

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

**Syntéza výchozích látek pro organické
chromofory s multi fotonovou absorpcí pro
fluorescenční mikroskopii**

Tomáš Hansl

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE
2017

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Tomáš Hansl**
Osobní číslo: **C14070**
Studijní program: **B2830 Farmakochemie a medicínální materiály**
Studijní obor: **Farmakochemie a medicínální materiály**
Název tématu: **Syntéza výchozích látek pro organické chromofory s multi fotonovou absorpcí pro fluorescenční mikroskopii.**
Zadávací katedra: **Ústav organické chemie a technologie**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

Teoretická část:

Na základě studia současné odborné literatury a laboratorních experimentů vypracujte bakalářskou práci s respektováním níže uvedených bodů:

1. Barevnost organických molekul, jedno a dvou fotonová absorpce - vysvětlení základních pojmů a základních sledovaných parametrů u používaných materiálů. Význam a využití popisovaných vlastností. Porovnání jedno a dvoufotonové absorpce.
2. Využití organických molekul s dvoufotonovou absorpcí v oblasti biovizualizace.
3. Dělení organických molekul s dvoufotonovou absorpcí dle současné literatury (struktury a potenciální aplikace).
4. Syntéza a metodika přípravy zvolených organických chromoforů s dvoufotonovou absorpcí.

Experimentální část:

1. Navrhnout syntetický přístup pro výchozí látky vedoucí k navrženým cílovým chromoforům s dvoufotonovou absorpcí.
2. Dle syntetického návrhu připravit a izolovat intermediáty v dostatečném množství a čistotě, případně navrhnout alternativní experimentální přístup a tento přístup též laboratorně ověřit.
3. Připravené meziproducty charakterizovat dostupnými metodami z hlediska struktury a čistoty.
4. Výsledky zpracujte formou závěrečné zprávy.

Rozsah grafických prací:

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Všechna dostupná chemická literatura.

Vedoucí bakalářské práce:

doc. Ing. Aleš Imramovský, Ph.D.

Ústav organické chemie a technologie

Datum zadání bakalářské práce: **28. února 2017**

Termín odevzdání bakalářské práce: **3. července 2017**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

L.S.



prof. Ing. Miloš Sedlák, DrSc.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2017

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracoval samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využil, jsou uvedeny v seznamu použité literatury. Byl jsem seznámen s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne

Tomáš Hansl

Tímto bych chtěl poděkovat vedoucímu mé bakalářské práce panu doc. Ing. Alešovi Imramovskému, Ph.D. za odborné konzultace, poskytnuté materiály, trpělivost a pomoc při vedení mé bakalářské práce. Dále bych rád poděkoval Ing. Karlovi Paukovi, Ph.D. za schovívavost a dobré vedení v průběhu laboratoří. Také děkuji rodině a blízkým přátelům za podporu během doby mého studia.

Tomáš Hansl

Anotace:

Bakalářská práce popisuje dvoufotonovou absorpci organických látek a jejich využití v dvoufotonové mikroskopii. V teoretické části je uvedena základní charakteristika světla a jednotlivé typy luminiscence se zaměřením na fluorescenci. Dále je popsán děj dvoufotonové absorpce, metody určení dvoufotonových průřezů a základní dělení látek s vysokými TPA průřezy dle dostupné literatury. V závěru teoretické části je pozornost věnována metodice přípravy vybraných molekul, kterými jsou tetrafenylethylen, distyrylbenzen a spirobifluoren. Praktická část je zaměřena na syntézu prekurzorů pro organické chromofory s dvoufotonovou absorpcí a ověření jejich syntéz.

Klíčová slova:

Dvoufotonová absorpce, fluorescence, fluorofor, dvoufotonový absorpční průřez

ANNOTATION:

Bachelor thesis describes two-photon absorption of organic substances and their use in two-photon microscopy. In the theoretical part the basic characteristics of light and individual types of luminescence with focus on fluorescence are presented. In addition, two photon absorption, methods of determination of two photon cross-sections and basic division of substances with high TPA cross-sections are described, according to available literature. At the end of the theoretical part, attention is paid to the methodology of preparation of selected molecules, which are tetraphenylethylene, distyrylbenzene and spirobifluoren. The practical part is focused on synthesis of precursors for organic chromophores with two-photon absorption and verification of their synthesis.

Keywords:

Two-photon absorption, fluorescence, fluorophore, two-photon cross-section,

Obsah

ÚVOD	12
Teoretická část	13
1. Světlo a jeho charakteristika	13
1.1 Části elektromagnetického spektra	14
2. Barevnost látek	15
3. Jablonského diagram	16
3.1 Nezářivé přechody	17
3.2 Zářivé přechody	17
4. Luminiscence	19
4.1 FLUORESCENCE	19
4.1.1 Specifikace fluorescenčního spektra	20
4.2 Fosforescence	21
5. Dvoufotonová absorpce	23
6. Metody měření TPA průřezu a spekter	25
6.1 metoda z-Scan	25
6.2 Metoda měření dvoufotonové fluorescence (TPEF)	27
6.3 Omezení při měření TPA průřezů	27
7. Látky s vysokými TPA průřezí	28
7.1 Dipolární molekuly	29
7.2 Kvadrupolární molekuly	29
7.3 Oktupolární molekuly	33
7.4 Další významné molekuly	34
8. Využití dvoufotonové absorpce	35
9. Fluorescenční mikroskopie	36
9.1 Stavba fluorescenčního mikroskopu	36

9.2 Využití fluorescenční mikroskopie v biozobrazování	37
10. Metodika syntézy zvolených organických chromoforů s dvoufotonovou absorpcí	38
10.1 distyrylbenzen	38
10.2 Tetrafenylethylen	39
10.3 Spirobifluoren	40
Experimentální část.....	42
Syntéza 1,1':4',1"-terphenyl-2',5'-dicarbaldehydu (2).....	43
Syntéza 5'-(1,3-dioxolan-2-yl)-1,1':4',1"- terphenyl-2' carbaldehydu (3).....	45
Redukce 5'-(1,3-dioxolan-2-yl)-1,1':4',1"- terphenyl-2'-carbaldehydu (2)	47
Syntéza 5'-(hydroxymethyl)-1,1':4',1"-terphenyl-2'-karbaldehydu (4).....	48
Syntéza (5'-ethenyl-1,1':4',1"-terphenyl-2'-yl) methanolu (5)	50
Syntéza dimethyl [4-(diphenylamino)benzyl]phosfonatu (7)	52
11. Diskuze výsledků.....	55
12. Závěr	56
13. Zdroje.....	57

Seznam obrázků:

1. Spektrum elektromagnetických vln
2. Jablonského diagram
3. Grafické znázornění Stokesova posunu
4. Energetický diagram znázorňující proces OPA a TPA
5. Schématické znázornění Z-scenu
6. Struktury dipolárních molekul
7. Molekula stilbenu
8. Molekula fluorenu
9. Základní struktura DPP
10. Nejčastěji atakované polohy X,Y u DPP
11. Struktura DPP1 a DPP2
12. Struktura DPP7
13. Struktura oktupolární molekuly s nejvyšší hodnotou TPA
14. Názorné schéma stavby fluorescenčního mikroskopu
15. Distyrylbenzen
16. Tetrafenylethylen
17. Spirobifluoren

Seznam schémat:

- 1.** Syntéza distyrylbenzenu
- 2.** Wittigova syntéza distyrylbenzenu
- 3.** McMurryho syntéza tetrafenylethylenu
- 4.** syntéza tetrafenylethylenu
- 5.** syntéza substituovaného tetrafenylethylenu
- 6.** Syntéza spirobifluorenu z fluoren-9-onu
- 7.** Syntéza spirobifluorenu z dibenzothiofen sulfonu

ÚVOD

Jako první, kdo předpověděl dvoufotonovou absorpci (TPA) byla Marie Goepert-Mayer v roce 1931. Její předpoklad o existenci absorpce dvoufotonů v jeden okamžik byl potvrzen díky vývoji laseru, který je nejvhodnějším zdrojem excitačního záření. Již od objevení byla pozornost věnována především aplikaci v medicíně a mikroskopii díky vysokému prostorovému rozlišení a hlubšímu průniku záření do pozorovaného objektu než u klasických mikroskopů. Díky těmto vlastnostem se stala dvoufotonová absorpce tématem mnoha vědců, což vedlo k objevení mnoha látek, které vykazují dvoufotonovou absorpci a prohloubila možnosti využití tohoto jevu.

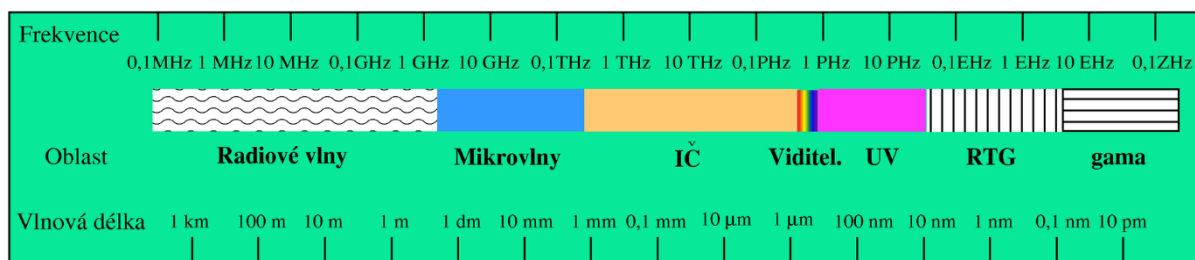
Cílem práce je vysvětlit dvoufotonovou absorpci a způsoby měření TPA spekter. Na základě dostupné literatury rozdělit organické molekuly s dvoufotonovou absorpcí a formou literární rešerše nastínit metodiku syntézy vybraných látek s dvoufotonovou absorpcí.

Teoretická část

1. Světlo a jeho charakteristika

Světlo je viditelná část elektromagnetického záření o určité vlnové délce, tento fakt byl významným přínosem pro fyziku v 19. století. Tento poznatek vycházel z teorie elektromagnetického pole, kterou vytvořil anglický fyzik JAMES CLERK MAXWELL (1831–1879). Díky zkoumání elektromagnetického pole bylo sestaveno spektrum elektromagnetických vln. Z Maxwellovi teorie elektromagnetického pole vyplývá, že kolem částic s nábojem, které se pohybují se zrychlením, existuje proměnné elektrické pole vyvolávající zároveň proměnné pole magnetické.¹

Pro popis a vysvětlení co je světlo se se používá vlnový charakter, který říká, že se světlo šíří ve formě vln. Fyzik James Clerk Maxwell to popsal jako oscilaci elektrické a magnetické složky na sebe kolmé. Všechny druhy elektromagnetického záření (radiové vlny, infračervené záření, světlo, gama paprsky aj.) se pohybují ve formě vln a ve vakuu rychlostí světla. Viditelné záření má vlnovou délku 400–750 nm. Vlnová délka je dána frekvencí.²



Obr.1: Spektrum elektromagnetických vln (obrázek převzat a upraven z: https://cs.wikipedia.org/wiki/Elektromagnetick%C3%A9_spektrum)

Pro celkové pochopení a popis absorpce světla nebo jeho emise však teorie o vlnovém charakteru nepostačuje. Proto na začátku 20. století Max Planck popsal částicový charakter, kde konstatoval, že světlo existuje jako určité množství energie, tzv. světelné kvantum. Světelné kvantum popisuje určitou velikost energetické hladiny ve, kterých může částice existovat. Tuto částici nazýváme foton. Velikost energie fotonu je součinem Planckovi konstanty ($6,6 \cdot 10^{-34} \text{J}\cdot\text{s}$) a frekvenc záření (s^{-1}). Foton je stabilní částicí, má nulovou klidovou hmotnost a nulový elektrický náboj. Jelikož se elektromagnetické záření pohybuje rychlostí světla, musí se i foton pohybovat rychlostí světla. Proto energie záření je přímo úměrná frekvenci. Energii, kterou foton nese, lze absorbovat nebo emitovat s interakcemi s jinými částicemi. Tuto teorii se dále zabývá kvantová fyzika.^{3,4}

1.1 Části elektromagnetického spektra

Jak je již z obrázku č. 1 patrné podle vlnového spektra dělíme celé spektrum na jednotlivé typy záření a to podle jeho vlnové délky. Typ s nejdelší vlnovou délkou se nazývá radiové vlny. Radiové vlny mají rozmanitou vlnovou délku, a dělí se proto do pásem na dlouhé, střední, krátké a velmi krátké vlny. Vlny, které mají vlnovou délku od 1 mm do 1 m se nazývají mikrovlnné a následuje infračervené záření. Pro účel této práce je nejdůležitější viditelné světlo a ultrafialové záření.⁴

- Viditelné spektrum

Viditelné světlo je elektromagnetické záření o vlnové délce od 380 nm do 780 nm. Ke každé vlnové délce světla odpovídá jeho zbarvení. Látka může světlo buď emitovat (vyzařovat) nebo absorbovat (pohlcovat). Pokud látka záření nějaké vlnové délky absorbuje, vnímáme to záření, které nebylo látkou absorbováno. Pokud látka absorbuje veškeré dopadající záření, vnímáme jí jako černou, jestliže veškeré VIS světlo propouští, je vnímána jako bezbarvá (denní světlo). Okem vnímaná barva je závislá na vlnové délce záření (λ). Vlnová délka (λ) je rovna podílu rychlosti (v) šíření světla daným prostředím ku frekvenci (f). Světlo se tedy všeobecně šíří různou rychlostí (v) podle typu prostředí. Nejrychleji se světlo šíří ve vakuu (v tomto případě již do vzorce místo v píšeme c , které je rovno 299 792 458 m/s. V ostatních prostředích je rychlost vždy menší než ve vakuu.⁴

- Ultrafialové záření

Ultrafialové záření (UV) je elektromagnetické záření o vlnové délce kratší, než má viditelné světlo, ale zároveň delší, než má mikrovlnné záření. Hlavním zdrojem UV záření je slunce, které vyzařuje velké množství UV záření. Na zemský povrch toto záření ovšem nedopadá, jelikož je zachyceno ve stratosféře díky ozonu. UV záření můžeme dělit na jednotlivé složky podle jejich vlnové délky:

- UVA má rozsah vlnových délek od 315 do 400 nm, tudíž má nejnižší energii
- UVB má vlnové délky v rozsahu 280–315 nm
- UVC – zahrnuje vlnové délky kratší než 280 nm s největší energií z uvedených typů UV záření⁴

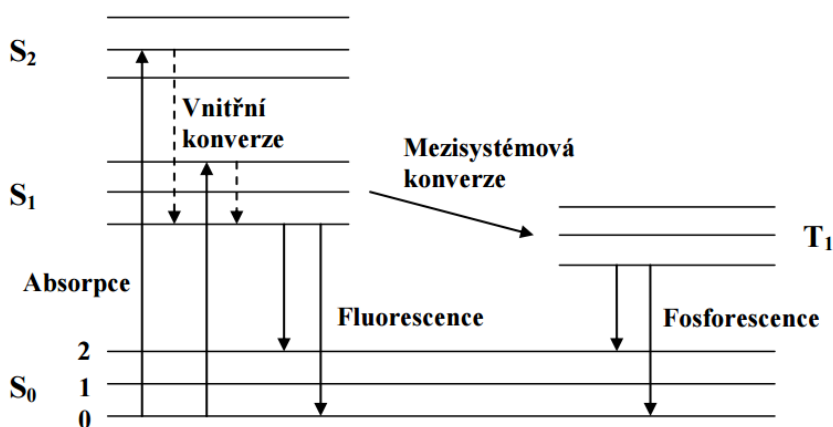
Za UV záření je dále řazeno gama záření s vlnovou délkou kratší než 124 pm. A poslední typ záření je takzvané gama záření s vlnovou délkou v rozmezí 10nm-1pm.⁴

2. Barevnost látek

Barviva jsou organické sloučeniny, které vykazují schopnost absorbovat a přetvářet světelnou energii (energii elektromagnetického záření) do viditelné, blízké infračervené a blízké ultrafialové oblasti spektra (380 nm do 780 nm). Nejčastěji je s barevností spojován pojem chromofor. Chromofor je barvotvorná skupina atomů v molekule nejčastěji se jedná o nenasycené skupiny atomů, které zvyšují konjugaci systému a tím posunují absorpci světla k delším vlnovým délkám. Tím, že látky absorbují část světelných paprsků určité vlnové délky ve viditelném spektru, stávají se barevnými. Pokud tedy látka selektivně absorbuje záření o vlnové délce například 565-590 nm, které na zrakové ústrojí vyvolává vjem žluté barvy (viz obrázek č.2), je působením zbývajících záření viditelného části spektra vyvolán vjem doplňkové modré barvy. Doplňková barva je tedy barva, která se vytvoří smíšením nepohlčeného záření. Příčinou zbarvení předmětu je selektivní absorpce záření o daných vlnových délkách z celkového světelného toku ve viditelné oblasti elektromagnetického záření.⁵

3. Jablonského diagram

Pro lepší pochopení procesů, které probíhají od absorpce světla až po jeho emisi, slouží tzv. Jablonského diagram, který dostal jméno podle profesora Alexandra Jablonského. Do těchto procesů spadá: absorpce fotonů, vnitřní konverze, fluorescence, mezisystémový přechod, fosforescence a zpožděná fluorescence.⁵



Obr.2: Jablonského diagram (obrázek převzat z: <http://canov.jergym.cz/barva/a/f.html>)

Jablonského diagram se skládá z jednotlivých singletních stavů. Jak je již patrné z obrázku číslo 2 tyto stavy jsou znázorněny pomocí symbolů S₀, S₁, S₂. V každém z těchto elektronových energetických hladin může dále fluorofor, existovat v jednotlivých vibračních hladinách označených čísly 0,1,2. V tomto schématu jsou znázorněny pouze základní interakce. Po absorpci záření následuje několik procesů. Fluorofor je obvykle excitován do některé z vyšších vibračních hladin stavu S₁ nebo S₂. Až na drobné výjimky molekuly v kondenzované fázi velmi rychle relaxují na nejnižší vibrační hladinu stavu S₁. Tento přechod je nazýván vnitřní konverzí a nastává během 10⁻¹² s. Jelikož doba dohasínání fluorescence trvá řádově 10⁻⁸ s, vnitřní konverze, která proběhne asi 10000x rychleji, je obecně dokončena ještě před emisí. Z tohoto důvodu nastává fluorescence nejčastěji z nejnižší energetické vibrační hladiny stavu S₁. Návrat do základního stavu obvykle nastává na některou z vyšších vibračních hladin základního stavu S₀, který během 10⁻¹² s přechází na rovnovážný stav. Fluorescence je tedy spinově dovolený zářivý přechod, obvykle z rovnovážné vibrační hladiny stavu S₁ do některé z vibračních hladin základního stavu S₀. Excitované molekuly ve stavu S₁ se mohou také dostat díky spinové konverzi do prvního tripletního stavu T₁. Emise ze stavu T₁ se označuje jako fosforescence a vzhledem k fluorescenci je posunuta do vyšších vlnových délek (nižších

energií). Konverze ze stavu S1 do stavu T1 se nazývá mezisystémová konverze. Jelikož je ale přechod z T1 do základního rovnovážného stavu zakázaný, je přechod z tohoto stavu o několik řádů pomalejší než u fluorescence.⁶

3.1 Nezářivé přechody

- Vnitřní a vnější konverze

Při vnitřní konverzi dochází k přestupu molekuly mezi dvěma stavy, jež disponují stejnou spinovou multiplicitou (např. S2, S1). To se odehrává mezi 10^{-14} – 10^{-10} s. Tento typ konverze je typický pro alifatické molekuly, ale u rigidních cyklických struktur nebývá častý. Srážkami excitovaných molekul s molekulami rozpouštědla může dojít k převedení přebytečné vibrační energie do rozpouštědla. Tento jev je známý jako vnější konverze.

- Vibrační relaxace

Doprovodným procesem v roztoku je vibrační relaxace, při které přechází molekula z vyšší vibrační hladiny do nejnižší vibrační hladiny daného elektronového stavu. Probíhá v rozmezí 10^{-12} – 10^{-10} s.

- Mezisystémový přechod

Jedná se o zakázaný přechod mezi systémy o různé spinové multiplicitě, S1, T1. Po vibrační relaxaci a vnitřní i vnější konverzi jde o další nezářivý přechod. Přejde-li molekula do vyšší vibrační hladiny, následuje vibrační relaxace. Celý děj se odehrává během 10^{-9} – 10^{-7} s.^{7,8}

3.2 Zářivé přechody

- Fluorescence

Jedná se o dovolený přechod z S1 do S0. Fluorescenční spektrum je charakteristické většími vlnovými délkami (nižší energií) než absorpční spektrum, což je dáno ztrátou energie během vibrační relaxace. Většinou je však fluorescenční spektrum částečně překryto absorpčním spektrem. Následkem toho je část světla emitována v nižších vlnových délkách než absorbované světlo. To však odporuje Stokesovu pravidlu, podle kterého by měla být vlnová délka fluorescenční emise vždy vyšší než absorpční. Je to tedy dáno tím, že jsou některé molekuly při pokojové teplotě ve vyšší vibrační hladině. Tato odchylka se dá redukovat snížením teploty.⁷

- Fosforescence

Stejně jako u fluorescence je to sekundární záření, jehož doba vyzařování je 10^{-3} – 10^2 s. Přejít nastává z T1 na S0. Tento přechod je však zakázaný, takže při pokojové teplotě převažují nezářivé deexcitace jako je mezisystémový přechod a vibrační relaxace. Za nízkých teplot a v tuhém médiu je už upřednostňována fosforescence. Energie nejnižší vibrační hladiny stavu T1 je nižší než odpovídající hladina stavu S1. Proto se nachází fosforescenční spektrum na vyšších vlnových délkách než fluorescenční.^{3, 8}

4. Luminiscence

Luminiscence byla definována E. Wiedemannem již v roce 1889. S nepatrnou korekturou od A. M. Gurviče je luminiscence známa jako děj, při kterém dochází k vyzařování světla o dané vlnové délce danou látkou. Jedná se tedy o děj, kdy je zářením o kratší vlnové délce v určité molekule vyvoláno záření o delší vlnové délce (o tomto principu pojednává Stokesův zákon). Luminiscenci byla objevena u většiny organických látek, nositelem luminiscenčního záření, jak již bylo zmíněno je molekula. U anorganických látek se luminiscenční záření také projevuje, ale to již není zapříčiněno molekulou, nýbrž pomocí shluku atomů, tzv. krystalů.^{9,10}

Jednotlivé typy luminiscence

Luminiscence se rozděluje podle způsobu, jakým je dodávána excitační (budící) energie.

- Fotoluminiscence – excitační energie je poskytována ve formě UV/VIS záření.
- Elektroluminiscence – energie je dodávána pomocí elektrického pole a průchodu elektrického proudu látkou
- Chemiluminiscence – tento způsob dodání energie není až tak častý, vyskytuje se pouze v určitých typech exotermních chemických reakcí, kdy uvolněné reakční teplo je vyzářeno ve formě světla.

Pro technické využití v analytické chemii je nejvýznamnější fotoluminiscence. Jak již bylo zmíněno v předchozích řádcích, při fotoluminiscenci dochází k interakci fotonu o frekvenci UV nebo VIS záření s částicí a dojde k předání energie valenčním elektronům molekuly. Nejčastěji se vyskytuje u organických látek s dvojnými vazbami (například aromatické uhlovodíky). Absorpce závisí převážně na struktuře a skupenství látky, ale také na teplotě, pH a jiných faktorech prostředí. Při absorpci záření se valenční elektrony snaží dostat na vyšší hladinu do tak zvaného excitovaného stavu. V excitovaném stavu nevydrží elektrony dlouho, proto mají relativně krátkou dobu života a dojde k návratu do základního stavu. Jakými způsoby se dostanou excitované molekuly zpět do základního stavu vysvětluje Jablonského diagram (viz. Kapitola 2.)^{3,9}

4.1 FLUORESCENCE

Jak již bylo řečeno fluorescence je spontánní jev, při kterém dochází k uvolnění energie z excitovaného stavu pomocí vyzáření fotonu, tzv. emisi záření. Pro fluorescenci je charakteristická doba vyzařování fotonů po ukončení excitaci v řádu 10^6 až 10^9 s⁻¹. K tomuto ději dochází při přechodu ze stavu S₁ do stavu S₀ (základní stav). Jen u několika molekul jako

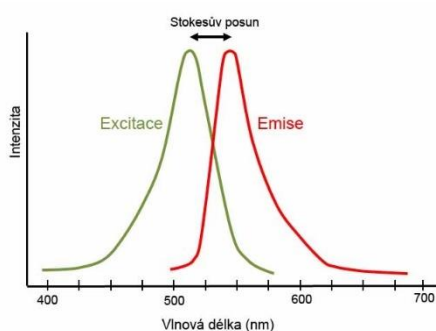
je např. azulén, dochází k přechodu ze stavu S2. Chceme-li aby molekula fluoreskovala, musíme splnit některé principy:

- Absorpce záření o dané vlnové délce nesmí způsobit chemickou přeměnu molekuly.
- Mezisystémový přechod ze stavu S1 do T1 musí být natolik pomalý, aby nedošlo k přechodu dřív, než dojde k fluorescenci.
- Bimolekulární procesy nesmí konkurovat.
- Geometrické uspořádání molekuly pozitivně ovlivňuje účinnost fluorescence³

4.1.1 Specifikace fluorescenčního spektra

Fluorescenční spektrum je dáno závislostí absorbance systému na vlnové délce. Dá se charakterizovat několika základními pojmy, jakými jsou Stokesův posun,

Stokesův posun dostal název po G. G. Stokesovi, který v roce 1852 na univerzitě v Cambridge sledoval průchod slunečního světla přes okenní tabuli do nádoby s roztokem chininu a okem pozoroval, jak se z ultrafialového světla stává viditelné světlo. Závěrem jeho pozorování bylo sepsání zákona, který dostal název Stokesův posun, který poukazuje na to, jak se mění energie fotonu absorbovaného oproti fotonu, který vyzáří fluorofor při přechodu z excitovaného stavu do základního stavu. Rozdíl mezi energií fotonů absorbovaných a vyzářených je charakteristická pro každou molekulu a nazývá se Stokesův posun. Neboli vlnová délka fluorescenčního záření je větší než vlnová délka absorpčního záření.⁹



Obr. Excitační a emisní pásma

Obr.3: Grafické znázornění Stokesova posunu (obrázek převzat a upraven z: <http://labguide.cz/fluorochromy/>)

Zákon zrcadlové symetrie

Zákona zrcadlové symetrie uvádí, že emisní spektrum je zrcadlově obráceným obrazem spektra absorpčního. Tento zákon platí pro mnoho organických molekul. Absorbující i emitující molekuly jsou převážně v rovnovážném vibračním stavu, u kterého je vibrační struktura

základního i excitovaného stavu stejná. Výjimky z tohoto pravidla jsou např. způsobeny rozdílným geometrickým uspořádáním atomových jader v základním a excitovaném stavu.⁵

kvantový výtěžek

Pro hodnocení a určení síly fluorescence se využívá kvantový výtěžek, který udává procenta počtu emitovaných fotonů ku počtu absorbovaných fotonů. Kvantový výtěžek u fluorescence je závislý na vedlejších deaktivčních procesech, mezi které patří mezi systémový přechod z S1 na T1 a nezářivé přechody. Jak zmiňuje Vavilovovo pravidlo kvantový výtěžek není závislý na vlnové délce excitačního záření. Kvantový výtěžek fluoreskujících látek je v rozmezí od 0-1, naopak u nefluoreskujících látek je kvantový výtěžek roven nule.⁵

kvantová účinnost

Dalším hodnoceným parametrem u fluorescence je kvantová účinnost, která je vyjadřována poměrem mezi počtem vzniklých nebo zaniklých částic ku počtu molů vzniklého absorpci 1 molu fotonů. Pro zjednodušení nám kvantová účinnost udává pravděpodobnost uskutečnění jednotlivých fotochemických kroků. K posouzení, jak moc daná látka fluoreskuje slouží měření Intenzity fluorescence, který nám udává počet fotonů procházející jednotkovou plochou za jednotku času.⁹

životnost excitovaného stavu

Mezi další hodnocené parametry patří, která se udává stejným způsobem jako poločas rozpadu. Tudíž poločas života excitovaného stavu $\tau_{1/2}$ je čas potřebný k tomu, aby se intenzita snížila na polovinu.⁴

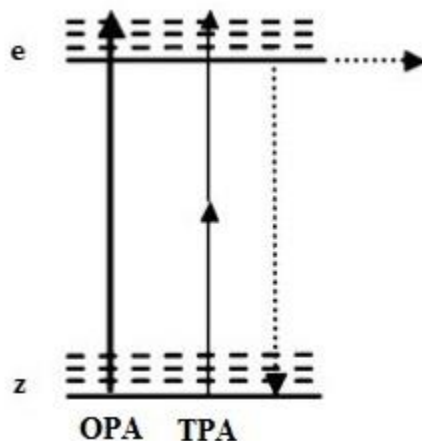
4.2 Fosforescence

Jedná se o určitý typ Luminiscence, u kterého dochází k přechodu elektronu z tripletního excitovaného stavu do stavu relaxačního za současného vyzáření světla. Z pohledu kvantové mechaniky se jedná o zakázaný přechod. K fosforescenci dochází, pokud excitovaný elektron změnil přechodem na vyšší hladinu spin a má tedy totožný spin jako jeho párový elektron v základním stavu. Poté tedy dochází k přechodu elektronu z hladiny S na hladinu T – tento jev se nazývá mezisystémová konverze. Samotné vyzáření fotonů (světla) je způsobeno návratem elektronu na základní hladinu. Intenzita vyzáření světla je mnohem menší než u fluorescence. Fosforescence se nejčastěji objevuje u organických sloučenin s C=O vazbou, nebo u heteroatomů.⁵

Obdobným jevem jako fosforescence je takzvaná zpožděná fluorescence, na rozdíl od ní však dochází k opakované mezisystémové konverzi mezi hladinami S a T, který je důvodem „zpoždění“ emise. Světlo je pak vyzářeno přechodem z hladiny S1 na základní energetickou hladinu. Životnost zpožděné fluorescence je srovnatelná s fosforescencí. Tento způsob vyzáření světelné energie a návrat na hladinu vykazuje například barvivo eosin nebo pyren. Celý tento děj je vysvětlen v Jablonského diagramu ⁵

5. Dvoufotonová absorpce

Dvoufotonová absorpce (TPA) je děj, při kterém molekula nebo materiál v jednu chvíli absorbuje dva fotony. Tyto fotony mají dohromady stejnou energii, která je potřebná k dosažení excitovaného stavu v daném materiálu pomocí jednofotonové absorpce (OPA). To znamená, že jeden foton má přibližně poloviční energii, z čehož vyplívá dvojnásobná vlnová délka. Rozdílu mezi jednofotonovou a dvoufotonovou absorpcí je vidět na obrázku.⁵



Obr.4: Energetický diagram znázorňující proces OPA a TPA. Délky jednotlivých šipek představují energii fotonů. Tečkovaná šipka znázorňuje světelnou emisi a návrat za hladinu Z (obrázek převzat a upraven z: <http://www.chempoint.cz/dvoufotonova-absorpce>)

Za předpokladu, že je přechod dovolený pravidly, které byly zmíněny v kapitole č.2, může být molekula excitována do určité energetické hladiny absorpcí jednoho fotonu (OPA), který má energii definovanou rozdílem excitovaný stav - počáteční stav. Stejněho stavu může být dosaženo i absorpcí dvou totožných fotonů (stejná vlnová délka a stejná energie) s poloviční energií (TPA). Po OPA nebo TPA molekula obvykle podstupuje rychlou vnitřní konverzi do energetické hladiny e. Z této hladiny systém může zrelaxovat zpět do základní hladiny. Jak již bylo zmíněno v kapitole č.2 k relaxaci dochází buď zářivými, nebo nezářivými procesy.

Jak již bylo zmíněno, pro dvoufotonovou absorpci je důležitý atak dvou totožných fotonů. U jednofotonové absorpce (OPA) je pravděpodobnost absorpce fotonu přímo úměrná intenzitě excitačního záření. Závislost mezi počtem excitovaných molekul a intenzitou excitačního záření u OPA vyjadřuje vztah:

$$n_1 = \sigma N_g \frac{I}{h\nu}$$

kde n_1 je počet molekul excitovaných OPA v jednotce objemu materiálu za jednotku času. σ je absorpční průřez, N_g je hustota molekul v základním energetickém stavu z. I je intenzita excitačního zdroje a $h\nu$ je energie fotonu.

Pravděpodobnost současné absorpce dvou fotonů je úměrná čtverci intenzity excitačního záření. Po úpravě pro dvoufotonovou absorpci získáváme vztah

$$n_2 = \frac{1}{2} \delta N_g \left(\frac{I}{h\nu} \right)^2$$

kde n_2 je počet molekul excitovaných TPA v jednotce objemu za jednotku času, δ je TPA absorpční průřez pro foton s energií $h\nu$. Prefaktor $\frac{1}{2}$ vyjadřuje, že je zapotřebí dvou fotonů k excitaci jedné molekuly. Z toho je patrné, že k excitaci dochází pouze v místech, kde je silný tok fotonů. Takto vysokých hustot fotonů se dosahuje buď kolimačními čočkami nebo lasery. Aby došlo k excitaci je zapotřebí alespoň 1028 fotonů/cm² k. Takovýto počet fotonů je pouze v místě zacílení laserového paprsku. Naopak při dvoufotonové absorpci nedochází v okolí zaměření laseru, tudíž při nasvícení kyvety laserem dojde pouze k lokální dvoufotonové absorpci a to jen ve směru záření laseru. Na rozdíl od jednofotonové absorpce, kde k excitaci dochází v celém objemu kyvety. Díky tomuto rozdílu poskytuje TPA mechanismus, kterým mohou být aktivovány chemické nebo fyzikální procesy s vysokým prostorovým rozlišením (viz také kapitola č.7). Tento fakt vychází ze skutečnosti, že excitace se snižuje s čtvercem vzdálenosti od místa zacílení paprsku.^{11, 12}

Díky této vlastnosti TPA nabízí mnoho výhod, jimiž jsou například omezení fotovybělení, které se projevuje pouze v malém měřítku a v lokalizovaném objemu. Dále se této vlastnosti TPA hojně využívá při pozorování, kde nedochází k rozmývání pozorovaného obrazu fluorescencí mimo ohniskovou rovinu. Další výhodou má své uplatnění v barvivech, která musí být při OPA excitována UV zářením, ovšem u TPA barviv postačuje infračervené (IR) záření (800 nm). Výhodou využívání IR záření je mnohem hlubší pronikání záření skrze biologické médium. Zde se využívá toho, že IR záření spadá do oblasti vlnových délek, kde mají tato média nízkou míru absorpce. Dále IR záření poškozují lidské tkáně mnohem méně než UV záření a také delší vlnové délky jsou mnohem méně rozptylovány při průchodu skrze biologický materiál než modrá část spektra.^{11, 12}

6. Metody měření TPA průřezu a spekter

K určení, jak účinná je dvoufotonová absorpce pro jasně specifikovaný materiál, nebo látku při dané vlnové délce byl definován dvofotonový absorpční průřez (TPA průřez). Tento odvozený TPA průřez vychází z Lambert-Beerova zákona pro jednofotonovou absorpci:

$$I(x) = I_0 e^{-\alpha c x}$$

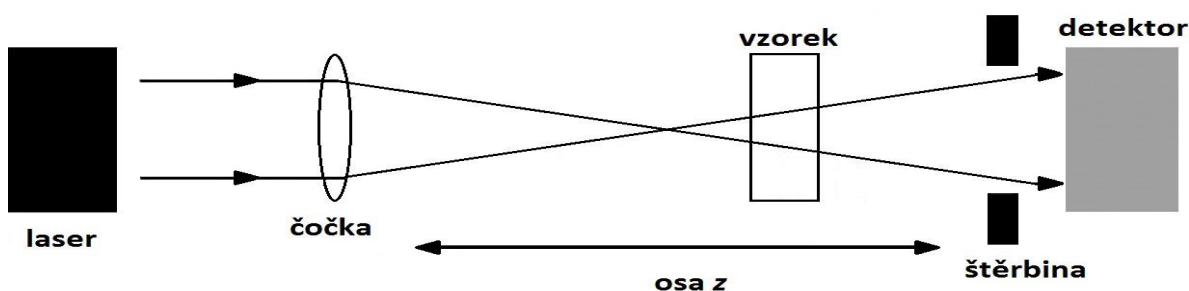
pro dvoufotonovou se také vychází z Lambert-Beerova zákona, ovšem ve vztahu musí být uvedeno, že dochází k absorpci dvou fotonů najednou, z čeho vyplívá vztah:

$$I(x) = \frac{I_0}{1 + \beta c x I_0}$$

U jednofotonové absorpce byl značen absorpční koeficient symbolem α , přičemž u dvoufotonové absorpce je značen symbolem β -TPA průřez. Jednotkou TPA průřezu je uváděn Goepfer-Mayer (GM). Jedna jednotka GM nabývá hodnot $10^{-50} \text{cm}^4 \text{s} \text{foton}^{-1}$.¹²

6.1 metoda z-Scan

Tato metoda je založená na postupném posouvání kyvety se vzorkem po dráze laserového paprsku. Intenzita laserového paprsku je snímána detektorem a je vynášena do grafu na osu z v závislosti na vzdálenosti kyvety od zdroje laserového paprsku. Od této osy z dostala tato metoda svůj název.¹²



Obr.5: Schématické provedení z-Scanu (obrázek převzat a upraven z: <http://hompi.sogang.ac.kr/nlopt/nlo1001600.htm>)

Jak je již z obrázku patrné při této metodě měření TPA průřezů se využívá pohyblivá kyveta, která se buď přibližuje, nebo oddaluje od zdroje laserového paprsku, druhou pohyblivou částí

tohoto měřicího zařízení je posuvná štěrbinu. Podle toho, jestli je štěrbinu otevřená, či uzavřená rozlišujeme u tohoto typu měření 2 typy detekce TPA průřezu

- Uzavřená štěrbinu

Pokud je štěrbinu v uzavřené pozici je umístěna tak, aby bránila průchodu části laserového záření. Před vstupem záření ke kyvetě prochází proud fotonů skrze čočku, která v tomto případě soustřeďuje paprsek do bodu, z kterým se tok fotonů přirozeně rozbíhá. A přesně v této oblasti za ohniskem je umístěna kyveta se vzorkem. Prošlý paprsek dopadá na již zmíněnou štěrbinu, která z celkového záření vybírá jen tu středovou část paprsku (nejčastější transmitance se pohybuje v rozmezí 0,1-0,5). Po průchodu vybraného paprsku skrze štěrbinu dopadá paprsek na detektor, kde dochází k vyhodnocení. Typ měření s uzavřenou štěrbinou je nevýhodný v tom, že v průběhu celého měření je nezbytně důležité, aby nedošlo k jakémukoliv ohybu laserového paprsku. Tento ohyb může být způsoben průchodem paprsku skrze vzorek, přičemž může dojít k nepatrnému ohybu paprsku. Tento zanedbatelný ohyb má za následek na množství dopadajícího záření na detektor (paprsek se ohne od detektoru, nebo naopak díky ohybu dojde ke zvýšení dopadajícího záření na detektor).¹³

- Otevřená štěrbinu

Jak již z názvu vyplívá, druhá metoda z-Scanu je založena na detekci veškerého záření, které prošlo skrze kyvetu. Při této metodě je zapotřebí, aby štěrbinu před detektorem byla zcela odstraněna, nebo otevřena na maximum. V tomto měření je výsledkem pouze odraz intenzity záření a proto může být využit pro měření TPA průřezů jednotlivých látek. Bohužel i u metody otevřené štěrbinu jsou značné nevýhody. První nevýhodou při stanovování TPA průřezů je, že výsledky mohou být negativně ovlivněny nedostatečným rozevřením štěrbinu. Nevyhovující výsledek získáme také za předpokladu, že vzdálenost mezi kyvetou a štěrbinou bude příliš velká. Tím dochází ke ztrátě, nebo snížení intenzity záření. Dále dochází k rozostřování, nebo nelineárnímu rozptylu na detektoru. Druhou značnou nevýhodou je že při měření může docházet k absorpci již excitovaných molekul. Tomuto jevu se dá předcházet používáním takové vlnové délky, kde je jednofotonová absorpce (OPA). zanedbatelná. OPA je zanedbatelná při použití velmi krátkých laserových pulzů (v tomto případě je potřeba použít pulzy, které jsou pod 1 ps). Při tomto měření se doporučuje používat frekvenci pod 1 KHz. ^{13,14}

6.2 Metoda měření dvoufotonové fluorescence (TPEF)

Vůbec první publikovaná zmínka o využití TPEF pochází od pánů Xu a Webba. Tato metoda měření TPA průřezů je častěji využívána z důvodu, že jejím výsledkem je přímo účinnost dvoufotonové absorpce. Tato metoda je založena na porovnávání spektra referenční látky, u které je již znám TPA průřez s látkou, u které TPA průřez potřebujeme zjistit. Jedinou limitující podmínkou při této metodě je, aby jak spektrum referenční látky, tak spektrum měřené látky bylo naměřeno na totožném laseru, za použití stejné metody. Pokud jsou obě spektra naměřena na stejném laseru, můžeme zanedbat mnoho faktorů, mezi které patří například: energie pulzu, trvání pulzu, rozložení intenzity v čase a závislost funkce detektoru na vlnové délce excitačního záření. Jak již lze z popisu této metody vyčíst, je zapotřebí znát referenční TPA průřezy různých látek. Proto v roce 2008 MAKAROV Nikolay a Aleksander REBANE vydali dokument, ve kterém uvádějí přesné hodnoty TPA spekter (v rozmezí vlnových délek 500-1600 nm) téměř všech dostupných organických barviv.^{15,16}

6.3 Omezení při měření TPA průřezů

Pro obě zmíněné metody měření TPA průřezů je zapotřebí využít pulzní laser zhruba 100 fs. Výhodou těchto měření je, že se pro stanovení do kvety předkládá zředěný roztok dané látky, který má absorpci zhruba 0,1, tudíž pro stanovení postačí miligramové množství vzorku. Při měření, jak již bylo zmíněno je zapotřebí aby byla eliminována jednofotonová absorpce a dále vzorek musí vykazovat fotoluminiscenci. Při porovnávání jednotlivých molekul s teoreticky vysokými TPA průřezy, je nezbytné vzít v úvahu, že výsledky naměřené metodou z-Scan jsou vždy mnohem větší, než při použití metody TPEF.¹⁷

7.Látky s vysokými TPA průřezy

Organických molekul, které vykazují vysoké hodnoty TPA průřezů je mnoho. Převážná většina těchto látek je obdobou fluoroforů pro OPA. Do této skupiny látek se řadí například fluorescein, kumarin, rhodaminy. Bohužel tyto látky mají tak nízké TPA průřezy, že je nelze využít pro dvoufotonovou mikroskopii. Důležitým parametrem pro využití látky v TPA mikroskopii je, aby byla dobře rozpustná ve vodě. Pokud je látka rozpustná ve vodě dochází k lepší interakci látky s buňkou, nebo tkání. Dále je podstatné, aby látka byla selektivní k určitým látkám v organismu. Takto specifickou selektivitu zajistíme použitím takové látky, která vykazuje TPA průřez alespoň 50 GM. Tím zajistíme, že signál bude detekovaný například pouze z určitých organel.¹⁸

Pro využití molekul s TPA je nezbytné, aby jejich dvoufotonový průřez byl co nejvyšší. Takto vysokých hodnot se dosahuje prodlužováním intermolekulární konjugace. Další parametr, který vede ke zvýšení TPA průřezu je posílení donor-akceptorové interakce. Aby byla zachována rozpustnost dané látky ve vodě, je potřebná redukce velikosti molekuly a dále zavedení rozpustných skupin na nosný skelet látky. Látky, které splňují tyto požadavky a z toho důvodu mají vysoký TPA průřez se dělí do mnoha skupin. Ovšem v každé dostupné literatuře se dělení TPA látek liší. Například Hwan a kol. rozdělili tyto látky podle cílového využití v dvoufotonové mikroskopii na:

- Dvoufotonové sondy pro mitochondrie a lysozomy
- Dvoufotonové sondy pro plazmatické membrány
- Dvoufotonové sondy pro kovové ionty¹⁸

Další možnost dělení uvádí He Guang a kol. který TPA látky dělí podle jejich složení na

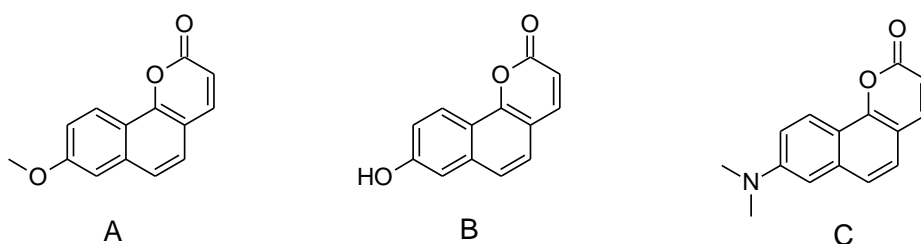
- Organické amorfnní molekuly
- Organické kapaliny a kapalně krystalné
- Konjugované polymery
- Fullereny
- Koordináční a organokovové sloučeniny
- Porfyriny a metaloporfyriny
- Nanočástice
- Biomolekuly a jejich substytuční deriváty¹⁹

Posledním, kdo tento obsáhlý okruh látek rozdělil byl MYUNG a kol. Ten molekuly s vysokým TPA rozdělil podle jejich stavby. Tento způsob rozdělení látek s dvoufotonovou absorpcí mi připadá nejpřehlednější a pro moje téma nejvhodnější a proto dále budu vycházet z toho dělení. Pan MYUNG KIM tyto látky rozdělil na:

- Dipolární molekuly
- Kvadrupolární molekuly
- Oktupolární molekuly²⁰

7.1 Dipolární molekuly

Dipolární molekuly jsou látky, které mají na jedné straně silný donor a na protilehlé straně naopak silný akceptor tento typ molekul se nejčastěji schematicky zaznamenává (D- π -A). V již zmiňované publikaci je nepřehledné množství dipolárních molekul. Pro lepší přehlednost udávám pouze benzopyranové deriváty, které mají vysoké TPA průřezy.²⁰



Obr.6: Struktury dipolárních molekul: U látky(A) byl naměřen TPA průřez 140GM, u látky (B)270GM a u látky (C) 350 GM

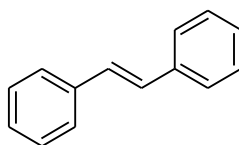
U různých benzopyranových derivátů je výhodou jejich dokonalá rozpustnost ve vodě a dále jejich vysoká stabilita. Poločas rozpadu $t_{1/2}=2100s$. Díky poměrně vysoké hodnotě TPA průřezů po absorpci energie vykazují silnou a dlouho trvající fluorescenci. Obměnou různých skupin na skeletu lze vytvořit širokou paletu látek s TPA. Čím silnější donor a akceptor je použit, tím silnější bude intenzita fluorescence.²⁰

7.2 Kvadrupolární molekuly

Další variantou látek s vysokými hodnotami TPA průřezů, jsou látky o schématu (D- π -D), (D-A-D) a (A- π -A), které dále ve své struktuře mají fenyl, bifenyl, dihydrofenantrenyl, anthracenyl jako jádro a mezi uhlíky v řetězci dvojnou vazbu, jako můstky konjugace. Z těchto vypsanych parametrů připadají v úvahu například deriváty stilbenu, nebo také deriváty fluorenu, dihydrofenantrenu a antracenu.²⁰

Deriváty stilbenu

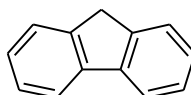
Deriváty stilbenu jsou hojně využívané sloučeniny, jelikož při zvyšování konjugace v molekule může být naměřen TPA průřez až 1300 GM (při použití vinylenové skupiny). U Stilbenu se konjugace prodlužuje pomocí vinylenové skupiny, nebo styrylenové skupiny. Pokud ovšem k prodlužování řetězce použijeme styrylenové skupiny dojde ke značnému nárůstu hodnoty TPA průřezu. Z tohoto faktu lze vydedukovat, že při dvoufotonové absorpci je mnohem výhodnější styrylenová skupina, než vinylenová. Dále bylo zjištěno, že pokud na stilben přidáme skupinu CN dojde ke zvýšení TPA průřezu. Těchto již výše zmíněných faktů bylo využito a byla připravena látka, která vykazuje hodnotu TPA průřezu okolo 5300 GM.²⁰



Obr.7: Molekula stilbenu

Deriváty Fluorenu, Dihydrofenantrenu a Antracenu

Deriváty těchto látek našli své uplatnění při syntéze látek, které vykazují vysoké TPA průřezy. Výhodou těchto látek je možnost prodloužení řetězce, zároveň tedy prodloužení konjugace bez porušení planarity. Naopak omezením u těchto derivátů je potřeba udržovat stálé pH a dbát na to, aby nedošlo ke změně složení rozpouštědla. Jak již bylo řečeno v předchozí kapitole, hodnota TPA průřezu je závislá na délce řetězce a její konjugaci a také zároveň na navázaných substituentech. Pokud tedy na derivát antracenu navážeme fenolové substituenty, tak dojde k poklesu TPA průřezu. Naopak navázáním CN skupiny do polohy 9 a 10 dojde ke značnému nárůstu. Dle literatury byl proveden pokus, kdy se na anthracenový derivát navázal jak fenyl, tak skupina CN. Z logiky věci vyplývá, že hodnota TPA průřezu by měla zůstat stejná, ale výsledkem daného pokusu bylo, že hodnota TPA průřezu se zvedla až na hodnotu 5530 GM. Další zajímavostí této látky je fakt, že při měření TPA průřezu vykazuje látka vysoké hodnoty v širokém rozsahu vlnových délek.²⁰



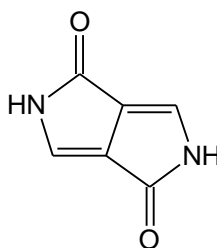
Obr.8: Molekula fluorenu

Deriváty thiofenu a squarainu

Tyto deriváty jsou svými TPA hodnotami podobné derivátu od stilbenu obsahující styrylovou konjugaci měřený při vlnové délce 700 nm a menší. Naopak squarainová barviva se schématem (D-A-D) jsou látky, které vykazují TPA průřezy až 33000GM. Těmito hodnotami jsou považované za nejlepší dvoufotonové heterocyklické fluofory. Takto vysoké hodnoty jsou způsobeny dipólovým momentem ve struktuře látky. Byly prováděny pokusy, kde se vědci snažili zvýšit hodnotu TPA průřezu změnou schématu (A-D-A) nebo (A-D-D-A), ovšem bez úspěchu.²⁰

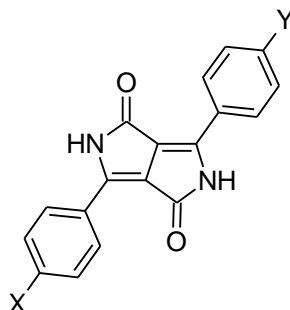
Diketopyrrolopyrrol (DPP)

Jak je již z obrázku patrné diketopyrrolopyrrol je konjugovaný, téměř zcela rovinný bicyklický dilaktám. DPP má ve své struktuře elektrodonorové skupiny N-H a naopak elektronové akceptory C=O^{21,22}



Obr.9: Základní struktura DPP

Na tento základní skelet viz. OBR se postupně přidávají různé substituenty z důvodu „vylepšení“ vlastností DPP. Nejčastěji atakované polohy jsou 3 a 6. Pro zvýšení delokalizace, která vede k vytvoření silných π - π interakcí s jádrem se nejčastěji do poloh 3 a 6 dávají fenyly (DPP(Ph)₂), nebo thienyly (DPP(Th)₂). Dále se na fenyl, či thienyl připojují polární substituenty do poloh X a Y viz OBR

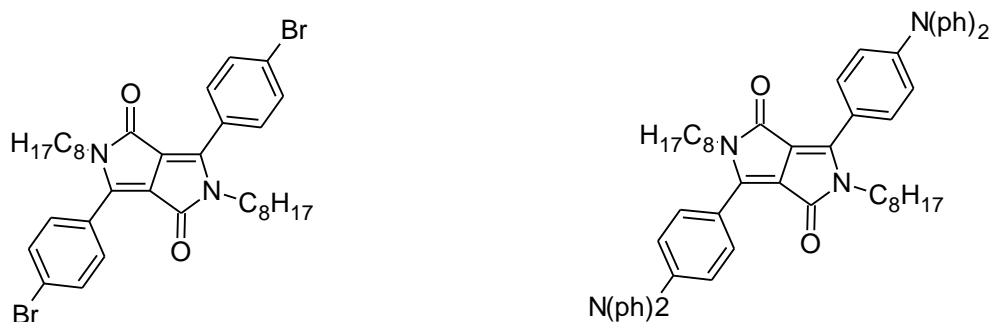


Obr.10: Nejčastěji atakované polohy X,Y u DPP

Výslednou látkou je materiál, který se hojně využívá jako aktivní část organických zařízení. Připojením elektro akceptorních i donorních skupin na fenyl dochází k významnému

bathochromnímu posunu absorpčního i excitačního spektra. N-substituované DPP sloučeniny jsou známy svojí poměrně vysokou rozpustností. Tato rozpustnost je způsobena již zablokovaným dusíkem, který již nemůže tvořit vodíkové můstky, jako tomu bylo u N-nesubstituovaného DPP. Rozpustnost není závislá na velikosti substituované látky, například připojením pouhého metylu dojde ke značnému zvýšení rozpustnosti vůči původnímu DPP. Po připojení substituentu na dusík nedochází pouze ke změně rozpustnosti, ale zároveň dochází ke změně optických vlastností. To je způsobeno změnou elektronové hustoty dusíkových atomů, které jsou nezbytnou součástí DPP chromoforu. Dalším důvodem, který vede ke změně optických vlastností je zásadní zvýšení sterickeho efektu na substituentech v polohách 3 a 6. Tato změna sterickeho efektu může vést k rotaci mimo rovinu.^{21,22}

Za přispění polárních a elektro donorových substituentů a kvadrupolární struktury vykazuje takto modifikovaný DPP poměrně vysoký TPA průřez. Jako první, kdo se zabýval měřením TPA spekter u DPP byl Yang a kolektiv (2009). Jako výchozí látku použili DPP1, z které přes další kroky syntetizovali DPP2 (viz OBR)^{20,23}

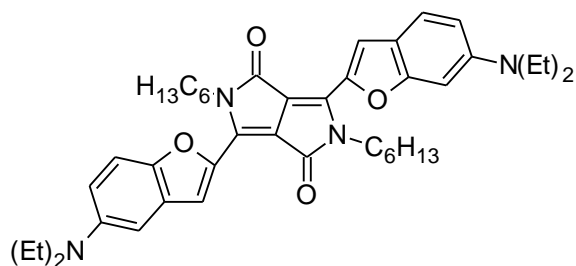


Obr.11: Struktura DPP1 a DPP2

Jak je již z obrázku patrné, jedná se o (D-A-D) barviva, která ve své struktuře obsahují fenylaminové skupiny, které jsou vhodnými donory elektronů. Při proměrování DPP1 Yang a kolektiv naměřili hodnotu TPA průřezu okolo 110 GM. Je ovšem nezbytné říci, že tyto hodnoty byly naměřeny metodou TPEF. Jak již bylo zmíněno více při použití metody TPEF jsou výsledky TPA průřezu značně nižší, než u metody z-Scan. Pokud je potřeba zjistit maximální vlnovou délku u dipolárních molekul, tak se často vychází z pravidla, že vlnová délka maxima u TPA je rovna dvojnásobku maxima vlnové délky u OPA. Naopak u kvadrupolárních molekul, které jsou ještě symetrické, tato poučka neplatí. Příkladem látek, u kterých tuto metodu zjištění maxima vlnové délky nelze využít je DPP1, DPP2, DPP3. DPP podléhají rozdílným kvantovým výběrovým pravidlům pro OPA a pro TPA. Například u DPP1 najdeme maximální TPA průřez

při vlnové délce 700 nm. Pokud do molekuly DPP1 přidáme donorní substituenty dojde k bathochromnímu posunu absorpčního spektra. Tímto posunem spektra dojde k nárůstu hodnoty TPA průřezu až na hodnotu okolo 1200 GM.²³

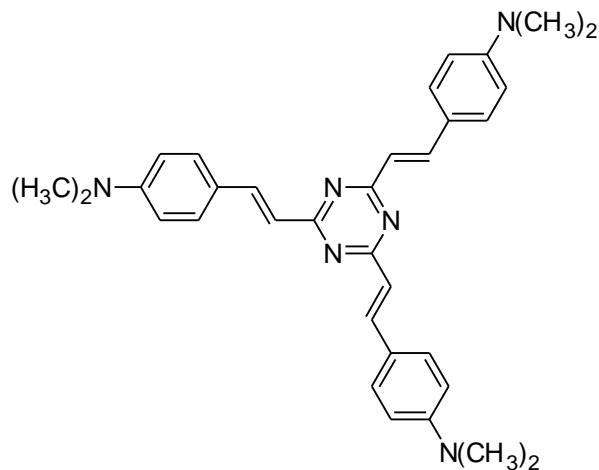
Struktura DPP byla mnoha autory pozměňována a upravována. Tyto úpravy vedly k vytvoření mnoha nových DPP derivátů, které z důvodu rozsahu práce záměrně neuvádím. Za zmínku ovšem stojí doposud nejúčinnější známý DPP derivát, který má schéma D-A-D a ve své struktuře má amino substituovaný furan a benzofuran, takto navázané skupiny zaujímají funkci donora elektronů. Tato nedávno objevená látka vykazuje TPA průřez okolo 3000 GM, což je totožné s již zmíněným DPP₂, který zkoumali a proměřovali Yang a kolektiv. Takto vzniklá molekula dostala označení DPP7, její struktura je patrná na OBR. Značnou výhodou této látky je poměrně vysoký kvantový výtěžek, tento fakt z DPP₇ vytváří nejúčinnější a nejvyužívanější DPP derivát.²⁴



Obr.12: Struktura DPP7

7.3 Oktupolární molekuly

Jako první, kdo u oktupolárních látek zkoumal dvoufotonovou absorpci byl CHO Bong Rae a kolektiv (2001). Kolektiv výzkumníků na strukturu navazoval různé substituenty a následně měřili TPA průřezy. Prvním krokem bylo navázání NMe₂ do skeletu látky. Výsledkem byl průřez 200 GM. Dále styrylovou skupinou byla prodloužena konjugace. Tento krok vedl k výsledku 1400 GM. Dále byla skupina NEt₂ změněna na NPh₂, což také nevedlo k tíženým výsledkům. Jedinou strukturou z kategorie oktupolárních látek, která vykazovala hodnoty blížíící se squarainovým barvivům (33000 GM). Takto vysokých hodnot, jak vyplívá z obrázku, bylo dosaženo zapojením elektron-akceptorních skupin.²⁵



Obr.13: Struktura oktupolární molekuly s nejvyšší hodnotou TPA

7.4 Další významné molekuly

Mezi další molekuly, které mají vysoké hodnoty TPA průřezu můžeme zařadit například porfyrin. Porfyrin je základní dvoufotonová struktura. Molekul je planární a má konjugovanou strukturu. Pokud dojde k propojení více molekul porfyrinu dochází k eliminaci sterického bránění. Pokud je splněna tato podmínka, tak dochází ke zvýšení planarity, což vede k nárůstu hodnoty TPA průřezu až na hodnoty 94000 GM. Další vlastností je poměrně dlouho doba životnosti, této vlastnosti se s oblibou využívá ve fotodynamické terapii.²⁶

Další významnou látkou s TPA je rhodamin. Tuto látku zkoumali pánové XU Chris a Watt W. Webb, kteří studovali jednofotonové, ale i dvoufotonové vlastnosti této látky. Pro danou látku byla provedena série měření, kdy různé rhodaminy byly rozpuštěny v methanolu a měřeny při různých vlnových délkách. Z měření vyplývá, že čím menší vlnová délka excitujícího záření je, tím je vyšší TPA průřez. Na práci Xu a Webba navázali Makarov Nikolay, Mikhail Drobizhev a Aleksander Rebane, kteří přeměřovali TPA spektra rhodaminů o různých koncentracích a porovnávali s veškerou dostupnou literaturou. Závěrem jejich práce byly téměř totožné výsledky, jako naměřili Xu a Webb. Díky takto dokonalému prozkoumání optických vlastnosti rhodaminů se často tyto látky s oblibou využívají jako standartní vzorek pro měření TPA spekter pomocí TPEF metody.^{15,27}

8. Využití dvoufotonové absorpce

Fluorescenční mikroskopie našla své uplatnění v oborech jako je například biologie či medicína. Za zmínku stojí fluorescenční fluorofory. Tyto fluorofory se používají k označování biologického materiálu a je následnou detekci v organismu. Tato obsáhla skupina se dělí na dvě hlavní podskupiny a to na základě vztahu mezi fluoforem a studovaným materiálem. Pokud se fluorescenční látka váže kovalentně na vzorek, nazýváme tyto látky fluorescenční značky. Pokud se ovšem váží nekovalentně jedná se o fluorescenční sondy.

- Fluorescenční značky jsou nevlastní fluorofory, které se ke sledovaným biomolekulám (proteinům, peptidům, ligandům, oligonukleotidům a jiným) vážou kovalentní vazbou. Nejčastěji se používají k fluorescenčnímu značení proteinů, kdy se kovalentně vážou na jejich aminové, sulfhydrylové nebo histidinové boční řetězce.
- Fluorescenční sondy jsou nevlastní fluorofory, které se ke sledované struktuře vážou nekovalentně a často přitom mění své fluorescenční vlastnosti. Volba fluorescenční sondy je klíčovou součástí experimentu ve fluorescenční spektroskopii, neboť právě její vlastnosti umožňují získat potřebné informace o pohybu sondy organismem.^{28,29,30}

Dalším vhodným využitím dvoufotonové absorpce je mikroobrábění. Tento proces je založen na principu dvoufotonové polymeraci. Ve své podstatě se jedná o mikro 3D tiskárnu využívající laser a dvoufotonovou absorpci. K dvoufotonové polymeraci se využívá dvojnásobná vlnová délka než u jednofotonové absorpce. A tím je zajištěno, že pouze v určitém bodě, kde je dostatečná optická intenzita dojde k vybuzení absorpce. Lze tak dosáhnout jemnějších struktur, dokonce i menších, než je použitá vlnová délka laseru.^{31,32,33}

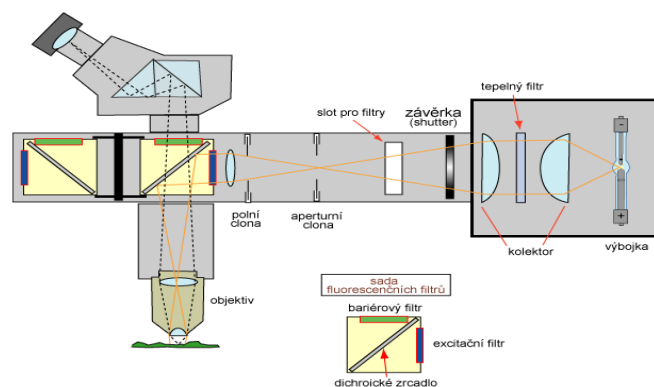
Za zmínku rozhodně také stojí využití dvoufotonové absorpce k trojrozměrnému zapisování dat. Současná zařízení pro ukládání optických dat, jako jsou například CD a DVD používají jednofotonové procesy pro zapisování a čtení dat z dvourozměrného povrchu. Při použití dvoufotonové absorpce, která má úzký excitační objem a vysokou eliminaci rušivých faktor pozadí umožňuje ukládání dat do trojrozměrného systému. Při použití dvoufotonové absorpce tedy dochází k razantnímu zhuštění zapisovaných dat. Tento fakt přispěl k výrobě prototypu disku, který má podobné rozměry jako CD ovšem jeho kapacita je až 1 TB. Zatím tento objev nemohl být uveden do provozu, jelikož zápis a čtení dat uložených na disku je časově mnohem zdouhavější než u klasického CD.^{34,35,36}

9. Fluorescenční mikroskopie

Fluorescenční mikroskop se používá při pozorování látek ve velmi malých množstvích. První výraznou změnou vůči klasické mikroskopii konfokálním mikroskopem je hloubka a ostrost obrazu, která je dána vysokým kontrastem vůči pozadí. Díky těmto parametrům lze tuto metodu používat při pozorování látek v živých buňkách. Dalším rozdílem vůči klasické mikroskopii je použitý zdroj světla. Fluorescenční mikroskop jako zdroj světla využívá vysokotlakou rtuťovou výbojku. Tato výbojka emituje mnohonásobně silnější záření v oblasti UV-VIS, než klasický zdroj světla u konfokálního mikroskopu. Rtuťová výbojka vyzářuje světelný tok o vlnové délce v rozmezí 356-546 nm. Vysoká energie a vhodná vlnová délka emitujícího záření jsou potřebné parametry pro excitaci fluorescenčních barviv.³⁷

9.1 Stavba fluorescenčního mikroskopu

Jak již bylo zmíněno v předchozí kapitole, jako zdroj se využívá vysokotlaká rtuťová výbojka. Vzniklé záření prochází skrze excitační filtr, tento filtr z celkového toku vybírá jen ty vlnové délky, které jsou vhodné k excitaci fluorochromu. Záření, které projde skrze filtr dopadá na dichroické zrcadlo, které je postavené v úhlu 45° vůči rovině světla. Již odražené světlo putuje přes objektiv na pozorovaný preparát. V pozorovaném preparátu dojde k excitaci elektronů do vyšších elektronových hladin. Při zpětném návratu do základního energetického stavu dochází k vyzáření excitačního světla. Toto záření prochází skrze imerzní objektiv s imerzním olejem, který propouští pouze určitou část záření. Vybrané záření imerzním objektivem dále putuje na dichroické zrcadlo a bariérový filtr. Již zmíněné excitační záření musí projít skrze bariérový filtr, jelikož v tomto filtru dochází k zabránění průchodu odraženého excitačního záření, které má vyšší intenzitu, než emisní záření. Tento filtr zabraňuje poškození oka pozorující osoby a také zlepšuje pozorování. Do samotného okuláru se tedy dostává pouze fluorescenční záření o vyšší vlnové délce a nižší je odráženo zpět.^{38,9}



Obr.14: Náznorné schéma stavby fluorescenčního mikroskopu (obrázek převzat z: <http://kfrserver.natur.cuni.cz/studium/prednasky/mikro/mscope/fluor/fluor.htm>)

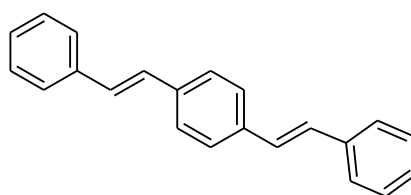
9.2 Využití fluorescenční mikroskopie v biozobrazování

Biozobrazování, stejně jako z-scan jsou již pokročilé fyzikální metody, které již nejsou tématem této práce a z tohoto důvodu jsou uvedeny pouze základní principy a techniky, které se nejčastěji v biozobrazování využívají. Fluorescenční mikroskopie se nejčastěji využívá k pozorování nukleových kyselin. Aby bylo pozorování možné, je potřeba dané nukleové kyseliny označit látkou, která je fluorescenční. Tyto látky se nazývají fluorescenční sondy. Fluorescenční sonda je látka, kterou lze použít k detekci sloučenin bez vlastní fluorescence. Aby fluorescenční sonda mohla být využita k detekci a kvantifikaci nukleových kyselin je nutné, aby sonda navázaná na nukleovou kyselinu měla výrazně odlišnou intenzitu než sonda nenavázaná. Molekula fluorescenční sondy by dále měla být planární. Pokud je splněna planarita je mnohem jednodušší vymezení mezi báze. Aby došlo k navázání sondy na nukleový řetězec, je potřebné, aby sonda ve své struktuře měla alespoň jednu kladně nabitou skupinu. Tato skupina potom interaguje se záporně nabitým řetězcem. V závislosti na struktuře mohou sondy preferovat určité úseky nukleových kyselin. Těchto vlastností se s oblibou využívá v diagnostice. Principiálně se jedná o navázání látky, která má schopnost fluorescence na určité nukleové kyseliny s pomocí interakce mezi kladně a záporně nabitou skupinou. Posléze je objekt vložen pod fluorescenční mikroskop a pozoruje se pouze ta část, na kterou byly navázány fluorescenční sondy. Značnou výhodou fluorescenčních sond je vysoká citlivost na přítomnost sledovaných látek. Výhodou může být i preference určitých úseků DNA, kterou lze využít při určení obsahu daných úseků. Naproti těmto výhodám je ovšem potřebné splnit podmínku, kterou je vhodné prostředí, ve kterém nebude docházet k zhášení fluorescence. Bohužel používané látky po navázání na DNA mohou značně narušit biologické pochody jako je například replikace nebo transkripce. Proto tyto tělu toxické sondy nelze využít ke studiu živých organismů.⁹

10. Metodika syntézy zvolených organických chromoforů s dvoufotonovou absorpcí

Pro metodiku syntézy byly zvoleny 3 základní struktury. Všechny použité struktury se řadí do skupiny dipolárních látek. Tyto molekuly se skládají z elektro akceptorních a donorních skupin, které jsou propojeny π konjugovaným systémem. Jako referenční látky byly zvoleny tetrafenylethylen, distyrylbenzen a spirobifluoren.

10.1 distyrylbenzen



Obr.15: Distyrylbenzen

Možnost syntézy č.1

V této syntéze využil Myung a kol. reakce, kde nechali reagovat diethyl ester (4-styrylbenzyl)fosfoniovou kyselinu s (E)-4-{2-[4-(diethylamino)fenyl]vinyl}benzaldehydem za vzniku námi požadovaného distyrylbenzenu.³⁹

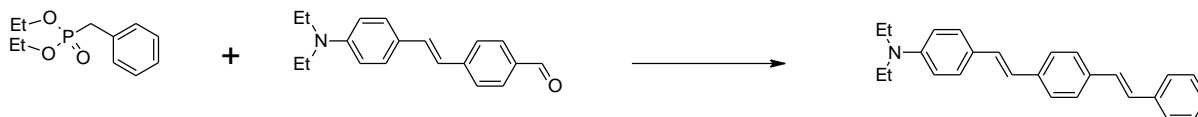


Schéma č.1: Syntéza distyrylbenzenu

Možnost syntézy č. 2

V této syntéze provedl Shubina L. a Malkes L. Wittigovu reakci za použití {4-[(E)-2-fenylethenyl]benzyl}(trifenyl)phosphonium bromidu a 4-dimethylamino-benzaldehydu.⁴⁰

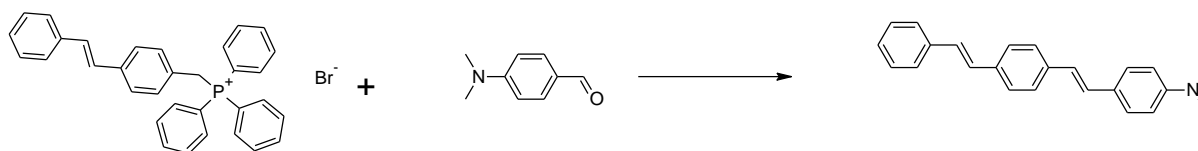
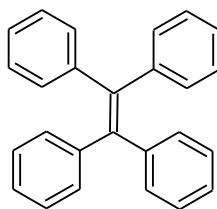


Schéma č.2: Wittigova syntéza distyrylbenzenu

10.2 Tetrafenylethylen

Jedná se o tetra substituovaný ethylen



Obr.16: Tetrafenylethylen

Možnost syntézy č. 1

První z variant syntézy je Cross McMurryho reakce, která uožňuje i syntézu nesymetrických sloučenin.⁴¹

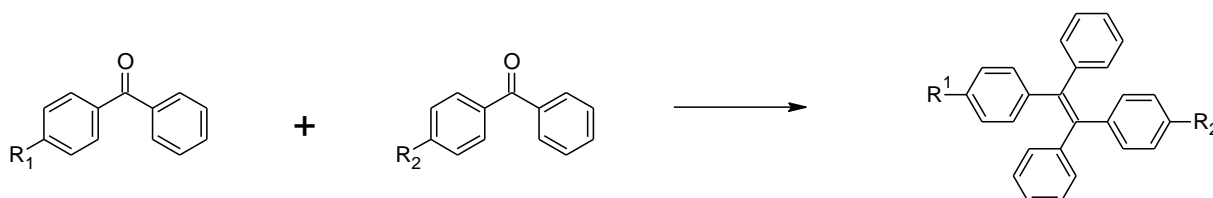


Schéma č.3: McMurryho syntéza tetrafenylethylenu

R1	R2	Zdroj
CH ₃	NH ₂	DUAN, Xin-Fang ⁴¹
Br	N(CH ₃) ₂	SHEN, Xiao Yuan ⁴²

Možnost syntézy č.2

Zou Chengxiang a Larock Richar výslednou látkou získali reakcí jodbenzenu, 4-(fenylethynyl)nitrobenzenu a 4-methylfenylboromové kyseliny.⁴³

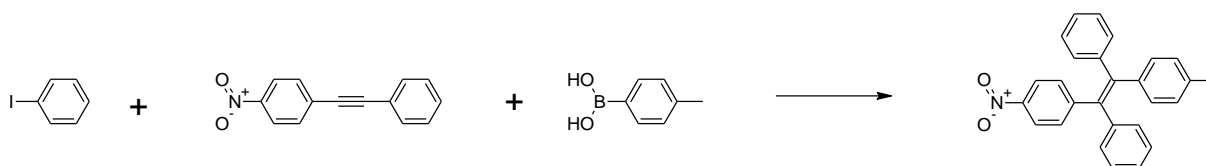


Schéma č. 4: syntéza tetrafenylethylenu

Možnost syntézy č.3

Huang a kol. výsledný substituovaný tetrafenylethylen připravili reakcí 4-ethenylpyridinu a {4-[2-(4-bromofenyl)-1,2-difenylvinyl]fenyl}difenylaminu za vzniku (4-{1,2-difenyl-2-[4-(2-pyridin-4-ylvinyl)fenyl]vinyl}fenyl)difenylaminu. Výsledný výtěžek byl pouze 33%.⁴⁴

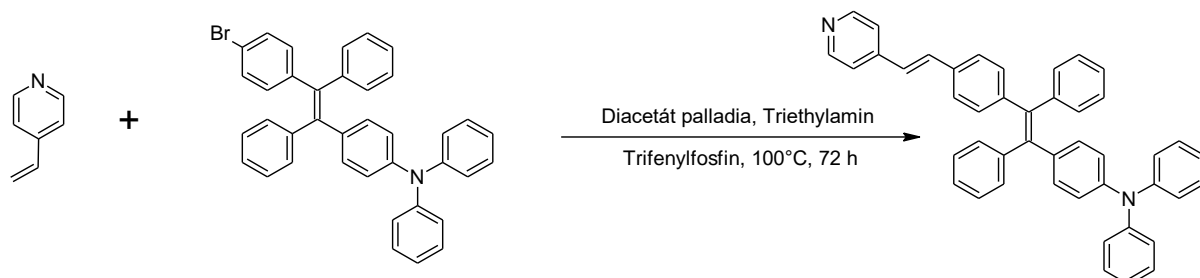
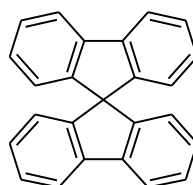


Schéma č.5:syntéza substituovaného tetrafenylethylenu

10.3 Spirobifluoren



Obr.17: Spirobifluoren

Možnost syntézy č. 1

V této syntéze vycházel Poriel a kol. z 2-jodo-1-phenylbenzenu a fluoren-9-onu. Výtěžek této reakce byl 90%.⁴⁵

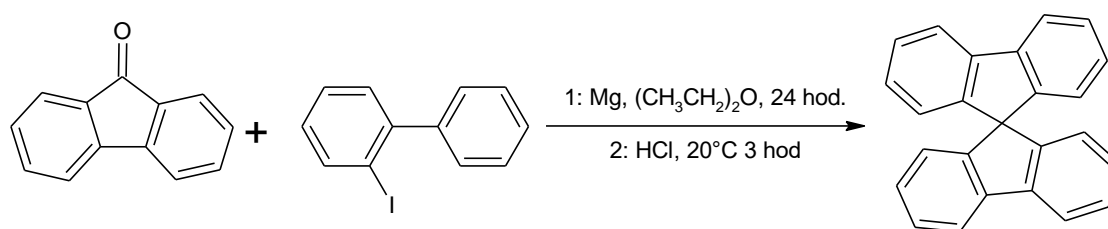


Schéma č.6: Syntéza spirobifluorenu z fluoren-9-onu

Možnost syntézy č. 2

Bhanuchandra a kol. nechali spolu reagovat dibenzothiofen sulfon a fluoren. Výtěžek celé reakce se pohyboval okolo 45%.⁴⁶

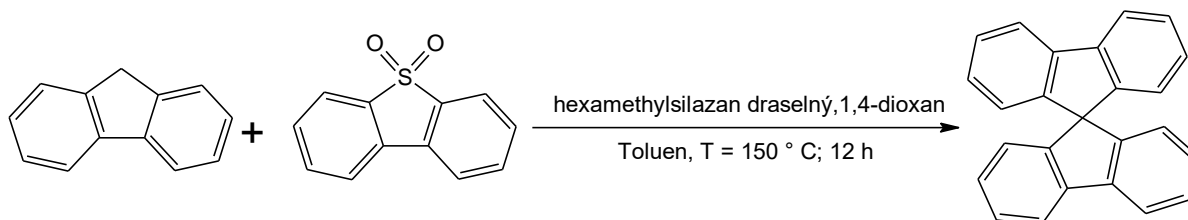


Schéma č.7: Syntéza spirobifluorenu z dibenzothiofen sulfonu

Experimentální část

Použité experimentální postupy

Všechny komerčně dostupné chemikálie byly zakoupeny od firmy Sigma Aldrich, Acros Organics, TCI nebo Merck Fluorochem. Sloupcová chromatografie byla prováděna na silikagelu (SiO_2 60 Å, velikost částic 0,060 - 0,200 mm, Acros Organics) za použití komerčně dostupných rozpouštědel nejčastěji n-hexan a ethyl-acetát. Tenkovrstvá chromatografie byla prováděna na hliníkových destičkách potažených silikagelem (SiO_2 60 F254 (Merck) s vizualizací pomocí UV lampy (254 nebo 360 nm). ^1H a ^{13}C NMR spektra byla měřena při laboratorní teplotě na přístroji Bruker AVANCE III 400 při frekvencích 400.13 resp. 100.62 MHz (pro ^{13}C). Základní interpretace NMR spekter byla provedena ve spolupráci se školitelem této bakalářské práce. Chemické posuny jsou uvedeny v jednotkách ppm vůči zbytkovému signálu rozpouštědla CDCl_3 nebo DMSO-d_6 . Interakční konstanty (J) jsou uvedeny v Hz. Pozorované signály jsou popsány jako s (singlet), br (široký singlet), d (dublet), t (triplet), a m (multiplet). Body tání byly měřeny na kapilárním bodotávku Buchi B-545. K další charakterizaci bylo využito servisního pracoviště elementární analýzy pracující s přístrojem Thermo Scientific Flash 2000 Organic elemental analyser.

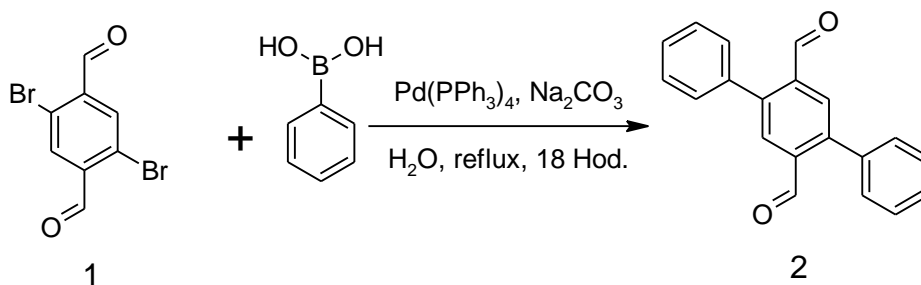
V Praktické části práce se budu dále zabývat syntézou výchozích látek, pro dvoufotonovou absorpci. Jednotlivé kroky syntézy byly sestaveny s vedoucím práce a byly rozděleny do jednotlivých kroků. Výsledkem laboratorní činnosti by mělo být ověření jednotlivých kroků syntézy a příprava výchozích látek pro organické chromofory.

Syntéza 1,1':4',1''-terphenyl-2',5'-dicarbaldehydu (2)

Účel experimentu: Připravit z výchozího dibrombenzendikarbaldehydu výsledný 1,1':4',1''-terphenyl-2',5'-dicarbaldehyd, který bude použit v dalším kroku přípravy

Princip experimentu: Jedná se o Suzukiho coupling, který spočívá v reakci dibrombenzendikarbaldehydu s fenolboronovou kyselinou.

Teoretická část



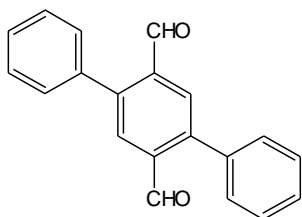
Postup přípravy:

Do 250 ml jednohrdlé baňky s kulatým dnem opatřené míchadlem byl předložen **1** (5g, 17.13 mmol), dále bylo přidáno 75 ml toulenu a (6,1g, 50 mmol) fenolboronové kyseliny. Stěny baňky byly opláchnuty toulenem a do baňky byl přiveden dusík který se nechal za stálého míchání probublávat zhruba 30 min. Poté bylo přidáno 12,5 ml (25 mmol) Na₂CO₃ a 1g (8.65 mmol) Pd(PPh₃)₄. Byl nasazen zpětný chladič. Směs byla míchána a zahřívána na 50 °C po dobu 18 hod, konec reakce byl stanoven pomocí TLC za použití fáze ethyl-acetát : n-hexan v poměru 1 : 3.

Izolace produktu:

Po 18. hodinách byla reakce ukončena přidáním 3x 50 ml vody, z vodné směsi byl produkt extrahován 50 ml ethanolu. Výsledný extrakt byl vysušen pomocí 20g Na₂SO₄ a zfiltrována přes vatku. Na rotační vakuové odparce (RVO) bylo oddestilováno rozpouštědlo při teplotě 60 °C a podtlaku 250 mbar. Produkt byl čištěn krystalizací z EtOH. Bylo získáno 3,35g **2**, což odpovídá 67 % vůči teorii.

1,1':4',1''-terphenyl-2',5'-dicarbaldehyde (2)



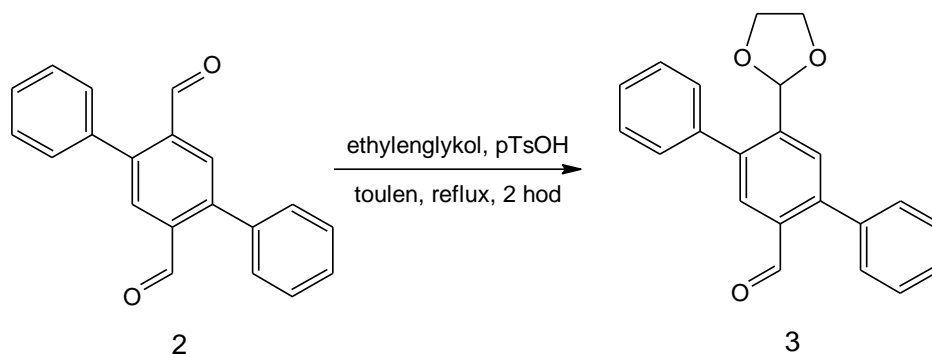
Nažloutlá krystalická látka, výtěžek 67%, b.t.:196,8 – 198,3 °C. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 10.15 (2H, s, CHO), 8.18 (2H, s, Ar- $\underline{\text{H}}$), 7.60 - 7.56 (6H, m, Ar- $\underline{\text{H}}$), 7.53 - 7.50 (4H, m, Ar- $\underline{\text{H}}$). ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ 192.0, 144.8, 136.7, 136.6, 130.4, 130.3, 128.95, 128.90. **Elementární analýza** pro $\text{C}_{20}\text{H}_{14}\text{O}_2$: Vypočteno

(%): C 83.19; H, 4.93. Nalezeno (%): C 82.15; H 4.85.

Syntéza 5'-(1,3-dioxolan-2-yl)-1,1':4',1''-terphenyl-2' carbaldehydu (**3**)

Účel experimentu: Parciální ochrana jedné aldehydické skupiny převedením na monoacetál

Teoretická část:



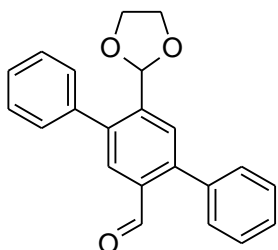
Postup přípravy:

Do 500 ml jednohrdlé baňky opatřené míchadlem byl předložen **2** (2g, 6.98 mmol), který byl rozpuštěn v 100ml toulenu. Dále byl přidán ethyl-acetát a katalické množství (0,1g, 0.58 mmol) kyseliny p-toulensulfonové. Byl nasazen Dean Starkův nástavec k odebrání vody v průběhu reakce. Byl prováděn reflux po dobu 2 hod, konec reakce byl stanoven pomocí TLC za použití fáze ethyl-acetát : n-hexan v poměru 2 : 2.

Izolace produktu:

Izolace produktu byla provedena sloupcovou chromatografií. Směs byla odpařena se 100 g silikagelu na rotační vakuové odparce (RVO) při teplotě 50°C a podtlaku 10 mb do sucha. Připravila se kolona s navázkou 200 g silikagelu a fází n-hexan – EtOAc odpovídající poměru 1:3. Nejdříve byla odebrána čistá fáze (750 ml) a poté byla odebrána fáze obsahující separovaný produkt (**3**) (1250 ml). Získané frakce se spojily a odpařily na RVO do sucha. Výsledkem bylo získání 2,35 g (**3**), což odpovídá výtěžku 92,5 % vůči teorii.

5'-(1,3-dioxolan-2-yl)-1,1':4',1''-terphenyl-2'-carbaldehydu (3)

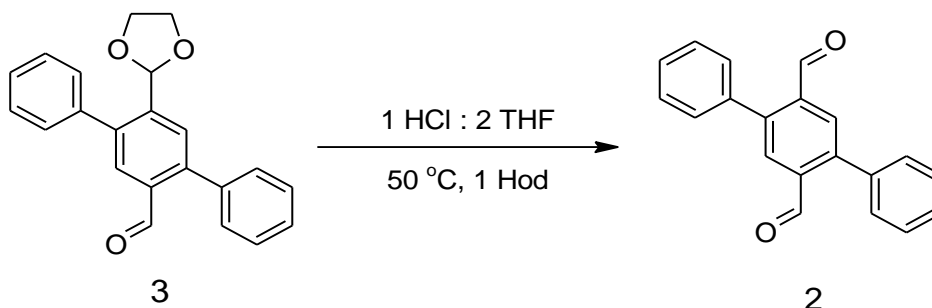


Bílá krystalická látka, výtěžek 92,5 %. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 10.03 (1H, s, CHO), 7.98 (1H, m, Ar-H), 7.83 (1H, m, Ar-H), 7.51 - 7.43 (10H, m, Ar-H), 5.74 (1H, s, CH), 4.19 - 4.16 (2H, m, OCH_2), 3.98 - 3.95 (2H, m, CH_2O). $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): δ 192.3, 144.9, 141.9, 140.1, 138.7, 137.7, 134.0, 130.4, 129.9, 129.6, 129.5, 129.0, 128.7, 128.42, 128.41, 127.9, 100.8, 65.9. **Elementární analýza** pro $\text{C}_{22}\text{H}_{18}\text{O}_3$: Vypočteno (%): C 79.98; H, 5.49. Nalezeno (%): C 79.25; H 5.50.

Redukce 5'-(1,3-dioxolan-2-yl)-1,1':4',1''-terphenyl-2'-carbaldehydu (2)

Účel experimentu: Zpětná redukce monoacetálu na dikarbaldehyd z důvodu objevení jednodušší a časově méně náročné ochrany jedné aldehydické skupiny.

Teoretická část:



Postup přípravy:

Do 500 ml jednohrdlé baňky opatřené míchadlem byl předložen **3** (2.35g, 6.96 mmol), který byl rozpuštěn v 54 ml THF, následně bylo přidáno 7.4 ml 10% HCl. Reakční baňka byla uzavřena a míchána 1 hodinu. Konec reakce byl stanoven pomocí TLC za použití fáze ethyl-acetát : n-hexan v poměru 3 : 1.

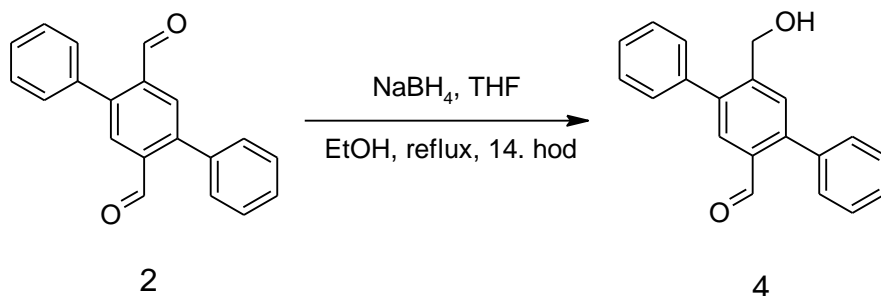
Izolace produktu:

Reakce byla ukončena přidáním 50 ml vody, z vodné směsi byl produkt extrahován 3x 50 ml ethyl - acetátu. Výsledný extrakt byl vysušen pomocí 20 g Na₂SO₄ a zfiltrována přes vatku. Na rotační vakuové odparce (RVO) bylo oddestilováno rozpouštědlo při teplotě 60 °C a podtlaku 200 mbar. Výsledkem bylo získání 1.97g (**2**), což odpovídá 98.9% vůči teorii.

Syntéza 5'-(hydroxymethyl)-1,1':4',1''-terphenyl-2'-karbaldehydu (4)

Účel experimentu: Ochrana jedné aldehydické skupiny spočívající v redukcí aldehydu na alkohol.

Teoretická část:



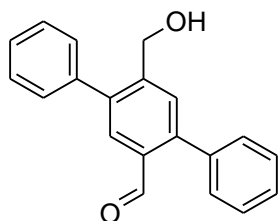
Postup přípravy:

Do 500 ml tříhrdlé baňky opatřené míchadlem byl předložen **2** (1.973g, 6.89 mmol), který byl rozpuštěn v 20 ml THF. Bylo přidáno 20 kapek Et-OH a najednou 65mg (1.72 mmol) NaBH₄. Reakční směs byla míchána po dobu 14 hod. Barva se změnila ze žluté na hnědou. Konec reakce byl stanoven pomocí TLC za použití fáze ethyl- acetát : n-hexan v poměru 3 : 1.

Izolace produktu:

Izolace produktu byla provedena sloupcovou chromatografií. Směs byl odpařena se 100 g silikagelu na rotační vakuové odparce (RVO) při teplotě 50 °C a podtlaku 10 mbar do sucha. Připravila se kolona s navázkou 200 g silikagelu a fází n-hexan : ethyl- acetát odpovídající poměru 1:3. Nejdříve byla odebrána čistá fáze (400 ml) a poté byla odebrána fáze obsahující separovaný produkt (**4**) (580 ml). Získané frakce se spojily a odpařily na RVO do sucha. Výsledkem bylo získání 0,5g produktu, což odpovídalo 25,3 % vůči teorii. Takto nízký výtěžek byl způsoben kontaminací kyselinou sírovou.

5'-(hydroxymethyl)-1,1':4',1''-terphenyl-2'-karbaldehydu (4)



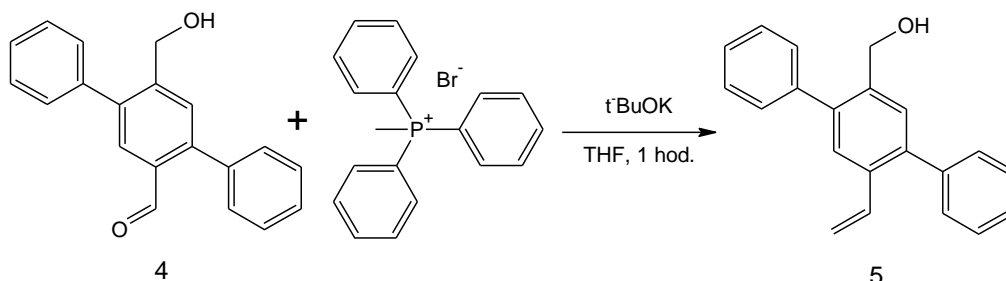
Bílá krystalická látka, výtěžek 25,3% ,b.t.: 118.8 – 119.2 °C. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 10.03 (1H, s, CHO), 7.98 (1H, m, Ar-H), 7.73 (1H, m, Ar-H), 7.53 - 7.38 (10H, m, Ar-H), 4.75 (2H, s, CH₂), 1.91 (1H, s, OH) ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 192.3, 145.1, 143.9, 140.4, 139.0, 137.5, 130.15, 130.1, 129.0, 128.9,

128.54, 128.52, 128.24, 127.9, 62.8. **Elementární analýza** pro $C_{20}H_{16}O_2$: Vypočteno (%): C 83.31; H, 5.59. Nalezeno (%): C 82.57; H 5.78. **HRMS**: m/z pro $C_{20}H_{16}O_2$ vypočteno $[M^+]$ 288.11503 Da, nalezeno $[M^+]$ 288.11482 Da.

Syntéza (5'-ethenyl-1,1':4',1''-terphenyl-2'-yl) methanolu (5)

Účel experimentu: ukončení větvení struktury na jednom aldehydu

Teoretická část:



Postup přípravy:

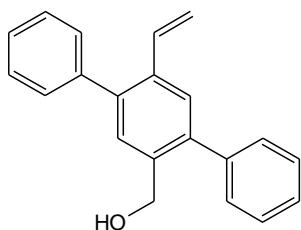
Do 50 ml tříhrdlé baňky opatřené míchadlem byl předložen **4** (0.37g, 1.73 mmol), dále byl přidán MTPPBr⁻ (1.85g, 1.72 mmol). Do vysekurované baňky bylo přidáno 25 ml čerstvě predestilovaného THF. Posléze byl po kapkách přidán tBuOK (0.57ml, 5.04 mmol). V průběhu přidávání byla reakční směs chlazena na 5°C. Po nadávkování se nechala reakční směs míchat 2 hod. Po 2 hodinách byl průběh reakce stanoven pomocí TLC za použití fáze ethyl-acetát : n-hexan v poměru 3 : 1 s v neuspokojivým výsledkem. Proto bylo v 50ml jednohrdlé baňce připraven směs MTPPBr a t-BuOK v THF (ve stejném poměru při stejném postupu práce). Takto připravený ylid ovšem vytvořil suspenzi, která nešla injekční stříkačkou nadávkovat do již stávající směsi. Z tohoto důvodu byla reakce ukončena a **4** byl zpětně vyextrahován.

Již podle zmíněného postupu byl připraven ylid v dvojnásobném nadbytku vůči **4**. Vyextrahovaný **4** z předchozího kroku byl rozpuštěn v 20 ml THF. Takto rozpuštěná látka byla pomocí injekční stříkačky přidána již k připravenému ylidu. Směs byla míchána po dobu 2 hodin. Konec reakce byl stanoven pomocí TLC za použití fáze ethyl-acetát : n-hexan v poměru 3 : 1.

Izolace produktu:

Produkt byl čištěn pomocí sloupcové chromatografie. Vzorek byl odpařen se 30 g silikagelu do sucha. Připravila se kolona s navázkou 100 g silikagelu za použití fáze ethyl-acetát : n-hexan v poměru 3:1. Celková spotřeba fáze byla 700ml. Nejdříve byla odebrána čistá fáze (400 ml) a poté byla odebrána fáze obsahující separovaný produkt (**5**) (300 ml). Získané frakce se spojily a odpařily na rotační vakuové odparce (RVO) při teplotě 50 °C a podtlku 10 mbar do sucha. Bylo získáno 132mg produktu (**5**), což odpovídá 35,6 % vůči teorii.

(5'-ethenyl-1,1':4',1''-terphenyl-2'-yl) methanol (5)

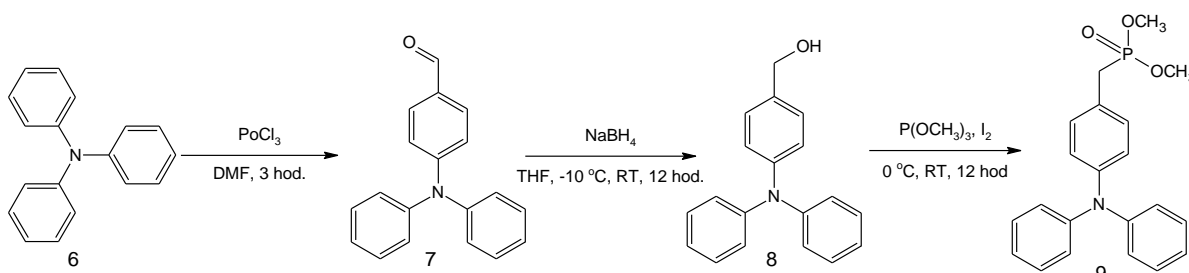


Bílá krystalická látka, výtěžek 35,6 %, b.t.: 110.6 – 111.5 °C. **¹H NMR** (500 MHz, CDCl₃): δ 7.61 (1H, m, Ar-H), 7.52 – 7.40 (10H, m, Ar-H), 7.28 (1H, s, OH), 6.78 (1H, d,d, J= 10.96 MHz ,J= 11.28, CH), 5.77 (1H, d, d, J=0.86 MHz, J=17.58 MHz. CH), 5.24 (1H, d, d, J=0.86 MHz, J=11.15 MHz. ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 140.3, 137.5, 135.4, 130.3, 129.9, 129.2, 128.5, 128.2, 127.5, 127.4, 127.2, 115.1, 63.0. **Elementární analýza** pro C₂₁H₁₈O: Vypočteno (%): C 88.08; H,6.34. Nalezeno (%): C 88.20; H 6.43. **HRMS**: m/z pro C₂₁H₁₈O vypočteno [M⁺] 286.135765 Da, nalezeno [M⁺] 286.13502 Da.

Syntéza dimethyl [4-(difenylamino)benzyl]fosfonátu (7)

Účel experimentu: Tříkrokovou syntézou připravit z výchozího trifenylaminu výsledný dimethyl [4-(difenylamino)benzyl]fosfonát, který je výchozí látkou pro syntézu látek, které vykazují dvoufotonovou absorpci.

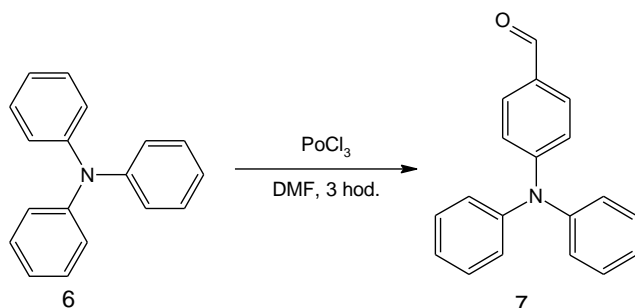
Teoretická část



Jednotlivé stupně reakce:

1) Syntéza N-difenylamino benzaldehydu

Teoretická část:

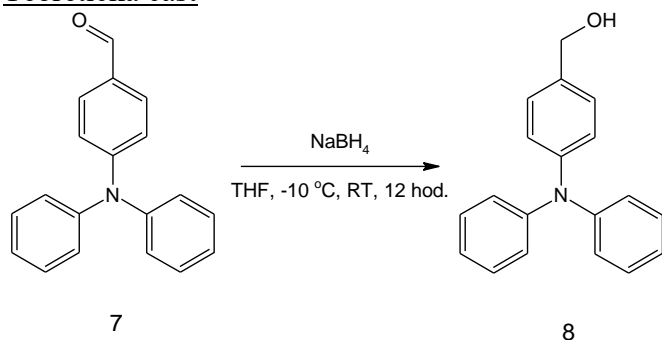


Postup přípravy:

Do 500 ml tříhrdlé baňky opatřené míchadlem bylo předloženo 75 ml DMF a **6** (15g, 61.14 mmol). Baňka byla schlazena na 0°C a poté byl přidán POCl_3 (5.72ml, 61.14 mmol). Roztok změnil barvu ze žluté na zelenou barvu. Směs se nechala zahřát na $80\text{--}85^\circ\text{C}$ a byla míchána 3 hodiny. Poté byl celý obsah baňky nalit na vodu s ledem. Šedá suspenze byla zfiltrována a bez čištění byla použita v druhém kroku syntézy.

2) Syntéza [4-(diphenylamino)phenyl] metanolu (8)

Teoretická část



Postup přípravy:

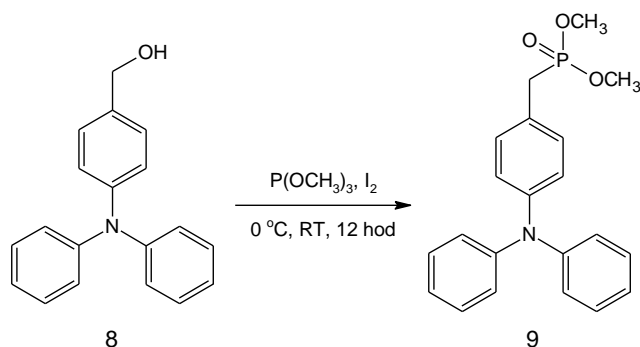
Do 1000 ml tříhrdlé baňky opatřené míchadlem byl předložen **7** (15.47g, 56.6 mmol), který byl rozpuštěn v 150 ml THF. Vzniklá směs byla schlazena na -10 °C a posléze byl nadávkován NaBH_4 (2.79g, 78.69 mmol). Po nadávkování byla směs míchána po dobu 12 hodin. Konec reakce byl stanoven pomocí TLC za použití fáze ethyl-acetát : n-hexan v poměru 3 : 1.

Izolace produktu:

Reakce byla ukončena přidáním zhruba 150 ml vody. Produkt byl vyextrahován přidáním 3x 50ml ethyl-acetátu. Produkt byl bez čištění použit v dalším kroku.

3) Syntéza dimethyl [4-(diphenylamino)benzyl]phosphonatu (9)

Teoretická část:



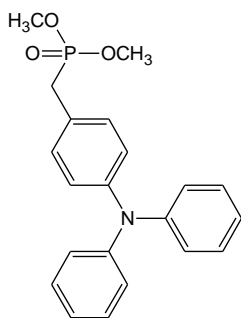
Postup přípravy:

Do 1000 ml tříhrdlé baňky byl předložen **8** (14.93g, 54.22 mmol), který byl rozpuštěn ve 150ml trimethylfosfitu. Reakční směs byla schlazena na -5 °C a poté byl postupně nadávkován jod (13.88g, 54.22 mmol). Při RT byla směs míchána 12 hodin. Konec reakce byl stanoven pomocí TLC za použití fáze ethyl-acetát : n-hexan v poměru 3.5 : 0.5.

Izolace produktu:

Produkt byl izolován sloupcovou chromatografií. Vzorek byl odpařen se silikagelem na rotační vakuové odparce (RVO) při teplotě 50°C a podtlaku 250mb. Poté byla provedena sloupcová chromatografie za použití fáze ethyl-acetát : n-hexan v poměru 5:1. Nejdříve byla odebrána čistá fáze (950 ml) a poté byla odebrána fáze obsahující fosfonát (**9**) (550 ml). Získané frakce se spojily a odpařily na RVO do sucha.

dimethyl [4-(diphenylamino)benzyl]phosphonatu (9)



Světle fialová látka, výtěžek 56 %, b.t.: 76 - 78 °C. **¹H NMR** (400 MHz, DMSO-d₆): δ 7.30 - 7.26 (4H, m, Ar-H), 7.20 - 7.18 (2H, Ar-H), 7.04 - 6.93 (8H, m, Ar-H), 3.67 (1H, d, *J* = 7.5 Hz, CH), 3.67 (6H, s, CH), 3.20 (1H, d, *J* = 7.5 Hz CH). **¹³C NMR** (100 MHz, DMSO-d₆): δ 147.9, 146.4, 146.4, 131.5, 131.4, 130.1, 124.4, 124.3, 124.3, 123.5. **Elementární analýza** pro C₂₁H₂₂NO₃P:

Vypočteno (%): C 68.66; H, 6.04 N 3.8. Nalezeno (%): C 68.22; H 6.0, N 3.52. **HRMS**: m/z pro C₂₁H₂₂NO₃P vypočteno [M⁺] 367.13373 Da, nalezeno [M⁺] 367.13318 Da

11. Diskuze výsledků

V tříkrokové syntéze byl připraven výsledný (5'-ethenyl-1,1':4',1''-terphenyl-2'-yl) methanol (**5**), jeho syntéza vycházela z dibrombenzendikarbaldehydu. Následovala parciální ochrana aldehydické skupiny pomocí ethylenglykolu. Tato ochrana byla ovšem nevyhovující z důvodu špatného dělení směsi na čistý monoacetál. Proto v následujícím kroku byl směr převedena zpět na původní dialdehyd (**2**). Pro ochranu jednoho aldehydu byl objeven jednodušší způsob parciální ochrany, který spočívá v redukci aldehydu na alkohol (**4**). V posledním kroku syntézy byla provedena Wittigova reakce za použití trifenylofosfonia bromidu za vzniku výsledného (5'-ethenyl-1,1':4',1''-terphenyl-2'-yl) methanol (**5**)

Další prováděný experiment zahrnoval tříkrokovou syntézu dimethyl [4-(diphenylamino)benzyl] fosfonátu (**9**). Syntéza výsledného fosfonátu vycházela z trifenyloaminu, který byl v prvním kroku převeden na aldehyd (**7**). Následovala redukce aldehydu na alkohol (**8**) a v posledním kroku byla provedena reakce alkoholu s trimethylfosfinem za vzniku výsledného fosfonátu (**9**)

12. Závěr

Práce podává souhrnné informace o dvoufotonové absorpci a o jednotlivých způsobech měření TPA spekter. Na základě dostupné literatury jsou v práci rozděleny molekuly s dvoufotonovou absorpcí do 4 základních skupin. U jednotlivých skupin jsou uvedeny základní struktury, ke kterým jsou dodány i jejich TPA průřezy. Dále jsou v práci vypsány jednotlivé možnosti využití, přičemž je hlavní důraz kladen na dvoufotonovou mikroskopii. Dle výše zmíněné teorie o dvoufotonové absorpci byly vybrány 3 základní struktury, u kterých byla formou literární rešerše vypracována metodika jejich syntéz.

V experimentální části práce byl připraven (5-ethenylterfenyl-2-yl) methanol. U tohoto experimentu byl vyvinut a aplikován nový způsob ochrany jedné aldehydické skupiny, který spočívá v převedení aldehydu na alkohol. Tímto postupem byl nahrazen původní způsob ochrany, který spočíval v převedení aldehydu na acetál. Díky obměně byla samotná syntéza výsledné látky zkrácená o jeden krok, který obsahoval zdlouhavé a zároveň špatně proveditelné dělení směsi sloupcovou chromatografií. Produkt se získal v dostatečné kvalitě a čistotě, aby mohl být využit k samotné syntéze látky s dvoufotonovou absorpcí.

V druhé části experimentální práce byl připraven dimethyl [4-(difenylamino)benzyl]fosfonát, což je významný meziproduct při syntéze látek s TPA.

Provedené experimenty jsem vyzkoušel a u syntézy fosfonátu i převedl do většího měřítko. Reakce, které jsem prováděl nebyly časově ani po technické stránce nikterak náročné. Avšak konečné rozdělování směsí pomocí sloupcové chromatografie bylo velmi časově náročné. V dalších experimentech by bylo vhodné vyvinout nový způsob syntézy výsledných produktů, bez použití této separační metody. Jako další možnost experimentální činnosti vidím v syntéze samotných látek s TPA a zdokonalování jejich přípravy, které by vedlo k hojnějšímu využití jak v medicíně, tak i v jiných oborech.

13. Zdroje

- ¹ Borodkin, V. F. *Chemie organických barviv*; Státní nakladatelství technické literatury: Praha, 1987.
- ² KRÁLÍK, Jiří. *Počátky moderní éry poznávání mikrosvěta*. Pokroky matematiky, fyziky a astronomie. Praha 2007.
- ³ LAPČÍK, L.; et al. *Fotochemické procesy*; Alfa: Bratislava, 1989.
- ⁴ Skripta z Fyziky II na FT UTB, Elektromagnetické vlny [online]. [Cit. 2017-04-8].
- ⁵ Fišar, Z. Principy fluorescenční spektroskopie, 2003. Fluorescenční mikroskopie v neurověděch.(accessed May 15, 2017).
- ⁶ Valeur, B. [Molecular Fluorescence](#), 1st ed.; Weinheim:: Wiley-VCH, 2002.
- ⁷ Davidson, W. [Molecular Expression](#)s.1998. Fluorescence Microscopy. .(accessed May 15, 2017).
- ⁸ Kočárek, E.; Pánek, M.; Novotná, D. *Klinická cytogenetika I.: úvod do klinické cytogenetiky: vyšetřovací metody v klinické cytogenetice*, 2nd ed.; Praha-Karolinum, 2010.
- ⁹ Lakowicz, J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 2nd ed.; Springer Science+Business Media: Singapor, 2006
- ¹⁰Pelant, I.; Valenta, J. *Luminiscenční spektroskopie: I. Objemové krystalické polovodiče*; Nakladatelství Academia: Praha, 2006.
- ¹¹ Pawlicky, M.; Hazel, M.; Anderson, H.; Denning, N. Two-Photon Absorption and the Design of Two-Photon Dyes. *Angew. Chem.* [Online] **2009**, 3244-3266. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/anie.200805257/full> (accessed June 10, 2017).
- ¹² Strehmel, M.; Strehmel, B. Two-Photon Physical, Organic, and Polymer Chemistry: Theory, Techniques, Chromophore Design, and Applications. *Adv. Photochem.* [Online] **2007**, 111-354. (accessed May 18, 2001).

-
- ¹³Kamada, D.; et al. Two-photon-absorption-induced accumulated thermal effect on femtosecond Z-scan experiments studied with time-resolved thermal-lens spectrometry and its simulation.. *Josa B* **2003**, *20* (3), 529–537.
 - ¹⁴ Sheik-Bahae, M.; Saide, A. [Sensitive measurement of optical nonlinearities using a single beam](#). *Journal of Quantum Electronics* **2002**.
 - ¹⁵ Makarov, N.; Drobizhev, M.; Rebane, A. [Two-photon absorption standards in the 550-1600 nm excitation wavelength range](#). *Optics Express* [Online] **2008**, 4029-4047.
 - ¹⁶Xu, Ch.; Watt, W. [Measurement of two-photon excitation cross sections of molecular fluorophores with data from 690 to 1050 nm](#). *J. Opt. Soc. Am. A* **1996**, *13/3*, 481–491.
 - ¹⁷ Signorini, N.; et al. Effective [Two-Photon Absorption](#) Cross Section of Heteroaromatic Quadrupolar Dyes: Dependence on Measurement Technique and Laser Pulse Characteristics. *Indian J. Chem., Sect. A: Inorg., Phys., Theor. Anal.* **2008**, *112* (18), 4224–4234.
 - ¹⁸ Hwan, M. [Small-Molecule Two-Photon](#) Probes for Bioimaging Applications. *Chem. Rev. (Washington, D.C.)* **2015**, *115* (11), 5014–5055.
 - ¹⁹ Guang, S.; et al. [Multiphoton Absorbing](#) Materials: Molecular Designs, Characterizations, and Applications. *Chem. Rev. (Washington, D.C.)* **2008**, *108* (4), 1245–1330.
 - ²⁰Hwan, M. [Two-photon materials](#) with large two-photon cross sections. Structure–property relationship. *Chem. Commun.* **2009**, *2*, 153–164.
 - ²¹ Grzybowski, M. Diketopyrrolopyrroles: Synthesis, Reactivity, and Optical Properties. *advanced optical materials* **2015**, *3* (3), 280–320.
 - ²²Schmitt, J.; et al. [Diketopyrrolopyrrole-Porphyrin](#) Conjugates with High Two-Photon Absorption and Singlet Oxygen Generation for Two-Photon Photodynamic Therapy. *Angew. Chem.* **2015**, *54* (1), 169–173.
 - ²³ Guo, E. [Diphenylamine end-capped](#) 1,4-diketo-3,6-diphenylpyrrolo[3,4-c]pyrrole (DPP) derivatives with large two-photon absorption cross-sections and strong two-photon excitation red fluorescence. *Chem. Commun.* **2009**, *39*, 5859–5861.
 - ²⁴ Čech, S.; Horký, D. *Přehled obecné histologie*; Masarykova univerzita v Brně: Brno, 2005.

-
- ²⁵Bong, R.; et al. Two Photon Absorption Properties of 1,3,5-Tricyano-2,4,6-tris(styryl)benzene Derivatives. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123* (41), 10039–10045
- ²⁶ Bonnett, R. [Photosensitizers of the porphyrin](#) and phthalocyanine series for photodynamic therapy. *Chem. Soc. Rev.* **1995**, *24* (1), 19–33.
- ²⁷ Albota, M.; Xu, Ch.; Web, W. [Two-photon fluorescence](#) excitation cross sections of biomolecular probes from 690 to 960 nm. *Appl. Opt.* **1998**, *37* (31), 7352–7356.
- ²⁸ Wang, X. A chemically labeled cytotoxic agent: Two-photon fluorophore for optical tracking of cellular pathway in chemotherapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1999**, *96* (20), 11081–11084.
- ²⁹ Kwan, M.; et al. Two-Photon Fluorescent Turn-On Probe for Lipid Rafts in Live Cell and Tissue. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *130* (13), 4246–4247.
- ³⁰ Kwan, M.; et al. Two-Photon Fluorescent Probes for Intracellular Free Zinc Ions in Living Tissue†. *Angew. Chem.* **2008**, *120* (28), 5245–5248.
- ³¹ Kawata, S.; et al. Finer features for functional microdevices. *Nature* **2001**, *412* (6848), 697–698.
- ³² Jia, B.; et al. Two-Photon Polymerization for Three-Dimensional Photonic Devices in Polymers and Nanocomposites. *Aust. J. Chem.* **2007**, *60* (7), 484–495.
- ³³ Lee, K. Recent developments in the use of two-photon polymerization in precise 2D and 3D microfabrications. *Polym. Adv. Technol.* **2006**, *17* (2), 72–82.
- ³⁴ Parthenopoulos, D. Three-dimensional optical storage memory.. *science* **1989**, *245* (4920), 843.
- ³⁵ Kawata, S.; Kawata, Y. Three-dimensional optical data storage using photochromic materials. *Chemical reviews* **2000**, *100* (5), 1777–1788.
- ³⁶ Walker, E.; et al. Two-photon technology: A new dimension. *Nature Photonics* **2008**, *2* (7), 406–408.
- ³⁷ Rost, F. *Fluorescence microscopy*; Cambridge University Press: N.Y., 1995.
- ³⁸ Hofr, C. [Fluorescenční mikroskopie](#). is.muni.
https://is.muni.cz/el/1431/podzim2014/C7230/um/6053971/6056654/12_mikroskopie.pdf
(accessed May 15, 2017).

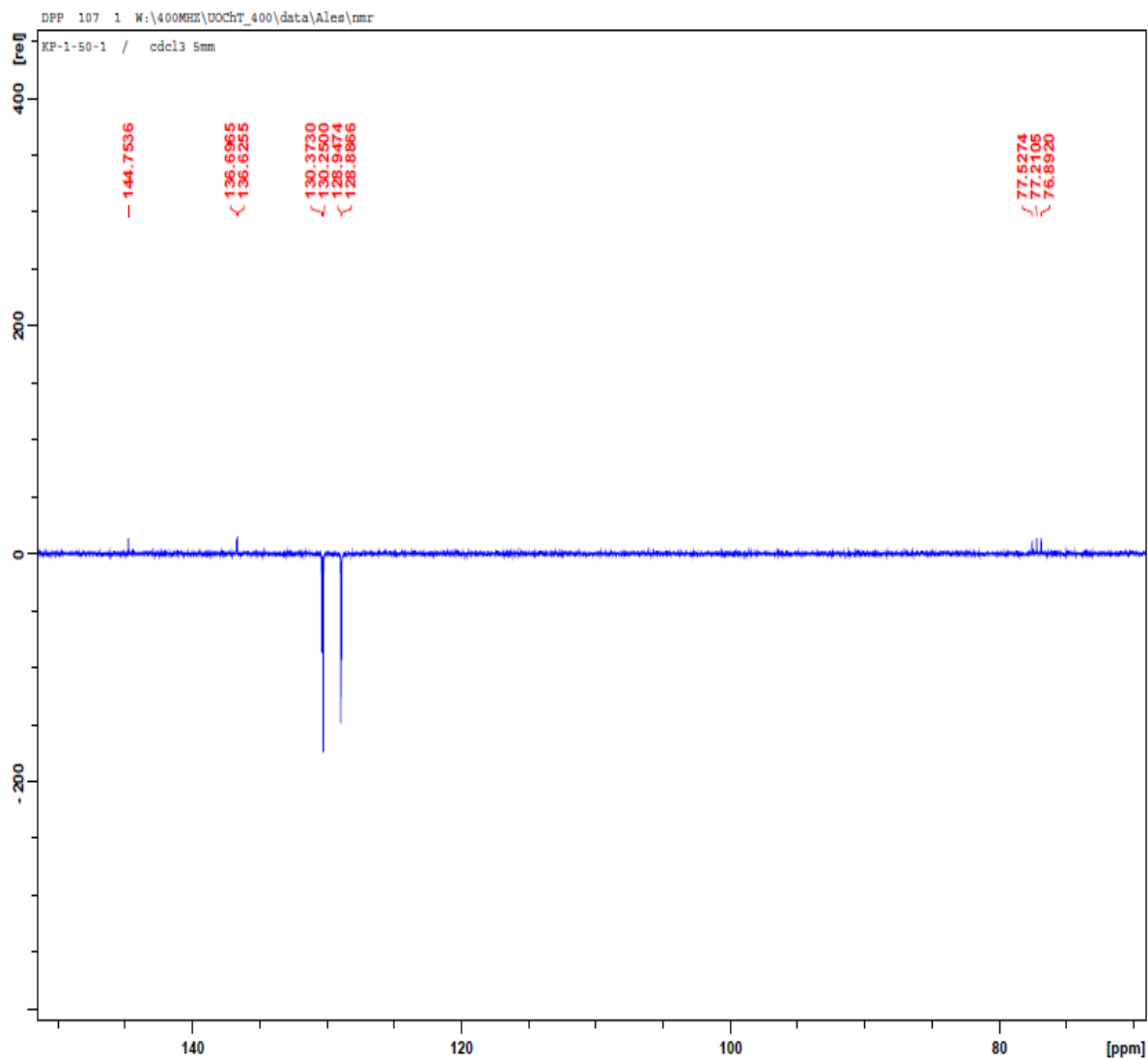
-
- 39 Myung, L.; et al. [Novel azo octupoles](#) with large first hyperpolarizabilities. *Journal of Materials Chemistry* **2003**, *13* (5), 1030–1037.
- 40 SHUBINA, L. V., MALKES, L. *Zhurnal Organicheskoi Khimii*, **1965**, 1 (5), 896 - 898
- 41 Duan, X.; et al. Insights into the general and efficient cross McMurry reactions between ketones. *The Journal of organic chemistry* **2006**, *71* (26), 9873–9876.
- 42 Shen, X. [Conjugates of tetraphenylethene](#) and diketopyrrolopyrrole: tuning the emission properties with phenyl bridges. *Chemical Communications* **2014**, *50* (63), 8747–8750
- 43 Zhou, Ch. Regio- and stereoselective route to tetrasubstituted olefins by the palladium-catalyzed three-component coupling of aryl iodides, internal alkynes, and arylboronic acids. *The Journal of organic chemistry* **2005**, *70* (10), 3765–3777.
- 44 Huang, S.; et al. Handy ratiometric detection of gaseous nerve agents with AIE-fluorophore-based solid test strips. *J. Mater. Chem.* **2016**, *4* (42), 10105–10110
- 45 Poriel, C.; et al. [Synthesis and stereochemical](#) studies of di and tetra 9, 9'-spirobifluorene porphyrins: new building blocks for catalytic material. *Tetrahedron* **60** (1), 145–158.
- 46 Bhanuchandra, M.; et al. Synthesis of Spirocyclic Diarylfluorenes by One-Pot Twofold SNAr Reactions of Diaryl Sulfones with Diarylmethanes. *Organic letters*. **2016**, *18* (3), 384–387.

Sezam příloh:

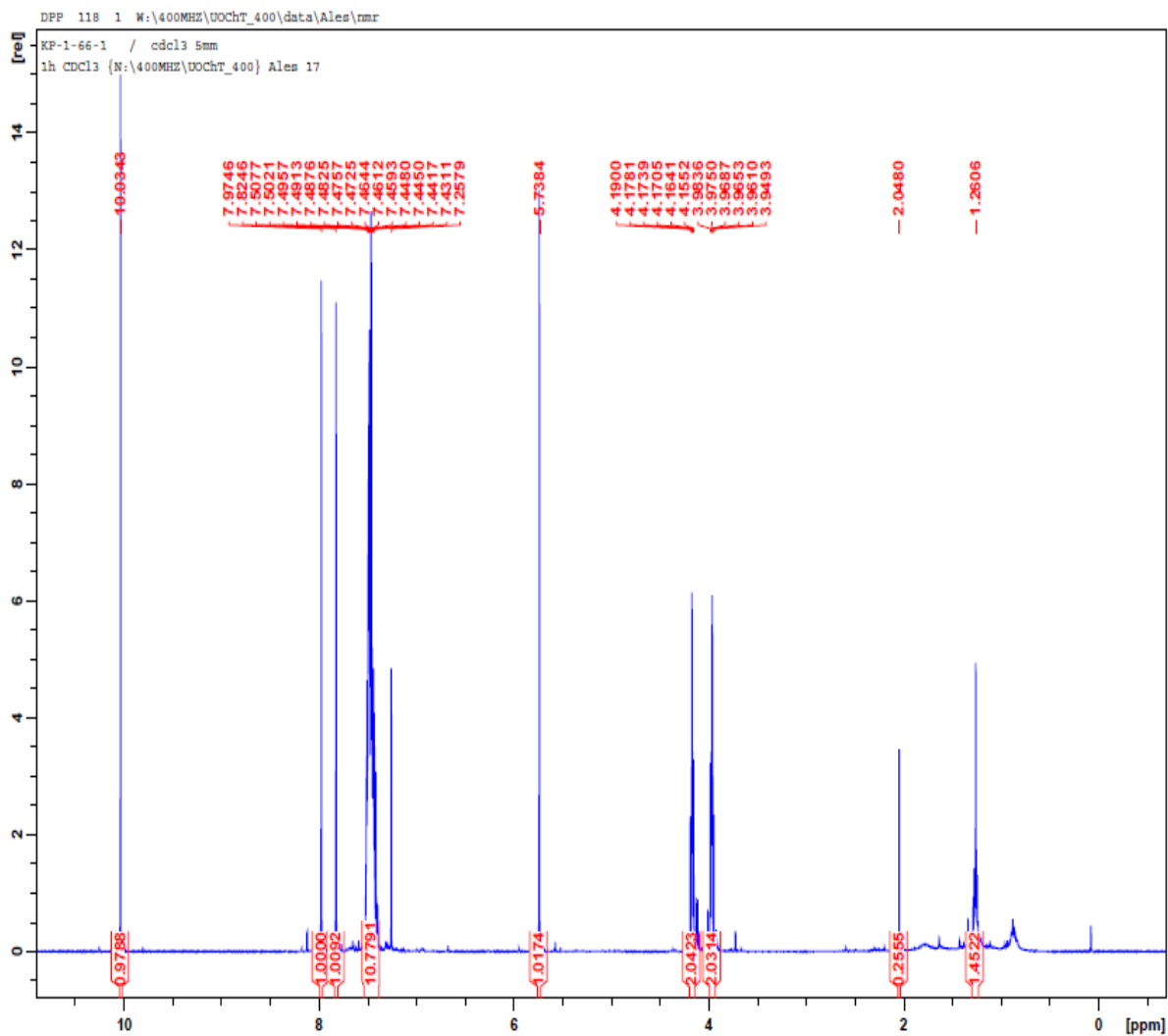
1. ^{13}C NMR pro (2)
2. ^1H NMR pro (2)
3. ^{13}C NMR pro (3)
4. ^1H NMR pro (3)
5. ^{13}C NMR pro (4)
6. ^1H NMR pro (4)
7. ^{13}C NMR pro (5)
8. ^1H NMR pro (5)
9. ^{13}C NMR pro (9)
10. ^1H NMR pro (9)
11. HRMS pro (4)
12. HRMS pro (5)
13. HRMS pro (6)

Přílohy:

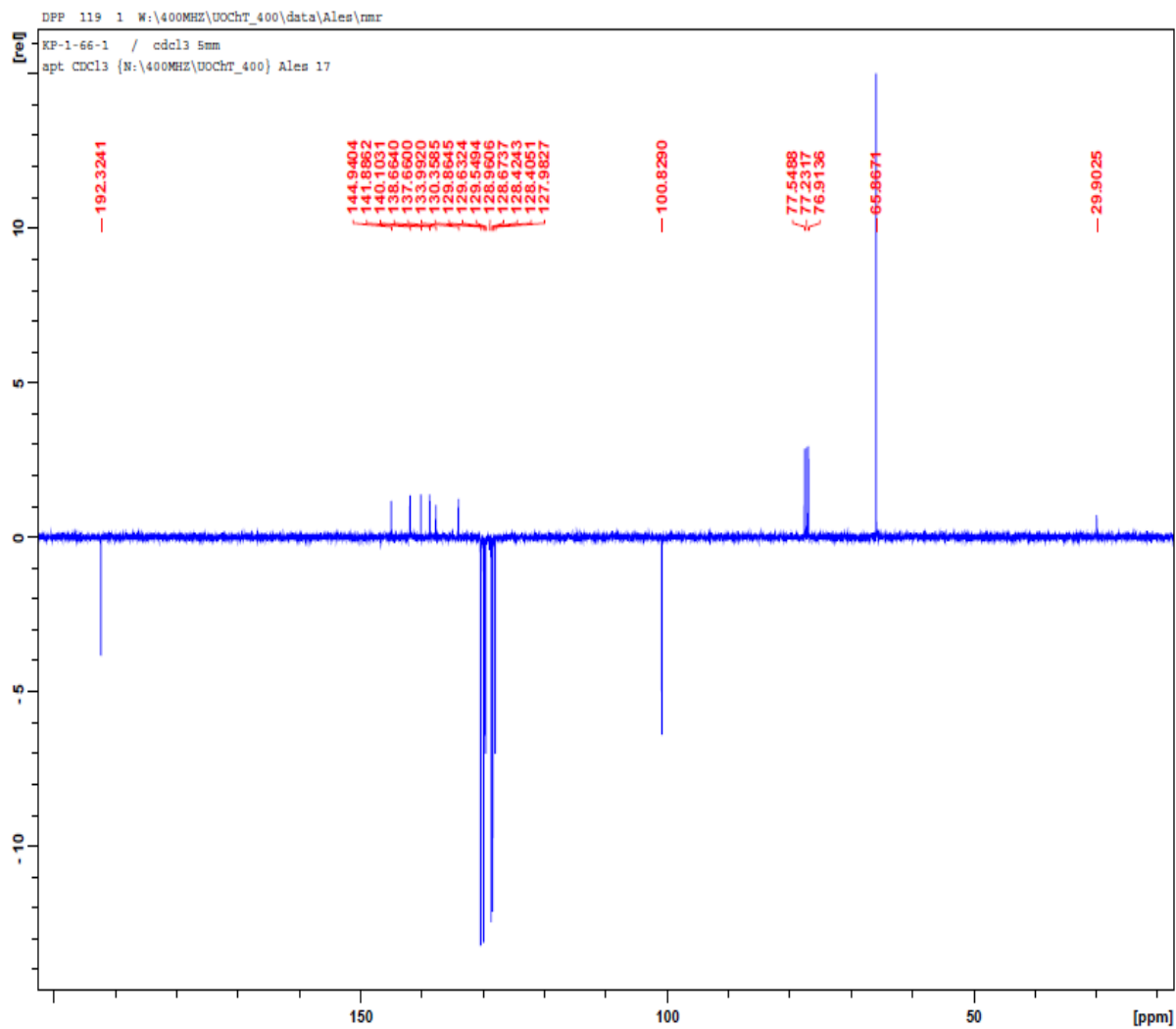
1. ^{13}C NMR pro (2)



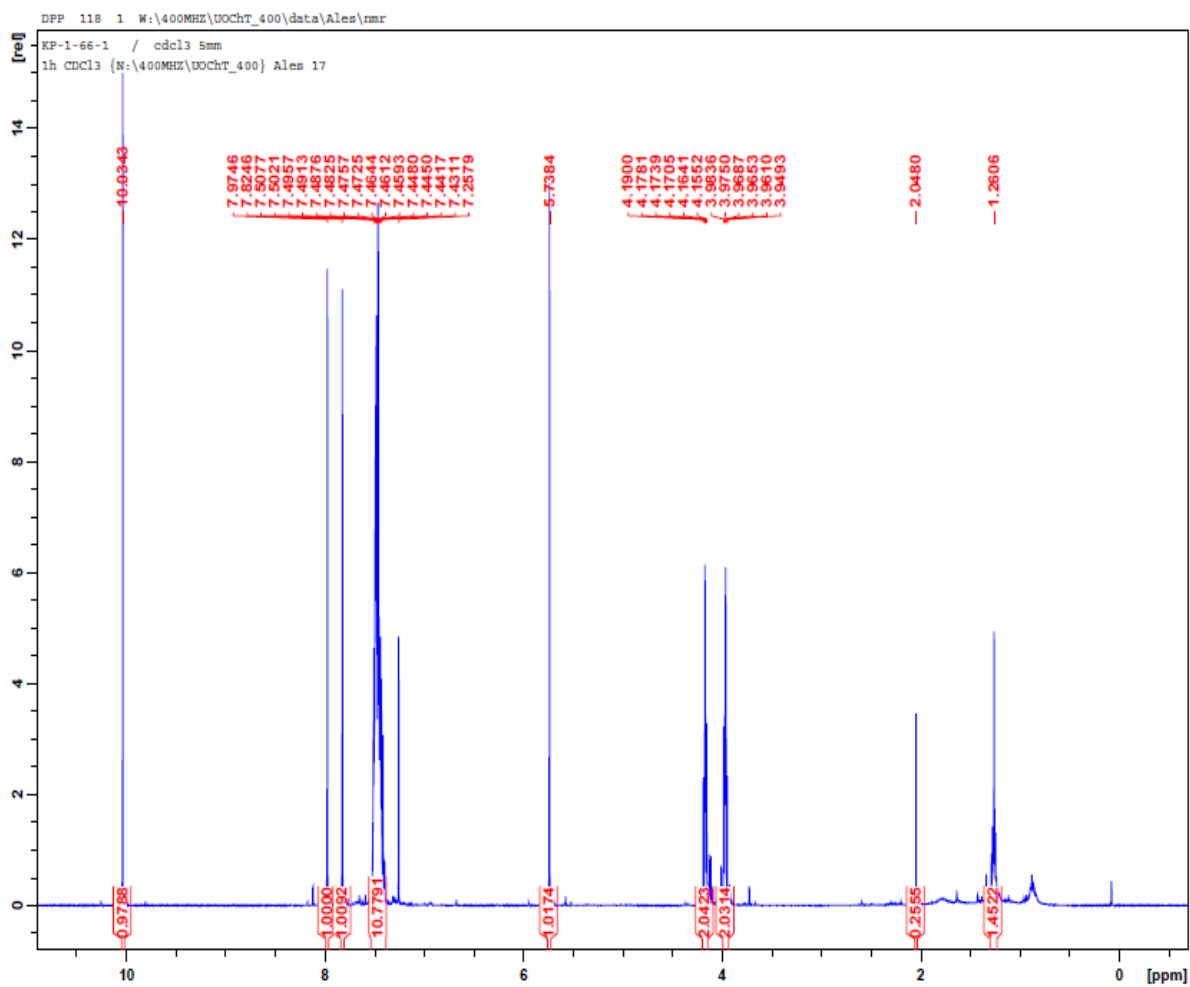
2. ^1H NMR pro (2)



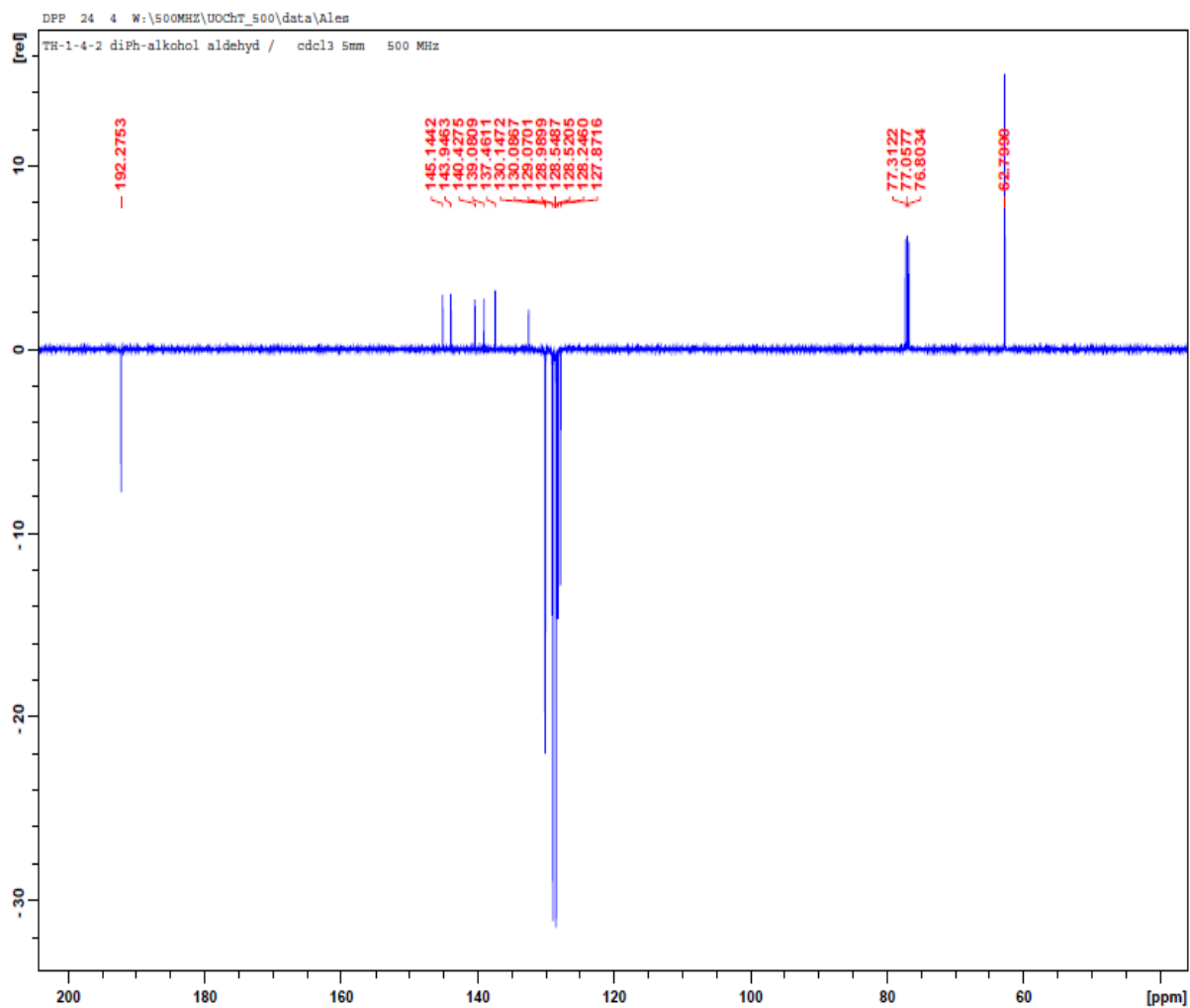
3. ^{13}C NMR pro (3)



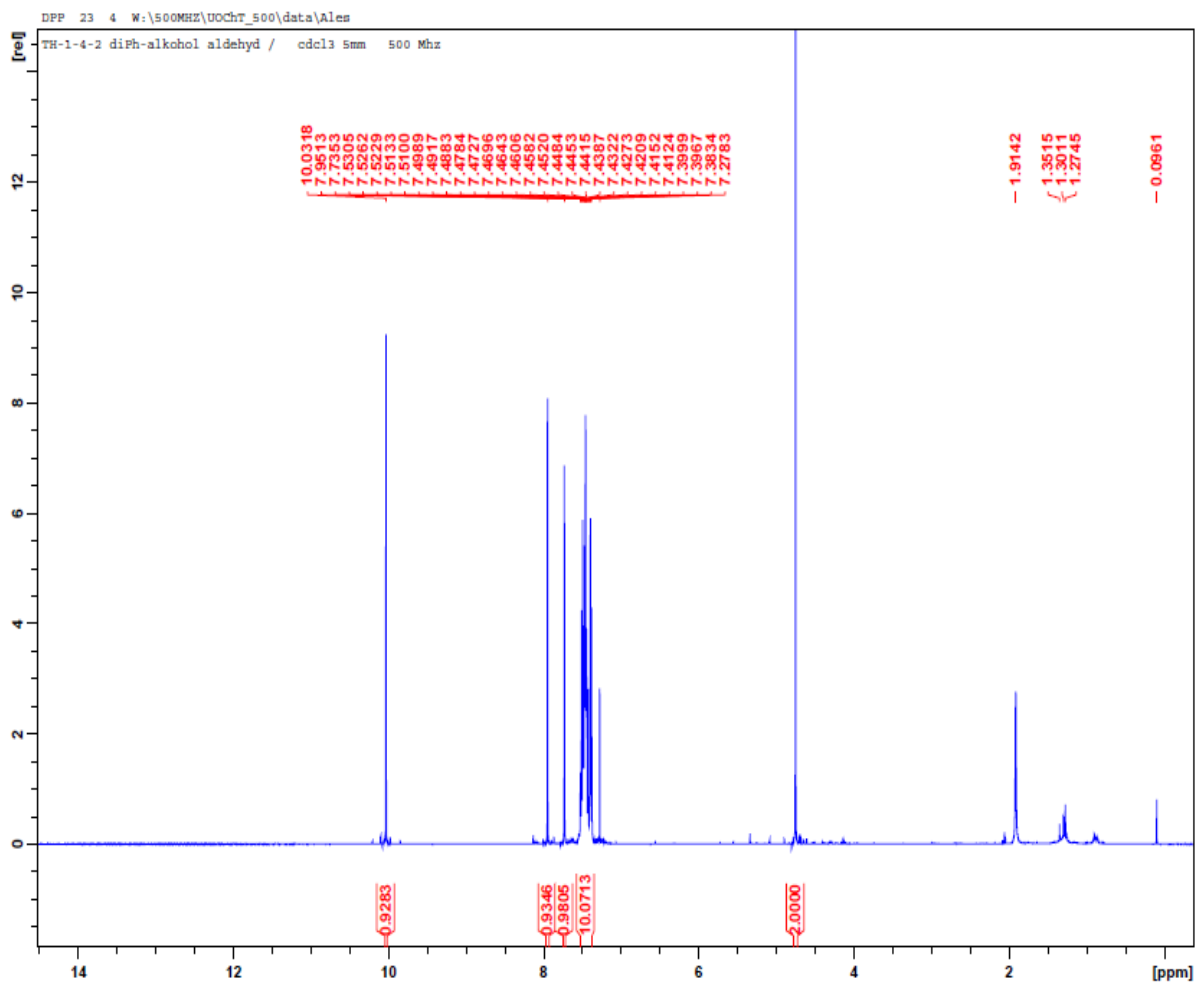
4. ^1H NMR pro (3)



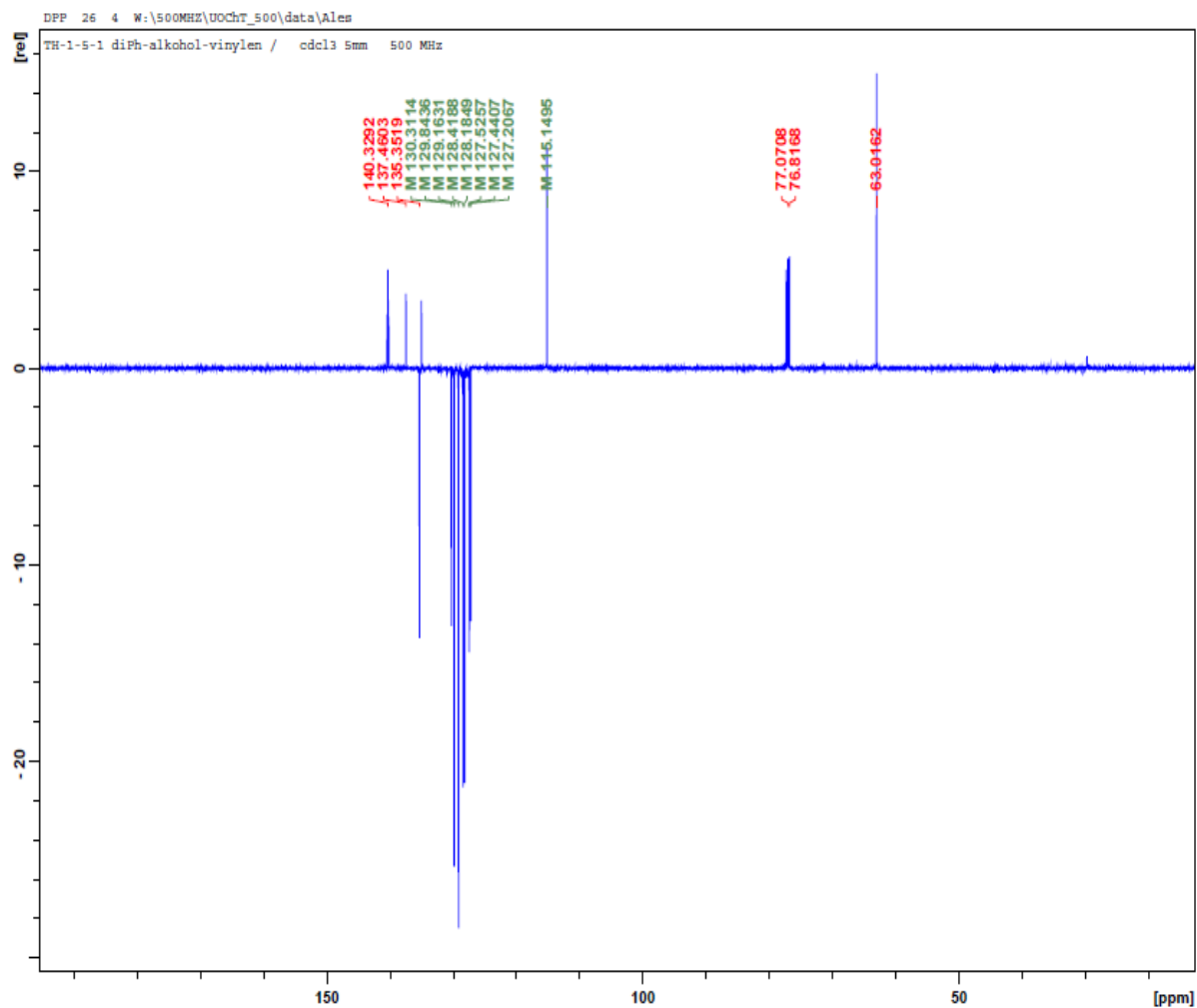
5. ^{13}C NMR pro (4)



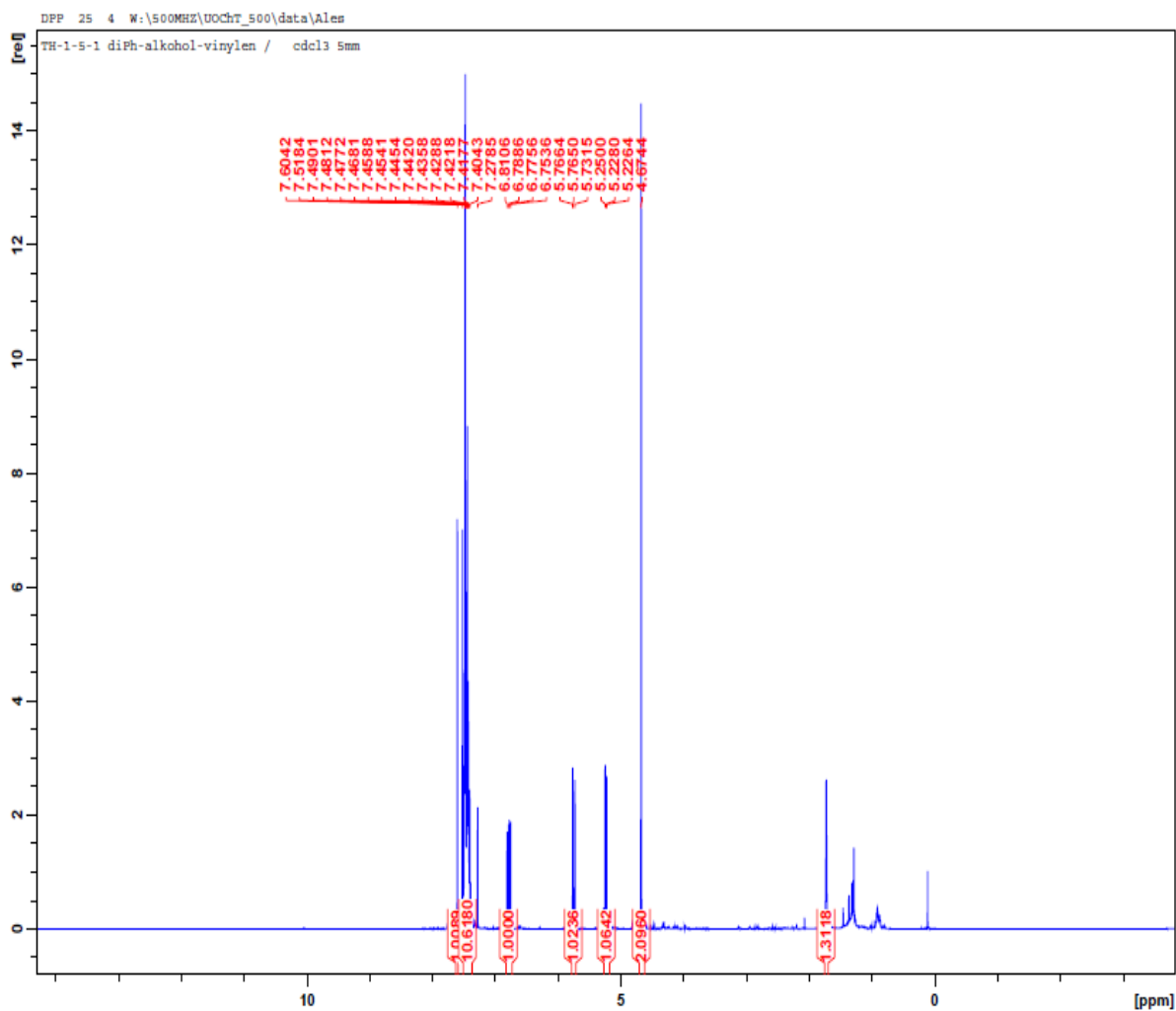
6. ¹H NMR pro (4)



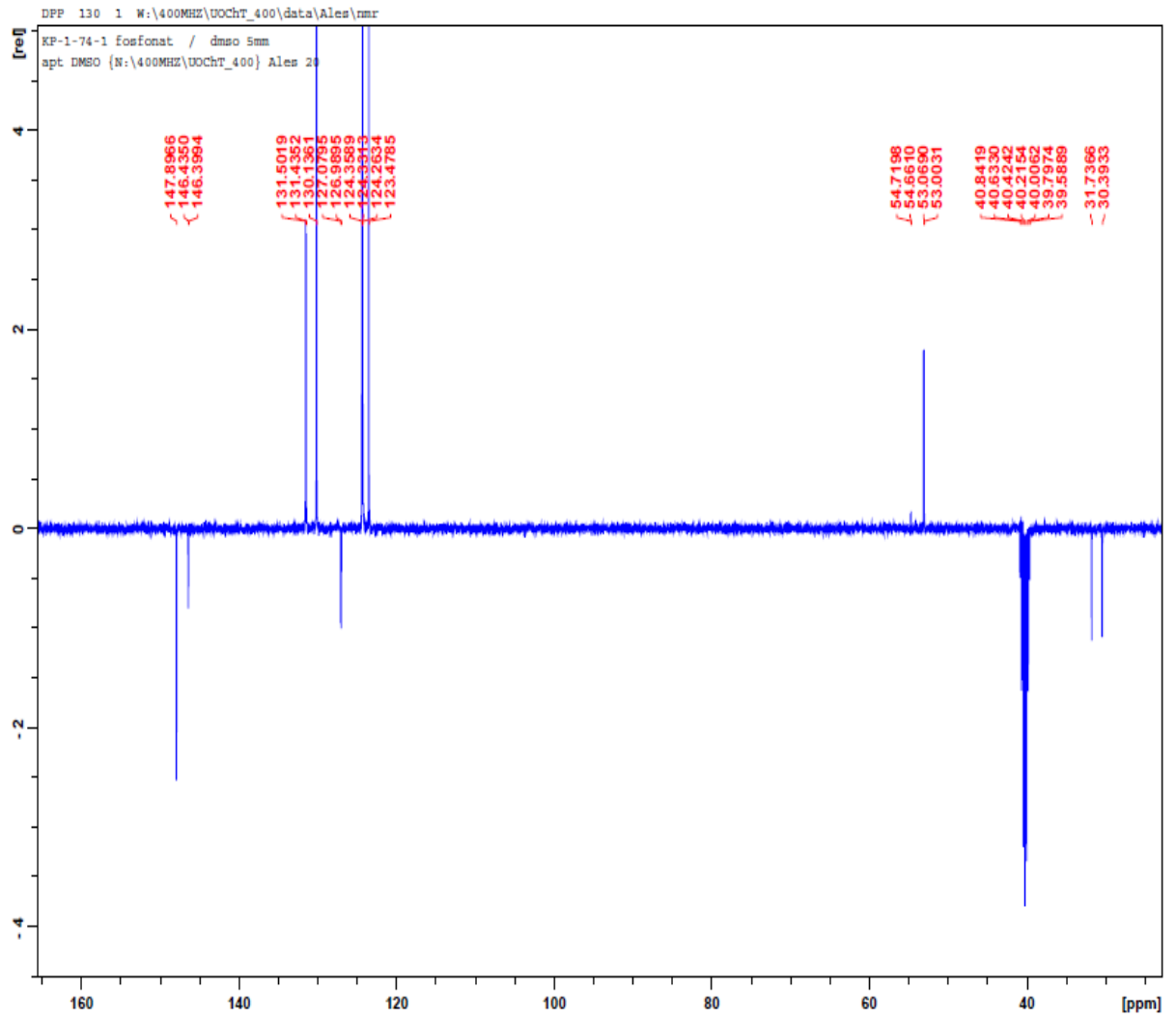
7. ^{13}C NMR pro (5)



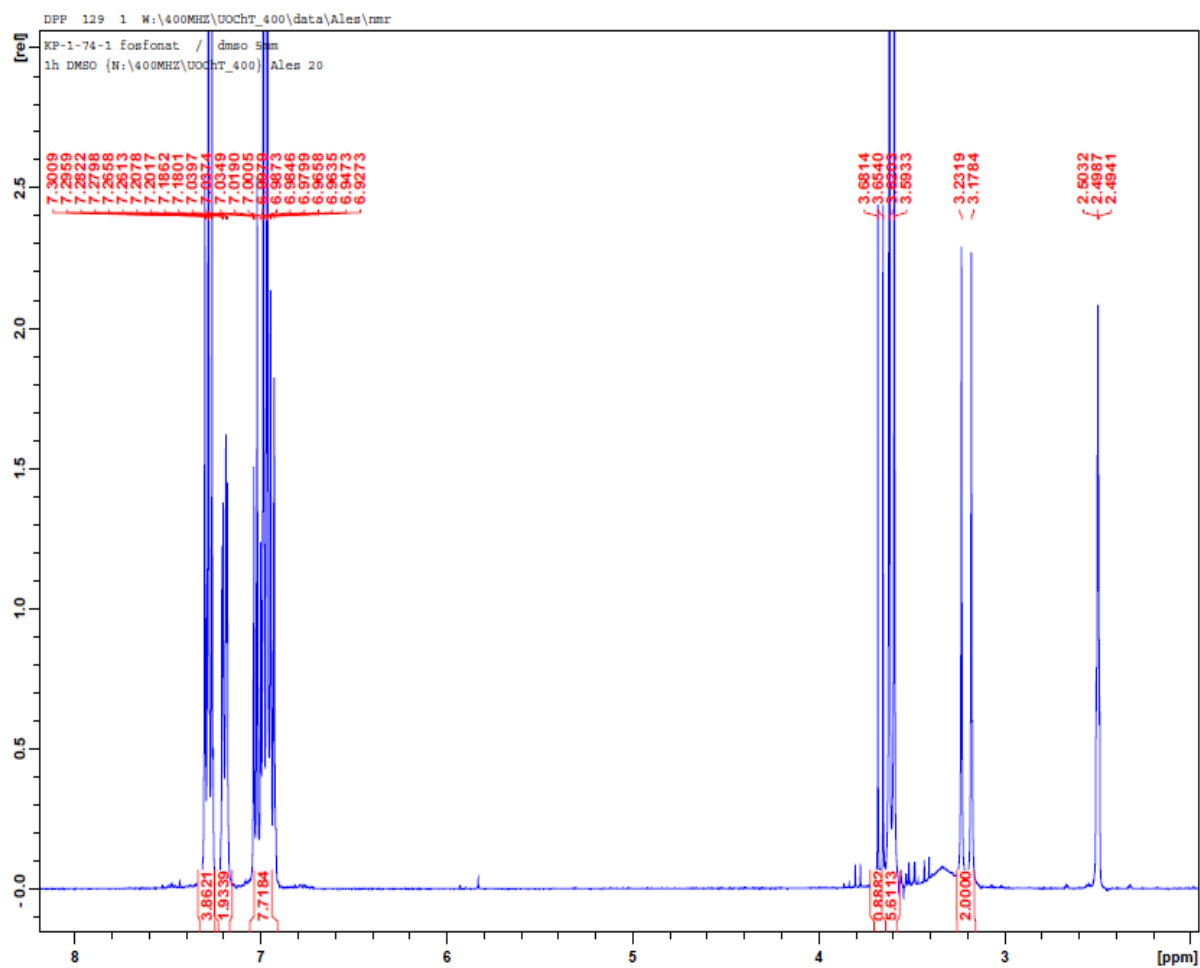
8. ¹H NMR pro (5)



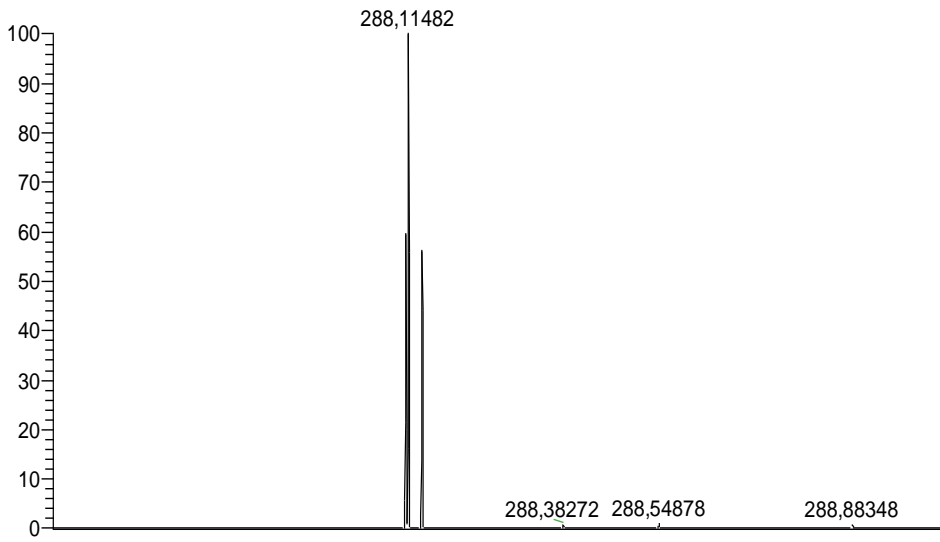
9. ¹³C NMR pro (9)



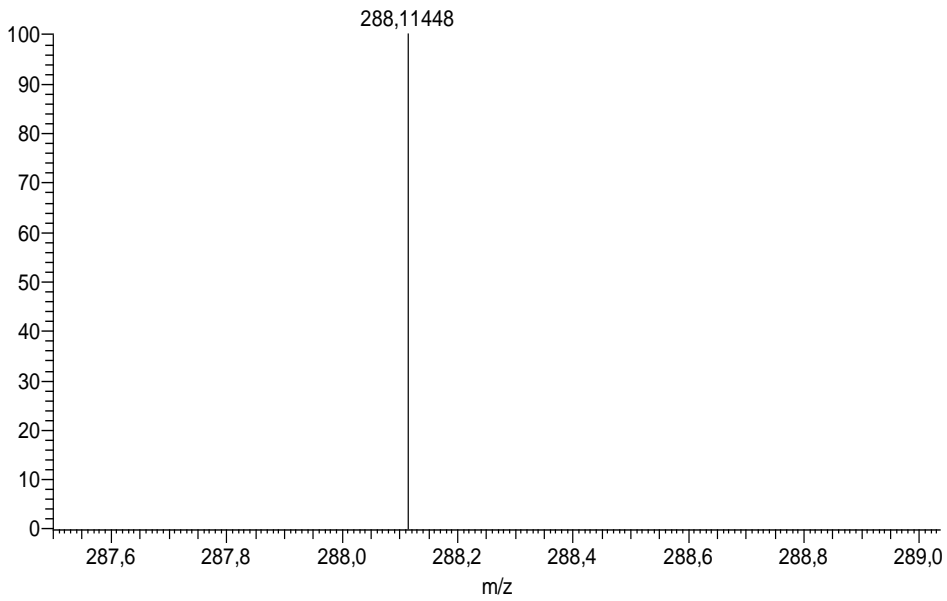
10. ¹H NMR pro (9)



11. HRMS pro (4)

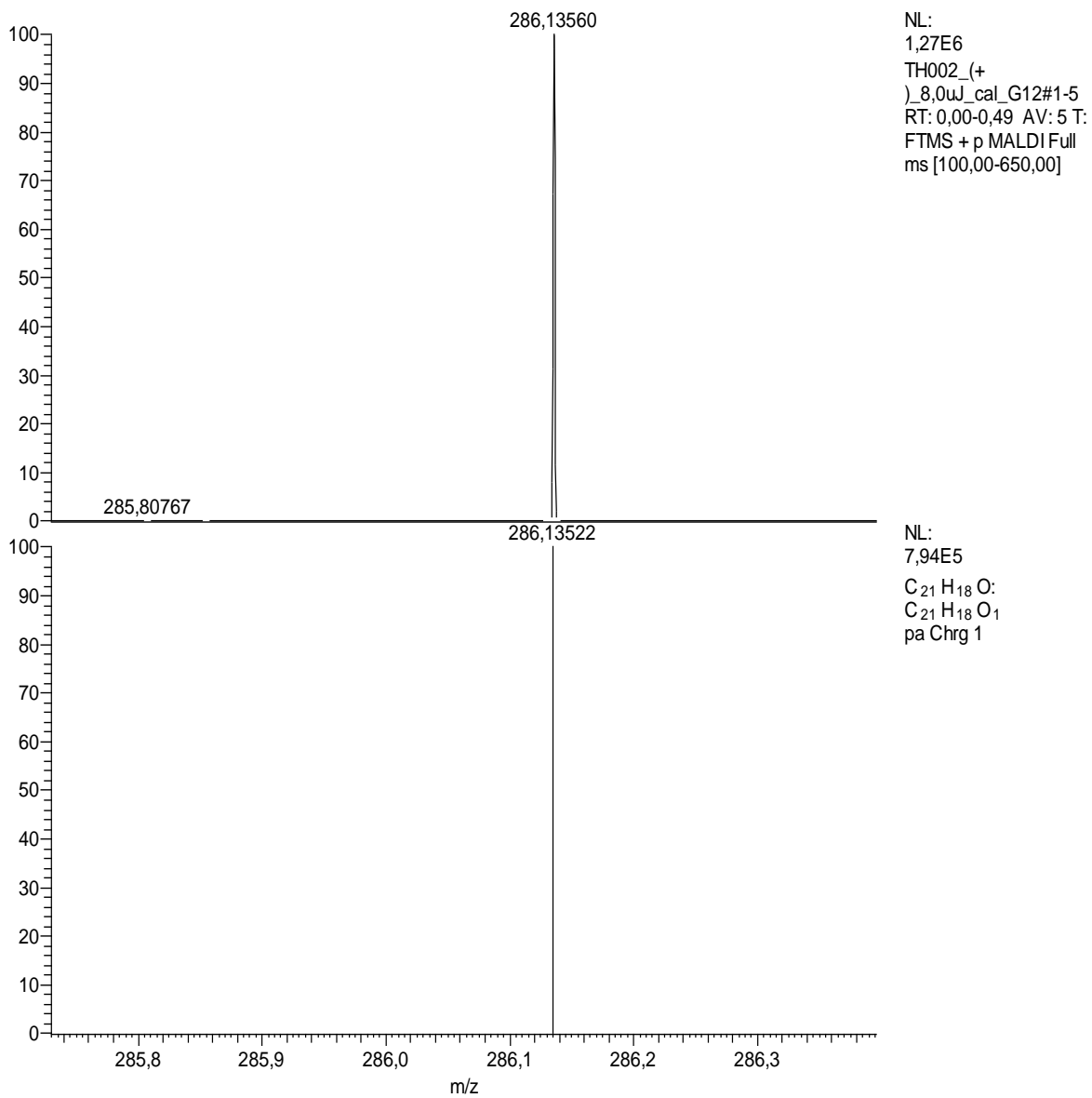


NL:
3,96E5
TH001_(+
)_12,0uJ_cal_G7#1-5
RT: 0,00-0,49 AV: 5 T:
FTMS + p MALDI Full
ms [100,00-650,00]

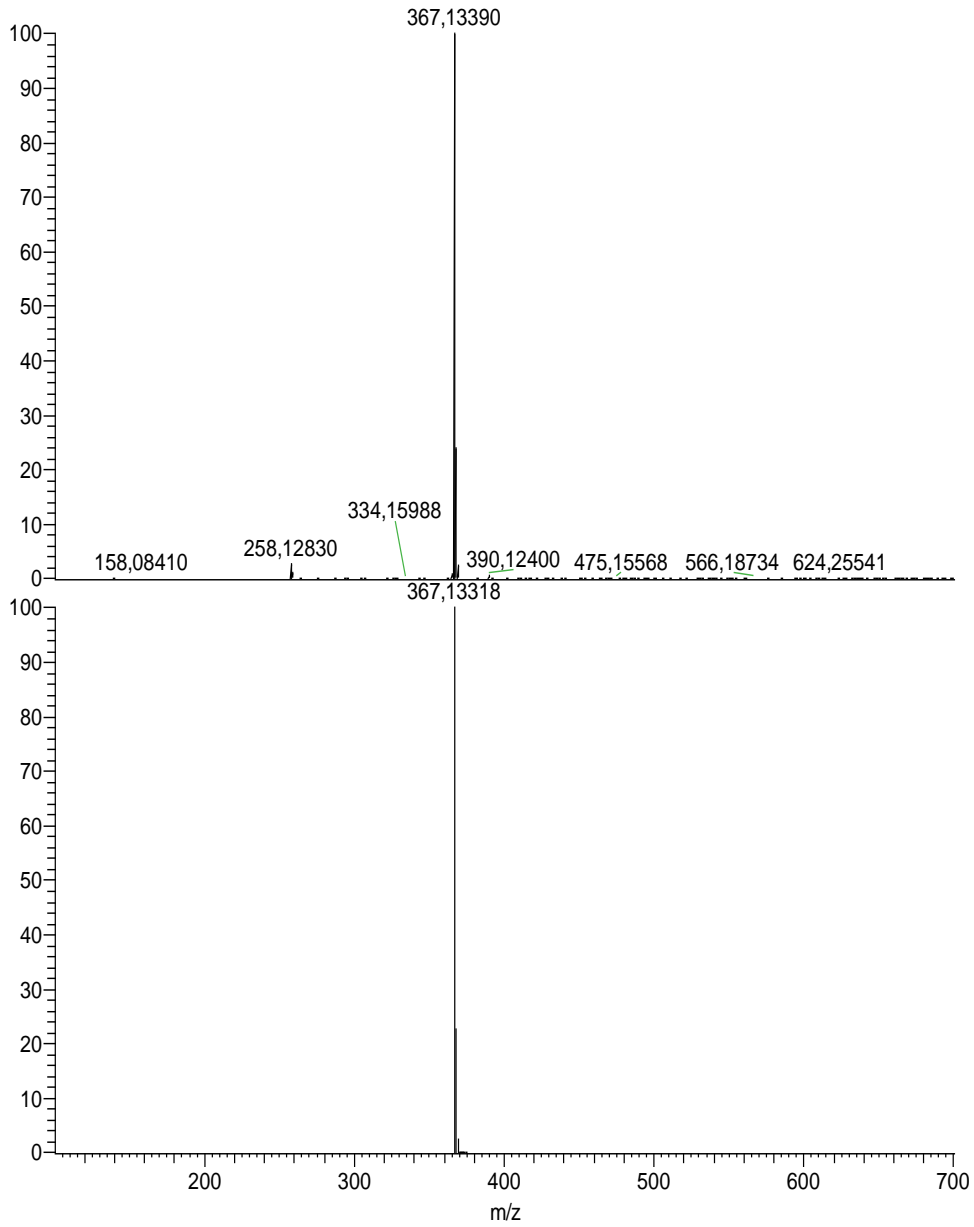


NL:
8,01E5
C₂₀H₁₆O₂:
C₂₀H₁₆O₂
pa Chrg 1

12. HRMS pro (5)



13.HRMS pro (9)



NL:
1,28E8
KP022_7,0uJ_ext_B8
#1-5 RT: 0,00-0,47
AV: 5 T: FTMS + p
MALDI Full ms
[100,00-700,00]

NL:
7,87E5
C₂₁H₂₂NO₃P:
C₂₁H₂₂N₁O₃P₁
pa Chrg 1