Derivati iminokumarina kao potencijalne solvatokromne probe

Kralj, Magdalena

Undergraduate thesis / Završni 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:149:255512

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**



Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Chemical Engineering and Technology University of Zagreb







SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE

SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Magdalena Kralj

DERIVATI IMINOKUMARINA KAO POTENCIJALNE SOLVATOKROMNE PROBE

Voditelj rada: Doc. dr. sc. Svjetlana Krištafor

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

Dr. sc. Nataša Perin, poslijedoktorand

Dr. sc. Petar Kassal, poslijedoktorand

Zagreb, rujan 2015.

Zahvalila bih se mentorici doc.dr.sc. Svjetlani Krištafor na vodstvu i danim smjernicama prilikom izrade ovog završnog rada. Također, posebno bih se zahvalila asistentici mag.appl.chem Emi Horak na uloženom vremenu i iznimnom strpljenju, te ponajviše na velikoj motivaciji i konstantnoj pomoći koja mi je bila potrebna za izradu ovog završnog rada. Zahvaljujem i svim ostalim djelatnicima na Zavodu za opću i anorgansku kemiju te prijateljima, kolegama i rodbini.

SAŽETAK

Svrha ovog rada jest optička karakterizacija novosintetiziranih derivata iminokumarina **IM1** - **IM4**, s ciljem utvrđivanja njihove potencijalne primjene kao solvatokromnih proba. Određivanje utjecaja otapala na optička svojstva ispitivanih spojeva bitan je korak u daljnjoj karakterizaciji novosintetiziranih spojeva kao potencijalnih pH i metalnih (kemo)senzora u otopinama i plastificiranoj polimernoj matrici.

UV-vidljivom apsorpcijska i fluorescencijska spektrofotometrijom ispitan je utjecaj strukture na spektralna svojstva derivata iminokumarina u otopinama. Proučavan je utjecaj otapala različitih parametara polarnosti na spektralna svojstva spojeva 7-*N,N*-dietilamino-2-imino-3-(2-*N*-metilbenzimidazolil)kromen (**IM1**), 2-imino-3-(2-*N*-metilbenzimidazolil)kromen (**IM2**), 7-*N*,*N*-dietilamino-2-imino-3-(*2-N*-5-nitro-1*H*-benzimidazolil)kromen (**IM3**) i 7-*N*,*N*-dietilamino-2-imino-3-(*2-N*-1*H*-benzimidazolil)kromen (**IM4)**.

Spektrofotometrijskom karakterizacijom ispitivanih spojeva u različitim otapalima utvrđeno je da spektralne karakteristike spomenutih derivata iminokumarina ovise o polarnosti i vrsti otapala. Spojevi **IM1**, **IM2** i **IM4**, 7-*N,N*-dietilamino-2-imino-3-(2-*N*-metilbenzimidazolil)kromen, 2-imino-3-(2-*N*-metilbenzimidazolil)kromen i 7-*N*,*N*-dietilamino-2-imino-3-(*2-N*-1*H*-benzimidazolil)kromen, uz detaljnija ispitivanja mogu biti korišteni kao solvatokromne probe. Spoj **IM3,** 7-*N*,*N*-dietilamino-2-imino-3-(*2-N*-5-nitro-1*H*-benzimidazolil)kromen, pokazuje najizraženije spektralne promjene, no nije pogodan za navedenu primjenu zbog izrazito slabe topljivosti.

Ključne riječi: derivati iminokumarina, fluorescencija i apsorpcija, solvatokromizam

SUMMARY

The aim of this work was the optical characterisation of novel iminocoumarine derivatives **IM1 – IM4** in order to determine their applicability as solvatochromic probes. Effect of solvent is an important parameter for the further characterisation of examined derivatives as a potential pH and metal (chemo)sensors in solutions and polymer matrices.

Compunds were characterised by UV-visible absorption and fluorescence spectrophotometry in order to examine effect of solvents on the spectral properties of the tested compunds. Effect of solvent on a spectral properties has been determined for compounds 7-*N*, *N*-diethylamino-2-imino-3-(2-*N*-methylbenzimidazolyl) chromene (**IM1**), 2-imino-3-(2-*N*-methylbenzimidazolyl) chromene (**IM2**), *N*,*N*-diethyl-2-imino-3-(5-nitro-1*H*-benzo[d]imidazol-2-yl)-2*H*-chromen-7-amine (**IM3**) and 7-*N*, *N*-diethylamino-2-imino-3-(2-*N*-1*H*-6-nitrobenzimidazolyl) chromene (**IM4**).

Spectral characteristics of mentioned iminocoumarine derivatives depend on a type and polarity of a solvent. Compounds **IM1**, **IM2** and **IM4**, 7-*N*, *N*-diethylamino-2-imino-3-(2-*N*-methylbenzimidazolyl) chromene, 2-imino-3-(2-*N*-methylbenzimidazolyl) chromene and 7-*N*,*N*-diethylamino-2-imino-3-(2-*N*-1*H*-6-nitrobenzimidazolyl) chromene, can be used as a solvatochromic probes. Compound **IM3,** N,*N*-diethyl-2-imino-3-(5-nitro-1*H*-benzo[d]imidazol-2-yl)-2*H*-chromen-7-amine, shows the most extreme spectral changes but it is not suitable for mentioned application because of its extremely low solubility.

Key words: iminocoumarine derivatives, absorbance and fluorescence, solvatochromism

SADRŽAJ

1. Uvod…….....1

2. Opći dio……. 4

2.1. Kemijski senzori……..5

2.1.1. Optički kemijski senzori……...……..6

2.1.1.1. Metode karakterizacije optičkih senzora……....7

UV-vidljiva apsorpcijska spektrofotometrija……..8

UV-vidljiva fluorescencijska spektrofotometrija…… 11

2.2. Solvatokromizam……...14

2.2.1. Solvatokromne molekule i njihova primjena u kemijskim senzorima..15

2.3. Iminokumarin i derivati iminokumarina……22

2.3.1. Derivati iminokumarina kao solvatokromne probe……23

3. Eksperimentalni dio ……...27

3.1. Materijali, kemikalije i instrumenti……...28

3.2. Priprava matičnih *(stock)* otopina i odabir otapala…….....30

3.2.1. Priprava matičnih (*stock*) otopina……...……30

3.2.2. Odabir otapala…….32

3.3. Spektralna karakterizacija ispitivanih spojeva …….34

3.3.1. Snimanje UV-vidljivih apsorpcijskih spektara……...34

3.3.2. Snimanje UV-vidljivih fluorescencijskih spektara…….35

4. Rezultati…… .37

4.1. Spektralne karakteristike ispitivanih spojeva u etanolu……38

4.2. Utjecaj otapala na apsorpcijska svojstva ispitivanih spojeva……42

4.3. Utjecaj otapala na fluorescencijska svojstva ispitivanih spojeva…….44

5. Rasprava……...….48

5.1. Spektralne karakteristike ispitivanih spojeva u etanolu…….…….….50
5.2. Utjecaj otapala na apsorpcijska svojstva ispitivanih spojeva……...52
5.3. Utjecaj otapala na fluorescencijska svojstva ispitivanih spojeva…….53

6. Zaključak…….....56

7. Literatura…….58

8. Životopis……...62

1.Uvod

Kemijski senzori jesu uređaji koji u određenom vremenu pretvaraju informaciju o prisutnosti kompleksnog spoja ili specifičnog iona u analitički mjerljivi signal. Osjetilni dio, odnosno receptor i mjerni pretvornik, dvije su osnovne funkcionalne jedinice svakog kemijskog senzora. Kemijski senzori osim navedene dvije funkcionalne jedinice mogu sadržavati i separator, primjerice membranu. Osjetilni dio pretvara kemijsku informaciju u oblik energije kojeg pretvornički dio senzora može prepoznati (najčešće se radi o električnom signalu) te je odgovoran za osjetljivo i selektivno prepoznavanje ispitivanog analita [1]. Optički kemijski senzori su vrsta kemijskih senzora čije se djelovanje temelji na interakciji ispitivane materije s elektromagnetskim zračenjem, pri čemu najčešće dolazi do apsorpcije i luminiscencije zračenja. Spektralnom karakterizacijom UV-vidljivog dijela zračenja možemo doći do točne informacije o koncentraciji analita i strukturi ispitivanog uzorka [2].

Poznato je kako okolni medij i otapala mogu utjecati na UV-vidljivi i infracrveni apsorpcijski spektar prilikom čega dolazi do promjena u položaju i intenzitetu te obliku apsorpcijskih vrpca, što nazivamo solvatokromizmom. Solvatokromne molekule stoga mogu biti primijenjene u kemijskim senzorima ili se same mogu koristiti kao solvatokromne probe. Među solvatokromne probe ubrajamo široki spektar pozitivno i negativno nabijenih molekula i spojeva koje imaju znatan utjecaj na pomake u apsorpcijskim i fluorescencijskim spektrima. Radi se o elektronskim promjenama koje se događaju u molekuli, a vidljive su promjenom valne duljine maksimuma apsorpcije i fluorescencije. Solvatokromne molekule se koriste u brojnim istraživanjima mikroheterogenog medija, kao i bioloških i biokemijskih sustava. Vrlo često su one jedini način za proučavanje strukture veznog mjesta i dinamike proteina nosača, lipida, slojeva i prirodnih membrana na molekularnim mikroskopskim slojevima.

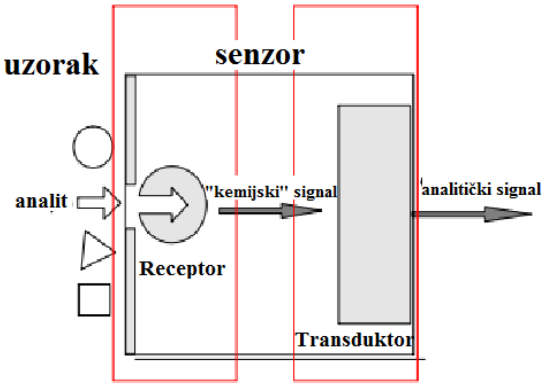
Zadnjih godina kumarini, iminokumarini i njihovi derivati su intenzivno istraživana skupina organskih spojeva zbog njihove primjene kao kemijskih i bioloških senzora te fluorescentnih proba. Također, derivati kumarina imaju široku primjenu u medicini kao antibiotici, antitumorski agensi i kemoterapeutici. Mnogi derivati kumarina su primjenjivani i u laserskoj tehnologiji. Značajna je i njihova osjetljivost na polarnost otapala, pH i temperaturu zbog čega su odlični optički senzori i solvatokromne probe [3 - 5].

U ovom radu istraživana su svojstva četiri derivata iminokumarina UV-vidljivom apsorpcijskom i fluorescencijskom spektrofotometrijom kako bi se utvrdila njihova potencijalna primjena kao solvatokromnih proba. Fotofizička karakterizacija 7-*N,N*-dietilamino-2-imino-3-(2-*N*-metilbenzimidazolil)kromena (**IM1**), 2-imino-3-(2-*N*-metilbenzimidazolil)kromena (**IM2**), 7-*N*,*N*-dietilamino-2-imino-3-(*2-N*-5-nitro-1*H*-benzimidazolil)kromena (**IM3**) i 7-*N*,*N*-dietilamino-2-imino-3-(*2-N*-1H-benzimidazolil)kromena (**IM4**) provedena je u etanolu te je ispitan utjecaj 10 otapala različitih parametara polarnosti na spektralna svojstva spomenutih derivata iminokumarina.

2. Opći dio

2.1. Kemijski senzori

Kemijski senzori su uređaji koji u realnom vremenu daju informacije o istraživanom uzorku. Točnije, oni pretvaraju informaciju o prisutnosti specifičnog spoja, iona ili kompleksnog uzorka u mjerljivi signal (slika 1.). Postoje različite vrste kemijskih senzora: optički kemijski senzori, senzori osjetljivi na promjenu mase, električni senzori, elektrokemijski, magnetski te termometrijski senzori, kao i kemijski senzori temeljeni na mjerenju fizikalnih svojstava sustava [1, 2].



Slika 1. Shema principa rada kemijskog senzora

Najveće moguće poteškoće pri razvoju, istraživanju i uporabi kemijskih senzora su sterilizacija, kontaminacija (opasnost da ne dođu u dodir s okolinom) i ponekad cijena. Korištenjem senzora *'in situ'* gotovo uvijek je nužna sterilizacija, a time dolazi do promjena pojedinih karakteristika senzora odnosno odstupanje od originalne kalibracije senzora [2].

2.1.1. Optički kemijski senzori

Optički kemijski senzori predstavljaju grupu kemijskih senzora kod kojih elektromagnetskim zračenjem pobuđujemo analitički signal u pretvorniku. Temelje se na reakciji koja uzrokuje optičku promjenu, a rezultat je međudjelovanja analita i osjetilnog djela senzora. Dakle, djelovanje optičkih senzora je temeljeno na interakciji svjetla i materije [1, 6]. Mogu se dodatno podijeliti prema vrsti optičkih svojstava koja su primijenjena u kemijskim senzorima na: apsorpcijske, refleksijske, luminiscencijske, fluorescencijske, senzore temeljene na mjerenju indeksa loma, optotermalnog efekta ili raspršenja svjetla [2].

Molekula ispitivane tvari može apsorbirati energiju elektromagnetskog vala pri čemu se povećava njena energija. Energetska promjena može biti rezultat vibracijske i rotacijske pobude ili promjena energije elektrona [6]. U praksi optički senzori djeluju u području vidljivog i ultraljubičastog dijela spektra, dok je idealan optički senzor u mogućnosti neprekidno očitavati točnu koncentraciju analita u skladu s promjenama optičkih svojstava indikatora [7].

U interakciji propuštene zrake svjetla i ispitivanog uzorka, mogući su različiti procesi koji se također mogu istovremeno odvijati. Materija može apsorbirati (dolazi do smanjenja inteziteta primarne zrake), refraktirati, reflektirati te luminiscirati u interakciji sa svjetlom. Tvari u pravilu različito apsorbiraju elektromagnetske valove različitih frekvencija. Odnos između valne duljine svjetla i relativne apsorpcije je zapravo apsorpcijski spektar tvari pomoću kojeg je moguće očitati molekularnu strukturu i ostala svojstva ispitivane tvari, što utvrđujemo metodama spektrofotometrije (detaljnije opisano u poglavlju 2.1.1.1.) [2, 6].

Senzori zasnovani na apsorpciji

Za senzore zasnovane na apsorpciji prolazećeg svjetlosnog snopa vrijedi da prilikom interakcije elektromagnetskog zračenja i materije dolazi do apsorpcije svjetla koja se odvija na atomskoj (ionskoj) odnosno molekulskoj razini. Mjerenjem apsorpcije dobivamo informaciju o broju odnosno koncentraciji optički aktivnih molekula, ali nažalost aktivitet (time i koeficijent aktiviteta) nema utjecaja na apsorpciju, time ni egzaktnu vezu između

koncentracije i aktiviteta analita u ispitivanom mediju. Međutim, ona je vidljiva u tzv. sekundarnom učinku, primjerice širenjem apsorpcijskog spektra ili pomakom apsorpcijskog vrha.

Senzori zasnovani na luminiscenciji

Interakcija materije i elektromagnetskog zračenja, koja rezultira luminiscencijom molekula prilikom prijelaza u osnovno elektronsko energetsko stanje, rezultira emitiranjem svjetla veće valne duljine (odnosno manje energije) u procesu fluorescencije ili fosforescencije. Emitirano svjetlo se prostire u svim smjerovima, kao i raspršenje svjetla u difuznoj refleksiji. Uz pomoć monokromatora lako možemo razlučiti pobudnu zraku od emitirane pošto je fluorescentno svjetlo veće valne duljine od valne duljine pobudne zrake, čime je omogućeno mjerenje luminiscencije uz minimalan signal smetnje [2].

Vrlo često se u znanstvenim istraživanjima daje prednost fluorescencijskim tehnikama, koje su osjetljivije i preciznije, iako postoje i senzori koji se baziraju na drugim optičkim parametrima (raspršenje, refrakcijski indeks, polarizacija, difrakcija) i spektroskopskim vrstama [7, 8]. Razlog tomu jest mišljenje kako fluorescencija ima optimalni prijenos signala u potencijalnim senzorskim primjenama, sama tehnika je vrlo osjetljiva (za detekciju su potrebne veoma male količine analita, a sama koncentracija analita može biti veoma malena), dok je valna duljina emisije uvijek duža od valne duljine pobude [2, 8].

2.1.1.1. Metode karakterizacije optičkih senzora

Najčešće tehnike karakterizacije optičkih kemijskih senzora su apsorpcijska i luminiscencijska (fluorescencijska) spektrofotometrija, kojima je moguće dobiti točnu informaciju o vrijednosti koncentracije analita. Prilikom reakcije osjetilnog elementa (u većini slučajeva radi se o reagensu) i analita dolazi do promjene optičkih svojstava u vidu spektralne promjene u emisiji ili apsorpciji. Za kvantitativnu analizu najčešće primjenjivane metode su molekulska ultraljubičasta i vidljiva apsorpcijska spektrofotometrija. Za kvantitativnu analizu

biokemijskih i biološki zanimljivih molekula, radi izuzetne osjetljivosti i visoke selektivnosti ponajviše se koriste molekulske fluorescencijske metode [2].

UV-vidljiva apsorpcijska spektrofotometrija

Vrste koje apsorbiraju u ultraljubičastom i vidljivom području, što je vidljivo u obliku jedne ili više elektronskih apsorpcijskih vrsta, moguće je snimati UV-Vis apsorpcijskom spektrofotometrijom [8, 9].

Apsorpcija elektromagnetskog zračenja od strane molekula je znatno složenija od apsorpcije atoma (atom u plinovitom stanju apsorbira točno određene kvante energije što vidimo kao linijski apsorpcijski spektar) jer molekula apsorbira fotone bliskih energija, što je vidljivo dobivanjem kontinuiranog apsorpcijskog spektra (širi apsorpcijski spektar). Drugi razlog zbog kojeg dolazi do proširenja apsorpcijskog spektra jest tzv. Franck-Condonov učinak (promjena međunuklearnog razmaka atoma u molekuli prilikom apsorpcije fotona). Elektromagnetskom pobudom molekula je u mogućnosti prijeći ne samo u prvo pobuđeno stanje, nego i u viša pobuđena stanja [2].

Svaka linija nam zapravo govori o prijelazu elektrona iz osnovnog u jedno od mnogih rotacijskih i vibracijskih energetski pobuđenih stanja. Broj linija koje obuhvaća tipična vrpca vrlo je velik, dok je njihov razmak jako malen upravo zbog postojanja tako velikog broja vibracijskih i rotacijskih energetskih stanja. Za kvantitativno određivanje možemo provoditi apsorpciju velikog broja anorganskih, organskih i bioloških vrsta. Molekulska apsorpcijska spektrofotometrija bazira se na mjerenju propuštenog ili apsorbiranog zračenja čime dolazi do smanjenja inteziteta zračenja, o čemu nam govori Lambert-Beerov zakon opisan u jednadžbi (1). Prilikom apsorpcije elektromagnetskog zračenja dolazi do pobude elektrona tako da molekula prelazi iz osnovnog stanja u prvo pobuđeno stanje, gdje ostaje vrlo kratko vrijeme nakon čega dolazi do smanjenja (gubitka) energije prilikom učestalih sudara sa okolnim molekulama. Lambert-Beerov zakon:

$$A = \log Io / I = \varepsilon\, c\, l \qquad (1)$$

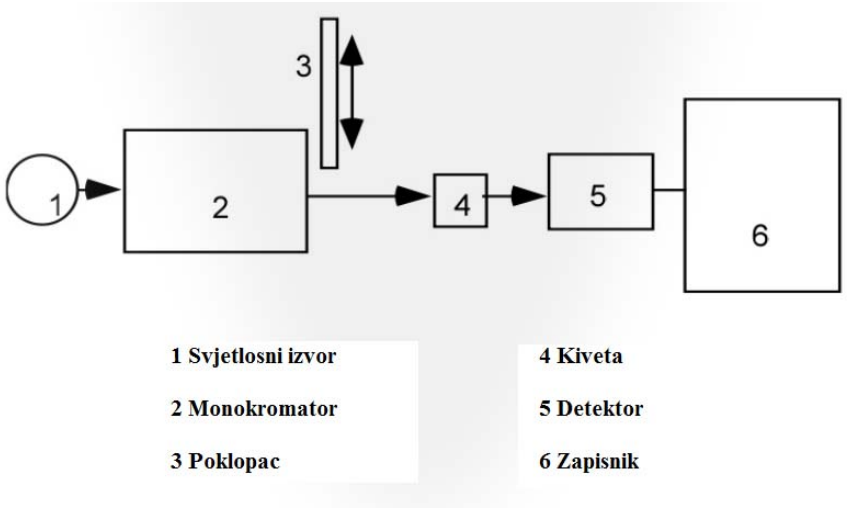
gdje A predstavlja apsorbanciju (slabljenje svjetla pri linearnom prolasku kroz medij), Io - intenzitet svjetlosne pobude, I - intenzitet propuštenog svjetla, ε / L mol^{-1} cm^{-1} – molarni

apsorpcijski koeficijent, c / mol L^{-1} – koncentracija molekule koja apsorbira zračenje, l / cm – optički put koji svjetlo prolazi putujući kroz medij [2, 8, 9].

Potrebno je napomenuti kako je Beerov zakon ograničen jer opisuje apsorpcijska ponašanja medija koji sadrži relativno niske koncentracije analita, dok se prilikom mjerenja pri višim koncentracijama (c > 0,01 mol dm^{-3}) povećava interakcija između otapala i otopljene tvari. Također, veliki utjecaj na okoliš analita i njegovu mogućnost apsorpcije zračenja imaju vodikove veze. Pri većim koncentracijama srednja udaljenost među molekulama i ionima smanjena do te mjere gdje svaki dio analita ima velik utjecaj na raspodjelu naboja okolnih molekula i iona [2, 9, 10].

U prisutnosti molekula otapala, energije različitih razina nepravilno se mijenjaju čime dolazi do širenja linija. Spomenuti učinak jače je naglašen u polarnim otapalima.

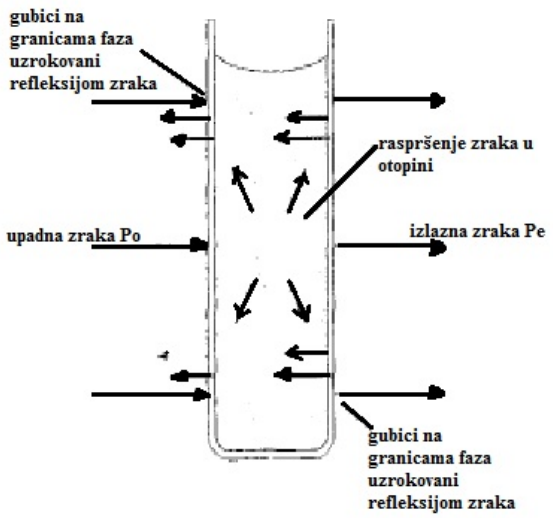
Kod instrumenata (fotometri i spektrofotometri) za ultraljubičastu i vidljivu apsorpcijsku spektrofotometriju uzorci su smješteni između monokromatora i detektora kako bi se izbjeglo fotokemijsko razgrađivanje uzoraka (slika 2.). Spektrofotometri imaju veliku osjetljivost (do $c = 10^{-5}$ mol dm^{-3}) i veliku selektivnost, a ujedno su velike točnosti, jednostavni su i prikladne brzine.



Slika 2. Shema spektrofotometra [11]

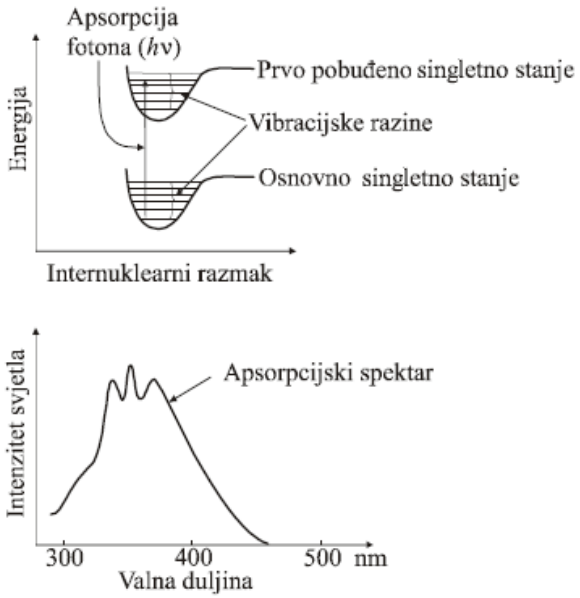
Uzorak analita kojem želimo izmjeriti transmitaciju i apsorbanciju zahtijeva mjerenje u kiveti koja sadrži dvije glatke strane te dvije strane napravljene od brušenog kvarcnog

stakla. Mogući razlozi smanjenja intenziteta zračenja prilikom prolaska upadne zrake kroz ispitivani uzorak prikazani su na slici 3. [9].



Slika 3. Prikaz raspršene i reflektirane zrake u tipičnoj staklenoj kiveti. Gubitak poradi refleksije može se pojaviti srazom sa svim granicama koje razdvajaju materijal. Primjerice, upadna svjetlosna zraka prođe kroz slijedeće granice: zrak – staklo, staklo – otopina, otopina – staklo, staklo – zrak.

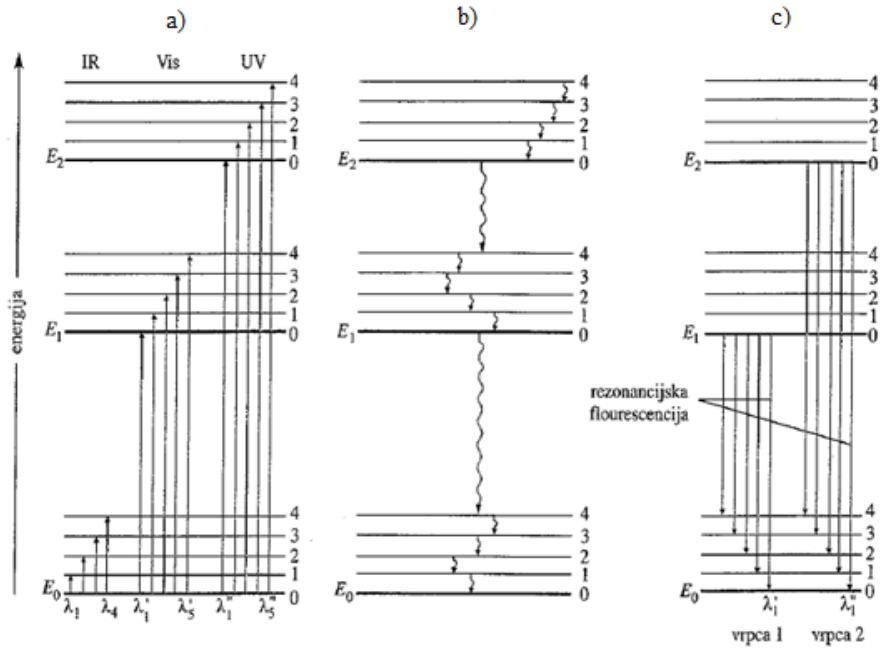
Kao rezultat snimanja UV-Vis spektrofotometrom dobiva se apsorpcijski spektar koji prikazuje ovisnost apsorbancije o promjeni valne duljine λ / nm, kao što je prikazano na slici 4.



Slika 4. Istovremeni prikaz elektronskog prijelaza odnosno pobude u interakciji materije i elektromagnetskog vala te pripadajući apsorpcijski UV-vidljivi spektar.

UV-vidljiva fluorescencijska spektrofotometrija

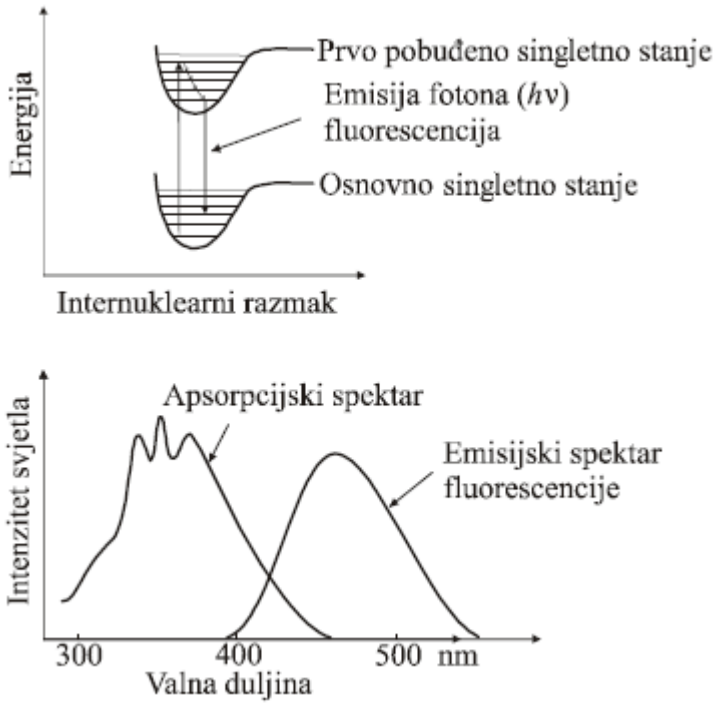
Spektrofotometrija molekulske luminiscencije podrazumijeva mjerenje emisije fotona iz molekule koja može biti rezultat pobude apsorpcijom fotona (fotoluminescencija) ili rezultat pobude proizvedene kemijskom reakcijom (kemiluminiscencija). Fotoluminescencija se dalje može podijeliti na spektrofotometriju fluorescencije, gdje dolazi do promjene stanja jednakog multipliciteta (prijelaz među singletnim stanjima) i spektrometriju fosforescencije, gdje dolazi do prijelaza između stanja različitih multipliciteta (singletnog i tripletnog), kao što je prikazano na slici 5.



Slika 5. Energetski dijagram koji pokazuje energetske promijene prilikom a) apsorpcije, b) relaksacije bez pojave zračenja te c) fluorescencije molekulskih vrsta [12].

Prilikom fluorescencijske spektrofotometrije mjeri se emisija fotona (fluorescencija), što je zapravo rezultat prijelaza molekule (*fluora*) iz najnižeg vibracijskog stanja prvog pobuđenog stanja u osnovno stanje (slika 6.). Efikasnost fluorescencije, čija se svjetlost širi u svim smjerovima u prostoru, određuje prijelaz fotona u osnovno stanje snažnim srazom sa susjednim molekulama. Fluorescencija inače traje od 1 do 10^3 ns, a pojava konkurentnih procesa ovisi o koncentraciji molekula *fluora* i *gasilaca* (molekula koje su u mogućnosti termalnim procesom i u malim koncentracijama preuzeti energiju pobuđene molekule). Također može doći i do potpunog nestanka fluorescencije prilikom reverzibilne reakcije s molekulom *fluora*.

Fluorescencijom i fosforescencijom molekula je u mogućnosti prijeći iz najnižeg vibracijskog singletnog ili tripletnog pobuđenog stanja u bilo koje vibracijsko osnovno elektronsko stanje emitiranjem fotona, što i rezultira dobivanjem kontinuiranog emisijskog spektra. Kvantitativnu mjeru fluorescencije predstavlja kvantno iskorištenje, odnosno omjer broja fotona koji su fluorescencijom emitirani i broja apsorbiranih fotona. Pomak, izražen u nanometrima, između maksimuma apsorpcije i maksimuma u fluorescencijskom spektru u normaliziranom spektru naziva se Stokesov pomak.



Slika 6. Prikaz elektronskog prijelaza u interakciji materije i elektromagnetskog vala, odnosno gubitak apsorbirane energije koju molekula izgubi prijelazom iz najnižeg vibracijskog stanja (koje se nalazi unutar prvog pobuđenog stanja) te dalje u osnovno stanje fluorescencijom (emisija fotona karakterističnih frekvencija).

Spektrofluorimetrija ili spektrometrija molekulske fluorescencije se zasniva na mjerenju intenziteta fluorescentnog zračenja. Analiza se provodi s otopinama uzoraka, adsorbiranim uzorcima ili na imobiliziranim čvrstim površinama. Glavna karakteristika ove tehnike jest velika osjetljivost i odlična selektivnost, međutim primjena ove metode jest ograničena samo na one kemijske sustave koji mogu fluorescirati (što čini svega 15% spojeva ili manje). Najintenzivnije i najupotrebljivije molekulske fluorescencijske emisije daju upravo spojevi koji sadrže aromatske prstenove (kao i iminokumarin i njegovi derivati). Fluoresciraju također i visoko konjugirane dvostruko vezane strukture i neki alifatski i aciklički karbonilni spojevi. Najjednostavniji heterociklički spojevi (kao što su tiofen, pirol te piridin) nemaju svojstvo molekulske fluorescencije [13, 14].

Na samu konstrukciju spektrometra za fotoluminescenciju primarno je utjecala potreba za detektiranjem vrlo malih veličina zračenja. Luminiscentni signal, odnosno snaga

luminiscentnog zračenja prilikom fotoluminiscentnih mjerenja, razmjerna je snazi zračenja koju apsorbira analit [9, 13, 14]. Dijelovi instrumenta za mjerenje fluorescencije su identični onima za spektrofotometriju u UV-vidljivom području. Obzirom da se fluorescencijsko zračenje širi u svim smjerovima, najpogodnije ga je promatrati pod pravim kutom u odnosu na pobudni snop. Neki spektrofluorimetri imaju dva monokromatora, čime jedan služi za pobudno zračenje a drugi za fluorescenciju, dok neki primjenjuju i filtre (koji ograničavaju pobudno zračenje) i monoktromatsku rešetku radi disperzije fluorescencije uzorka [9, 14].

UV-vidljiva fluorescencijska spektrofotometrija se inače primjenjuje za određivanje mnogih organskih molekula te posebno važnu primjenu ima u kliničkom i biokemijskom području istraživanja (proteini, steroidi, medicinski agensi i sl.), dok većina anorganskih fluorimetrijskih određivanja se zasniva na stvaranju fluorescentnih kelata s nefluorescentnim ligandima. Općenito su fluorescencijske metode za jedan do tri reda veličine osjetljivije od UV-vidljivih apsorpcijskih spektrometrija jer se njihova osjetljivost može povećati pojačanjem detektorskog signala ili pak povećanjem snage pobudnog snopa što vrijedi i za određivanje organskih, biokemijskih vrsta i za određivanje anorganskih vrsta kod kojih možemo dodatno koristiti izravnu i neizravnu metodu. Izravna metoda zasniva se na reakciji s kelatnim reagensom čime nastaje fluorescirajući kompleks, a neizravna metoda se temelji na gašenju fluorescencije reagensa koja je rezultat reakcije s uzorkom [9, 14].

2.2. Solvatokromizam

Poznato je kako okolni medij i otapala mogu utjecati na UV-vidljivi i infracrveni apsorpcijski spektar, prilikom čega dolazi do promjena u položaju i intenzitetu te obliku apsorpcijskih vrpca. Položaj i intenzitet električnih vrpci je pod utjecajem električnog polja. Promjene položaja apsorpcijskih vrpca uzrokovane su promjenom dipolnog momenta molekule u osnovnom stanju, dok su spomenute promjene u intenzitetu uzrokovane ovisnošću električnog polja o tranzicijskom momentu (električni dipolni moment povezan promjenom momenta iz početnog u konačni položaj), a moguće ga je opisati promjenom polariteta. Hantzsch je spomenute promjene električnih vrpci utjecajem otapala definirao kao solvatokromizam [15 - 17].

Nadalje, utjecaj otapala na spektar, uzrokovan elektronskim prijelazima, je prvenstveno ovisan o kromoforu i prirodi samog prijelaza. Hipsokromni ili plavi pomak (pomak prema nižim valnim duljinama) s povećanjem polarnosti se naziva negativni solvatokromizam. Pozitivni solvatokromizam je pak odgovarajući batokromi ili crveni pomak s porastom polarnosti otapala (pomak prema višim valnim duljinama), a pomaci su golim okom vidljivi promjenom boje otapala (slika 7.) [18]. Naime, apsorpcijska vrsta će se batokromno pomaknuti s povećanjem polarnosti otapala ako je pobuđeno stanje više dipolnog karaktera od osnovnog stanja. Ako je osnovno stanje više dipolnog karaktera od pobuđenog stanja dolazi do obrnutog ponašanja, to jest dolazi do hipsokromnog pomaka.



Slika 7. Isti organski spoj otopljen u otapalima različite polarnosti prilikom čega se uočava promjena boje [19].

2.2.1. Solvatokromne molekule i njihova primjena u kemijskim senzorima

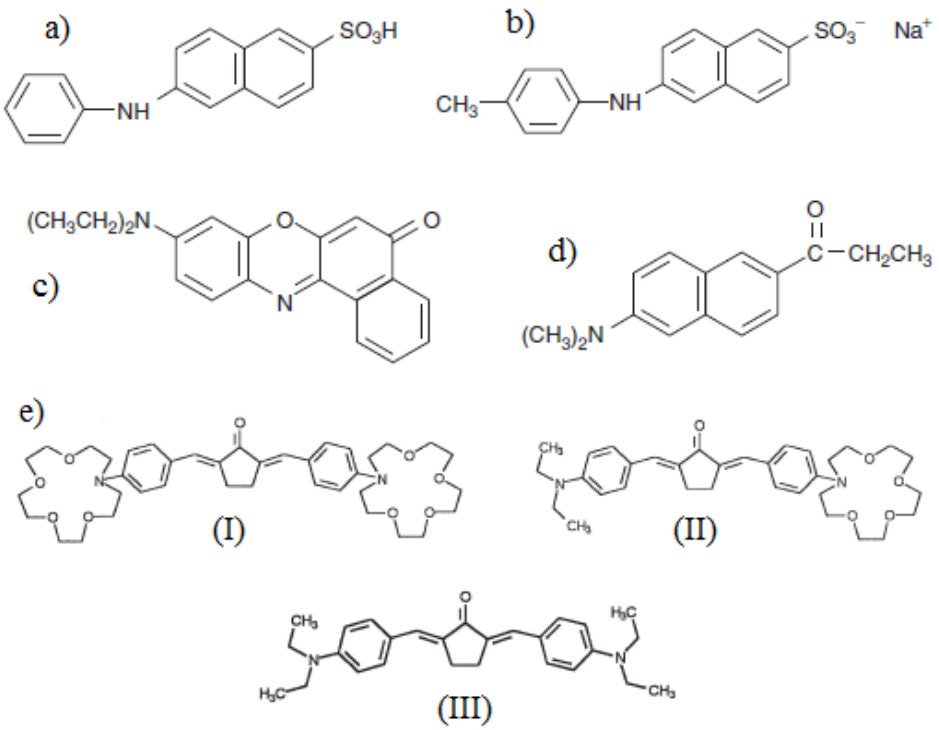
Pošto je utvrđeno da polarnost otapala ima velik i znatan utjecaj na apsorpcijske i emisijske spektre, kroz godine istraživanja nađen je široki spektar molekula i spojeva koje izazivaju pojavu pozitivnog i negativnog solvatokromizma. Spomenuti spojevi i molekule koriste se za uspostavljanje empirijske skale polarnosti otapala za UV-vidljiva i blisko infracrvena spektroskopska mjerenja uzoraka s naglaskom na $E_T(30)$ skalu, koja se računa iz relacije (2) [20]. Ona povezuje i pretvara elektronski prijelaz koji se događa u molekuli solvatokromne probe iz valne duljine maksimuma apsorpcije u odgovarajući energetski prijelaz izražen u kcal mol^{-1} [20, 21].

$$E_T\,(\text{kcal/mol}) = 28951/\,\lambda_{max}\,(\text{nm}) \qquad (2)$$

$E_T(30)$ predstavlja empirijsku vrijednost polarnosti otapala, a mjerna jedinica jest kcal mol^{-1}. Skala se bazira na spektroskopskom ponašanju indikatorske boje piridin *N*-fenolat betain, molekuli koja intenzivno mijenja boju ovisno o polarnosti samog otapala. Primjerice, u metanolu je crvena (λ_{max} = 516 nm), dok je u acetonu zelena (λ_{max} = 677 nm). Standardno betain bojilo topljivo je samo u vodi i malo manje u polarnim otapalima, dok je netopljivo u nepolarnim otapalima, kao primjerice u alifatskim ugljikovodicima, što stvara određeni problem. Skala koja je nastala iz tih vrijednosti pomaže definirati polarnost različitih otapala. Problem nekompatibilnosti mjerne jedinice (kcal mol^{-1}) riješen je normaliziranjem vrijednosti korištenjem vode i TMS (tetrametilsilana) kao referentnih otapala pa se koristi vrijednost E_T^N prema relaciji (3) [16].

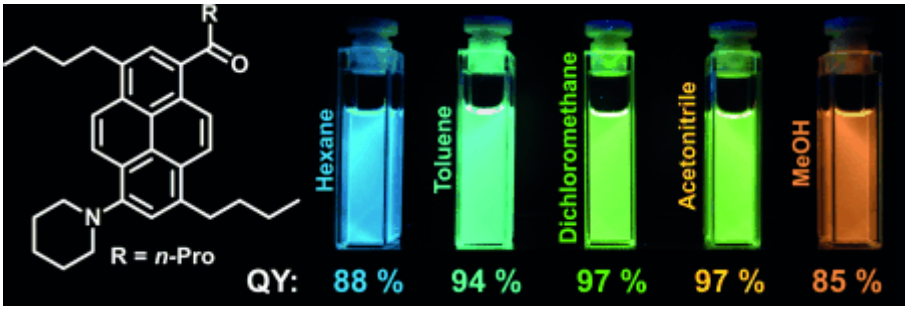
$$E_T^N = \frac{ET(solvent) - ET(TMS)}{ET(water) - ET(TMS)} = \frac{ET(solvent) - 30,7}{32,4} \qquad (3)$$

Nažalost, nije lako odrediti granicu između običnih solvatokromnih proba/bojila i onih koje bi se mogle koristiti kao potencijalni indikatori polarnosti otapala (slika 8.) [21].

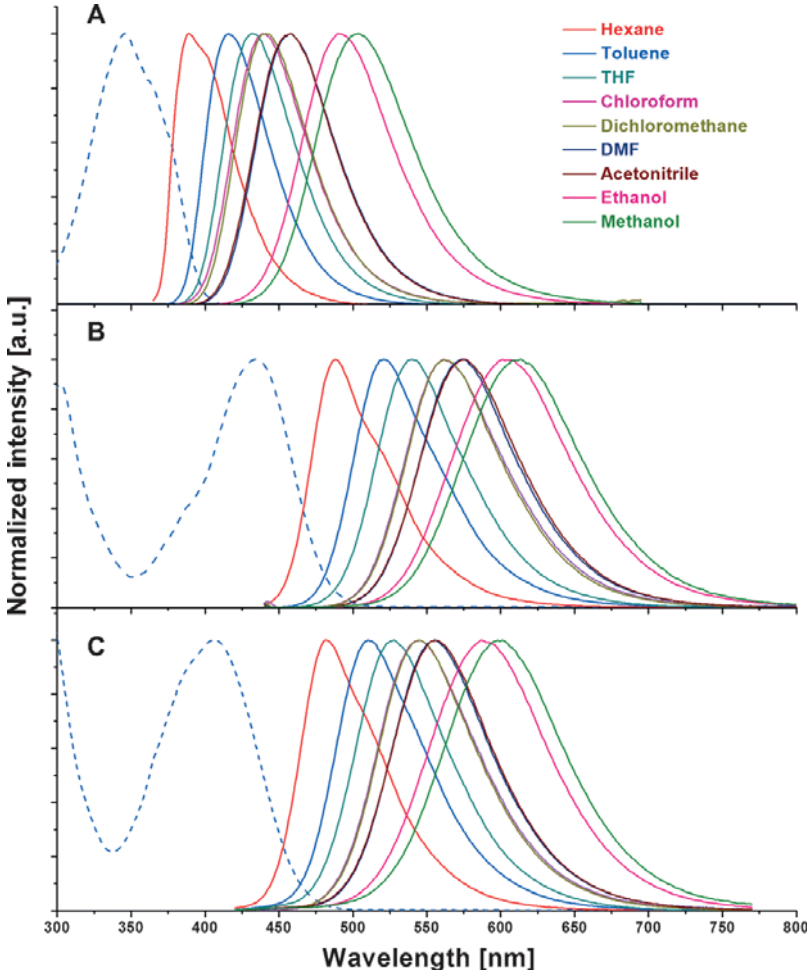


Slika 8. Struktura tipičnih bojila osjetljivih na promjenu okoliša u kojem se nalaze (promjena otapala) : a) 2,6-ANS, b) 2,6-TNS, c) Nile crvena, d) Prodan, e) bojilo ketocijanin i njegovi derivati [22].

Fluorofori pokazuju spektralne promjene u vidljivom dijelu spektra promjenom otapala su prikazani na slici 8. Gregorio Weber je predložio koncept solvatokromnih proba na primjeru triptofana. Triptofan mijenja dipolni moment prilikom ekscitacije, što mijenja interakcije s okolnim molekulama u mediju te je rezultat vidljiv u spektralnim promjenama. Bojila koja su našla najveću primjenu u proučavanju strukture, dinamike i interakcije u proteinima i bio-membranama su derivati naftalen sulfonata. Osim navedenih derivata, kao odlične solvatokromne probe su se pokazali i analozi pirena prikazani na slici 9.

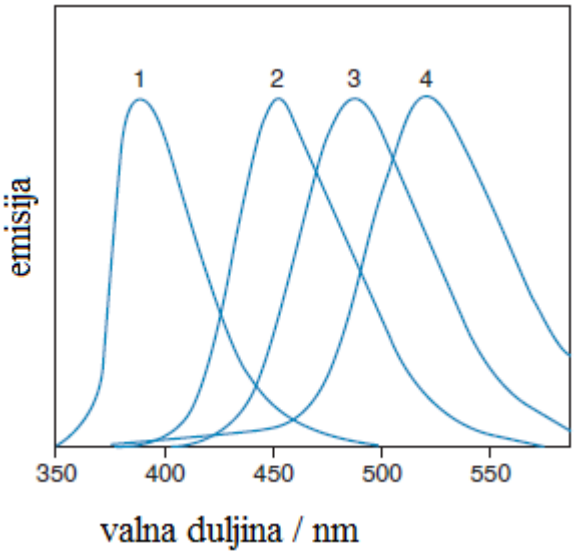


Slika 9. Utjecaj otapala na spektralne pomake analoga pirena, preuzeto iz [22].



Slika 10. Odgovarajući spektri solvatokromne probe analoga pirena., preuzeto iz [22].

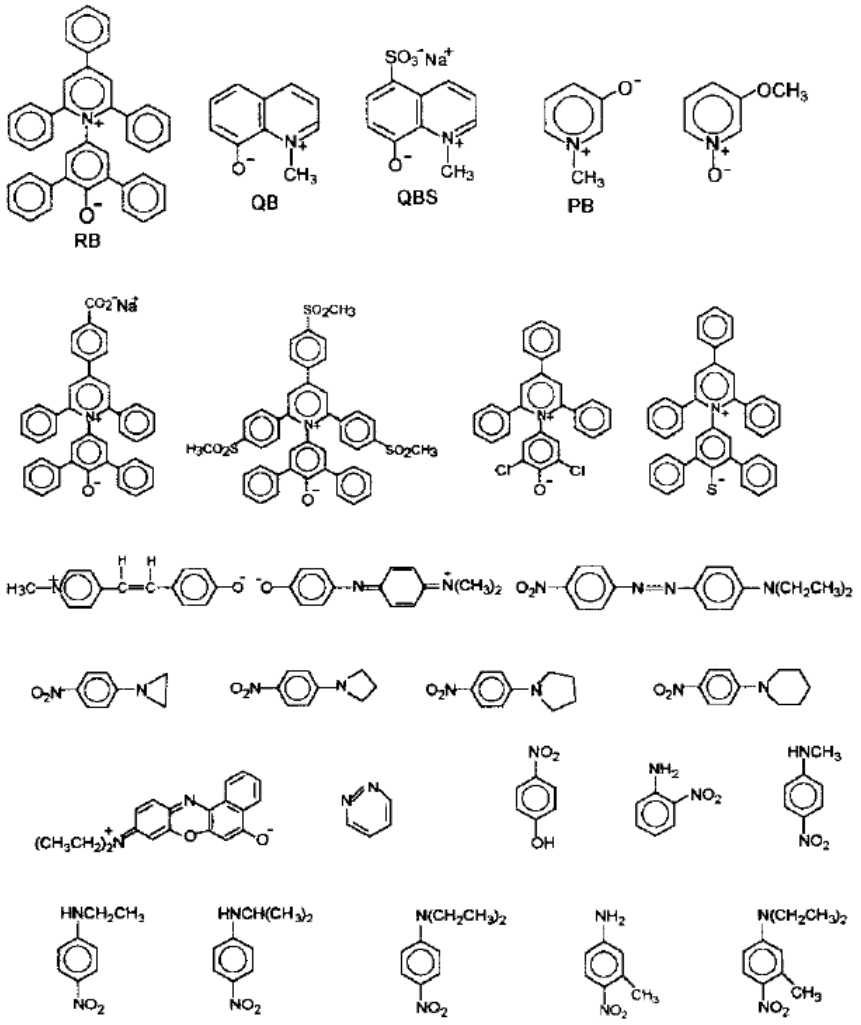
Prodan je jedan od često korištenih bojila koja su veoma osjetljiva na otapala (slika 11.) U različitim otapalima dolazi do pomaka u apsorpcijskom spektru koji je promatran u području između 350 i 370 nm te promjene u intenzitetu fluorescencije čije je promatrano područje 416-505 nm u metanolu. Također, nedavno je sintetiziran i analog Prodanu (naftalenska grupa zamijenjena je antracenom, što dovodi do promjene u ekscitaciji i emisiji spektra za 100 nm, dok je osjetljivost na polarnost otapala i formiranje vodikovih veza u protonskom okruženju ostala nepromijenjena) [22].



Slika 11. Utjecaj otapala na fluorescenciju popularnog bojila Prodana. Normalizirani emisijski spektar mjeren u (1) cikloheksanu, (2) dimetil formamidu, (3) etanolu i (4) vodi [22].

Ranije spomenuti problem uporabe skale $E_T(30)$ bazirane na piridin N-fenolat betainu, kao i skale bazirane na betainu 2,6-difenil-4-(2,4,6.trifenil-1-piridino)-1-fenolat – RB, riješen je primjenom drugih proba koje su više hidrofilne, kao 1-metil-8-oksikvinolin betain - QB i njenog derivata 1-metil-8-oksikvinolin betain-5-sulfonat - QBS i sintetiziranog 1-metil-3-oksipiridin betain - PB koji korelira linearno sa $E_T(30)$ skalom (slika 12.) [17].

Linearne korelacije koje se pritom promatraju su log *a* vs. p*K*a te $|S|$ vs. μ_g gdje je $|S|$ regresijski koeficijent, a μ_g osnovno stanje dipolnog momenta probe. Linearna ovisnost nam govori kako su različite skale polarnosti otapala osjetljive na iste interakcije otapalo-otopljena tvar, što je zapravo funkcija molekularne strukture korištene probe [21].

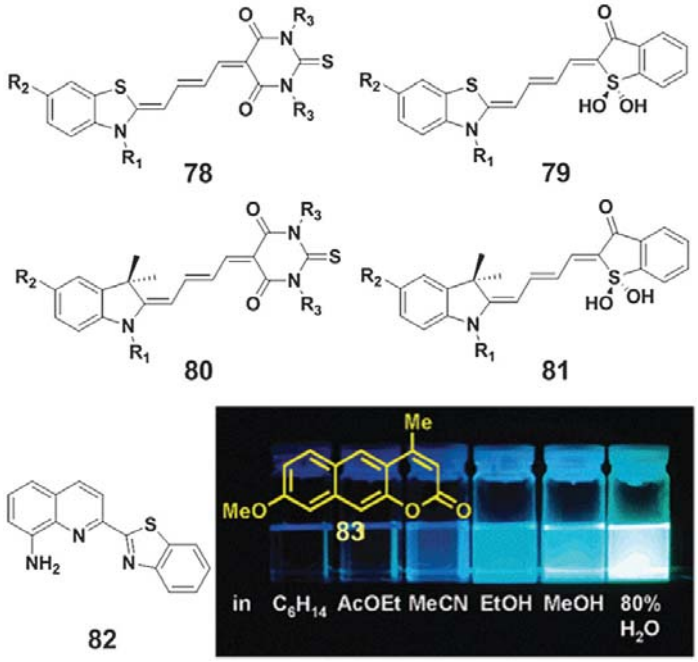


Slika 12. Prikaz nekih od sintetiziranih solvatokromnih proba sa skalama polarnosti otapala baziranih na QB, QBS i PB koje linearno koreliraju sa skalom $E_T(30)$.

Solvatokromno ponašanje boje je rezultat raznih interakcija otopljena tvar-otapalo, a jednadžba koja opisuje te interakcije je tzv. Kamlet-Taft-Abbound-ova jednadžba (4) gdje je SDP - svojstvo ovisno o otapalu (engl. *The Solvent Dependent Property*) kao npr. solvatokromni pomak, aα donor vodikove veze, bβ akceptor vodikove veze te pojam koji opisuje šupljinu [h(δ^2_H)], a solvatokromni parametri jesu α, β, i π^*

$$SDP = konst. + s(\pi^* + d\delta) + a\alpha + b\beta + h(\delta^2_H) \qquad (4)$$

Fluorescentne molekulske solvatokromne probe nisu korištene samo za empirijsko određivanje skale polarnosti otapala, već i u brojnim istraživanjima mikroheterogenog medija, kao i bioloških i biokemijskih sustava. Vrlo često su one jedini način za proučavanje strukture veznog mjesta i dinamike proteina nosača, lipida, slojeva i prirodnih membrana na molekularnim mikroskopskim slojevima. Većina spomenutih solvatokromnih fluorescirajućih proba izaziva pozitivni solvatokromizam, odnosno batokromni pomak emisijske vrpce sa porastom polarnosti otapala, primjerice merocijanin bojila (slika 13.) [17].



Slika 13. Prikazan je stabilan fluorescentan senzor. Merocijanin bojilo na kojoj je baziran senzor osjetljiv je na promjenu polarnosti otapala, čime se mijenja intezitet fluorescencije. Predstavljeni spoj ne fluorescira u aprotičnim otapalima, ali pokazuje vrlo jaku fluorescenciju pri većim valnim duljinama u protonskim otapalima [23].

Solvatokromne molekule mogu se koristiti i kao indikatori topline ili kao indikatori aciditeta i alkaliteta određenog okruženja jer su osjetljive ne samo na polarnost otapala, nego i na vrijednost pH i temperaturu [23].

2.3. Iminokumarini i derivati iminokumarina

Kumarini (2-*H*-kromen-2-oni) su rasprostranjena skupina organskih spojeva koje često nalazimo u prirodi (slika 14). Derivati kumarina imaju svestranu primjenu kao fluorescentne probe i indikatori, u laserskoj tehnologiji, parfumeriji, apliciraju se kao lijekovi te kao izvrsni kemijski senzori [4]. S obzirom na sveprisutnost ovih spojeva, sintezom njegovih 2*H*-kromen-2-on analoga iskorišten je njihov potencijal primjene kao kemoterapeutika. Naime, terapeutski potencijal proizlazi iz svojstva inhibicije daljnje replikacije HIV-a, dok veliki broj strukturnih derivata kumarina pokazuje značajnu citotoksičnu i anti-HIV aktivnost *in vitro* i *in vivo* [5]. Također služe kao antibiotici, fungicidi, antikoagulati i antitumorski agensi. Što se tiče njihove visoke fluorescencijske sposobnosti, široko su primjenjivani kao optička sredstva za izbjeljivanje, laserske boje i fluorescentne probe u biologiji i medicini [3].

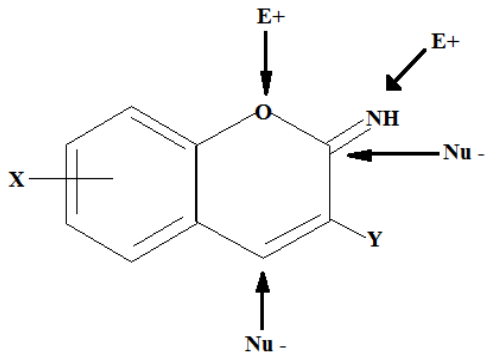


a) b)

Slika 14. Prikaz molekulske strukture a) kumarina i b) iminokumarina, 2-imino analoga kumarina.

Njihovi 2-imino analozi, heterociklički aromatski organski spojevi iminokumarini (slika 14.), zbog svoje biološke i kemijske aktivnosti privlače veliku pozornost organskih sintetičara. Nalaze široku primjenu zbog izrazito velike osjetljivosti na prirodu supstituenata vezanih na molekulu spoja kao i okolinu u kojoj se nalaze. Veliki broj PTK (protein tirozin kinaze u čiju skupinu spadaju i iminokumarini) inhibitora koriste se i kao potencijalni antitumorksi agensi. PTK inhibitori koji su izdvojeni iz 2-hidroksibenzaldehid i cijanoacetamida, pokazuju antitumorsko djelovanje protiv točno određenih P.388 limfocita leukemije. Nadalje, nađena je antibakterijska aktivnost mnogih iminokumarina i njegovih derivata prema gram-pozitivnim i gram-negativnim bakterijama. Posebno valja spomenuti izvrsnu antibakterijsku aktivnost kloro-iminokromena [3, 4].

Uzrok neobične reaktivnosti iminokumarina polazi od strukturnih značajki 2-iminopiranskog prstena. Reaktivna mjesta iminokumarina su kisik na aromatskom prstenu i iminska skupina kao potencijalna mjesta vezivanja elektrofilnih reagensa te mjesta C2 i C4 na pironskom prstenu na koja se lako vežu nukleofilni reagensi (slika 15).



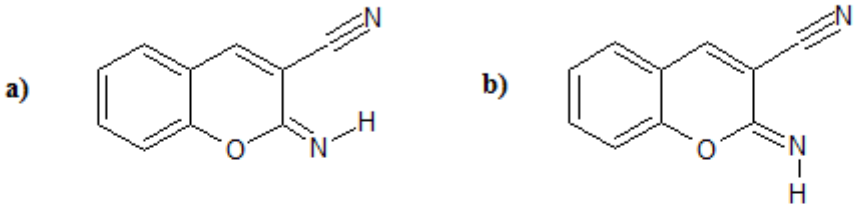
Slika 15. Prikaz reaktivnih mjesta molekule iminokumarina pogodan za vezanje elektrofilnih i nukleofilnih reagensa [3, 24].

2.3.1. Derivati iminokumarina kao solvatokromne probe

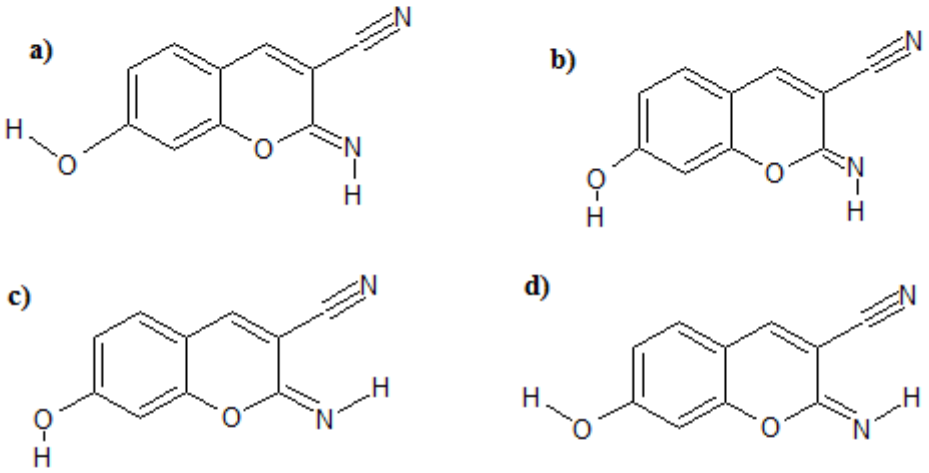
Osim spomenutih primjena iminokumarina i njegovih derivata, uočena je povezanost njihovih svojstava i polarnosti otapala. Poznata je Knoevenagel-ova reakcija prilikom formacije derivata kumarina i kromena, kao i transformacija iminokumarina u kumarine u bazičnim aprotičnim otapalima. Dolazi do izomerizacije koja je ustvrđena ^{1}H NMR spektroskopijom, a objašnjava se otvaranjem prstena piridina.

UV-vidljivom apsorpcijskom i fluorescencijskom spektrofotometrijom otkriveno je kako primjenom različitih otapala dolazi do batokromnog, odnosno hipsokromnog pomaka u spektrima s promjenom polarnosti otapala, a time i dipolnog momenta molekula. Ispitivanjem utjecaja otapala na apsorpcijske i emisijske spektre 2-imino-*H*-kromen-3-karbonila, 7-hidroksi-2-imino-*H*-kromen-3-karbonila, 2-okso-*H*-kromen-3-karbonila i 7-hidroksi-2-okso-*H*-kromen-3- karbonila (slika 16.) uočen je batokromni pomak povećanjem polarnosti otapala za sve molekule kod kojih dolazi do $\pi - \pi^*$ pomaka [3].

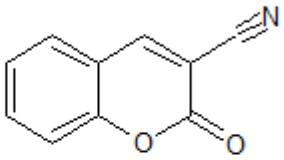
(1) 2-imino-2H-kromen-3-karbonitril



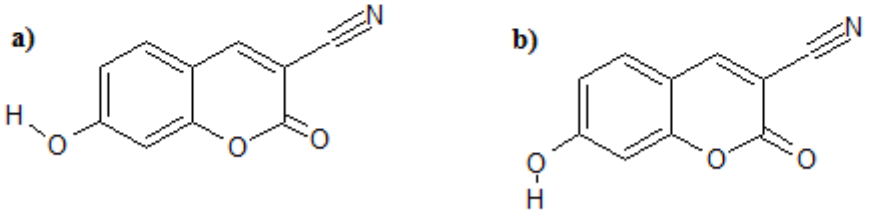
(2) 7-hidroksi-2-imino-2H-kromen-3-karbonitril



(3) 2-okso-2H-kromen-3-karbonitril



(4) 7-hidroksi-2-okso-2H-kromen-3-karbonitril

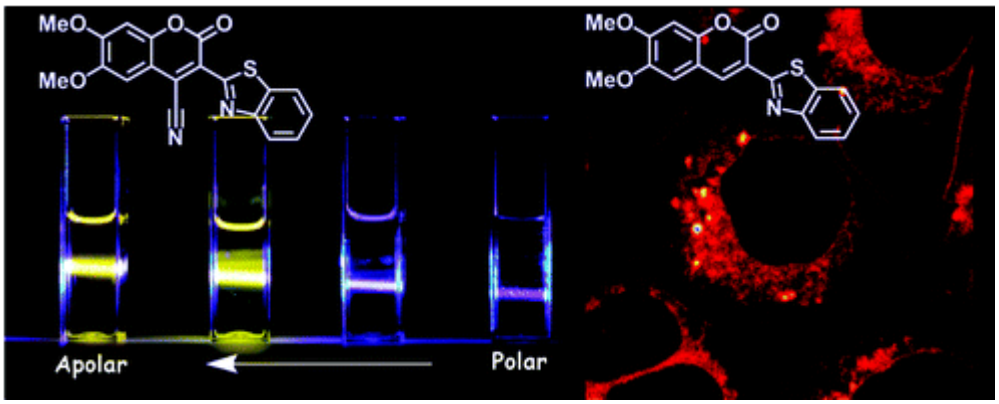


Slika 16. Shematski prikaz različitih 2*H*-kromen derivata uključujući i njihove rotamere koji su istraživani UV-vidljivom apsorpcijom i fluorescencijskom spektrofotometrijom (utjecaj otapala i temperature).

Sama formacija iminokumarina i/ili kumarina javlja se prilikom E/Z izomerizacije stirilnog intermedijera, a evidentant utjecaj na razliku selektivnosti stirilnog intermedijera imaju suspstituenti na aromatskom prstenu. Također, sve molekule visokog dipolnog momenta radije egzistiraju u pobuđenom doli u osnovnom energetskom stanju što je objašnjeno intenzivnom elektronskom rezinstivnošću supstituenta karbonila i imina u prvom pobuđenom stanju. Interakcije dvaju suspstituenata različite polarnosti pojačavaju delokalizaciju u pobuđenom stanju što molekulu čini polarnijom, a to pak rezultira većom vrijednosti dipolnog momenta. Istom efektu doprinose i mezomerni donorski utjecaj hidroksilne skupine [5].

Važno je napomenuti kako određeni derivati iminokumarina pokazuju veliki pomak u intenzitetu fluorescencije, dok u apsorpcijskom spektru ne dolazi do tako znatne promjene i obratno zbog čega je i njihova primjena podosta široka (optički senzori, pH-senzori,…).

U zadnje vrijeme fluorescentne probe ovisne o polaritetu otapala privlače veliki interes za označavanje stanica visoke razlučivosti. Pripremljeni su i ispitani novosintetizirani derivati iminokumarina prilagođeni za slikanja *in vivo*. Ispitani spojevi okarakterizirani su akceptorsko-donorskim molekulskim strukturama kumarinske jezgre, gdje je elektron donor alkileterska ili naftalenska grupa, a elektron-akceptorsku grupu predstavlja benzotiazin i cijano grupa. Testiranjem pomoću računalne metode utvrđeno je prije same sinteze da se supstituirani uzorci mogu lako sintetizirati i da će fluorescentni derivati imati ekscitaciju u vidljivom dijelu spektra. Derivati kumarina prikazani na slici 17. pokazali su izvrsnu fluorescenciju, visoki molarni koeficijent ekscitacije (do 46,000 $M^{-1}cm^{-1}$) te veliki Stokesov pomak. Nadalje, pokazuju izrazito jak solvatokromizam, gotovo uopće ne fluoresciraju u vodi dok u otapalima slabije polarnosti izrazito jako fluoresciraju (dolazi do povećanja svjetline do 780 puta).



Slika 17. Primjer sintetiziranog derivata kumarina koji posjeduje iznimno veliku osjetljivost na promjenu polarnosti otapala (solvatokromizam), pokazuje veliki intenzitet fluorescencije i ekscitacije kao i veliki Stokesov pomak.

Solvatokromizam ovih spojeva moguće je objasniti pomoću fotofizičkih metoda koje obuhvaća dva pobuđena stanja. Testiranjem na kulturama stanica, rezultati pokazuju kako testirani kumarini nisu bili štetni, a njihova fotofizička svojstva ostala su nepromijenjena kao i u slobodnom otapalu. Uzimajući u obzir solvatokromne karakteristike, fluorescencija kumarina otkrivena je jedino u okolini stanica koje pokazuju najveću lipofilnost. Također, pripremljeni uzorci predstavljaju izvanredne alate za istraživanje suptilnih biokemijskih procesa u *in vivo* okolini nakon izvedbe odgovarajućih konjugacija na biomolekulama. Istovremeno predstavljaju temelj za daljnji razvoj novih generacija biosenzora [27].

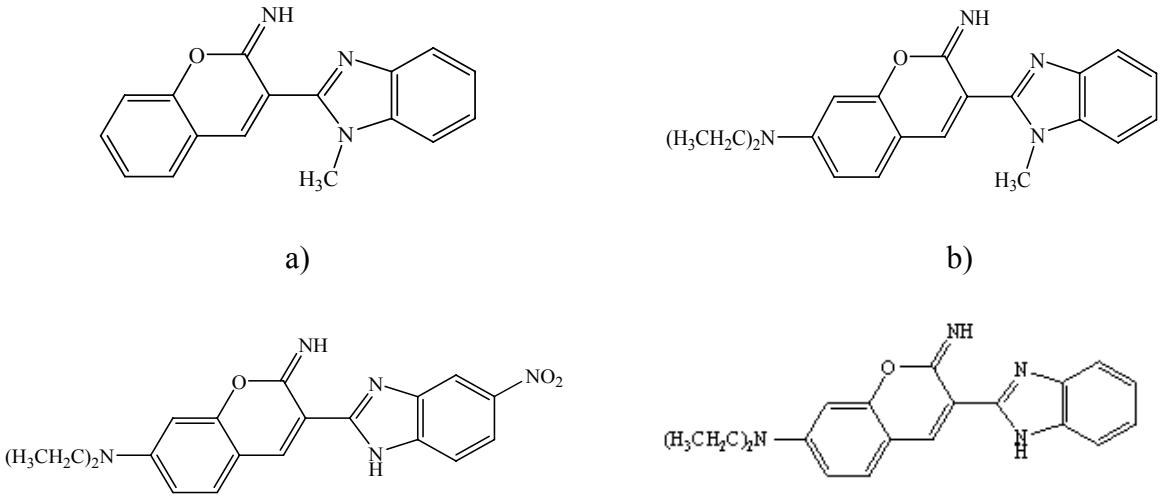
3. Eksperimentalni dio

Ovo poglavlje daje uvid u tehnike, laboratorijski pribor, instrumente te postupke koji su korišteni prilikom priprave matičnih (*stock*) otopina četiri ispitivana derivata iminokumarina, zatim odabir otapala te postupak mjerenja UV-vidljivih emisijskih i apsorpcijskih spektara.

U ovom završnom radu ispitivana su svojstva novosintetiziranih derivata iminokumarina: 7-*N,N*-dietilamino-2-imino-3-(2-*N*-metilbenzimidazolil)kromena (u daljnjem tekstu **IM1**), 2-imino-3-(2-*N*-metilbenzimidazolil)kromena (u daljnjem tekstu **IM2**), 7-*N,N*-dietilamino-2-imino-3-(*2-N*-5-nitro-1*H*-benzimidazolil)kromena (u daljnjem tekstu **IM3**) i 7-*N,N*-dietilamino-2-imino-3-(*2-N*-1*H*-benzimidazolil)kromena (u daljnjem tekstu **IM4**) kao potencijalnih solvatokromnih proba. Ispitivanja su provedena u 10 odabranih otapala različitih parametara polarnosti.

3.1. Materijali, kemikalije i instrumenti

Ispitivani derivati iminokumarina **IM1**, **IM2**, **IM3** i **IM4** (slika 18.) pripravljeni su na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije u Zavodu za organsku kemiju Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije pod vodstvom izv. prof. dr. sc. Marijane Hranjec.



Slika 18. Prikaz derivata iminokumarina a) **IM1**, b) **IM2**, c) **IM3**, d) **IM4**

Za pripravu univerzalnih pufera, matičnih i radnih otopina korištene su sljedeće kemikalije i instrumenti (slika 19.):

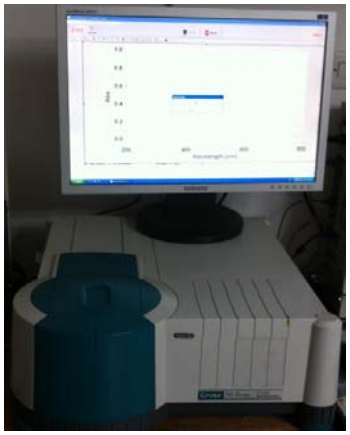
- **IM1** - 7-*N,N*-dietilamino-2-imino-3-(2-*N*-metilbenzimidazolil)kromen
- **IM2** - 2-imino-3-(2-*N*-metilbenzimidazolil)kromen
- **IM3** - 7-*N,N*-dietilamino-2-imino-3-(*2-N*-5-nitro-1*H*-benzimidazolil)kromen
- **IM4** - 7-*N,N*-dietilamino-2-imino-3-(*2-N*-1*H*-benzimidazolil)kromen
- citratna kiselina, *Kemika d.d., Zagreb*
- boratna kiselina, *Laborchemie Apolda*
- fosforna kiselina, *Laborchemie Apolda*
- natrijev hidroksid, *Merck*
- klorovodična kiselina, *c* (HCl) = 0,1 mol/dm^3, *Carlo Erba Reagents*
- deionizirana voda (Mili-Q voda)
- etanol, *Carlo Erba Reagents*
- metanol, *Sigma Adrich*
- aceton, *Sigma Adrich*
- acetonitril, *Carlo Erba Reagents*
- etil-acetat, *Carlo Erba Reagents*
- dimetilsulfoksid (DMSO), *Carlo Erba Reagents*
- tetrahidrofuran (THF), bezvodni, bez inhibitora, ≥99,9 % (THF), *Sigma-Aldrich*
- diklormetan ($CH_2Cl_{2),}$*Carlo Erba Reagents*
- dietil-eter, *Sigma Adrich*
- pH metar *MA 5740, Iskra d.d.*
- kvarcna kiveta
- automatske pipete (i nastavci) različitih volumena
- UV/VISIBLE spektrofotometar, *Varian 50 Scan*
- Fluorescencijski spektrofotometar, *Varian Cary Scan*
- Analitička vaga, *KERN & Sohn GmbH, D-72336 Balingen, Germany*



a)



b)



c)



d)

Slika 19. Instrumenti korišteni za provedbu eksperimenata : a) pH-metar, b) analitička vaga,, c) UV/VISIBLE spektrofotometar,, d) fluorescencijski spektrofotometar

3.2. Priprava matičnih (*stock*) otopina i odabir otapala

3.2.1. Priprava matičnih (*stock*) otopina

Matične (*stock*) otopine pripravljene su otapanjem točno određene mase (jednadžba (5)) derivata iminokumarina **IM1, IM2, IM3** i **IM4** u apsolutnom etanolu (Slika 20.). Spojevi **IM1, IM2** i **IM4** otopljeni su u 3 mL etanola (**IM1** i **IM2** je bilo potrebno zagrijavati kako bi se otopili u potpunosti), dok je zbog teške topljivosti spoja bilo potrebno čak 10 mL etanola

uz dodatno zagrijavanje za otapanje spoja **IM3**. Vrijednosti koncentracija *stock* otopina spojeva iznose *c* (**IM1**) = 1,33 * 10^{-3} mol dm^{-3} *c* (**IM2**) = 1,15 * 10^{-3} mol dm^{-3} *c* (**IM3**) = 2,9 * 10^{-4} mol dm^{-3}i *c* (**IM4**) = 1 * 10^{-3} mol dm^{-3} (detaljan prikaz podataka u Tablici 2.).



a) b)

Slika 20. Matične otopine spojeva **IM1**, **IM2**, **IM3** i **IM4** a) promatrane na danjem svjetlu, b) pod UV lampom.

Mase potrebne za pripravu svih matičnih otopina izračunate se iz sljedeće jednadžbe:

$$m[\mathrm{g}] = c[\mathrm{mol\ dm^{-3}}] * M[\mathrm{g\ mol^{-1}}] * V[\mathrm{dm^3}] \qquad (5)$$

m[g] – masa odvage određenog derivata iminokumarina

c[mol dm^{-3}] – koncentracija određenog derivata iminokumarina

M[g mol^{-1}] – molarna masa određenog derivata iminokumarina

V[dm^3] – volumen apsolutnog etanola

Za snimanje apsorpcijskih i emisijskih spektara pripravljene su radne koncentracije ispitivanih spojeva razrjeđivanjem matične otopine spoja, to jest uzimanjem točno određenih alikvota matičnih (*stock*) otopina izračunatih pomoću jednadžbe (6).

$$c_1[\text{moldm}^{-3}] * V_1[\text{dm}^3] = c_2[\text{moldm}^{-3}] * V_2[\text{dm}^3] \qquad (6)$$

$c_1[\text{moldm}^{-3}]$ – željena koncentracija prilikom snimanja UV-vidljivom spektrofotometrijom (za apsorpcijsku spektrofotometriju $1*10^{-5}$ mol dm^{-3} za fluorescencijsku spektrofotometriju $1*10^{-6}$ mol dm^{-3})

$V_1[\text{dm}^3]$ – volumen otapala stavljen u kivetu za snimanje UV-vidljivih spektara

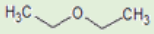
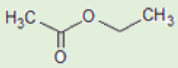
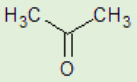
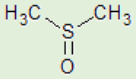
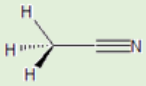
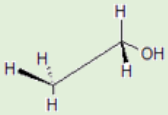
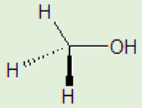
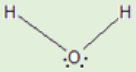
$c_2[\text{moldm}^{-3}]$ – početna koncentracija matične otopine ispitivanog spoja

$V_2[\text{dm}^3]$ – nepoznati volumen određene matične otopine kojeg je potrebno dodati u kivetu

3.2.2. Odabir otapala

U svrhu ispitivanja novosintetiziranih derivata iminokumarina kao potencijalnih solvatokromnih proba, odabrano je 10 otapala različitih parametara polarnosti (Tablica 1.). Pošto je cilj ovog rada bio ispitati sintetizirane derivate iminokumarina kao potencijalne solvatokromne probe, jedan od najbitnijih čimbenika bio je odabrati pogodna otapala. Bilo je potrebno odabrati otapala različitih polarnosti, koja su pristupačna i korištena u svakodnevnom laboratorijskom radu. Polarnost otapala odabirali smo prema empirijskoj vrijednosti polarnosti otapala, $E_T(30)$ koristeći organska i anorganska otapala koja su bila dostupna u laboratoriju (Tablica 1.)

Tablica 1. Otapala korištena u radu i vrijednosti njihovih dielektričnih konstanti te $E_T(30)$ vrijednosti.

Otapalo	Kemijska struktura	Dielektrična konstanta, ε	$E_T(30)$ / (kcal mol^{-1})	E_T^N
dietil-eter		4,3	34,5	0,117
etil acetat		6	38,1	0,228
diklor-metan		9,1	40,7	0,309
aceton		21	42,2	0,355
DMSO		47	45,1	0,444
acetonitril		37	45,6	0,627
THF (tetrahidrofuran)		7,5	50,3	0,605
etanol		24	51,9	0,654
metanol		33	55,4	0,762
voda		80	63,1	1

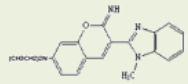
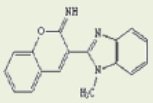
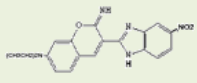
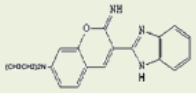
3.3. Spektralna karakterizacija ispitivanih spojeva u različitim otapalima

Ispitivani spojevi (**IM1**, **IM2**, **IM3** i **IM4)** su okarakterizirani UV-vidljivom apsorpcijskom i fluorescencijskom spektrofotometrijom u otapalima različite polarnosti. Istraživan je utjecaj različitih otapala na pomake valnih duljina apsorpcije, odnosno emisije te promjena intenziteta apsorpcije i emisije.

3.3.1. Snimanje UV-vidljivih apsorpcijskih spektara

Snimanje apsorpcije ispitivanih spojeva u različitim otapalima izvedeno je UV-vidljivom apsorpcijskom spektrofotometrijom. Za snimanje apsorpcije spojeva korištena je kvarcna kiveta (sa sve četiri strane prozirni kvarc, s čepom (*stopper*) kako bi se osiguralo da ne dođe do isparavanja otopine). U kvarcnu kivetu se stavi 3 mL otapala i određeni alikvot matične otopine ispitivanog spoja. Koncentracija snimane otopine iznosi $c = 1*10^{-5}$ mol dm^{-3} (vrijednosti potrebnih alikvota prikazane su u tablici 2.). Prije svakog snimanja kiveta se pere acetonom i suši, ili ispire otapalom u kojem se provodi trenutno mjerenje. Sva mjerenja provedena su u rasponu valnih duljina od 200 nm do 700 nm. 10^{-3}

Tablica 2. Priprava matičnih i radnih otopina za snimanje UV-vidljivih apsorpcijskih i fluorescencijskih spektara.

SPOJ	STRUKTURA	Mr	c(stock otopina) / moldm-3	V(stock otopina)/ µL	c/ moldm-3 za mjerenja apsorpcije	V(stock otopina)/ µL	c/ moldm-3 za mjerenja emisije
IM1		275,274	$1* 10^{-3}$	22,60	1* 10-5	2,00	1* 10-6
IM2		346,426	$1,15* 10^{-3}$	26,10	1* 10-5	3,00	1* 10-6
IM3		377,402	$2,9 * 10^{-4}$	103,00	1* 10-5	10,30	1* 10-6
IM4		332,4033	$1* 10^{-3}$	10,00	1* 10-5	1,00	1* 10-6

3.3.2. Snimanje UV-vidljivih fluorescencijskih spektara

Spektralna karakterizacija ispitivanih spojeva u odabranim otapalima provođena je pomoću UV-vidljive fluorescencijske spektrofotometrije, gdje je također korištena kvarcna kiveta u koju se stavi 3 mL otapala i određeni alikvot *stock* otopine ispitivanog spoja.

Koncentracija snimane otopine je $c = 1*10^{-6}$ mol dm^{-3} (vrijednosti potrebnih alikvota matične otopina prikazani su u tablici 2.). Fluorescencijski (emisijski) spektri snimani su u rangu valnih duljina od 300 nm do 700 nm za spoj **IM1** te pri 400 nm do 700 nm za spojeve **IM2**, **IM3** i **IM4**. Kao valna duljina pobude korištena je valna duljina maksimuma apsorpcije. U tablici 5. prikazani su eksperimentalni uvjeti za snimanje emisijskih spektara u različitim otapalima.

Nadalje, zavisno o samom intenzitetu fluorescencije, spektri su snimljeni pri različitim širinama otvora (*slit width*) koji su izraženi u nanometrima. Spomenute širine otvora određuju rezoluciju snimljenog spektra, stoga ukoliko neki spoj jako fluorescira snimljen je pri manjim slitovima tj. potrebna nam je manja rezolucija da bi emisija bila uočena na spektru i obratno. *Slit width* označeni su sa dva broja, gdje prvi broj govori o veličini ulaznog otvora u nanometrima, a drugi broj o veličini izlaznog otvora u nanometrima.

Tablica 3. Eksperimentalni uvjeti snimanja emisijskih spektara u različitim otapalima

	SLITOVI		IM1	IM2	IM3	IM4
			2,5 - 5 5 - 5 5 - 10	2,5 - 5 5 - 5	2,5 - 5 10 - 10	2,5 - 5
	OTAPALA	**$E_T(30)$ / kcal mol^{-1}**				
λpobude / nm	dietil eter	34,5	342	402	433	425
	etil acetat	38,1	337	405	457	428
	DCM	40,7	341	414	433	436
	aceton	42,2	341	407	460	432
	DMSO	45,1	339	415	469	440
	acetonitril	45,6	334	408	460	433
	THF	50,3	339	415	469	440
	etanol	51,9	335	415	460	438
	metanol	55,4	333	414	460	438
	voda	80	332	428	439	460

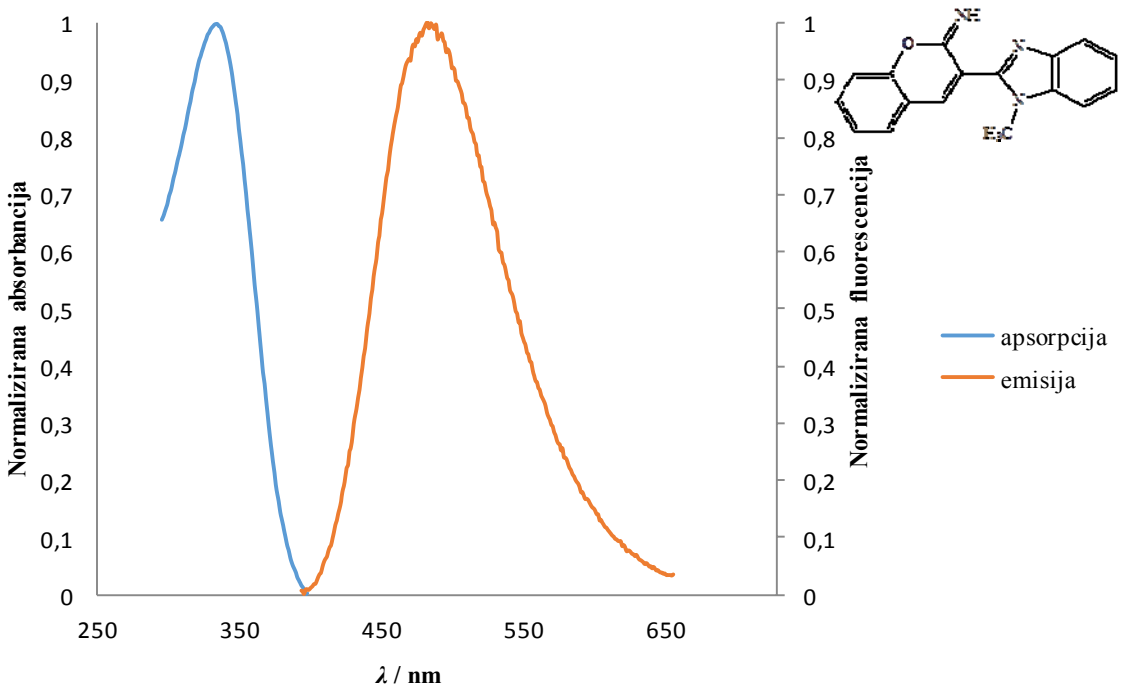
4. Rezultati

4.1. Spektralna karakteristika ispitivanih spojeva u etanolu

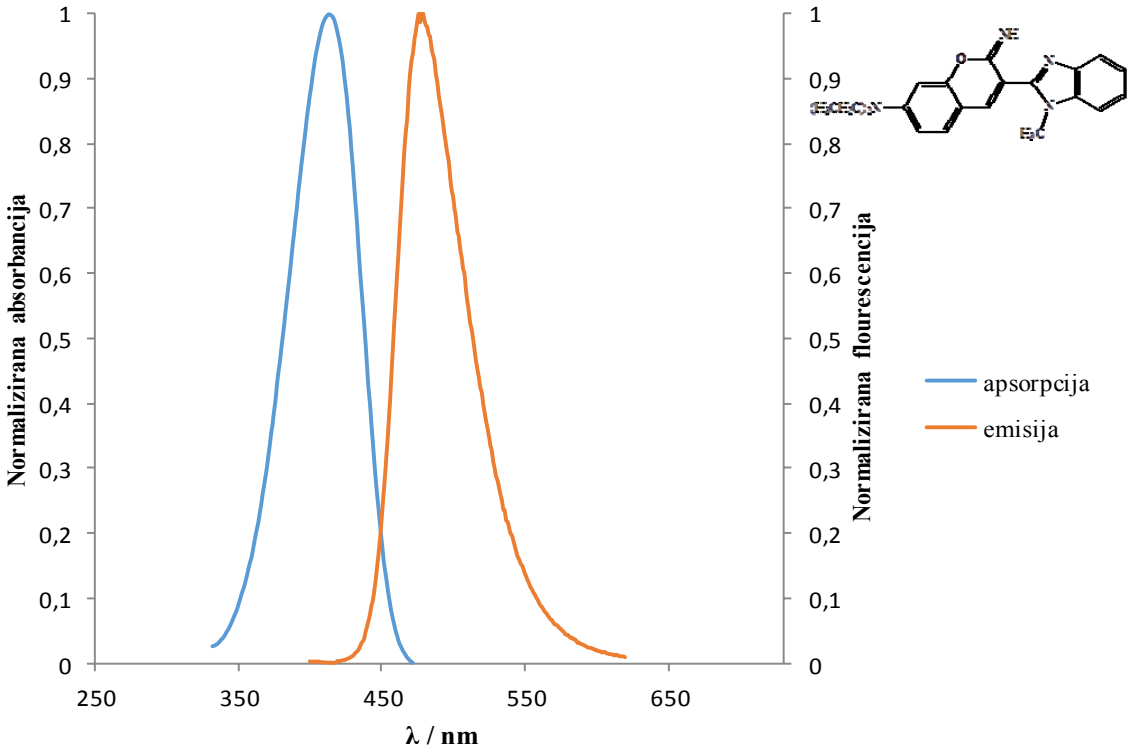
Fotofizičke karakterike ispitivanih spojeva određene su snimanjem UV-vidljivih apsorpcijskih i fluorescencijskih spektara u etanolu. Na slici 21. prikazani su apsorpcijski i emisijski spektri spojeva **IM1**, **IM2**, **IM3** i **IM4** u normaliziranim vrijednostima apsorpcije i fluorescencije. Normalizacija spektara je provedena prema jednadžbi (7):

$$A_{norm} = \frac{At - Amin}{Amax - Amin} \qquad (7)$$

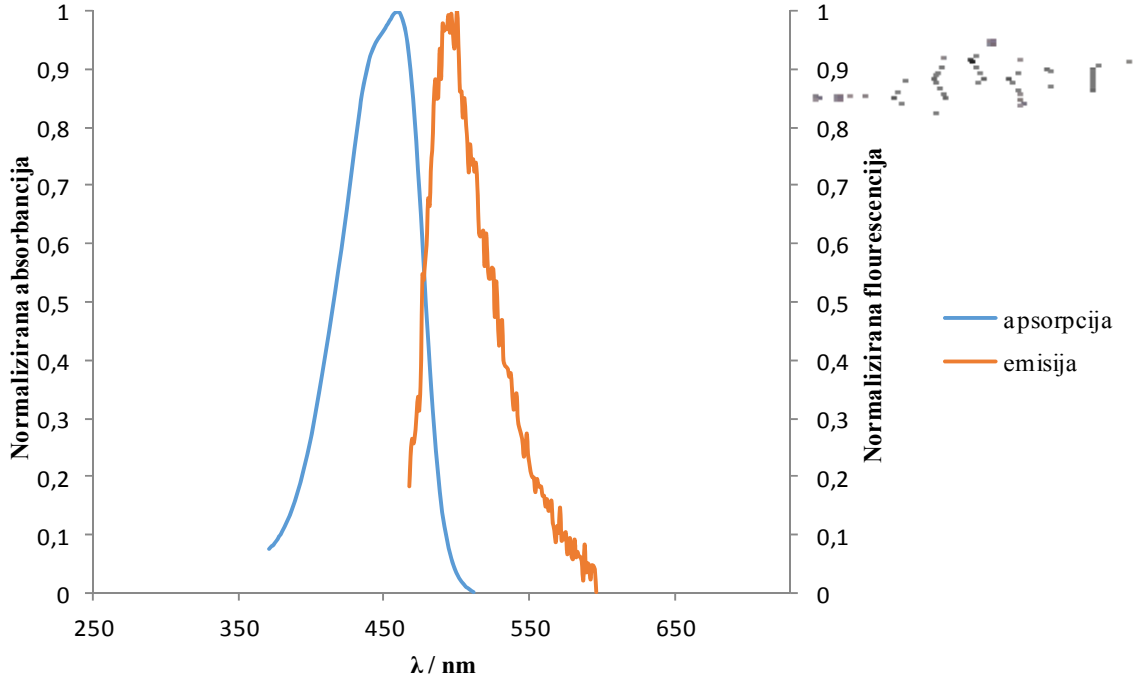
Gdje je A_t apsorbancija očitana u pojedinoj točki, A_{min} apsorbancija očitana u minimumu, A_{max} apsorbancija očitana u maksimumu a A_{norm} je normalizirana vrijednost apsorbancije.



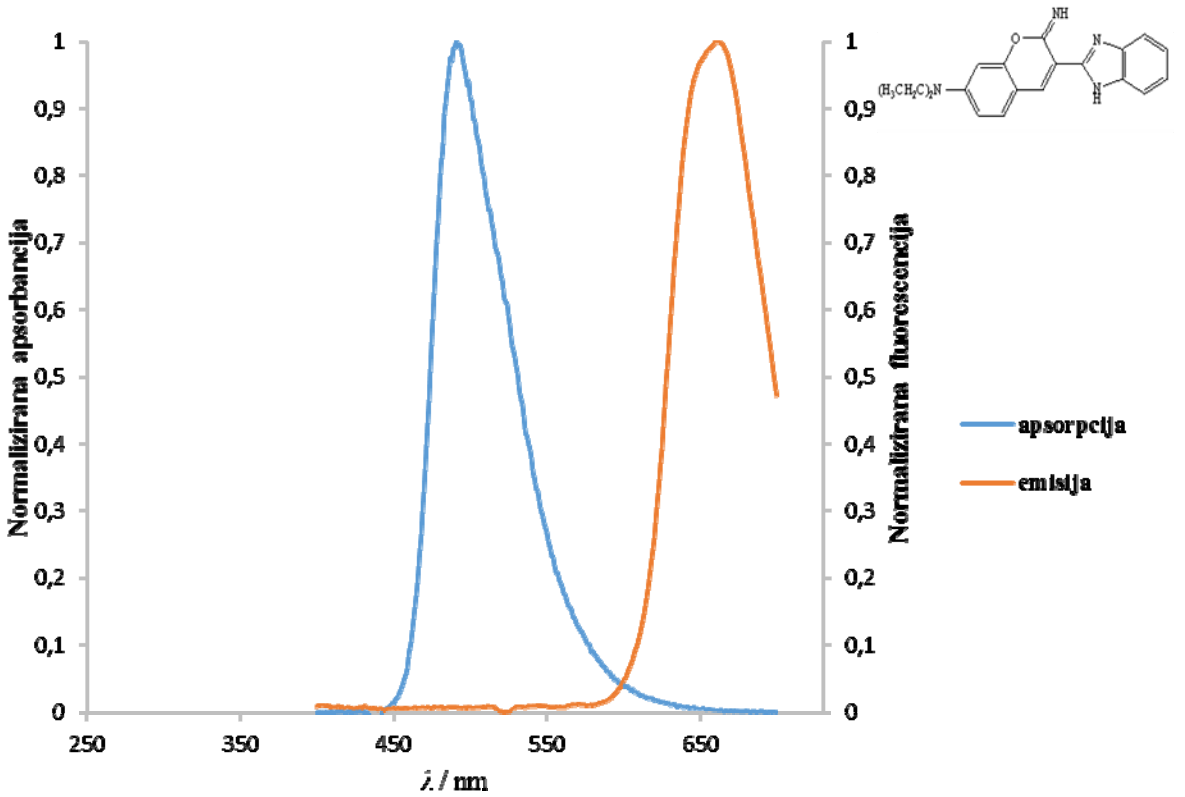
a)


Normalizirana absorbancija
Normalizirana flourescencija
λ / nm
apsorpcija
emisija

b)


Normalizirana absorbancija
Normalizirana flourescencija
λ / nm
apsorpcija
emisija

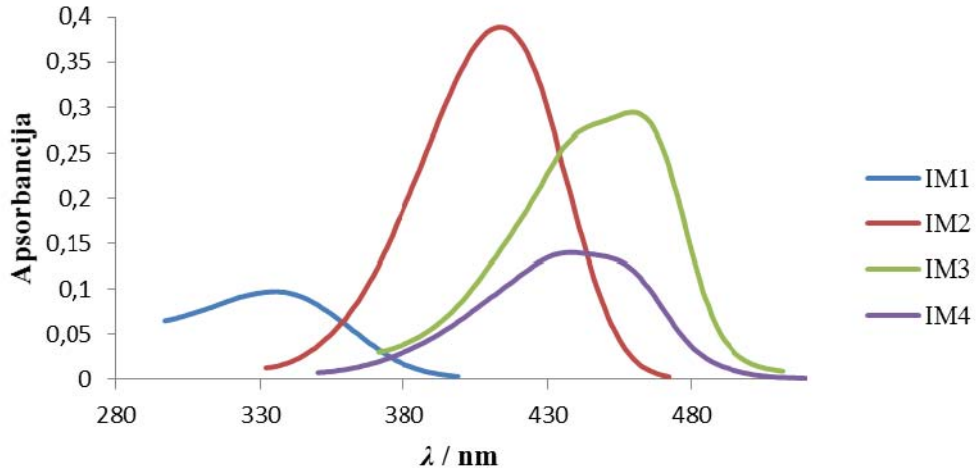
c)



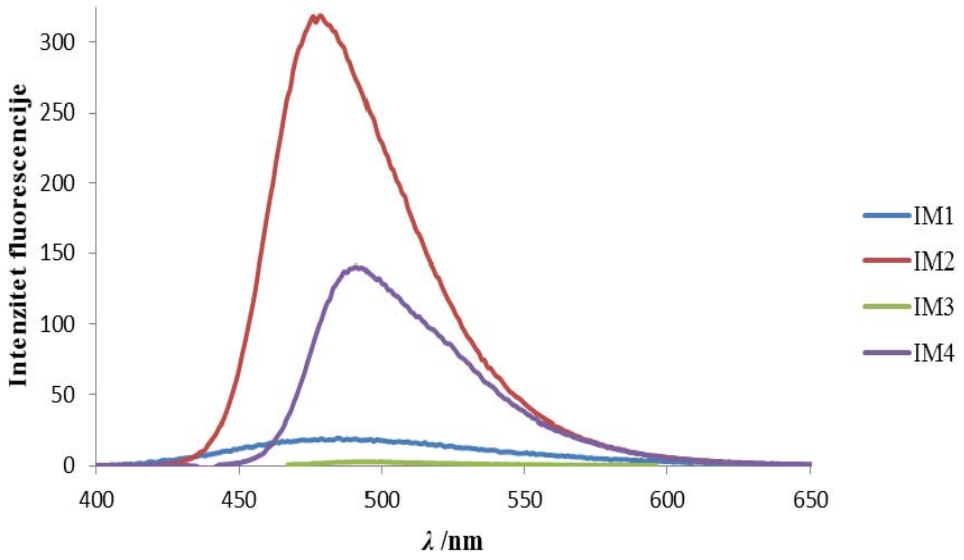
d)

Slika 21. Normalizirani UV-vidljivi apsorpcijski i emisijski spektri ($\lambda_{ex} = \lambda_{abs}^{max}$) spoja a) **IM1** b) **IM2** c) **IM3** i d) **IM4** u etanolu.

Usporedbeni spektri apsorpcije i fluorescencije ispitivanih spojeva **IM1**, **IM2**, **IM3** i **IM4** pri istim koncentracijama u etanolu prikazani su na slikama 22. i 23.



Slika 22. Usporedba apsorpcije **IM1**, **IM2**, **IM3** i **IM4** u etanolu pri istim koncentracijama, $c = 10^{-5}$ mol dm^{-3}.



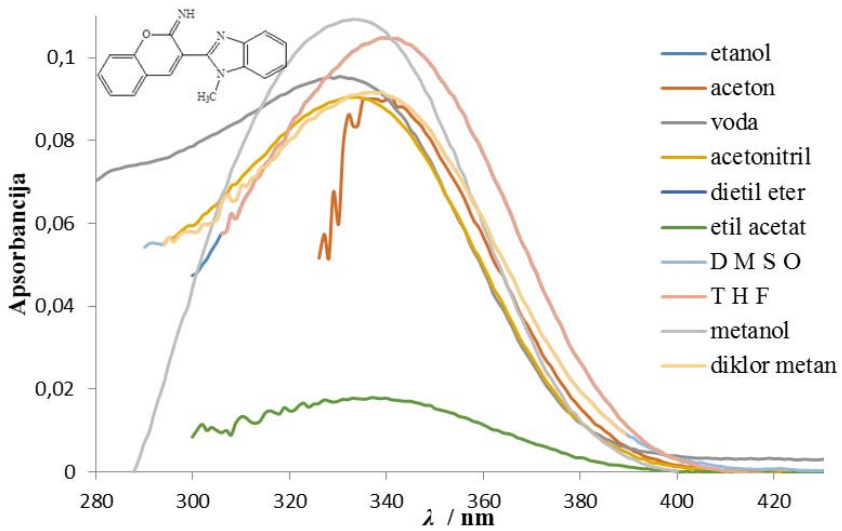
Slika 23. Usporedba intenziteta fluorescencije ispitivanih derivata iminokumarina u etanolu pri istim koncentracijama, $c = 10^{-6}$ mol dm^{-3} i slitovima 2,5 - 5.

Tablica 4. Fotofizička svojstva ispitivanih spojeva u etanolu.

	λ_{abs} / nm	ε / L mol^{-1} cm^{-1}	λ_{emiss} / nm	Intenzitet fluorescencije	Stokesov pomak / nm
IM1	335	9760	483,93	19,04857	148,93
IM2	415	38872	468,95	318,4546	53,95
IM3	460	29441	433,03	2,761875	26,97
IM4	438	14023	491,04	140,9266	53,04

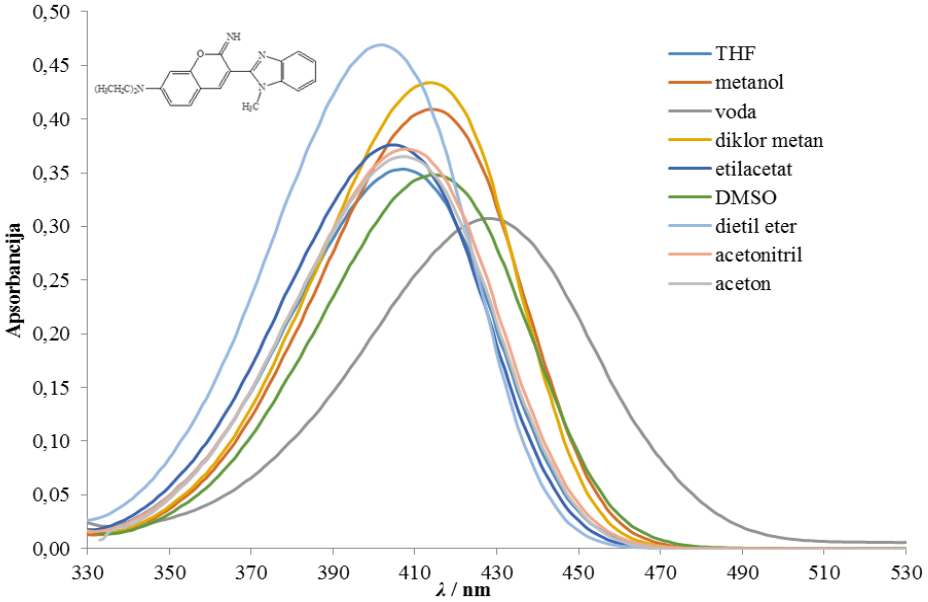
4.2. Utjecaj otapala na apsorpcijska svojstva ispitivanih spojeva

Kako bi se odredio utjecaj otapala različitih parametara polarnosti na apsorpcijska svojstva ispitivanih spojeva, snimljeni su apsorpcijski spektri ispitivanih derivata iminokumarina u 10 odabranih otapala. Dobiveni spektri prikazani su na slici 24.



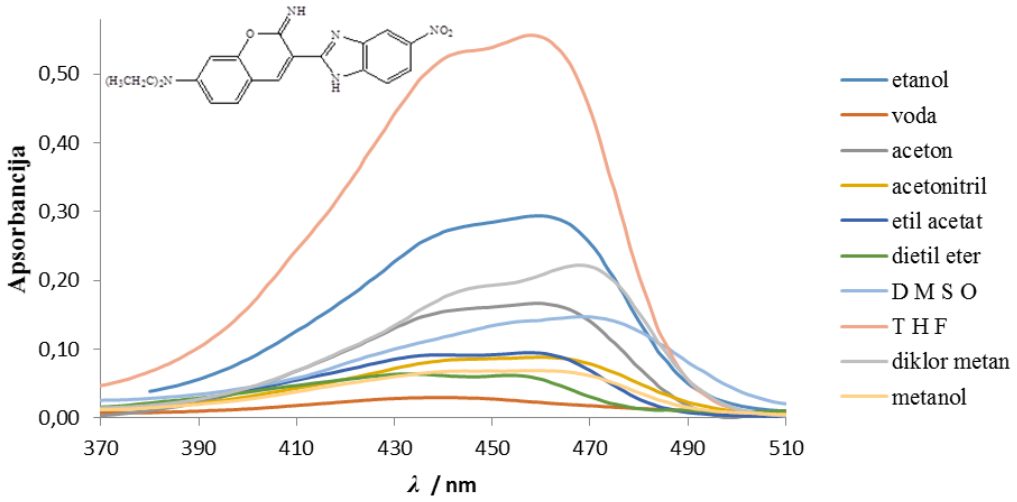


a)


0,50
0,45
0,40
0,35
0,30
0,25
0,20
0,15
0,10
0,05
0,00
Apsorbancija
330
350
370
390
410
430
450
470
490
510
530
λ / nm
THF
metanol
voda
diklor metan
etilacetat
DMSO
dietil eter
acetonitril
aceton

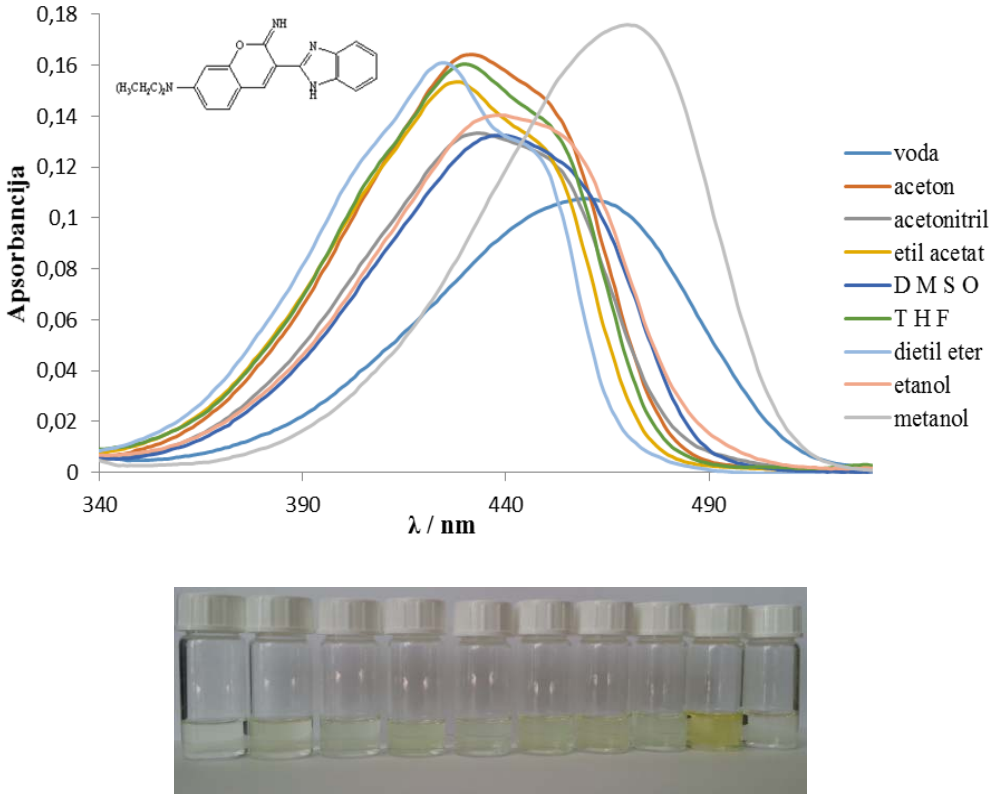


b)


0,50
0,40
0,30
0,20
0,10
0,00
Apsorbancija
370
390
410
430
450
470
490
510
λ / nm
etanol
voda
aceton
acetonitril
etil acetat
dietil eter
D M S O
T H F
diklor metan
metanol



c)

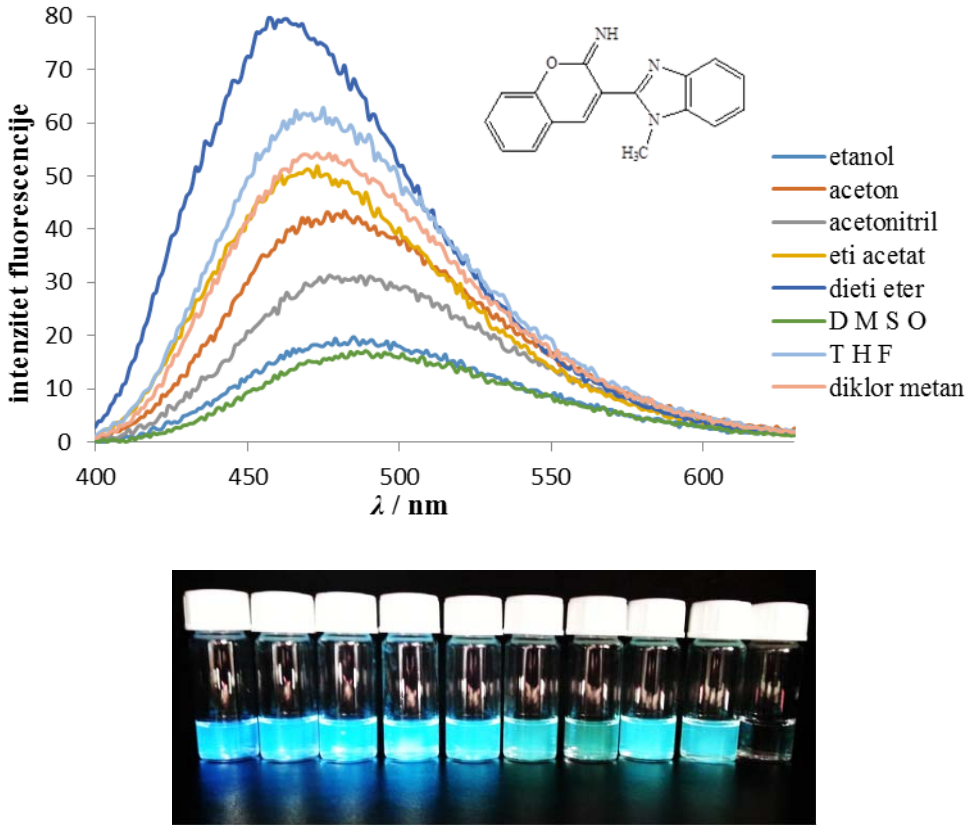


d)

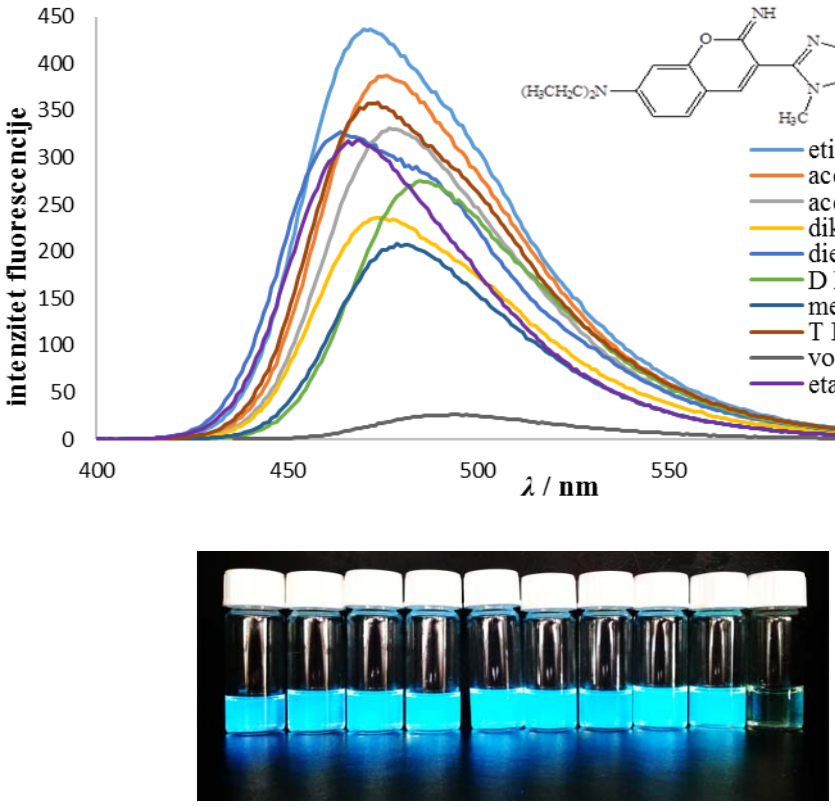
Slika 24. Apsorpcijski spektri **a) IM1 b) IM2 c) IM3 d) IM4** i fotografski prikaz otopina spoja **a) IM1 b) IM2 c) IM3** i **d) IM4** u ispitivanim otapalima poredanim po polarnosti prema tablici 4. na danjem svjetlu.

4.3. Utjecaj otapala na fluorescencijska svojstva ispitivanih spojeva

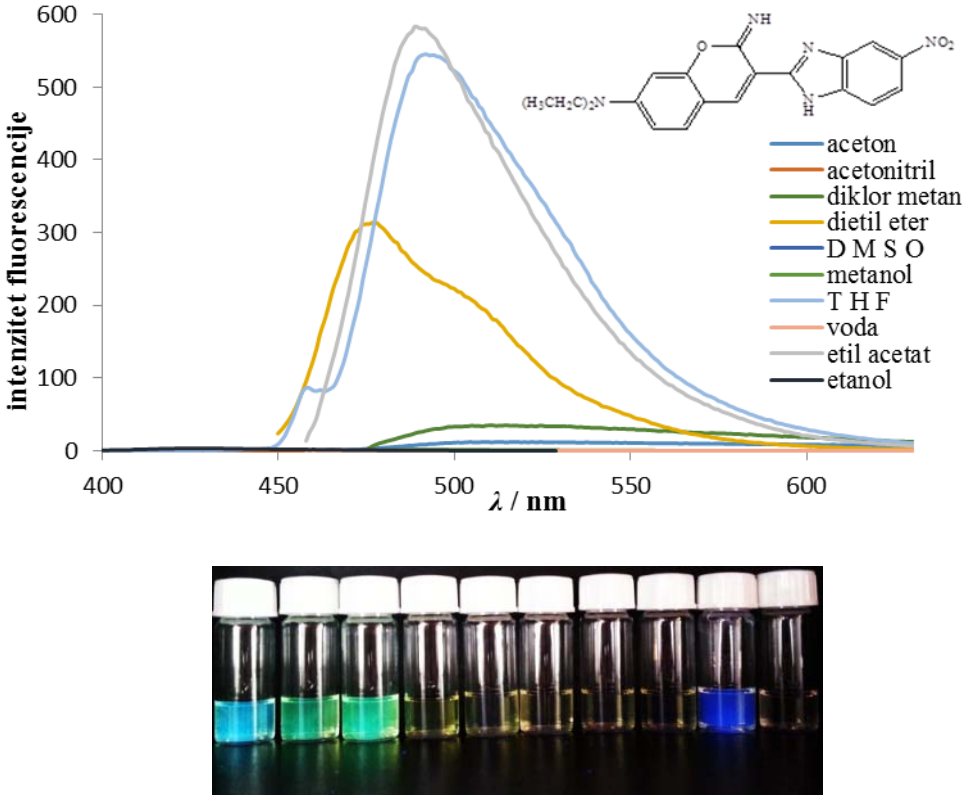
Utjecaj otapala različitih polarnosti na flourescencijska svojstva spojeva ispitan je UV-vidljivom fluorescencijskom spektrofotometrijom. Dobiveni spektri prikazani su na slici 25. Važno je spomenuti kako je sam utjecaj polarnosti otapala na intenzitet fluorescencije ispitivanih spojeva bio uočljiv golim okom i prije same obrade podataka.


intenzitet fluorescencije
λ / nm
etanol
aceton
acetonitril
eti acetat
dieti eter
D M S O
T H F
diklor metan

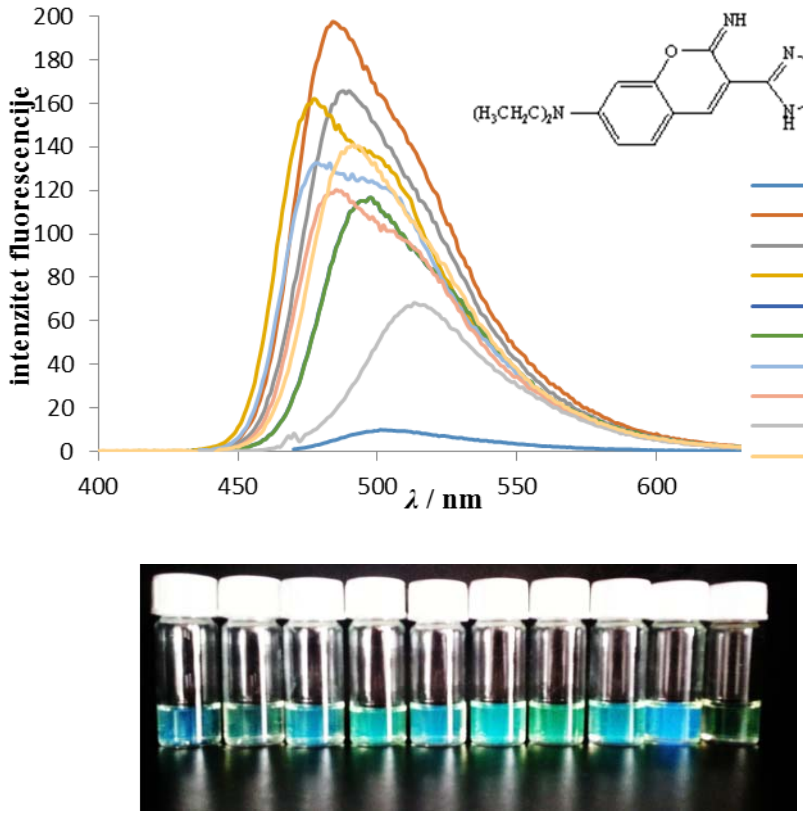
a)


intenzitet fluorescencije
λ / nm
etil acetat
aceton
acetonitril
diklor metan
dietil eter
D M S O
metanol
T H F
voda
etanol

b)


intenzitet fluorescencije
λ / nm
aceton
acetonitril
diklor metan
dietil eter
D M S O
metanol
T H F
voda
etil acetat
etanol

c)


intenzitet fluorescencije
λ / nm
voda
aceton
acetonitril
etil acetat
dietil eter
D M S O
T H F
diklor metan
metanol
etanol

d)

Slika 25. Emisijski spektri **a) IM1 b) IM2 c) IM3 d) IM4** i prikaz otopina spoja **a) IM1 b) IM2 c) IM3** i **d) IM4** koncentracije c = 10^{-6} mol dm^{-3} pri slitovima 2,5 - 5 u ispitivanim otapalima poredanim po polarnosti prema tablici 4. , promatrane pod UV lampom.

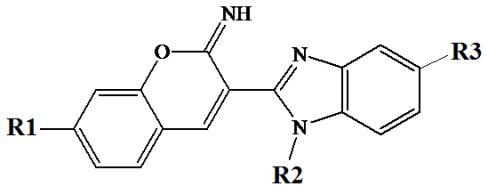
Tablica 5. Spektralna svojstva ispitivanih spojeva u različitim otapalima

otapalo	$E_T(30)$	λ_{abs} / nm				λ_{emiss} / nm			
		IM1	IM2	IM3	IM4	IM1	IM2	IM3	IM4
dietil eter	34,5	342	402	433	425	464,02	464,02	476,96	468,05
etil acetat	38,1	337	405	457	428	473,93	471,96	488,93	476,96
DCM	40,7	341	414	433	436	473,93	473,93	515,07	485
aceton	42,2	341	407	460	432	481,06	476,06	511,94	483,93
DMSO	45,1	339	415	469	440	485	485	510	497,01
acetonitril	45,6	334	408	460	433	485	476,96	498,05	490
THF	50,3	339	415	469	440	473,03	473,93	491,94	478,03
etanol	51,9	335	415	460	438	483,93	468,95	433,03	491,04
metanol	55,4	333	414	460	438	485	478,93	462,98	512,98
voda	80	332	428	439	460	382,014	495,07	438,93	461,04
otapalo	$E_T(30)$	ε, molarni apsorpcijski koeficijent				Intenzitet fluorescencije			
		IM1	IM2	IM3	IM4	IM1	IM2	IM3	IM4
dietil eter	34,5	1590,52499	46927,92594	6462,13517	16093,32263	78,92308	326,6085	314,5071	132,7942
etil acetat	38,1	1804,14077	37580,60634	9574,93112	15343,61243	50,06939	436,736	583,1897	162,1138
DCM	40,7	9792,58269	43365,11791	14646,4288	13300	53,50293	236,1477	34,86318	120,0587
aceton	42,2	9036,24743	36482,62322	16647,6548	16413,05983	42,1285	387,9474	12,73973	197,3484
DMSO	45,1	9157,42368	34823,85278	14694,8844	13237,64175	16,36661	274,851	0,680098	116,8035
acetonitril	45,6	9049,1198	37255,51665	8924,66903	13352,09608	30,91827	330,8944	0,59137	165,8805
THF	50,3	10484,5777	33504,63212	46548,5811	14953,86213	60,57099	358,208	544,8785	132,5324
etanol	51,9	9755,49519	38872	4706,96278	14020,41763	19,04857	318,4546	2,761875	140,9266
metanol	55,4	10931,9724	40952,88813	6983,90454	11304,63108	28,013	208,8171	88,85362	68,21337
voda	80	9503,2841	30715,00659	3002,95409	10745,30408	0,109461	26,4376	17,6587	38,04468

5. Rasprava

U ovom završnom radu istraživana su fotofizička svojstva derivata iminokumarina u svrhu potencijalne primjene kao solvatokromne probe. Spektralna svojstva novosintetiziranih spojeva su okarakterizirana apsorpcijskom i fluorescencijskom spektrofotometrijom u ultraljubičastom i vidljivom dijelu spektra. Istraživan je utjecaj 10 različitih otapala (Tablica 1.), čija je polarnost uspoređivana prema skali $E_T(30)$ vrijednosti, na spektralna svojstva spojeva.

Ispitivani derivati iminokumarini su grupa spojeva koja se sastoji od benzimidazolne i iminokumarinske jezgre međusobno povezane metilenskim mostom, što je vidljivo na slici 28. Na benzimidazolnom dijelu molekule je supstituirana metilna skupina u slučaju **IM1 i IM2** i nitro skupina kod spoja **IM3**. Kumarinski dio molekule je supstituiran dietil amino skupinom kod svih ispitivanih spojeva osim **IM1,** što se vidi na slici 26. Mnogi derivati iminokumarina koriste se kao luminiscentni indikatori poradi neočekivanih strukturalnih utjecaja iminopiranskog prstena na molekulske karakteristike, zbog čega su i ispitivane spektralne karakteristike novosintetiziranih spojeva.



IM 1 R1= H, R2 = CH_3, R3 = H

IM2 R1 = $(H_3CH_2C)_2N$, R2 = CH_3, R3 = H

IM3 R1 = $(H_3CH_2C)_2N$, R2 = H, R3 = NO_2

IM4 R1 = $(H_3CH_2C)_2N$, R2 = H, R3 = H

Slika 26. Shematski prikaz derivata iminokumarina **IM1, IM2, IM3 i IM4.**

5.1. Spektralne karakteristike ispitivanih spojeva u etanolu

Na slici 21. prikazani su normalizirani UV-vidljivi apsorpcijski i emisijski spektri spojeva **IM1, IM2, IM3** i **IM4** u etanolu u svrhu karakterizacije fotofizičkih svojstava. Otopine pripravljenih spojeva pobuđene su svjetlošću valne koja odgovara valnoj duljini maksimuma apsorpcije (λ_{max}).

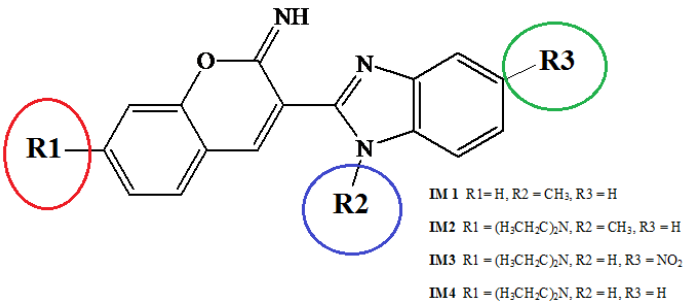
Visoki stupanj konjugacije, prisutnost aromatskih jezgara i planarna struktura molekula glavni su razlog pojave fluorescencije. Poznato je da se prilikom pobude elektromagnetskim zračenjem odvijaju niskoenergetski $\pi \rightarrow \pi^*$ prijelazi unutar aromatskih jezgara, koji uzrokuju izrazitu fluorescenciju. Intenzitet fluorescencije spoja **IM2** je najveći, nakon čega slijedi spoj **IM4**, dok spojevi **IM1** i **IM2** posjeduju znatno manji intenzitet fluorescencije. Apsorpcijski spektri spojeva u etanolu (slika 22.) prikazuju znatno nižu valnu duljinu apsorpcije spoja **IM1** u odnosu na ostale derivate iminokumarina. Spoj **IM3** apsorbira pri najvećoj valnoj duljini (najmanja energija), odnosno uočava se batokromni spektralni pomak. Razlike u apsorpciji i intenzitetu zračenja možemo ponajviše objasniti različitim supstituentima na kumarinskom i benzimidazolnom prstenu koji se razlikuju po prirodi, raspodjeli gustoće elektrona i elektron akceptorskim, odnosno elektron donorskim tendencijama. U ovom radu ispitivan je utjecaj metilne, nitro i dietil amino skupine (slika 27.)

Usporedbom apsorpcijskih spektara spojeva **IM1-IM4** u etanolu pri istim koncentracijama (slika 22.) uočava se razlika u položaju maksimuma apsorpcije (Tablica 5.), gdje spoj **IM1** pokazuje veliki hipsokromni pomak (prema nižim valnim duljinama) dok je kod ostala tri spoja vidljiv batokromni pomak, odnosno pomak prema većim valnim duljinama. Spoj **IM1** jedini apsorbira u ultraljubičastom području, dok ostala tri derivata apsorbiraju u vidljivom djelu elektromagnetskom zračenja. Valja naglasiti kako se najveći batokromni pomak uočava kod spoja **IM3** (slike 22.), Navedeno spektralno svojstvo se uočava i golim okom, odnosno spoj **IM3** jest narančaste boje, spojevi **IM4 i IM2** žute boje, dok je spoj **IM1** bezbojan. Batokromni pomak se u apsorpcijskom spektru uočava u navedenom slijedu (tablica 5., slika 22.):

IM1 (λ = 335 nm) → **IM2** (λ = 415 nm) → **IM4** (λ = 438 nm) → **IM3** (λ = 460 nm)

Navedeni spektralni pomaci mogu se objasniti pomoću elektron donorskih svojstava dietil amino skupine te elektron akceptorskih svojstava nitro skupine. Spoj **IM1** ne sadrži supstituente sa donorskim i akceptorskim svojstvima, stoga mu je valna duljina maksimuma apsorpcije najmanja (slika 22.). Također, razlog višeg maksimuma apsorpcije valne duljine spoja **IM3** u odnosu na spoj **IM4** možemo objasniti upravo elektron akceptorskim utjecajem nitro skupine koju sadrži spoj **IM3**.

Iz slike 23. vidljiva je usporedba intenziteta fluorescencije spojeva **IM1-IM4** pri istim koncentracijama ($c = 10^{-6}$ mol dm^{-3}) i slitovima (2,5 - 5) gdje je očevidno kako **IM2** pokazuje puno jači intenzitet fluorescencije nego spojevi **IM1, IM3** i **IM4**. Potrebno je naglasiti kako spoj **IM4,** za razliku od spojeva **IM1 i IM3,** ipak jače fluorescira. Promjene u jačini intenziteta fluorescencije uzrokovane su prvenstveno, u istraživanom slučaju, položajem supstituenata na iminokumarinskoj jezgri (slika 26.), odnosno samom strukturom ispitivanih spojeva.



Slika 27. Prikaz položaja supstituentana vezanih na molekulu iminokumarina.

Na benzimidazolni dio molekula **IM1** i **IM2** vezana je metilna skupina koja primarno doprinosi boljoj topljivosti spojeva u etanolu, odnosno doprinosi lipofilnosti molekule.

Spoj **IM2** fluorescira najjačim intenzitetom u etanolu upravo zbog dietil amino skupine vezane na položaju -R_1 (na kumarinsku jezgru spoja), kako je vidljivo iz slike 27. Dietil amino skupina je sekundarni amin, odnosno elektron-donorska skupina zbog svog slobodnog para elektrona na dušiku koji direktno sudjeluju u π vezi, te time utječe na konjugaciju sustava.

Unatoč vrlo zanimljivoj strukturi spoja **IM3** koja se sastoji od elektron donorske i elektron akceptorske skupine na suprotnim stranama konjugiranog sustava (D-π-A sustav), fluorescencija spoja je neočekivano malog intenziteta. Promatrajući spoj **IM3** kao D-π-A sustav, fluorescenciju možemo objasniti pojavom intermolekularnog prijenosa naboja (eng. ICT, *intermolecular charge transfer*). Naime spomenuta D-π-A struktura spoja **IM3** omogućava formiranje takozvanog *povuci-potegni* sustava u pobuđenom stanju, koje je vrlo osjetljivo na promjenu mikrookoline. Stoga, za spoj **IM3** su bile očekivane najveće spektralne promjene u ovisnosti o otapalu. Potrebno je također naglasiti da nitro skupina koja je vezana na benzimidazolnu jezgru, izravno utječe na smanjenje topivosti spoja **IM3**.

Spoj **IM4** pokazuje fluorescenciju podosta slabijeg intenziteta od spoja **IM2.**

Prikazom normaliziranih apsorpcijskih i fluorescencijskih spektara spjeva **IM1-IM4** otopljenih u etanolu vidljivi su Stokes-ovi pomaci (slika 21., tablica 4.). Spoj **IM1** ima evidentno najveći Stokes-ov pomak od 148,93 nm, nakon čega **IM2** i **IM4** imaju puno manji i međusobno vrlo slični pomak u iznosu od 53,95 nm za spoj **IM2** te 53,04 nm za spoj **IM4**. Najmanji Stokes-ov pomak od svega 26,97 nm uočava se kod spoja **IM3**.

5.2. Utjecaj otapala na apsorpcijska svojstva ispitivanih spojeva

Snimljeni su apsorpcijski spektri spomenuta 4 derivata iminokumarina u 10 različitih otapala kako bi se utvrdila moguća primjena njihovih optičkih svojstava. Zbog intermolekularnog prijenosa naboja, tzv. ICT (engl. *intermolecular charge transfer*), molekule u pobuđenom stanju dobivaju određeni dipolni karakter u otopinama različite polarnosti. Poradi različite polarnosti otapala, spojevi se u svakoj otopini drugačije ponašaju, što je vidljivo određenim apsorpcijskim pomakom tj. pomakom valne duljine apsorpcije. Kao rezultat promjene gustoće elektronskog oblaka na heteroatomima, dolazi do smanjena ili povećanja gustoće što direktno utječe i na mogućnost stvaranja vodikovih veza. Mogućnost stvaranja vodikovih veza u pobuđenom stanju može biti manja ili veća. Rezultat toga je hipsokromni (plavi) pomak molekula spoja **IM1** promjenom polarnosti otapala od najnepolarnijeg prema polarnom, odnosno tamo gdje je omogućeno stvaranje vodikovih veza.

Iz spomenutog razloga dolazi do više-manje postupnog batokromnog pomaka za spoj **IM2** s porastom polarnosti, odnosno do pomaka apsorpcijskih maksmimuma prema višim valnim duljinama, što se još naziva i crvenim pomakom. Iznimke su otopine spoja **IM2** u acetonu i acetonitrilu (tablica 5., slika 24.). Još bolje uočljiv batokromni pomak prema višim valnim duljinama, no nepravilan, povećanjem polarnosti otapala vidi se kod spojeva **IM3 i IM4.**

5.3. Utjecaj otapala na fluorescencijska svojstva ispitivanih spojeva

UV-vidljivom fluorescencijskom spektrofotometrijom ispitana su emisijska svojstva spojeva **IM1, IM2, IM3** i **IM4** te utjecaj polarnosti otapala na intenzitet fluorescencije (slika 27.) Najveći intenzitet fluorescencije se uočava kod spoja **IM2,** nakon čega po jačini intenziteta slijede **IM4 i IM1** dok **IM3** najslabije fluorescira. Usporedba intenziteta fluorescencije sva četiri ispitivana spoja otopljena u etanolu pri jednakim slitovima (2,5 - 5) prikazana je na slici 23.

Do promjena u intenzitetu fluorescencije dolazi prilikom intermolekularnih prijenosa naboja u pobuđenom stanju. Takav prijenos stvara signal kojeg detektiramo kao fluorescenciju, odnosno pobuda fluorofora uzrokuje pomak elektrona iz jedne orbitale u drugu. Ukoliko su te dvije orbitale udaljene u prostoru, elektronski prijelaz je popraćen trenutnom promjenom dipolnog momenta fluorofora. Ta promjena intenziteta fluorescencije podosta je izražena ukoliko ispitivani spojevi postoje konjugirane elektron donirajuće skupine kao npr. - NH_2, - NMe_2, - CH_3O koje su ujedno vezane i na elektron odvlačeću skupinu primjerice - $C=O$, - CN jer tada povećanje u dipolnom momentu može biti podosta izraženo.

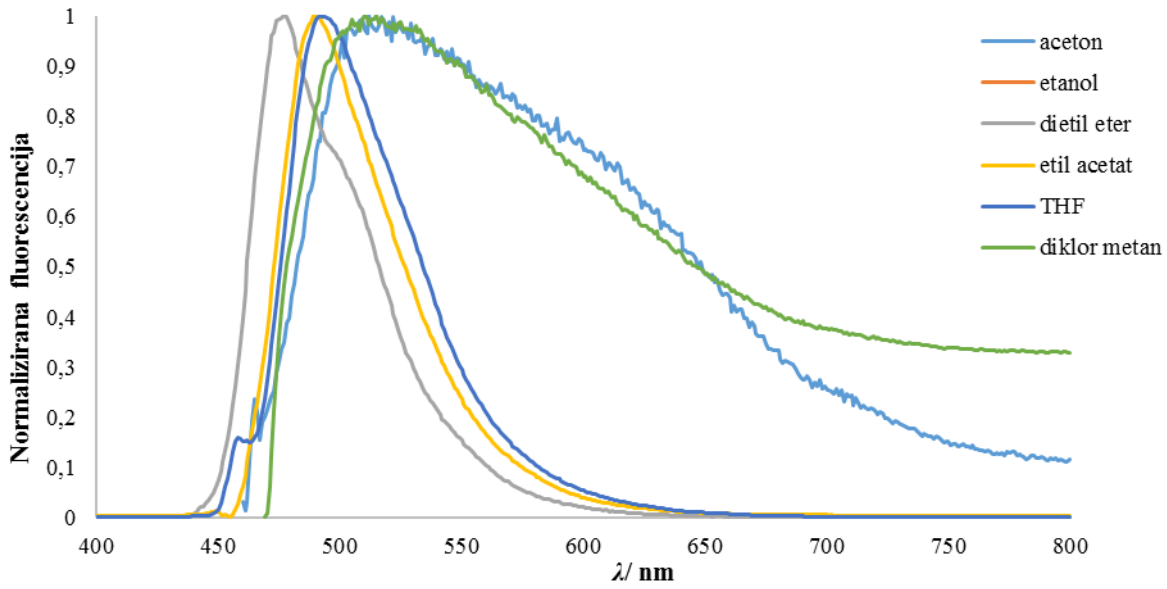
Osim u promjeni intenziteta fluorescencije, dolazi i do promijene valne duljine emisije što nam diktira boju emitiranog svjetla. Kao što je vidljivo iz tablice 5. i slike 25. valne duljine emisije za spojeve **IM1, IM2, IM3 i IM4** kreću se u rasponu između 382 - 515 nm što odgovara intenzivnoj plavoj boji.

Gore navedene promjene najizraženije su kod spoja **IM3** jer dolazi do pojave ICT-a pošto spoj sadrži dietil amino skupinu na kumarinskom prstenu te nitro skupinu na benzimidazolnom prstenu. Na slici 28. prikazani su normalizirani spektralni pomaci spoja

IM3 u različitih 6 otapala. Intermolekularni prijenos naboja do kojeg dolazi u različitim otapalima za spoj **IM3** objašnjen je u poglavlju 5.2. Nagle promjene boje emitiranog svjetla spoja **IM3** vidljive su i golim okom, a vrijednosti valnih duljina emisije prikazane su u tablici 7. Naime, tolike promjene u boji emitiranog svijetla promjenom polarnosti otapala je izrazito bitno svojstvo potencijalnog optičkog senzora.

Za spojeve **IM1** i **IM2** vidljiv je pad intenziteta fluorescencije (slika 25.) porastom polarnosti otapala, odnosno dolazi do hipokromnog spektralnog pomaka, dok za spojeve **IM3** i **IM4** ne možemo utvrditi izravnu ovisnost polarnosti otapala na intenzitet fluorescencije. Unatoč tome, u određenim otapalima spomenuti spojevi (**IM3** i **IM4**) pokazuju neočekivani i nagli porast intenziteta fluorescencije (hiperkromni pomak). Tako za spoj **IM3**, koji fluorescira najmanjim intenzitetom u odnosu na ostale derivate, uočava se najveći intenzitet fluorescencije kada je otopljen u etil acetatu i THF-u, nešto manji u dietil eteru dok u ostalim otapalima puno slabije fluorescira. Što se tiče fluorescencijskih svojstava spoja **IM4**, on pokazuje najjači intenzitet fluorescencije otopljen u acetonu, acetonitrilu i etil acetatu. Općenito spomenuti spoj pokazuje najjači intenzitet fluorescencije što je vidljivo iz slike 25., a vidljivo dolazi do smanjena intenziteta fluorescencije u najpolarnijem otapalu, vodi, što ujedno vrijedi i za ostala 3 ispitivana spoja.

Iz tablice 5. uočava se kako definitivno najbolja fluorescencijska svojstva pokazuju spojevi **IM2** i **IM4,** stoga se zaključuje kako se potencijalno mogu koristiti kao optički senzori, što je vidljivo i iz visokih vrijednosti valnih duljina emisija. Spoj **IM3,** iako nema toliko izražen intenzitet fluorescencije kao **IM4 i IM2,** veoma je zanimljiv jer dolazi do puno većih promjena valnih duljina emisije, odnosno boje emitiranog svjetla promjenom otapala. Razlog zbog kojega dolazi do spomenute pojave je vrlo vjerojatno intermolekularni prijenos naboja do kojeg dolazi u molekuli spoja **IM3** promjenom otapala različitih strukturnih značajki. Otapanjem u različitim otapalima dolazi do π-π^* prijelaza u konjugiranom sustavu molekule iminokumarina, koja je zapravo uzrok promjene valne duljine emisije.



Slika 28. Normalizirani UV-vidljivi emisijski spektar ($\lambda_{ex} = \lambda_{abs}^{max}$) spoja **IM3** u slijedećih 6 otapala: dietil eteru, etil acetatu, diklormetanu, acetonu i THF-u.

6. Zaključak

Uspješno je provedena karakterizacija spektralnih svojstava četiri sintetizirana derivata iminokumarina **IM1, IM2, IM3** i **IM4** UV-vidljivom apsorpcijskom i fluorescencijskom spektofotometrijom u 10 različitih otapala. Karakterizacijom navedenih spojeva dobiveni su odgovarajući apsorpcijski i emisijski spektri.

Spoj **IM1** apsorbira u UV području, dok valne duljine maksimuma apsorpcije za spojeve **IM2, IM3 i IM4** se nalaze u vidljivom dijelu elektromagnetskog zračenja.

Povećanjem polarnosti otapala spoj **IM2** pokazuje pomak maksimuma apsorpcije prema većim valnim duljinama (crveni pomak) odnosno dolazi do efekta pozitivnog solvatokromizma. Isto vrijedi i za spojeve **IM3 i IM4,** dok spoj **IM1** pokazuje relativno pravilan hipsokromni pomak.

Najveći intenzitet fluorescencije pokazuje spoj **IM2**. Spoj **IM3** pokazuje vrlo jasnu promjenu u boji emitirane svjetlosti u različitim otapalima što se tumači intermolekularnim prijenosom naboja izazvanim elektron donorsko/akceptorskim svojstvima supstituenata na spomenutom spoju, no problem je veoma slaba topljivost spoja.

Ispitivani novosintetizirani derivati iminokumarina predstavljaju potencijalne nove solvatokromne probe. Dva od četiri ispitivana derivata iminokumarina (**IM1, IM2**) pokazuju izrazitu fluorescenciju, a veoma dobru osjetljivost na polarnost otapala pokazuje **IM2** kao i već spomenuti spoj **IM3** sa zanimljivom promjenom valne duljine emisije**.** Nakon analize rezultata eksperimentalnih ispitivanja i karakterizacije spomenutih spojeva, može se zaključiti kako najbolja apsorpcijska i fluorescencijska svojstva pokazuje 2-imino-3-(2-*N*-metilbenzimidazolil)kromen (**IM2**) te u budućnosti može biti korišten kao solvatokromna proba i dobar optički senzor.

7. Literatura

1. Hulanicki, A., Glab, S., Ingman, F. Chemical Sensors, definitions and classifications. Pure and Applied Chemistry.,**9** (1991) 1247 – 1250

2. Piljac I., Senzori fizikalnih veličina i elektroanalitičke metode, 2010., 593 - 610

3. Volmajer, J., Toplak, R., Leban, I., Le M. ,A.M., Synthesis of new iminocoumarins and their transformations into N-chloro and hydrazono compounds et. Al. Tetrahedron **61** (2005) str. 7012 - 7021

4. Rajput, V.K., Leffler, H., Nilsson, U.J., Mukhopadhyay, V., Synthesis and evaluation of iminocoumaryl and coumaryl derivatized glycosides as galectin antagonists, Bioorg. & Med. Chem. Letters **254** (2014) str. 3516 - 3520

5. Rabahi A. et al. / Journal of Molecular Liquids, Synthesis and optical properties of coumarins and iminocoumarins: Estimation of ground- and excited-state dipole moments from a solvatochromic shift and theoretical methods **195** (2014) str. 240 - 247

6. Edmonds T.E. (ed.), Chemical Sensors, Blackie and Sons Ltd., London, (1988) 383 - 384

7. Vasylevska A. S., Karasyov A.A., Borisov S. M., Krause C., Novel coumarin-based fluorescent pH indicators, probes and membranes covering a broad pH range, Anal Bioanal Chem **387** (2007) str. 2131 - 2141

8. https://www.yumpu.com/sl/document/view/16786493/molekulska-absorpcijska-spektrometrija-mas/11 (pristup 20. kolovoza 2015.)

9. Skoog, D.A., West, D.M., Holler, F.J., *Osnove analitičke kemije*, ŠK, Zagreb 1999., str. 542 - 544 i 585 - 589

10. Valeur B., Molecula Fluorescence Principles and Applications, 2001, str. 20 - 143

11. Skoog D. A., Holler E. J. , Crouch S. R., Principles of Instrumental Analysis **6** (2007) str. 131 - 426

12. Demchenko A.P., Introduction in Fluorescence Sensing, Springer science + Business Media B. V., 2009, str. 119 - 188

13. Turki H. et al. / Dyes and Pigments, Optical properties of new fluorescent iminocoumarins, **73** (2007) str. 311 - 316

14. Turki H. et al. / C. R. Chimie, Optical properties of new fluorescent iminocoumarins, **9** (2006) str. 1252 - 1259

15. Liptay W., Angew. Chem. internat. **3** (1969) str. 177,178, 184 - 188

16. Rouessac, F., R., A. , Chemical Analysis, Modern Instrumentation Methods and Techniques, Wiley and Sons, LTD, Chichester, 2000. str. 167 - 203, 241 - 259

17. Reichardt C., Solvatochromic Dyes as Solvent Polarity Indicators, Chem. Rev. **94** (1994) str. 2319 - 2358

18. Valeur B., Molecula Fluorescence Principles and Applications, 2001., 200 - 226

19. https://www.flickr.com/photos/zack_mensinger/247225099 (pristup 20. kolovoza 2015.)

20. Huang S.-T. et al., *The synthesis and optical characterization of novel iminocoumarin derivatives*, Dyes and Pigments **86** (2010) str. 6 - 14

21. Novaki L.P., O.A. El S., Solvatochromism in Pure Solvents: Effects of the Molecular Structure of the Probes, Ber. Bunsenges. Phys. Chem. **5** (1995), str. 648 - 655

22. Demchenko A. P., Introduction in Fluorescence Sensing, Springer science + Business Media B. V., 2009., str. 299 - 500

23. Yang Z. C. J., He Y., Yang J. H., Kim T., Peng X., Jong S. K., Macro-/micro-environment-sensitive chemosensing and biological imaging, Chem. Soc. Rev., **43** (2014) str. 4563 - 4601

24. Turki H. et al. / C. R. Chimie, Optical properties of new fluorescent iminocoumarins, **9** (2006) str. 1252 - 1259

25. Dignore G., Nifosi R., Albertazzi L., Storti B., Ranieri B., Polarity-Sensitive Coumarins Tailored to Live Cell Imaging, J. Am. Chem. Soc., **132,** (2010) str. 1276 - 1288

8. Životopis

Rođena sam 01.12.1993. u Zagrebu. Pohađala sam Osnovnu školu Sveta Nedjelja nakon koje sam upisala opću gimnaziju Lucijana Vranjanina. Prilikom školovanja imala sam priliku raditi u geomehaničkom laboratoriju Studio d.o.o. i Geo-Eko d.o.o. Upisala sam Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije 2012. godine, smjer Primijenjena kemija. Praksu sam odrađivala 2014. godine na Zavodu za javno zdravstvo dr. Andrija Štampar.