Fluorescentni pi-konjugirani heterociklički kemosenzori temeljeni na 1,2,3-triazolu: sinteza i optička svojstva

Perković, Matej

Master's thesis / Diplomski rad

2015

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Chemical Engineering and Technology / Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:149:402538

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Chemical Engineering and Technology University of Zagreb

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE

SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Matej Perković

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, srpanj 2015.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Matej Perković

Fluorescentni pi-konjugirani heterociklički kemosenzori temeljeni na 1,2,3-triazolu: sinteza i optička svojstva

DIPLOMSKI RAD

Voditelj rada: Doc. dr. sc. Svjetlana Krištafor

Članovi povjerenstva:
Doc. dr. sc. Svjetlana Krištafor
Doc. dr. sc. Ivana Steinberg
Doc. dr. sc. Tatjana Gazivoda Kraljević

Zagreb, srpanj 2015.

Zahvaljujem mentorici doc. dr. sc. Svjetlani Krištafor, na predloženoj temi i pomoći pri izradi ovog rada. Posebno zahvaljujem Emi Horak, mag.appl.chem., na susretljivosti, te brojnim korisnim savjetima bez kojih izrada i pisanje ovog diplomskog rada ne bi bila moguća. Zahvaljujem svim članovima Zavoda za opću i anorgansku kemiju, Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije, na ugodnom radnom okruženju.

SAŽETAK

Cilj ovog rada je sinteza i optička karakterizacija novih derivata benzazola (benzimidazola, benzotiazola i benzoksazola) koji sadrže triazolnu jezgru radi utvrđivanja potencijalne senzorske primjene. Spojevi **4** i **5** uspješno su sintetizirani reakcijama klasične organske sinteze i *click* reakcijom terminalnog alkina i azida. Strukture svih priređenih spojeva potvrđene su spektroskopskom metodom ^{1}H-NMR.

Ispitivani spojevi su okarakterizirani pomoću UV-vidljive apsorpcijske i fluorescencijske spektrofotometrije na promjenu vrijednosti pH u univerzalnom puferu u rasponu od 1,02 do 12,02. Eksperimentalno je određen utjecaj otapala različitih parametara polarnosti na spektralna svojstva ispitivanih spojeva. Ispitan je i utjecaj različitih metalnih iona na intenzitet fluorescencije spojeva u otopinama.

Spektrofotometrijskom karakterizacijom u otopinama spojeva utvrđeno je da ispitivani spojevi pokazuju mogućnost primjene kao optički pH senzori u kiselom mediju.

Kod spojeva **4** i **5** uočen je solvatokromizam.

Uočena je promjena spektrofotometrijskih svojstava u prisutnosti metalnih iona. Spojevi **4** i **5** pokazuju mogućnost upotrebe kao senzori za metale.

Ključne riječi: kemosenzori, fluorescencija, triazoli, *click* kemija

SUMMARY

Aim of this work was synthesis and optical characterisation of novel benzazole derivatives (benzimidazole, benzthiazole, benzoxazole) based on triazole linker, in order to determine their potential sensor applications. Compounds **4** and **5** were successfully synthesized by reactions of classical organic synthesis and click reaction with terminal alkyne and azide. The structures of all synthesized compounds were confirmed by ^{1}H-NMR spectroscopy.

Compounds were characterized by UV-Visible absorption and fluorescence spectrophotometry in the universal buffer solutions in the pH range 1,02 to 12,02. The effect of solvent polarity was also studied. The influence of various metal ions on the fluorescence spectra was examined in solutions.

By spectrophotometric characterization studies of the solution was found that tested compounds could have potential application as optical pH sensors in an acidic medium.

Compounds **4** and **5** showed solvatochromism.

Change in the spectroscopic properties due to the presence of metal ions was detected, so the compounds **4** and **5** are suitable for potential metal sensing applications.

Keywords: chemosensors, fluorescence, triazoles, click chemistry

SADRŽAJ

1. Uvod **1**

2. Opći dio **3**

2.1. Click kemija 4

2.1.1. Cu(I) katalizirana 1,3-dipolarna cikloadicija 4

2.1.2. Triazoli i π-konjugirani sustavi 6

2.2. Kemijski senzori 8

2.2.1. Optički kemijski senzori 8

2.2.2. Metode karakterizacije kemijskih optičkih senzora 10

2.2.2.1. UV/vidljiva spektroskopija 10

2.2.2.2. Fluorescencija i fluorescencijska spektroskopija 11

2.2.3. Senzori temeljeni na click kemiji 14

2.3. Benzazoli i njihovi derivati 15

3. Eksperimentalni dio **17**

3.1. Opće napomene 18

3.2. Materijali 18

3.3. Instrumenti 19

3.4. Priprava spojeva 19

3.5. Pregled sintetiziranih spojeva 21

3.6. Priprava otopina 22

3.7. Mjerenja 22

3.7.1. Utjecaj promjene vrijednosti pH 23

3.7.2. Utjecaj otapala 23

3.7.3. Otopine različitih metalnih iona 25

4. Rezultati **26**

4.1. Sinteza spojeva 27

4.1.1. Analiza ^{1}H-NMR spektara 27

4.2. Spektralna karakterizacija ispitivanih spojeva u otopini 30

4.2.1. Utjecaj promjene vrijednosti pH 30

4.2.2. Utjecaj otapala 32

4.2.3. Otopine različitih metalnih iona 33

5. Rasprava **40**

5.1. Sinteza spojeva 41

5.2. Spektrofotometrijska karakterizacija ispitivanih spojeva u otopini 44
5.2.1. Utjecaj promjene vrijednosti pH 44
5.2.2. Utjecaj otapala 46
5.2.3. Otopine različitih metalnih iona 46
6. Zaključak **48**
7. Literatura **50**
8. Životopis **53**

1. UVOD

Svaka kemijska disciplina uvelike ovisi o kemijskim transformacijama dostupnima svojim praktikantima. Reakcije koje pouzdano povezuju lako dostupne gradivne blokove u prisustvu drugih funkcionalnih skupina, i preko širokog raspona reakcijskih uvjeta, pokazuju se kao vrlo korisnim alatima za izgradnju novih spojeva s korisnim funkcionalnim svojstvima.

Azid-alkin cikloadicija katalizirana bakrom (CuAAC) pokazuje široku primjenu i pouzdan način stvaranja novih kovalentnih veza između gradivnih blokova koji sadrže razne funkcionalne skupine. Ovakav pristup korišten je u organskoj sintezi, medicinskoj kemiji, površinskoj i polimernoj kemiji, te u biokonjugacijskim primjenama.

CuAAC proces pojavio se kao prvi primjer *click* kemije, termin nastao 2001. godine od strane Sharplessa koji je opisao skup „gotovo savršenih" reakcija za formiranje novih veza koje omogućuju stvaranje novih spojeva željenih funkcija.[1]

Pojavom *click* kemije 1,4-disupstituirani triazoli postali su predmetom istraživanja u razvoju kemosenzora. Iako su ovi *click*-derivati triazola često korišteni kao prikladna metoda za vezivanje; njihova učestalost u kemosenzorima može se pripisati sposobnosti vezivanja kationa i aniona. Djelovanje kemosenzora bazirano je na interakciji između ciljane molekule (analita) i receptora koji je pobuđen lako mjerljivom promjenom.

Većina kemosenzora oslanja se na kemijsku reakciju koja služi kao promjena emisijskih karakteristika postojećeg fluorofora. Drugi kemosenzori koriste promjene redoks potencijala ili konformacije kao način detekcije. Tako su mnogi kemosenzori sintetizirani u svrhu detekcije važnih bioloških i okolišnih analita.[2]

2. OPĆI DIO

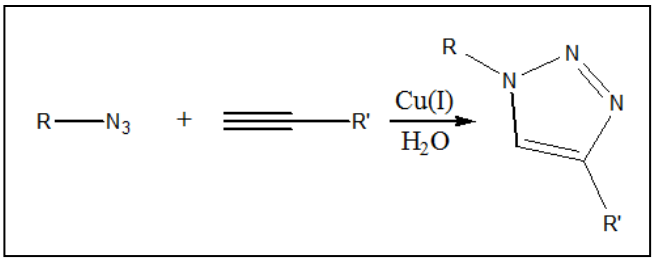
2.1 *Click* kemija

Click kemija predstavlja relativno novi pristup sintezi. Pojam *click* kemije uveo je K. B. Sharpless sa svojim suradnicima 2001. godine. Ovo je nedvojbeno jedan od najmodernijih sintetskih puteva u organskoj kemiji. Pojam „*click*“ odnosi se na jednostavne, efikasne i selektivne kemijske transformacije koje dovode do jednog produkta. Reakcija treba biti modularna, dati visoka iskorištenja, trebaju nastati produkti koji se mogu izolirati nekromatografskim metodama, mora biti stereospecifična (ne nužno i enantioselektivna). Karakteristično za ove reakcije je da se odvijaju u jednostavnim reakcijskim uvjetima, da su reaktanti dostupni i da se otapala ne koriste, a ako se koriste vrlo se lako uklanjaju.[3]

Za nekoliko vrsta reakcija otkriveno je da zadovoljavaju uvjete termodinamički favorizirane reakcije koja vodi do jednog produkta. Primjeri takvih reakcija su: reakcija nukleofilnog otvaranja prstena između epoksida i aziridina, nealdolni tipovi karbonilnih reakcija, formiranje hidrazona i heterocikla, adicije na nezasićene C-C veze, oksidativno formiranje epoksida, Michaelove adicije i Huisgenova 1,3-cikloadicija.[4]

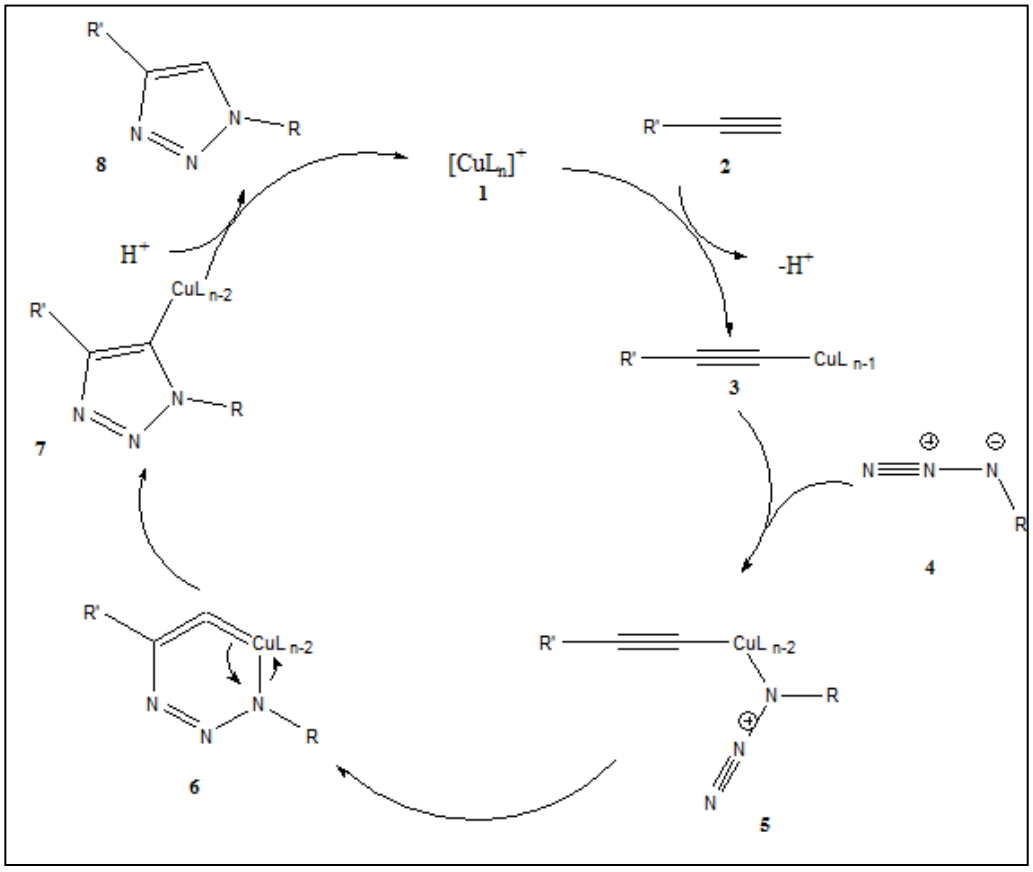
2.1.1 Cu(I) katalizirana 1,3-dipolarna cikloadicija

Azid-alkin cikloadicija katalizirana Cu(I) (CuAAC) je regioselektivna, kemoselektivna reakcija i može se provoditi u vodenom mediju na sobnoj temperaturi. Kao katalizatori se koriste bakrene soli (CuI, CuBr, $CuSO_4 \times 5H_2O$). U zadnjih nekoliko godina objavljeno je mnogo članaka koji opisuju sintetske mogućnosti reakcije CuAAC u bioznanostima. Ove reakcije koriste se u sintezi lijekova, biokemiji, sintezi biokonjugata, genskoj terapiji, bioseparaciji i dijagnostici. Vrlo veliko zanimanje za reakcije CuAAC rezultat je sljedećeg: prvo, reakcija se provodi u vodenom mediju pa se djelotvorno može odvijati u fiziološkim uvjetima; vjerojatno još važnije je to što je reakcija CuAAC vrlo kemoselektivna reakcija i može se koristiti za modificiranje visoko funkcionalnih biomolekula kao što su polipeptidi, nukleinske kiseline ili polisaharidi.[5]



Slika 1. Azid-alkin cikloadicija katalizirana Cu(I)

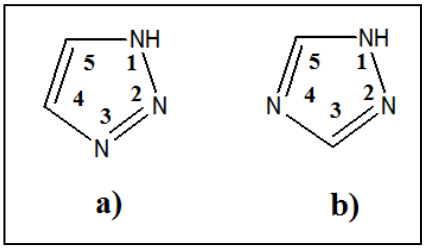
Mehanizam azid-alkin cikloadicije prikazan je na **Slici 2.** Započinje vezanjem alkina na Cu(I) uz izdvajanje jednog liganda čime nastaje bakrov acetilid (**3**). U sljedećem stupnju, azid zamjenjuje jedan od liganada i bakrov kompleks veže dušik vezan na supstituent R formirajući intermedijer **5**. Napadom terminalnog dušika u intermedijeru **5** na C-2 položaj acetilida nastaje neobičan šesteročlani Cu(III) kompleks (**6**). Preuređivanjem kompleksa **6** nastaje peteročlani prsten **7** koji proteolizom daje konačni produkt **8**.[6]



Slika 2. Mehanizam azid-alkin cikloadicije katalizirane Cu(I)

2.1.2 Triazoli i π-konjugirani sustavi

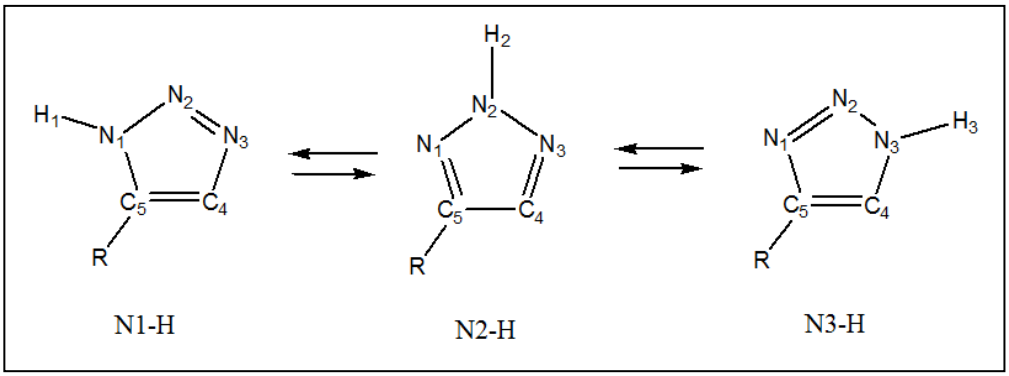
Triazoli su aromatske heterocikličke molekule opće formule $C_2H_3N_3$. Javljaju se u dva izomerna oblika: 1,2,3-triazol i 1,2,4-triazol. Sadrže dva atoma ugljika i tri atoma dušika u peteročlanom prstenu. Položaji 1, 4 i 5 1,2,3-triazola pogodni su za supstituciju (**slika 3.**). Ove molekule nisu pronađene u prirodnim spojevima, ali su vrlo važne zbog svoje široke primjene. Pokazuju dobru biološku aktivnost i nalaze se u mnogim lijekovima. Triazolni heterocikli dosta se primjenjuju i u industriji kao boje i bjelila za vlakna, inhibitori korozije za mnoge metale i legure, i agrokemikalije u obliku herbicida, fungicida i antibakterijskih preparata.[7]



Slika 3. 1,2,3-triazol (a) i 1,2,4-triazol (b)

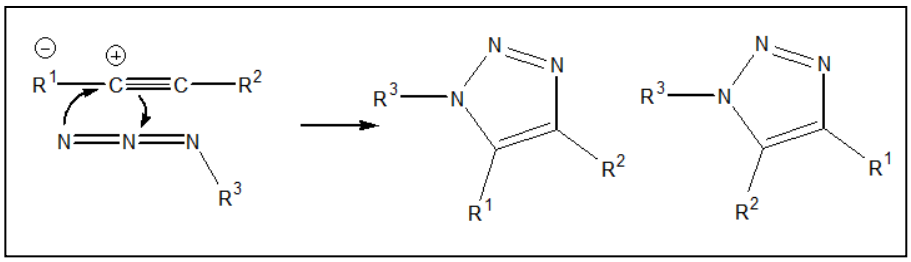
1,2,3- i 1,2,4-triazoli i njihovi derivati javljaju se u nekoliko tautomernih oblika. Precizno predviđanje tautomerne ravnoteže triazolnog prstena zahtjeva točne kalkulacije struktura i energija izoliranih molekula.[8a]

N(H) atom vodika može biti vezan na bilo koja tri atoma dušika. Uobičajeno, ako su dva ugljikova atoma supstituirana s dva različita supstituenta, npr. R≠H tada postoje tri različite tautomerne strukture (**slika 4.**).[8b]



Slika 4. Tautomeri 1,2,3-triazola

Najpoznatija metoda za sintezu 1,2,3-triazola je Huisgenova 1,3-dipolarna cikloadicija koja uključuje reakciju dipolarofila s 1,3-dipolarnim spojem. Primjer dipolarofila su alkeni i alkini i molekule koje sadrže heteroatome u funkcionalnim skupinama kao što su karbonili i nitrili. 1,3-dipolarni spojevi sadrže jedan ili više heteroatoma i primjer su nitril-oksidi, azidi i diazoalkani. Huisgenova 1,3-dipolarna cikloadicija organskog azida i alkina je termička reakcija kojom nastaju 1,4- i 1,5-disupstituirani regioizomeri 1,2,3-triazola (**slika 5.**).



Slika 5. Huisgenova 1,3-dipolarna cikloadicija

2π-elektroni dipolarofila i 4 elektrona dipolarne komponente sudjeluju u pericikličnom pomaku. Adicija je stereokonzervativna i reakcija je zato [2s+4s] cikloadicija slična Diels-Alder-ovoj reakciji. Elektron odvlačeće skupine na dipolarofilu favoriziraju interakciju najniže nepopunjene orbitale (LU) s najvišom popunjenom orbitalom (HO) dipola što dovodi do formiranja novih veza, budući da elektron donorske skupine na dipolarofilu pretežito favoriziraju inverznu interakciju.[9]

Huisgenova 1,3-cikloadicija alkina i azida zadovoljava neke kriterije *click* reakcija kao što je dostupnost reaktanata. Međutim, zbog zahtjevnih reakcijskih uvjeta i nastajanja dva regioizomera kriteriji *click* reakcija nisu u potpunosti zadovoljeni. Korištenjem bakra kao katalizatora omogućuje se sinteza 1,4-disuptituiranog regioizomera. Ako se primjenjuje rutenij kao katalizator nastaju 1,5-disupstituirani triazoli. Navedene reakcije, u kojima se koriste katalizatori, u potpunosti zadovoljavaju definiciju *click* kemije.[10]

Acetilen skupina ili ugljik-ugljik trostruka veza jedna je od najjednostavnijih funkcionalnih skupina u kemiji. Ovakva nezasićena i energetski bogata skupina omogućava daljnje modifikacije pomoću sintetskih transformacija. Bakrom katalizirana azid-alkin cikloadicija transformira acetilensku skupinu u triazolni prsten čime se otvaraju nove mogućnosti. Triazolni prsten sadrži tri atoma dušika što mu omogućava da bude ligand za koordinaciju metala, a može stvarati i vodikove veze. Ove karakteristike određuju primjenu triazola kao funkcionalne skupine u većim heteroaromatskim spojevima.[11]

2.2 Kemijski senzori

Senzor se općenito može definirati kao uređaj koji prima signal i odgovara na podražaj. Svaki senzor je pretvornik energije bez obzira na vrstu mjerenja. Kemijski senzori odgovaraju na podražaj raznih analita. Namjenjeni su identifikaciji i kvantifikaciji kemijskih tvari.

Kemijske senzore možemo podijeliti na direktne i indirektne. Direktni kemijski senzori koriste kemijsku reakciju koja utječe na mjerljive električne veličine poput otpora, potencijala, struje ili kapaciteta. Indirektni kemijski senzori moraju pretvarati jedan oblik energije u drugi kako bi mogli mjeriti električne veličine. To obuhvaća promjenu fizičkog stanja tvari, frekvencijski pomak, modulaciju svjetlosti, promjenu temperature ili mase tvari.

Također, kemijske senzore možemo podijeliti prema mjernoj veličini na elektrokemijske (potenciometrijske, amperometrijske i konduktometrijske), termalne, optičke i masene senzore.

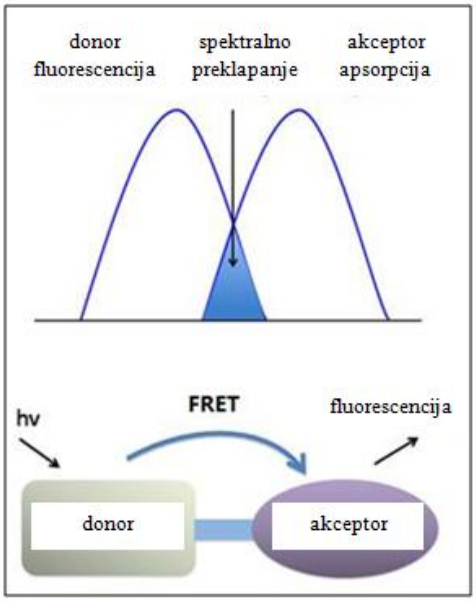
2.2.1 Optički kemijski senzori

Optički kemijski senzori bazirani su na interakciji elektromagnetskog zračenja i materije, što rezultira promjenom nekih svojstava zračenja. To može biti promjena intenziteta, polarizacije ili brzine svjetlosti u nekom mediju. Optičke promjene proučava spektroskopija koja pruža informacije o brojnim strukturama.

Općenito, elektromagnetsko zračenje prolazi kroz uzorak i njegova svojstva mogu se mjeriti i proučavati. S druge strane, uzorak može odgovoriti sekundarnim zračenjem (luminiscencijom) koje se može mjeriti.[12]

Mehanizmi koji omogućuju stvaranje i prijenos signala fluorescentnih senzorskih molekula su rezonantni prijenos energije (FRET), intramolekulski prijenos naboja (ICT) i fotoinducirani prijenos elektrona (PET).

Rezonantni prijenos energije je fizikalni proces u kojem se pobuđena fluorescentna molekula (donor), umjesto emisije prenosi svoju ekscitacijsku energiju na drugu molekulu (akceptor), kako bi akceptor mogao emitirati ili gasiti fluorescenciju. Uspješnost prijenosa ovisi o udaljenosti između donora i akceptora te o njihovim svojstvima.

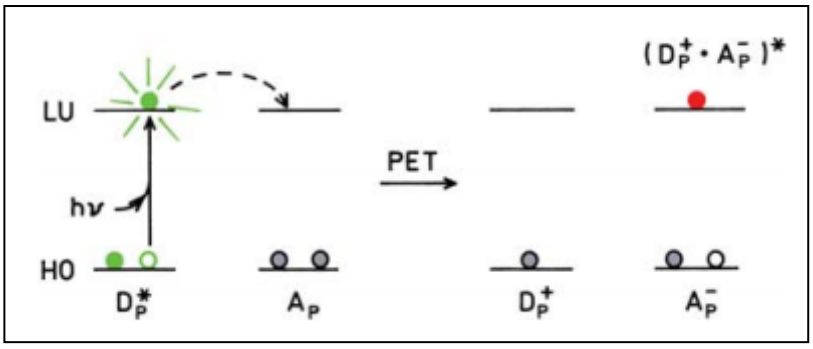


Slika 6. FRET mehanizam stvaranja i prijenosa signala

Intramolekulski prijenos naboja je proces koji mijenja cjelokupnu distribuciju naboja u molekulama. Proces se može odvijati unutar istog elektronskog sustava ili između dva sustava sa visokom elektronskom konjugacijom. Elektronska stanja nastala reakcijom nisu razdvojenog naboja već dolazi do polarizacije naboja u stanjima. Ovim mehanizmom može doći do pomaka valnih duljina emisije.

Treći mehanizam je fotoinducirani prijenos elektrona. U ovom mehanizmu formira se kompleks između elektron donora D_P i elektron akceptora A_P dajući $D_P^+A_P^-$, gdje *P* označava fotoinducirani prijenos elektrona. Nastali kompleks može se vratiti u osnovno stanje bez emisije fotona, ali ponekad se javlja emisija pobuđenog kompleksa. Na kraju, dodatni elektron na akceptoru vraća se na donora.

Pobuđeni fluorofor može biti ili elektron donor ili akceptor. Smjer prijenosa elektrona u pobuđenom stanju određen je oksidacijskim i redukcijskim potencijalima osnovnih i pobuđenih stanja.[13] (**Slika 7.**)



Slika 7. Prikaz PET mehanizma

2.2.2 Metode karakterizacije kemijskih optičkih senzora

2.2.2.1 UV/vidljiva spektroskopija

Većina organskih molekula i funkcionalnih skupina propušta dio elektromagnetskog spektra u području valnih duljina od 190 nm do 800 nm koje nazivamo ultraljubičasto (UV) i vidljivo područje elektromagnetskog spektra. Zbog toga je apsorpcijska spektroskopija limitirana na usko područje određenih valnih duljina. Ipak, u nekim slučajevima možemo izvući korisne informacije iz ovog dijela spektra.[14]

Kada zračenje djeluje na materiju javljaju se brojni procesi poput refleksije, raspršenja, apsorbancije i luminiscencije. Kako je svjetlost oblik energije, apsorpcija svjetlosti pomoću materije uzrokuje porast energije unutar molekula. Ukupna potencijalna energija molekule može se prikazati kao zbroj elektronske, vibracijske i rotacijske energije (1).

$$E_{ukupna} = E_{elektronska} + E_{vibracijska} + E_{rotacijska} \quad (1)$$

Suma energija koje molekula posjeduje nije kostantna već je serija diskretnih nivoa i stanja. Razlike u energijama određenih stanja prikazane su redom (2):

$$E_{elektronska} > E_{vibracijska} > E_{rotacijska} \quad (2)$$

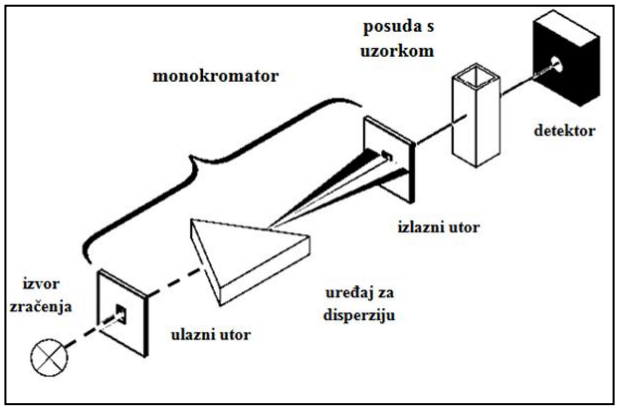
U nekim molekulama i atomima, fotoni UV/vidljive svjetlosti imaju dovoljno energije da uzrokuju prijelaze elektrona između različitih energetskih nivoa. Prijelazi se događaju iz energetski nižih nivoa u više nivoe.[15]

Što je veći broj i efikasnost molekula sposobnih za apsorpciju svjetlosti zadane valne duljine, to je veća apsorpcija svjetlosti. Iz te ideje proizlazi Beer-Lambertov zakon (3) koji omogućuje kvantitativno određivanje koncentracije nekog uzorka:

$$A = \varepsilon * c * l \quad (3)$$

gdje je A apsorbancija, ε je molarni apsorpcijski koeficijent, c je molarna koncentracija uzorka, a l je put koji svjetlost prelazi kroz posudu s uzorkom.[14]

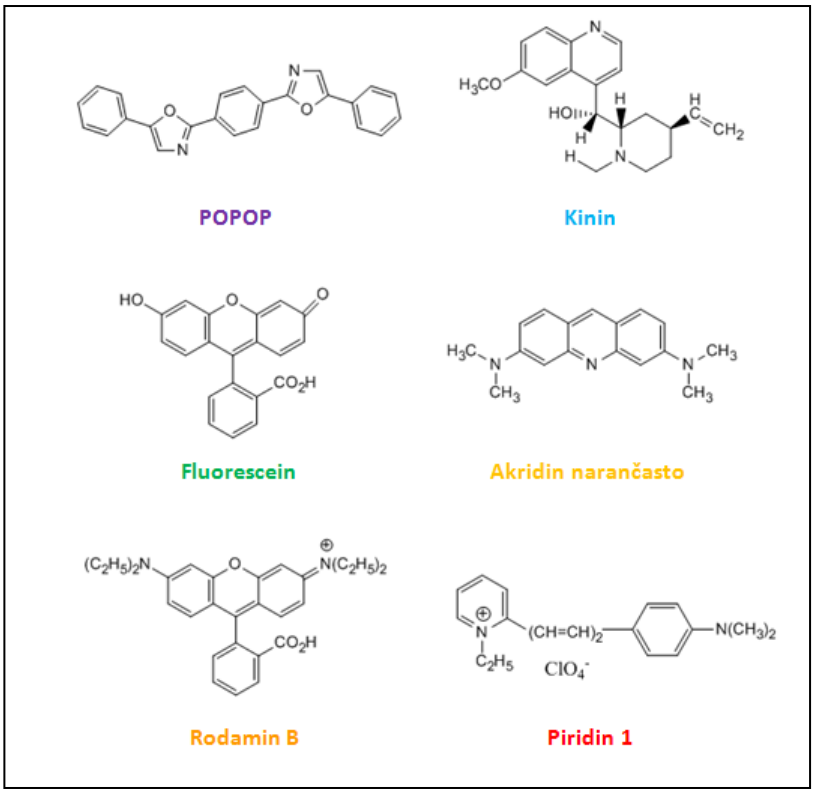
Na **Slici 8.** možemo vidjeti uređaj koji se koristi u UV/vidljivoj spektroskopiji pod nazivom spektrofotometar. On mjeri apsorbanciju uzorka kao funkciju valne duljine elektromagnetskog zračenja. Sastoji se od izvora koji emitira zračenje, monokromatora koji vrši selekciju zračenja, posude s uzorkom, te detektora za mjerenje intenziteta zračenja.

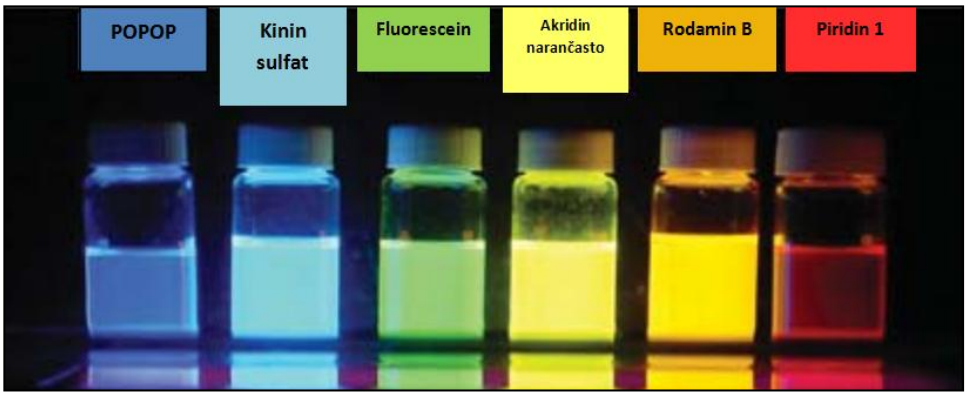


Slika 8. Shema spektrofotometra[16]

2.2.2.2 Fluorescencija i fluorescencijska spektroskopija

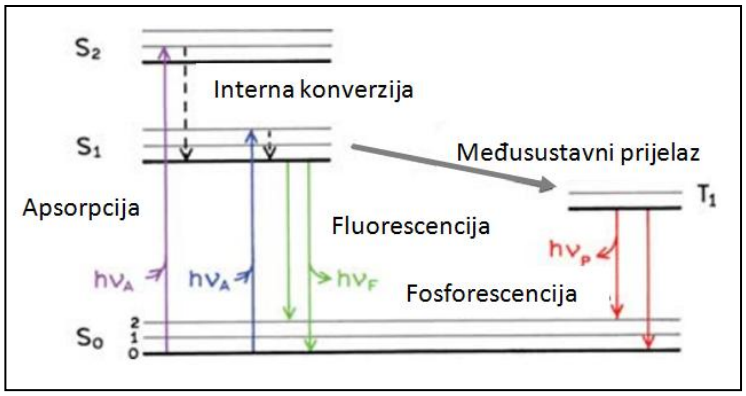
Luminiscencija predstavlja emisiju svjetlosti neke tvari, a nastaje iz elektronski pobuđenih stanja. Dijelimo ju na fluorescenciju i fosforescenciju obzirom na prirodu pobuđenog stanja. Kod fluorescencije elektron iz singletnog pobuđenog stanja emitira foton pri povratku u osnovno singletno stanje. Brzina emisije fluorescencije obično iznosi 10^8 s^{-1}, dok se životni vijek kreće oko 10 ns. Fluorescencija se obično javlja kod aromatskih molekula. Primjeri tipičnih fluorescirajućih tvari (fluorofora) mogu se vidjeti na **Slici 9.**





Slika 9. Prikaz struktura fluorofora i njihovih boja

Fluorescencijski spektralni podaci prikazuju se u obliku emisijskih spektara koji pokazuju ovisnost intenziteta fluorescencije o valnoj duljini. Procesi koji se odvijaju između apsorpcije i emisije svjetlosti zorno se mogu prikazati Jablonski dijagramom. U njemu možemo vidjeti razne molekulske procese koji se zbivaju iz pobuđenih stanja. (**Slika 10.**)



Slika 10. Jablonski dijagram

Singletno osnovno stanje, te pobuđeno prvo i drugo singletno stanje označena su redom ovim oznakama S_1, S_2 i S_3. Sa T_1 označeno je tripletno prvo pobuđeno stanje. Svaki fluorofor može postojati u brojnim vibracijskim nivoima svakog stanja. Prijelazi između različitih stanja prikazani su vertikalnim linijama koji opisuju prirodu apsorpcije svjetlosti. Prijelazi se odvijaju unutar 10^{-15} s. Sljedeći apsorpciju svjetlosti, obično se odvija nekoliko procesa. Fluorofor je uglavnom pobuđen u neki viši vibracijski nivo stanja S_1 ili S_2.

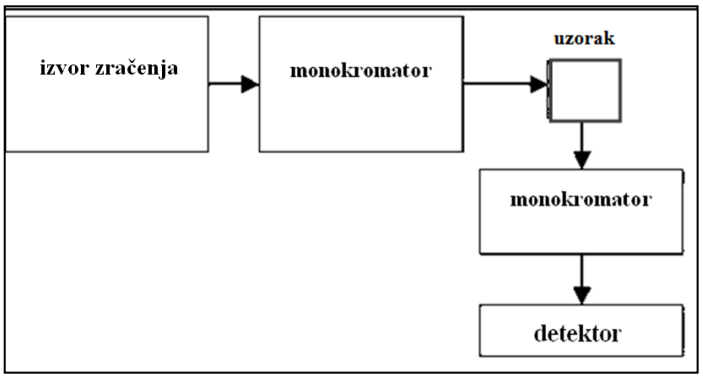
Molekule u krutoj fazi brzo se relaksiraju do najnižeg vibracijskog nivoa S_1 stanja, a taj proces nazivamo interna konverzija. Ona se odvija unutar 10^{-12} s ili još kraćem vremenskom intervalu. Kako se fluorescencija odvija u kraćem vremenskom intervalu, interna konverzija je uglavnom završena prije same emisije. Fluorescencija se uvijek događa iz najnižeg vibracijskog nivoa nekog pobuđenog singletnog stanja, a završava u nekom višem vibracijskom nivou osnovnog singletnog stanja.

Također, molekule iz S_1 stanja može preko međusustavnog prijelaza prijeći u stanje T_1. Emisija iz stanja T_1 naziva se fosforescencija i obično je pomaknuta prema većim valnim duljinama u odnosu na fluorescenciju. Prijelaz iz prvog tripletnog pobuđenog stanja u osnovno singletno stanje je zabranjeno i kao rezultat toga konstante brzina za tripletnu emisiju su nekoliko redova manje u odnosu na fluorescenciju.

Iz Jablonski dijagrama vidimo da je energija emisije većinom niža nego energija apsorpcije. Fluorescencija se ubičajeno javlja pri nižim energijama, odnosno većim valnim duljinama. Ovaj fenomen prvi je uočio Stokes 1852. godine na Sveučilištu u Cambridge-u. Stokes je promatrao gubitak energije između apsorpcije i emisije za fluorescirajuće molekule u otopinama. Jedan uobičajen uzrok Stokesovog pomaka je brzi prijelaz do najnižeg vibracijskog nivoa S_1 stanja.

Jedna od najvažnijih karakteristika fluorofora svakako su kvantno iskorištenje i životni vijek fluorescencije. Kvantno iskorištenje pokazuje omjer emitiranih i apsorbiranih fotona. Tvari sa visokim kvantnim iskorištenjem pokazuju jarke emisijske spektre. Životni vijek također je važna karakteristika fluorescencije jer određuje vrijeme u kojem fluorofor reagira s okolinom te time daje informacije o svojoj emisiji. Fluorescencijska spektroskopija predstavlja granu spektroskopije kod koje se fluorofor pobuđuje nekom valnom duljinom svjetlosti pri čemu emitira drugu valnu duljinu.[17]

Instrument koji se koristi pri fluorescencijskoj spektroskopiji naziva se fluorimetar. On se sastoji od izvora zračenja, monokromatora, posude za uzorak i detektora. (**Slika 11.**)



Slika 11. Shema fluorimetra

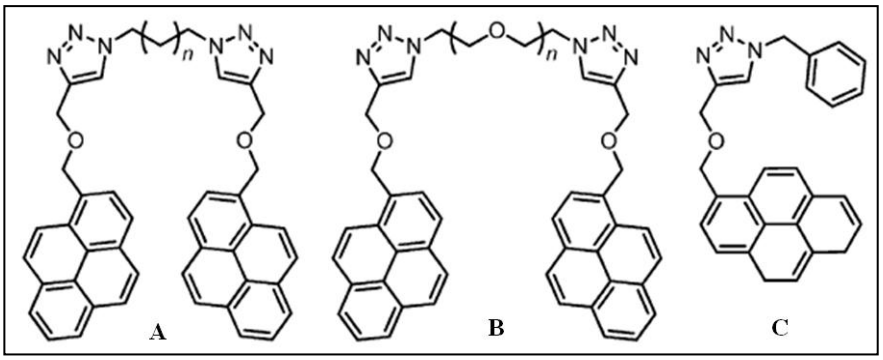
Fluorescencijsko zračenje emitirano je u svim smjerovima nakon pobude. Monokromator vrši selekciju valnih duljina koje propušta prema uzorku i od njega, a informacije o emisiji prima detektor. Fluorescencijska spektroskopija pokazuje veliku osjetljivost pri mjerenju, a količine uzorka potrebnog za mjerenje vrlo su male.[18]

2.2.3 Senzori temeljeni na *click* kemiji

Click reakcija cikloadicije predstavlja dobar način dobivanja triazolnog prstena pomoću raznih supstrata. To omogućuje konstruiranje brojnih konjugiranih strukutra. Funkcija triazola kao liganda za metale pruža mogućnost korištenja *click* reakcija za konstruiranje optičkih senzora za metale.

Fluorescirajuće strukture često se vežu CuAAC reakcijom na senzore za metale bazirane na triazolu. Chung i suradnici sintetizirali su takve senzore na bazi pirena. Alkilni lanac spoja **A** pokazao je sposobnost vezivanja iona Cu^{2+}, Hg^{2+} i Cr^{3+} u acetonitrilu. Spoj **C**

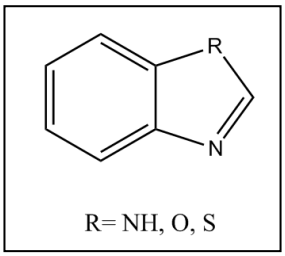
također je pokazao slične rezultate na navedene ione. Kod spoja **B** uočeno je vezivanje iona Cd^{2+} i Zn^{2+} zbog prisutnosti atoma kisika u lancu.[19] (**Slika 12.**)



Slika 12. Prikaz struktura senzora na bazi triazola

2.3 Benzazoli i njihovi derivati

Supstituirani benzazoli su biciklički heteroaromatski spojevi koji se sastoje od benzena na kojega je vezan peteročlani nezasićeni prsten s atomom dušika na položaju 1, te još jednog heteroatoma na položaju 3 u svojoj strukturi.[20] (**Slika 13.**)



Slika 13. Struktura supstituiranih benzazola

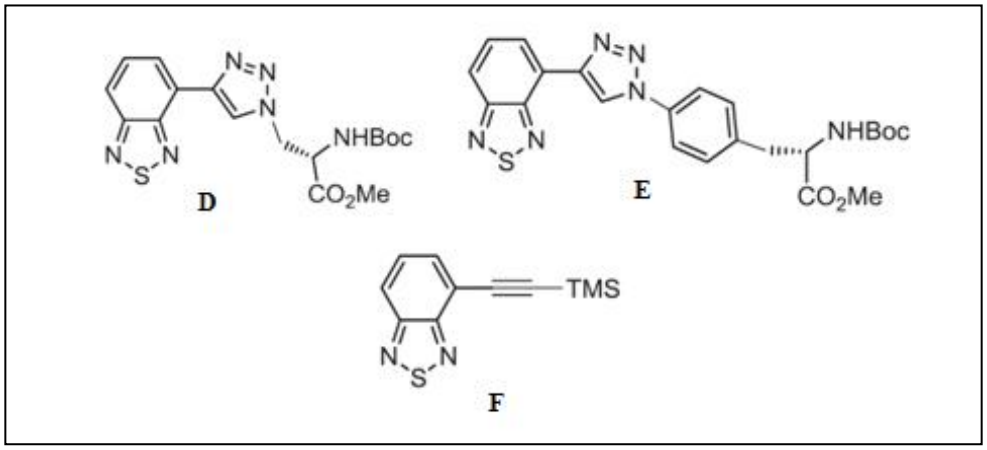
Benzimidazoli, benzotiazoli i benzoksazoli važna su skupina fuzioniranih heterocikličkih sustava. Pokazuju raznoliku farmakološku primjenu, ali i visoko tehnološku primjenu kao probe zahvaljujući svojim fluorescentnim svojstvima.[21]

Fluorescentni senzori su poželjni za primjenu zbog svojeg načina detekcije, visoke osjetljivosti i relativne isplativosti.[22]

Zbog sve veće potrebe za razvojem takvih senzora za detekciju okolišnih i bioloških analita, CuAAC reakcija predstavlja najučinkovitiji pristup kemijskim transformacijama radi dobivanja željenih spektralnih svojstava. Kada je triazolna skupina konjugirana s kromoforom, nastali prošireni aromatski sustav omogućuje pomak valnih duljina maksimuma kod pobude i emisije.[23]

Uočeno je da su Stokesovi pomaci ponekad veći; ako molekula u svojoj strukturi sadrži molekule benzimidazola, benzotiazola ili benzoksazola.[24]

Xie i suradnici uspješno su sintetizirali nove triazolne derivate na bazi benzotiadiazola koji su pokazali promjenu intenziteta fluorescencije u prisustvu Cu^{2+}, Ni^{2+}, Co^{2+} i Hg^{2+} iona u acetonitrilu.[23]



Slika 14. Prikaz struktura triazolnih derivata benzotiadiazola

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1 Opće napomene

Kemijske reakcije provedene su uobičajenim metodama organske sinteze.

Sva otapala sušena/pročišćavana su prema preporučenom postupku sušenja sredstvima za sušenje. Za tankoslojnu kromatografiju (TLC) korištene su ploče *60F-254* prevučene slojem silikagela *Merck*, a za detekciju izoliranih komponenata korištena je UV svjetlost valne duljine 254 nm. Kromatografija na koloni provedena je na silikagelu (*Fluka*, 0,063-0,2 mm), staklene kolone punjene su pod utjecajem gravitacije, a kao eluens korištene su odgovarajuće smjese CH_2Cl_2/CH_3OH. Spektri ^{1}H-NMR snimljeni su na spektrometru Bruker 300 i 600 MHz. Svi uzorci otopljeni su u DMSO-d_6 i mjereni pri 298 K. Kemijski pomaci (δ) u ^{1}H-NMR spektrima izraženi su u ppm u odnosu prema signalu DMSO na δ 2.50 ppm za ^{1}H. Pojedine rezonancije pridružene su na temelju kemijskih pomaka, intenziteta signala, multipliciteta signala i H-H konstante sprege.

3.2 Materijali

Za pripravu mjernih otopina korištene su sljedeće kemikalije:

- citratna kiselina, natrijev hidroksid, *Kemika d.d., Zagreb*
- fosforna kiselina, *Laborchemie Apolda*
- klorovodična kiselina, *Carlo Erba Reagents*
- tetrahidrofuran, bezvodni, bez inhibitora, ≥99,9 % (THF), *Sigma-Aldrich*
- etanol za pranje, *Carlo Erba Reagents*
- deionizirana voda
- metanol, aceton, *Sigma Aldrich*
- dietil eter, etil acetat, diklormetan, dimetil sulfoksid, acetonitril, etanol, *Kefo d.o.o.*
- cinkov klorid ($ZnCl_2$), bakrov klorid ($CuCl_2$), *Merck, Germany*
- srebrov nitrat ($AgNO_3$), željezov klorid ($FeCl_3$), živin klorid ($HgCl_2$), litijev klorid (LiCl), aluminijev klorid ($AlCl_3$), kalcijev klorid ($CaCl_2$), *Kemika d.d., Zagreb*

3.3 Instrumenti

Pri izvedbi eksperimenata rabljeni su sljedeći instrumenti:

- pH metar, MA 5740, *Iskra d.d.*
- UV-vidljivi spektrofotometar, *Cary 100 Scan*
- UV-vidljivi spektrofluorimetar, *Cary Eclipse*
- instrument za određivanje točke tališta MPS10

a) b)



Slika 15. a) UV-vidljivi apsorpcijski spektrofotometar; b) fluorescencijski spektrofotometar

3.4 Priprava spojeva

2-(prop-2-iniltio)benzo[*d*]tiazol (1)

2-merkaptobenzotiazol (600 mg; 3,59 mmol) otopljen je u suhom tetrahidrofuranu (THF) (5 mL), a zatim je dodan trietilamin (TEA) (0,75 mL; 5,38 mmol) te je reakcijska smjesa miješana 15 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon toga dodan je propargil bromid (0,27 mL; 3,59 mmol) i smjesa je stavljena na refluks. Tijek reakcije praćen je tankoslojnom kromatografijom. Nakon četiri sata reakcija je prekinuta, a otapalo je upareno pod sniženim tlakom. Suhi ostatak je pročišćen prekristalizacijom iz etanola (5 mL), pri čemu su izolirani smeđi kristali spoja **1** (240 mg; 32,56 %); T_t= 95˚C.

^{1}H-NMR (300 MHz, DMSO) (δ/ppm): 8,05 (d, 1H, $H_{arom.,ph.}$), 7,89 (dd, 1H, $H_{arom.,ph.}$), 7,48 (dd, 1H, $H_{arom.,ph.}$), 7,39 (m, 1H, $H_{arom.,ph.}$), 4,25 (d, 2H, $H_{alif.,CH2}$), 3,10 (q, $H_{alif.,CH}$)

2-(prop-2-iniltio)-1*H*-benzo[*d*]imidazol (2)

2-merkaptobenzimidazol (600 mg; 4 mmol) otopljen je u suhom THF-u (5 mL), a zatim je dodan TEA (0,84 mL; 6 mmol) te je reakcijska smjesa miješana 15 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon toga dodan je propargil bromid (0,3 mL; 4 mmol) i smjesa je stavljena na refluks. Tijek reakcije praćen je tankoslojnom kromatografijom. Nakon četiri sata reakcija je prekinuta, a otapalo je upareno pod sniženim tlakom. Suhi ostatak je pročišćen prekristalizacijom iz etanola (6 mL), pri čemu su izolirani bijeli kristali spoja **2** (197 mg; 26,16 %); T_t= 173˚C.

^{1}H-NMR (300 MHz, DMSO) (δ/ppm): 7,53 (d, 2H, $H_{arom.,ph.}$), 7,13 (d, 2H, $H_{arom.,ph.}$), 4,14 (d, 2H, $H_{alif.,CH2.}$), 3,18 (d, 1H, $H_{alif.,CH}$)

7-azido-4-metil-2*H*-kromen-2-on (3)

U otopinu 7-amino-4-metilkumarina (200 mg; 1,14 mmol) u p-toluensulfonskoj kiselini (1,9545 g; 10,28 mmol u 5 mL H_2O) postepeno je dodan bezvodni $NaNO_2$ (708,9 mg; 10,28 mmol). Reakcijska smjesa miješana je 60 minuta na sobnoj temperaturi, nakon čega je dodan NaN_3 (118,8 mg; 1,83 mmol) pri čemu je neposredno uočeno razvijanje N_2. Tijek reakcije praćen je tankoslojnom kromatografijom. Nakon toga smjesa je filtrirana pod tlakom čime je izoliran zeleno-žuti prah spoja **3** (190 mg; 82,72%).

7-(4-((benzo[*d*]tiazol-2-iltio)metil)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)-4-metil-2*H*-kromen-2-on (4)

Prah spoja **3** (45 mg; 0,224 mmol) otopljen je u smjesi otapala *tert*-butanol:H_2O=1:1 (5 mL) te su dodani kristali spoja **1** (80 mg; 0,389 mmol), 0,04 mL $CuSO_4$ x $5H_2O$ (1M) i natrij-askorbat (23,2 mg; 0,117 mmol). Tijek reakcije praćen je tankoslojnom kromatografijom. Nakon 24 sata reakcija je zaustavljena, otapalo je otpareno pri sniženom tlaku, te su izolirani žuto-smeđi kristali spoja **4** (50 mg; 55%); T_t > 180˚C.

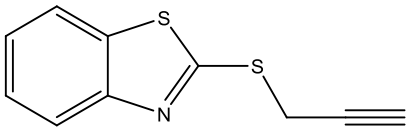
^{1}H-NMR (300 MHz, DMSO) (δ/ppm): 9,00 (s, 1H, $H_{arom.,triazol.}$), 7,98 (m, 6H, $H_{arom.,ph.}$, $H_{arom.,kumarin}$), 7,49 (t, 1H, $H_{arom.,ph.}$), 7,38 (t, 1H, $H_{arom.,ph.}$), 6,46 (s, 1H, $H_{kumarin}$), 4,82 (s, 2H, $H_{alif.,CH2.}$), 2,47 (s, 3H, $H_{alif.,CH}$)

7-(4-((1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-iltio)metil)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)-4-metil-2*H*-kromen-2-on (5)

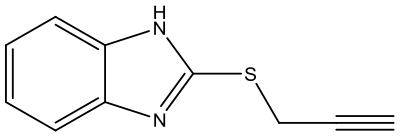
Prah spoja **3** (80 mg; 0,398 mmol) otopljen je u smjesi otapala *tert*-butanol:H_2O=1:1 (5 mL) te su dodani kristali spoja **2** (80 mg; 0,425 mmol), 0,04 mL $CuSO_4$ x $5H_2O$ (1M) i natrij-askorbat (25,3 mg; 0,128 mmol). Tijek reakcije praćen je tankoslojnom kromatografijom. Nakon 24 sata reakcija je zaustavljena, otapalo je otpareno pri sniženom tlaku, te su izolirani žuti kristali spoja **5** (113 mg; 68,28%); T_t > 180˚C.

^{1}H-NMR (300 MHz, DMSO) (δ/ppm): 8,95 (s, 1H, $H_{arom.,triazol.}$), 7,91 (m, 3H, $H_{arom.,ph.}$, $H_{arom.,kumarin}$), 7,49 (dd, 2H, $H_{arom.,ph.}$), 7,13 (d, 2H, $H_{arom.,ph.}$), 6,47 (s, 1H, $H_{kumarin}$), 4,78 (s, 2H, $H_{alif.,CH2.}$), 2,46 (s, 3H, $H_{alif.,CH}$)

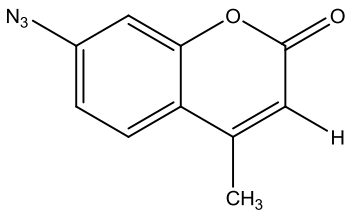
3.5 Pregled sintetiziranih spojeva



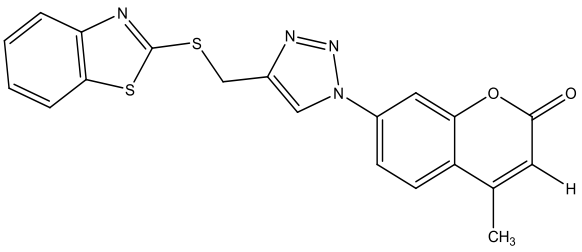
1



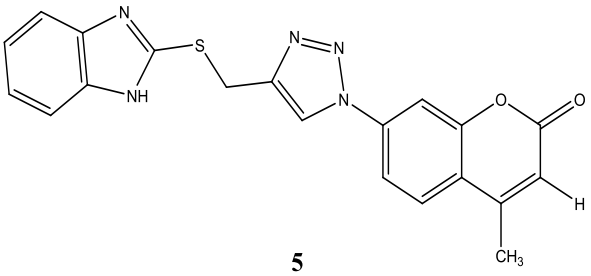
2



3



4



5

3.6 Priprava otopina

Matične (*stock*) otopine pripravljene su otapanjem spojeva **4** i **5** u 3 mL dimetil sulfoksida (DMSO). Potrebne mase spojeva **4** i **5** za pripravu matičnih otopina izračunate su pomoću jednadžbe (4):

$$m = c * M * V \quad (4)$$

gdje je c [mol dm^{-3}, M] koncentracija, M [g mol^{-1}] molarna masa tvari, V [dm^3] volumen otopine, a m [g] masa odvage potrebnog spoja. Koncentracije matičnih otopina iznose c = 1,03*10^{-3} M za spoj **4**, te c = 9,84*10^{-4} M za spoj **5**. Radne otopine ispitivanih spojeva različitih koncentracija pripravljene su razrjeđivanjem matičnih otopina.

Otopine univerzalnog pufera različitih vrijednosti pH pripravljene su miješanjem otopine A koja se sastoji od 100 mL 0,33 M otopine citratne kiseline, 100 mL 0,39 M otopine fosforne kiseline, 343 mL 1 M otopine NaOH i 3,54 g borne kiseline. Određeni volumen otopine A i otopine B (0,1 M otopina HCl) stavlja se u odmjernu tikvicu prema jednadžbi (5), te se nadopuni do oznake deioniziranom vodom.[25]

$$20 \text{ mL } A + x \text{ mL } B \text{ (u 100 mL)} \quad (5)$$

x (B) = volumen klorovodične kiseline (mL)

Otopine metalnih soli $HgCl_2$, $FeCl_3$, $AgNO_3$, $CuCl_2$, $ZnCl_2$, $AlCl_3$, $CaCl_2$ i LiCl pripravljene su u etanolu. Otapanjem odvage krutina između 1 mg i 3 mg dobivene su matične otopine koncentracija između c = 1,66*10^{-3} i c = 20,4*10^{-3} čijim su razrjeđivanjem pripravljene radne otopine u rasponu koncentracije c = 1*10^{-6} M do c = 5*10^{-4} M.

3.7 Mjerenja

Otopine spojeva **4** i **5** spektralno su okarakterizirane UV-vidljivom apsorpcijskom i fluorescencijskom spektrofotometrijom. Snimani su apsorpcijski i emisijski spektri u univerzalnom puferu različitih vrijednosti pH te se ispitao utjecaj različitih organskih otapala i metalnih iona na njihova spektralna svojstva.

Svi spektri snimljeni su pri koncentraciji $c = 1*10^{-5}$ M koja je dobivena razrjeđivanjem matičnih otopina spojeva. Prije svakog snimanja spektra, snimljena je bazna linija čistog otapala.

3.7.1. Utjecaj promjene vrijednosti pH

Ispitivana su kiselo-bazna svojstva, odnosno utjecaj promjene pH vrijednosti na apsorpcijske i emisijske spektre spojeva **4** i **5**. Korištene su otopine univerzalnog pufera u rasponu vrijednosti pH od 2,03 do 12,02, te 0,1 M HCl vrijednosti pH=1,02. Alikvot spoja je stavljen u otopinu određene vrijednosti pH te su nakon 3 minute snimljeni apsorpcijski i emisijski spektri na valnim duljinama od 200 do 800 nm u kvarcnoj kiveti optičkog puta 10 mm. Kao valna duljina pobude korištena je valna duljina maksimuma apsorpcije.

Tablica 1. Eksperimentalni uvjeti pri kojima su snimani apsorpcijski i emisijski spektri

	UV-Vis	**FLUO**		
	c/ mol dm^{-3}	*c*/ mol dm^{-3}	*Slitovi* (H_2O)	$\lambda_{pobude}(H_2O)$/nm
spoj **4**	$1*10^{-5}$	$1*10^{-5}$	5-5	292
spoj **5**	$1*10^{-5}$	$1*10^{-5}$	5-5	285

3.7.2. Utjecaj otapala

Ispitivan je utjecaj različitih organskih otapala na spektralna svojstva spojeva **4** i **5**. Korištena otapala su: etil-acetat, dietil-eter, aceton, etanol, metanol, voda, acetonitril, tetrahidrofuran, diklormetan i dimetilsulfoksid. Otapala su odabrana prema parametru polarnosti $E_T(30)$. Koncentracija ispitivanih spojeva je $c = 1*10^{-5}$ M. Snimani su apsorpcijski i emisijski spektri na valnoj duljini od 200 do 700 nm. Alikvot matične otopine spoja dodan je u kivetu s određenim otapalom te je nakon 3 minute snimljen spektar. Kao valna duljina pobude korištena je valna duljina maksimuma apsorpcije. Slitovi korišteni pri snimanju emisijskih spektara su 5-10.

Tablica 2. Odabrana otapala različite polarnosti

otapalo	$E_T(30)/(\text{kcal mol}^{-1})$	$E_T^N(30)$
dietil-eter	34,5	0,117
THF	37,4	0,207
etil-acetat	38,1	0,228
diklormetan	40,7	0,309
aceton	42,2	0,355
DMSO	45,1	0,444
acetonitril	45,6	0,460
etanol	51,9	0,645
metanol	55,4	0,760
voda	63,1	1,000

Tablica 3. Eksperimentalni uvjeti za snimanje emisijskih spektara u različitim otapalima

	λ_{pobude}/nm									
	dietil-eter	THF	etil-acetat	diklormetan	aceton	DMSO	acetonitril	etanol	metanol	voda
spoj **4**	283	282; 290	283	283	325	292,1	283	283	283	292
spoj **5**	285	288; 293	285	285,9	327	294	285	285	291	285

3.7.3. Otopine različitih metalnih iona

Ispitivan je utjecaj različitih metalnih iona na intenzitet fluorescencije spojeva **4** i **5**. Korištene su otopine metalnih soli žive, aluminija, bakra, cinka, srebra, kalcija, litija i željeza. U kvarcnu kivetu, u kojoj je čisti etanol, dodavao se alikvot matične otopine spoja tako da koncentracija spoja bude $c = 1*10^{-5}$M. Radne otopine metalnih soli različitih koncentracija pripravljene su razrjeđivanjem matičnih otopina. Koncentracija metalnih iona se postepeno povećavala dodatkom novog alikvota u kivetu. Prije svakog snimanja intenziteta fluorescencije otopina se miješala 3 minute. Kao valne duljine pobude korištena je valna duljina maksimuma apsorpcije u etanolu. Bitno je naglasiti da su svi spekri za određeni spoj snimani pri istim eksperimentalnim uvjetima (slitovi, valna duljina pobude).

Tablica 4. Koncentracije otopina metalnih iona pri kojima su snimljeni emisijski i apsorpcijski spektri

	***c*/moldm^{-3}**
spoj **4** i **5**	$1*10^{-5}$
1. dodatak	$1*10^{-6}$
2. dodatak	$2*10^{-6}$
3. dodatak	$5*10^{-6}$
4. dodatak	$1*10^{-5}$
5. dodatak	$5*10^{-4}$

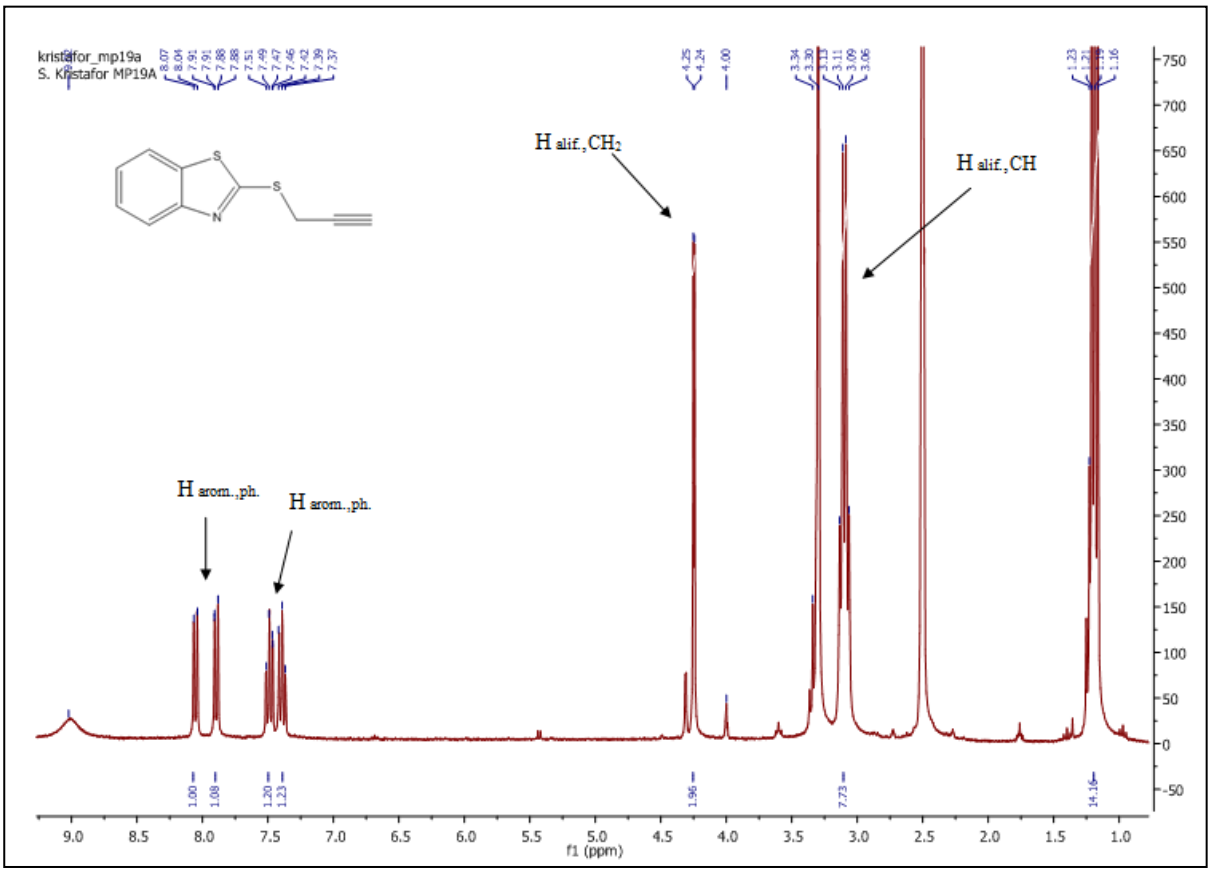
4. REZULTATI

4.1 Sinteza spojeva

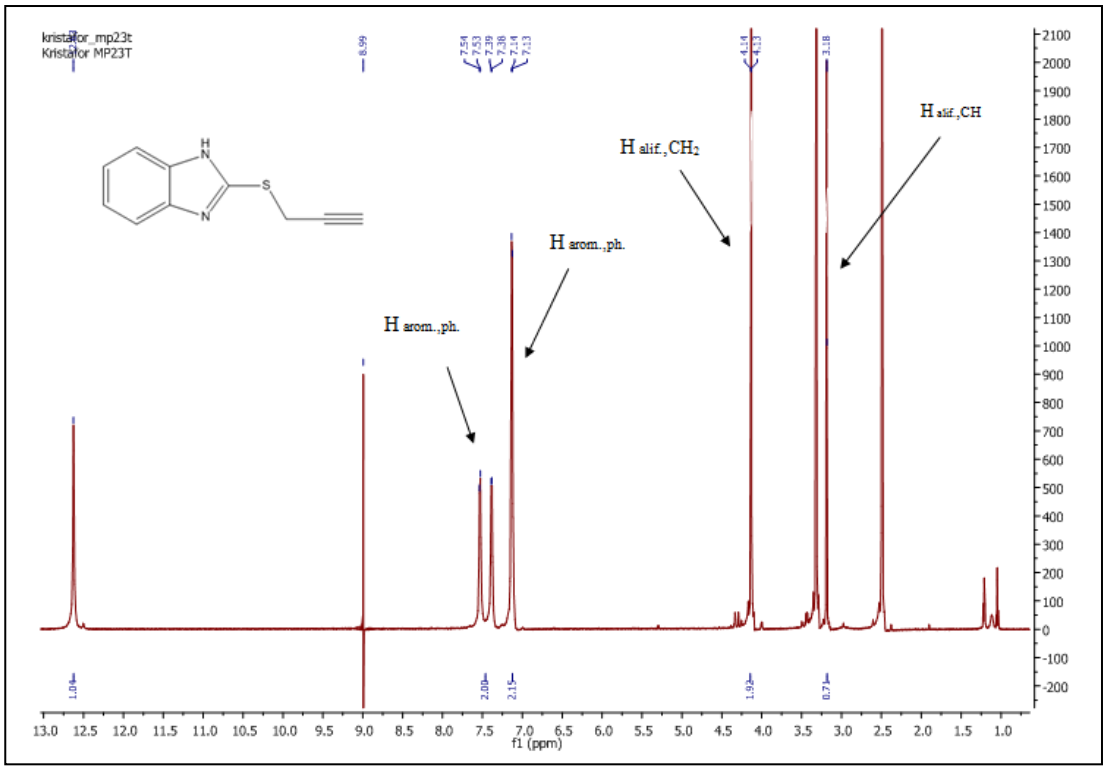
Trostupanjskom sintezom uspješno su pripravljeni spojevi **4** i **5** reakcijama klasične organske sinteze i click reakcijom terminalnog alkina i azida.

4.1.1. Analiza ^{1}H-NMR spektara

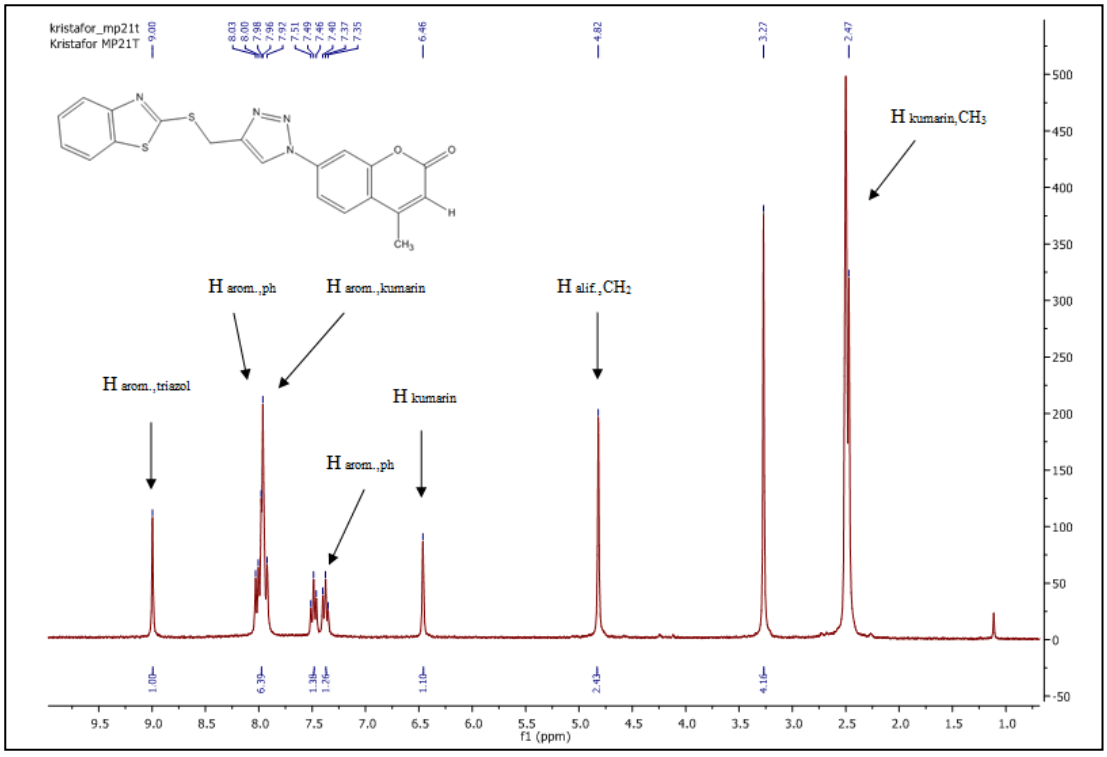
Za identifikaciju sintetiziranog spoja snimljeni su ^{1}H-NMR spektri na spektrometrima Varian Gemini 300 na 300 MHz i instrumentu Bruker AV-600 na 300 MHz. Uzorak je otopljen u DMSO-*d6* i mjeren pri 298 K. Kemijski pomaci (δ) u spektrima izraženi su u ppm (*part per million*) u odnosu prema signalu DMSO: δ 2,50 ppm za 1H. Struktura sintetiziranog spoja određena je na temelju kemijskih pomaka, veličine signala i multipliciteta spin-spin sprega između jezgara H-H. Kemijski pomaci i konstante sprege u spektrima ^{1}H-NMR za sintetizirane spojeve navedeni su u pripravi spojeva.



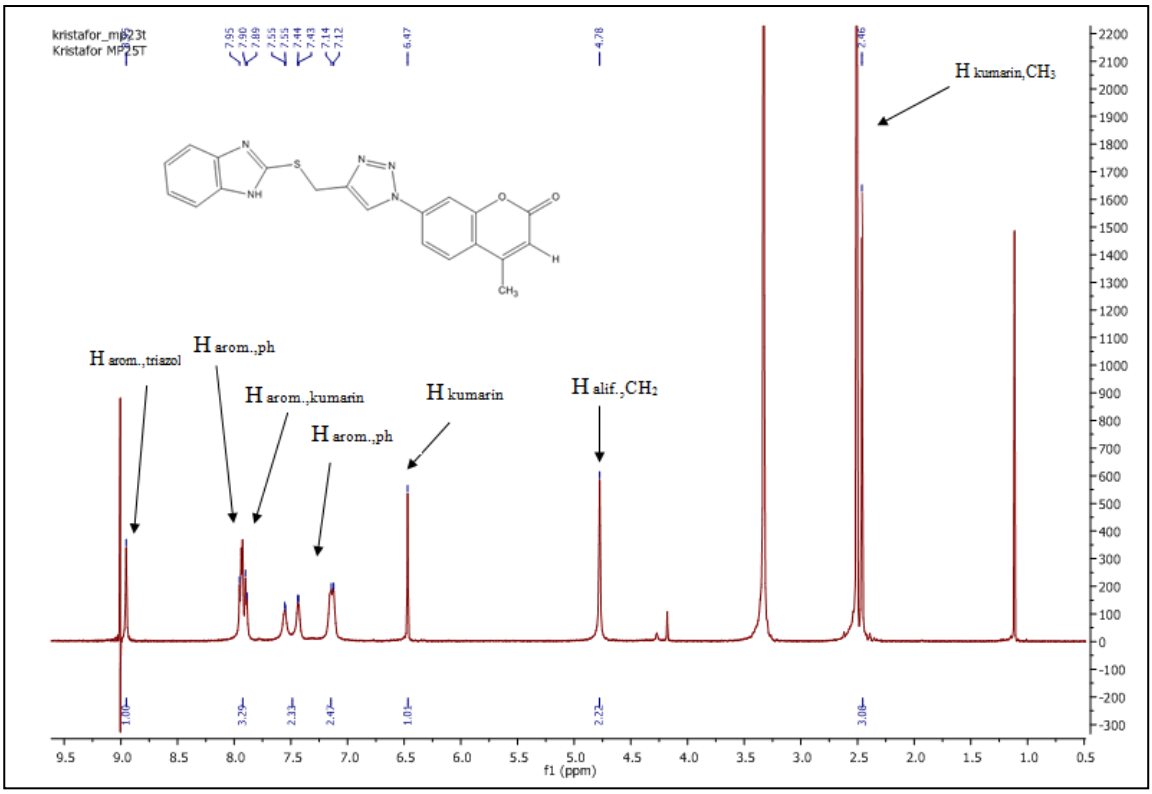
Slika 16. ^{1}H-NMR spektar spoja **1**



Slika 17. ^{1}H-NMR spektar spoja **2**



Slika 18. ^{1}H-NMR spektar spoja **4**



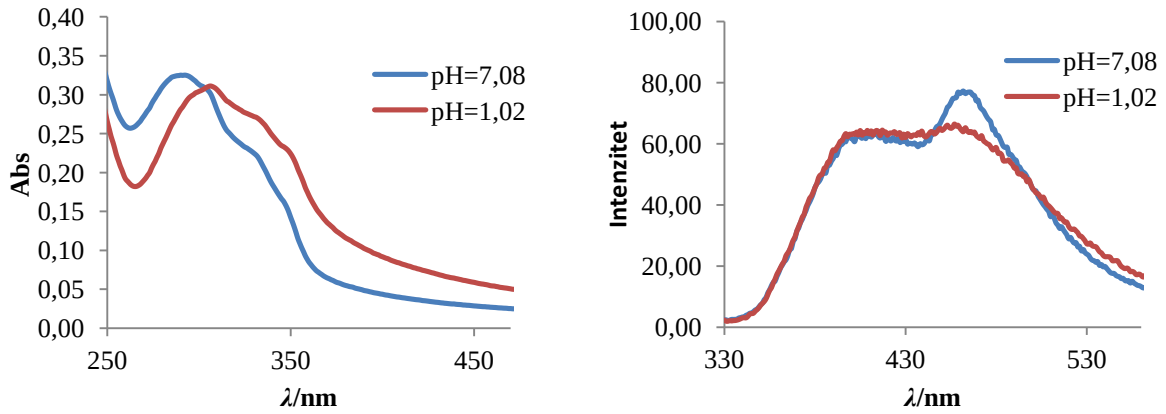
Slika 19. ^{1}H-NMR spektar spoja **5**

4.2 Spektralna karakterizacija ispitivanih spojeva u otopini

4.2.1 Utjecaj promjene vrijednosti pH

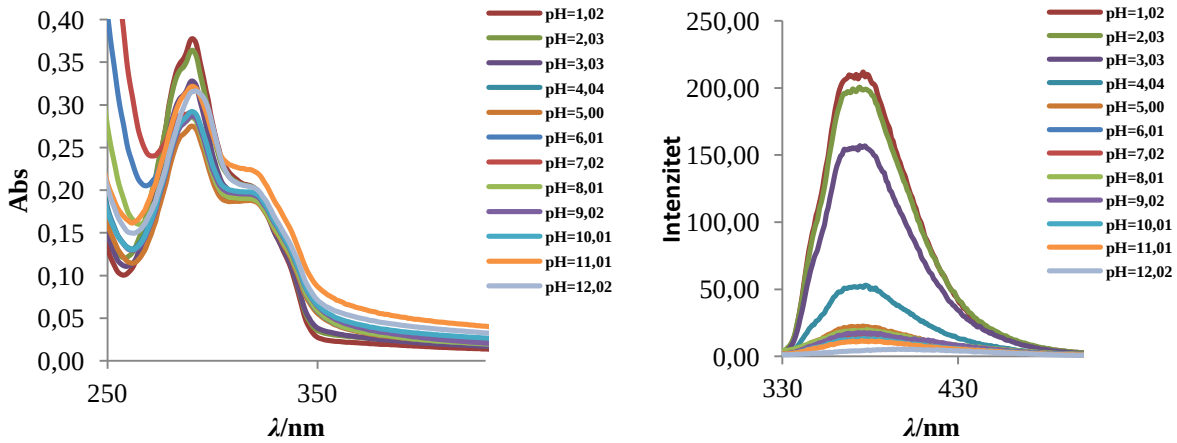
Promjena spektrofotometrijskih svojstava ispitivanih spojeva ovisno o vrijednosti pH, ključno je svojstvo optičkih pH senzora. Kiselo-bazna svojstva spojeva u otopinama univerzalnog pufera prikazana su na **Slici 20.** za spoj **4**, te na **Slici 21.** za spoj **5**.

a) b)



Slika 20. a) apsorpcijski spektri; b) emisijski spektri spoja **4** pri kiselim i neutralnim vrijednostima pH

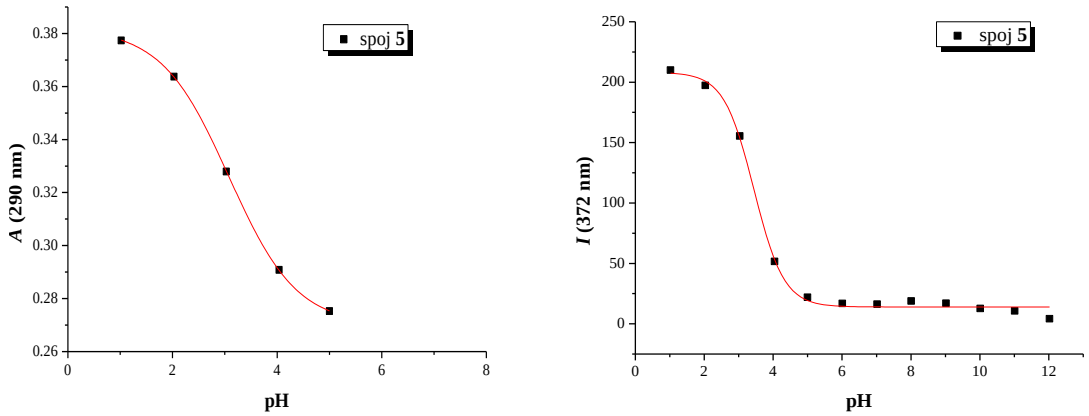
a) b)



Slika 21. a) apsorpcijski spektri; b) emisijski spektri spoja **5** u otopinama univerzalnog pufera različitih vrijednosti pH

Slika 22. prikazuje kalibracijske krivulje ovisnosti apsorbancije i intenziteta fluorescencije o vrijednosti pH za spoj **5** na temelju koje su određene uvjetne pK_a vrijednosti.

a) b)



Slika 22. a) ovisnost apsorbancije na valnoj duljini od 290 nm o vrijednosti pH za spoj **5**; b) ovisnost intenziteta fluorescencije na valnoj duljini od 372 nm o vrijednosti pH za spoj **5**

Tablica 5. Prikaz vrijednosti Stokesovih pomaka i uvjetne (*apparent*) pK_a spoja **5**

	Stokesov pomak / nm	**p$K_{a\ app}$**	
		apsorbancija	emisija
spoj **5**	82	3,08	3,44

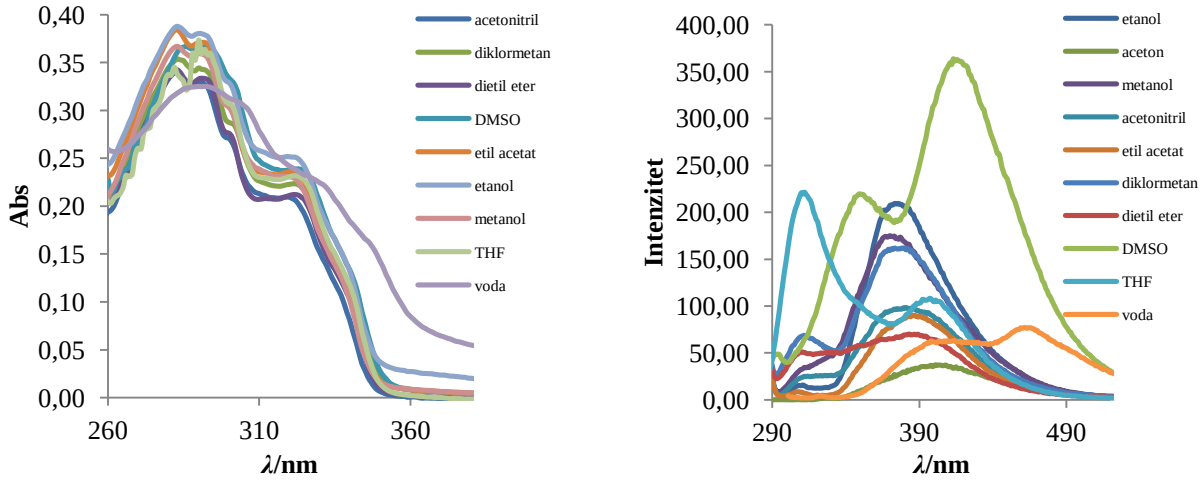
Tablica 6. Prikaz vrijednosti apsorbancije i molarnog ekstincijskog koeficijenta za vrijednosti pH od 1,02 do 12,02 spoja **5**

pH	**λ_{abss}/nm**	**Apsorbancija**	**λ_{emiss}/nm**	**Intenzitet fluorescencije**	**ε*10^4/dm^3 mol^{-1} cm^{-1}**
1,02	290	0,38	372	209,99	37737,60
2,03	290	0,36	372	197,37	36370,92
3,03	290	0,33	372	155,48	32790,02
4,04	290	0,29	372	51,63	29079,29
5,00	290	0,28	372	22,04	27524,75
6,01	290	0,29	372	16,87	29138,71
7,02	290	0,29	372	16,26	29079,71
8,01	290	0,29	372	18,94	28556,93
9,02	290	0,29	372	17,04	28680,32
10,01	290	0,29	372	12,73	29208,16
11,01	290	0,32	372	10,72	32153,96
12,02	290	0,32	372	4,18	31504,74

4.2.2 Utjecaj otapala

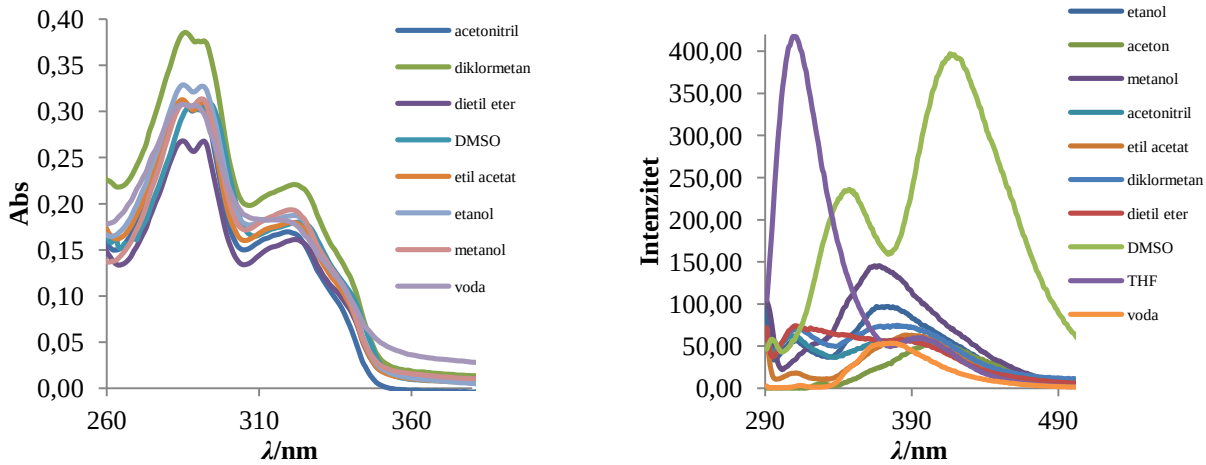
Na **Slikama 23.** i **24.** prikazani su apsorpcijski i emisijski spektri spoja **4** i **5** u različitim otapalima.

a) b)



Slika 23. a) apsorpcijski spektar; b) emisijski spektar spoja **4** u različitim otapalima snimljeni u istim eksperimentalnim uvjetima

a) b)



Slika 24. a) apsorpcijski spektar; b) emisijski spektar spoja **5** u različitim otapalima snimljeni u istim eksperimentalnim uvjetima

Tablica 7. Apsorpcijski maksimumi spojeva **4** i **5** u različitim otapalima

	λ_{abs}/nm									
	dietil eter	THF	etil acetat	diklormetan	aceton	DMSO	acetonitril	etanol	metanol	voda
spoj **4**	290	290	283	283	-	292	283	283	283	292
spoj **5**	285	-	285	286	-	294	291	285	291	285

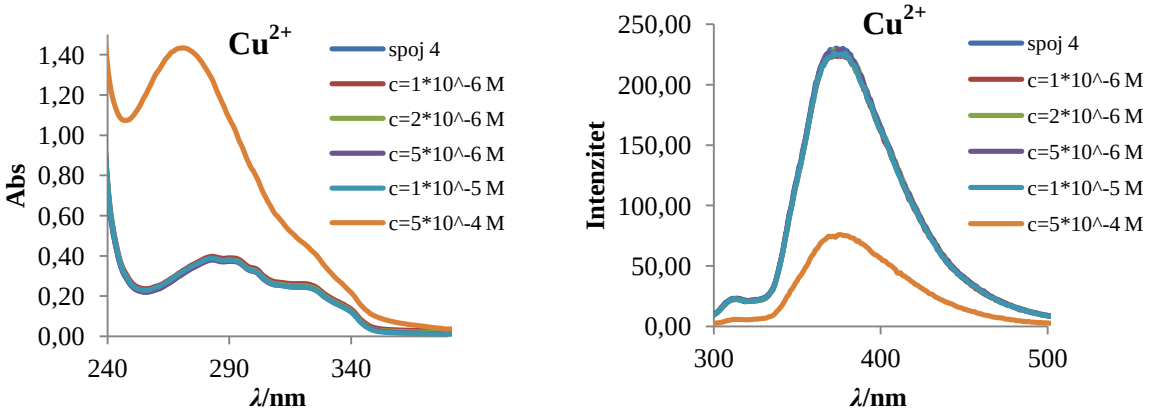
Tablica 8. Emisijski maksimumi spojeva **4** i **5** u različitim otapalima

	λ_{emiss}/nm									
	dietil-eter	THF	etil-acetat	diklormetan	aceton	DMSO	acetonitril	etanol	metanol	voda
spoj **4**	383	312; 395	386	312; 378	408	349; 413	381	374	373	462
spoj **5**	311	310; 394	387	313; 377	405	347; 416	309; 395	311; 374	291; 362	378

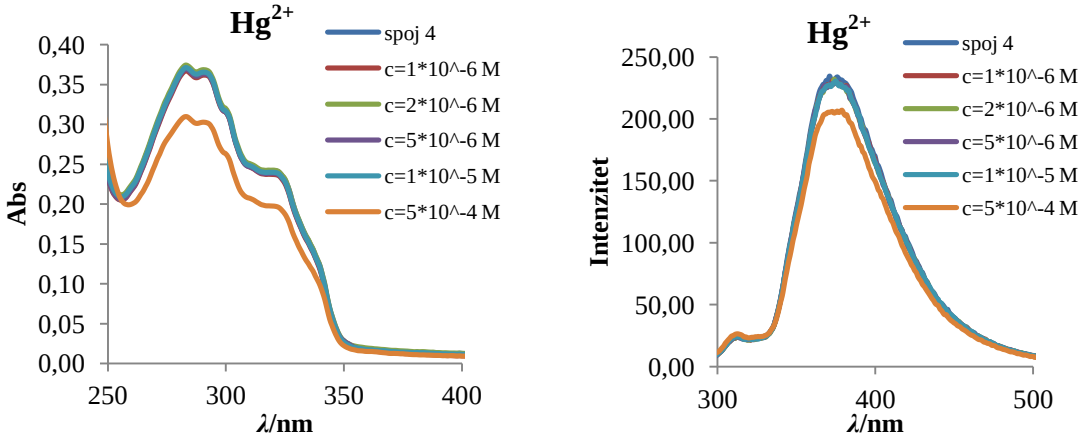
4.2.3 Otopine različitih metalnih iona

Ispitana je mogućnost kompleksiranja metalnih iona Ag^{+}, Cu^{2+}, Fe^{3+}, Hg^{2+}, Zn^{2+}, Al^{3+}, Ca^{2+} i Li^{+} i novosintetiziranih spojeva **4** i **5**. Na **Slikama 25.** i **26.** prikazani su apsorpcijski i emisijski spektri spojeva **4** i **5** u prisutnosti različitih koncentracija ispitivanih metalnih iona.

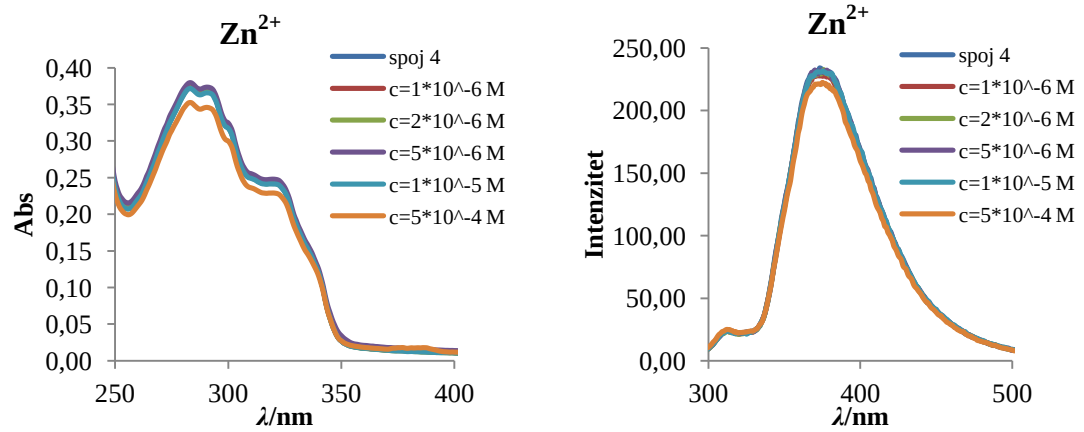
a)



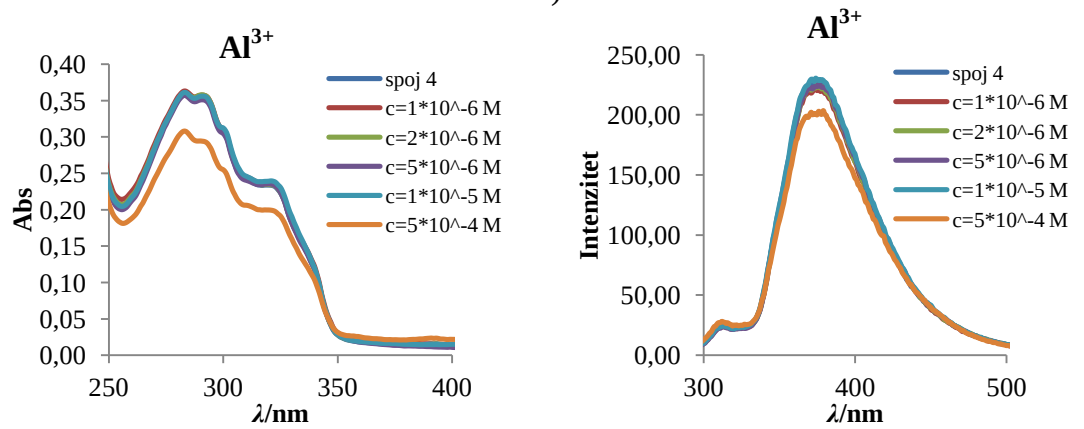
b)


Hg2+
spoj 4
c=1*10^-6 M
c=2*10^-6 M
c=5*10^-6 M
c=1*10^-5 M
c=5*10^-4 M
Abs
λ/nm
Intenzitet

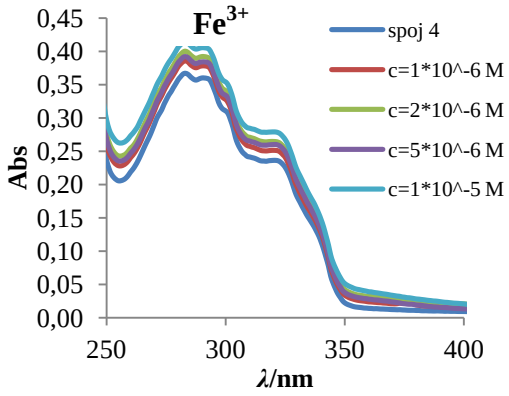
c)

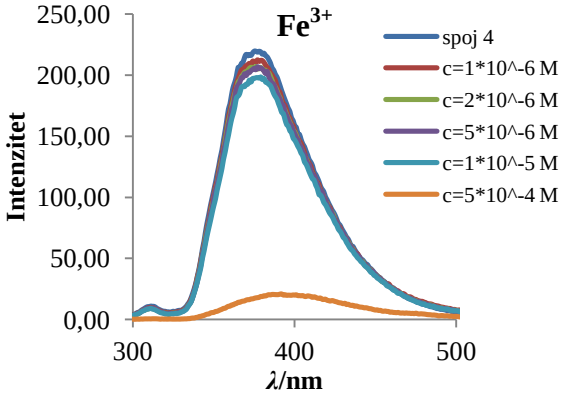

Zn2+
spoj 4
c=1*10^-6 M
c=2*10^-6 M
c=5*10^-6 M
c=1*10^-5 M
c=5*10^-4 M
Abs
λ/nm
Intenzitet

d)

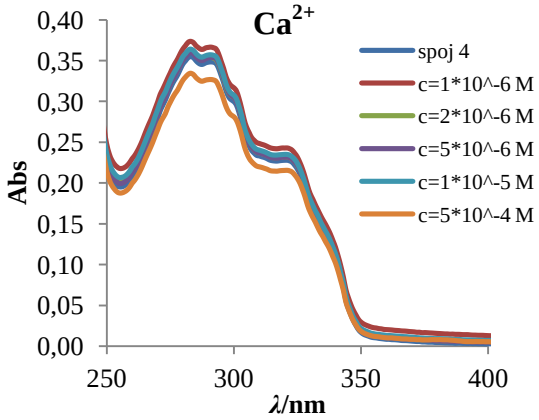

Al3+
spoj 4
c=1*10^-6 M
c=2*10^-6 M
c=5*10^-6 M
c=1*10^-5 M
c=5*10^-4 M
Abs
λ/nm
Intenzitet

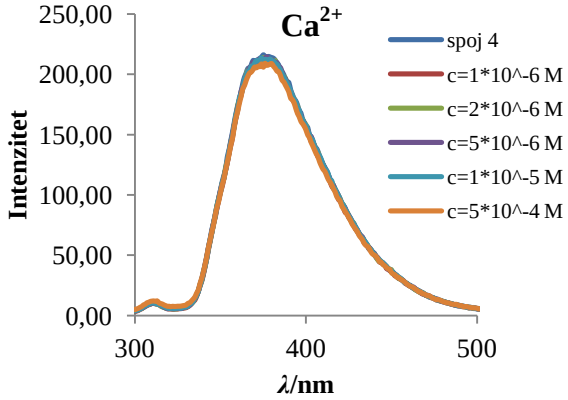
e)


Fe3+
Abs
λ/nm
spoj 4
c=1*10^-6 M
c=2*10^-6 M
c=5*10^-6 M
c=1*10^-5 M

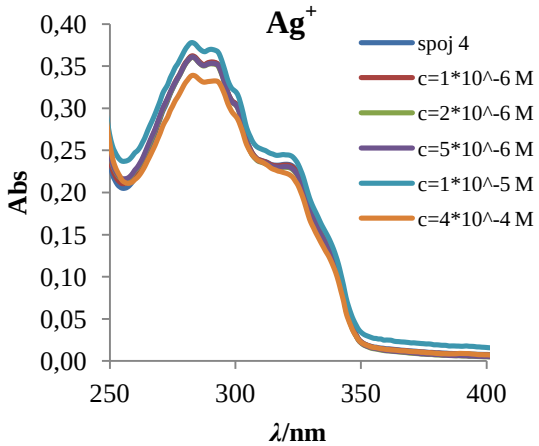

Fe3+
Intenzitet
λ/nm
spoj 4
c=1*10^-6 M
c=2*10^-6 M
c=5*10^-6 M
c=1*10^-5 M
c=5*10^-4 M

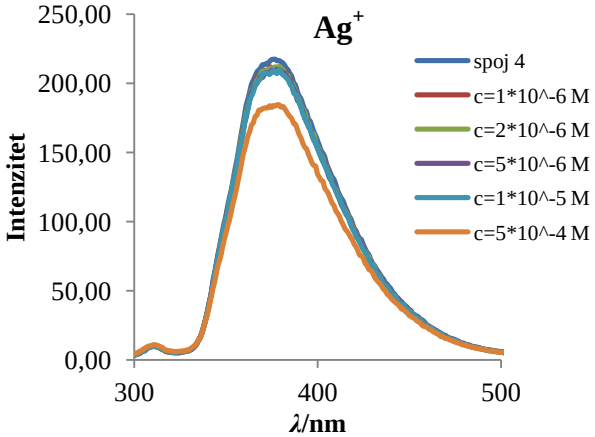
f)


Ca2+
Abs
λ/nm
spoj 4
c=1*10^-6 M
c=2*10^-6 M
c=5*10^-6 M
c=1*10^-5 M
c=5*10^-4 M

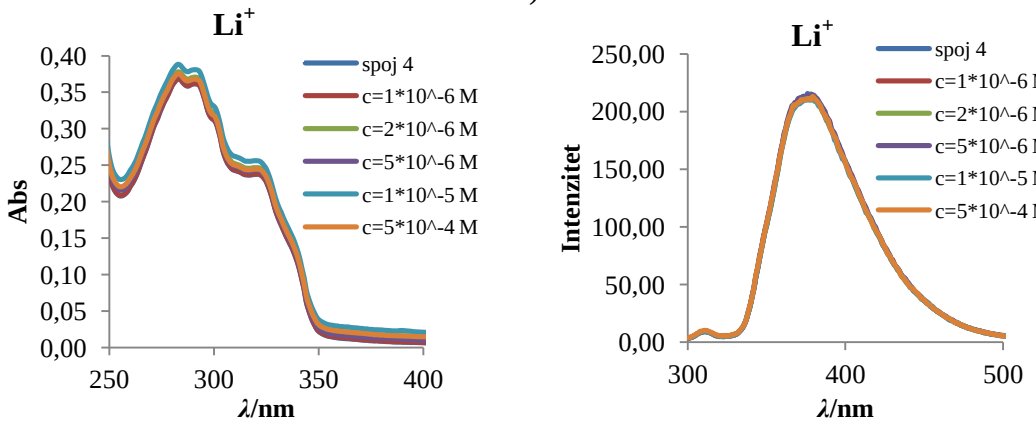

Ca2+
Intenzitet
λ/nm
spoj 4
c=1*10^-6 M
c=2*10^-6 M
c=5*10^-6 M
c=1*10^-5 M
c=5*10^-4 M

g)


Ag+
Abs
λ/nm
spoj 4
c=1*10^-6 M
c=2*10^-6 M
c=5*10^-6 M
c=1*10^-5 M
c=4*10^-4 M

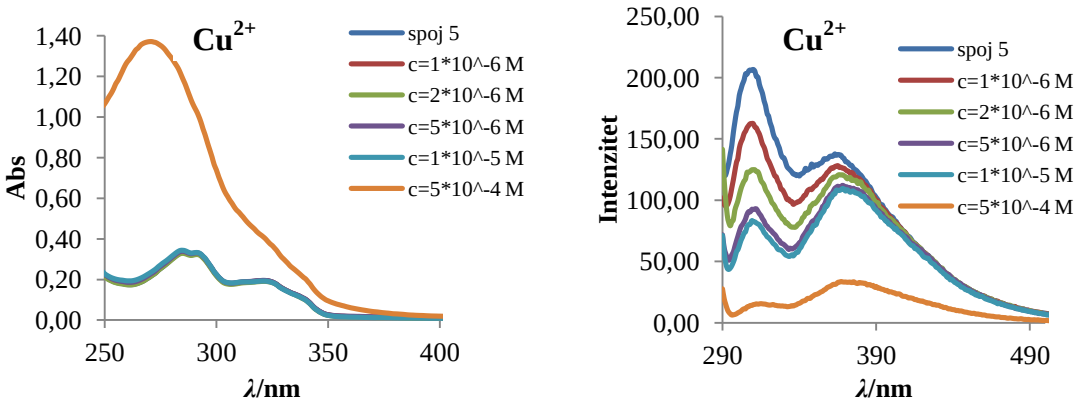

Ag+
Intenzitet
λ/nm
spoj 4
c=1*10^-6 M
c=2*10^-6 M
c=5*10^-6 M
c=1*10^-5 M
c=5*10^-4 M

h)

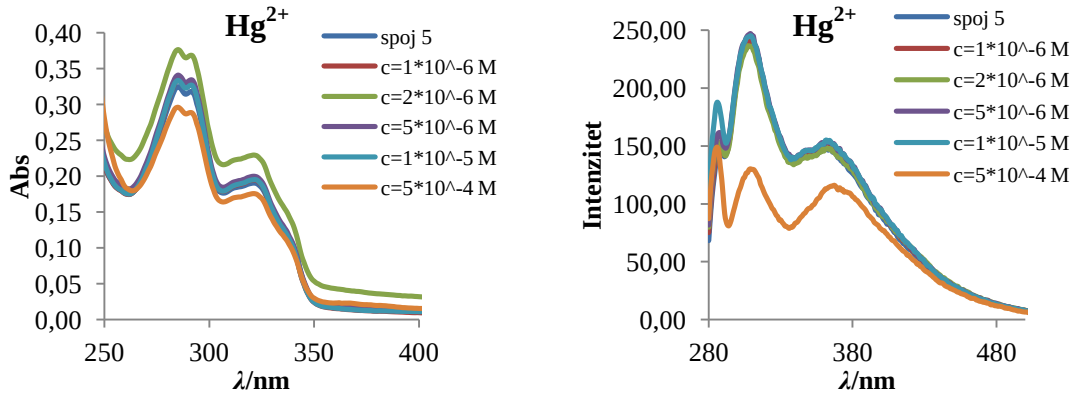


Slika 25. Apsorpcijski i emisijski spektri različitih koncentracija metalnih iona a) Cu^{2+}; b) Hg^{2+}; c) Zn^{2+}; d) Al^{3+}; e) Fe^{3+}; f) Ca^{2+}; g) Ag^{+} i h) Li^{+} za spoj **4**, *c* = 1*10^{-5} M

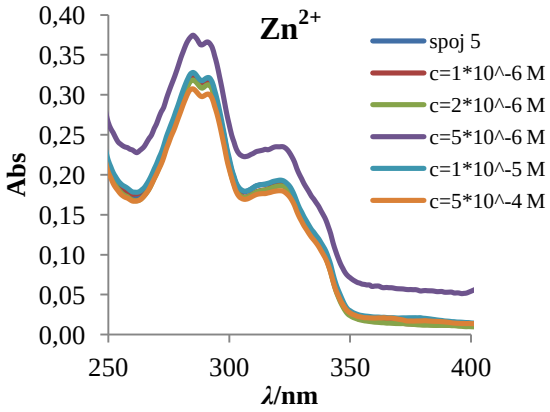
a)

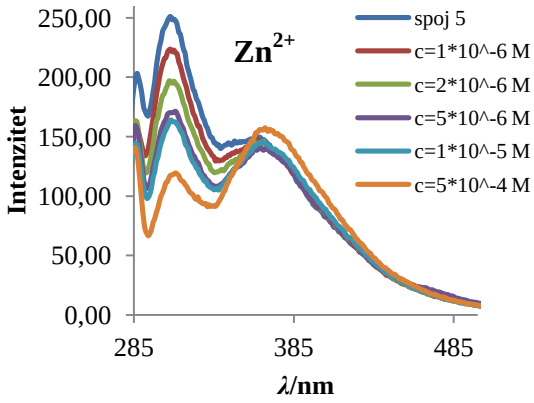


b)

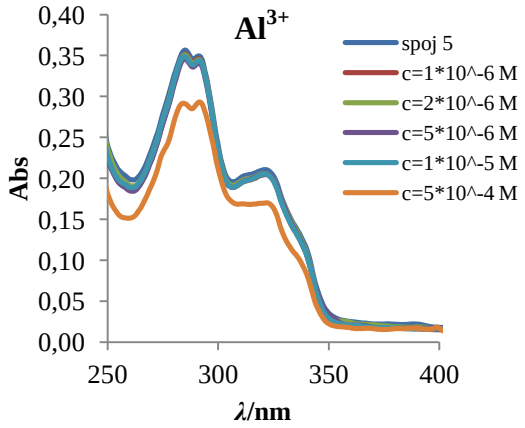


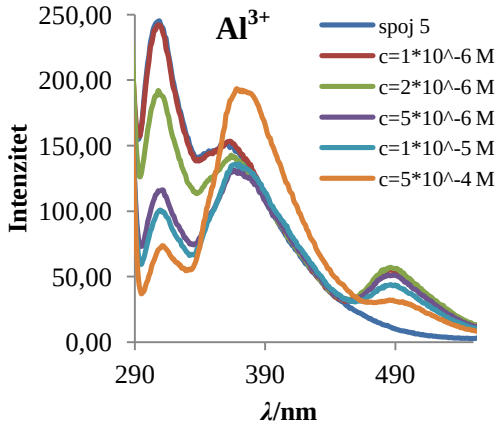
c)


Zn2+
spoj 5
c=1*10^-6 M
c=2*10^-6 M
c=5*10^-6 M
c=1*10^-5 M
c=5*10^-4 M
Abs
λ/nm

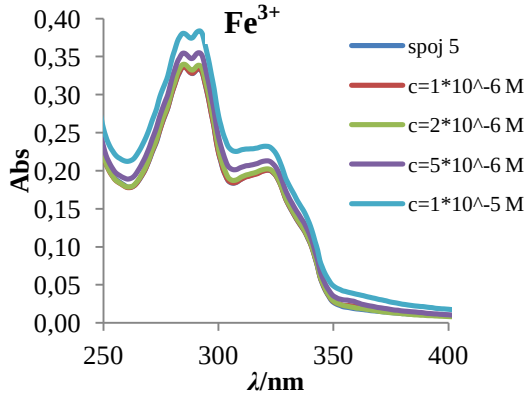

Zn2+
spoj 5
c=1*10^-6 M
c=2*10^-6 M
c=5*10^-6 M
c=1*10^-5 M
c=5*10^-4 M
Intenzitet
λ/nm

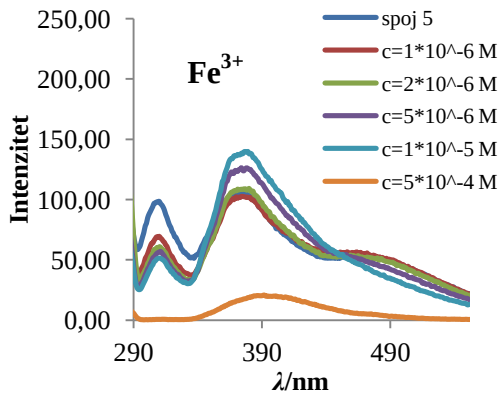
d)


Al3+
spoj 5
c=1*10^-6 M
c=2*10^-6 M
c=5*10^-6 M
c=1*10^-5 M
c=5*10^-4 M
Abs
λ/nm

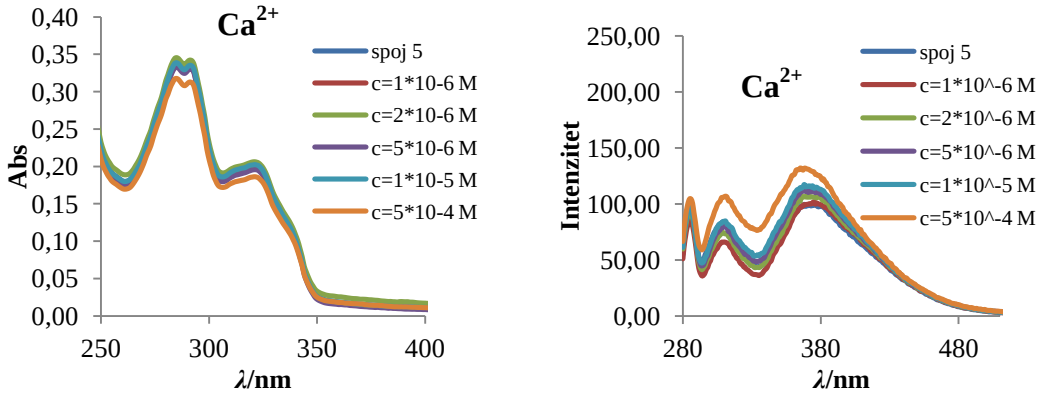

Al3+
spoj 5
c=1*10^-6 M
c=2*10^-6 M
c=5*10^-6 M
c=1*10^-5 M
c=5*10^-4 M
Intenzitet
λ/nm

e)

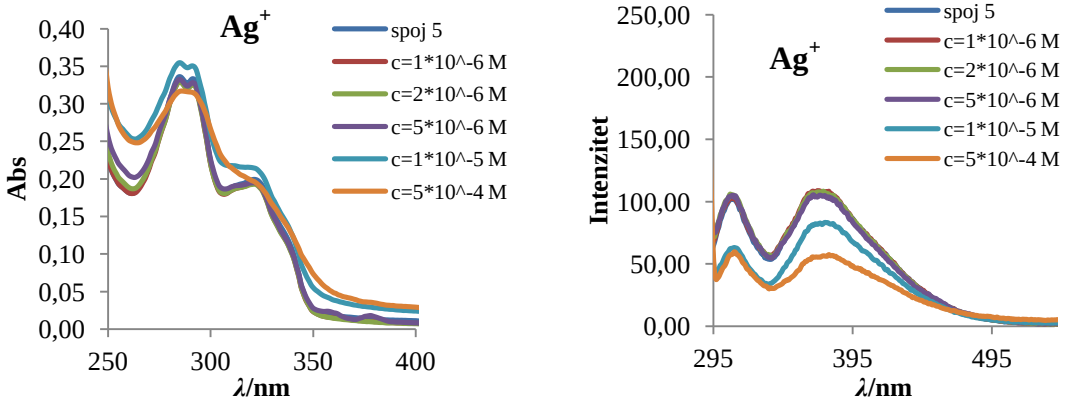

Fe3+
spoj 5
c=1*10^-6 M
c=2*10^-6 M
c=5*10^-6 M
c=1*10^-5 M
Abs
λ/nm


Fe3+
spoj 5
c=1*10^-6 M
c=2*10^-6 M
c=5*10^-6 M
c=1*10^-5 M
c=5*10^-4 M
Intenzitet
λ/nm

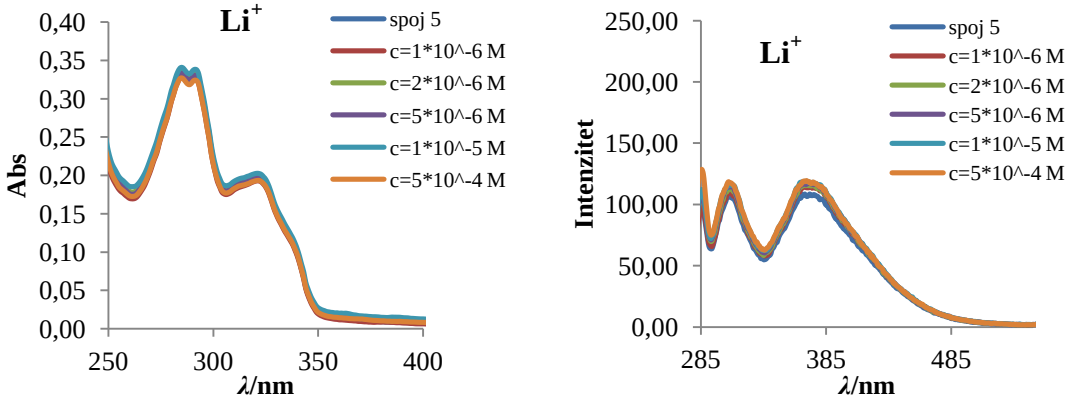
f)



g)

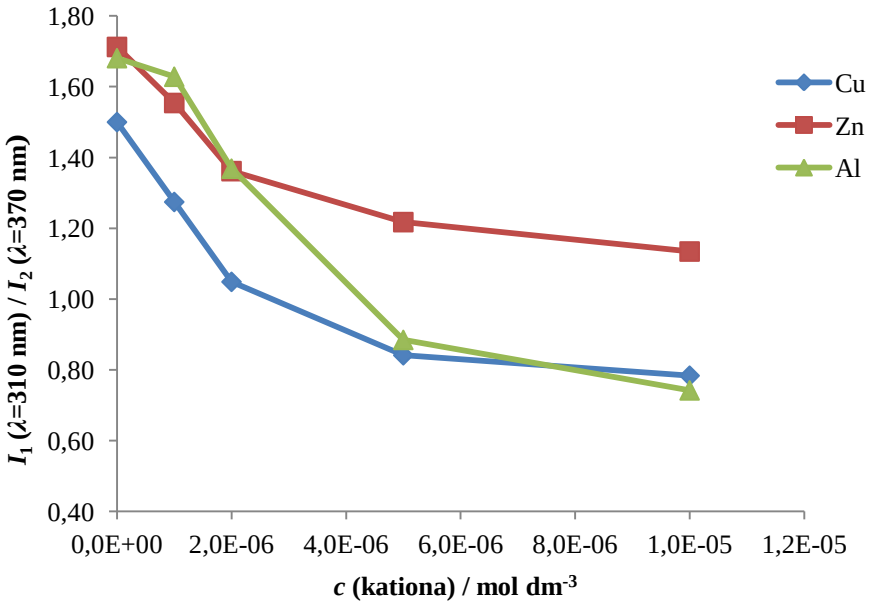


h)



Slika 26. Apsorpcijski i emisijski spektri različitih koncentracija metalnih iona a) Cu^{2+}; b) Hg^{2+}; c) Zn^{2+}; d) Al^{3+}; e) Fe^{3+}; f) Ca^{2+}; g) Ag^{+} i h) Li^{+} za spoj **5**, $c = 1*10^{-5}$ M

Prema dobivenim rezultatima, odnosno ovisnosti intenziteta fluorescencije o valnoj duljini, konstruiran je graf ovisnosti omjera intenziteta emisije na dvije valne duljine u odnosu na koncentraciju iona Cu^{2+}, Zn^{2+} i Al^{3+} spoja **5**. (**Slika 27.**)



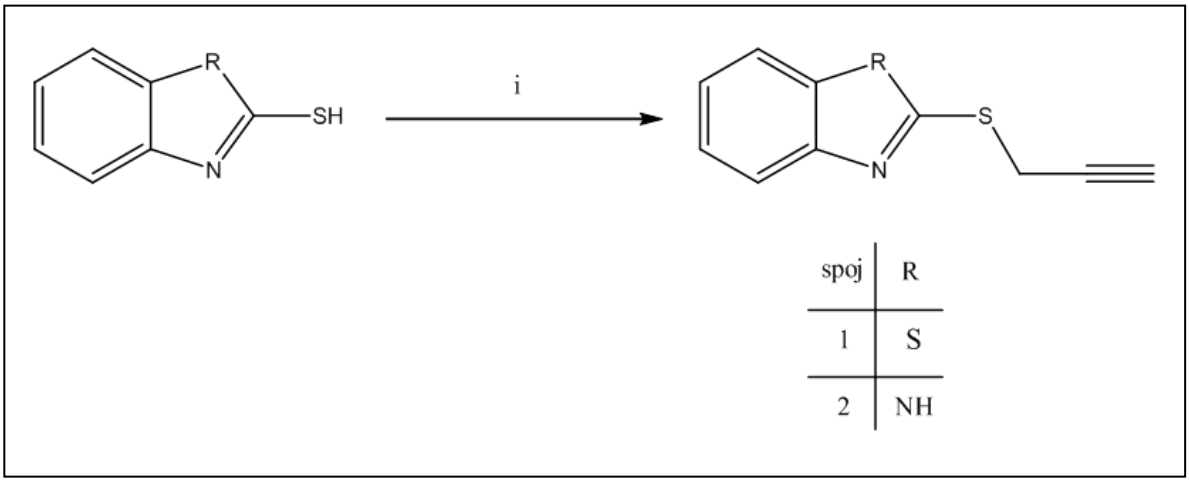
Slika 27. Ovisnost omjera intenziteta emisije na dvije valne duljine (310 nm i 370 nm) u odnosu na koncentraciju iona Cu^{2+}, Zn^{2+} i Al^{3+} spoja **5**

5. RASPRAVA

5.1. Sinteza spojeva

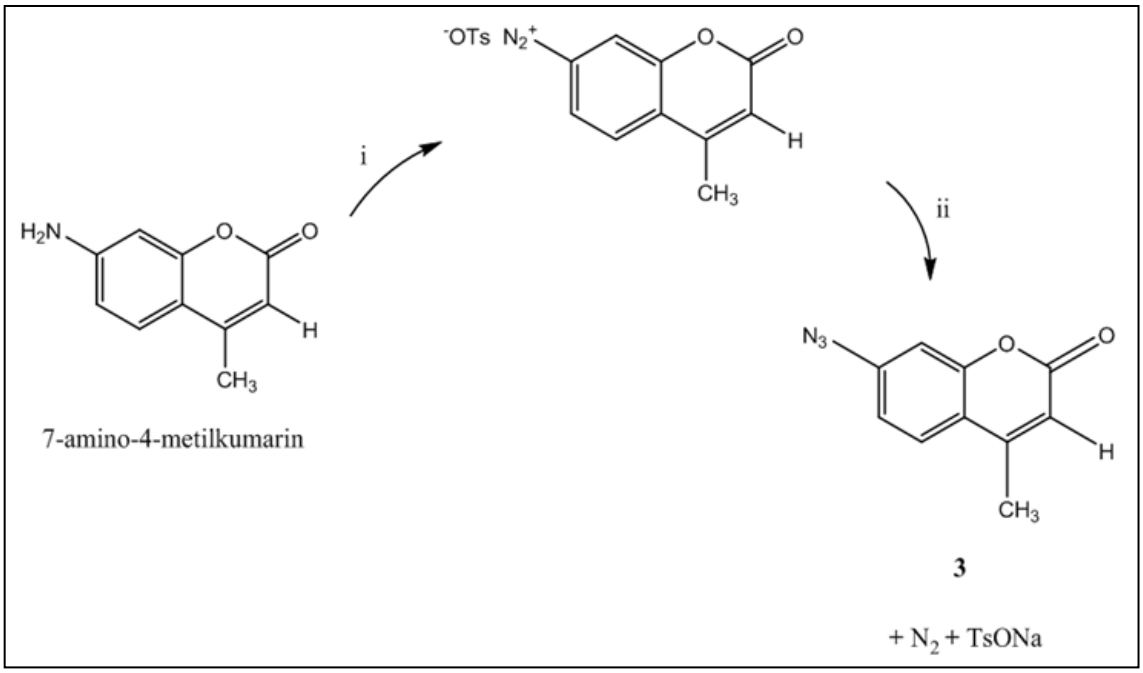
Željeni spojevi **4** i **5** dobiveni su klasičnom organskom sintezom u tri stupnja. Prvi stupanj obuhvaća alkiliranje 2-merkaptobenoztiazola za dobivanje spoja **1**, odnosno 2-merkaptobenzimidazola radi dobivanja spoja **2**.

Navedene reakcije provedene su pomoću propargil-bromida uz prisutnost baze kao deprotinirajućeg reagensa. Kao baza korišten je TEA. Na **Shemi 1.** prikazana je sinteza spojeva **1** i **2**.



Shema 1. (i) propargil-bromid, TEA, THF, refluks

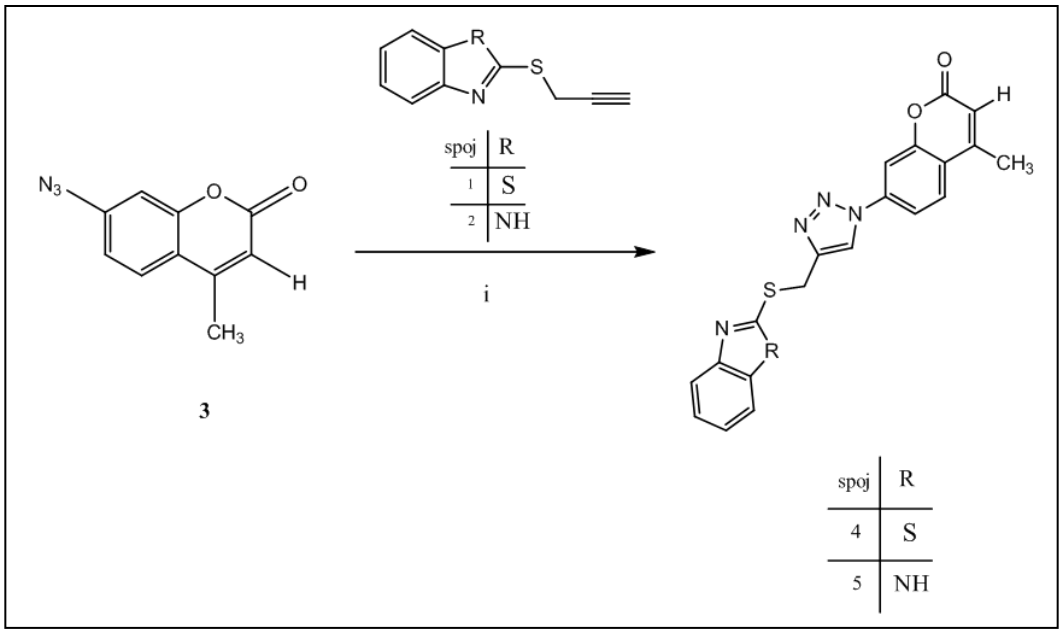
U sljedećem stupnju provedena je reakcija diazotacije 7-amino-4-metilkumarina s natrij nitritom u vodenoj otopini *p*-toluensulfonske kiseline, pri čemu nastaje odgovarajuća diazonijeva sol, koja u reakciji s natrijevim azidom daje spoj **3**. (**Shema 2.**)



Shema 2. (i) *p*-toluensulfonska kiselina, $NaNO_2$, H_2O
(ii) *p*-toluensulfonska kiselina, NaN_3

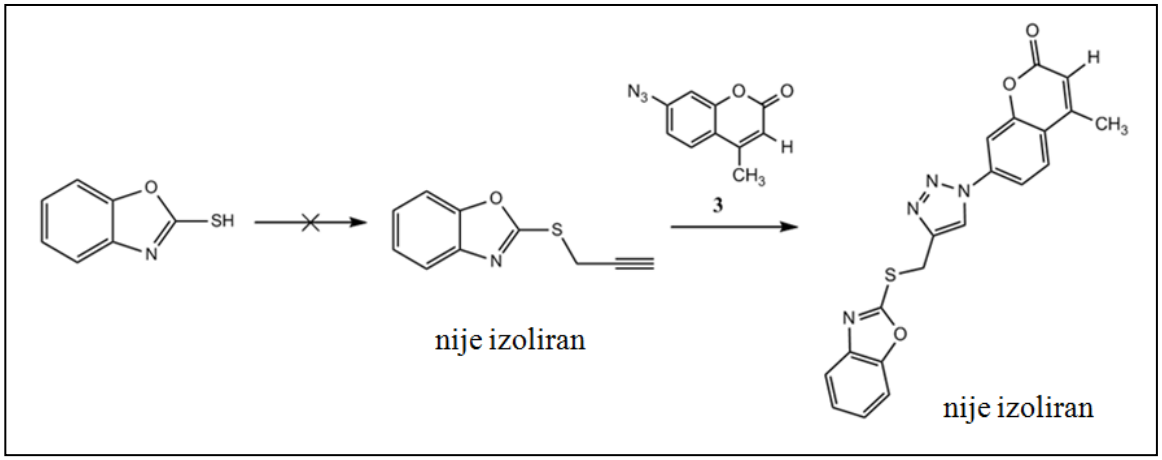
1,2,3-triazolni derivat benzotiazola i benzimidazola sintetiziran je CuAAC reakcijom prethodno sintetiziranog azida **3** sa spojevima **1** i **2**.

Kao katalizator korišteni su bakar (I) ioni koji nastaju *in situ* iz $CuSO_4$ x $5H_2O$ uz natrijev-askorbat kao reducens. Reakcije su provedene na sobnoj temperaturi, u smjesi otapala *t*-BuOH:H_2O =1:1. (**Shema 3.**)



Shema 3. (i) natrijev askorbat, $CuSO_4$ x $5H_2O$, t-BuOH: H_2O=1:1

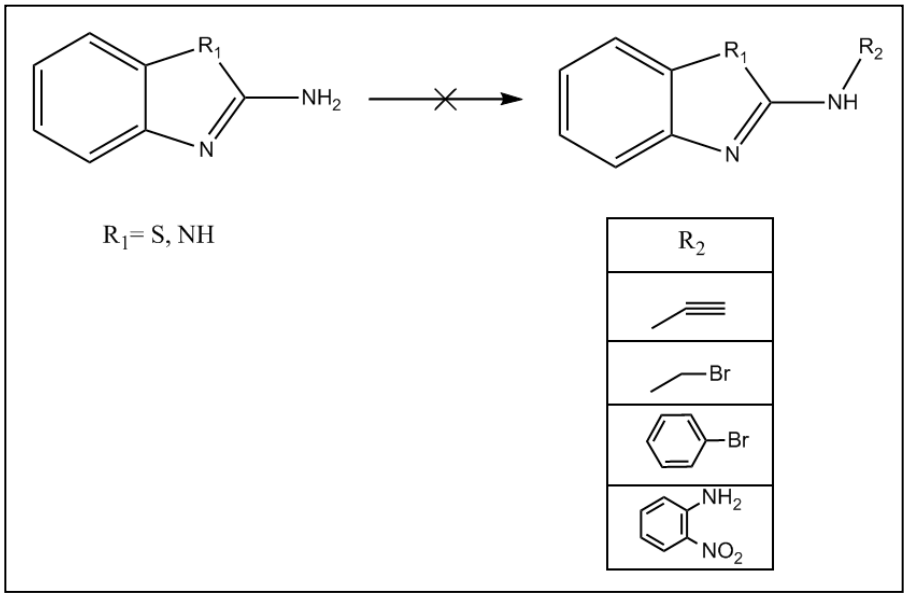
Na isti način provedena je i reakcija alkiliranja 2-merkaptobenzoksazola s propargil-bromidom, no 1,2,3-triazolni derivat bezoksazola nije izoliran. (**Shema 4.**)



Shema 4. Pokušaj sinteze spoja iz polazne molekule 2-merkaptobezoksazola

Osim reakcija provedenih sa tiolnom skupinom vezanom na benzazole (benzimidazol, benzotiazol i benzoksazol) korištena je i amino skupina kao supstituent na benzimidazolu i benzotiazolu, ali te reakcije nisu dale željene produkte. Alkiliranje je provođeno uz propargil-

bromid, dibrometan, *p*-dibrombenzen i 4-klor-2-nitroanilin. Kao deprotonirajući reagensi korišteni su kalijev karbonat (K_2CO_3) i natrijev hidrid (NaH). (**Shema 5.**)



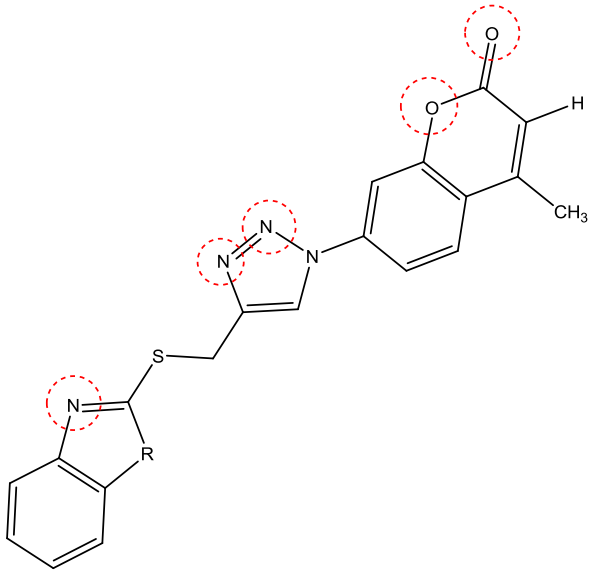
Shema 5. Pokušaj sinteze derivata benzazola

5.2. Spektrofotometrijska karakterizacija ispitivanih spojeva u otopini

Visoko konjugirane strukture spojeva **4** i **5**, protonabilna mjesta u molekulama te prisutnost kromofora čine ih potencijalnim pH senzorima i senzorima za metale. Ispitana su spektrofotometrijska svojstva ovisno o vrijednosti pH, polarnosti otapala te prisutnosti metalnih iona.

5.2.1. Utjecaj promjene vrijednosti pH

Ispitivanjem utjecaja promjene vrijednosti pH na spojeve **4** i **5** provjerila se mogućnost protoniranja molekula. Iz spektara je vidljivo da protoniranjem dolazi do promjene u valnim duljinama i intenzitetu fluorescencije. Na **Slici 28.** prikazana su moguća protonabilna mjesta ispitivanih spojeva.



Slika 28. Protonabilna mjesta spoja **4** i **5**

Iz apsorpcijskog spektra za spoj **4** u univerzalnom puferu (**Slika 20.**) uočavamo apsorpcijski maksimum na λ = 292 nm za pH vrijednost 7,08 dok za pH vrijednost 1,02 vidimo apsorpcijski maksimum na λ = 306 nm. Iz podataka vidimo da smanjenjem vrijednosti pH dolazi do malog batokromnog pomaka maksimuma apsorpcije. Također je vidljivo da intenzitet apsorpcije opada pri nižim vrijednostima pH. Što se tiče emisijskih spektara uočavamo dva maksimuma pri valnim duljinama 414 nm i 462 nm za pH vrijednost 7,08, a za kiseli medij imamo maksimume pri valni duljinama 417 nm i 460 nm. Vidimo blagi batokromni i hiperkromni pomak maksimuma na λ = 417 nm u kiselom mediju dok za maksimum na λ = 460 nm u kiselom mediju imamo hipsokromni i hipokromni pomak.

Na apsorpcijskim spektrima spoja **5** u univerzalnom puferu (**Slika 21.**) uočavamo vrlo malu promjenu maksimuma ($\Delta\lambda$ = 2 nm) dok intenzitet apsorpcije raste sniženjem vrijednosti pH. Kod emisijskih spektara uočavamo također malu promjenu maksimuma ($\Delta\lambda$ = 6 nm) osim za pH vrijednost 12,02 gdje vidimo značajniji batokromni pomak. Intenzitet emisije raste sniženjem vrijednosti pH.

Iz dobivenih spektara pH-metrijske titracije spoja **5** napravljene su krivulje odziva (**Slika 22.**) koje prikazuju ovisnost apsorbancije i intenziteta fluorescencije o promjeni vrijednosti pH. Obzirom da je odziv sigmoidalan, simulirana je Boltzmannova krivulja i dobivene su točke infleksije koje predstavljaju uvjetne pK_a vrijednosti. Dobivene pK_a nisu prave termodinamičke vrijednosti, nego ovise o uvjetima u kojima su određene.

Za račun su uzete vrijednosti na valnim duljinama maksimuma apsorpcije i emisije. Uvjetna pK_a vrijednost izračunata iz apsorpcijskih mjerenja iznosi pK_a = 3,08, a iz emisijskih iznosi pK_a = 3,44. Kako je dinamičko područje rada senzora obično ograničeno na pK_a ± 1,5, dobivene vrijednosti ukazuju na mogućnost primjene spoja kao pH senzora u kiselom mediju.

5.2.2. Utjecaj otapala

Na **Slikama 23.** i **24.** su prikazani apsorpcijski i emisijski spektri spojeva **4** i **5** u različitim otapalima, iz kojih se može uočiti da promjenom otapala dolazi do blage promjene valne duljine maksimuma apsorpcije i emisije i promjene intenziteta fluorescencije. Spoj **4** najslabije fluorescira u acetonu, dok najjači intenzitet fluorescencije pokazuje u DMSO-u.

Spoj **5** pokazuje najveći intenzitet fluorescencije u THF-u, dok najslabije fluorescira u acetonu. U DMSO-u su za oba spoja uočena dva emisijska maksimuma (λ = 349 nm i λ = 413 nm za spoj **4**, te λ = 347 nm i λ = 416 nm za spoj **5**). Najveća razlika u valnoj duljini emisije je uočena između THF-a (λ = 310 nm) i DMSO-a (λ = 416 nm).

5.2.3. Otopine različitih metalnih iona

Na **Slici 25.** prikazani su apsorpcijski i emisijski spektri spoja **4** različitih koncentracija metalnih iona. **Slika 25.** a) prikazuje utjecaj iona bakra na spoj **4** prema kojoj se može uočiti da samo najviša koncentracija iona bakra (c = 5*10^{-4} M) dovodi do smanjenja intenziteta fluorescencije, dok ostale koncentracije pokazuju gotovo identičan intenzitet kao spoj **4**. Do sličnog efekta dolazi i kod utjecaja iona žive, aluminija i srebra.

Na **Slici 25.** e) vidimo da spoj **4** pokazuje najveći intenzitet fluorescencije, a dodatkom iona željeza najmanje koncentracije c = 1*10^{-6} M taj intenzitet se smanjuje. Povećanjem koncentracije metalnih iona fluorescencija se smanjuje te pri najvećoj koncentraciji metalnih iona, c = 5*10^{-4} M, spoj **4** ima značajno manji intenzitet fluorescencije.

Kod utjecaja iona cinka, kalcija i litija na spoj **4** ne možemo uočiti značajnije promjene u intenzitetu fluorescencije porastom koncentracija iona. Zbog toga spoj **4** ne pokazuje potencijalnu senzorsku primjenu za ove ione.

Na **Slici 26.** prikazani su apsorpcijski i emisijski spektri spoja **5** različitih koncentracija metalnih iona. **Slika 26.** a) prikazuje utjecaj iona bakra na spoj **5** iz koje možemo vidjeti da najveći intenzitet fluorescencije pokazuje sam spoj **5**, dok se dodatkom bakrenih iona intenzitet smanjuje kako raste koncentracija iona. Utjecaj iona srebra pokazuje pad intenziteta

fluorescencije, ali uočeni pad nije pravilan s povećanjem koncentracije. Kod utjecaja iona cinka i aluminija na spoj **5** uočavamo pad intenziteta fluorescencije porastom koncentracije iona, a za najveću koncentraciju iona cinka i aluminija (c = 5*10^{-4} M) dodanih spoju **5** vidimo porast intenziteta fluorescencije za novonastali maksimum batokromnog pomaka. Kod utjecaja iona željeza vidimo smanjenje intenziteta fluorescencije maksimuma na nižim valnim duljinama koje je ovisno o porastu koncentracije iona željeza. Ioni kalcija pokazuju porast intenziteta fluorescencije u odnosu na sam spoj **5**. Kod utjecaja iona litija na spoj **5** nema značajnijih promjena u intenzitetu fluorescencije.

Utjecaj iona žive, željeza i kalcija na spoj **5** potrebno je dodatno ispitati.

Iz dobivenih rezultata vidljivo je da spoj **4** pokazuje potencijalnu senzorsku primjenu za metale u slučaju iona bakra, žive, aluminija, željeza i srebra; dok spoj **5** pokazuje potencijalnu senzorsku primjenu u slučaju iona bakra, cinka, aluminija i srebra.

Na **Slici 27.** prikazana je ovisnost omjera intenziteta emisije na dvije valne duljine u odnosu na koncentraciju iona Cu^{2+}, Zn^{2+} i Al^{3+} spoja **5** iz koje možemo vidjeti da povećanjem koncentracije kationa omjer intenziteta se mijenja. Ova tri kationa odabrana su jer njihovi emisijski spektri (**Slika 26.**) pokazuju najbolja svojstva za potencijalnu senzorsku primjenu.

6. ZAKLJUČAK

- Klasičnim metodama organske sinteze uspješno su pripravljeni spojevi **4** i **5** u nekoliko stupnjeva.
- Alkiliranje 2-merkaptobenzotiazola i 2-merkaptobenzimidazola s propargil-bromidom pokazalo se uspješno uz prisustvo trietilamina kao deprotonirajućeg reagensa; čime su dobiveni spojevi **1** i **2**.
- U slučaju alkiliranja 2-merkaptobenzoksazola nije dobiven željeni produkt, te su potrebna daljnja ispitivanja.
- Spoj **3** uspješno je pripravljen diazotacijom 7-amino-4-metilkumarina.
- CuAAC reakcijom dobivena je triazolna skupina koja je povezala sintetizirani azid **3** sa spojevim **1** i **2**.
- Isprobana je i amino skupina kao supstituent na benzimidazolu i benzotiazolu u reakcijama alkiliranja, ali nije bilo uspjeha.
- Spoj **5** pokazuje mogućnost korištenja kao pH senzor u kiselom mediju.
- Kod spojeva **4** i **5** uočen je solvatokromizam.
- Uočena je promjena spektrofotometrijskih svojstava zbog prisutnosti metalnih iona pa spojevi **4** i **5** pokazuju mogućnost upotrebe kao senzori za metale.
- Na **Slici 27.** prikazana je ovisnost omjera intenziteta emisije na dvije valne duljine u odnosu na koncentraciju iona Cu^{2+}, Zn^{2+} i Al^{3+} spoja **5** iz koje možemo vidjeti da povećanjem koncentracije kationa omjer intenziteta se mijenja. Ova tri kationa odabrana su jer njihovi emisijski spektri (**Slika 26.**) pokazuju najbolja svojstva za potencijalnu senzorsku primjenu.

7. LITERATURA

1. Hein, J. E., Fokin, V. V., Copper-catalyzed azide–alkyne cycloaddition (CuAAC) and beyond: new reactivity of copper(I) acetylides, Chem. Soc. Rev., **39** (2010) 1302-1315.

2. Lau, Y. H., Rutledge, P. J., Watkinson, M., M. Todd, H., Chemical sensors that incorporate click-derived triazoles, Chem. Soc. Rev., **40** (2011) 2848–2866.

3. Kolb, H. C., Finn, M. G., Sharpless, K. B., Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions, Angew. Chem. Int. Ed., **40** (2001) 2004-2021.

4. Daq, A., Durmaz, H., Kirmizi, V., Hizal, G.,Tunca, U., An easy way to the preparation of multi-miktoarm star block copolymers *via* sequential double click reactions, Polym. Chem., **1** (2010) 621-623.

5. Lutz, J.-F., Zarafshani, Z., Efficient construction of therapeutics, bioconjugates, biomaterials and bioactive surfaces using azide–alkyne "click" chemistry, Advanced Drug Delivery Rewiews, **60** (2008) 958-970.

6. Oppilliart, S., Mousseau, G., Zhang, L., Guochen, J., Thuery, P., Rousseau, B., Cintrat, J.-C., 1-Protected 5-amido 1,2,3-triazoles via ruthenium-catalyzed [3+2] cycloaddition of azides and ynamides, Tetrahedron, **63** (2007) 8094-8098.

7. Kamijo, S., Jin, T., Huo, Z., Yamamoto, Y., A one-pot procedure for the regiocontrolled synthesis of allyltriazoles via the Pd-Cu bimetallic catalyzed three-component coupling reaction of nonactivated terminal alkynes, allyl carbonate, and trimethylsilyl azide., J. Org. Chem., **69** (2004) 2386-2393.

8. a) Cox, J. R., Woodcock, S., Hillier, I.H., Vincent, M. A., Tautomerism of 1,2,3- and 1,2,4-triazole in the gas phase and in aqueous solution: a combined ab initio quantum mechanics and free energy perturbation study, J. Phys. Chem., **94** (1990) 5499-5501.

b) Ozimiński, W. P., Dobrowolski, J. Cz., Mazurek, A. P., DFT studies on tautomerism of C5-substitued 1,2,3-triazoles, J. of Mol. Struct., **651** (2003) 697-704.

9. http://www.organic-chemistry.org/namedreactions/huisgen-1,3-dipolar-cycloaddition.shtm (pristup 15. lipnja 2015.)

10. Majireck, M. M., Weinreb, S. M., A study of the scope and regioselectivity of the ruthenium-catalyzed [3 + 2]-cycloaddition of azides with internal alkynes, J. Org. Chem., **71** (2006) 8680-8683.

11. Juriček, M., Paul, H., Kouwer, J., Rowan, A. E., Triazole: a unique building block for the construction of functional materials, Chem. Comun., **47** (2011) 8740–8749.

12. Fraden, J., Handbook of modern sensors: physics, designs, and applications, third edition, Springer, 17 (2004) 499-520.

13. Lakowicz, J. R., Principles of Fluorescence Spectroscopy, third edition, Springer, 9 (2006) 334-335.

14. Pavia, D., Lampman, G. M., Kriz, G. S., Introduction to spectroscopy, third edition, Thomson Learning, 7 (2001) 353-356.

15. Owen, T., Fundamentals of modern UV-visible spectroscopy, Primer, Agilent Technologies, 1 (2000) 2-10.

16. Owen, T., Fundamentals of modern UV-visible spectroscopy, Primer, Agilent Technologies, 2 (2000) 30-37.

17. Lakowicz, J. R., Principles of Fluorescence Spectroscopy, third edition, Springer, 1 (2006) 1-30.

18. http://upendrats.blogspot.com/2014/06/molecular-luminescence-spectroscopy.html (pristup 15. lipnja 2015.)

19. Bryant, J. J., Bunz, U. H. F., Click To Bind: Metal Sensors, Chem. Asian J., **8** (2013) 1354-1367.

20. Joule, J. A., Mills, K., Heterocyclic Chemistry, fifth edition, Blackwell Publishing Ltd, 26 (2010) 503-511.

21. Padalkar, V., Ramasami, P., Sekar, N., TD-DFT Study of excited-state intramolecular proton transfer (ESIPT) of 2-(1,3-benzothiazol-2-yl)-5-(N,N-diethylamino)phenol with benzoxazole and benzimidazole analogues, Procedia Computer Science, **18** (2013) 797 – 805.

22. Esteves, C. I. C., Raposo, M. M. M., Costa, S. P. G., Synthesis and evaluation of benzothiazolyl and benzimidazolyl asparagines as amino acid based selective fluorimetric chemosensors for Cu^{2+}, Tetrahedron, **66** (2010) 7479-7486.

23. Ruan, Y.-B., Yu, Y., Li, C., Bogliotti, N., Tang, J., Xie, J., Triazolyl benzothiadiazole fluorescent chemosensors: a systematic investigation of 1,4- or 1,5-disubstituted mono- and bis-triazole derivatives, Tetrahedron, **69** (2013) 4603-4608.

24. Padalkar, V. S., Tathe, A., Gupta, V. D., Patil, V. S., Phatangare, K., Sekar, N., Synthesis and Photo-Physical Characteristics of ESIPT Inspired 2-Substituted Benzimidazole, Benzoxazole and Benzothiazole Fluorescent Derivatives, J. of Fluo., **22** (2012) 311-322.

25. Ciba-Geigy, A.G., Wissenschaftliche Tabellen Geigy: Physikalisch Chemie, Blut, Humangenetik, Stoffwechsel von Xenobiotika (Gebundene Ausgabe), Basel, (1979).

8. ŽIVOTOPIS

Matej Perković rođen je 6. siječnja 1992. godine u Zagrebu. Osnovnu školu završio je u Velikoj Gorici, te je 2006. godine upisao Opću gimnaziju u Velikoj Gorici. Po završetku srednjoškolskog obrazovanja upisao je 2010. godine Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije u Zagrebu, studij Primijenjene kemije. Godine 2013. obranio je završni rad iz polja organske kemije pod nazivom „Konjugati triazola i benzimidazola“ čime je stekao titulu sveučilišnog prvostupnika primijenjene kemije. Godine 2014. je sudjelovao je na X. Susretu mladih kemijskih inženjera u Zagrebu. Akademske godine 2013./2014. je upisao prvu godinu diplomskog studija Primijenjene kemije na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije. Aktivno se služi engleskim jezikom i pismom, a pasivno koristi talijanski jezik.