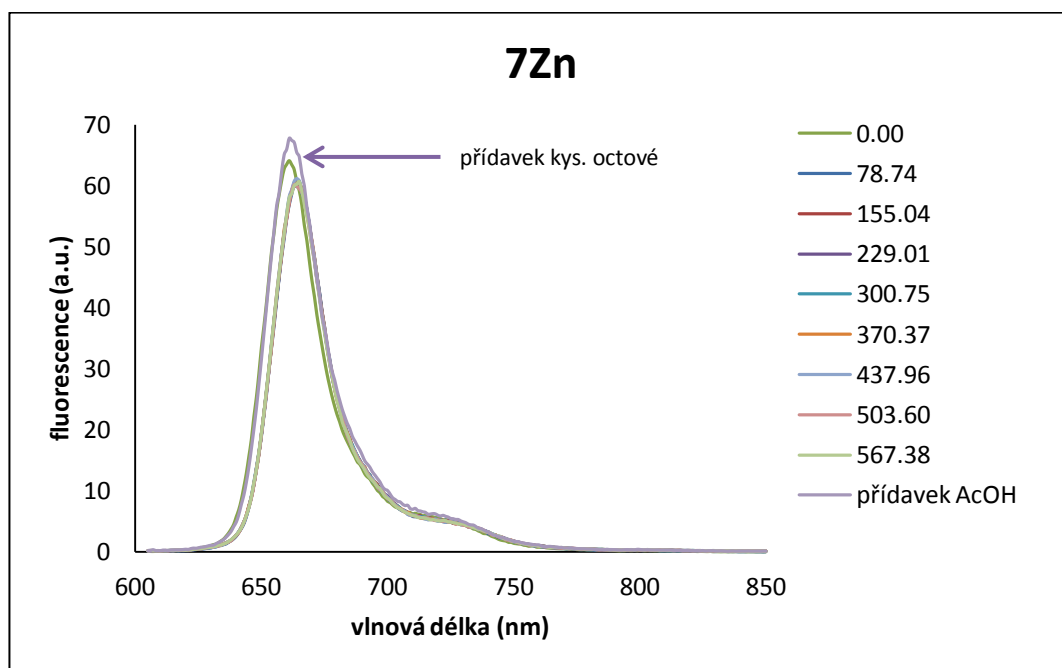


Graf 4 Absorpční spektrum **8Zn** před přidavkem TBAH, při posledním přidavku a po přidavku kyseliny octové.

Jako kontrolu jsme použili náš druhý komplex, **7Zn**, kde teoreticky není centrum, které by TBAH mělo ovlivňovat. Zde nedocházelo k natolik viditelným změnám ani v absorpčním (Graf 5), ani ve fluorescenčním spektru (Graf 6). Nepatrné změny, které pozorujeme na grafech, přisuzujeme koordinaci hydroxidových skupin z TBAH na centrální zinečnatý kation. Ke změně dochází totiž již po prvním přidavku, dále se spektrum nemění a změna je reverzibilní po přidavku kyseliny octové.



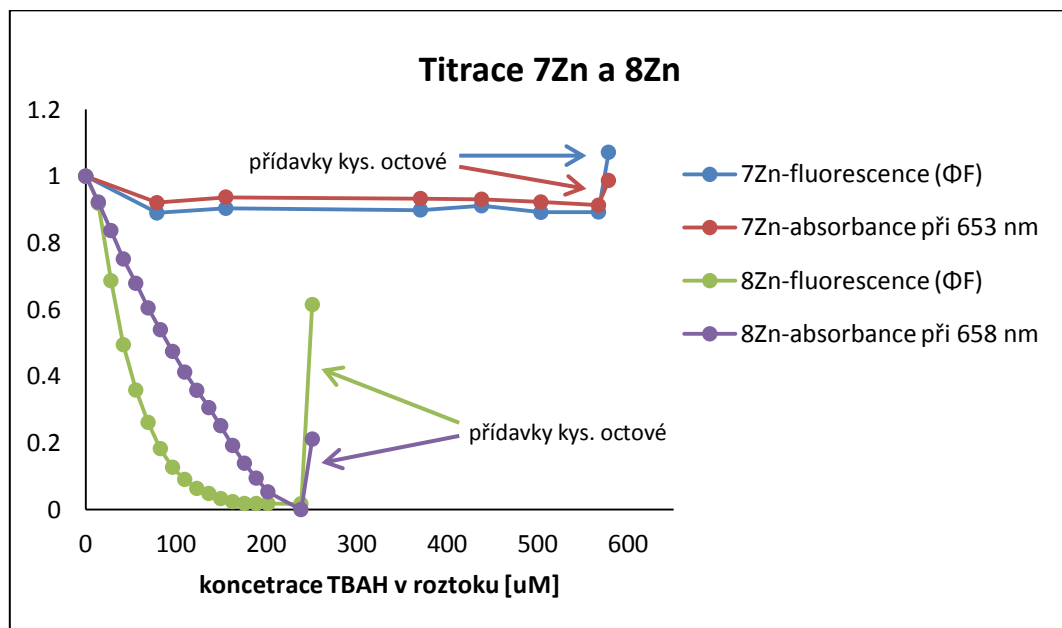
Graf 5 Změny absorpčního spektra **7Zn** v ACN při titraci TBAH (uvedené hodnoty jsou koncentrace TBAH v měřeném vzorku [μM]).



Graf 6 Změny ve fluorescenčních spektrech **7Zn** v ACN při titraci TBAH a po přidání kyseliny octové (uvedené hodnoty jsou koncentrace TBAH v měřeném vzorku [μM]).

V Grafu 7 můžeme pozorovat závislost absorpčních maxim a Φ_F na koncentraci TBAH v roztoku. U fluorescenční křivky **8Zn** můžeme pozorovat razantní pokles k nulovým hodnotám. Tento jev je způsoben deprotonizací fenolických skupin, kdy vznikají

fenolátové ionty, které se chovají jako silný donor a způsobují díky ICT snížení fluorescence. Fenolát jako donor je silný a zřejmě stačí deprotonizace jedné až dvou skupin k dosažení prakticky nulové fluorescence. Deprotonizace do vyššího stupně již fluorescence, která je na nule, ovlivnit nemůže. Kdežto když se podíváme na závislost absorpčních maxim na koncentraci TBAH (viz také Graf 2), můžeme pozorovat změny ve spektru díky deprotonizaci do vyšších stupňů neustále. Z tohoto důvodu nemají tyto dvě křivky shodný průběh.



Graf 7 Závislost normalizovaných absorpčních maxim a Φ_F na koncentraci TBAH v roztoku ACN.

8. ZÁVĚR

V mé diplomové práci jsem připravila AzaPc s fenolickými skupinami na periferii a k tomu příslušný kontrolní AzaPc, kde je fenol zablokován methylací. Oba AzaPc byly získány ve formě hořečnatého a zinečnatého komplexu i v bezkovové formě. Byla zjištěna závislost kvantového výtěžku fluorescence na polaritě rozpouštědla u AzaPc s fenolickými skupinami jako důsledek ovlivnění ICT. Látka, kde byly fenolické skupiny zablokovány alkylací, neměnila svoje vlastnosti. Fenol byl tak potvrzen jako velice slabý donor pro ICT u AzaPc. Dalšími experimenty bylo zjištěno, že fenolátový anion je silnějším donorem oproti fenolické skupině a jeho vznik je umožněn v bazickém prostředí. Fenol/fenolátový pár lze proto využít k návrhu nových senzorů reagujících poklesem fluorescence na zvýšení bazicity prostředí. Látka nesoucí osm fenolických skupin ovšem není pro tyto účely zcela vhodná kvůli ireverzibilitě celého procesu.

9. POUŽITÁ LITERATURA

1. LAKOWICZ, Joseph R. Principles of fluorescence spectroscopy. 3rd Ed., Springer Science & Business Media, New York, 2006. s. 960, ISBN 978-0387-31278-1.
2. NOVAKOVA, Veronika, et al. Ultrafast intramolecular charge transfer in tetrapyrazinoporphyrazines controls the quantum yields of fluorescence and singlet oxygen. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2010, 12(11): 2555-2563.
3. NOVAKOVA, Veronika, et al. Azaphthalocyanines: red fluorescent probes for cations. *Chem. Eur. J.*, 2013, 19(16): 5025-5028.
4. NOVAKOVA, Veronika, et al. Red-Emitting Dyes with Photophysical and Photochemical Properties Controlled by pH. *Chem. Eur. J.*, 2011, 17(50): 14273-14282.
5. LEMKE, Edward A.; SCHULTZ, Carsten. Principles for designing fluorescent sensors and reporters. *Nat. Chem. Biol.*, 2011, 7(8): 480-483.
6. BASABE-DESMONTS, Lourdes; REINHOUDT, David N.; CREGO-CALAMA, Mercedes. Design of fluorescent materials for chemical sensing. *Chem. Soc. Rev.*, 2007, 36(6): 993-1017.
7. SCHÄFERLING, Michael. The art of fluorescence imaging with chemical sensors. *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2012, 51(15): 3532-3554.
8. SIGMAALDRICH.COM, *Quantum dots* [online]. [cit. 19.02.2015]. Dostupné z: <<http://www.sigmaaldrich.com/materials-science/nanomaterials/quantum-dots.html>>
9. PARK, Moon Jeong. A pH-Responsive Molecular Switch with Tricolor Luminescence. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2015, 7(1): 704-712.
10. JOKIC, Tijana, et al. Highly photostable near-infrared fluorescent pH indicators and sensors based on BF₂-chelated tetraarylazadipyrrromethene dyes. *Anal. Chem.*, 2012, 84(15): 6723-6730.
11. KORNBLUM, Nathan; SELTZER, Raymond. Steric Hindrance as a Factor in the Alkylation of Ambident Anions: The Alkylation of Potassium 2,6-Di-*t*-butylphenoxide. *J. Am. Chem. Soc.*, 1961, 83(17): 3668-3671.
12. LE NOBLE, William J., et al. Chemical reactions under high pressure. XXII. Effect of pressure on the allylation of hindered phenoxides. *J. Org. Chem.*, 1971, 36(1): 193-196.
13. STAHLY, G. Patrick. Synthesis of unsymmetrical biphenyls by reaction of nitroarenes with phenols. *J. Org. Chem.*, 1985, 50(17): 3091-3094.
14. ALAM, N., et al. Electrosynthesis of unsymmetrical biaryls using a S_{RN} 1 type reaction. *Tetrahedron Lett.*, 1987, 28(49): 6171-6174.
15. WRIGHT, Jeremy; JORGENSEN, Eugene C. Synthesis of 2, 6-dialkylphenyl 4-nitrophenyl ethers from highly hindered phenols. *J. Org. Chem.*, 1968, 33(3): 1245-1246.

-
16. SAMMES, P. G.; THETFORD, D.; VOYLE, M. Displacement of an aromatic nitro group using phenoxides. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1987, (18): 1373-1374.
 17. NOVAKOVA, Veronika, et al. Role of Steric Hindrance in the Newman-Kwart Rearrangement and in the Synthesis and Photophysical Properties of Arylsulfanyl Tetrapyrazinoporphyrazines. *J. Org. Chem.*, 2014, 79(5): 2082-2093.
 18. BREWIS, Matthew, et al. The synthesis of some phthalocyanines and naphthalocyanines derived from sterically hindered phenols. *Chem. Eur. J.*, 1998, 4(9): 1633-1640.
 19. HILL, Jonathan P., et al. Antioxidant-substituted tetrapyrazinoporphyrazine as a fluorescent sensor for basic anions. *Chem. Commun.*, 2012, 48(33): 3951-3953.
 20. ISHIHARA, Shinsuke, et al. Reversible photoredox switching of porphyrin-bridged bis-2,6-di-tert-butylphenols. *J. Am. Chem. Soc.*, 2011, 133(40): 16119-16126.
 21. SHUNDO, Atsuomi, et al. Colorimetric visualization of acid–base equilibria in non-polar solvent. *Chem. Commun.*, 2013, 49(61): 6870-6872.
 22. TSURUMAKI, Eiji, et al. Peripheral Hexabromination, Hexaphenylation, and Hexaethynylation of meso-Aryl-Substituted Subporphyrins. *Chem. Eur. J.*, 2009, 15(1): 237-247.
 23. HAYASHI, Shin-ya, et al. Oxocyclohexadienylidene-Substituted Subporphyrins. *Angew. Chem.*, 2011, 123(14): 3311-3314.
 24. GEURINK, Paul P., et al. A Cleavable Linker Based on the Levulinoyl Ester for Activity-Based Protein Profiling. *Angew. Chem.*, 2010, 122(38): 6954-6957.
 25. SONG, Yuntao, et al. Synthesis, Structure-Activity Relationships, and in Vivo Evaluations of Substituted Di-tert-butylphenols as a Novel Class of Potent, Selective, and Orally Active Cyclooxygenase-2 Inhibitors. 1. Thiazolone and Oxazolone Series 1. *J. Med. Chem.*, 1999, 42(7): 1151-1160.
 26. BROUWER, Albert M. Standards for photoluminescence quantum yield measurements in solution (IUPAC Technical Report). *Pure Appl. Chem.*, 2011, 83(12): 2213-2228.
 27. ZIMCIK, Petr, et al. Magnesium azaphthalocyanines: an emerging family of excellent red-emitting fluorophores. *Inorg. Chem.*, 2012, 51(7): 4215-4223.
 28. KAESTNER, Lars, et al. Zinc octa-n-alkyl phthalocyanines in photodynamic therapy: photophysical properties, accumulation and apoptosis in cell cultures, studies in erythrocytes and topical application to Balb/c mice skin. *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2003, 2(6): 660-667.
 29. SVEC, Jan, et al. 1, 2, 5-Chalcogenadiazole-Annulated Tripyrazinoporphyrazines: Synthesis, Spectral Characteristics, and Influence of the Heavy Atom Effect on Their Photophysical Properties. *Eur. J. Org. Chem.*, 2015, 2015(3): 596-604.
 30. ZIMCIK, Petr. Azaftalocyaniny – od syntéz přes fotochemické a fotofyzikální vlastnosti k aplikacím. *Chem. Listy*, 2012, 106(4): 275-282.

-
31. MAKHSEED, Saad, et al. New highly soluble phenoxy-substituted phthalocyanine and azaphthalocyanine derivatives: Synthesis, photochemical and photophysical studies and atypical aggregation behavior. *Dyes Pigm.*, 2012, 95(2): 351-357.
32. NOVAKOVA, Veronika, et al. The synthesis, photochemical and photophysical properties of zinc aryloxy-and alkyloxy azaphthalocyanines. *Dyes Pigm.*, 2010, 87(2): 173-179.
33. MAKHSEED, Saad; SAMUEL, Jacob. The synthesis and characterization of zincphthalocyanines bearing functionalized bulky phenoxy substituents. *Dyes Pigm.*, 2009, 82(1): 1-5.
34. KOPECKY, Kamil, et al. Synthesis of new azaphthalocyanine dark quencher and evaluation of its quenching efficiency with different fluorophores. *Tetrahedron*, 2011, 67(33): 5956-5963.
35. LÁSKOVÁ, Miroslava, Syntéza azaftalocyaninů nesoucích jeden 2,6-di(*tert*-butyl)fenolický substituent , Diplomová práce, Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, plánovaný datum obhajoby 1.6.2015.
36. FAJARI, Lluis, et al. Intramolecular and intermolecular photoinduced electron transfer in isomeric mesoporphyrin nitrobenzyl esters: structure and solvent effects. *J. Photochem. Photobiol., A*, 1996, 93(2): 119-128.