

Sinteza i spektroskopska karakterizacija novih 1,2,3-triazolnih derivata benzotiazola

Tenžera, Jakov

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:149:719072>

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

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



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Jakov Tenžera

ZAVRŠNI RAD

Zagreb, rujan 2020.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I
TEHNOLOGIJE
POVJERENSTVO ZA ZAVRŠNE ISPITE

Kandidat Jakov Tenžera

Predao je izrađen završni rad dana: 18. rujna 2020.

Povjerenstvo u sastavu:

Dr. sc. Lidija Furač, viši predavač, Fakultet kemijskog
inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu
Izv. prof. dr. sc. Svjetlana Krištafor, Fakultet kemijskog
inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu
Dr. sc. Matija Cvetnić, asistent, Fakultet kemijskog
inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu

povoljno je ocijenilo završni rad i odobrilo obranu završnog
rada pred povjerenstvom u istom sastavu.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Jakov Tenžera

**SINTEZA I SPEKTROSKOPSKA KARAKTERIZACIJA
NOVIH 1,2,3-TRIAZOLNIH DERIVATA BENZOTIAZOLA**

ZAVRŠNI RAD

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

Članovi ispitnog povjerenstva:

Dr. sc. Lidija Furač, viši predavač

Izv. prof. dr. sc. Svjetlana Krištafor

Dr. sc. Matija Cvetnić, asistent

Zagreb, rujan 2020.

Zahvaljujem mentorici v. pred. Dr. sc. Lidiji Furač, na ponuđenoj temi, predanom znanju tijekom studija i vodstvu pri izradi završnog rada.

Posebno se zahvaljujem asistentici mag. appl. chem. Kristini Pršir, na strpljenju i susretljivosti prilikom izvođenja eksperimentalnog dijela završnog rada, brojnim uputama i stručnim savjetima, razumijevanju te pomoći pri pisanju i izradi završnog rada.

Također, zahvaljujem svim članovima Zavoda za opću i anorgansku kemiju, Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije, na ugodnom radnom okruženju.

Zahvaljujem svojim roditeljima, obitelji, prijateljima i svim kolegama na podršci tijekom studija.

SAŽETAK

Derivati benzotiazola pokazuju potencijalnu senzorsku primjenu zbog postojanja slobodnog elektronskog para na dušiku i konjugiranog π -sustava u benzotiazolnom prstenu.

1,2,3-triazoli imaju bitnu ulogu u senzorskoj kemiji kao fluorofor i kao π -poveznica, a zbog postojanja heteroatoma dušika te dipolnog karaktera mogu sudjelovati u koordinaciji metalnih kationa i stvaranju vodikovih veza.

Cilj rada je korištenjem "click" reakcije pripremiti novi derivat benzotiazola i 1,2,3-triazola iz odgovarajućih aromatskih azida i alkina kao potencijalna senzorska molekula. Ciljani produkt pripremljen je 1,3-dipolarnom cikloadicijom azida i alkina uz Cu(I) kao katalizator. Struktura dobivenog spoja potvrđena je $^1\text{H-NMR}$ i $^{13}\text{C-NMR}$ spektroskopijom.

Nadalje, provedena su preliminarna ispitivanja sintetiziranog 2-(4-(tiofen-3-il)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)benzo[*d*]tiazola (**2**) kao kemosenzora korištenjem UV-vidljive i fluorescencijske spektroskopije. Ispitane su spektralne karakteristike novog spoja u otapalima različite polarnosti te u univerzalnim puferima u rasponu pH vrijednosti 2-12, te otopini HCl pH=1 i NaOH pH=13.

Ključne riječi: "click" kemija, benzotiazol, derivati benzotiazola, 1,2,3-triazol, kemosenzor, spektroskopija, pH senzor

Synthesis and spectroscopic characterization of novel 1,2,3-triazolylbenzothiazoles

SUMMARY

Benzothiazole derivatives show potential sensory application due to the free electron pair on nitrogen atom and conjugated π -system in benzthiazole moiety.

1,2,3-triazoles play an important role in sensor chemistry as fluorophore and as π -linker. Because of nitrogen hetero atoms and dipole character, triazoles can participate in the coordination of metal cations and in the formation of hydrogen bonds.

The aim of this work is to prepare a new benzothiazole and 1,2,3-triazole derivative from the corresponding aromatic azides and alkynes as potential sensory molecules by "*click*" reactions. The target product was prepared by 1,3-dipolar cycloaddition of azides and alkynes with Cu(I) as a catalyst. The structure of the obtained compound was confirmed by means of $^1\text{H-NMR}$ and $^{13}\text{C-NMR}$ spectroscopy.

Furthermore, the potential use of synthesized 2-(4-(thiophen-3-yl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl) benzo[d]thiazole (**2**) as a chemosensor was examined using UV-visible absorption and fluorescence spectroscopy. Spectral characteristics of compound were examined in solvents of different polarity and in universal buffer solutions in the pH range 2-12, HCl solution pH=1 and NaOH solution pH=13.

Keywords: "*click*" chemistry, benzothiazole, benzothiazole derivatives, 1,2,3-triazole, chemosensor, spectroscopy, pH sensor

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. OPĆI DIO	2
2.1. Kemijski senzori	2
2.1.1. <u>Podjela kemijskih senzora</u>	3
2.1.2. <u>Molekulski senzori</u>	5
2.1.3. <u>Optički molekularni senzori</u>	7
2.2. Optički molekularni senzori za određivanje pH	7
2.3. Benzotiazol	9
2.3.1. <u>Sinteza benzotiazola</u>	10
2.3.2. <u>Derivati benzotiazola i njihova primjena</u>	11
2.4. 1,2,3-triazol	15
2.4.1. <u>Sinteza 1,2,3-triazola</u>	16
2.4.2. <u>Click kemija</u>	17
2.4.3. <u>Primjena 1,2,3-triazola</u>	19
2.5. Tiofen	20
2.5.1. <u>Primjena tiofena</u>	21
3. EKSPERIMENTALNI DIO	24
3.1. Opće napomene	24
3.2. Sinteza spoja	25
3.2.1. <u>Priprava 2-azido-benzotiazola</u>	25
3.2.2. <u>Priprava 2-(4-(tiofen-3-il)-1<i>H</i>-1,2,3-triazol-1-il)benzo[<i>d</i>]tiazola</u>	26
3.3. Mjerenje UV-vidljivih apsorpcijskih i fluorescencijskih spektara	26
3.3.1. <u>Priprava matične (stock) otopine spoja</u>	26
3.3.2. <u>Opis mjerenja UV-Vis apsorpcijskih i fluorescencijskih spektara</u>	27
4. REZULTATI I RASPRAVA	28
4.1. Cilj rada	28
4.2. Sinteza spojeva	28
4.2.1. <u>Priprava 2-azido-benzotiazola</u>	28
4.2.2. <u>Priprava 2-(4-(tiofen-3-il)-1<i>H</i>-1,2,3-triazol-1-il)benzo[<i>d</i>]tiazola</u>	29
4.3. Analiza NMR spektara	30

4.4. Karakterizacija spoja UV-Vis i fluorescencijskom spektroskopijom	31
4.4.1. <u>Ovisnost spektara o polarosti otapala</u>	32
4.4.2. <u>Utjecaj promjene pH vrijednosti</u>	34
5. ZAKLJUČAK	40
6. LITERATURA	41
ŽIVOTOPIS	44

1. UVOD

U zadnjih nekoliko godina uloženo je puno truda i sredstava u istraživanje molekularnih fluorescentnih senzora zbog brojnih prednosti u odnosu na konvencionalne senzore poput selektivnosti, osjetljivosti, dostupnosti i jednostavne sinteze. Posebno je naglasak na sensorima za detekciju pH vrijednosti otopine. Izuzetno je bitno praćenje normalne pH vrijednosti u živim sustavima jer odstupanja od normalnih vrijednosti mogu dovesti do brojnih bolesti, poremećaja i neželjenih posljedica. Uslijed svega navedenog kemosenzori su uvelike istraženi u medicinskom i biokemijskom području.

Kemijski senzori su uređaji koji omogućuju pretvorbu kemijske veličine u analitički signal. Sastoje se od dvije osnovne komponente, a to su receptorski dio i pretvornik. Izuzetno korisna vrsta kemijskih senzora su optički senzori. Optički senzori su vrsta kemijskih senzora u kojima se analitički signal pobuđuje elektromagnetskim zračenjem. U radu je naglasak na sintezi potencijalnih optičkih senzorskih molekula.

Derivati benzotiazola sve češće pronalaze primjenu u sensorima za pH, bilo kao fluorofor ili kao dio receptorskog dijela senzorske molekule, zahvaljujući pH osjetljivosti, postojanja slobodnog elektronskog para na dušiku, konjugiranog π -sustava u benzotiazolnom prstenu i planarnoj geometriji. Ova svojstva potakla su sintezu i proučavanje brojnih derivata benzotiazola kao potencijalnih senzorskih molekula.

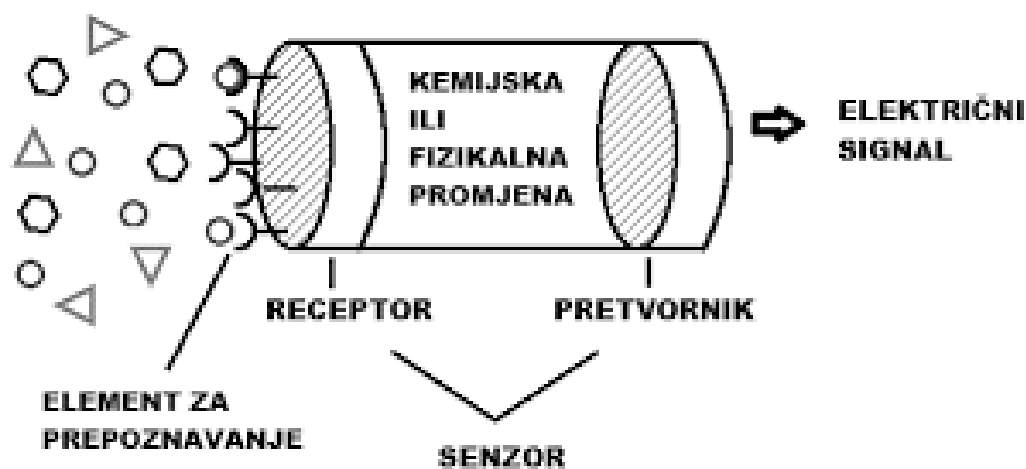
1,2,3-triazoli su potencijalni kemijski senzori uslijed slobodnih elektronskih parova na dušikovim atomima te π -sustava, što im omogućuje koordiniranje iona metala. Mogu imati ulogu π -poveznice između fluorofora i receptora ili kao dio fluorofora doprinositi konjugaciji molekule. Triazol u kombinaciji s poznatim fluoroforima poboljšava sposobnost nastalih molekula za vezanje različitih analita. Nastaju reakcijom "click" kemije koja predstavlja jedan od najznačajnijih načina sinteze u suvremenoj organskoj kemiji.

2. OPĆI DIO

2.1. Kemijski senzori

Kemijski senzori su uređaji koji pretvaraju kemijske informacije u analitički koristan signal. Informacija može biti nešto jednostavno, poput koncentracije specifične komponente uzorka ili pak nešto kompleksnije, npr. ukupni sastav analizirane tvari. Spomenute kemijske informacije, mogu potjecati iz kemijske reakcije analita ili promjene određenog fizikalnog svojstva ispitivanog sustava. Uz kemijske senzore potrebno je spomenuti i fizičke senzore, uređaji koji pružaju informacije o fizičkim svojstvima nekog sustava.

Kemijski senzori sastoje se od dvije osnovne funkcionalne jedinice: receptora i pretvornika. Receptor služi za selektivno i osjetljivo prepoznavanje analita, odnosno pretvorbu kemijske informacije u određeni oblik energije koji će biti mjerljiv pretvaraču. Izmjerenu energiju pretvarač pretvara u analitički signal koji sadrži kemijske podatke o mjerenom uzorku.¹



Slika 1. Shematski prikaz kemijskog senzora¹

2.1.1. Podjela kemijskih senzora

Razvojem mikroelektronike i računala omogućeno je dizajniranje bolje instrumentacije, a samim time i senzora koji imaju mogućnost korištenja većine poznatih fizikalnih, kemijskih te bioloških principa koji se koriste u području kemije. Tako se senzori mogu klasificirati obzirom na princip rada pretvarača: optički, elektrokemijski, električni, senzori osjetljivi na promjenu mase, magnetski senzori, termometrijski senzori te senzori osjetljivi na radijaciju.

Optički senzori su takovi uređaji koji prate promjene optičkih pojava, odnosno bilo koje uočljive promjene koje su rezultat međudjelovanja svjetlosti i materije. Optički senzori se dalje dijele u manje skupine ovisno o svojstvu koje pojedini senzor mjeri:

- a) apsorpcija svjetlosti – mjerenje promjene apsorpcije u prozirnomo mediju izazvana analitom ili reakcijom odgovarajućeg indikatora.
- b) refleksija svjetlosti – mjerenje refleksije pomoću imobiliziranog indikatora.
- c) luminiscencija – mjerenje intenziteta svjetlosti koja je emitirana kao rezultat kemijske reakcije.
- d) fluorescencija – mjerenje pozitivnog emisijskog učinka uzrokovanog zračenjem ili mjerenje selektivnog gašenja fluorescencije.
- e) indeks loma – mjerenje rezultata promjene sastava otopine.
- f) optotermalni efekt – mjerenje temperature izazvane apsorpcijom svjetla.
- g) raspršenje svjetlosti – mjerenje promjena uzrokovane česticama određene veličine prisutnih u uzorku.

Elektrokemijski senzori mjere te pretvaraju elektrokemijske interakcije analit/elektroda u analitički koristan signal. Interakcije, tj. reakcije je moguće potaknuti električnim putem, odnosno primjenom električne struje ili mogu biti rezultat spontane reakcije kada kroz sustav ne teče struja. Moguće je razvrstati ih u sljedeće podskupine:

- a) voltmetarski i ampermetarski senzori – njima se mjeri istosmjerna ili izmjenična struja. Ovoj podskupini možemo pridodati senzore na bazi kemijski inertnih elektroda, kemijski aktivnih elektroda ili modificiranih elektroda. Također su uključeni senzori koji posjeduju ili ne posjeduju vanjski izvore struje.
- b) potenciometarski senzori – potencijal indikatorske elektrode (ion-selektivna elektroda, redoks elektroda, itd.) se mjeri u odnosu na referentnu elektrodu.

- c) tranzistor efekta kemijski osjetljivih polja (eng. *chemically sensitized field effect transistor* [CHEMFET]) – reakcija analita i aktivne prevlake rezultira u promjeni struje.
- d) potenciometrijski senzori za plinove u krutom elektrolitu – razlika njih i potenciometarskih senzora je ta, da rade pri visokim temperaturama u krutim elektrolitima i primjenjuju se pri mjerenju osjetljivosti na plin.

Električni senzori su temeljeni na mjerenjima, kod kojih ne dolazi do odvijanja elektrokemijskih procesa. Signal kod električnih senzora proizlazi iz promjene električnih svojstava analita prilikom reakcije istoga. Dijelimo ih na:

- a) poluvodički senzori metalnih oksida – najčešće se koriste kao detektori za plinsku fazu, a temelje se na reverzibilnim redoks procesima komponenta analita, odnosno plinske faze.
- b) organski poluvodički senzori – princip rada ovakvih senzora zasniva se na stvaranju kompleksa kako bi došlo do prijenosa naboja, te nastankom istih dolazi do promjene gustoće naboja.
- c) senzori vodljivosti elektrolita
- d) senzori električne permitivnosti

Senzori osjetljivi na promjenu mase transformiraju zabilježenu promjenu mase analita u izlazni signal. Promjene mase je rezultat nakupljanja analita. Razlikujemo dvije vrste:

- a) piezoelektrični senzori – koristimo ih kod analize plinova i analize otopinama. Mjeri se promjena frekvencije titranja ploče kvarcnog oscilatora kao odgovor na adsorpciju mase analita na oscilator.
- b) senzori za mjerenje površinskih akustičnih valova – taloženjem određene mase analita dolazi do promjene brzine širenja proizvedenog akustičnog vala.

Magnetski senzori se koriste u svrhu analize plina. Mjere promjenu paramagnetičkih svojstava plina koji se analizira.

Termometrijski senzori mjere toplinskih učinaka kemijske reakcije ili adsorpcije analita. Mjerenje toplinskog učinka može se provesti na različite načine, npr. govorimo li o katalitičkim sensorima, toplinski učinak reakcije izgaranja ili enzimske reakcije moguće jer mjeriti uz pomoć termistora.

Ovakav tip klasifikacije senzora je jedna od mnogih mogućih alternativa, tako kemijske senzore možemo klasificirati prema primjeni za određivanje pojedinih analita, npr. senzori za pH, senzori za metalne ione, senzori za određivanje kisika itd.²

Uz pojam kemijskih senzora usko je povezan i pojam biosenzora. To su posebna vrsta kemijskih senzori u kojima se sustav prepoznavanja analita bazira na biokemijskom mehanizmu. Biološki sustav prepoznavanja prevodi informaciju iz biokemijske domene u nama mjerljiv signal.³

2.1.2. Molekulski senzori

Kemijski senzori ne moraju biti isključivo uređaji, mogu također biti molekule te takve senzore nazivamo molekulskim sensorima, tj. kemosenzorima. Molekulski senzori su molekule koje služe za određivanje specifičnog analita.⁴ Iako se molekulski senzori često svrstavaju pod pojam biosenzora, ustvari su to kemijski senzori u užem smislu riječi. Za razliku od klasičnih senzora koji sadrže dvije glavne funkcionalne jedinice (receptora i pretvarača), molekulski senzori sastoje se od 3 funkcionalne jedinice: receptorski dio, pretvarački dio te poveznice koja povezuje ta dva dijela molekule. Mjerenje kod molekulskih senzora provodi se u tri koraka: vezanje i prepoznavanje (eng. *capture and recognition*), transformacija te mjerenje i analiza mjerenja.

1. Vezanje i prepoznavanje

Pod ovim pojmom se podrazumijeva vezanje ciljanog analita. Sami proces vezanja molekulskog senzora i ciljanog analita inducira senzorski efekt, odnosno promjenu fizikalnih ili kemijskih svojstava. Analit koji pobuđuje senzorski efekt nazivamo ligandom. Željene karakteristike ovog koraka uključuju:

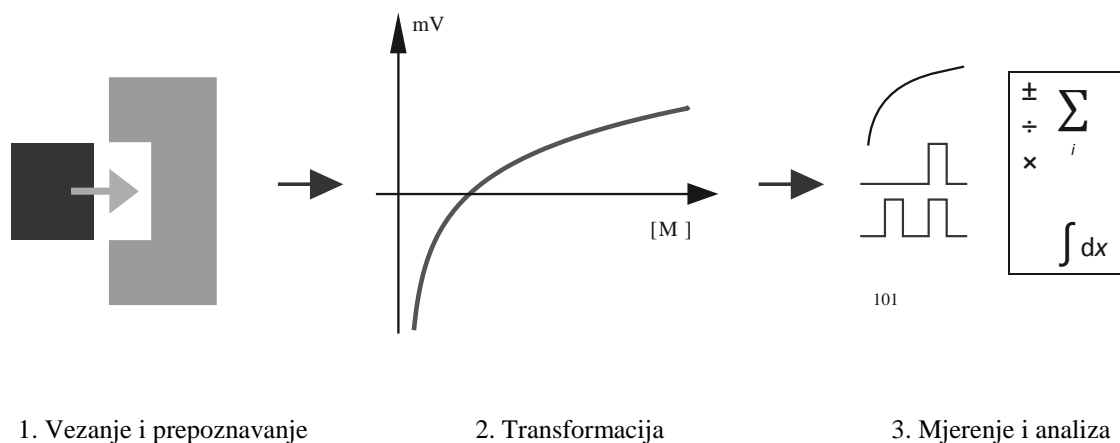
- a) selektivnost – senzorski efekt induciran jedino s ciljanim analitom
- b) osjetljivost – veliki senzorski efekt na mali broj molekula analita
- c) razlučivost – senzorski efekt dobar je pokazatelj količine zarobljenih molekula
- d) dinamički raspon – ne dolazi do prezasićenja s velikom brojem molekula analita

2. Transformacija

Ovaj korak se odnosi na detekciju prijašnjeg koraka te pretvaranje istog u mjerljivi signal. Najčešće je riječ o električnom signalu struje ili napona no mogući su i drugi oblici signala, npr. optički. Poželjne karakteristike ovog koraka su osjetljivost, dobra razlučivost i dinamički raspon.

3. Mjerenje i analiza

Dobiveni signal je potrebno izmjeriti i zabilježiti kako bi ga se moglo protumačiti kao količina molekularnih aktivnosti. Mjerenja mogu varirati, mogu biti izravna i jednostavna, ali mogu biti i veoma kompleksna. Mjerenja bioloških veličina, poput otkrivanje mirisa ili pronalaženje bolesti, kombinacija su nelinearnih reakcija bioloških sustava te je mjerenje veoma kompleksno. Kako bi došli do značajnih podataka mjerenog sustava, mogu biti potrebne visoke razine obrade signala. Kod modernih senzorskih sustava taj dio uglavnom rade digitalni procesori ili računala.⁵



Slika 2. Tri koraka mjerenja kod molekularnih senzora⁵

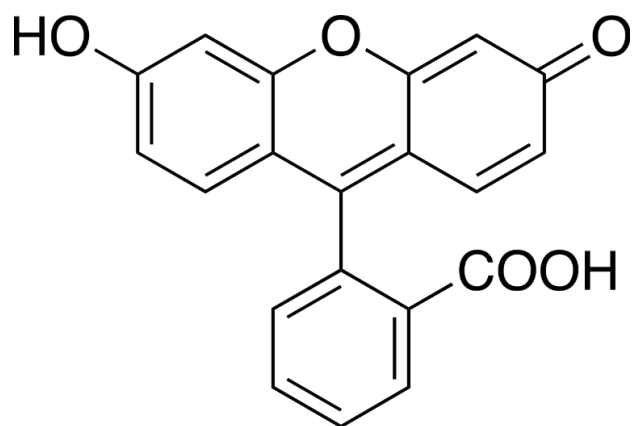
2.1.3. Optički molekularni senzori

Optički molekularni senzori je takav tip senzora, koji koriste tehnike optičke transdukcije. Temelj mjerenja s optičkim molekularnim sensorima jest korištenje reagensa koji mijenja svoja optička svojstva tokom interakcije sa željenim analitom. Svojstva koja najčešće promatramo i mjerimo su apsorpcija, intenziteta fluorescencije te vrijeme raspada, ali je moguće koristiti i indeks loma, rasipanje svjetlosti i polarizaciju svjetlosti kao analitičke parametre. Bilježi se stalni rast primjene i razvoja optičkih molekularnih senzora od 1980. godine. Taj porast u razvoju i primjeni pripisuje se napretku optoelektronike koji je omogućio jeftine minijaturizirane izvore svjetlosti, fotodetektore te optička vlakna visoke kvalitete, koji olakšavaju razvoj i upotrebu senzora na bazi optičkih vlakana za primjenu u medicini i industriji.⁶

2.2. **Optički molekularni senzori za određivanje pH vrijednosti**

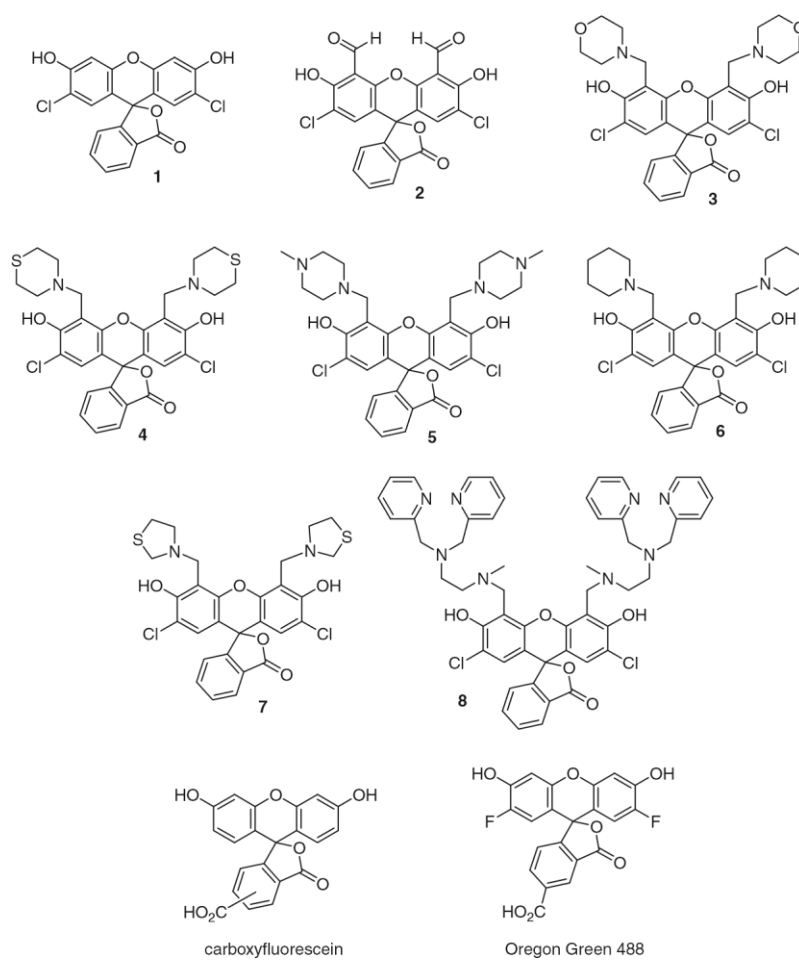
pH vrijednost je ključni parametar u okolišu, industriji, medicini te preradi hrane i pića. U laboratorijima se najčešće koristi lakmus papir, temeljen na pH osjetljivim indikatorskim bojilima te, ili pH elektrode, su najčešće korištene metode za određivanje pH vrijednosti. Pomoću pH elektrode imamo mogućnost mjeriti koncentraciju H_3O^+ iona u vodi. Pouzdana je i jednostavna za rukovanje, mjerenja su brza, a cijena je relativno niska. Nedostaci pH elektrode uključuju: veličina, kruti dizajn i osjetljivost na električne smetnje ili agresivne analite (poput alkalnih otopina ili otopina fluoridnih iona) čime je ograničena primjena u nekim realnim uzorcima. pH elektrode su također mehanički krhke i nisu pogodne za mjerenje malih količina uzoraka.⁶

Posljednjih nekoliko desetljeća istraživanja su se pretežito fokusirala na razvoj visoko osjetljivih fluorescentnih molekularnih pH senzora. Takvi senzori se pokazuju kao bolja alternativa u odnosu na tradicionalne pH elektrode. Fluorescentni molekularni senzori imaju niz prednosti, kao što su visoka osjetljivost, jednostavnost upotrebe i kraće vrijeme odziva. Sintetizirani su različiti fluorescentni molekularni pH senzori koji se temelje na različitim fluorescentnim molekulama poput fluoresceina te njegovih derivata.⁷

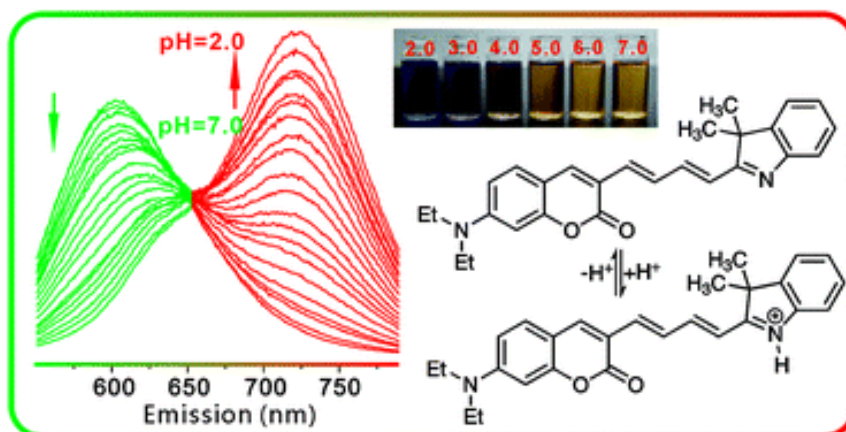


Slika 3. Struktura fluoresceina

Uobičajeni pH senzori na bazi fluoresceina su primjerice karboksifluorescein ili Oregon zeleno 448, prikazani na **Slici 4**.⁸

Slika 4. Strukture različitih derivata fluoresceina⁸

Kumarin posjeduje odlična fotofizikalna svojstva, radi čega je često korišten kao fluorofor. Spojevi u kojima je kumarin vezan na benzotiazol ili indol jednom ili dvije konjugirane veze, pokazali su obećavajuća svojstva kao fluorescentni senzori za određivanje vrijednosti pH. Primjer jednog takvog pH osjetljivog kemosenzora temeljenog na kumarinu prikazan je na **Slici 5**. U strukturi sadrži i pH osjetljivi indol koji se protonira u kiselom mediju i kao rezultat mijenja se boja otopine. Osim toga, u neutralnom spoj emitira pri 600 nm, dok se smanjenjem pH otopine javlja novi maksimum emisije pri 722 nm.⁹

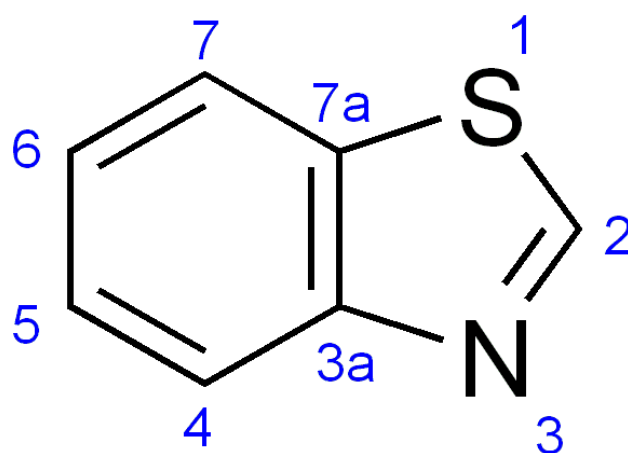


Slika 5. Fluorescentni pH senzor na bazi kumarina i indola⁹

2.3. Benzotiazol

Benzotiazol je biciklička molekula koja se sastoji od benzenske jezgre za koju je vezan tiazolni prsten. Tiazol je heterociklički peteročlani prsten kod kojeg je na položaju „1“ smješten atom sumpora, dok je na položaju „3“ atom dušika. Veze u tiazolnom prstenu su jednostruke, a veza C-2-N prema vrijednosti Wibergovih veza pokazuje svojstva dvostruke veze.¹⁰

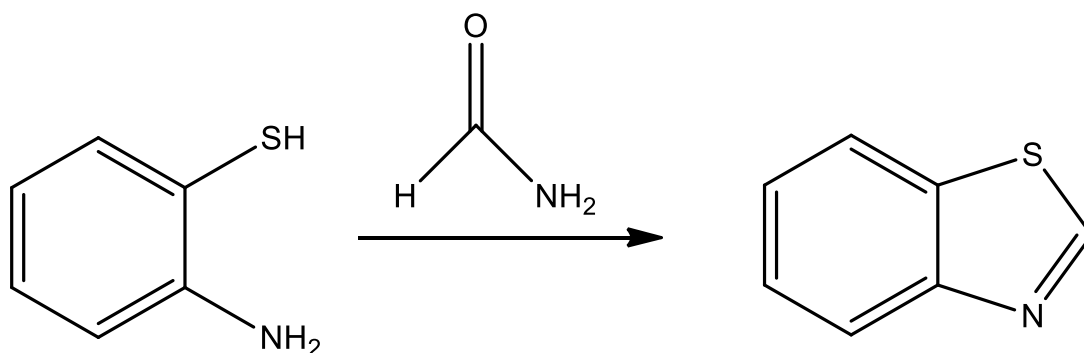
Kemijška formula benzotiazola glasi C_7H_5NS . Na sobnoj temperaturi bezbojna tekućina s temperaturom tališta od 2 °C, dok mu je temperatura vrelišta u rasponu od 227 do 228°C. Molekularna masa je jednaka 135,19 g/mol, a gustoća iznosi 1,24 g/mol.¹¹



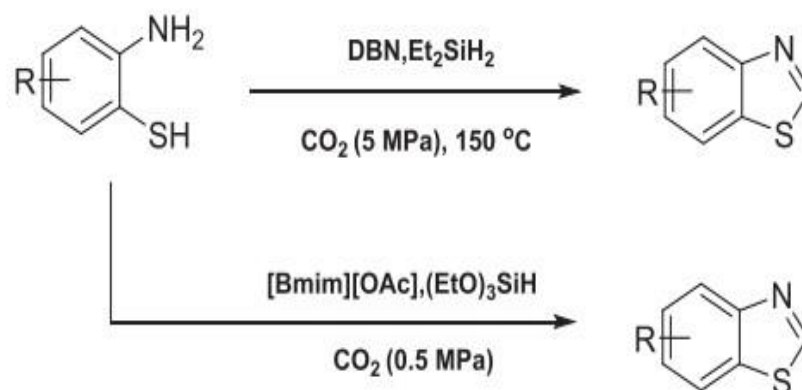
Slika 6. Struktura benzotiazola

2.3.1. Sinteza benzotiazola

Benzotiazol se u novije vrijeme priprema na dva osnovna načina. Prvi način je zatvaranje tiazolnog prstena iz derivata benzena kako je prikazano na **Slici 7**, a drugi način je reakcijama na postojećoj benzotiazolnoj jezgri. Hofmann je 1880. godine iz 2-aminobenzentiola i formamida prvi sintetizirao molekulu benzotiazola.¹²

Slika 7. Hofmannova sinteza benzotiazola¹²

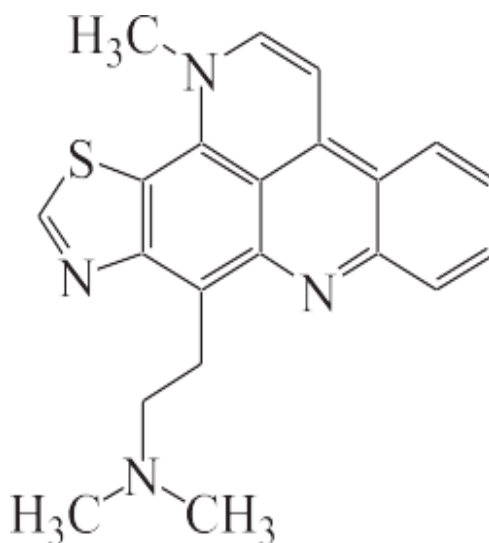
U 2014. godini je po prvi puta benzotiazol pripravljen iz 2-aminobenzentiola i u pripravi je kao sredstvo za fiksiranje CO₂ korišten silan. Reakcijski uvjeti su tlak od 5 MPa i temperatura od 150°C, što je ograničavalo samu provedbu procesa, radi čega je 2015. godine benzotiazol sintetiziran iz CO₂ i trietoksisilana na temperaturi od 60°C te su se koristile ionske tekućine na bazi imidazola kao katalizatore.



Slika 8. Dobivanje benzotiazola¹³

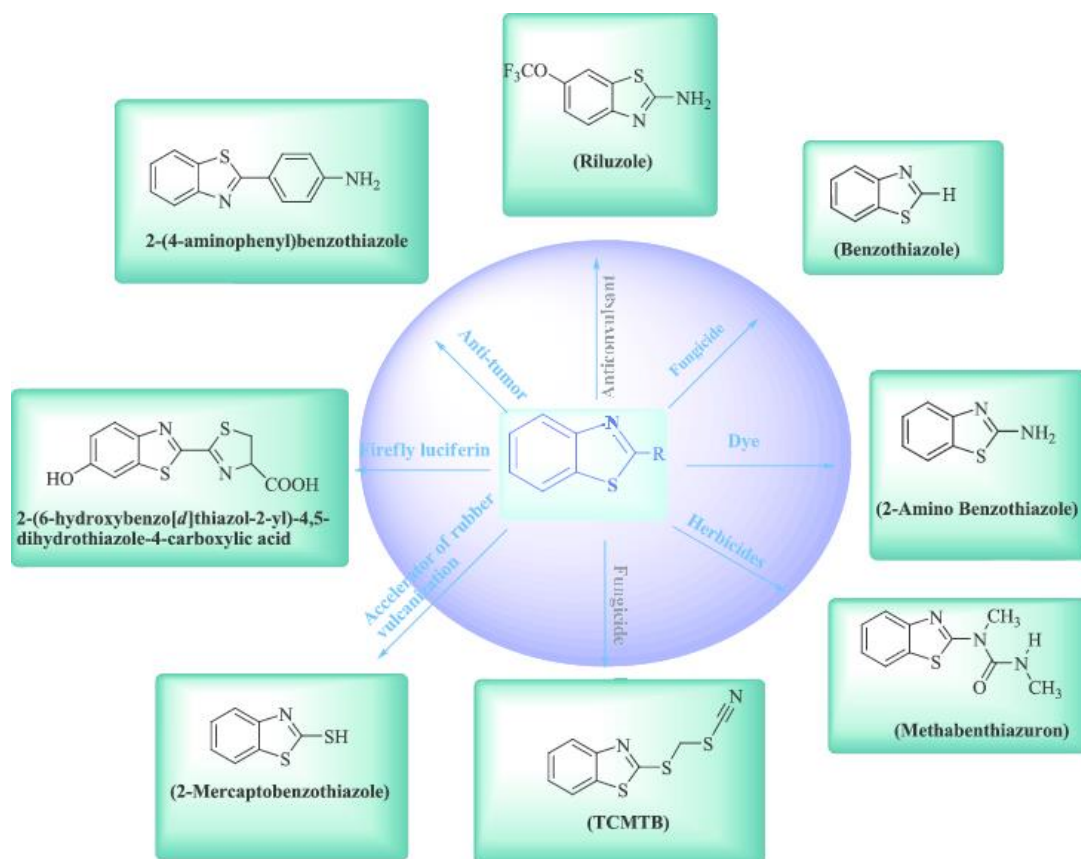
2.3.2. Derivati benzotiazola i njihova primjena

Benzotiazol posjeduje zanimljiva biološka i kemijska svojstva, radi čega je njegova primjena raznolika. Dercitin, prikazan na **Slici 8** u strukturi sadrži benzotiazol i pokazuje antitumorsko djelovanje inhibirajući stanice leukemije.¹³



Slika 9. Prikaz strukture dercitina¹³

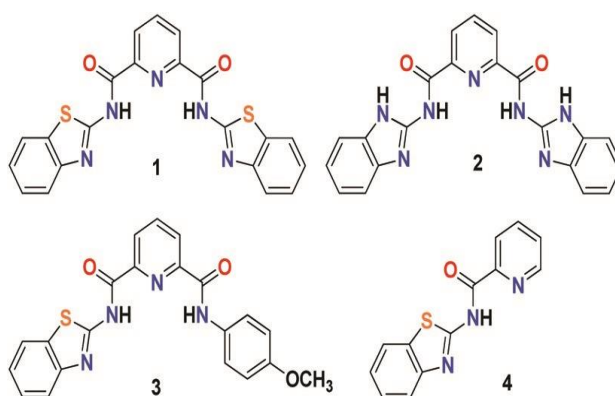
Neki derivati benzotiazola pokazuju značajnu djelotvornost protiv autoimunih i upalnih bolesti. Osim antitumorskog djelovanja, benzotiazol se istaknuo u dobrom antimikrobnom, antifungalnom te antiinfektivno djelovanju. Derivati benzotiazola mogu se koristiti u industriji, npr. azo derivati koriste se u tekstilnoj industriji kao bojila.¹⁴



Slika 10. Derivati benzotiazola i njihova uporaba¹⁴

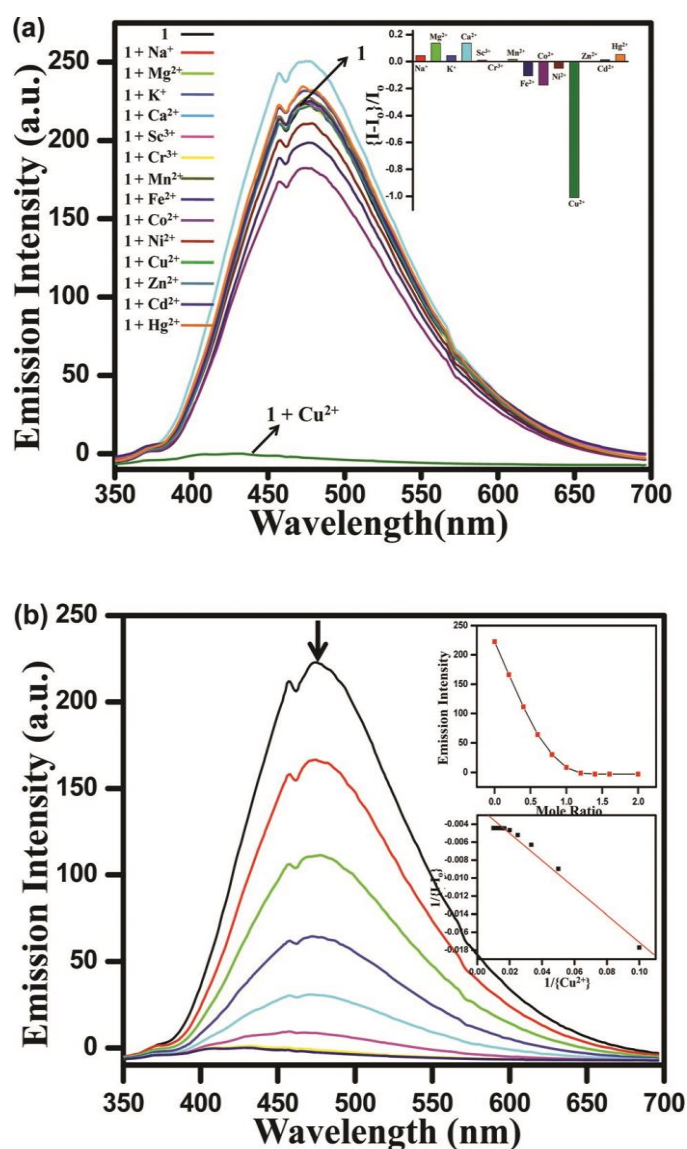
Spojevi na bazi benzotiazola su se pokazali kao dobri kemosenzori. Uz svojstva za određivanje pH, istaknuli su se u određivanju metalnih kationa. Metalni ioni vežu se na ligande pri čemu nastaje kompleks ili se vežu na dio molekule.¹⁵

Amidni derivati benzotiazola pokazali su se kao visoko selektivni kemosenzori za Cu^{2+} i Zn^{2+} ione. Primjer takvih derivata prikazani su na Slici 11.

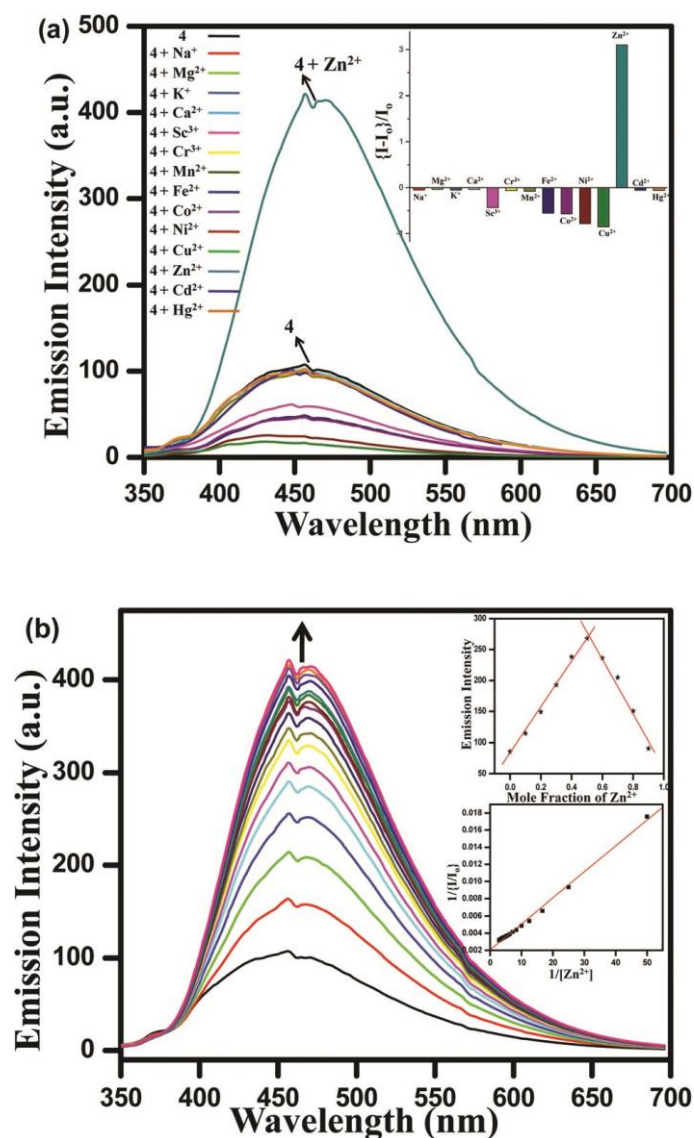


Slika 11. Strukture amidnih derivata benzotiazola¹⁶

Mjereni su emisijski spektri spojeva **1** – **4** u prisutnosti metalnih kationa (Na^+ , Mg^{2+} , K^+ , Ca^{2+} , Sc^{3+} , Cr^{3+} , Mn^{2+} , Fe^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} te Hg^{2+}). Zabilježen je afinitet vezanja Cu^{2+} iona spoja **1**, a kod spoja **4** zabilježena je velika selektivnost prema Zn^{2+} ionu. Emisijski spektri spoja **1** i **4** u prisutnosti različitih metalnih kationa i u otopinama različitih koncentracija pripadajućeg iona nalaze se na **Slici 12** i **13**. Uočljivo je kako u prisutnosti Cu^{2+} iona te dolazi do gašenja fluorescencije. Porastom koncentracije Cu^{2+} dolazi do naglog pada u intenzitetu fluorescencije. Kod spoja **4** dolazi do povećanja intenziteta u prisutnosti Zn^{2+} iona. Porastom koncentracije Zn^{2+} dolazi do rasta intenziteta fluorescencije, ali je rast intenziteta sve manji što je koncentracija veća.¹⁶

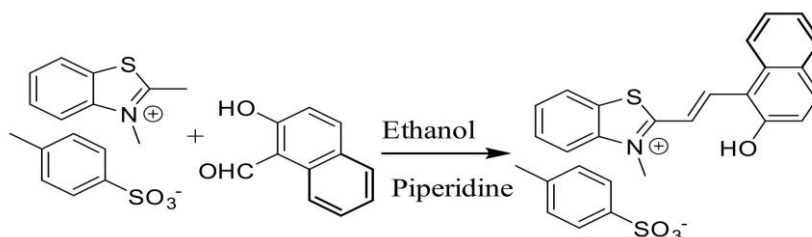


Slika 12. (a) promjena intenziteta emisije spoja **1** nakon dodavanja različitih metalnih iona (5 eq)
 (b) Promjena intenziteta emisije spoja **1** (0,1 mM) s porastom koncentracije Cu^{2+} iona (0–0,2 mM)¹⁶



Slika 13. (a) promjena intenziteta emisije spoja **4** nakon dodavanja različitih metalnih iona (5 eq)
 (b) Promjena intenziteta emisije spoja **4** (0,1 mM) s porastom koncentracije Zn^{2+} iona (0–0,2 mM)¹⁶

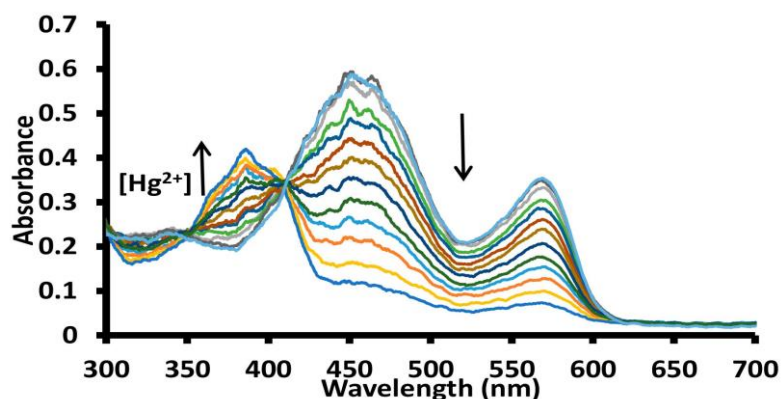
Sintetiziran je spiropiran koji u strukturi sadrži benzotiazol. Spoj pokazuje iznimno dobra svojstva za određivanje Hg^{2+} iona. Sinteza spoja te njegova struktura prikazana je na **Slici 14**.



Slika 14. Sinteza i struktura spiroirana¹⁷

Vidljivo je kako je ustvari riječ o soli p-toluensulfonat i spiropirana. Iz istog razloga moguće je koristiti ovaj kemosenzor u vodenim otopinama. Kod većina kemosenzora potrebno je mjerenja provoditi u organskim otapalima, što ograničava primjenu.

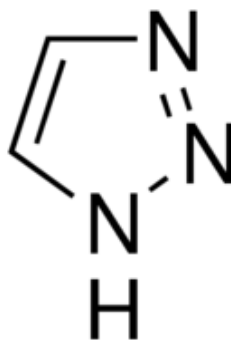
Snimljeni su apsorpcijski spektri spirospirana u otopinama različitih koncentracija Hg^{2+} iona i prikazani su na **Slici 15**. Porastom koncentracije Hg^{2+} dolazi do nastajanja novog maksimuma na području od 370 do 400 nm te do nestanka minimuma na području između 500 i 550 nm.¹⁷



Slika 15. Promjena u apsorpcijskom spektru vodene otopine spiropirana uslijed postupnog rasta koncentracije Hg^{2+} iona¹⁷

2.4. 1,2,3-triazol

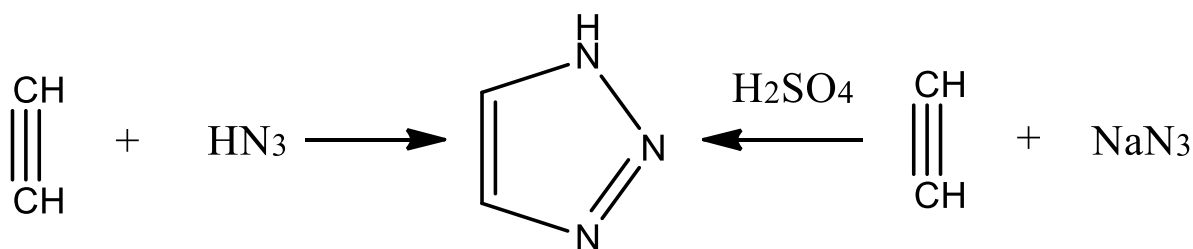
1,2,3-Triazol je nezasićeni peteročlani aromatski heterocikl na bazi dušika. Sastoji se od tri atoma dušika te dva atoma ugljika s dvije dvostruke veze, od kojih je jedan dušik pirolni, a druga dva su piridinska. Svi atomi u 1,2,3-triazolima su sp^2 hibridizirani, a raspolažu sa 6 π elektrona koji su delokalizirani po čitavom prstenu, pa je prema tome 1,2,3-triazol aromatskog karaktera.¹⁸



Slika 16. Struktura 1,2,3-triazola

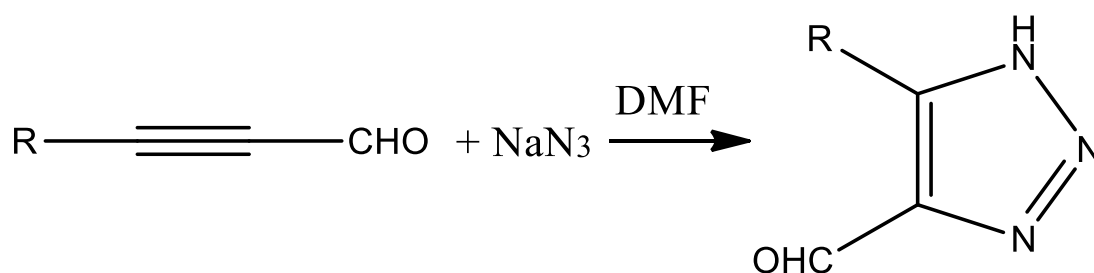
2.4.1. Sinteza 1,2,3-triazola

Dimroth i Fester su među prvima sintetizirali 1*H*-1,2,3-triazol zagrijavanjem HN_3 i acetilena pri $100\text{ }^\circ\text{C}$ u periodu od 70 sati. Osim toga, za dobivanje 1,2,3-triazola moguće je koristiti NaN_3 i aceten kao reaktante, a sama reakcija se provodi u otopini kiseline, kako je prikazano na **Slici 17**.



Slika 17. Dimroth-Fester sinteza¹⁹

Moguće je podvrgnuti azidni ion na cikloadiciju s alkinima kako bi dobili 1,2,3-triazoli s umjerenim do visokim iskorištenjem. Reakcijom alkina, koji sadrži jaku elektron-odvlačeću skupinu, s natrijevim azidom u DMSO ili DMF daje 1,5-disupstituirani 1*H*-1,2,3-triazol-4-karbaldehid, kako je prikazano na **Slici 18**.¹⁹



Slika 18. Sinteza 1,5-disupstituiranog 1,2,3-triazola¹⁹

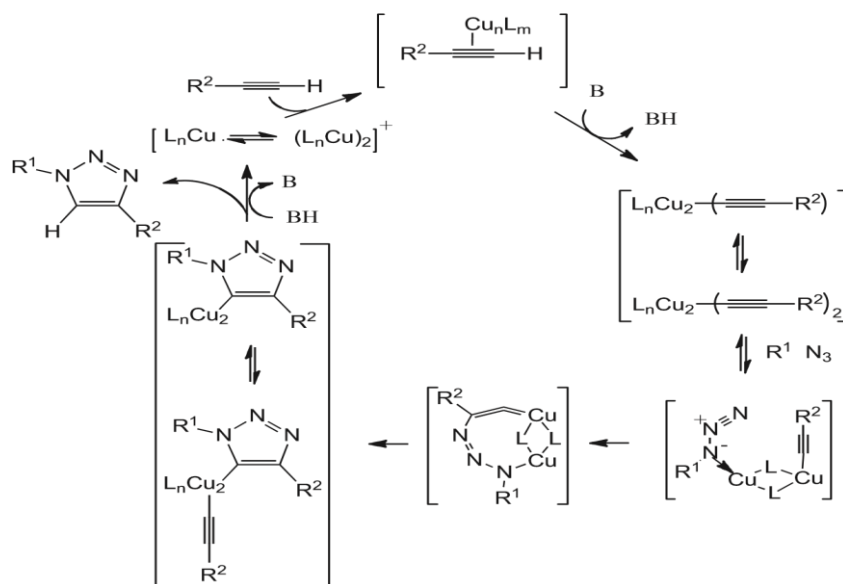
2.4.2. "*Click*" kemija

Pojam "*click*" kemije prvi je uveo K. B. Sharpless 2001. godine kako bi opisao reakcije visokog iskorištenja i širokog opsega. Takav tip reakcija stvara samo nusprodukte koje je moguće ukloniti korištenjem jednostavnijih metoda izolacije produkta, primjerice filtriranjem i bez korištenja kromatografskih metoda. Reakcije su stereospecifične i jednostavne za izvođenje.²⁰

Najpoznatija "*click*" reakcija jest 1,3-dipolarna cikloadicija azida i alkina. Huisgen, Szeimies i Moebius prvi su zabilježili ovakav tip reakcije. Zabilježili su nekoliko primjera učinkovitog stvaranja triazola samo kombiniranjem polaznih materijala. Optimizacijom tog procesa došlo je do azid-alkin cikloadicije katalizirane bakrom (eng. copper-catalyzed azide-alkyne cycloaddition [CuAAC]).

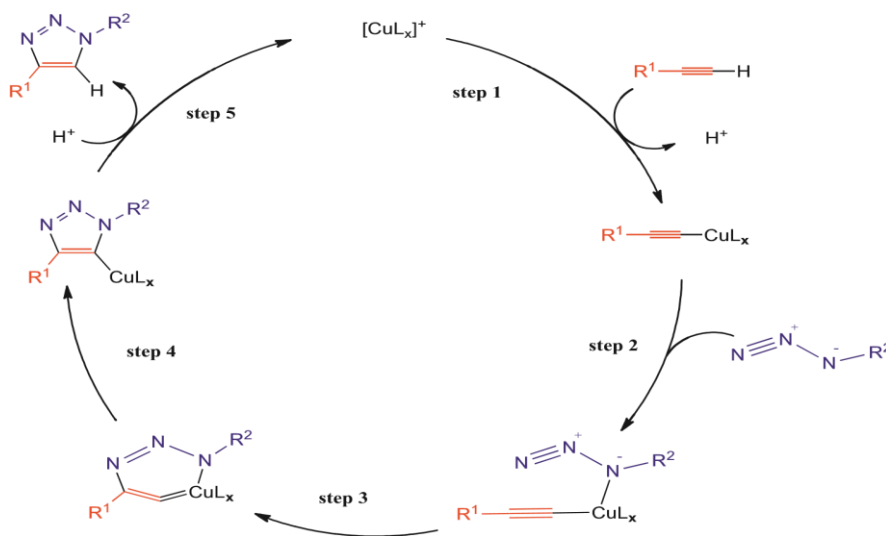
CuAAC reakciju je moguće provoditi na ekonomičan način, regioselektivna je te tolerantna prema bezbroj funkcionalnih skupina. Ovakav tip reakcije je izvrstan za organsku sintezu. Dodatne prednosti, poput jednostavnog pročišćavanja i biokompatibilnosti, čine CuAAC reakciju izvrsnom metodom za sintetiziranje biomakromolekula.²¹

Istraživanje mehanizma CuAAC reakcije se provodilo pomoću kinetičkih studija i DFT izračuna. U početku je predložen bimetalni mehanizam prikazan na **Slici 19**. Bimetalni mehanizam temelji se na postojanju katalitičkog ciklusa u kojem se alkinilni ligand veže za jedan, a azid za drugi Cu centar. Na početku katalitičkog ciklusa dolazi koordinacije Cu^+ na alkinilni ligand nastaje π -kompleks bakra i alikna. U drugom koraku dolazi do deprotonacije i nastanka bakrovog acetilida uslijed koordinacije Cu^+ na alkinilni ligand. Zatim se azid veže na drugi Cu^+ pri čemu nastaje intermedijer. Dolazi do pregradnje intermedijera te nastaje sedmeročlani prsten. Protoniranjem sedmeročlanog prstena dolazi do odvajanja 1,4-disupstituiranog 1,2,3-triazola i bakra, tj. kraja ciklusa.



Slika 19. Shematski prikaz bimetalnog mehanizma CuAAC reakcije²²

Daljnijim istraživanjem je predložen srodni mehanizam prikazan na **Slici 20**. Pretpostavlja se da se azid i alkilni ligand vežu za isti Cu centar. U prvom koraku koordinacijom Cu^+ na π -elektrone trostruke veze alkina nastaje π -kompleks bakra i alikna. Nadalje, dolazi do deprotonacije i nastanka bakrovog acetilida uslijed koordinacije Cu^+ na trostruku vezu alkina pri čemu dolazi do smanjenja pKa u drugom koraku. U trećem koraku nastaje intermedijer reakcijom kompleksa bakrovog acetilida i azida. U četvrtom koraku pregradnjom intermedijera nastaje šestočlani prsten. Zbog prisutnosti bakra u strukturi šestočlanog prstena spoj u koraku pet naziva se triazolil te njegovim protoniranjem nastaje 1,4-disupstituirani 1,2,3triazol.²²



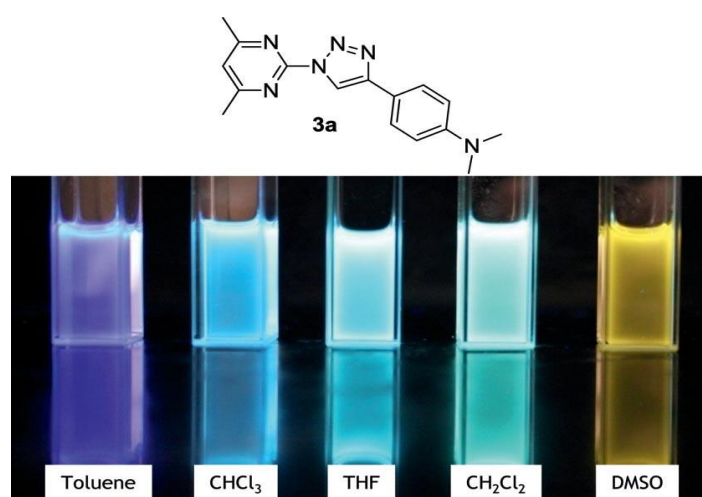
Slika 20. Shematski prikaz predloženog katalitičkog ciklusa CuAAC reakcije na temelju DFT izračuna²²

2.4.3. Primjena 1,2,3-triazola

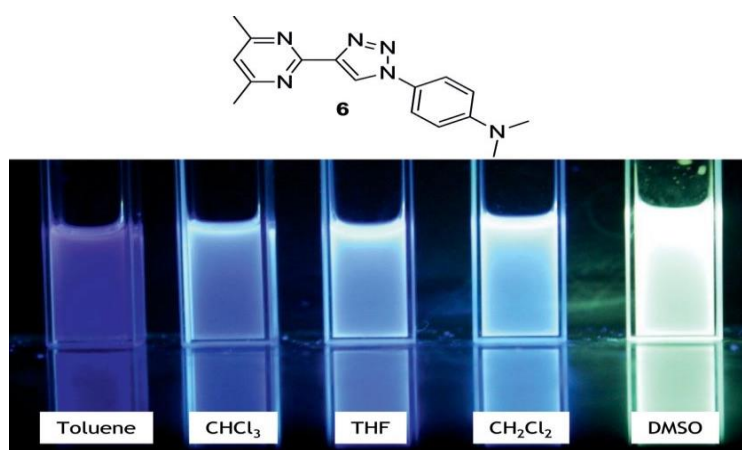
1,2,3-triazoli te njihovi benzo derivati su privukli iznimnu pozornost radi svoje sintetske vrijednosti, kao i zbog brojnih mogućnosti primjene u industriji i poljoprivredi. Uz sintetsku vrijednost posjeduju mnoštvo korisnih svojstva, kao npr. biološke aktivnosti. Sve se češće primjenjuju kao fluorescentni molekularni senzori.

1,2,3-triazol se primjenjuje kao π poveznica u takozvanim "push-pull" kromoforima, odnosno kemosenzorima. Općenito, "push-pull" kromofori posjeduju elektron-akceptorsku (A) i elektron-donorsku skupinu (D) povezane π -konjugiranom poveznicom, tzv. D- π -A struktura.²¹

Primjeri molekula s tzv. D- π -A strukturama prikazane su na **Slici 21** i **22**. Spojevi **3a** i **6** građeni su od 4,5-dimetilpirimidina i *N,N*-dimetilanilina povezanih 1,4-disupstituiranim 1,2,3-triazolom. Spoj **6** je izomer spoja **3a**.

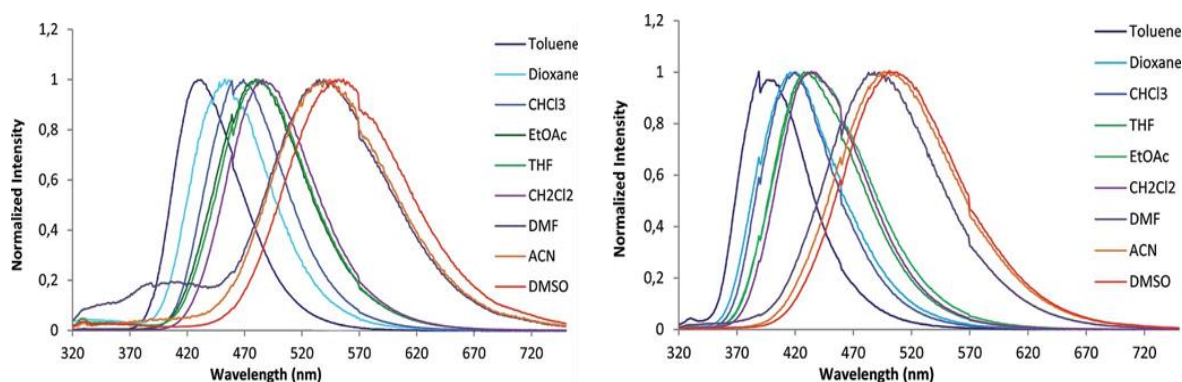


Slika 21. Struktura i promjena boje spoja **3a** u različitim otapalima²³



Slika 22. Struktura i promjena boje spoja **6** u različitim otapalima²³

Emisijski spektri spojeva **3a** i **6** u otapalima različitih polarnosti prikazani su na Slici **23**. Uočeni su veći Stokesovi pomaci s povećanjem polarnosti otapala. Vidljiv je crveni pomak od 124 i 113 nm za spoj **3a** odnosno **6** pri prijelazu iz toluena u DMSO. Takva pojava karakteristična je za unutarnji prijenos naboja pri pobudi.²³



Slika 23. Emisijski spektri spoja **3a** i **6** u otapalima različitih polarnosti²³

2.5. Tiofen

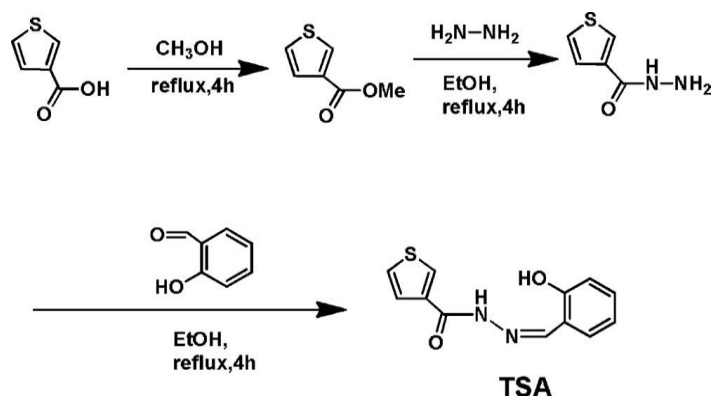
Tiofen je monociklički heteroaren nalik furanu u kojem je atom kisika zamijenjen sumporom, dakle kemijska formula mu glasi C_4H_4S . Bezbojna je tekućina neugodnog mirisa, netopiva u vodi. Nadražuje kožu, oči i sluznicu.²⁵



Slika 24. Prikaz strukture tiofena²⁴

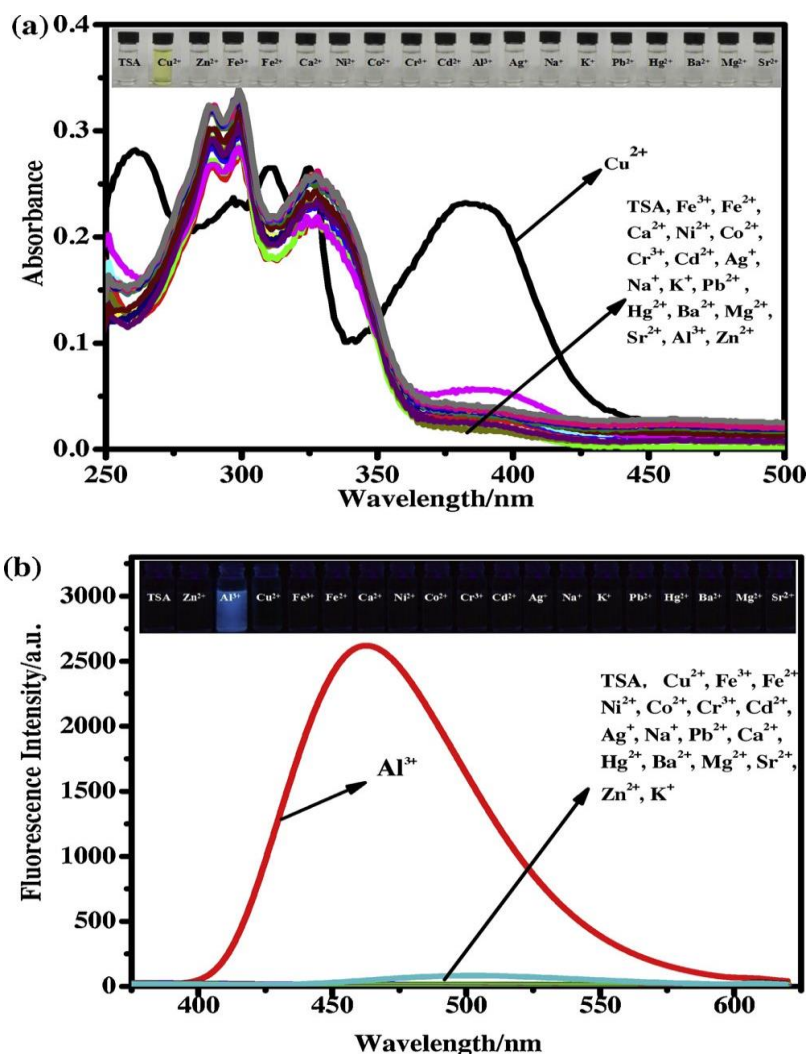
2.5.1. Primjena tiofena

Pojedini derivati tiofena lako vežu metalne katione za sebe. Iz istog razloga je moguće koristiti ih kao kemosenzore za određivanje metalnih kationa. Sintetiziran je novi kemosenzor **TSA**, čija je sinteza prikazana na **Slici 25**. Spoja **TSA** pokazuje veliku osjetljivost na Al^{3+} i Cu^{2+} ione u vodenim otopinama. Prisutnost Al^{3+} uzrokuje znatno pojačanje intenziteta fluorescencije, a u prisutnosti Cu^{2+} iona dolazi do promjene boje otopine iz bezbojne u žutu.



Slika 25. Sinteza i struktura spoja **TSA**²⁵

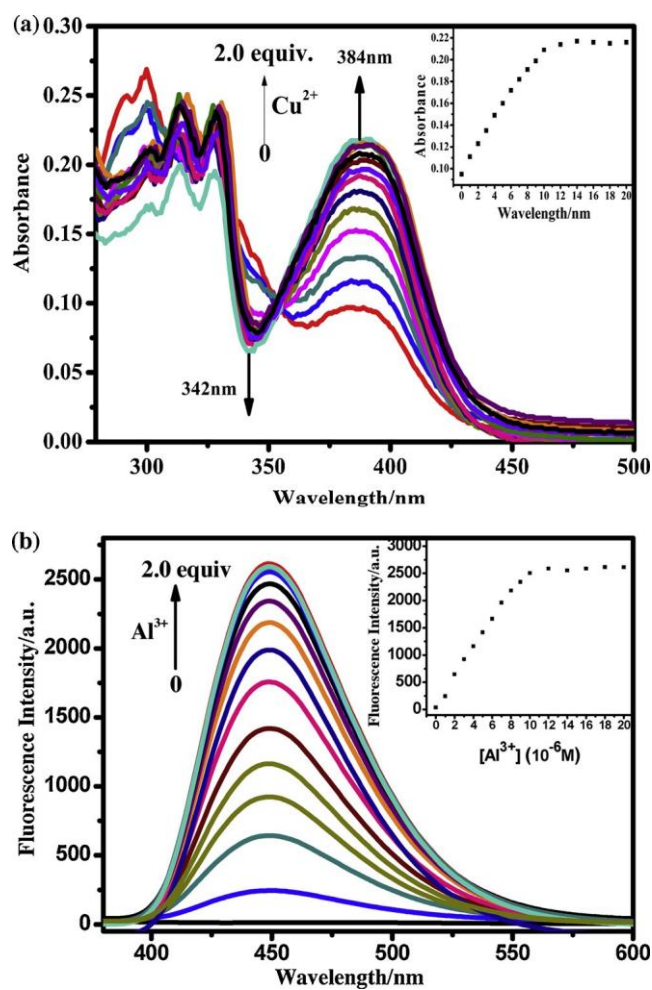
Apsorpcijski i emisijski spektri spoja **TSA** u prisutnosti različitih kationa (K^+ , Na^+ , Ag^+ , Mg^{2+} , Ba^{2+} , Ca^{2+} , Sr^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Fe^{3+} , Hg^{2+} , Zn^{2+} , Pb^{2+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} , Al^{3+} , Cr^{3+} te Fe^{2+}) prikazani su na **Slici 26**. Uočljivo je kako u prisutnosti Cu^{2+} iona dolazi do pojave novih maksimuma i minimuma u apsorpcijskom spektru spoja **TSA**. Iz emisijskih spektra je vidljivo kako svi kationi uzrokuju gašenje fluorescencije osim Al^{3+} iona.



Slika 26. (a) UV-vis apsorpcijski spektri spoja **TSA** ($10 \mu\text{M}$) u prisutnosti različitih metalnih kationa ($2,0 \text{ eq.}$)

(b) Fluorescentni spektri spoja **TSA** ($10 \mu\text{M}$) nakon dodavanja različitih metalnih kationa ($2,0 \text{ eq.}$)²⁵

Kako bi dobili bolji uvid u kolorimetrijski odgovor spoja **TSA** na prisutnost Cu^{2+} iona te pojačavanje fluorescencije u prisutnosti Al^{3+} iona, provedena su mjerenja apsorpcijskih i emisijskih spektara u otopinama različitih koncentracija tih iona. Spektri prikazani su na **Slici 27**. Postepenim povećanjem koncentracije Cu^{2+} dolazi do istovremenog povećanja i smanjivanja apsorpcije na 384 nm odnosno na 342 nm . Na 353 nm uočena je izobestična točka, što ukazuje na stvaranje novih vrsta između spoja **TSA** i Cu^{2+} . Iz emisijskog spektra vidljivo je kako porastom koncentracije Al^{3+} dolazi do pojačanja intenziteta fluorescencije, što ukazuje na stvaranje kompleksa između **TSA** i Al^{3+} .²⁵



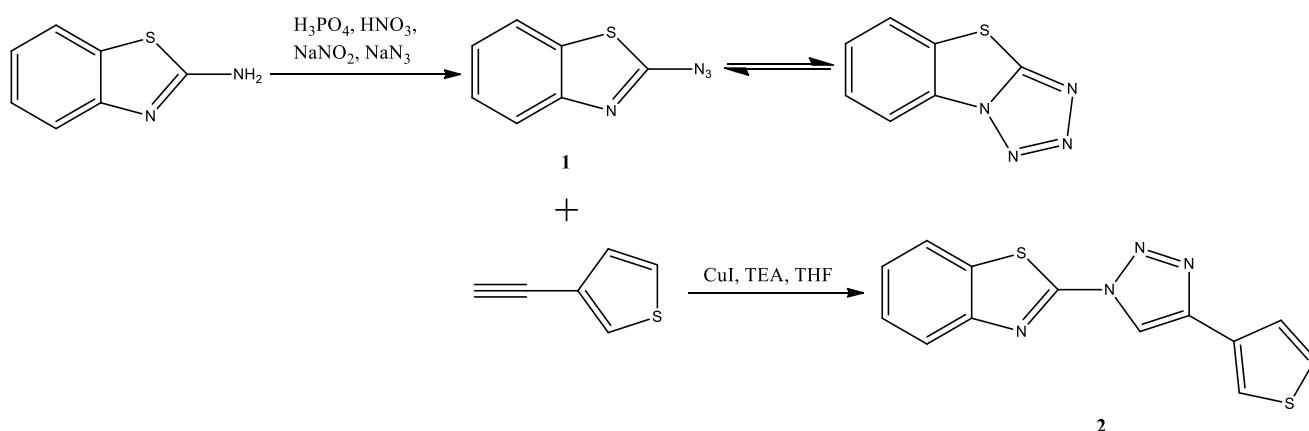
Slika 27. (a) Promjene apsorpcijskog spektra spoja **TSA** (10 μM) obzirom na porast koncentracije Cu²⁺ (0–2,0 eq.) (b) Promjena intenziteta fluorescencije spoja **TSA** (10 μM) obzirom na porast koncentracije Al³⁺ (0–2,0 eq.)²⁵

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Opće napomene

Sve kemijske reakcije provedene su uobičajenim metodama organske sinteze. Tijek kemijskih reakcija praćen je tankoslojnom kromatografijom, TLC (eng. *Thin Layer Chromatography*). Za tankoslojnu kromatografiju (TLC) korištene su ploče 60F-254 prevučene slojem silikagela Merck kao nepokretna faza, a kao pokretna faza korišten je diklormetan (CH_2Cl_2) ili smjesa diklormetan/metanol ($\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{CH}_3\text{OH}$). Za detekciju izoliranih komponenata korištena je UV svjetlost valne duljine 254 i 356 nm. Kolonska kromatografija se provodila na staklenim kolonama punjenim silikagelom (Fluka, 0,063-0,02 mm) pod utjecajem gravitacijske sile u svrhu pročišćavanja reakcijske smjese. Kao eluens korištena su otapala diklormetan, CH_2Cl_2 , a zatim smjesa diklormetan/metanol ($\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{CH}_3\text{OH}$). Spektri ^1H -NMR snimljeni su na spektrometru Bruker 300. Svi spektri snimani su u $\text{DMSO}-d_6$ kao otapalu i mjereni pri 298 K, koristeći tetrametilsilan kao interni standard. Kemijski pomaci (δ) ^1H -NMR i ^{13}C -NMR spektra izraženi su u ppm, a signal DMSO vidljiv je na 2,50 ppm u ^1H -NMR spektru, odnosno na 40 ppm u ^{13}C -NMR spektru. Apsorpcijski spektri snimljeni su na spektrofotometru Varian Cary 50, a fluorescencijski na Cary Eclipse spektrofluorimetru. U oba slučaja korištene su kvarcne kivete promjena 1 cm i volumena 3,0 mL.

3.2. Sinteza spoja



Slika 28. Sintetski put za dobivanje ciljanog spoja

3.2.1. Priprava 2-azido-benzotiazola 1

U okrugloj tikvici otopljeno je 751,3 mg 2-aminobenzotiazola (5,0 mmol, 1,0 eq) u 14,0 mL 85%-tne H_3PO_4 . Reakcijska smjesa ohlađena je u ledenoj kupelji do temperature $0\text{ }^\circ\text{C}$ te je kap po kap, kroz 10 minuta, dodano 2,0 mL koncentrirane HNO_3 (68 %). Pripremljena je vodena otopina NaNO_2 otapanjem 103,1 mg (0,3 eq) u 0,8 mL vode i dodana je reakcijskoj smjesi. Smjesa je miješana uz pomoć magnetske miješalice 65 minuta pri $0\text{ }^\circ\text{C}$. Tijek reakcije praćen je tankoslojnom kromatografijom. Nakon završetka reakcije, pripremljena je vodena otopina NaN_3 otapanjem 146,5 mg NaN_3 (0,45 eq) u 0,4 mL vode i dodana je reakcijskoj smjesi. Reakcijska smjesa miješana je 2,5 hna sobnoj temperaturi. Završetkom reakcije smjesa je neutralizirana dodatkom 4,0 mL 1M NaOH . Dobiveni talog je filtriran i posušen.

3.2.2. Priprava 2-(4-(tiofen-3-il)-1*H*-1,2,3-triazol-1-il)benzo[*d*]tiazola **2**

163,4 mg 2-azidobenzotiazola **1** (1,42 mmol, 1,2 eq) je otopljeno u 7,0 mL tetrahidrofurana (THF). Dodano je 178,1 mg CuI (1,2 eq), i 0,385 ml trietilamina, TEA (3,6 eq). Reakcijska smjesa je miješana i homogenizirana, te je dodano 75,85 μ l 3-etiniltiofena (1,0 eq). Reakcijska smjesa miješana je na temperaturi od 40 °C do potrošnje reaktanta. Reakcija je praćena tankoslojnom kromatografijom. Završetkom reakcija, smjesa je uparena do suha (uklanjanje THF, TEA). Produkt je izoliran kolonskom kromatografijom na silikagelu. Izolirano je 25,9 mg (11,83%) praškastog produkta **2**.

$^1\text{H NMR}$: 9,53 (s, 1H, $\text{H}_{\text{triazol}}$); 8,23 (d, $J=7,92$ Hz, 1H, $\text{H}_{\text{arom.}}$); 8,14 (t, $J=2,01$ Hz, 1H, $\text{H}_{\text{arom.}}$); 8,05 (d, $J=8,04$ Hz, 1H, $\text{H}_{\text{arom.}}$); 7,73 (d, $J=1,98$ Hz, 2H, $\text{H}_{\text{arom.}}$); 7,57 (t, $J=7,14$ Hz, 1H, $\text{H}_{\text{arom.}}$); 7,55 (t, $J=7,17$ Hz, 1H, $\text{H}_{\text{arom.}}$).

3.3. Mjerenje UV-vidljivih apsorpcijskih i fluorescencijskih spektara

3.3.1. Priprava matične (stock) otopine spoja

Matična otopina spoja **2** pripravljena je otapanjem 1,2 mg spoja u 3,0 mL DMSO, a koncentracija tako pripravljene otopine izračunata je pomoću jednadžbe (1):

$$c = \frac{m}{M \times V} \quad (1)$$

gdje je c [mol dm^{-3} , M] koncentracija spoja, M [g mol^{-1}] molarna masa tvari, V [dm^3] volumen otopine, a m [g] masa odvage spoja. Koncentracija matične otopine spoja **2** iznosi $c(\mathbf{2}) = 1,407 \times 10^{-3}$ M.

Mjerne otopine pripravljene su razrjeđenjem matične otopine spoja **2** prema jednadžbi (2):

$$c_1 \times V_1 = c_2 \times V_2 \quad (2)$$

gdje je c_1 [mol dm^{-3} , M] koncentracija matične otopine spoja **2**, V_1 [dm^3] volumen matične otopine spoja **2**, c_2 [mol dm^{-3} , M] koncentracija do koje se matična otopina razrjeđuje i V_2 [dm^3] volumen DMSO.

U eksperimentu korištene su univerzalne puferske otopine u rasponu pH od 1 do 13 te otopine različite polarnosti (dietil-eter, etil-acetat, diklormetan, DMSO, acetonitril, etanol, metanol, voda).

Otopine za mjerenje korištene u izvedbi eksperimenata pripravljene su razrjeđivanjem matične otopine spoja u 3,0 mL otapala.

3.3.2. Opis mjerenja UV-Vis apsorpcijskih i fluorescencijskih spektara

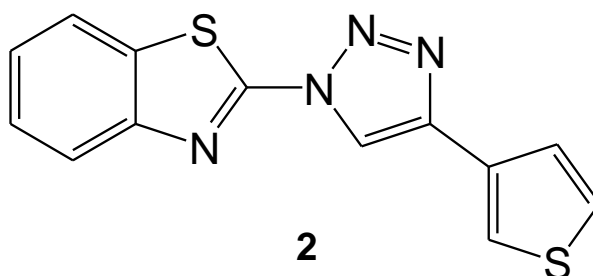
Apsorpcijski spektri spoja u otopinama različitih polarnosti i otopinama univerzalnih pufera snimani su pri koncentraciji spoja $c = 2,0 \times 10^{-5}$ M, a emisijski spektri spoja u istim spomenutim otopinama snimani su pri koncentraciji spoja $c = 5,0 \times 10^{-6}$ M. Otopine su dobivene razrjeđenjem matične otopine spoja. Mjerne otopine pripravljene su dodatkom određenog alikvota matične otopine u kivetu u kojoj se nalazi 3,0 mL otapala (DMSO).

Apsorpcijski spektri snimljeni su u rasponu valnih duljina od 200 do 600 nm. Mjerne otopine pripravljene su u kvarcnoj kiveti optičkog puta 1,0 cm. Prije svakog snimanja spektra, snimljena je bazna linija čistog otapala. Emisijski spektri snimljeni su u rasponu 300 do 800 nm, a valna duljina pobuda odgovara valnoj duljini maksimuma apsorpcije, očitanoj iz snimljenih apsorpcijskih spektara. Pri snimanju emisijskih spektara, ovisno o intenzitetu fluorescencije, potrebno je odabrati određenu širinu otvora (engl. *slit width*) koja određuje rezoluciju spektra, odnosno veličinu ulaznog i izlaznog otvora, koji se označavaju s dva broja izražena u nanometrima, a za provedena mjerenja širina otvora bila je 10-10.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Cilj rada

Cilj ovog rada bio je prirediti novi derivat 1,2,3-triazola i benzotiazola te ispitati spektroskopska svojstva spoja u otopinama različitih polarnosti i pH-vrijednosti. Ciljani spoja pripremljen je metodom "click" kemije. U prvom stupnju pripremljen je odgovarajući azid, a konačni produkt sintetiziran je 1,3-dipolarnom cikloadicijom azida **1** i aromatskog alkina u prisutnosti Cu(I) kao katalizatora. Struktura pripremljenog spoja prikazana na **Slici 29** potvrđena je ¹H-NMR i ¹³C-NMR spektroskopijom. Spektroskopska karakterizacija spoja **2** provedena je UV/Vis i fluorimetrijskom spektroskopijom u otapalima različitih polarnosti i puferkim otopinama.



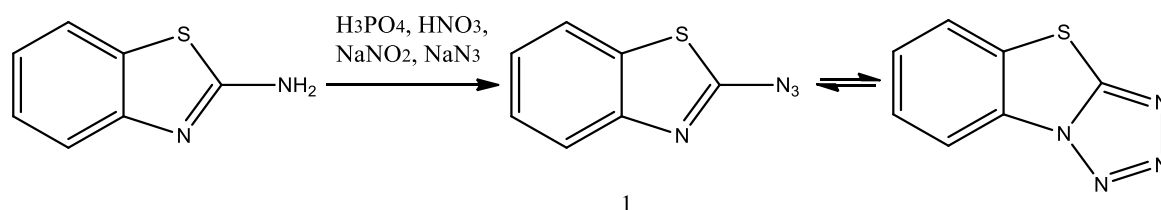
Slika 29. Struktura spoja **2**

4.2. Sinteza spojeva

Za dobivanje spoja **2** bilo je potrebno pripremiti odgovarajući aromatski azid, u ovom slučaju 2-azido-benzotiazol. Kao početni reagens korišten je 2-aminobenzotiazol.

4.2.1. Priprava 2-azido-benzotiazola

2-azido-benzotiazol **1** pripremljen je u smjesi koncentrirane fosforne i dušične kiseline uz dodatak NaNO₂ i NaN₃, kako je prikazano na **Slici 30**.

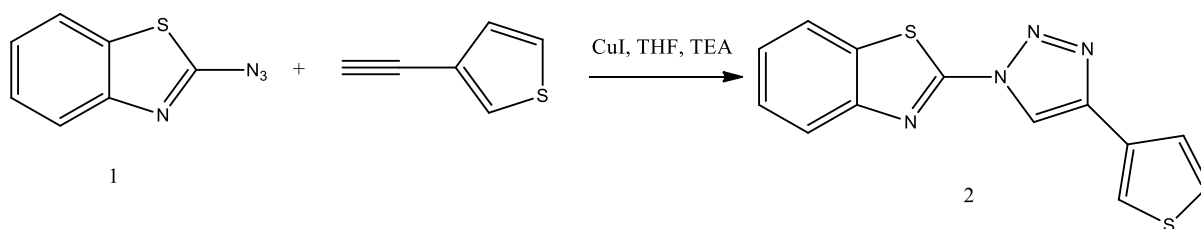


Slika 30. Shematski prikaz sinteze 2-azido-benzotiazola koji je u ravnoteži s tetrazolom

Reakcija primarnih amina s dušikastom kiselinom zove se diazotiranje. Kao reagens za diazotiranje koristi se sol dušikaste kiseline, najčešće natrijev nitrit. H^+ ion kiseline, u kojoj je amin otopljen, i nitritni ion stvaraju nedisociranu dušikastu kiselinu, koja prije raspadanja reagira s primarnim aminom prevodeći ga u diazonijevu sol.²⁶ Izlaganjem diazonijeve soli azidnom ionu dolazi do nukleofilne aromatske supstitucije te kao produkt nastaje odgovarajući azid.²⁷

4.2.2. Priprava 2-(4-(tiofen-3-il)-1H-1,2,3-triazol-1-il)benzo[d]tiazola

Konačni produkt sintetiziran je "click" reakcijom odgovarajućeg alkina i azida (spoj **1**) uz Cu^+ kao katalizator, tj. CuAAC reakcijom. Kao izvor Cu^+ za 1,3-dipolarnu cikloadicijsku reakciju korišten je CuI. Shematski prikaz sinteze spoja **2** prikazan je na **Slici 31**.

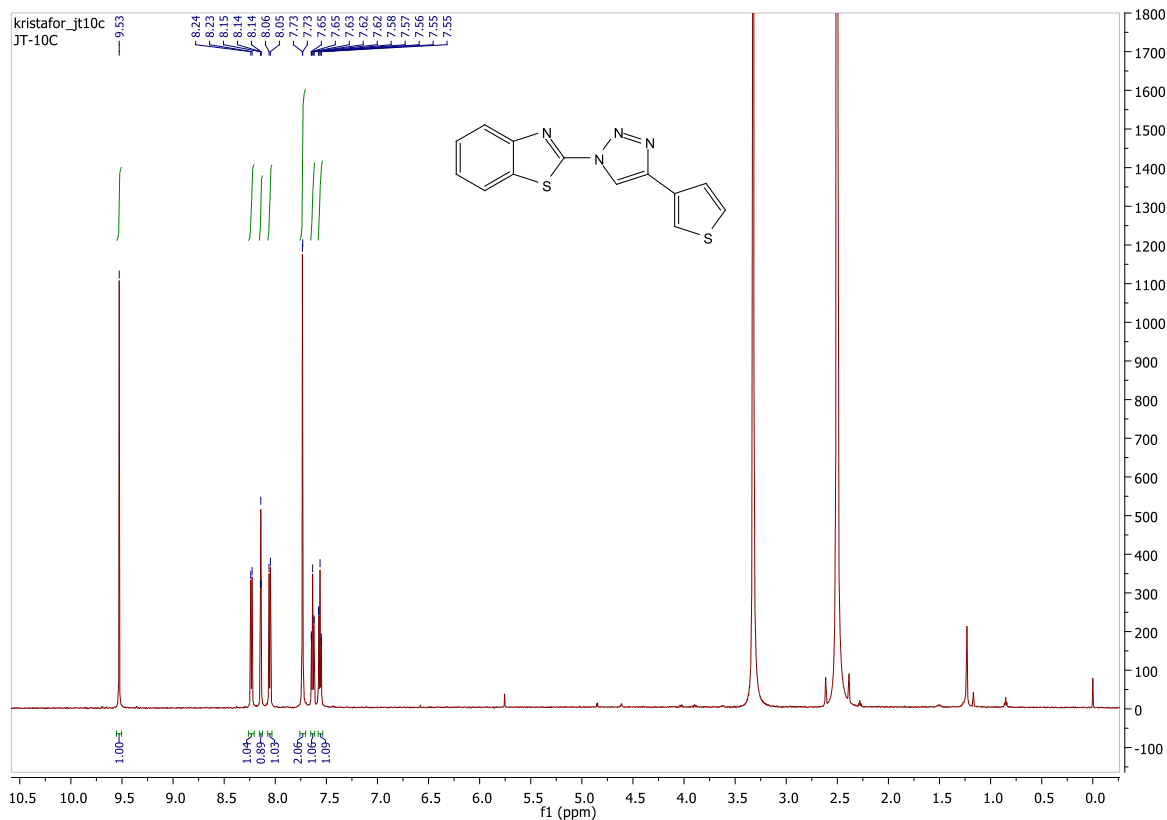


Slika 31. Shematski prikaz sinteze spoja **2**

Reakcija je provedena uz konstantno miješanje pri 40 °C do potrošnje reaktanta. Produkt je izoliran kolonskom kromatografijom u iskorištenju 11,83%.

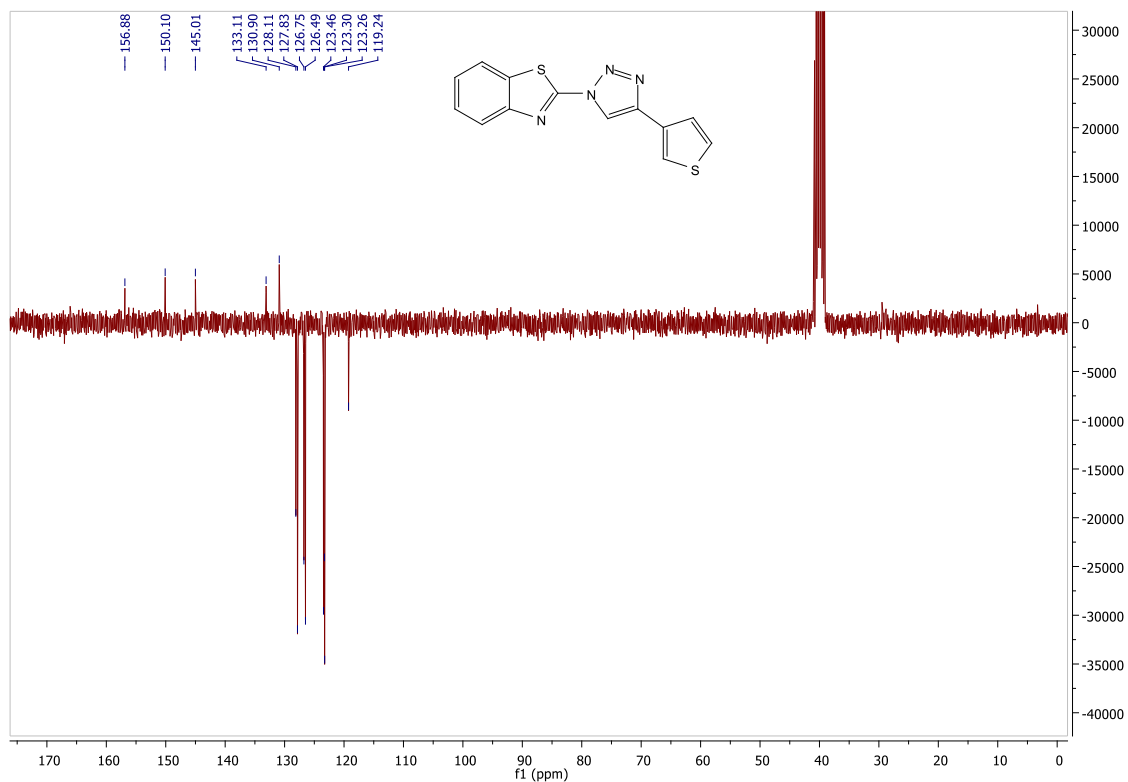
4.3. Analiza NMR spektara

Na **Slici 32** prikazan je ^1H -NMR spektar spoja **2**. U prikazanom spektru spoja **2** vidljiv je singlet na 9,53 ppm koji odgovara protonu 1,2,3-triazola. U aromatskom dijelu spektra od 7,55 – 8,24 ppm vidljivi su signali koji odgovaraju protonima benzotiazola i tiofena.



Slika 32. ^1H -NMR spektar spoja **2**

Na **Slici 33**, prikazan je ^{13}C -NMR spektar spoja **2**. U ^{13}C -NMR spektru vidljivi su samo signali aromatskih ugljikovih atoma, i to pet signala od 130,90 do 156,88 ppm koji odgovaraju kvaternim ugljicima (C), te osam signala u području od 119,24 do 128,11 ppm koji odgovaraju CH ugljikovim atomima molekule.



Slika 33. ^{13}C -NMR spektar spoja 2

4.4. Karakterizacija spoja UV-Vis i fluorescencijskom spektroskopijom

Spoj 2 u svojoj strukturi sadrži benzotiazol i 1,2,3-triazol, koji su česte strukture u senzorskim molekulama. Prema tome provedena su ispitivanja spektroskopskih karakteristika spoja u različitim otapalima i u otopinama pufera različitih pH vrijednosti.

Benzotiazol je termički stabilna heterociklična molekula elektron-akceptorskog karaktera, radi čega se opsežno istražuju funkcionalni derivati benzotiazola s D- π -A strukturom. Molekule koje u strukturi sadrže benzotiazol kao elektron-akceptor imaju relativno velike Stokesove pomake, što je jedno od poželjnih svojstava potencijalnih kemosenzora.²⁸

1,2,3-triazol se često koristi kao π -poveznica u molekulama D- π -A strukture, ali utvrđeno je kako 1,2,3-triazol također pridonosi ukupnim fizikalnim i kemijskim svojstvima cijele molekule.²⁹

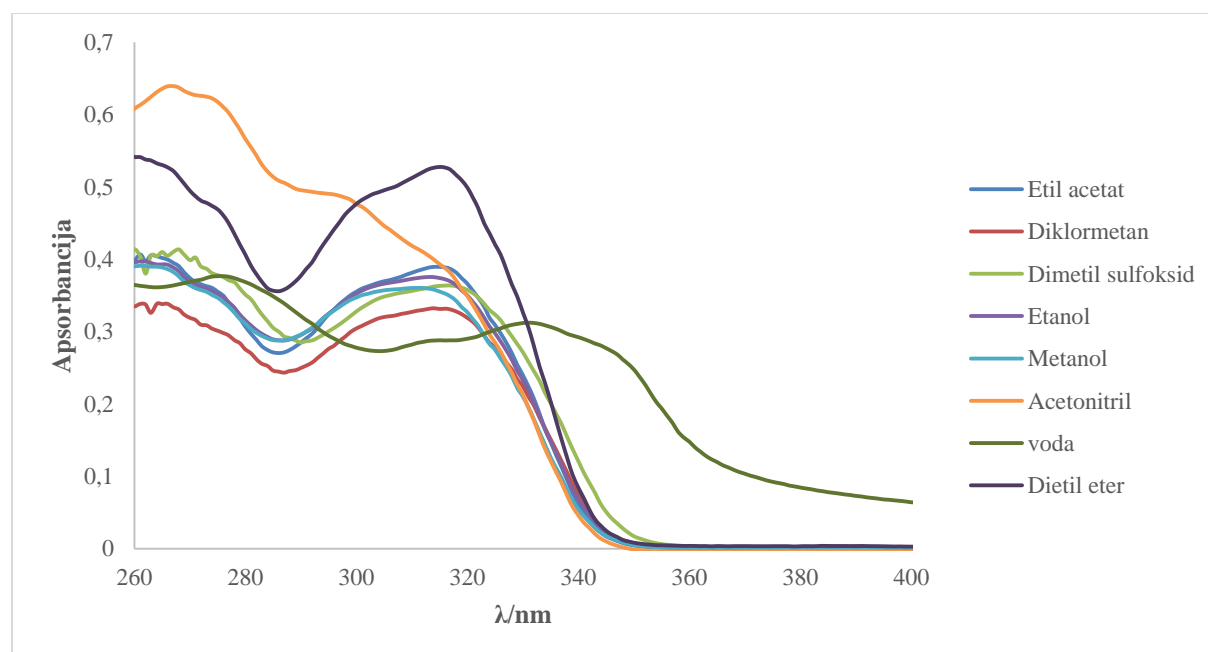
4.4.1. Ovisnost spektara o polarnosti otapala

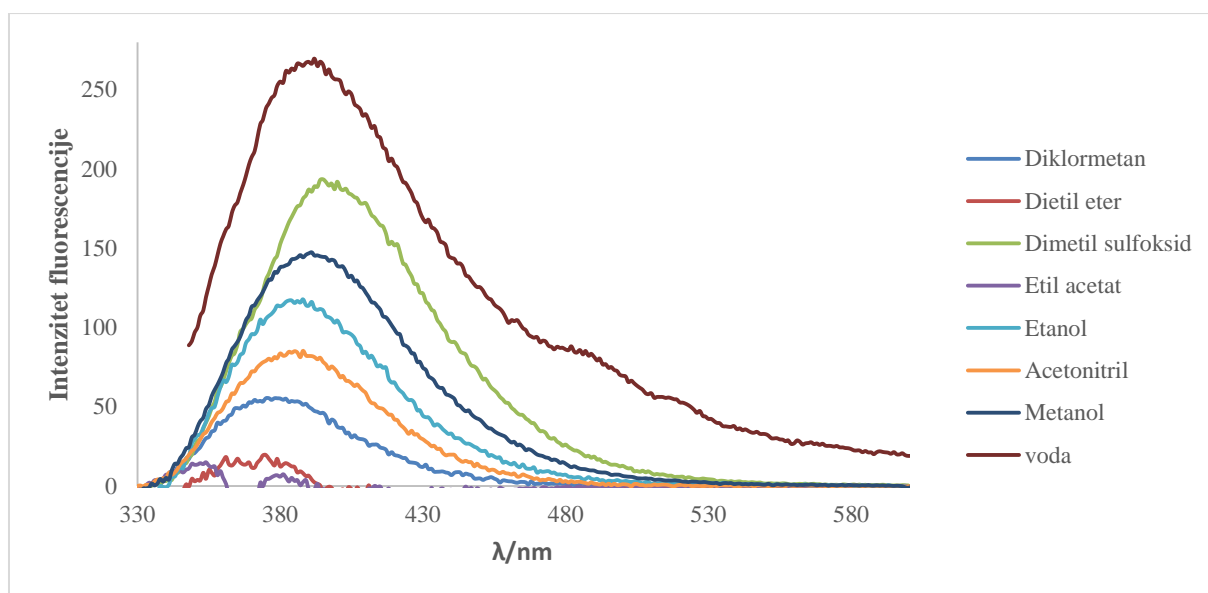
Push-pull solvatofluorokromna bojila su klasa molekula osjetljivih na polarnost medija u kojem su otopljene. Dok solvatokromna bojila mijenjaju boju u ovisnosti na polarnost okolnih, solvatofluorokromna bojila odlikuje promjena maksimuma emisije u ovisnosti o polarnosti medija. Zabilježen je niz bojila temeljenih na derivatima benzotiazola.³⁰ Obzirom na strukturu spoja **2**, mjereni su apsorpcijski i emisijski spektri u ovisnosti o polarnosti otapala. U **Tablici 1** su prikazana korištena otapala te njihove $E_T(30)$ vrijednosti.

Tablica 1. Odabrana otapala različite polarnosti

otapalo	Dietil eter	Etil acetat	CH ₂ Cl ₂	DMSO	MeCN	EtOH	MeOH	H ₂ O
$E_T(30)/$ (kcal mol ⁻¹)	34,5	38,1	40,7	45,1	45,6	51,9	55,4	63,1
$E_T^N(30)$	0,117	0,228	0,309	0,444	0,460	0,654	0,760	1,000

Apsorpcijski i emisijski spektri spoja **2** o polarnosti otapala prikazani su na **Slici 34** odnosno na **Slici 35**.

**Slika 34.** UV-Vis spektri spoja **2** u otapalima različite polarnosti



Slika 35. Emisijski spektri spoja **2** u otapalima različite polarnosti

Spoj **2** pokazuje dva apsorpcijska maksimuma, pri valnim duljinama od 270 nm i 315 nm, dok je kod acetonitrila vidljiv samo maksimum pri 270 nm. Najveća apsorbanacija zabilježena je kod acetonitrila s jednim maksimumom i kod dietil etera s dva maksimuma. Uočen je batokromni pomak maksimuma pri 315 nm kod vode. Iz apsorpcijskih spektara nije moguće zaključiti nikakav trend.

Na emisijskim spektrima spoja **2** pojavljuje se jedan maksimum intenziteta fluorescencije pri 380 nm. Rastom polarnosti (što je $E_T(30)$ veći, to je otapalo polarnije) otapala dolazi do batokromnog i hiperkromnog pomaka maksimuma, izuzev dimetil sulfoksida i etil acetata koji ne prate taj trend.

U **Tablici 2** su prikazana spektrofotometrijska svojstva spoja **2** u pojedinim otapalima, odnosno valne duljine maksimuma apsorpcije i emisije, pripadajuće apsorbanacije i intenzitet emitirane svjetlosti. ϵ je molarni apsorpcijski koeficijent, izračunat iz Lambert-Beerova zakona prema izrazu:

$$Abs = c \times l \times \epsilon \quad (3)$$

Stokesov pomak predstavlja razliku između valnih duljina maksimuma emisije i apsorpcije.

Najmanji Stokesov pomak zabilježen je kod etil acetata i iznosi 38 nm, a najveći kod acetonitrila i iznosi 122 nm. Iz dobivenih rezultata možemo uočiti kako ne postoji ovisnost Stokesovih pomaka o polarnosti otapala. Za daljnju primjenu spoja **2** kao solvatofluorokromnog bojila trebalo bi se provesti ispitivanje ovisnost intenziteta fluorescencije o polarnosti otapala koristeći se različitim otapalima. Smatram kako bi bilo korisno provesti ispitivanje spoja **2** kao potencijalnog kemosenzora za određivanje acetonitrila.

Tablica 2. Valna duljina maksimuma apsorpcije, molarni apsorpcijski koeficijent, Stokesov pomak, valna duljina maksimuma emisije, intenzitet fluorescencije spoja u različitim otapalima

Otapalo	λ_{abs} / nm	Apsorbancija	$\epsilon/\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$	λ_{emis} / nm	Intenzitet fluorescencije	Stokesov pomak / nm
dietil eter	316	0,527	26350	378	55,36	62
	265	0,530				
etil acetat	315	0,390	19500	353	13,76	38
	264	0,404	20200			
diklormetan	315	0,331	16550	375	19,50	60
	265	0,338	16900			
DMSO	318	0,362	18100	395	139,50	77
	268	0,414	20700			
acetonitril	267	0,640	32000	389	82,25	122
etanol	315	0,375	18750	388	118,0	73
	262	0,398	19900			
metanol	312	0,360	18000	393	145,5	81
	262	0,391	19550			
voda	332	0,312	15600	394	269,78	62
	277	0,376	18800			

4.4.2. Utjecaj promjene pH vrijednosti

Promjena spektrofotometrijskih svojstava ispitivanih spojeva uzrokovana promjenom pH vrijednosti otopine ključno je svojstvo optičkih pH senzora. Kako bi se ispitala mogućnost primjene spojeva kao optičkih pH kemosenzora, ispitana je promjena njihovih spektroskopskih svojstava ovisno o vrijednosti pH otopine korištenjem UV/Vis spektroskopije.

pK_a vrijednost je bitno svojstvo optičkog pH senzora jer određuje dinamičko područje u kojem je moguće određivati pH. pK_a vrijednost optičkog senzora predstavlja pH vrijednost u kojem senzor postiže ravnotežu te je u blizini pK_a senzor najosjetljiviji na promjenu pH otopine. Kiselo-bazna svojstva senzora okarakterizirana su pK_a vrijednošću koja se određuje spektrofotometrijski ili spektrofluometrijski. Koncentracija $[H^+]$ i $[OH^-]$ iona se određuju na temelju Henderson–Hasselbach-ove jednadžbe (4):

$$pH = pKa + \log \frac{[A^-]}{[HA]} \quad (4)$$

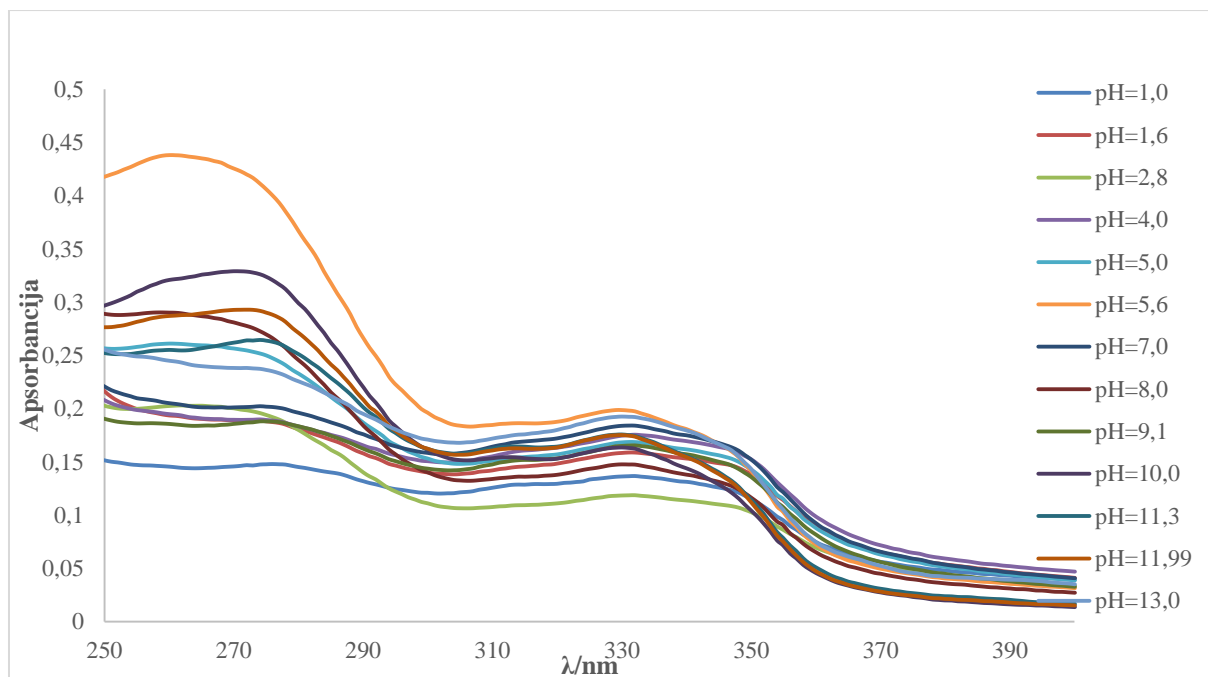
pK_a vrijednost može se odrediti računski i grafički. Grafičko određivanje se temelji na titracijskoj tzv. S krivulji gdje je prikazana ovisnost pH o određenom mjerenom svojstvu. Računski se može odrediti iz tzv. Boltzmanove funkcije (5), gdje je dana ovisnost apsorbancije ili emisije pri točno određenoj valnoj duljini i pH vrijednost:

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

Iz prikazane funkcije izračuna se točka infleksija, x_0 koja odgovara vrijednosti pK_a .³¹

Snimljeni su apsorpcijski spektri spoja **2** u otopinama univerzalnih pufera različitih vrijednosti pH, te otopinama HCl (pH=1) i NaOH (pH=13), a dobiveni rezultati prikazani su na **Slici 36**.

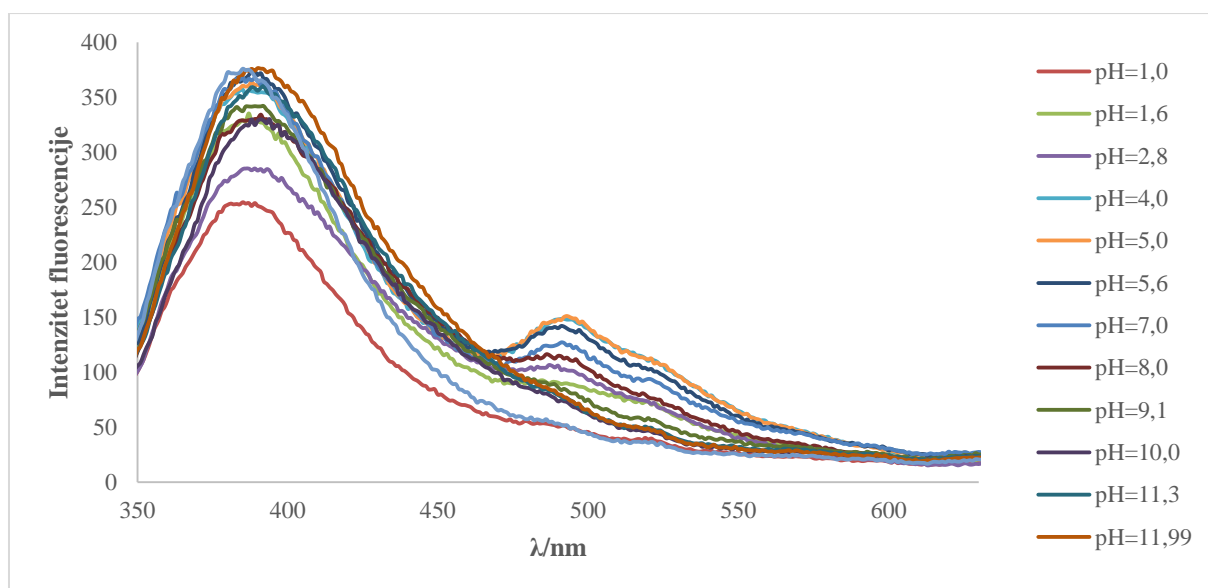
Spoj **2** pokazuje dva apsorpcijska maksimuma, pri valnim duljinama od 275 nm i 330 nm u kiselom, neutralnom i lužnatom području, dok je pri pH=1 vidljiv samo maksimum na 330 nm. Povećanjem pH vrijednosti od 8 do 12, povećava se apsorbancija spoja pri 330 nm, a pri ostalim vrijednostima nisu uočene značajne promjene koje bi mogle biti od primjene.



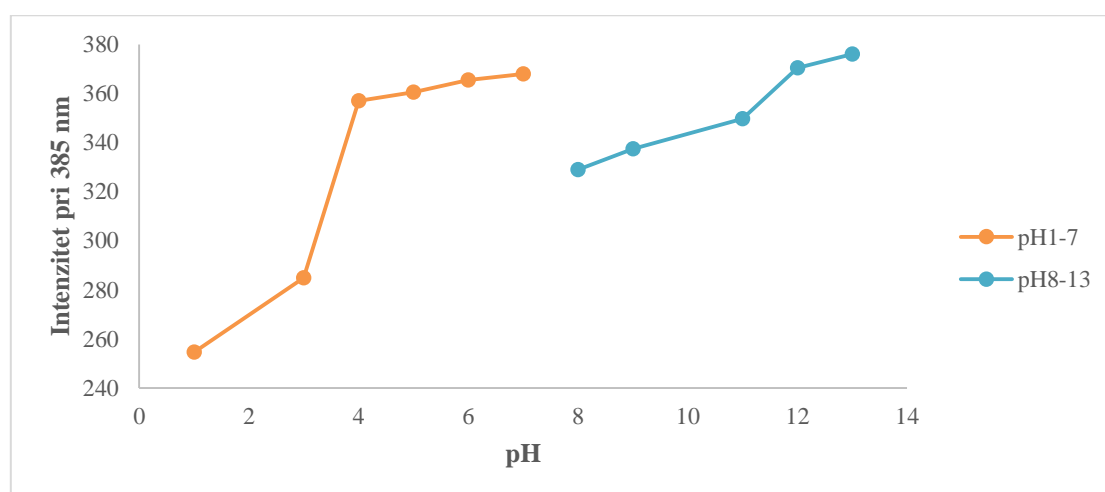
Slika 36. UV-Vis spektri produkta u univerzalnim puferima u rasponu pH vrijednosti 2-12, te otopini HCl pH=1 i NaOH pH=13

Snimljeni su emisijski spektri spoja **2** u otopinama univerzalnih pufera različitih vrijednosti pH, te otopinama HCl (pH=1) i NaOH (pH=13), a dobiveni rezultati prikazani su na **Slici 37**.

Na emisijskim spektrima spoja **2** uočena su dva maksimuma intenziteta fluorescencije pri 385 i 489 nm. Porastom pH vrijednosti od 1 do 7, dolazi do rasta intenziteta fluorescencije na 385 nm, a u blago lužnatom mediju (pH=8,0) dolazi do naglog pada intenziteta, nakon čega ponovno raste do pH=13,0. Na **Slici 38** prikazana je ovisnost intenziteta fluorescencije pri 385 nm o pH vrijednosti, a na sljedećim grafovima (**Slika 38**) razdvojeno je područje iznad i ispod pH=7 iz čega su određene približne pKa vrijednosti za ispitivani spoj.

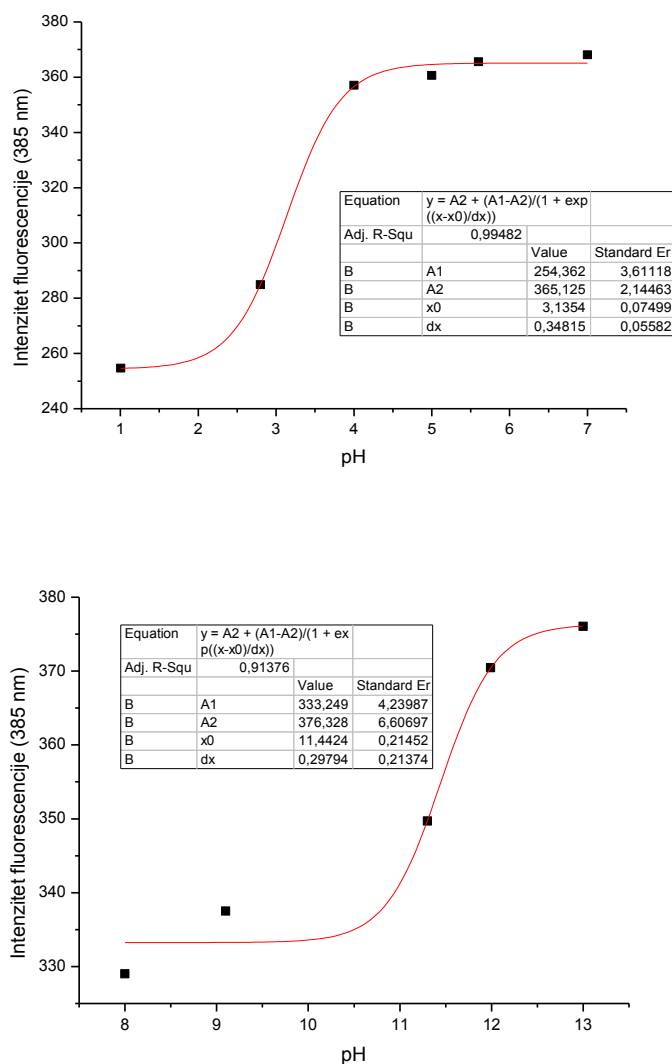


Slika 37. Emisijski spektri produkta u univerzalnim puferima u rasponu pH vrijednosti 2-12, te otopini HCl pH=1 i NaOH pH=13



Slika 38. Intenzitet fluorescencije pri 385 nm u ovisnosti o pH vrijednosti pufera

Iz ovisnosti intenziteta fluorescencije o pH vrijednosti medija, moguće je primjenom Boltzmanove funkcije eksperimentalno odrediti pKa vrijednosti spoja. S obzirom na dvije točke infleksije, eksperimentalno su određene vrijednosti pKa i iznose 3,1 i 11,4.



Slika 38. Sigmoidalne krivulje odziva na promjenu pH primjenom Boltzmanove funkcije: ovisnost omjera apsorbancije spoja na valnim duljinama maksimuma pri 385 nm o vrijednosti pH za područje pH 1-7 (gore) i pH 8-13 (dolje)

Iz dobivenih rezultata može se pretpostaviti kako bi se dobiveni spoj **2** mogao koristiti za određivanje pH u kiselom mediju. U lužnatom mediju postoje veća odstupanja, što bi moglo ograničavati primjenu spoja. Za daljnju primjenu trebalo bi se provesti ispitivanje ovisnost intenziteta fluorescencije u drugim puferima, ne samo univerzalnim, u rasponu $\text{pH} < 7$ s više točaka. Unatoč velikom odstupanjima u lužnatom mediju, smatram kako bi bilo korisno provesti ispitivanje u rasponu $\text{pH} > 7$.

Benziazolni derivati te derivati 1,2,3-triazola su prikladni kao potencijalni kemosenzori radi atoma dušika koji se nalazi u njihovoj strukturi. Dušik posjeduje slobodni elektronski par pa se može pretpostaviti da na tom mjestu dolazi do protoniranja.

5. ZAKLJUČAK

Kemosenzori su se pokazali kao bolja alternativa u odnosu na pojedine klasične analitičke metode te je bitan razvoj kemosenzora. Njihova primjena uvelike doprinosi napretku pojedinih znanstvenih polja. Sinteza kemosenzora najčešće se provodi "click" reakcijama alkina i odgovarajućih azida. Derivati benzotiazola su se pokazali kao obećavajući potencijalni kemosenzori zbog elektron-akceptorskog karaktera, osjetljivosti na metalne katione i pH. Kao π -poveznice najčešće se koristi 1,2,3-triazol, koji također može utjecati na fizikalna i kemijska svojstva kemosenzora.

Konačni produkt dobiven je 1,3-dipolarnom cikloadicijom iz 2-azidobenzotiazola i odgovarajućeg alikna uz Cu^+ kao katalizator. Kao izvori Cu^+ korišten je CuI . Struktura novopripremljenog spoja potvrđena je $^1\text{H-NMR}$ i $^{13}\text{C-NMR}$ spektroskopijom.

Provedena je spektroskopska karakterizacija kako bi se ispitala potencijalna primjena spoja **2** kao kemosenzorska molekula primjenjujući UV/Vis apsorpcijsku i fluorescencijsku spektroskopiju pri koncentraciji spoja $c = 2,0 \times 10^{-5}$ M odnosno $c = 1,0 \times 10^{-6}$ M. Ispitivane su promjene UV-Vis apsorpcijskih i emisijskih spektara spoja **2** u otapalima različitih polarnosti te u univerzalnim puferkim otopinama različitih pH vrijednosti. Zabilježen je trend ovisnosti intenziteta fluorescencije i valne duljine maksimuma o polarnosti otapala. Također je zabilježen veliki Stokesov pomak kod acetonitrila i iznosi 122 nm. Uočena su dva emisijska maksimuma spoja **2** pri 385 nm i 489 nm u otopinama različitih pH vrijednosti. Grafički je prikazana ovisnost intenziteta fluorescencije pri 385 nm u ovisnosti o pH vrijednosti otopine te su vidljive dvije S krivulje. Korištenjem Boltzmanove funkcije, opisana je ovisnost intenziteta fluorescencije spoja **2** o pH vrijednosti otopine, te su eksperimentalno određene pKa vrijednosti spoja **2** i iznose 3,1 i 11,4.

Za potencijalnu primjenu spoja **2** kao solvatofluorokromnog bojila potrebno je provesti daljnje ispitivanje ovisnosti intenziteta fluorescencije i valne duljine maksimuma o polarnosti otapala.

Za potencijalnu primjenu spoja **2** kao kemosenzora za određivanje acetonitrila potrebno je provesti ispitivanje spektroskopskih svojstva spoja **2** u acetonitrilu.

Za potencijalnu primjenu spoja **2** kao kemosenzora za određivanje pH vrijednosti potrebno je provesti dodatna ispitivanja, primjerice provesti ispitivanje ovisnosti intenziteta fluorescencije u drugim puferima, ne samo univerzalnim, u rasponu $\text{pH} < 7$ s više točaka.

6. LITERATURA

1. Karnaš, M., Pisac, S., Veić, A., M., Sakač, N., Biosensors for monitoring heavy metals and toxic compounds in environment, Odjel za kemiju, Sveučilište J.J. Strossmayera u Osijeku, Međimursko veleučilište u Čakovcu, (2015) 1 – 8.
2. Hulanicki, A., Glab, S., Ingman, F., Chemical sensors definitions and classification, *Pure and Appl. Chem.*, 63 (1991) 1248 – 1250.
3. Thévenot, D. R., Toth, K., Durst, R. A., Wilson, G., S., Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification, *Biosensors and Bioelectronics*, 16(1-2), (2001) 121 – 131.
4. Parkesh, R., Veale, E., B., Gunnlaugsson, T., *Fluorescent Detection Principles and Strategies* u Wang, B., Anslyn, E.V., *Chemosensors: principles, strategies, and applications*, John Wiley & Sons, Inc., New Jersey, (2011) 229 – 252
5. Zhang, J., X., J., & Hoshino, K., *Introduction to Molecular Sensors. Molecular Sensors and Nanodevices*, *Molecular sensors and nanodevices*, (2014). 1 – 42
6. Wencel, D., Abel, T., & McDonagh, C., *Optical Chemical pH Sensors. Analytical Chemistry*, 86(1), (2013) 1 – 15
7. Tan, Y., Yu, J., Gao, J., Cui, Y., Wang, Z., Yang, Y., Qian, G., A fluorescent pH chemosensor for strongly acidic conditions based on the intramolecular charge transfer (ICT) effect. *RSC Advances*, 3(15), (2013) 4872
8. Kim, H. N., Swamy, K. M. K., Yoon, J., Study on various fluorescein derivatives as pH sensors. *Tetrahedron Letters*, 52(18), (2011) 2340–2343
9. Liu, X.-D., Xu, Y., Sun, R., Xu, Y.-J., Lu, J.-M., Ge, J.-F., A coumarin–indole-based near-infrared ratiometric pH probe for intracellular fluorescence imaging., *The Analyst*, 138(21), 6542. (2013) 1 – 9.
10. Čaleta, I., Karminski-Zamola, G., *Sinteza i biološko djelovanje supstituiranih derivata benzotiazola*, *Kemija u industriji*, 6 (2008) 307-319.
11. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Benzothiazole> (pristup 10.09.2020.)
12. Li, J., J., *Heterocyclic Chemistry in Drug Discovery*, (2013) 283-328.
13. Chun, S., Yang, S., Chung, Y., K., Synthesis of benzothiazoles from 2-aminobenzenethiols in the presence of a reusable polythiazolium precatalyst under atmospheric pressure of carbon dioxide, *73(25)* (2017) 3438-3442.

14. Keri, R., S., Patil, M., R., Patil, S., A., Budagumpi, S., A comprehensive review in current developments of benzothiazole-based molecules in medicinal chemistry. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 89, (2015) 207 – 251.
15. Wang, F., Nam, S., W., Guo, Z., Park, S., Yoon, J., A new rhodamine derivative bearing benzothiazole and thiocarbonyl moieties as a highly selective fluorescent and colorimetric chemodosimeter for Hg²⁺. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 161(1) (2012) 948–953.
16. Bansal, D., Gupta, R., Chemosensors containing appended benzothiazole group(s): selective binding of Cu²⁺ and Zn²⁺ ions by two related receptors. *Dalton Transactions*, 45(2), (2016) 1 – 6.
17. Kumar, Kumar, Sahoo, Kumar, Colorimetric and Fluorescence-Based Detection of Mercuric Ion Using a Benzothiazolinic Spiropyran, (2019) 1 – 18.
18. Ji Ram, V., Sethi, A., Nath, M., Pratap, R., *The Chemistry of Heterocycles*, (2019) 149–478.
19. Wamhoff, H., 1,2,3-Triazoles and their Benzo Derivatives. *Comprehensive, Heterocyclic Chemistry*, (1984) 669–732.
20. <https://www.organic-chemistry.org/namedreactions/click-chemistry.shtm>
(pristup 14.9.)
21. Bryant, J., J., Bunz, U., H., F., Click To Bind: Metal Sensors., *Chemistry - An Asian Journal*, 8(7), (2013) 1354 – 1367.
22. Liang, L., Astruc, D., The copper(I)-catalyzed alkyne-azide cycloaddition (CuAAC) “click” reaction and its applications. An overview. *Coordination Chemistry Reviews*, 255(23-24), (2011) 2933 – 2945.
23. Cornec, A., S., Baudequin, C., Fiol-Petit, C., Plé, N., Dupas, G., Ramondenc, Y., One “Click” to Access Push-Triazole-Pull Fluorophores Incorporating a Pyrimidine Moiety: Structure-Photophysical Properties Relationships. *European Journal of Organic Chemistry*, 2013(10), 1908–1915.
24. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Thiophene#section=Structures>
(pristup 14.9.)
25. Yin, P., Niu, Q., Wei, T., Li, T., Li, Y., Yang, Q., A new thiophene-based dual functional chemosensor for ultrasensitive colorimetric detection of Cu²⁺ in aqueous solution and highly selective fluorimetric detection of Al³⁺ in living cells., *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 112249., (2019) 1 – 9.

26. Rapić, V., Postupci priprave i izolacije organskih spojeva, Školska knjiga, Zagreb, (2008) 73 – 74.
27. Joshi, S., M., de Cózar, A., Gómez-Vallejo, V., Kozirowski, J., Llop, J., Cossío, F., P., Synthesis of radiolabelled aryl azides from diazonium salts: experimental and computational results permit the identification of the preferred mechanism. *Chemical Communications*, 51(43), (2015) 8954.
28. Ji, S., Shigeta, M., Niko, Y., Watanabe, J., Konishi, G., Synthesis of highly soluble fluorescent π -extended 2-(2-thienyl)benzothiazole derivatives via oxidative cyclization of 2-thienylthioanilide as the key step. *Tetrahedron Letters*, 54(52), (2013) 7103–7106.
29. Gavlik, K., D., Sukhorukova, E., S., Shafran, Y., M., Slepukhin, P., A., Benassi, E., & Belskaya, N. P., 2-Aryl-5-amino-1,2,3-triazoles: New effective blue-emitting fluorophores. *Dyes and Pigments*, 136 (2017) 229–242.
30. Safir Filho, M., Fiorucci, S., Martin, A., R., Benhida, R., Design, synthesis and photophysical studies of styryl-based push–pull fluorophores with remarkable solvatochromism. *New Journal of Chemistry*, 41(22) (2017) 13760–13772.
31. Hranjec, M., Horak, E., Babić, D., Plavljanin, S., Srdovic, Z., Murković Steinberg, I., Vianello, R., Perin, N., Fluorescent benzimidazo[1,2-a]quinolines: synthesis, spectroscopic and computational studies of protonation equilibria and metal ion sensitivity, *New Journal of Chemistry*, 41 (2017) 358.

ŽIVOTOPIS

Jakov Tenžera [REDACTED] Živi u Zagrebu gdje je završio srednju školu XVIII. gimnaziju Zagreb. Po završetku srednje škole, 2016. upisuje fakultet Kemijskog inženjerstva i tehnologije u Zagrebu. 2020. odradio je stručnu praksu u Metalnoj galanteriji Vučetić.