

UNIVERZITA KARLOVA

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy



Studium rozpoznávacích částí sensorických azafthalocyaninů

Disertační práce



Mgr. Lukáš Lochman

Vedoucí disertační práce:

Doc. PharmDr. Veronika Nováková, Ph.D.

Odborný konzultant:

Doc. PharmDr. Petr Zimčík, Ph.D.

Hradec Králové 2017

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

V Hradci Králové, listopad 2017

.....

Mgr. Lukáš Lochman

Na tomto místě bych rád poděkoval především svým školitelům Doc. PharmDr. Veronice Novákové, Ph.D. a Doc. PharmDr. Petru Zimčíkovi, Ph.D. za jejich odborné vedení během mého PGS studia, podnětné rady a trpělivost.

Děkuji také kolegům Doc. PharmDr. Miroslavu Miletínovi, Ph.D., Mgr. Janu Švecovi, Ph.D., Mgr. Miloslavu Macháčkovi, Ph.D., Mgr. Antonínu Cidlinovi, Ph.D., Mgr. Janu Kollárovi a Mgr. Jiřímu Demuthovi z laboratoří výzkumné skupiny „AzaPc Group“ a všem členům Katedry farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy za příjemné pracovní prostředí. PharmDr. Jaroslavu Rohovi, Ph.D. děkuji za odborné konzultace a spolupráci. Chtěl bych také poděkovat studentům Mgr. Štěpánce Uhlířové, Patricii Šeminské a Soni Vodilkové za spolupráci na některých projektech.

Rád bych poděkoval Assoc. Prof. Sergeji Borisovovi, Ph.D. za vedení mého výzkumného projektu během stáže na „Graz University of Technology“ (Graz, Rakousko). Dr. Langovi a Dr. Kirakcimu z Akademie věd ČR děkuji za přípravu nanočástic.

V neposlední řadě děkuji svým rodičům, bratrově Martinovi a přítelkyni Petře za pochopení a velkou podporu během celého studia.

Tato disertační práce vznikla za finanční podpory těchto grantů a projektů:

Grantová agentura Univerzity Karlovy (GAUK: 494214)

Grantová agentura Univerzity Karlovy (GAUK: 1182313)

Grantová agentura Univerzity Karlovy (GAUK: 1916214)

Grantová agentura České republiky (GAČR: 13-27761S)

Univerzitní výzkumné centrum UK (UNCE 33/2012)

Program PRVOUK 190/11/1110-3

Projekt SVV 260 401

Stipendium programu AKTION Rakousko – ČR (ICM-2015-00621)

ABSTRAKT

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra: Katedra farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy

Kandidát: **Mgr. Lukáš Lochman**

Školitel: **Doc. PharmDr. Veronika Nováková, Ph.D.**

Konzultant: **Doc. PharmDr. Petr Zimčík, Ph.D.**

Disertační práce: **Studium rozpoznávacích částí sensorických azaftalocyaninů**

Azaftalocyaniny (AzaPc) jsou planární makrocyclické látky s unikátními fotofyzikálními vlastnostmi, jako jsou absorpce a emise nad 650 nm a vysoké kvantové výtěžky fluorescence. U alkylamino substituovaných AzaPc byl objeven jev zvaný intramolekulární přenos náboje (ICT), který je zodpovědný za účinné zhášení excitovaných stavů (nefluorescentní OFF stav). ICT probíhá mezi donorem (periferní amin) a akceptorem (makrocyclické jádro). Pokud zablokujeme probíhající ICT, dojde k obnovení kompetitivní relaxační cesty formou silné emise fluorescence (fluorescentní ON stav). ICT v AzaPc lze blokovat dvěma způsoby: Protonizací donoru, kterého se využívá u pH-senzitivních AzaPc senzorů, nebo koordinací kationtu kovu do rozpoznávací části typické pro AzaPc senzory citlivé ke kationtům kovu. Výše zmíněné vlastnosti předurčují AzaPc, aby se staly novými fluorescenčními senzory s dobrou svítivostí a výhodnou absorpcí a emisí červeného světla, které může pronikat hluboko do tkání díky nízké interferenci s endogenními chromofory.

Téma této disertační práce bylo zaměřeno na studium rozpoznávací části sensorických AzaPc citlivých ke kationtům kovů s cílem odhalit klíčové strukturní faktory ovlivňující selektivitu a citlivost senzoru a připravit senzor vysoce selektivní a citlivý k určitému analytu. Má práce začala projektem studujícím vliv velikosti aza-crownu jako rozpoznávací části na selektivitu senzoru. Bylo zjištěno, že velikost aza-crownu je klíčovým faktorem pro selektivní vázání kationtů alkalických kovů ale ne kationtů kovů alkalických zemin pravděpodobně kvůli vyšší elektronové hustotě dané jejich dvojmocným charakterem. Druhý projekt se zabýval využitím dvou aza-crownů ve specifickém uspořádání nazývaném „tweezer“ (pinzeta). Takovéto zvýšení rigidity rozpoznávací části způsobilo signifikantní zlepšení selektivity i citlivosti senzoru k požadovanému

analytu s téměř žádnou zkříženou citlivostí k jiným testovaným analytům. Hlavní nevýhoda této série, nízké hodnoty kvantového výtěžku fluorescence v ON stavu senzoru z důvodu nutnosti blokovat obě donorová centra, byla překonána ve třetím projektu, kde jsme využili znalosti získané z předešlých projektů. Tyto senzory měly jen jedno donorové centrum a zvýšení rigidity bylo dosaženo připojením lariat etherů nebo dalšího crownu. Výsledkem byly připravené AzaPc senzory vysoce selektivní k K^+ s 3,2× vyššími hodnotami kvantových výtěžků fluorescence v ON stavu ve srovnání se senzory ze série s aza-crowny v uspořádání „tweezer“.

V rámci mé výzkumné stáže ve skupině Assoc. Prof. Sergeje Borisova na „Graz University of Technology“ (Graz, Rakousko) jsem se zaměřil na možnost využít pH-senzitivní AzaPc pro přípravu nových CO_2 senzorů. Nejprve byla nalezena vhodná metoda pro imobilizaci AzaPc k podpůrné fólii, a poté jsme prozkoumali možnost použití nových alternativních maticí založených na polyuretanových elastomerech s různým obsahem vody (5-25 %). Dále jsme se zabývali také ovlivněním citlivosti senzoru k pCO_2 volbou báze ze skupiny tetraalkylammonium-hydroxidů, které se lišily délkou svého uhlovodíkového řetězce. Fólie s AzaPc indikátorem byla nakonec vložena na špičku skleněného vlákna a použita v experimentu pro předvedení možnosti použít takovéto zařízení ve skutečné aplikaci (např. pro monitorování CO_2 v dechu).

ABSTRACT

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Kralove

Department: Department of Pharmaceutical Chemistry and Pharmaceutical Analysis

Author: **Mgr. Lukas Lochman**

Supervisor: **Doc. PharmDr. Veronika Novakova, Ph.D.**

Advisor: **Doc. PharmDr. Petr Zimcik, Ph.D.**

Doctoral Thesis: **Study of recognition moieties of sensoric azaphthalocyanines**

Azaphthalocyanines (AzaPcs) are planar macrocyclic compounds with unique photophysical properties like absorption and emission over 650 nm and high quantum yields of fluorescence. Alkylamine substituted AzaPcs have been shown to undergo an ultrafast intramolecular charge transfer (ICT) which is responsible for efficient quenching of excited states (nonfluorescent OFF state). ICT occurs between donor (peripheral amine) and acceptor (macrocyclic core). Blocking of ICT leads to restoration of high fluorescence emission (fluorescent ON state) which is the competitive relaxation pathway. There are two known possible ways how to block ICT in AzaPcs so far: By protonation of donor in pH sensitive AzaPc sensors or by coordination of metal cation into the recognition moiety resulting in cation sensitive AzaPc sensors. Above-mentioned properties predestinate AzaPcs to become new fluorescent sensors with good brightness and advantageous absorption and emission of red light deep penetrating into the tissues thank low interference with endogenous chromophores.

The topic of my dissertation was focused on the study of the recognition moiety of sensoric AzaPcs sensitive to metal cations with the aim to disclose structural key factors influencing sensor selectivity and sensitivity, and to prepare a sensor highly selective and sensitive to a desired analyte. My work began with the project studying the effect of the size of aza-crown recognition moiety on the sensor selectivity. It was clearly demonstrated that the size of aza-crown is the key factor for selective binding of alkali metal cations but not for alkaline earth metal cations probably due to the higher electron density given by their divalent character. Second project dealt with the introduction of two aza-crowns in a specific arrangement called tweezer. Such an increase of rigidity of recognition moiety resulted in significant improvement

of the both sensor selectivity and sensitivity to desired analyte with almost no-cross sensitivity to other analytes tested. The main drawback of this series, i.e. low fluorescence quantum yields in ON state of sensor due to the necessity of blocking the both donor centers, was overcome in the third project combining knowledge obtained in the first two projects. These sensors had just one donor center whereas increased rigidity was achieved by the attachment of an either lariat ether or an additional crown. As a result, AzaPc sensors highly selective to K^+ with 3,2× higher fluorescence quantum yields in ON state in comparison with tweezer-like sensors were developed.

The possibility to use pH-sensitive AzaPcs in development of new CO_2 sensors was investigated during my research stay in the group of Assoc. Prof. Sergey Borisov at Graz University of Technology (Graz, Austria). Firstly, the method for immobilization of AzaPc to a support foil was successfully developed. It was followed by the study of the possibility to use new alternative matrices based on polyurethane elastomers with different content of water uptake (5-25 %). Then, we focused on the tuning of the sensor sensitivity to pCO_2 by the choice of the base from the group of tetraalkylammonium hydroxides differing in the length of alkyl chain. Finally, the foil containing AzaPc indicator was inserted on the tip of glass fiber and used in an experiment demonstrating the possibility to use such device in real application (e.g. for monitoring CO_2 in breathe).

OBSAH

1.	Seznam použitých zkratek.....	13
2.	Formulace problematiky a způsob řešení.....	15
3.	Cíl disertační práce.....	16
4.	Přehled současného stavu řešené problematiky.....	18
4.1	Ftalocyaniny a azaftalocyaniny.....	18
4.2	Vlastnosti Pc a AzaPc.....	19
4.2.1	Absorpční vlastnosti.....	20
4.2.2	Fotofyzikální a fotochemické vlastnosti.....	25
4.3	Přenos elektronu - PET a ICT.....	29
4.4	Fluorescenční senzory.....	31
4.4.1	Struktura fluorescenčního senzoru.....	32
4.4.2	Principy funkce fluorescenčních senzorů.....	32
4.4.3	Požadavky na optimální senzor pro biologickou aplikaci.....	36
4.5	Fluorofory.....	39
4.6	Přehled komerčně dostupných senzorů pro rozpoznávání kationtů kovů.....	44
4.7	pH a CO ₂ senzory pracující na principu RET.....	46
4.8	pH a CO ₂ senzory tvořící dvě formy.....	47
4.8.1	Fluorescein a jeho deriváty.....	47
4.8.2	8-hydroxypyren-1,3,6-trisulfonát (HPTS).....	48
4.8.3	Seminaftofluoresceiny (SNAFL) a seminaftorhodafluory (SNARF).....	49
4.8.4	Cyaninová barviva a ligandy ruthenia.....	49
4.9	Azaftalocyaniny jako fluorofory.....	51
4.9.1	Strukturální aspekty ovlivňující ICT a vlastnosti AzaPc.....	52
4.10	AzaPc jako senzory pro rozpoznávání kationtů kovů.....	56
4.11	AzaPc jako pH senzory.....	58
4.11.1	AzaPc pro měření v kyselé oblasti pH.....	58
4.11.2	AzaPc pro měření v zásadité oblasti pH.....	59
4.11.3	AzaPc operující v úzké oblasti pH prostředí OFF-ON-OFF senzory.....	61
5.	Metodická část.....	63
5.1	Příprava Pc a AzaPc.....	63
5.1.1	Příprava prekurzorů pro Pc a AzaPc.....	64
5.1.2	Příprava Pc a AzaPc makrociklu – cyklizační reakce.....	65
5.2	Metody pro studium fotofyzikálních vlastností Pc a AzaPc.....	67
5.2.1	Kvantový výtěžek fluorescence (fluorescence quantum yield, Φ_F).....	67

5.2.2	Vazebná konstanta	67
5.2.3	Zesilující faktor fluorescence (fluorescence enhancement factor, FEF)	67
5.2.4	Jobova metoda kontinuálních variací.....	68
6.	Experimentální část.....	69
6.1	Látky připravené v rámci projektu [P1].....	71
6.2	Látky připravené v rámci projektu [P2].....	82
6.3	Látky připravené v rámci projektu [P3].....	89
6.4	Fotofyzikální studium AzaPc senzorů [P1-3]	96
6.4.1	Výpočet Φ_F	96
6.4.2	Stanovení vazebné konstanty.....	96
6.4.3	Výpočet FEF	97
6.4.4	Stanovení stechiometrie vazby senzor/analyt Jobovou metodou	97
6.4.5	Fluorescenční titrace NP.....	97
6.5	Příprava CO ₂ senzorů [P4].....	98
6.6	Fotofyzikální studium CO ₂ senzorů [P4]	101
7.	Výsledky a diskuze.....	102
7.1	Studium rozpoznávacích částí AzaPc senzorů citlivých ke kationtům kovů	102
7.1.1	Vliv velikosti aza-crownu na selektivitu a senzitivitu AzaPc senzoru [P1].....	103
7.1.2	Vliv rigidity rozpoznávací části AzaPc senzoru na vazbu analytu [P2].....	109
7.1.3	Porovnání rozpoznávacích částí AzaPc senzorů [P3].....	116
7.2	Vývoj a studium nových CO ₂ senzorů založených na pH-senzitivních AzaPc [P4].....	123
8.	Závěr.....	130
9.	Seznam publikovaných vědeckých a odborných prací.....	132
10.	Granty, výzkumné stáže a ocenění.....	135
11.	Seznam literatury	137
12.	Seznam příloh.....	150

1. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AzaPc	azaftalocyanin (azaphthalocyanine)
BCECF	2',7'-bis(2-karboxyethyl)-5(6)-karboxyfluorescein (2',7'-bis(2-carboxyethyl)-5(6)-carboxyfluorescein)
BODIPY	boron-dipyrromethen (boron-dipyrromethene)
CSS	charge separated state
CTC	charge transfer complex
DAPI	4',6-diamidin-2-fenylindol (4',6-diamidino-2-phenylindole)
DBU	1,8-diazabicyklo[5,4,0]undec-7-en
DMF	<i>N,N</i> -dimethylformamid
DMSO	dimethylsulfoxid
DOPC	dioleoylfosfatidylcholin (dioleoylphosphatidylcholine)
DPP	diketo-pyrrolo-pyrrol
dppn	4,7-difenyl-1,10-fenantrolin (4,7-diphenyl-1,10-phenanthroline)
FEF	zesilující faktor fluorescence (fluorescence enhancement factor)
Φ_f	kvantový výtěžek fluorescence (fluorescence quantum yield)
FRET	Försterův rezonanční přenos energie (Förster resonance energy transfer)
GC	plynová chromatografie (gas chromatography)
GFP	zelený fluorescenční protein (green fluorescent protein)
HOMO	nejvyššího obsazený orbital (highest occupied molecular orbital)
HPLC	vysoce účinná kapalinová chromatografie (high-performance liquid chromatography)
HPTS	8-hydroxypyren-1,3,6-trisulfonát
ICT	intramolekulární přenos náboje (intramolecular charge transfer)

IČ	infračervená spektroskopie
LUMO	nejnižším neobsazený orbital (lowest unoccupied molecular orbital)
MeCN	acetonitril
MeOH	methanol
NADH	nikotinamidadenindinukleotid
NP	nanočástice (nanoparticle)
PBFI	potassium-binding benzofuran isophthalate
Pc	ftalocyanin (phthalocyanine)
PDT	fotodynamická terapie (photodynamic therapy)
PET	světlem vyvolaný přenos elektronu (photo-induced electron transfer)
PETE	polyethylentereftalát (polyethylene terephthalate)
RET	rezonanční přenos energie (resonance energy transfer)
SBFI	sodium-binding benzofuran isophthalate
SNAFL	seminaftofluorescein (seminaphthofluorescein)
SNARF	seminaftorhodafluor (seminaphthorhodafluor)
TBAH	tetrabutylammonium-hydroxid
TEAH	tetraethylammonium-hydroxid
TEOS	tetraethylorthosilikát
THF	tetrahydrofuran
TLC	chromatografie na tenké vrstvě (thin layer chromatography)
TOAH	tetraoktylammonium-hydroxid
t.t.	teplota tání
ZnPc	nesubstituovaný zinečnatý ftalocyanin (unsubstituted zinc phthalocyanine)

2. FORMULACE PROBLEMATIKY A ZPŮSOB ŘEŠENÍ

V současné době je kladen velký důraz na vývoj nových neinvazivních vyšetřovacích metod pro stanovení hladin rozdílných iontů (např. Na^+ , K^+ , Li^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+}) v těle,^[1] které mohou mít přímou souvislost s patogenním procesem uvnitř organismu.^[2] Většina instrumentace (vysoce účinná kapalinová chromatografie (HPLC), plynová chromatografie (GC), potenciometrie) je nepřenosná, velmi nákladná a vyžaduje vyškoleného operátora. Proto mezi těmito dobře zavedenými metodami zaujaly své nesporné místo fluorescenční senzory jako rychlá, přesná a dostupná varianta.^[1-3]

Molekula senzoru mění své fluorescenční vlastnosti v závislosti na přítomnosti určitého analytu. Současným trendem je vývoj zařízení obsahujících senzor(-y) v podobě tzv. kitů pro hodnocení hladin iontů nebo pH případně CO_2 , O_2 v těle pacienta nebo přístrojů umožňujících vzdálené snímání pomocí senzorů, které jsou jako součást zařízení umístěny na špičce optického vlákna.^[1, 2, 4, 5] Hlavními nedostatky komerčně dostupných fluorescenčních senzorů je většinou nevhodná oblast absorpce a emise pro biologické aplikace (pod 600 nm), nízká svítivost, nedostatečná fotostabilita nebo zkřížená citlivost na pH prostředí (neplatí pro pH senzory).^[2]

Naše skupina se již 15 let zabývá přípravou a vlastnostmi azaftalocyaninů (AzaPc) pro vývoj fotosenzitizérů pro fotodynamickou terapii (PDT),^[6, 7] nicméně teprve v době vypracování mé diplomové práce jsme přišli s myšlenkou využít AzaPc jako fluorescenční senzory.^[8] Velkou výzvou byla především oblast senzorů citlivých ke kationtům kovů, u kterých by AzaPc tvořil vlastní fluorofor a periferně navázaný aza-crown pak rozpoznávací část. Takovéto senzory by byly schopny překlenout výše zmíněné nevýhody, neboť pro AzaPc jsou typické absorpce a emise v červené oblasti spektra a vysoká hodnota extinkčního koeficientu v hlavním absorpčním pásu. Dokonalé zhášení v OFF stavu je v námi navrhovaném konceptu senzorů zajištěno tzv. *intramolekulárním přenosem náboje* (intramolecular charge transfer, ICT),^[9] který by měl být po koordinaci citlivého analytu do rozpoznávacího centra senzoru blokován, což se projeví signifikantním nárůstem intenzity fluorescence (ON stav senzoru). Práce v této oblasti byla započata během mé diplomové práce, kdy jsme pouze potvrdili správnost navrženého konceptu AzaPc senzorů pro kationty kovů.^[8] Dalším logickým krokem bylo detailní studium rozpoznávací části (velikost aza-crownu, rigidita, atd.) AzaPc senzoru, sledování vlivu prostředí a především pak popsání vztahů mezi strukturou a jejich sensorickými vlastnostmi. Tyto poznatky by měly následně vést k přípravě senzoru vysoce selektivního a citlivého k určitému kationtu kovu.

3. CÍL DISERTAČNÍ PRÁCE

Jak bylo uvedeno výše, vývoj nových fluorescenčních senzorů je v současné době velmi žádoucí a to z důvodu jejich nesporných výhod, jako je jejich vysoká citlivost, rychlá odezva a kompatibilita s biologickým prostředím.^[3] Sensory nacházejí široké uplatnění v medicíně při monitorování hladin iontů v těle (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Li^+), při monitorování plynů v dechu (O_2 , CO_2) nebo v zobrazovacích metodách.^[2] Hlavními nevýhodami komerčně dostupných senzorů je jejich slabá svítivost a absorpce jen při nízkých vlnových délkách. To nabízí dostatečný prostor pro vývoj strukturně nových látek s vylepšenými vlastnostmi. A to vedlo k myšlence prostudovat možnost použít AzaPc jako nové fluorescenční senzory pro rozpoznávání kationtů kovů nebo pro kvantifikaci pCO_2 v prostředí.

Největší výhodou AzaPc je jejich silná absorpce a emise v červené oblasti spektra (nad 650 nm, extinkční koeficienty $2\text{--}3 \times 10^5 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ v hlavním absorpčním pásu). U alkylamino substituovaných AzaPc byl objeven proces ICT,^[9] který probíhá mezi periferním aminem (donor) a AzaPc makrocylem (akceptor). ICT účinně zhasí excitované stavy molekuly (OFF stav senzoru). Avšak po navázání analytu do rozpoznávacího centra senzoru je ICT blokováno, a to se projeví nárůstem fluorescence (ON stav senzoru). Přímé spojení donorového aminu k makrocylem AzaPc snižuje jeho bazicitu a poskytuje tak další velkou výhodu v podobě necitlivosti senzoru k pH prostředí.

První projekt zabývající se AzaPc senzory pro kationty kovů^[8] řešený v rámci mé diplomové práce potvrdil možnost použít AzaPc jako fluorescenční senzory. Připravené sloučeniny byly sice preferenčně citlivé k K^+ a Na^+ , avšak do rozpoznávacího centra byly vázány i jiné kationty (Li^+ , NH_4^+ , Ba^{2+}), které byly schopny částečně přepnout senzor do ON stavu. Proto se mým hlavním cílem disertační práce stalo detailně prozkoumat klíčové strukturní faktory ovlivňující selektivitu a senzitivitu AzaPc senzoru k vybraným analytům a dále pak se pokusit vyvinout vysoce selektivní a senzitivní senzor emitující v červené oblasti spektra. Moje práce bude vždy nejprve zahrnovat přípravu požadovaných AzaPc, popsání jejich spektrálních a fluorescenčních vlastností s důrazem na změnu těchto vlastností v přítomnosti různých kationtů kovů. Z dosažených výsledků budou vyvozeny vztahy mezi strukturou a senzoryckými vlastnostmi. Na základě těchto závěrů bude vždy navržena nová série AzaPc senzorů s vylepšenými vlastnostmi.

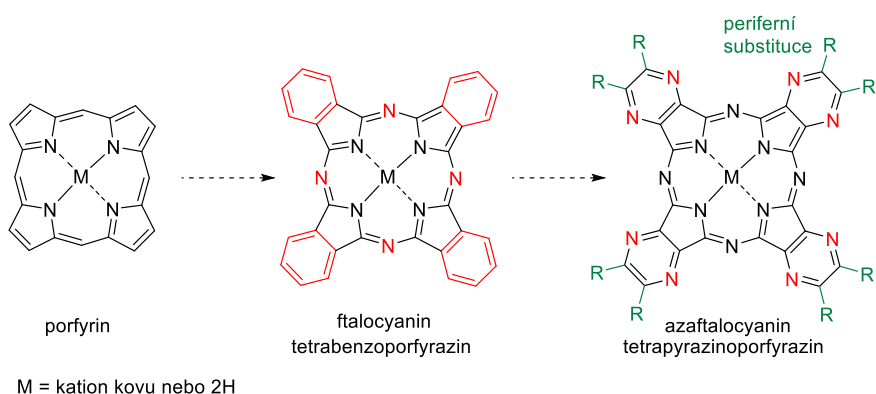
Další částí mé práce vypracované během stáže na „Graz University of Technology“ (Graz, Rakousko) se bude zabývat možností využití pH senzitivních AzaPc pro přípravu plastických CO_2

fluorescenčních senzorů. V rámci tohoto projektu bylo třeba optimalizovat podmínky pro imobilizaci AzaPc na fólii z polyethyltereftalátu (PETE) (výběr matrice, rozpouštědlo, báze), a poté ověřit citlivost senzorů na $p\text{CO}_2$ měřením změn intenzity fluorescence. Posledním krokem by mělo být ověření senzorických vlastností v reálné aplikaci senzoru.

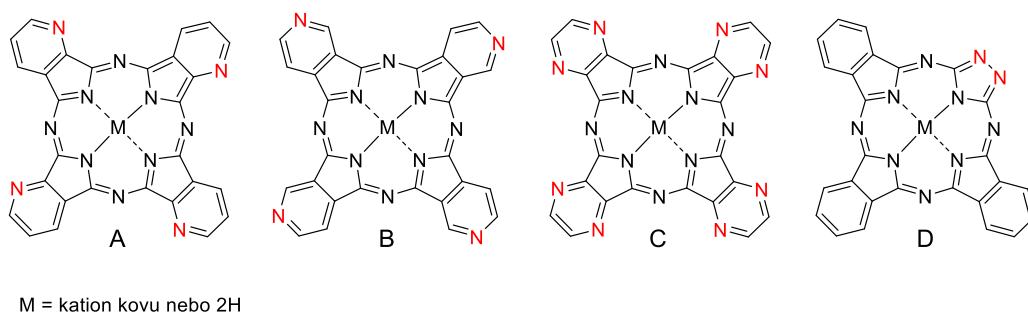
4. PŘEHLED SOUČASNÉHO STAVU ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

4.1 Ftalocyaniny a azaftalocyaniny

Ftalocyaniny (Pc) jsou planární makrocyclické látky s rozsáhlým systémem konjugovaných dvojných vazeb, který jim poskytuje unikátní fotofyzikální vlastnosti. Předlohou pro uměle připravené Pc byly přírodní porfyriny (**Obr. 1**), které jsou známy jako významné látky v metabolických procesech, jako je fotosyntéza nebo přenos kyslíku červenými krvinkami. Molekula Pc je složena ze čtyř isoindolinových jednotek spojených v polohách 1 a 3 azomethinovými můstky.^[10] Izosterní záměnou benzenových jader za jádra pyrazinová lze odvodit aza-analogy Pc tzv. tetrapyrazinoporfyraziny patřící do široké skupiny AzaPc nejznámější struktury jsou uvedeny na **Obr. 2**.



Obr. 1 Struktura porfyriu a odvozené struktury ftalocyaninu a azaftalocyaninu.



Obr. 2 Aza-analogy ftalocyaninů: tetrapyrroloporfyraziny (A, B), tetrapyrazinoporfyraziny (C) a triazoloftalocyaniny (D).^[11]

Izosterní záměnou a vznikem AzaPc dochází ke změnám některých vlastností oproti původním Pc. AzaPc jsou výhodnějšími z hlediska snazší přípravy prekurzorů, což je obecně dáno vyšší reaktivitou pyrazinu než ftalonitrilu. Výhodou může také být nižší lipofilita a lepší rozpustnost.^[12] Hlavními nevýhodami AzaPc jsou vyšší tendence agregovat a posun hlavního absorpčního pásu k nižším vlnovým délkám.^[13]

Pc/AzaPc komplexy mohou mít v centru chelatovaný kationt kovu nebo mohou existovat ve formě bez centrálního kationtu jako tzv. *bezkovové deriváty*. Dle literatury Pc mohou chelatovat do svého centra přes 70 různých kationtů kovů (Zn^{2+} , Mg^{2+} , Cu^{2+} , Si^{4+} , Ge^{4+}).^[10] Podobné vlastnosti můžeme očekávat také v méně prozkoumané skupině AzaPc díky stejné velikosti centrální dutiny.^[12] Volba centrálního kationtu kovu makrocyclu je velmi důležitým faktorem, neboť ovlivňuje finální vlastnosti molekuly, a proto se výběr kationtu kovu liší dle zamýšlené aplikace molekuly.

Důležitou modifikací Pc/AzaPc molekuly je také volba vhodných periferních substituentů, které zásadně ovlivňují finální vlastnosti látky. Pro modifikaci molekuly můžeme použít dva přístupy. První je založen na modifikaci již připravených Pc/AzaPc pomocí aromatické elektrofilní substituce (např. sulfonace oktafenyl substituovaného AzaPc reakcí s kyselinou chlorsulfonovou)^[12] nebo reakcí spojených s hydrolýzou esterových nebo nitrilových skupin na periferii Pc/AzaPc. Druhý přístup zahrnuje vhodnou substituci prekurzorů a následnou cyklizační reakci.^[13] Můžeme takto velmi snadno měnit tyto parametry: rozpustnost v organických nebo vodných rozpouštědlech; snížit tendenci agregovat (sterické zabránění^[14] nebo zabránění vlivem elektrostatických odpuzivých sil),^[15] spektrální vlastnosti (absorpce, emise), biologická aktivita.^[12]

4.2 Vlastnosti Pc a AzaPc

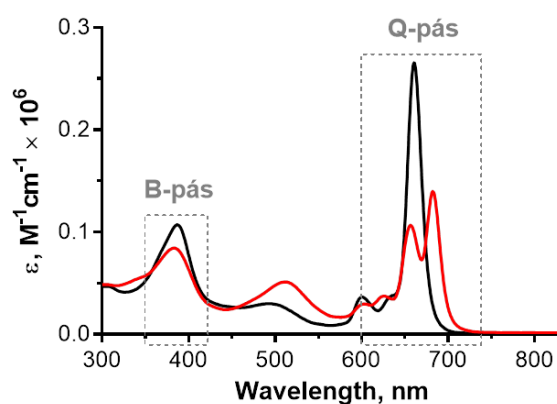
Pc a AzaPc jsou strukturně příbuzné sloučeniny, a proto i jejich níže popisované absorpční, fotofyzikální a fotochemické vlastnosti jsou podobné. Případné rozdíly mezi Pc a AzaPc jsou vždy uvedeny a porovnány.

4.2.1 Absorpční vlastnosti

Pc a AzaPc jako látky s π -konjugovaným systémem vazeb jsou schopny absorbovat světlo ve viditelné oblasti (390 – 760 nm), a to je důvodem jejich typického modrozeleného zabarvení. V absorpčním spektru Pc a AzaPc jsou snadno rozpoznatelné dva hlavní absorpční pásy. Vysokoenergetický B pás (Soretův pás) v oblasti blízko ultrafialového světla (320-380 nm),^[16] který se u Pc a AzaPc téměř nemění, a nízkoenergetický Q pás ležící ve viditelné oblasti světla 650-720 nm. Izosterní záměnou benzenových jader v Pc makrocyklu za pyrazinová dojde k výraznému hypsochromickému posunu Q pásu o 40-60 nm,^[6] proto je Q pás u AzaPc posunut k nižším vlnovým délkám do oblasti 620-670 nm.

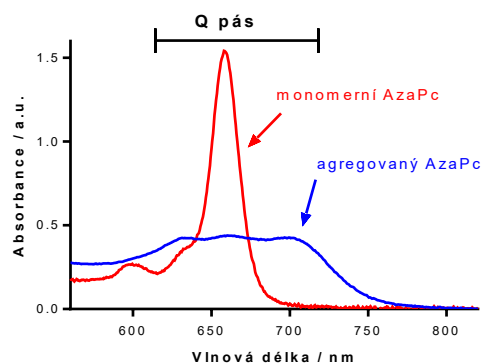
Informaci o tom, jak silně daná látka absorbuje (jak je zeslabena intenzita světla po průchodu vrstvou prostředí látky), vyjadřuje tzv. *extinkční koeficient*, který představuje součet koeficientu absorpce a koeficientu rozptylu světla v určitém prostředí.^[17] Hodnoty extinkčních koeficientů v maximu Q pásu pro Pc a AzaPc jsou srovnatelné s hodnotami okolo $1-3 \times 10^5 \text{ mol}^{-1} \text{ dm}^{-3} \text{ cm}^{-1}$.^[16] Z tvaru Q pásu můžeme snadno vyčíst další důležité informace týkající se nejen čistoty sloučeniny,^[11] ale dají se z něj získat i další informace o zkoumané sloučenině (viz níže).

Tvar Q pásu poskytuje informace týkající se symetrie/asymetrie sloučeniny. Symetrický Pc/AzaPc komplex s centrálním kationtem kovu má ostrý, neštěpený Q pás – sloučenina se nachází v termodynamicky stabilním stavu jako delokalizovaný dianion s vysokou mírou symetrie (**Obr. 3**). Rozštěpený Q pás je charakteristický pro nesymetrické molekuly s rozdílnými periferními substituenty nebo při ztrátě symetrie v případě symetricky substituovaných bezkovových derivátů Pc/AzaPc. V molekule Pc/AzaPc bez centrálního kovového kationtu dva isoindolové centrální dusíky vážou atomy vodíku a zbylé dva dusíky jsou zapojeny do formy iminu.^[11]



Obr. 3 Absorpční spektrum symetrického zinečnatého AzaPc (černá čára) a odpovídající bezkovový AzaPc (červená čára) (převzato a upraveno).^[18]

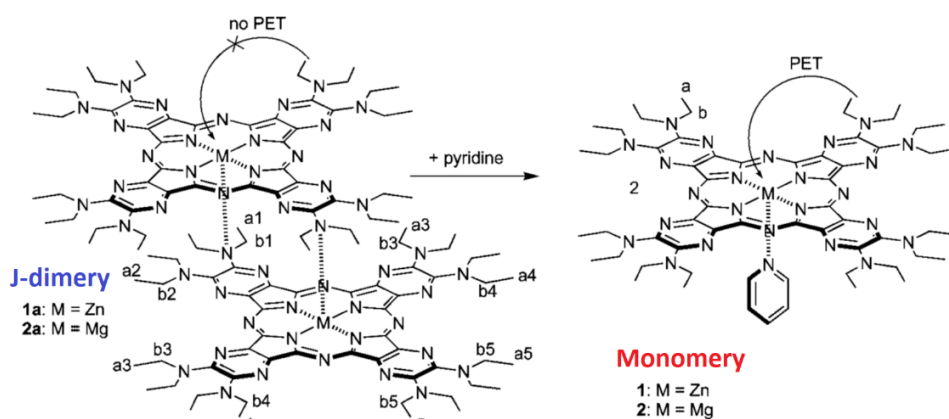
Pc/AzaPc jako planární molekuly mají tendenci vlivem $\pi-\pi$ interakcí agregovat a formovat se do dimerů, trimerů případně vyšších oligomerů.^[11, 13] Agregace je nežádoucí jev, který je spojen s dramatickou ztrátou fotochemických vlastností a rozpustnosti molekuly. Agregaci je možné sledovat v absorpčním spektru, kde se projeví širokým Q pásem o nižší intenzitě s výskytem nových absorpčních maxim (Obr. 4).^[11]



Obr. 4 Změny tvaru Q pásu absorpčního spektra: monomerní symetrický AzaPc a agregovaný AzaPc.

Rozlišujeme dva hlavní typy agregátů: H- a J-dimery. H-dimery tvoří Pc/AzaPc běžně, molekuly se v tomto případě orientují jako „head to head“. Absorpční spektrum je posunuto hypsochromně a roztok má nižší intenzitu fluorescence. H-dimery lze snadno rozvolnit přidáním rozpouštědla s koordinačním charakterem (např. pyridin), zředěním nebo zvýšením teploty. J-dimery se tvoří méně často a jsou v porovnání s H-dimery více stabilní. Molekuly jsou orientovány jako „head to tail“ a absorpční spektrum je posunuto bathochromně. Tvorba J-dimerů a jejich rozvolňování bylo detailně studováno naší skupinou na diethylaminosubstituovaných AzaPc (Obr. 5).^[19]

Další příčinou vzniku nového absorpčního pásu posunutého k červené části spektra může být také částečná protonizace azomethinových dusíků makrocycly.^[20]



Obr. 5 Struktury studovaných AzaPc J-dimerů a příslušných monomerů v toluenu. Proces ICT je blokován tvorbou AzaPc dimeru (převzato a upraveno).^[19]

Ovlivnění polohy a tvaru Q pásu v absorpčním spektru Pc/AzaPc je možno docílit:

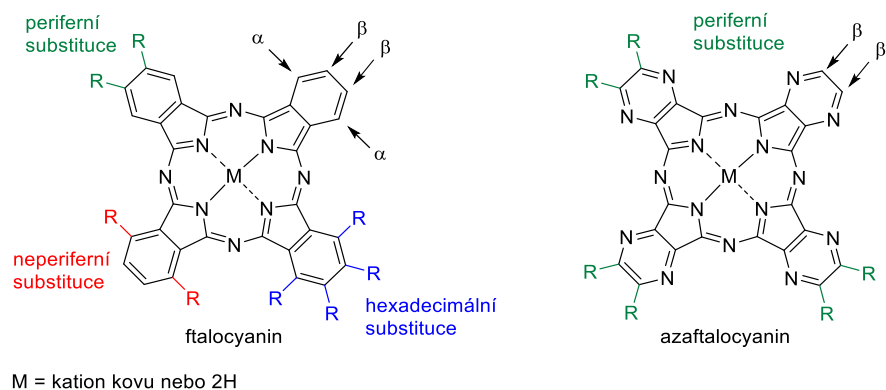
- Volbou centrálního kationtu kovu

V závislosti na velikosti, koordinačních vlastnostech a oxidačním stavu kationtu kovu může dojít k posunu Q pásu až o 100 nm (v rozsahu mezi 620-720 nm). Například Pc/AzaPc komplexy s chelatovanými kationty kovů s plně obsazenými orbitaly (Mg^{II} , Zn^{II}) mají Q pás v oblasti okolo 670 nm, naproti tomu kationty kovů s ne plně obsazenými orbitaly (Fe^{II} , Co^{II} , Ru^{II}) silně interagují s makrocykly a dochází k posunu Q pásu do oblasti 630-650 nm.^[11, 21] Příkladem vlivu oxidačního stavu centrálního kationtu kovu může být posun absorpčního maxima v komplexech $Co^I Pc$ (704 nm) \rightarrow $Co^{II} Pc$ (658 nm) \rightarrow $Co^{III} Pc$ (673 nm).^[22, 23]

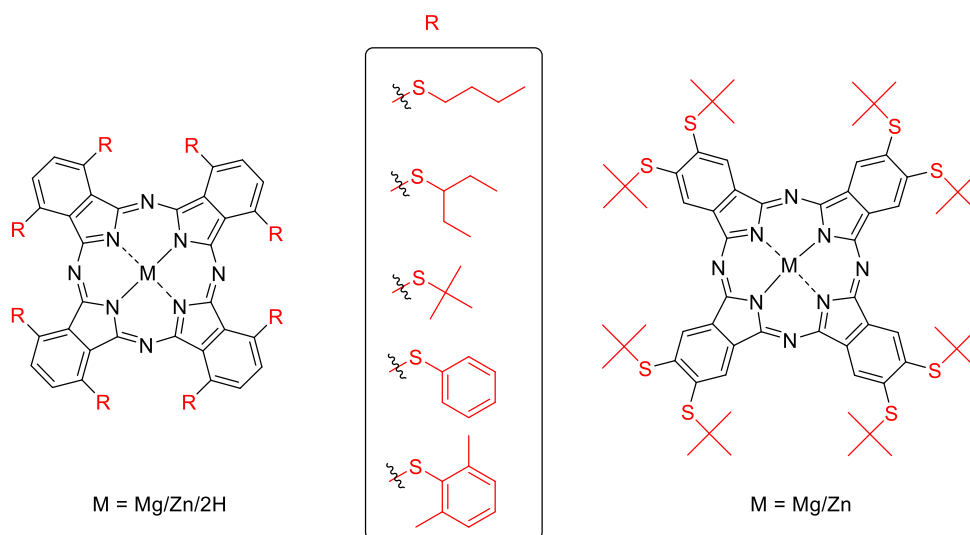
- Volbou periferních, neperiferních substituentů

Prekurzory Pc i AzaPc mohou být substituovány různými substituenty, pomocí kterých lze ovlivňovat fyzikální, elektronické a spektrální vlastnosti z nich připravených makrocyclů. Ovlivnění posunu absorpčních spekter periferní substitucí makrocyclu je však komplexnější záležitostí a je obecně založeno na tom, jak daný substituent přispívá/nepřispívá do systému konjugovaných vazeb. Příkladem může být alkyloxy- nebo aryloxy- substituovaný AzaPc s absorpcí v oblasti 630-635 nm, naproti tomu AzaPc s alkylamino- nebo alkylsulfanylovými substituenty absorbuje o 20 nm výše při 655 nm.^[6]

U Pc je možná substituce neperiferní i periferní (α a β) na rozdíl od AzaPc, kde je možná pouze substituce periferní (β) z důvodu obsazených poloh atomy dusíku (**Obr. 6**). Na posun v absorpčním spektru má větší vliv substituce v poloze α . Toho lze využít například u substituovaných Pc, kdy změna substituce totožných substituentů z periferní (β) polohy do neperiferní (α) polohy vede k bathochromnímu posunu Q pásu až o 70 nm.^[24, 25] Tento efekt byl pozorován a potvrzen také naší skupinou na sérii alkylsulfanyl- a arylsulfanyl- substituovaných Pc (**Obr. 7**). Současně byl pozorovaný i opačný jev, kdy extrémní zakřivení molekuly Pc při substituci objemnými *tert*-butylsulfanylovými skupinami vedlo k hypsochromnímu posunu Q pásu z důvodu pravděpodobného narušení π -elektronového systému,^[26] což bylo v souladu s dříve publikovanými výsledky Dumoulin a jejich spolupracovníků ve studii popisující stejný efekt u odpovídajícího bezkovového Pc.^[27] Vedle posunu Q pásu byly u série neperiferně substituovaných Pc pozorovány vyšší kvantové výtěžky fluorescence ve srovnání s Pc substituovanými periferně, na druhé straně však tyto látky vykazovaly nižší fotostabilitu.^[26]



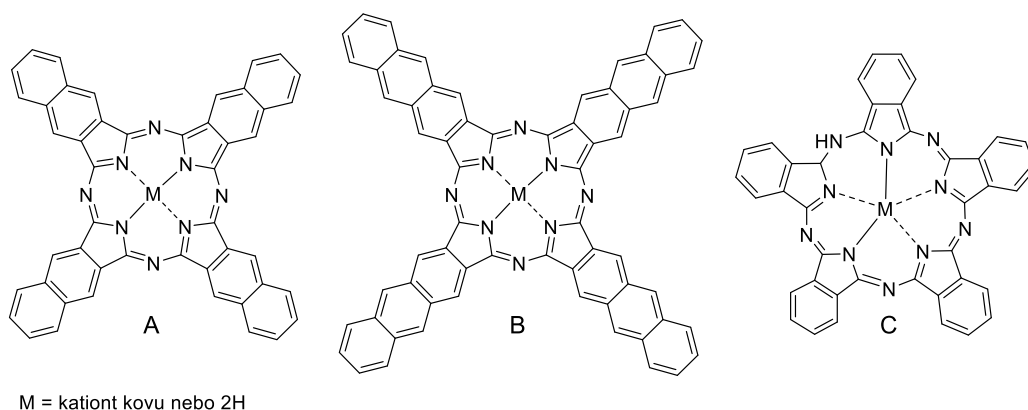
Obr. 6 Volné polohy pro substituci u Pc a AzaPc, uhlíky α pro neperiferní substituci a uhlíky β pro periferní substituci.



Obr. 7 Struktury Pc zapojené do studia vlivu neperiferní substituce (převzato a upraveno).^[26]

- Rozšířením systému konjugovaných dvojných vazeb

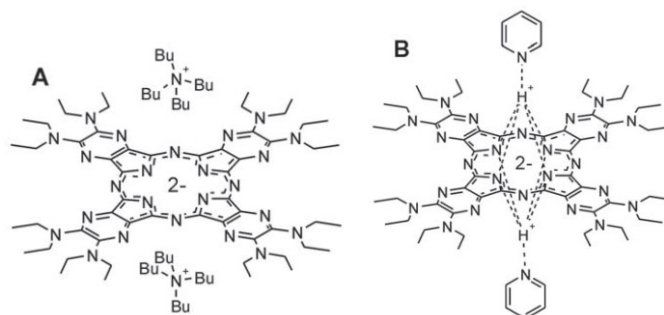
Anelace dalších cyklů na periferii vede k posunu o 80-100 nm k vyšším vlnovým délkám. Vkládáním dalších cyklů jsou odvozovány nové makrocycly z Pc \rightarrow naftalocyaniny \rightarrow antracencyaniny nebo superftalocyaniny^[11] (**Obr. 8**) a z AzaPc \rightarrow tetra[2,3]chinoxalinoporfyraziny^[28, 29] nebo tetra[6,7]chinoxalinoporfyraziny.^[30, 31] Bylo popsáno, že rozšíření π -systému vazeb o jedno benzenové jádro vede k červenému posunu o 20-30 nm u Pc^[11] a o 22 nm u AzaPc.^[31]



Obr. 8 Příklad rozšíření π -systému vazeb u Pc: naftalocyaniny (A), antracenocyaniny (B) a superftalocyaniny (C).^[11]

- Vliv rozpouštědla

Volba rozpouštědla ovlivňuje jen minimálně posun v absorpčním spektru tzv. *solvatochromní posun* – posun způsobený interakcí rozpouštědla s molekulou Pc/AzaPc. Vhodným výběrem rozpouštědla (methanol (MeOH), dimethylsulfoxid (DMSO), pyridin) lze však výrazně omezit nežádoucí agregaci molekul Pc/AzaPc nebo rozvolnit agregované komplexy.^[11] Při výběru takového rozpouštědla látka vykazuje monomerní charakter s ostrým Q pásem. Zvláštním případem interakce rozpouštědla charakteru slabé báze (*N,N*-dimethylformamid (DMF), DMSO, pyridin) a bezkovového AzaPc je tzv. „*proton transfer komplex*“. V tomto případě nejsou centrální dusíky AzaPc kompletně deprotonizovány za vzniku dianiontu, jako by tomu bylo v případě přidavku silné báze (tetrabutylammonium-hydroxid, TBAH),^[32] ale vzniká koordinační komplex AzaPc/rozpouštědlo (**Obr. 9**). Molekula bezkovového AzaPc takto získává opět symetrii, a to se projeví pouze jedním ostrým Q pásem v absorpčním spektru. S tímto fenoménem souvisí také další změny fotofyzikálních a fotochemických vlastností molekuly.^[33, 34]

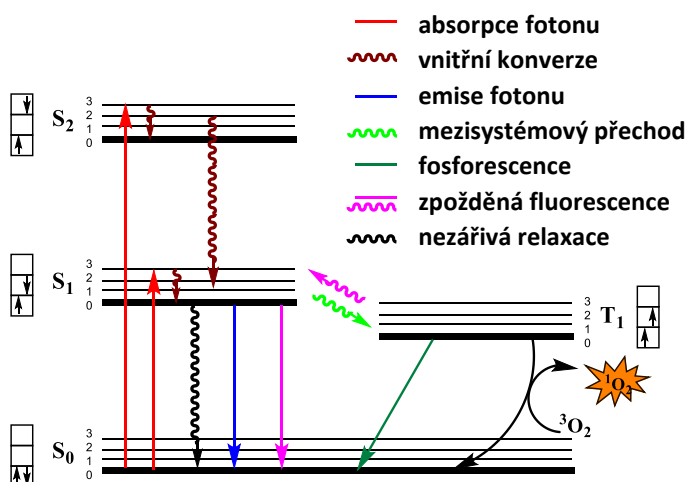


Obr. 9 Schéma deprotonace AzaPc po přidavku silné báze TBAH (A), proton transfer komplex AzaPc/rozpouštědlo po přidavku slabé báze – rozpouštědlo pyridin (B).^[33]

4.2.2 Fotofyzikální a fotochemické vlastnosti

Popis fotofyzikálních a fotochemických vlastností Pc/AzaPc je spojen s přechody molekul do excitovaných stavů s následným návratem do stavu základního, proto jsou tyto vlastnosti často prezentovány pomocí Jablonského diagramu, který bývá modifikován pro konkrétní případ relaxace studované látky. Dle Jablonského diagramu můžeme takto vysvětlit nejen princip fluorescence a fosforescence ale i ostatní možné děje vedoucí k relaxaci molekuly do základního stavu, jako je zhášení, přenos energie nebo interakce s rozpouštědlem.

Jablonského diagram (**Obr. 10**) má znázorněný základní singletový stav S_0 , první a druhý excitovaný stav S_1 a S_2 horizontálními čarami, přičemž každý stav lze ještě rozdělit na vibrační energetické hladiny (0, 1, 2 a 3). Přechody mezi energetickými stavy jsou vyznačeny vertikálními šipkami (zářivé procesy – šipka rovná, nezářivé procesy – vlnitá šipka).



Obr. 10 Modifikovaný Jablonského diagram (převzato a upraveno).^[2]

Molekuly s dostatečně rozsáhlým π -systémem mají schopnost přijmout energii ve formě fotonu a dostat se tak ze základního stavu do některé z vibračních hladin excitovaného stavu S_1 nebo S_2 .^[2, 35] Foton může být absorbován jen za podmínky, že jeho energie je právě rovna rozdílu energií energetických hladin dané molekuly.^[35] Přechod mezi stavy trvá 10^{-15} s, což je příliš krátká doba pro vychýlení jádra (tzv. *Franck-Condonův princip*).^[2] Excitovaná molekula většinou rychle ztrácí část své energie svou rotací a srážkami s ostatními molekulami, čímž se dostává na nejnižší vibrační hladinu S_1 . Tento děj se nazývá *vnitřní konverze* a trvá asi 10^{-12} s. Pokud molekula přijme další foton, je znovu excitována a dostává se do hladiny S_2 , ze které se opět vrací vnitřní konverzí po ztrátě energie na některou z energetických hladin S_1 v čase 10^{-12} s a pak znovu vnitřní konverzí

na nejnižší energetickou hladinu S_1 opět za 10^{-12} s.^[35] Z nejnižší vibrační hladiny S_1 je umožněna relaxace molekuly do základního stavu jednou z mnoha cest: fluorescence (emise fotonu) nebo formou nezářivých procesů (ztráta energie srážkami nebo interakcemi s okolními molekulami, mezisystémový přechod, přenos elektronu). Jednotlivé děje jsou blíže popsány v následujících kapitolách.

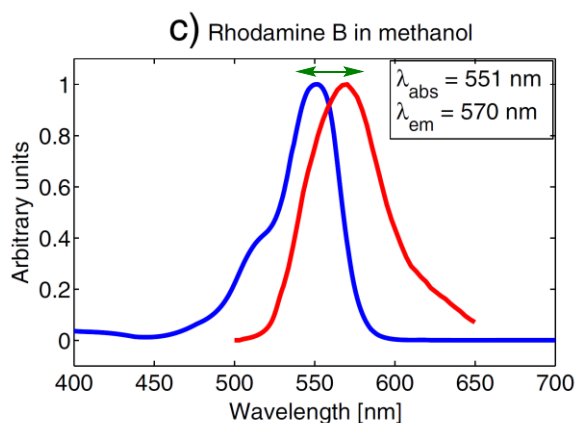
Všechny níže zmíněné procesy relaxace excitované molekuly ze stavu S_1 jsou navzájem kompetitivní děje a molekula může v reálném případě relaxovat všemi procesy současně. Pro zjištění pravděpodobnosti relaxace molekuly určitým způsobem byly zavedeny tzv. *kvantové výtěžky*. Například *kvantový výtěžek fluorescence* Φ_F , je definovaný jako poměr počtu emitovaných fotonů (fluorescence) na počet absorbovaných fotonů.

Fluorescence (emise fotonu)

Pokud molekula uvolní foton, dostává se ze stavu S_1 do jedné z vibračních hladin základního stavu (S_0) o vyšší energii, což se projeví širokým fluorescenčním spektrem. Opět platí, že energie emitovaného fotonu musí být rovna rozdílu mezi energetickými hladinami dané molekuly.^[2, 35] Pro úplnost je nutné uvést, že doba života fluorescence trvá většinou déle než vnitřní konverze (okolo 10^{-8} s), to je důvodem proč před fluorescencí ve většině případů probíhá vnitřní konverze molekuly a následná relaxace formou fluorescence probíhá vždy z nejnižší vibrační hladiny (S_1).^[2] Vnitřní konverzí se pak může molekula dostat z vibrační hladiny o vyšší energii základního stavu (S_0) na hladinu základního stavu (S_0) s nejnižší energií.

Díky zmíněným ztrátám při přechodu mezi vibračními hladinami je jasné, že energie uvolněná při emisi je vždy nižší, než byla energie přijata při absorpci. Fluorescence probíhá tedy za nižších energií, a tedy vyšších vlnových délek. Tento jev byl poprvé pozorován v roce 1852 sirem G. G. Stokesem a byl po něm pojmenován jako tzv. *Stokesův posun*. Na ztrátu energie mezi absorpcí a emisí mohou mít vliv kromě zmíněné vnitřní konverze i další faktory např. vliv rozpouštědla, reakce v excitovaném stavu, formace do komplexů nebo přenos energie, apod.^[2]

Při studiu fluorescence je měřena závislost intenzity fluorescence na vlnových délkách (tzv. *emisní (fluorescenční) spektrum*). Zajímavostí je, že emisní spektrum je zrcadlovým obrazem spektra absorpčního (**Obr. 11**). Dále je možné sledovat také závislost intenzity fluorescence na vlnové délce při konstantní vlnové délce emitovaného záření (tzv. *excitační spektrum*). U Pc a AzaPc většinou nedochází ke změně struktury v excitovaném stavu, excitační spektrum je proto shodné se spektrem absorpčním a může tak sloužit k prokázání monomerního stavu sloučenin.



Obr. 11 Zrcadlový obraz **absorpčního** a **emisního** spektra rhodaminu B v MeOH, Stokesův posun vyznačen **šipkou** (převzato a upraveno).^[36]

Nezářivé procesy

Formu relaxace molekuly nezářivými procesy můžeme rozdělit na tepelnou ztrátu energie, ztrátu energie srážkami nebo interakcemi s okolními molekulami a mezisystémový přechod.

Ztráta energie srážkami nebo interakcemi s okolními molekulami

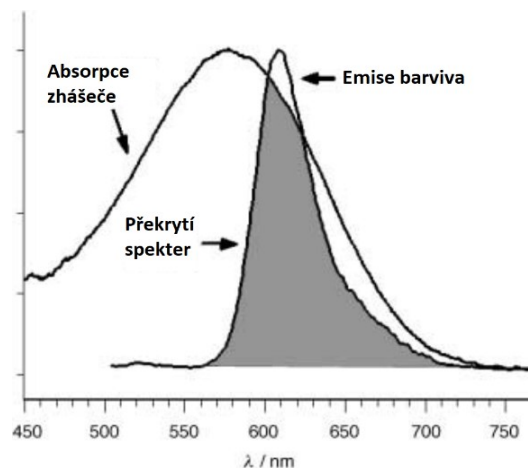
Návrat z excitovaných stavů do stavů základních (S_0) probíhá vlivem interakcí s ostatními molekulami v prostředí několika různými mechanismy.

Dynamické zhášení je založeno na přenosu energie ve formě elektronu v momentě, kdy se donor nachází v excitovaném stavu, patří sem např. Försterovo a Dexterovo zhášení.^[37] *Dexterovo zhášení* (kolizní přenos energie) probíhá formou výměny elektronu mezi excitovanou molekulou (donorem) a zhášečem (akceptorem). Po excitaci má donor elektron v nejnižším neobsazeném orbitalu („lowest unoccupied molecular orbital“, LUMO). Elektron je poté předán donorem na akceptor (zhášeč) a ten ho předá zpět ze svého nejvyššího obsazeného orbitalu („highest occupied molecular orbital“, HOMO) donorovi tak, že akceptor zůstává v excitovaném stavu.^[2]

Během přenosu energie pomocí *rezonančního přenosu energie* („resonance energy transfer“, RET) excitovaná molekula (donor) přenesse elektron z HOMO do LUMO a po interakci se zhášečem se dostává do základního stavu. Energie je pak vyzářena ve formě tepla nebo emisí fotonu (fluorescence). V obou popsaných případech dynamického zhášení je velmi důležitá

vzdálenost donor-akceptor a překrytí emisního spektra donoru s absorpčním spektrem akceptoru (**Obr. 12**).

Statické zhášení je založeno na tvorbě dimeru molekuly v základním stavu (S_0) se zhášečem. Vzniklý dimer má své unikátní vlastnosti a nedovolí, aby se molekula po absorpci fotonu dostala ze základního (S_0) do excitovaného stavu (S_1 nebo S_2). Příkladem může být agregace molekul barviv. Vlivem jejich hydrofobního charakteru nasedají na sebe, aby tak minimalizovaly kontakt s vodným rozpouštědlem.^[2, 37]



Obr. 12 Překrytí emisního spektra donoru (barviva) s absorpčním spektrem zhášeče (převzato a upraveno).^[37]

Další možností zhášení excitovaných stavů je *světlem vyvolaný přenos elektronu* („photo-induced electron transfer“, PET) a ICT. Těmto mechanismům se budu věnovat detailněji v kapitole 4.3. Mimo uvedené mechanismy relaxace může molekula ztratit energii i *fotchemickou reakcí* nebo *reakcí excitovaných stavů*.^[2]

Mezisyntémový přechod („Intersystem crossing“)

Excitovaná molekula se dostává ze singletového stavu S_1 na nejnižší energetickou hladinu tripletového stavu T_1 . Tento přechod je označován jako *spinově zakázaný*, neboť v tripletovém stavu jsou elektrony uloženy v orbitalech paralelně, tzn., že mají souhlasný spin. Když se nacházely v singletovém stavu S_0 , S_1 nebo S_2 byly jejich spiny vzájemně opačné. Děje založené na změně spinu probíhají poměrně vzácně, jejich pravděpodobnost však můžeme zvýšit přítomností atomu s vyšším atomovým číslem. V závislosti na volbě atomu roste pravděpodobnost spin-orbitalových interakcí v řadě $Mg \rightarrow Ca \rightarrow Zn \rightarrow Sr \rightarrow Cd \rightarrow Ba \rightarrow Hg$. Tato závislost se nazývá *efekt těžkého atomu* („heavy atom effect“).^[2]

Z tripletového stavu se může molekula následně vrátit do základního stavu fosforescencí (10^{-2} - 10^2 s) nebo přijmout další tepelnou energii a dostat se zpět do S_1 stavu a odtud *zpožděnou fluorescencí* do stavu základního (S_0).^[35] Další možností je předání energie v tripletovém stavu jiné molekule nacházející se také v tripletovém stavu (T_0) (např. tkáňovému O_2). V tomto případě vzniká vysoce reaktivní singletový kyslík (1O_2), který se využívá v PDT.^[38]

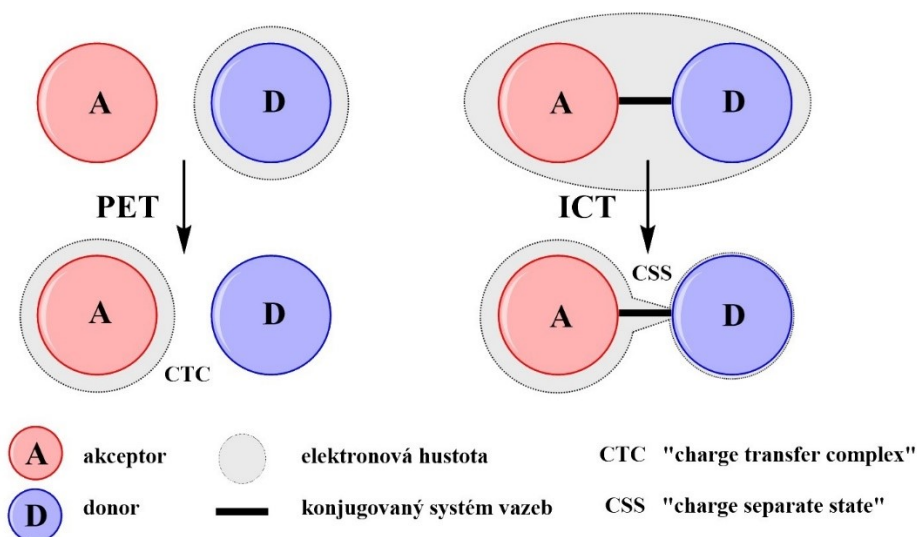
4.3 Přenos elektronu - PET a ICT

Zvláštním případem relaxace molekuly ze stavu (S_1) do základního stavu (S_0) je přenos elektronu, který probíhá jako PET nebo ICT proces. Tyto děje jsou v současnosti čteně využívány v návrhu nových fluorescenčních senzorů nebo případně zhášeců fluorescence.

Pro PET je typický „přeskok“ elektronu z donoru na akceptor na určitou vzdálenost. Na velmi krátkou chvíli vzniká „charge transfer complex“ (CTC), ze kterého se molekula dostává do základního stavu (S_0) jinými mechanismy než je fluorescence. V praxi si elektron předává molekula bohatá na elektrony tzv. *donor* (např. amin, fenolát) s molekulou schopnou přijmout elektrony tzv. *akceptor* (aromatická látka). V případě opačného redoxního potenciálu může donorem být i zhášec a akceptorem fluorofor (př. dvojice indol a RCOOH).^[1]

ICT je děj podobný PET, hlavním rozdílem je, že donor a akceptor jsou při ICT v konjugaci a při zhášení během excitace nedochází k přeskoku elektronu na určitou vzdálenost, ale jen posunutí náboje („push-pull“ princip) uvnitř jedné molekuly, tedy redistribuci elektronové hustoty a vytvoření dipólu.^[1] Namísto CTC se tvoří „charge separated state“ (CSS), kdy dochází ke zvýšení elektronové hustoty v oblasti akceptoru. CTC a CSS stavy se nacházejí energeticky níže než stav S_1 , protože část energie byla spotřebována právě na tvorbu těchto komplexů.

PET a ICT jsou dva rozdílné děje (**Obr. 13**), avšak způsobují v obou případech velmi účinné zhášení excitovaných stavů molekuly. Důvodem je vysoká rychlost procesů, která zajišťuje, že ostatní procesy v relaxaci molekuly se téměř nemají možnost uplatnit.^[2]



Obr. 13 Přenos elektronu během PET a ICT.

Největší vliv na účinnost PET a ICT procesů mají:

- Charakter rozpouštědla

Polární rozpouštědla (MeOH, acetonitril (MeCN), DMF, DMSO) stabilizují komplexy CTC a CSS a tím podporují přenos elektronu, nepolární rozpouštědla těmto procesům naopak brání (toluen, benzen).^[39]

- Vzdálenost donoru a akceptoru^[40]

Rychlost přenosu elektronu klesá s rostoucí vzdáleností donoru a akceptoru exponenciálně.^[41, 42] Přenos elektronu mezi donorem a akceptorem neprobíhá na vzdálenost větší než 20 Å.^[42] Vliv vzdálenosti donoru a akceptoru na průběh ICT u AzaPc byl také nedávno studován naší výzkumnou skupinou a výsledky projektu^[20] jsou rozebrány níže (kapitola 4.9.1).

4.4 Fluorescenční senzory

Fluorescenční senzory jsou látky, které mění své fluorescenční vlastnosti jako odpověď v přítomnosti určitého analytu. V současné době jsou fluorescenční senzory intenzivně studovány a vyvíjeny z důvodu jejich výhodných vlastností, jako je citlivost a selektivita k určitému analytu, doba odezvy nebo možnost vzdáleného snímání pomocí optických vláken s imobilizovaným senzorem na špičce vlákna.^[1, 43] Na druhé straně mají oproti jiným analytickým metodám i své nevýhody, jako je nepředvídatelné zhášení, absorpce chromofory v biologických aplikacích nebo limitovaná povrchová aplikace. Tyto slabiny fluorescenčních senzorů se dají však překlenout výběrem vhodného prostředí aplikace nebo instrumentací (endoskopie,^[3] kity pro stanovení analytu v krvi),^[2] a nebo vývojem úplně nových senzorů.

Fluorescenční senzory pro rozpoznávání kationtů kovů (Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+}) jsou důležité při studiu biologických procesů jako je přenos nervových vzruchů, svalová kontrakce, nebo regulace uvnitř buňky, některé ionty (např. Zn^{2+}) jsou také součástí tzv. *metaloenzymů*. V medicíně jsou monitorovány hladiny Li^+ při léčbě maniodepresivní psychózy, K^+ u pacientů při léčbě vysokého krevního tlaku, hladina Al^{3+} je monitorována kvůli toxickému charakteru hliníku a jako potenciální příčina vzniku Alzheimerovi choroby. V oceánografii se senzory uplatňují v monitorování hladin Zn^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} a Mn^{2+} v mořské vodě, které jsou důležité jako koenzymy enzymů důležitých pro potravu některých mikroorganismů. V neposlední řadě monitorování životního prostředí vyžaduje detekovat ionty toxické (Hg^{2+} , Pb^{2+} , Cd^{2+}).^[43] Neméně důležitou skupinou jsou senzory pro stanovení Cl^- , které nacházejí uplatnění při měření přestupu Cl^- membránou buňky.^[2]

Další velmi slibnou oblastí fluorescenčních senzorů je optická detekce pH, která je základem pro měření „krevních plynů“ pCO_2 a pO_2 v krvi pacientů na jednotkách intenzivní péče, předčasně narozených dětí nebo u obětí nehod.^[2] Schopnost pH senzorů měřit pCO_2 je umožněna měřením pH v hydrogenuhličitanu, který je vystaven přítomnosti CO_2 . Různá koncentrace rozpuštěného CO_2 mění disociaci hydrogenuhličitanu a tím i pH, které je přímo úměrné koncentraci plynu.^[2, 44] V této oblasti jsou sice dobře zavedené jiné metody jako infračervená spektroskopie (IČ), GC nebo potenciometrické stanovení pomocí Severinghausových elektrod,^[45] avšak tyto metody mají značné nevýhody (IČ – silná interference s vodou,^[46] GC – nákladnost, Severinghausovi elektrody – pouze nepřímé měření a vhodné pro vyšší tlaky pCO_2),^[45, 47] které mohou být překonány pouze novými fluorescenčními senzory.

4.4.1 Struktura fluorescenčního senzoru

Fluorescenční senzor se skládá z *rozpoznávací části* a *signální části* (tj. *fluoroforu*). Tyto dvě části mohou být spolu spojeny přímo nebo pomocí vhodného spojovacího řetězce (tzv. „*linker*“). *Rozpoznávací část* je zodpovědná za selektivní rozpoznání analytu, její vlastnosti jsou proto přizpůsobeny pro účinnou vazbu konkrétního analytu (iontový poloměr, náboj, koordinační číslo, atd.). Další vliv na rozpoznání analytu má ale také prostředí, kde bude senzor použit (pH, iontová síla v případě vodných roztoků). *Fluorofor* pak převádí informaci o rozpoznání analytu rozpoznávací částí do optického signálu změnou svých fotofyzikálních vlastností (obvykle nárůst fluorescence).^[43]

4.4.2 Principy funkce fluorescenčních senzorů

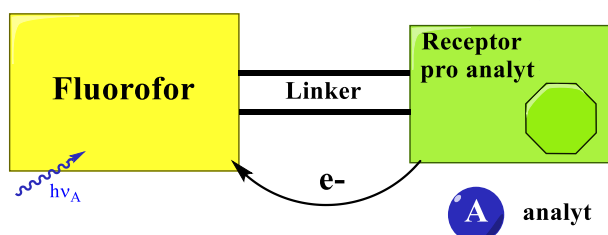
Ve své práci se omezím jen na popis základních nejčastěji se objevujících se mechanismů funkce senzorů: PET, ICT, Försterův rezonanční přenos energie (FRET, „Förster resonance energy transfer“), senzory založené na tvorbě excimeru a senzory založené na principu kolizního zhášení.

- PET senzory

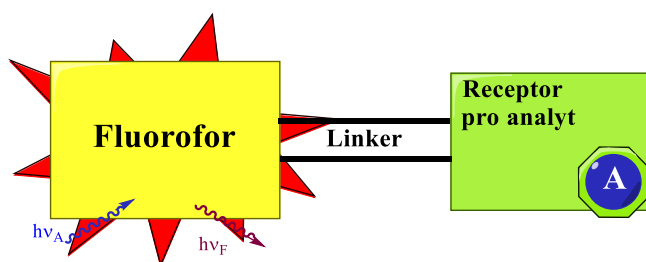
V PET senzorech je rozpoznávací částí *donor* (např. amino skupina,^[43] fenolát,^[48] fulleren)^[49] a signální částí fluorofor, který hraje roli *akceptoru* elektronu. Po excitaci fluoroforu přeskakuje elektron z HOMO orbitalu do neobsazeného LUMO orbitalu fluoroforu, vzniklé prázdné místo v HOMO orbitalu se ihned obsadí elektronem z donoru (amin rozpoznávací části). Senzor nadále nevykazuje fluorescenci (OFF stav), relaxace formou emise fotonu je totiž účinně blokována nezářivým PET procesem (**Obr. 14**). Avšak po navázání analytu do rozpoznávacího centra senzoru je redoxní potenciál donoru zvýšen, energie HOMO orbitalu poklesne, a proto není energeticky výhodné jeho zaplnění elektronem donoru. Tento elektron je pak využit pro vazbu s analytem. Výsledkem je potlačení PET procesu, molekula senzoru se přepne do ON stavu a relaxace probíhá formou emise fotonu (fluorescenci).^[2, 50]

Skupina PET senzorů byla široce studována a na tomto principu bylo připraveno velké množství senzorů s různými rozpoznávacími částmi. Pro rozpoznávání iontů kovů se osvědčily terciární alifatické nebo aromatické aminy nebo aza-crown ethery, které bývají pro vyšší stabilitu s analytem modifikovány do podoby tzv. *kryptandů* nebo *kalixarenů* (**Obr. 15**).^[43]

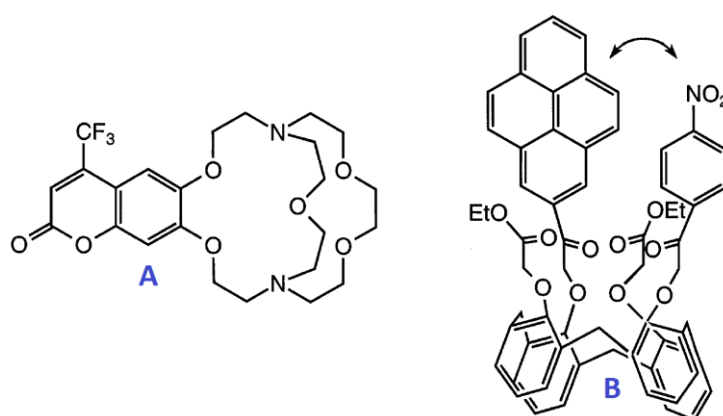
Nefluorescentní - volná forma senzoru bez analytu



Fluorescentní - senzor s navázaným analytem



Obr. 14 Schéma principu PET u fluorescenčních senzorů (převzato a upraveno).^[2]



Obr. 15 Příklady struktur PET senzorů citlivých k Na^+ s modifikovanou rozpoznávací částí do podoby kryptandu (A) nebo kalixarenu (B) (převzato a upraveno).^[43]

- ICT senzory

Princip ICT a PET se v mnohém shoduje, avšak v případě ICT je donor (rozpoznávací část) a akceptor (signální část) ve vzájemné konjugaci a nedochází zde k přeskokům elektronu, ale pouze k posunu elektronových hustot uvnitř molekuly.

Zapojení elektronového páru donoru do konjugace s molekulou senzoru je velmi výhodné z důvodu snížení bazicity terciárního aminu donoru. Tím je snížena často falešná citlivost senzoru vůči kyselému prostředí a je tak zamezeno nežádoucí protonizaci aminu, která je u senzorů důvodem falešně pozitivních výsledků.^[8] Další výhodou u tohoto principu je

možnost senzory využít jako „wavelength-ratiometric probes“, kdy je měřen poměr signálů při dvou excitačních nebo emisních vlnových délkách.^[2] V praxi jsou využívány senzory pro zobrazování Ca^{2+} Fura-2, který je příkladem excitačního typu senzoru, a Indo-1 jako emisní typ senzoru v konceptu měření jako „wavelength-ratiometric probes“.^[2, 51]

- FRET senzory

Přenos energie probíhá mezi donorem (molekulou v excitovaném stavu) a akceptorem (molekulou v základním stavu). Donor obvykle emituje při nižších vlnových délkách a jeho emise se překrývá s absorpčním spektrem akceptoru. Hlavním rozdílem oproti PET a ICT je, že přenos energie je výsledkem dipól-dipól interakcí na dlouhou vzdálenost. Nejde tedy o reabsorpci fotonu a proces nezahrnuje emisi s ní spojenou. Rychlost přenosu energie je dána několika faktory např. šířkou překrytí spekter donoru a akceptoru, kvantovým výtěžkem fluorescence donoru, relativní orientací dipólů donoru a akceptoru a vzdáleností obou molekul od sebe navzájem.^[2, 52]

FRET mechanismus je velmi výhodný ve vývoji senzorů v oblasti fluorescenční mikroskopie, kde je problém zajistit přesnou lokální koncentraci fluoroforu. V tomto případě je možné měření poměru intenzit fluorescence donor-akceptor, které nejsou závislé na celkové intenzitě. Příkladem může být intracelulární RET indikátor pro estrogény využívající zelený fluorescenční protein (GFP).^[53] Dalším využitím může být měření vzdáleností biomolekul, pozorování přenosu energie v buněčné membráně a především sledování procesů spojených s DNA pomocí oligonukleotidových sond.^[2, 52, 54]

- Senzory založené na tvorbě excimeru

Některé molekuly (např. anthracen, pyren) jsou schopny tvořit excitované dimery tzv. *excimery*. Excimery vznikají při přiblížení dvou planárních molekul v excitovaném stavu k sobě. Při relaxaci molekuly do základního stavu je pozorována duální fluorescence při vyšších vlnových délkách vlivem vytvořeného excimeru - spojení dvou molekul fluoroforu dohromady.^[1, 43]

Pro vznik excimeru je důležitá vzdálenost dvou molekul senzoru, ta může být ovlivněna charakterem rozpoznávaného kationtu kovu. Případně kationty kovu mohou být rozpoznávány na principu monitorování změn v poměrech vyskytujících se forem senzoru monomer/dimer, které lze snadno určit z fluorescenčního měření. Vazba iontu kovu může jak podporovat, tak i

bránit vzniku excimeru. Velkou výhodou pro praktické využití je autokalibrace a měření „wavelength-ratiometric probes“.^[50] Pro návrh těchto senzorů jsou voleny struktury typu koronandů,^[55, 56] kalixareňů,^[57] podandů^[58] nebo cyklodextrinů.^[59]

- Sensory založené na principu kolizního zhášení

Tyto senzory pracují na principu dynamického zhášení fluorescence fluoroforu v přítomnosti zhášeče (kapitola 4.2.2). Zhášeč nejprve difunduje k fluoroforu, který je v excitovaném stavu. Po kontaktu fluoroforu se zhášečem se fluorofor vrací do stavu základního bez vyzáření fotonu. Kolizní zhášení popisuje Stern-Volmerova rovnice (1):

$$\frac{F_0}{F} = 1 + k_q \tau_0 [Q] = 1 + K_D [Q] \quad (1)$$

F_0 a F intenzita fluorescence bez přítomnosti a v přítomnosti zhášeče

k_q bimolekulární konstanta zhášeče

τ_0 doba života fluorescence fluoroforu v nepřítomnosti zhášeče

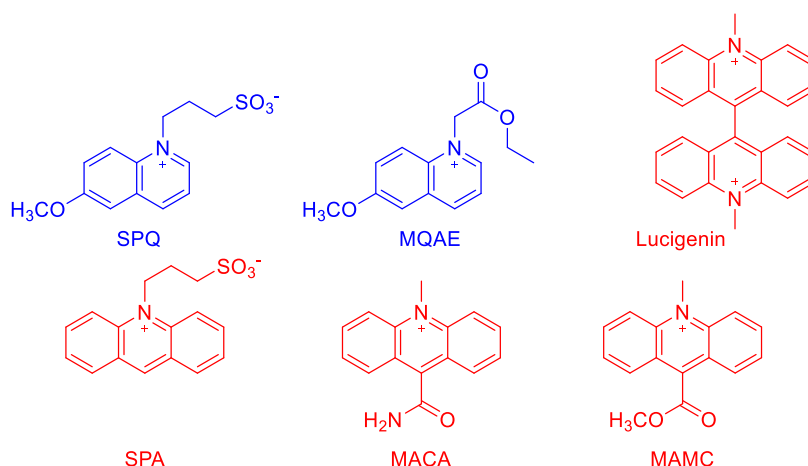
$[Q]$ koncentrace zhášeče

K_D Stern-Volmerova zhášečící konstanta pro dynamické zhášení, kdy $K_D = k_q \tau_0$

Data zhášení jsou pak prezentována jako lineární závislost poměru intenzit fluorescence F_0/F na koncentraci zhášeče $[Q]$.^[2]

Mezi nejznámější zhášeče patří molekulární kyslík, který zháší téměř všechny známé fluorofory, a proto bývá nutné ho vždy odstranit ze vzorků pro získání spolehlivých výsledků při studiu fluorescenčních vlastností.^[60] Aromatické a alifatické aminy jsou účinnými zhášeči většiny nesubstituovaných aromatických uhlovodíků (např. fluorescence anthracenu je zhášena diethylanilinem).^[61] Dalšími zhášeči jsou látky s těžkými atomy jako jód, bróm, chlór (například trichlorethanol nebo bromobenzen). Indol a karbazol a jejich deriváty jsou citlivé na zhášení chlorovanými uhlovodíky, a elektronovými „scavengery“ jako histidin, cystein fumarát, NO_3^- , Cu^{2+} , Pb^{2+} , Cd^{2+} , Mn^{2+} . Mechanismus je v tomto případě pravděpodobně založen na poskytnutí elektronu z fluoroforu na zhášeč. Indol, tryptofan a jejich deriváty jsou zhášeny například akrylamidem, dichloracetamidem, methioninem, Eu^{3+} , Ag^+ , Cs^+ , atd.^[2]

Příkladem reálné aplikace takovýchto senzorů může být studium prostupnosti buněčné membrány. Fluorofor (senzor) může být například navázán na membránu buňky a pokud je membrána buňky permeabilní prostoupí zlášť (Cl⁻) skrz ni, a to se projeví snížením intenzity fluorescence fluoroforu. Z hlediska detekce iontů v biologickém prostředí jsou nejvýznamnější aplikací senzory citlivé k Cl⁻. Známé jsou senzory založené na struktuře chinolinu nebo akridinu, případně se využívá fluorescenčních proteinů.^[2, 62] Struktury těchto sloučenin jsou znázorněny níže na **Obr. 16**.



Obr. 16 Struktury senzorů pro rozpoznávání Cl⁻ iontů založené na struktuře chinolinu nebo akridinu (převzato a upraveno).^[2]

4.4.3 Požadavky na optimální senzor pro biologickou aplikaci

- Citlivost k analytu za podmínek detekce

Citlivost senzoru je dána strukturou rozpoznávacího centra, jeho volba je závislá na druhu analytu. Disociační konstanta (K_D) by se měla shodovat s očekávanou měřenou koncentrací analytu. Koncentrace analytu jsou různé v různých oblastech využití měření. Např. senzory pro Ca²⁺ ($K_D = 0,1-0,3$ mM) navržené Tsienem^[63] jsou vhodné pro měření v buněčné biologii (intracelulární koncentrace Ca²⁺ $\approx 0,1$ mM/l) ale ne pro klinické stanovování vápníku (koncentrace Ca²⁺ v krvi nebo séru okolo 5 mM/l).^[43]

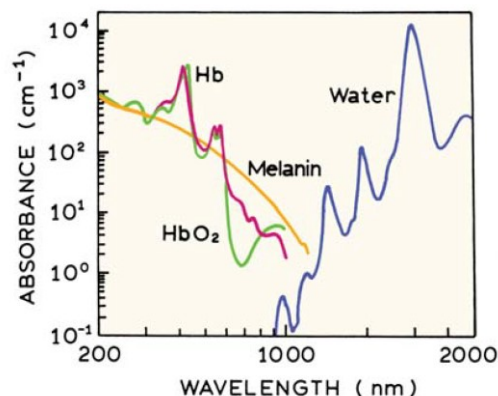
- Svítivost senzoru („brightness“)

Svítivost je definována jako součin extinkčního koeficientu při excitační vlnové délce a kvantového výtěžku fluorescence.^[64] Svítivost je ovlivněna volbou fluoroforu. Vyšší svítivost se

zvyšuje poměr signálu a šumu a současně je třeba méně světla pro excitaci. Poměr signálu a šumu „signal-noise ratio“ je ovlivněn účinností zhasení senzoru v OFF stavu a vysokou fluorescencí v ON stavu.

- Spektrální parametry fluoroforu

Světlo delších vlnových délek (600-1000 nm) v oblasti tzv. *optického okna biologických tkání* je málo pohlcováno endogenními chromofory či rozptylováno heterogenním prostředím (**Obr. 17**), a z toho důvodu lépe prostupuje tkáněmi. Zároveň toto světlo má nižší energii, a tím je sníženo riziko fotopoškození. Obě zmíněná fakta jsou výhodná zejména v biologických aplikacích.^[2, 17]



Obr. 17 „Optické okno biologických tkání“
- absorbance ve tkáních a ve vodě.^[2]

- Koncept měření jako „Wavelength-ratiometric probes“

Obecně můžeme koncepty měření fluorescenčními senzory rozdělit na měření intenzity fluorescence (případně kvantového výtěžku) a na měření poměru signálů při dvou excitačních nebo emisních vlnových délkách tzv. „wavelength-ratiometric probes“. Při měření intenzity dochází k odezvě detektoru jako odpověď na výskyt určitého analytu. Intenzita fluorescence je pak přímo úměrná koncentraci senzoru a neznalost přesné koncentrace v reálném vzorku může značně znesnadnit kvantitativní hodnocení analytu. Tento problém nastává především při využití senzorů v biologických aplikacích, kde je prostředí značně „nedokonalé“ (zakalení vzorku, špína na optických povrchích, rozdílnost biologických materiálů, atd.), a tudíž není možné stanovit přesnou koncentraci senzoru (např. při fluorescenční mikroskopii). Proto je v současnosti velký důraz kladen na vývoj senzorů založených na „wavelength-ratiometric probes“, který tyto nevýhody kompenzuje a umožňuje auto-kalibraci senzoru nezávislou na koncentraci senzoru v daném prostředí. Avšak jen malé množství molekul vykazuje duální změny při dvou různých excitačních nebo emisních vlnových délkách. Výraznou limitací je také ve většině případů nevhodná excitace v UV oblasti způsobující interferenci s biologickým prostředím.^[2, 51]

- Necitlivost k pH prostředí (netýká se pH senzorů)

Při nežádoucí citlivosti na kyselé pH prostředí dochází k protonizaci donorového centra senzoru (např. alifatický terciární amin u PET senzorů) a tím přepnutí senzoru do ON stavu, vzniká falešně pozitivní výsledek. U ICT je terciární amin aromatického charakteru, tím je velmi snížena jeho bazicita (např. u elektroneficientního jádra AzaPc $pK_A \approx -2,5$), čímž tyto látky nejsou citlivé na kyselé pH prostředí a nemůžou touto cestou podávat falešně pozitivní výsledky.^[8]

- Stabilita fluoroforu „*in vitro*“ a „*in vivo*“

Hlavním problémem senzoru je tzv. „photobleaching“ (zesvětlení) nebo někdy uváděno jako „fading“ (blednutí) vedoucí ke ztrátě jeho senzoričských vlastností. Kovalentní vazby fluoroforu jsou rozštěpeny nebo fluorofor senzoru reaguje nespecifickými reakcemi s okolním prostředím a senzor je takto rozložen.^[65] Výsledkem je pak trvalá ztráta fluorescence senzoru. Tento problém je nejčastěji pozorován při využití senzorů ve fluorescenční mikroskopii^[66, 67] a je studován u opakovaného použití senzoričských látek při tzv. „time-lapse imaging“.^[17]

- Farmakokinetika

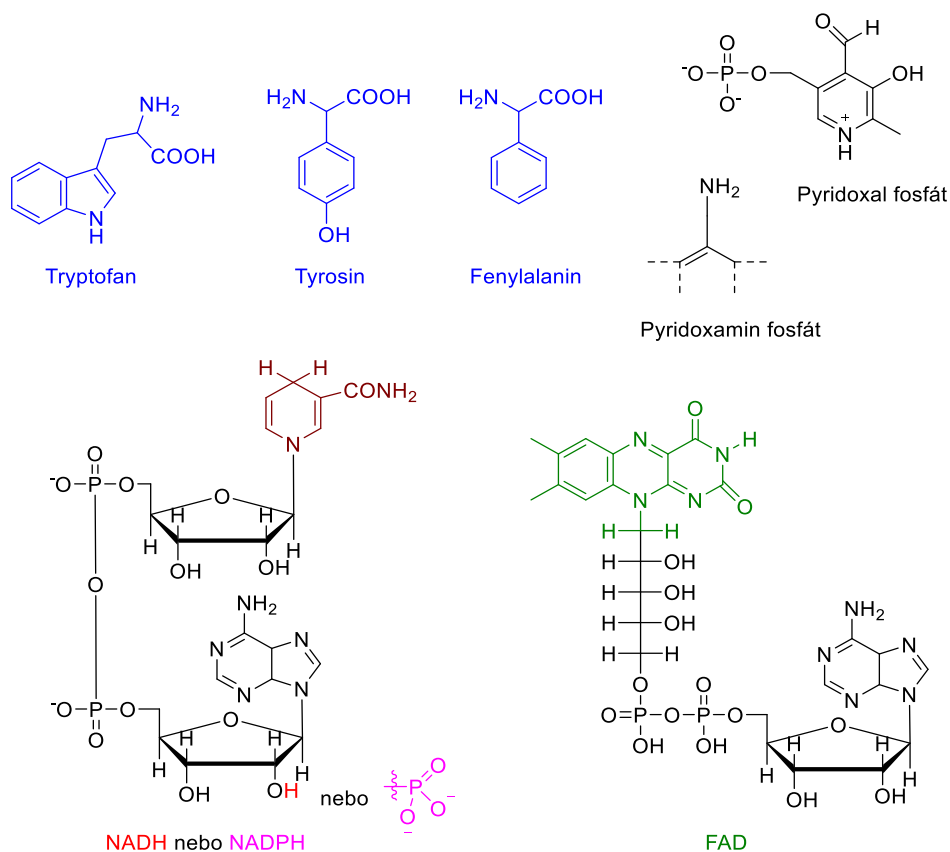
Důležitým parametrem senzorů používaných v biologických aplikacích je *biologický poločas*, vazba na proteiny a následná degradace a exkrece *in vivo*.^[3]

- Nízká toxicita

- Cenová dostupnost

4.5 Fluorofory

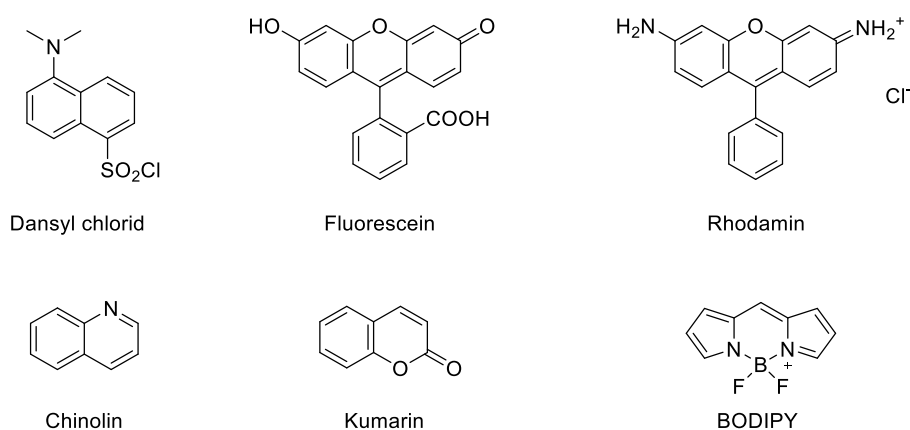
Fluorofory jsou malé fluorescenční molekuly, které jsou neocenitelnou pomůckou všech biologů, chemiků a biochemiků. Vhodnou volbou fluoroforů lze vizualizovat biologické a biochemické pochody, nebo je použít pro přípravu indikátorů, které mohou podávat důležité informace o daném biologickém prostředí (pH, koncentrace iontu kovu, atd.).^[68] Byly popsány tisíce různých fluoroforů, ty se z pohledu biologických aplikací dělí na dvě velké skupiny. *Vnitřní fluorofory* vyskytující se přirozeně v biologickém prostředí a *vnější fluorofory*, které se přidávají ke vzorku (značení proteinů, DNA, apod.), který do té doby nevykazuje žádné nebo nedostatečné spektrální vlastnosti.^[2] Tato kapitola je stručným přehledem nejvíce známých skupin fluoroforů a jejich uplatnění v biologických vědách.



Obr. 18 Struktury vnitřních (přirozených) fluoroforů (převzato a upraveno).^[2]

Mezi *vnitřní (přirodní) fluorofory* (**Obr. 18**) patří proteiny s aromatickými aminokyselinami jako je tryptofan, tyrosin a fenylalanin. V proteinech je dominantním fluoroforem indolová skupina tryptofanu. Indol absorbuje okolo 280 nm a emituje přibližně při 340 nm. Pokud je indolová skupina uložena v přírodním proteinu vlnová délka je posunuta k nižším hodnotám, naopak v případě rozmotání proteinu následuje posun emisního spektra

k delším vlnovým délkám. Tento mechanismus se využívá ke sledování konformačních změn proteinů. Tyrosin se uplatňuje ve sledování denaturace proteinů, kdy v přirozeném proteinu nevykazuje fluorescenci (je zhasen nejspíše peptidovými řetězci nebo přenosem energie k tryptofanu). Následná denaturace proteinu pak vede k emisi fluorescence. Velkou skupinou jsou kofaktory enzymů.^[2] Vysokou fluorescenci při 340 a 460 nm vykazuje redukovaný nikotinamidový kruh *nikotinamidadeninukleotidu* (NADH), jeho oxidovaná forma NAD⁺ je nefluorescentní. Fluorescence NADH je v roztoku částečně zhasena kolizemi nebo agregací s adeninovými částmi. Naopak pokud se NADH naváže na protein, jeho fluorescence může vzrůst 4x.^[69] Dalšími fluorescenčními kofaktory jsou pyridoxal fosfát, pyridoxamin^[70] a riboflavin (jako flavin mononukleotid FMN a flavin adenin dinukleotid, FAD), který absorbuje okolo 450 nm a emituje blízko 525 nm.^[2, 71]

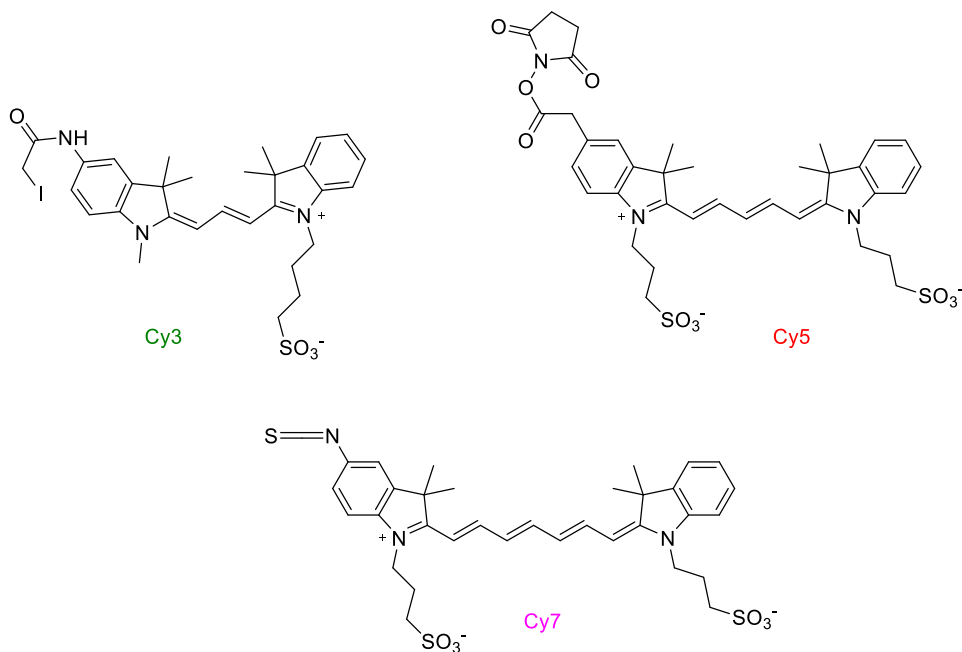


Obr. 19 Struktury vnějších fluoroforů (převzato a upraveno).^[2]

Mezi *vnější fluorofory* řadíme látky pro značení proteinů („protein-labeling“), existuje řada těchto molekul pro kovalentní i nekovalentní značení. Látky určené pro kovalentní značení mají různé reaktivní funkční skupiny pro spojení s aminy, thiolovými skupinami nebo bočními histidinovými řetězci proteinu. Široce využívanou látkou k značení proteinů je například Dansyl chlorid popsaný poprvé Weberem v roce 1952.^[72] Tato látka vykazuje výhodné vlastnosti jako excitaci při 350 nm v oblasti, kde proteiny neabsorbují, emisní maximum při 520 nm a dobu života fluorescence okolo 10 ns. Dalšími látkami jsou fluorescein a rhodamin a jejich deriváty (**Obr. 19**). Ty mají výhodné absorpční maxima 480-600 nm a emitují při 510-615 nm. Další výhodou je jejich vysoký extinkční koeficient okolo 80 000 M⁻¹ cm⁻¹ a oproti Dansyl chloridu nejsou citlivé na polaritu rozpouštědla. Fluorescein a rhodamin se široce uplatňují pro značení malých molekul (např. protilátek). Jako náhrada fluoresceinu a rhodaminu byly připraveny BODIPY („boron-dipyrromethen“) barviva s emisí 510-675 nm, obdobným extinkčním

koeficientem a necitlivosti k pH a polaritě rozpouštědla. Jedinou nevýhodou BODIPY je velmi malý Stokesův posun.^[73]

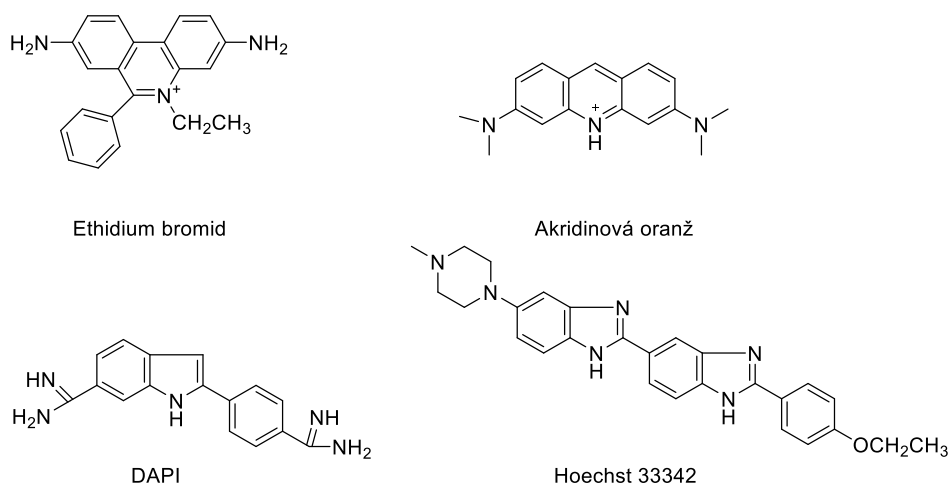
Pro nekovalentní značení proteinů se využívají látky odvozené od struktury naftylaminosulfonové kyseliny – nejčastěji 1-anilino-naftalen-6-sulfonová kyselina a 2-(*p*-toluidinyl)naftalen-6-sulfonová kyselina.^[74] Tyto látky jsou nefluorescenční nebo jen slabě fluorescenční ve vodě, avšak vysokou fluorescenci vykazují po vazbě na protein nebo membránu.^[75] Pro značení membrán je nejvíce využívána látka 1,6-difenyl-1,3,5-hexatrien (DPH), která je fluorescentní pouze v prostředí membrány.^[2] Mnoho látek s rozdílnými mechanismy (agregace, odpověď na elektrické pole, atd.) bylo vyvinuto ke studiu membránového potenciálu. Mezi nejznámější patří cyaninová barviva Cy3, Cy5 a Cy7 (**Obr. 20**) jako „long-wavelength probes“ poskytující výhodnou absorpci a emisi nad 500 nm a možnost zvýšené rozpustnosti ve vodě pomocí nabitého bočního řetězce.^[2, 76, 77]



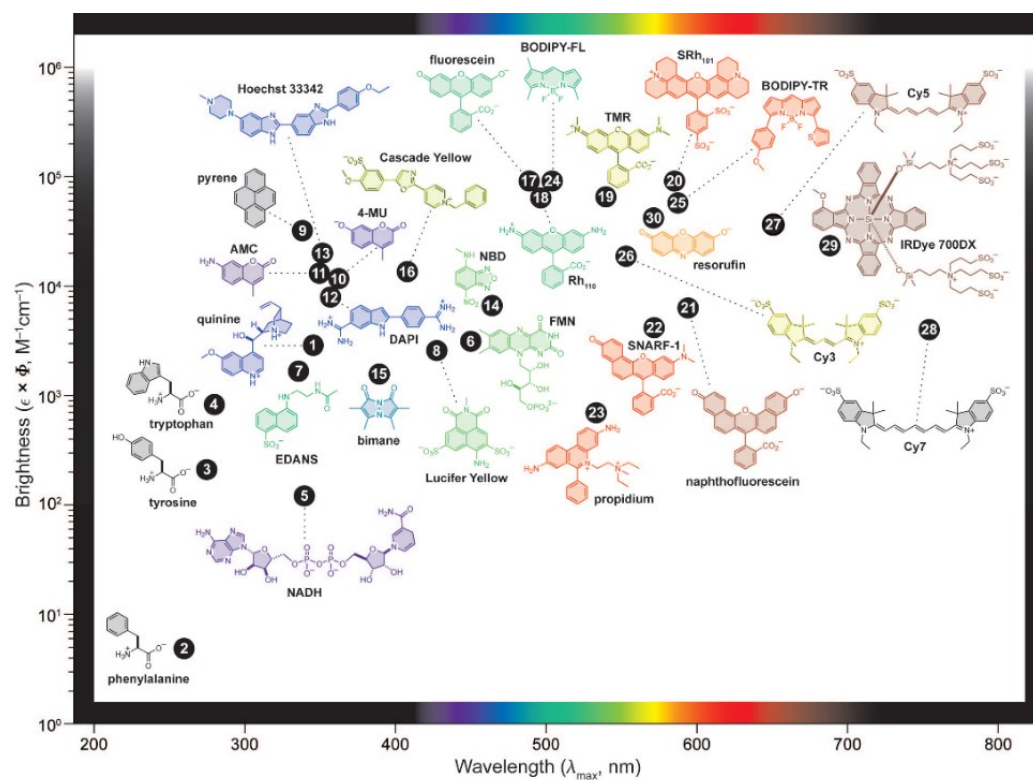
Obr. 20 Struktury nejužívanějších cyaninových barviv pro studium membránového potenciálu (převzato a upraveno).^[2]

Při značení DNA se nejvíce uplatňuje ethidium bromid, který je ve vodě slabě fluorescenční a jeho fluorescence stoupá až 30× po vazbě s dvoušroubovicí DNA, stejným *interkalačním* mechanismem se váže i akridinová oranž.^[2, 78] Další možností je vazba do malého žlábků DNA, to je typické pro látky jako je 4',6-diamidin-2-fenylindol (DAPI).^[79] Další známá látka Hoechst 33342 se váže na specifické páry v sekvencích DNA (**Obr. 21**).^[80, 81] Jiným přístupem ve

značení DNA může být přidání „nepřirodní“ fluorescentní DNA sondy (např. 2-aminopurin), která je analogem přirozené nefluorescentní báze DNA (adeninu).^[2, 82] Absorpční a fluorescenční vlastnosti nejčastěji využívaných fluoroforů jsou shrnuty na **Obr. 22**.



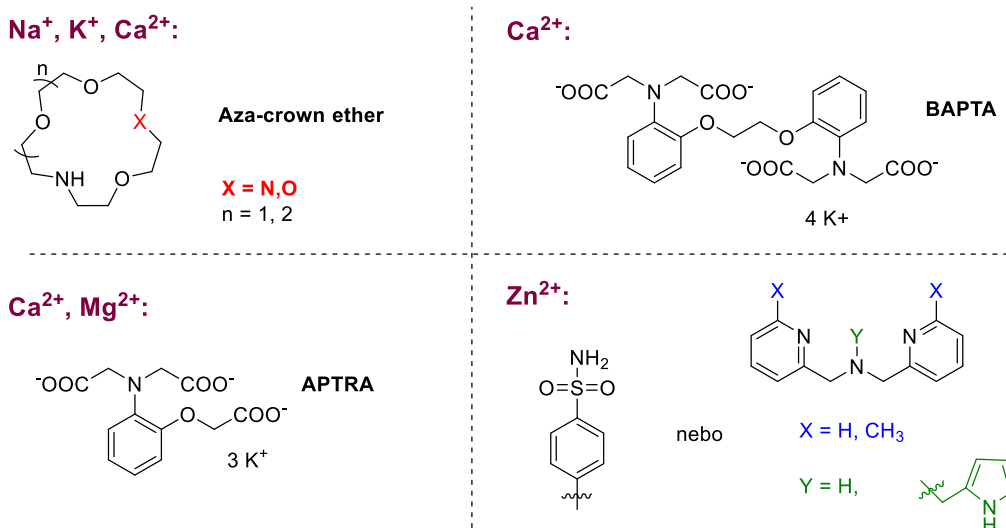
Obr. 21 Struktury látek uplatňujících se ve značení DNA (převzato a upraveno).^[2]



Obr. 22 Přehled nejčastěji využívaných fluoroforů s vyznačením závislosti jejich svítivosti na absorpčním maximu λ_{max} . Podbarvení molekul vyjadřuje emisní maxima λ_{em} .^[68]

Pro stanovení hladin iontů jako je Cl^- , Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} se využívají fluorescenční senzory, které jsou v současné době neocenitelnou pomůckou ve fluorescenční mikroskopii nebo jiných zobrazovacích metodách. Tato velká skupina senzorů pracuje na různých principech např. MQAE je kolizně zhasen Cl^- na základě Stern-Volmerovy rovnice (1),^[2, 62] jiné senzory jako je Fura-2 pro stanovení Ca^{2+} dovolují měření na základě posunu při dvou vlnových délkách pro absorpci nebo excitaci a jsou tedy využitelné jako „wavelength-ratiometric probe“. Jiné senzory vyjadřují množství analytu úměrným zvýšením nebo snížením intenzity fluorescence na základě blokování procesů PET nebo ICT (viz kapitola 4.4.2).^[2]

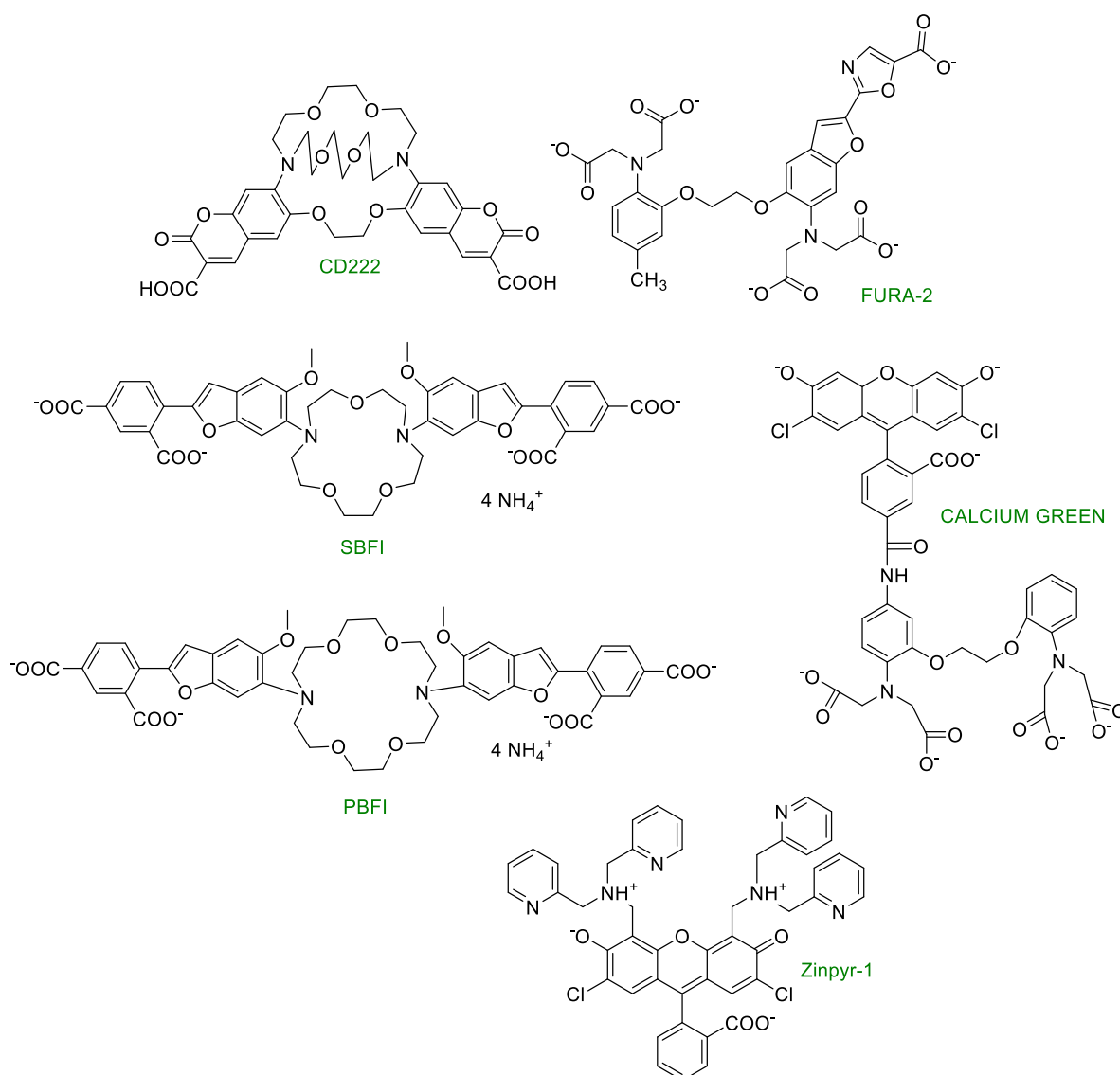
Fluorofory pro senzory jsou při vývoji voleny ze základních struktur dobře zavedených fluoroforů jako je fluorescein, rhodamin,^[83, 84] kumarin,^[85] chinolin nebo BODIPY barviva (**Obr. 19**).^[68] Vhodně zvolený fluorofor je v senzoru zodpovědný převážně za fotofyzikální vlastnosti senzoru (nárůst fluorescence ve stavu ON). **Rozpoznávací části** jsou voleny dle povahy analytu, nejvíce užívanými pro rozpoznávání iontů kovů jako Na^+ , K^+ , Ca^{2+} jsou aza-crown ethery a jejich různé chemické modifikace,^[43] pro rozpoznávání Ca^{2+} se osvědčila rozpoznávací část BAPTA,^[83, 84] pro Mg^{2+} a Ca^{2+} část APTRA^[86, 87] a Zn^{2+} jsou selektivně rozpoznávány sulfonamidovou skupinou (**Obr. 23**).^[17, 88]



Obr. 23 Struktury pro selektivní rozpoznávání analytů (převzato a upraveno).^[2]

4.6 Přehled komerčně dostupných senzorů pro rozpoznávání kationtů kovů

Pro rozpoznávání Na^+ a K^+ byl jako první zaveden „sodium-binding benzofuran isophthalate“ (SBFI)^[89] pro Na^+ a „potassium-binding benzofuran isophthalate“ (PBFI) pro K^+ (Obr. 24).^[2] Sensory byly navrženy pro „wavelength-ratiometric probe“, avšak vykazují nevýhodnou excitaci v UV oblasti způsobující autofluorescenci z buněk, další nevýhodou jsou malé rozdíly v excitačních spektrech po navázání analytu. Lepších vlastností především v oblasti excitace světlem vyšší vlnové délky bylo dosaženo u senzoru CD222^[90] pro K^+ odvozeného od kumarinu a Sodium green[™] odvozeného od fluoresceinu, který se uplatňuje v rozpoznávání Na^+ .^[2]



Obr. 24 Struktury komerčně dostupných senzorů pro selektivní rozpoznávání kationtů kovů (převzato a upraveno).^[2]

Ke stanovování hladin Ca^{2+} jsou užívány komerčně dostupné senzory s BAPTA^[83, 84] rozpoznávací částí Fura-2 a Indo-1, jejich nevýhodou je opět excitace v UV oblasti. Jistého zlepšení v tomto ohledu bylo docíleno u senzoru Calcium greenTM-1 s 8× nárůstem fluorescence po navázání Ca^{2+} (**Obr. 24**). Podobnou rozpoznávací skupinu APTRA obsahují senzory Mag-Indo-1 pro rozpoznávání Mg^{2+} ,^[86, 87] které jsou analogy senzorů pro vápník Fura-2 a Indo-1.^[2]

Stanovení hladin Zn^{2+} je možné pomocí senzorů^[91-93] s chelatační skupinou Zinpyr-1.^[17, 94] Fotofyzikální vlastnosti nejčastěji využívaných komerčních senzorů jsou uvedeny níže v **Tab. 1**.

Tab. 1 Přehled fotofyzikálních vlastností vybraných komerčních senzorů pro rozpoznávání kationtů kovů.^[2, 95]

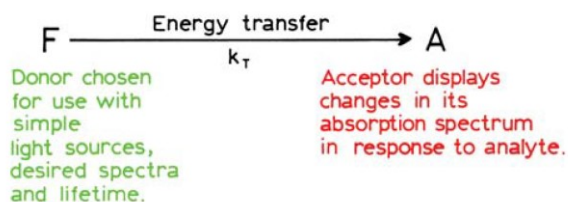
Komerční senzor	Analyt	Excitace (nm) ^[a]	Emise (nm) ^[a]	Φ_F ^[a]	K_D (mM)
SBFI	Na^+	348 (335)	499 (490)	0,045 (0,083)	3,8
Sodium Green TM	Na^+	506	535	7× ^[b]	6,0
PBFI	K^+	336 (338)	557 (507)	0,24 (0,72)	5,1
CD222	K^+	396 (363)	480 (467)	3,7× ^[b]	0,9
Fura-2	Ca^{2+}	362 (335)	518 (510)	0,23 (0,49)	0,145
Indo-1	Ca^{2+}	349 (331)	482 (398)	0,38 (0,56)	0,230
Calcium Green TM	Ca^{2+}	506	534	0,06 (0,75)	0,19
Mag-Indo-1	Mg^{2+}	349 (330)	480 (417)	0,36 (0,59)	2,7
Zinpyr-1	Zn^{2+}	490	531 (527)	0,38 (0,92)	0,0007

[a] hodnoty pro volnou formu senzoru (OFF stav); v závorce uvedeny hodnoty po navázání analytu (ON stav).

[b] uveden nárůst intenzity fluorescence (místo Φ_F).

4.7 pH a CO₂ senzory pracující na principu RET

Rezonanční přenos energie probíhá, pokud je donor a akceptor ve Försterově vzdálenosti. Změny v přenosu energie mohou probíhat na základě změn ve vzdálenosti analytu

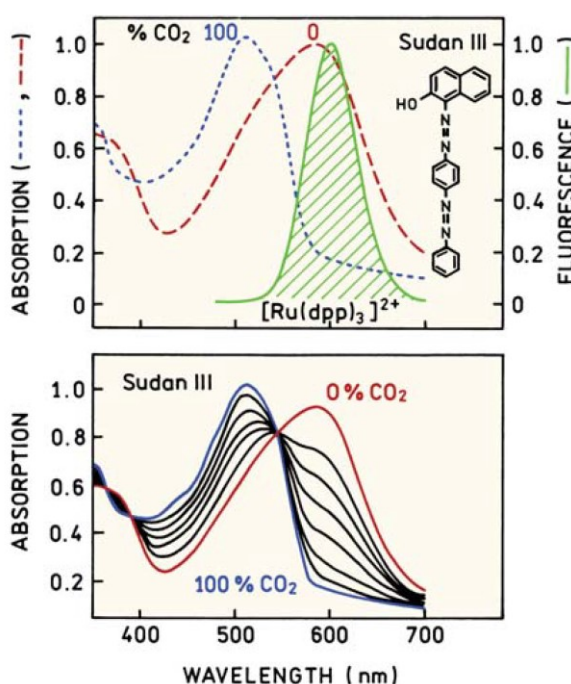


Obr. 25 Princip přenosu energie mezi donorem a akceptorem.^[2] na konkrétní analyt a akceptor může zobrazovat změny v absorpci jako odpověď na přítomnost analytu (**Obr. 25**).^[2]

Jako první bylo zaznamenáno použití eosinu jako donoru a fenolové červeně jako akceptoru.^[96] Fenolová červeně byla vybrána díky svému výhodnému pK_A blízko 7 a tomu, že její bazická forma absorbuje při 546 nm v oblasti, kde eosin emituje. Intenzita fluorescence eosinu současně klesá se stoupajícím pH. V tomto konkrétním případě však nebylo zřejmé, zda intenzita fluorescence klesá kvůli RET nebo tzv. efektu vnitřního filtru („inner filter effect“).^[2]

Stejný koncept byl také využit pro senzory založené na měření doby života fluorescence („lifetime-based sensors“) pro detekci pH, pCO_2 ^[97] a NH_3 .^[98, 99] Jako donor byl zvolen pro svůj dlouhý čas zhášení $[Ru(dppn)_3]^{2+}$, kde dppn je 4,7-difenyl-1,10-fenanthrolin („4,7-diphenyl-1,10-phenanthroline“). Jako akceptor byl zvolen Sudan III, který má své absorpční spektrum závislé na pCO_2 . Závislost změn na pCO_2 je sledováno v podobě změn v médiu charakteru polymeru, které

nebo změn závislých na analytu, to se projeví v absorpčním spektru akceptoru. Velkou výhodou tohoto principu je jednoduchost senzorů, kdy donorem a akceptorem mohou být dvě oddělené molekuly. Donor může být zvolen dle použitého zdroje světla a nemusí být citlivý



Obr. 26 Nahoře: Absorpční spektra Sudanu III v matrici v nepřítomnosti (0 %) a v přítomnosti (100%) CO₂. Emisní spektrum $[Ru(dppn)_3]^{2+}$ znázorněno zeleně. Dole: Změny v absorpčním spektru Sudanu III jako odpověď na změny koncentrace (0 – 100 %) CO₂.^[2]

obsahuje donor, akceptor a vyrovnávací komponenty. Při nízkém $p\text{CO}_2$ je pH vysoké a Sudan III absorbuje při emisních vlnových délkách donoru. Při vyšším $p\text{CO}_2$ se absorpce při vyšších vlnových délkách sníží (**Obr. 26**).^[2]

Zcela kritickým bodem v návrhu senzorů tohoto typu je prostředí - matrice, v němž je senzor zakotven. Pro CO_2 senzory je například volena matrice z ethylcelulózy obsahující tetraoktylammonium-hydroxid (TOAH), který slouží jako fázový převaděč pro plynný CO_2 .^[100] Jiným přístupem v přípravě senzorických zařízení může být hydrolyza tetraethylorthosilikátu (TEOS) ve směsi vody a ethanolu. Ve chvíli, kdy je TEOS hydrolyzován, začne se formovat SiO_2 . Porozita takto vzniklé matrice typu sol gel^[101, 102] je možná kontrolovat a do matrice vnořit senzory nebo enzymy.^[2]

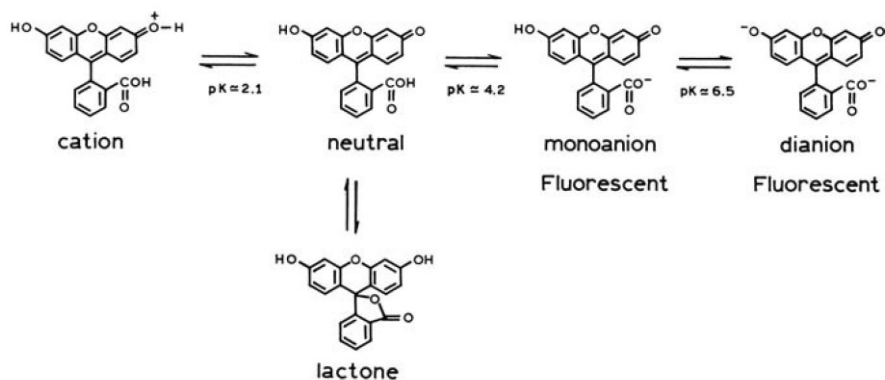
4.8 pH a CO_2 senzory tvořící dvě formy

4.8.1 Fluorescein a jeho deriváty

Jedním z prvních pH senzorů pro stanovení intracelulárního pH byl fluorescein,^[103] který byl využit i k měření $p\text{CO}_2$ v konceptu měření s hydrogenuhličitanem.^[104] Nevýhodou fluoresceinu je jeho rychlý únik z buněk, proto jsou často využívány jeho nabitě deriváty, jako je 5(6)-karboxyfluorescein nebo 2',7'-bis(2-karboxy-ethyl)-5(6)-karboxyfluorescein (BCECF). Fluorescein zobrazuje komplexní na pH závislou rovnováhu a emituje z různých svých iontových forem.^[105, 106] Například v organických rozpouštědlech nalézáme laktonovou formu, která není tvořena ve vodných rozpouštědlech nad $\text{pH} = 5$. Přičemž pouze dvě aniontové formy fluoresceinu jsou fluorescenční (**Obr. 27**).^[2]

Fluorescein umožňuje také měření jako „wavelength-ratiometric probe“ při dvou excitačních délkách okolo 450 a 495 nm. V absorpčním spektru je pozorovaný posun k vyšším vlnovým délkám při $\text{p}K_A$ okolo 6,5. Tyto změny v emisních a absorpčních spektrech jsou dány rovnováhou mezi dvěma fluorescentními formami fluoresceinu – monoaniontem a dianiontem.

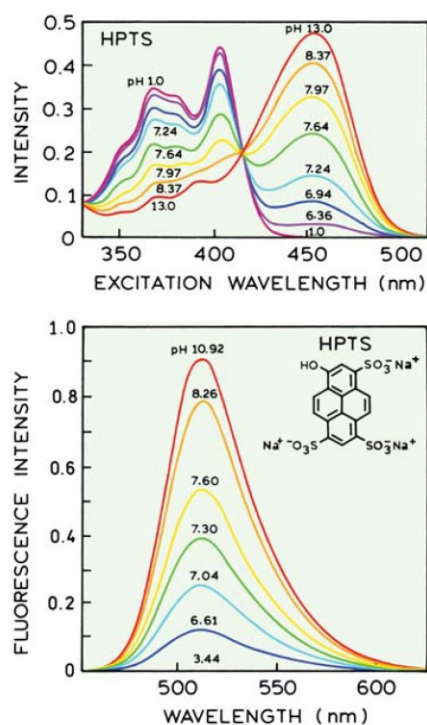
Nevýhodou fluoresceinu je $\text{p}K_A$ okolo 6,5, zatímco pH v cytosolu buňky se pohybuje mezi 6,8 – 7,4, a proto je pro přesné měření žádoucí vyšší hodnota $\text{p}K_A$. Proto byl vyvinut derivát fluoresceinu BCECF,^[107] který má stejné vlastnosti ale vyšší $\text{p}K_A$ okolo 7,0. Tento odstavec ilustruje důležitý aspekt všech senzorických látek, kdy hodnota $\text{p}K_A$ nebo K_D analytu musí být srovnatelná s koncentrací měřeného analytu. Další nevýhodou fluoresceinu je jen obtížné měření jako „wavelength-ratiometric probe“, protože absorpční a emisní spektra vykazují nízkou intenzitu pro excitaci při 450 nm.^[2]



Obr. 27 Ionizace fluoresceinu závislá na pH. Pouze forma monoaniontu a dianiontu je fluorescentní.^[2]

4.8.2 8-hydroxypyren-1,3,6-trisulfonát (HPTS)

HPTS byl vyvinut jako senzor s výhodnějšími vlastnostmi,^[108, 109] než které poskytuje fluorescein a také možností měření jako „wavelength-ratiometric probe“. Sulfonátové skupiny jsou důležité pro rozpustnost ve vodě a hydroxylová skupina zajišťuje citlivost k pH. Excitační a emisní spektra vykazují silnou závislost na pH. Pokud se pH zvýší, HPTS vykazuje vyšší absorpenci při 450 nm a pokles v absorpenci okolo 420 nm (**Obr. 28**). Tyto změny jsou závislé na pH-závislé ionizovatelnosti hydroxylové skupiny. Emisní spektrum HPTS senzoru je nezávislé na pH, důvodem může být fakt, že emise probíhá pouze při ionizované formě. Velkou výhodou HPTS je jeho pK_A okolo 7,5, a proto je tento senzor vhodný pro klinické použití. HPTS může být také použit jako senzor pro měření pCO_2 ve stejném konceptu měření jako fluorescein s hydrogenuhličitanem.^[110]



Obr. 28 Nahoře: Excitační spektrum pH senzoru HPTS v 0,07 M fosfátovém pufru při různých hodnotách pH. Dole: Emisní spektrum HPTS při excitaci při 454 nm.^[2]

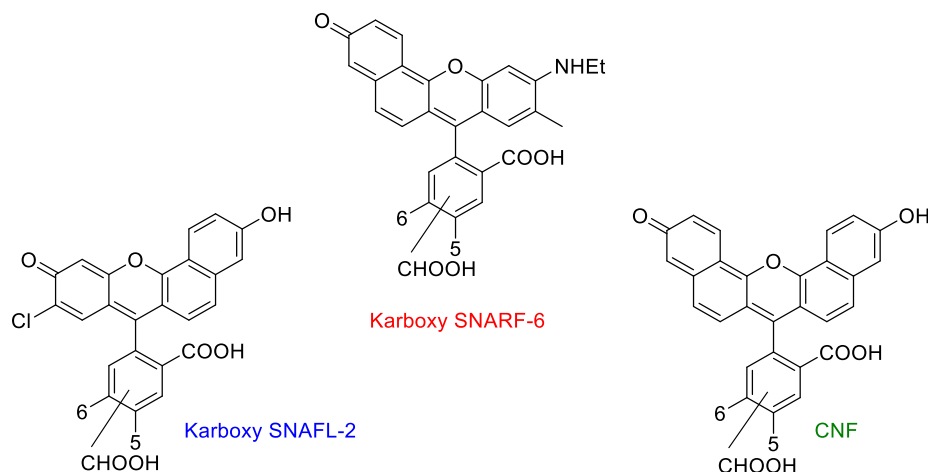
Možnou nevýhodou HPTS je, že ve formě fenolu (silně kyselé prostředí) může mít vyšší sklon k ionizaci v excitovaném stavu než ve stavu základním, což způsobí, že je pozorována pouze emise HPTS ve formě fenolátu při vyšší vlnové délce.^[111] Další nevýhodou HPTS je relativně

krátká excitační vlnová délka zejména pro kyselou formu HPTS, tato nevýhoda může být však překonána použitím diod emitujících modré světlo.^[2]

4.8.3 Seminaftofluoresceiny (SNAFL) a seminaftorhodafluory (SNARF)

SNAFL a SNARF (**Obr. 29**) patří do rodiny vylepšených pH senzorů.^[112] Poskytují posun v absorpčním i emisním spektru s pK_A od 7,6 do 7,9. Jejich absorpční a emisní vlnové délky jsou dostatečně dlouhé, a proto obě formy mohou být excitovány světlem při viditelných vlnových délkách blízko 540 nm a současně je možný koncept měření „wavelength-ratiometric probe“. To, že forma kyseliny i báze obou látek jsou fluorescentní, umožňuje jejich využití jako senzory s měřením doby života fluorescence. Doba života fluorescence je kratší pro senzor ve formě báze než pro kyselou formu senzoru. Například při pH = 4,9 je doba života fluorescence 4,51 ns a pro pH = 9,3 je doba života fluorescence 0,95 ns.^[113] Důležité je zmínit, že toto měření může být omezeno nežádoucí interakcí s makromolekulami z měřeného biologického prostředí.^[2]

Pro klinické využití jsou vysoce žádoucí senzory s absorpcí a emisí při vyšších vlnových délkách, proto byl připraven derivát SNAFL s připojeným benzenovým kruhem – karboxynaftofluorescein (CNF).^[2, 114]



Obr. 29 Struktury „wavelength-ratiometric probe“ pH senzorů ze skupiny SNAFL, SNARF nebo CNF (převzato a upraveno).^[2]

4.8.4 Cyaninová barviva a ligandy ruthenia

Dalšími senzory pracujícími při vyšších vlnových délkách byly látky založené na struktuře cyaninových barviv^[115] excitovatelných při 795 nm.^[116, 117] Tyto karboxy karbocyaninová barviva

vykazují pokles v intenzitě při pH okolo 8,5, ale nevykazují posun s výjimkou krátkých vlnových délek blízko 435 nm. Byly popsány také látky excitovatelné v oblasti UV s různými pK_A hodnotami od 1,7 do 9,0.

Pro klinické aplikace jsou žádoucí senzory s dlouhou dobou života fluorescence, proto byly popsány mimo jiné kovové pH-senzitivní ligandy ruthenia s časem zhášení 300 ns a pK_A blízko 7,5.^[118] Fotofyzikální vlastnosti několika nejznámějších pH senzorů jsou uvedeny v **Tab. 2**. Z důvodu stálé potřeby nových pH senzorů poskytujících výhodnější vlastnosti vývoj stále pokračuje.^[2]

Tab. 2 Srovnání fotofyzikálních vlastností vybraných pH senzorů.^[2]

pH senzor	Excitace		Emise		pK_A
	$\lambda_B (\lambda_A)^{[a]}$ [nm]	$\lambda_B (\lambda_A)^{[a]}$ [nm]	$Q_B (Q_A)^{[b]}$	$\tau_B (\tau_A)^{[c]}$	
BCECF	503 (484)	528 (514)	0,7	4,49 (3,17)	7,0
HPTS	454 (403)	511	[d]	[d]	7,3
K. SNAFL-2	547 (514)	623 (546)	0,054 (0,43)	0,94 (4,60)	7,7
K. SNARF-6	557 (524)	635 (559)	0,053 (0,42)	1,03 (4,51)	7,6
[Ru(deabpy)(bpy) ₂] ²⁺	450 (452)	615 (650)	[d]	380 (235)	7,5

deabpy 4',4'-diethylaminomethyl-2,2'-bipyridin

bpy 2,2'-bipyridin

[a] vlnová délka pro senzor ve formě báze (kyseliny)

[b] kvantový výtěžek fluorescence pro senzor ve formě báze (kyseliny)

[c] doba života fluorescence pro senzor ve formě báze (kyseliny)

[d] údaj není dostupný

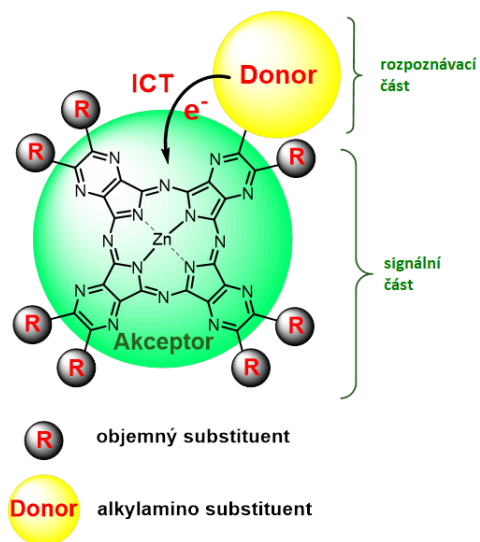
4.9 Azaftalocyaniny jako fluorofory

Studium AzaPc patří mezi dlouhodobý výzkumný záměr pracovní skupiny „Azaphthalocyanine group“. AzaPc mohou díky rozsáhlému systému konjugovaných vazeb absorbovat světlo a jeho energie může být pak využita k různým aplikacím dle způsobu relaxace excitované molekuly. Velkou výhodou AzaPc oproti jiným fluoroforům je absorpce a emise při vyšších vlnových délkách nad 630 nm z důvodu zamezení zhášení světla a jeho absorpci endogenními chromofory.^[2] Další nespornou výhodou je možnost ovlivňování spektrálních vlastností AzaPc „na míru“ volbou substituentů (elektron-donorové vs. elektron-akceptorové)^[119] a výběrem centrálního kationtu kovu.^[120]

Nevýhodou zmiňovaných látek je silná tendence agregovat vlivem planárního charakteru,^[11] což vede ke ztrátě fotofyzikálních vlastností. Dalším problémem může být nerozpustnost ve vodě pro aplikace cílené do biologického prostředí. Obě tyto nevýhody AzaPc lze do jisté míry překlenout vhodnou substitucí (objemné, nabitě substituenty) a technologickými postupy (příprava ve vodě rozpustných nanočástic (NP), lipozomů).

Velkým průlomem ve výzkumu byl objev a objasnění jevu ICT u alkylamino-substituovaných AzaPc naší výzkumnou skupinou v roce 2010. Bylo zjištěno, že ICT probíhá mezi donorem (alkylamino skupinou) a akceptorem (AzaPc makrocyclické jádro).^[9] Později bylo

zjištěno, že pomocí ICT a jeho blokování je možné ovlivňovat fotofyzikální vlastnosti AzaPc. Pokud ICT probíhá (**Obr. 30**), je molekula v OFF stavu, protože excitované stavy jsou účinně zhášeny. Při blokování ICT relaxuje molekula z excitovaného stavu kompetitivními procesy, jako je fluorescence nebo přechod do tripletového stavu a následná produkce singletového kyslíku. Různé způsoby blokování ICT umožnily využití AzaPc jako fluorescenčních senzorů, kdy blokování ICT protonizací donorového centra je principem pH senzorů,^[32, 121] blokování ICT koordinací kovového kationtu kovu je využitelné pro senzory citlivé ke kationtům kovů.^[8] V obou případech dochází k přepnutí molekuly do ON stavu, který je spojen s výrazným nárůstem fluorescence.



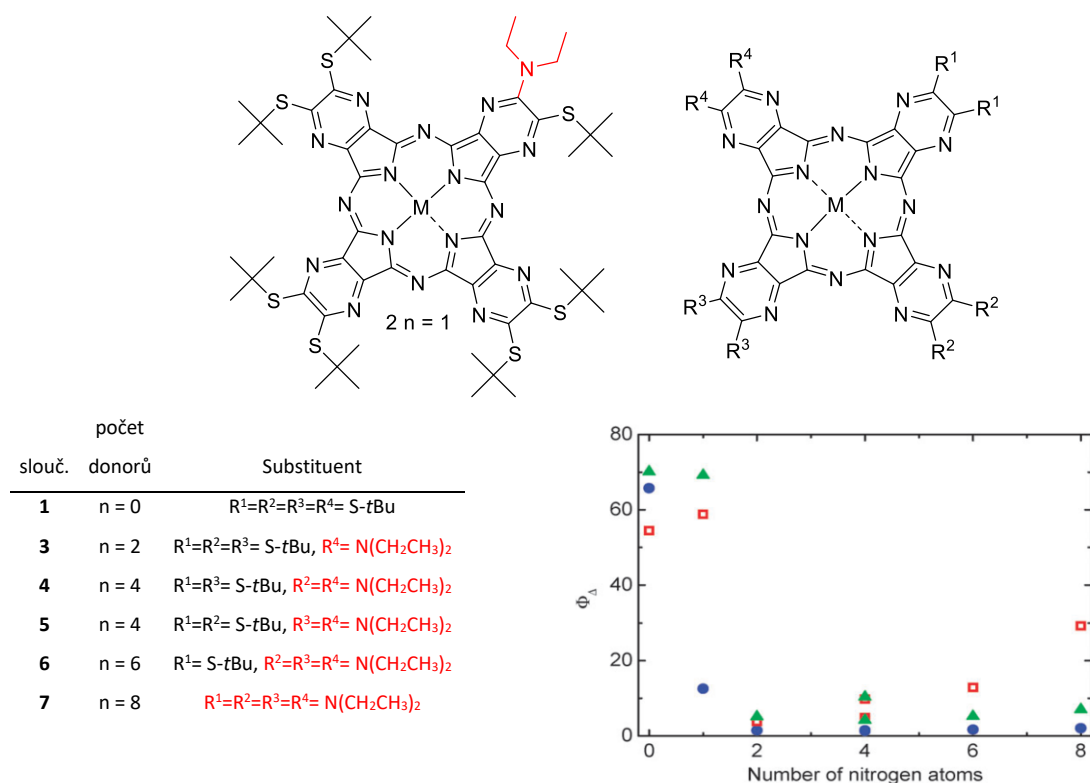
Obr. 30 Schématické znázornění průběhu ICT u AzaPc, obecné schéma pro návrh senzoru pro rozpoznávání kationtů kovů nebo pH-senzitivního AzaPc.

4.9.1 Strukturální aspekty ovlivňující ICT a vlastnosti AzaPc

Před návrhem nových molekul AzaPc pro konkrétní aplikace bylo třeba detailně prostudovat aspekty, které ovlivňují ICT. ICT je kompetitivní relaxační cesta k produkci singletového kyslíku molekulou, proto lze účinnost ICT hodnotit ze součtu kvantových výtěžků fluorescence Φ_F a produkce singletového kyslíku Φ_{Δ} . Během studia AzaPc bylo připraveno velké množství modelových sloučenin a proběhlo množství experimentů, ze kterých vyplynuly tyto závislosti struktury na účinnosti ICT:

- Počet donorových dusíků na periferii

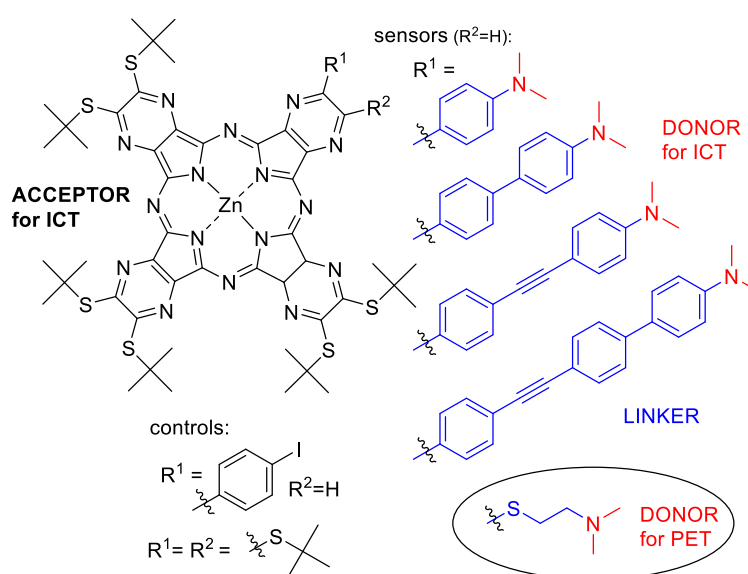
Z výsledků vyplynulo, že pouze jedno donorové centrum je dostatečné pro účinné zhášení procesem ICT (kvantové výtěžky fluorescence blízké nule) se současnou zachovanou citlivostí k ovlivnění ICT vnějšími vlivy (pH,^[121] polarita rozpouštědla) – což umožňuje přepínání mezi ON/OFF stavy. U sloučenin se dvěma až čtyřmi donorovými centry jsou kvantové výtěžky fluorescence nulové (**Obr. 31**).^[9, 122] A u sloučenin s více jak čtyřmi donory probíhá ICT už natolik účinně, že se nedá nijak ovlivnit vnějšími podmínkami (molekula stále ve stavu OFF), tyto látky nacházejí uplatnění jako zhášedce fluorescence („quencher“).^[123-125]



Obr. 31 Pokles intenzity fluorescence vlivem zvýšení účinnosti ICT pomocí vyššího počtu donorů na periferii v pyridinu, toluenu a toluenu s 1 % (v/v) pyridinu (převzato a upraveno).^[9]

- Vliv vzdálenosti mezi donorem a akceptorem

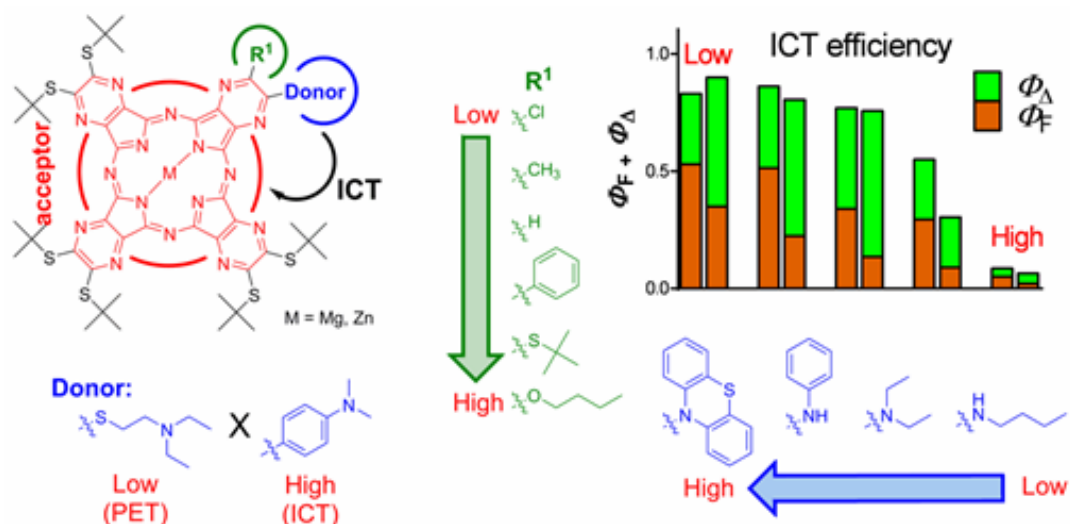
Spojení mezi akceptorem a donorem je možné mimo přímého spojení také spojením přes spojovací řetězec. Pro umožnění probíhajícího ICT je zásadní, aby byl donor a akceptor ve vzájemné konjugaci. Vliv spojovacího řetězce na účinnost ICT byl detailně studován naší výzkumnou skupinou na sérii pH senzitivních AzaPc, kdy donor pro ICT byl od akceptoru spojen spojovacím řetězcem o různé délce (**Obr. 32**). Bylo jednoznačně prokázáno, že účinnost ICT se snižuje s prodlužující se délkou spojovacího řetězce. Do studie byl pro porovnání zahrnut i AzaPc, u kterého probíhal PET místo ICT. Ukázalo se, že PET probíhá u AzaPc s výrazně nižší účinností než ICT.^[20]



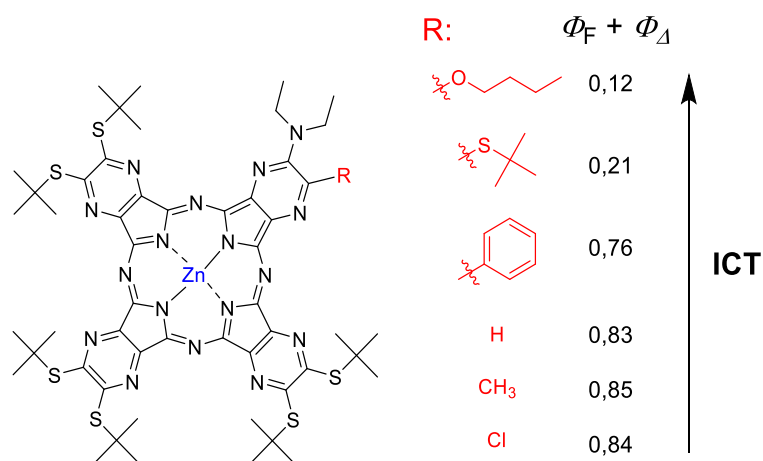
Obr. 32 Struktury pH senzitivních AzaPc zapojených do studie vlivu vzdálenosti mezi donorem a akceptorem na účinnost ICT. Účinnost ICT se snižovala s prodlužující se délkou spojovacího řetězce (převzato a upraveno).^[20]

- Typ donorového dusíku

Z experimentálních měření naší výzkumné skupiny vyplynulo, že donorové vlastnosti aminu rostou v pořadí alifatický amin < terciární alifatický amin < sekundární aromatický amin < terciární aromatický amin. Charakter donoru (alkyl/aryl aminu) hraje tedy důležitou roli pro účinnost ICT (**Obr. 33**).^[126] Dalším zcela překvapivým zjištěním byla možnost ovlivnění účinnosti ICT výběrem substituentu v *ortho* poloze vůči donorovému dusíku. Bylo zjištěno, že účinnost ICT roste v řadě substituentů $-Cl \approx CH_3 \approx H < -fenyl < \textit{terc}-butylsulfanyl- < -OBu (**Obr. 34**). Tento poznatek byl získán empiricky a bohužel se ho nepodařilo doposud vysvětlit.^[8]$



Obr. 33 Strukturální faktory ovlivňující ICT u AzaPc.^[126]



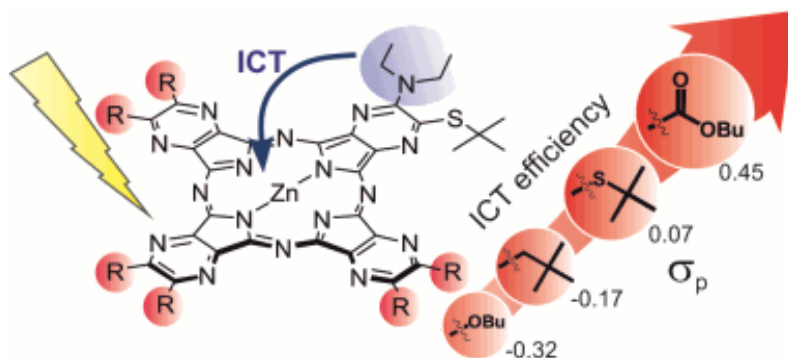
Obr. 34 Vliv substituentu v *ortho* poloze k donorovému dusíku a následné ovlivnění účinnosti ICT (převzato a upraveno).^[8]

- Typ makrocyclického jádra

ICT proces je mnohem efektivnější u AzaPc ve srovnání s Pc díky výraznějšímu elektron-deficientnímu charakteru makrocyclického jádra.^[127] Tento efekt je natolik výrazný, že v sérii nesymetrických makrocyclů s jedním donorovým centrem byla účinnost ICT signifikantně horší u Pc ($\Phi_F + \Phi_\Delta \approx 0,17$) než u AzaPc ($\Phi_F + \Phi_\Delta < 0,035$).^[128] Tento elektron-deficientní charakter se dá ještě více prohloubit vhodnou substitucí (viz níže).

- Vliv substituentů na makrocyclickém jádře na akceptorové vlastnosti

Účinnost ICT je signifikantně závislá na elektron-deficientním charakteru akceptoru (AzaPc jádra). Tato vlastnost může být ještě více prohloubena vhodnou periferní substitucí makrocyclu elektrony-odtahujícími skupinami (COOBu, *tert*-butylsulfanyl) nebo „zeslabena“ použitím skupin elektrony poskytujícími (OBu, neopentyl). Výběr vhodných substituentů pro takovéto úpravy vlastností AzaPc je usnadněn Hammetovými konstantami, které korelují s elektron-akceptorovými nebo elektron-donorovými vlastnostmi substituentů (Obr. 35).^[119]



Obr. 35 Periferní substituce AzaPc jako nástroj ovlivnění elektron-deficientního charakteru s uvedenými hodnotami Hammetových konstant pro substituenty s rozdílným elektron-odtahujícím/poskytujícím charakterem.^[119]

- Volba centrálního kationtu kovu AzaPc

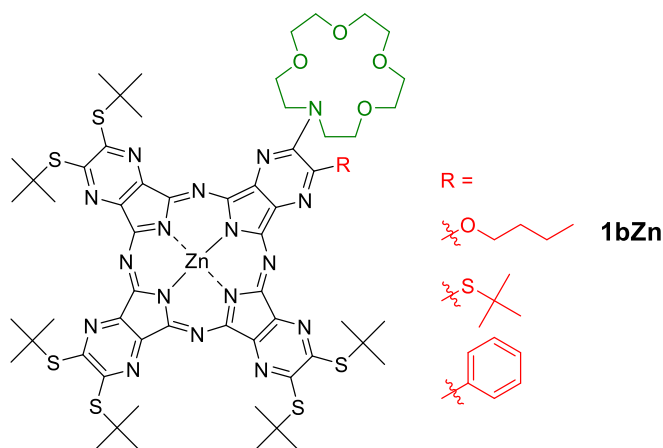
Volba centrálního kationtu kovu má vliv na finální fotofyzikální vlastnosti AzaPc makrocyclu. V současné době jsou rutinně koordinovány do centra AzaPc kationty Zn^{2+} a Mg^{2+} , které zaručují dobré fotofyzikální vlastnosti a v případě Zn^{2+} i stabilitu v kyselém prostředí. Volbou kationtu kovu je významně ovlivněna cesta relaxace molekuly, platí tzv. *efekt těžkého atomu*,^[129] který byl potvrzen také naší výzkumnou skupinou ve spolupráci s výzkumnou skupinou z Kuwaitu v projektu, kde AzaPc koordinovaly do svého centra AlCl, Zn, GaCl nebo InCl.^[120]

- Vliv objemných substituentů na periférii AzaPc

Nežádoucí agregaci AzaPc se dá zamezit volbou vhodného rozpouštědla a periferní substitucí makrocyclu objemnými substituenty (*tert*-butylsulfanylová skupina).

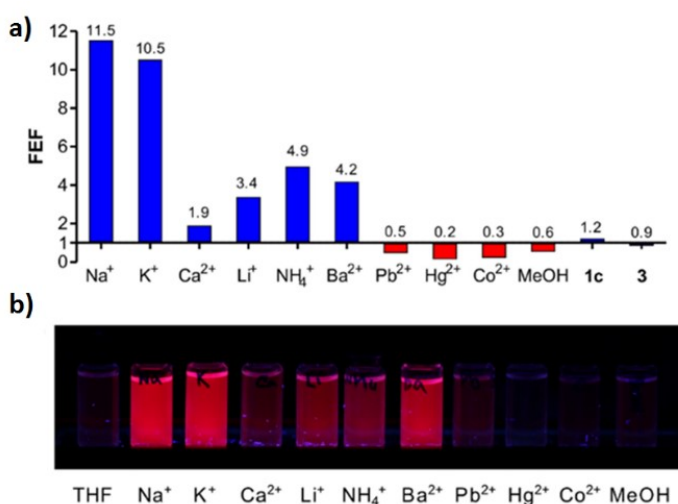
4.10 AzaPc jako senzory pro rozpoznávání kationtů kovů

V rámci mé diplomové práce jsem pracoval na projektu, který poprvé ověřil hypotézu použít AzaPc jako senzory citlivé ke kationtům kovů. Na základě výše uvedených poznatků o vlivu struktury AzaPc na účinnost ICT byla navržena modelová molekula (**Obr. 36**) s akceptorovou částí tvořenou zinečnatým AzaPc nesoucím šest objemných *tert*-butylsulfanylových skupin pro zamezení nežádoucí agregace a zajištění lepší účinnosti ICT. Do molekuly byl zaveden pouze jeden donor pro ICT v podobě terciárního aminu ze skupiny aza-crownů (konkrétně 1-aza-15-crown-5) se schopností koordinace Na⁺, K⁺ iontů. Terciární amin aza-crownu byl přímo spojen s AzaPc kvůli záměrnému snížení jeho bazicity a tím zabránění nežádoucí protonizaci v kyselém pH, která je zdrojem falešně pozitivních výsledků u komerčních senzorů.^[2, 50]



Obr. 36 Struktury připravených AzaPc senzorů zapojených do projektu, látka s nejlepšími sensorickými vlastnostmi oznažena **1bZn** (převzato a upraveno).^[8]

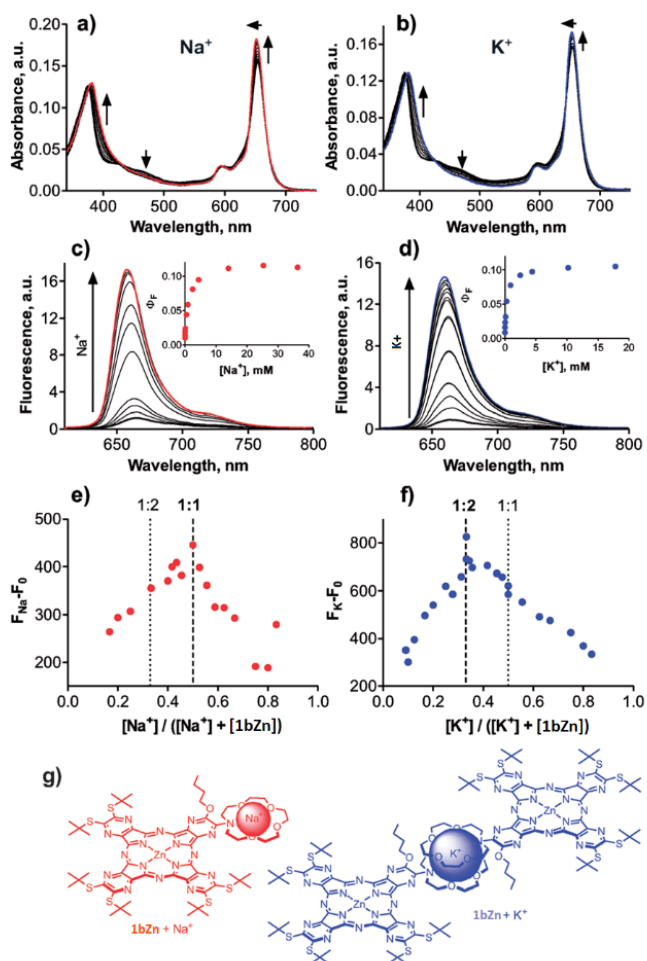
V tomto projektu byla tedy připravena série nesymetrických AzaPc s 1-aza-15-crown-5 rozpoznávací částí (**Obr. 36**). Citlivost AzaPc senzorů byla studována měřením absorpce a fluorescence během postupných titrací solemi kationtů kovů (Na⁺, K⁺, Li⁺, Ca²⁺, Ba²⁺, Pb²⁺, Hg²⁺, Co²⁺) ve formě thiokyanátů. Dle očekávání AzaPc ve stavu ON po přidání Na⁺ nebo K⁺ dosahovaly vysokých hodnot kvantových výtěžku fluorescence ($\Phi_f = 0,12-0,21$) ve srovnání s Φ_f AzaPc pouze s *tert*-butylsulfanylovými skupinami (stále v ON stavu), který byl měřen jako kontrolní látka ($\Phi_f = 0,35$). AzaPc **1bZn** měl nejlepší sensorické vlastnosti, kdy



Obr. 37 a) Nárůst fluorescence (uveden jako zesilující faktor fluorescence, FEF) AzaPc **1bZn** po přidání analytu včetně negativních kontrol; b) fotografie roztoků **1bZn** po přidání určitého kationtu kovu ($\lambda_{exc} = 366$ nm).^[8]

vázal preferenčně K^+ (nárůst fluorescence 11,5 \times) a Na^+ (10,5 \times), částečně byl ale citlivý i na ostatní kationty (Li^+ , NH_4^+ , Ba^{2+}) (**Obr. 37**). Studium stechiometrie komplexace AzaPc/analyt bylo provedeno Jobovou metodou kontinuálních variací (tzv. „Job’s plot“) a prokázalo, že Na^+ ionty se váží v poměru $Na^+/AzaPc$ 1:1, zatímco K^+ ionty se vázaly v poměru $K^+/AzaPc$ 1:2. Důvodem byla pravděpodobně příliš malá velikost kavity aza-crownu, který v tomto případě pouze „objímá“ K^+ jako korunka (**Obr. 38**). Sloučenina **1bZn** byla dále inkorporována do křemičitých NP a její senzorké vlastnosti byly potvrzeny spolu s necitlivostí k pH prostředí také ve vodném prostředí.

Tento pilotní projekt^[8] potvrdil, že AzaPc jako fluorofory nabízí mnoho výhodných vlastností jako je silná absorpce a emise v červené oblasti spektra (nad 650 nm, $\epsilon \sim 150\,000\,M^{-1}\,cm^{-1}$), necitlivost k pH prostředí a dobrý poměr Φ_F mezi OFF/ON stavem a mohou se tak stát slibnými fluorescenčními senzory pro kationty kovů. Avšak pro budoucí aplikace je nutné prozkoumat rozpoznávací část detailněji, aby byla zlepšena selektivita a senzitivita senzoru.



Obr. 38 Výsledky titrací AzaPc **1bZn** Na^+ (a, c, e) a K^+ ionty (b, d, f). a) a b) absorpční spektra; c) a d) fluorescenční spektra; e) a f) Jobova metoda kontinuálních variací; g) schéma předpokládané stechiometrie vazby AzaPc **1bZn** s Na^+ a K^+ (převzato a upraveno).^[8]

4.11 AzaPc jako pH senzory

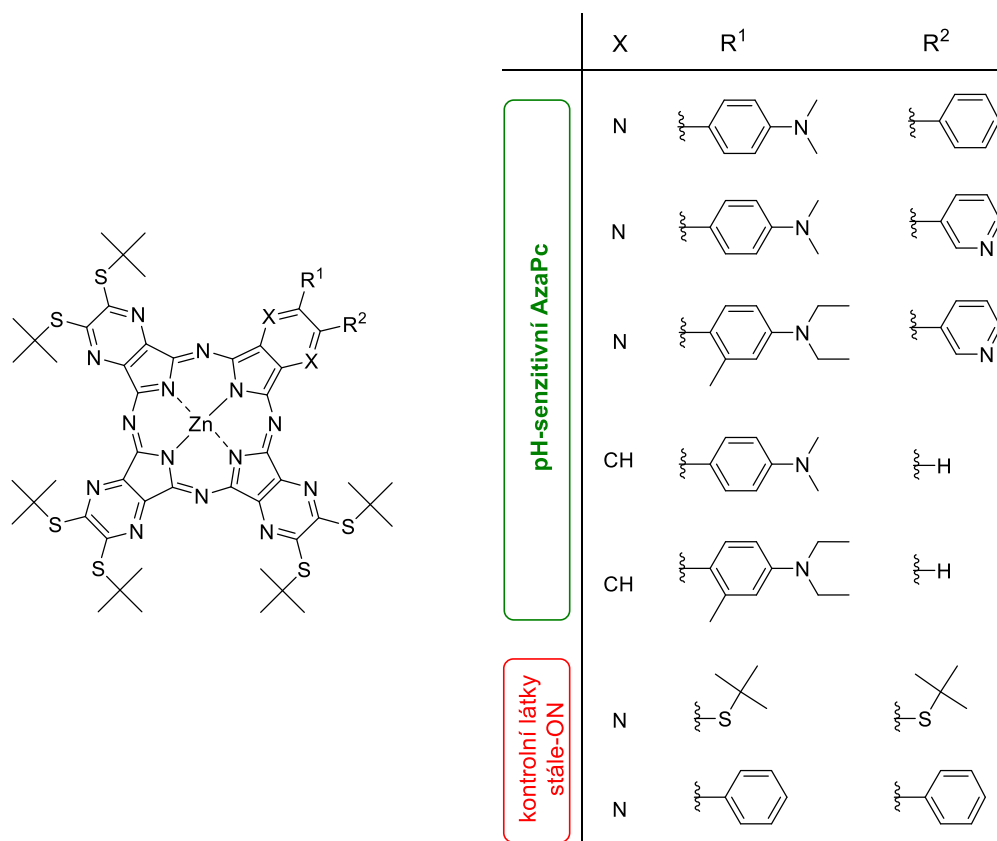
Naše skupina se vedle vývoje nových senzorů pro rozpoznávání kationtů kovů věnovala také návrhu a studiu nových pH-senzorů založených na struktuře AzaPc. Přepínání senzorů mezi OFF/ON stavy je zajištěno na základě blokování ICT protonizací donorové části senzoru vlivem hodnoty pH prostředí. Tento základní princip byl naší výzkumnou skupinou více rozvinut a byly připraveny pH-senzivní AzaPc pro měření kyselého^[121] i zásaditého pH.^[32] Zcela unikátní princip přepínání OFF-ON-OFF využívající nedávno popsané AzaPc pH-senzory navržené pro použití při měření úzké oblasti pH.^[20]

4.11.1 AzaPc pro měření v kyselé oblasti pH

Snaha připravit AzaPc pH senzory citlivé v oblasti kyselého pH byla motivována prací,^[130] ve které se dosahovalo vyšší selektivity PDT volbou pH senzitivních látek. Tento fakt byl založen na tom, že v oblasti nádorové tkáně je pH kyslejší (6,8) než v oblasti zdravé tkáně (7,4). A právě pomocí pH senzorů bychom byli schopni vizualizovat oblast s nižší hodnotou pH a odlišit tak tkáně nádorové od tkání zdravých. V rámci studie byla připravena série nesymetrických AzaPc s jedním donorovým centrem tvořeným různě substituovaným anilinem (**Obr. 39**) tak, aby bylo dosaženo různé bazicity rozpoznávacího centra. Pro posouzení účinnosti blokování ICT byly taktéž připraveny látky kontrolní (stále v ON stavu) substituované *terc*-butylsulfanylovými nebo fenylovými substituenty (**Obr. 39**).

Citlivost ke kyselému pH byla poté ověřena postupnými přidávkami H₂SO₄ v prostředí DMF. Dle očekávání byla pozorována odpověď senzorů na snížení pH formou silné emise v oblasti 663 – 675 nm se signifikantním nárůstem fluorescence, který dosahoval hodnot o dva řády vyšší než intenzita fluorescence pro látku ve stavu OFF a zároveň byl srovnatelný s intenzitou fluorescence u látek kontrolních (stále ON stav). Studované AzaPc vykazaly cca 20-ti násobné nárůsty fluorescence.

Pro biologickou aplikaci je důležité, aby látky byly rozpustné a měly zachované sensorické funkce také ve vodném prostředí. Proto byly senzory ukotveny do lipozomů na bázi dioleoylfosfatidylcholin (DOPC) a citlivost na pH byla ověřena změnou pH pufru s prakticky stejným výsledkem jako v prostředí organického rozpouštědla. Tímto, bylo potvrzeno, že připravené látky se mohou stát díky vhodnému pK_a 2,2-4,2 slibnými pH senzory pro oblasti s kyselým pH a mohou nabídnout výhodnou absorpci a emisi při vyšších vlnových délkách.^[121]



Obr. 39 Struktury připravených pH senzorů a kontrolních látek zapojených do studie pH-senzitivních AzaPc pro kyselé prostředí (převzato a upraveno).^[121]

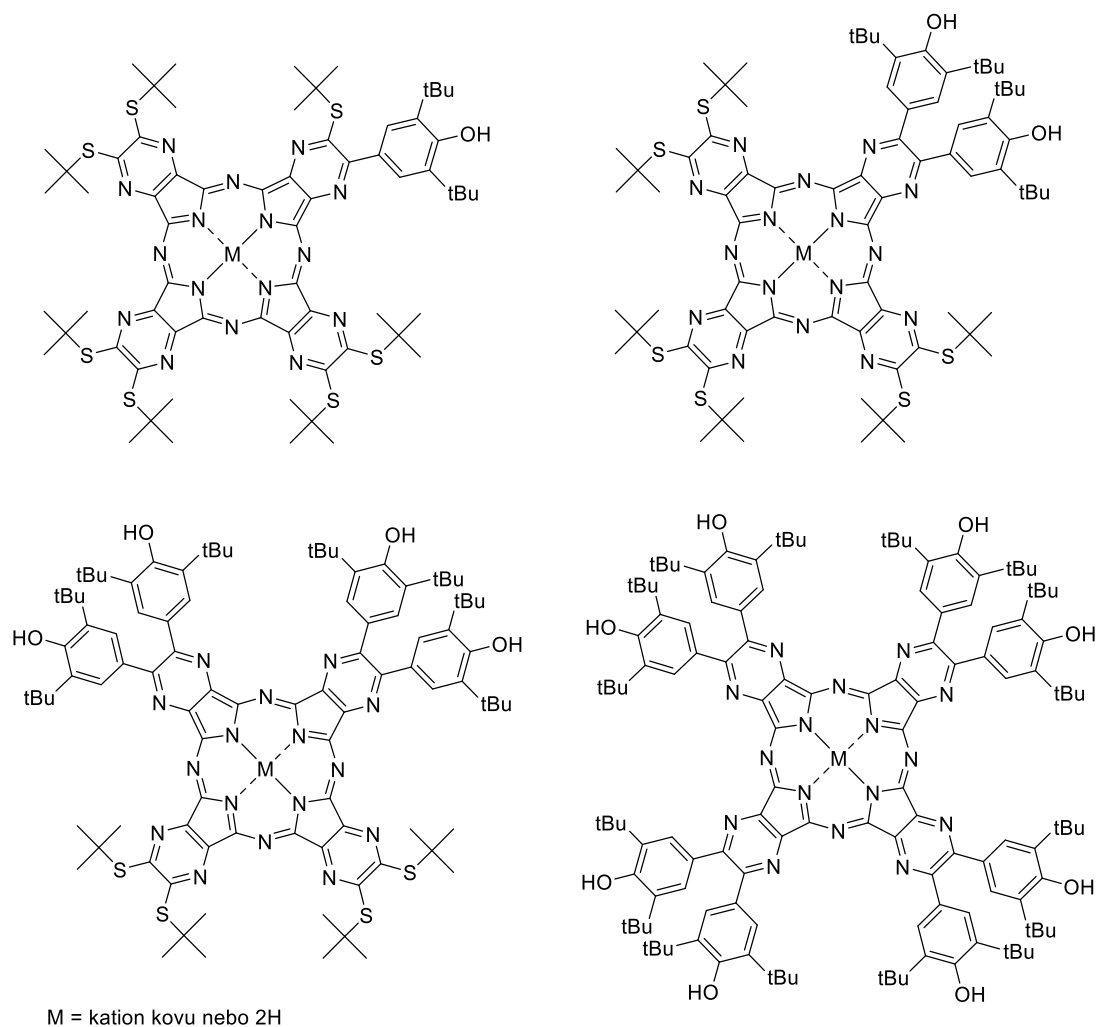
4.11.2 AzaPc pro měření v zásadité oblasti pH

V dalším projektu byla studována možnost použít rozpoznávací skupinu fenol/fenolát jako donor pro ICT v pH senzorech určených pro zásaditou oblast. V tomto konceptu je konverze fluorescenčního fenolového substituentu na nefluorescenční fenolát způsobena deprotonací OH skupin v zásaditém prostředí. Při tomto jevu dochází k vytvoření silného donorového centra v molekule senzoru, které je schopné účinně zhasět excitované stavy, a proto senzor po přidavku báze ztrácí své fluorescenční vlastnosti (fenolát - OFF stav).

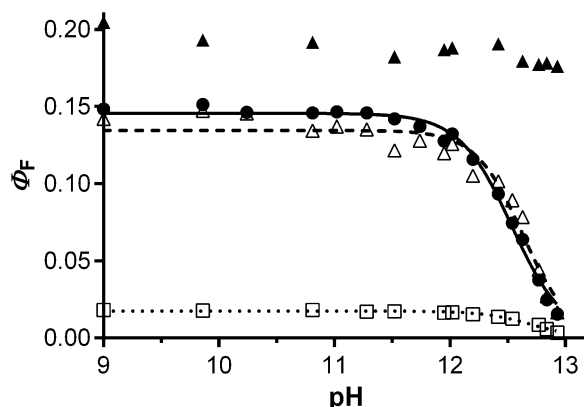
Byla studována série AzaPc senzorů s jedním, dvěma, čtyřmi a osmi 3,5-di(*tert*-butyl)-4-hydroxyfenyllovými skupinami (**Obr. 40**). A citlivost k zásaditému pH byla ověřena postupnými přidavky báze TBAH v MeCN. V souladu s očekáváním intenzita fluorescence klesala se zvyšující se koncentrací TBAH (**Obr. 41**). Tento jev byl plně reverzibilní a po přidavku kyseliny octové se molekula senzoru opět vrátila do své fluorescenční formy (fenol – ON stav).

Výjimku však tvořil senzor s osmi donorovými centry, u kterého došlo po přidání TBAH a následném oxyselení k nevratným změnám, které se projevily plochými roztáhlými absorpčními spektry a ztrátou fluorescence. Stejné chování 3,5-di(*tert*-butyl)-4-hydroxyfenylové skupiny bylo pozorováno a popsáno Clarksonem a kolektivem.^[131] Vysvětlením může být, že 3,5-di(*tert*-butyl)-4-hydroxyfenylová skupina podléhá oxidaci na chinon a/nebo známé transformaci zahrnující tvorbu endoperoxidů a/nebo kontrakci aromatického kruhu.^[132, 133]

Proto AzaPc senzory pouze jen s jednou, dvěma a čtyřmi donorovými centry byly vloženy do lipofilních částic v mikroemulzích a citlivost k zásaditému pH byla ověřena i ve vodném prostředí. Díky tomu bylo také možné stanovit hodnotu jejich pK_A , které se pohybovalo okolo 12,5. Tímto projektem bylo potvrzeno, že AzaPc s jedním, dvěma nebo čtyřmi donory tvořenými fenolovými jednotkami se mohou stát také senzory pro měření v zásadité oblasti pH a po přípravě lipofilních částic je také umožněno jejich využití v biologickém prostředí.^[32]



Obr. 40 Připravené struktury AzaPc senzorů pro zásaditou oblast pH (převzato a upraveno).^[32]

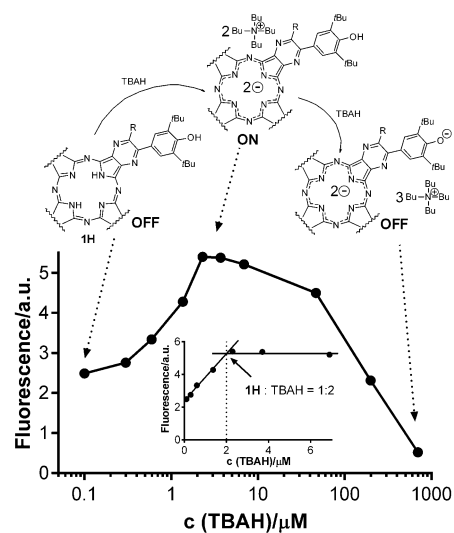


Obr. 41 Závislost kvantových výtěžků fluorescence na pH pufrů. Látka s jednou fenolickou skupinou (•), dvěma fenolickými skupinami (Δ), čtyřmi fenolickými skupinami (\square), kontrolní látka pouze s *tert*-butylsulfanylovými skupinami (\blacktriangle).^[32]

4.11.3 AzaPc operující v úzkém oblasti pH prostředí OFF-ON-OFF senzory

U bezkovových AzaPc senzorů navržených pro měření zásaditého pH byla pozorována velmi nízká intenzita fluorescence, která stoupla po přidání malého množství báze TBAH vlivem protonizace centrálních NH skupin AzaPc makrocyklu. Tento efekt vedl k vývoji nového konceptu OFF-ON-OFF pH senzorů pro úzké rozmezí pH.

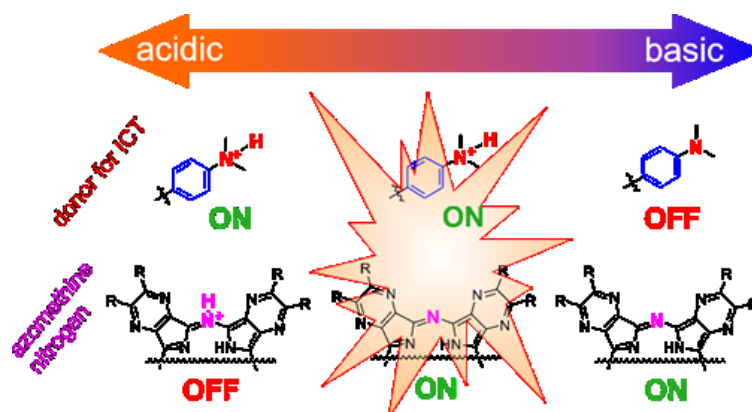
Jako první AzaPc senzor pro koncept OFF-ON-OFF byla studována struktura s jednou fenolovou skupinou (**Obr. 42**). Přidání malého množství TBAH vedlo ke změnám v absorpčním i emisním spektru (ON stav). V absorpčním spektru se Q pás typicky rozštěpený pro bezkovové AzaPc změnil na nerozštěpený. Tato změna indikovala deprotonizaci obou centrálních NH skupin.^[33, 134] V emisním spektru byl pak zaznamenán signifikantní nárůst fluorescence. Další malý přírůstek báze nezpůsobil žádné spektrální změny. Avšak po větším přírůdku báze došlo k poklesu



Obr. 42 Koncept přepínání OFF-ON-OFF pH-senzitivních AzaPc. Změny v intenzitě fluorescence pro senzor s jednou donorovou skupinou (koncentrace 1 μM , $\lambda_{\text{exc}} = 600 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 669 \text{ nm}$) po přidavku TBAH v MeCN.^[32]

fluorescence vlivem deprotonizace periferní fenolové skupiny (OFF stav). Tímto byla dokázána možnost přepínání senzoru OFF-ON-OFF přidávkem specifického množství báze (**Obr. 42**).^[32]

Koncept přepínání fluorescence senzorů v konceptu OFF-ON-OFF (**Obr. 43**) byl rozvíjen v dalším výzkumném projektu naší skupiny, kdy byla připravena série AzaPc s *N,N*-dimethylamino skupinami spojenými s makrocylem různými spojovacími řetězci (délka, typ spojovacího atomu) určená pro měření v úzké oblasti kyselého pH. V tomto projektu k prvnímu zhášení (OFF stavu) dochází protonizací azomethinových můstků molekuly AzaPc. Pro návrh všech senzorů bylo zvoleno stejné AzaPc jádro s koordinovaným zinečnatým kationtem, proto k přepnutí docházelo u všech senzorů při stejném pH ($pK_A = 1,3$). Citlivost k pH lze však měnit volbou donoru s různou bazicitou ($pK_A = 2,29-4,76$), která je zodpovědná za přepnutí senzoru do ON stavu. Mimo studia citlivosti k pH postupnými přídávky TBAH v tetrahydrofuranu (THF) byly pro potvrzení možné biologické aplikace byly ze senzorů připraveny lipozomy a jejich funkce byla testována ve vodném prostředí, kde byla pozorována citlivost v oblasti pH $\approx 1,0-2,5$ s až 20-ti násobnými nárůsty fluorescence v ON stavech.^[20]

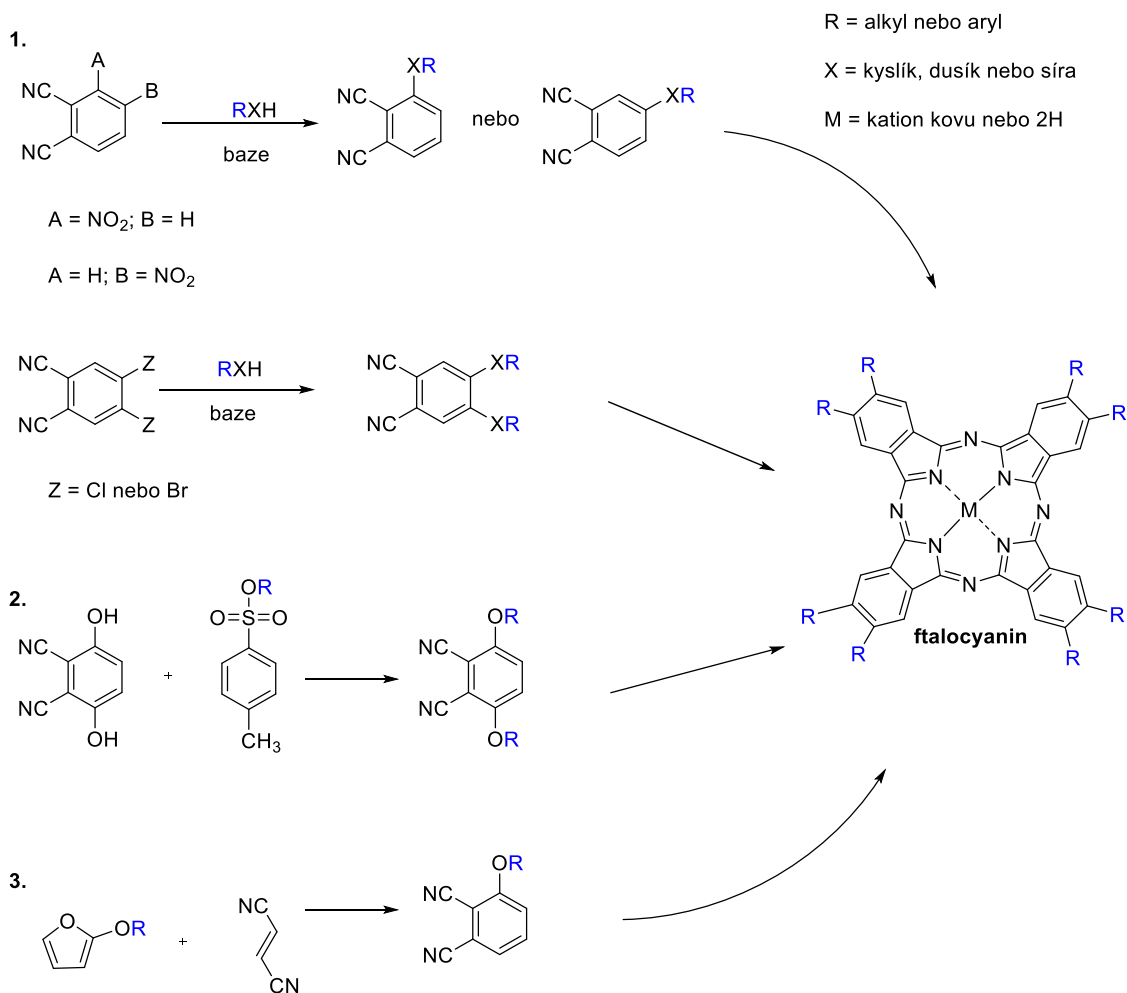


Obr. 43 Navrhovaný princip přepínání senzorů OFF-ON-OFF.^[20]

5. METODICKÁ ČÁST

5.1 Příprava Pc a AzaPc

Při přípravě Pc/AzaPc je třeba vždy v prvním kroku připravit prekurzor, ze kterého následně cyklizační reakcí vzniká příslušný makrocykl. Pc a AzaPc jsou připravovány stejnými cyklizačními reakcemi, liší se pouze příslušné výchozí látky. V případě Pc se většinou vychází ze substituovaných ftalonitrilů, naproti tomu u AzaPc je benzenové jádro nahrazeno za isosterní pyrazin, prekurzorem je tedy substituovaný pyrazin-2,3-dikarbonitril. Postupy přípravy zmíněných prekurzorů pro Pc a AzaPc jsou rozdílné, což je dáno rozdílnou reaktivitou benzenu a pyrazinu.



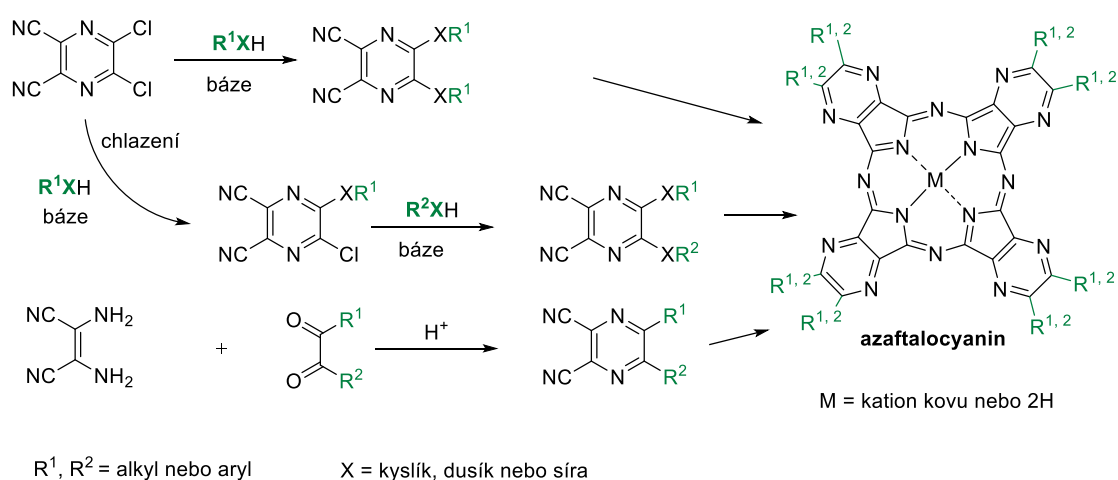
Obr. 44 Obecné postupy přípravy prekurzorů pro Pc: 1. nukleofilní substitucí; 2. alkyací fenolických hydroxylů; 3. Diels-Alderovou reakcí.

5.1.1 Příprava prekurzorů pro Pc a AzaPc

Při přípravě prekurzorů pro Pc se vychází z komerčně dostupných výchozích sloučenin: 3-nitroftalonitrilu, 4-nitroftalonitrilu nebo 4,5-dichlorftalonitrilu. Nukleofilní substitucí jsou poté připraveny alkyloxy-, aryloxy-, alkylsulfanyl- nebo arylsulfanyl- substituované ftalonitrilové prekurzory.^[13] Alkyloxy- a aryloxy- deriváty mohou být získány také Diels-Alderovou reakcí nebo alkylací fenolických hydroxylových skupin (**Obr. 44**).^[135, 136] Ke couplingovým reakcím je přistoupeno při přípravě Pc prekurzorů se substituenty vázanými C-C vazbou.^[137]

Příprava AzaPc prekurzorů vychází z nukleofilní substituce 5,6-dichlorpyrazin-2,3-dikarbonitrilu s příslušným N, O nebo S-nukleofilem za vzniku požadovaných 5,6-disubstituovaných pyrazin-2,3-dikarbonitrilů (**Obr. 45**).^[138, 139] Tyto reakce probíhají poměrně snadno díky zápornému indukčnímu efektu dusíku pyrazinového kruhu a zápornému mezomernímu efektu nitrilů v polohách 2 a 3, které snižují elektronovou hustotu na pyrazinových uhlících 5 a 6. Uhlíky v těchto polohách jsou pak snadno napadány nukleofily. Takto vznikají prekurzory s periferním substituentem vázaným přes heteroatom (N, O, S). Při ekvimolárním poměru výchozích látek a chlazení reakční směsi lze připravit také mono-substituované sloučeniny, které pak mohou dále v druhém kroku reagovat nukleofilní substitucí s jiným nukleofilem za vzniku nesymetrického prekurzoru.^[140]

Prekurzory se substituenty spojené C-C vazbou se připravují odlišně, a to kondenzací 2,3-diaminomaleonitrilu s vhodnou vicinální dikarboxylovou sloučeninou v kyselém reakčním prostředí.^[6, 141]



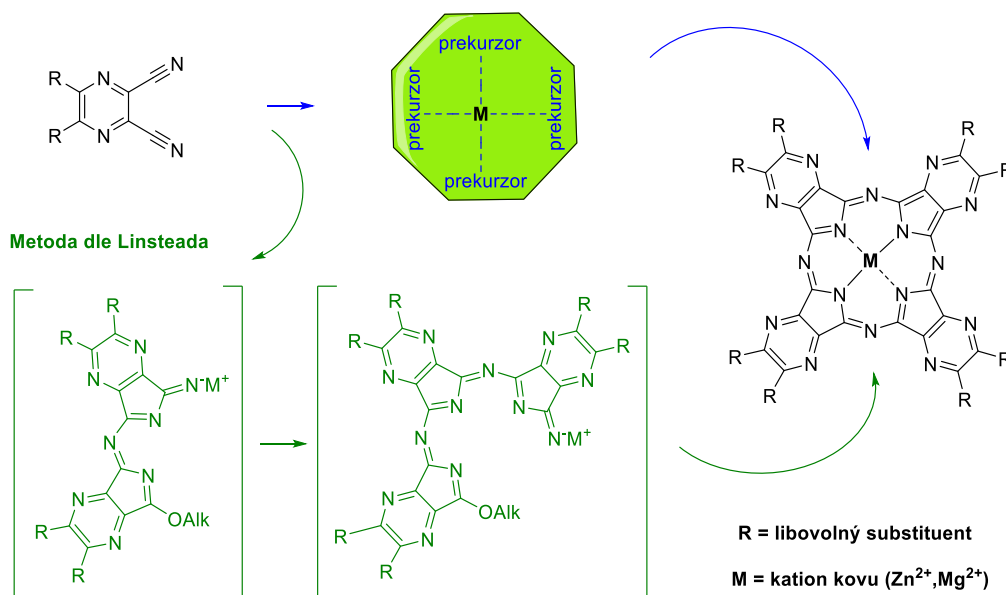
Obr. 45 Obecné postupy přípravy prekurzorů pro AzaPc.

5.1.2 Příprava Pc a AzaPc makrocyklu – cyklizační reakce

Příprava heterocyklických Pc analogů byla poprvé popsána Linsteadem a jeho spolupracovníky v roce 1937.^[142] Benzenové kruhy těchto sloučenin byly substituovány heterocykly jako je thiofen, thionaftalen, pyridin nebo pyrazin. Příprava AzaPc analogů byla popsána až mnohem později v 60. letech 20. století Galpenem a Luk'yanetsem.^[13]

Pro cyklizační reakci poskytující Pc/AzaPc lze použít dvě základní metody – metodu postupné výstavby makrocyklu po inicializaci reakce alkoholátem alkalického kovu, kovu alkalických zemin nebo pomocí silné báze (např. 1,8-diazabicyklo[5,4,0]undec-7-en nebo 1,5-diazabicyklo[4,3,0]non-5-en),^[143] tzv. *metoda dle Linsteada*, nebo *metodu templátového efektu kovu*, kdy je prekurzor zahříván ve vysokotroucím rozpouštědle (DMF, pyridin, chinolin) se solí určitého kovu (**Obr. 46**). V tomto případě kationt kovu slouží jako matrice, která k sobě váže čtyři prekurzory dostatečně blízko, aby došlo ke vzájemnému spojení prekurzorů ve finální Pc/AzaPc komplex.^[144] V obou případech dochází k chelataci kovového iontu použitého k tvorbě alkoholátu nebo jako matrice do centra makrocyklu. Pro přípravu dle *Linsteadovy metody* je v naší skupině rutinně používán butanolát hořečnatý, a proto je v centru makrocyklu po cyklizační reakci vázán hořečnatý kationt. Ten pak lze velmi snadno z centra molekuly odstranit v kyselém prostředí (kyselina *p*-toluensulfonová) a do centra chelatovat požadovaný kationt kovu (např. Zn^{2+}), reakcí s příslušnou solí.

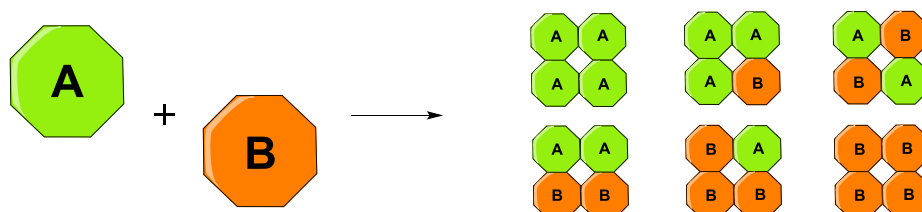
Templátová metoda



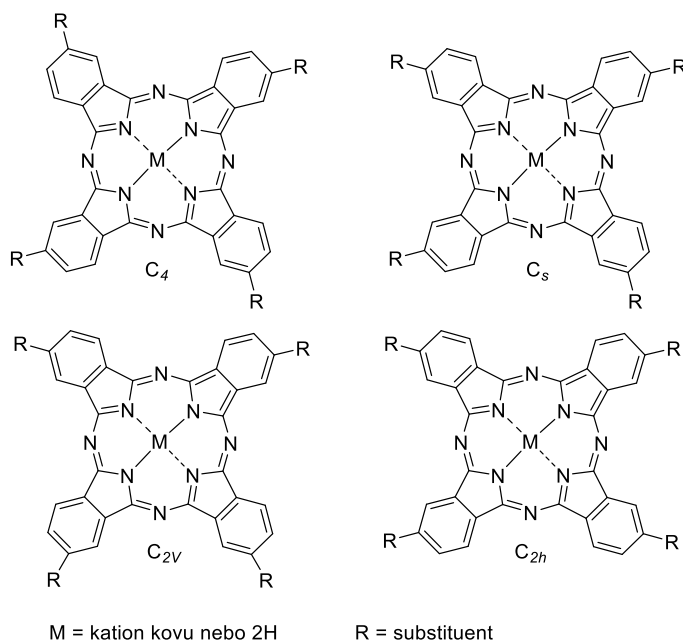
Obr. 46 Základní přístupy v přípravě AzaPc komplexů: *Templátová metoda a metoda dle Linsteada*.

Pokud je při cyklizaci použit jen jeden prekurzor jako výchozí látka, vzniká symetrický Pc/AzaPc. Když použijeme v reakci dva rozdílné prekurzory (A a B), vznikne po cyklizaci statistická směs šesti různých Pc/AzaPc (tzv. kongenerů) s různě nakombinovanými jednotkami A a B (AAAA, AAAB, ABAB, AABB, ABBB, BBBB) (**Obr. 47**). Touto reakcí zvanou statistická kondenzace se připravují nesymetrické Pc/AzaPc. Tato metoda přípravy je neselektivní a výtěžky reakce jsou obecně nízké, avšak podíl požadovaného nesymetrického kongeneru lze zvýšit volbou vhodného poměru prekurzorů A a B (obvykle 1:3, při požadované přípravě kongeneru ABBB),^[10] požadovaný nesymetrický kongener (obvykle ABBB) je poté izolován a čištěn pomocí chromatografických metod.

Další možností přípravy nesymetrického Pc/AzaPc může být použití jednoho nesymetrického prekurzoru v cyklizační reakci, kdy vzniká směs polohových izomerů s různými typy symetrie (**Obr. 48**).^[10]



Obr. 47 Obecné schéma vzniku směsi šesti různých kongenerů při přípravě nesymetrického Pc/AzaPc komplexu metodou statistické kondenzace (prekurzorů A a B).



Obr. 48 Polohové izomery Pc po cyklizaci nesymetrického prekurzoru a označením typu izomerie.

5.2 Metody pro studium fotofyzikálních vlastností Pc a AzaPc

5.2.1 Kvantový výtěžek fluorescence (fluorescence quantum yield, Φ_F)

Pro měření kvantového výtěžku fluorescence Φ_F je používána srovnávací metoda s nesubstituovaným zinečnatým ftalocyaninem (ZnPc) jako referenční látkou ($\Phi_F = 0,32$ v THF).^[145] Vzorek i referenční látka jsou excitovány při stejné vlnové délce. Pro výpočet Φ_F je pak použita rovnice (2),^[2] kde F je integrovaná plocha pod emisním spektrem, A je absorbance při excitační vlnové délce, n je index lomu rozpouštědla. Index R náleží referenční látce a index S se týká měřeného vzorku.

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

5.2.2 Vazebná konstanta

Pro stanovení vazebné konstanty je nejprve změřeno absorpční a emisní spektrum (λ_{exc} v isobestickém bodě) roztoku AzaPc v THF nebo MeCN ($C_{\text{AzaPc}} = 1 \mu\text{M}$). Poté je přidáno definované množství zásobního roztoku soli analytu rozpuštěného v MeOH. Absorpční a emisní spektra jsou měřena po každém přidavku a pro každý bod pak je stanoven kvantový výtěžek fluorescence. Kvantové výtěžky fluorescence Φ_F jsou počítány dle rovnice (2), jak bylo popsáno výše, a vyneseny jako závislost na koncentraci analytu. Asociační konstanta (K_A) nebo K_D jsou počítány nelineární regreseí za pomoci programu Prism 5 software for Windows (GraphPad Software, inc.). K_A je hodnota, která vyjadřuje schopnost tvorby komplexu sensor/analyt naproti tomu K_D vyjadřuje sílu nutnou k rozpadu komplexu sensor/analyt a je z ní tedy možné usuzovat, jak pevně k sobě vázán sensor s analytem. Pro konstanty K_A a K_D platí vzájemný vztah $K_D = 1/K_A$.

5.2.3 Zesilující faktor fluorescence (fluorescence enhancement factor, FEF)

FEF je poměr kvantového výtěžku fluorescence senzoru při kompletní saturaci kavity rozpoznávací části senzoru analytem ($\Phi_{F(M^+)}$) (okamžik, kdy titrační křivka dosahuje stavu „plateau“) a jeho volné formy před přidavkem analytu ($\Phi_{F(\text{Free})}$). FEF lze tedy spočítat dle rovnice (3).

$$FEF = \frac{\Phi_{F(M^+)}}{\Phi_{F(\text{Free})}} \quad (3)$$

5.2.4 Jobova metoda kontinuálních variací

Jobovou metodou kontinuálních variací je možné objasnit stechiometrii vazby senzor/analyt. Pro možné vyhodnocení experimentu je nutné, aby senzor byl citlivý ke studovanému analytu. Během měření musí být zachována konstantní celková koncentrace senzoru a analytu. Vzorky je nutné excitovat v oblasti isosbestického bodu absorpčního spektra, a pak změřit emisní spektrum před přidavkem analytu (F_0) a po přidavku analytu (F_{analyt}). Finální stechiometrie komplexu senzor/analyt je následně stanovena ze závislosti $F_{\text{analyt}} - F_0$ na $[\text{analyt}] / ([\text{analyt}] + [\text{senzor}])$, jako bod zlomu příslušné křivky.

6. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Všechna organická rozpouštědla byla v analytické kvalitě. Bezvodý butanol byl sušen hořčíkem zahříváním pod zpětným chladičem při teplotě varu rozpouštědla a byl oddestilován v čas potřeby. Všechny chemikálie pro přípravy sloučenin byly zakoupeny u zavedených dodavatelů (Sigma-Aldrich, Acros, Merck, VWR a TCI Europe) a byly použity, jak byly dodány.

Silikagel s indikátorem vlhkosti a podložní sklíčka pro mikroskopii byly objednány u firmy Carl Roth. Ethylcelulóza s 49 % obsahem ethoxyly byla objednána u Sigma-Aldrich. Hydrofilní termoplastické elastomery HydroThane™ 5, HydroThane™ 15, HydroThane™ 25 byly získány od firmy AdvanSource Biomaterials. Ultra jemný oxid titaničitý P170 byl objednán u firmy Kemira. Dusík, 5 % oxid uhličitý v dusíku a oxid uhličitý (všechny plyny v čistotě 99,999%) byly dodány od Air Liquide, Rakousko. Všechny silikonové komponenty pro přípravu CO₂ senzorů: vinylem-ukončený polydimethylsiloxan (viskozita 1000 cSt.), (25-35 % methylhydrosiloxan)-dimethylsiloxan kopolymer (viskozita 25-35 cSt.), 1,3,5,7-tetravinyl-1,3,5,7-tetramethylcyklotetrasiloxan a katalyzátor 1,3-divinyl-1,1,3,3-tetramethyldisiloxanový komplex platiny byly obdrženy od firmy ABCR, Německo. Podpůrná fólie z PETE Melinex 505 byla získána u firmy Pütz, Německo. Aplikátory pro nožové pokrytí fólie filmem s tloušťkou 75 μm byly vyrobeny firmou BYK Gardner, Německo.

Chromatografie na tenké vrstvě (TLC) byla prováděna na deskách Silica gel 60 F₂₅₄ (Merck, Darmstadt, Německo). Merck Kieselgel 60 (0,040-0,063 mm) byl použit pro preparativní sloupcovou chromatografii. Teploty tání (t.t.) byly měřeny na přístroji Electrothermal IA9200 Series Digital Melting Point apparatus (Electrothermal Engineering Ltd., Southend-on-Sea, Essex, Velká Británie). ¹H and ¹³C NMR spektra byla měřena na přístroji Varian Mercury Vx BB 300 nebo VNMR S500 na Katedře organické a bioorganické chemie. Zapsané chemické posuny jsou vztaženy relativně k vnitřnímu standardu Si(CH₃)₄. IČ byla měřena v peletách KBr přístrojem Nicolet 6700 v ATR módu na Katedře organické a bioorganické chemie. UV/Vis spektra byla zaznamenána přístrojem Shimadzu UV-2600 spectrophotometer. Fluorescenční spektra byla naměřena přístrojem AMINCO Bowman Series 2 luminescence spectrometer na Katedře biofyziky a fyzikální chemie nebo FS5 fluorescence spectrophotometer (Edinburgh Instruments Ltd, Velká Británie). Elementární analýza byla provedena pomocí Automatic Microanalyser EA1110CE (Fisons Instruments S.p.A., Miláno, Itálie) nebo Vario Micro Cube Elemental Analyzer (Elementar Analysensysteme GmbH, Hanau, Německo). APCI (*atmospheric pressure chemical ionization*) hmotnostní spektra byla získána pomocí přístroje Agilent 500 Ion Trap LC/MS (Agilent

Technologies, Santa Clara, California, USA) přímým nástřikem vzorku rozpuštěného v MeOH na detektor. HR MS spektra byla měřena pomocí UHPLC system Acquity UPLC I-class (Waters, Millford, USA), spektra byla měřena ve spojení s hmotnostním spektrometrem s vysokým rozlišením (HR MS) Synapt G2Si (Waters, Manchester, Velká Británie) založeném na Q-TOF. Chromatografie pro toto HR MS měření byla provedena na Acquity UPLC BEH300 C4 (2,1 x 50 mm; 1,7 μm) a užívala kolonu s isokratickou elucí s MeCN a 10 mmol ammonium-formiátový pufr pH = 3 (90:10) při průtoku 0,4 ml/min. Ionizační metoda elektrosprej pracující v pozitivním módu. ESI spektra byla zaznamenána v rozmezí 200-2000 m/z s využitím glu-fibrinopeptidu B jako referenční látky a jodidu sodného pro kalibraci. MALDI-TOF (*matrix assisted laser desorption ionization-time of flight*) hmotnostní spektra byla měřena v pozitivním reflektrovném módu na přístroji 4800 MALDI-TOF/TOF mass spectrometer (AB Sciex, Framingham, MA, USA) využívajícím jako matici *trans*-2-[3-(4-*tert*-butylfenyl)-2-methyl-2-propenyliden]malononitril. Přístroj byl kalibrován za použití externího pětibodového kalibračního standardu Peptide Calibration Mix1 (LaserBio Labs, Sophia-Antipolis, Francie).

5,6-dichlorpyrazin-2,3-dikarbonitril použitý jako výchozí látka při přípravě většiny prekurzorů byl objednáán u TCI Europe. Výchozí látka 4-hydroxy-3,5-diisopropylbenzaldehyd,^[32] prekurzory **P1b**, **P2b**^[8] a **P4**^[146] a AzaPc **1bZn** a **1eZn**^[8] byly připraveny přesně dle publikovaného postupu v odborné literatuře. ZnPc využívaný jako referenční látka při fotofyzikálním studiu připravených senzorů byl zakoupen u Sigma-Aldrich. Křemičité NP **2bZn@NP**, **3aZn@NP** a **4aZn@NP** byly připraveny z AzaPc senzorů **2bZn**, **3aZn** a **4aZn** ve spolupráci s Dr. Langem a Dr. Kirakcim z Ústavu anorganické chemie, Akademie věd ČR.

pH-senzitivní AzaPc indikátory **5aZn**, **5bZn**, **5cZn**^[32] zapojené do studie [P4] byly připraveny společně s kontrolní látkou **KLX**^[127] dle publikovaného postupu. Silanizované částice egyptské modří^[147] a indikátor diketo-pyrrolo-pyrrol (DPP)^[148] byly připraveny ve spolupráci s Assoc. Prof. Sergejem Borisovem z „Graz University of Technology“ (Graz, Rakousko) dle nedávno publikovaných postupů.

6.1 Látky připravené v rámci projektu [P1]

Příprava prekurzorů

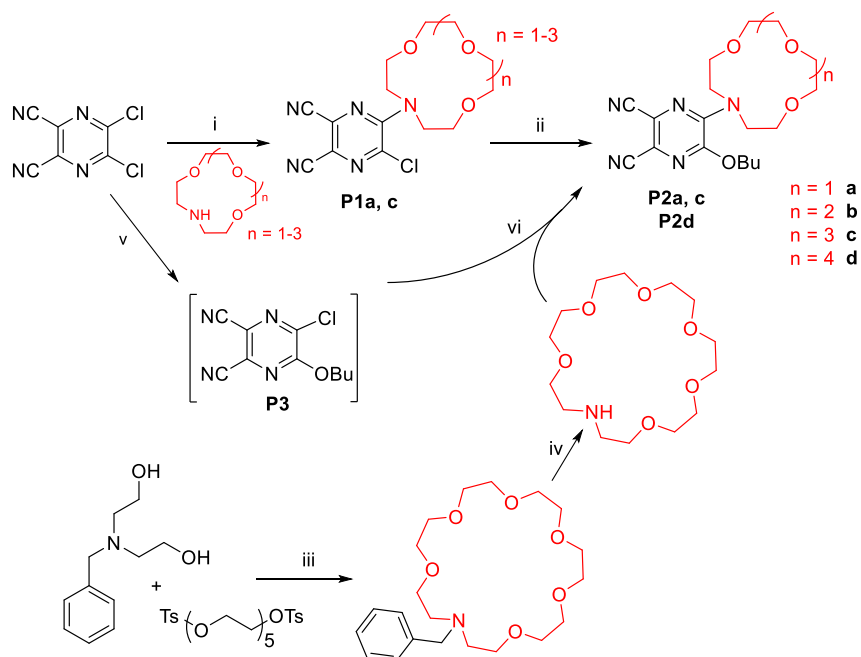


Schéma 1 Příprava prekurzorů: (i) bezvodý K_2CO_3 , THF, $-12\text{ }^\circ\text{C}$, 2 h; (ii) 1,8-diazabicyklo[5,4,0]undec-7-en (DBU), butanol, laboratorní teplota, 10 min – 1 h; (iii) *tert*-butanolát draselný, bezvodé THF, Argon, $40\text{ }^\circ\text{C}$, 2,5 h; (iv) 10 % Pd/C saturované H_2 , CH_3COOH , MeOH, laboratorní teplota, 12 h; (v) NaOH 1M vodný roztok, butanol, $-12\text{ }^\circ\text{C}$, 1 h; (vi) bezvodý K_2CO_3 , THF, laboratorní teplota, 1 h.

5-chlor-6-(1,4,7-trioxa-10-azacyklododekan-10-yl)pyrazin-2,3-dikarbonitril (P1a)

5,6-dichloropyrazin-2,3-dikarbonitril (909 mg; 4,57 mmol) rozpuštěný v THF (60 ml) byl zchlazen v lázni NaCl/led. K připravenému roztoku byl pomalu přidán ochlazený roztok 1-aza-12-crown-4 (801 mg; 4,57 mmol) v THF (15 ml) a směs byla míchána 5 min. Poté byl do reakční směsi přisypán jemně rozemletý bezvodý K_2CO_3 (842 mg; 6,09 mmol) v jednom přidavku a vzniklá suspenze byla míchána další 2 h při laboratorní teplotě. THF byl odpařen, do baňky byl přidán chloroform (50 ml) a jedna kapka kyseliny chlorovodíkové. A produkt byl následně třikrát vytřepán s nasyceným vodným roztokem NaCl (3×50 ml). Organická vrstva byla sbírána a přesušena bezvodým Na_2SO_4 , zfiltrována a odpařena do sucha na vakuové rotační odparce. Produkt byl čištěn sloupcovou chromatografií s mobilní fází diethyl ether/acetone 5:1 ($R_f = 0,55$

pro **P1a**). Surový produkt byl nakonec rekrystalizován z ethanolu, vzniklý precipitát produktu byl posbíráván filtrací a vysušen na vzduchu.

Výtěžek: 1,44 g (94 %) žlutá pevná látka; t.t. 87,9-88,5 °C; ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ = 3,63-3,68 (m, 8 H, crown-H); 3,93 (t, *J* = 5 Hz, 4 H, crown-H) a 4,08 ppm (t, *J* = 5 Hz, 4 H, crown-H); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ = 52,1; 69,9; 70,5; 71,4; 112,8; 113,0; 118,0; 129,0; 135,5 a 152,0 ppm; IČ (ATR): ν = 2863, 2228 (CN), 1548, 1505, 1434, 1385, 1355, 1294, 1238, 1133, 1089, 1066, 1046 and 1019 cm⁻¹; HR MS (ESI⁺): počítáno pro C₁₄H₁₆ClN₅O₃ m/z = 338,1014 [M+H]⁺; nalezeno m/z = 338.1004 [M+H]⁺.

5-chlor-6-(1,4,7,10,13-pentaoxa-16-azacyklooktadekan-16-yl)pyrazin-2,3-dikarbonitril (P1c)

5,6-dichlorpyrazin-2,3-dikarbonitril (600 mg; 3,02 mmol) rozpuštěný v THF (50 ml) byl zchlazen v lázni NaCl/led. K připravenému roztoku byl pomalu přidán ochlazený roztok 1-aza-18-crown-6 (790 mg; 3,00 mmol) rozpuštěného v THF (15 ml) a směs byla míchána po dobu 5 min. Poté byl do reakční směsi přisypán jemně rozemletý bezvodý K₂CO₃ (542 mg; 3,92 mmol) v jednom přidavku a vzniklá suspenze byla míchána další 2 h při laboratorní teplotě. THF byl odpařen, do baňky byl přidán chloroform (50 ml) a jedna kapka kyseliny chlorovodíkové. A produkt byl třikrát vytřepán s nasyceným vodným roztokem NaCl (3×50 ml). Organická vrstva byla sbírána a přesušena bezvodým Na₂SO₄, zfiltrována a odpařena do sucha na vakuové rotační odparce. Produkt byl čištěn sloupcovou chromatografií s mobilní fází diethyl ether/acetone 2:1 (R_f = 0,28 pro **P1c**).

Výtěžek: 1,02 g (79 %) světle žlutý olej; ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ = 3,61-3,67 (m, 16 H, crown-H); 3,82 (t, *J* = 6 Hz, 4 H, crown-H) a 4,10 ppm (t, *J* = 6 Hz, 4 H, crown-H); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ = 51,9; 69,2; 70,52; 70,56; 70,65; 70,73; 112,9; 113,1; 117,9; 129,0; 135,6 a 152,0 ppm; IČ (ATR): ν = 2868, 2228 (CN), 1549, 1441, 1384, 1350, 1299, 1233, 1118, 1045, 987 a 944 cm⁻¹; HR MS (ESI⁺): počítáno pro C₁₈H₂₄ClN₅O₅ m/z = 426,1539 [M+H]⁺; nalezeno m/z = 426,1543 [M+H]⁺.

5-butoxy-6-(1,4,7-trioxa-10-azacyklododekan-10-yl)pyrazin-2,3-dikarbonitril (P2a)

Výchozí látka **P1a** (900 mg; 2,66 mmol) byla rozpouštěna v butanolu (110 ml) v ultrazvukové lázni 10 min při laboratorní teplotě. Pak bylo do roztoku přikapáno DBU (446 mg; 2,93 mmol) a směs byla míchána při laboratorní teplotě další 1 h. Ke směsi byl přilít ethylacetát

(70 ml) a kapka kyseliny chlorovodíkové a produkt byl třikrát vytřepán s nasyceným vodným roztokem NaCl (3×50 ml). Organická vrstva byla sbírána, vysušena bezvodým Na₂SO₄, zfiltrována a odpařena do sucha na vakuové rotační odparce. Produkt byl čištěn sloupcovou chromatografií s mobilní fází toluen/THF 10:1 (*R_f* = 0,25 pro **P2a**). Po vymytí nečistot byla mobilní fáze urychlena na toluen/THF 5:1 (*R_f* = 0,67 pro **P2a**). Čištěný produkt byl dále rekrystalizován z ethanolu a jemný precipitát produktu byl posbírán filtrací.

Výtěžek: 939 mg (94 %) žlutá pevná látka, t.t. 89,7-90,6 °C; ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ = 0,98 (t, *J* = 7 Hz, 3 H, CH₃); 1,45 (sext, *J* = 7 Hz, 2 H, CH₂CH₃); 1,77 (p, *J* = 7 Hz, 2 H, CH₂CH₂CH₃); 3,65 (s, 8 H, crown-H); 3,86 (t, *J* = 5 Hz, 4 H, crown-H); 3,99 (br s, 4 H, crown-H) a 4,36 ppm (t, *J* = 7 Hz, 2 H, OCH₂CH₂CH₂CH₃); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ = 13,7; 19,3; 30,3; 52,1; 68,7; 70,3; 71,4; 114,2; 114,6; 116,4; 124,4; 146,8 a 149,5 ppm; IČ (ATR): ν = 2962, 2921, 2877, 2856, 2225 (CN), 1552, 1526, 1510, 1463, 1432, 1377, 1334, 1289, 1272, 1248, 1180, 1154, 1130, 1095, 1065, 1021, 983 a 954 cm⁻¹; HR MS (ESI⁺): počítáno pro C₁₈H₂₅N₅O₄ m/z = 376,1979 [M+H]⁺; nalezeno m/z = 376,1981 [M+H]⁺.

5-butoxy-6-(1,4,7,10,13-pentaoxa-16-azacyklooktadekan-16-yl)pyrazin-2,3-dikarbonitril (P2c)

Výchozí látka **P1c** (700 mg; 1,64 mmol) byla rozpouštěna v butanolu (24 ml) v ultrazvukové lázni 5 min při laboratorní teplotě. Pak bylo do roztoku přikapáno DBU (270 mg; 1,77 mmol) a směs byla míchána při laboratorní teplotě dalších 10 min. K připravené směsi byl přilít ethylacetát (60 ml) a kapka kyseliny chlorovodíkové a produkt byl třikrát vytřepán s nasyceným vodným roztokem NaCl (3×50 ml). Organická vrstva byla sbírána, vysušena bezvodým Na₂SO₄, zfiltrována a odpařena do sucha na vakuové rotační odparce. Produkt byl přečištěn sloupcovou chromatografií s mobilní fází toluen/THF 3:1 (*R_f* = 0,16 pro **P2c**).

Výtěžek: 670 mg (88 %) bezbarvý olej; ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ = 0,98 (t, *J* = 7 Hz, 3H, CH₃); 1,45 (sext, *J* = 7 Hz, 2H, CH₂CH₃); 1,77 (p, *J* = 7 Hz, 2 H, CH₂CH₂CH₃); 3,64 (s, 8 H, crown-H); 3,67 (s, 8 H, crown-H); 3,74 (t, *J* = 5 Hz, 4 H, crown-H); 4,02 (br s, 4 H, crown-H) a 4,36 ppm (t, *J* = 7 Hz, 2 H, OCH₂CH₂CH₂CH₃); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ = 13,7; 19,3; 30,4; 51,9; 68,7; 70,49; 70,53; 70,54; 70,79; 114,2; 114,6; 116,2; 124,6; 146,5 a 149,3 ppm; IČ (ATR): ν = 2870, 2226 (CN), 1553, 1525, 1512, 1427, 1350, 1289, 1223, 1119 a 948 cm⁻¹; HR MS (ESI⁺): počítáno pro C₂₂H₃₃N₅O₆ m/z = 464,2504 [M+H]⁺; nalezeno m/z = 464,2511 [M+H]⁺.

5-butoxy-6-(1,4,7,10,13,16-hexaoxa-19-azacyklohenikosan-19-yl)pyrazin-2,3-dicarbonitril (P2d)

Emulze NaOH 1M vodného roztoku (4,80 g; 4,62 mmol) v butanolu (10 ml) byla přikapána ke směsi 5,6-dichlorpyrazin-2,3-dicarbonitrilu (513 mg; 2,58 mmol) rozpuštěného v butanolu (120 ml), který byl zchlazen v lázni NaCl/led. Směs byla poté míchána při laboratorní teplotě 1 h a průběh reakce byl monitorován pomocí TLC (chloroform/toluene 6:7, $R_f = 0,60$). Po ukončení reakce byl k reakční směsi přidán ethylacetát (100 ml) a směs byla třikrát vytřepána s vodou (3×80 ml). Organická vrstva byla sbírána, vysušena bezvodým Na_2SO_4 , zfiltrována a odpařena do sucha na vakuové rotační odparce. Surový meziproduct **P3** (641 mg) byl rozpuštěn v THF (20 ml) a roztok byl pomalu přidán k suspenzi K_2CO_3 (257 mg; 1,86 mmol) a 1-aza-21-crown-7 (520 mg; 1,69 mmol) rozpuštěného v THF (25 ml). Reakční směs byla pak míchána při laboratorní teplotě další hodinu. Reakce byla opět monitorována pomocí TLC (ethylacetát/MeOH 5:1, $R_f = 0,65$ pro **P2d**). Po ukončení reakce bylo THF odpařeno na vakuové rotační odparce. Poté byl do baňky přidán chloroform (50 ml) a kapka kyseliny chlorovodíkové a produkt byl třikrát vytřepán s vodou (3×50 ml). Po oddělení vodné a organické fáze byla sbírána organická vrstva, která byla následně vysušena bezvodým Na_2SO_4 , zfiltrována a odpařena do sucha za sníženého tlaku. Produkt byl čištěn sloupcovou chromatografií s mobilní fází diethylether/acetone 2:1 ($R_f = 0,40$ pro **P2d**).

Výtěžek: 309 mg (24 %) světle oranžový olej; ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3 , 25 °C): $\delta = 0,97$ (t, $J = 7$ Hz, 3 H, CH_3); 1,44 (sext, $J = 7$ Hz, 2 H, CH_2CH_3); 1,76 (p, $J = 7$ Hz, 2 H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$); 3,58-3,69 (m, 20 H, crown-H); 3,72 (t, $J = 5$ Hz, 4 H, crown-H); 4,02 (br s, 4 H, crown-H) a 4,36 (t, $J = 7$ Hz, 2 H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$); ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3 , 25 °C): $\delta = 13,7$; 19,3; 30,4; 51,9; 68,7; 70,49; 70,54; 70,60; 70,74; 70,95; 114,3; 114,6; 116,0; 124,6; 146,4 a 149,2 ppm; IČ (ATR): $\nu = 2944, 2869, 2225$ (CN), 1555, 1513, 1427, 1350, 1289, 1253, 1222, 1118, 994 a 943 cm^{-1} ; HR MS (ESI⁺): počítáno pro $\text{C}_{24}\text{H}_{37}\text{N}_5\text{O}_7$ $m/z = 508,2766$ [M+H]⁺; nalezeno $m/z = 508,2770$ [M+H]⁺.

1-benzyl-1-aza-21-crown-7

Syntéza byla provedena podle publikovaného postupu uvedeného v literatuře^[149] se změnami, které jsou popsány níže. 2,2'-(benzylazandiyl)bis(ethan-1-ol) (759 mg; 3,89 mmol) byl rozpuštěn v bezvodém THF (40 ml) ve dvojhrdlé baňce pod ochrannou atmosférou (argon). K reakční směsi byl poté injekcí pomalu přidán roztok 1M *tert*-butanolátu draselného (8,03 g; 71,56 mmol) rozpuštěného v bezvodém THF. Pentaethylenglykol-di(*p*-toluensulfonát) (2,12 g; 3,89 mmol) byl rozpuštěn v bezvodém THF (20 ml) a přidán po kapkách k reakční směsi. Směs

byla míchána 2,5 h při 40 °C. Okamžité zreagování výchozích látek bylo indikováno pomocí TLC (ethylacetát/MeOH 5:1, $R_f = 0,29$ pro 1-benzyl-1-aza-21-crown-7). Po ukončení reakce bylo THF odpařeno za sníženého tlaku. Produkt byl následně rozpuštěn v ethylacetátu (50 ml) a extrahován 5 % kyselinou chlorovodíkovou (v/v) (3×50 ml). Vodná vrstva byla sbírána a zneutralizována NaOH 1M vodným roztokem a produkt byl třikrát extrahován ethylacetátem (3×80 ml). Tentokrát byla sbírána organická vrstva obsahující produkt, a poté byl ethylacetát odpařen na vaukové rotační odparce. Surový produkt byl čištěn sloupcovou chromatografií s mobilní fází ethylacetát/MeOH/triethylamin 15:1:0,1. Po vymytí nečistot byla mobilní fáze urychlena na ethylacetát/MeOH/triethylamin 15:3:1.

Výtěžek: 792 mg (51 %) bezbarvý olej. $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3 , 25 °C): $\delta = 2,74\text{--}2,93$ (m, 4H, CH_2); 3,59–3,72 (m, 26 H, CH_2) a 7,22–7,41 ppm (m, 5 H, Bn-H); MS (APCI): $m/z = 398,7$ [$\text{M}+\text{H}$] $^+$. Ostatní analytická data korespondovala s daty publikovanými v literatuře.^[149]

1-aza-21-crown-7

Odstranění chránící benzylové skupiny bylo provedeno dle v literatuře publikovaného postupu^[150] se změnami, které jsou uvedeny níže. Směs 10 % Pd/C (40 mg) v MeOH (3 ml) byla saturována vodíkem za stálého míchání při laboratorní teplotě po dobu 1 h. 1-benzyl-1-aza-21-crown-7 (792 mg; 1,99 mmol) byl rozpuštěn v roztoku 0,5 % kyseliny octové v MeOH (v/v) (20 ml) a následně přidán po kapkách do reakční směsi. Reakční směs pak byla míchána a probublávána vodíkem dalších 12 h. Průběh reakce byl monitorován pomocí TLC (ethylacetát/MeOH 5:1, $R_f = 0,16$ pro 1-aza-21-crown-7). Po ukončení reakce byl katalyzátor odstraněn ze směsi filtrací a třikrát promyt na filtru MeOH (3×20 ml). Filtrát byl sbírán a odpařen do sucha za sníženého tlaku a produkt byl pak rozpuštěn v ethylacetátu (30 ml) a extrahován 5 % kyselinou chlorovodíkovou (v/v) (3×20 ml). Vodná vrstva byla sbírána a zneutralizována NaOH 1M vodným roztokem a produkt byl následně třikrát extrahován ethylacetátem (3×50 ml). Organická vrstva obsahující produkt byla sbírána, vysušena bezvodým Na_2SO_4 , zfiltrována, a poté byl ethylacetát odpařen na vakuové rotační odparce. Surový produkt byl čištěn sloupcovou chromatografií s mobilní fází ethylacetát/MeOH/triethylamin 10:1:0,1. Po vymytí nečistot byla mobilní fáze urychlena na ethylacetát/MeOH/triethylamin 5:1:0,5. Produkt byl uchováván v lednici pod ochrannou atmosférou (argon).

Výtěžek: 571 mg (93 %) bledě žlutý olej. $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3 , 25 °C): $\delta = 3,02$ (t, $J = 5$ Hz, 4 H, CH_2); 3,58–3,68 (m, 20 H, CH_2); 3,71 (t, $J = 5$ Hz, 4 H, CH_2) a 5,85 ppm (br s, 1 H, NH);

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3 , 25 °C): δ = 48,3; 67,9; 70,41; 70,44 a 70,57 ppm. Ostatní analytická data odpovídala s daty publikovanými v literatuře.^[150]

Obecný postup přípravy bezkovových AzaPc 1a2H, 1c2H a 1d2H

Hořčíkové piliny (28 ekv.) s malým krystalem jódu byly suspendovány v čerstvě destilovaném bezvodém *n*-butanolu. Suspenze byla zahřívána při teplotě varu rozpouštědla 3 h, dokud se nevytvořil butanolát hořečnatý. Poté byl příslušný prekurzor **P2a**, **P2c** nebo **P2d** (prekurzor A, 1 ekv.) a prekurzor **P4** (prekurzor B, 3 ekv.) rozpuštěn každý zvlášť v čerstvě destilovaném bezvodém *n*-butanolu, a každý rychle přidán v jednom přidavku do reakční směsi (**Schéma 2**). Směs byla zahřívána při teplotě varu rozpouštědla několik hodin (množství výchozích látek a reakční časy jsou uvedeny pro každou sloučeninu níže). Roztok byl ochlazen a butanol částečně odpařen za sníženého tlaku. K produktu byla přilita směs voda/MeOH/kyselina octová 10:5:1 (v/v) a reakční směs byla míchána dalších 45 min při laboratorní teplotě do rozpuštění butanolátu hořečnatého v reakční směsi. Tmavě zelená pevná látka byla posbírána filtrací a na filtru několikrát promyta vodou, pak byla vysušena na vzduchu. Produkt byl rozpuštěn v THF a byla přidána kyselina *p*-toluensulfonová (10 ekv.), roztok byl míchán 2 h při laboratorní teplotě chráněný před průnikem světla hliníkovou fólií. Roztok byl poté zahuštěn částečným odpařením THF za sníženého tlaku a naředěn vodou. Vzniklý precipitát byl sbírán filtrací a na filtru ještě několikrát důkladně promyt vodou. Nesymetrický AzaPc kongener (typ ABBB) byl izolován a čištěn několika opakovanými chromatografickými sloupci. Po vymytí symetrického kongeneru (typ BBBB) byla mobilní fáze urychlena na mobilní fázi s vyšším R_f produktu. Mobilní fáze a počet opakování sloupcových chromatografií jsou uvedeny pro každou sloučeninu níže. Bezkovový AzaPc **1a2H**, **1c2H** nebo **1d2H** byl „vyškrábán“ do MeOH (**1a2H**, **1c2H**) nebo hexanu (**1d2H**), precipitát byl posbírán filtrací a na filtru promyt MeOH nebo hexanem a poté důkladně vysušen za sníženého tlaku.

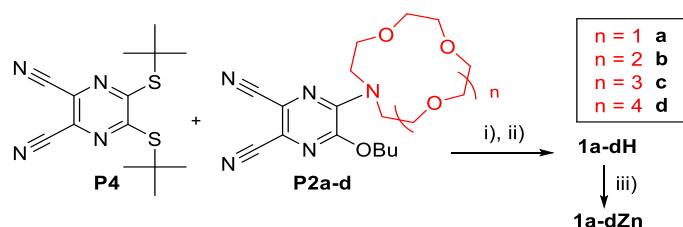


Schéma 2 Příprava cílových AzaPc senzorů: (i) $\text{Mg}(\text{BuO})_2$, butanol při teplotě varu rozpouštědla; (ii) kyselina *p*-toluensulfonová, THF, laboratorní teplota; (iii) $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, pyridin, teplota varu rozpouštědla.

Sloučenina 1a2H

Výchozí množství: Mg (1,09 g; 44,75 mmol), **P2a** (600 mg; 1,60 mmol), **P4** (1,47 g; 4,80 mmol), čas reakce 6 h; kyselina *p*-toluensulfonová (3,00 g; 15,77 mmol); mobilní fáze: toluen/THF 50:1, mobilní fáze byla změněna na toluen/THF 10:1 ($R_f = 0,64$) (čištěno dvakrát); výtěžek: 305 mg (15 %) tmavě zelená pevná látka; ^1H NMR (300 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{pyridin-d}_5$, 25 °C): $\delta = 1,25\text{-}1,38$ (m, 5H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$); $1,81\text{-}1,91$ (m, 2 H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$); $2,16$ (s, 18 H, CCH₃); $2,22$ (s, 18 H, CCH₃); $2,25$ (s, 18 H, CCH₃); $3,75\text{-}3,90$ (m, 8 H, crown-H); $4,33\text{-}4,42$ (m, 4 H, crown-H); $4,47\text{-}4,56$ (m, 4 H, crown-H) a $5,15$ ppm (t, $J = 7$ Hz, 2 H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$); ^{13}C NMR (75 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{pyridin-d}_5$, 25 °C): $\delta = 14,2$; 19,8; 29,8; 30,7; 30,87; 30,95; 31,0; 51,19; 51,24; 51,28; 51,80; 51,85; 53,3; 68,0; 70,4; 71,4; 133,8; 139,5; 139,6; 144,0; 144,4; 144,8; 145,2; 149,0; 152,3; 157,19; 157,21; 157,9; 158,3; 159,95 a 160,05 ppm; IČ (ATR): $\nu = 3304, 2957, 2929, 2862, 1509, 1477, 1362, 1281, 1234, 1139, 1102, 1076$ a 969 cm^{-1} ; UV/Vis (MeCN): $\lambda_{\text{max}} (\epsilon) = 671 (85\ 710), 649 (79\ 960), 532 (35\ 020), 470 (43\ 370)$ a $364\text{ nm} (125\ 370\text{ mol}^{-1}\text{dm}^3\text{cm}^{-1})$; UV/Vis (THF): $\lambda_{\text{max}} (\epsilon) = 671 (112\ 470), 648 (97\ 450), 619\text{ sh}, 593\text{ sh}, 521\text{ sh}, 476 (46\ 680)$ a $366\text{ nm} (127\ 690\text{ mol}^{-1}\text{dm}^3\text{cm}^{-1})$; HR MS (ESI⁺): počítáno pro $\text{C}_{60}\text{H}_{81}\text{N}_{17}\text{O}_4\text{S}_6$ $m/z = 1296,5060$ [M+H]⁺; nalezeno $m/z = 1296,5062$ [M+H]⁺; MS (MALDI-TOF): $m/z = 1295,4$ [M]⁺; $2590,7$ [2M]⁺.

Sloučenina 1c2H

Výchozí množství: Mg (735 mg; 30,23 mmol), **P2c** (500 mg; 1,08 mmol), **P4** (992 mg; 3,24 mmol), čas reakce 5 h; kyselina *p*-toluensulfonová (543 mg; 2,85 mmol); mobilní fáze: toluen/THF 30:1, mobilní fáze byla změněna na chloroform/THF 30:1 ($R_f = 0,07$) (čištěno dvakrát); výtěžek: 130 mg (9 %) tmavě zelená pevná látka; ^1H NMR (300 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{pyridin-d}_5$, 25 °C): $\delta = -2,86$ (br s, 2 H, NH); $1,32$ (t, $J = 7$ Hz, 3 H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$); $1,82\text{-}1,97$ (m, 4 H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$); $2,17$ (s, 18 H, CCH₃); $2,23$ (s, 18 H, CCH₃); $2,26$ (s, 18 H, CCH₃); $3,83\text{-}3,93$ (m, 16 H, crown-H); $4,27\text{-}4,35$ (m, 4 H, crown-H); $4,50\text{-}4,60$ (m, 4 H, crown-H) a $5,18$ (t, $J = 7$ Hz, 2 H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$); ^{13}C NMR (75 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{pyridin-d}_5$, 25 °C): $\delta = 14,3$; 19,9; 30,7; 30,9; 31,0; 31,2; 51,23; 51,27; 51,84; 52,7; 68,1; 70,1; 71,0; 71,1; 133,8; 139,6; 140,5; 144,5; 144,7; 144,8; 145,1; 152,2; 157,16; 157,22; 157,9; 158,3; 160,0 a 160,10 ppm; IČ (ATR): $\nu = 2961, 2864, 1519, 1478, 1425, 1362, 1313, 1279, 1247, 1138, 1076, 1025$ a 967 cm^{-1} ; UV/Vis (MeCN): $\lambda_{\text{max}} (\epsilon) = 670 (54\ 810), 650 (52\ 910), 618\text{ sh}, 597\text{ sh}, 531 (20\ 830), 476 (27\ 220)$ a $362\text{ nm} (83\ 110\text{ mol}^{-1}\text{dm}^3\text{cm}^{-1})$; UV/Vis (THF): $\lambda_{\text{max}} (\epsilon) = 672 (74\ 010), 649 (67\ 060), 619\text{ sh}, 596\text{ sh}, 522\text{ sh}, 473 (28\ 980)$ a $365\text{ nm} (91\ 880\text{ mol}^{-1}\text{dm}^3\text{cm}^{-1})$; HR MS (ESI⁺): počítáno pro $\text{C}_{64}\text{H}_{89}\text{N}_{17}\text{O}_6\text{S}_6$ $m/z = 1384,5584$ [M+H]⁺;

nalezeno $m/z = 1384,5582 [M+H]^+$; MS (MALDI-TOF): $m/z = 1383,4 [M]^+$; $1406,4 [M+Na]^+$; $2766,8 [2M]^+$; $2789,8 [2M+Na]^+$.

Sloučenina **1d2H**

Výchozí množství: Mg (186 mg; 7,65 mmol), **P2d** (139 mg; 0,27 mmol), **P4** (252 mg; 0,82 mmol), čas reakce 5 h; kyselina *p*-toluensulfonová (432 mg; 2,27 mmol); mobilní fáze: chloroform/toluen/THF 5:10:1, mobilní fáze byla změněna na chloroform/THF 5:1 ($R_f = 0,37$) (čištěno dvakrát); výtěžek: 39 mg (10 %) tmavě zelená pevná látka; 1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$ /pyridin- d_5 , 25 °C): $\delta = -2,54$ (br s, 2 H, NH); 1,24-1,39 (m, 3 H, $OCH_2CH_2CH_2CH_3$); 1,80-1,93 (m, 4 H, $OCH_2CH_2CH_2CH_3$); 2,16 (s, 9 H, CCH_3); 2,18 (s, 9 H, CCH_3); 2,23 (s, 18 H, CCH_3); 2,25 (s, 18 H, CCH_3); 3,76-3,95 (m, 20 H, crown-H); 4,22-4,38 (m, 4 H, crown-H); 4,42-4,63 (m, 4 H, crown-H, překryto signálem vody) a 5,18 ppm (t, $J = 7$ Hz, 2 H, $OCH_2CH_2CH_2CH_3$); ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$ /pyridin- d_5 , 25 °C): $\delta = 14,3$; 19,9; 30,65; 30,85; 30,93; 31,1; 51,2; 51,9; 52,7; 68,2; 70,74; 70,82; 70,99; 71,1; 71,3; 127,8; 133,8; 139,7; 140,7; 143,0; 143,4; 143,79; 143,81; 144,27; 144,31; 144,7; 144,8; 145,0; 145,3; 152,2; 157,3; 158,1; 158,5; 160,1 a 160,2 ppm; IČ (ATR): $\nu = 3306, 2957, 2868, 2580, 1726, 1639, 1513, 1477, 1362, 1280, 1248, 1139, 1077, 1028$ a 969 cm^{-1} ; UV/Vis (MeCN): $\lambda_{max} (\epsilon) = 672 (42\ 520), 649 (41\ 690), 622\text{ sh}, 591\text{ sh}, 539\text{ sh}, 470 (19\ 560)$ a $363\text{ nm} (58\ 690\text{ mol}^{-1}\text{dm}^3\text{cm}^{-1})$; UV/Vis (THF): $\lambda_{max} (\epsilon) = 672 (54\ 720), 650 (48\ 300), 620\text{ sh}, 595\text{ sh}, 522\text{ sh}, 473 (22\ 720)$ a $366\text{ nm} (63\ 200\text{ mol}^{-1}\text{dm}^3\text{cm}^{-1})$; HR MS (ESI $^+$): počítáno pro $C_{66}H_{93}N_{17}O_7S_6$ $m/z = 1428,5846 [M+H]^+$; nalezeno $m/z = 1428,5830 [M+H]^+$; MS (MALDI-TOF): $m/z = 1427,5 [M]^+$; $1450,5 [M+Na]^+$; $1466,5 [M+K]^+$.

Obecný postup přípravy hořečnatých AzaPc **1aMg**, **1cMg** a **1dMg**

Bezkovový AzaPc **1a2H**, **1c2H** nebo **1d2H** (1 ekv.) byl rozpuštěn v pyridinu, a poté byl k němu přidán bezvodý octan hořečnatý (1 ekv.). Reakce (Schéma 2) byla zahřívána při teplotě varu rozpouštědla 1,5 h. Po ukončení reakce byla směs zchlazena a naředěna vodou. Vzniklý precipitát byl sbírán filtrací a několikrát promyt na filtru vodou a poté směsí voda/MeOH 1:1 (v/v). Produkt byl přečištěn sloupcovou chromatografií (mobilní fáze pro každou sloučeninu jsou uvedeny níže). Pro zajištění vysoké čistoty byl produkt ještě „vyškrábán“ do MeOH (**1aMg**, **1bMg**) nebo hexanu (**1dMg**), posbíráno filtrací a důkladně vysušen za sníženého tlaku.

Sloučenina 1aMg

Výchozí množství: **1a2H** (40 mg; 0,031 mmol), $\text{Mg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ (4,4 mg; 0,031 mmol); mobilní fáze: toluen/THF 10:1 ($R_f = 0,07$), mobilní fáze byla změněna na toluen/THF 2:1; výtěžek: 31 mg (76 %) zelená pevná látka; ^1H NMR (300 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{pyridin-d}_5$, 25 °C): $\delta = 1,24$ (t, $J = 7$ Hz, 3H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$); 1,71-1,88 (m, 4H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$); 2,20 (s, 9 H, CCH_3); 2,21 (s, 9 H, CCH_3); 2,24 (s, 36 H, CCH_3); 3,79-3,90 (m, 8 H, crown-H); 4,41-4,51 (m, 8 H, crown-H) a 5,13 ppm (t, $J = 6$ Hz, 2H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$); ^{13}C NMR (75 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{pyridin-d}_5$, 25 °C): $\delta = 14,1$; 19,8; 30,9; 31,0; 31,1; 51,2; 51,31; 51,33; 53,2; 67,7; 70,3; 71,6; 71,7; 78,0; 138,5; 144,5; 144,7; 144,8; 144,9; 145,0; 145,3; 148,7; 150,1; 150,3; 150,4; 151,0; 151,2; 152,2; 152,4; 157,3; 157,5; 157,8; 157,9; 158,4 a 158,8 ppm; IČ (ATR): $\nu = 2958, 2901, 1573, 1521, 1461, 1362, 1251, 1144, 1093$ a 975 cm^{-1} ; UV/Vis (MeCN): $\lambda_{\text{max}} (\epsilon) = 656 (196\ 720), 598 (35\ 470)$ a $375\text{ nm} (158\ 870\text{ mol}^{-1}\text{dm}^3\text{cm}^{-1})$; UV/Vis (THF): $\lambda_{\text{max}} (\epsilon) = 655 (223\ 760), 596 (39\ 430), 462\text{ sh}$ a $382\text{ nm} (178\ 740\text{ mol}^{-1}\text{dm}^3\text{cm}^{-1})$; HR MS (ESI⁺): počítáno pro $\text{C}_{60}\text{H}_{79}\text{MgN}_{17}\text{O}_4\text{S}_6$ $m/z = 1318,4754$ [M+H]⁺; nalezeno $m/z = 1318,4740$ [M+H]⁺; MS (MALDI-TOF): $m/z = 1317,4$ [M]⁺; 1340,4 [M+Na]⁺; 1356,4 [M+K]⁺.

Sloučenina 1cMg

Výchozí množství: **1c2H** (13,4 mg; 0,0097 mmol), $\text{Mg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ (1,4 mg; 0,0097 mmol); mobilní fáze: chloroform/THF 6:1 ($R_f = 0,03$), mobilní fáze byla změněna na chloroform/THF 4:1 ($R_f = 0,06$); výtěžek: 12,8 mg (94 %) zelená pevná látka; ^1H NMR (300 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{pyridin-d}_5$, 25 °C): $\delta = 1,21$ -1,28 (m, 3 H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$); 1,72-1,90 (m, 4 H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$); 2,21 (s, 9 H, CCH_3); 2,22 (s, 9 H, CCH_3); 2,24 (s, 36 H, CCH_3); 3,80-3,88 (m, 16 H, crown-H); 4,30-4,40 (m, 4 H, crown-H); 4,50-4,59 (m, 4 H, crown-H) a 5,18 (t, $J = 7$ Hz, 2 H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$); ^{13}C NMR (75 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{pyridin-d}_5$, 25 °C): $\delta = 13,8$; 19,4; 29,4; 30,4; 30,57; 30,65; 30,74; 50,8; 52,0; 67,4; 70,40; 70,43; 70,47; 70,60; 70,69; 138,0; 144,26; 144,30; 144,32; 144,44; 144,6; 144,8; 145,0; 149,86; 149,92; 149,94; 150,5; 150,8; 151,5; 151,8; 152,0; 156,9; 157,0; 157,4; 157,9 a 158,3 ppm; IČ (ATR): $\nu = 2922, 2861, 1521, 1458, 1362, 1310, 1252, 1142, 1043, 974$ a 848 cm^{-1} ; UV/Vis (MeCN): $\lambda_{\text{max}} (\epsilon) = 655 (171\ 920), 597 (31\ 170), 458\text{ sh}$ a $375\text{ nm} (138\ 660\text{ mol}^{-1}\text{dm}^3\text{cm}^{-1})$; UV/Vis (THF): $\lambda_{\text{max}} (\epsilon) = 655 (213\ 050), 597 (38\ 530), 462\text{ sh}$ a $382\text{ nm} (169\ 250\text{ mol}^{-1}\text{dm}^3\text{cm}^{-1})$; HR MS (ESI⁺): počítáno pro $\text{C}_{64}\text{H}_{87}\text{MgN}_{17}\text{O}_6\text{S}_6$ $m/z = 1406,5278$ [M+H]⁺; nalezeno $m/z = 1406,5271$ [M+H]⁺; MS (MALDI-TOF): $m/z = 1405,4$ [M]⁺; 1428,4 [M+Na]⁺; 1444,3 [M+K]⁺; 2810,7 [2M]⁺; 2833,7 [2M+Na]⁺; 2849,7 [2M+K]⁺.

Sloučenina 1dMg

Výchozí množství: **1d2H** (9,4 mg; 0,007 mmol), $\text{Mg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ (0,9 mg; 0,007 mmol); mobilní fáze: chloroform/THF 4:1 ($R_f = 0,07$); výtěžek: 6,7 mg (70 %) zelená pevná látka; ^1H NMR (300 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{pyridin-d}_5$, 25 °C): $\delta = 1,22\text{-}1,30$ (m, 3 H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$); $1,71\text{-}1,90$ (m, 4 H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$); $2,21\text{-}2,29$ (br s, 54 H, CCH_3); $3,59\text{-}3,94$ (m, 20 H, crown-H); $4,07\text{-}4,44$ (m, 4 H, crown-H, překryto signálem vody); $4,52\text{-}4,67$ (m, 4 H, crown-H) a $5,20$ (t, $J = 7$ Hz, 2 H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$); ^{13}C NMR (75 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{pyridin-d}_5$, 25 °C): $\delta = 14,2$; 19,9; 29,9; 30,1; 30,9; 31,0; 31,1; 31,2; 51,25; 51,31; 52,5; 70,8; 70,9; 71,01; 71,05; 71,26; 71,37; 144,78; 144,82; 144,90; 145,0; 145,3; 151,8; 152,5; 156,8; 157,8; 158,3 a 158,8 ppm; IČ (ATR): $\nu = 2960, 2922, 1718, 1522, 1508, 1473, 1458, 1363, 1251, 1143, 1043, 974$ a 848 cm^{-1} ; UV/Vis (MeCN): $\lambda_{\text{max}} (\epsilon) = 657 (104\ 060), 602 (20\ 570)$ a $374\text{ nm} (95\ 960\ \text{mol}^{-1}\text{dm}^3\text{cm}^{-1})$; UV/Vis (THF): $\lambda_{\text{max}} (\epsilon) = 656 (107\ 510), 599 (20\ 560)$ a $380\text{ nm} (100\ 180\ \text{mol}^{-1}\text{dm}^3\text{cm}^{-1})$; HR MS (ESI⁺): počítáno pro $\text{C}_{66}\text{H}_{91}\text{MgN}_{17}\text{O}_7\text{S}_6$ $m/z = 1450,5535$ [M+H]⁺; nalezeno $m/z = 1450,5509$ [M+H]⁺; MS (MALDI-TOF): $m/z = 1449,5$ [M]⁺; $1472,5$ [M+Na]⁺; $1488,4$ [M+K]⁺.

Obecný postup přípravy zinečnatých AzaPc 1aZn, 1cZn a 1dZn

Bezvodový AzaPc **1a2H**, **1c2H** nebo **1d2H** (1 ekv.) byl rozpuštěn v pyridinu, pak byl do reakční směsi přidán bezvodý octan zinečnatý (3 ekv.) a reakce (Schéma 2) byla zahřívána při teplotě varu rozpouštědla 1 h. Reakční směs byla poté ochlazená a pyridin částečně odpařen za sníženého tlaku. Následně byla směs naředěna vodou. Vzniklý precipitát byl sbírán filtrací a několikrát promyt vodou. Produkt byl čištěn sloupcovou chromatografií (mobilní fáze pro každou sloučeninu jsou uvedeny níže). Produkt byl finálně dočištěn „vyškrábáním“ do MeOH (**1aZn**, **1bZn**) nebo hexanu (**1dZn**), posbírán filtrací a promyt MeOH nebo hexanem a důkladně vysušen za sníženého tlaku.

Sloučenina 1aZn

Výchozí množství: **1a2H** (127 mg; 0,098 mmol), bezvodý $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ (54 mg; 0,294 mmol); mobilní fáze: toluen/THF 10:1 ($R_f = 0,14$); výtěžek: 107 mg (80 %) zelená pevná látka; ^1H NMR (300 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{pyridin-d}_5$, 25 °C): $\delta = 1,25$ (t, $J = 7$ Hz, 3H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$); $1,73\text{-}1,90$ (m, 4 H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$); $2,23$ (s, 9 H, CCH_3); $2,25$ (s, 45 H, CCH_3); $3,78\text{-}3,91$ (m, 8 H, crown-H); $4,43\text{-}4,56$ (m, 8 H, crown-H) a $5,18$ ppm (t, $J = 7$ Hz, 2 H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$); ^{13}C NMR (75 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{pyridin-d}_5$, 25 °C): $\delta = 14,1$; 19,8; 29,8; 30,8; 30,9; 31,02; 31,08; 51,3; 51,4; 53,3; 67,8; 70,3;

71,7; 138,2; 144,28; 144,35; 144,38; 144,5; 144,6; 144,8; 148,9; 150,5; 150,67; 150,73; 151,3; 151,5; 152,2; 152,4; 152,7; 157,8; 157,9; 158,13; 158,16; 158,5 a 158,9 ppm; IČ (ATR): $\nu = 2960, 2916, 2861, 1560, 1522, 1473, 1458, 1362, 1314, 1251, 1141, 1096$ a 975 cm^{-1} ; UV/Vis (MeCN): $\lambda_{\text{max}} (\epsilon) = 656 (176 690), 601 (33 570)$ a $383 \text{ nm} (161 450 \text{ mol}^{-1}\text{dm}^3\text{cm}^{-1})$; UV/Vis (THF): $\lambda_{\text{max}} (\epsilon) = 654 (181 050), 597 (33 230), 455 \text{ sh}, 427 \text{ sh}$ a $376 \text{ nm} (147 120 \text{ mol}^{-1}\text{dm}^3\text{cm}^{-1})$; HR MS (ESI⁺): počítáno pro $\text{C}_{60}\text{H}_{79}\text{N}_{17}\text{O}_4\text{S}_6\text{Zn}$ $m/z = 1358,4195 [\text{M}+\text{H}]^+$; nalezeno $m/z = 1358,4183 [\text{M}+\text{H}]^+$; MS (MALDI-TOF): $m/z = 1357,4 [\text{M}]^+$; $2714,7 [2\text{M}]^+$.

Sloučenina 1cZn

Výchozí množství: **1c2H** (53 mg; 0,038 mmol), bezvodý $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ (21 mg; 0,114 mmol); mobilní fáze: chloroform/THF 20:1 ($R_f = 0,16$) čištěno jednou a poté přečištěno s mobilní fází chloroform/THF 10:3 ($R_f = 0,48$); výtěžek: 31 mg (56 %) zelená pevná látka; ¹H NMR (300 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{pyridin-d}_5, 25 \text{ }^\circ\text{C}$): $\delta = 1,28$ (t, $J = 7 \text{ Hz}$, 3 H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$); 1,78-1,94 (m, 4 H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$); 2,27 (s, 54 H, CCH_3); 3,80-3,94 (m, 16 H, crown-H); 4,31-4,46 (m, 4 H, crown-H); 4,51-4,66 (m, 4 H, crown-H) a 5,22 ppm (t, $J = 7 \text{ Hz}$, 2 H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$); ¹³C NMR (75 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{pyridin-d}_5, 25 \text{ }^\circ\text{C}$): $\delta = 14,2; 19,9; 30,9; 31,02; 31,09; 31,21; 51,38; 51,43; 70,94; 70,99; 71,1; 144,35; 144,42; 144,56; 144,69; 144,92; 150,76; 150,83; 151,3; 151,6; 152,1; 152,5; 152,8; 157,84; 157,94; 158,21; 158,24; 158,64$ a $159,0 \text{ ppm}$; IČ (ATR): $\nu = 2955, 2910, 1559, 1521, 1472, 1362, 1311, 1251, 1232, 1141, 1094, 1046$ and 975 cm^{-1} ; UV/Vis (MeCN): $\lambda_{\text{max}} (\epsilon) = 655 (158 400), 597 (28 400), 446 \text{ sh}$ a $382 \text{ nm} (135 830 \text{ mol}^{-1}\text{dm}^3\text{cm}^{-1})$; UV/Vis (THF): $\lambda_{\text{max}} (\epsilon) = 645 (165 390), 597 (31 570), 450 \text{ sh}, 425 \text{ sh}$ a $376 \text{ nm} (136 000 \text{ mol}^{-1}\text{dm}^3\text{cm}^{-1})$; HR MS (ESI⁺): počítáno pro $\text{C}_{64}\text{H}_{87}\text{N}_{17}\text{O}_6\text{S}_6\text{Zn}$ $m/z = 1446,4719 [\text{M}+\text{H}]^+$; nalezeno $m/z = 1446,4697 [\text{M}+\text{H}]^+$; MS (MALDI-TOF): $m/z = 1445,5 [\text{M}]^+$; $1468,5 [\text{M}+\text{Na}]^+$; $1484,5 [\text{M}+\text{K}]^+$.

Sloučenina 1dZn

Výchozí množství: **1d2H** (30 mg; 0,021 mmol), bezvodý $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ (12 mg; 0,063 mmol); mobilní fáze: chloroform/THF 4:1 ($R_f = 0,45$); výtěžek: 24 mg (77 %) zelená pevná látka; ¹H NMR (300 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{pyridin-d}_5, 25 \text{ }^\circ\text{C}$): $\delta = 1,24$ -1,32 (m, 3 H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$); 1,75-1,91 (m, 4 H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$); 2,19-2,33 (br s, 54 H, CCH_3); 3,82-3,90 (m, 20 H, crown-H); 4,31-4,38 (m, 4 H, crown-H, překryto signálem vody); 4,56-4,64 (m, 4 H, crown-H) a 5,16-5,27 ppm (m, 2 H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$); ¹³C NMR (75 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{pyridin-d}_5, 25 \text{ }^\circ\text{C}$): $\delta = 13,8; 19,5; 30,4; 30,56; 30,63; 30,76; 50,9; 51,0; 52,1; 67,4; 70,39; 70,45; 70,59; 70,64; 70,85; 70,94; 143,89; 143,95$;

144,11; 144,18; 144,22; 144,5; 150,28; 150,36; 150,9; 151,2; 151,5; 152,1; 152,3; 157,4; 157,5; 157,74; 157,77; 158,2 a 158,6 ppm; IČ (ATR): $\nu = 2957, 2865, 2586, 1725, 1640, 1572, 1526, 1475, 1362, 1251, 1143, 1046, 975$ a 848 cm^{-1} ; UV/Vis (MeCN): $\lambda_{\text{max}} (\epsilon) = 656 (138\ 670), 601 (28\ 490), 461 \text{ sh}$ a 382 nm ($131\ 670 \text{ mol}^{-1}\text{dm}^3\text{cm}^{-1}$); UV/Vis (THF): $\lambda_{\text{max}} (\epsilon) = 654 (146\ 490), 598 (29\ 780)$ a 375 nm ($125\ 750 \text{ mol}^{-1}\text{dm}^3\text{cm}^{-1}$); HR MS (ESI⁺): počítáno pro $\text{C}_{66}\text{H}_{91}\text{N}_{17}\text{O}_7\text{S}_6\text{Zn}$ $m/z = 1490,4981$ [M+H]⁺; nalezeno $m/z = 1490,5009$ [M+H]⁺; MS (MALDI-TOF): $m/z = 1489,4$ [M]⁺; $1512,4$ [M+Na]⁺; $1528,4$ [M+K]⁺.

6.2 Látky připravené v rámci projektu [P2]

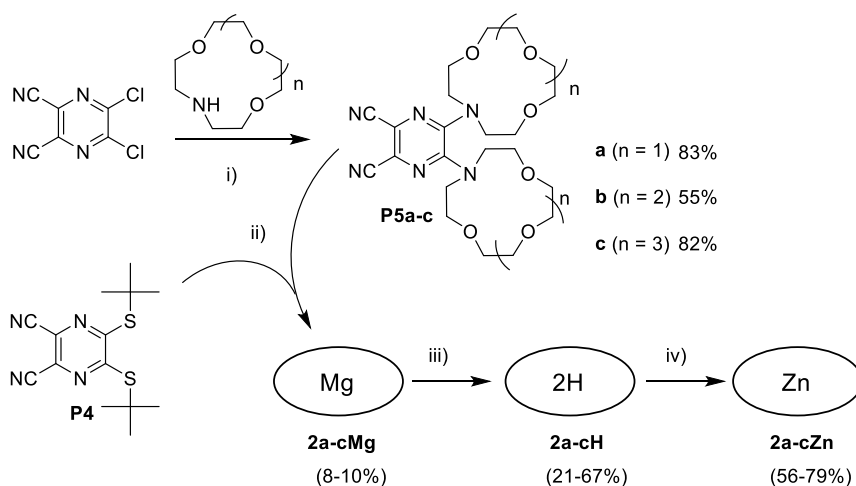


Schéma 3 Příprava prekursorů a cílových AzaPc senzorů s uspořádáním rozpoznávací části typu „tweezer“: (i) bezvodý K_2CO_3 , THF, teplota varu rozpouštědla; (ii) $\text{Mg}(\text{BuO})_2$, butanol, teplota varu rozpouštědla; (iii) kyselina *p*-toluensulfonová, THF, laboratorní teplota; (iv) $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, pyridin, teplota varu rozpouštědla.

Obecný postup přípravy prekursorů P5a-c

Příslušný aza-crown byl přidán k suspenzi jemně rozemletého bezvodého K_2CO_3 v THF. Poté byl pomalu přidán 5,6-dichlorpyrazin-2,3-dikarbonitril a směs byla zahřívána při teplotě varu rozpouštědla 3-4 h (Schéma 3). THF bylo po ukončení reakce odpařeno za sníženého tlaku a k produktu byl přidán chloroform s kapkou kyseliny chlorovodíkové a produkt byl třikrát vytřepán s nasyceným vodným roztokem NaCl. Organická vrstva byla oddělena a sbírána, zfiltrována a odpařena do sucha na vakuové rotační odparce. Surový produkt byl čištěn

sloupcovou chromatografií (mobilní fáze pro každý prekurzor jsou uvedeny níže). Produkt **P5a**, **P5b** nebo **P5c** byl pak důkladně vysušen za sníženého tlaku.

5,6-di(1,4,7-trioxa-10-azacyklododekan-10-yl)pyrazin-2,3-dikarbonitril (P5a)

Výchozí množství: 5,6-dichlorpyrazin-2,3-dikarbonitril (318 mg; 1,60 mmol), 1-aza-12-crown-4 (1,0 g; 5,74 mmol), bezvodý K_2CO_3 (1,1 g; 7,97 mmol); reakční čas 3 h; mobilní fáze: chloroform/aceton 5:1 ($R_f = 0,20$), produkt byl promyt hexanem; výtěžek: 631 mg (83 %) světle žlutá pevná látka; t.t. 137,4-138,0 °C; 1H NMR (500 MHz, aceton- d_6 , 25 °C): $\delta = 3,54$ -3,59 (m, 16 H; crown-H) a 3,73-3,81 ppm (m, 16 H; crown-H); ^{13}C NMR (125 MHz, aceton- d_6 , 25 °C): $\delta = 49,9$; 70,1; 70,6; 71,9; 116,0; 119,8 a 147,4 ppm; IČ (ATR): $\nu = 2961, 2908, 2869, 2229$ (CN), 2176, 1931, 1701, 1654, 1518, 1485, 1448, 1420, 1389, 1378, 1359, 1344, 1297, 1273, 1255, 1240, 1219, 1155, 1131, 1116, 1107, 1096, 1058, 1039, 1007 a 970 cm^{-1} ; elementární analýza (%): počítáno pro $C_{22}H_{32}N_6O_6$: C 55,45; H 6,77; N 17,64; nalezeno: C 55,32; H 6,80; N 17,50.

5,6-di(1,4,7,10-tetraoxa-13-azacyklopentadekan-13-yl)pyrazin-2,3-dikarbonitril (P5b)

Výchozí množství: 5,6-dichlorpyrazin-2,3-dikarbonitril (500 mg; 2,51 mmol), 1-aza-15-crown-5 (1,16 g; 5,29 mmol), bezvodý K_2CO_3 (1,73 g; 12,56 mmol); reakční čas 4 h; mobilní fáze: chloroform/aceton 5:1 ($R_f = 0,09$), produkt byl promyt hexanem; výtěžek: 785 mg (55 %) světle žlutá pevná látka; t.t. 107,7-108,6 °C; 1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$, 25 °C): $\delta = 3,58$ (s, 16 H; crown-H); 3,63 (s, 8 H; crown-H) a 3,64-3,71 ppm (m, 16 H; crown-H); ^{13}C NMR (125 MHz, $CDCl_3$, 25 °C): $\delta = 50,0$; 69,1; 70,1; 70,3; 71,1; 115,0; 119,8 a 146,5 ppm; IČ (ATR): $\nu = 2871, 2225$ (CN), 1735, 1538, 1517, 1492, 1438, 1410, 1347, 1291, 1267, 1245, 1218, 1179, 1115, 1097, 1081, 1065, 1040, 1017 a 990 cm^{-1} ; elementární analýza (%): počítáno pro $C_{26}H_{40}N_6O_8$: C 55,31; H 7,14; N 14,88; nalezeno: C 55,65; H 7,61; N 14,95.

5,6-di(1,4,7,10,13-pentaoxa-16-azacyklooktadekan-16-yl)pyrazin-2,3-dikarbonitril (P5c)

Výchozí množství: 5,6-dichlorpyrazin-2,3-dikarbonitril (410 mg; 2,06 mmol), 1-aza-18-crown-6 (1,63 g; 6,19 mmol), bezvodý K_2CO_3 (1,42 g; 10,31 mmol); reakční čas 3 h; mobilní fáze: chloroform/MeOH 15:1 ($R_f = 0,25$); výtěžek: 1,10 g (82 %) světle žlutý olej; 1H NMR (500 MHz, aceton- d_6 , 25 °C): $\delta = 3,51$ (s, 16 H; crown-H), 3,56-3,63 (m, 16 H; crown-H); 3,67 (t, $J = 5$ Hz, 8 H; crown-H) a 3,83 ppm (t, $J = 5$ Hz, 8 H; crown-H); ^{13}C NMR (125 MHz, aceton- d_6 , 25 °C): $\delta =$

49,6; 69,5; 70,8; 71,3; 71,4; 71,9; 116,2; 120,0 a 147,9 ppm; IČ (ATR): $\nu = 2864, 2224$ (CN), 1948, 1529, 1517, 1486, 1437, 1350, 1293, 1249, 1220, 1119 a 946 cm^{-1} .

Obecný postup přípravy hořečnatých AzaPc 2a-cMg

Hořčíkové piliny (28 ekv.) s malým krystalem jódu byly suspendovány v čerstvě destilovaném bezvodém *n*-butanolu. Suspenze byla zahřívána při teplotě varu rozpouštědla 3 h, dokud se nevytvořil butanolát hořečnatý. Poté byl příslušný prekurzor **P5a**, **P5b** nebo **P5c** (prekurzor A, 1 ekv.) a prekurzor **P4** (prekurzor B, 3 ekv.) rozpuštěn každý zvlášť v čerstvě destilovaném bezvodém *n*-butanolu a každý rychle přidán v jednom přídávku do reakční směsi (Schéma 3). Směs byla zahřívána při teplotě varu rozpouštědla dalších 5 h. Poté byla reakční směs ochlazena a butanol částečně odpařen za sníženého tlaku. K produktu byla přilita směs voda/MeOH/kyselina octová 10:3:1 (v/v) a směs byla míchána další 1 h při laboratorní teplotě do rozpuštění butanolátu hořečnatého. Tmavě zelená pevná látka byla sbírána filtrací a na filtru několikrát promyta vodou, a pak byla vysušena na vzduchu. Nesymetrický AzaPc kongener (typ ABBB) byl izolován a čištěn několika opakovanými chromatografickými sloupci. Mobilní fáze a počet opakování čištění pro každou sloučeninu jsou uvedeny níže. Hořečnatý AzaPc **P5a**, **P5b** nebo **P5c** byl finálně dočištěn „vyškrábáním“ do hexanu, a poté byl důkladně vysušen za sníženého tlaku.

Sloučenina 2aMg

Výchozí množství: Mg (895 mg; 36,82 mmol), **P5a** (626 mg; 1,31 mmol), **P4** (1,21 g; 3,94 mmol); mobilní fáze: chloroform/THF 5:1 ($R_f = 0,22$) (čištěno dvakrát); výtěžek: 153 mg (8 %) zelená pevná látka; HR MS (ESI⁺): počítáno pro $C_{64}H_{86}MgN_{18}O_6S_6$ $m/z = 1419,5231$ [M+H]⁺; nalezeno $m/z = 1419,5210$ [M+H]⁺; MS (MALDI-TOF): $m/z = 1418,4$ [M]⁺; 1441,4 [M+Na]⁺.

Sloučenina 2bMg

Výchozí množství: Mg (880 mg; 36,20 mmol), **P5b** (730 mg; 1,29 mmol), **P4** (1,19 g; 3,88 mmol); mobilní fáze: chloroform/THF 5:1 ($R_f = 0,09$), po vymytí symetrického AzaPc kongeneru BBBB, byla mobilní fáze změněna na chloroform/THF/MeOH 5:1:1 (čištěno dvakrát); výtěžek: 198 mg (10 %) zelená pevná látka; HR MS (ESI⁺): počítáno pro $C_{68}H_{94}MgN_{18}O_8S_6$ $m/z = 1507,5755$

[M+H]⁺; nalezeno m/z = 1507,5775 [M+H]⁺; MS (MALDI-TOF): m/z = 1506,6 [M]⁺; 1529,6 [M+Na]⁺; 1545,6 [M+K]⁺.

Sloučenina 2cMg

Výchozí množství: Mg (674 mg; 27,73 mmol), **P5c** (620 mg; 0,99 mmol), **P4** (911 mg; 2,97 mmol); mobilní fáze: chloroform/THF/MeOH 10:2:1 (R_f = 0,14) a poté chloroform/THF 10:2 mobilní fáze byla změněna po vymytí symetrického AzaPc kongeneru BBBB na chloroform/THF/MeOH 5:1:1 (čištěno jednou); výtěžek: 130 mg (8 %) zelená pevná látka; HR MS (ESI⁺): počítáno pro C₇₂H₁₀₂MgN₁₈O₁₀S₆ m/z = 1595,6279 [M+H]⁺; nalezeno m/z = 1595,6282 [M+H]⁺; MS (MALDI-TOF): m/z = 1594,5 [M+H]⁺; 1617,5 [M+Na]⁺.

Obecný postup přípravy bezkovových AzaPc 2a-c2H

AzaPc **2aMg**, **2bMg** nebo **2cMg** byl rozpuštěn v THF a k roztoku byla přidána kyselina *p*-toluensulfonová (Schéma 3). Reakce byla míchána 1 h při laboratorní teplotě chráněna před průnikem světla hliníkovou fólií. Pak byla reakční směs zakonzentrována částečným odpařením rozpouštědla na vakuové rotační odparce a naředěna vodou. Vzniklý precipitát byl posbírán filtrací a na filtru několikrát promyt vodou. Surový produkt byl následně přečištěn sloupcovou chromatografií. Mobilní fáze pro každou sloučeninu jsou uvedeny níže. Produkt **2a2H**, **2b2H** nebo **2c2H** byl na závěr promyt hexanem a důkladně vysušen za sníženého tlaku.

Sloučenina 2a2H

Výchozí množství: **2aMg** (275 mg; 0,19 mmol), *p*-toluensulfonová kyselina (368 mg; 1,93 mmol); mobilní fáze: chloroform/THF 5:1 (R_f = 0,30); výtěžek: 58 mg (21 %) tmavě zelená pevná látka; ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃/pyridin-d₅, 25 °C): δ = -1,48 (s, 2 H; central NH); 2,25 (s, 18 H; C-CH₃); 2,27 (s, 36 H; C-CH₃); 3,72-3,90 (m, 16 H; crown-H); 4,28-4,38 (m, 8 H; crown-H) a 4,38-4,49 ppm (m, 8 H; crown-H); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃/pyridin-d₅, 25 °C): δ = 30,5; 30,6; 30,8; 50,5; 51,21; 51,24; 51,8; 70,0; 70,3; 71,5; 138,6; 139,6; 145,0; 145,3; 150,9; 157,8; 158,8 a 160,3 ppm; IČ (ATR): ν = 3307 (centrální NH), 2953, 2898, 2576, 1519, 1461, 1416, 1362, 1318, 1278, 1246, 1136, 1076, 1028 a 969 cm⁻¹; UV/Vis (MeCN): λ_{max} (ε) = 670 (64 000), 649 (71 400), 580 (36 600), 469 (26 800), 424sh a 383 nm (84 200 mol⁻¹dm³cm⁻¹); UV/Vis (THF): λ_{max} (ε) = 671 (71 900), 651 (77 100), 577 (35 200), 469 (29 800), 430sh a 367 nm (88 600 mol⁻¹dm³cm⁻¹); HR MS (ESI⁺):

počítáno pro $C_{64}H_{88}N_{18}O_6S_6$ $m/z = 1397,5537 [M+H]^+$; nalezeno $m/z = 1397,5557 [M+H]^+$; MS (MALDI-TOF): $m/z = 1396,5 [M]^+$.

Sloučenina 2b2H

Výchozí množství: **2bMg** (150 mg; 0,10 mmol), *p*-toluensulfonová kyselina (132 mg; 0,69 mmol); mobilní fáze: chloroform/THF/MeOH 30:4:1 ($R_f = 0,52$); výtěžek: 99 mg (67 %) tmavě zelená pevná látka; 1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$ /pyridin- d_5 , 25 °C): $\delta = -1,50$ (s, 2 H; central NH); 2,23 (s, 36 H; C- CH_3); 2,24 (s, 18 H; C- CH_3); 3,71 (s, 8 H; crown-H); 3,73-3,85 (m, 16 H; crown-H); 4,21 (t, $J = 5$ Hz, 8 H; crown-H) a 4,41 ppm (t, $J = 5$ Hz, 8 H; crown-H); ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$ /pyridin- d_5 , 25 °C): $\delta = 30,6; 30,8; 31,0; 50,8; 51,32; 51,34; 51,9; 70,2; 70,4; 70,6; 71,2; 138,9; 139,7; 145,2; 145,6; 150,9; 157,8; 159,1$ a 160,4 ppm; IČ (ATR): $\nu = 3306$ (central NH), 2864, 2583, 1967, 1868, 1830, 1844, 1792, 1772, 1749, 1734, 1717, 1698, 1684, 1670, 1653, 1647, 1636, 1617, 1558, 1541, 1521, 1507, 1497, 1489, 1473, 1458, 1438, 1419, 1362, 1318, 1285, 1233, 1139, 1025 a 970 cm^{-1} ; UV/Vis (MeCN): $\lambda_{max} (\epsilon) = 671$ (84 200), 650 (95 000), 578 (49 700), 467 (35 200), 427sh a 365 nm (113 900 $mol^{-1}dm^3cm^{-1}$); UV/Vis (THF): $\lambda_{max} (\epsilon) = 672$ (93 000), 652 (102 200), 578 (49 500), 467 (37 800), 424sh a 366 nm (119 700 $mol^{-1}dm^3cm^{-1}$); HR MS (ESI $^+$): počítáno pro $C_{68}H_{96}N_{18}O_8S_6$ $m/z = 1485,6061 [M+H]^+$; nalezeno $m/z = 1485,6062 [M+H]^+$; MS (MALDI-TOF): $m/z = 1484,6 [M]^+$; 1507,6 [M+Na] $^+$; 1523,6 [M+K] $^+$.

Sloučenina 2c2H

Výchozí množství: **2cMg** (130 mg; 0,08 mmol), *p*-toluensulfonová kyselina (152 mg; 0,80 mmol); mobilní fáze: chloroform/THF/MeOH ($R_f = 0,20$); výtěžek: 29 mg (23 %) tmavě zelená pevná látka; 1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$ /pyridin- d_5 , 25 °C): $\delta = -1,49$ (s, 2 H; centrální NH); 2,22 (s, 18 H; C- CH_3); 2,23 (s, 18 H; C- CH_3); 2,24 (s, 18 H; C- CH_3); 3,70-3,82 (m, 32 H; crown-H); 4,13 (t, $J = 5$ Hz, 8 H; crown-H) a 4,50 ppm (t, $J = 5$ Hz, 8 H; crown-H); ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$ /pyridin- d_5 , 25 °C): $\delta = 30,6; 30,8; 31,0; 49,8; 51,3; 52,0; 70,2; 70,6; 70,9; 71,0; 71,2; 138,8; 139,6; 145,3; 145,7; 150,9; 157,8; 159,1$ a 160,5 ppm; IČ (ATR): $\nu = 3301$ (centrální NH), 2865, 2578, 1954, 1638, 1521, 1467, 1423, 1362, 1318, 1280, 1248, 1137, 1077, 1027 a 970 cm^{-1} ; UV/Vis (MeCN): $\lambda_{max} (\epsilon) = 670$ (74 600), 650 (85 200), 580 (47 200), 467 (32 000), 424sh a 365 nm (102 400 $mol^{-1}dm^3cm^{-1}$); UV/Vis (THF): $\lambda_{max} (\epsilon) = 670$ (92 400), 652 (102 600), 559 (54 300), 466 (39 500), 428sh a 367 nm (120 300 $mol^{-1}dm^3cm^{-1}$); HR MS (ESI $^+$): počítáno pro $C_{72}H_{104}N_{18}O_{10}S_6$ $m/z = 1573,6585$

[M+H]⁺; nalezeno m/z = 1573,6600 [M+H]⁺; MS (MALDI-TOF): m/z = 1572,6 [M]⁺; 1595,5 [M+Na]⁺; 1611,5 [M+K]⁺.

Obecný postup přípravy zinečnatých AzaPc 2a-cZn

Bezvodový AzaPc **2a2H**, **2b2H** nebo **2c2H** byl rozpuštěn v pyridinu, poté byl přidán bezvodý octan zinečnatý a reakční směs byla zahřívána při teplotě varu rozpouštědla 1 h (Schéma 3). Po ukončení reakce byla směs ochlazena a zakoncentrována částečným odpařením rozpouštědla na vakuové rotační odparce. Poté byla do reakční směsi přilita voda a vzniklý precipitát byl posbíráán filtrací a na filtru několikrát promyt vodou. Surový produkt byl přečištěn sloupcovou chromatografií. Mobilní fáze pro každou sloučeninu jsou uvedeny níže. Produkt **2aZn**, **2bZn** nebo **2cZn** byl na závěr promyt hexanem a důkladně vysušen za sníženého tlaku.

Sloučenina 2aZn

Výchozí množství: **2a2H** (40 mg; 0,029 mmol), bezvodý Zn(CH₃COO)₂ (16 mg; 0,087 mmol); mobilní fáze: chloroform/THF 4:1 (R_f = 0,35); výtěžek: 33 mg (79 %) zelená pevná látka; ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃/pyridin-d₅, 25 °C): δ = 2,27 (s, 54 H; C-CH₃) a 4,14-4,53 ppm (m, 32 H; crown-H); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃/pyridin-d₅, 25 °C): δ = 23,97; 24,02; 24,1; 29,69; 29,72; 30,9; 31,1; 50,34; 50,40; 51,41; 51,43; 67,5; 67,8; 70,2; 70,7; 71,8; 106,6; 107,8; 110,4; 142,5; 144,3; 144,5; 144,8; 151,6; 152,9; 157,9; 158,2 a 158,7 ppm; IČ (ATR): ν = 2948, 2885, 2864, 1736, 1518, 1458, 1417, 1362, 1295, 1248, 1143, 1096 a 975 cm⁻¹; UV/Vis (MeCN): λ_{max} (ε) = 654 (153 500), 595 (31 000) a 379 nm (123 800 mol⁻¹dm³cm⁻¹); UV/Vis (THF): λ_{max} (ε) = 654 (152 500), 595 (32 600) a 376 nm (121 500 mol⁻¹dm³cm⁻¹); HR MS (ESI⁺): počítáno pro C₆₄H₈₆N₁₈O₆S₆Zn m/z = 1459,4672 [M+H]⁺; nalezeno m/z = 1459,4662 [M+H]⁺; MS (MALDI-TOF): m/z = 1458,4 [M]⁺; 1481,4 [M+Na]⁺.

Sloučenina 2bZn

Výchozí množství: **2b2H** (73 mg; 0,049 mmol), bezvodý Zn(CH₃COO)₂ (63 mg; 0,34 mmol); mobilní fáze: chloroform/THF/MeOH 50:10:1 (R_f = 0,49); výtěžek: 43 mg (56 %) zelená pevná látka; ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃/pyridin-d₅, 25 °C): δ = 2,28 (s, 54 H; C-CH₃); 3,77 (s, 8 H; crown-H); 3,82 (s, 16 H; crown-H); 4,20 (t, J = 6 Hz; 8 H, crown-H) a 4,40 ppm (t, J = 6 Hz; 8 H, crown-H); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃/pyridin-d₅, 25 °C): δ = 30,92; 30,95; 31,1; 50,5; 51,41; 51,44;

51,47; 70,4; 70,7; 71,2; 123,9; 136,1; 142,6; 144,4; 144,5; 144,9; 150,0; 150,2; 150,5; 150,6; 151,6; 153,0; 157,9; 158,2 a 158,9 ppm; IČ (ATR): $\nu = 2945, 2895, 1703, 1638, 1519, 1489, 1458, 1421, 1362, 1296, 1233, 1144, 1049$ a 976 cm^{-1} ; UV/Vis (MeCN): $\lambda_{\text{max}} (\epsilon) = 655 (162\ 400), 596 (34\ 800)$ a $376 \text{ nm} (130\ 100 \text{ mol}^{-1}\text{dm}^3\text{cm}^{-1})$; UV/Vis (THF): $\lambda_{\text{max}} (\epsilon) = 654 (157\ 900), 594 (34\ 900)$ a $375 \text{ nm} (131\ 200 \text{ mol}^{-1}\text{dm}^3\text{cm}^{-1})$; HR MS (ESI⁺): počítáno pro $\text{C}_{68}\text{H}_{94}\text{N}_{18}\text{O}_8\text{S}_6\text{Zn}$ $m/z = 1547,5196$ [M+H]⁺; nalezeno $m/z = 1547,5190$ [M+H]⁺; MS (MALDI-TOF): $m/z = 1546,5$ [M]⁺; $1569,5$ [M+Na]⁺.

Sloučenina 2cZn

Výchozí množství: **2c2H** (25 mg; 0,017 mmol), bezvodý $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ (20 mg; 0,11 mmol); mobilní fáze: chloroform/THF/MeOH ($R_f = 0,34$); výtěžek: 16 mg (62 %) zelená pevná látka; ¹H NMR (300 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{pyridin-d}_5, 25 \text{ }^\circ\text{C}$): $\delta = 2,24$ (s, 54 H; C-CH₃); 3,74-3,82 (m, 32 H; crown-H); 4,08 (t, $J = 8 \text{ Hz}$; 8 H, crown-H) a 4,45 ppm (t, $J = 8 \text{ Hz}$, 8 H; crown-H); ¹³C NMR (75 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{pyridin-d}_5, 25 \text{ }^\circ\text{C}$): $\delta = 29,8; 30,8; 31,0; 49,5; 51,33; 51,36; 70,4; 70,6; 70,85; 70,99; 71,08; 142,5; 144,3; 144,4; 144,8; 151,5; 153,0; 157,8; 158,1$ a $158,8 \text{ ppm}$; IČ (ATR): $\nu = 2975, 2920, 2850, 1739, 1563, 1515, 1455, 1416, 1362, 1297, 1255, 1233, 1140, 1099, 1043$ a 976 cm^{-1} ; UV/Vis (MeCN): $\lambda_{\text{max}} (\epsilon) = 656 (137\ 700), 597 (27\ 300)$ a $379 \text{ nm} (98\ 260 \text{ mol}^{-1}\text{dm}^3\text{cm}^{-1})$; UV/Vis (THF): $\lambda_{\text{max}} (\epsilon) = 655 (134\ 700), 595 (28\ 600)$ a $377 \text{ nm} (105\ 200 \text{ mol}^{-1}\text{dm}^3\text{cm}^{-1})$; HR MS (ESI⁺): počítáno pro $\text{C}_{72}\text{H}_{102}\text{N}_{18}\text{O}_{10}\text{S}_6\text{Zn}$ $m/z = 1635,5720$ [M+H]⁺; nalezeno $m/z = 1635,5712$ [M+H]⁺; MS (MALDI-TOF): $m/z = 1634,5$ [M]⁺; $1657,5$ [M+Na]⁺.

6.3 Látky připravené v rámci projektu [P3]

Příprava prekurzorů

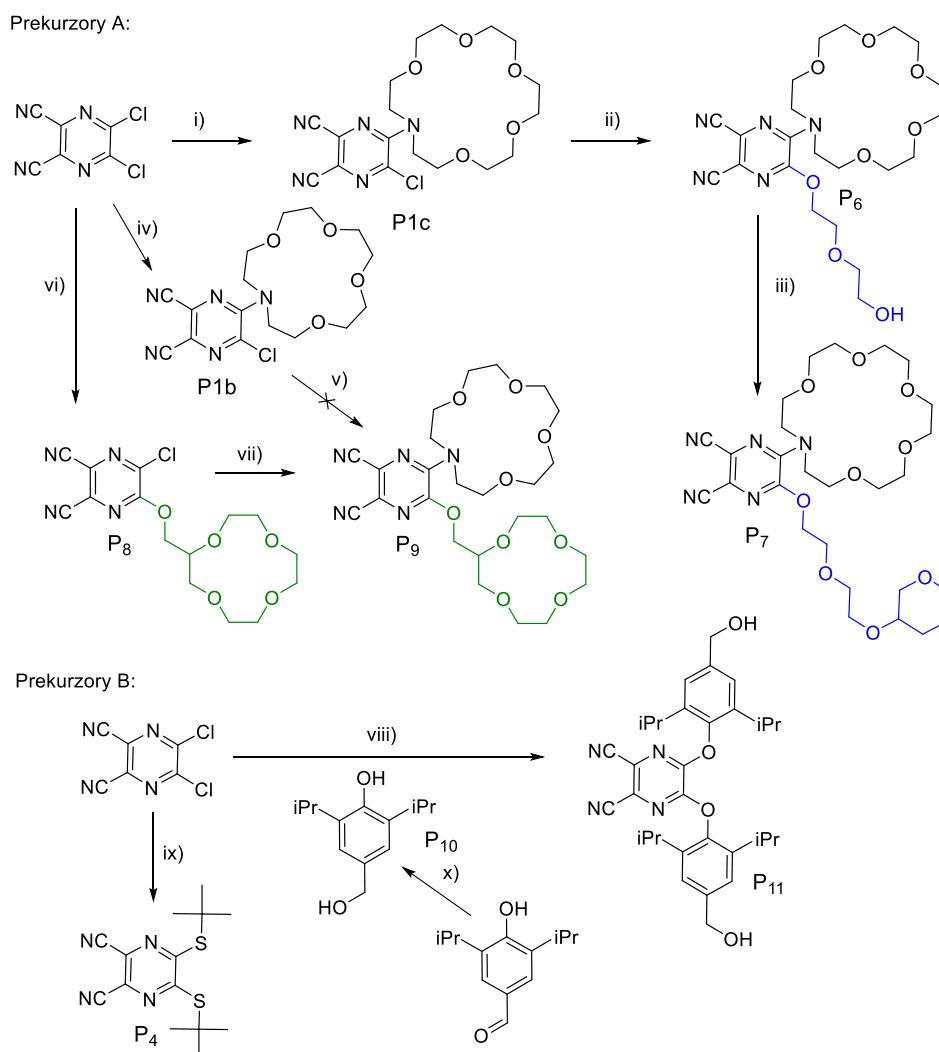


Schéma 4 Příprava prekurzorů A a B pro AzaPc senzory: (i) 1-aza-18-crown-6, bezvodý K_2CO_3 , THF, $-12\text{ }^\circ\text{C}$, 2 h; (ii) 2,2'-oxydiethan-1-ol, NaOH 1M vodný roztok, THF/voda, laboratorní teplota, 1 h; (iii) 3,4-dihydro-2H-pyran, pyridinium *p*-toluensulfonát, chloroform, teplota varu rozpouštědla, 4 h; (iv) 1-aza-15-crown-5, bezvodý K_2CO_3 , THF, $-12\text{ }^\circ\text{C}$, 3 h; (v) 2-hydroxymethyl-12-crown-4, NaOH 1M vodný roztok, THF/voda, laboratorní teplota, 90 min; (vi) 2-hydroxymethyl-12-crown-4, triethylamin, THF, laboratorní teplota, 2,5 h; (vii) 1-aza-15-crown-5, bezvodý K_2CO_3 , THF, laboratorní teplota, 3 h; (viii) NaOH 1M vodný roztok, THF/voda, laboratorní teplota, 1 h; (ix) *tert*-butylthiol, NaOH 1M vodný roztok, THF/voda, laboratorní teplota; (x) 4-hydroxy-3,5-diisopropylbenzaldehyd, $NaBH_4$, MeOH, laboratorní teplota, 30 min.

5-(1,4,7,10,13-pentaoxa-16-azacykloheptadekan-16-yl)-6-(2-(2-hydroxyethoxy)ethoxy)pyrazin-2,3-dikarbonitril (P6)

2,2'-oxydiethan-1-ol (240 mg; 2,26 mmol) byl rozpuštěn v NaOH 1M vodném roztoku (2,26 ml) a k této směsi byla přidána sloučenina **P1c** (875 mg; 2,06 mmol) rozpuštěná v THF (15 ml). Reakční směs byla pak míchána při laboratorní teplotě 1 h. TLC analýza odhalila, že během třepání produktu ve směsi ethylacetát/voda látka **P6** nepřechází dostatečně do organické vrstvy. Proto obě fáze byly posbírány a zahuštěny na vakuové rotační odparce do sucha. A surový produkt byl čištěn přímo sloupcovou chromatografií s mobilní fází acetonem ($R_f = 0,19$ pro **P6**).

Výtěžek: 801 mg (79 %) žlutý olej; $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, aceton- d_6 , 25 °C): $\delta = 3,52-3,55$ (m, 4 H, crown-H); 3,61-3,65 (m, 16 H, crown-H); 3,82 (t, $J = 6$ Hz, 4 H); 3,89-3,91 (m, 2 H); 4,05-4,09 (m, 4 H) a 4,54-4,56 ppm (m, 2 H, CH_2OAr); $^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, aceton- d_6 , 25 °C): $\delta = 150,6$; 148,1; 125,4; 116,5; 115,7; 115,4; 73,5; 73,4; 71,43; 71,30; 71,24; 71,23; 71,17; 69,0; 68,4; 62,00; 61,96 a 52,7 ppm; IČ (ATR): $\nu = 2918, 2850, 2226$ (CN), 1558, 1515, 1449, 1428, 1351, 1292, 1224, 1121, 925 a 759 cm^{-1} . MS (APCI⁺): $m/z = 496,3$ [M+H]⁺.

5-(1,4,7,10,13-pentaoxa-16-azacykloheptadekan-16-yl)-6-(2-(2-((tetrahydro-2H-pyran-3-yl)oxy)ethoxy)ethoxy)pyrazin-2,3-dikarbonitril (P7)

Směs prekurzoru **P6** (800 mg; 1,61 mmol), 3,4-dihydro-2H-pyranu (543 mg; 6,46 mmol) a pyridinium *p*-toluensulfonátu (32 mg; 0,13 mmol) rozpuštěných v chloroformu (20 ml) byla zahřívána při teplotě varu rozpouštědla 4 h. Barva reakční směsi zoranžověla. Poté byla do baňky přidána voda (60 ml) a produkt byl extrahován ethylacetátem (4×). Organické vrstvy byly posbírány a spojeny, vysušeny bezvodým Na_2SO_4 a odpařeny za sníženého tlaku. Produkt byl pak čištěn sloupcovou chromatografií s mobilní fází ethylacetát/MeOH 8:1 (R_f product = 0,47 pro **P7**).

Výtěžek: 510 mg (55 %) žlutý olej; $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3 , 25 °C): $\delta = 1,48-1,60$ (m, 4 H, pyran-H); 1,67-1,84 (m, 2 H, pyran-H); 3,46-3,52 (m, 1 H, pyran-H); 3,61-3,68 (m, 18 H, crown-H); 3,75 (t, $J = 6$ Hz, 4 H); 3,81-3,86 (m, 4 H); 4,03 (br s, 4 H); 4,49-4,52 (m, 2 H, CH_2OAr) a 4,59 ppm (t, $J = 4$ Hz, 1 H, pyran-H); $^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, CDCl_3 , 25 °C): $\delta = 148,9$; 146,6; 124,9; 115,8; 114,5; 114,2; 99,1; 77,3; 77,0; 76,7; 70,7; 70,5; 70,44; 70,43; 68,4; 67,3; 66,6; 62,4; 52,0; 30,5; 25,3 a 19,5 ppm; IČ (ATR): $\nu = 2965, 2866, 2226$ (CN), 1556, 1513, 1426, 1350, 1288, 1224, 1120, 1076, 1033, 987, 930, 872 a 814 cm^{-1} . MS (APCI⁺): $m/z = 580,3$ [M+H]⁺, 496,7 [M-C₅H₈O]⁺.

5-((1,4,7,10-tetraoxacyklododekan-2-yl)methoxy)-6-chlorpyrazin-2,3-dikarbonitril (P8)

5,6-dichlorpyrazin-2,3-dikarbonitril (500 mg; 2,51 mmol) byl přidán ke směsi 2-hydroxymethyl-12-crown-4 (570 mg; 2,76 mmol) a triethylaminu (509 mg; 5,03 mmol) rozpuštěných v THF (15 ml). Reakční směs zčervenala a byla míchána při laboratorní teplotě další 2,5 h. Rozpouštědlo s triethylaminem bylo odpařeno za sníženého tlaku a surový produkt byl čištěn přímo sloupcovou chromatografií s mobilní fází ethylacetátem ($R_f = 0,51$ pro **P8**).

Výtěžek: 543 mg (59 %) žlutá pevná látka; t.t. 111.5-115.2 °C; ^1H NMR (500 MHz, aceton- d_6 , 25 °C): $\delta = 3,55\text{-}3,85$ (m, 14 H, crown-H); 4,23 (m, 1 H, CH); 4,53 (dd, $J_1 = 7$ Hz, $J_2 = 7$ Hz, 1 H, CH_2OAr) a 4,69 ppm (dd, $J_1 = 4$ Hz, $J_2 = 4$ Hz, 1 H, CH_2OAr); ^{13}C NMR (125 MHz, aceton- d_6 , 25 °C): $\delta = 158,6$; 143,4; 130,3; 124,7; 113,88; 113,86; 77,6; 72,4; 72,3; 71,4; 71,3; 71,17; 71,15 a 70,8 ppm; IČ (ATR): $\nu = 2927, 2864, 2242$ (CN), 1545, 1528, 1461, 1437, 1356, 1306, 1231, 1159, 1128, 1101, 1065, 1041, 1027, 976, 943, 919, 853 a 830 cm^{-1} .

5-((1,4,7,10-tetraoxacyklododekan-2-yl)methoxy)-6-(1,4,7,10-tetraoxa-13-azacyklopentadekan-13-yl)pyrazin-2,3-dikarbonitril (P9)

1-aza-15-crown-5 (596 mg; 2,72 mmol) rozpuštěný v THF byl přidán ke směsi látky **P8** (530 mg; 1,44 mmol) a bezvodého K_2CO_3 (397 mg; 2,87 mmol) v THF (10 ml). Reakční směs okamžitě zoranžověla, míchání při laboratorní teplotě pokračovalo další 3 h. Rozpouštědla byla pak odpařena za sníženého tlaku a surový produkt byl čištěn sloupcovou chromatografií s mobilní fází ethylacetát/aceton 1:1 ($R_f = 0,21$ pro **P9**).

Výtěžek: 743 mg (94 %) žlutý olej; ^1H NMR (500 MHz, aceton- d_6 , 25 °C): $\delta = 3,56\text{-}3,89$ (m, 30 H, crown-H); 3,98-4,04 (m, 4 H, crown-H); 4,11 (m, 1 H, CH); 4,42 (dd, $J_1 = 7$ Hz, $J_2 = 7$ Hz, 1 H, CH_2OAr) a 4,49 ppm (dd, $J_1 = 4$ Hz, $J_2 = 4$ Hz, 1 H, CH_2OAr); ^{13}C NMR (125 MHz, aceton- d_6 , 25 °C): $\delta = 150,7$; 147,9; 125,4; 116,6; 115,6; 115,3; 77,6; 72,1; 71,7; 71,6; 71,4; 71,2; 71,14; 71,11; 70,8; 70,7; 70,3; 70,1; 69,4 a 54,1 ppm; IČ (ATR): $\nu = 2863, 2226$ (CN), 1558, 1522, 1508, 1428, 1354, 1289, 1255, 1223, 1120, 982, 926 a 840 cm^{-1} . MS (APCI $^+$): $m/z = 552,3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$.

5,6-bis(4-(hydroxymethyl)-2,6-diisopropylfenoxy)pyrazin-2,3-dikarbonitril (P11)

Látka **P10** (1,203 g; 5,78 mmol) byla rozpuštěna ve směsi NaOH 1M vodného roztoku (5,78 ml) a THF (10 ml). Pak byl do takto připravené reakční směsi přidán 5,6-dichlorpyrazin-2,3-dikarbonitril (500 mg; 2,51 mmol) rozpuštěný v THF (10 ml) a reakce byla míchána při laboratorní

teplotě 1 h. Po ukončení reakce byla rozpouštědla odpařena na vakuové rotační odparce. Produkt byl naředěn vodou (50 ml) a následně extrahován do ethylacetátu (3×50 ml). Organické vrstvy byly posbírány a spojeny, sušeny bezvodým Na₂SO₄ a odpařeny za sníženého tlaku. Produkt byl přečištěn sloupcovou chromatografií s mobilní fází chloroform/aceton 9:1.

Výtěžek: 1,34 g (98 %) bílá pevná látka; t.t. 245,4-245,8 °C; ¹H NMR (500 MHz, aceton-d₆, 25 °C): δ = 7,37 (s, 4 H, ArH); 4,70 (d, *J* = 6 Hz, 4 H, CH₂OH); 4,29 (t, *J* = 6 Hz, 2 H, OH); 3,06 (hept, *J* = 7 Hz, 4 H, CH) a 1,23 ppm (d, *J* = 7 Hz, 24 H, CH₃); ¹³C NMR (125 MHz, aceton-d₆, 25 °C): δ = 152,3; 146,0; 142,6; 140,7; 125,3; 123,6; 114,3; 64,6 a 28,4 ppm; IČ (ATR): ν = 2967, 2933, 2872, 2241 (CN), 1607, 1548, 1508, 1465, 1444, 1405, 1385, 1362, 1334, 1271, 1232, 1188, 1157, 1114, 1089 a 1018 cm⁻¹.

4-(hydroxymethyl)-2,6-diisopropylphenol (P10)

NaBH₄ (303 mg; 8,0 mmol) byl po kapkách přidán k roztoku 4-hydroxy-3,5-diisopropylbenzaldehydu (1,5 g; 7,27 mmol) rozpuštěného v MeOH (70 ml) a tato směs byla míchána při laboratorní teplotě 30 min. Po ukončení reakce byla směs okyselena zředěnou H₂SO₄ a byla přidána voda (50 ml). Surový produkt byl extrahován do ethylacetátu (3×50 ml). Organické vrstvy byly posbírány a spojeny, sušeny bezvodým Na₂SO₄ a odpařeny za sníženého tlaku. Produkt byl na závěr přečištěn sloupcovou chromatografií s mobilní fází chloroform/aceton 9:1.

Výtěžek: 1,42 g (94 %) bezbarvý olej; ¹H NMR (500 MHz, aceton-d₆, 25 °C): δ = 7,05 (s, 2 H, ArH); 7,00 (s, 1 H, ArOH); 4,53 (dd, *J*₁ = 5,8 Hz, *J*₂ = 0,6 Hz, 2 H, CH₂OH); 3,92 (td, *J*₁ = 5,8 Hz, *J*₂ = 0,5 Hz, 1 H, CH₂OH); 3,37 (hept, *J* = 6,9 Hz, 2 H, CH) a 1,22 ppm (d, *J* = 6,9, 0,5 Hz, 12 H, CH₃); ¹³C NMR (125 MHz, aceton-d₆, 25 °C): δ = 145,5; 130,4; 129,7; 117,8; 60,2; 22,5 a 18,4 ppm; IČ (ATR): ν = 2961, 2870, 1598, 1468, 1444, 1383, 1363, 1285, 1259, 1201, 1171, 1153, 1122, 1104, 1091, 1075 a 1004 cm⁻¹.

Obecný postup přípravy zinečnatých AzaPc 3a-bZn a 4a-bZn templátovou metodou

Příslušný prekurzor **P7** nebo **P9** (prekurzor A, 1 ekv.) a prekurzor nesoucí objemné skupiny **P4** nebo **P11** (prekurzor B, 3 ekv.) byly společně s bezvodým octanem zinečnatým rozpuštěny pod ochrannou argonovou atmosférou v malém množství bezvodého pyridinu (většinou 1-3 ml) (Schéma 5). Reakční směs byla pak zahřívána 5 h při teplotě varu rozpouštědla. Po ukončení reakce byl pyridin částečně odpařen za sníženého tlaku a do baňky byla přidána voda (20 ml). Vznikla tmavá suspenze, ze které byl precipitát sbírán filtrací a na filtru důkladně několikrát promyt vodou. Cílový AzaPc kongener **ABBB** byl izolován a čištěn sloupcovou chromatografií. Množství výchozích látek a konkrétní mobilní fáze jsou pro každou sloučeninu uvedeny níže.

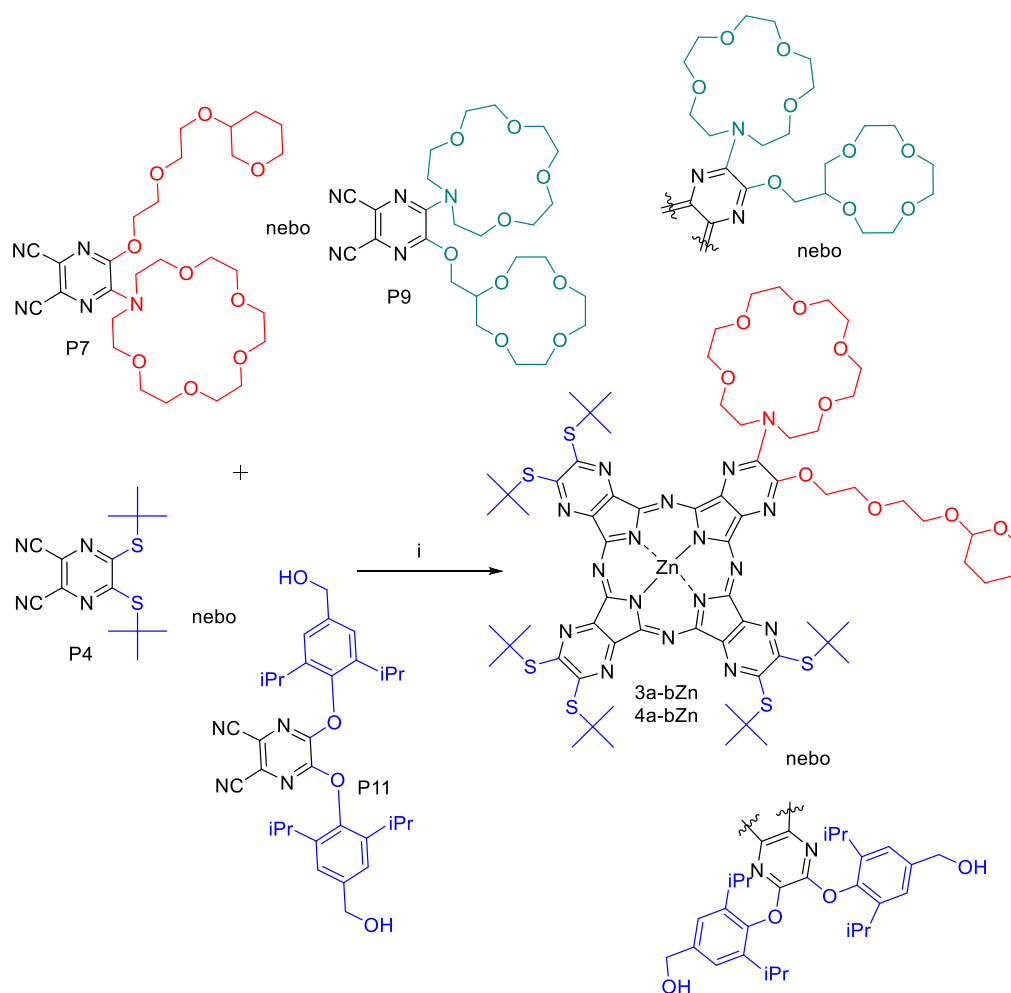


Schéma 5 Příprava cílových struktur AzaPc **3a-bZn** a **4a-bZn** statistickou kondenzací pomocí templátové metody: (i) bezvodý $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, bezvodý pyridin, argon, teplota varu rozpouštědla.

Sloučenina 3aZn

Výchozí množství: **P7** (346 mg; 0,60 mmol), **P4** (549 mg; 1,79 mmol), bezvodý $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ (438 mg; 2,39 mmol); mobilní fáze: chloroform/MeOH/THF 10:0,5:1 ($R_f = 0,59$ pro **3aZn**) (čištěno třikrát) poté mobilní fáze změněna na chloroform/THF 10:1 (čištěno jednou); výtěžek: 48 mg (5 %) zelená olejovitá pevná látka, ^1H NMR (500 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{pyridin-d}_5$, 25 °C): $\delta = 1,21\text{-}1,51$ (m, 6 H, pyran-H); 1,88 (s, 9 H, CCH_3); 1,90 (s, 45 H, CCH_3); 3,18-3,23 (m, 1 H, pyran-H); 3,32-3,43 (m, 18 H, crown-H); 3,47-3,61 (m, 10 H); 3,66-3,78 (br s, 4 H); 4,19 (t, $J = 4$ Hz, 4 Hz, 2 H, CH_2OAr) a 4,34 ppm (t, $J = 4$ Hz, 1 H, pyran-H); ^{13}C NMR (125 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{pyridin-d}_5$, 25 °C): $\delta = 159,1; 158,6; 158,23; 158,20; 157,9; 157,8; 152,6; 152,4; 151,6; 151,5; 151,3; 150,80; 150,75; 150,50; 150,48; 148,8; 146,8; 144,9; 144,7; 144,5; 144,4; 144,3; 125,1; 115,9; 114,8; 114,5; 99,2; 71,0; 70,7; 70,6; 68,6; 67,5; 66,9; 62,5; 52,3; 31,1; 31,1; 30,86; 30,82; 30,8; 30,3; 30,1; 25,6$ a 19,7 ppm; IČ (ATR): $\nu = 2972, 2867, 1744, 1556, 1514, 1442, 1427, 1362, 1350, 1286, 1255, 1225, 1123, 1077, 1033$ a 978 cm^{-1} ; UV/Vis (THF): $\lambda_{\text{max}} (\epsilon) = 654 (183\ 000), 596\text{sh}, 429\text{sh}$ a 377 nm ($141\ 000\text{ mol}^{-1}\text{dm}^3\text{cm}^{-1}$); MS (MALDI-TOF): $m/z = 1561,4 [\text{M}]^+; 1584,4 [\text{M}+\text{Na}]^+; 3122,7 [2\text{M}]^+$.

Sloučenina 3bZn

Výchozí množství: **P7** (100 mg; 0,172 mmol), **P11** (280 mg; 0,518 mmol), bezvodý $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ (127 mg; 0,69 mmol); mobilní fáze: chloroform/MeOH/THF 20:3:2 ($R_f = 0,26$ pro **3bZn**) (čištěno dvakrát); výtěžek: 30 mg (8 %) modrá olejovitá pevná látka; ^1H NMR (500 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{pyridin-d}_5$, 25 °C): $\delta = 0,99\text{-}1,15$ (m, 78 H, CH_3 a pyran-H); 3,07-3,26 (m, 12 H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$); 3,36-3,96 (m, 34 H, crown-H, CH_2O lariat etheru a CH_2O v pyranu); 4,39 (br s, 1 H, OCHO); 4,60 (s, 2 H, CH_2OH); 4,65 (s, 2 H, CH_2OH); 4,69 (s, 2 H, CH_2OH); 4,87 (s, 6 H, CH_2OH); 5,27 (br s, 6 H, OH) a 7,21-7,39 ppm (m, 12 H, ArH, částečně překryto signálem rozpouštědla); ^{13}C NMR (125 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{pyridin-d}_5$, 25 °C): $\delta = 151,6; 147,3; 147,0; 142,6; 142,5; 141,0; 140,98; 140,8; 140,4; 140,3; 127,9; 124,2; 99,2; 70,5; 69,0; 66,9; 65,0; 62,4; 50,3; 44,7; 32,1; 31,6; 31,2; 30,8; 30,6; 30,4; 29,9; 29,7; 29,5; 28,5; 25,6$ a 23,7 ppm; IČ (ATR): $\nu = 2963, 2928, 2870, 1467, 1402, 1364, 1285, 1246, 1215, 1158, 1101, 1056, 1034$ a 927 cm^{-1} ; UV/Vis (THF): $\lambda_{\text{max}} (\epsilon) = 634 (183\ 000), 579\text{sh}$ a 370 nm ($175\ 000\text{ mol}^{-1}\text{dm}^3\text{cm}^{-1}$); MS (MALDI-TOF): $m/z = 2269,9 [\text{M}]^+; 2292,9 [\text{M}+\text{Na}]^+; 2308,8 [\text{M}+\text{K}]^+$.

Sloučenina 4aZn

Výchozí množství: **P9** (100 mg; 0,181 mmol), **P4** (167 mg; 0,544 mmol), bezvodý $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ (133 mg; 0,725 mmol); mobilní fáze: chloroform/MeOH/THF 10:0,5:1 ($R_f = 0,39$ pro 4aZn) čištěno jednou a poté dvakrát čištěno s mobilní fází chloroform/MeOH/THF 10:0,25:1 ($R_f = 0,15$ pro 4aZn); výtěžek: 27 mg (9 %) zelená olejovitá pevná látka; ^1H NMR (500 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{pyridin-d}_5$, 25 °C): $\delta = 1,93$ (s, 9 H, CCH_3); 1,947 (s, 27 H, CCH_3); 1,952 (s, 18 H, CCH_3); 3,37-4,28 (m, 35 H); 4,93 (dd, $J_1 = 6$ Hz, $J_2 = 6$ Hz, 1 H, CH_2OAr) a 5,02 ppm (dd, $J_1 = 5$ Hz, $J_2 = 5$ Hz, 1 H, CH_2OAr); ^{13}C NMR (125 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{pyridin-d}_5$, 25 °C): $\delta = 158,7$; 158,2; 157,9; 157,8; 157,6; 157,4; 152,2; 151,9; 151,22; 151,20; 150,9; 150,49; 150,45; 150,20; 150,17; 148,1; 146,2; 144,55; 144,47; 144,3; 144,2; 144,04; 144,02; 143,97; 137,5; 124,7; 115,8; 114,4; 114,1; 76,7; 71,04; 71,02; 70,86; 70,81; 70,7; 70,45; 70,32; 70,23; 70,21; 70,05; 69,7; 69,4; 68,2; 53,6; 53,4; 51,06; 51,04; 51,03; 51,00; 50,97; 30,7; 30,6; 30,50 a 30,46 ppm; IČ (ATR): $\nu = 2916, 2863, 1524, 1470, 1446, 1427, 1362, 1252, 1138, 1101, 1045, 976, 847$ a 784 cm^{-1} ; UV/Vis (THF): $\lambda_{\text{max}} (\epsilon) = 653$ (142 000), 594sh a 376 nm ($100\,000\text{ mol}^{-1}\text{dm}^3\text{cm}^{-1}$). MS (MALDI-TOF): $m/z = 1533,3$ $[\text{M}]^+$, 1556,3 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; 3066,7 $[\text{2M}]^+$; 3089,6 $[\text{2M}+\text{Na}]^+$.

Sloučenina 4bZn

Výchozí množství: **P9** (100 mg; 0,181 mmol), **P11** (295 mg; 0,544 mmol), bezvodý $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ (133 mg; 0,725 mmol); mobilní fáze: chloroform/MeOH/THF 10:1:1 poté mobilní fáze změněna na chloroform/MeOH/THF 10:0,5:1 ($R_f = 0,40$ pro **4bZn**); výtěžek: 20 mg (5 %) modrá olejovitá pevná látka; ^1H NMR (500 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{pyridin-d}_5$, 25 °C): $\delta = 0,91$ -1,24 (m, 72 H, CH_3); 1,92-2,00 (m, 12 H, CHCH_3); 3,08-3,26 (m, 4 H, crown-H); 3,32-4,10 (m, 30 H, crown-H); 4,66 (d, $J = 7$ Hz, 2 H, CH_2OH); 4,83-4,89 (m, 4 H, CH_2OH); 5,03 (s, 2 H, CH_2OH); 5,18-5,28 (m, 4 H, CH_2OH); 5,35-5,52 (m, 6 H, OH) a 7,18-7,28 ppm (m, 12 H, ArH, částečně překryto signálem rozpouštědla); ^{13}C NMR (125 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{pyridin-d}_5$, 25 °C): $\delta = 171,3$; 171,1; 148,4; 142,1; 141,9; 141,3; 141,1; 140,4; 128,0; 125,1; 124,9; 108,1; 107,9; 106,7; 98,4; 71,4; 70,8; 70,7; 70,5; 67,9; 67,6; 67,5; 67,1; 66,9; 65,4; 65,2; 65,1; 53,9; 30,0; 29,82; 29,78; 29,73; 28,7 a 28,6 ppm; IČ (ATR): $\nu = 2966, 2930, 2870, 1734, 1541, 1522, 1489, 1398, 1363, 1338, 1286, 1245, 1214, 1158, 1101, 1056$ a 927 cm^{-1} ; UV/Vis (THF): $\lambda_{\text{max}} (\epsilon) = 635$ (128 000), 579sh and 365 nm ($115\,000\text{ mol}^{-1}\text{dm}^3\text{cm}^{-1}$); MS (MALDI-TOF): $m/z = 2365,9$ $[\text{M}+\text{2Na}+\text{2K}]^+$, 2388,9 $[\text{M}+\text{3Na}+\text{2K}]^+$.

6.4 Fotofyzikální studium AzaPc senzorů [P1-3]

Všechny AzaPc připravené v rámci mé disertační práce byly charakterizovány z hlediska fotofyzikálních vlastností (absorpční spektrum, extinkční koeficient, emisní spektrum). Studium selektivity a citlivosti senzorů k určitému analytu probíhalo pomocí fluorescenčních titrací různými kationty kovů (K^+ , Na^+ , Li^+ , Ca^{2+} , Ba^{2+} , Mg^{2+} a NH_4^+) ve formě jejich solí (thiokyanátů, chloristanů nebo triflátů). Dále byly senzory studovány pomocí níže popsaných metod.

6.4.1 Výpočet Φ_F

Kvantový výtěžek fluorescence Φ_F byl stanoven (v MeCN nebo THF) srovnávací metodou s ZnPc ($\Phi_F = 0,32$ v THF).^[145] Vzorek i srovnávací látka byly excitovány při stejné vlnové délce ($\lambda_{exc} = 600$ nm pro **1a-dZn**; $\lambda_{exc} = 595$ nm pro **2a-cZn**; **3aZn a 4bZn**; $\lambda_{exc} = 580$ nm pro **3bZn a 4bZn**). Φ_F byl pak vypočítán dle rovnice (2)^[2] (viz kapitola 5.2.1). Všechny experimenty byly provedeny třikrát a prezentované výsledky byla průměrem těchto tří měření. Absorbance vzorků při excitačních vlnových délkách byla udržována pod hodnotou 0,05 a maximum Q pásu pod hodnotou 0,1, aby se zabránilo efektu vnitřního filtru („inner filter effect“). Odhadovaná chyba měření je 15 %.

6.4.2 Stanovení vazebné konstanty

Stanovení vazebné konstanty vycházelo z titračních experimentů, kdy definované množství zásobního roztoku AzaPc senzoru (obvykle 10 - 40 μ l) rozpuštěného v MeCN nebo THF (HPLC kvalita; <0,05% H_2O) bylo převedeno do křemenné fluorescenční kyvety (10 \times 10 mm) s 2,45 ml MeCN nebo THF tak, aby celková koncentrace roztoku senzoru v kyvetě byla 1 μ M. Tato koncentrace byla kontrolována extinkčním koeficientem příslušného senzoru. Bylo změřeno absorpční a emisní spektrum (excitace v oblasti isosbestického bodu; $\lambda_{exc} = 600$ nm pro **1a-dZn**; $\lambda_{exc} = 595$ nm pro **2a-cZn**; **3aZn a 4bZn**; $\lambda_{exc} = 580$ nm pro **3bZn a 4bZn**). Poté bylo k senzoru přidáno definované množství (obvykle 5 - 50 μ l) zásobního roztoku obsahujícího kovový kationt ve formě SCN^- , ClO_4^- nebo $CF_3SO_3^-$ soli (většinou o koncentraci 0,001 – 0,5 M) rozpuštěné v MeCN nebo MeOH. Absorpční a emisní spektra byla měřena po každém přidavku. Kvantové výtěžky fluorescence byly počítány dle rovnice (2)^[2] (kapitola 5.2.1) pro každý přidavek (viz níže). K_A nebo K_D byly vypočítány nelineární regresí za pomoci programu Prism 5 software for Windows (GraphPad Software, inc.).

6.4.3 Výpočet FEF

FEF byl vypočítán z výsledků fluorescenčních titrací provedených v MeCN nebo THF ($c_{\text{senzor}} = 1 \mu\text{M}$) dle rovnice (3) (viz kapitola 5.2.3) jako podíl kvantového výtěžku fluorescence senzoru po úplné saturaci analytem $\Phi_{\text{F(M+)}}$ a kvantového výtěžku fluorescence volné formy senzoru $\Phi_{\text{F(Free)}}$ bez navázaného analytu. V případě bifázické titrační isotermy byl počítán FEF₁ pro nárůst fluorescence v prvním kroku titrace a celkový FEF odpovídající nárůstu fluorescence pro oba kroky titrační křivky.

6.4.4 Stanovení stechiometrie vazby senzor/analyt Jobovou metodou

Pro potřeby měření byl připraven zásobní roztok AzaPc senzoru ($c = 100 \mu\text{M}$) rozpuštěného v THF a zásobní roztok citlivého analytu KSCN, $\text{K}(\text{CF}_3\text{SO}_3)$ nebo $\text{Ba}(\text{CF}_3\text{SO}_3)_2$ ($c = 1 \text{ mM}$) v MeOH. Poté byla provedena série měření fluorescence s různými poměry senzor/analyt (15 – 20 měření, s poměry od 1:9 po 9:1 senzor/analyt). Do křemenné fluorescenční kyvety (10×4 mm) bylo přidáno takové množství THF, aby po přidavku zásobního roztoku senzoru a zásobního roztoku analytu byl celkový objem 1,00 ml. Do kyvety byl přidán nejprve zásobní roztok senzoru a bylo změřeno fluorescenčně emisní spektrum. Intenzita fluorescence v maximu byla považována za F_0 . Poté bylo přidáno příslušné množství zásobního roztoku analytu a platilo, že celková koncentrace látek je $10 \mu\text{M}$ ($[\text{senzor}] + [\text{analyt}] = 10 \mu\text{M}$). Opět bylo změřeno fluorescenčně emisní spektrum a jeho maximum bylo tentokrát pokládáno za F_{max} . Výsledná stechiometrie vazby senzor/analyt byla stanovena z Jobovy závislosti rozdílu $F_{\text{max}} - F_0$ na podílu koncentrací $[\text{analyt}]/([\text{analyt}] + [\text{senzor}])$.

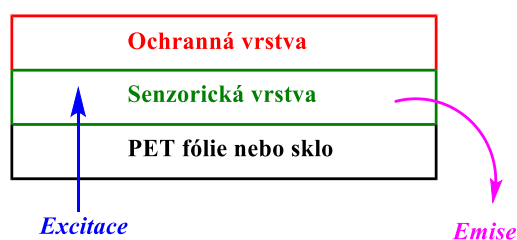
6.4.5 Fluorescenční titrace NP

2,5 ml zásobního vodného roztoku **2bZn@NP**, **3aZn@NP** nebo **4aZn@NP** ($c \approx 1 \mu\text{M}$) bylo přeneseno do kyvety z křemenného skla (10×10 mm) a byla změřena absorpční a emisní spektra ($\lambda_{\text{exc}} = 599 \text{ nm}$ pro **2bZn@NP** a $\lambda_{\text{exc}} = 595 \text{ nm}$ pro **2bZn@NP**). Poté bylo přidáno definované množství (5 - 50 μL) zásobního roztoku (koncentrace 10 mM – 1 M) analytu rozpuštěného ve vodě a byla měřena absorpční a emisní spektra po každém přidavku. Intenzita fluorescence byla korigována na absorbanci při hodnotě excitační vlnové délky. Intenzita fluorescence byla pak vynesena do grafu jako závislost na koncentraci analytu.

6.5 Příprava CO₂ senzorů [P4]

Senzorické fólie pro měření fluorescence

Při přípravě senzorů je podpurná fólie nebo sklo potaženo vrstvou obsahující indikátor imobilizovaný v matrici tzv. senzorická vrstva a vrstvou ochranou, která kryje senzorickou vrstvu a je tvořena silikonem (**Obr. 49**).



Obr. 49 Schéma připravovaného CO₂ senzoru.

Senzorická (citlivá) vrstva

„Cocktail“ obsahující 1 mg indikátoru **5aZn**, **5bZn** nebo **5cZn** případně kontrolní látky **KLX** (1 % w/w vzhledem k polymeru) a 100 mg matrice rozpuštěné ve 2 g směsi toluen/ethanol 6:4 (w/w) byl saturován probubláváním 100 % CO₂ ze zásobní lahve. V případě indikátoru **DPP** bylo množství látky 0,25 mg (0,25 % w/w vzhledem k polymeru). K směsi látek byla přidána příslušná báze (0,02 mmol; MeOH roztok). S výjimkou fólie obsahující kontrolní látku **KLX**. Takto připravená směs byla nožově potažena na podpurnou PETE fólii v tloušťce 75 μm. Fólie byly ponechány na vzduchu při laboratorní teplotě 45 min, aby došlo k úplnému odpaření rozpouštědel ze senzorické vrstvy. Při přípravě senzoru obsahujícího **DPP** indikátor nebyla použita PETE podpurná fólie ale podpora ve formě chlortrimethylsilanem modifikovaného mikroskopového sklíčka, a to z důvodu vysoké citlivosti indikátoru a zamezení hromadění CO₂ uvnitř citlivé vrstvy senzoru.^[147] Detaily (indikátor, matrice, typ a množství báze) pro přípravu všech fólií jsou shrnuty v **Tab. 3**.

Tab. 3 Seznam připravených CO₂ senzorických fólií.

Účel měření	Typ podpory ^[a]	Indikátor	Matrice	Báze ^[b]
Absorpční měření	PETE	5aZn	HydroThane™ 5	20,7 µl TBAH
	PETE	5aZn	HydroThane™ 15	20,7 µl TBAH
	PETE	5aZn	HydroThane™ 25	20,7 µl TBAH
Fluorescenční měření	PETE	5aZn	Ethylcelulóza 49 %	50,0 µl TOAH
	PETE	5bZn	Ethylcelulóza 49 %	50,0 µl TOAH
	PETE	5cZn	Ethylcelulóza 49 %	50,0 µl TOAH
	PETE	KLX	Ethylcelulóza 49 %	-
	PETE	5aZn	HydroThane™ 5	50,0 µl TOAH
	PETE	5bZn	HydroThane™ 5	50,0 µl TOAH
	PETE	5cZn	HydroThane™ 5	50,0 µl TOAH
	PETE	KLX	HydroThane™ 5	-
	PETE	5aZn	HydroThane™ 5	20,7 µl TBAH
	PETE	5aZn	HydroThane™ 15	20,7 µl TBAH
	PETE	5aZn	HydroThane™ 25	20,7 µl TBAH
	PETE	5aZn	HydroThane™ 25	50,0 µl TOAH
	PETE	5aZn	HydroThane™ 25	12,2 µl TEAH ^[c]
	sklo	DPP	HydroThane™ 25	50,0 µl TOAH
	sklo	DPP	HydroThane™ 25	20,7 µl TBAH
	sklo	DPP	HydroThane™ 25	12,2 µl TEAH ^[c]
Měření s optickým vláknem ^[d]	PETE	5aZn	HydroThane™ 15	20,7 µl TBAH

[a] podpůrná PETE fólie nebo chlortrimethylsilanem modifikované sklo.

[b] množství báze počítané na 1 mg AzaPc indikátoru (nebo 0,25 mg indikátoru **DPP**) ve 100 mg matrice rozpuštěných ve 2 g směsi toluen/ethanol 6:4 (w/w).

[c] tetraethylammonium-hydroxid

[d] přídavek 80 mg silanizovaných částic egyptské modři do ochranné silikonové vrstvy.

Ochranná silikonová vrstva

Polydimethylsiloxanový polymer s terminálním vinylem (500 mg) a ultra jemný oxid titaničitý P170 (125 mg) byly dispergovány v cyklohexanu (1 ml) a směs byla míchána přes noc při laboratorní teplotě. Poté byl do směsi za intenzivního míchání postupně přidán kopolymer (25-35 % methylhydrosiloxan)-dimethylsiloxan (20 μ l), 1,3,5,7-tetravinyl-1,3,5,7-tetramethylcyklotetrasiloxan (2 μ l) a katalyzátor 1,3-divinyl-1,1,3,3-tetramethyldisiloxanový complex platiny (3,5 μ l). Takto připravený „cocktail“ byl okamžitě nožově potáhnut na senzorickou vrstvu v tloušťce 75 μ m. Silikonová vrstva byla poté ponechána v sušárně při 60 °C 15 min, aby byla umožněna kompletní polymerizace silikonové vrstvy.

Senzorické fólie pro absorpční měření

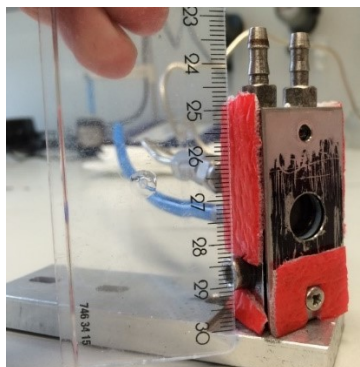
Senzorické fólie pro tento účel byly připraveny stejně, jak je popsáno výše, avšak bez přídavku ultra jemného oxidu titaničitého P170 v silikonové ochranné vrstvě.

Senzorické fólie pro měření na optickém vlákně

Senzorické fólie byly připraveny podobně, jako je uvedeno výše, ale do silikonové ochranné vrstvy byly přidány silanizované částice egyptské modři (80 mg).

6.6 Fotofyzikální studium CO₂ senzorů [P4]

Pro míchání plynů pro kalibraci CO₂ senzorů bylo použito zařízení GSC-A4TA-BB22 red-y smart series (Vögtlin). Měření změn fluorescence senzoričkových materiálů bylo provedeno na přístroji Hitachi F-7000 fluorescence spectrometer vybaveném fotonásobičem citlivým v červené oblasti R928 od firmy Hamamatsu s filtry OG550 a ND50, dále byla měření provedeno v kovové cela domácí výroby (**Obr. 50**). Vlhkost plynů při měření byla upravena na 85 % probubláváním plynu přes vyhřívanou baňku naplněnou silikagelem s indikátorem vlhkosti a vodným roztokem chloridu draselného. Teplota byla kontrolována termostatem ThermoHaake DC50. Absorpční měření bylo provedeno na přístroji Cary 50 UV-vis spectrophotometer (Varian). Kvantové výtěžky fluorescence senzoričkových fólií byly měřeny absolutní metodou na přístroji Fluorolog3 fluorescence spectrometer (Horiba) vybaveném fotonásobičem R2658 (Hamamatsu) citlivým v oblasti 300-1050 nm a integrační sférou (Horiba). Pro experiment s CO₂ senzory na optických vláknech byly změny fluorescence vyhodnoceny přístrojem FireStingO₂ oxygen meter (PyroScience), který byl vybaven LED zdrojem pro excitaci při 624 nm a fotodiodou pro detekci světla. Pro spojení s přístrojem byla použita optická vlákna z poly(methylmetakrylátu) délka 1 m, průměr: 1 mm (Ratioplast, Německo). Na konec vlákna byla umístěna senzoričková fólie (průměr: 3 mm), která byla zajištěna kovovou čepičkou.



Obr. 50 Kovová cela domácí výroby pro absorpční a fluorescenční měření fólií citlivých k pCO₂.

7. VÝSLEDKY A DISKUZE

V rámci mého studia jsem se zabýval přípravou a studiem fotofyzikálních vlastností AzaPc s důrazem na jejich senzorní vlastnosti ke kationtům kovů nebo $p\text{CO}_2$. Má práce zahrnovala přípravu prekurzorů a následně požadovaných AzaPc senzorů, které jsem poté studoval z hlediska fotofyzikálních vlastností. AzaPc byly také ukotveny do křemičitých NP, které byly připraveny ve spolupráci s Dr. Langem a Dr. Kirakcim z Ústavu anorganické chemie, Akademie věd ČR, a poté jsem provedl studium jejich senzorních vlastností ve vodném prostředí. Tato kapitola je rozdělena na dvě hlavní části. První část je věnována systematickému studiu vztahu struktury rozpoznávací části na selektivitu a senzitivitu senzorů pro rozpoznávání kationtů kovů. Druhá část komentuje výsledky, kterých bylo dosaženo během mé zahraniční stáže ve výzkumné skupině Assoc. Prof. Sergeje Borisova při vývoji CO_2 senzorů využívajících pH senzitivní AzaPc jako indikátory.

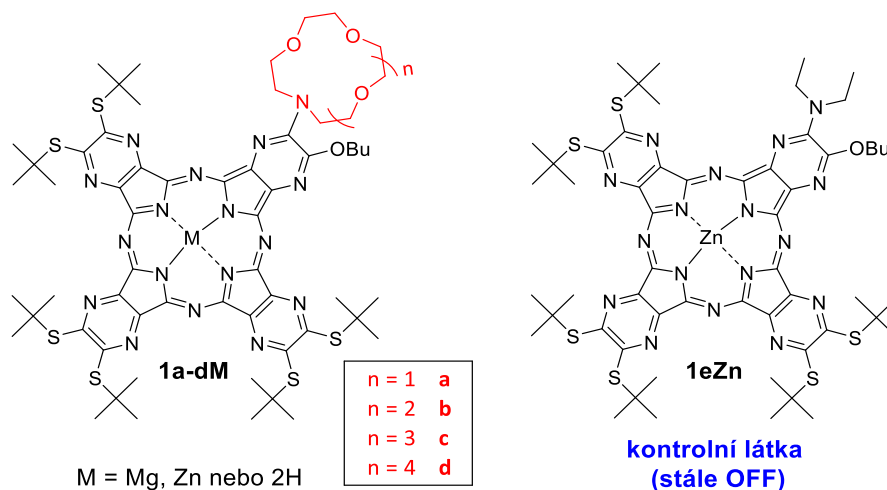
Stěžejní publikace, u kterých jsem uveden jako první autor, jsou v této kapitole z důvodu přehlednosti označeny a citovány jako [P1-P4]. Jedná se o recenzované články [P1-2 a P4], které byly přijaty k tisku do impaktovaných časopisů. Projekt [P3] byl dokončen v době sepisování této disertační práce a manuskript s výsledky práce je nyní finalizovaný a připravený k odeslání k recenznímu řízení v impaktovaném časopise. Kromě těchto publikací jsem ještě spoluautorem další publikace,^[8] která je citována s ostatními odkazy na původní literaturu. Tato publikace vychází z výsledků mé diplomové práce, a tudíž není podkladem pro mou disertační práci.

7.1 Studium rozpoznávacích částí AzaPc senzorů citlivých ke kationtům kovů

Z výsledků předchozího projektu^[8] vyplynulo, že AzaPc se mohou opravdu stát strukturálně novými fluorescenčními senzory pro rozpoznávání kationtů kovů s mnohými výhodnými vlastnostmi oproti komerčně dostupným senzorům. Avšak pro budoucí aplikaci bude třeba do detailu prozkoumat strukturní faktory ovlivňující selektivitu a senzitivitu senzoru k určitému analytu. To se stalo hlavním tématem mé disertační práce a dosažené výsledky jsou popsány v následujících kapitolách.

7.1.1 Vliv velikosti aza-crownu na selektivitu a senzitivitu AzaPc senzoru [P1]

První projekt se zabýval ovlivněním selektivity a senzitivity AzaPc senzorů volbou velikosti rozpoznávací části. Struktury připravených AzaPc senzorů byly navrženy dle struktury látky s nejlepšími vlastnostmi studované v minulém projektě.^[8] Dle předchozích zkušeností byl tedy jako fluorofor zvolen zinečnatý AzaPc, neboť Zn^{2+} je v centru pevně vázán. AzaPc byl substituován šesti objemnými *tert*-butylsulfanylovými skupinami jako sterická zábrana nežádoucí agregace. Zvolená periferní substituce stejně jako centrální zinečnatý kation jsou zároveň zárukou dobrých fotofyzikálních vlastností. Do *ortho* polohy k rozpoznávací části byla zvolena butoxy skupina na základě empirického poznatku z předchozího projektu.^[8] Jednotlivé AzaPc se v této sérii lišily různou velikostí aza-crownu sloužícího jako rozpoznávací část a konkrétně byly připraveny AzaPc **1a-dZn** nesoucí 1-aza-12-crown-4; 1-aza-15-crown-5; 1-aza-18-crown-6 a 1-aza-21-crown-7 (**Obr. 51**).



Obr. 51 Struktury připravených AzaPc senzorů **1a-dZn** a kontrolní látky **1eZn**.

Nejprve jsme připravili prekurzory pro navržené AzaPc podobnými reakcemi, které byly popsány dříve pro přípravu prekurzoru **P2b**.^[8] 5,6-dichlorpyrazin-2,3-dikarbonitril reagoval nejprve s příslušným aza-crownem za vzniku mono-substituovaných meziproduktů **P1a, c**. Tyto alkylaminové deriváty se běžně připravují nukleofilními substitucemi s nadbytkem příslušného alkylaminu, který současně slouží k vychytávání odstupujících chloridových aniontů. Avšak v tomto případě bylo nutné šetřit aza-crowny z důvodu jejich vysoké ceny, a proto byl do reakce přidán jako báze bezvodý K_2CO_3 , který vychytával chloridové anionty, a tak bylo možné do reakce dodat pouze malý nadbytek příslušného aza-cownu. Finální prekurzory **P2a, c** byly pak připraveny reakcí s butanolem s výtěžky 70 - 88 % (**P2a, c**) pro oba kroky reakce (Schéma 1).

Prekurzor **P2d** byl připraven také nukleofilní substitucí ve dvou krocích, ale postup přípravy byl obrácený a 1-aza-21-crown-7 byl substituován na monosubstituovaný meziprodukt **P3** až ve druhém kroku. K tomuto postupu jsme přistoupili na základě výsledků předběžného experimentu, kdy meziprodukt 5-chlor-6-(1,4,7,10,13,16-hexaoxa-19-azacyklohenikosan-19-yl)pyrazin-2,3-dikarbonitril se „táhl“ na chromatografickém sloupci a čištění bylo velmi obtížné. Taktéž čištění meziproduktu **P3**, který byl připraven v prvním kroku nukleofilní substituce reakcí 5,6-dichlorpyrazin-2,3-dikarbonitrilu s butanolem, bylo velmi obtížné tentokrát z důvodu velmi malého rozdílu mezi retenčním faktorem (R_f) připravované látky **P3** a vedlejšího produktu reakce (5,6-dibutoxypyrazin-2,3-dikarbonitrilu). Proto jsme se rozhodli tento meziprodukt nečistit a nechat přímo reagovat v další nukleofilní substituci a 1-aza-21-crown-7 za vzniku cílového prekurzoru **P2d** (Schéma 1). I přes modifikaci v postupu přípravy jsme dosáhli velmi nízkého výtěžku reakce jen 24 % pro oba kroky reakce. Prekurzor **P4** nesoucí objemné *tert*-butylsulfanylové skupiny byl připraven rutinně a naší výzkumnou skupinou publikovanou reakcí 5,6-dichlorpyrazin-2,3-dikarbonitrilu s *tert*-butylthiolátem sodným.^[121]

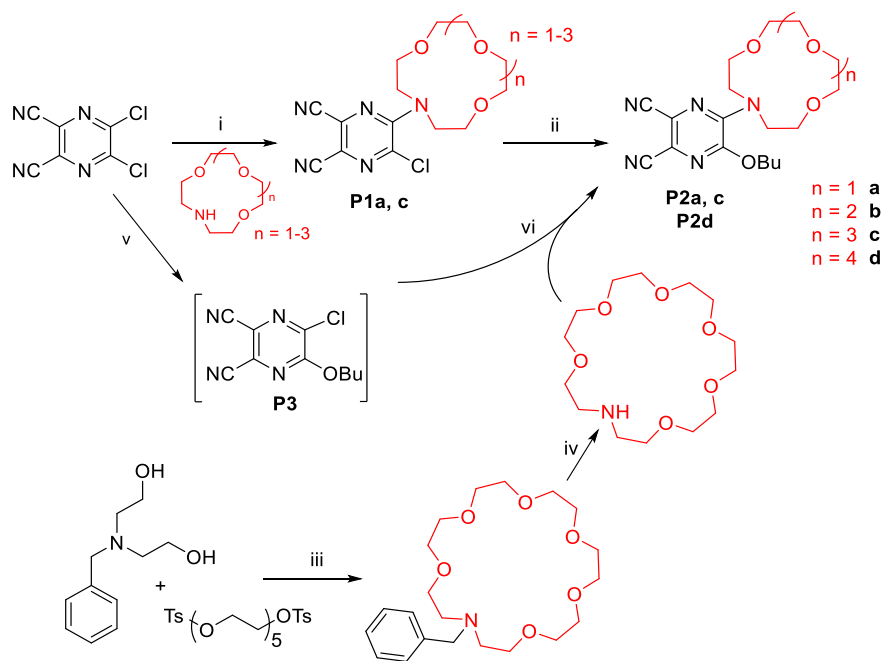


Schéma 1 Příprava prekurzorů: (i) bezvodý K_2CO_3 , THF, $-12\text{ }^\circ\text{C}$, 2 h; (ii) DBU, butanol, laboratorní teplota, 10 min – 1 h; (iii) *tert*-butanolát draselný, bezvodé THF, Argon, $40\text{ }^\circ\text{C}$, 2,5 h; (iv) 10 % Pd/C saturované H_2 , CH_3COOH , MeOH, laboratorní teplota, 12 h; (v) 1M NaOH, butanol, $-12\text{ }^\circ\text{C}$, 1 h; (vi) bezvodý K_2CO_3 , THF, laboratorní teplota, 1 h.

Všechny aza-crowny potřebné pro substituci byly komerčně dostupné s výjimkou 1-aza-21-crown-7, který bylo třeba připravit. Ačkoli příprava tohoto aza-crownu byla v literatuře již popsána,^[149-151] nepodařilo se nám ho připravit reakcí pentaethylglykol-di(*p*-toluensulfonátu) s *N*-benzyl-diethanolaminem a NaH jako bází^[151] ani jiným publikovaným postupem s CsCl, tetrabutylammonium-bromidem a 50 % vodným roztokem NaOH.^[150] 1-aza-21-crown-7 byl nakonec úspěšně připraven až reakcí pentaethylglykol-di(*p*-toluensulfonátu) a *N*-benzyl-diethanolaminu s přidavkem *tert*-butanolátu draselného jako báze (s výtěžkem 47 % po ochránění benzylové skupiny), podobně jako popisoval ve své publikaci Maeda a kolektiv.^[149] My jsme ale původní postup v naší práci upravili a nenechali tvořit *tert*-butanolát draselný *in situ*, ale přidali ho přímo do reakce (Schéma 1). Ochránění benzylové skupiny pak proběhlo dle publikovaného postupu redukcí 1-benzyl-1-aza-21-crown-7 vodíkem za katalýzy Pd/C.^[150]

Finální nesymetrické AzaPc **1a-dZn** byly připraveny statistickou kondenzací dvou rozdílných prekurzorů A (látka **P2a-d**) a B (látka **P4** s objemnými substituenty) v poměru 1:3 (A/B) dle *Linsteadovi metody* s butanolátem hořečnatým jako iniciátorem reakce (Schéma 2). Z dlouhodobých zkušeností naší výzkumné skupiny vyplynulo, že hořečnaté AzaPc kongenery se při sloupcové chromatografii zdržují na silikagelu, a tím je podstatně ztížena jejich izolace a purifikace.^[9] Proto Mg²⁺ byly z centra AzaPc odstraněny reakcí s kyselinou *p*-toluensulfonovou a požadovaný ABBB kongener byl izolován chromatografickými metodami v bezkovové formě (**1a-dH**). V posledním kroku přípravy byl do centra izolovaných nesymetrických AzaPc koordinován Zn²⁺ reakcí s octanem zinečnatým za vzniku cílových zinečnatých AzaPc **1a-dZn**.

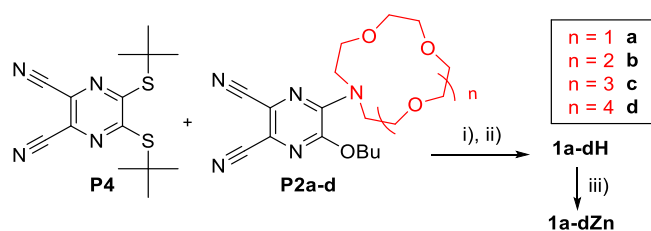
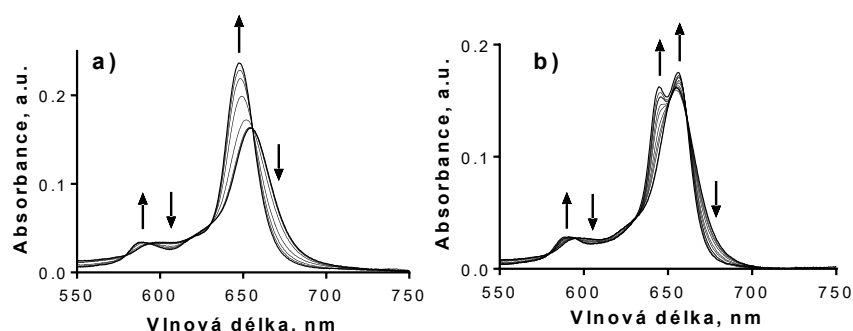


Schéma 2 Příprava cílových AzaPc senzorů: (i) Mg(BuO)₂, butanol při teplotě varu rozpouštědla; (ii) kyselina *p*-toluensulfonová, THF, laboratorní teplota; (iii) Zn(CH₃COO)₂, pyridin, teplota varu rozpouštědla.

Během studia sensorických vlastností připravených senzorů **1a-dZn** byl po přidavku kationtů alkalicích kovů (Li⁺, Na⁺, K⁺) zaznamenán hypso- a hyperchromický posun Q pásu absorpčního spektra u citlivého AzaPc senzoru. Tyto změny byly více prohloubeny při zvýšení interakce mezi senzorem a kationtem kovu při vyšších koncentracích analytu. K ještě

výraznějším změnám v absorpčních spektrech však docházelo po přidavcích kationtů kovů ze skupiny kovů alkalických zemin (Ca^{2+} , Ba^{2+} , Mg^{2+}). Už po prvním přidavku kationtu kovu jsme zaznamenali rozštěpení Q pásu doprovázeného jeho hypso- a hyperchromickým posunem (**Obr. 52**). Tento efekt si vysvětlujeme interakcí mezi kationtem kovu a periferním aminem (donorem), který nemůže nadále přispívat π -elektronovému systému makrocyclu svým volným elektronovým párem. Po vyhodnocení naměřených absorpčních spekter jsme vyvodili, že vazba kationtů kovů alkalických zemin je v porovnání s vazbou kationtů alkalických kovů mnohem silnější a to asi z důvodu vyššího náboje (1+ vs. 2+).

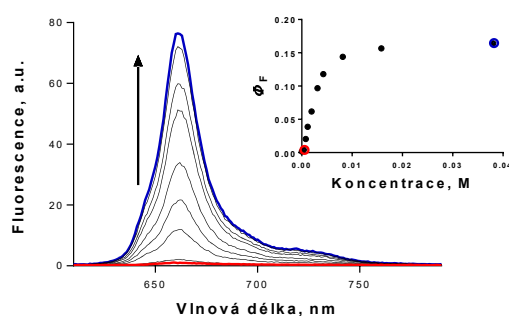


Obr. 52 Změny v absorpčních spektrech AzaPc **1bZn** sledované v průběhu titrace a) NaClO_4 (0 - 50 mM); b) $\text{Ca}(\text{ClO}_4)_2$ (0 - 70 mM) v MeCN.

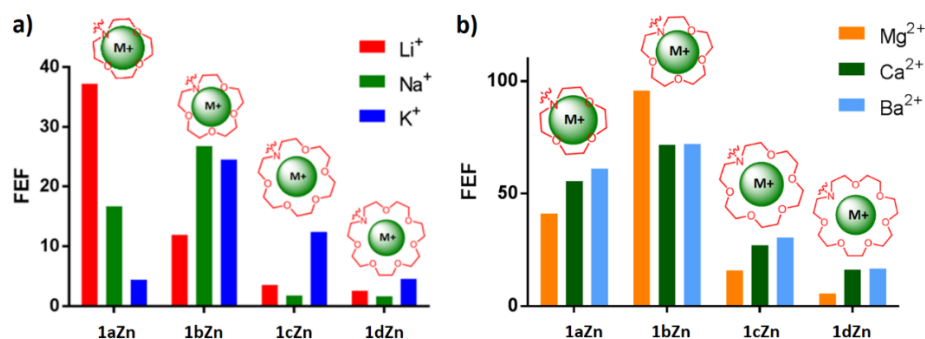
Popisovaný efekt byl současně pozorován i při měření fluorescenčních spekter, které navíc prokázaly souvislost mezi silou vazby analytu a selektivitou senzoru. Dle našeho očekávání jsme zjistili, že velikost kavity aza-crownu hraje roli ve skupině kationtů alkalických kovů (Li^+ , Na^+ , K^+), kde je selektivita jednoznačně dána velikostí kationtu a jemu odpovídající velikosti kavity aza-crownu. Např. AzaPc **1aZn** s 1-aza-12-crown-4 byl nejvíce citlivý k Li^+ , **1cZn** s 1-aza-18-crown-6 byl více selektivní k K^+ (FEF = 12,4) než k Li^+ a Na^+ (**Obr. 54**). Senzor **1dZn** s 1-aza-21-crown-7 měl špatné rozpoznávací vlastnosti, důvodem byla nejspíše vyšší flexibilita polyethylenglykolového řetězce způsobujícího nižší interakci s kationtem kovu nebo „natažení“ aza-crownu do konformace, kde jsou atomy kyslíku příliš blízko sebe, čímž je znemožněno navázání kationtu kovu. AzaPc **1bZn** byl srovnatelně citlivý k K^+ a Na^+ , tento výsledek byl očekáván a byl v souladu s výsledky z předešlého projektu.^[8]

Naproti tomu zajímavým a zcela nečekaným zjištěním byl fakt, že ve skupině kationtů kovů alkalických zemin (Ca^{2+} , Ba^{2+} , Mg^{2+}) nehraje velikost kationtu na selektivitu žádnou roli, navíc tyto analyty byly do rozpoznávacích center vázány výrazně vyšší silou než alkalické kovy. I

když je poloměr těchto kationtů přibližně srovnatelný v jednotlivých periodách s alkalickými kovy, jedná se o dvojmocné kationty, a s tím je spojena i jejich vyšší elektronová hustota. Tím si vysvětlujeme pevnější vazbu, a s tím spojené účinnější blokování ICT a vyšší hodnoty FEF (FEF až 100×) pozorované při našich titracích (**Obr. 53, 54 a Tab. 4**). Výjimku opět tvořil AzaPc **1dZn** s 1-aza-21-crown-7, v jehož případě byla opět potvrzena necitlivost ke kationtům kovů pravděpodobně z důvodu příliš velké a flexibilní kavity „největšího“ 1-aza-21-crown-7. Silnější komplexace kationtů kovů alkalických zemin byla potvrzena také výpočty hodnot $\Phi_{F(M^+)}$ a vazebných konstant K_D , které byly porovnány s hodnotami dosaženými u kationtů alkalických kovů srovnatelné velikosti. Příkladem ilustrujícím toto tvrzení může být senzor AzaPc **1cZn** citlivý k K^+ ($\Phi_{F(M^+)} = 0,074$, $K_D = 0,25$), jehož hodnoty $\Phi_{F(M^+)}$ a K_D byly při přidávcích Ba^{2+} ($\Phi_{F(M^+)} = 0,18$, $K_D = 0,0023$) z hlediska $\Phi_{F(M^+)}$ 2,4× vyšší a z hlediska hodnoty K_D o cca 2 řády nižší. Naměřené experimentální údaje (FEF, Φ_F , K_D) k senzorům **1a-dZn** pro titraci konkrétním analytem jsou uvedeny v **Tab. 4**.



Obr. 53 Nárůst fluorescence senzoru **1bZn** po přidávku $Ca(ClO_4)_2$. Ve výřezu uvedena závislost Φ_F na koncentraci přidaného kationtu.



Obr. 54 Nárůst fluorescence vyjádřený jako FEF senzorů **1a-dZn** po úplném navázání kationtů kovů a) ze skupiny alkalických kovů; b) ze skupiny kovů alkalických zemin titrace provedeny ve formě chloristanů nebo thiokyanátů (měřeno v MeCN).

Tab. 4 Spektrální a fluorescenční vlastnosti senzorů 1a-dZn v MeCN ^[a].

Senzor ^[b]	Analyt	$\lambda_{\text{abs}} (\log \epsilon) / \text{nm} (\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1})$	$\Phi_{\text{F}} (\lambda_{\text{em}})$	FEF	K_{D} / mM
1aZn	volný	656 (5,25)	0,0018 (662)	-	-
	+ LiClO ₄		0,067 (652)	37,2	64,31
	+ NaClO ₄		0,030 (654)	16,7	14,54
	+ KSCN		0,009 (656)	4,4	9,11
	+Mg(ClO ₄) ₂		0,074 (658)	41,1	5,50
	+Ca(ClO ₄) ₂		0,10 (660)	55,6	4,89
	+Ba(ClO ₄) ₂		0,11 (658)	61,1	1,08
1bZn	volný	655 (5,08)	0,0024 (662)	-	-
	+ LiClO ₄		0,029 (659)	11,9	0,17
	+ NaClO ₄		0,064 (656)	26,8	1,51
	+ KSCN		0,059 (658)	24,5	1,89
	+Mg(ClO ₄) ₂		0,23 (661)	95,8	0,38
	+Ca(ClO ₄) ₂		0,17 (661)	71,7	0,0050
	+Ba(ClO ₄) ₂		0,17 (659)	72,1	0,12
1cZn	volný	655 (5,20)	0,0059 (663)	-	-
	+ LiClO ₄		0,021 (661)	3,6	0,59
	+ NaClO ₄		0,011 (661)	1,8	[c]
	+ KSCN		0,074 (656)	12,4	0,25
	+Mg(ClO ₄) ₂		0,093 (659)	15,8	0,13
	+Ca(ClO ₄) ₂		0,16 (663)	27,1	0,0037
	+Ba(ClO ₄) ₂		0,18 (661)	30,5	0,0023
1dZn	volný	656 (5,14)	0,0011 (663)	-	-
	+ LiClO ₄		0,003 (664)	2,6	[c]
	+ NaClO ₄		0,002 (664)	1,6	[c]
	+ KSCN		0,005 (660)	4,6	[c]
	+Mg(ClO ₄) ₂		0,006 (662)	5,5	[c]
	+Ca(ClO ₄) ₂		0,018 (665)	16,2	0,0010
	+Ba(ClO ₄) ₂		0,018 (663)	16,6	0,0013

^[a] λ_{abs} (absorpční maximum Q pásu), ϵ (extinkční koeficient), Φ_{F} (kvantový výtěžek fluorescence), λ_{em} (emisní maximum)

^[b] $c_{(1a-dM)} = 1 \mu\text{M}$

^[c] hodnota nemohla být zjištěna (slabá vazba kationtu kovu).

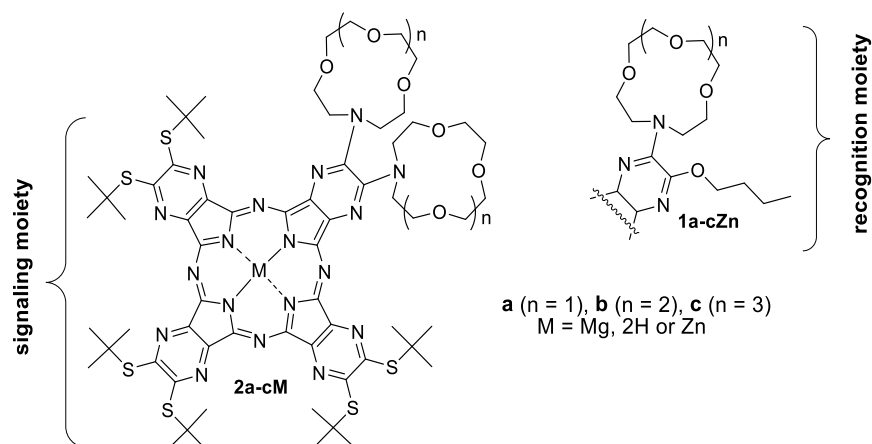
Závěrem lze shrnout, že tento projekt poskytuje důležité informace pro budoucí návrh nových AzaPc senzorů. Ověřili jsme hypotézu, že velikost aza-crownu opravdu hraje klíčovou roli v selektivním rozpoznávání kationtů alkalických kovů (Li^+ , Na^+ , K^+). Na druhou stranu, kationty kovů alkalických zemin se do centra aza-crownu vážou vlivem dvojmocného charakteru mnohem silněji, a proto velikost aza-crownu v tomto případě není faktorem ovlivňujícím selektivitu. Experimentální výsledek této práce je zároveň nejspíše vysvětlením, proč komerčně dostupné senzory pro rozpoznávání dvojmocných kationtů kovů nevyužívají jako rozpoznávací části aza-crowny ale jiné rozpoznávací skupiny. Například pro rozpoznávání Ca^{2+} se využívá skupina BAPTA (Calcium Green) nebo pro rozpoznání Mg^{2+} skupina APTRA (Magnesium Green).

7.1.2 Vliv rigidity rozpoznávací části AzaPc senzoru na vazbu analytu [P2]

Z projektu [P1] vyplynulo, že velikost aza-crownu není dostatečným strukturálním faktorem k zajištění selektivity senzoru k určitému analytu. Při studiu problematiky v odborné literatuře^[152-154] jsme došli k závěru, že vyšší rigidita rozpoznávacího centra je zásadním aspektem ovlivňujícím selektivní vazbu kationtu kovu do rozpoznávacího centra založeného na aza-crownu. A proto jsme přišli s myšlenkou připravit sérii AzaPc senzorů s vyšší rigiditou rozpoznávacího centra, které by bylo dosaženo substitucí AzaPc dvěma aza-crowny ve vzájemné *ortho* poloze ve specifickém uspořádání „tweezer“ (pinzeta) někdy také označovaného jako „sandwich“ nebo „clamshell“. Vzájemná blízká poloha aza-crownů umožňuje vytvoření pevné „kapsy“, a tím je podpořena stabilita vazby senzor/analyt. V sérii připravených senzorů jsme současně kombinovali i poznatky z [P1] a senzory tak nesly dva totožné aza-crowny s různou velikostí kavity: 1-aza-12-crown-4; 1-aza-15-crown-5 a 1-aza-18-crown-6 (**Obr. 55**). Tento projekt byl inovativní i z hlediska toho, že doposud nebyl popsán žádný fluorescenční senzor s aza-crowny, které by byly od sebe vzdálené méně než 4 vazby.^[155, 156]

Požadované prekurzory jsme připravili stejně jako v projektu [P1], avšak v nukleofilní substituci reagoval 5,6-dichlorpyrazin-2,3-dikarbonitril s aza-crownem příslušné velikosti pouze v jednom kroku za vzniku disubstituovaných prekurzorů **P5a-c** (Schéma 3). Při předběžných reakcích výchozí látky reagovaly při laboratorní teplotě, ale v reakční směsi vznikalo velké množství monosubstituovaného **P1a-c**, a úplné konverze na disubstituovaný produkt nebylo dosaženo ani při delších reakčních časech (několik dnů) nebo po přidání nadbytku příslušného aza-crownu. Proto se jako zcela zásadní projevilo zahřívání reakce při teplotě varu rozpouštědla pro umožnění kompletního zreagování výchozí látky 5,6-dichlorpyrazin-2,3-dikarbonitrilu na

disubstituovaný produkt **P5a-c** s dobrými výtěžky (55 – 83 %). Prekurzor **P4** byl připraven opět dle publikovaného postupu jako v [P1].^[121]



Obr. 55 Struktury připravených AzaPc senzorů **2a-cM** v rámci projektu [P2], pro porovnání zahrnutý i struktury **1a-cM** připravené v rámci předešlého projektu [P1].

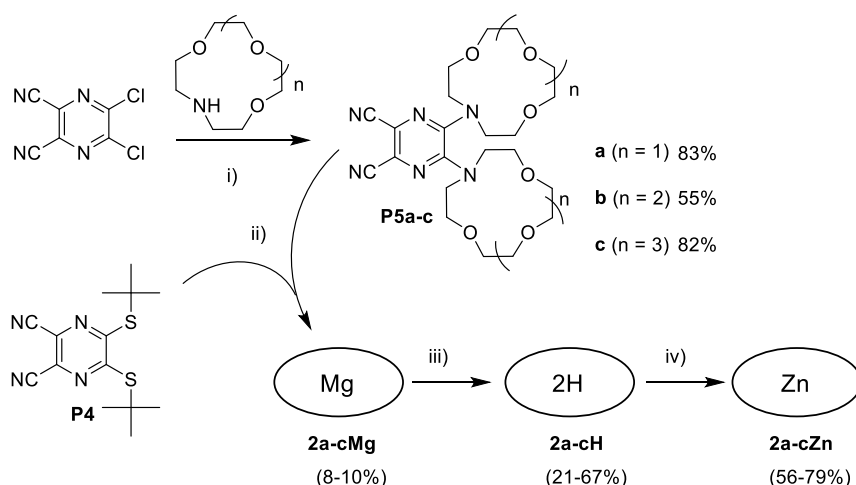


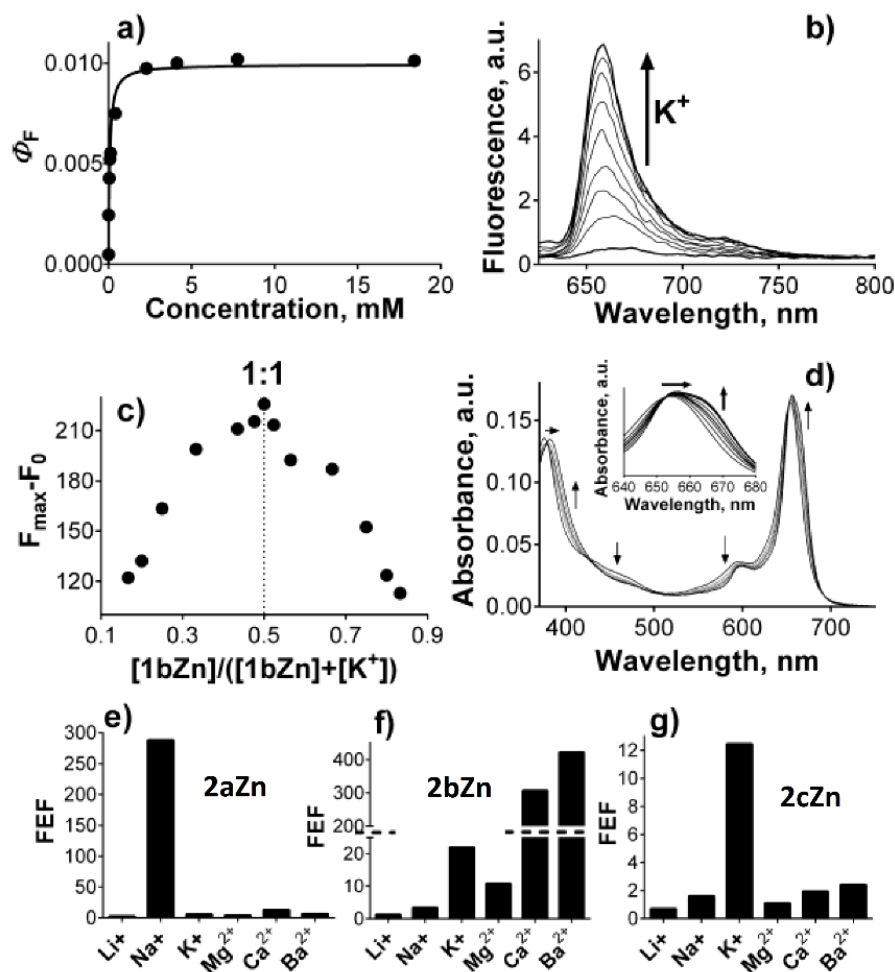
Schéma 3 Příprava prekurzorů a cílových AzaPc senzorů **2a-cZn** s uspořádáním rozpoznávací části typu „tweezer“: (i) bezvodý K_2CO_3 , THF, teplota varu rozpouštědla; (ii) $Mg(BuO)_2$, butanol, teplota varu rozpouštědla; (iii) kyselina *p*-toluensulfonová, THF, laboratorní teplota; (iv) $Zn(CH_3COO)_2$, pyridin, teplota varu rozpouštědla.

Navrhované AzaPc senzory **2a-cZn** byly pak připraveny statistickou kondenzací prekurzorů A (**P5a-c**) a B (**P4**) v poměru 1:3 (A/B) *Linsteadovou metodou* s butanolátem hořečnatým stejně jako v projektu [P1]. Odlišně byla provedena pouze izolace ABBB AzaPc kongeneru, která bývá rutinně provedena s AzaPc v bezkovové formě z důvodu minimalizace

zadržování na silikagelu. V tomto případě bylo ale možné ABBB kongener čistit sloupcovou chromatografií v hořčnaté formě díky velmi rozdílným R_f jednotlivých AzaPc kongenerů. Izolovaný nesymetrický AzaPc **2a-cMg** byl pak převeden reakcí s kyselinou *p*-toluensulfonovou na bezkovovou formu **2a-c2H**. A v závěrečném kroku přípravy byl do centra AzaPc **2a-c2H** koordinován Zn^{2+} reakcí s octanem zinečnatým za vzniku cílového zinečnatého AzaPc **2a-cZn** (Schéma 3).

Při přidavcích kationtů alkalických kovů a kovů alkalických zemin k sensorům jsme pozorovali jen malé změny v absorpčních spektrech související s interakcí mezi analytem a senzorem. Ve fluorescenčních spektrech byly však pozorovány mnohem výraznější nárůsty intenzit fluorescence vždy vázané citlivostí senzoru k určitému analytu, například u látky **2aZn** byla odhalena selektivita pouze k Na^+ , senzor **2bZn** rozpoznával K^+ , Ca^{2+} a Ba^{2+} avšak s rozdílnými K_A (Obr. 56), senzor **2cZn** byl selektivní pouze ke K^+ . Z popisovaných experimentálních výsledků vyplývá, že rigidní uspořádání rozpoznávací části „tweezer“ vedlo k podstatnému zlepšení selektivity sensorů v porovnání s předchozí sérií sensorů **1a-dZn**, kde se kationty kovů vázaly preferenčně dle velikosti kavity aza-crownu (s výjimkou kationtů kovů alkalických zemin), avšak s poměrně nízkou selektivitou. Uspořádání „tweezer“ nejspíše limituje počet kationtů, které mají vhodnou velikost pro vazbu do kavity rozpoznávací části. Velmi zajímavé bylo to, že senzory **2a-cZn** lépe rozpoznávaly větší kationty kovů, než byla odpovídající velikost kavity jejich aza-crownu, například **2aZn** vázal lépe Na^+ než Li^+ , nebo **2bZn** lépe rozpoznával K^+ než Na^+ .

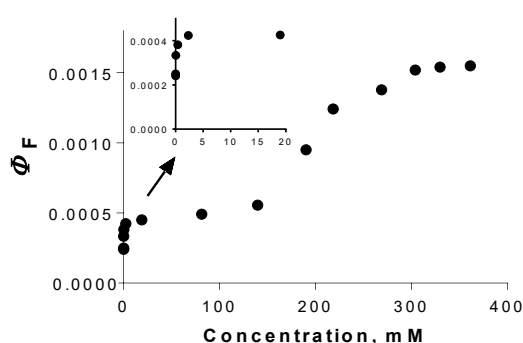
U připravených AzaPc **2a-cZn** jsme současně zaznamenali velmi účinné zhášení excitovaných stavů molekul procesem ICT ($\Phi_F < 0,001$) díky dvěma donorům na periférii makrocyclu. Toto zhášení zajišťovalo mnohem výraznější – méně fluorescentní OFF stavy v porovnání s příslušnými látkami pouze s jedním donorem z [P1]. Popisovaný výsledek byl námi očekáván jako jedna z výhod, která zajistila u celé série sensorů **2a-cZn** vyšší nárůsty fluorescence mezi OFF/ON stavy, v některých případech hodnota FEF přesahovala i hodnotu 100 (Obr. 56). Na druhou stranu efekt zhášení byl natolik účinný, že senzory nebylo možné „úplně“ přepnout do ON stavu po přidavku citlivého analytu, což se projevilo nízkými hodnotami kvantových výtěžků fluorescence sensorů v přítomnosti analytů ($\Phi_{F(M^+)} < 0,067$) a tím i nízkou svítivostí senzoru. Tato pozorovaná nevýhoda byla způsobena nutností blokovat obě donorová centra pro ICT tak, aby nedocházelo k částečnému (či úplnému!) zhášení molekuly při blokování pouze jednoho ze dvou donorových center.



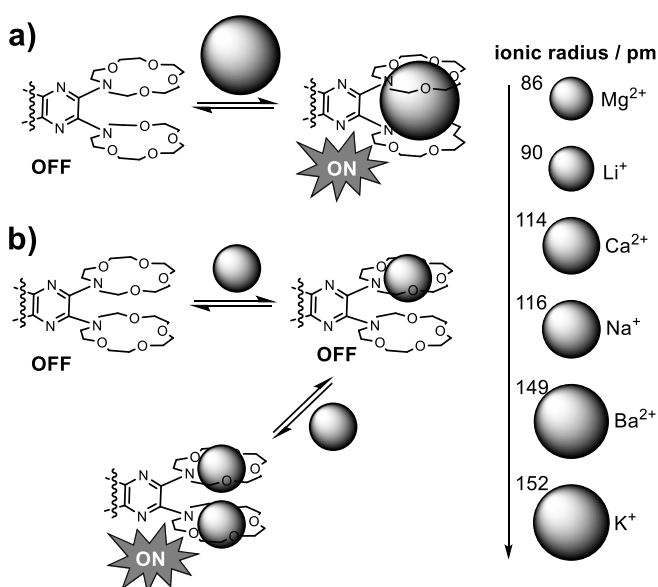
Obr. 56 Sensorické vlastnosti v THF. a) závislost ϕ_F senzoru **2bZn** na koncentraci K^+ . b) Fluorescenční spektra **2bZn** ($1 \mu M$) během titrace K^+ . c) Jobova metoda pro studium interakce **2bZn** a K^+ ($c_{(K+ 2bZn)} = 10 \mu M$). d) Absorpční spektra **2bZn** ($1 \mu M$) během titrace K^+ . FEF pro senzor **2aZn** (e), **2bZn** (f), **2cZn** (g) pro různé kationty kovů.

Z titračních experimentů dále vyplynulo, že vazba iontů do rozpoznávacího centra senzoru je zcela odlišná pokud porovnáme předchozí sérii látek **1a-dZn** a látky s uspořádáním „tweezer“ **2a-cZn**. V případě látek **1a-dZn** měla titrační křivka pouze jednu fázi. Avšak v případě senzorů **2a-cZn** byly často pozorovány bifazické titrační křivky (**Obr. 57**). Teoreticky je možné, že dva kationty mohou být koordinovány do centra obou aza-crownů současně (stechiometrie 1:2 senzor/analyt) nebo jeden kationt se může koordinačně vázat mezi dva aza-crowny (stechiometrie 1:1 senzor/analyt) (**Obr. 58**). V prvním případě je nutné, aby se oba kationty koordinovány do centra aza-crownu současně pro přepnutí senzoru do ON stavu, protože i jedno volné donorové centrum je stále schopno účinně zhaset excitované stavy molekuly. Dvě fáze

titrační křivky byly pozorovány po přidávání kationtů s velikostí ideální pro vazbu do kavity aza-crownu nebo s velikostí menší než byly velikosti kavity aza-crownu. V souladu s naším teoretickým vysvětlením, v první fázi křivky byla vazba kationtu doprovázena pouze malým nárůstem fluorescence 1,3 – 1,8× avšak vysokými hodnotami K_A . Druhá fáze titrace byla uskutečněna při vyšších koncentracích analytu (200 – 400 mM) s K_A hodnotami nižšími než 10 M^{-1} . Například Na^+ se vázal v první fázi titrace do centra senzoru **2aZn** s poměrně vysokou K_A ($21\,000 \text{ M}^{-1}$) a středně vysokým nárůstem fluorescence 7,7×, se zvýšením koncentrace Na^+ se ale nejspíše změnil charakter vazby a byla preferována vazba dvou kationtů Na^+ zvláště do každého aza-crownu s vysokým celkovým nárůstem fluorescence 291×.



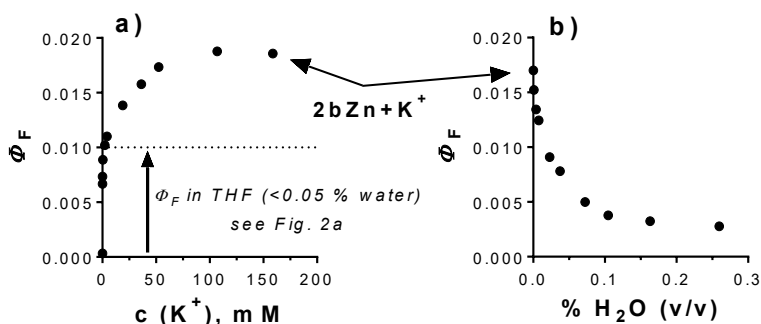
Obr. 57 Příklad titrační křivky se dvěma fázemi (závislost Φ_F senzoru **2bZn** na koncentraci Na^+) měřeno v THF.



Obr. 58 Předpokládané modely vazby kationtů kovů do rozpoznávacího centra typu „tweezer“ s příloženými iontovými poloměry pro jednotlivé kationty. a) stechiometrie vazby 1:1 (senzor/analyt). b) stechiometrie vazby 1:2 (senzor/analyt).

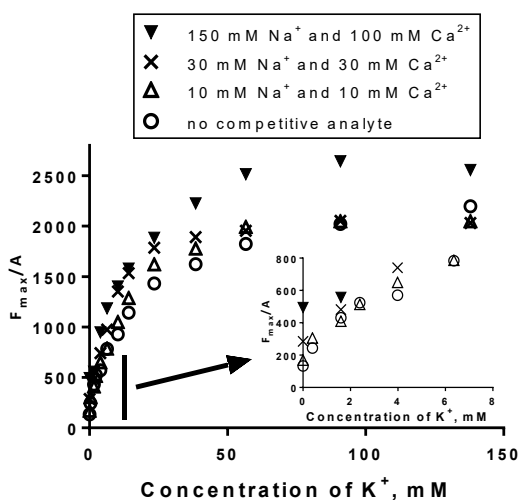
Popsaný typ vazby s bifazickou křivkou nebyl ale pro všechny analyty stejný, výjimku tvořily větší kationty kovu, než byla velikost příslušného aza-crownu senzoru (např. **2bZn**/ K^+ ; **2bZn**/ Ba^{2+}). V tomto případě se vazba analytu projevila okamžitým vysokým nárůstem fluorescence 22 – 413× a titrační křivkou s jednou fází. Toto chování je nejspíše způsobeno účinným blokováním obou donorů pro ICT „vmezežením“ většího kationtu mezi oba dva aza-crowny. Naše vysvětlení bylo současně doloženo studiem stechiometrie vazby senzor/analyt pomocí Jobovy metody, kdy jsme u „větších“ kationtů kovů našli stechiometrii vazby 1:1 pro senzor/analyt.

Mimo struktury senzoru je za jeden z nejvýznamnějších faktorů ovlivňujících vazbu senzoru a analytu považovaný efekt rozpouštědla.^[157] Velikost kationtu kovu se může zvětšit vlivem solvatace, a tím se může změnit i vhodná velikost aza-crownu preferovaného pro koordinaci. Navíc vlivem rozpouštědla může také docházet k různým změnám v konformaci aza-crownu. Efekty dané solvatací lze jednoduše odhadovat z Gutmannových donorových čísel,^[158] kde vyšší hodnota indikuje vyšší solvataci. Například voda (18), MeOH (19) a THF (20) mají silný solvatační efekt, naproti tomu běžná organická rozpouštědla mají tento efekt nižší MeCN (14,1), benzonitril (11,9), dichlormethan (1,0).^[159] Z literatury^[160] jsme dále zjistili, že voda může výrazně snižovat stabilitu vazby senzor/analyt, proto jsme se rozhodli tento efekt prostudovat také u našeho senzoru **2bZn**. Zjistili jsme, že i stopová množství vody vedou k výraznému poklesu kvantových výtěžků fluorescence během přidavků citlivého analytu (**Obr. 59**) a že ačkoli Gutmannovo donorové číslo je srovnatelné pro THF a vodu, THF jako rozpouštědlo nemůže simulovat vodné prostředí a my pro zamýšlenou biologickou aplikaci musíme zajistit, aby AzaPc senzory pracovaly ve vodě.



Obr. 59 Vliv vody na kvantové výtěžky fluorescence u **2bZn** titrovaného K^+ . a) Titrace **2bZn** rozpuštěného v bezvodém THF s přidavky KSCN rozpuštěného v bezvodém MeOH. b) Postupné přidavky vody k roztoku **2bZn** v bezvodém THF obsahujícím přidavem KSCN v bezvodém MeOH.

Na základě výše popsaného jsme se rozhodli použít **2bZn** jako modelový senzor pro přípravu křemičitých **2bZn@NP** a ověřit, zda je možné sensorické vlastnosti testované v prostředí organických rozpouštědel extrapolovat na vodné prostředí. Během fluorescenčních titrací **2bZn@NP** různými kationty alkalických kovů a kovů alkalických zemin byly pozorovány téměř stejné závislosti jako v prostředí organických rozpouštědel. Senzor **2bZn@NP** byl citlivý k K^+ s nárůstem fluorescence $17\times$ ($K_A = 82 \text{ M}^{-1}$) a necitlivý k Na^+ , Li^+ , Mg^{2+} . Přídavky Ca^{2+} a Ba^{2+} se projevíly nárůstem fluorescence avšak při koncentracích o několik řádů vyšších než je biologicky relevantní koncentrace. To bylo dále potvrzeno titrací **2bZn@NP** K^+ v přítomnosti Na^+ a Ca^{2+} při jejich fyziologických, resp. suprafyziologických koncentracích. Přítomnost kompetitivních iontů neměla vliv na průběh titrační křivky (**Obr. 60**) a senzor **2bZn@NP** vykázal uspokojivý nárůst fluorescence ($5\times$) i při suprafyziologických koncentracích Na^+ (150 mM) a Ca^{2+} (100 mM).^[2] Sensorické vlastnosti byly více než srovnatelné se dvěma nejčastěji využívanými komerčně dostupnými senzory PBF1 (FEF = 3,0; $K_A = 200 \text{ M}^{-1}$; $\lambda_{EM} = 557 \text{ nm}$) a CD222 (FEF = 3,7; $K_A = 1110 \text{ M}^{-1}$; $\lambda_{EM} = 480 \text{ nm}$) pro detekci K^+ ve vodě.^[2] **2bZn@NP** však nabízí vyšší FEF = 17 a mnohem výhodnější červenou oblast emise $\lambda_{EM} = 671 \text{ nm}$ pro využití v biologické aplikaci.



Obr. 60 Titrace **2bZn@NP** K^+ ve směsi voda/kyselina octová 3:1 v přítomnosti různých koncentrací Na^+ a Ca^{2+} .

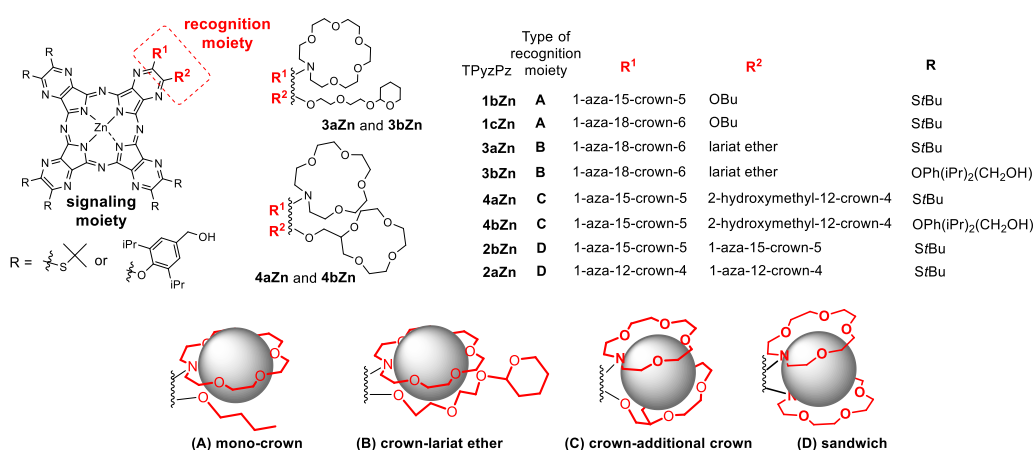
Závěrem lze shrnout, že v rámci tohoto projektu byly připraveny AzaPc senzory **2a-cZn** s vyšší rigiditou rozpoznávacího centra díky dvěma aza-crownům v uspořádání „tweezer“. Tímto byla podstatně zvýšena selektivita a citlivost senzorů v porovnání se sérií senzorů připravených v předešlé studii [P1]. Nejlepší látkou série byl senzor **2bZn**, který byl citlivý k K^+ s vysokou K_A

(14 000 M⁻¹) a nárůstem fluorescence 22×. Ze senzoru **2bZn** byly dále připraveny **2bZn@NP** a senzorké vlastnosti byly potvrzeny také ve vodném prostředí.

Hlavní nevýhodou této série senzorů **2a-cZn** a oblastí, kterou je nutné zlepšit v další výzkumné práci, jsou nízké kvantové výtěžky fluorescence v ON stavech senzorů, které nepřesáhly hodnotu 0,067 v případě citlivého analytu a byly způsobené nutností blokovat obě donorová centra pro ICT.

7.1.3 Porovnání rozpoznávacích částí AzaPc senzorů [P3]

V projektu [P2] jsme experimentálně dokázali, že zvýšení rigidity rozpoznávacího centra má vliv na selektivní vazbu analytu. Připravené senzory **2a-cZn** byly vysoce selektivní k určitému analytu, ale jejich velkou nevýhodou byly velmi nízké hodnoty kvantových výtěžků fluorescence v ON stavech, které omezovali budoucí využití senzorů kvůli jejich nízké svítivosti. Proto jsme navrhli „nové“ AzaPc senzory **3a-bZn** a **4a-bZn** (Obr. 61) s jedním donorovým centrem a zvýšenou rigiditou podobně jako u senzorů s uspořádáním rozpoznávací části typu „tweezer“.



Obr. 61 Struktury AzaPc senzorů zapojených do studie. Čtyři typy uspořádání rozpoznávacích částí (A) mono-aza-crown; (B) kombinace aza-crownu s lariat etherem; (C) kombinace aza-crownu s dalším crownem a (D) dva aza-crowny v uspořádání „tweezer“.

U senzorů **3a-bZn** je rozpoznávací část tvořena 1-aza-18-crown-6 s vhodnou velikostí kavity pro koordinaci K⁺ do centra aza-crownu a s rigiditou posílenou lariat etherem v *ortho* poloze, který by byl po navázání analytu schopen kationt kovu „obejmout“, a tím vazbu sensor/analyt stabilizovat. U **4a-bZn** rozpoznávací centrum tvoří menší 1-aza-15-crown-5 s dalším přidavným 2-hydroxymethyl-12-crown-4 v *ortho* poloze pro zvýšení rigidity vazby.

V tomto návrhu byl předpokládán odlišný charakter vazby K^+ mezi oba crowny, které by svíraly kationt kovu nahoře a dole jako „čepička“. Sensory **3aZn** a **4aZn** mají na periférii navázané objemné substituenty bránící nežádoucí agregaci tvořené šesti *tert*-butylsulnalovými skupinami. V případě senzorů **3bZn** a **4bZn** jsou objemné části tvořeny šesti hydrofilnějšími 4-(hydroxymethyl)-2,6-diisopropylfenylovými skupinami, které by umožňovaly imobilizaci senzoru na fólii a budoucí přípravu senzorického zařízení.

Nejprve jako v předešlých projektech [P1] a [P2] bylo třeba připravit příslušné prekurzory (Schéma 4) pro cyklizační reakci, kterou by byly následně připraveny nové AzaPc senzory **3a-bZn** a **4a-bZn**. Meziprodukty reakcí **P1b** a **P1c** byly připraveny nukleofilní substitucí 5,6-dichlorpyrazin-2,3-dikarbonitrilu s aza-crownem příslušné velikosti, jak bylo popsáno v práci [P1]. **P1c** poté reagoval s 2,2'-oxydiethan-1-olem a NaOH jako bází za vzniku meziprojektu **P6** (výtěžek 79 %). Čistění meziprojektu **P6** bylo provedeno přímo sloupcovou chromatografií bez předchozího vytřepávání z důvodu zvýšené hydrofility meziprojektu, a tím i obtížného přecházení do organické vrstvy ve směsi ethylacetát/voda. Nakonec byla ochráněna terminální hydroxylová skupina prekurzoru **P6** reakcí s 3,4-dihydro-2*H*-pyranem za vzniku prekurzoru **P7** (výtěžek 55 %). Při přípravě prekurzoru **P9** nukleofilní substitucí intermediátu **P1b** s 2-hydroxymethyl-12-crown-4 a NaOH jako bází všechny pokusy selhaly – TLC analýza prokázala vznik mnoha vedlejších produktů nebo možný rozklad produktu reakce. Proto jsme k přípravě **P9** museli přistoupit obráceně a nejprve připravit mono-substituovaný meziprojekt **P8** nukleofilní substitucí 5,6-dichlorpyrazin-2,3-dikarbonitrilu s 2-hydroxymethyl-12-crown-4, kde po vyzkoušení několika bází (NaOH, K_2CO_3 , triethylamin) se jako nejlepší osvědčil triethylamin poskytující nejvyšší výtěžky (59 %).

Symetrické prekurzory **P4** a **P11** byly připraveny (Schéma 4) v jednom kroku nukleofilní substitucí 5,6-dichlorpyrazin-2,3-dikarbonitrilu a *tert*-butylthiolátu^[121] nebo 4-(hydroxymethyl)-2,6-diisopropylfenolátu (**P10**) s NaOH jako bází (výtěžky **P4** 77 % a **P11** 98 %). Příslušný fenolát pro přípravu **P11** bylo nutné nejprve připravit redukcí 4-hydroxy-3,5-diisopropylbenzaldehydu pomocí $NaBH_4$ v MeOH (výtěžek 94 %). Pokus o přípravu prekurzoru **P11** opačným postupem, kdy reagoval nukleofilní substitucí 5,6-dichlorpyrazin-2,3-dikarbonitril s 4-hydroxy-3,5-diisopropylbenzaldehydem, a poté následovala redukce $NaBH_4$ na pyrazinovém derivátu, byl také úspěšný ale s nižšími výtěžky (67 % pro nukleofilní substituci a 60 % pro redukcí).

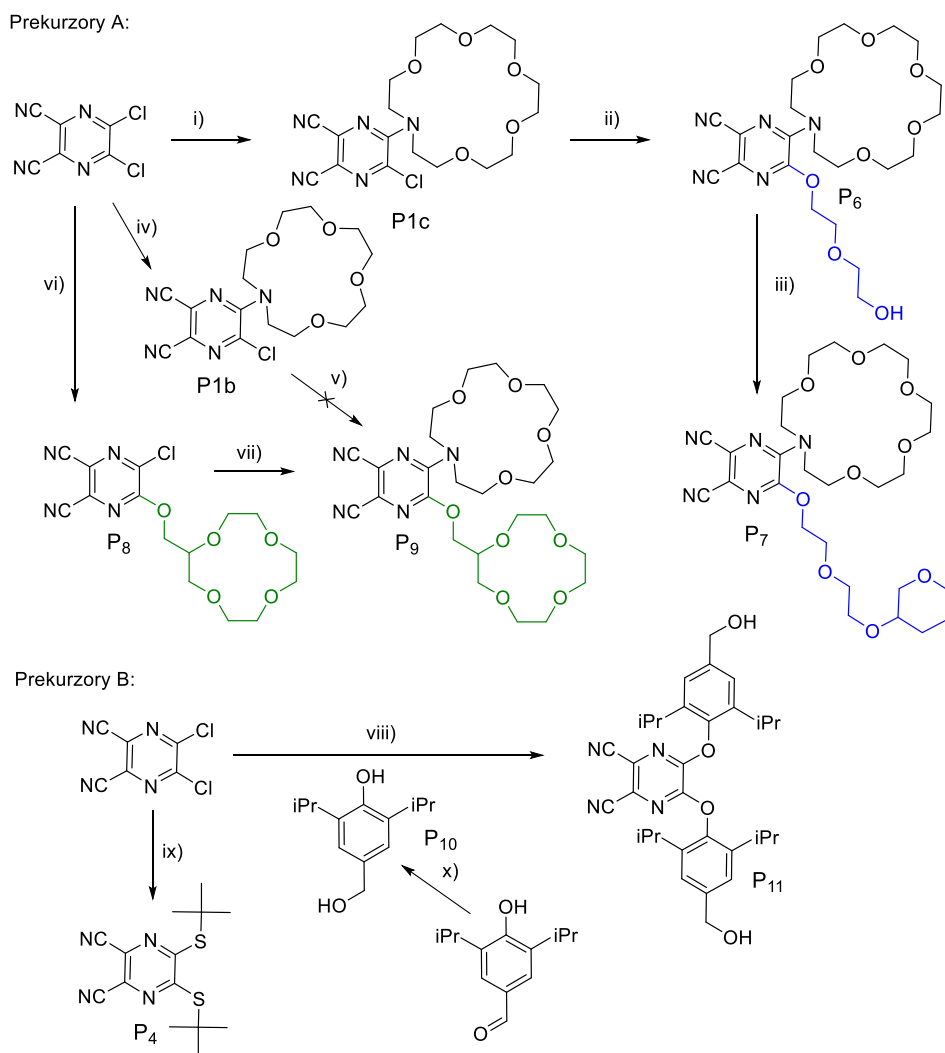


Schéma 4 Příprava prekurzorů A a B pro AzaPc senzory: (i) 1-aza-18-crown-6, bezvodý K_2CO_3 , THF, $-12\text{ }^\circ\text{C}$, 2 h; (ii) 2,2'-oxydiethan-1-ol, NaOH, THF/voda, laboratorní teplota, 1 h; (iii) 3,4-dihydro-2H-pyran, pyridinium *p*-toluensulfonát, chloroform, teplota varu rozpouštědla, 4 h; (iv) 1-aza-15-crown-5, bezvodý K_2CO_3 , THF, $-12\text{ }^\circ\text{C}$, 3 h; (v) 2-hydroxymethyl-12-crown-4, NaOH, THF/voda, laboratorní teplota, 90 min; (vi) 2-hydroxymethyl-12-crown-4, triethylamin, THF, laboratorní teplota, 2,5 h; (vii) 1-aza-15-crown-5, K_2CO_3 , THF, laboratorní teplota, 3 h; (viii) NaOH, THF/voda, laboratorní teplota, 1 h; (ix) *tert*-butylthiol, NaOH, THF/voda, laboratorní teplota; (x) 4-hydroxy-3,5-diisopropylbenzaldehyd, $NaBH_4$, MeOH, laboratorní teplota, 30 min.

Pro přípravu senzorů **3a-bZn** a **4a-bZn** nebyl možný postup přípravy Linsteadovou metodou^[161] jako v [P1] a [P2] kvůli nestabilitě alkyloxy skupiny prekurzorů **P7** a **P9** a vysoce pravděpodobné výměně těchto substituentů za butoxy skupiny rozpouštědla (butanol), jak bylo podobně dříve popsáno naší skupinou.^[162] Proto byla pro přípravu senzorů **3a-bZn** a **4a-bZn**

zvolena templátová metoda, která je v kapitole 5.1.2 uvedena jako další z možných přístupů v přípravě AzaPc a v tomto konkrétním je i šetrnější volbou. Nesymetrický prekurzor **P7** nebo **P9** reagoval s příslušným symetrickým prekurzorem (**P4** nebo **P11**) opět v poměru 1:3, reakce však probíhala v přítomnosti octanu zinečnatého a výševroucího rozpouštědla (pyridin). Izolace zinečnatého kongeneru ABBB je vždy velmi obtížná, proto prekurzory **P7**, **P8** byly navrženy tak, aby měly více hydrofilní charakter ve srovnání s prekurzory **P4** a **P11**, a tím byla umožněna snadnější izolace díky rozdílným R_f . Výtěžky této reakce byly poměrně nízké (5 – 9 %) z důvodu již zmíněné obtížnější separace při čištění sloupcovou chromatografií a nutností opakování několika cyklů čištění. V závěru je ale nutné uvést, že výtěžky reakcí i tak byly srovnatelné s celkovými výtěžky tří-krokové přípravy AzaPc Linsteadovou metodou, což není vůbec špatný výsledek.

Senzorické vlastnosti připravených senzorů **3aZn** a **4aZn** jsme poté studovali fluorescenčními titracemi kationty alkalických kovů, kovů alkalických zemin a NH_4^+ (ve formě triflátů) a srovnaly je s látkami připravenými dříve v [P1] a [P2]. Nejprve jsme se zaměřili na prozkoumání vlivu různé rigidity rozpoznávací části senzorů a pro toto studium vybrali látky **1cZn**, **3aZn**, **4aZn** a **2bZn** s očekávanou citlivostí k K^+ . Senzor **1cZn** s nejjednodušší rozpoznávací částí typu mono aza-crown rozeznával K^+ s nízkou K_A ($K_A = 0,25 \text{ M}^{-1}$; FEF = 4) a byl o něco více citlivý k jiným kationtům kovů (Ca^{2+} s $K_A = 1,5 \text{ M}^{-1}$ a Ba^{2+} s $K_A = 1,4 \text{ M}^{-1}$). Nové senzory **3aZn** a **4aZn**, kde vazba analytu je podpořena lariat etherem nebo dalším crownem v *ortho* pozici, měly navzájem srovnatelné vlastnosti. Ve srovnání s AzaPc **1cZn** se jejich citlivost k K^+ zvýšila pouze nepatrně (**3aZn** $K_A = 0,49 \text{ M}^{-1}$ a **4aZn** $K_A = 0,63 \text{ M}^{-1}$), avšak s dvakrát vyšším nárůstem fluorescence mezi OFF/ON stavem (**3aZn** FEF = 7,4; **4aZn** FEF = 7,9). Dalším důkazem účinného blokování ICT silnou vazbou analytu byla v tomto případě naměřená vyšší hodnota $\Phi_{F(M^+)}$ (0,1) v ON stavu. **3aZn** a **4aZn** se ukázaly mimo to také jako skvělé senzory pro rozpoznávání Ba^{2+} (**3aZn** $K_A = 11$; FEF = 21 a **4aZn** $K_A = 1,2$; FEF = 13) s vysokými kvantovými výtěžky fluorescence v ON stavu ($\Phi_F > 0,20$) a výhodnou necitlivostí k Ca^{2+} . U senzoru **2bZn** s rozpoznávacím centrem typu „tweezer“, tedy dvěma donorovými centry, velmi silný efekt ICT nedovolil po přidavku K^+ úplné přepnutí senzoru do ON stavu. **2bZn** sice dosáhl nejvyššího nárůstu fluorescence po přidavku K^+ (FEF = 14), ale kvantový výtěžek fluorescence v ON stavu byl velmi nízký ($\Phi_F = 0,0055$). Z tohoto pohledu nově připravené senzory **3aZn** a **4aZn** s obdobnou rigiditou rozpoznávacího centra a jedním donorovým centrem jsou dobrou alternativou pro detekci K^+ případně Ba^{2+} kationtů.

Z hlediska přípravy senzorických zařízení je důležité, aby indikátory byly dostatečně lipofilní z hlediska pevného ukotvení v matici a zábraně „vytečení“ indikátoru z matrice do vodného roztoku. Na druhé straně příliš lipofilní látky trpí sklonem k nežádoucí agregaci. Proto

jsme připravili hydrofilnější senzory **3bZn** a **4bZn**, které měly identickou rozpoznávací část s **3aZn** a **4aZn**, a experimentálně dokázali, že vykazují i plně srovnatelné sensorické vlastnosti. Naměřené experimentální údaje (Φ_F , FEF, K_A) k senzorům **1cZn**, **3a-bZn**, **4a-bZn** a **2bZn** pro titraci konkrétním analytem jsou uvedeny v **Tab. 5**.

Tab. 5 Sensorické vlastnosti studovaných senzorů v THF (analyty ve formě triflátů)^[a].

		1cZn	3aZn	3bZn	4aZn	4bZn	2bZn
Volná forma	$\Phi_F^{[b]}$	0.011	0.012	0.014	0.017	0.010	0.00039
	λ_{max}	654	654	637	653	637	654
	ϵ	165 000	183 000	183 000	142 000	128 000	158 000
	F_{max}	667	667	643	666	646	670
Na ⁺	$\Phi_F^{[b]}$	0.015	0.013	0.027	0.035	0.021	0.0013
	FEF	1.4	1.1	1.9	2.0	2.1	3.3
	$K_A^{[c]}$	-	-	-	-	-	-
K ⁺	$\Phi_F^{[b]}$	0.044	0.092	0.086	0.14	0.090	0.0055
	FEF	4.0	7.4	6.0	7.9	8.9	14
	$K_A^{[c]}$	0.25	0.49	2.9	0.63	3.0	XXX
Li ⁺	$\Phi_F^{[b]}$	0.011	0.012	0.013	0.017	0.0081	0.00040
	FEF	1.0	1.0	0.9	1.0	0.8	1.0
	$K_A^{[c]}$	-	-	-	-	-	-
NH ₄ ⁺	$\Phi_F^{[b]}$	0.011	0.029	0.023	0.016	0.0095	0.00035
	FEF	1.0	2.3	1.6	0.9	0.9	0.9
	$K_A^{[c]}$	-	-	-	-	-	-
Ca ²⁺	$\Phi_F^{[b]}$	0.048	0.042	0.018	0.016	0.0095	0.0022
	FEF	4.4	3.4	1.2	1.0	0.9	5.5
	$K_A^{[c]}$	1.5	-	-	-	-	-
Ba ²⁺	$\Phi_F^{[b]}$	0.23	0.26	0.21	0.21	0.18	0.17
	FEF	22	21	15	13	18	439
	$K_A^{[c]}$	1.4	11	53	1.2	17	0.06
Mg ²⁺	$\Phi_F^{[b]}$	0.011	0.021	0.012	0.015	0.028	0.0079
	FEF	1.0	1.7	0.9	0.9	2.8	20
	$K_A^{[c]}$	-	-	-	-	-	-

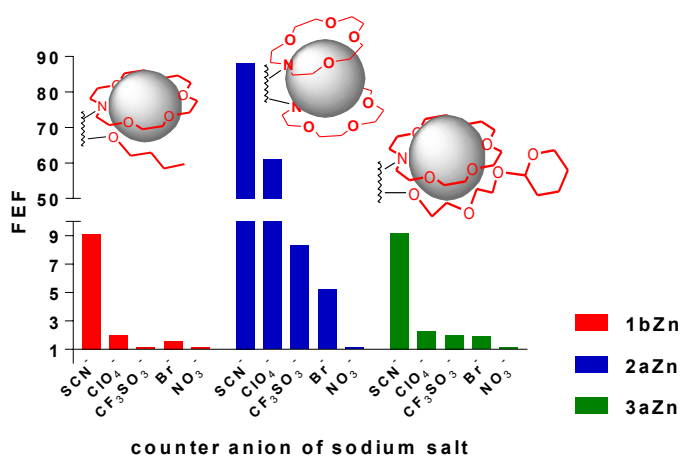
^[a] λ_{max} – absorpční maximum Q pásu (nm), ϵ – molární absorpční koeficient ($\text{mol}^{-1}\text{dm}^{-3}\text{cm}^{-1}$), F_{max} – poloha maxima fluorescence (nm)

^[b] jako referenční látka byl použit ZnPc ($\Phi_F = 0,32$ v THF).

^[c] K_A (M^{-1}) bylo stanoveno z Φ_F .

V dalším kroku naší studie jsme pro demonstraci možné biologické aplikace připravili ze senzoru **3aZn** křemičité NP (**3aZn@NP**) a sensorické vlastnosti ověřili také ve vodě. Senzor **3aZn@NP** byl selektivní pouze k Ba^{2+} a K^+ , tak jako tomu bylo při studiu v prostředí organického rozpouštědla, avšak dosažení plateau senzoru nebylo možné v případě ani jednoho kationtu z důvodu nutné vyšší koncentrace soli, které nebylo možné dosáhnout kvůli omezené rozpustnosti obou solí ve vodě.

Následujícím cílem našeho projektu bylo detailní prozkoumání role aniontu soli na rozpoznávání kationtu kovu. Pro potřeby studie jsme zvolili rozdílné Na^+ soli (slabě koordinující: SCN^- , CF_3SO_3^- , ClO_4^- ; středně koordinující: Br^- a silně koordinující anionty: NO_3^-) z důvodu jejich vyšší rozpustnosti v porovnání s K^+ solemi. Současně jsme zapojili do studie vhodné senzory, s rozdílnou rigiditou rozpoznávací části a předpokládanou preferenční citlivostí k Na^+ (**1bZn**, **2aZn**) nebo jen částečnou schopností rozpoznávat Na^+ (**4aZn**). Dle našeho očekávání byly po přidavcích analytů pozorovány signifikantní změny u různých typů Na^+ solí. Například NaNO_3 nezpůsobil po přidavku žádný nárůst fluorescence u všech senzorů ($\text{FEF} = 1$), zatímco přidavek NaSCN vedl k signifikantním nárůstům fluorescence: **1bZn** ($\text{FEF} = 9,1$), **2aZn** ($\text{FEF} = 9,2$), nejvíce markantní nárůst byl zaznamenán u látky s rozpoznávací částí typu „tweezer“ **4aZn** se selektivitou k Na^+ ($\text{FEF} = 88,2$). Velmi zajímavým zjištěním bylo, že citlivost senzorů stoupala v řadě solí $\text{NO}_3^- < \text{Br}^- < \text{CF}_3\text{SO}_3^- < \text{ClO}_4^- \ll \text{SCN}^-$ (**Obr. 62**). Dle studia v literatuře se následně ukázalo, že experimentálně získaná závislost kopíruje závislost iontů se schopností štěpit vodíkové vazby tzv. *Hofmeisterovu řadu*.^[163] Z výše uvedeného vyplývá, že také aniont soli použité při titraci může signifikantně ovlivňovat vazbu analytu do rozpoznávací části senzoru, a proto na něj musí být brán zřetel především při porovnávání výsledků publikovaných v různých článcích.

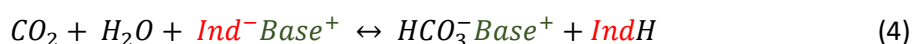


Obr. 62 Role aniontu soli na rozpoznávání analytu (různé typy sodných solí).

V rámci tohoto projektu byly tedy připraveny „nové“ AzaPc senzory **3a-bZn** a **4a-bZn** s jedním donorem pro ICT a zvýšenou rigiditou podobně jako u senzorů typu „tweezer“ tentokrát docílenou lariat etherem nebo dalším crownem v blízkosti rozpoznávací části. **3a-bZn** a **4a-bZn** senzory měly zachovanou citlivost k K^+ případně Ba^{2+} iontům, ale současně odstranily díky pouze jednomu donorovému centru hlavní nevýhodu senzorů z [P2] a vykazovaly vysoké kvantové výtěžky fluorescence ($\Phi_{F(M^+)}$ > 0,20) v ON stavu. Možné využití v biologické aplikaci bylo demonstrováno přípravou **3aZn@NP** a experimentálním ověřením senzoričských vlastností ve vodě. Ve druhé části studia jsme popsaly silný vliv aniontu soli na citlivost rozpoznávání analytu aza-crowny. Objevili jsme, že citlivost ke kationtu soli roste v řadě aniontů $NO_3^- < Br^- < CF_3SO_3^- < ClO_4^- \ll SCN^-$, a proto při studiu senzoričských vlastností musí být věnována pozornost nejen citlivosti ke kationtu kovu, ale také k typu soli použité při titraci.

7.2 Vývoj a studium nových CO₂ senzorů založených na pH-senzitivních AzaPc [P4]

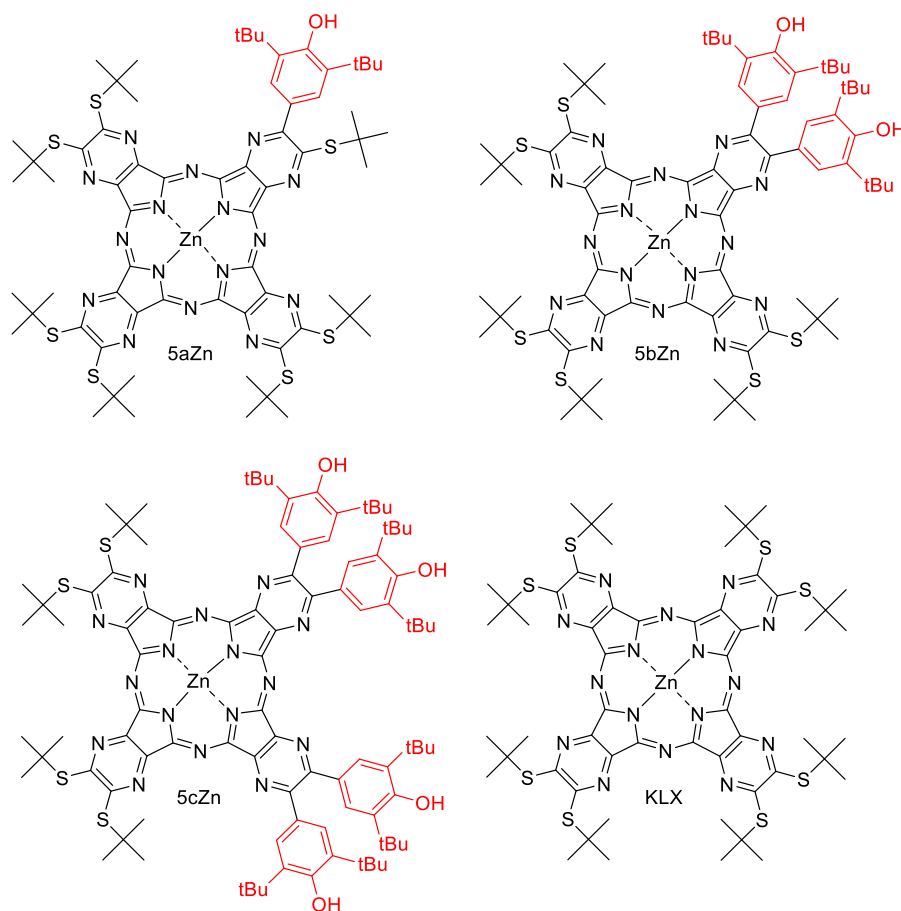
V rámci mé výzkumné stáže v Rakousku jsem se zabýval studiem využití pH-senzitivních AzaPc jako indikátorů v CO₂ senzorech. V plastickém typu senzoru je pH-senzitivní indikátor (*Ind*) uložen v hydrofobní polymerové matrici společně s lipofilní bází, která indikátor deprotonizuje (nefluorescentní OFF stav) v nepřítomnosti analytu. CO₂ poté difunduje semipermeabilní silikonovou membránou do citlivé vrstvy, kde v přítomnosti vody protonizuje indikátor, čímž dojde v případě AzaPc k signifikantnímu nárůstu fluorescence viz rovnice (4).^[164, 165]



Motivací pro vývoj nových CO₂ senzorů bylo především zavedení a ověření funkce nového indikátoru založeného na AzaPc, který by přinesl vylepšení v podobě optimálních spektrálních vlastností a možnosti modifikace pK_A,^[145] což je nespornou výhodou v porovnání s konvenčně používanými indikátory jako je HPTS nebo indikátory založené na trifenylmethanových barvivech.^[166, 167] Oblastí, kterou jsme chtěli detailněji prostudovat, bylo použití vedle konvenční ethylcelulózy také použití nových matric založených na polyuretanových elastomerech s různým obsahem vody (5-25 %). Nové matrice jsou v současnosti intenzivně studovaným a vyhledávaným nástrojem z hlediska možnosti „vylazení“ citlivosti senzoru k pCO₂ v určitém dynamickém rozsahu a minimalizace vlivu vnějších podmínek. Pro potřeby naší studie byly zvoleny zinečnaté AzaPc s jednou (**5aZn**), dvěma (**5bZn**) nebo čtyřmi (**5cZn**) fenolovými substituenty (**Obr. 63**), které byly nedávno popsány jako červeně emitující ($\lambda_{\text{EM}} = 660 \text{ nm}$) pH indikátory pro bazickou oblast (pK_A $\approx 12,6$)^[32] a v naší studii by byly vhodnými indikátory v CO₂ senzorech.

Na počátku projektu bylo třeba nalézt vhodnou matici pro vložení AzaPc indikátorů. Prvním pokusem byla volba konvenčně využívané EC matrice pro nekovalentní vazbu indikátoru **5aZn**, **5bZn**, **5cZn** nebo kontrolní látky **KLX** s TOAH jako bází. Avšak fólie obsahující AzaPc indikátory po expozici CO₂ nevykázaly dostatečný nárůst fluorescence, a to z důvodu nedostatečného zhášení fluorescence v OFF stavu u senzoru s **5aZn** nebo nedostatečného přepnutí do stavu ON v případě senzorů s **5bZn** a **5cZn**. Tento neúspěch jsme si vysvětlili absencí vody v hydrofobní EC matrici, AzaPc indikátory jsou sice také hydrofóbní, ale pro přepnutí senzoru do ON stavu po průchodu CO₂ hraje malé množství vody nejspíše důležitou roli. To bylo později dokázáno i na tom, že senzory založené na AzaPc indikátorech byly citlivé

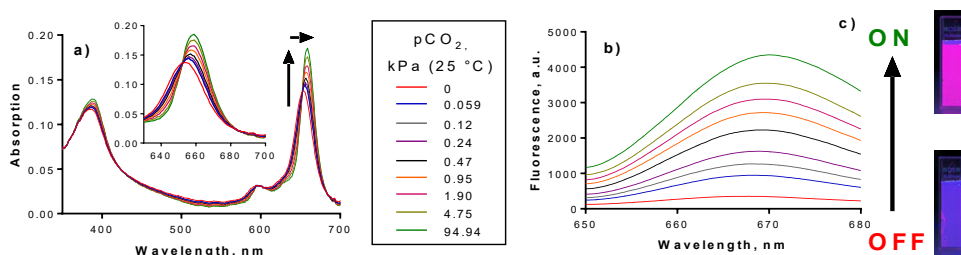
pouze na CO₂ s určitou humiditou nikoli na suchý plynný CO₂. Celá tato teorie je dále podpořena faktem, že jiné indikátory s dobrou odezvou v EC matrici jsou většinou více hydrofilní, což může zajistit potřebné „lokální“ množství vody.



Obr. 63 Struktury AzaPc indikátorů **5a-cZn** využitě pro přípravu CO₂ senzorů a kontrolní látka **KLX** (stále ON stav).

Proto jsme se rozhodli pro hydrofobní AzaPc indikátory vybrat matrice s určitým obsahem vody, jako jsou amfifilní polyurethanové elastomery komerčně dostupné pod označením HydroMed™ a HydroThane™, které obsahují hydrofilní i hydrofobní domény s obsahem vody 5-95 %. Ačkoli některé studie již popisovaly matrici HydroMed™ D4 (50 % obsahu vody) jako vhodnou pro přípravu optických senzorů,^[168, 169] my se rozhodli spíše prostudovat matrice s nižšími obsahy vody HydroThane™ 5, 15, 25 (5, 15 a 25 % vody), a to z několika důvodů. Vyšší obsah vody v matrici (nad 40 % obsahu vody) může způsobit mechanickou nestabilitu fólie a navíc lipofilní charakter AzaPc může v matrici s vyšším obsahem vody vyústit v nežádoucí agregaci indikátoru.

Proto indikátory **5a-cZn** a kontrolní látka **KLX** byly nekovalentně vloženy do matric HydroThane™ 5, 15 a 25. Po expozici CO₂ byly zaznamenány méně výrazné změny v absorpčních spektrech se dvěma isosbestickými body (při 595 a 652 nm) dokazujícími, že změny jsou způsobeny přechodem jedné formy (fenolát) senzoru na druhou (fenol) (**Obr. 64**). V emisních spektrech byly změny více markantní a zaznamenali jsme signifikantní nárůsty fluorescence závislé na pCO₂, čímž jsme potvrdili citlivost připravených senzorů k pCO₂.

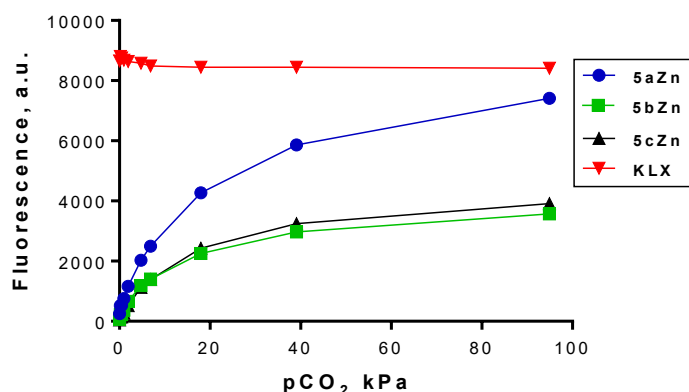


Obr. 64 Změny v absorpčních (a) a emisních (b) spektrech senzoru s indikátorem **5aZn** a TBAH báží v matrici HydroThane™ 25 po expozici CO₂ (0 – 95 kPa, 85% relativní humidity), c) fotografie sensorických fólií pod UV (excitace při 365 nm) ve vodě s N₂ (OFF stav) a CO₂ (ON stav).

V dalším kroku naší práce bylo třeba nalézt nejlepší AzaPc indikátor pro potřeby našeho dalšího studia, proto jsme senzory s **5a-cZn** vzájemně srovnaly a jako nejlepší látku vybrali indikátor **5aZn** obsahující jen jednu donorovou skupinu pro ICT. Senzor s **5aZn** po expozici CO₂ totiž vykázal nárůst fluorescence srovnatelný s kontrolní **KLX** (stále ON), a tím bylo dokázáno účinné blokování ICT a „dokonalé“ přepnutí senzoru do ON stavu (**Obr. 65**). Naproti tomu senzory s indikátory **5bZn** a **5cZn** měly intenzity fluorescence po expozici CO₂ ve srovnání se senzorem obsahujícím **5aZn** poloviční, protože v jejich případě je pro účinné blokování ICT nutná interakce všech donorových skupin s analytem. Tento výsledek nebyl pro nás překvapující z hlediska dříve publikovaných výsledků^[9, 122] týkajících se účinného blokování ICT (viz kapitola 4.9.1).

Poté bylo naším úkolem vybrat nejvhodnější matrici, a proto jsme připravili senzory s **5aZn** indikátorem a báží TBAH s různými matricemi HydroThane™ 5, 15 a 25 lišícími se obsahem vody (5, 15 a 25%). Nejlepší vlastnosti měl senzor s matricí HydroThane™ 25, výsledky byly opakovatelné s výbornou citlivostí k pCO₂ v rozsahu 0 – 5 kPa se zároveň nejvyššími nárůsty fluorescence (12×) mezi OFF/ON stavy v rozsahu 0-95 kPa pCO₂. HydroThane™ 15 se zdál být také využitelným pro přípravu CO₂ senzorů, avšak měl nižší nárůst fluorescence (jen 5×).

Nejméně reprodukovatelné výsledky měla matrice HydroThane™ 5 a možným vysvětlením špatné reprodukovatelnosti měření je nejspíše nízký obsah vody.

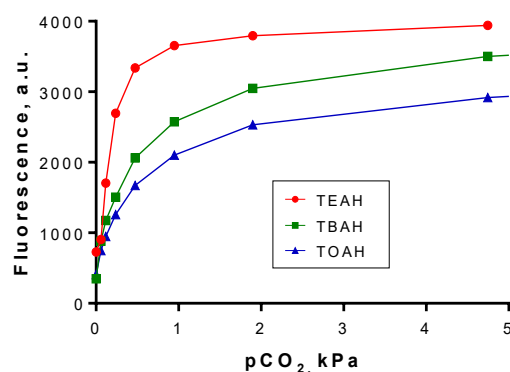


Obr. 65 Změny intenzity fluorescence při 672 nm pro senzory s indikátory **5a-cZn** s TOAH a kontrolní látkou **K LX** v matrici HydroThane™ 5 po expozici CO₂ při 25 °C ($\lambda_{exc} = 382$ nm).

Hlavní nevýhodou plastických CO₂ senzorů založených na EC matrici je citlivost na teplotu. Při vyšších teplotách dochází k poklesu citlivosti senzoru, která může vést k negativně falešným výsledkům měření. Proto naším dalším cílem bylo studium vlivu teploty (při 15, 25 a 35 °C) na citlivost k CO₂ u senzorů obsahujících indikátor **5aZn** a bázi TBAH s matricí HydroThane™ 5, 15 a 25. Senzor s matricí HydroThane™ 25 dosahoval opět nejlepších vlastností, měl stejnou citlivost k CO₂ při všech teplotách do 2 kPa CO₂ a pouze malé změny byly zaznamenány pro teploty 15 a 25 °C v rozsahu měření pCO₂ 2 – 93 kPa, a je tak nejhodnější pro přípravu optických CO₂ senzorů. V případě matric HydroThane™ 5 a 15 byly změny citlivosti k CO₂ vlivem teploty více výrazné.

Jak bylo již výše zmíněno, v plastickém typu senzoru je k indikátoru přidávána báze, která udržuje indikátor v deprotonované nefluorescentní formě (OFF stav). Nejčastěji je volen TOAH^[148, 170] ze skupiny tetraalkylammonium-hydroxidů. Z literatury jsme zjistili, že volbou méně stericky náročných bází dochází k signifikantnímu poklesu citlivosti senzorů.^[171] Proto nás v neposlední řadě zajímal vliv různě stericky náročných bází ze skupiny tetraalkylammonium-hydroxidů (TOAH, TBAH a tetraethylammonium-hydroxid (TEAH)) na finální citlivost CO₂ senzoru. Po vyhodnocení experimentálních dat jsme došli k závěru, že rozměrnost a tedy lipofilita báze opravdu koreluje s citlivostí senzoru a my takto můžeme připravit senzory s různými citlivostmi dle volby báze v řadě TOAH < TBAH < TEAH (**Obr. 66**). Například senzor s TOAH byl citlivý při vyšších pCO₂ (0-50 kPa). Přidání TBAH báze k senzoru zvýšila citlivost asi o

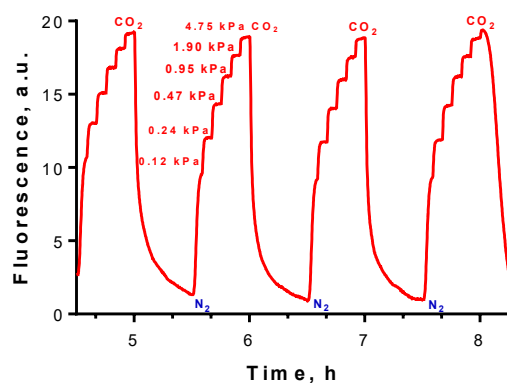
polovinu v porovnání s TOAH. Sensory s TOAH a TBAH by tak díky své citlivosti mohly nalézt uplatnění v monitorování biologických hladin CO_2 (v dechu pacienta) nebo v biotechnologických aplikacích. Sensor s TEAH byl citlivý i při velmi nízkých hladinách CO_2 (≈ 2 kPa, při 25°C), což může být velmi výhodné pro aplikaci v environmentálním monitorování CO_2 . Ovlivnění citlivosti senzoru výběrem báze je způsobeno tím, že hydrofobní více rozměrné báze (TOAH) brání, aby se voda dostala do blízkosti báze a naopak více hydrofilní báze jako TEAH jsou více hydratovány. Tato teorie je podpořena důležitým obsahem vody v matici pro přepnutí senzoru z OFF do ON stavu a zároveň tím, že hydrofóbnější báze lokalizují indikátor do oblastí matrice s menším obsahem vody a naopak. „Vyladění“ citlivosti CO_2 senzoru výběrem báze o různé délce řetězce je navíc možné v maticích HydroThane™ i pro strukturálně jiné indikátory než je AzaPc, což jsme dokázali přípravou a studiem vlastností senzoru s DPP^[148] indikátorem v maticích HydroThane™ 25 s různými bázemi (TOAH, TBAH nebo TEAH).



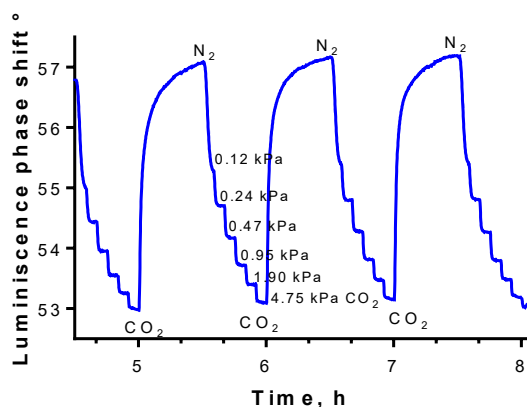
Obr. 66 Vliv báze na citlivost senzoru při 25°C (senzor s **5aZn** indikátorem v matici HydroThane™ 25 a bázemi TOAH, TBAH a TEAH).

Na závěr jsme chtěli doložit opravdovou využitelnost senzoru v reálných aplikacích, a proto jsme připravili senzor (indikátor **5aZn** + HydroThane™ 25 + TBAH) vhodný pro měření v kombinaci s optickým vláknem, umožňujícím vyhodnocení pomocí kompaktního oxygenometru (*FireStingO₂*). Tento přístroj je vybaven excitačním zdrojem červeného světla (624 nm) a fotodiodou, která detekuje emisi v červené oblasti. Během experimentu jsme naměřili reprodukovatelné zvýšení fluorescence v závislosti na pCO_2 (0 – 4,75 kPa) a to v několika cyklech (**Obr. 67**), což je velmi důležité pro reálnou aplikaci. Mimo výše uvedené předvedení reálné aplikace senzoru jsme navrhli také dva možné koncepty měření: „Dual Lifetime Referencing“ (DLR) technikou (**Obr. 68**),^[172] kdy je do ochranné vrstvy senzoru přidán ještě druhý referenční

materiál (silanizované částice egyptské modři).^[147] A měření jako „ratiometric 2-wavelength“, kdy do ochranné silikonové vrstvy senzoru je přidán fluorofor (Lemon Yellow), který je necitlivý k analytu a vykazuje odlišné emisní spektrum. A tímto způsobem je pak umožněno snímání emisních spekter v červené a zelené oblasti pomocí RGB kamery.



Obr. 67 Dynamická odpověď senzoru (5aZn a TBAH v HydroThane™ 15) na optickém vlákně spojeném s kompaktním oxygenometrem *FireStingO₂* při 25 °C pro expozici CO₂ (0 – 4,75 kPa).



Obr. 68 Dynamická odpověď senzoru (5aZn a TBAH v HydroThane™ 15) obsahujícího silanizované částice egyptské modři jako referenční matariál, koncept měření „Dual Lifetime Referencing“ (modulační frekvence 4kHz, 25 °C).

V rámci projektu byly připraveny nové CO₂ senzory využívající AzaPc indikátory **5a-cZn**. Jako neoptimálnější indikátor byl zvolen AzaPc **5aZn** s jednou fenolovou skupinou. Pro imobilizaci indikátorů byly namísto konveční EC matrice zvoleny polyurethanové elastomery pod komerčním označením HydroThane™ 5, 15 a 25 (s 5, 15 a 25 % obsahu vody), jako nevhodnější matrice byl zvolen HydroThane™ 25. Dále byl nalezen a objasněn vztah mezi lipofilitou bází ze skupiny tetraalkylammonium-hydroxidů s různou délkou řetězce. Byl pozorován nárůst citlivosti senzoru v řadě TOAH < TBAH < TEAH se zkracující se délkou alkylu báze. Tímto je možné připravit senzory citlivé v různém rozsahu pCO₂. Tento objev je univerzální, což bylo doloženo přípravou senzoru s jinou strukturou indikátoru (DPP). Na závěr byla demonstrována reálná aplikace připraveného senzoru založeného na AzaPc indikátoru **5aZn** na rozdílných konceptech měření s kombinací s optickými vlákny spojenými s komerčně dostupným oxygenometrem *FireStingO₂*.

8. ZÁVĚR

Tato disertační práce byla věnována detailnímu studiu rozpoznávacích částí sensorických AzaPc. V Teoretické části je shrnut současný stav studované problematiky. Zaměřil jsem se především na popsání struktur Pc a jim příbuzných AzaPc a jejich absorpční a fotofyzikální vlastnosti. Zvláštní pozornost jsem věnoval problematice fluorescenčních senzorů a připravil krátký přehled fluoroforů a rozpoznávacích částí s příklady citlivých analytů společně s přehledem komerčně dostupných fluorescenčních senzorů pro rozpoznávání kovových kationtů a senzorů citlivých k pH. V závěru kapitoly jsou sepsány všechny doposud publikované informace týkající se sensorických AzaPc a ovlivnění jejich vlastností. Metodická část je věnována přípravě Pc a AzaPc a jejich prekurzorů a metodám použitým pro studium fotofyzikálních vlastností. V Experimentální části jsou popsány konkrétní mnou prováděné přípravy prekurzorů a cílových AzaPc struktur a postupy při studiu sensorických vlastností AzaPc. Část Výsledky a diskuze je pak komentářem ke všem výzkumným projektům, které proběhly při přípravě disertační práce.

První část práce mapuje studium rozpoznávacích částí sensorických AzaPc s cílem připravit fluorescenční senzor vysoce selektivní a citlivý k určitému kationtu kovu. Projekt [P1] ukázal, že velikost aza-crownu je klíčovým faktorem v selektivním rozpoznávání kationtů alkalických kovů. Překvapivě kationty kovů alkalických zemin se vážaly do centra aza-crownu mnohem silněji pravděpodobně díky jejich vyšší elektronové hustotě dané dvojmocným charakterem, a proto velikost aza-crownu neměla v tomto případě vliv na selektivitu. V práci [P2] byla zvýšena rigidita rozpoznávacího centra uspořádáním dvou aza-crownů typu „tweezer“, což vedlo ke zlepšení selektivity k určitým analytům. Hlavní nevýhodou senzorů byly však nízké kvantové výtěžky fluorescence v ON stavu způsobené nutností blokovat obě donorová centra pro ICT. Výše zmíněný problém jsme se snažili překlenout v posledním zatím nepublikovaném projektu [P3], kde navrhované senzory měly jen jedno donorové centrum a rigidita byla zvýšena pomocí vhodných substituentů (lariatether, další crown) v blízkosti aza-crownu. Připravené senzory si zachovaly vysokou selektivitu k K^+ případně Ba^{2+} současně s vysokými hodnotami kvantových výtěžků fluorescence v ON stavu, což bylo cílem této série.

Druhá část práce se týkala studia možnosti použít pH-senzitivní AzaPc jako indikátory v CO_2 senzorech [P4] a vznikla během mé výzkumné stáže v Rakousku. Pro imobilizaci AzaPc indikátorů k podpurné fólii byly nejprve nalezeny optimální podmínky (matrice, rozpouštědlo, báze) a AzaPc indikátor s jednou fenolovou skupinou se ukázal jako nejlepší pro přípravu a

studium vlastností „nového“ CO₂ senzoru. V rámci projektu byl použit nový typ matic založených na polyurethanových elastomerech (Hydrothane™) se středním obsahem vody (5-25 %). Velkým překvapením byl pro nás nalezený vztah mezi délkou řetězce báze ze skupiny tetraalkylammonium-hydroxidů a citlivostí senzoru k pCO₂. Bylo pozorováno, že se snižující se délkou alkylového řetězce (vyšší hydrofilita, nižší sterická náročnost) báze roste citlivost k pCO₂ v řadě TOAH < TBAH < TEAH a my jsme takto schopni připravit senzory citlivé v různých rozmezích pCO₂, což umožňuje připravit senzory pro různé aplikace (monitorování dechu, biotechnologie, environmentální monitorování CO₂). V závěru tohoto projektu byla předvedena reálná aplikace senzoru přípravou senzorského materiálu a jeho umístěním na optické vlákno s vyhodnocením možným pomocí kompaktního fluorimetru.

Práce na vývoji AzaPc senzorů bude dále pokračovat projektem, kde v aza-crownech budou některé atomy kyslíku zaměněny za atomy dusíku nebo síry. U této série je předpokládána vyšší citlivost k těžkým kovům (Hg²⁺, Pb²⁺, Cd²⁺) a mohly by tak být velmi užitečnými nástroji v environmentálních aplikacích. Mimo jiné je ve spolupráci s kolegy z výzkumné skupiny Assoc. Prof. Sergeje Borisova plánována příprava a studium senzorského zařízení pro rozpoznávání kationtů kovů využívající AzaPc **3bZn** a **4bZn** jako indikátory.

9. SEZNAM PUBLIKOVANÝCH VĚDECKÝCH A ODBORNÝCH PRACÍ

Články v impaktovaných časopisech

První autor:

P1 Lochman, L.; Svec, J.; Roh, J.; Novakova, V. The role of the size of aza-crown recognition moiety in azaphthalocyanine fluorescence sensors for alkali and alkaline earth metal cations. *Dyes Pigm.* **2015**, *121*, 178-187. IF₂₀₁₄ = 3,966

Podíl autora: Příprava cílových struktur AzaPc senzorů, charakterizace fotofyzikálních vlastností a studium selektivity a citlivosti pomocí fluorescenčních titrací, vyhodnocení a finalizace dat. Podíl na přípravě textu publikace.

P2 Lochman, L.; Svec, J.; Roh, J.; Kirakci, K.; Lang, K.; Zimcik, P.; Novakova, V. Metal cation recognition in water by a tetrapyrazinoporphyrazine-based tweezer receptor. *Chem. Eur. J.* **2016**, *22*, 7, 2417-2426. IF₂₀₁₅ = 5,731

Podíl autora: Příprava cílových struktur AzaPc senzorů, charakterizace fotofyzikálních vlastností a studium selektivity a citlivosti pomocí fluorescenčních titrací, vyhodnocení a finalizace dat. Podíl na přípravě textu publikace.

P3 Lochman, L.; Miletin, M.; Uhlirova, S.; Lang, K.; Kirakci, K.; Zimcik, P.; Novakova, V. Structure-activity relationships and the role of counter anion in metal cation sensing by aza-crown recognition moieties. Manuskript finalizován a připraven k odeslání k posouzení v *Sens. Actuators, B*.

Podíl autora: Příprava cílových struktur AzaPc senzorů, charakterizace fotofyzikálních vlastností a studium selektivity a citlivosti pomocí fluorescenčních titrací, vyhodnocení a finalizace dat. Podíl na přípravě textu publikace.

P4 Lochman, L.; Zimcik, P.; Klimant, I.; Novakova, V.; Borisov, S.M. Red-emitting CO₂ sensors with tunable dynamic range based on pH-sensitive azaphthalocyanine indicators. *Sens. Actuators, B.* **2017**, *246*, 1100-1107. IF₂₀₁₆ = 4,758

Podíl autora: Příprava senzorických fólií, charakterizace fotofyzikálních vlastností a studium citlivosti k CO₂, příprava a studium referenčního materiálu, vyhodnocení a finalizace dat. Sepsání publikace - hlavní autor textu.

Spoluautor:

Novakova, V.; **Lochman, L.**; Zajícová, I.; Kopecky, K.; Miletin, M.; Lang, K.; Kirakci, K.; Zimcik, P.
Azaphthalocyanines: Red Fluorescent probes for Cations. *Chem. Eur. J.* **2013**, *19*, 16, 5025-5028.
IF₂₀₁₂ = 5,831

Tato práce vznikla během přípravy mé diplomové práce, a proto není zahrnuta do disertace.

Prezentace vědeckých výsledků formou ústních prezentací a posterů

Lochman L., Zimcik P., Novakova V. Ústní prezentace: „The effect of size of aza-crown recognition moiety of sensoric azaphthalocyanines on the selectivity to different analytes.“ 4. *Postgraduální a 2. postdoktorandská konference*, Hradec Králové, Česká republika, 28. -29.1. 2014.

Lochman L., Zimcik P., Novakova V. Poster: „The effect of size of aza-crown recognition moiety of sensoric azaphthalocyanines on the selectivity to different analytes.“ 8. *International Conference on Porphyrins and Phthalocyanines (ICPP-8)*, Istanbul, Turecko, 22. – 27.6. 2014.

Lochman L., Zimcik P., Novakova V. Poster: „Sensoric azaphthalocyanines: Influence of the size of aza-crown recognition moiety on the selectivity to different analytes.“ *International Conference on Molecular Sensors and Molecular Logic Gates (MSMLG-4)*, Šanghaj, Čínská lidová republika, 9. – 12.11. 2014.

Lochman L., Svec J., Zimcik P., Novakova V. Ústní prezentace: „The role of size of aza-crown recognition moiety in cation-sensing azaphthalocyanine fluorescence indicators.“ 5. *Postgraduální a 3. postdoktorandská konference*, Hradec Králové, Česká republika, 3. – 4.2. 2015.

Lochman L., Svec J., Zimcik P., Novakova V. Poster: „Sandwich arrangement of aza-crowns as a recognition moiety of sensoric azaphthalocyanines.“ *16. International symposium on novel aromatic compounds (ISNA)*, Madrid, Španělsko, 5. – 10.7. 2015.

Lochman L., Novakova V., Zimcik P., Borisov S. M. Ústní prezentace: „CO₂ sensors using phenol substituted azaphthalocyanines as the fluorescent indicator.“ *6. Postgraduální a 4. postdoktorandská konference*, Hradec Králové, Česká republika, 9. – 10.2. 2016.

Lochman L., Novakova V., Zimcik P., Borisov S. M. Ústní prezentace, poster: „Fluorescent sensors for potassium and ammonia based on azaphthalocyanines.“ *EUROPT[R]ODE XII*, Graz, Rakousko, 20. – 23.3. 2016.

Lochman L., Novakova V., Zimcik P., Borisov S. M. Poster: „Azaphthalocyanines as indicators in fluorescent CO₂ sensors.“ *Syntéza a analýza léčiv (SAL)*, Hradec Králové, Česká republika, 22. – 24.6. 2016.

Lochman L., Novakova V., Zimcik P., Borisov S. M. Poster: „Optical Carbon Dioxide Sensors Based on Azaphthalocyanine Indicators.“ *9. International Conference on Porphyrins and Phthalocyanines (ICPP-9)*, Nanjing, Čínská lidová republika, 3. – 8.7. 2016.

Lochman L., Uhlířová S., Zimcik P., Novakova V. Ústní prezentace: „Red-emitting azaphthalocyanine sensors highly selective toward potassium cations.“ *7. Postgraduální a 5. postdoktorandská konference*, Hradec Králové, Česká republika, 9. – 10.2. 2016.

Lochman L., Uhlířová S., Zimcik P., Novakova V. Poster: „New highly selective sensors to potassium cations based on azaphthalocyanines.“ *15. Conference on Methods and Applications in Fluorescence (MAF)*, Brugy, Belgie, 10. – 13.9. 2017.

10. GRANTY, VÝZKUMNÉ STÁŽE A OCENĚNÍ

Grantová agentura Univerzity Karlovy

Číslo projektu: **494214**

Hlavní řešitel: Mgr. Lukáš Lochman

Název projektu: „*Studium rozpoznávacích částí sensorických azaftalocyaninů.*“

Grantová agentura Univerzity Karlovy

Číslo projektu: **1182313**

Hlavní řešitel: Mgr. Antonín Cidlina

Spoluřešitel: Mgr. Lukáš Lochman

Název projektu: „*Studium vlivu strukturálních faktorů na účinnost intramolekulárního přenosu náboje u azaftalocyaninů.*“

Grantová agentura Univerzity Karlovy

Číslo projektu: **1916214**

Hlavní řešitel: Mgr. Miloslav Macháček

Spoluřešitel: Mgr. Lukáš Lochman

Název projektu: „*Studium nových ftalocyaninových a azaftalocyaninových fotosenzitizérů pro fotodynamickou léčbu nádorových onemocnění na buněčné a molekulární úrovni.*“

Grantová agentura České republiky

Číslo projektu: **13-27761S**

Hlavní řešitel: Doc. PharmDr. Petr Zimčík, Ph.D.

Spoluřešitel: Mgr. Lukáš Lochman

Název projektu: „*Vývoj nových fotosenzitizérů pro fotodynamickou terapii a výzkum jejich mechanismu působení na buněčné úrovni.*“

Univerzitní výzkumné centrum UK (UNCE)

Číslo projektu: **33/2012**

Hlavní řešitel: Doc. PharmDr. Tomáš Šimůnek, Ph.D.

Spoluřešitel: Mgr. Lukáš Lochman

Název projektu: „*Centrum pro výzkum toxických a protektivních účinků léčiv na kardiovaskulární systém.*“

Stipendium Aktion Rakousko – Česká republika

Číslo projektu: **ICM-2015-00621**

Držitel stipendia: Mgr. Lukáš Lochman

Název projektu stáže: „*Aplikace azaftalocyaninových indikátorů ve fluorescenčních senzorech pro kationty kovu.*“

Výzkumné stáže

2016 „Graz University of Technology” (Graz, Rakousko) – Studium možnosti použití azaftalocyaninové indikátory v CO₂ senzorech.

Vedoucí práce: Ass. Prof. Sergey Borisov (1 měsíc)

2015 „Graz University of Technology” (Graz, Rakousko) – Aplikace azaftalocyaninových indikátorů ve fluorescenčních senzorech pro kationty kovu.

Vedoucí práce: Ass. Prof. Sergey Borisov (3 měsíce)

Ocenění

16.6. 2017 „**Sanofi cena za farmacii 2017**“ – *druhé místo* v soutěži pořádané Francouzským velvyslanectvím v Praze a Jean-Marie Lehnem (laureátem Nobelovy ceny).
Prezentace výsledků disertační práce s názvem: “Study of recognition moieties of sensoric azaphthalocyanines.”



28.10. 2017 „**Medaile města Hradce Králové**“ udělena Radou města Hradce Králové a předána primátorem města Mudr. Zdeňkem Finkem jako ocenění za vědeckou činnost.

11. SEZNAM LITERATURY

1. CALLAN J. F., DE SILVA A. P., MAGRI D. C. Luminescent sensors and switches in the early 21st century. *Tetrahedron*, 2005, vol. 61, no. 36, p. 8551-8588.
2. LAKOWICZ J. R., Principles of fluorescence spectroscopy. 3rd ed.; Springer: New York, 2006.
3. KOBAYASHI H., OGAWA M., ALFORD R., CHOYKE P. L., URANO Y. New Strategies for Fluorescent Probe Design in Medical Diagnostic Imaging. *Chemical Reviews*, 2010, vol. 110, no. 5, p. 2620-2640.
4. ALI R., LANG T. M., SALEH S. M., MEIER R. J., WOLFBEIS O. S. Optical Sensing Scheme for Carbon Dioxide Using a Solvatochromic Probe. *Analytical Chemistry*, 2011, vol. 83, no. 8, p. 2846-2851.
5. SCHUTTING S., JOKIC T., STROBL M., BORISOV S. M., DE BEER D., KLIMANT I. NIR optical carbon dioxide sensors based on highly photostable dihydroxy-aza-BODIPY dyes. *Journal of Materials Chemistry C*, 2015, vol. 3, no. 21, p. 5474-5483.
6. ZIMCIK P., NOVAKOVA V., MILETIN M., KOPECKY K. Azaphthalocyanines containing pyrazine rings with focus on the alkylheteroatom, aryl and heteroaryl substitution and properties important in photodynamic therapy *Macroheterocycles*, 2008, vol. 1, no. 1, p. 21-29.
7. ZIMČÍK P. AZAFTALOCYANINY – OD SYNTÉZ PŘES FOTOCHEMICKÉ A FOTOFYZIKÁLNÍ VLASTNOSTI K APLIKACÍM. *Chemické listy*, 2012, vol. 106, no., p. 275-282.
8. NOVAKOVA V., LOCHMAN L., ZAJÍCOVÁ I., KOPECKY K., MILETIN M., LANG K., KIRAKCI K., ZIMCIK P. Azaphthalocyanines: Red Fluorescent Probes for Cations. *Chemistry – A European Journal*, 2013, vol. 19, no. 16, p. 5025-5028.
9. NOVAKOVA V., ZIMCIK P., MILETIN M., VACHOVA L., KOPECKY K., LANG K., CHÁBERA P., POLÍVKA T. Ultrafast Intramolecular charge transfer in tetrapyrazinoporphyrazines controls the quantum yields of fluorescence and singlet oxygen. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2010, vol. 12, no., p. 2555-2563.
10. DE LA TORRE G., CLAESSENS C. G., TORRES T. Phthalocyanines: The need for selective synthetic approaches. *European Journal of Organic Chemistry*, 2000, vol., no. 16, p. 2821-2830.
11. CLAESSENS C. G., HAHN U., TORRES T. Phthalocyanines: From outstanding electronic properties to emerging applications. *Chemical Record*, 2008, vol. 8, no. 2, p. 75-97.
12. DONZELLO M. P., ERCOLANI C., NOVAKOVA V., ZIMCIK P., STUZHIN P. A. Tetrapyrazinoporphyrazines and their metal derivatives. Part I: Synthesis and basic structural information. *Coordination Chemistry Reviews*, 2016, vol. 309, no., p. 107-179.
13. KADISH K. M., SMITH K. M., GUILARD R., *Handbook of Porphyrin Science*. World Scientific Publishing: Singapore, 2010; Vol. 1-10.
14. KOSTKA M., ZIMCIK P., MILETIN M., KLEMERA P., KOPECKY K., MUSIL Z. Comparison of aggregation properties and photodynamic activity of phthalocyanines and azaphthalocyanines. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 2006, vol. 178, no. 1, p. 16-25.

15. ZIMCIK P., MILETIN M., MUSIL Z., KOPECKY K., KUBZA L., BRAULT D. Cationic azaphthalocyanines bearing aliphatic tertiary amino substituents-Synthesis, singlet oxygen production and spectroscopic studies. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 2006, vol. 183, no. 1-2, p. 59-69.
16. RIO Y., RODRIGUEZ-MORGADE M. S., TORRES T. Modulating the electronic properties of porphyrinoids: a voyage from the violet to the infrared regions of the electromagnetic spectrum. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 2008, vol. 6, no. 11, p. 1877-1894.
17. CARTER K. P., YOUNG A. M., PALMER A. E. Fluorescent Sensors for Measuring Metal Ions in Living Systems. *Chemical Reviews*, 2014, vol. 114, no. 8, p. 4564-4601.
18. ZIMCIK P., MALKOVA A., HRUBA L., MILETIN M., NOVAKOVA V. Bulky 2,6-diphenylphenylsulfanyl substituents efficiently inhibit aggregation in phthalocyanines and tetrapyrrolineporphyrins and control their photophysical and electrochemical properties. *Dyes and Pigments*, 2017, vol. 136, no., p. 715-723.
19. NOVAKOVA V., ZIMCIK P., KOPECKY K., MILETIN M., KUNEŠ J., LANG K. Self-Assembled Azaphthalocyanine Dimers with Higher Fluorescence and Singlet Oxygen Quantum Yields than the Corresponding Monomers. *European Journal of Organic Chemistry*, 2008, vol. 2008, no. 19, p. 3260-3263.
20. CIDLINA A., MILETIN M., FATHI-RASEKH M., NEMYKIN V. N., ZIMCIK P., NOVAKOVA V. OFF-ON-OFF Red-Emitting Fluorescent Indicators for a Narrow pH Window. *Chemistry-a European Journal*, 2017, vol. 23, no. 8, p. 1795-1804.
21. RAWLING T., MCDONAGH A. Ruthenium phthalocyanine and naphthalocyanine complexes: Synthesis, properties and applications. *Coordination Chemistry Reviews*, 2007, vol. 251, no. 9-10, p. 1128-1157.
22. DAY P., HILL H. A. O., PRICE M. G. SOME REACTIONS OF COBALT PHTHALOCYANINES. *Journal of the Chemical Society a -Inorganic Physical Theoretical*, 1968, vol., no. 1, p. 90-&.
23. STILLMAN M. J., THOMSON A. J. ASSIGNMENT OF CHARGE-TRANSFER BANDS IN SOME METAL PHTHALOCYANINES - EVIDENCE FOR S = 1 STATE OF IRON(II) PHTHALOCYANINE IN SOLUTION. *Journal of the Chemical Society-Faraday Transactions II*, 1974, vol. 70, no. 5, p. 790-804.
24. KOBAYASHI N., FURUYAMA T., SATOH K. Rationally Designed Phthalocyanines Having Their Main Absorption Band beyond 1000 nm. *Journal of the American Chemical Society*, 2011, vol. 133, no. 49, p. 19642-19645.
25. FURUYAMA T., SATOH K., KUSHIYA T., KOBAYASHI N. Design, Synthesis, and Properties of Phthalocyanine Complexes with Main-Group Elements Showing Main Absorption and Fluorescence beyond 1000 nm. *Journal of the American Chemical Society*, 2014, vol. 136, no. 2, p. 765-776.
26. CIDLINA A., PAUŠÍMOVÁ Z., MILETIN M., ZIMCIK P., NOVAKOVA V. The effect of substituents at alkylsulfanyl/arylsulfanyl non-peripherally substituted phthalocyanines: Spectral and photophysical properties, basicity and photostability. *J. Porphyr. Phthalocyanines*, 2015, vol., no., p.
27. ZORLU Y., KUMRU U., ISCI U., DIVRIK B., JEANNEAU E., ALBRIEUX F., DEDE Y., AHSEN V., DUMOULIN F. 1,4,8,11,15,18,22,25-Alkylsulfanyl phthalocyanines: effect of macrocycle

- distortion on spectroscopic and packing properties. *Chemical Communications*, 2015, vol. 51, no. 30, p. 6580-6583.
28. KUDREVICH S. V., GALPERN M. G., LUKYANETS E. A., VANLIER J. E. Substituted tetra 2,3-pyrazinoporphyrazines .1. Angular annelation of tetra-2,3-quinoxalinoporphyrazine. *Canadian Journal of Chemistry-Revue Canadienne De Chimie*, 1996, vol. 74, no. 4, p. 508-515.
 29. KUDREVICH S. V., VAN LIER J. E. Substituted tetra-2,3-pyrazinoporphyrazines. Part II. Bis(tri-n-hexylsiloxy)silicon derivatives. *Canadian Journal of Chemistry*, 1996, vol. 74, no. 9, p. 1718-1723.
 30. MITZEL F., FITZGERALD S., BEEBY A., FAUST R. Acetylenic quinoxalinoporphyrazines as photosensitisers for photodynamic therapy. *Chemistry-a European Journal*, 2003, vol. 9, no. 5, p. 1233-1241.
 31. MUSIL Z., ZIMCIK P., MILETIN M., KOPECKY K., LENCO J. Synthesis, separation and UV/Vis spectroscopy of pyrazino-quinoxalino-porphyrine macrocycles. *European Journal of Organic Chemistry*, 2007, vol., no. 27, p. 4535-4542. IF2006=2.769.
 32. NOVAKOVA V., LÁSKOVÁ M., VAVŘIČKOVÁ H., ZIMCIK P. Phenol-Substituted Tetrapyrazinoporphyrazines: pH-Dependent Fluorescence in Basic Media. *Chemistry – A European Journal*, 2015, vol., no., p.
 33. PETRIK P., ZIMCIK P., KOPECKY K., MUSIL Z., MILETIN M., LOUKOTOVA V. Protonation and deprotonation of nitrogens in tetrapyrazinoporphyrazine macrocycles. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines*, 2007, vol. 11, no., p. 487-495.
 34. GALPERN M. G., KUDREVICH S. V., NOVOZHILOVA I. G. Synthesis and spectroscopic properties of soluble aza analogs of phthalocyanine and naphthalocyanine. *Chemistry of heterocyclic compounds*, 1993, vol. 29, no. 1, p. 49-54.
 35. NOOMNARM U., CLEGG R. M. Fluorescence lifetimes: fundamentals and interpretations. *Photosynthesis Research*, 2009, vol. 101, no. 2-3, p. 181-194.
 36. KRISTOFFERSEN A. S., ERGA S. R., HAMRE B., FRETTE O. Testing Fluorescence Lifetime Standards using Two-Photon Excitation and Time-Domain Instrumentation: Rhodamine B, Coumarin 6 and Lucifer Yellow. *Journal of Fluorescence*, 2014, vol. 24, no. 4, p. 1015-1024.
 37. JOHANSSON M. K., COOK R. M. Intramolecular dimers: A new design strategy for fluorescence-quenched probes. *Chemistry-a European Journal*, 2003, vol. 9, no. 15, p. 3466-3471.
 38. AGOSTINIS P., BERG K., CENGEL K. A., FOSTER T. H., GIROTTI A. W., GOLLNICK S. O., HAHN S. M., HAMBLIN M. R., JUZENIENE A., KESSEL D., KORBELIK M., MOAN J., MROZ P., NOWIS D., PIETTE J., WILSON B. C., GOLAB J. Photodynamic therapy of cancer: An update. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 2011, vol. 61, no. 4, p. 250-281.
 39. FAJARI L., FORS P., LANG K., NONELL S., TRULL F. R. Intramolecular and intermolecular photoinduced electron transfer in isomeric mesoporphyrin nitrobenzyl esters: Structure and solvent effects. *Journal of Photochemistry and Photobiology a-Chemistry*, 1996, vol. 93, no. 2-3, p. 119-128.
 40. WASIELEWSKI M. R. PHOTOINDUCED ELECTRON-TRANSFER IN SUPRAMOLECULAR SYSTEMS FOR ARTIFICIAL PHOTOSYNTHESIS. *Chemical Reviews*, 1992, vol. 92, no. 3, p. 435-461.

41. FOX M. A. PHOTOINDUCED ELECTRON-TRANSFER. *Photochemistry and Photobiology*, 1990, vol. 52, no. 3, p. 617-627.
42. BARBARA P. F., MEYER T. J., RATNER M. A. Contemporary issues in electron transfer research. *Journal of Physical Chemistry*, 1996, vol. 100, no. 31, p. 13148-13168.
43. VALEUR B., LERAY I. Design principles of fluorescent molecular sensors for cation recognition. *Coordination Chemistry Reviews*, 2000, vol. 205, no. 1, p. 3-40.
44. VUREK G. G., FEUSTEL P. J., SEVERINGHAUS J. W. A FIBER OPTIC PCO₂ SENSOR. *Annals of Biomedical Engineering*, 1983, vol. 11, no. 6, p. 499-510.
45. MILLS A., HODGEN S., Fluorescent Carbon Dioxide Indicators. In *Topics in Fluorescence Spectroscopy*, Geddes, C.; Lakowicz, J., Eds. Springer US: 2005; Vol. 9, pp 119-161.
46. ARIELI R., ERTRACHT O., DASKALOVIC Y. Infrared CO₂ analyzer error: an effect of background gas (N₂ and O₂). *Journal of Applied Physiology*, 1999, vol. 86, no. 2, p. 647-650.
47. SEVERINGHAUS J. W., BRADLEY A. F. ELECTRODES FOR BLOOD PO₂ AND PCO₂ DETERMINATION. *Journal of Applied Physiology*, 1958, vol. 13, no. 3, p. 515-520.
48. AIGNER D., FREUNBERGER S. A., WILKENING M., SAF R., BORISOV S. M., KLIMANT I. Enhancing Photoinduced Electron Transfer Efficiency of Fluorescent pH-Probes with Halogenated Phenols. *Analytical Chemistry*, 2014, vol. 86, no. 18, p. 9293-9300.
49. ITO O., D'SOUZA F. Recent Advances in Photoinduced Electron Transfer Processes of Fullerene-Based Molecular Assemblies and Nanocomposites. *Molecules*, 2012, vol. 17, no. 5, p. 5816-5835.
50. VALEUR B., LERAY I. Design principles of fluorescent molecular sensors for cation recognition. *Coordination Chemistry Reviews*, 2000, vol. 205, no., p. 3-40.
51. LAKOWICZ H. S. J. R., *Topics in fluorescence spectroscopy*. v. 5, Nonlinear and photon-induced fluorescence. 2002 edition (31 Dec. 1997) ed.; Springer: 2002.
52. DIDENKO V. V. DNA probes using fluorescence resonance energy transfer (FRET): Designs and applications. *Biotechniques*, 2001, vol. 31, no. 5, p. 1106-+.
53. KAWATA M., NISHI M., MATSUDA K., SAKAMOTO H., KAKU N., MASUGI-TOKITA M., FUJIKAWA K., HIRAHARA-WADA Y., TAKANARNI K., MORI H. Steroid receptor signalling in the brain - Lessons learned from molecular imaging. *Journal of Neuroendocrinology*, 2008, vol. 20, no. 6, p. 673-676.
54. ALGAR W. R., KRULL U. J. Towards multi-colour strategies for the detection of oligonucleotide hybridization using quantum dots as energy donors in fluorescence resonance energy transfer (FRET). *Analytica Chimica Acta*, 2007, vol. 581, no. 2, p. 193-201.
55. MARQUIS D., DESVERGNE J. P., BOUASLAURENT H. PHOTORESPONSIVE SUPRAMOLECULAR SYSTEMS - SYNTHESIS AND PHOTOPHYSICAL AND PHOTOCHEMICAL STUDY OF BIS-(9,10-ANTHRACENEDIYL)CORANANDS AAO(N)O(N). *Journal of Organic Chemistry*, 1995, vol. 60, no. 24, p. 7984-7996.
56. MARQUIS D., DESVERGNE J. P. A COOPERATIVE EFFECT IN SODIUM-CATION COMPLEXATION BY A MACROCYCLIC BIS(9,10)ANTHRACENO-CROWN ETHER IN THE GROUND-STATE AND IN THE EXCITED-STATE. *Chemical Physics Letters*, 1994, vol. 230, no. 1-2, p. 131-136.

57. JIN T., ICHIKAWA K., KOYAMA T. A FLUORESCENT CALIX 4 ARENE AS AN INTRAMOLECULAR EXCIMER-FORMING Na^+ SENSOR IN NONAQUEOUS SOLUTION. *Journal of the Chemical Society-Chemical Communications*, 1992, vol., no. 6, p. 499-501.
58. SUZUKI Y., MOROZUMI T., NAKAMURA H., SHIMOMURA M., HAYASHITA T., BARTSH R. A. New fluorimetric alkali and alkaline earth metal cation sensors based on noncyclic crown ethers by means of intramolecular excimer formation of pyrene. *Journal of Physical Chemistry B*, 1998, vol. 102, no. 40, p. 7910-7917.
59. CHOPPINET P., JULLIEN L., VALEUR B. Multichromophoric cyclodextrins as fluorescent sensors. Interaction of heptachromophoric beta-cyclodextrins with surfactants. *Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions 2*, 1999, vol., no. 2, p. 249-255.
60. HANS K. Quenching of luminescence by oxygen. *Transactions of the Faraday Society* 1939, vol. 35, no., p. 216-219.
61. KNIBBE H., REHM D., WELLER A. INTERMEDIATES AND KINETICS OF FLUORESCENCE QUENCHING BY ELECTRON TRANSFER. *Berichte Der Bunsen-Gesellschaft Fur Physikalische Chemie*, 1968, vol. 72, no. 2, p. 257-&.
62. BIWERSI J., TULK B., VERKMAN A. S. LONG-WAVELENGTH CHLORIDE-SENSITIVE FLUORESCENT INDICATORS. *Analytical Biochemistry*, 1994, vol. 219, no. 1, p. 139-143.
63. GRYNKIEWICZ G., POENIE M., TSIEN R. Y. A NEW GENERATION OF Ca^{2+} INDICATORS WITH GREATLY IMPROVED FLUORESCENCE PROPERTIES. *Journal of Biological Chemistry*, 1985, vol. 260, no. 6, p. 3440-3450.
64. SHANER N. C., STEINBACH P. A., TSIEN R. Y. A guide to choosing fluorescent proteins. *Nature Methods*, 2005, vol. 2, no. 12, p. 905-909.
65. SONG L. L., HENNINK E. J., YOUNG I. T., TANKE H. J. PHOTOBLEACHING KINETICS OF FLUORESCHEIN IN QUANTITATIVE FLUORESCENCE MICROSCOPY. *Biophysical Journal*, 1995, vol. 68, no. 6, p. 2588-2600.
66. GHAUHARALI R. I., HOFSTRAAT J. W., BRAKENHOFF G. J. Fluorescence photobleaching-based shading correction for fluorescence microscopy. *Journal of Microscopy-Oxford*, 1998, vol. 192, no., p. 99-113.
67. BERNAS T., ROBINSON J. P., ASEM E. K., RAJWA B. Loss of image quality in photobleaching during microscopic imaging of fluorescent probes bound to chromatin. *Journal of Biomedical Optics*, 2005, vol. 10, no. 6, p. 9.
68. LAVIS L. D., RAINES R. T. Bright ideas for chemical biology. *Acs Chemical Biology*, 2008, vol. 3, no. 3, p. 142-155.
69. VELICK S. F. FLUORESCENCE SPECTRA AND POLARIZATION OF GLYCERALDEHYDE-3-PHOSPHATE AND LACTIC DEHYDROGENASE COENZYME COMPLEXES. *Journal of Biological Chemistry*, 1958, vol. 233, no. 6, p. 1455-1467.
70. KWON O. S., BLAZQUEZ M., CHURCHICH J. E. LUMINESCENCE SPECTROSCOPY OF PYRIDOXIC ACID AND PYRIDOXIC ACID BOUND TO PROTEINS. *European Journal of Biochemistry*, 1994, vol. 219, no. 3, p. 807-812.
71. VISSER A. KINETICS OF STACKING INTERACTIONS IN FLAVIN ADENINE-DINUCLEOTIDE FROM TIME-RESOLVED FLAVIN FLUORESCENCE. *Photochemistry and Photobiology*, 1984, vol. 40, no. 6, p. 703-706.

72. WEBER G. POLARIZATION OF THE FLUORESCENCE OF MACROMOLECULES .2. FLUORESCENT CONJUGATES OF OVALBUMIN AND BOVINE SERUM ALBUMIN. *Biochemical Journal*, 1952, vol. 51, no. 2, p. 155-168.
73. JOHNSON I. D., KANG H. C., HAUGLAND R. P. FLUORESCENT MEMBRANE PROBES INCORPORATING DIPYRRROMETHENEBORON DIFLUORIDE FLUOROPHORES. *Analytical Biochemistry*, 1991, vol. 198, no. 2, p. 228-237.
74. SLAVIK J. ANILINONAPHTHALENE SULFONATE AS A PROBE OF MEMBRANE-COMPOSITION AND FUNCTION. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1982, vol. 694, no. 1, p. 1-25.
75. DANIEL E., WEBER G. COOPERATIVE EFFECTS IN BINDING BY BOVINE SERUM ALBUMIN .I. BINDING OF 1-ANILINO-8-NAPHTHALENESULFONATE . FLUORIMETRIC TITRATIONS. *Biochemistry*, 1966, vol. 5, no. 6, p. 1893-&.
76. SOUTHWICK P. L., ERNST L. A., TAURIELLO E. W., PARKER S. R., MUJUMDAR R. B., MUJUMDAR S. R., CLEVER H. A., WAGGONER A. S. CYANINE DYE LABELING REAGENTS - CARBOXYMETHYLINDOCYANINE SUCCINIMIDYL ESTERS. *Cytometry*, 1990, vol. 11, no. 3, p. 418-430.
77. BUSCHMANN V., WESTON K. D., SAUER M. Spectroscopic study and evaluation of red-absorbing fluorescent dyes. *Bioconjugate Chemistry*, 2003, vol. 14, no. 1, p. 195-204.
78. GEORGHIOU S. INTERACTION OF ACRIDINE DRUGS WITH DNA AND NUCLEOTIDES. *Photochemistry and Photobiology*, 1977, vol. 26, no. 1, p. 59-68.
79. ERIKSSON S., KIM S. K., KUBISTA M., NORDEN B. BINDING OF 4',6-DIAMIDINO-2-PHENYLINDOLE (DAPI) TO AT REGIONS OF DNA - EVIDENCE FOR AN ALLOSTERIC CONFORMATIONAL CHANGE. *Biochemistry*, 1993, vol. 32, no. 12, p. 2987-2998.
80. PARKINSON J. A., BARBER J., DOUGLAS K. T., ROSAMOND J., SHARPLES D. MINOR-GROOVE RECOGNITION OF THE SELF-COMPLEMENTARY DUPLEX D(CGCGAATTCGCG)2 BY HOECHST-33258 - A HIGH-FIELD NMR-STUDY. *Biochemistry*, 1990, vol. 29, no. 44, p. 10181-10190.
81. LOONTIENS F. G., MCLAUGHLIN L. W., DIEKMANN S., CLEGG R. M. BINDING OF HOECHST 33258 AND 4',6-DIAMIDINO-2-PHENYLINDOLE TO SELF-COMPLEMENTARY DECADEOXYNUCLEOTIDES WITH MODIFIED EXOCYCLIC BASE SUBSTITUENTS. *Biochemistry*, 1991, vol. 30, no. 1, p. 182-189.
82. WU P. G., LI H., NORDLUND T. M., RIGLER R., MULTISTATE MODELING OF THE TIME AND TEMPERATURE-DEPENDENCE OF FLUORESCENCE FROM 2-AMINOPURINE IN A DNA DECAMER. *Spie - Int Soc Optical Engineering*: Bellingham, 1990; Vol. 1204, p 262-269.
83. MINTA A., KAO J. P. Y., TSIEN R. Y. FLUORESCENT INDICATORS FOR CYTOSOLIC CALCIUM BASED ON RHODAMINE AND FLUORESCHEIN CHROMOPHORES. *Journal of Biological Chemistry*, 1989, vol. 264, no. 14, p. 8171-8178.
84. EBERHARD M., ERNE P. CALCIUM-BINDING TO FLUORESCENT CALCIUM INDICATORS - CALCIUM GREEN, CALCIUM ORANGE AND CALCIUM CRIMSON. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1991, vol. 180, no. 1, p. 209-215.
85. IATRIDOU H., FOUKARAKI E., KUHN M. A., MARCUS E. M., HAUGLAND R. P., KATERINOPOULOS H. E. THE DEVELOPMENT OF A NEW FAMILY OF INTRACELLULAR CALCIUM PROBES. *Cell Calcium*, 1994, vol. 15, no. 2, p. 190-198.

86. WATANABE S., IKISHIMA S., MATSUO T., YOSHIDA K. A luminescent metalloreceptor exhibiting remarkably high selectivity for Mg²⁺ over Ca²⁺. *Journal of the American Chemical Society*, 2001, vol. 123, no. 34, p. 8402-8403.
87. SUZUKI Y., KOMATSU H., IKEDA T., SAITO N., ARAKI S., CITTERIO D., HISAMOTO H., KITAMURA Y., KUBOTA T., NAKAGAWA J., OKA K., SUZUKI K. Design and synthesis of Mg²⁺-selective fluoroionophores based on a coumarin derivative and application for Mg²⁺ measurement in a living cell. *Analytical Chemistry*, 2002, vol. 74, no. 6, p. 1423-1428.
88. FREDERICKSON C. J., KASARSKIS E. J., RINGO D., FREDERICKSON R. E. A QUINOLINE FLUORESCENCE METHOD FOR VISUALIZING AND ASSAYING THE HISTOCHEMICALLY REACTIVE ZINC (BOUTON ZINC) IN THE BRAIN. *Journal of Neuroscience Methods*, 1987, vol. 20, no. 2, p. 91-103.
89. MINTA A., TSIEN R. Y. FLUORESCENT INDICATORS FOR CYTOSOLIC SODIUM. *Journal of Biological Chemistry*, 1989, vol. 264, no. 32, p. 19449-19457.
90. CROSSLEY R., GOOLAMALI Z., SAMMES P. G. SYNTHESIS AND PROPERTIES OF A POTENTIAL EXTRACELLULAR FLUORESCENT-PROBE FOR POTASSIUM. *Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions 2*, 1994, vol., no. 7, p. 1615-1623.
91. BURDETTE S. C., WALKUP G. K., SPINGLER B., TSIEN R. Y., LIPPARD S. J. Fluorescent sensors for Zn²⁺ based on a fluorescein platform: Synthesis, properties and intracellular distribution. *Journal of the American Chemical Society*, 2001, vol. 123, no. 32, p. 7831-7841.
92. WALKUP G. K., BURDETTE S. C., LIPPARD S. J., TSIEN R. Y. A new cell-permeable fluorescent probe for Zn²⁺. *Journal of the American Chemical Society*, 2000, vol. 122, no. 23, p. 5644-5645.
93. BURDETTE S. C., FREDERICKSON C. J., BU W. M., LIPPARD S. J. ZP4, an improved neuronal Zn²⁺ sensor of the Zinpyr family. *Journal of the American Chemical Society*, 2003, vol. 125, no. 7, p. 1778-1787.
94. THOMPSON R. B., PETERSON D., MAHONEY W., CRAMER M., MALIWAL B. P., SUH S. W., FREDERICKSON C., FIERKE C., HERMAN P. Fluorescent zinc indicators for neurobiology. *Journal of Neuroscience Methods*, 2002, vol. 118, no. 1, p. 63-75.
95. GOLDSMITH C. R., LIPPARD S. J. Analogues of Zinpyr-1 provide insight into the mechanism of zinc sensing. *Inorganic Chemistry*, 2006, vol. 45, no. 16, p. 6474-6478.
96. JORDAN D. M., WALT D. R., MILANOVICH F. P. PHYSIOLOGICAL PH FIBEROPTIC CHEMICAL SENSOR BASED ON ENERGY-TRANSFER. *Analytical Chemistry*, 1987, vol. 59, no. 3, p. 437-439.
97. VON BULTZINGSLOWEN C., MCEVOY A. K., MCDONAGH C., MACCRAITH B. D. Lifetime-based optical sensor for high-level pCO₂ detection employing fluorescence resonance energy transfer. *Analytica Chimica Acta*, 2003, vol. 480, no. 2, p. 275-283.
98. CHANG Q., SIPIOR J., LAKOWICZ J. R., RAO G. A LIFETIME-BASED FLUORESCENCE RESONANCE ENERGY-TRANSFER SENSOR FOR AMMONIA. *Analytical Biochemistry*, 1995, vol. 232, no. 1, p. 92-97.
99. MOHR G. J., DRAXLER S., TRZNADEL K., LEHMANN F., LIPPITSCH M. E. Synthesis and characterization of fluorophore-absorber pairs for sensing of ammonia based on fluorescence. *Analytica Chimica Acta*, 1998, vol. 360, no. 1-3, p. 119-128.

100. MILLS A., CHANG Q., MCMURRAY N. EQUILIBRIUM STUDIES ON COLORIMETRIC PLASTIC FILM SENSORS FOR CARBON-DIOXIDE. *Analytical Chemistry*, 1992, vol. 64, no. 13, p. 1383-1389.
101. AVNIR D., BRAUN S., OTTOLENGHI M. ENCAPSULATION OF ORGANIC-MOLECULES AND ENZYMES IN SOL-GEL GLASSES - A REVIEW OF NOVEL PHOTOACTIVE, OPTICAL, SENSING, AND BIOACTIVE MATERIALS. *AcS Symposium Series*, 1992, vol. 499, no., p. 384-404.
102. WOLFBEIS O. S., REISFELD R., OEHME I., Sol-gels and chemical sensors. In *Optical and Electronic Phenomena in Sol-Gel Glasses and Modern Application*, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 1996; pp 51-98.
103. OHKUMA S., POOLE B. FLUORESCENCE PROBE MEASUREMENT OF INTRALYSOSOMAL PH IN LIVING CELLS AND PERTURBATION OF PH BY VARIOUS AGENTS. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1978, vol. 75, no. 7, p. 3327-3331.
104. MUNKHOLM C., WALT D. R., MILANOVICH F. P. A FIBER-OPTIC SENSOR FOR CO₂ MEASUREMENT. *Talanta*, 1988, vol. 35, no. 2, p. 109-112.
105. YGUERABIDE J., TALAVERA E., ALVAREZ J. M., QUINTERO B. STEADY-STATE FLUORESCENCE METHOD FOR EVALUATING EXCITED-STATE PROTON REACTIONS - APPLICATION TO FLUORESCHEIN. *Photochemistry and Photobiology*, 1994, vol. 60, no. 5, p. 435-441.
106. SJOBACK R., NYGREN J., KUBISTA M. ABSORPTION AND FLUORESCENCE PROPERTIES OF FLUORESCHEIN. *Spectrochimica Acta Part a-Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 1995, vol. 51, no. 6, p. L7-L21.
107. RINK T. J., TSIEN R. Y., POZZAN T. CYTOPLASMIC PH AND FREE MG-2+ IN LYMPHOCYTES. *Journal of Cell Biology*, 1982, vol. 95, no. 1, p. 189-196.
108. CLEMENT N. R., GOULD J. M. PYRANINE (8-HYDROXY-1,3,6-PYRENETRISULFONATE) AS A PROBE OF INTERNAL AQUEOUS HYDROGEN-ION CONCENTRATION IN PHOSPHOLIPID-VESICLES. *Biochemistry*, 1981, vol. 20, no. 6, p. 1534-1538.
109. SCHULMAN S. G., CHEN S. X., BAI F. L., LEINER M. J. P., WEIS L., WOLFBEIS O. S. DEPENDENCE OF THE FLUORESCENCE OF IMMOBILIZED 1-HYDROXYPYRENE-3,6,8-TRISULFONATE ON SOLUTION PH - EXTENSION OF THE RANGE OF APPLICABILITY OF A PH FLUOROSENSOR. *Analytica Chimica Acta*, 1995, vol. 304, no. 2, p. 165-170.
110. UTTAMLAL M., WALT D. R. A FIBEROPTIC CARBON-DIOXIDE SENSOR FOR FERMENTATION MONITORING. *Bio-Technology*, 1995, vol. 13, no. 6, p. 597-601.
111. WOLFBEIS O. S., FURLINGER E., KRONEIS H., MARSONER H. FLUORIMETRIC ANALYSIS .1. A STUDY ON FLUORESCENT INDICATORS FOR MEASURING NEAR NEUTRAL (PHYSIOLOGICAL) PH-VALUES. *Fresenius Zeitschrift Fur Analytische Chemie*, 1983, vol. 314, no. 2, p. 119-124.
112. WHITAKER J. E., HAUGLAND R. P., PRENDERGAST F. G. SPECTRAL AND PHOTOPHYSICAL STUDIES OF BENZO C XANTHENE DYES - DUAL EMISSION PH SENSORS. *Analytical Biochemistry*, 1991, vol. 194, no. 2, p. 330-344.
113. SZMACINSKI H., LAKOWICZ J. R. OPTICAL MEASUREMENTS OF PH USING FLUORESCENCE LIFETIMES AND PHASE-MODULATION FLUOROMETRY. *Analytical Chemistry*, 1993, vol. 65, no. 13, p. 1668-1674.

114. WOLFBEIS O. S., RODRIGUEZ N. V., WERNER T. LED-COMPATIBLE FLUOROSENSOR FOR MEASUREMENT OF NEAR-NEURAL PH VALUES. *Mikrochimica Acta*, 1992, vol. 108, no. 3-6, p. 133-141.
115. BRIGGS M. S., BURNS D. D., COOPER M. E., GREGORY S. J. A pH sensitive fluorescent cyanine dye for biological applications. *Chemical Communications*, 2000, vol., no. 23, p. 2323-2324.
116. ZEN J. M., PATONAY G. NEAR-INFRARED FLUORESCENCE PROBE FOR PH DETERMINATION. *Analytical Chemistry*, 1991, vol. 63, no. 24, p. 2934-2938.
117. BOYER A. E., DEVANATHAN S., HAMILTON D., PATONAY G. SPECTROSCOPIC STUDIES OF A NEAR-INFRARED ABSORBING PH SENSITIVE CARBOCYANINE DYE. *Talanta*, 1992, vol. 39, no. 5, p. 505-510.
118. MURTAZA Z., CHANG Q., RAO G. V., LIN H., LAKOWICZ J. R. Long-lifetime metal-ligand pH probe. *Analytical Biochemistry*, 1997, vol. 247, no. 2, p. 216-222.
119. CIDLINA A., NOVAKOVA V., MILETIN M., ZIMCIK P. Peripheral substitution as a tool for tuning electron-accepting properties of phthalocyanine analogs in intramolecular charge transfer. *Dalton Transactions*, 2015, vol. 44, no. 15, p. 6961-6971.
120. TUHL A., MAKHSEED S., ZIMCIK P., AL-AWADI N., NOVAKOVA V., SAMUEL J. Heavy metal effects on physicochemical properties of non-aggregated azaphthalocyanine derivatives. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines*, 2012, vol. 16, no. 7-8, p. 817-825.
121. NOVAKOVA V., MILETIN M., KOPECKY K., ZIMCIK P. Red-Emitting Dyes with Photophysical and Photochemical Properties Controlled by pH. *Chemistry – A European Journal*, 2011, vol. 17, no. 50, p. 14273-14282.
122. NOVAKOVA V., MØRKVED E. H., MILETIN M., ZIMCIK P. Influence of protonation of peripheral substituents on photophysical and photochemical properties of tetrapyrazinoporphyrazines. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines*, 2010, vol. 14, no., p. 582-591.
123. KOPECKÝ K. Azaftalocyaniny jako nová skupina zhášečů fluorescence. *Disertační práce*, Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Hradec Králové, 2009.
124. KOPECKY K., NOVAKOVA V., MILETIN M., KUCERA R., ZIMCIK P. Solid-Phase Synthesis of Azaphthalocyanine-Oligonucleotide Conjugates and Their Evaluation As New Dark Quenchers of Fluorescence. *Bioconjugate Chemistry*, 2010, vol. 21, no. 10, p. 1872-1879.
125. KOPECKY 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, vol. 67, no. 33, p. 5956-5963. IF2010: 3.011.
126. NOVAKOVA V., HLADIK P., FILANDROVA T., ZAJICOVA I., KREPSOVA V., MILETIN M., LENCO J., ZIMCIK P. Structural factors influencing the intramolecular charge transfer and photoinduced electron transfer in tetrapyrazinoporphyrazines. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2014, vol. 16, no. 11, p. 5440-5446.
127. NOVAKOVA V., REIMEROVA P., SVEC J., SUCHAN D., MILETIN M., RHODA H. M., NEMYKIN V. N., ZIMCIK P. Systematic investigation of phthalocyanines, naphthalocyanines, and their aza-analogues. Effect of the isosteric aza-replacement in the core. *Dalton Transactions*, 2015, vol. 44, no. 29, p. 13220-13233.

128. VACHOVA L., NOVAKOVA V., KOPECKY K., MILETINA M., ZIMCIK P. Effect of intramolecular charge transfer on fluorescence and singlet oxygen production of phthalocyanine analogues. *Dalton Transactions*, 2012, vol. 41, no. 38, p. 11651-11656.
129. MCCLURE D. S. Triplet-Singlet Transitions in Organic Molecules - Lifetime Measurements of the Triplet State. *Journal of Chemical Physics*, 1949, vol. 17, no. 10, p. 905-913.
130. JIANG X. J., YEUNG S. L., LO P. C., FONG W. P., NG D. K. P. Phthalocyanine -Polyamine Conjugates as Highly Efficient Photosensitizers for Photodynamic Therapy. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2011, vol. 54, no. 1, p. 320-330.
131. CLARKSON G. J., HUMBERSTONE P., MCKEOWN N. B. Synthesis of a phthalocyanine derivative containing easily oxidised sterically-hindered phenolic substituents. *Chemical Communications*, 1997, vol., no. 20, p. 1979-1980.
132. NISHINAGA A., ITAHARA T., MATSUURA T., RIEKER A., KOCH D., ALBERT K., HITCHCOCK P. B. Base-catalyzed oxygenation of tert-butylated phenols. 2. Formation of 3-aryl-2,5-di-tert-butyl-2,4-cyclopentadienones by base-catalyzed oxygenation of 4-aryl-2,6-di-tert-butylphenols: x-ray structure determination of 2,5-di-tert-butyl-3-(4-chlorophenyl)cyclopentadienone. *Journal of the American Chemical Society*, 1978, vol. 100, no. 6, p. 1826-1834.
133. NISHINAGA A., SHIMIZU T., MATSUURA T. Base-catalyzed oxygenation of tert-butylated phenols. 3. Base-catalyzed reaction of peroxyquinols derived from oxygenation of 2,6-di-tert-butylphenols and mechanism of regioselective formation of epoxy-o-quinol from 2,4,6-tri-tert-butylphenol. *The Journal of Organic Chemistry*, 1979, vol. 44, no. 17, p. 2983-2988.
134. STUZHIN P. A. Azaporphyrins and phthalocyanines as multicentre conjugated ampholites. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines*, 1999, vol. 3, no. 6-7, p. 500-513.
135. DURMUS M., AYHAN M. M., GUREK A. G., AHSEN V. Peripherally alpha(alpha)-substituted novel phthalocyanines. *Dyes and Pigments*, 2008, vol. 77, no. 3, p. 570-577.
136. GALANIN N. E., KUDRIK E. V., SHAPOSHNIKOV G. P. Synthesis and spectral characteristics of phthalocyanines of unsymmetrical structure containing fragments of 3,6-didecyloxyphthalonitrile and 2-methyl-5,6-dicyanobenzimidazole. *Russian Journal of Organic Chemistry*, 2008, vol. 44, no. 2, p. 225-230.
137. SUGIMORI T., OKAMOTO S., KOTOH N., HANDA M., KASUGA K. Phthalocyanines obtained from phthalonitriles with phenyl derivatives: A new method for the synthesis of the phthalonitriles by use of Suzuki-coupling reaction. *Chemistry Letters*, 2000, vol., no. 10, p. 1200-1201.
138. ZIMCIK P., MILETIN M., KOSTKA M., SCHWARZ J., MUSIL Z., KOPECKY K. Synthesis and comparison of photodynamic activity of alkylheteroatom substituted azaphthalocyanines. *Journal of Photochemistry and Photobiology a-Chemistry*, 2004, vol. 163, no. 1-2, p. 21-28. IF2003=1.693.
139. MAKHSEED S., IBRAHIM F., BEZZU C. G., MCKEOWN N. B. The synthesis of metal-free octaazaphthalocyanine derivatives containing bulky phenoxy substituents to prevent self-association. *Tetrahedron Letters*, 2007, vol. 48, no. 41, p. 7358-7361.
140. KOPECKY K., ZIMCIK P., NOVAKOVA V., MILETIN M., MUSIL Z., STRIBNA J. The synthesis and characterization of metal-free, unsymmetrical azaphthalocyanines with hydroxy

- groups and their complex formation with pyridine. *Dyes and Pigments*, 2008, vol. 78, no. 3, p. 231-238. IF2007=2.796.
141. MØRKVED E. H., ANDREASSEN T., NOVAKOVA V., ZIMCIK P. Zinc azaphthalocyanines with thiophen-2-yl, 5-methylthiophen-2-yl and pyridin-3-yl peripheral substituents: Additive substituent contributions to singlet oxygen production. *Dyes and Pigments*, 2009, vol. 82, no. 3, p. 276-285.
 142. LINSTEAD R. P., NOBLE E. G., WRIGHT J. M. 187. Phthalocyanines. Part IX. Derivatives of thiophen, thionaphthen, pyridine, and pyrazine, and a note on the nomenclature. *Journal of the Chemical Society (Resumed)*, 1937, vol., no. 0, p. 911-921.
 143. OHTA K., WATANABE T., HASEBE H., MORIZUMI Y., FUJIMOTO T., YAMAMOTO I., LELIEVRE D., SIMON J. DISCOTIC LIQUID-CRYSTALS OF TRANSITION-METAL COMPLEXES-9 - SYNTHESIS AND PROPERTIES OF DISCOTIC LIQUID-CRYSTALS OF TETRAPYRAZINOPORPHYRAZINE DERIVATIVES. *Molecular Crystals and Liquid Crystals*, 1991, vol. 196, no., p. 13-26.
 144. KUDREVICH S. V., VAN LIER J. E. Azaanalogs of phthalocyanine: Syntheses and properties. *Coordination Chemistry Reviews*, 1996, vol. 156, no., p. 163-182.
 145. ZIMCIK P., NOVAKOVA V., KOPECKY K., MILETIN M., USLU KOBAK R. Z., SVANDRLIKOVA E., VÁCHOVÁ L., LANG K. Magnesium Azaphthalocyanines: An Emerging Family of Excellent Red-Emitting Fluorophores. *Inorganic Chemistry*, 2012, vol. 51, no. 7, p. 4215-4223.
 146. ZIMCIK P., MILETIN M., NOVAKOVA V., KOPECKY K., NEJEDLA M., STARA V., SEDLACKOVA K. Effective Monofunctional Azaphthalocyanine Photosensitizers for Photodynamic Therapy. *Australian Journal of Chemistry*, 2009, vol. 62, no. 5, p. 425-433.
 147. BORISOV S. M., WURTH C., RESCH-GENGER U., KLIMANT I. New Life of Ancient Pigments: Application in High-Performance Optical Sensing Materials. *Analytical Chemistry*, 2013, vol. 85, no. 19, p. 9371-9377.
 148. SUSANNE S., INGO K., DIRK DE B., SERGEY M. B. New highly fluorescent pH indicator for ratiometric RGB imaging of pCO₂. *Methods and Applications in Fluorescence*, 2014, vol. 2, no. 2, p. 024001.
 149. MAEDA H., FURUYOSHI S., NAKATSUJI Y., OKAHARA M. SYNTHESIS OF MONOAZA CROWN ETHERS FROM N,N-DI OLIGO(OXYALKYLENE) AMINES AND OLIGOETHYLENE GLYCOL DI(PARA-TOLUENESULFONATES) OR CORRESPONDING DICHLORIDES. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, 1983, vol. 56, no. 1, p. 212-218.
 150. LUK'YANENKO N. G., BASOK S. S., KULYGINA E. Y., BOGASHCHENKO T. Y., YAKOVENKO I. S. Synthesis of monoazacrown ethers under phase-transfer catalysis. *Russian Journal of Organic Chemistry*, 2012, vol. 48, no. 10, p. 1345-1352.
 151. MAO H., THORNE J. B., PHARR J. S., GAWLEY R. E. Effect of crown ether ring size on binding and fluorescence response to saxitoxin in anthracylmethyl monoazacrown ether chemosensors. *Canadian Journal of Chemistry-Revue Canadienne De Chimie*, 2006, vol. 84, no. 10, p. 1273-1279.
 152. SHINKAI S., OGAWA T., KUSANO Y., MANABE O., KIKUKAWA K., GOTO T., MATSUDA T. PHOTORESPONSIVE CROWN ETHERS .4. INFLUENCE OF ALKALI-METAL CATIONS ON PHOTO-ISOMERIZATION AND THERMAL-ISOMERIZATION OF AZOBIS(BENZOCROWN ETHER)S. *Journal of the American Chemical Society*, 1982, vol. 104, no. 7, p. 1960-1967.

153. FERY-FORGUES S., AL-ALI F. Bis(azacrown ether) and bis(benzocrown ether) dyes: butterflies, tweezers and rods in cation binding. *Journal of Photochemistry and Photobiology C-Photochemistry Reviews*, 2004, vol. 5, no. 2, p. 139-153.
154. NATALI M., GIORDANI S. Molecular switches as photocontrollable "smart" receptors. *Chemical Society Reviews*, 2012, vol. 41, no. 10, p. 4010-4029.
155. SATO O., MATSUDA N., TSUNETSUGU J. Preparation of azulenequinones containing azacrown moieties and the singular complexation of sodium or potassium cation by 3,5-bis(aza-18-crown-6)-1,7-azulenequinone in solution. *Heterocycles*, 2001, vol. 54, no. 1, p. 439-444.
156. KIM S. K., BANG M. Y., LEE S. H., NAKAMURA K., CHO S. W., YOON J. New fluorescent chemosensors for cationic guests: 1,8-bis(azacrown)anthracenes. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 2002, vol. 43, no. 1-2, p. 71-75.
157. STEED J. W. First- and second-sphere coordination chemistry of alkali metal crown ether complexes. *Coordination Chemistry Reviews*, 2001, vol. 215, no. 1, p. 171-221.
158. GUTMANN V., WYCHERA E. Coordination reactions in non aqueous solutions - The role of the donor strength. *Inorganic and Nuclear Chemistry Letters*, 1966, vol. 2, no. 9, p. 257-260.
159. REICHARDT C., *Solvents and Solvent Effect in Organic Chemistry*. 3rd Edition ed.; Wiley-VCH: Weinheim, 2003.
160. ROUNAGHI G. H., MOFAZZELI F. Study of Complex Formation Between Dicyclohexano-18-Crown-6 (DCH18C6) with Mg²⁺, Ca²⁺, Sr²⁺, and Ba²⁺ Cations in Methanol–Water Binary Mixtures Using Conductometric Method. *Journal of inclusion phenomena and macrocyclic chemistry*, 2005, vol. 51, no. 3-4, p. 205-210.
161. KOPECKY K., ŠATINSKÝ D., NOVAKOVA V., MILETIN M., SVOBODA A., ZIMCIK P. Synthesis of mono-, di-, tri- and tetracarboxy azaphthalocyanines as potential dark quenchers. *Dyes and Pigments*, 2011, vol. 91, no. 2, p. 112-119.
162. NOVAKOVA V., MILETIN M., KOPECKY K., FRANZOVA Š., ZIMCIK P. Synthesis of Unsymmetrical Alkyloxy/Aryloxy-azaphthalocyanines Based on a Transesterification Reaction. *European Journal of Organic Chemistry*, 2011, vol., no., p. 5879-5886.
163. HOFMEISTER F. Zur Lehre von der Wirkung der Salze. *Archiv für experimentelle Pathologie und Pharmakologie*, 1888, vol. 24, no. 4, p. 247-260.
164. MILLS A., LEPRE A., WILD L. Breath-by-breath measurement of carbon dioxide using a plastic film optical sensor. *Sensors and Actuators B-Chemical*, 1997, vol. 39, no. 1-3, p. 419-425.
165. AMAO Y. Probes and polymers for optical sensing of oxygen. *Microchimica Acta*, 2003, vol. 143, no. 1, p. 1-12.
166. MILLS A., YUSUFU D. Highly CO₂ sensitive extruded fluorescent plastic indicator film based on HPTS. *Analyst*, 2016, vol. 141, no. 3, p. 999-1008.
167. BORISOV S. M., KRAUSE C., ARAIN S., WOLFBEIS O. S. Composite material for simultaneous and contactless luminescent sensing and imaging of oxygen and carbon dioxide. *Advanced Materials*, 2006, vol. 18, no. 12, p. 1511-+.

168. STROBL M., RAPPITSCH T., BORISOV S. M., MAYR T., KLIMANT I. NIR-emitting aza-BODIPY dyes - new building blocks for broad-range optical pH sensors. *Analyst*, 2015, vol. 140, no. 21, p. 7150-7153.
169. WEIDGANS B. M., KRAUSE C., KLIMANT I., WOLFBEIS O. S. Fluorescent pH sensors with negligible sensitivity to ionic strength. *Analyst*, 2004, vol. 129, no. 7, p. 645-650.
170. BORCHERT N. B., KERRY J. P., PAPKOVSKY D. B. A CO₂ sensor based on Pt-porphyrin dye and FRET scheme for food packaging applications. *Sensors and Actuators B-Chemical*, 2013, vol. 176, no., p. 157-165.
171. VON BULTZINGSLOWEN C., MCEVOY A. K., MCDONAGH C., MACCRAITH B. D., KLIMANT I., KRAUSE C., WOLFBEIS O. S. Sol-gel based optical carbon dioxide sensor employing dual luminophore referencing for application in food packaging technology. *Analyst*, 2002, vol. 127, no. 11, p. 1478-1483.
172. HUBER C., KLIMANT I., KRAUSE C., WOLFBEIS O. S. Dual lifetime referencing as applied to a chloride optical sensor. *Analytical Chemistry*, 2001, vol. 73, no. 9, p. 2097-2103.

12. SEZNAM PŘÍLOH

Jedná se o soubor stěžejních publikovaných prací [P1-2 a P4] a práce [P3], která byla v době vzniku této disertační práce finalizována a připravena k odeslání k posouzení v odborném časopisu. Práce jsou řazeny v pořadí, ve kterém jsou uvedeny v kapitole 9. Seznam publikovaných vědeckých a odborných prací.

P1 Lochman, L.; Svec, J.; Roh, J.; Novakova, V. The role of the size of aza-crown recognition moiety in azaphthalocyanine fluorescence sensors for alkali and alkaline earth metal cations. *Dyes Pigm.* **2015**, *121*, 178-187. IF₂₀₁₄ = 3,966

P2 Lochman, L.; Svec, J.; Roh, J.; Kirakci, K.; Lang, K.; Zimcik, P.; Novakova, V. Metal cation recognition in water by a tetrapyrazinoporphyrazine-based tweezer receptor. *Chem. Eur. J.* **2016**, *22*, 7, 2417-2426. IF₂₀₁₅ = 5,731

P3 Lochman, L.; Miletin, M.; Uhlířová, S.; Lang, K.; Kirakci, K.; Zimcik, P.; Novakova, V. Structure-activity relationships and the role of counter anion in metal cation sensing by aza-crown recognition moieties. Manuskript finalizován a připraven k odeslání k posouzení v *Sens. Actuators, B*.

P4 Lochman, L.; Zimcik, P.; Klimant, I.; Novakova, V.; Borisov, S.M. Red-emitting CO₂ sensors with tunable dynamic range based on pH-sensitive azaphthalocyanine indicators. *Sens. Actuators, B.* **2017**, *246*, 1100-1107. IF₂₀₁₆ = 4,758

Příloha P1

Lochman, L.; Svec, J.; Roh, J.; Novakova, V. The role of the size of aza-crown recognition moiety in azaphthalocyanine fluorescence sensors for alkali and alkaline earth metal cations. *Dyes Pigm.* **2015**, *121*, 178-187. IF₂₀₁₄ = 3,966

Příloha P2

Lochman, L.; Svec, J.; Roh, J.; Kirakci, K.; Lang, K.; Zimcik, P.; Novakova, V. Metal cation recognition in water by a tetrapyrazinoporphyrazine-based tweezer receptor. *Chem. Eur. J.* **2016**, 22, 7, 2417-2426. IF₂₀₁₅ = 5,731

Příloha P3

Lochman, L.; Miletin, M.; Uhlířová, S.; Lang, K.; Kirakci, K.; Zimcik, P.; Nováková, V. Structure-activity relationships and the role of counter anion in metal cation sensing by aza-crown recognition moieties. Manuscript finalizován a připraven k odeslání k posouzení v Sens. Actuators, B.

Příloha P4

Lochman, L.; Zimcik, P.; Klimant, I.; Novakova, V.; Borisov, S.M. Red-emitting CO₂ sensors with tunable dynamic range based on pH-sensitive azaphthalocyanine indicators. *Sens. Actuators, B.* **2017**, *246*, 1100-1107. IF₂₀₁₆ = 4,758