

Spektroskopska ispitivanja novih fluorofora temeljenih na benzazolima

Šimić, Veronika

Undergraduate thesis / Završni rad

2018

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:149:363433>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-20**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Veronika Šimić

ZAVRŠNI RAD

Zagreb, rujan 2018.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Veronika Šimić

**SPEKTROSKOPSKA ISPITIVANJA NOVIH FLUOROFORA
TEMELJENIH NA BENZAZOLIMA**

ZAVRŠNI RAD

Voditelj rada: Doc.dr.sc.Svjetlana Krištafor

Članovi ispitnog povjerenstva: Doc. dr. sc.Svjetlana Krištafor (FKIT)
Dr. sc. Lidija Furač, v. pred. (FKIT)
Dr. sc. Ema Horak, poslijedoktorand (IRB)

Zagreb, rujan 2018.

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 se mentorici doc. dr. sc. Svjetlani Krištafor koja me je zainteresirala za ovu temu i na susretljivosti prilikom izrade rada. Također se zahvaljujem Kristini Bobanović, mag.appl.chem na svojoj pomoći prilikom rada u laboratoriju i na svom strpljenju i razumijevanju koje mi je ukazala prilikom izrade ovog završnog rada.

SAŽETAK

Kemijski senzori su uređaji koji pretvaraju kemijsku informaciju u analitički koristan signal. U novije vrijeme kemijski senzori sve više privlače pozornost znanstvenika zbog njihove široke primjene u medicine, biologiji i biokemiji. Glavni razlog tome je njihova osjetljivost, imunost na elektromagnetne smetnje, sigurnost prilikom rada i niska cijena.

Cilj ovog rada je bio ispitati spektroskopska svojstva novih fluorofora koji se baziraju na benzazolima. Benzimidazoli su heterociklički spojevi aromatskog karaktera s imidazolnim prstenom kondenziranim na benzensku jezgru. Derivati benzimidazola pokazuju zanimljiva spektroskopska svojstva, osjetljivi su na promjenu pH zbog postojanja dušika koji se može protonirati, te mogu koordinirati metalne katione zbog prisutnosti dušika.

1,2,3-triazol je sve češća funkcionalna jedinica u optičkim sensorima jer, osim kao poveznica u konjugiranim π -sustavima, može imati ulogu u koordinaciji metalnih iona.

U okviru ovog rada, sintetiziran je novi derivat benzimidazola koji sadrži 1,2,3-triazolni prsten, 2-(4-(*p*-tolil)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)-1*H*-benzo[*d*]imidazol, cikloadicijskom reakcijom iz odgovarajućih azida i alkina u prisutnosti Cu(I) kao katalizatora. Struktura spoja potvrđena je ^1H i ^{13}C NMR spektroskopijom, a UV-vidljivom apsorpcijskom i fluorescencijskom spektrofotometrijom ispitana su svojstva spoja u različitim otapalima i univerzalnim puferima u rasponu pH 2-12.

Ključne riječi: kemijski senzori, fluorofor, benzimidazol, UV-vidljiva i fluorescencijska spektroskopija

SUMMARY

Chemical sensors are devices that convert chemical information into an analytically useful signal. More recently, chemical sensors are increasingly attracted to scientists because of their wide application in medicine, biology and biochemistry. The main reason for this is their sensitivity, immunity to electromagnetic interference, safety at work and low price.

The aim of this paper was to examine the spectroscopic properties of new benzazole based fluorophors. Benzimidazoles are heterocyclic aromatic compounds with imidazole condensed to benzene ring. Benzimidazole derivatives exhibit interesting spectroscopic properties, sensitivity to pH change due to the presence of protonated nitrogen atom, and are sensitive to metal cations due to the presence of two nitrogen atoms.

1,2,3-triazoles became common functional moiety in optical sensors, due to their ability to act as linker in conjugated π -systems and to coordinate metal ions.

In this work, new benzimidazole derivative with 1,2,3-triazole ring was synthesized, 2-(4-(*p*-tolil)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)-1*H*-benzo[*d*]imidazole, by cycloaddition reaction from corresponding azide and alkyne using Cu(I) as catalyst. The structure was determined by means of ^1H i ^{13}C NMR, while UV-visible absorption and fluorescence spectroscopy was used to examine the changes of its spectroscopic properties in different solvents and in universal buffer solutions in pH range 2-12.

Keywords: chemical sensors, fluorophore, benzimidazole, UV-visible and fluorescence spectroscopy

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. OPĆI DIO	3
2.1. Kemijski senzori	4
2.2. Spektroskopske metode karakterizacije optičkih kemijskih senzorskih molekula	5
2.3. Benzazoli	11
2.3.1. Benzimidazol kao funkcionalna jedinica u kemosenzorskim molekulama	12
2.4. Click kemija	16
2.4.1. Cu(I) katalizirana 1,3-dipolarna cikloadicija	16
2.4.2. Triazoli	17
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	21
3.1. Opće napomene	22
3.2. Priprava 2-(4-(<i>p</i> -tolil)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-1-il)-1 <i>H</i> -benzo[<i>d</i>]imidazola 1	23
3.3. Priprava otopina	23
3.4. Mjerenja	24
4. REZULTATI I RASPRAVA	26
4.1. Sinteza spoja	27
4.2. Spektroskopska karakterizacija	29
5. ZAKLJUČAK	35
6. LITERATURA	37
7. ŽIVOTOPIS	40

1. UVOD

Kemijski senzori su uređaji koji pretvaraju kemijsku informaciju u analitički koristan signal. Ta informacija nastaje kao posljedica ili kemijske reakcije ili fizičkih svojstava ispitivanog uzorka. Svaki kemijski senzor se sastoji od dva djela: receptorskog i pretvorničkog dijela. Optički senzori su oni kemijski senzori kod kojih se pretvornički dio bazira na nekom optičkom svojstvu kao što je npr. fluorescencija ili apsorbancija.

U novije vrijeme sve se više istražuju kemijski senzori bazirani na benzazolima, a koji se mogu koristiti kao fluorofori upravo zbog konjugiranih dvostrukih veza. Benzimidazolni derivati su strukturno slični nukleotidima, što ih čini zanimljivima u organskoj sintezi bioaktivnih molekula, a osim toga, česte su funkcionalne jedinice u području optoelektronike, senzora i biološkog označavanja.

U ovom radu ispitana su spektroskopska svojstva 2-(4-(*p*-tolil)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)-1*H*-benzo[*d*]imidazola kao novog fluorofora. Ciljani produkt sintetiziran je u jednom koraku iz 2-azido-1*H*-benzimidazola i odgovarajućeg alkina u prisutnosti Cu(I) kao katalizatora. UV-vidljivom apsorpcijskom i fluorescencijskom spektroskopijom ispitane su karakteristike spoja u različitim otapalima, te u otopinama univerzalnih pufera kao potencijalni pH-osjetljivi senzor.

2. OPĆI DIO

2.1 Kemijski senzori

Kemijski senzori su uređaji koji pretvaraju kemijsku informaciju u analitički koristan signal. Kemijska informacija može nastati kao posljedica kemijske reakcije u kojoj sudjeluje ispitivani analit ili može biti posljedica promjene fizičkih svojstava ispitivanog sustava.

Kemijski senzori se sastoje od dvije osnovne funkcijske jedinice: receptorski dio i pretvornički dio. Receptor identificira ispitivani parametar npr. koncentraciju komponente i daje optički signal proporcionalan veličini tog parametra. Pretvornik je dio kemijskog senzora koji pretvara optički signal koji dolazi od receptora u mjerljivi signal pogodan za daljnu obradu.

Receptorski dio kemijskog senzora se bazira na različitim principima:

- a) fizički, gdje nema kemijskih reakcija. Tipičan primjer su oni koji se temelje na mjerenju apsorpcije, refrakcije, kondukcije, temperature ili promjene u masi.
- b) kemijski, u kojem kemijska reakcija u kojoj sudjeluje analit daje analitički signal
- c) biokemijski, u kojem je biokemijski proces izvor analitičkog signala, primjerice mikrobnih potencijometrijski senzori.

Najčešća podjela kemijskih senzora je s obzirom na pretvornički dio, pa se razlikuju:

- 1. Optički** - koji transformiraju određene optičke promjene, koje su rezultat interakcije analita sa receptorskim dijelom;
- 2. Elektrokemijski** - pretvaraju efekt elektrokemijske interakcije analita i elektrode u koristan signal;
- 3. Električni** - koji se baziraju na mjerenjima gdje nema elektrokemijskih procesa, ali je signal rezultat promjene električnih svojstva uzrokovanih interakcijom analita;
- 4. Maseni osjetljivi** - pretvaraju masene promjene na za to prilagođenoj površini u promjenu svojstva tog materijala;
- 5. Magnetski** - koji se baziraju na promjeni paramagnetskih svojstva plina koji se analizira;
- 6. Termometrijski** - koji se baziraju na mjerenju toplinskog efekta određene kemijske reakcije ili adsorpcije koja uključuje analit;
- 7. Druga fizička svojstva** kao npr. korištenjem gama ili beta zračenje koji mogu dati osnovu za druge senzore za određivanje kemijskog sastava. [1.]

Optički senzori predstavljaju grupu kemijskih senzora u kojima se elektromagnetno zračenje koristi kako bi se stvorio analitički signal. Oni se mogu podijeliti i dalje s obzirom na vrstu optičkog svojstva koje se koristi u kemijskim sensorima (apsorbancija, refleksija, luminiscencija, fluorescencija, indeks refrakcije, optothermalni efekt, raspršenje svjetlosti).

Interakcija EM zračenja sa uzorkom se mjeri iz promjene nekog optičkog parametra i povezana je sa koncentracijom analita. Optički kemijski senzori imaju brojne prednosti kao što su selektivnost, imunost na elektromagnetske smetnje, sigurnost prilikom rada sa zapaljivim i eksplozivnim komponentama, osjetljivi su, jeftini. Glavni nedostaci su im to što nisu dugotrajni, selektivnost im može bit ograničena i potreban je prijenos mase analita iz uzorka u indikatorsku fazu kako bi dobili analitički signal, te njihov rad može biti ometan svjetlošću iz okoline.

Optički kemijski senzori daju priliku za stalnim praćenjem kemijskih vrsta i kao takvi su našli brojne primjene u biotehnologiji, medicine i kemijskoj industriji [2.]

2.2 Spektroskopske metode karakterizacije optičkih kemijskih senzorskih molekula

Izraz spektroskopija se prvenstveno odnosio na granu znanosti koja se isključivo bavila vidljivom svjetlošću. S vremenom se značenje spektroskopije proširilo i na proučavanje druge vrste elektromagnetskog zračenja kao što su ultraljubičasto (engl. *ultraviolet*, UV), infracrveno (IC), mirkovalno i radiofrekvencijsko zračenje.[3.]

UV-vidljiva spektroskopija

Ultraljubičasto područje elektromagnetnog spektra se nalazi između vidljivog i rendgenskog djela spektra odnosno između $\lambda = 4 \cdot 10^{-7} \text{ m}$ i $\lambda = 10^{-8} \text{ m}$. [4.] Energija koja se apsorbira odgovara količini energije koja je potrebna da π -elektroni pređu u višu energijsku razinu. UV-spektri najčešće sadržavaju samo jedan široki apsorpcijski maksimum kojeg označujemo valnom duljinom.

Valna duljina koja je potrebna za povećanje energije π -elektrona ovisi o prirodi tih elektrona. Jedan od najvažnijih čimbenika je stupanj konjugacije. Što je on veći to je energija potrebna za energijske prijelaze manja.

Valne duljine pri kojima organska molekula apsorbira zračenje također ovisi o jakosti kojom su vezani elektroni. Tako je pobuđivanje elektrona iz veze ugljik- ugljik potrebno puno energije odnosno male valne duljine jer su ti elektroni čvrsto vezani. Organski spojevi koji sadrže dvostruke ili trostruke veze se puno lakše pobuđuju jer su elektroni u nezasićenim vezama puno slabije vezani.

Nezasićene organske funkcionalne grupe koje apsorbiraju u UV području zovu se kromofori. Kromofori i njihove apsorpcijske karakteristike u različitim otapalima prikazane su u Tablici 1. Prilikom odabira otapala važno je da otapalo ne apsorbira UV-zračenje. Tako je najčešće polarno otapalo etanol. Polarna otapala koja tvore jače vodikove veze s polarnim molekulama u osnovnom stanju (nego u pobuđenom stanju) povisuju energiju elektronskih prijelaza. U nekim slučajevima pobuđena stanja tvore jače vodikove veze nego odgovarajuća osnovna stanja te u tom slučaju polarna otapala pomiču apsorpciju prema duljim valnim duljinama jer se energija prijelaza smanjila.[5.]

Tablica 1. Kromofori i njihove apsorpcijske značajke

KROMOFOR	PRIMJER	OTAPALO	λ_{\max}	E_{\max}
alken	$C_6H_{13}CH=CH_2$	N-heptan	117	13000
konjugirani alken	$CH_2=CHCH=CH_2$	N-heptan	217	21000
alkin	$C_5H_{11}C\equiv C-CH_3$	N-heptan	178	10000
karbonil	CH_3COCH_3	N-heksan	186	1000
karboksil	CH_3COOH	etanol	204	41
amido	CH_3CONH_2	Voda	214	60
azo	$CH_3N=NCH_3$	etanol	339	5
nitro	CH_3NO_2	izooktan	280	22
nitrozo	C_4H_9NO	etilni eter	300	100
nitrat	$C_2H_5ONO_2$	dioksan	270	12
aromatski	C_6H_6	N-heksan	204	7900

Da li će molekula apsorbirati UV-zračenje ovisi o energiji fotona i o elektronskoj konfiguraciji molekule, odnosno o energijskim razlikama između elektronskih stanja u molekuli. S obzirom da svaka molekula ima različitu orbitalnu strukturu, različito će i apsorbirati svjetlo. O intezitetu apsorpcije fotona na određenoj valnoj duljini govori molarni apsorpcijski koeficijent ϵ . Što je potrebna veća energija za prijelaz iz jednog energetskog stanja u drugo to je apsorbirani

kvant svjetlosne energije veći, tj. to je frekvencija apsorbirane svjetlosti veća, odnosno valna duljina je manja.[6.] Prolaskom UV- zračenja kroz otopinu ispitivane molekule dio zračenja se apsorbira, a spektrofotometar mjeri zračenje koje se nije apsorbiralo. Količina zračenja koje je apsorbirano se najčešće iskazuje preko transmitacije, T koja je jednaka omjeru intenziteta transmitiranog, I i upadnog zračenja, I_0 , prema jednadžbi (1).

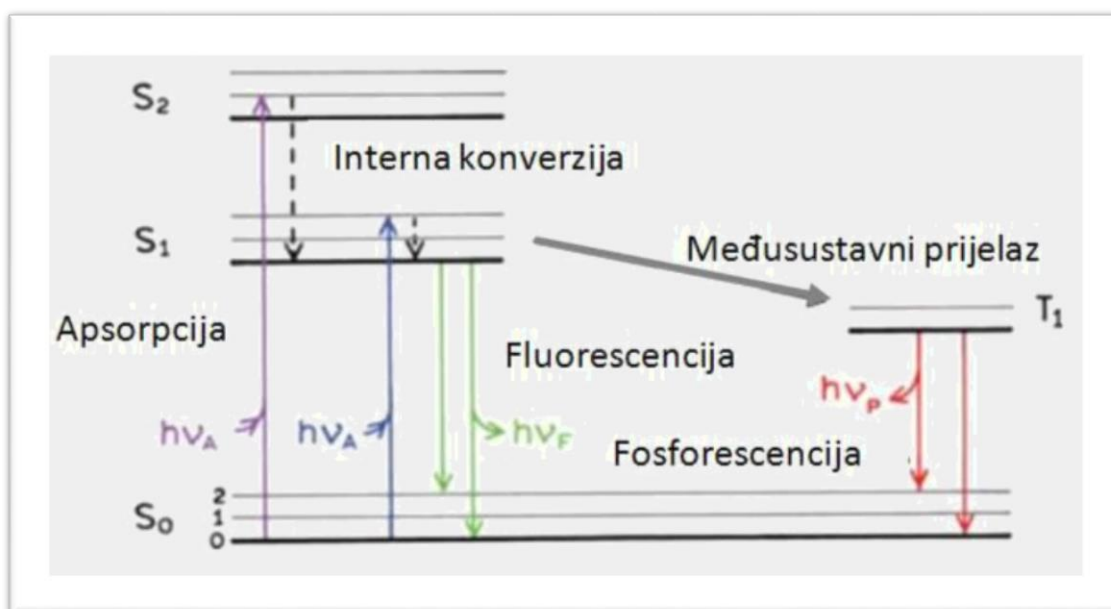
$$T = \frac{I}{I_0} \quad (1)$$

Apsorbancija ovisi i o koncentraciji otopine; što je više molekula koje mogu apsorbirati zračenje, to je apsorpcija veća i na taj pretpostavci se temelji Lambert-Beerov zakon:

$$A = c \times L \times \varepsilon \quad (2)$$

Dakle, apsorbcija ovisi o množinskoj koncentraciji otopine c , molarnom apsorpcijskom koeficijentu ε i o duljini ćelije L .

Jablonski dijagram prikazan na Slici 1 prikazuje energijske nivoe unutar molekule u koje mogu prijeći pobuđeni elektroni. Svjetlost određene valne duljine uzrokuje pobuđivanje elektrona na viši energijski nivo. Na ovom dijagramu kao rezultat apsorpcije elektron prelazi u S_2 orbitalu. Elektron se u pobuđenom stanju jako kratko zadržava pa postoje dvije opcije otpuštanja viška energije, relaksacija ili otpuštanje fotona svjetlosti.



Slika 1. Jablonski dijagram

Molekulska fluorescencijska spektroskopija

Fluorescencija je pojava u kojoj se atomi ili molekule pobuđuju apsorpcijom snopa elektromagnetnog zračenja te pri povratku u osnovno stanje emitiraju foton. Sve molekule koje apsorbiraju zračenje imaju mogućnost fluoresciranja. Unatoč tome većina molekula ne fluorescira. Razlog tome nalazimo u relaksacijskim procesima koji su brži od fluorescencijske emisije. Kada molekula apsorbira zračenje, prelazi u pobuđeno stanje gdje se zadržava jako kratko zbog postojanja više načina koji omogućuju otpuštanja suviška energije, a to su relaksacija bez pojave zračenja i fluorescencijska relaksacija.

Relaksacija bez pojave zračenja obuhvaća dva procesa:

1. vibracijska relaksacija - javlja se za vrijeme sudara među pobuđenim molekulama i molekulama otapala. Tijekom sudara višak energije se prenosi sa pobuđenih molekula na molekule otapala što dovodi do porasta temperature sredine.

2. unutrašnja pretvorba – relaksacija između najniže vibracijske razine pobuđenog elektronskog stanja i gornje vibracijske razine drugog elektronskog stanja

Najintenzivnije molekulske fluorescencijske emisije daju spojevi koji sadrže aromatske prstenove. Najjednostavniji heterociklički spojevi kao što su tiofen ili pirol ne fluoresciraju, ali strukture izgrađene od fuzioniranih aromatskih prstenova koje sadrže navedene spojeve fluoresciraju. Na fluorescenciju utječe supstitucija na aromatskom prstenu pa je tako intenzitet fluorescencije anililna značajno veći od intenziteta fluorescencije benzene. Fluorescenciji također pogoduje rigidnost molekula jer ona smanjuje mogućnost relaksacije molekule.

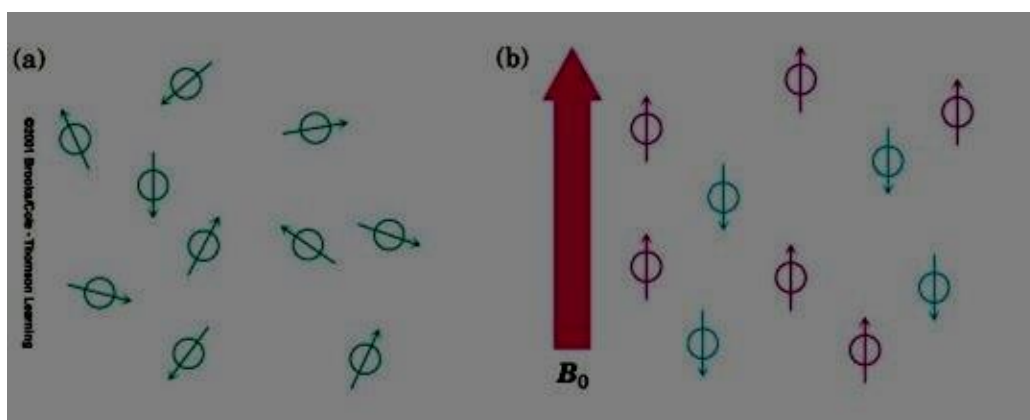
Također, kod većine molekula fluorescencija ovisi o otapalu i temperaturi. S porastom temperature raste brzina gibanja molekula pa raste broj sudara između molekula što pogoduje procesu vibracijske relaksacije. Smanjenje viskoznosti otapala omogućuje veću pokretljivost molekula što opet dovodi do povećanog broja sudara i u konačnici relaksacije, a ne fluorescencije.

Važan je i utjecaj koncentracije na intenzitet fluorescencije jer je otkriveno da pri dovoljno velikim koncentracijama dolazi do samoprigušenja odnosno molekule analita apsorbiraju fluorescenciju drugih molekula istog analita. [3.] Općenito fluorescencijske metode su jako osjetljive metode i selektivne jer mali broj molekula fluorescira.

Nuklearna magnetska rezonancija

Nuklearna magnetska rezonancija (NMR) kao spektroskopska metoda za određivanje strukture (organskih) spojeva temeljena je na apsorpciji energije jezgre u području radio-valova (102-105 m), a uz IC-spektroskopiju i UV-spektroskopiju omogućuje određivanje strukture vrlo složenih molekula.

Osnovno načelo na kojem se bazira NMR je svojstvo jezgra da se ponašaju kao magneti jer se vrte oko svoje osi. Kada na takve jezgre djelujemo vanjskim magnetnim poljem one će poprimiti određene orijentacije. Te orijentacije mogu biti paralelne ili antiparalelne sa vanjskim poljem (Slika 2). Paralelna orijentacija je stanje niže energije pa je stoga i vjerojatnija. Kada takve orijentirane molekule izložimo i djelovanju EMZ-a dolazi do apsorpcije zračenja i jezgra prelazi u stanje više energije. Kolika je frekvencija EMZ-a potrebna ovisi o jakosti vanjskog magnetnog polja i o vrsti jezgre. Jako vanjsko polje uzrokuje veću razliku između dvaju spinskih stanja pa je potrebna veća frekvencija zračenja.



Slika 2. a) jezgre bez prisustva vanjskog magnetnog polja; b) jezgre uz prisustvo vanjskog magnetnog polja.

Sve jezgre u molekuli su okružene elektronima. Kada molekulu postavimo u vanjsko magnetno polje elektroni koji se gibaju oko jezgre stvaraju svoja vlastita magnetna polja koja djeluju suprotno od vanjskog polja. Zbog toga kažemo da je jezgra zasjenjena jer je polje koja ona osjeća slabije od vanjskog polja.

Kako je svaka jezgra u molekuli u drugačijem elektronskom okruženju, svaka osjeća drugačije efektivno magnetsko polje. Upravo te razlike se detektiraju i vidimo ih kao različite NMR-signale za svaku ^1H i ^{13}C jezgru u molekuli. [7.]

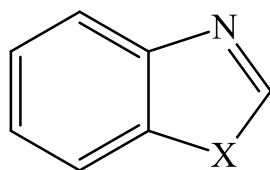
$$B_{\text{efektivno}} = B_{\text{vanjsko polje}} - B_{\text{lokalno polje}} \quad (3)$$

U praksi se uzorku dodaje mala količina tetrametilsilana (TMS) kako bi se tijekom snimanja spektra dobio referentni signal i u ^1H i ^{13}C NMR spektru TMS-a je vidljiv jedan karakterističan signal.. Velika prednost TMS-a je i to što je to lako hlapiva tekućina niske temperature vrelišta pa se nakon snimanja spektra uzorak lako prevede u čistu formu. Točan položaj pri kojem jezgra apsorbira se zove kemijski pomak pa tako kemijski pomak TMS-a u ^1H NMR spektru iznosi 0. Da bi mogli koristiti iste raspone za različite instrumente, kemijski pomak izražava se u ppm jedinicama, to je broj koji ne ovisi o polju i isti je bez obzira na instrument, što je onda olakšavajuća okolnost kod uspoređivanja spektara. Kemijski pomak jezgre odražava njenu elektronsku okolinu, odnosno on je funkcija elektronske gustoće oko jezgre. Kemijski pomak je posljedica činjenice da na jezgre ne djeluje samo magnetsko polje, već individualno magnetsko polje. [8.]

Bitni parametri u NMR su kemijski pomak, konstanta sprege i relativni intenzitet signala. Konstanta sprege nam govori kakav je utjecaj susjednih grupa na jezgru, kemijski pomak mjeri položaj signala, a intenzitet se odnosi na broj jezgri s istom okolinom.

2.3 Benzazoli

Benzazoli su skupina heterocikličkih spojeva koja ima vezana na benzensku jezgru azolni prsten, a općenita struktura prikazana je na Slici 3. U tu skupinu spadaju benzimidazol, benzotiazol i benzoksazol. Benzazoli svoju primjenu nalaze u širokom području pa se tako koriste u medicini, farmaciji i kao optički senzori zahvaljujući svojim fluorescentnim svojstvima.



Slika 3. Opća struktura benzazola

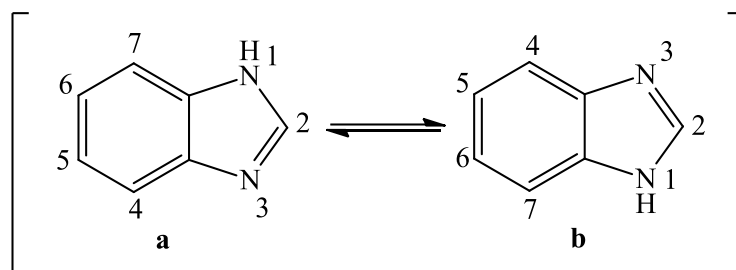
Benziazol je heretociklički aromatski spoj u čijoj strukturi se nalazi 7 ugljikovih atoma dva i heteroatoma, sumpora i dušika. Bezbojan je, a u tekućem obliku viskozan.

U prirodi postoje različiti derivati benziazola od kojih je najčešći luciferin krijesnica. Luciferin emitira svjetlost pa dolazi do pojave bioluminiscencije. Često se njegovi derivati koriste i kao insekticid i kao pojačivači okusa, primjerice 2-merkaptobenziatol.

Benzoksazol je aromatski heterociklički kemijski spoj, a sastoji se od benzenskog prstena i oksazola, peteročlanog prstena s dušikom i kisikom.

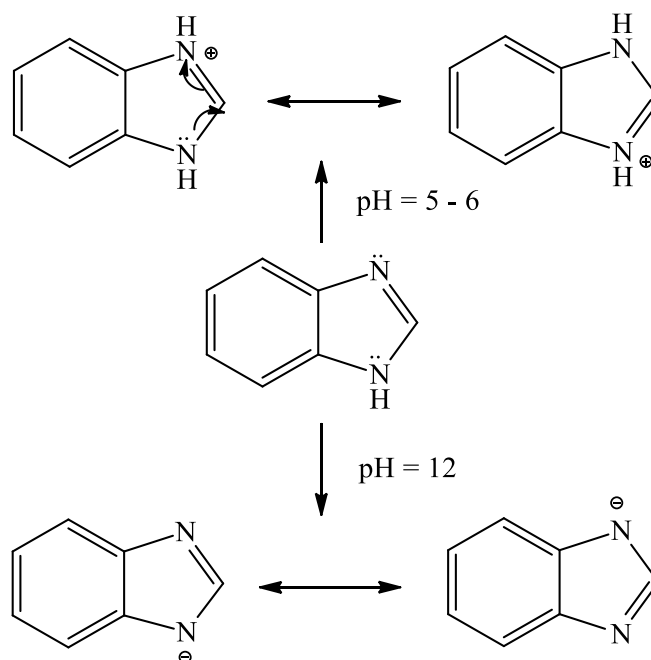
2.3.1. Benzimidazol kao funkcionalna jedinica u kemosenzorskim molekulama

Benzimidazol spada u jednu od najčešće sintetiziranih organskih skupina. Benzimidazoli su heterociklički spojevi aromatskog karaktera u čijoj se strukturi nalazi benzenska jezgra na koju je kondenziran peteročlani imidazolski prsten. Dvije su tautomerne strukture benzimidazola, prikazane na Slici 4:



Slika 4. Tautomerne strukture benzimidazola

U strukturi benzimidazola su dva heterociklička atoma dušika od kojih je jedan N atom piridinskog tipa na kojeg je vezan vodikov atom, te se može alkilirati ili acilirati i njegovi su elektroni dio aromatskog sustava, dok je drugi N atom sličan onomu pirola, nije dio aromatskog sustava i može se samo protonirati. U kiselom mediju (pH 5 – 6) taj dušikov atom je protoniran, a u lužnatom mediju (pH 12) se deprotonira što je prikazano na Slici 5: [9.]



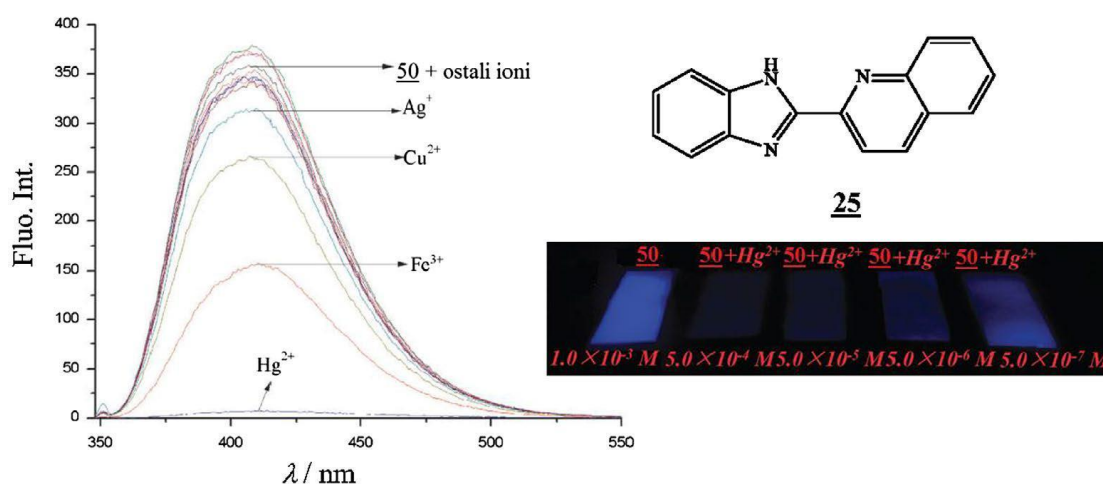
Slika 5. Ponašanje benzimidazolske jezgre u kiselom i lužnatom mediju

Benzimidazolni derivati su se pokazali kao obećavajuće funkcionalne jedinice u potencijalnim optičkim kemosenzorskim molekulama, zbog njihove pH-osjetljivosti, elektron-donorskog karaktera, sličnosti sa biomolekulama, a mogu imati ulogu π -poveznice u heteroaromatskim senzorskim sustavima. Osim toga, benzimidazoli su se pokazali kao ligandi za vezanje metalnih iona zbog postojanja slobodnog elektronskog para na atomu dušika. Reaktivnost im raste susptitucijom sa elektron donorskim skupinama, a derivati benzimidazola koji sadrže π -konjugirane veze pokazuju svojstvo fluorescencije. [10.]

Detekcija kationa je od velikog interesa mnogim znanstvenicima, uključujući kemičare, biologe i kliničke biokemičare. Tako su primjerice, alkalijski i zemnoalkalijski metali direktno uključeni u biološke procese prijenosa živčanih impulsa i reguliranje staničnih funkcija [11.], dok su teški metali iznimno opasni za zdravlje čovjeka i okoliš. Poznavanje koncentracije teških metala u ljudskom organizmu i u okolišu je vrlo važno, a s obzirom na osjetljivost fluorescentnih tehnika, fluorescentni senzori za određivanje metala u tom pogledu imaju ključnu ulogu.

Molekularni sustavi za prepoznavanje metalnih iona se baziraju na supramolekularnoj kemiji, gdje se komponente povezuju povratnim intermolekularnim silama (van der Waalsove sile, vodikove veze i elektrostatska privlačenja). Najčešći mehanizmi prepoznavanja metala se baziraju na stvaranju koordinirane veze između metala i liganda ili na selektivnim elektrostatskim interakcijama kao što su ion-dipol interakcije. Koordinacijom metala i liganda može doći do povećanja ili smanjenja fluorescencije.[12.] Benzimidazol je često dio senzorskog sustava za detekciju metala jer posjeduje slobodni elektronski par na dušikovom atomu što omogućuje vezanje kationa. Razvijeni su mnogi kemosenzori koji pokazuju veliku selektivnost i osjetljivost za određivanje prijelaznih metala i lantanida, a u nastavku su predstavljeni benzimidazolni derivati kao potencijalne kemosenzorske molekule.

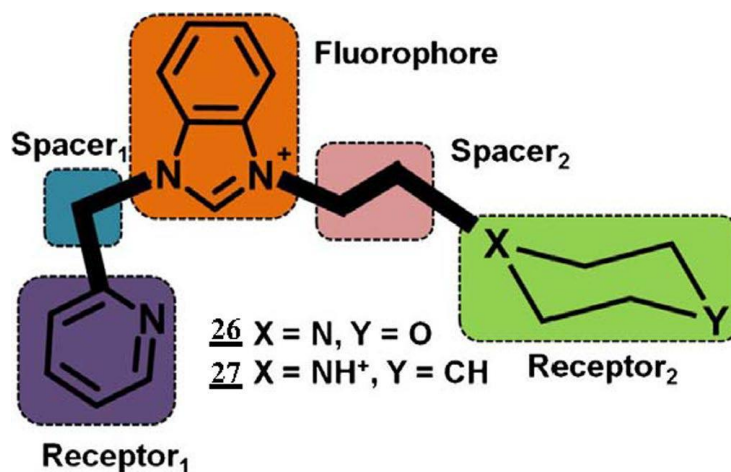
Hu i suradnici su 2015.godine sintetizirali su derivat kinolina i benzimidazola kao potencijalni senzor za određivanje Hg(II) iona. Živa je jedan od najotrovnijih metala, a veliki izazov u razvoju senzora je topljivost u vodi. U prisutnosti Hg(II) iona gasi se fluorescencija spoja, a pokazao se kao obećavajući fluorescentni senzor za određivanje živinih (II) iona zbog vrlo niske granice detekcije. Kinolinski dio molekule ima ulogu fluorofora, a benzimidazol receptora za Hg(II) ione. Većina derivata benzimidazola je netopljiva u vodi što ograničava njihovu primjenu, a drugi problem su valne duljine pri kojima ove molekule pokazuju optički odziv.[13.]



Slika 6. Optički senzor baziran na benzimidazolu za određivanje Hg²⁺ iona; gašenje fluorescencije uzrokovano je prisutnošću Hg²⁺, što je vidljivo i pod UV lampom

Senzori za određivanje iona željeza su najviše istraživani, ali je glavni problem kao i kod žive topljivost u vodi. Derivat benzimidazola i rodamina je rijedak primjer senzora koji je topljiv u vodi. Kompleksnost željeza uzrokuje promijenu boje od bezbojne do crvene uz značajan porast molarnog ekstincijskog koeficijenta. Te drastične promjene uzrokovane su otvaranjem rodaminskog prstena. [14.]

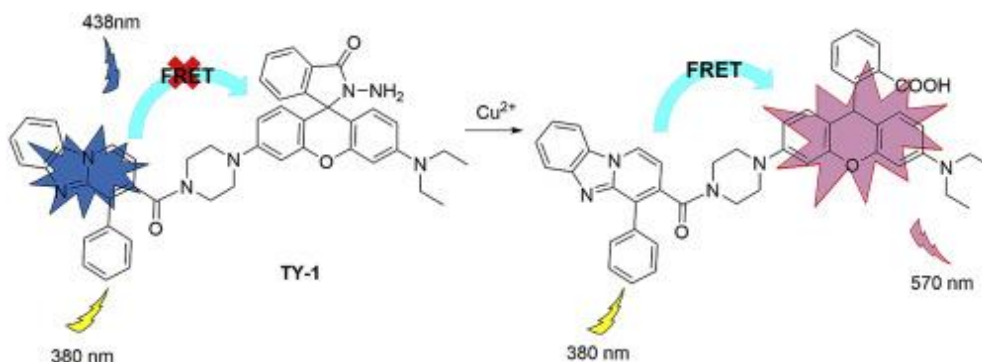
Najveći izazov u razvijanju senzora baziranih na benzimidazolu za određivanje metalnih kationa je njihova mogućnost da funkcioniraju u čistoj vodi. Lal i Milton su u tu svrhu dizajnirali benzimidazolne soli koje su sposobne detektirati metalne ione. Sustav se bazira na benzimidazolu kao fluoroforu, metilenu i etilenu kao poveznica i piperidinskim jedinicama kao receptorima. PET (fotoinducirani prijenos elektrona) ovisi o poziciji i o dostupnosti slobodnih elektronskih parova na receptorima. PET proces je jako izražen u 26, zbog dva receptora piridina i morfolina pa je stoga intenzitet fluorescencije puno manji nego u 27. 26 se ponaša kao *turn-on* senzor za željezo, krom i barijeve ione što je neuobičajeno jer željezovi i kromovi ioni gase fluorescenciju. 27 se ponaša kao *turn-off* senzor za željezo jer gasi fluorescenciju zbog paramagnetičnih svojstava. Ovakav senzor pokazuje veliku mogućnost korištenja u biologiji i biokemiji jer željezovi i kromovi ioni imaju važnu ulogu u metaboličnim procesima stanica. [15.]



Slika 7. Struktura senzora za željezo($\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$) i krom(Cr^{2+}) baziran na derivatima benzimidazola

Yanqing Ge i suradnici su sintetizirali fluorofor pirido[1,2-*a*]benzimidazol kojeg su iskoristili kao donor u sustavu fluorescentnog motoriziranog invertnog mikroskopa tzv.FRET (fluorescentni rezonancijski prijenos energije). Derivat je pokazao veliki Stokesov pomak, veliku selektivnost i brzi odziv. Također je uočena i velika osjetljivost na Cu^{2+} ione. Velika

prednost ovog derivata za detekciju bakra je to što otopina u prisutvu bakra promijeni boju iz bezbojne u ružičastu što omogućuje detekciju golim okom. [16.]

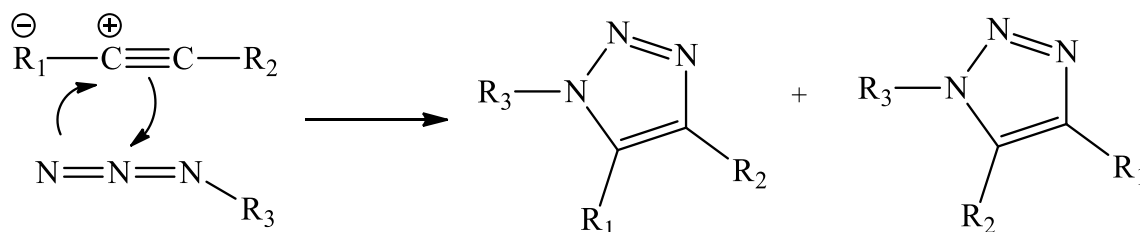


Slika 8. Pirido[1,2-*a*]benzimidazol

2.4 Click-kemija

Pojam *click* kemije uveo je K. B. Sharpless. Pojam „*click*“ odnosi se na jednostavne, efikasne i selektivne kemijske transformacije koje dovode do jednog produkta. Da bi reakcija bila *click* reakcija ona mora biti modularna, visokog iskorištenja, stereospecifična. Ove reakcije se odvijaju u jednostavnim uvjetima, otapala se rijetko koriste i ako se koriste lako se uklone. [17.]

Postoji nekoliko reakcija koje zadovoljavaju ove uvjete, a najpoznatija je Huisgenova 1,3-dipolarna cikloadicija koja uključuje reakciju dipolarofila (alkeni, alkini ili molecule koje sadrže heteroatome u funkcionalnim skupinama) s 1,3-dipolarnim spojem azidom, a kojom nastaju 1,4- i 1,5-disupstituirani regioizomeri 1,2,3-triazola, prikazano na Slici 13.



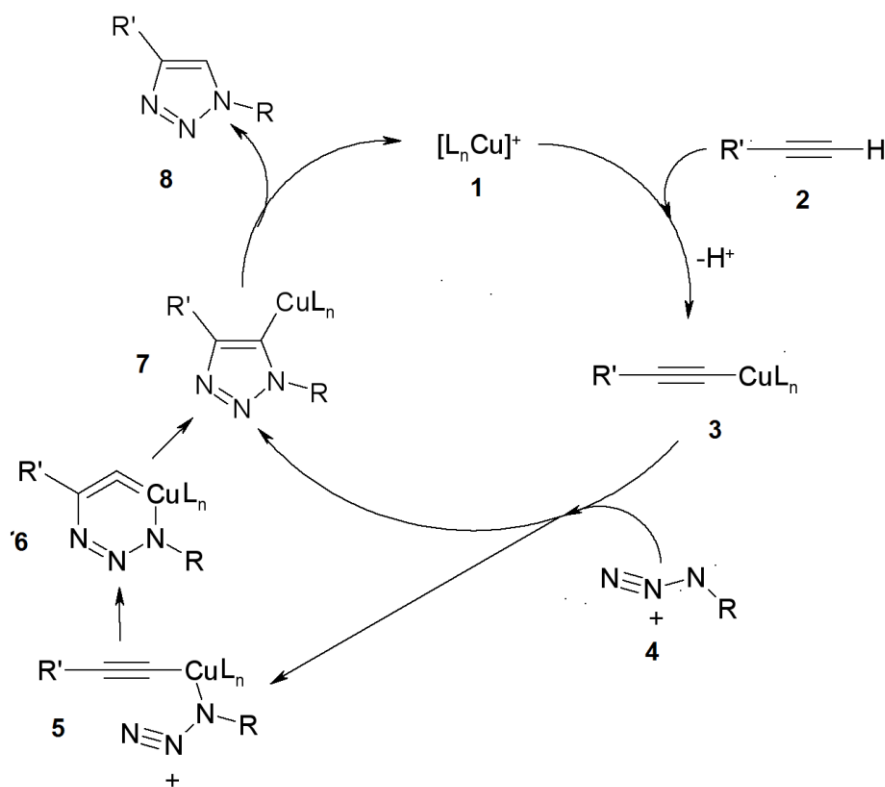
Slika 9. Huisgenova 1,3-dipolarna cikloadicija

Huisgenova 1,3-cikloadicija alkina i azida, zbog zahtjevnih reakcijskih uvjeta i nastajanja dvaju regioizomera, ne zadovoljava u potpunosti kriterije *click* reakcija. Kasnije je razvijena metoda za dobivanje samo 1,4-, odnosno 1,5-disupstituiranih derivata 1,2,3-triazola. korištenjem Cu(I) i Ru(II) iona kao katalizatora.

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

Azid-alkin cikloadicija katalizirana sa Cu(I) (CuAAC) je reakcija kojom nastaju isključivo 1,4-disupstituirani 1,2,3-triazolni derivati, a zadnjih godina je često korištena u sintezi lijekova, biokemiji, dijagnostici i genskoj terapiji. Reakciju karakterizira regioselektivnost i kemoselektivnost, jednostavna je za provođenje jer se kao otapalo koristi voda, a kao katalizatori lako dostupne bakrene soli ($\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$, CuI, CuBr).

Mehanizam reakcije prikazan je na Slici 10. Reakcija započinje vezanjem alkina **2** na Cu(I) uz izdvajanje jednog liganda pri čemu nastaje bakrov acetilid **3**. Zatim azid supstituira jedan od liganda i bakrov kompleks veže dušik vezan na supstituent R stvarajući intermedijer. Napadom dušika u intermedijereu na C-2 položaj acetilida nastaje šesteročlani Cu(III) kompleks **6** čijim preuređivanjem nastaje pentaciklički spoj **7** koji proteolizom daje konačni produkt 1,4-disupstituirani derivat 1,2,3-triazola **8**. [18.]

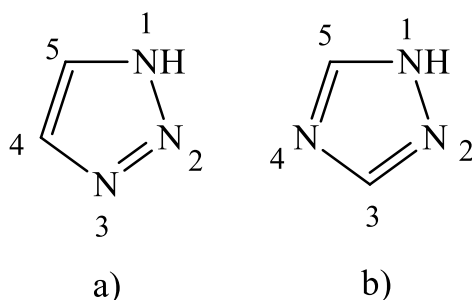


Slika 10. Mehanizam azid-alkin cikloadicije katalizirane Cu(I)

2.4.2 Triazoli u kemosenzorskim molekulama

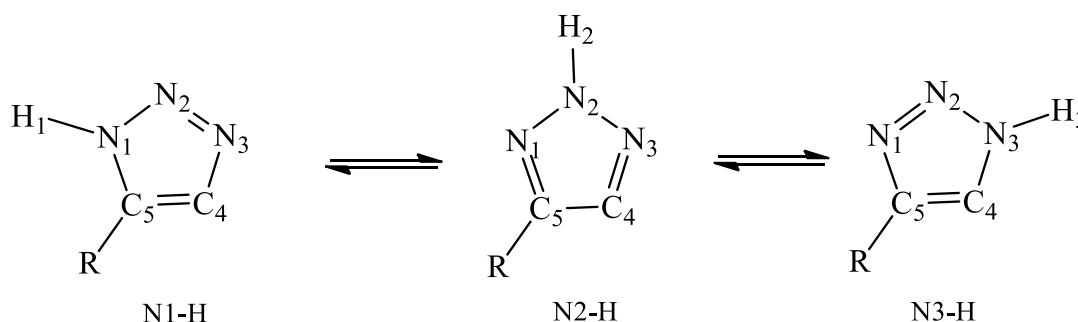
Triazolni prsten sadrži tri atoma dušika što mu omogućava da bude ligand za koordinaciju metala, a može stvarati i vodikove veze. Ove karakteristike određuju primjenu triazola kao funkcionalne skupine u većim heteroaromatskim spojevima.

Triazoli su aromatske molekule opće formule $C_2H_3N_3$, a javljaju se u dva izomerna oblika 1,2,3-triazol i 1,2,4-triazol. Atomi dušika mogu biti supstituirani, a različiti derivati 1,2,3- i 1,2,4-triazola su često korišteni u industriji kao boje i bjelila za vlakna, inhibitori korozije ili kao fungicidi i insekticidi.



Slika 11. a) 1,2,3-triazol i b) 1,2,4-triazol

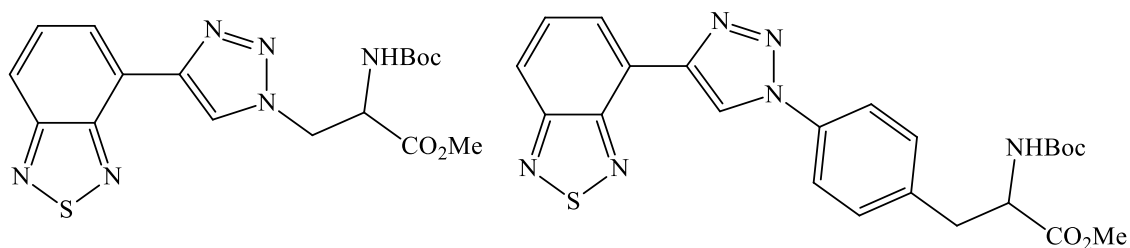
N(H) atom vodika 1,2,3-triazola može biti vezan na bilo koja tri atoma dušika. Uobičajeno, ako su dva ugljikova atoma supstituirana s dva različita supstituenta, npr. $R \neq H$ tada postoje tri različite tautomerne strukture (slika 12.). [19.]



Slika 12. Tautomeri 1,2,3-triazola

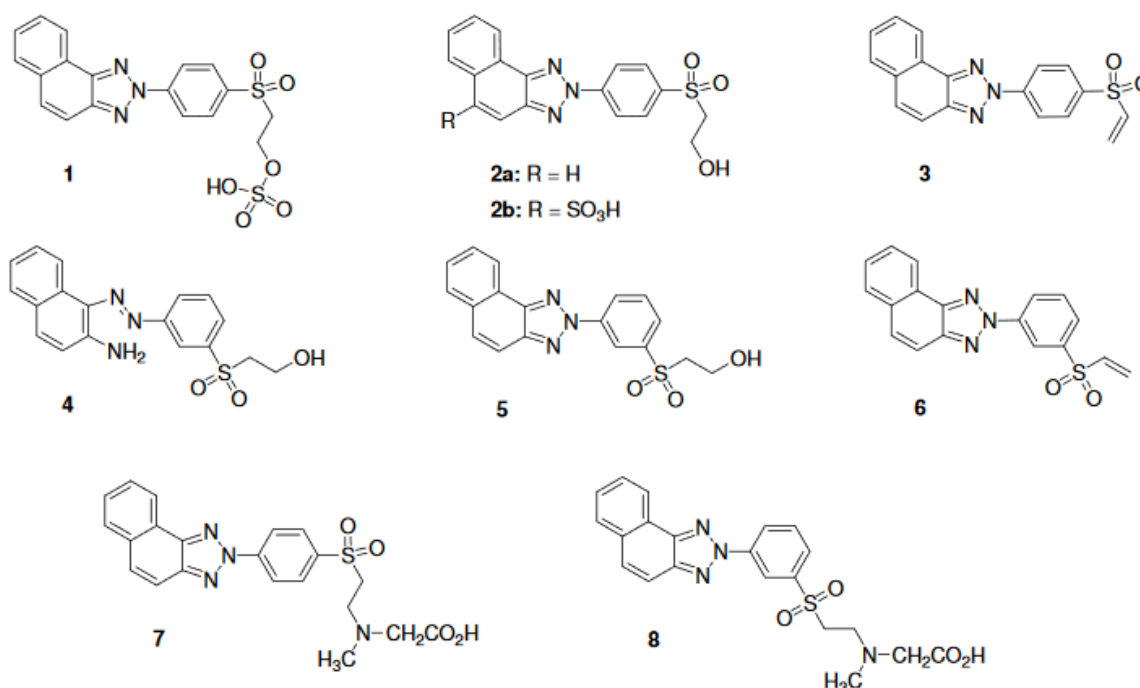
1,2,3-triazoli mogu imati različite uloge u senzorskom mehanizmu prepoznavanja metalnih kationa. Zbog prisutnosti dušikovih heteroatoma, triazoli mogu koordinirati metalne katione, a mogu imati i ulogu poveznice između receptorskog i fluorofornog dijela senzorske molekule zbog delokaliziranih π -elektrona, te kao dio konjugiranog fluorofora sudjelovati u prijenosu signala prilikom vezanja receptora na analit. [20.]

Xie i suradnici uspješno su sintetizirali nove triazolne derivate na bazi benzotriazola koji su pokazali promjenu intenziteta fluorescencije u prisustvu Cu^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} i Hg^{2+} iona u acetonitrilu. [21.] Struktura spojeva prikazana je na Slici 13.



Slika 13. Prikaz struktura triazolnih derivata benzotriazolona

Oliveira-Campos i suradnici su 2010. godine sintetizirali nove tricikličke derivate triazola, gdje je 1,2,3-triazolna jezgra fuzionirana na naftalen, a strukture su prikazane na Slici 14.



Slika 14. Strukture novopripremljenih derivata naftotriazola

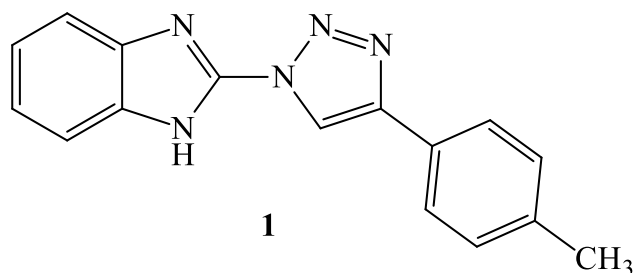
Spojevi su spektroskopski okarakterizirani apsorpcijskom i fluorescencijskom spektroskopijom, a na temelju dobivenih rezultata prikazanih u Tablici 2. zaključili su da se komponente mogu iskoristiti kao fluorescentne probe i kao optički izbjeljivači. [22.]

Tablica 2. Valne duljine maksimuma apsorpcije (A_{\max}) i emisije (F_{\max}), te vrijednosti kvantnih iskorištenja q_F spojeva 1-8 u acetonitrilu.

	Λ_{\max} (nm)	F_{\max} (nm)	λ_{excit} (nm)	q_F (%)
(1)	360	380	340	82
(2b)	360	380	340	80
(2a)	360	375	340	83
(5)	353	362	340	81
(3)	360	380	340	82
(6)	354	363	340	81
(7)	360	380	340	62
(8)	354	362	340	54

3. EKSPERIMENTALNI DIO

U okviru ovog rada pripremljen je novi derivat benzimidazola, 2-(4-(*p*-tolil)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)-1*H*-benzo[*d*]imidazol **1** (Slika 1) *click* kemijskom reakcijom odgovarajućih azida i alkina. Novopripremljeni spoj spektroskopski je okarakteriziran kao potencijalna kemosenzorska molekula za određivanje pH u otopinama univerzalnih pufera.



Slika 16. Struktura pripremljenog spoja

3.1. Opće napomene

Kemijske reakcije provedene su uobičajenim metodama organske sinteze. Za tankoslojnu kromatografiju (TLC) korištene su ploče *60F-254* prevučene slojem silikagela *Merck*, a za detekciju izoliranih komponenata korištena je UV svjetlost valne duljine 254 i 356 nm. Kromatografska odjeljivanja provedena su na staklenim kolonama punjenim silikagelom *Fluka* (0,063-0,02 mm) pod utjecajem gravitacijske sile, a kao eluens korištena je smjesa otapala $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{CH}_3\text{OH}$.

Spektri $^1\text{H-NMR}$ snimljeni su na spektrometru *Bruker* 300 MHz. Uzorci su otopljeni u $\text{DMSO-}d_6$ i mjereni pri 298 K. Kemijski pomaci (δ) u $^1\text{H-NMR}$ spektrima izraženi su u ppm u odnosu prema signalu DMSO na δ 2,50 ppm za ^1H .

Pri izvedbi eksperimenata rabljeni su sljedeći instrumenti:

- analitička vaga *KERN & Sohn GmbH, D-72336 Balingen, Germany*;
- UV-vidljivi spektrofotometar, *Cary 100 Scan*;
- UV-vidljivi spektrofluorimetar, *Cary Eclipse*.

3.2 Priprava 2-(4-(*p*-tolil)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)-1*H*-benzo[*d*]imidazol **1**

50,0 mg 2-azido-1*H*-benzimidazola (0,31 mmol) i 39,8 μ L 1-etinil-4-metilbenzena (0,31 mmol, 36,4 mg) otopljeni su u smjesi tert-butanol:voda = 1:1 (3 mL). U reakcijsku smjesu dodano je 0,5 mL DMF, 0,1 M $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ (25,0 mg $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ otopljeno u 1,0 mL H_2O), 31,0 mg natrijevog askorbata (0,15 mmol) i 8,3 mg i tris((1-benzil-4-triazolil)metil)amina, TBTA (0,02 mmol). Reakcijska smjesa miješa se preko noći na sobnoj temperaturi i u mraku, a tijekom reakcije praćen je tankoslojnom kromatografijom. Dobiveni produkt ekstrahiran je s $3 \times 5,0$ mL CH_2Cl_2 i pročišćen kolonskom kromatografijom uz CH_2Cl_2 : CH_3OH (200:1) kao eluens. Dobiveno je 12,5 mg praškastog bijelog produkta (14,5 %)

^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ/ppm = 13,79 (s, 1H, NH), 9,44 (s, 1H, $\text{H}_{\text{triazol}}$), 7,95 (d, J = 5,43 Hz, 2H, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 7,59 – 7,69 (m, 2H, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 7,33 (d, J = 7,86 Hz, $\text{H}_{\text{arom.}}$), 2,37 (s, 3H, CH_3).

3.3 Priprava otopina

3.3.1 Postupak priprave matične otopine spoja

Matična otopina spoja pripravljena je otapanjem 1,1 mg spoja u 3 mL etanola, a koncentracija pripravljene otopine izračunata je prema jednadžbi (4):

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

gdje je c [mol dm^{-3} , M] koncentracija spoja, M [g mol^{-1}] molarna masa tvari, V [dm^3] volumen otopine, a m [g] masa odvage spoja. Koncentracija matične otopine spoja **1** iznosi $c = 1,33 \times 10^{-3}$ M. Mjerne otopine korištene u izvedbi eksperimenata pripravljene su razrjeđivanjem matične otopine u 3,0 mL otapala.

3.3.2 Postupak pripreme puferских otopina različitih pH vrijednosti

Otopine univerzalnog pufera u rasponu vrijednosti pH od 2,00 do 12,00 pripravljene su prema standardnom postupku za pripremu pufera miješanjem citratne otopine i određenog volumena 0,1 M otopine klorovodične kiseline. Citratna otopina pripravlja se miješanjem 100,00 mL 0,33 M limunske kiseline, 3,54 g borne kiseline, 100,00 mL 0,33 M fosfatne kiseline te 343,00 mL 1 M natrijeva hidroksida u odmjerne tikvici od 1,0 L. Citratna otopina (A) i otopina klorovodične kiseline (B) miješaju se u odmjerne tikvici prema jednadžbi (-):

$$20,00 \text{ ml A} + x \text{ ml B (u 100,00 ml)}$$

gdje je x (B) = volumen klorovodične kiseline (mL).

Također, pripravljene su otopine 0,1 M klorovodične kiseline pH 1,00 i 0,1 M natrijevog hidroksida pH vrijednosti 13,00.

3.4. Mjerenja

Apsorpcijski i emisijski spektri spoja **1** u različitim otapalima i otopinama univerzalnih pufera snimani su pri koncentraciji spoja 1×10^{-5} M koja je dobivena razrjeđenjem matične otopine spoja. Mjerene otopine su pripravljene dodatkom određenog alikvota matične otopine u kivetu u kojoj se nalazi 3,0 mL otapala. Iz matičnih otopina spojeva automatskom pipetom su uzeti alikvoti od 22,5 μ L otopine.

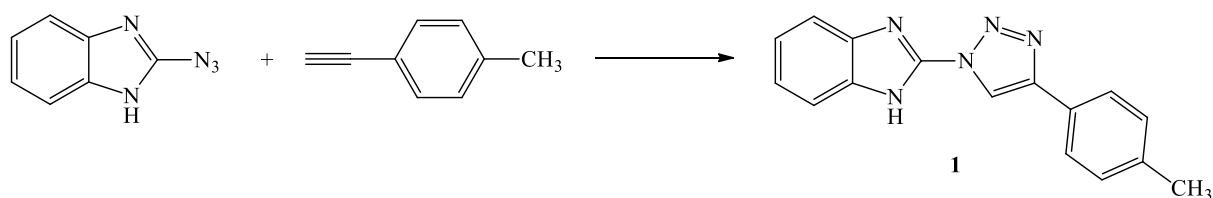
Apsorpcijski spektri snimljeni su u rasponu 200 – 500 nm. Mjerne otopine pripravljene su u kvarcnoj kiveti optičkog puta 10 mm. Prije svakog snimanja spektra, snimljena je bazna linija čistog otapala.

Emisijski spektri snimljeni su pri valnoj duljini pobude koja odgovara valnoj duljini maksimuma apsorpcije, očitanoj iz snimljenih apsorpcijskih spektara. 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. Spektri su snimani pri slitovima 5-10 i 10-10. Prije snimanja svakog apsorpcijskog i emisijskog spektra otopina u kiveti je miješana 2 minute, a valna duljina pobude za emisijske spektre bila je valna duljina maksimuma apsorpcije.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Sinteza spoja

Ciljani derivat benzimidazola i 1,2,3-triazola, 2-(4-(*p*-tolil)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)-1*H*-benzo[*d*]imidazol **1** pripravljen je *click*-reakcijom 2-azidobenzimidazola i 1-etinil-4-metilbenzena koji su u jednakim omjerima otopljeni u smjesi otapala *t*-BuOH/H₂O/DMF. Da bi reakcija bila selektivna, potrebno je dodati Cu(I) kao katalizator, pri čemu nastaje samo 1,4-disupstituirani derivat 1,2,3-triazola. Ioni bakra(I) pripravljeni su in-situ reakcijom CuSO₄ i natrijevog askorbata koji reducira Cu(II) u Cu(I) ione. TBTA je specifični ligand za Cu(I) ione i ima ulogu stabilizatora iona, odnosno promotora katalize. Na Slici 17 prikazana je Shema reakcije priprave spoja **1**.



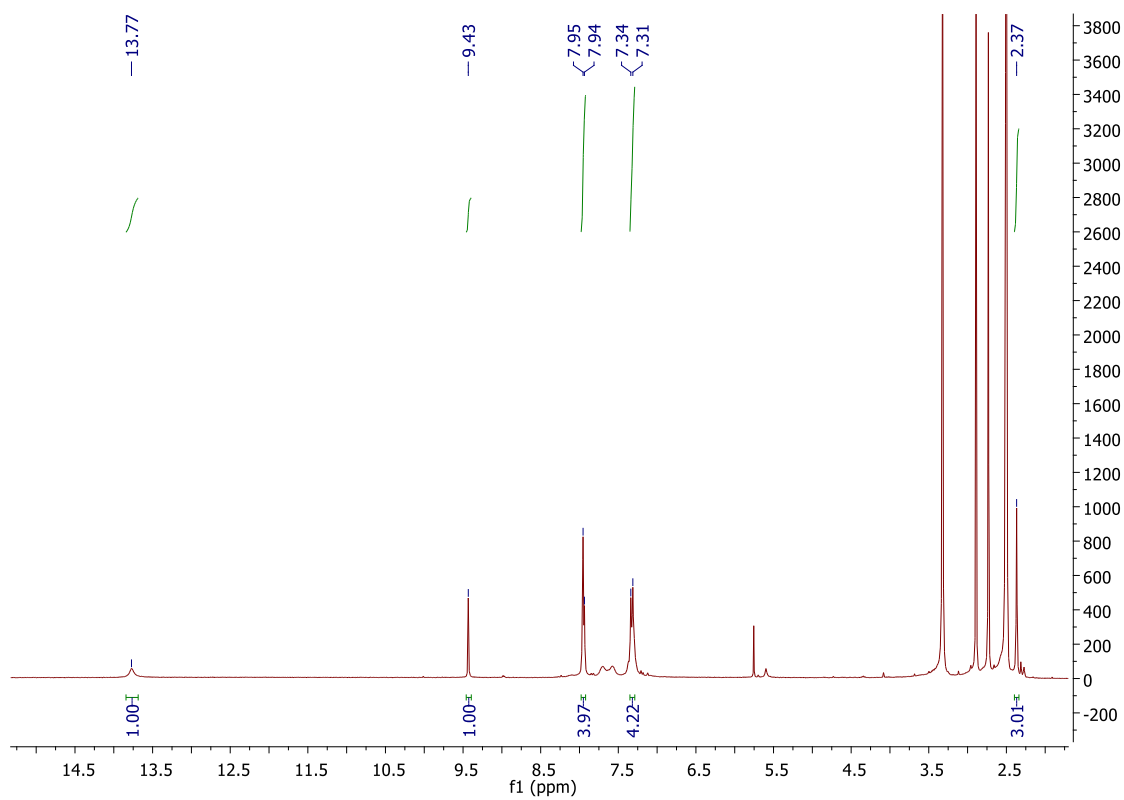
Slika 17. Priprava spoja **1**. Reagensi i uvjeti: *t*-BuOH:H₂O (1:1), DMF, CuSO₄ × 5H₂O, Na-askorbat, TBTA, 25 °C

Struktura spoja **1** potvrđena je ¹H i ¹³C NMR spektroskopijom, a dobiveni NMR spektri prikazani su na Slici 18.

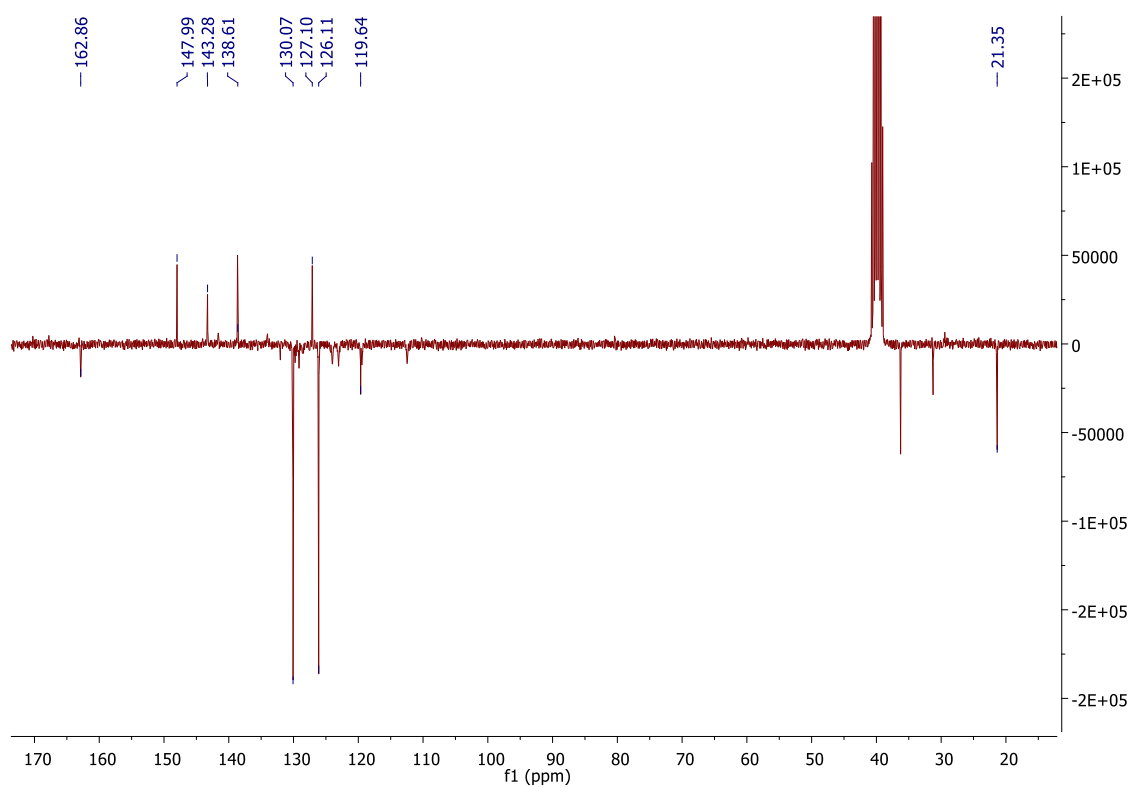
¹H NMR spektar spoja **1** prikazuje pet karakterističnih signala protona spoja. Signal na 13,77 ppm pripada jednom vodiku benzimidazola na položaju 1 koji je vezan na dušik (NH), dok proton 1,2,3-triazola na položaju C-5 pokazuje karakterističan singlet na 9,43 ppm. Dubleti na 7,95 i 7,33 ppm pripadaju aromatskim protonima dvaju benzena, dok se singlet na 2,37 ppm može pripisati trima alifatskim protonima CH₃ skupine.

U ¹³C NMR spektru spoja **1** na Slici 18. b) mogu se uočiti odgovarajući broj signala koji odgovaraju kvaternim ugljikovim atomima i odgovarajući signali CH skupina aromatskog dijela molekule. U alifatskom dijelu vidljiv je signal na --- ppm koji odgovara metilnoj skupini spoja **1**.

a)



b)

Slika 18. a) ^1H NMR spektar; b) ^{13}C NMR spektar spoja 1

4.2. Spektroskopska karakterizacija

U svrhu ispitivanja fotofizičkih svojstava novog spoja **1** snimljeni su UV-vidljivi I fluorescencijski spektri u različitim otapalima i puferskim otopinama, pri koncentraciji spoja $c = 1 \times 10^{-5}$ M.

4.2.1. Spektroskopska karakterizacija spoja u različitim otapalima

Ispitan je utjecaj otapala različite polarnosti na spektroskopska svojstva spoja **1** u vodi i izabranim organskim otapalima različite polarnosti: dietil-eteru, etil.acetatu, diklormetanu, acetonitrilu, etanolu i metanolu.

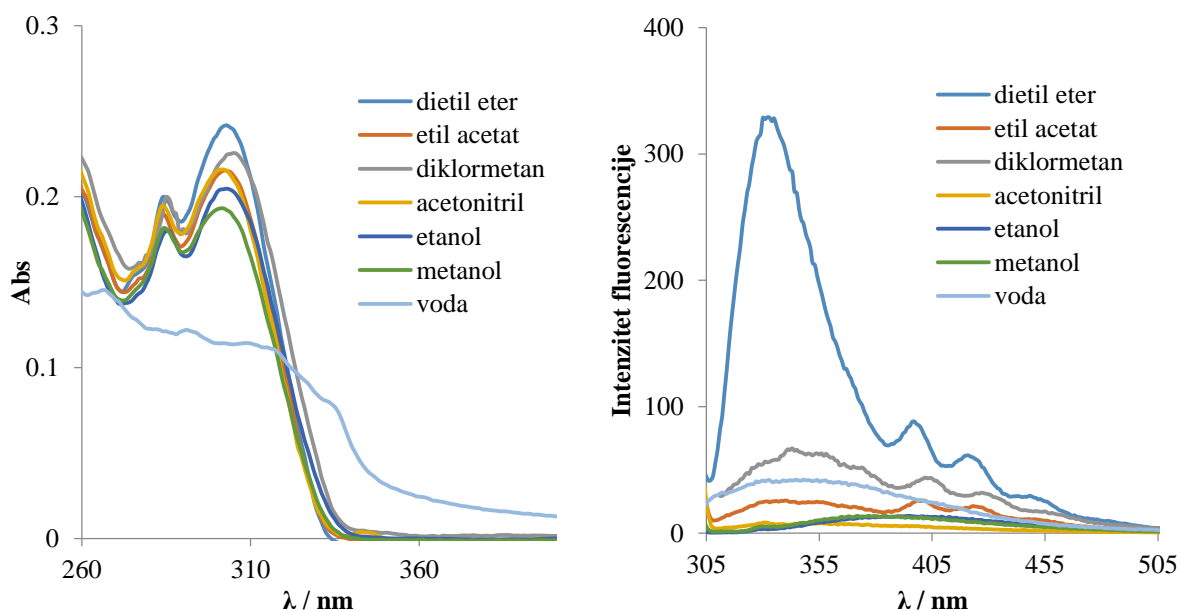
Polarnost otapala može utjecati na spektralna svojstva spojeva. Fizikalne intermolekularne interakcije između otapala i spoja koje mijenjaju energetska razliku između osnovnog i pobuđenog stanja apsorbirajućih vrsta uzrokuju promjene u apsorpcijskim spektrima snimljenim u različitim otapalima. Koeficijent polarnosti $E_T(30)$ određuje polarnost nekog otapala koja je definirana kao energija prijelaza otopljenog betainskog bojila, odnosno standarda, koji ima sposobnost promjene boje ovisno o polarnosti. Otapala veće polarnosti imaju više vrijednosti $E_T(30)$, pa prema podacima iz **Tablice 3** proizlazi da je voda polarnija od etanola i ostalih otapala. [23.]

Tablica 3. Izabrana otapala i parametri polarnosti E_T^N

OTAPALO	$E_T^N(30)$
dietil eter	0,1170
etil-acetat	0,2280
diklormetan	0,3090
acetonitril	0,4600
etanol	0,6540
metanol	0,7600
voda	1,0000

Apsorpcijska i fluorescencijska svojstva heterocikličkih spojeva koji u strukturi sadrže atome dušika ovisna su o otapalu zbog mogućnosti stvaranja vodikovih veza između atoma dušika i molekula otapala, pa polarna otapala mogu primjerice, uzrokovati batokromni pomak, tj. pomak prema većim valnim duljinama (engl. *red shift*). Postoje još hipsokromni pomak (eng. *blue shift*), tj. pomak prema kraćim valnim duljinama, hiperkromni efekt koji uzrokuje povećanje, a hipsokromni efekt smanjenje intenziteta apsorpcije, odnosno fluorescencije.

Snimljeni su apsorpcijski i emisijski spektri spoja **1**. U svim ispitanim otapalima vidljiva je apsorpcija u UV području pri 300-307 nm, s najvećim intenzitetom u nepolarnom otapalu dietil eteru. Povećanjem polarnosti dolazi do hipokromnog pomaka u apsorpcijskom spektru. U emisijskim spektrima spoja u ovim otapalima, uočeni su maksimumi emisije u području ispod 400 nm. U nepolarnom dietil eteru najveći je intenzitet fluorescencije, dok se povećanjem polarnosti intenzitet smanjuje. Također, u etanolu, metanolu i vodi, dolazi do batokromnog pomaka maksimuma emisije ($\lambda = 380-390$ nm) u odnosu na dietil eter. Dobiveni rezultati su prikazani na Slici 19. i u Tablici 4.



Slika 19. Apsorpcijski (lijevo) i emisijski (desno) spektra spoja **1** u različitim otapalima, $c(\text{spoja}) = 1 \times 10^{-5}$ M.

U Tablici 4. prikazana su spektrofotometrijska svojstva spoja u ovisnosti o otapalu, odnosno, valne duljine maksimuma apsorpcije i emisije te pripadajući intenzitet emisije. Molarni apsorpcijski koeficijent, ε izračunat je iz Lambert-Beerova zakona (2), a Stokesov pomak predstavlja razliku između valnih duljina maksimuma emisije i apsorpcije.

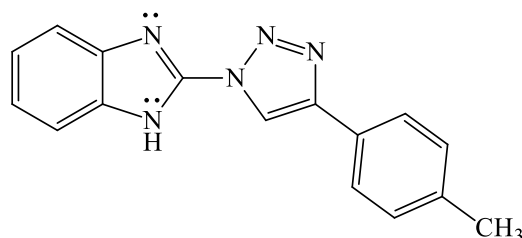
Tablica 4. Valna duljina maksimuma apsorpcije, λ_{abs} , molarni apsorpcijski koeficijent, ε , valna duljina maksimuma emisije, λ_{emisije} , Stokesov pomak i intenzitet emisije spoja u otapalima različite polarosti, pri koncentraciji $c = 1,0 \times 10^{-5}$ M.

OTAPALO	$E_T^N(30)$	$\lambda_{\text{abs}}/\text{nm}$	$\varepsilon/\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$	$\lambda_{\text{emisije}}/\text{nm}$	Stokesov pomak/nm	Intenzitet
dietil eter	0,1170					
etil-acetat	0,2280	304	35485	400	96	294,297
diklormetan	0,3090	307	33949	346	39	768,712
acetonitril	0,4600	304	14045	350	46	86,843
etanol	0,6540	300	33149	390	90	171,707
metanol	0,7600	303	36034	378	75	157,579
voda	1,0000	292	23312	392	100	461,855

4.2.2. Spektroskopska karakterizacija spoja u otopinama različitih pH vrijednosti

Promjena spektrofotometrijskih svojstava promjenom pH vrijednosti ključno je svojstvo optičkih pH senzora. Ovisnost spektrofotometrijskih svojstava spoja **1** o pH vrijednosti otopine ispitana je u univerzalnih puferima u rasponu pH vrijednosti 2-12, te u otopinama HCl (pH=1) i NaOH (pH=13), kako bi se procijenila mogućnost primjene spoja kao potencijalnog pH senzora.

Dušik na benzimidazolnom prstenu je protonabilno mjesto (Slika 20.). Zbog slobodnog elektronskog para na dušiku, u kiselom mediju može vezati H⁺ ion i protoniranje dušikovog atoma može uzrokovati spektralne promjene.



Slika 20. Protonabilno mjesto spoja **1**

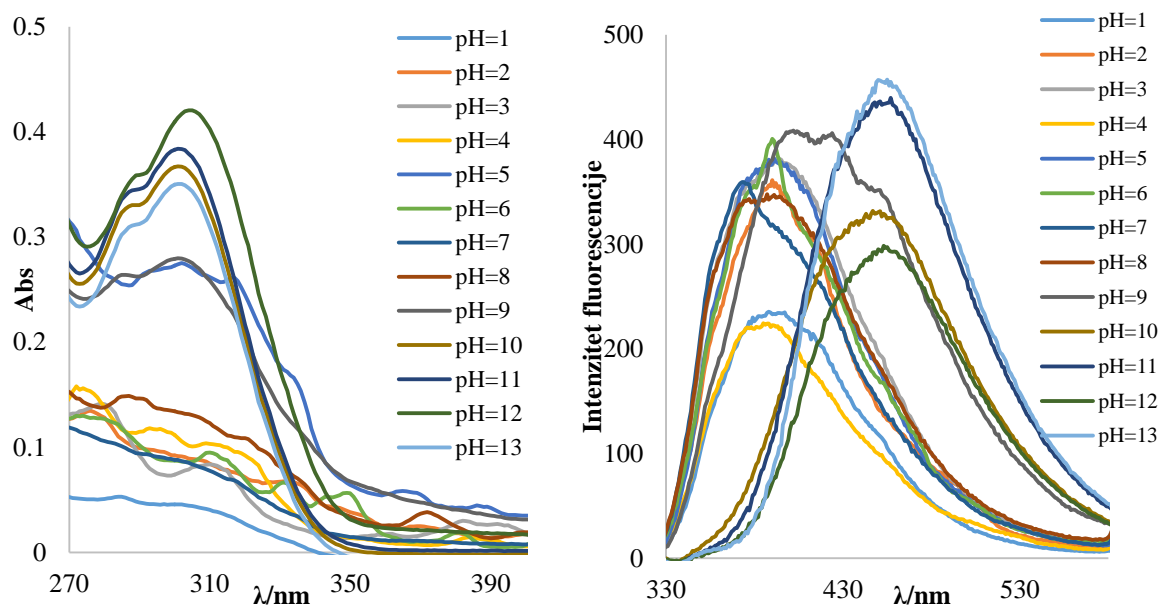
Na Slici 21. prikazani su apsorpcijski i emisijski spektri spoja u univerzalnim puferima. U apsorpcijskom spektru vidljivi su maksimumi apsorpcije pri 320 nm. Porastom pH otopine dolazi do promjene, odnosno, hiperkromnog pomaka apsorpcijske krivulje.

Senzori za pH su karakterizirani pK_a vrijednosti. Za izračunavanje pK_a, korištena je Boltzmanova funkcija (5) koja opisuje sigmoidalnu ovisnost apsorpcije ili emisije na jednoj valnoj duljini o vrijednosti pH.

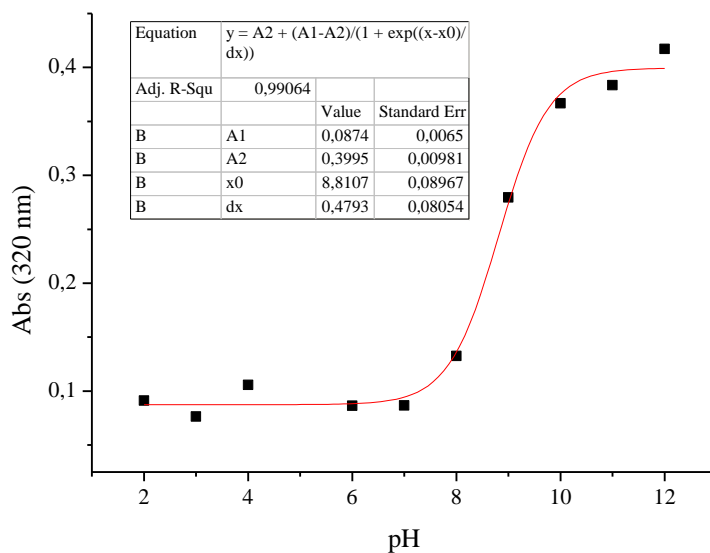
$$y = \frac{A_1 - A_2}{1 + e^{(x - x_0)/dx}} + A_2 \quad (5)$$

Iz dobivene sigmoidalne funkcije, izračunata je točka infleksije, x₀, koja odgovara uvjetnoj pK_a vrijednosti u uvjetima u kojima je izveden eksperiment. Za račun su uzete vrijednosti na valnim duljinama na kojima su najbolje vidljive spektralne promjene (apsorbancija pri 320 nm u apsorpcijskom spektru). Dobivena sigmoidalna krivulja ovisnosti apsorpcije o promjeni pH otopine prikazana je na Slici 22. Uvjetna pK_a vrijednost izračunata iz apsorpcijskih mjerenja

iznosi $pK_a = 8,81$. Dinamičko područje rada pH senzora je obično ograničeno na $pK_a \pm 1,5$, a dobiveni rezultati ukazuju na mogućnost primjene spoja kao optičkog pH senzora.



Slika 21. Apsorpcijski (lijevo) i emisijski (desno) spektri spoja 1 u otopinama univerzalnih pufera u rasponu pH vrijednosti 2-12



Slika 22. Sigmoidalna krivulja odziva na promjenu pH primjenom Boltzmanove funkcije: ovisnost apsorbancije spoja na valnoj duljini maksimuma (320 nm) o vrijednosti pH

U Tablici 5. prikazani su dobiveni parametri koji opisuju promjenu spektrofotometrijskih svojstava spoja ovisno o vrijednosti pH.

Tablica 5. Valna duljina maksimuma apsorpcije, apsorpcija, valna duljina maksimuma emisije, Stokesov pomak i intenzitet emisije spoja u otapalima različite polarности, $c = 1 \times 10^{-5}$ M otapalo

Pufer	$\lambda_{\text{abs}}/\text{nm}$	$\lambda_{\text{emisije}}/\text{nm}$	Stokesov pomak/nm	Intenzitet
pH=1	247	393	146	234,383
pH=2	257	384	127	347,712
pH=3	285	390	105	375,578
pH=4	275	394	119	218,848
pH=5	269	390	121	376,979
pH=6	280	388	108	394,576
pH=7	260	373	113	359,336
pH=8	253	383	130	341,441
pH=9	303	415	112	396,867
pH=10	303	449	146	330,613
pH=11	303	454	151	434,342
pH=12	305	452	147	292,608
pH=13	303	450	147	456,968

5. ZAKLJUČAK

- 1,2,3-triazol u kemosenzorima, osim kao ulogu poveznica u konjugiranim π -sustavima, može koordinirati metalne ione, pa su često korišteni kao ligandi u optičkim senzorima za metalne katione.
- Azid-alkin cikloadicija katalizirana bakrom(I) (CuAAC) je najčešća reakcija *click* kemije kojom se dobivaju 1,4-disupstituirani 1,2,3-triazoli.
- U okviru ovog rada *click* kemijski pristup je korišten za sintezu novog derivata benzimidazola, 2-(4-(*p*-tolil)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)-1*H*-benzo[*d*]imidazol.
- Struktura spoja potvrđena je ¹H- i ¹³C-NMR spektroskopijom. U ¹H NMR spektru vidljivi su karakteristični signali protona 1,2,3-triazola na 9,43 ppm i benzimidazola na 13,77 ppm.
- UV-vidljivom apsorpcijskom i fluorescencijskom spektrofotometrijom ispitana su spektroskopska svojstva spoja u ovisnosti o polarnosti otapala i pH vrijednosti pri koncentraciji spojeva $1,0 \times 10^{-5}$ M.
- Ispitivanjem spektrofotometrijskih svojstava spoja uočeni su veliki Stokesovi pomaci koji su ključno svojstvo senzorskih molekula.
- Kod spoja **1** uočen je solvatokromizam. Najveća apsorbanciju i intenzitet fluorescencije primijećeni su u nepolarnom otapalu dietil-eteru, a povećanjem polarnosti dolazi do hipokromnog pomaka u apsorpcijskom, te hipokromnog i batokromnog pomaka maksimuma emisije.
- Ispitan je utjecaj pH na spektroskopske karakteristike.
- Benzimidazolni prsten spoja **1** omogućuje vezanje H⁺ iona što dovodi do spektralnih promjena.
- Rezultati su pokazali da povećanjem pH vrijednosti otopine dolazi do povećanja apsorbancije na 320 nm. Također, u kiselom mediju, spoj emitira u području ispod 400 nm (390 nm), dok povećanjem pH je uočen batokromni pomak maksimuma emisije (450 nm).

6. LITERATURA

1. Hulanicki, A., Glab, S. Ingman, F., Chemical sensors definition and classification, *Pure & Appl.Chem* **63**(9)(1991) 1248 -1250.
2. Lobnik, A., Turel, M., Urek, Š. K., Optical Chemical Sensors: Design and Applications, Wang, W., *Advances in Chemical Sensors*, Rijeka, InTech (2011) 3-8.
3. Skoog, D. A., West, D. M., Holler, F. J., *Osnove analitičke kemije 1*, Školska knjiga, Zagreb (1999) 489-499, 585-589.
4. www.columbia.edu/~vjd1/electomag_spectrum.htm (pristup: 20.lipnja 2018.)
5. https://www.fkit.unizg.hr/_download/repository/Nastvani_tekst_Molekulska_spektroskopiya.pdf (pristup: 20. lipnja 2018.)
6. Filipović, I., Lipanović, S., *Opća i anorganska kemija 7*, Školska knjiga, Zagreb (1988) 354
7. McMurry, J., *Osnove organske kemije 7*, Zrinski d.d, Čakovec (2014) 445-447.
8. http://moodle.srce.hr/20172018/pluginfile.php/1538309/mod_resource/content/1/Predavanje%2016.pdf (pristup: 22.lipnja 2018.)
9. M.Hranjec, Doktorska disertacija „Sinteza, biološko djelovanje i interakcija s *ct*-DNK novih derivate benzimidazola“, Zagreb (2007)
10. Horak, E., Kassal, P., Steinberg, Murković I., Benzimidazole as structural unit in fluorescent chemical sensors: the hidden properties of a multifunctional heterocyclic scaffold, *Supramolecular Chemistry* **30**(10) (2017) 838-857.
11. Valeur, B., Lerray, I., Design principles of fluorescent molecular sensors for cation recognition, *Coordination Chemistry Review* **205** (2000) (1999) 1
12. Lehn, J.-M., *Molecular Recognition*. In *Supramolecular Chemistry 2006*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; pp. 11-30
13. Hu, J.; Li, J.; Qi, J; Chen, J. *New J. Chem.* **2015**,39,843-848
14. Li, G.; Tang, J.; Ding, P.; Ye, Y. *J. Fluoresc.* **2016**, 26, 155–161.
15. Lal, A.K.; Milton, M.D. *Sens.Actuator B-Chem.* **2014**, 202, 257-262
16. Ge, Yanqing., Zheng, X., Ji, Ruixue., Shen, S., Cao, X., A new pyrido[1,2-a]benzimidazole-rhodamine FRET system as an efficient ratiometric fluorescent probe for Cu²⁺ in living cells, *Analytica Chimica Acta* **965** (2017) 103.

17. Bryant, J., Bunz, U.H.F., *Click To Bind: Metal Sensors*, Asian Chemical Editorial Society, (2013) 1-12.
18. Liang, L., Astruc, D., The copper(I)-catalyzed alkyne-azide cycloaddition (CuAAC) “click” reaction and its applications. An overview, *Coordination Chemistry Reviews*, 5255 (2011) 2934-2936.
19. Oziminski, W. P., Dobrowolski, J. Cz., MAzurek, A.P., DFT studies on tautomerism of C5-substitued 1,2,3-triazoles, *Journal of Molecular Structure* **651** (2003) 697-704.
20. Lau, Y. H., Rutledge, P.J, Watkinson, M., Todd, M. H., Chemical sensors that incorporate click-derived triazoles, *Chemical Society Reviews* 40 (2011) 2848-2866.
21. Xie, J., Yu, Y., Ruan, Y., Li, C., Triazolyl benzothiadiazole fluorescent chemosensors: A systematic investigation on 1,4- or 1,5-disubstituted mono- and bis- triazole derivates, *Tetrahedron*, **69** (23) (2013) 4603.
22. Oliveira-Campos, A. M. F., Rodrigues, L.M., Esteves, A.P., Silva, E.M., Sivasubramanian, A., Hrdina, R., Soares, G.M.B., Pinto, T., Machalicky, O., Naphthotriazole derivatives: synthesis and fluorescence properties, *Dyes and Pigments* **87** (3) (2010) 188-193.
23. Reichardt, C., Welton, T., Solvent Effects on the Absorption Spectra of Organic Compounds, in *Solvents and Solvent Effects in Organic Chemistry*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, (2010) 359–424.

ŽIVOTOPIS

Veronika Šimić [REDACTED] Osnovnu školu Bogumila Tonija završila je u Samoboru. 2010. godine upisuje opću gimnaziju Antun Gustav Matoš u Samoboru. 2015. godine upisuje preddiplomski studij Kemijskog inženjerstva na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije u Zagrebu. Studentsku stručnu praksu odradila je u Odvodnji d.o.o. Samobor. 2018. godine obranila je završni rad na temu “Spektroskopska ispitivanja novih fluorofora temeljnih na benzazolima” čime je stekla titulu provstupnika kemijskog inženjerstva.