

# Uloga 1,2,3-triazola kao heteroaromatske gradivne jedinice u koordiniranju na metalne ione

---

Džanić, Emina

Undergraduate thesis / Završni rad

2017

*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:149:626639>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-12-26**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of Faculty of Chemical Engineering and Technology University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE  
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

**Emina Džanić**

**ULOGA 1,2,3-TRIAZOLA KAO HETEROAROMATSKE  
GRADIVNE JEDINICE U KOORDINIRANJU NA METALNE  
IONE**

ZAVRŠNI RAD

Zagreb, rujan 2017.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE  
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

**Emina Džanić**

**ULOGA 1,2,3-TRIAZOLA KAO HETEROAROMATSKE  
GRADIVNE JEDINICE U KOORDINIRANJU NA METALNE  
IONE**

ZAVRŠNI RAD

Voditelj rada: doc. dr. sc. Svjetlana Krištafor

Članovi ispitnog povjerenstva: Doc. dr. sc. Svjetlana Krištafor

Dr. sc. Ema Horak, asistent

Dr. sc. Nataša Perin, poslijedoktorand

Zagreb, rujan 2017.

*Zahvaljujem svojoj mentorici doc. dr. sc. Svjetlani Krištafor, na predloženoj temi i pomoći pri izradi ovog rada. Također zahvaljujem asistentici mag. appl. chem. Kristini Bobanović na velikom strpljenju, razumijevanju i kontinuiranoj podršci tijekom izrade ovog rada.*

## SAŽETAK

1,4-disupstituirani 1,2,3-triazoli sintetiziraju se bakrom kataliziranom azid alkin cikloadicijom (CuAAC, eng. *copper catalysed azide alkyne cycloaddition*), koja je ujedno i najzastupljenija *click* reakcija. 1,2,3-triazoli se zbog mogućnosti koordiniranja metalnih iona na svoje heteroatome uspješno primjenjuju u dizajnu i razvoju kemijskih senzora za metalne ione.

U ovom je radu prikazan pregled triazolnih fluorescentnih senzora za određivanje Zn(II), Al(III), Fe(III), Hg(II) i Cu(II) iona i fluorescentnih senzora za određivanje Cu(I) i Cu(II) iona temeljenih na benzazolnim derivatima. Također, objašnjeni su mehanizmi stvaranja fluorescentnog signala kao posljedica koordiniranja metalnih iona na senzorsku molekulu, te je predložena sinteza benziazolnog fluorescentnog senzora za određivanje metalnih iona s triazolnom jedinicom za koordiniranje iona.

Predložena višestupnjevita sinteza provedena je eksperimentalno, no benziazolni derivat 1,2,3-triazola nije uspješno izoliran.

### **Ključne riječi:**

*Click* kemija, 1,2,3-triazol, benziazol, optički senzori, fluorescencija, CuAAC.

## SUMMARY

Copper catalysed azide alkyne cycloaddition reaction (CuAAC), one of the most common click reaction, is used for 1,4-disubstituted 1,2,3-triazole synthesis. 1,2,3-triazoles are successfully applied in design and development of chemical sensors for metal ions because of their possibility to coordinate various metal ions.

This work gives a preview of fluorescent triazole derived sensors for Zn(II), Al(III), Fe(III), Hg(II) i Cu(II) ions and benzimidazole and benzothiazole sensors for Cu(I) and Cu(II) ions. Also, different metal coordination mechanisms are explained in this work and the synthesis of novel molecular sensor with benzothiazole and 1,2,3-triazole moiety is proposed.

The proposed synthesis, composed of multiple steps, was carried out, but the benzothiazole 1,2,3-triazole derivative was not successfully obtained.

### **Keywords:**

Click chemistry, 1,2,3-triazole, benzothiazole, optical sensors, fluorescence, CuAAC.

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>2. OPĆI DIO</b> .....	<b>3</b>
2.1. Triazoli .....	4
2.2. <i>Click</i> kemija .....	4
2.2.1. Sinteza 1,2,3-triazola azid alkin Huisgenovom cikloadicijom .....	7
2.2.2. Mehanizam bakrom(I) katalizirane azid alkin cikloadicije .....	8
2.2.3. Primjena <i>click</i> kemije .....	9
2.3. Kemijski senzori .....	9
2.3.1. Optički kemijski senzori .....	11
2.3.2. Fluorescentni kemijski senzori .....	12
2.3.3. Mehanizmi stvaranja i prijenosa signala fluorescentnih senzorskih molekula ....	13
2.3.3.1. Fotoinducirani prijenos elektrona .....	14
2.3.3.2. Intramolekulski prijenos naboja .....	15
2.3.3.3. Försterov prijenos rezonantne energije.....	16
2.3.3.4. Stvaranje ekcimeri i ekscipleka.....	16
2.3.3.5. Kemodozimetri .....	17
<b>3. LITERATURNI PREGLED</b> .....	<b>18</b>
3.1. Triazolni fluorescentni senzori za određivanje metalnih iona .....	19
3.1.1. Fluorescentni senzori za određivanje Zn(II) iona .....	19
3.1.2. Fluorescentni senzori za određivanje Cu(II) iona .....	23
3.1.3. Fluorescentni senzori za određivanje Al(III) iona .....	25
3.1.4. Fluorescentni senzori za određivanje Hg(II) iona.....	28
3.1.5. Fluorescentni senzori za određivanje Fe(III) iona .....	30
3.2. Benzazolni derivati kao metalni senzori .....	32
3.2.1. Fluorescentni benzimidazolni senzor za Cu(II) ion .....	33
3.2.2. Fluorescentni benzotiazolni senzor za Cu(I) i Cu(II) ion .....	34
<b>4. RASPRAVA I REZULTATI</b> .....	<b>36</b>
<b>5. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....	<b>40</b>
<b>6. ZAKLJUČAK</b> .....	<b>42</b>
<b>7. LITERATURA</b> .....	<b>44</b>
<b>ŽIVOTOPIS</b> .....	<b>47</b>

# 1. Uvod



Kemijski senzori su uređaji koji prepoznaju određenu kemijsku promjenu unutar mjernog sustava i nastali kemijski signal pretvaraju u koristan analitički signal, a sastoje se od receptorskog dijela, separacijskog dijela i pretvornika. Kemosenzori u užem smislu odnose se na molekulu koja specifično veže određeni analit te su stoga uglavnom visoko selektivni za pojedine kemijske vrste. Posebno zanimljiv tip kemijskog senzora je optički senzor, koji promjenu u optičkim svojstvima sustava pretvara u analitički signal. Takva vrsta senzora praktična je zbog brzine odziva i lakoće očitavanja promjene sustava.

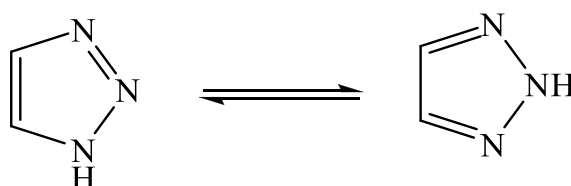
Zadnjih godina sintetiziran je značajan broj potencijalnih senzorskih molekula za određivanje metalnih iona. Razvoj senzora za metalne ione bitan je za napredak dijagnostike jer se metalni ioni nalaze u ljudskom organizmu kao mikroelementi i većina ih sudjeluje u ključnim biokemijskim procesima (primjerice Fe, K, Na, ...), a njihove prevelike ili premale koncentracije mogu uzrokovati različita oboljenja, od kojih se neka tek sad povezuju s poremećajima u koncentraciji metalnih iona. Također, bitno je pratiti količine metalnih iona u okolišu, posebice teških metala koji se akumuliraju u organizmima i prenose dalje putem hranidbenog lanca.

Kako bi se razvoj novih modernih senzora učinio jednostavnijim i efikasnijim, velika se pažnja posvećuje *click*-kemiji, koja definira jednostavne reakcije u blagim reakcijskim uvjetima s visokom iskoristivosti i lako izdvojivim produktom. Najzastupljenija *click* reakcija je zasigurno CuAAC reakcija sinteze 1,4-disupstituiranih 1,2,3-triazola, koji su zanimljivi zbog svojih heteroatoma dušika koji koordiniraju s metalnim ionima i imaju ulogu poveznice unutar  $\pi$ -konjugiranog sustava, što ih čini izrazito korisnima za sintezu fluorescentne senzorske molekule.

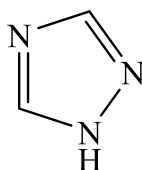
## 2. Opći dio

## 2.1. Triazoli

Triazoli su organski heterociklički spojevi molekulske formule  $C_2H_3N_3$  čiji se peteročlani prsten sastoji od dva ugljika i tri heteroatoma dušika. Postoje dva izomera : 1,2,3-triazol i 1,2,4-triazol od kojih svaki ima po dva tautomera, odnosno dva konstitucijska izomera s delokaliziranim protonima, čije su strukture prikazane na slikama 1 i 2.



**Slika 1.** Strukture 1,2,3-triazola.



**Slika 2.** Struktura 1,2,4-triazola.

## 2.2. Click kemija

2001. godine K. B. Sharpless i suradnici u kemijsku sintezu su uveli pojam “*click chemistry*” odnosno *click* kemija. *Click* reakcije su definirane kao reakcije s relativno visokim stupnjem iskorištenja i jednostavne za provesti uz otapalo koje se lako uklanja iz smjese. Produkti takvih reakcija trebaju biti stereospecifični i trebaju se moći ukloniti iz smjese nekromatografskim metodama.<sup>1</sup>

Iza *click* kemije prvenstveno leži ideja o biblioteci već gotovih kemijskih poluprodukata koji se brojnim kombinacijama mogu međusobno uvesti u *click* reakcije, što bi po Sharplessu, pojednostavilo brojne kemijske sinteze te ujedno i ubrzalo proces pronalaženja novih biološki zanimljivih spojeva. *Click* kemija je stoga najprije bila namijenjena medicinskim

biokemičarima, a najveću je primjenu doživjela u područjima kemije polimera te konačno i u farmaceutskoj industriji.<sup>2</sup>

Karakteristike *click* reakcija su blagi reakcijski uvjeti, široko područje primjene, neosjetljivost procesa na kisik i vodu, stereospecifičnost, lako dostupni početni materijali i reagensi, provođenje reakcije bez otapala ili korištenje bezopasnih otapala koja se lako uklanjaju, te jednostavno izoliranje produkata. Poželjno je da se pročišćavanje produkata provodi nekromatografskim metodama, poput prekrystalizacije, filtracije ili destilacije.<sup>3</sup>

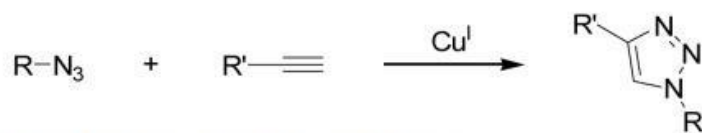
Kemijske transformacije koje udovoljavaju uvjetima *click* kemije su:<sup>3</sup>

- cikloadicije, prvenstveno 1,3-dipolarne ili hetero-Diels-Alder cikloadicije
- nukleofilno otvaranje prstena, primjerice otvaranje cikličkih sulfata, epoksida, aziridina, itd.
- karbonilna nealdolna reakcija, primjerice nastajanje urea, tiourea, amida, aromatskih heterocikla itd.
- adicije na ugljik-ugljik višestruke veze, poput nastajanja diola, epoksida, itd.

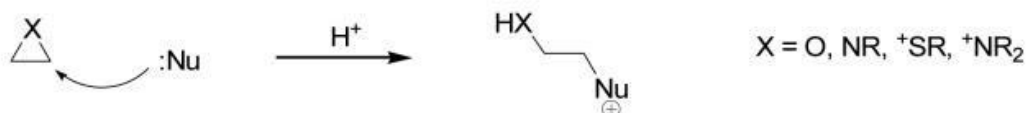
Sheme navedenih *click* reakcija prikazane su na slici 3.

## Cikloadicije

Cu-katalizirana Huisgenova 1,3-dipolarna azid-alkin cikloadicija

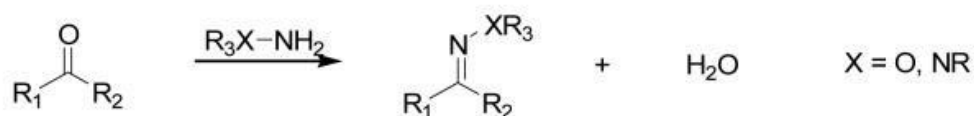


## Nukleofilno otvaranje prstena

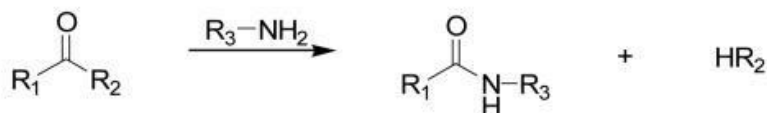


## Nealdolne karbonilne reakcije

Nastajanje hidrazon/oksim etera



Nastajanje urea/izourea



## Adicije na ugljik-ugljik višestruke veze

Nastajanje raznih tročlanih prstenova



Određene Michael-ove adicije

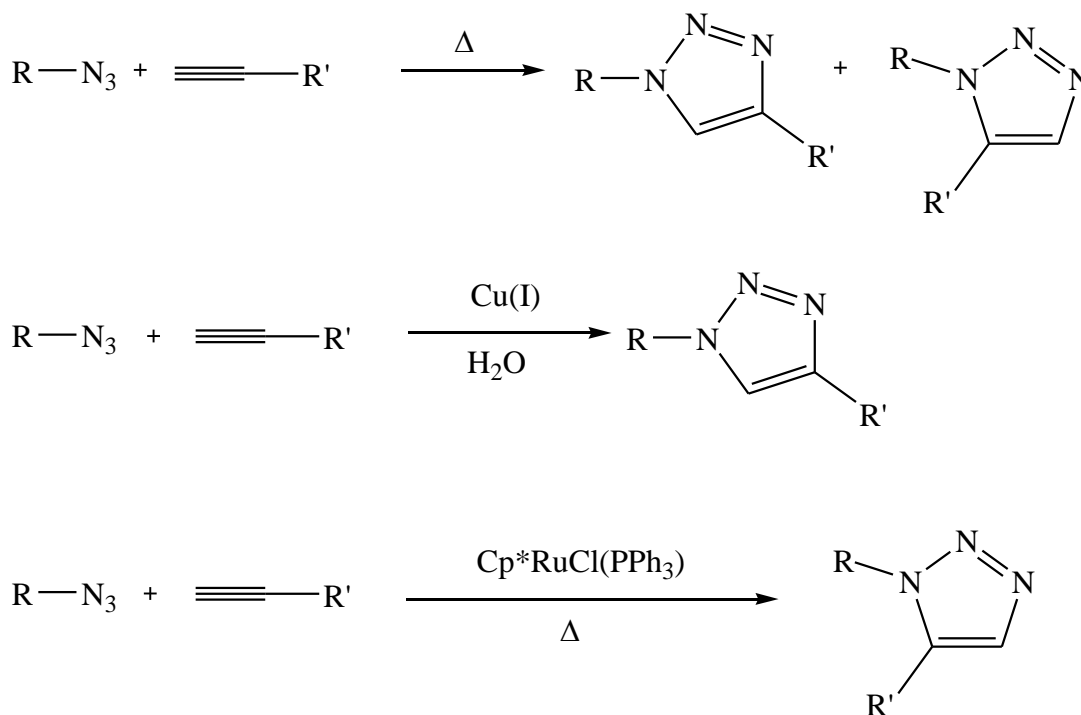


Slika 3. Klasifikacija *click* reakcija.<sup>2</sup>

### 2.2.1. Sinteza 1,2,3-triazola azid-alkin Huisgenovom cikloadicijom

Najzastupljenija reakcija sinteze 1,2,3-triazola, Huisgenova azid-alkin 1,3-dipolarna cikloadicija,<sup>4</sup> prikazana je na slici 4. Huisgenova azid-alkin cikloadicija (pri višim temperaturama) odgovara pojmu *click* reakcije u kontekstu dostupnosti reaktanata i selektivne sinteze disupstituiranog 1,2,3-triazola. Tako dobiveni 1,2,3-triazoli su strukturni izomeri, a konačan produkt je smjesa 1,4- i 1,5-disupstituiranih 1,2,3-triazola, koji se teže razdvajaju te se stoga termalna azid-alkin Huisgenova cikloadicija ne može u potpunosti smatrati *click* reakcijom.

V. V. Fokin i K. B. Sharpless te M. Meldal<sup>4</sup> su 2002. godine neovisno unaprijedili azid-alkin Huisgenovu cikloadiciju korištenjem bakra(I) kao katalizatora i utvrdili da bakrom(I) katalizirana 1,3-dipolarna azid-alkin cikloadicija (CuAAC), selektivno daje isključivo 1,4-disupstituirani 1,2,3-triazol, shematski prikazano na slici 4. Nekoliko godina kasnije, Fokin, Jia i suradnici<sup>5</sup> upotrijebili su rutenij(II) kao katalizator u Huisgenovoj 1,3-dipolarnoj cikloadiciji, pretpostavljajući da bi rutenij djelovao slično kao i bakar u CuAAC reakciji s obzirom da je Ru(II) pogodan katalizator za reakcije s alkinima. Produkt reakcije je bio 1,5-disupstituirani 1,2,3-triazol, a reakcija je analogno imenovana RuAAC te je shematski prikazana slikom 4.



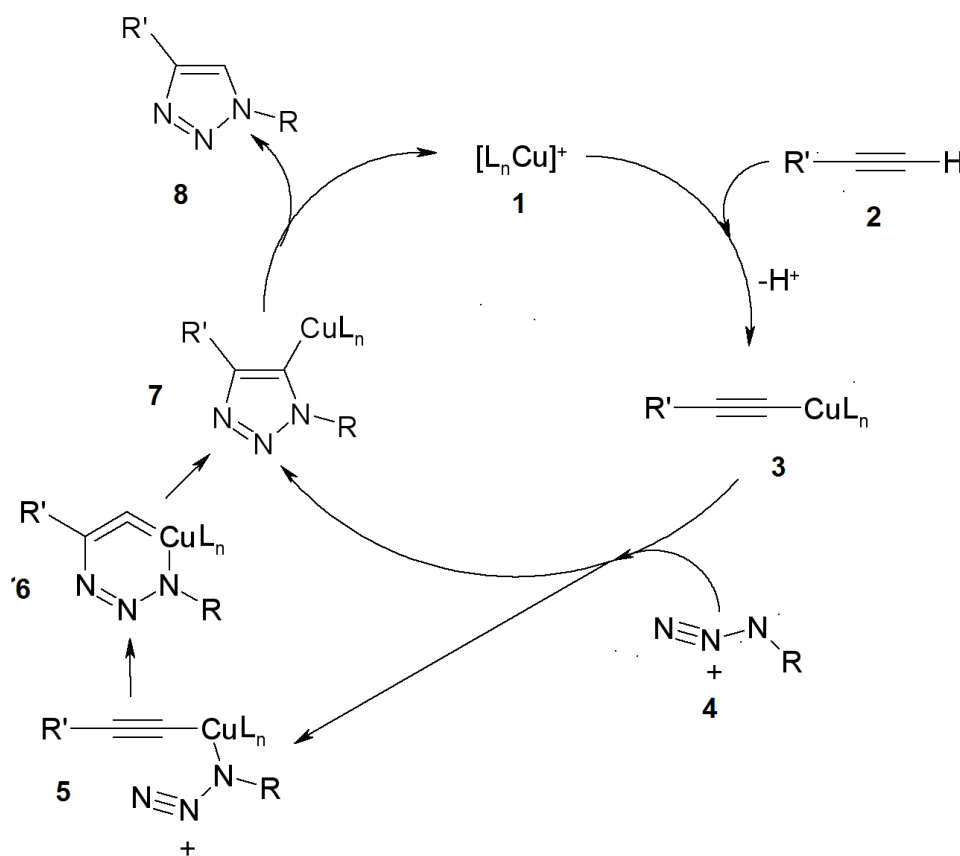
**Slika 4.** Termalna azid-alkin Huisgenova cikloadicija; CuAAC reakcija; RuAAC reakcija.

CuAAC reakcija dokazala se kao vrlo uspješan i efikasan mehanizam dobivanja 1,2,3-triazola, ne samo radi svoje regioselektivnosti, već i zbog mogućnosti provođenja reakcije pri blagim reakcijskim uvjetima i korištenjem širokog raspona otapala te je radi svoje jednostavne izvedbe i široke primjene postala najpoznatiji predstavnik *click* reakcija.<sup>5</sup>

### 2.2.2. Mehanizam bakrom(I) katalizirane azid-alkin cikloadicije

Huisgenova Cu(I)-katalizirana 1,3-dipolarna cikloadicija odvija se između 1,3 dipola i dipolarofila te kao produkt daje peteročlanu heterocikličku molekulu.

U prvom se koraku terminalni alkin (2) koordinira na Cu(I) kompleks (1) koji otpušta proton, a pritom se dobiva bakrov acetilid (3). N-3 dušik iz azida (4) se veže na bakrov acetilid (3) te nastaje intermedijar (5) čiji terminalni dušik napada C-2 atom acetilidnog dijela intermedijara te nastaje nestabilni šesteročlani prsten, bakrov metalocikl (6). Idući korak je nastajanje peteročlanog triazolil-bakar derivata (7), nakon čega, protolitičkom reakcijom, nastaje 1,4-disupstituirani-1,2,3-triazol (8).<sup>6</sup>



Slika 5. Mehanizam CuAAC reakcije.<sup>7</sup>

### 2.2.3. Primjena *click* kemije

Pojava principa *click* kemije u posljednjih desetak godina uvelike je utjecala na područje primijenjene kemije, a interes za njenu primjenu još uvijek raste. Kemičarima je *click* kemija izrazito zanimljiva upravo zbog lako izvedivih i visoko iskoristivih reakcija čiji se glavni produkti lako izdvajaju iz konačno dobivene smjese, a takav način laboratorijskog rada je praktičan i ekonomičan. Uz porast interesa za primjenu reakcija *click* kemije raste i interes za upotrebu 1,2,3-triazola, obzirom na zastupljenost CuAAC reakcije. Primjena 1,2,3-triazola je zanimljiva za različita područja primijenjene kemije i inženjerstva materijala zbog svojstva triazola da koordinira ione na heteroatome dušika koji posjeduju slobodne elektronske parove.<sup>8</sup>

Tri su glavna područja u kojima se primjenjuje metodologija *click* kemije: biokonjugacija, znanost materijala i razvoj lijekova, a konkretni primjeri takvih reakcija su:<sup>8</sup>

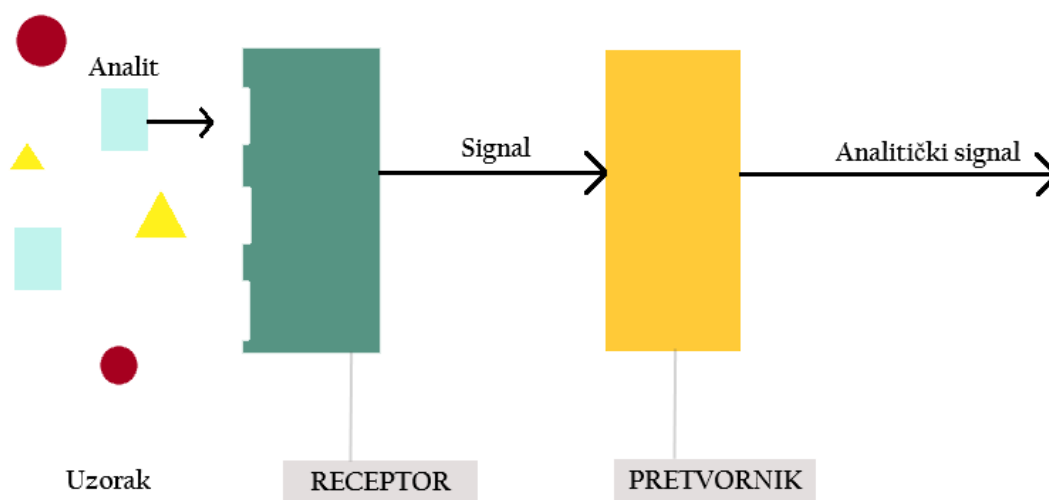
- sinteza 1,2,3-triazola (CuAAC i RuAAC metodom),
- modifikacije proteina i nukleinskih kiselina umetanjem fluorofora i/ili liganada,
- modifikacije DNA (DNA “labeling”),
- sinteza dendrimera (sintetske nanomolekule korištene u znanosti o materijalima i medicini),
- općenito u nanotehnologiji za modifikacije i/ili sinteze nanočestica,
- supramolekulska kemija.

### 2.3. Kemijski senzori

Kemijski senzori su uređaji koji pretvaraju određenu kemijsku promjenu sustava u odgovarajući signal, odnosno omogućuju mjerenje kvantitativnih svojstava sustava poput koncentracije analita. Promjena sustava koja daje analitički koristan signal može biti uzrokovana reakcijom, vezanjem molekula ili nekom drugom interakcijom, promjenom strukture kemijskih vrsta i slično.<sup>9</sup>



Osnovna struktura kemijskog senzora obično se sastoji od receptora ili osjetila koje očitava kemijsku promjenu i pretvara ju u drugi oblik energije povoljan za pretvornik, pretvornika koji pretvara energiju (kemijsku informaciju) dobivenu iz osjetila u koristan analitički signal, te separacijskog dijela, primjerice membrane.<sup>9</sup>



**Slika 6.** Shema kemijskog senzora.

Kemijski senzori se klasificiraju s obzirom na načela rada osjetila i pretvornika, a principi na kojima se temelji rad osjetila mogu biti:

- kemijski, pri čemu kemijska reakcija analita uzrokuje pobudu;
- fizikalni, gdje pobudu uzrokuje promjena fizikalnog svojstva sustava (u slučaju izostanka kemijske reakcije) te;
- biokemijski, pri čemu je pobuda uzrokovana biokemijskim procesom u sustavu.<sup>9</sup>

S obzirom na načelo rada pretvornika, kemijski senzori se svrstavaju na optičke, elektrokemijske, električne, magnetske, termometrijske senzore, te senzore koji su osjetljivi na promjenu mase i drugih fizikalnih svojstava.

Optički senzori pretvaraju promjene optičkih pojava uzrokovane interakcijom analita i osjetila. Elektrokemijski senzori pretvaraju efekt elektrokemijske interakcije između analita i elektrode u koristan signal, a do spomenutog može doći uz ili bez električnog poticaja, dok je kod električnih senzora signal uzrokovan promjenom električnih svojstava zbog interakcija analita, no bez elektrokemijskih procesa. Senzori osjetljivi na promjenu mase pretvaraju

promjenu mase na posebno oblikovanoj površini u promjenu svojstva pomoćnog materijala; promjena mase je uzrokovana akumulacijom analita. Magnetski senzori se temelje na promjeni paramagnetskih svojstava analiziranog plina, a termometrijski senzori na mjerenju toplinskog efekta pojedinih kemijskih reakcija ili adsorpcija koje uključuju analit. Postoje i senzori koji se temelje na ostalim fizikalnim svojstvima, primjerice na temelju X-,  $\beta$ - ili  $\gamma$ -zračenja.<sup>9</sup>

### 2.3.1. Optički kemijski senzori

Optički kemijski senzori pretvaraju informacije dobivene interakcijama elektromagnetskog zračenja i analita u koristan analitički signal putem pretvorničkog elementa, a dobiveni odziv uzrokovan tom interakcijom direktno je povezan s koncentracijom analita. Receptor optičkog senzora čini tvar koja selektivno reagira ili uspostavlja ravnotežu s određenom vrstom analita i daje optički signal kojega pretvornik transformira u mjerljivu vrijednost.<sup>9</sup>

Principi rada optičkih senzora su brojni, a mjeriti se mogu različita optička svojstva tvari:

- Apsorbancija svjetlosti – mjeri se u prozirnog mediju, uzrokovana apsorpcijom svjetlosti na samom analitu ili reakcijom s pogodnim indikatorom;
- Refleksija svjetlosti – mjeri se u prozirnog mediju pomoću imobiliziranog indikatora;
- Luminiscencija – temelji se na mjerenju intenziteta svjetlosti emitirane radi kemijske reakcije u receptorskom dijelu;
- Fluorescencija – mjeri se pozitivan efekt emisije uzrokovan zračenjem;
- Indeks loma – mjeri se kao posljedica promjene sastava otopine;
- Optotermalni efekt – temelji se na mjerenju termalnog efekta uzrokovanom apsorpcijom svjetlosti;
- Raspršenje svjetlosti – temelji se na efektu uzrokovanom prisutnošću raznih čestica u uzorku.

Sistem optičke detekcije može biti direktan ili indikatorski. Direktni senzori su namijenjeni analitima koji samostalno demonstriraju neko intrinzičko optičko svojstvo, poput fluorescencije, no takvi su analiti rijetki pa se stoga više koriste indikatorski senzori. Takvi senzori koriste reagense koji na analit reagiraju promjenom nekog optičkog svojstva te tako ukazuju na prisutnost i koncentraciju analita.<sup>10</sup>

Optički kemijski senzori su jeftini, zadržavaju osjetljivost tijekom vremena, koriste neinvazivne metode mjerenja i pokazuju visok stupanj selektivnosti. Osim toga, sigurni su za rad s eksplozivnim i zapaljivim tvarima te se mogu proizvesti u malim dimenzijama što ih čini izuzetno praktičnima za rad. Usprkos brojnim prednostima, još uvijek se pojavljuju nedostaci u korištenju optičkih kemijskih senzora. Dugotrajna stabilnost instrumenta nije garantirana, pri mjerenju se mogu pojaviti smetnje zbog svjetlosti itd.<sup>10</sup>

### 2.3.2. Fluorescentni kemijski senzori

Fluorescencija je fenomen kada molekula ili materijal (fluorofor), nakon pobude elektrona procesom apsorpcije svjetlosti, emitira kvant energije svjetlosti. Nakon pobude, molekula se još neko vrijeme nalazi u pobuđenom stanju te se može uočiti emisija niže energije (dulje valne duljine) od pobude. Vrijeme života fluorescencije ovisi o fluoroforu i njegovim interakcijama s okolinom. Moguće je snimiti nekoliko parametara fluorescentne emisije i svi oni mogu se koristiti u istraživanjima. Intenzitet fluorescencije može se mjeriti na danim valnim duljinama ekscitacije i emisije pri čemu se dobivaju ekscitacijski, odnosno emisijski spektri. Emisijska anizotropija,  $r$  ili sličan parametar, polarizacija,  $P$ , funkcija je intenziteta fluorescencije dobivenih na dvije različite polarizacije, vertikalne i horizontalne, a emisija se još može karakterizirati vremenom života fluorescencije,  $\tau_F$ . Parametri koji se mogu odrediti kao funkcija valnih duljina ekscitacije i emisije mogu se koristiti za opisivanje interakcije senzora i analita i mogućnosti njihove primjene u konstrukciji senzora.<sup>11</sup>

Uspješnost fluorescentnih senzora može se objasniti prednostima koje pruža fluorescencija u usporedbi s ostalim metodama detekcije metalnih iona. Visoka osjetljivost fluorescencije pruža potreban dinamički raspon snimljenih parametara fluorescencije. Druga karakteristika fluorescencije je brzina odziva koja može biti  $10^{-8}$  do  $10^{-10}$  sekundi te je ograničena vremenom života fluorescencije i brzinom fotofizičkog procesa koji daje odziv. Nedestruktivan i neinvazivan karakter fluorescencijskih mjerenja koristan je za biološke i

medicinske primjene. Kod fluorescentnih senzora, indikator i detektor signala nalaze se na određenoj udaljenosti, povezani putem zraka svjetlosti i zato je detekcija fluorescencijom jednako dobro prilagođena za daljinsko upravljanje kemijskih reakcija u industriji i detekciju različitih tvari unutar živih stanica. Senzorske molekule je moguće imobilizirati na površinu heterogenih sustava ili integrirati u nanočestice, pa je korištenjem optičkih vlakana sa imobiliziranom molekulom moguće daljinsko mjerenje fluorescencije.<sup>12</sup>

Najčešće korištene molekule kao indikatori su organska bojila. Njihove prednosti su laka dostupnost, niska cijena i raznovrsnost, s obzirom da omogućuju varijaciju kemijskih, fotokemijskih i spektroskopskih svojstava. Parametri koji karakteriziraju bojila i određuju senzorsku primjenu su visoki molarni apsorpcijski koeficijent  $\epsilon$ , visoko kvantno iskorištenje fluorescencije  $\Phi$ , optimalna valna duljina ekscitacije, optimalna valna duljina emisije, veliki Stokesov pomak, optimalno vrijeme života fluorescencije  $\tau_F$ , visoka fotostabilnost te optimalna topljivost/prodiranje/reaktivnost u određenom sustavu.<sup>13</sup>

Fluorescencijska svojstva molekule uvelike ovise i o njezinom mikro-okolišu, preciznije, o fizikalnim i kemijskim parametrima medija i ostalih prisutnih tvari koje se nalaze u njemu, primjerice prisutnost iona, vodikove veze, električni potencijali, polarnost molekula, temperatura, viskoznost itd. Fluorescentne molekule su prepoznate kao idealni kemijski senzori za ispitivanje prisutnosti metalnih iona u mediju, jer se koordiniranjem takvih molekula na kation mijenjaju njihova fluorescencijska svojstva.<sup>12</sup>

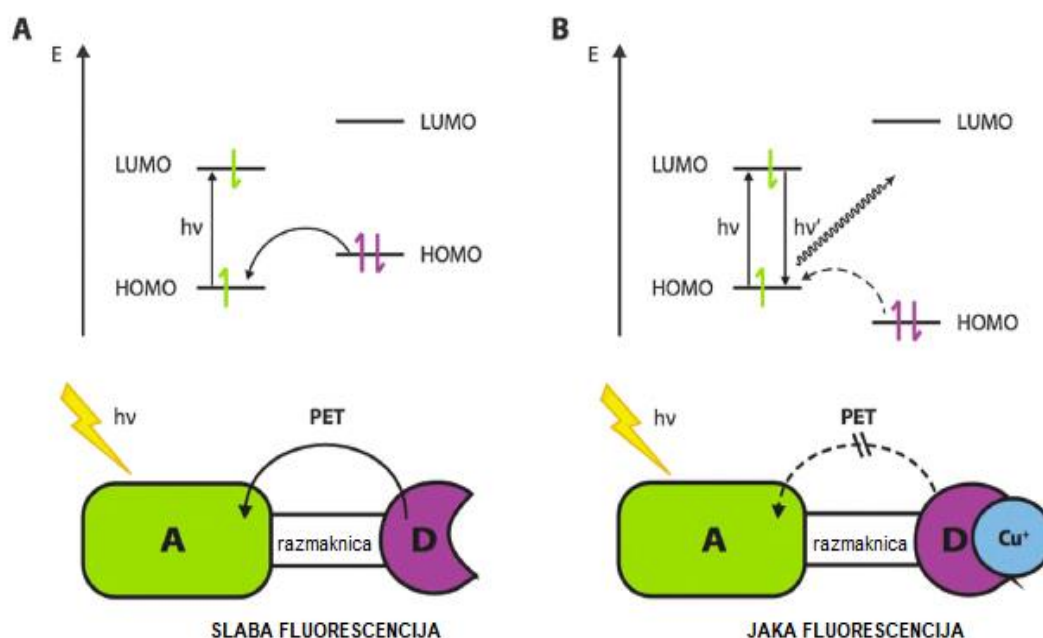
### 2.3.3. Mehanizmi stvaranja i prijenosa signala fluorescentnih senzorskih molekula

Prilikom dizajna fluorescentnih senzora za metale neizostavno je uzeti u obzir mehanizme koordiniranja metala na senzorsku molekulu, jer je metalna koordinacija zaslužna za pojavu promjena u fluorescenciji, životnom vijeku ili maksimumu ekscitacije odnosno emisije, što ukazuje na prisutnost metalnih kationa.

Najučestaliji mehanizmi kod senzorskih molekula su fotoinducirani prijenos elektrona (PET), fotoinducirani (intramolekulski) prijenos naboja (PCT ili ICT), prijenos Försterove rezonancijske energije (FRET) i fotoinducirano stvaranje ekscimera ili ekscipleksa.<sup>14</sup>

### 2.3.3.1. Fotoinducirani prijenos elektrona

Fotoinducirani prijenos elektrona (engl. *photoinduced electron transfer*, PET) je najčešći mehanizam stvaranja i prijenosa signala u dizajniranju fluorescentnih senzorskih molekula. Fluorescencijski kemosenzorski sustav sastoji se od fluorofora, razmaknice i ionofora, gdje su ionofori elektron donori, a fluorofori elektron akceptori. Prilikom pobude fluorofora dolazi do prijelaza elektrona iz njegove najviše popunjene molekulske orbitale (HOMO) u najnižu praznu molekulsku orbitalu (LUMO) apsorpcijom fotona a ta se pojava naziva fotoinducirani prijenos elektrona i uzrokuje fluorescenciju. Elektron ionofora iz njegove HOMO orbitale će prijeći u HOMO molekulsku orbitalu pobuđene fluorofora (u slučaju da je HOMO orbitala ionofora na višem energetskeg stupnju od one fluorofora) te će spriječiti prijelaz elektrona unutar samog fluorofora iz LUMO u HOMO molekulsku orbitalu i time neće doći do emisije energije odnosno do pojave fluorescencije. Koordinacijom ionofora na metalni ion dolazi do smanjenja njegovog HOMO energetskeg nivoa ispod HOMO energetskeg nivoa fluorofora pa elektron ionofora ne prelazi u HOMO fluorofora. Time je omogućen prijelaz elektrona unutar fluorofora i ponovno dolazi do pojave fluorescencije, a cijeli PET proces prikazan je slikom 7.<sup>14</sup>

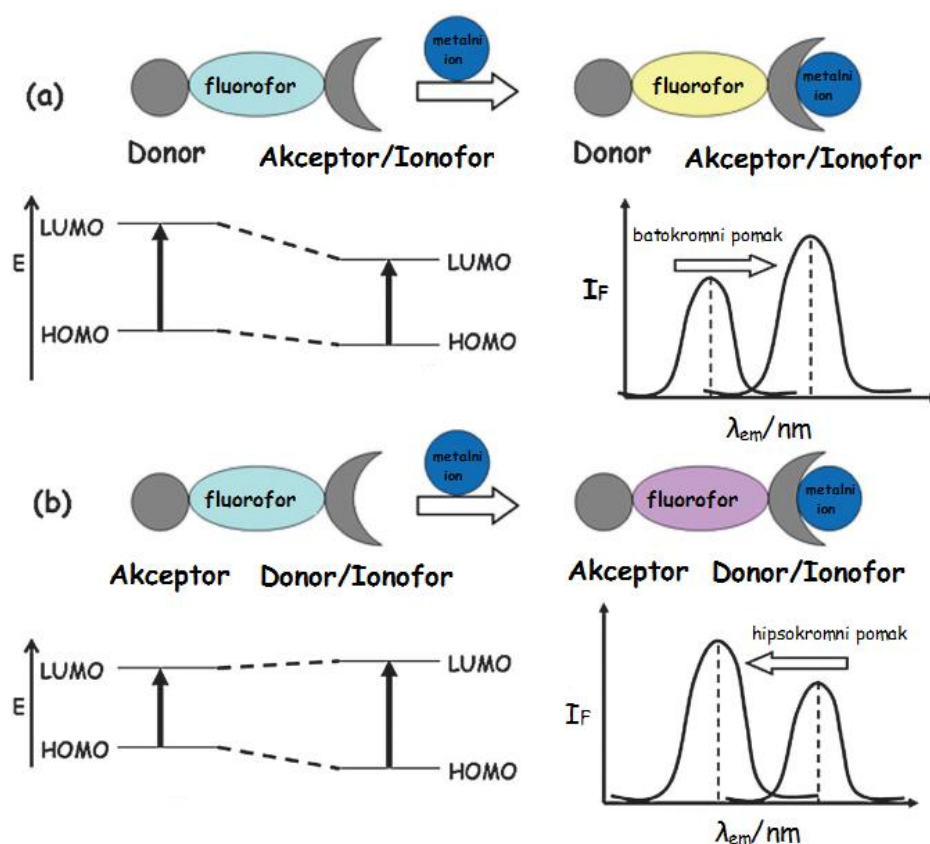


Slika 7. Mehanizam fotoinduciranog prijenosa elektrona (PET).<sup>15</sup>

### 2.3.3.2. Intramolekulski prijenos naboja

Intramolekulski prijenos naboja (engl. *intramolecular charge transfer*, ICT ili *photoinduced charge transfer*, PCT) je mehanizam prijenosa elektrona među parovima konjugiranih elektron-donorskih (D) i elektron-akceptorskih (A) grupa, čiji fluorofori pokazuju velike Stokesove pomake, emisijske pomake uzrokovane metalnom koordinacijom i pobudu vidljivog spektra svjetlosti, a mehanizam je shematski prikazan na slici 8. ICT mehanizam je izuzetno pogodan za upotrebu u biološkim sustavima, jer ICT efekt utječe na bazičnost donorskog amina te omogućuje dizajn pH-nezavisnih senzorskih molekula za medije karakterizirane pH vrijednošću bliskoj neutralnoj.<sup>14</sup>

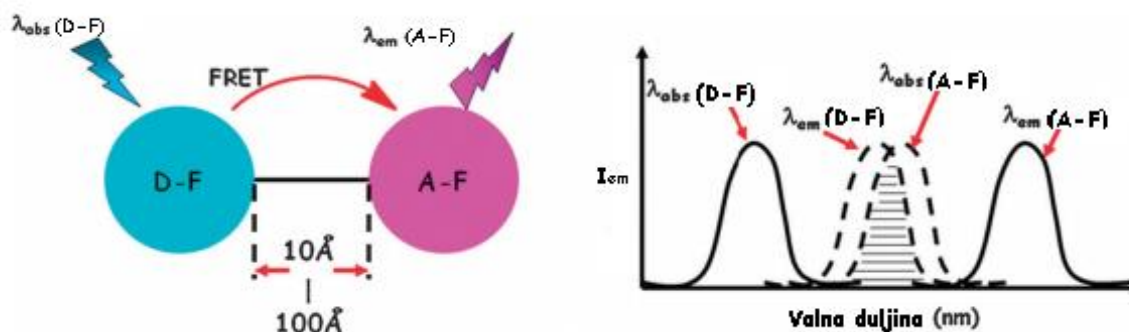
Prilikom koordiniranja donora ICT fluorofora na metalni ion, smanjuje se HOMO energija te dolazi do hipsokromnog pomaka eksitacijskog ili emisijskog maksimuma. U slučaju koordiniranja metala na akceptorski dio fluorofora, dolazi do suprotnog efekta, odnosno do batokromnog pomaka.<sup>14</sup>



Slika 8. Mehanizam intramolekulskog prijenosa naboja (ICT).<sup>14</sup>

### 2.3.3.3. Försterov prijenos rezonantne energije

Försterov ili fluorescencijski prijenos energije rezonancijom (eng. *fluorescence resonance energy transfer*, FRET)<sup>14</sup> je pojava rezonantni prijenosa energije između dva fluorofora dipol-dipol interakcijama. Donorski fluorofor (D-F) se dovodi u pobuđeno stanje te dolazi do rezonantnog prijenosa energije na akceptorski fluorofor (A-F) koji se nalazi u osnovnom stanju i emitira apsorbiranu energiju. Da bi FRET mehanizam bio moguć, donorski i akceptorski fluorofor moraju se nalaziti na udaljenosti od 10 do 100 Å, jer je proces prijenosa rezonantne energije izuzetno osjetljiv na najmanje promjene međusobne udaljenosti donora i akceptora. Drugi faktor bitan za uspješnost FRET procesa je preklapanje emisijskog spektra donorskog fluorofora i apsorpcijskog spektra akceptorskog fluorofora, jer se većim preklapanjem postiže efikasniji FRET prijenos. FRET mehanizam i preklapanje emisijskog i apsorpcijskog spektra dvaju fluorofora prikazani su slikom 9.



Slika 9. Mehanizam FRET prijenosa rezonantne energije.<sup>14</sup>

### 2.3.3.4. Nastajanje ekscimera i ekscipleksa

Ekscimer nastaje kada dođe do elektronske interakcije između dva jednaka fluorofora, jednog u pobuđenom stanju, a drugog u osnovnom stanju, povezanih razmaknicom koja je ujedno i ionofor.<sup>14</sup> Za nastajanje ekscimera bitno je smanjiti udaljenost između fluorofora na optimalnu vrijednost, što se postiže koordiniranjem metalnog iona na ionofor te tako najčešće nastaju  $\pi$ -konjugirani sustavi. Ekscipleksi nastaju interakcijama dva različita fluorofora. Uobičajeno je da ekscimeri daju batokromni pomak emisijskog maksimuma, dok monomeri

daju hipsokromni pomak. Ekscimeri se ne primjenjuju često u senzorske svrhe, jer su uglavnom netopivi u vodenim otopinama, a predviđanje udaljenosti između fluorofora još uvijek znanstvenicima predstavlja velik izazov.

#### **2.3.3.5. Kemodozimetri**

Kemodozimetar je molekula koja nastaje kao produkt uglavnom ireverzibilne reakcije koordiniranja metalnog iona na neku molekulu koja nema fluorescencijska svojstva, primjerice spiro-laktam.<sup>14</sup> Sinteza kemodozimetara koristi se uglavnom za katione koji u kompleksu sa senzorskom molekulom smanjuju intenzitet fluorescencije. Reakcije potaknute koordiniranjem metala moguće su zbog elektrofilne prirode većine prijelaznih metala, a najčešće reakcije tog tipa su otvaranje nefluorescentnog spiro-laktama, hidroliza estera, hidrazida ili etera, reakcije premještanja i reakcije nastajanja prstena. Kemodozimetri nisu poželjni za korištenje u sensorima za fiziološke uvjete jer su ireverzibilni i daju spor odziv.



### 3. Literaturni pregled

### 3.1. Triazolni fluorescentni indikatori za određivanje metalnih iona

Fluorescentni senzori za metalne ione sastoje se od prepoznavajuće vrste, receptora ili ionofora i signalizirajuće vrste, fluorofora koje mogu biti integrirane ili odvojene kemijskom vezom. Prepoznavajuća vrsta u svojoj strukturi sadrži funkcionalne grupe koje mogu koordinirati metalne ione, kao što su poliamini, polieteri, polisulfidi, karboksilne ili hidrokisamino kiseline, a mogu biti makrocikličke ili lančane strukture, ovisno o ciljanom metalnom ionu.<sup>16</sup> Signalizirajuća vrsta pretvara informaciju o vezanju analita u optički odziv, mijenjajući ekscitacijski/emisijski maksimum, vrijeme života ili intenzitet fluorescencije.<sup>14</sup> Za senzor je poželjno da proces vezivanja kationa i receptora bude reverzibilan kako bi se omogućilo kontinuirano praćenje analita.

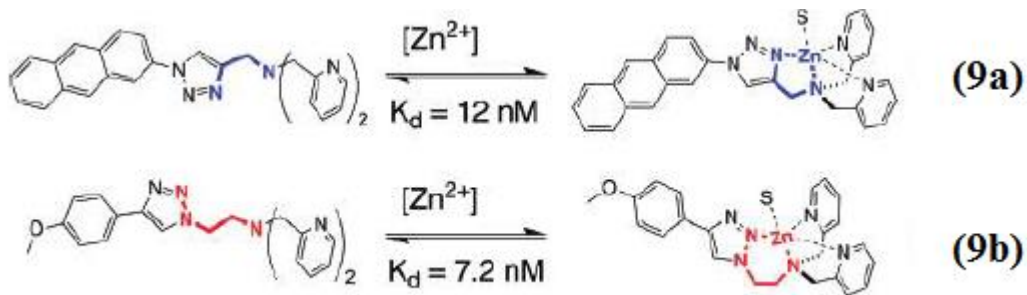
Pokazalo se da 1,2,3-triazoli mogu imati različite uloge u senzorskom mehanizmu prepoznavanja metalnih kationa. Triazoli zbog prisutnosti dušikovih heteroatoma mogu koordinirati metalne katione, a mogu imati i ulogu poveznice između receptorskog i fluorofornog dijela senzorske molekule zbog delokaliziranih  $\pi$ -elektrona, te kao dio konjugiranog fluorofora sudjelovati u prijenosu signala prilikom vezanja receptora na analit.

#### 3.1.1. Fluorescentni senzori za određivanje Zn(II) iona

Zn(II) ion je prisutan kao mikroelement u ljudskom organizmu, no njegova uloga u brojnim biokemijskim procesima nije još poznata zbog poteškoća u kvantitativnom i kvalitativnom određivanju cinkovog kationa uzrokovanih malim koncentracijama istog u organizmu, nepostojanju spektroskopskog potpisa Zn(II) iona i velikih varijacija u prisutnosti Zn(II) iona tijekom vremena trajanja nekog procesa unutar organizma. Bitno je razviti osjetljiv i reverzibilan senzor za Zn(II) ion kako bi se bolje shvatila njegova uloga u organizmu i zbog tretiranja potencijalnih neravnoteža u organizmu uzrokovanih neuobičajenim količinama Zn(II) iona.<sup>17</sup>

Sha Huang, Ronald J. Clark i Lei Zhu<sup>17</sup> razvili su dva derivata 1,2,3-triazola u svrhu upotrebe istih u visoko osjetljivim sensorima za Zn(II) ion u fiziološkim uvjetima. Dva sintetizirana indikatorska spoja su 1,2,3-triazolil-*N*-4-tridentatni ligandi koji visoko selektivno koordiniraju sa Zn(II) ionima čak i pri nanomolarnim koncentracijama, a senzori

sa spomenutim spojevima pokazuju pojačanje fluorescencije prilikom koordiniranja sa cinkom. Atom N3 iz spoja **9a** koordinira sa Zn(II) tvoreći peteročlani, a atom N2 iz spoja **9b** šesertočlani koordinacijski prsten, a strukture indikatorskih molekula i mehanizmi koordiniranja cinka prikazani su na slici 10.<sup>17</sup>

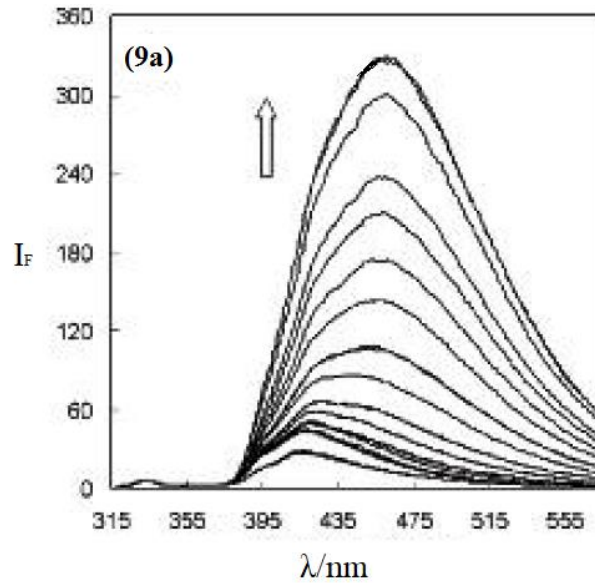


**Slika 10.** Kompleksi 1,2,3-triazola s koordiniranim cinkom (**9a**) i (**9b**).

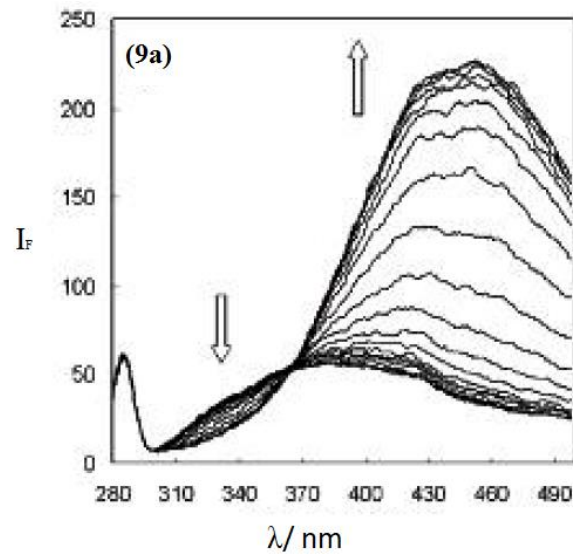
Prilikom koordiniranja kvantno iskorištenje fluorescencije ( $\Phi_F$ ) nastalih kompleksa liganada **9a** i **9b** sa cinkom je poraslo i to značajnije kod kompleksa **9a** te je kod oba spoja emisijski maksimum povećan (tablica 1, slike 11 i 12).

**Tablica 1.** Disocijacijske konstante za **9a,9b** – Zn(II) i kvantna iskorištenja fluorescencije za ligande i nastale komplekse.

	<b>9a</b>	<b>9b</b>
$K_d/\text{nM}$	$12 \pm 1,7$	$7,2 \pm 0,4$
$\lambda_{em}/\text{nm}$	462	450
$\Phi_F$ (ligand)	0,018	0,0013
$\Phi_F$ (kompleks)	0,140	0,0036

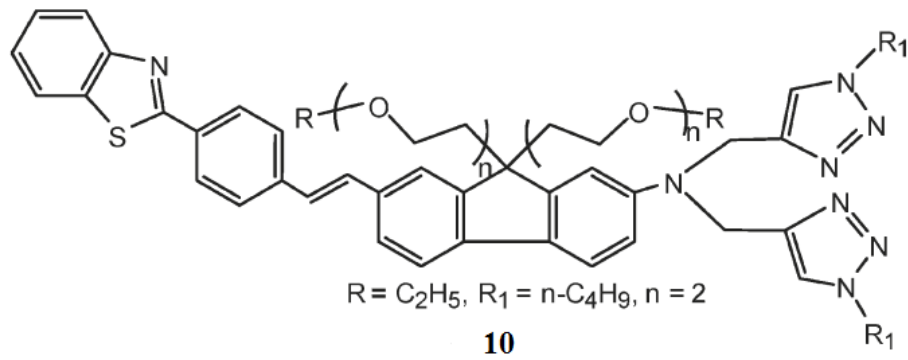


**Slika 11.** Emisijski spektar spoja **9a** u ovisnosti o koncentraciji Zn(II) iona.



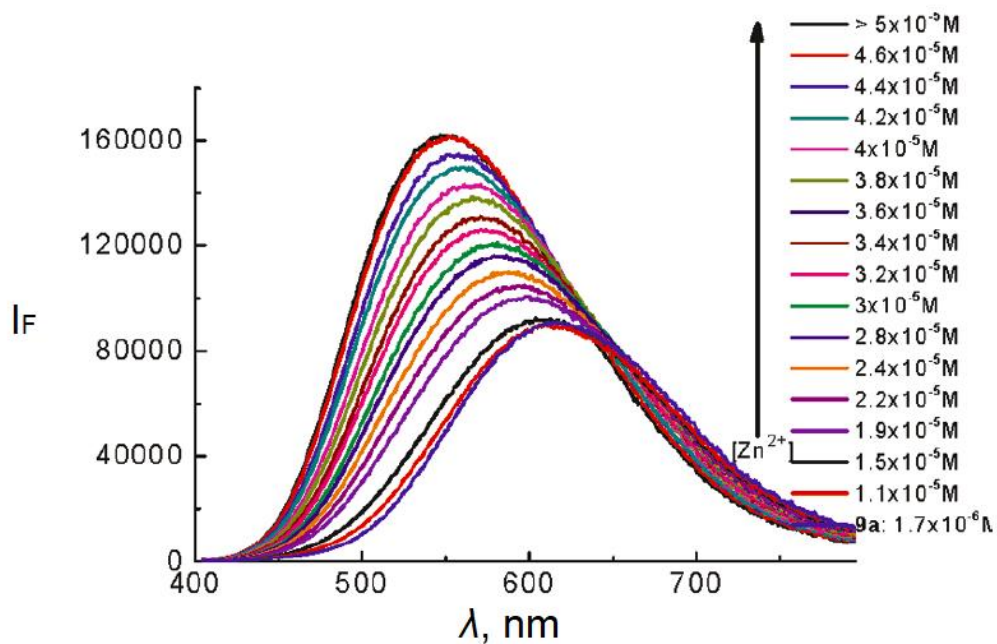
**Slika 12.** Emisijski spektar spoja **9b** u ovisnosti o koncentraciji Zn(II) iona.

Dao M. Nguyen i suradnici sintetizirali su derivate fluorena s 1,2,3-triazolilnim grupama kao prepoznavajućim vrstama senzorske molekule. Senzorska molekula je hidrofilna i koordinira sa Zn(II) ionima u stehiometrijskom odnosu 1:2.<sup>18</sup> Ionofor je amino bis-triazolilni dio, a receptor je fluorenski dio molekule (slika 13).



**Slika 13.** Struktura senzorske molekule **10**.

Nakon formiranja kompleksa senzorske molekule **10** sa Zn(II) ionom dolazi do povećanja intenziteta fluorescencije, a intenzitet rase i s porastom koncentracije Zn(II) iona (slika 14). Senzor **10** je vremenski stabilan i reverzibilan, a sa Zn(II) ionima koordinira brzo.

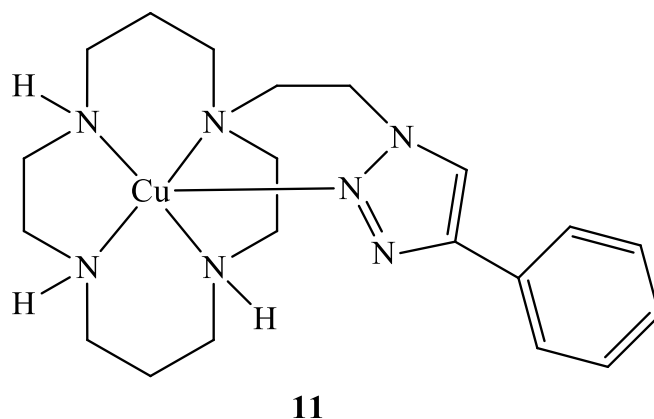


**Slika 14.** Fluorescencijski spektar kompleksa spoja **10** i Zn(II).

### 3.1.2. Fluorescentni senzori za određivanje Cu(II) iona

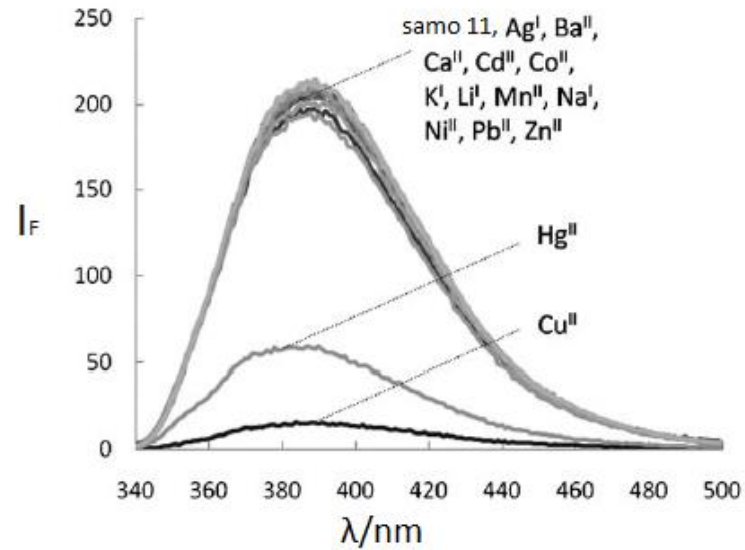
Cu(II) ion je mikroelement prisutan u biljnim i životinjskim organizmima te ga je potrebno unositi u određenim količinama kako bi se omogućilo ispravno provođenje različitih biokemijskih procesa, a u okolišu je prirodno prisutan, pogotovo blizu rudnika. Usprkos tome, bitno je pratiti količine Cu(II) iona u organizmu i okolišu kako bi se spriječila oboljena vezana uz njihov prevelik unos te je stoga bitno razviti selektivne i stabilne senzore za Cu(II) ion.

Yu H. Lau, Jason R. Price, Matthew H. Todd i Peter J. Rutledge<sup>19</sup> razvili su derivat ciklama s 1,2,3-triazolnom jezgrom kao potencijalnu fluorescentnu senzorsku molekulu za određivanje Cu(II) i Hg(II) iona, s time da se dodatkom  $S_2O_3^{2-}$  iona s lakoćom određuje koji od dva kationa otopina sadrži ili sadrži li pak smjesu oba. Senzor se može primjenjivati za određivanje Cu(II) iona u neutralnim vodenim otopinama te zadržava visoku osjetljivost čak i uz prisutnost različitih metalnih iona u uzorku. Kation bakra koordinira sa spojem **11** preko četiri dušika iz ciklama i N2 dušika iz 1,2,3-triazola, kako je prikazano slikom 15.

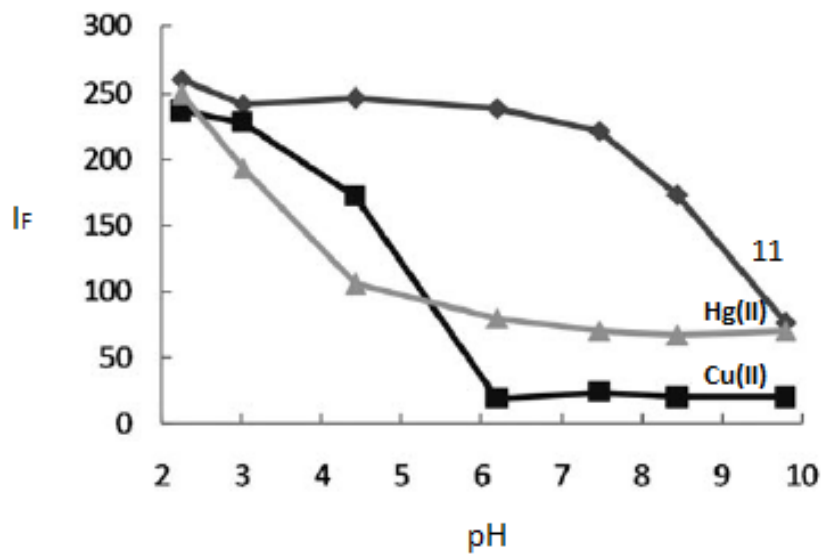


**Slika 15.** Model koordiniranja spoja **11** i Cu(II) iona.

Pokazalo se da se koordiniranjem bakrovog (II) iona na spoj **11** postiže značajno gašenje fluorescencije u usporedbi s drugim metalnim ionima (slika 16), a najmanji intenziteti fluorescencije postignuti su u otopinama sa srednjem i visokim pH vrijednostima (slika 17).

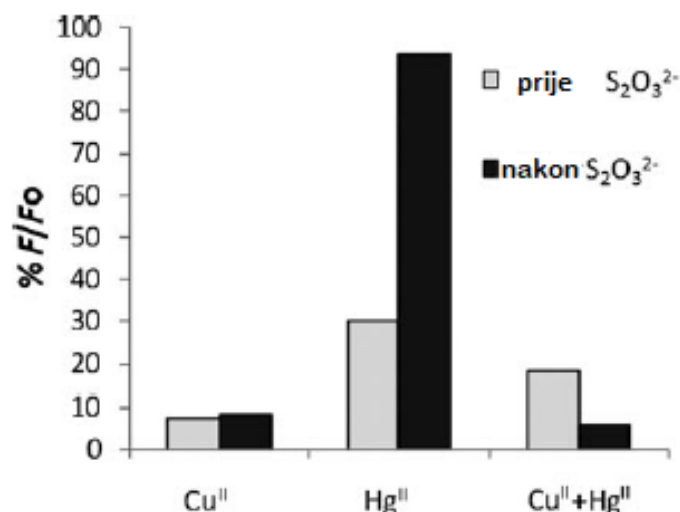


**Slika 16.** Fluorescencijski spektar spoja **11** uslijed dodatka različitih metalnih iona.



**Slika 17.** Intenzitet fluorescencije spoja **11** u ovisnosti o pH uz dodatak  $\text{Cu(II)}$  i  $\text{Hg(II)}$  iona.

Obzirom da smanjenje fluorescencije senzorske molekule **11** ukazuje na prisutnost  $\text{Cu(II)}$  i/ili  $\text{Hg(II)}$  iona, u uzorak se dodaje  $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ . Dodatkom tiosulfatnog iona ne mijenja se intenzitet fluorescencije ukoliko analit sadrži samo  $\text{Cu(II)}$  ion, a u slučaju smjese  $\text{Cu(II)}$  i  $\text{Hg(II)}$  iona, dodatkom  $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$  intenzitet fluorescencije analita dodatno opada (slika 18).



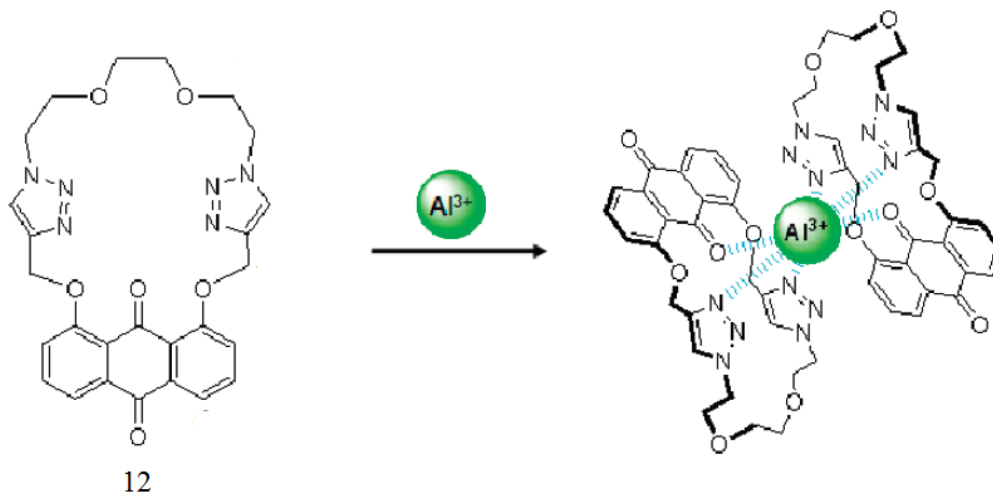
**Slika 18.** Fluorescencija spoja **11** uz prisutnost  $Cu(II)$  i  $Hg(II)$  iona prije i nakon dodavanja  $S_2O_3^{2-}$  iona.

### 3.1.3. Fluorescentni senzori za određivanje $Al(III)$ iona

Određivanje  $Al(III)$  bitno je kako za dijagnostiku, tako i za okoliš.  $Al(III)$  ion u ljudskom je organizmu toksičan te se povezuje s Alzheimerovom bolesti, a u tlu povisuje pH vrijednost što mu smanjuje plodnost. Razvoj senzora za  $Al(III)$  ione potreban je kako bi se pratile njihove vrijednosti u ljudskom organizmu i okolišu te kontrolirali procesi povezani s  $Al(III)$  ionima.<sup>20</sup>

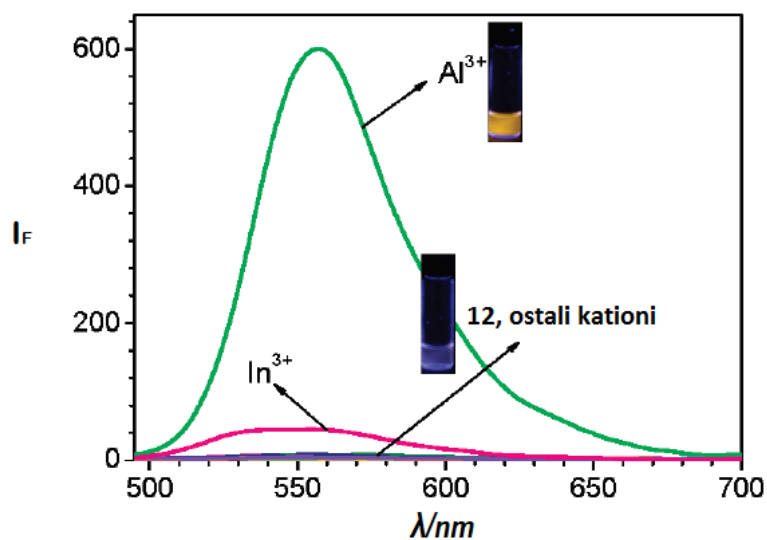
S. H. Kim i suradnici<sup>20</sup> su sintetizirali 1,2,3-triazolni derivat antrakinona kao senzorsku molekulu za određivanje  $Al(III)$  iona, čiji su struktura i pretpostavljeni model koordiniranja s  $Al(III)$  ionom vidljivi na slici 19. Spoj **12** koordinira s  $Al(III)$  ionom u stehiometrijskom omjeru 2:1 preko N3 dušika oba triazola i O9 kisika iz antrakinonskog dijela obje molekule **12**.





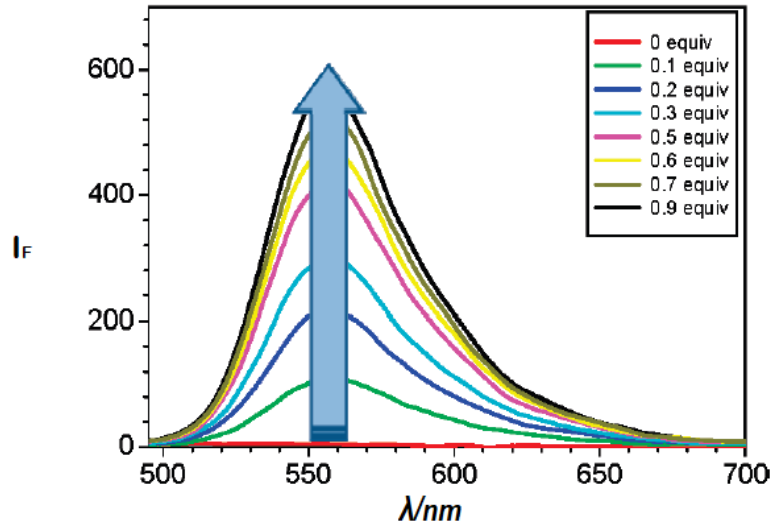
**Slika 19.** Struktura spoja **12** i predloženi model koordiniranja s  $\text{Al(III)}$  ionom.

Nakon koordiniranja spoja **12** s  $\text{Al(III)}$ , na apsorpcijskom spektru dolazi do batokromnog pomaka, odnosno područje valnih duljina se pomiče sa 380 nm za čisti spoj **12** na oko 500 nm za kompleks **12** i  $\text{Al(III)}$ , uzrokovano ICT mehanizmom. Na emisijskom spektru dolazi do pojačanja fluorescencije te kvantno iskorištenje fluorescencije ( $\Phi_F$ ) raste sa 0,038 (**12**) na 0,463 (kompleks **12** i  $\text{Al(III)}$ ), a novi emisijski maksimum se nalazi na 557 nm. Spomenute promjene su vidljive na slici 20.<sup>20</sup>



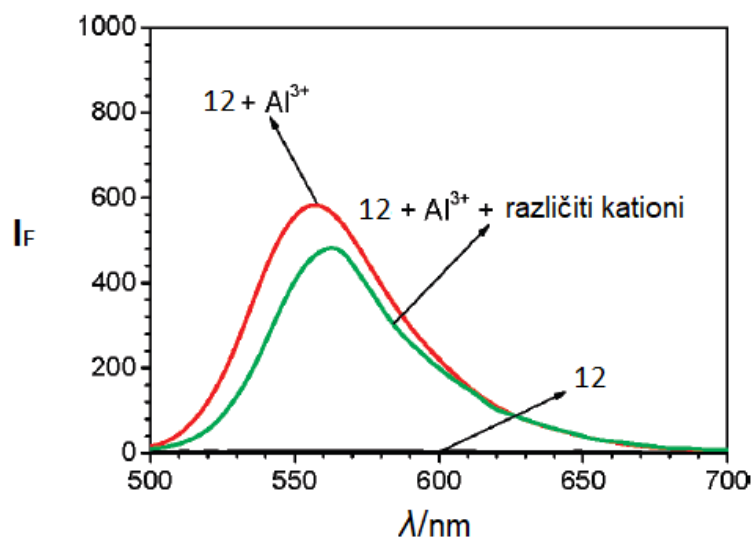
**Slika 20.** Spektar fluorescencije spoja **12** i različitih metalnih iona.

Prilikom dodavanja  $\text{Al(III)}$  iona u otopinu spoja **12**, dolazi do rasta intenziteta fluorescencije, što je prikazano slikom 21.



**Slika 21.** Spektar fluorescencije za ekvivalentne količine Al(III) dodanog spoju **12**.

Slika s prikazuje male promjene u intenzitetu fluorescencije kada se smjesi Al(III) – **12** dodaju razni metalni ioni, što ukazuje na dobru osjetljivost senzorske molekule **12** na prisutnost Al(III) iona.

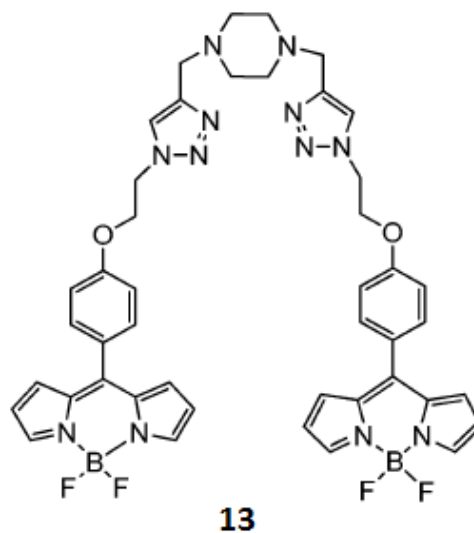


**Slika 22.** Spektar fluorescencije za smjesu Al(III)–**12** i Al(III)–**12**-kationi.

### 3.1.4. Fluorescentni indikatori za određivanje Hg(II) iona

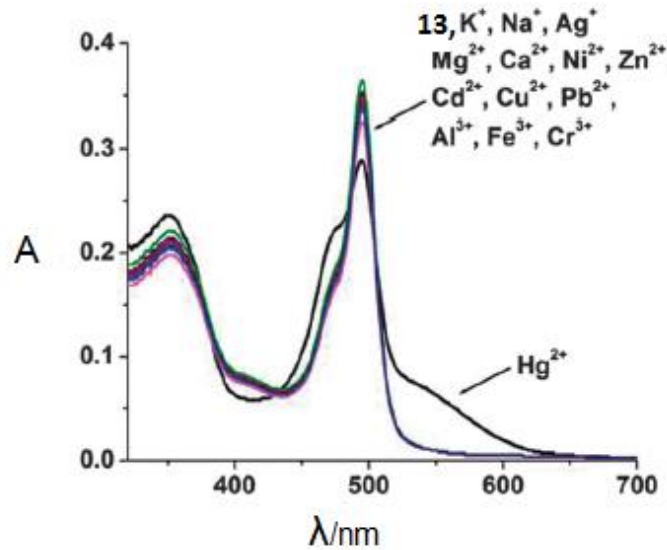
Snažna potreba za razvojem senzora za Hg(II) ione postoji zbog prisutnosti Hg(II) iona u okolišu, koja predstavlja velik ekološki i zdravstveni problem. Živa se putem hranidbenog lanca akumulira u životinjama i ljudima te zbog svoje toksičnosti uzrokuje trovanja, ozbiljna neurološka oboljenja i druge bolesti.<sup>21</sup>

R. S. Singh i suradnici<sup>21</sup> razvili su visoko selektivnu senzorsku molekulu za određivanje Hg(II) iona koja se sastoji od BODIPY (boron-dipirometen, eng *boron-dipyrromethene*) fluorofora, piperazina i 1,2,3-triazola, a njena struktura vidljiva je na slici 23. Senzor reverzibilno veže Hg(II) ione preko oba dušika iz piperizina i iz oba triazola.



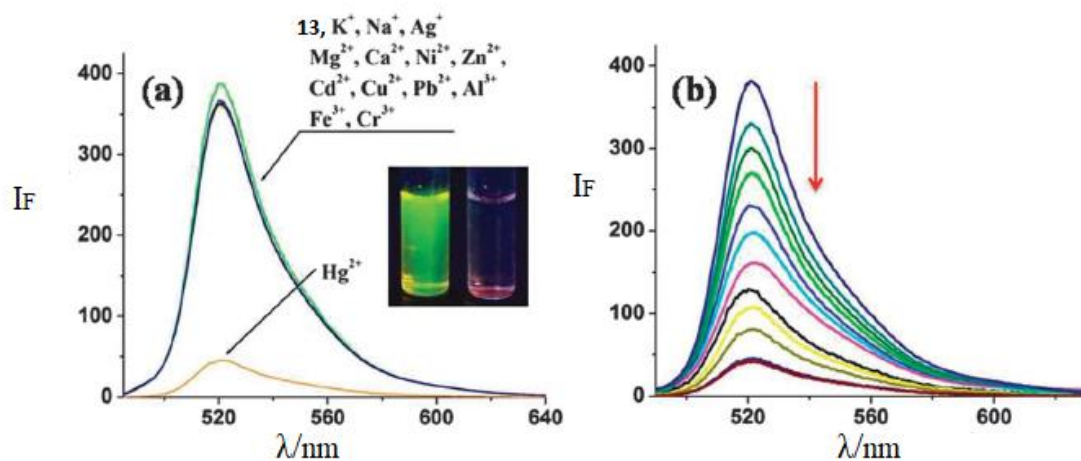
**Slika 23.** Struktura senzorske molekule **13**.

Spoj **13** daje vodenu otopinu žute boje te u prisustvu Hg(II) iona mijenja boju u narančastu, dok u prisustvu drugih metalnih iona ne mijenju boju. Spomenuta pojava je uzrokovana promjenama u apsorpcijskom spektru indikatora **13**, odnosno porastom apsorpcije na području između 500 i 600 nm, što je prikazano slikom 24.



**Slika 24.** Apsorpcijski spektar spoja **13** u prisustvu različitih metalnih iona.

Osim kolorimetrijskih promjena vidljivih okom, uočeno je i značajno smanjenje intenziteta fluorescencije pri 521 nm i kvantnog iskorištenja prilikom dodavanja Hg(II) iona u otopinu **13**, što je prikazano na slici 25. Senzorska molekula **13** je selektivna za Hg(II) ione u prisustvu različitih metalnih iona i pri različitim pH vrijednostima.

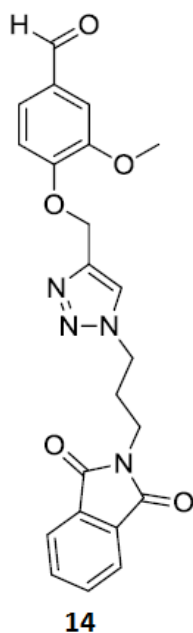


**Slika 25.** Emisijski spektar spoja **13**: (a) u prisustvu različitih metalnih iona; (b) uz povećanje količine dodanog Hg(II) iona.

### 3.1.5. Fluorescentni senzori za određivanje Fe(III) iona

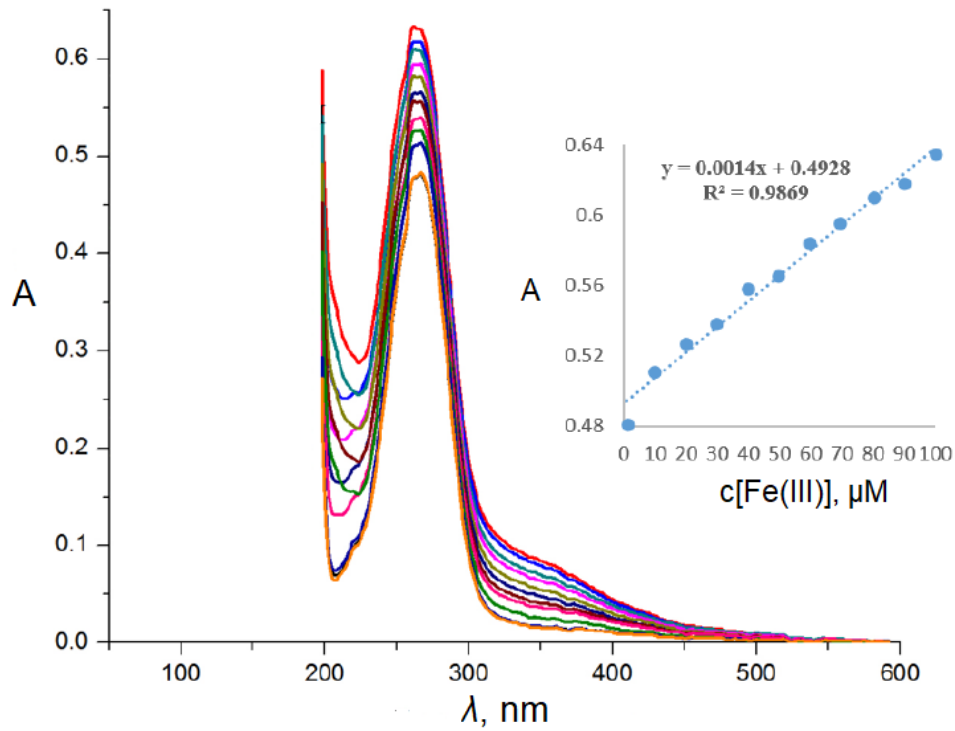
Fe(III) ioni iznimno su bitni za pravilno funkcioniranje ljudskog organizma, odnosno posjeduju ključnu ulogu u brojnim biokemijskim procesima (vezanje kisika, sinteza DNA i RNA, ...), a njihov nedostatak ili pak njihova prisutnost u prevelikim količinama dovodi do različitih oboljenja. Primjerice, količine Fe(III) iona u organizmu koje su veće od uobičajenih mogu dovesti do oštećenja biomolekula te čak do Alzheimerove ili Parkinsonove bolesti, a premalo Fe(III) uzrokuje anemiju i spor prijenos kisika do stanica. Razvoj senzora za Fe(III) ione ključan je korak ka efikasnijoj i bržoj dijagnostici.<sup>22</sup>

K. Shah, N. ul Ain i suradnici<sup>22</sup> sintetizirali su visoko selektivan triazolni kemijski senzor za određivanje Fe(III) iona u vodenom mediju, koji koordinira s Fe(III) ionom u stehiometrijskom odnosu 1:1, a čija je struktura prikazana na slici 26. Senzorskom molekulom se već uspješno određuju Fe(III) ioni u ljudskoj krvnoj plazmi i u vodovodnoj vodi u laboratoriju.



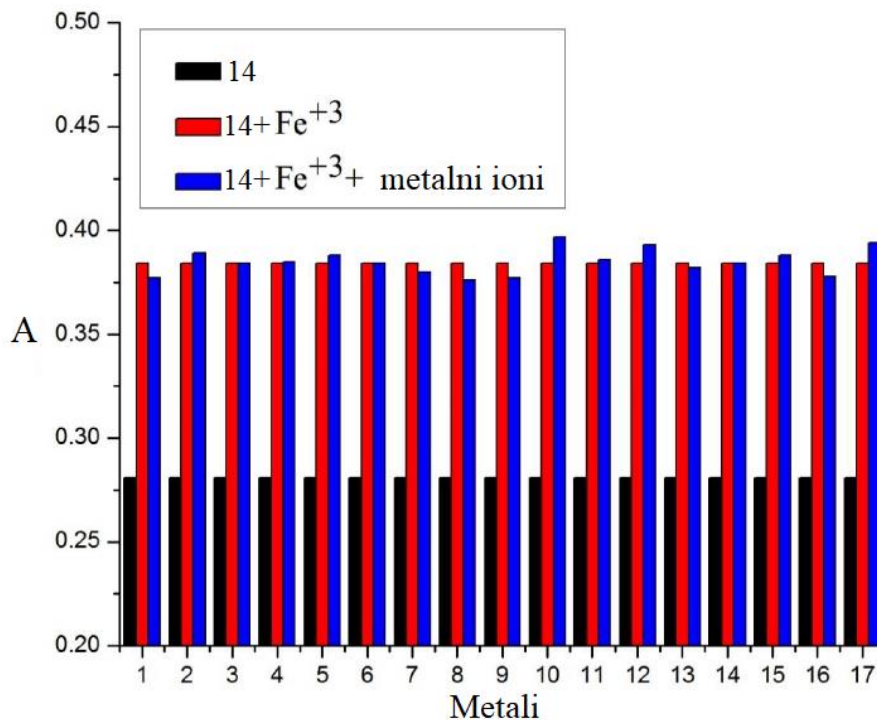
**Slika 26.** Struktura senzorske molekule **14**.

Prilikom koordiniranja senzora s Fe(III) ionom, uočeno je pojačanje absorbancije na 262 nm, a vrijednosti apsorbancije rastu paralelno s koncentracijom Fe(III) iona, što je prikazano na slici 27.



**Slika 27.** Apsorpcijski spektar kompleksa spoja **14** i Fe(III) iona s pripadajućim grafom ovisnosti apsorbancije o koncentraciji Fe(III) iona.

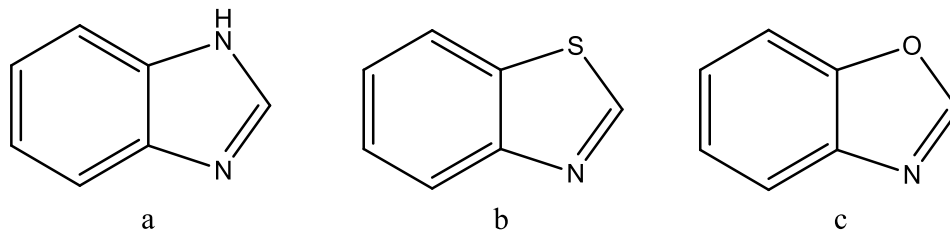
Uz dodatak različitih metalnih iona nastalom kompleksu, vrijednosti apsorbancije se značajnije ne mijenjaju (slika 28), što ukazuje na visoku selektivnost senzorske molekule prema Fe(III) ionima.



**Slika 28.** Absorbancije spoja **14**, kompleksa **14** i Fe(III) te istog kompleksa uz prisutnost različitih metalnih iona (1 = Ag<sup>+</sup>, 2 = Ca<sup>2+</sup>, 3 = Cd<sup>2+</sup>, 4 = Co<sup>2+</sup>, 5 = Cu<sup>+</sup>, 6 = Cu<sup>2+</sup>, 7 = Hg, 8 = In<sup>3+</sup>, 9 = K<sup>+</sup>, 10 = La<sup>3+</sup>, 11 = Li<sup>+</sup>, 12 = Mg<sup>2+</sup>, 13 = Na<sup>+</sup>, 14 = NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, 15 = Ni<sup>2+</sup>, 16 = Pb<sup>2+</sup>, 17 = Y<sup>3+</sup>, 18 = Zn<sup>2+</sup>).

### 3.2. Benzazolni derivati kao metalni senzori

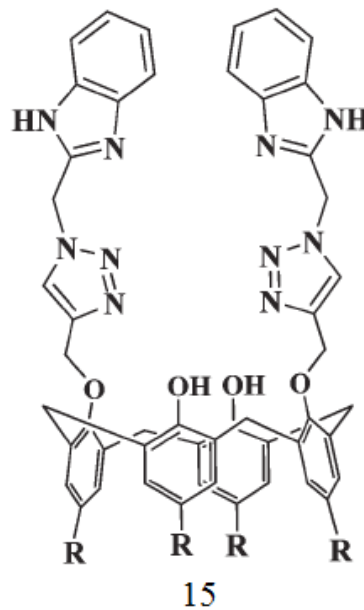
Benzazolni derivati imaju potencijalnu primjenu u kemijskim sensorima zbog svoje specifične strukture i već poznatih fluorescencijskih svojstava. Heteroatomi benzazolnih derivata koordiniraju s metalima tvoreći komplekse, što može promijeniti optička svojstva molekule. Pod benzazolne derivate ubrajaju se benzimidazol, benzotiazol i benzoksazol, čije su strukture prikazane na slici 29.



**Slika 29.** Strukture a) benzimidazola; b) benzthiazola; c) benzoksazola.

### 3.2.1. Fluorescentni benzimidazolni senzor za Cu(II) ion

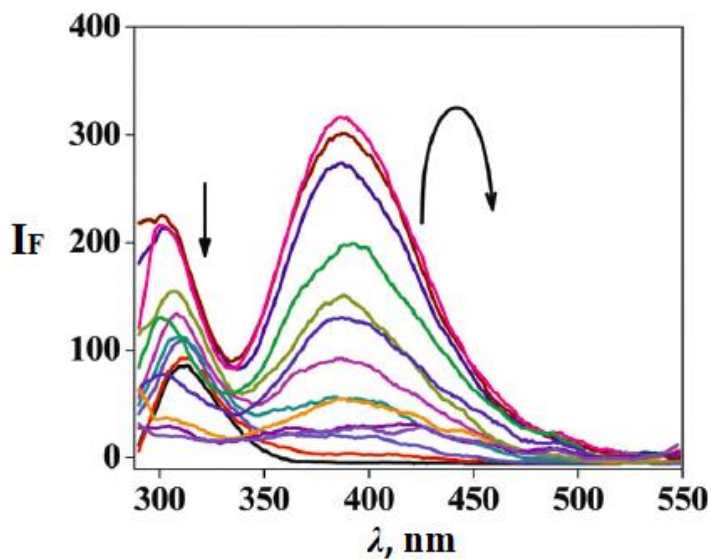
R. K. Pathak i suradnici<sup>23</sup> sintetizirali su derivat benzimidazola s triazolnim dijelovima kao selektivan senzor za Cu(II) ione u vodenom mediju, a struktura senzorske molekule prikazana je na slici 30.



**Slika 30.** Struktura senzorske molekule **15**.

Uočeno je da kod kompleksa nastalog koordinacijom spoja **15** i Cu(II) iona dolazi do promjene fluorescencije i novi emisijski maksimum na 380 nm, što je prikazano na slici 31. Također, u vodenom je mediju spoj **15** selektivan za Cu(II) ion čak i u prisutnosti različitih drugih metalnih iona.

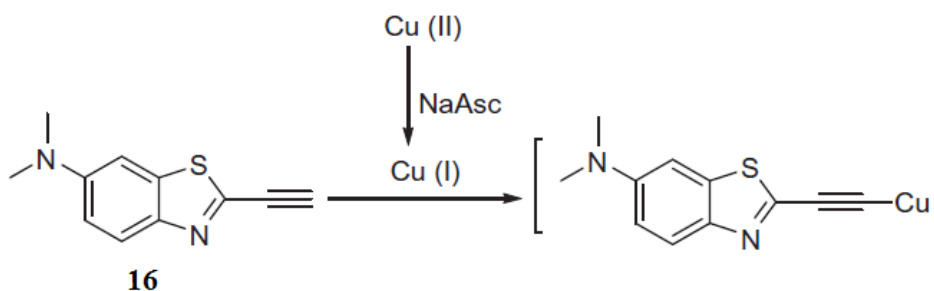




**Slika 31.** Fluorescencijski spektar kompleksa spoja **15** i Cu(II) iona u ovisnosti o koncentracijama metalnog iona.

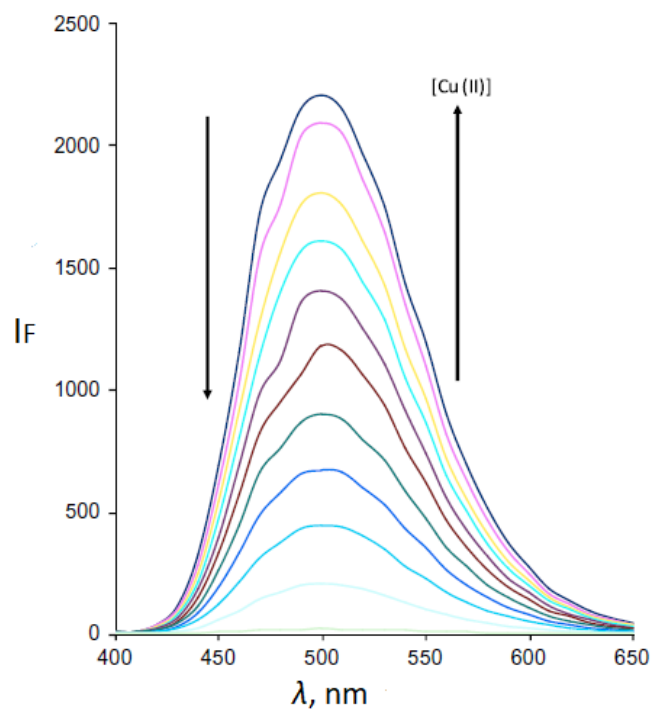
### 3.2.2. Fluorescentni benzotiazolni senzor za Cu(I) i Cu(II) ion

J. Qi i suradnici<sup>24</sup> razvili su 6-dimetilaminobenzotiazolni alkin kao fluorescentni senzor za bakrove ione u vodenoj otopini uz prisutnost reducensa (natrijevog askorbata), a shematski prikaz reakcije s Cu(I) ionima prikazan je na slici 32.



**Slika 32.** Struktura molekule **8** i shema reakcije s Cu(I) ionom.

Senzorskoj molekuli se pri reakciji s Cu(I) mijenjaju fluorescencijska svojstva, odnosno dolazi do brzog gašenja fluorescencije, što je prikazano na slici 33. Intenzitet fluorescencije obrnuto je proporcionalan koncentraciji bakrovih iona.



**Slika 33.** Emisijski spektar spoja **16** pri različitim koncentracijama Cu(II) iona.

## 4. Rasprava i rezultati

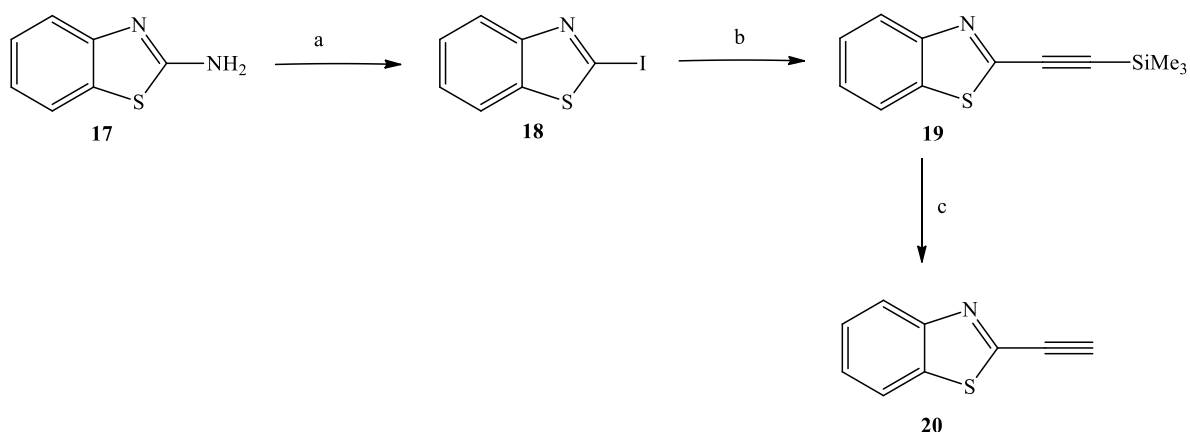
Kemijski optički senzori u užem smislu su organske molekule koje na sebe vežu ione ili molekule čime im se mijenjaju optička svojstva, primjerice fluorescencija. Određivanje analita fluorescencijskim tehnikama pokazalo se kao obećavajuća metoda zbog visoke osjetljivosti i selektivnosti i u zadnjih nekoliko godina sintetiziran je velik broj molekula kao potencijalnih fluorescentnih kemosenzora. Za dizajn fluorescentnih proba bitne su intramolekulske interakcije između fluorofora i receptora pa prilikom dizajna molekula senzora treba posvetiti pažnju mehanizmima stvaranja i prijenosa signala u molekuli za njeno senzorsko djelovanje.

Bakrom(I) katalizirana azid-alkin cikloadicija kojom se dobivaju 1,4-disupstituirani 1,2,3-triazoli predstavlja mogućnost jednostavne sinteze i modifikacije organskih molekula. S obzirom na prisutnost dušikovih atoma sa slobodnim elektronskim parom, 1,2,3-triazolni derivati pokazuju potencijalna senzorska svojstva za određivanje metalnih iona.

Uzimajući u obzir dosadašnje spoznaje o sve većoj zastupljenosti *click* metodologije u senzorskoj kemiji, te mogućoj primjeni triazolnih derivata za određivanje metalnih kationa, u nastavku istraživanja naglasak je dan na dizajn i sintezu novih malih organskih molekula iz reda benzotiazola s konjugiranim 1,2,3-triazolnim prstenom (slika 34). Benzotiazol je izabran kao fluorofor jer njegov analog luciferin pokazuje fluorescencijska svojstva. S obzirom na kemijsku strukturu benzotiazolnog prstena, pretpostavlja se da bi elektronski „siromašna“ alkilna ili elektronima bogata azidna skupina na položaju 2 benzotiazola smanjila fluorescenciju benzotiazola.<sup>25</sup> Međutim, uvođenjem konjugiranog 1,2,3-triazolnog prstena u molekulu *click* reakcijom s određenim terminalnim alkinima, benzotiazol bi postao fluorofor.

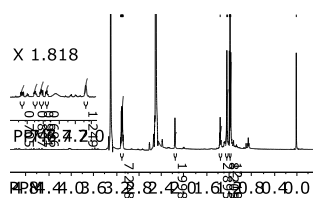
Ciljani derivati bit će pripremljeni *click* reakcijom 2-etinilbenzotiazola i 1-azidobenzena uz Cu(I) kao katalizator. U tu svrhu potrebno je sintetizirati 2-etinilbenzotiazol **20** iz 2-aminobenzotiazola **17**.

Predložena je višestupnjevita sinteza triazolil-benzotiazolnog derivata (**22**) koja se sastoji od četiri koraka. U prvom je koraku (a) procesom diazotacije i jodiranja u prisutnosti *para*-toluensulfonske kiseline, *p*-MeC<sub>6</sub>H<sub>4</sub>SO<sub>3</sub>H, u acetonitrilu, pripremljen 2-jodbenzotiazol **18**. U idućem se koraku (b) dobiva zaštićeni acetilen-benzotiazol **19** reakcijom spoja **18** s terminalnim alkinom u bazičnom mediju uz katalizatore Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub> i bakrov(I) jodid. Spoj **19** podvrgava se kolonskoj kromatografiji (c) na silika-gelu kako bi se uklonila zaštitna trimetilsililna skupina pri čemu nastaje željeni 2-alkilni derivat benzotiazola, 2-etinilbenzotiazol **20**.



**Slika 34.** Predložena sinteza 2-etinilbenzotiazola **20**. Reagensi i uvjeti: (a) *p*-MeC<sub>6</sub>H<sub>4</sub>SO<sub>3</sub>H, MeCN, 0-10 °C, KI, NaNO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O; (b) 1) CuI, PdCl<sub>2</sub>(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, NEt<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 2) NaHCO<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>O; (c) silika-gel.

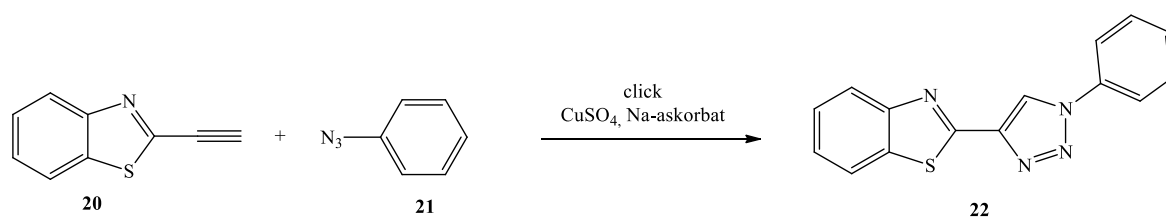
Tijek sinteze spoja **20** praćen je tankoslojnom kromatografijom (TLC, engl. *thin layer chromatography*), te je na temelju toga provedena *click* reakcija s 1-azidobenzenom u svrhu dobivanja željenog triazolnog derivata benzotiazola (**22**). Za spoj **20** snimljen je <sup>1</sup>H NMR spektar, prikazan na slici 35.



**Slika 35.** <sup>1</sup>H NMR spektar spoja **20**.

Na  $^1\text{H}$  NMR spektru vidljivo je da spoj **20** nije uspješno izoliran već je dobivena smjesa različitih produkata, te je potrebno optimirati metodu skidanja zaštitne trimetilsililne skupine.

Osim s 1-azidobenzenom, *click* reakciju je moguće provoditi s različito supstituiranim aromatskim azidima. Pretpostavka je da će elektron donorski supstituenti (primjerice  $-\text{NR}_2$ ,  $-\text{OH}$ ,  $-\text{NH}_2$  i dr.) pogodovati pojačavanju fluorescentnih svojstava molekule, jer je benzotiazol elektrofilan, dok bi elektron odvlačeće grupe supstituenata (primjerice  $-\text{NO}_2$ ,  $-\text{CN}$  i dr.) uzrokovale suprotan efekt.



**Slika 36.** Predložena sinteza novog triazolil-benzotiazolnog derivata kao potencijalnog senzora za metalne katione

Predloženi spoj i slični derivati pokazivali bi svojstvo fluorescencije zbog konjugiranog  $\pi$ -sustava dobivenog uvođenjem 1,2,3-triazolne skupine. Osim toga, heterocikličke organske molekule su poznate kao ligandi za metale. S obzirom da novopripremljeni spojevi u strukturi sadrže benzotiazolnu i 1,2,3-triazolnu jedinicu, može se pretpostaviti da će metalni ion koordinirati na heteroatome i time mijenjati optička svojstva molekule. Na temelju toga se može očekivati da će pripremljeni spojevi pokazati svojstva koja će im omogućiti primjenu kao optički senzori za metalne ione.

## 5. Eksperimentalni dio

### Priprava 2-jodbenzotiazola (**18**)

Bezbojna otopina KI (324,20 mg, 1,95 mmol) i NaNO<sub>2</sub> (103,64 mg, 1,50 mmol) u vodi (0,45 mL) dodana je u žutu otopinu 2-aminobenzotiazola (100 mg, 0,75 mmol) i *p*-TsOH (428,57 mg, 2,25 mmol) u acetonitrilu (2,67 ml) pri 0°C, a smjesa se na toj temperaturi miješala 2 sata te se dobivena smeđa otopina preko noći ostavila na sobnoj temperaturi. Otopini je dodana voda (10,51 mL) te je smjesa filtrirana. Talog je ispran metanolom i uparen do suhog smeđeg produkta (38,5 mg).

### Pokušaj priprave 2-etinilbenzotiazola (**20**)

35 mg spoja **18** otopljeno je u trimetilsililazidu, TMS (50,46 mg, 0,44 mmol) te je otopini dodan trietilamin (0,22 mL), diklormetan (0,46 mL), Pd(PPh)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1,89 mg) i CuI (0,56 mg). Smjesa se refluxirala 4 sata na 65°C. Reakcijska otopina je uparena pod sniženim tlakom i pročišćena kolonskom kromatografijom na silika gelu uz eluens CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:CH<sub>3</sub>OH (150:1) te je dobiveno 30,4 mg smeđeg praškastog produkta.

### Postupak *click* reakcije

Otopini 1-azidobenzena (51,90 mg) u DMF-u (11,12 mL) i vodi (3,71 mL) dodan je 2-etinilbenzotiazol (**20**) (30,4 mg, 0,19 mmol), CuSO<sub>4</sub> (6,12 mg), Na-askorbat (9,27 mg) i TBTA (14,83 mg), a otopina se miješala 30 min na sobnoj temperaturi. Reakcijska otopina ekstrahirala se s EtOAc, isprala s vodenom otopinom Na Cl i sušila preko Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Željeni produkt nije izoliran.



## 6. Zaključak

Razvoj *click* kemije posljednih godina značajno je utjecao na područja kemijskog i biokemijskog inženjerstva, a produkt najpoznatije reakcije *click* kemije, 1,2,3-triazol, pronašao je svoju primjenu u širokom području sinteze kemijskih senzora. Zbog svoje specifične strukture, 1,2,3-triazoli idealni su za ulogu poveznice između receptorskog i fluorofornog dijela senzora, jer njihovi delokalizirani  $\pi$ -elektroni postaju dijelom konjugiranog  $\pi$ -sustava molekule i sudjeluju u prijenosu signala. Također, triazoli mogu koordinirati metalne ione pomoću dušikovih atoma, čime se mijenjaju optička svojstva molekule.

Fluorescentni kemijski senzori za određivanje kationa iznimno su zanimljivi za područja dijagnostike i za potrebe određivanja kationa u osjetljivim uvjetima, jer na neinvanzivan način daju kvalitativni i kvantitativni signal. Potreba za fluorescentnim kemijskim sensorima u dijagnostici raste zbog mogućnosti lakšeg i bržeg određivanja metalnih iona u organizmu, čije odstupanje od uobičajene koncentracije može dovesti do raznih poremećaja ili oboljenja.

U ovom je radu dan literaturni pregled fluorescentnih triazolnih i benzazolnih kemijskih senzora za određivanje Zn(II), Al(III), Fe(III), Hg(II), Cu(II) i Cu(I) iona koji već imaju primjenu u praksi ili su potencijalno primjenjivi. Na temelju korištenih znanstvenih radova, razrađena je predložena sinteza za dobivanje triazolil-benzotiazolnog derivata kao potencijalnog senzora za metalne katione.

Predložena višestupnjevita sinteza triazolil-benzotiazolnog derivata kao potencijalnog senzora za metalne ione provedena je, no željeni produkt (**22**) nije uspješno izoliran.

## 7. Literatura

1. <http://www.organic-chemistry.org/namedreactions/click-chemistry.shtm>, (pristup 20. lipnja 2017.).
2. Hein, C. D., Liu, X.-M., Wang, D., Click chemistry, a powerful tool for pharmaceutical sciences, *Pharm. Res.* **25** (2008) 2216–2230.
3. Krstulović L., Saftić D., Matić J., Bajić M., Žinić B., 1,3-Dipolarna cikloadicija (II. dio): Trokomponentne Cu(I) katalizirane klik-reakcije, *Kem.Ind.* **64** (9-10) (2015) 499–512.
4. Liang L., Astruc D., The copper(I)-catalyzed alkyne-azide cycloaddition (CuAAC) “click” reaction and its applications. An overview, *Coordination Chemistry Reviews* **225** (2011) 2933–2945.
5. Johansson J.R., Beke-Somfai T., Stalsmeden A.S., Kann N., Ruthenium-Catalyzed Azide Alkyne Cycloaddition Reaction: Scope, Mechanism, and Applications, *Chem. Rev.* **116** (2016) 14726–14768.
6. Zhu L., Brassard C.J., Zhang X., Guha P.M., Clark R.J., On the Mechanism of Copper(I)-Catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition, *Chem. Rec.* **16** (2016) 1501–1517.
7. <http://www.namereactions.org/huisgen-13-dipolar-cycloaddition/>, (pristup 2. srpnja 2017.).
8. Moses J.E., Moorhouse A.D., The Growing Applications of Click Chemistry, *Chem. Soc. Rev.* **36** (2007) 1249–1262.
9. Hulanicki A., Glab S., Ingman F., Chemical Sensors Definitions and Classification, *Pure & Appl. Chem.* **63** (1991) 1247–1250.
10. Lobnik, A., Turel, M., Korent, Urek, Š., Optical Chemical Sensors: Design and Applications, u: Wang, W., *Advances in Chemical Sensors*, InTech, (2012) 3–28.
11. Demchenko, A. P., Introduction to fluorescence sensing, *Anal. and Bioanal. Chem.*, **395** (2009) 1195–1196.
12. Valeur, B., *Molecular Fluorescence*, John Wiley & Sons, Inc., Weinheim, 2002.
13. Parkesh, R., Veale, E. B., Gunnlaugsson, T., *Fluorescent Detection Principles and Strategies in Chemosensors*, John Wiley & Sons, Inc., 2011., str. 229–252.
14. Liu, Z., He, W., Guo, Z., Metal Coordination in Photoluminescent Sensing, *Chem. Soc. Rev.*, **42** (2013) 1568–1600.
15. Cotruvo, J., A., Jr., Aron, A., T., Ramos-Torres, K., M., Chang, C., J., Synthetic Fluorescent Probes for Studying Copper in Biological Systems, *Chem. Soc. Rev.*, **44** (2015) 4400–4414.
16. Formica, M., Fusi, V., Giorgi, L., Micheloni, M., New fluorescent chemosensors for metal ions in solution, *Coordination Chem. Rev.* **256** (2012) 170–192.

17. Huang, S., Clark, R.J., Zhu, L., Highly Sensitive Fluorescent Probes for Zinc Ion Based on Triazolyl-Containing Tetradentate Coordination Motifs, *Organic Letters*, Vol. 9, **24** (2007) 4999–5002.
18. Nguyen, D., M., Frazer, A., Rodriguez, L., Belfield, K., D., Selective Fluorescence Sensing of Zinc and Mercury Ions with Hydrophilic 1,2,3-Triazolyl Fluorene Probes, *Chem. Mater.*, **22** (2010) 3472–3481.
19. Lau, Y., H., Price, J., R., Todd, M., H., Rutledge, P., J., A Click Fluorophore Sensor That Can Distinguish Cu<sup>II</sup> and Hg<sup>II</sup> via Selective Anion-Induced Demetallation, **17** (2011) 2850–2858.
20. Kim, S., H., Choi, H., S., Kim, J., Lee, S., J., Quang, D., T., Kim, J., S., Novel Optical/Electrochemical Selective 1,2,3-Triazole Ring-Appended Chemosensor for the Al<sup>3+</sup> Ion, *Org. Lett.*, Vol. 12, **3** (2010) 560–563.
21. Singh, R., S., Gupta, R., K., Paitandi, R., P., Misra, A., Pandey, D., S., Triazole-Appended BODIPY-Piperazine Conjugates and Their Efficacy Toward Mercury Sensing, *New J. Chem*, **39** (2015) 2233–2239.
22. Shah, K., ul Ain, N., Ahmed, F., Anis, I., Raza Shah, M., A New Highly Selective Chemosensor for the Detection of Iron Ion in Aqueous Medium Based on Click Generated Triazole, *Sensors and Actuators B*, **249** (2017) 515–522.
23. Pathak, R., K., Hinge, V., K., Mondal, P., Rao, C., P., Ratiometric Fluorescence Off-on-off Sensor for Cu<sup>2+</sup> in Aqueous Buffer by a Lower Rim Triazole Linked Benzimidazole Conjugate of Calix [4] arene, *Dalton Trans.*, **41** (2012) 10652–10660.
24. Qi, J., M., Han, M., S., Tung, C.-H., A Benzothiazole Alkyne Fluorescent Sensor for Cu Detection in Living Cell, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **22** (2012) 1747–1749.
25. Qi, J., Tung, C.-H., Development of Benzothiazole ‘Click-on’ Fluorogenic Dyes, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **21** (2011) 320–323.

## ŽIVOTOPIS

Emina Džanić [REDACTED] Pohađala je osnovnu školu Marije Jurić Zagorke i 2010. godine upisala XV. gimnaziju u Zagrebu. Treći razred srednje škole pohađala je u gimnaziji *Lycée International Montebello* u Lilleu (Francuska), te maturirala u Hrvatskoj 2014. godine, kada je i upisala studij Kemijskog inženjerstva na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu. Radila je kao studentski demonstrator na laboratorijskim vježbama kolegija Opća i anorganska kemija.