

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



DIPLOMOVÁ PRÁCE

SYNTÉZA AZAFTALOCYANINŮ NESOUCÍCH JEDEN
2,6-DI(*TERC*-BUTYL)FENOLICKÝ SUBSTITUENT



Hradec Králové, 2015

Miroslava Lásková

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému školiteli doc. PharmDr. Petru Zimčíkovi, Ph.D. za ochotu, trpělivost a cenné rady při vzniku této práce. Dále bych chtěla poděkovat celému kolektivu Azaphthalocyanine group za příjemné a přátelské pracovní prostředí, především pak doc. PharmDr. Veronice Novákové, Ph.D. za její odborné rady a konzultace.

Za změření dat bych ráda poděkovala následujícím pracovníkům: Doc. PharmDr. Jiřímu Kunešovi, CSc. (NMR spektra), Ivě Vencovské (IČ spektra), Věnceslavě Hronové (elementární analýzy) a PharmDr. Juraji Lenčovi, Ph.D. (MS spektra).

Práce vznikla za finanční podpory projektu Specifického vysokoškolského výzkumu (SVV 260 183).

„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

.....

1. OBSAH

2.	ABSTRAKT	6
3.	ABSTRACT	7
4.	SEZNAM ZKRATEK	8
5.	CÍL PRÁCE.....	9
6.	TEORETICKÁ ČÁST	10
6.1	Luminiscence.....	10
6.2	Jablonského diagram	11
6.3	Fluorescenční vlastnosti látek	12
6.4	Přenos elektronu mechanismy PET a ICT	13
6.5	Fluorescenční senzory	14
6.6	Senzory založené na principu PET a ICT	15
7.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	18
7.1	Příprava 5-chlor-6-[3,5-di(terc-butyl)-4-hydroxyfenyl]pyrazin-2,3-dikarbonitrilu (1)	19
7.2	Příprava 5-terc-butylsulfanyl-6-[3,5-di(terc-butyl)-4-hydroxyfenyl]pyrazin-2,3-dikarbonitrilu (2).....	20
7.3	Příprava 5-oktylsulfanyl-6-[3,5-di(terc-butyl)-4-hydroxyfenyl]pyrazin-2,3-dikarbonitrilu (3).....	21
7.4	Příprava 5,6-bis(terc-butylsulfanyl)pyrazin-2,3-dikarbonitrilu (4)	22
7.5	Příprava 5,6-bis(oktylsulfanyl)pyrazin-2,3-dikarbonitrilu (5).....	23
7.6	Příprava 5-hydroxypyrazin-2,3-dikarbonitrilu (6)	24
7.7	Příprava 5-chlorpyrazin-2,3-dikarbonitrilu (7)	25
7.8	Příprava 5-[3,5-di(terc-butyl)-4-hydroxyfenyl]pyrazin-2,3-dikarbonitrilu (8).....	26
7.9	Příprava 2-[3,5-di(terc-butyl)-4-hydroxyfenyl]-3,9,10,16,17,23,24-heptakis(terc-butylsulfanyl)-1,4,8,11,15,18,22,25-(oktaaza)ftalocyaninu (9)	27
7.10	Příprava 2-[3,5-di(terc-butyl)-4-hydroxyfenyl]-3,9,10,16,17,23,24-heptakis(terc-butylsulfanyl)-1,4,8,11,15,18,22,25-(oktaaza)ftalocyaninato zinečnatého komplexu (10).....	28
7.11	Příprava 2-[3,5-di(terc-butyl)-4-hydroxyfenyl]-3,9,10,16,17,23,24-heptakis(terc-butylsulfanyl)-1,4,8,11,15,18,22,25-(oktaaza)ftalocyaninato kobaltnatého komplexu (11).....	29
7.12	Příprava 2-[3,5-di(terc-butyl)-4-hydroxyfenyl]-9,10,16,17,23,24-hexakis(oktylsulfanyl)-1,4,8,11,15,18,22,25-(oktaaza)ftalocyaninu (12)	30
7.13	Fotofyzikální a fotochemická měření	31
8.	VÝSLEDKY A DISKUZE	32
8.1	Syntéza AzaPc.....	33
8.1.1	Syntéza prekurzorů	33
8.1.2	Cyklotetramerizační reakce.....	36

8.2	<i>Fotofyzikální a fotochemická měření</i>	39
9.	ZÁVĚR	45
10.	POUŽITÁ LITERATURA	46

2. ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv

Kandidát **Miroslava Lásková**

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

Název diplomové práce **Syntéza azaftalocyaninů nesoucích jeden 2,6-di(*terc*-butyl)fenolický substituent**

V rámci této práce byly nasyntetizovány azaftalocyaniny (AzaPc) nesoucí jeden 2,6-di(*terc*-butyl)fenolický substituent. Fenolická OH skupina tohoto substituentu je slabým donorem pro intramolekulární přenos náboje (ICT). Nicméně, tato skupina může být v bazickém prostředí ionizována a výsledný fenolátový anion je velmi silným donorem. Výsledkem je probíhající ICT, čímž dojde k poklesu intenzity fluorescence této molekuly.

Prekurzory pro AzaPc jsou substituované pyrazin-2,3-dikarbonitrily. Byly připraveny reakcí 5,6-dichlorpyrazin-2,3-dikarbonitrilu s 2-methylpropan-2-thiolem, respektive s oktanthiolem nebo dvoustupňovou reakcí 5,6-dichlorpyrazin-2,3-dikarbonitrilu s 2,6-di(*terc*-butyl)fenolem následovanou nukleofilní substitucí 2-methylpropan-2-thiolem, respektive oktanthiolem. Další prekurzor byl získán reakcí kyseliny glyoxalové s diaminomaleonitrilem následované chlorací chloridem fosforu a následnou nukleofilní substitucí 2,6-di(*terc*-butyl)fenolem. Výsledné AzaPc byly připraveny cyklotetramerizační reakcí dvou prekurzorů iniciované butanolátem hořečnatým. Kongenery nesoucí jeden 2,6-di(*terc*-butyl)fenolický substituent byly v bezkovové formě vyizolovány ze směsi šesti kongenerů a převedeny na zinečnaté a kobaltnaté komplexy.

U zinečnatého komplexu byl studován vliv okolních podmínek na fluorescenci – konkrétně vliv polarity rozpouštědla a přítomnost baze. Polární rozpouštědla podporují ICT. AzaPc byl také citlivý na přítomnost baze, kdy vznik fenolátového aniontu vedl ke zhášení fluorescence a snížení kvantového výtěžku fluorescence o více než jeden řád. Tento proces byl plně reverzibilní.

3. ABSTRACT

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department Department of Pharmaceutical Chemistry and Drug Control

Candidate **Miroslava Lásková**

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

Title of Thesis **Synthesis of azaphthalocyanines bearing one 2,6-di(*tert*-butyl)phenol substituent**

In this work, azaphthalocyanines (AzaPcs) bearing one 2,6-di(*tert*-butyl)phenol substituent were synthesized. Phenolic OH in this moiety is a weak donor for intramolecular charge transfer (ICT). However, this group can be ionized in basic media and the resulting phenolate anion is very strong donor. This was expected to cause ICT and quench fluorescence of this compound.

The precursors for AzaPcs are substituted pyrazine-2,3-dicarbonitriles. They were prepared *via* one-step reaction of 5,6-dichloropyrazine-2,3-dicarbonitrile with 2-methylpropane-2-thiolate, respectively octanethiolate or *via* two-step reaction of 5,6-dichloropyrazine-2,3-dicarbonitrile with 2,6-di(*tert*-butyl)phenolate followed by nucleophilic substitution by 2-methylpropane-2-thiolate, respectively octanethiolate. Another precursor was prepared *via* reaction of glyoxylic acid with diaminomaleonitrile followed by chlorination with phosphoryl chloride and by subsequent nucleophilic substitution by 2,6-di(*tert*-butyl)phenolate. Resulting AzaPcs were prepared by cyclotetramerization of two precursors initiated by magnesium butoxide. Congeners (in metal-free form) bearing one 2,6-di(*tert*-butyl)phenol substituent were isolated in metal free form from the mixture of six congeners and converted to zinc or cobalt complexes.

The influence of properties of environment on fluorescence of zinc complex was subsequently studied – in particular the influence of polarity of solvent and presence of a base. The more polar solvents appeared to support the ICT. AzaPc was also sensitive to bases and formation of the phenolate anion quenched the fluorescence leading to decrease of fluorescence quantum yield for more than one order of magnitude. The process was found to be fully reversible.

4. SEZNAM ZKRATEK

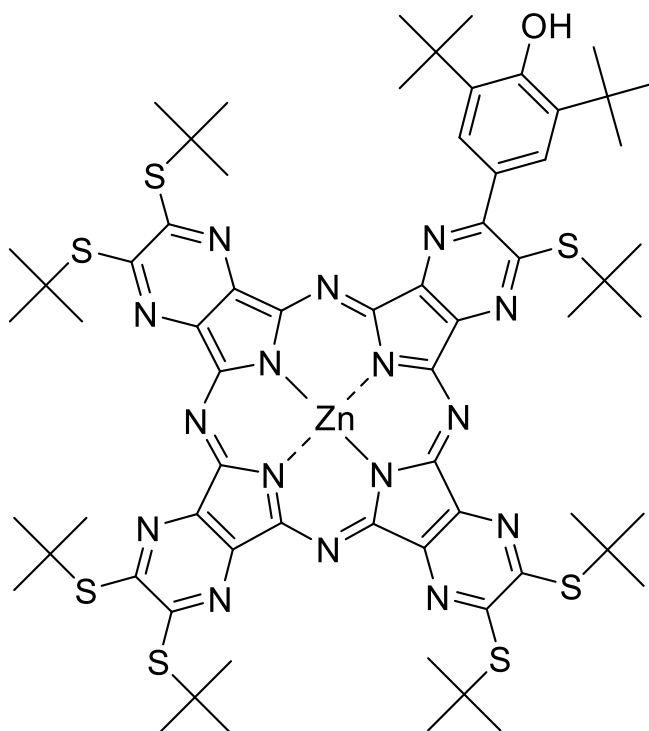
ACN	Acetonitril
AcOH	Kyselina octová
AzaPc	Azaftalocyanin
BEN	Benzín lékařský
CSS	Charge separated state
CTC	Charge transfer complex
DAMN	Diaminomaleonitril
DMAC	Dimethylacetamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMF	Dimethylformamid
DPBF	1,3-difenylisobenzofuran
EtAC	Ethyl-acetát
HEX	Hexan
ICT	Intramolekulární přenos náboje
IČ	Infračervený
MeOH	Methanol
PET	Světlem vyvolaný přenos elektronu
RET	Resonance energy transfer
TBAH	Tetrabutylamonium-hydroxid
THF	Tetrahydrofuran
TLC	Tenkvrstvá chromatografie
TMS	Tetramethylsilan
TOL	Toluen
ZnPc	Nesubstituovaný zinečnatý ftalocyanin
Φ_F	Kvantový výtěžek fluorescence
Φ_Δ	Kvantový výtěžek singletového kyslíku

5. CÍL PRÁCE

Cílem mé diplomové práce bylo nasyntetizovat asymetrické azaftalocyaniny (AzaPc) substituované jedním 2,6-di(*tert*-butyl)fenolickým substituentem. U těchto AzaPc se předpokládalo, že jejich fotofyzikální vlastnosti budou citlivé na změny pH hodnot okolního prostředí.

Jednotlivé AzaPc měly být připraveny pomocí cyklotetramerizační reakce dvou různých prekurzorů A a B (substituované pyrazin-2,3-dikarbonitrily). Ze vzniklé směsi měl být izolován pouze požadovaný kongener ABBB a ten následně konvertován na zinečnatý komplex.

U tohoto zinečnatého komplexu (Obrázek 1) byly studovány fotofyzikální vlastnosti. Předpokládalo se, že fenolická OH skupina 2,6-di(*tert*-butyl)fenolického substituentu je slabým donorem pro intramolekulární přenos náboje (ICT). Pokud by ale došlo k ionizaci v bazickém prostředí na fenolátový anion, tato skupina by se stala silným donorem pro ICT, což by způsobilo přepnutí mezi ON/OFF stavem fluorescence této molekuly. Byly tedy změřeny kvantové výtěžky fluorescence v rozpouštědlech s různou polaritou, která ICT podporuje a následně provedena titrace roztokem base.



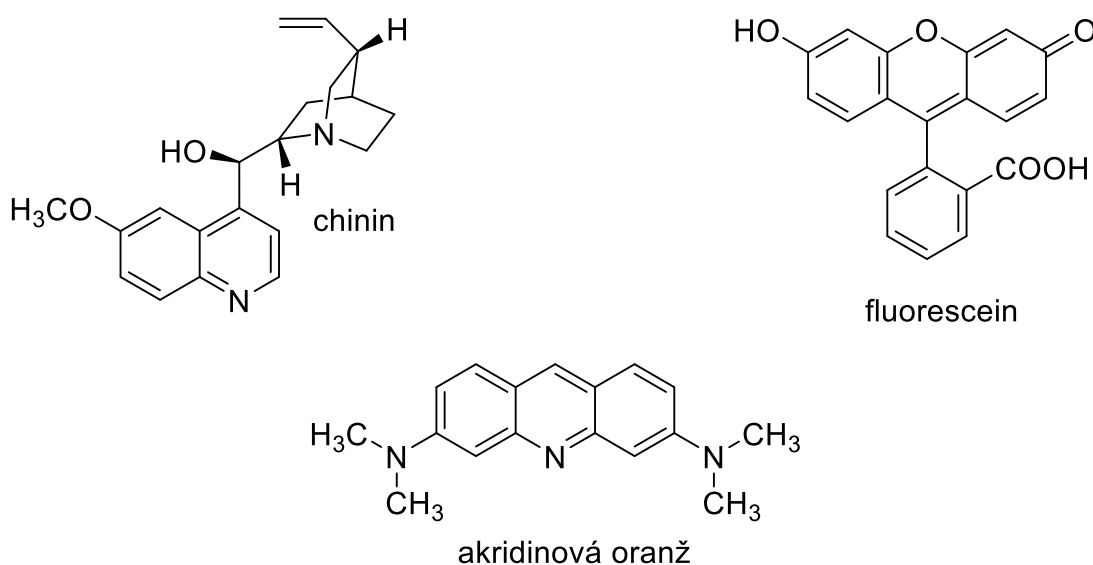
Obrázek 1: Požadovaná struktura AzaPc

6. TEORETICKÁ ČÁST

6.1 Luminiscence

Luminiscence je emise světla z libovolné substance, která nastává v důsledku vzniku excitovaných stavů elektronů. Rozlišujeme dva typy luminiscence – fluorescenci a fosforescenci. Tyto dva procesy se od sebe liší povahou excitovaných stavů, ze kterých k nim dochází. Pokud se elektron nachází v excitovaném singletovém stavu, pak je jeho návrat do základního stavu spinově povolený a nastává velmi rychlá emise fotonu (doba života je asi 10 ns). V tomto případě mluvíme o fluorescenci. Fosforescence je emise světla z tripletového excitovaného stavu. V tomto případě je návrat elektronu do základního stavu spinově zakázaný. Proto je doba, po kterou probíhá fosforescence delší než doba, po kterou probíhá fluorescence (řádově ms – s). Rozlišení fluorescence a fosforescence nemusí být vždy jednoznačné¹.

Fluorescence je typická pro aromatické molekuly, tzv. fluorofory (Obrázek 2). Objevuje se ale i u jiných typů látek, např. u lanthanoidů. K fosforescenci většinou dochází v molekulách obsahujících těžké atomy (brom, jód), které podporují přechod elektronů do tripletového stavu a tím zvyšují kvantové výtěžky fosforescence¹.



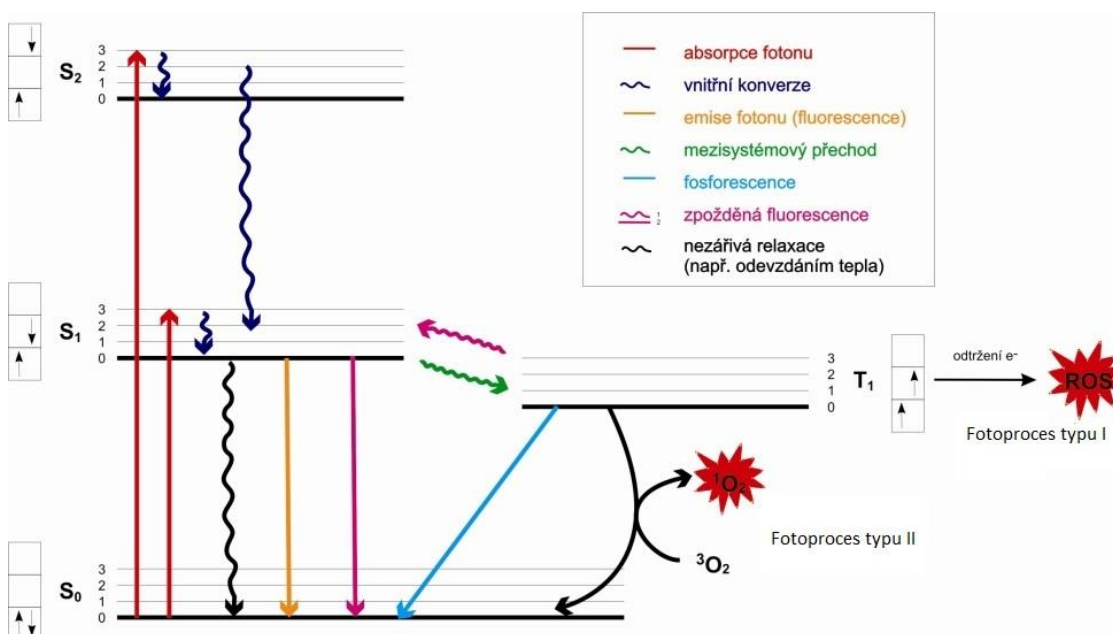
Obrázek 2: Struktury vybraných fluoroforů

Látka se z excitovaného stavu do základního může vrátit několika relaxačními cestami. Kromě luminiscenčních procesů jsou to například nezářivé relaxace ve formě tepla, intramolekulární přenos náboje nebo fotoprocesy typu I a II². Tyto deaktivací cesty jsou kompetitivní k luminiscenčním procesům (Obrázek 3).

6.2 Jablonského diagram

Procesy vycházející z excitovaných stavů molekul znázorňuje Jablonského diagram¹.

Existuje mnoho procesů, ke kterým může v excitovaných stavech docházet, proto i Jablonského diagram má mnoho modifikací^{1,3}. Jedna z těchto modifikací je znázorněna níže (Obrázek 3).



Obrázek 3: Modifikovaný Jablonského diagram (převzato z NOVÁKOVÁ, Veronika. Příprava a studium vlastností azaanalogů ftalocyaninů. Hradec Králové, 2011. Disertační práce. Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové.)

V Jablonského diagramu jsou znázorněny jednotlivé elektronové stavy – S₀ je základní elektronový stav, S₁, S₂ jsou pak excitované singletové stavy. Pro každý z těchto stavů existují určité vibrační energetické hladiny, v diagramu označeny čísly 0, 1, 2, 3, atd. Šipky ve schématu znázorňují přechody mezi jednotlivými energetickými hladinami¹.

Fluorofor se většinou po absorpci světla excituje do vyšších vibračních hladin stavů S₁ nebo S₂. Molekuly ale obvykle velice rychle relaxují do nejnižší vibrační hladiny S₁ stavu. Tento proces se nazývá vnitřní konverze a probíhá v čase asi 10⁻¹² s. Jednou z možností návratu ze stavu S₁ do základního stavu S₀ je pak vyzáření fotonu, tzv. fluorescence. Ta probíhá v čase asi 10⁻⁸ s. Z toho vyplývá, že před vlastní fluorescencí vždy dochází k vnitřní konverzi a fluorescence pak vychází z nejnižší energetické vibrační hladiny stavu S₁^{1,3}.

T₁ v Jablonského diagramu označuje první excitovaný tripletový stav. Do toho se může molekula dostat, pokud projde spinovou konverzí - tzv. mezisystémovým přechodem. Do stavu S₀ se pak z něj molekula může vrátit fosforescencí. Emise fotonu ve formě fosforescence je obvykle posunuta k vyšším vlnovým délkám, a tedy nižším energiím, než fluorescence^{1,3}.

6.3 Fluorescenční vlastnosti látek

Vlastnosti fluoroforů jsou nejčastěji charakterizovány pomocí emisních spekter, Stokesovým posunem, kvantovým výtěžkem fluorescence a dobou života fluorescence¹.

Emisní spektrum

Emisní spektrum je grafické vyjádření závislosti intenzity fluorescence na vlnové délce (nm) nebo vlnočtu (cm^{-1}). Tvar emisních spekter jednotlivých fluoroforů se liší – závisí jak na chemické struktuře fluoroforu, tak na použitém rozpouštědle. Pro emisní spektra je charakteristické, že jsou zrcadlovým obrazem absorpčního spektra znázorňujícího přechod elektronu ze základního stavu S_0 do excitovaného stavu S_1 ¹.

Stokesův posun

Z Jablonského diagramu vyplývá, že energie emise je menší než energie absorpce. To znamená, že fluorescence se tedy objevuje při vyšších vlnových délkách než předchozí absorpce fotonu. Rozdíl mezi energií excitace a emise se nazývá Stokesův posun. Mezi hlavní příčiny Stokesova posunu patří rychlý pokles na nejnižší vibrační hladinu stavu S_1 (vnitřní konverze). Další ztráty energie jsou způsobeny například tvorbou komplexů, vlastnostmi použitého rozpouštědla, přenosem energie nebo reakcemi v excitovaných stavech. Tento jev je pozorován obecně u všech roztoků fluoroforů. Nejvýraznější je pokles energie u polárních fluoroforů v polárních rozpouštědlech¹.

Kvantový výtěžek fluorescence

Kvantový výtěžek fluorescence (Φ_F) patří spolu s dobou života fluorescence mezi nejdůležitější charakteristiky fluoroforů. Je to poměr mezi počtem emitovaných fotonů a počtem absorbovaných fotonů. Pro jeho určení se nejčastěji používá porovnávací metoda se standardem, u kterého je kvantový výtěžek znám. Hodnota kvantového výtěžku může být ovlivněna například teplotou, použitým rozpouštědlem nebo tzv. efektem vnitřního filtru⁴.

Doba života fluorescence

Doba života fluorescence je průměrná doba, po kterou je molekula v excitovaném stavu před návratem do základního stavu S_0 . Dosahuje hodnot přibližně jednotek až desítek ns. Dobu, po kterou probíhá fluorescence, Stokesův posun a Φ_F mohou mimo jiné ovlivňovat další relaxační procesy, kompetitivní k fluorescenci a okolní prostředí¹.

Právě citlivost fluoroforů ke změnám okolních podmínek spolu s vysokou citlivostí detekce fluorescence jsou důvodem velmi širokého rozšíření spektrofluoroskopie jak v chemických, tak i v biologických a dalších vědách. Fluorescenční vlastnosti látek jsou využívány například ve fluorescenční mikroskopii⁵, diagnostických metodách v medicíně⁶ nebo jako nástroj pro objasnění konformace makromolekul⁷. Fluorescenční metody se staly důležitým výzkumným nástrojem v biochemii, biofyzice, forenzních a genetických analýzách a v mnoha dalších oborech¹.

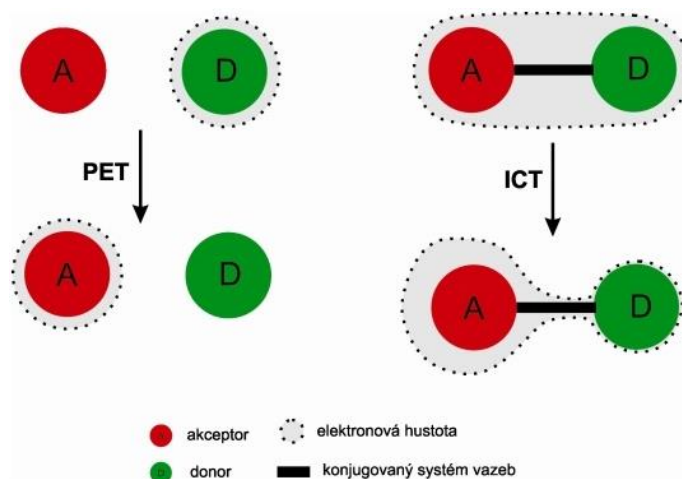
V posledních letech nacházejí fluorofory také uplatnění jako fluorescenční senzory, u nichž dochází ke změnám spektrálních vlastností v přítomnosti určité látky, iontu nebo při určitých hodnotách pH okolního prostředí¹.

6.4 Přenos elektronu mechanismy PET a ICT

Mezi relaxační cesty kompetitivní k luminiscenci patří mimo jiné i procesy, při nichž se molekula vrací do základního stavu S_0 pomocí přenosu elektronu z donoru na akceptor. Mezi tyto procesy patří tzv. světlem vyvolaný přenos elektronu (PET) a intramolekulární přenos náboje (ICT)^{1,8}.

Při PET dochází po excitaci molekuly k přeskočení elektronu na určitou vzdálenost, čímž dojde k vytvoření charge transfer complex (CTC). Tento komplex se poté do základního stavu vrací většinou jinými relaxačními cestami než vyzářením fotonu. Excitovaný fluorofor může být jak donorem, tak i akceptorem elektronu. Směr přenosu elektronu je dán oxidoredukčním potenciálem mezi základním a excitovaným stavem molekuly^{1,8}.

Při ICT musí být donor a akceptor ve vzájemné konjugaci. V tomto případě dochází po excitaci pouze k přeskočení elektronové hustoty a vytvoří se charge separated state (CSS). Elektronová hustota je v tomto stavu zvýšená v okolí akceptoru (Obrázek 4)^{1,8}.



Obrázek 4: Zjednodušené schéma přenosu elektronu PET a ICT (převzato z NOVÁKOVÁ, Veronika. Příprava a studium vlastností azaanalogů ftalocyaninů. Hradec Králové, 2011. Disertační práce. Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové.)

Energetická hladina CTC a CSS se nachází níže než excitovaný stav S_1 , protože část energie je spotřebována na vytvoření právě těchto stavů⁸. Oba procesy mohou být ovlivněny např. polaritou použitého rozpouštědla⁹, vzdáleností mezi donorem a akceptorem¹⁰, konformací molekuly¹¹ nebo teplotou¹². Polární rozpouštědla stabilizují CTC a CSS, čímž zvyšují účinnost přenosu elektronu. Mezi tato rozpouštědla patří např. dimethylformamid (DMF), acetonitril (ACN) nebo dimethylsulfoxid (DMSO). Naopak v nepolárních rozpouštědlech, jako je toluen, dochází k inhibici PET a ICT. Rychlost přenosu elektronu klesá exponenciálně s rostoucí vzdáleností mezi donorem a akceptorem¹³.

Pokud v molekule probíhá PET nebo ICT, jsou díky své rychlosti převažujícími relaxačními cestami a molekula nevykazuje žádnou fluorescenci (OFF stav). Zablokováním těchto procesů dochází opět k nárůstu kvantového výtěžku fluorescence (ON stav), čehož se využívá u fluorescenčních senzorů¹.

6.5 Fluorescenční senzory

Fluorescenční senzory jsou látky, jejichž spektrální vlastnosti jsou závislé na okolních podmínkách nebo přítomnosti zkoumaného analytu. Fluorescenční senzory zaznamenaly v poslední době velký rozvoj, především díky jejich širokému spektru využití a nízké ceně např. v porovnání s radionuklidy. Přítomnost analytu se může projevit změnami v intenzitě fluorescence, tvaru excitačního nebo emisního spektra, anizotropii nebo době života fluoroforu¹.

Využití mohou tyto senzory nacházet v detekci iontů, např. Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , $\text{Cl}^{-14,15}$, kyslíku¹⁶, glukózy¹⁷, ale uplatnění nacházejí i senzory citlivé na změny viskozity¹⁸ nebo změny hodnot pH okolního prostředí¹⁹.

Změny ve spektrálních vlastnostech senzorů mohou být způsobeny mnoha mechanismy. Velmi často nastává změna v intenzitě fluorescence tzv. zhášením. V tomto případě je analyt (např. ionty) zároveň i zhášečem daného senzoru. Po navázání analytu na senzoricou část fluoroforu dojde ke snížení intenzity fluorescence a toho se následně využije ke stanovení koncentrace daného iontu v roztoku²⁰.

Další skupina senzorů funguje na principu resonance energy transfer (RET), při němž dochází k přenosu energie z donoru na akceptor. Pokud dojde k přiblížení donoru a akceptoru, nastane v důsledku probíhajícího RET snížení intenzity fluorescence donoru. RET senzory mají tedy akceptorovou část, jejíž fluorescenční vlastnosti jsou citlivé ke sledovaném jevu, velmi často k hodnotě pH prostředí. Pokud dojde ke změnám okolního pH, dojde ke změnám i v absorpenci akceptoru, což se následně projeví poklesem intenzity fluorescence donoru²¹.

Některé fluorofory se mohou vyskytovat ve dvou formách, přičemž fluorescenci vykazuje pouze jedna z nich. Poměr mezi oběma stavy může být závislý na přítomnosti analytu, čehož se využívá v další skupině senzorů. Kromě změny intenzity fluorescence může docházet při přechodu jedné formy v druhou také k posunům v emisních spektrech. Těchto senzorů se využívá velmi často ke stanovení Ca^{2+} iontů nebo pH hodnot okolního prostředí, kdy změny ve spektrech vyvolá ionizace fluoroforu²².

Jako senzory našla uplatnění také celá škála látek, u nichž dochází k návratu z excitovaného stavu do základního mechanismem PET nebo ICT. V tomto případě se využívá poměrně snadného zablokování těchto procesů, což se projeví nárůstem intenzity fluorescence fluoroforu – dojde k přechodu z OFF do ON stavu²².

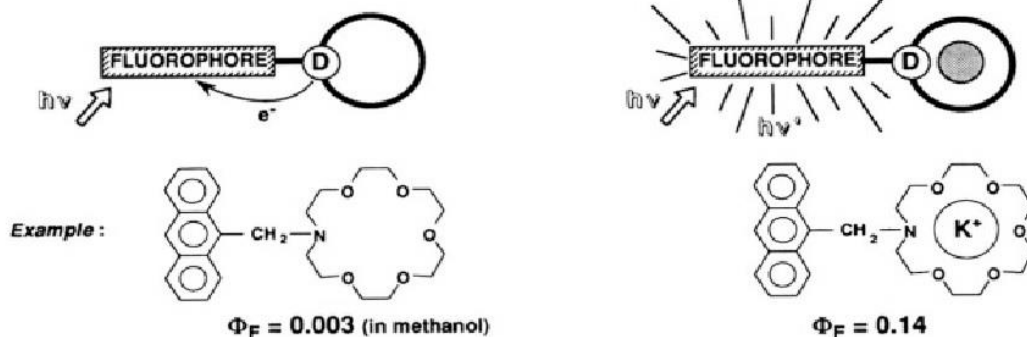
6.6 Senzory založené na principu PET a ICT

Molekuly senzorů založené na principu PET nebo ICT se skládají z části donorové (senzorické) a části akceptorové (signální). U PET senzorů jsou tyto dvě části spojeny tzv. spacerem (Obrázek 5), u ICT senzorů jsou ve vzájemné konjugaci. Donorovou částí jsou většinou aminoskupiny, neboť dusík poskytuje volný elektronový pár nutný pro PET nebo ICT. Akceptorem jsou pak aromatické cykly, které vykazují velkou intenzitu fluorescence^{1,23}. Zatímco u PET senzorů pozorujeme po navázání analytu většinou pouze změnu v intenzitě fluorescence, v případě ICT senzorů dochází i k více či méně výrazným posunům v absorpčních spektrech²².



Obrázek 5: Struktura PET senzoru (převzato z De SILVA, A. Prasanna, MOODY, Thomas S., WRIGHT, Glenn D. Fluorescent PET (Photoinduced Electron Transfer) sensors as potent analytical tools. *Analyst*. 2009, roč. 134, č. 12, s. 2385 – 2393.)

Mechanismus blokování těchto procesů souvisí s následným využitím senzoru. Blokace může probíhat koordinací analytu do donorového centra (Obrázek 6) nebo protonizací dusíku. Tyto senzory tedy nacházejí uplatnění nejčastěji při detekci kationtů kovů a dalších malých molekul a jako pH senzory¹.



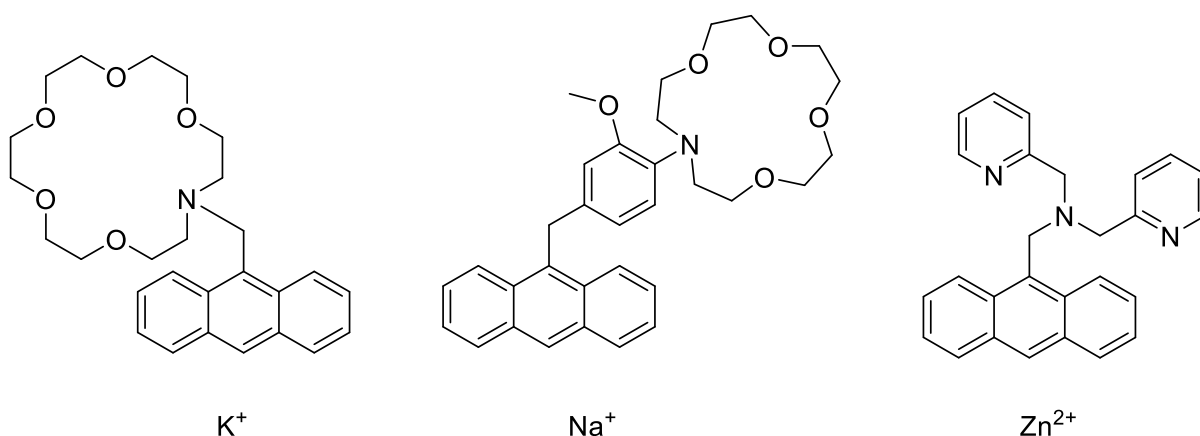
Obrázek 6: Princip blokace PET koordinací kationtu (převzato z LAKOWICZ, Joseph R. *Topics in Fluorescence Spectroscopy Probe Design and Chemical Sensing*. Boston, MA: Springer US, 2002. ISBN 0-306-47060-8).

Detekci biogenních kationtů kovů je věnována velká pozornost, protože jsou nepostradatelné pro správný průběh biologických procesů, jako je svalová kontrakce nebo přenos nervových vzruchů, nebo slouží jako kofaktory enzymů. Na druhé straně detekce kationtů, jako jsou např. Cd^{2+} nebo Hg^{2+} , se využívá v toxikologii, neboť tyto kationty mohou způsobovat závažné otravy. Monitorování hladin Li^+ nebo K^+ je pak důležité při antimanické léčbě, respektive při léčbě některými antihypertenzivy²⁴.

Pro praktické využití senzoru je potřebné, aby byl specifický pouze pro jeden určitý typ analytu. Za selektivitu vazby je zodpovědná především donorová část molekuly. Proto jsou

rozpoznávací substituenty senzorů voleny tak, aby velikost kavity odpovídala velikosti detekovaného kationtu²⁴.

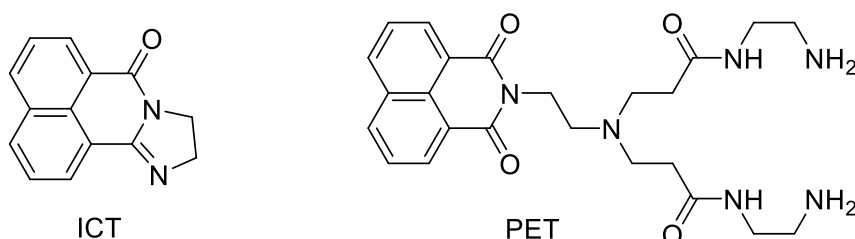
Rozpoznávací část senzorů je často tvořena cyklickými polyethery, v nichž jsou alespoň některé atomy kyslíku nahrazeny dusíkem (azacrowny). Změnou velikosti kruhu, jeho substitucí nebo otevřením se může ovlivnit citlivost k jednotlivým kationtům²⁴. Příkladem rozpoznávací části specifické pro draselné ionty je 1,4,7,10,13-pentaoxa-16-azacyklooktadekan a pro sodné ionty 13-(2-methoxyfenyl)-1,4,7,10-tetraoxa-13-azacyklopentadekan²⁵. Velkou skupinu tvoří také senzory pro Zn^{2+} ionty, které ve své signální části obsahují bis(2-pyridylmethyl)aminovou strukturu (Obrázek 7)²⁶.



Obrázek 7: Příklady struktury senzorů selektivních pro kationty kovů

Účinnost senzorů je vyjádřena tzv. zesilujícím faktorem fluorescence, což je poměr kvantového výtěžku senzoru s navázaným analytem a kvantového výtěžku volné formy senzoru¹.

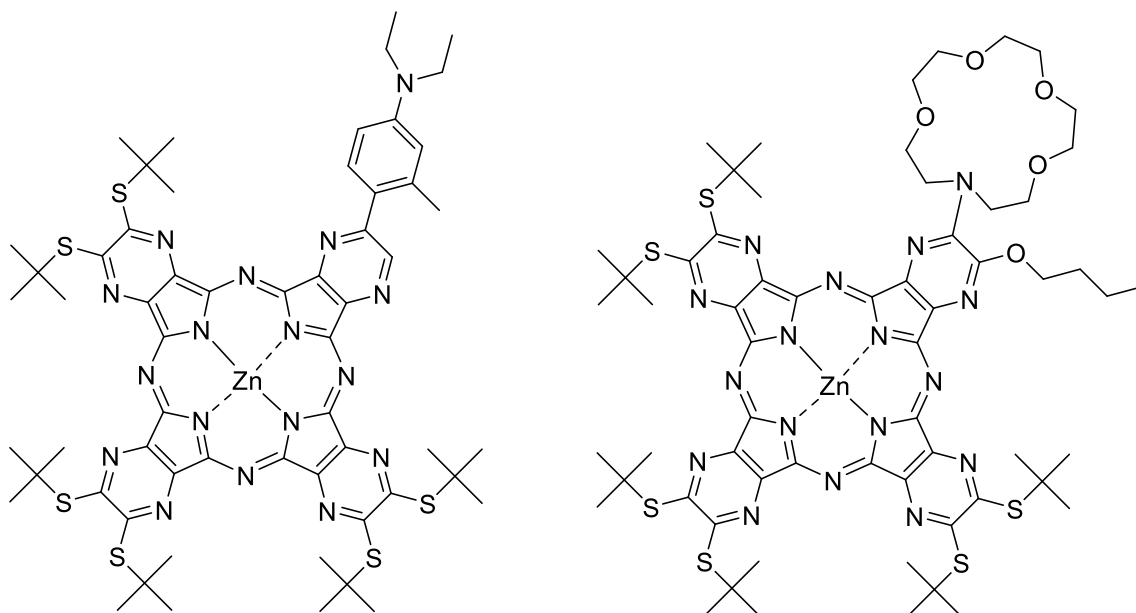
Velká pozornost je v posledních letech věnována také pH senzorům. Příkladem takových senzorů jsou deriváty naftalenu – naftalen-1,8,4,5-diimidy, 1,8-naftalimidy nebo 4-alkylamino-1,8-naftalimidy²⁷. Většina dosud popsaných a používaných senzorů je limitována jejich hydrofobicitou²⁸. Proto se současný výzkum orientuje převážně na ve vodě rozpustné molekuly (Obrázek 8)²⁹.



Obrázek 8: Příklady struktury pH senzorů na principu ICT a PET

Proces ICT byl popsán i u látek typu azaftalocyaninů (AzaPc) (Obrázek 9), kterými se zabývá výzkumná skupina Azaphthalocyanine group. Touto skupinou byly nasyntetizovány jak AzaPc, u nichž dochází k zablokování ICT navázáním kationtů kovů (Na^+ , K^+) do

donorového centra (aza[15]-crown-5)³⁰, tak pH senzitivní látky. V případě pH senzitivních derivátů byly zkoumány AzaPc periferně substituované aromatickým dialkylaminy (Obrázek 9). Tyto látky nevykazovaly žádnou fluorescenci v neutrálním prostředí. Pokud ale došlo k protonizaci dialkylaminoskupiny přidavkem kyseliny sírové, bylo zablockováno ICT a látka vykazovala poměrně vysoké kvantové výtěžky fluorescence³¹. Právě na základě těchto poznatků vznikla i tato práce.



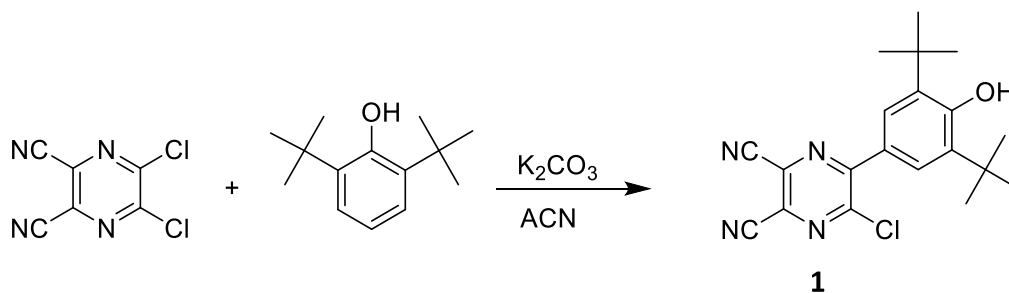
Obrázek 9: Struktury senzoricých AzaPc

7. 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). Mobilní fáze, které byly použity, jsou popsány u jednotlivých reakcí níže. Infračervená (IČ) 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. Chemický posun signálů je vztažen k tetramethylsilanu (TMS). Elementární analýza byla provedena pomocí přístroje Automatic Microanalyser EA1110CE. Spektra UV/Vis byla měřena pomocí přístroje Shimadzu UV-2600C spectrophotometer a fluorescenční spektra 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-*terc*-butylfenyl)-methyl-2-propenyliden-malononitril] v dichlormethanu, nanesen na destičku a důkladně vysušen.

7.1 Příprava 5-chlor-6-[3,5-di(*tert*-butyl)-4-hydroxyfenyl]pyrazin-2,3-dikarbonitrilu (**1**)



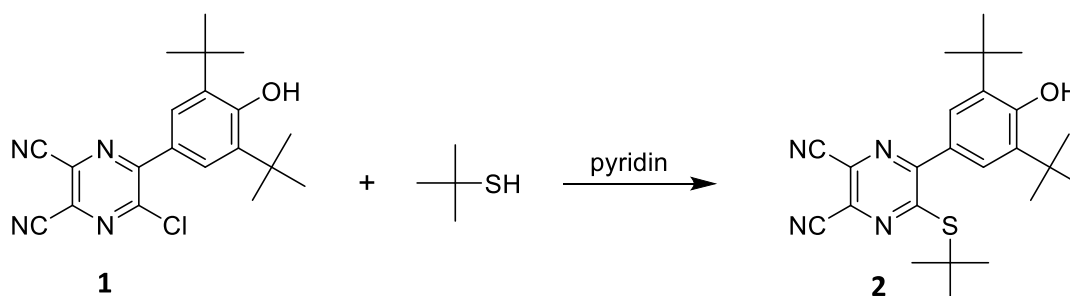
Příprava látky **1** byla prováděna v bezvodém prostředí pod argonem. K 5,6-dichlorpyrazin-2,3-dikarbonitrilu (2,0 g, 10 mmol) rozpuštěném v bezvodém ACN (25 ml) byl přidán 2,6-di(*tert*-butyl)fenol (2,3 g, 11 mmol) a bezvodý uhličitan draselný (3,0 g, 22 mmol). Fialová směs byla míchána při laboratorní teplotě po dobu 2,5 hodiny. Průběh reakce byl kontrolován pomocí TLC za použití směsi toluen (TOL)/lékařský benzín (BEN) v poměru 2:1 jako mobilní fáze.

Po skončení reakce bylo odpařeno rozpouštědlo na vakuové odparce a produkt byl třikrát vytřepán mezi ethyl-acetát (EtAC) a vodu mírně okyselenou kyselinou chlorovodíkovou, čímž došlo ke změně barvy organické fáze z fialové na žlutou. Organická fáze byla vysušena pomocí bezvodého síranu sodného. Směs byla poté zfiltrována a odpařena do sucha na vakuové odparce. Vzniklá žlutá pevná látka byla následně přečištěna pomocí sloupcové chromatografie za použití směsi TOL/BEN v poměru 2:1 jako mobilní fáze. Produktem byla žlutá krystalická látka 5-chlor-6-[3,5-di(*tert*-butyl)-4-hydroxyfenyl]pyrazin-2,3-dikarbonitril (**1**).

Výtěžek: 1,8 g (48 %)

T. t. 173,8 – 174,6 °C. 1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$, 25 °C, TMS): δ = 7,84 (s, 2H; ArH), 5,82 (s, 1H; OH), 1,50 (s, 18H, CH_3) ppm. ^{13}C NMR (125 MHz, $CDCl_3$, 25 °C, TMS): δ = 158,0, 157,0, 149,2, 136,5, 130,6, 127,8, 127,7, 123,8, 112,5, 112,2, 34,6, 30,1 ppm. IČ (ATR): ν = 3590 (OH), 2967, 2874, 2245 (CN), 1514, 1496, 1374, 1339, 1278, 1240, 1207, 1146, 1133, 1104 cm^{-1} . Elementární analýza (%) vypočítáno pro $C_{20}H_{21}ClN_4O$: C 65,12, H 5,74, N 15,19; nalezeno: C 64,48, H 6,00, N 15,26.

7.2 Příprava 5-*tert*-butylsulfanyl-6-[3,5-di(*tert*-butyl)-4-hydroxyfenyl]pyrazin-2,3-dikarbonitrilu (2)



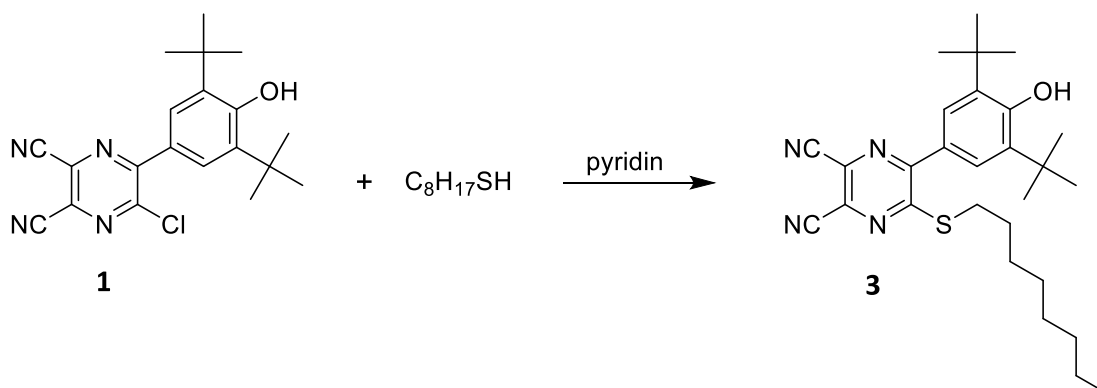
K látce **1** (1,0 g, 2,7 mmol) rozpuštěné v pyridinu (30 ml) byl přidán 2-methylpropan-2-thiol (0,37 ml, 3,2 mmol) za vzniku červené reakční směsi. Reakce byla prováděna pod zpětným chladičem za stálého míchání při teplotě varu pyridinu (115 °C) po dobu 1 hodiny. Reakce byla kontrolována pomocí TLC. Jako vyvíjecí soustava byla použita směs EtAC/BEN v poměru 1:19.

Po skončení reakce byl pyridin odpařen na vakuové odparce. Produkt byl promyt vodou, přefiltrován přes skládaný filtr a následně vysušen na vzduchu za laboratorní teploty. Vzniklý šedohnědý prášek byl vyčištěn pomocí sloupcové chromatografie. Jako mobilní fáze byla použita směs EtAC/BEN v poměru 1:15. Produkt byl následně rozpuštěn v minimálním množství chloroformu, do roztoku byl přidán hexan (HEX) a došlo k vysrážení žluté krystalické látky 5-*tert*-butylsulfanyl-6-[3,5-di(*tert*-butyl)-4-hydroxyfenyl]pyrazin-2,3-dikarbonitril (**2**).

Výtěžek: 0,88 g (77 %)

T. t. 143.7 - 144.6 °C. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3 , 25 °C, TMS): δ = 7,67 (s, 2H; ArH), 5,69 (s, 1H; OH), 1,62 (s, 9H, SCCH_3), 1,48 (s, 18H, CH_3) ppm. ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3 , 25 °C, TMS): δ = 162,5, 157,1, 156,2, 136,1, 127,8, 126,8, 126,1, 125,1, 113,7, 113,6, 51,3, 34,6, 30,1, 29,5 ppm. IČ (ATR): ν = 2963, 2874, 2225 (CN), 1489, 1379, 1363, 1222, 1139, 999 cm^{-1} . Elementární analýza (%) vypočítáno pro $\text{C}_{24}\text{H}_{30}\text{N}_4\text{OS}$: C 68,21, H 7,16, N 13,26; nalezeno: C 68,17, H 7,48, N 13,73.

7.3 Příprava 5-oktylsulfanyl-6-[3,5-di(*tert*-butyl)-4-hydroxyfenyl]pyrazin-2,3-dikarbonitrilu (3)



Látka **3** byla připravena analogickým postupem jako látka **2**.

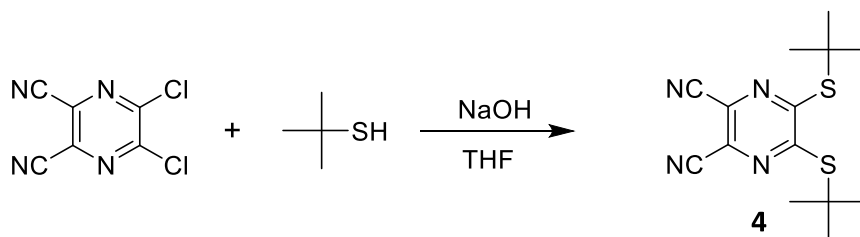
Látka **1** (0,29 g, 0,78 mmol) byla rozpuštěna v pyridinu (10 ml). Poté byl přidán oktanthiol (0,16 ml, 0,94 mmol) a reakční směs se zbarvila červeně. Směs byla za stálého míchání zahřívána na 115 °C po dobu 1 hodiny. Průběh reakce byl monitorován pomocí TLC. Jako mobilní fáze byla použita směs EtAC/BEN v poměru 1:19. Jako mobilní fáze byla použita směs EtAC/BEN v poměru 1:19.

Po skončení reakce byl pyridin odpařen na vakuové odparce. Vzniklý šedohnědý prášek byl vyčištěn pomocí sloupcové chromatografie. Jako mobilní fáze byla použita směs EtAC/BEN v poměru 1:19. Produktem po chromatografii byla žlutá olejovitá látka, která po pár dnech v baňce ztuhla. Produkt byl následně rozpuštěn v chloroformu, do roztoku byl přidán HEX a došlo k vysrážení žluté krystalické látky 5-oktylsulfanyl-6-[3,5-di(*tert*-butyl)-4-hydroxyfenyl]pyrazin-2,3-dikarbonitril (**3**).

Výtěžek: 0,22 g (59 %)

T. t. 54,7 – 55,1 °C. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, 25 °C, TMS): δ = 7,72 (s, 2H, ArH), 5,70 (s, 1H, OH), 3,18 (t, 2H, *J* = 7,3 Hz, SCH₂), 1,71 (p, 2H, *J* = 7,3 Hz, SCH₂CH₂), 1,55 – 1,39 (m, 20H), 1,38 – 1,22 (m, 8H, CH₂), 0,88 (t, 3H, *J* = 6,7 Hz, CH₃) ppm. ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃, 25 °C, TMS): δ = 161,6, 157,3, 156,1, 136,3, 128,6, 126,6, 126,4, 125,1, 113,8, 113,6, 34,6, 31,9, 31,7, 30,1, 29,07, 28,99, 28,90, 28,0, 22,6, 14,0 ppm. IČ (ATR): ν = 3630 (OH), 2957, 2929, 2857, 2233 (CN), 1597, 1497, 1441, 1386, 1323, 1224, 1146 cm⁻¹. Elementární analýza (%) vypočítáno pro C₂₈H₃₈N₄OS: C 70,25, H 8,00, N 11,70; nalezeno: C 70,69, H 7,75, N 12,14.

7.4 Příprava 5,6-bis(*tert*-butylsulfanyl)pyrazin-2,3-dikarbonitrilu (**4**)



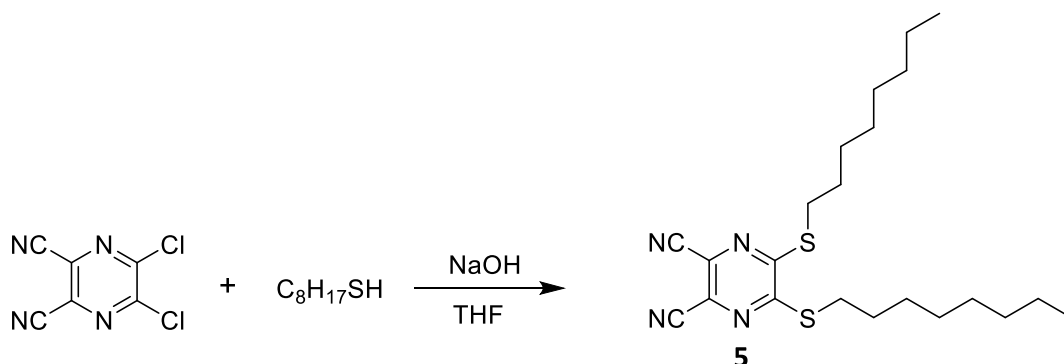
Příprava látky **4** byla již dříve publikována v odborné literatuře³².

K vodnému roztoku hydroxidu sodného o koncentraci 1 mol/l (70 ml, 70 mmol) byl přidán 2-methylpropan-2-thiol (8 ml, 71 mmol). Směs byla míchána 30 minut při laboratorní teplotě. Následně byl přidán roztok 5,6-dichlorpyrazin-2,3-dikarbonitrilu (6,0 g, 30 mmol) v tetrahydrofuranu (THF) (160 ml) a směs byla opět míchána při laboratorní teplotě 30 minut.

Po ukončení reakce byl do směsi přidán EtAC a odděleny organická a vodná fáze. Organická fáze byla poté vysušena pomocí síranu sodného. Síran sodný byl ze směsi odstraněn filtrací přes skládaný filtr a rozpouštědla byla následně odpařena na vakuové odparce. Produkt byl přečištěn pomocí sloupcové chromatografie za použití toluenu jako mobilní fáze. Získané žluté krystaly produktu byly překrystalizovány z methanolu (MeOH) s aktivním uhlím. Vzniklé nažloutlé krystaly 5,6-bis(*tert*-butylsulfanyl)pyrazin-2,3-dikarbonitrilu (**4**) byly odsáty na fritě. Látka byla srovnána na TLC se standardem připraveným v laboratoři již dříve.

Výtěžek: 7,55 g (82 %)

7.5 Příprava 5,6-bis(oktylsulfanyl)pyrazin-2,3-dikarbonitrilu (5)



Látka **5** byla připravena analogicky k látce **4**. Tato reakce již byla publikována v odborné literatuře³³.

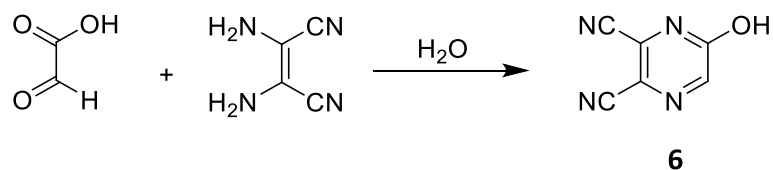
K vodnému roztoku hydroxidu sodného o koncentraci 1 mol/l (23 ml, 23 mmol) byl přidán oktanthiol (4,1 ml, 24 mmol). Směs byla míchána 30 minut při laboratorní teplotě. Následně byl přidán roztok 5,6-dichlorpyrazin-2,3-dikarbonitrilu (2,0 g, 10 mmol) v THF (53 ml) a žlutá reakční směs byla opět míchána při laboratorní teplotě 30 minut.

Po ukončení reakce byl do směsi přidán EtAC a odděleny organická a vodná fáze. Organická fáze byla poté vysušena pomocí síranu sodného. Síran sodný byl ze směsi odstraněn filtrací přes skládaný filtr a rozpouštědla byla následně odpařena na vakuové odparce. Vzniklá hnědá olejovitá látka byla přečištěna pomocí sloupcové chromatografie za použití směsi TOL/BEN v poměru 2:1 jako mobilní fáze. Žlutobílé krystaly 5,6-bis(oktylsulfanyl)pyrazin-2,3-dikarbonitrilu (**5**) byly následně překrytalizovány z MeOH. Látka byla srovnána na TLC se standardem připraveným v laboratoři již dříve.

Výtěžek: 2,45 g (58 %)

T.t. 65,7 – 66,3 °C (lit.³³ 64 °C)

7.6 Příprava 5-hydroxypyrazin-2,3-dikarbonitrilu (6)



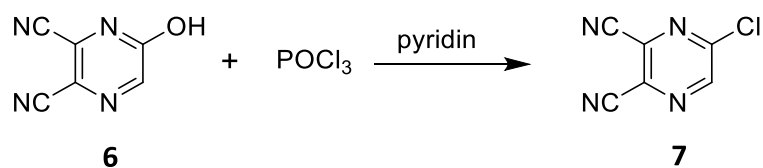
Látka **6** byla připravena podle již publikovaného postupu³⁴.

Kyselina glyoxalová (1,0 g, 13,5 mmol) a diaminomaleonitril (DAMN) (1,46 g, 13,5 mmol) byly rozpuštěny ve vodě (30 ml). Všechny pevné částice se rozpustily přibližně po 10 minutách. Směs byla míchána 3 hodiny při laboratorní teplotě.

Po skončení reakce byla směs vytřepána do EtAC a organická fáze byla vysušena pomocí bezvodého síranu sodného. Následně byla směs zfiltrována, čímž byl odstraněn síran sodný a EtAC byl odpařen na vakuové odparce. Produkt byl červenohnědý olej, který nebyl následně čištěn a byl použit jako výchozí látka pro další reakce.

Výtěžek: 2,21 g bez čištění

7.7 Příprava 5-chlorpyrazin-2,3-dikarbonitrilu (7)



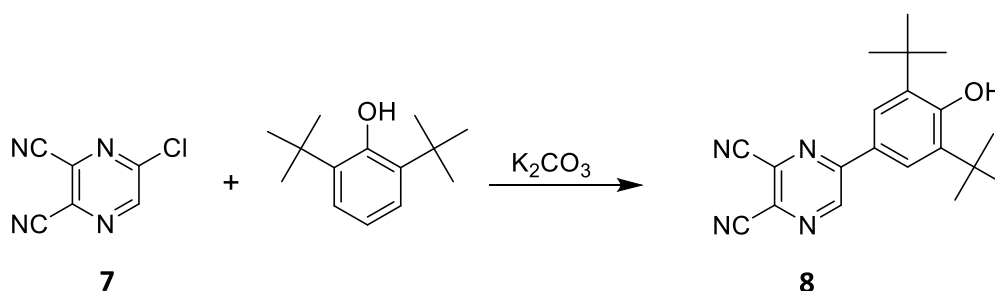
Postup přípravy látky **7** byl již dříve publikován v odborné literatuře.³⁴

K látce **6** získané předchozí reakcí (2,21 g, 15 mmol) byl přidán chlorid fosforylu (9 g, 5,5 ml). Následně byl za chlazení přikapáván pyridin (1,5 ml, 0,018 mol) za uvolňování bílých par. Směs byla po přidání veškerého pyridinu dále míchána 2 hodiny při 90 °C pod zpětným chladičem.

Po ukončení reakce byla směs zahuštěna na vakuové odparce a poté vytřepána mezi chloroform a vodu. Organická fáze byla odpařena a produkt byl přečištěn pomocí sloupcové chromatografie. Jako mobilní fáze byla použita směs chloroform/TOL v poměru 1:1. Produktem byla bílá krystalická látka 5-chlorpyrazin-2,3-dikarbonitril (**7**). Látka byla srovnána na TLC se standardem připraveným v laboratoři již dříve.

Výtěžek: 1,25 g (56 %) – počítáno na kyselinu glyoxalovou

7.8 Příprava 5-[3,5-di(*tert*-butyl)-4-hydroxyfenyl]pyrazin-2,3-dikarbonitrilu (**8**)



Příprava látky **8** byla prováděna analogicky k přípravě látky **1**.

Reakce probíhala v bezvodém prostředí pod argonem. Látka **7** (1 g, 6 mmol) byla spolu s 2,6-di(*tert*-butyl)fenolem (1,63 g, 8 mmol) rozpuštěna v bezvodém ACN (20 ml). Poté byl přidán uhličitan draselný (2,19 g, 16 mmol) za vzniku fialové reakční směsi. Směs byla míchána při laboratorní teplotě 2,5 hodiny. Poté byl přidán znovu 2,6-di(*tert*-butyl)fenol (1,63 g, 8 mmol) a uhličitan draselný (2,19 g, 16 mmol). Reakční směs byla míchána 3 dny při laboratorní teplotě. Reakce byla monitorována pomocí TLC, za mobilní fázi byla zvolena směs TOL/BEN v poměru 2:1.

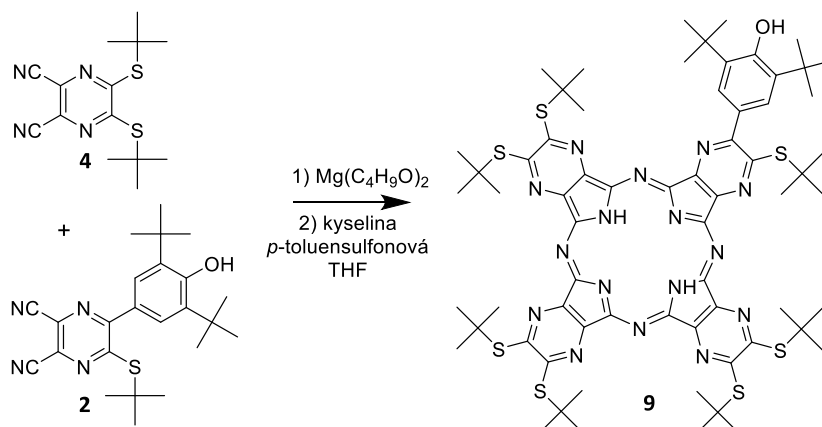
Po skončení reakce byla směs odpařena na vakuové odparce a produkt vytřepán mezi EtAC a vodu mírně okyselenou kyselinou chlorovodíkovou. Organická fáze byla vysušena pomocí bezvodého síranu sodného, který byl poté odstraněn filtrací přes skládaný filtr. Roztok byl odpařen na vakuové odparce do sucha a produkt byl přečištěn pomocí sloupcové chromatografie. Jako mobilní fáze byla zvolena směs TOL/HEX v poměru 2:1. Výsledným produktem byla bíložlutá krystalická látka 5-[3,5-di(*tert*-butyl)-4-hydroxyfenyl]pyrazin-2,3-dikarbonitril (**8**).

Část výsledného produktu pro analýzy byla překrytalizována rozpuštěním v chloroformu, do roztoku byl přidán HEX a došlo k vysrážení bíložluté krystalické látky.

Výtěžek: 0,71 g (35 %)

T. t. 238,3 – 239 °C. 1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$, 25 °C, TMS): δ = 9,18 (s, 1H, ArH), 7,95 (s, 2H, ArH), 5,85 (s, 1H, OH), 1,51 (s, 18H, CH_3). ^{13}C NMR (125 MHz, $CDCl_3$, 25 °C, TMS): δ = 158,6, 155,4, 143,5, 137,6, 133,2, 129,2, 125,5, 123,8, 113,5, 113,3, 34,6, 30,1 ppm. IČ (ATR): ν = 3627(OH), 2970, 2954, 2910, 2879, 2237, 1599, 1549, 1506, 1417, 1331, 1253, 1195, 1149 cm^{-1} . Elementární analýza (%) vypočítáno pro $C_{20}H_{22}N_4O$: C 71,83, H 6,63, N 16,75; nalezeno: C 70,34, H 6,54, N 16,85.

7.9 Příprava 2-[3,5-di(*tert*-butyl)-4-hydroxyfenyl]-3,9,10,16,17,23,24-heptakis(*tert*-butylsulfanyl)-1,4,8,11,15,18,22,25-(oktaaza)ftalocyaninu (9)



Do baňky k naváženému kovovému hořčíku (0,680 g, 28 mmol) byl přidán bezvodý čerstvě predestilovaný butanol (30 ml) a krystalek jódu. Směs byla za stálého míchání zahřívána 2,5 hodiny při teplotě 135 °C pod zpětným chladičem do vytvoření butanolátu hořečnatého. Poté byly přidány látka **2** (0,423 g, 1 mmol) a látka **4** (0,918 g, 3 mmol). Reakční směs byla dále zahřívána po dobu 24 hodin.

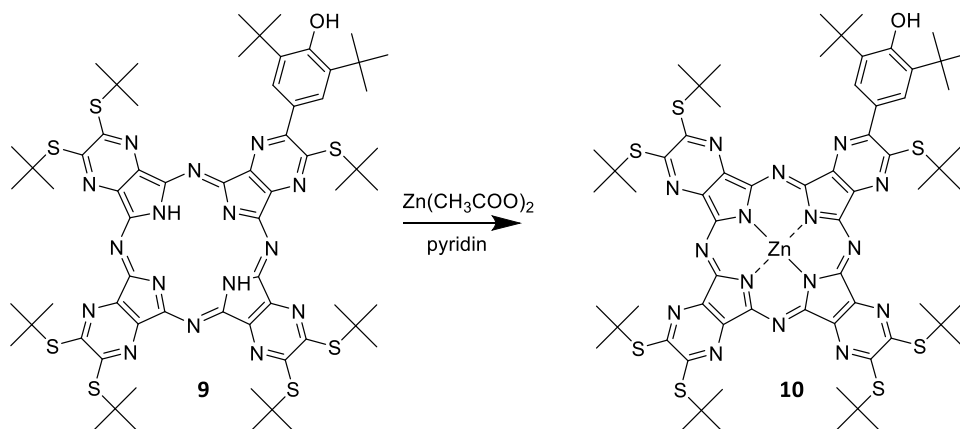
Po skončení reakce byla směs ochlazena a nalita do směsi voda/MeOH/kyselina octová (AcOH) v poměru 10:10:1. Vzniklá suspenze byla přefiltrována přes skládaný filtr a důkladně promyta vodou. Vzniklý zelený produkt se nechal na filtru vysušit do druhého dne.

Zelená pevná látka byla rozpuštěna ve směsi chloroform/THF a k roztoku byla za stálého míchání přidána kyselina *p*-toluensulfonová (1,72 g, 10 mmol) rozpuštěná v THF. Reakce probíhala za laboratorní teploty 1 hodinu. Následně byla rozpouštědla odpařena a ke směsi byla přidána voda. Sraženina byla odfiltrována a zelená pevná látka byla na filtru promyta vodou a vysušena. Poté byl produkt několikrát přečištěn pomocí sloupcové chromatografie. Jako mobilní fáze byla použita směs TOL/chloroform v poměru 2:1 a 3:1, cílová frakce se eluovala jako druhá zelenočerná frakce. Produktem byla tmavě zelená pevná látka bezkovového AzaPc (**9**).

Výtěžek: 90 mg (7 %)

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3 , 25 °C, TMS): δ = 8,38 (s, 2H; ArH), 5,66 (s, 1H; OH), 2,14 (s, 27H, SCCH_3), 2,11 (s, 18H, SCCH_3), 2,10 (s, 18H, SCCH_3), 1,68 (s, 18H, ArCCH_3), -1,73 (s, 2H, NH) ppm. ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3 , 25 °C, TMS): δ = 160,67, 160,31, 159,81, 159,16, 159,10, 156,03, 155,19, 135,54, 128,79, 127,78, 124,44, 123,96, 51,85, 51,75, 51,71, 51,64, 51,61, 50,85, 34,82, 30,79, 30,67, 30,57, 30,52, 30,18, 29,69 ppm (signály některých aromatických uhlíků nebyly detekovány). IČ (ATR): ν = 3630 (OH), 3302 (centrální NH), 2957, 2901, 1522, 1452, 1362, 1313, 1279, 1232, 1141, 1081, 1011, 971 cm^{-1} ; UV/Vis (THF, 1 μM): $\lambda_{\text{max}}(\epsilon)$ = 673 (135 100), 642 (110 000), 621 (36 700), 590 (26 100), 480 (49 400), 367 nm (103 500 $\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$); MS (MALDI): m/z : 1342.4 $[\text{M}]^+$. Elementární analýza (%) vypočítáno pro $\text{C}_{66}\text{H}_{86}\text{N}_{16}\text{O}_7$: C 58,99, H 6,45 N 16,68; nalezeno C 60,53, H 7,4, N 13,40.

7.10 Příprava 2-[3,5-di(*tert*-butyl)-4-hydroxyfenyl]-3,9,10,16,17,23,24-heptakis(*tert*-butylsulfanyl)-1,4,8,11,15,18,22,25-(oktaaza)ftalocyaninato zinečnatého komplexu (10)



Látka **9** (35 mg, 0,026 mmol) byla rozpuštěna v pyridinu (2 ml) a k roztoku byl přidán bezvodý octan zinečnatý (48 mg, 0,26 mmol). Reakční směs byla zahřívána 1 hodinu pod zpětným chladičem na teplotu 115 °C. Reakce byla kontrolována pomocí TLC, jako mobilní fáze byla zvolena směs TOL/chloroform v poměru 1:1.

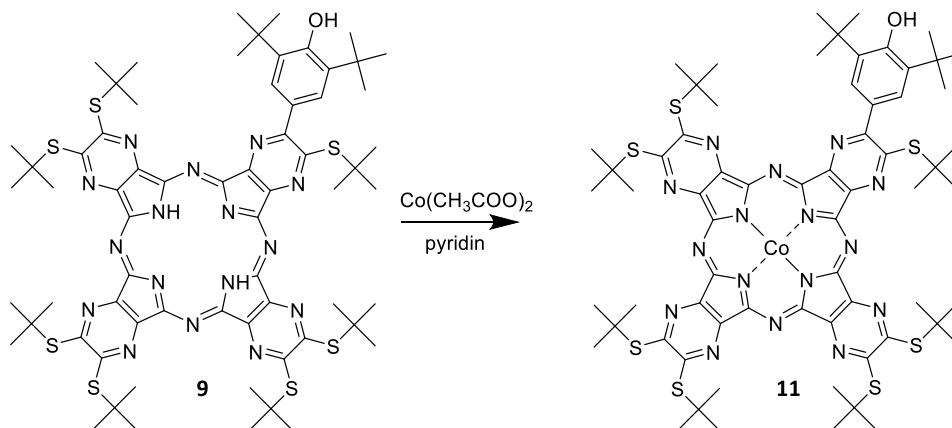
Po ukončení reakce byl pyridin odpařen na vakuové odparce. Vzniklý tmavě zelený produkt byl v baňce promyt vodou a následně odfiltrován.

Dále byl produkt přečištěn pomocí sloupcové chromatografie. Jako mobilní fáze byla nejprve použita směs TOL/chloroform v poměru 1:1 a poté TOL/chloroform/THF v poměru 20:10:0,5. Produktem byla zelenočerná pevná látka zinečnatého AzaPc (**10**).

Výtěžek: 34 mg (93 %)

^1H NMR (300 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{pyridin-d}_5$, 25 °C, TMS): δ = 8,53 (s, 2H; ArH), 7,04 (s, 1H; OH), 2,27 (s, 27H, SCCH_3), 2,25 (s, 18H, SCCH_3), 2,23 (s, 9H, SCCH_3), 2,21 (s, 9H, SCCH_3), 1,79 (s, 18H, ArCCH_3) ppm. ^{13}C NMR (75 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{pyridin-d}_5$, 25 °C, TMS): δ = 159,84, 159,02, 158,55, 158,51, 158,29, 156,50, 154,79, 151,97, 151,64, 151,54, 151,50, 151,43, 151,11, 146,85, 145,19, 144,85, 144,68, 144,59, 144,57, 144,55, 137,00, 129,29, 127,78, 51,52, 51,49, 51,46, 51,41, 50,76, 35,21, 31,07, 30,96, 30,88, 30,83, 30,78, 29,88 ppm (signály některých aromatických uhlíků nebyly detekovány). IČ (ATR): ν = 2968, 2915, 1518, 1477, 1454, 1391, 1362, 1321, 1252, 1146, 976 cm^{-1} ; UV/Vis (THF, 1 μM): $\lambda_{\text{max}}(\epsilon)$ = 651 (290 900), 591 (39 100), 378 nm ($148\,900\, \text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$); MS (MALDI): m/z : 1404.3 $[\text{M}]^+$. Elementární analýza (%) vypočítáno pro $\text{C}_{66}\text{H}_{84}\text{N}_{16}\text{O}_7\text{S}_7\text{Zn}$: C 56,33, H 6,02, N 15,92; nalezeno: C 60,21, H 6,98, N 14,55.

7.11 Příprava 2-[3,5-di(*tert*-butyl)-4-hydroxyfenyl]-3,9,10,16,17,23,24-heptakis(*tert*-butylsulfanyl)-1,4,8,11,15,18,22,25-(oktaaza)ftalocyaninato kobaltnatého komplexu (**11**)



Analogicky k látce **10** byla připravena i látka **11**.

Látka **9** (40 mg, 0,029 mmol) byla rozpuštěna v pyridinu (2 ml) a k roztoku byl přidán bezvodý octan kobaltnatý (52 mg, 0,29 mmol). Reakční směs byla zahřívána 1 hodinu pod zpětným chladičem na teplotu 115 °C. Reakce byla kontrolována pomocí TLC, jako mobilní fáze byla zvolena směs TOL/chloroform v poměru 1:1.

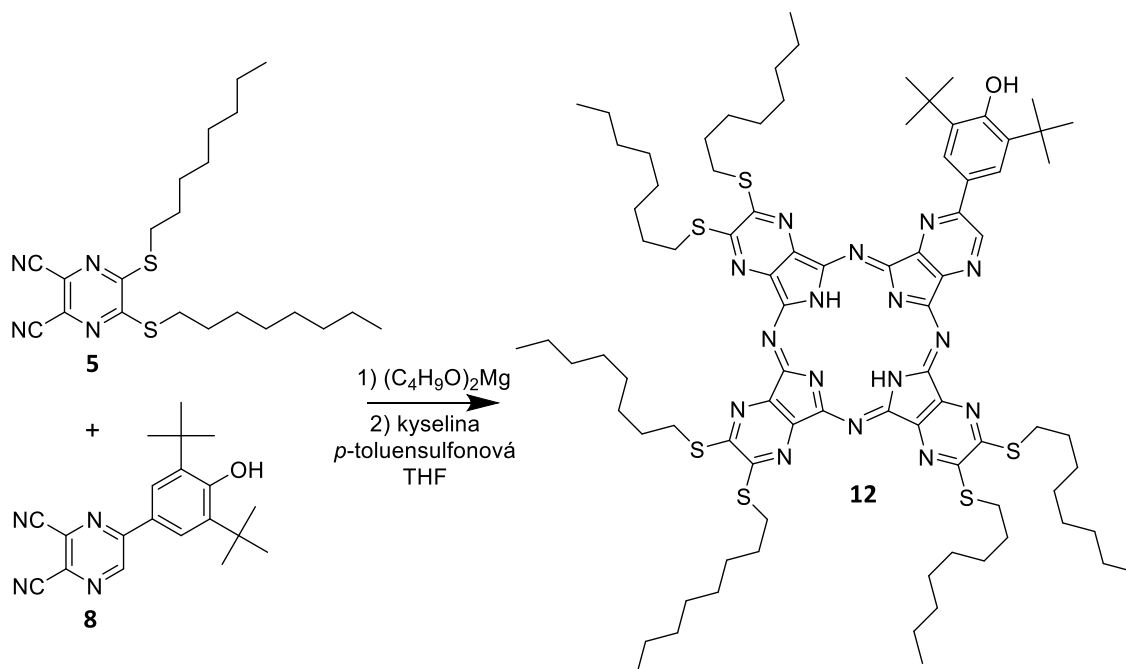
Po ukončení reakce byl pyridin odpařen na vakuové odparce. Vzniklý tmavě zelený produkt byl v baňce promyt vodou a následně odfiltrován.

Dále byl produkt přečištěn pomocí sloupcové chromatografie. Jako mobilní fáze byla nejprve použita směs TOL/chloroform v poměru 1:1 a poté TOL/chloroform/THF v poměru 20:10:0,5. Produktem byla zelená pevná látka kobaltnatého AzaPc (**11**).

Výtěžek: 35 mg (85 %)

^1H NMR (300 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{pyridin-d}_5$, 25 °C, TMS): δ = 9,19 (bs, 2H, ArH), 6,98 (s, 1H, OH), 2,45 (bs, 63H, CH_3), 1,88 (bs, 18H, CH_3). ^{13}C NMR (75 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{pyridin-d}_5$, 25 °C, TMS): δ = 51,2, 34,5, 30,6, 29,6, aromatické signály nebyly detekovány. IČ (ATR): ν = 3628 (OH), 2959, 2903, 1558, 1540, 1480, 1456, 1399, 1362, 1310, 1254, 1142 cm^{-1} . UV/Vis (THF, 1 μM): $\lambda_{\text{max}}(\epsilon)$ = 632 (120 800), 575sh, 422 (65 800), 356 (93 200). MS (MALDI): m/z : 1399,3 [M] $^+$, 1422,3 [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$, 1438,3 [$\text{M}+\text{K}$] $^+$. Elementární analýza (%) vypočítáno pro $\text{C}_{66}\text{H}_{84}\text{CoN}_{16}\text{OS}_7$: C 56,59, H 6,04, N 16,00; nalezeno: C 70,46, H 7,91, N 9,68.

7.12 Příprava 2-[3,5-di(*tert*-butyl)-4-hydroxyfenyl]-9,10,16,17,23,24-hexakis(oktylsulfanyl)-1,4,8,11,15,18,22,25-(oktaaza)ftalocyaninu (12)



Do baňky k naváženému kovovému hořčíku (0,068 g, 2,8 mmol) byl přidán bezvodý čerstvě předestilovaný butanol (5 ml) a krystalek jódu. Směs byla za stálého míchání zahřívána 3 hodiny pod zpětným chladičem na teplotu 135 °C do vytvoření butanolátu hořečnatého. Poté byly přidány látka **8** (0,033 g, 0,1 mmol) a látka **5** (0,126 g, 0,3 mmol). Reakční směs byla dále zahřívána po dobu 24 hodin.

Po skončení reakce byla směs ochlazená a nalita do směsi voda/MeOH/AcOH v poměru 10:10:1. Vzniklá suspenze byla přefiltrována přes skládaný filtr a důkladně promyta vodou. Zelený produkt se nechal na filtru vysušit do druhého dne. Zelená pevná látka byla rozpuštěna v chloroformu a za stálého míchání byla přidána kyselina *p*-toluensulfonová (0,17 g, 1 mmol) rozpuštěná v THF. Reakce probíhala za laboratorní teploty 1,5 hodiny. Poté byla rozpuštěná odpařena na vakuové odparce a pevný produkt byl na filtru důkladně promyt vodou a vysušen.

Dále byl produkt několikrát přečištěn pomocí sloupcové chromatografie. Jako mobilní fáze byla použita směs TOL/THF v poměru 50:1. Poté byla část produktu izolována pomocí preparativní TLC (TOL/THF 50:1) a použita pro potvrzení struktury pomocí hmotnostní spektrometrie.

MS (MALDI): m/z : 1590,8 $[M]^+$, 1613,8 $[M+Na]^+$, 1629,7 $[M+K]^+$.

7.13 Fotofyzikální a fotochemická měření

Stanovení kvantového výtěžku fluorescence a singletového kyslíku

Vzorky jednotlivých AzaPc byly nejprve přečištěny pomocí preparativní TLC na deskách Merck Kieselgel 60 F254, aby byla zajištěna vysoká čistota měřených látek.

Kvantový výtěžek singletového kyslíku (Φ_{Δ}) byl stanoven v THF pomocí srovnávací metody využívající rozklad specifického zhášeče singletového kyslíku, což je 1,3-difenylisobenzofuran (DPBF). Jako referenční látka byl použit nesubstituovaný zinečnatý ftalocyanin ZnPc ($\Phi_{\Delta(\text{THF})} = 0,53$).

Následně byl Φ_{Δ} vypočítán podle rovnice:

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

kde k je směrnice závislosti $\ln(A_0/A_t)$ na čase ozařování t . A_0 a A_t značí absorbance DPBF před ozáření a po ozáření stanovované látky světlem. I_{aT} je celkové množství absorbovaného světla zkoumaným vzorkem. R , respektive S v horním indexu označují referenční, respektive zkoumaný vzorek³⁵.

Kvantový výtěžek fluorescence (Φ_F) byl stanoven ve více rozpouštědlech (Tabulka 4) srovnávací metodou za použití ZnPc jako referenční látky ($\Phi_{F(\text{THF})} = 0,32^{36}$). Zkoumaný vzorek i referenční látka byly excitovány při stejné vlnové délce (599 nm). Φ_F byl následně vypočítán podle vztahu:

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

kde F je plocha pod křivkou emisního spektra, A je absorbance při excitační vlnové délce, n je index lomu rozpouštědla. R , respektive S v horním indexu označují referenční, respektive zkoumaný vzorek⁴. Pro každé rozpouštědlo byla provedena 3 měření, výsledná hodnota Φ_F byla získána jejich zprůměrováním. Absorbance v Q-pásu byla udržována pod 0,05, aby byl eliminován efekt vnitřního filtru.

Titrace

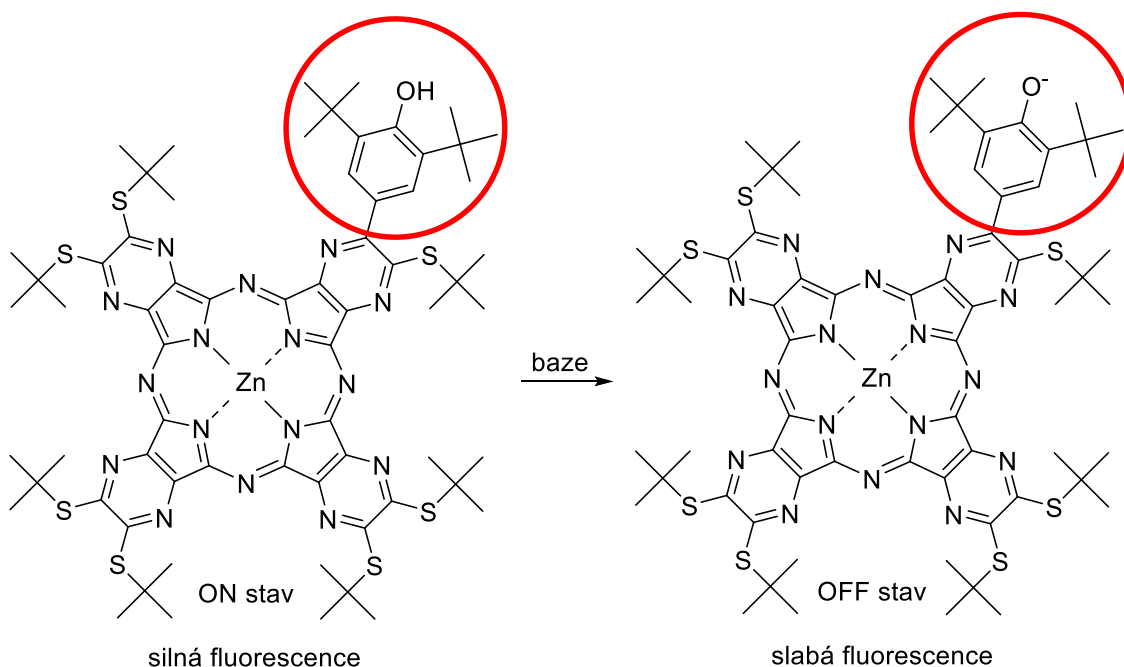
Nejprve byl připraven zásobní roztok měřeného AzaPc v ACN o koncentraci 1 μM . 2,5 ml tohoto roztoku bylo převedeno do kyvety a titrováno malými přídávky (typicky 5 – 10 μl) 5 mM roztoku tetrabutylamonium-hydroxidu (TBAH) v ACN. Po každém přídávku byla změřena absorpční a fluorescenční spektra. Titrace byly zakončeny přídávkem 7 μl (AcOH).

8. VÝSLEDKY A DISKUZE

V rámci své diplomové práce jsem se zabývala syntézou a následným studiem fotofyzikálních a fotochemických vlastností AzaPc nesoucích jeden 2,6-di(*tert*-butyl)fenolický substituent.

Již dříve byly popsány AzaPc periferně substituované aromatickými aminy, které přecházejí z excitovaného do základního stavu převážně cestou ICT. V těchto AzaPc je donorem pro ICT aminoskupina periferního substituentu, akceptorem pak AzaPc makrocyklus. Probíhající ICT má za následek velmi nízké hodnoty kvantových výtěžků fluorescence a singletového kyslíku. Pro ICT u aminosubstituovaných AzaPc je důležitý především volný elektronový pár aminu, který je v konjugaci s makrocyklem. Jeho zablokováním pak ICT neprobíhá, což se projeví nárůstem kvantového výtěžku fluorescence a singletového kyslíku. Jedním ze způsobů této blokace je snížení okolního pH, čímž dojde k protonizaci dusíku v aminoskupině. U těchto látek dochází k přepínání mezi ON/OFF stavem při hodnotách pH 2,2 – 4,2³¹.

Cílem mé práce bylo nasynthetizovat AzaPc, který by byl citlivý k vyšším hodnotám pH okolního prostředí než dříve popsané AzaPc substituované aromatickými aminy. Proto byl syntetizován AzaPc nesoucí jeden 2,6-di(*tert*-butyl)fenolický substituent. 2,6-di(*tert*-butyl)fenol, který je v konjugaci s AzaPc makrocyklem, je slabým donorem pro ICT. Pokud ale dojde k ionizaci na fenolátový anion, například v bazickém prostředí (Obrázek 10), vzniklý anion je teoreticky velmi silným donorem pro ICT, což se projeví poklesem intenzity fluorescence.



Obrázek 10: Schéma vzniku fenolátového anionu

8.1 Syntéza AzaPc

Syntéza AzaPc se skládala ze dvou kroků. Prvním byla syntéza prekurzorů, což jsou substituované pyrazin-2,3-dikarbonitrily, druhým pak cyklotetramerizační reakce, kdy spolu reagovaly dříve připravené prekurzory v poměru 1:3.

Skupiny, kterými se substituovaly jednotlivé prekurzory, byly zároveň i periferními substituenty výsledných AzaPc. Proto musely být připraveny prekurzory s takovými substituenty, které po konečné cyklotetramerizaci daly vzniklému AzaPc požadované vlastnosti.

Základním požadavkem na periferní substituci finálního AzaPc makrocyklu bylo, aby obsahoval jeden 2,6-di(*tert*-butyl)fenolický substituent. Protože jsou AzaPc planární aromatické útvary, dochází u nich často k agregaci. Z toho důvodu byly jako zbylé substituenty zvoleny *tert*-butylsulfanylové skupiny, které díky své objemnosti nežádoucí agregaci zabraňují³⁷. O substituci AzaPc oktylsulfanylovými řetězci projevila zájem spolupracující výzkumná skupina dr. Jonathana Hilla (National Institute for Materials Science, Tsukuba, Japonsko). Připravované prekurzory byly tedy substituované také těmito substituenty.

8.1.1 Syntéza prekurzorů

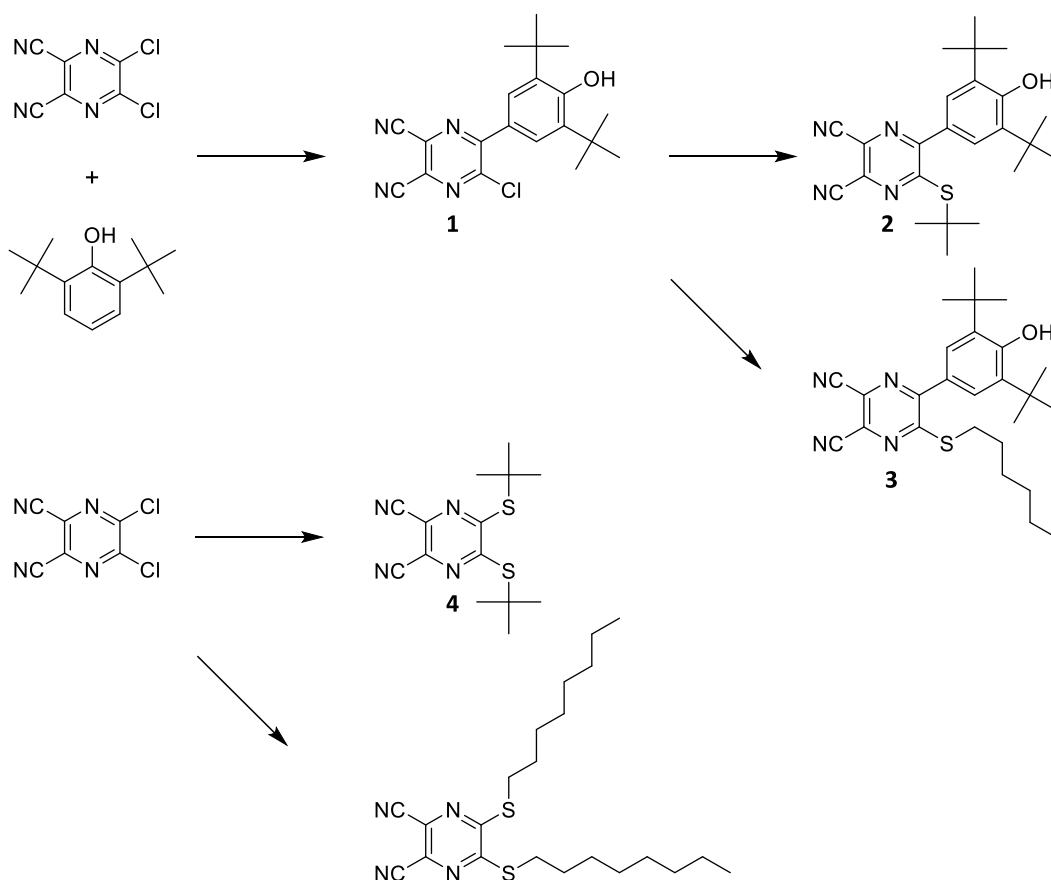


Schéma 1: Příprava prekurzorů 1 - 5

Příprava prekurzoru **2** byla dvoustupňová. Prvním krokem byla příprava látky **1** nukleofilní substitucí 5,6-dichlorpyrazin-2,3-dikarbonitrilu 2,6-di(*tert*-butyl)fenolem (Schéma **1**). Při této reakci bylo využito chránění kyslíku v hydroxylové skupině v molekule 2,6-di(*tert*-butyl)fenolu objemnými *tert*-butylovými substituenty, díky čemuž se 2,6-di(*tert*-butyl)fenol choval jako C-nukleofil, nikoliv jako O-nukleofil, a vznikla tak vazba C-C. Podmínky této reakce byly postupně optimalizovány (Tabulka **1**).

Tabulka 1: Reakční podmínky přípravy prekurzoru 1

Baze	Rozpouštědlo	Podmínky	Výtěžek
NaOH	Aceton	Laboratorní teplota, 3 hodiny	-
NaOH	ACN	Laboratorní teplota, 3 hodiny	14 %
NaOH	THF	Laboratorní teplota, 3 hodiny	28 %
K ₂ CO ₃	THF	Bezvodé prostředí, 80 °C, 3 hodiny	-
K ₂ CO ₃	ACN	Bezvodé prostředí, 80 °C, 3 hodiny	-
K ₂ CO ₃	THF	Bezvodé prostředí, 85 °C, 2 hodiny	29 %
K ₂ CO ₃	ACN	Bezvodé prostředí, laboratorní teplota, 2 hodiny	48 %

Nejprve byla provedena reakce za použití hydroxidu sodného jako baze v prostředí acetonu, ACN a THF. Při reakci probíhající v acetonu vznikalo dle TLC mnoho vedlejších produktů, proto nebyl výsledný produkt ani izolován. Výtěžek reakce probíhající v prostředí ACN, respektive THF, byl velmi nízký – 14 %, respektive 28 %. Proto byly dále změněny podmínky reakce (záměna baze, teplota, reakční čas, bezvodé prostředí).

Jako další baze byl použit uhličitan draselný. Reakce byly provedeny v bezvodém prostředí za použití ACN nebo THF jako rozpouštědel. Reakční směs byla zahřívána 3 hodiny na teplotu 80 °C. V obou rozpouštědlech vznikalo mnoho vedlejších produktů, a proto nebyly výsledné produkty izolovány. Následně byly upraveny reakční podmínky (teplota, čas, poměr reagujících složek). Nejvyššího výtěžku bylo dosaženo reakcí probíhající za laboratorní teploty po dobu 2 hodin v prostředí ACN.

Druhým krokem přípravy prekurzoru **2** byla nukleofilní substituce látky **1**, získané předchozí reakcí, 2-methylpropan-2-thiolem (Schéma **1**). Nejprve byla reakce provedena za použití hydroxidu sodného jako baze a THF jako rozpouštědla. Za těchto podmínek ale nevznikl žádný produkt. Hydroxid sodný byl poté nahrazen pyridinem a reakce byla provedena v prostředí acetonu, DMF a pyridinu. Při kontrole průběhu reakce pomocí TLC bylo zjištěno, že v prostředí acetonu vzniklo mnoho vedlejších produktů, a proto nebyl výsledný produkt izolován. V prostředí pyridinu byla dle TLC skvrna produktu intenzivnější než v prostředí DMF. Výsledný produkt byl proto získán reakcí probíhající za použití pyridinu jako baze i rozpouštědla

(Tabulka 2) s výtěžkem 77 %. Analogicky této reakci pak byl připraven i prekurzor 3 reakcí látky 1 s oktanthiolem s výtěžkem 59 %.

Tabulka 2: Reakční podmínky přípravy prekurzoru 2

Baze	Rozpouštědlo	Podmínky
NaOH	THF	90 °C, 6 hodin
Pyridin	Aceton	85 °C, 3 dny
Pyridin	DMF	115 °C, 1 hodina
Pyridin	Pyridin	115 °C, 1 hodina

Příprava prekurzoru 4 byla provedena reakcí 5,6-dichlorpyrazin-2,3-dikarbonitrilu s 2-methylpropan-2-thiolem za použití baze hydroxidu sodného v prostředí THF s výtěžkem 82 %. Tato reakce byla již popsána v odborné literatuře³².

Analogicky za stejných podmínek byl připraven i prekurzor 5 reakcí 5,6-dichlorpyrazin-2,3-dikarbonitrilu s oktanthiolem v THF s výtěžkem 58 %. Tato reakce již byla také publikována v odborné literatuře³³.

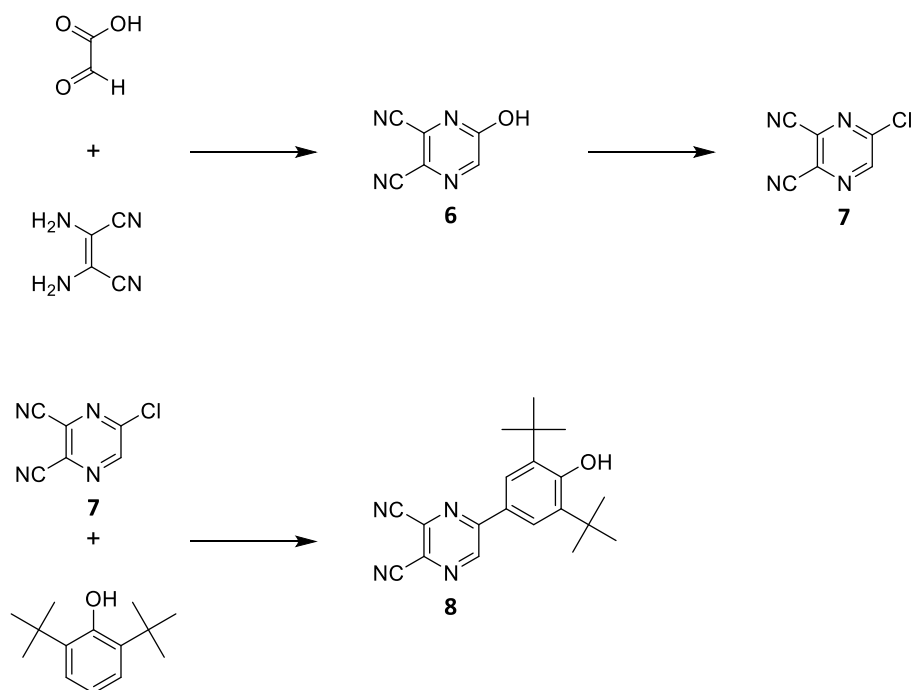


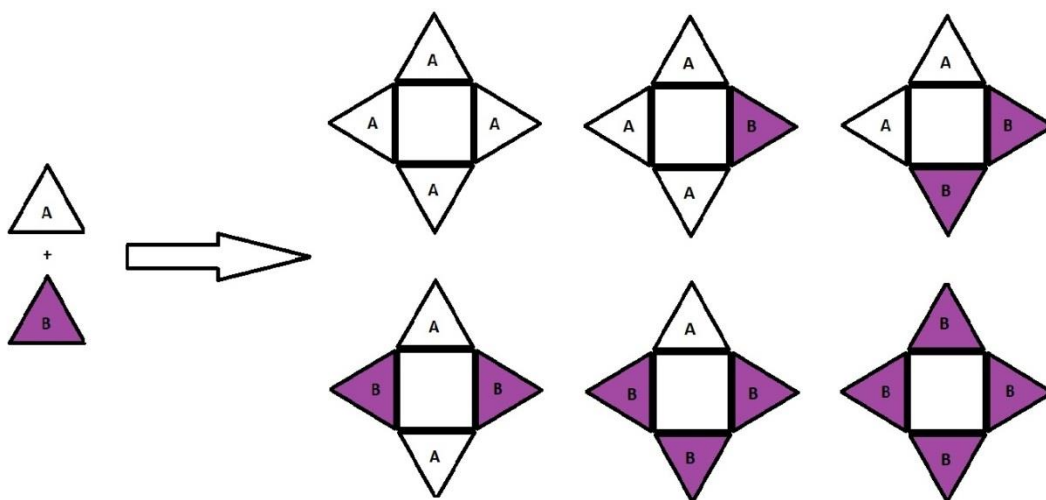
Schéma 2: Příprava prekurzorů 6 - 8

Pro další syntézy jsme se rozhodli použít i prekurzor 8, který v *ortho* poloze k fenolickému substituentu nemá žádný alkylsulfanyl substituent. Důvodem byly špatné zkušenosti ze separace AzaPc substituovaných sedmi oktylsulfanylovými substituenty a prekurzor 8 měl usnadnit separaci, protože byl méně lipofilní. Syntéza tohoto prekurzoru 8

(Schéma 2) vycházela z reakce monochlor derivátu **7** s 2,6-di(*terc*-butyl)fenolem. Monochlor derivát **7** byl získán dle již publikované reakce kyseliny glyoxalové s DAMN ve vodném prostředí s následnou chlorací pomocí chloridu fosforu v pyridinu ve výtěžku 56 %³⁴. Pro nukleofilní substituci s 2,6-di(*terc*-butyl)fenolem byly využity reakční podmínky pro přípravu strukturně obdobné látky **1** (bezvodé prostředí, ACN, uhličitan draselný, reakční doba 2 hodiny, laboratorní teplota). Po uplynutí reakční doby byla provedena kontrolní TLC, která ukázala, že v reakční směsi jsou stále zastoupeny převážně výchozí látky. Proto bylo do reakční směsi přidán přebytek reaktantů a reakce se nechala probíhat další 3 dny.

8.1.2 Cyklotetramerizační reakce

Výsledné AzaPc byly získány cyklotetramerizační reakcí, při které spolu reagovaly dříve připravené prekurzory. Jelikož bylo požadováno, aby finální AzaPc byly asymetrické, vstupovaly do reakce dva různě substituované prekurzory (A a B). Je popsáno několik metod přípravy nesymetrických AzaPc. Nejpoužívanější je statistická kondenzace prekurzorů A a B. Výsledkem této reakce je směs kongenerů AAAA, ABBB, ABAB, AABB, AAAB, BBBB (Obrázek 11). Zastoupení jednotlivých kongenerů lze ovlivnit stechiometrickým poměrem reagujících prekurzorů³⁸. Mým cílem bylo získat kongener ABBB, proto byly dané prekurzory použity v poměru 1:3.



Obrázek 11: Schéma vzniku 6 kongenerů při statistické kondenzaci

Požadované AzaPc byly připravovány reakcí s butanolátem hořečnatým v prostředí butanolu. Tímto postupem byly získány AzaPc s hořečnatými ionty koordinovanými ve svém centru.

Aby byl získán pouze požadovaný kongener ABBB, musel být ze směsi vyizolován pomocí chromatografických metod. To umožnilo až odstranění hořečnatých iontů a převedení kongenerů na bezkovové formy, protože skvrny jednotlivých hořečnatých kongenerů na TLC často nemají ostré tvary a prolínají se do sebe. Bezkovové deriváty se většinou ze směsi separují lépe³⁹.

Bezkovové deriváty byly získány reakcí směsi hořečnatých kongenerů s kyselinou *p*-toluensulfonovou rozpuštěnou v THF. Po ukončení reakce již mohly být izolovány jednotlivé kongenery pomocí sloupcové chromatografie.

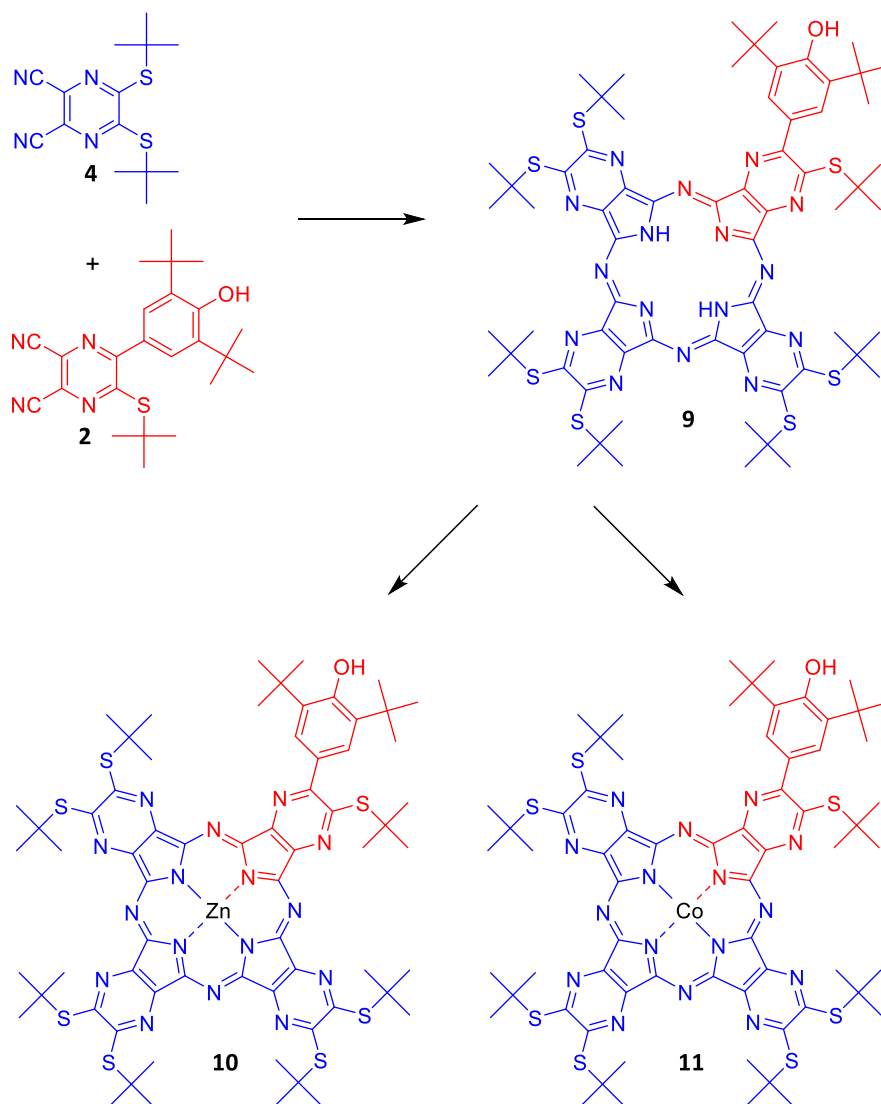
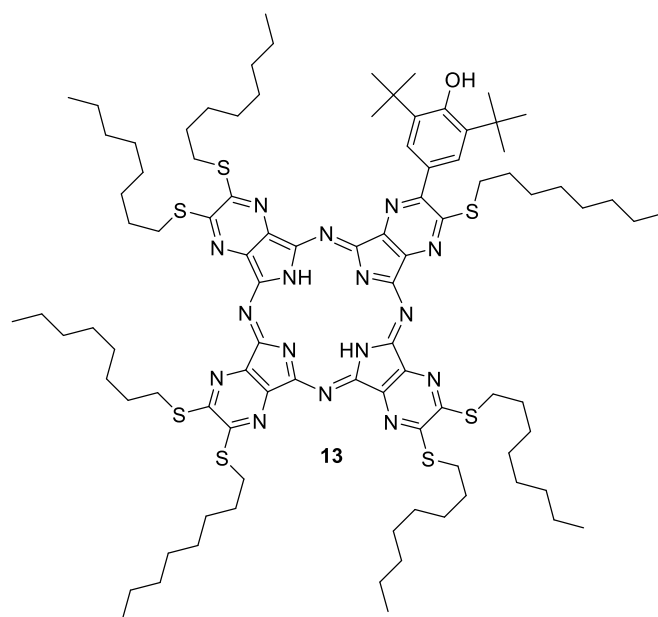


Schéma 3: Příprava AzaPc 9 - 11

Jako první byl připraven AzaPc z prekurzorů **2** a **4** (Schéma **3**). Po odkovení a vyizolování požadovaného kongeneru ABBB, byly do centra nesymetrického AzaPc **9** chelatovány ionty zinečnaté a kobaltnaté. Zinečnatý derivát **10** byl získán reakcí s bezvodým octanem zinečnatým v pyridinu, kobaltnatý reakcí s bezvodým octanem kobaltnatým v pyridinu. Kobaltnatý derivát **11** byl následně odeslán spolupracující výzkumné skupině Dr. Jonathana Hilla, která o něj projevila zájem. U zinečnatého derivátu byly zkoumány fotofyzikální a fotochemické vlastnosti (viz níže kapitola **8.2**. Fotofyzikální a fotochemická měření).



Obrázek 12: Struktura AzaPc 13

Skupina Dr. Hilla se také zabývá zkoumáním přenosu náboje v definovaných supramolekulárních útvarech, které vznikají kontrolovanou agregací AzaPc s dlouhými řetězci jako periferními substituenty. Proto Dr. Hill vyjádřil zájem také o syntézu AzaPc, ve kterém budou zaměněny periferní *tert*-butylsulfanylové substituenty za oktylsulfanylové, které by umožnily kontrolovanou tvorbu takovýchto supramolekulárních útvarů. Jako další byla tedy provedena cyklotetramerizační reakce s prekurzory **3** a **5** a očekávali jsme vznik a izolaci AzaPc **13** (Obrázek **12**). Pro přípravu tohoto AzaPc byla použita stejná metoda jako pro AzaPc **9**. Požadovaný kongener ABBB se ale nepodařilo ze směsi odseparovat, protože se záměnou periferních substituentů zvýšila lipofilita molekuly a zvýšila se schopnost agregace, což se na TLC projevilo prolínáním skvrn jednotlivých kongenerů do sebe.

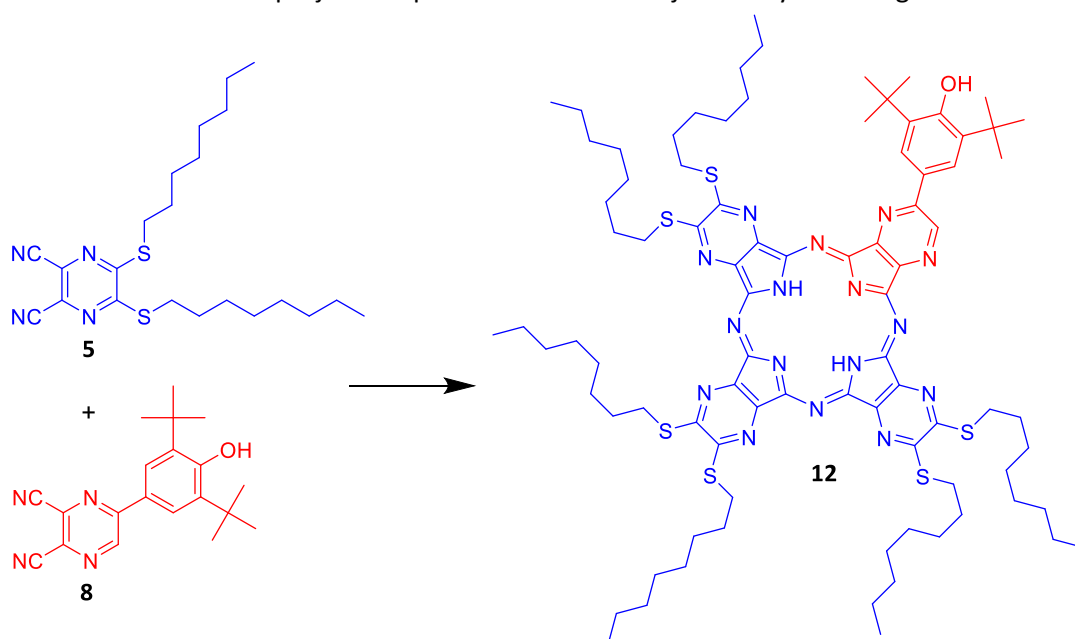
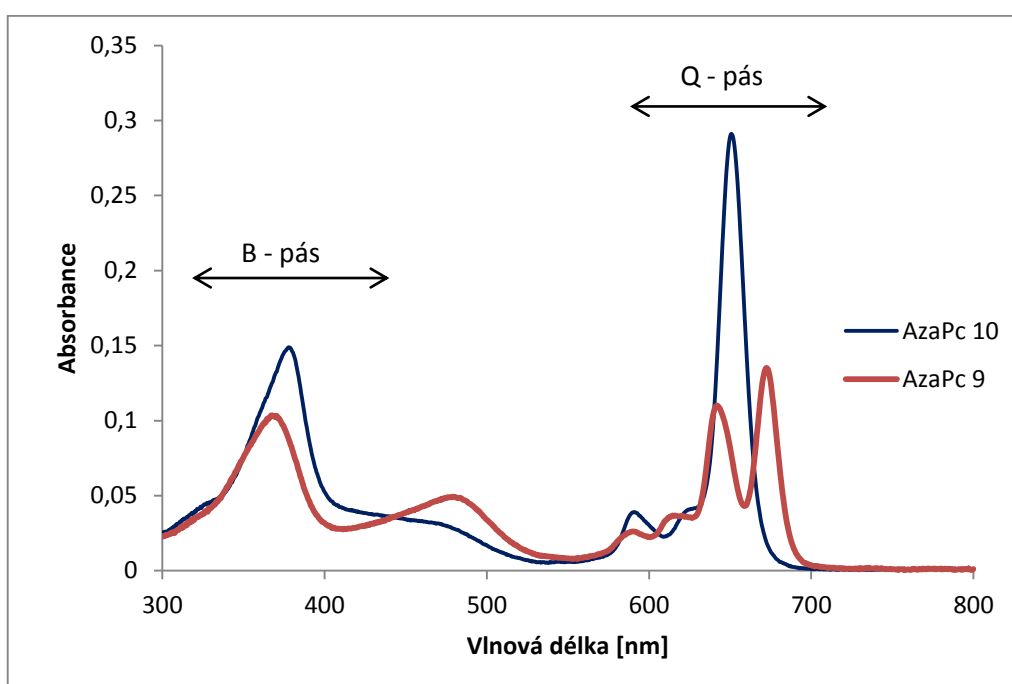


Schéma 4: Příprava AzaPc 12

Z tohoto důvodu byl nahrazen prekurzor **5** prekurzorem **8** (Schéma **4**), čímž došlo ke snížení lipofility výsledného AzaPc **12** a žádaný kongener se podařilo ze směsi izolovat. Kvůli nedostatku času byla ale izolována pomocí preparativní TLC pouze část produktu pro potvrzení struktury tohoto AzaPc hmotnostní spektrometrií.

8.2 Fotofyzikální a fotochemická měření

U připravených AzaPc **9** a **10** byla měřena absorpční spektra v THF, což je koordinující rozpouštědlo, které zabraňuje agregaci AzaPc. U obou látek byl průběh spekter typický pro AzaPc (Obrázek **13**) - vysokoenergetický absorpční B-pás v oblasti kolem 380 nm, nízkoenergetický Q-pás v oblasti kolem 650 nm. U AzaPc **9** se objevilo rozštěpení Q-pásu, které je charakteristické pro AzaPc bez centrálního kationtu.



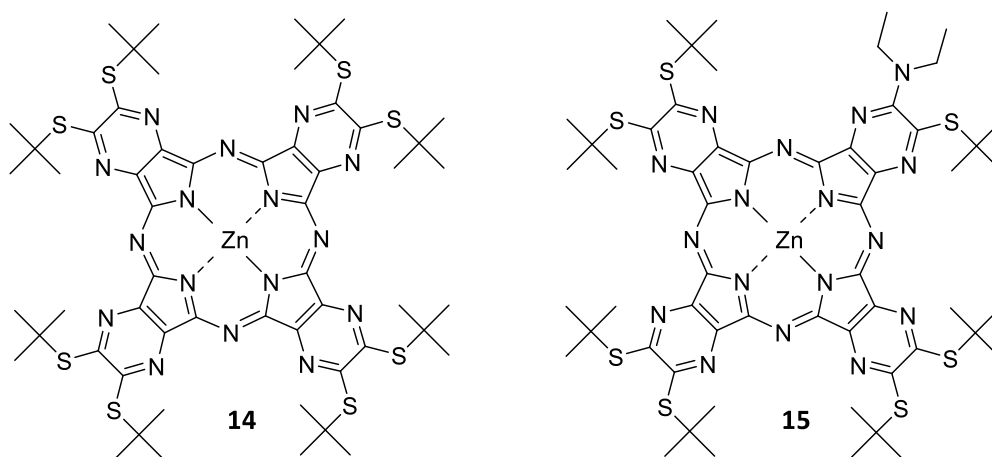
Obrázek 13: Absorpční spektra AzaPc 9, respektive AzaPc 10 v THF při koncentraci 1 µM

Dále byl u obou látek určen kvantový výtěžek fluorescence (Φ_F) a singletového kyslíku (Φ_Δ) v THF. Měření kvantového výtěžku singletového kyslíku bylo provedeno kolegy z laboratoře pomocí rozkladu DPBF. Pro obě měření byl použit jako referenční látka ZnPc ($\Phi_{F(\text{THF})} = 0,32^{36}$, $\Phi_{\Delta(\text{THF})} = 0,53^{35}$). Hodnoty kvantových výtěžků jsou uvedeny v tabulce (Tabulka **3**).

Tabulka 3: Hodnoty Φ_F a Φ_Δ AzaPc 9 a 10 v THF

Látka	Φ_F	Φ_Δ
AzaPc 9	0,036	0,056
AzaPc 10	0,28	0,58

Jako další byl u AzaPc **10** zkoumán vliv polarity rozpouštědla na kvantový výtěžek fluorescence. V molekule tohoto AzaPc je jedno donorové centrum pro ICT – fenolická hydroxy skupina, která je ale velmi slabým donorem pro ICT, což bylo dokázáno změřením kvantových výtěžků fluorescence v rozpouštědlech s různou polaritou. ICT je polaritou rozpouštědla podporováno. Proto u silných donorů pro ICT dochází v polárních rozpouštědlech k výraznému poklesu Φ_F . Současně s AzaPc **10** byl měřen Φ_F i u symetrického AzaPc **14** substituovaného osmi *tert*-butylsulfanylovými skupinami (Obrázek **14**). Tento AzaPc nemá donorové centrum pro ICT, a proto by u něj polarita rozpouštědla neměla mít vliv na Φ_F . Naměřené hodnoty Φ_F jsou uvedeny v tabulce (Tabulka **4**). Pro srovnání jsou zde i hodnoty Φ_F AzaPc **15** substituovaného jednou dialkylaminovou skupinou (Obrázek **14**), která je silným donorem pro ICT. Závislost Φ_F jednotlivých AzaPc na polaritě rozpouštědla je zobrazena níže (Obrázek **15**). Z tabulky i grafu je zřejmé, že hodnoty AzaPc **14** bez donorového centra byly prakticky nezávislé na polaritě rozpouštědla a že u AzaPc **10** byl pokles v závislosti na polaritě pouze slabý s porovnáním s AzaPc **15**, kde došlo k poklesu prakticky na nulové hodnoty již u relativně málo polárních rozpouštědel (např. THF). Z toho vyplývá, že fenolická skupina je donorem pro ICT, ale velice slabým.

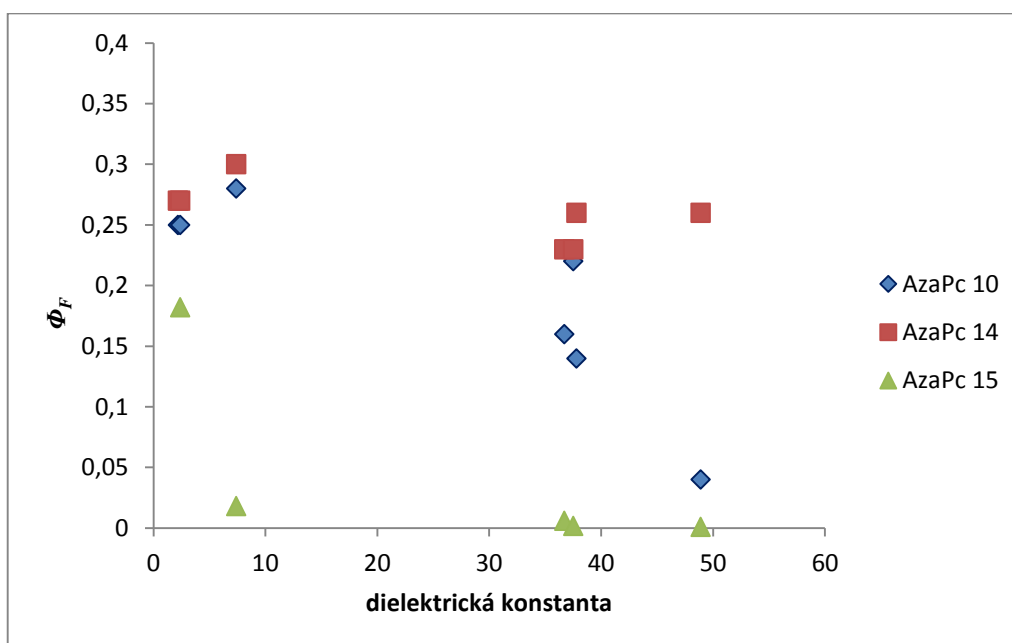


Obrázek 14: Struktura symetrického AzaPc (14) a AzaPc s diethylaminovým substituentem (15)

Tabulka 4: Hodnoty kvantových výtěžků fluorescence

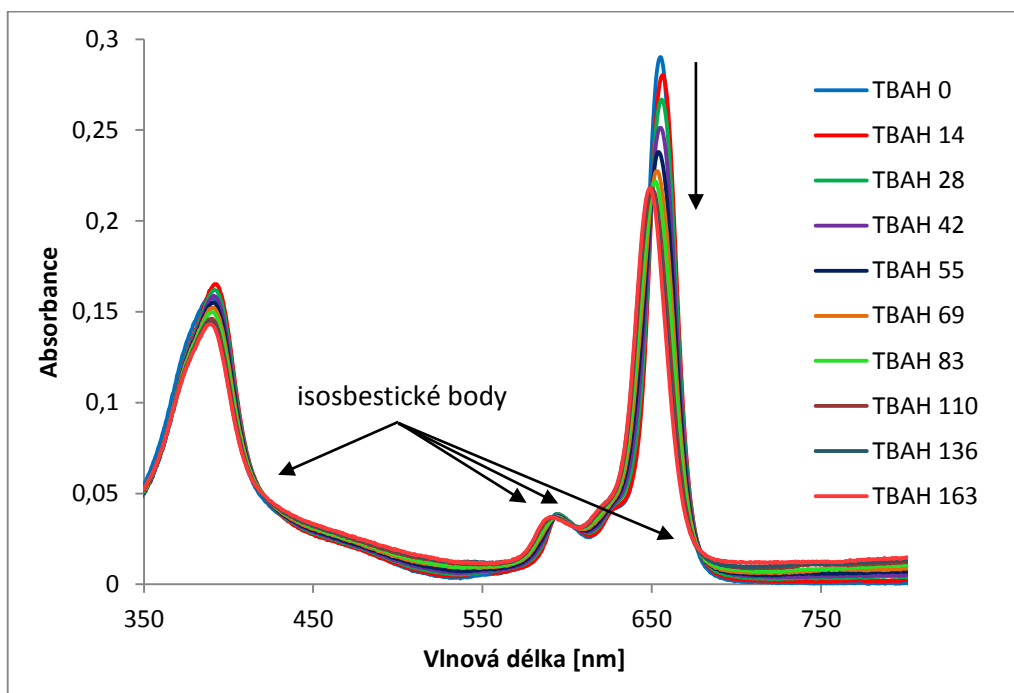
Rozpouštědlo	Dielektrická konstanta	Φ_F AzaPc 10	Φ_F AzaPc 13	Φ_F AzaPc 14 ^a
Dioxan	2,2	0,25	0,27	-
TOL	2,4	0,25	0,27	0,182 ^b
THF	7,4	0,28	0,30	0,018
DMF	36,7	0,16	0,23	0,006
ACN	37,5	0,22	0,23	0,002
DMAC	37,8	0,14	0,26	-
DMSO	48,9	0,04	0,26	0,001

^a Data převzata z literatury³⁹. Hodnoty byly korigovány na jinou hodnotu Φ_F referenční látky použité pro stanovení Φ_F . ^b V rozpouštědlovém systému toluen s 1 % pyridinu.

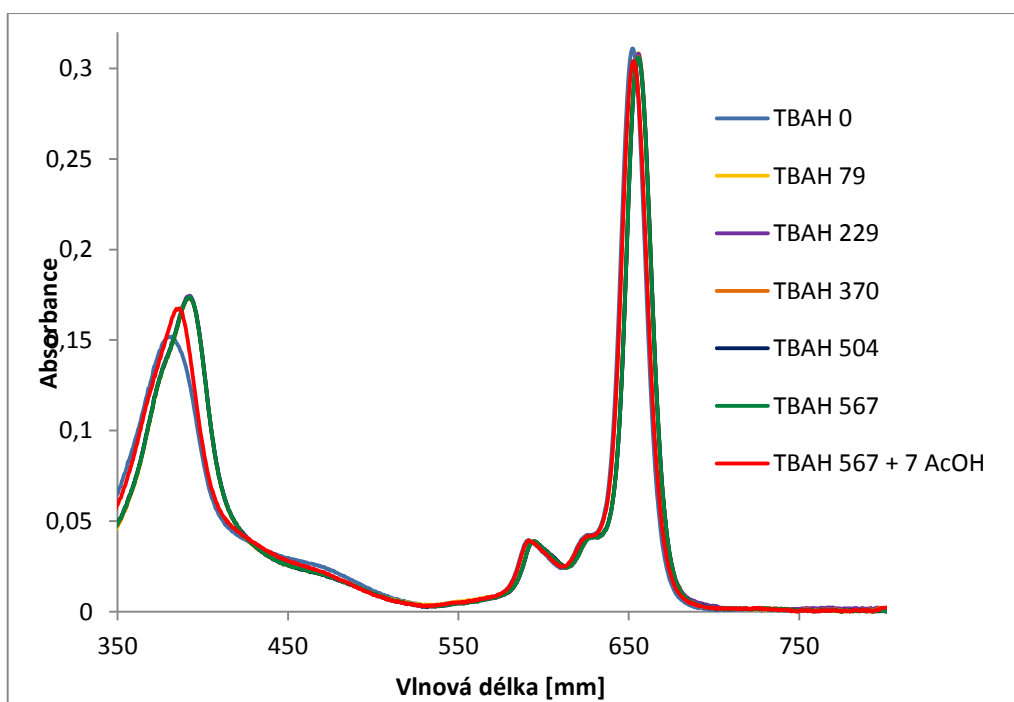


Obrázek 15: Závislost Φ_F na polaritě rozpouštědla

Na závěr byla provedena titrace AzaPc **10** s jedním donorovým centrem pro ICT a AzaPc **14** bez donorového centra (tato titrace sloužila jako kontrola) 5mM roztokem TBAH. AzaPc i TBAH byly rozpuštěny v ACN. Přidáváním TBAH k 1 μ M roztoku AzaPc se zvyšovalo pH okolního prostředí, což vedlo u AzaPc **10** k vytvoření fenolátového aniontu. Po každém přidavku TBAH bylo u obou AzaPc změřeno absorpční (Obrázek **16**, Obrázek **17**) a fluorescenční spektrum (Obrázek **18**, Obrázek **19**).



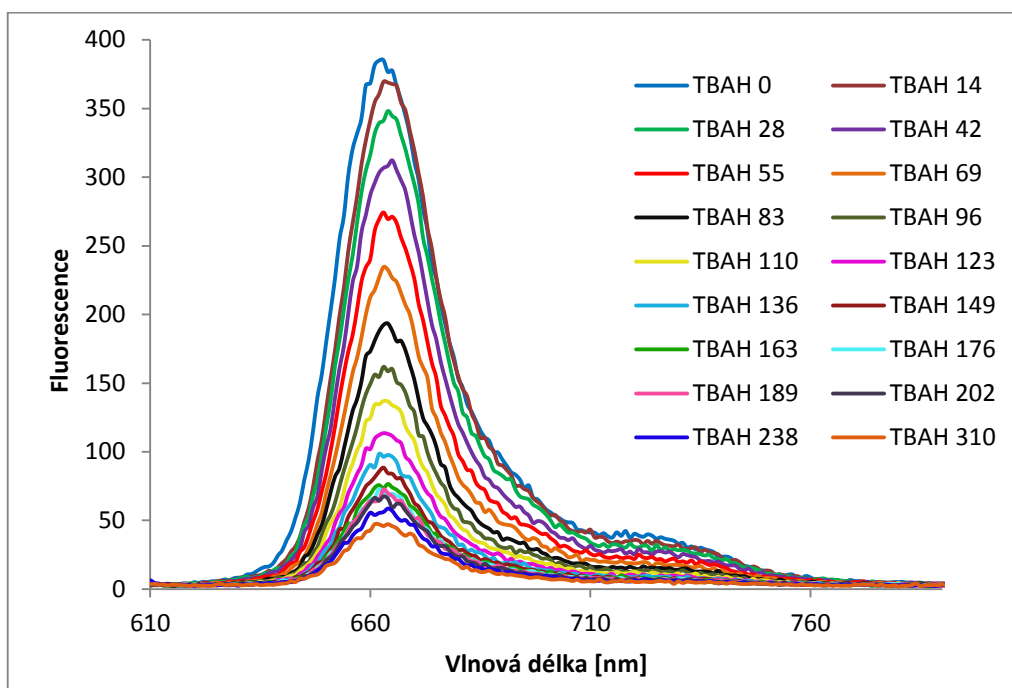
Obrázek 16: Změny v absorpčních spektrech AzaPc 10 v ACN po přidavcích TBAH. Čísla u TBAH udávají koncentraci TBAH v roztoku.



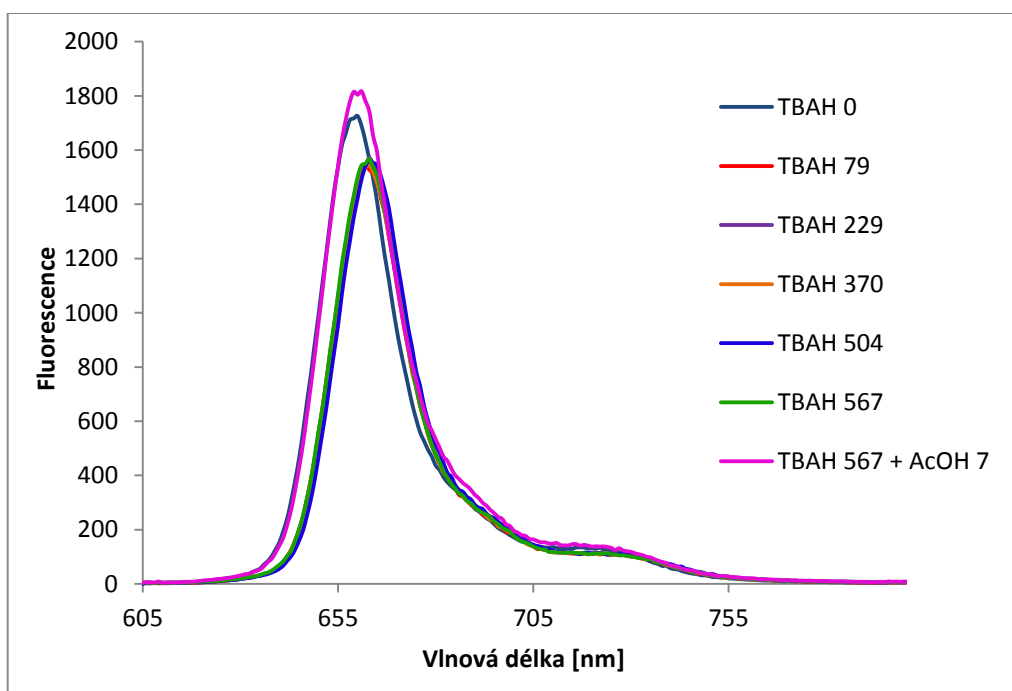
Obrázek 17: Změny v absorpčních spektrech AzaPc 14 v ACN po přidavcích TBAH, resp. AcOH. Čísla u TBAH udávají koncentraci TBAH v roztoku, resp. množství přidané AcOH v μl .

Nejprve byla u obou látek změřena absorpční a fluorescenční spektra bez přidavku TBAH. Jak průběh absorpčního, tak fluorescenčního emisního spektra odpovídal průběhu typickému pro zinečnaté AzaPc. V absorpčním spektru se u obou látek nacházel B-pás v oblasti kolem 380 nm, Q-pás kolem 650 nm (Obrázek 16, Obrázek 17). Po excitaci při 603 nm emitoval

AzaPc **10** fluorescenci s emisním maximem při 663 nm. AzaPc **13** byl excitován při 597 nm a vykazoval emisní maximum při 660 nm (Obrázek **18**, Obrázek **19**).



Obrázek 18: Změny ve fluorescenčních spektrech AzaPc 10 v ACN po přidavcích TBAH. Čísla u TBAH udávají koncentraci TBAH v roztoku.



Obrázek 19: Změny ve fluorescenčních spektrech AzaPc 14 v ACN po přidavcích TBAH, resp. AcOH. Čísla u TBAH udávají koncentraci TBAH v roztoku, resp. množství přidané AcOH v μl .

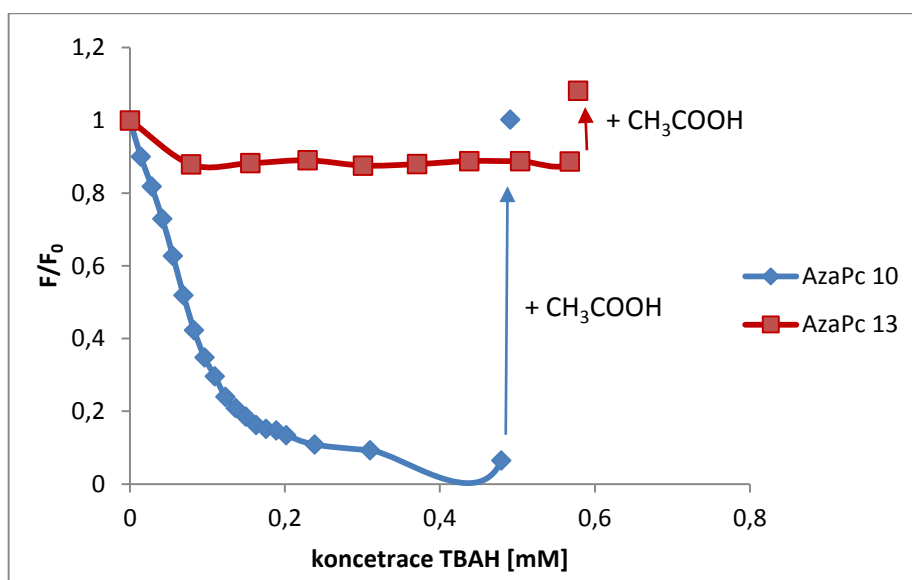
Po přidavcích roztoku TBAH došlo u AzaPc **10** ke změnám v průběhu absorpčního spektra – Q-pás se mírně posouval k nižším vlnovým délkám a docházelo k poklesu absorpance.

Při vlnových délkách 680, 605, 592 a 421 nm se vytvořily isosbestické body. Jejich přítomnost během titrací indikuje přechod jedné formy ve druhou, tzn. fenol na fenolát (Obrázek 16). Při kontrolní titraci AzaPc 13 k posunu Q-pásmu nedocházelo, mírný pokles absorpance po prvním přidavku byl způsoben zřejmě koordinací hydroxidových aniontů z TBAH na centrální zinečnatý kationt AzaPc, což změnilo absorpční vlastnosti celého komplexu. Spektrum se dalšími přidavky TBAH již neměnilo a vrátilo se k původnímu tvaru po přidavku AcOH.

Přidavkem roztoku TBAH ke vzorku AzaPc 10 došlo k rapidnímu poklesu intenzity fluorescence (Obrázek 18, Obrázek 20), což bylo způsobeno ionizací hydroxylové skupiny v 2,6-di(*tert*-butyl) fenolickém substituentu, čímž došlo k vytvoření fenolátového aniontu, který je silným donorem pro ICT (Obrázek 10). Tvar fluorescenčního spektra se po přidavku TBAH nezměnil. Emisní maxima se nacházela v oblasti 663 – 665 nm. Po ionizaci hydroxylových skupin všech AzaPc molekul v roztoku se pokles intenzity fluorescence zastavil. U kontrolního AzaPc 13 k poklesu intenzity fluorescence přidavkem roztoku TBAH nedocházelo (Obrázek 19), opět došlo pouze k velice malé dočasné změně emisních vlastností díky komplexaci hydroxidových aniontů na centrální zinečnatý kationt AzaPc, jak bylo pozorováno již v absorpčních spektrech.

Touto titrací bylo potvrzeno, že fenolátový anion v AzaPc 10 je silným donorem pro ICT. Celý proces je plně reverzibilní, což bylo dokázáno přidavkem kyseliny octové, kdy došlo k návratu intenzity fluorescence AzaPc 10 k původním hodnotám (Obrázek 20) a obnovil se i tvar absorpčního spektra.

Po zvýšení pH okolního prostředí, docházelo k poklesu intenzity fluorescence přibližně o jeden řád. Tento AzaPc má tedy předpoklad být citlivým senzorem, který by reagoval na jiné hodnoty pH než dříve popsané AzaPc substituované aromatickými aminy. Mohl by tedy nalézt uplatnění v oblasti senzorů pro bazické pH nebo pro detekci CO₂.



Obrázek 20: Změna intenzity fluorescence po přidavcích TBAH. F a F₀ představují intenzitu fluorescence po přidavku TBAH, respektive bez přidavku TBAH.

9. ZÁVĚR

V rámci své diplomové práce jsem našla syntetické postupy pro různě substituované pyrazin-2,3-dikarbonitrily s 2,6-di(*tert*-butyl)fenolickými substituenty. Jejich cyklotetramerizační reakcí bylo připraveno několik nesymetrických AzaPc, které byly vyizolovány ze směsi šesti kongenerů v bezkovové formě. Následně byly převedeny na zinečnaté a kobaltnaté komplexy.

U AzaPc **10** byl poté zkoumán vliv polarity rozpouštědla na kvantový výtěžek fluorescence a byla provedena titrace roztokem TBAH. Těmito měřeními bylo zjištěno, že fenol, který je v konjugaci s AzaPc makrocylem je slabým donorem pro ICT, fenolát silným donorem pro ICT. Ionizací fenolu v bazickém prostředí tedy dochází k přepnutí ze stavu ON do stavu OFF, přičemž poměr mezi těmito stavy je přibližně v řádu desítek. To znamená, že poměr mezi signálem a šumem by byl dobrý pro případné praktické využití.

10. POUŽITÁ LITERATURA

- ¹ LAKOWICZ, Joseph R. *Principles of fluorescence spectroscopy*. 3. vyd. New York: Springer, 2006. ISBN 978-0-38731278-1.
- ² ZIMČÍK, Petr. Azaftalocyaniny - od syntéz přes fotochemické a fotofyzikální vlastnosti k aplikacím. *Chem. Listy*. 2012, roč. 106, č. 4, s. 275 – 282.
- ³ NOOMNARM, Ulai, CLEGG, Robert M. Fluorescence lifetimes: fundamentals and interpretations. *Photosynth. Res.* 2009, roč. 101, č. 2-3, s. 181 – 194.
- ⁴ FERY-FORGUES, Suzanne, LAVABRE, Dominique. Are Fluorescence Quantum Yields So Tricky to Measure? A Demonstration Using Familiar Stationery Products. *J. Chem. Educ.* 1999, roč. 76, č. 9, s. 1260 – 1264.
- ⁵ VERVEER, Peter J., SQUIRE, Anthony, BASTIAENS, Philippe I.H.. Global Analysis of Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy Data. *Biophys. J.* 2000, roč. 78, č. 4, s. 2127 – 2137.
- ⁶ BECKER, Andreas, HESSENIUS, Carsten, LICHA, Kai, EBERT, Bernd, SUKOWSKI, Uwe, SEMMLER, Wolfhard, WIEDENMANN, Bertram, GRÖTZINGER, Carsten. Receptor-targeted optical imaging of tumors with near-infrared fluorescent ligands. *Nat. Biotechnol.* 2001, roč. 19, č. 4, s. 327 – 331.
- ⁷ JARES-ERIJMAN, Elizabeth A., JOVIN, Thomas M. FRET imaging. *Nat. Biotechnol.* 2003, roč. 21, č. 11, s. 1387 – 1395.
- ⁸ NOVÁKOVÁ, Veronika. *Příprava a studium vlastností azaanalogů ftalocyaninů*. Disertační práce. Hradec Králové, Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, 2011.
- ⁹ LIU, Jing Yao, SCHMIDT, John A., BOLTON, James R. Intramolecular photochemical electron transfer. 6. Bridge and solvent dependence of electron transfer in covalently linked porphyrin-peptide-quinone compounds. *J. Phys. Chem.* 1991, roč. 95, č. 18, s. 6924 – 6927.
- ¹⁰ WASIELEWSKI, Michael R., NIEMCZYK, Mark P. Photoinduced electron transfer in meso-triphenyltriptycenyloporphyrin-quinones. Restricting donor-acceptor distances and orientations. *J. Am. Chem. Soc.* 1984, roč. 106, č. 17, s. 5043 – 5045.
- ¹¹ OSUKA, Atsuhiko, MARUYAMA, Kazuhiro, HIRAYAMA, Satoshi. Quinone-linked and quinone-capped porphyrins. Their one-pot photochemical synthesis and fluorescence behavior. *Tetrahedron*. 1989, roč. 45, č. 15, s. 4815 – 4829.
- ¹² BERG-BRENNAN, Christine A., YOON, Dong I., HUPP, Joseph T. Modulation of photoinduced electron-transfer reactivity by intramolecular folding. *J. Am. Chem. Soc.* 1993, roč. 115, č. 5, s. 2048 – 2049.

-
- ¹³ FAJARI, Lluís, FORS, Pere, LANG, Kamil, NONELL, Santiago, TRULL, Francesc R. Intramolecular and intermolecular photoinduced electron transfer in isomeric mesoporphyrin nitrobenzyl esters: structure and solvent effects. *J. Photochem. Photobiol., A*. 1996, roč. 93, č. 2 - 3, s. 119 – 128.
- ¹⁴ NISHIZAWA, Seiichi, WATANABE, Masatoshi, UCHIDA, Tatsuya, TERAMAE, Norio. Fluorescence ratio sensing of alkali metal ions based on control of the intramolecular exciplex formation. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*. 1999, č. 2, s. 141 - 144.
- ¹⁵ SCHAZMANN, Benjamin, ALHASHIMY, Nameer, DIAMOND, Dermot. Chloride Selective Calix[4]arene Optical Sensor Combining Urea Functionality with Pyrene Excimer Transduction. *J. Am. Chem. Soc.* 2006, roč. 128, č. 26, s. 8607 – 8614.
- ¹⁶ ROSENZWEIG, Zeev, KOPELMAN, Raoul. Development of a Submicrometer Optical Fiber Oxygen Sensor. *Anal. Chem.* 1995, roč. 67, č. 15, s. 2650 – 2654.
- ¹⁷ PICKUP, John C., HUSSAIN, Faeiza, EVANS, Nicholas D., ROLINSKI, Olaf J., BIRCH, David J.S. Fluorescence-based glucose sensors. *Biosens. Bioelectron.* 2005, roč. 20, č. 12, s. 2555 – 2565.
- ¹⁸ HAIDEKKER, Mark A., THEODORAKIS, Emmanuel A. Molecular rotors - fluorescent biosensors for viscosity and flow. *Org. Biomol. Chem.* 2007, roč. 5, č. 11, s. 1669 – 1678.
- ¹⁹ PARKER, D. Luminescent lanthanide sensors for pH, pO₂ and selected anions. *Coord. Chem. Rev.* 2000, roč. 205, č. 1, s. 109 – 130.
- ²⁰ OLLEY, David A., WREN, Ellen J., VAMVOUNIS, George, FERNEE, Mark J., WANG, Xin, BURN, Paul L., MEREDITH, Paul, SHAW, Paul E. Explosive Sensing with Fluorescent Dendrimers: The Role of Collisional Quenching. *Chem. Mater.* 2011, roč. 23, č. 3, s. 789 – 794.
- ²¹ SNEE, Preston T., SOMERS, Rebecca C., NAIR, Gautham, ZIMMER, John P., BAWENDI, Mounji G., NOCERA, Daniel G. A Ratiometric CdSe/ZnS Nanocrystal pH Sensor. *J. Am. Chem. Soc.* 2006, roč. 128, č. 41, s. 13320 – 13321.
- ²² LAKOWICZ, Joseph R. *Topics in Fluorescence Spectroscopy Probe Design and Chemical Sensing*. Boston, MA: Springer US, 2002. ISBN 0-306-47060-8.
- ²³ DE SILVA, A. Prasanna. Combining luminescence, coordination and electron transfer for signalling purposes. *Coord. Chem. Rev.* 2000, roč. 205, č. 1, s. 41 – 57.
- ²⁴ VALEUR, Bernard. Design principles of fluorescent molecular sensors for cation recognition. *Coord. Chem. Rev.* 2000, roč. 205, č. 1, s. 3 – 40.
- ²⁵ TSUKANOV, Alexey. V., DUBONOSOV, Alexander. D., BREN, Vladimir A., MINKIN, Vladimir I. Organic chemosensors with crown-ether groups (review). *Chem. Heterocycl. Compd. (N. Y., NY, U. S.)*. 2008, roč. 44, č. 8, s. 899 – 923.
- ²⁶ DE SILVA, A. Prasanna, MOODY, Thomas S., WRIGHT, Glenn D. Fluorescent PET (Photoinduced Electron Transfer) sensors as potent analytical tools. *Analyst*. 2009, roč. 134, č. 12, s. 2385 – 2393.

-
- ²⁷ ZHENG, Shuai, LYNCH, P. L. Mark, RICE, Terence E., MOODY, Thomas S., GUNARATNE, H. Q. Nimal, DE SILVA, A. Prasanna. Structural effects on the pH-dependent fluorescence of naphthalenic derivatives and consequences for sensing/switching. *Photochem. Photobiol. Sci.* 2012, roč. 11, č. 11, s. 1675 – 1681.
- ²⁸ XU, Jun-Hong, HOU, Yi-Min, MA, Qiu-Juan, WU, Xue-Fen, WEI, Xiao-Jie. A highly selective fluorescent sensor for Fe³⁺ based on covalently immobilized derivative of naphthalimide. *Spectrochim. Acta, Part A.* 2013, roč. 112, s. 116 – 124.
- ²⁹ GEORGIEV, Nikolai I., DIMOV, Stefan M., ASIRI, Abdullah M., ALAMRY, Khalid A., OBAID, Abdullah Y., BOJINOV, Vladimir B. Synthesis, selective pH-sensing activity and logic behavior of highly water-soluble 1,8-naphthalimide and dihydroimidazonaphthalimide derivatives. *J. Lumin.* 2014, roč. 149, s. 325 – 332.
- ³⁰ NOVÁKOVÁ, Veronika, LOCHMAN, Lukáš, ZAJÍCOVÁ, Ivana, KOPECKÝ, Kamil, MILETÍN, Miroslav, LANG, Kamil, KIRAKCI, Kaplan, ZIMČÍK, Petr. Azaphthalocyanines: Red Fluorescent Probes for Cations. *Chem. – Eur. J.* 2013, roč. 19, č. 16, s. 5025 – 5028.
- ³¹ NOVÁKOVÁ, Veronika, MILETÍN, Miroslav, KOPECKÝ, Kamil, ZIMČÍK, Petr. Red-Emitting Dyes with Photophysical and Photochemical Properties Controlled by pH. *Chem. – Eur. J.* 2011, roč. 17, č. 50, s. 14273 – 14282.
- ³² ZIMČÍK, Petr, MILETÍN, Miroslav, NOVÁKOVÁ, Veronika, KOPECKÝ, Kamil, NEJEDLÁ, Marcela, STARÁ, Vendula, SEDLÁČKOVÁ, Kateřina. Effective Monofunctional Azaphthalocyanine Photosensitizers for Photodynamic Therapy. *Aust. J. Chem.* 2009, roč. 62, č. 5, s. 425 – 433.
- ³³ ZIMČÍK, Petr, MILETÍN, Miroslav, KOSTKA, Miroslav, SCHWARZ, Jan, MUSIL, Zbyněk, KOPECKÝ, Kamil. Synthesis and comparison of photodynamic activity of alkylheteroatom substituted azaphthalocyanines. *J. Photochem. Photobiol., A.* 2004, roč. 163, č. 1-2, s. 21 – 28.
- ³⁴ NAKAMURA, Akira, ATAKA, Toshiei, SEGAWA, Hirozo, TAKEUCHI, Yasutomo, TAKEMATSU, Tetsuo. Studies on herbicidal 2,3-dicyanopyrazines. Part I. Structure-activity relationship of herbicidal 2,3-dicyano-5-substituted pyrazines. *Agric. Biol. Chem.* 1983, roč. 47, č. 7, s. 1555 – 1560.
- ³⁵ NOVÁKOVÁ, Veronika, MILETÍN, Miroslav, FILANDROVÁ, Tereza, LENČO, Juraj, RŮŽIČKA, Aleš, ZIMČÍK, Petr. Role of Steric Hindrance in the Newman-Kwart Rearrangement and in the Synthesis and Photophysical Properties of Arylsulfanyl Tetrapyrazinoporphyrazines. *J. Org. Chem.* 2014, roč. 79, č. 5, s. 2082 – 2093.
- ³⁶ ZIMČÍK, Petr, NOVÁKOVÁ, Veronika, KOPECKÝ, Kamil, MILETÍN, Miroslav, USLU KOBAC, Rabia Zeynep, ŠVANDRLÍKOVÁ, Eva, VÁCHOVÁ, Lenka, LANG, Kamil. Magnesium Azaphthalocyanines: An Emerging Family of Excellent Red-Emitting Fluorophores. *Inorg. Chem.* 2012, roč. 51, č. 7, s. 4215 – 4223.
- ³⁷ KOSTKA, Miroslav, ZIMČÍK, Petr, MILETÍN, Miroslav, KLEMERA, Petr, KOPECKÝ, Kamil, MUSIL, Zbyněk. Comparison of aggregation properties and photodynamic activity of phthalocyanines and azaphthalocyanines. *J. Photochem. Photobiol., A.* 2006, roč. 178, č. 1, s. 16 – 25.

³⁸ DE LA TORRE, Gema, CLAESSENS, Christian G., TORRES, Tomás. Phthalocyanines: The Need for Selective Synthetic Approaches. *Eur. J. Org. Chem.* 2000, roč. 2000, č. 16, s. 2821 – 2830.

³⁹ NOVÁKOVA, Veronika, ZIMČÍK, Petr, MILETÍN, Miroslav, VÁCHOVÁ, Lenka, KOPECKÝ, Kamil, LANG, Kamil, CHÁBERA, Pavel, POLÍVKA, Tomáš. Ultrafast intramolecular charge transfer in tetrapyrazinoporphyrazines controls the quantum yields of fluorescence and singlet oxygen. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2010, roč. 12, č. 11, s. 2555 – 2563.