

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



## DIPLOMOVÁ PRÁCE

Syntéza a hodnocení hořčnatých komplexů azaftalocyaninů  
jako potenciálních fluoroforů



Hradec Králové, 2012

Eva Švandrlíková

*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. Tato práce nebyla použita k získání jiného či stejného titulu.*

*Děkuji svému školiteli Doc. PharmDr. Petru Zimčikovi Ph.D. za poskytnutí cenných rad při zpracovávání diplomové práce a všem ostatním, kteří mi jakkoli pomohli, ať se jednalo o poskytnutí informací či o psychickou podporu.*

Univerzita Karlova v Praze  
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové  
Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv

Studentka: Eva Švandrlíková

Školitel: Doc. PharmDr. Petr Zimčík Ph.D.

Název diplomové práce: Syntéza a hodnocení hořečnatých komplexů azaftalocyaninů jako potenciálních fluoroforů

Azaftalocyaniny jsou makrocyclické sloučeniny, které mohou být bez centrálního atomu nebo s centrálním atomem kovu. Centrální atom může vybrán z velké řady kationtů a podle toho se pak také mění vlastnosti azaftalocyaninů. Má práce se zaměřila na hořečnaté komplexy z důvodu jejich výrazné fluorescence.

Do této doby se hořečnaté azaftalocyaniny připravovali pouze cyklizační reakcí pomocí butanolátu hořečnatého. Jelikož to není ve všech případech možné a v některých případech nevýhodné z hlediska složitosti čištění nesymetrických sloučenin, zkoumala jsem možnosti vkládání hořčíku do již připraveného azaftalocyaninového cyklu.

Ve své práci jsem zkoumala možnosti vkládání hořečnatého kationtu s různými druhy jeho solí, v různých rozpouštědlech, zkoumala jsem vliv přítomné vlhkosti v rozpouštědlech a solích, různé reakční teploty a také vlivy periferní substituce makrocycly. Jako optimální podmínky se nakonec ukázala reakce v pyridinu s octanem hořečnatým za teploty varu rozpouštědla. Vlhkost nehrála prakticky žádnou roli. Tímto způsobem lze prakticky univerzálně chelatovat hořečnatý kationt do centra bezkovových ftalocyaninů i azaftalocyaninů s různými periferními substitucemi.

Charles University in Prague  
Faculty of Pharmacy in Hradec Kralove  
Department of Pharmaceutical Chemistry and Drug Control

Student: Eva Švandrlíková

Supervisor: Doc. PharmDr. Petr Zimčík Ph.D.

Title of the diploma thesis: Synthesis of magnesium(II) azaphthalocyanines as potential fluorophores

Azaphthalocyanines are macrocyclic compounds, which can exist with or without central metal (i.e. metal-free). Central metal can be chosen from a wide range of cations leading to significant changes in photophysical and photochemical properties of the macrocycle. My work is focused on magnesium complexes because of their significant fluorescence.

Magnesium azaphthalocyanines are generally synthesized by cyclotetramerization reaction with magnesium butoxide. However, some azaphthalocyanines may contain labile peripheral substituents that may be cleaved in butoxides or in the case of unsymmetrical azaphthalocyanines the separation must be performed in a metal-free form. For these reasons, my work concerns with direct magnesium insertion into already prepared azaphthalocyanine macrocycle.

I investigated possibilities of direct magnesium insertion with different kinds of magnesium salts, in different solvents, under different dryness of solvent, different temperature and different peripheral substitution of the macrocycle. The optimal conditions involve reflux in pyridine with magnesium acetate. Moisture is not playing any important role. Under these conditions a number of differently substituted phthalocyanines and azaphthalocyanines can complex magnesium cations.

# Obsah

<b>1. Cíl práce.....</b>	<b>9</b>
<b>2. Teoretická část .....</b>	<b>10</b>
2.1. Charakteristika fluorescence .....	10
2.1.1. Intenzita fluorescence .....	11
2.1.2. Spektrální složení.....	12
2.1.3. Polarizace.....	13
2.1.4. Zhášení fluorescence.....	13
2.1.5. Stokesův posun .....	13
2.2. Typické fluorofory .....	15
2.3. Rozdělení fluoroforů .....	20
2.3.1. Vnitřní fluorofory .....	20
2.3.2. Vnější fluorofory.....	20
2.4. Fotostabilita fluoroforů .....	22
2.5. Fluorescence v červené oblasti.....	23
2.6. Využití fluorescence.....	25
2.6.1. Technické.....	25
2.6.2. Biologické.....	25
2.7. Nové fluorofory.....	26
2.7.1. Nanočásticové polovodičové fluorofory.....	26
2.7.2. Lanthanoidové fluorofory .....	26
2.7.3. Komplexy s kovovými ligandy s dlouhou dobou života .....	27
<b>3. Metodická část.....</b>	<b>28</b>
3.1. Metoda s využitím templátového efektu .....	28
3.2. Metoda využívající hořečnaté alkoholáty .....	32
3.3. Metoda využívající vkládání hořečnatých kationtů .....	34
3.4. Speciální metody .....	36
<b>4. Experimentální část .....</b>	<b>38</b>
4.1. Schéma prováděných reakcí.....	39
4.2. Optimalizace komplexace hořečnatých iontů azaftalocyaniny .....	40
4.2.1. Vkládání hořčíku za použití hořečnaté sloučeniny .....	40
4.2.2. Vliv vlhkosti na průběh reakce .....	41
4.2.3. Vliv druhu zvoleného rozpouštědla .....	42
4.2.4. Vliv teploty lázně.....	43

4.2.5.	Komplexace hořečnatých iontů dalšími AzaPc .....	44
	Syntéza 2,3,9,10,16,17,23,24-oktakis(diethylamino)-1,4,8,11,15,18,22,25-(oktaaza)ftalocyaninátu hořečnatého komplexu (ZIP14Mg) .....	44
	Syntéza 2,3,9,10,16,17,23,24-oktakis(butoxy)-1,4,8,11,15,18,22,25-(oktaaza)ftalocyaninátu hořečnatého komplexu (ZIP37Mg) .....	45
4.3.	Syntéza 2,3,9,10,16,17,23,24-oktakis(butoxy)-1,4,8,11,15,18,22,25-(oktaaza)ftalocyaninu(ZIP37H2) .....	46
4.4.	Syntéza 2,3,9,10,16,17,23,24-oktakis(butoxy)-1,4,8,11,15,18,22,25-(oktaaza)ftalocyaninátu hořečnatého komplexu (ZIP37Mg) přímou cyklizací .....	47
<b>5.</b>	<b>Diskuze</b> .....	<b>48</b>
<b>6.</b>	<b>Závěr</b> .....	<b>51</b>
<b>7.</b>	<b>Použitá literatura</b> .....	<b>52</b>

## SEZNAM ZKRATEK

AzaPc	azaftalocyaniny (z angl. „azaphthalocyanines“)
DAPI	4',6-diamidino-2-fenylindol
DBU	1,8-diazabicyklo[5.4.0]undec-7-en
DMAE	<i>N,N</i> -dimethylaminoethanol
DPH	1,6-difenyl-1,3,5-hexatrien
KFCHKL	Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv
p.a.	pro analýzu (označení čistoty látky)
R <sub>f</sub>	retenční faktor
THF	tetrahydrofuran
TLC	tenkovrstvá chromatografie (z angl. „thin-layer chromatography“)



# 1. Cíl práce

Náplní této diplomové práce byla syntéza hořečnatých komplexů azaftalocyaninů (AzaPc) metodou přímého vkládání hořčíku do již vzniklého cyklu.

Při standardních syntézách, zejména hořečnatých AzaPc, je problematické oddělování směsi jednotlivých AzaPc. Z tohoto důvodu jsem zkoumala metodu přímého vkládání hořčíku do AzaPc cyklu, jelikož separovatelnost bezkovových AzaPc je jednodušší a efektivnější.

Snažila jsem se tuto metodu dále optimalizovat zkoumáním vhodných podmínek a vlivů, které tuto reakci ovlivňují, aby tato metoda mohla být dále využívána.

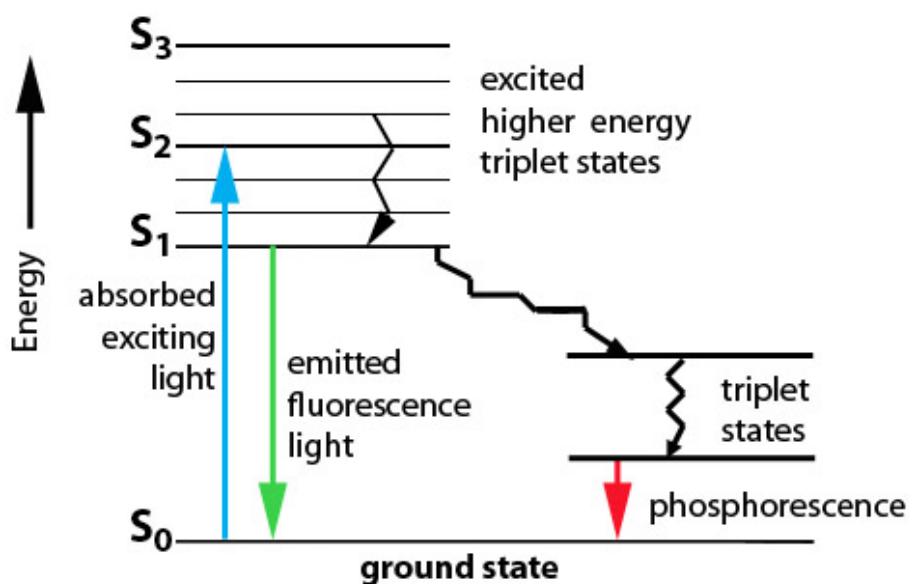
Vzhledem k tomu, že hořečnaté komplexy AzaPc se vyznačují velice silnou fluorescencí a jsou zkoumány jako potenciální fluorescenční značky, zabývala jsem se v teoretické části obecnou charakteristikou fluorescence, jejími vlastnostmi, zákonitostmi a vlivy ji ovlivňujícími. Dále jsem se zaměřila na charakteristické zástupce fluoroforů, jejich použití a zejména pak na fluorofory z dlouhovlnné červené oblasti.

## 2. Teoretická část

### 2.1. Charakteristika fluorescence

Fluorescenci řadíme mezi fyzikálně-chemické děje, které se svým charakterem spadají do luminiscence. Jedná se o sekundární záření vzniklé absorpcí částice, fotonu nebo elektronu, a následnou emisí záření za velmi krátký časový úsek řádově  $10^{-9}$  s až  $10^{-6}$  s přechodem z prvního singletového stavu  $S_1$  do základního hladiny  $S_0$ . Názorně tento jev popisuje Jablonského diagram (viz. **Obrázek 1**)<sup>1,2</sup>.

Fluorescence je popsána následujícími charakteristikami – intenzitou, spektrálním složením, polarizací, dobou dohasínání a koherenčními vlastnostmi<sup>2</sup>.



Obrázek 1 - Jablonského diagram (Převzato z lit.<sup>3</sup>)

### 2.1.1. Intenzita fluorescence

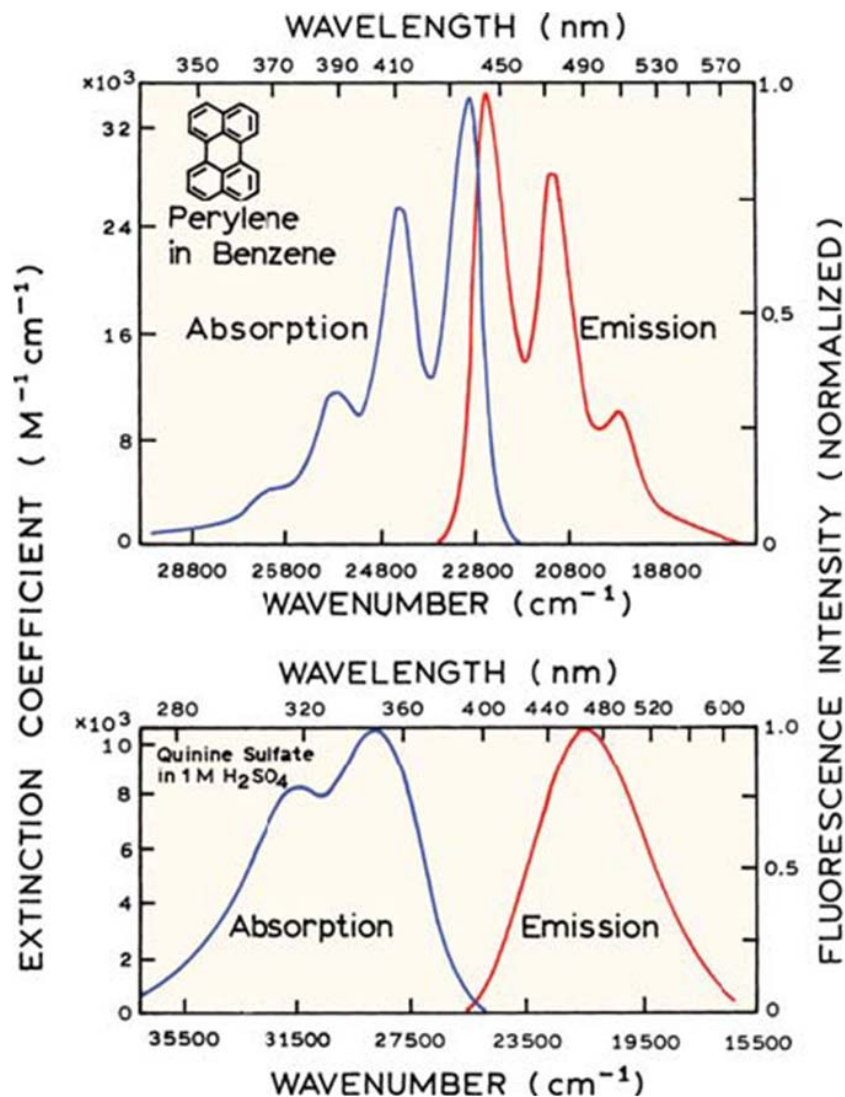
Intenzitu fluorescence charakterizujeme jako intenzitu absorpce při excitační vlnové délce násobenou kvantovým výtěžkem fluorescence ( $\Phi_F$ ). Kvantový výtěžek fluorescence je charakterizován jako počet fotonů emitovaných ku počtu fotonů absorbovaných (viz. **Rovnice 1**). Kvantový výtěžek fluorescence je u roztoků složitějších molekul většinou nezávislý na vlnové délce budícího záření. Excitační spektrum fluorescence u zředěných roztoků je přesnou replikou jejich absorpčního spektra a lze tak spektrofluorimetricky lépe získat absorpční spektrum fluoreskující látky při nižších koncentracích, než při přímém měření absorpce na spektrofotometru<sup>2</sup>.

$$\Phi_F = \frac{\text{počet emitovaných fotonů}}{\text{počet absorbovaných fotonů}}$$

**Rovnice 1 - Kvantový výtěžek fluorescence (Převzato z lit.<sup>2</sup>)**

Intenzita fluorescence je rovněž závislá na vlnové délce. Charakteristická spektra určují specifickou látku, jelikož pro každou látku je typické excitační a emisní spektrum. Příkladem může být **Obrázek 2**. Excitační spektrum vyjadřuje účinnost budícího záření produkovat fluorescenci v závislosti na vlnové délce budícího záření při měření stále stejné emisní vlnové délky fluorescence. Emisní spektrum vyjadřuje závislostní charakteristiku intenzity fluorescence na vlnové délce, přičemž vlnová délka excitace zůstává konstantní<sup>1,4</sup>.

Speciální jev nastává excitací veškeré absorbované energie. Tento jev se nazývá rezonanční fluorescence a nastává většinou jen u dvouatomových molekul v plynné fázi. U složitějších molekul, zvláště ve vodné fázi, může docházet k deaktivacím spojeným s vnitřní či vnější konverzí. Vnitřní konverze odpovídá přechodu energetických hladin, který je spojen se změnou vibračního stavu molekuly. Setkáváme se s tímto stavem zejména u alifatických molekul. Zřídka se tento typ konverze vyskytuje u cyklických molekul s pevnou strukturou. Vnější konverzi vyvolávají nejčastěji srážky excitovaných molekul s energeticky nabitými molekulami rozpouštědla<sup>1</sup>.



Obrázek 2 - Absorpční a emisní spektrum perylenu a chininu (Převzato z lit.<sup>4</sup>)

### 2.1.2. Spektrální složení

Spektrálním složením se zabývá několik zákonů, postulátů a pravidel. Nejznámějším je Stokesův zákon, Vavilovův zákon, Vavilovy postuláty a Kashovo pravidlo<sup>1,2</sup>.

Stokesův zákon nám říká, že vlnová délka emitujícího záření je větší nebo rovna vlnové délce excitujícího (budícího) záření ( $\lambda_{em} \geq \lambda_{ex}$ )<sup>2</sup>.

Vavilovův zákon poukazuje, že kvantový výtěžek fluorescence a časový úsek trvání excitace složitějších molekul v roztoku nezávisí na vlnové délce excitujícího (budícího) záření, tudíž ani emisní spektra na vlnové délce excitace nezávisí<sup>2</sup>.

Vavilovův postulát číslo 1 udává, že za splnění předpokladu Stokesova zákona, nedosáhne kvantový výtěžek fluorescence hodnoty vyšší než 1<sup>2</sup>.

Vavilovův postulát číslo 2 spočívá ve antistokesovském buzení, při kterém klesá energetický výtěžek fluorescence v závislosti na teplotě<sup>2</sup>.

Kashovo pravidlo říká, že před emisí kvanta fluorescenční energie dochází většinou k relaxaci vibrační energie a vnitřní konverzi, proto fluorescenční přechod nastává z nejnižší vibrační hladiny, to znamená z prvního excitovaného stavu  $S_1^2$ .

### 2.1.3. Polarizace

Mezi další charakteristiky fluorescence patří polarizace. Pokud je polarizovaným zářením excitován roztok fluoroforů budou excitovat pouze molekuly s nenulovým absorpčním přechodovým momentem. Průměrná rotačně-relaxační doba může být mnohem delší než doba dohasínání fluorescence, potom by výsledná fluorescence byla rovněž polarizována. Při opačném ději, kdy je rotačně-relaxační doba kratší než doba dohasínání fluorescence by tato hodnota mohla klesnout na limitní až nulovou. Při srovnatelné době dohasínání fluorescence bude tato polarizace korigována (řízena) molekulárním pohybem. Při měření polarizace fluorescence můžeme získat informace např. o fluiditě membrán, interakcích ligand-receptor, proteolýze, interakci proteinu a DNA, kontrakci svalů a aktivitě proteáz<sup>2</sup>.

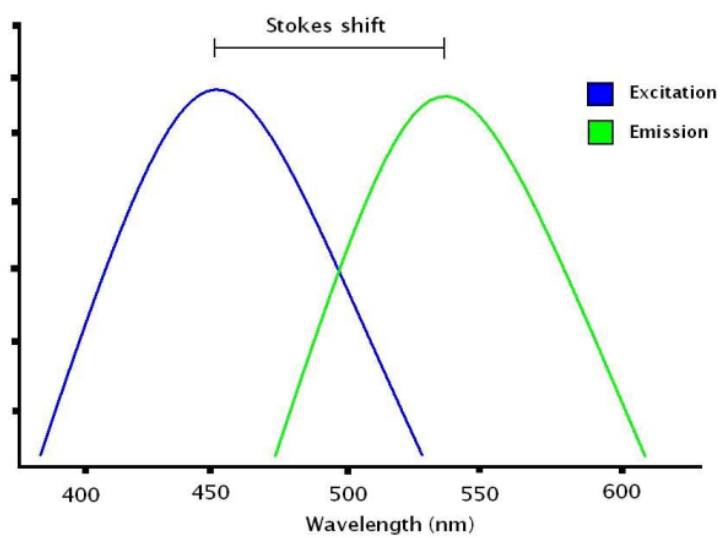
### 2.1.4. Zhášení fluorescence

Další jev, ne zpravidla nežádoucí, se označuje zhášení fluorescence. Definuje se jako bimolekulární proces snižující kvantový výtěžek fluorescence s nezměněným emisním spektrem. Nejčastěji nastává srážkové (dynamické) zhášení, přičemž je excitovaný fluorofor deaktivován srážkou s molekulou zhášeče, které nejsou nijak při tomto ději pozměněny. Při statickém zhášení po reakci fluoroforu a zhášeče vznikne nefluorescenční komplex. Samozhášení je vyvoláno fluoroforem samotným, jeho vysokou koncentrací či při vysoké hustotě značení (např. proteinů)<sup>2</sup>.

### 2.1.5. Stokesův posun

Zákon zrcadlové symetrie absorpčního a fluorescenčního pásu je pozorován u organických molekul, u kterých absorpce a emise vycházející z vibračního stavu molekuly mají stejnou relativní pravděpodobnost. Absorbující a emitující molekuly se vyskytují v klidovém vibračním stavu a zároveň struktura základního a excitovaného stavu se nijak neliší. Z této úvahy vyplývá posun mezi absorpčním a emisním pásem, který se nazývá Stokesův posun (viz. **Obrázek 3**). Odchytky od Stokesova posunu mohou být způsobeny odlišnostmi v uspořádání atomových jader v základním a excitovaném stavu<sup>2</sup>.

### Excitation, Emission and Stokes shift



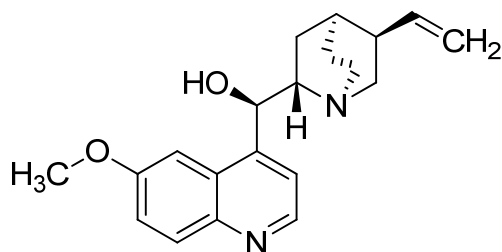
Obrázek 3 - Stokesův posun (Převzato z lit.<sup>5</sup>)

## 2.2. Typické fluorofory

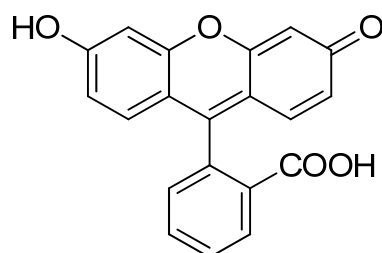
Fluorescence je typická vlastnost některých organických aromatických molekul, fluoreskují však i některé anorganické látky např. fluorit neboli kazivec, chemickým vzorcem  $\text{Ca}_2\text{F}$ , podle kterého byla tato zářivost nazvána fluorescencí<sup>1</sup>.

Typickými fluorofory jsou např.<sup>1,4</sup>:

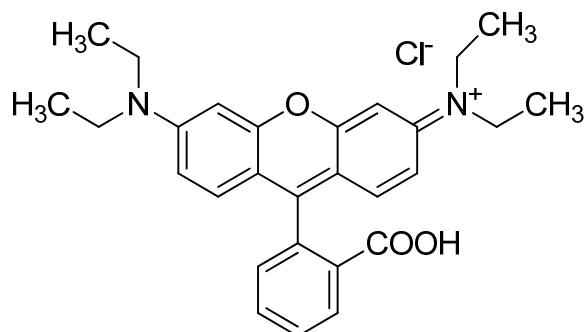
- **Chinin**



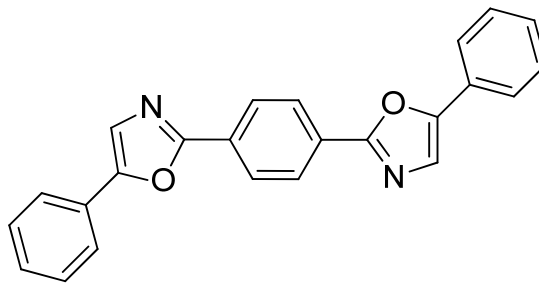
- **Fluorescein**



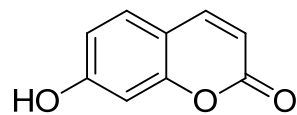
- **Rhodamin B**



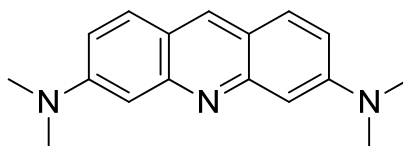
- **POPOP** u scintilátorů – chemicky 1,4-bis(5-fenyloxazol-2-yl)benzen



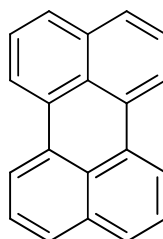
- **Umbeliferon** (chemicky 7-hydroxykumarin)



- **Akridinová oranž**

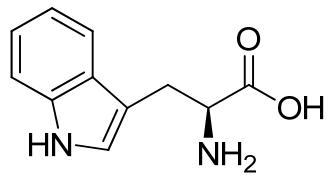


- **Perylen**

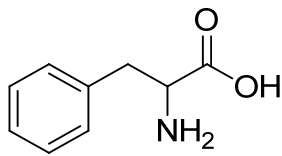




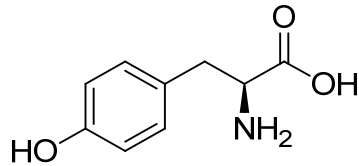
- **Tryptofan**



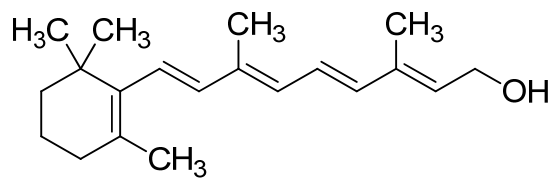
- **Fenylalanin**



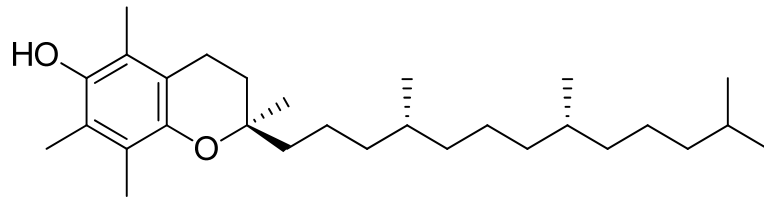
- **Tyrosin**



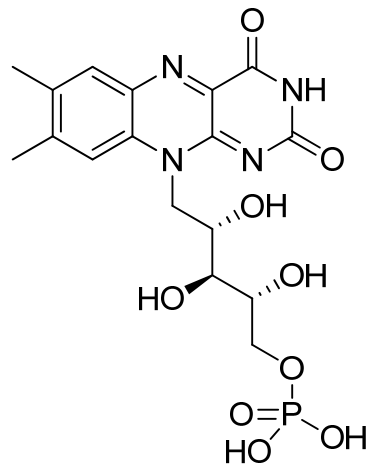
- **Vitamin A**



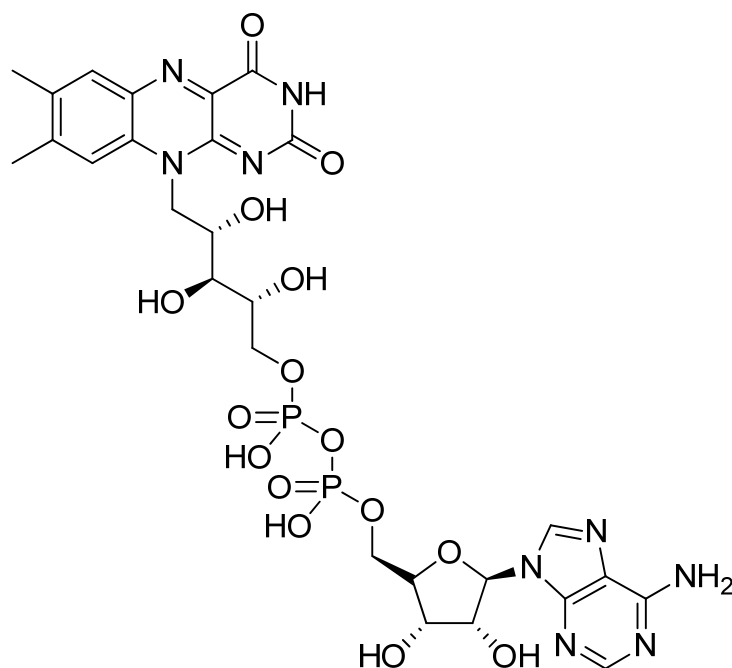
- **Vitamin E**



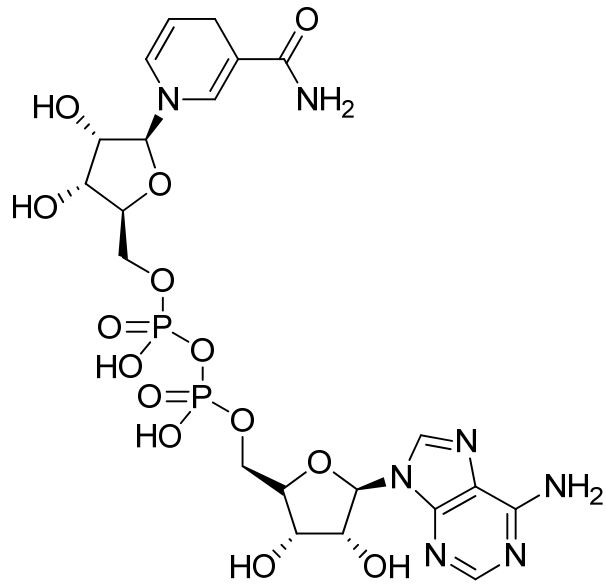
- **Flavin mononukleotid**



- **Flavin adenin dinukleotid**



- **Redukovaná forma nikotin adenin dinukleotidu**



## 2.3. Rozdělení fluoroforů

### 2.3.1. Vnitřní fluorofory

Jako vnitřní charakterizujeme fluorofory pocházející z buněk, vlastních látek vnitřního prostředí. Řadíme sem například proteiny, redukované koenzymy, vitamíny, cytochromy, peroxidázy, hemoglobin, myoglobin a chlorofyl. Proteiny, zejména aromatické aminokyseliny, fluoreskují v UV oblasti světla v rozmezí 240-300 nm. Další uvedené látky fluoreskují ve viditelné oblasti, proto jejich fluorescenci vnímáme jako barevnou<sup>1</sup>.

### 2.3.2. Vnější fluorofory

Vnější fluorofory jsou látky většinou nebiogenní povahy. Zpravidla bývají přidávány ke studovanému vzorku a dělí se na fluorescenční značky a fluorescenční sondy. Podle změn kvantového výtěžku fluorescence se vnější fluorofory dělí na látky, u nichž se fluorescence nemění po přidání ke vzorku, a na fluorofory závislé na okolním prostředí. Mezi fluorofory nezávislé na okolním prostředí patří např. fluorescein či akridinová oranž, naopak látky závislé na okolí zahrnují např. 1,6-difenyl-1,3,5-hexatrien, zkráceně DPH, používaný jako membránová sonda<sup>1</sup>.

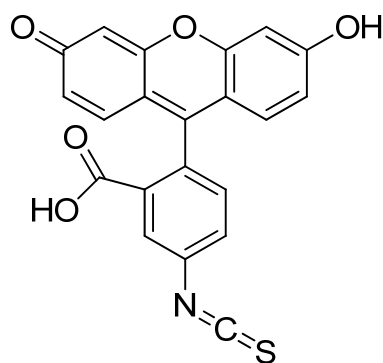
#### 2.3.2.1. Fluorescenční značky

Fluorescenční značky se nejčastěji používají k fluorescenčnímu značení proteinů, ke kterým se vážou kovalentní vazbou. Může být rovněž využívána vazba biotinu s fluorescenčně značeným avidinem. Nejvýznamnějšími zástupci jsou FITC chemickým složením fluorescein-5-isothiokyanát (viz. **Obrázek 4**) a TRITC chemickým složením tetramethylrhodamin-5-isothiokyanát (viz. **Obrázek 5**). FITC je barvivo s absorpčním maximem při 495 nm a maximální fluorescencí při 519 nm. Nevýhodou těchto látek je citlivost na hodnotu pH a jejich snadná fotodestrukce. Z těchto důvodů byla objevena skupina difluoroderivátů, jež jsou stabilnější vůči vlivu pH i fotodestrukci<sup>1</sup>.

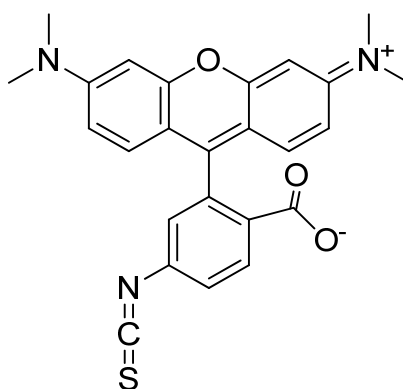
Nové fluorescenční značky nazývané BODIPY obsahují atomy bóru. Jejich kvantový výtěžek fluorescence je vysoký s celkem širokým emisním spektrem (od 510 do 675 nm) a jsou nezávislé na okolním vlivu pH. Píky emisních spekter jsou úzké, aby bylo více světla vyzařováno v emisním maximu. Nevýhodou těchto látek je velmi malý Stokesův posun<sup>4</sup>.

Dnes jsou vyvíjena nová barviva, která vykazují jak velký Stokesův posun tak zároveň dobrou rozpustnost ve vodě. Takovým barvivem je například Kaskádová žluť (viz. **Obrázek 6**), obchodním názvem Cascade Yellow<sup>TM</sup>, mající excitační a emisní

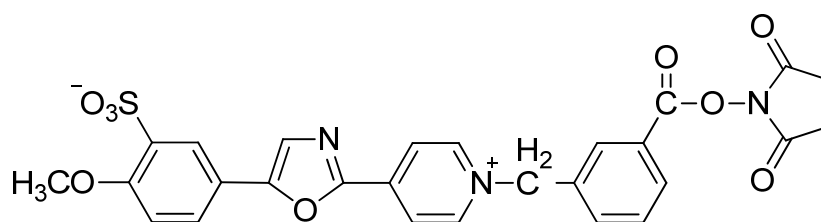
maxima při 409 a 558 nm. Velký Stokesův posun přitom minimalizuje tendenci homotransferu a náboje na aromatických kruzích zvyšují rozpustnost ve vodě<sup>4</sup>.



Obrázek 4 - FITC



Obrázek 5 - TRITC



Obrázek 6 - Kaskádová žlutá (sukcinimidyl ester)

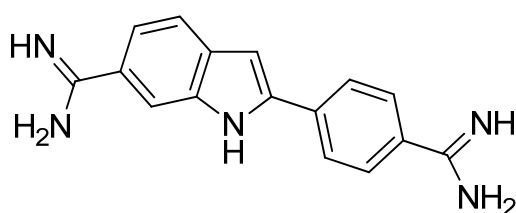
### 2.3.2.2. *Fluorescenční sondy*

Fluorofory vážící se k látce nekovalentní vazbou, přičemž se mohou měnit její fluorescenční vlastnosti, se nazývají fluorescenční sondy. Studují se s nimi změny konformace bílkovin, průměr membrán, intenzita membránového potenciálu atd. Fluorescenční sondy se především používají ke značení DNA jakožto vizualizaci a identifikaci. Typicky používanými barvivy jsou naftylaminy sulfonových kyselin,

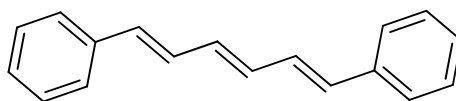
z nichž jsou nejpoužívanější 1-anilinonaftalen-6-sulfonová (ANS) a 2-(*p*-toluidinyl)naftalen-6-sulfonová (TNS) kyselina. Barviva této třídy jen slabě fluoreskují ve vodě nebo nefluoreskují vůbec, až při silné vazbě na proteiny a membrány se objeví silná fluorescence<sup>1,4</sup>.

Další skupinou jsou akridinová oranž, ethidium bromid a DAPI, chemicky 4',6-diamidino-2-fenylindol (viz. **Obrázek 7**), s absorpčním maximem při 345 nm a maximální fluorescencí při 455 nm<sup>1</sup>.

Speciální skupinou fluorescenčních sond jsou sondy membránové. Označování je dosaženo rozptýlením ve vodě nerozpustných sond do nepolárních částí membrány. Nejčastěji používaným je 1,6-difenyl-1,3,5-hexatrien (DPH) zmíněný již výše (viz. **Obrázek 8**)<sup>4</sup>.



**Obrázek 7 - DAPI**



**Obrázek 8 - DPH**

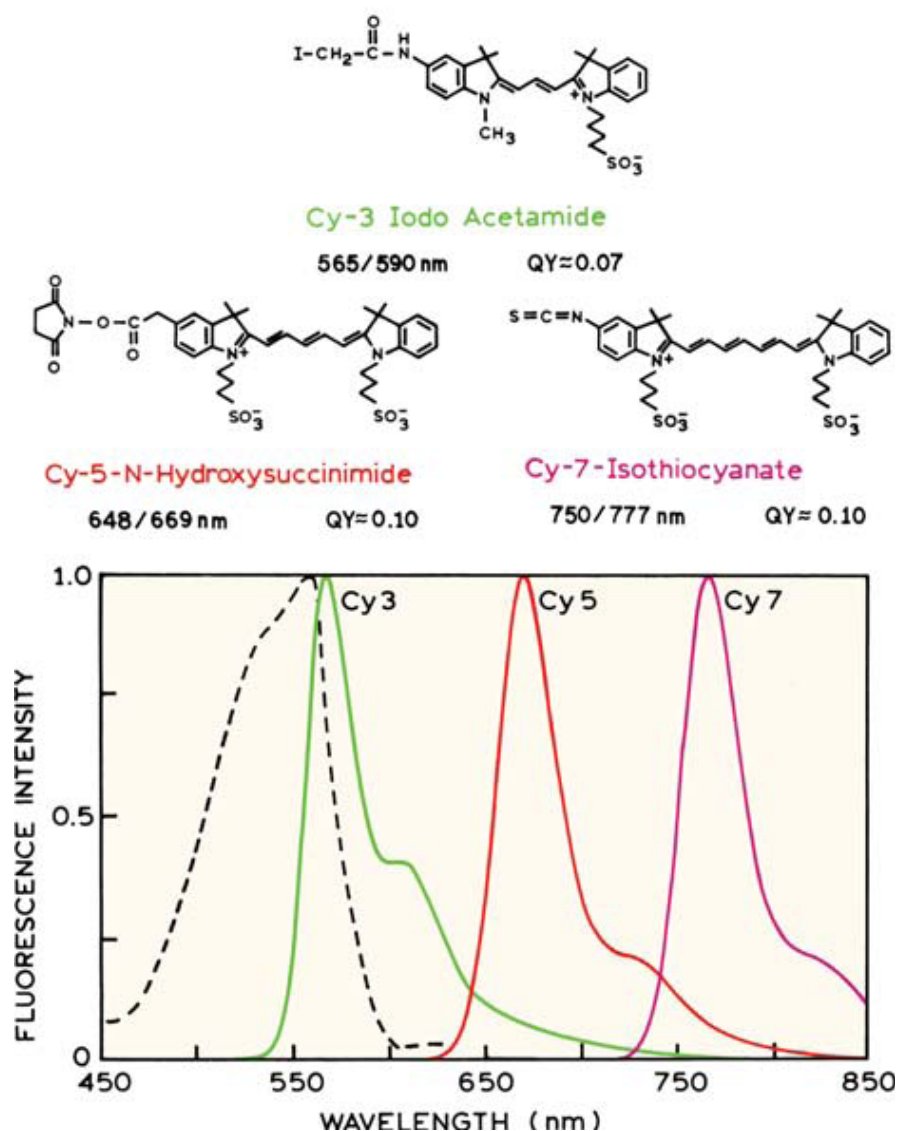
## 2.4. Fotostabilita fluoroforů

Jedna z nejdůležitějších vlastností sond je jejich fotostabilita. Skoro všechny fluorofory při neustálém osvětlení ztrácejí své fluorescenční vlastnosti (rozpad molekuly na menší části, oxidace částí molekuly apod.). Tento jev se vyskytuje především u fluorescenční mikroskopie, kde se setkáváme s vysokou intenzitou excitujícího záření. Fluorescein patří k nejméně fotostabilním, naopak barviva charakteru Alexa Fluor<sup>®</sup> patří mezi fotostabilní barviva. Emisní spektrum Alexa Fluor<sup>®</sup> barviv se pohybuje od 442 do 775 nm. Fotostabilita barviv může být ovlivněna okolním prostředím, v některých případech se zvyšuje při odstranění kyslíku či naopak nemá odstranění kyslíku žádný vliv. Neexistují tedy žádné všeobecné zásady pro předpověď fotostability<sup>4</sup>.

## 2.5. Fluorescence v červené oblasti

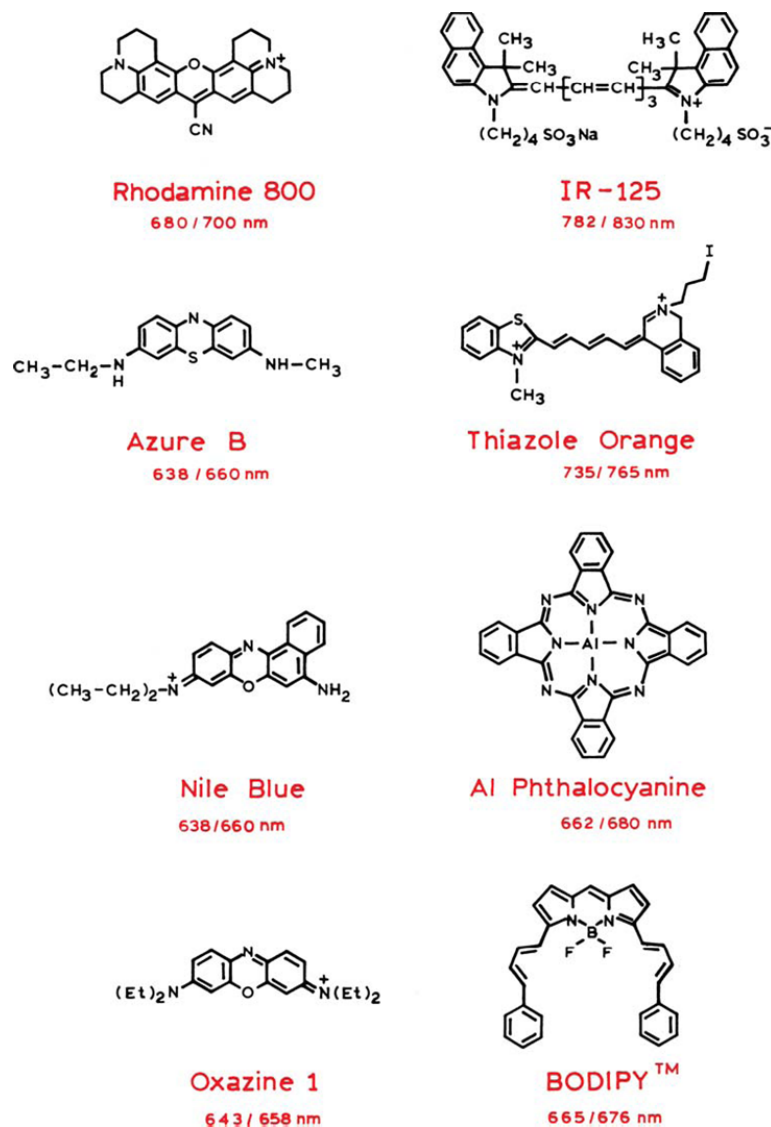
Dlouhovlnné sondy probouzejí zájem z několika důvodů. Citlivost detekce fluorescence bývá u nižších vlnových délek snížena autofluorescencí biologických vzorků. Jak se vlnová délka detekce prodlužuje, autofluorescence se snižuje, a tak se citlivost stanovení zvyšuje. Také průnik světla hlouběji do tkání závisí na vlnové délce – prohlubuje se s prodlužující se vlnovou délkou. Rozptyl světla je také nižší při použití světla delších vlnových délek. Barviva s dlouhou vlnovou délkou mohou být navíc excitována laserovými diodami<sup>4</sup>.

Jednou z nejvýznamnější skupiny fluoroforů emitujících v červené oblasti jsou cyaninová barviva. Cyaninová barviva se dříve využívala jako sondy membránového potenciálu a postupem času se z nich vyvinuly nejčastěji používaná dlouhovlnná barviva. Nejznámější barviva jsou Cy-3, Cy-5 a Cy-7 (viz. **Obrázek 9**). Tato barviva mají absorpční a emisní vlnové délky nad 550 nm<sup>4</sup>.



Obrázek 9 - Cy-3, Cy-5, Cy-7, excitační/emisní vlnové délky, kvantový výtěžek fluorescence, graf emisních spekter (Převzato z lit.<sup>4</sup>)

Máme k dispozici širokou škálu konjugovaných cyaninových barviv. Postranní řetězce bývají nabité, což přispívá k lepší rozpustnosti ve vodě nebo k prevenci agregace, která je příčinou samozhášení těchto barviv. Příklady některých dalších dlouhovlnných barviv mimo ta cyaninová jsou na obrázku níže (viz. **Obrázek 10**)<sup>4</sup>.



**Obrázek 10 - Dlouhovlnná barviva s excitační/emisní vlnovou délkou (Převzato z lit.<sup>4</sup>)**

Některé deriváty rhodaminu ukazují dlouhovlnnou absorpci a emisi, příkladem může být rhodamine 800. Oxazinová barviva mají překvapivě absorpční a emisní maxima posunuta výrazně k červené oblasti, i přes jejich malé velikosti<sup>4</sup>.

Na druhou stranu, výsledkem rozsáhlých konjugovaných systémů jsou absorpční a emisní vlnové délky v červené oblasti (např. u IR-125 a thiazolové oranže). Barviva s konjugovanými systémy dvojných vazeb jsou typická pro použití dlouhovlnných sond a DNA sekvenování. Thiazolová oranž může být excitována při 735 nm a na DNA se váže silnou vazbou. Thiazolová barviva se používají pro barvení DNA fragmentů během kapilární elektroforézy<sup>4</sup>.



Další třídou barviv s dlouhou vlnovou délkou excitace a emise jsou ftalocyaniny a naftalocyaniny. V současnosti se tato barviva používají jen omezeně v biochemii z důvodu nedostatečné rozpustnosti ve vodě a tendenci k agregaci. Z tohoto důvodu je důležité pracovat na zlepšení ftalocyaninů a objevovat další barviva s absorpcí a emisí v červené a blízké infračervené oblasti<sup>4</sup>.

## 2.6. Využití fluorescence

Fluorescenční vlastnosti se využívají velice široce v několika odvětvích. Základními dvěma jsou níže uvedené technické a biologické.

### 2.6.1. Technické

Na podkladě fluorescence pracují některé typy přístrojů využívaných v laboratorních podmínkách. Do této skupiny řadíme například:

- **Fluorescenční mikroskopy**

Umožňují pozorovat fluorescenci dvojrozměrných nebo trojrozměrných mikroskopických objektů. Fluorescenční mikroskopie nachází široké uplatnění zejména v medicíně a v oblasti přírodních věd<sup>2</sup>.

- **Spektrofluorimetry**

Umožňují měřit střední signál celého vzorku umístěného v kyvetě nebo v jamce mikrodestičky<sup>2</sup>.

- **Průtokové cytometry**

Umožňují měřit fluorescenci velkého množství jednotlivých buněk, identifikaci a separaci jejich subpopulací<sup>2</sup>.

- **Fluorescenční skenery**

Umožňují měřit fluorescenci dvojrozměrných makroskopických objektů jako jsou elektroforetické gely, bloty či chromatogramy<sup>2</sup>.

### 2.6.2. Biologické

Biologická odvětví využívají podstatu fluorescence pro objasnění a charakteristiku dějů či změn v biologickém materiálu například:

- **Membránové sondy**

Využívají se pro vazbu na membránu a jejich emise probíhá v membránovém prostředí<sup>4</sup>.

- **Značení DNA**

Z důvodu slabé vlastní emise DNA se používají sondy, které se na DNA samovolně váží a zvýší tím svoji emisi<sup>4</sup>.

- **Studium membránového potenciálu**

Existují membránové sondy citlivé na elektrický potenciál v membráně. Barviva tak reagují na potenciál rozštěpením nebo agregací v membráně či reagují přímo na elektrické pole membrány<sup>4</sup>.

- **Označování protilátek**

Běžně se k tomuto účelu používá fluoresceinem a rhodaminem značených imunoglobulinů, které jsou komerčně dostupné. Tyto proteiny jsou hojně využívány ve fluorescenční mikroskopii a imunologii<sup>4</sup>.

## **2.7. Nové fluorofory**

### **2.7.1. Nanočásticové polovodičové fluorofory**

U nanočásticových fluoroforů se nejčastěji používá jako hlavní složka selenid kadmnatý (CdSe). Dále mohou být použity sulfid kadmnatý (CdS), fosfid inditý (InP) či arsenid inditý (InAs). Průměry těchto nanočástic by měly být od 3 do 6 nm, přičemž vykazují intenzivní fluorescenci. U CdSe se jedná o nanočástici typu jádro-obal, kde jádro se skládá z CdSe, které je obaleno ZnS. Změna velikosti nebo chemického složení umožňuje měnit emisní vlnové délky. Částice PbSe umožňují rozšířit rozsah emisních vlnových délek až k 4  $\mu\text{m}$ <sup>4</sup>.

### **2.7.2. Lanthanoidové fluorofory**

Speciální fluorescenčními sondami jsou lanthanoidy europia ( $\text{Eu}^{3+}$ ) a terbia ( $\text{Tb}^{3+}$ ). Oproti všem dosud popsaným fluoroforům, lanthanoidy ukazují spektra jednotlivých atomů. Emise  $\text{Eu}^{3+}$  a  $\text{Tb}^{3+}$  vycházejí z přechodů f orbitalů, proto jsou doby života fluorescence řádově v milisekundách. Změny spektra lanthanoidů nejsou závislé na polaritě a nejsou zhaseny kyslíkem. Lanthanoidové sondy mohou být citlivé na okolní prostředí, přesto se liší od klasických fluoroforů. Doba rozpadu lanthanoidů je závislá na počtu koordinačně vázaných molekul vody. Lanthanoidy se mohou vázat na proteiny v místě vápníku a jejich životnost může být použita k určení hydratace proteinově vázaných iontů<sup>4</sup>.

Excitace lanthanoidů není většinou přímá, ale ionty jsou nejprve navázány na chelátory, které obsahují fluorofor. Excitační energie pak může být převáděna na lanthanoidy, avšak tato energie musí být optimální k lanthanoidovému vybuzení.

Chelátorovým úkolem je jednak zvyšování kvantového výtěžku fluorescence přemísťováním molekul vody, čímž se snižuje zhášení, jednak nabízí možnost navázání lanthanoidu na jiné molekuly<sup>4</sup>.

### **2.7.3. Komplexy s kovovými ligandy s dlouhou dobou života**

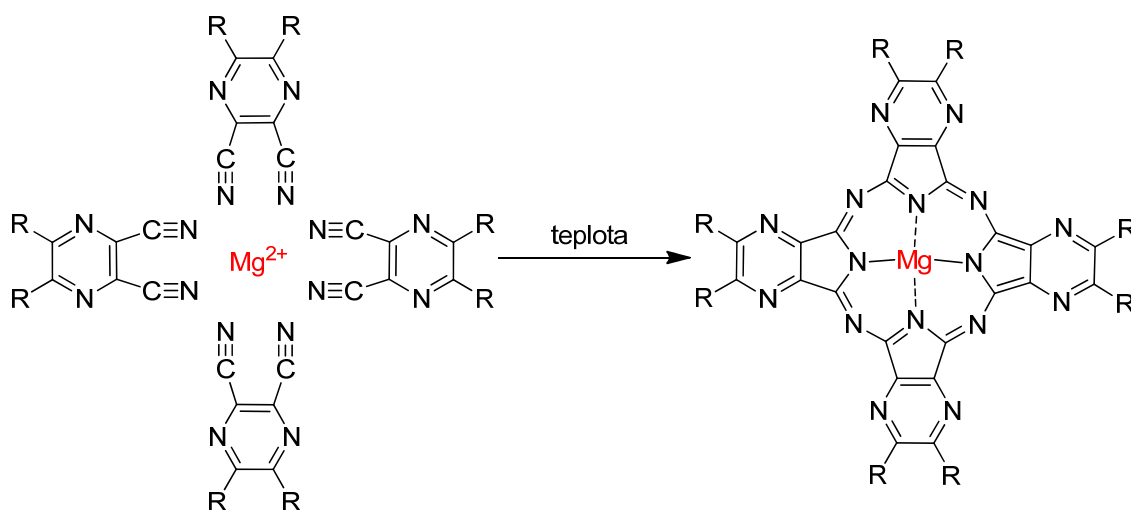
Složení těchto komplexů je  $[\text{Ru}(2,2'\text{-bipyridin})_3]^{2+}$ . Tyto sloučeniny byly připraveny k přeměně sluneční energie a dále se používají při studiu excitovaného stavu při přenosu energie. Při absorpci světelné energie se jeden ligand redukuje a ruthenium oxiduje. Centrálními atomy kromě ruthenia (Ru) mohou být dále typické kovy rhenium (Re), osmium (Os) a iridium (Ir)<sup>4</sup>.

### 3. Metodická část

V této části diplomové práce se zabývám dosud známými a používanými metodami syntézy hořečnatých ftalocyaninů a azaftalocyaninů. Zaměřuji se pouze na syntézu a nezohledňuji postupy dalšího zpracování či čištění látek.

#### 3.1. Metoda s využitím templátového efektu

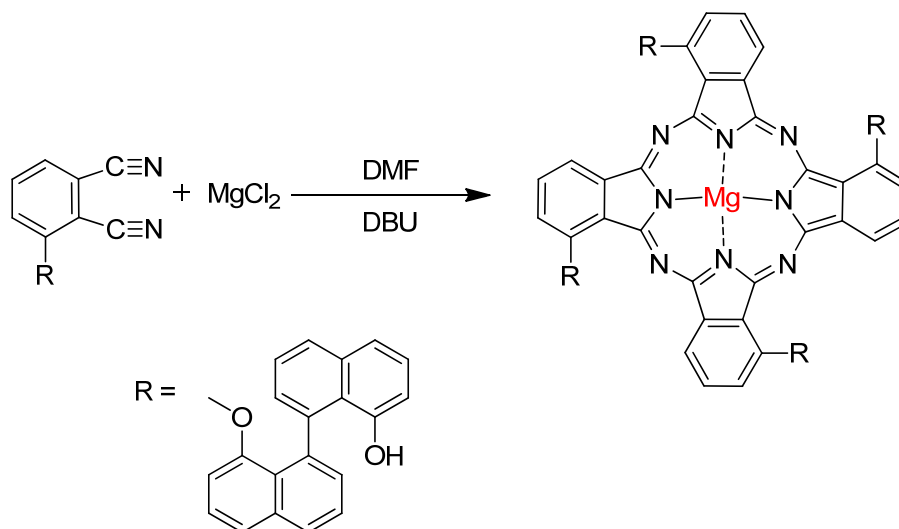
V této metodě se využívá vlastnosti kladně nabitého kovového iontu, v tomto případě hořečnatého kationtu, seskupovat okolo sebe prekurzory v počtu čtyř. Tento jev se nazývá templátový efekt. Zahřátím této směsi na vyšší teplotu se dosáhne vzniku ftalocyaninového nebo AzaPc cyklu (viz. **Obrázek 11**). Donorem hořečnatého kationtu může být chlorid hořečnatý, octan hořečnatý či práškový hořčík převedený na hořečnaté kationty<sup>6</sup>. Specifická využití této metody jsou uvedena v podkapitolách.



Obrázek 11 - Obecné schéma templátového efektu (Převzato z lit.<sup>6</sup>)

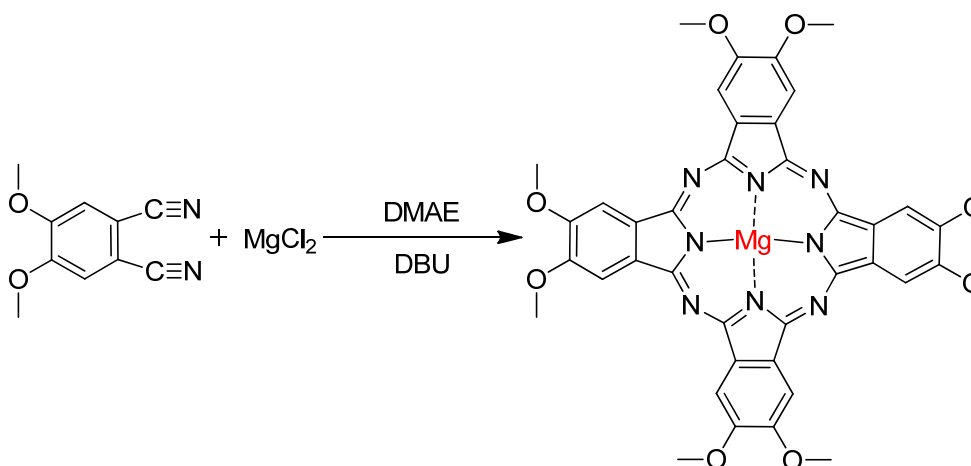
### Metoda využívající chlorid hořečnatý

Tato metoda využívá prekursoru pro AzaPc cyklus a chlorid hořečnatý rozpuštěné v suchém dimethylformamidu (DMF). Směs je zahřívána po dobu 18 hodin při teplotě varu DMF pod atmosférou dusíku a v přítomnosti 1,8-diazabicyklo[5.4.0]undec-7-en (DBU) (viz. **Obrázek 12**)<sup>7</sup>.



Obrázek 12 - Reakce s chloridem hořečnatým (Převzato z lit.<sup>7</sup>)

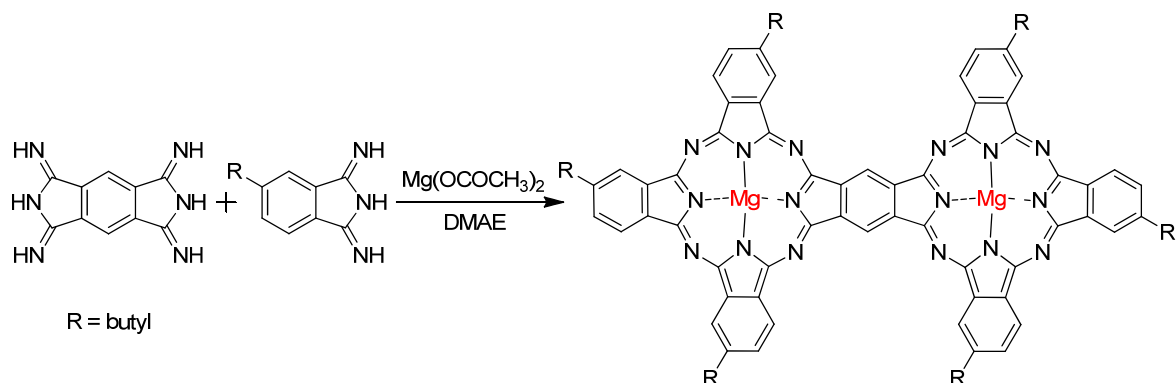
Další možností je rozpuštění prekursoru v *N,N*-dimethylaminoethanolu (DMAE) a přidání bezvodého chloridu hořečnatého. Reakce probíhá v prostředí DBU a atmosféře dusíku (viz. **Obrázek 13**). Směs je promíchána a ozařována v mikrovlnné troubě při výkonu 370 W po dobu 10 minut. Výtěžek reakce dosahoval 89%<sup>8</sup>.



Obrázek 13 - Reakce s chloridem hořečnatým (Převzato z lit.<sup>8</sup>)

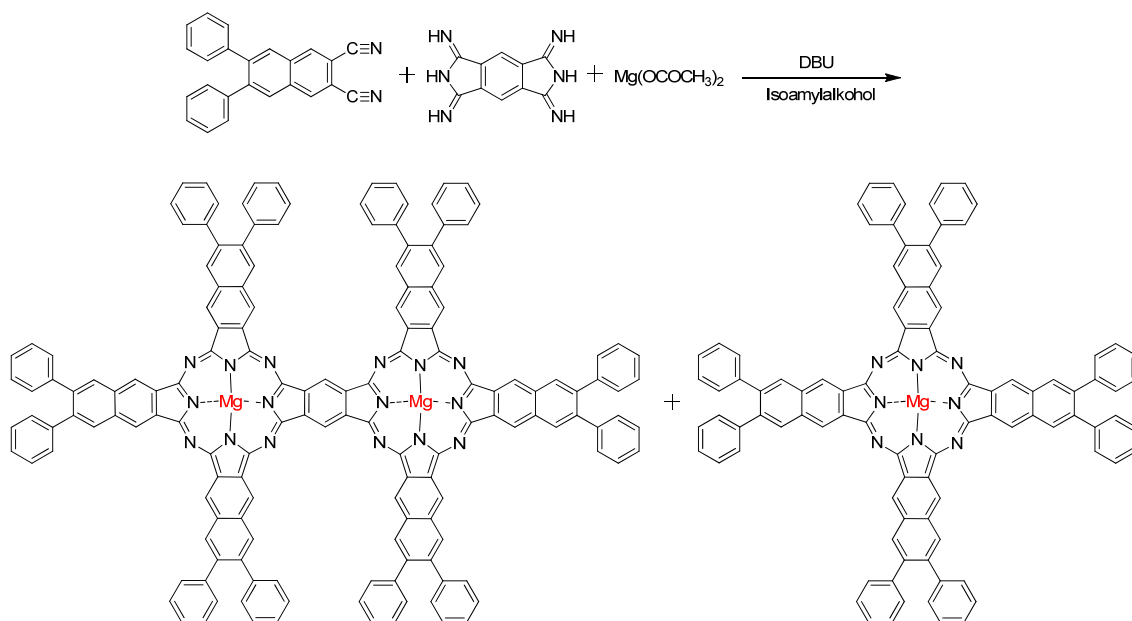
## Metoda využívající octan hořečnatý

U jedné z metod se prekurzory rozpustí v DMAE a přidá se octan hořečnatý tetrahydrát. Směs se zpočátku míchá 15 minut při pokojové teplotě a potom se zahřívá při teplotě varu DMAE po dobu 4 hodin (viz. **Obrázek 14**). Směs prekurzorů a octanu hořečnatého tetrahydrátu je zvolena v poměru 4 : 1<sup>9</sup>.



**Obrázek 14 - Reakce s octanem hořečnatým (Převzato z lit.<sup>9</sup>)**

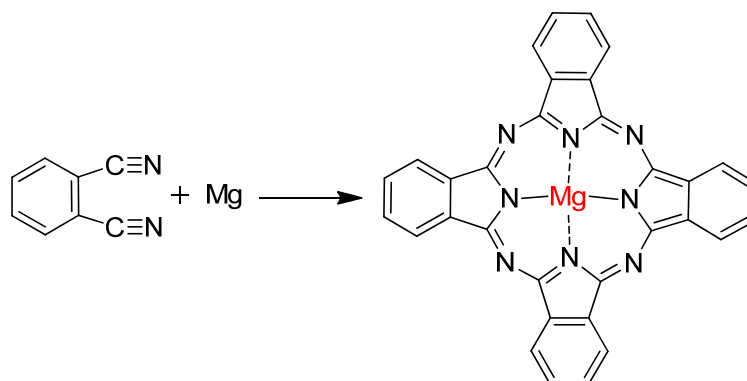
Další z metod využívající octan hořečnatý je založená na stejném principu. Smísí se dva různé prekurzory a octan hořečnatý tetrahydrát v isoamylalkoholu, při jehož teplotě varu se nechá 12 hodin reagovat v prostředí DBU (viz. **Obrázek 15**). Poměr prekurzorů a octanu hořečnatého tetrahydrátu je 5 : 1<sup>10</sup>.



**Obrázek 15 - Reakce s octanem hořečnatým (Převzato z lit.<sup>10</sup>)**

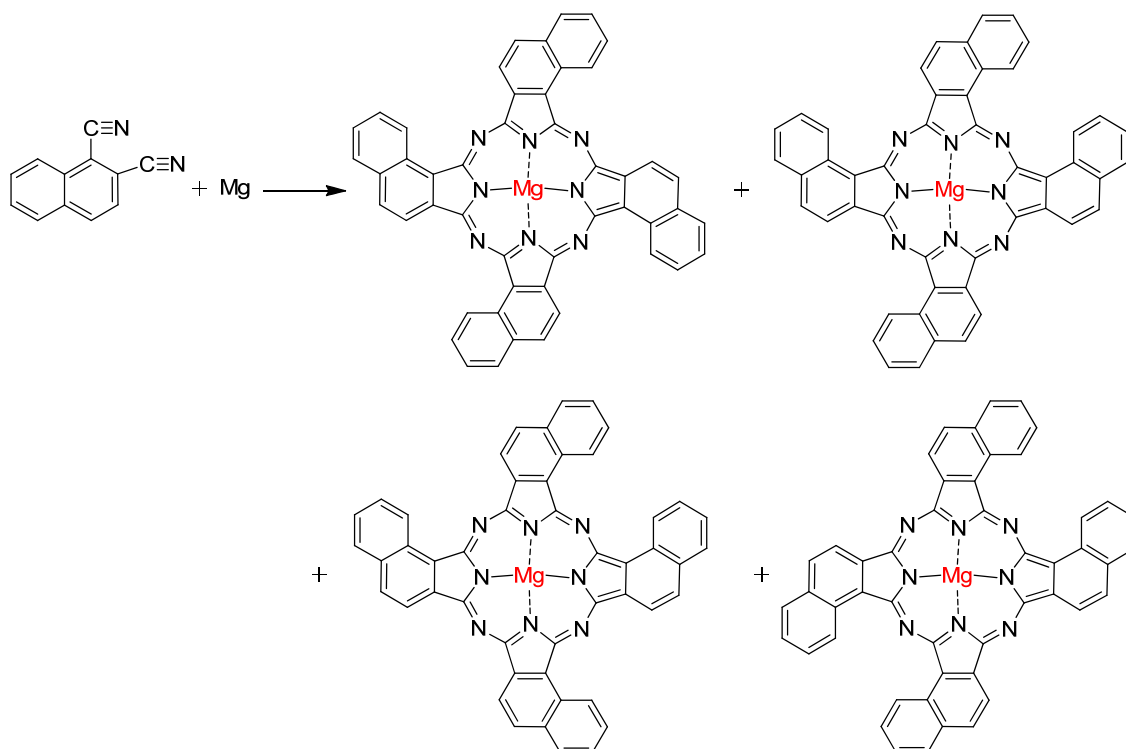
## Metoda využívající kovový hořčík

U této metody se do reakce přidává prekurzor a hořčík v práškovém stavu. Obě tyto látky v molárním poměru 4 : 1 se smísí a stlačí do pelet. Tyto pelety se umístí do evakuovaných baněk a jsou zahřívány při teplotě 270 °C po dobu 24 hodin, čímž se aktivuje katalyzovaná tetramerizace (viz. **Obrázek 16**)<sup>11</sup>.



Obrázek 16 - Reakce s práškovým hořčíkem (Převzato z lit.<sup>11</sup>)

Obdoba metody využívá prekurzoru a kovového hořčíku v atmosféře dusíku, přičemž zahřívání probíhá 2 hodiny při teplotě 375 °C. Reakční směs je poté zchlazena na pokojovou teplotu a zbavena zbytků nezreagovaného prekurzoru. Následně je směs opět zahřívána na teplotu 200 °C po dobu 1 hodiny (viz. **Obrázek 17**)<sup>12</sup>.

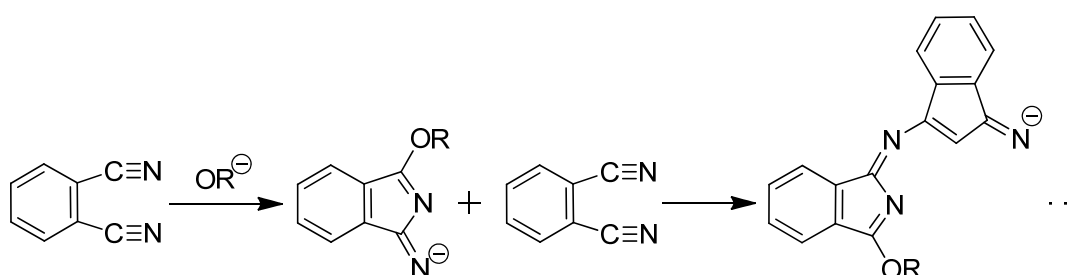


Obrázek 17 - Reakce s kovovým hořčíkem (Převzato z lit.<sup>12</sup>)

### 3.2. Metoda využívající hořčnaté alkoholáty

V této metodě dochází k reakci prekursoru (ftalonitrilu) s alkoholátem. V důsledku tohoto jevu dochází k nukleofilnímu ataku alkoholátu na nitrilovou skupinu, což vede ke vzniku reaktivního isoindolinu. Tento isoindolin je schopen napadnout další ftalonitril za vzniku dimeru, který může dále reagovat s dalším ftalonitrilem za vzniku trimeru a tak dále do vzniku tetrameru. Také dimery jsou schopné samostatně kondenzovat (viz. **Obrázek 18**)<sup>6</sup>.

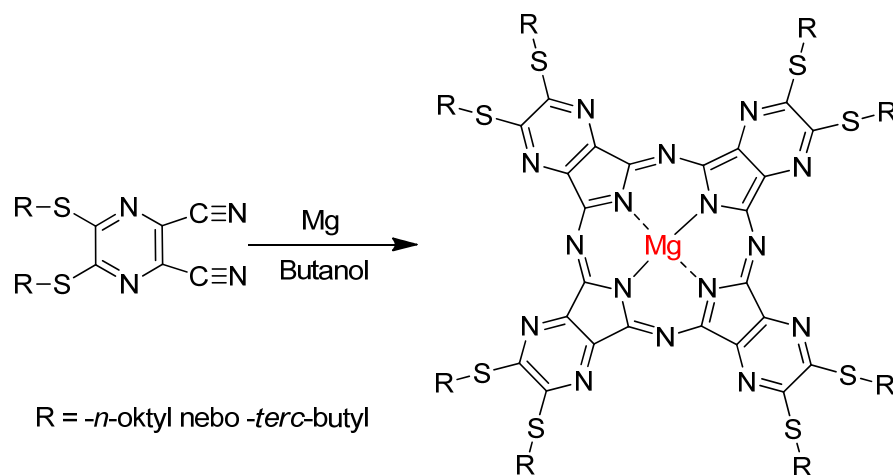
Pro tuto metodu se využívají různé druhy alkoholátů např.: butanolát hořčnatý, směs pentanolu s oktánolem či *n*-oktanol. Specifické postupy jsou uvedeny v následujících podkapitolách.



Obrázek 18 - Obecné schéma reakce hořčnatých alkoholátů (Převzato z lit.<sup>6</sup>)

#### Metoda využívající butanolát hořčnatý

U tohoto typu reakce se využívá kovový hořčík, respektive jeho šupinky v butanolu. Celá reakční směs je zahřívána při teplotě varu butanolu. Katalyzátorem reakce je krystalek jodu, který nakoroduje povrch kovu a usnadní reakci. Po několika hodinách vznikne kašovitá hmota (butanolát hořčnatý), ke které se přidá precursor a dalším zahříváním při teplotě varu butanolu se nasyntetizuje požadovaná látka (viz. **Obrázek 19**)<sup>13,14,15</sup>.

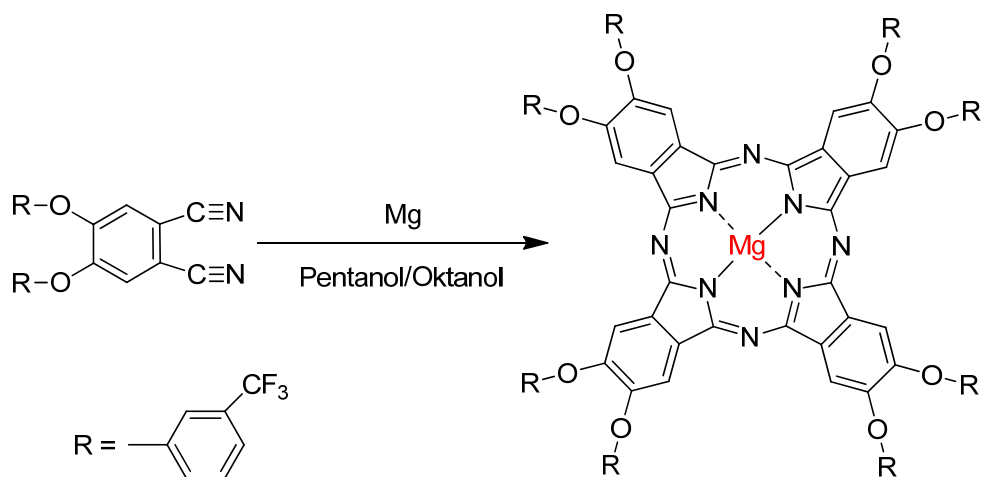


Obrázek 19 - Reakce s butanolátem hořčnatým (Převzato z lit.<sup>15</sup>)



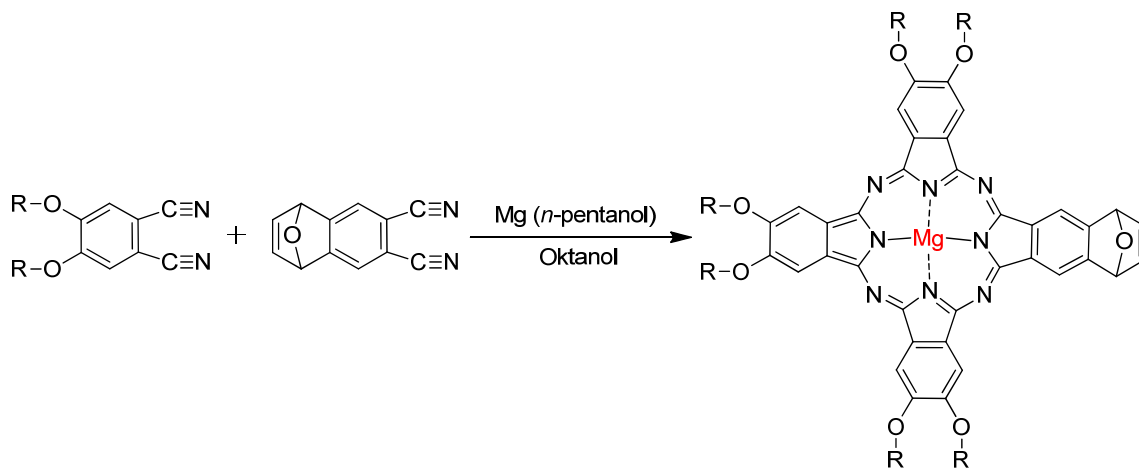
### Metoda využívající směs pentanol/oktanol

Kromě butanolu lze použít i jiných alkoholů. Piliny hořčíku se suspendují do směsi pentanolu : oktanolu v poměru 1 : 1 a zahřívají se na teplotu 170 °C, při které se přidá prekursor. Při této teplotě probíhá reakce po dobu 1,5 hodiny (viz. **Obrázek 20**)<sup>16</sup>.



Obrázek 20 - Reakce probíhající ve směsi pentanol/oktanol (Převzato z lit.<sup>16</sup>)

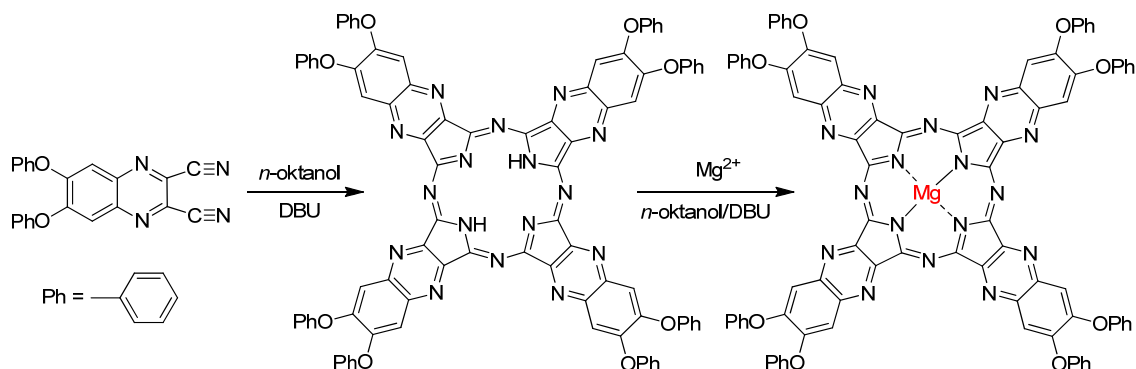
Nebo se piliny hořčíku rozptýlí v pentanolu a zahřívají se při teplotě 150 °C po dobu 1 hodiny. Následně se přidá oktanol s prekuzory a směs se zahřívá při teplotě 160 °C po dobu 24 hodin (viz. **Obrázek 21**)<sup>17</sup>.



Obrázek 21 - Reakce s postupným přidáním *n*-pentanolu a oktanolu (Převzato z lit.<sup>17</sup>)

## Metoda využívající *n*-oktanol a vkládání hořčnatého kationtu

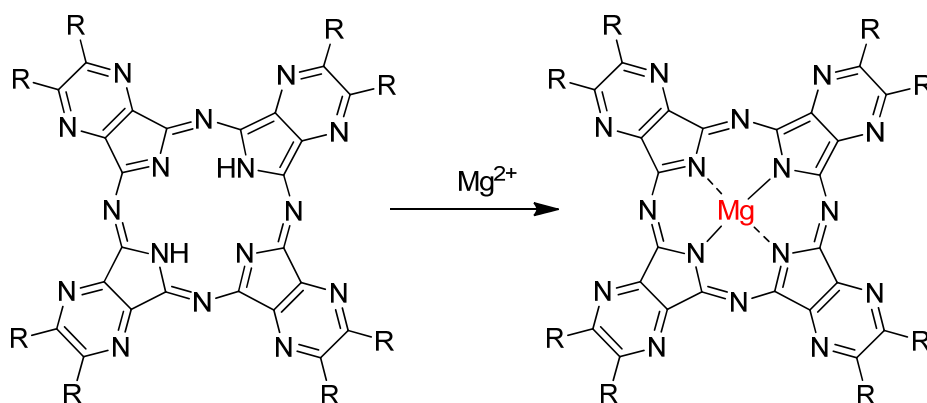
Při využití octanu hořčnatého se také využívá *n*-oktanol v přítomnosti DBU. Prekurzor a octan hořčnatý dihydrát jsou použity v poměru 4 : 1. Při této reakci dochází ke vzniku makrocyklického jádra použitím alkoholátu a až do něj je zřejmě *in situ* komplexován hořčnatý kationt (viz. **Obrázek 22**). Výtěžky dosahují 68%<sup>18</sup>.



**Obrázek 22** - Reakce *n*-oktanolu a *in situ* přidání hořčnatého kationtu (Převzato z lit.<sup>18</sup>)

### 3.3. Metoda využívající vkládání hořčnatých kationtů

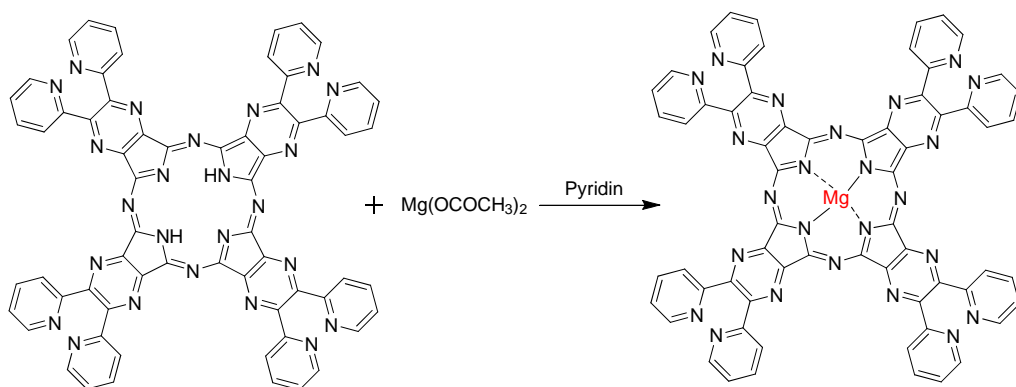
V této metodě se využívá již vzniklého AzaPc cyklu. Do tohoto cyklu se vkládají hořčnaté kationty pocházející z hořčnaté soli. V centru bezkovového AzaPc jsou kyselé NH skupiny umožňující komplexovat kationty kovů (viz. **Obrázek 23**)<sup>19</sup>.



**Obrázek 23** - Obecné schéma vkládání hořčnatého kationtu (Převzato z lit.<sup>19</sup>)

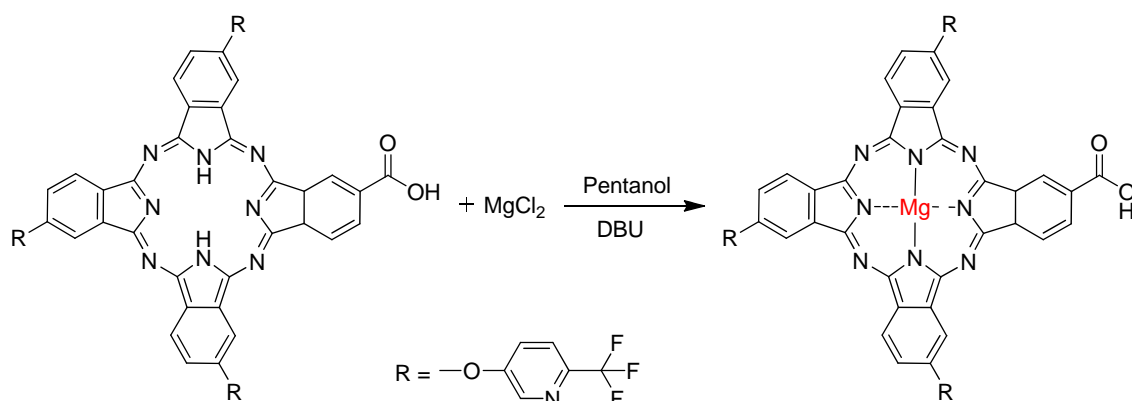
Směs bezkovového AzaPc a octanu hořčnatého tetrahydrátu se rozpustily v pyridinu a zahřívaly se při teplotě varu pyridinu po dobu 4 hodin (viz. **Obrázek 24**). Výtěžek reakce dosahoval 55%<sup>20</sup>.

V literatuře<sup>19</sup>, kde je použita stejná metoda zmíněná výše, byla sledována pouze kinetika reakce a nebyl izolován vznikající produkt.



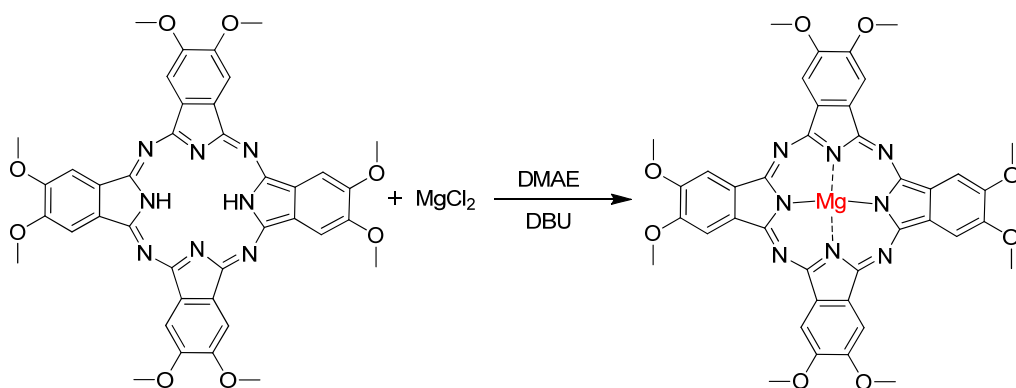
**Obrázek 24 - Vkládání hořečnatého kationtu v prostředí pyridinu (Převzato z lit.<sup>20</sup>)**

U metody vkládání je taktěž možné použití suchého pentanolu jako rozpouštědla. Bezkovový ftalocyanin a chlorid hořečnatý se rozpustili v bezvodém pentanolu a bylo přidáno 6 kapek DBU. Směs byla zahřívána při teplotě varu pentanolu po dobu 2 hodin (viz. **Obrázek 25**)<sup>21</sup>.



**Obrázek 25 - Vkládání hořečnatého kationtu v prostředí pentanolu (Převzato z lit.<sup>21</sup>)**

Další možností je rozpuštění prekursoru v DMAE v přítomnosti DBU a přisypání bezvodého chloridu hořečnatého. Vzduch v baňce byl nahrazen dusíkovou atmosférou. Směs byla dobře promíchána a ozařována v mikrovlnné troubě při výkonu 300 W po dobu 8 minut (viz. **Obrázek 26**)<sup>8</sup>.

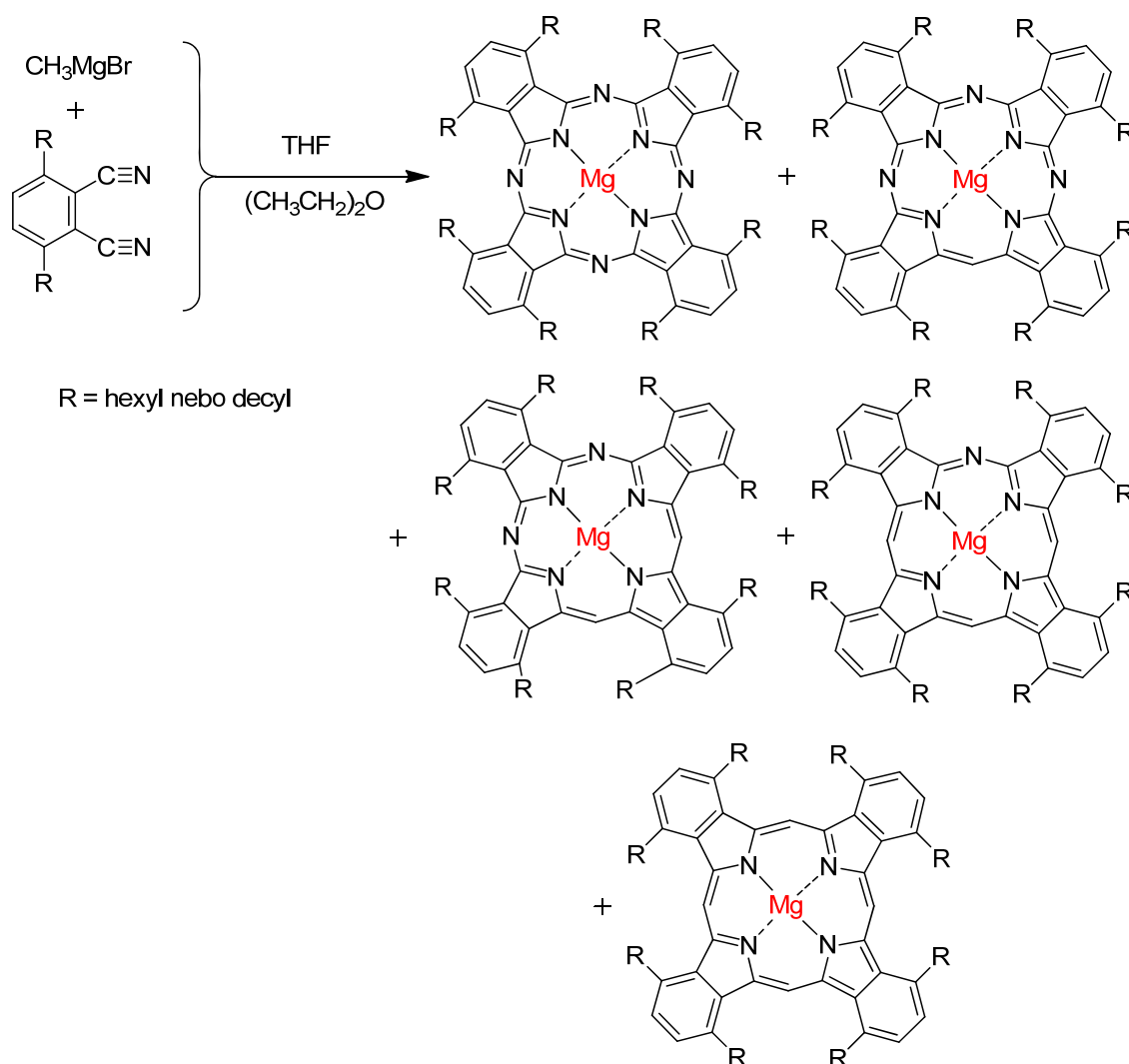


**Obrázek 26 - Vkládání hořečnatého kationtu v prostředí DMAE/DBU (Převzato z lit.<sup>8</sup>)**

### 3.4. Speciální metody

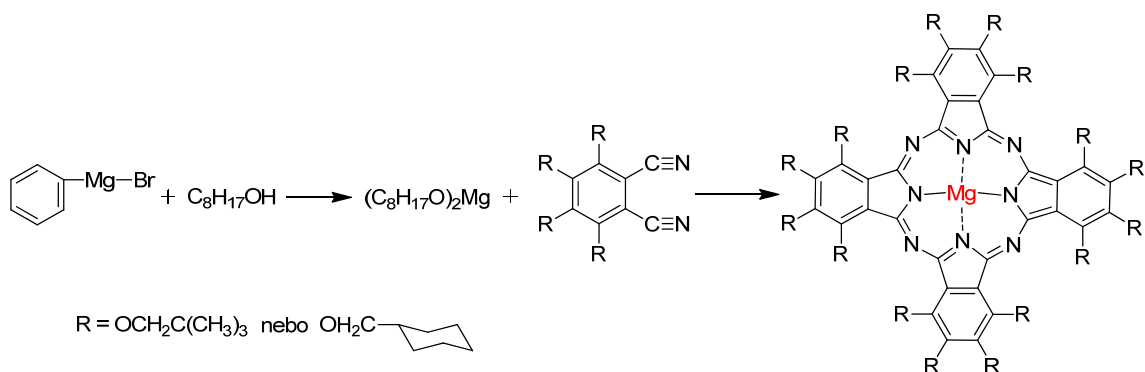
#### Metoda využívající Grignardovy sloučeniny

Specifickým případem vzniku hořečnatých komplexů je použití Grignardových sloučenin jako cyklizačního prostředku. V tomto případě ovšem nevznikají pouze ftalocyaniny, ale dochází k záměně azomethinových dusíků za methinové skupiny za vzniku např. tetrabenzotriazaporfyrinů. Při této metodě se používá methylmagnesiumbromid ve stejném množství jako prekurzoru. Obě látky se zahřívají v bezvodém tetrahydrofuranu (THF) při jeho teplotě varu v přítomnosti diethyletheru pod atmosférou dusíku po dobu půl hodiny. Po vymytí zbytků rozpouštědla byl zbytek přenesen do suchého chinolinu a zahříván přes noc při teplotě 200 °C pod atmosférou dusíku (viz. **Obrázek 27**)<sup>22</sup>.



Obrázek 27 - Reakce prekurzoru s methylmagnesiumbromidem (Převzato z lit.<sup>22</sup>)

Grignardových sloučenin je rovněž možné použít pro přípravu alkoholátů hořečnatých, vlastním cyklizačním prostředkem jsou pak tyto alkoholáty. Nedochozí zde k záměně azomethinových dusíků methinovými skupinami. Tato metoda byla využita např. při reakci fenylmagnesiumbromidu, který se nechal 15 minut reagovat s 1-oktanolem v THF bez zahřívání. Následně se přidal prekurzor a reakční směs byla zahřívána při 120 °C. Reakční doba je závislá na vlastnostech prekurzoru (viz. **Obrázek 28**)<sup>23</sup>.



**Obrázek 28 - Reakce fenylmagnesiumbromidu za vzniku alkoholátu s následnou cyklotetramerizací (Převzato z lit.<sup>23</sup>)**

## 4. Experimentální část

Náplní mojí práce bylo zjistit vhodné podmínky pro vkládání hořčíku do již vzniklých azaftalocyaninových sloučenin (**ZIP21H2**, **ZIP14H2**, **ZIP37H2**). Tyto látky byly již dříve připraveny na KFCHKL.

- **ZIP14H2** – látka byla v laboratoři již dříve připravena dle postupu z lit.<sup>24</sup>
- **ZIP21H2** – látka byla v laboratoři již dříve připravena dle postupu z lit.<sup>15</sup>
- **ZIP37H2** – látka byla v laboratoři již dříve připravena dle postupu z lit.<sup>25</sup>

Všechny látky (octan hořečnatý, mléčnan hořečnatý, uhličitan hořečnatý, oxid hořečnatý a chlorid hořečnatý) jsem nechala sušit v sušící pistolí při 78 °C 5-6 hodin. Poté jsem uhličitan hořečnatý a oxid hořečnatý nechala dále sušit v sušárně při 100 °C 5 hodin.

Pyridin jsem nechala míchat 24 hodin s hydroxidem draselným. Následující den jsem ho dekantovala a destilovala při teplotě 115 °C. Tímto způsobem jsem získala bezvodý pyridin, který byl dále držen nad molekulovými sítí.

Použitá rozpouštědla zakoupená u firmy Penta: Pyridin, dimethylformamid, dimethylsulfoxid, tetrahydrofuran.

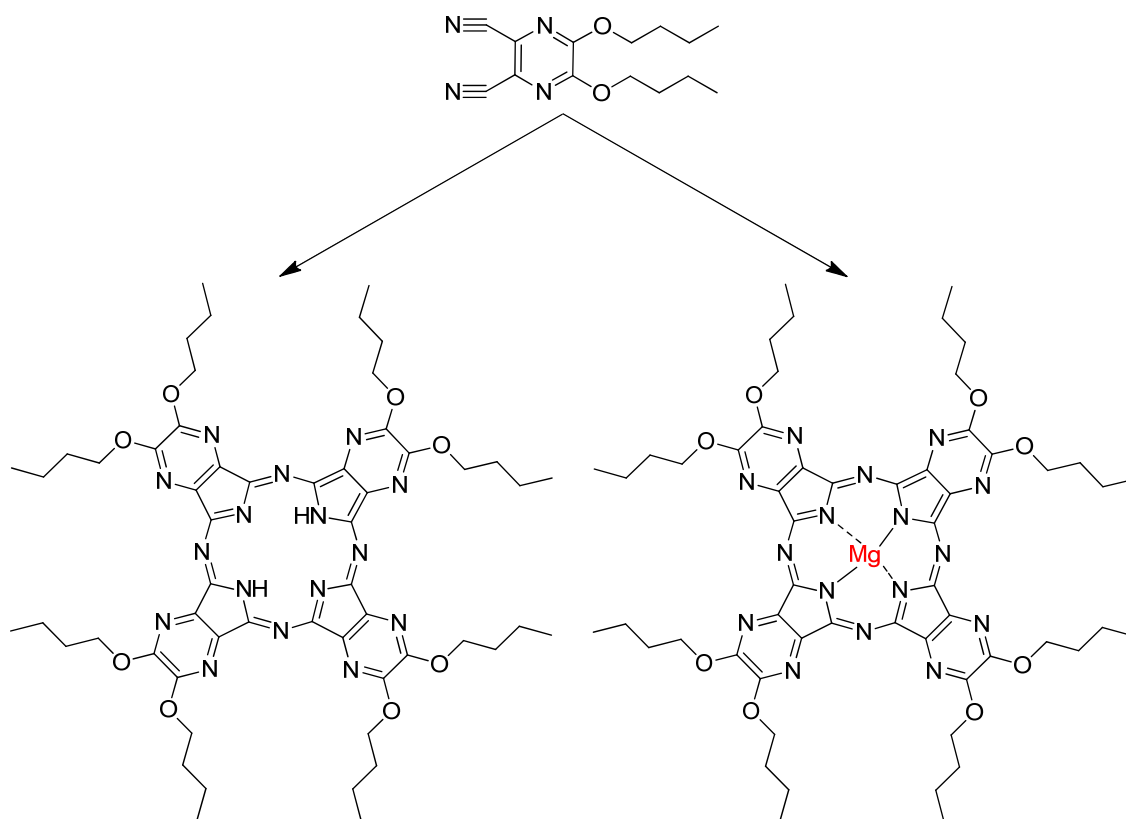
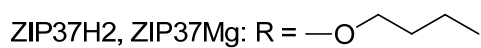
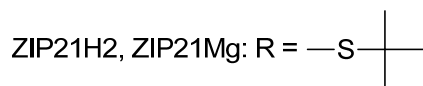
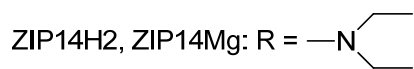
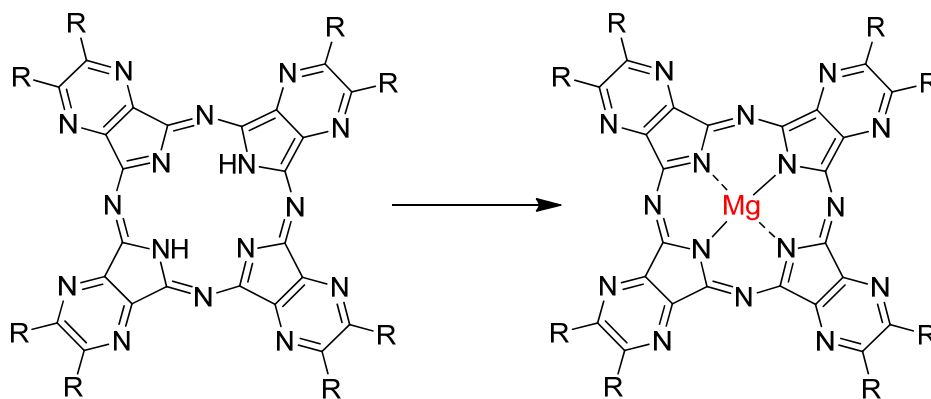
Použitá rozpouštědla zakoupená u firmy Sigma-Aldrich: dimethylacetamid

Čistota produktů a meziproduktů a průběh jednotlivých reakcí byly kontrolovány tenkovrstvou chromatografií na deskách Merck Silikagel 60 F254. Detekce byla prováděna světlem o vlnové délce 254 nm a 366 nm.

K sloupcové chromatografii byl použit silikagel Merck Kieselgel 60 (0,040-0,063 mm).

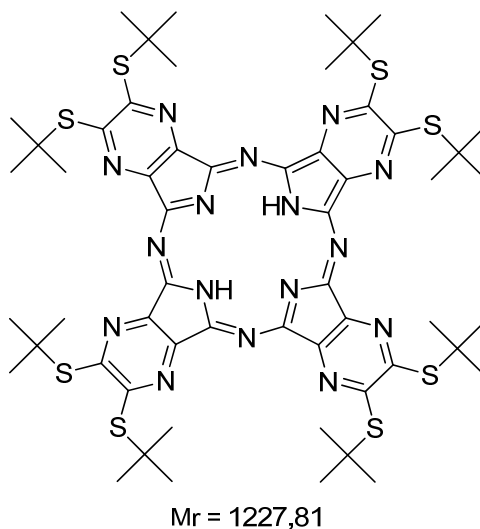
Spektrum ve viditelné oblasti bylo naměřeno na přístroji SHIMADZU UV 2401 PC: UV-VIS recording spectrophotometer.

#### 4.1. Schéma prováděných reakcí



## 4.2. Optimalizace komplexace hořečnatých iontů azaftalocyaniny

První látkou, kterou jsem ve svých experimentech použila byla **ZIP21H2** (viz. **Obrázek 29**). Na této látce jsem postupně prováděla reakce, při kterých jsem zkoumala druh hořečnaté soli, vliv teploty, vlhkosti, rozpouštědel.



Obrázek 29 - ZIP21H2 a jeho molekulová hmotnost

### 4.2.1. Vkládání hořčíku za použití hořečnaté sloučeniny

Pro vkládání hořčíku do **ZIP21H2** byly zvoleny tyto látky jako zdroj hořečnatého kationtu:

- Octan hořečnatý –  $\text{Mg}(\text{OCOCH}_3)_2$
- Mléčnan hořečnatý –  $\text{Mg}(\text{CO}_3\text{H})_2$
- Uhličitán hořečnatý –  $\text{MgCO}_3$
- Oxid hořečnatý –  $\text{MgO}$
- Chlorid hořečnatý –  $\text{MgCl}_2$

#### *Parametry reakcí:*

- Navážka **ZIP21H2**: 20 mg (0,0163mmol)
- Rozpouštědlo: pyridin bezvodý 2 ml
- Teplota lázně: 130 °C
- Detekce: TLC po 30 min v mobilní fázi chloroform : toluen : ethyl-acetát (10 : 10 : 1)
- Zdroj hořečnatých solí: 0,1630mmol (viz. **Tabulka 1**)



Do baňky se navázil AzaPc **ZIP21H2** (20 mg, 0,0163mmol) a přidal se bezvodý pyridin (2 ml). K roztoku se přidal zdroj hořečnatých solí (množství viz. **Tabulka 1**) a směs se zahřívala při teplotě varu pyridinu. V různých časových intervalech byla prováděna kontrola reakce pomocí TLC.

**Tabulka 1 - Hodnoty hořečnatých sloučenin**

Název látky	Molekulová hmotnost (g/mol)	Násobek oproti bezkovové látce	Navážená hmotnost (mg)
Octan hořečnatý	142,40	10	23,0 (0,163 mmol)
Mléčnan hořečnatý	202,45	10	32,0 (0,163 mmol)
Uhličitan hořečnatý	84,30	10	13,7 (0,163 mmol)
Oxid hořečnatý	40,30	10	6,6 (0,163 mmol)
Chlorid hořečnatý	95,21	10	15,5 (0,163 mmol)
		20	30,0 (0,315 mmol)

### *Výsledky reakcí*

Octan hořečnatý zreagoval zcela již po 30 minutách. Dle TLC již nebyla patrná výchozí látka (bezkovový AzaPc). U mléčnanu hořečnatého, uhličitanu hořečnatého a oxidu hořečnatého byly po 30 minutách detekovány pouze stopy produktu. Po 6,5 hodinách, kdy byla reakce ukončena, byl výsledný produkt (hořečnatý AzaPc) stále přítomen pouze v nepatrném množství. Chlorid hořečnatý reagoval velice pomalu. Po 30 minutách byly detekovány stopy produktu. Zcela zreagoval až po 5 hodinách. Reakce byla provedena také s 20-ti násobným přebytkem. S tímto množstvím proběhla reakce zcela již po 3 hodinách.

## **4.2.2. Vliv vlhkosti na průběh reakce**

### *Parametry reakcí:*

- Navážka **ZIP21H2**: 10 mg (0,0081 mmol)
- Rozpouštědlo: 1 ml pyridin bezvodý nebo 1 ml v kvalitě p.a. (obsahuje 0,1 % vody)
- Teplota lázně: 130 °C
- Detekce: TLC po 30 min v mobilní fázi chloroform : toluen : ethyl-acetát (10 : 10 : 1)
- Navážka octanu hořečnatého bezvodého: 11,5 mg (0,081 mmol)
- Navážka octanu hořečnatého tetrahydrátu: 17,3 mg (0,081 mmol, Mr = 214,40 g/mol)

**ZIP21H2** (10 mg, 0,0081mmol) byl rozpuštěn v pyridinu (bezvodý nebo p.a.). Octan hořečnatý (bezvodý nebo tetrahydrát) byl přidán do reakce, tak aby byly získány níže uvedené kombinace (viz. **Tabulka 2**). Směs se zahřívala při teplotě varu pyridinu. Kontrola byla prováděna pomocí TLC po 30 minutách.

**Tabulka 2 - Použité kombinace octanu hořečnatého a pyridinu**

Baňka	Octan hořečnatý	Pyridin
1.	Bezvodý	Bezvodý
2.	Tetrahydrát	Bezvodý
3.	Bezvodý	Pro analýzu (0,1%vody)
4.	Tetrahydrát	Pro analýzu (0,1%vody)

### *Výsledky reakcí*

Detekce na TLC po 30 minutách ukázala, že u všech kombinací došlo ke kvantitativní konverzi na hořečnatý komplex.

### **4.2.3. Vliv druhu zvoleného rozpouštědla**

Byla zkoumána tato rozpouštědla:

- Pyridin (již zkoumán v kapitole 4.3.1 a kapitole 4.3.2)
- Dimethylformamid (DMF)
- Dimethylsulfoxid (DMSO)
- Dimethylacetamid
- Tetrahydrofuran (THF)

### *Parametry reakcí:*

- Navážka **ZIP21H2**: 10 mg (0,0081 mmol)
- Teplota lázně: 130 °C
- Detekce: TLC po 30 min v mobilní fázi chloroform : toluen : ethyl-acetát (10 : 10 : 1)
- Navážka octanu hořečnatého bezvodého: 11,5 mg (0,0810 mmol)
- Zkoumané rozpouštědlo: 1 ml

Do baněk se pokaždé navážil AzaPc **ZIP21H2** (10 mg, 0,0081 mmol) a přidalo se zkoumané rozpouštědlo (1 ml). K tomuto roztoku se přidal octan hořečnatý bezvodý (11,5 mg, 0,0810 mmol). Směs se zahřívala v olejové lázni při 130 °C. Detekce se prováděla prostřednictvím TLC po různých časových intervalech.

### *Výsledky reakcí*

Reakce v dimethylformamidu, dimethylsulfoxidu a dimethylacetamidu probíhala velmi dobře a TLC po 30 minutách ukázalo přítomnost pouze hořčnatého AzaPc. Reakce v tetrahydrofuranu neprobíhala ani po 6 hodinách.

#### **4.2.4. Vliv teploty lázně**

Pro určení vlivu teploty byly zvoleny tyto teploty lázně:

- 25 °C (laboratorní teplota)
- 40 °C
- 70 °C
- 90 °C
- 130 °C

#### *Parametry reakcí:*

- Navážka **ZIP21H2**: 10 mg (0,0081 mmol)
- Rozpouštědlo: pyridin p.a. (0,1 % vody) 1 ml
- Detekce: TLC po 30 min v mobilní fázi chloroform : toluen : ethyl-acetát (10 : 10 : 1) a mobilní fázi toluen : chloroform (1 : 1)
- Navážka octanu hořčnatého bezvodého: 11,5 mg (0,0810 mmol)

Do každé baňky se navážil AzaPc **ZIP21H2** (10 mg, 0,0081 mmol) a přidal se pyridin p.a. (1 ml). K tomuto roztoku se přidal octan hořčnatý bezvodý (11,5 mg, 0,0810 mmol) a směs byla zahřívána při teplotě varu pyridinu. Kontrola se prováděla prostřednictvím TLC v různých časových intervalech.

### *Výsledky reakcí*

V následující tabulce (viz. **Tabulka 3**) jsou shrnuty použité teploty, při kterých reakce probíhaly, v jakém čase a s jakým výsledkem.

**Tabulka 3 - Závislost teploty na čase a výsledku reakce**

Teplota	Čas	Stav
25 °C		Ani po 48h není vše zreagováno, nedostatečná teplota
40 °C		
70 °C	180 min	Vše zreagováno
90 °C	30 min	
130 °C	30 min	

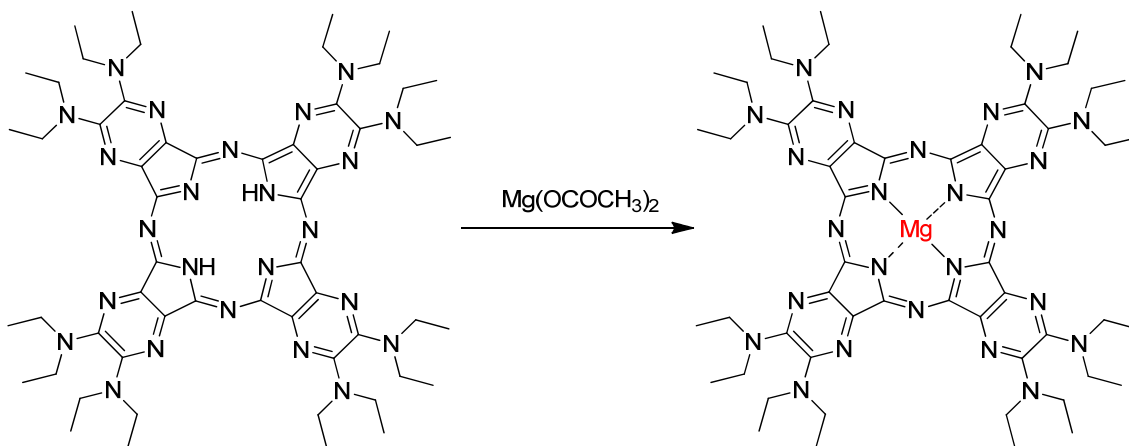
#### 4.2.5. Komplexace hořečnatých iontů dalšími AzaPc

##### Syntéza 2,3,9,10,16,17,23,24-oktakis(diethylamino)-1,4,8,11,15,18,22,25-(oktaaza)ftalocyaninátu hořečnatého komplexu (ZIP14Mg)

###### Parametry reakce:

- Navážka **ZIP14H2** : 10,0 mg (0,0092 mmol)
- Navážka octanu hořečnatého tetrahydrátu: 19,6 mg (0,0920 mmol)
- Rozpouštědlo: pyridin bezvodý 1 ml
- Teplota lázně: 130 °C
- Detekce: TLC po 30 minutách v mobilní fázi chloroform : ethyl-acetát v poměru od 7 : 1 do 10,5 : 1,5

Do baňky byl navážen **ZIP14H2** (10,0 mg, 0,0092 mmol) a rozpuštěn v pyridinu (1 ml). Dále byl přisypán octan hořečnatý tetrahydrát (19,6 mg, 0,0920 mmol) a směs se zahřívala při teplotě varu pyridinu pod zpětným chladičem (viz. **Obrázek 30**). Detekce byla prováděna pomocí TLC po různě dlouhé době. Reakce byla ukončena po 60 hodinách.



Obrázek 30 - Reakce vzniku ZIP14Mg

###### Výsledek reakce

Po 30 minutách se na TLC desce zobrazily jen stopy hořečnatého produktu. Reakce probíhala dál a její stav byl průběžně kontrolován pomocí TLC. Reakce byla ukončena po 60 hodinách, přičemž stále byly detekovány stopy výchozí látky na TLC.

## Syntéza 2,3,9,10,16,17,23,24-oktakis(butoxy)-1,4,8,11,15,18,22,25-(oktaaza)ftalocyaninátu hořečnatého komplexu (ZIP37Mg)

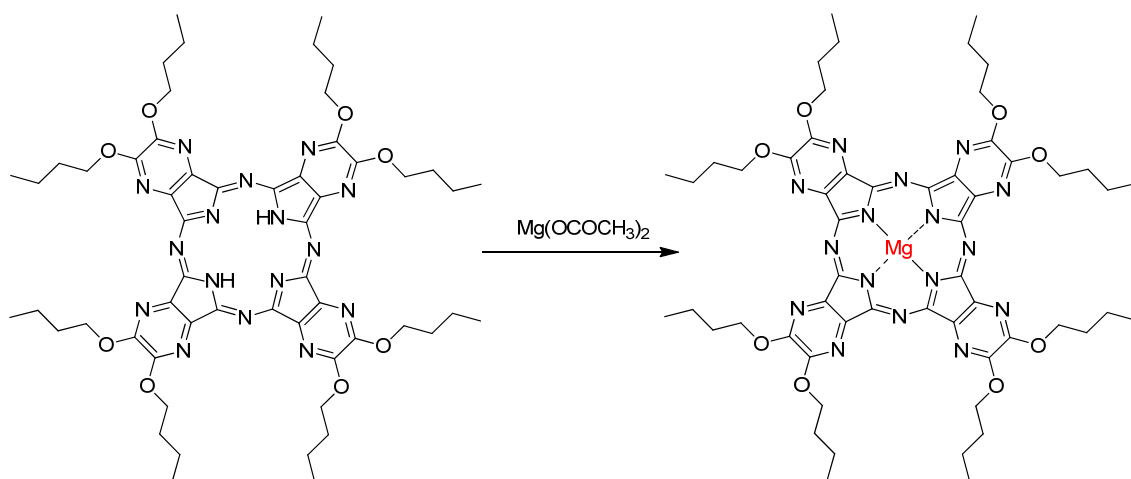
### Parametry reakce:

- Navážka **ZIP37H2**: 25,30 mg (0,0227 mmol)
- Navážka octanu hořečnatého bezvodého: 32,38 mg (0,2270 mmol)
- Rozpouštědlo: pyridin p.a. (0,1 % vody) 2,5 ml
- Teplota lázně: 130 °C
- Detekce: TLC po 30 min s použitím mobilní fáze chloroform : ethyl-acetát v poměru 30 : 1, která je vhodná pro bezkovový **ZIP37H2** a mobilní fáze toluen : aceton : pyridin v poměru 10 : 1 : 1 vhodná pro **ZIP37Mg**.

Do baňky byl navážen **ZIP37H2** (25,30 mg, 0,0227mmol) a rozpuštěn v pyridinu (2,5 ml). Dále byl přisypán octan hořečnatý bezvodý (32,38 mg, 0,2270 mmol) a směs se zahřívala při teplotě varu pyridinu pod zpětným chladičem (viz. **Obrázek 31**). Po 30 minutách na desce TLC nebyla detekována výchozí látka, pouze vzniklý **ZIP37Mg**.

Po vyndání míchadla a odpaření pyridinu na vakuové odparce byl vzniklý **ZIP37Mg** promyt vodou, zfiltrován a promyt methanolem. Následně byl **ZIP37Mg** čištěn na silikagelu pomocí sloupcové chromatografie s využitím mobilní fáze chloroform : ethyl-acetát v poměru 30 : 1. Bylo získáno 17 mg čistého **ZIP37Mg** (tj. 65 %).

Látka byla porovnána na TLC se standardem připraveným již dříve na katedře a vykazovala stejný  $R_f$ .



Obrázek 31 - Reakce vzniku ZIP37Mg

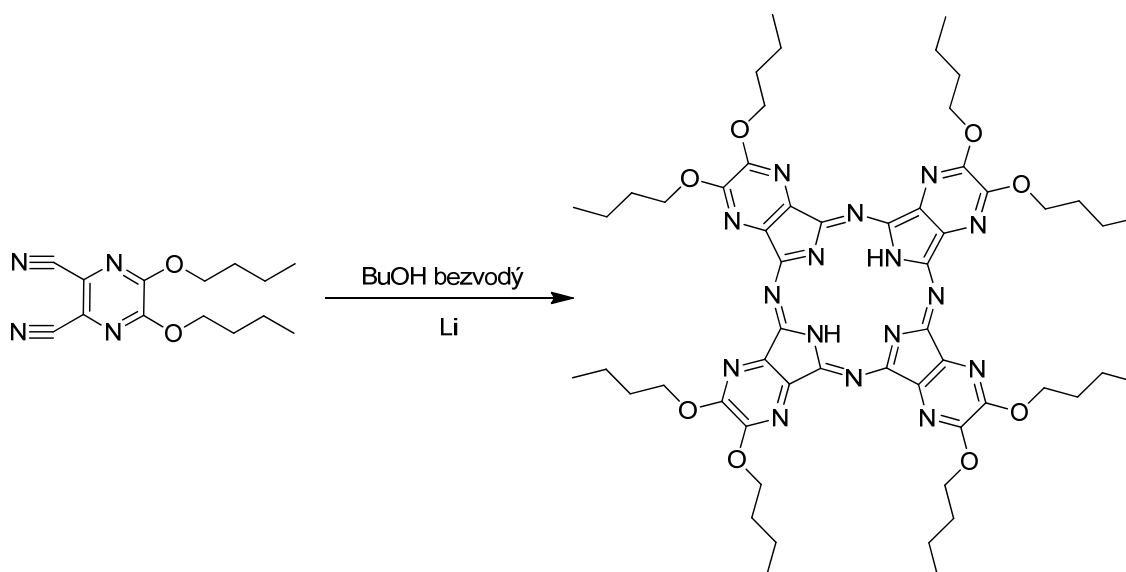
### 4.3. Syntéza 2,3,9,10,16,17,23,24-oktakis(butoxy)-1,4,8,11,15,18,22,25-(oktaaza)ftalocyaninu (ZIP37H2)

#### Parametry reakce:

- Navážka ZIP37: 1000 mg (3,6454 mmol)
- Navážka lithia: 178,6 mg (25,5143 mmol, Mr = 7)
- Rozpouštědlo: suchý predestilovaný butanol 50 ml
- Teplota lázně: 130 °C

5,6-Dibutoxypyrazin-2,3-dikarbonitril (1000 mg, 3,6454 mmol) se rozpustil v bezvodém butanolu (50 ml) a směs se zahřála k teplotě varu rozpouštědla. Do reakce bylo postupně přidáváno kovové lithium (178,60 mg, 25,5143 mmol) a směs se zahřívala po dobu 3,5 hodiny (viz. **Obrázek 32**).

Po ukončení reakce se vyndalo míchadlo a butanol se odpařil na vakuové odparce. Látka byla dále míchána s roztokem 50% kyseliny octové (150 ml), přefiltrována přes skládaný filtr, promyta roztokem methanol : voda v poměru 1 : 1 (50 ml), malým množstvím methanolu (20 ml), ethanolu a acetonu. Na filtru zůstává tmavofialová látka (ZIP37H2).



Obrázek 32 - Reakce přípravy ZIP 37H2

#### 4.4. Syntéza 2,3,9,10,16,17,23,24-oktakis(butoxy)-1,4,8,11,15,18,22,25-(oktaaza)ftalocyaninátu hořečnatého komplexu (ZIP37Mg) přímou cyklizací

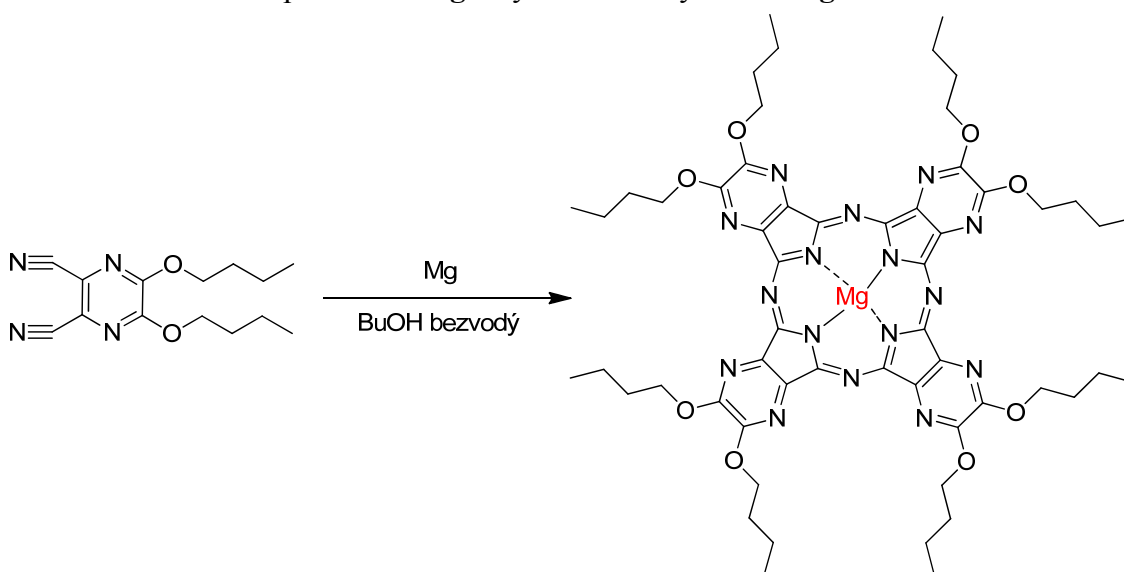
##### Parametry reakce:

- Navážka **ZIP37**: 851,8 mg (0,7749 mmol)
- Navážka hořčíku: 500,0 mg (20,5719 mmol)
- Rozpouštědlo: suchý predestilovaný butanol 75 ml
- Teplota lázně: 130 °C

Kovový hořčík (500 mg, 20,5719 mmol) se zahříval v butanolu (75 ml) 3 hodiny při teplotě 130 °C do vzniku butanolátu hořečnatého (kašovitá hmota). Následně byl přidán **ZIP37** (851,8 mg, 0,7749 mmol) rozpuštěný v malém množství butanolu (15 ml) a směs se zahřívala další 3 hodiny do vzniku **ZIP37Mg** (viz. **Obrázek 33**).

Po ukončení reakce se vyndalo míchadlo a butanol se odpařil na vakuové odparce. V kádince byl připraven roztok 50% kyseliny octové (150 ml). Ve 100 ml tohoto roztoku se **ZIP37Mg** nechal míchat 30 minut. Zbylým roztokem se látka promyla a přefiltrovala na skládaném filtru. Látka se dále promyla methanolem a acetonem a vysušila na fritě.

Krystal látky se rozpustil v chloroformu a provedla se analýza pomocí TLC s použitím mobilních fází pro **ZIP37H2** fází *chloroform : ethyl-acetát (30 : 1)* a **ZIP37Mg** fází *toluen : aceton : pyridin (10 : 1 : 1)*. Látka nebyla čistá, proto byla čištěna na silikagelu pomocí mobilní fáze pro **ZIP37Mg**. Látka opět nedosahovala požadované čistoty, proto byla promyta methanolem a vysušena. Druhý sloupec se nejprve eluoval fází pro **ZIP37H2**, čímž byly odstraněny nečistoty. Poté byla fáze změněna na vhodnou pro **ZIP37Mg** a byl získán čistý **ZIP37Mg**.



Obrázek 33 - Reakce vzniku ZIP37Mg

## 5. Diskuze

Syntéza hořečnatých AzaPc lze provést několika způsoby, nejčastěji však cyklizační metodou. Často se však u těchto AzaPc štěpí periferní substituenty nebo asymetrické AzaPc se od sebe hůře oddělují a čistí. Aby se těmto jevům zabránilo, je výhodnější metoda vkládání hořečnatých kationtů. Tuto metodu jsem optimalizovala zkoumáním vhodných podmínek pro vkládání hořčíku: hořečnaté soli, vliv teploty, vliv rozpouštědel, vliv vlhkosti a v neposlední řadě i vliv periferní substituce.

### *Vkládání hořečnaté soli*

Pro zkoumání vhodné soli využitelné u metody vkládání jsem použila **ZIP21H2** v navážce 20 mg. Toto množství jsem zvolila vzhledem k tomu, že je dostačující k detekci úspěšnosti reakce. Adekvátně k tomuto množství jsem v desetinásobném nadbytku navážila hořečnaté sloučeniny (viz. **Tabulka 1**) a jako rozpouštědlo jsem zvolila bezvodý pyridin, protože vodný pyridin by mohl snížit či potlačit reaktivitu. Tento jev jsem se rozhodla později také prozkoumat. Jelikož je teplota varu pyridinu 115 °C, zvolila jsem teplotu lázně 130 °C pro zajištění bezproblémového průběhu reakce. Z dřívějších pokusů na KFCHKL jsem měla k dispozici  $R_f$  hodnoty **ZIP21H2** a **ZIP21Mg**. Z důvodu velmi odlišných retenčních faktorů jsem jako jednoduchou detekční metodu vybrala TLC, která zajistila jasně čitelný výsledek. Vzorek z reakce jsem odebírala po 30 minutách. Interval 30 minut jsem zvolila s ohledem na proveditelnost a průběh reakce.

Octan hořečnatý zreagoval zcela již po 30 minutách. Dle TLC již nebyla patrná výchozí látka (bezkovový AzaPc). U mléčnanu hořečnatého, uhličitanu hořečnatého a oxidu hořečnatého byly po 30 minutách detekovány pouze stopy produktu. Po 6,5 hodinách, kdy byla reakce ukončena, byl výsledný produkt (hořečnatý AzaPc) stále přítomen pouze v nepatrném množství. Chlorid hořečnatý zreagoval velice pomalu. Po 30 minutách byly detekovány stopy produktu. Zcela zreagoval až po 5 hodinách. Reakce byla provedena také s 20-ti násobným přebytkem. S tímto množstvím proběhla reakce zcela již po 3 hodinách. Octan hořečnatý zreagoval ze všech použitých látek nejlépe a nejrychleji. Z tohoto důvodu jsem ho použila do dalších reakcí.

### *Vliv vlhkosti*

Vliv vlhkosti mohl být důležitým faktorem ovlivňujícím vkládání hořčíku. Proto jsem se rozhodla tento parametr prozkoumat. Pracovala jsem pouze s octanem hořečnatým, který při prvních reakcích využívající metodu vkládání zreagoval nejlépe. Používala jsem bezvodý nebo tetrahydrát a jako rozpouštědlo bezvodý pyridin nebo pyridin pro analýzu s obsahem 0,1 % vody. Kombinace látek jsem navrhla tak, abych pokryly všechny existující možnosti a mohla jsem tak získat komplexní výsledky s vypovídající hodnotou. Detekce na TLC po 30 minutách ukázala, že všechny kombinace jsou vhodné pro vkládání hořčíku.



### ***Vliv rozpouštědel***

Pro metodu vkládání hořčíku je rovněž důležité v jakém rozpouštědle může reakce probíhat. Zda by se tato metoda mohla využít i s jinými rozpouštědly či probíhá pouze v přítomnosti pyridinu. Kromě pyridinu byla proto zkoumána i rozpouštědla dimethylformamid, dimethylsulfoxid, dimethylacetamid a tetrahydrofuran.

V dimethylformamidu, dimethylsulfoxidu a dimethylacetamidu probíhala reakce velmi dobře a TLC analýza po 30 minutách ukázala kvantitativní výtěžek hořečnatého AzaPc. Z této skutečnosti vyplývá, že tato rozpouštědla by taktéž mohla být použita při vkládání hořčíku. S těmito rozpouštědly jsem dále nepracovala, jelikož mají vyšší teplotu varu než pyridin, a proto by se hůře odstraňovala z reakční směsi po ukončení reakce. Dimethylformamid má teplotu varu 153 °C, dimethylsulfoxid vře při 189 °C a dimethylacetamid dosáhne varu při 165 °C. Tetrahydrofuran se ukázal jako nevhodné rozpouštědlo pro vkládání hořčíku, jelikož k reakci nedošlo ani po 6 hodinách.

### ***Vliv teploty***

Při vkládání hořčíku mě rovněž zajímalo, jak velkou roli hraje teplota na průběh této reakce. Zda se změní reakční doba (zůstane stejná či se prodlouží), bude-li mít změna teploty vliv na její efektivnost či teplota nehraje žádnou roli. Při zkoumání tohoto vlivu jsem taktéž postupovala podle základní reakce. Navážky jsem použila stejné jako při zkoumání vlivu vlhkosti a vlivu rozpouštědel. Teploty lázně byly zvoleny systematicky od laboratorní teploty po teplotu varu rozpouštědla. Při teplotách lázně 130 °C a 90 °C probíhá vkládání hořčíku již po 30 minutách s kvantitativním výtěžkem hořečnatého AzaPc. U teploty 70 °C je tato reakční doba prodloužena na 3 hodiny, avšak rovněž dosahuje dobrých výsledků. Reakce při teplotách 40 °C a 25 °C má velmi pomalý průběh. Ani po 48 hodinách nedochází ke kvantitativnímu výtěžku hořečnatého AzaPc, proto tyto teploty nejsou vhodné pro metodu vkládání hořčíku. Kromě mobilní fáze zobrazující hořečnaté AzaPc jsem zde použila i mobilní fázi toluen : chloroform (1 : 1), která je vhodná k detekci výchozí látky.

### ***Vliv periferní substituce***

Mimo výše uvedených vlivů jsem zkoumala vliv periferní substituce na dalších makrocyclických látkách. Nejčastějšími periferními substituenty u AzaPc zkoumaných v naší laboratoři jsou alkylsulfanyl skupiny, dialkylamino skupiny a alkyloxy skupiny. Základní látku pro zkoumání faktorů ovlivňujících vkládání hořečnatých kationtů jsem použila **ZIP21H2** obsahující alkylsulfanyl skupiny (viz výše), proto jsem dále zvolila látku **ZIP14H2** s dialkylamino skupinami a látku s alkyloxy skupinami **ZIP37H2**.

U syntézy AzaPc **ZIP21Mg** jsem sledovala mnohé vlivy vkládání hořčíku a jako optimální podmínky se ukázalo zahřívání při teplotě varu v pyridinu s octanem hořečnatým. Tyto podmínky byly proto aplikovány i na další látky.

Při syntéze AzaPc **ZIP14Mg** jsem měla k dispozici bezkovový AzaPc **ZIP14H2**, proto nebyla jeho příprava nutná. Do reakce jsem vložila **ZIP14H2** a tetrahydrát octanu hořečnatého v deseti-molárním nadbytku. Tuto směs jsem zahřívala při teplotě varu pyridinu a prováděla detekci TLC po různě dlouhé době. Reakce probíhala velice pomalu, proto jsem ji ukončila po 60 hodinách, přestože na TLC byly stále patrné stopy výchozí látky (bezkovový AzaPc). Tento jev si vysvětluji přítomností diethylamino skupin, které působí silným kladným indukčním a kladným mezomerním efektem. NH skupiny v centru jsou tudíž slaběji kyselé, což způsobuje zpomalení komplexační reakce.

Pro syntézu AzaPc **ZIP37Mg** jsem si nejprve musela připravit **ZIP37H2** a do něj jsem mohla vkládat hořečnaté kationty. 5,6-Dibutoxypyrazin-2,3-dikarbonitril jsem rozpustila v butanolu a k tomuto roztoku přidávala kovové lithium usnadňující tuto cyklizační reakci. Reakční směs jsem zahřívala 3,5 hodiny při teplotě varu butanolu. Po odstranění rozpouštědla a promytí látky jsem získala **ZIP37H2**.

**ZIP37H2** jsem dále podrobila optimálním podmínkám pro komplexaci hořečnatých kationtů. Již po 30 minutách jsem detekovala pomocí TLC pouze **ZIP37Mg**. Protože tato látka nebyla zcela čistá, rozhodla jsem se využít sloupcové chromatografie. Získala jsem 17,0 mg čistého **ZIP37Mg** což je 65 % teoretického výtěžku. Konverze **ZIP37H2** na **ZIP37Mg** byla podle TLC kvantitativní, ale došlo ke ztrátám sloupcovou chromatografií zřejmě v důsledku vyšší agregace.

Syntézu AzaPc **ZIP37Mg** jsem si také vyzkoušela metodou přímé cyklizace. Kovový hořčík jsem nechala reagovat 3 hodiny s butanolem za vzniku butanolátu hořečnatého, ke kterému jsem přidala 5,6-dibutoxypyrazin-2,3-dikarbonitril a směs dále zahřívala při teplotě varu butanolu další 3 hodiny do vzniku **ZIP37Mg**. Pro vyčištění jsem zvolila sloupcovou chromatografií s mobilní fází pro **ZIP37Mg**. Tímto sloupcem se rovněž nepodařilo odstranit všechny nečistoty. Tento problém jsem se rozhodla řešit další sloupcovou chromatografií s pomalejší mobilní fází, kde měly nečistoty vysoký  $R_f$  a **ZIP37Mg** se držel u startu. Touto fází jsem z látky odstranila nečistoty a čistý **ZIP37Mg** mi zůstal navázaný na silikagelu. Proto jsem následně použila polárnější fází eluovala tak čistý **ZIP37Mg**.

Při porovnání obou metod se domnívám, že metoda vkládání hořečnatých kationtů do již vzniklého AzaPc cyklu je jednodušší, efektivnější a rychlejší. Vyžaduje ovšem nejprve přípravu bezkovového makrocyclu.

## 6. Závěr

V rámci diplomové práce jsem se pokusila optimalizovat metodu vkládání hořečnatých kationtů do již vzniklého AzaPc cyklu, aby tato metoda mohla být dále využívána.

Zkoumala jsem jednotlivé vlivy, které mohly ovlivňovat vkládání:

- Druh hořečnaté soli
- Vliv vlhkosti
- Vliv rozpouštědla
- Vliv teploty lázně
- Periferní substituce

Rovněž jsem si pro syntézu hořečnatých AzaPc vyzkoušela metodu přímé cyklizace, abych mohla objektivně posoudit obě tyto metody. V porovnání s metodou přímé cyklizace je metoda vkládání jednodušší a efektivnější, je ovšem závislá na předchozí úspěšné syntéze bezkovového derivátu.

Z výsledků se mi podařilo určit optimální parametry metody vkládání hořčíku:

- Octan hořečnatý
- Bez vlivu vlhkosti
- Rozpouštědlo pyridin
- Teplota lázně 130 °C
- Velmi vhodné pro AzaPc substituované alkylsulfanyl skupinami a alkyloxy skupinami. V případě dialkylamino substituovaných AzaPc je snížena kyselost NH skupin způsobená kladným indukčním a kladným mezomerním efektem těchto skupin. Tento jev způsobuje dlouhé reakční doby a brání úplné konverzi na hořečnatý AzaPc.

Výsledky mé diplomové práce se staly také součástí již publikované práce zabývající se syntézou a hodnocením hořečnatých azaftalocyaninů a ftalocyaninů: ZIMCIK, P.; NOVAKOVA, V.; KOPECKY, K.; MILETIN, M.; USLU KOBAC, R. Z.; SVANDRLIKOVA, E.; VÁCHOVÁ, L.; LANG, K.: Magnesium Azaphthalocyanines: An Emerging Family of Excellent Red-Emitting Fluorophores, *Inorg.Chem.*, **2012**, Vol. 51, No. 7, pp. 4215-4223.

## 7. Použitá literatura

---

- 1 KOČÁREK, E.; PÁNEK, M.; NOVOTNÁ, D. *Klinická Cytogenetika I.: Úvod do klinické cytogenetiky*. Praha (ČR): Univerzita Karlova v Praze - Nakladatelství Karolinum, **2010**, ISBN 978-80-246-1880-7.
- 2 FIŠAR, Z.: *FLUORESCENČNÍ SPEKTROSKOPIE V NEUROVĚDÁCH: Principy fluorescenční spektroskopie*. [online]. [cit. 2012-01-26]. Dostupné z: <<http://psych.lf1.cuni.cz/fluorescence/Default.htm>>.
- 3 UNIVERSITY OF VICTORIA, advanced imaging laboratory. *Epi-fluorescence with the microscope* [online]. **2005**, poslední revize 21. 9. 2005 [cit. 2012-01-26]. Dostupné z: <<http://web.uvic.ca/ail/techniques/epi-fluorescence.html>>.
- 4 LAKOWICZ, J. R.: *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Third Edition. New York (USA): Springer Science+Business Media, **2006**, ISBN 0-387-31278-1.
- 5 RIDDLE, D.: Coral Coloration: Fluorescence: Part 1, *Advanced Aquarist's Online Magazine* [online] **2006**, Vol. 5, No. 9. [cit. 2012-01-26]. Dostupné z: <[http://www.advancedaquarist.com/2006/9/aafeature\\_album/Figure1.JPG/view](http://www.advancedaquarist.com/2006/9/aafeature_album/Figure1.JPG/view)>
- 6 RAGER, Ch.; SCHMID, G.; HANACK, M.: Influence of Substituents, Reaction Conditions and Central Metals on the Isomer Distribution of 1(4)-Tetrasubstituted Phthalocyanines, *Chem. Eur. J.*, **1999**, Vol. 5, No. 1, pp. 280-288.
- 7 CANLICA, M.; NYOKONG, T.: Synthesis and photophysical properties of 1,1'-binaphthol substituted phthalocyanines, *Inorg. Chim. Acta.*, **2010**, Vol. 363, No. 13, pp. 3384–3389.
- 8 YOUSSEF, T. E.: Efficient green procedures for the preparation of novel tetraalkynyl-substituted phthalocyanines, *Polyhedron*, **2010**, Vol. 29, No. 7, pp. 1776-1783.
- 9 TOLBIN, A. Yu.; PUSHKAREV, V. E.; TOMILOVA, L. G.; ZEFIROV, N. S.: Synthesis and spectral properties of new planar binuclear phthalocyanines sparing the benzene ring, *Russ. Chem. Bull.*, **2006**, Vol. 55, No. 7, pp. 1155-1158.

- 
- 10 DUBININA, T. V.; BORISOVA, N. E.; PARAMONOVA K. V.; TOMILOVA, L. G.: Synthesis and spectral properties of dodecaphenyl-substituted planar binuclear naphthalocyanine magnesium complex sharing a common benzene ring, *Mendeleev Commun.*, **2011**, Vol. 21, No.3, pp. 165–167.
- 11 JANCZAK, J.; KUBIAK R.: X-ray single crystal investigation of magnesium phthalocyanine. The 4 + 1 coordination of Mg ion and its consequence, *Polyhedron*, **2001**, Vol. 20, No. 24-25, pp. 2901-2909.
- 12 GACHO, E. H.; IMAI, H.; TSUNASHIMA, R.; NAITO, T.; INABE, T.; KOBAYASHI, N.: Synthesis, Isolation and Structural Characterization of the C<sub>4h</sub> Isomer of Metal (1,2-naphthalocyanine) and Its One-Dimensional Conductor of the Axially Substituted Species, *Inorg. Chem.*, **2006**, Vol. 45, No. 10, pp. 4170-4176.
- 13 GABERKORN, A.; DONZELLO, M.-P.; STUZHIN, P. A.: Synthesis and Spectroscopic Study of *tert*-Butyl-Substituted Benzoporpyrazines with Fused 1,2,5-Thiadiazole Fragments, *Russ. J. Org. Chem.*, **2006**, Vol. 42, No. 6, pp. 929-935.
- 14 FAUST, R.; MITZEL, F.: NIR chromophores from small acetylenic building blocks: a Diels-Alder approach to octaalkynylphthalocyanines, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **2000**, No. 22, pp. 3746 – 3751.
- 15 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**, Vol. 178, No. 1, pp. 16 – 25.
- 16 VAGIN, S.; HANACK, M.: Synthesis and Some Properties of Aryl- and Aryloxy-Substituted Phthalocyanines and Their Metal Complexes: A Comparison with Porphyrazine and Naphthalocyanine Analogues, *Eur. J. Org. Chem.*, **2004**, Vol. 2004, No. 3, pp. 600-606.
- 17 CALVETE, M. J. F.; DINI, D.; FLOM, S. R.; HANACK, M.; PONG, R. G. S.; SHIRK, J. S.: Synthesis of Bisphthalocyanine and Its Nonlinear Optical Properties, *Eur. J. Org. Chem.*, **2005**, Vol. 2005, No. 16, pp. 3499-3509.
- 18 DUBININA, T. V.; PISKOVOI, R. A.; TOLBIN, A. Yu.; PUSHKAREV, V. E.; VAGIN, M. Yu.; TOMILOVA, L.G.; ZEFIROV, N. S.: Synthesis of new lanthanoide naphthalocyanine complexes based on 6,7-bis(phenoxy)-2,3-naphthalodinitrile and their spectral and electrochemical investigation, *Russ. Chem. Bull.*, **2008**, Vol. 57, No. 9, pp. 1912 – 1919.

- 
- 19 KOKAREVA, E. A.; PETROV, O. A.; KHELEVINA, O. G.: Acid and Complex-Forming Properties of Tetrapyrazinoporphyrazines, *Russ. J. Gen. Chem.*, **2009**, Vol. 79, No. 11, pp. 2440-2444.
- 20 DONZELLO, M. P.; OU, Z.; DINI, D.; MENEGHETTI, M.; ERCOLANI, C.; KADISH, K. M.: Tetra-2,3-pyrazinoporphyrazines with Externally Appended Pyridine Rings. 2. Metal Complexes of Tetrakis-2,3-[5,6-di(2-pyridyl)pyrazino]porphyrazine: Linear and Nonlinear Optical Properties and Electrochemical Behavior, *Inorg. Chem.*, **2004**, Vol. 43, No. 26, pp. 8637-8648.
- 21 NOMBONA, N.; CHIDAWANYIKA, W.; NYOKONG, T.: Photophysical behavior of asymmetrically substituted metal free, Mg and Zn phthalocyanines in the presence of folic acid, *Polyhedron*, **2011**, Vol. 30, No. 4, pp. 654 – 659.
- 22 CAMMIDGE, A. N.; CHAMBIER, I.; COOK, M.; HUGHES, D. L.; RAHMAN, M.; SOSA-VARGAS, L.: Phthalocyanines Analogues: Unexpectedly Facile Access to Non-Peripherally Substituted Octaalkyl Tetrabenzotriazaporphyrins, Tetrabenzodiazaporphyrins, Tetrabenzomonoazaporphyrins and Tetrabenzoazaporphyrins, *Chem. Eur. J.*, **2011**, Vol. 17, No. 11, pp. 3136-3146.
- 23 LEZNOFF, C. C.; SCOTT BLACK, L.; HIEBERT, A.; CAUSEY, P. W.; CHRISTENDAT, D.; LEVER, A. B. P.: Red manganese phthalocyanines from highly hindered hexadecaalkoxyphthalocyanines, *Inorg. Chim. Acta*, **2006**, Vol. 359, No. 9, pp. 2690-2699.
- 24 PETRIK, P.; ZIMCIK, P.; KOPECKY, K.; MUSIL, Z.; MILETIN, M.; LOUKOTOVA, V.: Protonation and deprotonation of nitrogens in tetrapyrazinoporphyrazine macrocycles, *J. Porphyrins Phthalocyanines*, **2007**, Vol. 11, No. 7, pp. 487-495.
- 25 ZIMCIK, P.; MILETIN, M.; KOSTKA, M.; SCHWARZ, J.; MUSIL, Z.; KOPECKY, K.: Synthesis and comparison of photodynamic activity of alkylheteroatom substituted azaphthalocyanines, *J. Photochem. Photobiol., A*, **2004**, Vol. 163, No. 1-2, pp. 21–28.