

Univerzita Karlova  
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové  
Katedra farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy



Diplomová práce

# Ovlivnění $pK_a$ rozpoznávací části azaftalocyaninových senzorů

Veronika Čermáková



Školitel: doc. PharmDr. Petr Zimčík, Ph.D.

Hradec Králové, 2018

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

| *V Hradci Králové, květen 2018*

.....

## **Poděkování**

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému školiteli doc. PharmDr. Petru Zimčíkovi, Ph.D. za výborné vedení mé práce, trpělivost a veškerou pomoc a čas, který mi věnoval. Dále děkuji členům výzkumné skupiny azaftalocyaninů a celému kolektivu katedry, jmenovitě doc. PharmDr. Veronice Novákové, Ph.D., doc. PharmDr. Miroslavu Miletínovi, Ph.D., Mgr. Lukáši Lochmanovi, Ph.D., Mgr. Jiřímu Demuthovi, Mgr. Janu Kollárovi za přátelskou atmosféru a cenné rady, které vedly k vytvoření této práce. Za finanční podporu děkuji projektu Specifického vysokoškolského výzkumu SVV 260 401. V neposlední řadě děkuji své rodině za podporu v průběhu celého mého studia.

# Obsah

ABSTRAKT.....	6
ABSTRACT.....	7
SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	8
1 CÍL PRÁCE.....	9
2 TEORETICKÁ ČÁST.....	11
2.1 Fluorescence.....	11
2.2 Fluorescenční senzory.....	14
2.3 Fluorescenční senzory určené ke stanovení pH.....	16
2.4 AzaPc jako senzory pH.....	19
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	21
3.1 Schéma prováděných reakcí.....	22
3.2 Příprava 3,5-dibrom-4-methoxybenzaldehydu (1a).....	24
3.3 Příprava 1,12-bis{(1-methylbenzimidazolium)-3-yl}dodekan- dibromidu (katalyzátor).....	25
3.4 Benzoinová kondenzace látky 1a.....	26
3.5 Příprava 5,6-bis( <i>tert</i> -butylsulfanyl)pyrazin-2,3-dikarbonitrilu (2).....	28
3.6 Příprava 1-(3,5-dibrom-4-hydroxyfenyl)ethanonu (3a).....	29
3.7 Příprava 5-(3,5-dibrom-4-hydroxyfenyl)pyrazin-2,3-dikarbonitrilu (3b) 30	
3.8 Příprava 2-(3,5-dibrom-4-hydroxyfenyl)-9,10,16,17,23,24-hexakis( <i>tert</i> - butylsufanyl)-1,4,8,11,15,18,22,25-(oktaaza)ftalocyaninato hořečnatého komplexu (3c-Mg) 31	
3.9 Příprava 2-(3,5-dibrom-4-hydroxyfenyl)-9,10,16,17,23,24-hexakis( <i>tert</i> - butylsufanyl)-1,4,8,11,15,18,22,25-(oktaaza)ftalocyaninato zinečnatého komplexu (3c-Zn) 33	
3.10 Příprava 1-(4-hydroxy-3-nitrofenyl)ethanonu (4a).....	35
3.11 Příprava 5-(4-hydroxy-3-nitrofenyl)pyrazin-2,3-dikarbonitrilu (4b) .	36

3.12	Příprava 2-(3-nitro-4-hydroxyfenyl)-9,10,16,17,23,24-hexakis( <i>terc</i> -butylsufanyl)-1,4,8,11,15,18,22,25-(octaaza)ftalocyaninato hořečnatého komplexu (4c-Mg)	37
3.13	Příprava mikroemulze se zabudovaným senzorem .....	39
3.14	Příprava lipozomů se zabudovaným senzorem .....	40
3.15	Stanovení $pK_a$ pomocí měření absorpčních a fluorescenčních spekter	41
4	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	42
5	ZÁVĚR.....	52
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....	53

# ABSTRAKT

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy

Autor: Veronika Čermáková

Školitel: doc. PharmDr. Petr Zimčík, Ph.D.

Název diplomové práce: **Ovlivnění  $pK_a$  rozpoznávací části azaftalocyaninových senzorů**

Azaftalocyaniny (AzaPc) jsou makrocyclické sloučeniny obsahující rozsáhlý systém konjugovaných dvojných vazeb, který jim uděluje schopnost absorbovat světlo v červené oblasti spektra. Jsou charakterizovány intenzivní červenou fluorescencí jako jednou z možných cest deaktivace excitovaných stavů po absorpci fotonu. Fluorescence AzaPc substituovaných fenolickou skupinou na periferii může být vypnuta/zapnuta v závislosti na pH okolního prostředí a  $pK_a$  fenolické skupiny. V zásaditém prostředí se molekula nachází ve formě fenolátu a podstupuje tzv. intramolekulární přenos náboje mezi fenolátem, který slouží jako donor, a elektrondeficitním makrocyclickým jádrem, které slouží jako akceptor. Výsledkem je zhášení fluorescence. Přepínání mezi ON/OFF stavy u fenol-substituovaných AzaPc je závislé na koncentraci protonů, a proto mohou být tyto látky využity k monitorování pH.

Cílem této práce byla syntéza derivátů fenol-substituovaných AzaPc, jejichž  $pK_a$  fenolické skupiny je modulováno vhodnou substitucí v *ortho* pozici. Syntéza začala přípravou příslušných prekurzorů, tedy derivátů 5-(4-hydroxyfenyl)pyrazin-2,3-dikarbonitrilu. Byla provedena elektrofilní substituce (bromace nebo nitrace) komerčně dostupného 4-hydroxyacetofenonu. Produkty reakcí byly následně oxidovány pomocí oxidu seleničitého na ketoaldehydy, které nebyly izolovány, ale byly *in situ* v následné kondenzační reakci s diaminomaleonitrilem převedeny na příslušné pyrazin-2,3-dikarbonitrily. Pro získání nesymetrických AzaPc byla provedena smíšená cyklotetramerizace těchto prekurzorů (A) spolu s 5,6-bis(*terc*-butylsulfanyl)pyrazin-2,3-dikarbonitrilem (B) za použití butanolátu hořečnatého jako iniciátoru reakce. Výsledná směs obsahovala šest různých kongenerů (t.j. AAAA, AAAB, AABB, ABAB, ABBB, BBBB), z níž požadovaný kongener (ABBB) byl separován pomocí sloupcové chromatografie. AzaPc byly následně ukotveny do lipofilních nosičů (mikroemulze, lipozomy) a změny intenzity fluorescence byly hodnoceny jako funkce pH pufru. Závislost intenzity fluorescence na pH umožnila stanovení hodnoty  $pK_a$ .

# ABSTRACT

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmaceutical Chemistry and Pharmaceutical Analysis

Candidate: Veronika Čermáková

Supervisor: Assoc. Prof. Petr Zimčík, Ph.D.

Title of Diploma Thesis: **Modulation of  $pK_a$  of the recognition moiety of azaphthalocyanine sensors**

Azaphthalocyanines (AzaPc) are macrocyclic compounds containing a large system of conjugated double bonds that enables them to absorb light in the red part of the spectrum that is promising in biological applications. They are characterized by intense red fluorescence as one of the relaxation pathways of the excited state after absorbing a photon. The fluorescence of AzaPc substituted with a phenol moieties on the periphery can be switched ON/OFF depending on the pH of the environment and the  $pK_a$  of the phenolic group. In basic medium, the molecule occurs as phenolate and undergoes intramolecular charge transfer between the phenolate group (a donor) and the electron-deficient macrocyclic core (an acceptor). As a consequence of this process, the fluorescence is quenched. Switching between ON/OFF states in phenol-substituted AzaPc is dependent on the proton concentration and thus can be utilized in pH sensing. The aim of this work was to synthesize derivatives of phenol-substituted AzaPcs whose  $pK_a$  is modulated with suitable substitution in *ortho* position. The synthesis started with preparation of appropriate precursors (*i.e.* substituted 5-(4-hydroxyphenyl)pyrazine-2,3-dicarbonitriles). Electrophilic substitution of commercially available 4-hydroxyacetophenone (bromination or nitration) was performed. The products were treated with selenium dioxide affording corresponding ketoaldehydes that were not isolated but directly reacted in a condensation reaction with diaminomaleonitrile. To obtain unsymmetrical AzaPc, a mixed cyclotetramerization (statistical condensation) of these precursors (A) with 5,6-bis(*tert*-butylsulfanyl)pyrazine-2,3-dicarbonitrile (B) was performed using magnesium butoxide as an initiator. Resulting mixture contained six different congeners (*i.e.* AAAA, AAAB, AABB, ABAB, ABBB, BBBB) from which the required congener (ABBB) was isolated using column chromatography. AzaPcs were then incorporated to lipophilic particles (microemulsion, liposomes) and the fluorescence changes were investigated as a function of pH of the buffer. Dependence of fluorescence on pH allowed determination of  $pK_a$  value.

## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ACN	acetonitril
AzaPc	azaftalocyanin
BCECF	2',7'-bis(2-karboxyethyl)-5(6)-karboxyfluorescein
BCECF AM	acetoxymethylester 2',7'-bis(2-karboxyethyl)-5(6)-karboxyfluoresceinu
BODIPY	bor-dipyrrromethen
CHF	chloroform
CSS	charge separate state
DAMN	diaminomaleonitril
DBU	1,8-diazabicyklo[5.4.0]undec-7-en
DOPC	dioleoylfosfatidylcholin
HPTS	8-hydroxypyren-1,3,6-trisulfonát sodný
ICT	intramolekulární přenos náboje (intramolecular charge transfer)
MeOH	methanol
MCT	triglyceridy se střední délkou řetězce (medium-chain triglycerides)
NMR	nukleární magnetická resonance
ROS	reaktivní formy kyslíku (reactive oxygen species)
SNAFL	seminaftofluorescein
SNARF	seminaftorhodafluor
TLC	tenkovrstvá chromatografie (Thin-layer chromatography)
THF	tetrahydrofuran



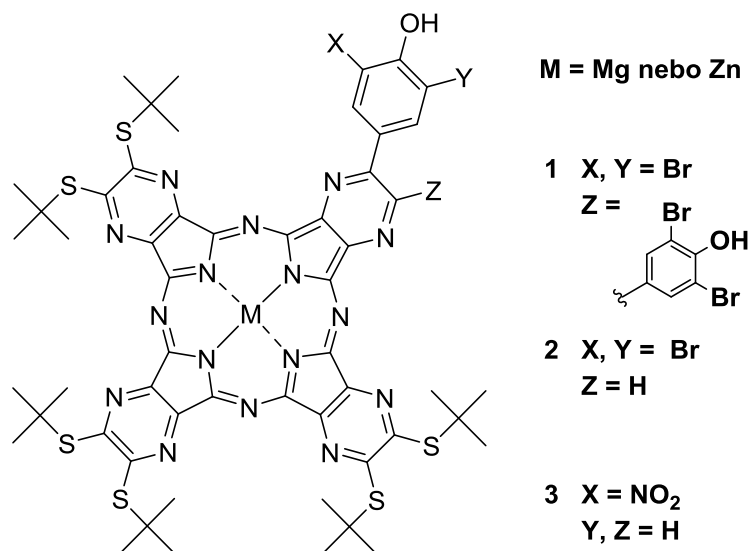
# 1 CÍL PRÁCE

pH představuje důležitý fyziologický parametr, který je v organismu zpravidla striktně regulován a udržován v úzkém rozmezí hodnot. Pro jeho zachování se v buňkách uplatňují různé homeostatické a pufrovací mechanismy. Vychýlení od normálních hodnot doprovází rozličné patologické i fyziologické události. pH hraje například důležitou roli při apoptóze<sup>1</sup> a svalové kontrakci<sup>2</sup>. Abnormální hodnoty pH jsou spojovány s rakovinou<sup>3,4</sup> či Alzheimerovou nemocí.<sup>5</sup> Informace o hodnotě pH je zprostředkována fluorescenčními senzory a slouží k pochopení konkrétních jevů a je vodítkem k vývoji nových léčebných přístupů pro dané patologické stavy.

Azaftalocyaniny (AzaPc) jsou planární makrocyclické sloučeniny obsahující rozsáhlý systém konjugovaných dvojných vazeb, který je předurčuje k modrému až zelenému zbarvení. Vyznačují se silnou absorpcí v červené oblasti spektra a intenzivní červenou fluorescencí. Jsou to syntetické sloučeniny strukturně podobné přirozeně se vyskytujícím porfyrinům, jako je hem, nebo chlorinům, jako je chlorofyl. Pro své fotofyzikální a fotochemické vlastnosti jsou v současnosti intenzivně zkoumány jako účinné fotosenzitizéry ve fotodynamické terapii,<sup>6</sup> dále jako zhášeče fluorescence v DNA sondách<sup>7,8</sup> a jako fluorescenční senzory kationtů kovů.<sup>9</sup> Tato práce se zabývá AzaPc jako možnými senzory pH, jejichž fotofyzikální vlastnosti jsou závislé na pH prostředí.

Použití AzaPc ke stanovení pH je strukturně podmíněno přítomností donorové fenolické skupiny na periferii. Takto substituované látky podléhají v zásaditém prostředí disociaci na fenolátový anion a podstupují proces zvaný intramolekulární přenos náboje (intramolecular charge transfer, ICT) jako hlavní cestu deaktivace excitovaných stavů, jehož výsledkem je vymizení fluorescence.<sup>10</sup>

Cílem této práce byla syntéza nesymetrických pH senzitivních derivátů AzaPc ze skupiny tetrapyrazinoporfyrazinů, jejichž  $pK_a$  rozpoznávací fenolické části je ovlivněno vhodnou substitucí v *ortho* pozici (Obr 1).



*Obr. 1* Struktura cílových molekul.

## 2 TEORETICKÁ ČÁST

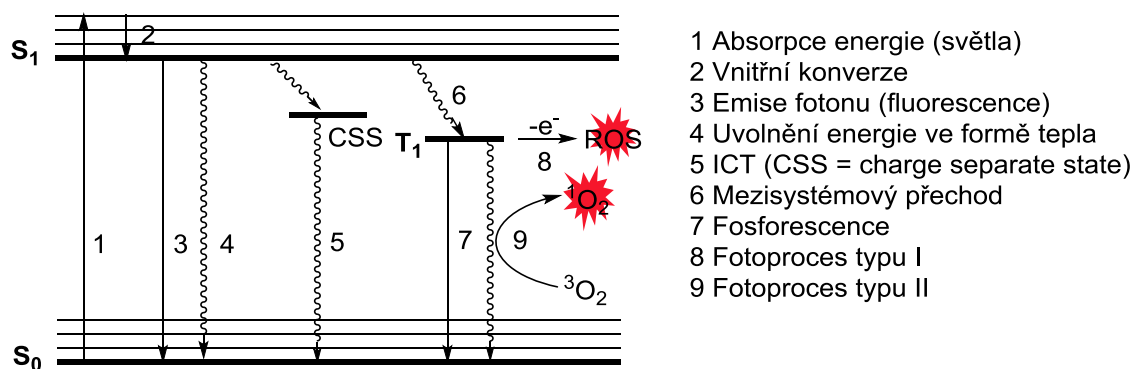
### 2.1 Fluorescence

Fluorescence je jev, při kterém dochází k emisi světla látkou, a představuje jeden z možných způsobů uvolnění energie nabyté předešlou absorpcí fotonu. Vyskytuje se jak u anorganických (minerál fluorit), tak i organických látek (typicky aromatických). Mezi zástupce organických látek se schopností fluoreskovat se řadí například fluorescein, který se kromě jiného používá v oftalmologii k zjištění vad rohovky, či antimalarikum chinin.<sup>11</sup>

Fenomén fluorescence byl pozorován již v 16. století ve výluhu dřeva nazývaného *Lignum nephriticum*, používaného pro léčbu onemocnění ledvin. Původcem byla látka strukturně blízká fluoresceinu vzniklá rozštěpením glykosidické vazby při porušení tkáně dřeva. V 17. století bylo při jeho zkoumání zjištěno, že jev je možné pozorovat pouze v zásaditém prostředí, vymizí přidáním kyseliny, ale je navrácen novým přídavkem báze. Poprvé tak bylo využito fluorescenční látky jako ukazatele pH.<sup>12</sup>

Pokud molekula absorbuje světlo, přijímá tak energii a dochází k přechodu elektronu ze základního stavu  $S_0$  do jedné z vibračních hladin energeticky vyššího excitovaného stavu  $S_1$  (Obr. 2). Tento stav je nestabilní, a po určitém čase se molekula různými způsoby energie zbavuje a navrací zpět do základního stavu. Jednou z cest relaxace je emise fotonu (fluorescence), přičemž vlnová délka vyzářeného světla je zpravidla delší (má nižší energii) než vlnová délka světla absorbovaného. Příčinou je ztráta části energie vnitřní konverzí a přechodem molekuly na nejnižší vibrační hladinu excitovaného stavu před vlastním vyzářením fotonu. Tento rozdíl vlnových délek je označován jako Stokesův posun. Proces absorpce s následnou emisí je při fluorescenci velmi rychlý (řadově nanosekundy), a proto metody založené na fluorescenci poskytují pohotovou odpověď na rychle se měnící podmínky v biochemických dějích.<sup>11</sup>

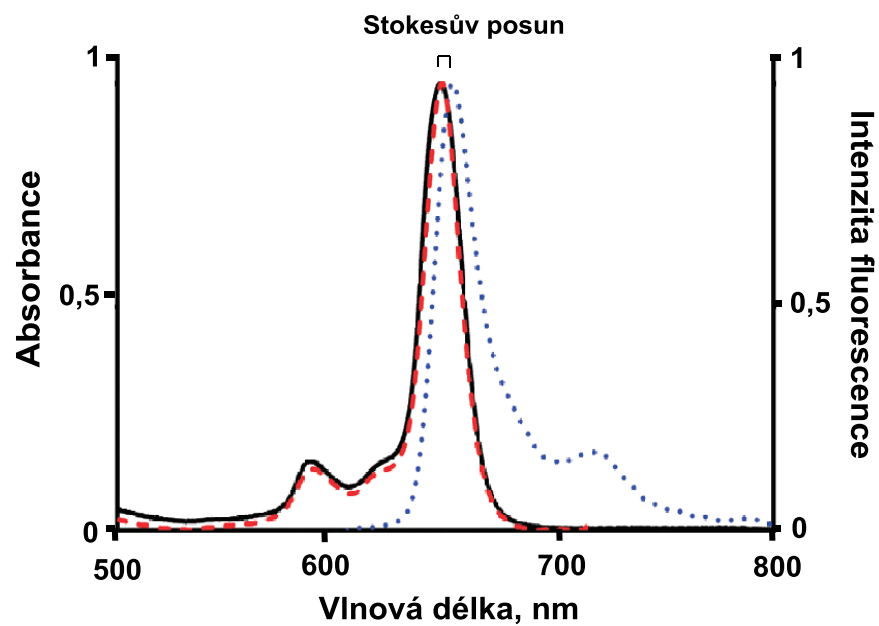
Mezi další způsoby návratu do energeticky výhodného stavu  $S_0$  patří uvolnění energie ve formě tepla a ICT. Molekula se energie dále může zbavit pomocí mezisystémového přechodu a vyzářením fotonu fosforescencí či předáním energie okolním molekulám za vzniku jejich vysoce reaktivních forem (reactive oxygen species, ROS, singletový kyslík,  $^1O_2$ ), což je uplatněno ve fotodynamické terapii.<sup>13</sup>



Obr. 2 Schéma energetických přechodů po absorpci energie ve formě fotonu (tzv. Jablonského diagram). Zářivé přechody jsou vyznačeny rovnou čarou s šipkou, nezářivé vlnovkou.

Měření založená na fluorescenci se vyznačují mimořádnou citlivostí (detekovatelné jsou i koncentrace v řádu  $10^{-10}$  M). Ta je podmíněna způsobem měření, kdy je intenzita emitovaného záření vztažena k tmavému pozadí. Měření absorpce naproti tomu spočívá ve srovnání intenzity prošlého světla vzorkem analytu a slepým vzorkem a citlivost je tedy mnohem menší.<sup>11</sup>

Absorpční a fluorescenční vlastnosti látek jsou hodnoceny na základě spekter (Obr. 3). Absorpční spektrum je vyjádřením grafické závislosti absorbance na vlnové délce absorbovaného záření. Emisní spektrum popisuje intenzitu emisního záření jako funkci vlnové délky tohoto záření, přičemž vlnová délka excitačního záření je konstantní. Naproti tomu excitační spektrum popisuje intenzitu emisního záření jako funkci vlnové délky excitačního záření, vlnová délka emisního záření je konstantní. Excitační spektrum většinou kopíruje absorpční spektrum, emisní spektrum je jeho zrcadlovým obrazem.<sup>12</sup>



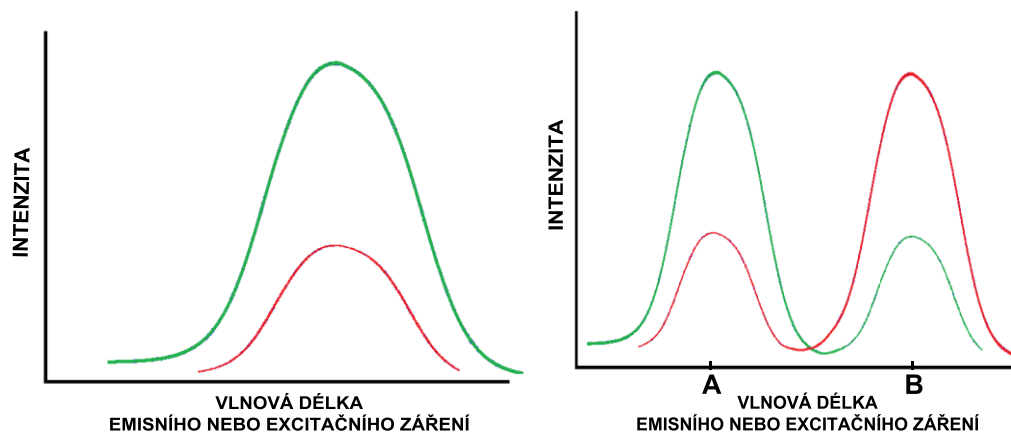
Obr. 3 Ukázkové absorpční (plná černá čára), emisní (tečkovaná modrá čára) a excitační (čárkovaná oranžová čára) spektrum u AzaPc. Rozdíl vlnových délek maxim absorpčního a emisního spektra je označován jako Stokesův posun.

## 2.2 Fluorescenční senzory

Fluorescenční senzory jsou látky schopné selektivně rozpoznat analyt (např. anorganické ionty jako je  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Na^+$ ,  $Cl^-$  či proton  $H^+$ ). Přítomnost analytu se projeví ve změně jejich fotofyzikálních vlastností. Pro měření fluorescence skrze živé tkáně je žádané, aby hodnota vlnové délky excitačního a emisního záření byla v intervalu 650-900 nm. Jedná se o oblast spektra daleké červené a blízké infračervené části. Světlo této vlnové délky v kontrastu se světlem kratší vlnové délky prostupuje hlouběji tkáněmi, nedochází k autofluorescenci přirozeně se vyskytujících endogenních fluoroforů (hemoglobin, melanin), ani k nadměrnému rozptylu. Tkáň po vystavení tomuto záření má pouze tendenci se zahřívat, nedochází k přímému poškození tkáně.<sup>14</sup>

Významným parametrem senzoru je kvantový výtěžek fluorescence  $\Phi_F$ , který udává pravděpodobnost návratu excitované molekuly do základního stavu emisí fotonu. Je dán poměrem počtu emitovaných fotonů k počtu absorbovaných fotonů. Vysoké kvantové výtěžky fluorescence  $\Phi_F$  snižují množství senzoru potřebná k měření. Senzory jsou navíc testovány pro stabilitu a kompatibilitu s živými systémy.<sup>14</sup>

Stanovení koncentrace analytu může být založeno pouze na poklesu nebo nárůstu intenzity fluorescence dle pH. Nevýhodou je závislost na koncentraci senzoru. Senzory, které tento problém překonávají, vykazují posuny v absorpčních (excitačních) nebo emisních spektrech po navázání analytu. Poměr intenzit fluorescence naměřených při dvou vlnových délkách emisního či excitačního záření na koncentraci senzoru závislý není a umožňuje spolehlivější stanovení pH (Obr. 4).<sup>11</sup>

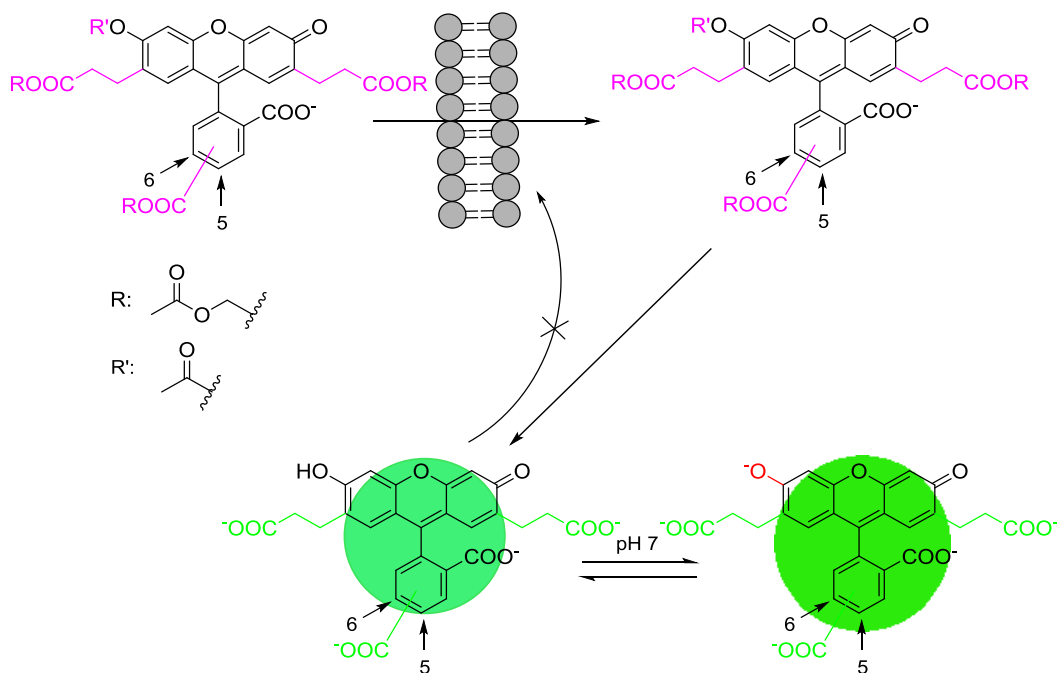


*Obr. 4 Spektra naměřená při dvou hodnotách pH (zelená a červená křivka). Vlevo spektrum senzoru, který v závislosti na pH vykazuje jednoduchou změnu v intenzitě (pokles, nárůst). Vpravo spektrum senzoru, který umožňuje stanovení pH z poměru intenzit při dvou vlnových délkách.*

## 2.3 Fluorescenční senzory určené ke stanovení pH

Důležitým parametrem pro fluorescenční pH senzory je hodnota  $pK_a$ , která musí odpovídat hodnotě pH měřeného prostředí, aby zjištěné hodnoty byly přesné. Při pouze malém výkyvu pH je tak změna ve fotofyzikálních vlastnostech zřetelná. V tomto ohledu existují senzory určené ke stanovení pH v cytosolu (pH 6,8–7,4) nebo acidických organelách (lysozomy, pH 4,5–6).<sup>15</sup>

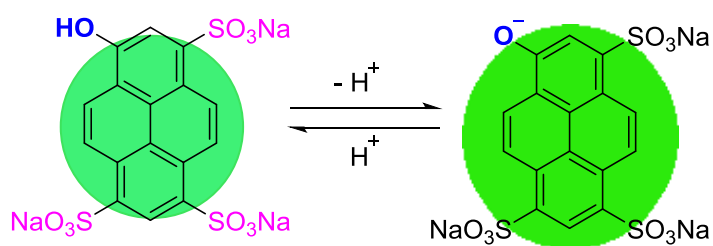
Mezi v současnosti používané komerčně dostupné fluorescenční pH senzory patří deriváty fluoresceinu, jako je 2',7'-bis(2-karboxyethyl)-5(6)-karboxyfluorescein (BCECF), jehož  $pK_a$  je oproti vlastnímu fluoresceinu upraveno k hodnotě blízké 7. BCECF je ve formě lipofilního esteru (BCECF AM, acetoxymethylester), který snadno prochází přes membrány, vpraven neinvazivně do buňky. Zde pomocí přítomných nespecifických esteráz dochází k hydrolýze, volné karboxylové skupiny jsou v prostředí cytosolu ionizovány, čímž je zpomalen únik molekuly ven z buňky (Obr. 5). Absorpční (excitační) spektrum BCECF vykazuje s narůstající hodnotou pH nárůst intenzity a posun k vyšším vlnovým délkám, který je dán vznikem fenolátové formy molekuly BCECF. Měření s BCECF je založeno na porovnávání intenzit fluorescence měřených při dvou vlnových délkách excitačního záření.<sup>11</sup>



Obr. 5 Formy BCECF: BCECF AM, volná (de)protonovaná forma.

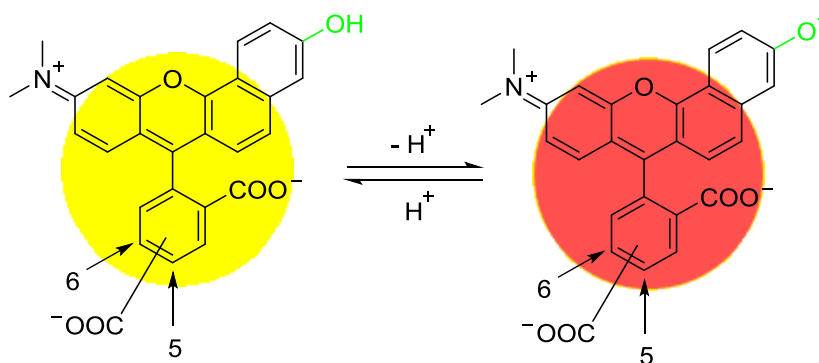


Jiným zástupcem fluorescenčních pH senzorů je 8-hydroxypyren-1,3,6-trisulfonát sodný (HPTS, obr. 6). Sulfonátové skupiny jsou podmínkou rozpustnosti molekuly ve vodě, hydroxyskupina, jejíž  $pK_a$  je přibližně 7,5, poskytuje citlivost k pH. Ionizovaná forma se vyznačuje silnou fluorescencí. Excitační spektra vykazují s rostoucím pH (a tedy počtem disociovaných molekul) pokles intenzity emisního záření při vlnové délce 420 nm excitačního záření a současně nárůst při 450 nm. pH je určeno na základě poměru intenzit naměřených při těchto vlnových délkách.<sup>11</sup>



Obr. 6 HPTS.

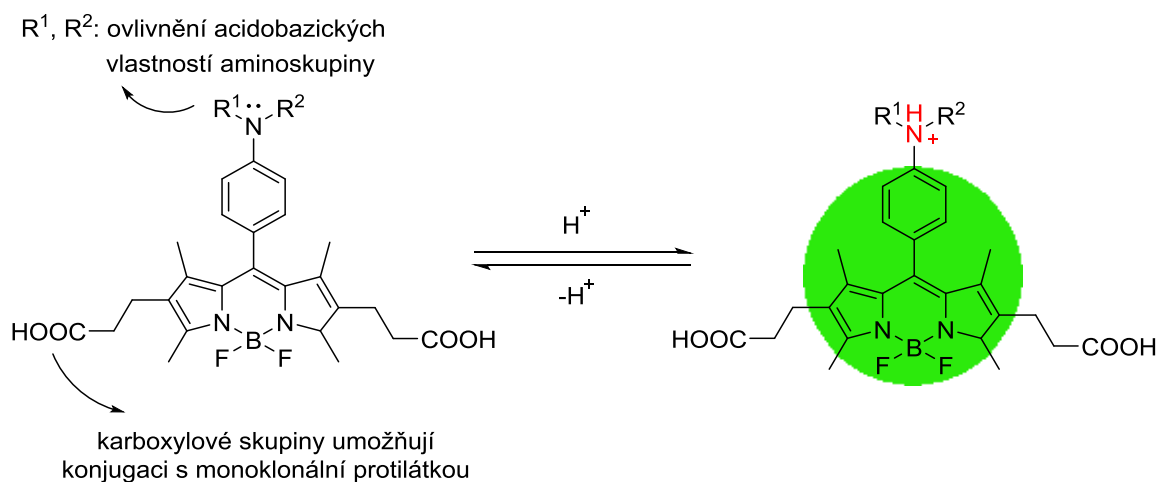
Mezi pH senzory dále patří seminaftofluoresceiny (SNAFL) a seminaftorhodafluory (SNARF). Posuny podmíněné změnou pH jsou u nich patrné jak v absorpčních (excitačních), tak emisních spektrech. Zástupcem této skupiny je karboxy-SNARF-1 (Obr. 7) s hodnotou  $pK_a \sim 7,5$ , jehož fluorescence se s pH mění ze žluté (580 nm) na červenou (640 nm).<sup>11</sup>



Obr. 7 Karboxy-SNARF-1.

Nové molekuly v oblasti pH senzorů představují látky odvozené ze struktury bor-dipyromethenu (BODIPY, obr. 8), které absorbují a emitují záření v oblasti daleké červené a blízké infračervené. Jedna z řad těchto látek (2,6-dikarboxyethyl-1,3,5,7-tetramethyl-BODIPY) byla zkoušena pro selektivní zobrazení nádorové tkáně.

Tyto BODIPY deriváty byly konjugovány s monoklonální protilátkou, jejíž specifickou vazbou na povrchové struktury nádorové buňky došlo cíleně k internalizaci do endozomu. V kyselém prostředí zralého endozomu došlo k aktivaci BODIPY na silně fluorescenční formu, čímž bylo dosaženo vizualizace nádorové tkáně s vysokým rozlišením od té zdravé.<sup>16</sup>



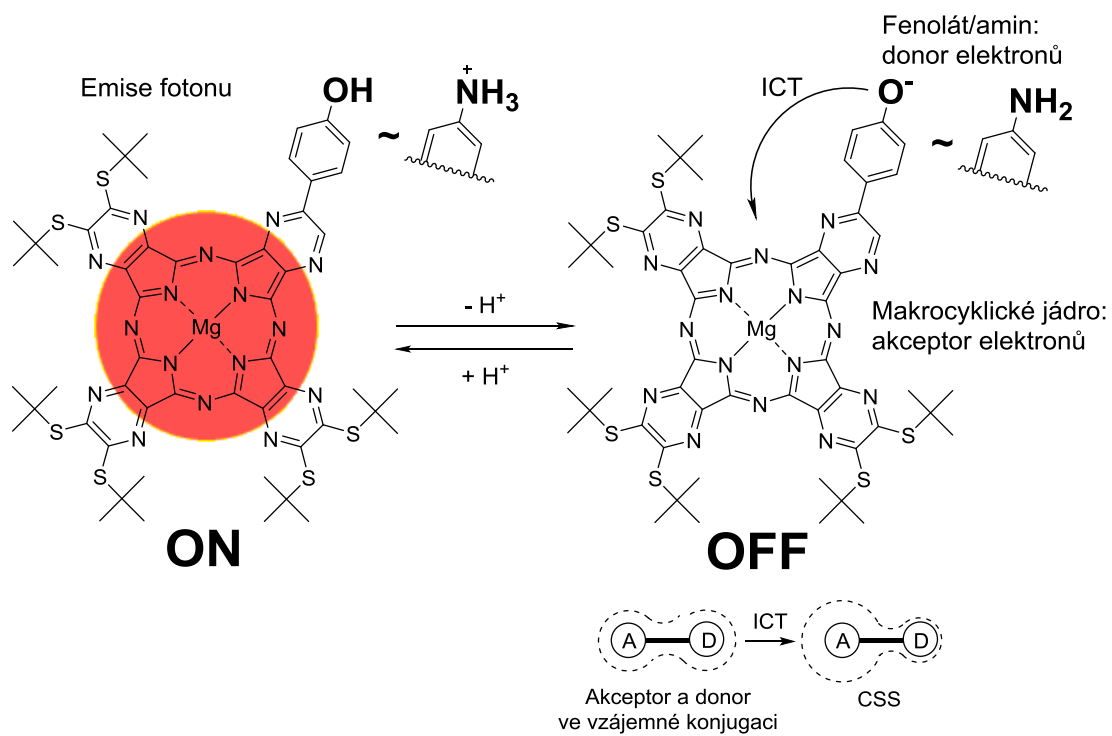
*Obr. 8 BODIPY.*

## 2.4 AzaPc jako senzory pH

Závislost intenzity fluorescence na pH prostředí je u AzaPc strukturně podmíněna přítomností volného elektronového páru donorové skupiny (amin, fenolát). Dle pH okolního prostředí a hodnoty  $pK_a$  donorové skupiny se molekula nachází ve své ionizované či neionizované formě. V kyselém prostředí ( $pH < pK_a$ ) se vyskytuje v podobě fenolu, případně amoniového kationtu, kdy volný elektronový pár je blokován protonem a molekula vykazuje po excitaci intenzivní fluorescenci. V zásaditém prostředí ( $pH > pK_a$ ) molekula podstupuje ICT mezi fenolátem, respektive aminovou skupinou, a makrocyclickým jádrem, které vystupuje jako akceptor elektronu. Výsledkem je vymizení fluorescence (Obr. 9).<sup>10,17</sup>

ICT je alternativním mechanismem deaktivace vybuzené molekuly, kdy se mezi donorem a akceptorem, kteří jsou ve vzájemné konjugaci, vytváří v excitovaném stavu  $S_1$  parciální náboj. Dochází k rychlému zvýšení elektronové hustoty u akceptoru na úkor donoru (tzv. charge separate state, CSS) a následně se molekula velmi rychle vrací nezářivým procesem zpět do základního stavu  $S_0$ .<sup>18</sup>

Principem měření pH u AzaPc je tedy kompetice fluorescence a ICT – dvou možných cest návratu excitovaných molekul do základního energetického stavu. Volný elektronový pár fenolátu (aminu) je silným donorem pro ICT a celý proces probíhá velice rychle (řádově pikosekundy), proto dochází přednostně ke zhášení excitovaných stavů tímto způsobem.<sup>18</sup> V kyselém prostředí je molekula zapnuta (ON), v zásaditém je vypnuta (OFF). Přepínání mezi ON/OFF stavy je závislé na pH prostředí a  $pK_a$  donorové skupiny a je většinou plně reverzibilní.<sup>10</sup>



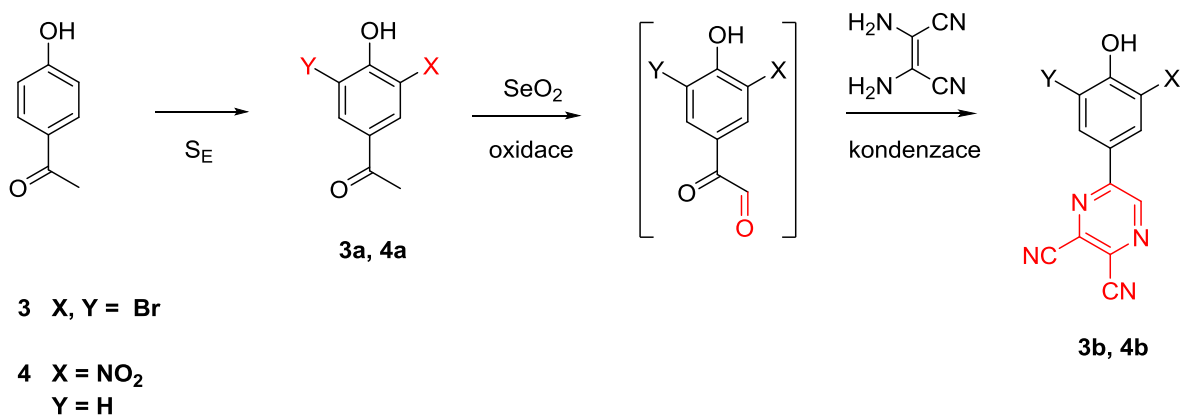
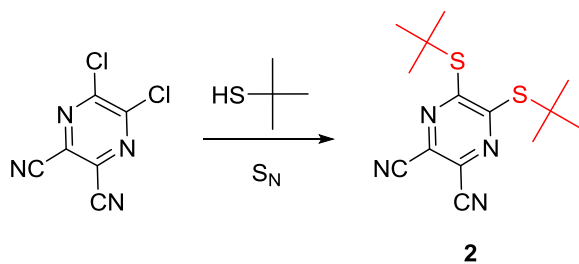
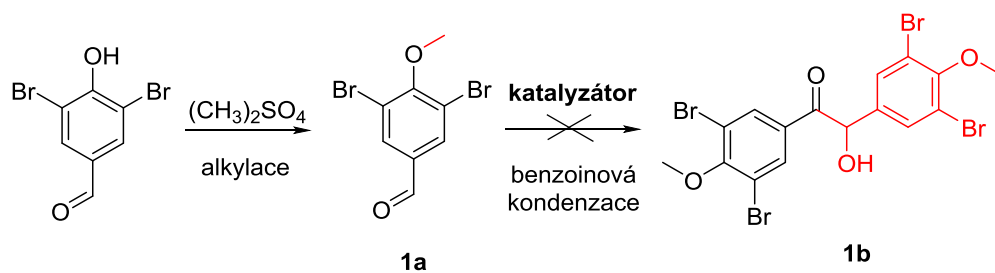
Obr. 9 Princip pH senzitivity u AzaPc: ICT.

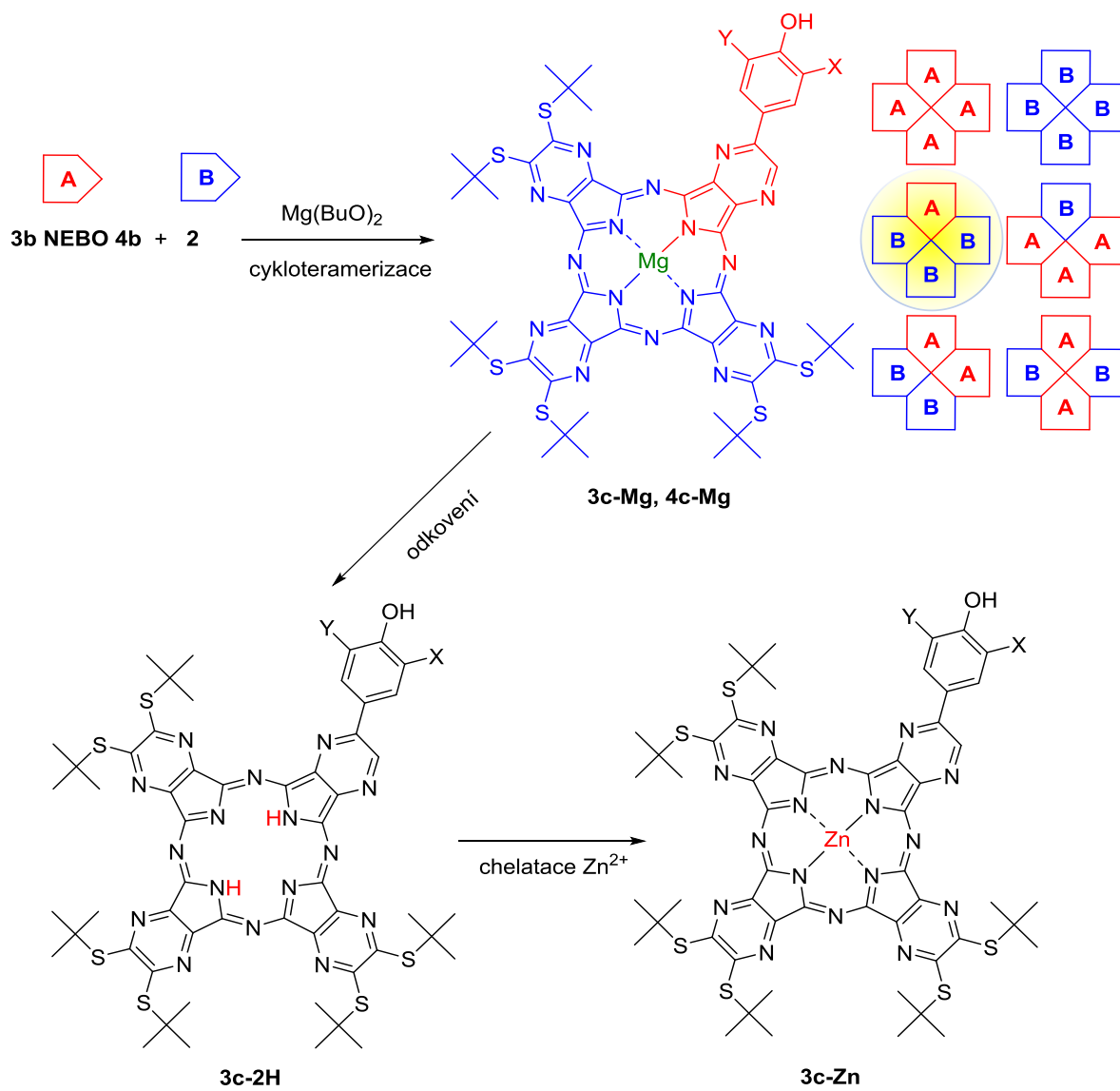
### 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Výchozí látky a rozpouštědla pro reakce byly zakoupeny od firem Lach-Ner, Penta, Sigma-Aldrich či Acros. Byly použity bez dalšího čištění.

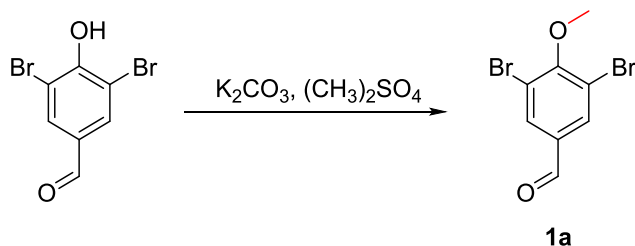
Průběh reakcí a čistota výsledných produktů byly sledovány pomocí tenkovrstvé chromatografie (TLC) na deskách Merck Kieselgel 60 F254. Detekce UV lampou probíhaly při vlnové délce 254 nm nebo 366 nm. Teplota tání sloučenin byla měřena pomocí digitálního přístroje ELECTROTHERMAL IA9200. Čištění produktů reakcí bylo prováděno pomocí sloupcové chromatografie na stacionární fázi Merck Kieselgel 60 (0,040-0,063 mm). Mobilní fáze použité pro jednotlivé reakce jsou popsány níže. Infračervená spektra byla měřena IČ spektrofotometrem Nicolet 6700 v ATR módu.  $^1\text{H}$  NMR a  $^{13}\text{C}$  NMR spektra byla měřena na přístroji VNMR S500 (Varian). Elementární analýza byla provedena na přístroji Vario Micro Cube Elemental Analyzer (Elementar Analysensysteme GmbH, Hanau, Germany). UV/Vis spektra byla měřena pomocí přístroje Shimadzu UV-2600 spectrophotometer (Shimadzu) a fluorescenční spektra na FS5 Spectrofluorometer (Edinburg Instruments). Hmotnostní spektrometrie (MALDI-TOF) byla provedena na přístroji 4800 MALDI TOF/TOF mass spectrometer (AB Sciex, Framingham, MA, USA) s použitím *trans*-2-[3-(4-*terc*-butylfenyl)-2-methyl-2-propenyliden]-malononitrilu jako matrice. Přístroj byl kalibrován externě pětibodovou kalibrační metodou pomocí Peptide Calibration Mix 1 (LaserBioLabs, Sophia-Antipolis, France).

### 3.1 Schéma prováděných reakcí





### 3.2 Příprava 3,5-dibrom-4-methoxybenzaldehydu (1a)



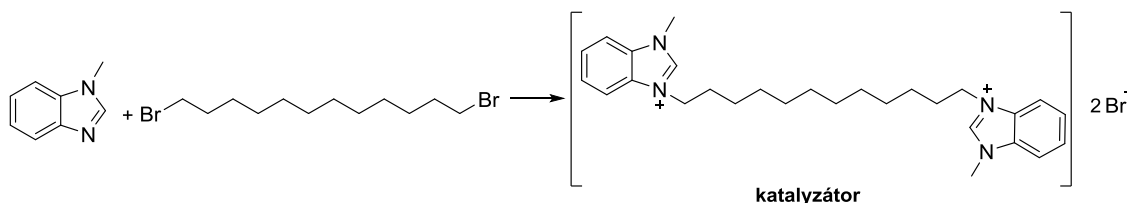
3,5-dibrom-4-hydroxybenzaldehyd (2,01 g, 7 mmol) a uhličitan draselný (1,46 g, 10,6 mmol) byly rozpuštěny v acetonitrilu (ACN, 40 ml). Rozpuštění bylo usnadněno mikronizací pomocí ultrazvuku. Reakční směs byla přivedena k varu, následně byl přidán dimethylsulfát (1,3 ml, 14 mmol). Pokračovalo se v zahřívání k teplotě varu rozpouštědla za stálého míchání pod zpětným chladičem po dobu jedné hodiny. Průběh reakce byl sledován pomocí TLC, kdy vyvíjecí soustavu tvořil hexan a ethyl-acetát v poměru 9:1. Směs byla následně přefiltrována přes skládaný filtr a zbavena rozpouštědla pomocí rotační vakuové odparky. Ke zbytku byla přidána voda a produkt byl třikrát vytřepáván do ethyl-acetátu. Spojené ethyl-acetátové výtřepky byly vysušeny bezvodým síranem sodným, přefiltrovány přes skládaný filtr a odpařeny na rotační vakuové odparce. Produktem je bílá pevná látka.

**Výtěžek:** 2,06 g (97 %)

**Molekulová hmotnost:** 293,94. **T. t.:** 89,4–90,2 °C (lit.<sup>19</sup> 97 °C). **<sup>1</sup>H NMR** (500 MHz, chloroform-*d*): δ 9,86 (s, 1H, CHO), 8,03 (s, 2H, CH), 3,97 (s, 3H, CH<sub>3</sub>) ppm. **<sup>13</sup>C NMR** (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 188,38, 159,11, 134,20, 133,89, 119,28, 60,86 ppm.



### 3.3 Příprava 1,12-bis{(1-methylbenzimidazolium)-3-yl}dodekan-dibromidu (katalyzátor)

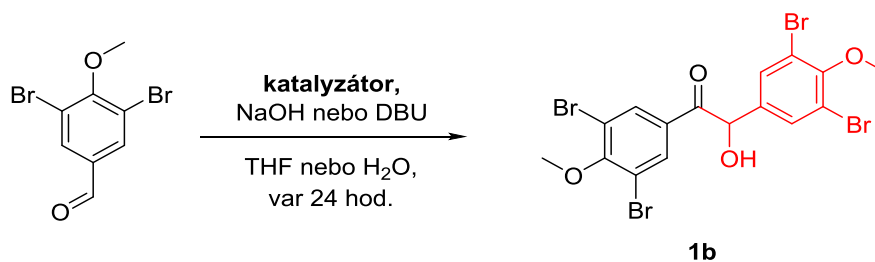


Syntéza byla založena na postupu popsáném již dříve v literatuře.<sup>20</sup> 1,12-dibromdodekan (8,20 g, 25 mmol) byl za horka rozpuštěn v ACN (70 ml). 1-methylbenzimidazol (6,61 g, 50 mmol) byl rozpuštěn v ACN (30 ml) a přidán k roztoku 1,12-dibromdodekanu. Směs byla zahřívána pod zpětným chladičem za stálého míchání na teplotu varu rozpouštědla po dobu 24 hod. Po ochlazení byl nerozpustný produkt reakce odfiltrován za sníženého tlaku a vysušen v sušárně. Filtrát v odsávací baňce byl zbaven rozpouštědel pomocí rotační vakuové odparky, zbytek v baňce byl rozpuštěn ve vodě. Roztok byl čtyřikrát třepán s ethyl-acetátem. Tímto způsobem přečištěná vodná fáze byla zbavena rozpouštědla pomocí rotační vakuové odparky. Následně byla provedena rekrystalizace z ACN (25 ml), a krystaly byly po odfiltrování spojeny s předchozí frakcí získanou přímo krystalizací z reakční směsi. Produktem je bílá krystalická látka.

**Výtěžek:** 6,42 g (43%).

**Molekulová hmotnost:** 592,46. **T. t.:** 191,9–192,4 °C (dle literatury<sup>20</sup> 193–194 °C). **<sup>1</sup>H NMR** (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 9,89 (s, 2H, imidazolH), 8,13–8,06 (m, 2H, ArH), 8,06–7,99 (m, 2H, ArH), 7,73–7,64 (m, 4H, ArH), 4,50 (t, *J* = 7,2 Hz, 4H, NCH<sub>2</sub>), 4,09 (s, 6H, CH<sub>3</sub>), 1,89 (p, *J* = 7,2 Hz, 4H, CH<sub>2</sub>), 1,35–1,27 (m, 8H, CH<sub>2</sub>), 1,21 (s, 8H, CH<sub>2</sub>) ppm. **<sup>13</sup>C NMR** (126 MHz, DMSO): δ 142,80, 131,97, 131,12, 126,60, 126,59, 113,77, 113,70, 46,71, 33,45, 29,08, 28,99, 28,80, 28,65, 25,90 ppm.

### 3.4 Benzoinová kondenzace látky 1a

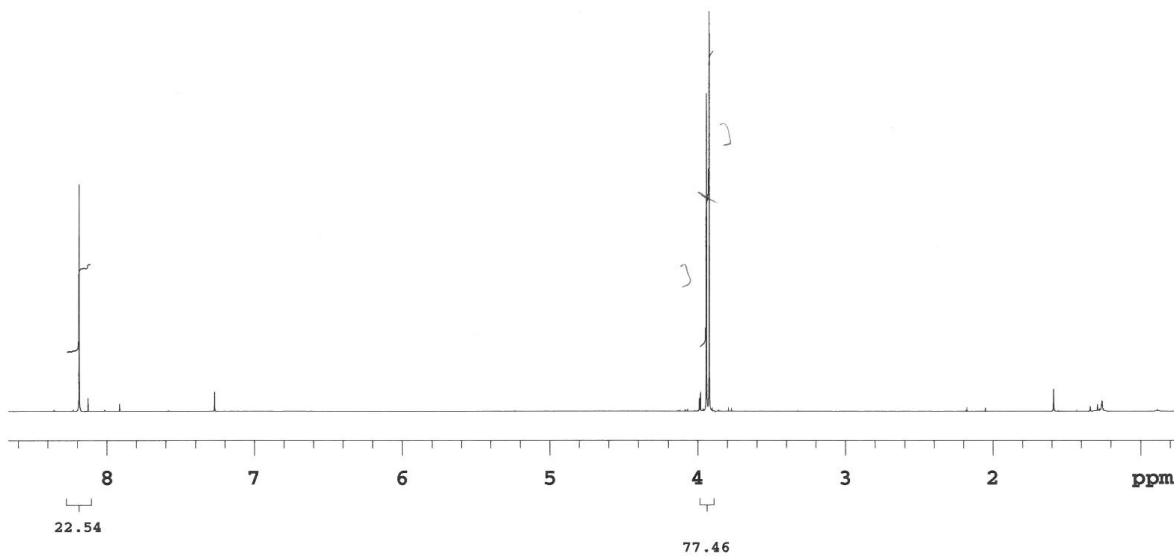


Látka **1a** (0,29 g, 1 mmol) a **katalyzátor** (0,03 g, 0,05 mmol) byly v prostředí tetrahydrofuranu (THF, 40 ml) a roztoku hydroxidu sodného 1M (200  $\mu$ l, 0,2 mmol) zahřívány na teplotu varu rozpouštědla za stálého míchání pod zpětným chladičem po dobu 24 hodin. Produkt nebyl tímto postupem připraven.

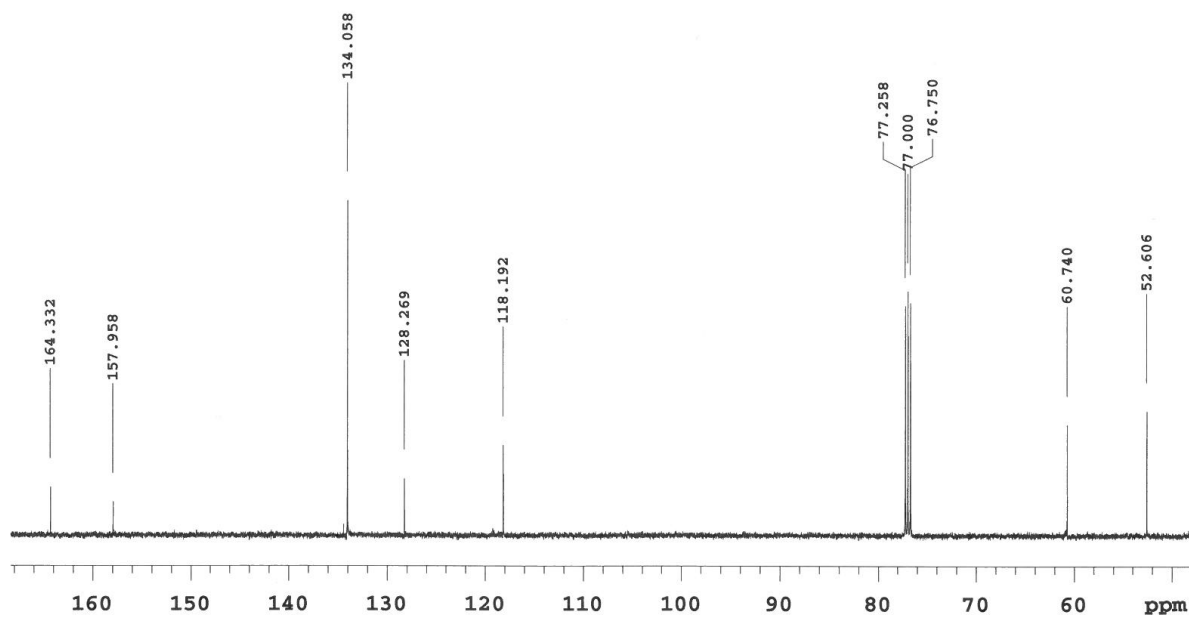
Druhý pokus byl proveden v prostředí vody (5 ml) a diazabicykloundec-10-enu (DBU, 150  $\mu$ l, 1 mmol) s látkou **1a** (1,47 g, 5 mmol) a **katalyzátorem** (0,15 g, 0,25 mmol). Po 24 hodinách byly na desce patrné dvě skvrny - výchozí látky a produktu. Reakční směs byla třikrát vytřepána do ethyl-acetátu, spojené ethyl-acetátové výtřepky vysušeny bezvodým síranem sodným a přefiltrovány přes skládaný filtr. Filtrát byl zbaven rozpouštědla pomocí rotační vakuové odparky. Produkt oranžové barvy byl přečištěn pomocí sloupcové chromatografie, kdy jako mobilní fáze byla použita směs rozpouštědel hexan/ethyl-acetát v poměru 9:1.

**Výtěžek:** 0,08 g. NMR (Obr. 10, 11) vyloučilo přítomnost produktu předepsané struktury, izolovanou látkou dle NMR byl methylester kyseliny 3,5-dibrom-4-methoxybenzoové (Obr. 12).

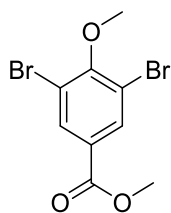
Reakce nebyla úspěšně provedena.



Obr. 10  $^1\text{H}$  NMR výsledného produktu.

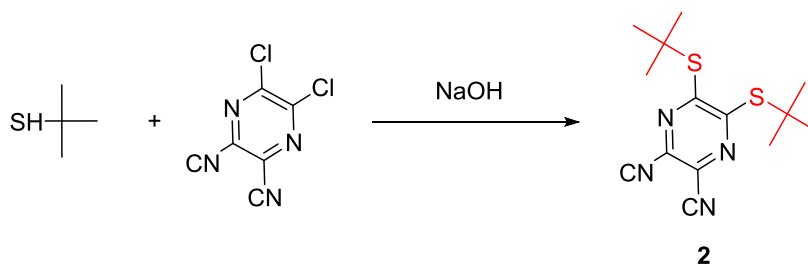


Obr. 11  $^{13}\text{C}$  NMR výsledného produktu.



Obr. 12 Struktura izolovaného produktu dle NMR.

### 3.5 Příprava 5,6-bis(*tert*-butylsulfanyl)pyrazin-2,3-dikarbonitrilu (2)

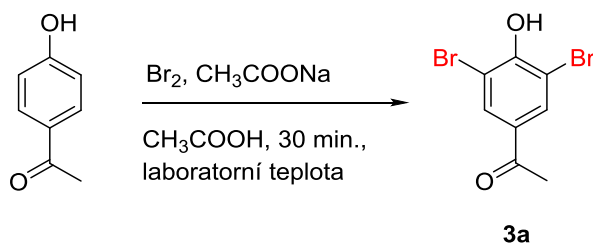


Syntéza byla založena na postupu publikovaném již dříve v literatuře.<sup>21</sup> K 1M vodnému roztoku hydroxidu sodného (103,5 ml, 103,5 mmol) byl za pozvolného míchání při pokojové teplotě pomocí skleněné Pasteurovy pipety přidán 2-methylpropan-2-thiol (12 ml, 106,5 mmol). Směs se nechala míchat při pokojové teplotě po dobu třiceti minut a následně byl přidán roztok 5,6-dichlorpyrazin-2,3-dikarbonitrilu (9,00 g, 45 mmol) v THF (240 ml). Po dalších patnácti minutách míchání byla směs třikrát vytřepána do ethyl-acetátu, spojené ethyl-acetátové výtřepky byly vysušeny pomocí bezvodého síranu sodného a přefiltrovány přes skládaný filtr. Rozpouštědlo bylo odpařeno pomocí rotační vakuové odparky. Produkt byl přečištěn pomocí sloupcové chromatografie, kdy jako mobilní fáze byl použit toluen. Produktem je citronově žlutá pevná látka.

**Výtěžek:** 11,90 g (86 %).

**Molekulová hmotnost:** 306,45. **T. t.:** 161,8–162,3 °C (lit.<sup>21</sup> 161–162 °C). Totožnost látky byly ověřena pomocí TLC srovnáním se standardem připraveným v laboratoři již dříve.

### 3.6 Příprava 1-(3,5-dibrom-4-hydroxyfenyl)ethanonu (3a)

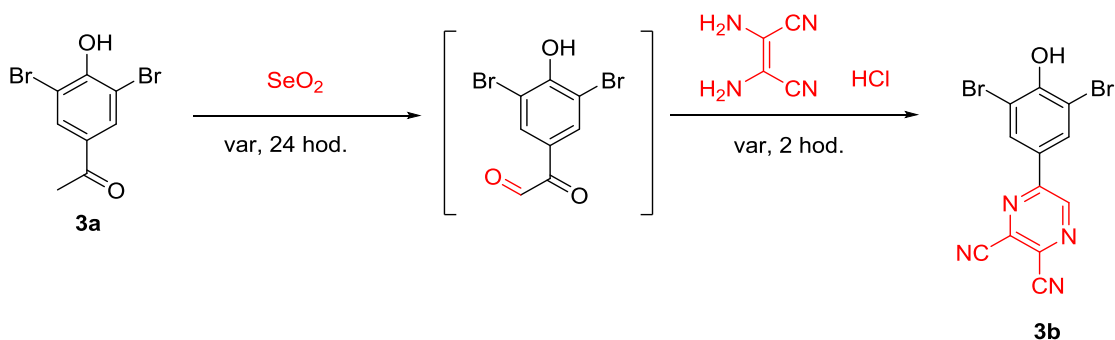


Příprava látky **3a** byla založena na postupu popsaném již dříve v literatuře.<sup>22</sup> Brom (1 ml, 19 mmol) v kyselině octové (3 ml) byl přidáván po kapkách ke směsi 4-hydroxyacetofenonu (1,22 g, 9 mmol) a octanu sodného (2,29 g, 28 mmol) v kyselině octové (20 ml) za pokojové teploty. Reakční směs byla míchána po dobu třiceti minut, následně byla přidána voda (20 ml), vzniklá sraženina byla zfiltrována. Zbytek na filtru byl několikrát promyt vodou a nechán k proschnutí. Produkt byl přečištěn pomocí sloupcové chromatografie, kdy jako mobilní fáze byla použita soustava rozpouštědel hexan/ethyl-acetát/kyselina octová v poměru 2:1:0,2. Po získání čistých frakcí byla provedena rekrystalizace z ethanolu (25 ml) za horka.

**Výtěžek:** 2,12 g (81 %).

**Molekulová hmotnost:** 293,9404. **T. t.:** 184–186 °C (dle literatury<sup>23</sup> 185–187 °C). **<sup>1</sup>H NMR** (500 MHz, aceton-*d*<sub>6</sub>): δ 8,15 (s, 2H, ArCH), 2,58 (s, 3H, CH<sub>3</sub>) ppm. **<sup>13</sup>C NMR** (126 MHz, aceton-*d*<sub>6</sub>): δ 194,59, 155,44, 133,55, 132,62, 111,35, 26,36 ppm.

### 3.7 Příprava 5-(3,5-dibrom-4-hydroxyfenyl)pyrazin-2,3-dikarbonitrilu (3b)

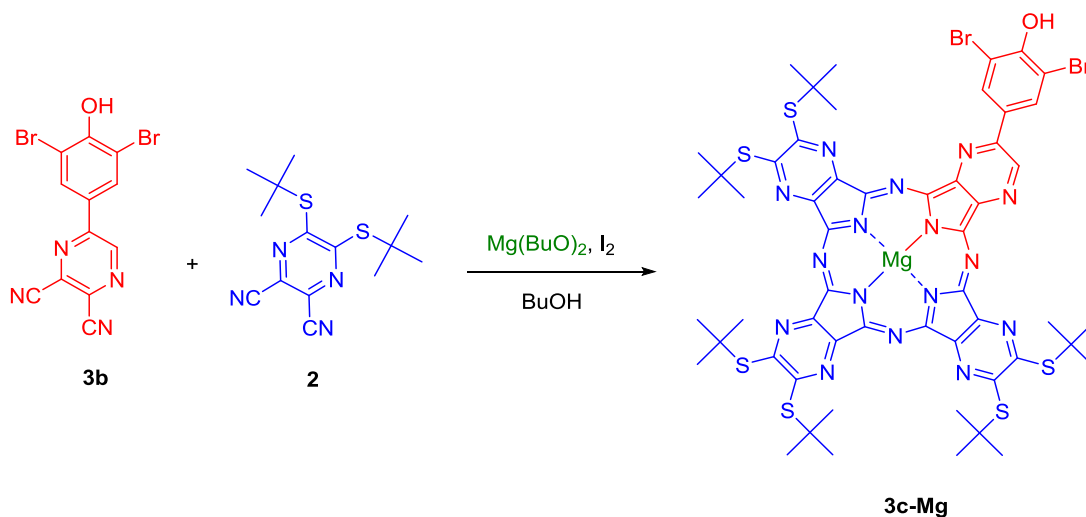


Látka **3a** (3,43 g, 11,7 mmol) a oxid seleničitý (3,88 g, 35 mmol) byly rozpuštěny ve směsi rozpouštědel voda, 1,4-dioxan (1:9, v/v, 30 ml). Reakční směs byla zahřívána na teplotu varu rozpouštědla za stálého míchání pod zpětným chladičem po dobu 24 hodin. Po ochlazení reakční směsi na pokojovou teplotu byl následně přidán diaminomaleonitril (DAMN, 2,53 g, 23,4 mmol) a kyselina chlorovodíková 35% (4 ml). Směs byla dále zahřívána po dobu dvou hodin za stálého míchání pod zpětným chladičem při teplotě varu rozpouštědla. Po vychladnutí byla směs zfiltrována přes skládaný filtr. Filtr byl promyt THF a filtrát zbaven rozpouštědel za sníženého tlaku pomocí rotační vakuové odparky. Produkt byl přečištěn pomocí sloupcové chromatografie, kdy jako mobilní fáze byla použita směs hexanu, ethyl-acetátu a kyseliny octové v poměru 2:1:0,1. Následně byla provedena rekrystalizace z ethanolu za horka. Produktem je oranžová krystalická látka.

**Výtěžek:** 3,06 g (69 %).

**Molekulová hmotnost:** 380,0. **T. t.:** pozorován rozklad při 236 °C.  **$^1\text{H}$  NMR** (500 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ):  $\delta$  11,01 (s, 1H; OH), 9,70 (s, 1H; pyrazinCH), 8,45 (s, 2H; fenylnCH) ppm.  **$^{13}\text{C}$  NMR** (126 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ):  $\delta$  154,79, 151,02, 145,06, 132,98, 132,04, 130,77, 126,81, 114,57, 114,22, 112,79 ppm. **IČ** (ATR,  $\text{cm}^{-1}$ ):  $\nu$  = 3333 (OH), 3085, 3062 (CH), 2244 (CN). **Elementární analýza** (%) pro  $\text{C}_{12}\text{H}_4\text{Br}_2\text{N}_4\text{O}\cdot\text{H}_2\text{O}$ : vypočítáno: C 37,93, H 1,06, N 14,74; nalezeno: C 38,43, H 1,08, N 14,54.

### 3.8 Příprava 2-(3,5-dibrom-4-hydroxyfenyl)-9,10,16,17,23,24-hexakis(*tert*-butylsufanyl)-1,4,8,11,15,18,22,25-(oktaaza)ftalocyaninato hořečnatého komplexu (3c-Mg)



Aktivovaný hořčík (3,33 g, 139 mmol) a čerstvě predestilovaný suchý butanol (80 ml) spolu se zrnkem jodu byly zahřívány na teplotu varu rozpouštědla po dobu čtyř hodin za stálého míchání pod zpětným chladičem. Následně byla přidána látka **3b** (1,88 g, 5,0 mmol) a látka **2** (4,55 g, 15 mmol). Po šestnácti hodinách varu pod zpětným chladičem byla reakce ukončena. Po ochlazení byl přidán methanol (MeOH), voda a kyselina octová v poměru 5:5:1 (150 ml), směs se nechala míchat po dobu patnácti minut, kdy došlo k převedení přebytečného butanolátu hořečnatého na rozpustný octan hořečnatý a butanol. Produkt byl posbíráán pomocí filtrace na fritě za sníženého tlaku, filtr byl promyt vodou a nechán na vzduchu proschnout. Produkt byl několikrát přečištěn pomocí sloupcové chromatografie, kdy jako mobilní fáze byla použita směs rozpouštědel chloroform (CHF), THF, MeOH v poměru 20:1:0,2. Po odpaření rozpouštědel byl rozpuštěn v minimálním množství CHF a nakapán do MeOH za vzniku jemné suspenze. K maximálnímu vysrážení byla směs ponechána při teplotě – 18 °C přes noc. Sraženina byla přefiltrována na skládaném filtru, promyta MeOH a ponechána na vzduchu k proschnutí. Produktem je sytě zelená pevná látka.

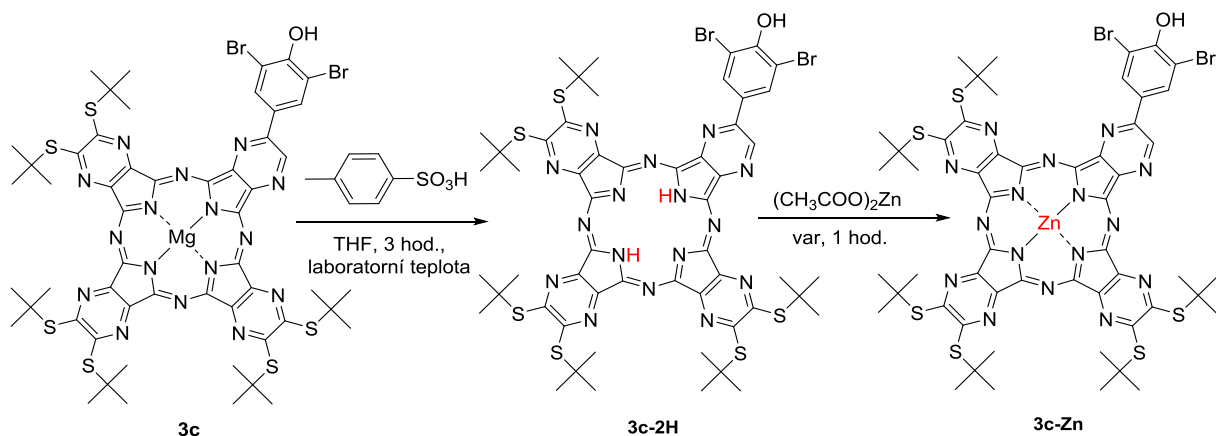
**Výtěžek:** 0,394 g (6 %).

**Molekulová hmotnost:** 1323,6. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>/pyridin-*d*<sub>5</sub>): δ 9,92 (s, 1H, pyrazinCH) 9,07 (s, 2H, fenylCH), 2,27 (s, 9H, CH<sub>3</sub>), 2,26 (s, 36H, CH<sub>3</sub>), 2,21 (s, 9H, CH<sub>3</sub>) ppm. <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 158,94, 158,88, 158,19, 157,90,

157,78, 154,85, 152,01, 151,96, 151,71, 151,65, 151,17, 151,01, 150,19, 150,05, 148,32, 145,26, 145,24, 145,21, 145,16, 145,05, 141,91, 131,92, 130,30, 113,59, 51,67, 51,44, 51,42, 51,31, 31,13, 31,07, 30,85, 30,83, 30,82, 30,80 ppm. Čtyři aromatické signály nebyly detekovány nebo byly překryty signálem rozpouštědla. **ÍČ** (ATR,  $\text{cm}^{-1}$ ):  $\nu = 2960, 2919$  (CH). **Elementární analýza** (%) pro  $\text{C}_{54}\text{H}_{58}\text{Br}_2\text{MgN}_{16}\text{OS}_6 \cdot 1\text{H}_2\text{O}$ : vypočítáno: C 48,34, H 40,51, N 16,7; nalezeno: C 48,38, H 40,58, N 16,5. **MS** (MALDI):  $m/z$ : 1320,1  $[\text{M}]^+$ .



### 3.9 Příprava 2-(3,5-dibrom-4-hydroxyfenyl)-9,10,16,17,23,24-hexakis(*tert*-butylsufanyl)-1,4,8,11,15,18,22,25-(oktaaza)ftalocyaninato zinečnatého komplexu (3c-Zn)



Látka **3c-Mg** (0,39 g, 0,3 mmol) byla rozpuštěna v CHF (20 ml) a přidána k roztoku kyseliny *p*-toluensulfonové (0,56 g, 3 mmol) v THF (10 ml). Směs byla míchána po dobu tří hodin při laboratorní teplotě. Následně byla zbavena rozpouštědel pomocí rotační vakuové odparky. Do baňky byla následně přilita voda a suspenze byla přefiltrována přes skládaný filtr. Zbytek na filtru se nechal proschnout. Tmavě zelený produkt byl přečištěn pomocí sloupcové chromatografie, kdy jako mobilní fáze byla použita soustava rozpouštědel CHF/THF v poměru 30:1.

**Výtěžek:** 0,183 g (47 %).

**Molekulová hmotnost:** 1301,35.

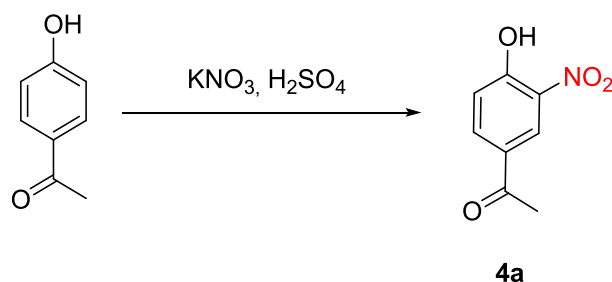
Tímto způsobem připravený bezkovový derivát (látka **3c-2H**, 0,183 g, 0,14 mmol) byl rozpuštěn v pyridinu (10 ml) a podroben působení bezvodého octanu zinečnatého (0,258 g, 1,4 mmol) při teplotě varu rozpouštědla po dobu jedné hodiny za stálého míchání pod zpětným chladičem. Poté bylo rozpouštědlo odpařeno, přidala se voda a sraženina byla odfiltrována a promyta vodou na filtru. Nakonec byly krystalky promyty malým množstvím MeOH. Produkt byl přečištěn pomocí sloupcové chromatografie, kdy jako mobilní fáze byla použita soustava rozpouštědel CHF/THF/kyselina octová v poměru 20:1:0,1. Produkt byl po odpaření promyt malým množstvím MeOH.

**Výtěžek:** 0,129 g (67 %)

**Molekulová hmotnost:** 1364,72. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz) CDCl<sub>3</sub>/pyridin-*d*<sub>5</sub>): δ 9,93 (s, 1H, pyrazinCH), 9,03 (s, 2H, fenylCH), 2,24 (s, 9H, CH<sub>3</sub>), 2,20 (s, 36H, CH<sub>3</sub>), 2,17

(s, 9H, CH<sub>3</sub>) ppm. <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 159,42, 159,38, 158,90, 158,87, 158,75, 158,64, 154,96, 152,41, 152,35, 152,17, 152,06, 151,68, 151,44, 150,50, 150,33, 150,02, 148,22, 144,84, 144,81, 144,79, 144,76, 144,67, 142,43, 131,96, 130,16, 113,55, 51,86, 51,58, 51,56, 51,51, 51,47, 31,10, 31,04, 30,85, 30,83, 30,81 ppm. Dva aromatické signály nebyly detekovány nebo byly překryty signálem rozpouštědla. IČ (ATR, cm<sup>-1</sup>) ν = 2961, 2919 (CH). **Elementární analýza** (%): pro C<sub>54</sub>H<sub>58</sub>Br<sub>2</sub>N<sub>16</sub>OS<sub>6</sub>Zn vypočítáno: C 47,53, H 4,28 N 16,42; nalezeno: C 47,77, H 4,48, N 15,98. **MS** (MALDI): *m/z*: 1360,0 [M]<sup>+</sup>.

### 3.10 Příprava 1-(4-hydroxy-3-nitrofenyl)ethanonu (4a)

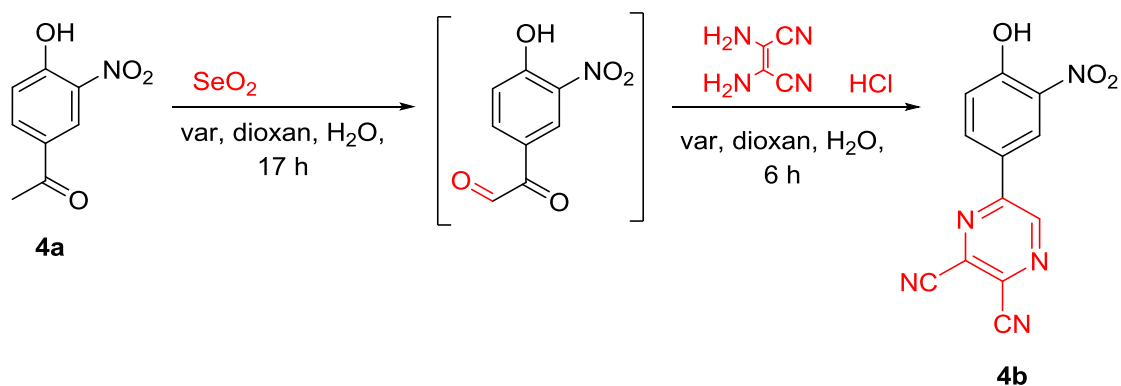


4-hydroxyacetofenon (1,36 g, 10 mmol) byl rozpuštěn v koncentrované kyselině sírové (15 ml). Postupně po malých částech byl přidáván dusičnan draselný (1,01 g, 10 mmol). Reakce probíhala za stálého míchání na magnetické míchačce a pro svou exotermní povahu za chlazení v lázni s ledem. Po dvou hodinách byla reakce ukončena nalitím směsi na led. Po roztátí ledu byly vzniklé krystalky odsáty na fritě. Produkt byl přečištěn pomocí sloupcové chromatografie, kdy jako mobilní fáze byla použita směs hexanu, ethyl-acetátu a kyseliny octové v poměru 20:10:3. Produkt byl nakonec rekrystalizován za horka z MeOH. Produktem je žlutá krystalická látka.

**Výtěžek:** 1,41 g (78 %).

**Molekulová hmotnost:** 181,145. **T. t.** 131,3–132,4 °C (lit.<sup>24</sup> 131,0–132,6 °C). **<sup>1</sup>H NMR:** (500 MHz, aceton-*d*<sub>6</sub>): δ 10,82 (s, 1H, OH), 8,69 (d, *J* = 2,2 Hz, 1H, C2), 8,27 (dd, *J* = 8,8, 2,2 Hz, 1H, C6), 7,32 (d, *J* = 8,8 Hz, 1H, C5), 2,64 (s, 3H, CH<sub>3</sub>) ppm. **<sup>13</sup>C NMR** (126 MHz, aceton): δ 195,18, 158,19, 136,98, 134,96, 130,59, 126,65, 120,99, 26,41 ppm. **IČ** (ATR, cm<sup>-1</sup>): ν = 3277 (OH), 3112 (CH), 1678 (CO). **Elementární analýza** (%) pro C<sub>8</sub>H<sub>7</sub>NO<sub>4</sub>: vypočítáno: C 53,04, H 3,9, N 7,73; nalezeno: C 52,75, H 3,75, N 7,62.

### 3.11 Příprava 5-(4-hydroxy3-nitrofenyl)pyrazin-2,3-dikarbonitrilu (4b)

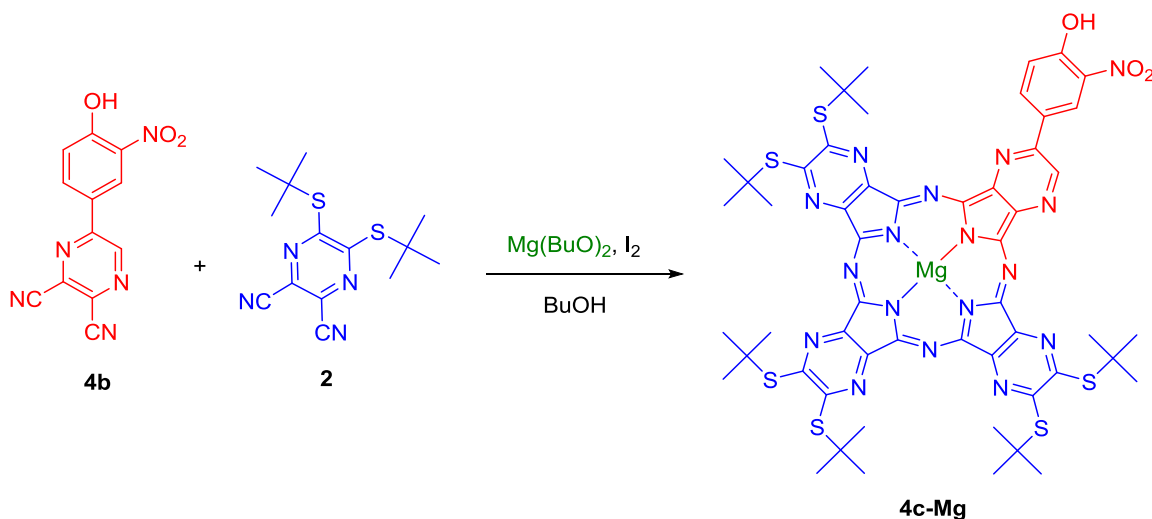


Látka **4a** (1,21 g, 6,7 mmol) a oxid seleničitý (2,22 g, 20 mmol) byly rozpuštěny ve směsi voda, dioxan (1:9, v/v, 15 ml). Reakční směs byla zahřívána na teplotu varu rozpouštědla za stálého míchání pod zpětným chladičem po dobu sedmnácti hodin. Následně po ochlazení byl přidán DAMN (1,43 g, 13,3 mmol) a kyselina chlorovodíková 35% (2 ml), směs byla dále zahřívána po dobu šesti hodin. Vzniklá směs byla po ochlazení zfiltrována přes skládaný filtr. Filtr byl promyt THF, filtrát zahuštěn částečným odpařením rozpouštědel. Následně byla přidána voda a produkt byl třikrát vytřepán do ethyl-acetátu. Organická fáze byla vysušena bezvodým síranem sodným, přefiltrována přes skládaný filtr a odpařena na rotační vakuové odparce. Produkt byl přečištěn pomocí sloupcové chromatografie, kdy jako mobilní fáze byla použita soustava rozpouštědel hexanu, ethyl-acetátu a kyseliny octové v poměru 20:5:1. Dále byla provedena rekrystalizace z MeOH a malého množství vody. Vzniklé krystalky byly posbírány pomocí filtrace na fritě za sníženého tlaku, promyty směsí MeOH/voda v poměru 1:1 a vysušeny v sušící pistolí. Produktem je oranžová krystalická látka.

**Výtěžek:** 0,998 g (56 %).

**Molekulová hmotnost:** 267,2. **T. t.:** 179–189 °C. **<sup>1</sup>H NMR** (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 12,05 (s, 1H, OH), 9,70 (s, 1H, pyrazinH), 8,76 (d, *J* = 2,4 Hz, 1H, C2), 8,41 (dd, *J* = 8,9, 2,4 Hz, 1H, C6), 7,31 (d, *J* = 8,9 Hz, 1H, C5) ppm. **<sup>13</sup>C NMR** (126 MHz, DMSO): δ 155,27, 151,82, 144,92, 138,16, 133,99, 133,06, 130,71, 125,39, 123,89, 120,29, 114,60, 114,25 ppm. **IČ** (ATR, cm<sup>-1</sup>) *ν* = 3236 (OH), 3089 (CH), 2243 (CN). **Elementární analýza** (%) pro C<sub>12</sub>H<sub>5</sub>N<sub>5</sub>O<sub>3</sub>: vypočítáno: C 53,94, H 1,89, N 26,21; nalezeno: C 53,86, H 1,78, N 26,21.

### 3.12 Příprava 2-(3-nitro-4-hydroxyfenyl)-9,10,16,17,23,24-hexakis(*tert*-butylsufanyl)-1,4,8,11,15,18,22,25-(octaaza)ftalocyaninato hořečnatého komplexu (4c-Mg)



Aktivovaný hořík (0,83 g, 34,6 mmol), čerstvě predestilovaný suchý butanol (20 ml) spolu se zrnkem jodu byly zahřívány na teplotu varu rozpouštědla po dobu čtyř hodin za stálého míchání pod zpětným chladičem. Po ochlazení byla přidána látka **4b** (0,33 g, 1,2 mmol) a látka **2** (1,13 g, 3,7 mmol). Po dvaceti hodinách varu byla směs zahuštěna pomocí rotační vakuové odparky, byla přidána kyselina octová 50% (v/v, 50 ml) a směs se nechala patnáct minut míchat za vzniku rozpustného octanu hořečnatého. Následně byla směs přefiltrována přes skládaný filtr, zbytek na filtru se nechal na vzduchu proschnout. Produkt byl několikanásobně přečištěn pomocí sloupcové chromatografie, kdy jako mobilní fáze byla použita soustava rozpouštědel CHF, THF, MeOH v poměru 20:1:0,5. Produkt byl dále rozpuštěn v minimálním množství CHF a nakapán do MeOH za vzniku jemné suspenze. K maximálnímu vysrážení byla směs ponechána při teplotě  $-18\text{ }^\circ\text{C}$  přes noc. Sraženina byla odfiltrována na skládaném filtru a ponechána na vzduchu k proschnutí. Produktem je sytě zelená pevná látka.

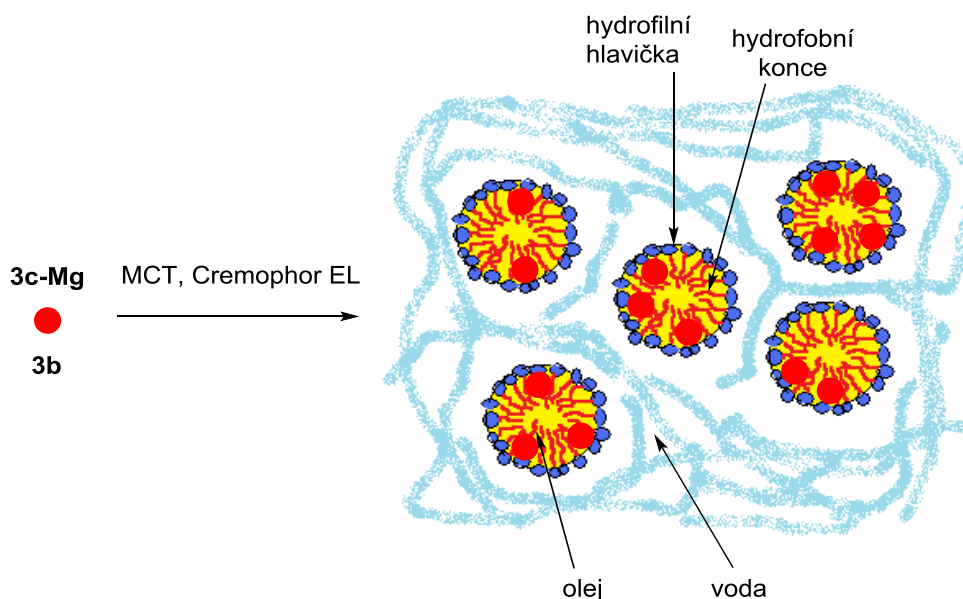
**Výtěžek:** 0,049 g (3 %).

**Molekulová hmotnost:** 1210,8.  $^1\text{H NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3/\text{pyridin-}d_5$ ):  $\delta$  9,65 (s, 1H), 9,45 (s, 1H), 8,54 (s, 1H), 7,19 (d,  $J = 8,5$  Hz, 1H), 1,95 (s, 9H,  $\text{CH}_3$ ), 1,92 (s, 36H,  $\text{CH}_3$ ), 1,87 (s, 9H,  $\text{CH}_3$ ) ppm.  $^{13}\text{C NMR}$  (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  159,04, 159,01, 158,44,

158,27, 158,09, 156,40, 152,13, 152,09, 151,79, 151,75, 151,12, 150,96, 145,31, 145,25, 145,15, 141,99, 129,07, 125,29, 121,22, 51,77, 51,50, 51,38, 31,09, 31,05, 30,85 ppm. Některé aromatické signály nebyly detekovány nebo byly překryty signálem rozpouštědla. **ÍČ** (ATR,  $\text{cm}^{-1}$ )  $\nu = 2961, 2920$  (CH). **Elementární analýza** (%) pro  $\text{C}_{54}\text{H}_{59}\text{MgN}_{17}\text{O}_3\text{S}_6 \cdot 1\text{H}_2\text{O}$ : vypočítáno: C 52,78, H 5,00, N 19,38; nalezeno: C 53,14, H 5,08, N 18,70. **MS** (MALDI):  $m/z$ : 1209,3  $[\text{M}]^+$ .

### 3.13 Příprava mikroemulze se zabudovaným senzorem

Triglyceridy se střední délkou řetězce (medium chain triglycerides, MCT, 29 mg) a Cremophor EL (neionogenní surfaktant, stabilizátor emulzí, 72 mg) byly rozpuštěny v CHF. Rozpouštědlo bylo odpařeno pomocí rotační vakuové odparky. Látka **3c-Mg** (0,331 mg, 0,25  $\mu\text{mol}$ ) byla rozpuštěna za pomoci ultrazvuku v CHF (2,5 ml), roztok byl následně přidán do baňky obsahující MCT a Cremophor EL. Rozpouštědlo bylo odpařeno pomocí rotační vakuové odparky. Pro odstranění veškerých zbytků rozpouštědla bylo udržováno hluboké vakuum (5 mbar) po dobu třiceti minut. Následně bylo přidáno asi 4,5 ml Britton-Robinsonova pufru o pH 7. Směs byla třepána pomocí třepačky a poté kvantitativně převedena do 5 ml odměrné baňky a doplněna po rysku roztokem pufru. Koncentrace látky **3c-Mg** v takto vzniklé homogenní mikroemulzi byla 50  $\mu\text{mol/l}$ . Stejný postup byl uplatněn pro látku **3b** (0,950 mg, 2,5  $\mu\text{mol}$ ), jejíž výsledná koncentrace byla 500  $\mu\text{mol/l}$  (Obr. 13).

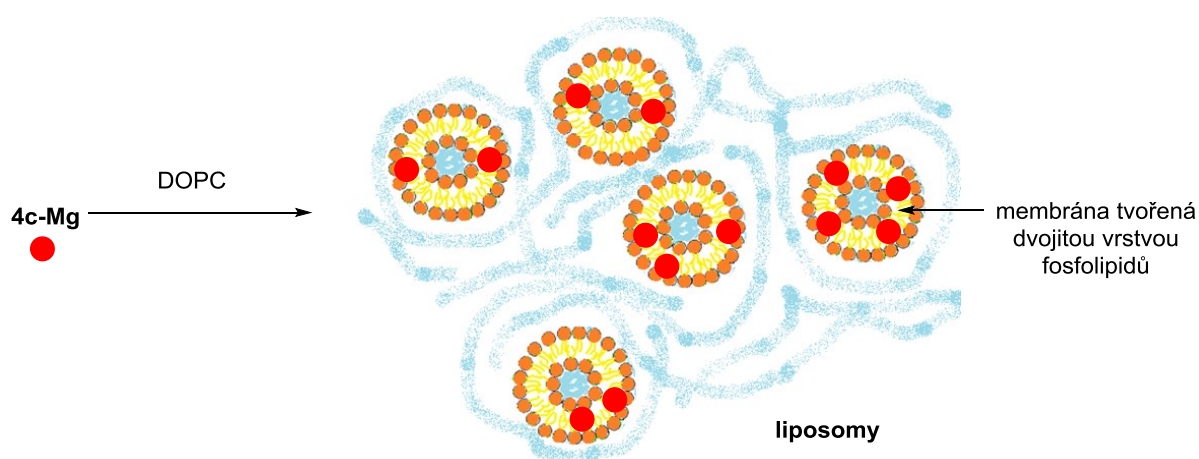


Obr. 13 Příprava mikroemulze se zabudovanou látkou **3c-Mg**, popř. prekurzorem **3b** (v hydrofobním jádře, naznačeno červeně). Obrázek byl se svolením autora převzat a upraven z Čermák, P. Příprava a fotofyzikální hodnocení tetrapyridoporfyrasinů vhodných pro fotodynamickou terapii. Diplomová práce. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Hradec Králové 2016.

### 3.14 Příprava lipozomů se zabudovaným senzorem

Lipidy (dioleoylfosfatidylcholin, DOPC (Lipoid GmbH), 10,1 mg, 0,013 mmol) byly rozpuštěny v dichlormethanu. Přesná navážka látky **4c-Mg** (0,721 mg, 0,0006 mmol) byla rozpuštěna v 6 ml THF (bez antioxidačních přísad) za vzniku 100 $\mu$ M roztoku. 0,25 ml tohoto roztoku bylo přidáno k roztoku lipidů a společně odpařeno pomocí rotační vakuové odparky. Tenký lipidový film na stěně baňky byl smyt pomocí 1,0 ml Britton-Robinsonova pufru o pH 10 nejdříve jemnými krouživými pohyby rukou, poté pomocí třepačky, přičemž došlo ke sbalení lipidů do multilamelárních vezikul. Suspenze byla ponechána po dobu tří hodin bobtnat za laboratorní teploty v temnu, aby nedocházelo k případnému rozkladu látky světlem. Následně byla protlačena (extrudována) tam a zpátky celkem jednadvacetkrát skrze dva polykarbonátové filtry (velikost porů 100 nm) za vytvoření unilamelárních vezikul jednotné velikosti. Koncentrace látky **4c-Mg** ve finální suspenzi byla 25  $\mu$ mol/l.

Lipozomy připraveny tímto postupem byly charakterizovány již dříve pomocí fotonového korelačního spektroskopu Zetasizer Nano-ZS (Malvern, UK) na Katedře farmaceutické technologie a jejich průměrná velikost se pohybovala okolo 154,7 nm (index polydisperzity 0,227), 132,2 nm (index polydisperzity 0,106) a 0,131,5 nm (index polydisperzity 0,074) v pořadí pro pH 3, 5 a 7 (Obr. 14).<sup>25</sup>



Obr. 14 Příprava lipozomů se zabudovanou látkou **4c-Mg** (uvnitř lipidové dvojrstvy s hydrofilní fenolickou skupinou vyčnívající ven, naznačeno červeně).



### 3.15 Stanovení $pK_a$ pomocí měření absorpčních a fluorescenčních spekter

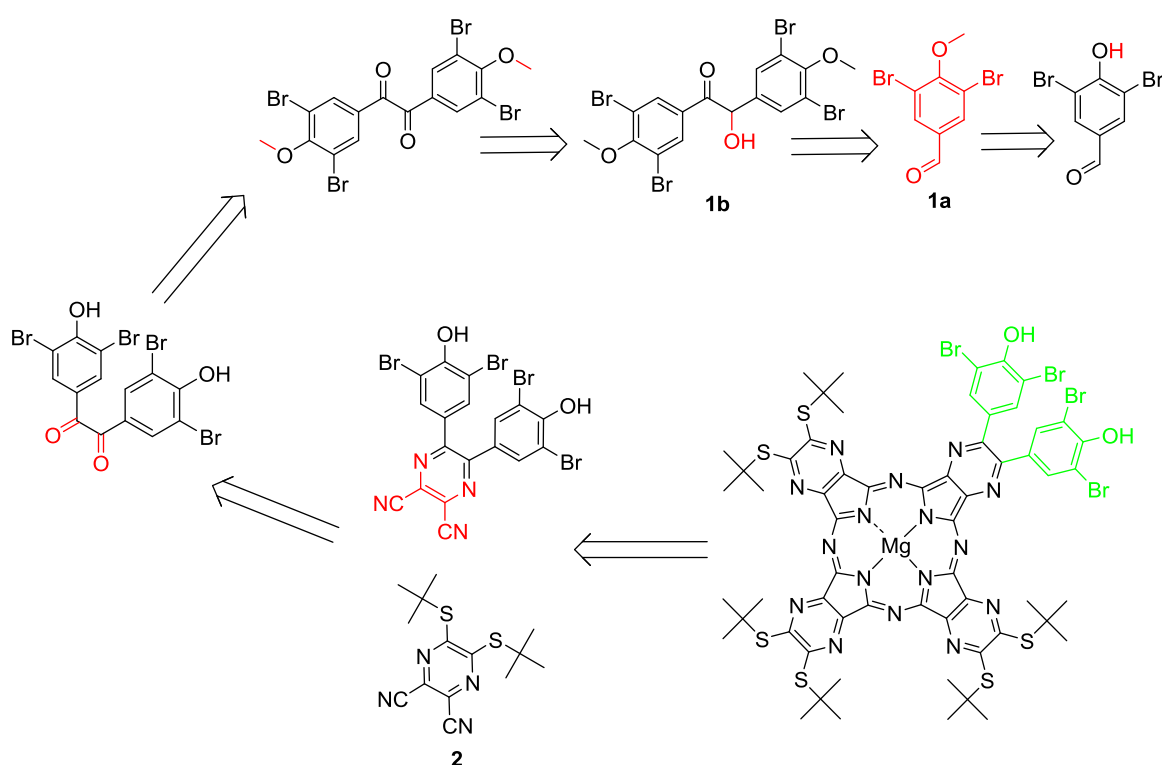
25  $\mu$ l mikroemulze se začleněnou látkou **3c-Mg** (popř. látkou **3b**) a 2,5 ml Britton- Robinsonova pufru o příslušné hodnotě pH bylo vpraveno do skleněné kyvety. Konečná koncentrace ve vzorku byla 0,5  $\mu$ mol/l v případě látky **3c-Mg** a 5  $\mu$ mol/l v případě látky **3b**. Ihned poté byla proměřena absorpční a emisní spektra těchto vzorků. Na základě měření byl sestaven graf závislosti maxima intenzity fluorescence (nebo absorbance při zvolené vlnové délce) na pH pufru, pomocí něhož byla stanovena hodnota  $pK_a$  obou látek nelineární regresí v programu Prism 7 for Windows (GraphPad).

40  $\mu$ l suspenze lipozomů se zabudovanou substancí **4c-Mg** spolu s 2 ml Britton- Robinsonova pufru o příslušné hodnotě pH bylo převedeno do skleněné kyvety. Výsledná koncentrace **4c-Mg** v suspenzi byla 0,5  $\mu$ mol/l. Ihned bylo proměřeno absorpční a následně emisní spektrum vzorku. Vždy stejným způsobem byly připraveny vzorky pro celkem jedenáct hodnot pH pufru. Na základě těchto měření byl sestaven graf závislosti maxima intenzity fluorescence na pH pufru, pomocí něhož byla stanovena hodnota  $pK_a$  látky **4c-Mg**.

## 4 VÝSLEDKY A DISKUZE

Tato práce je pokračováním systematického studia AzaPc výzkumné skupiny Azaphtalocyanine group Katedry farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy Farmaceutické fakulty v Hradci Králové. V předchozím zkoumání bylo pozorováno zhášení fluorescence u AzaPc substituovaných aminoskupinou na periférii. Byl potvrzen ICT jako princip tohoto jevu, kdy volný elektronový pár na dusíku slouží jako silný donor pro ICT.<sup>26</sup> Blokováním volného elektronového páru na dusíku protonem v kyselém prostředí dochází k obnově fluorescence. Analogicky byl proces ICT úspěšně zkoušen u fenolátové skupiny.<sup>10</sup> Tato práce na tyto poznatky navazuje. Jejím cílem je ovlivnění  $pK_a$  fenolické skupiny pH senzitivních AzaPc. Snahou je posun k hodnotám slučitelným s fyziologickým pH pro aplikaci v živých soustavách *in vivo*.

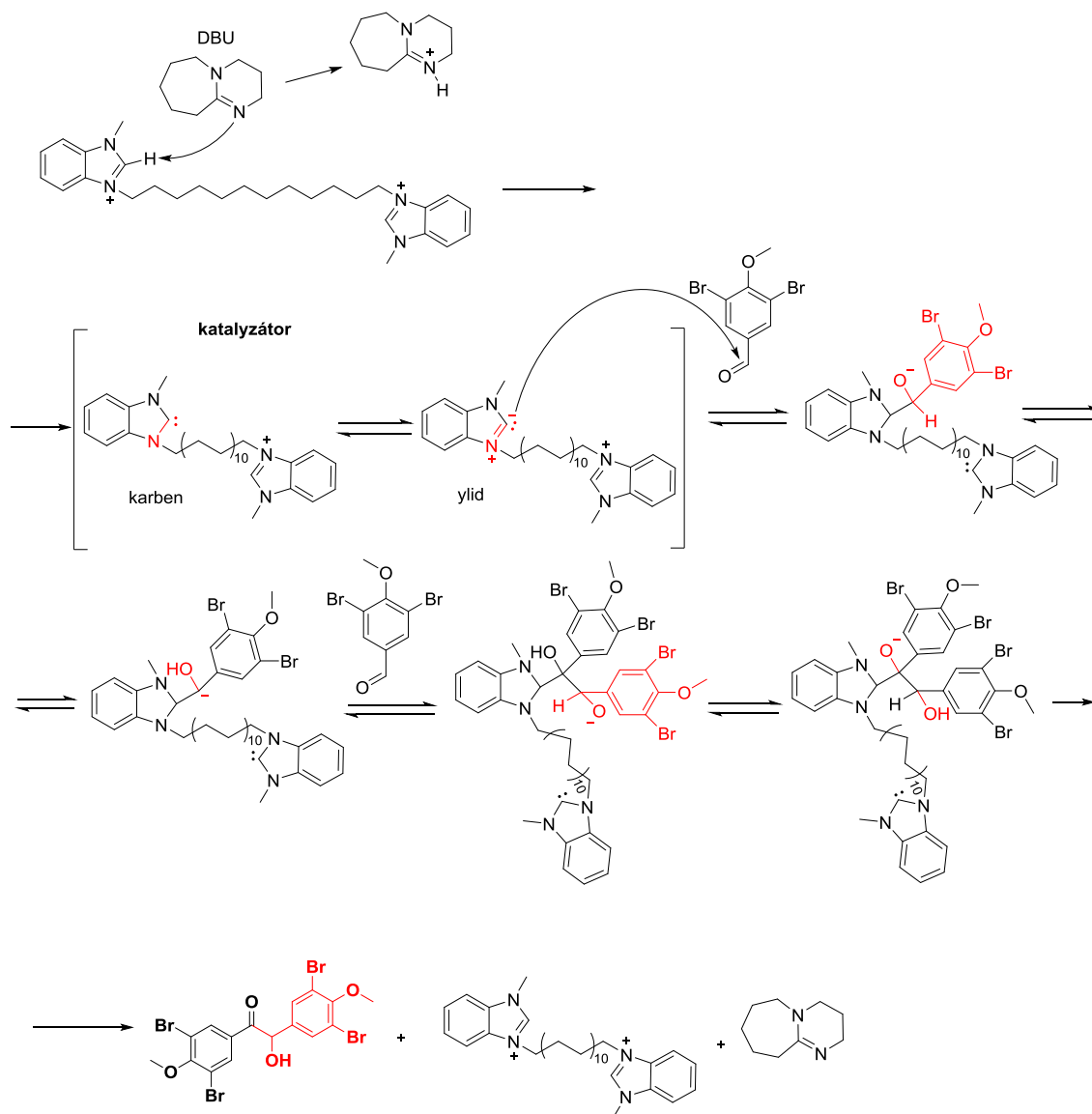
Původně byla navržena série látek obsahujících dvě fenolické skupiny na periférii (Obr. 15).



Obr. 15 Původní návrh – molekuly se dvěma fenoly na periférii. Retrosyntetická analýza.

Syntéza začala ochraněním hydroxyskupiny 3,5-dibrom-4-hydroxybenzaldehydu methylací. Jednalo se o alkylační reakci s dimethylsulfátem probíhající prakticky

kvantitativně. Následovala benzoinová kondenzace. V návaznosti na řadu neúspěšných pokusů kolegy v laboratoři, který podobné látky syntetizoval (použití thiazoliové soli a NaCN jako katalyzátorů), byla jako katalyzátoru použita bis(benzimidazoliová) sůl s methylenovým přemostěním, která jediná vykazovala výsledky v předchozí studii.<sup>27</sup> Mechanismus reakce je obdobný jako při použití kyanidu (Obr. 16).

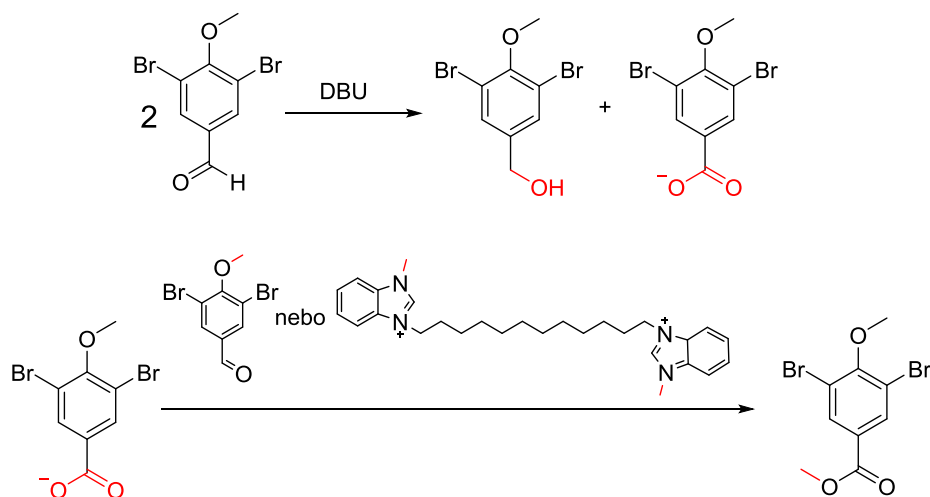


Obr. 16 Mechanismus benzoinové kondenzace (inspirováno Hrabálek, A. *Laboratorní cvičení z organické chemie pro farmaceuty*. 2., nezměn. vyd. Karolinum, Praha 2011.

ISBN 978-80-246-1981-1).

První pokus byl proveden v THF a za použití NaOH jako baze. TLC nepotvrdilo proběhlou reakci. Jako reakční prostředí v druhém pokusu byla zvolena voda a DBU.

TLC vykazovalo dvě skvrny – výchozí látky a produktu, který byl následně izolován. Jeho totožnost odhalila NMR, kdy namísto žádaného acyloinu se jednalo o methylester substituované kyseliny benzoové. Došlo zřejmě k disproportionaci aldehydu v Canizzarově reakci, která je také iniciována silnými bazemi. Původ methyly může být v katalyzátoru či methoxy skupině jiné molekuly aldehydu (Obr. 17)



Obr. 17 Přeměna aldehydu na methylester substituované kyseliny benzoové.

Dalších pokusů (bromace až po cyklotetramerizaci) bylo zanecháno. Byla navržena nová série látek obsahující pouze jednu hydroxy skupinu na periférii, jejichž syntéza se benzoinové kondenzací vyhýbá.

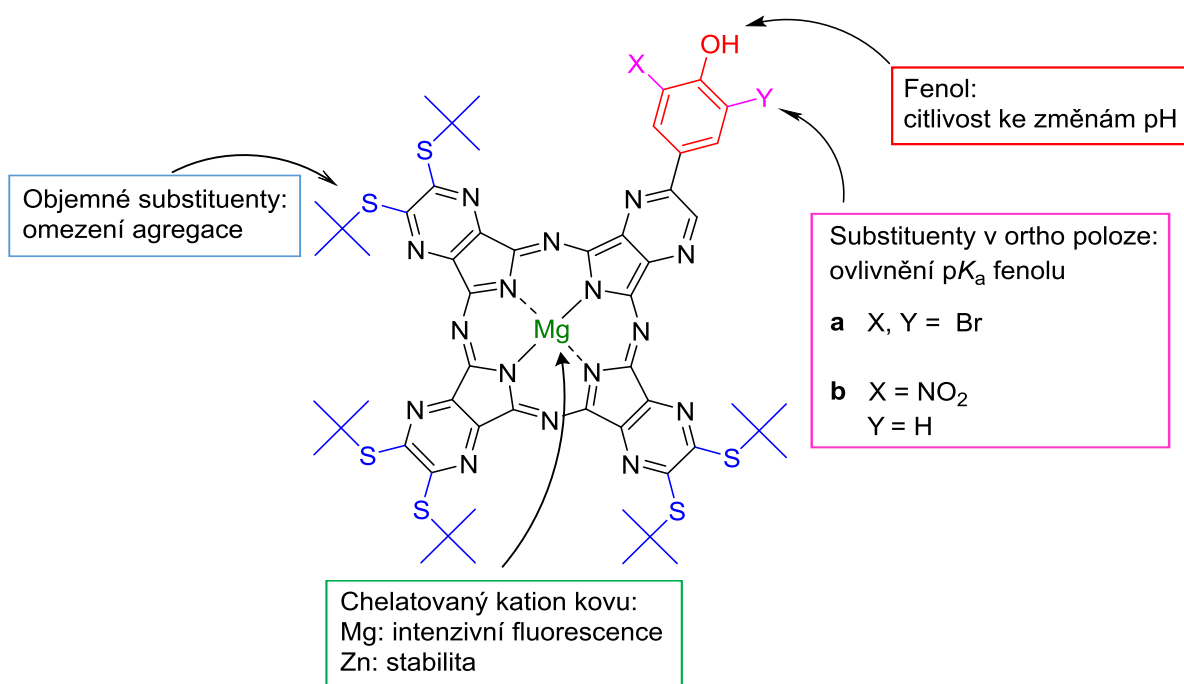
Struktura (Obr. 18) byla racionálně sestavena dle poznatků předešlého výzkumu. Základem je tetrapyrazinoporfyrinové jádro bohaté na atomy dusíku, které mu propůjčují významný elektronefektivní charakter, a činí ho tedy silným akceptorem pro ICT.<sup>28,29</sup> Navíc izosterní záměna methinových skupin dusíkem v benzenových jádrech makrocyclického kruhu ftalocyaninů vede k vyšším kvantovým výtěžkům fluorescence.<sup>30</sup>

Navržené molekuly dále obsahují šest objemných *tert*-butylsulfanylových skupin na periférii, které brání jinak planární molekule v nežádoucí agregaci. Agregáty nespecificky, nezávisle na pH ztrácí své fotofyzikální vlastnosti, což by mohlo vést k mylnému výkladu výsledků fotofyzikálních měření.<sup>30,31</sup>

Klíčovou rozpoznávací část tvoří fenolická skupina podmiňující citlivost molekuly ke změnám pH. Již jedna donorová skupina zajišťuje dostatečnou účinnost ICT.<sup>26</sup> Ovlivnění  $pK_a$  rozpoznávací fenolické skupiny je dosahováno vhodnou substitucí

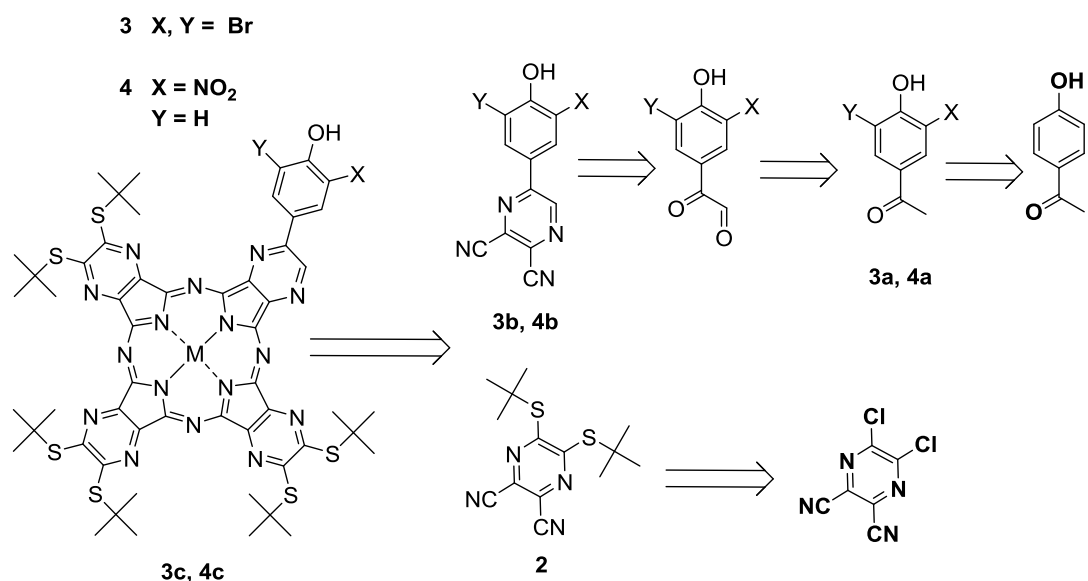
v *ortho* poloze. V rámci této práce se jedná o dva atomy bromu u první sloučeniny a o jednu nitroskupinu u druhé.

Do středu molekul je chelatován hořečnatý, případně zinečnatý kationt. Lehký hořečnatý kationt zajišťuje vysoké výtěžky fluorescence  $\Phi_F$  odpovídající teorii zvané efekt těžkého atomu (heavy atom effect). Podle ní platí, že komplexace atomy s nižším atomovým číslem vede k upřednostňování emise fotonu nad alternativními cestami návratu z excitovaného stavu.<sup>32,33,34</sup> Těžší zinečnatý kationt je na rozdíl od hořečnatého poután v molekule pevnější vazbou a nehrozí jeho odstranění v silně kyselém prostředí.



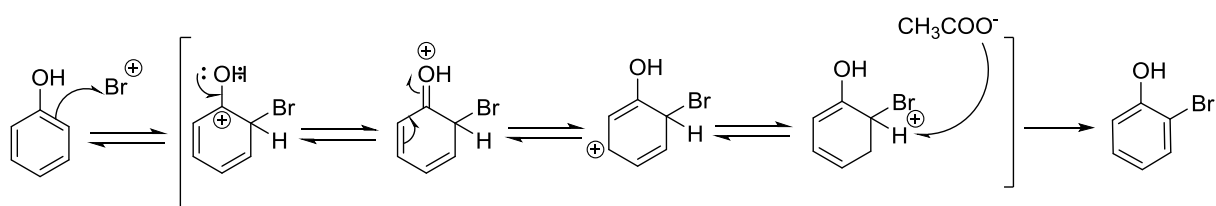
Obr. 18 Rozbor struktury cílových molekul ve vztahu k účinku.

Po racionálním návrhu struktur nových molekul byly určeny jednotlivé kroky syntézy (Obr. 19).



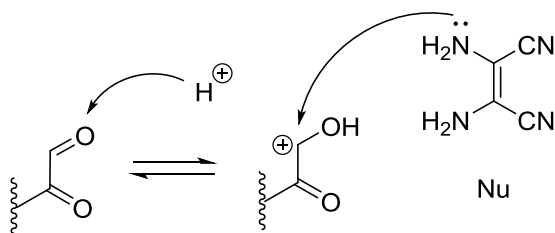
Obr. 19 Cesta ke komerčně dostupným výchozím látkám retrosyntézou.

Retrosyntetickou úvahou se dospělo ke komerčně dostupnému 4-hydroxyacetofenonu, který elektrofilní substitucí poskytl látky **2a**, **3a**. Látka **2a** byla připravena bromací obou *ortho* poloh vůči aktivující hydroxyskupině (substituent I. řádu), kdy octanový anion se účastní reakce jako báze a odštěpuje proton ze  $\sigma$ -komplexu za obnovení aromaticity cyklu (Obr 20). Pro přípravu látky **3a** byla nitro-skupina zavedena do molekuly výchozí látky po reakci s dusičnanem draselným a kyselinou sírovou.



Obr. 20 Mechanismus bromace.

Látky **3a**, **4a** byly podrobeny oxidaci oxidem seleničitým za poskytnutí příslušných ketoaldehydů. Produkty nebyly izolovány, ale pro jednoduchost bylo pokračováno kondenzační reakcí s DAMN v přítomnosti kyseliny chlorovodíkové za vzniku substituovaných pyrazin-3,4-dikarbonitrilů (prekurzorů **3b**, **4b**, Obr. 21).



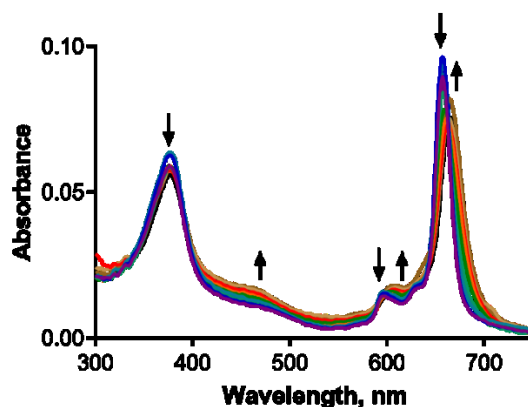
Obr. 21 Naznačení mechanismu kondenzační reakce s DAMN.

Syntéza prekurzoru **2** je založena na nukleofilní substituci 5,6-dichlorpyrazin-2,3-dikarbonitrilu, kdy v reakci s 2-methyl-2-propanthiolem dochází k nahrazení obou atomů chloru *tert*-butylsulfanylem.

Molekula AzaPc je složena ze čtyř jednotek prekurzorů. Pro přípravu nesymetrických AzaPc typu AAAB do cyklotetramerizační reakce vstupují dva různé prekurzory A, B (tři ekvivalenty látky **2** spolu s jedním ekvivalentem látky **3b** nebo **4b**). Reakce je zahájena iniciátorem, kterým byl v našem případě butanolát hořečnatý. Výsledná statistická směs hořečnatých komplexů vzniklá náhodným kombinováním prekurzorů A a B obsahuje šest kongenerů (AAAA, AAAB, AABB, ABAB, ABBB, BBBB), z nichž žádaný kongener ABBB je separován pomocí sloupcové chromatografie. Reakce není selektivní, ovšem vhodný poměr prekurzorů zvyšuje podíl žádoucího kongeneru.

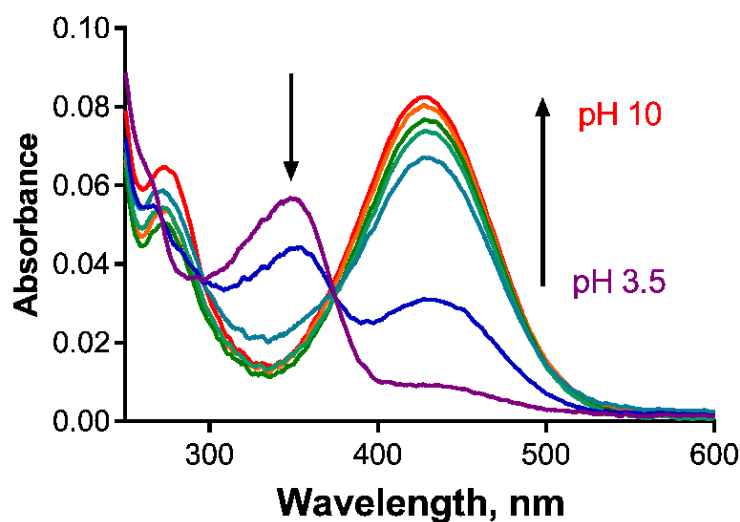
Ani jedna z cílových látek není rozpustná ve vodě, proto k hodnocení fotofyzikálních vlastností byly látka **3c-Mg** a její prekurzor **3b** zabudovány do lipofilních částic v mikroemulzi, látka **4c-Mg** byla inkorporována do lipidové dvojvrstvy lipozomů, které napodobují jednoduchý model biologické membrány.

Absorpční spektra látek **3c-Mg** a **4c-Mg** vykazovala tvar typický pro tetrapyrazinoporfyriziny s dvěma hlavními absorpčními pásy – nízkoenergetický Q pás (~660 nm) a vysokoenergetický B-pás (~380 nm). Ostrý Q-pas potvrzoval přítomnost pouze monomerní formy bez známky agregátů vznikajících na základě  $\pi$ - $\pi$  interakce. V závislosti na pH pufru byly pozorovány nevýznamné posuny v absorpčním spektru (Obr. 22). S narůstajícím podílem fenolátové formy byl zaznamenán mírný batho- (směrem k vyšším vlnovým délkám) a hypochromní (snížení intenzity absorpce) posun nízkoenergetického Q pásu.



Obr. 22 Změny v absorpčním spektru látky **3c-Mg** v mikroemulzi při přechodu z kyselého (modrá křivka) do bazického pH (světle hnědá křivka).

Absorpční spektrum prekurzoru **3b** naproti tomu vykazovalo s rostoucím pH významný pokles absorbance při vlnové délce ~340 nm a současně nárůst při ~430 nm (Obr. 23), což se projevilo změnou barvy ze žluté na oranžovou. Prekurzor je tak potenciálně vhodný pro využití jako pH indikátor v acidobazických titracích s vizuální kontrolou změn pH.

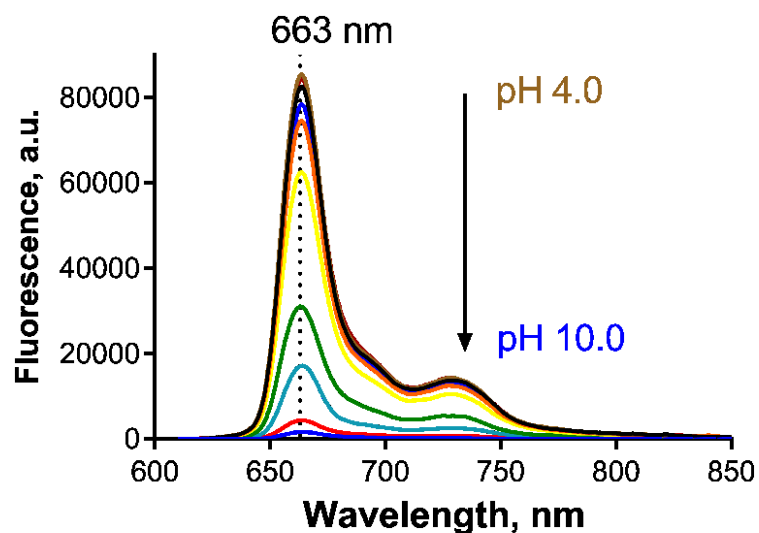


Obr. 23 Změny v absorpčním spektru prekurzoru **3b** v mikroemulzi při přechodu z kyselého pH (fialová křivka) do bazického pH (červená křivka).

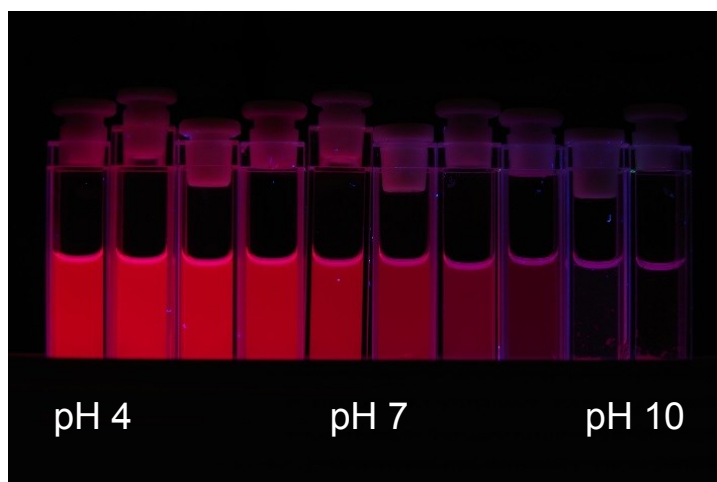
Emisní spektra látek **3c-Mg** a **4c-Mg** byla zrcadlovým obrazem jejich absorpčních spekter s pouze malým Stokesovým posunem. Vlnová délka emisního záření příslušející maximu intenzity fluorescence byla 663 nm. Jako odpověď na různé hodnoty pH pufru



byly zaznamenány významné změny v intenzitě fluorescence (Obr. 24, 25), což bylo v souladu s teorií o ICT jako kompetitivního procesu k emisi fotonu u fenol-substituovaných AzaPc. Nebyly pozorovány podstatné posuny jak v absorpčních (viz výše), tak v emisních spektrech, proto nelze tyto látky využít jako pH senzory založené na porovnávání intenzit při dvou vlnových délkách.



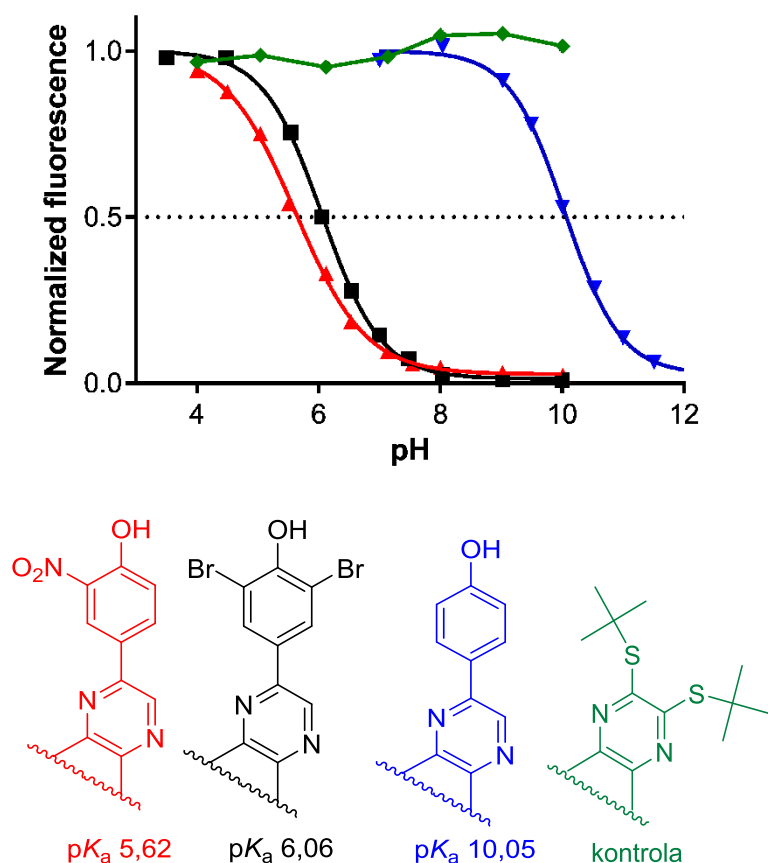
Obr. 24 Změny v emisním spektru látky **3c-Mg** v mikroemulzi při přechodu z kyselého pH (světle hnědá křivka) do bazického (modrá křivka) pH.



Obr. 25 Řada kyvet s odstupňovanou hodnotou pH vzorku látky **4c-Mg** v lipozomech pod UV lampou (366 nm).

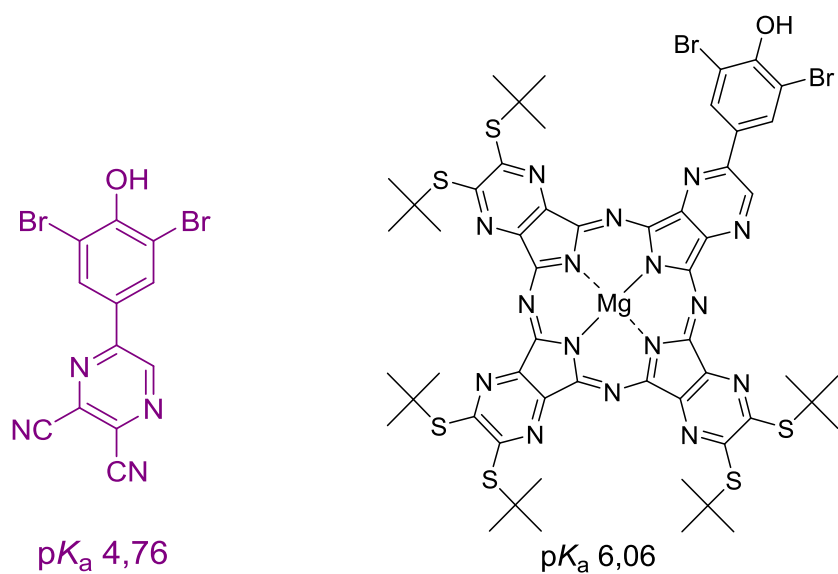
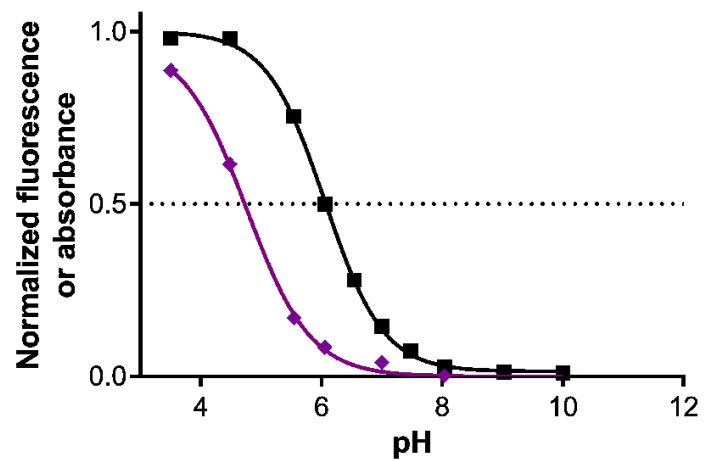
Ze závislosti intenzity fluorescence (respektive absorbance v případě prekurzoru) na pH byla určena hodnota  $pK_a$  (Obr. 26). Ve srovnání s dříve syntetizovaným

fenol substituovaným AzaPc bez substituentů v *ortho* poloze ( $pK_a$  10,05)<sup>31</sup> bylo  $pK_a$  nových molekul (5,62 pro látku **3c-Mg**, 6,06 pro látku **4c-Mg**) posunuto a odpovídá hodnotě pH, kterou nalezneme v acidických organelách, jako jsou lysozomy. Obrázek dále poskytuje srovnání s kontrolou, tedy se strukturně blízkým AzaPc, který však ve své molekule neobsahuje žádnou fenolickou skupinu. Jak obrázek dokládá, jeho fluorescence se s pH nemění.



Obr. 26 Grafické porovnání závislosti intenzity fluorescence na pH látek **4c-Mg**, **3c-Mg**, derivátu bez substituentu v *ortho* poloze, derivátu bez fenolické skupiny.

Hodnota  $pK_a$  prekursoru **3a** byla stanovena na 4,76. Obr. 27 srovnává vliv karbonitrilových skupin a AzaPc jádra na acidobazické vlastnosti fenolické skupiny. Karbonitrilové skupiny v porovnání s AzaPc jádrem mají silnější elektronegativní charakter, který činí vodík fenolické skupiny snadněji odštěpitelným,  $pK_a$  proto dosahuje nižší hodnoty.



Obr. 27 Grafické porovnání závislosti intenzity fluorescence (absorbance) na pH látky **3c** a jejího prekurzoru.

## 5 ZÁVĚR

V rámci mé diplomové práce byly úspěšně syntetizovány a popsány celkem dva deriváty fenol-substituovaných AzaPc. Ve formě mikroemulze či zabudované do lipozomů, (simulující biologickou membránu) byly vyhodnoceny jejich fotofyzikální vlastnosti jako funkce pH pufru. Z výsledků měření byla stanovena hodnota  $pK_a$ . Monitorování pH pomocí těchto derivátů vychází pouze ze změn intenzity fluorescence, jejich spektra nevykazují posuny, a nejsou tedy vhodné pro měření založené na poměru intenzit při dvou vlnových délkách. Velmi výhodné ale je, že oba deriváty absorbují a emitují světlo v červené oblasti spektra okolo 660 nm. Jejich hodnoty  $pK_a$  (5,62, 6,06) jsou díky vhodné substituci v *ortho* poloze vůči fenolické skupině vyladěny tak, aby odpovídaly fyziologickému pH. Tyto vlastnosti je činí vhodnými kandidáty pro monitorování pH v acidických organelách, jako jsou např. lysozomy.

## SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- <sup>1</sup> Gottlieb, R. A. [Cell acidification in apoptosis](#). *Apoptosis*, **1996**, *1(1)*, 40–48.
- <sup>2</sup> Chin, E. R.; Allen, D. G. [The contribution of pH-dependent mechanisms to fatigue at different intensities in mammalian single muscle fibres](#). *J. Physiol. (Oxford, U. K.)*, **1998**, *512(3)*, 831–840.
- <sup>3</sup> Damaghi, M.; Wojtkowiak, J. W.; Gillies, R. J. [pH sensing and regulation in cancer](#). *Front. Physiol.*, **2013**, *4*:370.
- <sup>4</sup> Swietach, P.; Vaughan-Jones, R. D.; Harris, A. L.; Hulikova, A. [The chemistry, physiology and pathology of pH in cancer](#). *Philos. Trans. R. Soc., B.*, **2014**, *369(1638)*: 20130099.
- <sup>5</sup> Fang, B.; Wang, D.; Huang, M.; Yu, G.; Li, H. [Hypothesis on the relationship between the change in intracellular pH and incidence of sporadic Alzheimer's disease or vascular dementia](#). *Int. J. Neurosci.*, **2010**, *120(9)*, 591–595.
- <sup>6</sup> Vachova, L.; Machacek, M.; Kucera, R.; Demuth, J.; Cermak, P.; Kopecky, K.; Miletin, M.; Jedlickova, A.; Simunek, T.; Novakova, V.; Zimcik, P. [Heteroatom-substituted tetra\(3,4-pyrido\)porphyrazines: a stride toward near-infrared-absorbing macrocycles](#). *Org. Biomol. Chem.*, **2015**, *13(20)*, 5608–5612.
- <sup>7</sup> Kopecky, K.; Novakova, V.; Miletin, M.; Kucera, R.; Zimcik, P. [Solid-phase synthesis of azaphthalocyanine–oligonucleotide conjugates and their evaluation as new dark quenchers of fluorescence](#). *Bioconjugate Chem.*, **2010**, *21(10)*, 1872–1879.
- <sup>8</sup> Miletin, M.; Zimčík, P.; Kopecký, K.; Musil, Z.; Nováková, V.; Haluza, R.; Bunček, M. (Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové a Generi Biotech, s.r.o.): [Nefluoreskující deriváty ftalocyaninů a azaftalocyaninů jako zhášče fluorescence](#). CZ Patent 300906, **2009**.
- <sup>9</sup> Novakova, V.; Lochman, L.; Zajicova, 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.
- <sup>10</sup> Novakova, V.; Laskova, M.; Vavrickova, H.; Zimcik, P. [Phenol-substituted tetrapyrazinoporphyrazines: pH-dependent fluorescence in basic media](#). *Chem. - Eur. J.*, **2015**, *21(41)*, 14382–14392.
- <sup>11</sup> Lakowicz, J. R. *Principles of fluorescence spectroscopy*. 3<sup>rd</sup> Ed. Springer, New York 2006. ISBN 978-0-387-31278-1

- <sup>12</sup> Jameson, D. M. *Introduction to fluorescence*, str. 3-4. 1<sup>st</sup> Ed. CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton 2014. ISBN 978-1439806043
- <sup>13</sup> Zimčik, P. Azaftalocyaniny – od syntéz přes fotochemické a fotofyzikální vlastnosti k aplikacím. *Chem. Listy*, **2012**, *106*, 275–282.
- <sup>14</sup> Kobayashi, H.; Ogawa, M.; Alford, R.; Choyke, P. L.; Urano, Y. [New strategies for fluorescent probe design in medical diagnostic imaging](#). *Chem. Rev. (Washington, DC, U. S.)*, **2010**, *110(5)*, 2620–2640.
- <sup>15</sup> Wang, R.; Yu, C.; Yu, F.; Chen, L. [Molecular fluorescent probes for monitoring pH changes in living cells](#). *TrAC, Trends Anal. Chem.*, **2010**, *9(29)*, 1004–1013.
- <sup>16</sup> Urano, Y., Asanuma, D.; Hama, Y.; Koyama, Y.; Barrett, T.; Kamiya, M.; Nagano, T.; Watanabe, T.; Hasegawa, A.; Choyke, P. L.; Kobayashi, H. [Selective molecular imaging of viable cancer cells with pH-activatable fluorescence probes](#). *Nature Medicine (N. Y, NY, U. S.)*, **2008**, *15(1)*, 104–109.
- <sup>17</sup> Vachova, L.; Novakova, V.; Kopecky, K.; Miletin, M.; Zimcik, P. [Effect of intramolecular charge transfer on fluorescence and singlet oxygen production of phthalocyanine analogues](#). *Dalton Trans.*, **2012**, *41(38)*, 11651–11656.
- <sup>18</sup> Nováková, V. Příprava a studium vlastností azaanalogů ftalocyaninů. Disertační práce. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Hradec Králové 2011.
- <sup>19</sup> Boulange, A.; Parraga, J.; Galan, A.; Cabedo, N.; Leleu, S.; Sanz, M. J.; Cortes, D.; Franck, X. [Synthesis and antibacterial activities of cadiolides A, B and C and analogues](#). *Bioorg. Med. Chem.*, **2015**, *23(13)*, 3618–3628.
- <sup>20</sup> Iwamoto, K.; Kimura, H.; Oike, M.; Sato, M. [Methylene-bridged bis\(benzimidazolium\) salt as a highly efficient catalyst for the benzoin reaction in aqueous media](#). *Org. Biomol. Chem.*, **2008**, *6(5)*, 912–915.
- <sup>21</sup> Kostka, M.; Zimcik, P.; Miletin, M.; Klemra, P.; Kopecky, K.; Musil, Z. [Comparison of aggregation properties and photodynamic activity of phthalocyanines and azaphthalocyanines](#). *J. Photochem. Photobiol., A*, **2006**, *178(1)*, 16–25.
- <sup>22</sup> Ullah, N. [The first total synthesis of racemic hydroxymoloka'iamine](#). *Z. Naturforsch., B: J. Chem. Sci.*, **2009**, *64b(7)*, 879–882.

- 23 Huang, J.-G.; Guo, Y.; Jjang, J.-A.; Liu, H.-W.; Ji, Y.-F. [An eco-friendly Co\(OAc\)<sub>2</sub>-catalyzed aerobic oxidation of 4-benzylphenols into 4-hydroxybenzophenones](#). *Res. Chem. Intermed.* **2015**, *41*(10), 7115–7124.
- 24 Wang, S.; Yan, J.; Wang, J.; Chen, J.; Zhang, T.; Zhao, Y.; Xue, M. [Synthesis of some 5-phenylisoxazole-3-carboxylic acid derivatives as potent xanthine oxidase inhibitors](#). *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, *45*(6), 2663–2670.
- 25 Novakova, V.; Miletin, M.; Kopecky, K.; Zimcik, P. [Red-emitting dyes with photophysical and photochemical properties controlled by pH](#). *Chem. – Eur. J.*, **2011**, *17*(50), 14273–14282.
- 26 Novakova, V.; Zimcik, P.; Miletin, M.; Vachova, L.; Kopecky, K.; Lang, K.; Chabera, P.; Polivka, T. [Ultrafast intramolecular charge transfer in tetrapyrazinoporphyrazines controls the quantum yields of fluorescence and singlet oxygen](#). *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2010**, *12*(11), 2555–2563.
- 27 Valer, V. Syntéza derivátů azaftalocyaninů s fenolickou skupinou jako fluorescenčních senzorů pro pH. Diplomová práce. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Hradec Králové 2017.
- 28 Novakova, V.; Reimerova, P.; Svec, J.; Suchan, D.; Miletin, M.; Rhoda, H. M.; Nemykin, V. N.; Zimcik, P. [Systematic investigation of phthalocyanines, naphthalocyanines, and their aza-analogues. Effect of the isosteric aza-replacement in the core](#). *Dalton Trans.*, **2015**, *44*(29), 13220–13233.
- 29 Vachova, L.; Novakova, V.; Kopecky, K.; Miletin, M.; Zimcik, P. [Effect of intramolecular charge transfer on fluorescence and singlet oxygen production of phthalocyanine analogues](#). *Dalton Trans.*, **2012**, *41*(38), 11651–11656.
- 30 Zimcik, P.; Miletin, M.; Novakova, V.; Kopecky, K.; Nejedla, M.; Stara, V.; Sedlackova, K. [Effective monofunctional azaphthalocyanine photosensitizers for photodynamic therapy](#). *Aust. J. Chem.*, **2009**, *62*, 425–433.
- 31 Cidlina, A.; Novakova, V.; Miletin, M.; Zimcik, P. [Peripheral substitution as a tool for tuning electron-accepting properties of phthalocyanine analogs in intramolecular charge transfer](#). *Dalton Trans.*, **2015**, *44*(15), 6961–6971.
- 32 Tuhl, A.; Makhseed, S.; Zimcik, P.; Al-Awadi, N.; Novakova, V.; Samuel, J. [Heavy metal effects on physicochemical properties of non-aggregated azaphthalocyanine derivatives](#). *J. Porphyrins Phthalocyanines*, **2012**, *16*(07n08), 817–825.

- <sup>33</sup> Svec, J.; Zimcik, P.; Novakova, L.; Rakitin, O. A.; Amelichev, S. A.; Stuzhin, P. A.; Novakova, V. [1,2,5-Chalcogenadiazole-annulated tripyrazinoporphyrazines: synthesis, spectral characteristics, and influence of the heavy atom effect on their photophysical properties.](#) *Eur. J. Org. Chem.*, **2015**, *2015(3)*, 596–604.
- <sup>34</sup> Solovyov, K. N.; Stuzhin, P. A.; Kuzmitsky, V. A.; Volkovich, D. I.; Knyukshto, V. N.; Borisevich, E. A.; Ul-Haque, A. [Porphyrazines with Annulated Chalcogen-Containing Heterocycle: Study of Spectral-Luminescent Properties and Quantum-Chemical Calculations of the Excited Electronic States.](#) *Makroeterotsikly*, **2010**, *3(1)*, 51–62.