

**MASARYKOVA UNIVERZITA
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
ÚSTAV CHEMIE**

**SPEKTROSKOPICKÉ STUDIE
K OBJASNĚNÍ INTERAKCÍ LÁTEK
NA LEDU A MECHANISMŮ
FOTOCHEMICKÝCH REAKCÍ**

Spectroscopic Studies to Explain the Interactions of Molecules
on Ice and the Mechanisms of Photochemical Reactions

Habilitační práce

Vědní obor: 14-04-9 Fyzikální chemie

Brno 2016

Dominik Heger

Bibliografický záznam

Autor: Mgr. Dominik Heger, Ph. D.
Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita
Ústav chemie

Název práce: Spektroskopické studie k objasnění interakcí látek na ledu a mechanismů fotochemických reakcí

Klíčová slova: Mechanistická fotochemie, Fotofyzika, Časově rozlišená spektroskopie, Fotochemické chránící skupiny, Led, Kryoprotekce farmaceutických proteinů

Bibliographic Entry

Author Mgr. Dominik Heger, Ph. D.
Faculty of Science, Masaryk University
Department of Chemistry

Title of Thesis: Spectroscopic Studies to Explain the Interactions of Molecules on Ice and the Mechanisms of Photochemical Reactions

Keywords: Mechanistic photochemistry, Photophysics, Time resolved spectroscopy, Photoremovable protecting groups, Ice, Cryoprotection of pharmaceutical proteins

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem svou habilitační práci vypracoval samostatně s využitím informačních zdrojů, které jsou v práci citovány. Děkuji všem svým spolupracovníkům a blízkým za pomoc a podporu.

Brno 1. srpna 2016

.....
Mgr. Dominik Heger, Ph. D.

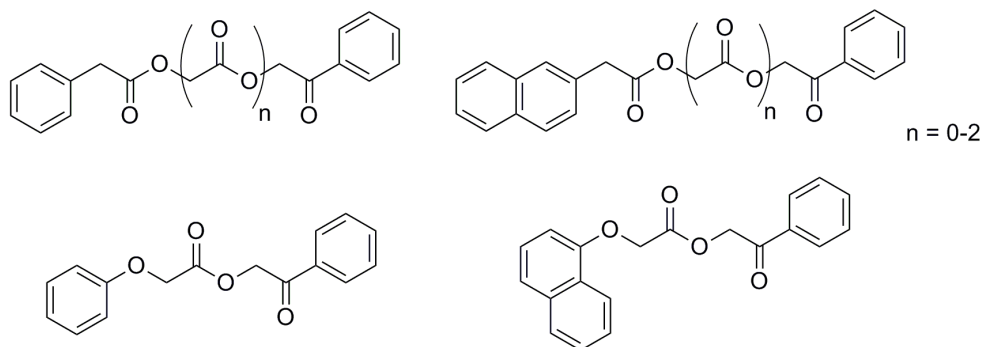
Obsah

Úvod	6
Led	9
Úvod do problematiky studia ledu	9
Výzkum během doktorského studia	11
Agregace při mrazení.....	12
Změna aktivity protonů při zmrazení roztoků	13
Solvatochromní charakterizace ledu	15
Studie po dokončení doktorátu	17
Závěr části habilitační práce zabývající se studiem ledu.....	26
Články, které jsou součástí habilitačního řízení a týkají se tématu ledu	28
Mechanistická fotochemie.....	31
Úvod do problematiky mechanistické fotochemie.....	31
Fotochemické chránící skupiny	31
Laserová záblesková fotolýza	32
Deriváty 2,5-dimetylfenacylu.....	38
Fotochromismus fenoxynafthacenchinonů	38
<i>p</i> -Hydroxyfenacyly – fotochemické chránící skupiny	41
4-hydroxyfenacyl amoniové soli	47
Další chránící skupiny	48
2-hydroxyfenacyl estery	48
<i>S</i> -fenacyl xantáty.....	48
Bengálská červená	48
Závěr části habilitační práce zabývající se mechanistickou fotochemií	49
Články, které jsou součástí habilitačního řízení a týkají se tématu mechanistické fotochemie	50
Závěr	53
Odkazy na použitou literaturu.....	54
Přílohy: uveřejněné vědecké práce, které jsou součástí habilitačního řízení	59

Úvod

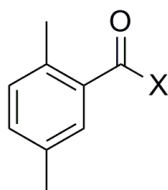
Předložená habilitační práce komentuje ve dvou vzájemně nezávislých kapitolách můj výzkum doložený publikacemi, které jsou součástí přílohy. První kapitola se zabývá charakterizováním látek na površích ledu, druhá pak mechanismy odstoupení chráněných molekul původně kovalentně vázaných v organických molekulách. Pojítkem mezi oběma tématy je spektroskopie; a to zejména v ultrafialové a viditelné oblasti (UV-Vis), v ustáleném stavu i časově rozlišená, luminiscenční i přechodová. Obě vědecká témata mně postupně pomohla pochopit a zdokonalit se ve spektroskopii a také ve zpracování získaných dat. Tyto dovednosti jsou obecně přenositelné a zpětně viděno, pokrok v jednom tématu byl často podmíněn znalostmi nabytými při řešení tématu druhého. Přínos této habilitační práce spatřuji v možnosti popsat souvislosti a detaily, které nejsou zmíněny v samotných článcích, a to s časovým odstupem a z poněkud osobnějšího pohledu. V textu jsem se snažil vysvětlovat a objasňovat pohnutky jednotlivých prací a zasadit je do širšího kontextu. Pro detailní informace je pak čtenář laskavě odkázán do původních článků.

Obě zmíněná témata jsem započal studovat již během diplomové a zejména disertační práce pod vedením prof. RNDr. Petra Klána Ph. D. Mým prvním vědeckým projektem, který jsem začal v průběhu prvního ročníku bakalářského studia, byla syntéza a studium přenosu energie na flexibilních bichromoforech (Zabada, Heger *et al.* 2004). Synteticky jsem připravil tři páry esterů s postupně se prodlužujícím řetězcem (Obrázek 1) a u nich jsem pomocí měření kvantových výtěžků, se zvyšující se koncentrací donoru vodíku nebo elektronu, stanovil rychlostní konstanty přenosu energie z fenacylového konce na konec opačný. Ta se ukázala být závislá na tuhosti a délce pojícího řetězce.



Obrázek 1: Připravené bichromofory pro studium přenosu energie.

Dr. Miroslav Zabadal provedl obdobnou studii na analogických peptidech. Naměřená data naznačila, že bimolekulární rychlostní konstanty se mění pro jednotlivé studované molekuly. Tento fakt komplikoval analýzu a ubíral jí věrohodnosti. Ve snaze odstranit tuto potíž jsem navrhl, aby se zdroj vodíku nebo elektronu umístil přímo na studovanou molekulu do *ortho*-polohy ke karbonylu. Touto substitucí zanikla potřeba externího zdroje vodíku a navržený chromofor sám o sobě dovoľoval odstoupení kovalentně vázaného aniontu. Tímto mimoděk vznikla nová 2,5-dimethylfenacylová chránící skupina (Obrázek 2) (Klan, Zabadal *et al.* 2000).



Obrázek 2: 2,5-dimethylfenacylové chránící skupiny (X = -OCOPh, -OCOCH₂Ph, -OCOMe).

Ta byla později intenzivně studována (Pelliccioli, Klan *et al.* 2001; Zabadal, Pelliccioli *et al.* 2001; Klan, Pelliccioli *et al.* 2002; Pelliccioli a Wirz 2002; Literak, Relich *et al.* 2003; Literak, Wirz *et al.* 2005; Kammari, Plistil *et al.* 2007; Solomek, Stacko *et al.* 2010). Naší počáteční studie si mimo jiné povšiml prof. Jakob Wirz, Ph. D. a požádal nás o navázání spolupráce za účelem studia mechanismu

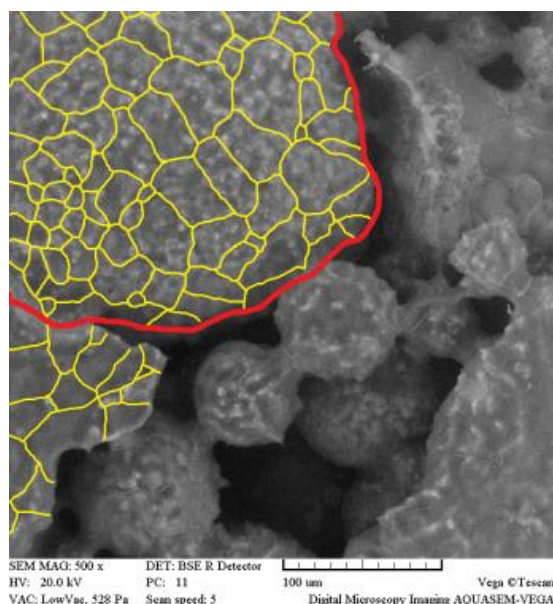
odstoupení látek z 2,5-dimethylfenacylů. Tato spolupráce se opravdu uskutečnila a ukázala se být klíčovou pro další směřování mé i celé brněnské fotochemické skupiny. Později v roce 2007, s laskavým svolením a pomocí prof. Wirze, při příležitosti jeho odchodu do důchodu, byla z Basileje do Brna převezena většina vybavení jeho laboratoře, včetně mikrosekundové, nanosekundové a femtosekundové transienční zábleskové spektroskopie. Prof. Wirz je stále častým návštěvníkem Brna a stále s ním probíhá vědecká spolupráce. Zbývá dodat, že studium přenosu energie na oligoesterech a peptidech došlo po vynaložení značného úsilí ke zdárnému konci a vedlo k vydání publikace, která však zůstává bez citační odezvy. Příčinou je nejspíš špatná volba časopisu, ve kterém je práce uveřejněna (Zabadal, Heger *et al.* 2004).

Ve své disertační práci jsem se začal zabývat studiem látek na ledu. To, co nakonec tvoří podstatu mé disertační práce (studium agregací a spektroskopických vlastností), bylo z počátku zamýšleno jako krátká studie před dalšími projekty studujícími led. Původním záměrem disertační práce bylo realizovat projekt navržený prof. Josefem Michlem – využít ledové matrice k přípravě polymerů v kanálcích ledu. Provedli jsme několik fotopolymerizačních reakcí v ledu, ale absence zkušeností a analytických metod pro polymerní chemii nám nedovolila pokračovat ve výzkumu. Tématu se ve světě chopili jiní a ukázalo se být velmi nosné – metody pro přípravu polymerů v matrici ledu se dnes využívá k přípravě polymerů s vlastnostmi vhodnými k pěstování buněčných kultur (Kirsebom a Mattiasson 2011; Henderson, Ladewig *et al.* 2013). Zaměření disertační práce „pouze“ na absorpční vlastnosti látek se ukázalo být přínosné pro mnoho oborů v několika aspektech, které budou diskutovány v kapitole tomu věnované, a je naší pracovní skupinou rozvíjeno doposud.

Led

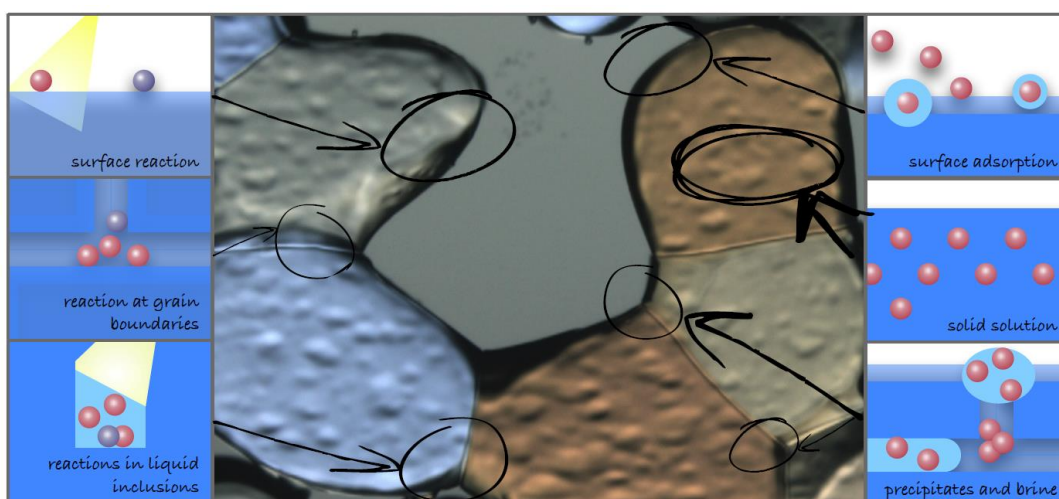
Úvod do problematiky studia ledu

Základní informace o ledu I_h týkající se našich projektů jsou shrnuty v patřičných monografiích a v souhrnných člancích na toto téma, k příspěvní do dvou z nich jsem byl také pozván (McNeill, Grannas *et al.* 2012; Bartels-Rausch, Jacobi *et al.* 2014). Diskuse, která se rozvinula v průběhu tvorby jednoho ze zmíněných souhrnných článků (Bartels-Rausch, Jacobi *et al.* 2014), byla velmi přínosná a poučná: ukázalo se totiž, že jednotliví autoři se neshodovali na základních pojmech. Jejich vymezení a výsledná shoda, dovoluji si tvrdit, posunula výzkum v této oblasti významně vpřed. Led je velmi zajímavé médium; detaily o jeho chování a interakcích s nečistotami nejsou doposud příliš známy. Tento fakt mě zprvu velmi překvapil. Asi nejdůležitějším základním poznatkem je, že většina nečistot se do krystalové mřížky ledu I_h zabudovává velmi málo nebo vůbec a zůstává na povrchu jednotlivých krystalů ledu. V přírodě i při mrazení laboratorním nejčastěji vzniká led polykrystalický, s jednotlivými monokrystalky o velikosti mikrometrů až milimetrů. Nečistoty jsou tedy umístěny na plošky a zejména na hrany mezi jednotlivé monokrystalky v rámci většího kusu ledu (Obrázek 3).



Obrázek 3: Znázornění jednotlivých krystalků ledu (žluté čáry) pro ledové kuličky ohraničená červenou čarou. (Krausko, Runštuk *et al.* 2014)

Tato místa jsou různými vědeckými komunitami označována různě: trojitě spoje (z anglického *triple junctions*), žíly nebo mikroskopické kapsičky. Množství názvů a jejich nejednotné použití zrcadlí nejistotu, kde a v jaké formě se vlastně nečistoty v/na ledu vyskytují. Doposud se neví, za jakých podmínek nečistoty v žilách vykrystalizují, jaké je jejich bezprostřední okolí a jak se nečistoty chovají v závislosti na stárnutí a přeměnách ledu (Domine, Bock *et al.* 2013). Mikroskopický popis nečistot ledu je zajímavé téma základního výzkumu, jehož správné pochopení má mnoho praktických důsledků. Například doposud se nedaří uspokojivě simulovat osudy polutantů životního prostředí v ledové matici, není známo, jak probíhají velká, ekologicky významná uvolňování halogenů z ledu v arktických oblastech (Vogt, Crutzen *et al.* 1996; Spicer, Plastringe *et al.* 2002; Abbatt, Thomas *et al.* 2012), mrazení biologických materiálů často probíhá s velkými ztrátami aktivity, chování nečistot v amorfních ledech (které jsou v kosmu pravděpodobně nejvíce rozšířenou formou vody) je doposud neprozkoumané (Lignell and Gudipati 2015). Mou snahou je pochopit naznačené problémy v jednotlivých konkrétních případech a pokusit se k nim přinést odpovědi postavené na laboratorních experimentech: charakterizovat led a chemické látky na něm přítomné pomocí spektroskopických, elektrochemických a mikroskopických metod. Toto úsilí je shrnuto v této kapitole habilitační práce.



Obrázek 4: Znázornění rozmístění nečistot v různých kompartmentech ledu. (převzato z Bartels-Rausch, Jacobi *et al.* 2014)

Studium ledu na našem pracovišti bylo započato spoluprací prof. RNDr. Holoubka CSs. s prof. Klánem. Znalosti prof. Holoubka o polutantech přírodního prostředí a dálkovém transportu vzbudily zájem u fotochemika prof. Klána. Jestliže jsou (organické) látky přenášeny v atmosféře na velké vzdálenosti z míst jejich emise až na póly, jsou při tom vystaveny slunečnímu záření a často jejich vodné roztoky zamrzají. Skupina prof. Klána v rozsáhlých studiích zmrzlých vodných roztoků zjistila, že fotoreaktivita (organických) látek na ledu je rozdílná od jejich fotoreaktivity v roztocích, a že v ledu často vznikají látky podstatně toxičtější než v roztocích (Klan, Ansorgova *et al.* 2000; Klan, Janosek *et al.* 2000; Klan, Del Favero *et al.* 2001; Klan a Holoubek 2002; Klan, Klanova *et al.* 2003; Klanova, Klan *et al.* 2003; Literak, Klan *et al.* 2003; Blaha, Klanova *et al.* 2004; Ruzicka, Barakova *et al.* 2005; Matykiewiczova, Kurkova *et al.* 2007). Laboratorní experimenty se od přírodních podmínek lišily především podstatně vyššími koncentracemi látek a použitím tvrdého UV záření. Z toho vyplývají následující otázky: 1. Bude fotoreaktivita u podstatně méně koncentrovaných zmrzlých roztoků jiná než u roztoků koncentrovaných? 2. Bude fotoreaktivita způsobená slunečním světlem, které dopadá na zemský povrch a má obvykle delší vlnové délky, jiná než způsobená UV zářením?

V naší studii jsme se rozhodli odpovědět na druhou otázku. Pokud platí Vavilovo pravidlo¹, pak by fotoreaktivita látky neměla záviset na vlnové délce absorbovaného světla. Látka ale musí sluneční světlo absorbovat. Absorpční spektra látek v ledu však před našimi měřeními v podstatě nebyla známa – nezbývalo, než je naměřit.

Výzkum během doktorského studia

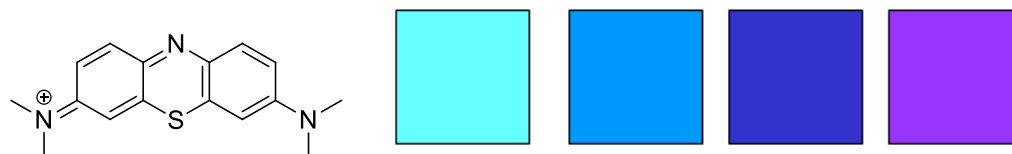
Vybrali jsme tedy řadu látek, jejichž fotoreaktivita v ledu se už na našem pracovišti studovala (např. 1,2-chlorfenol, 1,4-chlorfenol, 1,2-nitrofenol, 1,4-nitrofenol, 1,2-dichlorbenzen a další), a změřili jsme jejich absorpční spektra v ledu. Měření probíhala v laboratoři na Ústavu fyzikální chemie Jaroslava Heyrovského AV ČR

¹ Vavilovovo pravidlo praví, že fotoreaktivita nastává z nejnižšího excitovaného stavu. Vavilovovo pravidlo je tak důsledkem pravidla Kašova, které říká, že vnitřní přeměny vibrační energie v rámci jednotlivých elektronových přechodů jsou podstatně rychlejší než přechod elektronový. Na obě pravidla lze nahlížet jako na zkonkretizovaný zákon energetické mezery – velký energetický rozdíl se překonává pomaleji než malý.

v Praze a za cenné pomoci pana RNDr. Jaromíra Jirkovského, CSc. Z prvních měření vyplynulo, že spektroskopické chování po zmrazení ve vodném roztoku je velice individuální: některá spektra se nezměnila skoro vůbec (chlorfenoly a fenoláty), spektra jiných se posunula k červené oblasti (1,4-nitrofenol) a u jiných látek ještě některé absorpční pásy výrazně změnilly svou intenzitu. První měření přinesla víc otázek než odpovědí: 1. Je spektrum látek ovlivněno hlavně interakcí látky s ledem, nebo interakcemi v agregátech či krystalech? (Neb jsme na tuto otázku neznali přesnou odpověď, je podnes výše zmíněná spektroskopická část práce z větší části nepublikována.) 2. Jsou spektra ovlivněna změnou pH, která může při zmrazení nastat? 3. Bylo by možné zobecnit pozorované změny absorpčních spekter na jiné látky, než jaké již byly zkoumány? Na tyto tři otázky jsme, myslím, v hrubých obrysech odpověděli třemi publikacemi, které vznikly v průběhu mé disertační práce. Obecnější popis je stále předmětem výzkumu mé skupiny. Provedu tedy krátkou analýzu studií, které vyplynuly z mé disertační práce. Tato fakta pak dají základ pro porozumění pracím následujícím.

Agregace při mrazení

Při mrazení dochází k agregaci látek do žil mezi krystaly ledu. Jak vysoká bude v těchto žilách koncentrace nečistot? Bude záviset na způsobu mrazení? Budou v žilách ledu podmínky vhodné ke krystalizaci látek? Začal jsem tedy hledat molekulovou sondu, která by k zodpovězení těchto otázek mohla přispět. Jako nejvhodnější se ukázala methylenová modř, která vykazuje posun absorpčního spektra s agregací. V rozsáhlé studii, ve které jsem se navíc učil základy zpracování dat s velkou pomocí Mgr. Pavla Dvořáka Ph. D. z Ústavu fyzikální elektroniky, MU, jsme ukázali, že míra agregace je závislá na rychlosti mrazení: rychlé mrazení ponořením vzorku do tekutého dusíku vede k lokálnímu zakoncentrování látek v žilách přibližně o tři řády, kdežto pomalé mrazení ponořením vzorku do ethanolu o teplotě 243 K o více než šest řádů (Heger, Jirkovsky *et al.* 2005). Zmíněná závislost je, zpětně viděno, očekávatelná a může se jevit až triviální, nicméně náš článek je ve vědecké literatuře v podstatě jedinečný v pokusu o kvantifikaci jevu. To je asi důvodem, proč je tento článek mým nejvíce citovaným dílem (75 citací).



Obrázek 5: Struktura methylenové modře a znázornění změny barvy vodných roztoků se zvyšující se koncentrací (zleva doprava).

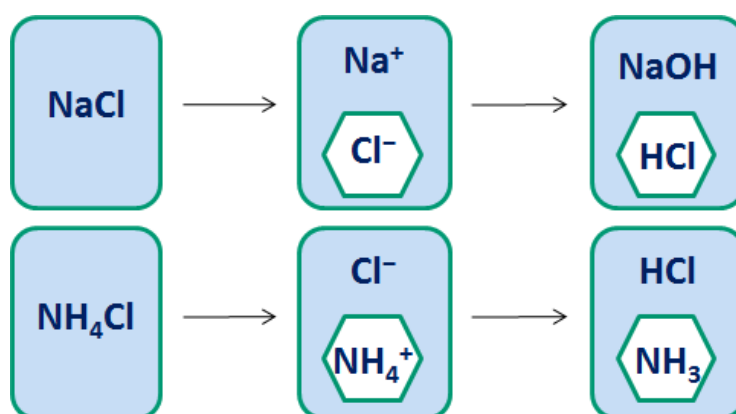
Změna aktivity protonů při zmrazení roztoků

Pokud dochází k agregaci organických látek v žilách ledu, jak je to s protony pro zmrzlé roztoky různých kyselin? K zodpovězení této otázky jsme se pokusili použít řadu pH indikátorů. Zjistili jsme, že většina z nich po zmrazení přestane fungovat, že jsou prostě během zmrazení hydrolyzovány či jinak poškozeny a přestanou vykazovat charakteristické absorpční pásy. Hydrolyza během mrazení je mimochodem častý a zajímavý fenomén (Bronshteyn a Chernov 1991).

Jako jeden z indikátorů rezistentních k mrazení roztoku se ukázala kresolová červeň (Heger, Klanova *et al.* 2006). Zpětně viděno, důkladná rešerše literatury by nám bývala ušetřila mnohé experimenty – pH indikátory ze sulfoftaleinové skupiny, kam kresolová červeň patří, byly při mrazení používány již dříve (Orii a Morita 1977; Zinchuk, Hancock *et al.* 2005; Govindarajan, Chatterjee *et al.* 2006). Pravděpodobným důvodem tehdejšího nenalezení patřičných článků bylo, že tyto indikátory se pro zmrazené vzorky používají v chemii potravinářské a farmaceutické, a tedy tyto informace jsou bohužel neznámé pro chemiky zabývajícími se přírodním prostředím, ba dokonce i pro mnohé biochemiky. Tuto politováníhodnou situaci se snažím řešit přenášením znalostí mezi jednotlivými vědeckými komunitami tím, že používám led jako společný jmenovatel svého zájmu.

Pomocí analýzy spekter zmrzlých vodných roztoků různých kyselin (HF, HCl, H₂SO₄, HNO₃, kyselina *p*-toluensulfonová) s kresolovou červení jsme zjistili, že při mrazení v kapalném dusíku při 77 K dochází ke zvýšení lokální aktivity protonů v žilách ledu o tři až čtyři řády a že tento nárůst je ještě vyšší při mrazení při 253 K.

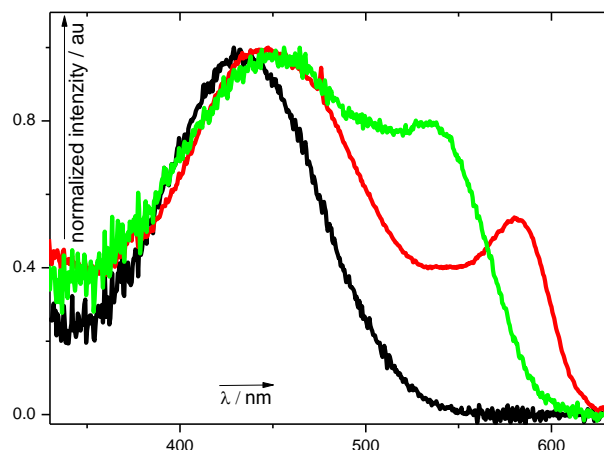
V době vzniku této práce jsem v literatuře našel zmínky o fenoménu, který se mně velice zalíbil, a který jsem pro komunitu lidí zabývajících se environmentální chemií ledu znovuobjevil: mrznoucí potenciál. Tento jev byl poprvé popsán Workmenem a Reinoldsem v roce 1948 (Workman a Reynolds 1948; Workman and Reynolds 1950). Tito pánové naměřili elektrický potenciál mezi kapalným vodným roztokem a mrznoucím ledem. Je vysvětlen nerovnoměrnou distribucí iontů s různými náboji mezi roztokem a mrznoucím ledem. Tento potenciál byl navržen jako možné vysvětlení vzniku bouřek. Přestože bylo později ukázáno, že nabíjení mraků a tedy vznik bouřek se dá lépe vysvětlit jinak (Jungwirth, Rosenfeld *et al.* 2005), elektrický potenciál při zamrzání vodných roztoků iontů vzniká v podstatě pokaždé. Mechanismus vzniku potenciálu mrznutí pro mrznoucí roztoky chloridu sodného a chloridu amonného je znázorněn na Obrázek 6.



Obrázek 6: Znázornění vzniku potenciálu mrznutí a změny pH pro chlorid sodný a chlorid amonný během mrznutí.

Mrznoucí potenciál mezi ledem a roztokem s časem klesá z důvodu pomalé difuze protonů mezi ledem a nezmrzlým roztokem. Nerovnoměrná distribuce různě nabitých iontů mezi roztokem a ledem vede ke změně pH ve zbývajícím nezmrzlém roztoku. Byl jsem velmi potěšen, když jsem takovouto změnu kyselosti naměřil pomocí kresolové červeně pro dvě reprezentativní soli NaCl a NH₄Cl. Jednak se tím otevřela možnost ověření výpočtů potenciálu mrznutí prováděná

Bronshteynem a Chernovem (Bronshteyn a Chernov 1991), a také jsme získali důkaz o správnosti naší indikační metody změny pH.



Obrázek 7: Naměřená absorpční spektra roztoku kresolové červeně (černá) a zmrzlých roztoků chloridu sodného (červená, došlo k ozásadění) a chloridu amonného (zelená, došlo k okyselení, Heger, Klanova *et al.* 2006).

Solvatochromní charakterizace ledu

Přestože předchozí dva články jsou hojně citovány, sám příkládám největší váhu poslednímu článku, který vznikl v průběhu mé disertační práce. Jedná se totiž o zobecnění, o němž si myslím, že má prediktivní sílu. Led jsme charakterizovali pomocí solvatochromních parametrů (Heger a Klan 2007). Pokud by charakterizace byla dokonalá, stačila by pak znalost vlastností látek v kapalinách, abychom mohli předvídat jejich spektrální posuny v ledu oproti roztoku. Konkrétně: solvatochromními parametry se dá charakterizovat každé rozpouštědlo. Jedná se o přibližné vztahy volné energie, kde jednotlivé parametry vždy charakterizují jednu vlastnost, jako například schopnost solventu působit jako donor či akceptor vodíkové vazby nebo působit v dipól-dipólových interakcích. Pokud tedy známe citlivosti látky k těmto parametrům, pak bychom měli být schopni stanovit, jak bude ovlivněno spektrum dané látky v jiném

prostředí – například v ledu. Předpokladem je, že látka interaguje s ledem, a nikoli sama mezi sebou.

Našel jsem sérii osmi látek, které se používají pro kalibrační nalezení solvatochromních parametrů, změřil jsem jejich spektra v různě připravených zmrazených vodných roztocích a z vyhodnocení posunů maxim jsem získal solvatochromní parametry pro led. Parametry byly určeny nezávisle, jeden parametr byl vždy stanoven pomocí více molekulových sond. Shledali jsme, že led se pro molekuly ve zmrzlém roztoku jeví jako velmi silný donor a akceptor vodíkových vazeb, a jako velmi slabé médium v dipól-dipólových interakcích. Dodnes otevřenou a námi studovanou otázkou zůstává, jaký vliv v těchto interakcích hraje velikost lokální koncentrace sledovaných látek.

Nedocenění této práce vědeckou komunitou, zabývající se environmentálním ledem, naznačené slabším citačním ohlasem (16 citací), příkládám přílišné komplikovanosti problému. Obávám se, že pokud vědci neznají problematiku lineárních vztahů volné energie, nemohou docenit možné dosahy těchto zjištění pro jejich výzkum. Řešení vidím v možnosti pokusit se predikční sílu tohoto popisu ukázat a ověřit na systémech, které jsou pro tuto komunitu relevantní.

Pět měsíců doktorského studia jsem strávil na basilejské univerzitě u prof. Wirze na projektu, jehož cílem bylo naměřit (tripletová) transientní spektra při přenosu energie mezi látkami zmrzlými v ledu. Zprvu jsem se seznámil s měřením nanosekundové laserové zábleskové spektroskopie. Dále jsem měřil rychlostní konstanty přenosu energie mezi vybranými látkami ve vodných roztocích jako referenční hodnoty k chystaným měřením v ledu. Musím konstatovat, že přechod na měření transientů v ledu se během tohoto pobytu nezdařil (a nebyl ve vědecké literatuře publikován dodnes). Představa o průsvitnosti ledu pro bílé světlo z xenonové lampy se ukázala být naivní; připravené ledové vzorky rozptylovaly příliš světlo a do detektoru se nedostal dostatek fotonů. Nicméně aparatura se dala alespoň využít k měření rychlosti přenosu energie sledováním luminiscenčních procesů, čímž se mně otevřela oblast luminiscenční spektroskopie obecně, a zejména pak v časově rozlišeném modu. Měl jsem také možnost se podílet na renovaci zařízení výměnou zastaralého (a již málo funkčního) multikanálového snímače za moderní ICCD (anglická zkratka *intensified charge-coupled device*)

kameru. Nabyté zkušenosti jsem pak bohatě využil při budování laboratoře pro časově rozlišená měření v Brně.

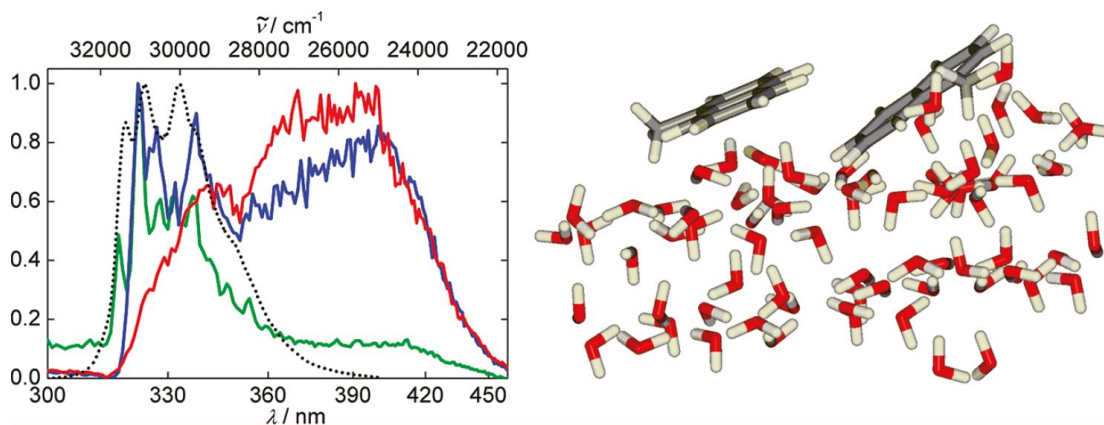
Studie po dokončení doktorátu

Po dokončení doktorátu jsem strávil dva roky na postgraduální stáži opět v Basileji, kde jsem se věnoval mechanistické fotochemii, a teprve po návratu zpět do Brna jsem se k ledovým projektům vrátil, tentokrát již jako vedoucí studentských prací.

Uvědomili jsme si, že zmrzlé vodné roztoky nejsou jediným modelovým systémem pro přírodní ledy a že v přírodě často dochází k depozici organických molekul na již dříve zmrzlou vodu. Začali jsme tedy připravovat malé ledové kuličky, někdy též označované jako umělý sníh, stříkáním kapiček vody do kapalného dusíku (viz Obrázek 3). Tato metoda přípravy ledu je velice vhodná, neboť malé kuličky mají velký aktivní povrch a napaření na ně může vést k nízké lokální koncentraci sledovaných molekul. Současně jsme přešli od měření UV-Vis absorpčních spekter k měření spekter fluorescenčních. Prvotní motivací bylo, abychom se byli schopni přiblížit koncentracím polutantů, které se běžně vyskytují v přírodě. Přestože jsme zjistili, že tohoto cíle nemůže být dosaženo (intenzita signálu jakýchkoli organických látek v ledu se ztrácí v šumu při koncentracích ca 1×10^{-7} M), luminiscenční technika přinesla jiné přednosti.

Záměrem prvního projektu bylo navázat na práci s methylenovou modří a charakterizovat velikost zakoncentrování látek při mrznutí pomocí fluorescenční charakteristiky vhodně zvolené molekulové sondy: experimenty jsme začali s naftalénem a jeho deriváty. Předpokládal jsem, že pro vysoké koncentrace naftalenu budeme při mrazení pozorovat excimery, a doufal jsem, že pro nízké koncentrace začne převládat signál monomerů (Heger, Nachtigallova *et al.* 2011).

Množství vzniklého excimeru bylo opravdu vyšší při vyšším pokrytí povrchu ledových kuliček 1-methylnaftalénem, kdežto při nižším pokrytí převládaly signály monomeru (Obrázek 8). Napařování bylo uskutečněno při 238 K. Významnou pomocí při interpretaci našich experimentálních dat se staly výpočty spekter prováděné RNDr. Danou Nachtigallovou, Ph. D.



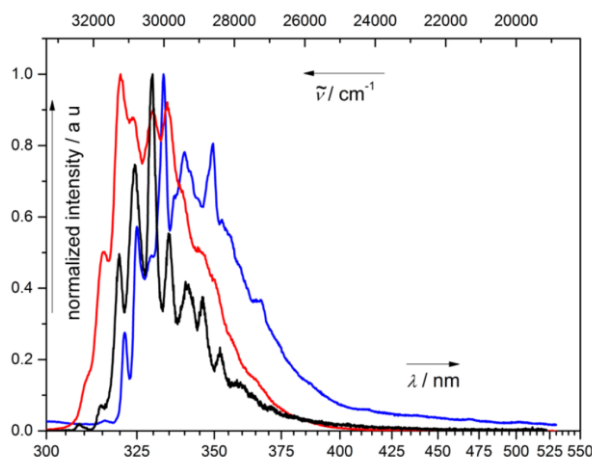
Obrázek 8: Spektra monomer (píky kolem 330 nm) a excimerů (široké emisní pásy) 1-methylnaftalenu na ledu, doplněná znázorněním jejich interakce s povrchem ledu (převzato z Heger, Nachtigallova et al. 2011 s povolením Americké Chemické Společnosti).

Jistou míru nejistoty do interpretací našich měření přináší fakt, že spektrum monomeru naftalenu a jeho derivátů je velmi podobné spektrům krystalů. Můžeme tedy rozlišit, jestli jsou na povrchu ledu přítomny molekuly naftalenu separované molekulami vody, nebo jsou molekuly naftalenu vytěsněny k sobě. Nemůžeme však vyloučit, že přítomné agregáty zkrystalizovaly.

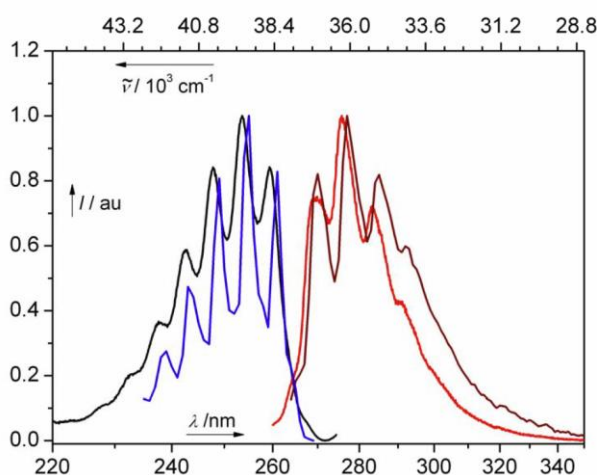
Naše pozorování širokých pásů 1-methylnaftalenu napařeného na povrch ledu, připisovaných excimerům, byla v kontrastu s pozorováním prof. Donaldsona z Toronta, který pro naftalen na ledu pozoroval úzké píky, které přiřadil excimeru naftalenu (Kahan a Donaldson 2007). Nabyli jsme přesvědčení, že tyto píky odpovídají skupinám různě orientovaných excimerů, které, dle výpočtů dr. Dany Nachtigallové, by v této spektrální oblasti mohly emitovat. Naše experimenty si však neodpovídaly. Rozdíl byl v použité molekulové sondě – v našem případě 1-methylnaftalen, kdežto prof. Donaldson používal naftalen. Rozhodli jsme se proto prozkoumat fotofyzikální vlastnosti naftalenu na ledu také v naší laboratoři.

Závěr značného úsilí, publikovaný v samostaném článku, je, že naftalen při zmrazení vodného roztoku opravdu agreguje, ale tvar emisního spektra tohoto excimeru je jiný, než se domníval prof. Donaldson (Krausko, Malongwe *et al.* 2015). Signál excimeru se totiž projevuje jako rozšíření emisního spektra monomeru směrem k červené oblasti spektra (Obrázek 9). Toto pozorování je nečekané, jelikož excimery s takovýmto spektrem vznikají při interakcích naftalenu s

povrchy (například s povrchem siliky). Podobný jev jsme pozorovali pro zmrzlý vodný roztok benzenu (Obrázek 10), což by mohlo ukazovat na zobecnitelnost pozorování i pro jiné látky.



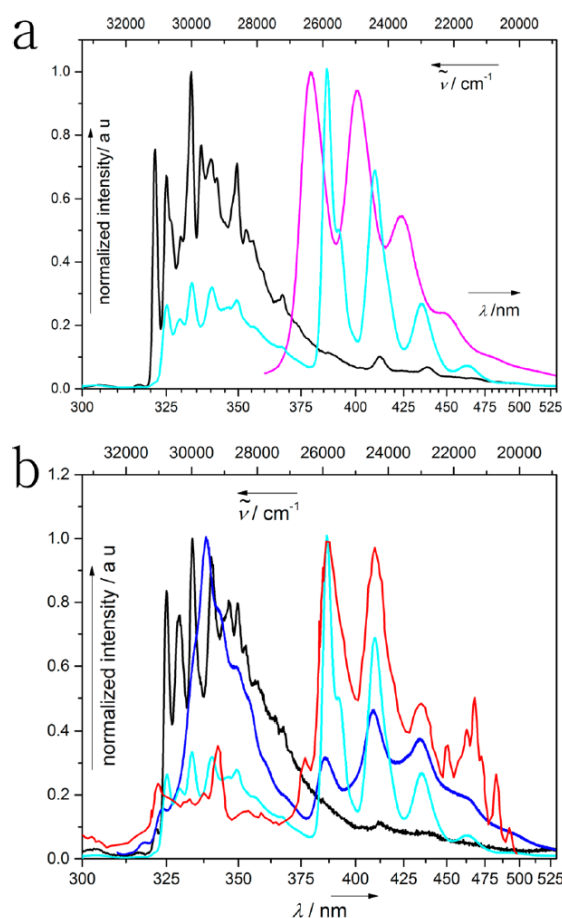
Obrázek 9: Emisní spektra naftalenu v roztoku (červená), v zmrzlém roztoku (modrá) a v krystalu (černá) (převzato z Krausko, Malongwe *et al.* 2015 s povolením Americké Chemické Společnosti).



Obrázek 10: Excitační a emisní spektra benzenu v roztoku při laboratorní teplotě a v roztoku zmrzlém při 77 K (tmavší odstíny) (převzato z Kania, Malongwe *et al.* 2014 s povolením Americké Chemické Společnosti).

Avšak jednotlivé úzké pásy, které prof. Donaldson připsal emisím excimerů, jsme identifikovali jako signály anthracenu, který bývá ve vzorcích naftalenu přítomen

jako nečistota (Obrázek 11). Tento fakt jsme publikovali jako komentář ke článkům prof. Donaldsona a dr. Kahan, kteří na chybných interpretacích svých pozorování postavili četné závěry o látkách vytěsněných z ledů (Krausko, Ondrušková *et al.* 2015). Důvodem nekritického ohlasu těchto prací je podle mého názoru alarmující selhání při recenzních řízeních ve vědeckých časopisech, ale i chybějící kritický postoj odborných čtenářů. Zajímavostí je, že přenos energie z naftalenu na anthracen je velmi dobře znám a využíván při detekci ionizujícího záření.

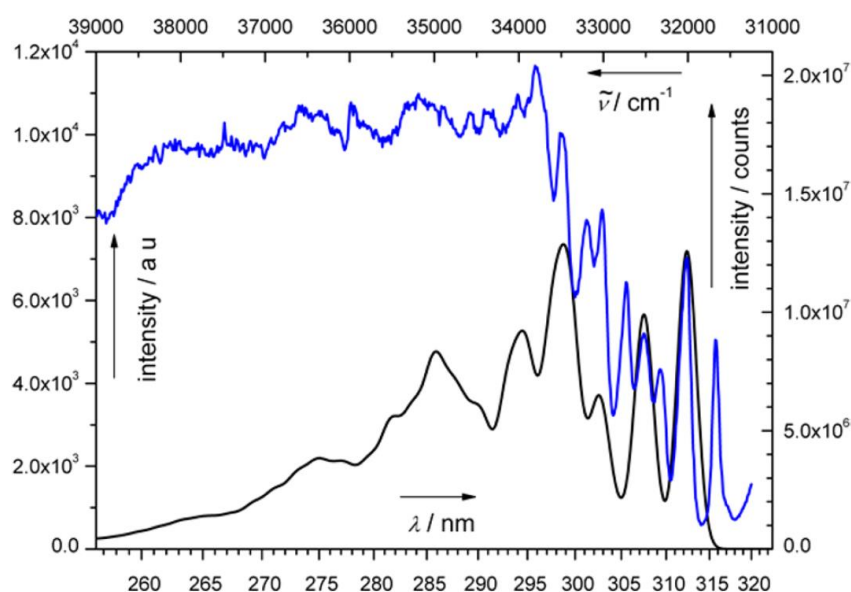


Obrázek 11: Důkaz přítomnosti anthracenu ve vzorcích naftalenu. Anthracen se projevuje sérií vibračně rozlišených pásů nad 380 nm (převzato z Krausko, Ondrušková *et al.* 2015 s povolením Americké Chemické Společnosti).

Další otevřenou otázkou v environmentální ledové fotochemii je, proč jsou některé fotochemické reakce probíhající na ledu výrazně efektivnější než ve vodě. Někteří autoři se tento jev pokusili vysvětlit posunem absorpčních spekter látek

na ledu směrem k červené oblasti spektra. Dle této představy by pak tyto látky mohly absorbovat podstatně více slunečního záření dopadlého na led než na vodný roztok.

V naší práci jsme na naftalenu a benzenu ukázali, že u těchto modelových látek ke zmíněnému posunu spekter nedochází (Kania, Malongwe *et al.* 2014; Krausko, Malongwe *et al.* 2015). Tento závěr je v protikladu k pracím publikovaným prof. Donaldsonem. K řádnému doložení našich argumentů jsme použili UV-Vis absorpční spektroskopii a fluorescenční excitační spektroskopii zmíněných látek na ledu. Měřeno bylo s velmi vysokým rozlišením, které umožnilo použít derivační spektroskopii k určení poloh jednotlivých vibračních hladin elektronové hladiny S_1 . Nalezené vibrační progresy velmi dobře odpovídají progresím naměřeným v plynné fázi a získaným kvantově chemickými výpočty, a současně jednoznačně určují polohu absorpčního spektra (Obrázek 12).



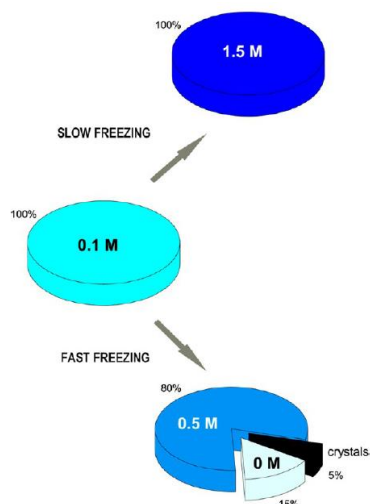
Obrázek 12: Vibračně rozlišené spektrum naftalenu změřené ve zmrzlém vodném roztoku (modrá) a získané z ab initio výpočtů (černá) (převzato z Krausko, Malongwe *et al.* 2015 s povolením Americké Chemické Společnosti).

Absorpční spektra odpovídají velmi přesně excitačním fluorescenčním spektrům, což dodává značné důvěryhodnosti našim závěrům. Můžeme tedy s jistotou říci, že pro benzen a naftalen k posunu absorpčních spekter nedochází při žádném způsobu přípravy ledu s těmito nečistotami (zmrazení, napaření při všech testovaných teplotách). Závěr není neočekávatelný, neboť absorpční spektra

zmíněných látek nedoznávají posunu v žádném popsaném rozpouštědle nebo heterogenním prostředí. Je pro mne překvapením, že pozorování s opačným výsledkem byla prof. Donaldsonovi opublikována a vědeckou komunitou nekriticky přijata. Za zmínku také stojí, že spektra benzenu (Kahan a Donaldson 2010), o nichž prof. Donaldson tvrdí, že jsou měřena na povrchu vody, se neshodují se spektry publikovanými již dříve (Inagaki 1972). Naše spektra však ve shodě s prvotně publikovanými jsou (Kania, Malongwe et al. 2014).

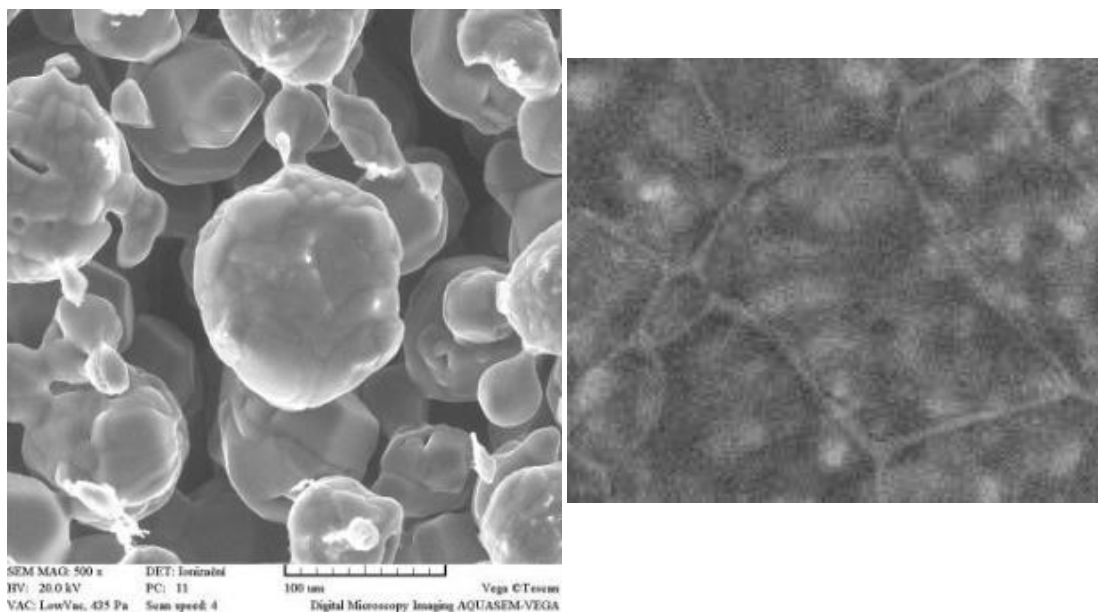
Byl jsem překvapen, že vibrační rozlišení absorpčních spekter pro benzen a naftalen ve vodě nebyla do té doby provedena. Nám se povedlo rozlišit jednotlivé vibrační přechody pro benzen, ale z důvodu značného překryvu vibračních pásů je analogická analýza pro naftalen pravděpodobně neproveditelná. Přesné přiřazení přechodů jednotlivých vibrací nejnižšího elektronového stavu benzenu ve vodě se nám povedlo na základě analogie s benzenem v plynné fázi a je cenným vedlejším produktem naší potřeby charakterizovat absorpční spektrum benzenu na ledu. Přesně naměřená absorpční spektra byla na vyžádání také zaslána do vytvářené databáze absorpčních spekter v Německu (<http://www.science-softcon.de/>).

Další projekt vycházel z touhy stanovit aktivitu protonů na zrnech ledu fluorescenčním měřením. Jako vhodná látka se jevil dusičnan uranylu, jehož rychlostní konstanta fluorescence je závislá na koncentraci kyseliny chloristé (Krausko, Runštuk *et al.* 2014). Zjistili jsme, že při pomalém mrazení dochází k vyššímu nárůstu koncentrace na hranách zrn ledu než při rychlém mrazení (Obrázek 13).



Obrázek 13: Schématické znázornění zakoncentrování v žilách ledu při zmrazení kyseliny chloristé a uranylu.

Bohužel nebylo možno dostatečně snížit koncentraci dusičnanu uranylu tak, aby bylo dosaženo environmentálních koncentrací, protože citlivost pro měření dob života se ukázala být relativně nízká. Dusičnan uranylu se ukázal být vhodný pro přímé pozorování ledu a dynamiky jeho fázových změn pomocí environmentálního skenovacího elektronového mikroskopu. Navázali jsme totiž spolupráci s Ing. et Ing. Vilémem Nedělou, Ph. D. z Ústavu přístrojové techniky Akademie věd České republiky, který má světově unikátní elektronové mikroskopy schopné pracovat při relativně vysokých tlacích (do 2000 Pa), a proto jsou schopny mikroskopovat i vodné roztoky za laboratorní teploty nebo při teplotách nižších. Mikroskopovali jsme tedy čistý led a led vzniklý zmrznutím roztoku dusičnanu uranylu v mikroskopické komoře a také led vzniklý sprejováním roztoku do kapalného dusíku. Pěkným závěrem práce je jednoznačná identifikace polykrystalického složení mikrometrických ledových kuliček (Obrázek 14). Byli jsme také schopni pozorovat mrznutí a tání ledu a popsat chování nezmrzlé části vzorku při těchto fázových změnách.

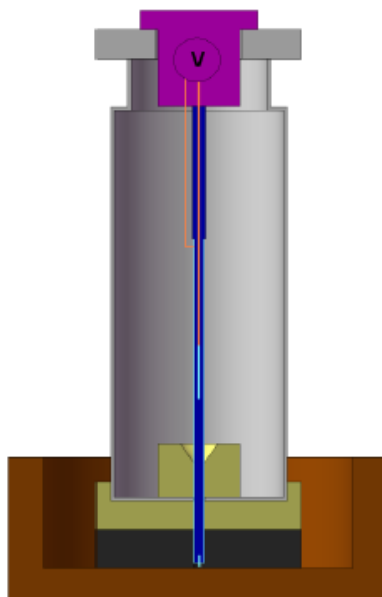


Obrázek 14: Ledové kuličky měřené elektronovým skenovacím mikroskopem s malým přiblížením (vlevo) a v detailu (vpravo).

Ne všechna spektroskopická data naměřená na zmrzlých vodných roztocích v naší skupině byla k dnešnímu dni publikována. Důvodem je naše opatrnost, jak výsledky interpretovat. Proto jsme navázali spolupráci s Assoc.-Prof. Mag. Thomasem Loertingem Ph. D. na univerzitě v Innsbrucku v Rakousku, kde naše vzorky charakterizujeme pomocí rozdílové skenovací kalorimetrie a difrakční rentgenové analýzy. Obrázek ze všech zmíněných analytických technik je podstatně ucelenější a zdá se, že bude pro vědeckou komunitu velmi přínosný; pracujeme na dokončení první společné publikace.

Jak jsem již zmínil, velmi mě zaujal fenomén potenciálu mrazení. Měli jsme možnost měřit následně vzniklý rozdíl dostupnosti protonů v žilách ledu pomocí měření změn zastoupení protonovaných forem kresolové červeně, ale lákalo mě přímé měření elektrického potenciálu. Ten je totiž primární pozorovatelnou veličinou, změna protonace je až sekundární. Po počátečních nezdarech s měřením v improvizovaných podmínkách jsem se obrátil na prof. Ing. Pavla Fialu, Ph. D. z Fakulty elektrotechniky a komunikačních technologií na Vysokém učení technickém v Brně. Prof. Fiala problém označil za netriviální a se svým týmem navrhl a zkonstruoval zařízení na měření potenciálu mrznutí (Obrázek 15), které

jsme úspěšně otestovali a provedli na něm základní měření (Roubal, Szabó *et al.* 2011). Momentálně je přístroj dále vylepšován, testován a jsou na něm měřeny iontové roztoky.



Obrázek 15: Schéma zařízení pro měření potenciálu mrznutí. Hlavní část je skleněná trubička (uprostřed) s venkovní napařenou vodivou vrstvou, která vede elektrický náboj ze spodní platinové elektrody, která zamrzá do ledu. Horní platinová elektroda je v nezmrzlém roztoku.

Téma, u kterého jsem se pokusil o přenos znalostí z environmentálních studií ledu směrem k farmaceutické aplikaci, je mrazení proteinů (Krausková, Procházková *et al.* 2016). Uvědomil jsem si, že vědomosti o rozdílných distribučních koeficientech jednotlivých iontů mezi led a zbývající nezmrzlý roztok nejsou obecně známy a že by tento fakt mohl mít velké dopady na všechny oblasti lidské činnosti, při nichž se něco zmrazuje. Zmrazování a lyofilizace jsou významnou částí přípravy či uskladňování proteinů. Začalo mě zajímat, jestli někdo provedl korelaci mezi elektrickým potenciálem vzniklým mrznutím a množstvím deaktivovaných proteinů při zmrazení. Přes rozsáhlou rešerši odborné literatury jsem takovouto práci nenašel. Nezbyvalo tedy než experimenty provést. Nejlepším parametrem ukazujícím poškození proteinu je jeho

enzymatická aktivita. Ve spolupráci s laboratoří prof. Damborského jsme tedy začali různé enzymy podrobovat mrazení za různých podmínek a vyhodnocovat, které působí destruktivně. Záhy jsme našli silnou korelaci mezi změnou pH způsobenou mrazením a množstvím deaktivovaného enzymu. Důvody změny pH při mrazení jsou trojí: zakoncentrování kyselin do žil, rozdílné distribuční koeficienty přítomných iontů mezi led a zbývající roztok a krystalizace kyselé nebo zásadité soli pufru. Na rozdíl od ostatních dvou důvodů je změna kyselosti způsobená částečnou krystalizací pufru zakořeněna v povědomí vědců z farmaceutické komunity. Nejznámějším příkladem je značné okyselení sodnofosfátového pufru při zmrazení. V naší práci jsme ukázali, že při zmrazení sodnofosfátového pufru snížené pH skutečně detekujeme a navíc způsobí značné poškození enzymu. Tento fakt jsme nejen experimentálně potvrdili, ale navíc jsme našli řešení daného problému. Použitím soli, která při zamrazení působí opačnou změnu pH než sodnofosfátový pufr, se dosáhne minimalize skoku pH při zmrazení. Současně dojde k úplnému zachování enzymatické aktivity mrazeného enzymu. Věřím, že tato nová metoda bezztrátového mrazení postavená na pochopení mikroskopického chování látek při mrazení může být prospěšná a obecně použitelná. Příprava článku shrnujícího tyto poznatky pro mě byla velmi náročná, protože jsem se musel zorientovat ve velkém množství relevantní farmaceutické literatury. Myslím si, že ze všech mých prací může právě tato mít nejsnázeji aplikovatelné praktické důsledky.

Závěr části habilitační práce zabývající se studiem ledu

Přínos naší práce v oblasti interakcí nečistot v ledové matici spatřuji v úspěšném kvantifikování zvýšení lokální koncentrace v žilách ledu při zmrazení roztoků nebo při napaření z plynné fáze pomocí několika nezávislých molekulových sond. Během přípravy zmíněných publikací jsme se naučili rozumět spektroskopii modelových látek, které nadále používáme za různých environmentálně důležitých podmínek. Tyto studie jsou součástí disertačních prací Mgr. Jána Krauska a Mgr. Gabriely Ondruškové. Dalším důležitým přínosem našich studií je vyvrácení domněnky posunu absorpčních spekter benzenu a naftalenu při interakcích na povrchu ledu. Velmi významné jsou podle mého názoru pozorování změn aktivity protonů v žilách a na povrchích ledu. Pro vědeckou environmentální

ledovou a také pro farmaceutickou komunitu byl nový zejména fakt, že dostupnost protonů v žilách je značně ovlivnitelná přítomností různých iontů, jejichž směsi v roztocích poskytují pH-neutrální roztoky. Také toto téma nadále rozvíjíme dalším výzkumem, např. ve spolupráci s dr. Kitae Kimem z Jižní Koreje. Doufám, že se podaří zobecnitelné závěry z těchto studií zpřístupnit vědecké komunitě. Myslím, že výsledky těchto experimentálních pozorování bude důležité zahrnout do matematických environmentálních modelů a brát je v potaz při mrazení, která předchází lyofilizacím. Očekávám, že největším přínosem mé práce bude využití nových poznatků o interakcích ledu s nečistotami při zmrazování v biochemickém a farmaceutickém průmyslu.

Články, které jsou součástí habilitačního řízení a týkají se tématu ledu

1. Heger, D.; Nachtigallova, D.; Surman, F.; Krausko, J.; Magyarova, B.; Brumovsky, M.; Rubes, M.; Gladich, I.; Klan, P., Self-Organization of 1-Methylnaphthalene on the Surface of Artificial Snow Grains: A Combined Experimental-Computational Approach. *Journal of Physical Chemistry A* **2011**, 115, 11412-11422.

Jsem autorem myšlenky a korespondujícím autorem tohoto článku, zavedl jsem v Brně fluorescenční metody měření v kryogenních podmínkách, experimentálně jsem se podílel na přípravě vzorků i jejich měření, což jsem později naučil JK, BM, MB, FS a dohlížel na jejich správnost. FS stanovoval aktivní povrch. DN a IG prováděli výpočty. Já a PK jsme psali článek. Odhad podílu na článku 40 %.

2. Roubal, Z.; Szabó, Z.; Steinbauer, M.; Heger, D.; Kubásek, R. In *The design of high-impedance and high-voltage input amplifier for measurement of electropotentials on solid-liquid phase boundary*, Progress in Electromagnetics Research Symposium, 2011; 2011; pp 1162-1166.

Jsem autorem myšlenky výroby zařízení, které je ve článku z konference popsáno. Odhad podílu na článku 15 %.

3. McNeill, V. F.; Grannas, A. M.; Abbatt, J. P. D.; Ammann, M.; Ariya, P.; Bartels-Rausch, T.; Domine, F.; Donaldson, D. J.; Guzman, M. I.; Heger, D.; Kahan, T. F.; Klán, P.; Masclin, S.; Toubin, C.; Voisin, D., Organics in environmental ices: sources, chemistry, and impacts. *Atmos. Chem. Phys.* **2012**, 12, 9653-9678.

Souhrnný článek, do kterého jsem přispěl částí textu. Odhad podílu na článku < 5 %.

4. Bartels-Rausch, T.; Jacobi, H. W.; Kahan, T. F.; Thomas, J. L.; Thomson, E. S.; Abbatt, J. P. D.; Ammann, M.; Blackford, J. R.; Bluhm, H.; Boxe, C.; Domine, F.; Frey, M. M.; Gladich, I.; Guzmán, M. I.; Heger, D.; Huthwelker, T.; Klán, P.; Kuhs, W. F.; Kuo, M. H.; Maus, S.; Moussa, S. G.; McNeill, V. F.; Newberg, J. T.; Pettersson, J. B. C.; Roeselová, M.; Sodeau, J. R., A review of air-ice chemical and physical interactions (AICI): liquids, quasi-liquids, and solids in snow. *Atmos. Chem. Phys.* **2014**, 14, 1587-1633.

Souhrnný článek, do kterého jsem přispěl částí textu a diskusemi nad ustálením nomenklatury. Odhad podílu na článku < 5 %.

5. Kania, R.; Malongwe, J. K. E.; Nachtigallová, D.; Krausko, J.; Gladich, I.; Roeselová, M.; Heger, D.; Klán, P., Spectroscopic Properties of Benzene

at the Air–Ice Interface: A Combined Experimental–Computational Approach. *The Journal of Physical Chemistry A* **2014**, 118, 7535-7547.

Do článku jsem přispěl vedením spektroskopické práce a její interpretací, interpretací vypočítaných dat a psaním článku, výběrem a sestavením aparatury. Jsem korespondujícím autorem. Odhad podílu na článku 25 %.

6. Krausko, J.; Runštuk, J.; Neděla, V.; Klán, P.; Heger, D., Observation of a Brine Layer on an Ice Surface with an Environmental Scanning Electron Microscope at Higher Pressures and Temperatures. *Langmuir* **2014**, 30, 5441-5447.

Jsem autorem myšlenky a korespondujícím autorem tohoto článku; přispěl jsem zvolením zkoumaného systému a analytických metod, nalezením vhodné spolupráce, vedením spektroskopických experimentů; spolupodílel jsem se na mikroskopických měřeních a s JK jsme společně psali článek. Odhad podílu na článku 60 %.

7. Krausko, J.; Malongwe, J. K. E.; Bičanová, G.; Klán, P.; Nachtigallová, D.; Heger, D., Spectroscopic Properties of Naphthalene on the Surface of Ice Grains Revisited: A Combined Experimental–Computational Approach. *The Journal of Physical Chemistry A* **2015**, 119, 8565-8578.

Jedná se o dokončení studie částečně publikované roku 2011. Jsem korespondujícím autorem. Odhad podílu na článku 30 %.

8. Krausko, J.; Ondrušková, G.; Heger, D., Comment on “Photolysis of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons on Water and Ice Surfaces” and on “Nonchromophoric Organic Matter Suppresses Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Photolysis in Ice and at Ice Surfaces”. *The Journal of Physical Chemistry A* **2015**, 119, 10761-10763.

Jedná se o komentář k článkům v návaznosti na náš článek z téhož roku. Jsem korespondujícím autorem tohoto článku. Odhad podílu na článku 50 %.

9. Krausková, L.; Procházková, J.; Klašková, M.; Filipová, L.; Chaloupková, R.; Malý, S.; Damborský, J.; Heger, D., Suppression of protein inactivation during freezing by minimizing pH changes using ionic cryoprotectants. *International Journal of Pharmaceutics* **2016**, 509, 41-49.

Jsem autorem myšlenky a korespondujícím autorem tohoto článku. Vedl jsem práce svých studentů a vyžádal si pomoc od kolegů. Odhad podílu na článku 40 %.

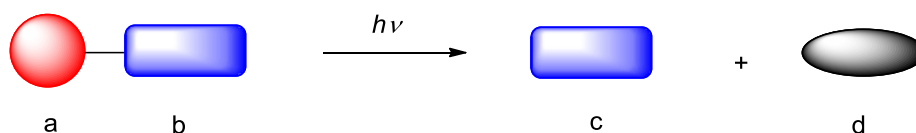
Mechanistická fotochemie

Úvod do problematiky mechanistické fotochemie

Fotofyzika a fotochemie jsou pomezí vědecké disciplíny, při kterých se uplatní znalosti z fyziky, chemie a matematiky. Pro vysvětlení základních pojmů mohu odkázat do slovníčku s přesnými vysvětleními: IUPAC Gold Book (<http://goldbook.iupac.org/>); pro obšírnější vysvětlení do vynikající učebnice *Photochemistry of Organic Compounds*, která vznikla jako knižní podoba fotochemických přednášek prof. Klána a prof. Wirze, já jsem měl tu čest ji pročítat a vyjadřovat se k jednotlivým dílům jejího rukopisu (Klan a Wirz 2009). Práce předkládané k habilitačnímu řízení v této kapitole mají za cíl popsat mechanismy elementárních reakcí, které následují po excitaci molekul.

Fotochemické chránící skupiny

Fotochemické chránící skupiny jsou látky, u kterých absorpce fotonu způsobí rozštěpení kovalentní vazby, a tak dá vzniknout volné molekule látky chráněné (aktivované molekule) a zbytku chránící skupiny (Obrázek 16). (Zabadal a Klan 2001; Klan, Solomek *et al.* 2013; Solomek, Wirz *et al.* 2015.) Foton v tomto případě může být považován za reagent fyzikální povahy, jehož výhody oproti reagentům chemické povahy jsou především okamžité, přesné a snadné dávkování v prostoru a čase, a to bez zředění vzorku. Tyto a další vlastnosti fotochemicky aktivovatelných molekul způsobily, že jejich hlavní využití neleží v chránění funkčních skupin v organické syntéze, ale spíše v aplikacích, které zúročí možnost časově a prostorově přesného uvolnění požadované látky. Pokud je navíc pozorovaný děj způsobený chemickou reakcí s přidanou látkou rychlejší, než by byla difuze molekul, stává se fotochemické uvolnění „rychle“ odstupující skupiny jediným použitelným prostředkem. Takto bylo chránících skupin využito například k měření rychlosti nervového vzruchu (uvolněním neurotransmiteru v místě synapse, Stensrud, Noh *et al.* 2009), popisu chemotaxe spermií (uvolněním oxytocinu, Blake, Bareiss *et al.* 2012) či uvolnění léčiva (Woll, Lukzen *et al.* 2012).



Obrázek 16: Schéma funkce fotochemické chránící skupiny (a – fotochemická chránící skupina, b – chráněná látka, c – aktivovaná látka, d – vedlejší produkt, zbytek chránící skupiny).

Problematika chránících skupin a jejich využití je v literatuře dobře shrnuta v souhrnných člancích (Mayer a Heckel 2006; Klan, Solomek *et al.* 2013).

Laserová záblesková fotolýza

Mechanismy rozpadu kovalentní vazby chráněné molekuly, neboli uvolnění chráněné i chránící skupiny, stejně tak jako jiné fotochemicky iniciované procesy, je nejlépe studovat kinetikou dané látky po ozáření světlem. Pro objasnění mechanismu reakce je třeba sledovat a přiřadit veškeré přechodně žijící species (tzv. intermediáty), které se zapojují do reakce od výchozí látky až k produktům. Spektroskopická metoda, kterou pro zkoumání mechanismů odstoupení chráněných skupin nejvíce používám, je laserová záblesková fotolýza. Sám název „laserová fotolýza“ je poněkud zavádějící. Laseru totiž nebývá použito jen k světlem způsobenému štěpení vazeb, jak by název (řecký *lysis* znamená rozklad) mohl indikovat, ale k jakémukoli světlem iniciovanému fyzikálnímu nebo chemickému ději. Termínem laserová fotolýza se označují spektroskopie, které mají časové rozlišení nad nanosekundu, transientní spektroskopie rychlejší se označují jako pump-probe spektroskopie z důvodů rozdílného způsobu měření, které budou objasněny později.

Zařízení pro laserovou zábleskovou spektroskopii, která jsou používána pro měření zde popsanych prací, jsem demontoval v Basileji, převezl do Brna a modernizoval. Zejména náš nanosekundový zábleskový spektrofotometr svými parametry předčí všechny komerčně dodávané přístroje a je optimalizovaný pro naše studie. Jelikož tyto techniky nejsou zcela běžné, dovolím si je stručně popsat.

Princip transientní spektroskopie spočívá v rychlém vybuzení části molekul vzorku do excitovaného stavu a měření změn absorpce v čase. Výsledkem

pak může být rozdílové absorpční spektrum v konkrétním čase nebo kinetická stopa při konkrétní vlnové délce, které v sobě nesou informace o intermediátech. Transientní spektroskopie je možná v různých částech radiofrekvenčního spektra, takže mimo námi používané UV-Vis-NIR spektroskopie je také s výhodou využívána transientní časově rozlišená spektroskopie s detekcí infračerveného záření, Ramanova rozptylu, difrakce Roentgenova záření či signálů elektronové paramagnetické resonance (Klan a Wirz 2009).

Silný záblesk světla a jeho absorpce způsobí, že část molekul vzorku je ze základního stavu přemístěna do stavů vzbuzených o stejné multiplicitě, jakou měl základní stav. Například pokud má molekula základní stav singletový, pak budou po excitaci obsazeny vyšší singletové stavy. V časovém odstupu po budicím záblesku světla následuje absorpce světla měřeného. V prvních několika pikosekundách většinou dojde k vnitřnímu chlazení a molekula zaujme elektronovou konfiguraci nejnižšího excitovaného singletového stavu. Z tohoto stavu může, zářivě či nezářivě, relaxovat do stavu základního nebo přejít do níže ležícího elektronového stavu jiné multiplicity (nejčastěji tripletu); zmíněné stavy mohou také podléhat chemickým reakcím za tvorby intermediátů. Každému elektronovému stavu nebo intermediátu s dostatečnou dobou života je v principu možno změřit absorpční spektrum, a tedy, v příznivém případě, všechny stavy a intermediáty přiřadit a charakterizovat. Jejich chování v časové souslednosti je popsáno kinetikými modely, které často zahrnují následné a paralelní reakce. Důležité je brát v potaz, že je možno měřit jen spektra rozdílová, která mimo absorpci intermediátů mohou zahrnovat i chybějící absorpci základního stavu (tzv. bělení z anglického *bleach*) nebo stimulovanou emisi. To je důležité zejména v případě, že se spektrum ve stavu základním překrývá se spektrem intermediátu.

Nanosekundová laserová záblesková fotolýza

Konstrukčně se přístroje pro časově rozlišená spektroskopická měření zásadně liší délkou prodlevy mezi budicím a měřicím časem. Původní zařízení bylo vynalezeno Norrishem a Porterem v roce 1949 (Thrush 2003). Bylo zkonstruováno pro studii fotochemicky iniciovaných reakcí v plynné fázi. Jeho vznik se dá považovat za jeden z pozitivních výsledků technologického rozvoje

způsobeného druhou světovou válkou. George Porter za války sloužil u protiletadlové obrany se specializací na radary, a díky tomu získal zkušenosti s elektronikou, pulsovanými zdroji a zdroji světla. K prvnímu pokusu o získání detekovatelného množství CH_2 karbenu z ketenů nebo diazometanu použili 7,5 kW obloukovou rtuťovou zářivku, která se používala pro vojenské účely ve světloometech protiletadlové obrany. Pokus byl částečně úspěšný, k průkaznějším výsledkům bylo však třeba silnějších zdrojů světla. Ty byly nalezeny v zábleskových trubicích, které se za války používaly k nočnímu fotografování ze vzduchu a poskytovaly dvě milisekundy trvající záblesky. S nimi se již vědcům podařilo dobře prokázat některé intermediáty (např. radikály $\cdot\text{OH}$, $\text{ClO}\cdot$, $\text{COO}\cdot$), které jsou podstatné v atmosférické fotochemii a přispívají například k ničení ozonové vrstvy.



Obrázek 17: Fotografie znázorňující původní Porterovu aparaturu (převzato z Thrush 2003).

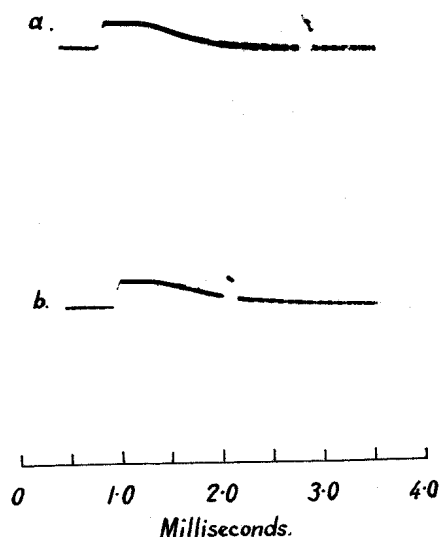


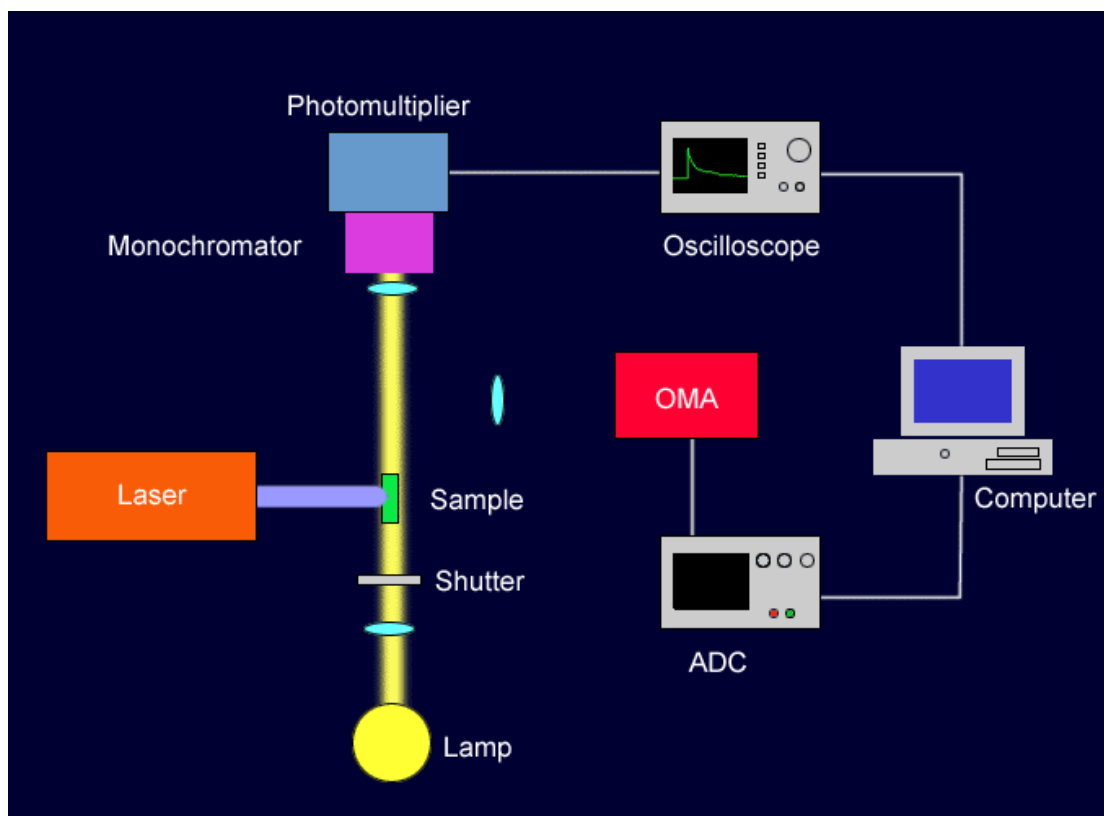
Fig. 2 Intensity-time record for the two flashes in the original flash photolysis apparatus.

Obrázek 18: Záznam kinetické stopy transientu se zřetelným přerušením z důvodu časování (převzato z Thrush 2003).

Časování přístroje bylo sledováno pomocí točícího se kola s dírkami. Ronald Norrish a George Porter společně s Manfredem Eigenem v roce 1967 obdrželi Nobelovu cenu za „jejich studie extrémně rychlých reakcí, ovlivněných vychýlením rovnováhy velmi krátkými pulzy energie“. Je pěkné si uvědomit, že to, co se v roce 1967 nazývalo „extrémně rychlé“, se s příchodem pulzních laserů stalo relativně pomalým a velmi rychlé děje se začaly nazývat „ultrarychlé“; ty dnes dosahují femtosekundových i attosekundových časů.

Naše zařízení nanosekundové laserové fotolýzy je, jak již bylo zmíněno, rozšířenou verzí převezenou z Basileje. Tam od sedmdesátých let budoval prof. Jakob Wirz spektro-foto-chemické pracoviště, sám strávil postdoktorský pobyt s Georgem Porterem v Londýně. Prof. Wirz byl celosvětově jedním z hlavních spektroskopiků, kteří se touto technikou zabývali. Je také tvůrce IUPAC doporučení, jak tyto přístroje konstruovat a používat.

Časové rozlišení zařízení pro laserovou fotolýzu je určeno nejpomalejším prvkem. Pro většinu zařízení je to budicí laser, který populuje vzbuzenou hladinu. V tomto je náš systém výjimečný, neboť doba pulzního záblesku je díky moderní technologii (jedná se o časovou komprimaci Q-spínaného pulzu) pouze 150 až 700 ps. Laser je založen na relativně jednoduchém elektronicky časovaném základu, a proto je levnější než ostatní takto rychlé lasery. Pokud je mi známo, vyrábí jej pouze jediná firma na světě. Náš nanosekundový fotolytický laserový systém je tedy limitován rychlostí detekce s hodnotou jednotek nanosekund. Vzorek je nejprve vybuzen krátkým laserovým pulzem a vzápětí je sledována absorpce vzniklých intermediátů. K tomuto měření je opět potřeba světlo, v našem případě je dodáno z xenonové excimerové výbojky, která se na několik milisekund přepulzuje. Světlo je pak zaznamenáno buďto spektrograficky pro zvolený čas (v našem případě od ca 4 ns více) pomocí ICCD kamery, nebo se monochromátorem zvolí některá vlnová délka a zaznamenává se kinetická stopa. Obě zmíněné techniky poskytují jednodimenzionální řez stejné fyzikální informace, která může být znázorněna jako záznam absorbancí v závislosti na vlnové délce a čase.



Obrázek 19: Schéma aparatury laserové zábleskové fotolýzy. Převzato s laskavým svolením dr. Pelliciolly.

Pump-probe spektroskopie

Vývoj ultrarychlých laserů s dobou záblesku ve femtosekundách způsobil možnost ještě rychlejších, sub-nanosekundových měření. Není však možno měření časovat elektronicky, ale používá se časování optického. Základním principem metody je rozdělení pulzovaného laserového signálu na polopropustném zrcadle na dvě části. Z jedné z nich se pomocí nelineární optických prvků vymodeluje budicí signál (tzv. *pump*) a z druhé části signál měřicí (tzv. *probe*). Pokud oba paprsky urazí stejnou dráhu, na měřený vzorek dopadnou ve stejném čase. Časování tohoto systému se nastavuje relativní změnou drah budicího a měřicího paprsku. To je umožněno konstantností šíření světla v prostředí. Lze lehce vypočítat, že prodloužením dráhy paprsku o 30 cm se paprsek zpozdí o ca 1 ns. Náš *pump-probe* femtosekundový systém je schopen měřit od 1 ps do 1.8 ns. V roce 1999 byla Ahmedu Zewailovi udělena Nobelova cena „za studie transientních stavů chemických reakcí s použitím femtosekundové spektroskopie“.

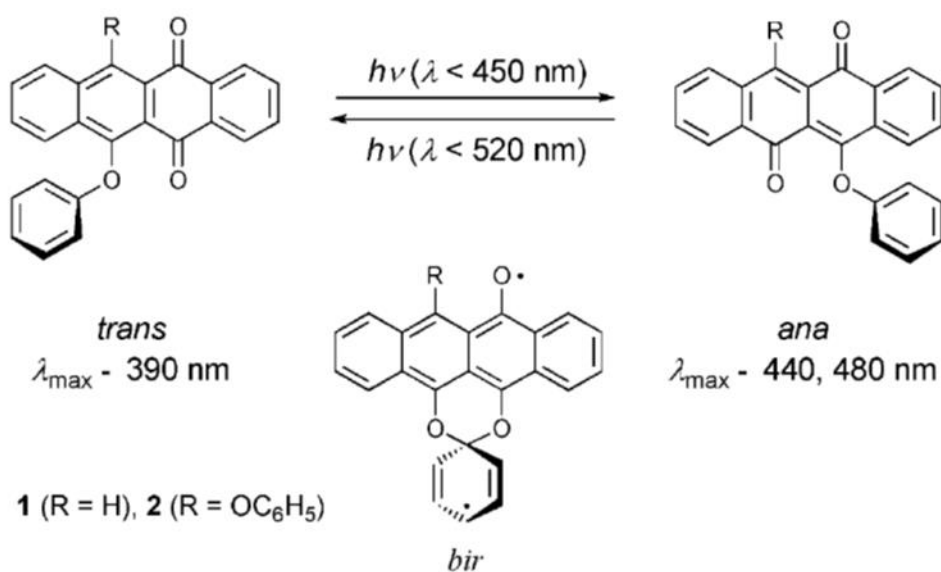
Na Masarykově univerzitě se tedy povedlo vybudovat zmíněné dva systémy pro měření transientní spektroskopie. Společně s možnostmi měřit luminiscenční procesy v časově rozlišeném modu tak dávají dobré experimentální zázemí pro řešení fotochemických mechanistických problémů, jejichž příklady budou uvedeny níže. Měl bych také vzpomenout, že systém by nebyl v Brně přítomen nebýt finančního zabezpečení Masarykovou univerzitou, RECETOXem, a že k jeho rozvoji významně přispěli mnozí studenti a technici, zejména Mgr. Pavel Friš a Bc. Luboš Jílek.

Deriváty 2,5-dimethyfenacylu

Můj návrat od ledové problematiky k tématu fotochemických chránících skupin se začal na složitějším derivátu 2,5-dimethyfenacylu (s kterým jsem započal již během magisterského studia), a sice s mechanismem odstoupení halogenidů z 2-alkoxymethyl-5-methylfenacylu chloridu a benzoátu (Plistil, Solomek *et al.* 2006). Látky během diplomové práce připravil Mgr. Lukáš Plíštil a jejich ozáření dávalo řadu produktů v závislosti na konkrétních experimentálních podmínkách. K projektu jsem přispěl kinetickou analýzou transientů, která se uskutečnila na basilejské univerzitě v rámci mého postdoktorského pobytu.

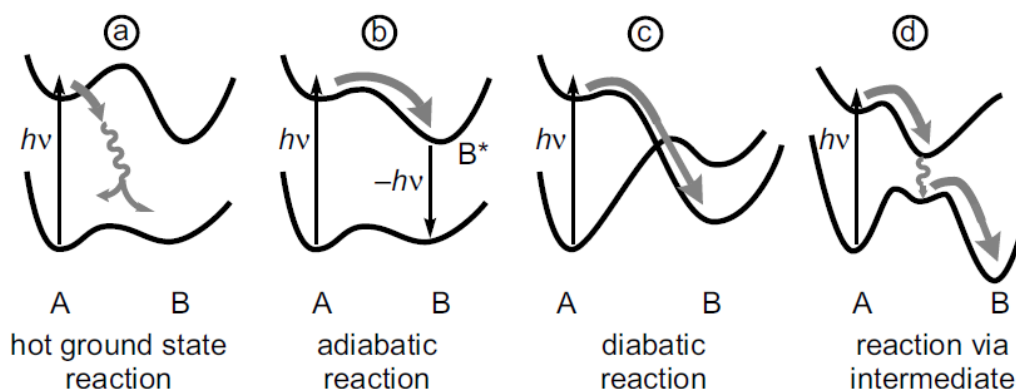
Fotochromismus fenoxynaftacenchinonů

Velmi náročná a současně pro mne významná byla následná studie fotochemicky indukovaného přeskoku fenylové skupiny v molekulách fenoxynaftacenchinonů (Obrázek 20) (Born, Fischer *et al.* 2007).



Obrázek 20: Reakční schéma izomerizace fenoxynaftacenchinonu (převzato z Born, Fischer *et al.* 2007).

Fenoxynaftacenchinony patří mezi fotochromní látky s potenciálním uplatněním v holografii či optickém uchovávání dat (např. pro prepisovatelná CD/DVD média). Úkolem bylo zjistit, jakým mechanismem dochází k izomerizacím: zdali adiabaticky (po jedné hyporploše), nebo diabaticky (s přechodem z jedné plochy na druhou).



Obrázek 21: Znázornění druhů mechanismů fotochemických reakcí (převzato z Klan a Wirz 2009).

Jak je ukázáno na obrázku 21, fotochemické reakce probíhají buďto adiabaticky², bez přechodu z jedné hyperplochy na druhou, nebo diabaticky (také někdy nazváno neadiabaticky – dvě záporky dávají klad) s křížením hyperploch. Jako důkaz diabatického mechanismu by se mohl zdát fakt, že je pozorován excitovaný stav fotoproduktu, což by byla pravda pouze tehdy, kdyby se podařilo excitovat jen výchozí látku. Mnohem častěji, a je to i případ izomerizace z *trans*- na *ana*- v molekulách fenoxynafthacenchinonů, dojde k diabatické izomerizaci a následné excitaci fotoproduktu. Celý výzkum byl hnán předpokladem, který vychází z korelačního diagramu založeného na pravidlech zachování symetrie. Jednoduchý diagram byl vytvořený prof. Wirzem ze znalostí spektroskopie, molekulových orbitalů a symetrie bez použití počítačové výpočetní síly a je pro mne vzorem vědeckého uvažování. Experimentální důkazy jeho správnosti nebyly již tak jednoduché. V tomto případě bylo z ultra rychlé spektroskopie zřejmé, že po vybuzení *trans*-isomeru do horkého singletového stavu dojde k jeho chlazení a mezisystémovému křížení na stav tripletový, ze kterého pak vznikne tripletový biradikál.

Já jsem se na projektu podílel stanovením molárních absorpčních koeficientů látek a měřením laserové zábleskové spektroskopie. Komplikací bylo, že doby života biradikálového intermediátu nebylo možné na našem zařízení změřit, neboť doba záblesku laseru byla příliš dlouhá. Musel jsem proto rozhodující experimenty měřit na přístroji v jiné pracovní skupině – a tak jsem se naučil ovládat a nastavovat jiný druh zařízení. Rozhodující bylo, že jsem si všiml a popsal, jak se mění transientní kinetické stopy po násobném ozáření laserem. Postupně totiž ve směsi přibývalo *ana*-isomeru a z kinetického chování jeho tripletu se dalo usoudit, že je přítomný již i při prvním laserovém záblesku.

Z měření nakonec vyplynulo, že izomerizační *trans-ana* reakce po tripletové hyperploše by byla příliš energeticky náročná, a proto dojde k přeskoku na singletovou základní hladinu – reakce je tedy diabatická. Pozorovaný tripletový stav *ana*-isomeru vzniká reexcitací již vzniklého *ana*-derivátu nebo biradikálu a lze jej minimalizovat použitím kratšího laserového pulzu nebo jeho nižším

² Podobnost s termínem používaným v termodynamice je pouze v tom, že „adiabatický“ děj „nepřekračuje hranice“ jiné hyperplochy. Nemá spojitost s nepřestupováním energie přes hranice a tedy je do značné míry zavádějící zdvojení použití tohoto výrazu.

výkonem. Naproti tomu zpětná *ana-trans* izomerizace probíhá po singletové hyperploše. Dalším přínosem tohoto projektu bylo, že jsem pro vysvětlení experimentálních dat začal používat simulace v programu Maple, což se také později ukázalo jako velmi výhodná dovednost.

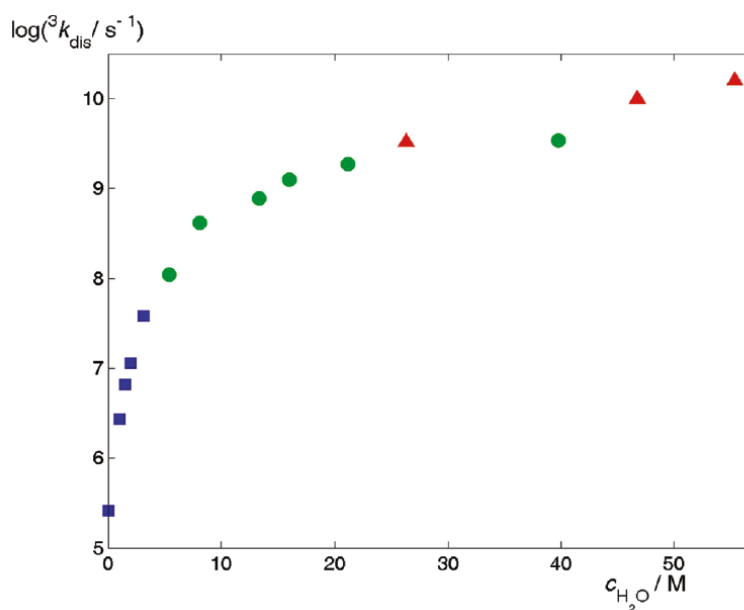
p-Hydroxyfenacyly – fotochemické chránící skupiny

Nejrozšířenější a nejvíce používanou fotochemickou chránící skupinou je bezesporu *o*-nitrobenzyllová skupina (Klan, Solomek *et al.* 2013). Za své rozšíření a popularitu vděčí především tomu, že byla použita jako první a že dnes je řada biologicky významných látek (např. ATP, neurotransmitery) ochráněných touto skupinou komerčně dostupná. Důležitou předností použití biologicky aktivních molekul je možnost jejich přesného prostorově-časového dávkování. Mechanismus odstoupení chráněných látek z *o*-nitroderivátů byl velmi podrobně zkoumán prof. Wirzem a bylo shledáno, že odstoupení probíhá v rámci sekund přes řadu intermediátů. Proto látka uvolněná z *o*-nitroderivátu nemůže sloužit jako vhodný spouštěč pro následné reakce, jejichž rychlostní konstanta odpovídá době života delší než stovky milisekund.

Mým úkolem bylo, s použitím ultrarychlé *pump-probe* spektroskopie, přispět k objasnění dějů, které následují těsně po excitaci *o*-nitrobenzenu. Bohužel se ukázalo, že spektrální signál intermediátů v UV-Vis oblasti spektra je velmi slabý a dovozovat z něj nějaké závěry by bylo příliš obtížné – proto naše úsilí vynaložené tímto směrem zůstalo bez publikačních výstupů. Později jiné vědecké skupiny použily infračervenou a Ramanovu ultrarychlou spektroskopii a podařilo se jim intermediáty identifikovat a navrhnout mechanismus odstoupení (Klan, Solomek *et al.* 2013).

Jinou fotochemickou chránící skupinou, prosazovanou prof. Richardem Givensem z Kansasu, je *p*-hydroxyfenacyl. Prof. Givens připravil řadu substitučních derivátů této látky a také řadu látek s nimi ochránil. Za zmínku jistě stojí chráněná ATP a některé neurotransmitery (např. kyselina γ -aminomáselná) (Conrad, Givens *et al.* 2000). S těmito řadami látek se obrátil na skupinu vedenou prof. Wirzem s prosbou, abychom mu pomohli identifikovat nejvhodnější deriváty vykazující vysokou rychlost odstoupení. Již od roku 2000 byla stanovena hypotéza, že chráněná skupina je vypuzena z tripletového stavu, který byl dobře

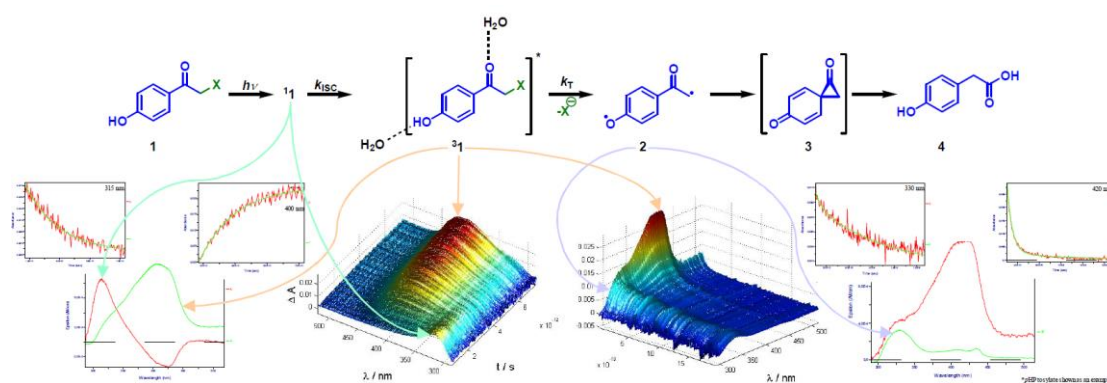
spektroskopicky charakterizován (Conrad, Givens *et al.* 2000). Námi prováděné měření s aparaturou ultrarychlé *pump-probe* spektroskopie probíhalo velmi dobře, neboť intermediáty poskytovaly velmi silné signály v UV-Vis spektrální oblasti. Z důvodu biologické aplikovatelnosti se většina měření prováděla ve vodě, k některým vzorkům se přidávalo malé množství acetonitrilu z důvodu lepší rozpustnosti. Po asi půl roce usilovné práce jsme si všimli toho, že parametr, který chceme stanovit – doba života tripletového stavu – je kriticky závislý právě na přesném složení směsi rozpouštědel. Větší množství vody totiž velmi urychluje odstoupení chráněné skupiny. Rychlostní konstanty tripletového stavu fenacylu a tedy i odstoupení fosfátu v závislosti na poměru acetonitrilu a vody jako rozpouštědla je ukázáno na obrázku 22. Velmi dobrou zprávou bylo, že v čisté vodě je odstoupení pro fosfát uskutečněno s rychlostní konstantou $1,6 \times 10^{10} \text{ s}^{-1}$, což bylo v té době nejrychlejší odstoupení iniciované světlem, dostatečně rychlé pro snad všechny biologické aplikace.



Obrázek 22: Rychlostní konstanty zániku tripletového stavu fenacylu, a tedy odstoupení fosfátu v závislosti na poměru acetonitrilu a vody z *p*-hydroxyfenacyl-fosfátu (převzato z Stensrud, Noh *et al.* 2009 s povolením Americké Chemické Společnosti).

V okamžiku tohoto zjištění však také bylo jasné, že naše data z uplynulého půl roku nejsou použitelná k charakterizování rychlosti odstoupení z jednotlivých derivátů *p*-hydroxyacetofenonu, neboť jsme na přesné složení rozpouštědla nedávali dostatečný pozor. Velmi nepříjemné však bylo, že se aparatura ultrarychlé *pump-probe* spektroskopie měla do třech týdnů demontovat, protože prof. Wirz odcházel do důchodu. S kolegou Mgr. Petrem Šebejem, Ph. D., který tehdy byl v Basileji v rámci programu Sokrates, jsme se rozhodli, že měření z minulého půl roku zopakujeme. Ve třech týdnech se nám opravdu podařilo naměřit skoro všechno znovu – střídali jsme se v denních a nočních službách, přístroj byl v provozu bez přestávky až do dne balení.

Přestože se naměřená data nehodila k původnímu záměru, podrobně jsme je zanalyzovali. Při pozorování výše zmíněné závislosti doby života tripletu na množství vody v rozpouštědle jsem si všiml, že se zkracující se dobou života se při globální analýze pro dobře odstupitelné skupiny (jako je diethylfosfát, tosylát nebo mesylát) objevují ve spektrech také nové slabé dvojpíky při vlnových délkách nad 420 nm. Na tento fakt jsem upozornil prof. Wirze, který ve spektru okamžitě rozpoznal tripletový intermediát, což byl poslední potřebný intermediát k uspokojivému vysvětlení celého mechanismu odstoupení skupin z *p*-hydroxyfenacylů při foto-Favorského přesmyku. Tato data byla přidána k rozsáhlé předchozí práci skupiny prof. Wirze a úspěšně publikována (Givens, Heger *et al.* 2008).



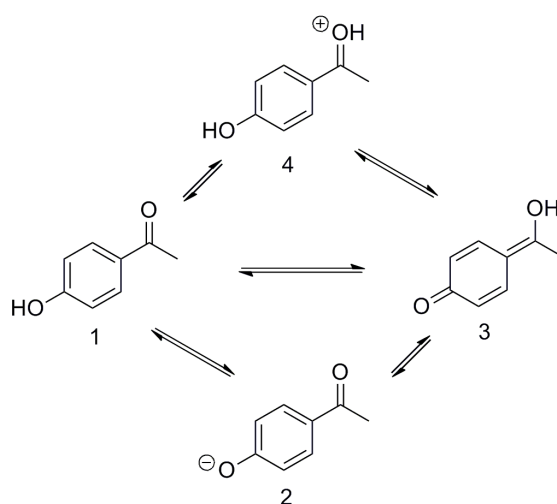
Obrázek 23: Mechanismus odstoupení chráněné skupiny z *p*-hydroxyfenacylu. Prezentovaná data jsou naměřena pro *p*-hydroxyfenacyl-fosfát.

Zajímavostí, se kterou jsme se v tomto projektu setkali, je, že pro následnou reakci $A \rightarrow B \rightarrow C$ s podobnými rychlostními konstantami nelze bez dalších informací určit, která rychlostní konstanta náleží ke kterému kroku (Andraos, Lathioor *et al.* 2000). Je matematicky dokázáno, že z kinetického pozorování nelze rozhodnout, je-li rychlejší rychlostní konstanta pro děj $A \rightarrow B$ nebo $B \rightarrow C$. Toto dilema se v našem případě vyřešilo, neboť druhá rychlostní konstanta již byla dříve stanovena pomocí časově rozlišené rezonanční Ramanovy spektroskopie (Zuo, Ma *et al.* 2005).

Ostatní výsledky našich měření před stěhováním femtosekundové *pump-probe* aparatury byly postupně publikovány ve třech dalších článcích (Stensrud, Heger *et al.* 2008; Stensrud, Noh *et al.* 2009; Givens, Stensrud *et al.* 2011). Jsem přesvědčen, že pro dobře odstupující chráněné skupiny se nám podařilo vystihnout mechanismus odstoupení velmi dobře, neboť pokrývá všechna pozorování, která kdy byla provedena. Naši práci jsme chtěli rozšířit i na látky, které nejsou tak dobře odstupující, na konjugované báze slabých kyselin. Z transientních měření vyplynulo, že triplet zaniká do dalšího species s absorpčním maximem při 350 nm, jehož identitou jsme si nebyli jisti. Pracovně jsme toto species přiřadili konjugované bázi *p*-hydroxyphenacylu v základním stavu, ale protože zůstával přítomen i v kyselém prostředí, byla tato hypotéza vyvrácena. Druhou možností bylo, že se jedná o tripletový chinon-enol (struktura analogická **3** na obrázku 24), o kterém jsme se domnívali, že neposkytuje reakci. Tuto domněnku ve své disertační práci vyvrací Mgr. Vít Ladányi, ale cesta k ní vedla přes důkladnou fotochemickou studii látky, která je modelová pro *p*-hydroxyfenacyl, což je *p*-hydroxyacetofenon.

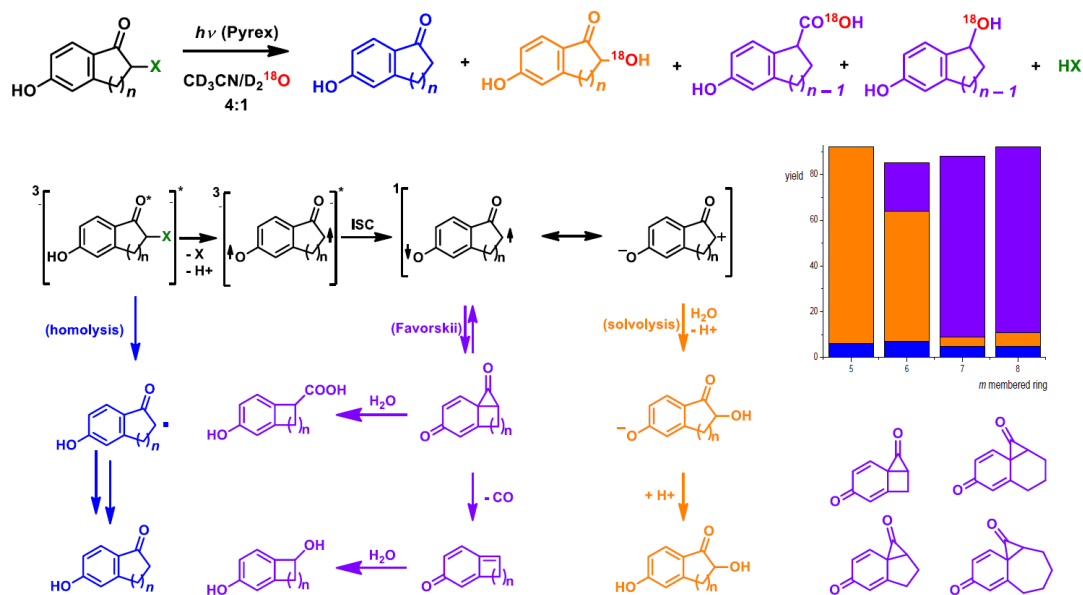
Studium *p*-hydroxyacetofenonu započal v Basileji již před rokem 2000 dr. Bruno Hellrung. Data však nedávala ucelený obrázek, a proto jsem ve výzkumu pokračoval já s pomocí dr. Petra Šebeje. Práci jsme však v Basileji nestihli dokončit, a tudíž se v Brně pokračovalo až po vybudování časově rozlišené laboratoře – což představovalo tři roky (nejen) mého úsilí. V Brně byl *p*-hydroxyacetofenon prvním tématem, které jsem vedl; na tématu aktivně pracovala Mgr. Ľubica Klíčová, Ph. D. a s výpočty přispěl na pomoc Mgr. Tomáš Šolomek, Ph. D. pod vedením prof. Mgr. Petra Slavíčka, Ph. D. V této práci jsme detailně popsali acidobazické rovnováhy v základním, excitovaném singletovém a

tripletovém stavu všech forem *p*-hydroxyacetofenonu (viz obrázek 24, formy **1-4**)(Klicova, Sebej *et al.* 2012). Titrace v tripletovém stavu byla provedena spektrograficky i kineticky. Potvrdili jsme předchozí domněnku a ve fotochemii často pozorovaný fakt, že v excitovaném stavu se síla kyselin a bazí často zásadně mění oproti stavu základnímu. Velmi zajímavé na molekule *p*-hydroxyacetofenonu je, že jsou obě funkce přítomny na jedné molekule, a tedy, že je chinon-enol (**3** na obrázku 24) v tripletu stabilnější než výchozí neutrální *p*-hydroxyacetofenon (**1**). Současně se nám podařilo výpočetně vyvrátit argument prof. P. H. Phillipse, že se o tripletový chinon-enol (**3**) nejedná. V jeho skupině totiž naměřili rezonančně zesílená časově rozlišená Ramanova spektra za podmínek, kdy měl být přítomen tripletový chinon-enol. Vypočítali pak pro toto species Ramanova spektra, která se neshodovala s jejich měřeními. Byla tak ohrožena správnost naší interpretace. Dr. Tomáš Šolomek však na mou prosbu spočítal rezonančně zesílená Ramanova spektra a našel velmi dobrý soulad se spektry měřenými skupinou prof. Phillipse (Zuo, Ma *et al.* 2005). Práce je velmi detailní, stojí na stovkách naměřených kinetických stop a rozdílových spektrech a je navíc doplněna skriptem v programu Maple se simulací kinetického chování všech pozorovaných species při nastavitelném složení roztoku. Práce je tak dobrým východiskem pro pochopení *p*-hydroxyfenacylů s hůře odstupujícími skupinami.



Obrázek 24: Znázornění acidobazických rovnováh v tripletovém stavu pro *p*-hydroxyacetofenon.

Prof. Klán a prof. Givens spolupracovali na projektu, ve kterém připravili a charakterizovali další deriváty *p*-hydroxyacetofenonu a jejich fotoreaktivitu v ustáleném stavu. Jako velmi zajímavé se ukázaly cyklické deriváty (Kammath, Solomek *et al.* 2013). Distribuce fotoproduktů je závislá na různé velikosti kruhů, jak je ukázáno na obrázku 25, který znázorňuje také příslušné meziproducty.



Obrázek 25: Distribuce fotoproduktů pro deriváty *p*-hydroxyacetofenonů s různě velkým nearomatickým kruhem je znázorněna ve sloupcovém grafu (Kammath, Solomek *et al.* 2013). Fotoprodukty i meziproducty k nim vedoucím jsou odlišeny barevně.

Velmi zajímavý projekt, který na základě práce s připravenými deriváty vznikl, stojí na vhledu a výpočtech dr. Tomáše Šolomka (Solomek, Heger *et al.* 2013). V mechanismu foto-Favorského reakce figuruje tripletový biradikál, který jsme dříve spektroskopicky odhalili a identifikovali. Je však zřejmé, že tento intermediát před další reakcí (což je zacyklení a tvorba cyklopropanového kruhu) musí přejít do singletového stavu. Dr. Šolomek si správně uvědomil, že rychlost mezisystémového křížení pro tento biradikál z tripletu do singletu bude pro biradikály s různě napjatým kruhem různá. Energetická mezera mezi singletovým a tripletovým stavem výpočetně vyšla největší pro pětičlenný kruh. Dr. Šolomek

také napočítal, že největší pravděpodobnost mezisystémového křížení (největší spin-orbitální interakce) je pro dihedralní úhel asi 40° , který je pro pětičlenný derivát v podstatě nedostupný. Z výpočtů tedy vyplynulo, že pěti i šestičlenné tripletové biradikály vzniklé při foto-Favorského reakci by měly mít delší dobu života než tripletový biradikál necyklický. Začal jsem je měřit a ukázalo se, že hypotéza je pravdivá. Doba života necyklického biradikálu byla námi již dříve stanovena na 0,56 ns, doby života biradikálu s pětičlenným a šestičlenným kruhem jsme postupně stanovili na 13,9 a 3 ns. Na tyto výsledky jsem velmi hrdý, protože jejich pořízení bylo zcela vázáno na naši laserovou zábleskovou spektroskopii. Pokud vím, jedná se o nejrychlejší procesy naměřené na aparatuře s elektronickým časováním, jež byly kdy publikovány. Časové rozlišení, kterého se dosáhlo, je dáno volbou krátkozábleskového laseru, který neposkytuje žádný komerční dodavatel těchto zařízení. Tento výsledek tedy považuji za zadostiučinění, že velké úsilí, které jsme vynaložili při konstrukci vlastního zařízení, mělo smysl. Dalším pozoruhodným výstupem tohoto výzkumu, který jsme nepředpokládali, je zjištění, že pětičlenný triplet způsobí ještě rychlejší odstoupení chráněné skupiny než triplet necyklický; pro odstoupení acetátu se doba života zkrátí z 63 ps na 9 ps! Vyplývá z toho, že pětičlenný derivát *p*-hydroxyacetofenonu je lepší chránicí skupinou než *p*-hydroxyacetofenon bez cyklu, což by mohlo být využito zejména pro zvýšení rychlosti odstoupení a kvantového výtěžku pro špatně odstupující skupiny.

4-hydroxyfenacyl amoniové soli

Posledním projektem zmíněným v této podkapitole jsou amoniové soli ochráněné *p*-hydroxyfenacylovou skupinou (projekt opět vznikl jako společná práce prof. Givense a prof. Klána) (Bownik, Šebej *et al.* 2015). Foto-Favorského reakce probíhá dobře pro amoniové soli, pro aminy kvantový výtěžek klesá a pravděpodobně dochází k homolytickému štěpení. Zajímavou částí projektu, na které jsem se podílel společně s Mgr. Vítem Ladányim a Mgr. Ing. Iwonou Bownik, byly acidobazické titrace připravených látek. pK_a hodnoty pro hydroxylovou skupinu a amoniovou sůl se nachází blízko sebe, takže bylo relativně náročné data správně zpracovat. Bohužel většina časově rozlišených dat zkoumajících detaily

mechanismu odstoupení amoniových solí v tomto projektu zůstala doposud neopublikována.

Další chránící skupiny

Následujících dvou projektů jsem se účastnil jako vedoucí studentů, kteří prováděli časově rozlišená měření.

2-hydroxyfenacyl estery

Zdánlivě nevinnou modifikací výše popsané *p*-hydroxyfenacylové skupiny je přemístění OH substituentu z polohy *para* do polohy *ortho*. Nezbytnou konsekvencí této substituce je zefektivnění přeskočení protonu, který je v bezprostřední blízkosti karbonylové skupiny. K tomuto ději opravdu došlo a následující odstoupení chráněné skupiny je tedy komplikováno rychlou tautomerní rovnováhou v tripletovém stavu (Ngoy, Sebej *et al.* 2012).

S-fenacyl xantáty

Syntéza S-fenacyl dithiokarbonátů byla vedena snahou donutit odstupovat s vysokým kvantovým výtěžkem i špatně odstupující skupiny, jako třeba alkoholy (Veetil, Solomek *et al.* 2011). Karbonyl či thiokarbonyl je výrazně lepší odstupující skupina ve srovnání s alkoholy. Pokud by se tedy fotochemicky uvolnil thiokarbonyl a ten se pak rozpadl na CS₂ a alkohol, došlo by k efektivnímu uvolnění alkoholu. Bohužel z analýzy fotoproduktů i z laserové zábleskové spektroskopie se ukázalo, že dochází k homolýze vazby C-S, a tedy vzniku radikálů a následným radikálovým reakcím. Kýžené reakce je dosaženo jen v přítomnosti dalšího zdroje atomu vodíku (např. propan-2-olu).

Bengálská červená

Mgr. Lucie Ludvíková pod vedením prof. Petra Klána začala studovat kinetiku interakcí různých látek s excitovanou bengálskou červení. Cílem bylo porozumět způsobu, jakým se zmíněná látka podílí na fotochemickém šití tkání: bengálská červená se ozáří zeleným světlem a chirurgický řez se zacelí bez nutnosti šít. Naše zařízení je k tomuto projektu velice vhodné, neboť transienty vzniklé po excitaci

bengálské červeně jsou relativně dobře pozorovatelné. Po jisté době jsem byl k projektu přizván a shledali jsme, že již fotochemické chování samotné bengálské červené není jednoduše popsatelné (Ludvikova, Fris *et al.* 2016). Postupně jsme se snažili pomocí izolační metody za vhodně nastavených podmínek získat jednotlivé rychlostní konstanty, ale naše snaha nevedla k jednoznačným výsledkům. Požádali jsme tedy Mgr. Pavla Friše, aby nám naprogramoval skript určený pro proložení několika rychlostních konstant z několika kinetických stop zároveň. Projekt byl po sedmi letech práce a několika nečekaných zvratech úspěšně publikován v prestižním časopise. Přínos této práce spatřuji nejen v důkladném popisu fotochemického chování bengálské červené, ale i v zavedení metody přesného a správného zpracování kinetických dat z více měření, která nebyla doposud používána.

Závěr části habilitační práce zabývající se mechanistickou fotochemií

Na projektech zmiňovaných v této kapitole jsem se naučil zkoumat mechanismy světlem vybuzených reakcí. Molekulou, které jsem se ve svém životě věnoval doposud nejvíce, je jistě *p*-hydroxyacetofenon a od něj odvozená chránicí skupina *p*-hydroxyfenacylová. Podle mého názoru není její potenciál zatím plně vědecky využíván. V podrobných studiích jsme prozkoumali fotofyziku a fotochemii tohoto chromoforu a objasnili jsme mechanismy uvolnění z této chránicí skupiny. Tím jsme ukázali přednosti oproti zavedené *o*-nitrobenzylové skupině. Jestli dojde k rozšíření použití *p*-hydroxyfenacylové skupiny, zůstává otázkou dalšího vývoje, ke kterému chci nadále přispívat. V navazující práci se snažíme objasnit chování *p*-hydroxyfenacylu pro špatně odstupující skupiny – provedli jsme rozsáhlou časově rozlišenou studii a stanovili jsme kvantové výtěžky této reakce (probíhající disertační práce Mgr. Víta Ladányiho). To nás přivedlo k problematice kvantových výtěžků a molárních absorpčních koeficientů doposud špatně zavedeného aktinometru azobenzenu. *p*-Hydroxyacetofenon vykazuje také velmi zajímavé anti-Kashovské chování – dochází u něj k mezisystémovému křížení z S_2 stavu, nikoli z S_1 . Tento výzkum se stal tématem bakalářské a diplomové práce Mgr. Moniky Chrástkové.

Články, které jsou součástí habilitačního řízení a týkají se tématu mechanistické fotochemie

1. Plistil, L.; Solomek, T.; Wirz, J.; Heger, D.; Klan, P., Photochemistry of 2-alkoxymethyl-5-methylphenacyl chloride and benzoate. *Journal of Organic Chemistry* **2006**, 71, 8050-8058.

K článku jsem přispěl transientní spektroskopii – měřením a interpretací. Odhad podílu na článku 20 %.

2. Born, R.; Fischer, W.; Heger, D.; Tokarczyk, B.; Wirz, J., Photochromism of phenoxynaphthacenequinones: diabatic or adiabatic phenyl group transfer? *Photochemical & Photobiological Sciences* **2007**, 6, 552-559.

K článku jsem přispěl transientní spektroskopii – měřením a interpretací. Odhad podílu na článku 30 %.

3. Givens, R. S.; Heger, D.; Hellrung, B.; Kamdzhilov, Y.; Mac, M.; Conrad, P. G.; Cope, E.; Lee, J. I.; Mata-Segreda, J. F.; Schowen, R. L.; Wirz, J., The photo-Favorskii reaction of p-hydroxyphenacyl compounds is initiated by water-assisted, adiabatic extrusion of a triplet biradical. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 3307-3309.

K článku jsem přispěl transientní spektroskopii – měřením a interpretací. Odhad podílu na článku 20 %.

4. Stensrud, K. F.; Heger, D.; Sebej, P.; Wirz, J.; Givens, R. S., Fluorinated photoremovable protecting groups: the influence of fluoro substituents on the photo-Favorskii rearrangement. *Photochemical & Photobiological Sciences* **2008**, 7, 614-624.

K článku jsem přispěl transientní spektroskopii – měřením a interpretací a vedením, podílel jsem se na psaní článku. Odhad podílu na článku 25 %.

5. Stensrud, K.; Noh, J.; Kandler, K.; Wirz, J.; Heger, D.; Givens, R. S., Competing Pathways in the Photo-Favorskii Rearrangement and Release of Esters: Studies on Fluorinated p-Hydroxyphenacyl-Caged GABA and Glutamate Phototriggers. *Journal of Organic Chemistry* **2009**, 74, 5219-5227.

K článku jsem přispěl transientní spektroskopii – měřením a interpretací a vedením, podílel jsem se na psaní článku. Odhad podílu na článku 25 %.

6. Kammari, L.; Solomek, T.; Ngoy, B. P.; Heger, D.; Klan, P., Orthogonal Photocleavage of a Monochromophoric Linker. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, 132, 11431-11433.

K článku jsem přispěl transientní spektroskopii – měřením a interpretací a vedením, podílel jsem se na psaní článku. Odhad podílu na článku 25 %.

7. Givens, R. S.; Stensrud, K.; Conrad, P. G.; Yousef, A. L.; Perera, C.; Senadheera, S. N.; Heger, D.; Wirz, J., p-Hydroxyphenacyl photoremovable protecting groups - Robust photochemistry despite substituent diversity. *Canadian Journal of Chemistry-Revue Canadienne De Chimie* **2011**, 89, 364-384.

K článku jsem přispěl transientní spektroskopii – měřením a interpretací a vedením, podílel jsem se na psaní článku. Odhad podílu na článku 25 %.

8. Veetil, A. T.; Solomek, T.; Ngoy, B. P.; Pavlikova, N.; Heger, D.; Klan, P., Photochemistry of S-Phenacyl Xanthates. *Journal of Organic Chemistry* **2011**, 76, 8232-8242.

K článku jsem přispěl vedením spektroskopické části. Odhad podílu na článku 15 %.

9. Klicova, L.; Sebej, P.; Solomek, T.; Hellrung, B.; Slavicek, P.; Klan, P.; Heger, D.; Wirz, J., Adiabatic Triplet State Tautomerization of p-Hydroxyacetophenone in Aqueous Solution. *Journal of Physical Chemistry A* **2012**, 116, 2935-2944.

Jsem hlavním a korespondujícím autorem tohoto článku a organizoval jsem celý postup výzkumu. Zpochybnil jsem původní výsledky BH, značnou část experimentů jsem osobně měřil, později jsem měření naučil PŠ a LK, a s podporou JW jsem interpretoval výsledky a sepsal článek. PS a TŠ byli zodpovědní za výpočetní část. Sestrojil jsem dvě aparatury, na kterých byla prováděna měření. Odhad podílu na článku 50 %.

10. Ngoy, B. P.; Sebej, P.; Solomek, T.; Lim, B. H.; Pastierik, T.; Park, B. S.; Givens, R. S.; Heger, D.; Klan, P., 2-Hydroxyphenacyl ester: a new photoremovable protecting group. *Photochemical & Photobiological Sciences* **2012**, 11, 1465-1475.

K článku jsem přispěl vedením spektroskopické části. Odhad podílu na článku 15 %.

11. Kammath, V. B.; Solomek, T.; Ngoy, B. P.; Heger, D.; Klan, P.; Rubina, M.; Givens, R. S., A Photo-Favorskii Ring Contraction Reaction: The Effect of Ring Size. *Journal of Organic Chemistry* **2013**, 78, 1718-1729.

K článku jsem přispěl vedením spektroskopické části. Odhad podílu na článku 15 %.

12. Solomek, T.; Heger, D.; Ngoy, B. P.; Givens, R. S.; Klan, P., The Pivotal Role of Oxyallyl Diradicals in Photo-Favorskii Rearrangements: Transient Spectroscopic and Computational Studies. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, 135, 15209-15215.

K článku jsem přispěl transientní spektroskopií – měřením a interpretací, podílel jsem se na psaní článku. Odhad podílu na článku 35 %.

13. Bownik, I.; Šebej, P.; Literák, J.; Heger, D.; Šimek, Z.; Givens, R. S.; Klán, P., 4-Hydroxyphenacyl Ammonium Salts: A Photoremovable Protecting Group for Amines in Aqueous Solutions. *The Journal of Organic Chemistry* **2015**, 80, 9713-9721.

K článku jsem přispěl zejména stanovením molárních absorpčních koeficientů a stanovením pKa hodnot, dále transientní spektroskopií – měřením a interpretací. Odhad podílu na článku 15 %.

14. Ludvikova, L.; Fris, P.; Heger, D.; Sebej, P.; Wirz, J.; Klan, P., Photochemistry of rose bengal in water and acetonitrile: a comprehensive kinetic analysis. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2016**, 18, 16266-16273.

K článku jsem přispěl vedením části zabývající se transientní spektroskopií a její interpretací, podílel jsem se na psaní článku. Odhad podílu na článku 35 %.

Závěr

V tomto shrnutí části své dosavadní vědecké práce jsem okomentoval vědecké publikace předkládané k habilitačnímu řízení na pozadí popisu svého vědeckého vývoje v naději, že začlenění do souvislostí přinese čtenáři vhled, který jen z článků není možný. Detailní a vědecky přesné popisy lze získat vždy ve zmíněných publikacích. Těžiště mé práce leží ve spektroskopii organických molekul v ustáleném stavu a ve spektroskopii s časovým rozlišením, v roztocích nebo na ledu. Nevědomky jsem se dostal k popisu toho podstatného, co ve své práci nacházím: velkou zálibu v nejjemnějších detailech pozorování, které přinášejí potřebná vysvětlení a kterých si jiní často nevšimnou. Dalším společným rysem všech mých publikací je měření experimentálních fyzikálně-chemických veličin a jejich vyhodnocení. Snažil jsem se popsat svůj vědecký vývoj pravdivě, jak si jej pamatuji. Nesmlčel jsem časté neúspěchy, změny očekávání a to, že řada nejdůležitějších objevů se stala nečekaně – snad dle tvrzení, že štěstí přejí připraveným. V několika případech jsem analyzoval chybnou publikační strategii a navrhl jsem její nápravu. Protože se v člancích některých autorů setkávám s chybami a zavádějícími interpretacemi, provádím měření tak dlouho, dokud nejsem zcela přesvědčen o jejich správnosti, a proto mnoho výsledků zatím stále nebylo publikováno. Za tímto postupem si stojím, bývá však těžké jej obhájit před některými kolegy, studenty, spolupracovníky a grantovými agenturami, neboť není z hlediska publikační metriky výhodný. Věřím však, že je užitečný pro vědu.

Odkazy na použitou literaturu

- Abbatt, J. P. D., J. L. Thomas, et al. (2012). "Halogen activation via interactions with environmental ice and snow in the polar lower troposphere and other regions." Atmospheric Chemistry and Physics **12**(14): 6237-6271.
- Andraos, J., E. C. Lathioor, et al. (2000). "Simultaneous pH-rate profiles applied to the two step consecutive sequence A[rightward arrow]B[rightward arrow]C: a theoretical analysis and experimental verification." Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2(2): 365-373.
- Bartels-Rausch, T., H. W. Jacobi, et al. (2014). "A review of air-ice chemical and physical interactions (AICI): liquids, quasi-liquids, and solids in snow." Atmos. Chem. Phys. **14**(3): 1587-1633.
- Blaha, L., J. Klanova, et al. (2004). "Toxicity increases in ice containing monochlorophenols upon photolysis: Environmental consequences." Environmental Science & Technology **38**(10): 2873-2878.
- Blake, J. A., B. Bareiss, et al. (2012). "Design of xanthone propionate photolabile protecting group releasing acyclovir for the treatment of ocular herpes simplex virus." Photochemical & Photobiological Sciences **11**(3): 539-547.
- Born, R., W. Fischer, et al. (2007). "Photochromism of phenoxynaphthacenequinones: diabatic or adiabatic phenyl group transfer?" Photochemical & Photobiological Sciences **6**(5): 552-559.
- Bownik, I., P. Šebej, et al. (2015). "4-Hydroxyphenacyl Ammonium Salts: A Photoremovable Protecting Group for Amines in Aqueous Solutions." The Journal of Organic Chemistry **80**(19): 9713-9721.
- Bronshteyn, V. L. and A. A. Chernov (1991). "Freezing Potentials Arising on Solidification of Dilute Aqueous-Solutions of Electrolytes." Journal of Crystal Growth **112**(1): 129-145.
- Conrad, P. G., R. S. Givens, et al. (2000). "p-hydroxyphenacyl phototriggers: The reactive excited state of phosphate photorelease." Journal of the American Chemical Society **122**(38): 9346-9347.
- Domine, F., J. Bock, et al. (2013). "Can We Model Snow Photochemistry? Problems with the Current Approaches." Journal of Physical Chemistry A **117**(23): 4733-4749.
- Givens, R. S., D. Heger, et al. (2008). "The photo-Favorskii reaction of p-hydroxyphenacyl compounds is initiated by water-assisted, adiabatic extrusion of a triplet biradical." Journal of the American Chemical Society **130**(11): 3307-3309.
- Givens, R. S., K. Stensrud, et al. (2011). "p-Hydroxyphenacyl photoremovable protecting groups - Robust photochemistry despite substituent diversity." Canadian Journal of Chemistry-Revue Canadienne De Chimie **89**(3): 364-384.
- Govindarajan, R., K. Chatterjee, et al. (2006). "Impact of freeze-drying on ionization of sulfonephthalein probe molecules in trehalose-citrate systems." Journal of Pharmaceutical Sciences **95**(7): 1498-1510.
- Heger, D., J. Jirkovsky, et al. (2005). "Aggregation of methylene blue in frozen aqueous solutions studied by absorption spectroscopy." Journal of Physical Chemistry A **109**(30): 6702-6709.

- Heger, D. and P. Klan (2007). "Interactions of organic molecules at grain boundaries in ice: A solvatochromic analysis." Journal of Photochemistry and Photobiology a-Chemistry **187**(2-3): 275-284.
- Heger, D., J. Klanova, et al. (2006). "Enhanced protonation of cresol red in acidic aqueous solutions caused by freezing." Journal of Physical Chemistry B **110**(3): 1277-1287.
- Heger, D., D. Nachtigallova, et al. (2011). "Self-Organization of 1-Methylnaphthalene on the Surface of Artificial Snow Grains: A Combined Experimental-Computational Approach." Journal of Physical Chemistry A **115**(41): 11412-11422.
- Henderson, T. M. A., K. Ladewig, et al. (2013). "Cryogels for biomedical applications." Journal of Materials Chemistry B **1**(21): 2682-2695.
- Inagaki, T. (1972). "Absorption Spectra of Pure Liquid Benzene in the Ultraviolet Region." The Journal of Chemical Physics **57**(6): 2526-2530.
- Jungwirth, P., D. Rosenfeld, et al. (2005). "A possible new molecular mechanism of thundercloud electrification." Atmospheric Research **76**(1-4): 190-205.
- Kahan, T. F. and D. J. Donaldson (2007). "Photolysis of polycyclic aromatic hydrocarbons on water and ice surfaces." Journal of Physical Chemistry A **111**(7): 1277-1285.
- Kahan, T. F. and D. J. Donaldson (2010). "Benzene Photolysis on Ice: Implications for the Fate of Organic Contaminants in the Winter." Environmental Science & Technology **44**(10): 3819-3824.
- Kammari, L., L. Plistil, et al. (2007). "2,5-Dimethylphenacyl carbamate: a photoremovable protecting group for amines and amino acids." Photochemical & Photobiological Sciences **6**(1): 50-56.
- Kammath, V. B., T. Solomek, et al. (2013). "A Photo-Favorskii Ring Contraction Reaction: The Effect of Ring Size." Journal of Organic Chemistry **78**(5): 1718-1729.
- Kania, R., J. K. E. Malongwe, et al. (2014). "Spectroscopic Properties of Benzene at the Air-Ice Interface: A Combined Experimental-Computational Approach." The Journal of Physical Chemistry A **118**(35): 7535-7547.
- Kirsebom, H. and B. Mattiasson (2011). "Cryostructuration as a tool for preparing highly porous polymer materials." Polymer Chemistry **2**(5): 1059-1062.
- Klan, P., A. Ansorgova, et al. (2000). "Photochemistry of chlorobenzene in ice." Tetrahedron Letters **41**(40): 7785-7789.
- Klan, P., D. Del Favero, et al. (2001). "Photodegradation of halobenzenes in water ice." Environmental Science and Pollution Research **8**(3): 195-200.
- Klan, P. and I. Holoubek (2002). "Ice (photo)chemistry. Ice as a medium for long-term (photo)chemical transformations - environmental implications." Chemosphere **46**: 1201-1210.
- Klan, P., J. Janosek, et al. (2000). "Photochemistry of valerophenone in solid solutions." Journal of Photochemistry and Photobiology a-Chemistry **134**(1-2): 37-44.
- Klan, P., J. Klanova, et al. (2003). "Photochemical activity of organic compounds in ice induced by sunlight irradiation: The Svalbard project." Geophysical Research Letters **30**(6): 46.
- Klan, P., A. P. Pelliccioli, et al. (2002). "2,5-Dimethylphenacyl esters: A photoremovable protecting group for phosphates and sulfonic acids." Photochemical & Photobiological Sciences **1**(11): 920-923.

- Klan, P., T. Solomek, et al. (2013). "Photoremovable Protecting Groups in Chemistry and Biology: Reaction Mechanisms and Efficacy." Chemical Reviews **113**(1): 119-191.
- Klan, P. and J. Wirz (2009). Photochemistry of organic compounds: From concepts to practice. Chichester, John Wiley & Sons Ltd.
- Klan, P., M. Zabadal, et al. (2000). "2,5-dimethylphenacyl as a new photoreleasable protecting group for carboxylic acids." Organic Letters **2**(11): 1569-1571.
- Klanova, J., P. Klan, et al. (2003). "Environmental ice photochemistry: monochlorophenols." Environmental Science & Technology **37**(8): 1568-1574.
- Klicova, L., P. Sebej, et al. (2012). "Adiabatic Triplet State Tautomerization of p-Hydroxyacetophenone in Aqueous Solution." Journal of Physical Chemistry A **116**(11): 2935-2944.
- Krausko, J., J. K. E. Malongwe, et al. (2015). "Spectroscopic Properties of Naphthalene on the Surface of Ice Grains Revisited: A Combined Experimental-Computational Approach." The Journal of Physical Chemistry A **119**(32): 8565-8578.
- Krausko, J., G. Ondrušková, et al. (2015). "Comment on "Photolysis of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons on Water and Ice Surfaces" and on "Nonchromophoric Organic Matter Suppresses Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Photolysis in Ice and at Ice Surfaces"." The Journal of Physical Chemistry A **119**(43): 10761-10763.
- Krausko, J., J. Runštuk, et al. (2014). "Observation of a Brine Layer on an Ice Surface with an Environmental Scanning Electron Microscope at Higher Pressures and Temperatures." Langmuir **30**(19): 5441-5447.
- Krausková, L., J. Procházková, et al. (2016). "Suppression of protein inactivation during freezing by minimizing pH changes using ionic cryoprotectants." International Journal of Pharmaceutics **509**(1-2): 41-49.
- Lignell, A. and M. S. Gudipati (2015). "Mixing of the Immiscible: Hydrocarbons in Water-Ice near the Ice Crystallization Temperature." The Journal of Physical Chemistry A **119**(11): 2607-2613.
- Literak, J., P. Klan, et al. (2003). "Photochemistry of alkyl aryl ketones on alumina, silica-gel and water ice surfaces." Journal of Photochemistry and Photobiology a-Chemistry **154**(2-3): 155-159.
- Literak, J., S. Relich, et al. (2003). "Temperature dependent photochemical cleavage of 2,5-dimethylphenacyl esters." Molecular Diversity **7**(2-4): 265-271.
- Literak, J., J. Wirz, et al. (2005). "2,5-Dimethylphenacyl carbonates: A photoremovable protecting group for alcohols and phenols." Photochemical & Photobiological Sciences **4**(1): 43-46.
- Ludvikova, L., P. Fris, et al. (2016). "Photochemistry of rose bengal in water and acetonitrile: a comprehensive kinetic analysis." Physical Chemistry Chemical Physics.
- Matykiewiczova, N., R. Kurkova, et al. (2007). "Photochemically induced nitration and hydroxylation of organic aromatic compounds in the presence of nitrate or nitrite in ice." Journal of Photochemistry and Photobiology a-Chemistry **187**(1): 24-32.
- Mayer, G. and A. Heckel (2006). "Biologically active molecules with a "light switch"." Angewandte Chemie-International Edition **45**(30): 4900-4921.

- McNeill, V. F., A. M. Grannas, et al. (2012). "Organics in environmental ices: sources, chemistry, and impacts." Atmos. Chem. Phys. **12**(20): 9653-9678.
- Ngoy, B. P., P. Sebej, et al. (2012). "2-Hydroxyphenacyl ester: a new photoremovable protecting group." Photochemical & Photobiological Sciences **11**(9): 1465-1475.
- Orii, Y. and M. Morita (1977). "MEASUREMENT OF PH OF FROZEN BUFFER SOLUTIONS BY USING PH INDICATORS." Journal of Biochemistry **81**(1): 163-168.
- Pelliccioli, A. P., P. Klan, et al. (2001). "Photorelease of HCl from o-methylphenacyl chloride proceeds through the Z-xylylenol." Journal of the American Chemical Society **123**(32): 7931-7932.
- Pelliccioli, A. P. and J. Wirz (2002). "Photoremovable protecting groups: reaction mechanisms and applications." Photochemical & Photobiological Sciences **1**(7): 441-458.
- Plistil, L., T. Solomek, et al. (2006). "Photochemistry of 2-alkoxymethyl-5-methylphenacyl chloride and benzoate." Journal of Organic Chemistry **71**(21): 8050-8058.
- Roubal, Z., Z. Szabó, et al. (2011). The design of high-impedance and high-voltage input amplifier for measurement of electropotentials on solid-liquid phase boundary. Progress in Electromagnetics Research Symposium.
- Ruzicka, R., L. Barakova, et al. (2005). "Photodecarbonylation of dibenzyl ketones and trapping of radical intermediates by copper(II) chloride in frozen aqueous solutions." Journal of Physical Chemistry B **109**(19): 9346-9353.
- Solomek, T., D. Heger, et al. (2013). "The Pivotal Role of Oxyallyl Diradicals in Photo-Favorskii Rearrangements: Transient Spectroscopic and Computational Studies." Journal of the American Chemical Society **135**(40): 15209-15215.
- Solomek, T., P. Stacko, et al. (2010). "Photoenolization-Induced Oxirane Ring Opening in 2,5-Dimethylbenzoyl Oxiranes To Form Pharmaceutically Promising Indanone Derivatives." Journal of Organic Chemistry **75**(21): 7300-7309.
- Solomek, T., J. Wirz, et al. (2015). "Searching for Improved Photoreleasing Abilities of Organic Molecules." Accounts of Chemical Research **48**(12): 3064-3072.
- Spicer, C. W., R. A. Plastridge, et al. (2002). "Molecular halogens before and during ozone depletion events in the Arctic at polar sunrise: concentrations and sources." Atmospheric Environment **36**(15-16): 2721-2731.
- Stensrud, K., J. Noh, et al. (2009). "Competing pathways in the photo-Favorskii rearrangement and release of esters: studies on fluorinated *p*-hydroxyphenacyl-caged GABA and glutamate phototriggers." Journal of Organic Chemistry **74**(15): 5219-5227.
- Stensrud, K. F., D. Heger, et al. (2008). "Fluorinated photoremovable protecting groups: the influence of fluoro substituents on the photo-Favorskii rearrangement." Photochemical & Photobiological Sciences **7**(5): 614-624.
- Thrush, B. A. (2003). "The genesis of flash photolysis." Photochemical & Photobiological Sciences **2**(5): 453-454.
- Veetil, A. T., T. Solomek, et al. (2011). "Photochemistry of S-Phenacyl Xanthates." Journal of Organic Chemistry **76**(20): 8232-8242.

- Vogt, R., P. J. Crutzen, et al. (1996). "A mechanism for halogen release from sea-salt aerosol in the remote marine boundary layer." Nature **383**(6598): 327-330.
- Woll, D., N. Lukzen, et al. (2012). "Diffusion-controlled sensitization of photocleavage reactions on surfaces." Photochemical & Photobiological Sciences **11**(3): 533-538.
- Workman, E. J. and S. E. Reynolds (1948). "A SUGGESTED MECHANISM FOR THE GENERATION OF THUNDERSTORM ELECTRICITY." Physical Review **74**(6): 709-709.
- Workman, E. J. and S. E. Reynolds (1950). "Electrical Phenomena Occurring during the Freezing of Dilute Aqueous Solutions and Their Possible Relationship to Thunderstorm Electricity." Physical Review **78**(3): 254.
- Zabadal, M., D. Heger, et al. (2004). "Intramolecular triplet-triplet energy transfer in short flexible bichromophoric amino acids, dipeptides and carboxylic acid diester." Collection of Czechoslovak Chemical Communications **69**(4): 776-796.
- Zabadal, M. and P. Klan (2001). "Photoremovable protecting groups." Chemicke Listy **95**(11): 694-699.
- Zabadal, M., A. P. Pelliccioli, et al. (2001). "2,5-dimethylphenacyl esters: A photoremovable protecting group for carboxylic acids." Journal of Physical Chemistry A **105**(45): 10329-10333.
- Zinchuk, A., B. Hancock, et al. (2005). "The influence of measurement conditions on the Hammett acidity function of solid pharmaceutical excipients." European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics **61**(3): 158-170.
- Zuo, P., C. S. Ma, et al. (2005). "Time-resolved resonance Raman and density functional theory study of the deprotonation reaction of the triplet state of p-hydroxyacetophenone in water solution." J. Org. Chem. **70**(22): 8661-8675.

Přílohy: uveřejněné vědecké práce, které jsou součástí habilitačního řízení

1. Heger, D.; Nachtigallova, D.; Surman, F.; Krausko, J.; Magyarova, B.; Brumovsky, M.; Rubes, M.; Gladich, I.; Klan, P., Self-Organization of 1-Methylnaphthalene on the Surface of Artificial Snow Grains: A Combined Experimental-Computational Approach. *Journal of Physical Chemistry A* **2011**, 115, 11412-11422.
2. Roubal, Z.; Szabó, Z.; Steinbauer, M.; Heger, D.; Kubásek, R. In *The design of high-impedance and high-voltage input amplifier for measurement of electropotentials on solid-liquid phase boundary*, Progress in Electromagnetics Research Symposium, 2011; 2011; pp 1162-1166.
3. McNeill, V. F.; Grannas, A. M.; Abbatt, J. P. D.; Ammann, M.; Ariya, P.; Bartels-Rausch, T.; Domine, F.; Donaldson, D. J.; Guzman, M. I.; Heger, D.; Kahan, T. F.; Klán, P.; Masclin, S.; Toubin, C.; Voisin, D., Organics in environmental ices: sources, chemistry, and impacts. *Atmos. Chem. Phys.* **2012**, 12, 9653-9678.
4. Bartels-Rausch, T.; Jacobi, H. W.; Kahan, T. F.; Thomas, J. L.; Thomson, E. S.; Abbatt, J. P. D.; Ammann, M.; Blackford, J. R.; Bluhm, H.; Boxe, C.; Domine, F.; Frey, M. M.; Gladich, I.; Guzmán, M. I.; Heger, D.; Huthwelker, T.; Klán, P.; Kuhs, W. F.; Kuo, M. H.; Maus, S.; Moussa, S. G.; McNeill, V. F.; Newberg, J. T.; Pettersson, J. B. C.; Roeselová, M.; Sodeau, J. R., A review of air-ice chemical and physical interactions (AICI): liquids, quasi-liquids, and solids in snow. *Atmos. Chem. Phys.* **2014**, 14, 1587-1633.
5. Kania, R.; Malongwe, J. K. E.; Nachtigallová, D.; Krausko, J.; Gladich, I.; Roeselová, M.; Heger, D.; Klán, P., Spectroscopic Properties of Benzene at the Air-Ice Interface: A Combined Experimental-Computational Approach. *The Journal of Physical Chemistry A* **2014**, 118, 7535-7547.
6. Krausko, J.; Runštuk, J.; Neděla, V.; Klán, P.; Heger, D., Observation of a Brine Layer on an Ice Surface with an Environmental Scanning Electron Microscope at Higher Pressures and Temperatures. *Langmuir* **2014**, 30, 5441-5447.
7. Krausko, J.; Malongwe, J. K. E.; Bičanová, G.; Klán, P.; Nachtigallová, D.; Heger, D., Spectroscopic Properties of Naphthalene on the Surface of

Ice Grains Revisited: A Combined Experimental–Computational Approach. *The Journal of Physical Chemistry A* **2015**, 119, 8565-8578.

8. Krausko, J.; Ondrušková, G.; Heger, D., Comment on “Photolysis of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons on Water and Ice Surfaces” and on “Nonchromophoric Organic Matter Suppresses Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Photolysis in Ice and at Ice Surfaces”. *The Journal of Physical Chemistry A* **2015**, 119, 10761-10763.
9. Krausková, L.; Procházková, J.; Klašková, M.; Filipová, L.; Chaloupková, R.; Malý, S.; Damborský, J.; Heger, D., Suppression of protein inactivation during freezing by minimizing pH changes using ionic cryoprotectants. *International Journal of Pharmaceutics* **2016**, 509, 41-49.
10. Plistil, L.; Solomek, T.; Wirz, J.; Heger, D.; Klan, P., Photochemistry of 2-alkoxymethyl-5-methylphenacyl chloride and benzoate. *Journal of Organic Chemistry* **2006**, 71, 8050-8058.
11. Born, R.; Fischer, W.; Heger, D.; Tokarczyk, B.; Wirz, J., Photochromism of phenoxynaphthacenequinones: diabatic or adiabatic phenyl group transfer? *Photochemical & Photobiological Sciences* **2007**, 6, 552-559.
12. Givens, R. S.; Heger, D.; Hellrung, B.; Kamdzhilov, Y.; Mac, M.; Conrad, P. G.; Cope, E.; Lee, J. I.; Mata-Segreda, J. F.; Schowen, R. L.; Wirz, J., The photo-Favorskii reaction of p-hydroxyphenacyl compounds is initiated by water-assisted, adiabatic extrusion of a triplet biradical. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 3307-3309.
13. Stensrud, K. F.; Heger, D.; Sebej, P.; Wirz, J.; Givens, R. S., Fluorinated photoremovable protecting groups: the influence of fluoro substituents on the photo-Favorskii rearrangement. *Photochemical & Photobiological Sciences* **2008**, 7, 614-624.
14. Stensrud, K.; Noh, J.; Kandler, K.; Wirz, J.; Heger, D.; Givens, R. S., Competing Pathways in the Photo-Favorskii Rearrangement and Release of Esters: Studies on Fluorinated p-Hydroxyphenacyl-Caged GABA and Glutamate Phototriggers. *Journal of Organic Chemistry* **2009**, 74, 5219-5227.
15. Kammari, L.; Solomek, T.; Ngoy, B. P.; Heger, D.; Klan, P., Orthogonal Photocleavage of a Monochromophoric Linker. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, 132, 11431-11433.

16. Givens, R. S.; Stensrud, K.; Conrad, P. G.; Yousef, A. L.; Perera, C.; Senadheera, S. N.; Heger, D.; Wirz, J., p-Hydroxyphenacyl photoremovable protecting groups - Robust photochemistry despite substituent diversity. *Canadian Journal of Chemistry-Revue Canadienne De Chimie* **2011**, 89, 364-384.
17. Veetil, A. T.; Solomek, T.; Ngoy, B. P.; Pavlikova, N.; Heger, D.; Klan, P., Photochemistry of S-Phenacyl Xanthates. *Journal of Organic Chemistry* **2011**, 76, 8232-8242.
18. Klicova, L.; Sebej, P.; Solomek, T.; Hellrung, B.; Slavicek, P.; Klan, P.; Heger, D.; Wirz, J., Adiabatic Triplet State Tautomerization of p-Hydroxyacetophenone in Aqueous Solution. *Journal of Physical Chemistry A* **2012**, 116, 2935-2944.
19. Ngoy, B. P.; Sebej, P.; Solomek, T.; Lim, B. H.; Pastierik, T.; Park, B. S.; Givens, R. S.; Heger, D.; Klan, P., 2-Hydroxyphenacyl ester: a new photoremovable protecting group. *Photochemical & Photobiological Sciences* **2012**, 11, 1465-1475.
20. Kammath, V. B.; Solomek, T.; Ngoy, B. P.; Heger, D.; Klan, P.; Rubina, M.; Givens, R. S., A Photo-Favorskii Ring Contraction Reaction: The Effect of Ring Size. *Journal of Organic Chemistry* **2013**, 78, 1718-1729.
21. Solomek, T.; Heger, D.; Ngoy, B. P.; Givens, R. S.; Klan, P., The Pivotal Role of Oxyallyl Diradicals in Photo-Favorskii Rearrangements: Transient Spectroscopic and Computational Studies. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, 135, 15209-15215.
22. Bownik, I.; Šebej, P.; Literák, J.; Heger, D.; Šimek, Z.; Givens, R. S.; Klán, P., 4-Hydroxyphenacyl Ammonium Salts: A Photoremovable Protecting Group for Amines in Aqueous Solutions. *The Journal of Organic Chemistry* **2015**, 80, 9713-9721.
23. Ludvikova, L.; Fris, P.; Heger, D.; Sebej, P.; Wirz, J.; Klan, P., Photochemistry of rose bengal in water and acetonitrile: a comprehensive kinetic analysis. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2016**, 18, 16266-16273.