

# Sinteza i fotokemija halogeniranih BODIPY fotokaveza

---

**Popović, Matija**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2021**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:310458>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-11-26**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu  
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET  
Kemijski odsjek

Matija Popović

# **SINTEZA I FOTOKEMIJA HALOGENIRANIH BODIPY FOTOKAVEZA**

**Diplomski rad**

predložen Kemijskom odsjeku  
Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu  
radi stjecanja akademskog zvanja  
magistra kemije

Zagreb, 2021.



Ovaj diplomski rad izrađen je u Laboratoriju za sintetsku organsku kemiju instituta Ruđer

Bošković pod mentorstvom dr. sc. Nikole Basarića.

Nastavnik imenovan od strane Kemijskog odsjeka je doc. dr. sc. Đani Škalamera.

Diplomski rad izrađen je u okviru projekta Hrvatske zaklade za znanost pod nazivom  
Fotokemija: Reakcijski mehanizmi i primjene u organskoj sintezi i biologiji (PhotoApp),  
voditelj: dr. sc. N. Basarić.(HrZZ-IP-2019-04-8008)



## Zahvale

---

*Ovim putem zahvalio bi se svom mentoru dr. sc. Nikoli Basariću na velikoj pomoći i brojnim savjetima te velikom znanju koje je prenio na mene. Također hvala što ste me podučili pragmatičnom razmišljanju i probudili u meni ogroman interes za istraživački rad.*

*Veliko hvala svim kolegama iz LSOK-a koji su mi pomogli svaki put kada je zapelo, a ponajviše mag. chem. Katarini Zlatić na brojnim savjetima i trikovima vezanim za sintezu i kromatografiju.*

*Hvala svim članovima NMR centra Instituta Ruđer Bošković na svim snimljenim spektrima.*

*Hvala Marijeti Kralj i Lidiji Uzelac koje su u Laboratoriju za eksperimentalnu terapiju u Zavodu za molekularnu medicinu Instituta Ruđer Bošković, provele biološke testove za spojeve koje sam napravio. Također htio bih se zahvaliti i Ivi Džebi koja je provela eksperimente laserske pulsne fotolize za spojeve.*

*Doc. dr. sc. Đaniju Škalameri koji mi je pomogao da stupim u kontakt s mentorom Nikolom i pomagao oko sve birokracije na fakultetu i omogućio da diplomiram.*

*Želim se zahvaliti svim kolegama koji su mi učinili boravak na fakultetu ugodnim i veselim. Također im se želim zahvaliti na svojoj pomoći i savjetima.*

*Posebno se želim zahvaliti mojoj ljubavi Petri koja je bila uz mene kada je bilo najteže i najlakše te pokazala mi kako stati na svoje dvije noge čak i kada je najteže. Veliko hvala i njejoj obitelji koji su me objeručke prihvatili i olakšali studij na mnogo načina.*

*Najveća hvala cijeloj mojoj obitelji koja me podržavala tijekom studiranja. Hvala mami Stanki i tati Goranu što su mi omogućili odlazak na studij i podržavali tijekom cijelog studiranja. Hvala baki Ljubici za najfinije i najbolje ručkove koje je pripremala. Najveća hvala na podršci i sestri Klari koja će jednog dana kao što sam i ja postati prava kemičarka.*

*Velika HVALA svima koji su bili uz mene, a zaboravio sam ih navesti!*

---



# Sadržaj

<b>SAŽETAK.....</b>	<b>IX</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>XI</b>
<b>§ 1. UVOD.....</b>	<b>1</b>
<b>§ 2. LITERATURNI PREGLED .....</b>	<b>4</b>
<b>2.1. Fotokavezi.....</b>	<b>4</b>
2.1.1. Svojstva i karakteristike fotokaveza .....	4
2.1.2. Fenacilne skupine .....	5
2.1.3. Nitroarilne skupine .....	7
2.1.4. Arilmetilne skupine .....	8
<b>2.2. Fotokavezi koji apsorbiraju u vidljivom dijelu spektra .....</b>	<b>9</b>
2.2.1. Prednosti fotokaveza koji apsorbiraju u vidljivom dijelu spektra.....	9
2.2.2. Fotootpuštanje iz koordinacijskih spojeva.....	10
2.2.3. Fotokemijski pokretači kiselosti i bazičnosti.....	12
2.2.4. Fotoaktivacija i fotodeaktivacija lijekova (fotofarmakologija).....	13
<b>2.3. Fotokavezi s BODIPY strukturom .....</b>	<b>14</b>
2.3.1. Općenito o BODIPY spojevima.....	14
2.3.2. Primjena BODIPY fotokaveza.....	15
2.3.3. Fotokemija BODIPY fotokaveza .....	16
2.3.4. Sinteza meso-metilnih BODIPY fotokaveza .....	22
<b>2.4. Kinon-metidi (QM) .....</b>	<b>24</b>
2.4.1. Struktura i svojstva kinon-metida.....	24
2.4.2. Generiranje kinon-metida .....	24
2.4.3. Biološka primjena fotokemijski nastalih kinon-metida .....	26
<b>§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO .....</b>	<b>28</b>
<b>3.1. Opće napomene .....</b>	<b>28</b>
<b>3.2. Sinteza halogeniranih BODIPY fotokaveza.....</b>	<b>29</b>
3.2.1. Sinteza 4,4-difluor-8-acetoksimetil-1,3,5,7-tetrametil-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacena (1) .....	29
3.2.2. Sinteza 4,4-dimetil-8-hidroksimetil-1,3,5,7-tetrametil-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacena (2) .....	30
3.2.3. Sinteza 4,4-dimetil-8-brommetil-1,3,5,7-tetrametil-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacena (3).....	31
3.2.4. Sinteza 4,4-dimetil-8-brommetil-2,6-dijod-1,3,5,7-tetrametil-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacena (10).....	32
3.2.5. Sinteza 4,4-dimetil-8-[(2-hidroksimetil)fenoksi]metil-1,3,5,7-tetrametil-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacena (4) .....	33



3.2.6. Sinteza 4,4-dimetil-8- $\{[(2\text{-hidroksimetil})\text{fenoksi}]\text{metil}\}$ -2,6-dijod-1,3,5,7-tetrametil-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacena (5) .....	34
3.2.7. Sinteza 4,4-dimetil-8- $\{[(2\text{-hidroksimetil})\text{fenoksi}]\text{metil}\}$ -2,6-dibrom-1,3,5,7-tetrametil-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacena (6) .....	35
3.2.8. Sinteza 4,4-dimetil-8- $\{[(2\text{-acetoksimetil})\text{fenoksi}]\text{metil}\}$ -2,6-dijod-1,3,5,7-tetrametil-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacena (7) .....	36
3.2.9. Sinteza 4,4-dimetil-8- $\{[(2\text{-acetoksimetil})\text{fenoksi}]\text{metil}\}$ -2,6-dibrom-1,3,5,7-tetrametil-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacena (8) .....	37
<b>3.3. Određivanje kvantnih prinosa fluorescencije .....</b>	<b>38</b>
<b>3.4. Vremenski korelirano brojanje pojedinačnih fotona (TC–SPC).....</b>	<b>39</b>
<b>3.5. Određivanje kvantnih prinosa reakcije upotrebom aktinometra .....</b>	<b>40</b>
<b>§ 4. REZULTATI I RASPRAVA .....</b>	<b>42</b>
4.1. Dizajn i sinteza spojeva.....	42
4.2. Fotofizička karakterizacija spojeva.....	49
4.3. Fotokemijska reaktivnost spojeva .....	53
4.4. Laserska pulsna fotoliza .....	56
4.5. Antiproliferativna ispitivanja .....	58
<b>§ 5. ZAKLJUČAK .....</b>	<b>59</b>
<b>§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA.....</b>	<b>61</b>
<b>§ 7. LITERATURNI IZVORI.....</b>	<b>63</b>
<b>§ 8. DODATAK.....</b>	<b>XV</b>
8.1. $^1\text{H}$ i $^{13}\text{C}$ NMR .....	xv
8.2. UV/Vis .....	xxxi
8.3. Fluorescencija.....	xxxiii
8.4. HPLC .....	xxxv
8.5. LFP .....	xxxvii
<b>§ 9. ŽIVOTOPIS .....</b>	<b>XV</b>



Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
**Kemijski odsjek**

Diplomski rad

## SAŽETAK

### SINTEZA I FOTOKEMIJA HALOGENIRANIH BODIPY FOTOKAVEZA

Matija Popović

U okviru ovog rada provedena je sinteza četiri nova BODIPY fotokaveza te su im istražena fotofizička svojstva i fotokemijska reaktivnost. Spojevi su supstituirani na *meso* metilnoj poziciji s fotouklonjivom fenolnom skupinom za koju se očekuje da daje kinon-metide u reakcijama otpuštanja. 4,4-Dimetil-8-[[2-hidroksimetil]fenoksi]metil}-2,6-dijod-1,3,5,7-tetrametil-4-bora-3a,4a-diaza-*s*-indacen (**5**), 4,4-dimetil-8-[[2-hidroksimetil]fenoksi]metil}-2,6-dibrom-1,3,5,7-tetrametil-4-bora-3a,4a-diaza-*s*-indacen (**6**), 4,4-dimetil-8-[[2-acetoksimetil]fenoksi]metil}-2,6-dijod-1,3,5,7-tetrametil-4-bora-3a,4a-diaza-*s*-indacen (**7**) i 4,4-dimetil-8-[[2-acetoksimetil]fenoksi]metil}-2,6-dibrom-1,3,5,7-tetrametil-4-bora-3a,4a-diaza-*s*-indacen (**8**) sintetizirani su i okarakterizirani  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  NMR spektroskopijom te pomoću masene spektrometrije. Fotofizička svojstva dobivenih spojeva ispitana su UV/Vis spektroskopijom, stacionarnom i vremenski razlučenom fluorescencijskom spektroskopijom. Usporedbom kvantnih prinosa fluorescencije ( $\Phi_F$ ) nehalogeniranih i halogeniranih BODIPY fotokaveza utvrđeno je da su  $\Phi_F$  niži za halogenirane BODIPY fotokaveze što ukazuje na veću učinkovitost međustavnog križanja. Vremenski koreliranim brojanjem pojedinačnih fotona određena su vremena života singletnog pobuđenog stanja te konstante brzine deaktivacije zračenjem i bez zračenja. Laserskom pulsnom fotolizom detektirana su tripletna pobuđena stanja koja sudjeluju u reakciji heterolize. Fotokemijska reaktivnost ispitana je reakcijama fotosolvolize u metanolnim otopinama uz pobuđivanje vidljivim svjetlom. Fotokemijske reakcije praćene su HPLC-om te su dobiveni kvantni prinosi reakcija. Za spojeve **5-8** provedena su antiproliferativna ispitivanja na ljudskim tumorskim stanicama čuvanim u mraku ili ozračenim vidljivim svjetlom. Spojevi pokazuju pojačanu antiproliferativnu aktivnost nakon ozračivanja što ih čini prikladnima u razvoju antitumorskih fototerapeutika.

(66 + XXXVIII stranica, 6 slika, 47 shema, 4 tablice, 79 literaturna navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj kemijskoj knjižnici Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Horvatovac 102a, Zagreb i Repozitoriju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

Ključne riječi: BODIPY, fotokavez, fotokemija, kinon-metidi

Mentor: dr. sc. Nikola Basarić, zn. sav.

Nastavnik (imenovan od strane Kemijskog odsjeka): doc. dr. sc. Đani Škalamera

Ocjenitelji:

1. doc. dr. sc. Đani Škalamera
2. prof. dr. sc. Željka Soldin
3. doc. dr. sc. Adriana Kenđel
4. Zamjena: doc. dr. sc. Željka Car

Datum diplomskog ispita: 17. rujna 2021





University of Zagreb  
Faculty of Science  
Department of Chemistry

Diploma Thesis

## ABSTRACT

### SYNTHESIS AND PHOTOCHEMISTRY OF HALOGENATED BODIPY PHOTOCAGES

Matija Popović

This master thesis features the synthesis of four new BODIPY photocages and investigation of their photophysical properties and photochemical reactivity. The compounds are substituted at the *meso* methyl position with a photocleavable phenolic group that is anticipated to deliver quinone methides in the decaging reaction. 4,4-Dimethyl-8-{[(2-hydroxymethyl)phenoxy]methyl}-2,6-diiodo-1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a-diaza-*s*-indacene (**5**), 4,4-dimethyl-8-{[(2-hydroxymethyl)phenoxy]methyl}-2,6-dibromo-1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a-diaza-*s*-indacene (**6**), 4,4-dimethyl-8-{[(2-acetoxymethyl)phenoxy]methyl}-2,6-diiodo-1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a-diaza-*s*-indacene (**7**) and 4,4-dimethyl-8-{[(2-acetoxymethyl)phenoxy]methyl}-2,6-dibromo-1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a-diaza-*s*-indacene (**8**) were synthesized and characterized by <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C NMR and HRMS. Photophysical properties were examined by UV/Vis, steady-state and time-resolved fluorescence spectroscopy. By comparing fluorescence quantum yields ( $\Phi_F$ ) of non-halogenated and halogenated BODIPY photocages, it was found that  $\Phi_F$  were lower for the halogenated BODIPY photocages, indicating more efficient intersystem crossing. The time-correlated single photon counting was used to determine lifetimes of the singlet excited states and rate constants for radiative and non-radiative decay. Laser flash photolysis was used to detect triplet excited states, which are involved in the heterolysis reaction. The photochemical reactivity was investigated by conducting photosolvolyses in methanolic solutions upon excitation by visible light. The progress of the reactions was monitored by HPLC and quantum yields of the reactions were obtained. For compounds **5-8**, antiproliferative investigations against human cancer cells were performed with cells kept in dark or irradiated. Compounds show enhanced antiproliferative activity upon irradiation, which renders them applicable in the development of cancer phototherapeutics.

(66 + XXXVIII pages, 6 figures, 47 schemes, 4 tables, 79 references, original in Croatian)

Thesis deposited in Central Chemical Library, Faculty of Science, University of Zagreb, Horvatovac 102a, Zagreb, Croatia and in Repository of the Faculty of Science, University of Zagreb

Keywords: BODIPY, photocages, photochemistry, quinone methides

Mentor: Dr. Nikola Basarić, Senior scientist

Supervisor (appointed by the Department of Chemistry): Dr. Đani Škalamera, Assistant Professor

Reviewers:

1. Dr. Đani Škalamera, Assistant Professor
  2. Dr. Željka Soldin, Professor
  3. Dr. Adriana Kendel, Assistant Professor
- Substitute: Dr. Željka Car Assistant Professor

Date of exam: September 17, 2021.



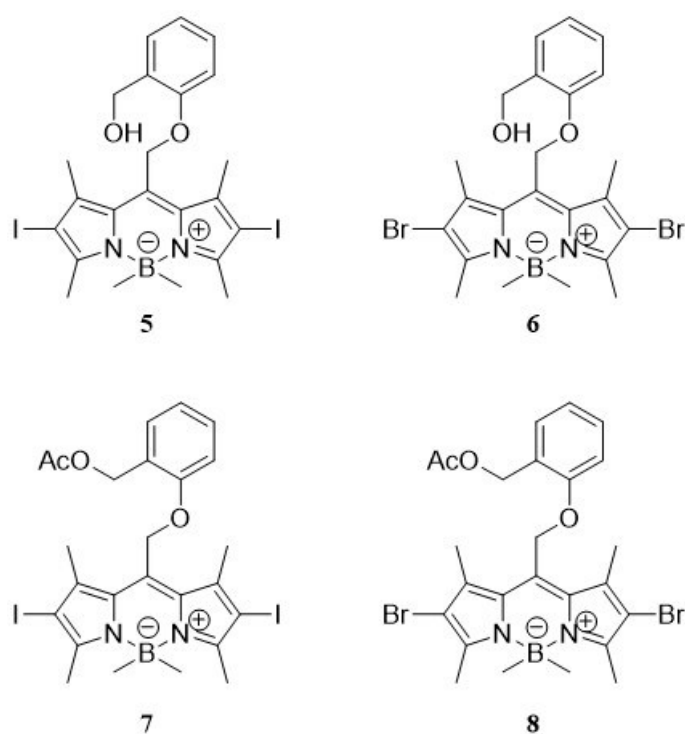
## § 1. UVOD

Zaštitne skupine u organskoj sintezi koriste se kada se neka kemijska reakcija treba odvijati selektivno na jednom reakcijskom mjestu molekule s više funkcionalnih skupina, a druga reakcijska mjesta molekule moraju biti privremeno blokirana. Zaštitne skupine moraju ispunjavati određene uvjete. Moraju reagirati selektivno u dobrom iskorištenju kako bi dale zaštićeni supstrat koji je stabilan u reakcijskim uvjetima željene reakcije. Zaštitna skupina mora se moći selektivno ukloniti u dobrom iskorištenju korištenjem lako dostupnih reagensa koji ne napadaju regeneriranu funkcionalnu skupinu. Također, treba tvoriti derivate bez generiranja novih stereogenih centara, koji se mogu lako odvojiti od mogućih nusprodukata koji nastaju tijekom nastajanja zaštićenog reagensa, kao i imati minimalnu dodatnu funkcionalnost kako se ne bi stvarala dodatna reakcijska mjesta.<sup>1</sup>

Fotokavezi su molekule koje sadrže fotokemijski uklonjivu zaštitnu skupinu, gdje uslijed izlaganja svjetlosti oslobađaju molekulu iz „kaveza“ te omogućuju vremensku i prostornu kontrolu oslobađanja različitih biogenih spojeva (neurotransmitera i staničnih signalnih molekula), kiselina, baza,  $\text{Ca}^{2+}$ -iona, oksidansa, insekticida, feromona i parfema.<sup>2,3,4,5,6</sup> Već nakon prvih publikacija o fotouklonjivim skupinama u organskoj sintezi u kratkom vremenskom periodu počela je primjena u biološkim sustavima gdje je prvo izvedeno fotouklanjanje cikličkog adenozin monofosfata (cAMP) i adenozin trifosfata (ATP).<sup>7</sup> Također, trenutno postoji veliki interes za razvoj fotokaveza koji bi imali primjenu u organskoj sintezi ili biomedicini, ponajviše za kontroliranu dostavu lijekova u biološkim sustavima. Kriteriji za dizajn dobre fotokemijski uklonjive skupine najviše ovise o njihovoj primjeni. Općenito, fotokavezi trebaju apsorbirati zračenje iznad 350 nm gdje je malo vjerojatno da će biološki sustav biti oštećen, ali je osigurana energija potrebna da se potakne cijepanje jednostruke veze organske molekule. Fotoreakcija mora imati što manje nusprodukata i visoki kvantni prinos ili efikasnost oslobađanja. Idealni fotokavez ne smije imati nečistoća, mora biti stabilan u mediju prije i tijekom fotolize te se dobro otapati u ciljanom mediju (vodena otopina u biološkoj/medicinskoj primjeni). Fotokemijski produkti koji nastaju zajedno s oslobođenim bioaktivnim reagensima ne smiju apsorbirati zračenje valnih duljina pri kojima se odvija reakcija, niti reagirati i utjecati na promatrani biološki sustav.<sup>8,9</sup>

Kako bi se osigurala primjena fotokaveza u medicini važno je dizajnirati spojeve kod kojih je moguće uklanjanje zaštitne skupine korištenjem vidljivog svjetla, što rezultira interesom za razvoj niza novih fotokaveza kao što su derivati 4-bora-3a,4a-diaza-*s*-indaceni (BODIPY spojevi).<sup>10</sup> Pokazano je da se BODIPY spojevi mogu koristiti kao fotokavezi za derivate karboksilnih kiselina i alkohola, a utvrđeno je da se uklanjanje zaštitne skupine odvija preko tripletnog pobuđenog stanja.<sup>10</sup> U nastavku istraživanja, naša ideja je koristiti metilirani BODIPY fotokavez<sup>11,12</sup> za kinon-metide,<sup>1</sup> reaktivne međuprodukte s biološkom aktivnošću povezanom s alkiliranjem proteina i DNA.<sup>13</sup>

U okviru ovog rada cilj je sintetizirati četiri nova fotokaveza za kinon-metide s BODIPY strukturom, supstituiranih bromom ili jodom **5-8**. Strukture ciljnih molekula prikazane su na shemi 1. Pretpostavka je da će se uvođenjem halogena povećati kvantni prinos međusustavnog križanja (ISC) i populacije tripleta te da će biti podložni učinkovitijim reakcijama uklanjanja zaštitne skupine.



Shema 1. Strukturne formule ciljanih molekula.

<sup>1</sup> Iako IUPAC više ne preporučuje naziv kinon-metid, već kinometan, u diplomskom radu smo se odlučili koristiti stari naziv koji je uvriježen u literaturi.

Rad uključuje sintezu heterocikličkih BODIPY spojeva uobičajenim metodama u organskoj sintezi te karakterizaciju novih molekula spektroskopskim metodama. Sintetiziranim fotokavezima ispitana su fotofizička svojstva mjerenjem stacionarne i vremenski razlučene fluorescencije, metodom brojanja pojedinačnih fotona. Provedena su ozračivanja fotokaveza u nukleofilnim otapalima kako bi se ispitala njihova fotokemijska reaktivnost, a regiospecifična ugradnja nukleofila indirektno ukazuje na prisutnost reaktivnih međuprodukata u reakcijama. Tripletne pobuđena stanja molekula i reaktivni međuprodukti detektirani su laserskom pulsnom fotolizom. U suradnji s grupom dr. sc. M. Kralj na IRB-u ispitano je antiproliferativno djelovanje molekula koje bi mogle biti potencijalni antitumorski fototerapeutici.



## § 2. LITERATURNI PREGLED

### 2.1. Fotokavezi

#### 2.1.1. Svojstva i karakteristike fotokaveza

Fotokavezi su molekule koje sadrže fotokemijski uklonjivu zaštitnu skupinu. U literaturi se često koristi kratica PPG (eng. „*Photoremovable protecting group*“) za fotokemijski uklonjive zaštitne skupine. One omogućuju prostornu i vremensku kontrolu otpuštanja tvari u promatrani sustav, poput bioagensa (neurotransmitera i staničnih signalnih molekula), kiselina, baza,  $\text{Ca}^{2+}$  iona, oksidansa, insekticida, feromona, mirisa i drugih tvari.<sup>2-6</sup> Nakon ranih izvještaja o PPG-ima za upotrebu u organskoj sintezi,<sup>5,6</sup> potaknuta je primjena i u biologiji gdje je prvi put postignuto foto-otpuštanje cikličkog adenozin monofosfata (cAMP) odnosno ATP-a.<sup>7,8</sup> Nakon toga uveden je prikladan, premda pomalo varljiv, pojam „kavez“ za označavanje spoja koji je zaštićen PPG-om.<sup>14</sup> Postoje mnogo članaka koji pokrivaju primjenu PPG-a u sintezi, biokemiji i neurobiologiji, biomedicini, polimerizaciji i fluorescencijskoj aktivaciji.<sup>2</sup>

Kriteriji za dizajn dobre PPG ovise o njihovoj primjeni. Općenito, PPG treba jako apsorbirati zračenje valnih duljina znatno iznad 350 nm, gdje će biti manje vjerojatna apsorpcija zračenja od strane biološkog sustava. Nadalje, fotokemijska reakcija mora biti selektivna te mora imati veliki kvantni prinos,  $\Phi_{\text{rel}}$ . Važna mjera efikasnosti PPG-a je umnožak kvantnog prinosa i molarnog apsorpcijskog koeficijenta  $\epsilon$  PPG-a,  $\Phi_{\text{rel}} \times \epsilon(\lambda_{\text{irr}})$ , koji je proporcionalan količini otpuštanja slobodnog supstrata pri zadanoj valnoj duljini pobude.<sup>2</sup>

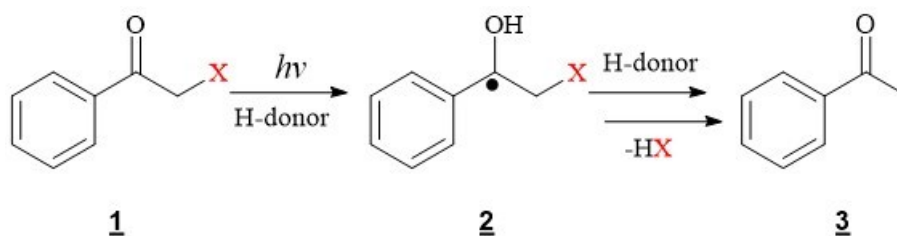
Prilikom primjene fotokavezi moraju biti čisti spojevi i stabilni u mediju prije i nakon fotolize. Nusprodukti fotokemijske reakcije koji prate otpuštanje bioaktivnog reagensa ne smiju apsorbirati zračenje pri valnoj duljini ozračivanja, kako bi se smanjila kompetitivna apsorpcija. Nadalje, fotokavezi moraju biti biokompatibilni i ne smiju stupati u reakciju s promatranim sustavom.<sup>2</sup>

Kako bi se pratila kinetika brzog odgovora na oslobođeni reagens u uzorcima živih stanica, fotokavez mora biti pobuđen kratkim svjetlosnim pulsevima, a konstanta brzine nastajanja produkta ( $k_{\text{app}}$ ) mora biti veća od promatranog staničnog odgovora. Postoji nekoliko reakcijskih koraka koji uključuju osnovno i pobuđeno stanje međuprodukata, a prethode otpuštanju supstrata. Ukoliko nije moguće mjeriti  $k_{\text{app}}$  u realnom vremenu potrebno je znati detaljan mehanizam reakcije, točnije onaj dio mehanizma koji uključuje najsporiji korak na reakcijskom

putu (onaj koji određuje brzinu reakcije) i vrijeme života fotokaveza  $\tau_{\text{rd}}$ . Sustav ne mora u potpunosti ispunjavati sve navedene zahtjeve.<sup>2</sup>

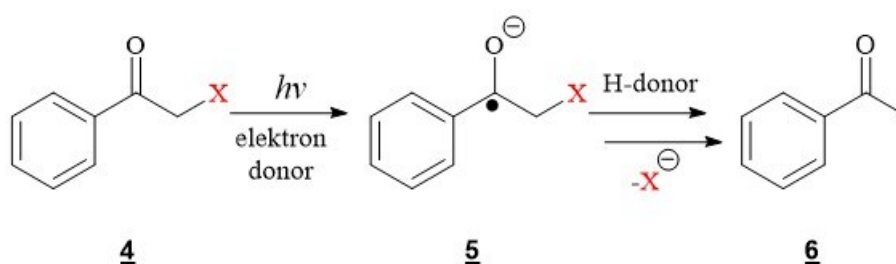
### 2.1.2. Fenacilne skupine

Fenacilni spojevi su se pokazali od interesa za dizajn fotokaveza.  $\alpha$ -Supstituirani esteri fenacilnih kromofora koriste se kao PPG za otpuštanje karboksilnih kiselina. Nije potvrđeno fotokemijsko homolitičko cijepanje veze C–O estera pri čemu nastaju fenacilni i aciloksi radikali. Umjesto toga, laserskom pulsnom fotolizom utvrđeno je da mehanizam uključuje reakciju oduzimanja vodika u tripletnom pobuđenom stanju fenacilnog estera **1** od molekule koja je donor atoma vodika. Reakcija se odvija preko ketil-esterskog radikalskog međuprodukta **2** (Shema 2).<sup>14</sup>



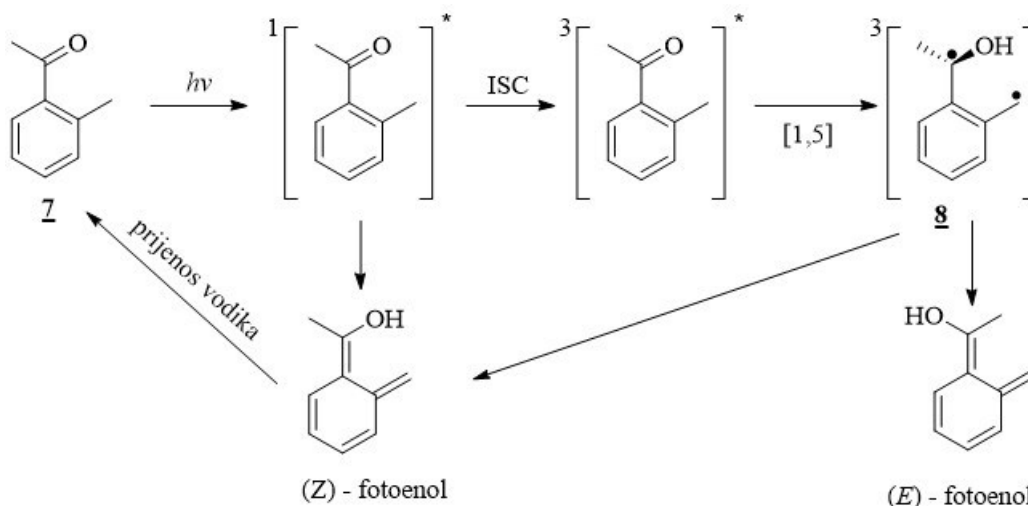
Shema 2. Primjer fotokemijske reakcije aromatskog ketona u prisutnosti donora atoma vodika te otpuštanje izlazne skupine X.<sup>2</sup>

U prisutnosti elektron-donora, mehanizam uključuje prijenos elektrona s donora na karbonilnu skupinu nakon čega slijedi otpuštanje izlazne skupine.<sup>2</sup> Reakcija je prikazana na shemi 3.



Shema 3. Primjer fotokemijske reakcije aromatskog ketona u prisutnosti donora elektrona te otpuštanje izlazne skupine X.<sup>2</sup>

Kod aromatskih ketona moguća je i foto-enolizacija. Primjer takvog mehanizma prikazan je kod foto-enolizacije spoja **7** na shemi 4.



Schema 4. Mehanizam fotoinducirane keto-enolne tautomerije (fotoenolizacije).<sup>2</sup>

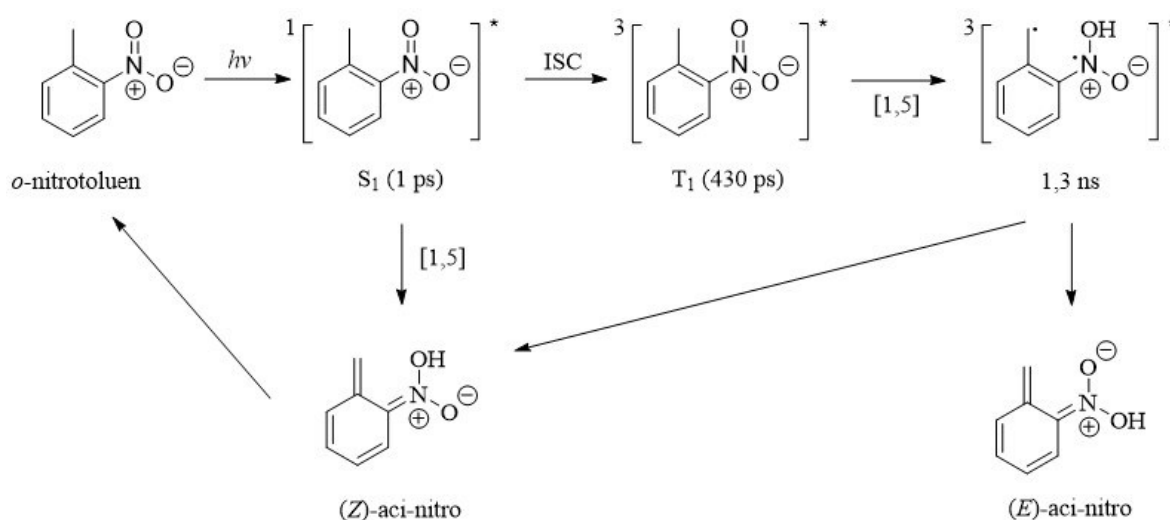
Vrijeme života (*Z*)-izomera slično je tripletnom biradikalu i obično lako i učinkovito prelazi natrag u početnu molekulu 1,5-sigmatropnim pomakom vodika. Njegovo vrijeme života također ovisi i o otapalu zbog nastanka vodikovih veza između hidroksilne skupine i polarnog otapala što usporava sigmatropni pomak. Kako bi se (*E*)-izomer vratio u keton potreban je intermolekulski prijenos vodika koji se može ostvariti ili protoniranjem metilenske skupine kiselinom ili prijenosom protona s enolnog OH preko otapala ili baze nakon čega slijedi protoniranje ugljika.<sup>2</sup>

Aromatski ketoni su termički stabilni i sintetski lako dostupni spojevi, a njihova fotokemijska svojstva su dobro proučena i razumljiva. Najniži energijski prijelaz jednostavnih karbonilnih spojeva najčešće odgovara  $n, \pi^*$  prijelazu. Visoko energetske  $\pi, \pi^*$  apsorpcijske vrpce su intenzivne te je unutarnja konverzija u prvo pobuđeno singletno stanje ( $S_1$ ) vrlo brza. Elektronski prijelazi aromatskih ketona su osjetljivi na polarnost otapala te ovise i o supstituentima vezanim na fenilnom prstenu. Stvaranjem vodikove veze između protičnog otapala i karbonilne skupine stabilizira kisikovu neveznu orbitalu što uzrokuje pomak  $n, \pi^*$  apsorpcijske vrpce prema kraćim valnim duljinama. Nasuprot tome, elektron-donirajuće skupine (EDG) i polarna otapala utječu na batokromni pomak  $\pi, \pi^*$  apsorpcijske vrpce. Kod aromatskih ketona uočena je jaka fosforescencija i slaba fluorescencija. Razlog tome je brzo i efikasno međusustavno križanje u tripletna stanja. Energetski bliske  $n, \pi^*$  i  $\pi, \pi^*$  apsorpcijske

vrpce imaju važnu ulogu u križanju  $S_1/T_2/T_1$ . Karbonilna skupina kod aromatskih ketona je najčešće centar fotokemijske reaktivnosti takvih spojeva.<sup>2</sup>

### 2.1.3. Nitroarilne skupine

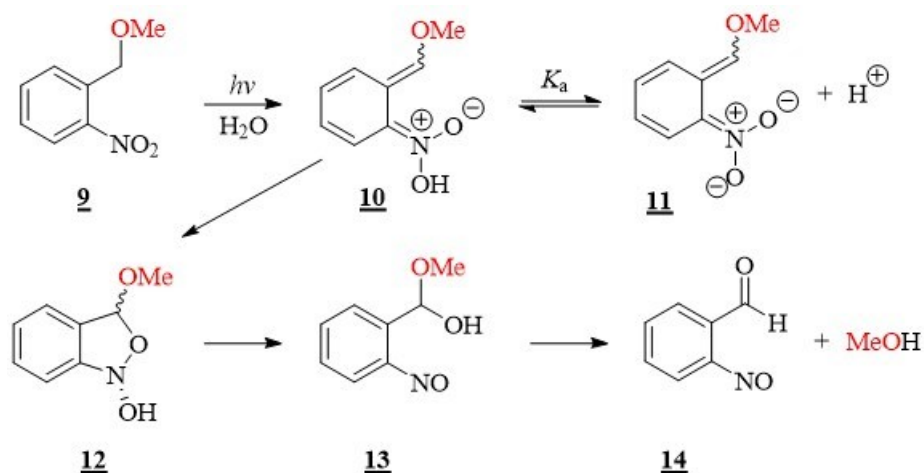
*o*-Nitrobenzilni derivati (*o*-NB) također su predstavljeni kao fotokavezi.<sup>6</sup> Primarnom fotoreakcijom *o*-alkilnitroarena smatra se prijenos vodika s *o*-alkilnog supstituenta na nitro skupinu koji rezultira nastajanjem aci-nitro tautomera u osnovnom stanju.<sup>2</sup> Primjer je reakcija fototautomerizacije *o*-nitrotoluena prikazana na shemi 5.



Shema 5. Reakcijski mehanizam fototautomerizacije *o*-nitrotoluena u THF-u.<sup>2</sup>

Nitrobenzilni, nitrofenilni spojevi i njihovi dimetoksi derivati su najčešće korišteni fotokavezi. Kinetika nestajanja njihovih primarnih kinonoidnih međuprodukata na mikrosekundnoj vremenskoj skali najčešće ne odgovara koraku koji određuje brzinu kemijske reakcije zato što je otpuštanje supstrata u nekim slučajevima i za red veličine sporije. Nadalje, fotoliza takvih spojeva uzrokuje pojavu potencijalno toksičnih i jako apsorbirajućih nusprodukata poput *o*-nitrozobenzaldehida. Stoga nitrobenzilni i nitrofenilni spojevi nisu najpogodnije PPG za korištenje u biološkim sustavima.<sup>2</sup>

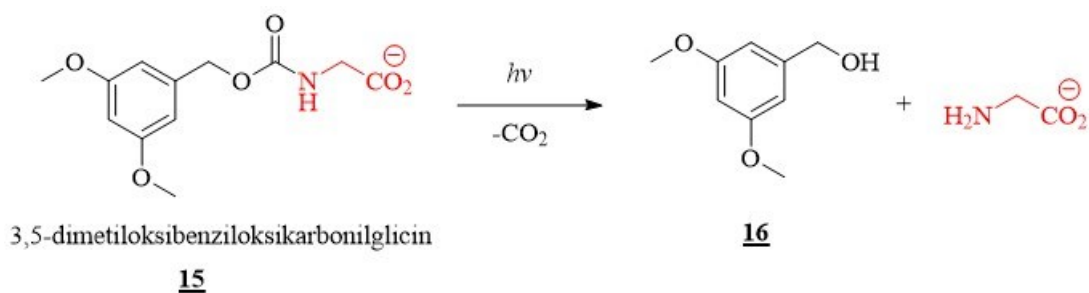
Na shemi 6. prikazan je primjer otpuštanja supstrata s *o*-nitrobenzilnog fotokaveza **9** gdje dolazi do ireverzibilnog stvaranja peteročlanog prstena iz **10** u **12**, otvaranja prstena iz **12** u **13** te konačno otpuštanja metanola i nastanak nitrozo derivata **14**.<sup>15</sup>



Shema 6. Primjer mehanizma fotoreakcije derivata *o*-nitrobenzena.<sup>15</sup>

#### 2.1.4. Arilmetilne skupine

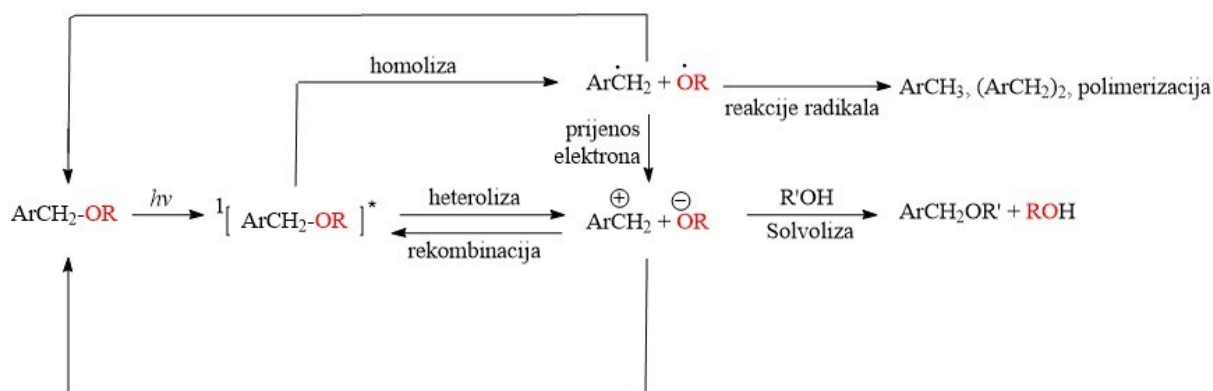
Velik broj fotolabilnih zaštitnih skupina temelji se na fotokemijski-induciranoj hidrolizi benzilnih ili heterobenzilnih estera ili etera. Štoviše, fotokemijsko oslobađanje glicina iz benziloksikarbonilnog derivata je prva primjena fotoreaktivne zaštitne skupine u organskoj kemiji.<sup>16</sup> Ozračivanje *N*-benziloksikarbonilglicina pri valnoj duljini 254 nm rezultira otpuštanjem glicina u 75% iskorištenju i s kvantnim prinosom od 0,15. Fotolabilna zaštita aminokiselina i dipeptida te njihovo otpuštanje prikazano je na primjeru osvjetljavanja 3,5-dimetoksibenziloksikarbonilglicina (**15**). Reakcija fotolize prikazana je na shemi 7.<sup>17</sup>



Shema 7. Oslobađanje glicina fotolizom 3,5-dimetoksibenziloksikarbonilglicina.<sup>17</sup>

S mehanističkog stajališta, ova fotosolvoliza može se odvijati preko inicijalne, svjetlom inducirane, homolize C–O veze, nakon čega slijedi brzi prijenos elektrona kako bi se dobio ionski par u kavezu otapala. Ionski par zatim bježi iz kaveza otapala kako bi nastao konačan produkt. Pokazano je kako je taj proces dominantan u fotolizi jednostavnih benzilnih derivata. Zapravo, fotosolvoliza benzilnih estera često je popraćena nastajanjem radikala.<sup>2</sup>

Računske studije ukazuju na to kako je heteroliza C–O veze energetski povoljnija od homolize, posebno u prisutnosti *ortho* i *meta* supstituenata koji stabiliziraju benzilni kation.<sup>18</sup> Različite aromatske strukture omogućuju delokalizaciju pozitivnog naboja u osnovnom stanju te potiču prijenos elektrona. Kada se takva molekula pobudi u pobuđenom stanju dolazi do promjene elektronske strukture, što za posljedicu ima heterolizu C–O veze. Shema 8. prikazuje procese koje se mogu dogoditi tijekom ozračivanja fotokaveza arilmetilnih etera. Prvo dolazi do pobude molekule u pobuđeno stanje. Zatim je moguća heteroliza C–O veze, u kojoj nastaje ionski par, ili homoliza C–O veze, gdje nastaje par radikala. Ako nastane par radikala moguć je nastanak monomera, dimera i polimera radikala, dok je kod nastanka ionskih parova moguća solvoliza. Reakcija oslobađanja alkohola ovisi o kompeticiji između reakcije solvolize i povratne reakcije koja je usmjerena prema nastanku početnog spoja. Polarna protična otapala povećavaju učinkovitost heterolitičkog cijepanja i prijenos elektrona.<sup>2</sup>



Shema 8. Fotokemijske reakcije arilmetilnih etera.<sup>2</sup>

## 2.2. Fotokavezi koji apsorbiraju u vidljivom dijelu spektra

### 2.2.1. Prednosti fotokaveza koji apsorbiraju u vidljivom dijelu spektra

Energija fotona pri valnim duljinama  $\lambda \approx 300$  nm ( $\sim 400$  kJ/mol) dovoljna je kako bi se potaklo homolitičko cijepanje većine veza u organskim molekulama. Većina fotokaveza apsorbira svjetlost u području valnih duljina od 300 do 400 nm. Međutim, pobuda u UV području predstavlja nekoliko problema, pogotovo u biološkim sustavima. Visoka energija UV svjetla ograničeno prodire u tkivo zbog visokog optičkog raspršenja i jake apsorpcije endogenih kromofora poput hemoglobina i melanina. Također, moguća je pojava fototoksičnih i fotoalergijskih reakcija zbog interakcije UV svjetla s DNA, RNA i raznim lipidima.<sup>3</sup>

Vidljivo i NIR zračenje prodire dublje u tkivo i znatno je manje štetno biološkim sustavima. Manja biološka štetnost vidljivog i NIR zračenja tako omogućuje novu primjenu fotokaveza u raznim područjima, poput dostave lijekova u biološke sustave. Već se neki fotokemijski pristupi koriste u rutinskoj kliničkoj primjeni. Nadalje, vidljivi/NIR izvori, koherentni i nekoherentni, često su jeftiniji, učestaliji i lako dostupni manje stručnim krajnjim korisnicima od UV izvora.<sup>3</sup>

Donedavno je bilo poznato samo nekoliko PPG-a čija je aktivacija moguća direktnim zračenjem iznad ~600 nm. Smatralo se da je dizajn PPG-a, koji efikasno provode fotootpuštanje pri valnim duljinama iznad 500 nm, zahtjevan. Konstanta brzine deaktivacije bez zračenja povećava se kako se energetski razmak između energijskih stanja smanjuje. To objašnjava zašto organske PPG s više  $\pi$  elektrona koje apsorbiraju vidljivo ili NIR zračenje manje učinkovito reagiraju u fotoreakcijama. Međutim, dok su kvantni prinosi otpuštanja manji za takve fotokaveze, njihovi kromofori imaju velike molarne apsorpcijske koeficijente te čine  $\Phi_{\text{rel}} \times \varepsilon(\lambda_{\text{irr}})$  umnožak dovoljno velikim za praktičnu upotrebu.

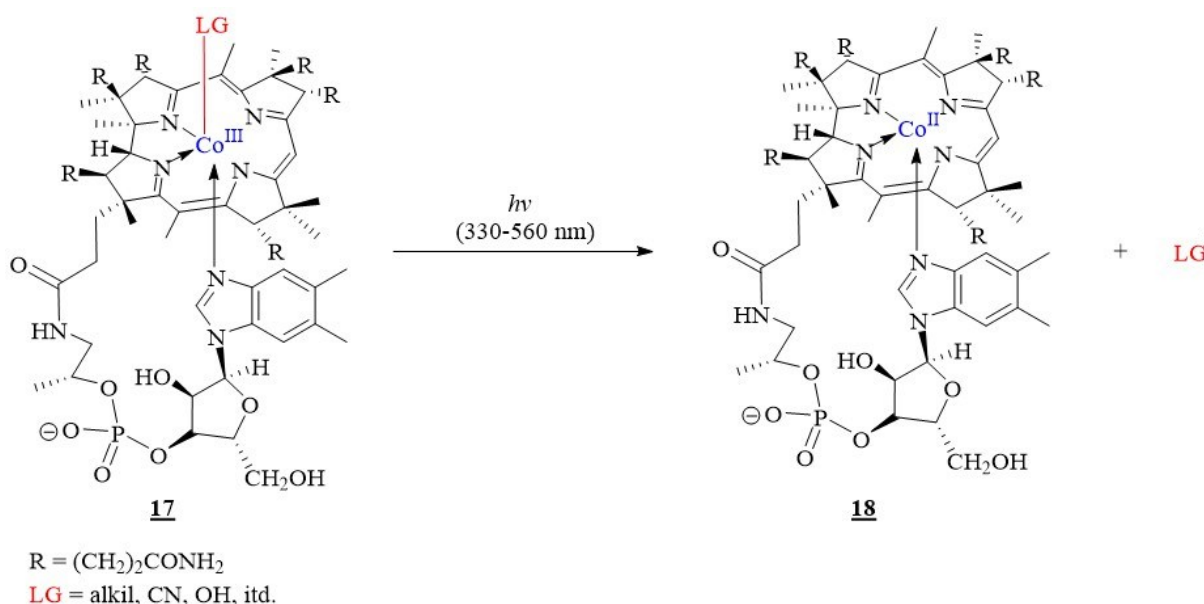
Primjena PPG nije ograničena na otpuštanje jedne vrste od interesa. Pažljivim odabirom komplementarnih fotoaktivirajućih dijelova, koji apsorbiraju svjetlost različitih valnih duljina te podliježu specifičnoj fototransformaciji, omogućuje se selektivno otpuštanje pomoću određenih valnih duljina. Takva selekcija često se naziva kromatska ortogonalnost.<sup>3</sup>

### 2.2.2. Fotootpuštanje iz koordinacijskih spojeva

Koordinacijski spojevi sastoje se od centralnog (najčešće metalnog) atoma ili iona okruženog ligandima. Koordinacijski spojevi također pokazuju zanimljivu i bogatu fotokemiju. Često imaju jedinstvena svojstva osnovnog i pobuđenog stanja koja se mogu varirati promjenom centralnog atoma ili koordinacijskih liganada te omogućuju fotootpuštanje kemijskih ili biološki aktivnih vrsta. Puno organskih kompleksa također pokazuje fotoumrežavanje ili fotocitotoksičnu aktivnost, što je popraćeno raznolikim tipovima fotofragmentacijskih reakcija.<sup>19</sup>

Kompleksi prijelaznih metala često su obojeni spojevi i zato se mogu pobuditi korištenjem vidljivog svijetla. Dostupnost više pobuđenih stanja s drugačijim spinskim multiplicitetima i kompetitivnim fotofizičkim i kemijskim procesima rezultira u kompleksnom fotokemijom. Mnogo različitih primarnih fotofizičkih procesa, koji uključuju prijenos naboja s metala na ligand (MLCT), prijenos naboja s liganda na metal (LMCT) i prijenos naboja s liganda na ligand (LLCT), može prethoditi otpuštanju izlazne skupine.<sup>3</sup>

Primjer takvog koordinacijskog fotokaveza je vitamin B<sub>12</sub>. Vitamin B<sub>12</sub>, poznat pod nazivom kobalamin, je metalni kompleks koji je topljiv u vodi, a sadrži ion kobalta u centru konjugiranog klorina. Njegova fotofizička i fotokemijska svojstva su relativno poznata.<sup>20</sup> Kompleks klorina i kobalta(III) apsorbira zračenje valnih duljina ispod 580 nm. Njegov derivat **17**, prikazan na shemi 9, podložan je homolizi Co–C veze u pobuđenom singletnom stanju te prijenosom naboja unutar 10 pikosekundi nastaje međuprodukt Co<sup>III</sup>. Međuprodukt zatim disocira na par radikala Co<sup>II</sup> i izlaznu skupinu, koji se zatim u nanosekundama regeneriraju u početni spoj ili izlaze iz kaveza otapala. Svojstva otapala utječu na efikasnost rekombinacije.<sup>21</sup>



Shema 9. Vitamin B<sub>12</sub> kao fotokavez. <sup>3</sup>

Ovisno o ligandima, relaksirana singletna stanja okarakterizirana su ili MLCT ili LMCT karakterom.<sup>22</sup> Opažen je i efekt magnetnog polja na fotolizu 5'-deoksiadenozilkobalamina. Brzina rekombinacije radikalskog para osjetljiva je na vanjsko magnetno polje jačine od 10 do 100 mT u viskoznim otopinama.<sup>23</sup>

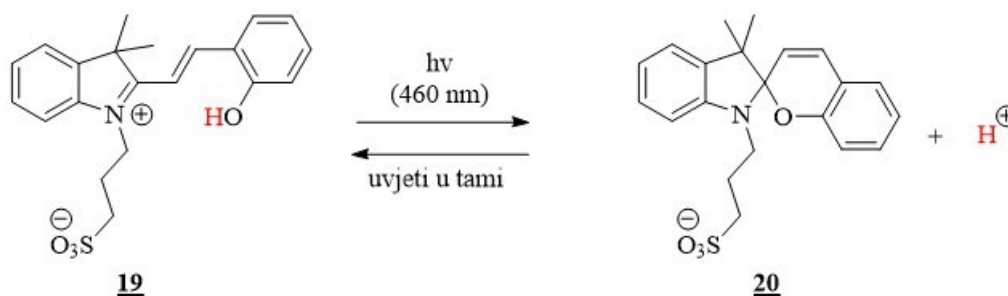
Nastanak radikala iz tiolato-kobalamina dokazan je elektronskom paramagnetnom rezonancijom. Zračenjem alkilkobalamina pri valnim duljinama >500 nm uočeno je nastajanje ugljikovih radikala koji uzrokuju oštećenja DNA. Nadalje, prisutnost reducensa poput TiO<sub>2</sub> ili Zn/NH<sub>4</sub>Cl uzrokuje fotokemijsku redukciju derivata kobalamina do jakog nukleofilnog kompleksa Co<sup>I</sup> koji može stupiti u reakciju s elektrofilima S<sub>N</sub>2 mehanizmom. Kvantni prinosi reakcije otpuštanja izlazne skupe iz kobalaminskog derivata često ovise o valnoj duljini ozračivanja.<sup>3</sup>



### 2.2.3. Fotokemijski pokretači kiselosti i bazičnosti

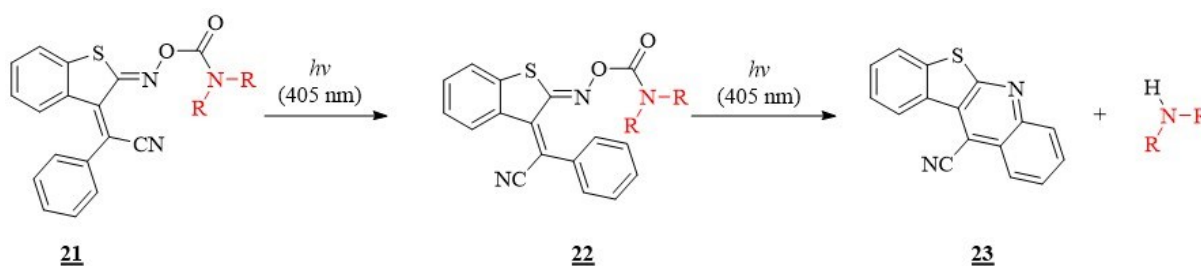
Fotopolimerizacijski procesi često koriste svjetlost u reakciji inicijacije polimerizacije, najčešće preko reakcija radikala. Nadalje, polimerizaciju je moguće potaknuti kiselinom ili bazom koja je nastala ozračivanjem fotokemijskog pokretača kiselosti ili bazičnosti.<sup>3</sup>

Primjer takvih kontroliranih reakcija deprotoniranja je polimerizacija potaknuta vidljivim zračenjem u prisutnosti fotokemijskog pokretača kiselosti temeljenog na merocijaninu, a prikazana je na shemi 10. Svjetlom potaknuta disocijacija protona s **19** je reverzibilna, što znači da spoj **20** bez prisutnosti svijetla prelazi ponovno u spoj **19**, te time omogućuje vremensku kontrolu polimerizacije.<sup>24</sup>



Shema 10. Disocijacija protona potaknuta osvjetljivanjem **19**.<sup>3</sup>

Shema 11 prikazuje rijedak primjer apsorpcije vidljivog svjetla fotokemijskog pokretača bazičnosti gdje imino derivat benzotiofena **21** otpušta aminsku bazu u fotoreakciji koja se odvija u dva koraka. Prvo dolazi do fotoinducirane izomerizacije **21** u **22**, zatim homolitičkog cijepanja N–O veze **22**, nakon čega slijedi dekarboksilacija i intramolekulska adicija radikala na susjedni arilni prsten.<sup>25</sup>



Shema 11. Fotokemijska reakcija pokretača bazičnosti koji apsorbira vidljivo zračenje.<sup>3</sup>

#### 2.2.4. Fotoaktivacija i fotodeaktivacija lijekova (fotofarmakologija)

Većina fotokemijskih sustava otpuštanja lijeka oslanja se na ireverzibilno otpuštanje supstrata s pomoćnog fotokemijskog reaktivnog kromofora koji stupa u različite fotokemijske reakcije, što dovodi do njegovog raspada i mogućeg nastajanja neželjenih spojeva. Na te procese treba obratiti posebnu pozornost tijekom razvoja novih fotoreaktivnih sustava, posebice zbog njihove kompatibilnosti u biološkim sustavima. Unatoč tom ograničenju, istraživanje ireverzibilnih sustava otpuštanja i dalje je dominantan pristup, kako u fundamentalnim, tako i u praktičnim istraživanjima.<sup>3</sup>

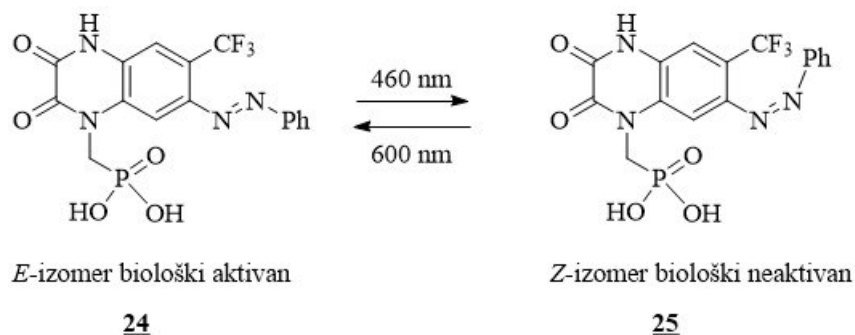
Postoje i reverzibilni sustavi otpuštanja koji koriste fotokromne dijelove i mogu se primijeniti u kompleksnijim sustavima, gdje njihova reverzibilna reakcija poput *E-Z*-fotoizomerizacije može izazvati promjene u veznom afinitetu gosta tijekom ozračivanja.<sup>26</sup> Aktivne vrste također se mogu ugraditi u privjesak čime se mijenja konformacija i duljina lanca prilikom ozračivanja, te se time aktivna molekula dovodi u blizinu mjesta od interesa.<sup>26</sup> Također, prikazan je i drugačiji pristup koji uključuje fotokromni ligand koji može postojati u dvije ili više izomernih formi koje su interkonvertibilne prilikom ozračivanja, od koje je jedna aktivna u specifičnoj primjeni. Izomerizacija se u ovom slučaju može potaknuti u jednom smjeru zagrijavanjem i stoga nastaviti spontano pod određenim uvjetima.<sup>3</sup>

Izraz fotofarmakologija korišten je za bioaktivne molekularne sustave koji su podložni reverzibilnim i ireverzibilnim fotokemijskim transformacijama, a mijenjaju njihova farmakokinetička i farmakodinamička svojstva. To je relativno novi koncept, ali izrazito privlačan te zanimljiv u novijim istraživanjima.<sup>27,28,29</sup>

Azobenzen i njegovi derivati najčešće su korišteni fotokromni sustavi u fotofarmakologiji. Većina azobenzenskih derivata prelazi iz *E* u *Z* oblik u UV području. Prelazak iz biološki neaktivnog oblika u biološki aktivan oblik događa se u UV području, dok se reakcija prelaska iz biološki neaktivnog u biološki aktivan oblik odvija u vidljivom području. Supstituenti na fotokromnim skupinama mogu batokromno pomicati apsorpcijski maksimum kako bi se odvijala reakcija u oba smjera pri valnim duljinama vidljivog dijela spektra.<sup>3</sup>

*E* i *Z* izomeri derivata azobenzena mogu biti farmaceutski aktivni. Predstavljen je derivat azobenzena **24** koji je antagonist  $\alpha$ -amino-3-hidroksi-5-metil-izoksazolopropionske kiseline (AMPA) receptora glutaminske kiseline, biološki je aktivan kao *E* izomer, dok je kao *Z* izomer **25** neaktivan.<sup>30</sup> Zbog znatnog batokromnog pomaka njegovog apsorpcijskog maksimuma,

može doći do *E-Z* interkonverzije pri valnim duljinama od 460 i 600 nm, kao što je prikazano na shemi 12.

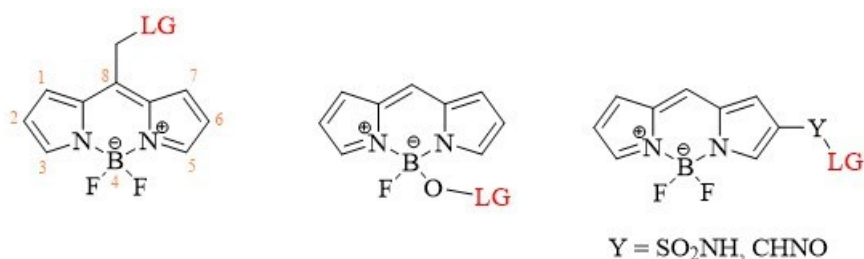


Shema 12. *E-Z* interkonverzija kinoksalin-2,3-dion antagonista vidljivim svjetlom.<sup>30</sup>

## 2.3. Fotokavezi s BODIPY strukturom

### 2.3.1. Općenito o BODIPY spojevima

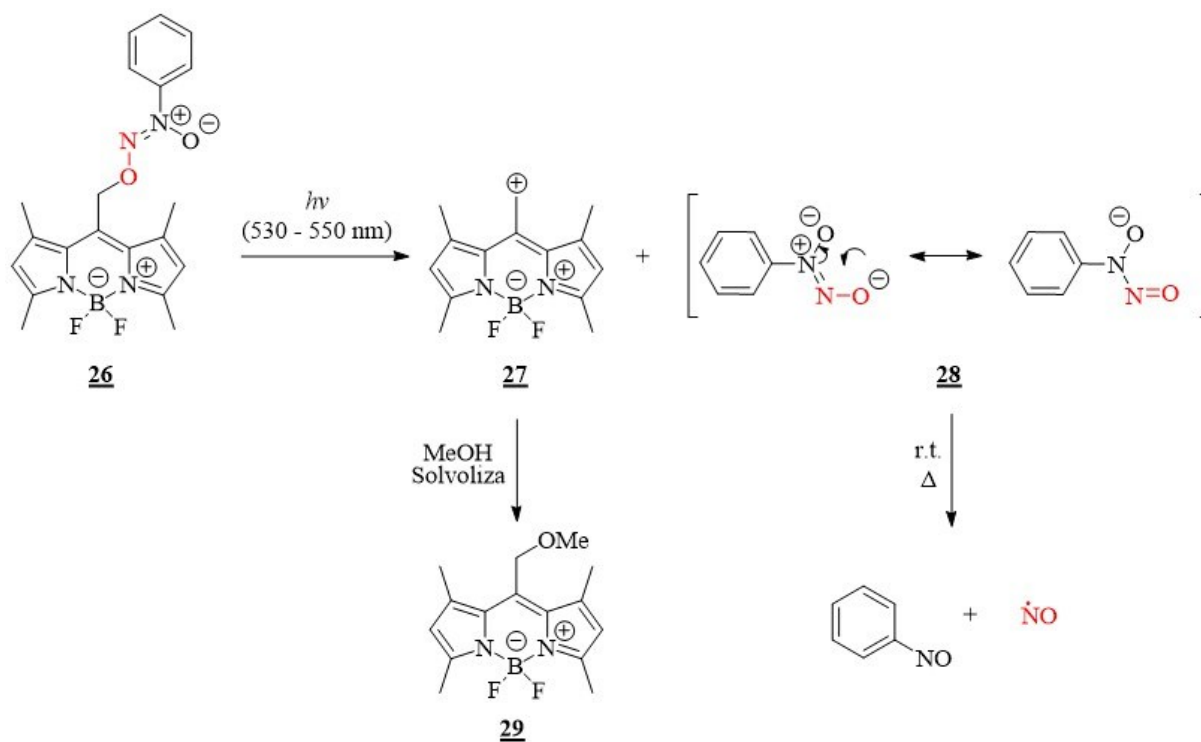
4,4-Difluor-4-bora-3a,4a-diaza-*s*-indacen (BODIPY) i njegovi derivati su fluorescentne boje koje imaju široku primjenu u kemiji i biologiji. Njihova povoljna spektroskopska svojstva pripisana su njihovoj relativno kompaktnoj, rigidnoj i planarnoj strukturi, što uzrokuje sličnosti u plohama potencijalne energije  $S_0$  i  $S_1$  stanja. Posljedica toga je pojava uskih apsorpcijskih i emisijskih vrpca na najnižim energijskim prijelazima. Ti spojeve imaju visoke kvantne prinose fluorescencije zbog neučinkovite relaksacije bez zračenja i ISC. Jednostavni BODIPY kromofori tipično imaju dvije uske apsorpcijske vrpce u vidljivom dijelu spektra ( $\lambda_{\text{max}} \approx 490\text{--}540 \text{ nm}$ ,  $\epsilon \approx 3\text{--}9 \times 10^4 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). Intenzivna 0–0 vrpca pojavljuje se zbog  $S_0 - S_1$  prijelaza, a uz to je često vidljivo i rame koje se pripisuje 0–1 vibracijskom prijelazu. BODIPY spojevi fotokemijski su stabilni te ne podliježu degradaciji s kiselinama i bazama. Lako ih je sintetski modificirati pri čemu se moduliraju njihova spektralna svojstva. Na shemi 13 prikazane su BODIPY strukture od interesa.<sup>3</sup>



Shema 13. Strukture BODIPY PPG-a s izlaznim skupinama na različitim položajima.<sup>3</sup>

## 2.3.2. Primjena BODIPY fotokaveza

Fotootpuštanje izlaznih skupina s *meso*-metilnih BODIPY derivata korišteno je za različite biološke i sintetske primjene.<sup>31,32</sup> Otpuštanje iz kaveza signalnih molekula, uključujući H<sub>2</sub>S, histamin i dopamin, primijenjeno je u staničnim okruženjima.<sup>33,34</sup> Nedavni izvještaji pokazuju kako je moguće postići vazodilataciju aorte štakora otpuštanjem NO iz fotokaveza koji u strukturi ima *N*-nitrozo-*N*-fenilhidroksilaminsku skupinu. Na shemi 14 prikazana je fotokemijska reakcija **26** u kojoj dolazi do heterolize C–O veze te nastaje kation **27** koji je podložan reakciji s otapalom gdje nastaje spoj **29**. Također nastaje i anion **28** koji u termičkoj reakciji otpušta NO.<sup>10</sup>

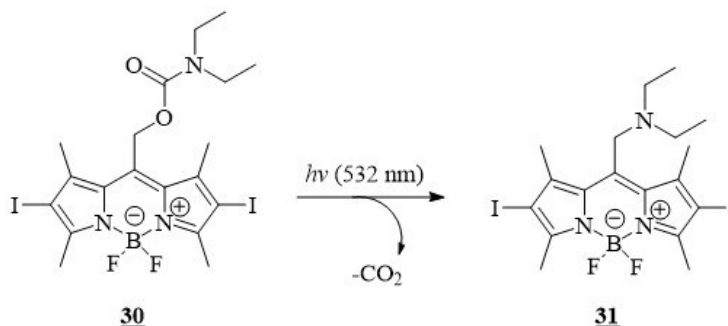


Shema 14. Fotokemijska reakcija otpuštanja NO iz BODIPY fotokaveza **26**.<sup>10</sup>

Predstavljena je primjena *meso*-metilnih BODIPY derivata koja omogućuje ciljanje specifičnih staničnih organela i razvoj derivata topljivih u vodi. Značajnija primjena uključuje fotootpuštanje 2,4-dinitrofenola u mitohondriju i inhibitora protein sinteze puromicina u endoplazmatskom retikulumu, kao i dovođenje citotoksičnih molekula uključujući klorambucil i inhibitora katapsina B u stanice.<sup>35</sup>

*Meso*-metil BODIPY fotokavez dietilamina **30** korišten je kao organski cijanoakrilatni pokretač sposoban za brzo fotostvrdnjavanje kemijskih formulacija različitih cijanoakrilata

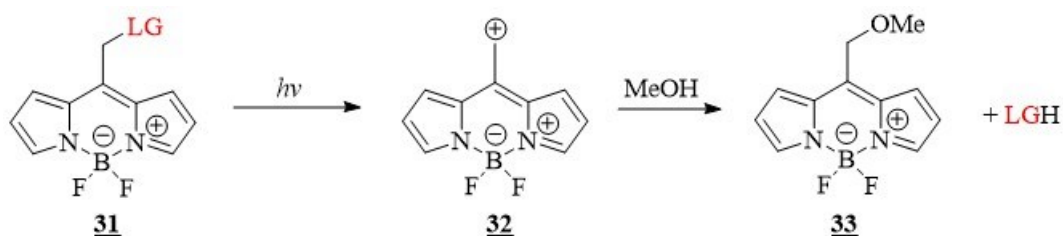
uključujući i biološki relevantne monomere s dugim akrilnim lancima. Na shemi 15 prikazana je reakcija fotolize **30**.<sup>36</sup>



Shema 15. Fotoliza BODIPY – DEA **30** pri 532 nm.<sup>36</sup>

### 2.3.3. Fotokemija BODIPY fotokaveza

Nezavisna istraživanja proučavala su oslobađanje izlaznih skupina *meso*-metilnih derivata BODIPY-a prilikom fotoekscitacije zelenim svjetlom. Osnova takve fotoreaktivnosti može se pripisati svojstvima kromofora u *meso*-položaju. Heterolitička fotodisocijacija i nastajanje *meso*-metilnog karbokationa omogućeno je kada pobuda u najniže singletno elektronsko stanje uključuje veći prijenos elektronske gustoće na  $sp^2$  hibridiziran ugljikov atom kromofora koji sadrži izlaznu skupinu u  $\alpha$  položaju, takvu da se protuvezna  $\sigma^*$  orbitala miješa s LUMO orbitalom kromofora.<sup>37</sup> U takvim slučajevima pobuđivanje elektrona iz HOMO u LUMO orbitalu slabi C–LG vezu, olakšavajući heterocikličku disocijaciju izlazne skupine. HMO računi sugeriraju da BODIPY reagira na taj način zato što se HOMO i LUMO orbitale na *meso* položaju ne preklapaju te negativni naboj na *meso* položaju raste tijekom ekscitacije. Na shemi 16 je prikazano fotootpuštanje izlazne skupine s *meso*-metil BODIPY derivata, a na slici 1 je prikaz HOMO i LUMO orbitala  $\pi$ -sustava BODIPY derivata.<sup>37</sup>



Shema 16. Fotootpuštanje LG s *meso*-metilnog BODIPY derivata.<sup>3</sup>

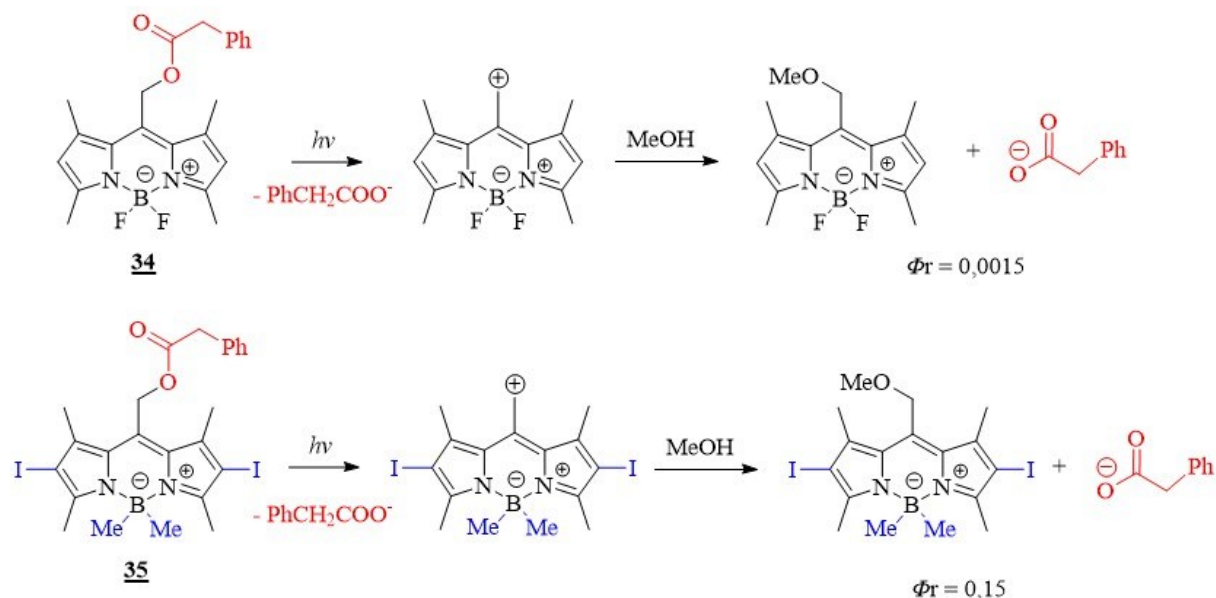
Energija za vertikalnu pobudu u prvo pobuđeno stanje za *meso*-metilni kation je mala, od svega 8 – 13 kcal mol<sup>-1</sup>, što ukazuje na blisko degenerativnu biradikalnu konfiguraciju.<sup>8</sup> Određene *meso*-metilne BODIPY PPG tipično pokazuju maksimume apsorpcije na  $\lambda_{\max} \approx 490\text{--}545$  nm, iako je pokazano da  $\pi$ -proširene *meso*-metilne BODIPY PPG imaju  $\lambda_{\max} \approx 589\text{--}693$  nm.<sup>3</sup>

Poznato je fotootpuštanje različitih funkcionalnih skupina poput primarnih i sekundarnih amina (kao karbamata),<sup>36</sup> karboksilnih kiselina,<sup>38</sup> alkohola (kao estera karboksilnih kiselina ili etera),<sup>39</sup> halogenida,<sup>10</sup> hidroksilamina,<sup>40</sup> tiokarbamata,<sup>41</sup> tioacetata<sup>10</sup> i tiola iz BODIPY baziranih PPG-ova.<sup>42</sup> Oslobođanje izlaznih skupina dobro je korelirano s pK<sub>a</sub> njihovih konjugiranih kiselina i kvantnim prinosom otpuštanja supstrata s nesupstituiranog BODIPY-a (osim 1,3,5,7-tetrametil derivata). Kvantni prinosi reakcija ovise o prisutnosti kisika te je pokazano da kisik gasi fotokemijske reakcije, što je u skladu s pretpostavkom da se reakcije odvijaju preko tripletnog pobuđenog stanja. Niske vrijednosti  $\Phi_r$  za takve sustave kompenzirane su visokim molarnim apsorpcijskim koeficijentom koji povećava vrijednost  $\Phi_{\text{rel}} \times \varepsilon(\lambda_{\text{irr}})$ . Glavni nusprodukti fotokemijskih reakcija *meso*-metilnih derivata BODIPY-a su produkti solvolize, a najčešće su eteri i nastaju korištenjem metanola kao otapala. Takvi spojevi apsorbiraju na sličnim valnim duljinama kao i originalne PPG te se zbog toga mogu ponašati kao optički filteri, ali se raspadaju tijekom dužeg ozračivanja.<sup>3</sup>

Winter i suradnici pokazali su da usprkos prirodi izlazne skupine, efikasnost fotootpuštanja iz BODIPY kromofora ovisi o vezanim supstituentima. Halogeni atomi supstituirani na položajima 2,6 povećavaju efikasnost reakcije i  $\Phi_{\text{ISC}}$ . Efekt opada korištenjem atoma halogena manje mase: I > Br > Cl > H. Međutim, elektronegativni halogenski supstituenti povećavaju elektrofilnost *meso*-metilnog položaja, što ga čini podložnijim nukleofilnom napadu koji uzrokuje oslobođanje izlazne skupine. Jače elektron-odvlačeće skupine (EWG, engl. *electron withdrawing groups*) poput aldehida i sulfonata na 2,6 pozicijama znatno povećavaju energetska barijeru heterolize C–O veze na plohi potencijalne energije tripletnog pobuđenog stanja i zbog toga teže dolazi do fotootpuštanja izlazne skupine.<sup>10</sup>

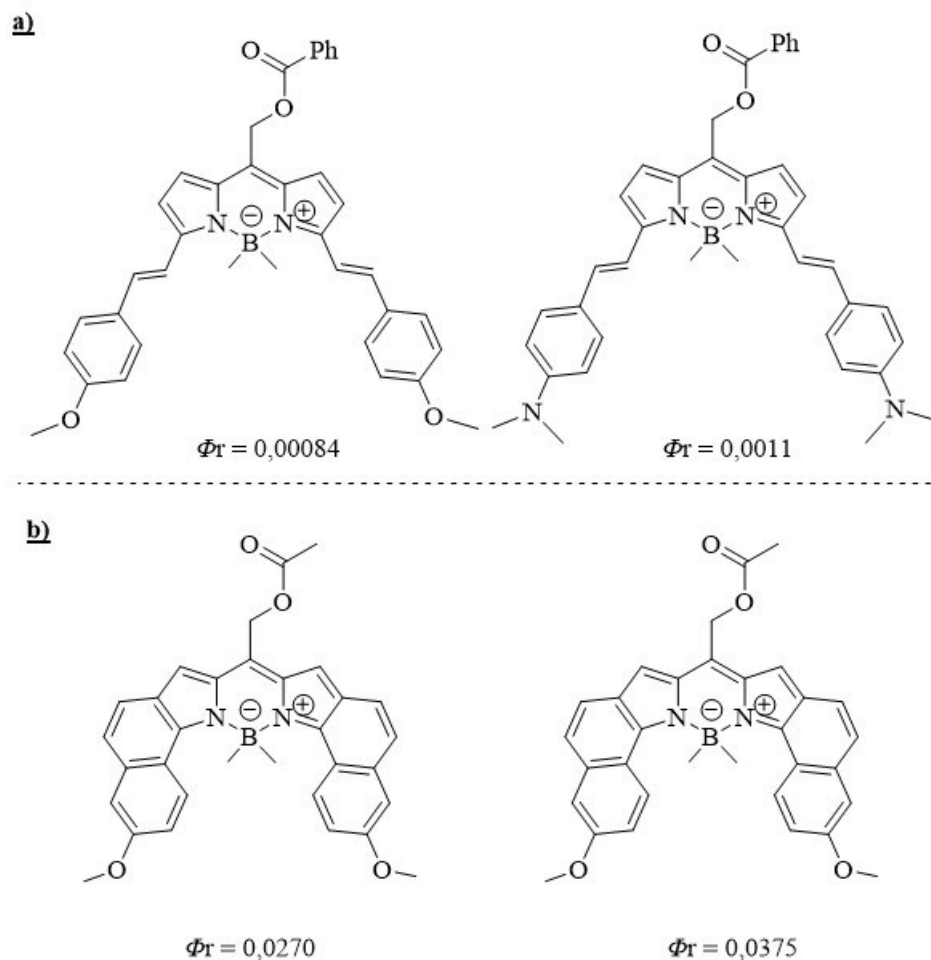
Odsutnost metilnih skupina na položajima 1,7 umanjuje  $\Phi_r$  za faktor ~ 1,5. Razlog tome je smanjena elektronska gustoća u BODIPY jezgri i time je smanjena mogućnost stabilizacije kationskog diradikalnog međuprodukta. Dodatno, dialkilboratni analozi imaju znatno veće  $\Phi_r$  vrijednosti nego njihovi BF<sub>2</sub> analozi.<sup>10</sup> Na shemi 17 prikazane su strukture i fotokemijske

reakcije BODIPY fotokaveza od kojih je **34** primjer BODIPY fotokaveza koji nije supstituiran, dok je **35** supstituiran metilnim skupinama na atomu bora i jodom u položajima 2 i 6.



Shema 17. Fotokemijske reakcije i kvantni prinosi BODIPY PPG od kojih je **35** modificiran jodom na 2,6 položaju i metilnim skupinama na atomu bora.<sup>10</sup>

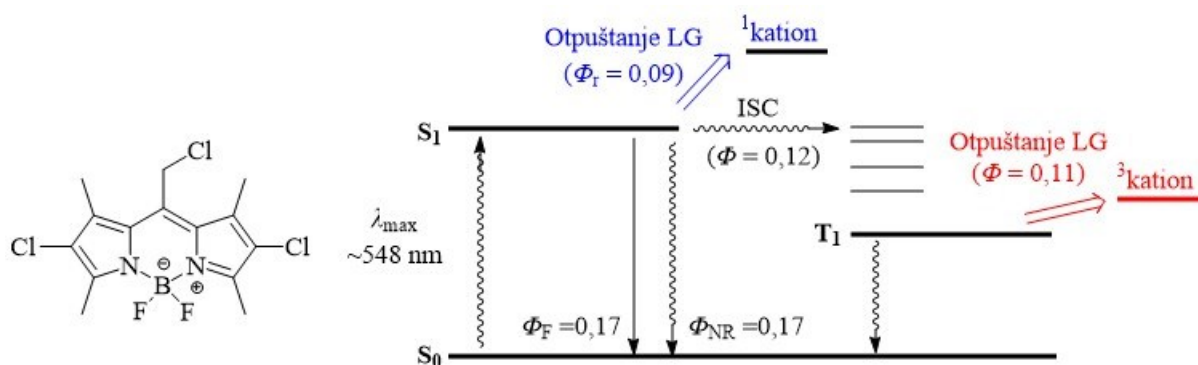
Winter i suradnici nedavno su proučavali konformacijski zakočene *meso*-metilne BODIPY fotokaveze kojima je konjugirani sustav proširen sraštenim prstenima, radi se o spojevima prikazanim na slici 1 **b**). Spojevi prikazani na slici 1 apsorbiraju pri oko 700 nm kako bi otpustili octenu kiselinu s  $\Phi_r = 0,018\text{--}0,037$ . Takva učinkovitost je oko 50 puta veća nego kod nezakočenih derivata (slika 1 **a**). Pretpostavlja se da konformacijsko ograničenje inhibira kompetitivne puteve pobuđenih stanja poput unutarnje konverzije, što dovodi do većeg kvantnog prinosa fotootpuštanja supstrata.<sup>43</sup>



Slika 1. Prikaz konformacijski nezakočenih BODIPY fotokaveza **a)** i konformacijski zakočenih BODIPY fotokaveza **b)** i njihovih reakcijskih kvantnih prinosa.<sup>43</sup>

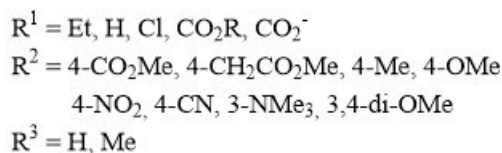
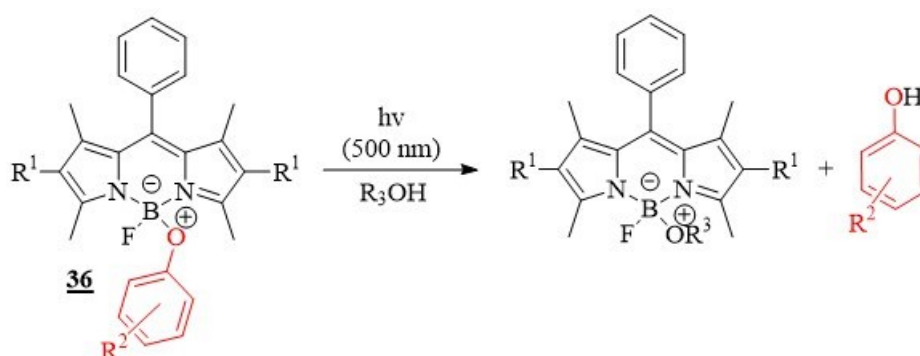
Dijagram Jablonskog prikazan na slici 2 prikazuje fotofizičke i fotokemijske puteve *meso*-metilnog BODIPY derivata koji je na položajima 2 i 6 supstituiran klorom. Prikazano je kako se otpuštanje izlazne skupine odvija iz singletnog i tripletnog pobuđenog stanja. Povećanje kvantnog prinosa korelirano je povećanim međusustavnim križanjem (ISC), koje može reducirati kompeticiju procesa sa zračenjem ( $\Phi_F$ ) i bez zračenja ( $\Phi_{NR}$ ).<sup>10</sup>



Slika 2. Dijagram Jablonskog za *meso*-metilni BODIPY derivat s klorom na položajima 2,6.<sup>10</sup>

Treba napomenuti kako su reakcijska iskorištenja relativno niska za prosječne LG poput karboksilata, vjerojatno zbog rekombinacije ionskih parova i deaktivacije bez zračenja iz tripletnog pobuđenog stanja, što se ne događa tijekom fotolize dobre izlazne skupine poput  $\text{Cl}^-$ .<sup>10</sup>

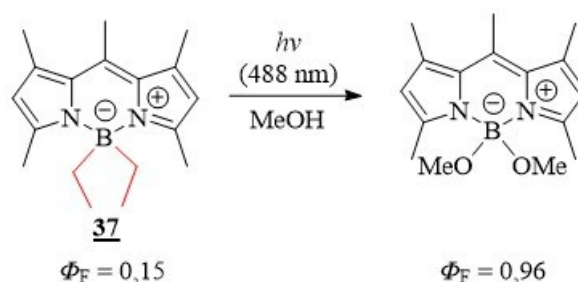
Borov atom BODIPY fotokaveza također je evidentiran kao fotoreaktivni centar. Pokazano je da B–O veza kod 4-ariloksi BODIPY fotokaveza može biti fotolizirana te otpuštanje fenole. Na shemi 18 prikazano je fotootpuštanje fenola fotolizom B–O veze BODIPY fotokaveza **36**.<sup>44</sup>

Shema 18. Fotootpuštanje fenola fotolizom B–O veze.<sup>44</sup>

Na maksimume apsorpcije i emisije ( $\lambda_{\text{abs}} = 459\text{--}525$ ;  $\lambda_{\text{em}} = 506\text{--}541$  nm) i molarne apsorpcijske koeficijente ( $\epsilon_{\text{max}} = 6,2\text{--}9,8 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ), derivata prikazanih na shemi 18, minimalno utječe modulacija energetske razlike HOMO/LUMO orbitala. Međutim, njihovi kvantni prinosi fluorescencije ( $\Phi_{\text{F}}$ ) vidljivo opadaju povećanjem energije HOMO orbitala arilnih skupina ili

smanjenjem LUMO energije BODIPY jezgre. Taj efekt smanjenja  $\Phi_F$  pripisuje se prijenosu elektrona (eT) sa susjedne arilne skupine na BODIPY jezgru. Kvantni prinosi otpuštanja obično su inverzno korelirani sa  $\Phi_F$ , što ukazuje da se fotoreakcija odvija preko kompetitivnog fotoinduciranog prijelaza elektrona (PeT) u kojem solvoliza B–O veze prethodi nastajanju međuprodukta s radikal-kationskom arilnom skupinom i radikal-anionskom BODIPY jezgrom.<sup>10</sup>

Razvijen je fotoaktivirajući BODIPY senzor **37** za snimanje stanica u visokoj rezoluciji. Pokazano je kako je B–C veza također podložna fotocijepanju. Ekscitacija pri  $\lambda_{irr} = 488\text{--}532\text{ nm}$  uzrokuje cijepanje dvije B–alkilne skupine i njenu naknadnu zamjenu aduktima otapala, a popraćeno je približno 6 puta većim vrijednostima  $\Phi_F$ . Veći kvantni prinosi fluorescencije omogućuju bolju razlučivost tijekom snimanja živih stanica. Takva metoda snimanja stanica nije štetna za stanicu zato što senzor ne pokazuje citotoksičnost tijekom reakcije i reakcija se odvija upotrebom vidljivog svjetla.<sup>45</sup>



Shema 19. Fotoaktivirajući BODIPY senzor koji se temelji na fotocijepanju B–C veze.<sup>45</sup>

Konjugacija senzora s paklitekselom preko njegove stirilne skupine omogućuje vizualizaciju mikrotubula u visokoj rezoluciji u živim HeLa stanicama. Kako bi došlo do reakcije prikazane na shemi 19 potrebno je koristiti laser na relativno niskoj snazi.<sup>45</sup>

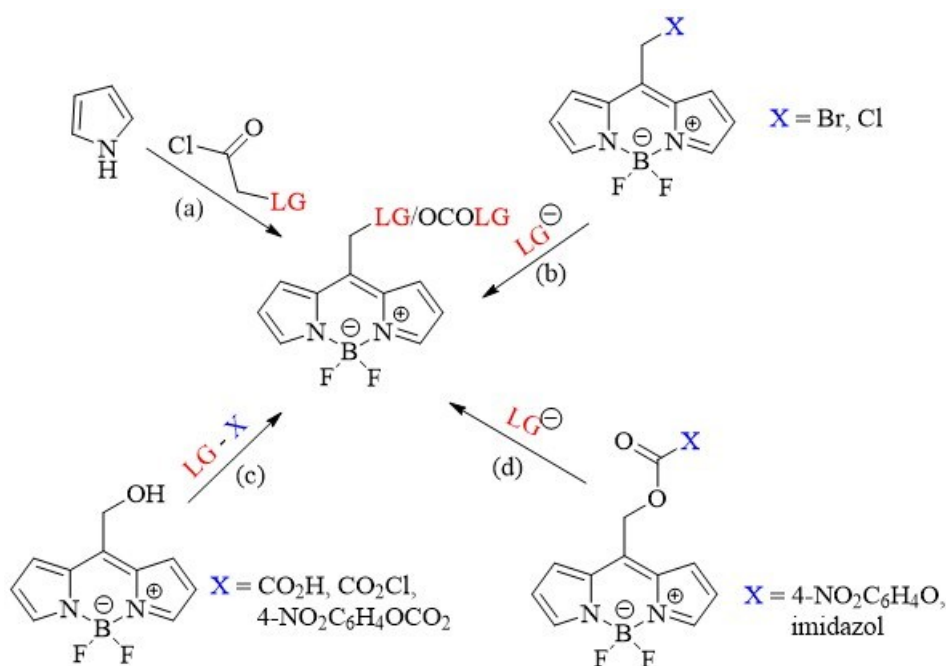
Drugačiji pristup korištenja BODIPY fotokaveza za fotootpuštanje predstavljeno je uvođenjem fotoreaktivnih skupina na položajima 2 i 6. Takav pristup služi kao primjer fotootpuštanja amina iz sulfonamidne skupine na položajima 2,6 BODIPY jezgre.<sup>46</sup>

Predložen je i BODIPY fotokavez koji u *meso* položaju sadrži hidroksilni derivat kumarina. Takav derivat korišten je kako bi se provodilo kontinuirano fotootpuštanje kumarina u biološkim sustavima. Poznato je kako fluorescencija 7-hidroksikumarina jako ovisi o supstituciji hidroksilne skupine. Zaštićeni kumarin pokazuje slabiju fluorescenciju u odnosu na slobodni. HeLa stanice inkubirane su korištenjem takvog fotokaveza i ozračene. Stanice

ozračene u intervalima zelenog svjetla pokazale su povećanje fluorescencije na 450 nm korištenjem kratke ekscitacije pri valnoj duljini od 365 nm. Kako bi se dobio najbolji omjer signala i šuma stanice su ozračene laserom valne duljine od 350 nm.<sup>47</sup>

#### 2.3.4. Sinteza meso-metilnih BODIPY fotokaveza

Sinteza meso-metilnih BODIPY derivata općenito slijedi poznate metode sinteze. Vežanje izlazne skupine od interesa postiže se kao što je prikazano na shemi 20.<sup>3</sup>

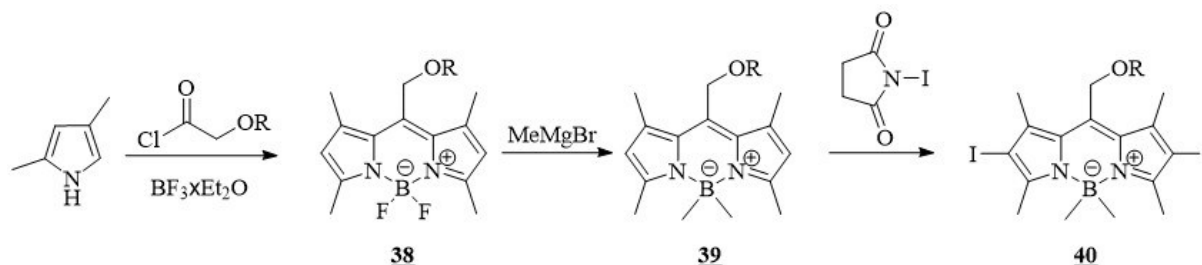


Shema 21. Sintetski putevi do meso-metilnih BODIPY PPG-a.<sup>3</sup>

Vežanje izlaznih skupina na meso položaj moguće je postići tijekom same sinteze BODIPY jezgre kao što je prikazano na shemi 21 (a),<sup>8</sup> supstitucijom prethodno uvedene dobre izlazne skupine (b)<sup>10</sup>. Korištenjem meso-hidroksimetilnih derivata kao nukleofila moguće je provesti reakciju s elektrofilom koji sadrži željenu izlaznu skupinu pri čemu se dobije željena izlazna skupina na meso položaju (c)<sup>8</sup> ili pak modifikacijom prethodno dobivenog derivata karboksilne kiseline (d).<sup>38</sup>

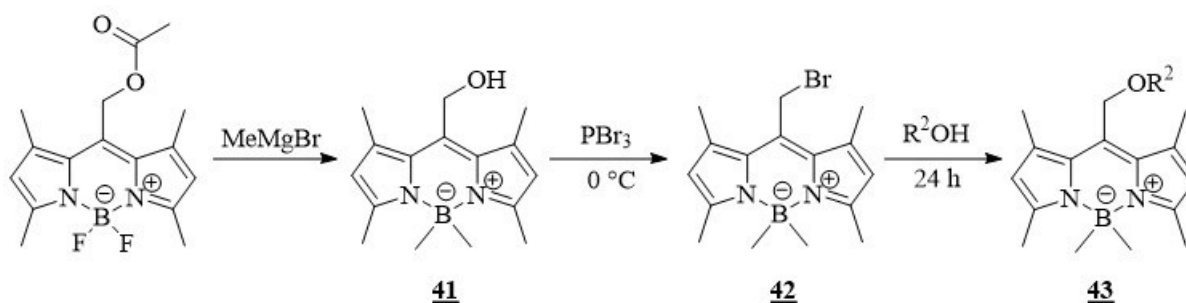
Na shemi 22 prikazana je sinteza BODIPY derivata **40** koji su korišteni kao fotokavezi alkohola. Prvo je provedena sinteza meso-metil BODIPY-a **38** u jednom koraku iz 2,4-dimetilpirola s acetil-kloridom, a potom je provedeno kompleksiranje s borovim trifluoridom dietil-eteratom. Metilacija bora je izvedena metilmagnezijevim bromidom te

nastaje **39**. *N*-jodsukcinimid (NIS) korišten je kako bi se vezao jod na položaje 2 i 6 BODIPY jezgre te u konačnici nastaje željeni derivat **40**.<sup>12</sup>



Shema 22. Sintetska shema priprave BODIPY fotokaveza iz acetil-klorida za fotokemijsko otpuštanje alkohola.<sup>12</sup>

Fotootpuštanje alkohola vidljivim svjetlom s BODIPY jezgre ima veliku primjenu u istraživanju biološki važnih alkohola. Određene alkohole nije moguće vezati u prvom koraku na BODIPY jezgru. Jedna od učestalijih metoda uvođenja alkohola u *meso* položaju BODIPY jezgre je Wiliamsonova sinteza etera koja koristi alkohol od interesa kao nukleofil, a reakcija je prikazana na shemi 24.<sup>12</sup>



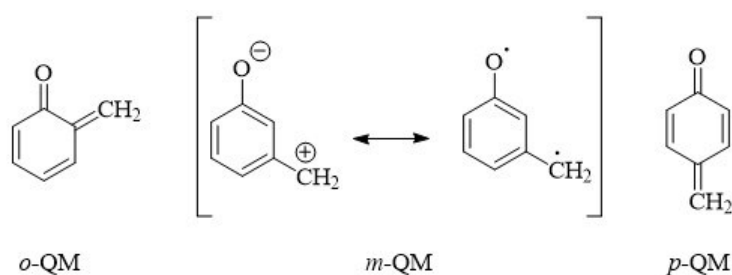
Shema 24. Sinteza BODIPY etera Wiliamsonovom sintezom etera iz *meso* bromirane metilirane BODIPY jezgre.<sup>12</sup>

Korištenjem metilmagnezijevog bromida dolazi do metilacije bora i uklanjanja acetilne skupine na *meso* položaju pri čemu nastaje spoj **41**. Zatim se reakcijom BODIPY derivata s  $\text{PBr}_3$  dovodi brom u *meso* položaj te nastaje **42**. Nadalje, korištenjem željenog alkohola provodi se Wiliamsonova sinteza etera na *meso* položaju metilirane BODIPY jezgre i time dobiva željeni BODIPY fotokavez **43**.<sup>12</sup>

## 2.4. Kinon-metidi (QM)

### 2.4.1. Struktura i svojstva kinon-metida

Kinon-metidi (QM) su reaktivni međuprodukti koji su strukturno slični kinonima ili kinodimetanima. Najčešće se javljaju kao *ortho*- i *para*-QM. Svi QM posjeduju parcijalni zwitterionski karakter te su zbog toga jako polarizabilni i pokazuju reaktivnost s elektrofilima i nukleofilima, dok se *meta*- supstituirani analog može prikazati kao rezonantni hibrid zwitteriona i biradikala, prikazano na shemi 25, gdje su također prikazane strukture *ortho*- i *para*- kinon-metida.<sup>13</sup>

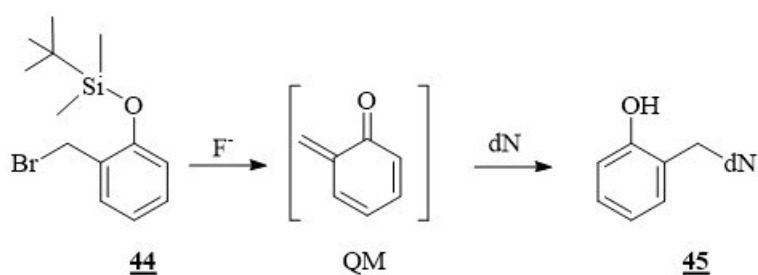


Shema 25. Strukture *ortho*-, *meta*- i *para*- kinon-metida.<sup>13</sup>

QM u reakciji s nukleofilima ponašaju se kao Michaelovi sustavi, pri čemu nukleofili napadaju egzociklički metilenski položaj. Najčešći nukleofili su molekule polarnih otapala ili tioli i amino skupine polipeptida i nukleozida u biološkim sustavima. Pošto su QM često okarakterizirani kao kratkoživuće molekule te se ne mogu skladištiti, često se generiraju *in situ*.<sup>13</sup>

### 2.4.2. Generiranje kinon-metida

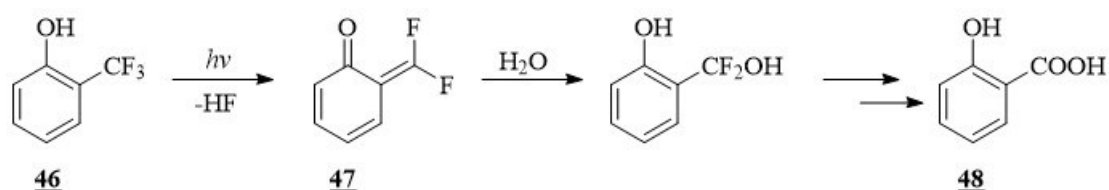
Sintetske kemijske metode za generiranje QM najčešće se oslanjaju na termičke reakcije poput oksidacije fenola,<sup>48</sup> dehidracije hidroksibenzilnih alkohola,<sup>49</sup> eliminacije nitrila iz 1,2-benzoksizina<sup>50</sup> i fluoridom inducirane desililacije.<sup>51</sup> Na shemi 26 prikazana je reakcija **44** s fluoridom pri čemu nastaje nastaje QM. Nastali QM dalje reagira sa deoksinukelozidom (dN) te daje spoj **45**.<sup>51</sup>



Shema 26. Fluoridom inducirana desililacija **44** pri čemu nastaje QM koji se veže za dN.<sup>51</sup>

Sintetska primjena QM demonstrirana je u Diels-Alderovim reakcijama nastajanja kromena, kao i u stereoselektivnoj sintezi.<sup>52</sup> Generiranje QM u fotokemijskim reakcijama moguće je pratiti laserskom pulsnom fotolizom (engl. *laser flash photolysis*, LFP). Za razliku od termičkih reakcija, tijekom izvođenja fotokemijskih reakcija potrebno je obratiti pozornost na određene parametre poput valne duljine pobude kromofora i kvantni prinos reakcije.<sup>9</sup>

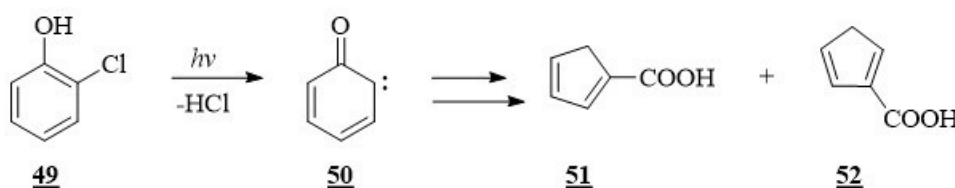
Prvi izvještaji fotokemijskog nastajanja QM-a uključuju ozračivanje derivata fenola **46** i naftola. Ozračivanje **46** uzrokuje eliminaciju HF i nastajanje QM **47** koji može reagirati s H<sub>2</sub>O i u konačnici nastaje salicilna kiselina **48**.<sup>9</sup> Primjer takve reakcije prikazan je na shemi 27.<sup>53</sup>



Shema 27. Fotokemijsko generiranje kinon-metida iz *o*-trifluormetilfenola koje prethodi nastajanju salicilne kiseline.<sup>53</sup>

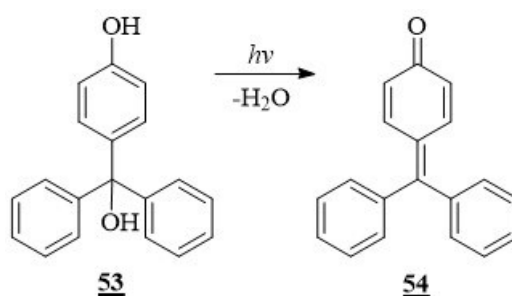
Kvantni prinosi fotoeliminacije HF ovise o derivatu. Mehanizam reakcije uključuje heterolizu C–F veze iz fenolata, koji nastaje prijenosom protona.<sup>9</sup>

Fotodehidrohalogenacija kao metoda generiranja QM poznata je za jednostavne *ortho*- i *para*-supstituirane klorfenole. Ozračivanjem *o*-klorfenola **49** nastaje karbensi-QM međuprodukt **50**, koji se podvrgava Wolffovoj pregradnji i daje ciklopentadiensku karboksilnu kiselinu **51** i **52**.<sup>54</sup> Reakcija je prikazana na shemi 28.



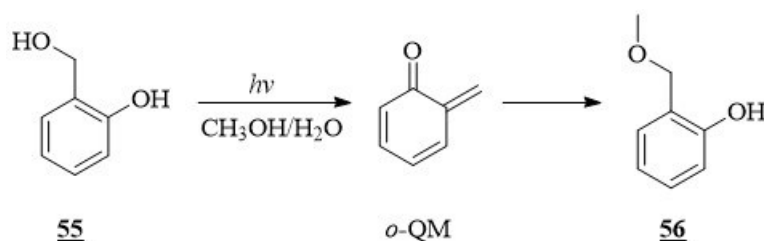
Shema 28. Fotogeneriranje QM karbena **50** koje prethodi nastajanju ciklopentadienskih kiselina **51** i **52**.<sup>54</sup>

Prvi primjeri foto-dehidracije objavljeni su prije otprilike 120 godina kada je uočena pojava žute boje nakon izlaganja krutine hidroksibifenila **53** sunčevoj svjetlosti.<sup>55</sup> Ta pojava objašnjena je nastankom QM **54**. Reakcija fotodehidracije **53** prikazana je na shemi 29. Istraživanjem kristalne strukture **53** otkriveno je da se molekule međusobno povezuju vodikovim vezama preko –OH skupine fenola i benzilnog alkohola.<sup>56</sup>



Shema 29. Fotokemijska reakcija dehidracije hidroksibifenila **53** pri čemu nastaje QM **54**.<sup>13</sup>

Daljnje studije foto-dehidracije temeljene su na istraživanju hidroksikarbinola gdje je izmjeren kvantni prinos fotosolvolize spoja **55** prikazano na shemi 30 ( $\Phi = 0,23$ ). Kao međuprodukt nastaje *o*-QM, koji u drugom koraku reagira s metanolom i nastaje fenol **56**.<sup>57</sup>



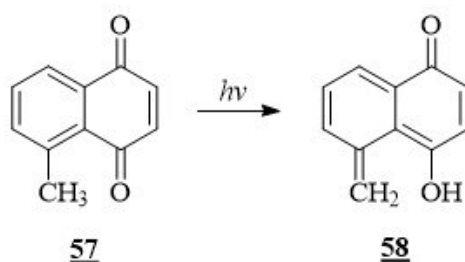
Shema 30. Reakcija fotosolvolize spoja **55**.<sup>13</sup>

#### 2.4.3. Biološka primjena fotokemijski nastalih kinon-metida

Reaktivnost QM s biološki važnim molekulama u fokusu je mnogih istraživačkih grupa. Trenutno je dobro utvrđeno da QM reagiraju s aminokiselinama i proteinima,<sup>58, 59ab</sup> posebice s cistidinskim ograncima.<sup>60</sup> Reaktivnost sa serinom može se upotrijebiti za inhibiciju enzima.<sup>61</sup> Međutim, nije poznato mnogo primjera obilježavanja proteina fotokemijski nastalim QM.<sup>62</sup> S druge strane, fotokemijski nastanak QM je posebno zanimljiv jer je moguća prostorna i vremenska kontrolu nad njihovim nastajanjem.<sup>9</sup>

Suprotno reaktivnosti s proteinima, reaktivnost fotokemijski nastalih QM s nukleinskim kiselinama značajno je istražena. Pronađeno je da QM stvaraju stabilne adukte s deoksigvaninom (dG) i deoksiadeninom (dA) tako što stupaju u reakciju s egzocikličkim dušikom na položaju 2 i 6. Nadalje, deoksicitozin (dC) pokazuje najveću reaktivnost na cikličkom N3 dušiku. Deoksinukleozid s najvećom reaktivnosti prema QM je dC.<sup>63</sup> Sekvencijalno specifična alkilacija DNA postignuta je vezanjem QM prekursora na oligonukleotidni lanac. Vezanjem QM prekursora na komplementarni DNA lanac obilježen <sup>32</sup>P na 5' kraju i ozračivanjem dupleksa nastaju QM koji su inducirali umrežavanje. Nastajanje mreža DNA lanca analizirano je nakon denaturacije autoradiogramom na poliakrilamidnoj gel elektroforezi. Metodom otiska prsta hidroksi radikala ukazano je da su gvanin i citozin mete alkilacije i umrežavanja.<sup>9</sup>

Prva izvješća fotokemijski nastalih QM koji su korišteni u biološkim sustavima poznata su još početkom 1990-tih<sup>64</sup> iako je 1977. godine prvi put uočena fotoenolizacija spoja 57.<sup>65</sup> U tim istraživanjima promatrana je fotoenolizacija spoja 57 koja se odvija preko tripletnog pobuđenog stanja što rezultira nastankom QM 58. Reakcija fotoenolizacije prikazana je na shemi 31.



Shema 31. Fotoenolizacija kinona u tripletno pobuđeno stanje te nastanak QM.<sup>13</sup>



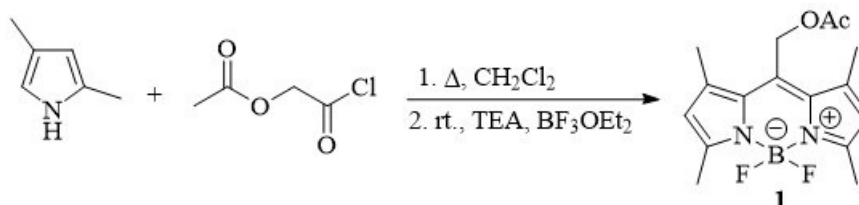
## § 3. EKSPERIMENTALNI DIO

### 3.1. Opće napomene

Spojevi pripremljeni u okviru ovog diplomskog rada identificirani su metodama nuklearne magnetske rezonancije ( $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR). Spektri  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR snimljeni su na instrumentima Bruker Avance 600 MHz i Bruker Avance 300 MHz u  $\text{CDCl}_3$  kao otapalu i tetrametilsilan (TMS) kao unutarnji standard. Čistoća pojedinih spojeva utvrđena je tankoslojnom kromatografijom (TLC). Svi čisti spojevi izolirani su kromatografijom na stupcu silikagela uz odgovarajući sustav otapala. Spojevi nakon osvjetljavanja analizirani su na HPLC instrumentu Agilent 1260 Infinity II s DAD detektorom korištenjem Phenomex Luna 3u C18 100A kolone (150×4,60 mm). Tališta su određena na Köflerovom aparatu i nisu korigirana. Molarni apsorpcijski koeficijenti određeni su korištenjem UV/Vis spektrometra PG-80. Dobivene ciljane molekule također su analizirane MALDI TOF/TOF spektrometrijom masa koristeći pozitivnu ionizaciju. Za snimanje MALDI tehnologijom mala količina uzorka je otopljena u metanolu, pomiješana s THAP/DAC (2,4,6-trihidroxiacetofenon/di-amonijev citrat) matricom i nakapana na pločicu. Za određivanje kvantnog prinosa fluorescencije i fluorescencijska mjerenja napravljena su na FS5 spektrofluorometru tvrtke Edinburgh Instruments. Fotokemijske reakcije izvedene su u Luzchem fotokemijskom reaktoru opremljenim s 8 lampi „cool white“ s maksimumom na oko 540 nm. Kvantni prinosi fotokemijskih reakcija određeni su u Luzchem fotokemijskom reaktoru opremljenim jednom lampom „cool white“ s maksimumom pri oko 540 nm. Prije osvjetljavanja otopine su 20 minuta propuhane argonom. U fotokemijskim eksperimentima kao otapalo korišten je metanol HPLC čistoće.

### 3.2. Sinteza halogeniranih BODIPY fotokaveza

#### 3.2.1. Sinteza 4,4-difluor-8-acetoksimetil-1,3,5,7-tetrametil-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacena (1)



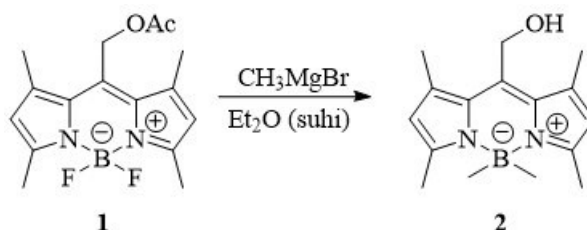
Shema 32. Sinteza BODIPY jezgre 1.

Sastavljena je aparatura za refluks s dvogrlom tikvicom. Dodan je 2,4-dimetilpirol (1,00 g, 10,5 mmol) i 2-klor-2-oksoetil-acetat (0,72 g, 5,25 mmol) te diklormetan (DCM) (5ml) kao otapalo. Reakcijska smjesa je miješana 2 sata u struji dušika uz zagrijavanje na temperaturi refluksa. Nakon 2 sata reakcijska smjesa je ohlađena na sobnu temperaturu te su dodana dva množinska ekvivalenta trietilamina (2,2 ml, 1,06 g, 10,5 mmol), zatim jedan množinski ekvivalent  $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$  (0,75 g, 5,25 mmol). Reakcijska smjesa je miješana na sobnoj temperaturi idućih sat vremena. Odvijanje reakcije je praćeno kromatografijom na tankom sloju silikagela (TLC) gdje je kao eluens korišten DCM te odmah po završetku reakcije dobivena smjesa je ukncentrirana i nanesena na kromatografsku kolonu napunjenu silikagelom uz DCM kao eluens. Dobiveni sirovi produkt je rekromatografiran na stupcu silikagela uz DCM kao eluens. Dobiveno je 485 mg čistog spoja (iskorištenje 30 %), čiji se spektri NMR poklapaju s onim iz literaturnog navoda.<sup>12</sup>

4,4-difluor-8-acetoksimetil-1,3,5,7-tetrametil-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen (1): 485 mg (30%);

$^1\text{H NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ /ppm: 6,08 (s, 2H), 5,29 (s, 2H), 2,53 (s, 6H), 2,35 (s, 6H), 2,13 (s, 3H).

$^{13}\text{C NMR}$  (150 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ /ppm: 170,6 (s), 156,6 (s), 141,5 (s), 133,3 (s), 122,3 (d), 57,9 (t), 20,6 (q), 15,6 (q), 14,6 (q), jedan singlet nije opažen.

3.2.2. *Sinteza 4,4-dimetil-8-hidroksimetil-1,3,5,7-tetrametil-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacena (2)*

Shema 33. Metilacija BODIPY jezgre metil magnezijevim bromidom.

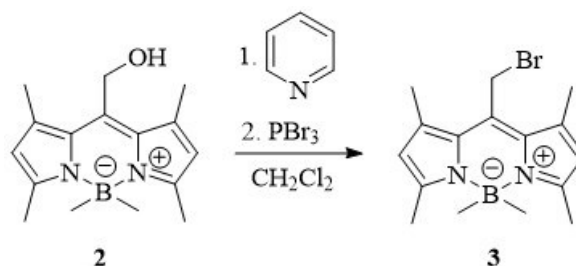
Sastavljena je aparatura za refluks s dvogrlom tikvicom i dodan je spoj **1** (432 mg, 1,3 mmol) otopljen u suhom eteru (2,5 mL). Reakcijska smjesa je miješana na sobnoj temperaturi u struji dušika, a potom je pažljivo dodano 11 množinskih ekvivalenata eterske otopine metilmagnezijevog bromida (7 mL,  $c = 3,0 \text{ mol dm}^{-3}$ ). Reakcijska smjesa je miješana sat vremena u struji dušika. Nakon završetka reakcije u smjesu je pažljivo dodana zasićena vodena otopina amonijeva klorida. Reakcijska smjesa je prenesena u lijevak za odjeljivanje i ekstrahirana diklormetanom ( $3 \times 10 \text{ mL}$ ). Organski ekstrakti su spojeni i sušeni iznad bezvodnog magnezijevog sulfata nakon čega su filtrirani te je otapalo uklonjeno na rotacijskom uparivaču. Pročišćavanje produkta izvedeno je kromatografijom na stupcu silikagela, gdje je kao mobilna faza korišten sustav otapala heksan/etil acetat u omjeru 4:1. Dobiveno je 373 mg (iskorištenje 81 %) čistog spoja, čiji se spektri NMR poklapaju s onim iz literaturnog navoda.<sup>12</sup>

4,4-dimetil-8-hidroksimetil-1,3,5,7-tetrametil-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen (**2**): 373 mg (81%);

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ /ppm: 6,08 (s, 2H), 4,96 (d, 2H,  $J = 5,7 \text{ Hz}$ ), 2,51 (s, 6H) 2,49 (s, 6H), 0,18 (s, 6H).

<sup>13</sup>C NMR (150 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ /ppm: 152,8 (s), 138,2 (s), 137,0 (s), 130,6 (s), 122,5 (d), 56,4 (t), 16,6 (q), 15,9 (q), ne vide se B-CH<sub>3</sub> signali.

3.2.3. Sinteza 4,4-dimetil-8-brommetil-1,3,5,7-tetrametil-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacena (3)

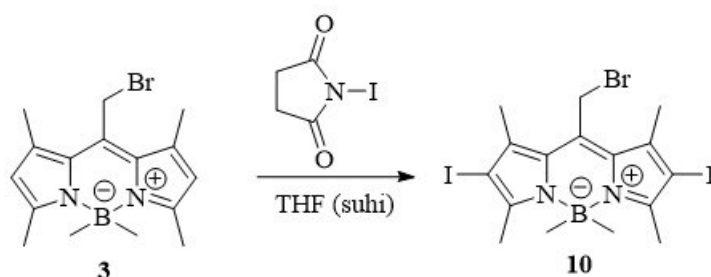


Shema 34. Bromiranje *meso* položaja metilirane BODIPY jezgre.

Spoj **2** (125 mg, 0,46 mmol, 1 ekvivalent) otopljen je u suhom DCM (5 mL) i ohlađen na 0 °C. Potom su dodana dva i pol množinska ekvivalenta piridina (0,1 mL, 1,16 mmol) i dva množinska ekvivalenta PBr<sub>3</sub> (89 μL, 0,93 mmol). Reakcija je izvođena u atmosferi N<sub>2</sub>. Reakcijska smjesa je miješana 20 minuta, nakon čega je postala tamno crvene boje. Po završetku reakcije u reakcijsku smjesu je dodana ledena voda te je organski sloj ekstrahiran s DCM (3×15 mL). Organski slojevi isprani su sa zasićenom otopinom natrijeva karbonata, amonijeva klorida i natrijeva klorida, potom su sušeni na bezvodnom natrijevom sulfatu. Osušeni organski slojevi su zatim filtrirani te je otapalo uklonjeno na rotacijskom uparivaču. Pročišćavanje produkta provedeno je kromatografijom na stupcu silikagela gdje je kao eluens korišten sustav otapala heksan/diklormetan u omjeru 90:10. Dobiveno je 44 mg (iskorištenje 29 %) čistog spoja čiji se spektri NMR poklapaju s onim iz literaturnog navoda.<sup>12</sup>

4,4-dimetil-8-brommetil-1,3,5,7-tetrametil-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen (**3**): 44 mg (29 %);  
<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ/ppm: 6,09 (s, 2H), 4,79 (s, 2H), 2,59 (s, 6H), 2,47 (s, 6H), 0,21 (s, 3H), 0,16 (s, 3H).

<sup>13</sup>C NMR (150 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ/ppm: 153,1, 137,5, 136,5, 129,5, 122,8, 29,7, 25,9, 16,6, 16,3.

3.2.4. Sinteza 4,4-dimetil-8-brommetil-2,6-dijod-1,3,5,7-tetrametil-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacena (**10**)

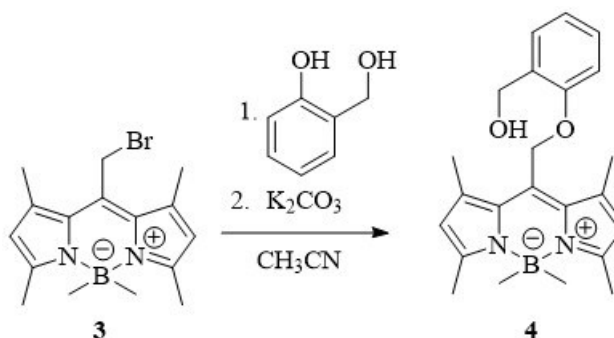
Shema 35. Jodiranje BODIPY jezgre s NIS.

Trogrla tikvica u kojoj je izvođena je propuhana dušikom te je u tikvicu dodana otopina spoja **3** (67 mg, 0,201 mmol) u suhom THF-u (15 mL). Otopljen je *N*-jodsukcinimid (NIS) (137 mg, 0,603 mmol, 3 množinska ekvivalenta) u suhom THF (15 mL), te je ta otopina zatim polako dodavana u reakcijsku smjesu. Reakcija je izvođena u atmosferi N<sub>2</sub>. Reakcijska smjesa je miješana 70 minuta. Odvijanje reakcije praćeno je kromatografijom na tankom sloju silikagela gdje je kao eluens korišten sustav otapala DCM/heksan u omjeru 1:9. Nakon završetka reakcije dodani su DCM (5 mL) i voda (5 mL). Reakcijska smjesa je ekstrahirana s DCM (4×10 mL). Organski ekstrakti sušeni su na bezvodnom natrijevom sulfatu u tami te su zatim profiltrirani, a otapalo je uklonjeno na rotacijskom uparivaču. Smjesa je pročišćena kromatografijom na stupcu silikagela gdje je kao eluens korišten sustav otapala DCM/heksan u omjeru 1:9. Dobiveno je 84 mg (iskorištenje 71 %) čistog spoja u obliku tamno ljubičastih-kristala.

2,6-dijod-4,4-dimetil-8-brommetil-1,3,5,7-tetrametil-4-bora-3a,4a-diaza-*s*-indacen (**10**): 84 mg (71 %)

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ/ppm: 4,80 (s, 2H), 2,65 (s, 6H), 2,55 (s, 6H), 0,22 (s, 3H), 0,16 (s, 3H).

3.2.5. *Sinteza 4,4-dimetil-8-[[2-(hidroksimetil)fenoksi]metil]-1,3,5,7-tetrametil-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacena (4)*



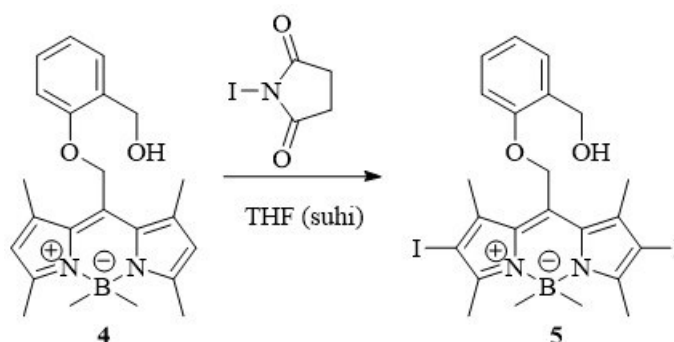
Shema 36. Sinteza etera **4**.

Otopljen je spoj **3** (44 mg, 0,13 mmol) u CH<sub>3</sub>CN (5 mL) te su u otopinu dodani 2-hidroksimetilfenol (25 mg, 0,19 mmol) i K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (37 mg, 0,27 mmol). Reakcijska smjesa miješana je na sobnoj temperaturi u atmosferi N<sub>2</sub> 24 sata. Sljedeći dan dodana voda (5 mL), te je provedena ekstrakcija s diklormetanom (3×10 mL). Organski ekstrakti su sušeni na bezvodnom MgSO<sub>4</sub>, smjesa je profiltrirana te je otapalo uklonjeno na rotacijskom uparivaču. Smjesa je pročišćena kromatografijom na stupcu silikagela gdje je kao eluens korišten sustav otapala etilacetat/heksan u omjeru 1:2. Dobiveno je 44 mg (iskorištenje 89 %) čistog spoja. 4,4-dimetil-8-[[2-(hidroksimetil)fenoksi]metil]-1,3,5,7-tetrametil-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen (**4**): 44 mg (89%);

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ/ppm: 7,38 – 7,32 (m, 2H), 7,07 – 7,00 (m, 2H), 6,09 (s, 2H), 5,28 (s, 2H) 4,69 (s, 2H), 2,51 (s, 6H), 2,30 (s, 6H), 0,25 (s, 6H);

<sup>13</sup>C NMR (150 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ/ppm: 156,2 (s), 153,2 (s), 137,2 (s), 133,7 (s), 131,5 (s), 129,3 (s), 129,0 (d), 122,7 (d), 121,5 (d), 110,3 (d), 61,8 (t), 61,6 (t), 16,6 (q), 15,5 (q). Jedan dublet i B-CH<sub>3</sub> signali nisu opaženi.

3.2.6. *Sinteza 4,4-dimetil-8-{{(2-hidroksimetil)fenoksi}metil}-2,6-dijod-1,3,5,7-tetrametil-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacena (5)*



Shema 37. Sinteza ciljne molekule 5.

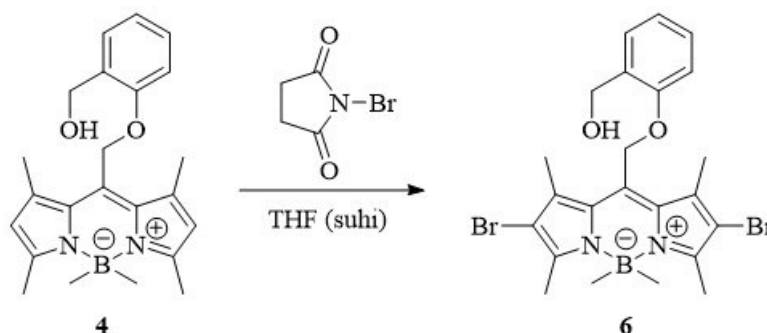
Trogla tikvica u kojoj je izvođena reakcija propuhana je dušikom te je u tikvicu dodana otopina spoja 4 (19 mg, 0,05 mmol) u suhom THF-u (5 mL). Otopljen je *N*-jodsukcinimida (NIS) (22 mg, 0,10 mmol, dva množinska ekvivalenta) u suhom THF (15 mL), te je ta otopina zatim polako dodavana u reakcijsku smjesu. Reakcija je izvođena u atmosferi N<sub>2</sub>. Reakcijska smjesa je miješana sat vremena. Odvijanje reakcije praćeno je kromatografijom na tankom sloju silikagela gdje je kao eluens korišten sustav otapala etilacetat/heksan u omjeru 1:3. Nakon završetka reakcije dodani su DCM (5 mL) i voda (5 mL). Reakcijska smjesa je ekstrahirana DCM (3×10 ml). Organski ekstrakti sušeni su na bezvodnom natrijevom sulfatu u tami te su zatim profiltrirani, a otapalo je uklonjeno na rotacijskom uparivaču. Smjesa je pročišćena kromatografijom na stupcu silikagela gdje je kao eluens korišten sustav otapala etilacetat/heksan u omjeru 1:2. Dobiveno je 23 mg (iskorištenje 72 %) čistog spoja u obliku ljubičastih krsitala.

4,4-dimetil-8-{{(2-hidroksimetil)fenoksi}metil}-2,6-dijod-1,3,5,7-tetrametil-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen (5): 23 mg (72 %);  $T_t = 177-178\text{ }^\circ\text{C}$ ;

<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ /ppm: 7,37 (d, 1H,  $J=7,5$  Hz), 7,33 (dd (t), 1H,  $J=7,6$  Hz), 7,07 (dd (t), 1H,  $J=8,1$  Hz), 6,98 (d, 1H,  $J=8,1$  Hz), 5,24 (s, 2H), 4,69 (s, 2H), 2,56 (s, 6H), 2,33 (s, 6H), 0,25 (s, 6H);

HRMS teorijska masa C<sub>23</sub>H<sub>27</sub>BI<sub>2</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ([M<sup>+</sup>]) 628,0255; izmjerena masa, 628,0250.

3.2.7. *Sinteza 4,4-dimetil-8-[[2-(hidroksimetil)fenoksi]metil]-2,6-dibrom-1,3,5,7-tetrametil-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacena (6)*



Shema 38. Sinteza ciljne molekule **6**.

Tikvica u kojoj je izvođena reakcija je propuhana dušikom te je u tu tikvicu dodana otopina spoja **4** (32 mg, 0,09 mmol) u suhom THF-u (5 mL). Otopljen je *N*-bromosukcinimida (NBS) (31 mg, 0,18 mmol, dva množinska ekvivalenta) u suhom THF (15 mL), te je ta otopina zatim polako dodavana u reakcijsku smjesu. Reakcija je izvođena u atmosferi N<sub>2</sub>. Reakcijska smjesa je miješana sat vremena. Odvijanje reakcije praćeno je kromatografijom na tankom sloju silikagela gdje je kao eluens korišten sustav otapala etil-acetat/heksan u omjeru 1:3. Nakon završetka reakcije dodani su DCM (5 mL) i voda (5 mL). Reakcijska smjesa je ekstrahirana s DCM (3×15 mL). Organski ekstrakti sušeni su na bezvodnom natrijevom sulfatu u tami te su zatim profiltrirani, a otapalo je uklonjeno na rotacijskom uparivaču. Smjesa je pročišćena kromatografijom na stupcu silikagela gdje je kao eluens korišten sustav otapala etil-acetat/heksan u omjeru 1:3. Dobiveno je 17 mg (iskorištenje 35 %) čistog spoja u obliku svijetlo ljubičastih kristala.

4,4-dimetil-8-[[2-(hidroksimetil)fenoksi]metil]-2,6-dibrom-1,3,5,7-tetrametil-4-bora-3a,4a-diaza-*s*-indacena (**6**): 17 mg (35 %); *T*<sub>t</sub> = 160-161 °C;

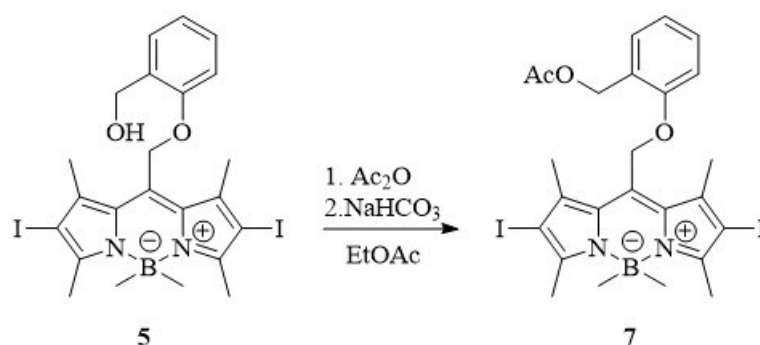
<sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ/ppm: 7,37 (d, 1H, *J* = 7,4 Hz), 7,33 (dd(t), 1H, *J* = 8,0 Hz), 7,05 (dd (t), 1H *J* = 7,4 Hz), 6,97 (d, 1H, *J* = 8,0 Hz), 5,22 (s, 2H) 4,66 (s, 2H), 2,51 (s, 6H), 2,27 (s, 6H), 0,25 (s, 6H);

<sup>13</sup>C NMR (150 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ/ppm: 155,7, 151,5, 134,8, 133,8, 130,6, 129,5, 129,2, 122,0, 112,9, 110,3, 61,8, 61,6, 16,0, 14,7, ne vidi se signal B-CH<sub>3</sub> i jedan singlet.

HRMS teorijska masa za C<sub>23</sub>H<sub>27</sub>BBr<sub>2</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ([M<sup>+</sup>]) 532,0532; izmjerena masa, 532,0549.



3.2.8. *Sinteza 4,4-dimetil-8-{{(2-acetoksimetil)fenoksi}metil}-2,6-dijod-1,3,5,7-tetrametil-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacena (7)*



Shema 39. Sinteza ciljne molekule 7.

Spoj **5** (23 mg, 0,03 mmol) otopljen je u etil-acetatu te prebačen u tikvicu s okruglim dnom. Reakcijska smjesa je propuhana dušikom te je dodan anhidrida octene kiseline ( $\text{Ac}_2\text{O}$ ) (22  $\mu\text{L}$ , 0,18 mmol, 6 množinskih ekvivalenata) i  $\text{NaHCO}_3$  (17 mg, 0,16 mmol). Reakcija je izvođena u atmosferi  $\text{N}_2$ . Reakcijska smjesa miješana je na sobnoj temperaturi 48 sati, nakon čega je dodano još  $\text{Ac}_2\text{O}$  (25  $\mu\text{L}$ , 0,26 mmol) i  $\text{NaHCO}_3$  (15 mg, 0,14 mmol) te je reakcijska smjesa miješana još 48 sati na sobnoj temperaturi. Praćenje reakcije izvedeno je kromatografijom na tankom sloju silikagela, a kao eluens korišten je sustav otapala EtOAc/heksan u omjeru 1:3. Po završetku reakcije, reakcijska smjesa je profiltrirana, a otapalo uklonjeno na rotacijskom uparivaču. Smjesa je pročišćena kromatografijom na stupcu silikagela, a kao eluens korišten je sustav otapala etil-aceatat/heksan u omjeru 1:3. Dobiveno je 18 mg (iskorištenje 72 %) spoja u obliku tamno ljubičastih kristala.

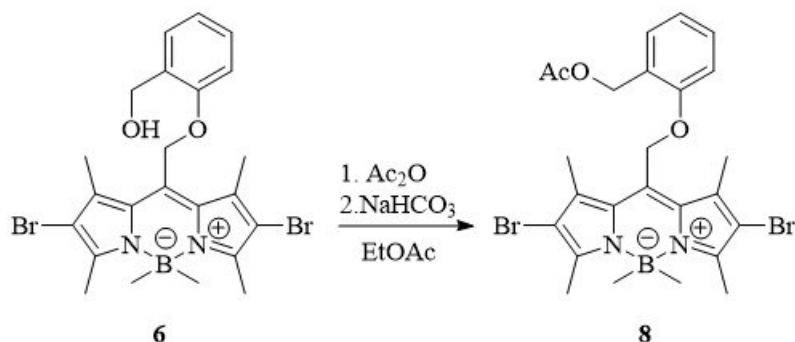
4,4-dimetil-8-{{(2-acetoksimetil)fenoksi}metil}-2,6-dijod-1,3,5,7-tetrametil-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacena (**7**): 23 mg (72 %);  $T_t = 165\text{-}166\text{ }^\circ\text{C}$

$^1\text{H NMR}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta/\text{ppm}$ : 7,38 – 7,35 (m, 2H), 7,04 (dd (t), 1H  $J = 7,7$  Hz), 6,97 (d, 1H,  $J = 8,1$  Hz), 5,19 (s, 2H), 5,09 (s, 2H), 2,55 (s, 6H), 2,30 (s, 6H), 1,96 (s, 3H) 0,23 (s, 6H);

$^{13}\text{C NMR}$  (150 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta/\text{ppm}$ : 170,8, 155,7, 153,6, 139,7, 132,9, 131,5, 130,3, 129,9, 124,5, 121,5, 110,3, 87,2, 62,0, 61,6, 20,9, 18,3, 17,8, ne vidi se signal B- $\text{CH}_3$  i jedan singlet;

**HRMS** teorijska masa za  $\text{C}_{25}\text{H}_{29}\text{BI}_2\text{N}_2\text{O}_3$  ( $[\text{M}^+]$ ) 670,0361; izmjerena masa, 670,0342.

3.2.9. *Sinteza 4,4-dimetil-8-{{(2-acetoksimetil)fenoksi}metil}-2,6-dibrom-1,3,5,7-tetrametil-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacena (8)*



Shema 40. Sinteza ciljne molekule **8**.

Spoj **6** (15 mg, 0,03 mmol) otopljen je u etil-acetatu te prebačen u tikvicu s okruglim dnom. Reakcijska smjesa je propuhana dušikom te je dodan anhidrida octene kiseline ( $\text{Ac}_2\text{O}$ ) (17  $\mu\text{L}$ , 0,17 mmol, 5,5 množinskih ekvivalenata) i  $\text{NaHCO}_3$  (13 mg, 0,15 mmol). Reakcija je izvođena u atmosferi  $\text{N}_2$ . Reakcijska smjesa miješana je na sobnoj temperaturi 48 sati, nakon čega je dodano još  $\text{Ac}_2\text{O}$  (10  $\mu\text{L}$ , 0,1 mmol) i  $\text{NaHCO}_3$  (5 mg, 0,05 mmol) te je reakcijska smjesa miješana još 48 sati na sobnoj temperaturi. Praćenje reakcije izvedeno je kromatografijom na tankom sloju silikagela, a kao eluens korišten je sustav otapala etil-aceat/heksan u omjeru 1:3. Po završetku reakcije, reakcijska smjesa je profiltrirana, a otapalo uklonjeno na rotacijskom uparivaču. Smjesa je pročišćena kromatografijom na stupcu silikagela, a kao eluens korišten je sustav otapala etil-aceat/heksan u omjeru 1:3. Dobiveno je 16 mg (iskorištenje 75 %) spoja u obliku ljubičastih kristala.

4,4-dimetil-8-{{(2-acetoksimetil)fenoksi}metil}-2,6-dibrom-1,3,5,7-tetrametil-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacena (**8**): 23 mg (72 %):  $T_t = 172\text{-}173\text{ }^\circ\text{C}$ ;

$^1\text{H NMR}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta/\text{ppm}$ : 7,38 – 7,34 (m, 2H), 7,04 (dd (t), 1H  $J = 7,8$  Hz), 6,97 (d, 1H,  $J = 8,2$  Hz), 5,19 (s, 2H), 5,09 (s, 2H), 2,52 (s, 6H), 2,27 (s, 6H), 1,96 (s, 3H) 0,23 (s, 6H);

$^{13}\text{C NMR}$  (150 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta/\text{ppm}$ : 170,4, 155,4, 150,7, 134,2, 133,3, 130,2, 129,8, 129,4, 124,0, 121,1, 112,2, 109,8, 61,3, 61,2, 20,4, 15,4, 14,0, ne vidi se signal B- $\text{CH}_3$ ;

**HRMS** teorijska masa za  $\text{C}_{25}\text{H}_{29}\text{BBr}_2\text{N}_2\text{O}_3$  ( $[\text{M}^+]$ ) 574,0638; izmjerena masa, 574,0640.

### 3.3. Određivanje kvantnih prinosa fluorescencije

Priređene su otopine spojeva **5–8** u CH<sub>3</sub>CN takve da maksimum apsorpcije u UV/Vis spektru iznosi oko 0,1. Tako priređene otopine propuhane su argonom 20 minuta. Emisijski spektri snimani su uz pobuđivanje pri 520 nm, 510 nm i 500 nm, a raspon snimanja bio je 525 – 700 nm za pobudu pri 520 nm, 520 – 700 nm za pobudu pri 510 nm te 510 – 700 nm za pobudu pri 500 nm. Širina pukotine monokromatora odgovarala je propusnosti vrpce od 1,5 nm za pobuđivanje i 1 nm za detekciju emisije. Ekscitacijski spektri snimani su uz detekciju emisije pri 570 nm s rasponom snimanja od 240 – 560 nm i uz detekciju pri 590 nm s rasponom snimanja od 240 – 570 nm. Snimljeni spektri su korigirani s obzirom na odgovarajuće otapalo, fluktuacije intenziteta Xe lampe i različitu propusnost zračenja različitih valnih duljina kroz optičke komponente. Kvantni prinosi fluorescencije izmjereni su koristeći rodamin B kao referentni spoj čiji je kvantni prinos poznat u literaturi ( $\Phi_F = 0,66$ )<sup>66</sup>. Iz površine ispod krivulja emisije (dobivene obradom podataka korištenjem programa OriginPro9.0) i apsorbancija pri određenim valnim duljinama određeni su kvantni prinosi fluorescencije prema jednadžbi (1).<sup>66</sup>

$$\Phi_F = \Phi_{\text{ref}} \left( \frac{n}{n_r} \right)^2 \frac{I}{I_R} \frac{1 - 10^{A_r}}{1 - 10^A} \quad (1)$$

pri čemu su:

$\Phi_{\text{ref}}$  – kvantni prinos referentne molekule

$n$  – indeks loma otapala u kojem su otopljeni spojevi **5–8** ( $n(\text{CH}_3\text{CN}) = 1,34411$ )

$n_r$  – indeks loma otapala u kojem je otopljena referentna molekula ( $n(\text{CH}_3\text{OH}) = 1,3284$ )

$I$  – površina ispod fluorescencijske krivulje u emisijskim spektrima spojeva **5–8** pri određenim valnim duljinama pobude

$I_R$  – površina ispod fluorescencijske krivulje u emisijskim spektrima referentne molekule pri određenim valnim duljinama pobude

$A_r$  – apsorbancija referentne molekule pri odgovarajućim valnim duljinama pobude

$A$  – apsorbancija spojeva **5–8** pri odgovarajućim valnim duljinama

### 3.4. Vremenski korelirano brojanje pojedinačnih fotona (TC–SPC)

TC–SPC mjerenja izvedena su na instrumentu Edinburgh FS5 spektrometru opremljenim s pulsnom svjetlećom diodom valne duljine 450 nm. Signali fluorescencije pri 580 nm praćeni su u 1023 kanala s vremenskim prirastom od 0,020 ns po kanalu. Fotoni su skupljani sve dok ih nije sakupljeno 3000 u kanalu maksimalnog intenziteta. Suspenzija silikagela u H<sub>2</sub>O koja rasipa svjetlo korištena je kako bi se dobila funkcija odaziva instrumenta (engl. *Instrument Response Function*, IRF). Prije mjerenja otopine spojeva **5–8** propuhane su s N<sub>2</sub> 30 min, a apsorbanacija pri 450 nm je iznosila 0,01–0,04. Mjerenja su izvedena pri sobnoj temperaturi (25 °C). Krivulje opadanja intenziteta fluorescencije opisane su kao suma eksponenata prema izrazu (2) koristeći programski paket instrumenta.

$$F(t) = \alpha_1 \exp\left(-\frac{t}{\tau_1}\right) + \alpha_2 \exp\left(-\frac{t}{\tau_2}\right) + \alpha_3 \exp\left(-\frac{t}{\tau_3}\right) + \dots \quad (2)$$

Gdje je

$F$  – intenzitet fluorescencije u vremenu  $t$

$\alpha$  – predeksponencijalni faktor

$\tau$  – vrijeme života (engl. *lifetime*) ili vrijeme nestajanja (engl. *decay time*) singletnog pobuđenog stanja

### 3.5. Određivanje kvantnih prinosa reakcije upotrebom aktinometra

Priredena je otopina kalijevog tris(oksalato)ferata(III) trihidrata ( $K_3[Fe(C_2O_4)_3] \cdot 3H_2O$ ) ( $c = 0,012 \text{ mol dm}^{-3}$ ) u  $H_2SO_4$  ( $c = 0,5 \text{ mol dm}^{-3}$ ). Također je priredena puferirana otopina fenantrolina ( $w = 0,1\%$ ), na način da su fenantrolin monohidrat (1.0 g) i natrijev acetat trihidrat (225 g) otopljeni u otopini  $H_2SO_4$  (1 L,  $c = 0,5 \text{ mol dm}^{-3}$ ).

Osigurani su uvjeti bez svjetla, te su odabrane dvije kivete koje se mogu dobro začepiti. U obje kivete pažljivo je dodano točno 2,5 mL otopine tris(oksalatno)feratnog(III) aktinometra. Jedna kiveta s aktinometrom čuvana je na mračnom mjestu, dok je druga pripremljena za ozračivanje na način da je omotana crnim papirom s 3 strane. Otopina aktinometra je osvjetljavana zajedno s metanolnim otopinama sintetiziranih spojeva **5–8** u volumenu od 3 mL u Luzchem reaktoru, pri čemu je maksimum apsorpcije za sintetizirane otopine iznosio oko 0,5 za sva četiri uzorka. Nakon jedne minute osvjetljavanja otopina aktinometra je izvađena iz reaktora i u obje otopine aktinometra (ozračene i neozračene) dodano je 0,5 mL prethodno priređene puferirane otopine fenantrolina. Sadržaj u kivetama je dobro izmiješan, snimljen je UV/Vis spektar obje otopine te je izmjerena apsorbanacija na 510 nm ( $A_{510}$ ). Otopine sintetiziranih spojeva ozračivane su u reaktoru još 30 minuta. Uzorci ozračenih otopina prikupljeni su nakon 1 minute, 5 minuta, 10 minuta, 15 minuta i 30 minuta. Množina fotona koje je apsorbirao aktinometar izračunata je prema jednadžbi (3).<sup>66</sup>

$$n \text{ (apsorbiranih fotona)} = \frac{\Delta A_{510} \times V_{\text{ozr}}}{\varepsilon_{510} \times l \times \Phi_{\text{lit}}} \times \frac{V_{\text{phen}}}{V_{\text{ozr}}} \quad (3)$$

Pri čemu su:

$\Delta A_{510}$  – razlika u apsorbanacijama pri 510 nm za ozračeni i neozračeni uzorak

$V_{\text{ozr}}$  – ozračeni volumen otopine

$V_{\text{phen}}$  – dodani volumen fenantrolina

$\varepsilon_{510}$  – molarni apsorpcijski koeficijent kompleksa  $[Fe(\text{phen})_3]^{+2}$ , koji iznosi  $11100 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

$l$  – duljina optičkog puta, za korištene kivete iznosi 1 cm

$\Phi_{\text{lit}}$  – kvantni prinos aktinometra koji je poznat iz literature<sup>67</sup> i iznosi,  $\Phi_{\text{lit}} = 0,53$ <sup>66</sup>

Nakon što je izračunata množina apsorbiranih fotona za aktinometar izračunata je ozračenost spojeva. Iz množine fotoprodukata izračunata je množina fotona koje je uzorak primio prema jednadžbi (4).

$$n(\text{apsorbiranih fotona}) = \frac{n(\text{fotokemijskih produkata})}{\Phi_r} \quad (4)$$

Za otopine čiji su maksimumi apsorpcije u rasponu od 0,4 – 0,8 potrebno je uzeti faktor korekcije i podijeliti ukupan broj fotona s članom  $(1 - T)$  prema jednadžbi (5).

$$n(\text{apsorbiranih fotona}) = n(\text{ukupno fotona}) \times (1 - T) \quad (5)$$

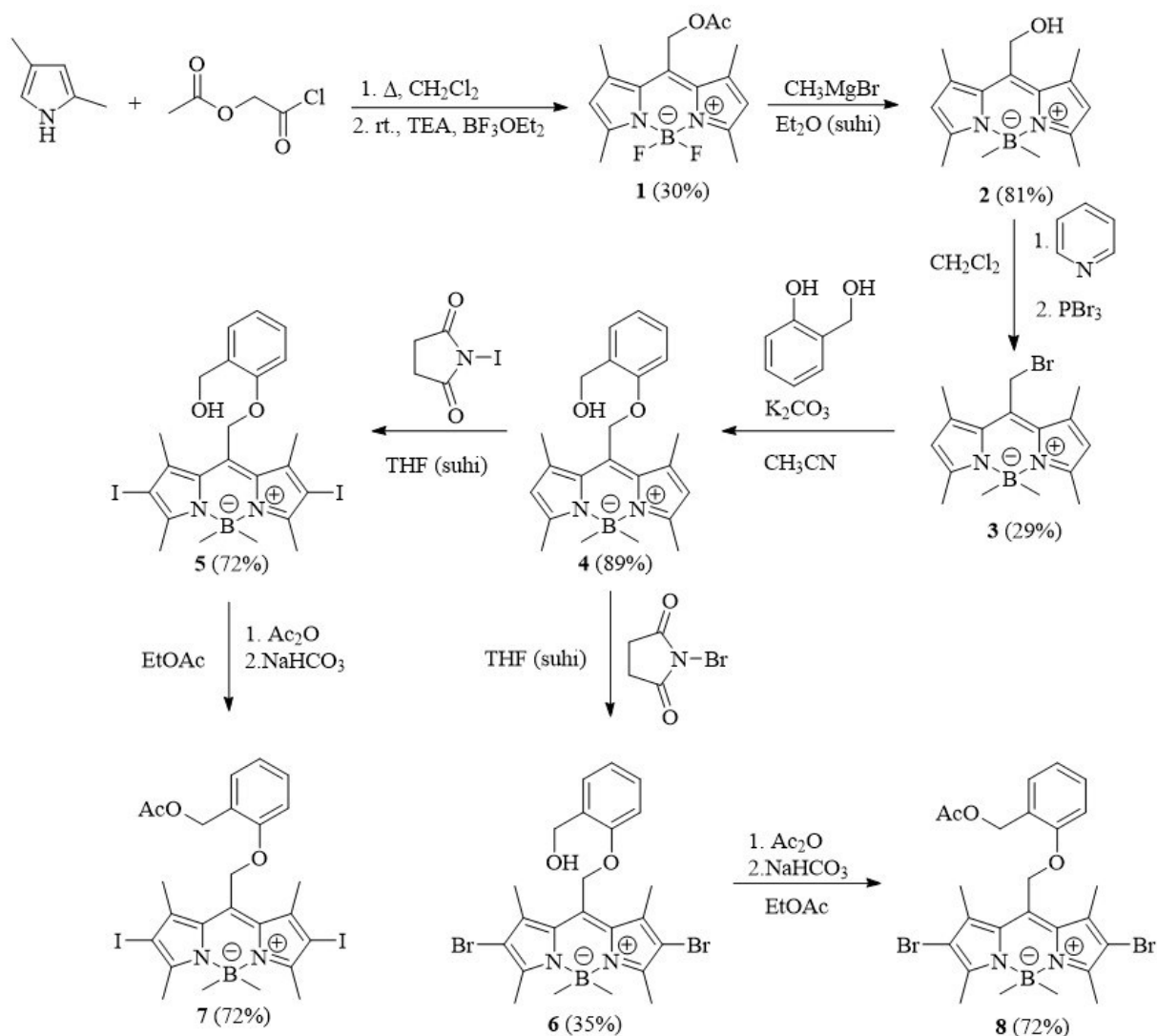
Gdje je  $(1 - T) = 1 - 10^{-A}$ . Kvantni prinos reakcije za pojedini spoj izračunat je prema jednadžbi (6).

$$\Phi_r = \frac{A_{\lambda_{\max}} \times V_{\text{ozr}} \times x(\text{fotokemijskih produkata})_{\text{HPLC}}}{\varepsilon_{\lambda_{\max}} \times l \times n(\text{ukupno fotona}) \times (1 - T_{\lambda_{\max}})} \quad (6)$$

## § 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1. Dizajn i sinteza spojeva

Pretpostavka je da će uvođenje halogenih elemenata poput broma i joda na 2 i 6 položaje BODIPY fotokaveza povećati kvantni prinos međusustavnog križanja (ISC) te populaciju tripleta. Naime, poznato je da teški elementi poput broma, a pogotovo joda, povećavaju sprezanje spina i putanje (engl. *spin-orbit coupling*), što dovodi do bržeg i učinkovitijeg međusustavnog križanja.<sup>68</sup> Stoga smo proveli bromiranje i jodiranje BODIPY jezgre. Pretpostavljeni mehanizam fotokemijske reakcije BODIPY fotokaveza uključuje heterolizu u *meso*-položaju uz nastanak karbokationa na BODIPY jezgri i izlazak fenoksidnog iona. Nadalje, ideja nam je bila priprava acetilnih derivata na benzilhidroksilnoj skupini kako bi OH preveli u dobru odlazeću skupinu. Tako je, prema analogiji nastajanja QM u reakcijama fluoridom-induciranog desililiranja,<sup>51</sup> za očekivati da će nakon heterolize i nastajanja fenolata doći do eliminacije acetilne skupine uz nastajanje QM. Stoga smo u konačnici priredili 4 ciljne molekule, s bromom ili jodom, te s acetiliranom benzilnom OH skupinom ili bez acetila. Reakcijski put sinteze ciljnih molekula **5–8** prikazan je na shemi 41.

Shema 41. Reakcijski put sinteze spojeva **5**–**8**.

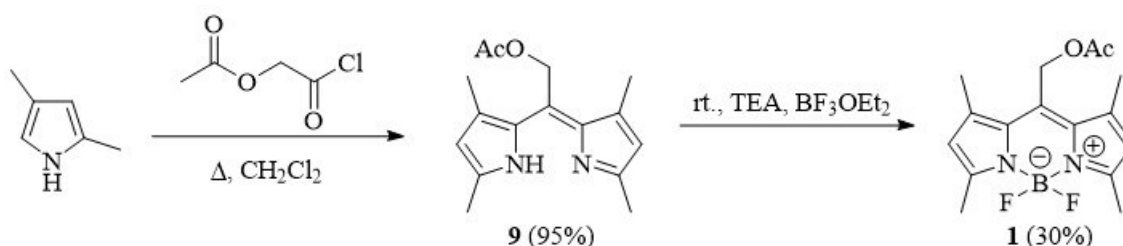
Relativno je jednostavno kondenzacijom acil-klorida, u ovom slučaju 2–klor–2–oksoetil-acetata, i 2,4–dimetilpirola koji su komercijalno dobavljeni sintetizirani *meso*–supstituirani BODIPY spoj **1**. Reakcija uključuje nastanak međuproducta, dipirometena **9** (Shema 42.), koji se u drugom koraku dodatkom organske baze (TEA) i  $\text{BF}_3\cdot\text{Et}_2\text{O}$  prevodi u BODIPY spoj **1**. Zbog poteškoća s izolacijom dipirometena, dva stupnja se provode u jednom koraku bez izolacije međuproducta **9**.

Reakcija nastanka dipirometena uključuje kondenzaciju dva pirola koji su supstituirani u položajima 2 i 6 te imaju jedan slobodan  $\alpha$  položaj. Dolazi do nukleofilnog napada supstituiranog pirola na elektrofil (acil-kloridnu skupinu) pri čemu nastaje piril-alkil-keton koji



u kiselim uvjetima reagira s drugom molekulom supstituiranog pirola kao nukleofilom te nastaje odgovarajući derivat dipirometana te eliminacijom vode dipirometen **9**.<sup>69</sup>

Struktura dobivenog produkta **1** potvrđena je <sup>1</sup>H-NMR spektrom gdje je opažen karakteristični singlet pri 6,09 ppm koji odgovara H atomima na položaju 2 i 6 BODIPY jezgre, metilenska skupina na 5,29 ppm koja odgovara *meso*-metilom položaju, a vidljiva su i dva singleta na 2,53 i 2,35 ppm s intenzitetima koji odgovaraju 6 H atoma, a koji se pripisuju metilnim skupinama na pirolskom prstenu, te acetilna skupina na 2,31 ppm. U <sup>13</sup>C spektru molekule vidljiv je karbonilni C atom pri 170,6 ppm kao i aromatski C atomi koji pripadaju BODIPY jezgri pri 156,6, 141,5, 133,3 te 122,3 ppm. Također, u <sup>13</sup>C spektru vidljiv je i signal *meso*-metilenskog C atoma pri 57,9 ppm te dva signala metilnih skupina na položajima 1,3,5,7 BODIPY jezgre pri 15,6 i 14,6 ppm.

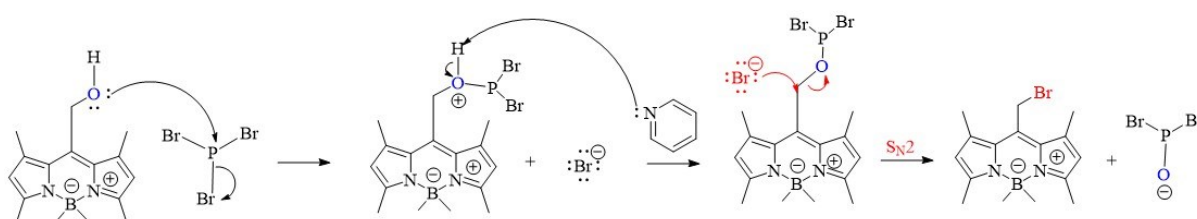


Shema 42. Nastanak derivata dipirometana **9** tijekom sinteze *meso*-BODIPY derivata **1**.<sup>70</sup>

U sljedećem stupnju provedeno je metiliranje spoja **1** korištenjem suviška CH<sub>3</sub>MgBr te je dobiven spoj **2**. CH<sub>3</sub>MgBr korišten je za metilaciju bora u BODIPY jezgri spoja **1** te za hidrolizu acetilne skupine na *meso*-položaju. Metilmagnezijev bromid je Grignardov reagens koji reagira s elektrofilima, borovim atomom pri čemu se zamjenjuje atom fluora s metilnom skupinom. Osim toga, Grignardov reagens napada elektrofilnu karbonilnu OAc skupinu te kasnijom obradom s vodom dolazi do hidrolize i nastanka alkohola **2**.

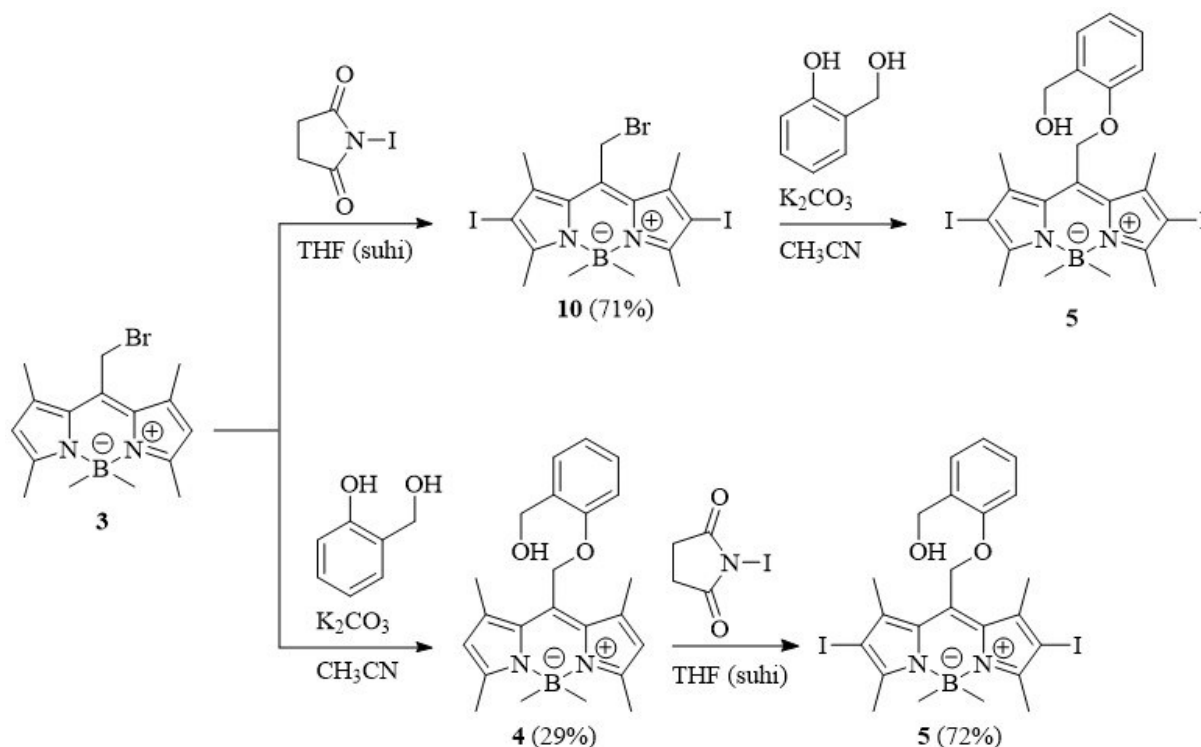
Struktura produkta **2** potvrđena je spektrima NMR. U <sup>1</sup>H-NMR spektru spoja **2** uočen je singlet pri 0,18 ppm koji odgovara H atomima na metilnim skupinama koje su se vezale na atom bora u BODIPY jezgri. Osim toga, u usporedbi s <sup>1</sup>H-NMR spektrom spoja **1**, vidljivo je da je nestao karakteristični singlet na 2,31 ppm koji se pripisuje signalu acetilne skupine. Zanimljivo je da u <sup>13</sup>C NMR spektru nisu primijećeni signali metilnih skupina na borovom atomu. Mogući razlog izostanak tih signala moglo bi biti dugo relaksacijsko vrijeme tih ugljikovih jezgri uslijed čega zbog slabog intenziteta signala oni postaju dio šuma.

Spoj **3** je sintetiziran reakcijom spoja **2** s fosforovim tribromidom. Reakcija se provodi s piridinom kao bazom. Mehanizam reakcije (Shema 43.)<sup>71</sup> uključuje nukleofilni napad *meso*-OH skupine na elektrofilni PBr<sub>3</sub>, nakon čega slijedi deprotoniranje bazom koja je u ovom slučaju piridin. Posljednji korak uključuje S<sub>N</sub>2 reakciju u kojoj nukleofil (Br<sup>-</sup>) napada *meso* atom ugljika pri čemu izlazi PBr<sub>3</sub>O<sup>-</sup>. Reakcija je izvedena četiri puta, gdje je u prva tri pokušaja dobiven spoj **3** s prinosom od 1,5 – 3,5 %, te u četvrtom pokušaju dobiven je spoj **3** s prinosom od 29%. Dobiveni spoj nakon obrade potrebno je odmah pročistiti kako bi se osigurao što veći prinos reakcije.



Shema 43. Mehanizam reakcije nastanka spoja **3**.<sup>71</sup>

Priprava ciljne molekule **5** iz spoja **3** može se u principu provesti na dva načina, kako je prikazano u shemi 44. Jedna strategija prvo uključuje reakciju elektrofilne aromatske supstitucije s *N*-jodsukcinimidom pri čemu nastaje spoj **10**, a potom pripremu etera **5** Williamsonovom sintezom. Reakcijom jodiranja, spoj **10** uspješno je izoliran s relativno dobrim iskorištenjem (71 %) te je sa svom količinom spoja **10** provedena sinteza etera **5**. Međutim, nakon obrade reakcijske smjese uočeno je nastajanje većeg broja produkata koje nismo uspjeli očistiti kromatografskim tehnikama i okarakterizirati. Pretpostavljeno je da je prilikom Williamsove sinteze etera došlo i do nukleofilne supstitucije na BODIPY jezgri, u skladu s literaturnim navodima. Naime poznato je da se klor na BODIPY jezgri može zamijeniti s dobrim nukleofilima kao što su alkoksidi, sulfidi, amini<sup>72</sup> i fenoksidi.<sup>73</sup> Stoga smo odustali od ovog sintetskog puta, te smo ciljne molekule pripravili tako da je prvo provedena Williamsova sinteza etera, a potom halogeniranje, kako je prikazano na ranijoj shemi 41.

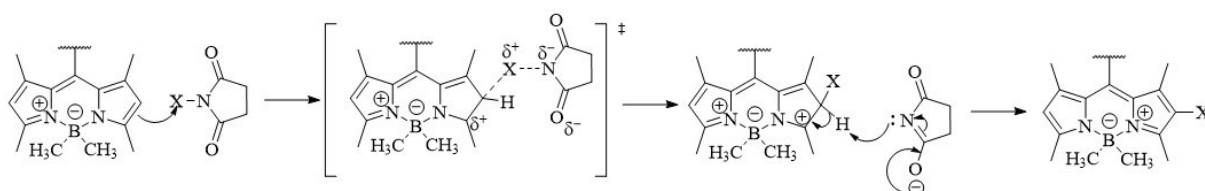


Shema 44. Predloženi sintetski put za dobivanje ciljnih molekula.

Spoj **4** priređen je Williamsonovom sintezom etera gdje je 2-hidoksimetilfenol dodan u suvišku kako bi prinos reakcije bio što veći. Kao baza korišten je K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. <sup>1</sup>H NMR spektrom potvrđeno je vezanje 2-hidoksimetilfenola na *meso*-C atom metilirane BODIPY jezgre, u spektru se pojavljuje multiplet na 7,32 – 7,27 ppm koji odgovara 2H iz fenilnog prstena te na 7,00 ppm triplet i 6,92 ppm dublet koji odgovaraju po 1H iz fenilnog prstena te ukazuju na karakteristični uzorak *o*-disupstituiranih fenilnih skupina. Osim toga, vidljiva je još jedna metilenska skupina na 5,28 ppm, dok su u spektru <sup>13</sup>C pojavljuju ukupno 10 signala u aromatskom području te dva karakteristična tripleta na 61,8 i 61,6 ppm koji odgovaraju metilenskim C-atomima.

BODIPY spojevi podliježu elektrofilnim aromatskim supstytucijama, kao i ostali pirolski derivati. Međutim, zbog specifičnog elektronskog utjecaja BF<sub>2</sub> skupine, elektrofilne supstucije (S<sub>E</sub>Ar) vjerojatnije su na položajima 2 i 6.<sup>74</sup> Reakcija uvođenja broma i joda na položaje 2 i 6 BODIPY jezgre pokazala se izrazito efikasnom. Pretpostavljamo kako klasično halogeniranje koje uključuje korištenje tekućeg broma ili HIO<sub>3</sub> može rezultirati halogeniranjem benzenske jezgre na fotouklonljivoj izlaznoj skupini koja je aktivirana zbog elektron-donorskog učinka fenolnog kisika. Kako bi to izbjegli korišteni su *N*-jodsukcinimid (NIS) i *N*-bromsukcinimid (NBS) koji selektivnije zamjenjuju vodik na položajima aromatske 2,6 BODIPY jezgre.

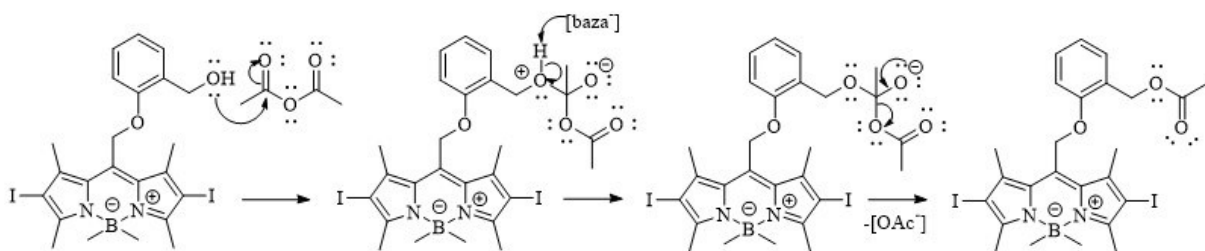
Pretpostavljamo da je moguć nastanak i monohalogeniranih BODIPY spojeva koji u ovom slučaju nisu izolirani jer je korišten suvišak halogenirajućeg reagensa. Dobiveni su spojevi **5** i **6**, s iskorištenjem od 72% za spoj **5** i 35% za spoj **6**. Lošije iskorištenje reakcije dobivanja spoja **6** moglo bi se objasniti tako što je u reakcijskoj smjesi ostalo više neizreagirano reaktanta **4**. Optimizacijom reakcijskih uvjeta poput produljenja vremena ili odabira odgovarajućeg otapala moglo bi se povećati iskorištenje reakcije halogeniranja.<sup>75</sup> Na temelju literaturnih navoda u kojima je opisana elektrofilna aromatska supstitucija s *N*-halogenim sukcinimidima uz BF<sub>3</sub> kao katalizator<sup>76</sup> možemo i kod nas pretpostaviti sličan mehanizam koji je prikazan na shemi 44. Pri tome, kod nas kao Lewisova kiselina može biti B(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> skupina druge BODIPY molekule, koja aktivira N-X vezu, olakšavajući stvaranje X<sup>+</sup> elektrofila.<sup>76</sup>



Shema 44. Pretpostavljeni mehanizam S<sub>E</sub>Ar reakcije s *N*-halogensukcinimidom.<sup>74</sup>

Usporedbom <sup>1</sup>H NMR spektra spojeva **4** s onima od **5** i **6**, vidljivo je kako signal pirolskog C-H pri 6,09 ppm nestaje te možemo reći da je uspješno provedeno uvođenje dva broma ili joda na položaje 2 i 6. Osim toga, potvrda uspješnog bromiranja i jodiranja dobivena je spektrometrijom masa.

Sinteza spojeva **7** i **8** izvedena je uz veliki suvišak anhidrida octene kiseline i suvišak baze, ovom slučaju NaHCO<sub>3</sub>. Pretpostavljamo da reakcijski mehanizam uključuje nukleofilnu supstituciju derivata karboksilne kiseline (anhidrida octene kiseline). Mehanizam reakcije uključivao bi nukleofilni napad alkohola na karbonilni C atom anhidrida, zatim bi slijedila deprotoniranje te konačno izlazak octene kiseline. (Shema 45.).

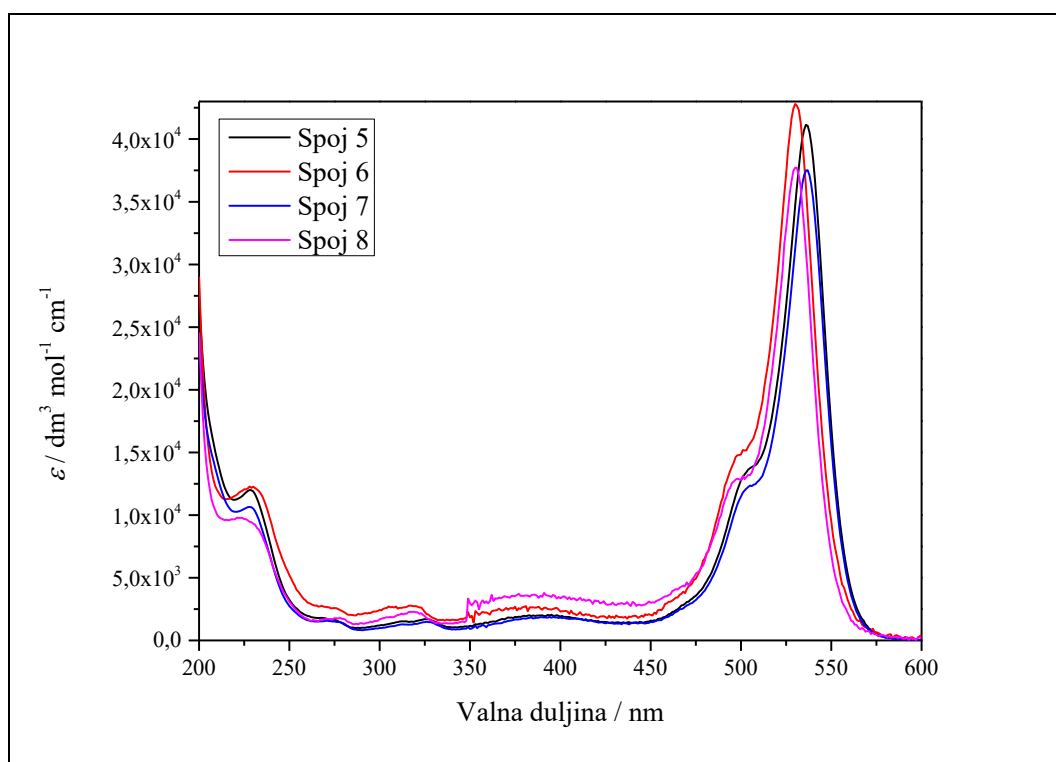


Shema 45. Pretpostavljeni mehanizam nastajanja spoja **5**.

Dobiveni  $^1\text{H}$  NMR spektar pokazuje signal pri 1,97 ppm za oba slučaja, koji odgovara vodikovim atomima novo uvedene acetilne skupine. Također potvrda uspješnog uvođenja acetilne skupine dobivena je spektrometrijom masa.

## 4.2. Fotofizička karakterizacija spojeva

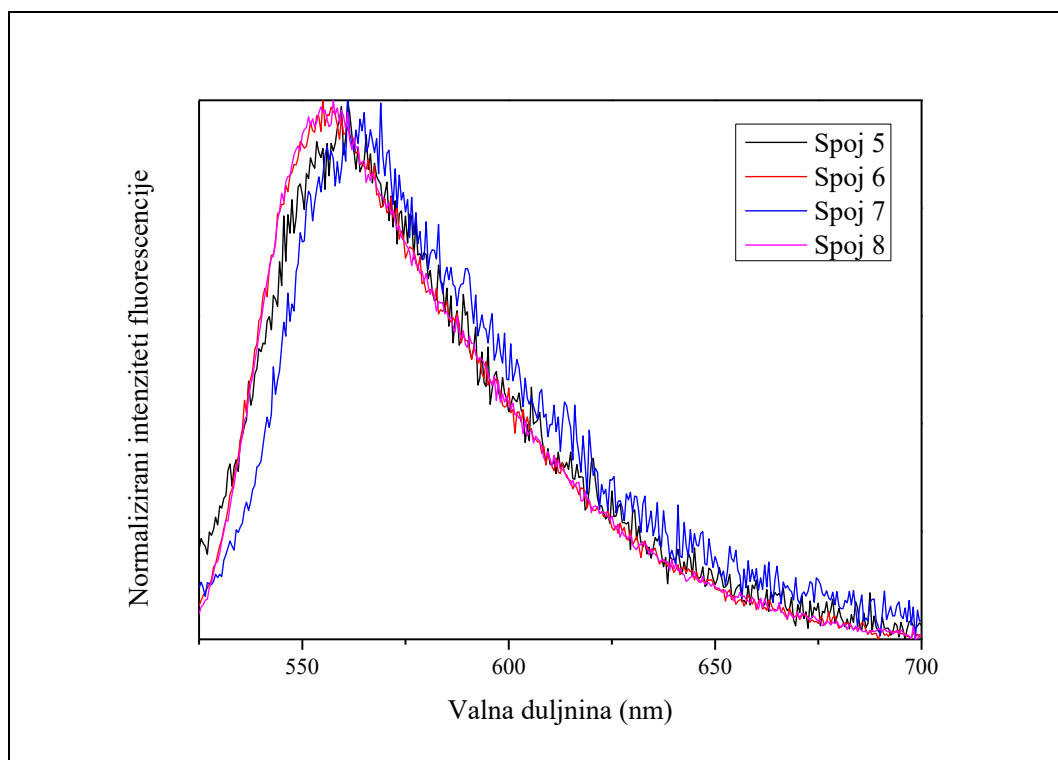
Za primjenu spojeva kao fotokaveza nužno je poznavanje spektroskopskih i fotofizičkih svojstava. Tako smo spojevima **5-8** izmjerili apsorpcijske spektre u  $\text{CH}_3\text{CN}$ . Spektri su prikazani na slici 3. Vidljivo je da sve spojeve karakterizira snažna i uska apsorpcijska vrpca na oko 535 nm, karakteristična za BODIPY spojeve,<sup>77</sup> a koja se pripisuje HOMO→LUMO prijelazu i populaciji  $S_1$  stanja. Molarni apsorpcijski koeficijenti u maksimumu apsorpcije imaju vrijednosti  $37000\text{--}42000\text{ dm}^3\text{ mol}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ , što je u skladu s dozvoljenim elektronskim prijelazima. U području kraćih valnih duljina na oko 500 nm vidljivo je i rame u apsorpcijskim spektrima koje se pripisuje  $0\rightarrow 1$  vibracijskoj vrpci.



Slika 3. UV/Vis spektri spojeva **5-8** u  $\text{CH}_3\text{CN}$ .

Normalizirani fluorescencijski spektri spojeva **5-8** snimljeni u  $\text{CH}_3\text{CN}$  prikazani su na slici 4. Kao i ostale BODIPY spojeve, karakterizira ih oštra emisijska vrpca s malim Stokesovim pomakom. Usporedbom ekscitacijskih i emisijskih spektara vidljiva je zrcalna simetrija što ukazuje da prilikom pobuđivanja ne dolazi do velikih promjena u geometriji molekule te da su vibracijska stanja osnovnog i elektronski pobuđenog stanja slična. Spojevi imaju slične

maksimume emisije, pri čemu je vidljivo da spojevi **5** i **7** imaju karakteristične maksimume emisije pri 561 nm, spoj **8** pri 557 nm te spoj **6** pri 555 nm.



Slika 4. Normalizirani emisijski ( $\lambda_{\text{ex}} = 520$ ) spektri spojeva **5** – **8** u CH<sub>3</sub>CN.

U tablici 1 navedena su spektroskopska svojstva spojeva: molarni apsorpcijski koeficijenti pri maksimumu apsorpcije ( $\epsilon_{\text{max}}$ ), valne duljine maksimuma apsorpcije ( $\lambda_{\text{aps. max}}$ ), valne duljine maksimuma emisije ( $\lambda_{\text{em. max}}$ ), iznosi Stokesovih pomaka ( $\nu$ ) za spojeve **4**–**8**. Usporedbom spektroskopskih svojstava spoja **4** i spojeva **5** i **6** vidimo da se uvođenjem halogenog elementa maksimum apsorpcije batokromno pomiče. Za bromirane spojeve pomak je 20 nm, a za jodirane 16 nm. Pomaci u emisijskim spektrima nešto su izraženiji te iznose 34 nm za jodirane spojeve i 28 nm za bromirane spojeve. Također, Stokesov pomak spoja **4** nešto je manji nego kod spojeva **5** i **6**, što sugerira da uvođenje atoma halogena na položaj 2 i 6 BODIPY jezgre povećava fleksibilnost molekularne geometrije.

Tablica 1. Spektroskopska svojstva spojeva 4–8 u acetonitrilu.

Spoj	$\epsilon_{\max}^a / \text{dm}^3 \text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$	$\lambda_{\text{aps. max}}^b / \text{nm}$	$\lambda_{\text{em. max}}^c / \text{nm}$	$\nu^d / \text{cm}^{-1}$
4	87209	510	527	632
5	41143	536	561	831
6	42810	530	555	850
7	37520	536	569	1082
8	37724	530	558	947

<sup>a</sup> Molarni apsorpcijski koeficijenti pri maksimumu apsorpcije ( $\epsilon_{\max}$ ). <sup>b</sup> Valne duljine maksimuma apsorpcije ( $\lambda_{\text{aps. max}}$ ). <sup>c</sup> Valne duljine maksimuma emisije ( $\lambda_{\text{em. max}}$ ). <sup>d</sup> Stokesovi pomaci ( $\nu$ )

Kvantni prinosi fluorescencije ( $\Phi_f$ ) za acetonitrilne otopine spojeva 5–8 izmjereni su korištenjem rodamina B u metanolu kao standarda ( $\Phi_f = 0,66$ ).<sup>66</sup> Vidljivo je da bromirani spoj ima sličan  $\Phi_f$  kao i nesupstituirani spoj 4, dok je jodiranim BODIPY derivatima  $\Phi_f$  niži i za red veličine. To bi se moglo objasniti učinkovitijim ISC te većom populacijom tripletnog pobuđenog stanja kod jodiranog spoja.<sup>10</sup>

Vremena života singletnog pobuđenog stanja ( $\tau$ ) za spojeve 4–8 određena su mjerenjem opadanja intenziteta fluorescencije tehnikom vremenski koreliranog brojanja pojedinačnih fotona (TC–SPC). Nadalje, iz prosječnog vremena života singletnog pobuđenog stanja i  $\Phi_f$  mogu se izračunati konstante brzine fluorescencije ( $k_f$ ) te konstante brzine neradijativnih procesa ( $k_{nr}$ ) koje su prikazane u tablici 2.



Tablica 2. Vremena života singletnog pobuđenog stanja u acetonitrilu te konstante brzina fluorescencije i neradijativnih procesa za spojeve 4–8 dobivene TC-SPC metodom.

Spoj	$\Phi_f(\text{CH}_3\text{CN})^a$	$\tau(\text{CH}_3\text{CN})^b / \text{ns}$	$k_f^c / \times 10^8 \text{ s}^{-1}$	$k_{nr}^d / \times 10^8 \text{ s}^{-1}$
4	$0,33 \pm 0,06$	$0,06 \pm 0,02$ (4%)	0,37	0,75
		$1,82 \pm 0,02$ (77%)		
		$4,54 \pm 0,13$ (28%)		
5	$0,050 \pm 0,007$	$0,07 \pm 0,005$ (56%)	1,05	20,03
		$1,17 \pm 0,08$ (12%)		
		$3,90 \pm 0,07$ (31%)		
6	$0,39 \pm 0,09$	$0,18 \pm 0,009$ (31%)	9,26	14,47
		$1,02 \pm 0,02$ (51%)		
		$3,95 \pm 0,10$ (17%)		
7	$0,04 \pm 0,01$	$0,06 \pm 0,005$ (67%)	1,07	25,77
		$0,85 \pm 0,09$ (7%)		
		$3,91 \pm 0,06$ (26%)		
8	$0,4 \pm 0,1$	$0,14 \pm 0,008$ (45%)	16,17	22,35
		$0,80 \pm 0,02$ (42%)		
		$2,95 \pm 0,11$ (13%)		

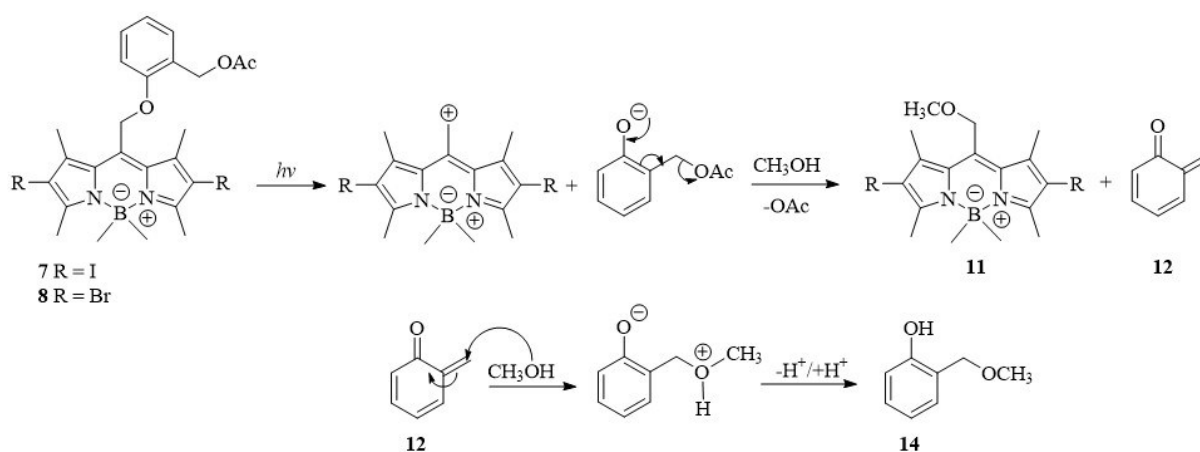
<sup>a</sup> Kvantni prinosi fluorescencije izmjereni su korištenjem rodamina B u metanolu kao standarda ( $\Phi_f = 0,66$ ).<sup>66</sup> Provedeno je jedno mjerenje pri čemu su snimljena tri fluorescencijska spektra uz pobuđivanje pri  $\lambda_{\text{ex}} = 500, 510$  i  $520$  nm. Izračunata su tri  $\Phi_f$  za svaku valnu duljinu te je navedena srednja vrijednost. <sup>b</sup> Vremena života singletnog pobuđenog stanja ( $\tau$ ). <sup>c</sup> Konstanta brzine fluorescencije ( $k_f$ ). <sup>d</sup> Konstante brzine neradijativnih procesa ( $k_{nr}$ ).

Opadanje intenziteta fluorescencije za ciljne molekule ne može se opisati kao monoeksponencijalna funkcija. Dobivene krivulje opisane su kao suma tri eksponenta prema izrazu (2) u poglavlju 3.4. Takav opis krivulja opadanja intenziteta fluorescencije ukazuje na kompleksnu fotofiziku i postojanje više pobuđenih vrsta koje se deaktiviraju fluorescencijom.

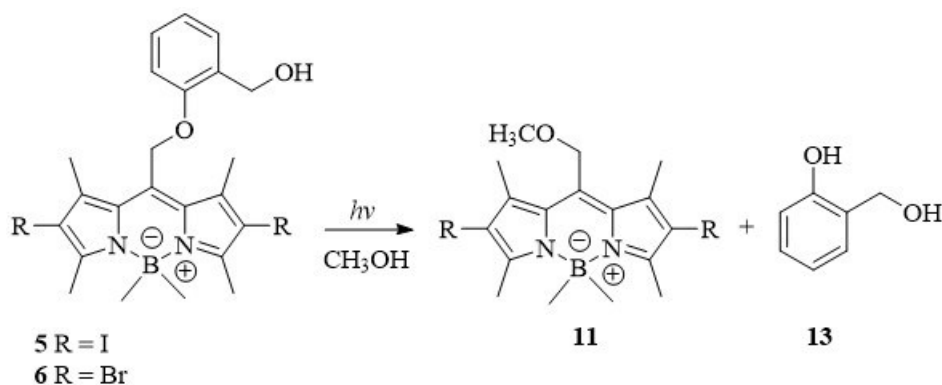
Vidljivo je da uvođenje joda i broma na položaje 2 i 6 BODIPY jezgre znatno doprinosi promjeni fotofizičkih svojstava. U oba slučaja znatno se povećava konstanta brzine deaktivacije bez zračenja. Kako to uključuje ISC, IC i fotokemijsku reakciju, navedena opažanja u skladu su s hipotezom ovog rada. Zanimljivo je da se konstanta brzine deaktivacije zračenjem bromiranih derivata također povećava, što u konačnici dovodi do toga da je  $\Phi_f$  spojeva s bromom sličan onom osnovnog spoja 4.

### 4.3. Fotokemijska reaktivnost spojeva

Iz literaturnih navoda poznato je da BODIPY fotokavezi podliježu heterolitičkom cijepanju u *meso*-položaju stvarajući BODIPY benzilni kation.<sup>10,11,12</sup> Također, u literaturi je opisano nastajanje QM fotosolvilizom BODIPY fotokaveza iz viših pobuđenih stanja, anti-Kashinim fotokemijskim reakcijama.<sup>13</sup> Slijedom toga, očekivali smo da će ozračivanjem vidljivim svjetlom spojeva **5-8** u metanolnim otopinama doći do nastajanja etera **11**, produkta nukleofilnog napada metanola na BODIPY karbokation. Nadalje, eliminacijom fenolata iz *meso*-položaja, u slučaju ciljnih molekula **5** i **6** očekuje se nastajanje produkta **13** (shema 47), dok je iz acetilnih derivata moguća eliminacija octene kiseline uz nastajanje QM (shema 46). Naime, acetat je puno bolja izlazna skupina od OH<sup>-</sup>. Tako fenolat bez acetilne skupine reagira kao baza i protonira se uz nastanak **13** dok eliminacijom OAc<sup>-</sup> nastaje QM. Kako su QM podložni reakciji s nukleofilima, detekcija metilnog etera **14** indirektni je dokaz nastajanja QM u tim reakcijama.



Shema 46. Pretpostavljena fotokemijska reakcija spojeva **7** i **8** ozračenih vidljivim svjetlom.

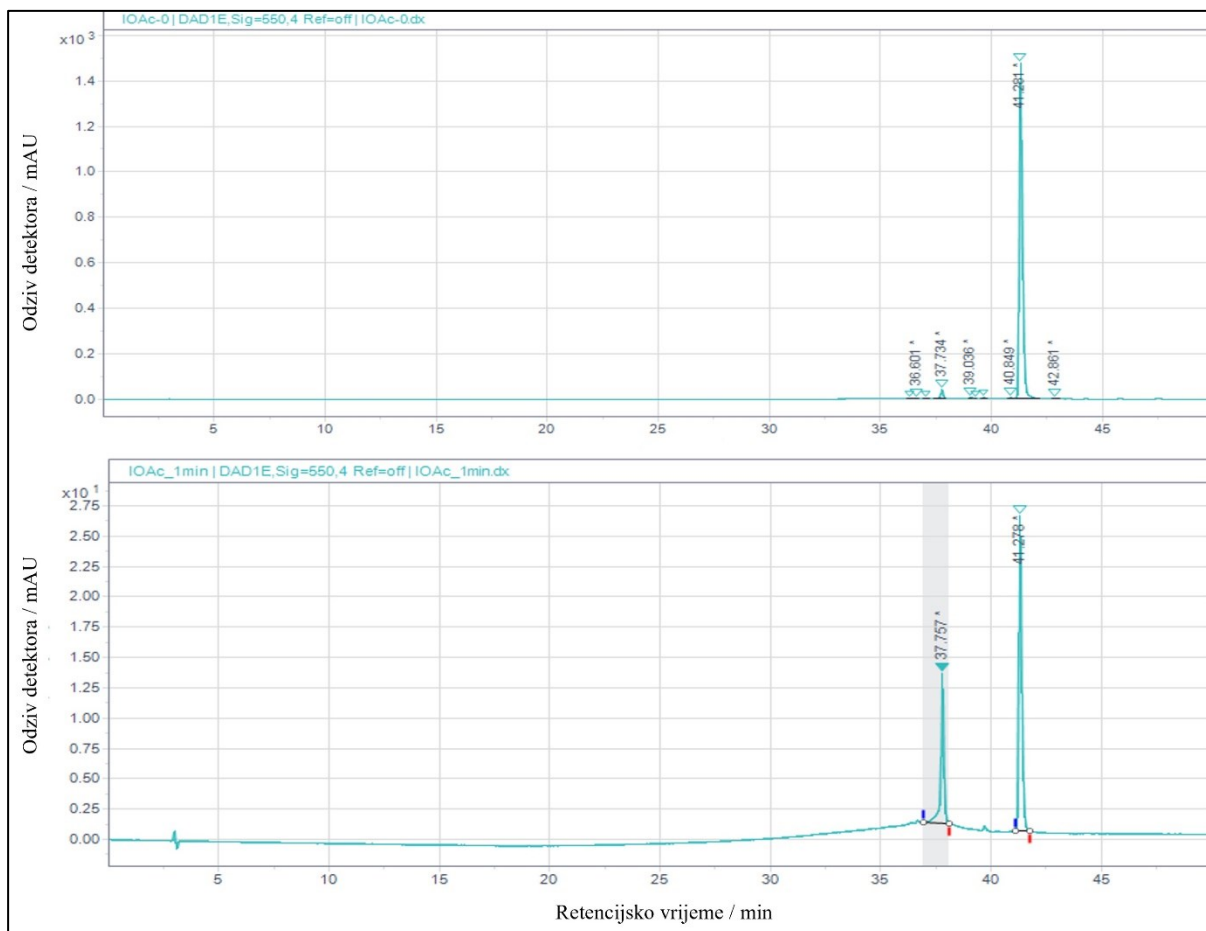


Shema 47. Pretpostavljena fotokemijska reakcija spojeva **5** i **6** ozračenih vidljivim svjetlom.

Treba napomenuti kako je ovo samo pretpostavljeni mehanizam reakcije nastanka fotoprodukata budući da su količine sintetiziranih fotokaveza **5–8** kojima je izvedeno ozračivanje bile nedovoljne za preparativna ozračivanja uz izolaciju fotoprodukata i njihovu potpunu karakterizaciju tehnikama NMR. Pokušaj analize ozračenih smjese HPLC-MS analizom također nije bio uspješan. Iako su s DAD detektorom vide signali, ESI tehnika ionizacije za navedene spojeve nije dobra te njihovi maseni spektri nisu dobiveni. Međutim, HPLC analiza ozračenih otopina ukazuje na relativno učinkovite i selektivne fotokemijske reakcije. U kromatogramima uočena su dva karakteristična signala, od kojih jedan odgovara početnim fotokavezima **5–8**, a drugi nastalom fotoproduktu (slika 5). Pretpostavljamo da su detektirani fotoprodutki **11**, ali za sada nemamo za to dokaza.

Uočeno je i kako količina nastalog fotoprodukta raste s duljim vremenom ozračivanja, a pokazali smo i da novi produkti nisu rezultat termičke reakcije jer stajanjem otopina u mraku ne dolazi do promjena. Nakon jedne minute ozračivanja ( $c = 0,66 \text{ mg mL}^{-1}$ , jedna „cool white“ lampa od 8 W), konverzija reaktanata u produkte iznosila je oko 50 % za spojeve **6 i 8** te oko 30 % za spojeve **5 i 7**. Pretpostavka je da je fotoreakcija iznimno učinkovita zbog uvedenog halogenog atoma na položaje 2 i 6 BODIPY jezgre.

Koristeći željezov oksalat kao aktinometar,<sup>66,67</sup> pokušali smo izmjeriti kvantne prinose fotokemijskih reakcija za spojeve **5–8**. Međutim, kako smo za ozračivanje koristili lampe koje emitiraju široki spektar vidljive svjetlosti, vrijednosti treba uzeti samo kao relativnu usporedbu jer se kvantni prinosi definiraju za monokromatsko zračenje. Osim toga, kvantni prinos aktinometra na  $\lambda > 500 \text{ nm}$  ovisi o valnoj duljini te smo uzeli vrijednost  $\Phi_{\text{lit}} = 0,53^{66}$  koja odgovara zračenju 530 nm gdje BODIPY kavezi 5-8 imaju maksimume apsorpcije. Tako su izmjerene vrijednosti  $\Phi_r = 0,35$  za spoj **5**,  $\Phi_r = 0,98$  za spoj **6** te  $\Phi_r = 0,65$  za spoj **7**. Za spoj **8** konverzija reaktanata u fotoprodukte bila je iznimno visoka te nije bilo moguće precizno odrediti kvantni prinos reakcije. Za precizno određivanje kvantnih prinosa potrebno je ponoviti mjerenja uz korištenje monokromatskog izvora zračenja na oko 530 nm. Međutim, svakako se može komentirati da nehalogenirani analog **4** puno manje učinkovito reagira pri istim uvjetima ozračivanja. U nastavku istraživanja potrebno će biti sintetizirati i veće količine fotokaveza **5–8** te provesti njihove fotokemijske reakcije u većim količinama što će omogućiti izolaciju i karakterizaciju fotoprodukata.



Slika 5. HPLC kromatogram otopine spoja **7** u  $\text{CH}_3\text{OH}$  prije ozračivanja vidljivim svjetlom (gore) i nakon provedenog ozračivanja od jedne minute vidljivim svjetlom (dolje).

#### 4.4. Laserska pulsna fotoliza<sup>2</sup>

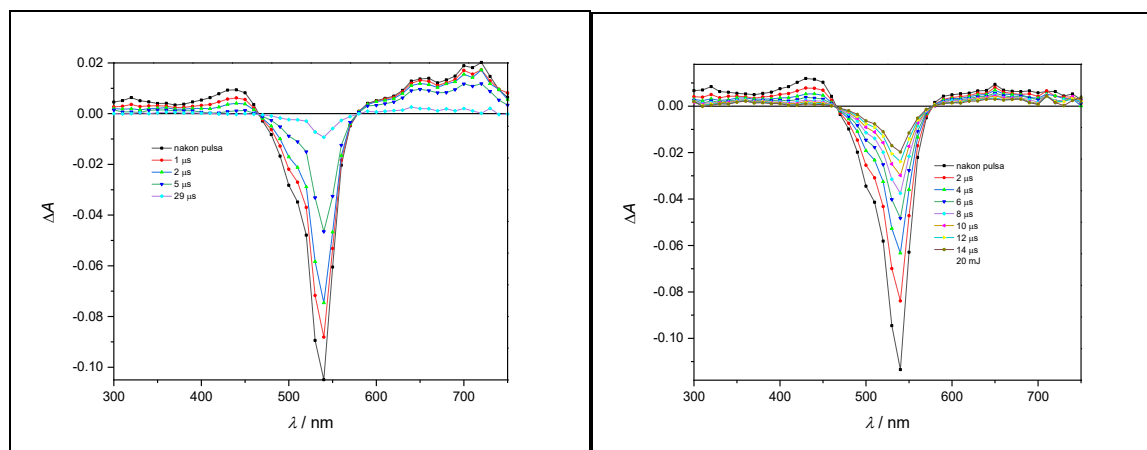
Kako bi detektirali tripletna pobuđena stanja za spojeve **5-8** te druge eventualne međuprodukte u njihovoj fotokemiji, kao što su QM, provedeni su eksperimenti laserske pulsne fotolize (LFP). Uzorci su pobuđivani drugim harmonikom Nd:YAG lasera na 532 nm, a mjerenja su provedena u CH<sub>3</sub>CN otopinama koje su bile propuhane s N<sub>2</sub> ili O<sub>2</sub>, pri čemu se očekuje da O<sub>2</sub> gasi tripletna pobuđena stanja i radikale, ali ne karbokatione i QM.

U N<sub>2</sub>-propuhanim otopinama sva četiri spoja detektiran je tranzijent koji apsorbira u cijelom vidljivom području s maksimumima na oko 490 i 660 nm. Primjer tranzijentnih spektara za spojeve **5** i **7** nalazi se na slici 6. Kako se tranzijent gasi s kisikom s konstantom brzine reda veličine  $k = 1.8-1.9 \times 10^9 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , detektirane čestice pripisane su tripletnim pobuđenim stanjima molekula, odnosno detektirana je triplet-tripletna apsorpcija tih spojeva. Podatci dobiveni LFP-om sumirani su u tablici 3. Asignacija je i u skladu s literaturnim podacima za tripletna pobuđena stanja BODIPY spojeva.<sup>78</sup>

Osim signala tripleta u tranzijentnim apsorpcijskim spektrima primijećen je i negativni signal na 450-550 nm, koji je nastao zbog privremenog smanjenja koncentracije spoja u osnovnom stanju uslijed nastajanja međuprodukata (engl. *reversible bleach*). Potrebno je napomenuti da *bleach* signal ne iščezava u potpunosti, što znači da spoj podliježe kemijskoj reakciji dajući produkte. Nadalje, kinetika nestajanja *bleach* signala ne može se opisati monoeksponencijalnom funkcijom, što znači da osim tripleta spojeva **5-8** nastaju i drugi, duže živeći međuprodukti. Tako se u spektru spoja **7**, ali ne i u spektru spoja **5** može vidjeti tranzijentna apsorpcija na oko 360 nm. Kinetika nestajanja tog signala na 360 nm opisuje se sumom dva eksponenta s vremenima života  $\approx 14$  i  $\approx 240 \mu\text{s}$ . Dugo-živeći tranzijent koji apsorbira na oko 360 nm te ima vrijeme života od 240  $\mu\text{s}$ , a moguće ga je detektirati iz spoja **7**, (ali ne i iz spoja **5**), mogao bi se pripisati QM. Asignacija je temeljena na usporedbi s poznatim podacima za analogni QM,<sup>79</sup> međutim potrebno bi bilo provesti eksperimente gašenja s poznatim gasiocima. Nažalost, intenzitet tranzijentne apsorpcije koji bi se mogao pripisati tom međuproduktu premalen je za eksperimente gašenja i precizno određivanje kinetike nestajanja.

---

<sup>2</sup> Eksperimente laserske pulsne fotolize provela je dr. sc. Iva Džeba na Institutu Ruđer Bošković.



Slika 6. Tranzijentni apsorpcijski spektri BODIPY spojeva **5** (lijevo) i **7** (desno) u  $N_2$ -propuhanoj otopini  $CH_3CN$ . Otopine su imale istu apsorbanciju,  $A_{532} = 0.32$ , dok je snaga laserskog pulsa bila 20 mJ.

Tablica 3. Svojstva tripletnog pobuđenog stanja spojeva **5-8** u  $CH_3CN$  dobivena LFP mjerenjima.

Spoj	$\tau_T / \mu s$ <sup>a</sup>	$k_q(O_2) / dm^3 mol^{-1} s^{-1}$ <sup>b</sup>	$\tau_{int} / \mu s$ <sup>c</sup>
<b>5</b>	$4.6 \pm 0.6$	-	$\approx 20$ (360 nm)
<b>6</b>	$7.9 \pm 0.5$	$1.9 \times 10^9$	$\approx 170$ (530 nm)
<b>7</b>	$3.80 \pm 0.09$	$1.8 \times 10^9$	$12 \pm 2$ (610 nm) $\approx 250$ (360 nm)
<b>8</b>	$4.6 \pm 0.3$	$1.8 \times 10^9$	$70 \pm 30$ (610 nm)

<sup>a</sup> Vrijeme života tripletnog pobuđenog stanja u  $N_2$ -propuhanoj otopini  $CH_3CN$ . <sup>b</sup> Konstanta brzine gašenja s kisikom. <sup>c</sup> Vrijeme života dugo-živućeg tranzijenta; valna duljina detekcije navedena je u zagradi.

#### 4.5. Antiproliferativna ispitivanja

Antiproliferativna ispitivanja spojeva **5–8** *in vitro* provedena su u Laboratoriju za eksperimentalnu terapiju u Zavodu za molekularnu medicinu Instituta Ruđer Bošković. Eksperimente je provela grupa na čelu s dr. sc. Marijetom Kralj.

Cilj istraživanja bio je istražiti utjecaj pripremljenih halogeniranih BODIPY fotokaveza na rast ljudskih tumorskih stanica MCF-7 (karcinom dojke), HCT 116 (karcinom debelog crijeva) te H460 (karcinom pluća). Nakon dodatka priređenih spojeva u kulture stanica, jedan set uzoraka čuvan je u mraku dok je na drugom setu provedeno ozračivanje vidljivim svjetlom. Za svaki spoj provedena su barem dva eksperimenta. Izračunate su koncentracije spojeva **5–8** koje uzrokuju 50 % inhibicije rasta stanica ( $GI_{50}$ ) i prikazane su u tablici 4.

Tablica 4. Rezultati antiproliferativnih ispitivanja spojeva **5–8** na kulturama tumorskih stanica MCF-7, H460 i HCT 116.

$GI_{50} / \mu\text{mol dm}^{-3}$						
Stanice						
Spoj	MCF-7		H460		HCT 116	
	neozračeno	ozračeno Vis 3×15 min	neozračeno	ozračeno Vis 3×15 min	neozračeno	ozračeno Vis 3×15 min
<b>5</b>	27±6	0,13±0,03	53±19	0,18±0,02	37±10	0,13±0,02
<b>6</b>	17±3	0,23±0,04	69±12	0,6±0,3	26±9	0,4±0,1
<b>7</b>	63±36	0,17±0,01	≥100	0,25±0,01	≥100	0,18±0,02
<b>8</b>	18±4	0,17±0,01	33±5	0,19±0,01	25±0,4	0,16±0,04

Iz prikazanih rezultata vidljivo je kako su  $GI_{50}$  spojeva **5–8** znatno veće u slučaju uzoraka čuvanih u mraku. Nakon ozračivanja uzoraka znatno se smanjuje  $GI_{50}$  za ispitivane spojeve. Posebno je zanimljiv spoj **7** koji uopće nije citotoksičan za kulture tumorskih stanica H460 i HCT 116. Nakon ozračivanja vidljivim svjetlom efekt povećanja citotoksičnosti veći je od 100 puta. Dobiveni rezultati ukazuju na potencijalnu primjenivost ovih spojeva u medicinskoj kemiji i razvoju novih fotofarmaceutika.

## § 5. ZAKLJUČAK

U sklopu ovog diplomskog rada provedena je sinteza halogeniranih BODIPY fotokaveza: 4,4-dimetil-8- $\{[(2\text{-hidroksimetil})\text{fenoksi}]\text{metil}\}$ -2,6-dijod-1,3,5,7-tetrametil-4-bora-3a,4a-diaza-*s*-indacena (**5**), 4,4-dimetil-8- $\{[(2\text{-hidroksimetil})\text{fenoksi}]\text{metil}\}$ -2,6-dibrom-1,3,5,7-tetrametil-4-bora-3a,4a-diaza-*s*-indacena (**6**), 4,4-dimetil-8- $\{[(2\text{-acetoksimetil})\text{fenoksi}]\text{metil}\}$ -2,6-dijod-1,3,5,7-tetrametil-4-bora-3a,4a-diaza-*s*-indacena (**7**) i 4,4-dimetil-8- $\{[(2\text{-acetoksimetil})\text{fenoksi}]\text{metil}\}$ -2,6-dibrom-1,3,5,7-tetrametil-4-bora-3a,4a-diaza-*s*-indacena (**8**). Sinteza spojeva uključivala je pripremu početne BODIPY jezgre, njenu metilaciju Grignardovim reagensom, uvođenje prekursora QM na *meso* položaj BODIPY jezgre te u konačnici halogeniranje samog fotokaveza  $\text{S}_{\text{E}}\text{Ar}$  reakcijom korištenjem NIS ili NBS. Priređeni spojevi okarakterizirani su  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR spektroskopijom te su im snimljeni HRMS spektri.

Spojevima **5–8** ispitana su fotofizička svojstva spektroskopskim metodama. UV/Vis metodom određeni su molarni apsorpcijski koeficijenti spojeva pri maksimumu apsorpcije. Uvođenjem atoma halogena u molekulu vidljiv je batokromni pomak maksimuma apsorpcije. Određeni su i kvantni prinosi fluorescencije ( $\Phi_{\text{f}}$ ) te je uočeno da spojevi u koje je uveden jod na položaje 2,6 BODIPY jezgre pokazuju znatno manje vrijednosti  $\Phi_{\text{f}}$ , što vjerojatno potječe od efekta teškog atoma. Također, pokazali smo kako se konstanta brzine deaktivacije bez zračenja povećava uvođenjem halogena na položaje 2,6 BODIPY jezgre što ukazuje na povećanje učinkovitosti međusustavnog križanja (ISC) i populacije tripletnog pobuđenog stanja.

Fotokemijska reaktivnost spojeva istražena je reakcijom fotosolvolize u metanolu nakon ozračivanja vidljivim svjetlom. Reakcija je praćena HPLC-om, ali zbog malih količina fotoprodukti nisu izolirani. Međutim, pretpostavljamo da nastaju metoksi produkti nukleofilnog napada metanola na BODIPY karbokation. Pomoću aktinometra izračunati su kvantni prinosi reakcije. Nadalje, pretpostavljamo da do heterolize i nastajanja karbokationa dolazi preko tripletnih pobuđenih stanja koja su detektirana s LFP.

Ispitana su i antiproliferativna svojstva priređenih spojeva te su im određene  $\text{GI}_{50}$  vrijednosti na kulture ljudskih stanica karcinoma dojke, pluća i debelog crijeva. Uočeno je da spojevi pokazuju znatno veću citotoksičnost nakon ozračivanja vidljivim svjetlom. Posebno je zanimljiv spoj **7** koji neozračen ne pokazuje citotoksična svojstva na stanice H460 i HCT 116,



a nakon ozračivanja dovoljne su vrlo male koncentracije kako bi se rast stanica inhibirao, što ga čini potencijalnim vodećim spojem za razvoj fototerapeutika.

## § 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA

*A* – apsorbancija

AMP – adenzin monofosfat

ATP – adenzin trifosfat

BODIPY – 4-bora-3a,4a-diaza-*s*-indaceni

cAMP – ciklički AMP

DCM – diklormetan

dN – deoksinukleozid

DNA – deoksiribonukleinska kiselina

EDG – elektron-donirajuća skupina (engl. *electron donor group*)

eT – prijenos elektrona

GI<sub>50</sub> – koncentracija spoja koja uzrokuje 50 % inhibicije rasta kulture stanica

HOMO – popunjena molekularna orbitala najveće energije (engl. *highest occupied molecular orbital*)

HPLC – tekućinska kromatografija visoke dijelovitosti (engl. *high performance liquid chromatography*)

HRMS – spektrometrija masa visoke rezolucije (engl. *high resolution mass spectrometry*)

IC – unutarnja konverzija (engl. *internal conversion*)

ISC – međusustavno križanje (engl. *intersystem crossing*)

LFP – laserska pulsna fotoliza (engl. *laser flash photolysis*)

LG – izlazna skupina (engl. *leaving group*)

LLCT – prijenos naboja s liganda na ligand (engl. *ligand-ligand charge transfer*)

LMCT – prijenos naboja s liganda na metal (engl. *ligand-metal charge transfer*)

LUMO – nepopunjena molekulska orbitala najniže energije (engl. *lowest unoccupied molecular orbital*)

TOF MS – spektrometrija masa – vrijeme leta (engl. *time of flight mass spectrometry*)

MALDI – matricom potpomognuta ionizacija uz desorpciju laserskim zračenjem (engl. *matrix assisted laser desorption/ionization*)

MLCT – prijenos naboja s metala na ligand (engl. *metal-ligand charge transfer*)

NIR – blisko infracrveno zračenje

NMR – nuklearna magnetska rezonancija

NXS – *N*-halogensuksinimid

PeT – fotonom induciran prijenos elektrona

PPG – fotouklonjiva zaštitna skupina (engl. *photoremovable protective group*)

QM – kinon-metid (engl. *quinone methide*)

S<sub>n</sub> – *n*-to singletno stanje

*T* – transmitancija

TC–SPC – vremenski korelirano brojanje pojedinačnih fotona (engl. *time–correlated single photon counting*)

TEA – trietilamin

THAP/DAC – 2,4,6-trihidroxiacetofenon/*di*-amonijev citrat

TLC – tankoslojna kromatografija (engl. *thin-layer chromatography*)

TMS – trimetilsilan

T<sub>n</sub> – *n*-to tripletno stanje

UV – ultraljubičasto (engl. *ultraviolet*)

Vis – vidljivo (engl. *visible*)

Φ – kvantni prinos

## § 7. LITERATURNI IZVORI

1. Theodora W. Greene, Peter G. M. Wuts. *Greene's Protecting Groups in Organic Synthesis (4 ed.)*. John Wiley & Sons Inc., Hoboken, New Jersey, 2007, str. 1
2. P. Klán, T. Šolomek, C. G. Bochet, A. Blanc, R. Givens, M. Rubina, V. Popik, A. Kostikov, J. Wirz, *Chem. Rev.* **113** (2013) 119–191.
3. R. Weinstain, T. Slanina, D. Kand, P. Klán, *Chem. Rev.* **120** (2020) 13135–13272.
4. J. A. Bartltrop, P. Schofield, *Tetrahedron Lett.* **16** (1962) 697–699.
5. D. H. R. Barton, Y. L. Chow, A. Cox, G. W. Kirby, *Tetrahedron Lett.* **23** (1962) 1055–1057.
6. A. Patchornik, B. Amit, R. B. Woodward, *J. Am. Chem. Soc.* **92** (1970) 6333–6335.
7. J. H. Kaplan, B. III Forbush, J. F. Hoffman, *Biochemistry* **17** (1978) 1929–1935
8. P. P. Goswami, A. Syed, C. L. Beck, T. R. Albright, K. M. Mahoney, R. Unash, E. A. Smith, A. H. Winter, *J. Am. Chem. Soc.* **137** (2015) 3783–3786.
9. J. A. Peterson, C. Wijesooriya, E. J. Gehrman, K. M. Mahoney, P. P. Goswami, T. R. Albright, A. Syed, A. S. Dutton, E. A. Smith, A. H. Winter, *J. Am. Chem. Soc.* **140** (2018) 7343–7346.
10. T. Slanina, P. Shrestha, E. Palao, D. Kand, J. A. Peterson, A. S. Dutton, N. Rubinstein, R. Weinstain, A. H. Winter, P. Klán *J. Am. Chem. Soc.* **139** (2017) 15168–15175.
11. P. Shrestha, K. C. Dissanayake, E. J. Gehrman, C. S. Wijesooriya, A. Mukhopadhyay, E. A. Smith, A. H. Winter, *J. Am. Chem. Soc.* **142** (2020) 15505–15512.
12. J. A. Peterson, L. J. Fischer, E. J. Gehrman, P. Shrestha, D. Yuan, C. S. Wijesooriya, E. A. Smith, A. H. Winter, *J. Org. Chem.* **85** (2020) 5712–5717.
13. N. Basarić, K. Mlinarić-Majerski, M. Kralj, *Curr. Org. Chem.* **18** (2014) 3–18.
14. A. Banerjee, D.E. Falvey, *J. Am. Chem. Soc.* **120** (1998) 2965–2966.
15. Y.V. Il'ichev, J. Wirz, *J. Phys. Chem. A* **104** (2000) 7856–7870.
16. J. A. Barltrop, P. Schofield, *Tetrahedron Lett.* **16** (1962) 696–699.
17. J.W. Chamberlin, *J. Org. Chem.* **31** (1966) 1658–1660.
18. H.E. Zimmerman, *J. Phys. Chem. A* **102** (1998) 5616 – 5621.
19. V. Balzani, S. Campagna, Eds., *Photochemistry and Photophysics of Coordination Compounds I & II*, Springer – Verlag, Berlin, Heidelberg, 2007.

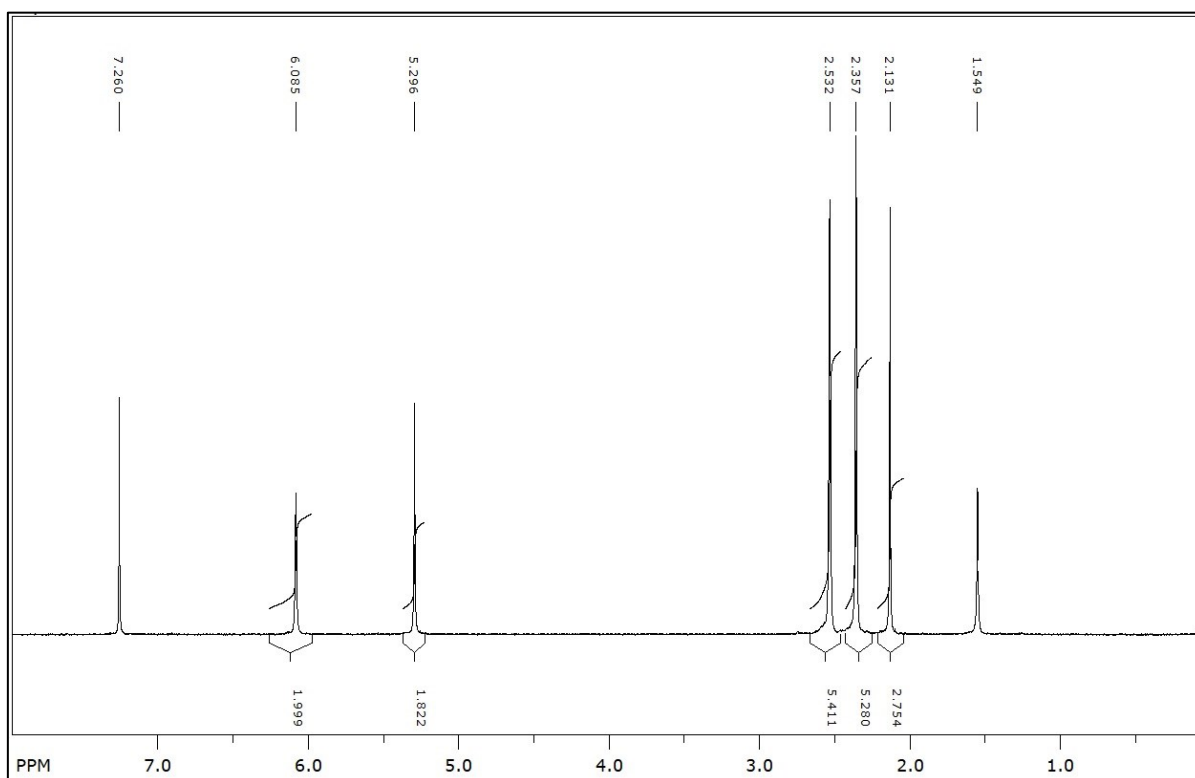
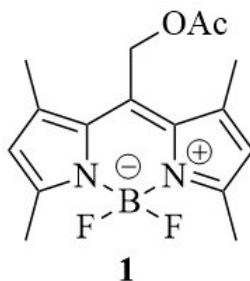
20. P.M. Kozłowski, B.D. Garabato, P. Lodowski, M. Jaworska, *Dalton Trans.* **45** (2016) 4457–4470.
21. N.A. Miller, T.E. Wiley, K.G. Spears, M. Ruetz, C. Kieninger, B. Krautler, R.J. Sension, *J. Am. Chem. Soc.* **138** (2016) 14250–14256.
22. P. Lodowski, K. Ciura, M.J. Toda, M. Jaworska, P.M. Kozłowski, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **19** (2017) 30310–30315.
23. A.R. Jones, S. Hay, J.R. Woodward, N.S. Scrutton, *J. Am. Chem. Soc.* **129** (2007) 15718–15727.
24. C. Fu, J. Xu, C. Boyer, *Chem. Commun.* **52** (2016) 7126–7129.
25. C.O. Hayes, W.K. Bell, B.R. Cassidy, C.G. Willson, *J. Org. Chem.* **80** (2015) 7530–7535.
26. K. Hull, J. Morstein, D. Trauner, *Chem. Rev.* **118** (2018) 10710–10747.
27. M.W.H. Hoorens, W. Szymanski, *Trends Biochem. Sci.* **43** (2018) 567–575.
28. F. Reessing, W. Szymanski, *Curr. Med. Chem.* **24** (2018) 4905–4950.
29. K. Hull, J. Morstein, D. Trauner, *Chem. Rev.* **118** (2018) 10710–10747.
30. D.M. Barber, S.-A. Liu, K. Gottschling, M. Sumser, M. Hollmann, D. Trauner, *Chem. Sci.* **8** (2017) 611–615.
31. M. Benstead, G.H. Mehl, R.W. Boyle, *Tetrahedron* **67** (2011) 3573–3601.
32. N. Boens, V. Leen, W. Dehaen, *Chem. Soc. Rev.* **41** (2012) 1130–1172.
33. P. Štacko, L. Muchovaa, L. Vitek, P. Klan, *Org. Lett.* **20** (2018) 4907–4911.
34. W. Lv, Y. Li, F. Li, X. Lan, Y. Zhang, L. Du, Q. Zhao, D.L. Phillips, W. Wang, *J. Am. Chem. Soc.* **141** (2019) 17482–17486.
35. M. Liu, J. Meng, W. Bao, S. Liu, W. Wei, G. Ma, Z. Tian, *ACS Appl. Bio Mater.* **2** (2019) 3068–3076.
36. E. Faggi, J. Aguilera, R. Saez, F. Pujol, J. Marquet, J. Hernando, R.M. Sebastian, *Macromolecules* **52** (2019) 2329–2339.
37. T. Šolomek, J. Wirz, P. Klan, *Acc. Chem. Res.* **48** (2015) 3064–3072.
38. W. Lv, Y. Li, F. Li, X. Lan, Y. Zhang, L. Du, Q. Zhao, D.L. Phillips, W. Wang, *J. Am. Chem. Soc.* **141** (2019) 17482–17486.
39. N. Rubinstein, P. Liu, E.W. Miller, R. Weinstain, *Chem. Commun.* **51** (2015) 6369–6372.
40. M. Blangetti, A. Fraix, L. Lazzarato, E. Marini, B. Rolando, F. Sodano, R. Fruttero, A. Gasco, S.A. Sortino, *Chem.–Eur. J.* **23** (2017) 9026–9029.

41. P. Štacko, L. Muchovaa, L. Vitek, P. Klan, *Org. Lett.* **20** (2018) 4907–4911.
42. M. Li, A.P. Dove, *Angew. Chem. Int. Ed.* **59** (2020) 2284–2288
43. P. Shrestha, K.C. Dissanayake, E.J. Gehrman, C.S. Wijesooriya, A. Mukhopadhyay, E.A. Smith, A.H. Winter, *J. Am. Chem. Soc.* **142** (2020) 15505–15512.
44. N. Umeda, H. Takahashi, M. Kamiya, T. Ueno, T. Komatsu, T. Terai, K. Hanaoka, T. Nagano, Y. Urano, *ACS Chem. Bio.* **9** (2014) 2242–2246.
45. C. S. Wijesooriya, J. A. Peterson, P. Shrestha, E. J. Gehrman, A. H. Winter, E. A. Smith, *Angew. Chem.* **57** (2018) 12685–12689.
46. A. Takeda, T. Komatsu, H. Nomura, M. Naka, N. Matsuki, Y. Ikegaya, T. Terai, T. Ueno, K. Hanaoka, T. Nagano, Y. Urano, *ChemBioChem* **17** (2016) 1233–1240.
47. Y. Zhang, N. Song, Y. Li, Z. Yang, L. Chen, T. Sun, Z. Xie, *J. Mater. Chem. B* **7** (2019) 4717–4724.
48. D. A. Bolon, *J. Org. Chem.* **35** (1970) 3666–3670.
49. G.G.-H. Qiao, K. Lenghaus, D.H. Solomon, A. Reisinger, I. Bytheway, C. Wentrup, *J. Org. Chem.* **63** (1998) 9806–9811.
50. M. Yato, T. Ohwada, K. Shudo, *J. Am. Chem. Soc.* **112** (1990) 5341–5342.
51. P. Pande, J. Shearer, J. Yang, W.A. Greenberg, S.E. Rokita, *J. Am. Chem. Soc.* **121** (1999) 6773–6779.
52. R. W. Van De Water, T.R.R. Pettus, *Tetrahedron* **58** (2002) 5367–5405.
53. P. Seiler, J. Wirz, *Tetrahedron Lett.* **12** (1971) 1683–1686.
54. K. Omura, T. Matsuura, *Tetrahedron* **27** (1971) 3101–3109.
55. M. Gomberg, *J. Am. Chem. Soc.* **35** (1913) 1035–1042.
56. T.W. Lewis, D. Y. Curtin, I.C. Paul, *J. Am. Chem. Soc.* **101** (1979) 5717–5725.
57. P. Wan, B. Chak, *J. Chem. Soc. Perkin Trans 2*, (1986) 1751–1756.
58. E. Modica, R. Zanaletti, M. Freccero, M. Mella, *J. Org. Chem.* **66** (2001) 41–52.
59. (a) S. Arumugam, J. Guo, N. E. Mbua, F. Fiscourt, N. Lin, E. Nekongo, G. J. Boons, V. V. Popik, *Chem. Sci.* **5** (2014) 1591–1598. (b) R. Pérez-Ruiz, O. Molins-Molina, E. Lence, C. González-Bello, M. A. Miranda, M. Consuelo Jiménez, *J. Org. Chem.* **83** (2018) 13019–13029.
60. J.L Bolton, S.B Turnipseed, J.A. Thompson, *Chem. Biol. Interact.* **107** (1997) 185–200.
61. I.A. McDonald, P.L. Nyce, M.J. Jung, J.S. Sabol, *Tetrahedron Lett.* **32** (1991) 887–890.
62. Jiang, J.; Zeng, D.; Li, S. *ChemBioChem.* **10** (2009) 635–638.

63. P. Pande, J. Shearer, J. Yang, W.A. Greenberg, S.E. Rokita, *J. Am. Chem. Soc.* **121** (1999) 6773–6779.
64. M. Chatterjee, S.E. Rokita, *J. Am. Chem. Soc.* **116** (1994) 1690–1697.
65. E. Rommel, J. Wirz, *Helv.* **60** (1977) 38–42.
66. M. Montalti, A. Credi, L. Prodi, M. T. Gandolfi, *Handbook of Photochemistry (4 ed.)*, CRC Press Book, 2006.
67. S. Goldstein, J. Rabani, *J. Photochem. Photobiol.* **193** (2008) 50–55.
68. N. J. Turro, V. Ramamurthy, J. C. Scaiano, *Principles of Molecular Photochemistry*, University Science Books, Sausalito, 2010.
69. J.A. Joule, K. Mills, *Heterocyclic Chemistry, Fifth Edition*, Joh Wiley & Sons Ltd, Chichester, West Sussex, 2010, str. 300–301.
70. A. Loudet, K. Burgess, *Chem. Rev.* **107** (2007) 4891–4932.
71. J. Clayden, N. Greeves, S. Warren, *Organic Chemistry (2 nd ed.)*, Oxford University Press Inc., 2012., New York, str. 348.
72. T. Rohand, M. Baruah, W. Qin, N. Boens, W. Dehaen, *Chem. Commun.* **3** (2006) 266–268.
73. T. Rohand, J. Lycoops, S. Smout, E. Braeken, M. Sliwa, M. Van der Auweraer, W. Dehaen, W. M. DeBorggraeve, N. Boens, *Photochem. Photobiol. Sci.* **6** (2007) 1061–1066.
74. N. Boens, B. Verbelen, M. J. Ortiz, L. Jiao, W. Dehaen, *Coord. Chem. Rev.* **399** (2019) 213024–213109.
75. L. Wang, J.W. Wang, A. Cui, X. Cai, Y. Wan, Q. Chen, M. Y. He, W. Zhang, K. Burgess, *RSC Adv.* **3** (2013) 9219–9222.
76. G. K. Surya Prakash, T. Mathew, D. Hoole, P. M. Esteves, Q. Wang, G. Rasul, G. A. Olah, *J. Am. Chem. Soc.* **126** (2004) 15770–15776.
77. N. Boens, V. Leen, W. Dehaen, *Chem. Soc. Rev.* **41** (2012) 1130–1172.
78. J. Zhao, K. Xu, W. Yang, Z. Wang, F. Zhong, *Chem. Soc. Rev.* **44** (2015) 8904–8939.
79. Y. Chiang, A. J. Kresge, Y. Zhu, *J. Am. Chem. Soc.* **122** (2000) 9854–9855.

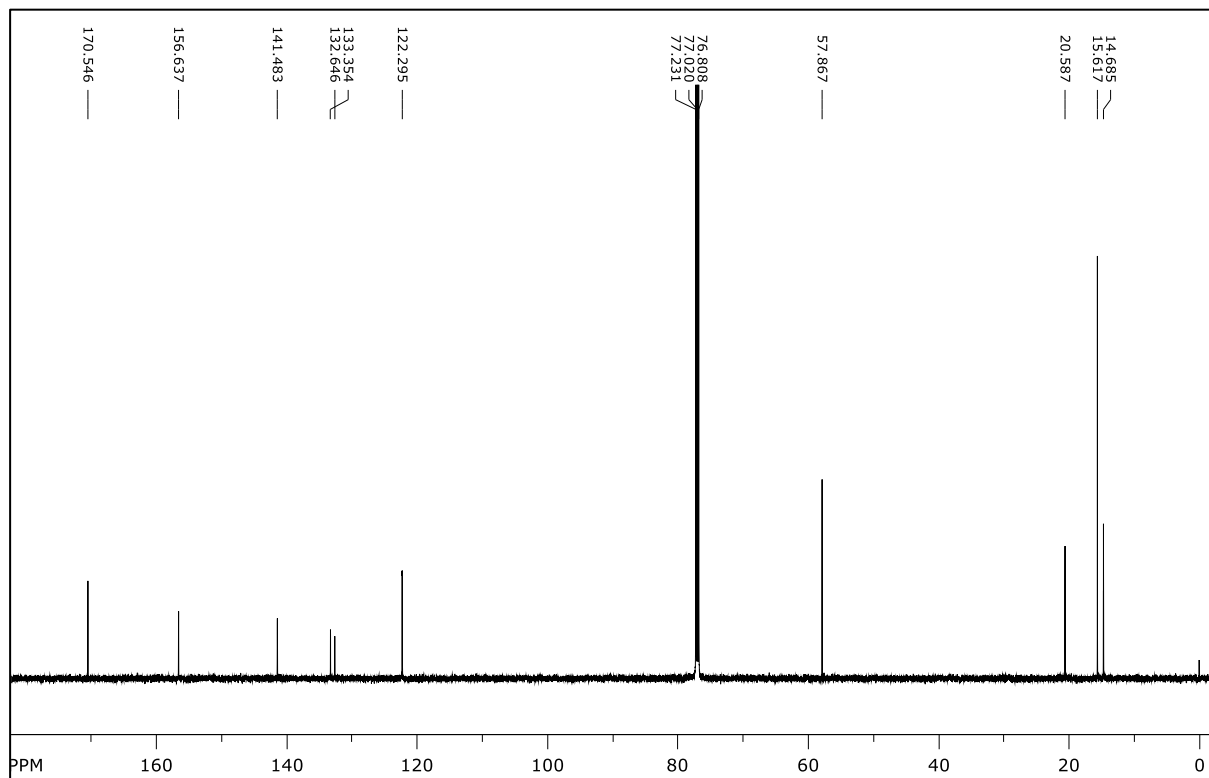
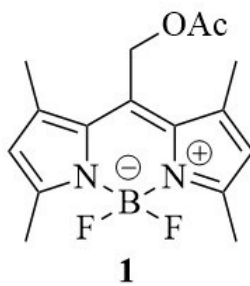
## § 8. DODATAK

### 8.1. $^1\text{H}$ i $^{13}\text{C}$ NMR

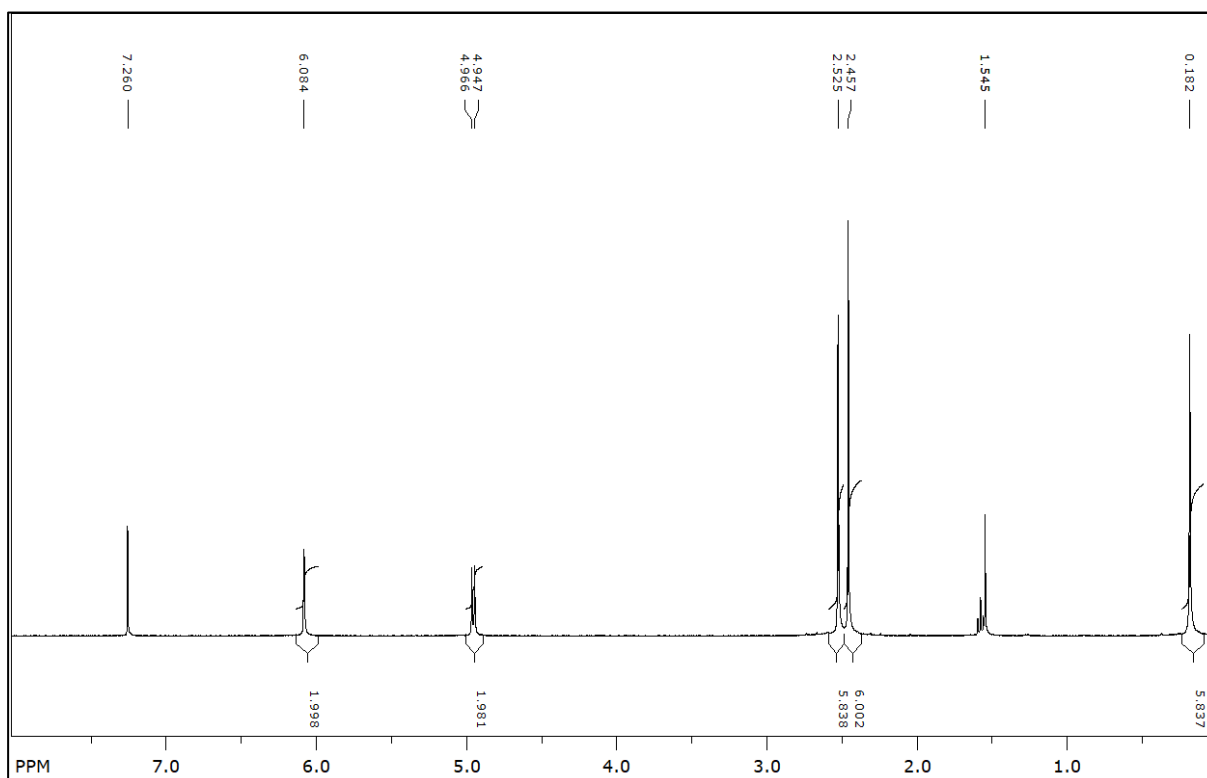
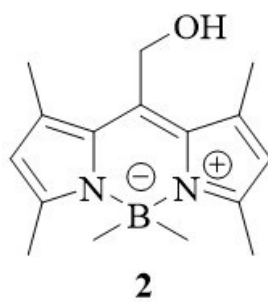


Slika D1.  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz) spektar spoja **1**.

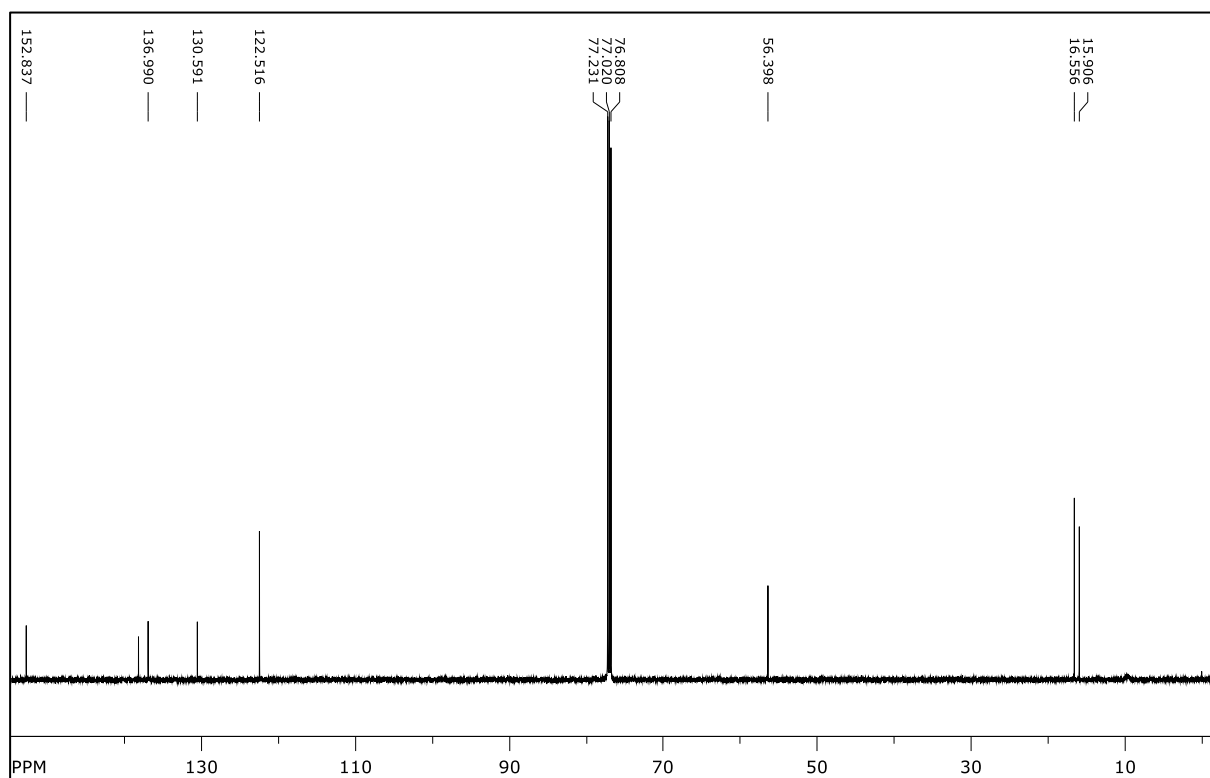
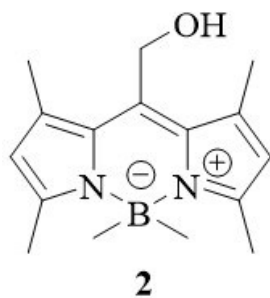




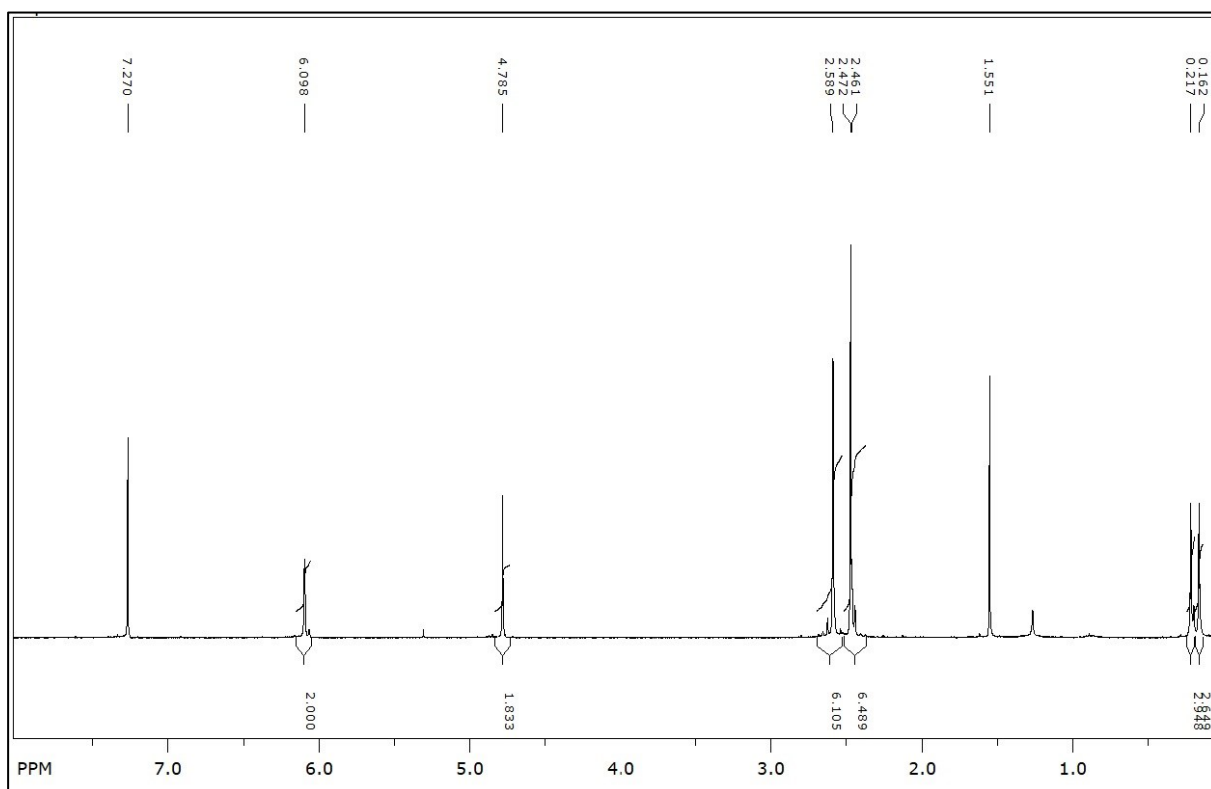
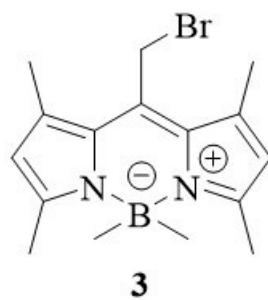
Slika D2.  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 150 MHz) spektar spoja **1**.



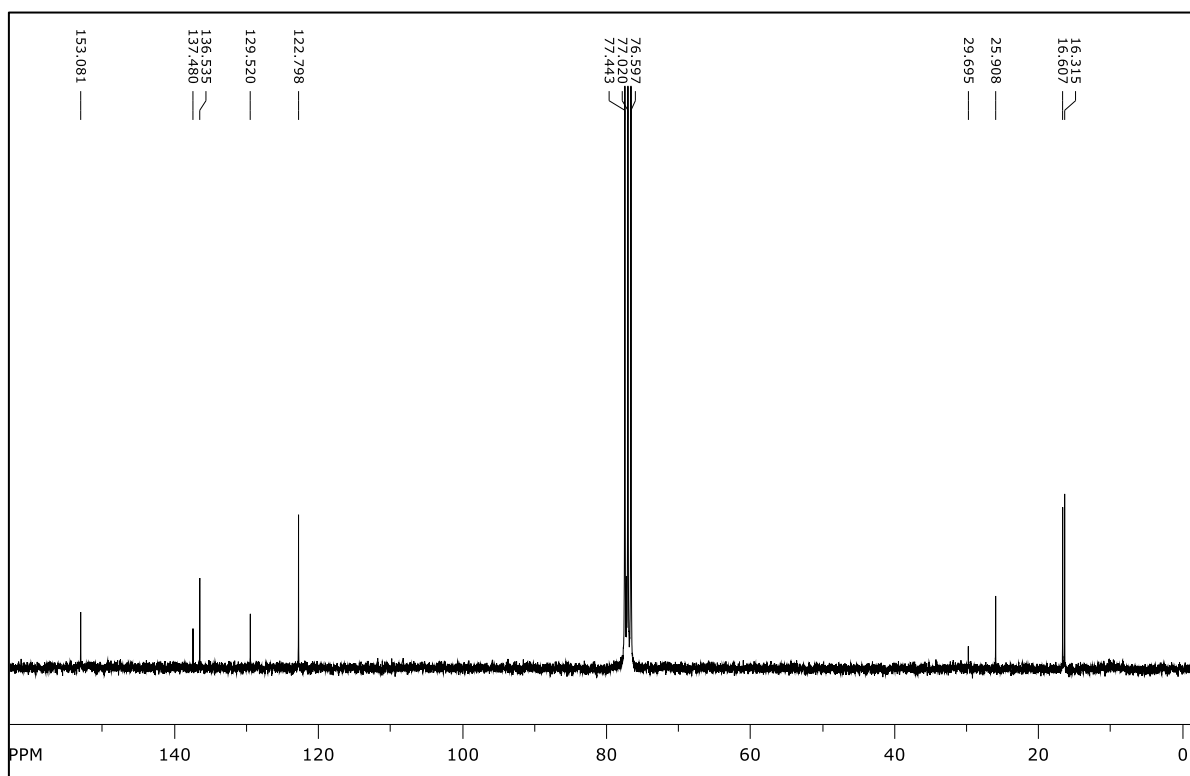
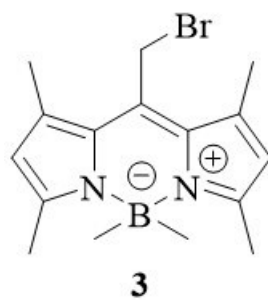
Slika D3.  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz) spektar spoja **2**.



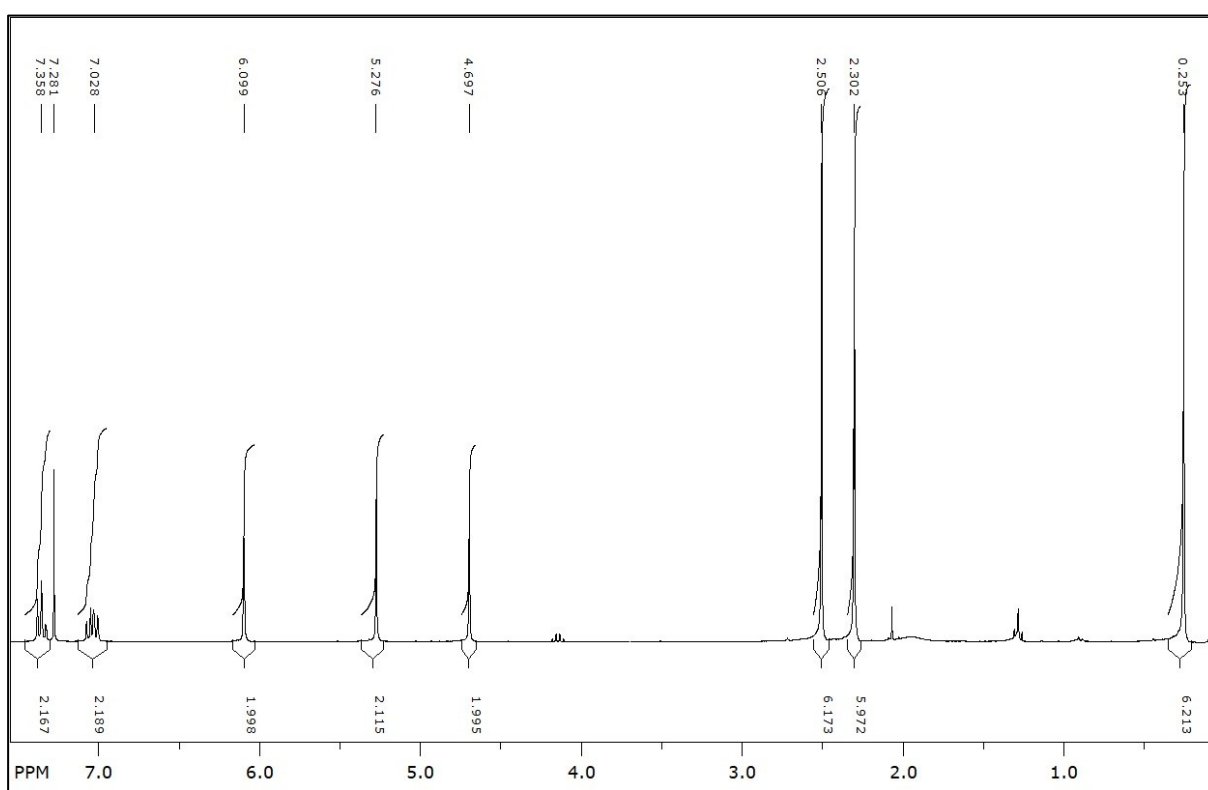
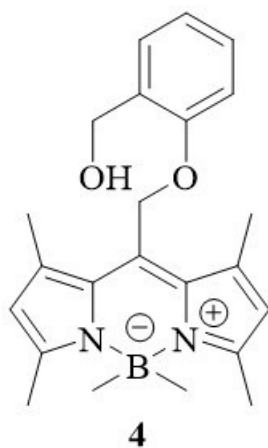
Slika D4.  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 150 MHz) spektar spoja **2**.



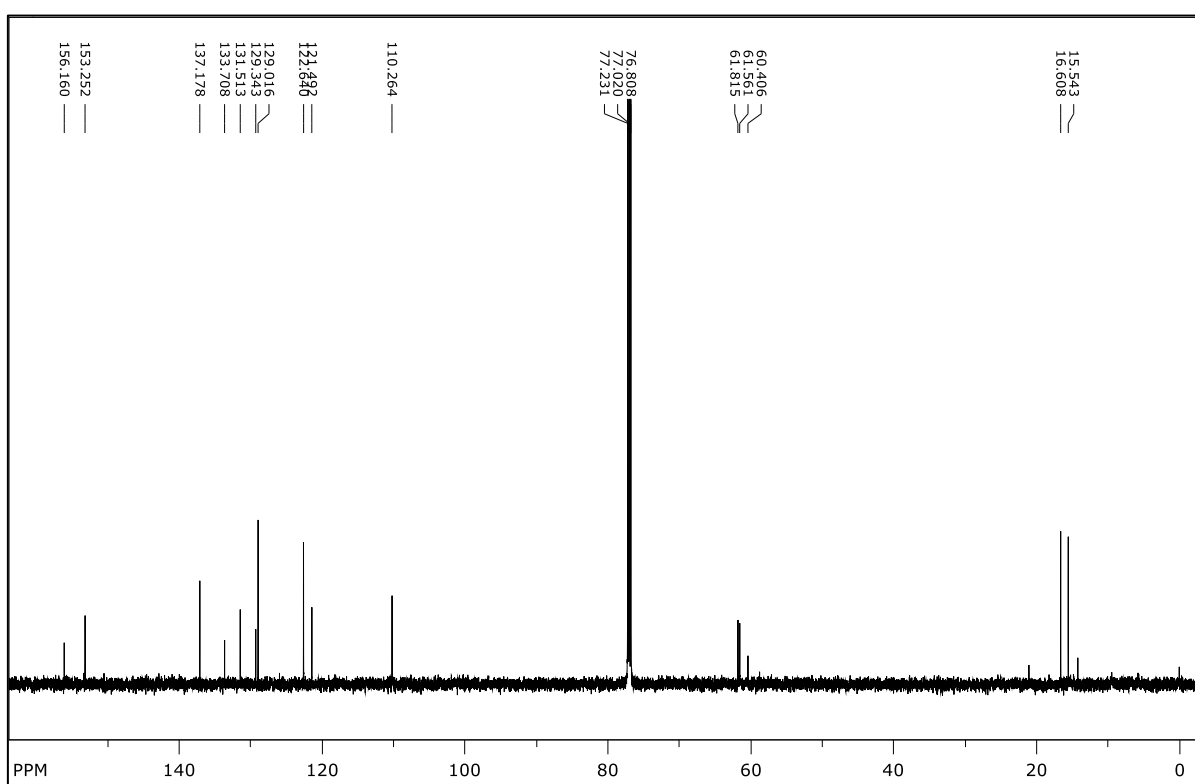
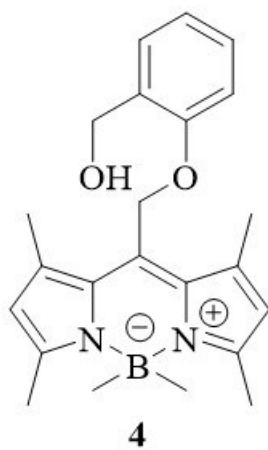
Slika D5.  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz) spektar spoja **3**.



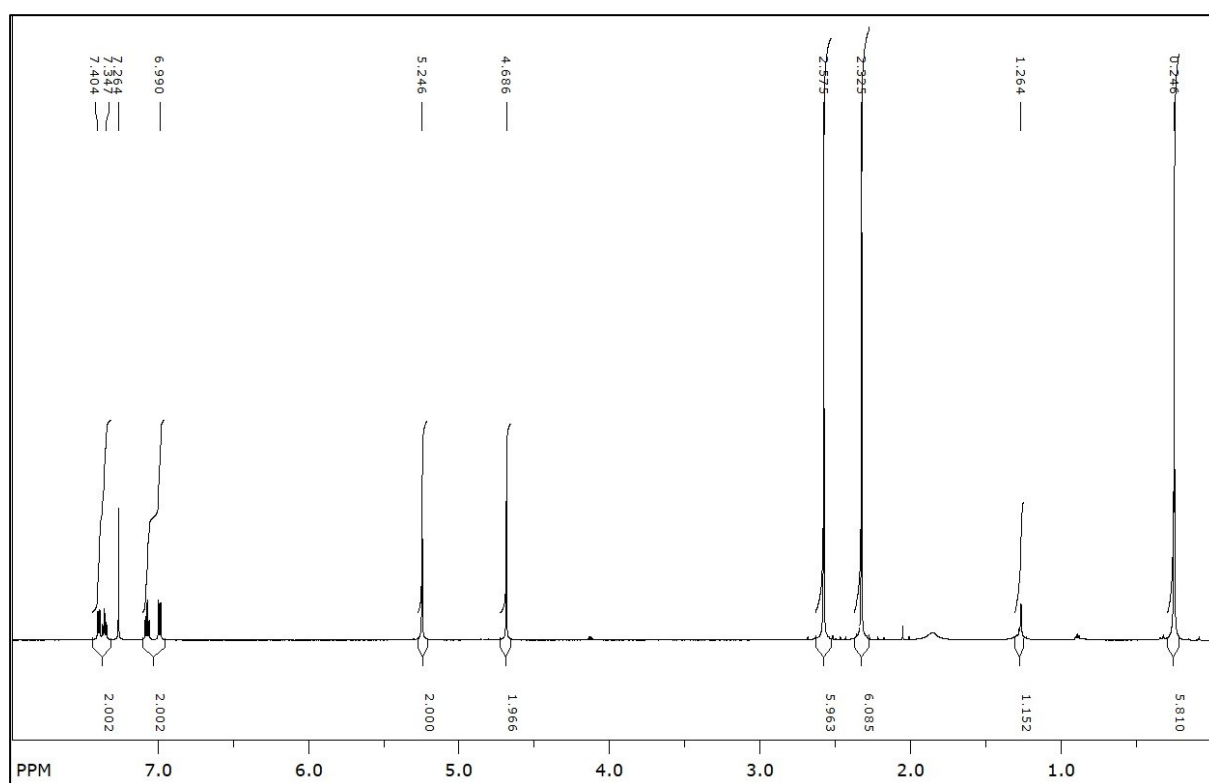
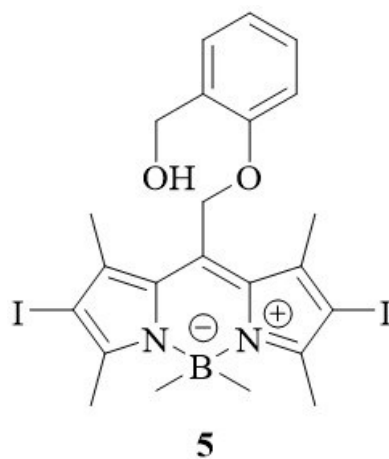
Slika D6.  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz) spektar spoja **3**.



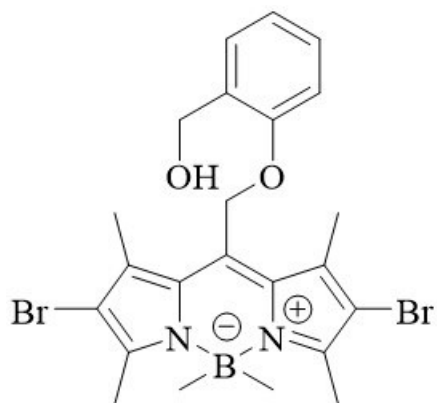
Slika D7.  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz) spektar spoja **4**.



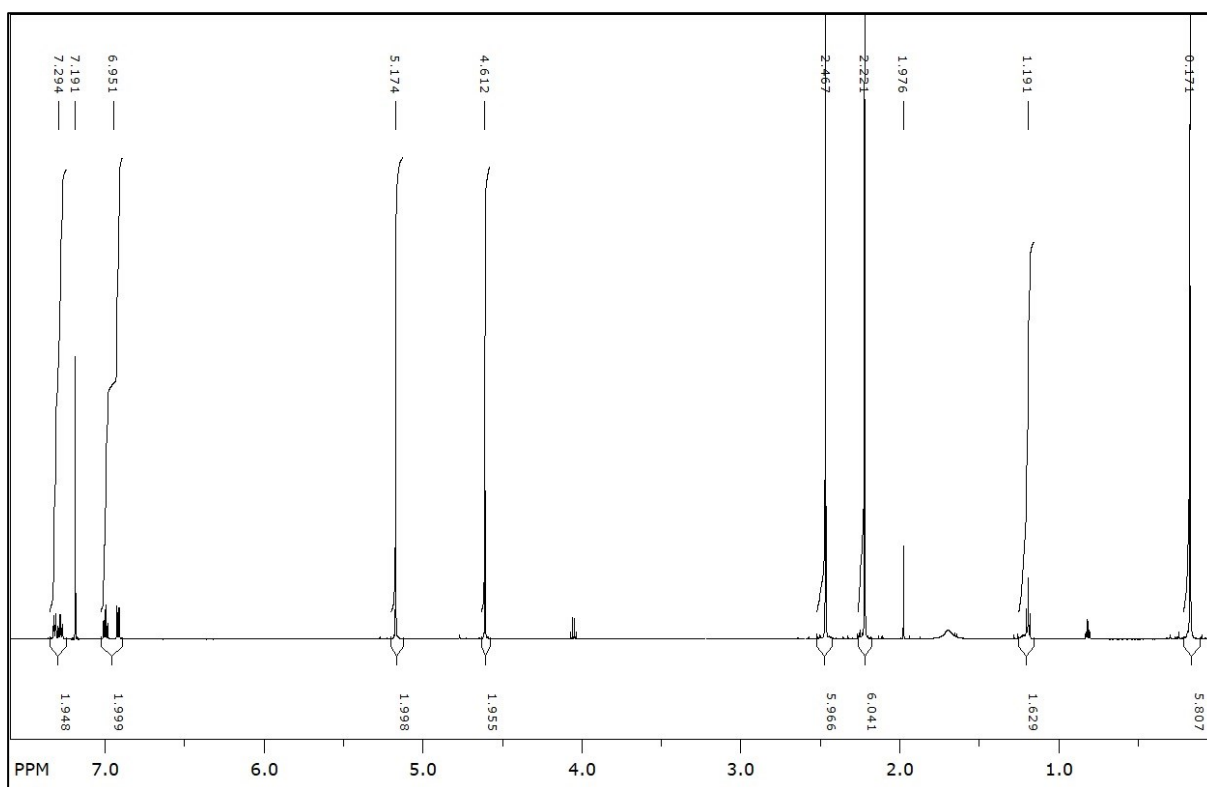
Slika D8.  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 150 MHz) spektar spoja 4.

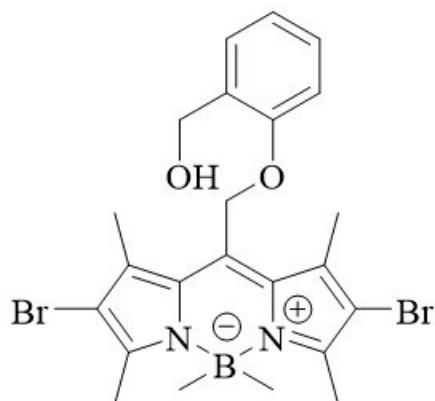
Slika D9.  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz) spektar spoja **5**.



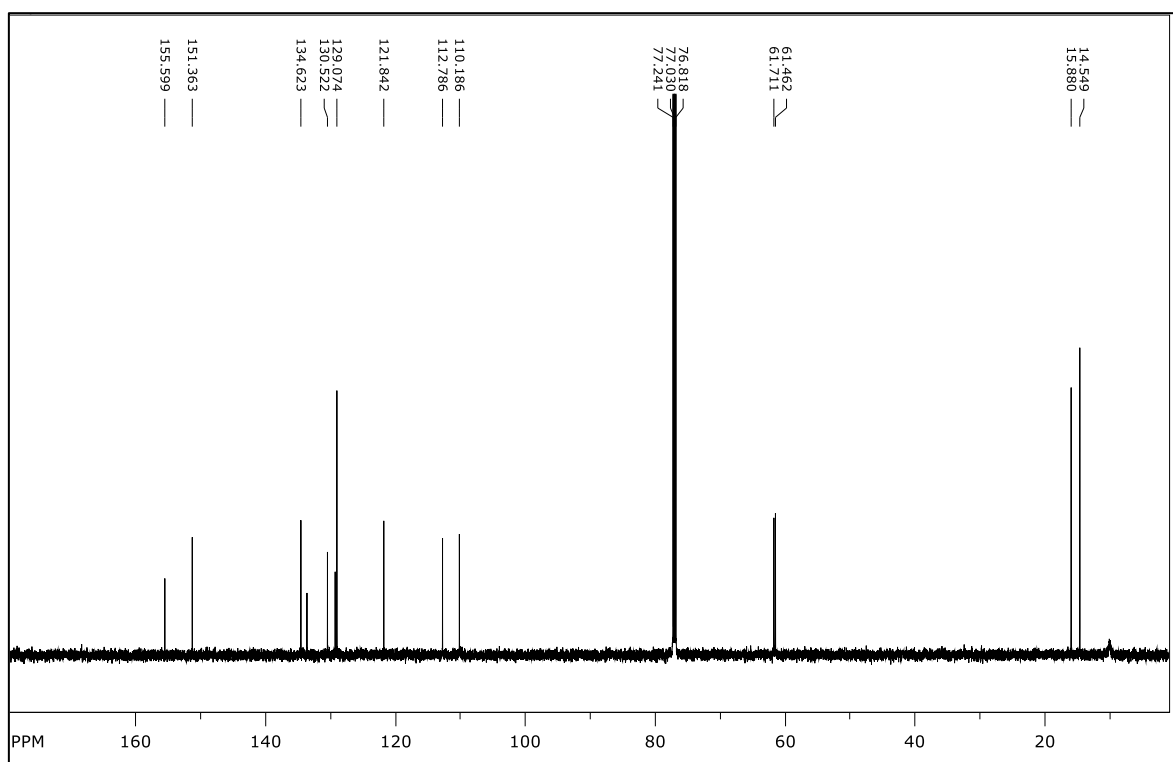


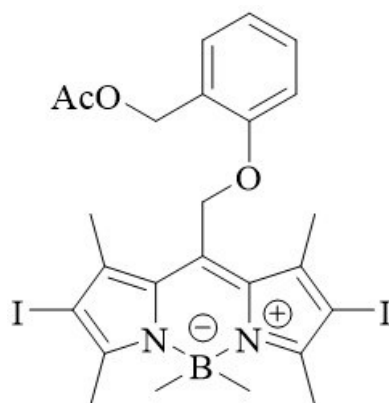
6

Slika D11.  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz) spektar spoja 6.

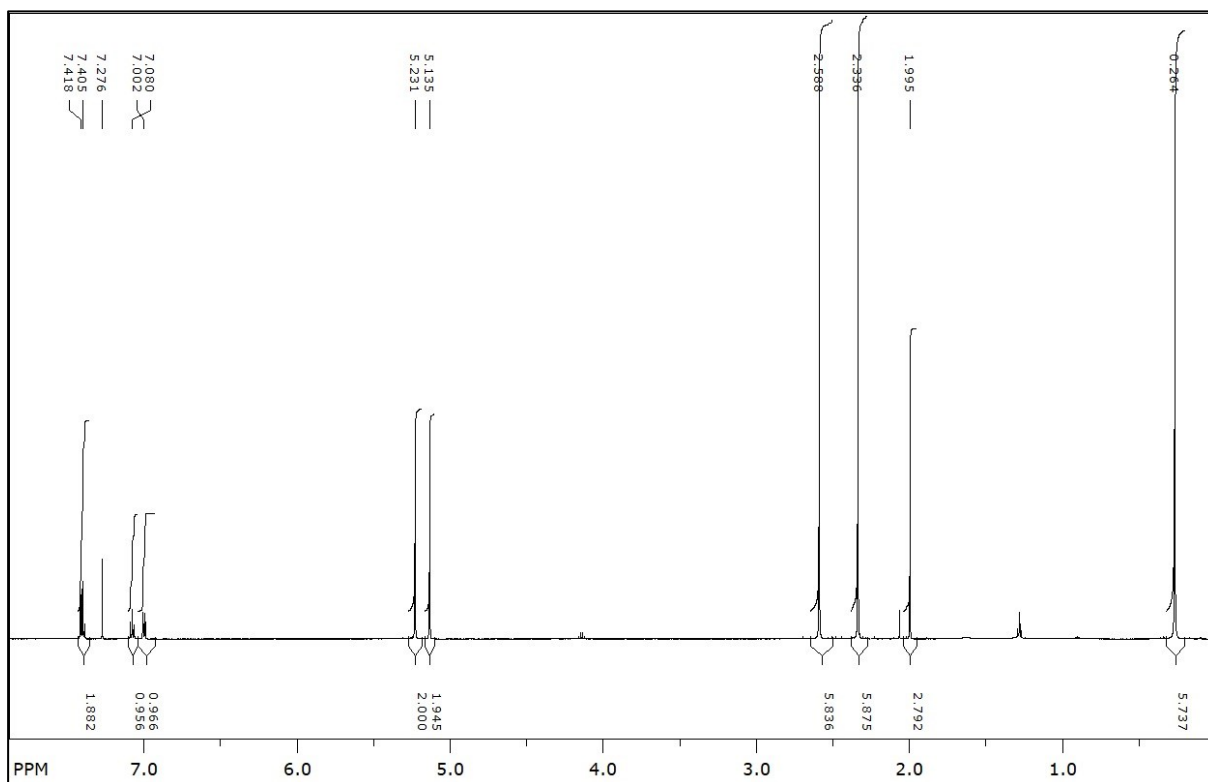


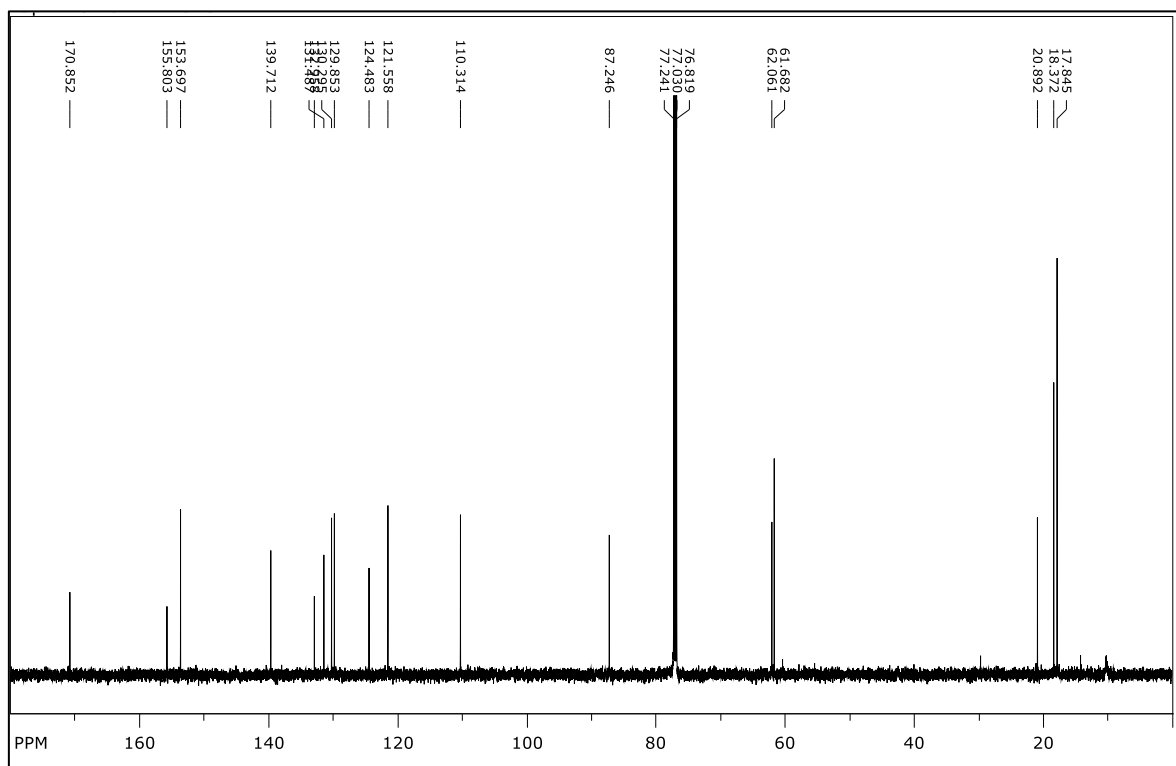
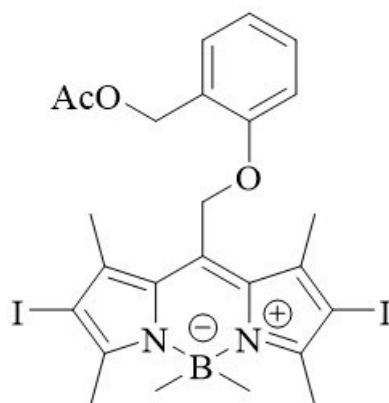
6

Slika D12.  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 150 MHz) spektar spoja 6.

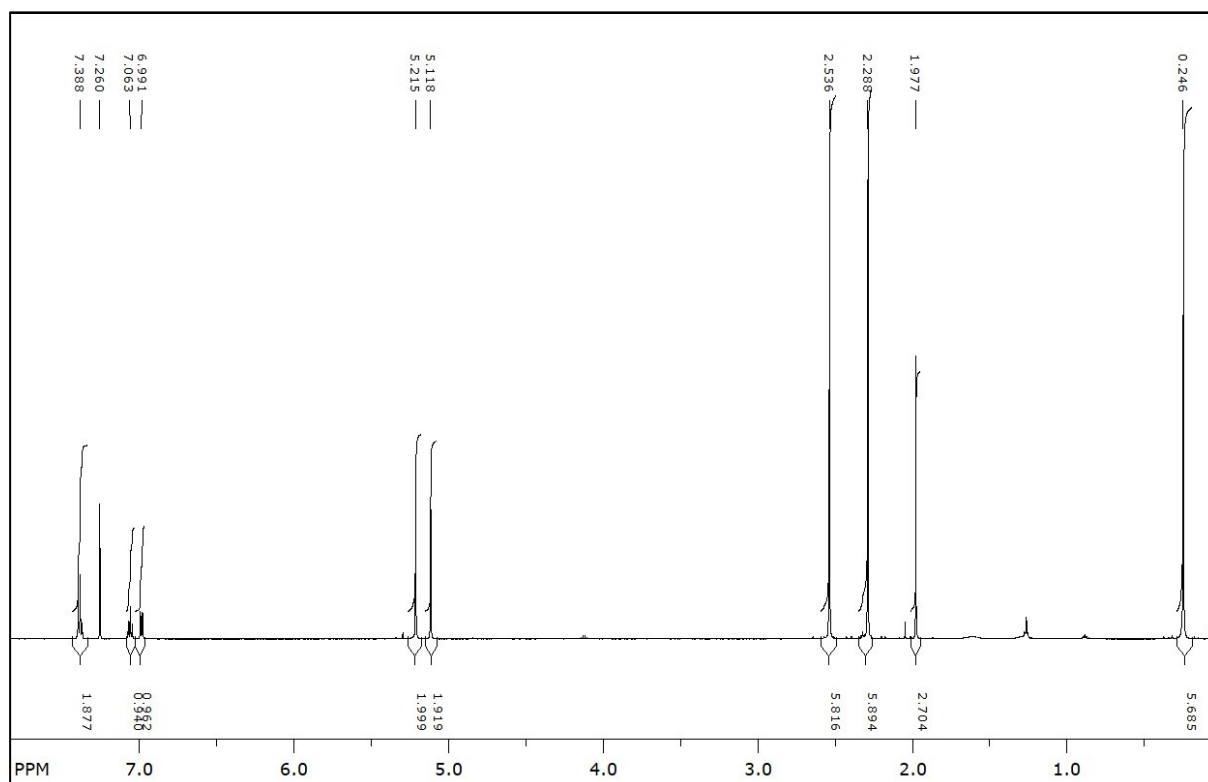
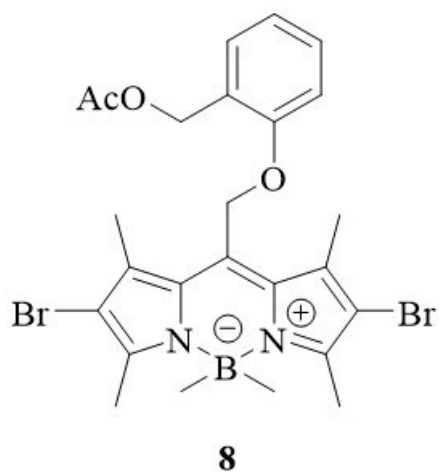


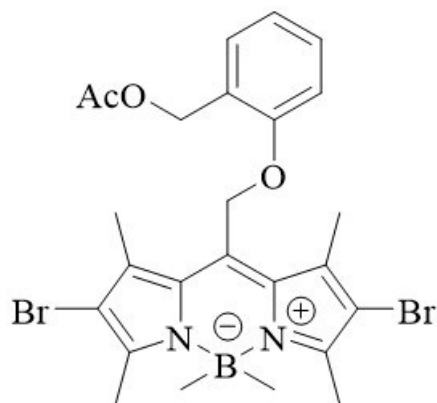
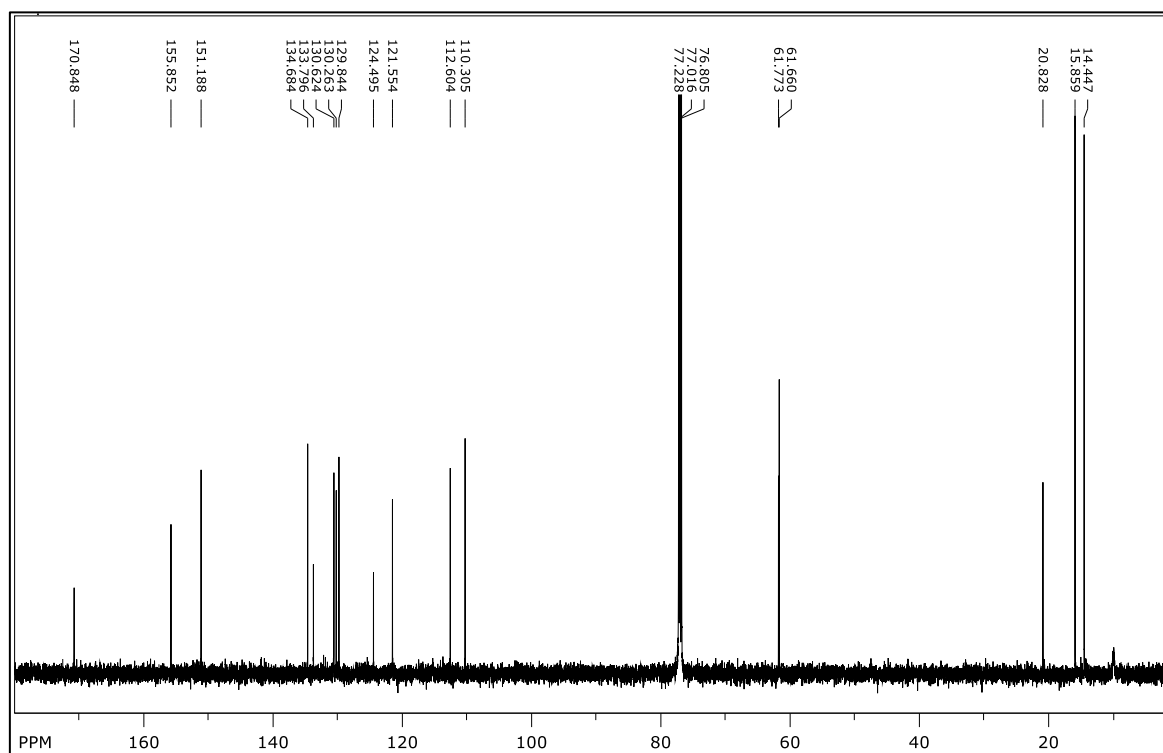
7

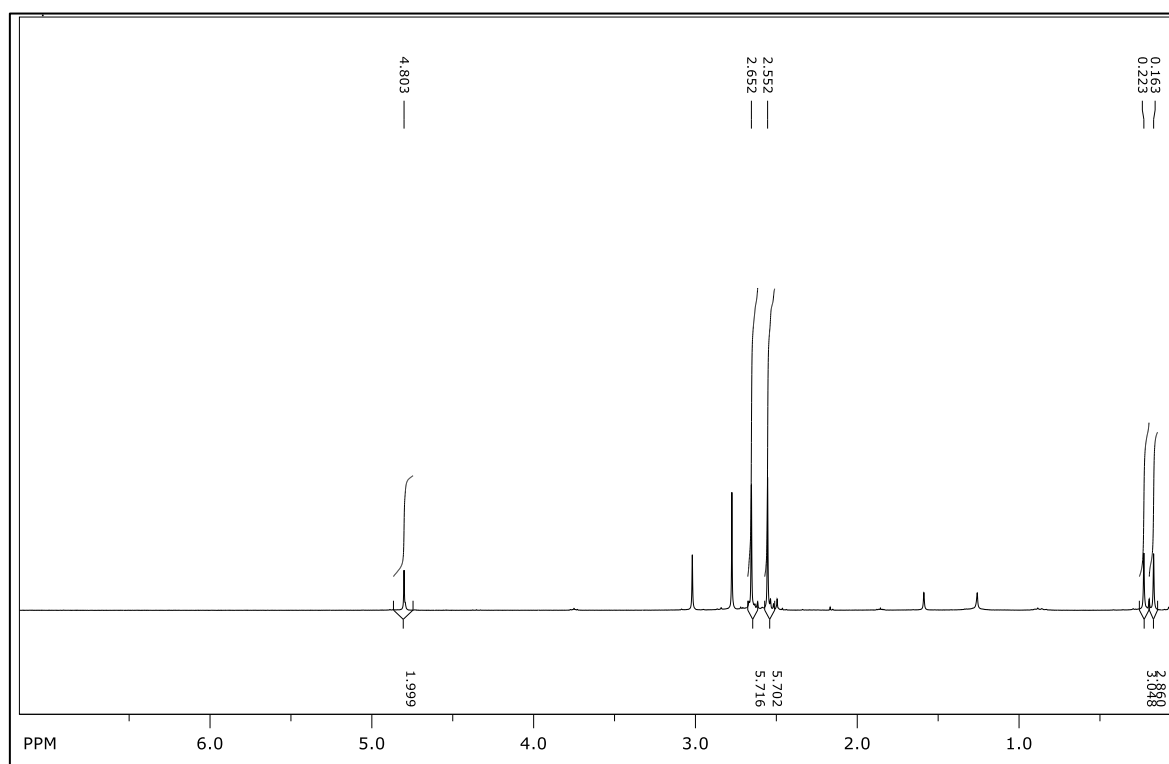
Slika D13.  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz) spektar spoja 7.



Slika D14.  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 150 MHz) spektar spoja 7.

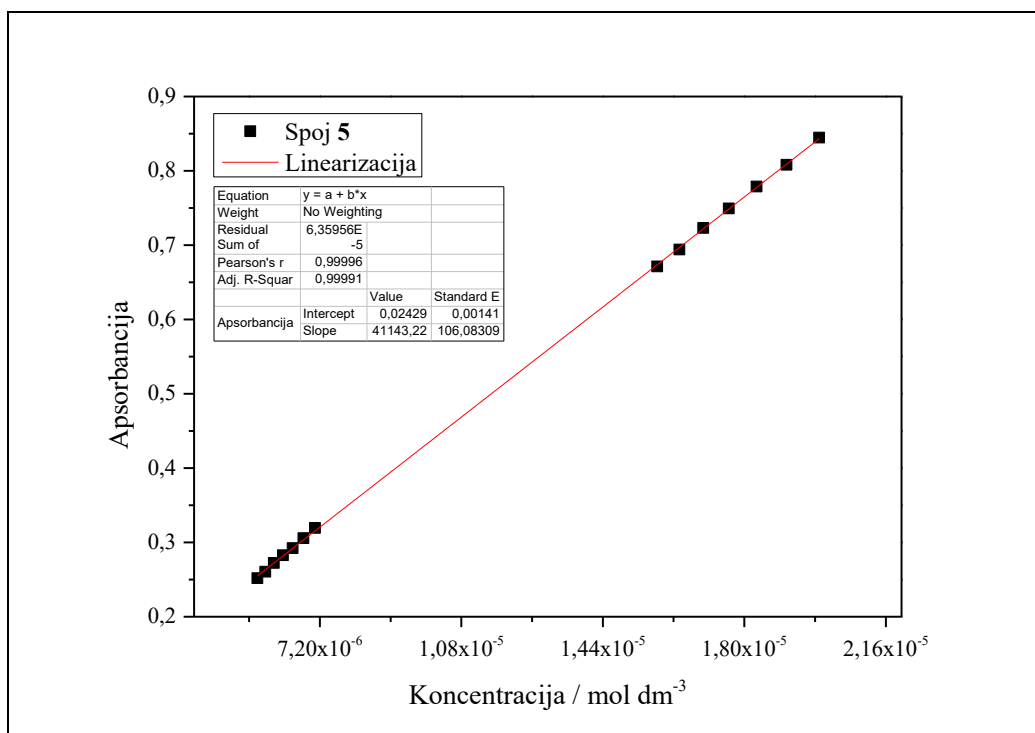
Slika D15.  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz) spektar spoja **8**.

**8**Slika D16.  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 150 MHz) spektar spoja **8**.

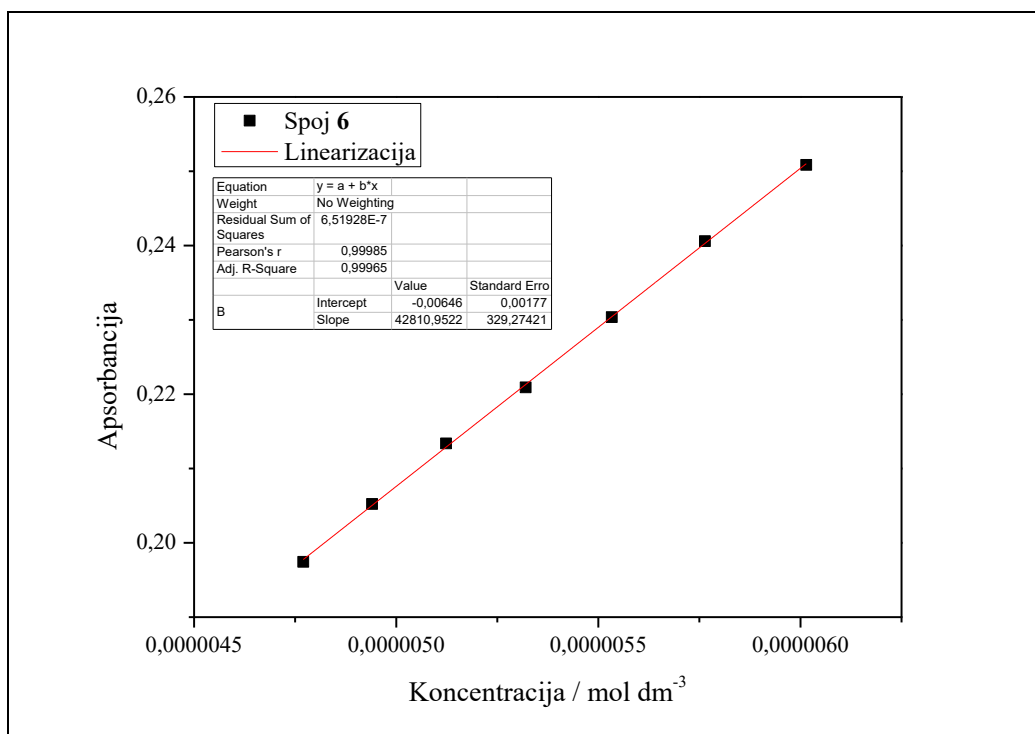


Slika D17.  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz) spektar spoja **10**.

## 8.2. UV/Vis

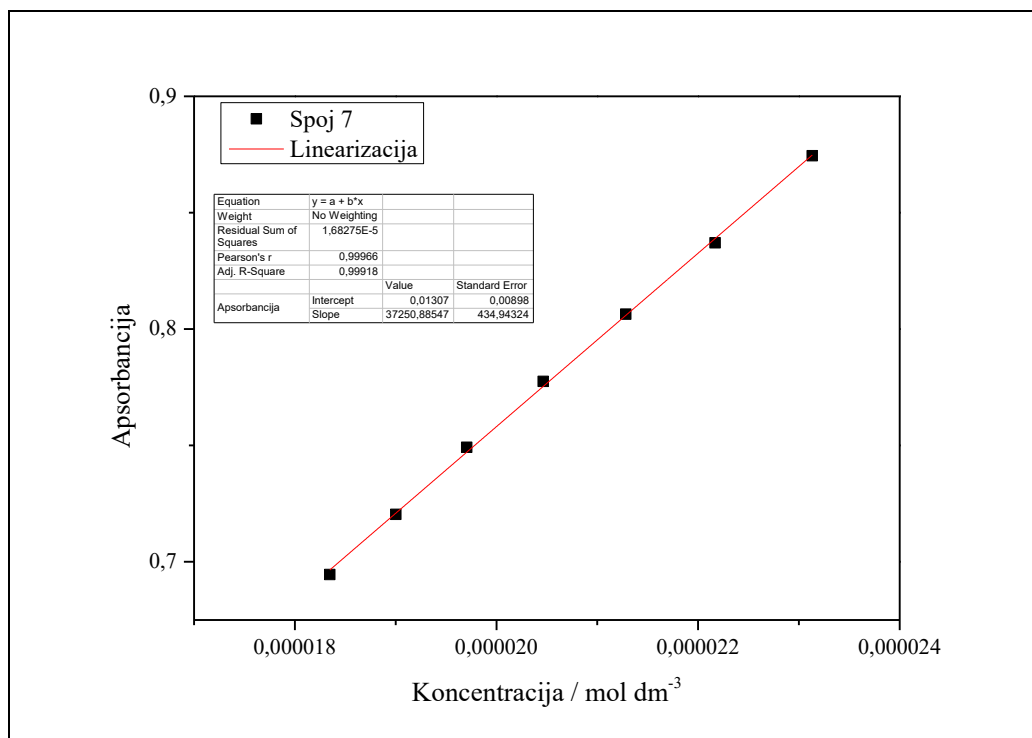


Slika D18. Graf ovisnost apsorbancije o koncentraciji za spoj 5.

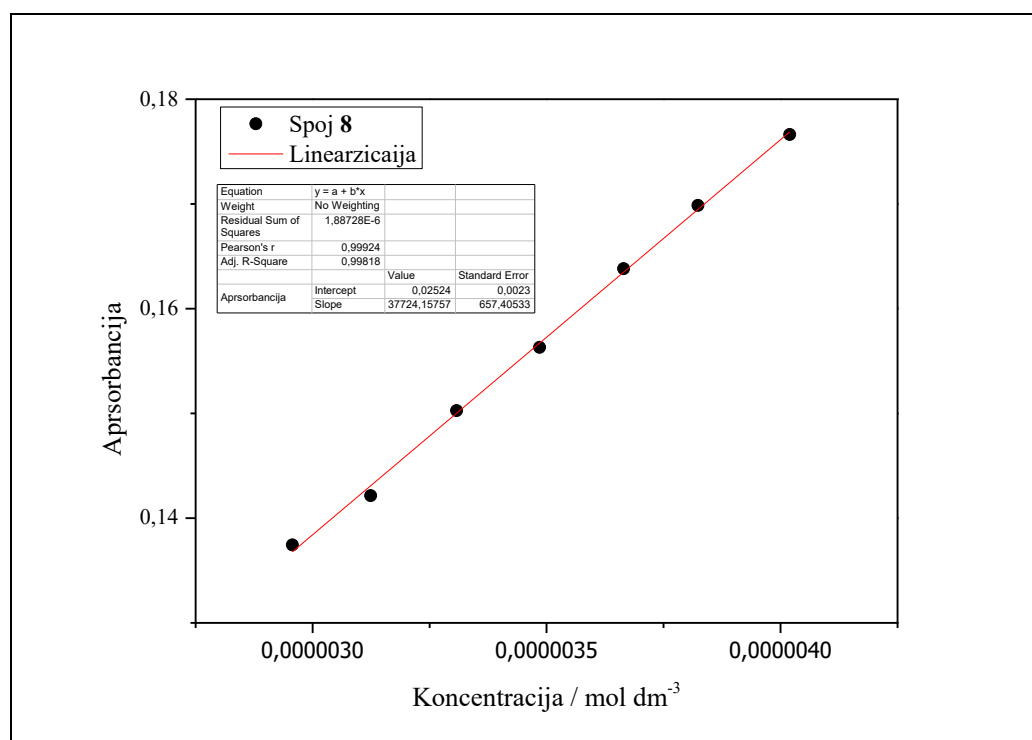


Slika D19. Graf ovisnost apsorbancije o koncentraciji za spoj 6.



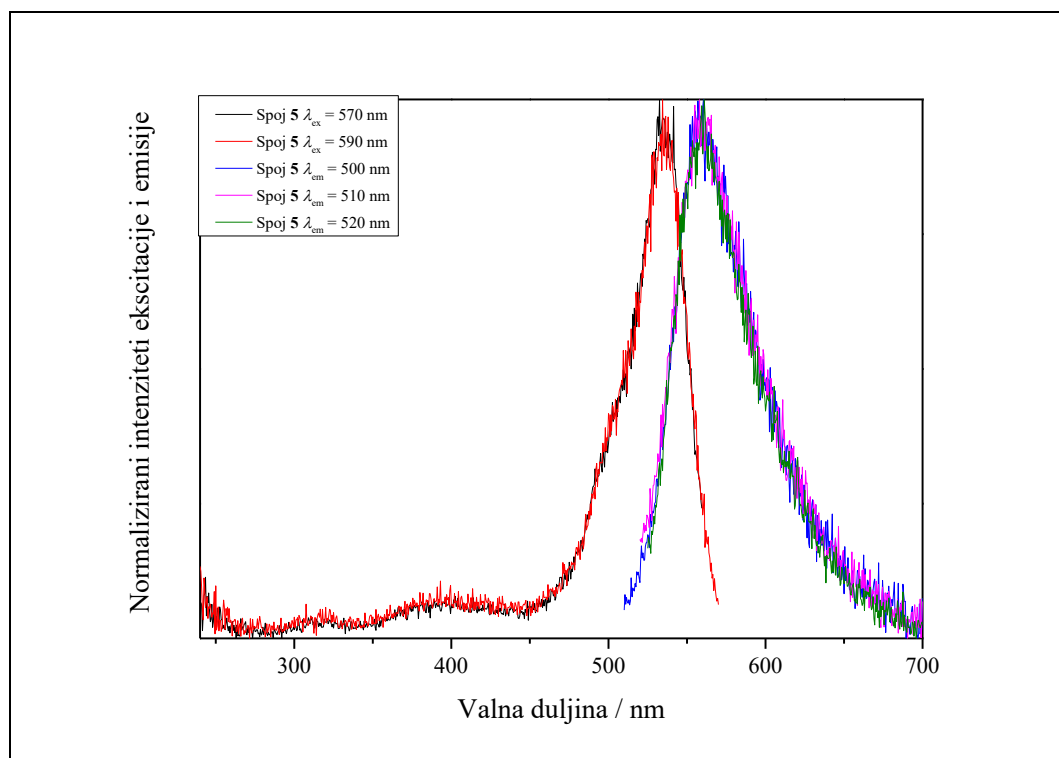


Slika D20. Graf ovisnost apsorbancije o koncentraciji za spoj 7.

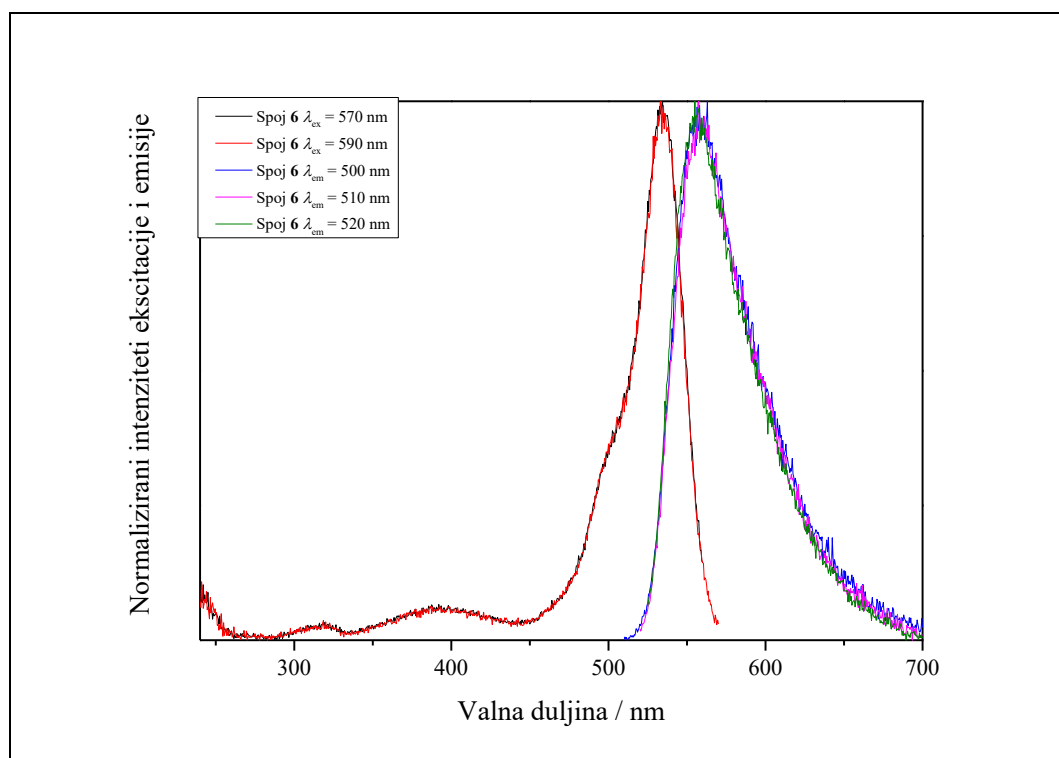


Slika D21. Graf ovisnost apsorbancije o koncentraciji za spoj 8.

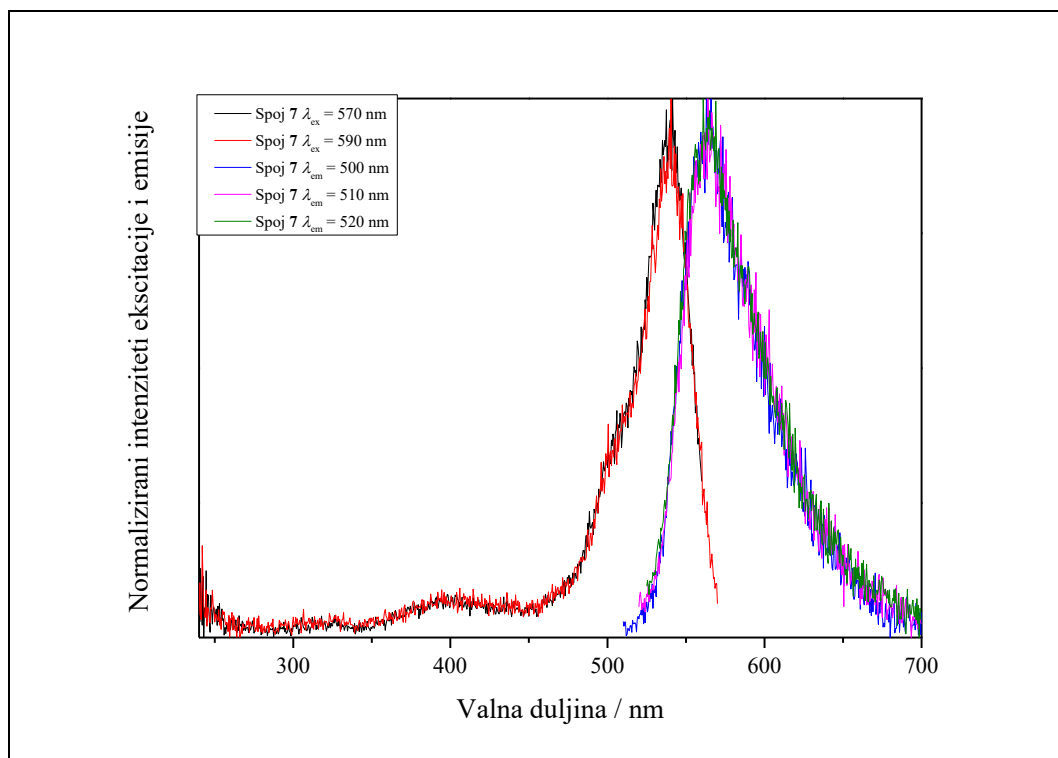
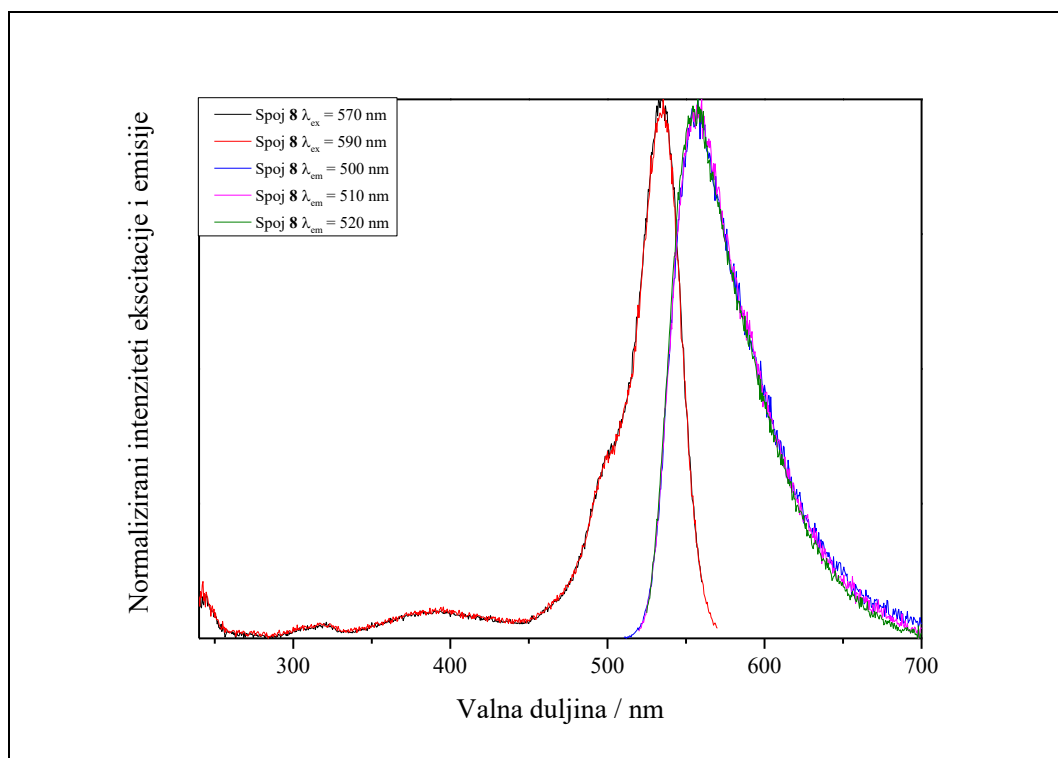
### 8.3. Fluorescencija



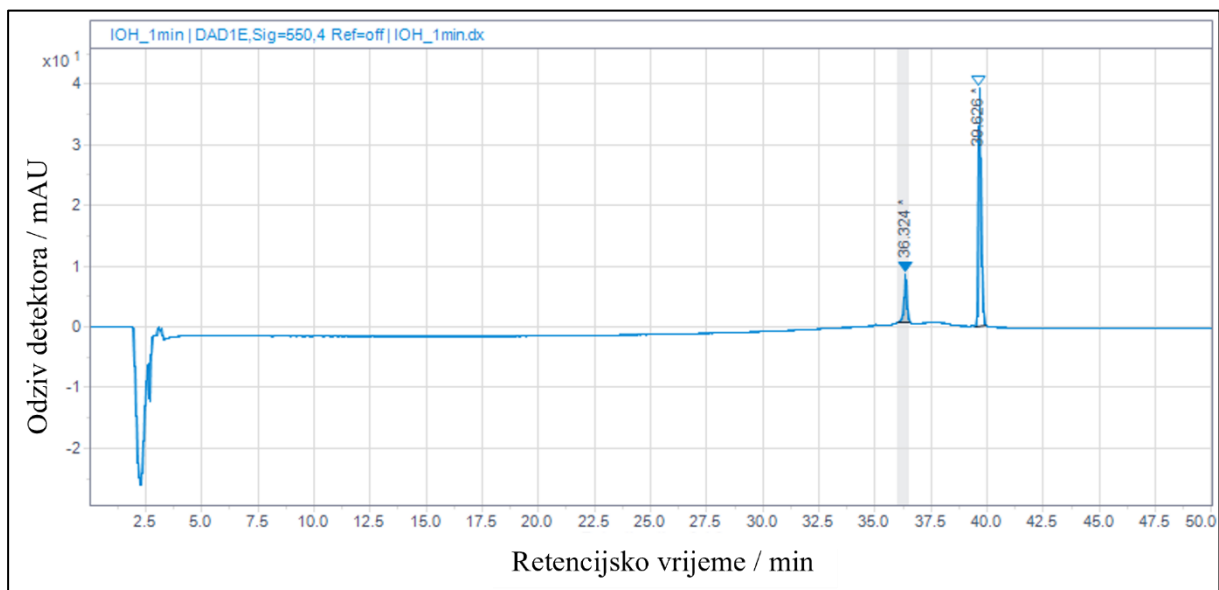
Slika D22. Normalizirani spektar emisije i ekscitacije spoja **5** u CH<sub>3</sub>CN.



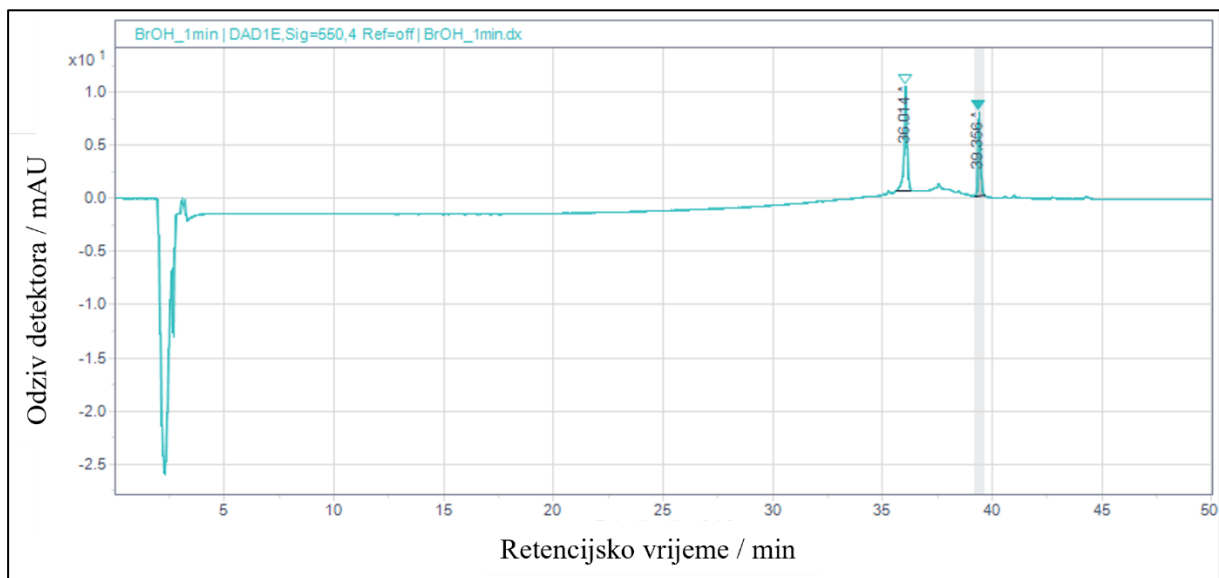
Slika D23. Normalizirani spektar emisije i ekscitacije spoja **6** u CH<sub>3</sub>CN.

Slika D24. Normalizirani spektar emisije i ekscitacije spoja **7** u CH<sub>3</sub>CN.Slika D25. Normalizirani spektar emisije i ekscitacije spoja **8** u CH<sub>3</sub>CN.

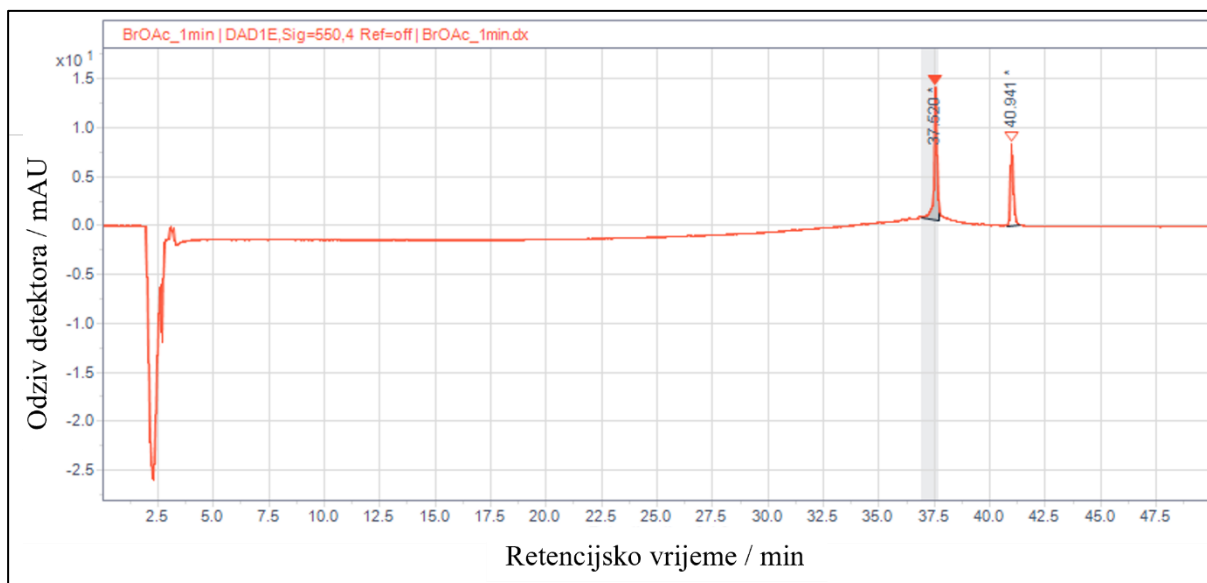
## 8.4. HPLC



Slika D26. HPLC kromatogram otopine spoja **5** u  $\text{CH}_3\text{OH}$  nakon provedenog ozračivanja od jedne minute vidljivim svjetlom.

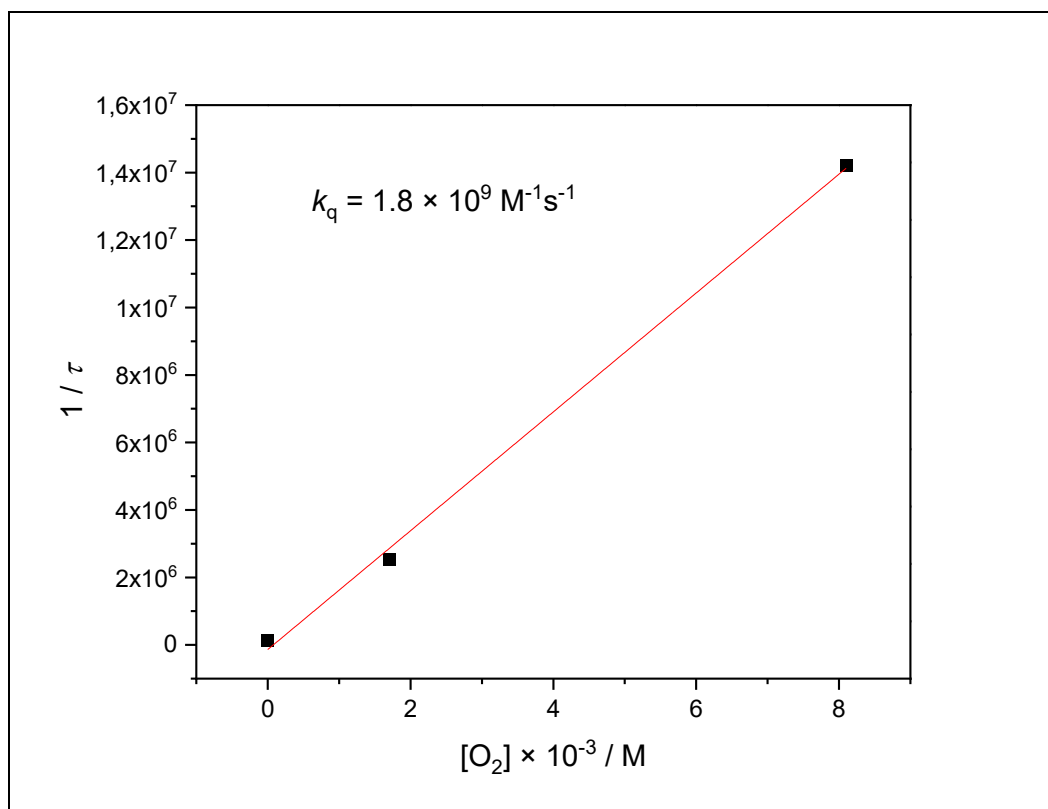


Slika D27. HPLC kromatogram otopine spoja **6** u  $\text{CH}_3\text{OH}$  nakon provedenog ozračivanja od jedne minute vidljivim svjetlom.

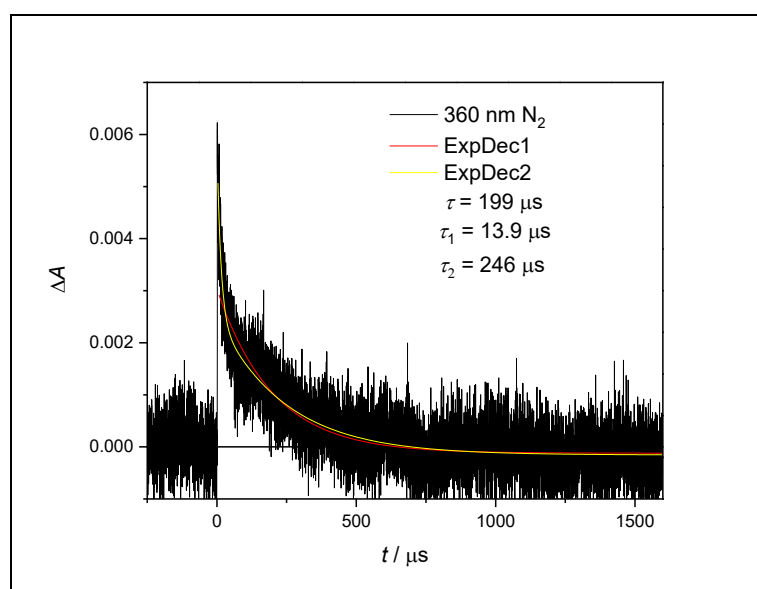


Slika D28. HPLC kromatogram otopine spoja **8** u CH<sub>3</sub>OH nakon provedenog ozračivanja od jedne minute vidljivim svjetlom.

## 8.5. LFP



Slika D29. Stern-Volmerov graf ovisnosti opažene konstante brzine nestajanja tripleta o koncentraciji kisika za spoj **6** u  $\text{CH}_3\text{CN}$ .



Slika D30. Opadanje intenziteta tranzijentne apsorpcije na 360 nm za spoj **7** u  $\text{N}_2$ -propuhanoj otopini  $\text{CH}_3\text{CN}$ .

## § 9. ŽIVOTOPIS

### Osobni podatci

Ime i prezime: Matija Popović

Datum rođenja: 1. lipnja 1994.

Mjesto rođenja: Zagreb

### Obrazovanje

2001.–2009. Osnovna škola Josipa Račića, Zagreb

2009.–2013. Športska gimnazija

2013.–2019. Preddiplomski sveučilišni studij Kemija, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb

2019. – 2021. Diplomski sveučilišni studij Kemija, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb

### Sudjelovanja u popularizaciji znanosti

2014. – 2017. Otvoreni dan Kemijskog odsjeka

2014. – 2015. Volontiranje u studentskoj udruzi *Primus*

2016. Čarolije u kemiji, radionica

---