

Derivati iminokumarina kao potencijalni fluorescentni pH senzori

Martinović, Andrea

Undergraduate thesis / Završni rad

2015

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:149:380350>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-25**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Andrea Martinović

**DERIVATI IMINOKUMARINA KAO POTENCIJALNI
FLUORESCENTNI pH SENZORI**

Voditelj rada: dr. sc. Lidija Furač, viša predavačica

Članovi ispitnog povjerenstva: dr. sc. Lidija Furač, viša predavačica

dr. sc. Nataša Perin, poslijedoktorand

dr. sc. Petar Kassal, poslijedoktorand

Zagreb, rujan 2015.

Na početku bih se zahvalila svim djelatnicima na Zavodu za opću i anorgansku kemiju te Zavodu za organsku kemiju. Zahvaljujem se dr.sc. Lidiji Furač na mentorstvu i podršci pri izradi završnog rada. Ponajviše se zahvaljujem asistentici mag.appl.chem Emi Horak na uloženom vremenu, iznimnom strpljenju, te velikoj motivaciji i konstantnoj pomoći koja mi je bila potrebna za izradu ovog završnog rada. Također, veliko hvala mojim roditeljima, rodbini i prijateljima.

SAŽETAK

Svrha ovog rada jest optička karakterizacija kiselo-baznih svojstava novih derivata iminokumarina u otopinama s ciljem utvrđivanja njihove potencijalne senzorske primjene. Ovim radom određen je utjecaj strukture na svojstva spojeva 2-imino-3-(2-*N*-metilbenzimidazolil)kromen (**IM1**), 7-*N,N*-dietilamino-2-imino-3-(2-*N*-metilbenzimidazolil)kromen (**IM2**) i 7-*N,N*-dietilamino-2-imino-3-(2-*N*-5-nitro-1*H*-benzimidazolil)kromen (**IM3**) te je procijenjena njihova primjenjivost u senzorima za pH. Ispitivani spojevi spektralno su okarakterizirani u univerzalnom puferu i/ili etanolnim otopinama u rasponu vrijednosti pH od 1,00 do 13,00 primjenom UV-vidljive fluorescencijske i apsorpcijske spektrofotometrije. Također, utvrđen je utjecaj otapala na kiselo-bazna i spektralna svojstva ispitivanih spojeva.

Spektrofotometrijskom karakterizacijom u otopinama utvrđeno je da se spomenuti derivati iminokumarina mogu koristiti kao potencijalni fluorescentni pH senzori. Točnije, karakterizacijom kiselo-baznih svojstava pokazalo se kako su spojevi 2-imino-3-(2-*N*-metilbenzimidazolil)kromen (**IM1**) i 7-*N,N*-dietilamino-2-imino-3-(2-*N*-metilbenzimidazolil)kromen (**IM2**) puno bolji pH senzori od 7-*N,N*-dietilamino-2-imino-3-(2-*N*-5-nitro-1*H*-benzimidazolil)kromena (**IM3**). Važno je također spomenuti da su spomenuti spojevi okarakterizirani na Zavodu za opću i anorgansku kemiju kao potencijalne solvatokromne probe te kao optički senzori u otopinama i plastificiranoj polimernoj matrici.

Ključne riječi:

- pH senzori
- Fluorescencija i apsorpcija
- Derivati iminokumarina

SUMMARY

The main idea of this work is the characterisation of novel iminocoumarine derivatives in order to determine their applicability as pH sensors. Structure – property relation and effect of pH is determined for compounds 2-imino-3-(2-*N*-methylbenzimidazolyl)chromen (**IM1**), 7-*N,N*-diethylamino-2-imino-3-(2-*N*-methylbenzimidazolyl)chromen (**IM2**) and 7-*N,N*-diethylamino-2-imino-3-(2-*N*-5-nitro-1*H*-benzimidazolyl)chromen (**IM3**). Compounds were characterised in the universal buffer solutions and/or ethanol solutions in the pH range 1,00 to 13,00 by UV-Visible fluorescence and absorption spectrophotometry. Also, effect of solvent on acid - base properties of examined compounds was investigated.

Examined iminocoumarine derivatives can be used as a potential fluorescent pH sensors. It has been shown that compounds 2-imino-3-(2-*N*-methylbenzimidazolyl)chromen (**IM1**) and 7-*N,N*-diethylamino-2-imino-3-(2-*N*-methylbenzimidazolyl)chromen (**IM2**) are better pH sensors than 7-*N,N*-diethylamino-2-imino-3-(2-*N*-5-nitro-1*H*-benzimidazolyl)chromen (**IM3**). Also, it is important to mention that investigated compounds are previously characterised as a potential solvatochromic probes and optical sensors in solutions and polymer matrices.

Key words:

- fluorescent pH sensors
- fluorescence and absorbance
- iminocoumarine derivatives

SADRŽAJ

1. Uvod.....	1
2. Opći dio.....	3
2.1. Kemijski senzori.....	4
2.1.1. Optički kemijski senzori.....	5
2.1.1.1. UV-vidljiva apsorpcijska spektroskopija.....	6
2.1.1.2. Fluorescencijska spektroskopija.....	8
2.2. pH senzori.....	11
2.2.1. Fluorescentni pH senzori.....	12
2.3. Iminokumarin i derivati iminokumarina.....	14
2.3.1. Derivati iminokumarina kao pH senzori.....	15
3. Eksperimentalni dio.....	19
3.1. Materijali.....	20
3.2. Instrumenti.....	21
3.3. Priprava otopina.....	23
3.3.1. Priprava matičnih (<i>stock</i>) otopina.....	23
3.3.2. Priprava otopina univerzalnog pufera.....	24
3.3.3. Priprava etanolnih otopina različitih vrijednosti pH.....	24
3.4. Spektralna karakterizacija ispitivanih spojeva u otopini.....	25
3.4.1. Snimanje UV-vidljivih fluorescencijskih spektara.....	25

3.4.2. Snimanje UV-vidljivih fluorescencijskih spektara.....	25
4. Rezultati.....	27
4.1. Spektralna karakterizacija ispitivanih spojeva u etanolu.....	28
4.2. Utjecaj promjene vrijednosti pH na spektralna svojstva	31
4.2.1. Utjecaj promjene vrijednosti pH na spektralna svojstva spoja IM1.....	31
4.2.2. Utjecaj promjene vrijednosti pH na spektralna svojstva spoja IM2.....	32
4.2.3. Utjecaj promjene vrijednosti pH na spektralna svojstva spoja IM3.....	35
4.2.4. Određivanje pK_a vrijednosti ispitivanih spojeva.....	36
5. Rasprava.....	40
5.1. Spektralna karakterizacija ispitivanih spojeva u etanolu.....	41
5.2. Spektralna karakterizacija ispitivanih spojeva u otopini.....	43
5.2.1. Utjecaj promjene vrijednosti pH na spektralna svojstva	43
5.2.1.1. Utjecaj promjene vrijednosti pH na spektralna svojstva spoja IM1.....	43
5.2.1.2. Utjecaj promjene vrijednosti pH na spektralna svojstva spoja IM2.....	44
5.2.1.3. Utjecaj promjene vrijednosti pH na spektralna svojstva spoja IM3.....	45
5.2.1.4. Određivanje pK_a vrijednosti ispitivanih spojeva.....	45
6. Zaključak.....	47
7. Literatura.....	49
ŽIVOTOPIS.....	51

1.Uvod

Kemijski senzor se može definirati kao naprava koja omogućava kontinuirano dobivanje informacija o okolišu. Prema IUPAC-u, kemijski senzor je naprava koja može kemijsku informaciju (od koncentracije specifične kemijske vrste u uzorku ili do ukupnog sastava uzorka) pretvoriti u koristan analitički signal. Optički kemijski senzori spadaju u grupu kemijskih senzora čiji se analitički signal pobuđuje elektromagnetskim zračenjem. Osjetilni element optičkih kemijskih senzora je reagens čija se optička svojstva mijenjaju njegovom reakcijom s analitom pri čemu dolazi do promjene fotofizičkih svojstava [1,2,3].

pH je vrlo bitna veličina te često ključan parametar u industriji, farmaciji, medicini, biokemiji ili okolišu. Vrijednost pH otopine može se mjeriti na različite načine - elektrokemijski pomoću pH metra te optički pomoću optoda. Fluorescencija je optimalan mehanizam prijenosa signala u pH senzorima jer omogućuje vrlo osjetljivo mjerenje [2].

Posljednjih su godina intenzivno proučavana sinteza, karakterizacija i primjena kumarina, iminokumarina i njihovih derivata. Razlog rastućeg interesa za te spojeve je njihova rasprostranjenost u prirodi, svestrana primjena kao fluorescentne probe i bojila (indikatori), u laserskoj tehnologiji i industriji parfema. Apliciraju se kao lijekovi te kao izvrsni kemijski senzori [4,5,6].

U ovom radu ispitivana su kiselo-bazna svojstva i utjecaj pH na spektralna svojstva triju derivata iminokumarina, 7-*N,N*-dietilamino-2-imino-3-(2-*N*-metilbenzimidazolil)kromena (**IM1**), 2-imino-3-(2-*N*-metilbenzimidazolil)kromena (**IM2**) i 7-*N,N*-dietilamino-2-imino-3-(2-*N*-5-nitro-1*H*-benzimidazolil)kromena (**IM3**) UV-vidljivom apsorpcijskom i fluorescencijskom spektrofotometrijom, kako bi se ustvrdila njihova potencijalna primjena kao senzora za pH.

2. Opći dio

2.1. Kemijski senzori

Kemijski senzori su uređaji koji u realnom vremenu daju informaciju o ispitivanom uzorku. U užem smislu riječi, to je molekula ili skup molekularnih jedinica koji je u stanju vezati ciljanu molekulu (analit) te pružiti potrebne informacije o vezivanju. Njihova zadaća je pretvaranje informacije o prisutnosti specifičnog spoja ili iona u jednostavnim ili čak kompleksnim uzorcima u mjerljivi signal [1,2].

Svi kemijski senzori u sebi sadrže aktivnu tvar (receptor), osjetljivu na određenu kemijsku vrstu, te pretvornik (transformator) signala, koji ima ulogu preoblikovanja signala u mjerljivi signal na instrumentu. Podjela kemijskih senzora je moguća na više načina, a najčešća je ona prema vrsti pretvornika. Pretvornici se mogu podijeliti na četiri glavne vrste: elektrokemijski pretvornici (potenciometrijski, voltametrijski, FET senzori, konduktometrijski), toplinski pretvornici, piezoelektrični i akustični pretvornici te optički pretvornici (UV-vidljivi, IR, luminiscencijski, reflektometrijski) [2].

Zbog širokog spektra primjene koji pružaju senzori, posljednjih godina porastao je interes za njihovo proučavanje. Najvažnija područja primjene obuhvaćaju gotovo sve aspekte čovjekovog života. Dva područja koja postaju sve značajnija su praćenje čistoće zraka, vode i općenito kvalitete života, te neposredno korištenje za medicinske potrebe.

Najveći mogući problemi vezani uz kemijske senzore su sterilizacija, kontaminacija i ponekad cijena. Sterilizacija je skoro uvijek nužna kod *'in situ'* uporabe, te neminovno dolazi do promjena pojedinih karakteristika senzora što dalje znači odstupanje od originalne kalibracije senzora, sa svim potencijalnim posljedicama. Kod kontaminacije se podrazumijeva opasnost da korišteni biološki materijal/kemikalije tijekom vremena ne dođu u dodir s okolinom (ljudsko tkivo). Cijena proizvodnje pojedinih senzora, koliko god oni bili tehnički besprijekorni i primamljivi, vrlo teško ili nikako ne opravdava tržišnu isplativost, pa su takvi senzori vrlo skupi ili se serijski uopće ne proizvode [1,2].

2.1.1. Optički kemijski senzori

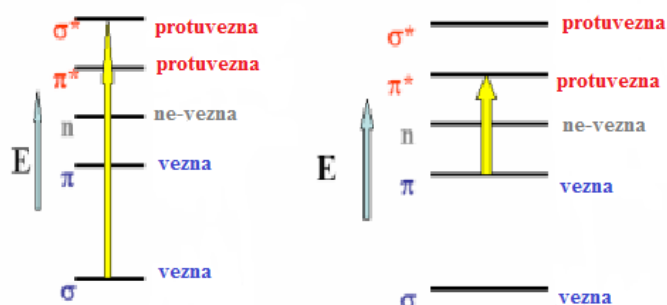
Optički kemijski senzori spadaju u grupu kemijskih senzora čiji se analitički signal u pretvorniku pobuđuje elektromagnetskim zračenjem. Podrazumijevaju mjerenje promjene optičkih karakteristika (apsorpcija, emisija, polarizacija, indeks loma) određenog dijela spektra svjetla. Princip rada se sastoji u prolasku svjetlosti određene valne duljine kroz mjernu veličinu uslijed čega dolazi do promjena nekih od optičkih karakteristika svjetlosti (apsorpcija, emisija, polarizacija, indeks loma). Sami teorijski pristup se najčešće može podijeliti na dvije metode: direktnu i indirektnu. Kod direktne metode povezuju se mjerene veličine i osjetilni materijali u parove i/ili nusprodukte koji su dalje odgovorni za promjenu neke od optičkih karakteristika. S druge strane indirektnu metodu opisuje postojanje tzv. analognih molekula koje već prije izlaganja mjernoj veličini tvore parove s osjetilnim materijalom. Kada se senzor izloži stvarnoj mjernoj veličini dolazi do pucanja parova analogne molekule/osjetilni materijal i na mjesto analognih molekula dolazi mjerna veličina. To dalje znači da porast slobodnih analognih molekula, koje su kao takve izložene svjetlu određene valne duljine, mijenja optičke karakteristike svjetla. U veličini tih promjena se nalazi informacija o koncentraciji stvarne mjerne veličine jer je ona direktno odgovorna za stvaranje slobodnih analognih molekula [1,3].

Optički senzori nude određene prednosti u odnosu na elektrokemijske senzore: nije potrebna referentna elektroda (iako se gotovo uvijek koristi tzv. referentni nivo svjetlosti), optički kablovi su imuni na električni šum,, moguće je provesti višestruko mjerenje mjereći više veličina na različitim valnim duljinama itd. Mana im je relativno usko područje linearnosti (dva reda veličine koncentracije) u odnosu na elektrokemijske senzore [3].

Najčešće tehnike karakterizacije optičkih kemijskih senzora su apsorpcijska i luminiscencijska (fluorescencijska) spektrofotometrija, kojima je moguće dobiti točnu informaciju o vrijednosti koncentracije analita [3].

2.1.1.1. UV-vidljiva apsorpcijska spektrofotometrija

Molekule podliježu trima vrstama kvantiziranih prijelaza UV, vidljivim ili infracrvenim zračenjem. Pobuđivanje UV i vidljivim zračenjem uključuje prijelaz elektrona koji prebiva u molekulskoj ili atomskoj orbitali niske energije u orbitalu više energije, a taj prijelaz elektrona između dviju orbitala naziva se elektronskim prijelazom (slika 1.).



Slika 1. Prijelaz elektrona s orbitale niske energije na orbitalu više energije.

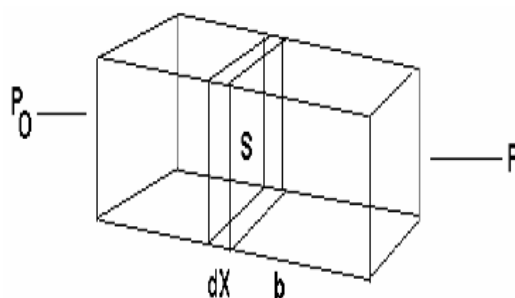
Temelj molekulske apsorpcije su UV, vidljivo i infracrveno zračenje za identifikaciju i određivanje niza anorganskih i organskih spojeva. UV i vidljiva apsorpcijska spektrofotometrija najčešće je primjenjivana metoda [7,8,9].

Molekulska apsorpcijska spektrofotometrija najbolje se opisuje Lambert-Beerovim zakonom (slika 2.) opisanim u jednažbi (1):

$$A = \log I_0 / I = \varepsilon c l \quad (1)$$

gdje je A apsorbancija, I_0 - intenzitet svjetlosne pobude, I - intenzitet propuštenog svjetla, ε / $\text{L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ – molarni apsorpcijski koeficijent, c / mol L^{-1} – koncentracija molekule koja apsorpira zračenje, l / cm – optički put koji svjetlo prolazi putujući kroz medij.

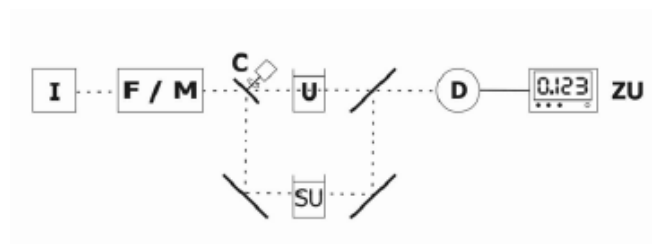
Slika 2. prikazuje spomenuti Lambert - Beerov zakon gdje je P_0 snaga upadnog zračenja, P snaga propuštenog zračenja, S površina presjeka, dx infinitezimalna debljina a dn broj čestica u presjeku.



Slika 2. Prolazak svjetla kroz uzorak - Lambert- Beerov zakon.

Snop paralelnog monokromatskog zračenja (P_0) pada okomito na uzorak koji apsorbira, nakon prolaza duljinom b tvari koja sadrži n čestica koje apsorbiraju, snaga zračenja se smanjuje (P). Presječni sloj površine S i infinitezimalne debljine dx sadrži dn čestica koje apsorbiraju (svaka čestica predstavlja zamišljenu površinu na kojoj dolazi do "hvatanja" fotona – apsorpcija) [1].

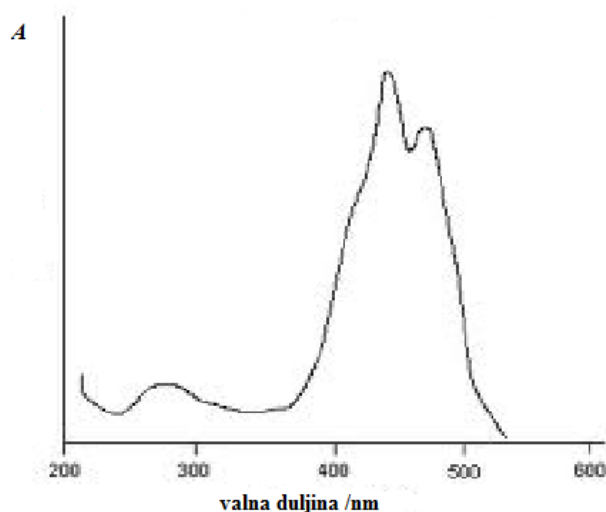
Instrument na kojem se provodi UV-vidljiva apsorpcijska spektrofotometrija naziva se spektrofotometar ili fotometar (slika 3). Uzorak analita koji mjerimo stavlja se u kivetu koja se nalazi između monokromatora i detektora kako bi se izbjeglo fotokemijsko razgrađivanje uzorka.



Slika 3. Shema spektrofotometra.

Kao rezultat mjerenja dobiva se apsorpcijski spektar koji prikazuje ovisnost apsorbancije o valnoj duljini λ/nm , kao što je prikazano na slici 4. Apsorpcijski spektar pokazuje se u obliku jedne elektronske apsorpcijske vrpce ili više njih, od kojih je svaka građena od velikog broja smještenih, ali odvojenih linija. Svaka linija je prijelaz elektrona iz osnovnog u jedno od mnogih vibracijskih i rotacijskih energijskih stanja povezanih sa svakim pobuđenim

elektronskim energijskim stanjem. Zbog mnogo postojećih vibracijskih i rotacijskih energijskih stanja te neznatnih međusobnih razlika njihovih energija, broj linija koje obuhvaća tipična vrpca je vrlo velik, a njihov međusobni razmak vrlo malen.



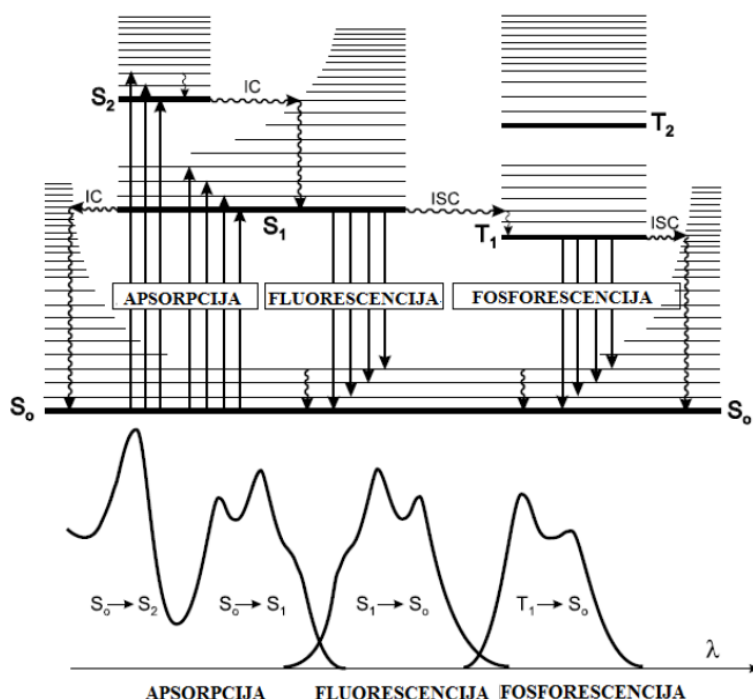
Slika 4. Prikaz apsorpcijskog spektra.

UV-vidljiva apsorpcijska spektrofotometrija koristi se za određivanje organskih, anorganskih, biokemijskih te mnogih drugih vrsta. Ona je najčešće primjenjivana metoda upravo zato što ima puno prednosti u odnosu na ostale metode, a to su: osjetljivost, velika selektivnost, točnost, jednostavnost i brzina [7,8,9].

2.1.1.2. Fluorescencijska spektrofotometrija

Fluorescencijska spektrofotometrija je zajedno sa spektrometrijom fosforescencije dio spektroskopije molekulske luminiscencije tj. dio fotoluminiscencije - emisije koja je rezultat pobuđivanja nastalog apsorpcijom fotona. Jednom kada je molekula pobuđena apsorpcijom fotona, moguće ju je vratiti u osnovno stanje određenim radijativnim i neradijativnim mehanizmima. Najpoznatiji radijativni mehanizam je emisija fluorescencije, dok kod neradijativnog mehanizma postoji više različitih procesa kao što su: međusustavno križanje,

konformacijska promjena i interna konverzija. Dijagram na kojem su jasno prikazani svi prethodno spomenuti procesi naziva se *Perrin- Jablonski* dijagram i prikazan je na slici 5.



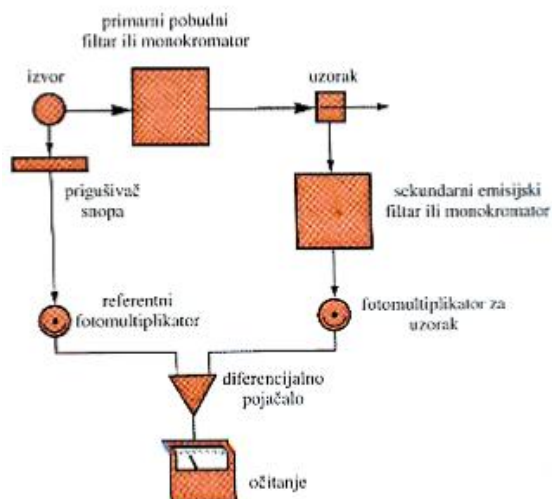
Slika 5. Perrin-Jablonski dijagram.

U Perrin-Jablonskom dijagramu singletna elektronska stanja označena su sa $S_0, S_1, S_2, \dots$, a tripletna sa $T_1, T_2, \dots$. Vidljivo je da se fluorescencija događa sa S_1 pobuđenog stanja odnosno prati ju $S_1 \rightarrow S_0$ relaksacija. Za nju jednostavno možemo reći da je zapravo rezultat prijelaza molekule (*fluora*) iz najnižeg vibracijskog stanja prvog pobuđenog stanja u osnovno stanje, iako dolazi i do predaje energije prilikom sudara sa susjednim molekulama. Proces emisije fluorescentnih fotona je spontan proces i odvija se jednako brzo kao i apsorpcija fotona. Kada je riječ o fluorescenciji bitno je spomenuti još jedan pojam, a to je Stokesov pomak koji je definiran kao razlika između vrijednosti maksimuma prve apsorpcijske vrpce i maksimuma fluorescencijske vrpce (2):

$$\Delta \nu = \nu_a - \nu_f \quad (2)$$

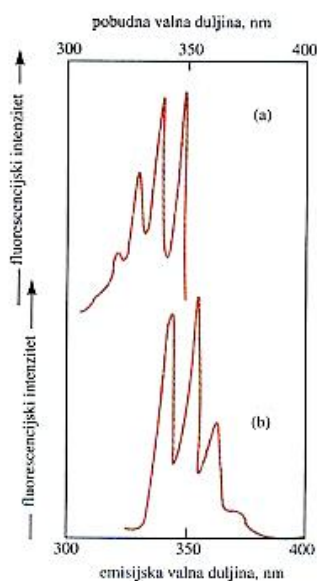
gdje je $\Delta \nu$ Stokesov pomak, ν_a valna duljina maksimuma apsorpcije a ν_f valna duljina maksimuma intenziteta fluorescencije. Stokesov pomak je važan parametar jer nam može dati

informacije o pobuđenom stanju. Instrument na kojem se provodi fluorescencijska spektrofotometrija naziva se spektrofluorimetar (slika 6.). Spektrofluorimetri se ne razlikuju uvelike od spektrofotometara iako spektrofluorimetri primjenjuju filtre za ograničavanje pobudnog zračenja i monokromatorsku rešetku za disperziju fluorescencije uzorka.



Slika 6. Shema spektrofluorimetra.

Kao rezultat mjerenja dobiva se emisijski spektar koji prikazuje ovisnost intenziteta fluorescencije o valnoj duljini λ/nm , kao što je prikazano na slici 7.



Slika 7. Prikaz emisijskog spektra.

Fluorescencijska spektrofotometrija koristi se za određivanje mnogih vrsta organskih i anorganskih molekula te je posebno primjenjivana u biokemijskom i kliničkom području. Prednost ove tehnike je velika osjetljivost i selektivnost, a nedostatak joj je što je ograničena samo na one spojeve koji mogu fluorescirati, što je svega manje od 15 % spojeva [7,8,9].

2.2. pH senzori

pH je vrlo bitna veličina te često ključan parametar u industriji, farmaciji, medicini, biokemiji ili okolišu. Vrijednost pH otopine može se mjeriti na različite načine - elektrokemijski pomoću pH metra te optički pomoću optoda. Mjerenje vrijednosti pH je u biti utvrđivanje stupnja kiselosti (lužnatosti) neke vodene otopine. Kiselost (lužnatost) je određena sa koncentracijom vodikovih H^+ (OH^-) iona. Neutralna otopina ima podjednaku koncentraciju H^+ i OH^- iona. Konstanta disocijacije K je definirana na sljedeći način (3):

$$\frac{[H^+][OH^-]}{[H_2O]} = K \quad (3)$$

Budući da je koncentracija nedisocirane vode puno veća od koncentracije disocirane vode (koncentracije slobodnih H^+ i OH^- iona) moguće je nazivnik izraza (3) smatrati konstantnim, pa ga također staviti pod konstantu K_w koja pri 25°C iznosi $10^{-14} \text{ mol}^2 \text{ dm}^{-6}$ (4):

$$\begin{aligned} [H^+][OH^-] &= K_w = 10^{-14} \text{ mol}^2 \cdot \text{dm}^{-6} \\ [H^+] &= [OH^-] = 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \quad \text{neutralna otopina} \end{aligned} \quad (4)$$

Proizlazi da se kiselost, tj. lužnatost otopine može odrediti koncentracijom vodikovih kationa H^+ gdje je u kiselim otopinama koncentracija velika ($> 10^{-7}$), a u lužnatima mala ($< 10^{-7}$). Iz praktičnih razloga se pH vrijednost otopine označava eksponentom prema (5):

$$\begin{aligned} pH &= -\log[H^+] \\ pH &< 7 \quad \text{kiselo} \\ pH &> 7 \quad \text{lužnato} \\ pH &= 7 \quad \text{neutralno} \end{aligned} \quad (5)$$

Nedostaci pH metra kao uređaja za mjerenje pH otopine su veličina i izvedba, osjetljivost na agresivne kemijske interferente, kao što su lužine i fluoridni ioni, lomljivost staklene elektrode te nemogućnost mjerenja u malim volumenima uzorka. Za razliku od pH metra, optode se mogu smanjiti, ne trebaju referentni senzorski sustav, jeftine su i mogu služiti za kontinuirano mjerenje te mjerenje u malim volumenima [10].

Većina optičkih pH senzora sastoji se od pH osjetljivog indikatora imobiliziranog u čvrstu matricu propusnu za protone. Protoni u ravnotežnoj interakciji s molekulama pH indikatora uzrokuju promjenu boje filma u ovisnosti o pH vrijednosti otopine s kojom je film u kontaktu. Na taj način je moguće fotometrijski mjeriti pH vrijednost otopine. Nedostaci optoda su njihova fotoosjetljivost i ispiranje indikatorskog bojila te temperaturna osjetljivost. Kod optičkog određivanja pH mjeri se koncentracija kiselih i bazičnih oblika pH indikatora, a pH se računa prema Henderson-Hasselbachovoj jednadžbi (6):

$$\text{pH} = \text{pK}_a + \log \frac{[B]}{[A]} \quad (6)$$

2.2.1. Fluorescentni pH senzori

Fluorescencija se već duže vrijeme koristi kao metoda za temeljna istraživanja u biološkim znanostima, primjerice u razvoju novih lijekova, kod sigurnosti hrane i kvalitete okoliša, kao i za kliničke dijagnoze bolesti zbog svoje visoke selektivnosti i osjetljivosti. Iz tog razloga se i fluorescentni pH senzori široko koriste u kemiji, biologiji, medicini i zaštiti okoliša. Nova istraživanja u ovom području odnose se na sintezu i primjenu fluorescentnih organskih spojeva (pH osjetljivih bojila) sa spektralnim karakteristikama koje su osjetljive na različite promjene u okolini. Fluorescentne pH osjetljive molekule pokazuju bolju osjetljivost i selektivnost od apsorpcijskih pH osjetljivih molekula. Utvrđeno je da mjerenja koja se temelje na fluorescenciji pokazuju veću detekciju osjetljivosti i selektivnosti od tradicionalnih optičkih metoda koja se temelje na apsorpciji.[9]

Uloga fluorescentnih pH senzora je da ukazuju na prisutnost analita, procesom fluorescencije. Fluorofor (funkcionalan skupina koja je odgovorna za fluorescenciju) djeluje kao pretvornik, odnosno on pretvara kemijski podatak u pogodan optički odgovor, dok receptor prepoznaje taj

signal na selektivan način, odnosno veže na sebe analit. Kakva će biti selektivnost prepoznavanja signala ovisi o strukturi molekule i funkcionalnim skupinama te o karakteristikama ciljanog analita. Bitan je i utjecaj otapala, odnosno mikrookoliša koji uključuje pH, polarnost, vodikove veze, ione, temperaturu, tlak, viskoznost, električni potencijal. Vrlo je važna fotostabilnost ovakvih senzora zbog reverzibilnosti i kontinuiranosti mjerenja.

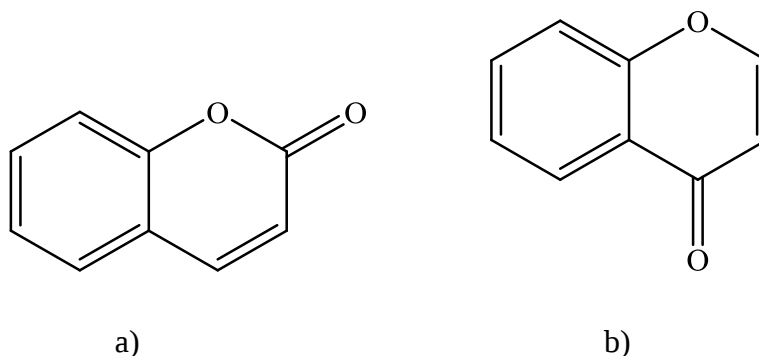
Saari je 1982. godine pripremio prvi fluorescentni pH senzor gdje je fluoresceinamin kovalentno bio imobiliziran u celulozu. Do danas je objavljeno već mnogo znanstvenih radova koji govore o razvoju fluorescentnih pH senzora.

Da bi senzor bio fotostabilan i relevantan, fluorescentne pH osjetljive boje moraju posjedovati slijedeće karakteristike:

- *Visoki molarni apsorpcijski koeficijent*, ε – parametar koji definira sposobnost molekule da apsorbira svjetlost pri određenoj valnoj duljini, a definira se jednačom (1)
- *Optimalna valna duljina pobude* – kada je valna duljina pobude najbliža valnoj duljini apsorpcijskog maksimuma, tada se postiže najjači intenzitet fluorescencije.
- *Visoko kvantno iskorištenje*, Φ – omjer broja molekula koje fluoresciraju i ukupnog broja pobuđenih molekula
- *Optimalna valna duljina emisije* – u obzir dolazi raspon valnih duljina koje detektor može detektirati, odnosno optimalna valna duljina određuje se ovisno o osjetljivosti detektora.
- *Veliki Stokesov pomak* – razlika između vrijednosti maksimuma prve apsorpcijske vrpce i maksimuma fluorescencijskog spektra. Važan parametar koji govori o pobuđenosti stanja. Poželjno je da je Stokesov pomak što veći što pogoduje lakšoj detekciji fluorescentnih boja.
- *Visoka fotostabilnost* – fluorescentne boje podložne su raspadu nakon određenih ciklusa pobude i emisije, a do raspada dolazi zbog fotokemijskih reakcija. Boja mora biti kemijski stabilna i otporna na uvjete mikrookoliša [9].

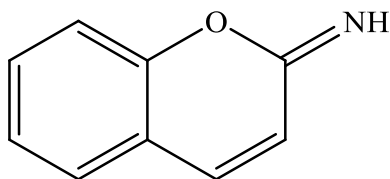
2.3. Iminokumarin i derivati iminokumarina

Kumarini (slika 8.) zajedno sa svojim derivatima su vrlo rasprostranjena skupina organskih spojeva. Kumarini sa benzopironskom strukturom imaju mnoge prednosti, uključujući visoko fluorescentni kvantni prinos, mogućnost rotacije, izvrsnu stabilnost i nisku toksičnost. Stoga se kumarini uvelike koriste na području biologije, medicine, u izradi parfema, kozmetike i fluorescentnih boja. Derivati kumarina se vrlo često koriste u svrhu fluorescentnih pH proba, za detekciju dušikovog oksida, nitroksida i vodikovog peroksida. Osim toga, derivati kumarina služe i kao dobri kemosenzori aniona, uključujući cijanid, fluorid, pirofosfat, acetat, benzoat i dihidrogenfosfat te različitih metalnih iona kao na primjer Hg (II), Cu (II), Zn (II), Ni (II), Ca (II), Pb (II), Mg (II), Fe (III), Al (III), Cr (III), i Ag (I). Fuzija pironskog s benzenskim prstenom dovodi do nastanka heterocikličkih spojeva poznatih kao benzopirona, od kojih razlikujemo dvije vrste, točnije, benzo- α -pirone, koji se još nazivaju kumarinima i benzo- γ -pirone, koji se nazivaju kromonima. Potonji se razlikuju od prethodnih samo u položaju karbonilne skupine u heterocikličnom prstenu kao što je prikazano na slici 8. Poznato je da je stilben s *trans* konformacijom izuzetno fluorescentan. Sa stajališta molekularne strukture, kumarini nose ugljik-ugljik dvostruku vezu, koja je fiksirana kao *trans* konformacija kod *trans*-stilbena kroz laktonsku strukturu. To može pomoći da se izbjegne *trans-cis* transformacija dvostruke veze pod ultraljubičastim (UV) zračenjem što se događa kod spojeva stilbena i rezultira jakom fluorescencijom te visokim prinosom fluorescencije i fotostabilnosti kod većine derivata kumarina [10,11,12,13].



Slika 8. Strukturni prikaz: a)kumarin, b)kromon.

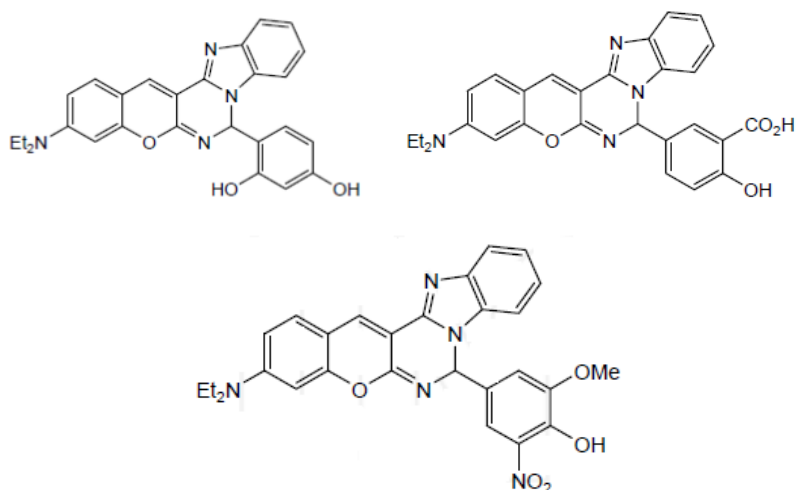
Heterociklički aromatski organski spojevi iminokumarini (slika 9.), zbog svoje biološke i kemijske aktivnosti privlače sve veću pozornost sintetičara. Vrlo su reaktivni zbog svojih strukturnih značajki te je pronađena njihova antibakterijska aktivnost prema gram pozitivnim i gram negativnim bakterijama.



Slika 9. Struktura iminokumarina, 2- imino analoga kumarina.

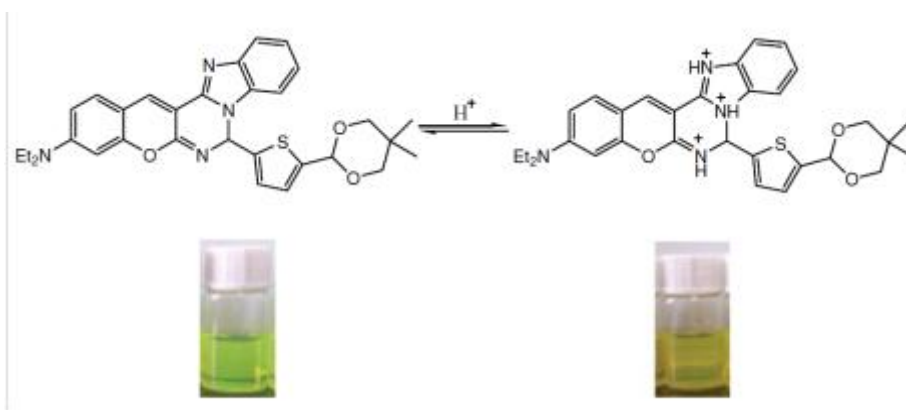
2.3.1. Derivati iminokumarina kao pH senzori

Nekoliko derivata iminokumarina (slika 10.) sintetizirano je kao novi tip fluorescentnih pH indikatora. Imaju umjerenu do visoku svjetlinu, izvrsnu fotostabilnost i kompatibilnost s diodama koje emitiraju svjetlost. Ovi indikatori mogu biti kovalentno imobilizirani na površini amino-modificiranog polimera mikrogranula koje su pak inkorporirane u matricu, čime se dobije hidrogel pH-osjetljivih svojstava. Kada se koristi smjesa dvije različite mikrogranule, membrane imaju mogućnost optičkog očitavanja pH na širem području uspoređujući s dinamičkim područjem staklene elektrode (pH 1-11) [11].



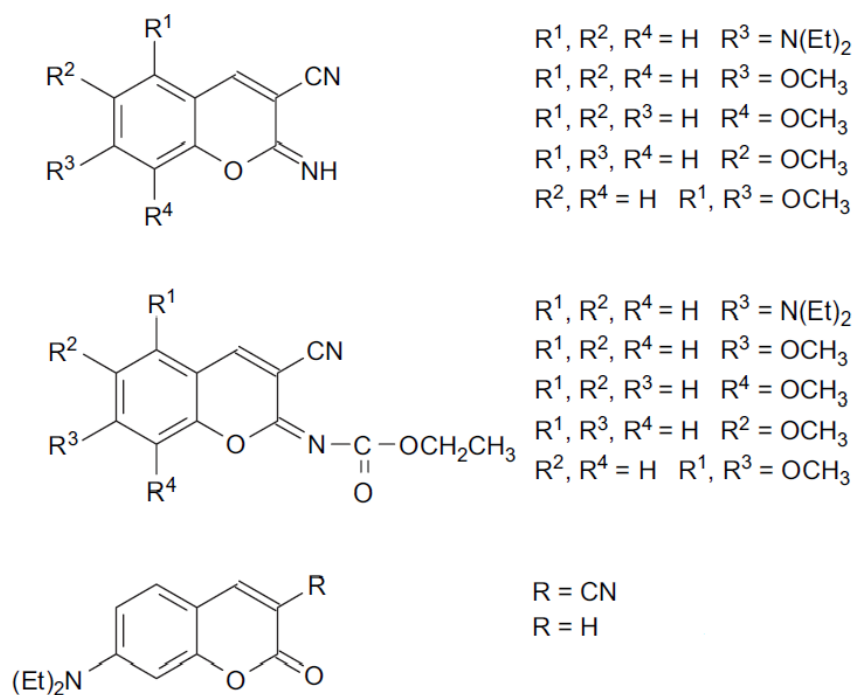
Slika 10. Novi pH osjetljivi derivati kumarina ispitivani u otopini i polimernim membranama [11]

Hongqi Li je zajedno s nekoliko svojih suradnika dizajnirao i sintetizirao novi kolorimetrijski i fluorescentni pH senzor koji proizlazi iz iminokumarina i tiofenkarboksaldehida. Golim je okom uočena promjena boje nove senzorske otopine iz zelene u žutu u sustavu etanol-voda sa smanjenjem pH vrijednosti. Intenzitet maksimuma emisije senzorske molekule povećao se postupno smanjenjem kiselosti otopine (porast pH vrijednosti od 2 do 7) i dostigao maksimum kod oko pH= 6. Intenzitet maksimuma emisije senzorske molekule ne pokazuje promjenu pri $\text{pH} \leq 11,85$, a fluorescencija se ne uočava na pH= 13,36. Senzor se može koristiti u svrhu kao fluorescentne pH probe u prisutnosti zajedničkih metalnih kationa i aniona bez interferencija [10].



Slika 11. Primjer kiselo-bazne ravnoteže i promjene boje derivata iminokumarina [10]

Optička svojstva novih 10 iminokumarin bojila, koja nose cijano skupinu u trećem položaju, ispitivana su kod CH_2Cl_2 UV / VIS apsorpcijom i fluorescentnom spektroskopijom. Pet bojila nosi slobodnu imino skupinu, a razlikuju se po prirodi i položaju svoje skupine elektron-donora. Među njima, bojilo koje nosi dietilamino skupinu u sedmom položaju pokazuje najzanimljivija optička svojstva. Svi su spojevi promatrani u odnosu na analoge koji sadrže etoksikarbonilnu skupinu s imino funkcijom. Prisutnost etoksikarbonilne skupine sustavno potiče promjenu apsorpcije i emisije spektra prema dugim valnim duljinama. Kod tri boje u kojima je prijenos naboja slab, supstitucija smanjuje učinkovitost fluorescencije. S druge strane, fluorescencija kvantnog prinosa i vijek trajanja su malo porasli kod spojeva s jakim prijenosom naboja, a posebno kod onih koji nose dietilamino skupinu na položaju 7. To pokazuje da supstitucija kod imino skupine može biti dobar način za dobivanje dobrih fluorescentnih sondi (proba) dizajniranih za različite svrhe [13].

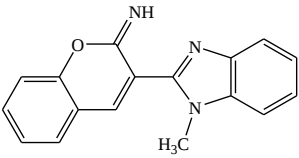
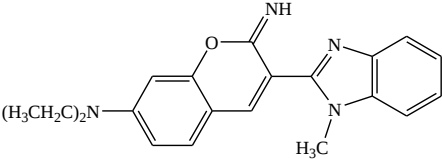
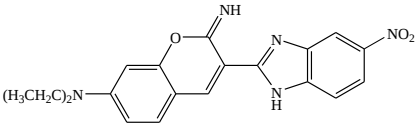


Slika 12. Derivati iminokumarina koji pokazuju osjetljivost na pH [13]

3. Eksperimentalni dio

U ovom radu ispitana su kiselo-bazna svojstva novih derivata iminokumarina UV-vidljivom apsorpcijskom i fluorescencijskom spektrofotometrijom. Ispitivanja su provedena za: 7-*N,N*-dietilamino-2-imino-3-(2-*N*-metilbenzimidazolil)kromen (**IM1**), 2-imino-3-(2-*N*-metilbenzimidazolil)kromen (**IM2**) i 7-*N,N*-dietilamino-2-imino-3-(2-*N*-5-nitro-1*H*-benzimidazolil)kromen (**IM3**), s ciljem utvrđivanja njihove primjene kao senzora za pH. Promatran je utjecaj vrijednosti pH te utjecaj okoline (otapala) na spektralna svojstva prethodno spomenutih spojeva. Ispitivani derivati iminokumarina **IM1**, **IM2** i **IM3** (tablica 1.) sintetizirani su na Zavodu za organsku kemiju Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije pod vodstvom izv. prof. dr. sc. Marijane Hranjec.

Tablica 1. Prikaz ispitivanih derivata iminokumarina.

	IM1
	IM2
	IM3

3.1. Materijali

Kemikalije uporabljene za pripremu pufera i otopina su slijedeće:

- **IM1** - 7-*N,N*-dietilamino-2-imino-3-(2-*N*-metilbenzimidazolil)kromen
- **IM2** - 2-imino-3-(2-*N*-metilbenzimidazolil)kromen
- **IM3** - 7-*N,N*-dietilamino-2-imino-3-(2-*N*-5-nitro-1*H*-benzimidazolil)kromen

- **IM4** - 7-N,N-dietilamino-2-imino-3-(2-N-1H-benzimidazolil)kromen
- Citratna kiselina, *Kemika d.d., Zagreb*
- Boratna kiselina, *Laborchemie Apolda*
- Fosforna kiselina, *Laborchemie Apolda*
- Natrijev hidroksid, *Merck*
- Klorovodična kiselina, $c(\text{HCl}) = 0,1 \text{ mol/dm}^3$, *Carlo Erba Reagents*
- Deionizirana voda (Mili-Q voda)
- Etanol, *Carlo Erba Reagents*
- Aceton, *Sigma Adrich*

3.2. Instrumenti

Pri izvedbi eksperimenata rabljeni su sljedeći instrumenti:

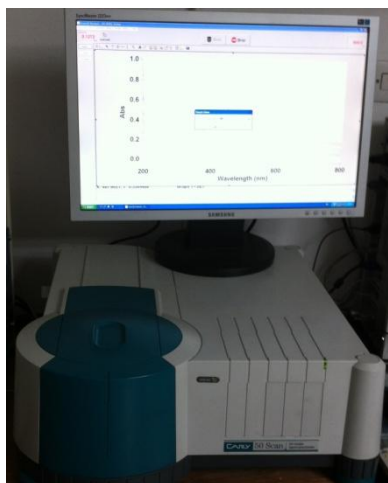
- pH metar *MA 5740, Iskra d.d.*
- kvarcna kiveta
- automatske pipete (i nastavci) različitih volumena
- UV/VISIBLE spektrofotometar, *Varian 50 Scan*
- Fluorescencijski spektrofotometar, *Varian Cary Scan*
- Analitička vaga, *KERN & Sohn GmbH, D-72336 Balingen, Germany*



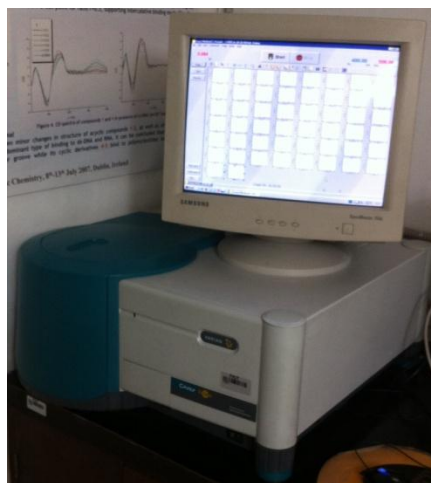
a)



b)



c)



d)

Slika 13. Instrumenti korišteni za provedbu eksperimenata: a) pH-metar, b) analitička vaga, c) UV/VISIBLE spektrofotometar d) fluorescencijski spektrofotometar

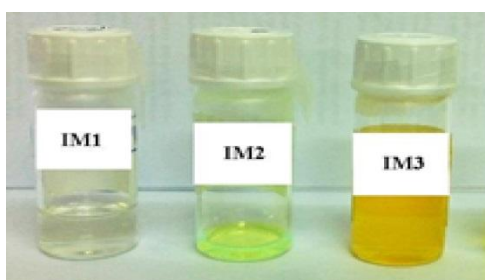
3.3. Priprava otopina

3.3.1. Priprava matičnih (*stock*) otopina

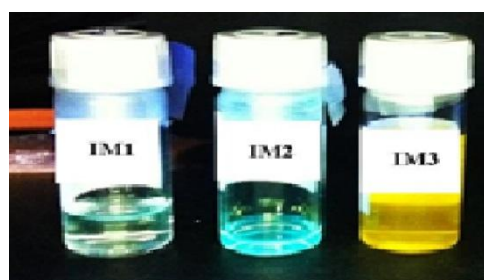
Matične (*stock*) otopine ispitivanih spojeva pripravljene su otapanjem derivata iminokumarina (spojevi **IM1-IM3**) u etanolu. Koncentracije matičnih otopina iznose od $c = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ do $c = 5 \cdot 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$, a volumen je 3 mL. Potrebne mase spojeva za pripravu matičnih otopina izračunate su pomoću jednadžbe (7):

$$m = c * M * V \quad (7)$$

gdje je c = koncentracija [mol dm^{-3}], M = molarna masa tvari (g mol^{-1}), m = masa odvage spoja (g) i V = volumen otopine [dm^3].



a)



b)

Slika 14. Matične otopine spojeva **IM1**, **IM2** i **IM3** a) na danjem svijetlu, b) pod UV lampom.

3.3.2. Priprava otopina univerzalnog pufera

Otopine univerzalnog pufera različitih vrijednosti pH pripravljene su miješanjem otopine A, koja se sastoji od: 100 mL 0,33 M otopine citratne kiseline, 100 mL 0,39 M otopine fosforne kiseline, 343 mL 1 M otopine NaOH i 3,54 g borne kiseline. Određeni volumen otopine A i otopine B (0,1 M otopina HCl) stavlja se u odmjernu tikvicu prema jednadžbi (8) te se nadopuni do oznake demineraliziranom vodom.

$$20 \text{ ml A} + x \text{ ml B (u 100 ml)} \quad (8)$$

$x \text{ (B)}$ = volumen klorovodične kiseline (mL)

3.3.3. Priprava etanolnih otopina različitih vrijednosti pH

Etanolne otopine vrijednosti pH od 1 do 13 pripravljene su dodatkom 1 M HCl ili 1 M NaOH u određeni volumen 96%-tnog etanola. Okviran volumen natrijevog hidroksida i klorovodične kiseline se računao pomoću jednadžbe (9):

$$c_1 * V_1 = c_2 * V_2 \quad (9)$$

gdje je c_1 = poznata koncentracija NaOH ili HCl [mol dm^{-3}], V_1 = nepoznati volumen NaOH ili HCl koji je potrebno dodati etanolu [dm^3], c_2 = koncentracija NaOH ili HCl u etanolu [mol dm^{-3}], i V_2 = potreban volumen etanola [dm^3]. Točna vrijednost etanolne otopine je nakon dodatka kiseline ili lužine izmjerena na pH-metru.

3.4. Spektralna karakterizacija ispitivanih spojeva u otopini

Otopine spojeva **IM1**, **IM2** i **IM3** pripravljene na prethodno opisan način, snimane su UV - vidljivom apsorpcijskom i fluorescencijskom spektrofotometrijom.

3.4.1. Snimanje UV-vidljivih apsorpcijskih spektara

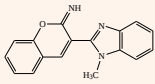
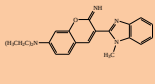
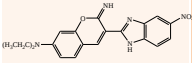
Za snimanje UV-vidljivih apsorpcijskih spektara korištene su otopine univerzalnog pufera i otopine etanola u rasponu vrijednosti pH od 1,00 do 13,00. Za snimanje se koristila kvarcna kiveta koja je prije svakog stavljanja u UV apsorpcijski spektrofotometar isprana acetonom i dobro posušena. U kvarcnu kivetu stavi se određeni alikvot spoja (Tablica 2.) i 3 mL otapala te se započne sa snimanjem. Sva snimanja provedena su u rasponu valnih duljina od 200 nm do 700 nm. Koncentracije ispitivanih spojeva pri snimanju UV-vidljivih apsorpcijskih spektara su $c = 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$.

3.4.2. Snimanje UV-vidljivih fluorescencijskih spektara

Za snimanje UV-vidljivih fluorescencijskih spektara korištene su otopine univerzalnog pufera i etanolne otopine u rasponu vrijednosti pH od 1,00 do 13,00. Također je korištena kvarcna kiveta koja je prije upotrebe trebala biti čista i posušena. Prije snimanja UV-vidljivih fluorescencijskih spektara odabrane su širine otvora (engl. *slit width*) izražene u nm, koje određuju rezoluciju snimljenog spektra i označuju se s dva broja odnosno veličinom ulaznog i izlaznog otvora. Tako će npr. spojevi s većom sposobnošću fluorescencije biti snimani pri manjim slitovima i obrnuto. U kvarcnu kivetu stavi se određeni alikvot spoja (Tablica 2.) i 3 mL otapala kako bi koncentracije ispitivanih spojeva pri snimanju UV-vidljivih fluorescencijskih spektara bile $c = 1 \cdot 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$. Emisijski spektri spoja **IM1** snimani su u rasponu valnih duljina od 300 nm do 700 nm dok su ostala dva spoja, **IM2** i **IM3**, snimana u rasponu od 400 nm do 700 nm. Kao valna duljina pobude korištena je valna duljina

maksimuma apsorpcije. U tablici 2. prikazani su eksperimentalni uvjeti pri kojima su snimani apsorpcijski i emisijski spektri.

Tablica 2. Eksperimentalni uvjeti pri kojima su snimljeni UV-vidljivi apsorpcijski i fluorescencijski spektri.

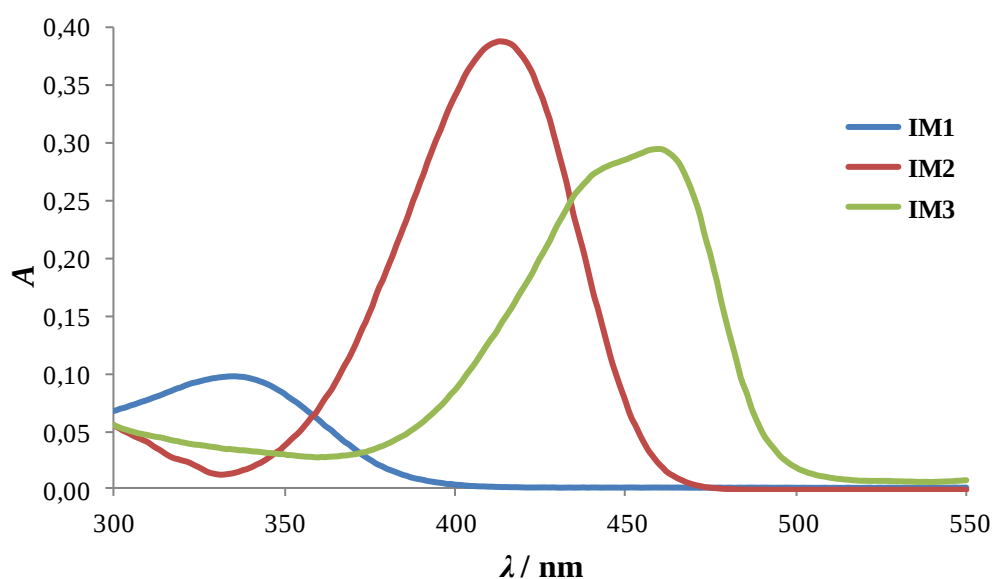
Spoj	Struktura	Mr	c (stock otop.) / mol dm^{-3}	V (stock otop.)/ μL	c / mol dm^{-3} ABS	$\lambda_{\text{aps}}/\text{nm}$	V(stock otop.)/ μL	c/ mol dm^{-3} FLUO
IM1		275,274	$1,33 \cdot 10^{-3}$	22,60	$1 \cdot 10^{-5}$	200-700	2,00	$1 \cdot 10^{-6}$
IM2		346,426	$1,15 \cdot 10^{-3}$	26,10	$1 \cdot 10^{-5}$	200-700	3,00	$1 \cdot 10^{-6}$
IM3		377,402	$2,9 \cdot 10^{-4}$	103,00	$1 \cdot 10^{-5}$	200-700	10,30	$1 \cdot 10^{-6}$

4. Rezultati

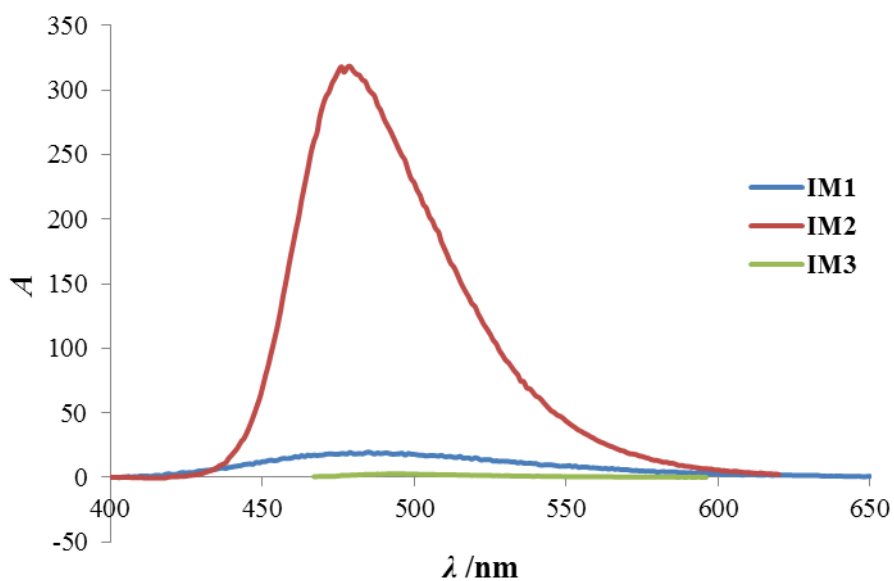
4.1. Spektralna karakterizacija ispitivanih spojeva u etanolu

Preliminarno su snimljeni apsorpcijski i emisijski spektri ispitivanih spojeva **IM1** – **IM3** u otopini čistog etanola. Otopine pod dnevnim svjetlom odgovaraju apsorpcijskom spektru te je vidljiva razlika u boji između spojeva - IM1 je bezbojan, IM2 žut, a IM3 narančaste boje. Nakon pobude svjetlošću UV lampe, spojevi emitiraju zračenje te je vidljiva fluorescencija (Slika 12.).

Kako bi se usporedio utjecaj supstituenta, odnosno odnos strukture i spektralnih svojstava spojeva, prikazani su apsorpcijski i emisijski spektri ispitivanih spojeva snimljeni pri istim eksperimentalnim uvjetima (Slika 13.).

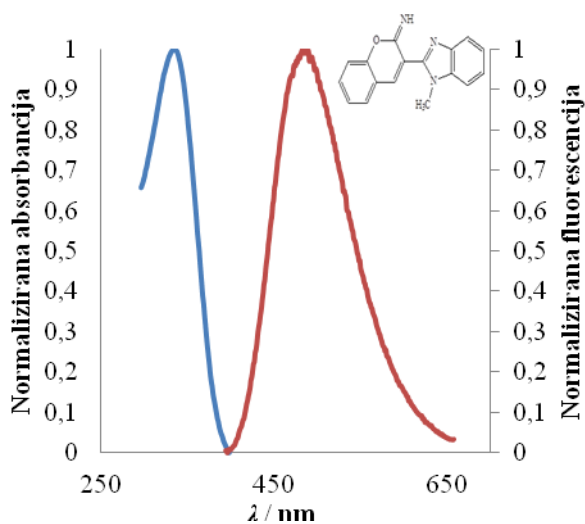


Slika 15a. Apsorpcijski spektar ispitivanih spojeva u etanolu.



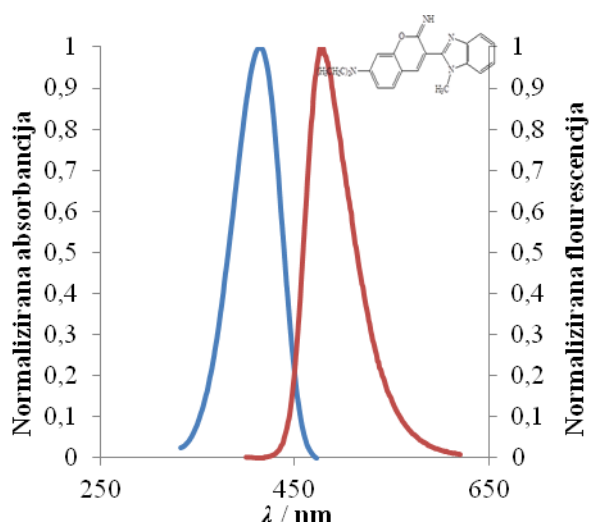
Slika 15b. Emisijski spektar ispitivanih spojeva u etanolu.

Kako bi se omogućila usporedba dobivenih spektara apsorpcije i emisije, prikazane su njihove normalizirane vrijednosti, odnosno relativni intenzitet u rasponu vrijednosti od 0 do 1.



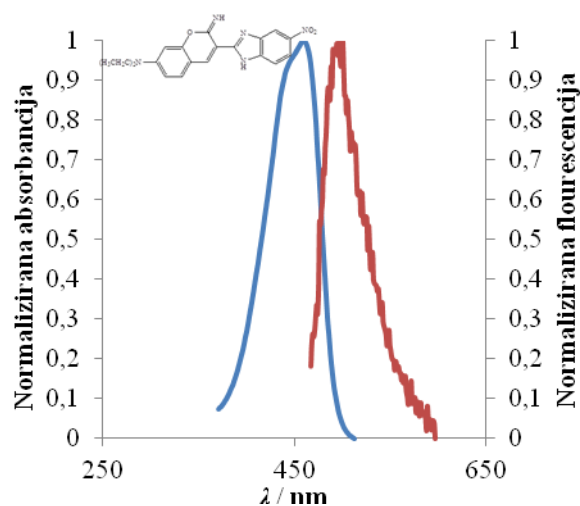
a)

Slika 16a. Apсорpcijski i emisijski spektar spoja **IM1** u etanolu.



b)

Slika 16b. Apсорpcijski i emisijski spektar spoja **IM2** u etanolu.



c)

Slika 16c. Apsorpcijski i emisijski spektar spoja **IM3** u etanolu.

Podaci dobiveni spektralnom karakterizacijom ispitivanih spojeva sumarno su prikazani u tablici 3.

Tablica 3. Valne duljine maksimuma apsorpcije, apsorpcijski koeficijent, valne duljine emisije, intenzitet fluorescencije i Stokesov pomak ispitivanih spojeva u etanolu.

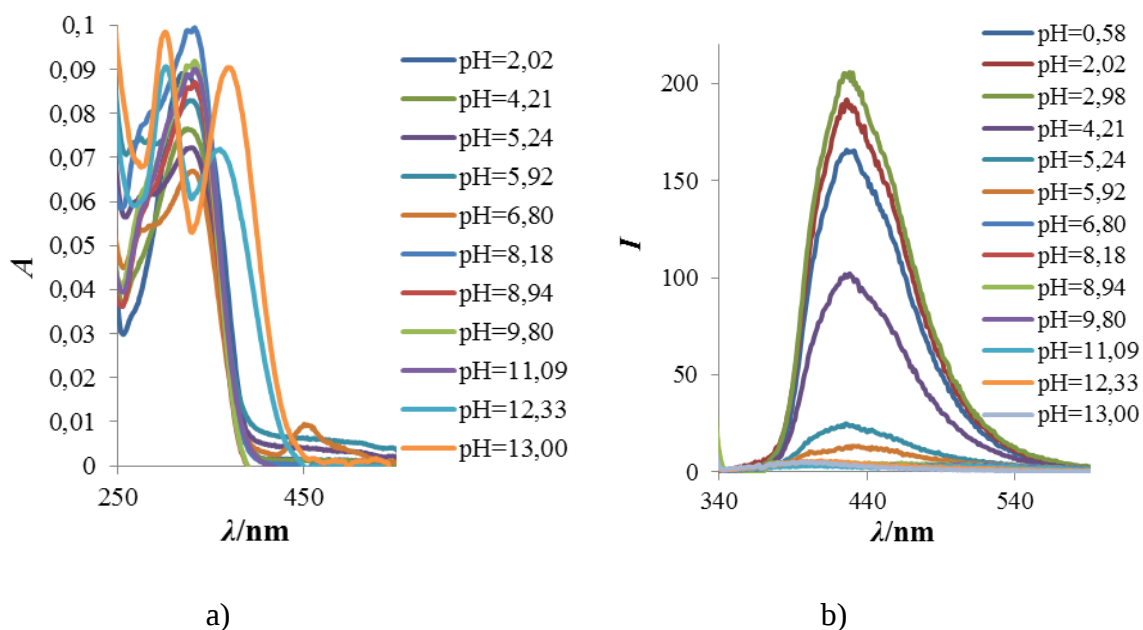
	$\lambda_{\text{abs}} / \text{nm}$	$\varepsilon * 10^4 / \text{dm}^3 \text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$	$\lambda_{\text{emiss}} / \text{nm}$	Fluo. Int. (a.u.)	Stokesov pomak / nm
IM1	335	3350	483,93	19,04857	148,93
IM2	415	4150	468,95	318,4546	53,95
IM3	460	4600	433,03	2,761875	26,97

4.2. Utjecaj promjene vrijednosti pH na spektralna svojstva

Kako bi se utvrdila mogućnost primjene spojeva **IM1**, **IM2** i **IM3** kao optičkih pH senzora, ispitana je promjena njihovih spektralnih svojstava ovisno o vrijednosti pH otopine. Snimljeni su apsorpcijski i emisijski spektri u otopinama univerzalnog pufera i etanola različitih vrijednosti pH prema ranije opisanom postupku u odjeljku (3.4.1 , 3.4.2.).

4.2.1. Utjecaj promjene vrijednosti pH na spektralna svojstva spoja **IM1**

Na slici 17. su prikazani apsorpcijski i fluorescencijski spektri spoja **IM1** u univerzalnom puferu pri različitim vrijednostima pH. Na slici 18. su prikazane otopine spoja **IM1** u vodi i puferskim otopinama na danjem i pod UV svjetlom.



Slika 17. Apsorpcijski (a) i fluorescencijski (b) spektri spoja **IM1** u univerzalnom puferu pri različitim vrijednostima pH.



a)



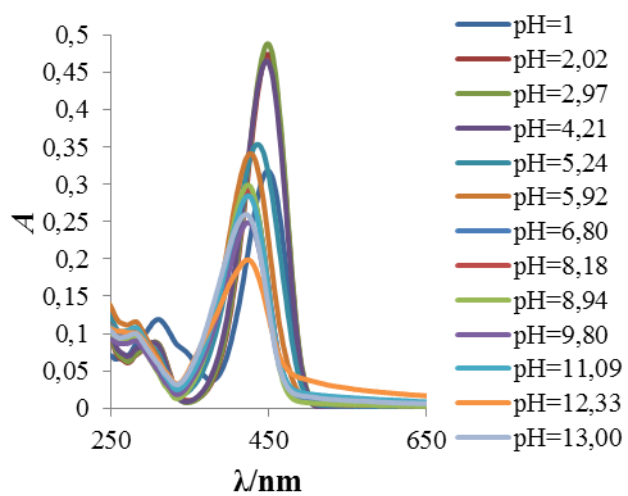
b)

Slika 18. Prikaz otopina spoja **IM1** u neutralnom (lijevo) i kiselom mediju (desno) na danjem svjetlu (a) i pod UV lampom (b).

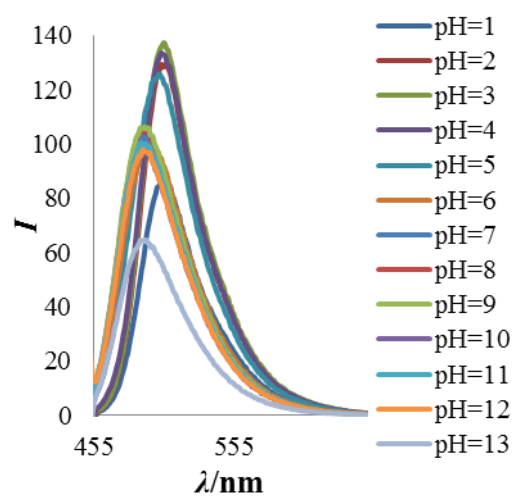
4.2.2. Utjecaj promjene vrijednosti pH na spektralna svojstva spoja IM2

a) Utjecaj promjene vrijednosti pH na spektralna svojstva spoja IM2 u univerzalnom puferu

Na slici 19. su prikazani apsorpcijski i fluorescencijski spektri spoja **IM2** u univerzalnom puferu pri različitim vrijednostima pH te otopine spoja na danjem i pod UV svjetlom.



a)



b)



c)

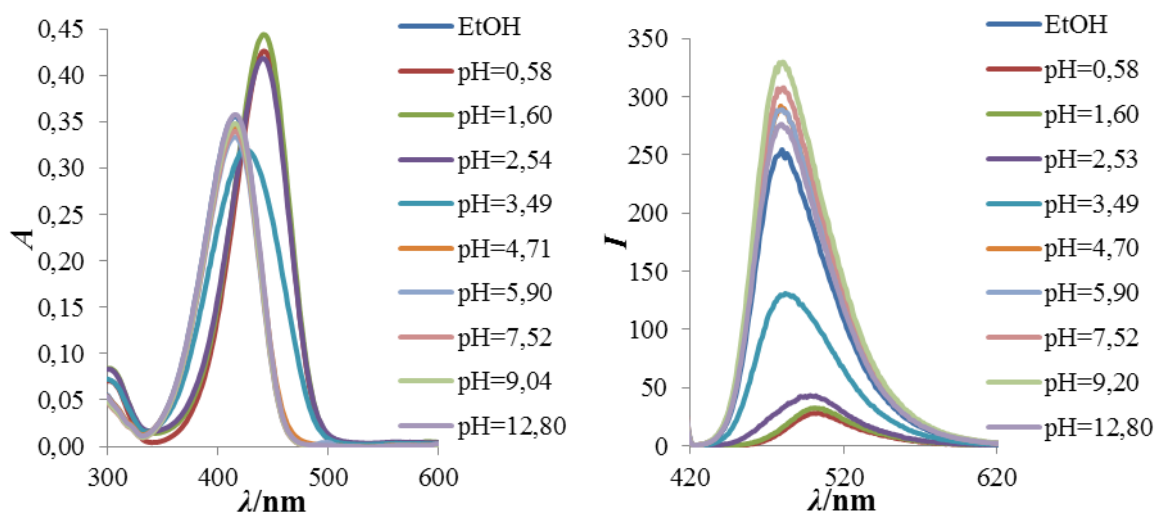


d)

Slika 19. Prikaz apsorpcijskog (a) i fluorescencijskog (b) spektra spoja **IM2** u univerzalnom puferu pri različitim vrijednostima pH ; prikaz otopina spoja **IM2** u neutralnom (lijevo) i kiselom mediju (desno) na danjem svjetlu (c) i pod UV lampom (d).

b) Utjecaj promjene vrijednosti pH na spektralna svojstva spoja IM2 u etanolnim otopinama

Na slici 20. su prikazani apsorpcijski i fluorescencijski spektri spoja **IM2** u etanolnoj otopini pri različitim vrijednostima pH te otopine spoja na danjem i pod UV svjetlom.



a)

b)



c)

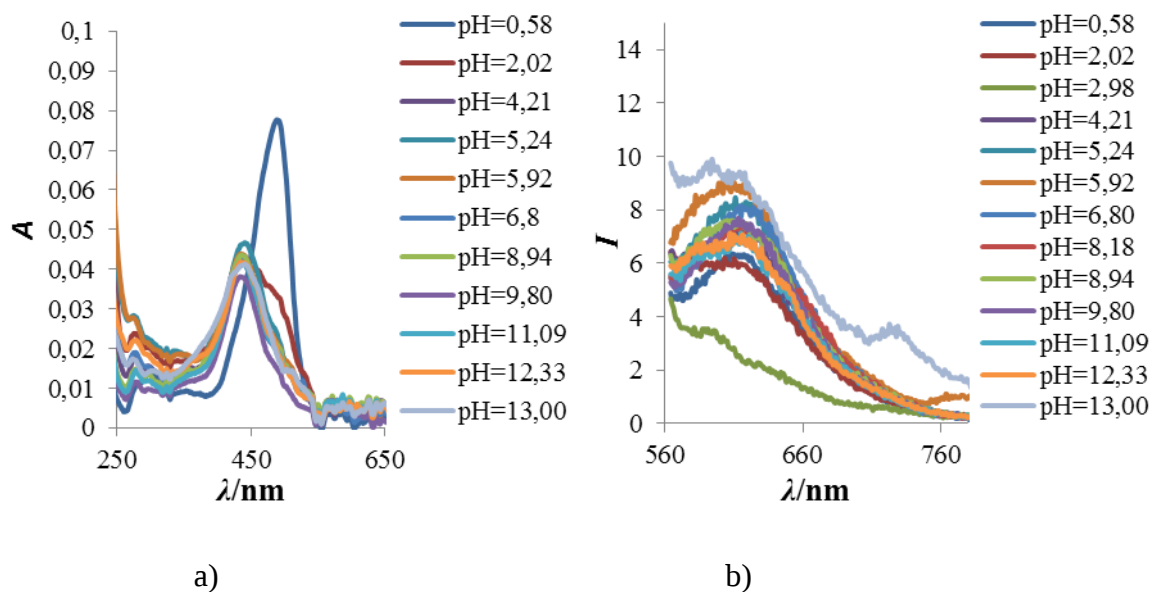


d)

Slika 20. Prikaz apsorpcijskog (a) i fluorescencijskog (b) spektra spoja **IM2** u etanolnim otopinama pri različitim vrijednostima pH; prikaz otopina spoja **IM2** u neutralnom (lijevo) i kiselom mediju (desno) na danjem svjetlu (c) i pod UV lampom (d).

4.2.3. Utjecaj promjene vrijednosti pH na spektralna svojstva spoja IM3

Na slici 21. su prikazani apsorpcijski i fluorescencijski spektri spoja **IM3** u univerzalnom puferu pri različitim vrijednostima pH. Na slici 22. su prikazane otopine spoj **IM3** u vodi i puferskim otopinama na danjem i pod UV svjetlom.



Slika 21. Apsorpcijski (a) i fluorescencijski (b) spektri spoja **IM3** u univerzalnom puferu pri različitim vrijednostima pH.



Slika 22. Prikaz otopina spoja **IM3** u neutralnom (lijevo) i kiselom mediju (desno) na danjem svjetlu (a) i pod UV lampom (b)

4.2.4. Određivanje pK_a vrijednosti ispitivanih spojeva

Kako bi se ispitala mogućnost primjene spojeva **IM1**, **IM2** i **IM3** kao optičkih pH senzora određena je njihova uvjetna pK_a vrijednost. Uvjetna vrijednost jest vrijednost određena pri točno određenim uvjetima stoga se Uvjetna pK_a vrijednost razlikuje od prave, termodinamičke vrijednosti i vrlo je bitna značajka jer poznavanjem njene vrijednosti može se definirati optimalni raspon pH vrijednosti unutar kojeg će senzor funkcionirati.

U tablici 4. sumarno su prikazana spektrofotometrijska svojstva ispitivanih spojeva u ovisnosti o vrijednosti pH.

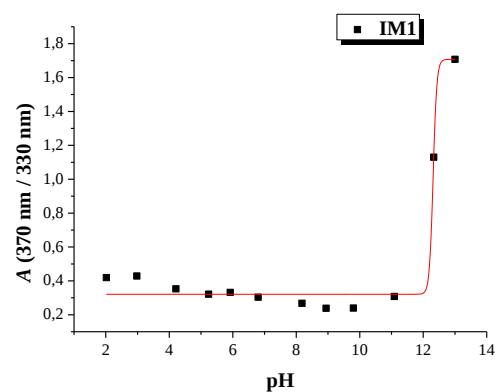
Tablica 4. Spektrofotometrijska svojstva ispitivanih spojeva u ovisnosti o vrijednosti pH

	$\lambda_{\text{abs}}/\text{nm}$		$\lambda_{\text{emis}}/\text{nm}$	
	kiselo	neutralno	kiselo	neutralno
IM1/voda	318,95	330,98	426,06	426,06
IM2/voda	445	431,95	503,21	501,06
IM2/etanol	441,06	416	506,06	485
IM3/voda	476,05	435,94	615,6	611,02

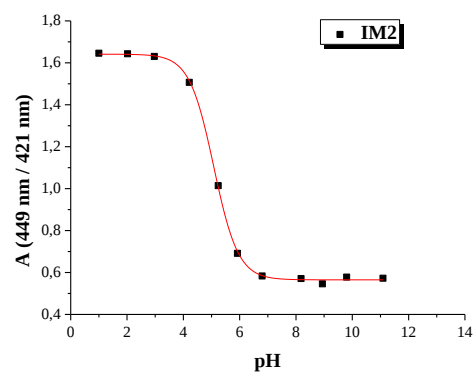
Slika 23. prikazuje krivulje ovisnosti vrijednosti apsorbancije o pH na temelju kojih se određuju uvjetne pK_a vrijednosti za spojeve **IM1**, **IM2** i **IM3**. Dobivena titracijska krivulja je sigmoidalnog oblika te je kroz dobivene točke provučena Boltzmanova krivulja prikazana jednadžbom (10):

$$y = \frac{A_1 - A_2}{1 + e^{(x-x_0)/dx}} + A_2 \quad (10)$$

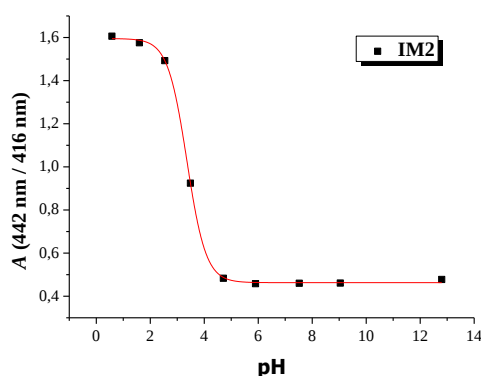
Točka infleksije odgovara uvjetnoj pK_a vrijednosti u ispitivanim otopinama. U tablici 5. prikazane su izračunate vrijednosti pK_a .



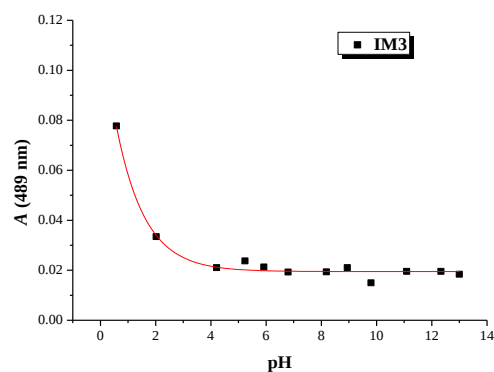
a)



b)



c)

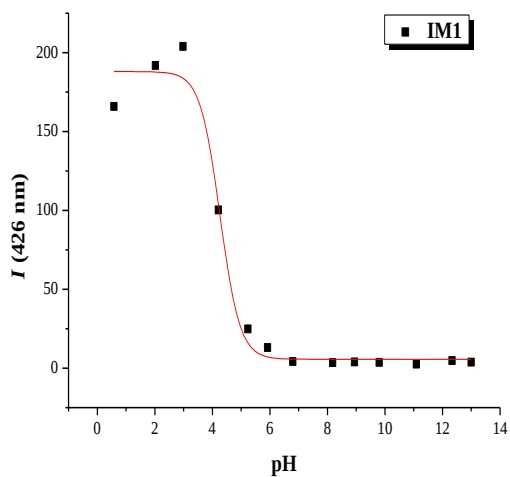


.d)

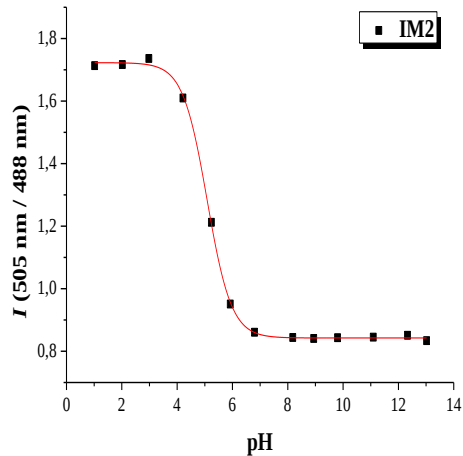
Slika 23. Ovisnosti vrijednosti apsorbancije o pH u puferskim i etanolnim otopinama za spojeve: a) **IM1** ($\lambda = 370 \text{ nm} / 330 \text{ nm}$); b) **IM2** ($\lambda = 449 \text{ nm} / 421 \text{ nm}$); c) **IM2** (EtOH) ($\lambda = 442 \text{ nm} / 416 \text{ nm}$); d) **IM3** ($\lambda = 489 \text{ nm}$)

Slika 24. prikazuje krivulje ovisnosti emisije ispitivanih spojeva o pH na temelju koje se određuju uvjetne pK_a vrijednosti za spojeve **IM1**, **IM2**. Spoj **IM3** ne pokazuje pravilan odziv,

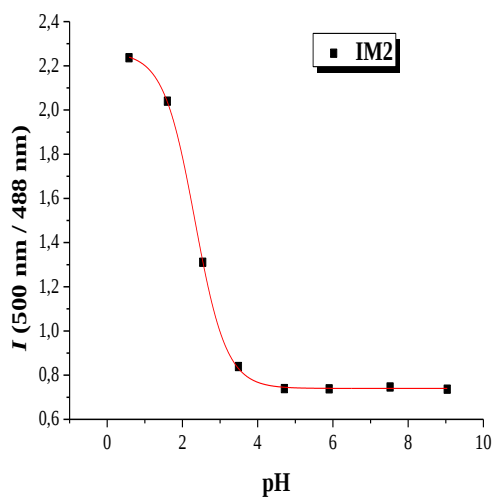
stoga nije konstruirana kalibracijska krivulja. U tablici 5. prikazane su izračunate vrijednosti pK_a .



a)



b)



c)

Slika 24. Krivulje ovisnosti vrijednosti emisije o pH u puferskim i etanolnim otopinama za spojeve: a) IM1 ($\lambda = 426$ nm); b) IM2 ($\lambda = 505$ nm / 488 nm); c) IM2 (EtOH) ($\lambda = 500$ nm / 488 nm)

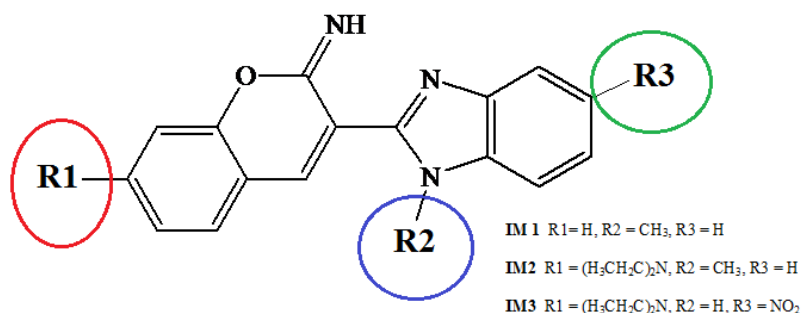
Tablica 5. Vrijednosti pK_a određene iz apsorbancijskih i emisijskih spektara za spojeve IM1, IM2 i IM3.

Spoj	Apsorbancija		Emisija	
	$\lambda_{\text{abs}}/\text{nm}$	pK_a	$\lambda_{\text{emis}}/\text{nm}$	pK_a
IM1	370	12,31	426	4,27
IM2	449	5,08	505	5,08
	442 (EtOH)	3,35 (EtOH)	500(EtOH)	2,33
IM3	489	< 3		

5. Rasprava

U ovom završnom radu istraživana su optička senzorska svojstva novosintetiziranih derivata iminokumarina. Novosintetizirani spojevi su okarakterizirani metodama UV-vidljive apsorpcijske i fluorescencijske spektrofotometrije u otopinama te su istražena njihova svojstva u ovisnosti o strukturi i promjeni vrijednosti pH.

Ispitivani derivati iminokumarina su spojevi koji se sastoje od dviju jezgara, benzimidazolne i kumarinske, povezanih metilenskim mostom. Na benzimidazolnom dijelu molekule je supstituirana metilna skupina u slučaju **IM1** i **IM2** i nitro skupina kod spoja **IM3**. Kumarinski dio molekule je supstituiran dietil amino skupinom kod svih ispitivanih spojeva osim **IM1**, što se vidi na slici 25. Apsorpcijska i fluorescencijska svojstva možemo objasniti utjecajem supstituenata na kumarinskom i benzimidazolnom prstenu koji se razlikuju po prirodi, raspodjeli gustoće elektrona i elektron akceptorskim, odnosno elektron donorskim tendencijama. Protoniranje ispitivanih spojeva znatno utječe na njihova spektralna svojstva. Ako su ta svojstva dovoljno izražena mogu se karakterizirati i dalje razvijati za potencijalnu senzorsku primjenu. U ispitivanim molekulama postoji mogućnost protonacije na dušikovim atomima (amino skupina ili imino dušik).



Slika 25. Prikaz položaja supstituentana vezanih na molekulu iminokumarina.

5.1. Spektralna karakterizacija ispitivanih spojeva u etanolu

Na Slici 15. prikazani su apsorpcijski i emisijski spektri ispitivanih spojeva snimljeni pri istim eksperimentalnim uvjetima kako bi se što bolje usporedio odnos strukture i spektralnih svojstava spojeva. Na apsorpcijskom spektru (slika 15.a) vidi se kako **IM3** apsorbira pri najvećoj valnoj duljini, dok **IM1** pri najmanjoj. Na emisijskom spektru ispitivanih spojeva u

otopini čistog etanola odmah je vidljivo kako je intenzitet fluorescencije spoja **IM2** najveći u odnosu na ostala dva spoja, koji pokazuju znatno manji intenzitet. Razlike u apsorpciji i intenzitetu zračenja se javljaju zbog razlika u strukturi spomenutih derivata.

Spojevi **IM1** i **IM2** u svojoj strukturi imaju metilnu skupinu koja im pridonosi bolju topljivost u etanolu u odnosu na spoj **IM3** koji pokazuje izrazito slabu topljivost zbog postojanja nitro skupine u svojoj strukturi. Naime, nitro skupina jaka je elektron-akceptorska skupina koja izravno utječe na smanjenje topljivosti spoja **IM3**, a time možda i na smanjenje intenziteta fluorescencije, ako su eksperimenti nepravilno izvedeni.

Iako oba spoja, **IM1** i **IM2** u svojoj strukturi imaju već spomenutu metilnu skupinu spoj **IM2** fluorescira jačim intenzitetom, a razlog tome je dietil amino skupina vezana na položaju -R1 (na kumarinsku jezgru spoja). Dietil amino skupina je elektron-donorska skupina zbog svog slobodnog para elektrona na dušiku koji direktno sudjeluju u π vezi te time utječe na konjugaciju sustava, odnosno povećava fluorescenciju spoja. Nadalje, na slici 15.(a) također je vidljiv hipsokromni pomak (pomak prema nižim valnim duljinama) spoja **IM1** u odnosu na ostale spojeve. Ako spoj **IM1** promatramo kao 'roditeljski' spoj, odnosno spoj bez supstituenta, možemo govoriti o batokromnom pomaku, odnosno pomaku prema većim valnim duljinama, spojeva **IM2** i **IM3** u odnosu na **IM1**.

Prikazom normaliziranih vrijednosti spojeva, odnosno relativnog intenziteta apsorpcije i fluorescencije u rasponu vrijednosti od 0 do 1 (slika 16.) vidljivi su Stokes-ovi pomaci. Najveći Stokes-ov pomak od 148,93 nm ima spoj **IM1**, nakon čega **IM2** ima pomak u iznosu od 53,95 nm. Najmanji Stokes-ov pomak od 26,97 nm pokazao je spoj **IM3**. Veći Stokesov pomak omogućuje lakšu i bolju primjenu spoja u senzorskim sustavima.

5.2. Spektralna karakterizacija ispitivanih spojeva u otopini

5.2.1. Utjecaj promjene pH vrijednosti

Ispitivan je utjecaj promjene vrijednosti pH na spektralna svojstva spojeva **IM1**, **IM2** i **IM3** kako bi se utvrdila njihova potencijalna primjena u senzorskim sustavima za određivanje pH.

5.2.1.1. Utjecaj promjene vrijednosti pH na spektralna svojstva spoja **IM1**

Iz apsorpcijskog spektra za spoj **IM1** u univerzalnom puferu (slika 17.a) uočava se apsorpcijski maksimum na $\lambda = 335\text{nm}$ pri gotovo svim vrijednostima pH. Do odstupanja dolazi pri pH vrijednostima $\text{pH} = 12,33$ i $\text{pH} = 13,00$ gdje se uočava apsorpcijski maksimum na $\lambda = 300\text{ nm}$.

Emisijski maksimumi na valnoj duljini $\lambda = 423,029\text{ nm}$ se uočavaju pri svim pH vrijednostima (slika 17.b). Intenzitet fluorescencije je najveći u kiselom mediju, a smanjenjem kiselosti fluorescencija se gotovo potpuno gasi. Navedeno svojstvo senzorske molekule ima široku primjenu u pH senzorima kao tzv. *on-off* senzor.

IM1 se smatra roditeljskim spojem jer ne sadrži supstituent na kumarinskoj jezgri. Metilnom skupinom je supstituiran samo dušik na benzimidazolnoj jezgri. U kiselom mediju dolazi do protoniranja jednog od dušika unutar molekule **IM1** te se uočava izrazit porast intenziteta fluorescencije upravo zbog promjene strukture molekule protoniranjem.

5.2.1.2. Utjecaj promjene vrijednosti pH na spektralna svojstva spoja IM2

a) Utjecaj promjene vrijednosti pH na spektralna svojstva spoja IM2 u univerzalnom puferu

Na apsorpcijskom spektru za spoj **IM2** u univerzalnom puferu (slika 19.a) uočava se apsorpcijski maksimum na $\lambda = 433,02$ nm za pH vrijednosti 13 do 4,21. Vrijednost valne duljine apsorbancije se povećava smanjenjem vrijednosti pH pa od pH = 4,21 i manje, maksimum apsorpcije se mijenja i nalazi se na valnoj duljini $\lambda = 450,98$ nm.

Emisijski maksimumi najizraženiji su pri niskim pH vrijednostima i nalaze se na valnoj duljini $\lambda = 501,06$ nm (slika 19.b). Intenzitet fluorescencije je kao i kod spoja **IM1** najveći u kiselom mediju, a smanjenjem kiselosti on postupno opada.

IM2 za razliku od **IM1** i **IM3** ima najjači intenzitet. Razlog tome je dietil amino skupina vezana na položaj R1 (slika 25.). Dietil amino skupina spada u sekundarne amine, tj. to je elektron-donorska skupina zbog svog slobodnog elektronskog para na dušiku.

Spektralne promjene se uočavaju zbog protonacije spoja na već spomenutim dušikovim atomima ili zbog protonacije dietil amino skupine.

b) Utjecaj promjene vrijednosti pH na spektralna svojstva spoja IM2 u etanolnim otopinama

Spoj **IM2** pokazuje sličan odziv na pH i u etanolnim otopinama (slika 20.a) kao i u puferskim otopinama. Maksimumi apsorpcije su, sukladno promjeni polarnosti otapala, lagano batokromno pomaknuti u odnosu na vodeni medij, odnosno pufer. U kiselom mediju (pH = 1,00- 2,00) uočava se maksimum apsorpcije na $\lambda = 449,04$ nm, dok su pri ostalim pH vrijednostima maksimumi na $\lambda = 420$ nm. Najveća spektralna promjena se uočava na emisijskom spektru spoja **IM2** u etanolnoj otopini.

Kako je vidljivo iz slike 18.b. fluorescencija se pri niskim vrijednostima pH skoro u potpunosti gasi.

5.2.1.3. Utjecaj promjene vrijednosti pH na spektralna svojstva spoja IM3

Apsorpcijski spektar spoja **IM3** u univerzalnom puferu pokazuje maksimum apsorpcije na $\lambda = 441$ nm za gotovo sve vrijednosti pH (slika 21.a). Izrazito odstupanje vidljivo je na pH vrijednosti pH = 13,00 gdje vrijednosti maksimuma apsorpcije doseže $\lambda = 495,08$ nm. Kod spoja **IM3** također je vidljivo povećanje vrijednosti apsorpcije smanjenjem vrijednosti pH.

Intenzitet fluorescencije spoja **IM3** je vrlo slab, kao što je vidljivo na slici 19.b. Emisijski maksimum je vrlo teško odrediti ali može se zaključiti da se otprilike nalazi na $\lambda = 600$ nm. Fluorescencija spoja **IM3** može se objasniti pojavom intermolekularnog prijenosa naboja. Struktura spoja **IM3** omogućava formiranje takozvanog *povuci-potegni* sustava u pobuđenom stanju. Sastoji se od elektron donorske i elektron akceptorske skupine na suprotnim stranama konjugiranog sustava (*D- π -A* sustav). S obzirom na spomenutu strukturu spoja **IM3** za očekivati je da je intenzitet fluorescencije, kao i promjena valne duljine emisije, izražen. Međutim, to se u ovom slučaju ne vidi, a razlog tome je moguće sudjelovanje i nekih drugih mehanizama stvaranja signala.

Prilikom otapanja molekula spoja dolazi, između ostalog, i do protonacije samog spoja a time i do vezanja protona na dušike unutar molekule iminokumarina i onemogućavanje daljnjeg prijenosa naboja što rezultira gašenjem fluorescencije.

5.2.1.4. Određivanje pK_a vrijednosti ispitivanih spojeva

Iz dobivenih spektara pH-metrijske titracije napravljene su kalibracijske krivulje (slika 21 i 22.) koje prikazuju ovisnost apsorpcije i/ili intenziteta emisije o promjeni pH vrijednosti. Simulirana je Boltzmannova krivulja i dobivene su točke infleksije koje predstavljaju uvjetne pK_a vrijednosti. Titracije su se provodile u vodenim otopinama za sva tri spoja i u etanolnim

otopinama za spoj **IM2** te se može zaključiti da dolazi do vrlo malog pomaka uvjetne pK_a vrijednosti. Kao što je prikazano u tablici 5., izračunate pK_a vrijednosti za sva tri spoja se nalaze u kiselom području ($pK_a < 5$). Bitno je napomenuti da se kod spoja **IM1** u apsorpcijskom i emisijskom spektru ne uočava ista kiselo-bazna promjena te su navedene pK_a vrijednosti izrazito drukčije ($pK_a=12,31$ i $pK_a=4,21$). Izračunate uvjetne pK_a vrijednosti za spoj **IM2** se razlikuju za ≈ 2 jedinice u etanolu i vodi. Zbog izrazito slabe fluorescencije i neznatnih promjena u spektru, vrijednosti za spoj **IM3** nisu jednoznačno određene.

6. Zaključak

Uspješno su okarakterizirana spektrofotometrijska svojstva spojeva **IM1**, **IM2** i **IM3** UV-vidljivom i fluorescencijskom spektrofotometrijom u vodenim i etanolnim otopinama.

Položaj i vrsta supstituenta utječe na spektrofotometrijska svojstva ispitivanih spojeva te njihove fotofizičke karakteristike.

Protoniranje ispitivanih spojeva znatno utječe na njihova spektralna svojstva. U ispitivanim molekulama postoji mogućnost protonacije na dušikovim atomima (amino skupina ili imino dušik).

S obzirom na dobivene apsorpcijske spektre vidimo da spoj **IM1** apsorbira u UV području, a spojevi **IM2** i **IM3** u vidljivom dijelu elektromagnetskog spektra. Spoj **IM2** se pokazao kao najbolji optički senzor zbog najjačeg intenziteta fluorescencije.

Ispitivani novosintetizirani derivati iminokumarina predstavljaju potencijalne nove vrste pH senzora. Dva od tri ispitivana derivata iminokumarina (**IM1**, **IM2**) pokazuju izrazitu fluorescenciju i promjenu spektralnih svojstava u ovisnosti o pH.

Iz dobivenih spektara pH-metrijske titracije napravljene su kalibracijske krivulje te je simulirana je Boltzmannova krivulja. Dobivene su točke infleksije koje predstavljaju uvjetne pK_a vrijednosti. Izračunate pK_a vrijednosti za sva tri spoja se nalaze u kiselom području ($pK_a < 5$).

7. Literatura

1. Hulanicki, A., Glab, S., Ingman, F. Chemical Sensors, definitions and classifications, Pure and Applied Chemistry **9** (1991) 1247-1250
2. Piljac I., Senzori fizikalnih veličina i elektroanalitičke metode, 2010., str. 593 – 610
3. Edmonds T.E. (ed.), Chemical Sensors, Blackie and Sons Ltd., London, 1988, str. 383-384
4. Volmajer, J., Toplak, R., Leban, I., Le M., A.M., Synthesis of new iminocoumarins and their transformations into N-chloro and hydrazono compounds et. Al. Tetrahedron **61** (2005) str. 7012–7021
5. Rajput, V.K., Leffler, H., Nilsson, U.J., Mukhopadhyay, V., Synthesis and evaluation of iminocoumaryl and coumaryl derivatized glycosides as galectin antagonists, Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters **254** (2014) 3516 – 3520
6. Rabahi A. et al. / Journal of Molecular Liquids, Synthesis and optical properties of coumarins and iminocoumarins: Estimation of ground- and excited-state dipole moments from a solvatochromic shift and theoretical methods **195** (2014) 240–247
7. Skoog D. A., Holler E. J. , Crouch S. R., Principles of Instrumental Analysis **6** (2007) 131 - 159, 230 - 250, 336 - 426
8. Valeur B., Molecula Fluorescence Principles and Applications, 2001, str. 20-143
9. Demchenko A.P., Introduction in Fluorescence Sensing, Springer science + Business Media B. V., 2009, str. 119-188
10. Li H., Guo J., Zhang X., Chen Z., A Novel Colorimetric and Fluorescent pH sensor Derived from Iminocoumarin and Thiophene-Carboxaldehyde **6** (2012) 551
11. Li H., Guo J., Zhang X., Chen Z., Coumarin-Derived Fluorescent Chemosensors, 2012., str. 121-124
12. S. Vasylevska A., A. Karasyov A., M. Borisov S., Krause C., Novel coumarin-based fluorescent pH indicators, probes and membranes covering a broad pH range (2007) 2131
13. Turki H., Souhir A., Fery-Forgues S., El Gharbi R., Optical properties of new fluorescent iminocoumarins: Part 1 (2006) 312-313

ŽIVOTOPIS

Rođena sam 15.03.1993. u Splitu. Pohađala sam Osnovnu školu Jurja Dalmatinca u Pagu nakon koje sam upisala opću gimnaziju Bartola Kašića. Upisala sam Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije 2011. godine, smjer Primijenjena kemija. Praksu sam odradila 2015.godine u tvrtki Komunalije d.o.o. Novalja na poslovima ispitivanja mora i na uređaju za pročišćavanje otpadnih voda grada Novalje. Tema završnog preddiplomskog rada glasi "Derivati iminokumarina kao potencijalni fluorescentni pH senzori". Radi se o eksperimentalnom završnom radu kojeg sam provodila na Zavodu za opću i anorgansku kemiju pod vodstvom mentorice dr.sc. Lidije Furač.