

# Derivati naftilimida kao fluorescentni indikatori za ione teških metala

---

**Matić, Mislav**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2020**

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

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:149:548309>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-12-02**



*Repository / Repozitorij:*

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



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

**Mislav Matić**

**ZAVRŠNI RAD**

**Zagreb, 2020.**

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE  
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

**Mislav Matić**

**DERIVATI NAFTILIMIDA KAO FLUORESCENTNI  
INDIKATORI ZA IONE TEŠKIH METALA**

ZAVRŠNI RAD

Voditelj rada: izv. prof. dr. sc. Ivana Steinberg

Članovi ispitnog povjerenstva: izv. prof. dr. sc. Ivana Steinberg  
izv. prof. dr. sc. Svjetlana Krištafor  
doc. dr. sc. Dragana Vuk

Zagreb, 2020.

*Prije svega, želim se zahvaliti mentorici, izv. prof. dr. sc. Ivani Steinberg, na pružanju mogućnosti sudjelovanja u znanstvenim istraživanjima te na ukazanom povjerenju, strpljivosti i velikoj pomoći tokom cijelog mogeg rada na preddiplomskom studiju. Hvala Vam na prenesenom znanju i svim savjetima koji su iznimno utjecali na mene.*

*Veliko hvala i asistentici Kristini Pršir, mag. appl. chem., na neizmjernoj pomoći prilikom izrade ovoga rada, otvorenosti i lijepom vremenu provedenom u laboratoriju. Također, zahvaljujem svim članovima Zavoda za opću i anorgansku kemiju na ugodnoj radnoj atmosferi.*

*Posebno se zahvaljujem dr. sc. Emi Horak na uvođenju u tematiku kemijskih senzora i danom praktičnom znanju.*

*Zahvaljujem se dr. sc. Gerhardu Mohru na pripremljenim spojevima bez kojih ovaj rad ne bi bio moguć.*

*Naravno, ne bih nikada došao do trenutka pisanja ovoga i ne bih nikada ostvario nijedan uspjeh bez ljubavi i potpore moje obitelji. Hvala vam za sve.*

*I na kraju, želim se zahvaliti svim prijateljima i kolegama na svakoj pomoći i lijepim trenucima koje ću zauvijek pamtit. Irena, hvala ti na svim predivnim uspomenama, smijehu, pomoći, razgovoru i što smo, mnogo puta iznova, pokorili svijet.*

*Posvećeno Marini i Matei.*

## SAŽETAK

Derivati 4-amino-1,8-naftilimida fluorescentni su spojevi koji primjenu pronalaze kao optički kemosenzori i kao komponente optičkih kemijskih senzora za detekciju raznih kemijskih vrsta. U ovome radu spektroskopski su ispitana dva nova derivata naftilimida, **GJM-523** i **GJM-525**, a koje je sintetizirao Gerhard J. Mohr (Joanneum Research, Weiz, Austrija). Ispitan je potencijal primjene spojeva **GJM-523** i **GJM-525** kao pH osjetljivih fluorescentnih kemosenzora za metalne ione u vodenim otopinama primjenom UV-vidljive apsorpcijske i fluorescencijske spektrofotometrije. Optička svojstva derivata naftilimida proizlaze iz elektronske interakcije fluorofora i receptora vezanog putem amino dušika u položaju 4 u strukturi naftilimida mehanizmom fotoinduciranog prijenosa elektrona (PET). Vežanjem analita na receptor mijenjaju se fluorescencijska svojstva molekule ovisno o vrsti i koncentraciji analita. Ispitana je ovisnost fluorescentnog odziva spojeva **GJM-523** i **GJM-525** o pH vrijednosti vodenih otopina u rasponu 1,20 - 8,00 pri čemu intenzitet fluorescencije pravilno raste padom pH vrijednosti uslijed protoniranja amino dušika u strukturi piperazina u receptoru. Također, ispitan je fluorescentni odziv spojeva u prisutnosti metalnih iona u vodenim otopinama. Za spoj **GJM-523** određen je mogući stehiometrijski omjer vezanja s ionima  $\text{Cu}^{2+}$  i  $\text{Hg}^{2+}$ . Spoj **GJM-525** ispitan je kao selektivni fluorescentni kemosenzor za  $\text{Hg}^{2+}$  ione uz praćenje vremenske ovisnosti intenziteta fluorescencije. Ispitivani derivati naftilimida imaju potencijal za primjenu kao fluorescentni kemosenzori za pH te za  $\text{Cu}^{2+}$  i  $\text{Hg}^{2+}$  ione u vodenim otopinama. Zbog mogućnosti kovalentne imobilizacije na celulozne i tekstilne materijale, spojevi su posebno zanimljivi kao moguće komponente nosivih senzora te je idući korak u istraživanju detaljna kinetička studija interakcije spojeva **GJM-523** i **GJM-525** s metalnim ionima, odnosno s ionima  $\text{Cu}^{2+}$  i  $\text{Hg}^{2+}$  te analiza kompleksa metala i naftilimida radi dobivanja punog uvida u mehanizam senzorskog odziva spojeva te optimizacija uvjeta ispitivanja.

**Ključne riječi:** naftilimid, fluorescencija, pH vrijednost, metalni ioni

## SUMMARY

Fluorescent 4-amino-1,8-naphthalimide derivatives found application as optical chemosensors or as components of optical chemical sensors for the detection of various chemical species. In this work, two new naphthalimide derivatives, **GJM-523** and **GJM-525**, synthesized by Gerhard J. Mohr (Joanneum Research, Weiz, Austria), were examined as potential pH sensitive chemosensors for metal ions in aqueous solutions using UV-visible absorption and fluorescence spectrophotometry. The optical properties of naphthalimide derivatives result from the electronic interaction of the fluorophore and the amino nitrogen-coupled receptor at position 4 in the naphthalimide structure via photoinduced electron transfer (PET) mechanism. By binding the analyte to the receptor, a change in the fluorescence properties of the molecule occurs depending on the type and concentration of the analyte. The dependence of the fluorescent response of compounds **GJM-523** and **GJM-525** on the pH value of aqueous solutions in the range 1.20 - 8.00 was investigated, where the fluorescence intensity increases with decreasing pH value due to protonation of the amino nitrogen in the piperazine structure of the receptor. In addition, the fluorescent response of the compounds in the presence of metal ions in aqueous solutions was examined. A possible stoichiometric binding ratio for **GJM-523** and  $\text{Cu}^{2+}$  and  $\text{Hg}^{2+}$  ions was determined. Compound **GJM-525** was tested as a selective fluorescent chemosensor for  $\text{Hg}^{2+}$  ions with time dependence of fluorescence intensity being monitored. Due to the possibility of covalent immobilization on cellulose and textile materials, these compounds are particularly interesting as possible components of wearable sensors. The next step in research is a detailed kinetic study of the interaction of compounds **GJM-523** and **GJM-525** with metal ions and analysis of metal-naphthalimide complexes to gain full insight into the mechanism of sensory response of compounds and optimization of experimental conditions.

**Keywords:** naphthalimide, fluorescence, pH value, metal ions

# SADRŽAJ

|   |    |
|---|----|
| <b>1. UVOD</b> .....  | 1  |
| <b>2. OPĆI DIO</b> .....  | 3  |
| 2.1. Kemijski senzori i kemosenzori: definicije i podjela .....                     | 3  |
| 2.2. Kemijski optički senzori i kemosenzori .....                                   | 5  |
| 2.2.1. Granica detekcije fluorescentnih optičkih senzora i kemosenzora .....        | 7  |
| 2.2.2. Metode karakterizacije fluorescentnih kemijskih senzora i kemosenzora .....  | 8  |
| 2.2.2.1. UV-vidljiva apsorpcijska spektrofotometrija .....                          | 9  |
| 2.2.2.2. UV-vidljiva fluorescencijska spektrofotometrija .....                      | 12 |
| 2.2.3. Primjena kemijskih optičkih senzora i kemosenzora .....                      | 14 |
| 2.3. Derivati naftilimida .....   | 15 |
| 2.3.1. Strukturna i optička svojstva derivata naftilimida.....                      | 16 |
| 2.3.1.1. Fluorofor molekula naftilimida .....                                       | 17 |
| 2.3.1.2. Receptor molekula naftilimida .....  | 18 |
| 2.3.1.3. <i>N</i> -supstituent molekula naftilimida .....                           | 19 |
| 2.3.2. Fotoinducirani prijenos elektrona.....                                       | 21 |
| 2.3.3. Osjetljivost na pH vrijednost.....   | 22 |
| 2.3.4. Osjetljivost na metalne ione .....   | 22 |
| 2.3.4.1. Stehiometrija vezanja metalnih iona .....                                  | 23 |
| 2.4. Primjeri kemosenzora na bazi derivata naftilimida.....                         | 24 |
| 2.4.1. Kemosenzor za određivanje aminokiselina.....                                 | 24 |
| 2.4.2. Kemosenzor za određivanje aniona.....  | 25 |
| 2.4.3. Kemosenzor za praćenje redoks procesa.....                                   | 26 |
| <b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....   | 27 |
| 3.1. Kemikalije .....   | 27 |
| 3.1.1. Priprema temeljnih standardnih otopina <b>GJM-523</b> i <b>GJM-525</b> ..... | 27 |
| 3.1.2. Priprema temeljnih standardnih otopina metalnih iona.....                    | 27 |
| 3.1.3. Radne otopine metalnih iona.....   | 27 |
| 3.1.4. Otopine pufera.....  | 28 |
| 3.2. Instrumenti .....  | 28 |
| 3.3. Opis mjerenja .....  | 28 |
| 3.3.1. Mjerenje apsorpcijskih spektara.....   | 28 |
| 3.3.2. Mjerenje fluorescencijskih spektara.....                                     | 29 |



|   |           |
|---|-----------|
| 3.3.3. Određivanje kvantnog iskorištenja <b>GJM-523</b> i <b>GJM-525</b> .....              | 29        |
| 3.3.4. pH titracija <b>GJM-523</b> i <b>GJM-525</b> .....                                   | 29        |
| 3.3.5. Odziv u prisutnosti metalnih iona .....  | 30        |
| 3.3.5.1. Odziv <b>GJM-523</b> u prisutnosti metalnih iona .....                             | 30        |
| 3.3.5.2. Vrijeme odziva <b>GJM-525</b> u prisutnosti $Hg^{2+}$ iona .....                   | 31        |
| 3.3.5.3. Odziv <b>GJM-525</b> u prisutnosti $Hg^{2+}$ iona i drugih metalnih iona .....     | 31        |
| 3.3.6. Titracija <b>GJM-523</b> s metalnim ionima .....                                     | 31        |
| 3.3.7. Ispitivanje stehiometrije vezanja metalnih iona .....                                | 32        |
| <b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b> .....  | <b>33</b> |
| 4.1. Spektroskopska svojstva <b>GJM-523</b> i <b>GJM-525</b> .....                          | 33        |
| 4.2. pH osjetljivost derivata naftilimida .....   | 34        |
| 4.3. Osjetljivost na metalne ione .....   | 40        |
| 4.3.1. Osjetljivost <b>GJM-523</b> .....  | 41        |
| 4.3.1.1. Fluorescencijski odziv u prisutnosti metalnih iona .....                           | 41        |
| 4.3.1.2. Titracija <b>GJM-523</b> s metalnim ionima .....                                   | 45        |
| 4.3.1.3. Vezanje metalnih iona i <b>GJM-523</b> .....                                       | 47        |
| 4.3.2. Osjetljivost <b>GJM-525</b> .....  | 48        |
| 4.3.2.1. Fluorescencijski odziv u prisutnosti metalnih iona .....                           | 48        |
| 4.3.2.1.1. Vremenska ovisnost intenziteta fluorescencije u prisutnosti $Hg^{2+}$ iona ..... | 49        |
| 4.3.2.2. Selektivnost <b>GJM-525</b> .....  | 51        |
| <b>5. ZAKLJUČAK</b> .....   | <b>53</b> |
| <b>6. LITERATURA</b> .....  | <b>54</b> |
| <b>ŽIVOTOPIS</b> .....  | <b>61</b> |

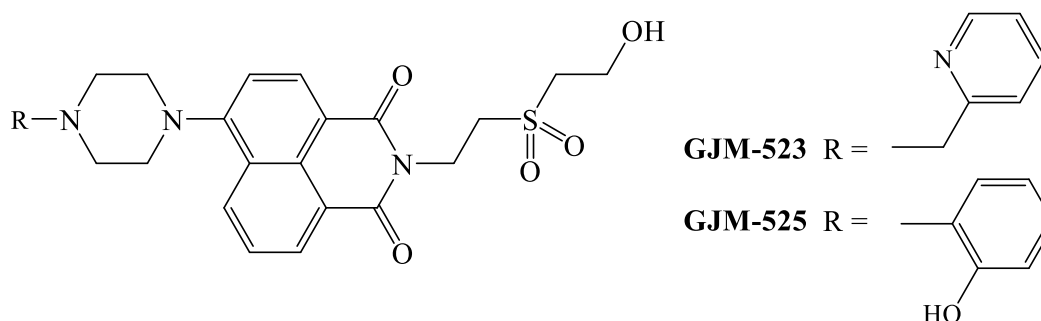
## 1. UVOD

Prisutnost iona teških metala u vodenim i kopnenim ekosustavima kao i njihova prisutnost u hrani, vodi za ljudsku potrošnju, površinskim i podzemnim vodama, sedimentima, tlima i živim organizmima predstavlja veliki i vrlo kompleksni ekološki i zdravstveni problem. Pod teškim metalima uobičajeno se podrazumijevaju elementi gustoća većih od  $5 \text{ g cm}^{-3}$ .<sup>1</sup> Ioni teških metala vrlo su rašireni te kao onečišćujuće tvari odlikuju se nemogućnosti razgradnje i toksičnosti za žive organizme pri vrlo niskim koncentracijama.<sup>2,3</sup> Najznačajniji izvori putem kojih ioni teških metala dopijevaju u okoliš su postrojenja kemijske i metalurške industrije, spalionice otpada u gradskim sredinama, rudnici, prijevozna sredstva te poljoprivredne i domaćinske aktivnosti.<sup>3,4</sup> Za analizu metalnih iona razvijene su brojne tehnike s mogućnosti određivanja vrlo niskih koncentracija, a najčešće su spektrometrijske<sup>4,5</sup> i elektroanalitičke tehnike.<sup>6</sup> Međutim, navedene tehnike često su nepraktične za rutinsku primjenu budući da uključuju i nužnu pripremu uzorka te je vrijeme trajanja analize također ograničavajući faktor uz cijenu samih instrumenata. Zbog navedenog, nužno je pristupiti istraživanju i razvoju drugačijih analitičkih metoda.

Tako su primjenu pronašli fluorescencijski senzori i kemosenzori koji iskorištavaju optička svojstva koja proizlaze iz specifičnosti strukture određenih organskih molekula. Derivati 1,8-naftilimida, skraćeno naftilimidi, klasa su imida kod kojih je na ugljikove atome acilne skupine vezan naftalen u položajima 1 i 8. Navedeni spojevi odlikuju se fluorescencijom koja proizlazi iz strukturnih karakteristika detaljno opisanih i objašnjenih u literaturi. Osnovnu strukturnu jedinicu spojeva koji se koriste kao fluorescentni molekulski senzori i kao komponente optičkih senzora čini 4-amino-1,8-naftilimidni fragment.<sup>7</sup>

Uvođenjem različitih funkcionalnih skupina na imidnom (R') i amino (R'') atomu dušika moguće je znatno utjecati na fizikalna i kemijska svojstva naftilimida te na mogućnost primjene kao potencijalnih kemijskih i biokemijskih senzora.<sup>8</sup> Općenito, skupina R'' zajedno s amino dušikom čini receptorski dio molekule koji je odgovoran za stupanje u interakciju s analitom, a skupina R' vezana na imidni atom dušika utječe na fizikalna poput topljivosti. 1,8-naftilimid predstavlja fotostabilni konjugirani sustav zbog prisutnosti dva aromatska prstena i dvije dvostruke veze s kisikom što omogućuje  $\pi\text{-}\pi^*$  prijelaz elektrona uslijed apsorpcije svjetlosti u ultraljubičastom području.<sup>9</sup> Posljedično, derivati 4-amino-1,8-naftilimida izvrsni su kandidati kao potencijalni optički (kemo)senzori za razne kemijske vrste, a naročito metalne katione.

Cilj ovoga rada je ispitati optička svojstva dva nova derivata 4-amino-1,8-naftilimida te karakterizirati ih kao pH osjetljive fluorescentne kemosenzore za ione teških metala u vodi. Strukture ispitivanih spojeva, **GJM-523** i **GJM-525**, prikazane su na Slici 1. Spojeve je sintetizirao Gerhard J. Mohr (Joanneum Research, Austrija).<sup>10</sup> Spojevi **GJM-523** i **GJM-525** odlikuju se lancem vezanim na imidni atom dušika koji u svojoj strukturi sadrži 2-hidroksietilsulfonilnu skupinu, a koja se može lako modificirati u vinilsulfonilnu skupinu primjenom koncentrirane sumporne kiseline.<sup>10</sup> Vinilsulfonilna skupina omogućuje kovalentnu imobilizaciju spojeva na celulozne i tekstilne (nano)materijale otvarajući mogućnost primjene spojeva kao komponenti nosivih senzora korištenih primjerice u fiziologiji sporta i pametnim zavojima (eng. *smart bandages*) za poboljšanje zacjeljivanja i praćenja stanja rana.<sup>10,11</sup>



**Slika 1.** Struktura spojeva **GJM-523** i **GJM-525**.

## 2. OPĆI DIO

### 2.1. Kemijski senzori i kemosenzori: definicije i podjela

Derivati naftilimida pronalaze veliku primjenu kao fluorescentni molekularni senzori i kemijski senzori. Za potrebe rada, prikazan je kratki pregled podjele kemijskih senzora odnosno molekularnih senzora uz pripadajuće definicije.

Kemosenzori ili molekularni senzori naziv je za organske i anorganske molekule (komplekse) koji se koriste za detekciju i određivanje koncentracije analita pri čemu analit stupa u interakciju s navedenom molekulom i daje mjerljivi analitički signal.<sup>12</sup> Molekularni senzori u osnovi sadrže receptorski dio molekule koji stupa u interakciju s analitom, a koji je vezan ili direktno ili putem poveznice na pretvornički dio koji daje analitički signal na osnovi interakcije receptora i analita.<sup>13,14</sup> Analitički signal najčešće je određeni optički fenomen poput apsorpcije svjetlosti ili fluorescencije. Posebnu skupinu molekularnih senzora čine indikatori kod kojih prilikom stupanja u interakciju s analitom dolazi do vidne promjene u boji ili fluorescenciji promatranog sustava. Najpoznatiji primjeri indikatora su pH indikatorske molekule metiloranž i fenolftalein kod kojih dolazi do promjene boje otopine ovisno o koncentraciji H<sup>+</sup> iona.

Kemijski senzori prema IUPAC-u su definirani kao uređaji koji pretvaraju kemijsku informaciju, od koncentracije određene komponente uzorka do kompletne analize komponenata, u analitički koristan signal pri čemu kemijska informacija može potjecati od kemijske reakcije analita i senzora ili od promjene fizikalnih svojstava ispitivanog sustava.<sup>15</sup> Analogno kemosenzorima, kemijski senzori sastoje se od dvije glavne funkcionalne jedinice, odnosno od receptora i pretvornika. Receptor je dio koji kemijsku informaciju pretvara u takav oblik energije kojeg pretvornik može mjeriti. Pretvornik pretvara energiju u kojoj se nalazi kemijska informacija o analitu u analitički signal te kao takav nije odgovoran za selektivnost samoga senzora. Uz navedene jedinice, senzor može sadržavati i separator poput membrane.

Kemijski senzori klasificiraju se prema vrsti analitičkog signala kojega daje pretvornik, stoga razlikujemo:

1. **Optičke senzore** kod kojih kemijska informacija nastaje kao rezultat interakcije analita i receptora i pretvara se u mjerljivi optički fenomen ili svojstvo kao analitički signal. Optički senzori zasnivaju se na mjerenju:
  - a) apsorbacije analita ili uslijed kemijske reakcije u kojoj sudjeluje analit,
  - b) refleksije u netransparentnom mediju,
  - c) luminiscencije, odnosno intenziteta vidljive svjetlosti nastale kao posljedica reakcije analita i receptora,
  - d) promjene intenziteta fluorescencije uslijed interakcije analita i receptora,
  - e) indeksa loma kao posljedice promjene u sastavu mjerne otopine,
  - f) optotermalnog efekta temeljen na mjerenju toplinskih efekata uzrokovanih apsorpcijom svjetlosti,
  - g) raspršenja svjetlosti uzrokovano određenom veličinom čestica koje se nalaze u uzorku.
2. **Elektrokemijske senzore** koji pretvaraju efekte nastale elektrokemijskom interakcijom analita i elektrode u analitički mjerljiv signal. Efekti mogu biti stimulirani električki ili mogu biti posljedica interakcije pri uvjetima nulte struje. Mogu se podijeliti u sljedeće podgrupe:
  - a) voltometrijski senzori,
  - b) amperometrijski senzori,
  - c) potenciometrijski senzori,
  - d) CHEMFET (eng. *Chemically Sensitized Field Effect Transistor*) senzori.
3. **Električni senzori** - temelje se na mjerenjima gdje nema elektrokemijskih procesa, a signal dolazi od promjene električnih svojstava uzrokovanih interakcijama s analitom.
4. **Maseni senzori** - mjerni signal je posljedica promjene mase uzrokovane vezanjem analita na površinu osjetilnog dijela senzora.
5. **Magnetski uređaj** - signal je posljedica promjene paramagnetskog svojstva analiziranog plina.
6. **Termometrijski uređaj** - koji se temelji na mjerenju toplinskih efekata specifične kemijske reakcije analita ili adsorpcije analita na površinu senzora.
7. **Ostala fizikalna svojstva** poput X-,  $\beta$ -,  $\Gamma$ - zračenja mogu tvoriti temelje za kemijske senzore za slučaj određivanja kemijskog sastava.

Ovdje je bitno naglasiti kako se pod kemijskim senzorom smatra funkcionalni uređaj sastavljen od nekoliko komponenti dok se pod kemosenzorom podrazumijeva samo molekula spoja sastavljena od receptorskog i pretvorničkog dijela koja može dati određeni analitički signal uslijed interakcije s analitom. Molekule sa svojstvima kemosenzora često su komponente kemijskih senzora te se oboje karakteriziraju istim ili sličnim metodama prilikom ispitivanja mogućnosti njihove primjene za analizu željenog analita. Također, za opis kemijskih senzora i kemosenzora koriste se iste izvedbene značajke validacije. Zbog navedenog, kemosenzori i kemijski senzori često su sinonimi, a u velikom dijelu literature pod kemijskim senzorima podrazumijevaju se i kemosenzori. Radi jednostavnosti, u daljnjem tekstu rada podrazumijeva se da navodi i objašnjenja svojstava i karakteristika kemijskih senzora vrijede i za kemosenzore, i obratno, osim ako nije drugačije navedeno.

## 2.2. Kemijski optički senzori i kemosenzori

Kako je prethodno navedeno, kemijski optički senzori zasnivaju se na mjerenju optičkih fenomena kao posljedice interakcije analita i receptora senzora ili senzorne molekule. Promjene u mjernim optičkim fenomenima ili pojave optičkog fenomena govore o promjeni u analiziranom sustavu.

Najraširenija vrsta optičkih senzora su fluorescencijski kemijski senzori te postoje mnoge prednosti korištenja fluorescencije, i luminiscencije općenito, kao analitičkih signala. Prednosti se mogu opisati visokom osjetljivošću prilikom detekcije i određivanja analita, detekcijom pojedinačnih molekula, nanometarskom prostornom razlučivosti s mogućnošću podmikronske vizualizacije, otpornost na elektromagnetske interferencije, mogućnost komunikacije s molekulama u živim organizmima i više različitih načina detekcije analita.<sup>16-20</sup> Uz prednosti treba uzeti u obzir i otežavajuće faktore, a koji mogu biti interferencije sa ambijentalnim svjetlom, ispiranje komponenti s površine senzora, prijenos mase analita u prostor senzora, ograničeno dinamičko područje, selektivnost i osjetljivost.<sup>19,20</sup>

S obzirom na mogućnost kontinuirane uporabe, optički senzori mogu se podijeliti još i na reverzibilne i ireverzibilne.

- *Reverzibilni* senzori stupaju u interakciju s analitom preko elektrostatskih veza te nakon mjerenja se mogu regenerirati i ponovno koristiti.

- *Ireverzibilni* senzori kovalentno se vežu s analitom pri čemu dolazi do nepovratnih promjena u kemijskoj strukturi senzora te kao takav se više ne može regenerirati i ponovno koristiti.<sup>20</sup> Ireverzibilni senzori mogu se primjenjivati kao kemodozimetri.

Za upotrebu optičkih kemijskih senzora i kemosenzora potrebno je poznavati njihove funkcionalne značajke. Za opis i karakterizaciju kemijskih optičkih senzora ili kemosenzora koriste se neke od izvedbenih značajki validacije analitičkih metoda kao što su selektivnost, osjetljivost, mjerno područje, stabilnost, granica detekcije, granica kvantifikacije, linearno područje, točnost i preciznost. Također, kod senzora u obzir se uzimaju i mehanizam odziva, životni vijek senzora i vrijeme odziva.

*Mehanizam odziva* (kemo)senzora definira se kao opis interakcije senzora sa matricom i analitom, način separacije analita, prijenos mase te definiranje kemijskih reakcija značajnih za senzorski mehanizam.

*Vrijeme odziva* definira se kao vrijeme potrebno za postizanje jedinstvene koncentracije analita koja je u interakciji sa (kemo)senzorom. U praktičnom smislu, vrijeme odziva je vrijeme potrebno da se u prisutnosti analita postigne jedinstvena vrijednost analitičkog signala.

*Životni vijek* (kemo)senzora je vrijeme unutar kojeg će senzor biti funkcionalan u smislu ponovljivosti, točnosti i stabilnosti kod mjerenja.<sup>20</sup>

*Selektivnost* se definira kao sposobnost metode ili instrumenta (senzora) da odredi samo željeni analit.

*Osjetljivost* podrazumijeva promjenu analitičkog signala kojega daje (kemo)senzor, a koja nastaje uslijed promjene koncentracije analita.

*Mjerno područje* definira se kao područje između minimalne i maksimalne koncentracije analita unutar kojeg (kemo)senzor daje određeni analitički signal. Pri tome se zanemaruje određena točnost, preciznost i ponovljivost izmjerenih koncentracija analita.<sup>21</sup>

*Stabilnost* senzora je raspon uvjeta u kojima, uslijed vanjskih utjecaja, senzor neće biti oštećen sa smanjenim senzorskim sposobnostima, a može se odnositi na raspon pH vrijednosti, temperature, vremena i drugih čimbenika koji mogu utjecati na stabilnost senzora.<sup>20</sup>

*Linearno područje* (kemo)senzora je područje unutar kojega je ovisnost signala o koncentraciji analita linearna.<sup>21</sup>

*Granica detekcije* se općenito definira kao najmanja koncentracija ili količina analita koja se može kvalitativno odrediti.

*Granica kvantifikacije* je najmanja koncentracija ili količina analita koja se može kvantitativno odrediti uz određenu točnost i preciznost.

*Točnost* podrazumijeva stupanj podudaranja mjerene vrijednosti (npr. koncentracije analita) s pravom ili očekivanom vrijednosti.

*Preciznost* se definira kao mjera podudaranja rezultata dobivenih mjerenjem istog homogenog uzorka.<sup>21,22</sup>

### 2.2.1. Granica detekcije fluorescentnih optičkih senzora i kemosenzora

Prema IUPAC-u, granica detekcije (eng. *limit of detection*, LOD) definirana je pomoću najmanjeg mogućeg analitičkog signala koji se može pouzdano izmjeriti u prisutnosti analita, a da se pri tome značajno razlikuje od signala slijepe probe.<sup>23</sup> Signal analita dan je jednadžbom 1:

$$X_L = X_{sr}^{sp} + z\sigma_{sp} \quad (1)$$

pri čemu je  $X_L$  - najmanji analitički signal u prisutnosti analita,  $X_{sr}^{sp}$  - srednja vrijednost signala slijepe probe,  $\sigma_{sp}$  standardna devijacija mjerenja signala slijepe probe i  $z$  - faktor koji podrazumijeva željeni interval pouzdanosti.

Iz jednadžbe 1 može se izvesti jednadžba 2 za izračun granice detekcije:

$$LOD = \frac{3\sigma_{sp}}{k} \quad (2)$$

pri čemu je  $k$  - nagib pravca ovisnosti signala o koncentraciji analita.

Osim jednadžbe 2, za određivanje granice detekcije fluorescentnih optičkih senzora i kemosenzora može poslužiti i Stern-Volmerov izraz. Stern-Volmerov izraz koristan je kada prilikom interakcije analita i senzora dolazi do smanjenja intenziteta fluorescencije.<sup>24</sup> Stern-Volmerov izraz zadan je jednadžbom 3:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{sv}[Q] \quad (3)$$



pri čemu je  $F_0$  - početni intenzitet fluorescencije u odsutnosti analita,  $F$  - intenzitet u prisutnosti analita,  $K_{sv}$  - Stern-Volmerova konstanta (umnožak brzine gašenja fluorescencije i životnog vijeka fluorescencije u odsutnosti analita),  $[Q]$  - koncentracija analita odnosno tvari koja uzrokuje gašenje fluorescencije.<sup>24</sup>

Stern-Volmerova konstanta odgovara nagibu pravca ovisnosti  $F_0/F$  o koncentraciji analita ( $[Q]$ ).

Analogno jednadžbi 2, izraz za određivanje granice detekcije pomoću Stern-Volmerove konstante glasi:

$$LOD = \frac{3\sigma_{sp}}{K_{sv}} \quad (4)$$

### 2.2.2. Metode karakterizacije fluorescencijskih kemijskih senzora i kemosenzora

Prolaskom elektromagnetskog zračenja kroz otopinu kemosenzora ili padom elektromagnetskog zračenja na površinu optičkog kemijskog senzora mogu se odvijati razni procesi poput apsorpcije zračenja, loma svjetlosti, refleksije zračenja, zagrijavanja uslijed apsorpcije zračenja te pojave ili promjene svojstava luminiscencije i fluorescencije. Kod fluorescencijskih senzora dolazi do promjene intenziteta i svojstava fluorescencije. Za karakterizaciju fluorescentnih optičkih senzora i kemosenzora najčešće korištene metode su apsorpcija i emisija elektromagnetskog zračenja u ultraljubičastom (UV) i vidljivom dijelu spektra. Mjerenjem navedenih optičkih fenomena može se doći do kvantitativnih i kvalitativnih podataka vezanih za optički senzor. Za primjenu navedenih metoda i interpretaciju rezultata potrebno je razumijevanje djelovanja elektromagnetskog zračenja na razini molekulske strukture i kako strukturalna svojstva spojeva utječu na vrijednosti apsorbiranog ili emitiranog elektromagnetskog zračenja.

Prema teoriji molekulskih orbitala, pri povezivanju atoma i stvaranju kemijskih veza dolazi do linearne kombinacije njihovih atomskih orbitala pri čemu nastaju vezne i protuvezne molekulske orbitale (MO). Pravilo je da linearnom kombinacijom  $n$  atomskih orbitala mora nastati  $n$  molekulskih orbitala ukoliko je  $n$  parni broj. Pri linearnoj kombinaciji neparnog broja atomskih orbitala nastaju i nevezne orbitale uz vezne i protuvezne molekulske orbitale. Vezne orbitale energetski su stabilnije, odnosno elektroni u veznim orbitalama imaju nižu energiju od elektrona u protuveznim orbitalama te stoga kažemo da elektroni u protuveznim orbitalama

doprinosu nestabilnosti kemijske veze. Izlaganjem molekula elektromagnetskom zračenju, elektron može apsorbirati točno određeni kvant energije  $\Delta E$  čiji je iznos zadan jednadžbom 5:

$$\Delta E = h\nu = h \frac{c}{\lambda} \quad (5)$$

pri čemu je  $h$  Planckova konstanta i približno iznosi  $6,626 \times 10^{-34}$  Js,  $c$  je brzina svjetlosti u vakuumu približnog iznosa  $3,00 \times 10^8$  m/s,  $\nu$  označava frekvenciju upadnog zračenja, a  $\lambda$  valnu duljinu upadnog elektromagnetskog zračenja.

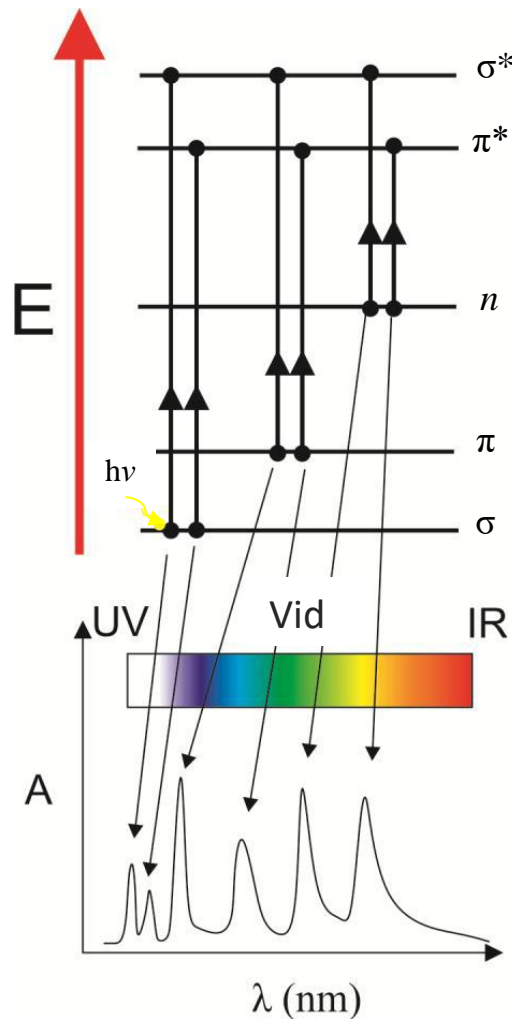
Apsorpcijom kvanta energije, elektron se pobuđuje i iz osnovnog stanja prelazi u protuveznu molekulsku orbitalu više energije. Postoji nekoliko mehanizama povratka elektrona u osnovno stanje. Kod fluorescentnih molekula, elektron pri povratku u osnovno stanje prolazi kroz niz vibracijskih stanja u kojima gubi energiju vibracijom što se manifestira kao razlika u energiji emitiranog i apsorbiranog elektromagnetskog zračenja.<sup>22,25,26</sup>

### 2.2.2.1. UV-vidljiva apsorpcijska spektrofotometrija

Kod UV-vidljive apsorpcijske spektrofotometrije prati se apsorpcija elektromagnetskog zračenja valnih duljina od 200 do 780 nm, što pokriva područje ultraljubičastog zračenja te područje vidljive svjetlosti. Ukupna energija molekule zbroj je elektronske ( $E_{el}$ ), vibracijske ( $E_{vib}$ ), rotacijske ( $E_{rot}$ ) i translacijske ( $E_{tr}$ ) energije prema jednadžbi 6:

$$E = E_{el} + E_{vib} + E_{rot} + E_{tr} \quad (6)$$

Translacijska energija uglavnom se može zanemariti budući da je iznosom znatno manja od zbroja preostalih triju komponenti ukupne energije molekule. Apsorpcijom kvanta energije ( $\Delta E$ ) elektron prelazi u pobuđeno stanje te se elektronska energija molekule povećava.<sup>22</sup> Molekulske orbitale mogu biti  $\sigma$  i  $\pi$  vezne te pripadajuće  $\sigma^*$  i  $\pi^*$  protuvezne orbitale uz nevezne  $n$  orbitale. Energija orbitala raste redom  $\sigma < \pi < n < \sigma^* < \pi^*$ . Kako je prikazano na Slici 2., elektroni mogu prelaziti iz veznih odnosno neveznih orbitala u protuvezne. Međutim, ovisno o iznosu apsorbiranog kvanta energije, elektron će prijeći u točno određenu orbitalu više energije. Za  $\sigma$ - $\sigma^*$  prijelaz potrebno je najviše energije te se uz  $\sigma$ - $\pi^*$  i  $\pi$ - $\sigma^*$  prijelaze obično nalazi u krajnjem ultraljubičastom području ( $\lambda < 200$  nm). Ostali prijelazi,  $\pi$ - $\pi^*$ ,  $n$ - $\sigma^*$  i  $n$ - $\pi^*$  nalaze se u bliskom UV i vidljivom djelu spektra, odnosno u području valnih duljina od 200 do 1000 nm.<sup>25</sup> Prijelazi  $\pi$ - $\pi^*$  karakteristični su za dvostruke veze konjugiranih sustava koji obično tvore fluorofore.



**Slika 2.** Prijelazi elektrona uslijed apsorpcije elektromagnetskog zračenja u UV-vid području spektra.<sup>20</sup>

UV-vidljivom apsorpcijskom spektrofotometrijom prati se ovisnost apsorpcije o valnoj duljini upadnog zračenja čime se dobivaju apsorpcijski spektri. Apsorbancija definirana je kao dekadski logaritam omjera intenziteta upadnog zračenja ( $I_0$ ) i propuštenog zračenja ( $I$ ) kako je zadano jednadžbom 7, odnosno jednaka je negativnom logaritmu transmitancije ( $T$ ).

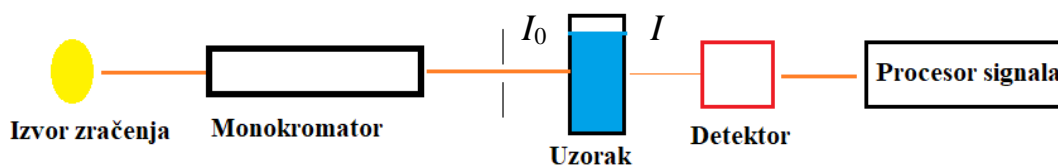
$$A = \log\left(\frac{I_0}{I}\right) = -\log T \quad (7)$$

Mjerenje apsorpcije je jednostavnije i lakše izvedivo od direktnog mjerenja energije koje elektroni apsorbiraju u ovisnosti o valnoj duljini. Mjerenjem apsorpcije mogu se dobiti kvalitativni i kvantitativni podatci o uzorku na osnovi Lambert-Beerovog zakona zadanog jednadžbom 8:

$$A = \varepsilon \times c \times l \quad (8)$$

Iz Lambert-Beerova zakona mogu se dobiti kvalitativni podatci o uzorku na osnovi molarnog ekstincijskog koeficijenta ( $\varepsilon$ ) koje je karakteristika svake tvari koja apsorbira zračenje u ispitivanom području valnih duljina. Također, može se odrediti i koncentracija ( $c$ ) tvari koja apsorbira zračenje uz prethodno poznavanje njezinog molarnog ekstincijskog koeficijenta. Optički put ( $l$ ) ili optička debljina predstavlja duljinu puta kojega zraka svjetlosti prolazi pri čemu joj intenzitet opada s početne vrijednosti  $I_0$  na konačnu vrijednost  $I$ . U praktičnom smislu, optički put jednak je širini posude (kivete) u kojoj se nalazi uzorak prilikom snimanja apsorpcijskih spektara.<sup>22</sup>

Instrumenti koji mjere apsorbanciju, odnosno intenzitet upadnog i propuštenog zračenja u UV-vidljivom području nazivaju se spektrofotometri. Postoji niz mogućih izvedbi spektrofotometara, no svaki spektrofotometar sadrži osnovne dijelove: izvor zračenja, selektor valnih duljina, detektor i procesor signala. Na Slici 3. prikazana je shema jednostavnog spektrofotometra.



**Slika 3.** Shematski prikaz UV-vid apsorpcijskog spektrofotometra.

Selektor valnih duljina dio je instrumenta koji smanjuje široko područje valnih duljina zračenja kojega daje izvor. Selektor bitno utječe na osjetljivost i točnost instrumenta, no važno je istaknuti kako nije moguće izdvojiti točno određenu valnu duljinu zračenja, tj. ne može se u potpunosti izdvojiti linijski spektar iz kontinuiranog spektra zračenja što ga daje izvor zračenja. Monokromatori najčešći su selektori valnih duljina, a sastavljeni su uglavnom od ulazne pukotine, kolimacijske leće, prizme ili optičke rešetke te dijela za fokusiranje izlaznih slika pukotine.

Mjerenje se provodi postavljanjem kivete s uzorkom između monokromatora i detektora. Upadni kut zrake svjetlosti u odnosu na uzorak iznosi  $90^\circ$  te zraka prolazi kroz uzorak do detektora. Rezultat mjerenja je apsorpcijski spektar koji prikazuje ovisnost apsorbancije o

valnoj duljini. Svaka linija na apsorpcijskom spektru je rezultat prijelaza elektrona iz osnovnog u neko od mogućih pobuđenih stanja.<sup>22</sup>

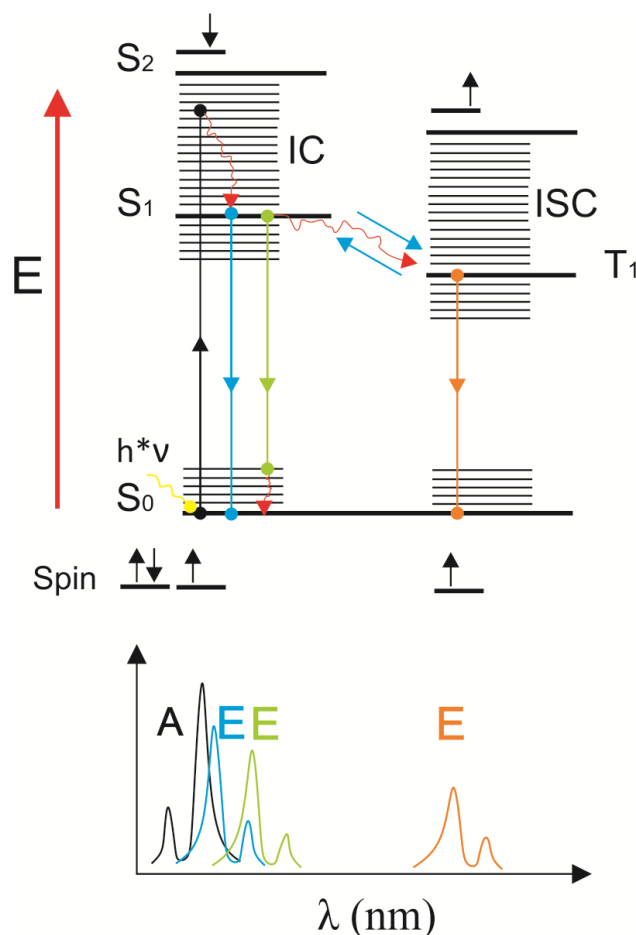
### 2.2.2.2. UV-vidljiva fluorescencijska spektrofotometrija

Kod nekih molekula može doći do emisije vidljive svjetlosti pri povratku elektrona u osnovno stanje uslijed pobude apsorpcijom elektromagnetskog zračenja određene valne duljine i prelaska u više energetska stanja. Navedeni prijelaz naziva se radijacijski prijelaz elektrona, a emisija svjetlosti do koje dolazi u ovome slučaju općenito se naziva luminiscencija. Luminiscencija se dalje može podijeliti, ovisno o mehanizmu kojim se elektroni relaksiraju u osnovno stanje, na fluorescenciju i fosforescenciju.<sup>22</sup>

Pojavu fluorescencije najlakše je objasniti pomoću dijagrama Jablonskog prikazanog na Slici 4. Elektron u osnovnom stanju ( $S_0$ ) pobuđuje se apsorpcijskom kvanta energije elektromagnetskog zračenja te prelazi u energetska stanja, tj. pobuđena stanja, kao što je prikazano na Slici 4. Pobuđeno stanje elektrona neko je od mogućih rotacijskih i vibracijskih energetskih stanja elektrona te nije određeno isključivo molekulskom orbitalom u koju elektron prelazi. Energija elektrona postepeno se smanjuje relaksacijom do najnižeg pobuđenog stanja ( $S_1$ ) pri čemu elektron gubi energiju vibracijom i rotacijom. Gubitak energije vibracijom i rotacijom uzrokuje pomak između apsorpcijskih i emisijskih spektara što se naziva Stokesovim pomakom. Gubitak energije može biti i veći budući da emisijom zračenja pri padu iz pobuđenog stanja ( $S_1$ ) prema osnovnom stanju ( $S_0$ ), elektron može dodatno izgubiti energiju prelaskom kroz vibracijska i rotacijska stanja osnovnog stanja  $S_0$  pa sve do osnovnog stanja ( $S_0$ ) na kojemu se nalazio prije apsorpcije zračenja. Prema tome, fluorescencija se odvija relaksacijom elektrona od najnižeg pobuđenog stanja ( $S_1$ ). Prema jednadžbi 9 energija emitiranog zračenja zbrojena s energijom koju elektron izgubi vibracijom i rotacijom jednaka je apsorbiranom kvantnu energije:

$$\Delta E = E_{vib} + E_{rot} + h \frac{c}{\lambda'} \quad (9)$$

pri čemu je  $\lambda'$  valna duljina emitiranog zračenja.

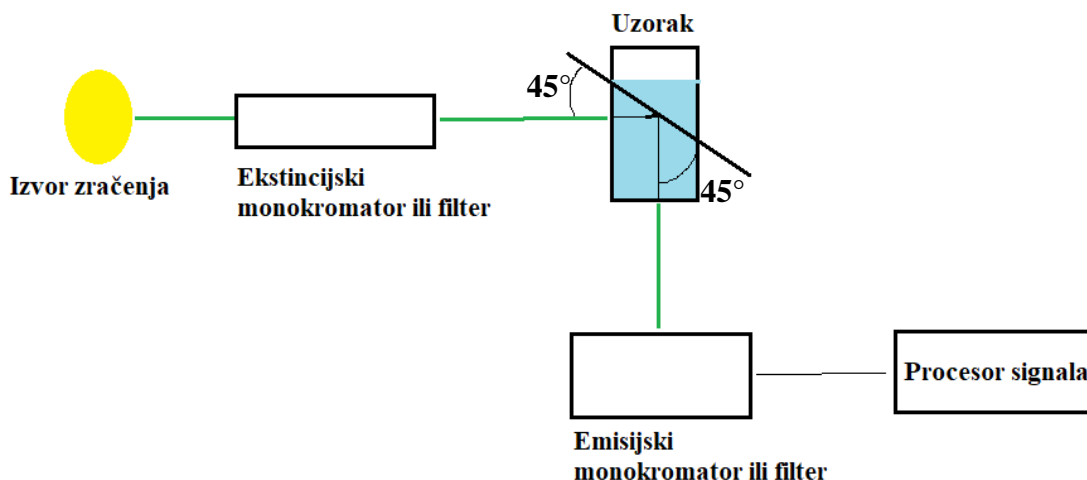


Slika 4. Dijagram Jablonskog.<sup>20</sup>

Fluorescencija nastupa kada se elektronski prijelazi događaju unutar istog elektronskog sustava (eng. *internal conversion*, IC) u okviru singletnog stanja. Također, elektron može prijeći u energetski bliski sustav drugačijeg multipliciteta (eng. *intersystem crossing*, ISC). Fluorescencija će biti vremenski odgođena ako elektroni prelaze između sustava IC i ISC te se vraćaju u osnovno stanje  $S_0$  padom iz stanja  $S_1$ . Ukoliko se elektron vraća u osnovno stanje ( $S_0$ ) iz tripletnog pobuđenog stanja ( $T_1$ ), dolazi do pojave fosforescencije jer elektroni gube energiju padom kroz niz zabranjenih stanja s paralelnim spinovima i relaksacija se odvija puno sporije. Posljedično, fosforescencija ima znatno dulji životni vijek od fluorescencije te se emisija svjetlosti nastavlja i nakon gašenja elektromagnetskog zračenja koje izaziva pobudu elektrona.<sup>20,22</sup>

Mjerenje intenziteta fluorescencije se provodi UV-vid fluorescencijskom spektrofotometrijom. Na Slici 5. prikazani su osnovni dijelovi fluorescencijskog spektrofotometra i položaj uzorka u

odnosu na upadni kut pobudne zrake elektromagnetskog zračenja. Rezultat mjerenja je emisijski spektar uzorka s ovisnošću intenziteta fluorescencije o valnoj duljini.<sup>20,22</sup>



**Slika 5.** Shematski prikaz UV-vid fluorescencijskog spektrofotometra.

### 2.2.3. Primjena kemijskih optičkih senzora i kemosenzora

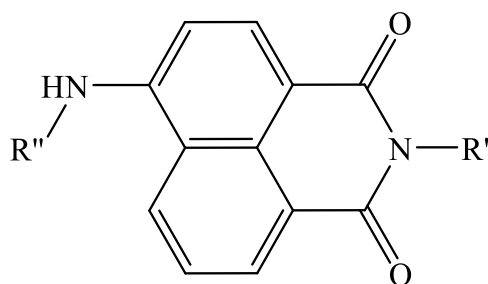
Optički senzori i kemosenzori pronalaze veliku primjenu u ispitivanju parametara okoliša te kao senzori za biološke sustave.<sup>27-30</sup> Na bazi derivata naftilimida osmišljeni su i pripremljeni senzori za detekciju i određivanje alkalijskih<sup>27</sup>, zemnoalkalijskih i teških metala<sup>28</sup> kao i određenih vrsta aniona.<sup>9</sup> Općenito, primjena senzora vrlo je pogodna u sustavima koji zahtijevaju kontinuirano i rutinsko praćenje. Jednostavnost izvedbe senzora i pristupačna cijena čini ih idealnim za brze i učestale analize, a budući da je vrlo često izostavljen i postupak pripreme uzoraka, pogodni su i za terenska ispitivanja. Osim primjene u analizi okoliša, optički senzori često su korišteni u biomedicini. Upravo njihova brzina ih čini pogodnima za primjenu u javnome zdravstvu.

Prisutnost iona teških metala u vodenim i kopnenim ekosustavima kao i njihova prisutnost u hrani, vodi za ljudsku potrošnju, površinskim i podzemnim vodama, sedimentima, tlima i živim organizmima predstavlja veliki i vrlo kompleksni ekološki i zdravstveni problem. Pod teškim metalima uobičajeno se podrazumijevaju elementi gustoća većih od  $5 \text{ g cm}^{-3}$ .<sup>1</sup> Međutim, pod teške metale često se ubrajaju i elementi koji ne zadovoljavaju navedeni kriterij od kojih je najpoznatiji arsen.<sup>1</sup> Ioni teških metala vrlo su rašireni te kao onečišćujuće tvari odlikuju se nemogućnosti razgradnje i toksičnosti za žive organizme pri vrlo niskim koncentracijama.<sup>2</sup> Kod živih organizama narušavaju metaboličke procese i povezani su s mutagenim djelovanjem na

stanice čovjeka te mogu biti okidači kancerogeneze.<sup>3</sup> Najvažniji izvori putem kojih ioni teških metala dospijevaju u okoliš su metalurška, kemijska i građevinarska industrija, spalionice otpada u gradskim sredinama, rudnici, prijevozna sredstva te poljoprivredne i domaćinske aktivnosti.<sup>3,4</sup> Zbog visoke toksičnosti, arsen, kadmij, živa, olovo i krom ubrajaju se u prioritetne tvari prilikom evaluacije zdravstvene ispravnosti hrane, predmeta opće uporabe i sastavnica okoliša. Za analizu metalnih iona koriste se razne analitičke tehnike od kojih se posebno ističu atomska apsorpcijska spektrometrija (AAS), masena spektrometrija s induktivno spregnutom plazmom (ICP-MS) te elektroanalitičke metode.<sup>4-6</sup> Međutim, navedene tehnike često su nepraktične za rutinsku primjenu budući da uključuju i nužnu pripremu uzorka te je vrijeme trajanja analize također ograničavajući faktor uz cijenu samih instrumenata. Zbog navedenog, potrebno je pristupiti istraživanju i razvoju drugačijih analitičkih metoda. Tako su svoju primjenu pronašli fluorescencijski kemijski senzori i kemosenzori. Svjetska zdravstvena organizacija i Europska komisija propisuju maksimalne dopuštene koncentracije za svaku tvar s potencijalnim štetnim djelovanjem na ljudsko zdravlje. Ukoliko je granica detekcije senzora niža od maksimalne dopuštene koncentracije, senzor je praktičan za brzo dobivanje informacija o uzorku te procjenu zdravstvene ispravnosti, a mjerenjem apsorpcijskih ili emisijskih spektara mogu se dobiti i kvantitativni podatci.

### 2.3. Derivati naftilimida

Derivati 1,8-naftilimida, skraćeno naftilimidi, klasa su imida kod kojih je na ugljikove atome acilne skupine vezan naftalen u položajima 1 i 8. Navedeni spojevi odlikuju se fluorescencijom koja proizlazi iz strukturnih karakteristika detaljno opisanih i objašnjenih u literaturi. Osnovnu strukturnu jedinicu spojeva koji se koriste kao fluorescentni molekularni senzori i kao komponente optičkih senzora čini 4-amino-1,8-naftilimidni fragment<sup>7</sup> čija je struktura prikazana na Slici 6.



**Slika 6.** Opća struktura 4-amino-1,8-naftilimida.



Uvođenjem različitih funkcionalnih skupina na imidnom (R') i amino (R'') atomu dušika moguće je znatno utjecati na fizikalna i kemijska svojstva naftilimida te na mogućnost primjene kao potencijalnih kemijskih i biokemijskih senzora.<sup>8</sup> Općenito, skupina R'' zajedno s amino dušikom čini receptorski dio molekule koji je odgovoran za stupanje u interakciju s analitom, a skupina R' vezana na imidni atom dušika utječe na fizikalna svojstva poput topljivosti. 1,8-naftilimid predstavlja fotostabilni konjugirani sustav zbog prisutnosti dva aromatska prstena i dvije dvostruke veze s kisikom što omogućuje  $\pi$ - $\pi^*$  prijelaz elektrona uslijed apsorpcije svjetlosti u ultraljubičastom (UV) području.<sup>9</sup> Posljedično, derivati 4-amino-1,8-naftilimida izvrsni su kandidati kao potencijalni optički (kemo)senzori za razne kemijske vrste, a naročito metalne katione.

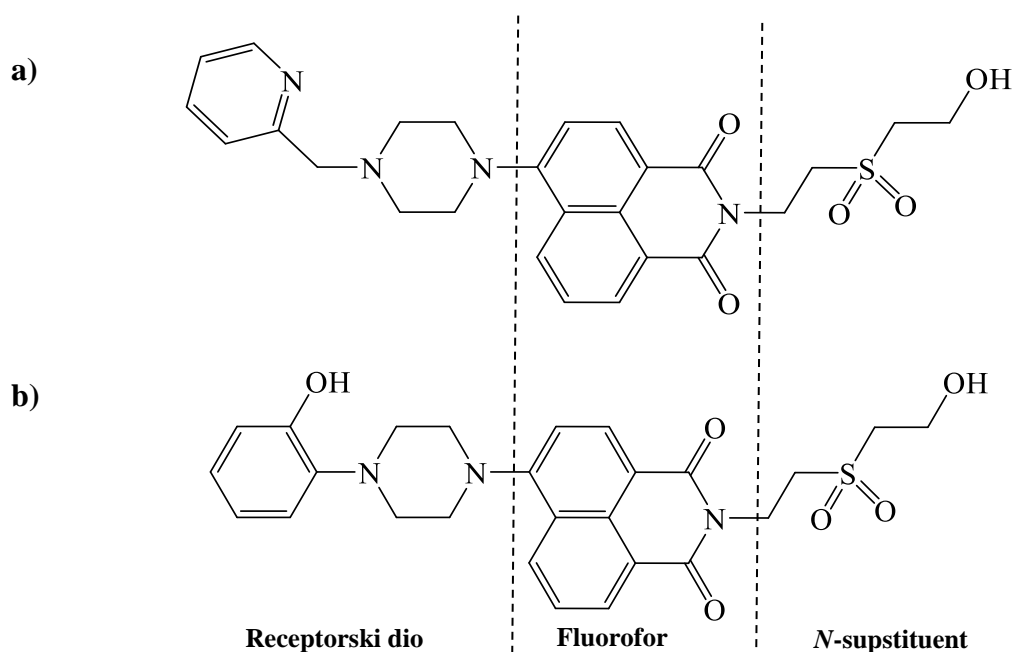
Krajem 70-ih godina 20. stoljeća, derivati naftilimida počeli su se koristiti prilikom staničnog označavanja te za mjerenje koncentracija izvanstaničnog i unutarstaničnog kalija. Interakcijom s kalijevim ionima, molekule naftilimida intenzivno fluoresciraju što je omogućilo mjerenje vrlo malih koncentracija kalija i praćenje staničnog metabolizma.<sup>31</sup> Od tada pa do danas, derivati naftilimida opsežno su istraživani kao selektivni molekulski senzori za ione metala u otopinama kao i pH osjetljivi fluorofori. Zbog relativno jednostavne sinteze uvođenjem različitih funkcionalnih skupina R'' preko amino skupine, naftilimidni derivati primjenu su pronašli u različitim područjima.<sup>10</sup> Također, zbog svojih strukturnih značajki, mogu se primjenjivati i kao komponente funkcionalnih materijala<sup>32</sup> te kao komponente sustava za dostavu lijekova.<sup>33</sup>

U ovome radu ispitana su optička svojstva dva nova derivata 4-amino-1,8-naftilimida, **GJM-523** i **GJM-525**, te su karakterizirani kao pH osjetljivi kemosenzori za ione teških metala u vodi. Funkcionalni dijelovi struktura ispitivanih spojeva prikazani su na Slici 7. Spojeve je sintetizirao Gerhard J. Mohr.<sup>10</sup>

### 2.3.1. Strukturna i optička svojstva derivata naftilimida

Kao što je prethodno navedeno, naftilimidi koji se koriste kao molekulski senzori i kao komponente optičkih senzora u osnovi su derivati 4-amino-1,8-naftilimida čija je struktura prikazana na Slici 7. Može se zaključiti kako promjena funkcionalnih skupina na imidnom i amino dušiku, R' i R'', utječe na fizikalna i kemijska svojstva spoja poput topljivosti i stabilnosti u različitim otapalima. Promjena strukture R'' skupine može znatno utjecati na

sposobnost vezanja analita, a time i na optička svojstva spoja.<sup>34</sup> Nadalje, odgovarajuća funkcionalna skupina R' na imidnom dušiku omogućuje imobilizaciju spoja na nosač optičkog senzora načinjenog primjerice od celuloze<sup>10</sup> i stakla.<sup>35</sup> Stoga, može se reći kako su skupine vezane na imidni odnosno amino atom dušika u strukturi 4-amino-1,8-naftilimida ključne za svojstva derivata naftilimida kao potencijalnih fluorescentnih indikatora i sastavnica optičkih senzora. Struktura ispitivanih derivata 4-amino-1,8-naftilimida, **GJM-523** i **GJM-525**, ima tri funkcionalna dijela, odnosno u strukturi se mogu razlikovati receptor, fluorofor te *N*-supstituent kako je prikazano na Slici 7.



**Slika 7.** Funkcionalni dijelovi strukture naftilimida a) **GJM-523** b) **GJM-525**.

Primarna fluorescencijska svojstva 4-amino-1,8-naftilimida su široki raspon valnih duljina emisije (460-600 nm) te veliki Stokesov pomak neosjetljiv na promjene pH vrijednosti.<sup>7</sup> Prilikom razmatranja optičkih svojstava, ključni proces koji diktira fluorescentno ponašanje naftilimida u prisutnosti analita i u raznim otapalima jest fotoinducirani prijenos elektrona (eng. *photoinduced electron transfer*, PET) koji je opisan u daljnjem tekstu.

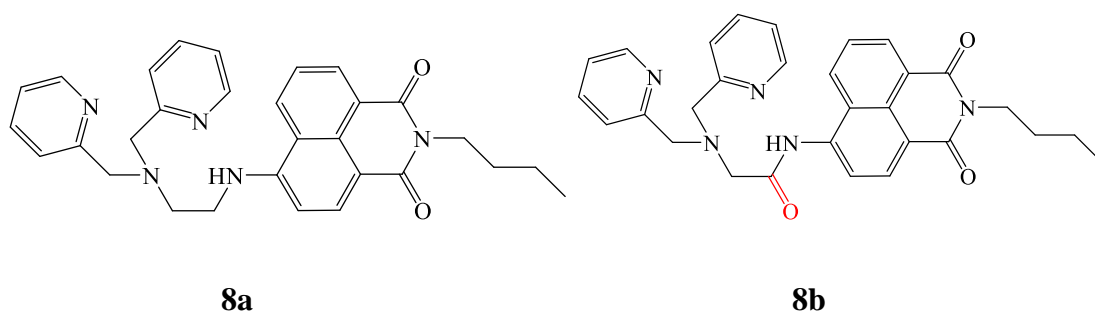
### 2.3.1.1. Fluorofor molekula naftilimida

Fluorofor ili pretvornički dio molekule predstavlja 1,8-naftilimid kako je označeno na Slici 7. Općenito, pretvornički dio daje analitički signal na osnovi interakcije receptora i analita te u

ovom slučaju analitički signal predstavlja promjenu intenziteta fluorescencije. 1,8-naftilimidni dio molekule predstavlja konjugirani sustav s pripadajućim lokaliziranim HOMO i LUMO orbitalama. Uslijed pobude apsorbacijom ultraljubičastog zračenja, elektron u HOMO orbitali prelazi u LUMO orbitalu s većim sadržajem energije. Pri povratku u HOMO orbitalu, dolazi do emisije vidljive svjetlosti, odnosno dolazi do fluorescencije. Opisani proces ovisi o elektronskoj interakciji fluoroformata i receptora, odnosno o fotoinduciranom prijenosu elektrona (PET) koji se odvija između njih. Kod derivata naftilimida, uslijed interakcije analita i receptora dolazi do promjene intenziteta fluorescencije spoja. Kod nekih derivata zabilježeni su i hipsokromni<sup>36</sup> i batokromni<sup>37</sup> pomak valne duljine.

### 2.3.1.2. Receptor molekula naftilimida

Receptor odnosno receptorski dio molekule predstavljaju amino atom dušika i skupina vezana na njega. Receptorski dio molekule odgovoran je za prepoznavanje i vezanje s analitom. Skupine receptorskog dijela sadrže atome s elektronima smještenim u neveznim orbitalama (atomi dušika, kisika, fosfora ili sumpora) koji omogućuju koordinaciju i kompleksaciju metalnih iona.<sup>7</sup> Također, bazični amino dušik omogućuje vezanje protona.<sup>9,34,38</sup> Male promjene u strukturi receptorskog dijela mogu znatno utjecati na interakciju s analitom i posljedično na elektronsku interakciju s fluoroformom što je ilustrirano spojevima **8a** i **8b** na Slici 8.



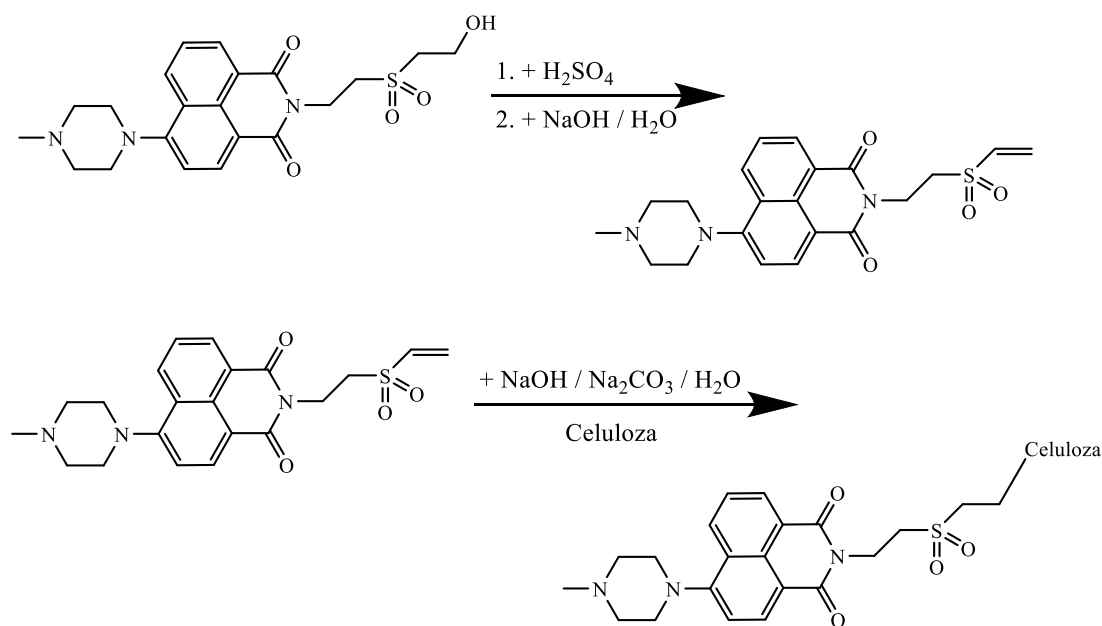
**Slika 8.** Spojevi **8a** i **8b** s razlikom u karbonilnoj skupini u strukturi receptora.<sup>39</sup>

Spojevi **8a** i **8b** razlikuju se jedino po karbonilnoj skupini prisutnoj u strukturi receptora spoja **8b**. Prilikom interakcije spoja **8a** s ionima  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Ag}^+$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  i  $\text{Cd}^{2+}$  dolazi do smanjenja intenziteta fluorescencije dok kod spoja **8b** dolazi do povećanja. Kisikov atom karbonilne skupine ponaša se kao donor elektrona metalnim ionima te koordinacijom sprječava njihovu potencijalnu elektronsku interakciju s fluoroformom. Također,

dvostruka veza karbonilne skupine čini strukturu receptora rigidnijom što za posljedicu povećava selektivnost vezanja spoja **8b** i metalnih iona što dokazuje povećanje fluorescencije samo u prisutnosti  $\text{Cr}^{3+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  i  $\text{Ni}^{2+}$  iona.<sup>39</sup>

### 2.3.1.3. *N*-supstituent molekula naftilimida

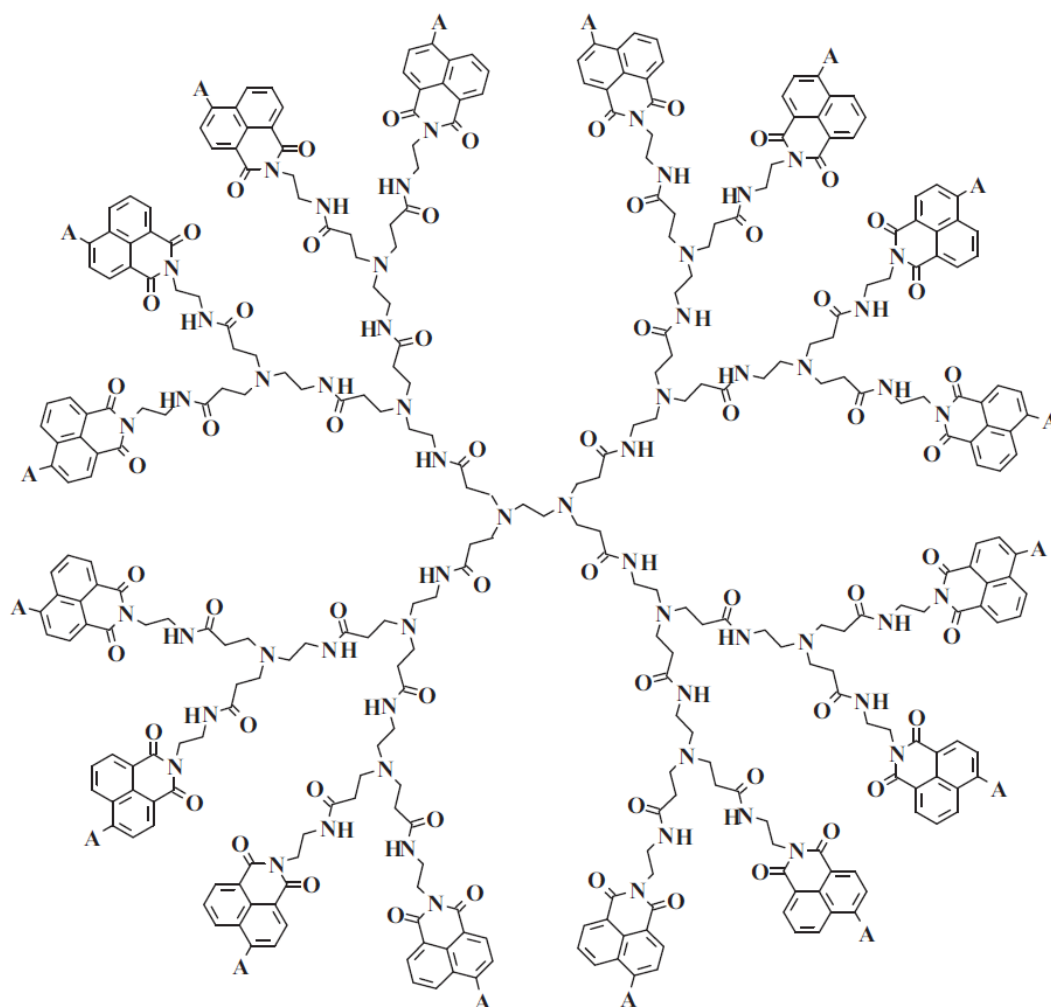
*N*-supstituent naziv je za skupinu vezanu na imidni atom dušika u strukturi naftilimida. *N*-supstituent ne utječe na interakciju receptora i analita kao ni na fluorescencijski odziv. Razlog tome je postojanje nodalne ravnine duž veze 4a-8a u strukturi naftilimida što onemogućuje elektronsku interakciju receptora i supstituenta.<sup>40</sup> Međutim, ukoliko se u strukturi receptora nalazi jaka elektron-odvlačeća skupina u blizini amino dušika<sup>40</sup> ili ako naftilimid nije 4-amino supstituiran<sup>41,42</sup> tada *N*-supstituent može utjecati na fluorescencijska svojstva molekule zbog promjene energije HOMO orbitala<sup>40</sup> te čak djelovati kao receptor za prepoznavanje metalnih iona ukoliko sadrži atome s elektronima u neveznim orbitalama (atomi N, O, S, P).<sup>40-43</sup> U najvećem broju spojeva, receptor je strukturno izveden na način da nije prisutna elektron-odvlačeća skupina, a primjer su spojevi **GJM-523** i **GJM-525**. Kod takvih spojeva, *N*-supstituent utječe na fizikalna svojstva poput topljivosti u raznim otapalima te je od iznimne važnosti prilikom razvoja optičkih senzora jer se preko njega molekula naftilimida veže za nosač senzora.<sup>10,35</sup> Shematski prikaz primjera modifikacije *N*-supstituenta i vezanja derivata naftilimida prikazan je na Slici 9.



**Slika 9.** Primjer vezanja derivata naftilimida na celulozu preko *N*-supstituenta.<sup>10</sup>

Spoj prikazan na Slici 9 sadrži 2-hidroksietilsulfonilnu skupinu poput spojeva **GJM-523** i **GJM-525**. Navedena skupina može se modificirati u vinilsulfonilnu skupinu primjenom koncentrirane sumporne kiseline te omogućuje kovalentnu imobilizaciju spojeva na celulozne i tekstilne materijale.<sup>10</sup> Imobilizacija putem vinilsulfonilne skupine jedna je od najpogodnijih imobilizacijskih tehnika za celulozne odnosno tekstilne materijale jer omogućuje pranje materijala konvencionalnim deterdžentima u perilicama za rublje bez ispiranja spoja i smanjenja funkcionalnosti imobiliziranih spojeva.<sup>44</sup>

Osim za nosače kemijskih senzora, derivati naftilimida mogu se preko *N*-supstituenta povezivati s drugim molekulama, a najčešće s molekulama istoga spoja. Time mogu nastati relativno jednostavne simetrične molekule<sup>43</sup>, ali mogu se sintetizirati i složeni dendrimeri velikih molarnih masa<sup>45</sup> kao što je prikazano na Slici 10.

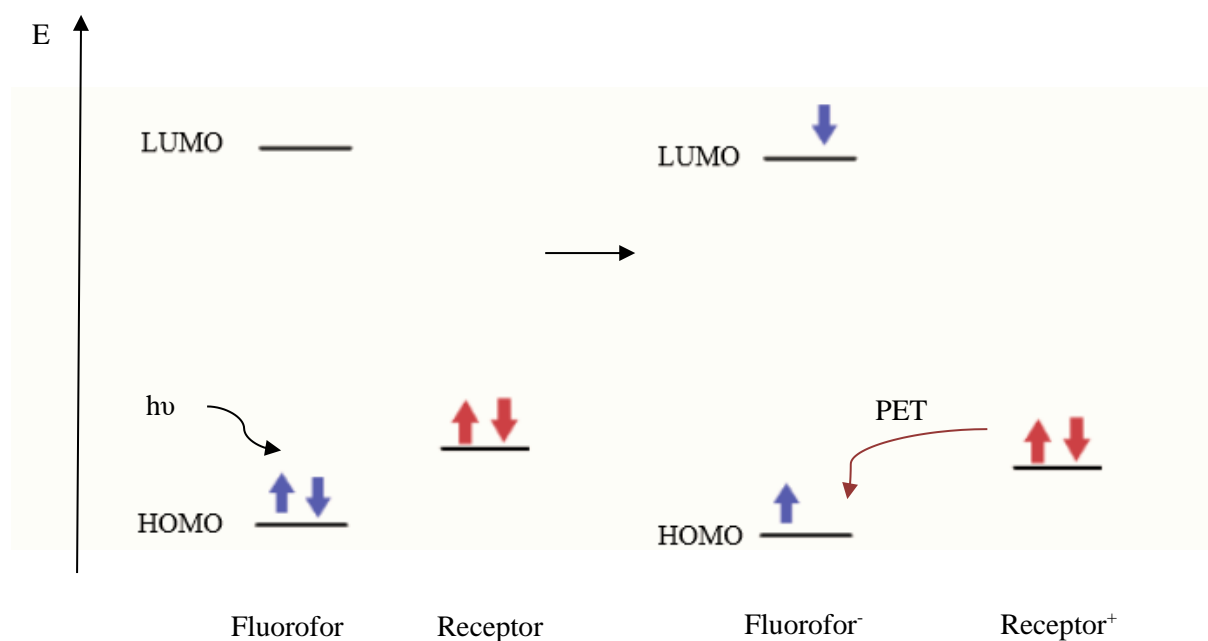


**Slika 10.** Primjer dendrimera sastavljenog od 16 molekula derivata 4-amino-1,8-naftilimida povezanih preko *N*-supstituenta s alifatskim lancima. A = H, NO<sub>2</sub>, NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, NHCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, NHCH<sub>2</sub>CH=CH<sub>2</sub>, *N*-piperidin.<sup>45</sup>

### 2.3.2. Fotoinducirani prijenos elektrona

Mehanizam fluorescentnog odziva derivata naftilimida u prisutnosti analita zasniva se na fotoinduciranom prijenosu elektrona (PET). Razumijevanje mehanizma PET-a od velike je važnosti za promatranje derivata naftilimida kao potencijalnih optičkih senzora ili indikatora. Njihova fluorescencijska svojstva proizlaze iz elektronskog procesa koji se odvija između receptorskog i fluorofornog dijela molekule, a na kojega se može utjecati vezanjem metalnih iona ili protona na receptorski dio molekule.<sup>9,17</sup>

Početak razmatranja PET-a jest pretpostavka da se molekula spoja u pobuđenom stanju ponaša drugačije nego u osnovnom stanju. Izlaganjem molekule elektromagnetskom zračenju i apsorpcijom određenog kvanta energije, molekula prelazi u pobuđeno stanje. Kod molekula sastavljenih od fluorofornog i receptorskog dijela, kao što su naftilimidi, elektron iz HOMO orbitale fluoroforma prelazi u orbitalu više energije (LUMO orbitala) uslijed pobude. Prelaskom u LUMO orbitalu, u HOMO orbitali ostaje jedan nespareni elektron (Slika 11.). Potom, elektron iz nevezne orbitale atoma kisika, dušika, sumpora ili fosfora u strukturi receptora prelazi u HOMO orbitalu pobuđenog fluoroforma. Ovim putem se receptor oksidira i poprima pozitivni naboj dok se fluorofor reducira i poprima negativni naboj. Može se reći kako dolazi do intramolekulske redukcije i oksidacije. Pobuđeni elektron iz LUMO orbitale fluoroforma ne vraća se prilikom relaksacije u HOMO orbitalu, već u neveznu orbitalu atoma u strukturi receptora. Time je onemogućena emisija elektromagnetskog zračenja i fluorescencija je ugašena.<sup>7,17</sup>



Slika 11. Shematski prikaz PET-a.<sup>17</sup>

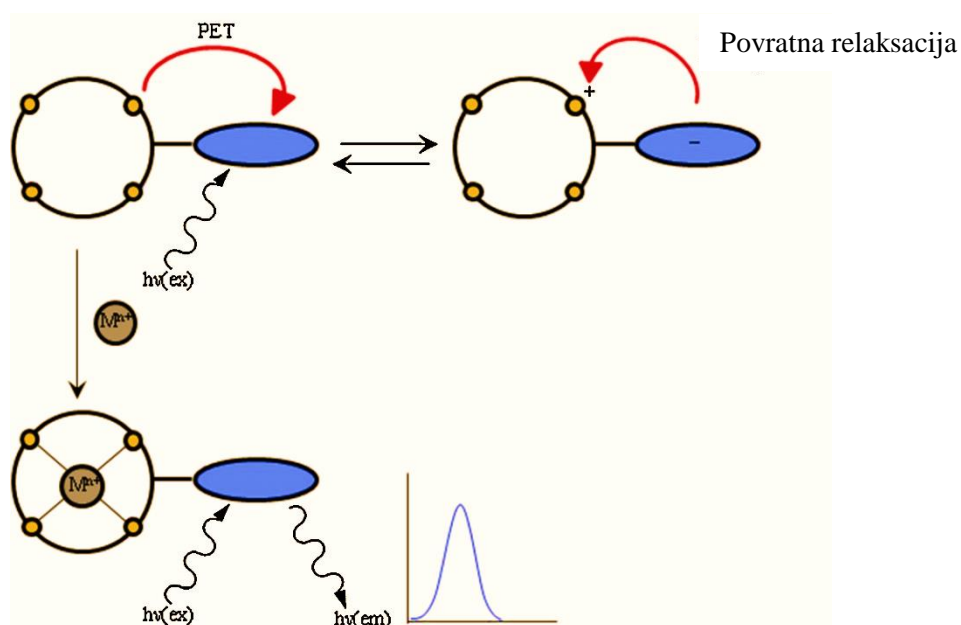
Općenito, polarna otapala pospješuju učinak PET-a zbog dipolnog efekta na nevezne molekulske orbitale receptora. Napolarna otapala smanjuju učinak PET-a te aktiviraju fluorescenciju.<sup>46,47</sup>

### 2.3.3. Osjetljivost na pH vrijednost

Fluorescencijska svojstva amino derivata naftilimida jako ovise o pH vrijednosti medija u kojemu se nalaze. Protoniranjem amino dušika u naftilimidu, PET se zaustavlja jer se energija neveznih orbitala elektron-donorskih atoma u strukturi receptora smanjuje te prelazak u HOMO orbitale fluorofora nije energetski povoljno.<sup>47,48</sup>

### 2.3.4. Osjetljivost na metalne ione

Prisutnost metalnih iona također utječe na optička svojstva naftilimida. Utjecaj metalnih iona na fluorescencijska svojstva naftilimida shematski je prikazan je na Slici 12. Receptor u strukturi naftilimida sadrži atome dušika, kisika, fosfora ili sumpora oko kojih su lokalizirani elektroni u neveznim orbitalama, što otvara mogućnost vezanja kationa metala i stvaranja kelata.



**Slika 12.** Shematski prikaz onemogućavanja PET-a uslijed kelatiranja iona metala neveznim elektronima receptora.<sup>7</sup> Oznake:  $h\nu(ex)$  - energija pobudnog elektromagnetskog zračenja,  $h\nu(em)$  - energija emitiranog zračenja.

Vežanjem metalnih iona, dolazi do promjena u energiji spomenutih neveznih orbitala, odnosno energija elektrona se smanjuje. Energija elektrona u neveznim orbitalama sada je manja od energije elektrona u HOMO orbitali fluorofora. Izlaganjem molekule elektromagnetskom zračenju dolazi do pobude elektrona u HOMO orbitali fluorofora te ona prelazi u LUMO orbitalu više energije. Budući da je energija neveznih orbitala zbog kompleksiranja metalnog iona manja od HOMO orbitale fluorofora, prelazak elektrona u polupopunjenu HOMO orbitalu je energetske nepovoljno te je PET proces spriječen.

Elektron u LUMO orbitali fluorofora prilikom povratka u HOMO orbitalu emitira elektromagnetsko zračenje u obliku fluorescencije.<sup>7,17</sup> Povećanje intenziteta fluorescencije odnosno aktivacija fluorescencije uslijed kelatiranja (eng. *chelation effect fluorescence enhancement*, CHEF) veže se uz procese onemogućavanja PET-a, tzv. „On-Off“ - PET procesi.<sup>17</sup>

Međutim, osim povećanja intenziteta fluorescencije moguće je i smanjenje intenziteta uslijed kelatiranja (eng. *chelation effect fluorescence quenching*, CHEQ). Pretpostavlja se kako prilikom vežanja metalnih iona i receptora dolazi do povećanja energije elektrona u neveznim orbitalama što potiče PET. Ioni  $\text{Hg}^{2+}$  i  $\text{Cu}^{2+}$  najpoznatiji i najčešći su deaktivatori fluorescencije te predstavljaju izazov za razvoj optičkih senzora za njihovu detekciju i određivanje.<sup>49</sup>

#### 2.3.4.1. Stehiometrija vežanja metalnih iona

Prisutnost elektrona u neveznim orbitalama receptora otvara mogućnost vežanja metalnih iona u različitim stehiometrijskim omjerima. Metalni ioni i receptor najčešće se vežu u stehiometrijskom omjeru 1:1.<sup>47,50</sup> Međutim, mogući su i drugi stehiometrijski omjeri, ovisno o broju elektron-donorskih atoma u strukturi receptora te steričkim smetnjama. Često je i vežanje u omjeru 2:1 pri čemu dvije molekule naftilimida koordiniraju jedan metalni ion. Kod navedenog omjera, zanimljivi su primjeri koordiniranja u kojima se molekule naftilimida smještaju paralelno jedna ispod druge s vezanim metalnim ionom između njih tvoreći tzv. sendvič komplekse.<sup>40</sup>

Metoda po Jobu jednostavna je metoda kojom se može pretpostaviti stehiometrijski omjer naftilimida i metalnog iona, a zasniva se na mjerenju intenziteta fluorescencije otopine naftilimida u prisutnosti metalnih iona pri različitim molarnim udjelima. Pri tome dolazi do promjene intenziteta fluorescencije kako se mijenja udio metalnih iona odnosno naftilimida.



Udio metalnih iona ili naftilimida u točki sjecišta ekstrapoliranih pravaca ovisnosti intenziteta fluorescencije o udjelu iona i spoja određuje njihove stehiometrijske koeficijente.<sup>51</sup>

Konstanta ravnoteže reakcije kelatiranja može se odrediti pomoću Benesi-Hildebrandove metode ukoliko su poznati stehiometrijski omjeri naftilimida i metalnog iona. Benesi-Hildebrandova metoda zasniva se na pretpostavci da kada je bilo koji od reaktanata u suvišku, karakteristični apsorpcijski spektar drugog reaktanta je transparentan u odnosu na mjereni spektar sustava.<sup>52</sup>

Mjerenjem intenziteta fluorescencije, može se odrediti konstanta ravnoteže pomoću Benesi-Hildebrandovog izraza zadanog jednadžbom 10:

$$\log \frac{(F - F_{\min})}{(F_{\max} - F)} = \log K + n \log [Me^{z+}] \quad (10)$$

pri čemu je  $F_{\min}$  - intenzitet fluorescencije u odsutnosti metalnih iona,  $F_{\max}$  - intenzitet fluorescencije pri zasićenju metalnim ionima,  $F$  - intenzitet fluorescencije kompleksa naftilimid-metalni ion u linearnom području,  $n$  - stehiometrija vezanja (1 za 1:1 vezanje).

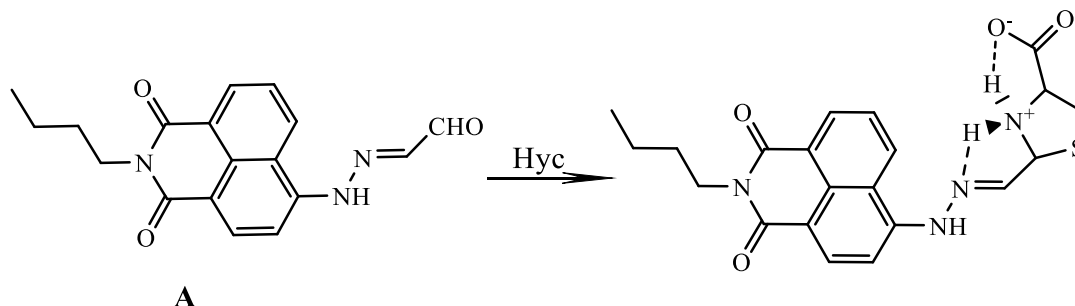
## 2.4. Primjeri kemosenzora na bazi derivata naftilimida

Prethodno je objašnjen mehanizam fluorescencijskog odziva derivata naftilimida u prisutnosti metalnih iona i uslijed promjene pH vrijednosti medija. Osim za određivanje metalnih iona, derivati naftilimida koriste se kao kemosenzori za određivanje aniona<sup>9,53</sup>, aminokiselina<sup>54</sup>, saharida<sup>55</sup>, tiola<sup>29,53</sup>, vode<sup>56</sup>, vodikovog peroksida<sup>57</sup> i nukleotida<sup>58</sup>, kao i za praćenje temperature<sup>59</sup> i redoks procesa.<sup>60</sup> Važno je istaknuti kako se način vezanja i mehanizam fluorescentnog odziva naftilimida bitno razlikuje ovisno o vrsti analita. U nastavku su dani primjeri naftilimidnih molekulskih senzora za određivanje aminokiselina, aniona i praćenje redoks procesa. Ovdje je objašnjen mehanizam karakterističan za navedeni primjer kemosenzora i analit za kojega je namijenjen.

### 2.4.1. Kemosenzor za određivanje aminokiselina

Mehanizam detekcije i određivanja aminokiselina pomoću spoja **A** prikazanog na Slici 13. temelji se na sprečavanju izomerizacije C=N veze u strukturi receptora spoja **A** uslijed vezanja aminokiselina cisteina (Cys) i homocisteina (Hcy). Spoj **A** u otopini dimetilsulfoksida (DMSO)

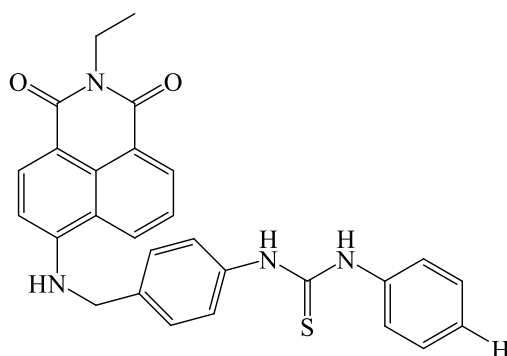
vrlo slabo fluorescira izlaganjem ultraljubičastom zračenju što je posljedica izomerizacije C=N veze uslijed apsorpcije zračenja. Aminokiseline Cys i Hcy vežu se za receptor te dolazi do stabilizacije i ukrućivanja strukture zbog intramolekulskih vodikovih veza između vodika i atoma dušika –N=CH–CHO dijela molekule<sup>54</sup> kako je prikazano na Slici 13.



**Slika 13.** Vežanje aminokiseline Hcy i spoja A i nastajanja intramolekulskih vodikovih veza. Reakcija je analogna za Cys.<sup>54</sup>

#### 2.4.2. Kemosenzor za određivanje aniona

Na Slici 14. prikazan je kemosenzor za određivanje fluoridnih iona. Funkcionalne jedinice navedene molekule istovjetne su onima kod kemosenzora za metalne ione. Fluorofor predstavlja 1,8-naftilimid na kojega je metilenskom vezom preko amino dušika u položaju 4 vezana diariltiurea kao neutralni receptor za prepoznavanje aniona.



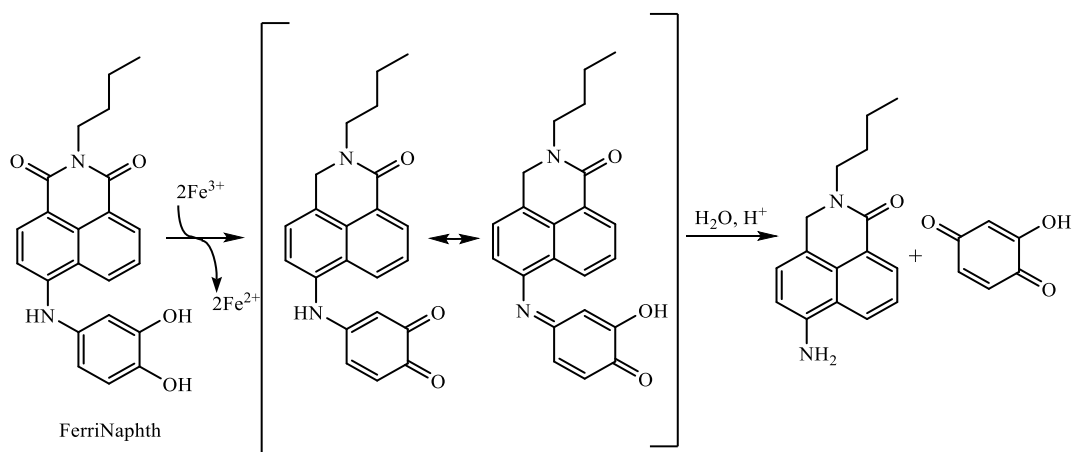
**Slika 14.** Kemosenzor na bazi 1,8-naftilimida za određivanje F<sup>-</sup> iona.<sup>9</sup>

Spoj na Slici 14. intenzivno fluorescira u otopini dimetilsulfoksida (DMSO), a u prisutnosti fluoridnih iona dolazi do smanjenja intenziteta fluorescencije bez pomaka valne duljine. Mehanizam gašenja fluorescencije može se interpretirati pomoću PET-a. U prisutnosti F<sup>-</sup> iona

dolazi do prijelaza elektrona s receptora bogatog elektronima na fluorofor uslijed pobude molekule apsorpcijom ultraljubičastog zračenja.<sup>9</sup>

### 2.4.3. Kemosenzor za praćenje redoks procesa

Vrlo zanimljiv primjer kemosenzora za praćenje redoks aktivnih metalnih iona je **FerriNaphth** čiji se mehanizam određivanja  $\text{Fe}^{3+}$  iona temelji na redukciji do  $\text{Fe}^{2+}$  uslijed oksidacije spoja. Pri tome dolazi do fluorescencijske transdukcije i stvaranja rezonantnih kompleksa te konačnog cijepanja molekule naftilimida (Slika 15.). Navedeni procesi praćeni su hipokromnim pomakom intenziteta fluorescencije u ovisnosti u vremenu s maksimumom emisije na 520 nm.<sup>60</sup>



**Slika 15.** Mehanizam fluorescencijske transdukcije prilikom određivanja  $\text{Fe}^{3+}$ .<sup>60</sup>

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. Kemikalije

Sve kemikalije nabavljene su od komercijalnih dobavljača Sigma Aldrich, Fluka ili Acros te su korištene bez dodatnog pročišćavanja. Metanol spektroskopske (HPLC) čistoće korišten je za spektroskopska mjerenja. Soli čistoće p.a. korištene u radu su  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ ,  $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2 \times \text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{AgNO}_3$ ,  $\text{FeCl}_2 \times 4 \text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{FeCl}_3 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{LiCl}$ ,  $\text{ZnCl}_2$ ,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{CoCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CuCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MnCl}_2 \times 4 \text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{BaCl}_2$ ,  $\text{AlCl}_3 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{NiCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$  i  $\text{CdCl}_2$ .

Spojeve **GJM-523** i **GJM-525** prethodno je sintetizirao Gerhard J. Mohr<sup>10</sup> te su korišteni bez dodatnog pročišćavanja. Za pripremu vodenih otopina korištena je Mili-Q voda.

##### 3.1.1. Priprema temeljnih standardnih otopina GJM-523 i GJM-525

Temeljne standardne otopine (*stock* otopine) spojeva **GJM-523** i **GJM-525** pripremljene su otapanjem 0,10 mg spoja u 100,00 mL metanola (MeOH). Koncentracija *stock* otopine spoja **GJM-523** iznosi  $c(\text{GJM-523}, \text{stock}) = 1,97 \times 10^{-5} \text{ M}$ , odnosno za **GJM-525** iznosi  $c(\text{GJM-525}, \text{stock}) = 1,96 \times 10^{-5} \text{ M}$ .

##### 3.1.2. Priprema temeljnih standardnih otopina metalnih iona

Temeljne standardne otopine (*stock* otopine) iona  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Ag}^+$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  i  $\text{Cd}^{2+}$  koncentracije  $1,00 \times 10^{-3} \text{ M}$  pripremljene su otapanjem prethodno navedenih soli u 0,01 M otopini  $\text{HNO}_3$ .

##### 3.1.3. Radne otopine metalnih iona

Radne otopine iona  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Ag}^+$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  i  $\text{Cd}^{2+}$  koncentracije  $3,00 \times 10^{-4} \text{ M}$  pripremljene su razrjeđivanjem *stock* otopina metalnih iona s 0,01 M  $\text{HNO}_3$ . Ovako pripremljene otopine korištene su prilikom titracija **GJM-523** s metalnim ionima.

### 3.1.4. Otopine pufera

Za pH područje 5,00 - 8,00 korišten je fosfatni pufer dok je za postizanje nižih pH vrijednosti u području 1,20 - 4,80 korišten citratni pufer. Otopine fosfatnog pufera pripravljene su miješanjem odgovarajućih volumena otopina  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ( $9,07 \text{ g L}^{-1}$ ) i otopine  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$  ( $11,87 \text{ g L}^{-1}$ ). Otopine citratnog pufera pripravljene su miješanjem odgovarajućih volumena  $0,10 \text{ M HCl}$  i otopine monohidrata limunske kiseline ( $21,01 \text{ g L}^{-1}$  u  $0,25 \text{ M NaOH}$ ). Točna pH vrijednost tako pripremljenih otopina određena je pomoću pH metra.

## 3.2. Instrumenti

Za provedbu eksperimenata i pripremu otopina korišteni su slijedeći instrumenti:

- Analitička vaga, KERN & Sohn GmbH, D-72336 Balingen, Germany
- pH metar MA 5740, Iskra d.d., s  $\text{Cu/CuSO}_4$  elektrodom
- UV svjetiljka valne duljine 365 nm
- Uređaj za dobivanje Mili-Q vode, TKA - GenPure, Wasseraufbereitungssystem GmbH
- Dvosnopni UV-vidljivo apsorpcijski spektrofotometar Varian Cary 50, Varian Inc, SAD
- Fluorescencijski spektrofotometar Varian Cary Eclipse, Varian Inc, SAD

## 3.3. Opis mjerenja

### 3.3.1. Mjerenje apsorpcijskih spektara

Mjerenje apsorpcijskih spektara u UV-vidljivom području izvršeno je na Varian Cary dvosnopnom spektrofotometru. Mjereni su spektri u odnosu na otapalo u području valnih duljina od 200 do 800 nm na  $25 \text{ °C}$  pri čemu su korištene kvarcne kivete optičkog puta  $1,00 \text{ cm}$ . Prije svakog seta mjerenja određena je bazna linija na način da je snimljen apsorpcijski spektar slijepe probe (otopina metanola i fosfatnog pufera pH 5,50).

Molarni ekstincijski koeficijenti ( $\epsilon$ ) spojeva određeni su pomoću Lambert-Beerovog zakona prikazanog jednadžbom 11:

$$\epsilon = \frac{A}{c \times d} \quad (11)$$

pri čemu  $A$  označava apsorbanciju pri valnoj duljini 388 nm i 410 nm,  $c$  označava koncentraciju **GJM-523** odnosno **GJM-525**, a  $d$  predstavlja duljinu optičkog puta i iznosi 1,00 cm.

### 3.3.2. Mjerenje fluorescencijskih spektara

Mjerenje fluorescencije izvršeno je na Varian Cary Eclipse fluorescencijskom spektrofotometru. Emisijski spektri zabilježeni su pri 25 °C u području valnih duljina od 380 do 800 nm pri čemu je valna duljina pobude  $\lambda_{exc}$  iznosila 410 nm. Također, korištene su kvarcne kivete optičkog puta 1,00 cm. Prije svakog seta mjerenja određena je bazna linija na način da je snimljen apsorpcijski spektar slijepe probe (otopina metanola i fosfatnog pufera pH 5,50).

### 3.3.3. Određivanje kvantnog iskorištenja **GJM-523** i **GJM-525**

Spojevi **GJM-523** i **GJM-525** spektroskopski su karakterizirani mjerenjem apsorpcijskih i fluorescencijskih spektara spojeva u MeOH pri koncentraciji  $1,00 \times 10^{-5}$  M. Također, otopine spojeva promatrane su pod danjim i UV svjetlom. Kvantno iskorištenje određeno je koristeći Millerov izraz zadan jednadžbom 12:

$$\Phi_x = \Phi_s \times A_s D_x n_x^2 / (A_x D_s n_s^2) \quad (12)$$

pri čemu je  $\Phi$  - emisijsko kvantno iskorištenje,  $A$  - apsorbancija na valnoj duljini pobude (410 nm),  $D$  - površina ispod korigirane krivulje emisije,  $n$  - indeks loma korištenih otapala. Indeksi  $s$  i  $x$  odnose se na standard i na ispitivanu otopinu. Korišteni standard je kinin sulfat s kvantnim iskorištenjem 0,54.

### 3.3.4. pH titracija **GJM-523** i **GJM-525**

Kako bi se odredio utjecaj pH vrijednosti na spektroskopska svojstva spojeva **GJM-523** i **GJM-525** mjereni su apsorpcijski i fluorescencijski spektri otopina spojeva u području pH 1,60 - 8,00 za **GJM-523**, odnosno 1,20 - 8,00 za **GJM-525**. Otopine spojeva korištene u ispitivanju pripremljene su na način da je 1 mL *stock* otopine pojedinog spoja razrijeđen s 2 mL pufera. Koncentracija **GJM-523** i **GJM-525** u tako pripremljenim otopinama iznosi  $6,56 \times 10^{-6}$  M odnosno  $6,54 \times 10^{-6}$  M.

Primjenom računalnog programa Origin konstruirane su sigmoidalne krivulje ovisnosti omjera apsorbancije pri 388 nm i 410 nm o pH vrijednosti za oba spoja korištenjem Boltzmannove funkcije. Također, konstruirane su i krivulje ovisnosti intenziteta fluorescencije pri 523 nm za **GJM-523** i 525 nm za **GJM-525** o pH vrijednosti. Iz vrijednosti apscise u točkama infleksije krivulja određene su  $pK_a$  vrijednosti spojeva. Boltzmannova funkcija zadana je jednačbom 13:

$$y = A_2 + \frac{A_1 - A_2}{1 + e^{\frac{x-x_0}{dx}}} \quad (13)$$

pri čemu je  $A_2$  – gornja vrijednost funkcije,  $A_1$  – donja vrijednost funkcije,  $x$  – vrijednost apscise,  $x_0$  – vrijednost apscise u točki infleksije,  $dx$  – nagib tangente na krivulju u točki s apscisom  $x$ .

### 3.3.5. Odziv u prisutnosti metalnih iona

Sva mjerenja fluorescencijskih svojstava izvršena su pri pH 5,50 u otopini MeOH i fosfatnog pufera (v/v, 1/2). Prije mjerenja fluorescencijskih spektara spojeva, provedena je vizualna procjena fluorescencijskog odziva ispitivanih spojeva u prisutnosti metalnih iona. Prilikom ispitivanja, u 1,00 mL otopine MeOH i pufera pH 5,50 (v/v, 1/2) pri čemu je koncentracija spojeva **GJM-523** i **GJM-525** iznosila  $6,56 \times 10^{-6}$  M, odnosno  $6,54 \times 10^{-6}$  M dodano je 30,00  $\mu$ L *stock* otopina metalnih iona koncentracije  $1,00 \times 10^{-3}$  M. Tako pripremljene otopine promatrane su pod UV svjetlom.

#### 3.3.5.1. Odziv GJM-523 u prisutnosti metalnih iona

Kod ispitivanja odziva u prisutnosti metalnih iona, koncentracija **GJM-523** iznosi  $5,00 \times 10^{-7}$  M, a otopina je pripremljena tako da se 83,30  $\mu$ L *stock* otopine spoja **GJM-523** razrijedi s 916,70  $\mu$ L MeOH i 2,00 mL pufera pH 5,50. *Stock* otopinu spoja potrebno je razrijediti na ovaj način jer je spoj iznimno fluorescentan te intenzitet fluorescencije pri većim koncentracijama prelazi preko mjernog područja instrumenta. Na tako pripremljenu otopinu tri puta je dodan određeni volumen *stock* otopine metalnih iona uz 2,00 min miješanja nakon svakog dodatka. Dodani volumen otopine metalnih iona te koncentracije spoja i metalnih iona pri svakom dodatku prikazani su u Tablici 1. Također, prikazani su i omjeri množina metalnih iona i spoja. Fluorescencijski spektri mjereni su za svaki dodatak.

**Tablica 1.** Ukupni volumen dodane *stock* otopine metalnih iona koncentracije  $1,00 \times 10^{-3}$  M ( $\Sigma V(\text{Me}^{z+})$ ), koncentracija metalnih iona u otopini ( $c_2(\text{Me}^{z+})$ ) i omjer množina metalnih iona i spoja ( $n(\text{Me}^{z+}) : n(\text{GJM-523})$ ) za 3 dodatka otopine metalnih iona.

| Br. dodatka                              | 1. dodatak            | 2. dodatak            | 3. dodatak            |
|--|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| $\Sigma V(\text{Me}^{z+}) / \mu\text{L}$ | 3,00                  | 30,00                 | 150,00                |
| $c_2(\text{Me}^{z+}) / \text{M}$         | $1,00 \times 10^{-6}$ | $9,90 \times 10^{-6}$ | $4,76 \times 10^{-5}$ |
| $c(\text{GJM-523}) / \text{M}$           | $4,99 \times 10^{-7}$ | $4,95 \times 10^{-7}$ | $4,76 \times 10^{-7}$ |
| $n(\text{Me}^{z+}) : n(\text{GJM-523})$  | 2 : 1                 | 20 : 1                | 95 : 1                |

### 3.3.5.2. Vrijeme odziva GJM-525 u prisutnosti $\text{Hg}^{2+}$ iona

Vremenska ovisnost intenziteta fluorescencije spoja **GJM-525** u prisutnosti  $\text{Hg}^{2+}$  iona određena je u razrijeđenoj otopini spoja pri pH 5,50. 1,00 mL *stock* otopine **GJM-525** razrijedi se s 2 mL fosfatnog pufera pH 5,50 na koncentraciju  $6,54 \times 10^{-6}$  M u kvarcnoj kivetu. U tako pripremljenu otopinu dodano je 150,00  $\mu\text{L}$  *stock* otopine  $\text{Hg}^{2+}$  koncentracije  $1,00 \times 10^{-3}$  M te je mjeren fluorescencijski spektar 2, 5, 6, 7, 8 i 10 minuta nakon dodatka otopine  $\text{Hg}^{2+}$  iona.

### 3.3.5.3. Odziv GJM-525 u prisutnosti $\text{Hg}^{2+}$ iona i drugih metalnih iona

1,00 mL *stock* otopine **GJM-525** razrijedi se s 2,00 mL fosfatnog pufera pH 5,50 na koncentraciju  $6,54 \times 10^{-6}$  M u kvarcnoj kivetu. U tako pripremljenu otopinu dodano je 150,00  $\mu\text{L}$  *stock* otopine metalnih iona koncentracije  $1,00 \times 10^{-3}$  M te je mjeren fluorescencijski spektar otopine nakon 2 minute miješanja. Potom se u otopinu doda 150,00  $\mu\text{l}$  *stock* otopine  $\text{Hg}^{2+}$  iona te se snima fluorescencijski spektar nakon 5 minuta od dodatka iona  $\text{Hg}^{2+}$ . Postupak je ponovljen za svaki ispitivani metalni ion.

### 3.3.6. Titracija GJM-523 s metalnim ionima

Spoj **GJM-523** titriran je s  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$  i  $\text{Cd}^{2+}$  u rasponu koncentracija iona od  $5,00 \times 10^{-8}$  M do  $5,00 \times 10^{-5}$  M. Titracije su provedene pri pH 5,50 i pri koncentraciji spoja **GJM-523** od  $5,00 \times 10^{-7}$  M. Navedena koncentracija postignuta je na način opisan u odlomku 3.3.5.1. te je mjeren fluorescencijski spektar otopine spoja bez prisutnosti metalnih



iona. Potom, u otopinu spoja su dodavani mali alikvoti otopina metalnih iona koncentracija  $1,00 \times 10^{-3}$  M i  $3,00 \times 10^{-4}$  M te je izmjeren fluorescencijski spektar otopine nakon dvije minute miješanja. Postupak je ponovljen za svaki dodatak alikvota i za svaki pojedini metalni ion.

### 3.3.7. Ispitivanje stehiometrije vezanja metalnih iona

Jednostavan način određivanja stehiometrijskih koeficijenata metala i naftilimida je metoda po Jobu koja se zasniva na mjerenju intenziteta fluorescencije otopine naftilimida u prisutnosti metalnih iona pri različitim molarnim udjelima. Pri tome dolazi do promjene intenziteta fluorescencije kako se mijenja udio metalnih iona odnosno naftilimida. Udio metalnih iona ili naftilimida u točki sjecišta ekstrapoliranih pravaca ovisnosti intenziteta fluorescencije o udjelu određuje njihove stehiometrijske koeficijente.<sup>51</sup>

**Tablica 2.** Volumeni otopina spoja **GJM-523** i metalnih iona te njihovi omjeri molarnih udjela.

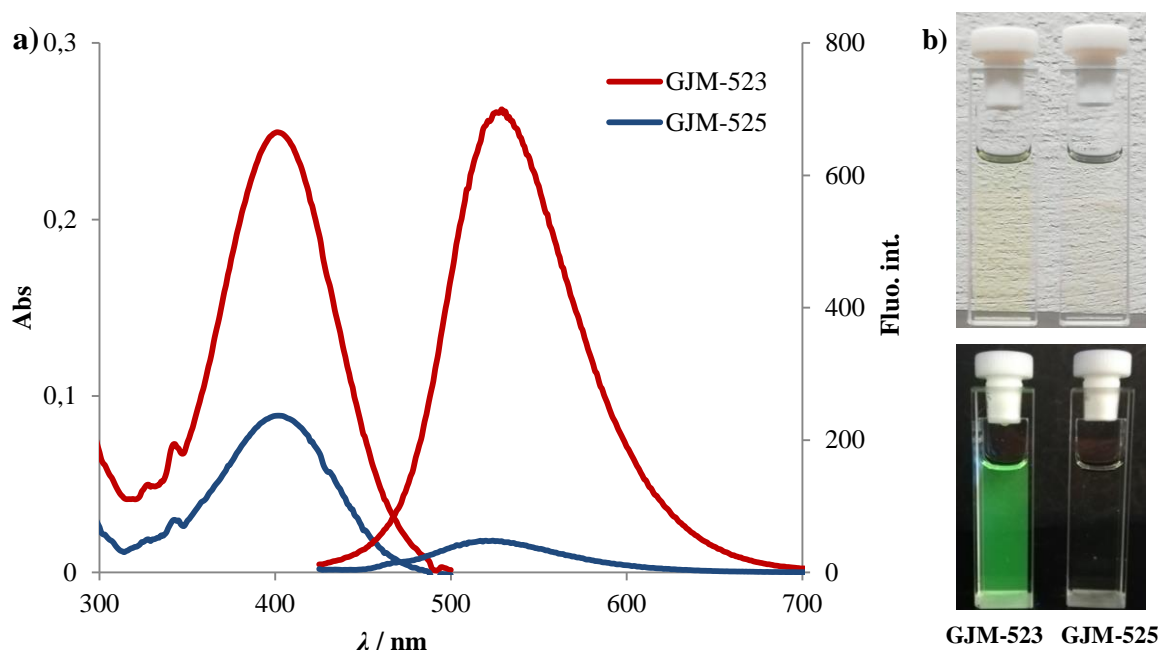
| $x$ (GJM) : $x$ (Me <sup>z+</sup> ) | $V$ (GJM-523) / mL | $V$ (Me <sup>z+</sup> ) / mL | $V$ (pufera pH 5,50) |
|-------------------------------------|--------------------|------------------------------|----------------------|
| 10 : 0                              | 1,00               | 0,00                         | 2,00 mL              |
| 9 : 1                               | 0,90               | 0,10                         |                      |
| 8 : 2                               | 0,80               | 0,20                         |                      |
| 7 : 3                               | 0,70               | 0,30                         |                      |
| 6 : 4                               | 0,60               | 0,40                         |                      |
| 5 : 5                               | 0,50               | 0,50                         |                      |
| 4 : 6                               | 0,40               | 0,60                         |                      |
| 3 : 7                               | 0,30               | 0,70                         |                      |
| 2 : 8                               | 0,20               | 0,80                         |                      |
| 1 : 9                               | 0,10               | 0,90                         |                      |
| 0 : 10                              | 0,00               | 1,00                         |                      |

Stehiometrijski koeficijenti određivani su za reakcije vezanja Cu<sup>2+</sup> i Hg<sup>2+</sup> iona s **GJM-523**. Prilikom ispitivanja, *stock* otopine spoja i metalnih iona razrijeđene su na koncentraciju  $5,00 \times 10^{-6}$  M u metanolu odnosno u 0,01 M HNO<sub>3</sub>. Tako pripremljena otopina Hg<sup>2+</sup> odnosno Cu<sup>2+</sup> iona miješana je otopinom **GJM-523** kako je prikazano u Tablici 2. u kvarcnoj kiveti uz 2 minute miješanja te je potom snimljen fluorescencijski spektar. Sva mjerenja provedena su uz dodatak 2,00 mL fosfatnog pufera pH 5,50.

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1. Spektroskopska svojstva GJM-523 i GJM-525

Apsorpcijski i emisijski odnosno fluorescencijski spektri spojeva mjereni su u MeOH pri čemu je koncentracija spojeva bila jednaka i iznosi  $1,00 \times 10^{-5}$  M. Apsorpcijski i emisijski spektri spojeva u MeOH prikazani su na Slici 16a. te fotografije otopina spojeva pod danjim i UV svjetlom na Slici 16b.



**Slika 16.** a) apsorpcijski i fluorescencijski (emisijski) spektri b) otopine spojeva **GJM-523** i **GJM-525** u metanolu ( $c = 1,00 \times 10^{-5}$  M) pod danjim svjetlom (gore) i pod UV svjetlom (365 nm) (dolje),  $\lambda_{exc} = 410$  nm.

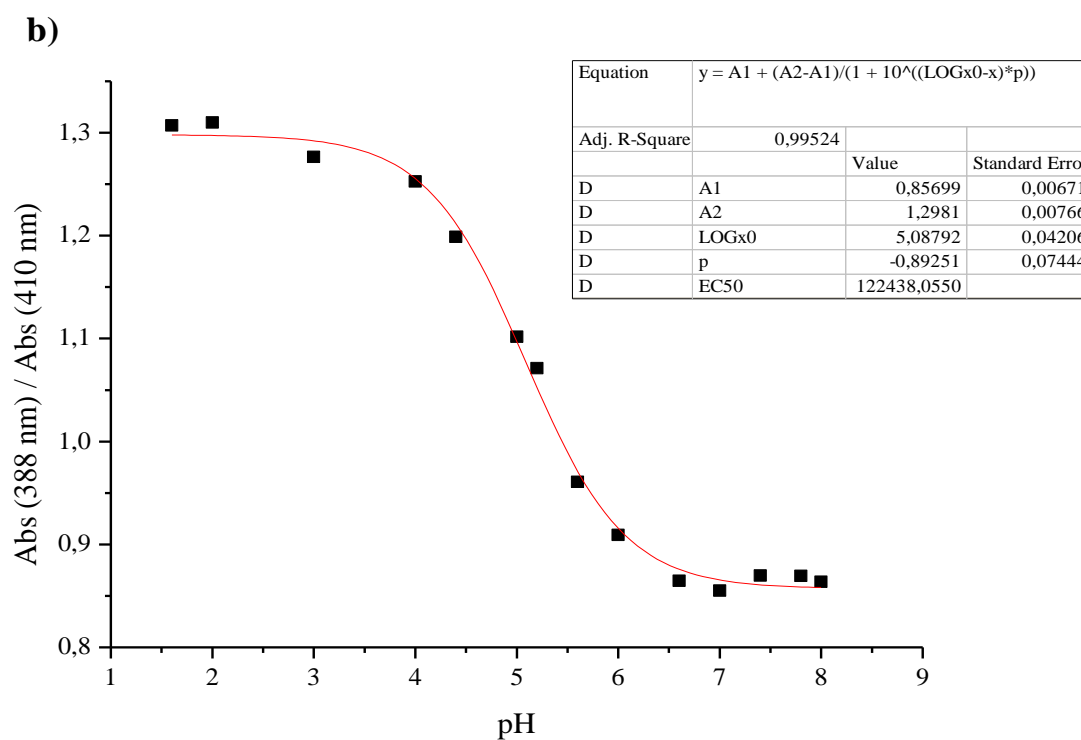
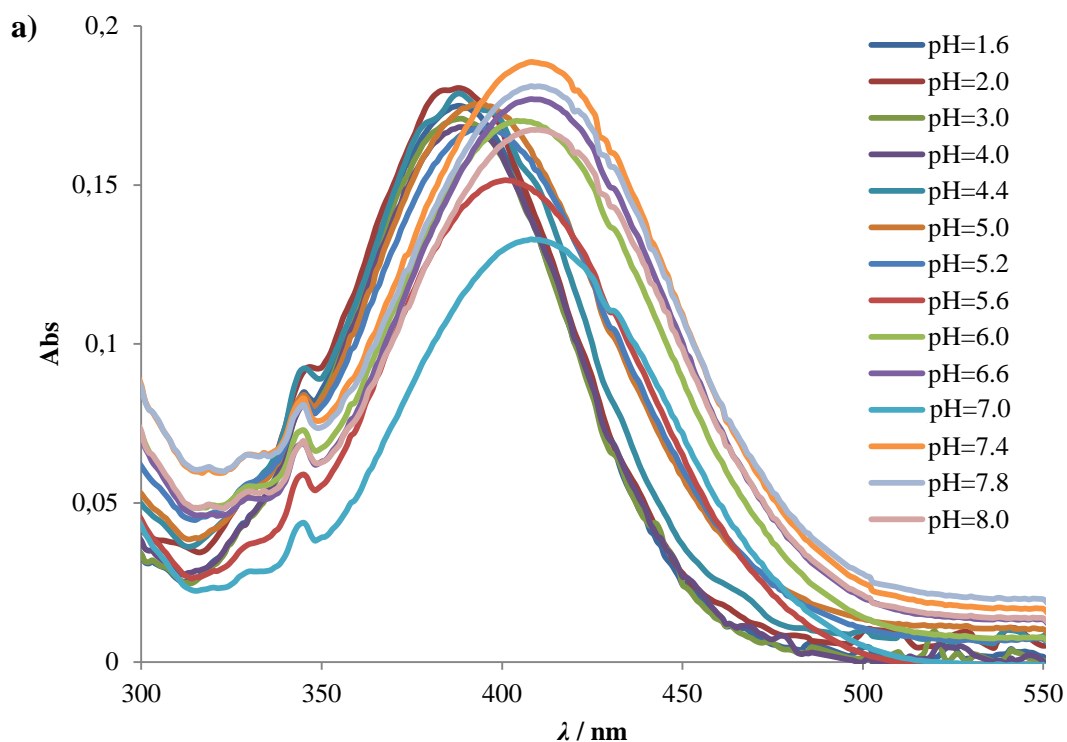
U apsorpcijskim spektrima vidljiv je maksimum apsorpcije za oba spoja pri valnoj duljini od 410 nm. Na Slici 16b. vidi se kako su otopine oba spoja svijetlo žute boje pod danjim svjetlom te kako spoj **GJM-523** znatno jače fluorescira pod UV svjetlom (365 nm). Iz fluorescencijskih spektara spojeva (Slika 16a.) može se očitati kako se maksimumi intenziteta emisije nalaze na 523 nm i 525 nm za **GJM-523** odnosno **GJM-525**.

Strukture spojeva **GJM-523** i **GJM-525** razlikuju se po skupini vezanoj preko piperazina na 2-hidroksietilsulfonil naftilimid kao što je prikazano na Slici 1. Ova strukturna razlika znatno

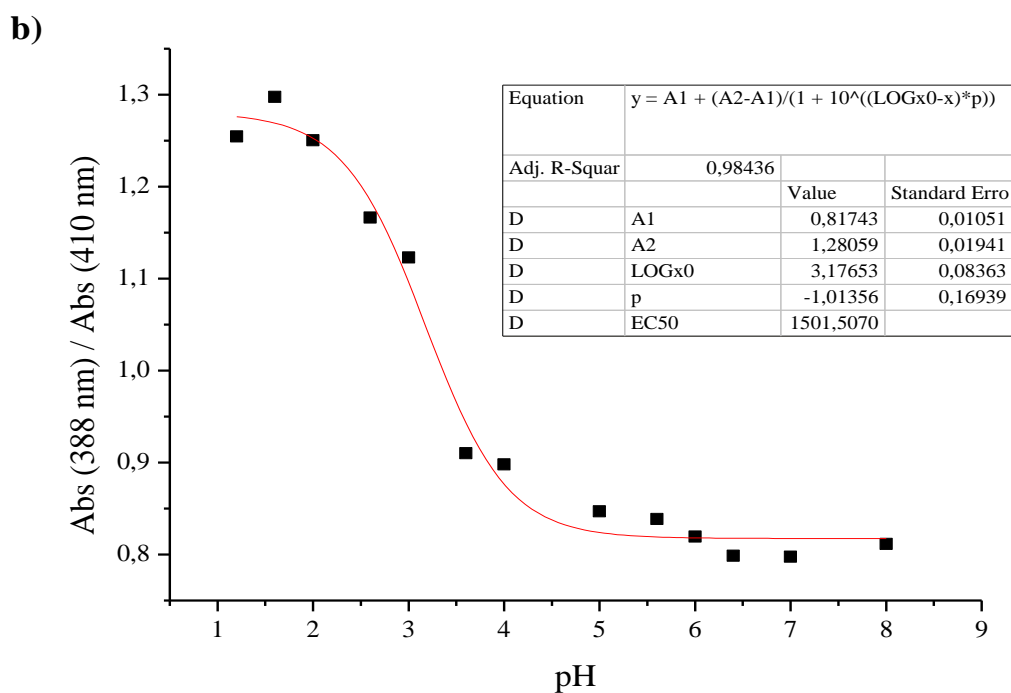
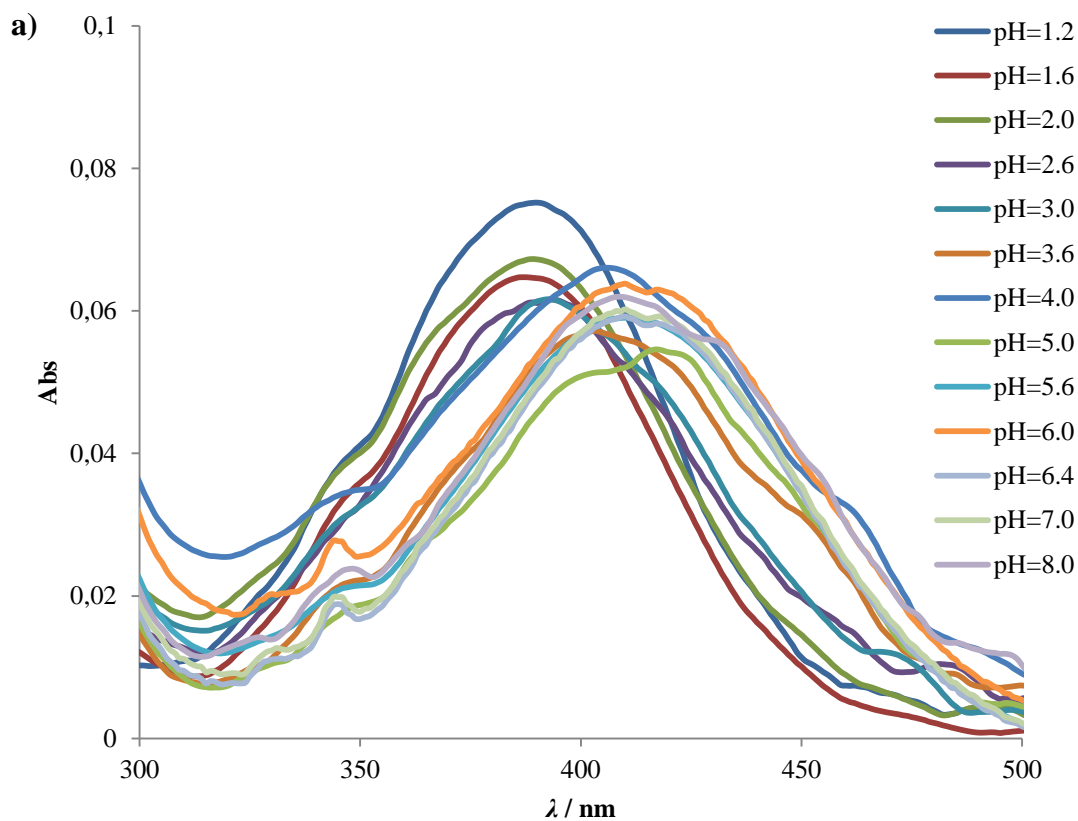
utječe na spektroskopska svojstva spojeva. Molarni apsorpcijski koeficijent za **GJM-523** iznosi  $\varepsilon = 2,41 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  i  $\varepsilon = 8,52 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  za **GJM-525**, a apsorpcijska svojstva se mogu protumačiti  $\pi\text{-}\pi^*$  prijelazom. Intenzitet fluorescencije znatno je ovisan o prethodno navedenim skupinama vezanim na naftilimid. **GJM-523** sadrži 2-metilpiridinsku skupinu te je visoko fluorescentni fluorofor koji emitira zelenu svjetlost nakon pobude upadnim zračenjem. U usporedbi s **GJM-523**, spoj **GJM-525** fluorescira znatno slabijim intenzitetom što se može pripisati hidroksifenilnom supstituentu. Oba spoja pokazuju veliki Stokesov pomak od 113 nm (**GJM-523**) i 115 nm (**GJM-525**) što ih čini izvrsnim kandidatima za potencijalnu primjenu kao molekularni senzori unatoč malom kvantnom iskorištenju fluorescencije od  $\Phi = 0,027$  za **GJM-523** i  $\Phi = 0,004$  za **GJM-525** u odnosu na neke već ispitane derivate naftilimida s piperazinom u strukturi receptora.<sup>61</sup>

## 4.2. pH osjetljivost derivata naftilimida

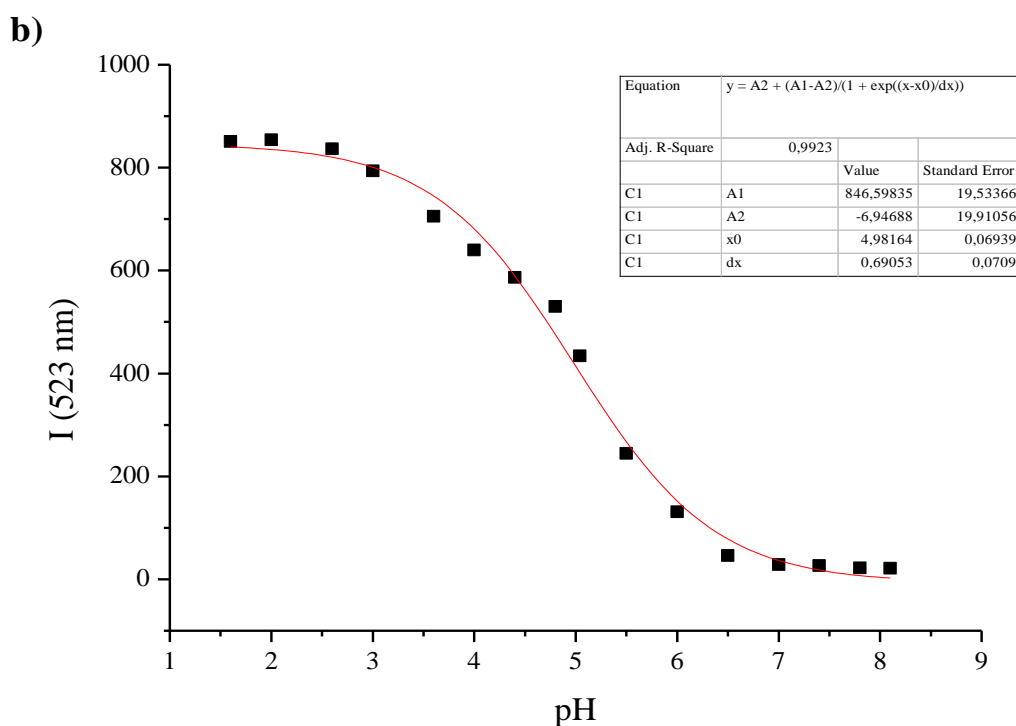
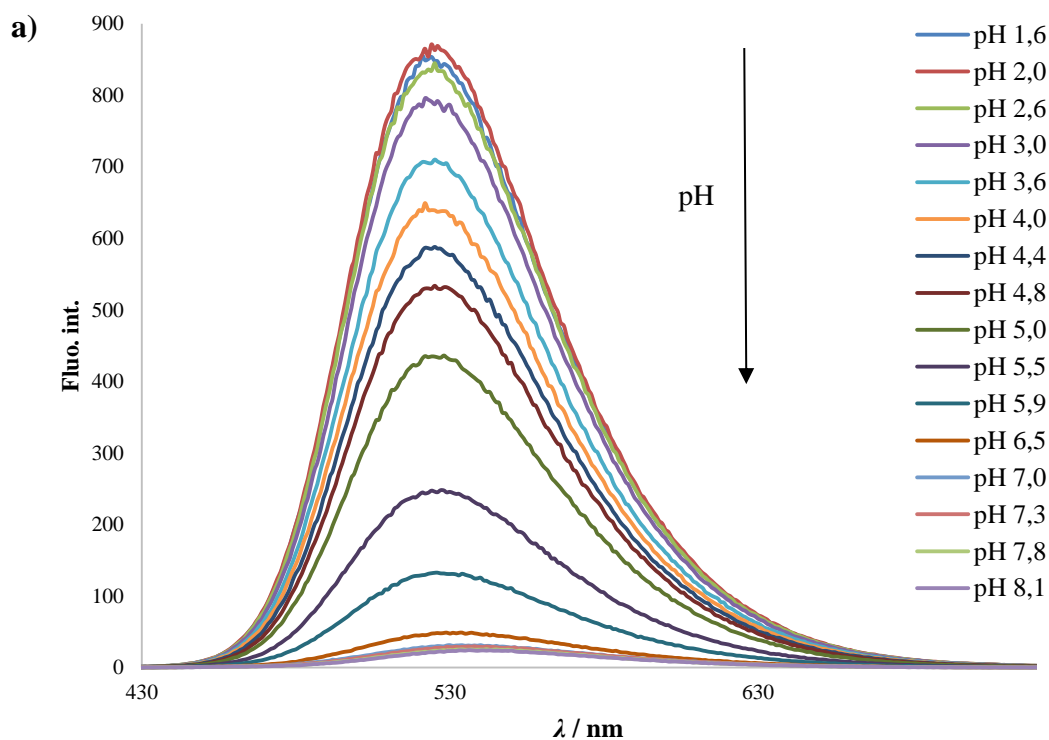
Utjecaj promjene pH vrijednosti na optička svojstva ispitivanih spojeva ispitan je korištenjem apsorpcijske i fluorescencijske spektrofotometrije. Apсорpcijski i fluorescencijski spektri spojeva **GJM-523** i **GJM-525** mjereni su u otopini MeOH i pufera (v/v, 1/2) pri čemu su koncentracije spojeva bile  $6,56 \times 10^{-5} \text{ M}$  (**GJM-523**) i  $6,54 \times 10^{-5} \text{ M}$  (**GJM-525**). Apсорpcijski spektri prikazani su na Slici 17a. odnosno Slici 18a. uz pripadajuće krivulje ovisnosti omjera apsorpcije pri 388 i 410 nm o pH vrijednosti (Slike 17b. i 18b). Fluorescencijski spektri prikazani su na Slikama 19. i 20. uz krivulje ovisnosti intenziteta fluorescencije pri 523 nm odnosno 525 nm o pH vrijednosti. U Tablici 3. prikazane su izračunate  $pK_a$  vrijednosti u kiselj (pH 1,60) i neutralnoj otopini (pH 7,00) kao i valna duljina apsorpcije i emisije te izračunati molarni apсорpcijski koeficijenti, Stokesovi pomaci i maksimumi intenziteta fluorescencije za spojeve **GJM-523** i **GJM-525**.



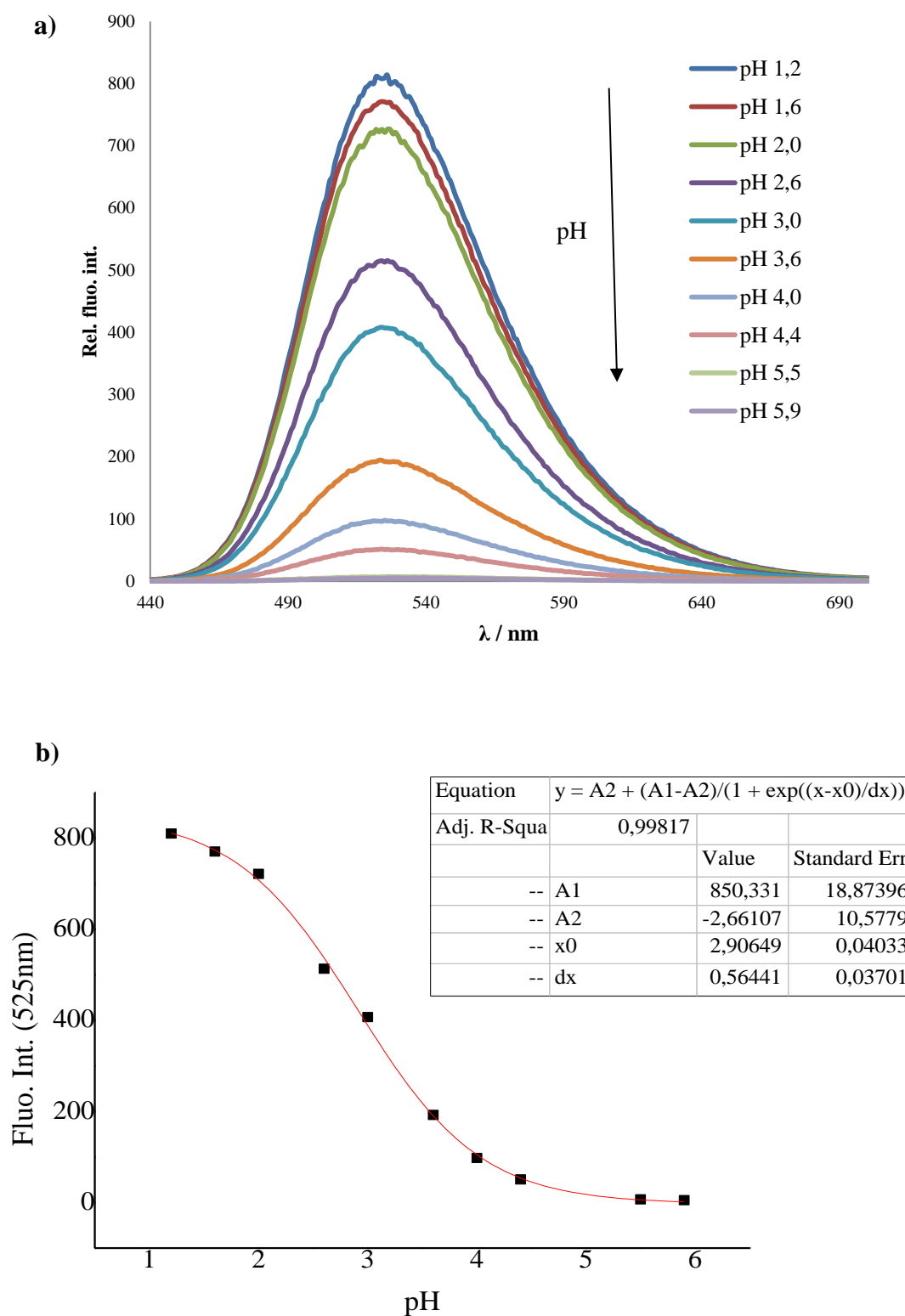
**Slika 17.** Spoj **GJM-523** ( $6,56 \times 10^{-5}$  M) u otopini MeOH/pufer (v/v, 1/2) a) apsorpcijski spektri pri različitim pH vrijednostima u otopini MeOH/pufer (v/v, 1/2) b) krivulja ovisnosti omjera apsorbancije pri 388 nm i 410 nm o pH vrijednosti otopine.



**Slika 18.** Spoj **GJM-525** ( $6,54 \times 10^{-5}$  M) u otopini MeOH/pufer (v/v, 1/2) a) apsorpcijski spektri pri različitim pH vrijednostima u otopini MeOH/pufer (v/v, 1/2) b) krivulja ovisnosti omjera apsorbancije pri 388 nm i 410 nm o pH vrijednosti otopine.



**Slika 19.** Spoj **GJM-523** ( $6,56 \times 10^{-5}$  M) u otopini MeOH/pufer (v/v, 1/2) a) fluorescencijski spektri u ovisnosti o pH vrijednosti otopine MeOH/pufer (v/v, 1/2) b) ovisnost intenziteta fluorescencije pri 523 nm o pH vrijednosti otopine.



**Slika 20.** Spoj **GJM-525** ( $6,54 \times 10^{-5}$  M) u otopini MeOH/pufer (v/v, 1/2) a) fluorescencijski spektri u ovisnosti o pH vrijednosti otopine MeOH/pufer (v/v, 1/2) b) ovisnost intenziteta fluorescencije pri 525 nm o pH vrijednosti otopine.

**Tablica 3.** Izračunate  $pK_a$  vrijednosti u kiseloj i neutralnoj otopini, valna duljina maksimuma apsorpcije ( $\lambda_{abs}$ ) i fluorescencije ( $\lambda_{emiss}$ ), intenzitet fluorescencije i Stokesov pomak za spojeve **GJM-523** i **GJM-525**.

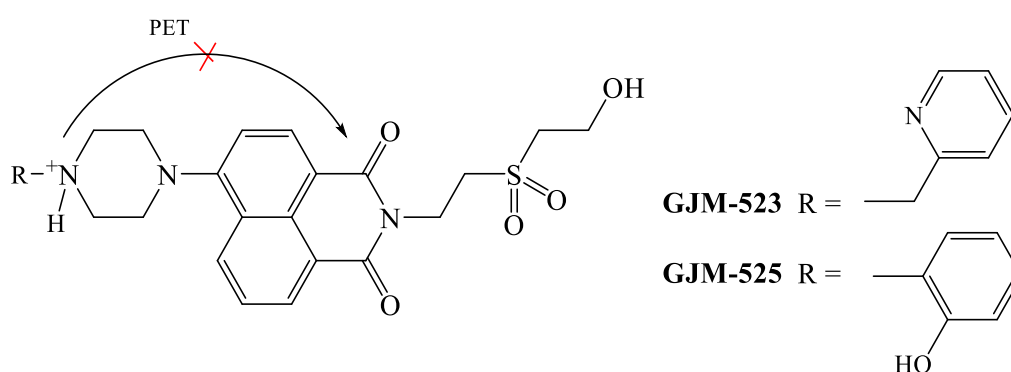
| Spoj           | pH  | $\lambda_{abs}$ /<br>nm | $\epsilon / M^{-1}cm^{-1}$ | $\lambda_{emiss}$ /<br>nm | Fluo.<br>int. | Stokesov<br>pomak /<br>nm | $pK_{a,abs}$ | $pK_{a,emiss}$ |
|----------------|-----|-------------------------|----------------------------|---------------------------|---------------|---------------------------|--------------|----------------|
| <b>GJM-523</b> | 1,6 | 388                     | 2662,90                    | 523                       | 836,19        | 134                       | 5,09         | 4,98           |
|                | 7,0 | 410                     | 2020,58                    | 531                       | 30,21         | 121                       |              |                |
| <b>GJM-525</b> | 1,6 | 388                     | 988,53                     | 525                       | 769,75        | 137                       | 3,18         | 2,91           |
|                | 7,0 | 410                     | 916,58                     | 533                       | <4,95         | 123                       |              |                |

Promjenom pH vrijednosti otopine, apsorpcijski spektar ispitivanih spojeva vrlo se malo mijenja. Kod **GJM-523**, smanjenjem pH vrijednosti dolazi do pomaka maksimuma apsorpcije s 410 nm na 388 nm uz hiperkromni pomak maksimuma (Slika 17a.). **GJM-525** ponaša se jednako promjenom pH vrijednosti otopine uz hiperkromni i hipsokromni pomak maksimuma apsorpcije s 410 na 388 nm (Slika 18a.). Sigmoidalne krivulje na Slici 17b. i Slici 18b. dobro opisuju ovisnost omjera apsorpcije pri 388 nm i 410 nm o pH vrijednosti. U emisijskim spektrima prikazanim na Slici 19a. i 20a. vidljivi su maksimumi intenziteta emisije na 523 nm za **GJM-523** i 525 nm za **GJM-525**, a povećanjem pH vrijednosti dolazi do hipokromnog pomaka intenziteta fluorescencije. Kod **GJM-525** dolazi do gašenja fluorescencije pri znatno nižim pH vrijednostima u odnosu na **GJM-523** kod kojega potpuno gašenje nastupa tek u lužnatom području. Ovisnost intenziteta fluorescencije o pH vrijednosti također dobro opisuje sigmoidalna krivulja.

Promjene u optičkim svojstvima nastaju uslijed protoniranja atoma dušika piperazina što ispitivane spojeve čini potencijalnim pH indikatorima odnosno kemosenzorima.<sup>61</sup> Općenito, utjecaj protoniranja jače je izražen u fluorescencijskim nego u apsorpcijskim spektrima. Poznato je kako protoniranje atoma dušika piperazina zaustavlja PET od amino-donora do naftilimida<sup>47,61</sup> (Slika 21.) te se smanjenjem pH vrijednosti otopine povećava intenzitet fluorescencije. Intenzitet fluorescencije oba spoja znatno se povećava uslijed protoniranja odnosno povećava se 29,6 puta za **GJM-523** i 162,5 puta za **GJM-525**. Aktivacija fluorescencije u kiselom mediju nadalje potvrđuje zaustavljanje PET-a protoniranjem amino



dušika u strukturi derivata piperazin-naftilimida. Iz točka infleksije krivulja ovisnosti omjera apsorbancije odnosno iznosa intenziteta fluorescencije određene su  $pK_a$  vrijednosti spojeva. Za **GJM-523**  $pK_a$  vrijednost određena iz ovisnosti omjera apsorbancije iznosi 5,09, a iz ovisnosti intenziteta fluorescencije iznosi 4,98 dok za **GJM-525** iznosi 3,18 odnosno 2,98. Razlika ovako određenih  $pK_a$  vrijednosti pojedinog spoja manja je od 10 %. Može se zaključiti kako navedeni supstituenti znatno utječu na  $pK_a$  vrijednosti spojeva te time imaju ključnu ulogu prilikom razmatranja potencijalne primjene derivata naftilimida kao pH indikatora. Određivanje  $pK_a$  vrijednosti **GJM-523** i **GJM-525** imobiliziranih na celulozu proveo je Gerhard Mohr te je ustanovljeno kako  $pK_a$  vrijednost imobiliziranog **GJM-525** iznosi 2,98 dok za imobilizirani **GJM-523** iznosi 6,05.<sup>10</sup>



**Slika 21.** Predloženi mehanizam protoniranja **GJM-523** i **GJM-525** i inhibicije PET procesa.

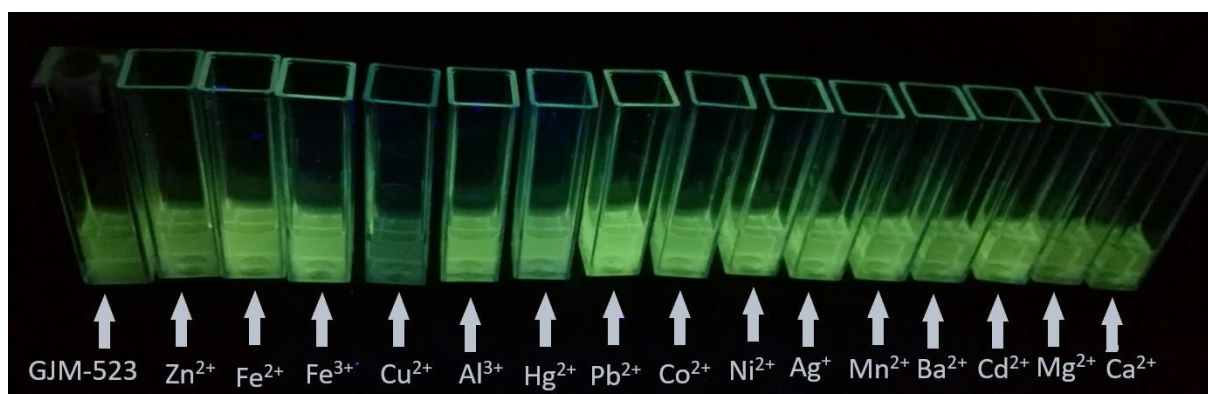
### 4.3. Osjetljivost na metalne ione

Spojevi **GJM-523** i **GJM-525** sadrže različite funkcionalne skupine vezane na piperazin. Osim na spektroskopska svojstva spojeva i osjetljivost na promjenu pH vrijednosti medija, navedene skupine utječu i na fluorescencijski odziv spojeva uslijed interakcije s metalnim ionima. Osjetljivost spojeva na metalne ione ispitivana je snimanjem fluorescencijskih spektara spojeva u otopini MeOH i fosfatnog pufera pH 5,50 (v/v, 1/2). Eksperimentalni uvjeti i koncentracija spojeva prilikom mjerenja prilagođeni su zasebno za svaki spoj na temelju prethodno ustanovljenih spektroskopskih svojstava zbog različitog odziva spojeva u prisutnosti metalnih iona. Rezultati ispitivanja prikazani su odvojeno za **GJM-523** i **GJM-525**.

### 4.3.1. Osjetljivost GJM-523

#### 4.3.1.1. Fluorescencijski odziv u prisutnosti metalnih iona

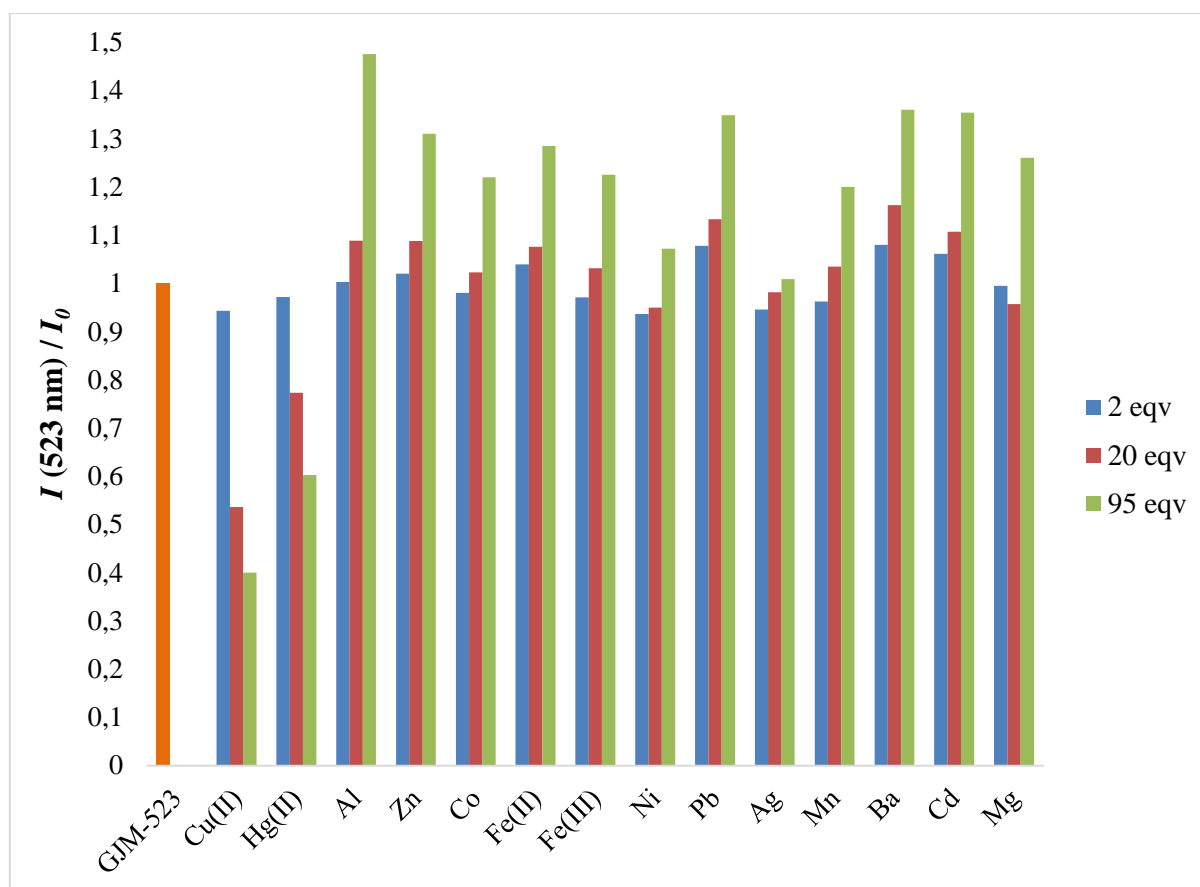
Preliminarno ispitivanje fluorescencijskog odziva **GJM-523** u prisutnosti metalnih iona provedeno je dodatkom 30,00  $\mu\text{L}$  *stock* otopina metalnih iona koncentracije  $1,00 \times 10^{-3}$  M u otopinu MeOH/pufer pH 5,50 (v/v, 1/2) spoja **GJM-523** pri čemu je koncentracija **GJM-523** bila  $6,56 \times 10^{-6}$  M. Tako pripravljene otopine promatrane su pod UV svjetlom (365 nm) (Slika 22.).



Slika 22. **GJM-523** u prisutnosti metalnih iona u otopini MeOH/pufer pH 5,50 (v/v, 1/2).

Iz Slike 22. jasno je vidljivo da u prisutnosti  $\text{Cu}^{2+}$  iona dolazi do znatnog smanjenja fluorescencije dok se u prisutnosti ostalih metalnih iona intenzitet fluorescencije vidljivo ne mijenja u odnosu na otopinu čistoga **GJM-523**. Smanjenje fluorescencije u prisutnosti  $\text{Cu}^{2+}$  iona je očekivano, budući da su  $\text{Cu}^{2+}$  ioni poznati kao prigušivači fluorescencije kod molekularnih senzora baziranih na derivatima naftilmida.<sup>49,62</sup> Zbog jake fluorescencije spoja **GJM-523** (Slika 22.) nije moguće vizualno ustanoviti promjene intenziteta fluorescencije, odnosno smanjenje i povećanje fluorescencije, uslijed dodatka metalnih iona osim kod dodatka  $\text{Cu}^{2+}$  iona. Iz tog razloga, provedena su detaljnija spektroskopska ispitivanja ovisnosti fluorescencijskih svojstava **GJM-523** u prisutnosti metalnih iona.

Mjereni su fluorescencijski spektri **GJM-523** u otopini MeOH/pufer pH 5,50 (v/v, 1/2) uz koncentraciju spoja  $5,00 \times 10^{-7}$  M pri koncentracijama metalnih iona od  $1,00 \times 10^{-6}$  M (2,00),  $9,90 \times 10^{-6}$  M (20,00) i  $4,76 \times 10^{-5}$  M (95,00 eqv). Rezultati su prikazani na Slici 23. kao ovisnost omjera intenziteta fluorescencije **GJM-523** u prisutnosti metalnih iona i intenziteta fluorescencije čistog **GJM-523** pri 523 nm za tri različite koncentracije metalnih iona. U Tablici 4. prikazana je postotna promjena intenziteta fluorescencije za tri koncentracije metalnih iona.



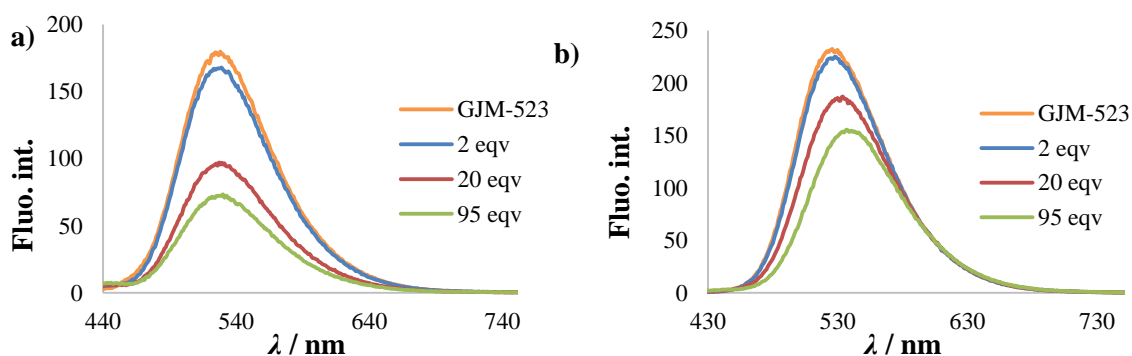
**Slika 23.** Ovisnost omjera intenziteta fluorescencije **GJM-523** uz prisutnost metalnih iona i intenziteta fluorescencije čistog **GJM-523** pri 523 nm za koncentracije metalnih iona od 2,00 eqv ( $c(\text{Me}^{z+}) = 1,00 \times 10^{-6}$  M), 20,00 eqv ( $c(\text{Me}^{z+}) = 9,90 \times 10^{-6}$  M) i 95,00 eqv ( $c(\text{Me}^{z+}) = 4,76 \times 10^{-5}$  M).

**Tablica 4.** Promjena intenziteta fluorescencije otopine **GJM-523** u MeOH/pufer pH 5,50 (v/v, 1/2) za tri koncentracije metalnih iona. Predznaci: (+) povećanje intenziteta fluorescencije, (–) smanjenje intenziteta fluorescencije.

|             |                  | Promjena intenziteta fluorescencije ( $\Delta I$ ) |  |  |
|-------------|------------------|--|--|--|
|             |                  | $1,00 \times 10^{-6}$ M<br>(2,00 eqv)              | $9,90 \times 10^{-6}$ M<br>(20,00 eqv) | $4,76 \times 10^{-5}$ M<br>(95,00 eqv) |
| Metalni ion | Cu <sup>2+</sup> | –5,68 %  | – 46,40 %                              | – 59,97 %                              |
|             | Hg <sup>2+</sup> | – 2,83 %   | – 22,70 %                              | – 39,75 %                              |
|             | Al <sup>3+</sup> | + 0,28 %   | + 8,88 %                               | + 47,89 %                              |
|             | Zn <sup>2+</sup> | + 2,05 %   | + 8,83 %                               | + 31,07 %                              |
|             | Pb <sup>2+</sup> | + 7,79 %   | + 13,33 %                              | + 34,91 %                              |
|             | Ba <sup>2+</sup> | + 7,99 %   | + 16,26 %                              | + 35,99 %                              |
|             | Cd <sup>2+</sup> | + 6,17 %   | + 10,71 %                              | + 35,40 %                              |

Iz grafičkog prikaza na Slici 23. vidljivo je kako pri nižim koncentracijama metalnih iona (2,00 eqv) dolazi do malih promjena intenziteta fluorescencije. Mjerenjem emisijskih spektara potvrđeno je smanjenje intenziteta fluorescencije u prisutnosti Cu<sup>2+</sup> iona, ali do smanjenja intenziteta fluorescencije dolazi i u prisutnosti Hg<sup>2+</sup> iona. Povećanjem koncentracije metalnih iona (20,00 i 95,00 eqv) promjene intenziteta postaju više izražene pri čemu u prisutnosti svih metalnih iona, osim Cu<sup>2+</sup> i Hg<sup>2+</sup>, dolazi do povećanja intenziteta. Znatnije povećanje intenziteta fluorescencije javlja se u prisutnosti Al<sup>3+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Ba<sup>2+</sup>, Pb<sup>2+</sup> i Cd<sup>2+</sup> iona, a naročito pri višim koncentracijama (95,00 eqv).

Na Slici 24. prikazani su emisijski spektri otopine **GJM-523** u prisutnosti Cu<sup>2+</sup> i Hg<sup>2+</sup> iona pri tri različite koncentracije iona.



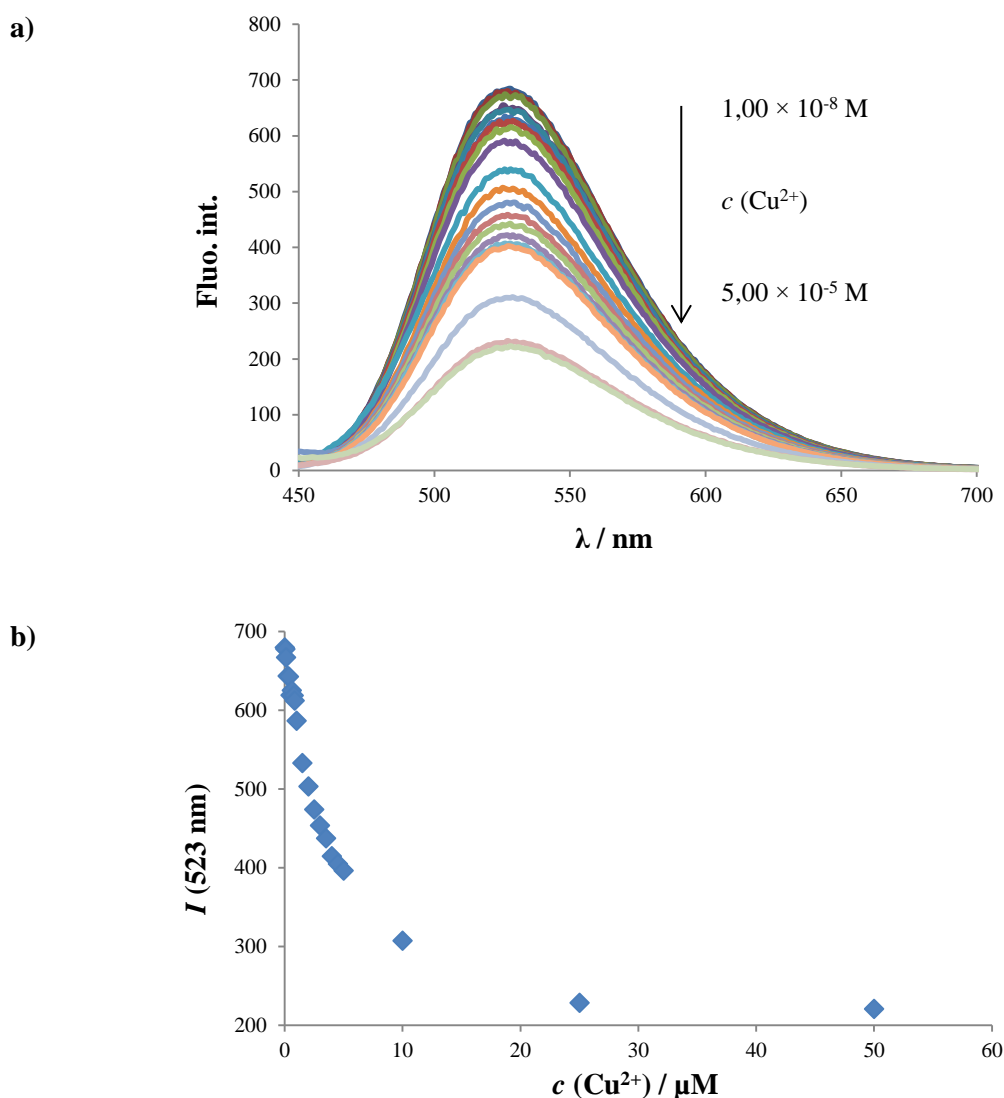
**Slika 24.** Emisijski spektri **GJM-523** u prisutnosti a) Cu<sup>2+</sup> b) Hg<sup>2+</sup> iona.

Zanimljivo je istaknuti razliku u emisijskim spektrima u prisutnosti  $\text{Hg}^{2+}$  i  $\text{Cu}^{2+}$  iona prikazanim na Slici 24. U prisutnosti  $\text{Hg}^{2+}$ , osim hipokromnog pomaka, dolazi i do batokromnog pomaka, dok u prisutnosti  $\text{Cu}^{2+}$  dolazi samo do hipokromnog pomaka.

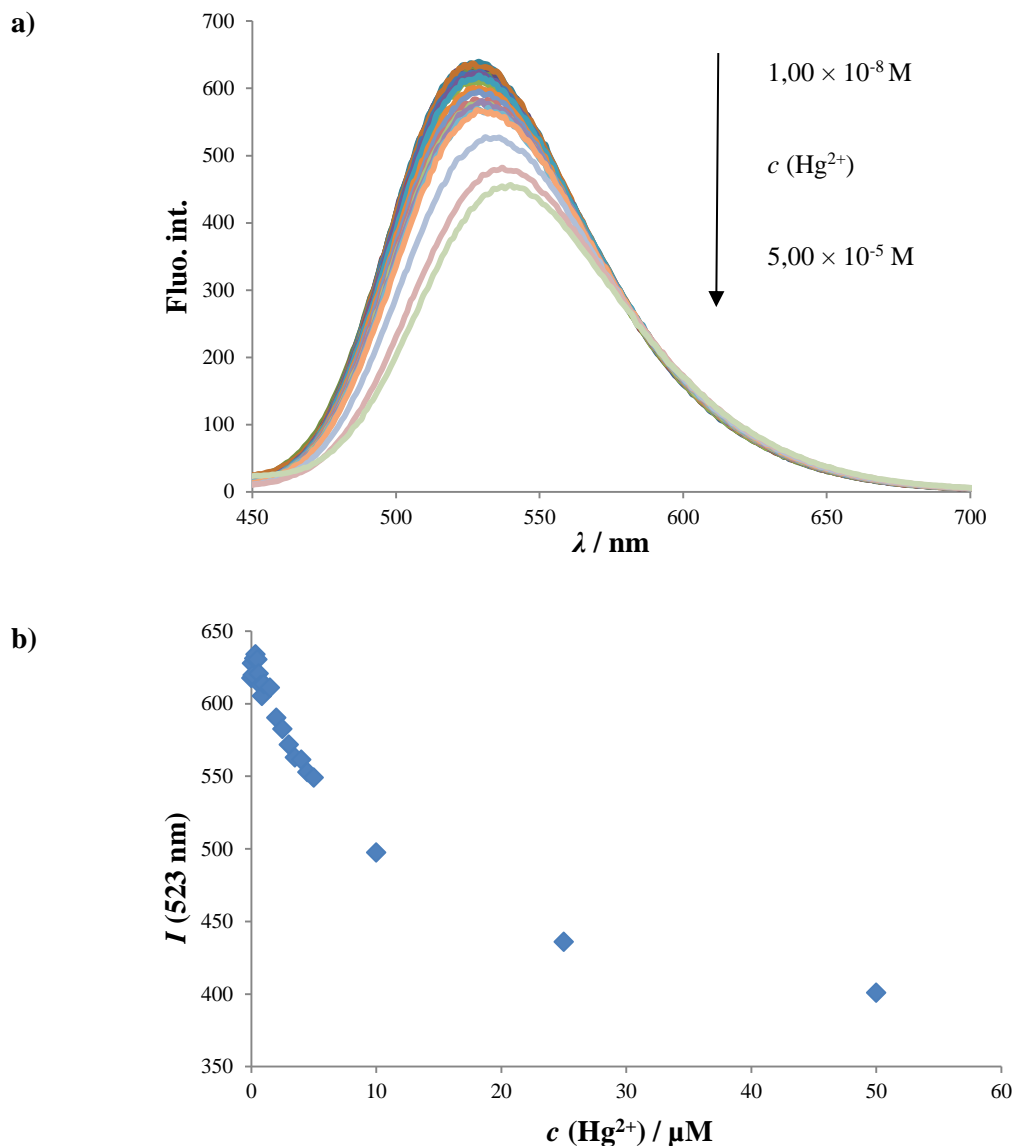
Smanjenje intenziteta **GJM-523** u prisutnosti  $\text{Hg}^{2+}$  iona vrlo je iznenađujuće. Naime, Wu i sur. sintetizirali su derivat naftilimida s istim receptorom kao i **GJM-523** te ga imobilizirali na stakleni nosač i ispitali fluorescencijski odziv optode u prisutnosti metalnih iona.<sup>50</sup> Ispitivanje u prisutnosti metalnih iona vršeno je pri pH 7,01 u 0,05 M vodenoj otopini Tris-HCl (2-amino-2-hidroksimetil-propan-1,3-diol) koristeći  $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2 \times 0,5 \text{H}_2\text{O}$  za pripremu standardne otopine  $\text{Hg}^{2+}$  iona. Rezultati su pokazali znatno povećanje intenziteta fluorescencije isključivo u prisutnosti  $\text{Hg}^{2+}$  iona. Uzimajući u obzir ovisnost optičkih o strukturnim svojstvima derivata naftilimida, očekivano je da će i **GJM-523** pokazivati slični odziv, odnosno da će u prisutnosti  $\text{Hg}^{2+}$  doći do povećanja fluorescencije. Međutim, Wu i sur. također su zabilježili znatnije smanjenje intenziteta fluorescencije u prisutnosti  $\text{Cu}^{2+}$  iona pri čemu su standardnu otopinu  $\text{Cu}^{2+}$  iona pripremili pomoću  $\text{CuCl}_2$ . Nadalje, Liu i sur. sintetizirali su dva nova derivata naftilimida, također s istim receptorom kao i **GJM-523**, imobilizirali ih na (poli)stirenski nosač te tako pripremili optode oznaka **PS-NA** i **PS-ND**.<sup>63</sup> Optode se razlikuju prema lancu u *N*-supstituentu naftilimida preko kojega su spojevi vezani za nosač, a koji je kod **PS-NA** duži u odnosu na **PS-ND**. Odziv optoda u prisutnosti metalnih iona ispitan je pri pH 7,20 u otopini acetonitril/HEPES (2-[4-(2-hidroksietil)piperazin-1-il]etansulfonska kiselina) (v/v, 1/1). Isključivo u prisutnosti  $\text{Hg}^{2+}$  iona došlo je do znatnog povećanja intenziteta fluorescencije pri čemu je kod **PS-NA** povećanje bilo veće. Prilikom ispitivanja, za pripremu standardnih otopina korištene su soli  $\text{Hg}(\text{ClO}_4)_2 \times 3\text{H}_2\text{O}$  i  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \times 3\text{H}_2\text{O}$ . Iako su receptori u sva četiri navedena spoja isti, u prisutnosti  $\text{Hg}^{2+}$  odnosno  $\text{Cu}^{2+}$  iona spojevi međusobno daju drugačije odzive što implicira kako kemijska struktura spojeva, odnosno struktura *N*-supstituenta, način imobilizacije te uvjeti ispitivanja (pH vrijednost, otapalo, prisutnost aniona) utječu na fluorescentni odziv u prisutnosti metalnih iona. Smanjenje intenziteta fluorescencije u prisutnosti  $\text{Cu}^{2+}$  i  $\text{Hg}^{2+}$  iona može se pripisati CHEQ mehanizmu, međutim potrebno je provesti daljnja istraživanja elektronskih interakcija metalnih iona i naftilimida za potpuno razumijevanje mehanizma fluorescentnog odziva. Do porasta intenziteta fluorescencije u prisutnosti ostalih iona dolazi zbog CHEF-a, odnosno, kelatiranjem se sprječava fotoinducirani prijenos elektrona (PET) od receptora do naftilimida.

#### 4.3.1.2. Titracija GJM-523 s metalnim ionima

Provedena je titracija otopine **GJM-523** s ionima  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$  i  $\text{Cd}^{2+}$  pri koncentraciji **GJM-523** od  $5,00 \times 10^{-7}$  M u otopini MeOH/pufer pH 5,50 (v/v, 1/2) uz dodatak malih alikvota otopina metalnih iona u rasponu koncentracija iona od  $5,00 \times 10^{-8}$  M do  $5,00 \times 10^{-5}$  M, odnosno od 0,10 do 100,00 eqv te su mjereni fluorescencijski spektri nakon svakog dodatka alikvota. U ovome dijelu prikazani su samo fluorescencijski spektri i ovisnost intenziteta fluorescencije pri 523 nm o koncentraciji metalnog iona za  $\text{Cu}^{2+}$  na Slici 25. i  $\text{Hg}^{2+}$  ione na Slici 26.



**Slika 25.** a) Emisijski spektri otopine **GJM-523** ( $5,00 \times 10^{-7}$  M) u MeOH/pufer pH 5,50 (v/v, 1/2) u rasponu koncentracija  $\text{Cu}^{2+}$  iona  $5,00 \times 10^{-8}$  M -  $5,00 \times 10^{-5}$  M. b) Ovisnost intenziteta fluorescencije otopine **GJM-523** ( $5,00 \times 10^{-7}$  M) u MeOH/pufer pH 5,50 (v/v, 1/2) pri 523 nm u rasponu koncentracija  $\text{Cu}^{2+}$  iona  $5,00 \times 10^{-8}$  M -  $5,00 \times 10^{-5}$  M.



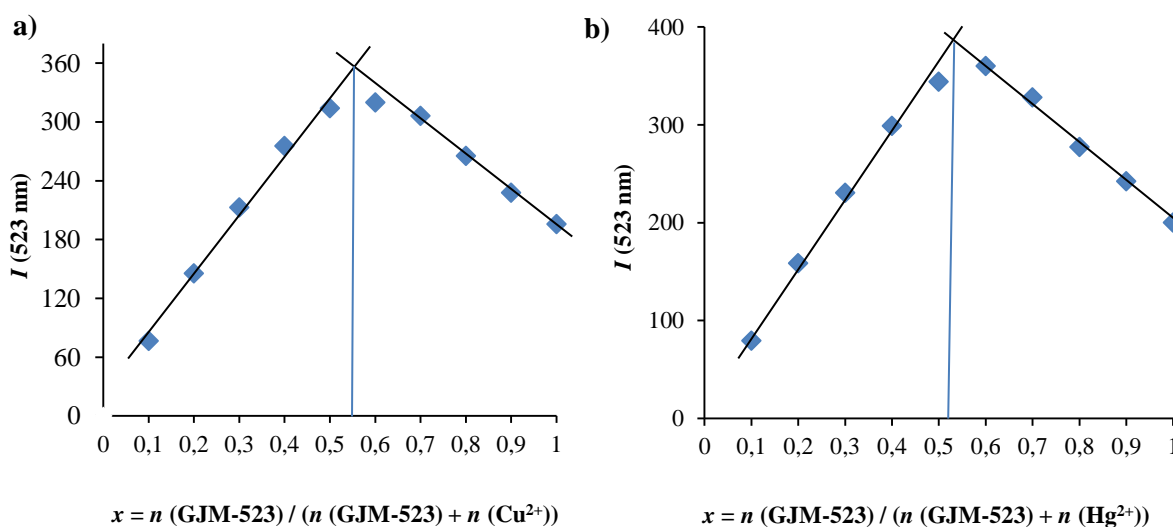
**Slika 26.** a) Emisijski spektri otopine **GJM-523** ( $5,00 \times 10^{-7}$  M) u MeOH/pufer pH 5,50 (v/v, 1/2) u rasponu koncentracija  $\text{Hg}^{2+}$  iona  $5,00 \times 10^{-8}$  M -  $5,00 \times 10^{-5}$  M. b) Ovisnost intenziteta fluorescencije otopine **GJM-523** ( $5,00 \times 10^{-7}$  M) u MeOH/pufer pH 5,50 (v/v, 1/2) pri 523 nm u rasponu koncentracija  $\text{Hg}^{2+}$  iona  $5,00 \times 10^{-8}$  M -  $5,00 \times 10^{-5}$  M.

Iz emisijskih spektara vidljivo je kako porastom koncentracije metalnih iona dolazi do smanjenja intenziteta fluorescencije spoja **GJM-523**, a znatan pad intenziteta ostvaruje se pri višim koncentracijama. U prisutnosti  $\text{Cu}^{2+}$  iona dolazi do hipokromnog pomaka odnosno smanjenja intenziteta fluorescencije pri 523 nm, dok u prisutnosti  $\text{Hg}^{2+}$  iona dolazi do batokromnog pomaka emisije s 523 na 541 nm. Intenzitet fluorescencije pri 523 nm postepeno opada s porastom koncentracije oba iona.

Hipokromni pomak intenziteta uobičajen je kod derivata naftilimida kod kojih prisutnost  $\text{Cu}^{2+}$  iona izaziva gašenje fluorescencije.<sup>50</sup> Međutim, batokromni pomak u prisutnosti  $\text{Hg}^{2+}$  iona nije uobičajen te bi se zbog različitog fluorescentnog odziva spoja u prisutnosti  $\text{Cu}^{2+}$  i  $\text{Hg}^{2+}$  iona, **GJM-523** mogao koristiti za određivanje i razlikovanje navedenih iona u otopinama

#### 4.3.1.3. Vežanje metalnih iona i GJM-523

Koristeći metodu po Jobu dobivena je pretpostavka o mogućim stehiometrijskim koeficijentima  $\text{Cu}^{2+}$  i  $\text{Hg}^{2+}$  iona u reakciji vežanja s **GJM-523**. Prilikom ispitivanja, *stock* otopine spoja i metalnih iona razrijeđene su na koncentraciju  $5,00 \times 10^{-6}$  M. Tako pripremljena otopina  $\text{Hg}^{2+}$  odnosno  $\text{Cu}^{2+}$  iona miješana je s otopinom **GJM-523** u zadanim molarnim udjelima uz dodatak fosfatnog pufera pH 5,50 te je potom snimljen fluorescencijski spektar otopine. Zbroj koncentracija metalnih iona i **GJM-523** je stalan i iznosi  $5,00 \times 10^{-6}$  M. Ovisnost intenziteta fluorescencije pri 523 nm o molarnom udjelu **GJM-523** u otopini s  $\text{Cu}^{2+}$  i  $\text{Hg}^{2+}$  ionima prikazana je na Slici 27.



**Slika 27.** Ovisnost intenziteta fluorescencije pri 523 nm o molarnom udjelu **GJM-523** u otopini s a)  $\text{Cu}^{2+}$  ionima i b)  $\text{Hg}^{2+}$  ionima pri ukupnoj koncentraciji  $5,00 \times 10^{-6}$  M i dodatak pufera pH 5,50. Prikazani su ekstrapolirani pravci ovisnosti intenziteta o molnom udjelu **GJM-523**.



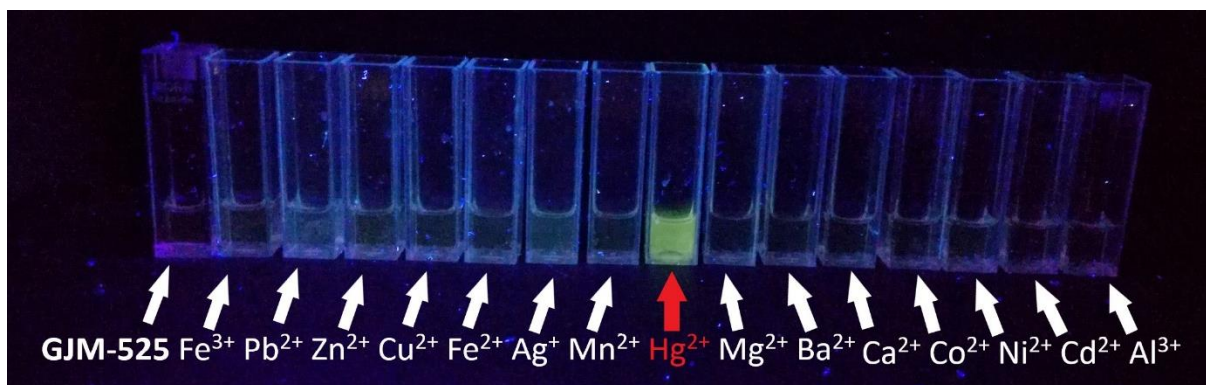
Iz grafičkih prikaza na Slici 27. vidljivo je kako porastom udjela **GJM-523** postepeno raste intenzitet fluorescencije na 523 nm u prvome, rastućem, dijelu dok u drugome, padajućem, postepeno opada s porastom udjela **GJM-523**. Ovisnost intenziteta o molnom udjelu **GJM-523** u padajućem odnosno u rastućem dijelu može se aproksimirati pravcima povučenim kroz točke krivulje kako je prikazano na Slici 27. Sjecište ekstrapoliranih pravaca u točki je s vrijednosti apscise  $x \approx 0,5$  za oba metalna iona.

Iz vrijednosti molnog udjela u sjecištu ekstrapoliranih pravaca mogu se pretpostaviti stehiometrijski koeficijenti **GJM-523** i  $\text{Cu}^{2+}$  odnosno  $\text{Hg}^{2+}$  iona prilikom njihovog vezanja. Vrijednost apscise u sjecištu odgovara molnom udjelu **GJM-523** prilikom vezanja s metalnim ionima te za  $x \approx 0,5$  stehiometrijski koeficijenti su 1:1. Ovakva stehiometrija reakcije kelatiranja jedno je od očekivanih svojstava interakcije iona  $\text{Hg}^{2+}$  i  $\text{Cu}^{2+}$  s **GJM-523**. Naime, Wu i suradnici su također utvrdili kako je 1:1 vjerojatan stehiometrijski omjer prilikom vezanja  $\text{Hg}^{2+}$  s naftilimidom.<sup>50</sup> Međutim, treba naglasiti kako su ovo pretpostavljeni stehiometrijski omjeri. Za dobivanje točnog stehiometrijskog omjera i strukture kelata naftilimida i metalnog iona potrebno je primijeniti spektroskopske tehnike poput NMR i IR spektroskopije koje se koriste za određivanje strukture organskih i anorganskih spojeva.<sup>64,65</sup> U receptorskom dijelu, spoj **GJM-523** sadrži atome dušika u strukturi piperazina i piridina koji sadrže elektrone u neveznim orbitalama što ih čini potencijalnim veznim mjestima metalnih iona budući da mogu koordinirati metalne ione donirajući elektrone smještenim neveznim orbitalama.

#### 4.3.2. Osjetljivost **GJM-525**

##### 4.3.2.1. Fluorescencijski odziv u prisutnosti metalnih iona

Preliminarno ispitivanje fluorescencijskog odziva **GJM-525** u prisutnosti metalnih iona provedeno je dodatkom 30,00  $\mu\text{L}$  *stock* otopina metalnih iona koncentracije  $1,00 \times 10^{-3}$  M u otopinu MeOH/pufer pH 5,50 (v/v, 1/2) spoja **GJM-525**. Priređene otopine spoja **GJM-525** koncentracije  $6,54 \times 10^{-6}$  M uz dodatak metalnog iona promatrane su pod UV svjetlom (365 nm) (Slika 28.)



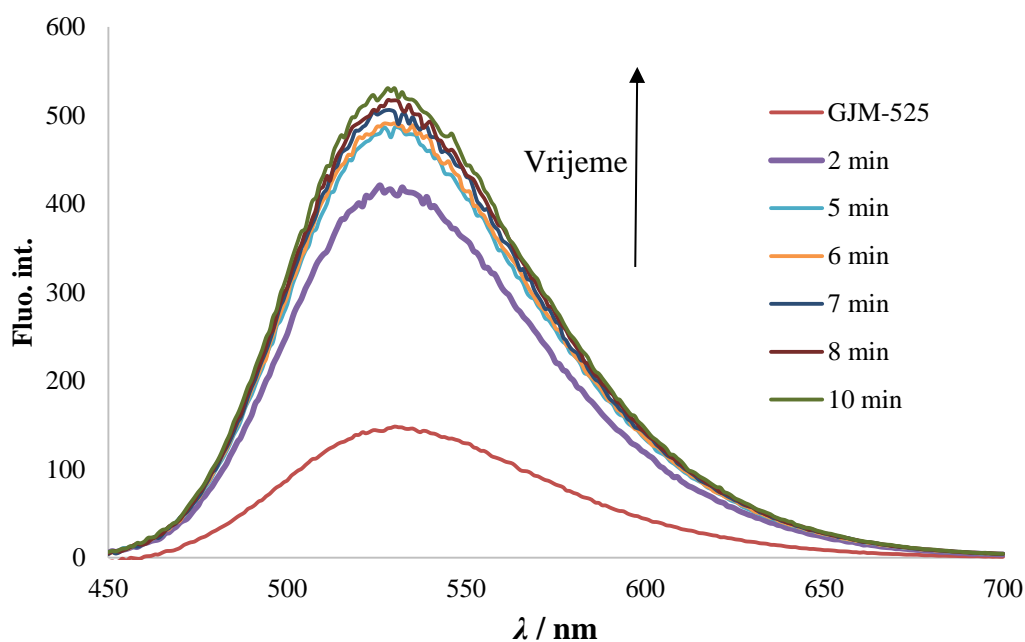
**Slika 28.** Otopina spoja **GJM-525** ( $6,54 \times 10^{-6}$  M) u otopini MeOH/pufer pH 5,50 (v/v, 1/2) u prisutnosti metalnih iona.

Iz Slike 28. vidljivo je kako **GJM-525** ne fluorescira u otopini MeOH/pufer pH 5,50 pod UV svjetlom. Do promjene fluorescencije odnosno do povećanja intenziteta dolazi isključivo uslijed dodatka  $\text{Hg}^{2+}$  iona. Dodatkom ostalih metalnih iona ne dolazi do opažljivih promjena.

Osim povećanja intenziteta fluorescencije, prilikom preliminarnog ispitivanja uočeno je kako intenzitet fluorescencije **GJM-525** u prisutnosti  $\text{Hg}^{2+}$  raste s vremenom.

#### 4.3.2.1.1. Vremenska ovisnost intenziteta fluorescencije u prisutnosti $\text{Hg}^{2+}$ iona

Vremenska ovisnost intenziteta fluorescencije spoja **GJM-525** u prisutnosti  $\text{Hg}^{2+}$  iona ispitana je u razrijeđenoj otopini spoja pri koncentraciji  $6,54 \times 10^{-6}$  M u MeOH pufer pH 5,50 (v/v, 1/2) pri čemu je koncentracija  $\text{Hg}^{2+}$  iona iznosila  $4,76 \times 10^{-5}$  M. Mjeren je fluorescencijski spektar 2, 5, 6, 7, 8 i 10 minuta nakon dodatka otopine  $\text{Hg}^{2+}$  iona, a rezultati su prikazani na Slici 29.



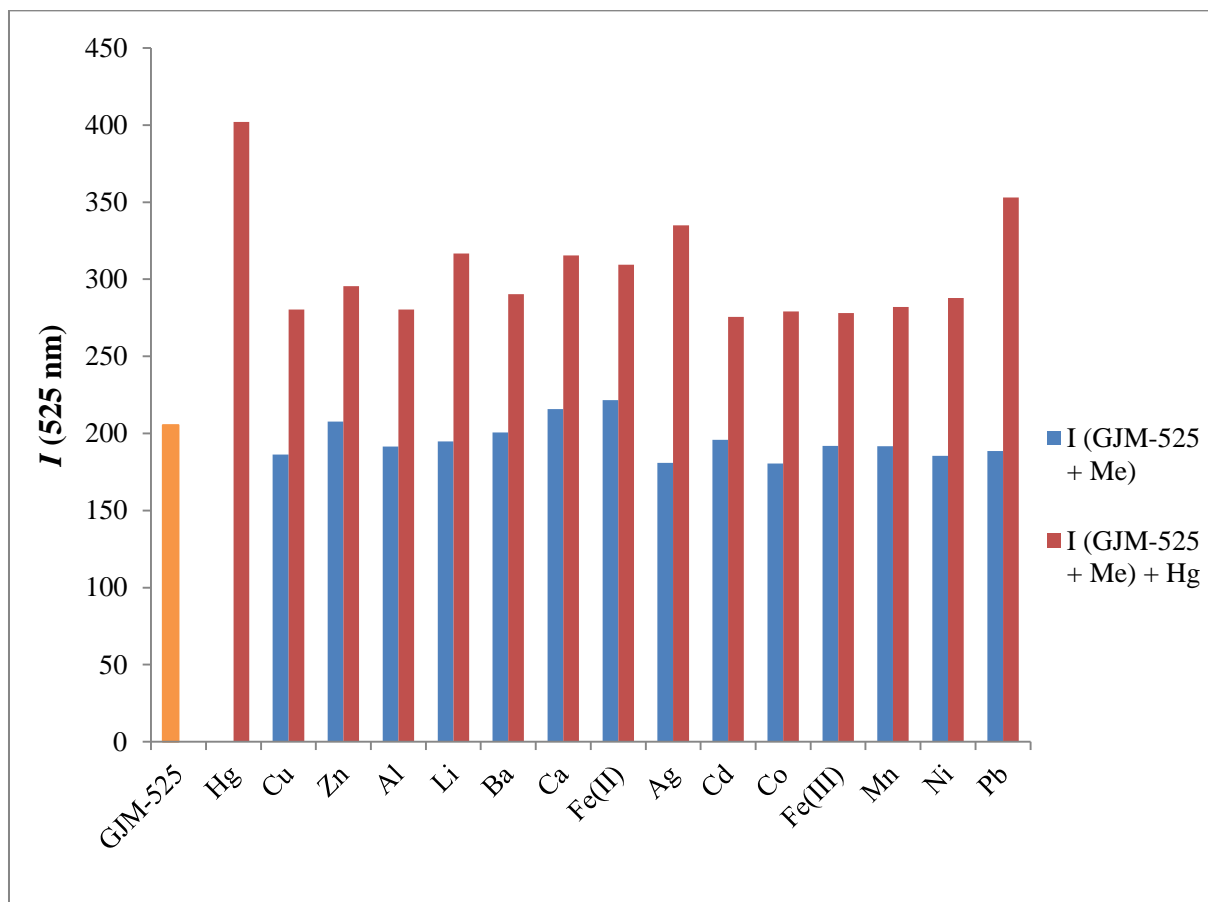
**Slika 29.** Fluorescencijski spektri **GJM-525** koncentracije  $6,54 \times 10^{-6}$  M u otopini MeOH/pufer pH 5,50 (v/v, 1/2) uz dodatak  $150,00 \mu\text{L}$   $1,00 \times 10^{-3}$  M otopine  $\text{Hg}^{2+}$  u ovisnosti o vremenu.

Iz emisijskih spektara prikazanih na Slici 29. vidljivo je kako intenzitet fluorescencije raste s vremenom uz nagli skok intenziteta nakon 2 minute od dodatka  $\text{Hg}^{2+}$  iona. S vremenom, dolazi samo do hiperkromnog pomaka pri čemu je maksimum intenziteta fluorescencije na 525 nm. Nakon 5 minuta od dodatka  $\text{Hg}^{2+}$  iona, ne dolazi do velikih promjena intenziteta fluorescencije s vremenom.

U literaturi su zabilježeni derivati naftilimida kod kojih je fluorescencijski odziv u prisutnosti  $\text{Hg}^{2+}$  iona vremenski ovisan, iako je općenito vremenska ovisnost fluorescencije u prisutnosti metalnih iona kod derivata naftilimida rjeđe zabilježena. Tian i suradnici sintetizirali su i karakterizirali derivat naftilimida kod kojega 10 minuta nakon dodatka  $\text{Hg}^{2+}$  iona dolazi do neznatnih promjena u porastu intenziteta fluorescencije.<sup>66</sup> Kod **GJM-525**, promjena intenziteta nakon 5 min postaje manja s vremenom te su sva daljnja ispitivanja i mjerenja fluorescencije optimirana na 5 minuta od dodatka  $\text{Hg}^{2+}$  iona otopini **GJM-525**.

#### 4.3.2.2. Selektivnost GJM-525

Mjerenja su provedena pri koncentraciji **GJM-525** od  $6,53 \times 10^{-6}$  M u otopini MeOH/pufer pH 5,50 (v/v, 1/2) uz dodatak 150,00  $\mu$ L *stock* otopine metalnih iona koncentracije  $1,00 \times 10^{-3}$  M i uz dodatak 150,00  $\mu$ L *stock* otopine  $\text{Hg}^{2+}$  iste koncentracije. Snimljen fluorescencijski spektar nakon 5 minuta od dodatka  $\text{Hg}^{2+}$ . Rezultati su prikazani na Slici 30. kao ovisnost intenziteta fluorescencije pri 525 nm u prisutnosti metalnih iona i u prisutnosti  $\text{Hg}^{2+}$  iona.



**Slika 30.** Intenzitet fluorescencije **GJM-525** ( $6,54 \times 10^{-6}$  M) pri 525 nm u otopini MeOH/pufer pH 5,50 (v/v, 1/2) nakon dodatka 150,00  $\mu$ L *stock* otopine  $\text{Hg}^{2+}$  i ostalih metalnih iona nakon 5 min od dodatka  $\text{Hg}^{2+}$  iona. Koncentracije  $\text{Hg}^{2+}$  iona i metalnih iona su jednake ( $4,55 \times 10^{-5}$  M).

Iz grafičkog prikaza na Slici 30. vidljivo je kako otopina **GJM-525** u prisutnosti  $\text{Hg}^{2+}$  i ostalih metalnih ima manji intenzitet fluorescencije nego otopina koja sadrži isključivo  $\text{Hg}^{2+}$  ione. Također, vidljivo je kako metalni ioni, izuzev  $\text{Hg}^{2+}$ , ne utječu znatno na intenzitet fluorescencije.

**GJM-525** pokazuje veću selektivnost odnosu na **GJM-523**, koja se može pripisati strukturnoj razlici njihovih receptora. Naime, kod **GJM-525** hidroksifenilna skupina vezana je direktno na piperazin preko atoma dušika što čini strukturu receptora rigidnijom u odnosu na **GJM-523** kod kojega je piperidin povezan s piperazinom metilenskom vezom. Rigidnija struktura receptora kod **GJM-525** onemogućuje da koordinira raznovrsne ione kao što je slučaj kod **GJM-523**.

## 5. ZAKLJUČAK

Spojevi **GJM-523** i **GJM-525** ispitani su kao fluorescentni pH osjetljivi kemosenzori za ione teških metala u vodi. Povećanjem pH vrijednosti, dolazi do protoniranja amino dušika u strukturi piperazina te intenzitet fluorescencije spojeva opada pri čemu kod **GJM-525** dolazi do gašenja fluorescencije pri nižim pH vrijednostima u odnosu na **GJM-523**. Intenzitet fluorescencije spojeva postepeno opada s porastom pH vrijednosti u ispitivanom rasponu pH 1,20 - 8,00.

U prisutnosti  $\text{Cu}^{2+}$  i  $\text{Hg}^{2+}$  iona, opada intenzitet fluorescencije spoja **GJM-523** te preliminarni rezultati sugeriraju vezanje **GJM-523** i metalnih iona u stehiometrijskom omjeru 1:1. Nadalje, spoj **GJM-525** se selektivno veže s  $\text{Hg}^{2+}$  ionima uz znatan porast intenziteta fluorescencije koji je vremenski ovisan.

Ispitivani derivati naftilimida imaju potencijal za primjenu kao fluorescentni kemosenzori za pH te za određivanje  $\text{Cu}^{2+}$  i  $\text{Hg}^{2+}$  iona u vodenim otopinama. Zbog strukture *N*-supstituenta mogu se kovalentno imobilizirati na celulozne i tekstilne materijale omogućujući primjenu spojeva kao komponenti nosivih senzora (eng. *wearable sensors*) korištenih u fiziologiji sporta, pametnim zavojima i funkcionalnim materijalima.<sup>67-69</sup> Idući korak u istraživanju je detaljna kinetička studija interakcije spojeva **GJM-523** i **GJM-525** s metalnim ionima odnosno s  $\text{Cu}^{2+}$  i  $\text{Hg}^{2+}$  te analiza kompleksa metala i naftilimida radi dobivanja punog uvida u mehanizam senzorskog odziva spojeva te optimizacija uvjeta ispitivanja.

**6. LITERATURA**

1. M. K. Raikwar, P. Kumar, M. Singh, A. Singh, Toxic effect of heavy metals in livestock health, *Veterinary World* **1** (2008), 28-30.
2. N. Herawati, S. Suzuki, K. Hayashi, I. F. Rivai, H. Koyama, Cadmium, copper, and zinc levels in rice and soil of Japan, Indonesia, and China by soil type, *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* **64** (2000), 33-39.
3. V. Masindi, K. L. Muedi, *Environmental Contamination by Heavy Metals, Heavy Metals*, IntechOpen (2018).
4. C. Voica, A. Dehelean, A. Iordache, I. Geana, Method validation for determination of metal in soil by ICP-MS, *Romanian Reports in Physics* **64** (2012), 221–231.
5. M. Aceto, O. Abollino, M. C. Bruzzoniti, E. Mentasti, C. Sarzanini, M. Malandrino Determination of metals in wine with atomic spectroscopy (flame-AAS, GF-AAS and ICP-AES); a review, *Food Additives & Contaminants* **19** (2002), 126-133.
6. P. Niu, C. Fernandez-Sanchez, M. Gich, C. Ayora, A. Roig, Electroanalytical Assessment of Heavy Metals in Waters with Bismuth Nanoparticle-Porous Carbon Paste Electrodes, *Electrochimica Acta* **165** (2015), 155-161.
7. M. Formica, V. Fusi, L. Giorgi, M. Micheloni, New fluorescent chemosensors for metal ions in solution, *Coordination Chemistry Reviews* **256** (2012), 170-192.
8. A. P. de Silva, H. Q. N. Gunaratne, J. L. Habib-Jiwan, C. P. McCoy, T. E. Rice, J.-P. Soumillion, New Fluorescent Model Compounds for the Study of Photoinduced Electron Transfer: The Influence of a Molecular Electric Field in the Excited State *Angewandte Chemie International Edition* **34** (1995), 1728-1731.
9. R. M. Duke, E. B. Veale, F. M. Pfeffer, P. E. Kruger, T. Gunnlaugsson, Colorimetric and fluorescent anion sensors: an overview of recent developments in the use of 1,8-naphthalimide based chemosensors, *Chemical Society Reviews* **39** (2010.), 3936-3953.
10. G. J. Mohr, Synthesis of naphthalimide-based indicator dyes with a 2-hydroxyethylsulfonyl function for covalent immobilisation to cellulose, *Sensors & Actuators: B. Chemical* **275** (2018), 439-445.
11. C. Schaude, E. Fröhlich, C. Meindl, J. Attard, B. Binder, G. J. Mohr, The Development of Indicator Cotton Swabs for the Detection of pH in Wounds, *Sensors* **17** (2017), 1365.

12. D. Wu, C. A. Sedgwick, T. Gunnlaugsson, U. E. Akkaya, J. Yoon, T. D. James, Fluorescent chemosensors: the past, present and future, *Chemical Society Reviews* **46** (2017): 7105–7123.
13. A. W. Czarnik, Fluorescent Chemosensors for Ion and Molecule Recognition, ACS Symposium Series **538** (1993).
14. A. R. Bissell, A. P. de Silva, N. H. Q. Gunaratne, M. Lynch, E. G. Maguire, Glenn, S. Sandanayake, Molecular fluorescent signaling with 'fluor-spacer-receptor' systems: approaches to sensing and switching devices via supramolecular photophysics, *Chemical Society Reviews* **21** (1992), 187–195.
15. A. Hulanicki, S. Glab, F. Ingman, Chemical sensors: definitions and classification, *Pure and Applied Chemistry* **63** (1991), 1247–1250.
16. M. Hranjec, E. Horak, M. Tireli, G. Pavlovic, G. Karminski-Zamola, Synthesis, crystal structure and spectroscopic study of novel benzimidazoles and benzimidazo 1,2-*a* quinolines as potential chemosensors for different cations, *Dyes and Pigments* **95** (2012), 644-656.
17. A. P. de Silva, H. Q. N Gunaratne, T. Gunnlaugsson, A. J. M. Huxley, C. P. McCoy, J. T. Rademacher, T. E. Rice, Signaling recognition events with fluorescent sensors and switches. *Chemical Reviews* **97** (1997), 1515-1566.
18. T. Q. Duong, J. S. Kim, Fluoro- and Chromogenic Chemodosimeters for Heavy Metal Ion Detection in Solution and Biospecimens. *Chemical Society Reviews* **110** (2010), 6280-6301.
19. A. Lobnik, M. Turel, S. K. Urek, Optical Chemical Sensors: Design and Applications. *Advances in Chemical Sensors* (2011), 3-28.
20. V. Vučić, Primjena fluorescentnih derivata benzimidazola u funkcionalnim materijalima, diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, 2017.
21. M. Kaštelan-Macan, Kemijska analiza u sustavu kvalitete, 1. izdanje, Školska knjiga, Zagreb, 2003.
22. D. A. Skoog, D. M. West, F. J. Holler, Osnove analitičke kemije, 1. izdanje, Školska knjiga, Zagreb, 1999.
23. IUPAC. Compendium of Chemical Terminology, 2nd ed. (the "Gold Book"), Blackwell Scientific Publications, Oxford (1997). *Online* version (2019-)



24. M. H. Gehlen, The centenary of the Stern-Volmer equation of fluorescence quenching: From the single line plot to the SV quenching map, *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews* **42** (2020), 100338.
25. I. Filipović, S. Lipanović, *Opća i anorganska kemija*, 1. dio, Školska knjiga, Zagreb, 1995.
26. D. Grdenić, *Molekule i kristali*, Školska knjiga, Zagreb, 1989.
27. X. Zhou, F. Su, W. Gao, Y. Tian, C. Youngbull, R.H. Johnson, D. R. Meldrum, Triazacryptand based fluorescent sensors for extracellular and intracellular K<sup>+</sup> sensing, *Biomaterials* **32** (2011), 8574–8583.
28. L. Yan, Q. Yanxin, Z. Jianjian, Z. Xinyue, Z. Bin, L. Xiaoyan, Z. Xiaoyu, Z. Haixia, Naphthalimide derived fluorescent probes with turn-on response for Au<sup>3+</sup> and the application for biological visualization, *Biosensors and Bioelectronics*, **83** (2016), 334-338.
29. N. Sok, M. Nikolantonaki, S. Guyot, T. Dan Nguyen, A. Viaux, F. Begala, Y. Rousselin, F. Husson, R. Gouageon. R. Saurel, Design of new sensitive  $\alpha,\beta$ -unsaturated carbonyl 1,8-naphthalimide fluorescent probes for thiol bioimaging, *Sensors and Actuators B: Chemical* **242** (2017), 865-871.
30. A. D. Johnson, K. A. Paterson, J. C. Spiteri, S. A. Deniso, G. Jonusauskas, A. Tron, N. D. McClenaghan, D. C. Magri, Water-soluble naphthalimide-based ‘Pourbaix sensors’: pH and redox-activated fluorescent AND logic gates based on photoinduced electron transfer, *New Journal of Chemistry* **40** (2016), 9917-9922.
31. W. W. Stewart, Lucifer dyes – highly fluorescent dyes for biological tracing, *Nature* **292** (1981), 17-21.
32. P. Gopikrishna, N. Meher, P. K. Iyer, Functional 1,8-Naphthalimide AIE/AIEEgens: Recent Advances and Prospects, *ACS Applied Materials & Interfaces* **10** (2018), 2081-12111.
33. N. Singh, R. Srivastava, A. Singh, R. K. Singh, Synthesis and Photophysical Studies on Naphthalimide Derived Fluorophores as Markers in Drug Delivery, *Journal of fluorescence* **26** (2016), 1431-1438.
34. S.-A. Choi, C. Soon Park, O. Seok Kwon, H.-K. Giong, J.-S. Lee, T. Hwan Ha, C.-S. Lee, Structural effects of naphthalimide-based fluorescent sensor for hydrogen sulfide and imaging in live zebrafish, *Scientific Reports* **6** (2016), 26230.

35. J.-H. Xu, Y.-M. Hou, Q.-J. Ma, X.-F. Wu, X.-J. Wei, A highly selective fluorescent sensor for Fe<sup>3+</sup> based on covalently immobilized derivative of naphthalimide, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **112** (2013), 116-124.
36. K. Hanaoka, Y. Muramatsu, Y. Urano, T. Terai, T. Nagano, Design and Synthesis of a Highly Sensitive Off–On Fluorescent Chemosensor for Zinc Ions Utilizing Internal Charge Transfer, *Chemistry – A European Journal* **16** (2010), 568-572.
37. G. Saito, D. Velluto and M. Resmini, Synthesis of 1,8-naphthalimide-based probes with fluorescent switch triggered by flufenamic acid, *Royal Society Open Science* **5** (2018), 172137.
38. M. Hee Lee, N. Park, C. Yi, J. H. Han, J. H. Hong, K. P. Kim, D. H. Kang, J. L. Sessler, C. Kang, J. S. Kim, Mitochondria-Immobilized pH-Sensitive Off–On Fluorescent Probe, *Journal of the American Chemical Society* **136** (2014), 14136–14142.
39. Z. Xu, S. J. Han, C. Lee, J. Yoon, D. R. Spring, Development of off–on fluorescent probes for heavy and transition metal ions, *Chemical Communications* **10** (2010), 1679-1681.
40. P. A. Panchenko, Y. V. Fedorov, V. P. Perevalov, G. Jonusauskas, O. A. Fedorova, Cation Dependent Fluorescent Properties of Naphthalimide Derivatives with *N*-Benzocrown Ether Fragment, *The Journal of Physical Chemistry A* **114** (2010), 4118-4122.
41. P. A. Panchenko, P. A. Ignatov, M. A. Zakharko, Y. V. Fedorov, O. A. Fedorova, A fluorescent PET chemosensor for Zn<sup>2+</sup> cations based on 4-methoxy-1,8-naphthalimide derivative containing salicylideneamino receptor group, *Mendeleev Communications* **30** (2020), 55-58.
42. S. Y. Kim, J.-I. Hong, Naphthalimide-based fluorescent Zn<sup>2+</sup> chemosensors showing PET effect according to their linker length in water, *Tetrahedron Letters* **50** (2009), 2822-2824.
43. H. Dai, H. Xu, A water-soluble 1,8-naphthalimide-based ‘turn on’ fluorescent chemosensor for selective and sensitive recognition of mercury ion in water, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **21** (2011), 5141-5144.
44. C. Schaude, G. J. Mohr, Indicator washcloth for detecting alkaline washing solutions to prevent dermatitis patients and babies from skin irritation, *Fashion and Textiles* **4** (2017).

45. I. Grabchev, D. Staneva, R. Betcheva, Fluorescent Dendrimers as Sensors for Biologically Important Metal Cations, *Current Medicinal Chemistry* **19** (2012), 4976-4983.
46. X. Poteau, A. I. Brown, R. G. Brown, C. Holmes, D. Matthew, Fluorescence switching in 4-amino-1,8-naphthalimides: “off-on-off” operation controlled by solvent and cations, *Dyes and Pigments* **47** (2000), 91-105.
47. D. Staneva, I. Grabchev, R. Betcheva, Sensor potential of 1,8-naphthalimide and its dyeing ability of cotton fabric, *Dyes and Pigments* **98** (2013), 64-70.
48. B. Daly, J. Ling, A. P de Silva, Current developments in fluorescent PET (photoinduced electron transfer) sensors and switches, *Chemical Society Reviews*, **44** (2015), 4203-4211.
49. X. Guo, X. Qian, L. Jia, A Highly Selective and Sensitive Fluorescent Chemosensor for  $\text{Hg}^{2+}$  in Neutral Buffer Aqueous Solution, *Journal of the American Chemical Society* **126** (2004), 2272-2273.
50. X.-F. Wu, Q.-J. Ma, X.-J. Wei, Y.-M. Hou, X. Zhu, A selective fluorescent sensor for  $\text{Hg}^{2+}$  based on covalently immobilized naphthalimide derivative, *Sensors and Actuators B: Chemical* **183** (2013), 565-573.
51. J. Renny, L. L. Tomasevich, E. H. Tallmadge, D. B. Collum, Method of Continuous Variations: applications of job plots to the molecular associations in organometallic chemistry, *Angewandte Chemie International Edition English* **46** (2013), 11998-2013.
52. H. A. Benesi, J. H. Hildebrand, A spectrophotometric investigation of the interaction of iodine with aromatic hydrocarbons, *Journal of the American Chemical Society* **71** (1949), 2703-2707.
53. K. Kaur, R. Saini, A. Kumar, V. Luxami, N. Kaur, P. Singh, S. Kumar, Chemodosimeters: An approach for detection and estimation of biologically and medically relevant metal ions, anions and thiols. *Coordination Chemistry Reviews* **256** (2012), 1992-2028.
54. P. Wang, J. Liu, X. Lv, Y. Liu, Y. Zhao, W. Guo, A Naphthalimide-Based Glyoxal Hydrazone for Selective Fluorescence Turn-On Sensing of Cys and Hcy, *Organic Letters* **14** (2012), 520-523.
55. S. Trupp, A. Schweitzer, G. J. Mohr, A fluorescent water-soluble naphthalimide receptor for saccharides with highest sensitivity in the physiological pH range, *Organic and Biomolecular Chemistry* **4** (2006), 2965-2968.

56. Z. Li, Q. Yang, R. Chang, G. Ma, M. Chen, W. Zhang, N-Heteroaryl-1,8-naphthalimide fluorescent sensor for water: molecular design, synthesis and properties, *Dyes and Pigments* **88** (2011), 307-314.
57. D. B. M. Groegel, M. Link, A. Duerrkop, O. S. Wolfbeis, A new fluorescent PET probe for hydrogen peroxide and its use in enzymatic assays for L-lactate and D-glucose, *ChemBioChem* **12** (2011), 2779-2785.
58. A. J. Moro, P. J. Cywinski, S. Koersten, G. J. Mohr, An ATP fluorescent chemosensor based on a Zn(II)-complexed dipicolylamine receptor coupled with a naphthalimide chromophore, *Chemical Communications* **46** (2010), 1085-1087.
59. C. Li, S. Liu, Responsive nanogel-based dual fluorescent sensors for temperature and Hg<sup>2+</sup> ions with enhanced detection sensitivity, *Journal of Materials Chemistry* **20** (2010), 10716-10723.
60. R. K. Jackson, Y. Shi, X. Yao, S.C. Burdette, FerriNaphth: a fluorescent chemodosimeter for redox active metal ions, *Dalton Transactions* **39** (2010), 4155-4161.
61. J. Gan, K. Chen, C. P. Chang, H. Tian, Luminescent properties and photo-induced electron transfer of naphthalimides with piperazine substituent, *Dyes and Pigments* **57** (2003), 21-28.
62. Y.-G. Gao, F.-L. Liu, S. Patil, D.-J. Li, A. Qadir, X. Lin, Y. Tian, Y. Li, A.-R. Qian, 1,8-Naphthalimide-Based Multifunctional Compounds as Cu<sup>2+</sup> Probes, Lysosome Staining Agents, and Non-viral Vectors, *Frontiers in Chemistry* **7** (2019).
63. Y. Liu, J. Zhang, T. Fenga, Y. Li, Synthesis, structure-fluorescence relationships and density functional theory studies of novel naphthalimide-piperazine-pyridine-based polystyrene sensors for Hg(II) detection, *RSC Advances* **10** (2020), 25281-25289.
64. Z. Xu, S. J. Han, C. Lee, J. Yoon, D. R. Spring, Development of off-on fluorescent probes for heavy and transition metal ions, *Chemical Communications* **10** (2010), 1679-1681.
65. D. Brynn Hibberta, P. Thordarson, The death of the Job plot, transparency, open science and online tools, uncertainty estimation methods and other developments in supramolecular chemistry data analysis, *Chemical Communications* **87** (2016), 12792-12805.
66. M. Tian, C. Wang, Q. Ma, Y. Bai, J. Sun, C. Ding, A Highly Selective Fluorescent Probe for Hg<sup>2+</sup> Based on a 1,8-Naphthalimide Derivative, *CS Omega* **5** (2020), 18176-18184.

67. E. Horak, P. Kassal, M. Hranjec, I. M. Steinberg, Benzimidazole functionalised Schiff bases: Novel pH sensitive fluorescence turn-on chromoionophores for ion-selective optodes, *Sensors and Actuators B: Chemical* **258** (2018), 415-423.
68. P. Kassal, M. Zubak, G. Scheipl, G. J. Mohr, M. D. Steinberg, I. M. Steinberg, Smart bandage with wireless connectivity for optical monitoring of pH, *Sensors and Actuators B: Chemical* **246** (2017), 455-460.
69. P. Kassal, E. Horak, M. Sigurnjak, M. D. Steinberg, I. M. Steinberg, Wireless and mobile optical chemical sensors and biosensors, *Reviews in Analytical Chemistry* **37** (2018), 27.

## ŽIVOTOPIS

Mislav Matić [REDACTED] završava osnovnu školu i pohađa prirodoslovnu gimnaziju u Tehničkoj školi i prirodoslovnoj gimnaziji Ruđera Boškovića te maturira kao učenik generacije. Preddiplomski studij *Primijenjena kemija* na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu upisuje 2017. godine. Od listopada iste godine aktivno je uključen u rad Studentske sekcije Hrvatskog društva kemijskih inženjera i tehnologa, sudjelujući u organizaciji preko 20 projekata. Od 2018. do 2020. godine glavni je urednik znanstveno-popularnog časopisa Reaktor ideja te kao član novinarskog postava nagrađen je Rektorovom nagradom za društveno koristan rad u akademskoj zajednici u ak. god. 2018./2019. Iste godine nagrađen je i Dekanovom nagradom za sudjelovanje na studentskom projektu Boje inženjerstva. U 2020. godini predsjednik je organizacijskog odbora Studentskog kongresa o HIV-u održanog na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije te je član organizacijskog odbora 7. Simpozija studenata kemičara.

Od listopada 2018., uključen je u znanstveni rad Zavoda za opću i anorgansku kemiju Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije u istraživačkoj skupini izv. prof. dr. sc. Ivane Steinberg na području razvoja i istraživanja optičkih senzora na bazi derivata benzimidazola i derivata naftilimida za određivanje pH vrijednosti i iona teških metala. 2019. godine sudjeluje s posterskim priopćenjem na 6. Simpoziju studenata kemičara, a 2020. sudjeluje na 13. Susretu mladih kemijskih inženjera s usmenim izlaganjem.