

Bis(benzotiazolil-triazolil)benzeni kao potencijalne solvatokromne probe

Grobenski, Paola

Undergraduate thesis / Završni rad

2022

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:149:841782>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-07**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI PREDIPLOMSKI STUDIJ

Paola Grobenki

ZAVRŠNI RAD

Zagreb, rujan 2022.

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

Kandidatkinja Paola Grobenski

Predala je izrađen završni rad dana: 14. rujna 2022.

Povjerenstvo u sastavu:

izv. prof. dr. sc. Svjetlana Krištafor, Fakultet kemijskog
inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu
prof. dr. sc. Ivana Steinberg, Fakultet kemijskog inženjerstva i
tehnologije, Sveučilište u Zagrebu
prof. dr. sc. Danijela Ašperger, Fakultet kemijskog inženjerstva i
tehnologije, Sveučilište u Zagrebu

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

Završni ispit održat će se dana: 19. rujna 2022.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI PREDIPLOMSKI STUDIJ

Paola Grobenki

**BIS(BENZTIAZOLIL-TRIAZOLIL)BENZENI KAO POTENCIJALNE
SOLVATOKROMNE PROBE**

ZAVRŠNI RAD

Voditelj rada: izv. prof. dr. sc. Svjetlana Krištafor

Članovi ispitnog povjerenstva: izv. prof. dr. sc. Svjetlana Krištafor

prof. dr. sc. Ivana Steinberg

prof. dr. sc. Danijela Ašperger

Zagreb, rujan 2022.

Zahvaljujem svojoj mentorici izv. prof. dr. sc. Svjetlani Krištafor na predloženoj temi i pomoći pri izradi ovoga rada. Posebno se zahvaljujem asistentici mag. appl. chem. Kristini Pršir na strpljenju, susretljivosti i kontinuiranoj pomoći, te brojnim raspravama koje su uvelike olakšale izradu ovoga rada. Zahvaljujem i ostalim djelatnicima Zavoda za Opću i anorgansku kemiju.

Hvala kolegama, prijateljima, obitelji, i djelatnicima Krivog puta za podršku pruženu tijekom mogeg višegodišnjeg studija.

SAŽETAK

U ovom je radu cilj istražiti potencijalnu primjenu bis(benzotiazolil-triazolil)benzena kao solvatokromnih proba. Spojevi se sintetiziraju bakrom kataliziranom azid – alkin cikloadicijom (CuAAC) koja se smatra jednom od najzastupljenijih *click* reakcija. 1,2,3-triazoli primjenjivani su kao kemijski senzori uslijed mogućnosti koordiniranja metalnih iona, te vršenja uloge poveznice u *push-pull* sustavima.

Sintetiziran je 1,4-bis(benzotiazolil-triazolil)benzen **3** u niskom iskorištenju. Fotofizička svojstva spoja **3** karakterizirana su UV-vidljivom apsorpcijskom i fluorescencijskom spektrofotometrijom.

Ispitan je utjecaj polarnosti otapala na spektre dobivenih spojeva. Korištena otapala su dimetilsulfoksid (DMSO), tetrahidrofuran (THF), aceton, etanol (EtOH), etil-acetat (EtAc), acetonitril, metanol (MeOH), i kloroform. Otapala su birana s obzirom na parametre polarnosti.

Uočen je batokromni pomak prilikom otapanja u svim otapalima, te je pri korištenju acetonitrila primijećen Stokesov pomak od 58 nm što spoj čini podobnim za uporabu u svrhu solvatokromne probe. Predložena je modifikacija strukture čime bi se povoljno utjecalo na solvato(fluoro)kromno ponašanje.

Ključne riječi: optički kemijski senzori

click kemija

benzotiazol

1,2,3-triazol

UV-vidljiva spektrofotometrija

fluorescencija

intramolekularni prijenos naboja

ABSTRACT

The objective of this paper has been to explore the potential application of 1,3- and 1,4-bis(benzothiazolyl-triazolyl)benzene as solvatochromic probes. The compounds were synthesized by using copper-catalyzed azide-alkyne cycloaddition (CuAAC), considered to be one of the most common click reactions. 1,2,3-triazoles were used as chemical sensors due to their capacity to coordinate metal ions and serve as a linker in push-pull systems.

1,4-bis(benzothiazolyl-triazolyl)benzene **3** was synthesized in low yield. Photophysical properties of the compound were categorized by using UV-visible absorption and fluorescent spectrophotometry.

The influence of solvent polarity on the spectra of synthesized compounds was also examined. Solvents used are as follows: dimethylsulfoxide (DMSO), tetrahydrofuran (THF), acetone, ethanol (EtOH), ethyl-acetate (EtAc), acetonitrile, methanol (MeOH), and chloroform. The solvents were chosen in regard to polarity parameters.

A bathochromic shift was observed during the dissolution in all solvents. A Stokes shift of 58 nm was noticed in the case of acetonitrile, which indicates that the compound is suitable for use as a solvato(fluoro)chromic probe. Finally, structural modifications are proposed as they would have a positive influence on solvato(fluoro)chromic behaviour of the compound.

Key words: optical chemical sensors

click chemistry

benzthiazole

1,2,3-triazole

UV-visible spectrophotometry

fluorescence

intramolecular charge transfer

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. OPĆI DIO	3
2.1. Kemijski senzori	4
2.1.1. Optički kemijski senzori	4
2.2. Spektroskopske metode u karakterizaciji kemosenzorskih molekula	5
2.2.1. UV/VIS apsorpcijska spektrofotometrija.....	6
2.2.2. Fluorescencijska spektrofotometrija	8
2.3. Struktura i svojstva benzotiazola	10
2.4. Struktura i svojstva 1,2,3-triazola	12
2.4.1. <i>Click</i> kemija	13
2.4.1.1. Azid-alkin Huisgenova cikloadicija.....	14
2.4.2. Sinteza 1,4-disupstituiranih 1,2,3-triazola	16
2.5. Solvatokromizam i solvatofluorokromizam.....	17
2.5.1. π -konjugirani sustavi.....	17
2.5.2. <i>Push-pull</i> sustavi	18
2.5.3. Karakteristični mehanizmi prijenosa signala u fluorescentnim senzorskim molekulama ...	19
2.5.3.1. Fotoinducirani prijenos elektrona (PET).....	19
2.5.3.2. Intramolekularni prijenos naboja (ICT)	20
2.5.4. Donorske i akceptorske grupe.....	21
2.5.5. Donorsko-akceptorski sustavi s 1,2,3-triazolnom poveznicom	22
3. EKSPERIMENTALNI DIO	24
3.1. Opće napomene.....	25
3.2. Sinteza spojeva.....	26
3.2.1. Priprava 2-azidobenzotiazola 1	27
3.2.2. Priprava 1,3-bis(1-(1 <i>H</i> -benz[d]tiazol-2-il)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-il)benzena 2	27
3.2.3. Priprava 1,4-bis(1-(1 <i>H</i> -benz[d]tiazol-2-il)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-il)benzena 3	28
3.3. Opis mjerenja	28
3.3.1. Priprema matičnih otopina	28
3.4. Spektroskopska karakterizacija spojeva.....	29
4. REZULTATI I RASPRAVA	31
4.1. Cilj rada.....	32
4.2. Sinteza spojeva.....	33
4.3. UV-vidljivi apsorpcijski i emisijski spektri spoja 3 u otapalima različite polarnosti	39
5. ZAKLJUČAK	44
6. LITERATURA	46
ŽIVOTOPIS	50

1. Uvod

Kemijski su senzori uređaji koji pretvaraju kemijsko ili fizikalno svojstvo analita u mjerljivi signal. Mehanizam optičkog kemijskog senzora temelji se na interakciji analita s elektromagnetskim zračenjem, te se mjeri određen optički fenomen kao što je fluorescencija. Takva vrsta senzora odlikuje se brzinom odziva i selektivnosti.

Razvoj senzora znatno je pojednostavila pojava *click* kemije, čiji se principi temelje na dostupnosti reaktanata, visokom stupnju iskorištenja, i jednostavnoj izolaciji produkata. Klasični primjer *click* reakcije predstavlja upravo 1,3-dipolarna cikloadicija azida i alkina katalizirana bakrom(I). Produkt reakcije su 1,4-disupstituirani 1,2,3-triazoli koji mogu vršiti ulogu receptora i poveznice D- π -A sustava, te doprinositi funkciji pretvornika u senzoru čime se nazire njihova potencijalna primjena u sklopu solvatokromnih proba.

Benziazoli također posjeduju mogućnost senzorske primjene pri motrenju biomolekula u ljudskom organizmu što omogućuje rano dijagnosticiranje raznih poremećaja. Spajanjem benziazola s 1,2,3-triazolom formira se π -konjugirani sustav s fluoroforom te je ispunjen preduvjet za pojavu fluorescencije.

Potruga za novim solvato(fluoro)kromnim probama posljedica je njihove važne senzorske primjene u ekoinženjerstvu i biokemiji gdje su korištene za detekciju metalnih kationa ili proteinskih agregata u ljudskom organizmu.

U ovom radu predložena je sinteza 1,3- i 1,4-bis(1-(1*H*-benz[*d*]tiazol-2-il)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)benzena kao potencijalnih solvatokromnih proba, te su ispitana njihova optička svojstva u odnosu na korišteno otapalo.

2. Opći dio

2.1. Kemijski senzori

Kemijski senzori mjerni su uređaji koji pretvaraju kemijsko ili fizikalno svojstvo nekog analita u mjerljivi signal čija je veličina najčešće proporcionalna koncentraciji analita.¹ Obično se sastoje od senzornog materijala (receptora) i mjernog pretvornika. Senzorni materijal u kontaktu je s analizom te javlja pretvorniku promjenu mjernog svojstva kao što je električna vodljivost ili masa. Mjerni pretvornik prevodi signal u onaj čitljiv računalu. Mehanizam senzora temelji se na raznim principima; mogu biti fizički (u slučaju da ne dolazi do kemijske reakcije), kao što su indeks loma, apsorbancija, promjena mase ili temperature, kemijski (gdje reakcija uzrokuje analitički signal), biokemijski (u kojem biokemijski proces uzrokuje signal, biosenzori).

Neophodna karakteristika kemijskih senzora upravo je reverzibilnost. Neki od ostalih parametara su brz odziv, točnost, ponovljivost, selektivnost, i niska cijena. Važno je napomenuti da karakteristike senzora razvijenog za određenu specifičnu primjenu variraju ovisno o zahtjevima područja istraživanja, kako i o dostupnim tehnologijama.

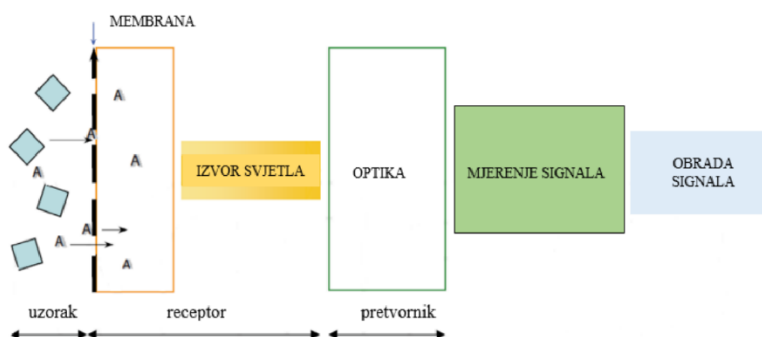
Prema IUPAC-u, mogu se podijeliti u 7 kategorija: optički, elektrokemijski, električni, maseni, magnetski, termometrijski, te senzori koji prate fizikalna svojstva kao što je gama zračenje.²

2.1.1. Optički kemijski senzori

Optički senzori grupa su kemijskih senzora koji reagiraju na pobudu elektromagnetskim zračenjem te generiraju analitički signal u pretvorničkom elementu. Interakcija zračenja i uzorka mjera je promjene određenog optičkog parametra povezanog uz koncentraciju analita. Receptor identificira parametar (primjerice koncentraciju analita) te pruža optički signal proporcionalan veličini parametra.²

Analitički signal mjerljiv je optički fenomen kao što je apsorpcija, intenzitet fluorescencije, ili indeks loma. Pri apsorpciji fotona određene valne duljine dolazi do povećanja energije molekule. Ta energija pohranjena je u sklopu elektronske, rotacijske, ili vibracijske pobude. Kontaktom elektromagnetskog zračenja i uzorka analit može apsorbirati, reflektirati, ili emitirati energiju (fluorescencija i fosforescencija).

Optičke senzore karakteriziraju mnoge prednosti: selektivnost, sigurnost, osjetljivost, te niska cijena. Pouzdano rade u težim uvjetima okoline kao što su visoka temperatura ili pH, te im, usporedno s elektrokemijskim sensorima, nije potrebna referentna elektroda.¹ Međutim, uslijed ispiranja i izbjeljivanja indikatora ograničene su stabilnosti, te na njihov rad može utjecati i ambijentalno svjetlo. Shema optičkog kemijskog senzora prikazana je na slici 1.



Slika 1. Shema optičkog kemijskog senzora

2.2. Spektroskopske metode u karakterizaciji kemosenzorskih molekula

Spektrometrija pruža informacije o kemijskom sastavu i strukturi tvari na temelju odjeljivanja, dokazivanja, i mjerenja energijskih promjena u atomskim jezgrama, omotaču ili u molekulama nakon njihove interakcije s energijom (elektromagnetskog zračenja).³ Spektrometrija je svaki postupak mjerenja spektra u ovisnosti o nekom njegovom svojstvu. Ovisno o tome dolazi li do apsorpcije ili emisije zračenja, spektroskopija se dijeli na apsorpcijsku i emisijsku.

2.2.1. UV/VIS apsorpcijska spektrofotometrija

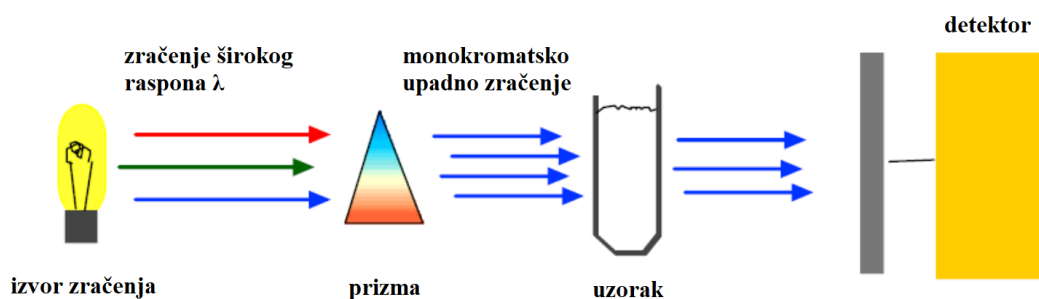
Ultraljubičasto i vidljivo zračenje samo su dio spektra elektromagnetskog zračenja. Ultraljubičasto zračenje pokriva spektar od 200 do 380 nm, dok se vidljivi dio spektra može pronaći u rasponu od 380 do 780 nm.

Elektroni u određenim energetske stanjima mogu, u kontaktu sa zračenjem, apsorbirati energiju fotona te skočiti na viši energijski nivo, odnosno odlaze u pobuđeno stanje. Međutim, oni u pobuđenom stanju ostaju kratko, tek oko 10^{-8} sekundi, te se emisijom fotona vraćaju u svoje stacionarno stanje. Tvari koje emitiraju fluorescentno zračenje zrače dulje, 10^{-8} - 10^{-4} s, dok fosforescencija može trajati čak 20 sekundi i više.⁴

Međutim, neće svaka valna duljina zračenja moći pobuditi svaku molekulu. Elektroni molekule koji se mogu pobuditi određenom valnom duljinom prijeći će s energetski nižeg na viši nivo, odnosno apsorbirat će energiju fotona. Apsorpcija zračenja temelji se na Lambert-Beerovom zakonu:

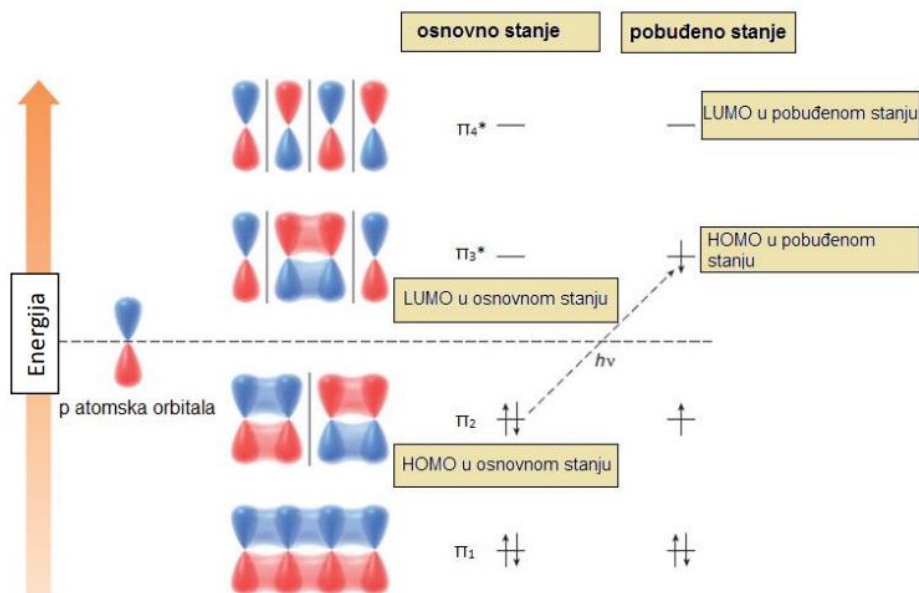
$$\log \frac{I_0}{I} = A = \varepsilon \times b \times c \quad (1)$$

gdje ε predstavlja molarni apsorpcijski koeficijent [$\text{mol}^{-1}\text{dm}^3\text{cm}^{-1}$], b duljinu ćelije [cm], c koncentraciju analita [$\text{mol}^{-1}\text{dm}^3$], dok I [cd], odnosno I_0 [cd] predstavljaju izlazno i ulazno zračenje. Važno je napomenuti da Lambert-Beerov zakon (1) vrijedi samo za monokromatsko zračenje i niske koncentracije analita. Instrumenti korišteni za analizu nazivaju se spektro(foto)metri. Shema spektrofotometra prikazana je na slici 2.

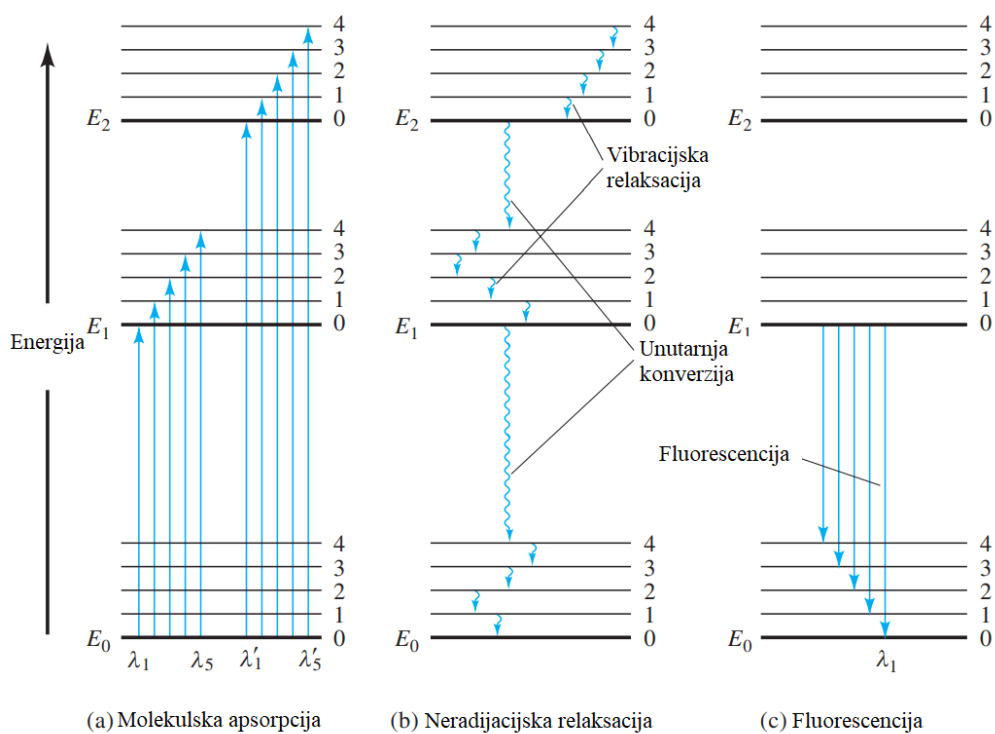


Slika 2. Shema spektrofotometra

Prilikom pobude, elektron ne može skočiti u bilo koju orbitalu. Osnovni preduvjet je da orbitala u koju dolazi nije popunjena, te da elektron ima dovoljnu energiju kako bi ostvario prijelaz. Točnije, elektron će skočiti sa najviše popunjene molekulske orbitale (engl. *highest occupied molecular orbital*, HOMO) na najnižu nepopunjenu molekulsku orbitalu (engl. *lowest unoccupied molecular orbital*, LUMO)⁵, kako je prikazano na slici 3.



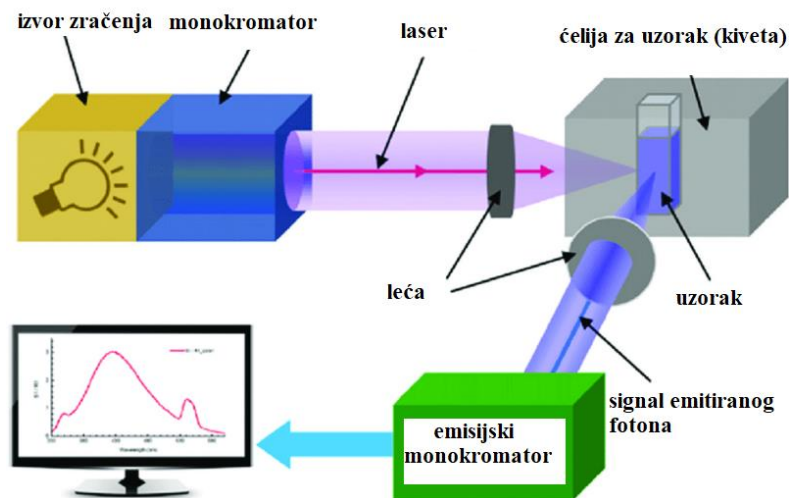
Slika 3. Prikaz prijelaza elektrona iz HOMO u LUMO



Slika 5. Dijagram energijskih razina i promjena pri apsorpciji i relaksaciji⁷

Stokesov pomak prvenstveno je rezultat dvaju fenomena: vibracijske relaksacije ili disipacije i reorganizacije otapala. Definiran je kao razlika valne duljine maksimuma apsorpcije i maksimalnog intenziteta fluorescencije. Molekula je dipol koji se otapanjem okružuje molekulama otapala. Pri ulasku u pobuđeno stanje, njegov dipolni moment se mijenja, međutim, okolne se molekule otapala ne mogu prilagoditi u tako kratkom roku. Tek nakon vibracijske relaksacije njihovi se dipolni momenti ponovno usklađuju.⁸

Ispitivanje fluorescentnih svojstava vrši se fluorescencijskom spektroskopijom čije su prednosti velika osjetljivost i selektivnost, ali imaju i pozamašan nedostatak – ograničeni su na ispitivanje isključivo spojeva koji imaju sposobnost fluorescencije, a njih čini manje od 20% poznatih spojeva. Instrumenti za fluorimetrijsku spektroskopiju nazivaju se fluorimetri, čija je shema prikazana na slici 6.

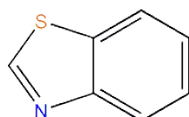


Slika 6. Shema spektrofluorimetra

Uzimajući u obzir da se fluorescencija emitira u svim smjerovima, potreban je dodatni monokromator (odnosno filter) koji vrši selekciju valnih duljina. Rezultat analize je emisijski spektar koji kvantitativno i kvalitativno opisuje analit. Pri korištenju fluorescentnih senzora, veći Stokesov pomak dati će jasniji emisijski spektar, a time i bolju kvalitetu podataka.

2.3. Struktura i svojstva benzotiazola

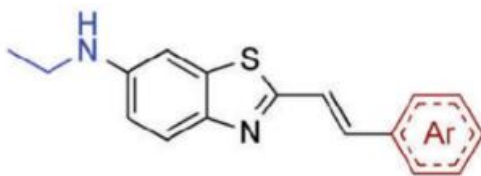
Benzotiazol je aromatski heterociklički spoj kemijske formule C_7H_5NS . Pri sobnoj temperaturi je bezbojna tekućina neugodnog mirisa, te male viskoznosti. Sastoji se od peteročlanog prstena 1,3-tiazola, spojenog na benzenski prsten (slika 7). Molarna masa benzotiazola iznosi 135,19 g/mol.



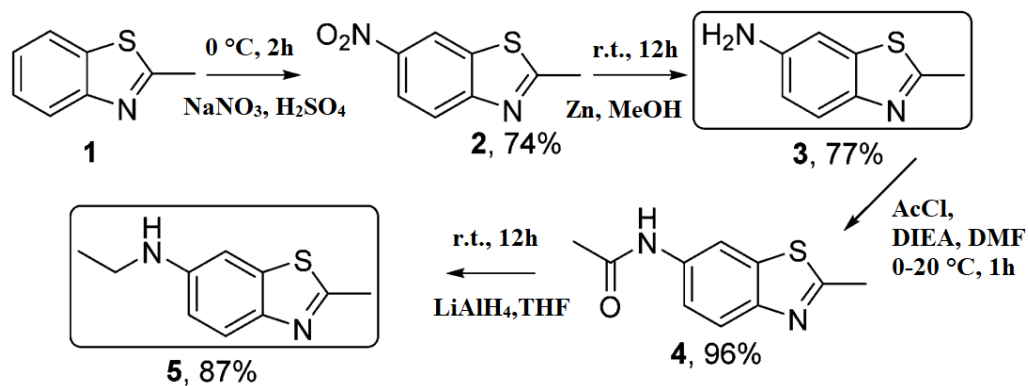
Slika 7. Struktura benzotiazola

Fluorescentne probe na bazi benzotiazola formiraju se spajanjem benzotiazolnog fluorofora s tvari sposobnom za detekciju određene komponente ili fiziološkog stanja.⁹ Takve fluorescentne probe selektivno reagiraju s raznim analitima te vode do promjene u parametrima luminiscencije koji omogućuju opažanje i identifikaciju analita.

Fluorescentne probe na bazi benzotiazola mogu se koristiti za dijagnosticiranje poremećaja, ili bolesti kao što je Alzheimerov sindrom, putem motrenja temeljnih biomolekula ljudskog organizma.¹⁰ Probe pokazuju veliki Stokesov pomak, visoko kvantno iskorištenje fluorescencije, te jasnu promjenu boje. Primjerice, benzotiazol može služiti kao poveznica između 6-etilamino- (donorske grupe), i akceptorske grupe iz obitelji arila (slika 8).



Slika 8. Primjer solvatrokromne probe na bazi benzotiazola¹¹

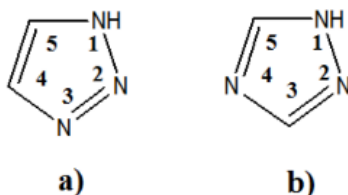


Slika 9. Shema sinteze solvatrokromne probe na bazi benzotiazola¹¹

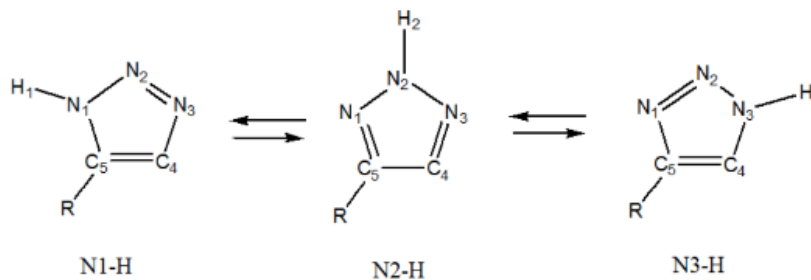
Skupina francuskih znanstvenika, koristeći shemu prikazanu na slici 9, uspješno je sintetizirala 20 solvatokromnih proba. Probe su pokazale visoku emisiju u polarnim i nepolarnim otapalima te su zabilježeni Stokesovi pomaci od čak 192 i 255 nm što probe čini podobnima za upotrebu u sklopu senzora.¹¹

2.4. Struktura i svojstva 1,2,3-triazola

Triazol je aromatski heterociklički spoj kemijske formule $C_2H_3N_3$. Sačinjen je od dva ugljikova i tri dušikova atoma povezanih u peteročlani prsten. Dušikovi atomi mogu poslužiti kao ligand za koordinaciju metala, te mogu stvarati vodikove veze. Na slici 10 prikazana su dva oblika triazola: 1,2,3-triazol, i 1,2,4-triazol. 1,2,3-triazol može se pojaviti u više tautomernih oblika od kojih su najčešći prikazani na slici 11. Ovisno o obliku, vodikov atom može biti vezan na bilo koji od tri dušika u prstenu.



Slika 10. Izomeri triazola: a) 1,2,3-triazol i b) 1,2,4-triazol



Slika 11. Tautomeri 1,2,3-triazola

Promatrajući 1*H*-1,2,3-triazol, primjećuje se da tri atoma dušika uzrokuju snažnu polarizaciju aromatskog sustava, što rezultira parcijalno pozitivnim nabojem na atomima ugljika (C4 i C5) i dušika na poziciji 1, dok dušici N2 i N3 pokazuju parcijalno negativni naboj. Elektronska struktura triazola zajedno sa slobodnim elektronskim parovima na atomima dušika pruža mogućnost koordinacije metala i tvorenja vodikovih veza.¹² Sposobnost koordinacije metala razlog je čestoj ugradnji 1,4-disupstituiranog triazola u kemosenzore.¹³

Pri upotrebi triazola kao supstituenta, njegovo se ponašanje razlikuje ovisno o atomu putem kojeg je vezan. Primjerice, vezanjem preko atoma C4, triazol će pokazati karakteristiku elektron donora, dok vezanjem preko N1 pokazuje induktivni elektron-akceptorski karakter.¹²

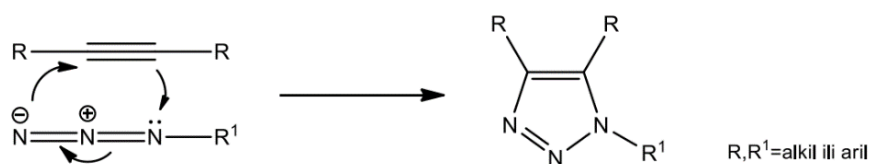
2.4.1. *Click* kemija

Termin *click* kemija prvi put uvode K. B. Sharpless i suradnici 2001. godine. Ona predstavlja novi pristup u organskoj sintezi, odnosno obuhvaća raznovrsne reakcije nastajanja veze između atoma ugljika i heteroatoma. Ideja *click* kemije pojednostavljenje je brojnih kemijskih sinteza postojanjem mnoštva poluprodukata koji se kombiniranjem uvode u *click* reakcije. Takav način rada ubrzao bi i olakšao pronalazak novih zanimljivih i u industriji primjenjivih spojeva.

Sharpless i suradnici definirali su određeni skup uvjeta koje reakcija, kako bi se smatrala *click* reakcijom, mora zadovoljiti. Neki od zahtjeva su blagi reakcijski uvjeti (atmosferski tlak i približno sobna temperatura), stereoselektivnost, pristupačnost reagensa, stabilnost, i laka izolacija produkata. Uvjete ne ispunjava pregršt reakcija, a neke od predstavnica su adicija na nezasićene C-C veze, reakcije nukleofilne supstitucije, te najzastupljenija - Huisgenova 1,3-cikloadicija.

2.4.1.1. Azid-alkin Huisgenova cikloadicija

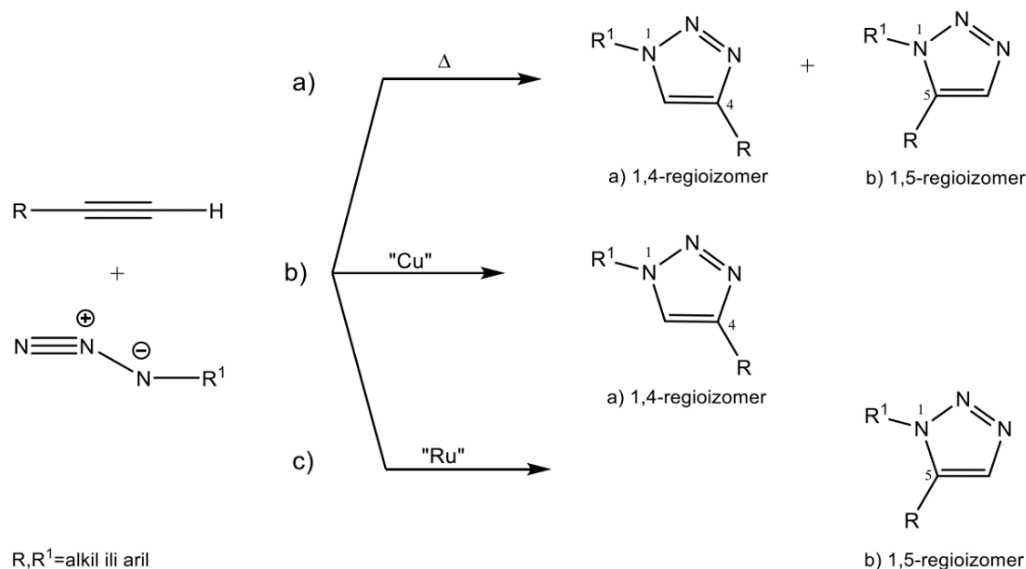
Huisgenova cikloadicija najzastupljeniji je način sinteze 1,2,3-triazola. Radi se o nastajanju 1,2,3-triazolnog prstena 1,3-dipolarnom cikloadicijom azida i alkina kao što je prikazano na slici 12. Reakcija traži uvjete povišene temperature te je produkt najčešće smjesa dvaju izomera (1,4- i 1,5-disupstituirani 1,2,3-triazoli). Reakcija zahtijeva visoke temperature radi pozamašne energije aktivacije (čak 25 kcal mol^{-1} za metil-azid i propin) što rezultira vrlo brzom reakcijom. Potreba za visokim temperaturama krši preduvjete *click* kemije, stoga se ovaj način sinteze ne može u potpunosti smatrati *click* reakcijom, međutim Sharpless i suradnici su pronašli rješenje.



Slika 12. Opći prikaz Huisgenove cikloadicije

Kako bi reakcija bila u skladu s idejom *click* kemije, nadograđuje se pomoću bakra(I), te kao rezultat nastaje bakrom(I) katalizirana azid-alkin cikloadicija (engl. *Copper Catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition*, CuAAC).

U odsutnosti katalizatora reakcija je poprilično spora što dugujemo inerciji i selektivnosti reaktanata, te njihovoj stabilnosti u širokom spektru otapala i temperatura.¹⁴ U prisutnosti bakra, reakcija se odvija drugačijim mehanizmom te nestaje potreba za visokim temperaturama kako bi se svladala energija aktivacije, također, ne nastaje smjesa produkata, nego isključivo 1,4-disupstituirani 1,2,3-triazol. Drugim riječima, reakcija je regio i kemoselektivna što je prikazano na slici 13. Upotrebom rutenija(II) umjesto bakra, kao produkt dobiva se 1,5-disupstituirani regioizomer.¹⁵ Reakcija je imenovana analogno, te nosi naziv RuAAC.



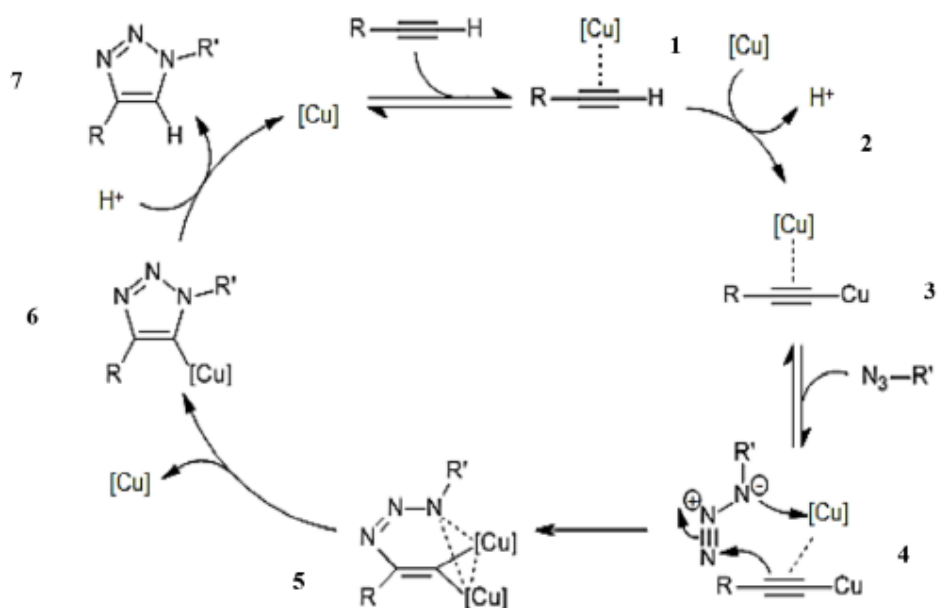
Slika 13. Regioselektivnost 1,3-dipolarne azid-alkin cikloadicije pri a) povišenoj temperaturi
b) katalizi pomoću bakra(I) c) katalizi pomoću rutenija(II)

Kao izvor bakra(I) koriste se kompleksi i soli bakra(I). Bakar(I) zbog svoje termodinamičke nestabilnosti lako oksidira u bakar(II) koji je kao katalizator neaktivan i time neupotrebljiv. Aktivni oblik bakar(I) može biti dobiven uz pomoć natrijeva askorbata kao redukcijskog agenta u polarnom otapalu.¹⁷ S obzirom na bakrovu osjetljivost na prisutnost kisika, reakcije sa solima kao što su CuI ili CuBr provode se u organskim otapalima i inertnoj atmosferi, te se najčešće pripremaju *in situ*.

CuAAC vrlo je važna reakcija koja je primjenu pronašla u medicinskoj kemiji u sklopu sinteze polimera i različitih vrsta lijekova.¹⁶

2.4.2. Sinteza 1,4-disupstituiranih 1,2,3-triazola

Produkt Cu(I)-katalizirane 1,3-dipolarne cikloadicije peteročlana je ciklička molekula dobivena reakcijom 1,3-dipola i dipolarofila. Kao reaktanti mogu se koristiti primarni, sekundarni, i tercijarni azidi, pa i tako aromatski. Triazoli se najčešće dobivaju upravo putem CuAAC reakcije čiji je mehanizam prikazan na slici.



Slika 14. Mehanizam CuAAC reakcije¹⁷

Prvi korak uključuje koordinaciju bakra na π -elektrone alkina tvoreći π -kompleks bakra i alkina. Dolazi do deprotoniranja (2) te nastaje bakrov acetilid na koji se veže drugi bakrov atom (3). π -elektroni trostruke veze acetilida zatim napadaju krajnji atom dušika na azidu (N3), te nastaje paralelna veza drugog atoma bakra i dušika sa suprotne strane spoja (4). Posljedica toga je formiranje nestabilnog šesteročlanog prstena (5), koji se ubrzo preslaže u peteročlani derivat triazolil-bakar (6). Finalna forma triazola postiže se protonizacijom, odnosno zamjenom bakra s nativnim vodikom (7).¹⁷

2.5. Solvatokromizam i solvatofluorokromizam

Solvatokromizam je pojava promjene valne duljine ili intenziteta apsorpcije (λ_{\max} , apsorbanacija) kromofora u otapalima različite polarnosti, dok solvatofluorokromizam uključuje i promjenu u fluorescenciji uzorka. U ovom kontekstu, najvažnija svojstva otapala su dielektrična konstanta te mogućnost formiranja vodikovih veza.

Različita otapala svojim svojstvima utječu na osnovno i pobuđeno energijsko stanje elektrona u molekuli, preciznije, utječu na razliku energije između spomenutih stanja. Promjena se može manifestirati kao pozitivan i negativan solvatokromizam, gdje pozitivan odgovara batokromnom pomaku valne duljine povećanjem polarnosti, dok negativan odgovara hipsokromnom pomaku uslijed povećanja polarnosti otapala. Formacija vodikovih veza ne samo da može dovesti do velikih solvatokromnih pomaka, već ima mogućnost mijenjanja spektroskopske prirode emitirajućih komponenti što može rezultirati smanjenjem kvantnog iskorištenja. Utjecaj otapala vidljiv je pri snimanju apsorpcijskih i emisijskih spektara otopine.

Solvatokromizam se koristi u mnogim područjima kemijskog i biološkog istraživanja masene i lokalne polarnosti u makrosustavima (primjerice membrana), ili konformacije i vezanja proteina. Usprkos širokoj primjeni, fenomen solvatokromizma ostaje uglavnom nepoznat što duguje kompleksnosti različitih interakcija i dinamičkih procesa koji ga čine.¹⁸

2.5.1. π -konjugirani sustavi

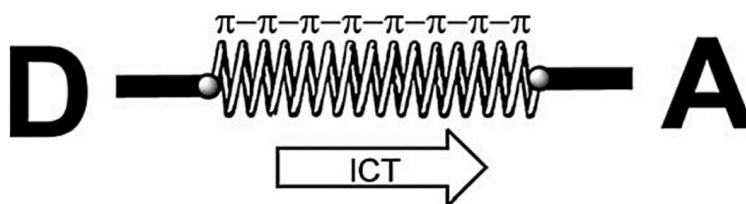
Konjugirani sustav je sustav povezanih π -orbitala u kojima se nalaze delokalizirani π -elektroni, pojavljuje se u molekulama s naizmjeničnim jednostrukim i dvostrukim vezama gdje elektroni prestaju pripadati zasebnim atomima, već pripadaju grupi. Konjugacija je preklapanje jedne p -orbitale s drugom preko mosta jednostruke veze. Najveće konjugirane sustave možemo opaziti u grafenu, grafitu, i ugljikovim nanocijevima. Jedinstveno svojstvo takvih sustava je pigmentacija, odnosno obojenje. Primjerice u strukturi β -karotena nalazi se lanac konjugiranih ugljikovodika koji daju intenzivnu narančastu boju.

Pri apsorpciji fotona, većina elektronskih prijelaza odvija se iz jedne konjugirane molekulske orbitale π -sustava s parnom vrstom simetrije u drugu konjugiranu orbitalu π -sustava s neparnom vrstom simetrije ($\pi \rightarrow \pi^*$). Konjugirani sustavi s manje od osam konjugiranih dvostrukih veza apsorbiraju samo u ultraljubičastom spektru i što ih čini ljudskom oku bezbojnima. Ova apsorpcija zračenja u UV-vidljivom spektru može se kvantificirati korištenjem UV-vidljive spektroskopije. Generalno, produljenje π -konjugacije vodi apsorpciji i emisiji pri većim valnim duljinama.¹⁹

Konjugirani sustavi čine osnovu kromofora, odnosno dijelova molekule koji mogu apsorbirati svjetlost i time uzrokovati obojenje spoja. Sastoje se od niza konjugiranih veza i/ili prstenastih (često aromatskih) sustava koji mogu uključivati C–C, C=C, C=O, ili N=N veze.

2.5.2. Push-pull sustavi

Push-pull sustavi predstavljaju fascinirajuću klasu organskih π -konjugiranih materijala. Slika 15 prikazuje shemu sustava koji se sastoji od elektron-donorske (D) i elektron-akceptorske (A) jedinice povezane preko π -poveznice. Upravo π -poveznica omogućuje odvijanje intramolekularnog prijenosa naboja (ICT) s donorske do akceptorske grupe, formirajući novu molekulsku orbitalu. Elektroni koji su sadržani u novonastaloj orbitali bivaju pobuđeni ulaznim zračenjem što je uzrok obojenosti *push-pull* sustava.



Slika 15. Shema *push-pull* mehanizma²⁰

Takvi sustavi velik interes duguju svom dipolarnom karakteru radi kojeg mogu biti hiperpolarizabilni, što je svojstvo koje je preduvjet kako bi molekula bila kandidat za senzorski materijal. U nedostatku steričkih efekata, opseg doprinosa dipolarne rezonantne strukture ovisi o elektron-donirajućoj snazi donorske grupe, i moći privlačenja elektrona akceptorske skupine. Molekule se klasificiraju prema svome obliku, koji odgovara slovima engleske abecede.²⁰

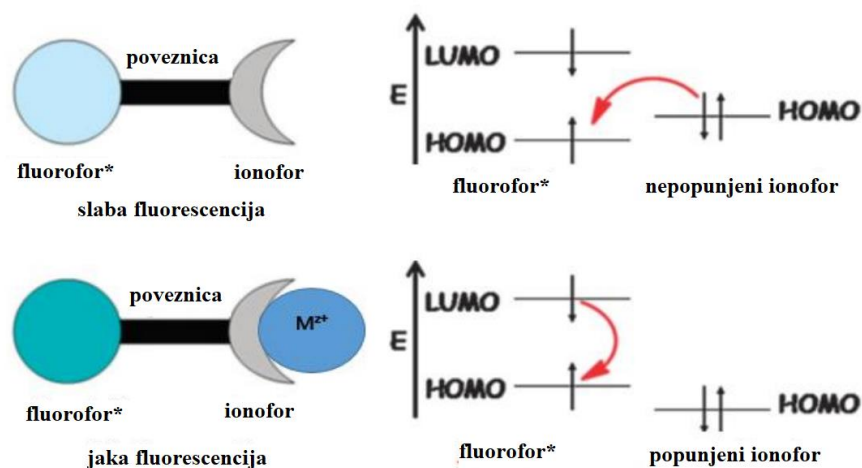
2.5.3. Karakteristični mehanizmi prijenosa signala u *push-pull* sustavima

Svaka kemijska reakcija za svoj početak treba određene energetske uvjete. Pobuda elektrona potiče i omogućava odvijanje reakcija kojima uvjeti stacionarnog stanja ne pogoduju. S obzirom da se pri fluorescenciji elektroni nalaze u pobuđenom stanju, reaktivniji su te se njihovo stanje može iskoristiti kao senzorni mehanizam. Uslijed dizajna senzora i solvatokromnih proba važno je pomno promotriti mehanizam čiji je produkt analitički signal, te prijenos samog signala. Najčešći mehanizmi su fotoinducirani prijenos elektrona (PET), te intramolekularni prijenos naboja (ICT).

2.5.3.1. Fotoinducirani prijenos elektrona (engl. *photoinduced electron transfer*, PET)

Pri fotoinduciranom prijenosu elektrona (prikazanom na slici 16) dolazi do prijenosa elektrona s receptora (ionofora) na elektron-akceptor (fluorofor) putem poveznice. Pobudom fluorofora elektron prelazi iz najviše popunjene molekulske orbitale (HOMO) u najnižu nepopunjenu molekulsku orbitalu (LUMO). Ako na receptorska mjesta nije vezana molekula analita, elektron slobodno prelazi s receptora na fluorofor, odnosno zauzima slobodno mjesto elektrona u HOMO orbitali (pod uvjetom da je energija HOMO orbitale ionofora na višem energetske nivou od one fluorofora). Posljedica je onemogućeno zračenje jer se elektron ne može nesmetano vratiti u svoje originalno stanje. Takav slučaj nazivamo OFF stanje.

Međutim, ako se molekula analita (primjerice metalni kation) nađe na receptorskom mjestu, ne dolazi do prijenosa elektrona jer je elektron već vezan putem analita. Naboj kationa privlači elektronski par ionofora i smanjuje energiju HOMO orbitale tako da je fotoinducirani prijenos elektrona obustavljen. U HOMO orbitali ostaje prazno mjesto na koje se pobuđeni elektron iz LUMO orbitale može nesmetano vratiti. Relaksacijom dolazi do oslobađanja energije, odnosno svjetlosne emisije fluorofora. Takav se slučaj naziva ON stanje.²¹

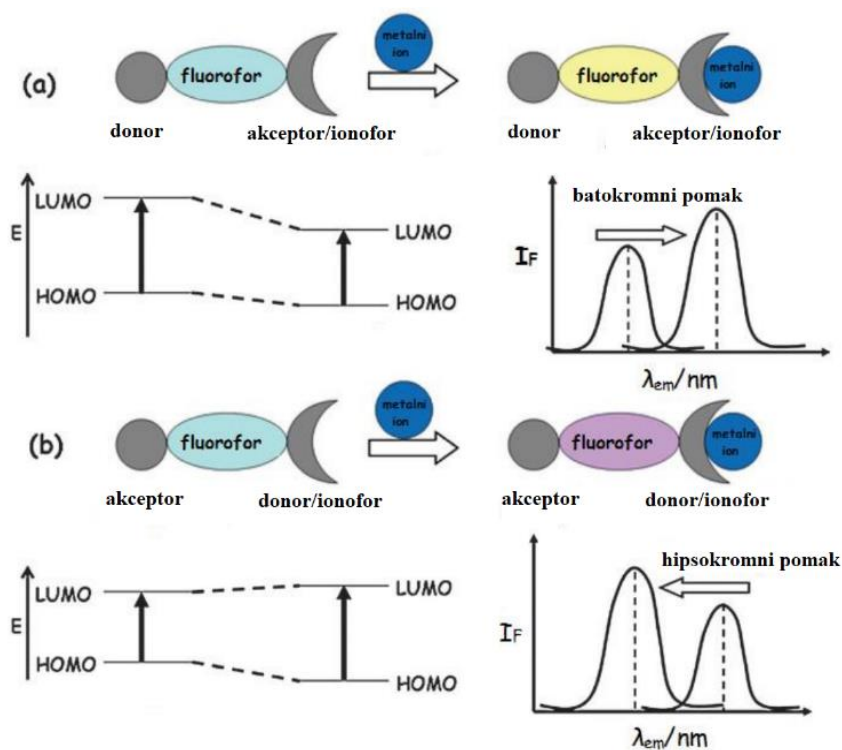


Slika 16. Shema PET mehanizma

2.5.3.2. Intramolekularni prijenos naboja (engl. *intramolecular charge transfer*, ICT)

Pri intramolekularnom prijenosu naboja (slika 17) također dolazi do prijenosa elektrona, međutim, ovaj proces karakterističan je za sustave koji imaju visok stupanj konjugacije. S obzirom na prisutnost elektron-donorske (engl. *electron donating group*, EDG) i elektron-odvlačeće skupine (engl. *electron withdrawing group*, EWG) prilikom pobude doći će do polarizacije naboja. U pobuđenom stanju polarizacija se pojačava te se mijenja dipolni moment. Posljedica toga su veliki Stokesovi pomaci koji ovise o okolini fluorofora, odnosno dipolima u mediju.

Koordiniranjem metala na EDG fluorofora može doći do smanjenja energije HOMO orbitale, odnosno povećanja razlike energije pobuđenog i osnovnog stanja što inducira hipsokromni (crveni) pomak emisijskog maksimuma, u suprotnom, vezanjem na EWG skupinu molekule dolazi do destabilizacije, odnosno do batokromnog (plavog) pomaka maksimuma.²²



Slika 17. Shema ICT mehanizma²²

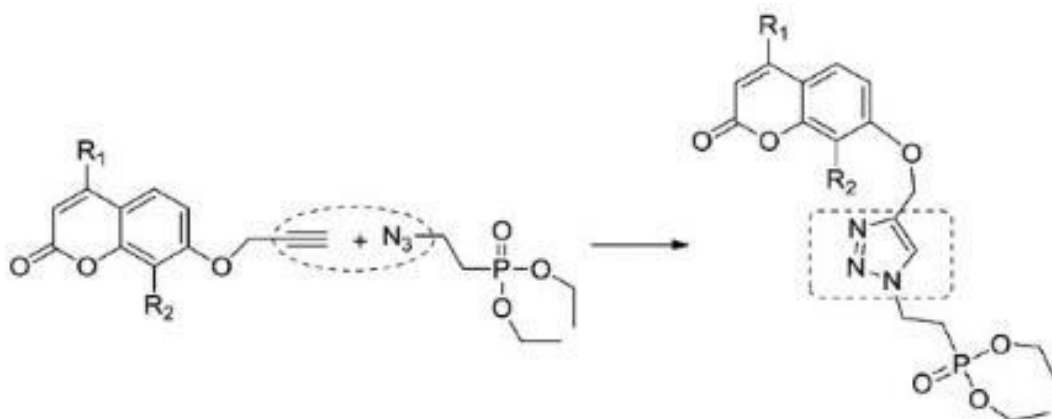
2.5.4. Donorske i akceptorske grupe

Supstituenti su atomi ili grupe atoma povezane na molekulu umjesto vodika. Ovisno o prirodi supstituenta mijenja se i utjecaj na reaktivnost i mapu elektrostatskog potencijala molekule. Supstituenti mogu biti elektron-donorskog i elektron-akceptorskog karaktera. Elektron-donorske su sve skupine koje posjeduju nevezne elektrone na atomu vezanom na prsten ($-\text{OH}$, $-\text{NH}_2$, $-\text{R}$, $-\text{Ar}$). Karakteristika elektron-akceptorskih skupina je pozitivno ili parcijalno pozitivno nabijen atom kojim se veže za prsten. Neki od primjera su $-\text{NO}_2$ i $-\text{C}\equiv\text{N}$ grupe.

Donori i akceptori vrlo su često organske funkcionalne skupine kao što su eteri, oksidi, te amino ili dialkilamino skupina (koji djeluju kao donori), te nitro, karbonilna, ili cijano skupina (koji djeluju kao akceptori).²³

2.5.5. Donorsko-akceptorski sustavi s 1,2,3-triazolnom poveznicom

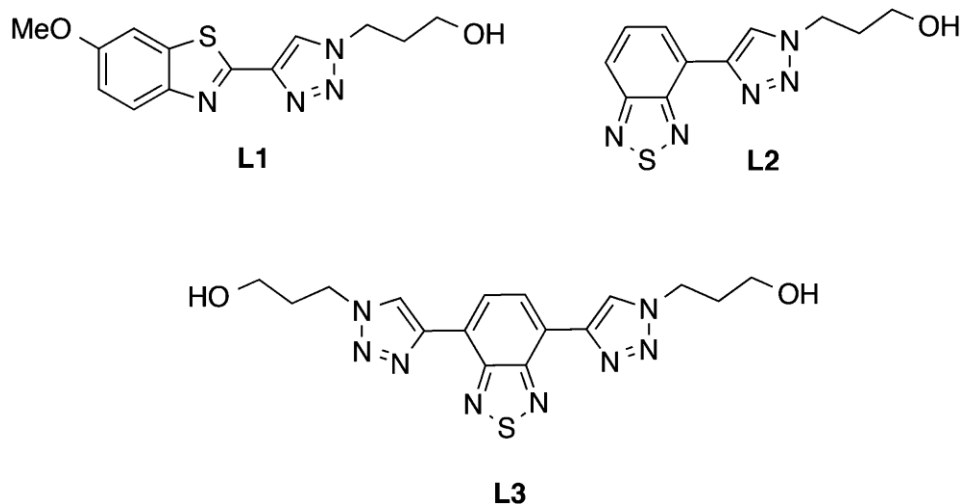
Aromatski triazoli često su korišteni kao π -konjugirane poveznice u intramolekularnom prijenosu elektrona. Karakteristična svojstva derivata triazola kao što su kemijska stabilnost, jaki dipolni moment i heteroaromatičnost, omogućuju interakcije s biomolekulama, te površinama organskih, pa i anorganskih materijala. Sustavi s triazolnom poveznicom istražuju se radi pozamašnog potencijala primjene u raznim sensorima. Primjerice, uspješno je sintetiziran 1,2,3-triazolom povezan fosfonatni derivat kumarina (slika 18), baziran na CuAAC reakciji.²⁴



Slika 18. Primjer spoja s triazolnom poveznicom dobiven CuAAC reakcijom²⁴

Već je spomenuto kako su probe na bazi benzotiazola pronašle primjenu u biokemiji pri detekciji proteinskih agregata koji uzrokuju bolesti poput Alzheimerera i Parkinsona. Prethodno korištene probe (primjerice tioflavin T) naišle su na ograničenja koja mogu dati lažno negativne rezultate što je potaknulo znanstvenike na sintezu novih primjeraka.

Na slici 19 prikazane su sintetizirane kombinacije 1,2,3-triazolne jedinice povezane s dva već istražena kromofora – benzotiazolom i benzotiadiazolom.²⁵



Slika 19. Strukture derivata benzotiazola-triazola (L1) i benzotiadiazola-triazola (L2 i L3)²⁵

Derivat benzotiazol-triazola pokazao je maksimum apsorpcije pri 313, te emisije pri 391 nm, dok su se maksimumi apsorpcije derivata benzotiadiazola-triazola nalazili na 353 i 387 nm, a emisije na 494 i 531 nm što nije začuđujuće s obzirom da je fragment benzotiadiazola karakteriziran velikim Stokesovim pomakom, te snažnim elektron-akceptorskim karakterom (koji olakšava intramolekularni prijenos naboja).²⁵

Premda novoistraženi derivati nisu zasjenili već poznate probe, sintetska shema cikloadicije azida i alkina otvara nove putove za dizajniranje niza strukturno različitih liganada koji bi mogli pronaći senzorsku primjenu u nekom od mnogih područja kemije što je, naposljetku, i cilj ovoga rada.

3. Eksperimentalni dio

3.1. Opće napomene

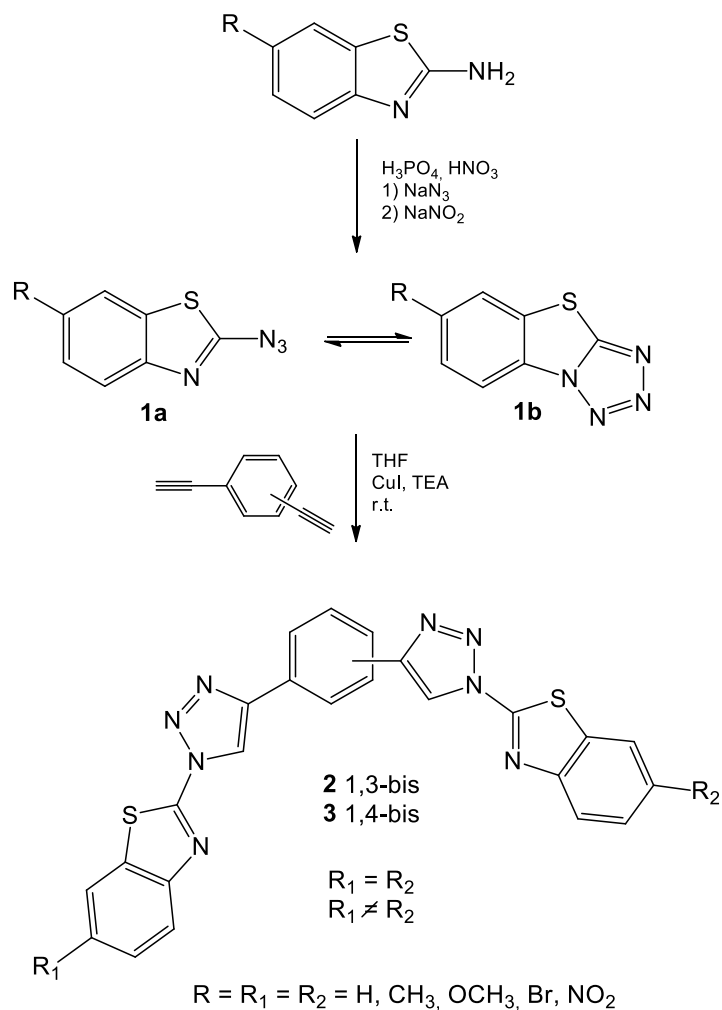
Kemijske su reakcije provedene uobičajenim postupcima i metodama organske sinteze. Za praćenje reakcija korištena je metoda tankoslojne kromatografije (TLC). Rabljene su ploče 60F-254 prevučene slojem silikagela proizvođača *Merck*, a za detektiranje izoliranih komponenata korištena je UV svjetlost valne duljine 254 i 356 nm. Izoliranje spoja provedeno je kolonskom kromatografijom u staklenoj koloni visine 70 cm i promjera 2 cm punjenom silikagelom Fluka (0,063 – 0,02 mm). Smjesa diklormetana (CH_2Cl_2) i metanola (CH_3OH) korištena je kao eluens. $^1\text{H-NMR}$ spektri snimani su na spektrometru Bruker Avance 300 na 300 MHz. Za spektroskopsku karakterizaciju spoj je otopljen u DMSO. UV-vidljivi apsorpcijski i emisijski spektri snimani su u odabranim otapalima na instrumentima Varian Cary 100 Scan i Varian Cary Eclipse, koji su prikazani na slici 20.



Slika 20. UV-vidljivi apsorpcijski spektrofotometar *Cary 100 Scan* (lijevo), i fluorescencijski spektrofotometar *Cary Eclipse* (desno)

3.2. Sinteza spojeva

Sinteza 1,3- i 1,4-bis(benzotiazolil-triazolil)benzena može se podijeliti u dva koraka. Prvi korak uključuje sintezu reaktanta 2-azidobenzotiazola. U drugom koraku cikloadicijskom klik reakcijom 2-azidobenzotiazola s odgovarajućim 1,3- ili 1,4-dietinilbenzenom uz katalizator bakar(I) pripremaju se ciljani bis(benzotiazolil-triazolil)benzeni, kako je shematski prikazano na slici 21.



Slika 21. Shema sinteze 1,3- i 1,4-bis(benzotiazolil-triazolil)benzena

3.2.1. Priprava 2-azidobenzotiazola **1**

Sinteza 2-azidobenzotiazola provedena je prema literaturi²⁶ otapanjem 755 mg 2-aminobenzotiazola (5,00 mmol, 1,0 ekv.) u 14,5 mL 85%-tne otopine fosforne kiseline, H₃PO₄. Reakcijska smjesa hladi se u ledenoj kupelji (0 °C) te se kroz 10 min dokapava ukupno 2,0 mL 68%-tne nitratne kiseline, HNO₃. Nakon toga, dodaje se 0,8 mL pripremljene vodene otopine natrijeva nitrita, NaNO₂ (101 mg, 1,46 mmol, 0,3 ekv.). Reakcijska smjesa miješana je 30 minuta na 0 °C, nakon čega smjesu se dodaje 0,4 mL prethodno pripremljene vodene otopine NaN₃ (146 mg, 2,25 mmol, 0,45 ekv.). Reakcijska smjesa miješana je 2 h na sobnoj temperaturi (uz praćenje reakcije putem TLC), i po završetku reakcije, neutralizirana je dodatkom 4,0 mL 1 M otopine NaOH. Talog je profiltriran i dobiveno je 802 mg smeđeg produkta (90 %).

3.2.2. Priprava 1,3-bis(1-(1*H*-benz[*d*]tiazol-2-il)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)benzena **2**

Za dobivanje 1,3-bis(benzotiazolil-triazolil)benzena koristi se prethodno dobiveni 2-azidobenzotiazol **1**. On sudjeluje u klik reakciji s odabranim alkinom (1,3-dietinilbenzen, *M* = 176 mg/mmol). 176 mg azida (0,77 mmol, 1,0 ekv.) potrebno je otopiti u 7,0 mL tetrahidrofurana (THF, *M* = 72,11 mg/mmol), te dodati 321,1 µL trietilamina (TEA, 2,31 mmol, 3,0 ekv., *M* = 101,19 mg/mmol), i 146,6 mg CuI (0,77 mmol, 1,0 ekv., *M* = 190,54 mg/mmol). Nakon homogenizacije dodano je 49 mg 1,3-dietinilbenzena (0,385 mmol, 0,5 ekv., *M* = 126 mg/mmol) i reakcijska smjesa je miješana 48 h na sobnoj temperaturi. Smjesa je uparena do suha i pročišćena kolonskom kromatografijom na silikagelu uz smjesu otapala diklormetana (DCM) i metanola. Izoliranom produktu snimljen je ¹H-NMR spektar, ali željeni produkt nije dobiven navedenim postupkom.

3.2.3. Priprava 1,4-bis(1-(1*H*-benz[d]tiazol-2-il)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)benzena **3**

Za dobivanje 1,4-bis(benzotiazolil-triazolil)benzena **3** korišten je prethodno pripravljeni 2-azidobenzotiazol **1** i alkin 1,4-dietinilbenzen ($M = 176$ mg/mmol). 270 mg azida (1,0 ekv., 1,54 mmol) je otopljeno u 14,0 mL tetrahidrofurana (THF, $M = 72,11$ mg/mmol) i dodano je 642,0 μ L trietilamina (TEA) i 293 mg CuI (1 ekv., 1,54 mmol, $M = 190,54$ mg/mmol). Nakon homogenizacije dodano je 97 mg 1,4-dietinilbenzena (0,77 mmol, 0,5 ekv., $M = 126$ mg/mmol), a reakcijska smjesa je miješana na sobnoj temperaturi 48 h. Navedenim postupkom izolirana je smjesa mono- i bis(benzotiazolil-triazolil)-supstituiranog benzena. Za dobivanje željenog spoja **3**, provedena je nova sinteza sa 322 mg (1,83 mmol) azida i 115 mg (0,91 mmol) alkina u 17,0 mL THF-a, uz dodatak 348 mg (1,83 mmol) CuI i 763,0 μ L TEA. U drugom postupku reakcijska smjesa zagrijana je na temperaturu refluksa (65 °C) i miješana 5 dana. Dobiveni talog pročišćavan je kolonskom kromatografijom na silikagelu uz smjesu diklormetana (DCM) i metanola kao eluens. Dobiveno je 2,7 mg žutog praškastog produkta **3** (0,6 %).

3.3. Opis mjerenja

3.3.1. Priprema matičnih otopina

Matična otopina pripremljena je otapanjem 2,7 mg ($5,6 \times 10^{-3}$ mmol) 1,4-bis(benzotiazolil-triazolil)benzena u 3,0 mL DMSO. Putem jednadžbe (1) izračunata je koncentracija matične otopine:

$$c = \frac{n}{V} = \frac{5,6 \times 10^{-6} \text{ mol}}{3,0 \times 10^{-3} \text{ dm}^{-3}} = 1,88 \times 10^{-3} \text{ M} \quad (2)$$

gdje je c [mol/dm³] koncentracija, n [mol] množina tvari, i V [dm³] volumen otapala.

S obzirom na snimanje spektara, potrebno je izračunati volumen alikvota kako bi se dobila koncentracija $1,0 \times 10^{-5} \text{ M}$ pri razrjeđenju na volumen kivete čiji je kapacitet 3,0 mL.

$$c_1 \times V_1 = c_2 \times V_2 \quad (3)$$

$$V_1 = \frac{c_2 \times V_2}{c_1} = \frac{1,0 \times 10^{-5} \text{ M} \times 3,0 \text{ mL}}{1,88 \times 10^{-3} \text{ M}} \approx 0,08 \text{ mL} = 80,0 \mu\text{L} \quad (4)$$

3.4. Spektroskopska karakterizacija spojeva

Spektroskopska karakterizacija spojeva provedena je UV-vidljivom apsorpcijskom, te fluorescencijskom spektrofotometrijom. Snimljeni su apsorpcijski i emisijski spektri u navedenim otapalima: dimetilsulfoksid (DMSO), tetrahidrofuran (THF), aceton, etanol (EtOH), etil-acetat (EtAc), acetonitril, metanol (MeOH), i kloroform. Otapala su birana s obzirom na parametre polarnosti.

Tablica 1. Vrijednosti parametara polarnosti odabranih otapala

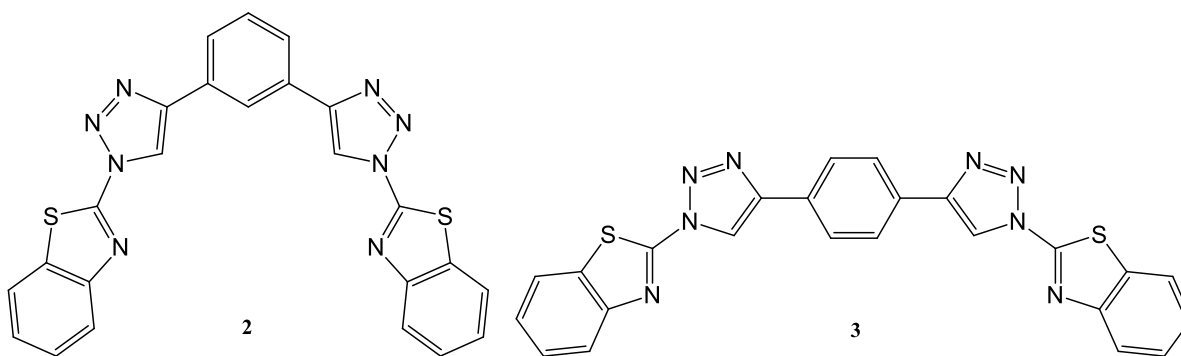
OTAPALO	$E_T(30)/(\text{kcal mol}^{-1})$	$E_T^N(30)$
tetrahidrofuran (THF)	37,4	0,207
etil-acetat (EtAc)	38,1	0,228
kloroform	39,1	0,259
aceton	42,2	0,355
dimetilsulfoksid (DMSO)	45,1	0,444
acetonitril	45,6	0,460
etanol (EtOH)	51,9	0,654
metanol (MeOH)	55,4	0,762

Koncentracija spoja iznosi $c = 1,0 \times 10^{-5} M$, te je dobivena razrijeđenjem matične otopine. Mjerenja su izvedena smještanjem uzorka u kvarcne kivete optičkog puta duljine 10 mm. Rezolucija spektra određena je širinom ulaznog i izlaznog otvora (eng. *slit width*). Spektri su snimani pri nanometarskim širinama 2,5-5, i 2,5-2,5. Prije snimanja spektara određene su bazne linije otapala. Spektri apsorpcije snimani su u rasponu 200-800 nm, a emisije 300-700 nm.

4. Rezultati i rasprava

4.1. Cilj rada

Cilj rada uključuje sintezu 1,3- i 1,4-bis(1-(1*H*-benz[d]tiazol-2-il)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)benzena (prikazani na slici 22) metodom klik kemije. Prvi korak uključuje sintezu 2-azidobenzotiazola, dok je drugi korak *click* reakcija dobivenog azida s 1,3-, odnosno 1,4-dietinilbenzenom. Ispitana su spektroskopska svojstva spoja **3**.



Slika 22. Prikaz 1,3-bis(benzotiazolil-triazolil)benzena **2** i njegovog 1,4-izomera **3**

Kemijski optički senzori u sebi sadrže organske molekule koje imaju mogućnost vezanja raznih iona, ili vršenja uloge π -poveznice, što na razne načine utječe na optička svojstva kao što je fluorescencija. Vrsta senzora od posebnog interesa su solvatokromne probe koje primjenu pronalaze u biokemiji i znanosti o okolišu. Solvato(fluro)kromne probe mogu služiti kao indikator promjene boje ili fluorescencije kao posljedice otapanja u medijima različite polarnosti.

Za proučavanje solvatokromizma primjenjuju se spektroskopske metode karakterizacije kao što su UV-vidljiva apsorpcijska i emisijska spektroskopija. Snimanjem spektara probe u različitim otapalima dobivaju se informacije o intenzitetu apsorpcije i emisije zračenja pri različitim valnim duljinama. Istraživanja potencijalnih fluorescencijskih senzora pozamašna su uslijed visoke osjetljivosti i selektivnosti, te široke znanstvene primjene. Prilikom dizajniranja potencijalnih senzora, potrebno je pomno promotriti mehanizam stvaranja i prijenosa signala unutar strukture (PET, ICT), te uzeti u obzir intramolekularne interakcije fluorofora i senzora.

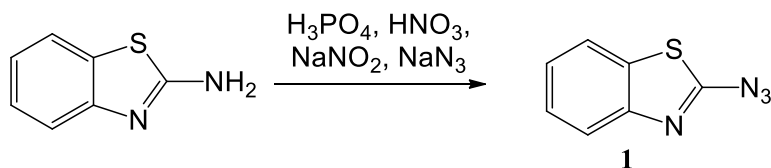
Click kemija je koncept rođen početkom 21. stoljeća koji je revolucionarizirao sintezu organskih tvari putem lako izvedivih reakcija s visokim stupnjem iskorištenja. Predstavnik *click* kemije uvjerljivo je reakcija bakrom(I) katalizirane azid-alkin cikloadicije (CuAAC) čiji je rezultat 1,4-disupstituirani 1,2,3-triazol.

Derivati 1,2,3-triazola radi mogućnosti vezanja iona na atome dušika u prstenu ili obnašanja funkcije poveznice, tema su mnogih istraživanja, te su pokazali široku primjenu u području dizajniranja kemosenzora. Naime, adicijom triazolnog prstena na benzotiazol, ispunjen je ključni uvjet za postizanje fluorescencije – novonastale dvostruke veze unutar triazolnog prstena formiraju π -konjugirani sustav s matičnim fluoroforom.²⁰

4.2. Sinteza spojeva

Konvencionalne metode dobivanja azida najčešće uključuju proces diazotacije (uz nukleofilnu supstituciju amino- i azidne skupine). Mogu se sintetizirati i putem supstitucije halogena kao što je klor s azidnom skupinom. Literatura navodi i primjer upotrebe *p*-toluensulfonske kiseline koja se veže na amino-supstituent čime tvori dobru odlazeću skupinu za nukleofilnu supstituciju s azidom, a uspješno je sintetiziran i upotrebom *t*-butil nitrita i azida.²⁷

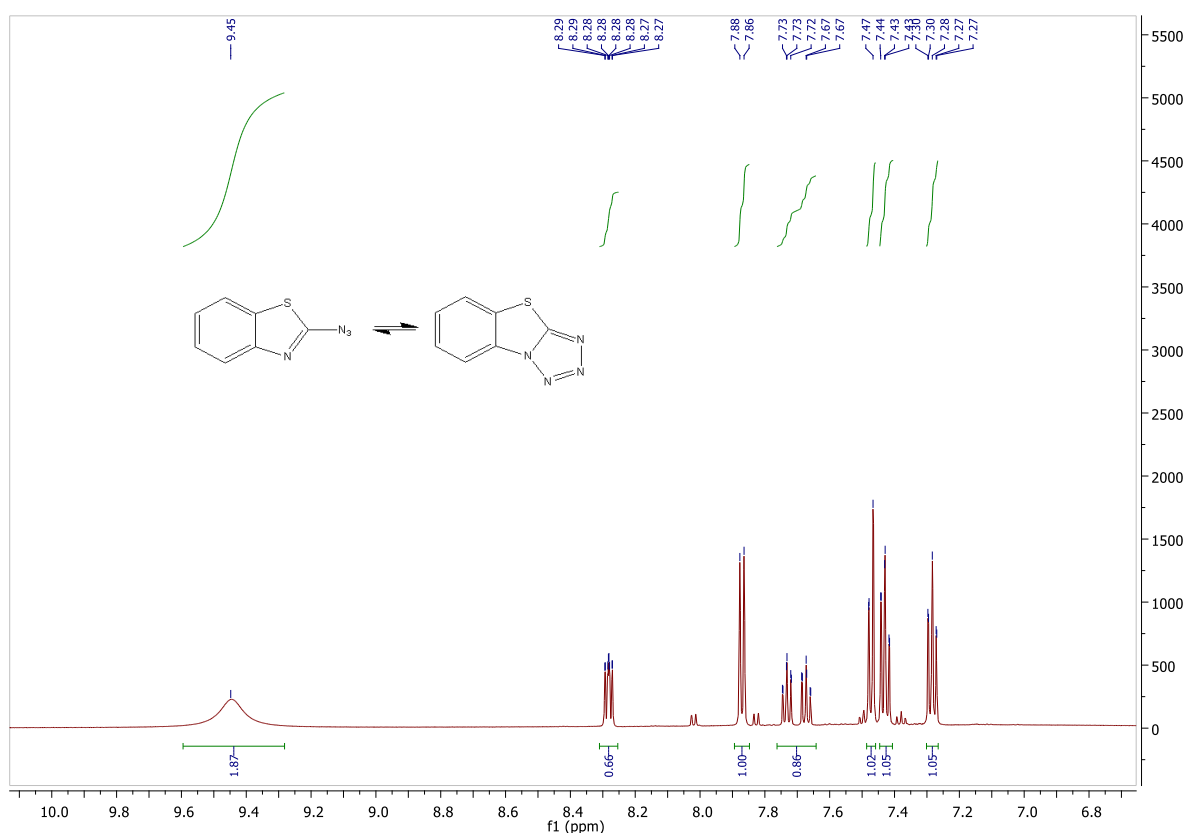
Na slici 23 shematski je prikazan postupak opisan u literaturi²⁶, putem kojeg je pripremljen azid iz 2-aminobenzotiazola reakcijom sa NaNO_2 i NaN_3 u smjesi 85%-tne otopine H_3PO_4 i 68%-tne otopine HNO_3 .



Slika 23. Shema sinteze 2-azidobenzotiazola

Problematika produkta 2-azidobenzotiazola leži u njegovom tautomernom obliku 2-tetrazolobenzotiazolu koji radi ciklizacije pokazuje slabu reaktivnost. Na tautomernu ravnotežu može se utjecati pažljivim odabirom otapala. Upotrebom nepolarnog ili slabo polarnog otapala ravnoteža se pomiče prema stabilnom azidnom tautomeru potrebnom za dobivanje 1,4-disupstituiranih 1,2,3-triazola.

Na $^1\text{H-NMR}$ spektru (slika 24) vidljivi su signali aromatskih protona u području od 8,29 do 7,30 ppm, koji odgovaraju broju protona azidobenzotiazola i tetrazolobenzotiazola u smjesi.

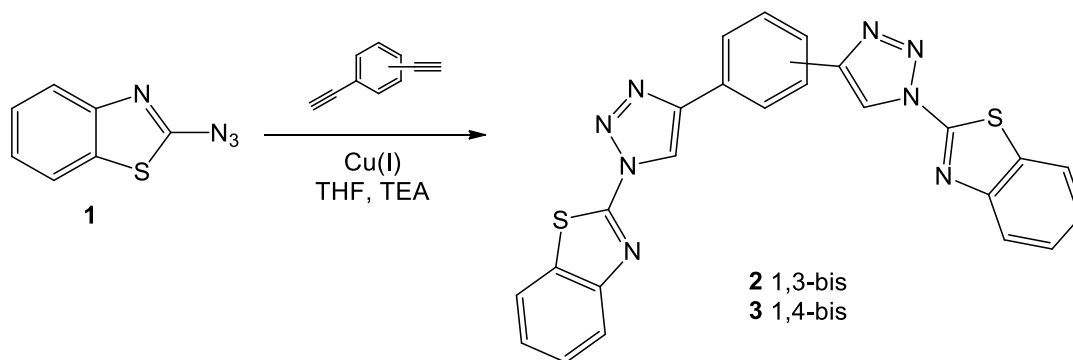


Slika 24. $^1\text{H-NMR}$ spektar 2-azidobenzotiazola **1**

Spojevi **2** i **3** pripravljeni su, prema shemi na slici 25, *click* reakcijom 2-azidobenzotiazola i 1,3-dietinilbenzena, odnosno 1,4-dietinilbenzena uz katalizator Cu(I) i trietilamin. Trietilamin (TEA) korišten je kao ligand radi svojih bazičnih svojstava koja promoviraju formiranje bakrovog acetilida kao intermedijera u CUAAC reakciji.²⁸

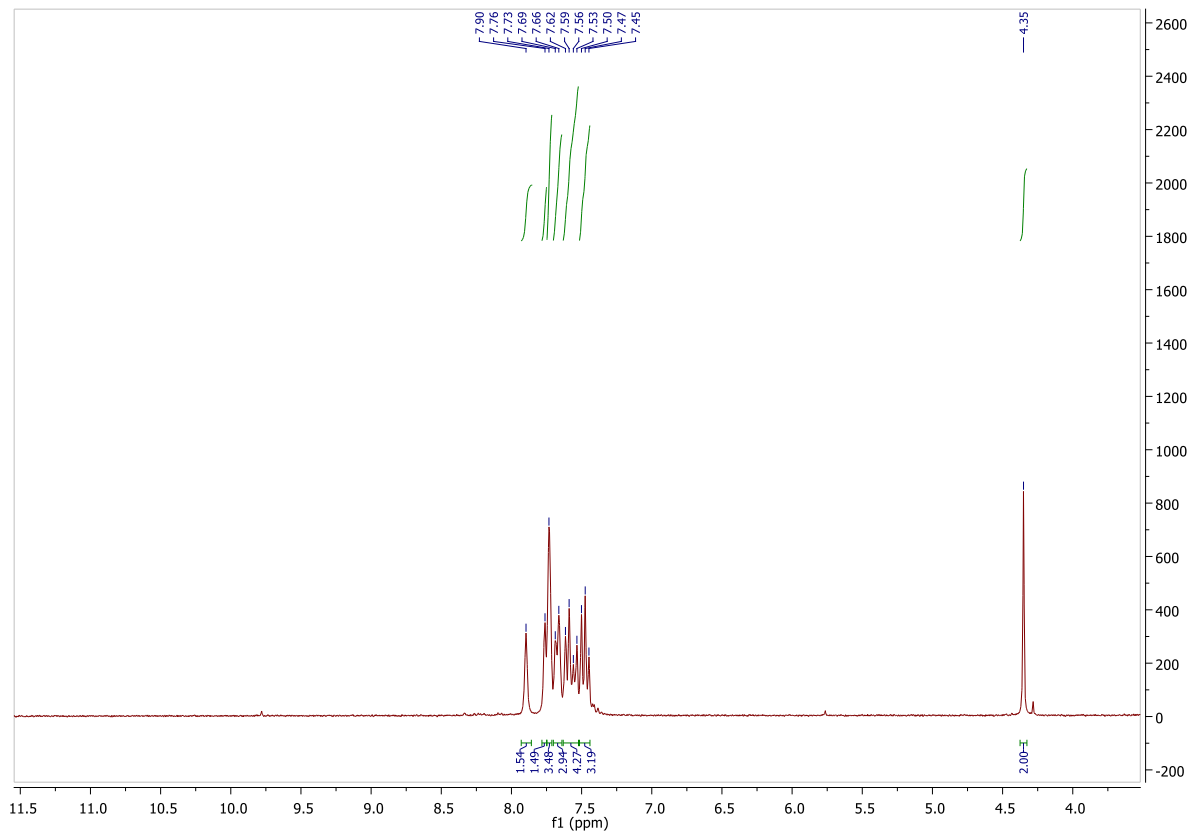
Reaktant 2-azido-1*H*-benzotiazol nalazi se u ravnoteži s tautomerom 2-tetrazolobenzotiazolom. Literatura navodi kako je smjesa dvaju tautomera inertna na konvencionalnu metodu sinteze koja koristi katalizator CuSO₄ reduciran na Cu(I) uz pomoć natrijeva askorbata, te smjesu otapala *tert*-butanola (*t*-BuOH) i vode.²⁹ Katalizator bakar(I) korišten je i radi svoje regioselektivnosti. Naime, bez katalizatora, umjesto željenog produkta došlo bi do sinteze smjese produkata 1,4- i 1,5- disupstituiranih triazola. Korištenjem bakra osigurana je sinteza isključivo 1,4-izomera.

Pažljivim odabirom otapala može se utjecati na tautomernu ravnotežu; azidni tautomer stabilan je u nepolarnom otapalu, dok u polarnom ciklizira u slabo reaktivni 2-tetrazolobenzotiazol, stoga je umjesto *t*-BuOH korišten THF manje polarnosti.²³ Osim toga, povišena temperatura pomiče ravnotežu prema otvaranju prstena tetrazola što dopušta reakciju azida i alkina.



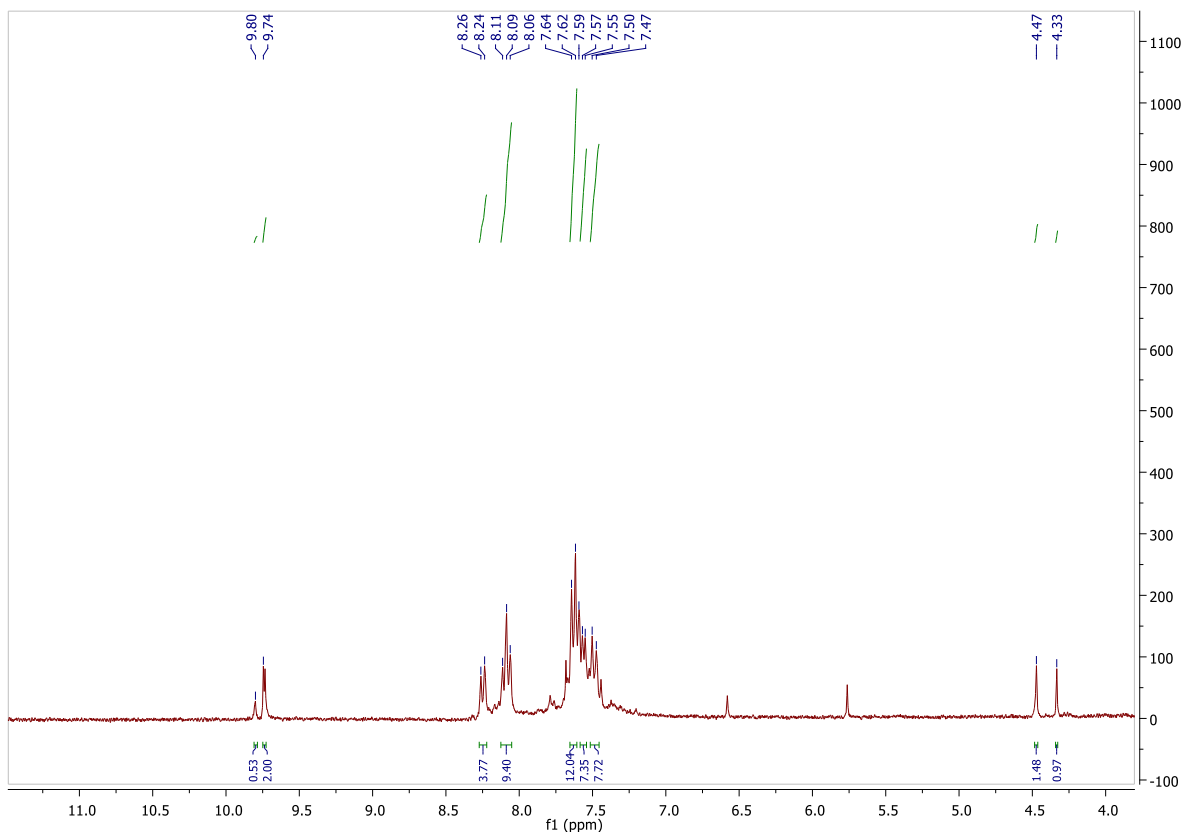
Slika 25. Shema sinteze bis(benzotiazolil-1,2,3-triazolil)benzena (**2** i **3**)

Izolacijom i pročišćavanjem reakcijske smjese dobiveni su praškasti produkti kojima su snimljeni ¹H-NMR spektri za potvrdu strukture. Na slici 26 prikazan je spektar spoja **2** nakon izolacije. Na spektru nije uočen karakteristični signal protona 1,2,3-triazola u području između 9 i 10 ppm, te se može zaključiti da željeni spoj **2** nije uspješno pripremljen opisanim postupkom. Pretpostavlja se da reakcijski uvjeti nisu pogodni za pripremu spoja, te se njihovom promjenom reakcija može usmjeriti ka željenom ishodu.



Slika 26. ^1H -NMR spektar 1,3-bis(1-(1*H*-benz[d]tiazol-2-il)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)benzena **2**
(šifra u dnevniku 3A)

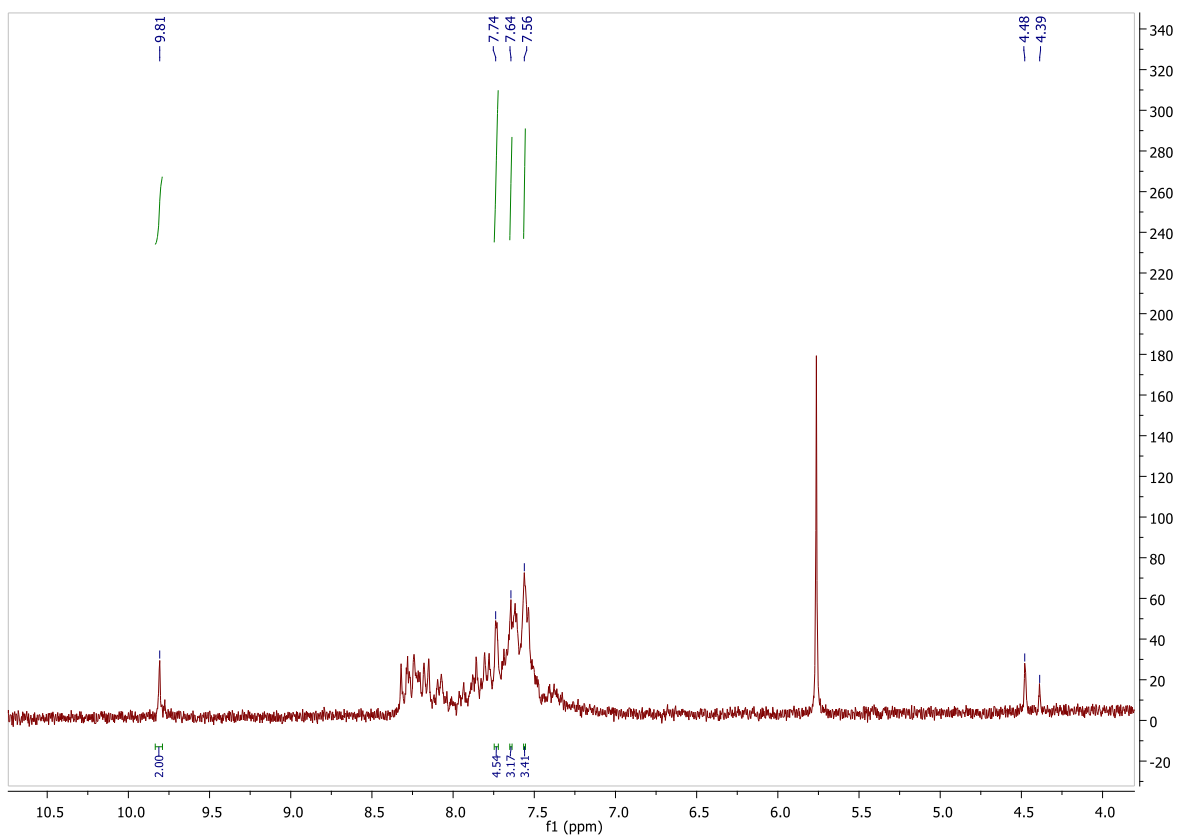
Na isti način pripremljen je i spoj **3**, a sinteza je rezultirala izolacijom produkta kojem je snimljen ^1H -NMR spektar prikazan na slici 27. U spektru su vidljiva dva signala karakteristična za 1,2,3-triazol na 9,80 i 9,74 ppm. Također, u spektru su vidljiva dva signala na 4,47 ppm i 4,33 ppm koji se mogu pripisati protonu CH skupine alkina.



Slika 27. $^1\text{H-NMR}$ spektar 1,4-bis(1-(1*H*-benz[d]tiazol-2-il)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)benzena **3** (šifra u dnevniku 4C)

Spektar na slici 27 upućuje da reakcija nije završena te se može pretpostaviti da su u smjesi prisutni mono- i bis(benzotiazolil-triazolil)-supstituirani benzen uz neizreagirani alkin. Iz tog razloga, ponovljena je sinteza spoja **3** s istim katalitičkim sustavom CuI i TEA u THF-u. U ovom procesu pripreve reakcijska je smjesa zagrijana na temperaturu refluksa te miješana 5 dana, uz pretpostavku da će povišena temperatura i produljeno vrijeme reakcije rezultirati dobivanjem bisprodukta **3**.

Ponovljenom sintezom izolirano je 2,7 mg praškastog produkta, zbog čega je snimljen samo $^1\text{H-NMR}$ spektar. Na slici 28 nalazi se spektar dobiven ponovljenom reakcijom. Na spektru je vidljiv signal na 9,81 ppm koji se može pripisati 1,2,3-triazolu bis-supstituiranog produkta **3**.

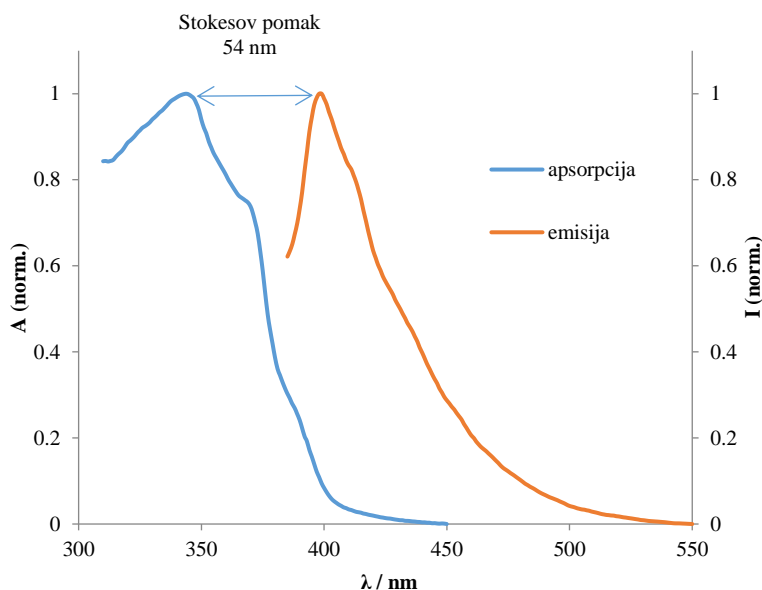


Slika 28. $^1\text{H-NMR}$ spektar 1,4-bis(1-(1*H*-benz[d]iazol-2-il)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)benzena **3**
(šifra u dnevniku 5E)

Sve provedene reakcije rezultirale su izrazito malenom masom produkata i niskim iskorištenjem reakcije, zbog čega je otežana karakterizacija spojeva, međutim, dobiveni spektar potvrđuje pripremu triazolnog produkta s karakterističnim signalom protona triazola na 9,81 ppm. S obzirom na dobivene rezultate, može se zaključiti da je zagrijavanje poboljšalo metodu dobivanja produkta, ali također pretpostaviti da bi drugačiji sustav otapala (eluens) omogućio dobivanje čisteg produkta u većem iskorištenju.

4.3. UV-vidljivi apsorpcijski i emisijski spektri spoja **3** u otapalima različite polarnosti

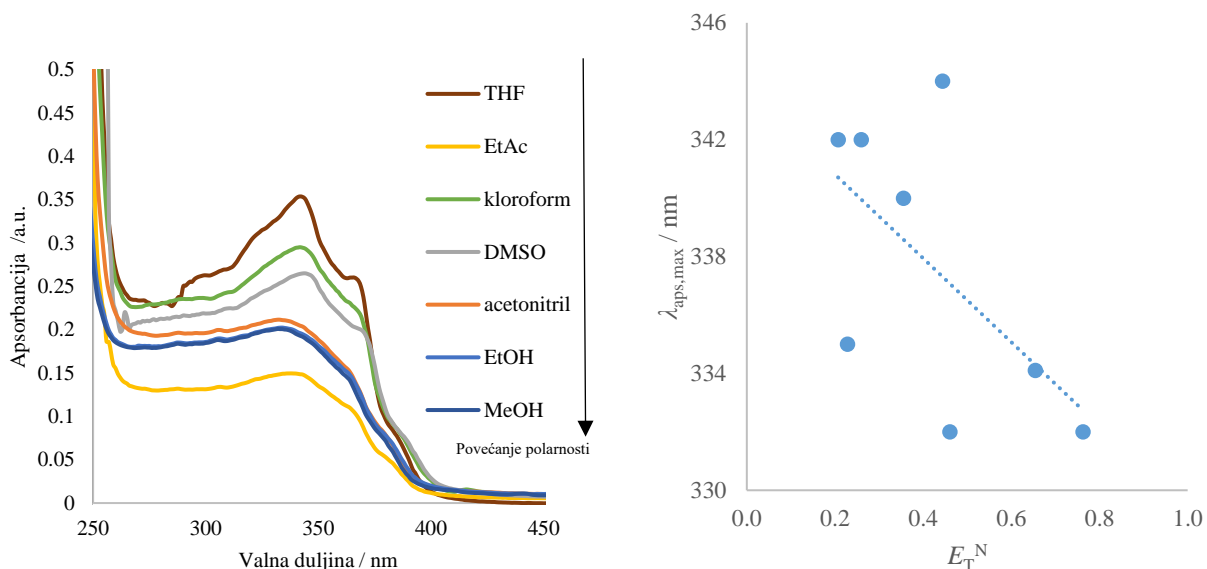
U svrhu ispitivanja spoja **3** kao potencijalne solvatokromne probe, snimljeni su preliminarni UV-vidljivi apsorpcijski i emisijski spektri u različitim otapalima navedenim u tablici 1. Snimljeni su apsorpcijski i emisijski spektri spoja **3** u matičnom otapalu, odnosno DMSO. Intenziteti apsorpcije i emisije prikazani su u normaliziranim vrijednostima, tj. u rasponu od 0 do 1.



Slika 29. Ovisnost normaliziranih intenziteta emisije i apsorpcije o valnoj duljini

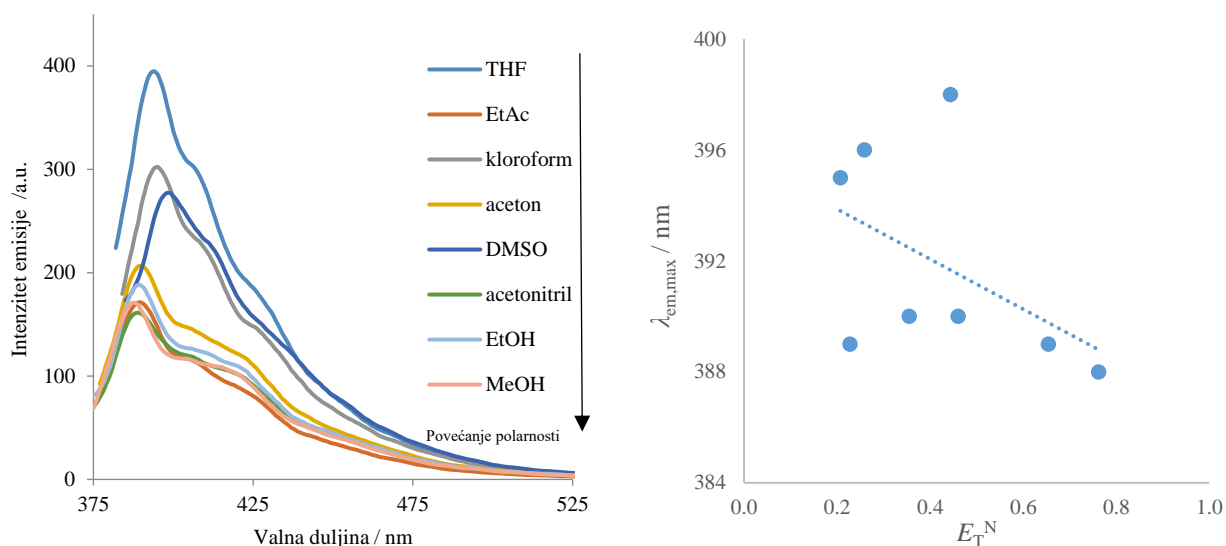
Iz ovisnosti normaliziranih intenziteta emisije i apsorpcije o valnoj duljini prikazanoj na slici 29 može se uočiti Stokesov pomak u iznosu od 54 nm. Budući da je pomak valne duljine usmjeren prema većim vrijednostima, radi se o batokromnom (crvenom) pomaku. Za potencijalnu primjenu kao solvatokromne probe, u literaturi je naveden potreban minimalni Stokesov pomak od 57 nm.³⁰

Matična otopina koncentracije $1,88 \times 10^{-3}$ M pripremljena je otapanjem spoja **3** u DMSO, a spektri su snimani pri koncentraciji spoja $1,0 \times 10^{-5}$ M u izabranim otapalima navedenim u tablici 1. Na slici 30 prikazani su dobiveni apsorpcijski spektri spoja u otapalima.



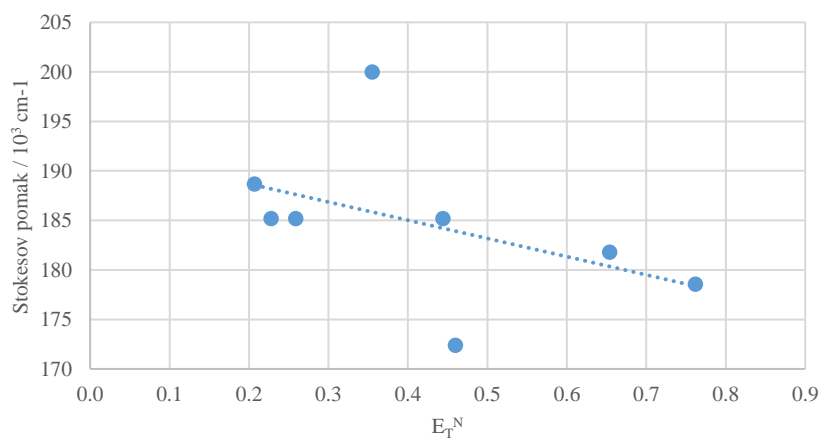
Slika 30. a) apsorpcijski spektri uzorka u otapalima i b) ovisnost valne duljine apsorpcije o polarnosti otapala

Valne duljine maksimuma apsorpcije vidljive su u UV području od 332 do 344 nm ($\epsilon = 15,0 \times 10^3 - 35,3 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}$). Najviši intenzitet apsorpcije primijećen je u najmanje polarnom THF-u pri 342 nm, te se povećanjem polarosti apsorpcija (pa i valna duljina njenog maksimuma) smanjuje. Najnižu vrijednost apsorpcije spoj pokazuje prilikom otapanja u etil-acetatu pri 335 nm.



Slika 31. a) emisijski spektri uzorka u otapalima i b) ovisnost valne duljine emisije o polarnosti otapala

Iz fluorescencijskog emisijskog dijagrama spoja **3** (slika 31) može se uočiti da se valne duljine maksimuma emisije nalaze se u vidljivom području, od 388 do 396 nm. Spoj **3** najjače fluorescira u THF-u na valnoj duljini od 395 nm, a najmanje u acetonitrilu pri 390 nm. Uz iznimke, porastom polarnosti otapala valne duljine maksimuma fluorescencije opadaju, a taj trend slijedi i intenzitet. Uočavaju se batokromni pomaci prilikom korištenja svih otapala.



Slika 32. Stokesov pomak u ovisnosti o polarnosti otapala

Iz ovisnosti Stokesovog pomaka o polarnosti otapala, uočava se da prilikom porasta polarnosti Stokesov pomak opada. Najveći zabilježeni Stokesov pomak (58 nm) uočen je prilikom otapanja u acetonitrilu, te jedini premašuje potreban iznos pomaka kako bi spoj bio podoban za uporabu kao solvatokromna proba. Najmanji Stokesov pomak je zabilježen kod acetona te iznosi 50 nm.

U tablici 2 prikazana su spektroskopska svojstva spoja **3** u otapalima različite polarnosti, te pripadajući intenziteti apsorbancije (Abs) i emisije (Fluo. Int.). Tabeliran je i molarni apsorpcijski koeficijent (ε), izračunat iz Lambert-Beerova zakona (1), te Stokesov pomak koji predstavlja razliku između maksimalnih valnih duljina emisije i apsorbancije.

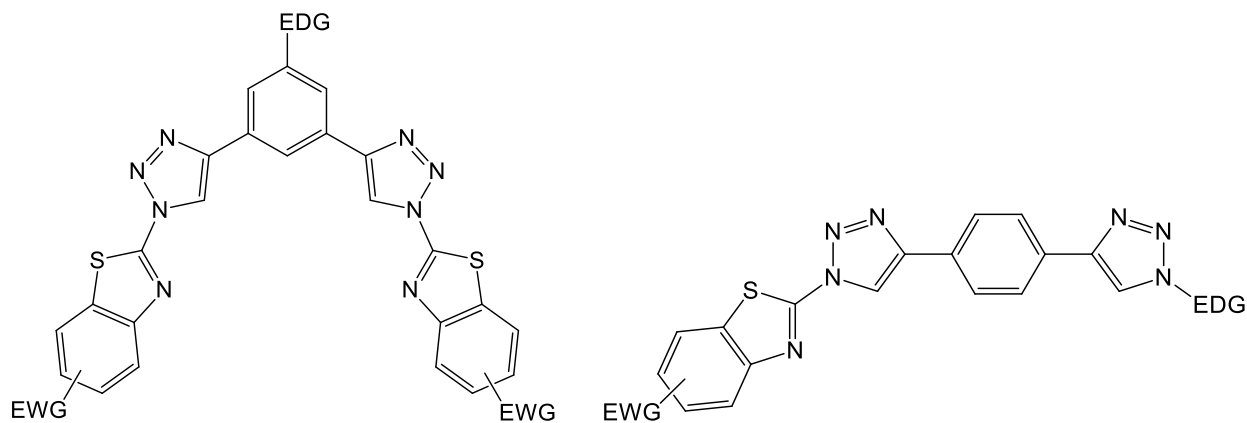
Tablica 2. Spektroskopska svojstva spoja **3** u otapalima različite polarnosti

OTAPALO	E_T (30)	$\lambda_{\text{aps,max}} / \text{nm}$	$\lambda_{\text{em,max}} / \text{nm}$	Abs	$\varepsilon \times 10^3 / \text{M}^{-1} \text{cm}$	Fluo. Int.	Stokesov pomak / nm
THF	37,4	342	395	0,35	35,3	80,3	53
EtAc	38,1	335	389	0,15	15,0	35,4	54
kloroform	39,1	342	396	0,30	29,5	61,1	54
aceton	42,2	340	390	/	/	41,4	50
DMSO	45,1	344	398	0,27	26,5	56,0	54
acetonitril	45,6	332	390	0,21	21,2	33,2	58
EtOH	51,9	334	389	0,20	20,0	35,4	55
MeOH	55,4	332	388	0,20	20,1	34,4	56

Donorski i akceptorski karakter supstituenata, te duljina π -poveznice faktori su jakosti *push-pull* sustava. Stoga, na iznos Stokesovog pomaka (i time na solvatokromno ponašanje) može se utjecati modifikacijom strukture molekula. Predloženo je nekoliko struktura koje bi se mogle pokazati efikasnijim solvato(fluro)kromnim probama.

S obzirom da na intenzitet i valnu duljinu fluorescencije utječu jačina donorske i akceptorske skupine, može se pretpostaviti da bi zamjenom benzena s jačom donorskom skupinom (primjerice anisolom ili dimetilanilinom), valna duljina i intenzitet fluorescencije porasli. Promatrajući strukturu spoja **3**, zamjenom benzotiazola na jednom „kraku“ molekule nekom donorskom skupinom, struktura molekule promijenila bi se iz A- π -D- π -A u A- π -D- π -D, čime bi se povoljno utjecalo na intenzitet, i valnu duljinu maksimuma fluorescencije. Sličan rezultat mogao bi se postići i adicijom supstituenta jakog akceptorskog karaktera na benzenski prsten u strukturi benzotiazola, čime bi se osnažio ukupni *pull* efekt akceptorskog dijela.

Aromatičnost benzenskog prstena otvara mogućnost korištenja benzena kao poveznice. U tom slučaju struktura neće biti A- π -D- π -D, nego A- π -D, gdje će π -poveznicu tvoriti konjugirani lanac triazol-benzen-triazol. S obzirom da produljenje π -konjugacije vodi pomaku prema većim valnim duljinama, takva struktura molekule mogla bi se pokazati povoljnim izborom za upotrebu kao solvato(fluoro)kromna proba. Navedene predložene strukture prikazane su na slici 33.



Slika 33. Primjeri unaprijeđenja struktura derivata benzotiazol-triazola

5. Zaključak

Click reakcija cikloadicije azid-alkin katalizirana bakrom(I) pokazala se kao uspješan način dobivanja 1,4-disupstituiranih triazola koji igraju važnu ulogu u dizajniranju kemijskih senzora i solvatokromnih proba. U ovom radu *click* reakcijom 2-azido-1*H*-benzotiazola i odgovarajućih dialkila pripremljeni su spojevi 1,3-bis(1-(1*H*-benz[*d*]tiazol-2-il)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)benzen **2** i 1,4-bis(1-(1*H*-benz[*d*]tiazol-2-il)-1*H*-1,2,3-triazol-4-il)benzen **3**.

Spoj **2** nije uspješno izoliran te se pretpostavlja da bi promjena reakcijskih uvjeta i uvjeta pročišćavanja/izoliranja spoja dovela do veće čistoće produkta i boljeg iskorištenja reakcije. Spoj **3** je izoliran u malim količinama te se preporučuje optimizacija reakcijskih uvjeta sinteze.

Ispitana su spektrofotometrijska svojstva 1,4-bis(triazolil-benzotiazolil)benzena **3** u otapalima različite polarnosti.

Spoj **3** pokazuje najveći intenzitet fluorescencije u THF, a najmanji u etil-acetatu, te je prisutan batokromni pomak prilikom otapanja u svim otapalima. Porastom polarnosti otapala uočeno je smanjenje intenziteta fluorescencije, odnosno pojava solvato(fluro)kromizma.

Uočen je i pad Stokesovog pomaka prilikom porasta polarnosti. Najmanji iznos Stokesovog pomaka opažen je u acetonu i iznosi 50 nm. Najveći Stokesov pomak spoja **3** primijećen je prilikom otapanja u acetonitrilu te iznosi 58 nm što je dovoljno da bi spoj bio pogodan za upotrebu kao solvato(fluro)kromna proba.

Povećanje Stokesovog pomaka, odnosno solvato(fluro)kromnog ponašanja molekula, može se unaprijediti modifikacijom strukture, primjerice uvođenjem dodatne grupe elektron-odvlačećeg karaktera u strukturu benzotiazola ili elektron-donirajuće skupine na benzen.

6. Literatura

- [1] Toshiyuki, A., Liming, D., *C60 and carbon nanotube sensors*, Elsevier, 12 (2006) 525-575.
- [2] Hulanicki, A., Glab, S., Ingman, F., *Chemical sensors: definitions and classification*, Pure and Applied Chemistry, 63 (1991) 1247-1250
- [3] Maljković, *Spektrometrija*, Tehnička enciklopedija, Sv. 12, Leksikografski Zavod "Miroslav Krleža", Zagreb, 1992, str. 150-178
- [4] Demchenko, A. P., *Introduction to fluorescence sensing*, Springer, New York, 2015., str. 70
- [5] Griffith, J.S. and L.E. Orgel. "Ligand Field Theory". *Q. Rev. Chem. Soc.*, 11 (1957) 381-383
- [6] Lakowicz, J. R., *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Springer, New York, 1983., str. 6
- [7] Skooge, D. A., West, D. M., Holler, F. J., Crouch, S. R., *Fundamentals of Analytical Chemistry*, Brooks/Cole Cengage Learning, Belmont, 2004., str. 761
- [8] Banwell C. N., McCash, E. M., *Fundamentals of Molecular Spectroscopy*, McGraw-Hill, Berkshire, 1994., str.101 i str.113
- [9] Qi, J., Tung, C.-H., Development of Benzothiazole 'Click-on' Fluorogenic Dyes, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 21 (2011) 320-323
- [10] Das, S., Kumar Indurthi H., Asati, P., Saha, P., Sharma, D. K., *Benzothiazole based fluorescent probes for the detection of biomolecules, physiological conditions, and ions responsible for diseases*, *Dyes and Pigments*, 199 (2022) 110074
- [11] Filho, M. S., Fioruvvi, S., Martin, A., Benhida, R., *Design, synthesis and photophysical studies of styryl-based push-pull fluorophores with remarkable solvatofluorochromism*, *New J. Chem.*, 41 (2017) 13760-13772
- [12] Lauko, J., Kouwer, P. H. J., Rowan, A. E., *1H-1,2,3-Triazole: From Structure to Function and Catalysis*, *J. Heterocyclic Chem.*, 54 (2017) 1677-1699
- [13] 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*, *Eur. J. Org. Chem.*, 10 (2013) 1908-1915

- [14] Barron, A. R., *Physical Methods in Chemistry and Nano Science*, LibreTexts, Houston, 2018., str. 346
- [15] Rostovtsev, V. V., Green, L. G., Fokin, V. V., Sharpless, K. B., *A Stepwise Huisgen Cycloaddition Process: Copper(I)-catalyzed regioselective "Litigation" of Azides and Terminal Alkynes*, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 41 (2002) 2596-2599
- [16] Xu, L., Li, Y. & Li, Y. *Application of „Click“ Chemistry to the Construction of Supramolecular Functional Systems*. *Asian J. Org. Chem.*, 3 (2014) 582-602
- [17] Worell, B. T., Malik, J. A., Fokin, V. V., *Direct evidence of a dinuclear copper intermediate in Cu(I)-catalyzed azide-alkyne cycloadditions*, *Science*, 340 (2013) 457-460
- [18] Marini, A., Muñoz-Losa, A., Biancardi, A., Mennucci, B., *What is Solvatochromism?*, *J. Phys. Chem. B*, 114, 51 (2010) 17128–17135
- [19] [https://chem.libretexts.org/Courses/Purdue/Purdue%3A_Chem_26505%3A_Organic_Chemistry_I_\(Lipton\)/Chapter_1._Electronic_Structure_and_Chemical_Bonding/1.10%3A_Pi_Conjugation](https://chem.libretexts.org/Courses/Purdue/Purdue%3A_Chem_26505%3A_Organic_Chemistry_I_(Lipton)/Chapter_1._Electronic_Structure_and_Chemical_Bonding/1.10%3A_Pi_Conjugation) (pristupila 10.8.2022.)
- [20] Klikar, M., Solanke, P., Tydlitát, J. & Bureš, F., *Alphabet-Inspired Design of (Hetero) Aromatic Push–Pull Chromophores*, *Chem. Rec.*, (2016) 1886–1905
- [21] de Silva, A. P., Moody, T. S. & Wright, G. D. *Fluorescent PET (Photoinduced Electron Transfer) sensors as potent analytical tools*. *Analyst*, 134 (2009) 2385
- [22] Liu, Z., He, W., Guo, Z., *Metal coordination in photoluminescent sensing*, *Chem. Soc. Rev.*, 42 (2013) 1568-1600
- [23] Bradamante, S., Facchetti, A., Pagani, G. A., *Heterocycles as Donor and Acceptor Units in Push-pull Conjugated Molecules*, *J. Phys. Org. Chem.*, 10 (1997) 514-524
- [24] Xu, L., Xiaolan, C., Jinwei, Y., Yang, L., Peipei, L., Lingbo, Q., Yufen, Z., *An Efficient Synthesis of 1,2,3-Triazole Bridge-Connected Phosphonate Derivatives of Coumarin, Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements*, 7 (2015) 961-971

- [25] Dyrager, C., Pinto Vieira, R., Nyström, S., Nilsson, K. P. R., Storr, T., *Synthesis and evaluation of benzothiazole-triazole and benzothiadiazole-triazole scaffolds as potential molecular probes for amyloid- β aggregation*, *New J. Chem.*, 41 (2017) 1566-1573
- [26] Belem, A., Roth, A., Streets, H., Dwyer, D. S., Kurth, M. J., *Triazolbenzo[d]thiazoles: Efficient synthesis and biological evaluation as neuroprotective agents*, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 22 (2012) 5976-5978
- [27] Meldal, M., Tornøe, C. W., *Cu-Catalyzed azide-alkyne cycloaddition*, *Chem. Rev.*, 108 (2008) 2952-3015
- [28] Neumann, S., Biewend, M. Rana, S., Binder, W. H., *The CuAAC: Principles, Homogeneous and Heterogeneous Catalysts, and Novel Developments and Applications*, *Macromol. Rapid Commun.*, 41 (2020) 1900359
- [29] Kautny, P., Bader, D., Stöger, B., Reider, G. A., Fröhlich, J., Lumpi, D., *Structure-Property Relationships in Click-Derived Donor-Triazole-Acceptor Materials*, *Chem. Eur. J.*, 22 (2016) 18887-18898
- [30] Wolfbeis, O.S. E.F., Kroneis, H., Marsoner, H., *Fluorimetric Analysis, A study on Fluorescent Indicators for Measuring Near Neutral ("Physiological") pH-Values*, *Analytische Chemie*, (1983) 119–124

ŽIVOTOPIS

Paola Grobensi [REDACTED] Pohađala je Osnovnu školu Špansko-Oranice u Zagrebu, nakon čega 2014. godine upisuje Gimnaziju Tituša Brezovačkog i Glazbenu školu Blagoja Berse, teorijski odjel. 2018. godine upisuje Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, preddiplomski studij Kemijsko inženjerstvo. Sudjelovala je u nastavi Organske kemije i Prijenosa tvari i energije u svojstvu demonstratora, te volontira na projektu Formula za znanost. Stručnu praksu odradila je 2021. godine na Zavodu za kemiju materijala Instituta Ruđer Bošković.