

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA FARMACEUTICKÉ CHEMIE A FARMACEUTICKÉ
ANALÝZY



Syntéza azaftalocyaninových zlášečů fluorescence vhodných
pro vazbu doprostřed oligonukleotidového řetězce

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Matěj Machan



Školitelka: doc. PharmDr. Veronika Nováková, Ph.D.

Hradec Králové, 2019

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

V Hradci Králové

Na úvod této práce bych rád poděkoval své školitelce doc. PharmDr. Veronice Novákové, Ph.D. a vedoucímu naší výzkumné skupiny prof. PharmDr. Petru Zimčikovi, Ph.D. za jejich odborné a cenné rady při vypracování této diplomové práce. Dále patří nemalý dík Mgr. Jiřímu Demuthovi, který velkou měrou napomáhal v úspěšném laboratorním bádání. Díky skvělému kolektivu AzaPc group za vytvoření vynikající pracovní atmosféry v laboratoři i mimo ni.

Za finanční podporu bych rád poděkoval Grantové agentuře UK (1168217) a SVV 260 401.

Abstrakt

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra: Katedra farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy

Kandidát: Matěj Machan

Školitelka: doc. PharmDr. Veronika Nováková, Ph.D.

Název práce: Syntéza azaftalocyaninových zhášečů fluorescence vhodných pro vazbu doprostřed oligonukleotidového řetězce

Azaftalocyaniny (AzaPc) jsou analoga ftalocyaninů s obměnou benzenových jader za jádra pyrazinová. Díky svému širokému spektru chemických a fotofyzikálních vlastností mají mnoho využití. Například mohou být využity jako fotosenzitizéry ve fotodynamické terapii nebo jako fluorescenční senzory. AzaPc, které jsou substituované alkylamino skupinami, mohou být využity jako zhášeče fluorescence, a to v uspořádání jako jednoduše značené sondy (tzv. FRET sondy) nebo ve dvojitě značených sondách. AzaPc pro tuto aplikaci mají obvykle tři čtvrtiny molekuly stejné (nesoucí alkylaminové substituenty zodpovědné za zhášení fluorescence) a poslední část je modifikována funkčními skupinami pro vazbu na oligonukleotidový řetězec. V rámci této diplomové práce byl připraven vhodný nesymetrický alkylamino substituovaný AzaPc s funkčními skupinami ve tvaru T, nesoucí dvě hydroxylové skupiny, které umožní vmezeření do oligonukleotidového řetězce. Prekurzory byly syntetizovány za využití nukleofilní substituce a Sonogashirova couplingu za vzniku vhodně substituovaných pyrazin-2,3-dikarbonitrilů. Posléze došlo k jejich cyklotetramerizaci metodou dle Linsteadova za vzniku směsi kongenerů bezkovových AzaPc. Požadovaný kongener typu AB₃ byl izolován pomocí sloupcové chromatografie. V posledním kroku syntézy byl do jeho centra koordinován zinečnatý kationt. Připravený AzaPc byl charakterizován z hlediska svých spektrálních vlastností a zároveň bylo studováno jeho agregační chování spolu se sérií AzaPc s podobnou periferní substitucí.

Abstract

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department: Department of Pharmaceutical chemistry and Pharmaceutical analysis

Candidate: Matěj Machan

Supervisor: doc. PharmDr. Veronika Nováková, Ph.D.

Title of thesis: Synthesis of novel azaphthalocyanines working as dark quenchers suitable for binding to the middle of an oligonucleotide chain

Azaphthalocyanines (AzaPcs) are analogues of well-known phthalocyanines with benzene rings replaced for pyrazine ones. AzaPcs can be used in many applications due to their interesting spectral and photophysical properties, e.g. as photosensitisers in photodynamic therapy or as fluorescence sensors. The alkylamino substituted AzaPcs can be used as dark quenchers of fluorescence in mono-labeled DNA hybridization probes (FRET probes) or double-labeled probes as well. The AzaPcs for this application have typically three quarters identical (bearing alkylamino groups responsible for quenching of fluorescence) and the last quarter is modified with a functional group for attaching to oligonucleotide probe.

The goal of this project was to synthesize unsymmetrical AzaPc with a T-shape functional group carrying two hydroxy groups that can be used for attaching to oligonucleotide probe. The synthesis consisted of preparation of appropriately substituted pyrazine-2,3-dicarbonitriles by nucleophilic substitution and Sonogashira coupling. The precursors were then used for cyclotetramerization employing the Linstead method in 1:3 ratio to obtain a mixture of congeners of metal-free AzaPcs. Desired congener of AB₃ type was isolated by column chromatography. Finally, zinc cation was coordinated to the center of macrocycle. Prepared AzaPc was characterized from spectral point of view and its aggregation was in detail studied with a series of AzaPc of similar peripheral substitution.

Obsah

1.	Seznam zkratek.....	9
2.	Cíl práce	10
3.	Teoretická část	11
3.1.	Syntéza AzaPc.....	11
3.1.1.	Syntéza prekurzorů.....	12
3.1.2.	Syntéza makrocyklu.....	12
3.1.3.	Asymetrické deriváty.....	14
3.2.	Vlastnosti AzaPc	14
3.2.1.	Absorbance – UV a VIS spektra	14
3.2.2.	Fotosenzitivita a PDT.....	15
3.2.3.	Fluorescence	16
3.3.	Zhášeče fluorescence (Quenchers)	17
3.3.1.	Kolizní zhášení fluorescence (dynamické).....	17
3.3.2.	Statické zhášení fluorescence	18
3.3.3.	Mechanismy zhášení	18
3.3.4.	Photoinduced electron transport (PET).....	19
3.3.5.	Resonanční přenos energie (RET)	19
3.3.6.	Typy sond	20
3.4.	Agregace azaftalocyaninů.....	22
3.5.	Mechanismy zamýšlených reakcí	23
3.5.1.	Nukleofilní aromatická substituce	23
3.5.2.	Sonogashirův coupling.....	25
3.5.3.	Cyklotetramerizace	26
3.5.4.	Cykloadiční typ reakce alkynu s azidem, tzv. click-chemistry	26
4.	Experimentální část	28
4.1.	Souhrnné schéma provedených reakcí.....	29

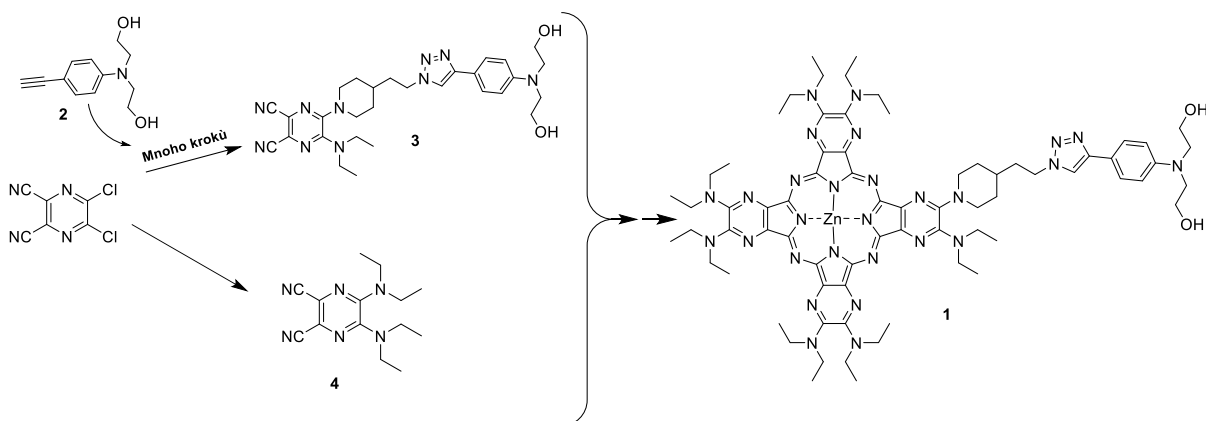
4.2. Příprava <i>N,N</i> -bis(2-hydroxyethyl)-4-ethynylanilinu (1)	31
4.2.1. Příprava <i>N,N</i> -bis(2-hydroxyethyl)-4-jodanilinu	31
4.2.2. Příprava 2,2'-((4-((trimethylsilyl)ethynyl)fenyl)azanediyl)bis(ethan-1-ol).....	32
4.2.3. Příprava 2,2'-((4-ethynylfenyl)azanediyl)bis(ethan-1-ol) (1)	33
4.3. Příprava 5-(4-(2-azidoethyl)piperidin-1-yl)-6-(diethylamino)pyrazin-2,3-dikarbonitrilu (3)	34
4.3.1. Příprava 5-chloro-6-(diethylamino)pyrazin-2,3-dikarbonitrilu (2) ..	34
4.3.2. Příprava 5-(4-(2-azidoethyl)piperidin-1-yl)-6-(diethylamino)pyrazin-2,3-dikarbonitrilu (3).....	35
4.3.3. Příprava 5-(diethylamino)-6-(4-(2-hydroxyethyl)piperidin-1-yl)pyrazin-2,3-dikarbonitrilu (4)	36
4.3.4. Alternativní příprava 5-(4-(2-azidoethyl)piperidin-1-yl)-6-(diethylamino)pyrazin-2,3-dikarbonitrilu (3).....	37
4.4. Příprava AzaPc 6-Zn postupem A.....	38
4.4.1. Příprava AzaPc 5-H ₂	38
4.4.2. Převedení na zinečnatý AzaPc 5-Zn.....	39
4.4.3. Příprava AzaPc 6-Zn.....	40
4.5. Příprava AzaPc 6-Zn postupem B.....	41
4.5.1. Příprava 5-(4-(2-(4-(4-(bis(2-hydroxyethyl)amino)fenyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)ethyl)piperidin-1-yl)-6-(diethylamino)pyrazin-2,3-dikarbonitrilu (7)	41
4.5.2. Příprava AzaPc 6-H ₂	42
4.5.3. Příprava zinečnatého AzaPc 6-Zn	43
4.6. Spektrální analýza	44
4.6.1. Studium agregačních vlastností AzaPc.....	44
5. Diskuze a výsledky	47
6. Závěr	53
7. Použitá literatura.....	54

1. Seznam zkratek

AzaPc	Azaftalocyaniny (z angl. azaphthalocyanines)
BuOH	Butanol
DAMN	Diaminomaleonitril
DCM	Dichlormethan
DIPEA	Diisopropylethylamin
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
EtAc	Ethyl-acetát
HEX	Hexan
MeOH	Methanol
MsCl	Mesylchlorid (chlorid methansulfonové kyseliny)
Pc	Ftalocyaniny (z angl. phthalocyanines)
PDT	Fotodynamická terapie (z angl. photodynamic therapy)
PET	Fotonem indukovaný elektronový transport (z angl. photo-induced electron transfer)
PS	Fotosenzitizér (z angl. photosensitizer)
RET	Resonance energy transfer
ROS	Reaktivní formy kyslíku (z angl. reactive oxygen species)
rtPCR	Polymerázová řetězová reakce v reálném čase
TEA	Triethylamin
THF	Tetrahydrofuran
TLC	Tenkovrstvá chromatografie (z angl. thin layer chromatography)

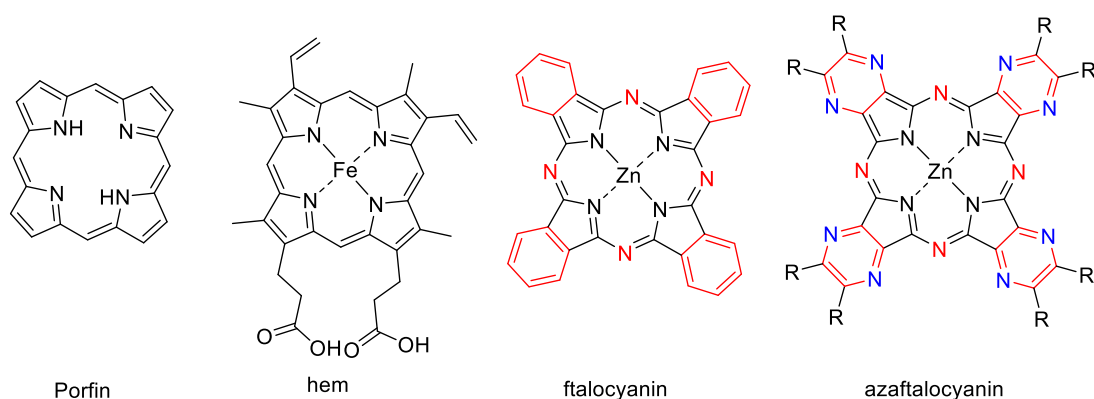
2. Cíl práce

Cílem této práce bude syntéza a následná fotofyzikální analýza nesymetrického AzaPc **1**, který bude substituován molekulou „ve tvaru T” – nesoucí dva hydroxyly, jež jsou schopné nahradit jeden deoxynukleosid v oligonukleotidovém řetězci. Syntéza bude spočívat v přípravě diolu **2** za využití Sonogashirova couplingu, který bude následně připojen na předem připravený substituovaný pyrazin-2,3-dikarbonitril za využití tzv. “click” chemie. Výsledná molekula **3** bude posléze cyklotetramerizována v kombinaci s molekulou **4** v poměru 1:3 za účelem získání AzaPc **1** (Obr. 1), který bude separován ze směsi kongenerů pomocí sloupcové chromatografie. Po získání cílové struktury bude provedena spektrální analýza s následnou titrací pyridinem. Dále bude popsáno i agregační chování produktu v sérii s dalšími AzaPc s periferní dialkylamino skupinou.



Obr. 1 Schéma navrhovaného postupu

3. Teoretická část



Obr. 2 Příkladů makrocyclických sloučenin

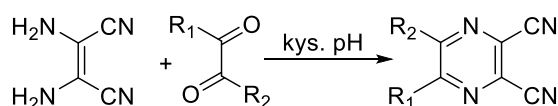
Azaftalocyaniny (AzaPc) jsou odvozené od dobře známých přírodních sloučenin typu hemu nebo chlorofylu (Obr. 2). Jedná se o analogy ftalocyaninů (Pc), které jsou díky svým zajímavým vlastnostem již mnoho let zkoumány. Mezi hlavní strukturální odlišnosti těchto dvou skupin je primárně počet zastoupení dusíků. Na základě počtu dusíkových atomů a též podle jejich polohy v jádře rozlišujeme následující typy AzaPc: AzaPc s pyridiny, pyrimidiny resp. pyraziny místo benzenových jader. Tato práce se věnuje studiu AzaPc ze skupiny tetrapyrazinoporfyrazinů. Centrální část cyklu zahrnuje porfyrazin, který vzniká kondenzací čtyř pyrrolových jader. Porfyrazin je podobný porfinu, který se v přírodě vyskytuje například i v lidském těle, a to v podobě hemu nebo u rostlin ve formě chlorofylu. Liší se typem přemostění, kdy u porfinu nalézáme methinovou skupinu, která je u porfyrazinu nahrazena azomethinovým můstkem. Kondenzované heterocykly jsou schopny chelatovat některé ionty kovů v centru a to například (Fe^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} ...), které určují jak stabilitu, tak i jiné vlastnosti výsledných AzaPc.¹

3.1. Syntéza AzaPc

Příprava AzaPc a jejich derivátů se skládá z vícekové syntézy. Nejprve je nutno připravit prekurzory, které budou tvořit výsledný makrocyklus. Po vytvoření makrocyklu je do jeho středu koordinován zamýšlený kationt kovu, čímž většinou příprava AzaPc končí, ale v některých případech může být celý makrocyklus dále derivatizován.³

3.1.1. Syntéza prekurzorů

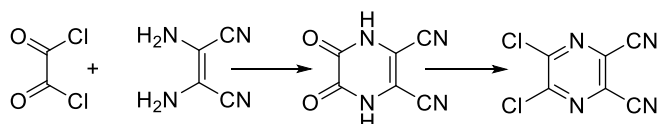
Příprava prekurzorů je důležitá jak z pohledu výsledných vlastností makrocyklů, tak i pro určení vhodné metody cyklotetramerizace. Ve většině případů jsou periferní substituenty na AzaPc makrocyklu již obsaženy ve struktuře pyrazin-2,3-dikarbonitrilů.² Zmiňovaný prekurzor může být připraven jednoduchou kondenzační reakcí dvou výchozích alifatických látek – vicinální diketon a diaminomaleonitril (DAMN) (Obr. 3).¹



Obr. 3 Schéma přípravy pyrazin-2,3-dikarbonitrilu

Substituenty, které mají být umístěny na periferii výsledného AzaPc makrocyklu jsou vázány na diketon. Pokud chceme, aby byly substituenty připojeny přes heteroatom tak je v tomto případě výhodné využít jako výchozí vicinální sloučeninu oxalylochlord za vzniku výsledného 5,6-dichlorpyrazin-2,3-dikarbonitrilu (Obr. 4).

Substituovaný chlor je elektroneficientní, proto funguje jako dobrá odstupující skupina při nukleofilní substituci s látkami typu alkoxidů, thiolů a aminů.¹ Chceme-li při nukleofilní substituci 5,6-dichlorpyrazin-2,3-dikarbonitrilu dosáhnout disubstituce v obou polohách 5 a 6, používá se obvykle přebytek nukleofilního činidla. Pro vznik monosubstituovaného produktu je potřeba pracovat s jedním ekvivalentem nukleofilu za snížené teploty. Takováto látka může pak dále podléhat reakci s jiným nukleofilem za vzniku nesymetricky substituovaného prekurzoru. V případě substituentů vázaných přes vazbu C-C je lepší je do sloučeniny zakomponovat ještě před kondenzací ve formě příslušného diketonu či α -ketokyseliny², případně je možno použít couplingové reakce.

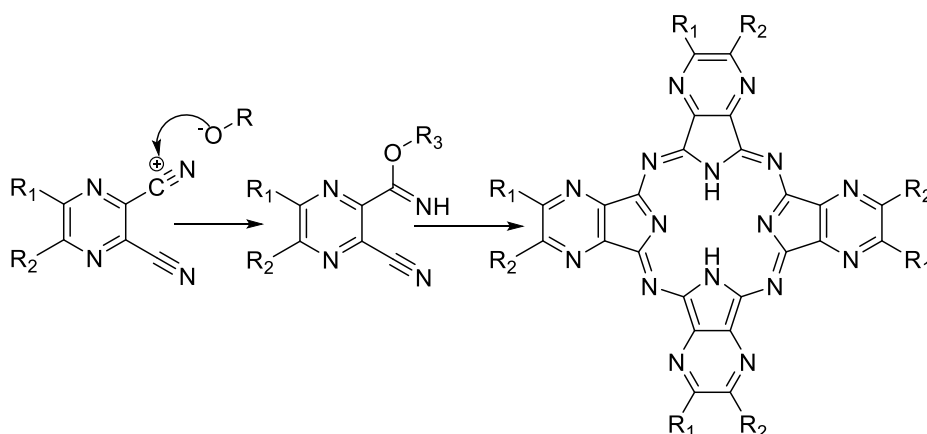


Obr. 4 Schéma přípravy 5,6—dichlorpyrazin-2,3-dikarbonitrilu

3.1.2. Syntéza makrocyklu

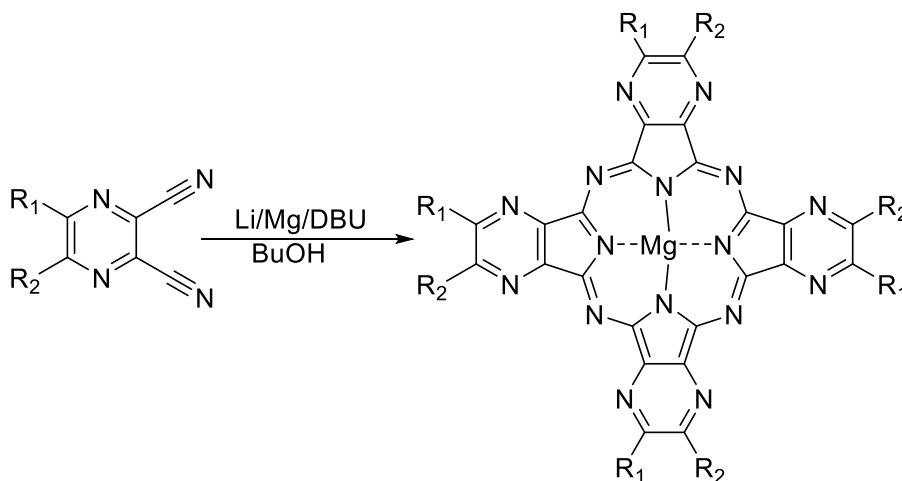
Dalším důležitým krokem syntézy AzaPc je cyklotetramerizace, která je založena na kondenzaci čtyř pyrazin-2,3-dikarbonitrilů. Podmínky této reakce jsou voleny s ohledem na vlastnosti periferních substituentů, tak i centrálního kationtu kovu. Obecně platí pravidlo, že elektron-odtahující skupiny zvyšují reaktivitu nitrilové skupiny

prekurzorů, a tedy cyklizace může probíhat za mírnějších podmínek. Naopak nese-li prekurzor silně elektron-donorové substituenty (například alkylamino skupiny), tak se snižuje rychlost reakce a zároveň jsou vyžadovány extrémnější podmínky cyklotetramerizace. Existují tedy dva různé scénáře cyklotetramerizace. Při metodě dle Linsteadova je reakce zahájena na elektron-deficitním uhlíku nitrilu. Nukleofilní skupiny jako jsou alkoholátové jsou nedostatkem elektronů přitahovány a atakují nitrilový uhlík za vzniku alkylkarboximidátu (Obr. 5). Ten dále atakuje další skupiny prekurzorů k dotvoření cyklotetrameru. Touto metodou vznikne AzaPc bez centrálního atomu kovu.¹



Obr. 5 Schéma cyklotetramerizace za pomoci alkoholátu

Druhá metoda využívá takzvaný templátový efekt a koordinační vlastnosti kationtu kovu. U této reakce očekáváme seskupení prekurzoru okolo centrálního kationtu kovu v těsné blízkosti a při dodání energie vytvoří makrocyklus. Centrální kation kovu je chelátován v centru a stabilizuje výsledný makrocyklus (Obr. 6). Výtěžek této reakce je často nižší než u metody dle Linsteadova, ovšem nezbytný pro určité typy



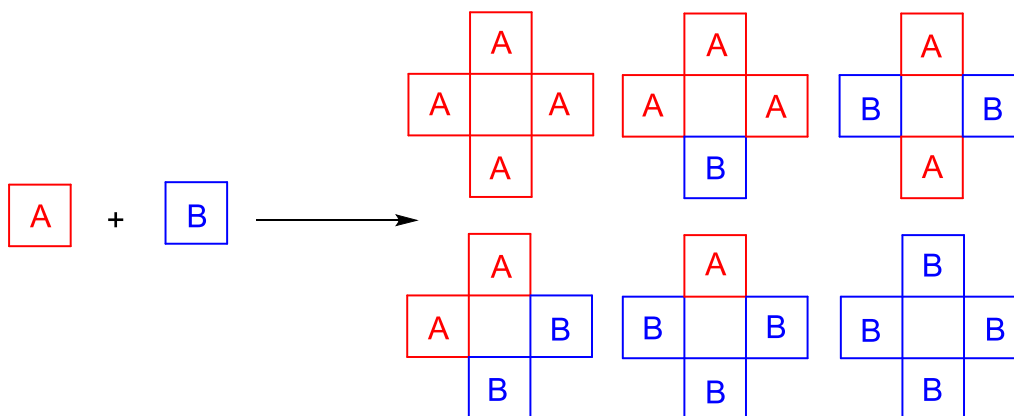
Obr. 6 Schéma cyklotetramerizace za pomoci kovu

prekurzorů. Například u monomerů s alkoxy- a aryloxy- substitucí, kdy by mohlo dojít k výměně substituentů za alkoxy skupinu rozpouštědla.

V případě, kdy do reakce vstupuje pouze jeden typ prekurzoru, vznikají látky symetrické. Pro většinu využití je ale potřeba připravit látky nesymetrické, které je potřeba dále separovat od sebe.

3.1.3. Asymetrické deriváty

Pro získání asymetrických cyklů se nejčastěji využívá metody statistické kondenzace vycházející ze dvou různých prekurzorů A a B, jejichž cyklotetramerizace vzniká šest různých kongenerů typu AAAA, AAAB, ABAB, AABB, ABBB a BBBB (Obr. 7). Výsledné kongenery musí být dále separovány pomocí chromatografických metod.



Obr. 7 Schéma statistické kondenzace

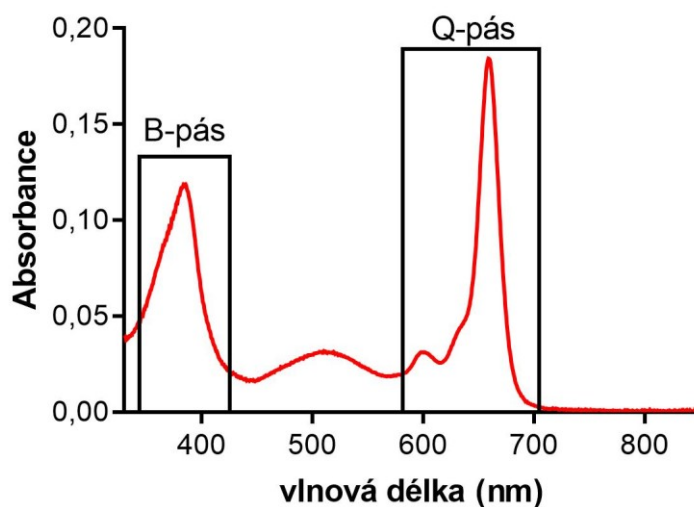
3.2. Vlastnosti AzaPc

3.2.1. Absorbance – UV a VIS spektra

Pro Pc a látky od nich odvozené je schopnost absorpce záření charakteristickou vlastností. Díky systému konjugovaných vazeb jsou schopny absorbovat záření o specifické vlnové délce. Na základě pozice svého absorpčního pásma mohou vykazovat různá zbarvení nebo mohou vykazovat fotochemické vlastnosti, které jsou využívány například ve fotodynamickou terapii (PDT) nebo jako zhášče fluorescence (quenchery), které budou popsány dále.

AzaPc jsou charakterizovány svými vlastnostmi v oblasti Q-pásu ve vlnových délkách mezi 600–700 nm s extinkčním koeficientem ϵ kolem 200 000 M⁻¹cm⁻¹. B-pás se naopak nachází v oblasti vlnové délky 360-380 nm. V těchto oblastech dochází k přesunu elektronů na π - π^* vazbách. Obecně je důležitější oblast Q-pásu (Obr. 8),

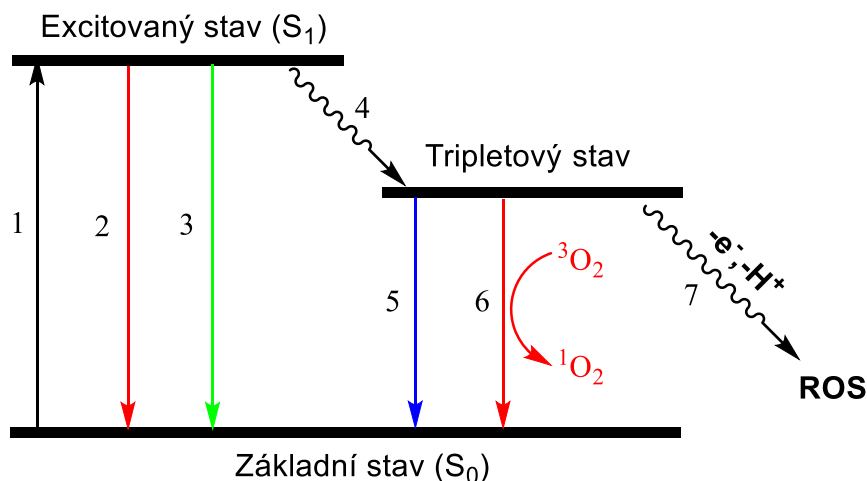
poněvadž z tvaru a pozice Q pásu lze odhadnout složení makrocyclického systému, míru rozpustnosti a tvorbu agregátů, dimerů nebo protonizaci molekuly.¹



Obr. 8 Znárodnění typického spektra AzaPc s vyznačenými typickými pásy

3.2.2. Fotosenzitivita a PDT

Látky typu AzaPc jsou schopné přijímat energii světla, dostat se tím do svého excitovaného stavu S_1 a následně se pak vracet různými relaxačními cestami zpět do jejich základního stavu S_0 (Obr. 9). Absorpcí světla (energie) dochází k excitaci molekuly a přesunu jednoho elektronu do vyšší energetické vrstvy. V této fázi se fotosenzitizér (PS) dostane do singletového excitovaného stavu, který není stabilní a energie, která přebývá se vylučuje formou tepla nebo fluorescence. Jinou možností uvolnění energie je vznik tzv. tripletového stavu. Jedná se o mezi-systémový přechod, kdy dochází k otočení spinu jednoho z elektronů ve vnějším molekulovém orbitalu. Z tripletového stavu je dále energie uvolňována formou fosforescence nebo interakcí PS s ostatními biomolekulami a interakcí s tkáňovým kyslíkem. Při PDT se primárně využívá právě zmiňované reakce s tkáňovým kyslíkem, který příjmem energie přechází na velmi reaktivní singletový kyslík útočící na okolní biologický materiál. Tento proces je popsán jako fotoproces typu II. Další proces je popisován jako fotoproces typu I, u kterého dochází k interakci se substrátem. Těmi mohou být rozpouštědla nebo okolní biomolekuly reagující s PS za vzniku radikálů, které napomáhají vzniku reaktivní formy kyslíku (ROS). U obou těchto procesů dochází k reakci s biomolekulami a následnému vyvolání apoptózy či nekrózy.^{2,4}



Obr. 9 Modifikovaný Jablonského diagram 1. absorpce světla, 2. uvolnění tepla, 3. fluorescence, 4. mezisystémový přechod, 5. fosforescence, 6. fotoproces typu II., 7. fotoproces typu I.

Právě apoptóza a nekróza hrají velikou roli při svém terapeutickém užití PDT v medicíně při specifické nádorové terapii nebo v terapii akné. Z klinického hlediska probíhá aplikace z dvou-krokové procedury. V první fázi (tzv. „presensitisation“) je PS aplikován systémově nebo topicky. V druhé fázi (ozařování), je tkáň, do které byl PS aplikován, ozařován světlem o specifické vlnové délce shodující se s absorpčním maximem dané molekuly, což má za následek produkci singletového kyslíku, který má destruktivní účinek na své okolí.⁵

3.2.3. Fluorescence

Fluorescence stejně jako fosforescence patří do skupiny luminiscenčních jevů, u kterých dochází k emisi světla. Látky schopné fluorescence jsou nazývány fluorofory. Jako první fluorofor byl identifikován chinin, který absorpcí UV záření ze slunečního světla mění své zbarvení na světle modrou barvu. Podobně jako PS u PDT přechází fluorofory do excitované formy S_1 . Excitované fluorofory přechází do svého základního stavu ztrátou energie ve formě fotonu, tedy fluorescencí. Tento jev trvá přibližně v řádu nanosekund (10^{-8} s).

Míru relaxace molekuly danou cestou lze popsat tzv. kvantovými výtěžky. Např. kvantovými výtěžek fluorescence (Φ_F), je definován jako poměr emitovaných fotonů ku počtu přijatých fotonů. Kvantový výtěžek produkce singletového kyslíku (Φ_Δ) je pak počet produkováných molekul singletového kyslíku ku počtu absorbovaných fotonů.⁶

3.3. Zhášeče fluorescence (Quenchers)

Mezi další vlastnost AzaPc patří zhášení fluorescence (tzv. quenching). Tyto vlastnosti jsou specifické pro alkylamino-substituované AzaPc, které mohou být využívány pro zhášení fluorescence v DNA-hybridizačních sondách. Molekuly typu zhášečů fluorescence mají široké uplatnění v biochemii, molekulární biologii a genetice k jasnější identifikaci a kvantifikaci pre-definovaných DNA sekvencí.

Z pohledu zhášení fluorescence můžeme definovat zhášení dynamické (kolizní) a statické. Pro aplikaci musí být vždy zkombinován vhodný donor fluorescence (fluorofor) s jejím akceptorem, tedy zhášečem (quencherem).² Ideální zhášeče by měly splňovat následující kritéria: absence vlastní fluorescence a minimální či nulová produkce reaktivních částic.

3.3.1. Kolizní zhášení fluorescence (dynamické)

Jak bylo zmíněno dříve, k zhášení dochází v případě, kdy dochází k deaktivaci již excitovaného fluoroforu, který přijde do kontaktu se zhášečem fluorescence (quencherem).

Jedná se o časově závislý děj, při kterém dochází k snížení energie fluoroforu bez vyzáření fotonu. V molekule nedochází k chemickým změnám. Tento jev je definován skrze Stern-Volmerovu rovnici.

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K[Q] = 1 + k_q \tau_0 [Q]$$

Jedná se o podíl intenzity fluorescence bez přítomnosti quencheru (F_0) a v jeho přítomnosti (F). Intenzita je definována Stern-Volmerovou konstantou (K), která indikuje citlivost fluoroforu k jeho zhášeči v závislosti na koncentraci zhášeče $[Q]$. Hodnota K je nízká v případě, kdy je fluorofor napojený na makromolekulový řetězec často nepřístupný pro zhášeče. Kdežto vyšších hodnot dosahujeme v případě fluoroforů, která nejsou nijak navázána na povrch biomolekul. Zbylé části rovnice jsou definovány jako bimolekulární konstanty zhášení (k_q) a doba života fluoroforu bez přítomnosti zhášeče τ_0 . Příkladem molekul fungujících jako kolizní zhášeče fluorescence mohou být kyslík, halogeny (nebo jejich sloučeniny), aminy nebo elektron-deficitní látky např. akrylamid.⁶

3.3.2. Statické zhášení fluorescence

V případě statického zhášení dochází v první řadě k tvorbě stabilního komplexu s quencherem. Tento komplex se po absorpci světla rychle navrácí do svého základního stavu nikoli emisí fotonu. Intenzita fluorescence je definována svoji konstantou (K_s), která je popsána následujícím vztahem.⁶

$$K_s = \frac{[F - Q]}{[F][Q]}$$

[F-Q].....koncentrace komplexu fluorofor/quencher

[F].....koncentrace fluoroforu

[Q].....koncentrace quencheru

Pro snížení intenzity fluorescence platí podobný vztah jako u dynamického zhášení, vyjádřený jako následující rovnice:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_s[Q]$$

Jelikož se jedná o lineární závislost, stejně jako u zhášení kolizního, nelze při pohledu na křivku přesně určit o jaký typ zhášeče se jedná. Tomuto případu se dá napomoci změnou podmínek prostředí, například zvýšením teploty. Při zvýšení teploty dochází k rychlejšímu pohybu molekul tudíž dochází i k většímu počtu kolizí zhášeče s fluoroforem. U statického typu zhášení naopak dochází k disociaci málo stabilních komplexů F-Q tvořených nekovalentními typy vazeb, a tedy ke snížení intenzity.⁶

3.3.3. Mechanismy zhášení

Zhášení fluorescence může probíhat několika mechanismy. Pro většinu je ovšem základní kontakt molekuly fluoroforu s molekulou zhášeče. Mezi ostatní mechanismy patří.

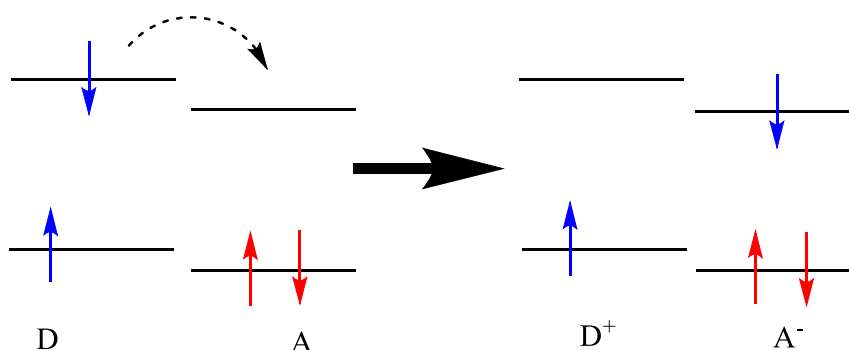
- Mezisystémový přechod (Intersystem crossing) těžkých kovů
- Fotonem podmíněný elektronový transport (PET)
- Elektronový přenos podle Dexterova

S mezisystémovým přechodem těžkých kovů se můžeme setkat v případě, kdy dochází k excitaci molekuly v singletovém stavu do vyššího energetického stavu (excitovaný singletový nebo tripletový stav). Excitovaný elektron tripletového stavu oproti singletovému již není párovaný s původním elektronem singletu. Tohoto stavu nejčastěji dosáhneme molekulovou absorpcí radiace. Excitovaný triplet se navrácí do svého původního stavu nezáživým procesem.⁷ Transport elektronu indukovaný

světlem (PET) je mechanismus fungující na bázi přesunu excitovaného elektronu pomocí donor/akceptorového systému za vzniku komplexu viz kapitola (3.3.4). Dextrův přenos elektronů je stav, kdy taktéž dochází k interakci donoru s akceptorem. Oproti PET je přenos podmíněn výměnou elektronu z excitovaného donoru na akceptor a zároveň dochází k přenosu jiného elektronu akceptoru na donor.⁸

3.3.4. Photoinduced electron transport (PET)

Jak bylo dříve zmíněno, jedná se o jev, kdy vzniká komplex donoru a akceptoru elektronu v excitovaném stavu. Při tomto jevu nedochází k emisi fotonu při návratu do základního stavu. V některých případech k emisi fotonu komplexu dochází. V poslední fázi dochází k návratu elektronu akceptoru zpět na původní donor (Obr. 10).



Obr. 10 Elektronový přenos při PET

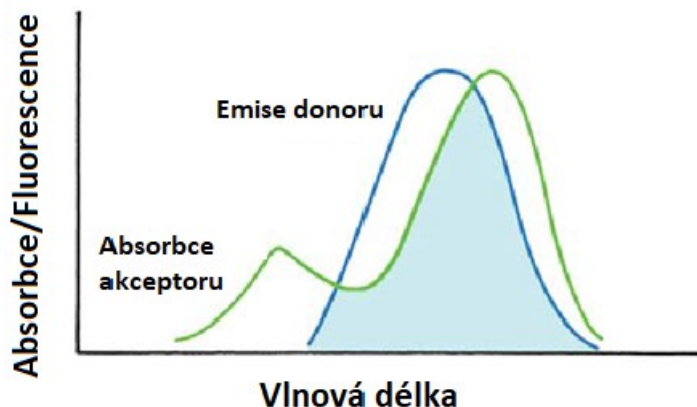
Oproti rezonančnímu přenosu energie (RET) se může fluorofor chovat jako akceptor, tak i donor. Mnohem častější ovšem je akceptorové chování fluoroforu. Jako příklad si můžeme uvést molekulu dimethylanilinu chovajícího se jako donor elektronů pro vícejaderné aromatické uhlovodíky, které jsou akceptory elektronů. Elektronový přenos je mnohem výhodnější pro elektron deficientní skupiny jako například 2-kyanonaftalen. Jako příklad opačného přenosu elektronů si můžeme uvést excitovaný indol (fluorofor), který přenáší elektron na elektron deficitní skupiny imidazolu nebo akrylamidu (zhášeče).⁶

3.3.5. Resonanční přenos energie (RET)

Dalším jevem, je rezonanční přenos energie (RET), který se může v literatuře vyskytovat i pod pojmem fluorescenční (Försterrův) rezonanční přenos energie (FRET). Z pohledu terminologie se využívá pojmu RET, poněvadž se přenosu energie nezúčastní další fotony, ale dochází k slabým interakcím dipol-dipol. Přenos energie je založen na konceptu oscilujícího dipólu fluoroforu, který je schopen výměny energie s dalším dipolem o podobné frekvenci resonance. Donor je zpravidla fluorofor,

nacházející se v excitované formě, akceptorem může být další fluorofor nebo nefluorescentní molekula. V případě nefluorescentní molekuly dochází k navrácení donoru do základního stavu bez emise a výsledná energie je ztracena ve formě tepla. Pokud je akceptorem jiný fluorofor, dochází k přenosu energie v podobě fluorescence, která je charakteristická pro daný fluorofor.

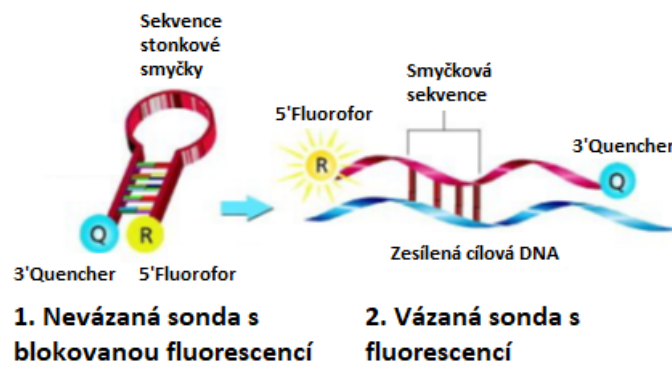
RET je závislý na překryvu absorpčních spekter donoru a akceptoru (Obr. 11) a na vzdálenosti molekul od sebe.



Obr. 11 Překryv spekter u RET, převzato z publikace⁶

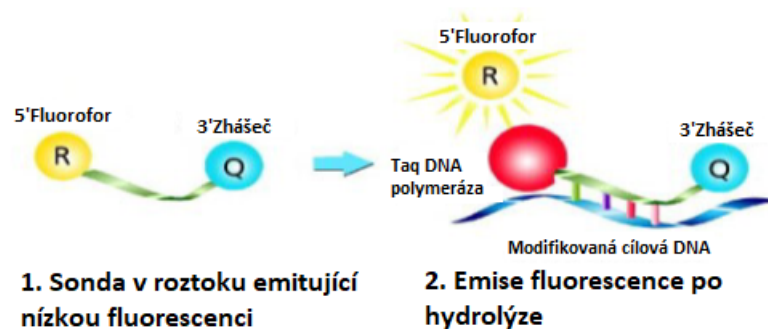
3.3.6. Typy sond

Jak bylo dříve zmíněno, lze využít zhášeče fluorescence v DNA-hybridizačních sondách. Ty mohou být navázány na oligonukleotidový řetězec jakožto **jednoduše značené sondy** (tzv. mono-labeled probes). Oligonukleotidové řetězce mohou být dále částečně modifikované (yin-yang probes, light up probes, adjacent probes), mohou i nemusí být k sobě komplementární.^{9,10} Běžnější typy sond bývají **dvojitě značené sondy** (dual-labeled probes). Jedná se o jednovláknové sondy s navázaným fluoroforem na jednom konci a zhášečem na konci druhém. Podle místa napojení molekul rozlišujeme konce na 3' nebo 5' konec (Obr. 12). Jednovláknová sonda může být také komplementární k molekulárnímu primeru při rtPCR (real-time polymerase chain reaction).



Obr. 12 Schéma dvojité značené sondy, převzato z literatury¹²

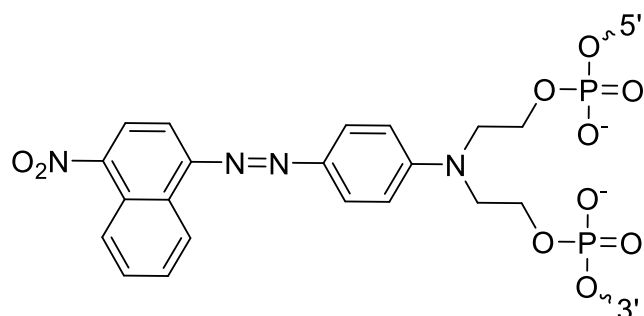
Dalším typem sond jsou tzv. **TaqMan sondy** (Obr. 13), které využívají komplementární systém k určitému segmentu cílové DNA. Sonda je označena dvěma fluorescenčními značkami. Emisní spektrum jedné překrývá excitační spektrum druhé a výsledkem je zhášení prvního fluoroforu druhým. Sonda je přítomna při PCR a ve výsledném produktu je degradována skrze 5'-nukleázovou aktivitu Taq polymerázy, která je specifická pro DNA-hybridizační matrice (templát). Degradace sondy umožní oddálení quencheru a fluoroforu a zapříčiní zvýšení intenzity emitovaného světla, které je možno dále identifikovat a kvantifikovat.¹¹



Obr. 13 Schéma dvojité značené sondy typu TaqMan, převzato z literatury¹³

Mezi novější typ sond patří tzv. ZEN™ (Obr. 14) zhášeč fluorescence pro modifikované dvojité značené sondy. Jedná se o typ zhášeče, který je svojí strukturou předlohou pro syntézu zamýšlené molekuly a to na vzdálenost devíti bází. Zhášeč je v sondě připojen ve fixní vzdálenosti od fluoroforu na 5'-konci nezávisle na délce sondy vůči zhášeči na 3'-konci oligonukleotidu. Díky svému specifickému napojení na oligonukleotidový řetězec se výsledná molekula duplexu stabilizuje (patrné jako zvýšení teploty tání duplexu) na rozdíl od jiných typů sond, které se chovají jako analoga bází. Průběh při rtPCR probíhá stejně jako u jiných typů sond v závislosti na exonukleázovou aktivitu. Při průběhu PCR nedochází ke snížení citlivosti nebo kvality zhášení i v případě

delších sond, toho je docíleno pomocí konstantní vzdálenosti vnitřního zhášedce s fluoroforem.¹⁴

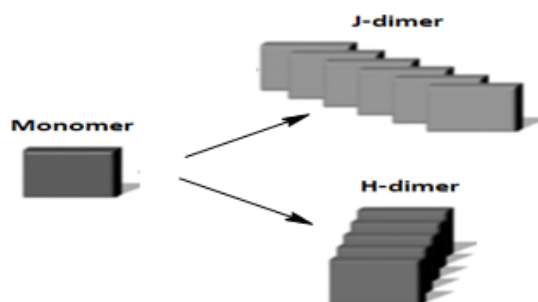


Obr. 14 Schéma ZEN™ typu quencheru

3.4. Agregace azaftalocyaninů

Molekulární agregace azaftalocyaninů se projevuje tvorbou dvou typů dimerů, které jsou definovány jako typ J- a H-. H-dimer je specifikován svým paralelním překryvem π -orbitalů aromátů a dá se popsat tvarem podobajícím se bloku papírů. Naopak J-dimer vzniká interakcí periferního substituentu jednoho monomeru s centrálním atomem monomeru druhého

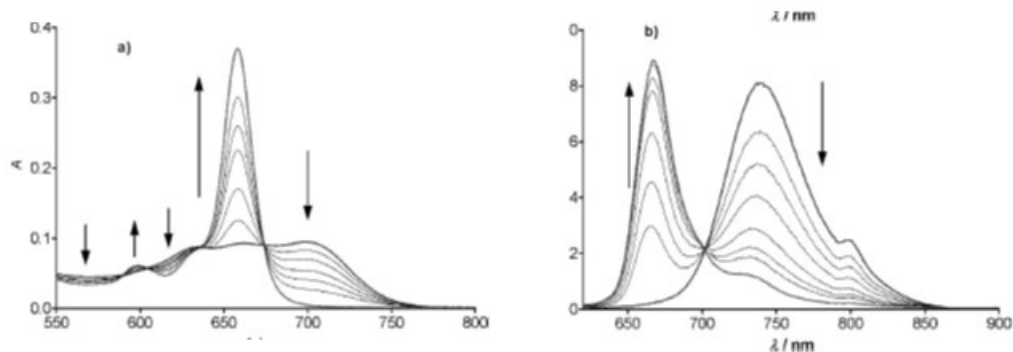
za vzniku stabilního agregátů se svým schodovitým tvarem (Obr. 15). Agregace jako taková je v mnohých případech nežádoucím jevem Pc a AzaPc, poněvadž dochází k změně dynamiky relaxačních cest excitovaných molekul.¹⁵ Pokud je AzaPc rozpuštěn v nekoordinačním rozpouštědle typu toluenu nebo dichloromethanu (DCM), lze převážně pozorovat agregovaná absorpční spektra (Obr.16a). Z hlediska fluorescenčních spekter dochází u J-dimerů k posunu k červené části spektra (Obr.16b), v případě H-dimerů klesá fluorescence k nulovým hodnotám. Přídavkem koordinačních rozpouštědel, typu tetrahydrofuranu (THF) nebo



Obr. 15 Schéma vzniklých dimerů (J- a H-)

Přídavkem koordinačních rozpouštědel, typu tetrahydrofuranu (THF) nebo

dimethylformamidu (DMF) a pyridinu, dochází k rozrušení agregátu a změně spektrálních vlastností.¹⁶



Obr.16 a) Změna absorpčního spektra při titraci pyridinem, b) změna fluorescence při titraci pyridinem. Šipky indikují změnu spektra v závislosti na přidavku koordinačního rozpouštědla, převzato z literatury.¹⁶

3.5. Mechanismy zamýšlených reakcí

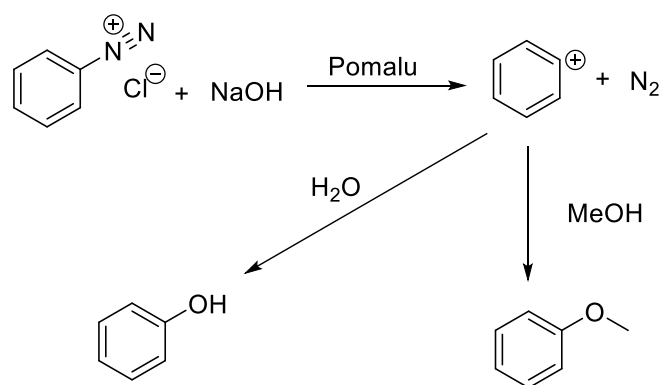
3.5.1 Nukleofilní aromatická substituce

Nukleofilní aromatická substituce je typem reakce, kdy je substituent, který je navázán na aromatické jádro nahrazen nukleofilním substituentem (nukleofilem). Reakce jako taková není pro aromatické molekuly typická, a to z důvodu velkého množství π -elektronů jádra. Reakce obvykle probíhají díky odstupujícím substituentům navázaným na jádro, které mají záporné mezomerní (-M) či záporné indukční (-I) efekty. A to díky charakteru odtahování elektronů z jádra aromátu. Tímto způsobem vzniká kladný parciální náboj na aromátu a dochází k usnadnění průběhu reakce, pro nukleofily. Mezi typické odstupující skupiny patří halogeny, nitroskupiny či diazoniový iont. Odstupující skupina musí být v poloze *-ortho* či *-para* vůči akceptorní skupině.^{17,19}

Nukleofilní aromatické substituce můžeme rozdělit dle mechanismu reakce na tři podtypy:

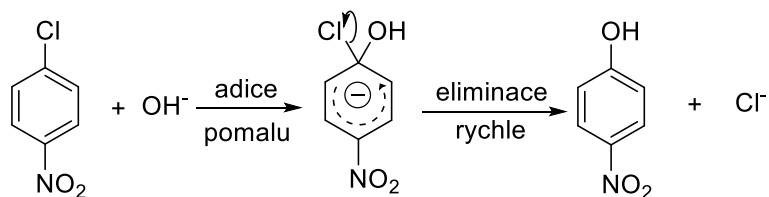
- Monomolekulární – S_N1 -Ar
- Bimolekulární (adičně-eliminační) – S_N2 -Ar(a-e)
- Bimolekulární (eliminačně-adiční) – S_N2 -Ar(e-a)

Monomolekulární typ reakce je typická pro diazoniové soli, za vzniku fenolů a etherů (Obr. 17). Další specifickou reakcí je tzv. Schiemannova reakce, při které vznikají aromatické fluorované uhlovodíky.



Obr. 17 Monomolekulární mechanismus vzniku fenolu a etheru – S_N1-Ar ¹⁷

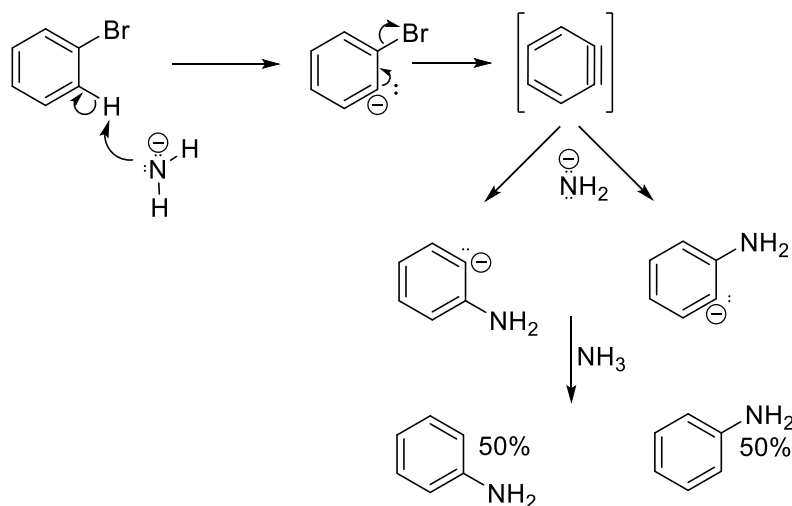
Adičně-eliminační S_N2-Ar typ, je typem reakce, kdy silný nukleofil atakuje uhlík s odstupující skupinou (adiční fáze reakce), současně také dochází k přesunu elektronů na kyslíku NO_2 skupiny, která stabilizuje přebytek elektronů na jádře vzniklý navázáním nukleofilu (Obr. 18).¹⁷



Obr. 18 Adičně-eliminační mechanismus $S_N2-Ar(a-e)$ ¹⁷

V další fázi reakce (eliminace) dochází k přesunutí elektronů volného el. páru kyslíku zpět do vazby s dusíkem a tlakem elektronů dochází k odštěpení odstupující skupiny. Reakci stabilizuje pouze přítomnost odstupující skupiny v poloze *-ortho* či *-para* vůči elektron-akceptující skupině, která stabilizuje záporný náboj intermediátu (karbanionu) po navázání nukleofilu.¹⁷

Eliminačně-adiční mechanismus reakce můžeme ilustrovat reakcí brombenzenu s amidovým iontem (Obr. 19). V prvním kroku dochází k iniciaci eliminace odtržením protonu v *ortho* poloze. Negativní náboj vzniklý na uhlíku v *ortho* poloze je stabilizovaný indukčním efektem sousedního bromu. V další fázi dochází k ztrátě bromidového aniontu (eliminace) za vzniku vysoce reaktivního arynu (benzynu). Vzniklý aryn (benzyn) poté reaguje s jakýmkoli dostupným nukleofilem.¹⁸

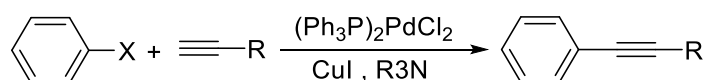


Obr. 19 Eliminačně-adiční mechanismus $S_N2-Ar(e-a)$

3.5.2. Sonogashirův coupling

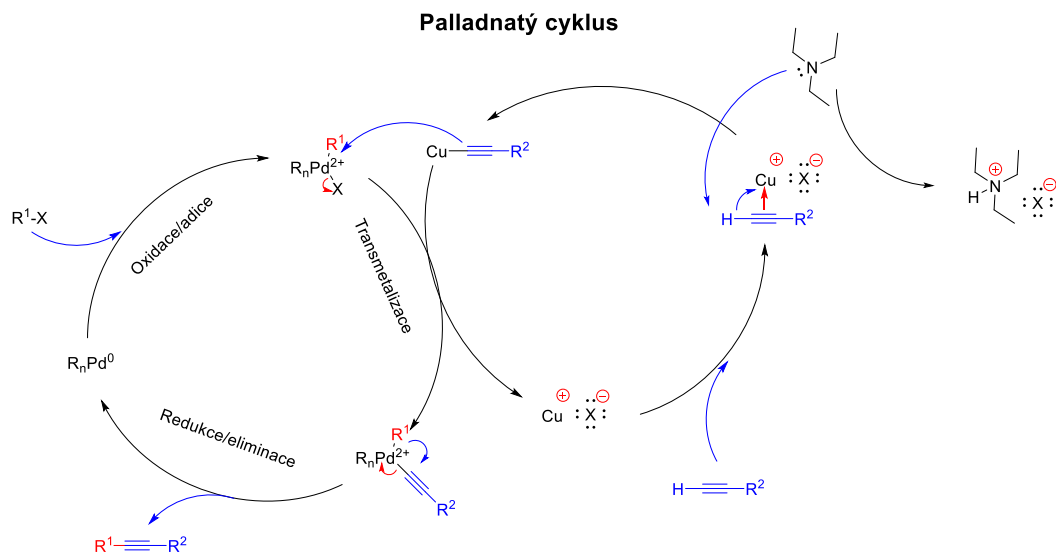
Jedná se o typ reakce spadající do skupiny cross-couplingových reakcí, při kterých dochází k de novo vzniklé σ -vazbě uhlík-uhlík, pomocí katalyzujícího kovu. Velikou výhodou těchto reakcí je poskytnutí nových cest k tvorbě vazeb mezi uhlíkovými skupinami, které by jinými cestami nebylo možné spojit.

Sonogashirův coupling je specifický pro reakci alkynů s arily nebo halogenvinyl deriváty v prostředí palladiového katalyzátoru a za přítomnosti mědného (Cu^I) ko-katalyzátoru a aminové báze (Obr. 20). Reakce probíhají typicky v bezvodém prostředí a v inertní atmosféře pro vyšší výtěžnost. Mechanismus reakce ještě není zcela objasněn, ale má se za to, že reakce probíhá v tzv. paládiovém cyklu.¹⁹



Obr. 20 Reakční schéma Sonogashirova couplingu u arylů

Palladiem katalyzovaný mechanismus začíná oxidativní adicí „organohalogenidu“ na $Pd^{(0)}$ za vzniku palladnatého $Pd^{(II)}$ komplexu. V další fázi cyklu dochází k transmetalizaci organomědného reagentu, který vznikl reakcí terminálního alkynu s mědným ko-katalyzátorem. Vzniklý alkynylový aniont dále nahrazuje halogen palladnatého komplexu. Halogenidový anion s mědným kationtem dává vznik nové soli, která znovu putuje do vedlejšího cyklu aktivující další molekuly alkynů. V poslední fázi reakce dochází k redukční eliminaci, při které vzniká finální produkt couplingu. Redukcí $Pd^{(II)}$ komplexu vzniká $Pd^{(0)}$, který může být znovu využit v novém cyklu (Obr. 21).²⁰



Obr. 21 Schéma předpokládaného mechanismu Sonogashirova couplingu

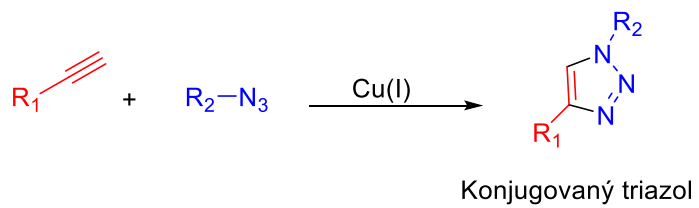
3.5.3. Cyklotetramerizace

Obecně jsou známy dva cyklotetramerizační mechanismy využívané pro zacyklení prekurzorů do makrocyklu. První metoda využívá kationt kovu jako templát. Předpokládá se, že kolem sebe koordinuje čtyři molekuly prekurzoru v dostatečné vzdálenosti od sebe. Malá vzdálenost mezi molekulami napomáhá samovolnosti interakcí mezi jednotkami za vzniku cyklotetrameru (Obr. 6). Při druhé metodě (tzv. metoda dle Linsteda) se využívá iniciace za pomoci butanolátu lithného nebo hořečnatého. Nitrilová skupina prekurzoru je butanolátem atakována za vytvoření aktivní molekuly, která samovolně reaguje s dalšími molekulami prekurzorů. Při využití lithné soli dochází ke vzniku cyklotetramerů bez centrálního kovu, poněvadž jsou lithné kationty jen velmi slabě koordinovány a lze je vytěsnit i velmi slabou kyselinou jako je voda. Pokud bychom využili hořečnaté soli tak vzniká cyklotetramer s již koordinovaným centrálním kationtem kovu.^{2,21}

3.5.4. Cykloadiční typ reakce alkyne s azidem, tzv. click-chemistry

Jedná se o reakci, odehrávající se mezi azidem a alkynem za vzniku kovalentního produktu a to 1,2,3-triazolu se dvěma substitucemi a to v poloze 1 a 4 (Obr. 22). Jedná se o velmi selektivní reakci, která je využívána pro tvorbu různých biomolekulových sond jako jsou dvakrát značené sondy pro rtPCR nebo napojení peptidů s azidovou skupinou k modifikované složce oligonukleotidu alkynem. Díky své selektivitě mezi alkynem a azidem nejsou napadávány ostatní organické skupiny, které se vyskytují v DNA nebo v proteinech (např. karboxy, amino skupiny). Reakce jako

taková probíhá pod katalýzou měďnými kationty Cu(I) a za využití polárních rozpouštědel, těmi mohou být voda, DMSO, DMF nebo THF.^{26, 27}

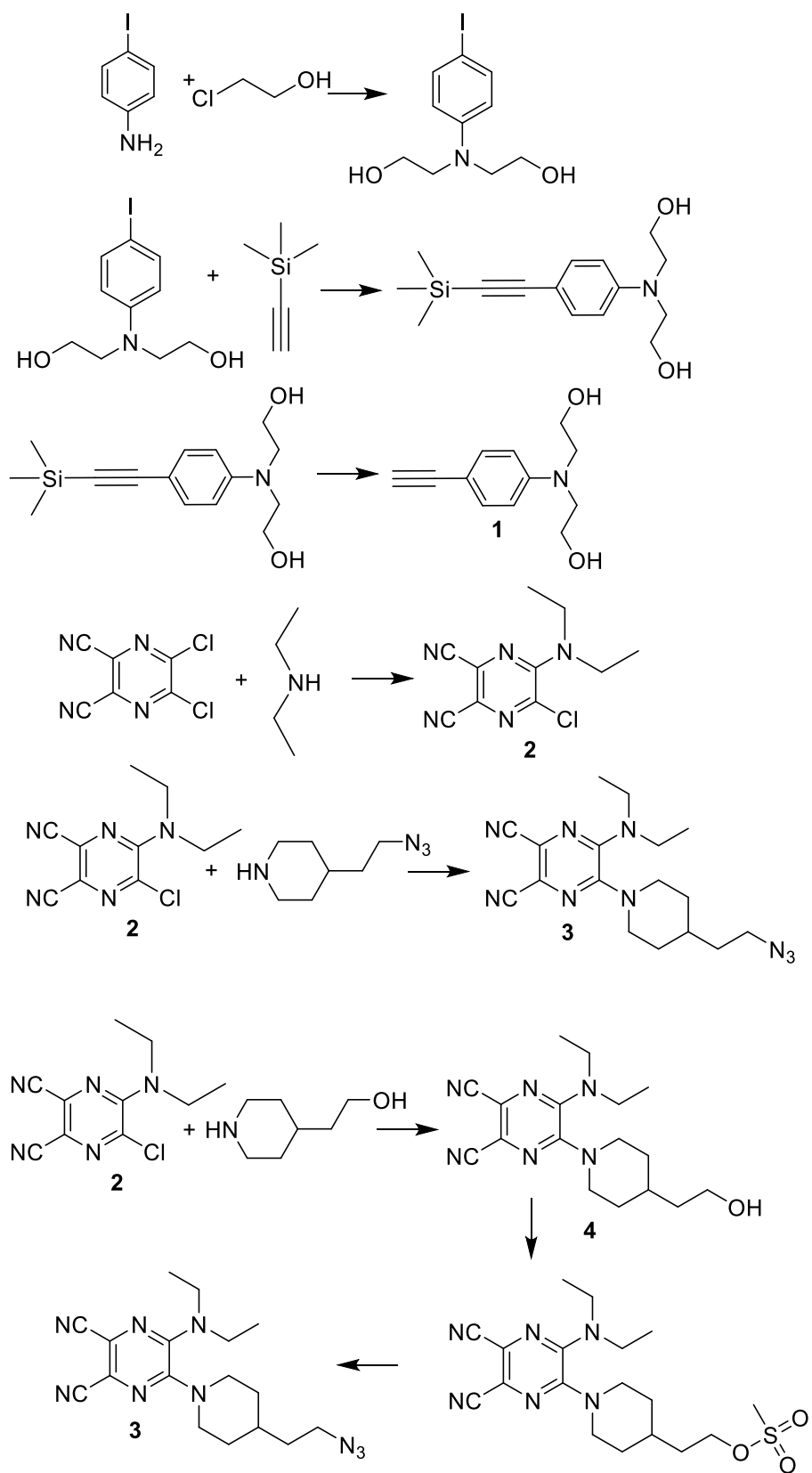


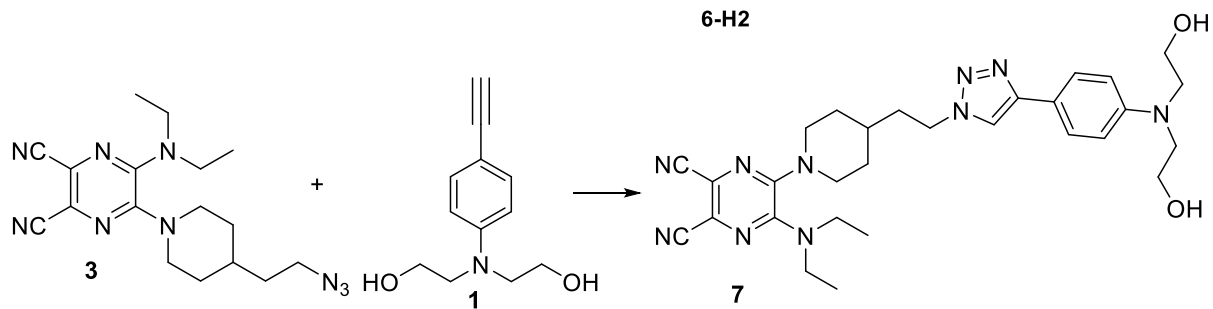
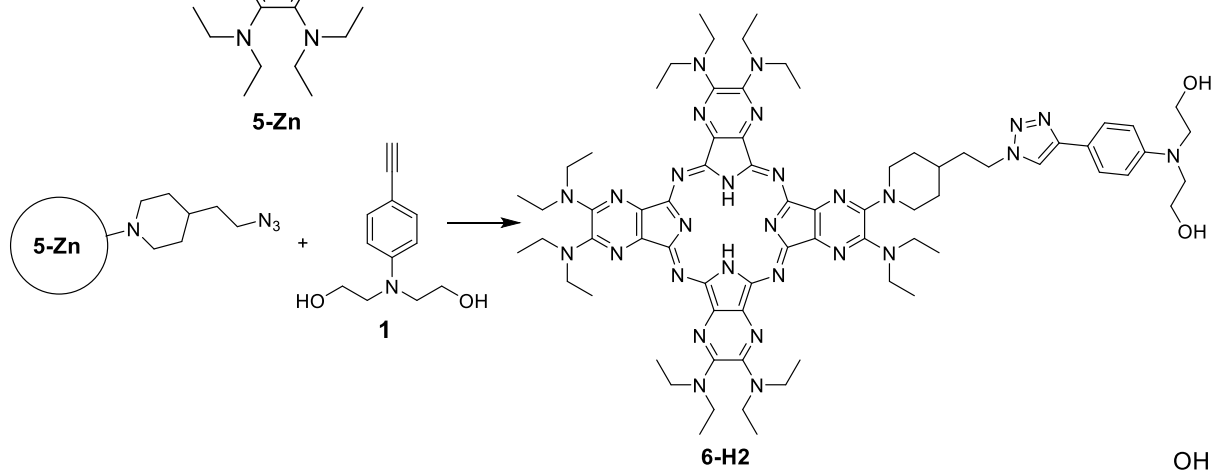
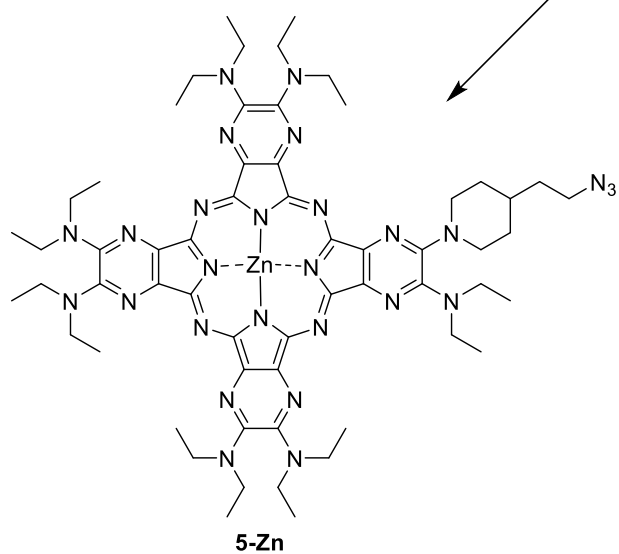
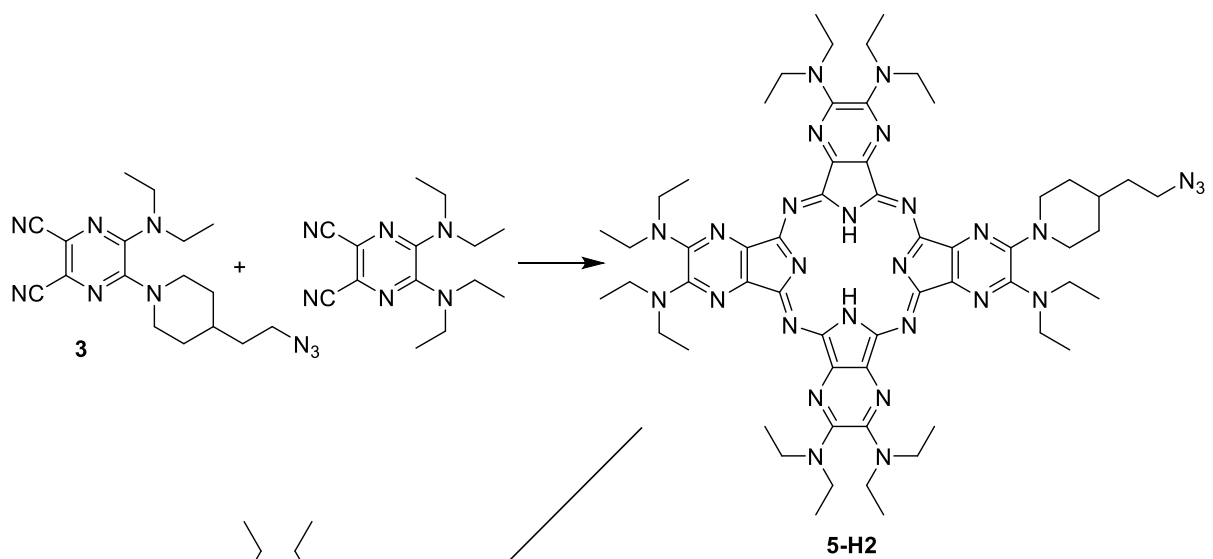
Obr. 22 Reakční schéma cykloadiční reakce

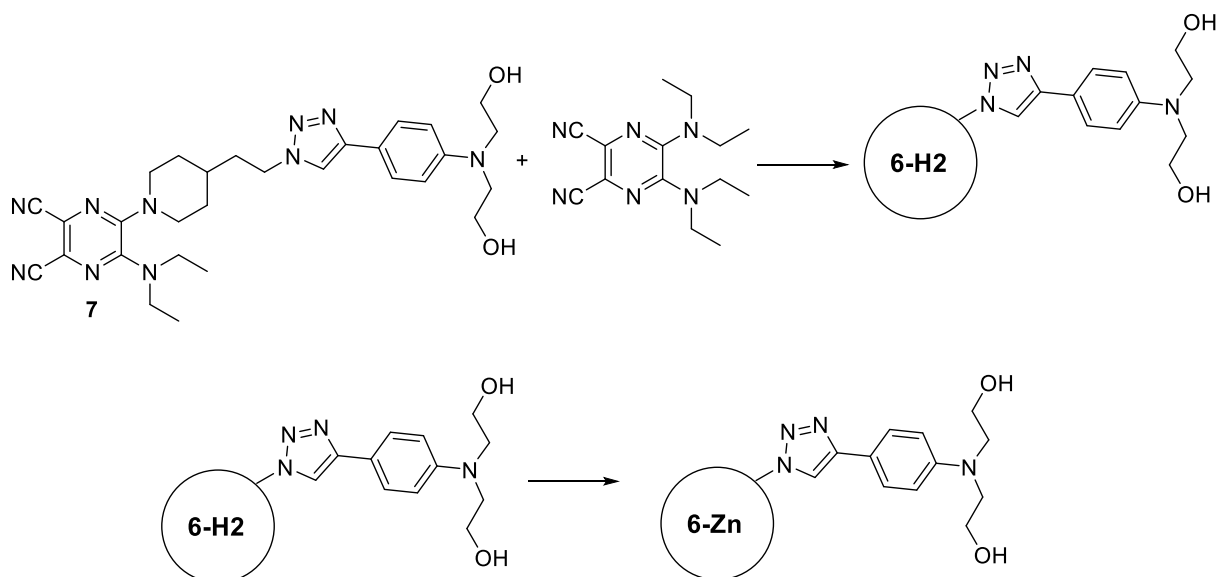
4. Experimentální část

Výchozí látky a rozpouštědla pro reakce byly zakoupeny od firem Lach-Ner, Penta a Merck. Průběh reakcí a čistota výsledných produktů byly sledovány pomocí tenkovrstvé chromatografie (thin layer chromatography, TLC) na deskách Merck Kieselgel 60 F254, detekce UV lampou probíhaly za vlnové délky 254 nm nebo 366 nm. Čištění produktů bylo realizováno pomocí sloupcové chromatografie na stacionární fázi Merck Kieselgel 60 (0,040 – 0,063 mm). Mobilní fáze, které byly použity, jsou popsány u jednotlivých reakcí níže. ^1H NMR a ^{13}C NMR spektra byla měřena na přístroji Varian VNMR S500 na Katedře organické a bioorganické chemie. Hmotnostní spektra s vysokým rozlišením (HRMS) byla měřena na UHPLC systému Acquity UPLC I-class (Waters, Millford, USA) v zapojení s hmotnostním spektrometrem s vysokým rozlišením Synapt G2Si (Waters, Manchester, UK) pracujícím na principu detektoru Q-TOF. Přístroj byl kalibrován pomocí leucin-enkefalinového standardu s použitím mravenčanu sodného (50-1200 m/z) nebo jodidu sodného (50-5000 m/z) jako externí kalibrace. Spektra UV/Vis byla měřena pomocí přístroje Shimadzu UV-2600 spectrophotometer. Teploty tání byly měřeny pomocí přístroje Electrothermal IA9200.

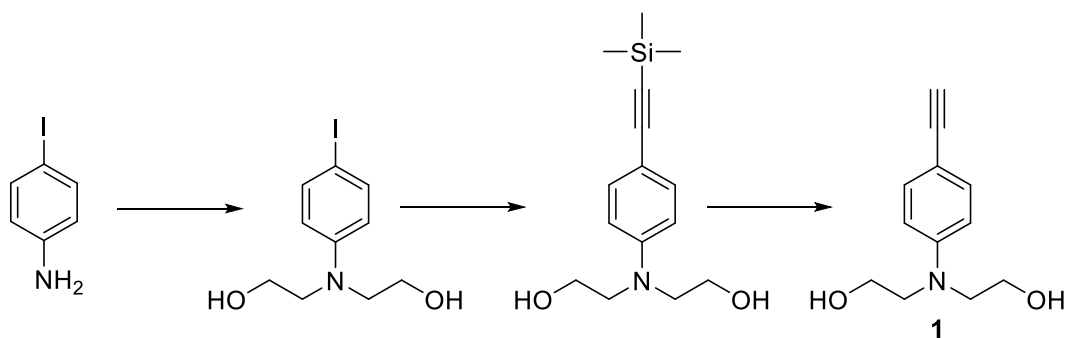
4.1. Souhrnné schéma provedených reakcí





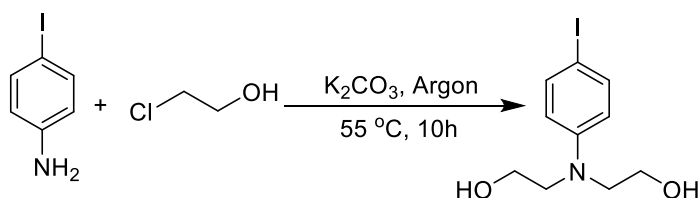


4.2. Příprava *N,N*-bis(2-hydroxyethyl)-4-ethynylanilinu (1)



Pro přípravu dané látky, jsme postupovali dle předepsaného postupu v literatuře.²² Jedná se o tříkrokovou syntézu za využití výchozí látky 4-jodoanilinu. NMR spektrum sloučeniny 1 odpovídalo datům v literatuře.

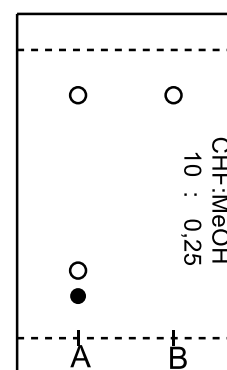
4.2.1. Příprava *N,N*-bis(2-hydroxyethyl)-4-jodanilinu



Do 100 ml destilační baňky byl navážen 4-jodanilin (10 g, 45,66 mmol) a baňka byla napuštěna inertní argonovou atmosférou. Přes pryžové septum byl postupně

přikapáván 2-chlorethanol (30 ml), který v reakci zastupoval alkylační činidlo i rozpouštědlo. Po zahřátí reakční směsi na 55°C jsme přidali bezvodý K₂CO₃ (31,5 g, 232,98 mmol). Reakce dále probíhala v prostředí argonu za teploty 55°C pod zpětným chladičem po dobu 10 hodin.

Po uplynutí 10 hodin byl zkontrolován průběh reakce pomocí tenkovrstvé chromatografie (TLC) s mobilní fází v poměru chloroform/methanol (MeOH) (10:0,25) proti molekule 4-jodanilinu (TLC 1). Reakční směs byla poté pomocí vakuové odpary zbavena zbytků 2-chlorethanolu a následně rozsuspendována v dichlormethanu (DCM) a třikrát vytřepávána s vodou. K lepšímu oddělování fází bylo využito nasyceného roztoku NaCl (brine). Extrahovaná organická fáze byla poté vysušena od zbytků vody pomocí Na₂SO₄ a dále byla organická fáze přefiltrována. Směs s DCM jsme odpařili a následně rekrystalizovali z ethylacetátu (EtAc).

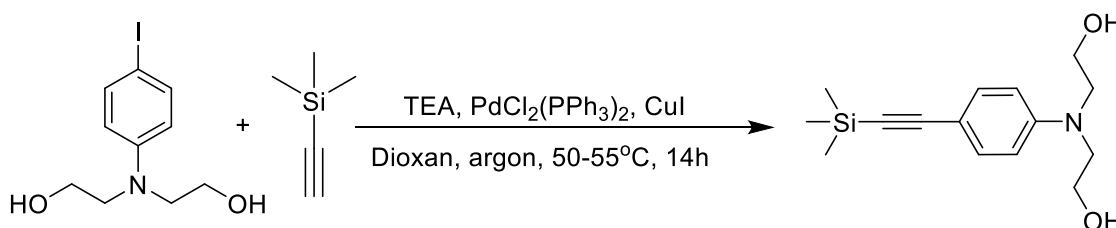


TLC 1
A - Produkt
B - p-jodanilin

Získali jsme bílé až nařazené krystalky. Výtěžek reakce byl 7,6 g (54 %), R_f=0,15 (CHCl₃:MeOH; 10:0,25).

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃; 278 K): δ(ppm, J(Hz)): 7,45 (d, J = 8,9 Hz, 2H); 6,46 (d, J = 8,9 Hz, 2H); 3,81 (t, J = 4,9 Hz, 4H); 3,53 (d, J = 5,1 Hz, 2H). ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃; 278 K): δ(ppm): 147,4; 137,7; 114,8; 77,6; 64,5; 60,5; 55,1.

4.2.2. Příprava 2,2'-((4-((trimethylsilyl)ethynyl)fenyl)azandiyl)bis(ethan-1-ol)



Do prostředí baňky dle Schlenka pod argonem, jsme navázili získaný produkt z předešlé reakce (7,6 g, 24,82 mmol) s katalyzátory PdCl₂(PPh₃)₂ (0,292 g, 0,416 mmol) a CuI (90 mg, 0,474 mmol). Prachové částice jsme rozpustili v bezvodém 1,4-dioxanu (30 ml) a jako báze bylo využito triethylaminu (TEA) (40 ml). Reakční směs byla znovu zajištěna argonem a zahřáta na 50-55°C. Po dosažení potřebné teploty byl

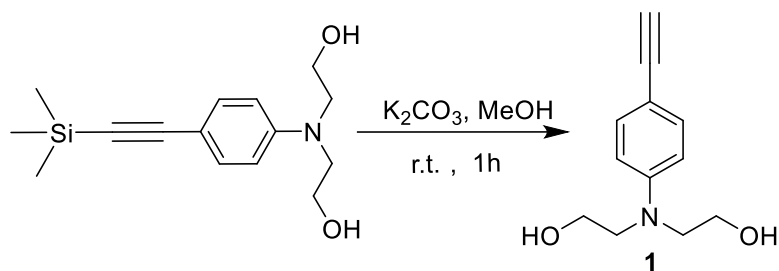
skrz pryžové septum přidán (trimethylsilyl)acetylen (2,4 ml eq., 1,7 g, 17,31 mmol). Reakce dále probíhala pod zpětným chladičem po dobu 14 hodin.

Výsledná směs byla poté zahuštěna pomocí vakuové odpary, rozpuštěna ve směsi MeOH/DCM (v poměru 1:9) a následně přefiltrována přes Celite. Přefiltrovaná směs byla dvakrát dělena pomocí sloupcové chromatografie, kdy byl sloupec ochráněn před světlem pomocí alobalové folie. Pro první dělení bylo využito mobilní fáze $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (15:1) a pro druhou fázi čištění mobilní fáze DCM/MeOH (15:1). Výsledná směs poté byla odpařena pomocí vakuové odpary.

Výsledkem reakce byly žlutavé krystalky s výtěžkem reakce 1,3 g (27 %).

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3 ; 278 K): δ (ppm, J (Hz)): 7,32 (d, $J = 9,1$ Hz, 2H); 6,56 (d, $J = 9,1$ Hz, 2H); 3,82 – 3,77 (m, 4H); 3,56 (d, $J = 4,3$ Hz, 4H); 0,24 (s, 9H).

4.2.3. Příprava 2,2'-((4-ethynylfenyl)azanediyl)bis(ethan-1-ol) (1)



Získaná látka z reakce (4.2.2) (1,3 g, 4,69 mmol) podstoupila reakci s K_2CO_3 (1,9 g, 13,75 mmol) v prostředí MeOH (15 ml). Reakční směs se míchala za pokojové teploty jednu hodinu.

Po ukončení reakce došlo k částečnému zahuštění směsi. Zahuštěná směs byla naředěna s DCM a následně přefiltrována přes Celite. Filtrát byl poté pomocí vakuové odpary zbaven zbytků DCM a přečištěn pomocí gradientové sloupcové chromatografie. V první fázi gradientové eluce byla použita mobilní fáze DCM a poté došlo k výměně mobilní fáze za DCM/MeOH (19:1).

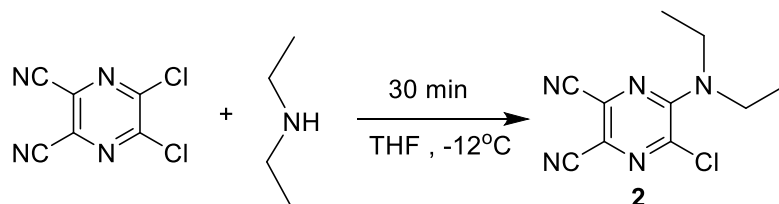
Výsledkem reakce byly žlutavé krystalky, které po expozici světlem zelenaly. Výtěžek vzniklého produktu 1 byl 0,549 g (57 %) s retenčním faktorem (R_f) zhruba 0,35 (DCM:MeOH; 19:1).

^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$, 278 K): δ (ppm, J (Hz)): 7,23 (d, $J = 7,4$ Hz, 2H); 6,65 (d, $J = 8,9$ Hz, 2H); 3,54 – 3,51 (m, 4H); 3,42 (t, $J = 6,3$ Hz, 4H); 2,50 (s, 1H). ^{13}C NMR (126 MHz, $\text{DMSO}-d_6$; 278 K): δ (ppm): 148,4; 147,8; 137,3; 132,9; 114,3; 111,3; 107,4; 85,0; 77,9; 58,2; 58,1; 53,3; 53,2.

4.3. Příprava 5-(4-(2-azidoethyl)piperidin-1-yl)-6-(diethylamino)pyrazin-2,3-dikarbonitrilu (3)

Pro přípravu byly vyzkoušeny dvě různé cesty syntézy a pro přípravu ve větším množství byla vybrána metoda s vyšším výtěžkem.

4.3.1. Příprava 5-chloro-6-(diethylamino)pyrazin-2,3-dikarbonitrilu (2)



Pro přípravu dané látky jsme postupovali podle předepsaného postupu v literatuře.²³

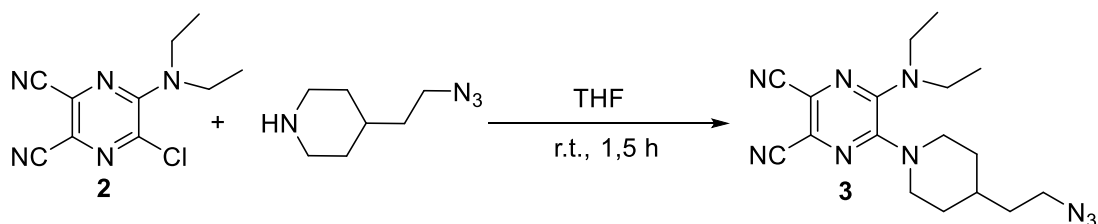
5,6-dichloro-pyrazin-2,3-dikarbonitril (4,8 g, 24,12 mmol) jsme rozpustili v THF (200 ml). Roztok jsme poté ochladili za pomoci lázně led/sůl na teplotu -12°C a do reakční směsi postupně přikapávali po kapkách směs diethylaminu (3,84 g, 52,50 mmol) rozpuštěného v THF. Reakční směs byla poté míchána po dobu půl hodiny, kdy se postupem času ohřála na laboratorní teplotu.

Vzniklá vysrážená sůl hydrochloridu diethylaminu byla poté odfiltrována a promytá pomocí THF. Mateční louh byl odpařen a následně přečištěn pomocí sloupcové chromatografie. Pro přečištění byla využita mobilní fáze Hex/EtAc (4:1).

Výsledkem reakce byla žlutavá olejovitá látka s výtěžkem reakce 4,6 g (74 %).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃; 278 K): δ(ppm, J(Hz)): 3,75 (q, J = 7,0 Hz, 4H); 1,31 (t, J = 7,0 Hz, 6H). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃; 278 K): δ(ppm): 151,3; 135,0; 129,4; 117,3; 113,2; 113,0; 45,5; 13,0.

4.3.2. Příprava 5-(4-(2-azidoethyl)piperidin-1-yl)-6-(diethylamino)pyrazin-2,3-dikarbonitrilu (**3**)

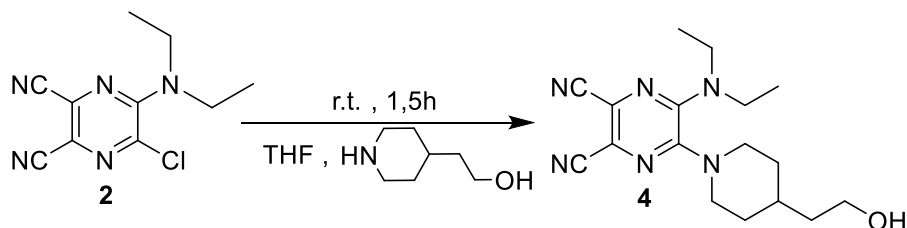


4-(2-azidoethyl)piperidin²⁵ (0,848 g, 5,50 mmol) jsme rozpustili v THF (20 ml). K první složce jsme poté přidali navážku monosubstituované molekuly dikarbonitrilu **2** (0,5636 g, 2,39 mmol) a reakční směs jsme nechali míchat. Po půlhodinových intervalech byly odebírány vzorky na kontrolu přes TLC oproti standardu s mobilní fází hexan (Hex)/EtAc (2:1). Po hodině a půl byla reakce ukončena.

Reakční směs byla posléze zahuštěna pomocí rotační vakuové odparky. Koncentrát byl poté třikrát vytřepáván ve směsi EtAc s vodou. Pro lepší oddělení fází bylo využito 1% roztoku HCl. Výsledná organická fáze byla poté odebrána a odpařena. Následně byla směs přečištěna pomocí sloupcové chromatografie za využití mobilní fází Hex/EtAc v poměru (3:1)

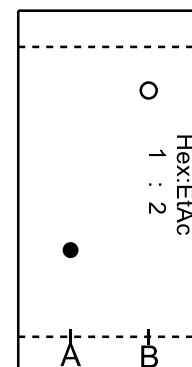
Výsledkem reakce byla žlutá olejovitá látka s $R_f=0,32$ (Hex:EtAc; 5:2). Výtěžek reakce byl 210 mg látky **3** (25 %). Z důvodu špatné dělitelnosti látky při čištění molekuly a nízké výtěžnosti byl vyzkoušen i další postup.

4.3.3. Příprava 5-(diethylamino)-6-(4-(2-hydroxyethyl)piperidin-1-yl)pyrazin-2,3-dikarbonitrilu (4)



Látku **2** (2,90 g, 11,28 mmol) jsme rozpustili v THF (100 ml) a přidali 2-(piperidin-4-yl)ethan-1-ol (4 g, 30,96 mmol). Výslednou směs jsme nechali za laboratorní teploty míchat hodinu a půl.

Po ukončení reakce byla směs zahuštěna pomocí vakuové odparky a následně třikrát vytřepávána s EtAc vůči vodě. Při vytřepávání bylo použito 1% roztoku HCl k lepšímu odstranění přebytečného 2-(piperidin-4-yl)ethan-1-olu. Po vytřepávání byla organická fáze zbavena zbytků vody pomocí Na₂SO₄, který byl poté odfiltrován. Organická fáze byla následně zahuštěna a čistota produktu byla ověřena pomocí TLC (TLC 2). Přečištění pomocí sloupcové chromatografie nebylo potřeba.

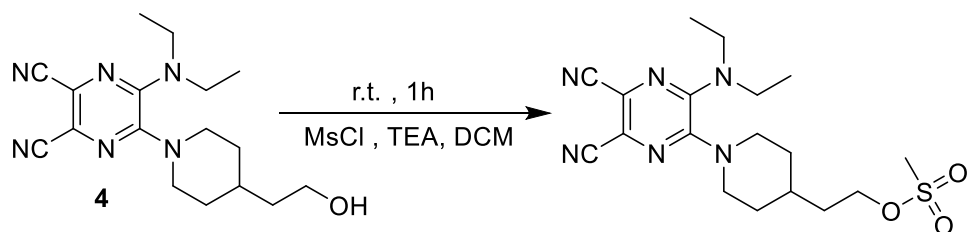


TLC 2
A - Produkt reakce
B - Výchozí látka

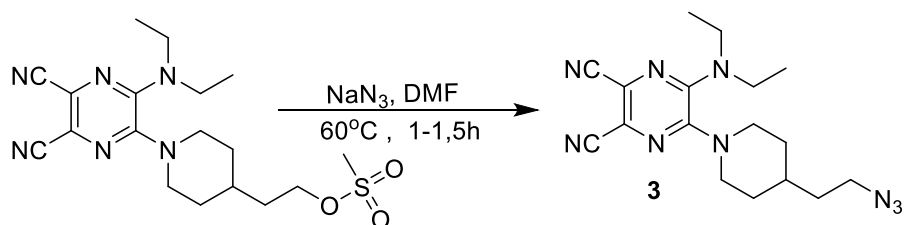
Výsledkem reakce byla nažloutlá olejovitá látka s výtěžkem 3,57 g (96 %), $R_f=0,3$ (Hex:EtAc; 1:2).

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃; 278 K): δ (ppm, J (Hz)): 4,04 (d, $J = 13,3$ Hz, 2H); 3,73 (d, $J = 6,1$ Hz, 2H); 3,56 (q, $J = 7,0$ Hz, 4H); 2,76 (dt, $J = 12,9; 2,5$ Hz, 2H); 1,84 (d, $J = 12,3$ Hz, 2H); 1,78 – 1,68 (m, 1H); 1,55 (q, $J = 6,6$ Hz, 2H); 1,33 – 1,20 (m, 3H); 1,11 (t, $J = 7,1$ Hz, 6H). ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃; 278 K): δ (ppm): 146,8; 146,0; 121,1; 119,7; 115,0; 114,9; 60,1; 47,1; 42,4; 38,9; 32,5; 31,8; 30,9. HR MS (ESI): (m/z): 329,2091 [M+H⁺].

4.3.4. Alternativní příprava 5-(4-(2-azidoethyl)piperidin-1-yl)-6-(diethylamino)pyrazin-2,3-dikarbonitrilu (3)



Výchozí látku **4** o navážce (3,57 g, 10,87 mmol) jsme rozpustili v DCM (50 ml) a přidali TEA (2,31 g, eq.3,18 ml, 22,83 mmol) a následně přikapávali roztok MsCl (chlorid methansulfonové kyseliny) (1,48 g, eq.1 ml, 12,92 mmol). Reakční směs se poté míchala po dobu jedné hodiny za pokojové teploty. Vzniklý meziprodukt byl poté odpařen od zbytků rozpouštědel a bez čištění použit do dalšího kroku.



Meziprodukt jsme rozpustili v bezvodém *N,N*-dimethylformamidu (DMF). Výslednou směs jsme zahřáli na 60°C a poté přisypali NaN_3 (3,53 g, 54,23 mmol). Reakce dále probíhala pod zpětným chladičem po dobu hodiny a půl.

Reakční směs jsme po uplynutí doby zahustili a následně čtyřikrát vytřepávali v chloroformu vůči vodě. Odpuštěnou organickou fází jsme poté vysušili pomocí Na_2SO_4 , přefiltrovali a odpařili. Odpařený produkt jsme poté přečistili pomocí sloupcové chromatografie s mobilní fází CHCl_3/Hex v poměru (3:2).

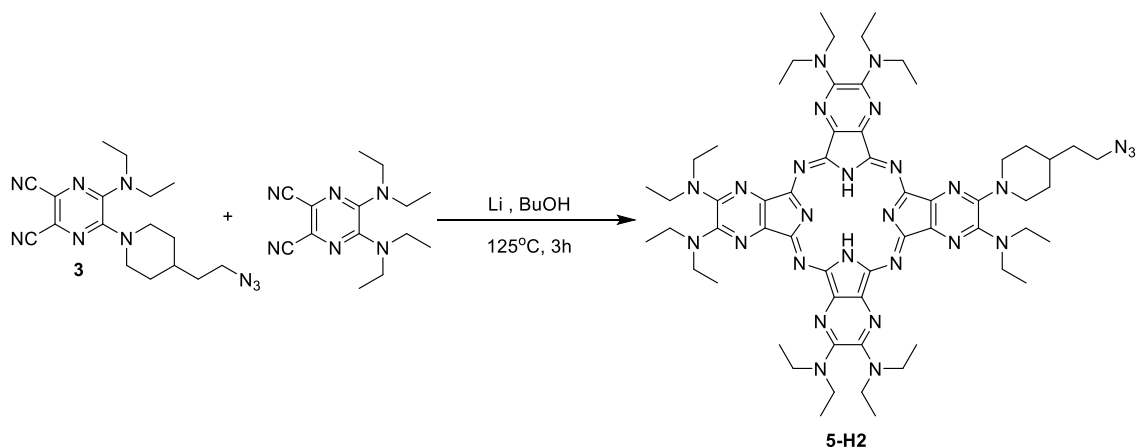
Výsledkem reakce byla žlutooranžová olejovitá látka s výtěžkem 3,32 g (87 %)

^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$; 278 K): δ (ppm, J (Hz)): 8,32 (s, 1H); 7,58 (d, J = 8,9 Hz, 2H); 6,73 (d, J = 9,1 Hz, 2H); 4,75 (d, J = 4,9 Hz, 2H); 4,40 (t, J = 7,2 Hz, 2H); 3,94 (t, J = 13,0 Hz, 2H); 3,59 – 3,48 (m, 8H); 3,43 (t, J = 6,4 Hz, 4H); 2,78 (t, J = 12,5 Hz, 2H); 1,86 – 1,77 (m, 4H); 1,54 – 1,43 (m, 1H); 1,25 (dq, J = 12,6; 3,8 Hz, 2H); 1,05 (t, J = 7,0 Hz, 6H). ^{13}C NMR (126 MHz, $\text{DMSO}-d_6$; 278 K): δ (ppm): 147,8; 147,1; 146,6; 145,8; 126,3; 120,0; 119,3; 118,7; 118,0; 115,6; 115,5; 111,5; 58,3; 53,4; 47,1; 46,6; 42,2; 36,0; 32,6; 30,8; 30,8; 12,7. HR MS (ESI): (m/z): 559,3247 [$\text{M}+\text{H}^+$].

4.4. Příprava AzaPc 6-Zn postupem A

Při tomto postupu jsme se snažili v prvním kroku o nesymetrickou cyklotetramerizaci prekurzorů v poměru 1:3 za vzniku výsledného cyklotetrameru, který byl následně využit do reakce pro připojení ethinylového derivátu **1** jakožto periferního substituentu.

4.4.1. Příprava AzaPc 5-H2



Do destilační baňky jsme navázili oba prekurzory v poměru 1:3. Navážka prekurzoru **3** byla 370 mg, 0,96 mmol a 5,6-bis(diethylamino)pyrazin-2,3-dikarbonitrilu ²⁴ 785 mg, 2,88 mmol. Navážené prekurzory jsme rozpustili v čerstvě predestilovaném butanolu (BuOH) a reakční směs jsme zahřáli na 125°C. Po dosažení požadované teploty jsme přidali skrz chladič navážené lithium (201 mg, 28,7 mmol). Reakce probíhala po dobu tří hodin a po uplynutí doby byla reakce ukončena a zbavena zbytků rozpouštědla. Pevný zbytek po odpaření byl suspenzován ve vodě a postupně byla přikapávána 50% kyselina octová do změny zbarvení suspenze a slabě kyselé reakce reakční směsi, která byla následně míchána 10 minut při laboratorní teplotě pro odstranění centrálně koordinovaných lithných kationtů. Reakční směs byla poté přefiltrována, vysušena. Produkt na filtru byl poté rozpuštěn ve směsi DCM/MeOH a převeden do baňky, rozpouštědla byla poté odpařena.

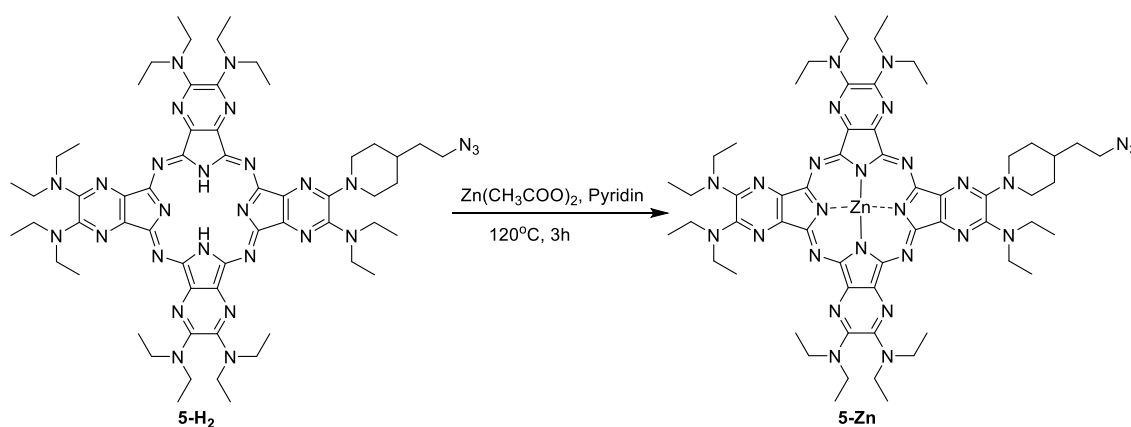
K přečištění jsme využili sloupcové chromatografie. Správný poměr mobilní fáze bylo potřeba vyzkoušet pomocí TLC (Tab. 1).

Tab. 1 Poměry mobilních fází pro separaci kongenerů

DCM	MeOH	Aceton	Vývoj dělení
40	1	1	Rychlé
40	0,5	0,5	Pomalejší, neoddělené
40	0,5	0	Stále rychlé
40	0	0,5	Pomalejší, neoddělené
40	0	1	Pomalé
30	1	1	Moc rychlé
30	0	1	Částečné oddělení, použito

Výsledkem reakce byly nafialovělé krystalky látky **5-H2** a výtěžek částečně přečištěné složky bylo 161 mg. Z důvodu špatné dělitelnosti jsme se pokusili o připojení ethylové molekuly **1** na periferii ke zlepšení dělicích vlastností. Postup při dělení je popsán detailněji v sekci Diskuze.

4.4.2. Převedení na zinečnatý AzaPc 5-Zn

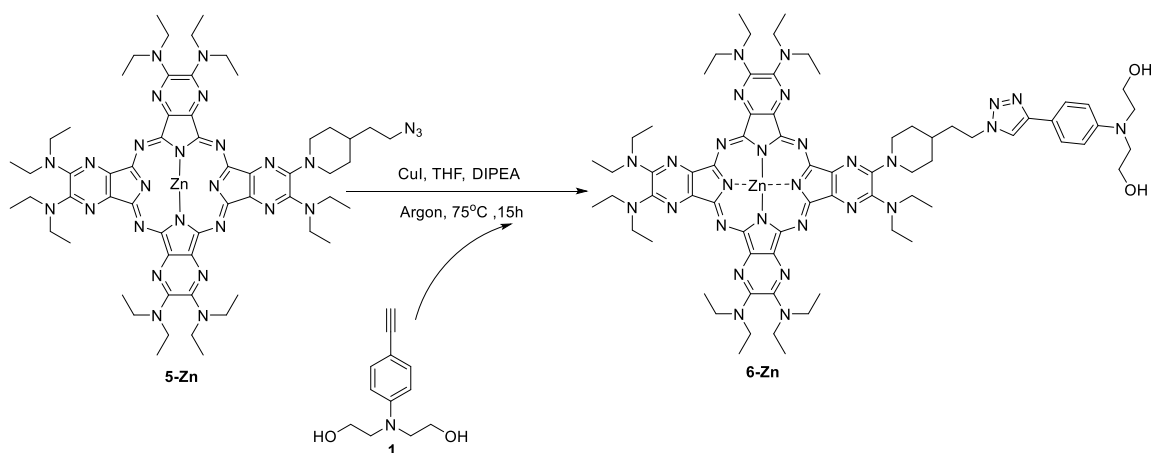


Sloučeninu **5-H2** (53 mg, 0,045 mmol) z předchozí reakce jsme rozpustili v pyridinu (20 ml). Po zahřátí směsi na 120°C jsme přidali bezvodý $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ (83 mg, 0,45 mmol) a reakční směs jsme nechali pod zpětným chladičem zahřívát při stejné teplotě po dobu tří hodin.

Po ukončení reakce jsme směs zbavili pyridinu odpařením do sucha, poté jsme přilili destilovanou vodu pro rozpuštění nezreagovaného $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2$. Produkt **5-Zn** jsme posbírali filtrací přes filtrační papír a nechaly vysušit.

Výsledkem reakce byly namodralé krystalky **5-Zn** ve formě nepřečištěné směsi o hmotnosti 44 mg. Produkt byl v této podobě použit do následující reakce.

4.4.3. Příprava AzaPc **6-Zn**

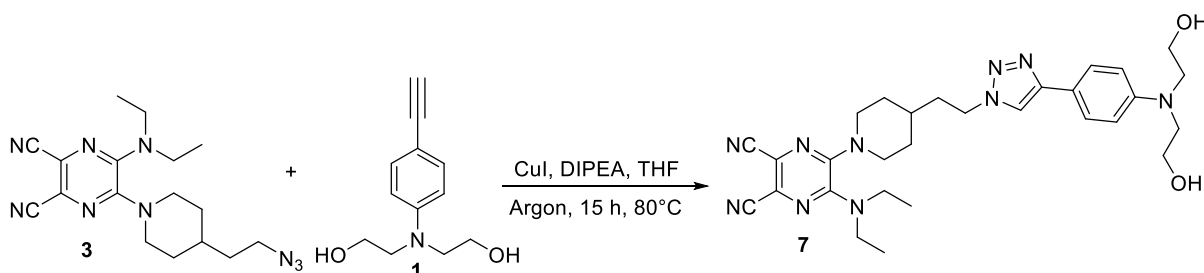


Do baňky dle Schlenka jsme navázili nepřečištěný produkt předchozí reakce obsahující AzaPc **5-Zn** (44 mg, 0,036 mmol), CuI (27 mg, 0,142 mmol) a *N,N*-bis(2-hydroxyethyl)-4-ethynylanilin **1** (50 mg, 0,242 mmol). Následně jsme naplnili baňku argonem a přidali THF (15 ml) skrz septum. Reakční směs byla zahřáta na 75 °C. Do reakční směsi jsme poté po kapkách přidávali roztok diisopropylethylaminu (DIPEA) (552 mg, 4,27 mmol). Reakci jsme poté zahřívali pod zpětným chladičem po dobu 15 hodin.

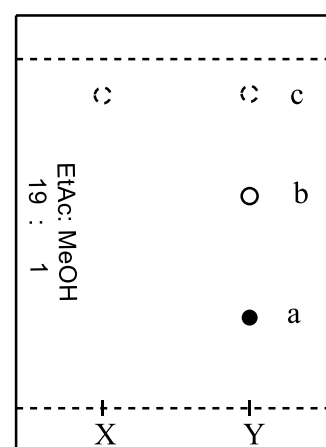
Po 15 hodinách byl odebrán vzorek a porovnán pomocí TLC proti výchozí látce **5-Zn** a bylo zjištěno, že reakce neproběhla. Proto jsme se rozhodli o druhou možnou cestu syntézy popsanou dále.

4.5. Příprava AzaPc 6-Zn postupem B

4.5.1. Příprava 5-(4-(2-(4-(4-(bis(2-hydroxyethyl)amino)fenyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)ethyl)piperidin-1-yl)-6-(diethylamino)pyrazin-2,3-dikarbonitrilu (7)



Do varné baňky jsme navázili sloučeninu **3** (174 mg, 0,493 mmol), sloučeninu **1** (250 mg, 1,218 mmol) a CuI (9 mg, 0,045 mmol), rozpustili v bezvodém THF (50 ml) a atmosféra byla nahrazena atmosférou argonu. Reakční směs byla zahřáta na 80°C a následně byla do směsi přikapávána báze DIPEA (1,7 g, 13,16 mmol). Průběh reakce byl kontrolován pomocí TLC oproti vzorku azidového prekurzoru **3** (TLC 3).



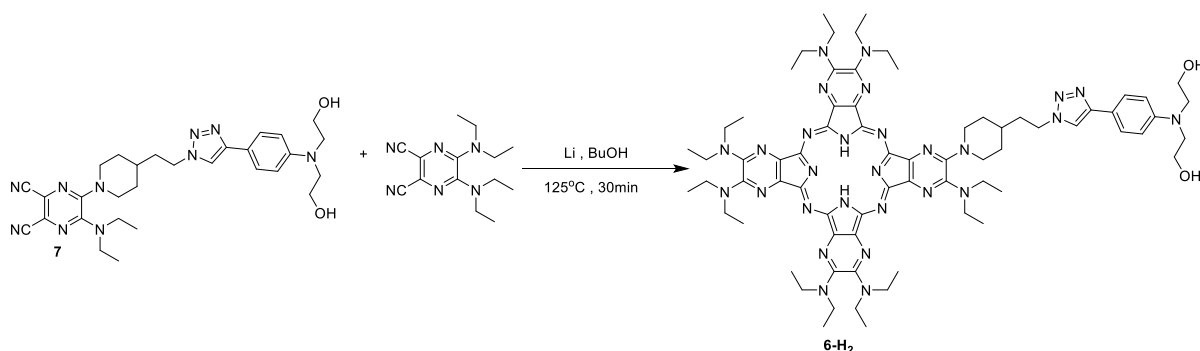
TLC 3
X - standard látky **3**
Y - a. produkt (**7**)
b. látka **1**
c. látka **3**

Po 15 hodinách byla reakce ukončena, reakční směs byla přefiltrována a filtrační koláč promyt THF. Mateční louh byl zbaven zbytků rozpouštědel pomocí vakuové odparky. Získaný koncentrát byl poté přečištěn pomocí sloupcové chromatografie s mobilní fází EtAc/MeOH (19:1). Sesbírané frakce byly odpařeny na vakuové odparce. Výsledný produkt byl poté rekrystalizován z DMSO.

Výsledkem reakce byly žluté jemné krystalky s bodem tání (180,0-181,9°C) o výtěžku 225 mg (82 %).

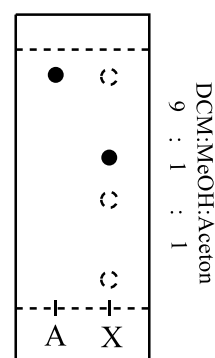
^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6 ; 278 K): δ (ppm, J (Hz)): 8,32 (s, 1H); 7,58 (d, J = 8,9 Hz, 2H); 6,73 (d, J = 9,1 Hz, 2H); 4,75 (d, J = 4,9 Hz, 2H); 4,40 (t, J = 7,2 Hz, 2H); 3,94 (t, J = 13,0 Hz, 2H); 3,59 – 3,48 (m, 8H); 3,43 (t, J = 6,4 Hz, 4H); 2,78 (t, J = 12,5 Hz, 2H); 1,86 – 1,77 (m, 4H); 1,54 – 1,43 (m, 1H); 1,25 (dq, J = 12,6; 3,8 Hz, 2H); 1,05 (t, J = 7,0 Hz, 6H). ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6 ; 278 K): δ (ppm): 147,8; 147,1; 146,6; 145,8; 126,3; 120,0; 119,3; 118,7; 118,0; 115,6; 115,5; 111,5; 58,3; 53,4; 47,1; 46,6; 42,2; 36,0; 32,6; 30,8; 30,8; 12,7. HR MS (ESI): (m/z): 559,3247 [$M+H^+$]. T_m = 180,0-181,9°C

4.5.2. Příprava AzaPc 6-H2



Látku **7** (73 mg, 0,13 mmol) a 5,6-bis(diethylalmino)pyrazin-2,3-dikarbonitril (111 mg, 0,41 mmol) jsme rozpustili v čerstvě předestilovaném BuOH (20 ml) a zahřáli na 125°C. Po dosažení požadované teploty bylo do reakční směsi přidáno kovové Li (28 mg, 4 mmol). Reakce probíhala po dobu 30 minut. Reakce monitorována vůči symetrické molekule viz TLC 4.

Výsledná směs poté byla zbavena zbytků BuOH odpařením za sníženého tlaku a po zahuštění byla směs rozpuštěna v DCM. Poté jsme danou směs třikrát vytřepávali s vodou, do které jsme přidali 1% roztok HCl k okyselení směsi, aby došlo k odstranění navázaných lithných kationtů v centru makrocyklu. Demetalace byla indikována změnou barvy až na fialovou. Organickou fáze jsme následně sebrali a vysušili bezvodým Na₂SO₄. V další fázi jsme směs přechistili pomocí sloupcové chromatografie s mobilní fází DCM/MeOH/Aceton 15:1:1. V druhé fázi čištění produktu bylo znovu využito sloupcové chromatografie, tentokrát s mobilní fází v poměru DCM/MeOH 20:1.



TLC 4

A - Symetrická molekula
X - Reakce **(produkt)**

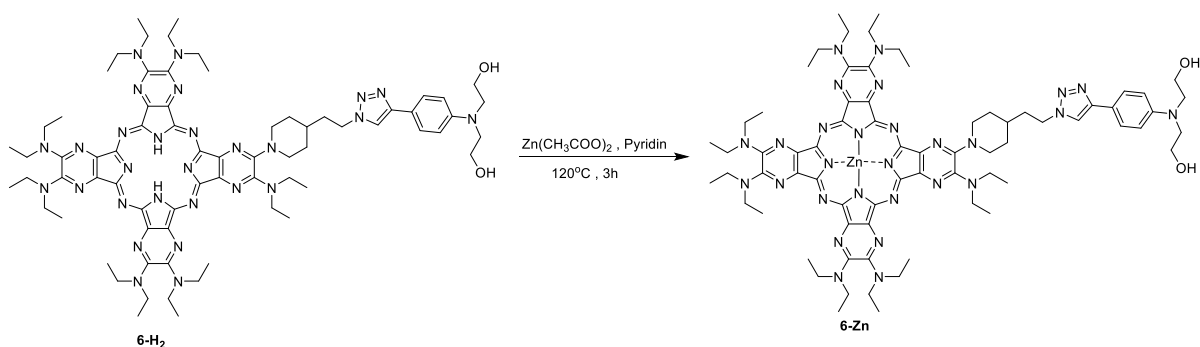
Po druhém přečištění byla výsledná látka rozpuštěna v minimálním množství DCM a přesrážena do hexanu při -20°C. Po rekrystalizaci byla směs centrifugována (7000 ot. po dobu 4 minut) a dekantována od hexanu. Krystalky produktu byly ponechány v centrifugační zkumavce v digestoři pro odpaření zbytků hexanu.

Celkový zisk produktu byl 36 mg (20 %) fialových krystalků látky **6-H2**.

¹H NMR (500 MHz, Pyridin-*d*₅; 278 K): δ(ppm, *J*(Hz)): 8,39 (s, 1H); 8,14 (d, *J* = 8,4 Hz, 2H); 7,03 (d, *J* = 9,3 Hz, 2H); 4,57 – 4,46 (m, 4H); 4,07 (t, *J* = 5,8 Hz, 4H); 4,01 (q, *J* = 7,1 Hz, 4H); 3,90 (p; *J* = 6,6 Hz, 24H); 3,81 (t, *J* = 5,9 Hz, 4H); 2,94 (t, *J* = 11,8 Hz, 2H); 1,87 (d, *J* = 12,9 Hz, 4H); 1,61 – 1,41 (m, 4H); 1,27 (t, *J* = 7,0 Hz, 9H); 1,24 – 1,18 (m, 28H); 1,18 – 1,14 (m, 6H); -1,22 (s, 2H). ¹³C NMR (126 MHz, Pyridin-*d*₅; 278

K): δ (ppm, J (Hz)): 162,4; 151,5; 150,8; 150,8; 150,7; 150,7; 150,5; 149,7; 148,8; 148,7; 135,5; 135,3; 127,3; 123,8; 123,5; 123,3; 119,5; 119,2; 112,6; 59,8; 55,0; 48,0; 47,9; 43,0; 42,9; 42,6; 37,1; 35,7; 33,6; 32,0; 30,8; 13,1; 13,1. HR MS (ESI): (m/z): 1377,8630 [$M+H^+$]. UV/Vis (THF): λ_{\max} (ϵ) = 679 (91 040), 648 (68 230), 516 (59 350), 367 nm (106 350 mol⁻¹dm³cm⁻¹).

4.5.3. Příprava zinečnatého AzaPc 6-Zn



Sloučeninu **6-H2** (25 mg, 0,018 mmol) a $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ (20 mg, 0,109 mmol) jsme rozpustili v pyridinu a zahřívali při 120°C po dobu 3 hodin.

Po zastavení reakce jsme odpařili zbytek pyridinu a zahuštěnou směs jsme čtyřikrát vytřepávali DCM proti vodě a následně jsme odebrali organickou fází. Před odpařením zbytků DCM byl do směsi přidán toluen k lepšímu odstranění zbytků vody.

Následně byla látka dvakrát přečištěna sloupcovou chromatografií s mobilní fází DCM/MeOH 13:1 a získaný produkt byl rozpuštěn v minimálním množství DCM a přesrážen pomocí hexanu. Po vyndání směsi z mrazáku byl produkt centrifugován a vysušen.

Výsledkem reakce bylo 18 mg (69 %) namodralých krystalů **6-Zn**.

¹H NMR (500 MHz, Pyridine-*d*₅; 278 K): δ (ppm, J (Hz)): 8,40 (s, 1H); 8,16 (d, J = 9,2 Hz, 2H); 7,04 (d, J = 8,9 Hz, 2H); 4,56 – 4,47 (m, 4H); 4,12 – 4,06 (m, 4H); 4,01 (q, J = 7,0 Hz, 4H); 3,90 (p; J = 6,9 Hz, 24H); 3,82 (t, J = 5,9 Hz, 4H); 2,95 (d, J = 11,3 Hz, 2H); 1,91 – 1,82 (m, 4H); 1,53 – 1,43 (m, 4H); 1,25 (t, J = 7,1 Hz, 9H); 1,23 – 1,17 (m, 28H); 1,15 (t, J = 7,1 Hz, 6H). ¹³C NMR (126 MHz, Pyridin-*d*₅) δ 150,9; 149,0; 143,0; 142,3; 141,8; 134,8; 134,6; 126,6; 122,8; 122,6; 118,9; 118,5; 111,9; 59,1; 54,3; 47,2; 42,3; 42,1; 41,9; 36,4; 33,0; 31,3; 12,5. HR MS (ESI): (m/z): 1439,7747 [$M+H^+$].

UV/Vis (THF): $\lambda_{\max} (\epsilon) = 705 (67\ 333), 653,5 (84\ 710), 382 (103\ 160), 367\ \text{nm} (106\ 350\ \text{mol}^{-1}\text{dm}^3\text{cm}^{-1})$.

4.6. Spektrální analýza

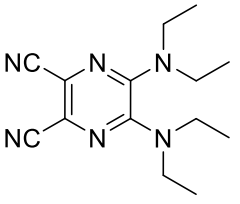
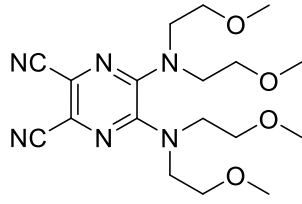
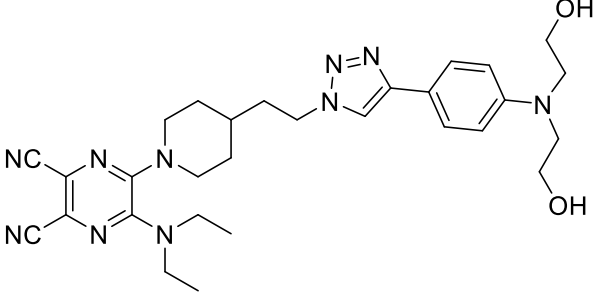
Spektrální analýza byla zaměřena na měření absorpčních spekter molekul podle tabulky (Tab. 2), které byly dále titrovány přídatky pyridinu.

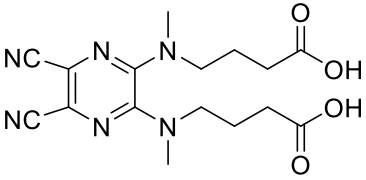
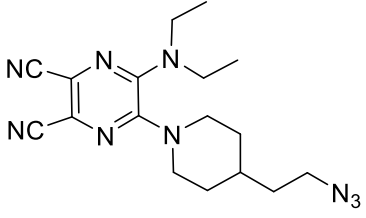
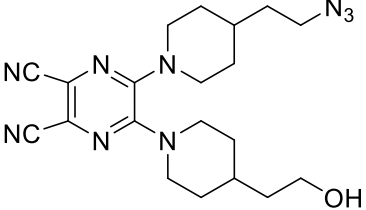
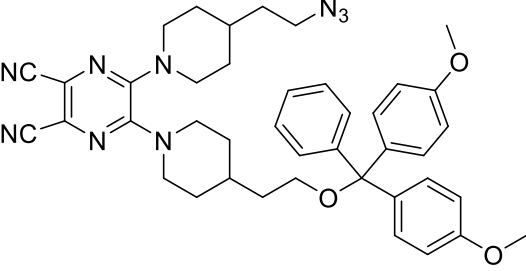
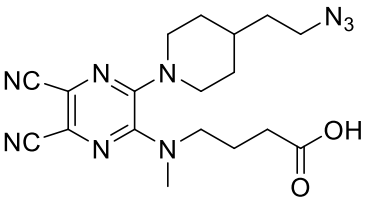
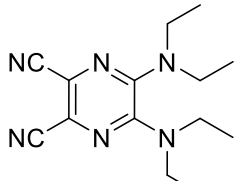
4.6.1. Studium agregačních vlastností AzaPc

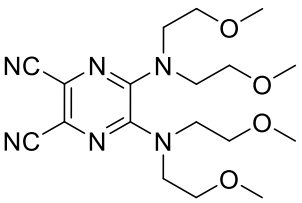
Pro vlastní měření asymetrických zinečnatých látek z tabulky (Tab. 2) jsme si připravili 100 μM zásobní roztoky v toluenu podle následujícího postupu (látky **6-Zn** až **15-Zn** byly připraveny kolegy v laboratoři): k naváženým vzorkům AzaPc ve zkumavkách jsme přidali takové množství toluenu, aby výsledný roztok byl 100 μM , a na 5 minut byly dány zkumavky do ultrazvukové lázně. Nakonec byly přefiltrovány, aby byly zbaveny prachových částic.

Do kyvety bylo napipetováno 2,5 ml toluenu a změřena baseline absorpčního spektra. Následně bylo přidáno 25 μl zásobního roztoku daného AzaPc a změřeno opět absorpční spektrum. Dalším krokem byl přídavek pyridinu dle tabulky č. 3 nebo 4 a změření absorpčního spektra. Pyridin byl přidáván tak dlouho, dokud nebylo dosaženo fáze plateau pro daný AzaPc. Bylo použito přibližně 20 přídavek pyridinu pro dosažení maximální koncentrace pyridinu 2%. Pro nižší přídatky pyridinu byla využita trituration v toluenu 10% a 1%.

Tab. 2 Struktury AzaPc pro měření absorpčních spekter a následnou titraci pyridinem

$1:3 \rightarrow$ \downarrow		
	6-Zn	X

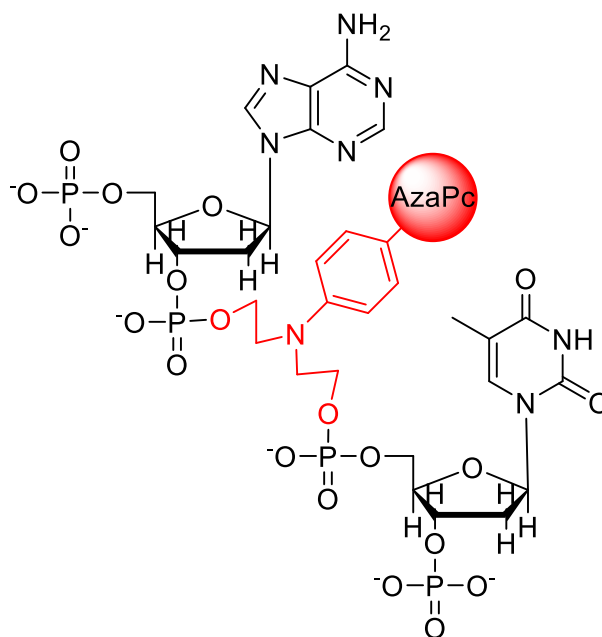
	8-Zn	9-Zn
	X	10-Zn
	11-Zn	X
	X	12-Zn
	13-Zn	14-Zn
	15-Zn	X

 <p>The image shows a chemical structure of a pyrimidine ring. The ring has two cyano groups (NC) attached to the 2 and 6 positions. The 4 and 5 positions are substituted with two N-(2-methoxyethyl) groups, represented as -N(CH₂)₂OCH₃.</p>	X	16-Zn
---	----------	--------------

5. Diskuze a výsledky

Cílem mé práce bylo nasyntetizovat asymetrickou molekulu AzaPc **6-Zn**, kterou je možné přímo vmezeřit do oligonukleotidového řetězce a zároveň aby byly zachovány její vlastnosti zhášení fluorescence (Obr. 23). Tého metody by bylo možné využít při rtPCR, kdy by byla výsledná molekula součástí dvojité značených sond, pro lepší identifikaci v průběhu PCR.

Prvním krokem byla příprava ethynylové látky **1**. Jednalo se o syntézu



Obr. 23 Teoretické schéma vmezeření molekuly AzaPc

za využití nukleofilní substituce a Sonogashirova couplingu. Reakce byla zkoušena vícekrát a to z několika důvodů. Jako první důvod se dá popsat reaktivita $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$, tento katalyzátor je velmi citlivý na reakční prostředí a při nedodržení inertní atmosféry argonu reakce neprobíhala a docházelo k zčernání reakční směsi. Další problém, který se vyskytl, byl při čištění směsi s výsledným produktem. Pro čištění směsi bylo nejprve využito vytřepávání s EtAc. Při vytřepávání pravděpodobně vznikal ethylester látky **1**, který nebylo možné navrátit do původního stavu. Při čištění přes sloupec se silikagelem docházelo k velmi pomalé eluci, pravděpodobně z důvodu vzniku slabých vodíkových interakcí mezi molekulami hydroxyly s molekulou silanolu obsaženého v silikagelu. V průběhu sloupcové chromatografie docházelo také ke změně zabarvení čištěné látky ze žluté na zelenou vlivem UV záření. K stejnému fenoménu docházelo i při kontrole TLC pod UV lampou. K zabránění rozkladu jsme získanou látku uchovávali pod atmosférou argonu v mrazáku. Zároveň se nám také nepodařilo dosáhnout výtěžnosti couplingu popsaného v literatuře,²² která se pohybovala kolem 91%, naše výtěžnost byla 27 %.

Pro přípravu látky **3** bylo nejprve využito přímé nukleofilní aromatické substituce 6-diethylamino-5-chloropyrazin-2,3-dikarbonitrilu 4-(2-azidoethyl)piperidinem.²⁵ Z důvodu blízkých retenčních faktorů při čištění bylo nutno výslednou směs přečistit několikrát. Z tohoto důvodu docházelo k vyšším ztrátám. Proto jsme se rozhodli pro zavedení azidu až v posledním kroku syntézy prekurzoru. 6-diethylamino-5-

chloropyrazin-2,3-dikarbonitril byl substituován 2-(piperidin-4-yl)ethan-1-olem a následnou substitucí hydroxylové skupiny pomocí MsCl, který vytvořil lepší odstupující skupinu pro následné zavedení azidu pomocí reakce s NaN_3 . I když se jednalo o víceetapovou syntézu, tak se nám podařilo dosáhnout výtěžků kolem 90 %.

Pro přípravu finální látky **6-Zn** bylo využito dvou cest syntézy (metoda A a B). Metoda A směřovala k cyklotetramerizaci látky **3** s 5,6-bis(diethylamino)pyrazin-2,3-dikarbonitrilem. Po cyklotetramerizaci vznikal produkt **5-H2**. Při okyselení reakční směsi dochází k odstranění lithiových kationtů z centra cyklu. Bohužel jsme při prvním pokusu přidali do výsledné směsi velké množství 50% roztoku CH_3COOH a došlo k rozložení cyklu. Syntéza proto musela být zopakována a při demetalizační fázi zpracování musela být 50% kyselina octová pouze přikapávána do suspenze. Před přečištěním jsme zkoušeli kombinovat mobilní fáze v různých poměrech pro správnou separaci vzniklých kongenerů (Tab. 1). Nejvhodnější kombinace mobilní fáze k separaci se nám zdál poměr DCM/Aceton 30:1 (TLC 5). Bohužel se nepodařilo úplně odseparovat všechny kongenery, které měly podobné retenční faktory. Bylo uděláno dvoudimenzionální TLC za využití DCM/aceton 30:1 a DCM/THF 30:1, ale to nám ukázalo, že směs kongenerů nepůjde dále rozdělit. Z tohoto důvodu jsme se rozhodli na alespoň částečně přečištěnou látku **5-H2** napojit látku **1** pro zlepšení dělitelnosti z důvodu změny polariry výsledného AzaPc. Před samotným připojením látky **1** k AzaPc **5-H2** bylo nutné koordinovat zinečnaté kationty do centra makrocyklu, neboť látka **1** měla být připojena pomocí „click“ reakce, při které dochází ke katalýze pomocí měďných iontů, které by se jinak mohly chlelatovat bezkovovým AzaPc.

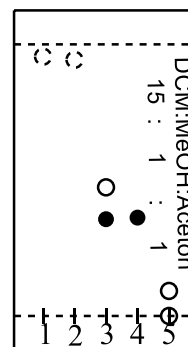


Látku **1** jsme se tedy pokusili napojit na azidový konec makrocyklu za pomoci měďného katalyzátoru a báze DIPEA. Reakce nevyšla z několika důvodů. Jako první důvod se dá uvažovat sterické bránění objemné molekuly cyklotetrameru. Druhým důvodem může být nízká reaktivita ethinylového produktu **1** s azidem vázaným na AzaPc. Dalším důvodem, který považujeme za nejpravděpodobnější je vznik měďných komplexů s hydroxylovými skupinami na periférii látky **1**. Po neúspěchu syntézy a po nabytí nových znalostí z pohledu reaktivity jsme se rozhodli o druhou cestu syntézy.

Metoda B se skládala z prvotního napojení alkyne látky **1** na azidovou skupinu látky **3** pomocí tzv. click – chemie. Při syntéze látky **7** jsme narazili na pár úskalí.

Jelikož se jednalo o prvotní syntézu, tak bylo potřeba reakci provádět v nízkých navážkách, aby došlo k optimalizaci reakčního prostředí. Při první přípravě jsme do reakční směsi přidávali přídavky látky **1** až do ustálení 2,7 násobku ekvivalentu vůči azidovému prekurzoru **3**. Při kontrole pomocí TLC byla i dále optimalizována mobilní fáze pro přečištění přes sloupcovou chromatografii. Čistý EtAc použitý pro první vyvinutí chromatogramu ukázal, že se jednalo o velmi pomalou mobilní fázi, proto byl přidán přídavek MeOH v poměru 19:1, který dostatečně separoval nečistoty od výsledného produktu (TLC 3). Po úspěšné separaci produktu jsme pokročili na reakci ve větším měřítku, která z neznámých důvodů nevyšla. Po prvotním neúspěchu jsme se ovšem nevzdávali a reakci jsme za stejných podmínek zkusili znovu s malou změnou reakčních podmínek. Reakce byla provedena jako bezvodá, tudíž bylo použito bezvodého THF a reakce probíhala pod argonovou atmosférou. Reakce v tomto případě probíhala bez problémů a směs byla podrobena přečištění za stejných podmínek jako při pilotní reakci. Po přečištění přes sloupcovou chromatografii jsme se pokoušeli danou látku ještě zbavit zbytků nečistot pomocí rekrystalizace. Problém ovšem nastal při vybírání správného rozpouštědla. Výsledná látka se nechtěla rozpouštět v žádných rozpouštědlech, a to jak slabě polárních, tak i nepolárních (MeOH, THF, CHCl₃, EtAc...). Rozpouštění jsme zkoušeli jak za pokojové teploty, tak i za zvýšené teploty, v obou případech jsme se nedočkali požadovaného efektu. Domníváme se, že při této reakci došlo k tvorbě jiné krystalické struktury, která zabraňovala v rozpustnosti. Jediné rozpouštědlo, kterému se povedlo produkt rozpustit byl DMSO. Využití DMSO je ovšem problematické, poněvadž při odpařování se velmi obtížně dá reakční směs zbavit zbytků rozpouštědla. I přes tuto nevýhodu jsme se rozhodli pro rekrystalizaci v DMSO. Směs jsme po dni v mrazu zkontrolovali. V baňce se objevily žlutavé krystaly s jemným práškem na dně. Výsledné velké krystaly byly ovšem tvořeny pevným DMSO ($T_m = 16\text{--}19\text{ }^\circ\text{C}$) a ne naší látkou. Jemné krystaly produktu byly odfiltrovány za sníženého tlaku.

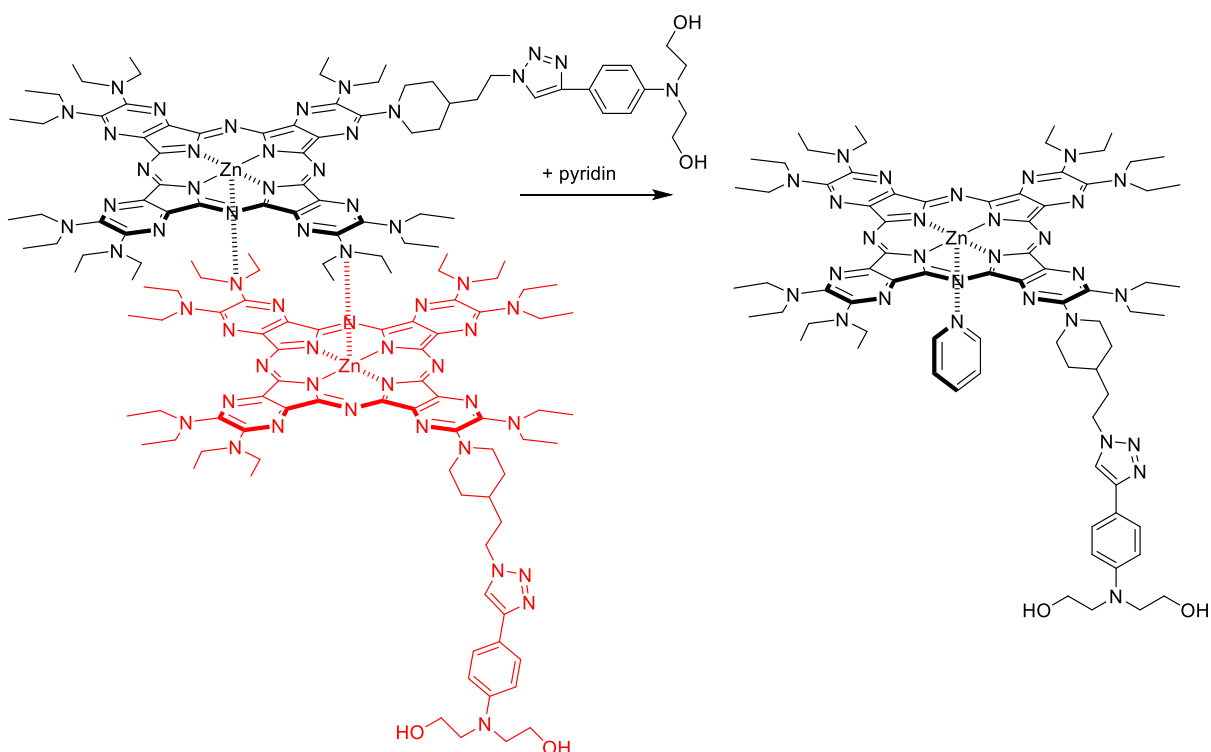
Po úspěšně provedeném přečištění jsme získaný produkt podrobili cyklotetramerizaci za stejných podmínek jako při prvním postupu. S již napojenou látkou **1** jsme předpokládali lepší podmínky pro následné dělení směsi. Po provedení cyklizace jsme se ovšem znovu dopustili chyby při odstraňování lithia z centra cyklu. Došlo k nadměrnému okyselení směsi a vlivem velmi nízkého pH došlo k rozkladu cyklotetrameru. Za větší opatrnosti jsme proto reakci provedli znovu za postupného okyselení směsi, kdy jsme směs při vytřepávání postupně okyselovali 1% roztokem HCl až do stálého fialového zabarvení. Po vytřepání jsme provedli TLC pro zjištění dělitelnosti jednotlivých kongenerů za využití mobilní fáze DCM/MeOH/Aceton 15:1:1, kde se ukázalo, že směs bude dělitelná viz TLC 6 (sbírané frakce 1 až 5 ze sloupcové chromatografie). Při cyklotetramerizačních reakcích, kde vzniká nesymetrický AzaPc, jsou z důvodu vzniku kongenerů běžné nižší výtěžky reakcí. Z tohoto důvodu jsme po rekrystalizaci a centrifugaci postupovali velmi opatrně, aby nedocházelo k zbytečným ztrátám při zpracování. Jelikož jsme pracovali v řádech miligramů, byla práce s těmito navážkami velmi obtížná na zpracování.



TLC 6
Produkt s
Rf 0,36

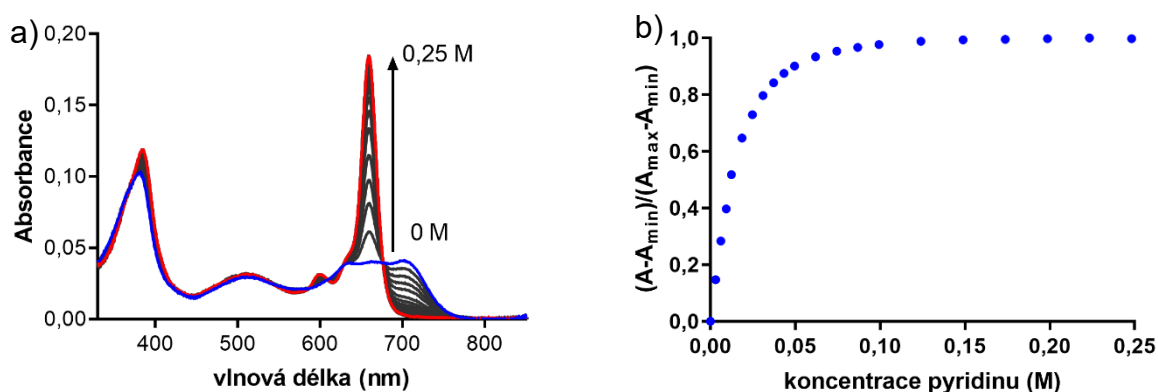
Azaftalocyaniny jako takové jsou velmi citlivé na světlo. Proto bylo důležité zajistit co nejvhodnější podmínky pro reakce, zpracovávání a uchovávání. Toho může být dosaženo například využitím alobalové folie kolem baněk a sloupců.

Po získání finálního produktu **6-Zn** jsme danou látku podrobili spektrálním měřením, kdy jsme zkoumali spektrální vlastnosti cílového produktu a látek z tabulky (Tab. 2). Při měření absorpčního spektra látky **6-Zn** v toluenu byl pozorován velice široký Q-pás s nízkými extinkčními koeficienty a přítomností dalších maxim posunutých k červené části spektra (modré spektrum na Obr. 25a), což je typické absorpční spektrum při vzniku J-dimerů. U **6-Zn** jsou J-dimery tvořené interakcí periferní dialkylamino skupiny s centrálním zinečnatým iontem (Obr. 24)



Obr. 24 Schodovité uskupení J-dimeru látky 6-Zn a monomerizace po přidavku pyridinu

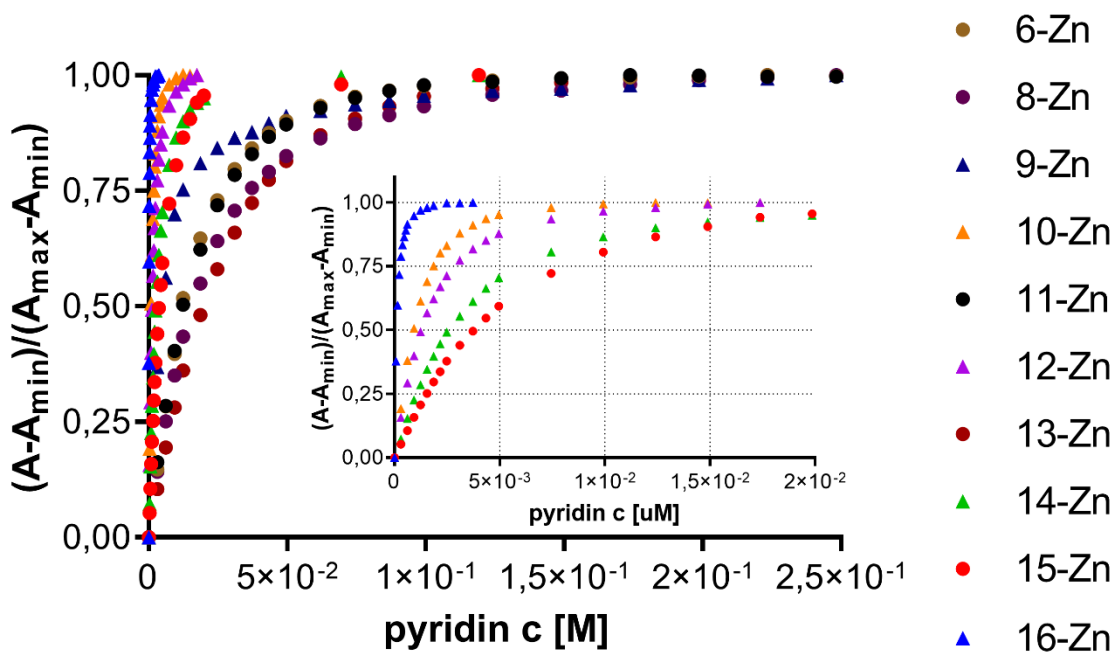
Tyto J-dimery je možné rozvolnit přidavkem koordinačních rozpouštědel např. pyridin, imidazol a další. Vlivem volného elektronového páru na dusíku pyridinu dochází k interakci s centrálním kationtem kovu a následně k rozrušení agregátu. Postupnou titrací pyridinem jsme zaznamenali nárůst absorpance v Q-pásu absorpčního spektra. V oblasti B-pásu nedocházelo k razantním změnám viz (Obr. 25).



Obr. 25 a) změna absorpčního spektra látky 6-Zn během titrace pyridinem (dimer, monomer); b) normalizovaný nárůst λ_{max} v Q-pásu látky 6-Zn

Stejným způsobem byly provedeny titrace pro zbylé látky z **8-Zn** až **16-Zn**. Během titrací jsem přišel na skutečnost, že při přidavcích pyridinu u bis(methoxyethyl)amino substituovaných látek docházelo k snadnějšímu rozrušení

dimerů. Z tohoto důvodu jsme prováděli titraci nižšími přídávky pyridinu. Na grafu na (Obr. 26) můžeme porovnat absorpci Q-pásu jednotlivých látek během titrace pyridinem. Nárůst absorpce je nepřímo úměrný stabilitě J-dimerů, což znamená, že nárůst absorbance při nižší koncentraci pyridinu indikuje menší stabilitu J-dimerů. Z těchto poznatků lze usoudit, že AzaPc s převažující periferní bis(methoxyethyl)amino substitucí tvoří slabší vazbu mezi dimery než AzaPc s diethylamino substitucí. Tento fenomén je s největší pravděpodobností způsoben větší objemností bis(methoxyethyl)aminové skupiny, která ztěžuje přiblížení periferního dusíku k centrálnímu zinečnatému kationtu, oproti diethylaminové skupině, která je menší.



Obr. 26 Znormalizovaná závislost λ_{max} pro Q-pás jednotlivých AzaPc. Označení převažující periferní substituce: bis(methoxyethyl)amin-▲ a diethylamin-●

6. Závěr

Cílem mé diplomové práce bylo nasyntetizovat AzaPc s modifikovaným periferním substituentem bis(hydroxyethyl)anilinem s přemostěním přes triazolový můstek. Látku jako takovou se nám podařilo získat pouze v omezeném množství z důvodu prvotních neúspěchů a při čištění. Z tohoto důvodu se nám nepodařilo nasyntetizovat dostatečné množství pro dříve zamýšlenou přípravu DNA sond. Látka jako taková ukazovala zajímavá spektra při spektrální analýze, kdy byla viditelná výrazná změna absorpce v oblasti Q-pásu absorpčního spektra, která vznikala vlivem agregace v prostředí nekoordinačního rozpouštědla. Látka byla titrována postupnými přídávky pyridinu až do fáze plateau, za vzniku ostrého vrcholu v oblasti Q-pásu spektra. Pro porovnání byly připraveny roztoky látek s podobnou alkylamino periferní substitucí, které jsme následně titrovali podle stejného schématu. Výsledky byly následně zaznamenány do grafu a porovnány. Z analýzy získaných dat můžeme usoudit, že AzaPc s periferní substitucí dialkylamino skupinou se v prostředí nekoordinačních rozpouštědel budou chovat podobně za vzniku J-dimerů, při čemž objemná periferní substituce snižuje stabilitu dimerů a přispívá k jejich snadnějšímu rozvolnění.

Tvorbu J-dimerů lze využít pro stabilnější tvorbu heterodimerů mezi fluoroforem a zhášedčem při přípravě DNA-sond. Výsledky mé diplomové práce budou přínosné pro navazující projekt zaměřující se na využití tohoto fenoménu.

7. Použitá literatura

1. ZIMCIK, P.; NOVAKOVA, V.; MILETIN, M.; KOPECKÝ, K. Azaphthalocyanines Containing Pyrazine Rings with Focus on the Alkylheteroatom, Aryl and Heteroaryl Substitution and Properties Important in Photodynamic Therapy. *Makroheterocycles*. 1, **2008**, Sv. 1, 21-29.
2. ZIMCIK, P. Azaftalocyaniny – od syntézy přes fotochemické a fotofyzikální vlastnosti k aplikacím. místo neznámé: *Chem. listy*, 2012.
3. KAMIL, K.; NOVAKOVA, V.; MILETIN, M.; KUCERA, R.; ZIMCIK, P. Synthesis of new azaphthalocyanine dark quencher and evaluation of its quenching efficiency with different fluorophores. *Tetrahedron*, **2011**, 67, 5956-5963.
4. AGOSTINIS, P.; BERG, K.; CENGEL, KA.; FOSTER, Photodynamic therapy of cancer: an update. *CA Cancer J. Clin.*, **2011**, 61(4), 250–281.
5. ALLISON, R. R.; MOGHISSI, K. Photodynamic Therapy (PDT): PDT Mechanisms. *Clin Endosc*. **2013**, 46 (1): 24-29 .
6. LAKOWICZ, J. R. *Principles of fluorescence spectroscopy*. 3rd Ed., Springer Science & Business Media, New York, **2006**. ISBN 978-0387-31278-1.
7. **COMPENDIUM OF CHEMICAL TERMINOLOGY** 2nd ed. (the "Gold Book") Online corrected version: **2006** "Intersystem crossing" DOI: 10.1351/goldbook.l03123. [staženo 6.5. 2019]
8. MURPHY, C.B.; ZHANG, Y.; TROXLER, T. Probing Förster and Dexter Energy-Transfer Mechanisms in Fluorescent Conjugated Polymer Chemosensors, *J. Phys. Chem. B*, **2004**, 108 (5), 1537-1543,
9. TYAGI, S.; KRAMER, FR. Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization. *Nat Biotechnol*, **1996**, 14 (3): 303–308.
10. MARMÉ, N.; KNEMEYER, JP. Sensitive bioanalysis—combining single-molecule spectroscopy with mono-labeled self-quenching probes. *Anal Bioanal Chem* **2007** 388: 1075–1085.
11. HOY, M.A. (2013) *Insect Molecular Genetics : An Introduction to Principles and Applications* 2nd ed., Elsevier Inc., **2003**. ISBN 978-0-12-357031-4. 307-372.
12. MERCK KGAA. Merck (Sigma-Aldrich). *Molecular Beacons*. <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biology/molecular-beacons.html>. [staženo 2.2. 2019]

- 13. MERCK KGAA.** Merck (Sigma-Aldrich). *Dual-labeled probes*. <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biology/dual-labeled-probes.html>. [staženo 8.2. 2019]
- 14. INTEGRATED DNA TECHNOLOGIES, INC.** *Better PCR probes: A second quencher lowers background, increasing signal detection*. <https://eu.idtdna.com/pages/education/decoded/article/modification-highlight-zen-internal-quencher>. [staženo 14.3. 2019]
- 15. LANG, K.; MOSINGER, J.; WAGNEROVA, D.M.** Photophysical properties of porphyrinoid sensitizers non-covalently bound to host molecules; models for photodynamic therapy. *Coord. Chem. Rev.*, **2004**, 248, 321-350.
- 16. NOVAKOVA, V.; ZIMCIK, P.; KOPECKY, K.** Self-Assembled Azaphthalocyanine Dimers with Higher Fluorescence and Singlet Oxygen Quantum Yields than the Corresponding Monomers. *Eur. J. Org. Chem.*, **2008**, 3260-3263.
- 17. HRABÁLEK, A.** *Laboratorní cvičení z organické chemie pro farmaceuty*. 1. vyd. Praha: Karolinum, **1999**. ISBN 978-80-7184-968-1.
- 18. SOLOMONS, T.W.G.; FRYHLE, C.B.** *Organic chemistry*, 10th ed., John Wiley and Sons inc., USA, **2011**. ISBN 978-0-470-55659-7.
- 19. McMURRY JOHN,** *Organic chemistry*, 8th ed., Brooks/Cole and Cengage Learning Company, **2012**. ISBN 978-0-8400-5453-1.
- 20. K. SONOGASHIRA, Y. TOHDA, N. HAGIHARA,** A convenient synthesis of acetylenes: catalytic substitutions of acetylenic hydrogen with bromoalkenes, iodoarenes and bromopyridines. *Tetrahedron Letters*, **1975**, 16, 4467-4470,
- 21. DONZELLO, MP.; ERCOLANI, C.; NOVAKOVA, V.; ZIMCIK, P.; STUZHIN, PA.** Tetrapyrazinoporphyrazines and Their Metal Derivatives. Part I: Synthesis and Basic Structural Information, *Coordination Chemistry Reviews*, **2016**, 309, 107-179.
- 22. HUANG, JH.; SUN YY.** Two-Stage Sensing Property via a Conjugated Donor-Acceptor-Donor Constitution: Application to the Visual Detection of Mercuric Ion, *J. Org. Chem.*, **2005**, 70(15), 5827-5832.
- 23. KOPECKY, K.; ZIMCIK, P.; NOVAKOVA, V.; MILETIN, M,** The synthesis and characterization of metal-free unsymmetrical azaphthalocyanines with hydroxy groups and their complex formation with pyridine, *Dyes and Pigments*, **2008**, 78, 231-238.

- 24. RIED, W.; TSIOTIS, G.** New fused nitrogen-rich heterocycles from 5,6-dichloropyrazine-2,3-dicarbonitrile, *Liebigs Ann. Chem.* **1988**, 1197-1199.
- 25. LI, Z.; YAZAKI, R.; OHSHIMA, T.** Chemo- and Regioselective Direct Functional Group Installation through Catalytic Hydroxy Group Selective Conjugate Addition of Amino Alcohols to α,β -Unsaturated Sulfonyl Compounds, *Org. Lett.*, **2016** 18(14), 3350-3353.
- 26. AMBLARD, F.; JONG, H.CH.; SCHINAZI, R.F.** Cu(I)-Catalyzed Huisgen Azide-Alkyne 1,3-Dipolar Cycloaddition Reaction in Nucleoside, Nucleotide, and Oligonucleotide Chemistry, *Chem. Rev.*, **2009**, 109 (9), 4207-4220.
- 27. EL-SAGHEER, A.H.; BROWN, T.** Click chemistry with DNA, *Chem. Soc. Rev.*, **2010**, 39 (4), 1388-1405.