

UNIVERZITA PARDUBICE

FAKULTA CHEMICKO TECHNOLOGICKÁ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2025

David Láník

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Syntéza a vlastnosti pyridiniových derivátů
trifenylaminu

Bakalářská práce

2025

David Láník

University of Pardubice
Faculty of chemical technology

Synthesis and properties of triphenylamine-pyridinium
derivatives

Bachelor thesis

2025

David Láník

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2024/2025

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **David Láník**
Osobní číslo: **C22031**
Studijní program: **B0531A130012 Farmakochemie a medicínální materiály**
Téma práce: **Syntéza a vlastnosti pyridiniových derivátů trifenylaminu**
Téma práce anglicky: **Synthesis and properties of triphenylamine-pyridinium derivatives**
Zadávací katedra: **Ústav organické chemie a technologie**

Zásady pro vypracování

1. Proveďte literární rešerši syntéz a využití pyridiniových derivátů trifenylaminu.
2. Připravte z vhodného substrátu alespoň jeden odpovídající derivát.
3. Výsledky zpracujte formou závěrečné práce v souladu se Směrnicí UPCE č. 7/2019 "Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací" v platném znění.

Rozsah pracovní zprávy: **dle potřeby**
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná/elektronická**

Seznam doporučené literatury:
veškerá dostupná odborná literatura

Vedoucí bakalářské práce: **Ing. Jiří Tydlitát, Ph.D.**
Ústav organické chemie a technologie
Konzultant bakalářské práce: **Ing. Jakub Štrojsa**
Ústav organické chemie a technologie
Datum zadání bakalářské práce: **28. února 2025**
Termín odevzdání bakalářské práce: **1. července 2025**

prof. Ing. Petr Němec, Ph.D. v.r.
děkan

L.S.

prof. Ing. Miloš Sedlák, DrSc. v.r.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2025

Prohlašuji:

Práci s názvem Syntéza a vlastnosti pyridiniových derivátů trifenylaminu 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., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, 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.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne: 25.6.2025

David Láník

PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych chtěl poděkovat svému školiteli a vedoucímu bakalářské práce Ing. Jiřímu Tydlitátovi, Ph.D. a také Ing. Jakubu Štrojsovi především za odborné vedení, všestrannou pomoc, cenné rady, trpělivost a především za možnost psát tuto bakalářskou práci na Ústavu organické chemie a technologie. Dále bych chtěl poděkovat své rodině, přítelkyni a přátelům za podporu v průběhu mého vysokoškolského studia. Bez jejich vstřícnosti by tato práce nikdy nevznikla.

ANOTACE

Byla provedena literární rešerše syntéz a vlastností pyridiniových derivátů trifenyloaminu. V této práci je diskutován princip fluorescence, využití fluorescence pro fluorescenční značení, vlastnosti a struktura fluoroforů pro fluorescenční značení, druhy fluoroforů a příklady reakcí, kterými se syntetizují pyridiniové a trifenyloaminové deriváty. Dále byly diskutovány syntetické cesty vedoucí k finálním dosud v literatuře nepopsaným sloučeninám. Výsledky byly popsány a zhodnoceny. Finální chromofory byly charakterizovány řadou analytických metod jako je bod tání, HR-MALDI-MS spektrometrie, ^1H a ^{13}C NMR spektroskopie a UV/Vis spektroskopie.

KLÍČOVÁ SLOVA

fluorescence, fluorofory, pyridinium, trifenyloamin, fluorescenční značení

TITLE

Synthesis and properties of triphenylamine-pyridinium derivatives

ANNOTATION

A literature search focused on the syntheses and properties of pyridinium derivatives of triphenylamine. This thesis includes the principle of fluorescence, the use of fluorescence for fluorescent labeling, the properties and structure of fluorophores used in labeling, the types of fluorophores, and examples of reactions used to synthesize pyridinium and triphenylamine derivatives. Furthermore, synthetic pathways leading to final compounds, which have not yet been described in the literature, were discussed. The results were described and evaluated. The final chromophores were characterized using a number of analytical methods, including melting point determination, HR-MALDI-MS spectrometry, ^1H and ^{13}C NMR spectroscopy, and UV/Vis spectroscopy.

KEYWORDS

fluorescence, fluorophores, pyridinium, triphenylamine, fluorescent labeling

OBSAH

SEZNAM OBRÁZKŮ, ZKRATEK A TABULEK.....	12
SEZNAM ZKRATEK.....	14
ÚVOD.....	16
1. TEORETICKÁ ČÁST	17
1.1. Emise	17
1.2. Fluorescenční značení.....	17
1.3. Fluorescenční mikroskopie.....	18
1.3.1. Jedno/dvoufotonová absorpce.....	18
1.4. Typy fluoroforů.....	19
1.4.1. Fluorescenční proteiny.....	19
1.4.2. Nanočástice	20
1.4.3. Organické fluorofory.....	21
1.4.4. Základní strukturální motivy sloučenin pro fluorescenční značení	21
1.5. Syntéza prekurzorů TPA	23
1.5.1. Syntéza bromovaných prekurzorů	23
1.5.2. Syntéza jodovaných prekurzorů.....	23
1.5.3. Syntéza prekurzoru pro Suzukiho cross-couplingovou reakci.....	24
1.5.4. Syntéza prekurzoru pro Heckovu reakci.....	24
1.6. Syntéza vybraných derivátů TPA s využitím cross-couplingových reakcí ...	25
1.6.1. Heckův cross-coupling.....	25
1.6.2. Sonogashirův cross-coupling	25
1.6.3. Suzukiho-Miyaurův cross-coupling.....	25
1.6.4. Ullmanův cross-coupling	26
1.6.5. Buchwaldova-Hartwigova reakce	26
1.7. Syntéza pyridiniových derivátů s využitím cross-couplingových reakcí	27
1.7.1. Stilleho cross-coupling.....	27

1.7.2.	Knoevenagelova kondenzace	27
1.8.	Příprava pyridiniových derivátů pomocí kvarternizace	27
1.8.1.	Kvarternizace sultony	27
1.8.2.	Kvarternizace dimethylsulfátem	28
1.8.3.	Kvarternizace halogenkarboxylovými kyselinami.....	28
1.8.4.	Kvarternizace alkylhalogenidy	29
1.9.	Výměna aniontů	29
2.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	31
2.1.	Obecné metody	31
2.2.	Syntéza prekurzorů	32
2.2.1.	Syntéza prekurzoru 50	32
2.2.2.	Syntéza prekurzoru 51	32
2.2.3.	Obecná metoda pro přípravu jodovaných prekurzorů.....	32
2.2.4.	Syntéza prekurzoru 52	33
2.2.5.	Syntéza prekurzoru 53	33
2.3.	Syntéza prekurzorů pomocí cross-couplingových reakcí	33
2.3.1.	Obecná metoda pro Heckův cross-coupling	33
2.3.2.	Syntéza prekurzoru 54	34
2.3.3.	Syntéza prekurzoru 55	34
2.3.4.	Syntéza prekurzoru 56	34
2.3.5.	Syntéza prekurzoru 57 pomocí Suzukiho-Miyaurova cross-couplingu...35	
2.4.	Syntéza pyridiniových prekurzorů	35
2.4.1.	Obecná metoda kvarternizace pyridiniových derivátů.....	35
2.4.2.	Syntéza prekurzoru 58	36
2.4.3.	Syntéza prekurzoru 59	36
2.5.	Syntéza finálních sloučenin	36
2.5.1.	Obecná postup výměny aniontu pyridiniového derivátu	36

2.5.2.	Syntéza chromoforu 60	37
2.5.3.	Syntéza chromoforu 61	37
3.	VÝSLEDKY A DISKUZE	38
3.1.	Syntéza prekurzorů	38
3.2.	Syntéza prekurzorů pomocí cross-couplingových reakcí	39
3.2.1.	Syntéza prekurzoru pomocí Suzukiho-Miyauraova cross-couplingu	40
3.3.	Syntéza pyridiniových prekurzorů	40
3.4.	Syntéza finálních sloučenin – výměna iontů	41
3.5.	Strukturní analýza	42
3.5.1.	HR-MALDI-MS	42
3.5.2.	NMR	43
3.5.3.	Analýza optických vlastností	45
	ZÁVĚR	47
	POUŽITÁ LITERATURA	48
	SEZNAM PŘÍLOH	52

SEZNAM OBRÁZKŮ, ZKRATEK A TABULEK

Obrázky

Obrázek 1. Obecná struktura finálních pyridiniových derivátů trifenylaminu.....	16
Obrázek 2. Jablonského diagram.....	17
Obrázek 3. Snímek z epifluorescenčního mikroskopu (buňky linie CHO-K1, značeno trifenylamin-pyridiniovou fluorescenční značkou, převzato z Ref. ^[5]).....	18
Obrázek 4. Příklad 1PA a 2PA.....	19
Obrázek 5. 4-(p-hydroxybenzyliden)-5-imidazolinon interagující s aminokyselinami. ^[2]	20
Obrázek 6. (A) Závislost absorpce na vlnové délce s rostoucí velikostí QDs (B) závislost emise na vlnové délce s rostoucí velikostí QDs.	20
Obrázek 7. Trifenylaminový push-pull chromofor 1	22
Obrázek 8. HR-MALDI MS spektrum sloučeniny 60 , v horní polovině jsou výřezy spektra experimentálně změřeného a v dolní polovině odpovídající simulovaná a) pro m/z látky C ₃₄ H ₃₀ N ₄ O ₂ , kdy z=2, b) [M] ⁺ pro C ₃₄ H ₃₀ N ₄ O ₂ , c) [M] ⁺ pro C ₃₄ H ₃₀ N ₄ O ₂ PF ₆	42
Obrázek 9. ¹³ H NMR spektrum sloučeniny 60	44
Obrázek 10. ¹³ C APT NMR spektrum sloučeniny 60	45
Obrázek 11. Normalizovaná absorpční a emisní spektra sloučenin 60 (niroderivát) a 61 (formylderivát) v acetonu.	46

Schémata

Schéma 1. Syntéza dibromovaného TPA 3	23
Schéma 2. Syntéza halogenovaného derivátu 5	23
Schéma 3. Syntéza jodovaného derivátu TPA 7	24
Schéma 4. Syntéza derivátu kyseliny boronové 9	24
Schéma 5. Syntéza TPA derivátu 12 pomocí Buchwaldovy–Hartwigovy cross-coupligové reakce.	24
Schéma 6. Syntéza TPA derivátu 15 Heckovým cross-couplingem.	25
Schéma 7. Syntéza TPA derivátu 18 pomocí Sonogashirova cross-couplingu.	25
Schéma 8. Syntéza derivátu TPA 21 Suzukiho–Miyauraovou cross-couplingovou reakcí.	26
Schéma 9. Syntéza derivátu TPA 24 Ullmanovou cross-couplingovou reakcí.	26
Schéma 10. Syntéza derivátu TPA 27 Buchwaldovou–Harwigovou reakcí.	26
Schéma 11. Syntéza pyridiniového derivátu 29 pomocí Stilleho cross-couplingu.	27
Schéma 12. Syntéza sloučeniny 32 prostřednictvím Knoevenagelovy kondenzace.....	27

Schéma 13. Příprava kvarternizovaných pyridinových derivátů 35 a 37	28
Schéma 14. Syntéza kvarternizovaných bipyridinových derivátů 40 a 41	28
Schéma 15. Syntéza pyridiniového derivátu 44	29
Schéma 16. Syntéza derivátu TPA 1	29
Schéma 17. Syntéza sloučeniny 47 s hexafluorofosforečnanovým aniontem.	30
Schéma 18. Příprava sloučeniny 49 výměnou halogenidového aniontu.....	30
Schéma 19. Syntéza prekurzoru 50	38
Schéma 20. Syntéza prekurzoru 51	38
Schéma 21. Syntéza prekurzorů 52 a 53	39
Schéma 22. Syntéza prekurzorů 54 a 55	39
Schéma 23. Syntéza prekurzoru 56	40
Schéma 24. Syntéza prekurzoru 57	40
Schéma 25. Syntéza prekurzorů 58 a 59	41
Schéma 26. Syntéza finálních sloučenin 60 a 61	41

Tabulky

Tabulka 1. Optické vlastnosti sloučenin 60 a 61 měřené v acetonu.	46
---	----

SEZNAM ZKRATEK

1PA	Jedno fotonová absorpce
2D	Dvourozměrný
2PA	Dvou fotonová absorpce
3D	Trojzozměrný
ACN	Acenonitril
APT	Attached proton test
b.t.	Bod tání
COSY	Korelační spektroskopie
dba	Dibenzylidenaceton
DCTB	<i>trans</i> -2-[3-(4- <i>terc</i> -butylfenyl)-2-methyl-2-propenyliden]malononitril
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
EtOAc	Ethyl-acetát
EtOH	Ethanol
FM	Fluorescenční mikroskopie
FP	Fluorescenční protein
GFP	Zelený fluorescenční protein
HMBC	Heteronuclear multiple bond correlation
HSQC	Heteronuclear single quantum coherence
IČ	Infračervené záření
ICT	Intramolekulární přenos náboje
ISC	Intersystem crossing
MeOH	Methanol
NBS	<i>N</i> -bromsukcinimid
NIR	Blízká infračervená oblast
NMR	Nukleární magnetická rezonance
OAc	Octanová skupina
OLED	Organické světlo emitující dioda
QDs	Kvantové tečky
THF	Tetrahydrofuran

TPA

Trifenylamin

UV

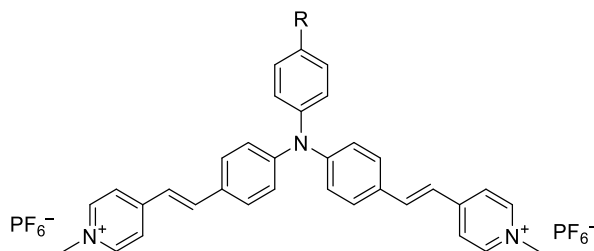
Ultrafialové záření

Vis

Viditelné záření

ÚVOD

Cílem této bakalářské práce bylo provést literární rešerši využití a syntéz pyridiniových derivátů trifenylaminu a syntézu alespoň jednoho odpovídajícího derivátu, kde substituent R může být nitroskupina či karbonylová funkční skupina (*Obrázek 1*) včetně popisu základních vlastností.



Obrázek 1. Obecná struktura finálních pyridiniových derivátů trifenylaminu.

V teoretické části byly popsány fotofyzikální vlastnosti pyridiniových derivátů trifenylaminu a jejich potencionální využití pro fluorescenční značení. Dále zde byly popsány syntézy různých sloučenin obsahujících trifenylaminovou jednotku, jenž jsou známé z dostupné literatury. V experimentální části byla popsána příprava a analýza cílových látek. Celkem bylo připraveno dvanáct látek, z toho dvě finální sloučeniny.

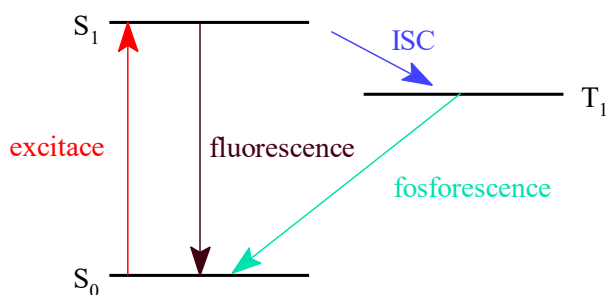
1. TEORETICKÁ ČÁST

1.1. Emise

Velké skupiny látek vykazují schopnosti emise záření. Může se jednat jak o sloučeniny připravené v laboratořích, ať už organické či anorganické, tak sloučeniny přírodního původu. Při emisi látka vyzařuje světlo. Tento proces se dělí na fluorescenci a fosforescenci, které lze popsat pomocí Jablonského diagramu (*Obrázek 2*).^[1]

U fluorescence dochází k vybuzení (excitaci) elektronu v atomu nebo molekule na vyšší energetickou hladinu ($S_0 \rightarrow S_1$). Když se elektron vrací zpět na původní hladinu ($S_1 \rightarrow S_0$), uvolní energii ve formě fotonu – tedy světla (*Obrázek 2*). Dochází tedy k emisi ze singletového stavu. Tento proces probíhá velmi rychle, téměř okamžitě po ozáření. Látky schopné fluorescence se označují jako fluorofory.^[1]

U fosforescence dochází rovněž k excitaci ze základního do excitovaného stavu ($S_0 \rightarrow S_1$). Následně ovšem dojde ke konverzi spinu ze singletového do tripletového stavu ($S_1 \rightarrow T_1$). Této konverzi se říká intersystem crossing (ISC). Elektron se poté vrací zpět do základního stavu ($T_1 \rightarrow S_0$) (*Obrázek 2*). Takový přechod zpět je energeticky „zakázaný“, takže trvá déle. Výsledkem je, že látka emituje ještě nějaký čas po skončení ozáření.^[1]



Obrázek 2. Jablonského diagram.

1.2. Fluorescenční značení

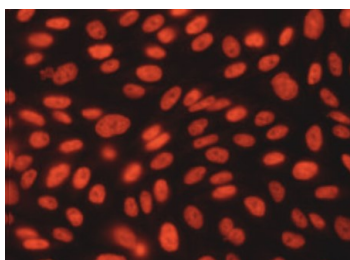
Látky schopné emise záření nacházejí své uplatnění v mnoha aplikacích. Jednou z nich je i fluorescenční značení. Je to metoda, při které se na vazebná místa molekul, které samy o sobě neemitují, nebo emitují jen velmi slabě, váže fluorescenční molekula. Díky takto získané fluorescenci je pak možné tyto molekuly detekovat. Tato metoda má využití hlavně v biomedicínských vědách například pro značení sekvencí DNA či proteinů. Dříve se k biochemickému značení využívaly například radioaktivní izotopy jódu a fosforu. Molekuly

označené tímto způsobem však nebylo možné dlouhodobě skladovat kvůli omezené životnosti způsobené poločasem rozpadu. Proto se v posledních letech rozšířilo použití fluorescenčního značení. Fluorescenční značky nabízejí lepší podmínky při skladování i manipulaci a lze je připravovat ve větším množství.^[2]

1.3. Fluorescenční mikroskopie

Fluorescenční mikroskopie (FM) je dnes nejrozšířenější metodou pro zvýraznění kontrastu požadované struktury vůči pozadí v biologických vzorcích. Vhodné fluorofory jsou klíčové pro FM. Výhodou této techniky je i vysoká citlivost a specificita, což umožňuje detailní pozorování nejen buněčných struktur, ale i buněčných procesů.^[3] FM využívá Stokesova zákona, tedy rozdílu mezi vlnovou délkou excitačního a emisního záření.^[4]

Nejpoužívanějšími fluorescenčními mikroskopy jsou epifluorescenční mikroskopy. Vzorek je osvětlován shora. Světlo s požadovanou vlnovou délkou pro excitaci fluoroforu je propuštěno přes excitační filtr na vzorek. Emitované záření putuje zpět do objektivu mikroskopu a filtry zablokují propuštění excitačního záření. Díky tomu lze značenou část vzorku jasně odlišit od pozadí (*Obrázek 3*).^[4]



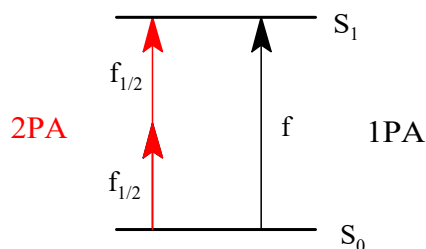
Obrázek 3. Snímek z epifluorescenčního mikroskopu (buňky linie CHO-K1, značeno trifenylamin-pyridiniovou fluorescenční značkou, převzato z Ref. ^[5]).

1.3.1. Jedno/dvoufotonová absorpce

Dvoufotonová absorpce (2PA) byla poprvé teoreticky popsána ve třicátých letech 20. století Marií Göppert-Mayerovou ^[6]. V letech šedesátých, krátce po vynalezení laseru, byla experimentálně prokázána.^[7,8]

Hlavní rozdíl mezi jednofotonovou absorpcí (1PA) a dvoufotonovou absorpcí spočívá v tom, že při 1PA dochází k excitaci jedním fotonem (f) vyšší energie např. z UV oblasti. V případě 2PA excitace zahrnuje současnou interakci dvou fotonů s poloviční energií ($f_{1/2} + f_{1/2} = f$), resp. z oblasti s nižší energií, např. IČ oblasti. Zde dochází ke spojení jejich energií a excitaci molekuly ze základního do excitovaného stavu ($S_0 \rightarrow S_1$) (*Obrázek 4*).^[9] U 2PA roste

pravděpodobnost tohoto jevu s druhou mocninou intenzity světla, zatímco u 1PA je tato závislost lineární. Z tohoto důvodu je 2PA možné pozorovat pouze při velmi intenzivním osvětlení – typicky pulzním laserem, který vytváří extrémně vysokou hustotu fotonů.^[10,11]



Obrázek 4. Příklad 1PA a 2PA.

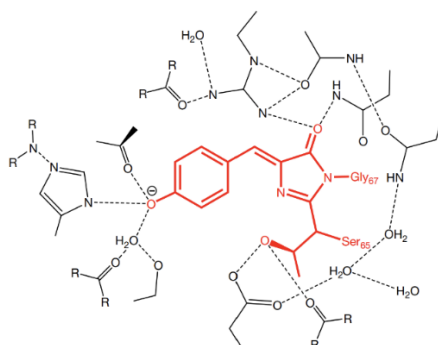
To má ale své výhody a při využití chromoforů s 2PA dochází k: a) Snížení fotochemického poškození vzorku způsobeného excitujícím zářením. Toho je dosaženo využitím záření o nižší energii. b) Zvýšení prostorového rozlišení při zobrazování v opticky neprůhledných nebo zakalených vzorcích, jelikož při 2PA dochází k efektivnějšímu průniku záření. c) Potlačení autofluorescenčního pozadí buněk, což vede ke zlepšení kontrastu a celkové kvality výsledného obrazu.^[12]

Sloučeniny s 2PA mají již nyní široké aplikační uplatnění například ve dvoufotonové fluorescenční mikroskopii (2PA-FM), mikrofabrikaci, v oborech zabývajících se 3D optickým ukládáním dat nebo fotodynamické terapii sloužící pro cílenou likvidaci buněk.^[13]

1.4. Typy fluoroforů

1.4.1. Fluorescenční proteiny

Fluorescenční proteiny (FP) pocházejí z různých organismů, které vytvářejí proteiny schopné emitovat světlo formou fluorescence. Jedním z nejznámějších fluoreskujících proteinů je zelený fluorescenční protein (GFP), který byl izolován z medúzy *Aequorea victoria*. Tato medúza produkuje světlo rychlým uvolněním iontů vápníku, čímž aktivuje fotoprotein aequorin, který následně excituje GFP. GFP emituje zelenou barvou s emisním maximem kolem 500 nm. Chromoforem zodpovědným za emisi GFP je derivát 4-(*p*-hydroxybenzyliden)-5-imidazolinonu (Obrázek 5).^[2,14,15]

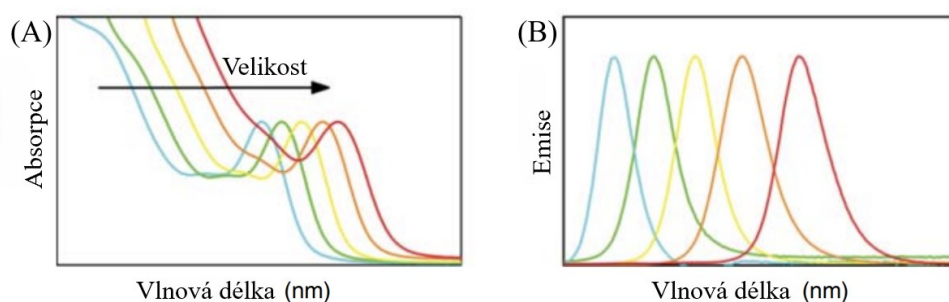


Obrázek 5. 4-(*p*-hydroxybenzyliden)-5-imidazolion interagující s aminokyselinami.^[2]

Největší výhodou fluorescenčních proteinů při značení je jejich možnost začlenění se do DNA buněk, dále také jejich rozpustnost ve vodě.^[15]

1.4.2. Nanočástice

Pro fluorescenční značení se využívají také různé typy nanočástic. Mezi nejběžněji používané patří kvantové tečky, uhlíkové tečky, křemíkové nanočástice a kovové či anorganické oxidové nanočástice (např. Au, ZnO, SiO₂, Ag₂O). V poslední době se však největší pozornost soustředí na kvantové tečky (QDs). QDs jsou polovodičové nanočástice s rozměry obvykle v rozmezí 2–10 nm. Zatímco jejich jádro je tvořeno nejčastěji CdSe, obal jádra bývá tvořen ZnS.^[2] Při výrobě QDs vznikají částice, jejichž schopnost pohlcovat a vyzařovat světlo závisí na jejich velikosti a složení (*Obrázek 6*). Když QD zachytí foton s energií vyšší, než je potřebná k překonání jejího vnitřního energetického rozdílu (tzv. šířky zakázaného pásma), vytvoří se pár složený z elektronu a díry, kterému říkáme exciton. Čím vyšší je energie dopadajícího světla, tím větší je pravděpodobnost, že světlo bude absorbováno. Kvantové tečky tak pohlcují světlo v široké oblasti spektra, což je velký rozdíl oproti běžným fluoroforům, které absorbují pouze v úzké oblasti spektra.^[16] Nevýhodou je hydrofobicita QDs, což znamená jejich nutnou modifikaci pro rozpustnost ve vodě, a to zavedením solvatujících skupin např. karboxylátů nebo sulfonových funkčních skupin.^[15]



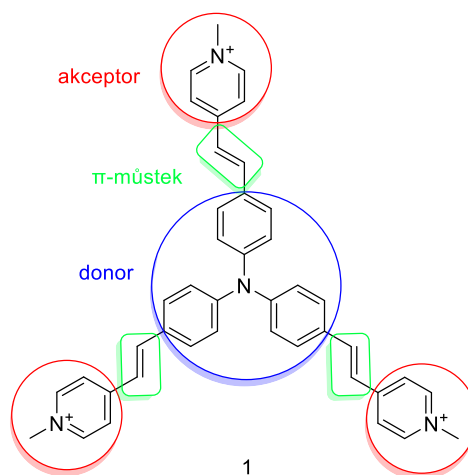
Obrázek 6. (A) Závislost absorpce na vlnové délce s rostoucí velikostí QDs (B) závislost emise na vlnové délce s rostoucí velikostí QDs.

1.4.3. Organické fluorofory

Organické fluorofory jsou molekuly s molekulovou hmotností nejčastěji mezi 500 a 1500 g/mol a velikostí přibližně 1–2 nm. Jejich struktura je tvořena (hetero)aromatickými jádry a konjugovaným systémem π -vazeb. S rostoucím počtem kondenzovaných jader (více π -vazeb) v molekule se prodlužují její excitační i emisní vlnové délky. Například kumarin (heteroaromát se dvěma kondenzovanými jádry) emituje světlo v modré oblasti spektra, zatímco fluorescein se třemi kruhy emituje světlo v oblasti zelené.^[15] Dle jejich struktury můžeme fluorofory dělit na deriváty kumarinů, rhodaminů, fluoresceinů, cyaninů, BODIPY^[15] nebo třeba trifenylaminů (TPA).^[17] Velkou výhodou organických fluoroforů oproti fluorescenčním proteinům je možnost jejich aplikace bez genetických úprav. Tato vlastnost umožňuje, aby byla fluorescenční barviva v klinických aplikacích využita rychleji než metody založené na genetických úpravách.^[18] Výhodou je rovněž možnost jejich modifikace a optimalizace vlastností jako je intenzita emise či fotostabilita.^[15]

1.4.4. Základní strukturní motivy sloučenin pro fluorescenční značení

Vhodná fluorescenční značka by měla obsahovat fluorofor – část molekuly, která je schopná emitovat světlo ve formě fluorescence – a zároveň kotvicí skupinu, která umožňuje navázání na cílovou strukturu například pomocí kovalentní vazby. Ideální fluorofor vykazuje vysoký kvantový výtěžek fluorescence, tedy vysoký poměr mezi počtem emitovaných a absorbovaných fotonů. Čím účinněji fluorofor absorbuje fotony, tím intenzivnější je jeho fluorescence.^[2,14,15] Mezi běžně používané kotvicí skupiny patří sukcinimidylester a isothiokyanát (reakce např. s aminy), maleimid (reakce např. s thioley), hydrazin či hydrazid (reakce s aldehydy/ketony).^[19] Interakce s cílovou molekulou mohou být nejen vazebné (pomocí kotvicí skupiny), ale také nevazebné. Takovým příkladem je i sloučenina **1**, která je schopna interagovat se záporně nabitými atomy v DNA pomocí elektrostatických interakcí (Obrázek 7).^[5]



Obrázek 7. Trifenylaminový push-pull chromofor **1**.

Sloučenina **1** patří mezi chromofory, kdy je základní skelet tvořen trifenyloaminem (elektrondonor). Ten je propojen pomocí vinylových skupin (π -můstek) s kvarternizovanými pyridiny (elektronakceptor) (Obrázek 7). Molekuly s takovým systémem se nazývají push-pull chromofory a umožňují intramolekulární přenos náboje (ICT) mezi skupinami při excitaci i relaxaci. [13,20]

Důležité je, aby fluorescenční značka po navázání neovlivnila funkci cílové struktury a zároveň si zachovala své fluorescenční vlastnosti. Například při značení proteinů je nutné, aby reakce probíhala ve vodném prostředí, za neutrálního pH a při pokojové teplotě, protože kyselé či zásadité prostředí a zvýšená teplota mohou vést k denaturaci bílkovin. [21]

Při tvorbě funkční fluorescenční značky jsou klíčové i optické vlastnosti fluoroforu. Mnoho fluoroforů absorbuje a vyzařuje světlo v ultrafialové (UV) a viditelné (Vis) oblasti, což není ideální – UV záření může poškodit nebo dokonce zničit buňky, se kterými se pracuje. Navíc absorpce v této oblasti často zvyšuje autofluorescenci pozadí/vzorku, například u tkání, což komplikuje měření. [19,22] V této UV-Vis oblasti (350–650 nm) jsou nejčastěji excitovány fluorofory s 1PA. [23]

Z výše zmíněných důvodů se častěji využívají fluorofory, které emitují světlo v blízké infračervené oblasti (NIR). [22] Fluorofory emitující v NIR oblasti absorbují nejčastěji mechanismem 2PA. [24] Ve srovnání s viditelným spektrem, které je často používané pro fluorescenční zobrazování, poskytuje širší NIR okno (NIR-I, 700-900 nm a NIR-II, 1000-1700 nm) lepší optické zobrazování hlubších tkání díky sníženému rozptylu, nižší absorpci a potlačení autofluorescence. [25]

1.5. Syntéza prekurzorů TPA

1.5.1. Syntéza bromovaných prekurzorů

Halogenované TPA prekurzory patří mezi hlavní výchozí látky pro přípravu pyridinových derivátů pomocí cross-couplingových reakcí. Takovým prekurzorem může být sloučenina **3**, která byla připravena bromací výchozího derivátu TPA **2** pomocí *N*-bromosukcinimidu (NBS) (*Schéma 1*). Reakce proběhla kvantitativně a produkt **3** byl získán jako žlutá pevná látka.^[26]

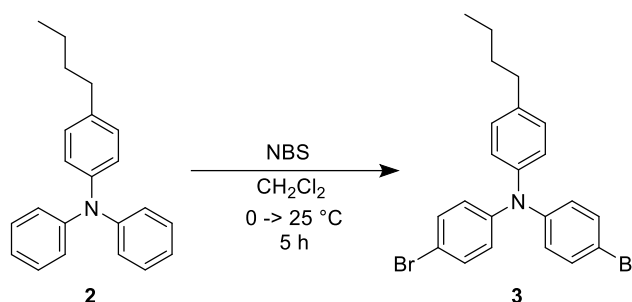


Schéma 1. Syntéza dibromovaného TPA **3**.

Jako bromační činidlo lze použít také elementární brom. Sloučenina **4** reagovala s bromem v chloroformu v rámci jedнокrokové reakce. Reakční směs byla refluxována po dobu 20 minut. Produkt **5** byl získán s výtěžkem 56 % (*Schéma 2*).^[27]

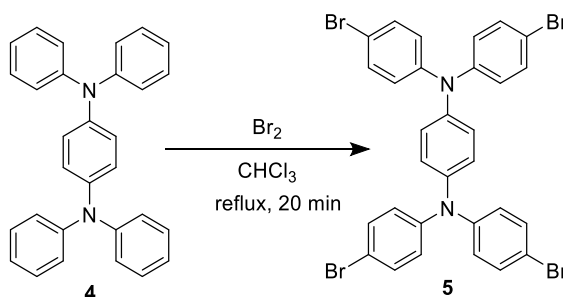


Schéma 2. Syntéza halogenovaného derivátu **5**.

1.5.2. Syntéza jodovaných prekurzorů

Jednokrokovou reakcí lze připravit jodovaný derivát TPA **7**. Výchozí látka **6** reagovala s elementárním jodem v přítomnosti oxidu rtuťnatého. Reakce probíhala 3 hodiny při teplotě 78 °C. Výsledkem byl produkt ve formě bílého krystalického prášku s výtěžkem 55 % (*Schéma 3*).^[28]

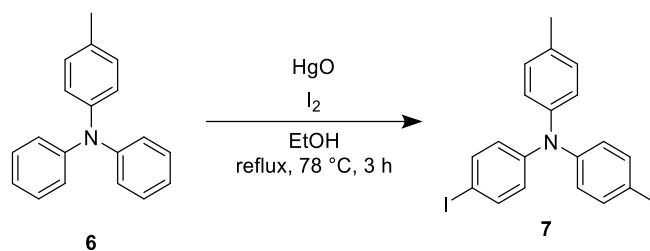


Schéma 3. Syntéza jodovaného derivátu TPA 7.

1.5.3. Syntéza prekurzoru pro Suzukiho cross-couplingovou reakci

Pro Suzukiho reakci jsou kromě halogenovaných derivátů klíčové i deriváty boronové kyseliny či její estery. Takovým příkladem může být i syntéza sloučeniny **9**, která byla získána jako bílá pevná látka ve výtěžku 70 % (*Schéma 4*). Sloučenina **9** byla následně použita jako prekurzor pro syntézu sloučenin emitujících v modré oblasti UV-Vis spektra s potencionálním využitím v OLED zařízeních.^[29]

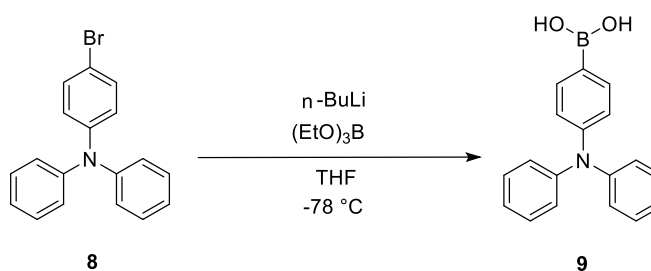


Schéma 4. Syntéza derivátu kyseliny boronové **9**.

1.5.4. Syntéza prekurzoru pro Heckovu reakci

Článek z roku 2004, který se zabývá organickými polovodiči, popisuje syntézu sloučeniny **12** pomocí Buchwaldovy–Hartwigovy cross-couplingové reakce. Sekundární amin **10** v tomto případě reagoval s halogenderivátem **11** v inertní atmosféře argonu při 100 °C po dobu jedné hodiny. Produkt byl získán s výtěžkem 85 % (*Schéma 5*).^[30] Takovýto TPA může být následně použit pro syntézu derivátů s vinylovým π -můstkem pomocí Heckovy reakce.

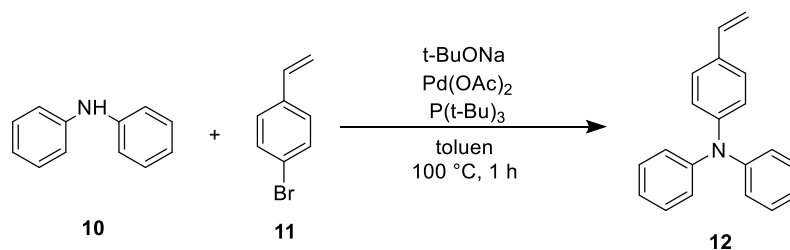


Schéma 5. Syntéza TPA derivátu **12** pomocí Buchwaldovy–Hartwigovy cross-couplingové reakce.

1.6. Syntéza vybraných derivátů TPA s využitím cross-couplingových reakcí

1.6.1. Heckův cross-coupling

Derivát TPA **15** byl syntetizován Heckovou cross-couplingovou reakcí. Jako výchozí látka byl použit derivát TPA **13**, který reagoval za obecných podmínek pro Heckovu reakci s halogenderivátem **14** (*Schéma 6*). Produkt **15** byl získán jako světle zelená pevná látka s výtěžkem 62 %.^[31]

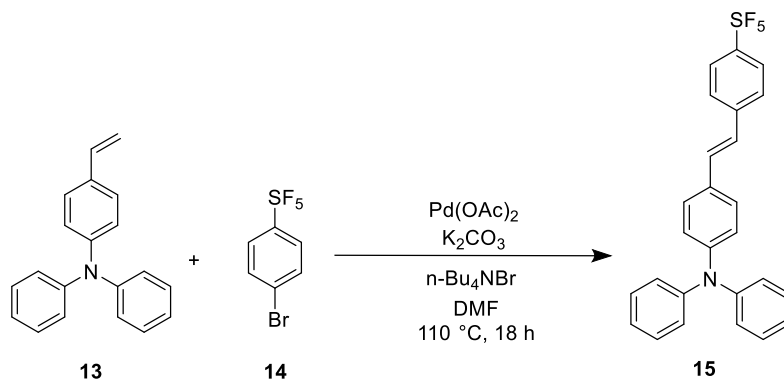


Schéma 6. Syntéza TPA derivátu **15** Heckovým cross-couplingem.

1.6.2. Sonogashirův cross-coupling

Sonogashirova reakce se využívá při přípravě sloučenin s acetylenovým π -můstkem. Pro syntézu derivátu TPA **18**, využil Tydlitát a spol. Sonogashirovou cross-couplingovou reakci vycházející z 4-ethynyltrifenylaminu **16** a halogenderivátu **17**. Výsledná sloučenina **18** byla získána v podobě žluté pevné látky s výtěžkem 90 % (*Schéma 7*).^[32]

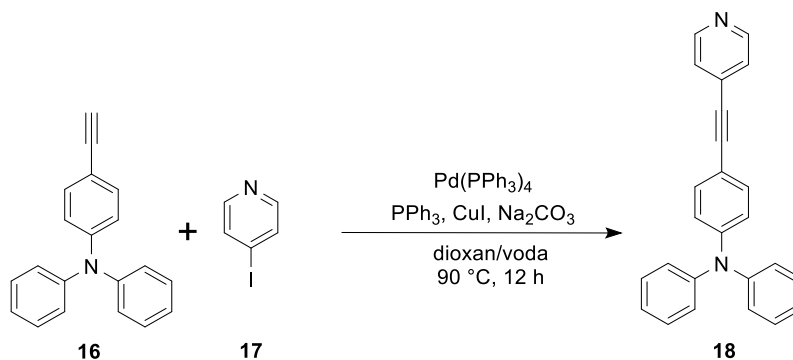


Schéma 7. Syntéza TPA derivátu **18** pomocí Sonogashirova cross-couplingu.

1.6.3. Suzukiho–Miyaurův cross-coupling

Pomocí Suzukiho–Miyaurovy cross-couplingové reakce je možno připravit TPA derivát **21**. Halogenovaný TPA **19** reaguje s pyridinovým derivátem boronové kyseliny **20**. Cílová molekula byla získána jako žlutá pevná látka ve výtěžku 78 % (*Schéma 8*).^[33]

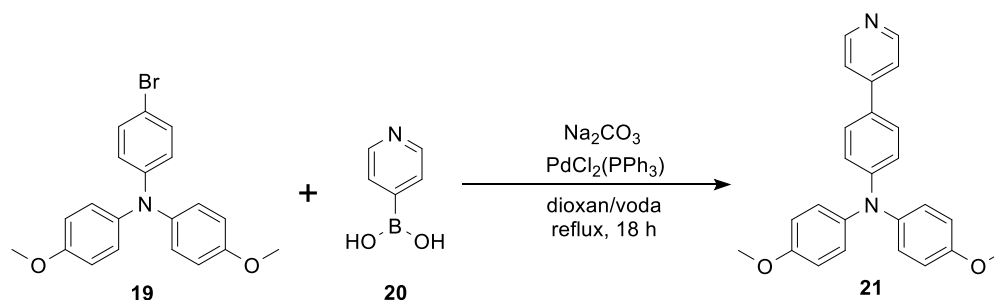


Schéma 8. Syntéza derivátu TPA **21** Suzukiho–Miyauraovou cross-couplingovou reakcí.

1.6.4. Ullmanův cross-coupling

Článek z roku 2019 týkající se organických sloučenin s potenciačním využitím ve fosforescenčních OLED technologiích zmiňuje syntézu sloučeniny **24** pomocí Ullmanova cross-couplingu. Halogenderivát **22** reagoval se sloučeninou **23** za přítomnosti mědi a jodidu měďného. Produkt **24** byl získán jako žlutá pevná látka ve výtěžku 62 % (*Schéma 9*).^[34]

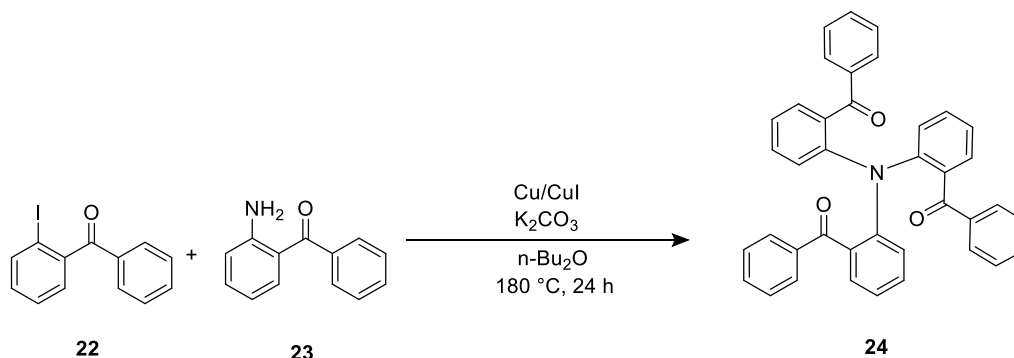


Schéma 9. Syntéza derivátu TPA **24** Ullmanovou cross-couplingovou reakcí.

1.6.5. Buchwaldova–Hartwigova reakce

Článek z roku 2014 se zabýval syntézou komplexů rhenia s organickými ligandy. Za tímto účelem byla pomocí C-N cross-couplingové reakce připravena i sloučenina **27**. Syntéza vycházela z látek **25** a **26** za přítomnosti komplexu palladia jako katalyzátoru. Produkt **27** byl získán jako béžová pevná látka s výtěžkem 83 % (*Schéma 10*).^[35]

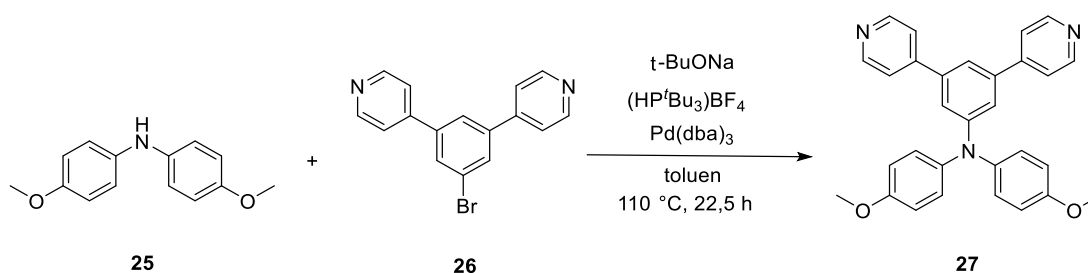


Schéma 10. Syntéza derivátu TPA **27** Buchwaldovou–Harwigovou reakcí.

1.7. Syntéza pyridiniových derivátů s využitím cross-couplingových reakcí

1.7.1. Stilleho cross-coupling

Pyridiniové deriváty lze zavádět do molekul přímo, a to například z halogenderivátů pomocí cross-couplingových reakcí. Tímto způsobem lze obejít krok kvarternizace při přípravě pyridiniových derivátů. Například derivát **29** byl připraven z kvarternizovaného pyridinu **28** a cínicité sloučeniny **27** pomocí Stilleho cross-couplingu (*Schéma 11*). Produkt **29** byl získán s výtěžkem 64 %.^[36]

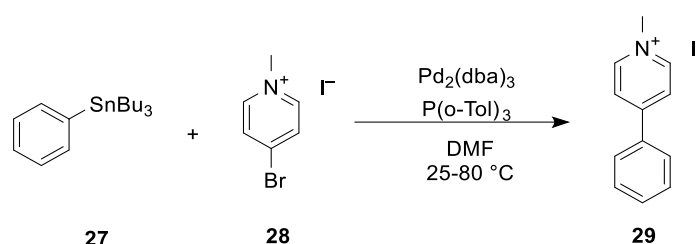


Schéma 11. Syntéza pyridiniového derivátu **29** pomocí Stilleho cross-couplingu.

1.7.2. Knoevenagelova kondenzace

Pro přímou syntézu pyridiniových derivátů lze využít také Knoevenagelovu kondenzaci. Sloučenina **32** byla připravena kondenzací výchozího aldehydu **30** a pyridinia **31** v bazickém prostředí (*Schéma 12*). Produkt **32** byl získán ve výtěžku 76 %. Sloučenina **32** má potencionální využití jako detektor kyseliny chlorné v mitochondriích a kohoutkové vodě.^[37]

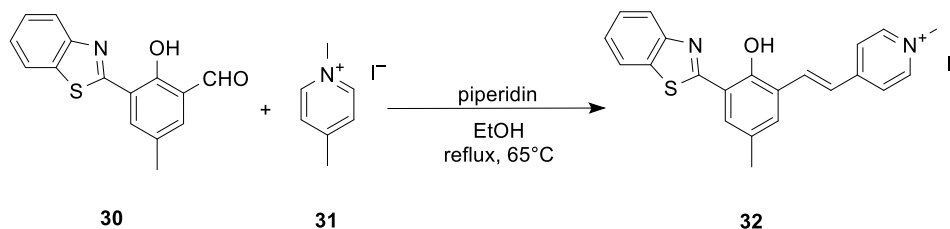


Schéma 12. Syntéza sloučeniny **32** prostřednictvím Knoevenagelovy kondenzace.

1.8. Příprava pyridiniových derivátů pomocí kvarternizace

1.8.1. Kvarternizace sultony

Kvarternizaci pyridinových jednotek lze provést několika různými činidly. Hung a spol. kvarternizovali pyridinový derivát **33** 1,4-butansultonem **34** resp. 1,3-propansultonem **36**. Sloučeniny **35** resp. **37** byly připraveny ve formě žluté pevné látky s výtěžkem 33 % resp. 44 % (*Schéma 13*).^[38]

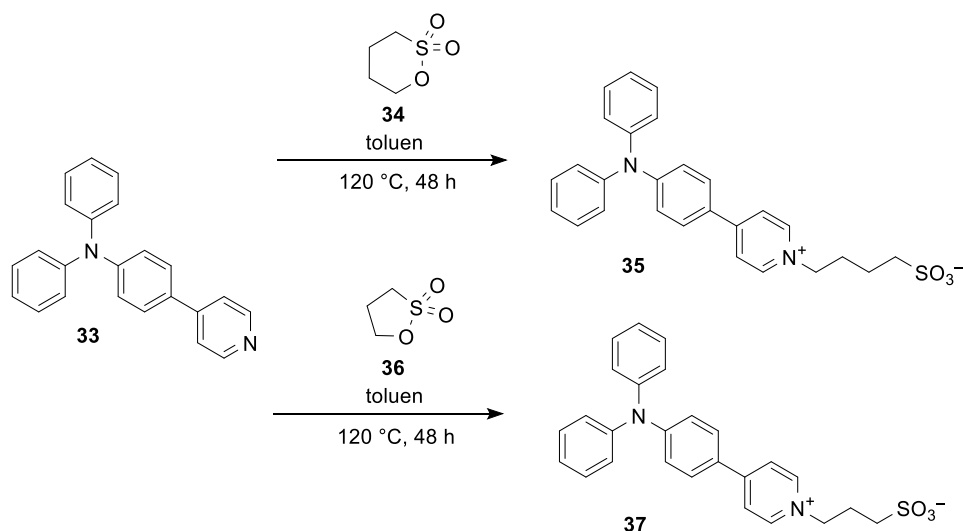


Schéma 13. Příprava kvarternizovaných pyridinových derivátů **35** a **37**.

1.8.2. Kvarternizace dimethylsulfátem

Dalším možným způsobem je kvarternizace pomocí dimethylsulfátu **39**. Reakcemi pyridinových derivátů se zabýval Rak a spol. v článku z roku 2021. Bipyridin **38** byl podroben kvarternizaci pomocí dimethylsulfátu **39**. Volbou podmínek lze ovlivnit počet kvarternizovaných pyridinů. Při mírnějších reakčních podmínkách s 1 ekvivalentem **39** byl získán monokvarternizovaný derivát **40** ve výtěžku 84 %. Naopak při refluxování se 2 ekvivalenty **39** byl získán produkt **41** s výtěžkem 95 % (*Schéma 14*).^[39]

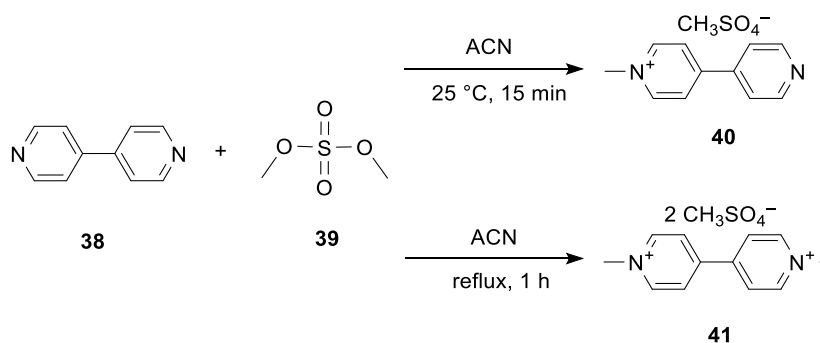


Schéma 14. Syntéza kvarternizovaných bipyridinových derivátů **40** a **41**.

1.8.3. Kvarternizace halogenkarboxylovými kyselinami

Jedním z častých způsobů kvarternizace je i ten s využitím halogenkarboxylových kyselin. Derivát kumarinu **42** reagoval s derivátem propionové kyseliny **43** za vzniku sloučeniny **44** v podobě oranžové pevné látky s výtěžkem 84 % (*Schéma 15*). Při kvarternizaci derivátem kyseliny propionové **43** dochází zároveň k zavedení karboxylové funkční skupiny do sloučeniny **42**. Ta následně umožnila vznik vazby s protinádorovým léčivem, které může být s pomocí nosiče cíleně doručeno do buněk.^[40]

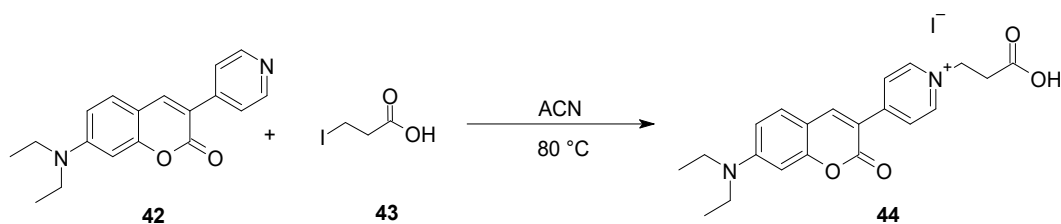
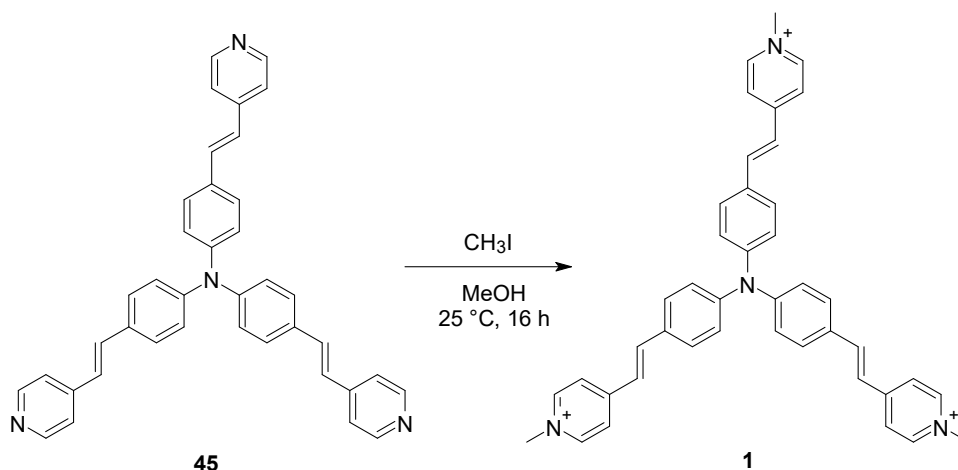


Schéma 15. Syntéza pyridiniového derivátu 44.

1.8.4. Kvarternizace alkylhalogenidy

Jak uvádí článek z roku 2007, derivát TPA **1** obsahující tři jednotky vinylpyridinia vykazuje vyšší účinnost 2PA než derivát se dvěma jednotkami. Na druhou stranu derivát se dvěma elektronakceptorními pyridiniovými skupinami lépe interaguje s cílovou molekulou, což se ukazuje jako nejvhodnější varianta. Díky kladnému náboji tyto sloučeniny lépe pronikají buněčnými membránami a vykazují lepší rozpustnost ve vodě. [5]

Za tímto účelem byla sloučenina **1** připravena kvarternizací sloučeniny **45** pomocí jodmethanu (*Schéma 16*). Produkt **1** byl získán jako tmavě červená pevná látka s výtěžkem 91 %. [5]

Schéma 16. Syntéza derivátu TPA **1**.

1.9. Výměna aniontů

Závěrem je vhodné též zmínit možnost záměny aniontů. To může být výhodné například z hlediska ovlivnění rozpustnosti, interakce s biologickým materiálem atd. Nahrazením jodidového aniontu v pyridiniové soli sloučeniny **46** došlo k přípravě sloučeniny **47** obsahující PF_6^- jako protiion (*Schéma 17*). Tato nově vzniklá sloučenina vykazovala výrazně vyšší kvantový výtěžek fluorescence ve srovnání s výchozí látkou. Sloučenina **47** byla následně využita pro fluorescenční značení mitochondrií a buněčných stěn. Sloučenina **47** byla získána ve výtěžku 83 % jako žlutá pevná látka. [41]

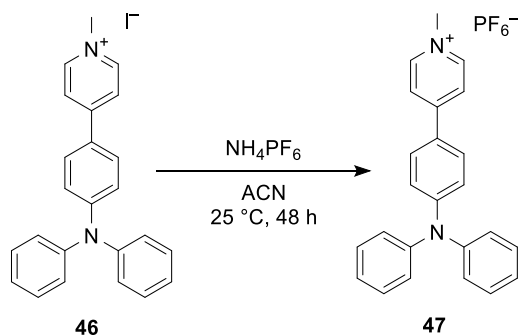


Schéma 17. Syntéza sloučeniny **47** s hexafluorofosforečnanovým aniontem.

Jako další protiion lze využít i tetrafluorborát. Sloučenina **49** byla získána z výchozí látky **48** reakcí s NaBF_4 , při které došlo k výměně aniontu (*Schéma 18*). Pyridiniový derivát **49** byl izolován jako červenohnědá pevná látka s výtěžkem 85 %. Na rozdíl od výchozí sloučeniny **48** vykazoval produkt **49** fluorescenci nejen v pevné fázi, ale také v roztoku. Emisní vlastnosti v roztoku byly závislé na použitém rozpouštědle, kdy v polárnějších protických rozpouštědlech docházelo k hypsochromnímu posunu emise.^[42]

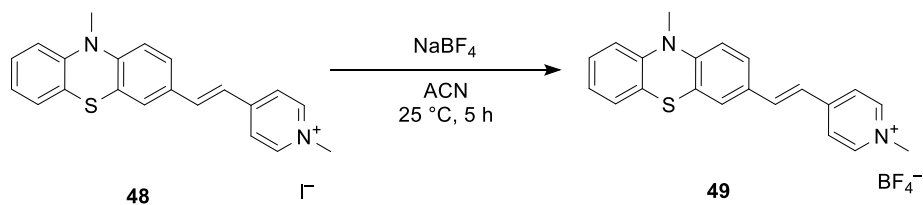


Schéma 18. Příprava sloučeniny **49** výměnou halogenidového aniontu.

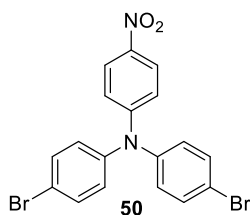
2. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

2.1. Obecné metody

Rozpouštědla a činidla použitá při syntéze byla zakoupena od firem Aldrich, Fluka nebo Penta a byla použita bez dalšího čištění. Použitá rozpouštědla byla odpařována na odparce Heidolph Laborota 4001. Cross-couplingové reakce byly prováděny na vakuum-inertní lince ve Schlenkových baňkách. Sloupcová chromatografie byla prováděna na silikagelu (SiO₂ 60, velikost částic 0,040-0,063 mm, Merck) a za použití komerčně dostupných rozpouštědel. Tenkovrstvá chromatografie byla prováděna na aluminiových destičkách potažených silikagelem SiO₂ 60 F₂₅₄ (Merck) s vizualizací pomocí UV lampy (254 nebo 360 nm). Body tání byly stanoveny v otevřených kapilárách na přístroji Buchi B-540. ¹H a ¹³C NMR spektra byla měřena v CDCl₃ při 25 °C na přístroji *Bruker AVANCE III* při frekvencích 500/125 MHz pro ¹H resp. ¹³C spektra.. Reziduální signály rozpouštědel byly použity jako vnitřní standard (CDCl₃ – 7,25 a 77,20; CD₂Cl₂–5,30 a 54,00; CD₃OD – 3,31 a 49,15; aceton-*d*₆ – 2,05 a 29,92 ppm pro ¹H- resp. ¹³C-NMR spektra. Interakční konstanty (³*J*) jsou uvedeny v Hz. Pozorované signály jsou popsány jako s (singlet), d (dublet) a m (multiplet) a jsou přiřazovány zkratkami odpovídající Me (methyl), Vin (vinyl) a Form (formyl). Hmotnostní spektra s vysokým rozlišením byla měřena metodou „dried droplet“ pomocí MALDI hmotnostního spektrometru *LTQ Orbitrap XL* (Thermo Fisher Scientific) vybaveného dusíkovým UV laserem (337 nm, 60 Hz). Spektra byla měřena v režimu pozitivních iontů, v normálním hmotnostním rozsahu s rozlišením 100 000 při *m/z* = 400. Jako matrice byla použita *trans*-2-[3-(4-*terc*-butylfenyl)-2-methyl-2-propenyliden]malononitril (DCTB). UV/Vis spektra byla měřena na fluorescenčním a absorpčním spektrometru DuettaTM HORIBA v acetonu.

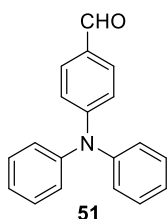
2.2. Syntéza prekurzorů

2.2.1. Syntéza prekurzoru 50



Ve 100 ml baňce byl ve 20 ml DMSO smíchán bis(4-bromfenyl)amin (2,190 g, 6,697 mmol), 4-fluornitrobenzen (1070 μ l, 10,045 mmol) a uhličitan draselný (1,390 g, 10,057 mmol). Reakční směs byla zahřívána a míchána při 145 °C přes noc. Následně byla směs ochlazena v ledové lázni a filtrována přes Büchnerovu nálevku. Filtrační koláč byl promyt ledovým EtOH (50 ml) a vodou (50 ml).^[43] Byl získán produkt ve výtěžku 95 % jakožto žlutá pevná látka s bodem tání 219-221 °C (ref.^[44] b.t. 221 °C). ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃, 25°C): δ = 6,94-6,96 (m, 2H), 7,01-7,03 (m, 4H), 7,46-7,47 (m, 4H), 8,04-8,06 (m, 2H) ppm. ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ = 119,01; 119,43; 125,73; 127,81; 133,33; 141,27; 144,69; 152,71 ppm. HR-MALDI-MS (DCTB) *m/z*: vypočteno pro C₁₈H₁₂Br₂N₂O₂ [M]⁺ 447,9240; nalezeno 447,9239.

2.2.2. Syntéza prekurzoru 51



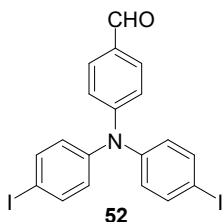
Do dvouhrdlé baňky bylo předloženo 25 ml DMF, ve kterém byl rozpuštěn trifenylamin (5 g, 20,382 mmol). Roztok byl ochlazen na 0 °C a po kapkách byl přidán POCl₃ (1,980 ml, 21,178 mmol). Směs byla následně zahřívána na 80 °C po dobu 3 h. Po uplynutí reakční doby byla směs ochlazena a přelita do kádinky s ledem. Vyloučená sraženina byla zfiltrována přes Büchnerovu nálevku a promyta vodou (50 ml).^[45] Byl získán produkt ve výtěžku 95 % jakožto béžová pevná látka s bodem tání 133-134,7 °C (ref.^[46] 132-134 °C) ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃, 25°C): δ = 7,00-7,02 (m, 2H), 7,15-7,17 (m, 6H), 7,32-7,35 (m, 4H), 7,66-7,68 (m, 2H), 9,80 (s, 1H, CH_{Fom}) ppm. ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ = 119,50; 125,28; 126,49; 129,25; 129,90; 131,48; 146,31; 153,52; 190,63 ppm. HR-MALDI-MS (DCTB) *m/z*: vypočteno pro C₁₉H₁₅NO [M]⁺ 273,1148; nalezeno 273,1142.

2.2.3. Obecná metoda pro přípravu jodovaných prekurzorů

Do 250 ml baňky byl předložen derivát TPA, jodid draselný, jodičnan draselný a 100 ml ledové kyseliny octové. Reakční směs byla míchána při 110 °C po dobu 6 h. Následně byla směs ochlazena v ledové lázni, naředěna ledovou vodou a neutralizována pevným K₂CO₃. Vzniklá sraženina byla zfiltrována přes Büchnerovu nálevku. Filtrační koláč byl promyt vodou (50 ml). Poté byla surová směs rozpuštěna v DCM (50 ml) a extrahována Na₂CO₃ (3×30 ml)

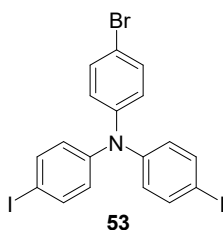
a vodou (3×30 ml). Organická fáze byla nakonec promyta solankou. Organický zbytek byl vysušen síranem sodným a zbytková rozpouštědla byla odpařena.

2.2.4. Syntéza prekurzoru 52



Prekurzor **52** byl připraven z prekurzoru **51** (2 g, 7,317 mmol), jodidu draselného (1,822 g, 10,975 mmol) a jodičnanu draselného (1,174 g, 5,488 mmol) dle obecného postupu pro přípravu jodovaných prekurzorů. Byl získán produkt ve výtěžku 96 % jakožto nažloutlá pevná látka s bodem tání 140-142 °C (ref.^[47] 142-143 °C). ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃, 25°C): δ = 6,87-6,89 (m, 4H), 7,03-7,05 (m, 2H), 7,60-7,63 (m, 4H), 7,69-7,71 (m, 2H), 9,83 (s, 1H, CH_{Form}) ppm. ¹³C-NMR spektrum je shodné se spektrem z literatury.^[48] HR-MALDI-MS (DCTB) *m/z*: vypočteno pro C₁₉H₁₃I₂NO [M]⁺ 524,9081; nalezeno 524,9080.

2.2.5. Syntéza prekurzoru 53



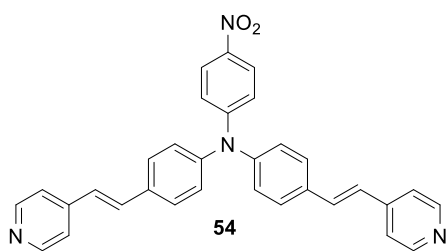
Prekurzor **53** byl připraven z 4-bromtrifenylaminu (1,700 g, 5,244 mmol), jodidu draselného (1,300 g, 7,831 mmol) a jodičnanu draselného (0,840 g, 3,925 mmol) dle obecného postupu pro přípravu jodovaných prekurzorů. Byl získán produkt ve výtěžku 81 % jakožto béžová pevná látka s bodem tání 148-150 °C (ref.^[49] 148 °C). ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃, 25°C): δ = 6,78-6,80 (m, 4H), 6,91-6,93 (m, 2H), 7,34-7,35 (m, 2H), 7,51-7,53 (m, 4H) ppm. ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃, 25 °C): δ = 86,61; 116,45; 126,05; 126,10; 132,72; 138,62; 146,03; 146,85; ppm. HR-MALDI-MS (DCTB) *m/z*: vypočteno pro C₁₈H₁₂BrI₂N [M]⁺ 574,8237; nalezeno 574,8238.

2.3. Syntéza prekurzorů pomocí cross-couplingových reakcí

2.3.1. Obecná metoda pro Heckův cross-coupling

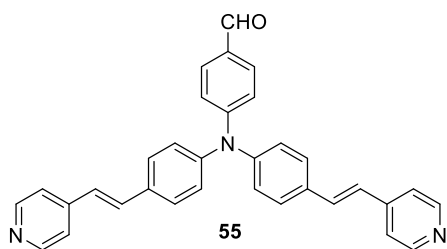
V předem vysekurované Schlenkově baňce v atmosféře argonu byl ve směsi rozpouštědel ACN:Et₃N (v poměru 7:1) rozpuštěn příslušný halogenderivát, vinylový derivát a tri-*ortho*-tolylfosfin. Směs byla probublána argonem, následně byl přidán katalyzátor Pd(OAc)₂. Reakční směs byla zahřívána a míchána při 80 °C přes noc. Po odpaření ACN byla reakční směs extrahována do DCM (3×30 ml) a NaHCO₃ (3×30 ml). Nakonec byla organická fáze promyta solankou (3×30 ml). Organický zbytek byl vysušen síranem sodným, zfiltrován a zbytková rozpouštědla byla odpařena.

2.3.2. Syntéza prekurzoru 54



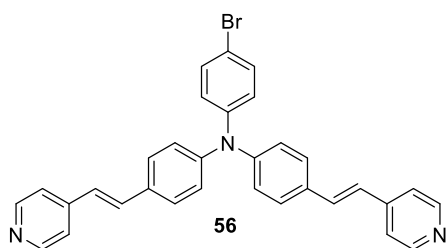
Prekurzor **54** byl připraven z prekurzoru **50** (0,500 g, 1,116 mmol), 4-vinylpyridinu (297 μ l, 2,791 mmol) a tri-*ortho*-tolylfosfinu (0,136 g, 0,446 mmol) dle obecného postupu pro Heckův cross-coupling. Surový produkt byl čištěn pomocí sloupcové chromatografie. $R_f = 0,25$ (SiO_2 ; EtOAc:MeOH = 20:1). Produkt byl získán ve výtěžku 93 % jakožto červená krystalická látka s bodem tání 135-137,5 °C. $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CD_2Cl_2 , 25 °C): $\delta = 7,01$ (d, 2H, $^3J = 16,5$ Hz, CH_{vin}), 7,04-7,07 (m, 2H), 7,15-7,19 (m, 4H), 7,31 (d, 2H, $J = 16,5$ Hz, CH_{vin}), 7,36-7,37 (m, 4H), 7,54-7,56 (m, 4H), 8,04-8,07 (m, 2H), 8,52-8,54 (m, 4H) ppm. $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CD_2Cl_2 , 25 °C): $\delta = 120,36$; 121,23; 125,87; 126,52; 126,74; 128,97; 132,31; 134,04; 141,64; 144,85; 146,35; 150,76; 153,27 ppm. HR-MALDI-MS (DCTB) m/z : vypočteno pro $\text{C}_{32}\text{H}_{24}\text{N}_4\text{O}_2$ $[\text{M}]^+$ 496,1894; nalezeno 496,1890.

2.3.3. Syntéza prekurzoru 55



Prekurzor **55** byl připraven z prekurzoru **52** (0,457 g, 0,870 mmol), 4-vinylpyridinu (231 μ l, 2,175 mmol) a tri-*ortho*-tolylfosfinu (0,106 g, 0,348 mmol) dle obecného postupu pro Heckův cross-coupling. Surový produkt byl čištěn pomocí sloupcové chromatografie. $R_f = 0,5$ (SiO_2 ; EtOAc:MeOH = 8:1). Produkt byl získán ve výtěžku 76 % jakožto oranžovo červená krystalická látka s bodem tání 129-132 °C. $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CD_2Cl_2 , 25 °C): $\delta = 6,99$ (d, 2H, $^3J = 16,5$ Hz, CH_{vin}); 7,12-7,14 (m, 2H); 7,16-7,17 (m, 4H); 7,31 (d, 2H, $^3J = 16,5$ Hz, CH_{vin}); 7,35-7,36 (m, 4H); 7,52-7,53 (m, 4H); 7,71-7,72 (m, 2H); 8,52-8,53 (m, 4H); 9,83 (s, 1H, CH_{form}) ppm. $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CD_2Cl_2 , 25 °C): $\delta = 121,20$; 121,69; 126,07; 126,35; 128,84; 130,90; 131,62; 132,48; 133,34; 144,97; 146,89; 150,68; 152,91; 190,77 ppm. HR-MALDI-MS (DCTB) m/z : vypočteno pro $\text{C}_{33}\text{H}_{25}\text{N}_3\text{O}_1$ $[\text{M}]^+$ 479,1992; nalezeno 479,1985.

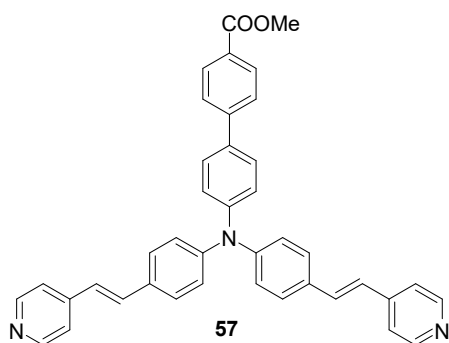
2.3.4. Syntéza prekurzoru 56



Prekurzor **56** byl připraven z prekurzoru **53** (0,500 g, 0,868 mmol), 4-vinylpyridinu (185 μ l, 1,736 mmol) a tri-*ortho*-tolylfosfinu (0,052 g, 0,171 mmol) dle obecného postupu pro Heckův cross-coupling. Surový produkt byl čištěn pomocí sloupcové chromatografie. $R_f = 0,27$ (SiO_2 ;

EtOAc:MeOH = 20:1). Produkt byl získán ve výtěžku 45 % jakožto červená krystalická látka s bodem tání 195-196 °C. $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CD_2Cl_2 , 25°C): $\delta = 6,94$ (d, 2H, $^3J = 16,5$ Hz, CH_{vin}), 6,99-7,01 (m, 2H), 7,06-7,08 (m, 4H), 7,27 (d, 2H, $J = 16,5$ Hz, CH_{vin}), 7,33-7,34 (m, 4H), 7,38-7,40 (m, 2H), 7,44-7,46 (m, 4H), 8,50-8,51 (m, 4H) ppm. $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CD_2Cl_2 , 25 °C): $\delta = 116,70$; 121,12; 124,48; 125,18; 126,92; 128,65; 131,75; 132,67; 132,97; 145,13; 146,61; 147,81; 150,65; ppm. HR-MALDI-MS (DCTB) m/z : vypočteno pro $\text{C}_{32}\text{H}_{24}\text{BrN}_3$ $[\text{M}]^+$ 529,1148; nalezeno 529,1149.

2.3.5. Syntéza prekurzoru 57 pomocí Suzukiho-Miyaurova cross-couplingu



Do skleněného autoklávu byl přidán prekurzor **56** (0,300 g, 0,566 mmol), methyl-4-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)benzoát (0,267 g, 1,019 mmol), $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$ (0,012 g, 0,017 mmol) a uhličitan sodný (0,090 g, 0,850 mmol) v systému rozpouštědel dioxan:voda (4:1). Směs byla probublána argonem a míchána při teplotě 120 °C po dobu 3 dnů. Po uplynutí

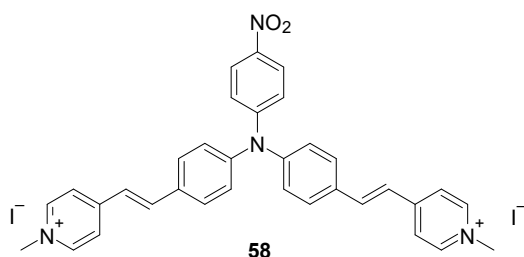
reakční doby byla směs ochlazená a extrahována pomocí dichlormethanu (3×30 ml) a NaHCO_3 (3×30 ml). Nakonec byla organická fáze promyta solankou (3×30 ml). Organický zbytek byl vysušen síranem sodným, zfiltrován a zbytková rozpouštědla byla odpařena. Surový produkt byl čištěn pomocí sloupcové chromatografie. $R_f = 0,35$ (SiO_2 ; EtOAc:MeOH = 8:1). Produkt byl získán ve výtěžku 93 % jakožto oranžová pevná látka. $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3 , 25°C): $\delta = 6,92$ (d, 2H, $^3J = 16$ Hz, CH_{vin}), 7,14-7,15 (m, 4H), 7,20-7,22 (m, 2H), 7,24-7,28 (m, 2H), 7,33-7,34 (m, 4H), 7,44-7,46 (m, 4H), 7,55-7,57 (m, 2H), 7,64-7,65 (m, 2H), 8,08-8,10 (m, 2H), 8,54-8,55 (m, 4H) ppm. HR-MALDI-MS (DCTB) m/z : vypočteno pro $\text{C}_{40}\text{H}_{31}\text{N}_3\text{O}_2$ $[\text{M}]^+$ 585,2411; nalezeno 585,2403.

2.4. Syntéza pyridiniových prekurzorů

2.4.1. Obecná metoda kvarternizace pyridinových derivátů

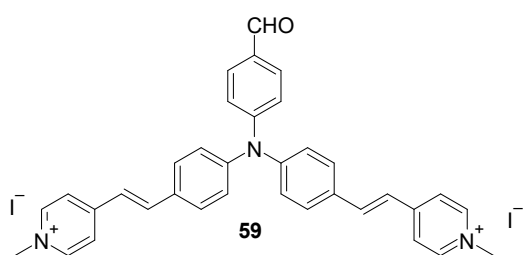
Do 25 ml baňky byl předložen daný derivát TPA a jodmethan. Směs byla míchána při 40 °C přes noc. Zbytkový jodmethan byl odpařen. Surový produkt byl přečištěn pomocí rekrystalizace z dichlormethanu.

2.4.2. Syntéza prekurzoru 58



Prekurzor **58** byl připraven z prekurzoru **54** (0,300 g, 0,604 mmol) a jodmethanu (10 ml, 160,631 mmol) dle obecné metody kvarternizace. Byl získán produkt ve výtěžku 97 % jakožto červená pevná látka, s teplotou rozkladu 299 °C. ¹H-NMR (500 MHz, CD₃OD, 25°C): δ = 4,32 (s, 6H_{Me}); 7,19-7,21 (m, 2H); 7,26-7,28 (m, 4H); 7,42 (d, 2H, ³J = 16 Hz, CH_{Vin}); 7,80-7,82 (m, 4H); 7,95 (d, 2H, ³J = 16 Hz, CH_{Vin}); 8,16-8,19 (m, 6H); 8,71-8,72 (m, 4H) ppm. ¹³C-NMR (125 MHz, CD₃OD, 25 °C): δ = 47,92; 123,09; 123,72; 125,09; 126,65; 127,16; 131,37; 133,71; 141,94; 143,75; 146,23; 149,26; 153,80; 155,28 ppm. HR-MALDI-MS (DCTB) *m/z*: vypočteno pro C₃₄H₃₀N₄O₂ [M]⁺ 526,2363; nalezeno 526,2349.

2.4.3. Syntéza prekurzoru 59



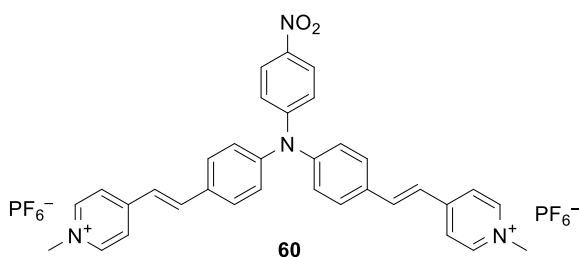
Prekurzor **59** byl připraven z prekurzoru **55** (0,205 g, 0,428 mmol) a jodmethanu (10 ml, 160,631 mmol) dle obecné metody kvarternizace. Byl získán produkt ve výtěžku 76 % jakožto červená pevná látka, s teplotou rozkladu 156 °C. ¹H-NMR (500 MHz, CH₃OH, 25°C): δ = 4,32 (s, 6H_{Me}); 7,23-7,25 (m, 6H); 7,40 (d, 2H, ³J = 16 Hz, CH_{Vin}); 7,78-7,79 (m, 4H); 7,85-7,87 (m, 2H); 7,95 (d, 2H, ³J = 16 Hz, CH_{Vin}); 8,15-8,17 (m, 4H); 8,70-8,71 (m, 4H); 9,87 (s, 1H, CH_{Form}) ppm. ¹³C-NMR (125 MHz, CH₃OH, 25 °C): δ = 47,89; 123,39; 124,18; 125,02; 126,76; 131,28; 132,67; 133,10; 133,20; 142,09; 146,19; 149,66; 153,58; 155,35; 192,68 ppm. HR-MALDI-MS (DCTB) *m/z*: vypočteno pro C₃₅H₃₁N₃O [M]⁺ 509,2462; nalezeno 509,2449.

2.5. Syntéza finálních sloučenin

2.5.1. Obecná postup výměny aniontu pyridiniového derivátu

Ve 25 ml baňce byl v systému rozpouštědel voda:MeOH (2:1) za horka rozpuštěn hexafluorofosforečnan draselný. Následně byl do směsi přidán daný pyridiniový derivát TPA. Reakční směs byla refluxována při teplotě 100 °C po dobu 1 hodiny. Po uplynutí reakční doby byla směs ochlazena a vyloučené krystaly byly zfiltrány.

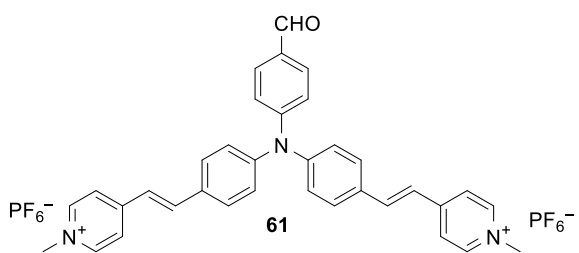
2.5.2. Syntéza chromoforu 60



Prekurzor **60** byl připraven z hexafluorofosforečnanu draselného (0,106 g, 0,575 mmol) a prekurzoru **58** (0,180 g, 0,230 mmol) dle obecného postupu výměny aniontu pyridinia. Byl získán produkt ve výtěžku 87 %

jakožto červená pevná látka, s teplotou rozkladu 262 °C. ¹H-NMR (500 MHz, aceton-d₆, 25 °C): δ = 4,52 (s, 6H_{Me}), 7,22-7,24 (m, 2H); 7,33-7,34 (m, 4H); 7,58 (d, 2H, ³J = 16 Hz, CH_{Vin}); 7,85-7,86 (m, 4H); 8,09 (d, 2H, ³J = 16 Hz, CH_{Vin}); 8,17-8,19 (m, 2H); 8,31-8,33 (m, 4H); 8,93-8,95 (m, 4H) ppm. ¹³C-NMR (125 MHz, aceton-d₆, 25 °C): δ = 48,15; 122,64; 123,63; 124,82; 126,31; 126,92; 131,00; 133,24; 141,26; 143,09; 146,15; 148,62; 153,33; 154,53 ppm. HR-MALDI-MS (DCTB) *m/z*: vypočteno pro C₃₄H₃₀N₄O₂ [M]⁺ 526,2363; nalezeno 526, 2348.

2.5.3. Syntéza chromoforu 61



Prekurzor **61** byl připraven z hexafluorofosforečnanu draselného (0,090 g, 0,489 mmol) a prekurzoru **59** (0,150 g, 0,196 mmol) dle obecného postupu výměny aniontu pyridinia. Byl získán produkt ve výtěžku 90 %

jakožto červená pevná látka, s teplotou rozkladu 197 °C. ¹H-NMR (500 MHz, aceton-d₆, 25 °C): δ = 4,51 (s, 6H_{Me}); 7,25-7,28 (m, 6H); 7,54 (d, 2H, ³J = 16 Hz, CH_{Vin}); 7,81-7,83 (m, 4H); 7,87-7,88 (m, 2H); 8,07 (d, 2H, ³J = 16 Hz, CH_{Vin}); 8,29-8,31 (m, 4H); 8,90-8,91 (m, 4H); 9,94 (s, 1H, CH_{Form}) ppm. ¹³C-NMR (125 MHz, aceton-d₆, 25 °C): δ = 48,09; 123,21; 123,91; 124,72; 126,33; 130,92; 132,06; 132,59; 132,82; 141,42; 146,06; 149,11; 152,70; 154,59; 191,23 ppm. HR-MALDI-MS (DCTB) *m/z*: vypočteno pro C₃₅H₃₁N₃O [M]⁺ 509,2462; nalezeno 509,2445.

3. VÝSLEDKY A DISKUZE

3.1. Syntéza prekurzorů

Základním stavebním kamenem pro syntézu pyridiniových derivátů trifenylaminů jsou halogenované prekurzory. Prekurzory v podobě halogenderivátů byly připraveny z komerčně dostupných výchozích látek.

Prekurzor **50** byl připraven nukleofilní aromatickou substitucí z výchozích látek **62** a **63**. Reakce probíhala v bazickém prostředí při 145 °C po dobu 12 h (*Schéma 19*).^[43] Produkt byl získán v podobě žluté pevné látky ve výtěžku 95 %. ¹H NMR analýza ukázala, že produkt obsahuje zbytkové množství výchozí látky **63**. Produkt byl promyt velkým množstvím ledového EtOH (cca 100 ml). Poté byla znovu provedena ¹H NMR analýza, která prokázala nulovou přítomnost výchozích látek (*Příloha 1*).

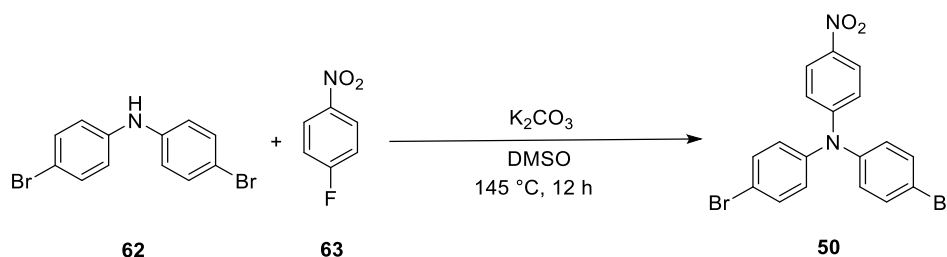


Schéma 19. Syntéza prekurzoru **50**.

Pro syntézu derivátu nesoucího formylskupinu byla nejprve sloučenina **64** podrobena reakci s POCl₃ a DMF (Vilsmeierova-Haackova reakce). Reakce probíhala při teplotě 80 °C po dobu 3 h. Výsledný prekurzor **51** byl získán jakožto béžová pevná látka ve výtěžku 95 % (*Schéma 20*), což se shoduje s výtěžkem popsáním v literatuře.^[45]

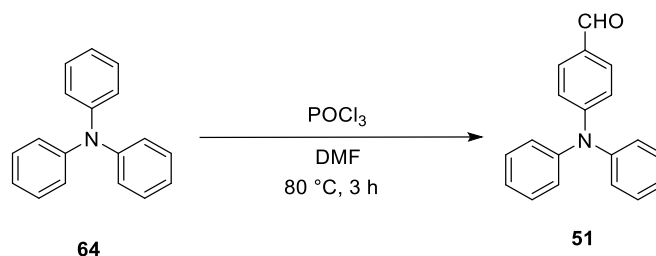


Schéma 20. Syntéza prekurzoru **51**.

Prekurzory **52** a **53** byly připraveny jodací výchozích látek **51** a **7** pomocí metody běžně využívané pro jodaci TPA derivátů systémem KI/KIO₃/kyselina octová. Produkt **52** byl získán

ve výtěžku 96 % jakožto nažloutlá pevná látka (*Schéma 21*). Produkt **53** byl získán ve výtěžku 81 % jakožto béžová pevná látka (*Schéma 21*).

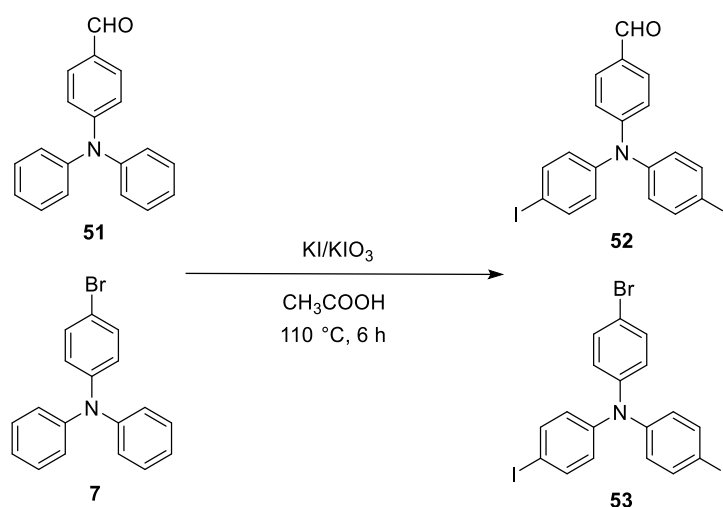


Schéma 21. Syntéza prekurzorů **52** a **53**.

3.2. Syntéza prekurzorů pomocí cross-couplingových reakcí

Pyridinové prekurzory **54** a **55** byly připraveny ze sloučenin **50** resp. **52** pomocí Heckova cross-couplingu. Surové produkty byly čištěny pomocí sloupcové chromatografie. Výsledný nitroderivát **54** byl získán v podobě červené pevné látky ve výtěžku 93 % (*Schéma 22*). Produkt **55** byl získán ve výtěžku 76 % jakožto oranžovo-červená krystalická látka (*Schéma 22*).

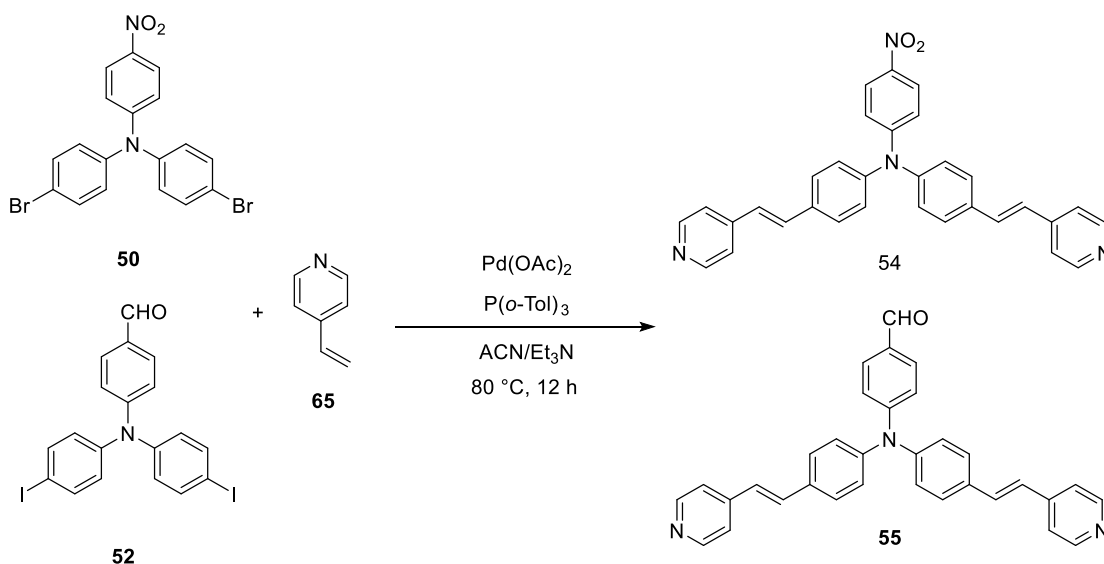


Schéma 22. Syntéza prekurzorů **54** a **55**.

Při syntéza prekurzoru **56** byl oproti syntéze nitroderivátu **54** a formylderivátu **55** reakční čas zredukován na 6 h. Při delší reakční době docházelo i k substituci atomu bromu za

vzniku symetrického tripodálního derivátu TPA. Produkt **56** byl dočištěn pomocí sloupcové chromatografie a byl získán v podobě červené pevné látky ve výtěžku 45 % (*Schéma 23*).

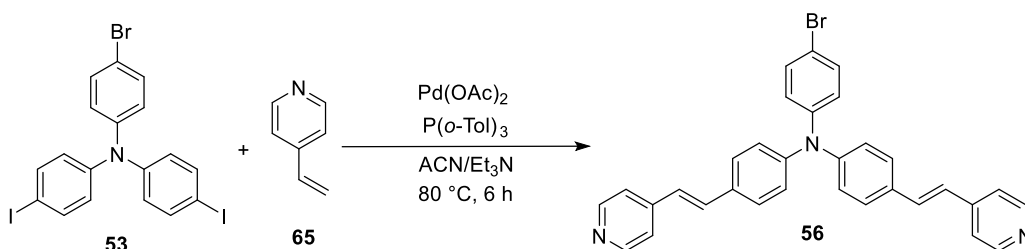


Schéma 23. Syntéza prekurzoru **56**.

3.2.1. Syntéza prekurzoru **57** pomocí Suzukiho-Miyaurova cross-couplingu

Prekurzor **57** byl syntetizován Suzukiho-Miyaurovou cross-couplingovou reakcí (*Schéma 24*). Produkt byl získán ve výtěžku 93 % jakožto oranžová látka. ^1H NMR analýza ukázala, že produkt obsahuje zbytkové množství výchozí látky **56**. Ve snaze odstranit ze směsi výchozí látku byl produkt přečištěn pomocí sloupcové chromatografie. Čištění však bylo neúspěšné. Jako další čistící metoda byla zvolena rekrystalizace z dichlormethanu s následným přesrážením pomocí hexanu. Přes veškeré úsilí se látku **57** nepodařilo získat v dostatečné čistotě (*Příloha 21*). Z výše zmíněného důvodu bylo upuštěno od dalších syntéz s využitím prekurzoru **57**.

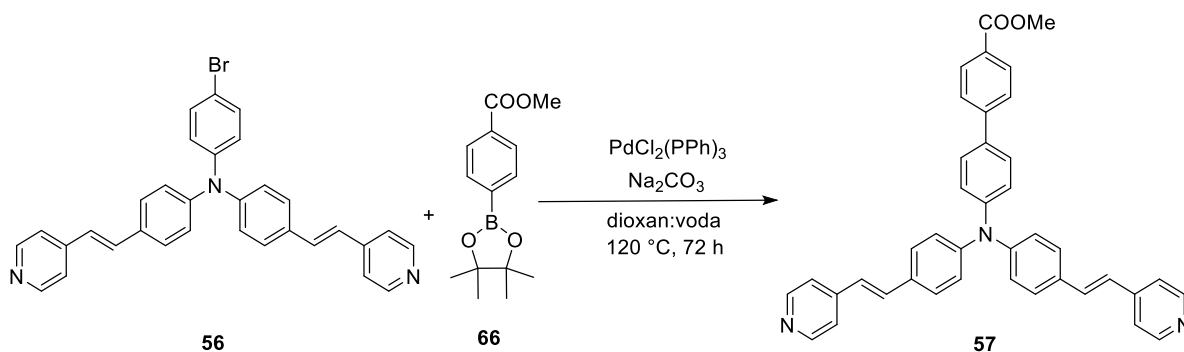


Schéma 24. Syntéza prekurzoru **57**.

3.3. Syntéza pyridiniových prekurzorů

Předposledním krokem pro přípravu finálních sloučenin byla kvarternizace pyridiniových derivátů. Prekurzory **54** a **55** byly podrobeny reakci s jodmethanem za vzniku produktů **58** a **59**. Pyridiniové deriváty **58** a **59** byly získány ve výtěžku 97 % a 76 %, oba v podobě červené pevné látky (*Schéma 25*). U obou produktů nebyl pozorován bod tání a docházelo rovnou k dekompozici. Ta se projevila karbonizací pozorovanou jako zčernání

měřeného vzorku. U produktu **58** byl tento jev pozorován při teplotě 299 °C a u produktu **59** při 156 °C.

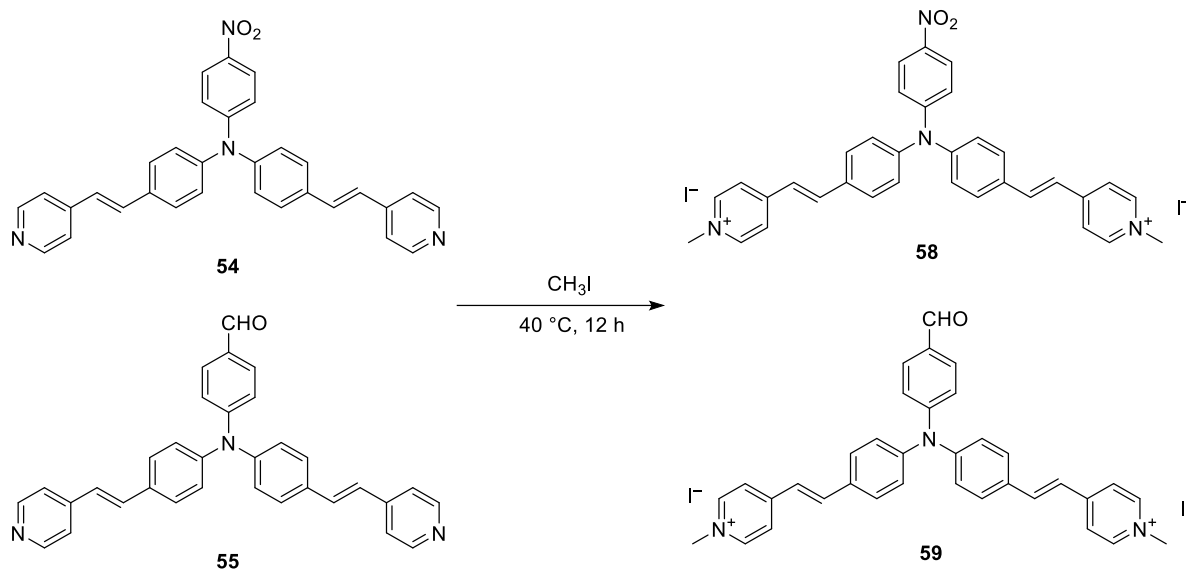


Schéma 25. Syntéza prekurzorů **58** a **59**.

3.4. Syntéza finálních sloučenin – výměna iontů

Finální sloučeniny byly připraveny z prekurzorů **58** a **59** výměnou aniontu pyridiniového derivátu (*Schéma 26*). Finální sloučeniny **60** a **61** byly získány ve výtěžku 87 % a 90 %, obě v podobě červené pevné látky látka. U obou produktů nebyl pozorován bod tání a docházelo rovnou k dekompozici. Ta se projevila karbonizací měřeného vzorku. U produktu **60** byl tento jev pozorován při teplotě 262 °C a u produktu **61** při 197 °C.

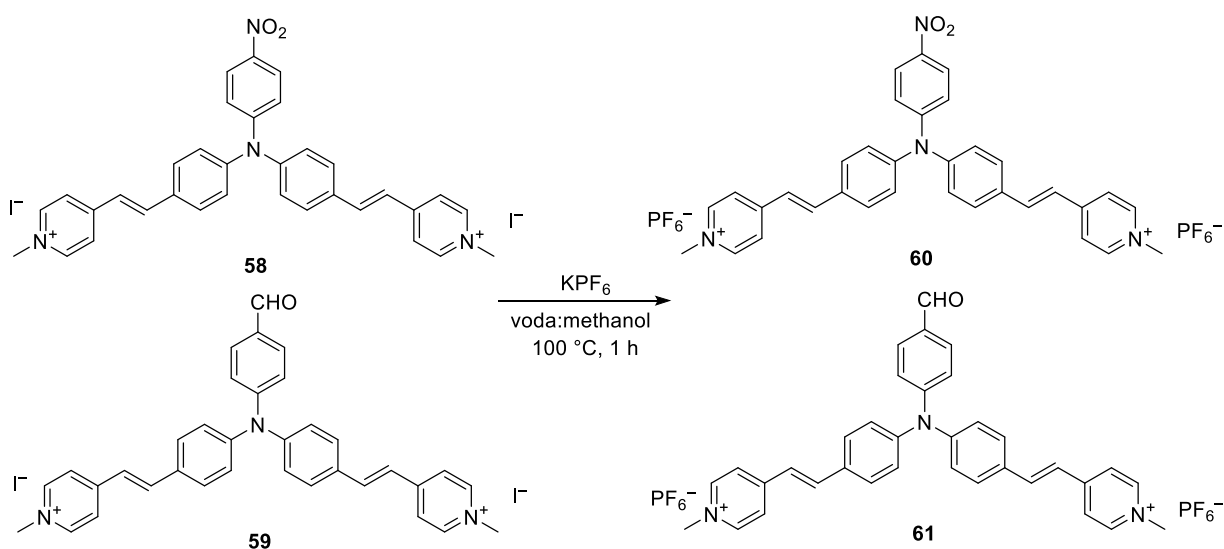
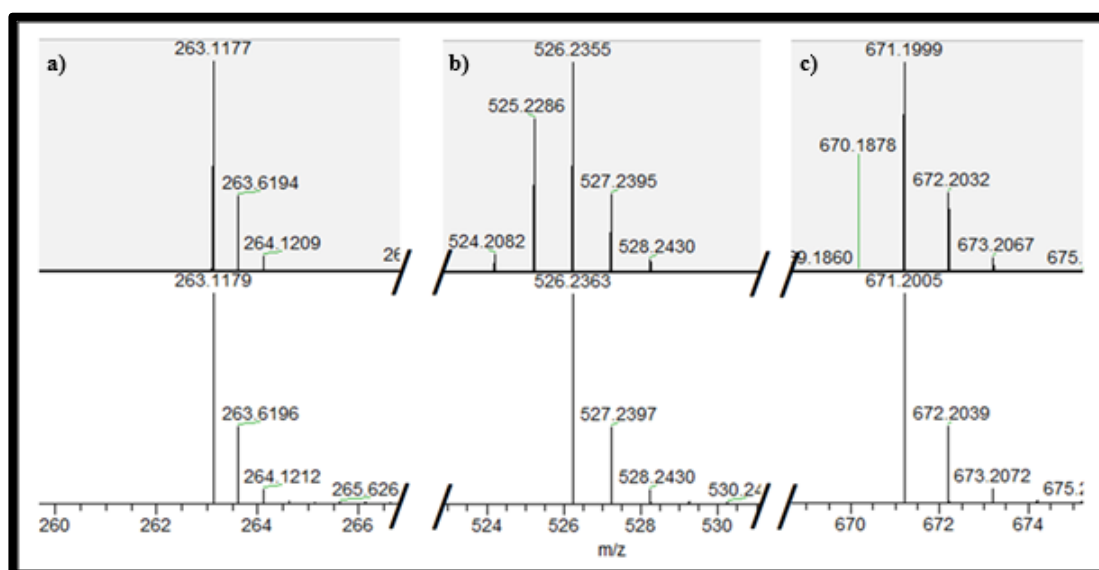


Schéma 26. Syntéza finálních sloučenin **60** a **61**.

3.5. Strukturní analýza

3.5.1. HR-MALDI-MS

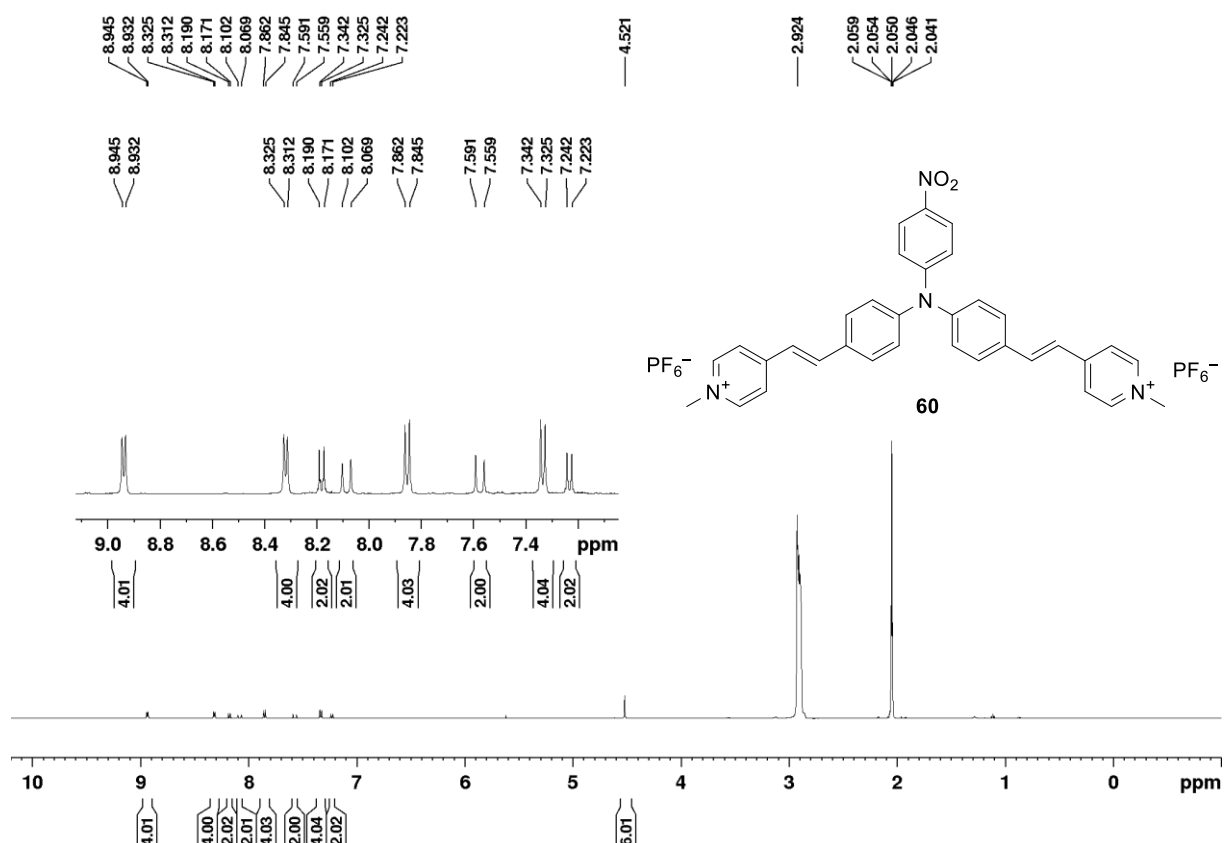
HR-MALDI-MS spektra byla měřena na přístroji ThermoFisher s použitím analyzátoru/detektoru Orbitrap pracujícím v režimu s vysokým rozlišením. Jako matrix byl použit *trans*-2-[3-(4-*terc*-butylfenyl)-2-methyl-2-propenyliden]malonnitril (DCTB). Na *Obrázku 8* je přiloženo HR-MALDI-MS spektrum sloučeniny **60**, kdy v horní polovině je spektrum experimentálně změřené a v dolní polovině simulované pomocí programu Xcalibur. Při porovnání spekter je viditelná shoda změřeného píku s hodnotou m/z odpovídající 526,2355 Da, který odpovídá $[M]^+$, tedy látky **60**. Simulovaná hodnota pro sumární vzorec $C_{34}H_{30}N_4O_2$ pak odpovídá 526,2363 Da (*Obrázek 8b*). Rozdíl kalkulované a experimentálně zjištěné hodnoty je pak 1,52 ppm. V experimentálně změřeném spektru byl rovněž nalezen pík s hodnotou 263,1177 Da, který odpovídá stejnému sumárnímu vzorci, ale pro případ m/z , kdy $z=2$. Simulovaná hodnota pak odpovídá 263,1179 Da (*Obrázek 8a*). Rozdíl kalkulované a experimentálně zjištěné hodnoty je pak 0,76 ppm. Jako signál s nejvyšší intenzitou byl nalezen pík s hodnotou 671,1999 Da. Ten odpovídá sumárnímu vzorci $C_{34}H_{30}N_4O_2PF_6$. Simulovaná hodnota pak odpovídá 671,2005 Da (*Obrázek 8c*). Rozdíl kalkulované a experimentálně zjištěné hodnoty je pak 0,89 ppm. Jelikož pík s hodnotou 653,1408 Da pro $C_{34}H_{30}N_4O_2I$ nebyl nalezen, můžeme potvrdit 100% náhradu I za PF_6 . S tolerancí 4 ppm určenou pro danou metodiku tak lze považovat látku **60** za potvrzenou.



Obrázek 8. HR-MALDI MS spektrum sloučeniny **60**, v horní polovině jsou výřezy spektra experimentálně změřeného a v dolní polovině odpovídající simulovaná **a)** pro m/z látky $C_{34}H_{30}N_4O_2$, kdy $z=2$, **b)** $[M]^+$ pro $C_{34}H_{30}N_4O_2$, **c)** $[M]^+$ pro $C_{34}H_{30}N_4O_2PF_6$.

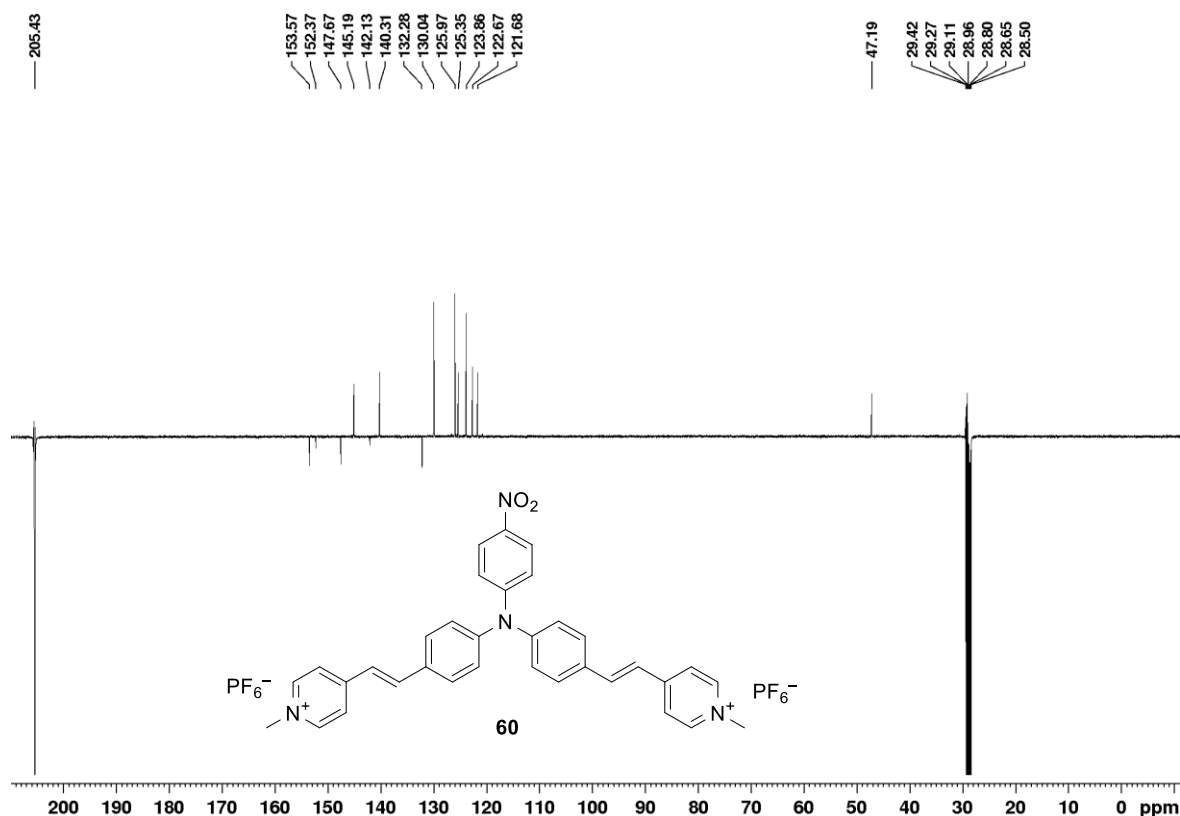
3.5.2. NMR

V ^1H NMR spektru sloučeniny **60** (Obrázek 9) můžeme vidět celkem 11 signálů. Signál kalibrovaný na hodnotou 2,05 ppm odpovídá použitému deuterovanému rozpouštědлу aceton- d_6 . Signál s hodnotou 2,92 ppm má tvar singletu. Pomocí porovnání s tabulkou chemických posunů různých typu rozpouštědel byl tento signál určen jako zbytková voda v měřeném vzorku. Zbytek signálů (9) můžeme přiřadit sloučenině **60**. Singlet s chemickým posunem 4,52 ppm a integrální intenzitou 6 odpovídá CH_3 skupinám na dusíku pyridinia. Dále jsou ve spektru v oblastech 7,22-7,24 ppm a 8,17-8,19 ppm signály s integrální intenzitou odpovídající dvěma vodíkům, ty s největší pravděpodobností odpovídají vodíkům na benzenu s nitroskupinou. Dublety v oblasti 7,58 ppm a 8,09 ppm odpovídají svými integrálními intenzitami a interakčními konstantami ($^3J = 16$ Hz) vodíkům dvojných vazeb s *trans* konfigurací. V oblastech 8,31-8,33 ppm a 8,93-8,95 ppm jsou pak viditelné multiplety, každý s integrální intenzitou odpovídající čtyřem vodíkům. Ty lze s velkou pravděpodobností přiřadit k elektronakceptornímu pyridiniu. Zbývající multiplety s integrální intenzitou odpovídající čtyřem vodíkům v oblastech 7,33-7,34 ppm a 7,85-7,86 ppm odpovídají svými integrálními intenzitami vodíkům benzenových jader nesoucích vinyl pyridiniové skupiny. Podle integrálních intenzit odpovídajících počtu vodíků a tvarů/štěpení některých signálů tak lze potvrdit, že se jedná o chromofor **60**. Pro jednoznačné přiřazení jednotlivých signálů by bylo nutné doplnit analýzu o další NMR experimenty, jako je například dvourozměrná korelační spektroskopie (2D NMR COSY).



Obrázek 9. ^1H NMR spektrum sloučeniny **60**.

^{13}C NMR spektrum cílového chromoforu **60** (Obrázek 10) bylo měřeno metodikou APT (attached proton test), pomocí které můžeme rozlišit primární/terciární typy uhlíků od sekundárních/kvarterních typů uhlíků. To je umožněno na základě umístění jejich signálů. Jsou-li signály ve stejném směru od osy jako signál rozpouštědla (*aceton- d_6* 29,93 ppm a 205,43 ppm), jedná se o sekundární/kvarterní typy uhlíků, v opačném směru pak o primární a terciární. Spektrum chromoforu **60** obsahuje vyjma signálů rozpouštědla celkem 14 signálů. Z toho 5 signálů (132,28; 142,13; 147,67; 152,37; 153,57 ppm) směřuje na stejnou stranu jako signál rozpouštědla, ty odpovídají kvarterním uhlíkům. Dalších 9 signálů (47,19; 121,68; 122,67; 123,86; 125,35; 125,97; 130,04; 140,31; 145,19 ppm) směřuje na opačnou stranu, ty odpovídají terciárním uhlíkům, resp. primárnímu uhlíku CH_3 skupiny ($\delta = 47,19$ ppm) sloučeniny **60**. Počet, pozice a typy signálů tak opět potvrzují, že se jedná o sloučeninu **60**. Pro jednoznačné přiřazení signálů uhlíků by bylo nezbytné využít doplňkové NMR techniky, zejména 2D experimenty jako HSQC a HMBC, které umožňují propojení ^{13}C a ^1H signálů prostřednictvím jedno- nebo vícevazebných interakcí.



Obrázek 10. ¹³C APT NMR spektrum sloučeniny **60**.

3.5.3. Analýza optických vlastností

Absorpční a emisní spektra sloučenin **60** a **61** byly měřeny pomocí UV-Vis absorpční a emisní spektroskopie, a to v acetonu při koncentracích 2×10^{-5} mol·dm⁻³ (Obrázek 11). Pro lepší přehlednost byla absorpční i emisní spektra normalizována. V Tabulce 1 jsou uvedeny hodnoty absorpčních maxim nejdélnějších pásů (λ_{\max}^A), emisních maxim (λ_{\max}^E) a Stokesových posunů v acetonu.

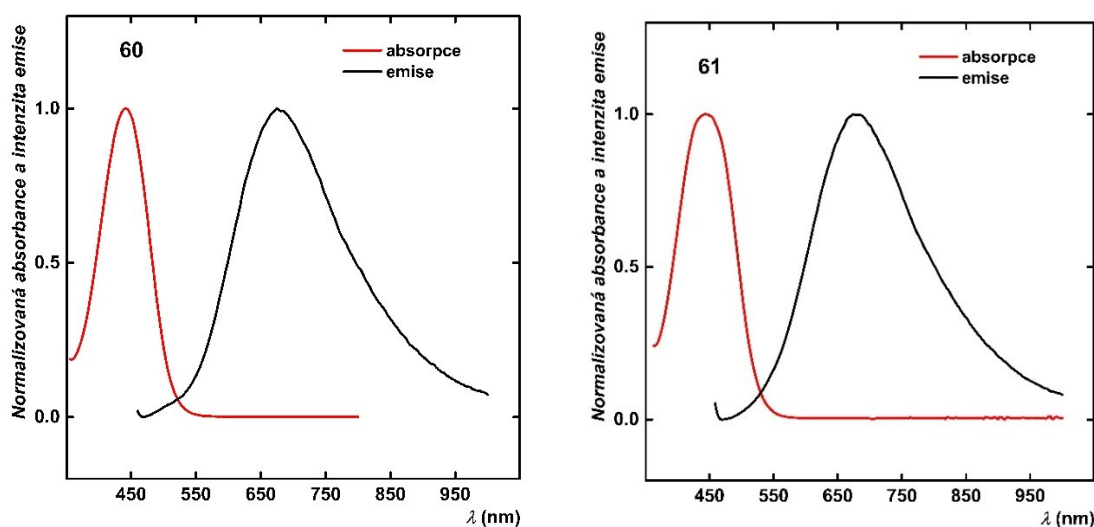
Nejdélnější absorpční pás, odpovídající přechodu typu $\pi-\pi^*$, vykazuje maxima při 444 nm pro sloučeninu **60** a 442 nm pro sloučeninu **61**. Tyto hodnoty naznačují, že zavedení elektron-akceptorních substituentů – konkrétně formylové (-CHO) u sloučeniny **60** a nitroskupiny (-NO₂) u sloučeniny **61** – nemá výrazný vliv na polohu absorpčního maxima. Posun absorpčního maxima je pouze 2 nm, což je z hlediska spektrální analýzy zanedbatelné a spadá do experimentální chyby měření.

Podobná situace byla pozorována i u emisních vlastností těchto derivátů. Emisní maxima obou sloučenin byla identifikována při shodné vlnové délce 675 nm, což opět poukazuje na minimální rozdíl v jejich elektronové struktuře při excitovaném stavu. Tato spektrální shoda může být důsledkem podobné míry delokalizace π -elektronů v konjugovaném

systemu a srovnatelného uspořádání orbitálních energetických hladin bez ohledu na povahu druhého akceptoru (formyl, nitro) v porovnání s pyridiniem.

Z výše uvedených údajů lze rovněž vypočítat hodnoty Stokesova posunu, tedy rozdílu mezi energiemi absorpčního a emisního maxima (vyjádřeno v cm^{-1}). Pro sloučeninu **60** činí Stokesův posun přibližně 7700 cm^{-1} , zatímco pro sloučeninu **61** je hodnota mírně vyšší, 7800 cm^{-1} . Hodnoty Stokesova posunu zůstávají pro oba deriváty velmi podobné, což opět potvrzuje malý vliv formyl resp. nitroskupiny na spektrální vlastnosti těchto sloučenin.

Celkově lze konstatovat, že náhrada formylové skupiny za silnější elektron-akceptorní nitroskupinu nevede k významné změně v poloze ani absorpčního, ani emisního maxima. To může být důsledkem prostorového uspořádání molekuly, které omezuje efektivní konjugaci mezi centrální aminoskupinou a periferním nitro či formyl elektron-akceptorem sloučeniny **60** resp. **61**. Dominantní vliv na fotofyzikální vlastnosti tedy hraje část molekuly nesoucí pyridiniový elektron-akceptor vázaný přes vinylový můstek.



Obrázek 11. Normalizovaná absorpční a emisní spektra sloučenin **60** (nitroderivát) a **61** (formylderivát) v acetonu.

Tabulka 1. Optické vlastnosti sloučenin **60** a **61** měřené v acetonu.

Sloučenina	$\lambda_{\text{max}}^{\text{A}}$ (nm)	$\lambda_{\text{max}}^{\text{E}}$ (nm)	Stokesův posun (cm^{-1})
60	444	675	7700
61	442	675	7800

ZÁVĚR

Tato bakalářská práce poskytuje celistvý pohled na fluorofory, které díky svým fotofyzikálním vlastnostem našly uplatnění v oblastech fluorescenčního značení. V teoretické části byly popsány základní parametry, které musí splňovat fluorescenční značka. Konkrétně byla práce zaměřena na pyridiniové deriváty TPA obsahující kotvicí skupinu. Teoretická část také obsahovala různorodé metody syntéz pyridiniových derivátů TPA.

V rámci této bakalářské práce byla popsána syntéza dvou v literatuře doposud nepopsaných finálních chromoforů **60** a **61** jakožto i syntéza prekurzorů **50-61** potřebných pro jejich přípravu. Práce obsahuje detailní popis jejich syntézy, charakterizaci struktur a optických vlastností. Na základě optických vlastností sloučenin **60** a **61** tato práce poukazuje na potenciální využití těchto látek pro fluorescenční značení. Vlnová délka jejich emise ($\lambda_{\text{max}}^{\text{E}} = 675 \text{ nm}$) totiž odpovídá červené oblasti viditelného spektra, která je velmi blízko požadované NIR oblasti. Obě molekuly ale potřebují značnou modifikaci.

POUŽITÁ LITERATURA

- [1] Lakowicz, J. R., Ed. , V knize: *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Springer US, Boston, MA, **2006**.
- [2] Díaz-García, M. E., Badía-Laiño, R., Kapitola v knize: in *Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering*, Academic Press, **2019**, s. 266–280.
- [3] Dobrucki, J. W., Kapitola v knize: in *Fluorescence Microscopy: From Principles to Biological Applications*, Wiley, **2013**, s. 97–142.
- [4] Baschong, W., Landmann, L., Kapitola v knize: in *Cell Biology: A Laboratory Handbook*, Elsevier, **2006**, s. 5–17.
- [5] Allain, C., Schmidt, F., Lartia, R., Bordeau, G., Fiorini-Debuisschert, C., Charra, F., Tauc, P., Teulade-Fichou, M., *ChemBioChem* **2007**, 8, 424–433.
- [6] Göppert-Mayer, M., *Ann. Phys.* **1931**, 401, 273–294.
- [7] Kaiser, W., Garrett, C. G. B., *Phys. Rev. Lett.* **1961**, 7, 229–231.
- [8] Denk, W., Strickler, J. H., Webb, W. W., *Science (1979)* **1990**, 248, 73–76.
- [9] Denk, W., Piston, D. W., Webb, W. W., Kapitola v knize: in *Handbook of Biological Confocal Microscopy*, **1995**, s. 445–458.
- [10] Pawlicki, M., Collins, H. A., Denning, R. G., Anderson, H. L., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, 48, 3244–3266.
- [11] Helmchen, F., Denk, W., *Nat. Methods* **2005**, 2, 932–940.
- [12] Velusamy, M., Shen, J., Lin, J. T., Lin, Y., Hsieh, C., Lai, C., Lai, C., Ho, M., Chen, Y., Chou, P., Hsiao, J., *Adv. Funct. Mater.* **2009**, 19, 2388–2397.
- [13] Dréano, M., Mongin, O., Paul, F., Humphrey, M. G., *Aust. J. Chem.* **2023**, 76, 130–149.
- [14] Drummen, G., *Molecules* **2012**, 17, 14067–14090.
- [15] Nienhaus, G. U., Nienhaus, K., Kapitola v knize: in *Fluorescence Microscopy: From Principles to Biological Applications*, Wiley, **2017**, s. 133–164.

- [16] Michalet, X., Pinaud, F. F., Bentolila, L. A., Tsay, J. M., Doose, S., Li, J. J., Sundaresan, G., Wu, A. M., Gambhir, S. S., Weiss, S., *Science (1979)* **2005**, *307*, 538–544.
- [17] Klikar, M., Georgiou, D., Polyzos, I., Fakis, M., Růžičková, Z., Pytela, O., Bureš, F., *Dyes Pigm.* **2022**, *201*, 110230.
- [18] te Velde, E. A., Veerman, Th., Subramaniam, V., Ruers, Th., *Eur. J. Surg. Oncol.* **2010**, *36*, 6–15.
- [19] A. Hilderbrand, S., Kapitola v knize: in *Methods Mol. Biol.*, **2010**, s. 17–45.
- [20] Klikar, M., le Poul, P., Růžička, A., Pytela, O., Barsella, A., Dorkenoo, K. D., Robin-le Guen, F., Bureš, F., Achelle, S., *J. Org. Chem.* **2017**, *82*, 9435–9451.
- [21] Grohmann, D., Werner, F., Tinnefeld, P., *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2013**, *17*, 691–698.
- [22] Weissleder, R., Ntziachristos, V., *Nat. Med.* **2003**, *9*, 123–128.
- [23] Wu, L., Liu, J., Li, P., Tang, B., James, T. D., *Chem. Soc. Rev.* **2021**, *50*, 702–734.
- [24] König, K., *J. Microsc.* **2000**, *200*, 83–104.
- [25] Hong, G., Antaris, A. L., Dai, H., *Nat. Biomed. Eng.* **2017**, *1*.
- [26] Lin, H., Doba, T., Sato, W., Matsuo, Y., Shang, R., Nakamura, E., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2022**, *61*.
- [27] Dapperheld, S., Steckhan, E., Brinkhaus, K. G., Esch, T., *Chem. Ber.* **1991**, *124*, 2557–2567.
- [28] Plater, M. J., Jackson, T., *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1.* **2001**, 2548–2552.
- [29] Lee, H., Jo, M., Yang, G., Jung, H., Kang, S., Park, J., *Dyes Pigm.* **2017**, *146*, 27–36.
- [30] Lindner, S. M., Thelakkat, M., *Macromolecules* **2004**, *37*, 8832–8835.
- [31] Gautam, P., Yu, C. P., Zhang, G., Hillier, V. E., Chan, J. M. W., *J. Org. Chem.* **2017**, *82*, 11008–11020.

- [32] Tydlitát, J., Achelle, S., Rodríguez-López, J., Pytela, O., Mikýsek, T., Cabon, N., Robin-le Guen, F., Miklík, D., Růžicková, Z., Bureš, F., *Dyes Pigm.* **2017**, *146*, 467–478.
- [33] Tydlitát, J., Fecková, M., le Poul, P., Pytela, O., Klikar, M., Rodríguez-López, J., Robin-le Guen, F., Achelle, S., *Eur. J. Org. Chem.* **2019**, *2019*, 1921–1930.
- [34] Kumar, S., Li, D., Wang, Y.-K., Yuan, Y., Khan, A., Jiang, Z.-Q., Liao, L.-S., *Synth. Met.* **2019**, *254*, 42–48.
- [35] Bonn, A. G., Neuburger, M., Wenger, O. S., *Inorg. Chem.* **2014**, *53*, 11075–11085.
- [36] García-Cuadrado, D., Cuadro, A. M., Alvarez-Builla, J., Vaquero, J. J., *Synlett* **2002**, 1904–1906.
- [37] Chen, Y., Wei, T., Zhang, Z., Zhang, W., Lv, J., Chen, T., Chi, B., Wang, F., Chen, X., *Chin. Chem. Lett.* **2017**, *28*, 1957–1960.
- [38] Hung, C., Lin, J., Yang, Y., Liu, Y., Gu, M., Chou, T., Wang, S., Chen, Z., Wu, C., Chen, L., Hsu, C., Chen, C., Chiu, C., Chen, H., Chou, P., *JACS Au* **2022**, *2*, 1189–1199.
- [39] Rak, K., Klikar, M., Burešová, Z., Mazúr, P., Mikešová, M., Kvíčala, J., Bureš, F., *Org. Biomol. Chem.* **2021**, *19*, 8830–8839.
- [40] Wang, C., Xu, H., Chen, Y., Li, X., Chen, H., Liu, J., Yang, J., Cao, Y., Li, M., Ma, J., Ren, B., Zhang, T., Cao, X., Tao, F., Lu, J., *Eur. J. Med. Chem.* **2025**, *283*, 117153.
- [41] Yin, P., Wang, T., Yang, Y., Yin, W., Zhang, S., Yang, Z., Qi, C., Ma, H., *New J. Chem.* **2019**, *43*, 18251–18258.
- [42] Stoean, B., Rugina, D., Focsan, M., Craciun, A.-M., Nistor, M., Lovasz, T., Turza, A., Porumb, I.-D., Gál, E., Cristea, C., Silaghi-Dumitrescu, L., Astilean, S., Gaina, L. I., *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 2985.
- [43] Picini, F., Schneider, S., Gavat, O., Vargas Jentsch, A., Tan, J., Maaloum, M., Strub, J.-M., Tokunaga, S., Lehn, J.-M., Moulin, E., Giuseppone, N., *J. Am. Chem. Soc.* **2021**, *143*, 6498–6504.

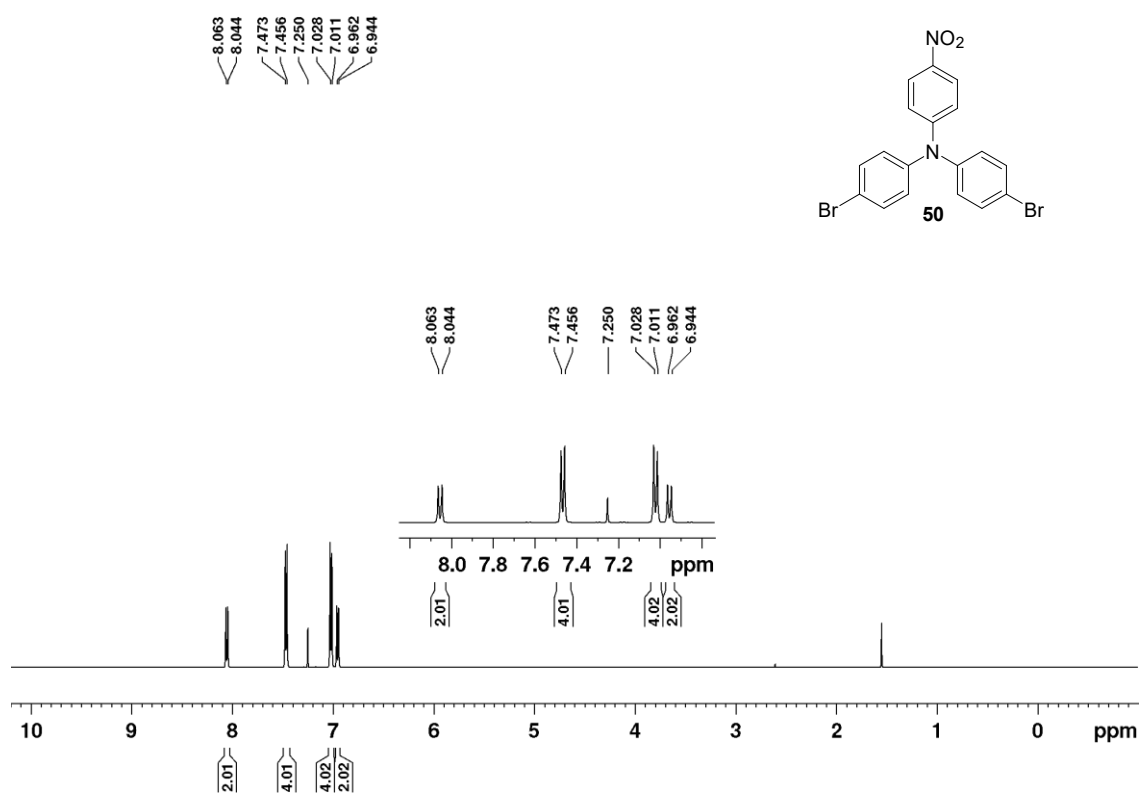
- [44] Ishow, E., Brosseau, A., Clavier, G., Nakatani, K., Pansu, R. B., Vachon, J.-J., Tauc, P., Chauvat, D., Mendonça, C. R., Piovesan, E., *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 8970–8971.
- [45] Rosero, W. A., Guimaraes, R., Matias, T., Araki, K., *J. Braz. Chem. Soc.* **2020**, *31*, 2250–2264.
- [46] Fu, J., Yan, L., Wang, S., Song, H., Gu, Q., Zhang, Y., *Chem. Pap.* **2021**, *75*, 1485–1496.
- [47] Xia, H., He, J., Xu, B., Wen, S., Li, Y., Tian, W., *Tetrahedron* **2008**, *64*, 5736–5742.
- [48] Ma, H., Qi, C., Cao, H., Zhang, Z., Yang, Z., Zhang, B., Chen, C., Lei, Z. Q., *Chem. Asian J.* **2016**, *11*, 58–63.
- [49] Pati, P. B., Zade, S. S., *Tetrahedron Lett* **2014**, *55*, 5290–5293.

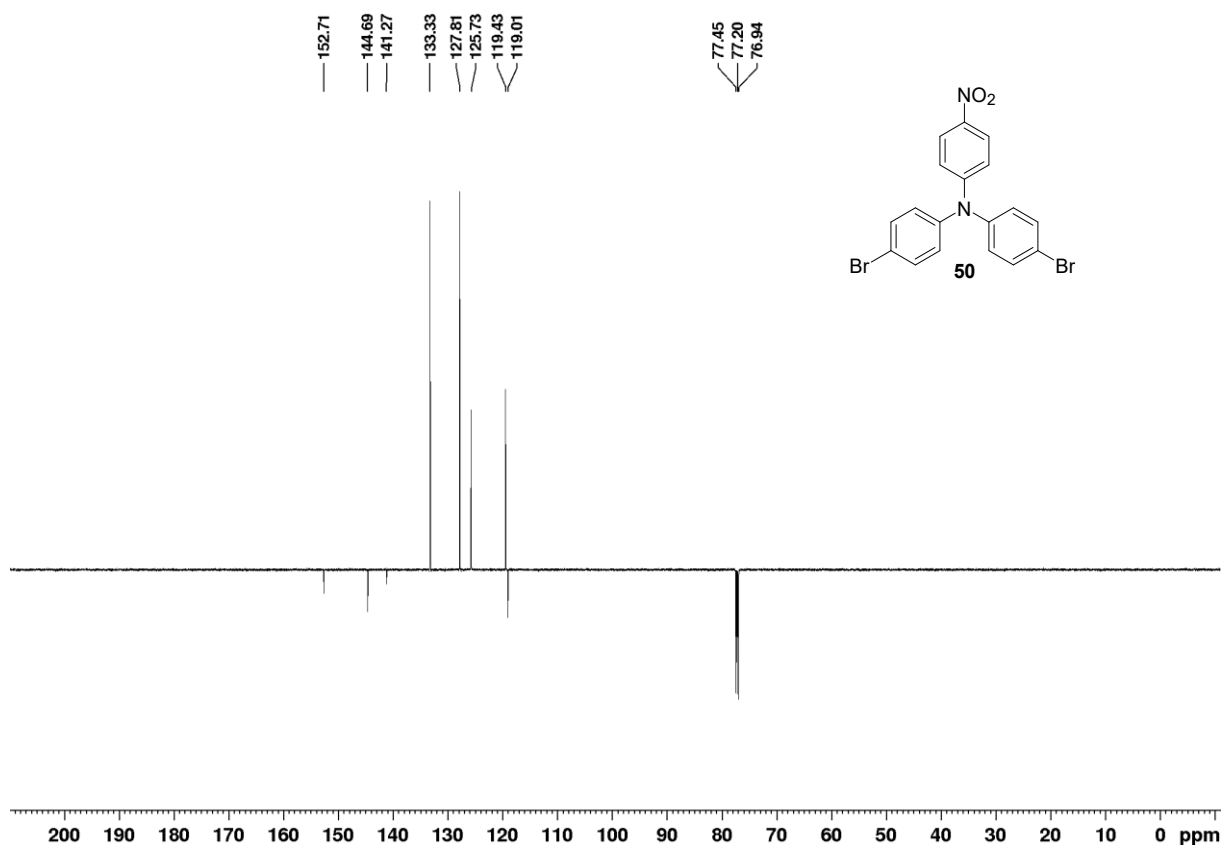
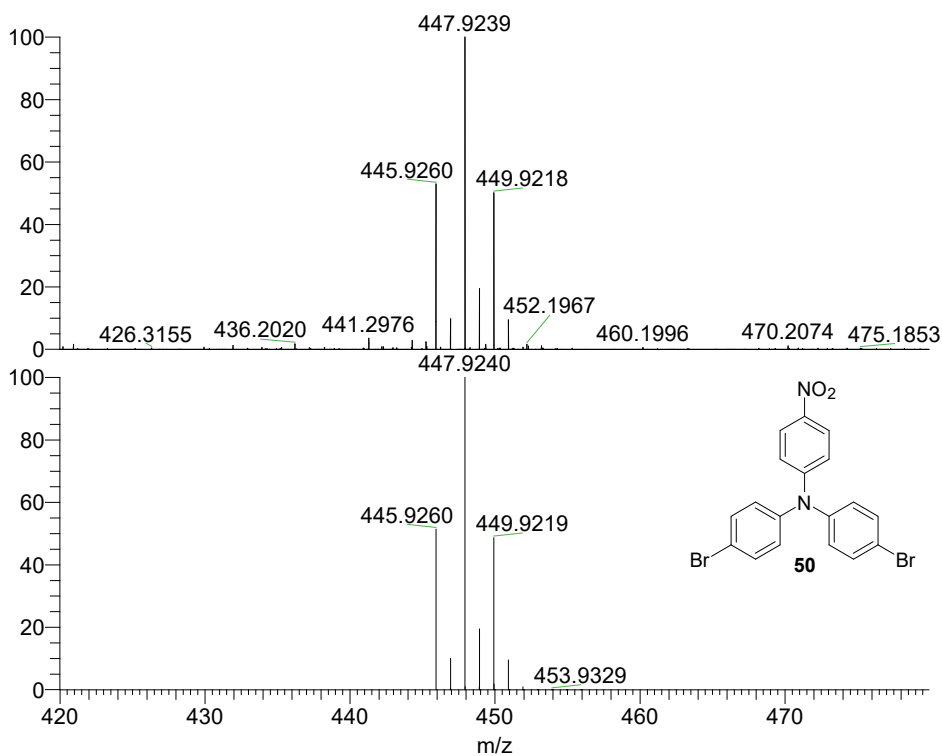
SEZNAM PŘÍLOH

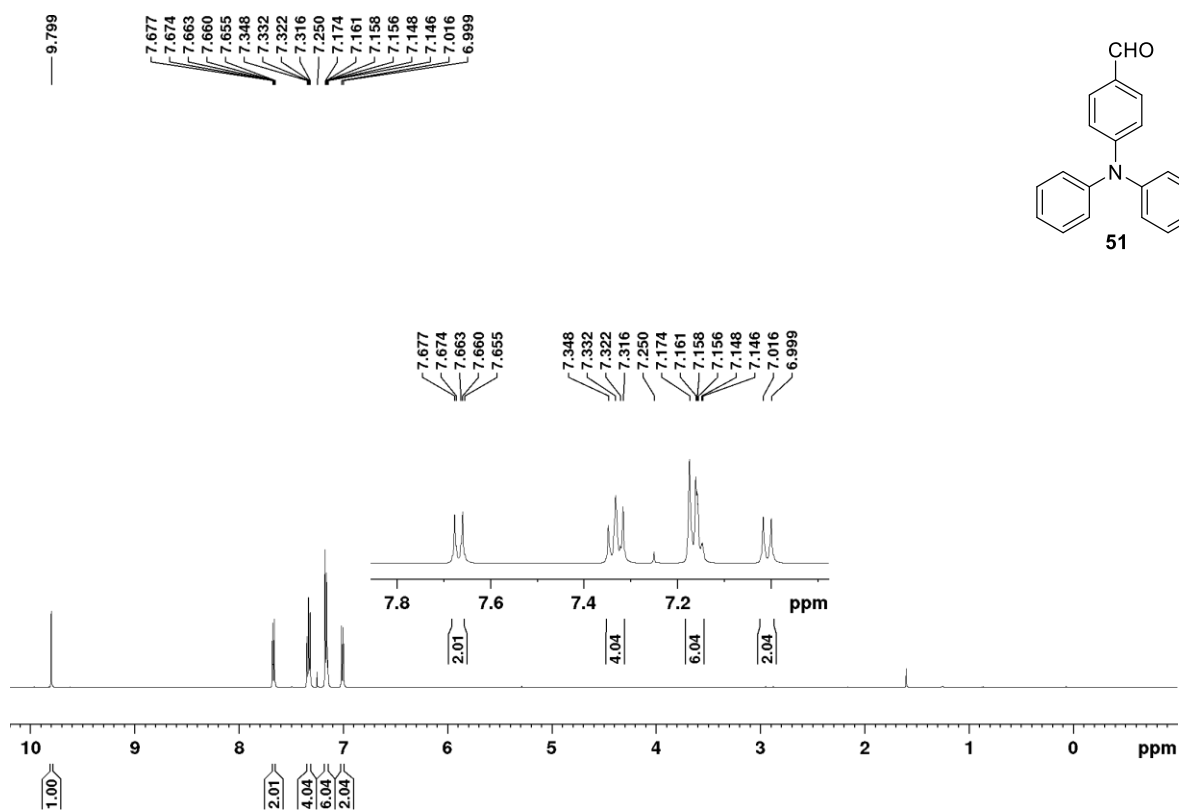
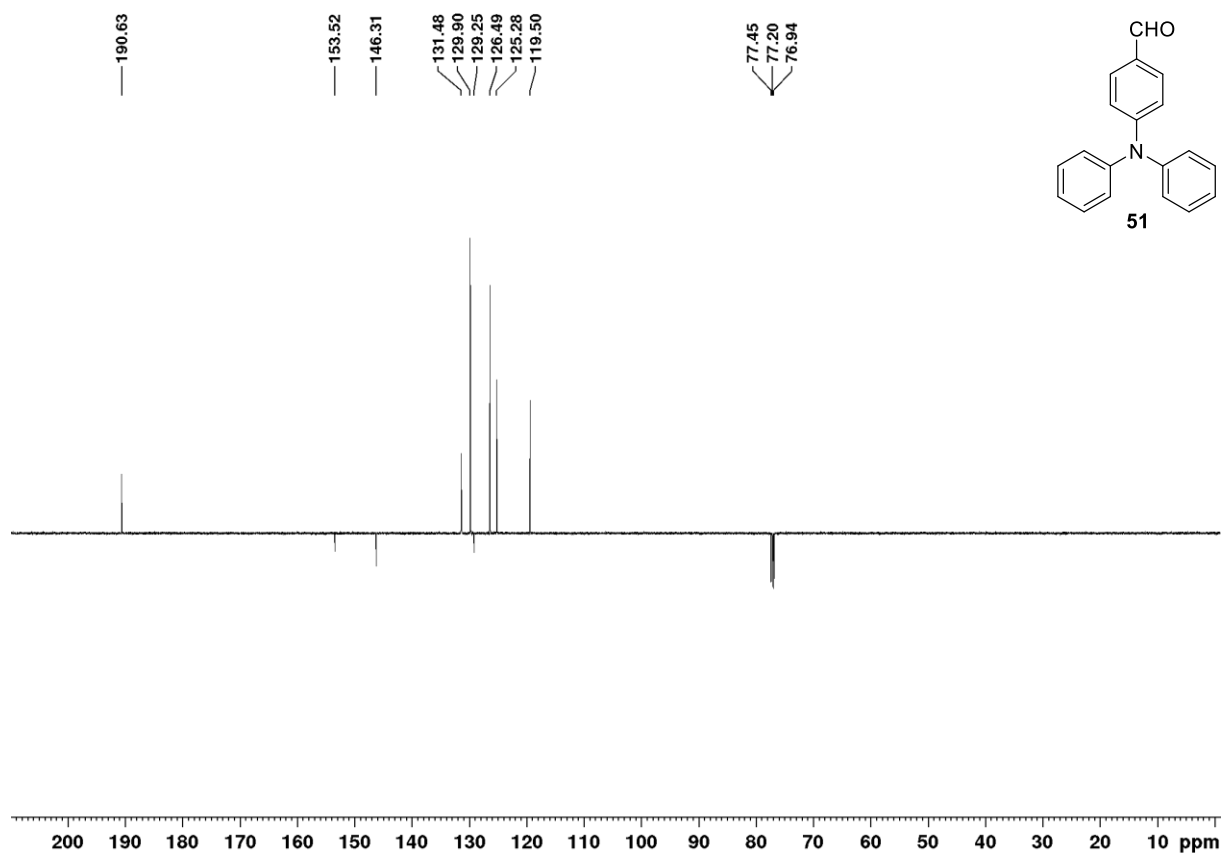
Příloha 1. ^1H NMR spektrum sloučeniny 50	53
Příloha 2. ^{13}C APT NMR spektrum sloučeniny 50	54
Příloha 3. HR-MALDI-MS spektrum sloučeniny 50 , horní spektrum připadá látce syntetizované, dolní spektrum je simulované pro $\text{C}_{18}\text{H}_{12}\text{Br}_2\text{N}_2\text{O}_2$	54
Příloha 4. ^1H NMR spektrum sloučeniny 51	55
Příloha 5. ^{13}C APT NMR spektrum sloučeniny 51	55
Příloha 6. HR-MALDI-MS spektrum sloučeniny 51 , horní spektrum připadá látce syntetizované, dolní spektrum je simulované pro $\text{C}_{19}\text{H}_{15}\text{NO}$	56
Příloha 7. ^1H NMR spektrum sloučeniny 52	56
Příloha 8. HR-MALDI-MS spektrum sloučeniny 52 , horní spektrum připadá látce syntetizované, dolní spektrum je simulované pro $\text{C}_{19}\text{H}_{13}\text{I}_2\text{NO}$	57
Příloha 9. ^1H NMR spektrum sloučeniny 53	57
Příloha 10. ^{13}C APT NMR spektrum sloučeniny 53	58
Příloha 11. HR-MALDI-MS spektrum sloučeniny 53 , horní spektrum připadá látce syntetizované, dolní spektrum je simulované pro $\text{C}_{18}\text{H}_{12}\text{BrI}_2\text{N}$	58
Příloha 12. ^1H NMR spektrum sloučeniny 54	59
Příloha 13. ^{13}C APT NMR spektrum sloučeniny 54	59
Příloha 14. HR-MALDI-MS spektrum sloučeniny 54 , horní spektrum připadá látce syntetizované, dolní spektrum je simulované pro $\text{C}_{32}\text{H}_{24}\text{N}_4\text{O}_2$	60
Příloha 15. ^1H NMR spektrum sloučeniny 55	60
Příloha 16. ^{13}C APT NMR spektrum sloučeniny 55	61
Příloha 17. HR-MALDI-MS spektrum sloučeniny 55 , horní spektrum připadá látce syntetizované, dolní spektrum je simulované pro $\text{C}_{33}\text{H}_{25}\text{N}_3\text{O}$	61
Příloha 18. ^1H NMR spektrum sloučeniny 56	62
Příloha 19. ^{13}C APT NMR spektrum sloučeniny 56	62
Příloha 20. HR-MALDI-MS spektrum sloučeniny 56 , horní spektrum připadá látce syntetizované, dolní spektrum je simulované pro $\text{C}_{32}\text{H}_{24}\text{BrN}_3$	63
Příloha 21. ^1H NMR spektrum sloučeniny 57	63
Příloha 22. HR-MALDI-MS spektrum sloučeniny 57 , horní spektrum připadá látce syntetizované, dolní spektrum je simulované pro $\text{C}_{40}\text{H}_{31}\text{N}_3\text{O}_2$	64
Příloha 23. ^1H NMR spektrum sloučeniny 58	64
Příloha 24. ^{13}C APT NMR spektrum sloučeniny 58	65

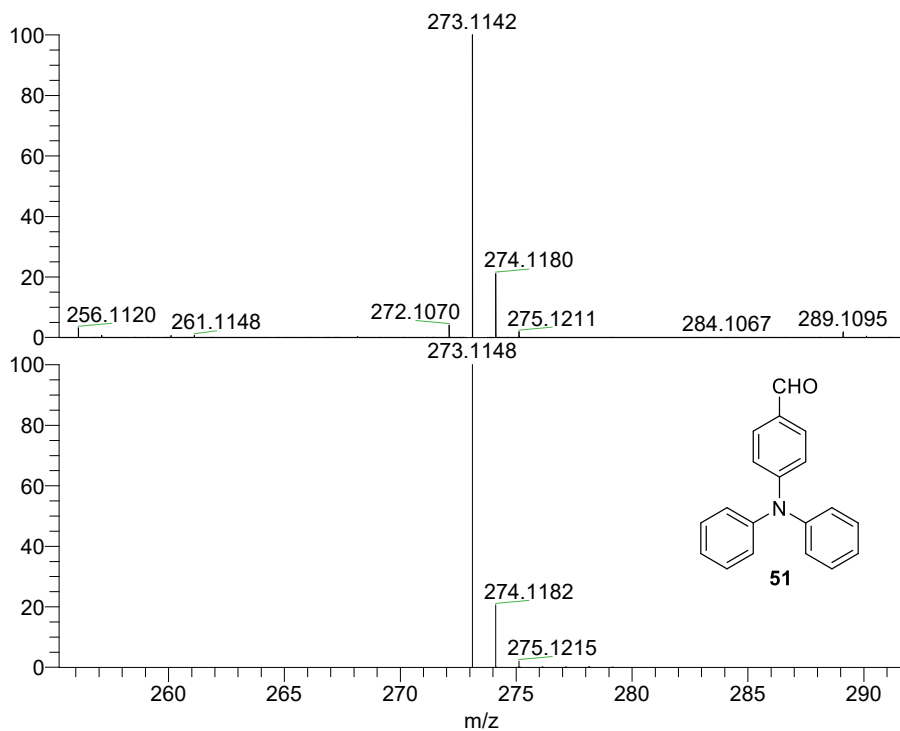
Příloha 25. HR-MALDI-MS spektrum sloučeniny 58 , horní spektrum připadá látce syntetizované, dolní spektrum je simulované pro $C_{34}H_{30}N_4O_2$.	65
Příloha 26. 1H NMR spektrum sloučeniny 59 .	66
Příloha 27. ^{13}C APT NMR spektrum sloučeniny 59 .	66
Příloha 28. HR-MALDI-MS spektrum sloučeniny 59 , horní spektrum připadá látce syntetizované, dolní spektrum je simulované pro $C_{35}H_{31}N_3O$.	67
Příloha 29. 1H NMR spektrum sloučeniny 60 .	67
Příloha 30. ^{13}C APT NMR spektrum sloučeniny 60 .	68
Příloha 31. HR-MALDI-MS spektrum sloučeniny 60 , horní spektrum připadá látce syntetizované, dolní spektrum je simulované pro $C_{34}H_{30}N_4O_2$.	68
Příloha 32. 1H NMR spektrum sloučeniny 61 .	69
Příloha 33. ^{13}C APT NMR spektrum sloučeniny 61 .	69
Příloha 34. HR-MALDI-MS spektrum sloučeniny 61 , horní spektrum připadá látce syntetizované, dolní spektrum je simulované pro $C_{35}H_{31}N_3O$.	70

PŘÍLOHY

Příloha 1. 1H NMR spektrum sloučeniny **50**.

Příloha 2. ^{13}C APT NMR spektrum sloučeniny **50**Příloha 3. HR-MALDI-MS spektrum sloučeniny **50**, horní spektrum připadá látce syntetizované, dolní spektrum je simulované pro $\text{C}_{18}\text{H}_{12}\text{Br}_2\text{N}_2\text{O}_2$.

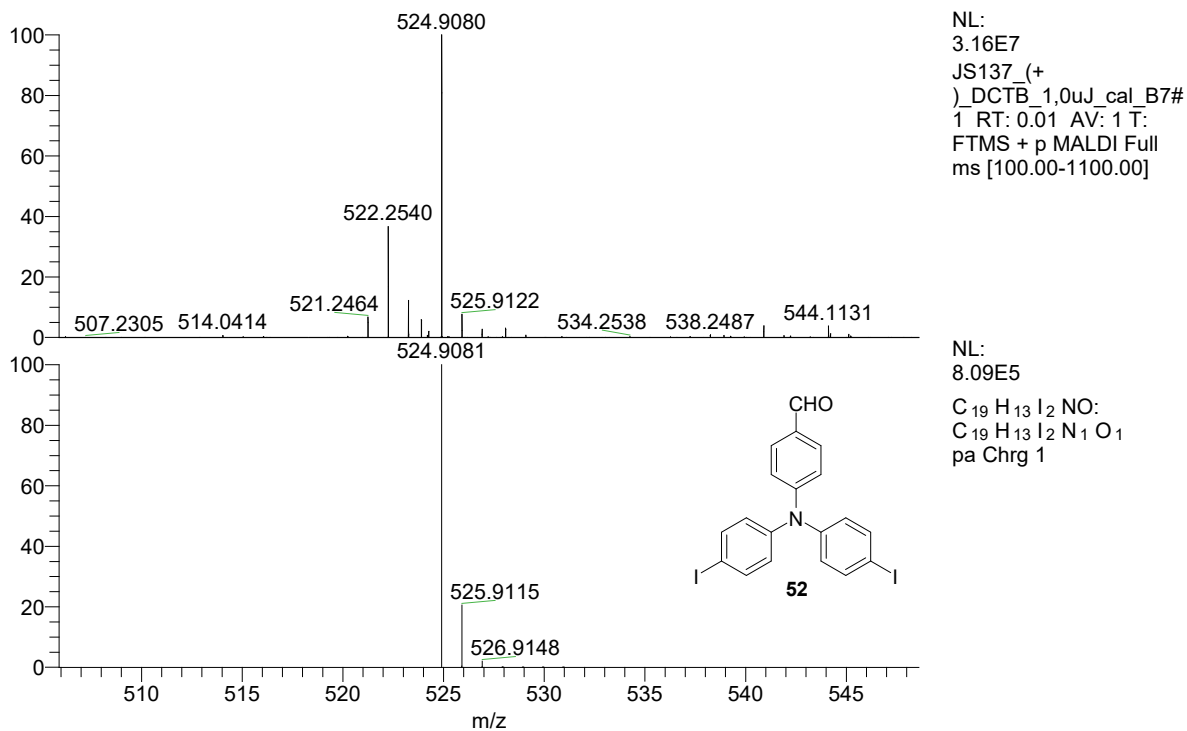
Příloha 4. $^1\text{H NMR}$ spektrum sloučeniny 51.Příloha 5. $^{13}\text{C APT NMR}$ spektrum sloučeniny 51.



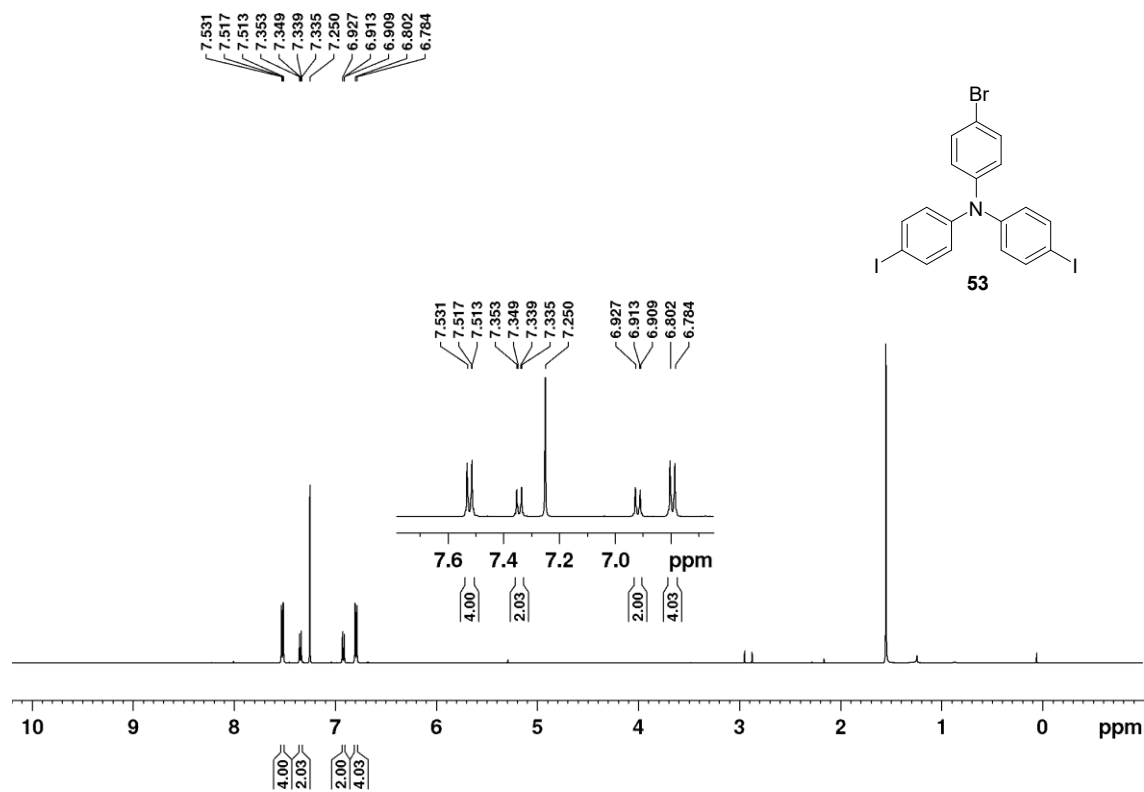
Příloha 6. HR-MALDI-MS spektrum sloučeniny **51**, horní spektrum připadá látce syntetizované, dolní spektrum je simulované pro C₁₉H₁₅NO.



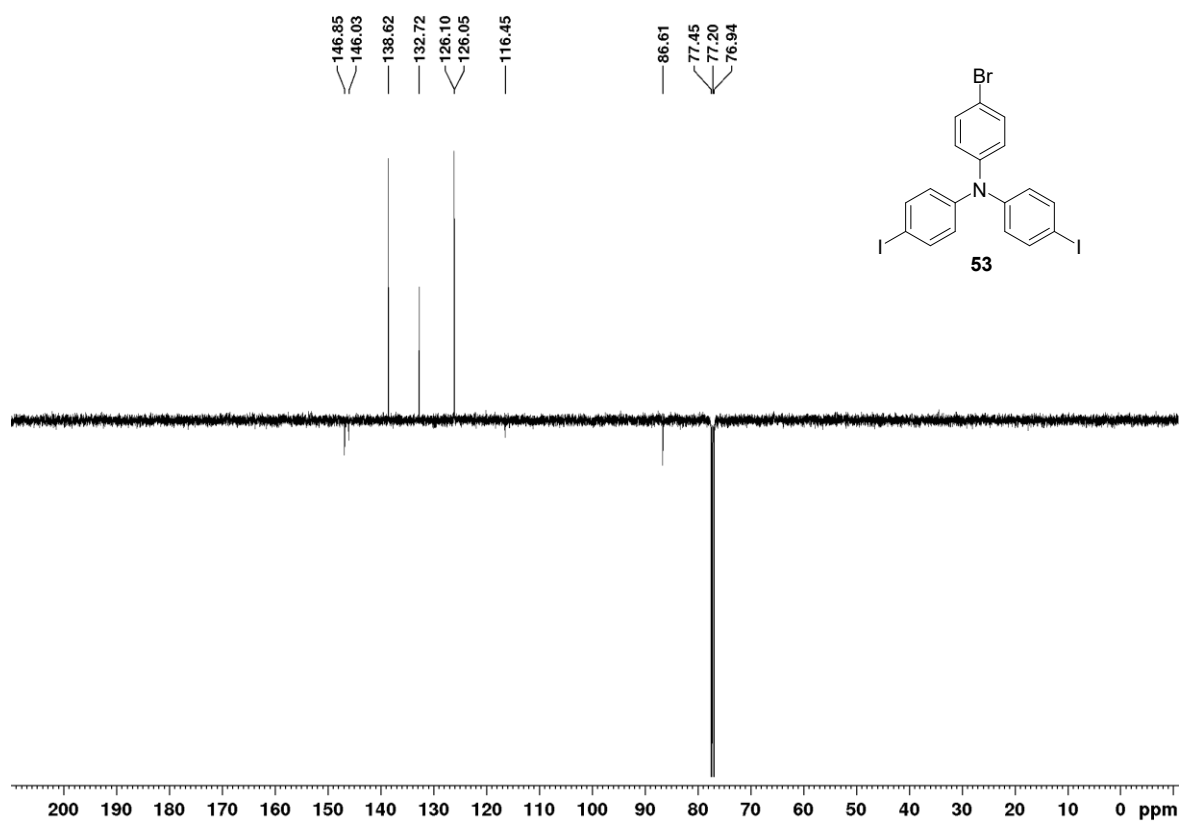
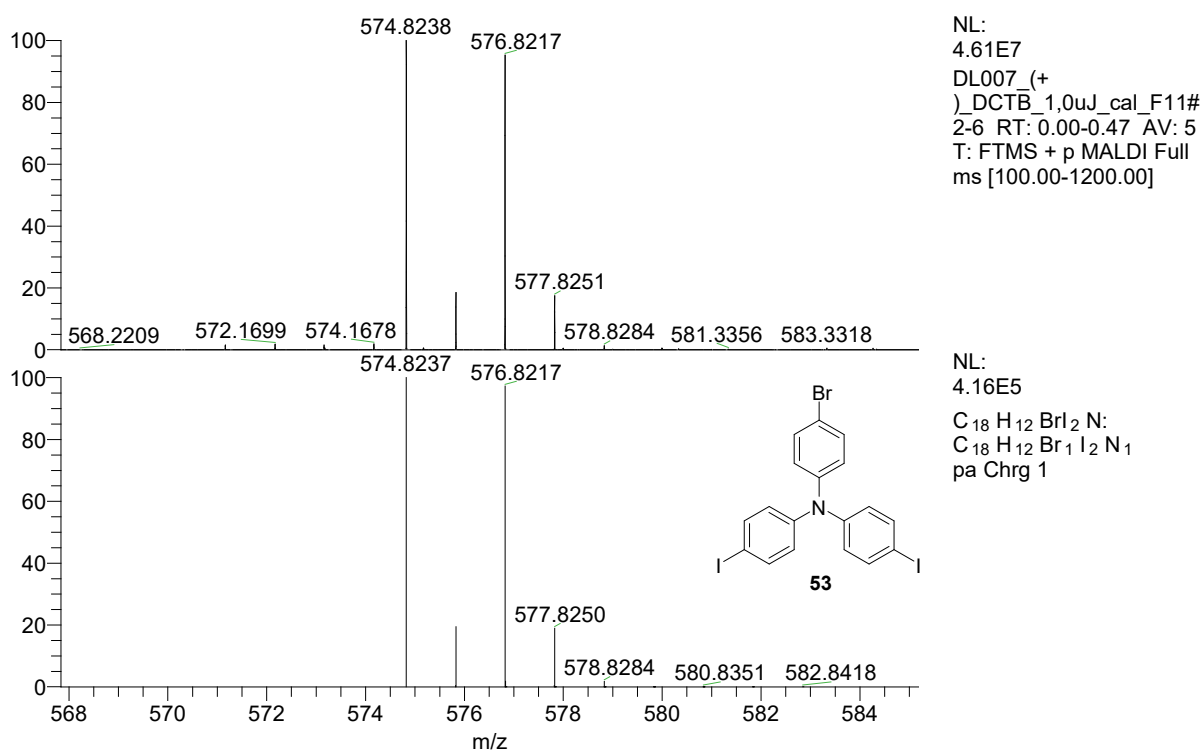
Příloha 7. ¹H NMR spektrum sloučeniny **52**.

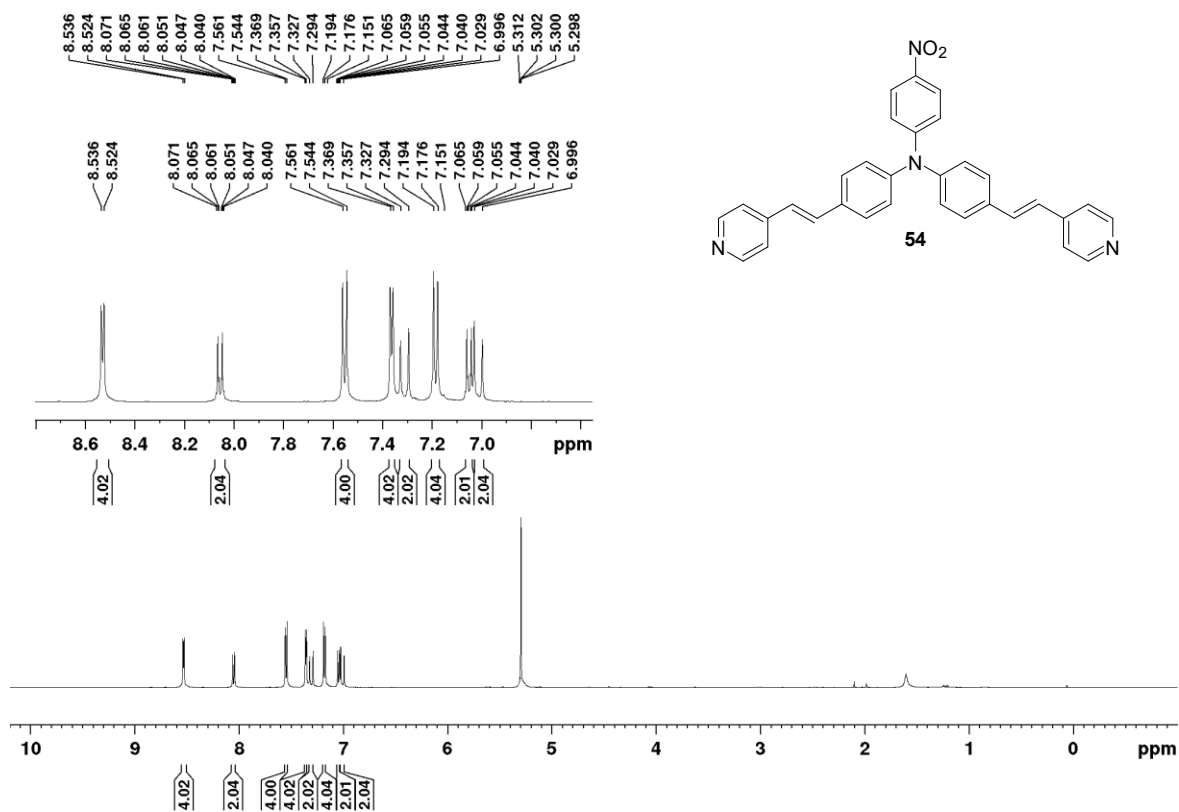
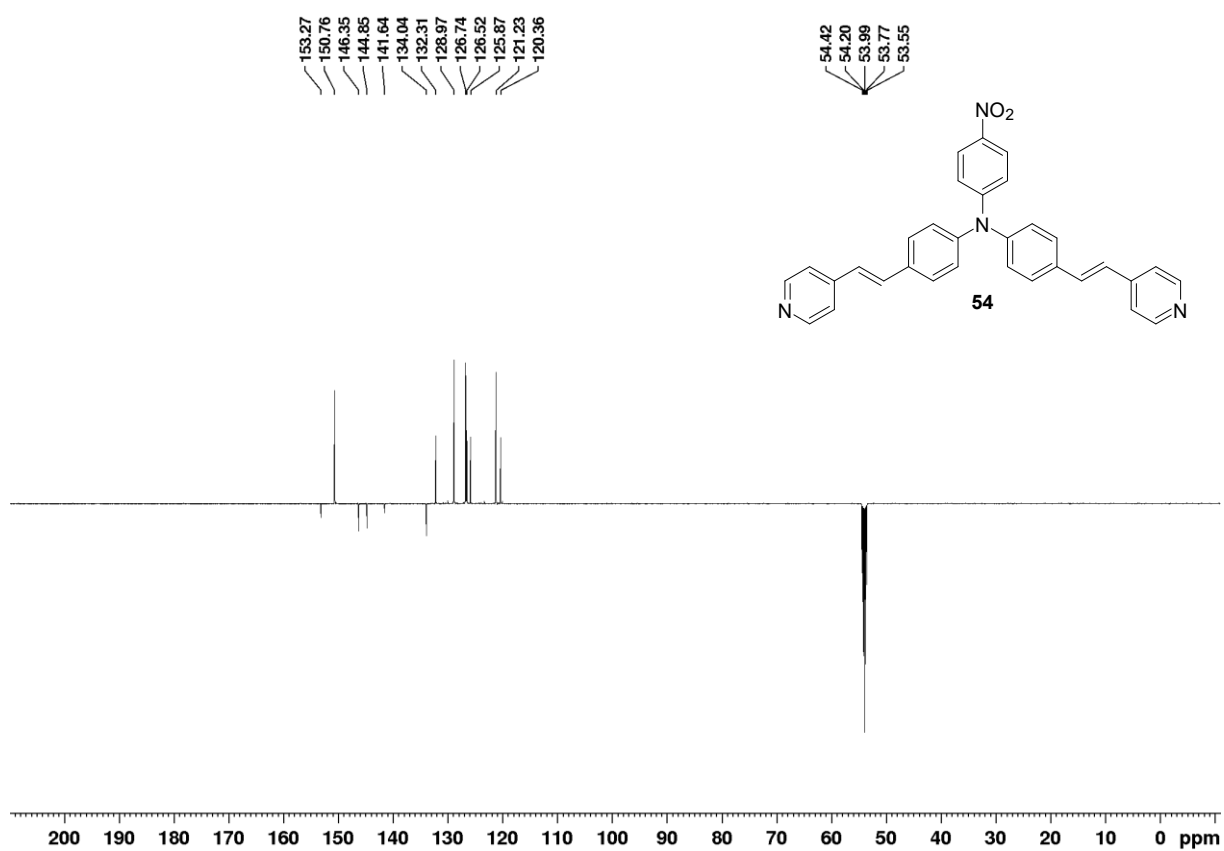


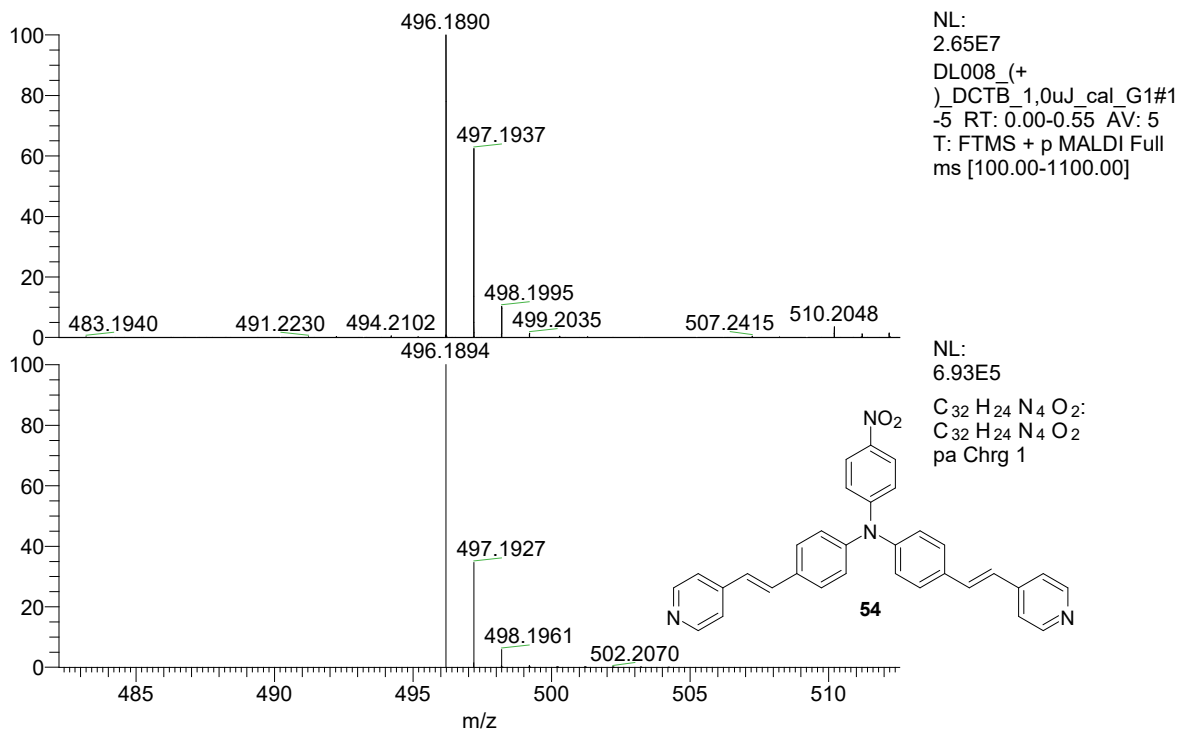
Příloha 8. HR-MALDI-MS spektrum sloučeniny **52**, horní spektrum připadá látce syntetizované, dolní spektrum je simulované pro C₁₉H₁₃I₂NO.



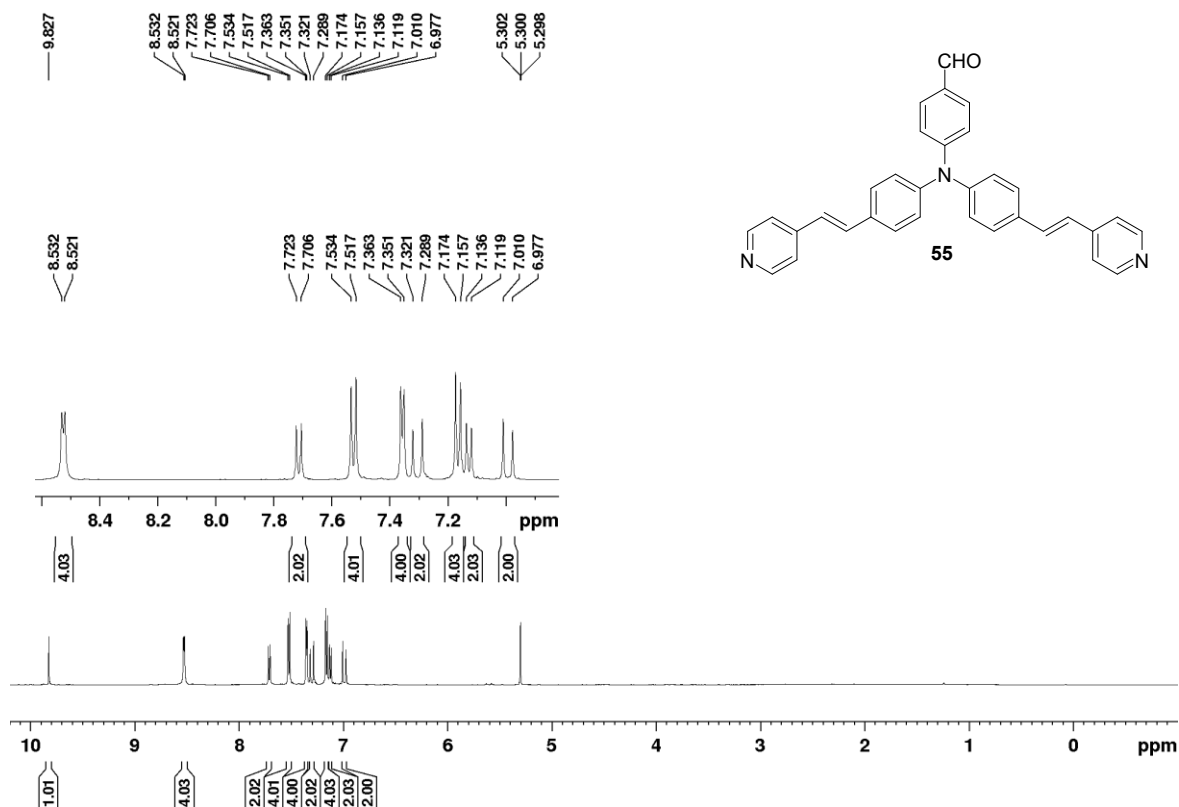
Příloha 9. ¹H NMR spektrum sloučeniny **53**.

Příloha 10. ^{13}C APT NMR spektrum sloučeniny **53**.Příloha 11. HR-MALDI-MS spektrum sloučeniny **53**, horní spektrum připadá látce syntetizované, dolní spektrum je simulované pro C₁₈H₁₂BrI₂N.

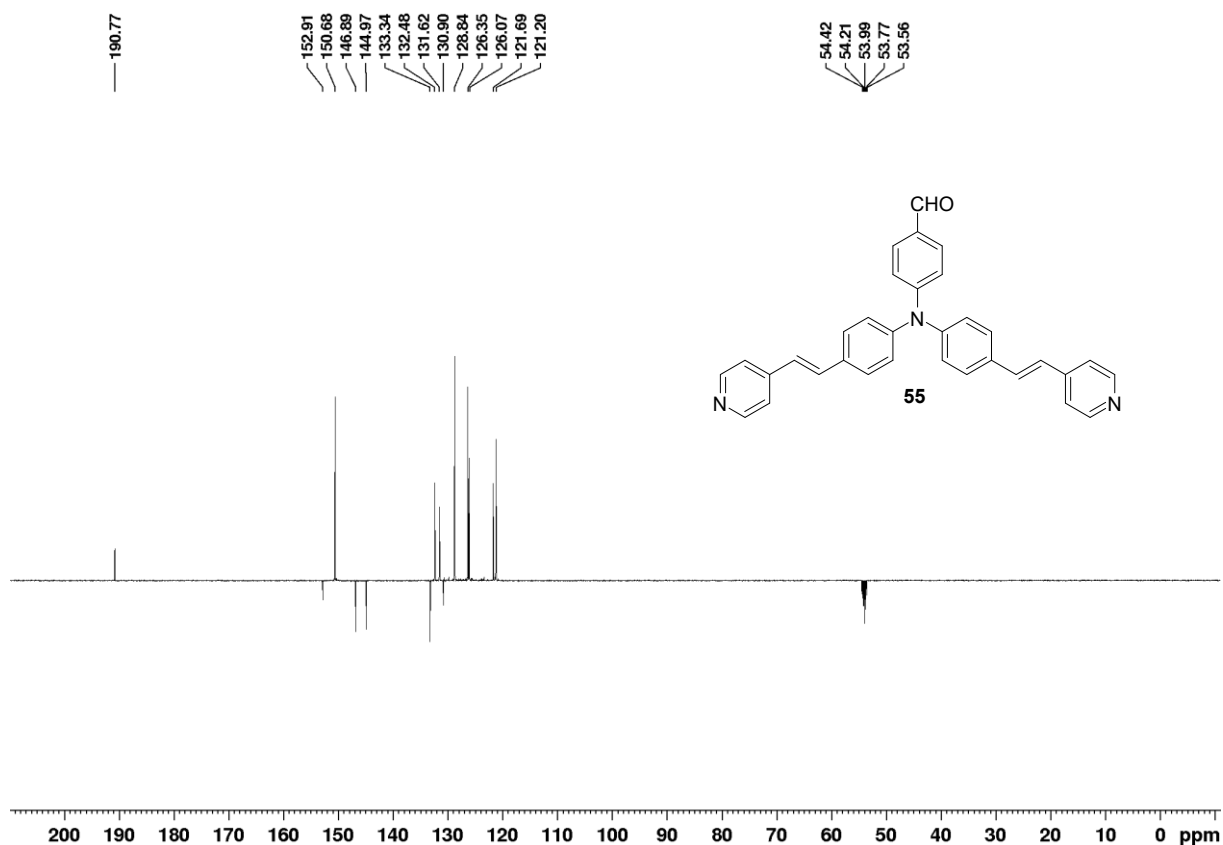
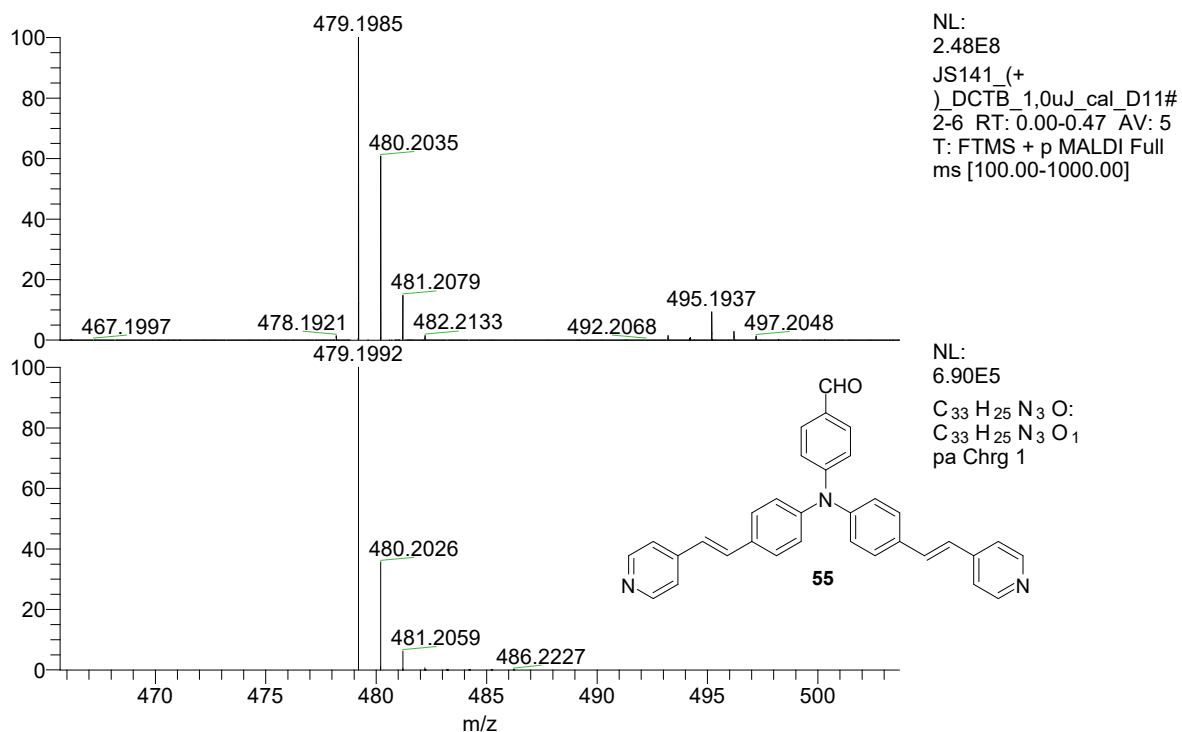
Příloha 12. ¹H NMR spektrum sloučeniny 54.Příloha 13. ¹³C APT NMR spektrum sloučeniny 54.

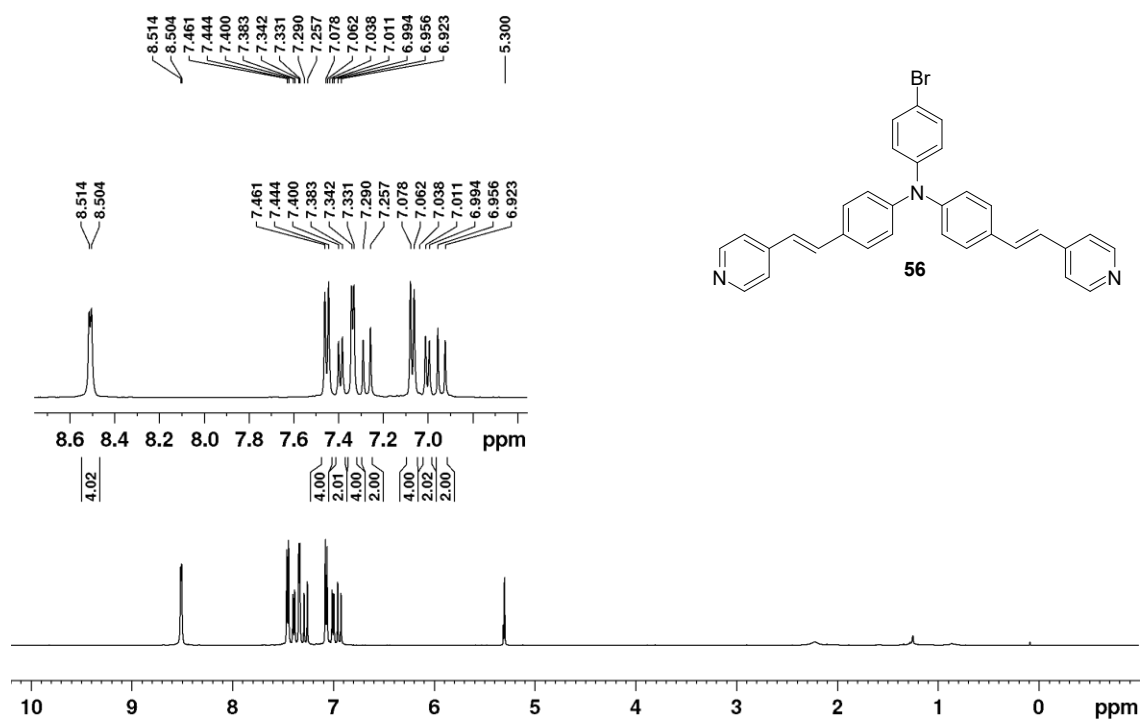
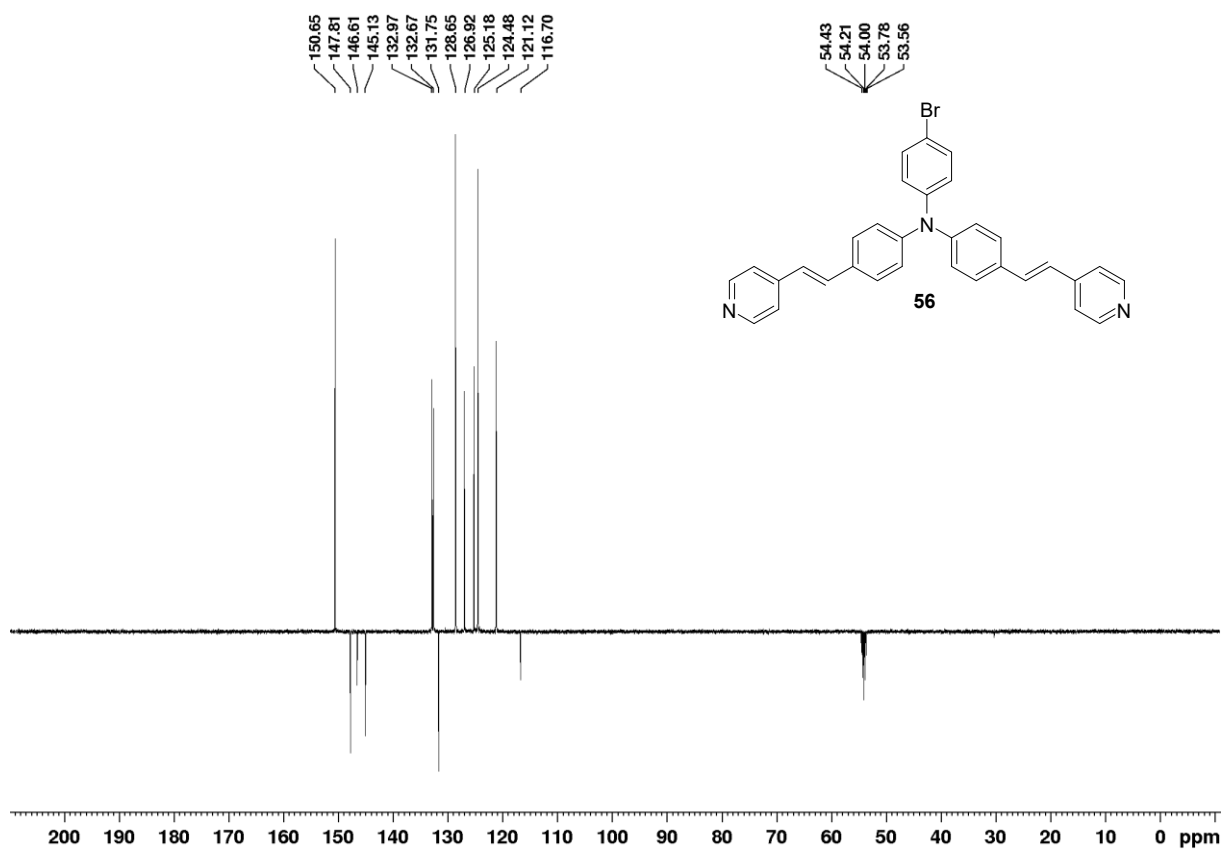


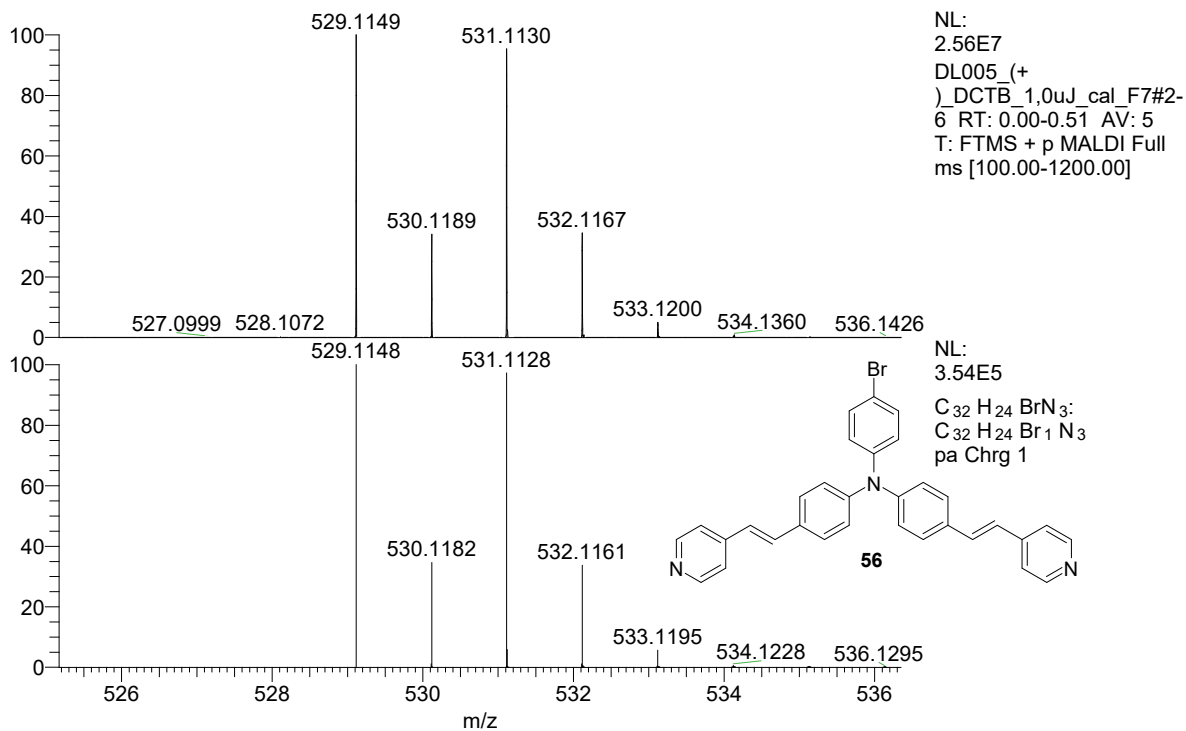
Příloha 14. HR-MALDI-MS spektrum sloučeniny **54**, horní spektrum připadá látce syntetizované, dolní spektrum je simulované pro C₃₂H₂₄N₄O₂.



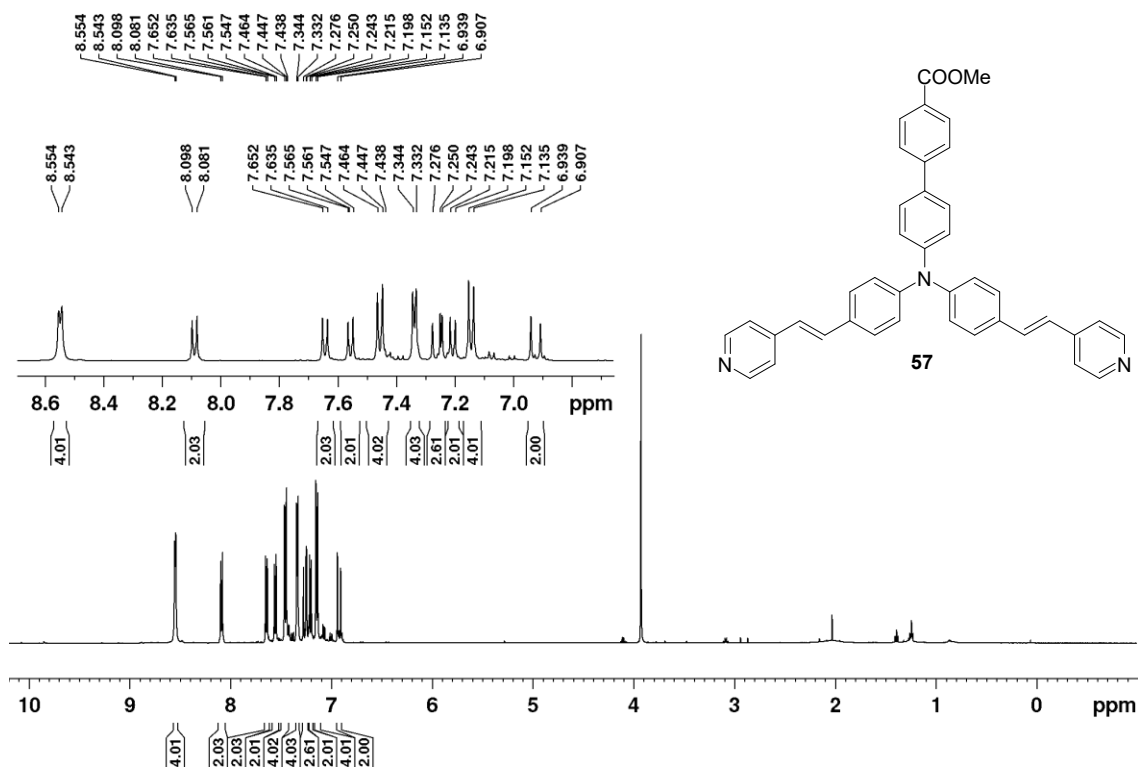
Příloha 15. ¹H NMR spektrum sloučeniny **55**.

Příloha 16. ¹³C APT NMR spektrum sloučeniny 55.Příloha 17. HR-MALDI-MS spektrum sloučeniny 55, horní spektrum připadá látce syntetizované, dolní spektrum je simulované pro C₃₃H₂₅N₃O.

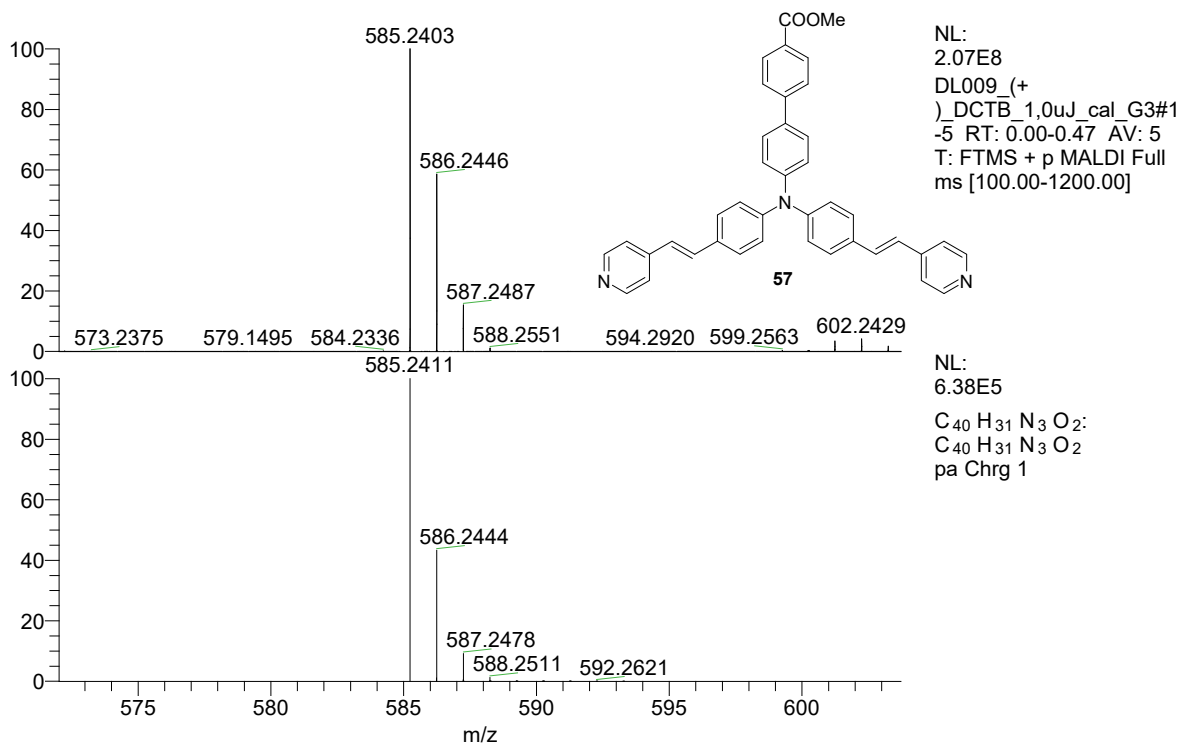
Příloha 18. ¹H NMR spektrum sloučeniny 56.Příloha 19. ¹³C APT NMR spektrum sloučeniny 56.



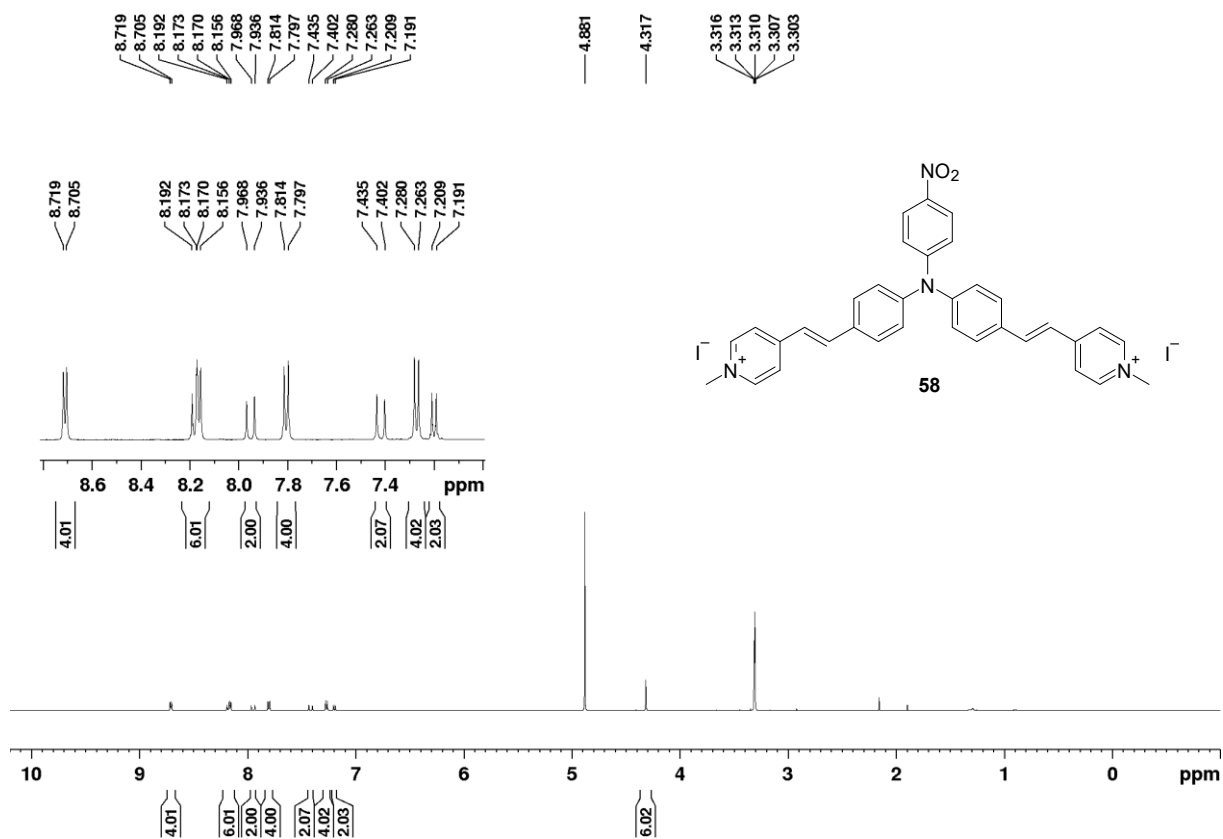
Příloha 20. HR-MALDI-MS spektrum sloučeniny **56**, horní spektrum připadá látce syntetizované, dolní spektrum je simulované pro C₃₂H₂₄BrN₃.



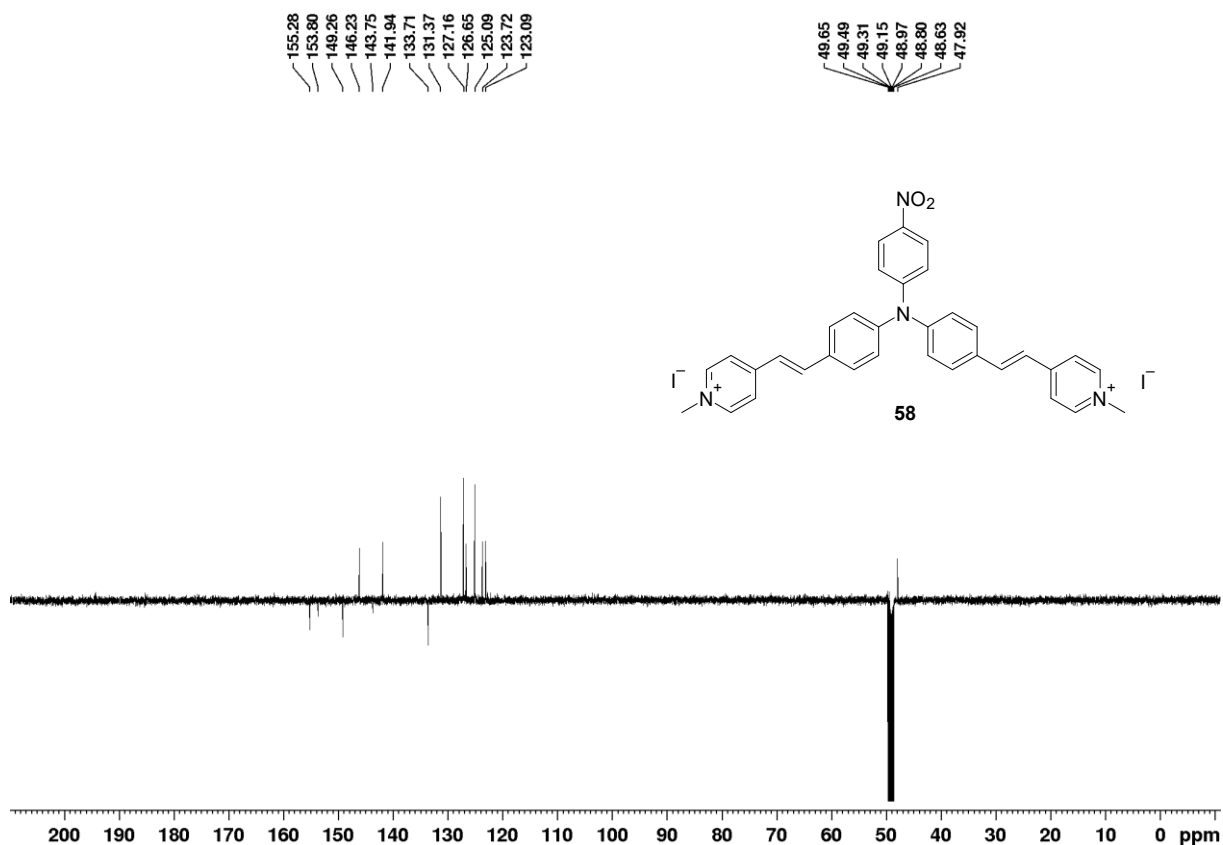
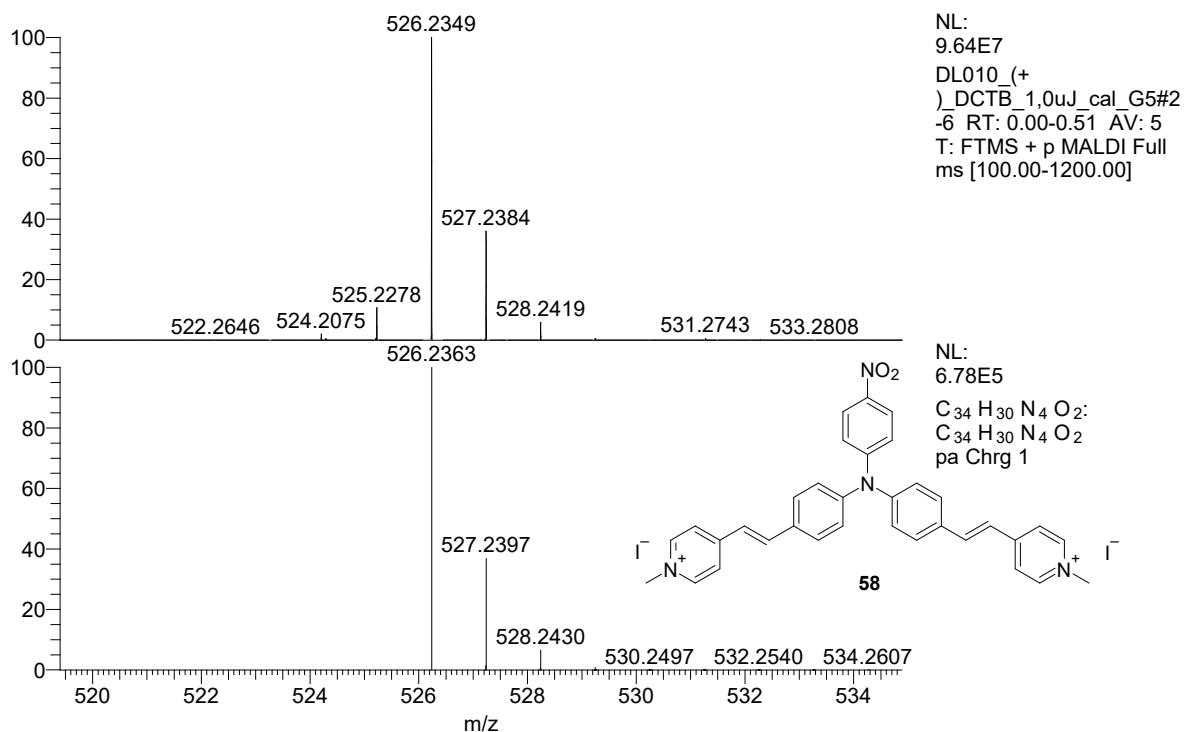
Příloha 21. ¹H NMR spektrum sloučeniny **57**.

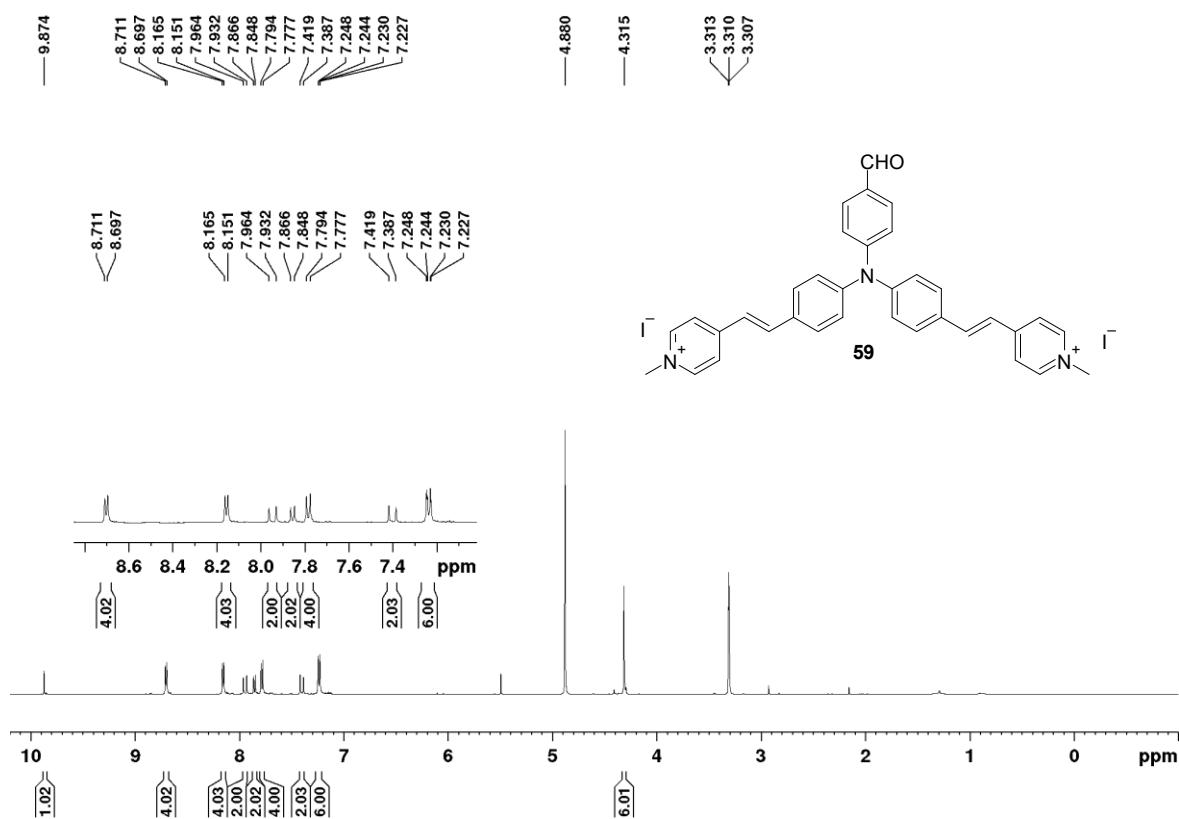
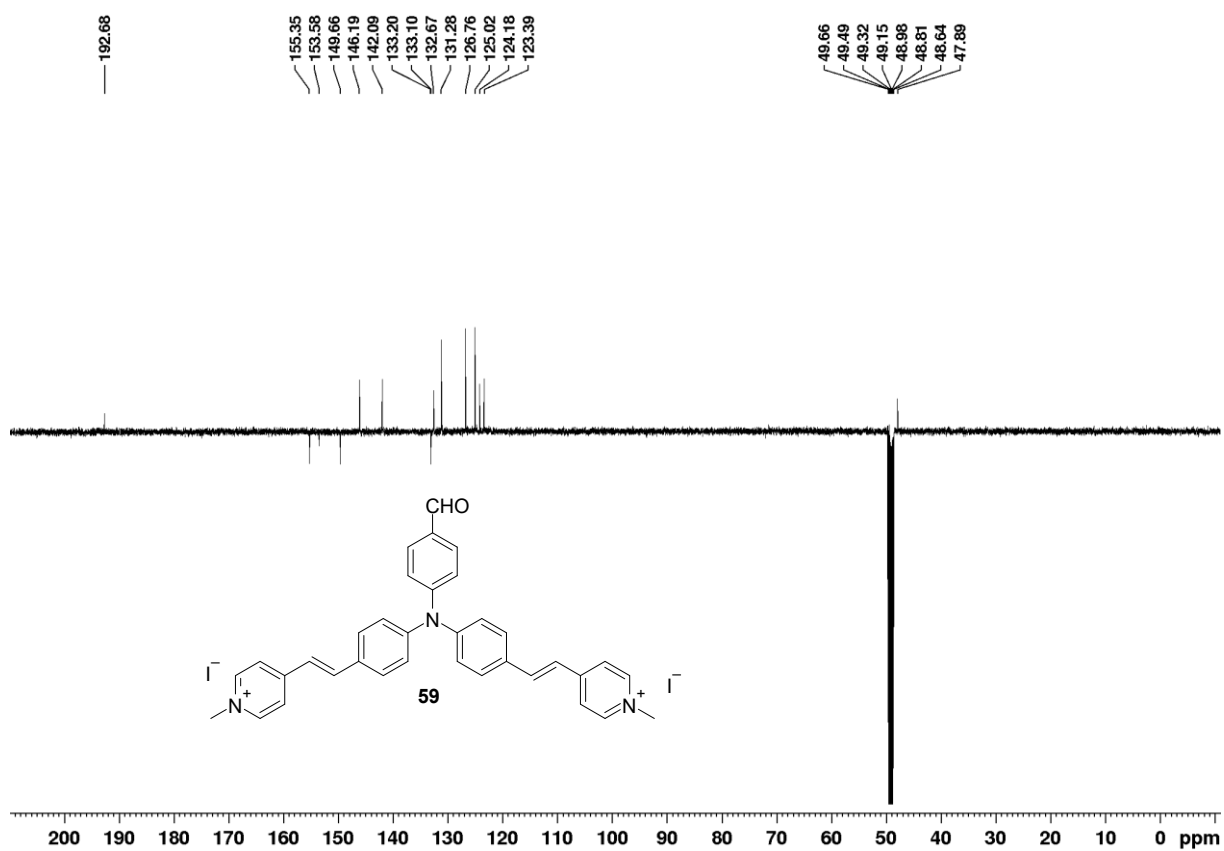


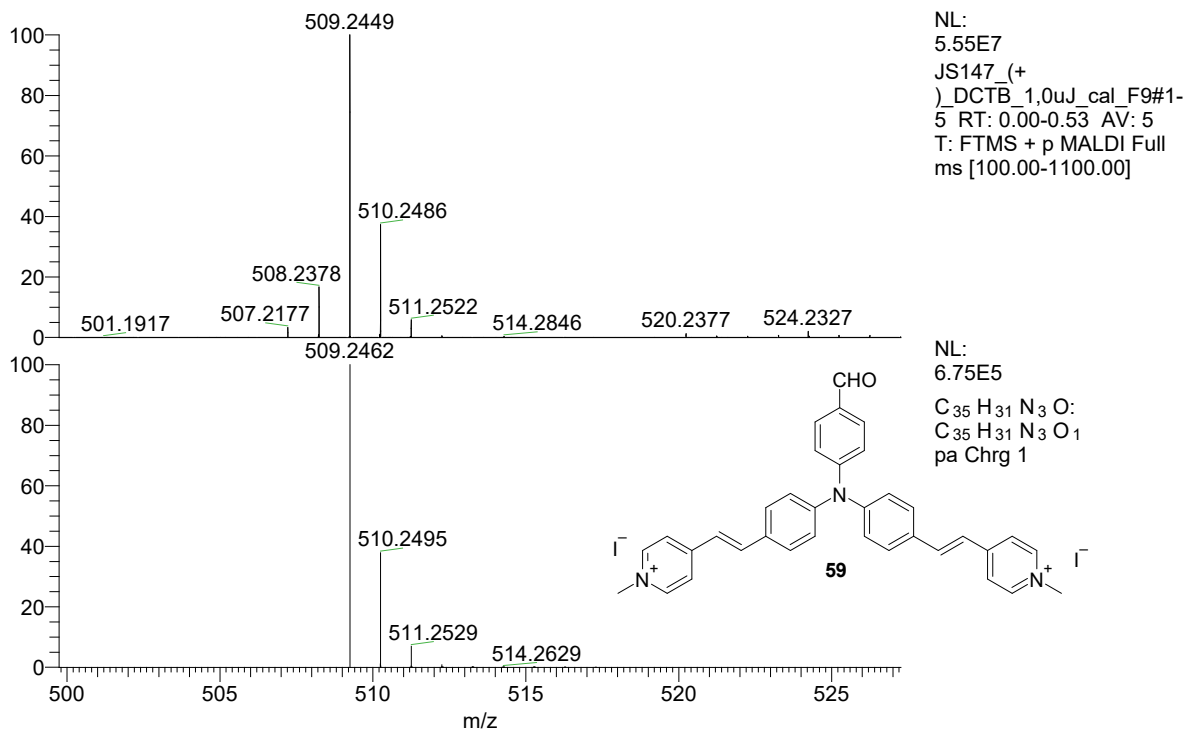
Příloha 22. HR-MALDI-MS spektrum sloučeniny **57**, horní spektrum připadá látce syntetizované, dolní spektrum je simulované pro C₄₀H₃₁N₃O₂.



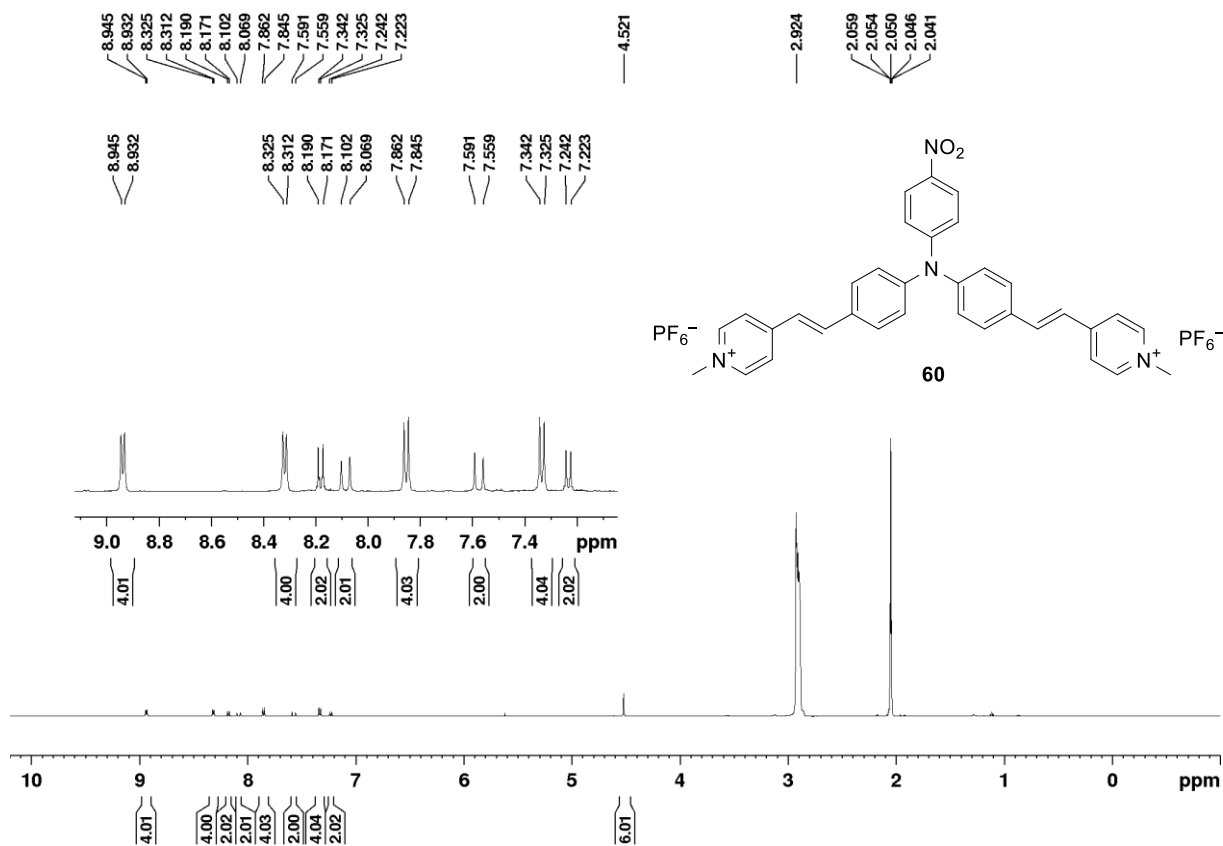
Příloha 23. ¹H NMR spektrum sloučeniny **58**.

Příloha 24. ¹³C APT NMR spektrum sloučeniny 58.Příloha 25. HR-MALDI-MS spektrum sloučeniny 58, horní spektrum připadá látce syntetizované, dolní spektrum je simulované pro C₃₄H₃₀N₄O₂.

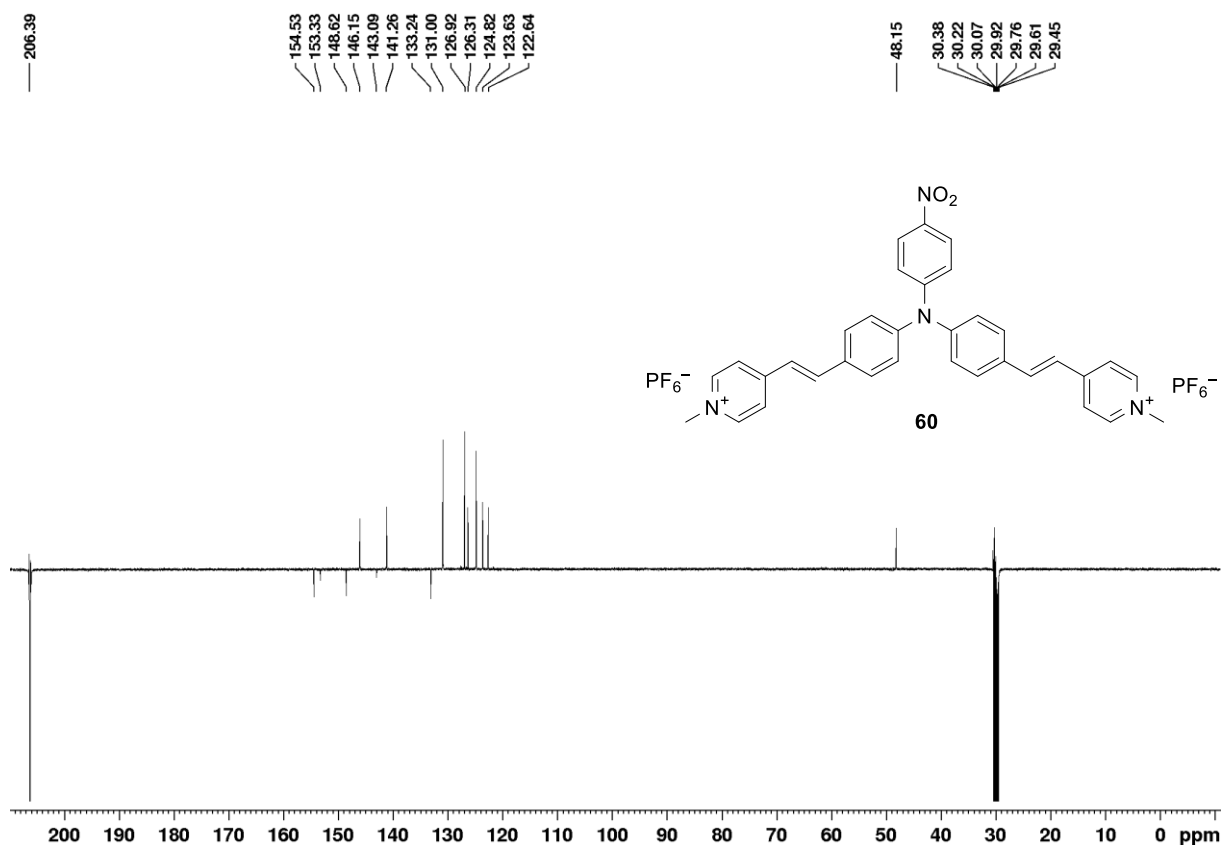
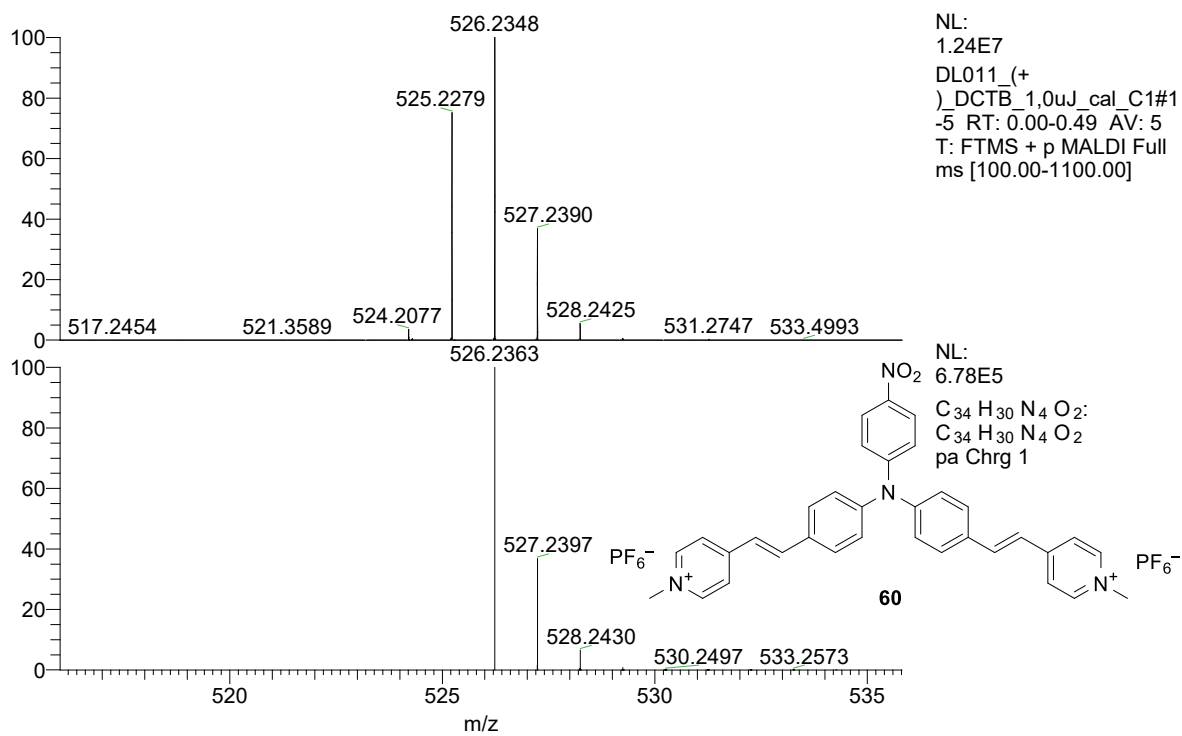
Příloha 26. ¹H NMR spektrum sloučeniny 59.Příloha 27. ¹³C APT NMR spektrum sloučeniny 59.

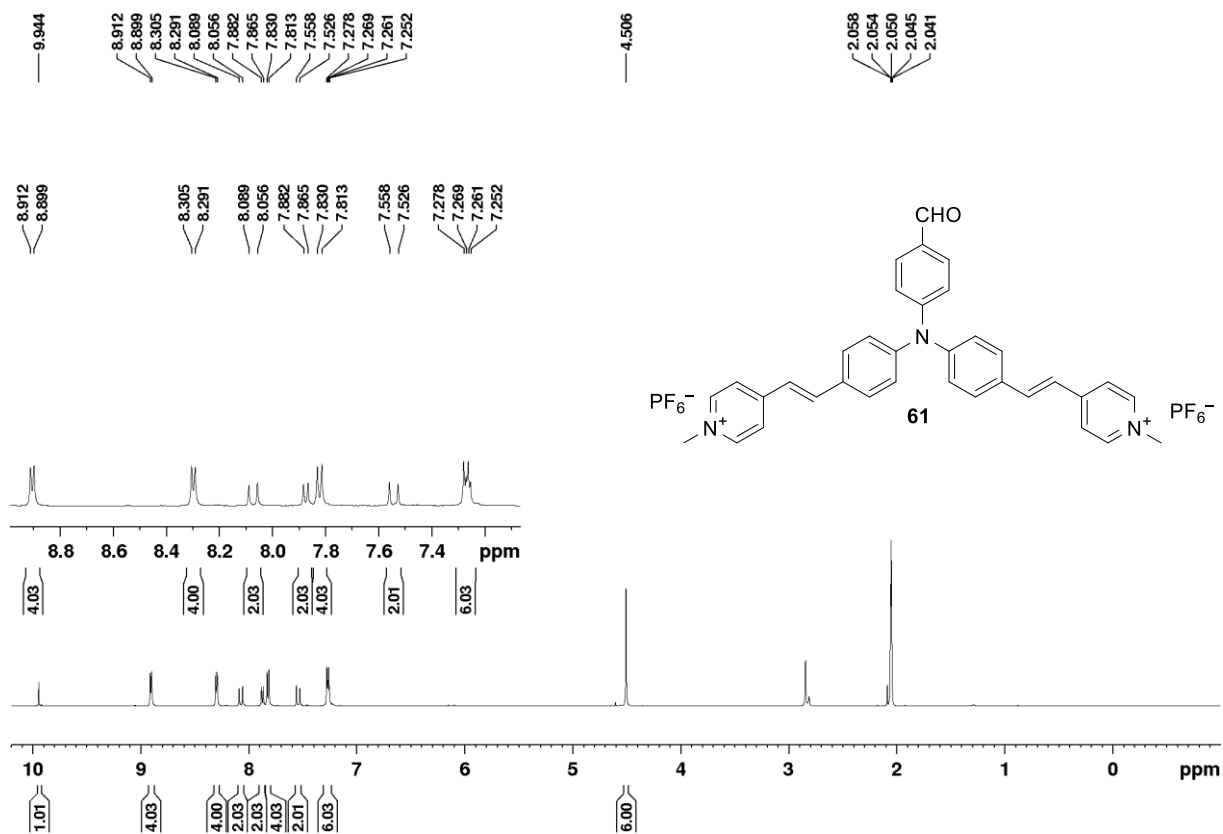
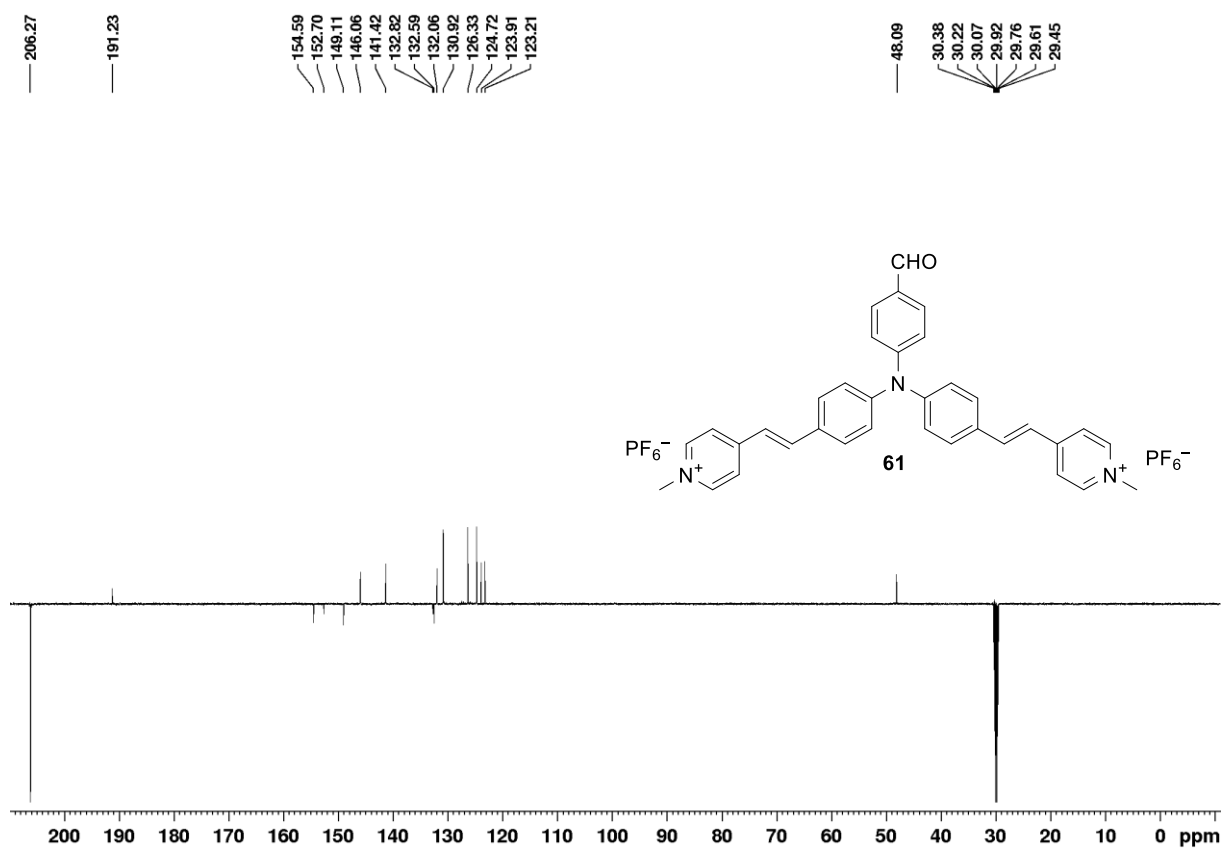


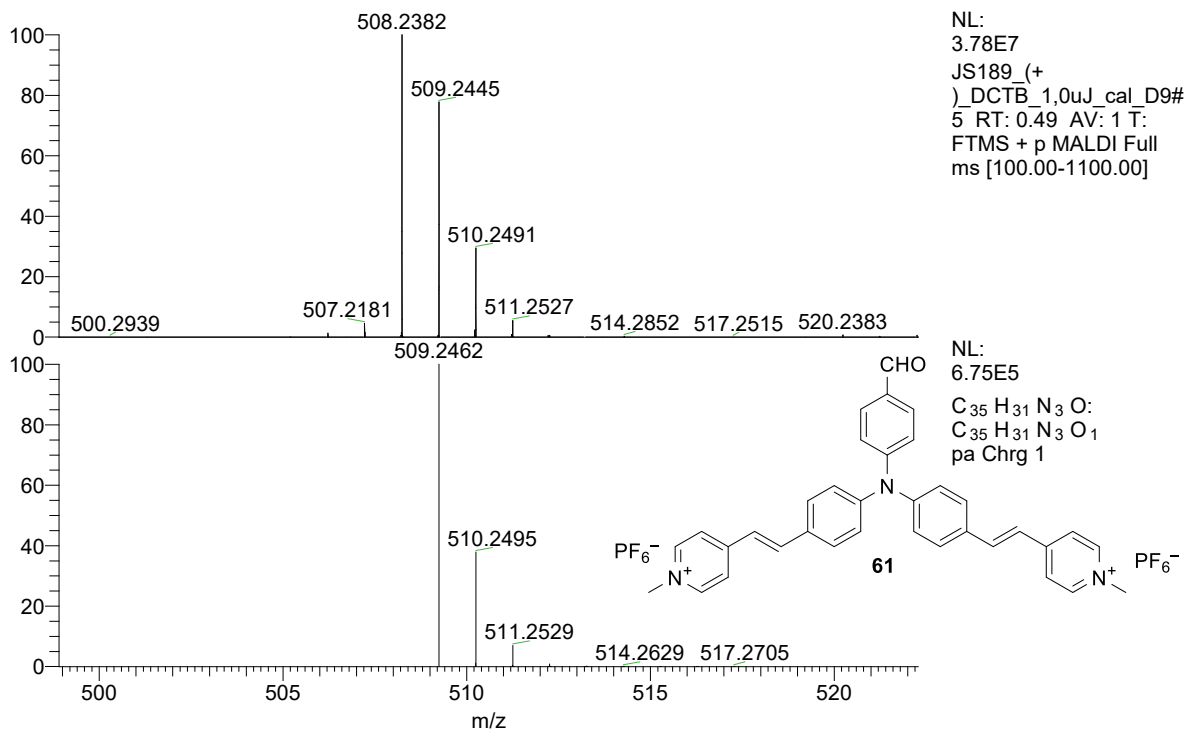
Příloha 28. HR-MALDI-MS spektrum sloučeniny **59**, horní spektrum připadá látce syntetizované, dolní spektrum je simulované pro C₃₅H₃₁N₃O.



Příloha 29. ¹H NMR spektrum sloučeniny **60**.

Příloha 30. ¹³C APT NMR spektrum sloučeniny **60**.Příloha 31. HR-MALDI-MS spektrum sloučeniny **60**, horní spektrum připadá látce syntetizované, dolní spektrum je simulované pro C₃₄H₃₀N₄O₂.

Příloha 32. ¹H NMR spektrum sloučeniny 61.Příloha 33. ¹³C APT NMR spektrum sloučeniny 61.



Příloha 34. HR-MALDI-MS spektrum sloučeniny **61**, horní spektrum připadá látce syntetizované, dolní spektrum je simulované pro $C_{35}H_{31}N_3O$.

ÚDAJE PRO KNIHOVNICKOU DATABÁZI

Název práce	Syntéza a vlastnosti pyridiniových derivátů trifenylaminu
Autor práce	David Láník
Obor	Farmakochemie a medicínální materiály
Rok obhajoby	2025
Vedoucí práce	Ing. Jiří Tydlitát, Ph.D.
Anotace	Byla provedena literární rešerše syntéz a vlastností pyridiniových derivátů trifenylaminu. V této práci je diskutován princip fluorescence, využití fluorescence pro fluorescenční značení, vlastnosti a struktura fluoroforů pro fluorescenční značení, druhy fluoroforů a příklady reakcí, kterými se syntetizují pyridiniové a trifenylaminové deriváty. Dále byly diskutovány syntetické cesty vedoucí k finálním dosud v literatuře nepopsaným sloučeninám. Výsledky byly popsány a zhodnoceny. Finální chromofory byly charakterizovány řadou analytických metod jako je bod tání, HR-MALDI-MS spektrometrie, ^1H a ^{13}C NMR spektroskopie a UV/Vis spektroskopie.
Klíčová slova	fluorescence, fluorofory, pyridinium, trifenylamin, fluorescenční značení