

# Bis(benzotiazolil-triazolil)benzeni kao potencijalni kemijski senzori za metalne katione

---

Vukorepa, Gracia

Undergraduate thesis / Završni rad

2020

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:149:400945>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-27**



Repository / Repozitorij:

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



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU**  
**FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE**  
**SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ**

**Gracia Vukorepa**

**ZAVRŠNI RAD**

**Zagreb, 2020.**

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE  
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

**Gracia Vukorepa**

**Bis(benzotiazolil-triazolil)benzeni kao potencijalni kemijski senzori  
za metalne katione**

ZAVRŠNI RAD

Voditelj rada: Izv. prof. dr. sc. Svjetlana Krištafor

Članovi ispitnog povjerenstva: Izv. prof. dr. sc. Svjetlana Krištafor

Dr. sc. Lidija Furač, viši predavač

Dr. sc. Silvija Maračić, znanstveni novak

Zagreb, rujan 2020.

Ovaj rad je izrađen u sklopu projekta Hrvatske zaklade za znanost (HrZZ) pod nazivom „*Design and Synthesis of Novel Nitrogen-Containing Heterocyclic Fluorophores and Fluorescent Nanomaterials for pH and Metal-Ion Sensing*“ (projekt HRZZ-3386, iNFiNiTE-SENS).



*Zahvaljujem svojoj mentorici izv.prof.dr.sc. Svjetlani Krištafor na predloženoj temi i vodstvu tijekom izrade završnog rada. Naročito želim zahvaliti Kristini Pršir mag.appl.chem. na strpljenju i nesebičnoj pomoći, na brojnim savjetima te na ljubaznosti i razumijevanju prilikom izrade završnog rada. Zahvaljujem svojoj obitelji, partneru, kolegama i prijateljima koji su mi bili podrška tijekom studija.*

## SAŽETAK

Bakrom(I) katalizirana 1,3-dipolarna azid-alkin cikloadicija (CuAAC) najpoznatija je *click* reakcija kojom se sintetiziraju 1,4-disupstituirani triazoli, a to je ujedno i najzastupljenija *click* reakcija općenito. Zbog mogućnosti koordiniranja metalnih iona na svoje heteroatome, 1,2,3-triazoli se uspješno koriste u dizajnu i razvoju kemijskih senzora za metalne ione. U ovom je radu prikazan pregled molekulskih senzora za metalne katione temeljenih na derivatima benzotiazola i 1,2,3-triazola, te na spojevima koji u strukturi imaju dva ili više benzotiazolna ili 1,2,3-triazolna prstena. Također je razjašnjena važnost benzotiazola u kemosenzorima, a obrađene su i spektroskopske metode karakterizacije optičkih senzorskih molekula.

**Ključne riječi:** benzotiazol

1,2,3-triazol

*click* kemija

UV-Vis spektroskopija

molekulski senzor

## SUMMARY

Copper (I) catalyzed 1,3-dipolar azide-alkyne cycloaddition (CuAAC) is the best known click reaction to synthesize 1,4-disubstituted triazoles, and it is also the most common click reaction in general. Due to the possibility of coordinating metal ions to their heteroatoms, 1,2,3-triazoles are successfully used in the design and development of chemical sensors for metal ions. This paper presents an overview of molecular sensors for metal cations based on benzthiazole and 1,2,3-triazole derivatives and compounds containing two or more benzthiazole or 1,2,3-triazole rings in the structure. The importance of benzthiazole in chemosensors has also been clarified, and spectroscopic methods for the characterization of optical sensor molecules have been discussed.

**Keywords:** benzthiazole

1,2,3-triazole

click chemistry

UV-Vis spectroscopy

molecular sensor

## SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>2. OPĆI DIO</b> .....	<b>2</b>
2.1. Benziazol.....	2
2.1.1. Benziazoli kao biološki aktivne molekule .....	2
2.2. Kemosenzori.....	4
2.2.1. Fluorescencijski kemosenzori.....	5
2.2.2. Benziazoli u razvoju kemosenzora.....	6
2.2.3. Triazoli u razvoju kemosenzora.....	7
2.3. <i>Click</i> kemija.....	8
2.3.1. Sinteza 1,2,3-triazola.....	10
2.4. Spektroskopske metode karakterizacije optičkih senzorskih molekula.....	12
2.4.1. Fluorescencijska spektroskopija.....	13
2.4.2. UV/vidljiva spektroskopija.....	15
<b>3. LITERATURNI PREGLED</b> .....	<b>17</b>
3.1. Pregled molekulskih senzora za metalne katione temeljenih na derivatima benziazola..	17
3.2. Pregled molekulskih senzora za metalne katione koji u strukturi sadrže dva ili više benziazolnih prstena .....	25
3.3. Pregled molekulskih senzora za metalne katione temeljenih na derivatima 1,2,3-triazola.....	31
3.4. Pregled molekulskih senzora za metalne katione koji u strukturi sadrže dva ili više 1,2,3 triazolna prstena.....	37
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b> .....	<b>43</b>
<b>5. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....	<b>48</b>
<b>6. ZAKLJUČAK</b> .....	<b>49</b>



**7. LITERATURA.....50**

## 1. UVOD

Kemijski senzor je uređaj koji pretvara kemijske informacije u koristan analitički signal. Kemijski senzor sastavljen je od dva osnovna dijela: pretvornika i receptora. Neki senzori imaju i separator, npr. membranu. Receptor je dio senzora u kojem se kemijska informacija pretvara u oblik energije koji može biti izmjeren pretvornikom, dok je pretvornik dio koji pretvara energiju koja nosi kemijsku informaciju o uzorku u koristan analitički signal. Kemijski senzori mogu se podijeliti s obzirom na princip rada pretvornika, a nama su posebno zanimljivi optički senzori. To su uređaji koji pretvaraju promjene optičkih pojava, koje su rezultat interakcije analita i receptora, u koristan analitički signal.

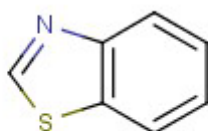
Kemosenzori su molekule visoko selektivne za pojedine metalne vrste. Mnogi metalni ioni imaju bitnu ulogu u raznim biološkim procesima, a dizajn i razvoj kemosenzora selektivnih za metalne ione postao je vrlo važno područje istraživanja. Derivati benzotiazola ponašaju visoko selektivno prema metalnim kationima.

U razvoju kemosenzora važno je i da njihova sinteza bude što brža i jednostavnija. Upravo zato se velika pažnja usmjerava na tzv. *click* kemiju koja omogućava provođenje jednostavnih reakcija u blagim reakcijskim uvjetima uz visok stupanj iskorištenja. Produkti *click* reakcije su 1,2,3-triazoli koji imaju važne uloge u kemosenzorskim molekulama. Također povećanjem broja funkcionalnih jedinica, triazola i benzotiazola u strukturi molekule, povećava se sposobnost molekule za vezanje različitih analita.

## 2. OPĆI DIO

### 2.1. Benzotiazol

Benzotiazol je aromatski heterociklički spoj kemijske formule  $C_7H_5NS$  prikazan na Slici 1. Bezbojna je tekućina male viskoznosti. Iako matični spoj benzotiazol nema široku upotrebu, mnogi njegovi derivati nalaze se u komercijalnim proizvodima ili u prirodi.



Slika 1. Benzotiazol

#### 2.1.1. Benzotiazoli kao biološki i optički aktivne molekule

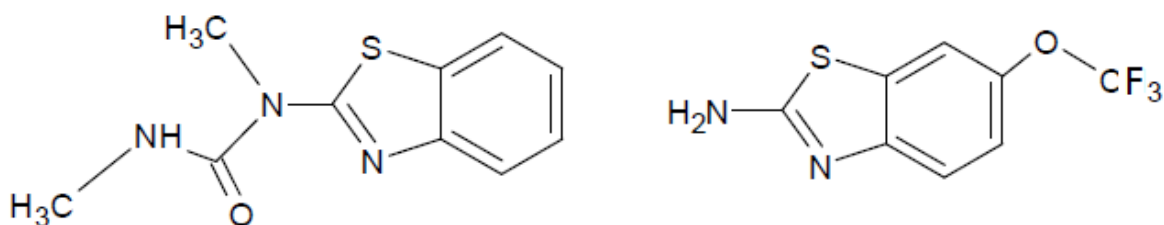
Benzotiazol (BTA) i njegovi derivati najvažniji su heterociklički spojevi koji su zajedničko obilježje različitih prirodnih proizvoda i farmaceutskih sredstava. BTA pokazuje razna farmakološka svojstva, a njegovi derivati nude visoki stupanj strukturne raznolikosti što je dokazano korisno za razvoj i istraživanje novih terapijskih sredstava.

Strukture s benzotiazolom kao bazom predstavljaju klasu molekula koje se mogu vezati na više receptora s visokim afinitetom. Upotreba ovih molekula omogućuje medicinskim kemičarima brzo otkrivanje biološki aktivnih spojeva u širokom rasponu terapijskih područja. BTA derivati privukli su veliki interes zbog svojih raznolikih bioloških aktivnosti. Osim antitumorske aktivnosti, derivati benzotiazola pokazuju još i antimikrobna, antikonvulzivna, antivirusna, antituberkularna, antimalarijska, antihelminthička, analgetska, anti-upalna i antidijabetička djelovanja. Derivati benzotiazola pokazali su se i kao potencijalna dijagnostička sredstva za neurodegenerativne bolesti, a mogu djelovati i kao selektivni inhibitori hidrolaze

amida masnih kiselina, inhibitori stearoil-koenzima A desaturaze, te antagonisti receptora LTD4, oreksina 2 i histamina H<sub>2</sub>. Koriste se i kao sredstva za smanjenje apetita i za zaštitu biljaka. Primjerice, metabenzotiazuron (MTBU) koristi se kao herbicid u usjevima kukuruza i aktivni je sastojak dvije komercijalno dostupne formule, Tribunila i Ormeta koji se koriste u industriji papira i celuloze kao slimicidi.

Riluzol (2-amino-6-trifluorometoksibenzotiazol) koristi se za liječenje amiotrofične lateralne skleroze, a 2-(4-aminofenil)benzotiazol pokazuje antitumorska svojstva.

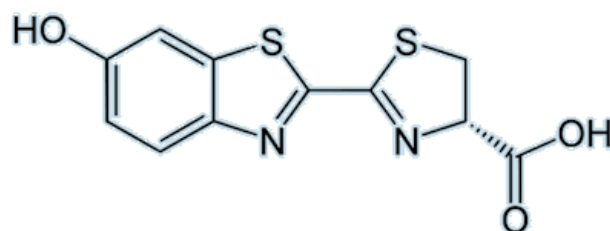
Spojevi s elektron odvlačećom skupinom u para položaju prstena *N*-metilbenzenamina pokazuju značajno antioksidacijsko svojstvo.<sup>1</sup>



Slika 2. Metabenzotiazuron<sup>2</sup> (lijevo) i riluzol<sup>3</sup> (desno)

Jedan od najpoznatijih derivata BTA je svakako luciferin, tj. (4*S*)-2-(6-hidroksi-1,3-benzotiazol-2-il)-4,5-dihidrotiazol-4-karboksilna kiselina koju proizvode krijesnice. Naziv luciferin odnosi se na skupinu spojeva koji, kada oksidiraju u prisutnosti enzima (luciferaze), stvaraju vidljivu svjetlost. Svaki luciferin ima svoju luciferazu-specifični enzim koji katalizira reakciju. Vidljiva emisija nastaje kada se oksiluciferin opusti iz pobuđenog u osnovno stanje. Boja koja se emitira razlikuje se, čak i ako je luciferin isti; to može biti posljedica promjena pH ili razlika u strukturi luciferaze koja je u pitanju.

Reakcija kod krijesnica uključuje oksidaciju luciferina upotrebom različitih enzima i reagensa poput ATP-a. To rezultira uklanjanjem atoma H iz prstena, a zatim se molekula preuređuje tako da tvori peroksi spoj nazvan 1,2-dioksetan. Ovaj je spoj nestabilan pa se spontano raspada na CO<sub>2</sub> i pobuđeni keton. Energija se oslobađa povratkom iz pobuđenog stanja koje emitira vidljivu svjetlost.<sup>4</sup>



Slika 3. Luciferin

## 2.2. Kemosenzori

Kemosenzor je molekula koja može specifično komunicirati s analitom i slati povratne informacije generirajući signale koji se mogu detektirati. Obično se sastoji od skupine za prepoznavanje ili receptorskog dijela, te signalnog dijela molekule. Prvi je odgovoran za selektivnost i učinkovitost vezanja, a drugi pretvara informacije u signal koji se može detektirati. Fluorescencijski kemosenzori privlače sve veći interes zahvaljujući izrazito osjetljivim fotofizičkim svojstvima mikrookoline. Optički signali mogu dati informacije o njihovim fizikalnim (poput hidrofobnosti i krutosti) i kemijskim (poput pH i koncentracije analita) parametrima. Razvoj luminiscentnih anorganskih i organometalnih kompleksa prijelaznih metala kao kemosenzora privukao je veliko zanimanje, jer mnogi od njih pokazuju intenzivnu i dugovječnu fotoluminiscenciju s velikim Stokesovim pomacima, a energijom emisije ovih kompleksa može se upravljati pomoću različitih liganda.<sup>5</sup>

Razvoj fluorescencijskih kemosenzora koji imaju sposobnost detektiranja biološki ili okolišno važnih metalnih iona poput  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$  i  $\text{Zn}^{2+}$  postala je bitna tema istraživanja.<sup>9</sup> Uravnotežena koncentracija bakrenih iona potrebna je za nesmetano funkcioniranje jetre i bubrega, dok njihovo nakupljanje dovodi do štetnih učinaka na proces gastrointestinalnog trakta, uz oštećenje jetre i bubrega. Poznato je da ioni cinka obavljaju različite fiziološke i enzimske funkcije u živućih organizama. Neravnoteža cinka dovodi do raznih bolesti poput Alzheimerove, Parkinsonove, Menkesove i Wilsonove bolesti. Razvoj kemosenzora za otkrivanje  $\text{Hg(II)}$  već dugo izaziva veliku zabrinutost zbog visoke toksičnosti i široke rasprostranjenosti u okolišu.<sup>6</sup>

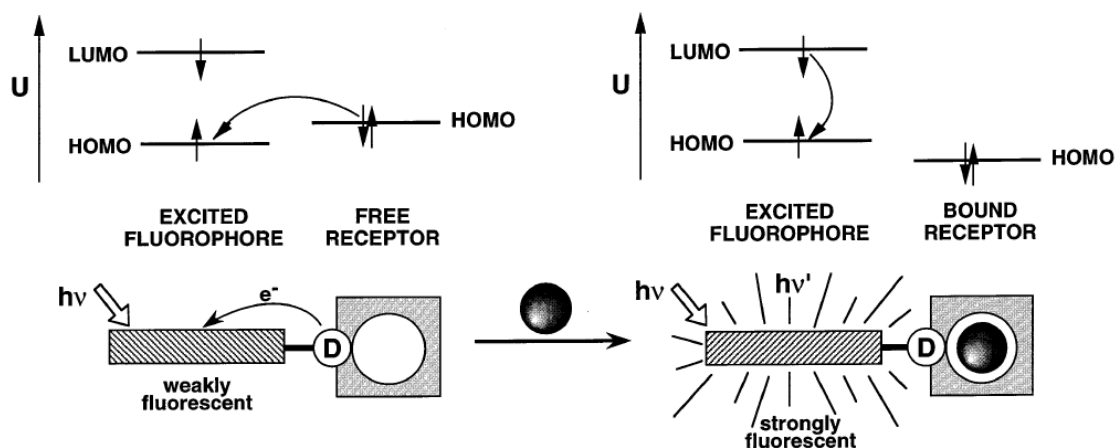
Željezo je važan biogeni element. U organizmu su prisutni željezovi ioni koji se nalaze u sastavu hemoglobina i mioglobina. Nedostatak željezovih iona u organizmu očituje se kao manjak hemoglobina u krvi, što može dovesti do anemije. Stoga je dizajn i razvoj kemosenzora za različite metalne ione, posebno za ione bakra i cinka, značajno područje istraživanja.<sup>7</sup>

### 2.2.1. Fluorescencijski kemosenzori

Brojne analitičke metode koje su dostupne za otkrivanje kationa, kao što su plamena fotometrija, atomska apsorpcijska spektrometrija, ion selektivne elektrode, su skupe, često zahtijevaju velike količine uzorka i ne dopuštaju kontinuirano nadgledanje. S druge strane, metode temeljene na fluorescentnim sensorima nude različite prednosti u pogledu osjetljivosti, selektivnosti, vremenu odziva, te omogućuju lokalno promatranje. Nadalje, moguće je i daljinsko istraživanje pomoću optičkih vlakana s molekulskim sensorom imobiliziranim na vrhu. Iz ovih razloga su uloženi znatni naponi kako bi se razvili selektivni fluorescentni senzori za detekciju kationa. Fluorescentni senzori sastoje se od fluorofora koji je povezan s ionoforom i zato se naziva fluoroionofor. U dizajnu ovih senzora treba obratiti pozornost i na jedinice za prepoznavanje i signalizaciju. Fluorofor je signalni dio molekule koji pretvara informaciju (događaj prepoznavanja analita) u optički signal izražen kao promjene fotofizičkih karakteristika fluorofora. Ionofor je jedinica za prepoznavanje i/ili vezanje analita.

Promjene optičkih karakteristika fluorofora nastaju zbog poremećaja (uslijed vezanog kationa) fotoinduciranih procesa poput prijenosa elektrona, prijenosa naboja, prijenosa energije, stvaranja ili nestanka ekscimera ili ekscipleksa. Fotoinducirani prijenos elektrona (PET), koji je shematski prikazan na Slici 4, najčešći je mehanizam nastanka signala kod molekulskih senzora za metalne katione. U fluorescentnom PET senzoru kationski receptor je donor elektrona (npr. amino skupina), a fluorofor igra ulogu akceptora. Pri pobuđivanju fluorofora, elektron najviše popunjene molekulske orbitale (HOMO) premješta se u najnižu nepopunjenu molekulsku orbitalu (LUMO), što omogućuje fotoinducirani prijenos elektrona iz HOMO donora (koji pripada receptoru slobodnog kationa) u onu fluorofora, uzrokujući fluorescentno gašenje potonjeg. Nakon vezanja s kationom, redoks potencijal donora se

podigne tako da relevantni HOMO postane niži u energiji od fluorofora; posljedično, fotoinducirani prijenos elektrona više nije moguć i gašenje fluorescencije je suzbijeno. Drugim riječima, intenzitet fluorescencije je pojačan nakon vezanja s kationom.



Slika 4. Fotoinducirani prijenos elektrona<sup>8</sup>

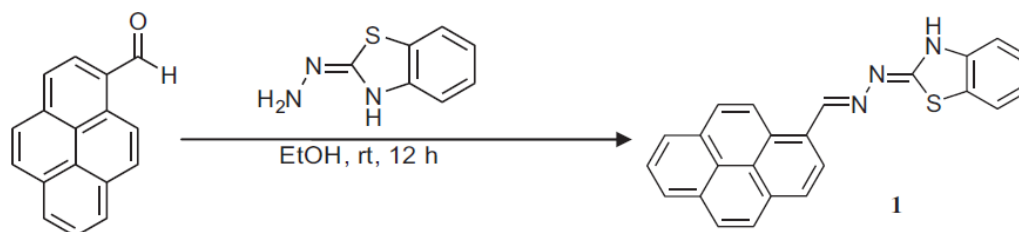
### 2.2.2. Benzotiazoli u razvoju kemosenzora

Osim biološkog značaja, derivati benzotiazola zadnjih godina primjenjuju se kao kemosenzori za metalne katione. Benzotiazol karakterizira heterociklički prsten koji zbog heteroatoma dušika i sumpora pokazuje sposobnost koordinacije s različitim metalnim ionima. BTA ima planarnu strukturu i molekula je aromatskog karaktera. Benzotiazolni derivati poznati su po intermolekularnom prijenosu protona u pobuđenom stanju (ESIPT) kroz tautomerizaciju. Uz ESIPT, derivati benzotiazola posjeduju i svojstvo emisije izazvane agregacijom (AIE). Sposobnost koordinacije, koju posjeduje benzotiazol, može utjecati na fluorescenciju molekule, a pretpostavlja se da je upravo fluorescencija pogodan signal za detekciju metalnih iona.<sup>9</sup>

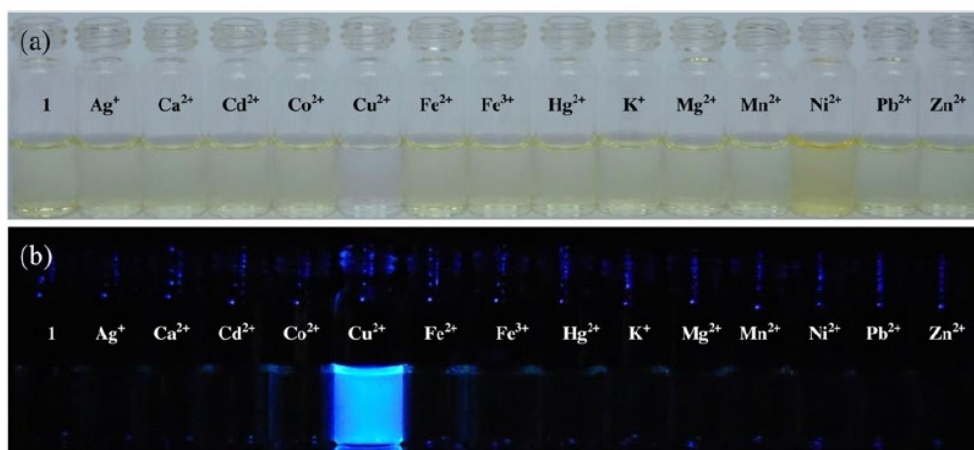
U nastavku je predstavljen primjer derivata BTA kao optičkog kemosenzora.

Fluorescentni kemosenzor **1** na bazi pirena i BTA prikazan je na Slici 5, a sintetiziran je reakcijom 2-benzotiazol-hidrazona i 1-pirenkarboksialdehida pri čemu se stvara iminska veza između benzotiazolhidrazona i pirena, žute je boje te ima apsorpcijski pojas centriran na 385

nm što je pomak od 50 nm od tipične apsorpcijske vrpce pirena koja je centrirana na 335 nm. Ovaj kemosenzor koristi se za detektiranje bakrovih(II) iona jer u prisutnosti bakrovih iona dolazi do očite promjene boje dok drugi ioni ne uzrokuju nikakvu značajnu promjenu u boji što je vidljivo na Slici 6.



Slika 5. Sinteza kemosenzora 1



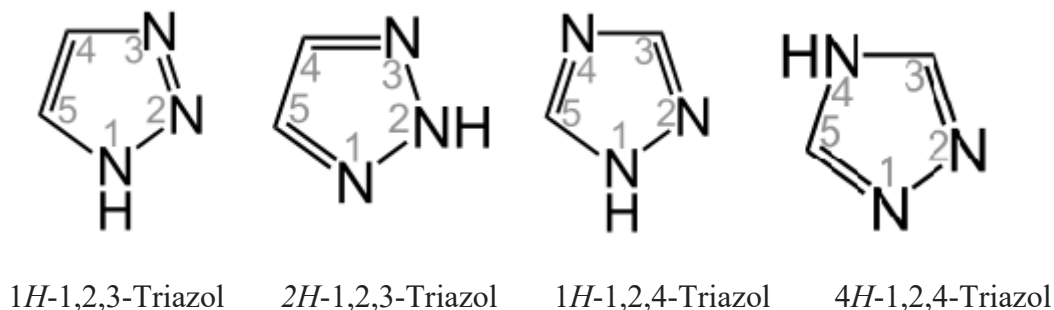
Slika 6. Promjena boje i fluorescencije kemosenzora nakon dodatka različitih iona<sup>10</sup>

### 2.2.3. Triazoli u razvoju kemosenzora

Triazol je heterociklički spoj molekulske formule  $C_2H_3N_3$  koji ima peteročlani prsten od dva atoma ugljika i tri atoma dušika. Postoje dva seta izomera koji se razlikuju u relativnom položaju tri atoma dušika, 1,2,3-triazol i 1,2,4-triazol. Svaki od njih ima dva tautomera koja se



razlikuju prema tome na koji dušikov atom je vezan vodik, a strukture svih navedenih tautomera, prikazane su na Slici 7.



Slika 7. Strukture izomera triazola

*N*-heterocikli su karakteristični metalni ligandi, a 1,2,3-triazol sa tri dušikova atoma u strukturi je sve češća funkcionalna jedinica molekula receptora za metalne ione. Taloženje metalnih soli iz otopine s 1,2,3-benzotriazolom prvi je put zabilježeno 1937. godine, a razvoj koncepta *click* kemije potaknuo je povećano zanimanje za sintezu i primjenu 1,2,3-triazolnih derivata. Sposobnost triazola da koordinira metalne ione i jednostavna sinteza predstavljaju idealne uvjete za njihovo integriranje u optičke kemijske senzore za metalne ione.<sup>11</sup>

Od pojave *click* kemije 2001. godine, 1,4-disupstituirani triazol postaje sve češći motiv u kemijskim sensorima, a nerijetko pojavljivanje u kemosenzorima može se pripisati njihovoj sposobnosti vezanja i kationa i aniona.<sup>12</sup>

### 2.3. *Click* kemija

Pojam *click* kemija uveli su 2001. godine Sharpless, Kolb i Finn, a podrazumijeva kemijske reakcije u kojima nastaju veze ugljikovih atoma s heteroatomima i u kojima se brzo i pouzdano dolazi do produkata spajanjem više manjih jedinica. Sharpless i suradnici definirali su niz uvjeta koje reakcija treba zadovoljiti da bi se smatrala *click* reakcijom: široki raspon primjene, neškodljivi i lako uklonjivi nusprodukti, stereospecifičnost (ne nužno i enantioselektivnost), jednostavni reakcijski uvjeti, neosjetljivost na vodu i kisik, uporaba pristupačnih reagenasa i lako uklonjivih neškodljivih otapala, te nastanak stabilnog produkta u velikom iskorištenju uz jednostavnu izolaciju metodama kao što su kristalizacija i filtracija.

Iako je teško navesti reakciju koja zadovoljava baš sve navedene, gotovo idealne uvjete, u posljednjih deset godina raste broj poznatih *click* reakcija.

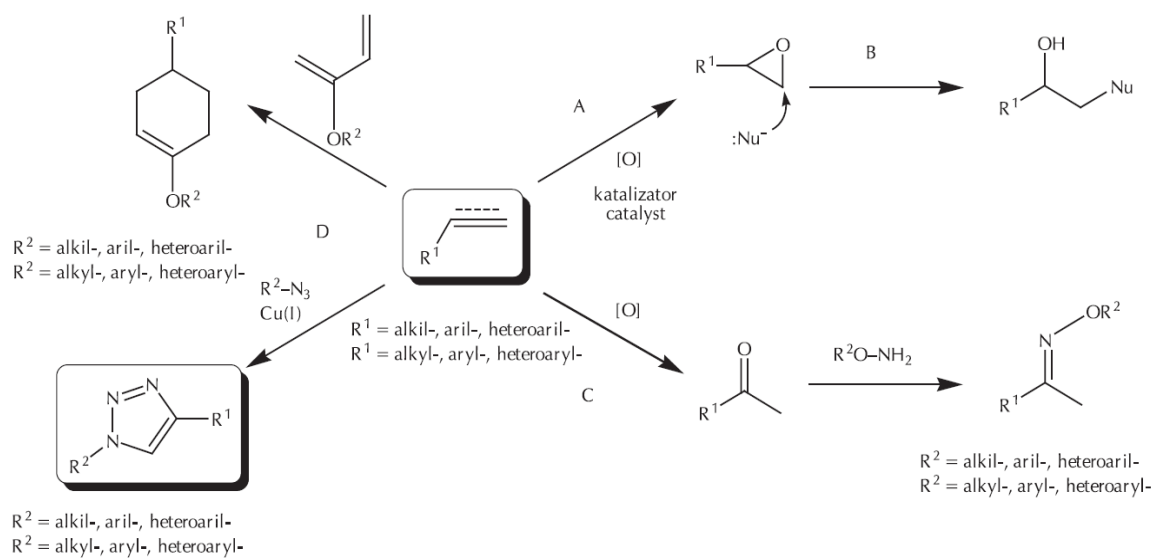
Na Slici 8 prikazani su primjeri reakcija koje udovoljavaju kriterijima *click* kemije:

A) adicije na nezasićenu vezu ugljik-ugljik;

B) reakcije nukleofilnog otvaranja prstena;

C) karbonilna kemija nealdolnog tipa;

D) cikloadicijske reakcije.<sup>13</sup>



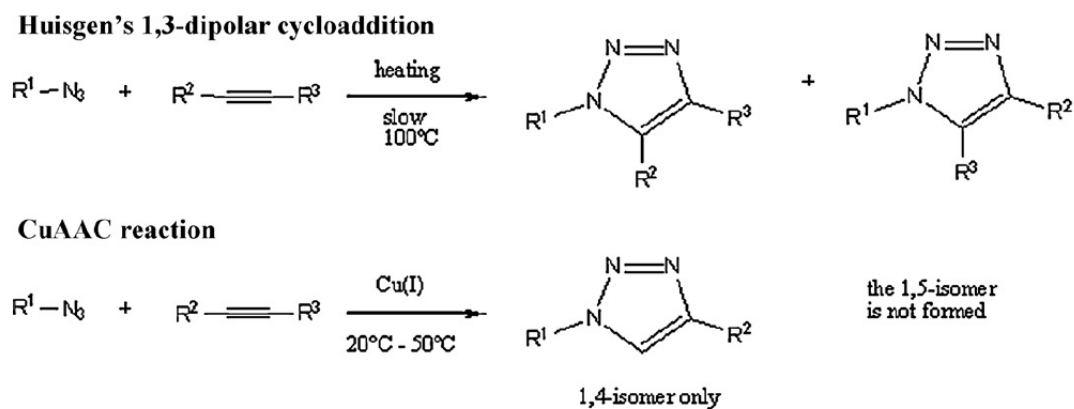
Slika 8. Primjeri reakcija koje udovoljavaju kriterijima *click* reakcija

### 2.3.1. Sinteza 1,2,3-triazola

2002. godine istraživačke skupine Fokin i Sharpless te Meldal i suradnici neovisno su izvijestili o efikasnoj Cu(I) kataliziranoj azid-alkin cikloadiciji (CuAAC). Nekatalizirana reakcija azida i alkina poznata je od 1893.godine kada je Michael izvijestio o prvoj sintezi 1,2,3-triazola iz dietil-acetilendikarboksilata i fenil-azida, a poznata je kao Huisgenova dipolna cikloadicija kojom nastaje smjesa 1,4 i 1,5-disupstituiranih 1,2,3-triazola, dok je CuAAC reakcija terminalnih alkina potpuno selektivna za stvaranje 1,4-disupstituiranih triazola s raznim Cu(I) katalizatorima ili prekursorima za dobivanje Cu(I) katalizatora.<sup>14</sup>

*Click* kemija opisuje reakcije koje su i modularne i učinkovite, sa jednostavnim reakcijskim uvjetima i pročišćavanjem. Od reakcija koje ispunjavaju ove kriterije, bakrom(I) katalizirana 1,3-dipolarna azid-alkin cikloadicija možda je privukla najviše pažnje. CuAAC reakcija je regioselektivna i tolerantna na bezbroj funkcionalnih skupina. Korisnost ove reakcije najveća je u organskoj sintezi. Dodatne prednosti ove reakcije su i jednostavno pročišćavanje i biokompatibilnost zbog čega je CuAAC reakcija izvrsna metoda za povezivanje biomakromolekula. Ipak, uloga CuAAC reakcije je više od učinkovite reakcije spajanja, tj. formiranje triazolnog prstena.<sup>11</sup>

Cu(I) katalizirana 1,3-dipolarna cikloadicija je mnogo brža od nekatalizirane Huisgenove cikloadicije, a odvija se pri temperaturama od 0 do 25 °C. Sterička i elektronska svojstva supstituenata ne utječu bitno na tijek katalizirane reakcije. Reakcijom regioselektivno nastaju 1,4-disupstituirani 1,2,3-triazoli (Slika 8) koji su stabilni u hidrolitičkim i oksidoredukcijskim uvjetima te pri visokim temperaturama. CuAAC najzastupljenija je i najpoznatija *click*-reakcija čiju primjenu, osim u sintetskoj organskoj kemiji, nalazimo i u medicinskoj kemiji i kemiji materijala.



Slika 9. Huisgen reakcija i Cu(I) katalizirana azid-alkinska cikloadicija

Bakar(I) se u reakciju uvodi izravno ili se može pripremiti *in situ*, a odgovarajući katalizator se izabire ovisno o reakcijskim uvjetima. U slučaju polarnih supstrata najčešće se, u vodenom mediju, primjenjuje  $\text{CuSO}_4$  uz odgovarajuće redukcijsko sredstvo (npr. natrijev askorbat) koje će *in situ* generirati potrebni Cu(I). Neposredna primjena katalizatora Cu(I) najčešće uključuje primjenu soli Cu(I) (primjerice, CuI ili CuBr) ili kompleksa Cu(I)([Cu(CH<sub>3</sub>CN)<sub>4</sub>]PF<sub>6</sub>, (EtO)<sub>3</sub>P·CuI, [Cu(PPh<sub>3</sub>)<sub>3</sub>]Br). Kompleksi su se pokazali kao dobro rješenje kod reakcija u organskim otapalima gdje je topljivost Cu(I) soli ograničena. Osim Cu(I) i Cu(II) kao izvora bakra poznate su i primjene Cu(0) (bakrena žica ili bakreni prah) te nanočestica bakra kao katalizatora. Cu(I) je termodinamički nestabilan i relativno lako se oksidira u Cu(II) koji je katalitički neaktivan.

Cu(II) kao oksidacijsko sredstvo može uzrokovati nastanak neželjenih nusprodukata, a da bi se to spriječilo, reakcije sa solima Cu(I) treba voditi bez prisutnosti kisika. Kao alternativno rješenje strogo suhim reakcijskim uvjetima u reakcijama CuAAC mogu se upotrijebiti i kompleksi Cu(I) s različitim ligandima.

Ligandi štite Cu(I) od oksidacije, pa nije nužno voditi reakciju bez prisutnosti kisika, a mogu i poboljšati katalitička svojstva soli Cu(I). Osim toga, ligandi mogu djelovati i kao akceptori protona, pa nije potrebna upotreba baza. Najčešće upotrebljavan ligand u organskoj sintezi i biokonjugaciji molekula je TBTA (tris[(1-benzil-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metil]amin), a batofenantrolin i PMEDTA (*N*<sup>1</sup>-(2-(dimetilamino) etil)-*N*<sup>1</sup>,*N*<sup>2</sup>,*N*<sup>2</sup>-trimetiletan-1,2-diamin) se upotrebljavaju u kemiji polimera. U reakcijama CuAAC upotrebljava se niz nepolarnih te polarnih aprotičnih i protičnih otapala (toluen, 1,4-dioksan, CHCl<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, THF, DMF,

CH<sub>3</sub>CN, DMSO, NMP, *t*-BuOH, EtOH, MeOH), a moguća je i upotreba vode u smjesi s nekim organskim otapalom (najčešće s EtOH ili *t*-BuOH).

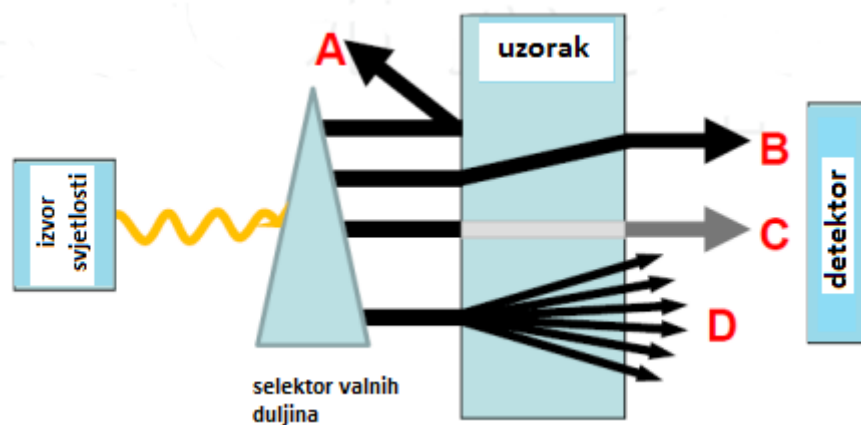
Kao baze se najčešće upotrebljavaju diizopropiletilamin (DIPEA), *N,N'*-dimetiletilendiamin (DMEDA) i trietilamin Et<sub>3</sub>N, a nešto rjeđe 1,8-diazabicyklo[5.4.0]undek-7-en (DBU), piperidin i 2,6-lutidin. Opći uvjeti za reakciju CuAAC u nukleozidnoj kemiji podrazumijevaju temperaturu 0-25 °C te 10 mol% bakrovog katalizatora, 5 mol% redukcijskog sredstva (npr. natrijeva askorbata) i 15 mol% baze, sve u odnosu na mjerodavni reaktant koji može biti alkin odnosno azid. Postupak obrade reakcije i izolacija produkta uglavnom su vrlo jednostavni te podrazumijevaju filtraciju i prekrizaciju.

S obzirom na to da se radi o potencijalno biološki aktivnim spojevima koji se pripremaju u svrhu bioloških testiranja, posebnu pažnju treba obratiti na kontaminaciju spojeva bakrovim solima. To je iznimno važan stupanj izolacije, a najuspješniji postupci uklanjanja bakra su filtracija kroz stupac Cellita ili kroz kratki stupac SiO<sub>2</sub>/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> odnosno tretiranje reakcijske smjese aktivnim ugljenom.<sup>13</sup>

## 2.4. Spektroskopske metode karakterizacije optičkih senzora

Spektroskopija je znanost koja se bavi istraživanjem i mjerenjem spektra koji nastaju kada materijali djeluju sa elektromagnetskim zračenjem ili ga emitiraju.<sup>15</sup>

Optički senzori, odnosno optode, predstavljaju skupinu kemijskih senzora u kojima se elektromagnetsko zračenje koristi za generiranje analitičkog signala u pretvorbenom elementu. Ti se senzori mogu temeljiti na različitim optičkim principima (apsorbancija, reflektiranje, luminiscencija, fluorescencija), pokrivajući različita područja spektra (UV, vidljivo, IR, NIR) i omogućujući mjerenje ne samo intenziteta svjetlosti, već i drugih srodnih svojstva, poput indeksa loma, raspršivanja, difrakcije i polarizacije.<sup>16</sup>

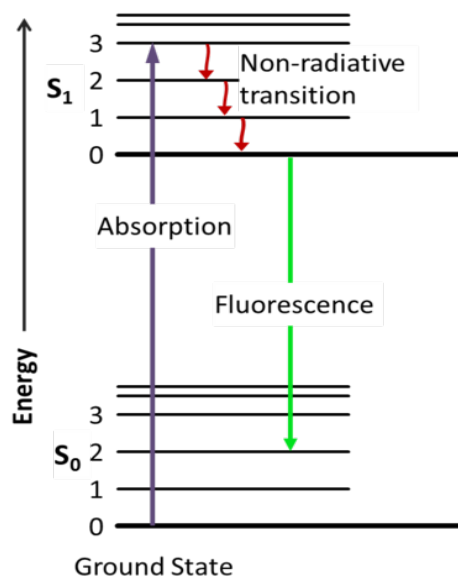


Slika 10. Općenito uređenje spektroskopskih mjerenja: A - refleksija svjetlosti, B - lom svjetlosti, C - apsorpcija svjetla, D - emisija svjetlosti.<sup>17</sup>

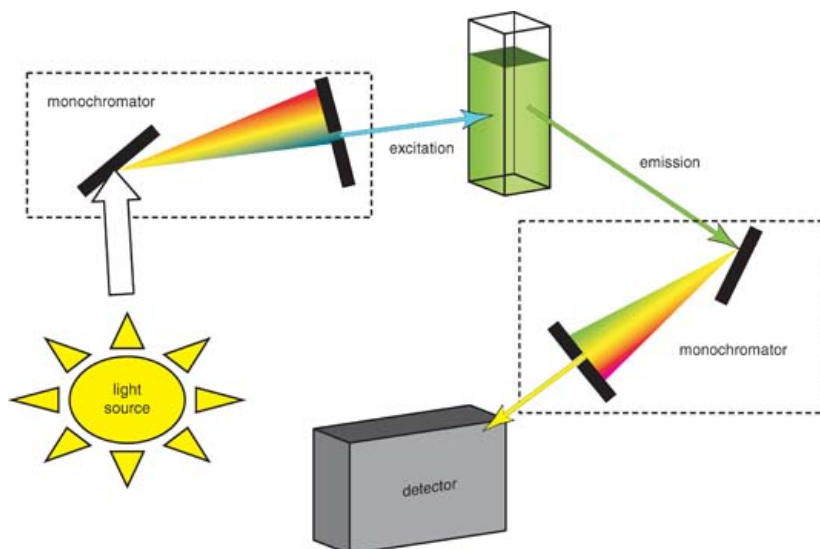
#### 2.4.1. Fluorescencijska spektroskopija

Fluorescencija je vrsta luminiscencije, javlja se u plinskim, tekućim ili čvrstim kemijskim sustavima. Fluorescencija je emisijski proces prilikom kojeg se atomi ili molekule pobuđuju apsorpcijom elektromagnetskog zračenja. Spin elektrona je još uvijek uparen s elektronom stacionarnog stanja, za razliku od fosforescencije. Kako se pobuđena molekula/atom vraća u stacionarno stanje, uključuje emisiju fotona niže energije, što odgovara većoj valnoj duljini od apsorbiranog fotona.

Na slici 11 prikazan je Jablonski energetski dijagram koji predstavlja fluorescenciju. Ljubičasta strelica predstavlja apsorpciju svjetlosti, crvena strelica predstavlja vibracijsko opuštanje iz pojedinačno pobuđenog stanja, S2 do S1. Ovaj postupak je neradijativno opuštanje u kojem se energija pobude raspršuje kao vibracije ili toplina otapala, a ne emitira se foton. Zelena strelica predstavlja fluorescenciju do singletnog osnovnog stanja, S0.



Slika 11. Jablonski dijagram



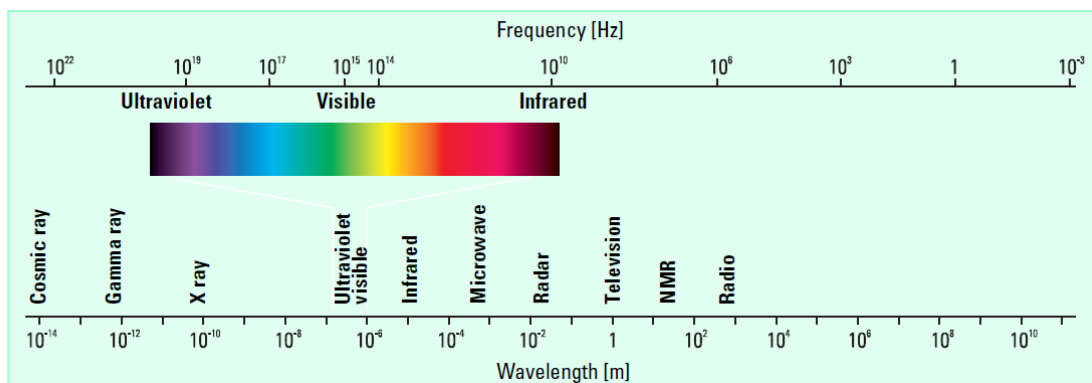
Slika 12. Shematski prikaz fluorescentnog spektrometra

Slika 12 je shema tipičnog filtrirajućeg fluorimetra koji koristi izvor svjetlosti za izazivanje fluorescencije i par cijevi fotomultiplikatora kao pretvarače. Izvorski snop se dijeli blizu izvora u referentni snop i uzorak. Otvorom je referentni snop prigušen tako da njegov

intenzitet bude otprilike jednak intenzitetu fluorescencije. Obje zrake prolaze kroz primarni filter, pri čemu se referentna zraka reflektira na cijev referentnog fotomultiplikatora. Snop zračenja fokusiran je na uzorak pomoću par leća i uzrokuje emisiju fluorescencije. Emitirano zračenje prolazi kroz drugi filter i zatim se fokusira na cijev za fotomultiplikatore uzorka. Električni izlazi iz dva pretvarača tada se obrađuju analogno-digitalnim pretvaračem kako bi se izračunao omjer uzorka prema referentnim intenzitetima, koji se zatim može koristiti za kvalitativnu i kvantitativnu analizu. Da bi se dobio spektar emisije, monokromator pobude je fiksiran, a monokromator emisije varira. Da bi se dobio spektar pobude, monokromator pobude varira dok je monokromator emisije fiksiran.<sup>18</sup>

## 2.4.2. UV/vidljiva spektroskopija

Ultraljubičasto (UV) i vidljivo zračenje samo su mali dio elektromagnetskog spektra, koji uključuje i druge oblike zračenja kao što su radio-zračenje, infracrveno (IC), kozmičko, i X zrake.



Slika 13. Elektromagnetski spektar

Energija povezana s elektromagnetskim zračenjem je definirana sljedećom jednadžbom:

$$E = h\nu \quad (1)$$

gdje je  $E$  energija (u džulima),  $h$  je Planckova konstanta ( $6,62 \times 10^{-34}$  Js), a  $\nu$  je frekvencija (u sekundama). Elektromagnetsko zračenje može se smatrati kombinacijom izmjeničnih električnih i magnetskih polja koja putuju kroz prostor gibanjem valova.



Iz razloga što zračenje djeluje kao val, može se klasificirati pomoću valne duljine ili frekvencije, koje su povezane sa sljedećom jednačicom:

$$v = c/\lambda \quad (2)$$

gdje je  $v$  frekvencija (u sekundama),  $c$  brzina svjetlosti ( $3 \times 10^8 \text{ ms}^{-1}$ ), a  $\lambda$  je valna duljina (u metrima). U UV-Vis spektroskopiji, valna duljina se obično izražava u nanometrima. Iz gornjih jednačica proizlazi da zračenje sa kraćom valnom duljinom ima veću energiju. U UV-Vis spektroskopiji, UV svjetlost male valne duljine ima najviše energije. U nekim je slučajevima ta energija dovoljna da uzrokuje neželjene fotokemijske reakcije pri mjerenju spektra uzorka (UV zračenje je komponenta svjetlosti koja izaziva opekotine od sunca).

Kada zračenje djeluje na materiju, mogu se događati mnogobrojni procesi, uključujući refleksiju, rasipanje, apsorpciju, fluorescenciju/fosforescenciju (apsorpcija i emisija) i fotokemijsku reakciju (apsorpcija i kidanje veze). Općenito, pri mjerenju UV-Vis spektra, želimo da nastane samo apsorpcija. Kako je svjetlost oblik energije, apsorpcijom svjetlosti raste energija molekule unutar materije. Ukupna potencijalna energija molekule predstavljena je kao zbroj elektronske, vibracijske i rotacijske energije:

$$E_{\text{ukupna}} = E_{\text{elektronska}} + E_{\text{vibracijska}} + E_{\text{rotacijska}}^{19} \quad (3)$$

Količina apsorbirane svjetlosti proporcionalna je broju molekula sposobnih za apsorpciju kroz koje svjetlost prolazi. Za svaku valnu duljinu svjetlosti koja prolazi kroz spektrometar mjeri se intenzitet svjetlosti koja prolazi kroz referentnu ćeliju. To se obično označava s  $I_0$ .

Intenzitet svjetlosti koja prolazi kroz ćeliju uzorka mjeri se i za tu valnu duljinu što se označava sa  $I$ . Ako je  $I$  manji od  $I_0$ , uzorak je apsorbirao dio svjetla (zanemarujući refleksije svjetlosti s površine kivete). Na računalu se zatim korištenjem jednostavne matematike dobiva izraz za apsorpciju uzorka-označava se sa  $A$ . Apsorbancija prijelaza ovisi o dvije vanjske pretpostavke, da je apsorpcija izravno proporcionalna koncentraciji otopine uzorka ( $c$ ) upotrijebljenog u eksperimentu i duljini putanje svjetlosti ( $l$ ), koja je jednaka širini kivete.

Na kraju dolazimo do formule za apsorpciju koja glasi:

$$A = \varepsilon \times c \times l \quad (4)$$

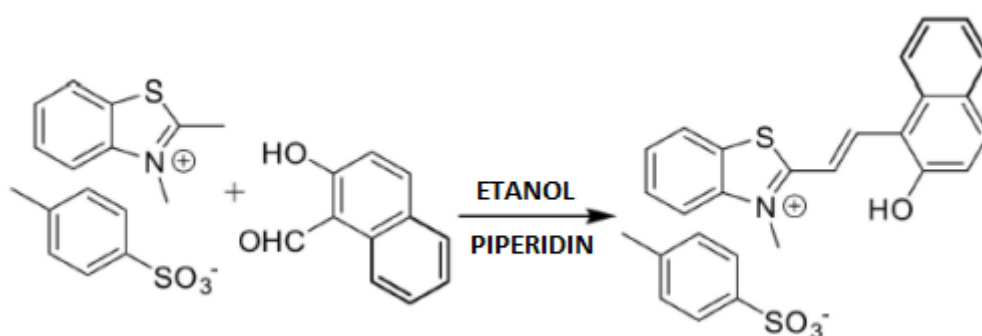
gdje je  $A$  apsorpcija,  $\varepsilon$  ( $\text{dm}^3 \text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ) je molarni apsorpcijski koeficijent,  $c$  ( $\text{mol dm}^{-3}$ ) je molarna koncentracija uzorka, a  $l$  (cm) je put koji svjetlost prolazi kroz uzorak.<sup>20</sup>

### 3. LITERATURNI PREGLED

U nastavku rada dan je pregled u literaturi poznatih spojeva koji u strukturi sadrže jedan ili dva benzotiazola, tzv. bis-benzotiazolni derivati, te spojeva koji sadrže dva triazolna prstena, (bis-triazoli). Prilikom pretrage literature, naglasak je na spojevima koji su ispitani kao potencijalni molekularni senzori za metalne katione.

#### 3.1. Pregled molekularnih senzora za metalne katione temeljeni na derivatima benzotiazola

Slika 14 prikazuje sintezu kemosenzora **2** koja se provodi refluksom soli 2,3-dimetilbenzotiazolijeva *p*-toluensulfata s 2-hidroksi-1-naftaldehidom u etanolu u prisutnosti piperidina kao katalizatora. Ovaj kemosenzor koristi se za kolorimetrijsku i fluorescentnu detekciju živinih iona. Promjena boje u bezbojnu primijećena je u otopini koja sadrži ione žive, dok otopine koje sadrže druge ione metala prikazuju blijedu promjenu boje ili promjenu boje u svijetložutu, što je dovelo do zaključka da se navedeni kemosenzor može koristiti za vizualno otkrivanje živinih(II) iona u vodi, što je vidljivo na Slici 15.

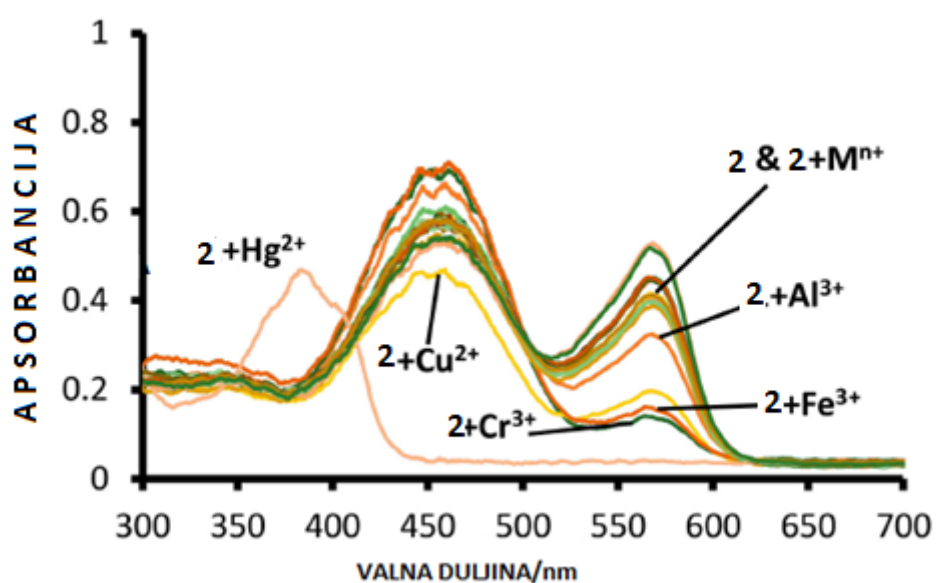


Slika 14. Sinteza kemosenzora **2**



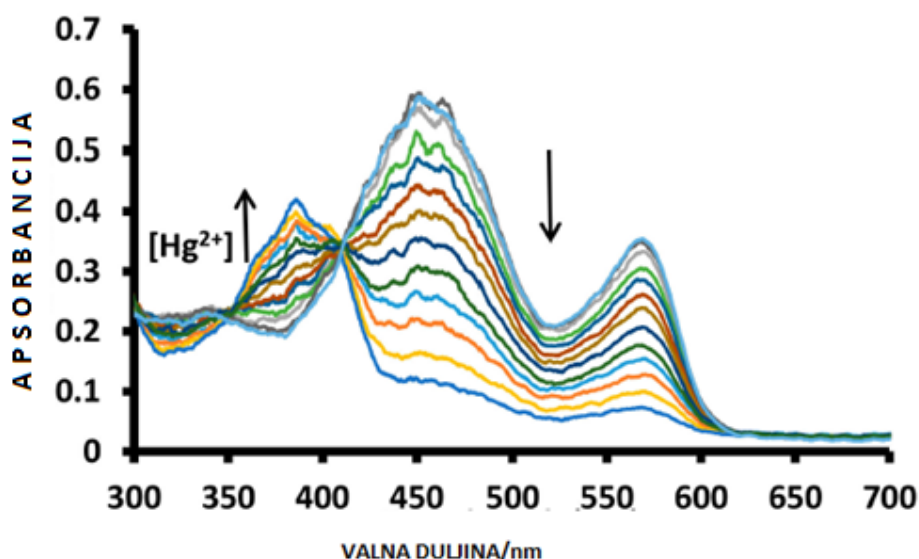
Slika 15. Promjena boje u otopini **1** u vodi; A=čista otopina, B=Hg<sup>2+</sup>, C=Al<sup>3+</sup>, D=Cr<sup>3+</sup>, E=Fe<sup>3+</sup>, F=Cu<sup>2+</sup>, G=Rb<sup>+</sup>, H=Sm<sup>3+</sup>, I=Zn<sup>2+</sup>, J=K<sup>+</sup>, K=Gd<sup>3+</sup>, L=Pb<sup>2+</sup>, M=Ca<sup>2+</sup>, N=Ni<sup>2+</sup>, O=Cd<sup>2+</sup>, P=Fe<sup>2+</sup>, Q=Mg<sup>2+</sup>, R= Pd<sup>2+</sup>, S=Na<sup>+</sup>, T=Cs<sup>+</sup>, U=Li<sup>+</sup>, V=Ba<sup>2+</sup>, W=Co<sup>2+</sup>, X=Sr<sup>2+</sup>.

Ekvimolarne otopine različitih metalnih iona i **2** u vodi (pH 7,6, 1,0 mM HEPES) analizirane su UV spektroskopijom. Apsorpcijski spektri spoja **2** u vodi pokazuju dva maksimuma, na 570 nm i 455 nm. Dodatkom otopine živinih iona u **2** maksimumi više nisu na 570 nm i 455 nm već je vidljiv maksimum apsorpcije na 380 nm. Dodavanje drugih metalnih iona (Al<sup>3+</sup>, Fe<sup>3+</sup>, Cu<sup>2+</sup> i Cr<sup>3+</sup>) otopini kemosenzora **2** dovelo je do smanjenja apsorpcije na  $\lambda_{\max}=570$  nm te do malog povećanja na  $\lambda_{\max}=455$  nm, što je vidljivo na Slici 16.



Slika 16. Promjena apsorpcijskog spektra otopina receptora **2** u vodi nakon dodavanja soli različitih metalnih iona. [2]= 20  $\mu$ M = [M<sup>n+</sup>] = Hg<sup>2+</sup>, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Li<sup>+</sup>, Cr<sup>3+</sup>, Al<sup>3+</sup>, Fe<sup>3+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, Pb<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Cs<sup>+</sup>, Ba<sup>2+</sup>, Sr<sup>2+</sup> ioni.

Kako bi se dalje istražilo stvaranje kompleksa senzora **2** i metalnog iona, otopine **2** titrirane su ionima  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$  i  $\text{Cu}^{2+}$  u vodi pri pH od 7,6 (1,0 mM HEPES). Na Slici 17 vidljivo je kako je postupnim dodavanjem  $\text{Hg}^{2+}$  iona u otopinu receptora **2** došlo je do smanjenja apsorpcije na  $\sim 450$  nm i  $\sim 570$  nm uz istovremenu pojavu novog maksimuma na  $\sim 380$  nm. Postupnim dodavanjem otopine bakrenih iona u otopinu **2** u vodi pri pH 7,6 (1,0 mM HEPES) došlo je do malog smanjenja apsorpcije na  $\sim 455$  nm i značajnog smanjenja apsorpcije na  $\sim 570$  nm. Međutim, u apsorpcijskim spektrima nije se pojavio dodatni vrh. Dodavanjem otopine iona  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Cr}^{3+}$  ili  $\text{Fe}^{3+}$  otopini **2** u vodi (pH 7,6, 1,0 mM HEPES) došlo je do postupnog smanjenja apsorpcijskog intenziteta na  $\sim 580$  nm, dok nije došlo do značajne promjene intenziteta apsorpcije na  $\sim 455$  nm.

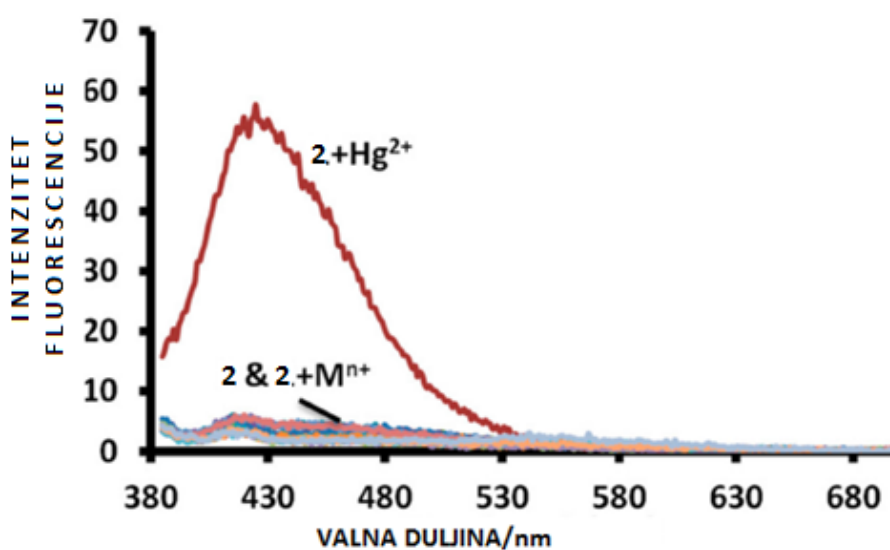


Slika 17. Promjena apsorpcijskog spektra otopine receptora **2** u vodi (pH = 7,6, 1,0 mM HEPES) nakon postupnog dodavanja živinih iona. Strelica prema gore označava povećanje intenziteta apsorpcije, dok strelica prema dolje znači smanjenje intenziteta apsorpcije s porastom koncentracije živinih iona.  $[\mathbf{2}] = 20 \mu\text{M}$ ;  $[\text{Hg}^{2+}] = 0\text{--}13,63 \mu\text{M}$ .

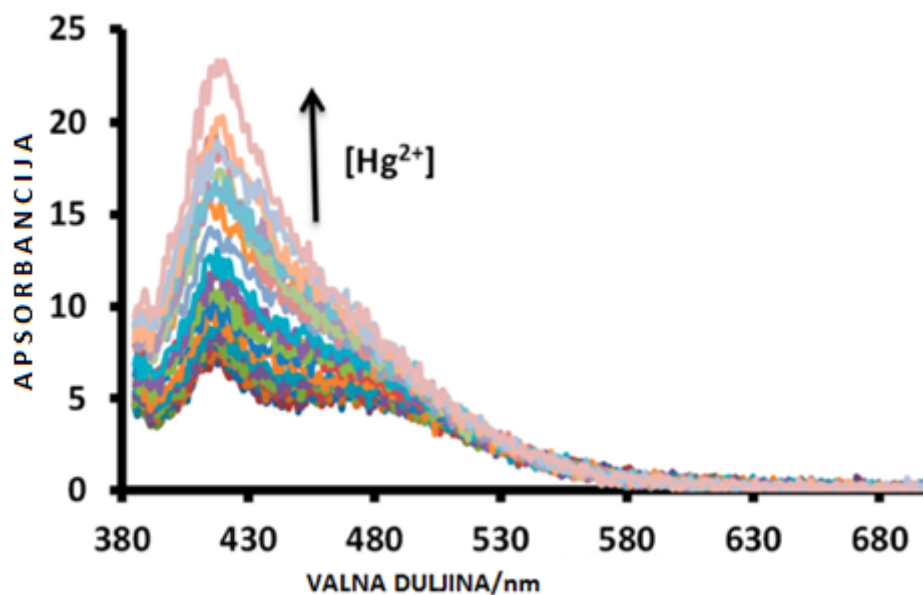
Nadalje, istraživane su moguće promjene u emisijskim spektrima ekvimolarne otopine **2** i metalnih iona pomoću valnih duljina pobude, 570 nm, 450 nm i 365 nm, u vodi pri pH 7,6 (1,0 mM HEPES). Primijećen je vrlo slab fluorescentni signal korištenjem valnih duljina od 450 nm i 570 nm u otopini **2** i **2** s metalnim ionima. Međutim, ekvimolarna otopina spoja **2** i živinog iona pokazala je snažnu emisiju na 425 nm sa Stokesovim pomakom od 45 nm

koristeći valnu duljinu od 365 nm. Ekvimolarna otopina receptora **2** i živinog iona pokazala je 27 puta veći intenzitet fluorescencije u odnosu na intenzitet fluorescencije otopine **2** u vodi. Međutim, nije primijećena promjena intenziteta fluorescencije za otopine koje sadrže **2** i druge metalne ione, što se vidi na Slici 18.

Provedena je i titracije otopine senzora **2** živinim ionima u vodi pri pH 7,6 (1,0 mM HEPES) korištenjem valne duljine od 365 nm. Na Slici 19 vidljivo je da je postupnim dodavanjem otopine živih iona postignuto postupno povećanje intenziteta fluorescencije na 425 nm.

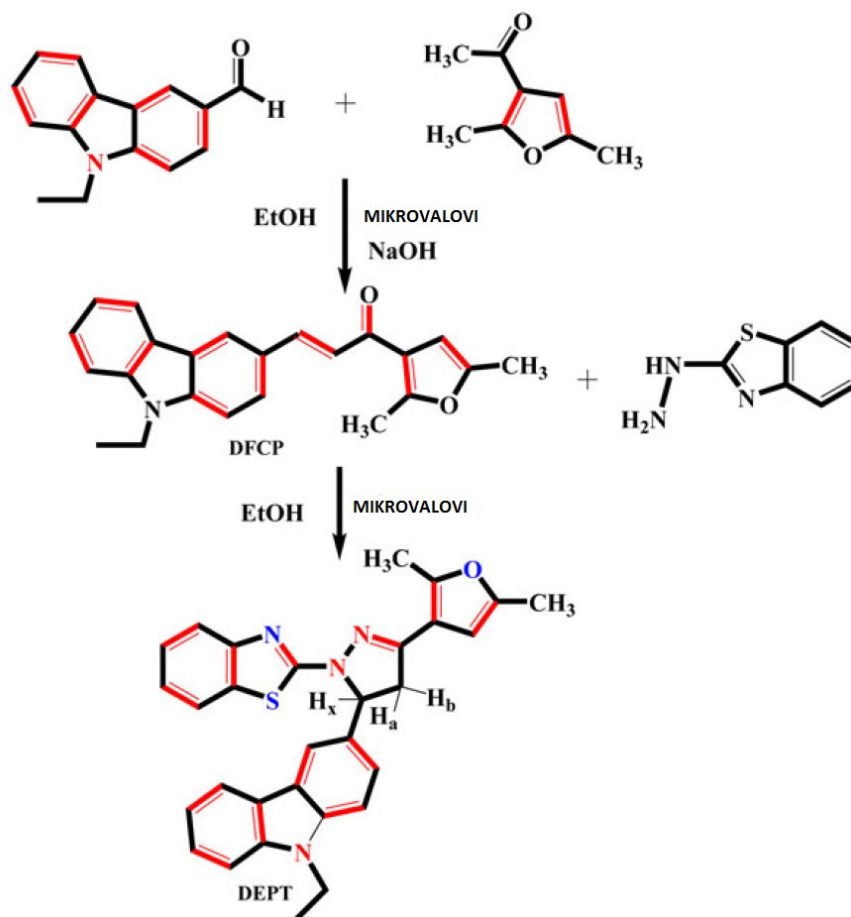


Slika 18. Promjena intenziteta fluorescencije otopina receptora **2** u vodi (pH = 7,6, 1,0 mM HEPES) nakon dodavanja različitih metalnih iona.  $[2] = 20 \mu\text{M} = [M^{n+}] = \text{Hg}^{2+}, \text{Na}^+, \text{K}^+, \text{Li}^+, \text{Cr}^{3+}, \text{Al}^{3+}, \text{Fe}^{3+}, \text{Mn}^{2+}, \text{Ni}^{2+}, \text{Pb}^{2+}, \text{Zn}^{2+}, \text{Co}^{2+}, \text{Cu}^{2+}, \text{Cs}^+, \text{Ba}^{2+}, \text{Sr}^{2+}$ .



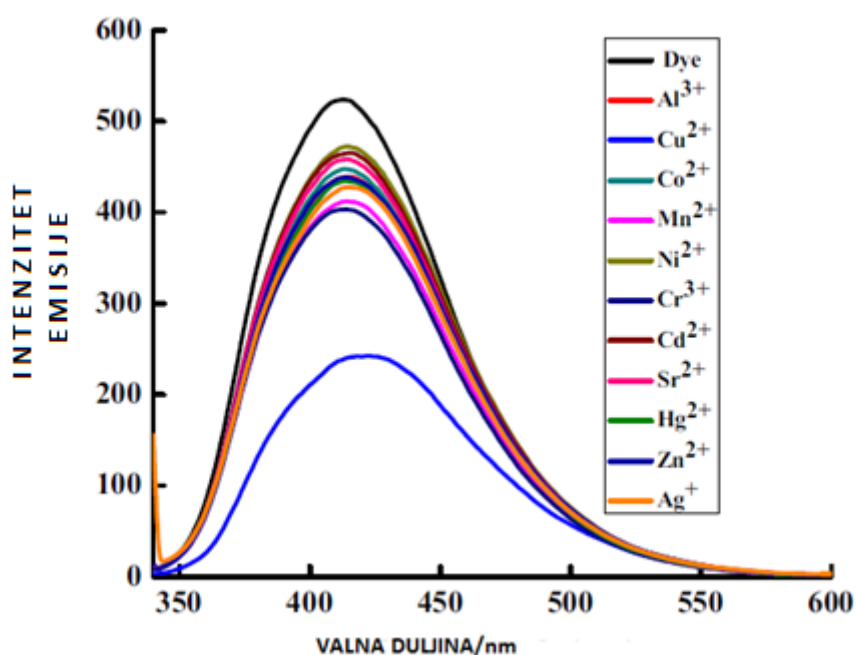
Slika 19. Promjena spektra fluorescencije otopine receptora **2** u vodi (pH = 7,6, 1,0 mM HEPES) nakon postupnog dodavanja živih iona. Strelica označava porast intenziteta s porastom koncentracije živih iona; [2] = 20 μM; [Hg<sup>2+</sup>] = 0-0,67 μM.<sup>21</sup>

Na Slici 20 prikazana je sinteza kemosenzora **3**, a radi se o 2-(3-(2,5-dimetilfuran-3-il)-5-(9-etil-9*H*-karbazol-3-il)-4,5-dihidro-1*H*-pirazol-1-il)benzo[d]tiazolu (DEPT) dobivenom reakcijom 2-hidrazinobenzotiazola s halkonom (DFCP).



Slika 20. Sinteza receptora **3**

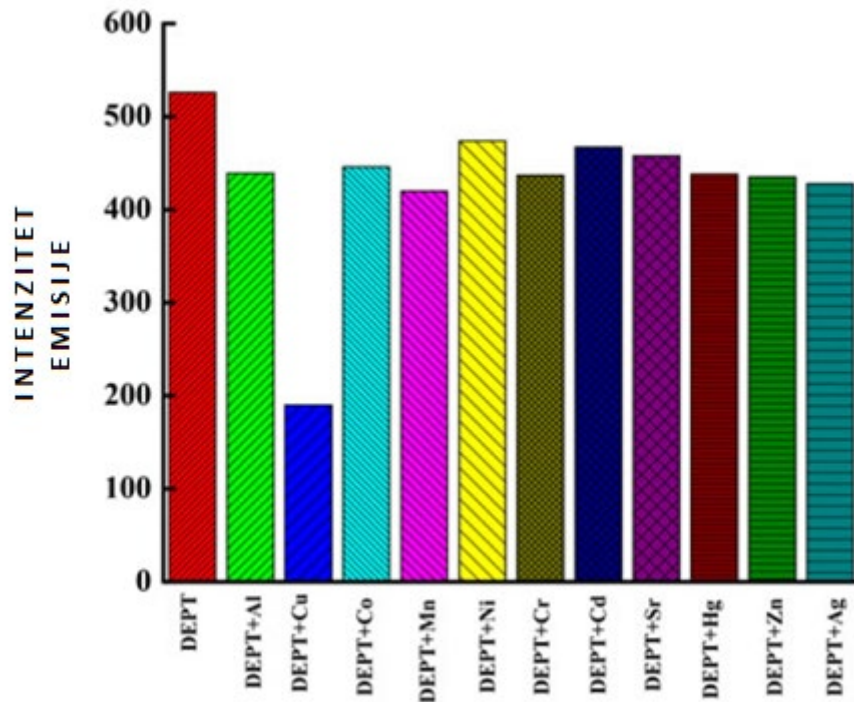
Djelovanje **3** kao potencijalnog fluorescentnog kemosenzora ispitano je na temelju intenziteta emisije u prisutnosti različitih iona metala. Za ispitivanje svojstava **3** pripremljene su otopine spoja **3** i metalnih iona (10 ekv.) u otopini DMF/H<sub>2</sub>O (9:1, v/v). Kao što je vidljivo na Slici 21, receptor **3** pokazuje jaku fluorescenciju u odsustvu metalnih iona kada se pobudi na 325 nm. Dodatkom  $5,0 \times 10^{-5}$  M metalnih iona dolazi do smanjenja intenziteta fluorescencije.



Slika 21. Intenzitet emisije receptora **2** ( $1,0 \times 10^{-5}$  M) nakon dodavanja  $5,0 \times 10^{-5}$  M metalnih iona u otopini DMF/H<sub>2</sub>O (9:1, v/v)

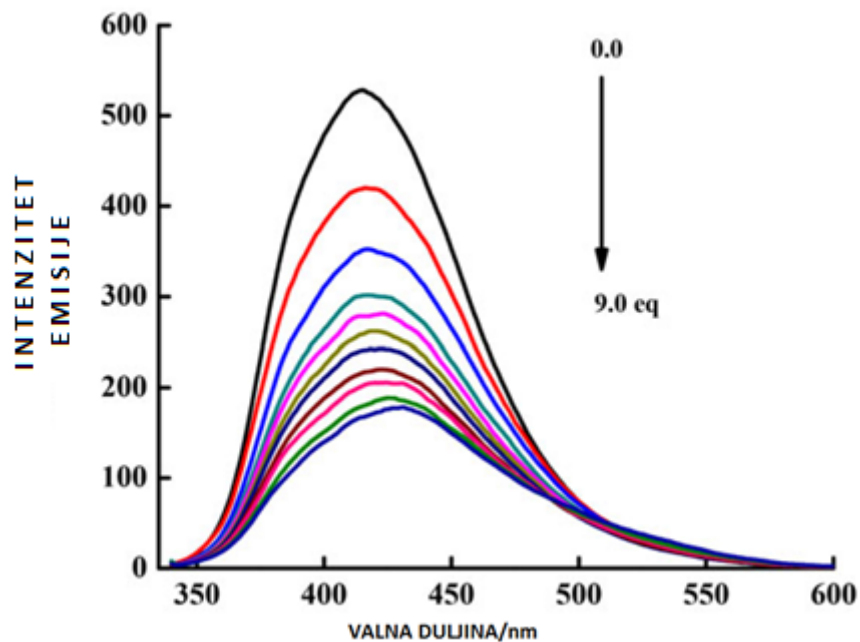
Dodatkom iste količine Cu<sup>2+</sup> iona u otopinu **3**, intenzitet emisije od 420 nm smanji se sedmerostruko i fluorescencija je praktički ugašena, a dolazi i do promjene boje fluorescencije iz plave u bezbojnu. Na Slici 22 uočljivo je da receptor **3** pokazuje dobar senzorski odgovor u prisutnosti Cu<sup>2+</sup> iona što ga čini prihvatljivim kemosenzorom za bakrove ione.





Slika 22. Intenzitet emisije receptora **3** u prisutnosti metalnih iona

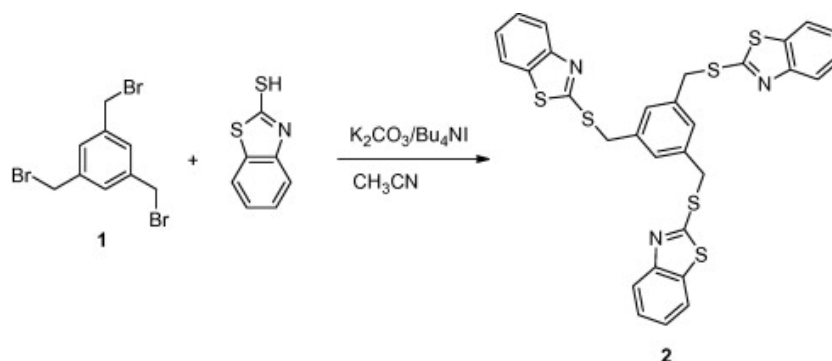
Utjecaj bakrovih iona na gašenje fluorescencije ispitano je titracijom senzora **3** bakrovim ionima u vodenoj otopini. Veliki intenzitet fluorescencije spoja **3** smanjuje se porastom koncentracije  $\text{Cu}^{2+}$  iona u otopini, što je prikazano Slikom 23, a do potpunog gašenja fluorescencije dolazi pri koncentraciji od  $9,0 \times 10^{-5}$  M.



Slika 23. Emisijski spektri senzora **3** ( $1,0 \times 10^{-5}$  M) pri različitim koncentracijama  $\text{Cu}^{2+}$  iona u otopini DMF/ $\text{H}_2\text{O}$  (9:1, v/v)<sup>22</sup>

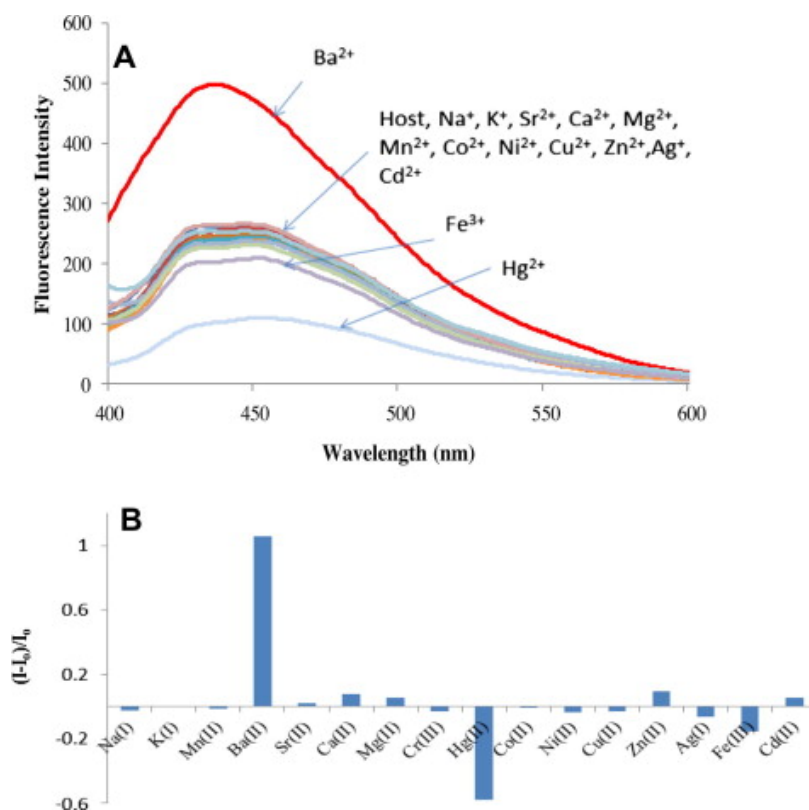
### 3.2. Pregled molekularnih senzora za metalne katione koji u strukturi sadrže dva ili više benzotiazolnih prstena

Fluorescentni kemosenzor **4** sintetiziran je reakcijom tribromida s 2-tiobenzotiazolom refluksom u acetonitrilu u prisutnosti  $\text{K}_2\text{CO}_3$ .



Slika 24. Sinteza kemosenzora **4**

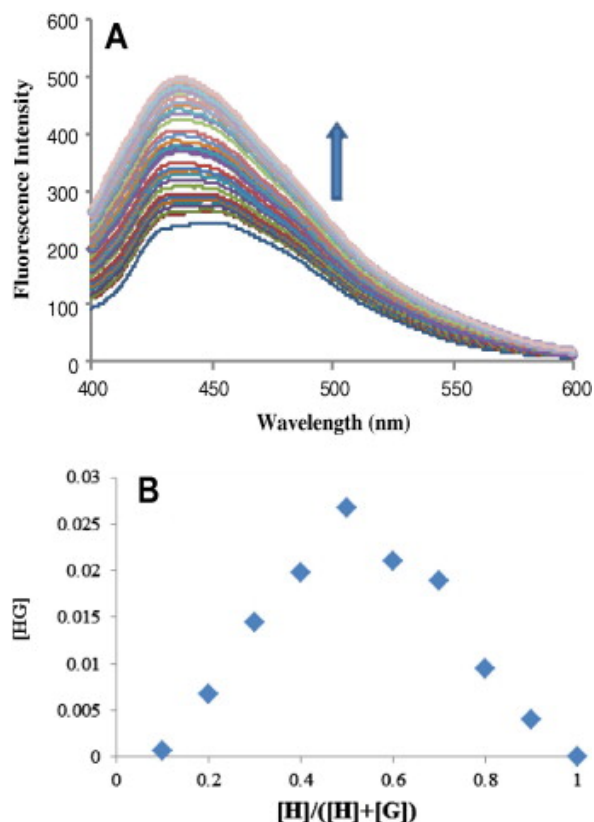
Rezultati osjetljivosti spoja **4** na metalne ione su prikazani na Slici 25. Prisutnost  $\text{Ba}^{2+}$  iona uzrokovala je porast intenziteta fluorescencije, dok je dodatkom  $\text{Fe}^{3+}$  iona došlo do gašenja fluorescencije spoja **4**.



Slika 25. (A) Fluorescentni spektri senzora **4** (50 μM) u prisutnosti različitih soli nitrata (50 μM) u THF/H<sub>2</sub>O (8:2, v/v); (B) Relativni intenzitet ((I-I<sub>0</sub>)/I<sub>0</sub>) **4** (50 μM) na 435 nm dodatkom različitih soli nitrata (50 μM) u otopini THF/H<sub>2</sub>O (8:2, v/v).

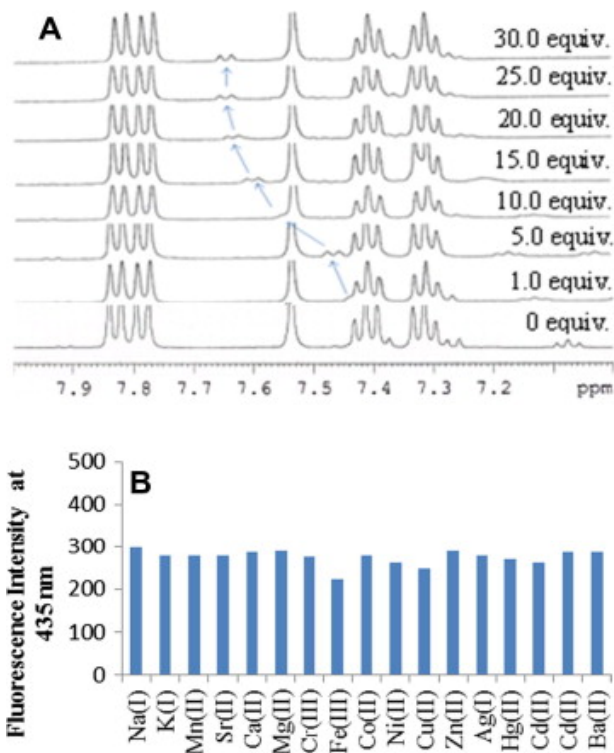
Za ispitivanje svojstava spoja **4** kao senzora za  $\text{Ba}^{2+}$  provedena je titracija u smjesi otapala THF/H<sub>2</sub>O (8:2, v/v), a rezultati su prikazani na Slici 26. Kontinuiranim dodatkom iona  $\text{Ba}^{2+}$  u otopinu **4**, dolazi do porasta intenziteta emisije 50 μM otopine **4** na 435 nm. Konstanta asocijacije,  $K_a$ , za senzor **4** za  $\text{Ba}^{2+}$  izračunata je na osnovu metode Benesi-Hildebrand i iznosi  $4,28 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ . Metodom po Jobu određena je stehiometrija nastalog kompleksa i određeno je da se spoj **4** i  $\text{Ba}^{2+}$  ioni vežu u omjeru 1:1. Derivat **4** može otkriti nisku koncentraciju  $\text{Ba}^{2+}$  s granicom detekcije od 1,0 μM. Ispitan je utjecaj pH na kompleks senzora **4** i  $\text{Ba}^{2+}$  i uočeno je da u pH području od 3,3 do 11,8 nema značajne promjene u afinitetu vezanja **4** za  $\text{Ba}^{2+}$ . Osim toga, provedena su ispitivanja osjetljivosti **4** u smjesi otapala THF/voda s različitim udjelima

vode i THF-a, a rezultati su pokazali da spoj **4** može odrediti barij u rasponu koncentracija 0–20  $\mu\text{M}$  u otapalu THF/ $\text{H}_2\text{O}$  (7:3, v/v).



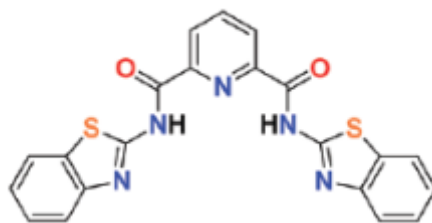
Slika 26. (A) Fluorescentni spektri senzora **4** (50  $\mu\text{M}$ ) s povećanjem koncentracije iona  $\text{Ba}^{2+}$  (0–50  $\mu\text{M}$ ) u otopini THF/ $\text{H}_2\text{O}$  (8:2, v/v); (B) Metoda po Jobu koja se koristi za određivanje stehiometrije kompleksa formiranog između derivata **4** i  $\text{Ba}^{2+}$ .

Da se potvrdi ponašanje prilikom vezanja, provedena je  $^1\text{H}$  NMR titracija čiji rezultati su prikazani na Slici 27. Usporedbom NMR spektra senzora **4** i kompleksa **4**- $\text{Ba}^{2+}$ , utvrđeno je da se njihovi protonski signali drastično razlikuju. Pojava novog signala ukazuje da se dodatkom dodatnih ekvivalenata  $\text{Ba}^{2+}$  pojavljuje asimetrija u kompleksu. Također su provedeni kompetitivni eksperimenti vezanja tako što se mjerio intenzitet fluorescencije na 435 nm u nizu otopina koje sadrže **4**,  $\text{Ba}^{2+}$  ione i još jedan metalni ion. Emisija pri 435 nm bila je gotovo identična onoj dobivenoj u nedostatku bilo kojeg metalnog iona. Ovi rezultati potvrđuju da metalni ioni ne ometaju signalni odziv izazvan kompleksiranjem  $\text{Ba}^{2+}$  sa spojem **4**.



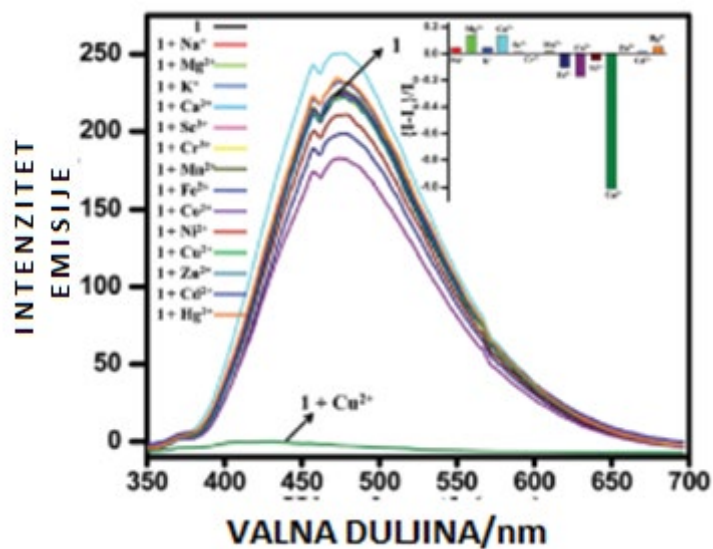
Slika 27. (A)  $^1\text{H}$  NMR spektri senzora **4** nakon uzastopnih dodavanja  $\text{Ba}^{2+}$ ; (B) Procjena  $\text{Ba}^{2+}$  u prisutnosti biološki važnih iona metala (2 ekv.) u THF/ $\text{H}_2\text{O}$  (8:2, v/v) sustavu otapala gdje je emisija pri  $\lambda_{\text{max}}=435$  nm korištena u proračunima.<sup>23</sup>

Za potencijalne senzorske primjene razvijen je receptor **5** prikazan na Slici 28. Kemosenzor **5**, koji pokazuje jaku emisiju pri 470 nm kada je pobuđen na 310 nm, ispitan je na velikom broju metalnih iona.



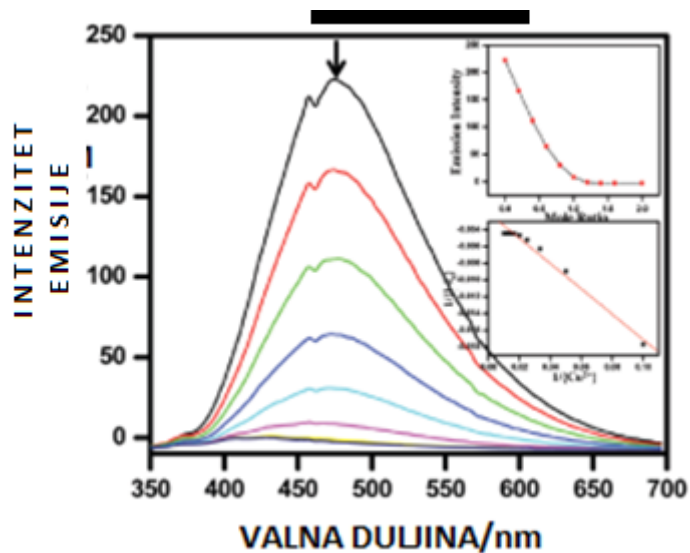
Slika 28. Receptor **5**

Zapaženo je da **5** ima preferencijalni afinitet vezanja za ion  $\text{Cu}^{2+}$  dok je afinitet za vezanje sa  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Sc}^{3+}$ ,  $\text{Cr}^{3+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$  i  $\text{Hg}^{2+}$  ione slabiji što se može vidjeti na Slici 29.



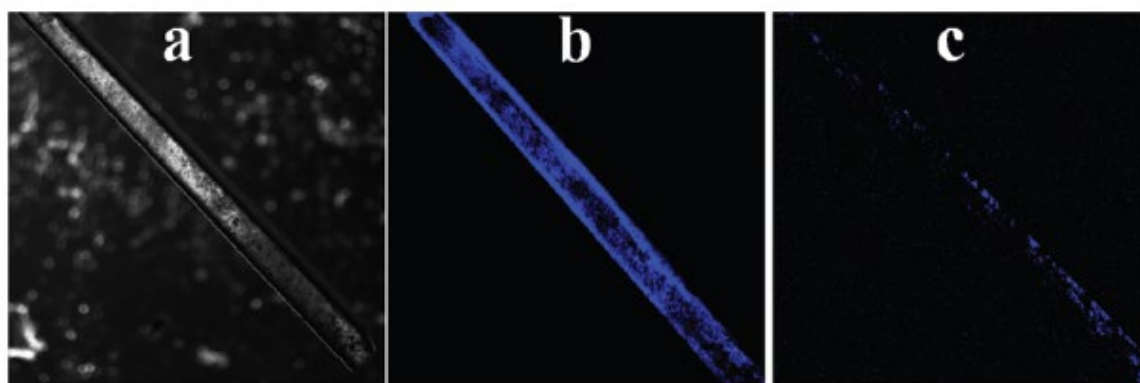
Slika 29. Promjena intenziteta emisije kemosenzora **5** nakon dodavanja različitih iona metala (5 ekv.)

Provedena je titracija otopine senzora **5** bakrovim ionima. Na Slici 30 vidljivo je smanjenje intenziteta emisije povećanjem koncentracije  $\text{Cu}^{2+}$  iona u otopini, dok je potpuno gašenje nastupilo nakon dodavanja 1 ekv.  $\text{Cu}^{2+}$  iona.



Slika 30. Promjena intenziteta emisije kemosenzora **5** (0,1 mM) s povećanjem koncentracije Cu(II) iona (0–0,2 mM)

Kako bi se ispitala sposobnost djelovanja kemosenzora **5** u čvrstom stanju, igličasti monokristali **5** su izloženi djelovanju otopine bakrovih(II) iona. Na Slici 31 može se primijetiti kako kristal **5** emitira plavo svjetlo nakon što je pobuđen na 310 nm (b), a prilikom izlaganja razrijeđenoj otopini Cu<sup>2+</sup> iona intenzitet emisije je znatno slabiji (c).



Slika 31. A) Mikroskopska slika igličastog kristala **5**, B) Fluorescentna slika istog kristala pod UV svjetlom od 310 nm, C) Slabljenje intenziteta emisije **5** nakon izlaganja 1 mM otopini Cu<sup>2+</sup> tijekom 10 minuta

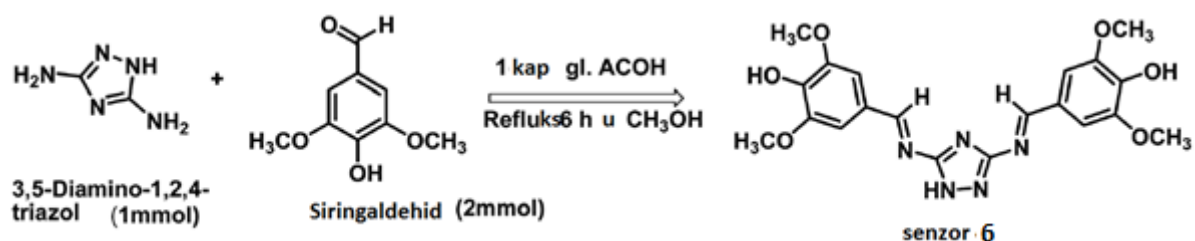
Kemosenzor **5** je izrazito selektivan prema  $\text{Cu}^{2+}$  ionima kako u otopini, tako i u čvrstom stanju.<sup>7</sup>

### 3.3. Pregled molekulskih senzora za metalne katione temeljenih na derivatima 1,2,3-triazola

Najraniji fluorescentni senzori koji su sadržavali triazol grupe kao metalne ligande pojavili su se 2007.<sup>10</sup>

Sintetski postupak senzora **6** prikazan je na Slici 32.

3,5-diamino-1,2,4-triazol (0,099 g, 1 mmol) je otopljen u 15 mL bezvodnog metanola. Ovoj otopini dodaje se kap po kap 20mL metanolne otopine siringaldehida (0,364 g, 2 mmol) uz stalno miješanje. Reakcijska smjesa se refluksira tijekom 6 sati na 70 °C, i održava se suho stanje u prisutnosti katalitičke količine octene kiseline. Taloži se žućkasta krutina, filtrira i ispere nekoliko puta s *n*-heksanom, a zatim ponovno kristalizira iz metanola i osuši u vakuumu.

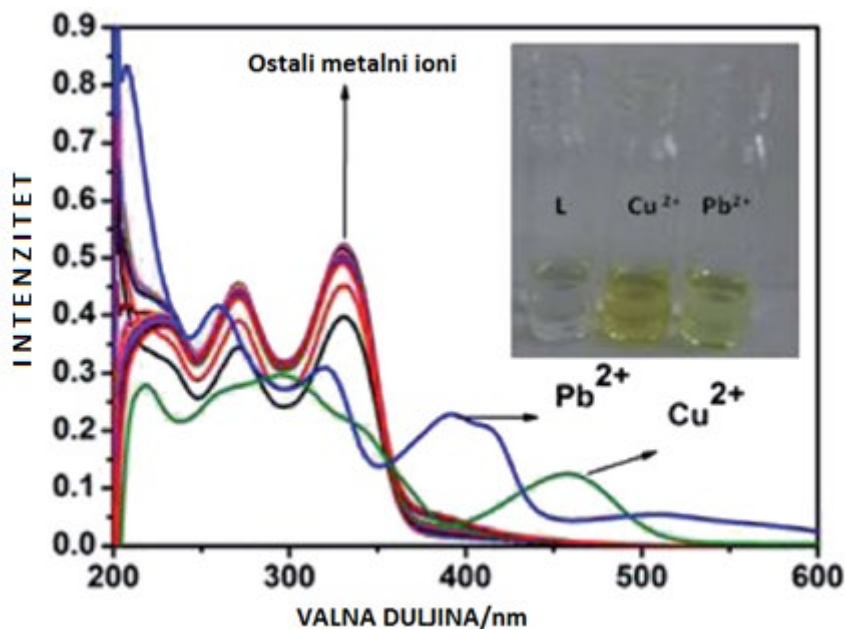


Slika 32. Sinteza receptora **6**

Apsorpcijski spektar **6** ima dva maksimuma, pri valnim duljinama od 330 nm i 270 nm. Apsorpcijski maksimum na 330 nm pripisan je prijelazima n-p\* elektrona, dok je onaj na 270 nm povezan s p-p\* prijelazima. Sposobnost vezanja kationa derivata **6** ispitivana je u  $\text{CH}_3\text{OH}$ -tris pufer (1:1, v/v) smjesi dodavanjem 3 ekv. različitih metalnih kationa kao što su  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Cr}^{3+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$  i  $\text{Ag}^+$ . Kako je i prikazano na Slici 33, samo se kod  $\text{Cu}^{2+}$  pojavljuje novi maksimum pri 460 nm s promjenom boje iz bezbojnu u žutu, dok se kod  $\text{Pb}^{2+}$  pojavljuje širi vrh usredotočen na 400 nm s dva pika



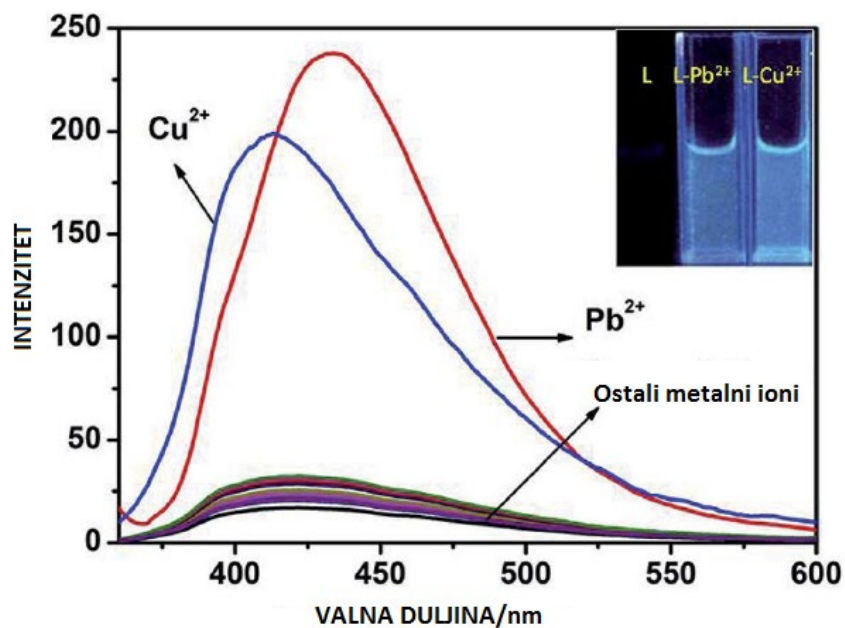
zbog veće delokalizacije p-elektrona što je dovelo do promjene boje iz bezbojne u svijetložutu. Ostali kationi pokazuju samo blago smanjenje apsorpcijskog intenziteta.



Slika 33. Apsorpcijski spektri senzora **6** (10 mM) uz dodatak 3 ekv. različitih metalnih iona.

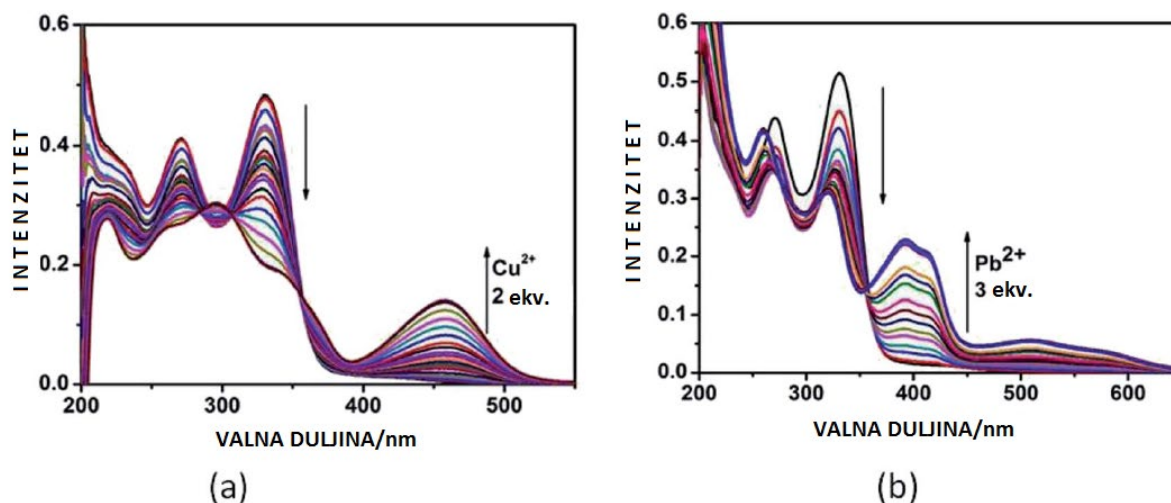
Umetak: promjena boje **6** dodatkom 3 ekv.  $Pb^{2+}$  i  $Cu^{2+}$ .

Emisijsko djelovanje receptora **6** ispitano je mjerenjem fluorescencije u  $CH_3OH$ -tris pufer (10 mM, pH 7,2, 1:1) smjesi s valnom duljinom pobude od 340 nm. Spoj **6** pokazuje vrlo slabu emisiju na valnoj duljini oko 440 nm. Promjena intenziteta fluorescencije dodatkom metalnih kationa prikazana je na Slici 34. Dodatkom  $Pb^{2+}$  i  $Cu^{2+}$  iona otopini **6** dolazi do pojačavanja intenziteta, dok dodatak ostalih metalnih kationa ne uzrokuje značajne promjene intenziteta.



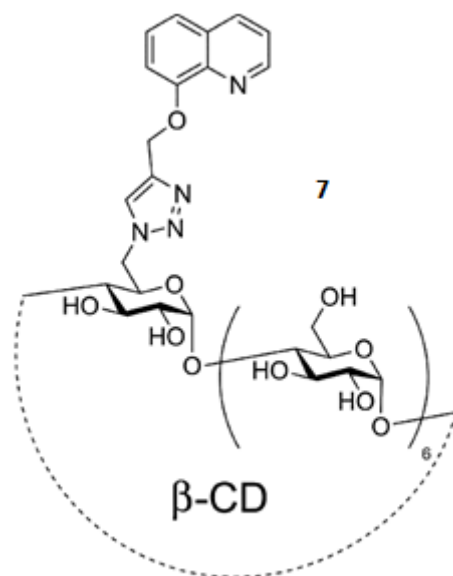
Slika 34. Fluorencijski spektri receptora **6** (10 mM) u prisutnosti 5 ekv. različiti metalnih iona u smjesi CH<sub>3</sub>OH–tris pufera (1:1). Umetak: promjena boje **6** dodatkom 5 ekv. Pb<sup>2+</sup> i Cu<sup>2+</sup> vidljiva na UV svjetlu.

Ovi rezultati sugeriraju da može doći do stvaranja kompleksa između **6** i Pb<sup>2+</sup> i Cu<sup>2+</sup> iona kroz intermolekularnu interakciju. Da bi se istražio mehanizam stvaranja kompleksa, provedena je titracija **6** sa Pb<sup>2+</sup> i Cu<sup>2+</sup> ionima. Na Slici 35a uočljivo je da nakon postepenog dodavanja Cu<sup>2+</sup> iona, intenzitet fluorescencije **6** na 440 nm postepeno je pojačan za oko 15 puta i pomaknut na 412 nm. Slično je i kod titracije Pb<sup>2+</sup> ionima, intenzitet se na 440 nm pojačao gotovo 17 puta, što je vidljivo na Slici 35b, a za ovakve promjene dovoljan je bio dodatak od 5 ekv. svakog metalnog iona.



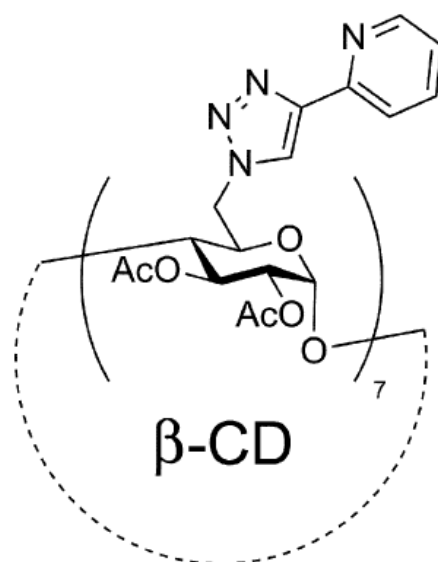
Slika 35. UV-vis titracija **6** s (a)  $\text{Cu}^{2+}$  i (b)  $\text{Pb}^{2+}$  ionima u  $\text{CH}_3\text{OH}$ –tris puferu.<sup>24</sup>

Liu i suradnici stvorili su fluorescentni  $\text{Cd}^{2+}$  senzor **7** vezanjem 8-hidroksikinolina na jezgru  $\beta$ -ciklodekstrina putem triazola. Hidroksikinolinske i triazolne skupine kelatiraju  $\text{Cd}^{2+}$  u vodenoj otopini pri fiziološkom pH, što rezultira pojačanom fluorescencijom hidroksikinolina. Način vezanja  $\text{Cd}^{2+}$  na senzor potvrđen je kombinacijom  $^1\text{D}$  i  $^2\text{D}$  NMR tehnika i ispitivanjem analoga kojima nedostaje triazol ili kinolinski dušik. Kemosenzor pokazuje selektivnost za  $\text{Cd}^{2+}$ , s tim da je  $\text{Zn}^{2+}$  jedini drugi metalni ion koji može izazvati sličan fluorescencijski odgovor. Međutim, gašenje fluorescencije dogodilo se u prisutnosti  $\text{Cu}^{2+}$  i  $\text{Fe}^{3+}$ , te u manjoj mjeri dodatkom  $\text{Ag}^+$ ,  $\text{Hg}^{2+}$  i  $\text{Pb}^{2+}$  iona. Uvođenje adamantinske karboksilne kiseline u ciklodekstrin značajno je poboljšalo fluorescentni odgovor i selektivnost za  $\text{Cd}^{2+}$  i  $\text{Zn}^{2+}$ , zahvaljujući kooperativnom vezanju gostujuće karboksilatne skupine.



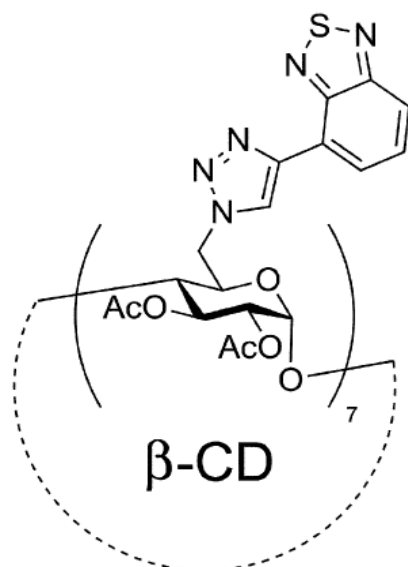
Slika 26. Senzor 7

U skladu s njihovim radom s kaliksarenom 7, Xiejeva je skupina vezala piridin-2'-il-1,2,3-triazol fluorofore na *b*-ciklodekstrin. Fluorescentna titracija u MeOH pokazala je da spoj **8** veže  $Zn^{2+}$  u stehiometriji od 1:1 sa sedmostrukim porastom intenziteta fluorescencije. Početnim istraživanjima je utvrđeno da je za niz metalnih iona samo  $Mg^{2+}$  pokrenuo sličan (iako manji) odgovor, dok su različiti ioni prijelaznih metala gasili fluorescenciju. No kasnije je utvrđeno da  $Cd^{2+}$  također uzrokuje porast fluorescencije, tvoreći komplekse spoja i metala u omjerima 1:1, 1:2 i 1:3. Sintetiziran je i manji spoj kao model koji predstavlja jednu podjedinicu ciklodekstrina 11, i pokazano je da tvori osjetljivije, ali slabije povezane 1:1 komplekse sa  $Zn^{2+}$  i  $Cd^{2+}$ . Važnost piridinil-triazolske skupine za osjetljivost pokazana je stvaranjem analoga fenila i hidroksimetil-triazola koji nisu pokazali emisiju fluorescencije.



Slika 27. Senzor **8**

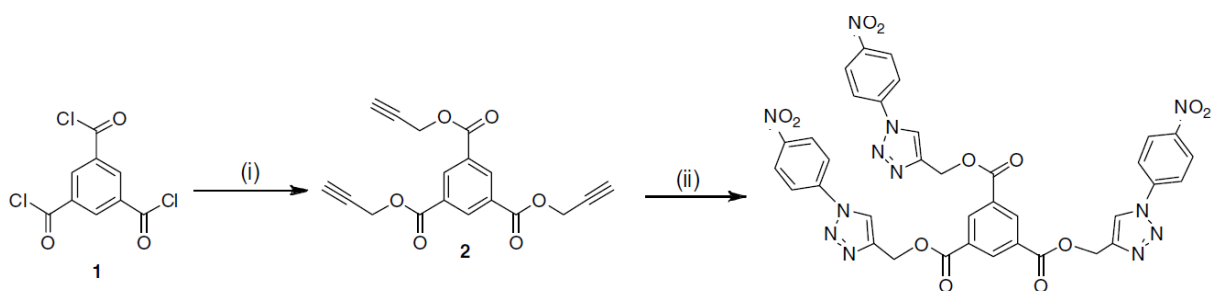
Benzatiodiazoil-triazolni fluorofori također su korišteni za stvaranje senzora **9**, koji detektira  $\text{Ni}^{2+}$  potpunim gašenjem emisije fluorescencije u MeCN. Senzor pokazuje razumnu selektivnost, registrirajući značajan odgovor na  $\text{Ni}^{2+}$  u prisutnosti drugih metalnih iona, usprkos umjerenom gašenju fluorofora zbog  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  i  $\text{Hg}^{2+}$ .



Slika 28. Senzor **9**<sup>25</sup>

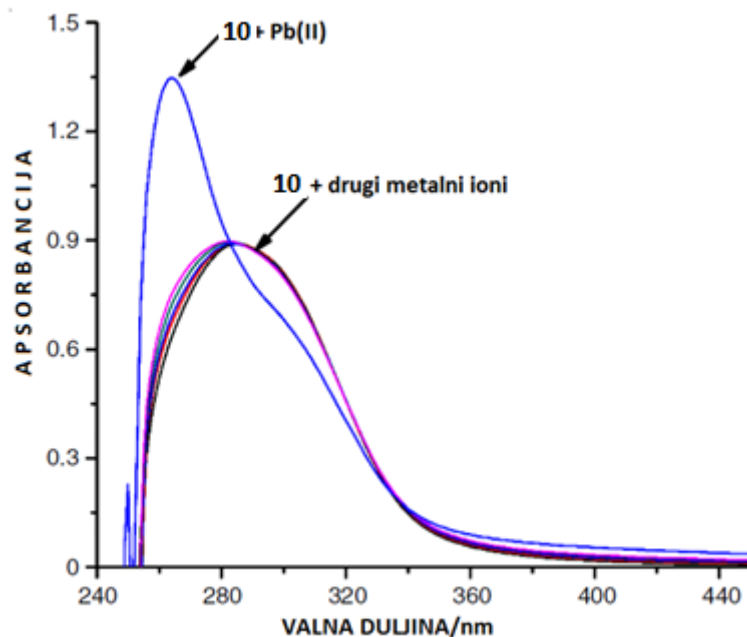
### 3.4. Pregled molekulskih senzora za metalne katione koji u strukturi sadrže dva ili više 1,2,3-triazolna prstena

Kemosenzor **10** sintetiziran je prema shemi na Slici 36.



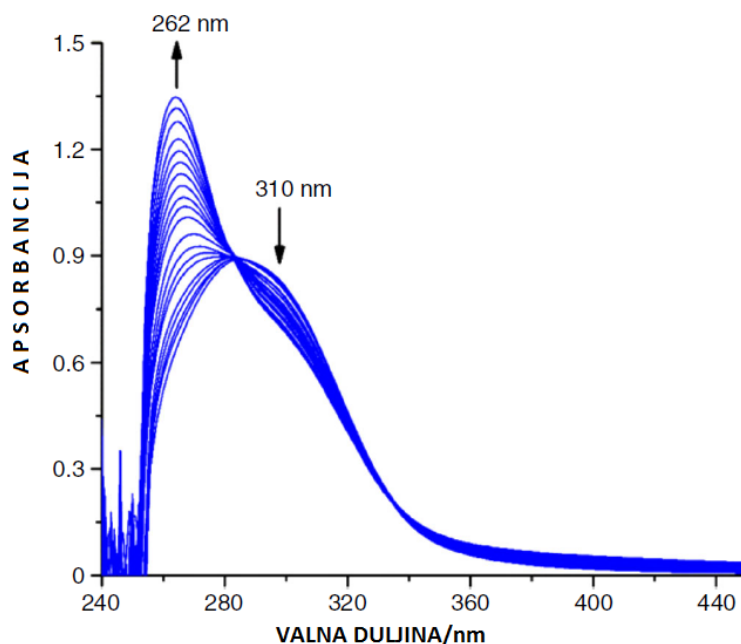
Slika 36. Sinteza senzora **10**, (i)  $C_3H_4O$ , *N,N*-dimetiaminopiridin. (ii) Fenil azidi, katalizator nanočestica bakrenog jodida i voda (10 ml), 80 °C

Sposobnost prepoznavanja iona sintetiziranog receptora **10** ispitivana je u sustavu otapala DMSO/ $CH_3CN$  (1:9, v/v) dodatkom perklorata različitih iona poput  $Cu^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Hg^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$  i  $Ni^{2+}$  u standardnu otopinu **10**. Na Slici 37 vidljiv je pomak u apsorpcijskom spektru senzora **10** nakon dodatka olovnog perklorata. Prisutnost drugih metalnih iona gotovo uopće nije utjecalo na apsorpcijski spektar **10** u prisutnosti  $Pb^{2+}$  iona. Dodatkom  $Pb^{2+}$  iona došlo je do postupnog smanjenja intenziteta pri 310 nm i pojave novog maksimuma na 262 nm. Ovakav pomak prema plavom području pokazuje da  $Pb^{2+}$  ion ulazi u interakciju s karbonilnim atomom kisika i dušikovim atomom triazolnog dijela receptora **10**.



Slika 37. ApSORPCIJSKI spektri senzora **10** (12  $\mu\text{M}$ ) nakon dodavanja metalnih iona

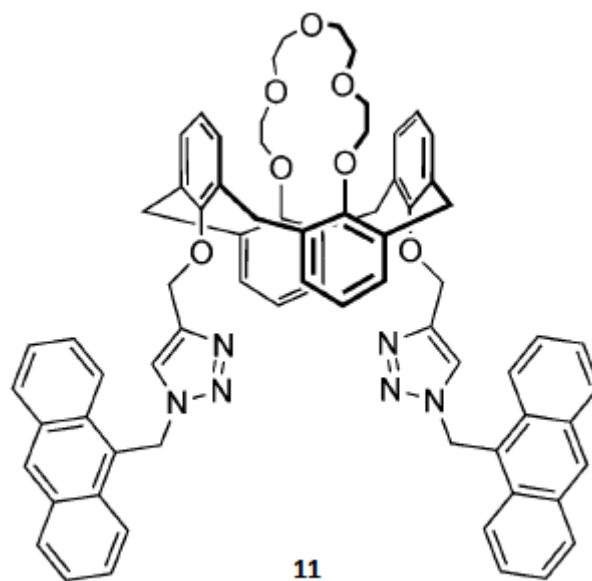
Istraženo je stvaranje veze između **10** i  $\text{Pb}^{2+}$  iona praćenjem promjena apsorpcije nakon postupnog dodavanja olovnog perklorata u otopinu receptora **10** u sustavu otapala DMSO- $\text{CH}_3\text{CN}$  (1,0:9,0 v/v). Eksperimenti s UV-vidljivom titracijom pokazuju da dodavanje  $\text{Pb}^{2+}$  iona u 12,0  $\mu\text{M}$  otopine **10** dovodi do postupnog smanjenja maksimuma pri 310 nm i pojave novog pika na 262 nm koji je dostigao svoju graničnu vrijednost dodavanjem 1,0 ekvivalenta  $\text{Pb}^{2+}$  iona kako je i prikazano na slici 38. Uz to, pojava dobro definirane izosbestične točke na 344 nm u UV-vidljivom spektru pripisana je stvaranju jednostrukog reaktivnog intermedijara između receptora **6** i iona  $\text{Pb}^{2+}$  u ravnoteži i time stvaranje kompleksa 1:1 između derivata **6** i iona  $\text{Pb}^{2+}$ .



Slika 38. Promjena apsorpcijskog spektra **10** ( $12\mu\text{M}$ ) s postupnim dodavanjem  $\text{Pb}^{2+}$  iona u otopini DMSO- $\text{CH}_3\text{CN}$  (1,0:9,0, v/v)<sup>26</sup>

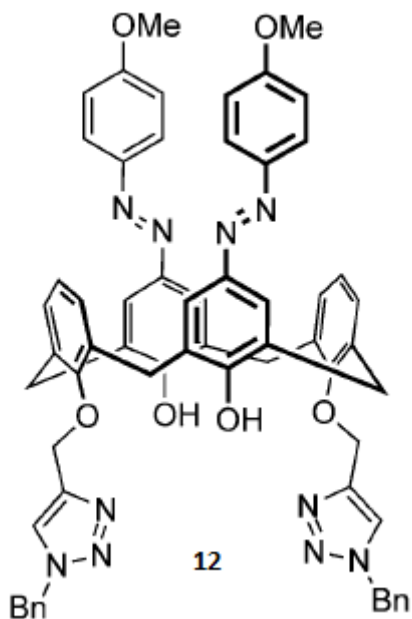
Povezivanje kaliksarena s triazolnim skupinama postignuto je u većini slučajeva *click* reakcijom alkinil kaliksarena na fluorofore koji nose azide. Dušikovi atomi iz triazolnih skupina i atomi kisika kaliksarena tvore mjesto vezanja, čineći ove kaliksarene učinkovitim sensorima za katione. Chung i suradnici prvi su upotrijebili *click* kemiju na okvirima kaliksarena za izgradnju senzora. Spoj **11** sintetiziran je *click* reakcijom antracenskih jedinica na kaliks krune kaliksa da bi se stvorila dva potencijalna mjesta vezanja metala: između triazola ispod kaliksarenskog prstena i u krunskom eteru iznad prstena. Opažena je ograničena selektivnost u MeCN/ $\text{CHCl}_3$ : fluorescencija antracenskih skupina smanjena je sa  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Cr}^{3+}$  i  $\text{Pb}^{2+}$  ionima, a pojačana s  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ba}^{2+}$  i  $\text{Zn}^{2+}$  ionima. Zanimljivo je da je dodavanje  $\text{K}^+$  iona u kompleks  $\text{Pb}^{2+}$  rezultiralo gotovo potpunim pobuđivanjem emisije fluorescencije, dok je gašenje nastupilo kada je  $\text{Pb}^{2+}$  dodan u  $\text{K}^+$  kompleks. Stoga kemosenzor **11** ima mogućnost isključivanja i uključivanja, s  $\text{K}^+$  i  $\text{Pb}^{2+}$  kao prekidačima.  $^1\text{H}$  NMR studije pokazale su da se  $\text{K}^+$  veže na krunski eter, a  $\text{Pb}^{2+}$  na triazolno mjesto za vezanje, pri čemu se izmjena metala pripisuje elektrostatskim odbijanjima i ne-karakteriziranim alosteričnim učincima.





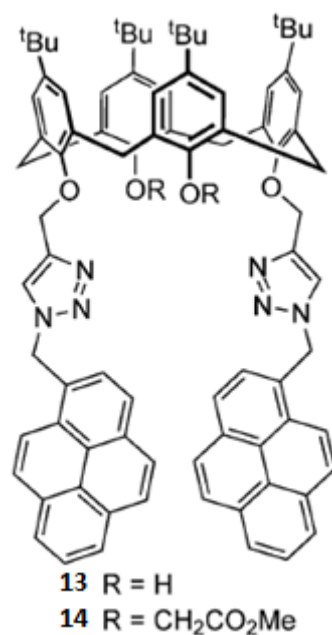
Slika 39. Senzor **11**

Srodni senzor **12** je kromogeni kaliks(IV)aren sa sličnim džepom za vezanje na donjem dijelu koji uključuje dva *click* triazola, a koji koriste diazofenolske skupine vezane za kaliksarenski prsten kao kromofor. Iz niza metalnih iona,  $\text{Ca}^{2+}$  i  $\text{Pb}^{2+}$  uzrokovali su značajan pomak prema crvenom dijelu spektra apsorbancije kromofora. Vezna stehiometrija (1:1) potvrđena je u oba slučaja UV-Vis apsorbancijom analiziranom metodom po Jobu.



Slika 40. Senzor **12**

Kemosenzor **13** sintetiziran je *click* reakcijom dviju fluorescentnih pirenskih podjedinica na okvir kaliks(IV)arena. Nakon dodavanja  $\text{Zn}^{2+}$  ili  $\text{Cd}^{2+}$  iona u otopinu spoja u acetonitrilu, MeCN, senzor **13** pokazuje proporcionalan odgovor, s povećanom emisijom monomera pirena i gašenjem emisije ekscimera.  $^1\text{H}$  NMR eksperimenti sugeriraju da su pirenske podjedinice spoja **13** uključene u p-p slaganje, ali njihovo razdvajanje je prisilno unošenjem metalnog iona na mjesto vezanja triazola. Da bi se ispitala učinkovitost receptora **13** kao kemosenzora, zabilježen je fluorescentni odgovor u prisutnosti drugih metalnih iona. Pokazalo se da su samo  $\text{Cu}^{2+}$  i  $\text{Hg}^{2+}$  poremetili senzor potpunim gašenjem fluorescencije.



Slika 41. Senzori **13** i **14**

Osim kao senzori za metalne katione, bis-triazoli pokazuju mogućnost vezanja aniona. Modificirani senzor **14** istražen je kao selektivni anionski senzor u MeCN, pokazujući pojačanu emisiju monomera formiranjem 1:1 kompleksa s jodidnim anionom. Međutim, utjecaj metalnih iona na receptor **14** nije proučen, a način vezanje jodida nije u potpunosti razjašnjen.<sup>23</sup>

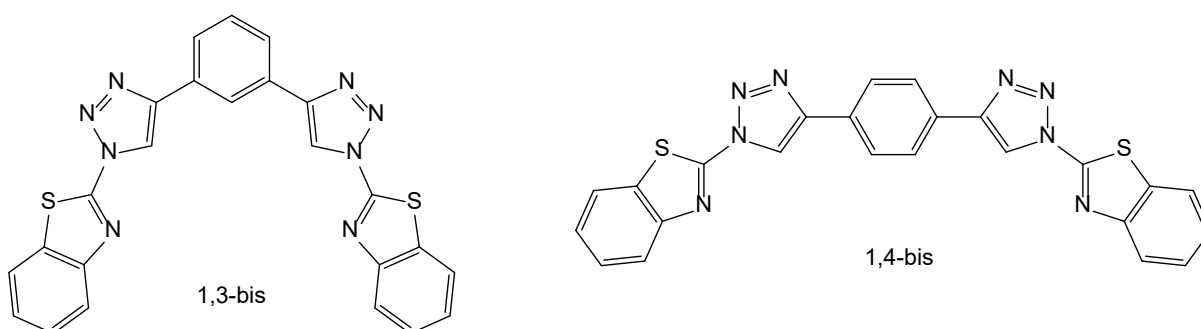
## 4. RASPRAVA

Pregledom literature, uočeno je da su spojevi koji u strukturi sadrže više benzotiazolnih ili 1,2,3-triazolnih jedinica obećavajuće strukture u dizajnu metalnih kemosenzora. Benzotiazol sadrži heteroatome dušik i sumpor koji zbog slobodnih elektronskih parova mogu sudjelovati u koordinaciji metalnih iona. 1,2,3-triazoli imaju važnu ulogu u dizajnu metalnih kemosenzora jer mogu pridonijeti vezanju ciljanog analita. Zbog prisutnosti dušikovih atoma sa slobodnim elektronskim parom, 1,2,3-triazoli također imaju sposobnost koordinacije metalnih iona. Zahvaljujući bakrom(I) kataliziranoj azid-alkin cikloadiciji, sinteza je jednostavna što je još jedan razlog sve veće primjene 1,2,3-triazola u ispitivanju senzora.

Dizajn i razvoj kemosenzora za različite ione metala, posebno za bakrove i cinkove ione, predstavlja značajno područje istraživanja. Od raznih senzora, fluorescentni kemosenzori imaju više prednosti u pogledu veće brzine odziva i niske koncentracije analita, omogućavajući tako praćenje u stvarnom vremenu, posebno u biološkim uvjetima. Receptori na bazi amida koji sadrže prstenove benzotiazola pokazuju izvrsnu selektivnost prema biološki relevantnim metalnim ionima bakra i cinka.

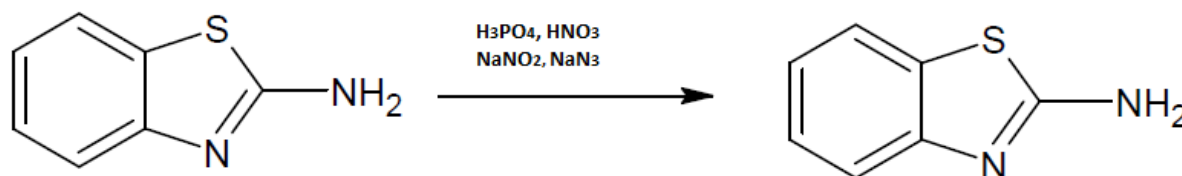
Pregledom literature, također je uočeno da je zapravo jako malo poznatih i sintetiziranih molekula bis-benzotiazol i bis-triazola, odnosno, onih koji sadrže i benzotiazol i triazol u strukturi. Zbog toga se javlja potreba za sintezom novih molekula i ispitivanjem potencijalnih senzorskih svojstava za određivanje metalnih kationa.

U ovom radu, predložena je sinteza tzv. bis(benzotiazolil-triazolnih)benzena kod kojih su na benzen u položaju 1,3 i 1,4 vezana dva benzotiazola preko 1,2,3-triazolnog prstena, a koji su prikazani na Slici 42.



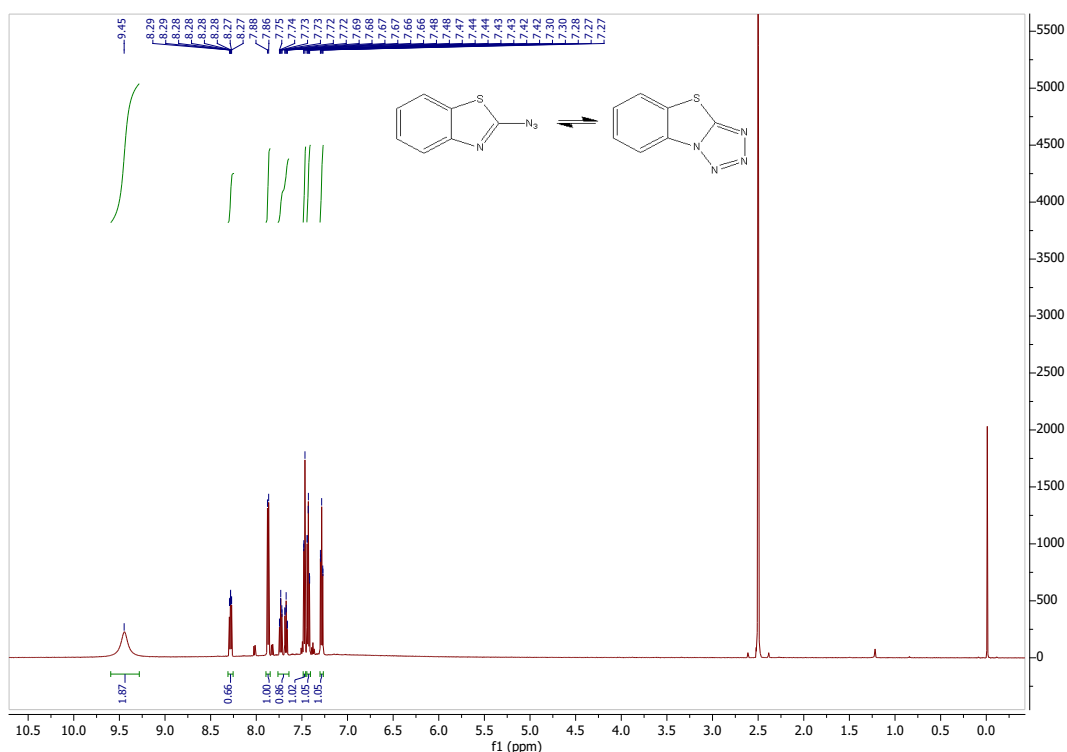
Slika 42. Strukture ciljanih bis(benzotiazolil-1,2,3-triazolil)benzena

Predložena višestupnjevita sinteza 1,3- i 1,4-bis(benzotiazolil-1,2,3-triazolil)benzena sastoji se od dva koraka. U prvom koraku, prikazanom na Slici 43, sintetizira se 2-azidobenzotiazol reakcijom 2-aminobenzotiazola sa 85%-tnom fosfornom kiselinom. Reakcijska smjesa se hladi na 0 °C, zatim se dodaje koncentrirana nitratna kiselina te vodena otopina natrijevog nitrata. Nakon miješanja reakcijske smjese (30-60 min) dodaje se vodena otopina natrijevog nitrita.



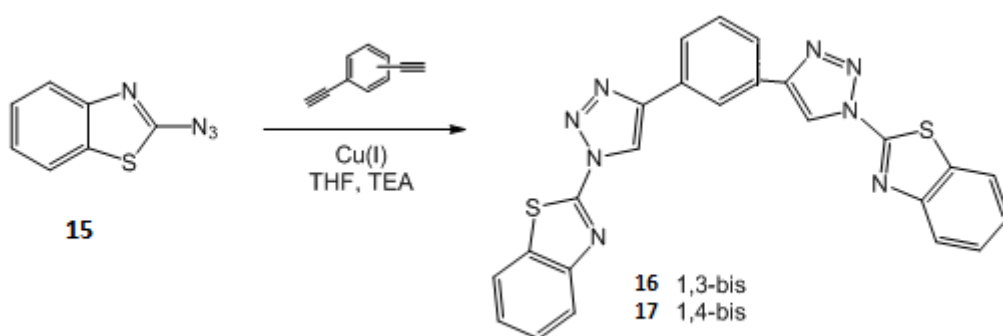
Slika 43. Predložena sinteza 2-azidobenzotiazola **15**

Tankoslojnom kromatografijom (TLC) praćena je sinteza spoja **15**, a kao eluens je korištena smjesa diklormetana i metanola u omjeru 100:1. Nakon razvijanja kromatograma zaključeno je da je nastao novi spoj zbog različite R<sub>f</sub> vrijednosti koja za razliku od početnog (R<sub>f</sub>(početni)=0,55) iznosi R<sub>f</sub>=0,71. Za spoj **15** snimljen je <sup>1</sup>H NMR spektar, prikazan na Slici 44. U spektru spoja **15** vidljivo je osam signala, od kojih bi široki singlet na 9,45 ppm mogao odgovarati protonima amino skupine početnog spoja. Ostali signali odgovaraju aromatskim protonima. Prema tome, može se pretpostaviti da je uz nastajanje novog spoja 2-azidobenzotiazola, zaostalo i nešto početnog 2-aminobenzotiazola, ali dobiveni azid je korišten dalje u reakcijama bez pročišćavanja.



Slika 44.  $^1\text{H}$  NMR spektar spoja **15**

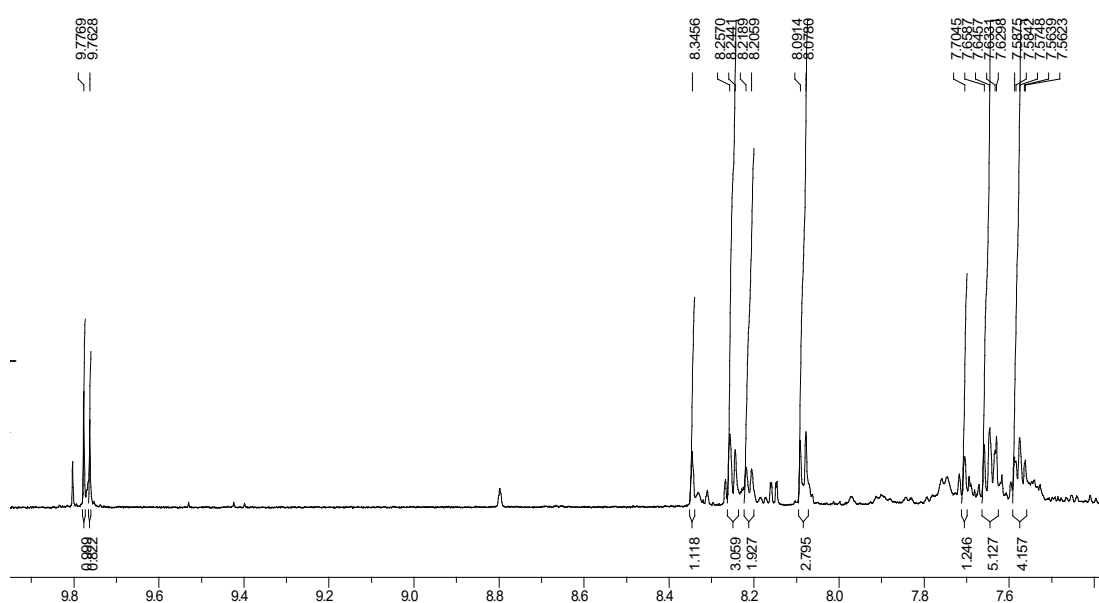
Drugi korak je priprava bis(benzthiazilil-1,2,3-triazolil)benzena **16-17** primjenom *click* kemije. Kako je i prikazano na Slici 45, 2-azidobenzthiazol **15** otapa se u tetrahidrofuranu (THF) te se dodaje CuI pa trietilamin (TEA). Nakon homogenizacije reakcijske smjese dodaje se odgovarajući alkin, 1,3-dietinilbenzen u suvišku.



Slika 45. Sinteza bis(benzthiazilil-1,2,3-triazolil)benzena **16-17**

Sinteza **16** također se pratila pomoću tankoslojne kromatografije kako bi se ustanovilo jesu li svi reaktanti potrošeni. Kako prilikom prve provjere reakcije nije došlo do iskorištavanja svih

reaktanata, dodalo se još katalizatora CuI te azida. Tek nakon što se pomoću TLC ustanovilo da su svi reaktanti izreagirali, smjesa je uparena do suha pri cca 70 °C. Produkt se zatim pročistio kolonskom kromatografijom na silikagelu, a struktura spoja određena je snimanjem  $^1\text{H}$  NMR spektra koji je prikazan slikom 46. U spektru dobivenog spoja vidljivi su singleti na 9,98 i 9,76 ppm koji bi odgovarali dvama protonima triazola. Također, NMR spektar pokazuje i veći broj signala u aromatskom i alifatskom području od očekivanog, što znači da je još uvijek zaostalo nečistoća, odnosno da bi za dobivanje čistog spoja **16** trebalo još jednom pročistiti dobivenu smjesu. Osim toga, s obzirom da je molekula **16** simetrična, za očekivati je samo jedan signal triazola koji bi odgovarao dvama protonima, pa se prema dobivenom spektru može pretpostaviti i dobivanje smjese mono- i bis-(benzotiazolil-1,2,3-triazolil)-supstituiranog benzena.



Slika 46.  $^1\text{H}$  NMR spektar 1,3-bis(benzotiazolil-1,2,3-triazolil)benzena

Sinteza senzora mogla bi se optimirati zagrijavanjem *click* reakcije te boljim miješanjem reakcijske smjese pri čemu bi došlo do povećanja kontaktne površine reaktanata, bržeg otapanja i homogenizacije, a samim time iskorištenje reakcije bilo bi veće. Također je vrlo važno da se kolonska kromatografija na silikagelu provodi što kvalitetnije (što manje vanjskih utjecaja, paziti da je kapanje ustaljeno, a da pri tome nije ni prebrzo ni presporo) kako bi razdvajanje smjese bilo što učinkovitije. Osim toga može se provesti kolonska kromatografija s drugim eluensom kako bi se dobio čisti produkt.

U literaturnom pregledu vidljivo je da su kao potencijalni kemosenzori sintetizirani prvenstveno spojevi koji pokazuju svojstvo fluorescencije, a to su konjugirani  $\pi$ -sustavi. Na taj način moguće je pratiti intenzitet fluorescencije, tj. porast ili smanjenje istog, i na temelju toga zaključiti dolazi li do vezanja metalnog iona. Metalni ioni koordiniraju na heteroatome, odnosno vežu se na slobodni elektronski par heteroatoma, a najpogodniji za vezanje su atomi dušika, kisika i sumpora. Na taj način oni mijenjaju optička svojstva molekule. Spomenute heteroatome imaju 1,2,3-triazol (dušik) i benzotiazol (sumpor i dušik), stoga ne čudi da su upravo oni izabrani kao baza za sintezu potencijalnih senzora. Također, važno je i na koji način dolazi do promjene optičkih svojstava. Metode temeljene na fluorescentnim sensorima nude različite prednosti u pogledu osjetljivosti, selektivnosti, vremenu odziva, te omogućuju lokalno promatranje. Najčešći mehanizam nastanka signala kod molekulskih senzora za metalne katione je fotoinducirani prijenos elektrona.

1,3-bis(benzotiazolil-1,2,3-triazolil)benzen simetrična je i planarna molekula koja sadrži dva 1,2,3-triazolna i dva benzotiazolna prstena. Iz svega navedenog u ovom radu, može se pretpostaviti kako spoj **16** ima dobar potencijal za vezanje metalnih kationa. Kako bi se ustanovilo ima li **16** sposobnost detektiranja metalnih iona, pratila bi se promjena intenziteta emisije **16** nakon dodavanja različitih iona metala. Kada bi se ustanovilo smanjenje intenziteta emisije u prisutnosti nekog metalnog kationa, otopina **16** titrirala bi se upravo tim kationom te bi se pratila promjena intenziteta emisije povećanjem koncentracije metalnog iona za koji je spoj **16** selektivan.



## 5. EKSPERIMENTALNI DIO

### Sinteza 2-azidobenzotiazola

U okrugloj tikvici otopljeno je 751,5 mg 2-aminobenzotiazola (5,0 mmol) u 14,0 mL 85%-tne  $\text{H}_3\text{PO}_4$ . Reakcijska smjesa hladila se u ledenoj kupelji (0 °C) te je dodano 2,0 mL 68%-tne  $\text{HNO}_3$  kap po kap tijekom 10 minuta. Pripremljena je otopina otapanjem 103,5 mg  $\text{NaNO}_2$  u 1 mL vode te je dodana u tikvicu. Reakcijska smjesa miješala se 1 sat na 0 °C te je provedena tankoslojna kromatografija (diklormetan:metanol=100:1) kako bi se utvrdilo da su reaktanti u potpunosti potrošeni. Zatim je pripremljena otopina od 146,25 mg  $\text{NaN}_3$  i 0,4 mL vode koja je također dodana u reakcijsku smjesu prilikom čega je došlo do stvaranja taloga, a boja je postala crvenkasto-smeđa. Reakcijska smjesa miješana je 4 sata (TLC) te je smjesa neutralizirana dodatkom 4,0 mL  $\text{NaOH}$  (1 M), a dobiveni talog profiltriran, posušen i izvagan (880 mg).

### Sinteza 1,3-bis(benzotiazilil-1,2,3-triazolil)benzena 16

151 mg 2-azidobenzotiazola otopljeno je u 7,0 mL tetrahidrofurana (THF). Dodan je katalizator  $\text{CuI}$  (161,88 mg), a zatim i trietilamin (TEA, 0,340 mL). Reakcijska smjesa se miješala dok se nije homogenizirala. Nakon toga dodan je alkin (53,61 mg), pri čemu je boja otopine iz žute prešla u narančastu, te se reakcijska smjesa miješala na sobnoj temperaturi. Kako je pomoću TLC utvrđeno da svi reaktanti nisu potrošeni, dodano je još 100 mg  $\text{CuI}$  i 150 mg azida. Smjesa je nakon završetka reakcije uparena do suha (cca 70 °C), a produkt je pročišćavan kolonskom kromatografijom na silikagelu.

## 6. ZAKLJUČAK

Kemosenzori su molekule koje pokazuju visoku selektivnost za pojedine metalne vrste. Mnogi metalni ioni imaju bitnu ulogu u raznim biološkim procesima, stoga je razvoj optičkih senzora vrlo važno područje istraživanja i sve se više pažnje posvećuje sintezi novih potencijalnih spojeva koji bi djelovali kao senzori za metalne ione.

Najpoznatija *click* reakcija je bakrom(I) katalizirana 1,3-dipolarna azid-alkin cikloadicija kojom se sintetiziraju 1,4-disupstituirani 1,2,3-triazoli. Korištenjem CuAAC reakcije moguće je jednostavno i brzo, u blagim reakcijskim uvjetima uz visok stupanj iskorištenja, sintetizirati 1,2,3-triazole koji imaju široku primjenu u razvoju kemijskih senzora za metalne ione zbog sposobnosti koordiniranja metalnih iona na svoje heteroatome. Posebno se veliki napori ulažu u razvoj selektivnih fluorescentnih senzora za detekciju metalnih iona jer oni nude mnoge prednosti u pogledu osjetljivosti, selektivnosti i vremenu odziva.

U ovom radu prikazani su senzori temeljeni na derivatima benzotiazola i 1,2,3-triazola te na derivatima 1,2,3-triazola i benzotiazola koji sadrže dva ili više benzotiazolna ili triazolna prstena. Iz literaturnog pregleda može se zaključiti da se povećanjem broja funkcionalnih jedinica, triazola i benzotiazola u strukturi molekule, povećava i sposobnost molekule za vezanje različitih analita.

Prema tome, u okviru ovog rada predložena je sinteza novih simetričnih 1,3- i 1,4-bis(benzotiazolil-triazolil)benzena kao potencijalnih fluorescencijskih kemosenzora za određivanje metalnih kationa. Također, provedena je sinteza 1,3-bis-derivata, a dobiveni rezultati pokazali su da je predloženim postupkom moguće dobiti 1,2,3-triazolne derivate. Dakle, rezultati su obećavajući no potrebno je optimiranje reakcijskih uvjeta u svrhu dobivanja čistih produkata i većih iskorištenja reakcija.

## 8. LITERATURA

- [1] Rangappa S. Keri , Mahadeo R. Patil, Siddappa A. Patil, Srinivasa Budagumpi, A comprehensive review in current developments of benzothiazolebased molecules in medicinal chemistry, *European Journal of Medicinal Chemistry*, **89** (2015) 207-251
- [2] <https://echa.europa.eu/substance-information/-/substanceinfo/100.038.62> (pristup 2.rujna 2020.)
- [3] <https://www.wikiwand.com/sh/Riluzol> (pristup 2.rujna 2020.)
- [4] <http://www.chm.bris.ac.uk/motm/luciferin/luciferinh.htm> (pristup 4.rujna 2020.)
- [5] K.Y.Zhang, K.K.-W.Lo, Chemosensing and Diagnostics, *Comprehensive Inorganic Chemistry II*, **8** (2013) 657-732
- [6] K. Xu, Y. Li, Y. Si, Y. He, J. Ma, J. He, H. Hou, K. Li, A “turn-on” fluorescent chemosensor for the detection of Hg(II) in buffer-free aqueous solution with excellent selectivity, *Journal of Luminescence*, **204** (2018) 182-188
- [7] D. Bansal, R. Gupta, Chemosensors containing appended benzothiazole group(s): selective binding of Cu<sup>2+</sup> and Zn<sup>2+</sup> ions by two related receptors, *Dalton Trans.*, **45** (2016) 502
- [8] Bernard Valeur, Isabelle Leray, Design principles of fluorescent molecular sensors for cation recognition, *Coordination Chemistry Reviews* **205** (2000) 3–40
- [9] Y. Jin, S. Wang, Y. Zhang, B. Song, Highly selective fluorescent chemosensor based on benzothiazole for detection of Zn<sup>2+</sup>, *Sensors and Actuators B: Chemical*, **225** (2016) 167-173
- [10] Hsuan-Fu Wang, Shu-Pao Wu, A pyrene-based highly selective turn-on fluorescent sensor for copper(II) ions and its application in living cell imaging, *Sensors and Actuators B: Chemical*, **181** (2013) 743-748
- [11] Jonathan J. Bryant and Uwe H. F. Bunz ,Click To Bind: Metal Sensors, *Chem. Asian J.*, **8** (2013) 1354-1367
- [12] Y.H. Lau, P. J. Rutledge, M. Watkinson, M. H. Todd, Chemical sensors that incorporate click-derived triazoles, *Chem. Soc. Rev.*, **40** (2011) 2848–2866
- [13] L. Krstulović, D. Saftić, M. Bajić, B. Žinić, 1,3-Dipolarna cikloadicija (I. dio): Dobivanje 1,2,3-triazolnih derivata u nukleozidnoj kemiji, *Kem. Ind.*, **64** (2015) 481–498
- [14] L. Liang, D. Astruc, The copper(I)-catalyzed alkyne-azide cycloaddition (CuAAC) “click” reaction and its applications, *Coordination Chemistry Reviews*, **255** (2011) 2933–2945
- [15] Freek van der Meer, Near-infrared laboratory spectroscopy of mineral chemistry: A review, *International Journal of Applied Earth Observation and Geoinformation* **65** (2018) 71-78
- [16] Jerónimo, P. C. A, Araújo, A. N., Montenegro, M., Optical Sensors and Biosensors based on Sol-gel Films, *Talanta*, **72** (2007) 13–27.
- [17] Lobnik, A., Turel, M., Koren Urek Š., Optical Chemical Sensors: Design and Applications, u: Wang, W., *Advances in Chemical Sensors*, **1** (2012) 1-28

- [18] [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Physical\\_and\\_Theoretical\\_Chemistry\\_Textbook\\_Maps/Supplemental\\_Modules\\_\(Physical\\_and\\_Theoretical\\_Chemistry\)/Spectroscopy/Electronic\\_Spectroscopy/Radiative\\_Decay/Fluorescence](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Physical_and_Theoretical_Chemistry_Textbook_Maps/Supplemental_Modules_(Physical_and_Theoretical_Chemistry)/Spectroscopy/Electronic_Spectroscopy/Radiative_Decay/Fluorescence) (pristup 15.srpnja 2020.)
- [19] Owen, T., Fundamentals of modern UV-visible spectroscopy, *Primer, Agilent Technologies* **1** (2000) 2–10
- [20] [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Physical\\_and\\_Theoretical\\_Chemistry\\_Textbook\\_Maps/Supplemental\\_Modules\\_\(Physical\\_and\\_Theoretical\\_Chemistry\)/Spectroscopy/Electronic\\_Spectroscopy/Electronic\\_Spectroscopy\\_Basics/The\\_Beer-Lambert\\_Law](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Physical_and_Theoretical_Chemistry_Textbook_Maps/Supplemental_Modules_(Physical_and_Theoretical_Chemistry)/Spectroscopy/Electronic_Spectroscopy/Electronic_Spectroscopy_Basics/The_Beer-Lambert_Law) (pristup 18.srpnja 2020.)
- [21] A. Kumar, A. Kumar, P. Ranjan Sahoo and S. Kumar, Colorimetric and Fluorescence-Based Detection of Mercuric Ion Using a Benzothiazolinic Spiropyran, *Chemosensors*, **35** (2019) 1-18
- [22] S. A. Khan, P. Kumar, Photophysical and Physicochemical Investigation of Newly Synthesized Polycyclic Pyrazoline Benzothiazole as Fluorescence Chemosensor for the Detection of Cu<sup>2+</sup> Metal Ion, *Polycyclic Aromatic Compounds*, (2019) 1563-5333
- [23] Preeti Saluja, Navneet Kaur, Narinder Singh, Doo Ok Jang, A benzthiazole-based tripodal chemosensor for Ba<sup>2+</sup> recognition under biological conditions, *Tetrahedron Letters* **52** (2011) 6705-6708
- [24] K. Rout, A. Kumar Manna, M. Sahu, J. Mondal, S. K. Singh, G. K. Patra, Triazole-based novel bis Schiff base colorimetric and fluorescent turn-on dual chemosensor for Cu<sup>2+</sup> and Pb<sup>2+</sup>: application to living cell imaging and molecular logic gates, *RSC Advances*, **9** (2019) 25919-25931
- [25] Yu Heng Lau, Peter J. Rutledge, Michael Watkinson and Matthew H. Todd, Chemical sensors that incorporate click-derived triazoles, *Chem. Soc. Rev.*, **40** (2011) 2848–2866
- [26] P. Rani, K. Lal, R. Shrivastava, Tris-Triazole Based Chemosensors for Selective Sensing of Pb<sup>2+</sup> Ions, *Asian journal of chemistry*, **31** (2019) 2443-2447