

Fluorescencijski kemijski senzori temeljeni na kumarinu

Majnarić, Katarina

Undergraduate thesis / Završni rad

2017

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:149:933920>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-25**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Katarina Majnarić

ZAVRŠNI RAD

Zagreb, rujan 2017.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Katarina Majnarić

**FLUORESCENCIJSKI KEMIJSKI SENZORI
TEMELJENI NA KUMARINU**

ZAVRŠNI RAD

Voditelj rada: dr. sc. Lidija Furač, viši predavač

Članovi ispitnog povjerenstva: dr. sc. Lidija Furač, viši predavač
dr. sc. Ema Horak, asistent
dr. sc. Nataša Perin, poslijedoktorand

Zagreb, rujan 2017.

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, dr. sc. Lidiji Furač, na predloženoj temi i pomoći pri izradi završnog rada. Posebno se zahvaljujem asistentici Kristini Bobanović mag.appl.chem., na strpljenju, stručnim savjetima i vodstvu tijekom izrade eksperimentalnog dijela, te na velikoj pomoći tijekom pisanja završnog rada. Zahvaljujem se i svim članovima Zavoda za opću i anorgansku kemiju na vrlo ugodnom radnom okruženju.

Posebno hvala ide mojoj obitelji i svim prijateljima koji su mi bili najveća podrška tijekom dosadašnjeg studija. Najveća vam hvala na iznimnom strpljenju i razumijevanju u svim teškim situacijama.

SAŽETAK

Kumarini su se zadnjih godina pokazali kao obećavajuće strukture u dizajnu i sintezi novih kemosenzorskih molekula zbog svojih fluorescentnih svojstava, a otkrićem *click*-kemije predstavljen je novi način sinteze spojeva jednostavnim i brzim postupcima. Ovim načinom sinteze dizajnirani su mnogobrojni kemosenzori, a u radu je dan pregled dosad istraženih kemijskih senzora za metalne ione i pH temeljenih na derivatima kumarina i triazola.

Cilj rada bila je sinteza i spektroskopska karakterizacija novog derivata kumarina kao potencijalnog kemijskog senzora. Ciljani spoj 7-(4-(4-(dimetilaminofenil)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)-4-metil-2*H*-kromen-2-on **3** pripremljen je klasičnom reakcijom organske sinteze i *click*-reakcijom odgovarajućeg azido derivata kumarina i 4-etinil-*N,N*-dimetilanilina uz Cu(I) kao katalizator. Kako bi se ispitala mogućnost primjene spoja kao optičkog pH senzora i senzora za metalne ione, ispitana je promjena njegovih spektroskopskih svojstava ovisno o pH otopine i u prisutnosti različitih metalnih soli primjenom UV/Vis i fluorimetrijske spektroskopije.

Spoj **3** pokazuje ovisnost spektrofotometrijskih svojstava o vrijednosti pH otopine, te je zbog toga potencijalni pH senzor. Preliminarna ispitivanja u otopinama etanola s dodatkom različitih metalnih soli pokazala su značajan utjecaj prisutnosti Hg²⁺ i Li⁺ iona na apsorpcijski i emisijski spektar spoja **3**. Potrebno je provesti dodatna detaljnija ispitivanja kako bi se sa sigurnošću utvrdila senzorska primjena spoja **3** za navedene metale.

Ključne riječi: optički senzori, kumarin, triazol, *click*-kemija, fluorescencija, UV/Vis i fluorimetrijska spektroskopija

SUMMARY

Coumarins are promising structures in the synthesis and design of novel chemosensors as they exhibit fluorescence properties. With the discovery of *click*-chemistry, a new way of synthesizing compounds with simple and quick synthetic steps has been found. A significant number of potential chemosensors was designed by the click chemistry approach. In this work, an overview of chemosensors for metal ions and pH based on the derivatives of coumarin and triazole is given.

This work presents the synthesis and spectroscopic characterization of a novel coumarin derivative as potential chemosensor. Targeted compound 7-(4-(4-(dimethylamino)phenyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)-4-methyl-2*H*-chromen-2-one **3** was prepared by classical chemical reaction of organic chemistry and by *click*-reaction from the corresponding azido-coumarin derivative and 4-ethynyl-*N,N*-dimethylaniline in the presence of Cu(I) as catalyst. In order to determine the possibility of application as pH and metal ion sensor, the changes of the compounds spectroscopic properties depending on the pH value and in presence of different metal ions were studied by UV/Vis and fluorescence spectroscopy.

Compound **3** shows dependence of spectroscopic properties on the pH value of the solution, and is therefore a potential pH sensor. Preliminary testing in ethanol solutions with the addition of various metal salts showed a significant influence in the presence of Hg²⁺ and Li⁺ ions in absorption and emission spectrum of compound **3**. It is required to carry out more detailed testing to determine the sensing application of compound **3** for said metals.

Keywords: optical sensors, coumarin, triazol, *click*-chemistry, fluorescence, UV/Vis and fluorimetric spectroscopy

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. OPĆI DIO	3
2.1. Kemijski senzori	4
2.1.1. Optički kemijski senzori	4
2.1.2. Fluorescentni kemijski senzori.....	5
2.1.3. Mehanizmi fluorescentnog djelovanja senzora.....	6
2.2. Kumarini kao fluorescentni senzori.....	9
2.2.1. Derivati kumarina kao fluorescentni senzori za metalne ione	11
2.2.2. Derivati kumarina kao fluorescentni pH senzori	15
2.3. Click-kemija.....	16
2.3.1. Bakrom(I) katalizirana azid-alkin dipolarna cikloadicija	17
2.3.2. Triazoli kao funkcionalne jedinice u kemosenzorima	18
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	20
3.1. Opće napomene	21
3.2. Materijali	21
3.3. Instrumenti.....	22
3.4. Sinteza spojeva	22
3.4.1. Sinteza 7-azido-4-metil-2 <i>H</i> -kromen-2-ona.....	23
3.4.2. Sinteza 7-(4-(4-(dimetilaminofenil)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-1-il)-4-metil-2 <i>H</i> -kromen-2-ona.....	23
3.5. Priprava otopina.....	24
3.5.1. Priprava otopina univerzalnog pufera različitih vrijednosti pH.....	24
3.5.2. Priprava matične (<i>stock</i>) otopine spoja	25
3.5.3. Etanolne otopine različitih vrijednosti pH	25
3.5.4. Matične (<i>stock</i>) otopine metala	25
3.6. Mjerenja.....	25
3.6.1. Utjecaj promjene vrijednosti pH	26
3.6.2. Utjecaj prisutnosti različitih metalnih iona	26
4. REZULTATI I RASPRAVA	27
4.1. Sinteza spoja.....	28

4.2. Spektrofotometrijska karakterizacija ispitivanih spojeva u otopini	31
4.2.1. Fotofizička karakterizacija ispitivanih spojeva.....	31
4.2.2. Utjecaj promjene vrijednosti pH	32
4.2.3. Utjecaj prisutnosti metalnih iona	35
5. ZAKLJUČAK	39
6. LITERATURA.....	41
7. ŽIVOTOPIS	46

1. UVOD

Kemijski senzor je uređaj koji mjeri određenu fizikalnu veličinu, te ju pretvara u signal pogodan za daljnju obradu. Fluorescentni kemijski senzori temeljeni na derivatima kumarina u zadnje vrijeme koriste se u detekciji metalnih iona, od kojih najčešće Hg^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} , Cd^{2+} , Au^{3+} , ali i u detekciji aniona, različitih molekula te kao pH senzori.

Kumarini su heterociklički spojevi sa strukturom benzo- α -pirona, zbog koje imaju odlična svojstva kao što su veliko kvantno iskorištenje, veliki Stokesov pomak, izvrsna fotostabilnost i niska toksičnost. Upravo zbog toga, derivati kumarina pokazali su se kao dobri potencijalni kemijski senzori koji pokazuju intenzivnu fluorescenciju u prisutnosti određenih metalnih iona i u određenom rasponu pH vrijednosti.

Click-kemija se pokazala obećavajućom metodom u dizajnu potencijalnih senzorskih molekula jer nastali produkt 1,2,3-triazol ima ulogu poveznice i u koordinaciji s metalnim ionima. S obzirom na to, otkrićem i razvitkom Huisgenove 1,3-dipolarne azid-alkin cikloadicije korištenjem bakra(I) kao katalizatora *click*-kemija zadnjih 15 godina ubrzano napreduje. Reakcijama *click*-kemije brzim i jednostavnim sintetskim metodama dizajniraju se raznoliki produkti široke primjene. Upotrebom 1,2,3-triazola dolazi do razvitka brojnih biološki aktivnih molekula. Ovi se derivati upotrebljavaju ponajviše u farmaceutskoj industriji, a tek malo manju primjenu imaju kao boje i fotostabilizatori u optičkim vlaknima, inhibitori korozije metala i legura, te kao insekticidi, fungicidi i herbicidi.

U ovome je radu sintetiziran novi derivat kumarina, reakcijama *click*-kemije, kao potencijalni kemijski senzor. Ispitana su spektroskopska svojstva spoja u otopini pri različitim pH vrijednostima i u prisutnosti metalnih iona korištenjem UV-vidljive i fluorescencijske spektroskopije.

2. OPĆI DIO

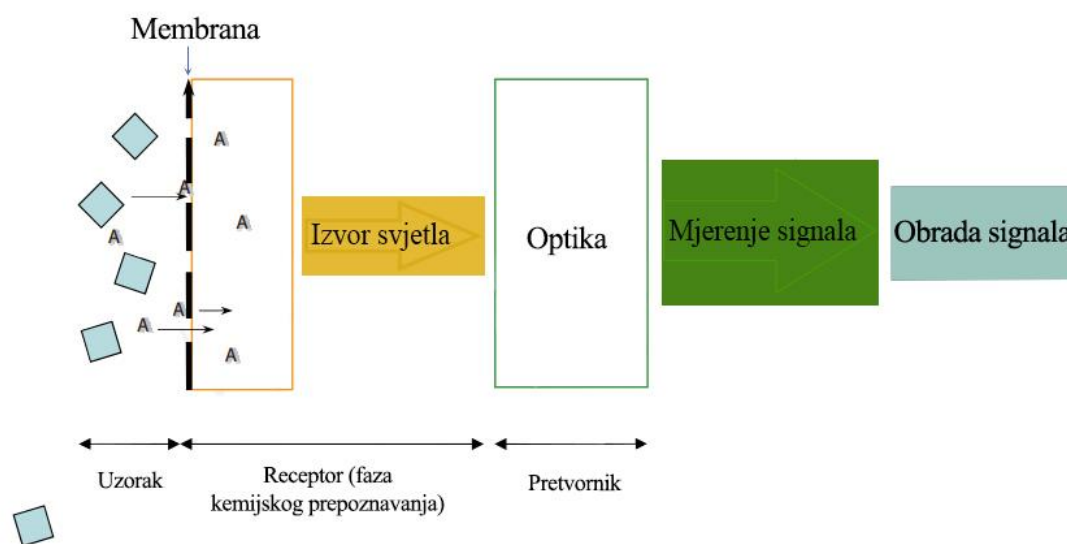
2.1. Kemijski senzori

Kemijski senzor je uređaj koji pretvara kemijsku informaciju pojedinog analita u analitički koristan signal. Kemijska informacija može potjecati iz kemijske reakcije analita ili iz fizikalnih svojstava ispitivanog sustava.

Kemijski senzori sadrže dva osnovna dijela: receptor i pretvornik. Neki senzori mogu imati i separator, npr. membranu. U receptoru se kemijska informacija pretvara u oblik energije koji se može detektirati pretvornikom. Pretvornik tu energiju, koja sadrži kemijsku informaciju o uzorku, pretvara u koristan analitički signal.¹

2.1.1. Optički kemijski senzori

Optički senzori – opt(rod) su grupa kemijskih senzora u kojima se elektromagnetsko zračenje koristi za generiranje analitičkog signala u pretvorniku. Receptor identificira parametar, npr. koncentraciju danog spoja, pH i sl., te daje optički signal proporcionalan veličini tog parametra. Pretvornik prenosi optički signal, proizveden receptorom, u mjerljivi signal koji je pogodan za obradu pojačavanjem, filtriranjem, snimanjem, prikazom, itd.



Slika 1. Shema optičkog kemijskog senzora.²

Optički senzori temelje se na različitim optičkim principima: apsorbancija, refleksija, luminiscencija, fluorescencija, čime su pokriveni različiti dijelovi spektra (ultraljubičasti,

vidljivi, infracrveni), te je moguće mjeriti intenzitet svjetlosti, vrijeme života, indeks refrakcije, raspršenja, difrakcije i polarizacije.²

Tvari apsorbiraju (gase) točno određena spektralna područja, odnosno zrake točno određene valne duljine. Pusti li se kroz neku prozirnu tvar svjetlost svih boja (npr. Sunčevu svjetlost) i zatim se prolazna svjetlost rastavi u spektar, dobiju se u kontinuiranom spektru, u točno određenim područjima uže ili šire crne crte. Ovo svojstvo služi za identifikaciju i određivanje tvari, a sam se postupak analize naziva apsorpcijska spektralna analiza. Apsorpcijski spektri postoje u širokom spektralnom području, od ultraljubičastog (10–400 nm) preko vidljivog (400–800 nm) do infracrvenog (800 nm – 1 mm).³ Za mjerenje količine svjetla koju apsorbira uzorak, odnosno za mjerenje apsorbancije koristi se spektrofotometar. Apsorpcija svjetlosti kroz otopinu može se matematički opisati Lambert-Beerovim zakonom:

$$A = \varepsilon \times l \times c \quad (1)$$

gdje je A apsorbancija, ε molarni apsorpcijski koeficijent, l duljina puta svjetlosti kroz uzorak, cm, c koncentracija uzorka, mol dm⁻³.⁴ Apsorbancija je logaritam omjera intenziteta upadnog zračenja P_0 i propuštenog zračenja P , kroz uzorak: $A = \log(P_0/P)$.⁵

Usporedivši ih s konvencionalnim elektroničnim sensorima, optički senzori imaju mnoge prednosti kao što su selektivnost, imunost na elektromagnetske interferencije i sigurnost tijekom rada sa zapaljivim i eksplozivnim spojevima, te su cijenom prihvatljiviji. Unatoč mnogim prednostima, optički senzori imaju i nekoliko nedostataka: njihov rad može ometati svjetlo u okruženju, dugotrajna stabilnost je ograničena ispiranjem indikatora ili izbjeljivanjem pod utjecajem svjetlosti, a selektivnost može biti slaba i neophodan je prijenos mase analita iz uzorka u indikatorsku fazu kako bi se dobio analitički signal.

Optički kemijski senzori omogućavaju kontinuirano praćenje kemijskih spojeva, te se stoga koriste u mnogim područjima kao što su kemijska industrija, biotehnologija, medicina, znanosti o okolišu, osobna zaštita, itd.²

2.1.2. Fluorescentni kemijski senzori

Zajednički naziv za pojave emisije elektromagnetskog zračenja (ultraljubičastog, vidljivog ili infracrvenog) kao posljedica prijelaza elektrona iz pobuđenog u niže energetske stanje (obično u osnovno stanje) je luminiscencija. Luminiscencija se s obzirom na trajanje sekundarnog zračenja dijeli na fluorescenciju i fosforescenciju.⁶

Kod pojave fluorescencije elektron se gotovo trenutno vraća u svoje osnovno stanje, a emisija svjetlosti prestaje uklonjenjem izvora pobude.⁷ Kod pojave fosforescencije prijelaz iz pobuđenog singletnog stanja ide preko niže energijskog tripletnog stanja u osnovno singletno stanje, odnosno fosforescencija je pojava u kojoj emisija traje i nakon prestanka pobude.^{3,6}

Postoje mnoge analitičke metode za detekciju kationa: atomska apsorpcijska spektrometrija, ion-osjetljive elektrode, analiza elektronskih mikroproba, analiza aktivacije neutrona. Međutim, ove metode su skupe, često zahtijevaju uzorke u velikim količinama i ne postoji mogućnost kontinuiranog praćenja analize. U suprotnosti s njima, fluorescentni senzori nude prednosti u pogledu osjetljivosti, selektivnosti, te brzinom odziva koja može biti 10^{-8} do 10^{-10} sekundi.^{8,9} Fluorescentni kemijski senzori pronalaze primjenu u mnogim poljima uključujući kemiju okoliša, analitičku kemiju i biomedicinu, jer omogućuju preciznu detekciju toksičnih teških metalnih iona, aniona i enzima uz manje troškove izrade senzora i same detekcije.¹⁰

2.1.3. Mehanizmi fluorescentnog djelovanja senzora

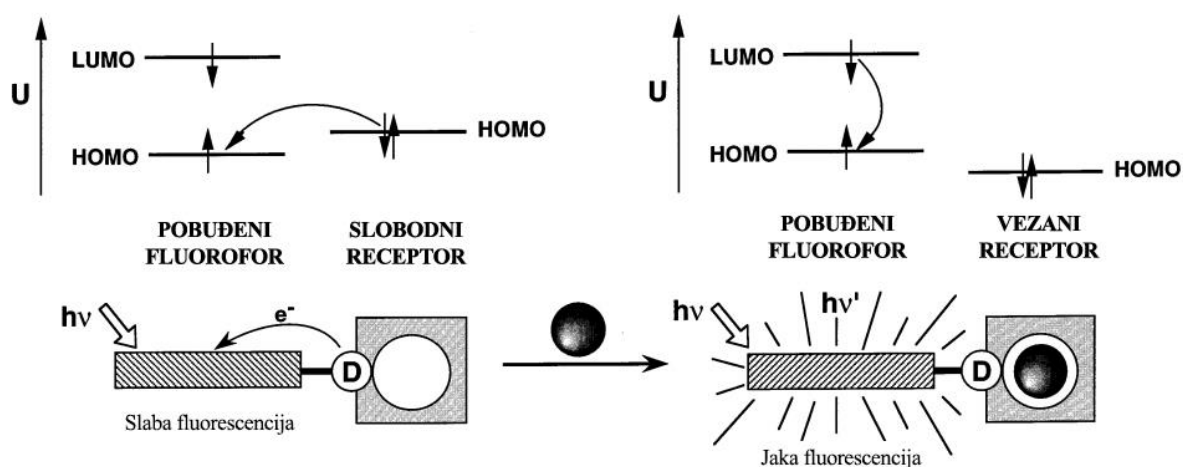
Fluorescentni kemijski senzor se sastoji od fluorofora koji je povezan s ionoforom te se takvi senzori nazivaju fluoroionofori. U konstrukciji takvih senzora bitno je obratiti pozornost na prepoznavajuće i signalizirajuće podjedinice.

Signalizirajuća podjedinica predstavlja pretvornik signala, tj. ona pretvara informaciju u optički signal koji je izražen u promjenama fotofizikalnih karakteristika fluorofora. Te su promjene posljedica promjena fotoinducirajućih procesa kao što su prijenos elektrona, prijenos naboja, prijenos energije, stvaranje ili nestanak ekscimera ili ekscipleksa, itd.

Prepoznavajuća podjedinica je odgovorna za selektivnost i učinkovitost vezanja koja ovisi o topologiji liganda, karakteristikama kationa (ionski radijus, naboj, koordinacijski broj, tvrdoća) i o prirodi otapala.⁸

Fluorescentni kemosenzori s mehanizmom fotoinduciranog prijenosa elektrona (engl. *photoinduced electron transfer*, PET) sastoje se od tri komponente: fluorofora, poveznice i receptora. Fluorofor je vezan za receptor pomoću poveznice. Na Slici 2. dan je shematski prikaz PET mehanizma. Fluoroionofor sadrži kationski receptor elektron donor (npr. amino skupinu), a fluorofor ima ulogu akceptora. Receptor obično sadrži nevezni elektronski par, npr. dušikov atom, čija energija leži između HOMO (engl. *highest occupied molecular orbital*) i LUMO (engl. *lowest unoccupied molecular orbital*) orbitala fluorofora. Da bi došlo

do fotoinduciranog prijenosa elektrona, energija pobuđenog stanja fluorofora mora biti dovoljna za oksidaciju receptora i redukciju fluorofora.^{8,11}



Slika 2. Shematski prikaz PET mehanizma.⁸

Nakon pobuđivanja fluorofora, elektron najviše popunjene molekulske orbitale (HOMO) prelazi u najnižu nepopunjenu molekulsku orbitalu (LUMO), što omogućuje fotoinducirani prijenos elektrona iz HOMO orbitale donora u HOMO orbitalu akceptora, odnosno fluorofora, čime se uzrokuje gašenje fluorescencije. Nakon vezanja kationa, redoks potencijal donora je povećan tako da se energija HOMO orbitala donora smanjuje usporedivši s onom fluorofora. Kao posljedica, fotoinducirani prijenos elektrona više nije moguć, te je gašenje fluorescencije zaustavljeno.

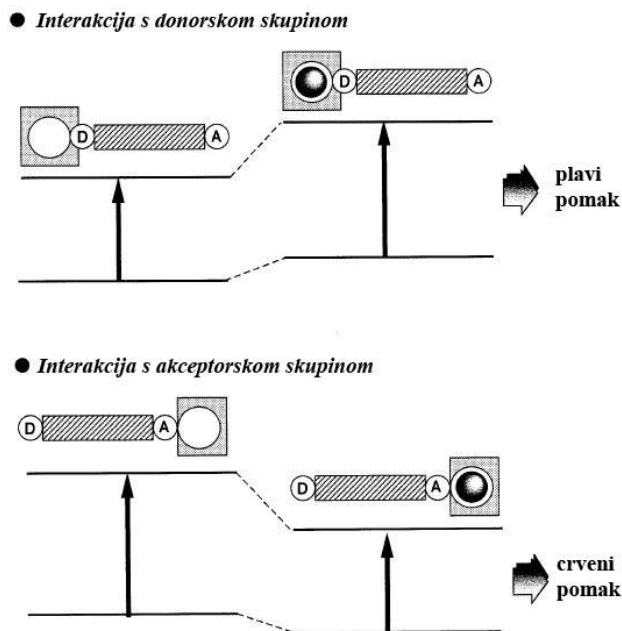
Prijelaz elektrona s nevezanog elektronskog para receptora u pobuđeno stanje fluorofora gasi fluorescenciju. Drugim riječima, intenzitet fluorescencije se povećava vezanjem kationa.^{8,11}

Prednost PET mehanizma je vrlo velika promjena u intenzitetu fluorescencije koja se uočava nakon vezanja kationa, zbog čega se za takve senzore koristi izraz „on-off“ fluorescentni senzor. Još jedna karakteristika je izostanak pomaka maksimuma fluorescencije ili ekscitacije spektra što isključuje mogućnost određivanja omjera intenziteta mjerenja na dvije valne duljine.⁸

Intramolekularni prijenos naboja (engl. *internal charge transfer*, ICT ili *photoinduced charge transfer*, PCT) je mehanizam koji se često koristi u ratiometričkim fluorescentnim kemosenzorima. ICT i PET spojevi strukturno su različiti, pa tako ICT spojevi imaju receptor

i fluorofor u istom elektronskom sustavu. Spojevi koji pokazuju intramolekularni prijenos naboja su polarizirani, a dizajnirani su tako da unutar konjugiranog π -sustava sadrže funkcionalne skupine ili dijelove molekule koje su bogate elektronima i one manje bogate elektronima.¹¹

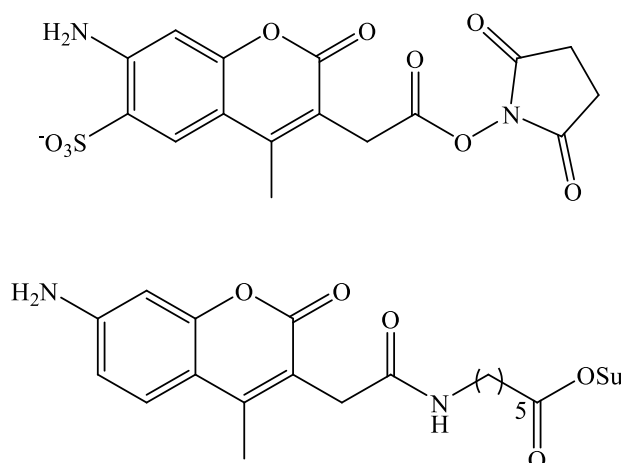
Do intramolekularnog prijenosa naboja između donora i akceptora dolazi kada fluorofor sadrži elektron-donorsku skupinu (najčešće amino skupinu) konjugiranu s elektron-odvlačecom skupinom. Kada skupina (npr.amino skupina) ima ulogu elektron-donora unutar fluorofora koji reagira s kationom, dolazi do smanjenja elektron-donorskog karaktera skupine, a samim time dolazi i do hipsokromnog (plavog) pomaka apsorpcijskog spektra. Nasuprot tome, kation koji djeluje s akceptorskom skupinom povećava elektron-akceptorski karakter skupine, te dolazi do batokromnog (crvenog) pomaka u apsorpcijskom spektru. Fluorescentni spektri se pomiču u istom smjeru kao i apsorpcijski spektri.⁸ Fluorofori s ICT mehanizmom obično pokazuju veliki Stokesov pomak i pomak emisije uzrokovan koordinacijom metala. Osim toga, ICT mehanizam može primjerice, smanjiti bazičnost donorskog amina. Na taj način moguće je dizajnirati senzor koji ne ovisi o pH otopine za primjenu u biološkim sustavima (pri neutralnim pH vrijednostima).¹²



Slika 3. Shematski prikaz ICT mehanizma.⁸

2.2. Kumarini kao fluorescentni senzori

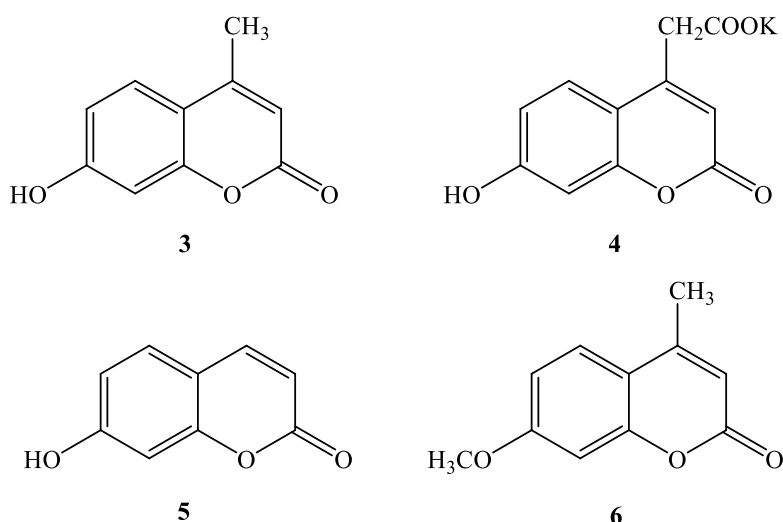
Kumarini su prirodni produkti dobiveni iz biljaka, poznati po širokom spektru biološke aktivnosti. Zadnjih godina pokazali su se kao obećavajuće strukture u sintezi i razvoju fluorescentnih proba, pa su tako poznati i komercijalno dostupni fluorofori derivati aminometilkumarina i karboksilnih kiselina, primjerice Alexa Fluor[®] bojilo, AMCA i DyLight Fluors, prikazani na Slici 4.^{13,14}



Slika 4. Strukture komercijalno dostupnih derivata kumarina Alexa Fluor[®] 350 (gore) i AMCA-X SE (dolje).

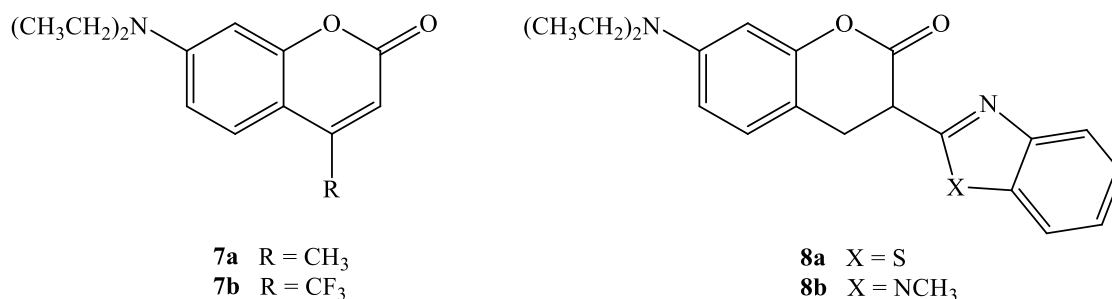
Kumarini sa strukturom benzo- α -pirona, imaju mnoge prednosti: veliko kvantno iskorištenje, veliki Stokesov pomak, izvrsnu fotostabilnost i nisku toksičnost.¹⁰ Zato se kumarini naširoko koriste u području biologije, medicine, parfema, kozmetike i fluorescentnih boja. Derivati kumarina dosad su korišteni kao fluorescentni senzori za pH, enzime, amine i aminokiseline, proteine, DNA i RNA, kisik, anione, metalne katione, dušikove okside i vodikov peroksid.^{10,15}

Razlikuju se dvije različite vrste benzopirona koje se međusobno razlikuju u poziciji karbonilne skupine u heterocikličkom prstenu. Jedna vrsta su kumarini, sa strukturom benzo- α -pirona, a druga su kromoni, sa strukturom benzo- γ -pirona, a njihove strukture su prikazane na Slici 5.



Slika 6. Derivati kumarina, 7-hidroksi-4-metil-kumarin **3**, kalijev-(7-hidroksikumarin-4-il)-acetat **4**, 7-hidroksikumarin **5**, 7-metoksi-4-metilkumarin **6**.

Dodatna istraživanja na derivatima kumarina prikazanim na Slici 7. pokazala su da se povećanjem polarnosti otapala apsorbancija pomiče u smjeru većih valnih duljina (crveni pomak). Otopine na kojima su provedena ispitivanja su cikloheksan, etil acetat, acetonitril, etanol i glicerol.¹⁷

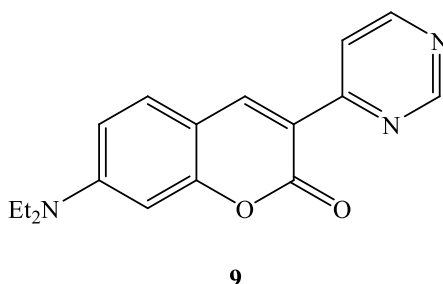


Slika 7. Derivati kumarina ovisni o polarnosti otapala.

2.2.1. Derivati kumarina kao fluorescentni senzori za metalne ione

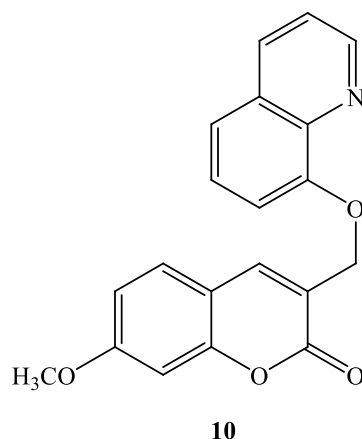
Velika je pozornost posvećena istraživanju fluorescentnih metoda za detekciju metalnih iona, s naglaskom na toksične, kao što su živa i bakar, te za metalne ione koji se nalaze u okolišu i živim organizmima (npr. cink). Mehanizmi prepoznavanja ovih kemijskih senzora uglavnom uključuju fotoinducirani prijenos elektrona (PET) i intramolekularni prijenos naboja (ICT), te prijenos fluorescentne rezonancijske energije (FRET).¹⁰

Prvenstveno je pozornost posvećena metodama detekcije Hg^{2+} iona s obzirom da je živa potencijalno najviše toksičan teški metal i česti zagađivač pa je samim time velika prijetnja okolišu i ljudskom zdravlju.¹⁸ Živa se lako širi zrakom, vodom i tlom, a dolazi iz mnogih izvora kao što su proizvodnja zlata, postrojenja za proizvodnju ugljena, termometri, barometri i svjetiljke sa živom. Trovanje živom i njenim spojevima izaziva negativne promjene u centralnom živčanom sustavu s raznim kognitivnim i motornim poteškoćama.¹⁹ Skupina znanstvenika¹⁸ razvila je 2013. godine kolorimetrijski i fluorescentni senzor za detekciju Hg^{2+} iona temeljen na 7-(dietilamino)-3-(pirimidin-4-il)-2*H*-kromen-2-onu ($c = 2 \times 10^{-5}$ M) prikazanom na Slici 8. Senzor pokazuje veliku osjetljivost i selektivnost, s granicom detekcije 5,9 μM , dok se u emisijskom spektru može detektirati 10 μM . U prisutnosti Hg^{2+} iona dolazi do očima vidljive promjene boje u apsorpciji (iz zelene u crvenu) i emisiji (iz žutozelene u svjetlonarančastu). S obzirom na dobivene rezultate ispitivanja, ista skupina znanstvenika je za praktičnu uporabu razvila kolorimetrijski komplet za analizu s uključenim senzorom za ione žive(II).



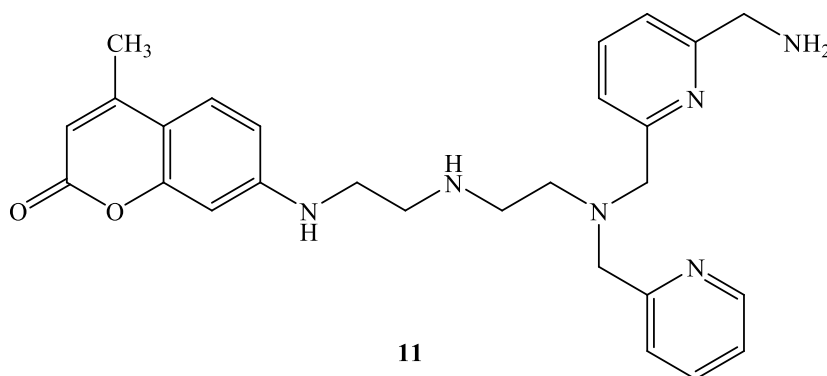
Slika 8. Struktura 7-(dietilamino)-3-(pirimidin-4-il)-2*H*-kromen-2-ona.

Kinolinski derivat kumarina prikazan na Slici 9. je fluorescentni senzor za detekciju paramagnetičnih Co^{2+} i Ni^{2+} iona, koji inače gase fluorescenciju. Kao posljedica koordinacije Co^{2+} i Ni^{2+} iona s navedenim spojem dolazi do povećanja intenziteta fluorescencije, a NMR i IR spektroskopske studije su pokazale da metalni ioni koordiniraju s kinolinskim receptorom, a ne s kumarinskim dijelom molekule, te je pretpostavljeni mehanizam djelovanja senzora fotoinducirani prijenos elektrona, PET. Raspon pH vrijednosti u kojima je provedeno istraživanje je od 3 do 8.²⁰



Slika 9. Struktura kinolinskog derivata kumarina.

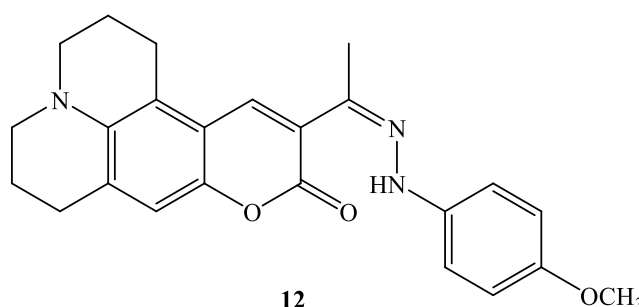
Raciometrički kemosenzor prikazan na Slici 10. koji se sastoji od 7-amino-4-metil-1,2-benzopirona i derivata *N,N,N',N'*-tetrakis(2-piridilmetil) etilendiamina otkriven je kao kemijski senzor za detekciju Cd^{2+} iona. U fiziološkim uvjetima ($\text{pH} = 7,2$) kada je vezan za Cd^{2+} , spoj **11** pokazuje značajan plavi pomak, čime se omogućuje dvostruko ekscitacijsko raciometričko snimanje Cd^{2+} iona, što potencijalno može dati točne kvantitativne podatke o koncentraciji metalnih iona u stanicu. Osim Cd^{2+} za spoj **11** mogu se vezati i prijelazni ioni metala kao što su Cu^{2+} , Zn^{2+} i Hg^{2+} , međutim, bez prisutnosti Cd^{2+} iona dolazi do vrlo malih promjena u fluorescenciji.²¹



Slika 10. Raciometrički kemosenzor za detekciju Cd^{2+} iona.

Derivat kumarina čija je struktura prikazana na Slici 11. je vrlo učinkovit „turn-on“ fluorescentni senzor koji je katalitički hidroliziran sa Cu^{2+} ionima što dovodi do velikog povećanja u intenzitetu fluorescencije. Granica detekcije bakrovih(II) iona za spoj **12** je $8,7 \times 10^{-8}$ M. Osim ispitivanja u prisutnosti Cu^{2+} iona, provedeno je i ispitivanje na utjecaj

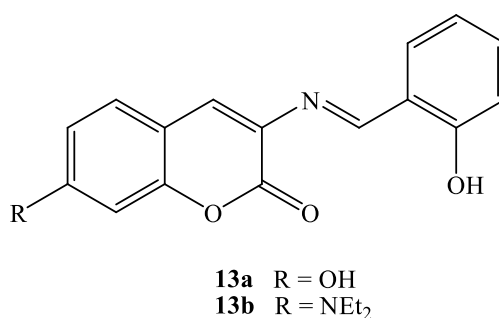
drugih metalnih iona na fluorescenciju kao što su Na^+ , K^+ , Fe^{2+} , Zn^{2+} , Hg^{2+} i Cd^{2+} , no nije zabilježen poseban pomak fluorescencije u prisutnosti tih metalnih iona.²²



Slika 11. Fluorescentni senzor za detekciju Cu^{2+} iona.

Derivat kumarina **13a** (7-hidroksi-3-(2-hidroksibenzilidenamin)-2H-kromen-2-on, Slika 12.) ponaša se kao „turn-on“ fluorescentni kemosenzor za Zn^{2+} ione. Ispitivanja provedena u otopini acetonitrila, u prisutnosti različitih perkloratnih soli, pokazala su povećani intenzitet apsorpcije u prisutnosti Zn^{2+} iona. Osim toga, spoj **13a** može se koristiti i kao kolorimetrijski senzor za cinkove(II) ione, pri čemu dolazi do promjene boje otopine iz bezbojne u žutu.²³

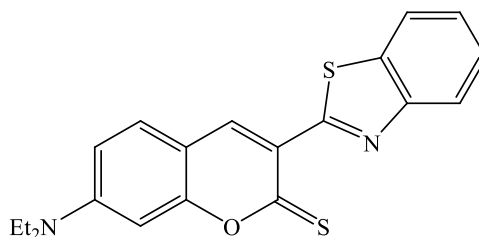
Spoj **13b** (Slika 12.) ne pokazuje nikakve promjene spektra u području valnih duljina od 760-860 nm osim u prisutnosti Zn^{2+} iona. Mjerenja su provedena u acetonitrilu i na sobnoj temperaturi, a kao izvor metalnih iona upotrijebljeni su metalni perklorati. Metalni ioni koji su osim Zn^{2+} iona bili uključeni u istraživanje su Na^+ , K^+ , Ca^{2+} i Mg^{2+} .²⁴



Slika 12. Derivati kumarina kao fluorescentni senzori za detekciju Zn^{2+} iona.

Spoj **14** (Slika 13.) u reakciji s Au^{3+} ionima prelazi u svoj okso analog što za posljedicu ima izražen fluorescentni signal. Selektivno opažanje Au^{3+} moguće je u prisutnosti uobičajenih alkalijskih, zemnoalkalijskih i prijelaznih metala, na kojima je provedeno istraživanje. Granica detekcije u 50%-tnoj vodenoj otopini acetonitrila iznosi $1,1 \times 10^{-7}$ M.

Moguće je i kolorimetrijsko određivanje Au^{3+} , pri čemu u prisutnosti spoja **14** dolazi do promjene boje iz ružičaste u žuto-zelenu.²⁵

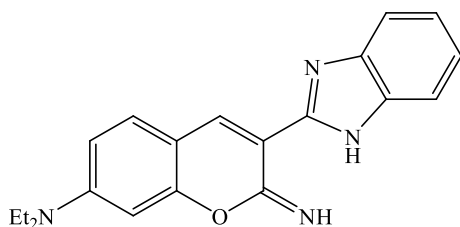


14

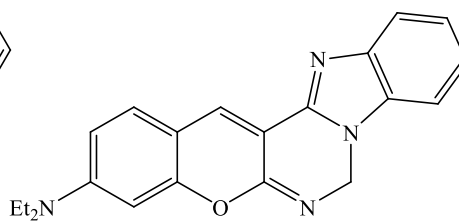
Slika 13. Fluorescentni senzor za određivanje Au^{3+} iona.

2.2.2. Derivati kumarina kao fluorescentni pH senzori

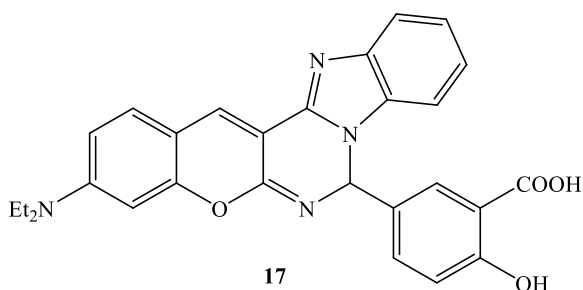
Nekoliko derivata iminokumarina (**15**) **16-18** su sintetizirani kao novi tip fluorescentnih pH senzora, a njihove strukture mogu se vidjeti na Slici 14. Ovi senzori posjeduju odličnu fotostabilnost i kompatibilnost sa svjetlo-emitirajućim diodama. Senzori mogu biti kovalentno imobilizirani na površinu amino-modificiranih polimernih mikrogranula koje su uklopljene u hidrogel matricu.^{10,26}



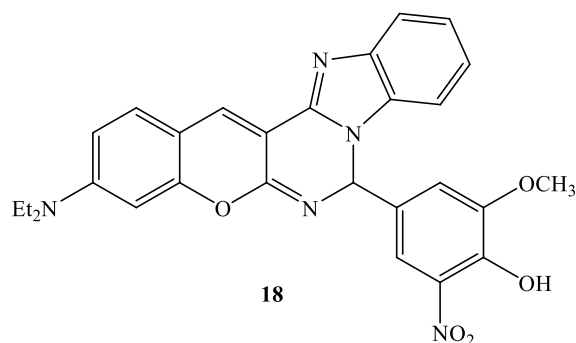
15



16



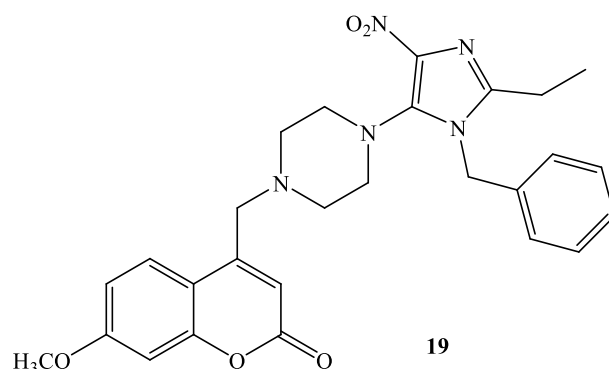
17



18

Slika 14. Derivati iminokumarina korišteni kao pH senzori.

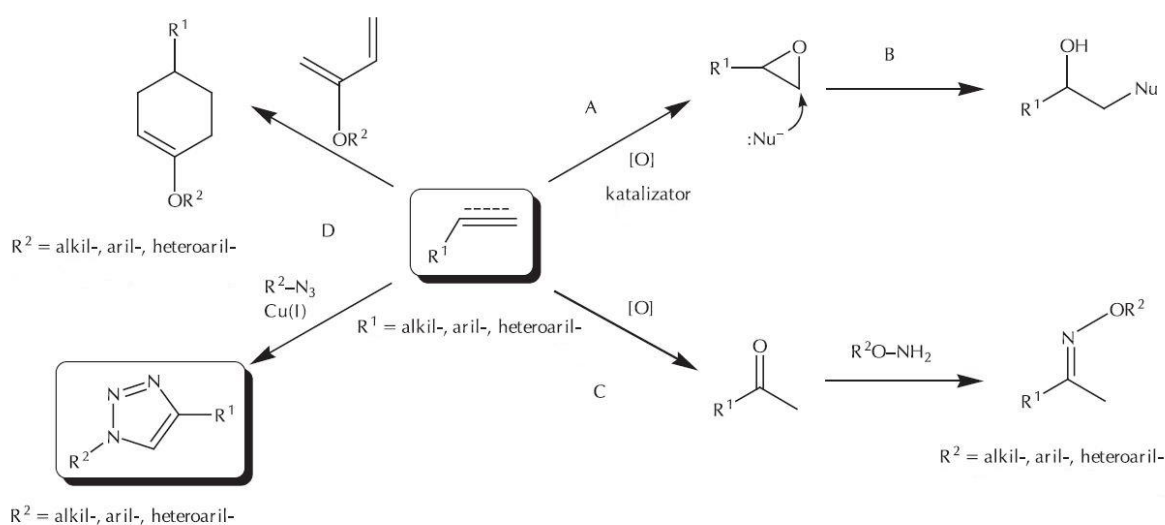
Spoj **19** koji sadrži piperazin i imidazol (Slika 15.), razvijen je kao fluorofor za određivanje vodikovih iona. Pojačanje fluorescencije s povećanjem koncentracije vodikovih iona temelji se na ometanju fotoinduciranog prijenosa elektrona u piperazini aminu i imidazol aminu.^{10,27}



Slika 15. Derivat kumarina korišten kao pH senzor.

2.3. Click-kemija

Pojam *click*-kemije prvi puta se pojavio 2001. godine kada su ga upotrijebili Sharpless i suradnici.²⁸ Radi se o kemijskim reakcijama u kojima brzo i pouzdano dolazi do produkata spajanjem više manjih jedinica. Na Slici 16. dani su primjeri reakcija koje zadovoljavaju uvjete *click*-kemije.

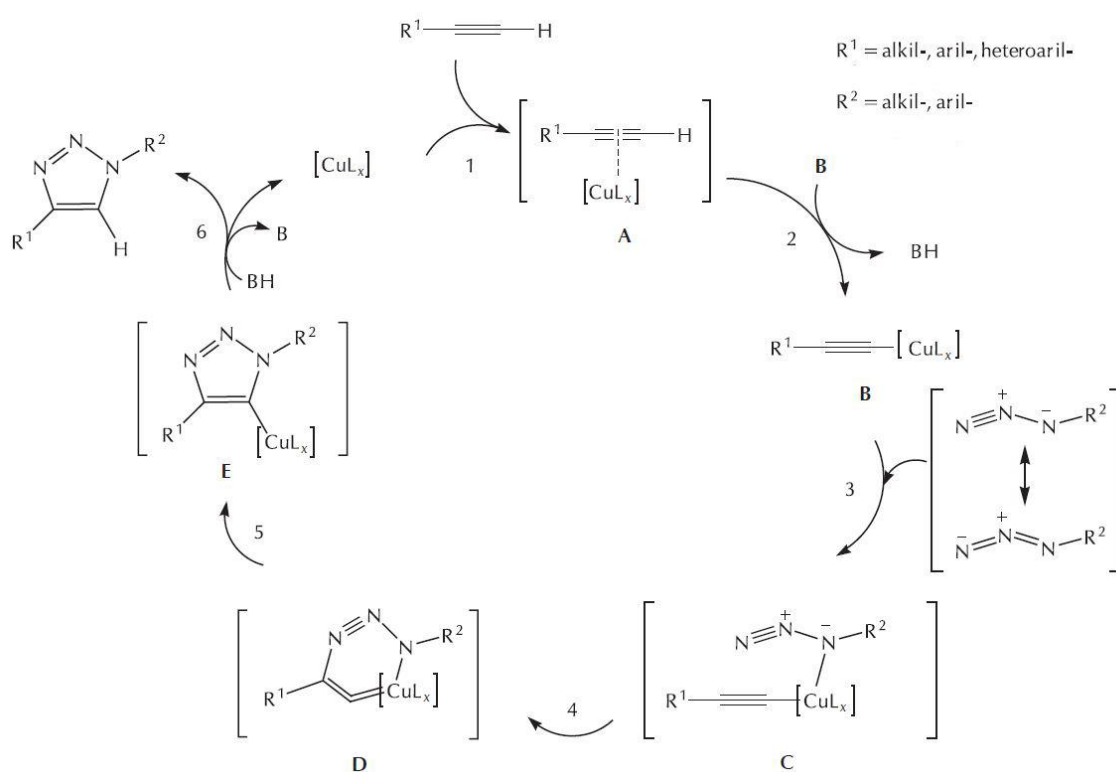


Slika 16. Primjeri reakcija koje zadovoljavaju uvjete *click*-kemije.²⁹

Reakcija A) odnosi se na adiciju na nezasićenu vezu ugljik-ugljik, B) reakciju nukleofilnog otvaranja prstena, C) karbonilnu kemiju nealdolnog tipa, te D) cikloadicijsku reakciju. Najpopularnija i najviše korištena reakcija u *click*-kemiji je Huisgenova 1,3-dipolarna cikloadicija azida i terminalnog alkina, i to posebice Cu(I)-katalizirana azid-alkin 1,3-dipolarna cikloadicija (engl. *Cu(I)-catalyzed alkyne-azide cycloaddition*, CuAAC) za dobivanje derivata 1,2,3-triazola.²⁹

2.3.1. Bakrom(I) katalizirana azid-alkin dipolarna cikloadicija

2002. godine Tornøe i Meldal su prvi puta upotrijebili bakar(I) kao katalizator pri čemu kao produkt selektivno nastaju 1,4-disupstituirani 1,2,3-triazolni derivati, i to do 10^7 puta brže od nekatalizirane reakcije i pri temperaturama od 0-25 °C.³⁰ U mehanizmu CuAAC prikazanom na Slici 17. prikazano je 6 koraka potrebnih za dobivanje 1,4-supstituiranog-1,2,3-triazola.



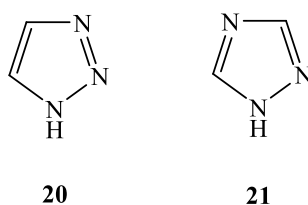
Slika 17. Mehanizam Cu(I)-katalizirane azid-alkinske 1,3-dipolarne cikloadicije.²⁹

[CuL] predstavlja bilo koji bakrov katalizator, koji se u reakciju uvodi izravno ili se može pripremiti metodom *in situ*. Radi li se o polarnim supstratima gdje se upotrebljava vodeni medij i CuSO₄, uz odgovarajuće redukcijsko sredstvo kao što je natrijev askorbat, *in situ* metodom će se generirati potrebni Cu(I). Važno je napomenuti da u CuAAC sintezi mogu sudjelovati isključivo terminalni alkin. Prema tome, u prvom koraku sudjeluje terminalni alkin, Cu⁺ koordinira π-elektrone alkina i nastaje π-kompleks bakra i alkina. U sljedećem koraku dolazi do deprotonacije i nastanka bakrovog acetilida, što je omogućeno koordinacijom Cu⁺ na C-C trostruku vezu (smanjuje se p*K*_a terminalnog protona alkina). U trećem koraku kompleks bakrovog acetilida koordinira azid, te nastaje intermedijar, čijom pregradnjom nastaje šesteročlani prsten. Nakon toga nastaje triazolil koji se protonira, a kao konačni produkti nastaju bakar i 1,4-supstituirani-1,2,3-triazol.²⁹

2.3.2. Triazoli kao funkcionalne jedinice u kemosenzorima

Usporedivši triazolni prsten s drugim aromatskim prstenima koji sadržavaju sve atome ugljika, on sadrži tri atoma dušika, pa može služiti kao ligand za koordinaciju metala ili kao akceptor ili donor vodikove veze. Druga povoljna svojstva su visoka kemijska stabilnost, jak dipolni moment i heteroaromatski karakter. Upravo zato triazoli se mogu vezati sa mnogim biološkim molekulama, te organskim i anorganskim materijalima.³¹

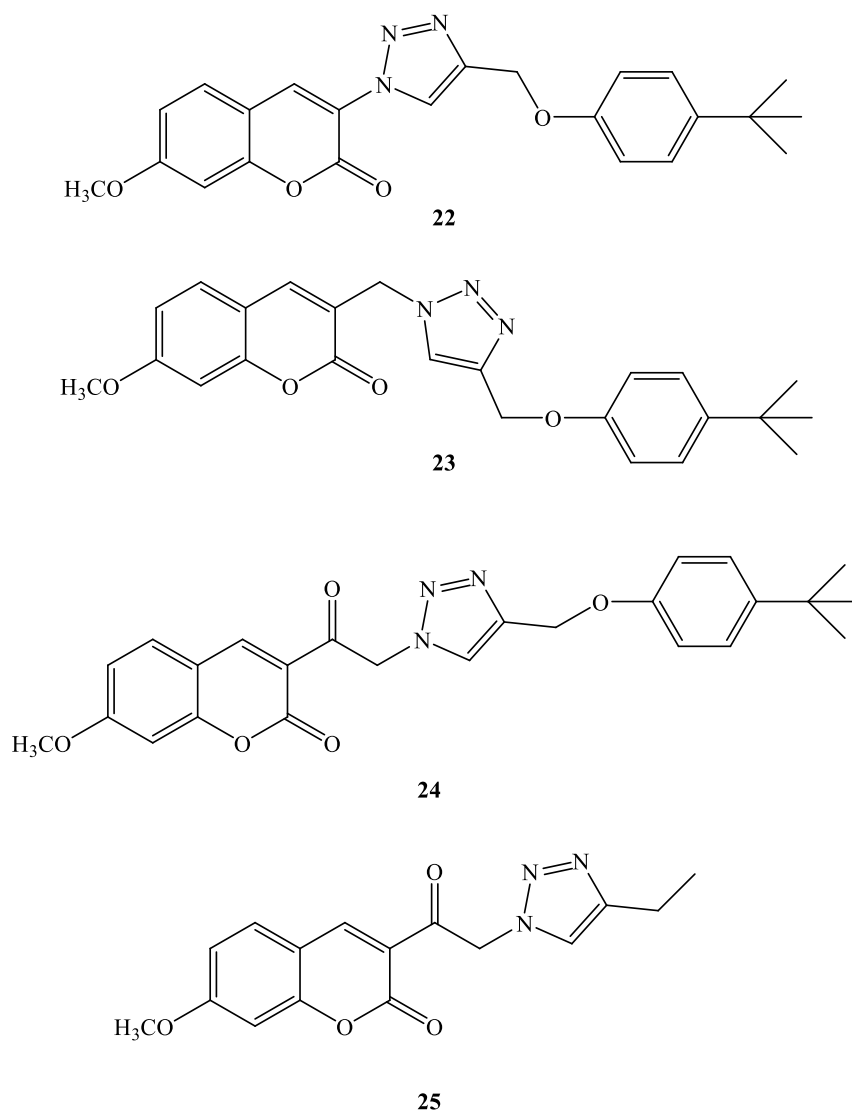
Postoje dva izomerna oblika triazola prikazana na Slici 18., u kojima atomi dušika mogu biti u položajima 1,2,3 ili 1,2,4.³²



Slika 18. 1, 2, 3-triazol **20** i 1, 2, 4-triazol **21**.

Skupina znanstvenika³³ je 2012. godine provela istraživanje na triazolnim derivatima kumarina **22**, **23** i **24** prikazanim na Slici 19. Ispitana je selektivnost spojeva na perkloratne soli različitih metalnih iona (Li⁺, Na⁺, K⁺, Mg²⁺, Ba²⁺, Ca²⁺, Cu²⁺, Hg²⁺, Cr³⁺, Pb²⁺, Ag⁺, Mn²⁺, Zn²⁺, Cd²⁺ i Ni⁺) u smjesi otapala metanol/kloroform (9:1) te je otkriveno da spoj **24** pokazuje veliku selektivnost za Hg²⁺, s granicom detekcije 2,00×10⁻⁷ M. Rezultati ukazuju da acetilna poveznica između 7-metoksikumarina i triazola ima značajnu ulogu u kompleksaciji

spoja **24** sa Hg^{2+} ionima. Spojevi **22** i **23** pokazuju gotovo nikakvu fluorescentnu promjenu u prisutnosti Hg^{2+} . Kasnije je provedeno ispitivanje i na spoju **25**, koji se od spoja **24** razlikuje po tome što je na mjesto 4 triazolne skupine umjesto 4-*tert*-butilfenoksimetila ugrađena benzilna skupina. I ovaj je spoj pokazao veliku selektivnost za Hg^{2+} , s granicom detekcije $3,15 \times 10^{-7}$ M.



Slika 19. Triazolni derivati kumarina.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Opće napomene

Kemijske reakcije provedene su uobičajenim metodama organske sinteze.

Za praćenje tijeka kemijskih reakcija korištena je tankoslojna kromatografija (TLC – *thin layer chromatography*). Pločice 60 F₂₅₄ prevučene slojem silikagela Merck korištene su kao nepokretna faza, a kao eluens je korištena smjesa otapala diklormetan/metanol u omjeru CH₂Cl₂:CH₃OH = 200:1. Za detekciju izoliranih komponenata korištena je UV svjetlost valne duljine 254 i 365 nm.

Kolonska kromatografija je provedena u staklenim kolonama punjenim silikagelom (Fluka, 0,063-0,2 mm) pod utjecajem gravitacije, a kao eluens je korištena smjesa otapala diklormetan/metanol (CH₂Cl₂/CH₃OH) u različitim omjerima.

¹H NMR spektri snimljeni su na spektrometru Bruker AV-600 na 600 MHz. Svi NMR spektri snimani su u DMSO-*d*₆ kao otapalu pri 298 K, koristeći tetrametilsilan kao interni standard. Kemijski pomaci (δ) izraženi su u ppm (*parts per million*) vrijednostima u odnosu prema signalu DMSO: δ 2,50 ppm za 1H, a konstante sprege (*J*) u Hz.

3.2. Materijali

Za pripravu spojeva i mjernih otopina korištene su sljedeće kemikalije:

- 7-amino-4-metil-2*H*-kromen-2-on, *tert*-butanol, bakrov(II) sulfat, natrijev askorbat, *p*-toluensulfonska kiselina, *Acros Organics*;
- bezvodni natrijev nitrit, 4-etinil-*N,N*-dimetilanilin, TBTA, *Sigma-Aldrich*;
- natrijev azid, *Fischer Scientific*;
- limunska kiselina (monohidrat), natrijev hidroksid, *Kemika*;
- klorovodična kiselina, diklormetan, metanol, *Carlo Erba Reagents*;
- borna kiselina, fosforna kiselina, *Pharma VVB, Laborchemie Apolda*;
- etanol (apsolutni), aceton, dimetil sulfoksid (DMSO), *Gram mol*;
- deionizirana voda
- kositar (II) klorid dihidrat, litijev klorid, željezov (III) klorid heksahidrat, aluminijev (III) klorid heksahidrat, srebrov nitrat, olovo (II) klorid, kobaltov (II) klorid dihidrat, *Kemika*;
- kalijev klorid, *VWR Chemicals*;
- natrijev klorid, *Alkaloid AD*;

- živin (II) klorid, *Gram mol*;
- cinkov klorid, *Merck, Germany*;
- bakrov (II) klorid dihidrat, *Laboratorija za proizvodstvo na hemikali i foto mat., Skopje, Jugoslavija*.

3.3. Instrumenti

Pri izvedbi eksperimenata korišteni su sljedeći instrumenti (Slika 20.):

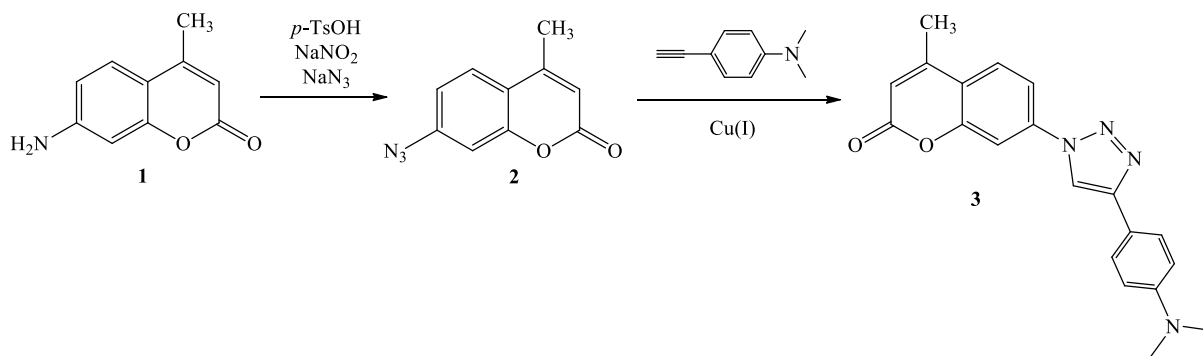
- pH – metar, MA 5740, *Iskra*;
- UV – vidljivi spektrofotometar, *Cary 100 Scan*;
- UV – vidljivi spektrofluorimetar, *Cary Eclipse*.



Slika 20. S lijeva na desno: pH – metar, UV – vidljivi spektrofotometar, UV – vidljivi spektrofluorimetar.

3.4. Sinteza spojeva

Sinteza ciljanog produkta provedena je u dva stupnja. U prvom stupnju pripravljen je 7-azido-4-metil-2*H*-kromen-2-on. Dobiveni terminalni azid podvrgnut je *click*-reakciji s 4-etinil-*N,N*-dimetilanilinom pri čemu je kao produkt dobiven željeni 1,2,3-triazolni derivat kumarina. Shema provedenih reakcija dana je na Slici 21.



Slika 21. Ukupna shema dobivanja spoja 3.

3.4.1. Sinteza 7-azido-4-metil-2H-kromen-2-ona

100 mg (0,57 mmola) 7-amino-4-metil-2H-kromen-2-ona **1** otopljeno je u *p*-toluensulfonskoj kiselini, *p*-TsOH (977,4 mg; 5,14 mmola u 5,14 mL vode). Zatim je postepeno dodan bezvodni natrijev nitrit, NaNO₂ (354,6 mg, 5,14 mmola). Reakcijska smjesa je miješana 45 minuta na sobnoj temperaturi pri čemu se razvijaju oksidi što pokazuje pojava prozirno žute boje. Nakon 45 minuta dodan je natrijev azid, NaN₃ (59,4 mg, 0,91 mmol) pri čemu je došlo do pojave pjene koja ukazuje na razvijanje dušika, N₂, a tijekom reakcije praćen je tankoslojnom kromatografijom. Nastali talog se profiltrira i dobije se narančasti praškasti produkt.^{34,35}

¹H NMR (DMSO-*d*₆, 600 MHz): δ/ppm = 7,80 (d, 1H, *J* = 8,47 Hz, H_{arom.}), 7,18 (d, 1H, *J* = 1,68 Hz, H_{arom.}), 7,15 (dd, 1H, *J*₁ = 1,71 Hz, *J*₂ = 8,49 Hz, H_{arom.}), 6,36 (s, 1H, H_{kumarin}), 2,44 (s, 3H, H_{metil}).

3.4.2. Sinteza 7-(4-(4-(dimetilaminofenil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)-4-metil-2H-kromen-2-ona

Spoj **2** (7-azido-4-metil-2H-kromen-2-on), dobiven ranije opisanim reakcijama, otopi se u smjesi metanol/*tert*-butanol/voda (1:1:2) i doda se 1 eq 4-etinil-*N,N*-dimetilaminilina, 0,2 eq CuSO₄ × 5H₂O, 0,2 eq natrijeva askorbata i 0,05 eq TBTA (tris[(1-benzil-1H-1,2,3-triazol-4-il)metil]amina). Reakcijska smjesa miješana je na sobnoj temperaturi 48 h u mraku. Tijek reakcije praćen je tankoslojnom kromatografijom. Nakon završetka reakcije, reakcijskoj smjesi dodan je CH₂Cl₂ i vodena faza ekstrahira se 3 × s CH₂Cl₂. Organski sloj suši se 1h iznad bezvodnog CaCl₂, profiltrira i upari do suha. Nastali produkt pročisti se kolonskom kromatografijom uz eluens CH₂Cl₂:CH₃OH.³⁶

^1H NMR (DMSO- d_6 , 600 MHz): $\delta/\text{ppm} = 9,26$ (s, 1H, $\text{H}_{\text{triazol}}$), 8,02 (s, 3H, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 7,76 (d, 2H, $J = 8,46$ Hz, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 6,84 (d, 2H, $J = 8,7$ Hz, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 6,49 (s, 1H, $\text{H}_{\text{kumarin}}$), 3,01 (s, 3H, $\text{H}_{\text{alif.}}$), 2,96 (s, 6 H, $\text{H}_{\text{alif.}}$).

3.5. Priprava otopina

Pripravljene su sljedeće otopine:

- Otopine univerzalnog pufera u području vrijednosti pH od 1 do 13
- 0,1 M otopina klorovodične kiseline (pH = 1)
- 0,1 M otopina natrijeva hidroksida (pH = 13)
- Matična (*stock*) otopina spoja
- Etanolne otopine u području vrijednosti pH od 1,010 do 12,714
- Matične (*stock*) otopine metala

3.5.1. Priprava otopina univerzalnog pufera različitih vrijednosti pH

Otopine univerzalnog pufera pripravljene su miješanjem određenih volumena otopine A i 0,1 M otopine klorovodične kiseline. 0,1 M HCl pripravljena je razrijeđivanjem koncentrirane HCl ($\rho = 1,15$ kg/L, $w = 0,30$). Otopina A pripravljena je miješanjem 100 mL 0,33 M limunske kiseline (6,93 g limunske kiseline u 100 mL deionizirane vode), 100 mL 0,33 M fosforne kiseline (85%, 2,23 mL u 100 mL), 343 mL 1 M otopine natrijeva hidroksida (20 g u 0,5 L) i 3,54 g borne kiseline. Otopina A i 0,1 M klorovodična kiselina B miješaju se u odmjerne tikvici prema jednadžbi (2):

$$20 \text{ mL A} + x \text{ mL B (u 100 mL)} \quad (2)$$

gdje je x (B) volumen klorovodične kiseline, mL.³⁷

Volumeni otopine B za pripravu univerzalnih pufera pH = 2–12 prikazani su u Tablici 1.

Tablica 1. Volumen 0,1 M HCl potreban za pripravu univerzalnih pufera.

pH	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
$V(B) / \text{mL}$	74,4	56,9	50,7	45,4	39,7	32,9	28,1	24,0	18,1	14,7	1,3

3.5.2. Priprava matične (*stock*) otopine spoja

Matična otopina spoja pripravljena je otapanjem 1 mg spoja u 3 mL DMSO zbog slabe topljivosti spoja u etanolu i prema formuli (3) je izračunata koncentracija spoja koja iznosi $1,25 \times 10^{-3}$ M.

$$c = \frac{n}{V} = \frac{\frac{m}{M}}{V} = \frac{m}{M \times V} \quad (3)$$

gdje je: c koncentracija spoja, mol dm^{-3} , n množina spoja, mol, V volumen DMSO, dm^3 , m masa spoja, g, M molarna masa spoja, g mol^{-1} .

3.5.3. Etanolne otopine različitih vrijednosti pH

Etanolne otopine različitih vrijednosti pH (između 1 i 13) pripravljene su dodavanjem određene, vrlo male količine 0,1 M i 1 M klorovodične kiseline za niže vrijednosti pH i 0,1 M i 1 M natrijeva hidroksida za više vrijednosti pH. Vrijednosti pH određivane su pH – metrom.

3.5.4. Matične (*stock*) otopine metala

Otopine metalnih soli PbCl_2 , $\text{SnCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$, KCl , NaCl , LiCl , ZnCl_2 , $\text{CuCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$, HgCl_2 , $\text{FeCl}_3 \times 6 \text{H}_2\text{O}$, $\text{AlCl}_3 \times 6 \text{H}_2\text{O}$, AgNO_3 , $\text{CoCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ pripravljene su u etanolu. Otapanjem različitih odvaga krutina soli između 1 mg i 15 mg u etanolu dobivene su otopine metalnih soli koncentracija između $5,16 \times 10^{-3}$ M i $1,13 \times 10^{-1}$ M čijim su daljnjim razrjeđenjem pripravljene radne otopine koncentracije $c = 1 \times 10^{-5}$ M.

3.6. Mjerenja

Spektroskopska karakterizacija dobivenog spoja provedena je UV-vidljivom apsorpcijskom i fluorescencijskom spektrofotometrijom. Snimljeni su apsorpcijski i emisijski spektri spoja u univerzalnim puferima i etanolnim otopinama različitih vrijednosti pH, te u etanolu u prisutnosti metalnih kationa.

Svi spektri su snimljeni pri koncentraciji spoja $c = 1 \times 10^{-5}$ M dobivenoj razrjeđenjem matične otopine. Mjerne otopine pripravljene su u kvarcnoj kivetu optičkog puta 10 mm. Prije svakog snimanja spektra, snimljena je bazna linija čistog otapala.

Pri snimanju emisijskih spektara, ovisno o intenzitetu fluorescencije, potrebno je odabrati određenu širinu otvora (engl. *slit width*) koja određuje rezoluciju spektra, odnosno veličinu ulaznog i izlaznog otvora, koji se označavaju s dva broja izražena u nanometrima. Slitovi korišteni pri snimanju emisijskih spektara razlikuju se ovisno o utjecaju koji se pratio.

3.6.1. Utjecaj promjene vrijednosti pH

U ispitivanju kiselo-baznih svojstava dobivenog spoja korištene su otopine univerzalnog pufera u području vrijednosti pH od 1 do 13, te etanolne otopine u području vrijednosti pH od 1,010 do 12,714. Mjerne otopine su pripravljene dodatkom alikvota spoja u 3 mL pufera ili etanolne otopine određene pH vrijednosti. Apsorpcijski i emisijski spektri na valnim duljinama od 200-600 nm snimljeni su nakon 2 minute miješanja mjerne otopine. Emisijski spektri snimljeni su pri valnoj duljini maksimuma apsorpcije, koja je očitana iz ranije snimljenih apsorpcijskih spektara. Kod snimanja emisijskih spektara u otopinama univerzalnih pufera korišteni su slitovi 10-20, a kod snimanja u etanolnim otopinama korišteni su slitovi 5-10.

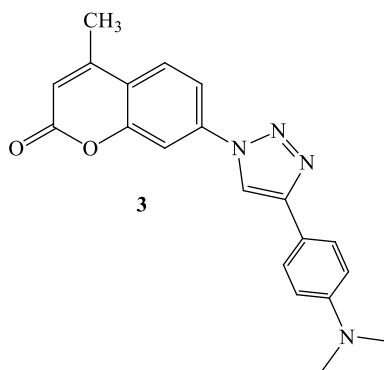
3.6.2. Utjecaj prisutnosti različitih metalnih iona

Ispitivanje utjecaja različitih metalnih iona u interakciji s dobivenim spojem provedeno je s otopinama metalnih soli aluminijske, bakra, cinka, kalija, kobalta, kositra, litija, natrija, olova, srebra, željeza i žive. U kvarcnu kivetu, s 3 mL čistog etanola, dodavan je alikvot matične otopine dobivenog spoja, te određeni volumen radne otopine različitih metalnih soli. Apsorpcijski i emisijski spektri na valnim duljinama od 200-600 nm snimljeni su nakon 2 minute miješanja mjerne otopine. Valna duljina pobude za emisijske spektre bila je valna duljina maksimuma apsorpcije. Slitovi korišteni pri snimanju emisijskih spektara su 10-20.

4. REZULTATI I RASPRAVA

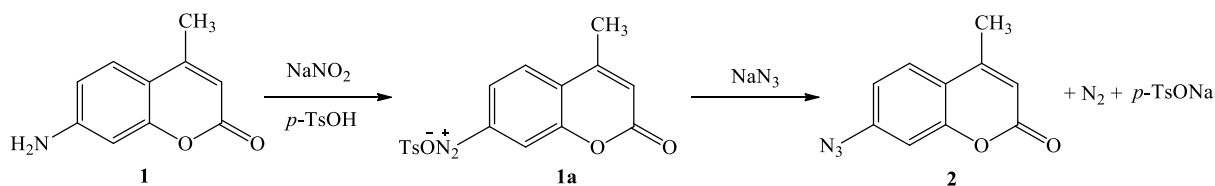
4.1. Sinteza spoja

Ciljani spoj 7-(4-(4-(dimetilaminofenil)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)-4-metil-2*H*-kromen-2-on uspješno je sintetiziran reakcijom klasične organske sinteze i *click*-reakcijom alkina i azida u dva stupnja. Njegova struktura prikazana je na Slici 22.



Slika 22. Struktura 7-(4-(4-(dimetilaminofenil)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)-4-metil-2*H*-kromen-2-ona **3**.

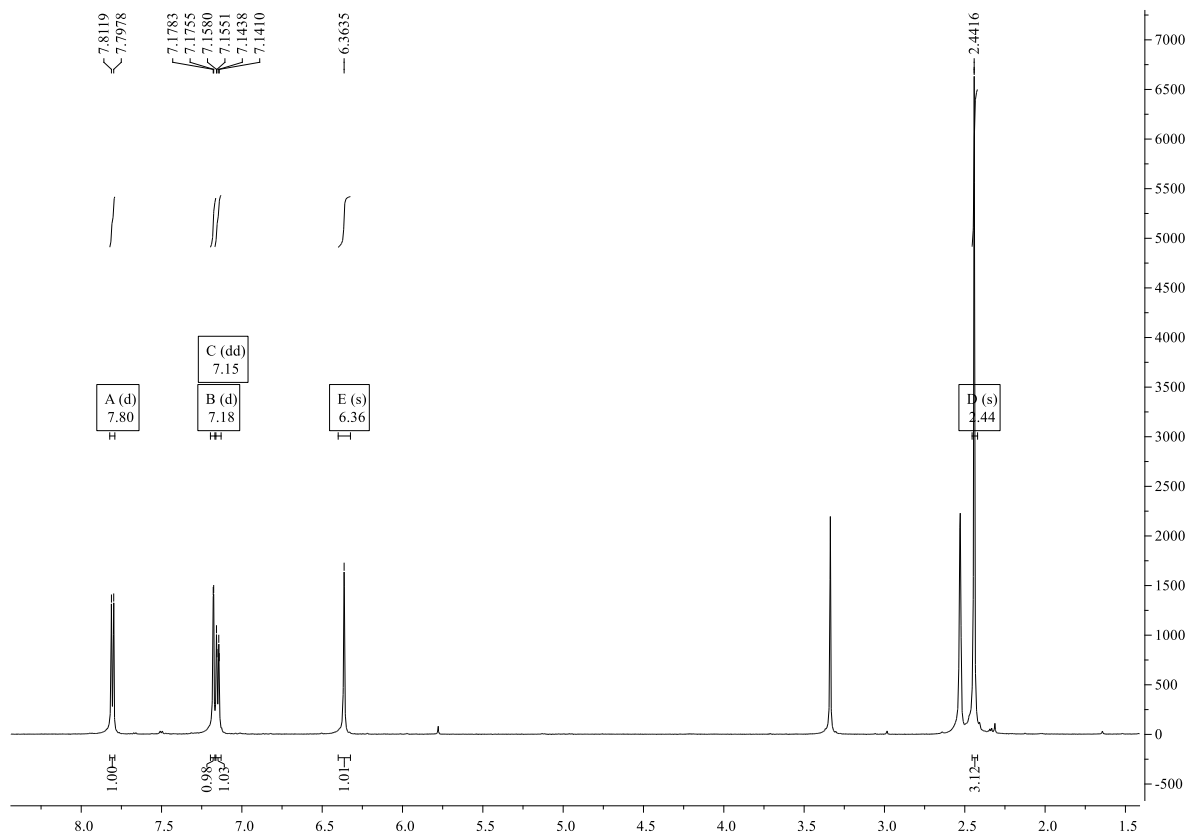
Početni spoj za sintezu 1,2,3-triazolnog derivata je derivat kumarina, 7-amino-4-metil-2*H*-kromen-2-on **1**. U prvom stupnju, amino skupina početnog spoja prevedena je u azidnu skupinu reakcijom diazotacije, prikazanom na Slici 23. U reakciji 7-amino-4-metil-2*H*-kromen-2-ona s natrijevim nitritom u vodenoj otopini *p*-toluensulfonske kiseline nastaje 4-metil-2*H*-kromen-2-on diazonij tosilat **1a**. Reakcijom diazonijeve soli **1a** i natrijeva azida dolazi do nukleofilne supstitucije i nastaje 7-azido-4-metil-2*H*-kromen-2-on **2**.^{34,35}



Slika 23. Reakcija dobivanja 7-azido-4-metil-2*H*-kromen-2-ona.

Za identifikaciju pripremljenih spojeva snimljeni su ¹H NMR spektri. Struktura spojeva određena je na temelju kemijskih pomaka, veličine signala i multipliciteta spin-spin sprega između jezgara H-H.

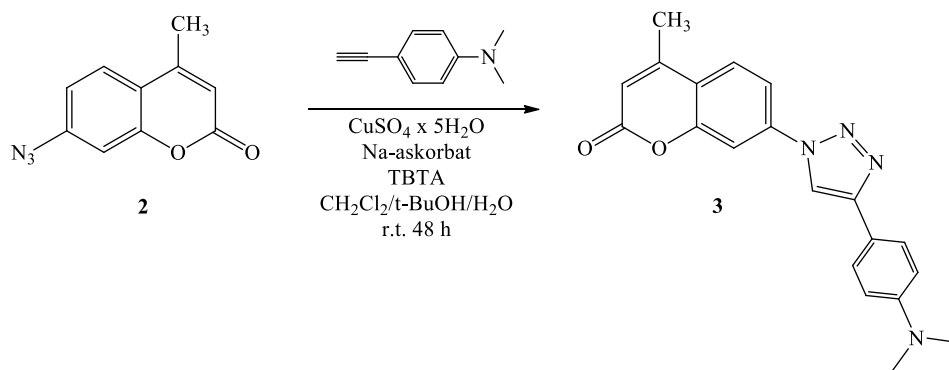
Na Slici 24. prikazan je ^1H NMR spektar sintetiziranog azido-derivata kumarina **2**.



Slika 24. NMR spektar azida.

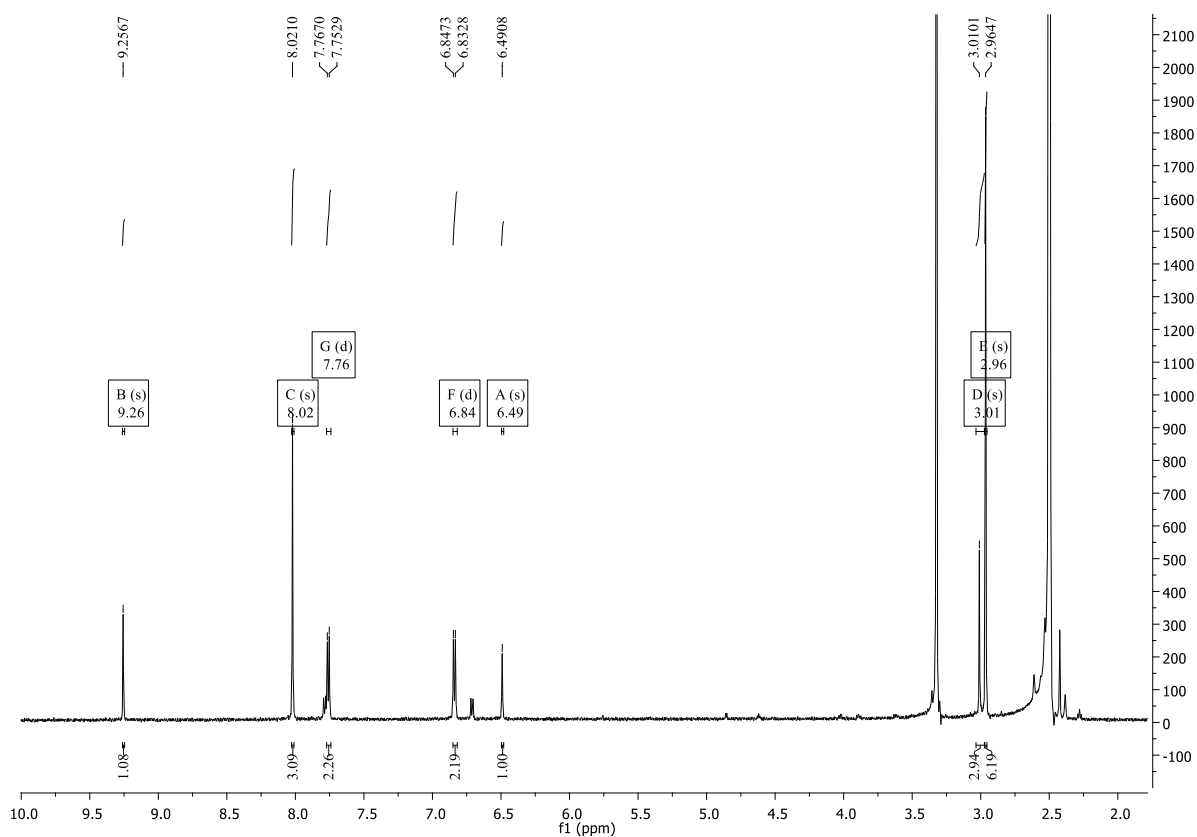
Na ^1H NMR spektru spoja **2** vidljivi su odgovarajući signali triju aromatskih protona na 7,80, 7,18 i 7,15 ppm, karakterističan signal protona kumarina na 6,36 ppm, te signal na 2,44 ppm koji odgovara trima protonima metilne skupine.

U drugom stupnju dolazi do *click*-reakcije azida **2** i 4-etinil-*N,N*-dimetilanilina, što je prikazano na Slici 25. Za dobivanje isključivo 1,4-disupstituiranog 1,2,3-triazola potreban je bakrov(I) ion kao katalizator reakcije. U tu svrhu, korišten je bakrov(II) sulfat kojeg reducira natrijev askorbat *in situ* do bakrov(I) iona. Također, dodan je reagens TBTA (tris[(1-benzil-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)metil]amin) koji služi kao promotor katalize, odnosno, ima ulogu liganda za dobivene bakrove(I) ione.³⁶



Slika 25. Reakcija dobivanja spoja 3.

Reakcijom je dobiven željeni produkt: 7-(4-(4-(dimetilaminofenil)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)-4-metil-2*H*-kromen-2-on **3** u iskorištenju 13,19 %, čija je struktura potvrđena ¹H NMR spektroskopijom (Slika 26).



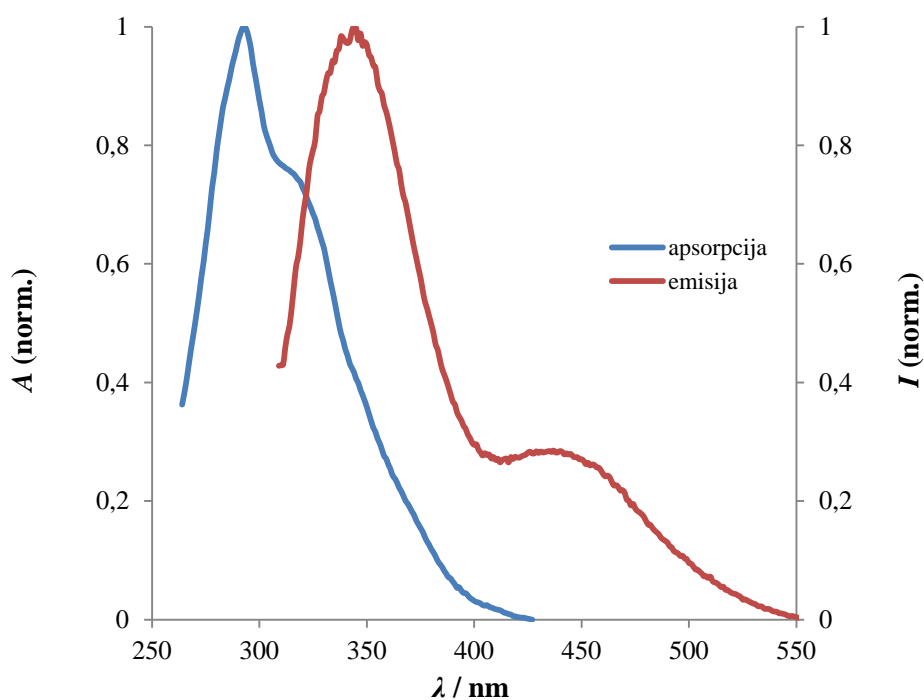
Slika 26. NMR spektar produkta 3.

Na ¹H NMR spektru spoja **3** vidljiv je signal na 9,26 ppm koji odgovara protonu triazola, na 8,02 ppm nalazi se signal za 3 aromatska protona, na 7,76 i 6,84 ppm su dva signala za 4 aromatska protona, karakterističan signal protona kumarina nalazi se na 6,49

ppm, na 3,01 ppm vidljiv je signal triju protona metilne skupine vezane za kumarinski prsten, te na 2,96 ppm signal dviju metilnih skupina vezanih za dušik.

4.2. Spektrofotometrijska karakterizacija ispitivanih spojeva u otopini

4.2.1. Fotofizička karakterizacija ispitivanih spojeva



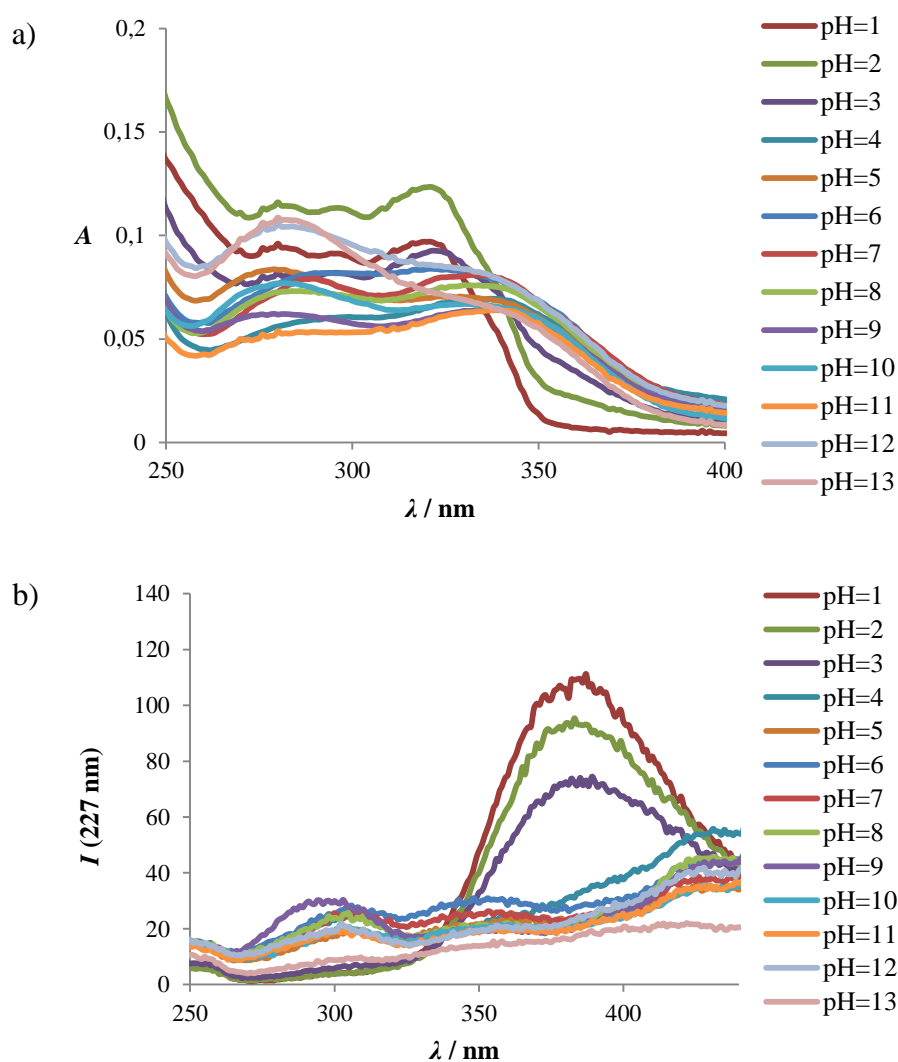
Slika 27. Normalizirani spektar spoja **3** u etanolu.

Snimljeni su apsorpcijski i emisijski spektri spoja **3** u etanolu, a radi lakše usporedbe prikazani su kao normalizirani spektri (Slika 27.). Mjerenja su provedena u etanolu, uočen je maksimum apsorpcije na 293 nm, te da spoj fluorescira na 344 nm. Razlika između valne duljine apsorpcije i emisije definira se kao Stokesov pomak, koji iznosi 51 nm. Prema literaturi, pomak od 57 nm je dovoljan za potencijalnu senzorsku upotrebu.³⁸

4.2.2. Utjecaj promjene vrijednosti pH

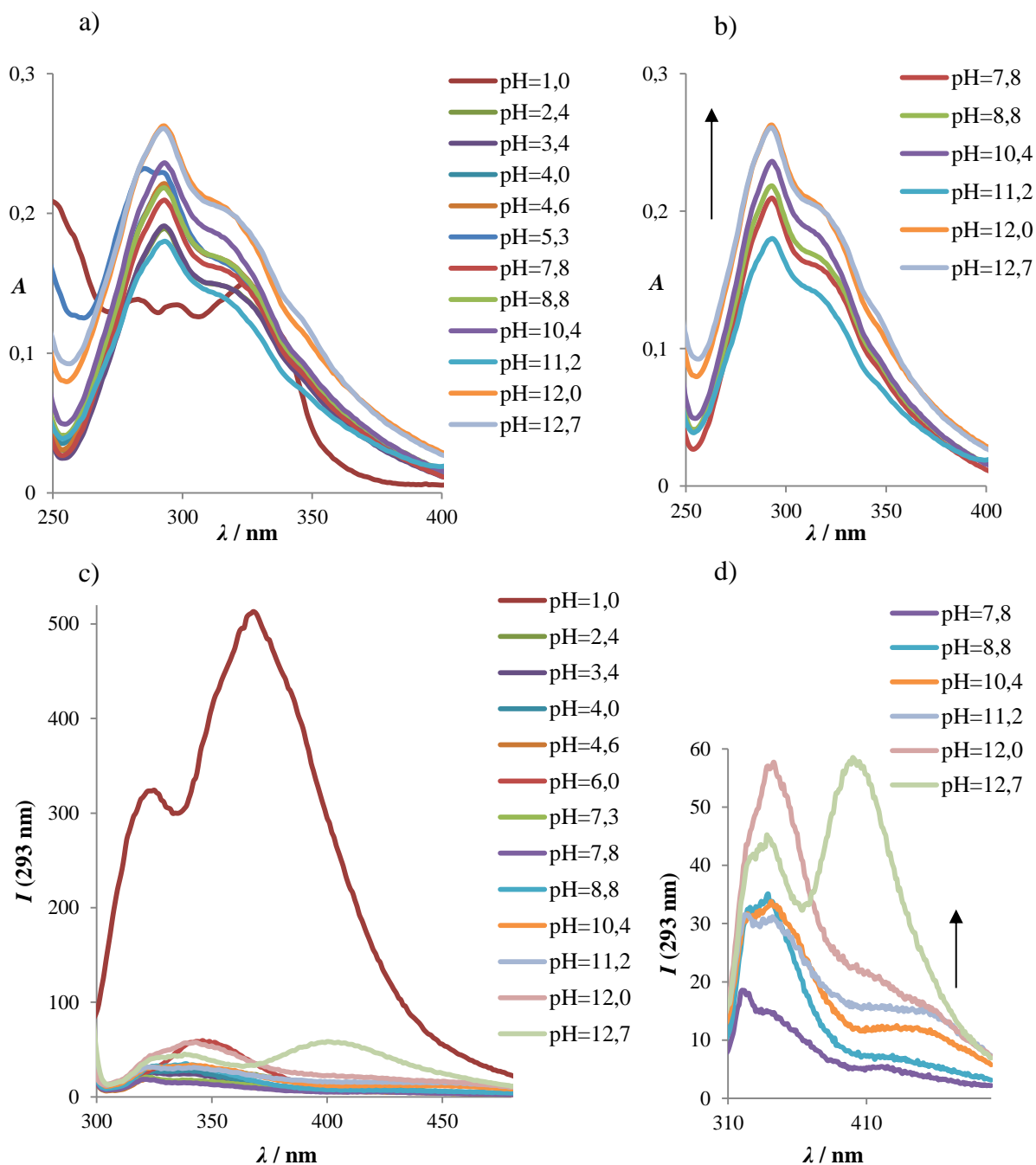
Promjena spektrofotometrijskih svojstava spoja u ovisnosti o pH otopine je ključno svojstvo optičkih pH senzora. U tu svrhu ispitan je utjecaj promjene pH otopine na svojstva spoja **3** u otopinama univerzalnih pufera i u etanolnim otopinama različitih pH vrijednosti, u kojima je pH podešavana dodatkom HCl, odnosno NaOH. U strukturi spoja **3** prisutna je elektron donorska *N,N*-dimetilamino skupina. Slobodni elektronski par na dušiku sudjeluje direktno u π vezi čime doprinosi konjugiranosti spoja, te na tom mjestu u molekuli omogućava protoniranje što može uzrokovati značajne spektralne promjene.

Na Slici 28. prikazani su apsorpcijski i emisijski spektri spoja **3** u univerzalnim puferima u rasponu pH vrijednosti od 1–13.



Slika 28. a) Apsorpcijski i b) emisijski spektar spoja **3** u univerzalnim puferima različitih vrijednosti pH (valna duljina pobude je 227 nm).

U apsorpcijskom spektru spoja **3** vidljivi su maksimumi apsorpcije na 320 nm pri nižim pH vrijednostima, dok se povećanjem pH javlja novi maksimum na 280 nm. U emisijskom spektru vidi se veliko povećanje intenziteta fluorescencije (hiperkromni efekt) u izrazito kiselim otopinama pH vrijednosti 1–3. Na Slici 29. prikazana je ovisnost spektrofotometrijskih svojstava spoja **3** u etanolnim otopinama različitih pH vrijednosti.



Slika 29. Apсорpcijski spektri spoja **3** u etanolnim otopinama različitih pH vrijednosti a) u rasponu pH 1–12,7, b) u rasponu pH 7,8–12,7. Fluorescencijski spektri spoja **3** u rasponu pH c) 1–12,7, d) 7,8–12,7 (valna duljina pobude je 293 nm).

U apsorpcijskom spektru vidi se maksimum apsorpcije na 293 nm, s iznimkom kod pH 1 gdje se vide tri maksimuma apsorpcije na 280, 298 i 327 nm, što može biti posljedica potencijalnog onečišćenja ispitivanog uzorka ili neobično ponašanje spoja **3** u iznimno kiseloj otopini. Kako bi se sa točnošću odredilo o čemu se radi, potrebno je ponoviti ispitivanja nekoliko puta dok se ne dođe do određene srednje vrijednosti. Može se primijetiti da porastom pH vrijednosti (pH > 7,8) dolazi do povećanja apsorpcije, odnosno do hiperkromnog efekta.

U emisijskom spektru dolazi do velikog povećanja intenziteta fluorescencije u otopini pH vrijednosti 1, te se primjećuje ponovni trend povećanja intenziteta fluorescencije s povećanjem pH vrijednosti otopine. Emisijski maksimum javlja se pri 341 nm, no, u izrazito lužnatoj otopini, pri pH 12,7, javlja se nova emisijska vrpca na 401 nm.

Parametri koji opisuju spektrofotometrijska svojstva spoja ovisno o pH prikazani su u Tablici 2.

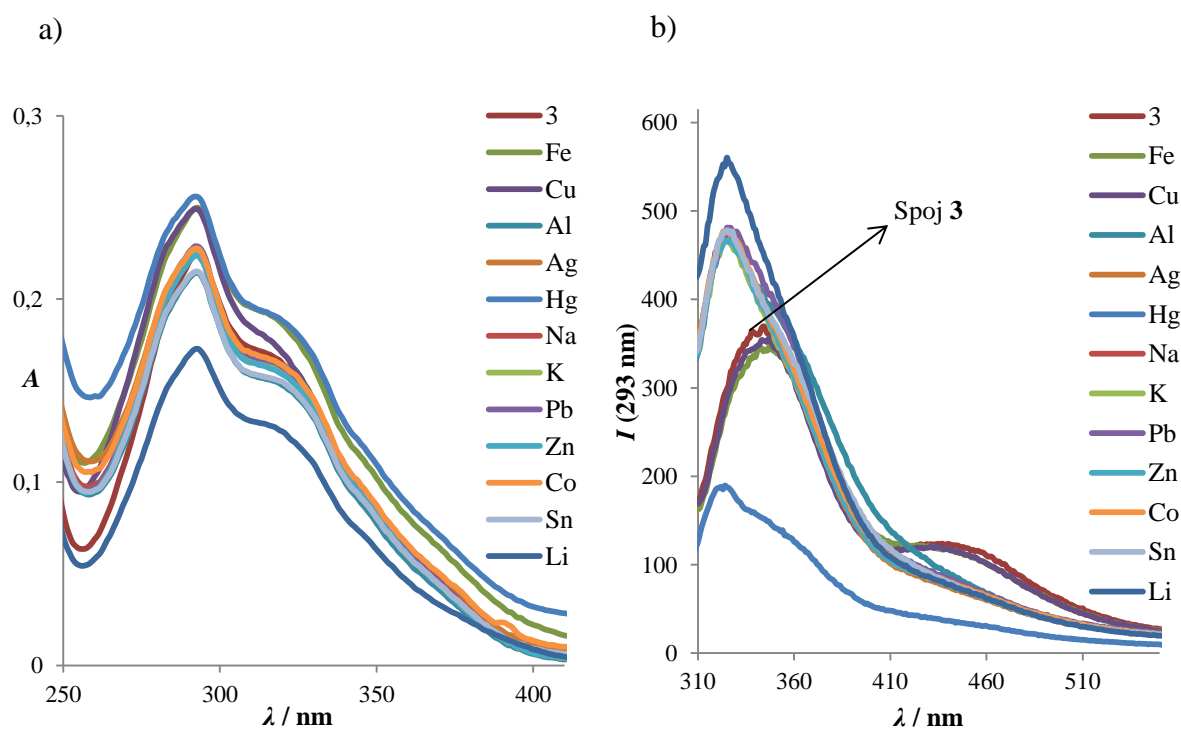
Tablica 2. Valna duljina maksimuma apsorpcije, molarni apsorpcijski koeficijent, Stokesov pomak, valna duljina maksimuma emisije, intenzitet fluorescencije spoja **3** u kiselom, neutralnom i lužnatom području pH vrijednosti.

		$\lambda_{max.aps.} / \text{nm}$	$\epsilon / \text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$	Stokesov pomak / nm	$\lambda_{max.emiss.} / \text{nm}$	Intenzitet fluorescencije
Otopine univerzalnog pufera	pH = 1	280	9400	102	382	109
		322	9500			
	pH = 7	288	7900	138	305	25
334		8000	426		37	
	pH = 13	280	10700	-	-	-
Etanolne otopine	pH = 1	280	14200	85	325	315
		298	13400		365	506
		327	15300			
	pH = 7,8	293	21400	22	315	20
	pH = 12,7	293	25800	103	332	42
				396	57	

4.2.3. Utjecaj prisutnosti metalnih iona

Kompleksiranjem metala nastaju kelati, odnosno kelatni kompleksi u kojima se ligand na dva ili više mjesta veže na centralni metalni ion. Ovo svojstvo dovodi do povećanja ili smanjenja fluorescencije. Kumarini pokazuju intenzivnu fluorescenciju zbog svoje strukture u kojoj je izbjegnut *trans-cis* prijelaz dvostruke veze pod utjecajem UV zračenja. Ta se fluorescencija smanjuje ili pojačava ovisno o supstituciji unutar derivata kumarina. Kada se na molekulu kumarina poveže triazolni prsten, dobiva se spoj koji zbog triazola može služiti kao ligand za koordinaciju metala ili kao akceptor ili donor vodikove veze.

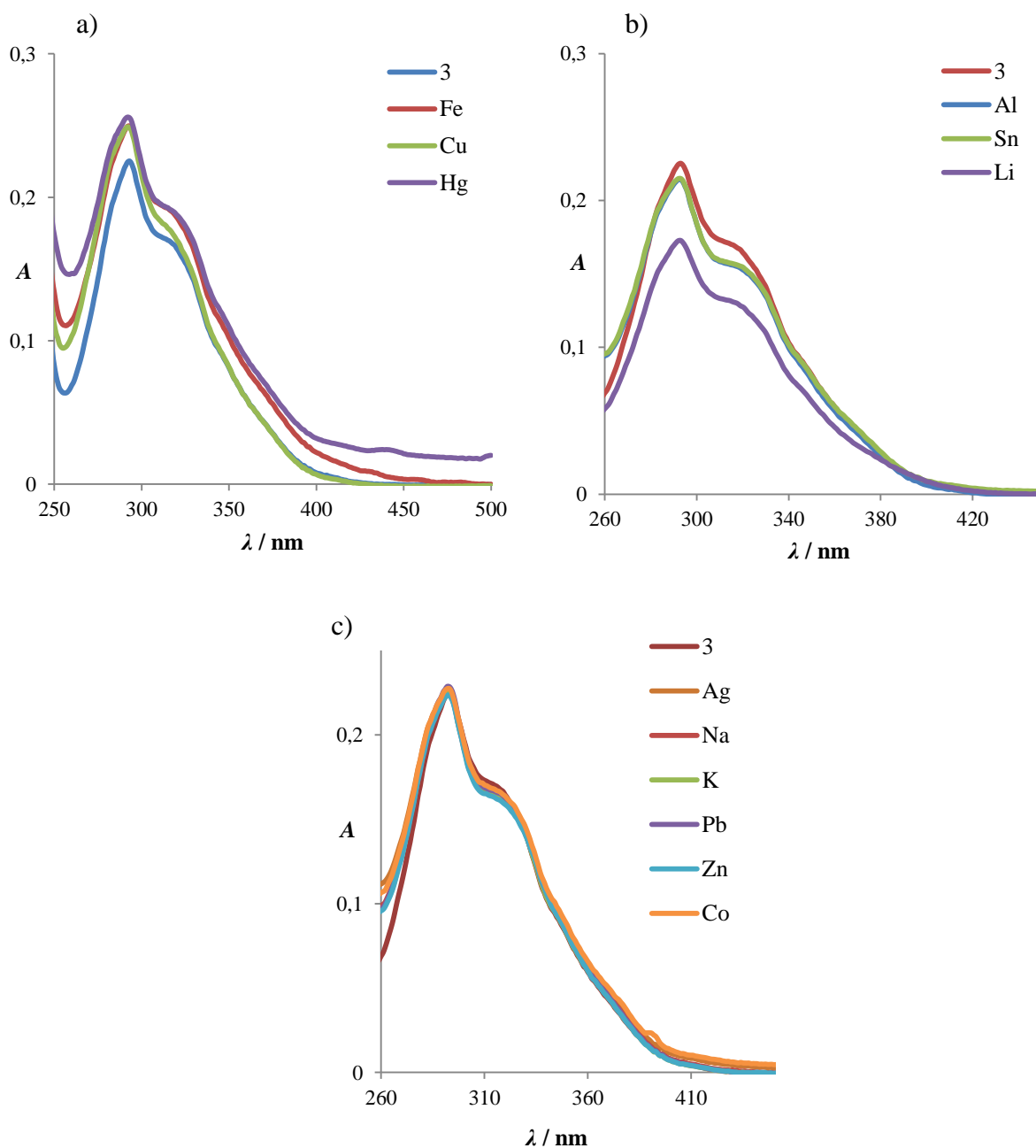
Da bi se ispitala potencijalna primjena novo sintetiziranog spoja kao senzora za metalne ione, provedena su preliminarna ispitivanja promjene spektrofotometrijskih svojstava spoja **3** u etanolu dodatkom različitih metalnih soli u omjeru 1:1. Kod većine metalnih iona uočena je promjena u apsorpcijskom i emisijskom spektru što je prikazano na Slici 30.



Slika 30. Apsorpcijski (a) i emisijski (b) spektra spoja **3** u otopinama različitih metalnih soli.

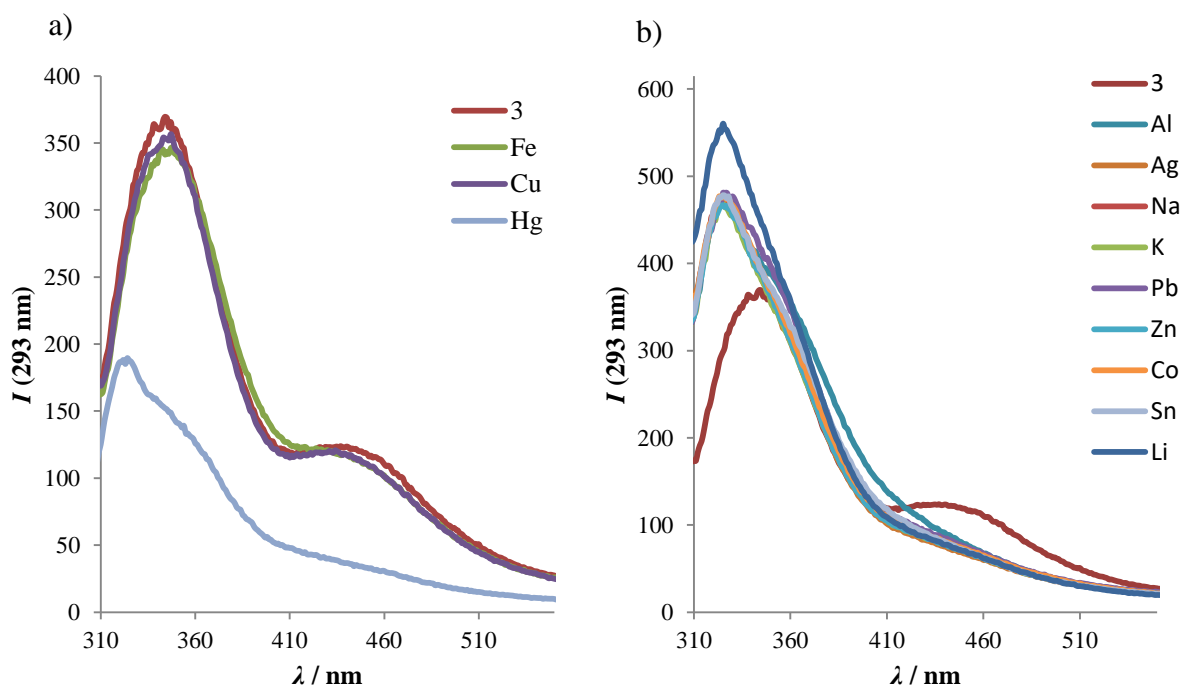
Na emisijskom spektru spoja **3** primjećuje se da svi metalni ioni osim Fe^{2+} i Cu^{2+} iona uzrokuju hipsokromni pomak, odnosno pomak prema kraćim valnim duljinama.

Značajan odziv u apsorpcijskom spektru uočen je pri ispitivanjima s ionima Fe^{2+} , Cu^{2+} i Hg^{2+} . Dodatkom ovih iona dolazi do porasta apsorbanције, dok u prisutnosti Li^+ iona dolazi do značajnog pada apsorbanције. Radi bolje usporedbe, na Slici 31. prikazani su apsorpcijski spektri spoja **3** u prisutnosti iona Fe^{2+} , Cu^{2+} , Hg^{2+} koji povećavaju apsorbanciju, Al^{3+} , Sn^{2+} , Li^+ koji smanjuju apsorbanciju, dok prisutnost Ag^+ , Na^+ , K^+ , Pb^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} iona ne uzrokuje nikakve promjene u apsorpcijskom spektru spoja **3**.



Slika 31. Apсорpcijski spektri spoja **3** u prisutnosti metala koji povećavaju apsorbanciju (a), metala koji smanjuju apsorbanciju (b), te metala koji ne uzrokuju nikakve promjene u apсорpcijskom spektru (c).

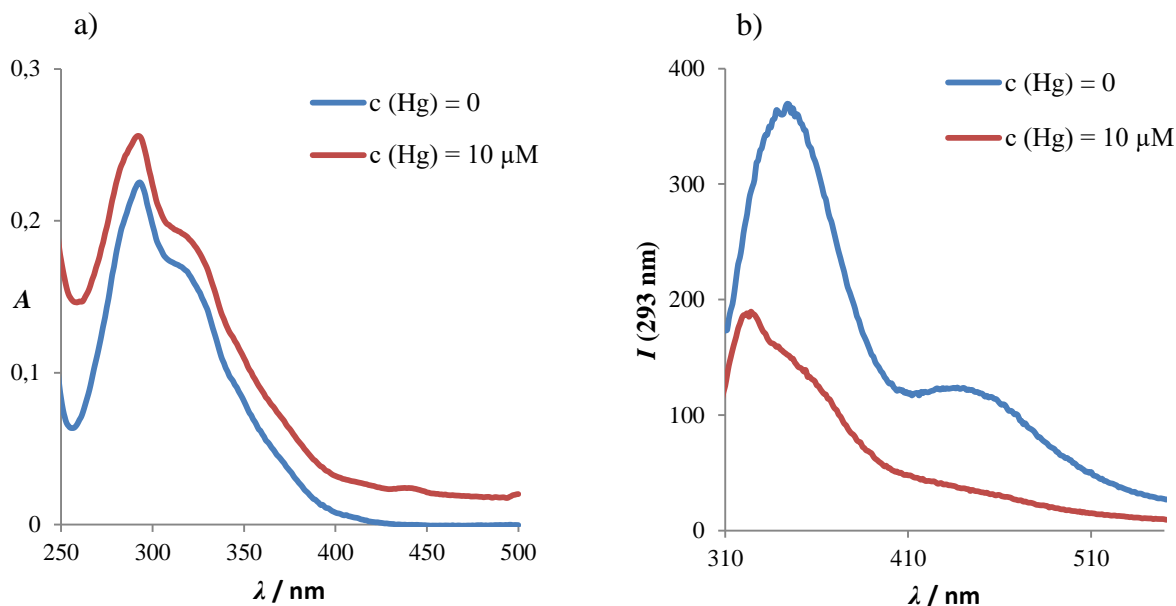
Na Slici 32. prikazani su emisijski spektri spoja **3** u prisutnosti iona Fe^{2+} , Cu^{2+} , Hg^{2+} koji smanjuju intenzitet emisije, te u prisutnosti svih ostalih metalnih iona (Al^{3+} , Sn^{2+} , Li^+ , Ag^+ , Na^+ , K^+ , Pb^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+}) koji povećavaju intenzitet emisije do valne duljine od 410 nm, nakon koje smanjuju intenzitet emisije.



Slika 32. Emisijski spektri spoja **3** u prisutnosti metala koji smanjuju intenzitet emisije (a), te u prisutnosti svih ostalih metalnih iona (b).

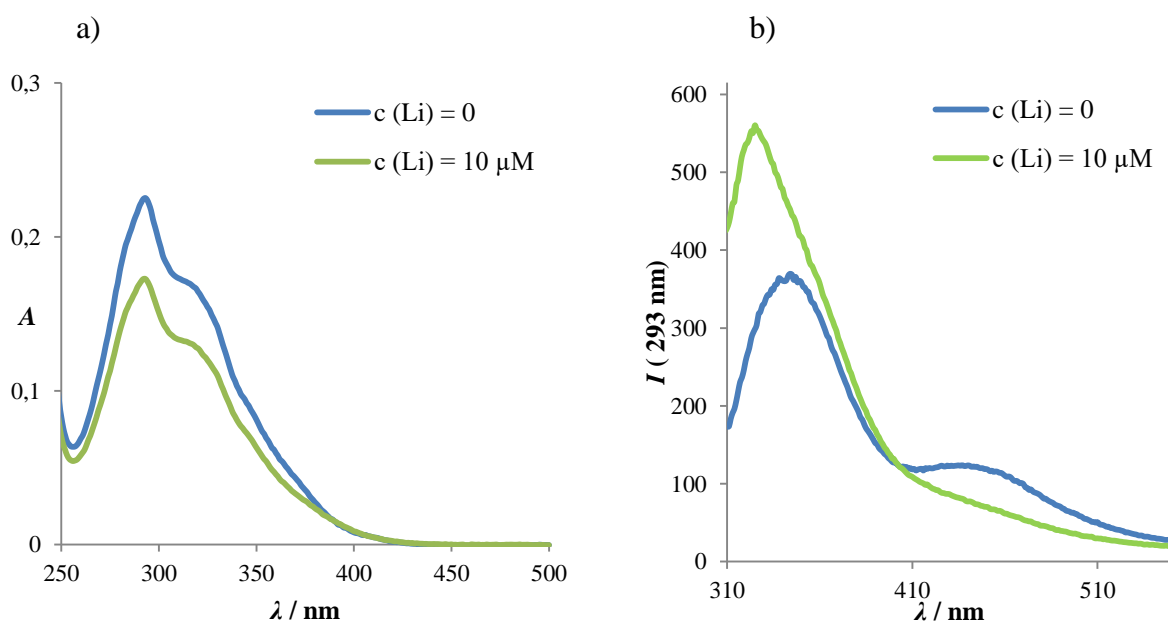
Na emisijskom spektru spoja **3** u prisutnosti Hg^{2+} iona primjećuju se dva efekta. Jedan je značajan pad intenziteta emisije, a drugi je pomak u smjeru kraćih valnih duljina, odnosno hipsokromni pomak. Apsorpcijski i emisijski spektar čistog spoja **3** i u prisutnosti Hg^{2+} iona prikazani su na Slici 33. Na apsorpcijskome spektru je vidljivo pojačanje apsorpcije u prisutnosti Hg^{2+} iona.

S obzirom da se radi o preliminarnim ispitivanjima provedenim u prisutnosti 1 eq metalnih iona potrebno je provesti dodatna detaljnija ispitivanja, titraciju s metalnim solima Hg^{2+} od niže prema višoj koncentraciji soli.



Slika 33. Apsorpcijski (a) i emisijski (b) spektar čistog spoja **3** i u prisutnosti Hg^{2+} iona.

Osim potencijalnog korištenja spoja **3** kao kemijskog senzora za Hg^{2+} ione, bilo bi potrebno provesti i slična dodatna ispitivanja s Li^+ ionima čiji je utjecaj u provedenim preliminarnim ispitivanjima doveo do smanjenja apsorpcije, te znatnog povećanja emisije i hipsokromnog pomaka. Utjecaj Li^+ iona može se vidjeti na Slici 34.



Slika 34. Apsorpcijski (a) i emisijski (b) spektar čistog spoja **3** i u prisutnosti Li^+ iona.

5. ZAKLJUČAK

- Cilj rada bila je sinteza novog derivata kumarina, kao potencijalnog kemijskog senzora, primjenom *click*-metodologije.
- Kumarinski i triazolni derivati zbog svoje strukture pokazuju zanimljive karakteristike za primjenu u kemijskim sensorima, ponajviše zbog toga što pokazuju intenzivnu fluorescenciju.
- Za dobivanje željenog spoja, u prvom stupnju pripremljen je 7-azido-4-metil-2*H*-kromen-2-on **2** reakcijom diazotacije i nukleofilne supstitucije.
- Ciljani derivat 7-(4-(4-(dimetilaminofenil)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)-4-metil-2*H*-kromen-2-on **3** pripremljen je *click*-reakcijom odgovarajućeg azida **2** i terminalnog alkina 4-etinil-*N,N*-dimetilnilina uz Cu(I) kao katalizator.
- Strukture spojeva **2** i **3** potvrđene su ¹H NMR spektroskopijom.
- Kako bi se ispitala primjena spoja **3** kao novog senzora za pH, provedena je spektrofotometrijska karakterizacija spoja u otopinama univerzalnih pufera raspona pH vrijednosti 1–13, te u etanolnim otopinama raspona pH vrijednosti 1–12,7.
- Spoj **3** se pokazao kao potencijalni pH senzor jer se porastom pH otopine povećava apsorpcija i intenzitet fluorescencije. U emisijskom spektru u prisutnosti univerzalnih pufera pH vrijednosti 1–3 vidi se izrazito povećanje intenziteta fluorescencije.
- Provedena su preliminarna ispitivanja spoja **3** kao potencijalnog senzora za metalne ione. U tu svrhu ispitana je promjena spektrofotometrijskih svojstava spoja **3** u etanolu u prisutnosti 1 eq izabranih metalnih soli.
- Uočeno je da spoj **3** pokazuje potencijalnu senzorsku primjenu za određivanje Hg²⁺ i Li⁺ iona, no potrebno je provesti dodatna detaljnija eksperimentalna i teorijska ispitivanja.

6. LITERATURA

1. Hulanicki, A., Glab, S., Ingman, F., Chemical sensors definitions and classification, *Pure & Appl. Chem.*, **63** (9) (1991) 1247-1250.
2. Lobnik, A., Turel, M., Korent Urek, Š., Optical Chemical Sensors: Design and Applications, *Advances in Chemical Sensors*, Prof. Wen Wang (Ed.), InTech (2012) 3-28.
3. Filipović, I., Lipanović, S., *Opća i anorganska kemija*, I dio, Školska knjiga, Zagreb (1995) str. 122, 356.
4. Pine, S. H., *Organska kemija*, Školska knjiga, Zagreb (1994) str. 1114-1115.
5. Generalić, E., „Apsorbancija.“ Englesko-hrvatski kemijski rječnik & glosar. KTF-Split. <https://glossary.periodni.com> (pristup 05. rujna 2017.).
6. Generalić, E., "Luminiscencija." Englesko-hrvatski kemijski rječnik & glosar. KTF-Split. <http://glossary.periodni.com> (pristup 23. srpnja 2017.).
7. Generalić, E., "Fluorescencija." Englesko-hrvatski kemijski rječnik & glosar. KTF-Split. <http://glossary.periodni.com> (pristup 23. kolovoza 2017.).
8. Valeur, B., Leray, I., Design principles of fluorescent molecular sensors for cation recognition, *Coord. Chem. Rev.* **205** (2000) 3-40.
9. Parkesh, R., Veale, E. B., Gunnlaugsson, T., *Fluorescent Detection Principles and Strategies in Chemosensors*, John Wiley & Sons, Inc. (2011) str. 229-252.
10. Li, H., Cai, L., Chen, Z., Coumarin-Derived Fluorescent Chemosensors, *Advances in Chemical Sensors*, Prof. Wen Wang (Ed.), InTech (2012) 121-150.
11. https://www.google.hr/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=2&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwi9ovzro5_VAhXFPhQKHT0HD7gQFggzMAE&url=http%3A%2F%2Fcourses.chem.indiana.edu%2F344%2Fdocuments%2FFluorescenceHandout_000.docx&usg=AFQjCNGcKO4_ZcWb0d7P25PNIOfWQ2bYYg, Indiana University, Department of Chemistry (pristup 23.07.2017.).
12. Liu, Z., He, W., Guo, Z., Metal coordination in photoluminescent sensing, *Chem. Soc. Rev.*, **42** (2013) 1568-1600.
13. Nallapaneni, H., Chunduri, V. R., Synthesis, cytotoxic activities and photophysical properties of 7-amino-4-methylcoumarin based 1,4-di substituted 1,2,3-triazole derivatives by "Click" chemistry, *Am. J. PharmTech Res.*, **4** (2014) 169-184.

14. Soumya, T. V., Thasnim, P., Bahulayan, D., Step-economic and cost effective synthesis of coumarin based blue emitting fluorescent dyes, *Tetrahedron Lett.*, **55** (2014) 4643-4647.
15. Song, Y., Chen, Z., Li, H., Advances in Coumarin-Derived Fluorescent Chemosensors for Metal Ions, *Curr. Org. Chem.*, **16** (22) (2012) 2690-2707.
16. Hoshiyama, M., Kubo, K., Igarashi, T., Sakurai, T., Complexation and proton dissociation behavior of 7-hydroxy-4-methylcoumarin and related compounds in the presence of β -cyclodextrin, *J. Photochem. Photobiol., A*, **138** (2001) 227-233.
17. Jones II, G., Jackson, W. R., Choi, C.-Y., Bergmark, W. R., Solvent Effects on Emission Yield and Lifetime for Coumarin Laser Dyes. Requirements for a Rotatory Decay Mechanism, *J. Phys. Chem.*, **89** (1985) 294-300.
18. Goswami, S., Das, A. K., Maity, S., 'PET' vs. 'push-pull' induced ICT: a remarkable coumarinyl-appended pyrimidine based naked eye colorimetric and fluorimetric sensor for the detection of Hg^{2+} ions in aqueous media with test strips, *Dalton Trans.*, **42** (2013) 16259-16263.
19. Kim, H. N., Ren, W. X., Kim, J. S., Yoon, J., Fluorescent and colorimetric sensors for detection of lead, cadmium, and mercury ions, *Chem. Soc. Rev.*, **41** (2012) 3210-3244.
20. Lin, W., Yuan, L., Cao, Z., Feng, J., Feng, Y., Fluorescence enhancement of coumarin-quinoline by transition metal ions: Detection of paramagnetic Ni^{2+} and Co^{2+} , *Dyes and Pigments*, **83** (2009) 14-20.
21. Taki, M., Desaki, M., Ojida, A., Iyoshi, S., Hirayama, T., Hamachi, I., Yamamoto, Y., Fluorescence Imaging of Intracellular Cadmium Using a Dual-Excitation Ratiometric Chemosensor, *J. Am. Chem. Soc.*, **130** (2008) 12564-12565.
22. Kim, M. H., Jang, H. H., Yi, S., Chang S., Han, M. S., Coumarin-derivative-based off-on catalytic chemodosimeter for Cu^{2+} ions, *Chem. Commun.*, **32** (2009) 4838-4840.
23. Li, H.-Y.; Gao, S.; Xi, Z. A colorimetric and "turn-on" fluorescent chemosensor for Zn(II) based on coumarin Schiff-base derivative, *Inorg. Chem. Commun.*, **12** (2009) 300-303.
24. Ray, D., Nag, A., Jana, A., Goswami, D., Bharadwaj, P. K., Coumarin derived chromophores in the donor-acceptor-donor format that gives fluorescence enhancement

- and large two-photon activity in presence of specific metal ions, *Inorg. Chim. Acta*, **363** (2010) 2824-2832.
25. Park, J. E., Choi, M. G., Chang, S.-K., Colorimetric and Fluorescent Signaling of Au³⁺ by Desulfurization of Thiocoumarin, *Inorg. Chem.*, **51** (2012) 2880-2884.
 26. 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) 2131-2141.
 27. Saleh, N., Al-Soud, Y. A., Nau, W. M., Novel fluorescent pH sensor based on coumarin with piperazine and imidazole substituents, *Spectrochim. Acta Part A*, **71** (2008) 818-822.
 28. Kolb, H. C., Finn, M. G., Sharpless, K. B., Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **40** (2001) 2004-2021.
 29. Saftić, D., Krstulović, L., Bajić, M., Žinić, B., 1,3-Dipolarna cikloadicija (I.dio): Dobivanje 1,2,3-triazolnih derivata u nukleozidnoj kemiji, *Kem. Ind.*, **64 (9-10)** (2015) 481-498.
 30. Tornøe, C. W., Christensen, C., Meldal, M., Peptidotriazoles on Solid Phase: [1,2,3]-Triazoles by Regiospecific Copper(I)-Catalyzed 1,3-Dipolar Cycloadditions of Terminal Alkynes to Azides, *J. Org. Chem.*, **67** (2002) 3057-3064.
 31. Juriček, M., Kouwer, P. H. J., Rowan, A. E., Triazole: a unique building block for the construction of functional materials, *Chem. Commun.*, **47** (2011) 8740-8749.
 32. Arshad, M., An insight to the synthetically obtained triazole possessing numerous biological activities, *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.*, **6 (9)** (2014) 438-442.
 33. Ho, I.-T., Lai, T.-L., Wu, R.-T., Tsai, M.-T., Wu, C.-M., Lee, G.-H., Chung, W.-S., Design and synthesis of triazolyl coumarins as Hg²⁺ selective fluorescent chemosensors, *Analyst*, **137** (2012) 5770-5776.
 34. Filimonov, V. D., Trusova, M., Postnikov, P., Krasnokutskaya, E. A., Lee, Y. M., Hwang, H. Y., Kim, H., Chi, K.-W., Unusually Stable, Versatile, and Pure Arenediazonium Tosylates: Their Preparation, Structures, and Synthetic Applicability, *Org. Lett.*, **10 (18)** (2008) 3961-3964.

35. Kutonova, K. V., Trusova, M. E., Postnikov, P. S., Filimonov, V. D., Parelo, J., A Simple and Effective Synthesis of Aryl Azides via Arenediazonium Tosylates, *Synthesis*, **45** (2013) 2706-2710.
36. Meudtner, R. M., Ostermeier, M., Goddard, R., Limberg, C., Hecht, S., Multifunctional "Clickates" as Versatile Extended Heteroaromatic Building Blocks: Efficient Synthesis via Click Chemistry, Conformational Preferences, and Metal Coordination, *Chem. Eur. J.*, **13** (2007) 9834-9840.
37. Ciba-Geigy, A. G., Wissenschaftliche Tabellen Geigy: Physikalisch Chemie, Blut, Humangenetik, Stoffwechsel von Xenobiotika (Gebundene Ausgabe), Basel (1979).
38. Wolfbeis, O. S., Furlinger, E., Kroneis, H., Marsoner, H., Fluorimetric Analysis, A study on Fluorescent Indicators for Measuring Near Neutral ("Physiological") pH-Values, *Analytische Chemie*, **314** (1983) 119-124.

7. ŽIVOTOPIS

