UNIVERZITA KARLOVA

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

KATEDRA BIOFYZIKY A FYZIKÁLNÍ CHEMIE

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Příprava fluorescenčních senzorů odvozených od azaftalocyaninů se zvýšenou selektivitou pro vybrané kationty kovů

Hradec Králové, 2017 Štěpánka Uhlířová

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

V Hradci Králové, dne 8.5.2017 ……...……

Na tomto místě bych ráda poděkovala mé školitelce doc. PharmDr. Veronice Novákové, Ph.D. za pomoc, trpělivost, cenné rady a vedení při vzniku této práce. Velký dík patří také celému kolektivu laboratoře AzaPc group za velmi příjemné pracovní prostředí a ochotu vždy pomoci. Diplomová práce vznikla za podpory projektu SVV 260 401.

OBSAH

1. ABSTRAKT 3
2. ABSTRACT 4
3. ZKRATKY 5
4. CÍL PRÁCE 6
5. TEORETICKÁ ČÁST 7
5.1. Fluorescence 8
5.1.1. Zrcadlová symetrie absorpčního a emisního spektra 9
5.2. Intramolekulární přenos náboje a princip senzorů 10
5.3. Fluorescenční senzory 10
5.3.1. Fluorofory používané v praxi 11
5.3.2. Azaftalocyaniny jako fluorofory 13
5.3.3. Senzorické AzaPc 14
6. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST 17
6.1. Použité chemikálie a přístroje 17
6.2. Schéma prováděných reakcí 18
6.3. Příprava 5-chlor-6-(1,4,7,10,13-pentaoxa-16-azacyklooktadekan-16-yl)pyrazin-2,3-dikarbonitrilu (1) 20
6.4. Příprava 2-(2-((tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)oxy)ethoxy)ethanolu 21
6.5. Příprava 5-(2-(2-hydroxyethoxy)ethoxy)-6-(1,4,7,10,13-pentaoxa-16-azacyklooktadekan-16-yl)pyrazin-2,3-dikarbonitrilu (2) 22
6.6. Příprava 5-(1,4,7,10,13-pentaoxa-16-azacyklooktadekan-16-yl)-6-(2-(2-((tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)oxy)ethoxy)ethoxy)pyrazin-2,3-dikarbonitrilu (3) 23
6.7. Příprava nesymetrického AzaPc 4 24
6.8. Příprava nesymetrického AzaPc 5 26
6.9. Příprava 5-chloro-6-(1,4,7,10-tetraoxa-13-azacyklopentadekan-13-yl)pyrazin-2,3-dikarbonitrilu (6) 28
6.10. Příprava 5-((1,4,7,10-tetraoxacyklododekan-2-yl)methoxy)-6-(1,4,7,10-tetraoxa-13-azacyklopentadekan-13-yl)pyrazin-2,3-dikarbonitrilu (8) 29
6.11. Příprava 5-((1,4,7,10-tetraoxacyklododekan-2-yl)methoxy)-6-chloropyrazin-2,3-dikarbonitrilu (7) 30
6.12. Příprava 5-((1,4,7,10-tetraoxacyklododekan-2-yl)methoxy)-6-(1,4,7,10-tetraoxa-13-azacyklopentadekan-13-yl)pyrazin-2,3-dikarbonitrilu (8) 32
6.13. Příprava nesymetrického AzaPc 9 33
6.14. Příprava nesymetrického AzaPc 10 35

6.15. Fotofyzikální měření 37
7. DISKUZE A VÝSLEDKY 38
8. ZÁVĚR 47
9. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY 48

1. ABSTRAKT

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra	**Katedra biofyziky a fyzikální chemie**
Kandidát	**Štěpánka Uhlířová**
Školitel	**doc. PharmDr. Veronika Nováková, Ph.D.**
Název diplomové práce	**Příprava fluorescenčních senzorů odvozených od azaftalocyaninů se zvýšenou selektivitou pro vybrané kationty kovů**

Azaftalocyaniny (AzaPc) s navázanými aza-crowny na periferii jsou sloučeniny, které lze použít jako fluorescenční senzory pro kationty kovů. Velkou výhodou těchto látek je emise v červené části spektra, ve které není záření absorbováno endogenními chromofory. Předchozí projekty naší výzkumné skupiny sloužily zejména k ověření citlivosti AzaPc senzorů k alkalickým kovům a kovům alkalických zemin. Cílem této diplomové práce je příprava sloučenin se zvýšenou selektivitou rozpoznávacího centra pro jednotlivé kationty kovů. Toho lze dosáhnout navázáním různých substituentů typu lariat etheru resp. crown etheru do blízkosti aza-crownu.

Nejprve byly, pomocí nukleofilní substituce, připraveny vhodné prekurzory, tj. 5,6-disubstituované pyrazin-2,3-dikarbonitrily. V dalším kroku následovala cyklotetramerizace dvou různých prekurzorů (A a B) pomocí templátové metody s octanem zinečnatým ve vysoko vroucím rozpouštědle. Výsledkem této reakce byla statistická směs šesti kongenerů AzaPc, ze kterého byl vyizolován požadovaný kongener typu ABBB. Senzorické vlastnosti připravených AzaPc byly následně studovány pomocí fluorescenčních titračních experimentů, které ukázaly na vysokou selektivitu k draselným iontům bez citlivosti na další studované analyty (Na^+, Li^+, Ca^{2+}, Mg^{2+}).

2. ABSTRACT

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department	**Department of Biophysics and Physical Chemistry**
Candidate	**Štěpánka Uhlířová**
Supervisor	**doc. PharmDr. Veronika Nováková, Ph.D.**
Title of thesis	**Syntheses of azaphthalocyanine fluorescence sensors with the improved selectivity towards desired metal cations**

Azaphthalocyanines (AzaPc) bearing aza-crowns on the periphery may be used as fluorescence sensors for metal cations. Emission in the red part of the spectrum is a great advantage of these compounds because such light is not absorbed by endogenous chromophores. Previous projects served mostly as a proof of concept where sensitivity of AzaPc sensors to a series of alkali and alkaline earth metal cations was shown. The aim of this diploma thesis is focused on the improvement the selectivity of a recognition moiety for particular cations. This can be achieved by the attachment of lariat ethers or crown ethers close to aza-crown moiety.

Firstly, appropriate precursors, i.e. 5,6-disubstituted pyrazine-2,3-dicarbonitriles, were prepared by nucleophilic substitution. Then, cyclotetramerization of two different precursors (A and B) using a template method with zinc acetate in a high boiling solvent provided a statistical mixture of AzaPc congeners. Desired unsymmetrical AzaPc of ABBB type was chromatographically separated. Finally, sensoric properties of prepared AzaPcs were studied by the mean of fluorescence titration experiments, which revealed improved selectivity for potassium cations together with insensitivity to other cations studied (Na^{+}, Li^{+}, Ca^{2+}, Mg^{2+}).

3. ZKRATKY

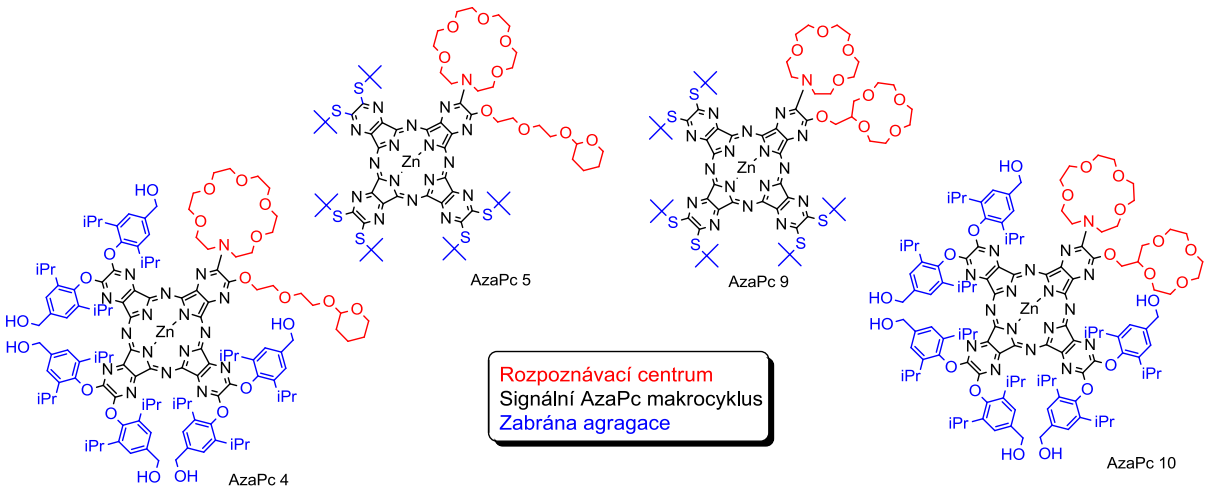
AzaPc	Azaftalocyanin (Azaphthalocyanine)
EAC	Ethyl-acetát
CHF	Chloroform
CSS	Charge separated state
DMF	*N,N*-Dimethylformamid
ICT	Intramolekulární přenos náboje (Intramolecular charge transfer)
IČ	Infračervené spektrum
MeOH	Methanol
MS	Hmotnostní spektrometrie (Mass spectrometry)
NMR	Nukleární magnetická rezonance
PET	Světlem vyvolaný přenos náboje (Photo-induced electron transfer)
Pc	Ftalocyanin (Phthalocyanine)
R_f	Retenční faktor
TEA	Triethylamin
THF	Tetrahydrofuran
TLC	Tenkovrstvá chromatografie (Thin layer chromatography)

4. CÍL PRÁCE

Cílem mé diplomové práce bude příprava asymetrických azaftalocyaninů (AzaPc) se zvýšenou selektivitou k vybraným kationtům kovů. Princip senzorických vlastností těchto molekul zahrnuje blokaci tzv. intramolekulárního přenosu náboje (ICT) po navázání analytu do rozpoznávacího centra molekuly, výsledkem této interakce je pak nárůst fluorescence.

Cílové molekuly (viz. Obr. 1) budou připraveny pomocí cyklotetramerizace za použití templátové metody, kdy budou reagovat námi připravené prekurzory A a B v poměru 1:3 a bude vyizolován kongener typu ABBB. Rozhodli jsme se pro přípravu molekul, kde je navázán buďto 1-aza-15-crown-5, který je známý pro svoji citlivost k sodným a draselným iontům nebo 1-aza-18-crown-6, citlivý převážně k draselným iontům.[1] V blízkosti těchto aza-crownů pak bude substituent (lariat ether nebo crown), který by měl zvýšit pevnost vazby analytu v rozpoznávacím centru. Zbytek AzaPc molekuly ponese objemné substituenty *(terc*-butylsulfanylové, respektive aryloxy skupiny), zabraňující nežádoucí agregaci. Agregace molekul by vedla ke ztrátě fotofyzikálních vlastností AzaPc[2] nezávisle na přítomnosti analytů v roztoku.

K ověření selektivity připravených AzaPc molekul budou provedeny fluorescenční titrační měření s různými kationty kovů (Na^+, K^+, Li^+, Mg^{2+}, Ca^{2+}).



Obr. 1 : Cílové molekuly

5. TEORETICKÁ ČÁST

V lidském těle probíhá množství různých životně důležitých procesů. Nezastupitelnou roli při těchto pochodech mají ionty. Z tohoto důvodu je velice důležitá možnost jejich detekce a to jak v medicíně, tak ve výzkumu. Změny jejich koncentrace mohou lidské tělo ohrozit nebo mu naopak pomoci ke zlepšení stavu při nemoci. Mezi ionty, které se v organismu vyskytují v největším množství, podílejí se na udržení osmotické regulace, zajišťují svalový stah a zodpovídají za správnou funkci pohybového aparátu či zprostředkovávají nervových přenos, patří kationty **alkalických kovů** a **kovů alkalických zemin**, zejména draselné, sodné, hořečnaté a vápenaté.[3, 4] V těle jsou přítomny i další ionty, např. železnaté a železité, zinečnaté, hořečnaté, měďnaté a jiné, které se označují pojmem stopové prvky. Jejich zastoupení je v množství o dost menším než u výše zmíněných kationtů kovů, avšak pro správnou funkci organismu jsou nepostradatelné.[4, 5] Detekce kationtů kovů probíhá i v přírodě, především při monitorování čistoty prostředí.[3]

Z výše uvedeného tedy vyplývá, že vývoj nových metod a optimalizace stávajících metod pro detekci iontů je velmi žádoucí. Jednou z možností detekce kationtů kovů je využití sloučenin, které selektivně mění fluorescenční vlastnosti v přítomnosti daného analytu. Tyto tzv. **fluorescenční senzory** mají velkou výhodu, jelikož jsou obvykle kompatibilní s biologickým prostředím, detekce je tedy možná přímo v buňce. Fluorescence je metoda citlivá, poměrně rychlá a bezpečná.[3, 6] Zmíněné výhodné vlastnosti zvýšily zájem o rozvoj fluorescenčních senzorů, kdy je kladen důraz především na emisi v červené části spektra. Takovéto světlo lépe proniká biologickým materiálem. AzaPc emitující právě v oblasti nad 660 nm se proto jeví nadějnými fluorescenčními senzory (viz. dále).[6]

V následujícím textu si popíšeme základní parametry fluorescence, princip fungování fluorescenčních senzorů pomocí ICT, dále zmíníme používané fluorofory a zaměříme se na dosud prostudované AzaPc se senzorickými vlastnostmi.

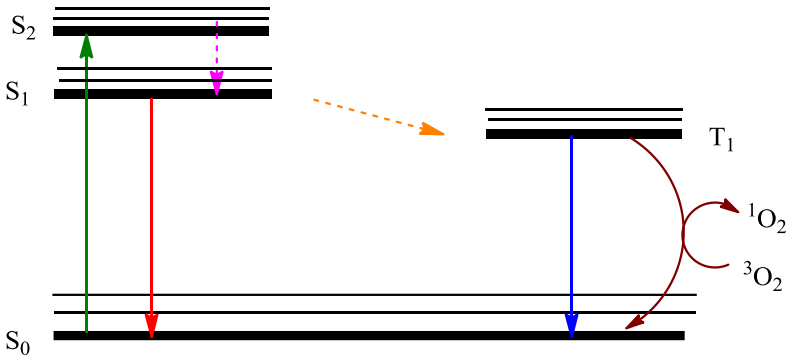
5.1. Fluorescence

Fluorescence je jednou z kategorií fotoluminiscence, kdy dochází k emisi fotonů při návratu dané látky z jejího excitovaném stavu (ten nastává po absorpci záření) do stavu základního. Celý proces obvykle trvá pouze kolem 10 ns. K popisu principu se využívá tzv. **Jablonskiho diagram** (Obr. 2), což je grafické znázornění právě fotoluminiscenčních dějů.[7]

Na diagramu je možné sledovat přechody fluoroforů (tj. látky schopné fluorescence) do různých energetických hladin. Po absorpci záření je molekula excitována ze základního singletového stavu S_0 do vyšších vibračních hladin singletových stavů S_1, S_2. Při návratu do nižších stavů lze před samotnou fluorescencí pozorovat tzv. **vnitřní konverzi**, kdy molekula přechází do nejnižší vibrační hladiny S_1, tento proces trvá přibližně 10^{-12} s.[8, 9] Následuje relaxace molekuly ze stavu S_1 na S_0, tedy právě **fluorescence**, kterou můžeme v některých případech zachytit okem.[7]

U některých molekul v prvním singletovém stavu S_1 lze pozorovat tzv. **mezisystémový přechod** na první tripletový stav T_1 (elektrony se zde vyznačují stejnými spiny). Následuje relaxace do nižších vibračních hladin základního stavu S_0, tento děj se nazývá **fosforescence** (další kategorie fotoluminiscence). Fosforescence však probíhá při nižší energii, tedy vyšší vlnové délce a děj trvá milisekundy až sekundy. Příkladem fosforeskujících molekul jsou ty, které obsahují těžší atomy např. brom (usnadňující mezisystémový přechod).[7] Z tripletového stavu může také sloučenina předat svoji energii jiným sloučeninám, které se nacházejí v základním tripletovém stavu. Takovou molekulou je např. tkáňový kyslík, který se přijetím této energie mění na vysoce reaktivní singletový kyslík. Tomuto ději říkáme **produkce singletového kyslíku** a na jeho principu je založena fotodynamická terapie některých nádorových i nenádorových onemocnění.[9]

Dalším relaxačním dějem je tzv. **zpožděná fluorescence**. Molekula ve stavu T_1 přechází zpět do excitovaného S_1 stavu, následuje vyzáření fotonů a přechod do základního stavu cestou fluorescence.[9]

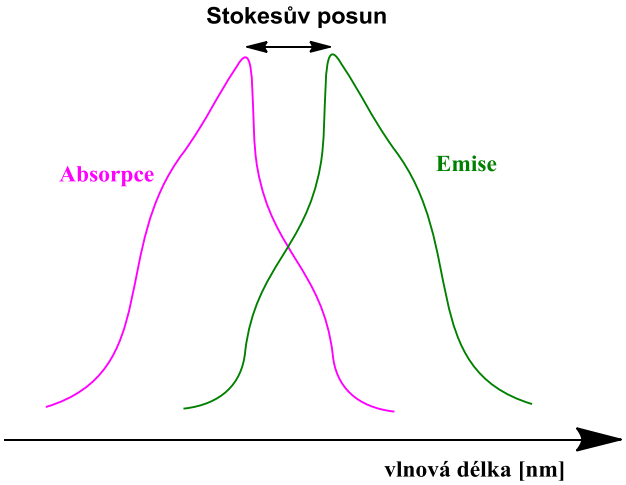


Obr. 2 : Jablonskiho diagram

Absorpce fotonu; fluorescence; vnitřní konverze; mezisystémový přechod; fosforescence; produkce singletového kyslíku

5.1.1. Zrcadlová symetrie absorpčního a emisního spektra

Zrcadlová symetrie popisuje podobnost absorpčního a emisního pásu (Obr. 3), která se objevuje u mnoha molekul. Díky ztrátám energie vnitřní konverzí molekuly a faktu, že emise fotonů nastává vždy z nejnižší vibrační hladiny excitovaného S_1 stavu, je fluorescenční spektrum vždy posunuto k vyšším vlnovým délkám a tedy nižší energii oproti absorpčnímu spektru. Rozdíl mezi absorpčním a emisním maximem se nazývá tzv. **Stokesův posun**.[7, 10] Pro fluorescenční senzory je velkou výhodou vysoký Stokesův posun, kdy už nedochází k překryvu absorpčního a emisního spektra a tudíž nemůže docházet k reabsorpci emitovaných fotonů.



Obr. 3 : Znázornění podobnosti absorpčního a emisního spektra, Stokesův posun

5.2. Intramolekulární přenos náboje a princip senzorů

Fluorescenční senzory jsou tvořeny **signální částí**, která je zodpovědná za fluorescenční vlastnosti po přepnutí senzoru do ON stavu a **rozpoznávacím centrem**, do kterého se váže analyt, který je zodpovědný za přepínání senzoru mezi ON/OFF stavem. Selektivita rozpoznávacího centra je ovlivňována mnoha faktory, typická je však přítomnost dusíku, který má volný elektronový pár. Tento dusík slouží jako donor elektronu při tzv. **intramolekulárním přenosu náboje** (ICT, z angl. intramolecular charge transfer), signální část (v našem případě AzaPc makrocyklus) pak jako akceptor tohoto procesu.[6, 11]

Princip fluorescenčních senzorů je většinou založen na blokování či umožnění tohoto ICT. Ve své podstatě je ICT dalším relaxačním dějem excitovaných stavů molekuly za stavu S_1 do S_0 (viz. Jablonskiho diagram). Jedná se o proces natolik rychlý a efektivní, že další relaxační procesy nemají možnost se uplatnit ve velké míře.[11] Pokud tedy probíhá ICT, molekula senzoru nevykazuje fluorescenci (případně ani produkci singletového kyslíku, fosforescenci, apod.), nachází se ve stavu OFF. Polárnějším rozpouštědlem lze přenos pomocí ICT ještě více zesílit, neboť polární prostředí stabilizuje nabité stavy molekuly, které se při tomto procesu na krátký čas tvoří (tzv. CSS, charge separated states). Pokud je ovšem volný elektronový pár donorového dusíku rozpoznávacího centra použit na vazbu analytu, ICT je blokováno a relaxace molekuly z excitovaných stavů probíhá fluorescencí. Senzor se nachází v ON stavu.[6]

V praxi se setkáváme u některých fluorescenčních senzorů také s dějem zvaným **photo-induced electron transfer** (PET), který se ICT do určité míry podobá, avšak akceptor a donor spolu nejsou v konjugaci, elektron při relaxaci molekuly přechází na delší vzdálenost.[3, 6]

5.3. Fluorescenční senzory

Fluorescenční senzory pro detekci iontů lze využívat přímo v organismu či buňce,[3] jak bylo zmíněno výše. Účinnost senzorů je ovlivněna jejich fotostabilitou v daném prostředí a **svítivostí**. Čím jasnější fluorofor, tím méně světla je potřeba pro jeho

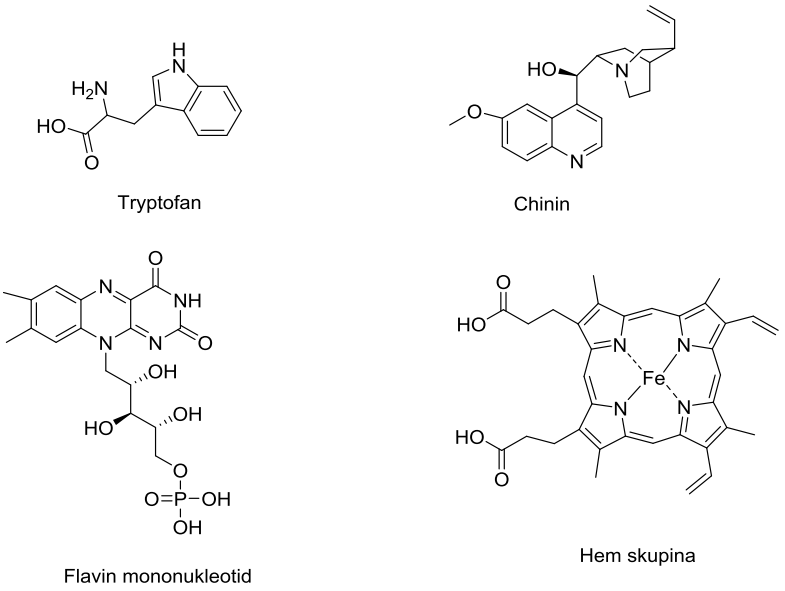
excitaci a z toho plyne menší riziko poškození pro buňku. Svítivost lze vyjádřit jako součin **extinkčního koeficientu** daného senzoru (udává schopnost fluoroforu absorbovat světlo) a jeho **kvantového výtěžku fluorescence**.[4] Ten lze definovat jako poměr emitovaných fotonů k počtu fotonů, které byly senzorem absorbovány.[10] Fotofyzikální vlastnosti senzorů jsou ovlivněny také dalšími faktory jako je např. viskozita, pH prostředí či vlastnosti rozpouštědla.[4]

Efektivnost senzorických vlastností ovlivňuje i vlnová délka světla, kterou lze daný senzor excitovat. Sloučeniny, které lze excitovat světlem delší vlnové délky mají výhodnější vlastnosti, protože takové světlo podléhá méně rozptylu světla, není pohlcováno endogenními chromofory (např. hemoglobin, melanin) a z těchto důvodů lépe proniká do tkání. Bylo prokázáno, že takové sloučeniny jsou i méně fototoxické.[4]

5.3.1. Fluorofory používané v praxi

Existuje velké množství fluorescenčních senzorů, které se liší strukturou, svými vlastnostmi a použitím. Prvním popsaným fluoroforem byl **chinin** (Obr. 4) již v roce 1845,[7, 12] od té doby bylo objeveno mnoho dalších významných struktur, které se používají jako senzory a umožňují tak různé experimenty a testování.

Přirozeně se vyskytující látky, u kterých lze měřit fluorescenci, označujeme jako **endogenní fluorofory**. Typickými zástupci jsou aromatické aminokyseliny, nejvíce fluoreskující přírodní aminokyselinou je tryptofan (Obr. 4).[13] Dále sem můžeme zařadit deriváty porfyrinu, redukované nikotinamidové kofaktory např. NADH, flaviny (Obr. 4) aj.[12, 14]



Obr.4: Příklady endogenních fluoroforů

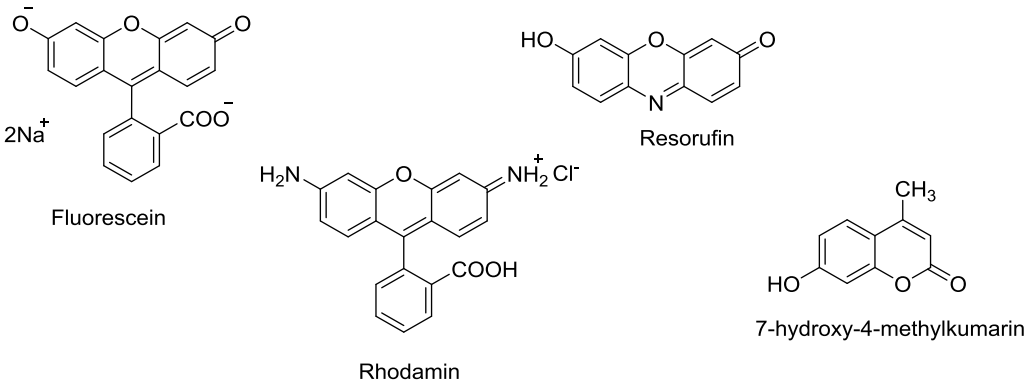
Nevýhodou těchto fluoroforů je možnost nepříznivého ovlivňování experimentů v buňce svou přirozenou fluorescencí.[12, 14] Jak bylo zmíněno výše, příprava senzorů, které jsou schopny absorpce a emise při delších vlnových délkách, čili v červené části spektra, kde endogenní fluorofory neabsorbují ani neemitují, je proto žádoucí.

Jedním z nejstarších fluoroforů se zajímavými vlastnostmi je **fluorescein** (Obr. 5), jehož deriváty lze použít jako indikátory vápenatých, sodných, zinečnatých či rtuťnatých kationtů. Schopnost fluoresceinu vyskytovat se v rovnováze mezi laktonovou a chinoidní, jinak řečeno uzavřenou (nefluorescenční) / otevřenou (fluorescenční) formou, lze využít při detekci enzymů. Vhodnou substitucí přechází molekula do své uzavřené formy a ve vodném prostředí nesvítí, stává se substrátem pro enzymy a slouží k jejich detekci.[12, 15]

Rhodaminy (Obr. 5) jsou dalšími zástupci fluoroforů, které je možno použít jako detektory enzymů.[16] Využívají se také k detekci některých iontů. Zajímavým typem je hybridní forma mezi fluoresceinem a rhodaminem zvaná „rhodol“, využívaná též jako sonda.[12, 17]

Fluorescenční vlastnosti **kumarinů** v oblasti UV jsou dány substitucí heteroatomu v poloze 7. Zástupcem je např. 7-hydroxy-4-methylkumarin (Obr. 5). Mimo jiné patří mezi fluorofory také některé **polycyklické aromáty.** Častými zástupci této skupiny jsou deriváty naftalenu. Fluorofory, jejichž základ tvoří **indol** či **dibenzimidizol**, se

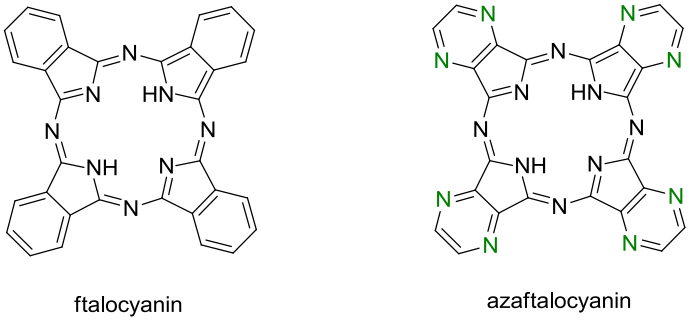
využívají pro zobrazovaní DNA, a to díky jejich schopnosti vázat se na tuto nukleonovou kyselinu s následným nárůstem fluorescence.[12] Molekula **resorufinu** (Obr. 5) a její obměny slouží k detekci enzymů cytochromu P450[18] a hydroláz. Na rozdíl od fluoreskujícího resorufinu, *N*-oxidované či redukované deriváty fluorescenci nevykazují.[12]



Obr. 5: Další vybrané typy fluoroforů

5.3.2. Azaftalocyaniny jako fluorofory

Azaftalocyaniny (AzaPc) jsou aza-analogy odvozené od ftalocyaninů (Pc, z angl. phthalocyanines),[11] kde jsou benzenová jádra Pc nahrazena čtyřmi pyrazinovými (Obr. 6). Z toho důvodu mají AzaPc většinu vlastností podobných s předlohovými Pc, najdeme však i některé vlastnosti od nich odlišné (např. vyšší fluorescenční kvantové výtěžky, zvýrazněný elektrondeficitní charakter a poměrně snadná příprava prekurzorů pro jejich syntézu).[19]



Obr. 6: Obecná struktura ftalocyaninu a azaftalocyaninu

Výhodou molekul typu Pc a AzaPc je schopnost fluorescence v červené části spektra. Od nich odvozené senzory tedy nejsou negativně ovlivněny autofluorescencí endogenních fluoroforů (hemoglobin, melanin apod.). Důsledkem je pak hlubší průnik do tkání.[19]

Jejich vlastnosti jsou ovlivňovány především centrálním kationtem kovu a periferní substitucí, dále také rozpouštědlem (viz níže). Mezi centrální kationty, které zajišťují vysokou stabilitu makrocyklu a podporují fluorescenční vlastnosti AzaPc, patří hořečnaté a zinečnaté kationty.[19] V přítomnosti těžšího atomu je podpořen mezisystémový přechod, výsledkem je větší kvantový výtěžek singletového kyslíku (zinečnaté komplexy těchto makrocyklů vykazují vyšší produkci singletového kyslíku oproti hořečnatým), a zároveň menší kvantový výtěžek fluorescence. Tomuto jevu se říká tzv. **efekt těžkého atomu**.[7, 19] Navázané periferní substituenty zabraňují agregaci molekul, která mimo jiné blokuje fluorescenci, a ovlivňují také rozpustnost sloučenin.[19] Alkylaminové periferní substituenty mají pak zásadní roli při ICT, neboť slouží jako donory pro tento děj.[11] Alkyl- a aryloxysubstituované makrocykly mají obvykle vyšší fluorescenci oproti alkyl- a arylsulfanyl substituovaným analogům, které naopak vykazují vyšší produkci singletového kyslíku.[19]

V absorpčním spektru AzaPc lze pozorovat 2 hlavní pásy, vysokoenergetický B-pás (ten se příliš nemění) a nízkoenergetický Q-pás vyskytující se při vlnových délkách 620-720 nm, který je ovlivňován symetrií a periferní substitucí molekul. Symetrické molekuly s centrálním atomem se vyznačují ostrým Q-pásem na rozdíl od nesymetrických, kde je Q-pás rozštěpen.[9, 11]

5.3.3. Senzorické AzaPc

Naše výzkumná skupina se vývojem AzaPc senzorů zabývá již několik let. Během této doby bylo připraveno mnoho modelových sloučenin a proběhlo množství experimentů pro objasnění strukturálních faktorů, které ovlivňnují účinnost těchto senzorů.

Hlavní cestou relaxace z excitovaného stavu alkylamino substituovaných AzaPc je již zmíněný ICT.[20] ICT byl studován u komplexů různých typů odvozených od Pc či

jeho aza-analogů, s centrálním kationtem kovu (Zn^{2+}, Mg^{2+}) i bez centrálního kationtu kovu. Byly zjišťovány strukturní faktory ovlivňující agregaci, stabilitu, fluorescenci či produkci singletového kyslíku připravených sloučenin.[20, 21] Mimo jiné bylo zjištěno, že AzaPc bez centrálního kationtu kovu vykazují obecně nízkou fluorescenci i bez přítomnosti donoru pro ICT.[19] AzaPc se v porovnání s Pc prokázaly jako silnější akceptory elektronů,[22] a to díky jejich elektron deficitnějšímu makrocyklu (způsobené přítomností dusíků). Čím více je makrocykl schopen přijímat elektrony, tím silnější ICT přenos nastává.[21] Elektronakceptorový charakter makrocyklu je možno dále podpořit vhodnými periferními substituenty odtahujícími elektrony z makrocyklu. Z tohoto pohledu byl nejvíce elektron-akceptorový makrocykl nesoucí COOBu skupiny, nejméně pak makrocykl nesoucí butoxyskupiny.[23] AzaPc se ukázaly ve srovnání s Pc také fotostabilnější.[21]

ICT mohou ovlivnit i substituenty v *ortho* poloze vůči donoru pro ICT, tento efekt se zatím bohužel nepovedlo jednoznačně vysvětlit. Konkrétně bylo zjištěno, že ICT zesilují *terc*-butylsulfanylové a butoxy skupiny, naopak chlor či methyl v *ortho* poloze vůči donoru ICT snižují.[24] Velký vliv na účinnost ICT má počet donorů pro ICT v molekule. Pro zajištění možnosti blokovat ICT je nutná přítomnost maximálně dvou takovýchto donorů. Při čtyřech a více donorech nelze ICT blokovat a makrocykl se vyskytuje pouze v OFF stavu. Takovéto AzaPc nelze využít v oblasti fluorescenčních senzorů, ale vzhledem k tomu, že jsou schopny zhášet fluorescenci jiných molekul, jsou studovány jako zhášeče fluorescence ze skupiny tzv. dark quencherů.[25, 26]

Blokovat ICT lze několika způsoby. Jedním z nich je protonizace dusíkového donoru v kyselém prostředí. Touto cestou lze získat **pH senzory**.[27] Další možností je blokování pomocí koordinace kationtů kovů, čímž dostaneme právě **senzory pro kationty kovů**. [28]

V oblasti AzaPc **senzorů pro kationty kovů** bylo zjištěno, že zásadní roli pro rozpoznávání kationtů hraje velikost použitého aza-crownu a rigidita rozpoznávacího centra. První projekt na toto téma sloužil jako potvrzení konceptu a připravené senzorické AzaPc vykazovaly citlivost jak na sodné, tak na draselné kationty. Částečně pak byly citlivé i na další analyty.[28] Nicméně tento projekt jednoznačně ukázal, že by se AzaPc mohly stát novou skupinou červeně emitujících senzorů pro kationty kovů. Další projekty se pak zaměřily na zvýšení selektivity a senzitivity rozpoznávání kationtů

kovů. Na sérii AzaPc nesoucích různě velké aza-crowny bylo demonstrováno, že **velikostí aza-crownu** lze ovlivnit selektivitu vůči kationtům alkalických kovů (Li^+, Na^+, K^+). Zajímavým poznatkem bylo, že kationty kovů alkalických zemin se váží pevněji než alkalické kovy, navíc neselektivně bez vlivu velikosti aza-crownu.[1] Dalším důležitým poznatkem bylo zjištění, že molekula obsahující dva aza-crowny vedle sebe v tzv. tweezer uspořádání, výrazně zvyšuje senzitivitu vůči analytu. Díky **zvýšené rigiditě uspořádání** takovéhoto rozpoznávacího centra jsou analyty vázány již v minimálních koncentracích. Nevýhodou tweezer uspořádání byla přítomnost dvou donorů pro ICT a z toho vyplývající malé kvantové výtěžky fluorescence po přepnutí senzoru do ON stavu (v řádech pouze jednotek procent). Účinnost ICT je totiž tak vysoká, že už jeden donor pro ICT je schopen kompletně zhášet excitované stavy. Vazba kationtů kovů je koordinační, díky určité rovnováze je tedy neustále část molekul AzaPc bez vázaného analytu.[29] Jinými slovy, nikdy nedojde k aktivaci úplně všech senzorických molekul AzaPc, a proto je fluorescence nižší, než by mohla být, kdyby vazba analytu byla kovalentní. Tento jev je umocněn faktem, že jsou v molekule dvě donorová centra pro ICT, která obě musí být blokována analytem, aby se mohla objevit fluorescence.[29] Logickým krokem je tedy připravit AzaPc senzor se zvýšenou rigiditou rozpoznávacího centra, který má však pouze jeden donorový dusík pro ICT. Právě tomuto nápadu se věnuje moje diplomová práce.

Jak bylo zmíněno výše, AzaPc lze využít nejen jako senzory pro kationty kovů, ale také pro monitorování pH. Byla připravena série AzaPc nesoucích anilin na periferii, jehož bazicita byla měněna dalšími substituenty poblíž donorového dusíku, pH senzitivní vlastnosti byly studovány pomocí titračních experimentů kyselinou. Po okyselení roztoku došlo k protonizaci donorového dusíku pro ICT, doprovázeného vzrůstem fluorescence či produkcí singletového kyslíku díky blokaci ICT. Tyto sloučeniny fluoreskují při nízkém pH (2 - 4).[27] Jako donor pro ICT nemusí vždy sloužit pouze dusík, dobrým donorem je i fenolát (molekula je v OFF stavu v bazickém prostředí), který v neutrálním nebo kyselém prostředí přechází na fenol (ON stav senzoru). Takovéto AzaPc jsou tedy vhodnými senzory pro bazické pH.[30] Speciálním využitím pH senzitivních AzaPc nesoucích fenolické substituenty jako donory pro ICT je vývoj senzorů pro oxid uhličitý po imobilizaci těchto sloučenin na pevnou matrici.[31]

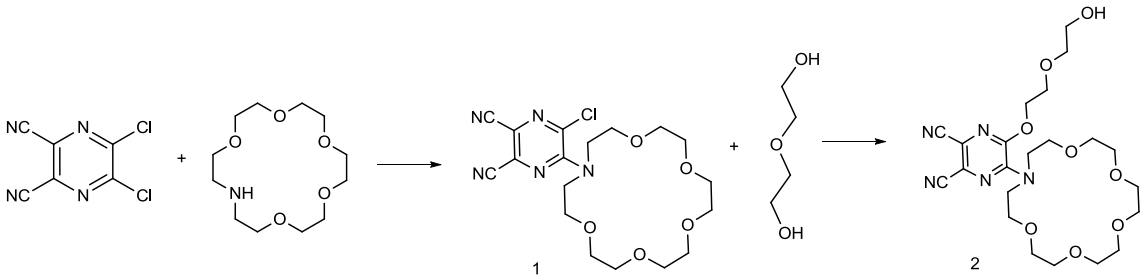
6. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

6.1. Použité chemikálie a přístroje

Výchozí látky a rozpouštědla pro reakce byly zakoupeny od firem Lach-Ner, Penta, BDL, Sigma-Aldrich nebo Acros a byly použity bez dalšího čištění do reakcí.

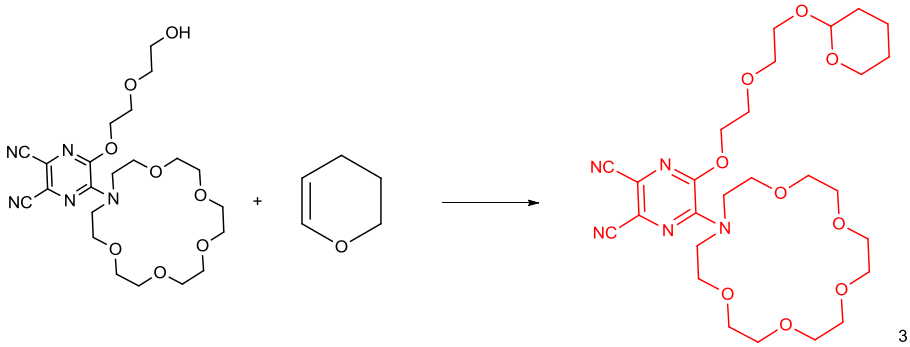
Průběh reakcí a čistota výsledných produktů byly sledovány pomocí tenkovrstvé chromatografie (TLC) na deskách Merck Kieselgel 60 F254, detekce UV lampou probíhaly při vlnové délce 254 nm nebo 366 nm. Čištění produktů bylo prováděno pomocí sloupcové chromatografie na stacionární fázi Merck Kieselgel 60 (0,040-0,063 mm). Použité mobilní fáze jsou popsány u jednotlivých reakcí níže. Teploty tání byly měřeny pomocí digitálního přístroje ELECTROTHERMAL IA9200. Infračervená spektra byla měřena IČ spektrofotometrem Nicolet 6700 v ATR módu na Katedře anorganické a organické chemie. ^{1}H NMR a ^{13}C NMR spektra byla měřena na přístroji VNMR S500 NMR spektrometer na Katedře anorganické a organické chemie. Spektra UV/Vis byla měřena pomocí přístroje Shimadzu UV-2600 spectrophotometer na Katedře farmaceutické chemie a kontroly léčiv. Fluorescenční emisní spektra byla měřena na přístroji FS5 spectrofluorimeter (Edinburgh Instruments) vybavený TSCPC modulem. Hmotnostní spektrometrie (MALDI-TOF) byla provedena na přístroji 4800 MALDI TOF/TOF mass spectrometer (AB Sciex, Framingham, MA, USA) s využitím *trans*-2-[3-(4-terc-butylfenyl)-2-metyl-2-propenyliden]malononitrilu jako matrice. Přístroj byl kalibrován externě pětibodovou kalibrační metodou pomocí Peptide Calibration Mix1 (LaserBioLabs, Sophia-Antipolis, France). MS (APCI) bylo měřeno na přístroji Agilent 500 Ion Trap LC/MS (Agilent Technologies, Santa Clara, California, USA) po rozpuštění vzorku v MeOH a přímém nástřiku na detektor.

6.2. Schéma prováděných reakcí

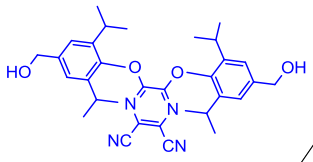


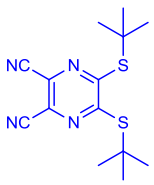
1

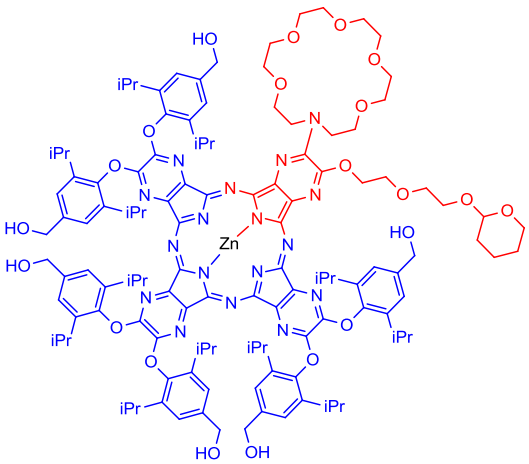
2



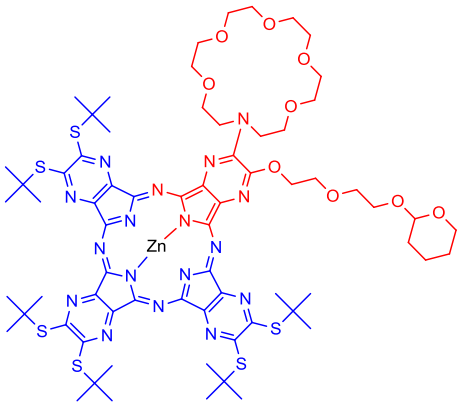
3



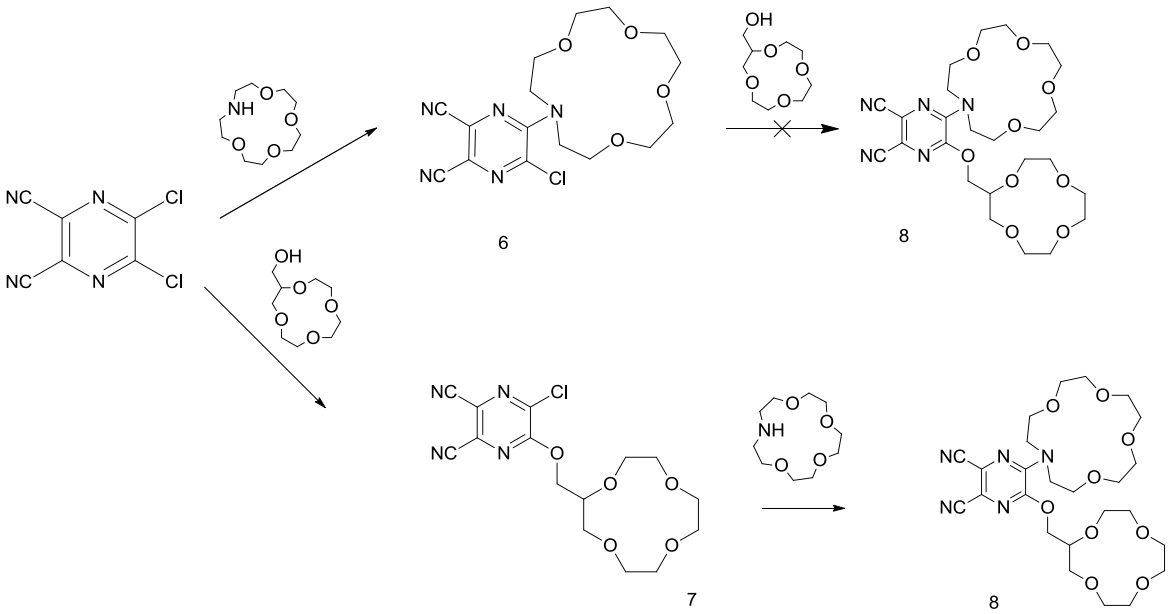


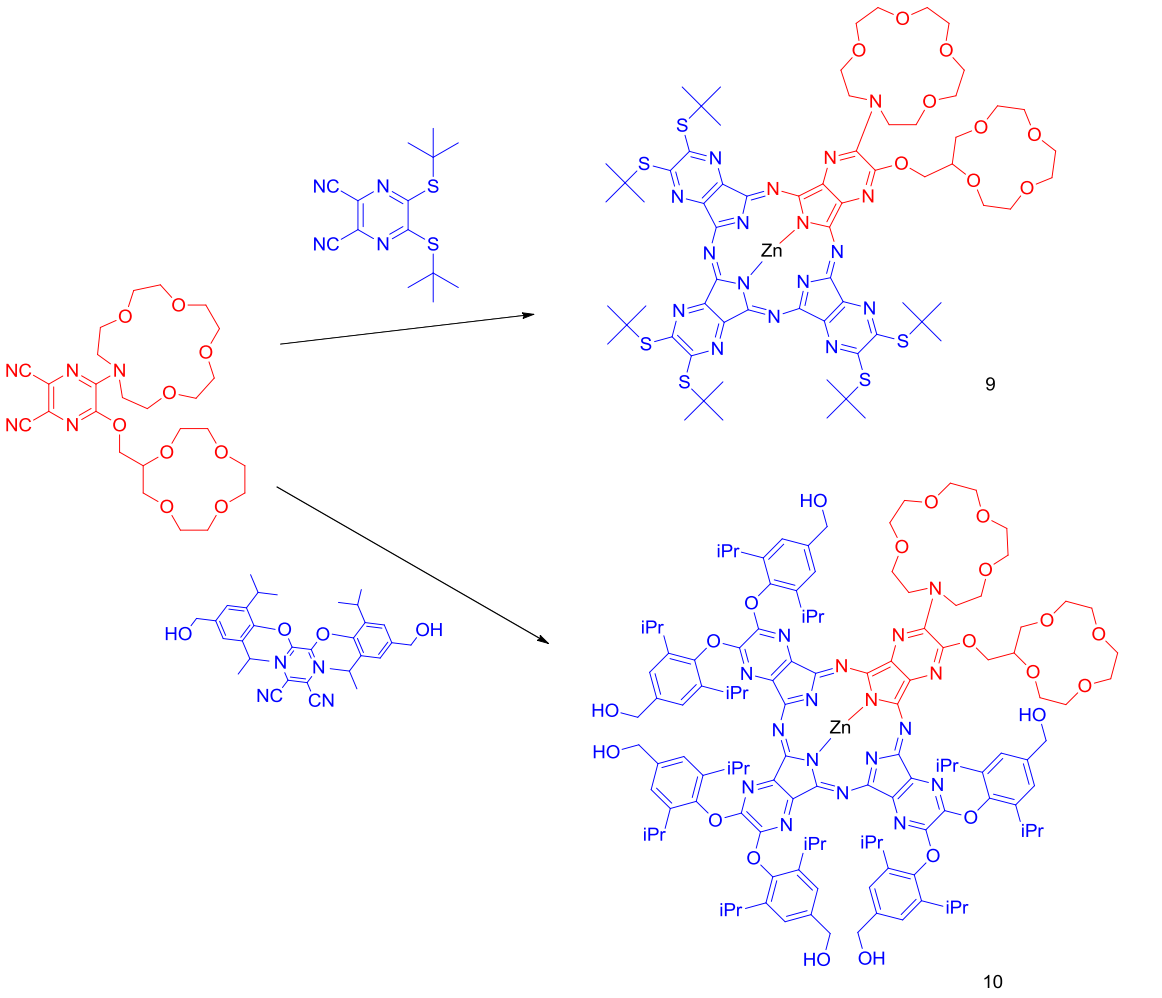


4

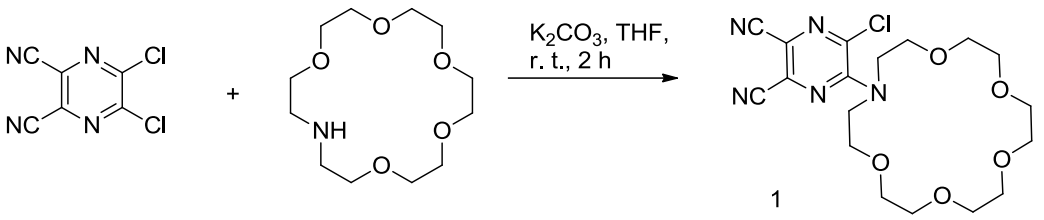


5


NC
N
Cl
NC
N
Cl
NH
O
O
O
OH
O
O
O
NC
N
N
O
O
O
NC
N
Cl
6
OH
O
O
O
O
NC
N
N
O
O
O
NC
N
O
8
NC
N
Cl
NC
N
O
7
NH
O
O
O
NC
N
N
O
O
O
NC
N
O
8


NC
N
N
O
O
O
NC
N
O
O
O
O
NC
N
S
S
NC
N
S
S
S
S
S
S
S
S
N
N
N
N
N
N
N
N
N
N
N
N
N
N
N
N
Zn
O
O
O
N
O
O
O
O
O
O
O
O
9
HO
OH
NC
CN
HO
iPr
iPr
iPr
iPr
HO
HO
HO
HO
iPr
iPr
iPr
iPr
iPr
iPr
iPr
iPr
iPr
iPr
HO
OH
Zn
10

6.3. Příprava 5-chlor-6-(1,4,7,10,13-pentaoxa-16-azacyklooktadekan-16-yl)pyrazin-2,3-dikarbonitrilu (1)



Příprava sloučeniny **1** byla založena na postupu popsaném již dříve v literatuře.[1]

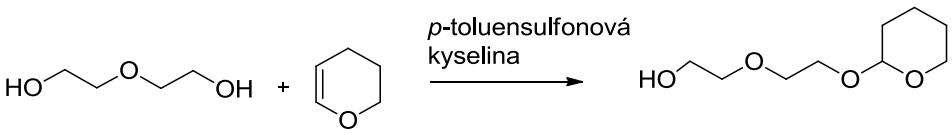
5,6-dichlor-pyrazin-2,3-dikarbonitril (1,2 g, 6,0 mmol) byl rozpuštěn v tetrahydrofuranu (THF) (100 ml). Roztok byl vychlazen pomocí lázně obsahující směs led/sůl na -10°C. Poté byl přidán 1-aza-18-crown-6 (1,58 g, 6,0 mmol) rozpuštěný v THF (30 ml). Po 5-ti minutách (stále chlazeno na -10°C) byl přisypán bezvodý uhličitan draselný (1,08 g, 7,86 mmol). Reakční směs se zbarvila oranžově. Směs byla míchána při pokojové teplotě 2 hodiny. Průběh reakce byl kontrolován pomocí TLC, mobilní fází byl diethylether/aceton v poměru 2:1.

Přebytečné množství rozpouštědla bylo odstraněno na vakuové rotační odparce a následně byla směs 3× vytřepána mezi ethyl-acetát (EAC) a vodu okyselenou kapkou kyseliny chlorovodíkové. Organické fáze byly posbírány, spojeny, vysušeny bezvodým síranem sodným, zfiltrovány přes skládaný filtrační papír a zahuštěny na vakuové odparce.

Produktem byl oranžovožlutý olej 5-chloro-6-(1,4,7,10,13-pentaoxa-16-azacyklooktadekan-16-yl)pyrazin-2,3-dikarbonitril **(1)**, který byl přečištěn sloupcovou chromatografií. Mobilní fáze byla složena z diethyletheru/acetonu v poměru 2:1 (R_f produktu = 0,30).

Výtěžek: 1035 mg (40 %). **Molekulová hmotnost**: 425,87. Naměřená analytická data odpovídají publikovaným hodnotám.[1]

6.4. Příprava 2-(2-((tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)oxy)ethoxy)ethanolu



Syntéza krytí OH skupiny

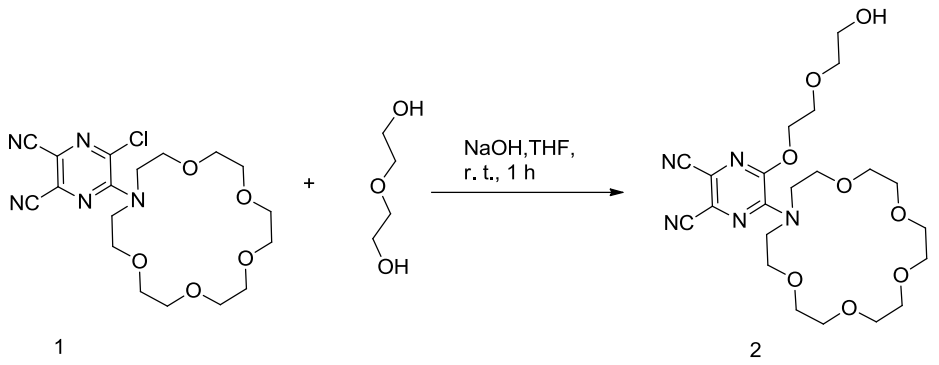
Diethylenglykol (18 ml, 0,190 mol) byl smíchán s *p*-toluensulfonovou kyselinou (1 g, 0,006 mol) . Směs byla zchlazena na teplotu -10 °C, při které byl pomalu (během 45-ti minut) postupně přidáván 3,4-dihydro-2*H*-pyran (2,1 g, 0,025 mol). Směs byla bezbarvá. Poté byla reakční směs míchána ještě 1 hodinu při teplotě -10 °C a další 2 hodiny při pokojové teplotě. Průběh byl kontrolován pomocí TLC, mobilní fází byl EAC (R_f produktu = 0,24).

Do reakční směsi byl přidán 1M roztok hydroxidu sodného (50 ml) a produkt byl vyextrahován dichlormethanem (5 × 20 ml). Organické frakce byly posbírány a vysušeny bezvodým síranem sodným.

Požadovaný produkt byl získán destilací při teplotě 195,5 °C a tlaku 6,5 mBarr, ve výtěžku 2,2 %. Jednalo se o bezbarvý olejnatý produkt.

NMR: Směs výchozí látky a produktu.

6.5. Příprava 5-(2-(2-hydroxyethoxy)ethoxy)-6-(1,4,7,10,13-pentaoxa-16-azacyklooktadekan-16-yl)pyrazin-2,3-dikarbonitrilu (2)



1 2

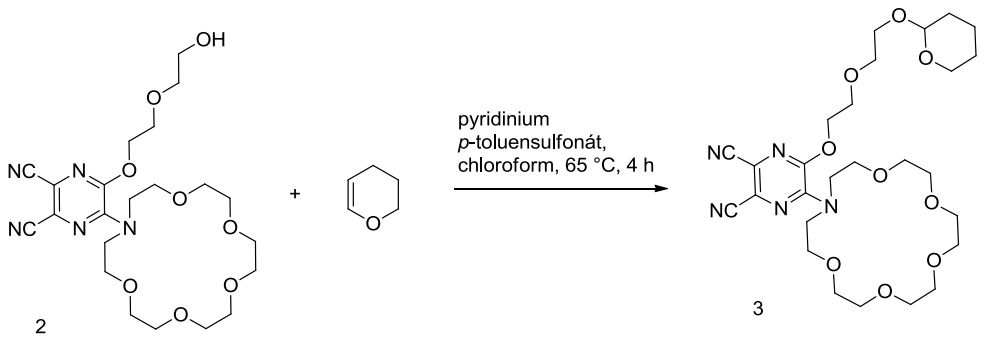
Diethylenglykol (240 mg, 2,26 mmol) byl smíchán s roztokem 1M hydroxidu sodného (2,26 ml, 2,26 mmol). Byla přidána látka **1** (875 mg, 2,06 mmol) v THF (15 ml). Reakční směs byla míchána při pokojové teplotě 1 hodinu. V průběhu reakce směs zežloutla. Reakce byla sledována pomocí TLC, mobilní fáze byla tvořena acetonem.

Směs byla zahuštěna na rotační vakuové odparce, produkt byl 3× vytřepán mezi EAC/vodu. Podle TLC analýzy bylo patrné, že produkt nepřecházel dostatečně do organické fáze. Obě fáze byly proto posbírány a opět zahuštěny na vakuové odparce. Přečištění produktu probíhalo rovnou, pomocí sloupcové chromatografie s mobilní fází acetonem (R_f produktu = 0,19).

Produktem byl žlutý olej 5-(2-(2-hydroxyethoxy)ethoxy)-6-(1,4,7,10,13-pentaoxa-16-azacyklooktadekan-16-yl)pyrazin-2,3-dikarbonitril (**2**).

Výtěžek: 800 mg (79 %). **Molekulová hmotnost**: 495,53. **^{1}H-NMR** (aceton-d_6, 500 MHz): δ_H 3,52 – 3,55 (4H, m, crown-H); 3,61 – 3,65 (16H, m, crown-H); 3,82 (4H, t, J = 6 Hz); 3,89 – 3,91 (2H, m); 4,05 – 4,09 (4H, m) a 4,54 – 4,56 ppm (2H, m, CH_2OAr). **^{13}C-NMR** (aceton-d_6, 125 MHz): 150,6; 148,1; 125,4; 116,5; 115,7; 115,4; 73,5; 73,4; 71,43; 71,30; 71,24; 71,23; 71,17; 69,0; 68,4; 62,00; 61,96 a 52,7 ppm. **IČ** (ATR, cm^{-1}): 2918, 2850, 2226 (CN), 1558, 1515, 1449, 1428, 1351, 1292, 1224, 1121, 925 a 759. **MS** (APCI+) *m/z*: 496,3 $[M+H]^+$.

6.6. Příprava 5-(1,4,7,10,13-pentaoxa-16-azacyklooktadekan-16-yl)-6-(2-(2-((tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)oxy)ethoxy)ethoxy)pyrazin-2,3-dikarbonitrilu (3)



Sloučenina **2** (800 mg, 1,61 mmol) byla rozpuštěna v chloroformu (CHF) (20 ml). Byl přidán 3,4-dihydro-2*H*-pyran (543 mg, 6,46 mmol) a jako katalyzátor pyridinium *p*-toluensulfonát (32 mg, 0,13 mmol). Směs byla zahřívána pod zpětným chladičem při teplotě varu rozpouštědla. Došlo ke žlutooranžovému zbarvení reakce. Po 4 hodinách byla reakce ukončena. Celou dobu byla kontrolována pomocí TLC, mobilní fáze byla tvořena EAC/methanol (MeOH) v poměru 8:1 (R_f produktu = 0,47).

Směs byla zahuštěna na vakuové odparce a 4× vytřepána mezi EAC/vodu. Produkt přecházel do organické fáze, tyto fáze byly sbírány, zbytky vody byly odstraněny pomocí bezvodého síranu sodného. Produkt byl přečištěn pomocí sloupcové chromatografie s mobilní fází EAC/MeOH 8:1.

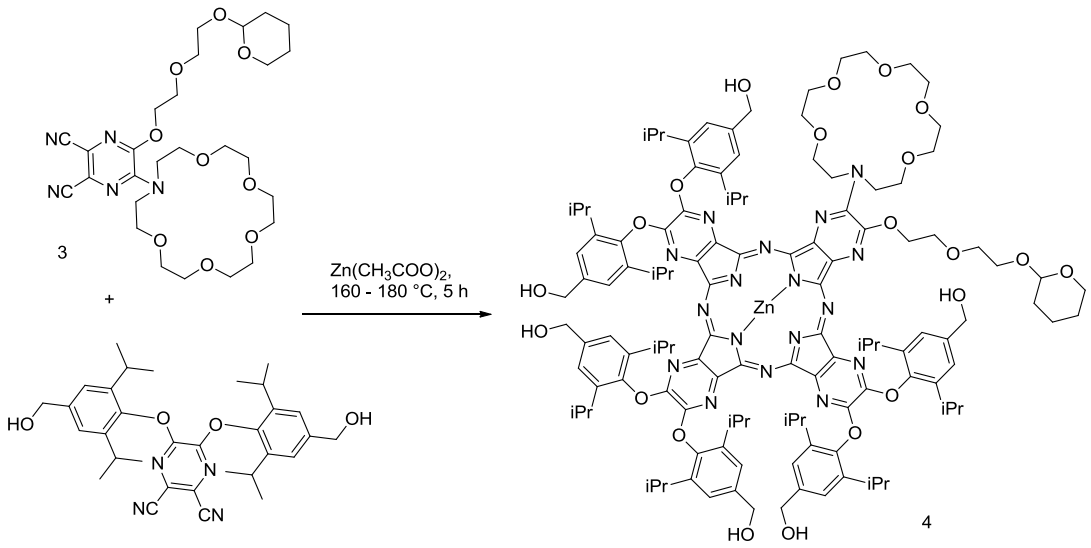
Produktem byl žlutooranžový olej 5-(1,4,7,10,13-pentaoxa-16-azacyklooktadekan-16-yl)-6(2-(2-((tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)oxy)ethoxy)ethoxy)pyrazin-2,3-dikarbonitril (**3**).

Výtěžek: 510 mg (55 %). **Molekulová hmotnost**: 579,64. **^{1}H-NMR** ($CDCl_3$, 500 MHz): δ_H 1,48 – 1,60 (4H, m, pyran-H); 1,67 – 1,84 (2H, m, pyran-H); 3,46 – 3,52 (1H, m, pyran-H); 3,61 – 3,68 (18H, m, crown-H); 3,75 (4H, t, J = 6 Hz); 3,81 – 3,86 (4H, m); 4,03 (4H, br s); 4,49 – 4,52 (2H, m, CH_2OAr) a 4,59 ppm (1H, t, J = 4 Hz, pyran-H). **^{13}C-NMR** ($CDCl_3$, 125 MHz): 148,9; 146,6; 124,9; 115,8; 114,5; 114,2; 99,1; 77,3; 77,0; 76,7; 70,7; 70,5; 70,44; 70,43; 68,4; 67,3; 66,6; 62,4; 52,0; 30,5; 25,3 a 19,5 ppm. **IČ** (ATR, cm^{-1}): 2965, 2866, 2226 (CN), 1556, 1513, 1426, 1350, 1288, 1224, 1120, 1076, 1033, 987, 930, 872 a 814. **MS** (APCI+) *m/z*: 580,3 $[M+H]^+$, 496,7 $[M-C_5H_8O]^+$.

6.7. Příprava nesymetrického AzaPc 4

Rozpouštědlo A) pyridin

B) *N,N*-dimethylformamid



Byly prováděny dvě reakce současně se stejnými prekurzory. Reakce se lišily použitým rozpouštědlem. Při první reakci byl jako rozpouštědlo použit bezvodý pyridin. Při druhé reakci byl použit bezvodý *N,N*-dimethylformamid (DMF).

Látka **3** (50 mg, 0,086 mmol), 5,6-bis(4-(hydroxymethyl)-2,6-diisopropylfenoxy)pyrazin-2,3-dikarbonitril (140 mg, 0,259 mmol) a octan zinečnatý (63,3 mg, 0,345 mmol) byly pod argonovou atmosférou rozpuštěny v bezvodém rozpouštědle (1 ml) (pyridin vs. DMF) a zahřívány při teplotě 160-180 °C.

Po přidání pyridinu došlo okamžitě ke vzniku zeleného zbarvení. Po přidání DMF došlo k zelenému zbarvení reakce také, ale až po 30 minutách. Po 5-ti hodinách byly obě reakce ukončeny, produkty zahuštěny na rotační vakuové odparce.

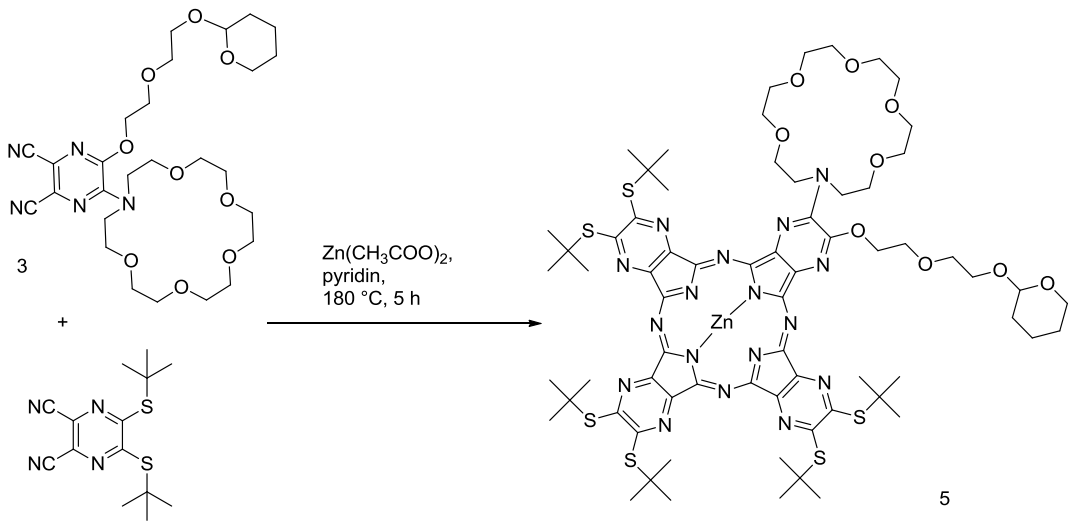
K oběma produktům byla přidána voda (10 ml), vzniklá sraženina byla posbírána filtrací přes skládaný filtr. Sraženiny na filtračních papírech byly promyty vodou a sušeny v sušárně při 100 °C asi 25 minut. Produkty byly rozpuštěny v acetonu, převedeny do baňky a zbytky rozpouštědel byly odstraněny zahuštěním na rotační vakuové odparce.

Produkty byly přečištěny sloupcovou chromatografií. U produktu, kde byl použit pyridin, byla mobilní fáze složena z CHF/MeOH/THF 10:1:1. Produkt, který byl připraven v přítomnosti DMF, byl přečištěn mobilní fází CHF/MeOH/THF v poměru 10:2:1.

Závěrečné přečištěný spojených modrých olejnatých produktů proběhlo za použití CHF/MeOH/THF 10:1,5:1 (R_f produktu = 0,26).

Výtěžek: 30,3 mg (8 %, počítáno z dvojnásobných navážek výchozích sloučenin). **Molekulová hmotnost**: 2273,03. **^{1}H-NMR** ($CDCl_3$/pyridin 3:1, 500 MHz): δ_H 0,99 – 1,15 (78H; m; CH_3 a pyran-H); 3,07 – 3,26 (12H, m, C*H*$(CH_3)_2$); 3,36 – 3,96 (34H, m, crown-H, lariat ether CH_2O a CH_2O pyranu); 4,39 (1H, br s, OCHO) 4,60 (2H, s, C*H*$_2$OH); 4,65 (2H, s, C*H*$_2$OH); 4,69 (2H, s, C*H*$_2$OH); 4,87 (6H, s, C*H*$_2$OH); 5,27 (6H, br s, OH) a 7,21 – 7,39 ppm (12H, m, ArH, částečně překryt signálem rozpouštědla). **^{13}C-NMR** ($CDCl_3$/pyridin 3:1, 125 MHz): 151,6; 147,3; 147,0; 142,6; 142,5; 141,00; 140,98; 140,8; 140,4; 140,3; 127,9; 124,2; 99,2; 70,5; 69,0; 66,9; 65,0; 62,4; 50,3; 44,7; 32,1; 31,6; 31,2; 30,8; 30,6; 30,4; 29,9; 29,7; 29,5; 28,5; 25,6; 23,7 ppm. **IČ** (ATR, cm^{-1}): 2963, 2928, 2870, 1467, 1402, 1364, 1285, 1246, 1215, 1158, 1101, 1056, 1034 a 927. **MS** (MALDI-TOF) *m/z*: 2269,9 $[M]^+$; 2292,9 $[M+Na]^+$; 2308,8 $[M+K]^+$. **UV-Vis** λ_{max}/THF**;** nm (ε/THF; $dm^3mol^{-1}cm^{-1}$): 634 (183 000), 579sh, 370.

6.8. Příprava nesymetrického AzaPc 5



Ke sloučenině **3** (346 mg, 0,60 mmol), 5,6-bis(*terc*-butylsulfanyl)pyrazin-2,3-dikarbonitrilu (549 mg, 1,79 mmol)[32] a octanu zinečnatému (438 mg, 2,39 mmol) byl pod argonovou atmosférou přidán bezvodý pyridin (5 ml). Směs byla zahřívána při 180 °C po dobu 5 hodin, kdy postupně změnila barvu na tmavě zelenou.

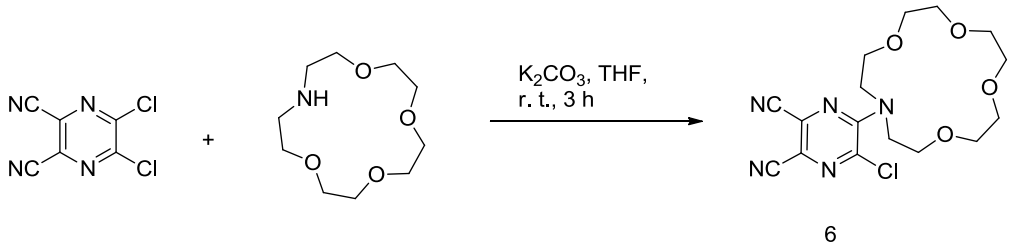
Vzniklý produkt byl zahuštěn na odparce. Byla přidána voda (10 ml), vzniklá suspenze byla přefiltrována. Sraženina vzniklá na filtračním papíře byla důkladně promyta a vysušena v sušárně při 100 °C 25 minut, následně byl produkt rozpuštěn v CHF, převeden do baňky a opět zahuštěn na odparce.

Produkt byl přečištěn sloupcovou chromatografií (3×) s mobilní fází CHF/MeOH/THF v poměru 10:0,5:1. (R_f produktu = 0,59). Poté ještě jednou s mobilní fází CHF/THF 10:1. Produktem byl zelený olej.

Výtěžek: 48 mg (5 %). **Molekulová hmotnost**: 1564,37. **^{1}H-NMR** ($CDCl_3$/pyridin 3:1, 500 MHz): δ_H 1,21 – 1,51 (6H, m, pyran-H); 1,88 (9H, s, CCH_3); 1,90 (45H, s, CCH_3); 3,18 – 3,23 (1H, m, pyran-H); 3,32 – 3,43 (18H, m, crown-H); 3,47 – 3,61 (10H, m); 3,66 – 3,78 (4H, br s); 4,19 (2H, t, J = Hz, 4 Hz, CH_2OAr) a 4,34 ppm (1H, t, *J* = 4 Hz, pyran-H). **^{13}C-NMR** ($CDCl_3$/pyridin 3:1, 125 MHz): 159,1; 158,6; 158,23; 158,20; 157,9; 157,8; 152,6; 152,4; 151,6; 151,5; 151,3; 150,80; 150,75; 150,50; 150,48; 148,8; 146,8; 144,9; 144,7; 144,5; 144,4; 144,3; 125,1; 115,9; 114,8; 114,5; 99,2; 71,0; 70,7; 70,6; 68,6; 67,5; 66,9; 62,5; 52,3; 31,1; 31,1; 30,86; 30,82; 30,8; 30,3;

30,1; 25,6 a 19,7 ppm. **IČ** (ATR, cm^{-1}): 2972, 2867, 1744, 1556, 1514, 1442, 1427, 1362, 1350, 1286, 1255, 1225, 1123, 1077, 1033 a 978. **MS** (MALDI-TOF) *m/z*: 1561,4 $[M]^+$; 1584,4 $[M+Na]^+$; 3122,7 $[2M]^+$. **UV-Vis** λ_{max}/THF; nm (ε/THF; $dm^3mol^{-1}cm^{-1}$): 654 (183 000), 596sh, 429sh, 377 (141 000).

6.9. Příprava 5-chloro-6-(1,4,7,10-tetraoxa-13-azacyklopentadekan-13-yl)pyrazin-2,3-dikarbonitrilu (6)



6

Příprava látky **6** byla založena na postupu popsaném již dříve v literatuře.[28]

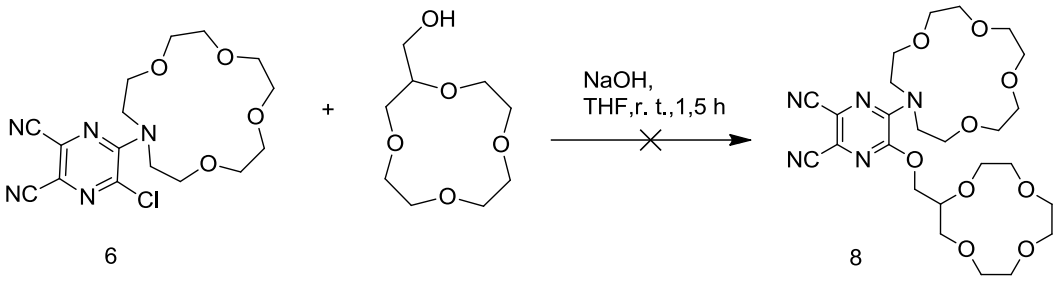
K 5,6-dichlor-pyrazin-2,3-dikaronitrilu (600 mg, 3,02 mmol) rozpuštěném v THF (60 ml) byl přidán 1-aza-15-crown-5 (661 mg, 3,02 mmol) rozpuštěný v THF (15 ml). Roztok byl chlazen na lázni voda/sůl (přibližně -10 °C) 10 minut. Došlo ke žlutému zbarvení reakce. Reakční směs byla míchána při pokojové teplotě 5 minut, poté byl přidán bezvodý uhličitan draselný (541 mg, 3,92 mmol). Reakce probíhala při pokojové teplotě 3 hodiny, její průběh byl sledován pomocí TLC s mobilní fází nejdříve CHF (R_f = 0,19), poté diethylether/aceton v poměru 2:1 (R_f produktu = 0,64).

Po ukončení reakce byla směs zahuštěna na rotační vakuové odparce. Produkt byl vytřepáván mezi EAC (3×50 ml) a vodu okyselenou kapkou kyseliny chlorovodíkové. Organické fáze byly posbírány, spojeny a vysušeny bezvodým síranem sodným. Produkt byl následně přečištěn sloupcovou chromatografií s mobilní fází CHF.

Produktem byl žlutý olej 5-chlor-6-(1,4,7,10-tetraoxa-13-azacyklopentadekan-13-yl)pyrazin-2,3-dikarbonitril (**6**).

Výtěžek: 828 mg (72 %). **Molekulová hmotnost**: 381,82. Naměřená analytická data odpovídají publikovaným hodnotám.[28]

6.10. Příprava 5-((1,4,7,10-tetraoxacyklododekan-2-yl)methoxy)-6-(1,4,7,10-tetraoxa-13-azacyklopentadekan-13-yl)pyrazin-2,3-dikarbonitrilu (8)



6 8

Ke směsi 2-hydroxymethyl-12-crownu-4 (59 mg, 0,29 mmol) s 1 M hydroxidem sodným (0,52 ml, 0,52 mmol) byla přidána sloučenina **6** (100 mg, 0,26 mmol) v THF (10 ml). Směs okamžitě zežloutla. Reakce probíhala při pokojové teplotě po dobu 1,5 hodiny, její průběh byl kontrolován pomocí TLC s mobilní fází EAC/aceton 5:1.

Směs byla následně zahuštěna na odparce. Produkt byl vytřepáván mezi EAC/vodu, ale podle kontroly TLC nepřecházel dostatečně do organické fáze. Proto byla celá směs opět odpařena do sucha na rotační vakuové odparce a produkt byl přečištěn pomocí sloupcové chromatografie s acetonem jako mobilní fázi (R_f produktu = 0,27).

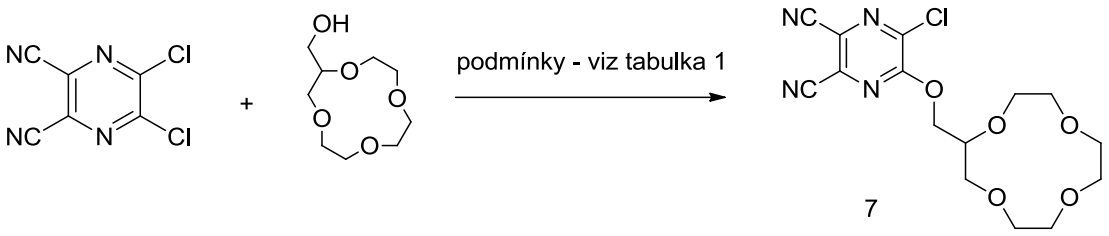
NMR: nebyl potvrzen očekávaný produkt.

6.11. Příprava 5-((1,4,7,10-tetraoxacyklododekan-2-yl)methoxy)-6-chloropyrazin-2,3-dikarbonitrilu (7)

Zkoušené podmínky během optimalizace této reakce shrnuje Tabulka 1.

METODA	BÁZE	ROZPOUŠTĚDLO	TEPLOTA	ČAS	VÝSLEDEK
A	NaOH	THF	r. t.	2,5 h	nereaguje
B	K_2CO_3	THF	80 °C	3 h	10 %
C	TEA	THF	r. t.	2,5 h	59 %

Tabulka 1: Přehled použitých bází a podmínky, při kterých reakce probíhaly s výtěžky



6.11.1 Metoda A

Ke směsi 2-hydroxymethyl-12-crown-4 (114 mg, 0,55 mmol) v THF (5 ml) s 1 M hydroxidem sodným (1 ml, 1,01 mmol) byl přidán 5,6-dichlorpyrazin-2,3-dikarbonitril (100 mg, 0,50 mmol). Směs, která se ihned zbarvila červenorůžově, byla míchána při pokojové teplotě po dobu 2,5 hodiny. Reakce byla kontrolována pomocí TLC s mobilní fází EAC/aceton 3:1.

Produkt byl zahuštěn na rotační vakuové odparce a vytřepán mezi EAC/vodu (3×50 ml). Organické vrstvy byly posbírány a vysušeny pomocí bezvodého síranu sodného. Produkt byl následně přečištěn sloupcovou chromatografií (2×). Při prvním čištění byla mobilní fáze složena z EAC/acetonu 3:1, nedošlo k dokonalému přečištění. Mobilní fáze při druhém přečištění EAC/aceton 2:1.

NMR: nebyl nepotvrzen očekávaný produkt.

6.11.2. Metoda B

Ke směsi 2-hydroxymethyl-12-crownu-4 (114 mg, 0,55 mmol) v THF (3 ml) s bezvodým uhličitanem draselným (139 mg, 1,01 mmol) byl přidán 5,6-dichlorpyrazin-2,3-dikarbonitril (100 mg, 0,50 mmol). Směs se zbarvila ihned žlutě. Reakce probíhala pod zpětným chladičem při 80 °C po dobu 3 hodin. Průběh reakce byl monitorován pomocí TLC s EAC jako mobilní fází (R_f produktu = 0,51).

Produktem byla žlutá pevná látka 5-((1,4,7,10-tetraoxacyklododekan-2-yl)methoxy)-6-chlorpyrazin-2,3-dikarbonitril **(7)**, která byla přečištěna sloupcovou chromatografií s EAC jako mobilní fázi.

Výtěžek: 19 mg (10 %). **Molekulová hmotnost**: 368,77.

6.11.3. Metoda C

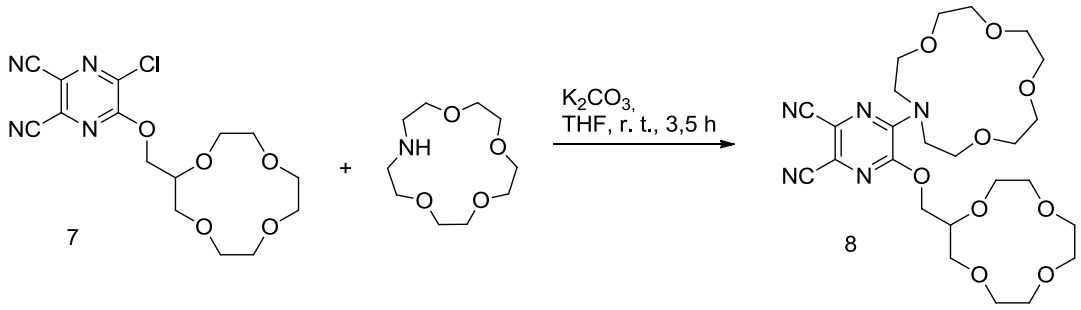
Ke směsi 2-hydroxymethyl-12-crownu-4 (570 mg, 2,76 mmol) v THF (15 ml) a triethylaminu (TEA) (509 mg, 5,03 mmol) byl přidán 5,6-dichlorpyrazin-2,3-dikarbonitril (500 mg, 2,51 mmol). Reakční směs, která se zbarvila ihned červeně, byla míchána při pokojové teplotě po dobu 2,5 hodiny.

Reakce byla kontrolována pomocí TLC s EAC jako mobilní fází. Produkt byl přečištěn sloupcovou chromatografií, mobilní fáze byla tvořena opět EAC (R_f produktu = 0,51).

Produkt 5-((1,4,7,10-tetraoxacyklododekan-2-yl)methoxy)-6-chlorpyrazin-2,3-dikarbonitril **(7)** byla žlutá pevná látka.

Výtěžek: 543 mg (59 %). **Molekulová hmotnost:** 368,77. **Teplota tání:** 111,5-115,2 °C. **^{1}H-NMR** (aceton-d_6, 500 MHz): δ_H 3,55 – 3,85 (14H, m crown-H); 4,23 (1H, m, CH); 4,53 (1H, dd, J_1 = 7 Hz, J_2 = 7 Hz, CH_2OAr) a 4,69 ppm (1H, dd, J_1 = 4 Hz, J_2 = 4 Hz, CH_2OAr). **^{13}C-NMR** (aceton-d_6, 125 MHz): 158,6; 143,4; 130,3; 124,7; 113,88; 113,86; 77,6; 72,4; 72,3; 71,4; 71,3; 71,17; 71,15 a 70,8 ppm. **IČ** (ATR, cm^{-1}): 2927, 2864, 2242 (CN), 1545, 1528, 1461, 1437, 1356, 1306, 1231, 1159, 1128, 1101, 1065, 1041, 1027, 976, 943, 919, 853 a 830.

6.12. Příprava 5-((1,4,7,10-tetraoxacyklododekan-2-yl)methoxy)-6-(1,4,7,10-tetraoxa-13-azacyklopentadekan-13-yl)pyrazin-2,3-dikarbonitrilu (8)



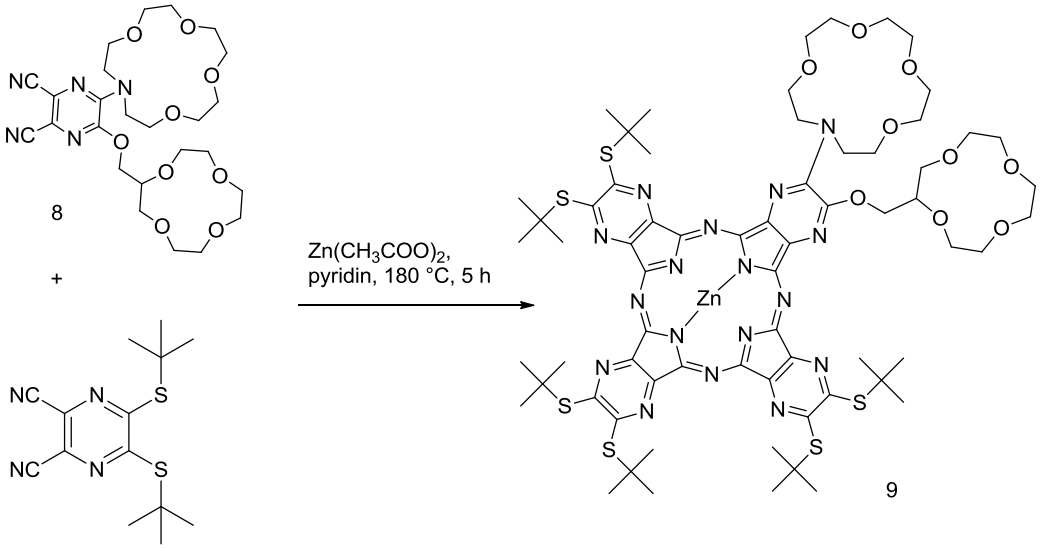
Ke sloučenině **7** (530 mg, 1,44 mmol) v THF (10 ml) s bezvodým uhličitanem draselným (397 mg, 2,87 mmol) byl za stálého míchání přidán 1-aza-15-crown-5 (473 mg, 2,16 mmol) v THF (5 ml). Žlutá reakční směs změnila barvu do oranžova. Směs byla míchána při pokojové teplotě a její průběh kontrolován pomocí TLC s mobilní fází EAC/aceton 1:1. Po třech hodinách se nijak výrazně reakce neměnila, proto byl přidán další 1-aza-15-crown-5 (123 mg, 0,56 mmol). Téměř ihned došlo k úplnému zreagování směsi.

Rozpouštědlo bylo odpařeno na rotační vakuové odparce a produkt byl přečištěn pomocí sloupcové chromatografie s mobilní fází EAC/aceton 1:1 (R_f produktu = 0,21).

Produkt byl žlutý olej 5-((1,4,7,10-tetraoxacyklododekan-2-yl)methoxy)-6-(1,4,7,10-tetraoxa-13-azacyklopentadekan-13-yl)pyrazin-2,3-dikarbonitril (**8**).

Výtěžek: 743 mg (94 %). **Molekulová hmotnost**: 551,59. **^{1}H-NMR** (aceton-d_6, 500 MHz): δ_H 3,56 – 3,89 (30H, m, crown-H); 3,98 – 4,04 (4H, m, crown-H); 4,11 (1H, m, CH); 4,42 (1H, dd, J_1 = 7 Hz, J_2 = 7 Hz, CH_2OAr) a 4,49 ppm (1H, dd, J_1 = 4 Hz, J_2 = 4 Hz, CH_2OAr). **^{13}C-NMR** (aceton-d_6, 125 MHz): 150,7; 147,9; 125,4; 116,6; 115,6; 115,3; 77,6; 72,1; 71,7; 71,6; 71,4; 71,2; 71,14; 71,11; 70,8; 70,7; 70,3; 70,1; 69,4 a 54,1 ppm. **IČ** (ATR, cm^{-1}): 2863, 2226 (CN), 1558, 1522, 1508, 1428, 1354, 1289, 1255, 1223, 1120, 982, 926 a 840. **MS** (APCI+) *m/z*: 552,3 $[M+H]^+$.

6.13. Příprava nesymetrického AzaPc 9



Byla smíchána látka **8** (100 mg, 0,181 mmol) s 5,6-bis(*terc*-butylsulfanyl)pyrazin-2,3-dikarbonitrilem[32] (167 mg, 0,544 mmol) a octanem zinečnatým (133 mg, 0,725 mmol). Pod ochrannou argonovou atmosférou byl následně přidán bezvodý pyridin (1 ml) a reakční směs byla míchána 5 hodin pod zpětným chladičem při teplotě varu rozpouštědla. Postupně došlo k zabarvení reakce na tmavě zelenou.

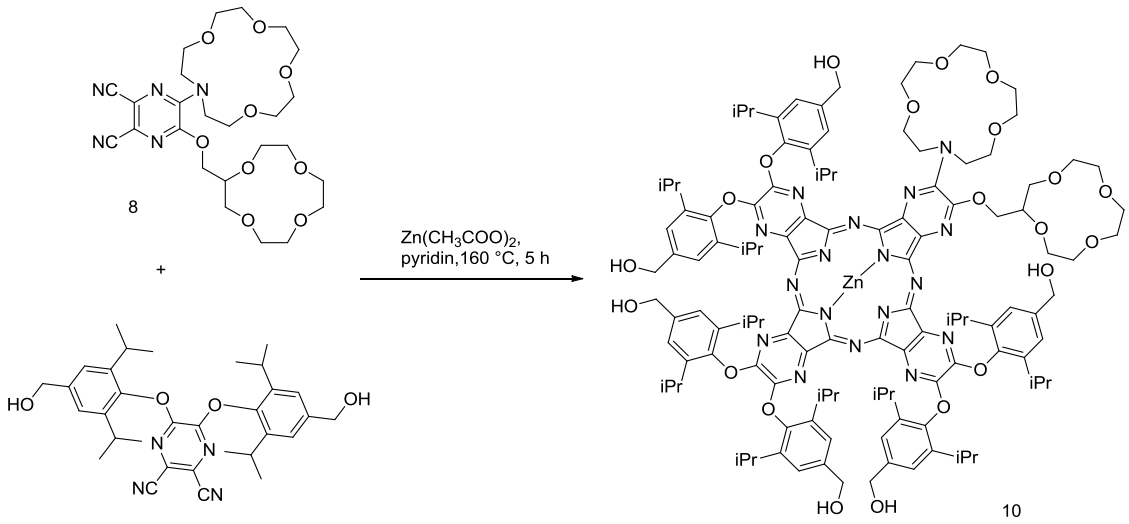
Po ukončení reakce byl produkt odpařen do sucha na rotační vakuové odparce, následně byla přidána voda, vzniklá suspenze byla zfiltrována přes skládaný filtrační papír, sraženina poté promyta vodou a sušena ve tmě při laboratorní teplotě přes noc.

Produkt byl čištěn sloupcovou chromatografií nejprve s mobilní fází CHF/MeOH/THF 10:0,5:1 (R_f produktu = 0,39), poté ještě 2× s mobilní fází CHF/MeOH/THF 10:0,25:1 (R_f produktu = 0,15). Produktem byl zelený olej.

Výtěžek: 27 mg (9 %). **Molekulová hmotnost** 1536,32. **^{1}H-NMR** ($CDCl_3$/pyridin 3:1, 500 MHz): δ_H 1,93 (9H, s, CCH_3); 1,947 (27H, s, CCH_3); 1,952 (18H, s, CCH_3); 3,37 – 4,28 (35H, m); 4,93 (1H, dd, J_1 = 6 Hz, J_2 = 6 Hz, CH_2OAr) a 5,02 ppm (1H, dd, J_1 = 5 Hz, J_2 = 5 Hz, CH_2OAr). **^{13}C-NMR** ($CDCl_3$/pyridin 3:1, 125 MHz): 158,7; 158,2; 157,9; 157,8; 157,6; 157,4; 152,2; 151,9; 151,22; 151,20; 150,9; 150,49; 150,45; 150,20; 150,17; 148,1; 146,2; 144,55; 144,47; 144,3; 144,2; 144,04; 144,02; 143,97;

137,5; 124,7; 115,8; 114,4; 114,1; 76,7; 71,04; 71,02; 70,86; 70,81; 70,7; 70,45; 70,32; 70,23; 70,21; 70,05; 69,7; 69,4; 68,2; 53,6; 53,4; 51,06; 51,04; 51,03; 51,00; 50,97; 30,7; 30,6; 30,50 a 30,46 ppm. **IČ (ATR, cm^{-1})**: 2916, 2863, 1524, 1470, 1446, 1427, 1362, 1252, 1138, 1101, 1045, 976, 847 a 784. **MS** (MALDI-TOF) *m/z*: 1533,3 $[M]^+$, 1556,3 $[M+Na]^+$; 3066,7 $[2M]^+$; 3089,6 $[2M+Na]^+$. **UV-Vis** λ_{max}/THF; nm (ε/THF; $dm^3mol^{-1}cm^{-1}$): 653 (142 000), 594sh, 376 (100 000).

6.14. Příprava nesymetrického AzaPc 10



Byla smíchána látka **7** (100 mg, 0,181 mmol) s 5,6-bis(4(hydroxymethyl)-2,6-diisopropylfenoxy)pyrazin-2,3-dikarbonitrilem (295 mg, 0,544 mmol) a octanem zinečnatým (133 mg, 0,725 mmol). Poté byl pod ochrannou argonovou atmosférou přidán bezvodý pyridin (1 ml). Reakce probíhala při teplotě varu rozpouštědla po dobu 5 hodin. Reakční směs postupně zmodrala.

Produkt byl odpařen do sucha pomocí rotační vakuové odparky, následně byla přidána voda (20 ml). Suspenze byla zfiltrována přes skládaný filtrační papír a sraženina promyta důkladně vodou. Produkt byl sušen v temnu při laboratorní teplotě přes noc.

Produkt byl přečištěn sloupcovou chromatografií s mobilní fází CHF/MeOH/THF 10:1:1, dále pak mobilní fází CHF/MeOH/THF 10:0,5:1 (R_f produktu = 0,40). Produktem byl modrý olej.

Výtěžek: 20 mg (5 %). **Molekulová hmotnost**: 2245,02. **^{1}H-NMR** ($CDCl_3$/pyridin 3:1, 500 MHz): δ_H 0,91 – 1,24 (72H, m, CH_3); 1,92 – 2,00 (12H, m, C*H*CH_3); 3,08 – 3,26 (4H, m, crown-H); 3,32 – 4,10 (30H, m, crown-H); 4,66 (2H, d, *J* = 7 Hz, C*H*$_2$OH); 4,83 – 4,89 (4H, m, C*H*$_2$OH); 5,03 (2H, s, C*H*$_2$OH); 5,18 – 5,28 (4H, m, C*H*$_2$OH); 5,35 – 5,52 (6H, m, OH); 7,18 – 7,28 ppm (12H, m, ArH, částečně překryt signálem rozpouštědla). **^{13}C-NMR** ($CDCl_3$/pyridine 3:1, 125 MHz): 171,3; 171,1; 148,4; 142,1; 141,9; 141,3; 141,1; 140,4; 128,0; 125,1; 124,9; 108,1; 107,9; 106,7; 98,4;

71,4; 70,8; 70,7; 70,5; 67,9; 67,6; 67,5; 67,1; 66,9; 65,4; 65,2; 65,1; 53,9; 30,0; 29,82, 29,78; 29,73; 28,7; 28,6 ppm. **IČ** (ATR, cm^{-1}): 2966, 2930, 2870, 1734, 1541, 1522, 1489, 1398, 1363, 1338, 1286, 1245, 1214, 1158, 1101, 1056 a 927. **MS** (MALDI-TOF) *m/z*: 2365,9 $[M+2Na+2K]^+$; 2388,9 $[M+3Na+2K]^+$. **UV-Vis** λ_{max}/THF; nm (ε/THF; $dm^3mol^{-1}cm^{-1}$): 635 (128 000), 579sh, 365 (115 000).

6.15. Fotofyzikální měření

Nejdříve proběhla příprava vzorků, kdy byly AzaPc **4**, **5**, **9** a **10** opět přečištěny pomocí preparativního TLC. Následující Tabulka 2 shrnuje mobilní fáze použité pro jednotlivé AzaPc:

AzaPc	Složení mobilní fáze
4	CHF:MeOH:THF (10:1,5:1)
5	CHF:THF (10:1)
9	CHF:MeOH:THF (10:0,25:1)
10	CHF:MeOH:THF (10:0,5:1)

Tabulka 2: Jednotlivé AzaPc a mobilní fáze, které byly použity pro závěrečné přečištění pomocí preparativního TLC

Z TLC byl produkt seškrábán a extrahován do acetonu. Následovala filtrace a důkladné odpaření vzorku do sucha na rotační vakuové odparce. Z těchto vzorků jsme si připravili přibližně 100 µM zásobní roztoky, pomocí absorpční spektrometrie a známých hodnot extinkčních koeficientů jednotlivých AzaPc **4**, **5**, **9** a **10** jsme experimentálně zjistili, jaké množství bude nutno přidat ke 2 ml THF, abychom získali 1 µM roztoky příslušných AzaPc.

Postup titrace:

Do kyvety byly napipetovány 2 ml čerstvě předestilovaného THF, bylo změřeno absorpční spektrum (označováno jako base line). Poté bylo do kyvety přidáno určité množství zásobního roztoku AzaPc tak, abychom získali 1 µM roztok (obvykle 20 µl). Opět bylo změřeno absorpční spektrum a dále také fluorescenční emisní spektrum (excitační vlnová délka 580 nm pro AzaPc **4** a **10**, 590 nm pro AzaPc **5** a **9**). Tato počáteční hodnota intenzity fluorescence v maximu emisního spektra byla označena jako F_0. Následovalo postupné přidávání analytů (K^+, Na^+, Li^+ , Ca^{2+} nebo Mg^{2+}) ve formě 0,01 M roztoků příslušných solí v MeOH. Po každém přídavku bylo změřeno jak absorpční tak emisní spektrum. Pro analýzu jsme odečetli absorpci při vlnové délce excitace (po odečtení absorbance baseline) a intenzitu fluorescence v maximu emisního spektra (hodnoty F). Získaná data byla analyzována z příslušných titračních křivek (závislost intenzity fluorescence F na koncentraci analytu) a byla porovnána citlivost jednotlivých AzaPc na dané analyty (jako nárůst fluorescence F_{max}/F_0, kdy F_{max} je maximální hodnota F při dané titraci).

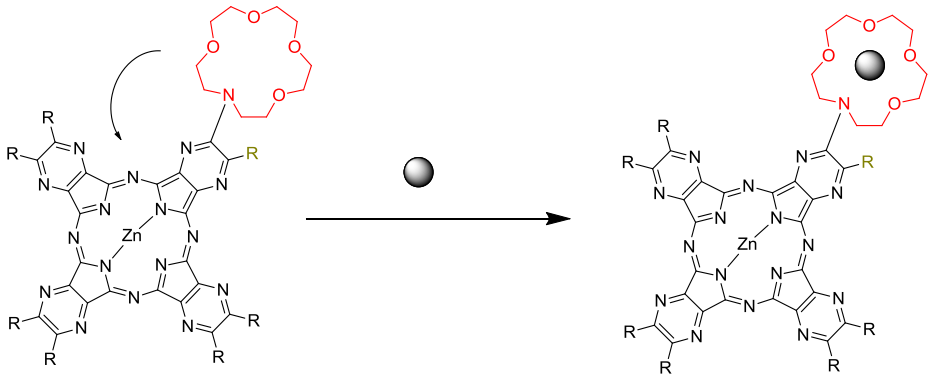
7. DISKUZE A VÝSLEDKY

Již v několika předchozích pracích naší výzkumné skupiny bylo zjištěno, že u AzaPc probíhá jev označující se jako tzv. **intramolekulární přenos náboje** (ICT, z angl. intramolecular charge transfer), pokud AzaPc obsahují alkylamino nebo arylamino skupinu na periferii.[20, 24]

Jak bylo zmíněno v Teoretické části, volný elektronový pár na dusíku alkylamino resp. arylaminového substituentu zde slouží jako donor ICT, makrocyklické jádro AzaPc pak jako akceptor. Probíhá-li ICT, dochází velice efektivně ke zhášení excitovaných stavů. Z toho důvodu se nemohou uplatnit jevy jako fluorescence nebo mezisystémový přechod s následnou produkcí singletového kyslíku, což jsou dvě hlavní relaxační cesty excitovaných stavů Pc a příbuzných sloučenin.[6, 11, 20] Jinými slovy, molekula nevykazuje fluorescenci, je „zhasnutá“ (u senzorických AzaPc hovoříme o OFF stavu). Pokud však dojde k zablokování ICT, mohou se tyto běžné relaxační cesty znovu uplatnit a jsme tak schopni pozorovat fluorescenci a produkci singletového kyslíku.[6] Blokaci ICT lze docílit několika způsoby, např. protonizací donorového dusíku (u pH senzitivních AzaPc)[27] nebo koordinací kationtu kovu (u AzaPc senzorů pro kationty kovů). Volný elektronový pár dusíku se podílí na vazbě protonu, resp. koordinaci kationtu, ICT není umožněno, a dochází tak k nárůstu fluorescence (senzor je v ON stavu) (Obr. 7). Vysoká účinnost tohoto děje je prokázána tím, že jedno takové donorové centrum je dostačující k dosažení OFF stavu s nulovou fluorescencí.[20]

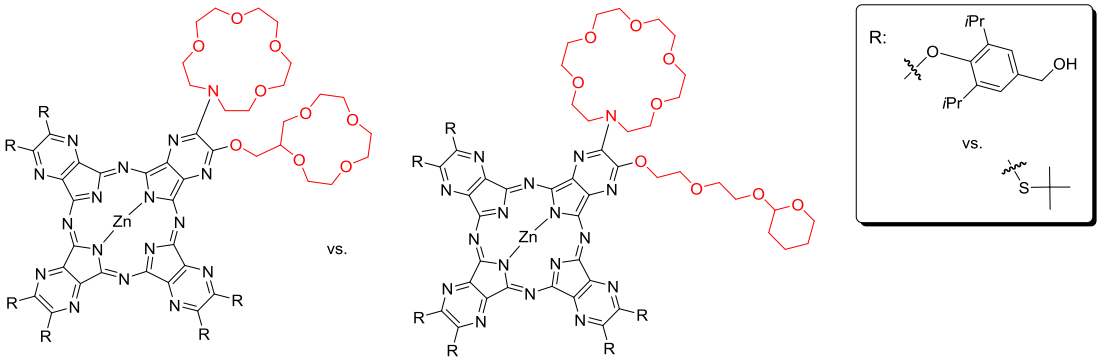
U senzorů pro kationty kovů je rozpoznávacím centrem většinou azacrown.[28] Z našich předchozích prací na toto téma vyplynulo, že selektivita AzaPc senzorů ke kationtům alkalických kovů závisí na velikosti aza-crownu vázaného na periferii AzaPc.[1] Zajímavým zjištěním byl fakt, že zvýšená rigidita rozpoznávacího centra, která byla dosažena tweezer uspořádáním aza-crownů, je také schopna optimalizovat selektivitu a navíc i značně zlepšit sensitivitu k požadovaným kationtům. Nevýhodná se v této práci ukázala přítomnost dvou donorů ICT a z toho vyplývající nižší kvantové výtěžky fluorescence v ON stavu senzoru.[29]

Vznikl tedy nápad, připravit senzorické AzaPc se zvýšenou selektivitou k vybraným kationtům kovů, a to pomocí zvýšené rigidity rozpoznávacího centra obsahujícího však pouze jeden aza-crown. Právě tímto tématem se zabývá má diplomová práce.



Obr. 7: Princip přenosu a blokace ICT

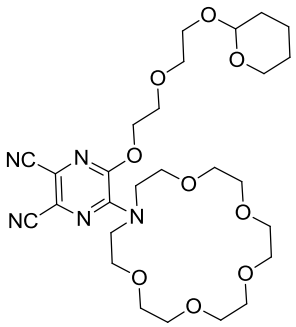
Má práce zahrnovala syntézu molekul obsahující 5-ti členný aza-crown 1,4,7,10-tetraoxa-13-azacyklopentadekan a 2-hydroxymethyl-12-crown-4, kdy se draselný kationt naváže do kavity jen částečně a bude náchylnější k vazbě tohoto kationtu v tzv. tweezer uspořádání. Dále byly připraveny molekuly obsahující 6-tičlenný aza-crown 1,4,7,10,13-pentaoxa-16-azacyklooktadekan, u kterých bylo již dříve zjištěno, že je draselný kation schopen navázat se do kavity úplně.[1] V blízkosti těchto aza-crownů jsou pak substituenty (tzv. lariat ethery, resp. crowny), jejichž úkolem je zpevnění vazby zmiňovaného draselného kationtu v aza-crownu, které ovšem neobsahují žádný donorový dusík pro ICT. Dále pak tyto cílové molekuly obsahují objemné substituenty zabraňující agregaci, tj. *terc*-butylsulfanylové, resp. aryloxy skupiny (viz Obr. 8). Pokud by k agregaci docházelo, ztratily by sloučeniny senzorické vlastnosti, jelikož agregované AzaPc nejsou obvykle excitovány.[9]



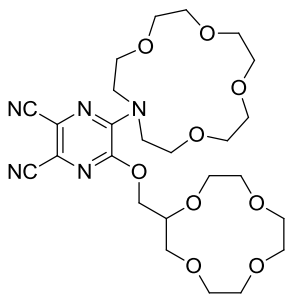
Obr. 8: Typy struktur, které byly připraveny

Byly navrženy 4 cílové AzaPc tak, aby mimo jiné splňovaly podmínky naší spolupracující výzkumné skupiny prof. Klimanta a dr. Borisova (Graz University of Technology, Rakousko). V rámci této spolupráce se pokoušíme ukotvit naše senzorické AzaPc do matric a připravujeme materiály využitelné pro reálné senzorické zařízení. Jejich základním požadavkem na finální molekulu je rozpustnost sloučenin v těkavém organickém rozpouštědle a nerozpustnost ve vodě. Z toho důvodu jsme volili nenabité objemné substituenty „R“ (Obr. 8) spíše lipofilního charakteru. Vazba na matrici pak může probíhat několika způsoby, např. nespecifickou interakcí využívající působení hydrofobních interakcí (vhodná u AzaPc **5** a **9**). Další možností je vazba na matrici pomocí volných OH skupin přítomných v AzaPc **4** a **10**. V neposlední řadě je i možnost specifické kovalentní vazby na matrici, pro kterou by bylo potřeba zavedení pouze jedné funkční skupiny do molekuly senzoru. Tuto podmínku by splnily sloučeniny **4** a **5** z naší série, po odstranění chránící skupiny.

Prvním krokem syntézy byla příprava prekurzorů **3** a **8** (obr. 9), tedy vhodně 5,6-disubstituovaných pyrazin-2,3-dikarbonitrilů. Při jejich přípravě byly využívány zejména nukleofilní substituce.



3

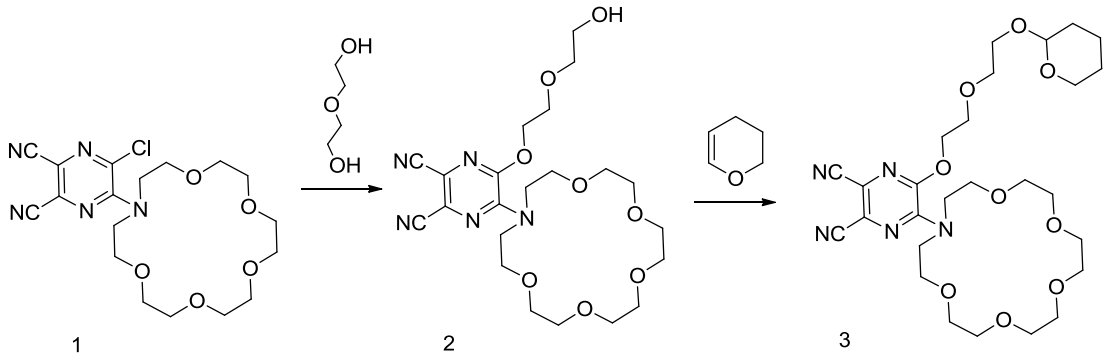


8

Obr. 9: Prekurzory **3** a **8** pro přípravu cílových struktur

Nejdříve došlo k reakci 5,6-dichlorpyrazin-2,3-dikarbonitrilu s 1-aza-18-crown-6 pomocí nukleofilní substituce za vzniku sloučeniny **1**. Reakce probíhala v poměru 1 :1 a za chlazení, neboť bylo potřeba docílit monosubstituce, tedy výměny pouze jednoho chlor substituentu za aza-crown. Reakce dále probíhala v mírném nadbytku K_2CO_3, který zde sloužil jako báze a zároveň „vychytávač“ chloridových iontů.

V dalším kroku byl nahrazen druhý chloridový substituent sloučeniny **1** pomocí nukleofilní substituce diethylenglykolem. Původně jsme zamýšleli ochránit nejprve jednu z koncových OH skupin diethylenglykolu 3,4-dihydro-2*H*-pyranem. Tuto sloučeninu se však nepodařilo připravit, respektive vyizolovat v čisté formě. Proto byl postup změněn tak, že jsme nechali reagovat sloučeninu **1** přímo s diethylenglykolem v přítomnosti NaOH jako baze, čímž byla získána látka **2** ve výtěžku 79 %. Až následně byla volná hydroxylová skupina ochráněna pomocí 3,4-dihydro-2*H*-pyranu za použití pyridinium *p*-toluensulfonátu jako katalyzátoru, což poskytlo požadovaný prekurzor **3** (Obr. 10). Toto chránění probíhalo s výtěžkem 55 %.



Obr.10: Schéma přípravy prekurzoru **3**

Příprava AzaPc **4** a **5** probíhala statistickou kondenzací, při které reagovaly prekurzor **3** (tj. prekurzor A) s odpovídajícím prekurzorem B v poměru 1:3. V prvním případě byl prekurzorem B 5,6-bis(4-(hydroxymethyl)-2,6-diisopropylfenoxy)pyrazin-2,3-dikarbonitril, připravený kolegy v laboratoři. Ve druhém případě reagoval prekurzor **3** a 5,6-bis(*terc*-butylsulfanyl)pyrazin-2,3-dikarbonitril, který byl připraven podle publikovaného postupu.[32] Poměr reaktantů 1:3 (A:B) zvyšoval pravděpodobnost přípravy námi požadovaného kongeneru ABBB mající pouze jedno rozpoznávací centrum v molekule.[33] Pro cyklizaci byla použita tzv. **templátová metoda**, kdy reakce probíhala v přítomnosti octanu zinečnatého ve vysokovroucím rozpouštědle. Zinečnatý kation zde slouží jako templát, který na sebe naváže čtyři prekurzory, ty se tak dostanou k sobě na blízkou vzdálenost a dojde k jejich spojení do makrocyklu. Výhodou této metody je přímá příprava zinečnatých komplexů. Zinečnatý kation jako centrální atom

zvyšuje stabilitu finálních AzaPc a zajišťuje i výhodné fotofyzikální vlastnosti v ON stavu senzoru. Tzv. Linsteadovu metodu s alkoholátem jako iniciátorem reakce v příslušném alkoholu, která se velmi často používá při syntézách podobného typu nesymetrických makrocyklů,[34] jsme se rozhodli nepoužít z důvodu rizika výměny lariat etheru za alkoxy skupiny rozpouštědla. K této výměně běžně dochází u málo objemných alkyloxysubstituovaných prekurzorů pro AzaPc.[35]

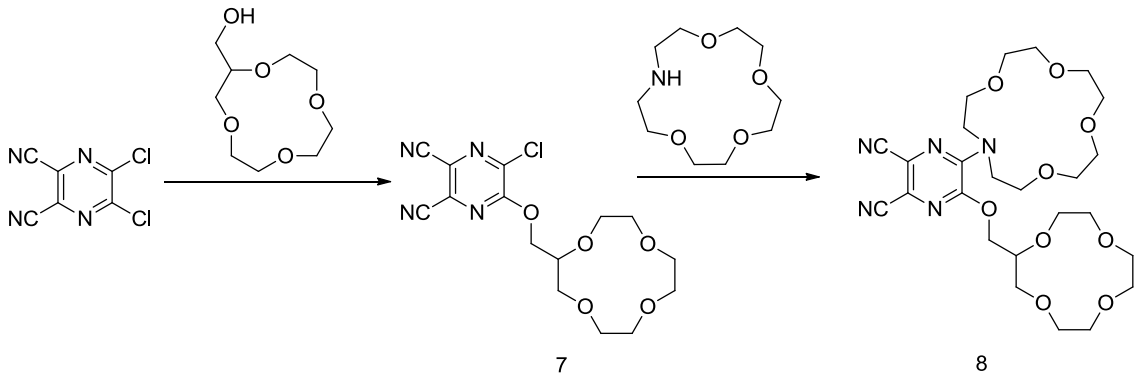
Průběh statistické kondenzace AzaPc **4** byl porovnán ve dvou různých rozpouštědlech, konkrétně v pyridinu a DMF. V obou případech jsme pracovali v bezvodém prostředí pod ochrannou argonovou atmosférou a při teplotě varu daného rozpouštědla. Po přidání pyridinu došlo okamžitě ke vzniku zeleného zbarvení. Po přidání DMF došlo k zelenému zbarvení reakce také, ale až po 30 minutách. Jako výhodnější z hlediska výtěžku se projevilo prostředí bezvodého pyridinu, proto při přípravě produktu **5** a i dalších AzaPc **9** a **10** byl jako rozpouštědlo použit právě bezvodý pyridin.

Statistickou kondenzací vznikne vždy směs šesti kongenerů z různě nakombinovaných podjednotek A a B (AAAA, AAAB, ABAB, AABB, ABBB a BBBB), ze které jsme izolovali ABBB kongener pomocí sloupcové chromatografie. Jak bylo zmíněno i výše, zvolili jsme tento kongener, jelikož jsme požadovali molekulu s pouze jedním rozpoznávacím centrem. Oddělování jednotlivých kongenerů bylo při izolování AzaPc **4** poměrně dost obtížné, naopak izolace AzaPc **5** probíhala výrazně snadněji. Výtěžky se pohybovaly v řádech jednotek procent (8 % pro AzaPc **4**; 5 % pro AzaPc **5**). Struktura všech meziproduktů a finálních AzaPc byla ověřena pomocí běžných analytických metod (NMR, IR a MS).

V další části práce jsem se zaměřila na přípravu AzaPc **9** a **10**, kde je lariat ether nahrazen crownem. Postup syntézy byl podobný jako při přípravě AzaPc **4** a **5**, která je zmíněna výše. První krok zahrnoval nukleofilní substituci 5,6-dichlorpyrazin-2,3-dikarbonirilu s 1-aza-15-crown-5, opět v poměru 1:1 a za chlazení, kdy byl připraven meziprodukt **6**. K této látce byl přidán 2-hydroxymethyl-12-crown-4 za přítomnosti NaOH jako báze a THF sloužící jako rozpouštědlo. Vyizolovaný produkt však nebyl potvrzen pomocí NMR. Reakce byla později ještě jednou opakována. Postup byl téměř identický jako v předchozím kroku. Rozdíl byl v použité mobilní fázi při přečištění

produktu na sloupcové chromatografii. Mobilní fáze byla tvořena CHF/aceton v poměru 1:2. NMR však opět produkt nepotvrdilo.

Proto jsme se rozhodli reakční kroky obrátit (Obr. 11). K 5,6,-dichlorpyrazin-2,3-dikarbonitrilu byl přidán v mírném nadbytku 2-hydroxymethyl-12-crown-4. Tento reakční krok bylo nutno optimalizovat. Vyzkoušeli jsme tři různé báze (NaOH, K_2CO_3 a TEA). Průběh reakce jsme monitorovali pomocí TLC a v některých případech jsme se podle TLC rozhodli zkoušet i různé reakční teploty. Za přítomnosti NaOH jako báze se produkt nepodařilo vůbec připravit. V případě, kdy byl jako báze použit K_2CO_3 byl získán produkt ve výtěžku 10 %, v dalším případě byl jako báze použit TEA, který poskytl produkt **7** ve výtěžku 59 %. Výhodnější se tedy ukázala reakce v přítomnosti TEA, proto byla tato báze použita při reakci ve scale-up. Meziprodukt **7** následně poskytl nukleofilní substitucí s 1-aza-15-crown-5 finální prekurzor **8** ve velmi dobrém výtěžku 94 %.

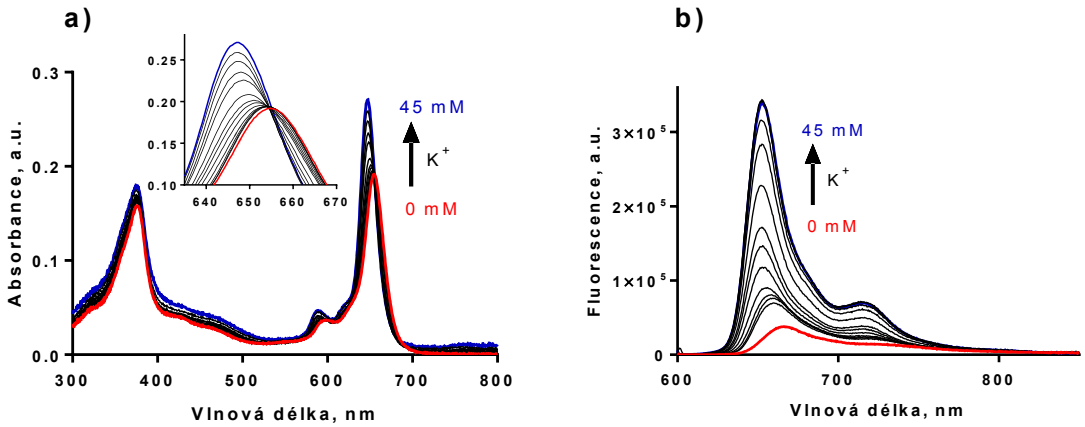


Obr.11: Schéma přípravy prekurzoru **8**

Následovala opět statistická kondenzace pomocí templátové metody, kdy spolu prekurzory reagovaly v poměru 1:3 za přítomnosti octanu zinečnatého v pyridinu, podobně jako při přípravě AzaPc **4** a **5**. Výsledkem byla směs kongenerů, ze které jsme pomocí chromatografických metod vyizolovali kongenery ABBB a tím získali AzaPc **9** a **10**. I v tomto případě mnohem lépe probíhala izolace AzaPc **9** než AzaPc **10**.

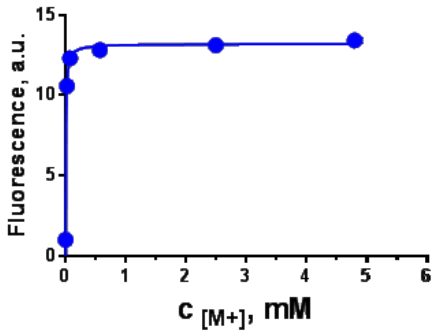
Třetí část diplomové práce byla zaměřena na **studování senzorických vlastností cílových AzaPc 4**, **5**, **9** a **10** pomocí fluorescenčních titračních experimentů. Senzory

byly vždy naředěny na 1 μM roztoky v čerstvě předestilovaném THF a postupně byly přidávány jednotlivé analyty v MeOH (soli alkalických kovů a kovů alkalických zemin – Li^+, Na^+, K^+, Ca^{2+}, Mg^{2+}). V absorpčních spektrech během titrací k příliš velkým změnám nedocházelo, u citlivých analytů došlo pouze k nárůstu Q pásu (Obr. 12a). Tyto změny v absorpčním spektru probíhaly přes několik isosbestických bodů, nejvýrazněji to bylo patrné v oblasti Q pásu (inset Obr. 12a). Tyto isosbestické body naznačují přechod jedné formy sloučeniny (tj. bez vázaného kationtu) na druhou formu (kation vázán v centru aza-crownu). Výrazné změny bylo možno pozorovat v emisních spektrech (Obr. 12b). Na počátku byla fluorescence téměř nulová, po přidání analytu docházelo v případě citlivého analytu k výraznému nárůstu fluorescence s nepatrným posunem emisního maxima ke kratším vlnovým délkám, což odpovídá i nepatrnému hypsochromnímu posunu pozorovanému v absorpčním spektru.



Obr. 12: Příklad průběhu titrace: změny v absorpčním spektru (a, inset – zvětšená oblast Q pásu) a fluorescenčním emisním spektru (b) během titrace AzaPc **5** draselnými kationty. Absorpční spektra jsou korigována na zředění.

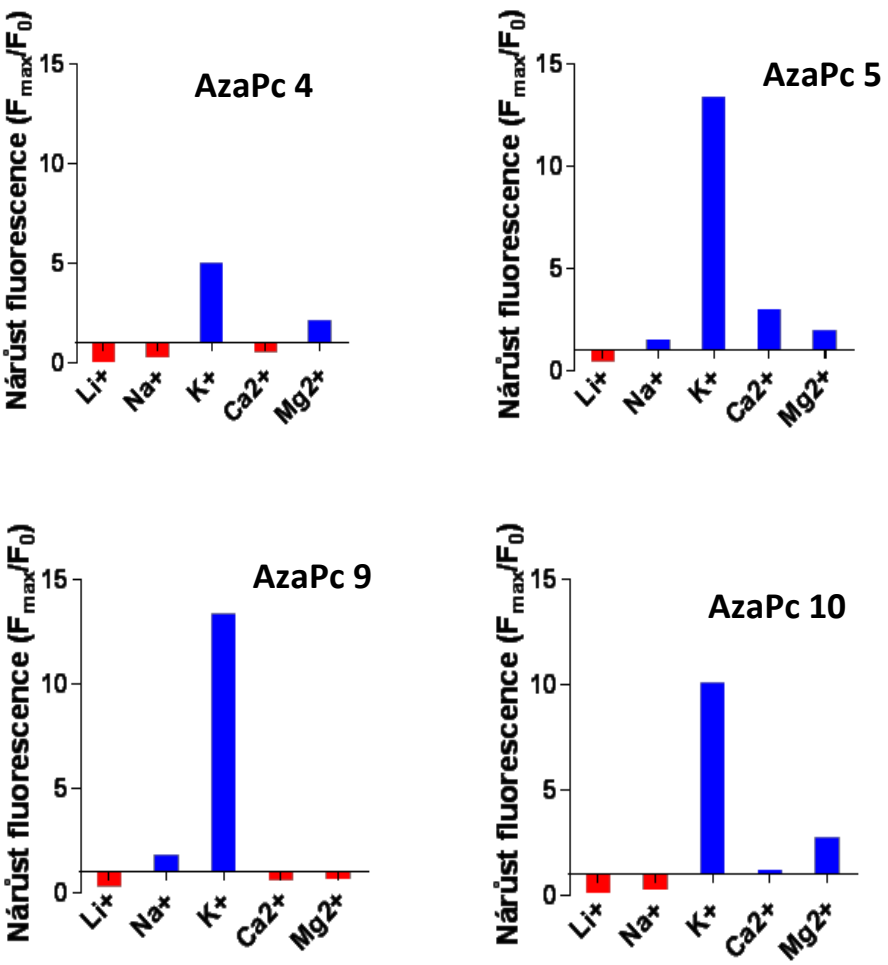
Postupný nárůst fluorescence během titrace je patrný i z grafu intenzity fluorescence na koncentraci analytu. Příklad takové závislosti je uveden na Obr. 13 opět pro titraci AzaPc **5** draselnými kationty.



Obr. 13: Příklad průběhu titrace AzaPc **5** draselnými kationty

Výsledky titrací všech AzaPc **4**, **5**, **9** a **10** se všemi zkoušenými analyty jsou shrnuty v grafech na Obr. 14. Rozsah na ose y je záměrně stejný u všech grafů, aby bylo možné výsledky snadno porovnat. Z těchto sloupcových grafů je patrné, že všechny připravené senzory vykazují **selektivitu k draselným kationtům.** Nárůst fluorescence až 15× již při poměrně nízké koncentraci draselných iontů (desítky mM) je velice slibný výsledek pro další vývoj senzorických AzaPc. Na ostatní analyty nejsou AzaPc **4**, **5**, **9** a **10** téměř vůbec citlivé, což je důležité především pro sodné kationty, které se velice často vyskytují současně s draselnými.

Záporné nárůsty (tedy poklesy fluorescence, v grafech znázorněny červeně) jsou způsobeny zvýšením polarity prostředí během titrace kvůli MeOH, který byl použit na rozpuštění solí. Tento výsledek je v souladu s obecným pravidlem, že v polárnějším prostředí je účinnost ICT vždy vyšší,[20] výsledkem je pak pokles fluorescence k ještě nižším hodnotám.



Obr. 14: Graf nárůstu fluorescence po přidání daného analytu u sloučenin **4**, **5**, **9**, **10** (F_0 je počáteční fluorescence; F_{max} maximální fluorescence při dané titraci)

V neposlední řadě je nutné zmínit další velkou výhodu našich připravených AzaPc senzorů, kterou je jejich absorpce a emise až v oblasti kolem 650 nm (např. AzaPc **5** má emisní maximum v THF 653 nm, viz Obr. 12b), tedy v červené části spektra. V této oblasti neabsorbují ani neemitují endogenní chromofory, nachází se zde tzv. optické okno biologických tkání, což je velice výhodné pro reálné využití studovaných sloučenin v biologických aplikacích.

8. ZÁVĚR

V rámci mé diplomové práci byly připraveny následující meziprodukty a prekurzory:

- 5-chlor-6-(1,4,7,10,13-pentaoxa-16-azacyklooktadekan-16-yl)pyrazin-2,3-dikarbonitril **(1)**
- 2-(2-((tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)oxy)ethoxy)ethanol
- 5-(2-(2-hydroxyethoxy)ethoxy)-6-(1,4,7,10,13-pentaoxa-16-azacyklooktadekan-16-yl)pyrazin-2,3-dikarbonitril **(2)**
- 5-(1,4,7,10,13-pentaoxa-16-azacyklooktadekan-16-yl)-6-(2-(2-((tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)oxy)ethoxy)ethoxy)pyrazin-2,3-dikarbonitril **(3)**
- 5-chlor-6-(1,4,7,10-tetraoxa-13-azacyklopentadekan-13-yl)pyrazin-2,3-dikarbonitril **(6)**
- 5-((1,4,7,10-tetraoxacyklododekan-2-yl)methoxy)-6-chlorpyrazin-2,3-dikarbonitril **(7)**
- 5-((1,4,7,10-tetraoxacyklododekan-2-yl)methoxy)-6-(1,4,7,10-tetraoxa-13-azacyklopentadekan-13-yl)pyrazin-2,3-dikarbonitril (**8)**

Cyklotetramerizací, za využití templátové metody byli připraveny zinečnaté komplexy:

- AzaPc **4**
- AzaPc **5**
- AzaPc **9**
- AzaPc **10**

Struktury všech připravených sloučeniny byly ověřeny analýzami NMR, IČ, finální AzaPc i MS spektroskopií.

AzaPc **4**, **5**, **9** a **10** byly podrobeny fotofyzikálním titračním měřením, při kterých byla zjištěna jejich poměrně vysoká **selektivita k draselným iontům**. Nárůst fluorescence u nejlepších sloučenin byl při titraci K^+ až 15×. Naopak na ostatní analyty (Na^+, Li^+, Ca^{2+}, Mg^{2+}) se nezdají být studované AzaPc citlivé. Emisní maxima připravených AzaPc leží při 653 nm, tedy v červené části spektra. Díky zmíněným pozitivním vlastnostem se připravené AzaPc jeví jako výhodné fluorofory k detekci K^+ kationtů, a to i v prostředí, kde se vyskytují endogenní fluorofory.

9. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

[1] LOCHMAN, L., SVEC, J., ROH, J., NOVAKOVA, V**.** The role of the size of aza-crown recognition moiety in azaphthalocyanine fluorescence sensors for alkali and alkaline earth metal cations. *Dyes Pigm.,* 2015, **121**, 178-187.

[2] KOSTKA, M., ZIMCIK, P., MILETIN, M., KLEMERA, P., KOPECKY, K., MUSIL, Z. Comparison of aggregation properties and photodynamic activity of phthalocyanines and azaphthalocyanines. *J. Photochem. Photobiol., A,* 2006, **178**(1), 16-25.

[3] VALEUR, B., LERAY, I. Design principles of fluorescent molecular sensors for cation recognition. *Coord. Chem. Rev.,* 2000, **205**(1), 3-40.

[4] CARTER, K. P., YOUNG, A. M., PALMER, A. E. Fluorescent Sensors for Measuring Metal Ions in Living Systems. *Chem. Rev.,* 2014, **114**(8), 4564-4601.

[5] BERTINI, I., GRAY, H. B., STIEFEL, E. I., VALENTINE, J. S., Eds; *Biological Inorganic Chemistry: structure and reactivity*, 1st ed, University Science Books: Sausalito, Calif., 2007. ISBN 978-1-891389-43-6.

[6] NOVÁKOVÁ, V. Studium strukturních a fotofyzikálních aspektů azaftalocyaninů se zaměřením na jejich senzorické vlastnosti. Habilitační práce. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Hradec Králové 2014.

[7] LAKOWICZ, J. R. *Principles of fluorescence spectroscopy*. 3rd ed.; New York: Springer, 2006, ISBN 978-0-387-31278-1.

[8] NOOMNARM, U., CLEGG, R. M. Fluorescence lifetimes: fundamentals and interpretations. *Photosynth. Res.,* 2009, **101**(2-3), 181-194.

[9] NOVÁKOVÁ, V. Příprava a studium vlastností azaanalogů ftalocyaninů. Disertační práce. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Hradec Králové 2011.

[10] FIŠAR, Z. *Fluorescenční spektroskopie v neurovědách: Principy fluorescenční spektroskopie* [online],
[cit. 2017-03-23]. Dostupné z: http://psych.lf1.cuni.cz/fluorescence/Default.htm.

[11] ZIMČÍK, P. Azaftalocyaniny - od syntéz přes fotochemické a fotofyzikální vlastnosti k aplikacím. *Chem. Listy*. 2012, **106**(4), 275-282.

[12] LAVIS, L. D., RAINES, R. T. Bright Ideas for Chemical Biology. *ACS Chem. Biol.,* 2008, **3**(3), 142-155.

[13] TEALE, F. W.J., WEBER, G. Ultraviolet fluorescence of the aromatic amino acids. *Biochem. J.,* 1957, 65(3), 476-482.

[14] AUBIN, J. E. Autofluorescence of viable cultured mammalian cells. *J. Histochem. Cytochem.*, 1979, **27**(1), 36-43.

[15] ZAIKOVA, T. O., RUKAVISHNIKOV, A. V., BIRRELL, G. B., GRIFFITH, O. H., KEANA, J.F. Synthesis of fluorogenic substrates for continuous assay of phosphatidylinositol-specific phospholipase C. *Bioconjugate Chem*., 2001, 12(2), 307-313.

[16] LEYTUS, S. P., PATTERSON, W. L., MANGEL, W. F. New class of sensitive and selective fluorogenic substrates for serine proteinases. Amino acid and dipeptide derivatives of rhodamine. *Biochem. J.,* 1983, **215**(2), 253-260.

[17] WHITAKER, J. E., HAUGLAND, R. P., RYAN, D., HEWITT, P. C., HAUGLAND, R. P., PRENDERGAST, F. G. Fluorescent rhodol derivates: versatile, photostable labels and tracers. *Anal. Biochem.,* 1992, **207**(2), 267-279.

[18] BURKE, M. D., THOMPSON, S., WEAVER, R. J., WOLF, C. R., MAYERS, R. T. Cytochrome P450 specificities of alkoxyresorufin O-dealkylation in human and rat liver. *Biochem. Pharmacol.,* 1994, **48**(5), 923-936.

[19] ZIMCIK, P., NOVAKOVA, V., KOPECKY, K., MILETIN, M., KOBAK, U. RZ., SVANDRLIKOVA, E., VACHOVA, L., LANG, K. Magnesium Azaphthalocyanines: An Emerging Family of Excellent Red-Emitting Fluorophores. *Inorg. Chem.,* 2012, 51(7), 4215-4223.

[20] NOVAKOVA, V., ZIMCIK, P., MILETIN, M., VACHOVA, L., KOPECKY, K., LANG, K., CHÁBERA, P., POLÍVKA, T. Ultrafast intramolecular charge transfer in tetrapyrazinoporphyrazines controls the quantum yields of fluorescence and singlet oxygen. *Phys. Chem. Chem. Phys.,* 2010, **12**(11), 2555-2563.

[21] NOVAKOVA, V., REIMEROVA, P., SVEC J., SUCHAN, D., MILETIN, M., RHODA, H. M., NEMYKIN, V. N., ZIMCIK, P. Systematic investigation of phthalocyanines, naphthalocyanines, and their aza-analogues. Effect of the isosteric aza-replacement in the core. *Dalton Trans.,* 2015, **44**(29), 13220-13233.

[22] VACHOVA, L., NOVAKOVA, V., KOPECKY, K., MILETIN, M., ZIMCIK, P. Effect of intramolecular charge transfer on fluorescence and singlet oxygen production of phthalocyanine analogues. *Dalton Trans*., 2012, **41**(38), 11651-11656.

[23] CIDLINA, A., NOVAKOVA, V., MILETIN, M., ZIMCIK, P. Peripheral substitution as a tool for tuning electron-accepting properties of phthalocyanine analogs in intramolecular charge transfer. *Dalton Trans.,* 2015, **44**(15), 6961-6971.

[24] NOVAKOVA, V., HLADÍK, P., FILANDROVÁ, T., ZAJÍCOVÁ, I., KREPSOVÁ, V., MILETIN, M., LENČO, J., ZIMCIK, P. Structural factors influencing the intramolecular charge transfer and photoinduced electron transfer in tetrapyrazinoporphyrazines. *Phys. Chem. Chem. Phys.,* 2014, **16**(11), 5440-5446.

[25] KOPECKY, K., NOVAKOVA, V., MILETIN M., KUCERA, R., ZIMCIK, P. Solid-Phase Synthesis of Azaphthalocyanine - Oligonucleotide Conjugates and Their Evaluation As New Dark Quenchers of Fluorescence. *Bioconjugate Chem.,* 2010, **21**(10), 1872-1879.

[26] KOPECKY, K., NOVAKOVA, V., MILETIN, M., KUČERA, R., ZIMCIK, P. Synthesis of new azaphthalocyanine dark quencher and evaluation of its quenching efficiency with different fluorophores. *Tetrahedron.* 2011, **67**(33), 5956-5963.

[27] NOVAKOVA, V., MILETIN, M., KOPECKY, K., ZIMCIK, P. Red-Emitting Dyes with Photophysical and Photochemical Properties Controlled by pH. *Chem. – Eur. J.,* 2011, **17**(50), 14273-14282.

[28] NOVAKOVA, V., LOCHMAN, L., ZAJÍCOVÁ, I., KOPECKY, K., MILETIN, M., LANG, K., KIRAKCI, K., ZIMCIK, P. Azaphthalocyanines: Red Fluorescent probes for Cations. *Chem. – Eur. J.,* 2013, **19**(16), 5025-5028.

[29] LOCHMAN, L., SVEC, J., ROH, J., KIRAKCI, K., LANG, K., ZIMCIK, P., NOVAKOVA, V. Metal-Cation Recognition in Water by a Tetrapyrazinoporphyrazine-Based Tweezer Receptor. *Chem. – Eur. J.,* 2016, **22**(7), 2417-2426.

[30] NOVAKOVA, V., LÁSKOVÁ, M., VAVŘIČKOVÁ, H., ZIMCIK, P. Phenol-Substituted Tetrapyrazinoporphyrazines: pH-Dependent Fluorescence in Basic Media. *Chem. – Eur. J.,* 2015, **21**(41), 14382–14392.

[31] LOCHMAN L., ZIMCIK, P., KLIMANT, I., NOVAKOVA, V., BORISOV, S. M. Red-emitting CO_2 sensors with tunable dynamic range based on pH-sensitive azaphthalocyanine indicators. *Sens. Actuators, B.* 2017, **246**, 1100-1107.

[32] ZIMCIK, P., MILETIN, M., NOVAKOVA, V., KOPECKY, K., NEJEDLA, M., STARA, V., SEDLACKOVA, K. Effective Monofunctional Azaphthalocyanine Photosensitizers for Photodynamic Therapy. *Aust. J. Chem.,* 2009, **62**(5), 425-433.

[33] KOPECKY, K., ŠATINSKÝ, D., NOVAKOVA, V., MILETIN, M., SVOBODA, A., ZIMCIK, P. Synthesis of mono-, di-, tri- and tetracarboxy azaphthalocyanines as potential dark quenchers. *Dyes Pigm.* 2011, **91**(2), 112-119.

[34] DONZELLO, M. P., ERCOLANI, C., NOVAKOVA, V., ZIMCIK, P., STUZHIN, P. A. Tetrapyrazinoporphyrazines and their metal derivatives. Part I: Synthesis and basic structural information. *Coord. Chem. Rev.,* 2016, **309**, 107-179.

[35] NOVAKOVA, V., MILETIN, M., KOPECKY, K., FRANZOVA, S., ZIMCIK, P. Synthesis of Unsymmetrical Alkyloxy/Aryloxy-azaphthalocyanines Based on a Transetherification Reactio. *Eur. J. Org. Chem.,* 2011, (29), 5879-5886.