

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



## Syntéza a modifikace látek zhášejících fluorescenci

DIPLOMOVÁ PRÁCE



*Školitel:* PharmDr. Miroslav Miletín, Ph.D.

Hradec Králové, 2009

Jana Šebelová

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci jsou řádně citovány.“

V Hradci Králové

Jana Šebelová

## Poděkování

Ráda bych poděkovala svému školiteli PharmDr. Miroslavu Miletínovi, Ph.D. a Mgr. Kamilu Kopeckému za odborné vedení, všestrannou pomoc a trpělivost při vypracovávání této diplomové práce. Děkuji také PharmDr. Petru Zimčíkovi, Ph.D. a Mgr. Veronice Novákové.

# OBSAH

<b>1. SEZNAM ZKRATEK.....</b>	<b>6</b>
<b>2. TEORETICKÁ ČÁST .....</b>	<b>7</b>
2.1. Principy fluorescence .....	7
2.2. Zhášení fluorescence .....	8
2.3. Molekulární sondy.....	11
2.3.1. Jednoduše značené sondy („mono-labeled probes“).....	12
2.3.2. Duálně značené sondy („dual-labeled probes“).....	13
2.3.3. Speciální typy sond.....	14
2.4. Fluorofory používané v praxi.....	15
2.4.1. Deriváty 4,4-difluor-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacenu .....	16
2.4.2. Deriváty xanthenu.....	17
2.4.3. Barviva s indocyaninovým skeletem .....	20
2.4.4. Další fluorescenční barviva .....	21
2.5. Zhášeče používané v praxi.....	22
<b>3. CÍL PRÁCE .....</b>	<b>28</b>
<b>4. METODICKÁ ČÁST.....</b>	<b>29</b>
4.1. Syntéza nesymetrických ftalocyaninů a jejich azaanalogů.....	30
4.1.1. Syntéza A <sub>3</sub> B ftalocyaninů.....	31
4.1.2. Syntéza A <sub>2</sub> B <sub>2</sub> ftalocyaninů.....	34
<b>5. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....</b>	<b>37</b>
5.1. Schéma prováděných reakcí.....	38
5.1.1. Příprava kyseliny 3-(5,6-dikyan-3-oxo-3,4-dihydropyrazin-2-yl)propanové .....	40
5.1.2. Příprava kyseliny 3-(3-chlor-5,6-dikyanpyrazin-2-yl)propanové .....	41
5.1.3. Příprava kyseliny 3-(5,6-dikyan-3-diethylaminopyrazin-2-yl)propanové .....	42
5.1.4. Příprava 5,6-dioxo-1,4,5,6-tetrahydropyrazin-2,3-dikarbonitrilu .....	43
5.1.5. Příprava 5,6-dichlorpyrazin-2,3-dikarbonitrilu .....	44
5.1.6. Příprava 5,6-bis(diethylamino)pyrazin-2,3-dikarbonitrilu.....	45
5.1.7. Příprava 5-diethylamino-6-chlorpyrazin-2,3-dikarbonitrilu .....	46
5.1.8. Příprava kyseliny 4-(methylamino)butanové.....	47
5.1.9. Příprava kyseliny 4-[(5,6-dikyan-3-diethylaminopyrazin-2-yl)methylamino]butanové.....	48
5.1.10. Příprava 2-(3-karboxyethyl)-3,9,10,16,17,23,24-heptakis(diethylamino)-1,4,8,11,15,18,22,25-(oktaaza)ftalocyaninu (Q17-1H <sub>2</sub> ).....	50
5.1.11. Příprava 2-[(4-karboxypropyl)methylamino]-3,9,10,16,17,23,24-heptakis(diethylamino)-1,4,8,11,15,18,22,25-(oktaaza)ftalocyaninu (Q18-1H <sub>2</sub> ).....	52
5.1.12. Příprava 2-[(4-karboxypropyl)methylamino]-3,9,10,16,17,23,24-heptakis(diethylamino)-1,4,8,11,15,18,22,25-(oktaaza)ftalocyaninato měďnatého komplexu (Q18-1Cu).....	54
5.1.13. Měření stability v roztoku jódu.....	56
<b>6. VÝSLEDKY A DISKUZE.....</b>	<b>57</b>

<b>7. ZÁVĚR .....</b>	<b>59</b>
<b>8. ABSTRAKT .....</b>	<b>60</b>
<b>9. ABSTRACT .....</b>	<b>61</b>
<b>10. POUŽITÁ LITERATURA .....</b>	<b>62</b>

## 1. Seznam zkratek

AzaPcs – azaftalocyaniny („azaphthalocyanines“)

BBQ - BlackBerry Quencher

BHQ - Black Hole Quenchers

DMF - dimethylformamid

DMSO - dimethylsulfoxid

DNA - deoxyribonukleová kyselina

FAM - karboxyfluorescein

FITC - fluorescein-isothiokyanát

FRET - „fluorescence-resonance energy transfer“

HEX - 6-karboxy-1,4-dichloro-2',4',5',7'-tetrachlorofluorescein

IB<sup>TM</sup>FQ - Iowa Black<sup>TM</sup>FQ

IB<sup>TM</sup>RQ - Iowa Black<sup>TM</sup>RQ

JOE - 6-karboxy-4',5'-dichlor-2',7'-dimethoxyfluorescein

NLO - nelineární optika

PCR - polymerázová řetězová reakce

Pcs - ftalocyaniny („phthalocyanines“)

PDT – fotodynamická terapie

PNA - peptidická nukleová kyselina

RNA - ribonukleová kyselina

ROX - 6-karboxy-X-rhodamin

SubPcs - subftalocyaniny („subphthalocyanines“)

TAMRA - 6-karboxytetramethylrhodamin

TET - 6-karboxy-1,4-dichloro-2',7'-dichlorofluorescein

THF - tetrahydrofuran

TMR - tetramethylrhodamin

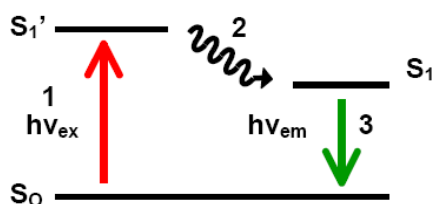
## 2. Teoretická část

### 2.1. Principy fluorescence

Fluorescence je typ luminiscence tvořený pomocí elektromagnetické excitace, který existuje krátkou dobu. To znamená, že fluorescence je vytvářena, když látka absorbuje světelnou energii při nízké vlnové délce (vyšší energii) a poté emituje světelnou energii při vyšší vlnové délce (nižší energii)<sup>1</sup>.

Doba života excitovaného stavu je určena průměrným časem, který molekula stráví v excitovaném stavu před návratem do stavu základního. Obecně je doba života fluorescence kolem  $10^{-8}$  s<sup>2</sup>.

Foton darované energie  $h\nu_{\text{ex}}$  je získán z okolního zdroje, například z laseru nebo lampy. Fluorescenční molekula ležící ve svém základním energetickém stavu  $S_0$  absorbuje energii, tvořící excitovaný elektronový singletový stav  $S_1'$  (viz. Jablonského diagram). Tento excitovaný stav potrvá omezenou dobu, obvykle jednu až deset nanosekund. V průběhu tohoto času fluorescenční molekula (fluorofor) podstoupí konformační změny a může být vystavena nesčetným potenciálním interakcím se svým molekulárním okolím. První fáze druhého stupně je charakterizována částečným rozptýlením některé z absorbované energie fluoroforu, tvořící relaxovaný singletový stav  $S_1$ . V tomto stavu fluorofor vstoupí do druhé fáze - emise energie,  $h\nu_{\text{em}}$ . Nakonec, ve třetím stupni, se fluorofor vrátí do svého základního stavu  $S_0$ <sup>1</sup>.



Obr. č. 1.: Jablonského diagram

Molekula fluoroforu začne ve svém základním stavu,  $S_0$ , a je převedena do excitovaného singletového stavu,  $S_1'$ , absorpcí energie o specifické vlnové délce. Uvolněním některé z absorbované energie přejde molekula do relaxovaného singletového stavu,  $S_1$ . Nakonec se molekula vrátí do svého základního energetického stavu uvolněním zbývající energie<sup>1</sup>.

Doba života fluoroforu za nepřítomnosti neradiačních zhášecích procesů se nazývá vnitřní (též přirozená, radiační) doba života. Vnitřní dobu života lze v principu spočítat z absorpčního spektra, extinkčního koeficientu a fluorescenčního spektra. Za určitých

podmínek lze vnitřní dobu života spočítat také jako poměr změřené doby života a kvantového výtěžku fluorescence.

## 2.2. Zhášení fluorescence

Zhášení fluorescence lze definovat jako bimolekulární proces, který snižuje kvantový výtěžek fluorescence beze změny fluorescenčního emisního spektra. Může být důsledkem různých procesů<sup>2</sup>. Energie může být přenášena mezi dvěma barvivy, donorem a akceptorem, nezářivě, a to buď dynamickým nebo statickým zhášením<sup>3</sup>.

Statické zhášení probíhá přes vytvoření nefluorescenčního komplexu v základním energetickém stavu („ground state complex“). Donorová a akceptorová část vytvoří intramolekulární dimer, který má své vlastní unikátní vlastnosti, a spektrální vlastnosti se nerovnjí součtu vlastností jednotlivých částí tohoto komplexu. Elektronové vlastnosti dimeru závisí na dipolární interakci a relativní orientaci tranzitních dipólových momentů donoru a akceptoru<sup>2,3</sup>.



**Obr. č. 2.: Znázornění statického zhášení**

Fluorofor F vytvoří se zhášečem („quencherem“) Q „komplex v základním energetickém stavu“ [FQ].

Vzniklé agregáty jsou děleny na H-agregáty a J-agregáty podle toho, zda je absorpce posunuta k horní (H-agregáty) či spodní (J-agregáty) oblasti excitačního pásu. H-agregáty mají absorpci posunutou k modré oblasti spektra a mají často významně sníženou fluorescenci. Zatímco J-agregáty mají absorpci posunutou k červené oblasti spektra a je pro ně typický zvýšený kvantový výtěžek fluorescence<sup>4</sup>.

Dynamický mechanismus zhášení bývá označován též jako fluorescenčně rezonanční přenos energie („fluorescence-resonance energy transfer“, FRET)<sup>5</sup>. Při tomto způsobu zhášení je donor energie po ozáření excitován a předává energii akceptoru, což způsobí jeho excitaci a současně přechod donoru do základního energetického stavu. Následně excitovaný akceptor, kterým může být jiný fluorofor nebo látka nemající fluorescenci, vyzáří energii ve formě fotonu nebo tepla<sup>6,7</sup>.



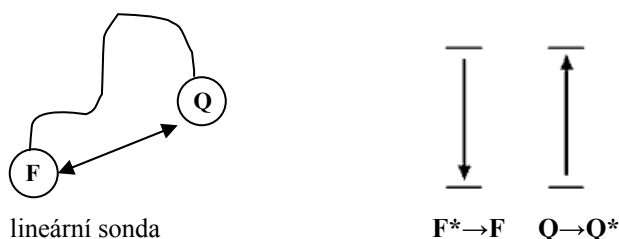
Snížení intenzity fluorescence dynamickým zhášením je popsáno Sternovou-Volmerovou rovnicí

$$F_0/F = t_0/t = 1 + k_q \times t_0 \times C_q,$$

kde  $F_0$  je kvantový výtěžek fluorescence za nepřítomnosti zhášeče,  $F$  kvantový výtěžek fluorescence za přítomnosti zhášeče o koncentraci  $C_q$ ,  $t_0$  je doba dohasínání fluorescence bez zhášeče,  $t$  je doba dohasínání v přítomnosti zhášeče a  $k_q$  je bimolekulární zhášecí konstanta (neboli bimolekulární rychlostní konstanta určená difúzí, vynásobená účinností zhášení)<sup>2</sup>.

FRET lze rozdělit na dva způsoby zhášení fluorescence, na Försterův a Dexterův mechanismus zhášení. Försterův mechanismus (známý také jako Coulombův) je založen na klasických interakcích dipól-dipól mezi tranzitními dipóly donoru a akceptoru. Tento mechanismus zhášení je extrémně závislý na vzdálenosti donoru a akceptoru energie ( $R$ ), vyjádřené vztahem  $1/R^6$ . Försterův model přenosu energie se vyskytuje typicky na vzdálenost 20 – 60 Å (2 - 6 nm), maximálně 100 Å (10 nm). Závisí také na spektrálním překryvu donoru a akceptoru. Fluorofory a zhášeče musí být tedy vybírány tak, aby se emisní spektrum fluoroforu a absorpční spektrum zhášeče překrývaly.

Dexterův mechanismus (známý také jako výměnný nebo srážecí přenos energie) se vyskytuje pouze v případě, jsou-li fluorofor a zhášeč v dostatečně krátké vzdálenosti, aby mohlo dojít k překryvu jejich molekulových orbitalů. Efektivita Dexterova přenosu energie se snižuje a to podle vztahu  $e^{-R}$ , kde  $R$  je vzdálenost fluoroforu a zhášeče. Tento mechanismus zhášení je u většiny donor-akceptorových párů méně důležitým jevem, nežli mechanismus Försterův<sup>3,4</sup>.



**Obr. č. 3.: Znázornění dynamického zhášení**

Mezi fluoroforem  $F$  a zhášečem („quencherem“)  $Q$  dochází k neradiačnímu přenosu energie při excitovaném stavu ( $*$ ) fluoroforu.

Vnitřní vlastnosti donorových a akceptorových barviv jako tvar jejich absorpčního a fluorescenčního spektra, jsou při zhášení probíhajícími oběma mechanismy (Försterovým i Dexterovým) zachovány<sup>3</sup>.

Z výše uvedeného tedy vyplývá, že je-li akceptor přenesen do blízkosti donoru, a to do vzdálenosti v rozmezí 20 – 100 Å (2 – 10 nm), může dojít k dynamickému přenosu energie, což se projeví snížením fluorescence donoru energie. Avšak, jestliže jsou k sobě donor a akceptor přeneseny blíže, dojde k zhášení statickému neboli kontaktnímu. V tomto případě je většina absorbované energie rozptýlena ve formě tepla, pouze malé množství energie je vyzářeno jako světlo. Sníží se tak emise u obou fluoroforů - donorového i akceptorového. U oligonukleotidových sond lze tedy uplatnit jeden z uvedených mechanismů zhášení v závislosti na velikosti vzdálenosti fluoroforu a zhášeče.

Jednou z využitelných charakteristik kontaktního mechanismu zhášení je, že všechny fluorofory jsou zhášeny stejně dobře, bez ohledu na to, zda emisní spektrum fluoroforu překrývá absorpční spektrum zhášeče, což je jedna z klíčových podmínek, která určuje efektivitu FRET, tedy dynamického mechanismu zhášení<sup>8</sup>.

Používání FRET se opírá o předpoklad, že fluorescenční vlastnosti sond jsou nezávislé na vlastnostech prostředí. Nicméně, fotofyzikální vlastnosti většiny fluorescenčních sond závisejí na fyzikálních a chemických vlastnostech okolí. To může vést ke zbytkové fluorescenci, jestliže se prostředí, ve kterém jsou sondy umístěny, významně mění v průběhu daného biologického procesu<sup>9</sup>.

Fluorescenčně rezonanční přenos energie (FRET) je jedním z mála nástrojů použitelných pro měření vzdáleností v řádu nanometrů i změn ve vzdálenostech, a to *in vitro* a *in vivo*. Je jednou z fluorescenčních technik s nejširším využitím pro zkoumání struktury a dynamiky biopolymerů<sup>6,9</sup>.

Fluorescenční značení je široce využíváno v biochemických testech v podobě molekulárních sond<sup>3</sup>. Fluorescenční techniky jsou důležitým nástrojem pro zkoumání struktury a dynamiky nukleových kyselin, například v real-time PCR (polymerázové řetězové reakci) se využívají k monitorování procesu amplifikace. Okruh využití významně vzrostl v posledních letech vzhledem k novým pokrokům v chemických syntézách na pevné fázi a snadné dostupnosti reagentů pro konjugaci sond k definovaným nukleotidovým pozicím<sup>9,10</sup>.

### 2.3. Molekulární sondy

Fluorescenční oligonukleotidové sondy jsou nepostradatelným nástrojem pro genetické analýzy a poskytují nový směr pro moderní objevování farmak a medicínu založenou na farmakogenetice<sup>3</sup>. Oligonukleotidy kovalentně značené fluorescenčními molekulami jsou rozšířeně využívány v různých genomových testech, zahrnujících genovou kvantifikaci, alelovou diskriminaci či analýzu exprese<sup>4</sup>. Duálně značené („dual-labeled“) oligonukleotidové sondy zhasějící fluorescenci se staly velmi důležitými reagenty v mnoha komerčních genetických studiích, především v kvantitativní PCR<sup>3</sup>.

Pro kvantifikaci a detekci DNA sekvencí je široce uplatňovanou metodou real-time PCR. Všechny real-time PCR detekční systémy se vyznačují přítomností fluorescenční sondy v reakční směsi, která detekuje množství PCR produktu během reakce zvýšením své fluorescenční aktivity. Sondy lze dělit podle různých vlastností, jedním ze základních měřítek je specifita vůči sekvenci.

Specifita detekčních systémů vůči amplifikované sekvenci je podmíněna přítomností oligonukleotidové sondy s navázaným fluorescenčním barvivem. Většina takových sond využívá principu FRET mezi fluorescenčním barvivem (fluoroforem) a zhasěčem („quencherem“). Vlastní nárůst fluorescenční aktivity je způsoben zvýšením relativní vzdálenosti mezi molekulou fluoroforu a zhasěče<sup>11</sup>.

Fluorofor a zhasěč mohou být navázány na dvou samostatných oligonukleotidech (fluorofor na konci jednoho, zhasěč na konci druhého oligonukleotidového vlákna), pak jde o tzv. jednoduše značené sondy („mono-labeled probes“), nebo současně na jednom oligonukleotidovém řetězci, pak se jedná o tzv. duálně značené sondy („dual-labeled probes“). Duálně značené sondy nesou obvykle fluorescenční barvivo na 5'-konci a na 3'-konci je navázán zhasěč. K aktivaci sondy a nárůstu fluorescenční aktivity dochází buď po hybridizaci k amplikonu („molecular beacons“) nebo hybridizací s následnou hydrolýzou („TaqMan probes“)<sup>8,11</sup>.

Z hlediska konformace mohou být sondy lineární, tvaru vlásenky nebo mají složitější uspořádání. Sondy tvaru vlásenky reprezentují jeden z nejpobulárnějších typů. Nicméně, není důležité pouze uspořádání sondy. V konstrukci nových sond se využívá i vlastností fluoroforů, například jejich umístění, počet a přirozené vlastnosti<sup>12</sup>.

V praxi našlo uplatnění několik typů molekulárních sond, a to „adjacent probes“, „amplifluor primers“, „competitive hybridization probes“, „light-up probes“, „molecular beacons“, „scorpion primers“ a „TaqMan probes“ („5'-nuclease probes“).

### 2.3.1. Jednoduše značené sondy („mono-labeled probes“)

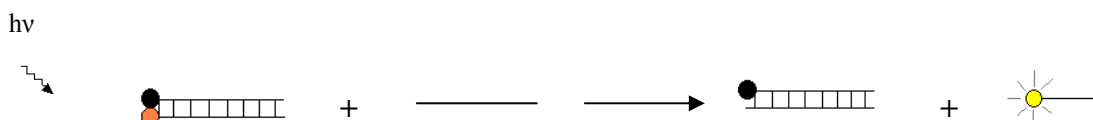
#### „Adjacent probes“

Tyto sondy jsou založeny na využití dvou oligonukleotidových řetězců, které se naváží k protilehlým stranám cílové struktury. Jeden řetězec je většinou označen donorovou částí na svém 3'-konci, druhý fluorescenční akceptorovou částí na svém 5'-konci. Vzdálenost mezi sondami je vybírána tak, aby po jejich hybridizaci mohlo dojít k efektivnímu přenosu energie z donoru na akceptor. Efektivní vzdálenosti mezi donorovými a akceptorovými molekulami se pohybují v rozmezí 10 - 100 Å (1 – 10 nm). Dalším požadavkem je překryv fluorescenčního emisního spektra donoru a absorpčního spektra akceptoru. Proto se přenos energie nemůže vyskytovat, jsou-li dvě sondy od sebe oddělené a jsou-li volně v roztoku. Výhodou těchto sond je relativně vysoká specifita<sup>13</sup>.



#### „Competitive hybridization probes“

Tento typ využívá dvou komplementárních oligonukleotidových řetězců, přičemž donor (fluorofor) je na 5'-konci jednoho řetězce a akceptor (fluorofor či zhášec) je na 3'-konci druhého řetězce. Nejprve jsou oba řetězce hybridizovány, čímž dojde k blízkému kontaktu mezi donorem a akceptorem. Po přidání stanovovaného vzorku dojde ke kompetici sekvence cílové struktury s oligonukleotidovým řetězcem a ustaví se dynamická rovnováha. To vede k rozdělení původně hybridizovaných řetězců<sup>14</sup>.

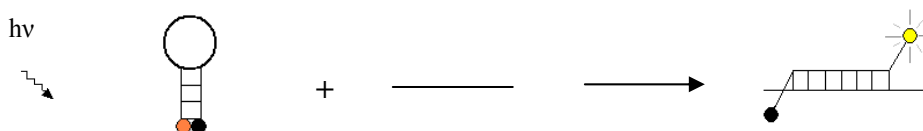


### 2.3.2. Duálně značené sondy („dual-labeled probes“)

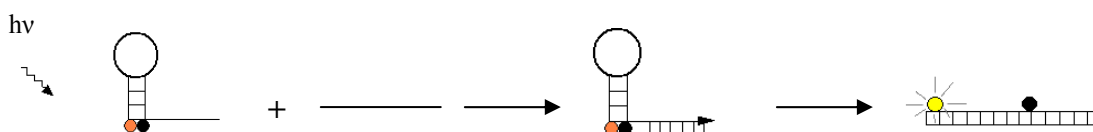
#### „Molecular beacons“

„Molecular beacons“ jsou hybridizační sondy nukleových kyselin tvaru vlásenky. Jedná se o jednovláknové oligonukleotidy, kde fluorofor je kovalentně navázán na jeden konec a nefluorescenční zhášecí část je kovalentně navázána k druhému konci oligonukleotidu. Sekvence komplementární k cílové struktuře je umístěna ve smyčce vlásenky a krátká přídatná sekvence na obou koncích sondy (dlouhá obvykle 5 – 6 nukleotidů) tvoří stopku<sup>13,15</sup>. Volná sonda se tedy formuje do jakési struktury stopka-smyčka, ve které jsou fluorofor a zhášec drženy těsně u sebe, a dochází tak ke statickému zhášení<sup>10,13</sup>. Když se „molecular beacon“ střetne s cílovou strukturou, vytvoří relativně rigidní hybrid sonda-cíl, který je delší a stabilnější než hybrid stopky. „Molecular beacon“ proto podstupuje spontánní konformační reorganizaci, která přinutí hybrid stopky k disociaci, čímž dojde k vzájemnému oddálení fluoroforu a zhášeče za obnovení fluorescence<sup>13</sup>.

„Molecular beacons“ mohou obsahovat různě zbarvené fluorofory, což umožňuje provádět testy, ve kterých dochází k simultánní detekci různých cílových struktur ve stejné reakci<sup>16</sup>.



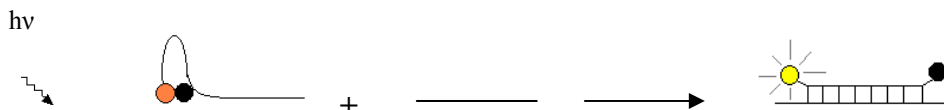
Na podobném principu jako „molecular beacons“ jsou založeny i další molekulové sondy. Patří mezi ně například „amplifluor primers“, což jsou značené primery se strukturou vlásenky („hairpin-primers“), které slouží k přímé detekci amplifikovaných produktů<sup>13</sup>. „Scorpion primers“ jsou také strukturně a funkčně příbuzné k „molecular beacons“, ale slouží jako primery v PCR reakci. „Sunrise primers“ mají taktéž strukturu podobnou struktuře vlásenky<sup>10,13</sup>.



„Amplifluor primers“



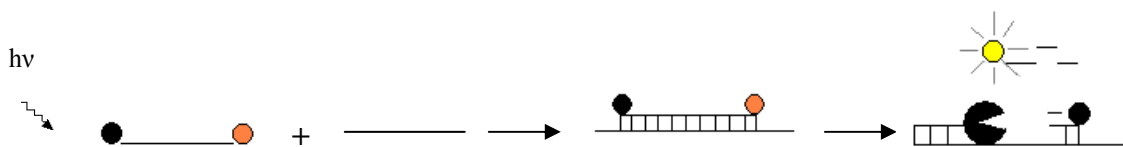
„Scorpion primers“



„Sunrise primers“

### **„TaqMan probes“ („5'-nuclease probes“)**

Využití základní 5'→3' nukleázové aktivity Taq DNA polymerázy, popisuje metoda, ve které jsou lineární DNA sondy, nazývané „5'-nuclease probes“ (známé také jako „TaqMan probes“), rozštěpeny při specifické hybridizaci, aby akumulovaly PCR produkty. Pro real-time monitoring amplifikačních reakcí bývají tyto sondy značeny donorovým fluoroforem na jednom konci a akceptorovým fluoroforem na druhém konci, které vzájemně interagují pomocí FRET. Sonda je připravena tak, aby hybridizovala k jednomu vláknku molekuly DNA ve stejném čase jako PCR primer. Nejprve Taq DNA polymeráza prodlouží primer a poté, co dospěje k sondě, dojde následkem 5'-nukleázové aktivity k rozštěpení této sondy. Rozštěpení sondy vede k separaci donoru a akceptoru a tím dojde k nárůstu intenzity signálu fluorescence<sup>13</sup>.

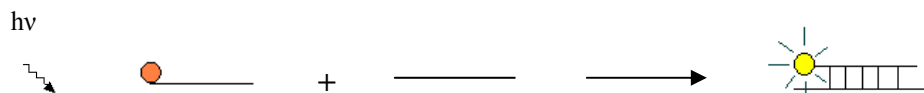


### **2.3.3. Speciální typy sond**

#### **„Light-up probes“**

„Light-up probes“ jsou krátké peptidové nukleové kyseliny (PNA), které využívají thiazolovou oranž jako fluorofor<sup>10,13</sup>. Zhášec není vyžadován. K nárůstu ve fluorescenci dojde omezením rotace vazby mezi aromatickým systémem thiazolové oranže, což eliminuje možnost nezářivého přenosu energie. „Light-up probes“ nevykazují fluorescenci jsou-li volně v roztoku. Lze je využít k monitorování amplifikačních reakcí, například v real-time PCR nebo k identifikaci specifické mRNA v živých

buňkách<sup>13</sup>. Tyto sondy jsou poměrně levné a snadno připravitelné, nicméně měření poklesu signálu je problematické, obzvláště v průběhu časné exponenciální fáze, ve které je zhášeno pouze velmi málo sond<sup>10</sup>.

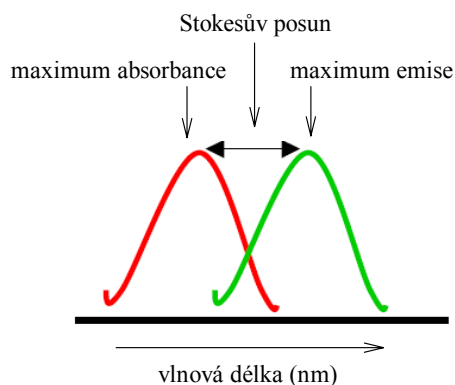


V jednotlivých sondách se uplatňuje dynamický či statický mechanismus zhášení. Například v „adjacent probes“ a „TaqMan probes“ zůstávají donorové a akceptorové části v takové vzdálenosti, že převládajícím mechanismem zhášení je FRET. Na druhé straně, v „competitive hybridization probes“ a „molecular beacons“, když nejsou hybridizovány k cílovým strukturám, jsou fluorofor a zhášec semknuty těsně k sobě a převládá mechanismus statického čili kontaktního zhášení<sup>8,13</sup>.

Sondy založené na FRET jsou používány *in vitro* a *in vivo* v mnoha aplikacích k monitorování různých typů DNA a RNA reakcí, zahrnujících PCR, hybridizaci, ligaci, štěpení, rekombinaci a syntézu. Jsou také využívány při sekvenaci, detekci mutací a jako součást biosenzorů ke stanovení koncentrací olova, DNA/RNA a proteinů<sup>12</sup>.

## 2.4. Fluorofory používané v praxi

Jak již bylo řečeno, molekuly, které produkují fluorescenci se nazývají fluorofory, popř. fluorochromy. Každá z těchto molekul má charakteristické absorpční (excitační) a emisní spektrum. Specifická vlnová délka, při které molekula fluoroforu nejefektivněji absorbuje energii, se nazývá maximum absorbance, a ta, při které nejefektivněji emituje energii, se nazývá maximum emise. Rozdíl mezi maximem absorbance a maximem emise je známý jako Stokesův posun podle George Stokese<sup>1</sup>.



Obr. č. 4.: Absorpční a emisní spektra fluoroforu.

Fluorofory obecně podléhají ve velké míře fotobleachingu, což je dynamický proces, ve kterém molekuly fluorochromů podstupují foto-indukovanou chemickou destrukci (oxidaci nebo redukci) po expozici excitačním světlem, čímž ztratí svou schopnost fluoreskovat<sup>17</sup>.

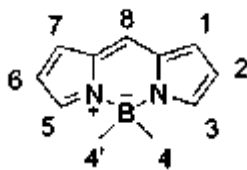
Fluorofory jsou široce využívány k detekci a znázornění buněčné organizace a distribuce chemikálií ve vzorcích tkání. Záznamy doby života fluorescence také reprezentují zajímavou alternativu technik fluoroforové detekce. Emisní spektrum fluoroforů se může měnit vlivem faktorů prostředí<sup>18</sup>.

V praxi nachází uplatnění hned několik fluoroforů, například fluorescein a jeho deriváty, BODIPY, cyaninová barviva a další. Podle struktury je lze rozdělit na deriváty xanthenu, barviva s indocyaninovým skeletem, deriváty 4,4-difluor-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacenu, a další strukturní typy.

#### 2.4.1. Deriváty 4,4-difluor-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacenu

##### BODIPY

Jedná se tedy o deriváty 4,4-difluor-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacenu<sup>19</sup>. Jejich výhodou je vysoký kvantový výtěžek fluorescence, možnost použít různé deriváty s emisí v širokém rozmezí (510 - 675 nm) a vysoký extinkční koeficient. Jejich nevýhodou je malý Stokesův posun<sup>2</sup>. Ve srovnání s deriváty xanthenu jsou BODIPY méně citlivé k podmínkám prostředí<sup>20</sup>. Mají nanosekundovou dobu života excitovaného stavu, obrovský rozsah barev a zlepšenou fotostabilitu ve srovnání s fluoresceinem<sup>19</sup>.



4,4-difluor-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacenu

BODIPY jsou neobvyklé tím, že jsou relativně nepolární a chromofor je elektricky neutrální. Jejich konjugáty s molekulami s nízkou molekulovou hmotností prostupují snadněji živými buňkami než konjugáty nabitých fluoroforů<sup>21</sup>. Používají se pro značení proteinů, nukleotidů, oligonukleotidů a dextranů, enzymových substrátů, mastných kyselin, fosfolipidů, lipopolysacharidů, receptorových ligandů a polystyrénových mikrokuliček<sup>2</sup>. Jsou také použitelnými reagensii pro HPLC a kapilární elektroforézu<sup>21</sup>.



Vlnové délky maxim absorpce (excitace) a emise fluoroforů<sup>1,21</sup>.

<b>fluorofor</b>	<b><math>\lambda_{\max}</math> excitace (nm)</b>	<b><math>\lambda_{\max}</math> emise (nm)</b>
BODIPY FL	503	512
BODIPY R6G	528	547
BODIPY TMR	543	569
BODIPY TR	592	618
BODIPY 630/650-X	625	640
BODIPY 650/665-X	646	660

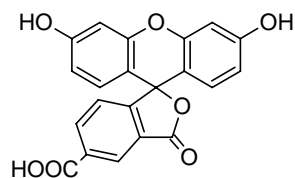
#### 2.4.2. Deriváty xanthenu

Fluorescein byl prvním fluoroforem a jsou od něj odvozeny další fluorofory. Společným znakem fluoresceinu a jeho derivátů je struktura xanthenu. Fluorescein má relativně vysokou absorbanci, výborný kvantový výtěžek fluorescence a dobrou rozpustnost ve vodě. Díky svému excitačnímu maximu je významným fluoroforem pro aplikace v konfokální laserové skenovací mikroskopii a průtokové cytometrii. Proteinové konjugáty fluoresceinu nejsou příliš přístupné precipitaci.

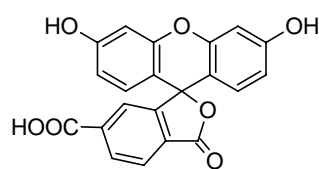
Barviva založená na fluoresceinu a jejich konjugáty mají relativně vysoký fotobleaching. Jejich fluorescence je pH senzitivní a mají relativně široké emisní spektrum fluorescence. Další jejich vlastností je tendence k zhášení fluorescence po konjugaci s biopolymery, obzvláště při vysokých stupních substituce. Kvůli fotobleachingu a pH senzitivitě fluoresceinu je kvantitativní měření s tímto fluoroforem problematické.

Novější barviva jsou fotostabilnější než fluorescein a mají menší nebo žádnou pH senzitivitu v rozmezí fyziologického pH. Ve srovnání s fluoresceinem vykazují tato barviva stejná či nepatrně vyšší spektra vlnových délek a srovnatelně vysoké kvantové výtěžky fluorescence.

Syntéza fluorescein-isothiokyanátu, karboxyfluoresceinu (FAM) a podobných derivátů fluoresceinu poskytuje směs izomerů v polohách 5 a 6 spodního kruhu fluoresceinů. Lze zmínit například jednotlivé izomery sukcinimidylesteru karboxyfluoresceinu, 5-FAM a 6-FAM. Molekulární sondy pro genetické analýzy obsahují též deriváty fluoresceinu JOE (6-karboxy-4',5'-dichlor-2',7'-dimethoxyfluorescein), HEX (hexachloro-fluorescein) a TET (tetrachlorofluorescein), jenž jsou významné pro využití při automatizované DNA sekvenaci<sup>21</sup>.



5-FAM



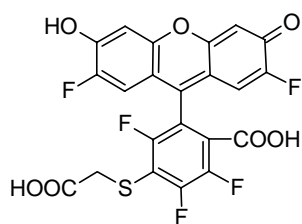
6-FAM

Vlnové délky maxim absorpce (excitace) a emise fluoroforů<sup>1</sup>.

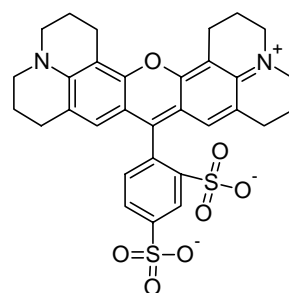
fluorofor	$\lambda_{\max}$ excitace (nm)	$\lambda_{\max}$ emise (nm)
FAM	494	518
FITC	492	516-525
JOE	520	548
HEX	535	556
TET	521	536

### Oregon Green, Rhodamine Green, Texas Red

Barviva Oregon Green 488 a Oregon Green 514 jsou fluorovanými analogy fluoresceinů s vyšší fotostabilitou než fluorescein a fluorescencí významně pH necitlivou v rozmezí fyziologického pH. Texas Red fluorofor emituje při vyšších vlnových délkách a kvantový výtěžek fluorescence jeho konjugátů je obvykle vyšší než například u konjugátů tetramethylrhodaminu. Rhodamine Green je nesulfonovaný analog barviva Alexa Fluor 488 s dobrou fotostabilitou, vysokým extinkčním koeficientem a vysokým kvantovým výtěžkem fluorescence, obzvláště v konjugátech s nukleotidy a nukleovými kyselinami. Fluorescence konjugátů Rhodamine Green je kompletně necitlivá k pH mezi 4 a 9<sup>21</sup>.



Oregon Green 514



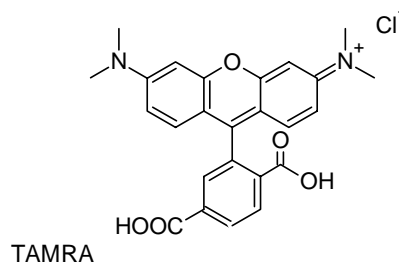
Texas Red

Vlnové délky maxim absorpce (excitace) a emise fluoroforů<sup>1</sup>.

fluorofor	$\lambda_{\max}$ excitace (nm)	$\lambda_{\max}$ emise (nm)
Oregon Green 488	492	517
Oregon Green 514	506	526
Rhodamine Green	504	532
Texas Red	595	615

## Tetramethylrhodamin

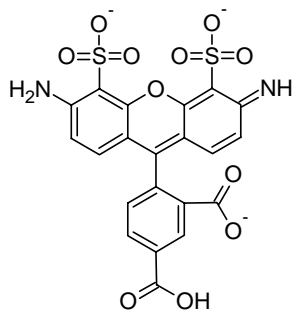
Tetramethylrhodamin (TMR = TAMRA) je důležitým fluoroforem pro přípravu konjugátů, pro značení oligonukleotidů a automatizovanou DNA sekvenaci. Kvantové výtěžky fluorescence konjugátů TAMRA jsou obvykle pouze okolo jedné čtvrtiny hodnoty konjugátů fluoresceinu, ale tento fluorofor je fotostabilnější než fluorescein<sup>21</sup>.



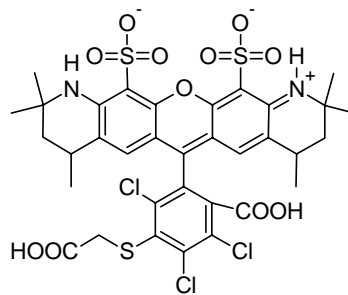
## Alexa Fluor

Alexa Fluor 350, 430, 488, 532, 546, 568, 594 apod. jsou jednou z novějších sérií fluoroforů. Čísla v názvech Alexa Fluor barviv vyjadřují přibližné vlnové délky excitačního maxima v nm. Absorpční a emisní spektra Alexa Fluor barviv, spektrálně podobná cyaninovým barvivům<sup>22</sup>, pokrývají celé spektrum od ultrafialové po červenou<sup>23</sup>. Tato barviva vykazují necitlivost svých spekter v širokém rozmezí pH<sup>21</sup>, nejčastěji mezi 4 - 10<sup>23</sup>. Dále mají vysoké kvantové výtěžky a vysokou efektivitu FRET<sup>21</sup>.

Všechna barviva Alexa Fluor jsou využívány ve formě sukcinimidylesteru pro konjugaci s primárními aminy biomolekul<sup>23</sup>. Jejich dobrá rozpustnost ve vodě usnadňuje konjugaci a činí konjugáty rezistentními k precipitaci a agregaci. Proteinové konjugáty Alexa Fluor 350 jsou optimálně excitovány při 346 nm a vykazují zářivou modrou fluorescenci (při 442 nm). Alexa Fluor 488 je zeleně fluoreskující barvivo. Alexa Fluor 532, 546, 555, 568, 594, 610 jsou žlutě, oranžově až červeně fluoreskující barviva opatřující silně viditelnou fluorescenci, která je dobře kontrastní se zelenou fluorescencí Alexa Fluor 488. Celkově jsou často používány v kombinaci se zeleně-fluoreskujícími barvivy.



Alexa Fluor 488



Alexa Fluor 546

Vlnové délky maxim absorpce (excitace) a emise fluoroforů<sup>21</sup>.

fluorofor	$\lambda_{\max}$ excitace (nm)	$\lambda_{\max}$ emise (nm)
Alexa Fluor 532	531	554
Alexa Fluor 546	556	573
Alexa Fluor 555	555	565
Alexa Fluor 568	578	603
Alexa Fluor 594	590	617
Alexa Fluor 610	612	628
Alexa Fluor 488	495	519

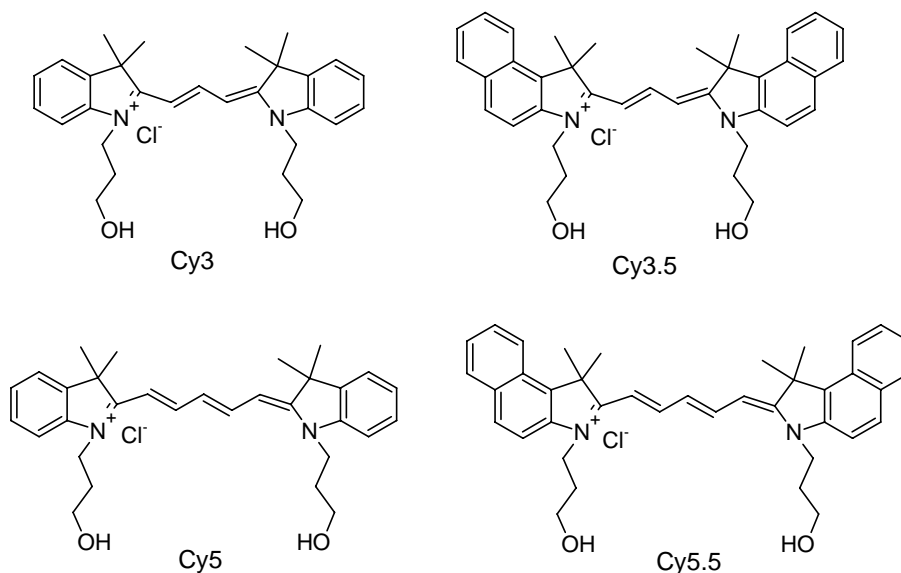
### 2.4.3. Barviva s indocyaninovým skeletem

#### Cyaninová barviva

Cyaninová barviva se skládají ze dvou kvartérních heteroaromatických bází spojených polymethinovým řetězcem. Tyto fluorofory jsou efektivními reagenty pro kovalentní značení proteinů, mají vysoký extinkční koeficient, ale nižší fotostabilitu. Jejich syntézy mohou být snadno ovlivnitelné k produkci barviv s absorpčními pásy v oblasti od 500 nm přibližně do 750 nm<sup>24</sup>.

Barviva Cy3, Cy5 a Cy5.5 jsou indocyaninová barviva o dlouhé vlnové délce běžně používaná ve fluorescenční mikroskopii, průtokové cytometrii a v detekčních metodách založených na identifikaci nukleových kyselin. Nicméně, ztráta fluorescence po konjugaci cyaninových barviv omezuje jejich účelnost<sup>22</sup>. Také kvantové výtěžky a rozpustnost ve vodě indocyaninových barviv nejsou optimální. Sulfoindocyaninová barviva (amino-reaktivní cyaninová barviva obsahující negativně nabitou sulfonovou skupinu na aromatickém jádře) jsou vysoce rozpustná ve vodě a fluoreskují ve viditelné a blízké-infračervené oblasti spektra, dobře oddělitelné od nižších vlnových délek autofluorescence, která je charakteristická v mnohých biologických vzorcích<sup>25</sup>.

Cy3 barviva jsou žluto-oranžová, zatímco Cy5 fluoreskují v červené oblasti. Jsou obvykle substituována reaktivními skupinami buď na jedné či obou dusíkových stranách řetězců tak, že mohou být chemicky navázány k nukleové kyselině či molekule proteinu<sup>26</sup>. Přikondenzování benzenového kruhu k indocyaninovým barvivům posouvá absorpci barviva k vyšším vlnovým délkám a zvyšuje kvantový výtěžek<sup>27</sup>. Kvantové výtěžky Cy3 a Cy5 jsou o něco vyšší v organických rozpouštědlech<sup>25</sup>.



Vlnové délky maxim absorpce (excitace) a emise fluoroforů<sup>1</sup>.

fluorofor	$\lambda_{\max}$ excitace (nm)	$\lambda_{\max}$ emise (nm)
Cy3	552	570
Cy3.5	588	604
Cy5	643	667
Cy5.5	675	694

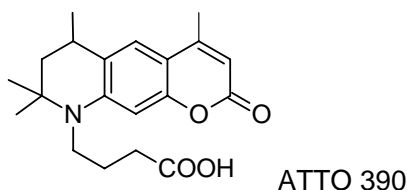
#### 2.4.4. Další fluorescenční barviva

##### ATTO fluorescenční značky

Jedná se o novou generaci patentovaných fluorescenčních markerů, které mohou být použity jako fluorescenční značky pro velký okruh biomolekul, například proteinů a nukleotidů. Mezi jejich charakteristické vlastnosti patří vysoký extinkční koeficient, vysoký kvantový výtěžek fluorescence a vysoká fotostabilita. Tyto značky nachází také uplatnění ve fluorescenční spektroskopii.

Příkladem tohoto typu značek je ATTO 390, jehož základem je kumarinová struktura. Mezi jeho vlastnosti patří velký Stokesův posun a vysoká stabilita při

fyziologickém pH. Je mírně hydrofilní a efektivně je excitován v rozmezí 360 - 410 nm. Struktura dalších ATTO fluoroforů je podobná či odlišná od ATTO 390<sup>28</sup>.



Výčet fluoroforů uvedený v této kapitole je pouze příkladem těch nejčastěji používaných. Ovšem škála fluoroforů je daleko širší a zahrnuje i spoustu látek a strukturních typů zde nezmíněných<sup>21</sup>.

## 2.5. Zhášecí používané v praxi

Volba zhášecího barviva závisí na typu fluorescenčního barviva, respektive na jeho emisním spektru<sup>11</sup>. Zhášecí mohou být samy o sobě fluorescenční, emitující foton při vyšších vlnových délkách než akceptorový fluorofor, nebo nefluorescenční<sup>29</sup>. Mezi fluorescenční akceptory patří ROX (6-karboxy-X-rhodamin) a TAMRA (6-karboxytetramethylrhodamin)<sup>21</sup>.

„Dark quenchery“ jsou nefluorescenční chromofory, které při mechanismu FRET mohou absorbovat energii z excitovaného stavu fluoroforu, zabraňují emisi fotonu fluorescence. Excitovaný „dark quencher“ se vrátí do základního stavu neradiačním přechodem - uvolněním energie nejčastěji ve formě tepla. Při kontaktním zhášení tvoří „dark quencher“ s fluoroforem nefluorescenční komplex v základním energetickém stavu maskující jeho fluorescenci až do rozpadu komplexu hybridizací<sup>29</sup>.

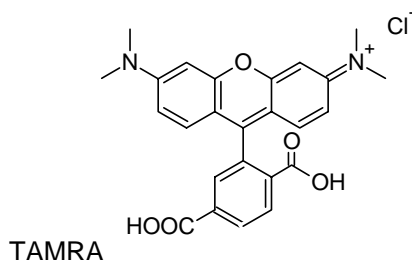
Do oligonukleotidů mohou být inkorporovány například následující „dark quenchery“: Dabcyl, Black Hole Quenchers<sup>TM</sup> (BHQ<sup>TM</sup>-1 a BHQ<sup>TM</sup>-2), Iowa Black<sup>TM</sup> (IB<sup>TM</sup>FQ a IB<sup>TM</sup>RQ) atd. V těsném okolí mohou někdy „dark quenchery“ zhášet fluorofory non-FRET mechanismem, což eliminuje požadavek spektrálního překryvu<sup>30</sup>.

Zhášecí se na oligonukleotidu mohou vyskytovat ve třech modifikacích, mohou být navázány na 3'-konec, 5'-konec nebo uvnitř (uprostřed) oligonukleotidu.

### TAMRA

Tento zhášecí je dnes vytěšňován z použití jinými zhášecí. Díky své autofluorescenci má příliš vysoké pozadí<sup>11</sup>. Ačkoli je TAMRA fluoroforem s emisním maximem

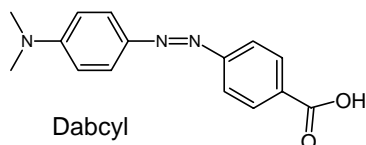
fluorescence přibližně při 576 nm, sondy FAM-TAMRA s FAM jako fluoroforem a TAMRA jako zhášecem byly široce využívány až do zavedení BHQ barviv v roce 2000<sup>31</sup>.



### **Dabcyl**

Dabcyl byl prvním běžně používaným „dark quencherem“ v duálně značených sondách („dual-labeled probes“). Má méně ideální spektrální charakteristiky s absorpčním maximem (453 nm)<sup>32</sup> vzdáleným od maxim fluorescence mnoha fluoroforů, což omezuje jeho efektivitu zhášení pomocí FRET<sup>31</sup>.

Dabcyl je tedy relativně slabý „dark quencher“ a hodí se nejlépe pro použití v „molecular beacons“, kde jsou fluorofor a zhášec umístěny v těsné blízkosti díky struktuře vlásenky<sup>33</sup>. Je využitelný pro zhášení fluoroforů s relativně krátkou vlnovou délkou jako karboxyfluorescein (FAM)<sup>29</sup>.



Dabsyl (karboxylová kyselina přítomná v molekule Dabcylu nahrazena sulfonovou kyselinou) má absorpční maximum při 464 nm. Dabcyl i Dabsyl mohou být použity jako zhášec pro fluorofory jako fluorescein, TAMRA a JOE<sup>31</sup>.

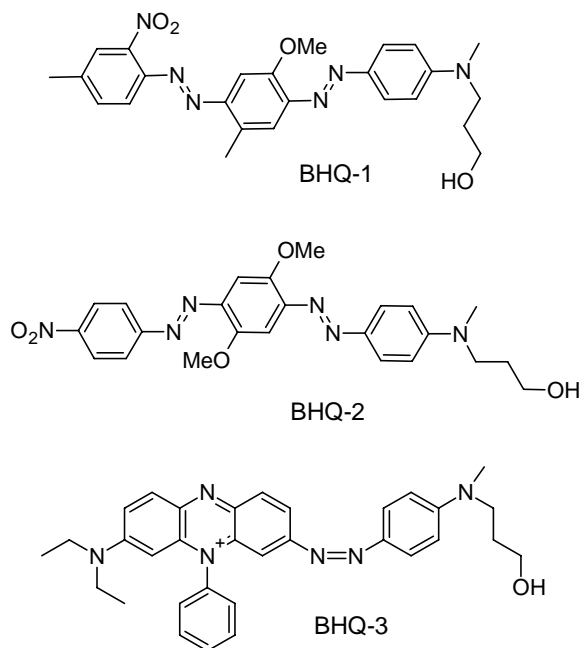
### **Black Hole Quenchers (BHQ)**

Black Hole Quenchers (BHQ) mají polyaromatický azoskelet, díky němuž jsou nefluorescenční, neboť elektronová energie je rozptýlena ve formě tepla. BHQ zhášec nevykazují žádnou nativní fluorescenci, jsou tedy pravými „dark quencher“.

Absorpční maxima BHQ jsou upravována vhodným výběrem elektron-donorových a elektron-akceptorových substituentů na aromatických kruzích, vedoucím k sérii nefluorescenčních barviv s absorpčními spektry překrývajícími emisní spektra

fluoroforů od modrého až po blízké infračervené pásmo. To maximalizuje efektivitu FRET zhášení pro různé fluorofory emitující od 400 - 650 nm.

BHQ-1 s absorpčním maximem při 534 nm je efektivnějším zhášečem pro více fluoroforů než například Dabcyl, neboť jeho absorpční spektrum přímo pokrývá emisními maxima běžně používaných barviv jako FAM, TET a JOE<sup>31</sup>. BHQ-2 s absorpčním maximem při 578 nm se nejlépe hodí pro fluorofory v rozmezí vlnových délek od Cy3 k Cy5<sup>33</sup>.



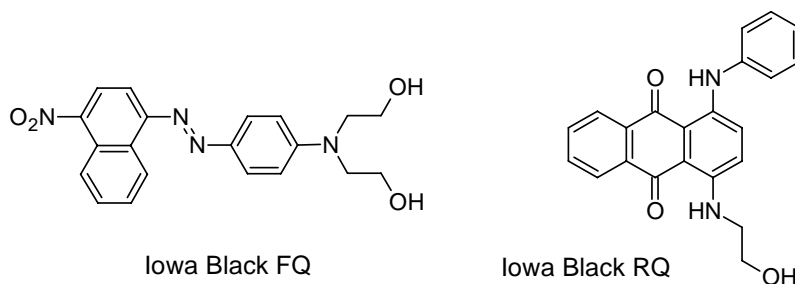
Absorpční maxima a vlnové délky zhášení<sup>32</sup>.

zhášeč	$\lambda_{\max}$ absorpce	oblast zhášení
BHQ-1	534 nm	480-580 nm
BHQ-2	578 nm	550-650 nm
BHQ-3	672 nm	620-730 nm

### **Iowa Black zhášeče**

Iowa Black<sup>TM</sup> zhášeče mají výborné vlastnosti pro použití v sondách zhášejících fluorescenci. Jsou stabilní v širokém okruhu podmínek, včetně pH a tepla. Iowa Black FQ<sup>TM</sup> má široké absorpční spektrum v oblasti od 420 do 620 nm s maximem absorpance při 531 nm. Tento zhášeč je ideální pro použití s fluoresceinem a dalšími fluorescenčními barvivy, které emitují v zelené až růžové oblasti spektra. Iowa Black RQ<sup>TM</sup> má také široké absorpční spektrum v rozmezí od 500 do 700 nm s maximem absorpance při 656 nm. Tento zhášeč je ideální pro použití s Texas Red<sup>®</sup>, Cy5<sup>TM</sup> a dalšími fluorofory, které emitují v červené oblasti spektra<sup>34</sup>.

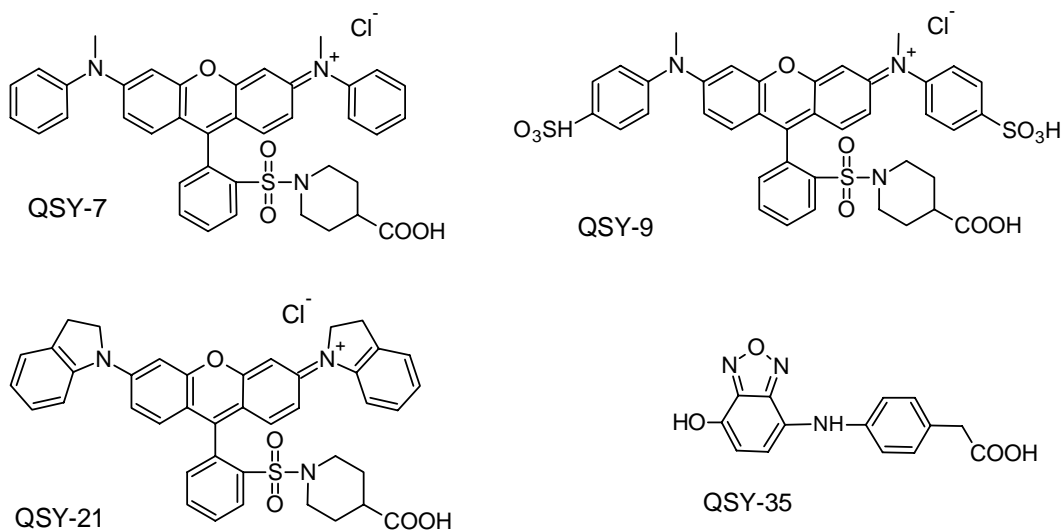




### QSY zhášecě

QSY zhášecě jsou analogy fluoresceinu<sup>32</sup>. Mohou sloužit jako efektivní zhášecě emise fluorescence v rozsahu vlnových délek 410 – 720 nm, tedy i pro sérii Alexa Fluor barviv. Jsou nefluorescenčními FRET akceptory, a proto poskytují nulové pozadí při měření FRET. QSY 7, QSY 9, QSY 21 a QSY 35 barviva mohou být inkorporována do proteinových konjugátů či konjugátů s nukleovými kyselinami za využití amino-reaktivních sukcinimidylesterů<sup>35</sup>. Rozdílem mezi QSY 7 a QSY 9 je rozpustnost jejich konjugátů ve vodě.

QSY zhášecě lze použít v různých FRET aplikacích, například při automatizované DNA sekvenaci, detekci hybridizace nukleových kyselin či v real-time PCR.

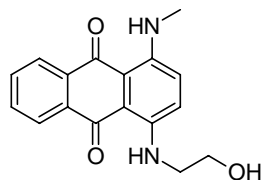


Absorpční maxima a vlnové délky zhášení<sup>32</sup>.

zhášecě	$\lambda_{\max}$ absorpce	oblast zhášení
QSY 7	560 nm	500-600 nm
QSY 9	562 nm	500-600 nm
QSY 21	660 nm	590-720 nm
QSY 35	472 nm	410-500 nm

### Disperse Blue

Disperse Blue je „dark quencher“, jehož strukturním základem je 1,4-diaminoanthrachinon. Má rozsáhlou absorpci v rozmezí 550 - 700 nm oblasti viditelného spektra a je proto schopen zhaset široký okruh fluoroforů, obzvláště ty, které emitují při vyšších vlnových délkách<sup>36</sup>.



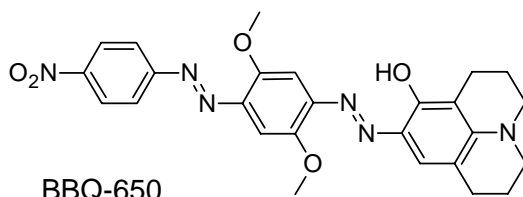
Disperse Blue

### ATTO zhášecí

Novějšími zhášecí fluorescence jsou ATTO 540Q, ATTO 580Q a ATTO 612Q. Jejich charakteristickými rysy jsou výrazná absorpce a vysoká teplotní stabilita a fotostabilita. Tato barviva jsou mírně hydrofilní. Jejich N-hydroxysukcinimidylestery vykazují výbornou rozpustnost v polárních rozpouštědlech jako DMF, DMSO či acetonitril<sup>37,38,39</sup>. Vlnová délka absorpce ve vodě je u ATTO 540Q 542 nm a u ATTO 612Q 615 nm<sup>37,39</sup>. ATTO 580Q se skládá ze tří izomerů s prakticky identickými vlnovými délkami absorpce 586 nm<sup>38</sup>.

### BlackBerry™ Quencher 650

BlackBerry™ Quencher 650 (BBQ-650) je také jedním z novějších „dark quencherů“. Jedná se o excelentní zhášecí fluorescence vyšších vlnových délek pomocí FRET i kontaktním mechanismem zhášení. Jeho využitelná absorpce je mezi 550 a 750 nm s absorpčním maximem přibližně při 650 nm. Tato široká oblast absorpce efektivně pokrývá emisní maxima populárních fluoroforů s vyšší vlnovou délkou jako Cy3, TAMRA, Texas Red, ROX, Cy5 a Cy5.5, poskytující efektivní zhášení. Tento zhášecí má strukturu podobnou BHQ, ovšem díky konjugaci s 8-alkoxyjulolidinem vykazuje vyšší chemickou stabilitu než BHQ<sup>29</sup>.



BBQ-650

V této kapitole byl uveden pouze výčet nejčastěji používaných zlášečů. Ve vývoji se nachází nesčetné množství potenciálních zlášečů fluorescence a to od derivátů nukleových bází až po zlaté nanočástice.

### 3. Cíl práce

V poslední době je věnováno mnoho pozornosti nesymetricky substituovaným ftalocyaninům a jejich azaanalogům, které obsahují jednak odlišné funkční skupiny, jednak různé typy přikondenzovaných aromatických či heterocyklických částí. Nicméně, syntéza a izolace takovýchto sloučenin zůstává stále složitým problémem<sup>40</sup>.

Nově byla u látek typu aminoderivátů azaftalocyaninů objevena schopnost zhaset fluorescenci<sup>41</sup>.

Cílem této diplomové práce byla příprava nových nesymetrických derivátů azaftalocyaninů, které byly syntetizovány smíšenou cyklotetramerizací dvou různých prekurzorů. Získané látky lze využít pro zhasení fluorescence, tedy jako „dark quenchery“. Periferní substituenty byly voleny tak, aby výsledné sloučeniny mohly být navázány na oligonukleotidové sondy.

Vhodnými skupinami k vazbě na oligonukleotidovou sondu jsou například skupina alkoholická nebo karboxylová. V této práci byla tímto vhodným substituentem karboxylová skupina, neboť je využitelná pro další modifikace a vazbu na pevnou fázi.

U finálních produktů, tedy azaftalocyaninů, byla také změřena stabilita v jednom z reagensů syntézy oligonukleotidů použitelných pro zhasení. Konkrétně se jednalo o roztok jódu, sloužící v syntéze oligonukleotidů jako oxidační činidlo.

## 4. Metodická část

Ftalocyaniny (phthalocyanines, Pcs) byly a stále jsou využívány jako barviva a pigmenty v tiskařském, textilním a papírenském průmyslu díky jejich intenzivní barvě, vysoké barvicí schopnosti, fotostabilitě, nerozpustnosti ve většině rozpouštědel a chemické inertnosti.

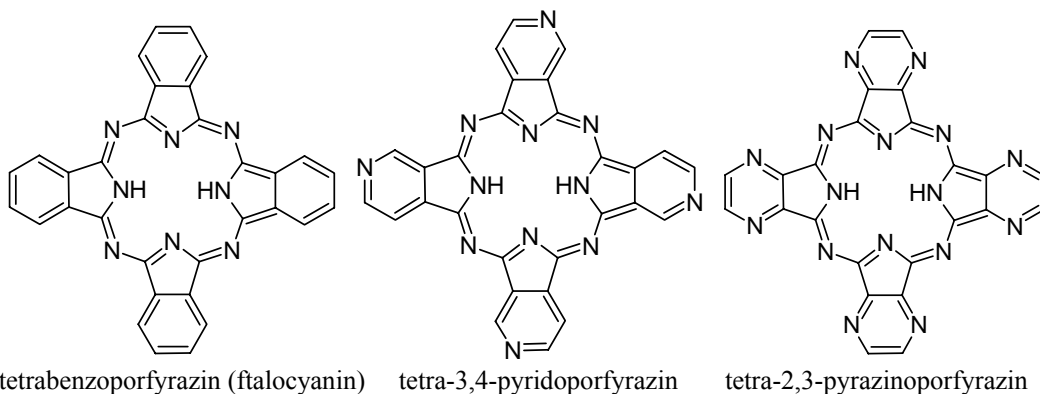
Vzhledem k unikátním chemickým a fyzikálním vlastnostem ftalocyaninů rapidně roste jejich důležitost v mnoha dalších oblastech. Tyto oblasti zahrnují například chemické senzory, tekuté krystaly, funkční polymery, nelineární optické (NLO) aplikace a fotosenzitizéry<sup>42</sup> pro fotodynamickou diagnostiku a terapii nádorů<sup>40</sup>.

Azaanalogy ftalocyaninů (azaphthalocyanines, AzaPcs) mohou být použity jako průmyslová barviva a pigmenty, pro kontrolování růstu mikroorganismů, dále jako elektrokatalyzátory pro redukcí kyslíkem, materiály pro elektrochromní displeje<sup>43</sup> a média pro optické uchovávání dat s obrovskou paměťovou kapacitou<sup>44</sup>. Neboť jsou velmi podobné Pcs, mohou být použity také ve velmi podobných aplikacích jako Pcs. Jsou známé jako dobré fotosenzitizéry a některé z nich jsou vhodnými činidly pro fotodynamickou terapii (PDT).

Pcs a také AzaPcs mají jednu nežádoucí vlastnost. Tyto makrocyclické sloučeniny vykazují vysokou tendenci agregace za vzniku dimerů a oligomerů v roztoku, což způsobuje nerozpustnost, brání purifikaci a charakterizaci těchto sloučenin, a znemožňuje jejich využití. Zavedení dlouhých řetězců nebo objemných substituentů na periferii makrocyclické molekuly může agregaci inhibovat<sup>43</sup>.

Syntéza heterocyclických analogů Pcs byla poprvé uvedena v roce 1937 Linsteadem a jeho spolupracovníky<sup>45</sup>. Benzenové kruhy těchto sloučenin byly substituovány heterocycly jako thiofen, thionaftalen, pyridin a pyrazin. Příprava AzaPcs byla popsána v šedesátých letech minulého století, předmětem studia byly jejich fotoelektrické, absorpční a katalytické vlastnosti.

Pro centrální kruh systému molekuly ftalocyaninu se používá termín porfyrizin, individuální sloučeniny jsou pojmenovány připojením příslušné předpony<sup>44</sup>.



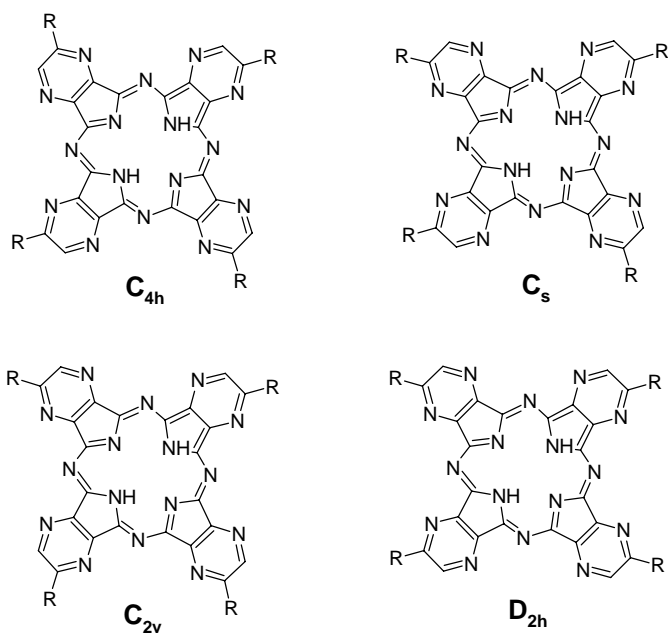
#### 4.1. Syntéza nesymetrických ftalocyaninů a jejich azaanalogů

Ftalocyaniny jsou 18  $\pi$ -elektronové aromatické makrocykly obsahující čtyři isoindolové jednotky spojené přes jejich polohy 1 a 3 pomocí dusíkových můstků. Delokalizace  $\pi$ -elektronů způsobuje velký počet unikátních fyzikálních vlastností těchto látek. Pcs jsou chemicky a termicky stabilní sloučeniny, vykazující mimořádné optické a elektrické chování.

Na Pc kruhu může být provedeno několik chemických modifikací, které poskytují vylepšení jejich fyzikálních vlastností. Pcs jsou schopné inkorporování více než 70 různých kovových a nekovových kationtů do jejich dutiny ve středu kruhu. Je také možné připojit rozmanité druhy substituentů na periferii makrocyklu, což může změnit elektronovou strukturu systému<sup>46</sup>. Hlavním účelem substituentů je zlepšit velmi omezenou rozpustnost Pcs<sup>47</sup>. Jsou-li tyto substituenty hydrofobní, tedy objemné či s dlouhým řetězcem, mohou sloužit k zvýšení rozpustnosti Pcs v běžných organických rozpouštědlech.

Syntézy široce popsaných nesubstituovaných či symetricky substituovaných Pcs se provádí s nízkými výtěžky cyklotetramerizačními reakcemi ftalyl-derivátů, obvykle ftalonitrilu či 1,3-diiminoisoindolinu.

Geometrická kombinace čtyř identických diiminoisoindolinových podjednotek postrádajících symetrickou souměrnost vede ke čtyřem konstitučním izomerům skeletu ftalocyaninu s  $C_s$ ,  $D_{2h}$ ,  $C_{2v}$  a  $C_{4h}$  symetriemi. Statistická směs těchto čtyř izomerů by obsahovala 12,5% izomeru  $D_{2h}$ , 12,5% izomeru  $C_{4h}$ , 25% izomeru  $C_{2v}$  a 50% izomeru  $C_s$ .



Byly vyvinuty selektivní metody pro syntézu nesymetricky substituovaných Pcs, hlavně těch obsahujících dvě různé isoindolové podjednotky (A a B). Mohou být použity specifické přístupy pro přípravu požadované sloučeniny podle typu produktu, který si přejeme získat<sup>46</sup>.

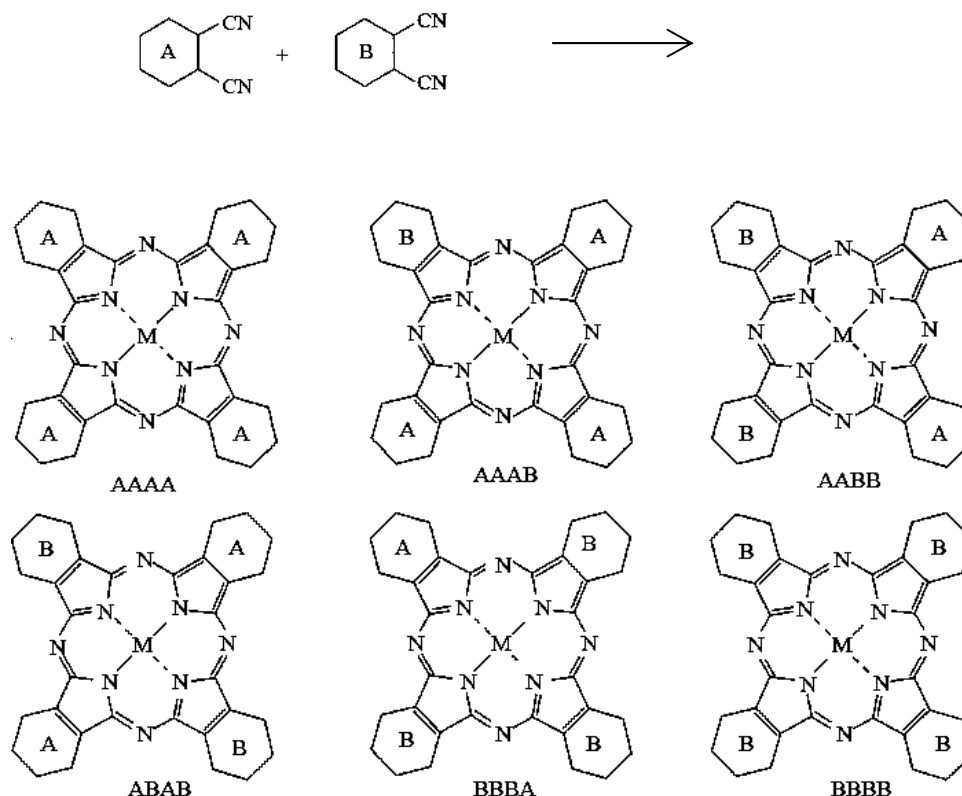
Předmětem zájmu je především syntéza ftalocyaninů složených ze tří identických (A) a jedné odlišné (B) isoindolové podjednotky (typ A<sub>3</sub>B) s jednou funkční skupinou, potenciálně využitelných pro další modifikaci. Přítomnost jedné reaktivní funkční skupiny může být také zajímavá zejména pro perspektivní možnost kovalentní vazby ftalocyaninové části k vhodné nosné molekule<sup>48</sup>.

#### 4.1.1. Syntéza A<sub>3</sub>B ftalocyaninů

Obvyklé strategie syntézy tohoto typu nesymetricky substituovaných Pcs jsou: metoda statistické kondenzace dvou různě substituovaných prekurzorů, subftalocyaninová metoda a metoda syntézy na pevné fázi<sup>48</sup>.

##### Metoda statistické kondenzace

Nejjednodušším přístupem k přípravě ftalocyaninů nesoucích různé substituenty je smíšená kondenzace dvou odlišně substituovaných prekurzorů. V podstatě se jedná o neselektivní metodu poskytující směs šesti sloučenin, je tedy nutné použít k izolaci požadovaných makrocyclů chromatografické techniky. Vzhledem k tendenci molekul Pcs agregovat je separace takové statistické směsi obtížná.



Chceme-li dosáhnout vysokého výtěžku derivátu A<sub>3</sub>B, je nutné použít vhodný stechiometrický poměr reaktantů A a B. Statistické výpočty předpovídají, že reakce dvou různých ftalyl-derivátů o stejné reaktivitě v poměru 3:1 bude poskytovat směs produktů v následujícím procentuálním množství: 33% A<sub>4</sub>, 44% A<sub>3</sub>B a 23% dalších možných produktů kondenzace. Obecně poskytuje molární poměr 3 : 1 požadovanou sloučeninu ve výtěžcích v rozmezí 10 a 20%. Je preferováno použití ftalonitrilů s různými solubilizačními charakteristikami, neboť to dovoluje separaci nesymetrických Pcs na základě odlišných rozpustností sloučenin přítomných ve výsledné statistické směsi.

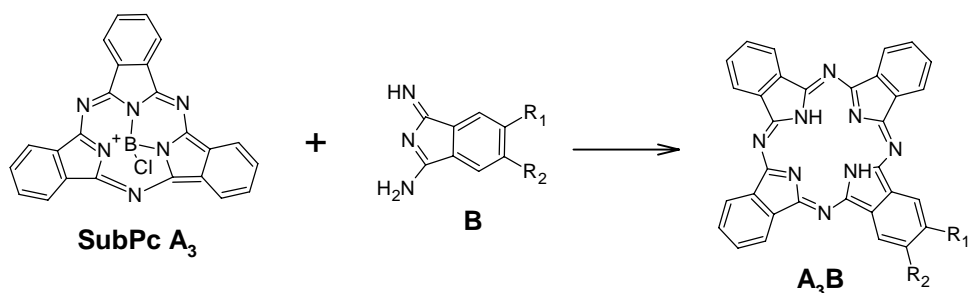
Dále lze použít dva různě substituované ftalonitrily (A a B) v poměru 9 : 1. Tento poměr vede k nárůstu množství produktu A<sub>4</sub> a snížení množství požadovaného A<sub>3</sub>B, ovšem další produkty kondenzace nejsou tvořeny prakticky vůbec a požadovaná sloučenina A<sub>3</sub>B může být snadněji separována z této jednoduché směsi. Tato stechiometrie 9 : 1 je také použitelná, je-li prekurzor B reaktivnější než prekurzor A.

#### Subftalocyaninový přístup

Tato originální metoda pro selektivní syntézu nesymetricky substituovaných ftalocyaninů typu A<sub>3</sub>B zahrnuje expanzi kruhu subftalocyaninu (subphthalocyanine, SubPc) pomocí derivátu sukcinimidu nebo diiminoisoindolinu. Geometrické pnutí

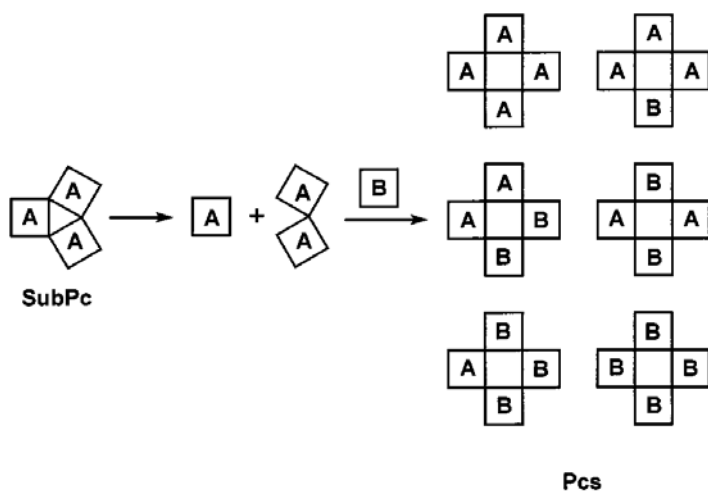


v subftalocyaninovém jádře způsobí, že toto jádro je ochotně rozštěpeno v přítomnosti diiminoisoindolinové jednotky, která je potom inkorporována do jeho skeletu tak, že formuje derivát ftalocyaninu typu  $A_3B$ . Tato reakce je velmi selektivní a efektivní v některých případech a umožňuje syntézu dříve nedosažitelných Pcs<sup>46</sup>.



Reakce rozšíření kruhu velmi závisí na původu substituentů na SubPcs, reaktivitě diiminoisoindolinu, rozpouštědle a použitých reakčních podmínkách<sup>42</sup>. Typická expanze kruhu se provádí přidavkem 6-9ti násobného molárního nadbytku derivátu diiminoisoindolinu k roztoku SubPc v DMSO/1-chlornaftalen či dichlorbenzen (1 : 4 až 4 : 1) nebo v (dimethylamino)ethanolu. Reakční směs je ponechána po dobu 5 - 12 h při teplotě 80 - 100°C. Požadované nesymetricky substituované Pcs jsou získávány ve výtěžcích v rozmezí 3 - 90%.

V roce 1995 se prokázalo, že reakce probíhá přes parciální nebo úplnou fragmentaci subftalocyaninového kruhu a následné statistické uzavření fragmentů do kruhu za vzniku směsi všech možných Pcs obsahujících všechny kombinace výchozích diiminoisoindolinových jednotek<sup>46</sup>.

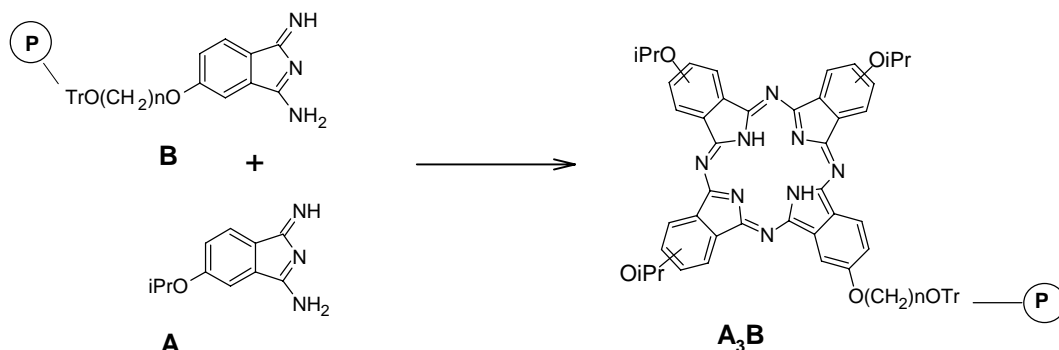


Wöhrle a spol. dokázali, že přidavek kovového templátu k reakční směsi zvyšuje výtěžky jak požadovaného  $A_3B$  nesymetricky substituovaného Pc, tak i ostatních produktů. Také se ukázalo, že SubPcs mohou reagovat s méně reaktivními deriváty ftalonitrilu v přítomnosti silné baze jako DBU<sup>49</sup> (1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-enu)<sup>44</sup> za dobrých výtěžků  $A_3B$  Pcs<sup>49</sup>.

Subftalocyaninová metoda má několik výhod oproti statistické kondenzační metodě. Kromě relativně dobrých výtěžků je to snadná purifikace asymetrických Pcs sloupcovou chromatografií<sup>50</sup>.

#### Metoda syntézy na pevné fázi („Polymeric support method“)

Dalším přístupem pro selektivní přípravu  $A_3B$  Pcs je syntéza na pevné fázi<sup>46</sup>. V této metodě je jeden z vhodně substituovaných Pc prekurzorů kovalentně napojen na pevnou fázi<sup>42</sup>, nejčastěji polymer nebo modifikovaný silikagel<sup>46</sup>. Následuje syntéza makrocyklu. Pc vázaný na polymer je získán filtrací, vazba k polymeru je rozštěpena a je získán čistý 3 : 1 nesymetricky substituovaný Pc. Ačkoli se tato metoda úspěšně používá k přípravě čistých nesymetricky substituovaných Pcs, je omezena počtem funkčních skupin, které mohou být kovalentně navázány k pevné fázi<sup>42</sup>.

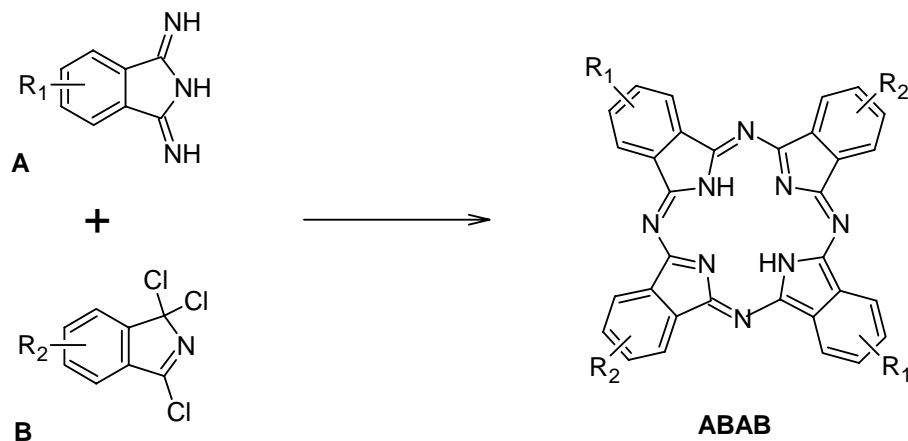


#### 4.1.2. Syntéza $A_2B_2$ ftalocyaninů

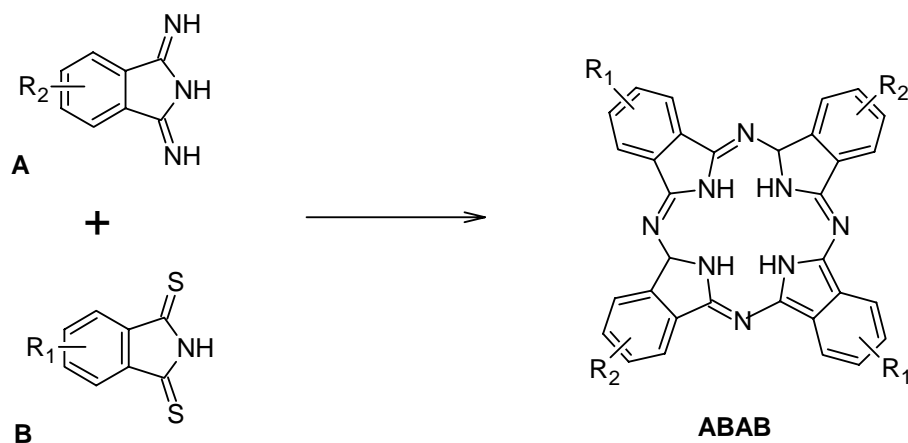
Pro syntézu  $A_2B_2$  derivátů musí být použity jiné metody. Tyto deriváty jsou složeny ze směsi dvou izomerů, sousedního („adjacent“) AABB a protilehlého („opposite“) ABAB. Dosud bylo publikováno velmi málo případů separace makrocyklů tohoto typu ze statistických směsí pomocí sloupcové chromatografie, neboť oba izomery (ABAB a AABB) vykazují podobné solubilizační charakteristiky a jsou často eluovány ve stejné frakci.

### Syntéza ABAB ftalocyaninů („Crosswise-Substituted Pcs“)

Jedna z možností této metody zahrnuje syntézu ftalocyaninů typu ABAB za mírných podmínek z ekvivalentního množství dvou různých ftalyl-derivátů, a to 1,3-diiminoisoindolinu a 1,3,3-trichlorisoindoleninu, v přítomnosti base a redukčního činidla. Tento způsob syntézy poskytuje ve všech případech požadovanou sloučeninu s velkou selektivitou.



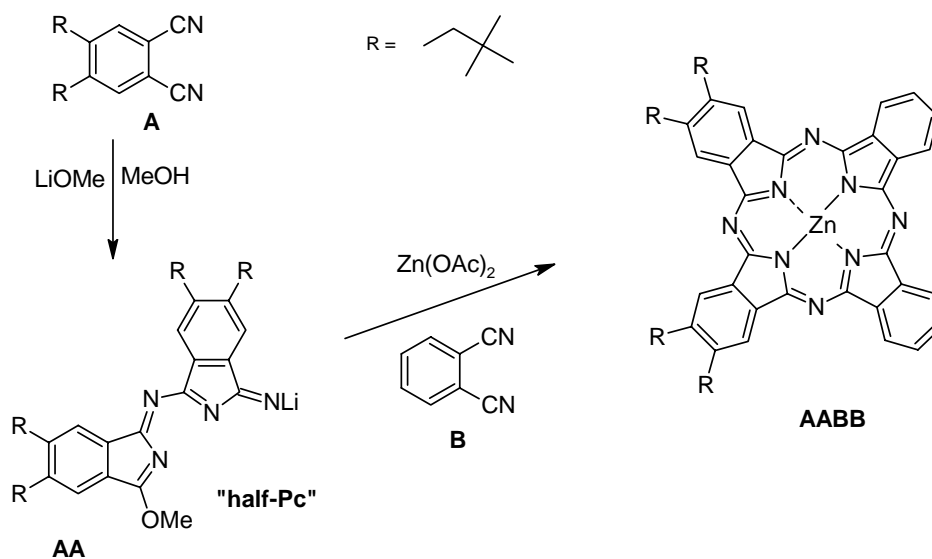
Druhá z možností metody zkřížené kondenzační reakce je reakce zahrnující 1,3-diiminoisoindolin a 1*H*-isoindol-1,3(2*H*)-dithion v molárním poměru 1 : 1. V tomto případě je získán nesymetrický ABAB ftalocyanin znečištěný stopami všech ostatních možných kongenerů<sup>46</sup>.



### Syntéza AABB ftalocyaninů („Adjacent Pcs“)

Metodu přípravy AABB sloučenin popsal Leznoff a jeho spolupracovníci<sup>51</sup>. Tato metoda zahrnuje využití „polovičního ftalocyaninového“ meziproduktu, který může být

izolován a následně podroben reakci s dalším ftalonitrilem za velmi mírných podmínek. Příprava polovičních meziproductů pouze s ftalonitrily nesoucími silně elektron-odtahující skupiny může vést ke stabilním meziproductům. V Leznoffově práci, reakce 4,5-bis(3,3-dimethyl-1-butynyl)ftalonitrilu s alkoxidem lithným v prostředí methanolu poskytla odpovídající meziproduct, který ve druhém kroku reagoval s ftalonitrilem za vzniku AABB ftalocyaninu ve 20% výtěžku a dalších možných kongenerů. Pro získání pouze požadovaného AABB Pc vyžaduje tato strategie přečištění<sup>46</sup>.

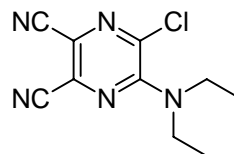
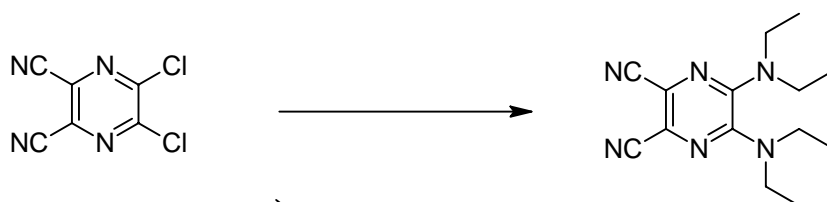
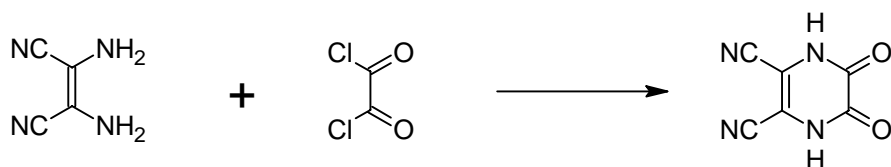
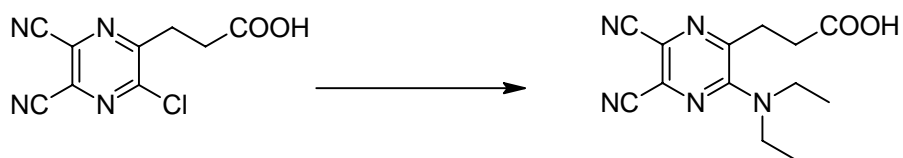
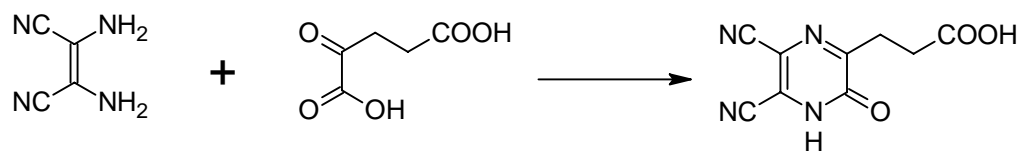


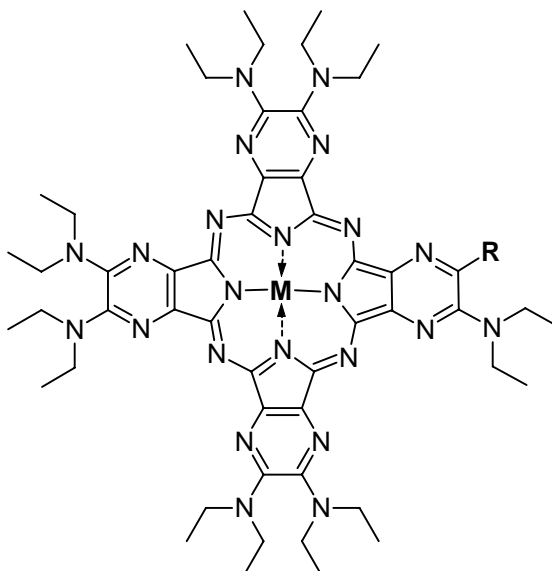
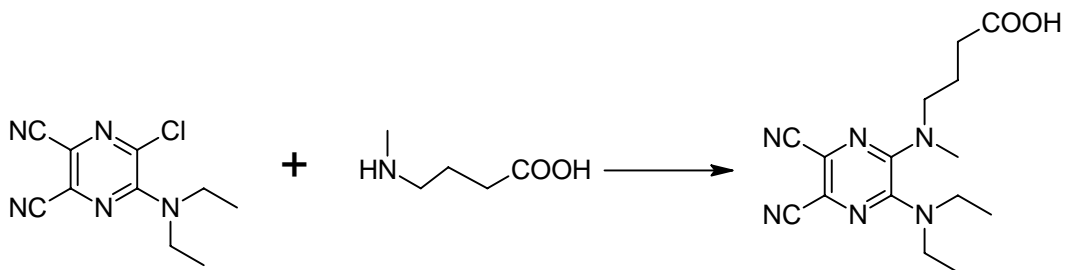
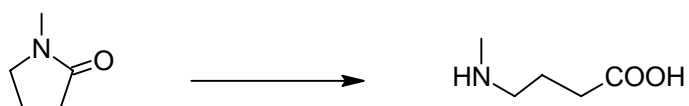
Syntéza tohoto typu byla provedena také Kobayashim<sup>52</sup> za použití bis(ftalonitrilů) spojených přemostujícími skupinami s vhodným pnutím, například 2,2'-dihydroxy-1,1'-binaftylem. Takovéto prekurzory mohou reagovat s dalšími odlišně substituovanými ftalonitrily za vzniku Pcs „adjacent“ typu ve 20 - 25% výtěžku<sup>46</sup>.

## 5. Experimentální část

Teploty tání byly stanoveny na digitálním přístroji pro stanovování teplot tání ELECTROTHERMAL IA9200 a jsou nekorigovány. Průběh reakcí a čistota produktů a meziproductů byly kontrolovány tenkovrstvou chromatografií na deskách Merck Silikagel 60 F254. Detekce byla prováděna světlem vlnové délky 254 nm a 366 nm. Vyvíjecí soustavy jsou uvedeny u jednotlivých reakcí. Sloupcová chromatografie byla prováděna na silikagelu Merck Kieselgel 60 (0,040-0,063 mm). Infračervená spektra (IČ) byla měřena IČ spektrofotometrem NICOLET IMPACT 400 na KAOCH FaF UK v Hradci Králové. Vlnočty jsou uvedeny v  $\text{cm}^{-1}$ . NMR spektra byla měřena na přístroji VARIAN MERCURY VxBB 300 na KAOCH FaF UK v Hradci Králové. Měření bylo prováděno při frekvenci 299.95 MHz ( $^1\text{H}$  NMR) a 75.43 ( $^{13}\text{C}$  NMR). Posuny jsou vztaženy k vnitřnímu standardu  $\text{Si}(\text{CH}_3)_4$ . Spektrum ve viditelné oblasti bylo změřeno na přístroji SHIMADZU UV 240 1 PC: UV-VIS recording spectrophotometer. Hmotnostní spektra byla měřena na přístroji Voyager-DE STR (Applied Biosystems, Framingham, Massachusetts, USA) v pozitivním refletronovém módu (MS-MALDI-TOF). Vzorok pro MS-MALDI-TOF byly připraveny nanesením 0,5  $\mu\text{l}$  roztoku na destičku, vysušením na vzduchu a překrytím 0,5  $\mu\text{l}$  roztoku matrice. Ta se skládala z 10 mg kyseliny  $\alpha$ -kyan-4-hydroxyskořicové v 100  $\mu\text{l}$  acetonitrilu v 0,1% kyselině trifluorctové. Přístroj byl kalibrován za použití externího pětibodového kalibračního standardu Peptide Calibration Mix1 (LaserBio Labs, Sophia-Antipolis, Francie). Dioxan byl sušen pomocí bezvodého chloridu vápenatého, předestilován a dosušen nad sodíkem. Butanol byl předestilován a sušen hořčíkem.

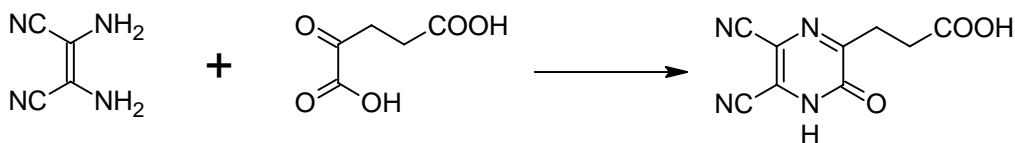
## 5.1. Schéma prováděných reakcí





	<b>R</b>	<b>M</b>
<b>Q17-1H2</b>	<chem>CCCC(=O)O</chem>	2H
<b>Q18-1H2</b>	<chem>CNCCCC(=O)O</chem>	2H
<b>Q18-1Cu</b>	<chem>CNCCCC(=O)O</chem>	Cu

### 5.1.1. Příprava kyseliny 3-(5,6-dikyan-3-oxo-3,4-dihydropyrazin-2-yl)propanové



$C_9H_6O_3N_4$

0,010 mol (1,459 g) kyseliny  $\alpha$ -ketoglutarové

0,010 mol (1,081 g) diaminomaleonitrilu

40 ml methanolu

5 ml 15% kyseliny chlorovodíkové

Diaminomaleonitril jsem rozpustila v methanolu a za míchání přidala kyselinu  $\alpha$ -ketoglutarovou. Poté jsem k roztoku postupně přikapala 15% kyselinu chlorovodíkovou. Reakci jsem nechala probíhat za stálého míchání po dobu čtyř hodin při laboratorní teplotě. Po uplynutí reakční doby jsem odpařila za vakua část methanolu, přidala 25 ml horké destilované vody a odpařila zbylý methanol. Výsledný roztok jsem zfiltrovala a filtrát nechala chladit v lednici, aby vykristalizovala sloučenina, kterou jsem poté znovu překrystalizovala z vody. Průběh reakce i výsledný produkt jsem kontrolovala pomocí tenkovrstvé chromatografie na silikagelu při detekci UV světlem o vlnové délce 254 nm. Jako mobilní fázi jsem použila směs benzín : ethylester kyseliny octové : kyselina octová v poměru 4 : 2 : 1.

Výtěžek: 1,21 g (tj. 55,4% teoretického výtěžku)

Popis: šedé jehličky

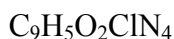
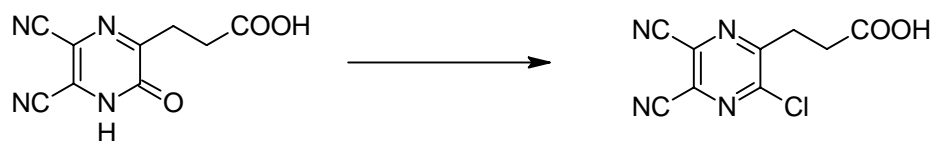
Molekulová hmotnost: 218,17

Teplota tání: 60,0 – 62,0 °C

Látka nebyla charakterizována spektry, neboť nebyla při skladování stálá a byla ihned zpracována. Charakterizován byl až následující meziprodukt.



### 5.1.2. Příprava kyseliny 3-(3-chlor-5,6-dikyanpyrazin-2-yl)propanové



0,006 mol (1,21 g) kyseliny 3-(5,6-dikyan-3-oxo-3,4-dihydropyrazin-2-yl)propanové

0,028 mol (4,25 g) chloridu fosforýlu

0,008 mol (0,61 g) pyridinu

Kyselinu 3-(5,6-dikyan-3-oxo-3,4-dihydropyrazin-2-yl)propanovou jsem ochladila na 0°C a za stálého míchání přidala chlorid fosforýlu a pyridin. Po skončení exotermní reakce jsem reakční směs za stálého míchání po dobu dvou hodin zahřívala na glycerinové lázni pod zpětným chladičem při teplotě 90°C. Přebytečný chlorid fosforýlu jsem odpařila na vakuové odparce a zbytek extrahovala chloroformem. Chloroformový extrakt jsem několikrát vytřepala s destilovanou vodou. Organickou část jsem vysušila bezvodým síranem sodným a odpařila do sucha. Výsledný produkt jsem přečistila pomocí sloupcové chromatografie za použití silikagelu a mobilní fáze složené ze směsi benzín : ethylester kyseliny octové v poměru 2 : 1.

Výtěžek: 0,510 g (tj. 38,9% teoretického výtěžku)

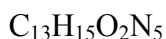
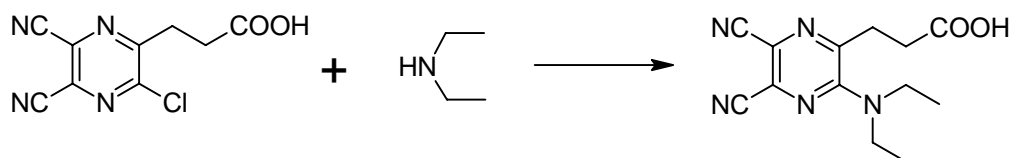
Popis: světlá olejovitá kapalina

Molekulová hmotnost: 236,62

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz, aceton- $d_6$ ):  $\delta = 172,8; 161,1; 152,5; 131,6; 130,9; 114,1; 113,7; 52,0$  a  $30,6$  ppm.

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz, aceton- $d_6$ ):  $\delta = 3,43$  (t, 2H,  $J = 6,8$  Hz,  $\text{CH}_2$ );  $2,93$  (t, 2H,  $J = 6,8$  Hz,  $\text{CH}_2\text{-COOH}$ ) ppm.

### 5.1.3. Příprava kyseliny 3-(5,6-dikyan-3-diethylaminopyrazin-2-yl)propanové



0,002 mol (0,480 g) kyseliny 3-(3-chlor-5,6-dikyanpyrazin-2-yl)propanové

0,008 mol (0,585 g) diethylaminu

20 ml tetrahydrofuranu

Kyselinu 3-(3-chlor-5,6-dikyanpyrazin-2-yl)propanovou jsem rozpustila ve 20 ml tetrahydrofuranu, poté přidala diethylamin a nechala míchat při laboratorní teplotě 30 minut. Po skončení průběhu reakce jsem reakční směs přefiltrovala a odpařila do sucha na vakuové odparce. Získanou látku jsem přečistila pomocí sloupcové chromatografie za použití silikagelu a mobilní fáze tvořené směsí chloroform : methanol v poměru 10 : 1, stejnou mobilní fází jsem použila i pro kontrolu pomocí tenkovrstvé chromatografie na silikagelu při detekci UV světlem o vlnové délce 254 nm a 366 nm.

Výtěžek: 0,499 g (tj. 90,1% teoretického výtěžku)

Popis: žlutá olejovitá kapalina

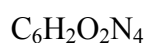
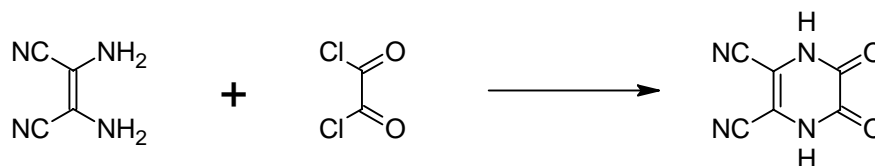
Molekulová hmotnost: 273,3

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 173,0; 154,1; 146,2; 128,5; 118,6; 114,5; 113,8; 51,9; 44,8; 30,7$  a  $13,1$  ppm.

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz):  $\delta = 3,59$  (q, 4H,  $J = 7,0$  Hz,  $\text{CH}_2\text{-N}$ );  $3,13$  (t, 2H,  $J = 6,6$  Hz,  $\text{CH}_2$ );  $2,83$  (t, 2H,  $J = 6,5$  Hz,  $\text{CH}_2\text{-COOH}$ );  $1,28$  (t, 6H,  $J = 7,0$  Hz,  $\text{CH}_3$ ) ppm.

IR (ATR):  $\nu_{\text{max}} = 2979; 2936; 2225$  (CN);  $1735$  (COOH);  $1541; 1436; 1356; 1169$   $\text{cm}^{-1}$ .

#### 5.1.4. Příprava 5,6-dioxo-1,4,5,6-tetrahydropyrazin-2,3-dikarbonitrilu



0,185 mol (20 g) diaminomaleonitrilu

40 ml oxalylchloridu

1500 ml dioxanu

V trojhrdlé baňce s chladičem a dělicí nálevkou jsem smísila 500 ml bezvodého dioxanu s oxalylchloridem. Z diaminomaleonitrilu a 1000 ml dioxanu jsem vytvořila suspenzi, kterou jsem přikapávala z dělicí nálevky po dobu tří hodin. Postupně jsem zvyšovala teplotu reakční směsi na glycerinové lázni na 50°C. Po smísení reaktantů jsem směs míchala další tři hodiny při stejné teplotě. Poté jsem obsah baňky zahustila na vakuové odparce, vyloučený produkt zfiltrovala a na filtru promyla hexanem. Produkt jsem překrystalizovala z vody a vysušila.

Výtěžek: 23,4 g (tj. 78,0 % teoretického výtěžku)

Popis: nažloutlé drobné krystaly

Molekulová hmotnost: 162,0

### 5.1.5. Příprava 5,6-dichlorpyrazin-2,3-dikarbonitrilu



0,144 mol (23,4 g) 5,6-dioxo-1,4,5,6-tetrahydropyrazin-2,3-dikarbonitrilu

0,709 mol (51,5 ml) thionylchloridu

900 ml dioxanu

15 ml dimethylformamidu

300 ml toluenu

Rozetřený 5,6-dioxo-1,4,5,6-tetrahydropyrazin-2,3-dikarbonitril jsem rozmíchala v bezvodém dioxanu, přidala thionylchlorid a míchala jednu hodinu při 60°C pod zpětným chladičem opatřeným sušicí rourkou. K suspenzi jsem přidala dimethylformamid a nechala míchat další hodinu a půl. Vzniklý tmavý roztok jsem zbavila rozpouštědla na vakuové odparce a extrahovala třikrát 100 ml horkého toluenu. Ten jsem odpařila za sníženého tlaku. Produkt jsem třikrát překrystalizovala z chloroformu.

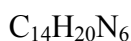
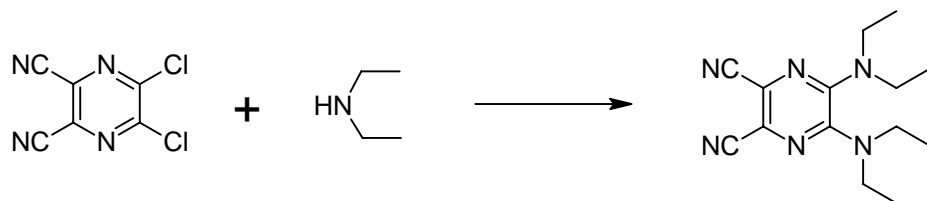
Výtěžek: 18,97 g (tj. 66 % teoretického výtěžku)

Popis: nažloutlé drobné krystaly

Molekulová hmotnost: 199,0

Teplota tání: 180,2 °C (dle literatury 179-180°C)<sup>53</sup>

### 5.1.6. Příprava 5,6-bis(diethylamino)pyrazin-2,3-dikarbonitrilu



0,010 mol (2,0 g) 5,6-dichloropyrazin-2,3-dikarbonitrilu

0,060 mol (4,4 g) diethylaminu

45 ml tetrahydrofuranu

5,6-dichloropyrazin-2,3-dikarbonitril jsem rozpustila v tetrahydrofuranu, přidala diethylamin a nechala zahřívát za stálého míchání na glycerinové lázni pod zpětným chladičem při teplotě 90°C po dobu 6 hodin. Po skončení reakční doby jsem reakční směs ochladila na 0°C a poté zfiltrovala za sníženého tlaku. Filtrát jsem odpařila do sucha na vakuové odparce. Získaný produkt jsem několikrát překrystalizovala z methanolu, matečný louh odpařila do sucha, nanesla na silikagel a chromatografovala na sloupci. Jako mobilní fázi jsem použila směs benzín : ethylester kyseliny octové v poměru 4 : 1.

Výtěžek: 2,49 g (tj. 91,5 % teoretického výtěžku)

Popis: světle žluté plátky

Molekulová hmotnost: 272,0

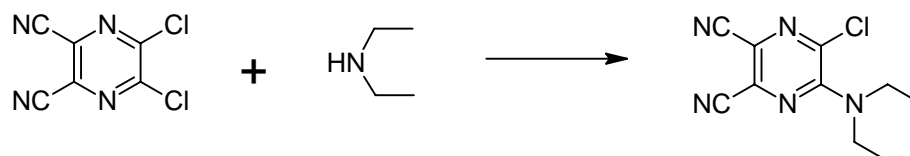
Teplota tání: 93,2 – 94,1 °C (dle literatury 94°C)<sup>54</sup>

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 146,1; 120,3; 115,0; 42,8 a 12,7 ppm.

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 3,48 (q; 8H; J = 7,1 Hz; CH<sub>2</sub>) a 1,07 (t; 12H; J = 7,1 Hz; CH<sub>3</sub>) ppm.

IR (KBr): ν<sub>max</sub> = 2978; 2935; 2876; 2228 (CN); 1518; 1489; 1347; 1253 cm<sup>-1</sup>.

### 5.1.7. Příprava 5-diethylamino-6-chlorpyrazin-2,3-dikarbonitrilu



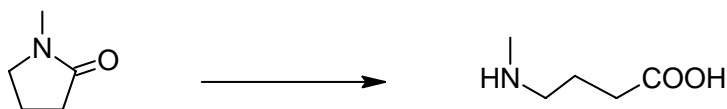
0,002 mol (0,400 g) 5,6-dichlorpyrazin-2,3-dikarbonitrilu

0,0042 mol (0,307 g) diethylaminu

15 ml tetrahydrofuranu

5,6-dichlorpyrazin-2,3-dikarbonitril jsem rozpustila v tetrahydrofuranu a ochladila směsí ledu a soli na teplotu  $-12^{\circ}\text{C}$ . Za stálého míchání jsem přidala po kapkách diethylamin rozpuštěný v malém množství tetrahydrofuranu. Dále jsem míchala půl hodiny a nechala tak směs ohřát na laboratorní teplotu. Reakční směs jsem přefiltrovala za sníženého tlaku a filtrát odpařila do sucha na vakuové odparce.

### 5.1.8. Příprava kyseliny 4-(methylamino)butanové



$C_5H_{11}O_2N$

10 ml 1-methylpyrrolidin-2-onu

22,8 g oktahydrátu hydroxidu barnatého

110 ml destilované vody

Do baňky s destilovanou vodou jsem přidala 1-methylpyrrolidin-2-on a hydroxid barnatý a zahřívala při teplotě 120 °C na glycerinové lázni pod zpětným chladičem čtyři a půl hodiny. Poté jsem směs ochladila na 0°C a přefiltrovala za sníženého tlaku. K filtrátu jsem přidala suchý led (pevný oxid uhličitý) a po skončení průběhu reakce opět přefiltrovala. Výsledný filtrát jsem odpařila do sucha na vakuové odparce. Získaný produkt jsem rozpustila v ethanolu, přefiltrovala za sníženého tlaku a opět odpařila do sucha na odparce.

Výtěžek: 6,71 g (tj. 55,7 % teoretického výtěžku)

Popis: bílé krystaly

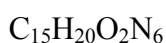
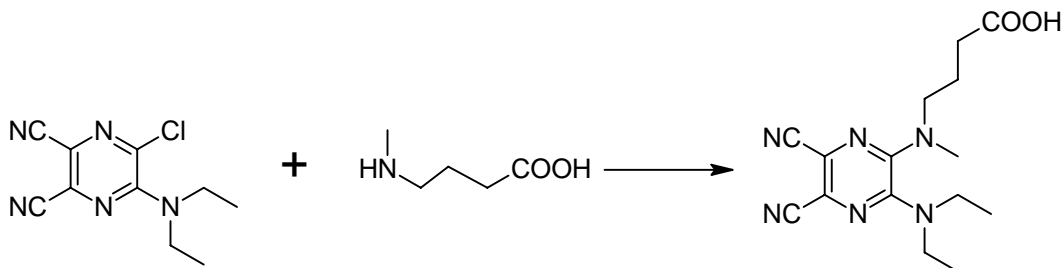
Molekulová hmotnost: 117,0

Teplota tání: 144,0 – 144,6 °C (dle literatury 146°C)<sup>55</sup>

$^{13}C$  NMR (75 MHz,  $D_2O$ ):  $\delta = 180,8; 48,3; 33,8; 32,1$  a 21,7 ppm.

$^1H$  NMR (300 MHz,  $D_2O$ ):  $\delta = 2,93$  (t, 2H,  $J = 7,9$  Hz,  $CH_2-N$ ); 2,61 (s, 3H,  $CH_3-N$ ); 2,18 (t, 2H,  $J = 7,3$  Hz,  $CH_2-COOH$ ); 1,80 (p, 2H,  $J = 7,5$  Hz,  $CH_2$ ) ppm.

### 5.1.9. Příprava kyseliny 4-[(5,6-dikyan-3-diethylaminopyrazin-2-yl)methylamino]butanové



0,0005 mol (0,118 g) 5-diethylamino-6-chloropyrazin-2,3-dikarbonitrilu

0,002 mol (0,234 g) kyseliny 4-(methylamino)butanové

0,004 mol (0,5 ml) triethylaminu

5 ml tetrahydrofuranu

5-diethylamino-6-chloropyrazin-2,3-dikarbonitril jsem rozpustila v tetrahydrofuranu, přidala roztok kyseliny 4-(methylamino)butanové a triethylaminu ve vodě a nechala míchat jednu hodinu při laboratorní teplotě. Po skončení průběhu reakce jsem odpařila maximum tetrahydrofuranu na vakuové odparce. Získaný produkt jsem extrahovala třikrát 20 ml chloroformu. Chloroformový podíl jsem několikrát vytřepala s 20 ml vody. Výsledný chloroformový podíl jsem vysušila síranem sodným, přefiltrovala za sníženého tlaku a odpařila do sucha na vakuové odparce. Získaný produkt jsem nanesla na silikagel a přečistila sloupcovou chromatografií. Jako mobilní fázi jsem použila směs benzín : ethylester kyseliny octové : kyselina octová v poměru 6 : 3 : 1. Stejnou mobilní fázi jsem využívala i ke kontrole průběhu reakce a výsledného produktu pomocí tenkovrstvé chromatografie na silikagelu při detekci UV světlem vlnové délky 254 nm a 366 nm.

Výtěžek: 52 mg (tj. 32,8 % teoretického výtěžku)



Popis: pomalu tuhnoucí žlutý olej

Molekulová hmotnost: 316,0

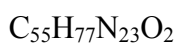
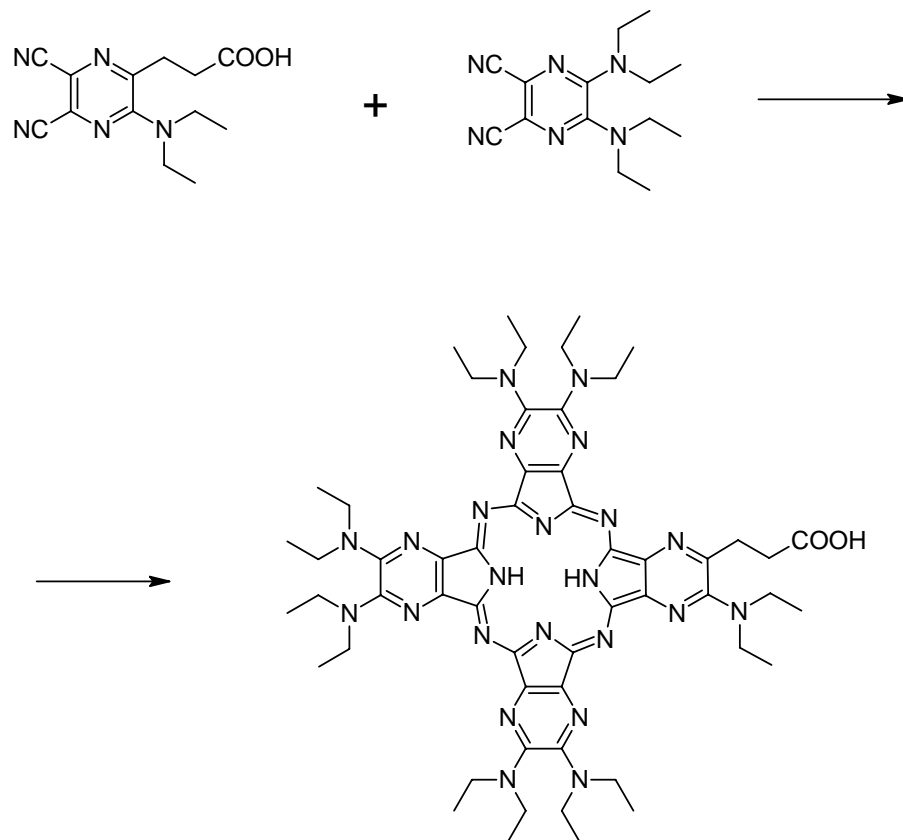
Teplota tání: 101,1 – 102,7 °C

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz, aceton- $\text{d}_6$ ):  $\delta = 173,9; 148,4; 146,9; 120,9; 120,5; 116,0; 115,9; 50,4; 43,5; 37,1; 31,3; 22,8$  a  $12,8$  ppm.

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz, aceton- $\text{d}_6$ ):  $\delta = 3,66\text{-}3,52$  (m, 6H,  $\text{CH}_2\text{-N}$ ); 3,07 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{-N}$ ); 2,23 (t, 2H,  $J = 7,2$  Hz,  $\text{CH}_2\text{-COOH}$ ); 1,82 (p, 2H,  $J = 7,2$  Hz,  $\text{CH}_2$ ); 1,09 (t, 6H,  $J = 7,1$  Hz,  $\text{CH}_3\text{-CH}_2$ ) ppm.

IR (KBr):  $\nu_{\text{max}} = 3385; 2976; 2897; 2225$  (CN); 1655 (COOH); 1529; 1456; 1383; 1091; 1050  $\text{cm}^{-1}$ .

### 5.1.10. Příprava 2-(3-karboxyethyl)-3,9,10,16,17,23,24-heptakis(diethylamino)-1,4,8,11,15,18,22,25-(oktaaza)ftalocyaninu (Q17-1H2)



0,0018 mol (0,480 g) kyseliny 3-(5,6-dikyan-3-diethylaminopyrazin-2-yl)propanové

0,0053 mol (1,44 g) 5,6-bis(diethylamino)pyrazin-2,3-dikarbonitrilu

0,0491 mol (0,344 g) lithia

10 ml butanolu

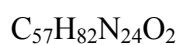
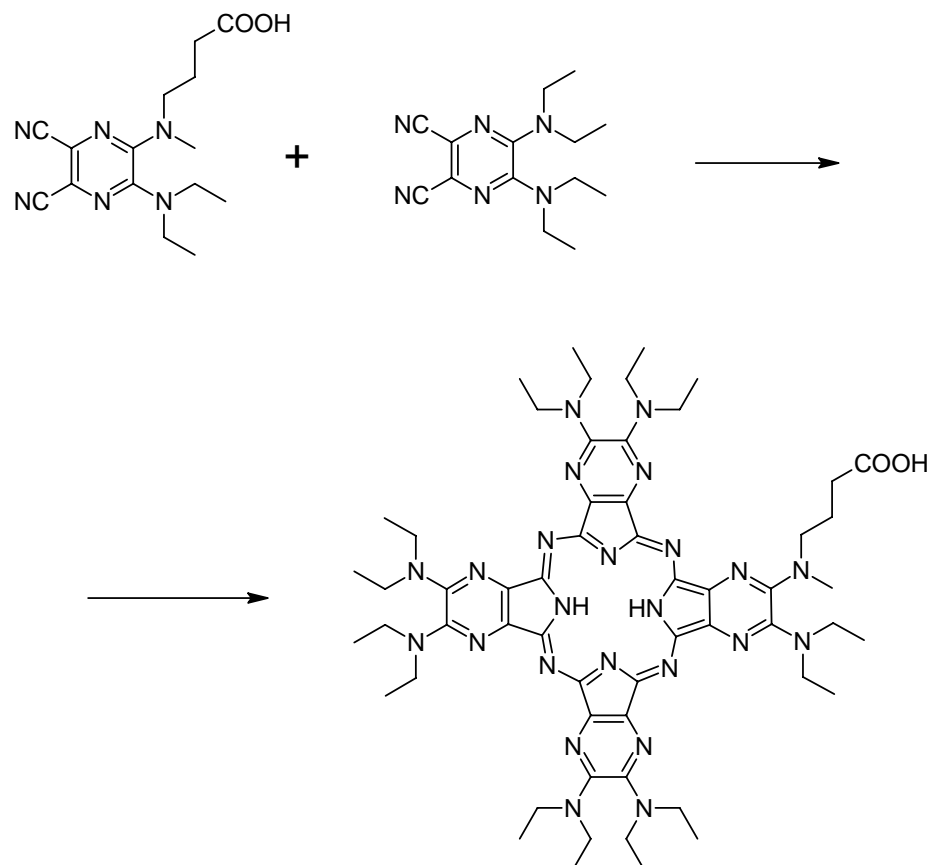
40 ml 50% kyseliny octové

Směs kyseliny 3-(5,6-dikyan-3-diethylaminopyrazin-2-yl)propanové a 5,6-bis(diethylamino)-pyrazin-2,3-dikarbonitrilu jsem rozpustila v čerstvě předestilovaném bezvodém butanolu, zahřála pod zpětným chladičem na teplotu 130 °C a následně

přidala lithium nakrájené na malé kousky. Směs jsem zahřívala za stálého míchání na glycerinové lázni tři hodiny. Po uplynutí reakční doby jsem rozpouštědlo odpařila na vakuové odparce, následně přidala 50% kyselinu octovou a nechala půl hodiny míchat. Získanou směs jsem zfiltrovala a filtr několikrát promyla vodou. Po vyschnutí jsem produkt odpařila do sucha na odparce, nanesla na silikagel a chromatografovala na sloupci s mobilní fází chloroform:methanol:aceton v poměru 20:1:1. Získanou látku jsem zředila dichlormethanem a znovu přečistila sloupcovou chromatografií.

Ani po opakované sloupcové chromatografii jsem nevyizolovala čistý produkt, který se při čištění pravděpodobně rozkládal.

**5.1.11. Příprava 2-[(4-karboxypropyl)methylamino]-3,9,10,16,17,23,24-heptakis(diethylamino)-1,4,8,11,15,18,22,25-(oktaaza)ftalocyaninu (Q18-1H2)**



0,001 mol (0,316 g) kyseliny 4-[(5,6-dikyan-3-diethylaminopyrazin-2-yl)methylamino]-butanové

0,003 mol (0,816 g) 5,6-bis(diethylamino)pyrazin-2,3-dikarbonitrilu

0,028 mol (0,196 g) lithia

7 ml butanolu

30 ml 50% kyseliny octové

Směs kyseliny 4-[(5,6-dikyan-3-diethylaminopyrazin-2-yl)methylamino]butanové a 5,6-bis(diethylamino)pyrazin-2,3-dikarbonitrilu jsem rozpustila v čerstvě predestilovaném bezvodém butanolu a roztok jsem zahřála na 130°C. Ke směsi jsem přidala lithium nakrájené na malé kousky a nechala za stálého míchání zahřívát na glycerinové lázni tři hodiny. Poté jsem rozpouštědlo odpařila na vakuové odparce. K získanému produktu jsem přidala 50% kyselinu octovou a nechala 30 minut míchat. Vzniklou suspenzi jsem zfiltrovala a filtrační papír promývala vodou, dokud netekl čirý filtrát. Získanou látku jsem na filtračním papíře nechala vyschnout, nanasla na silikagel a chromatografovala na sloupci. Jako mobilní fázi jsem použila směs dichlormethan : aceton : methanol v poměru 15 : 1 : 1. Jednotlivé frakce jsem kontrolovala pomocí tenkovrstvé chromatografie na silikagelu při detekci UV světlem za použití stejné mobilní fáze jako u sloupce. Vybrané frakce jsem přefiltrovala a odpařila do sucha na vakuové odparce. Výsledný produkt jsem rozpustila v minimálním množství dichlormethanu a nakapala do benzínu, abych se zbavila zbývajících nečistot. Tuto směs jsem přefiltrovala, filtrační papír promyla benzínem a nechala vyschnout.

Výtěžek: 0,190 g (tj. 16,7 % teoretického výtěžku)

Popis: pevná fialová látka

Molekulová hmotnost: 1135,45

Teplota tání: nad 200°C za rozkladu

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz, pyridin- $d_5$ ):  $\delta = 175,4; 151,7; 150,7; 141,3; 141,2; 141,0; 134,8; 124,1; 122,8; 50,6; 43,0; 42,8; 37,7; 32,5; 23,4; 13,1$  a  $13,0$  ppm.

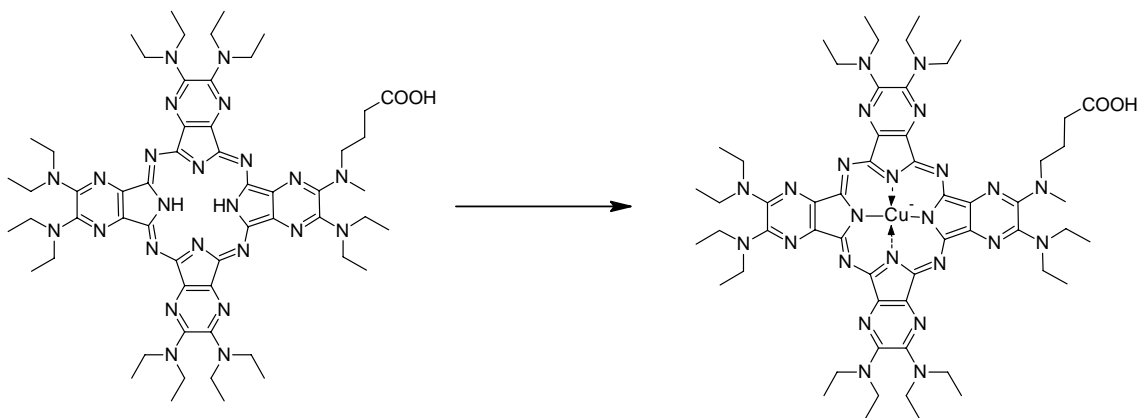
$^1\text{H}$  NMR (300 MHz, pyridin- $d_5$ ):  $\delta = 4,06$  (t, 2H,  $J = 7,1$  Hz,  $\text{CH}_2\text{-N}$ ); 4,01-3,83 (m, 28H,  $\text{CH}_2\text{-N}$ ); 3,39 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{-N}$ ); 2,66 (t, 2H,  $J = 7,2$  Hz,  $\text{CH}_2\text{-COOH}$ ); 2,32-2,18 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ); 1,28-1,14 (m, 42H,  $\text{CH}_3$ )

IR(ATR):  $\nu_{\text{max}} = 3303; 2970; 2933; 1726; 1640; 1422$   $\text{cm}^{-1}$ .

UV-vis (THF)  $\lambda_{\text{max}}$  ( $\epsilon$ ) 679,0 (83000), 649,0 (61600), 620,5sh, 593,5sh, 513,5 (56000), 367,0 (95600).

MS-MALDI-TOF:  $m/z = 1136$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ . Vypočtená mol. hmotnost 1135 ( $\text{C}_{57}\text{H}_{82}$   $\text{N}_{24}\text{O}_2$ ).

### 5.1.12. Příprava 2-[(4-karboxypropyl)methylamino]-3,9,10,16,17,23,24-heptakis(diethylamino)-1,4,8,11,15,18,22,25-(oktaaza)ftalocyaninato měďnatého komplexu (Q18-1Cu)



0,000088 mol (0,100 g) 2-[(4-karboxypropyl)methylamino]-3,9,10,16,17,23,24-heptakis(diethylamino)-1,4,8,11,15,18,22,25-(oktaaza)ftalocyaninu (Q18-1H2)

0,00176 mol (0,320 g) octanu měďnatého

15 ml dimethylformamidu

Q18-1H2 a bezvodý octan měďnatý jsem rozpustila v bezvodém dimethylformamidu a zahřívala za stálého míchání na glycerinové lázni pod zpětným chladičem čtyři hodiny při teplotě 170°C. Po uplynutí reakční doby jsem směs nechala zchladnout a zahustila na vakuové odparce. K získanému produktu jsem přidala destilovanou vodu a nechala vykristalizovat. Vzniklou suspenzi jsem přefiltrovala a filtrační papír několikrát promyla vodou. Filtrační papír s produktem jsem nechala vyschnout. Získanou látku jsem z filtru vymyla pomocí dichlormethanu a acetonu, odpařila na odparce a nanesla na silikagel a chromatografovala na sloupci. Jako mobilní fázi jsem použila směs dichlormethan : aceton : methanol v poměru 15 : 1 : 1. Vybrané frakce ze sloupcové chromatografie jsem přefiltrovala, odpařila do sucha, rozpustila

v minimálním množství dichlormethanu a nakapala do benzínu. Směs jsem opět přefiltrovala, filtrační papír promyla benzínem a nechala vyschnout.

Výtěžek: 0,055 g (tj. 52,2 % teoretického výtěžku)

Popis: pevná fialová látka

Molekulová hmotnost: 1196

Teplota tání: nad 200 °C za rozkladu

IR(ATR):  $\nu_{\max} = 2965; 2926; 2867; 1725; 1638; 1512; 1419 \text{ cm}^{-1}$ .

UV-vis (THF)  $\lambda_{\max} (\epsilon)$  699,5 (39900), 654,5 (121900), 596,5 (27200), 362,0 (89100).

MS-MALDI-TOF:  $m/z = 1197 \text{ [M+H]}^+$ . Vypočtená mol. hmotnost 1196 ( $\text{C}_{57}\text{H}_{80}\text{CuN}_{24}\text{O}_2$ ).

### 5.1.13. Měření stability v roztoku jódu

Nejprve jsem připravila základní roztoky AzaPcs - Q18-1H2 a Q18-1Cu v tetrahydrofuranu (THF) o koncentraci  $2 \times 10^{-5} \text{ mol} \times \text{dm}^{-3}$ . K těmto roztokům jsem přidala 0,04 M roztok jódu v THF/pyridinu/vodě v poměru 2 : 2 : 1, a to v poměru 1 : 1. Tím jsem získala roztoky AzaPcs o koncentraci  $1 \times 10^{-5} \text{ mol} \times \text{dm}^{-3}$ .

Tyto směsi jsem nechala míchat po dobu 24 hodin chráněny před světlem a v časech 0; 0,5; 1; 2; 5 a 24 hodin jsem odebírala vždy 2,5 ml roztoku a měřila UV-vis spektrum. Jako porovnávací roztok jsem použila 0,02 M roztok jódu v THF/pyridinu/vodě v poměru 2 : 2 : 1.

Naměřené hodnoty absorbance:

#### Q18-1H2

Čas [h]	0	0,5	1	2	5	24
Absorbance	0,348	0,330	0,295	0,225	0,239	0,332

#### Q18-1Cu

Čas [h]	0	0,5	1	2	5	24
Absorbance	0,597	0,645	0,642	0,643	0,600	0,791



## 6. Výsledky a diskuze

Jak bylo řečeno, azaftalocyaniny mají vysokou tendenci agregovat v roztoku za tvorby dimerů a oligomerů, což snižuje rozpustnost a znesnadňuje čištění a charakterizaci těchto látek. Zavedení objemných substituentů na periferii může agregaci inhibovat. Při syntéze AzaPcs jsem tedy takovéto objemné substituenty použila, konkrétně diethylaminové skupiny.

Dále bylo potřeba do molekuly AzaPcs zavést periferní substituent vhodný k navázání na oligonukleotidovou sondu, například alkoholickou nebo karboxylovou skupinu. Připravila jsem tedy prekurzory substituované karboxylovou skupinou, které jsem poté cyklila s prekurzory obsahujícími diethylaminové skupiny za definovaných podmínek metodou statistické kondenzace.

Při syntéze prvního prekurzoru jsem vycházela z kyseliny  $\alpha$ -ketoglutarové a diaminomaleonitrilu. Jejich reakcí jsem připravila kyselinu 3-(5,6-dikyan-3-oxo-3,4-dihydropyrazin-2-yl)propanovou, kterou jsem podrobila reakci s chloridem fosforilylu za vzniku kyseliny 3-(3-chlor-5,6-dikyanpyrazin-2-yl)propanové. Požadovaný prekurzor (kyselinu 3-(5,6-dikyan-3-diethylaminopyrazin-2-yl)propanovou) jsem získala ve velmi dobrém výtěžku reakcí této kyseliny s diethylaminem v prostředí tetrahydrofuranu (THF).

Při přípravě dalšího prekurzoru jsem vycházela z diaminomaleonitrilu a oxalylchloridu. Jejich reakcí jsem získala 5,6-dioxo-1,4,5,6-tetrahydropyrazin-2,3-dikarbonitril, který jsem podrobila reakci s thionylchloridem za vzniku 5,6-dichlorpyrazin-2,3-dikarbonitrilu. Syntéza této látky byla již dříve popsána v jiných pracích a probíhala s relativně dobrým výtěžkem. Z této látky jsem nukleofilní substitucí atomů chloru připravila další dva prekurzory, podle toho, zda tento krok probíhal do prvního či až do druhého stupně. Za mírnějších podmínek a ekvivalentních množství výchozích látek daných poměrem 1 : 2 docházelo k substituci do prvního stupně, v případě větších přebytků i do druhého stupně. Takto jsem tedy získala 5,6-bis(diethylamino)pyrazin-2,3-dikarbonitril a 5-diethylamino-6-chlorpyrazin-2,3-dikarbonitril.

Připravené prekurzory - 5,6-bis(diethylamino)pyrazin-2,3-di-karbonitril a kyselinu 3-(5,6-dikyan-3-diethylaminopyrazin-2-yl)propanovou jsem použila k cyklotetra-

merizační reakci v poměru 3 : 1. Získala jsem směs šesti AzaPcs. Bohužel ani po opakované sloupcové chromatografii jsem nevyizolovala požadovaný čistý produkt, pravděpodobně se totiž během čištění rozkládal. To vedlo k opuštění této cesty a k přípravě nového prekurzoru pro syntézu jiného AzaPc.

Tento nový prekurzor, kyselinu 4-[(5,6-dikyan-3-diethylaminopyrazin-2-yl)methylamino]butanovou, jsem připravila reakcí roztoku 5-diethylamino-6-chlorpyrazin-2,3-dikarbonitrilu v THF s roztokem kyseliny 4-(methylamino)butanové (získané hydrolyzou 1-methylpyrrolidin-2-onu) s triethylaminem jako bazí ve vodě. Přítomný triethylamin byl v reakci nezbytný pro vytěsnění sekundární aminoskupiny z kvarterní amoniové soli aminokyseliny a dále pak k vychytávání uvolňujícího se chlorovodíku, čímž posouval rovnováhu reakce ve prospěch požadovaného produktu. Bez triethylaminu by se kinetika reakce rapidně snížila.

Pro syntézu AzaPc jsem použila 5,6-bis(diethylamino)pyrazin-2,3-dikarbonitril a kyselinu 4-[(5,6-dikyan-3-diethylamino-pyrazin-2-yl)methylamino]butanovou v poměru 3 : 1. Cyklotetramerizační reakcí a následnou separací jsem získala čistý AzaPc Q18-1H<sub>2</sub> ve velmi dobrém výtěžku 16,7%. Tento AzaPc jsem charakterizovala teplotou tání, NMR, IČ, UV-vis a MS spektry. Dále jsem připravila reakcí tohoto bezkovového AzaPc s bezvodým octanem měďnatým jeho měďnatý komplex Q18-1Cu s výtěžkem 52,2%, který jsem také charakterizovala teplotou tání, IČ, UV-vis a MS spektry. NMR spektra byla změřena, ale jednotlivé signály byly špatně rozeznatelné.

Jedním z reagentů používaných při syntéze oligonukleotidu je 0,02 M roztok jódu ve směsi tetrahydrofuran/pyridin/voda 7 : 2 : 1, sloužící k oxidaci. Přítomnost sekundární aminoskupiny způsobuje nestabilitu makrocyklu AzaPc v oxidačním roztoku jódu. Dává se tedy přednost jiným substituentům. Nicméně, za typických podmínek standardní syntézy oligonukleotidové sondy obsahující 20 bazí je expozice AzaPc přibližně 15 minut.

Změřila jsem tedy stabilitu v 0,02 M roztoku jódu, a to u obou AzaPcs, bezkovového i jeho měďnatého komplexu. Po 0,5 hodině byla stabilita v jódu bezkovového AzaPc přibližně 95 % a jeho měďnatého komplexu přibližně 93 %. Vzhledem k tomu, že čas potřebný pro syntézu 24-méru, což je standardní délka duálně značené sondy, je zhruba 15 minut, lze považovat změřenou stabilitu pro syntézu oligonukleotidů za dostatečnou.

## 7. Závěr

V rámci mé diplomové práce jsem připravila tyto prekurzory AzaPc:

- kyselinu 3-(5,6-dikyan-3-oxo-3,4-dihydropyrazin-2-yl)propanovou
- kyselinu 3-(3-chlor-5,6-dikyanpyrazin-2-yl)propanovou
- kyselinu 3-(5,6-dikyan-3-diethylaminopyrazin-2-yl)propanovou
- 5,6-dioxo-1,4,5,6-tetrahydropyrazin-2,3-dikarbonitril
- 5,6-dichlorpyrazin-2,3-dikarbonitril
- 5,6-bis(diethylamino)pyrazin-2,3-dikarbonitril
- 5-diethylamino-6-chlorpyrazin-2,3-dikarbonitril
- kyselinu 4-[(5,6-dikyan-3-diethylaminopyrazin-2-yl)methylamino]butanovou

Všechny nově připravené látky jsem charakterizovala teplotou tání, NMR a IČ spektry.

Cyklizací prekurzorů se mi podařilo připravit tento asymetrický AzaPc:

- 2-[(4-karboxypropyl)methylamino]-3,9,10,16,17,23,24-*heptakis*-(diethylamino)-1,4,8,11,15,18,22,25-(oktaaza)ftalocyanin (Q18-1H<sub>2</sub>)

Vložením atomu mědi do středové dutiny jsem připravila tento kovový AzaPc:

- 2-[(4-karboxypropyl)methylamino]-3,9,10,16,17,23,24-*heptakis*-(diethylamino)-1,4,8,11,15,18,22,25-(oktaaza)ftalocyaninato měďnatý komplex (Q18-1Cu)

Oba tyto AzaPcs jsem charakterizovala teplotou tání, NMR, IČ, UV-vis a MS spektry.

## 8. Abstrakt

Tato diplomová práce se zabývá hledáním strukturně nových potenciálních nefluoreskujících zhášeců fluorescence, využitelných pro přípravu molekulárních sond. Tyto potenciální zhášecé jsou odvozeny od nesymetricky substituovaných alkylaminoderivátů tetrapyrazinoporfyrazinů – azaftalocyaninů. Součástí práce je také příprava prekurzorů - 5,6-disubstituovaných-2,3-dikarbonitrilů. Z nich byly připraveny známými metodikami reakcí finální sloučeniny, obsahující různé funkční skupiny. Produkty byly charakterizovány teplotou tání, NMR, IČ, UV-vis a MS spektry.

Celkem bylo připraveno 9 meziproductů, z toho 5 již dříve popsanych, a 3 finální tetrapyrazinoporfyraziny, a to dva bezkovové a jeden s centrálním atomem mědi. Podařilo se tedy připravit 6 dosud nepopsaných sloučenin. Syntéza jedné sloučeniny, konkrétně jednoho azaftalocyaninu, nebyla úspěšná.

## 9. Abstract

This diploma thesis deals with searching of structurally new non-fluorescent quenchers of fluorescence, which may be used for preparation of molecular probes. These potential quenchers are derived from asymmetrically substituted alkylaminoderivatives of tetrapyrazinoporphyrazines – azaphthalocyanines. As the component of this work 5,6-disubstituted-2,3-pyrazinedicarbonitriles were prepared as the precursors of final intended compounds. They were subsequently used as a starting material for the preparation of the final substances, bearing different functional moieties. The syntheses were performed by known reaction methodologies. Products were characterized by melting point, IR, UV-vis, NMR and MS spectra.

In total nine intermediates (five of them already previously described) and three final tetrapyrazinoporphyrazines (two metal-free and one with central atom of copper) were prepared. Together six compounds previously not yet described in available scientific literature were prepared. Synthesis of one substance, concretely of one azaphthalocyanine, was not successful.

## 10. Použitá literatura

- <sup>1</sup> Mark A. Behlke, Lingyan Huang, Lisa Bogh, Scott Rose, a Eric J. Devor, **Fluorescence and Fluorescence Applications**, ©2005 Integrated DNA Technologies, staž. 20.1.2009, dostupné na [http://eu.idtdna.com/Support/Technical/TechnicalBulletinPDF/Fluorescence\\_and\\_Fluorescence\\_Applications.pdf](http://eu.idtdna.com/Support/Technical/TechnicalBulletinPDF/Fluorescence_and_Fluorescence_Applications.pdf).
- <sup>2</sup> Zdeněk Fišar, **Fluorescenční spektroskopie v neurovědách**, posl. revize 3/2004, staž. 27.1.2009, dostupné na <http://www1.lfl.cuni.cz/~zfiisar/fluorescence/Default.htm>.
- <sup>3</sup> Mary Katherine Johansson a Ronald M. Cook: **Intramolecular Dimers: A New Design Strategy for Fluorescence-Quenched Probes**, Chem. Eur. J., 9, 3466 – 3471 (2003).
- <sup>4</sup> Mary Katherine Johansson, Henk Fidder, Daren Dick, a Ronald M. Cook, **Intramolecular Dimers: A New Strategy to Fluorescence Quenching in Dual-Labeled Oligonucleotide Probes**, J. Am. Chem. Soc., 124, 6950-6956 (2002).
- <sup>5</sup> T. Förster, **Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz**. Ann. Phys., 2, 55-75 (1948).
- <sup>6</sup> Paul R. Selvin, **The Renaissance of fluorescence resonance energy transfer**, nature structural biology, Vol. 7, No. 9, 730-734 (2000), dostupné na <http://structbio.nature.com>.
- <sup>7</sup> Yukio Okamura, Satoshi Kondo, Ichiro Sase, Takayuki Suga, Kazuyuki Mise, Iwao Furusawa, Shigeki Kawakami a Yuichiro Watanabe, **Double-labeled donor probe can enhance the signal of fluorescence resonance energy transfer (FRET) in detection of nucleic acid hybridization**, Nucleic Acids Research, Vol. 28, No. 24 e107, 1-6 (2000).
- <sup>8</sup> Salvatore A. E. Marras, Fred Russell Kramer a Sanjay Tyagi, **Efficiencies of fluorescence resonance energy transfer and contact-mediated quenching in oligonucleotide probes**, Nucleic Acids Research, Vol. 30, No. 21 e122, 1-8 (2002).
- <sup>9</sup> Matthew E. Sanborn, Brian K. Connolly, Kaushik Gurunathan a Marcia Levitus, **Fluorescence Properties and Photophysics of the Sulfoindocyanine Cy3 Linked Covalently to DNA**, J. Phys. Chem. B, 111, 11064 – 11074 (2007).
- <sup>10</sup> Jochen Wilhelm a Alfred Pingoud, **Real-Time Polymerase Chain Reaction**, ChemBioChem, 4, 1120 – 1128 (2003).
- <sup>11</sup> Duálně značené hydrolyzační sondy, staž. 28.1.2009, dostupné na [http://www.generi-biotech.com/firstpage\\_data/stalo\\_se\\_pdf/poster\\_GB\\_dualne\\_znacene\\_sondy.pdf](http://www.generi-biotech.com/firstpage_data/stalo_se_pdf/poster_GB_dualne_znacene_sondy.pdf).
- <sup>12</sup> Vladimir V. Didenko, **DNA Probes Using Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET): Designs and Applications**, Biotechniques, 31(5), 1106-1121 (2001).
- <sup>13</sup> Salvatore A. E. Marras, Sanjay Tyagi, Fred Russell Kramer, **Real-time assays with molecular beacons and other fluorescent nucleic acid hybridization probes**, Clinica Chimica Acta, 363, 48-60 (2006).
- <sup>14</sup> L. E. Morrison, T.C. Halder a L. M. Stols, **Solution-phase detection of polynucleotides using interacting fluorescent labels and competitive hybridization**, Anal. Biochem., 183, 231-244 (1989).
- <sup>15</sup> S. Tyagi, F. R. Kramer, **Molecular beacons: Probes that fluoresce upon hybridization**, Nat. biotechnol., 14, 303-308 (1996).
- <sup>16</sup> S. Tyagi, D. P. Bratu a F. R. Kramer, **Multicolor molecular beacons for allele discrimination**, Nat. biotechnol., 16, 49-53 (1998).

- 
- <sup>17</sup> Loling Song, E. J. Hennink, I. Ted Young a Hans J. Tanke, **Photobleaching Kinetics of Fluorescein in Quantitative Fluorescence Microscopy**, *Biophys. J.*, *68*, 2588-2600 (1995).
- <sup>18</sup> Hjalmar Brismar, Oliver Trepte a Brun Ulfhake, **Spectra and Fluorescence Lifetimes of Lissamine Rhodamine, Tetramethylrhodamine Isothiocyanate, Texas Red, and Cyanine 3.18 Fluorophores: Influences of Some Environmental Factors Recorded with a Confocal Laser Scanning Microscope**, *J. Histochem. Cytochem.*, *43*, 699-707 (1995).
- <sup>19</sup> Gilles Ulrich, Raymond Ziessel, and Anthony Harriman, **The Chemistry of Fluorescent Bodipy Dyes: Versatility Unsurpassed**, *Angew. Chem. Int. Ed.*, *47*, 1184-1201 (2008).
- <sup>20</sup> Jan Karolin, Lennart B.-A. Johansson, Leif Strandberg a Tor Ny, **Fluorescence and Absorption Spectroscopic Properties of Dipyrometheneboron Difluoride (BODIPY) Derivatives in Liquids, Lipid Membranes, and Proteins**, *J. Am. Chem. Soc.*, *116*, 7801-7806 (1994).
- <sup>21</sup> Richard P. Haugland, **Handbook of Fluorescent Probes and Research Products**, *Molecular Probes*, Eugene, OR, 9<sup>th</sup> edition, 2002.
- <sup>22</sup> Judith E. Berlier, Anca Rothe, Gayle Buller, Jolene Bradford, Diane R. Gray, Brian J. Filanoski, William G. Telford, Stephen Yue, Jixiang Liu, Ching-Ying Cheung, Wesley Chang, James D. Hirsch, Joseph M. Beechem, Rosaria P. Haugland a Richard P. Haugland, **Quantitative Comparison of Long-wavelength Alexa Fluor Dyes to Cy Dyes: Fluorescence of the Dyes and Their Bioconjugates**, *J. Histochem. Cytochem.*, *51*, 1699-1712 (2003).
- <sup>23</sup> Nataliya Panchuk-Voloshina, Rosaria P. Haugland, Janell Bishop-Steward, Mahesh K. Bhalgat, Paul J. Millard, Fei Mao, Wai-Yee Leung a Richard P. Haugland, **Alexa Dyes, a Series of New Fluorescent Dyes that Yield Exceptionally Bright, Photostable Conjugates**, *J. Histochem. Cytochem.*, *47*, 1179-1188 (1999).
- <sup>24</sup> Lauren A. Ernst, Ravinder K. Gupta, Ratnakar B. Mujumdar a Alan S. Waggoner, **Cyanine Dye Labeling Reagents for Sulfhydryl Groups**, *Cytometry*, *10*, 3-10 (1989).
- <sup>25</sup> Ratnakar B. Mujumdar, Lauren A. Ernst, Swati R. Mujumdar, Christopher J. Lewis a Alan S. Waggoner, **Cyanine Dye Labeling Reagents: Sulfoindocyanine Succinimidyl Esters**, *Bioconjugate Chem.*, *Vol. 4*, No. 2, 105-111 (1993).
- <sup>26</sup> Encyklopedie Wikipedia [online] (2009), poslední revize 27.12.2008, staž. 20.3.2009, dostupné na <http://en.wikipedia.org/wiki/Cyanine>.
- <sup>27</sup> Swati R. Mujumdar, Ratnakar B. Mujumdar, Charsetta M. Grant a Alan S. Waggoner, **Cyanine-Labeling Reagents: Sulfoindocyanine Succinimidyl Esters**, *Bioconjugate Chem.*, *7*, 356-362 (1996).
- <sup>28</sup> ATTO-TEC, Fluorescent Labels and Dyes, katalog 2007/2008, staž. 21.3.2009, dostupné na <http://www.atto-tec.com/ATTO-TEC.com/Products/documents/catalogue.pdf>.
- <sup>29</sup> Berry&Associates [online], Chemistry from Berry&Associates, *Vol. 1*, zima 2006, BlackBerry™ Quencher 650 – A new dark quencher of fluorescence, staž. 21.3.2009, dostupné na <http://www.berryassoc.com/literature/BerryNews1-1.pdf>.
- <sup>30</sup> Integrated DNA Technologies, Inc [online], © Copyright 2009, staž. 21.3.2009, dostupné na <http://eu.idtdna.com/Catalog/DNaProbes/Page1.aspx>.
- <sup>31</sup> Biosearch Technologies [online], DNA Synthesis Reagents Catalog, An Introduction to Black Hole Quencher Dyes, staž. 21.3.2009, dostupné na [http://www.biosearchtech.com/download/catalogs/btcatalog\\_dna\\_syn\\_reagents.pdf](http://www.biosearchtech.com/download/catalogs/btcatalog_dna_syn_reagents.pdf).
- <sup>32</sup> TriLink BioTechnologies (online), Quenchers, staž. 21.3.2009, dostupné na [http://www.trilinkbiotech.com/tech/tech\\_articles/quenchers.pdf](http://www.trilinkbiotech.com/tech/tech_articles/quenchers.pdf).

- 
- <sup>33</sup> Integrated DNA Technologies, Inc [online] © Copyright 2009, staž. 21.3.2009, dostupné na <http://eu.idtdna.com/catalog/Modifications/Modifications.aspx?catid=5>.
- <sup>34</sup> Integrated DNA Technologies, Inc [online] © Copyright 2009, staž. 21.3.2009, dostupné na <http://eu.idtdna.com/catalog/Modifications/Modifications.aspx?catid=4>.
- <sup>35</sup> invitrogen (online), A New Generation of FRET Acceptors, staž. 21.3.2009, dostupné na <http://www.invitrogen.com/etc/medialib/en/filelibrary/pdf/bioprobess/bioprobess44.Par.73886.File.dat/6.pdf>.
- <sup>36</sup> Jonathan P. May, Lynda J. Brown, Ian van Delft, Nicola Thelwell, Kate Harley a Tom Brown, **Synthesis and evaluation of a new non-fluorescent quencher in fluorogenic oligonucleotide probes for real-time PCR**, *Org. Biomol. Chem.*, 3, 2534-2542 (2005).
- <sup>37</sup> ATTO Technologies, ATTO 540Q, posl. revize 14.3.2007, staž. 21.3.2009, dostupné na [http://www.atto-tec.com/ATTO-TEC.com/Products/ATTO540Q\\_1.html](http://www.atto-tec.com/ATTO-TEC.com/Products/ATTO540Q_1.html).
- <sup>38</sup> ATTO Technologies, ATTO 580Q, posl. revize 10.3.2008, staž. 21.3.2009, dostupné na [http://www.atto-tec.com/ATTO-TEC.com/Products/ATTO580Q\\_1.html](http://www.atto-tec.com/ATTO-TEC.com/Products/ATTO580Q_1.html).
- <sup>39</sup> ATTO Technologies, ATTO 612Q, posl. revize 14.3.2007, staž. 21.3.2009, dostupné na [http://www.atto-tec.com/ATTO-TEC.com/Products/ATTO612Q\\_1.html](http://www.atto-tec.com/ATTO-TEC.com/Products/ATTO612Q_1.html).
- <sup>40</sup> V. E. Maizlish, V. P. Kulinich a G. P. Shaposhnikov, **Unsymmetrical Azaporphyrins. Synthesis, Structure, and Properties**, *Russian Journal of General Chemistry*, Vol. 74, No. 11, 1801-1803 (2004).
- <sup>41</sup> M. Miletín, P. Zimčík, K. Kopecký, Z. Musil, V. Nováková, R. Haluza, M. Bunčák, **Nefluoreskující deriváty ftalocyaninů a azaftalocyaninů jako zhasiče fluorescence**, Příhlaška vynálezu PV 2008-415, (2. 7. 2008).
- <sup>42</sup> Wesley M. Sharman a Johan E. van Lier, **Synthesis and Photodynamic Activity of Novel Asymmetrically Substituted Fluorinated Phthalocyanines**, *Bioconjugate Chem.*, 16, 1166-1175 (2005).
- <sup>43</sup> Petr Zimčík, Miroslav Miletin, Jan Ponec, Miroslav Kostka, Zdenek Fiedler, **Synthesis and studies on photodynamic activity of new water-soluble azaphthalocyanines**, *J. Photochem. Photobiol. A Chem.*, 155, 127-131 (2003).
- <sup>44</sup> Svetlana V. Kudrevich, Johan E. van Lier, **Azaanalogs of phthalocyanine: syntheses and properties**, *Coordination Chemistry Reviews*, 156, 163-182 (1996).
- <sup>45</sup> R. P. Linstead, E. G. Noble a J. M. Wright, *J. Chem. Soc.*, 911 (1937).
- <sup>46</sup> Gema de la Torre, Christian G. Claessens a Tomás Torres, **Phthalocyanines: The Need for Selective Synthetic Approaches**, *Eur. J. Org. Chem.*, 2821-2830 (2000).
- <sup>47</sup> Joseph G. Young a William Onyebuagu, **Synthesis and Characterization of Di-disubstituted Phthalocyanines**, *J. Org. Chem.*, 55, 2155-2159 (1990).
- <sup>48</sup> Barbara Cosimelli, Gabrio Roncucci, Donata Dei, Lia Fantetti, Fiammetta Ferroni, Micaela Ricci a Domenico Spinelli, **Synthesis and antimycotic activity of new unsymmetrical substituted zinc phthalocyanines**, *Tetrahedron*, 59, 10025-10030 (2003).
- <sup>49</sup> A. Weitemeyer, H. Kliesch, D. Wöhrle, *J. Org. Chem.*, 60, 4900 – 4904 (1996)
- <sup>50</sup> Ángela Sastre, Belén del Rey a Tomás Torres, **Synthesis of Novel Unsymmetrically Substituted Push-Pull Phthalocyanines**, *J. Org. Chem.*, 61, 8591-8597 (1996).



- 
- <sup>51</sup> K. J. M. Nolan, M. Hu, C. C. Leznoff, *Synlett*, 593-594 (1997).
- <sup>52</sup> N. Kobayashi, *Chem. Commun.*, 487-488 (1998).
- <sup>53</sup> E. H. Mørkved, L.T. Holmaas, H. Kjösen, G. Hvistendahl, *Acta Chemica Scandinavica*, 50, 1153-1156 (1996).
- <sup>54</sup> Foks H., Manowska W., Sienicka J.: **Synthesis and tuberculostatic activity of some derivatives of pyrazine 2 carboxylic acid**, *Acta Pol. Pharm.*, 33, (6), 687 – 693 (1976).
- <sup>55</sup> W. Reppe, *Liebigs Ann. Chem.*, 596, 158 (1955).