

Priprava fluorescentnog indikatora za određivanje H₂S

Panić, Izabella Doris

Undergraduate thesis / Završni rad

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Department of Chemistry / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za kemiju**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:182:279232>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-09**

Repository / Repozitorij:

[Repository of the Department of Chemistry, Osijek](#)



Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku - Odjel za kemiju
Sveučilišni prijediplomski studij Kemija

Izabella Doris Panić

PRIPRAVA FLUORESCENTNOG INDIKATORA ZA ODREĐIVANJE H₂S

Završni rad

Mentor: doc.dr.sc. Aleksandar Sečenji
Neposredni voditelj: Andrea Dandić, dr.sc.

Osijek, 2024.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Naziv sveučilišta: Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku – Odjel za kemiju

Naziv studija: Sveučilišni prijediplomski studij Kemija

Znanstveno područje: Prirodne znanosti

Znanstveno polje: Kemija

Znanstvena grana: Organska kemija

PRIPRAVA FLUORESCENTNOG INDIKATORA ZA ODREĐIVANJE H₂S

IZABELLA DORIS PANIĆ

Rad je izrađen na: Sveučilištu u Osijeku – Odjel za kemiju

Mentor: doc. dr. sc. Aleksandar Sečenji

Sažetak: U ovom završnom radu opisana je priprava fluorescentnog indikatora za detekciju unutarstaničnog H₂S. Kao fluorofor u procesu dizajna fluorescentnog indikatora odabran je 1,8-naftalimidni sustav, dok je kao receptor odgovoran za reakciju s ciljnim analitom, H₂S, odabrana azidna skupina. Osnovni naftalimidni sustav strukturno je modificiran uvođenjem anilinskih derivata na dušikov atom. Kao polazni spoj za pripremu ciljnih spojeva odabran je 4-brom-1,8-naftalanhidrid dok kao anilinski derivati odabrani su *p*-metilanilin i *p*-kloranilin. Za pripremu ciljnih derivata korišten je sintetski put koji podrazumijeva pripremu azidnog derivata 4-brom-1,8-naftalanhidrida, spoja **1**, te njegovu reakciju s odabranim anilinskim derivatima. Ovakav sintetski put rezultirao je uspješnom pripravom spoja **2**, s metilnom skupinom na arilnom dijelu molekule, dok spoj **b**, s atomom klora na arilnom dijelu molekule, nije uspješno pripremljen predloženim sintetskim putem. S ciljem pripreme spoja **b** predložen je i novi sintetski put koji podrazumijeva reakciju polaznog spoja, 4-brom-1,8-naftalanhidrida s *p*-kloranilinom, nakon čega slijedi uvođenje azidne skupine u strukturu naftalimidnog derivata. Spoj **b** nije uspješno pripremljen niti novim predloženim sintetskim putem. Ciljni produkt, spoj **2**, korišten je za fluorescentnu detekciju generiranog H₂S. Strukture pripremljenih spojeva pretpostavljene su NMR spektroskopijom (¹H i ¹³C).

Ključne riječi: azidna skupina; fluorescencija; fluorescentni indikator; fluorofor, sumporovodik (H₂S).

Jezik izvornika: hrvatski jezik

Završni rad obuhvaća: 36 stranica, 37 slika, 36 literaturnih navoda, 8 priloga

Rad prihvaćen:

Stručno povjerenstvo za provjeru rada:

Rad je pohranjen: Knjižnica Odjela za kemiju, Ulica Franje Kuhača 20, 31000 Osijek

Repozitorij Odjela za kemiju, Osijek

FUNDAMENTAL DOCUMENTATION CARD

University Name: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek – Department of Chemistry**

Name of study programme: **University Undergraduate study programme in Chemistry**

Scientific area: Natural sciences

Scientific field: Chemistry

Scientific branch: Organic chemistry

PREPARATION OF A FLUORESCENT INDICATOR FOR THE DETERMINATION OF H₂S

IZABELLA DORIS PANIĆ

The paper was created on: Department of Chemistry

Supervisor: doc. dr. sc. Aleksandar Sečenji

Abstract: In this thesis the preparation of a fluorescent indicator for the detection of intracellular H₂S is described. The 1,8-naphthalimide system was chosen as the fluorophore in the fluorescent indicator design process, while the azide group was chosen as the receptor responsible for the reaction with the target analyte, H₂S. The basic naphthalimide system is structurally modified by introduction of aniline derivatives on the nitrogen atom. 4-bromo-1,8-naphthalic anhydride was selected as the starting compound for the preparation of the target compounds, while *p*-methylaniline and *p*-chloroaniline were selected as aniline derivatives. For the preparation of target derivatives synthetic pathway which implies preparation of the azide derivative of 4-bromo-1,8-naphthalanhydride, compound **1**, and its reaction with selected aniline derivatives was used. This synthetic route resulted in the successful preparation of compound **2**, with a methyl group on the aryl part of the molecule, while compound **b**, with a chlorine atom on the aryl part of the molecule, was not successfully prepared using the proposed synthetic route. With the aim of preparing compound **b**, a novel synthetic route was proposed, which involves the reaction of the starting compound, 4-bromo-1,8-naphthalanhydride with *p*-chloroaniline, followed by the introduction of an azide group into the structure of the naphthalimide derivative. Compound **b** was not successfully prepared even by the novel proposed synthetic route. The target product, compound **2**, was used for fluorescence detection of generated H₂S. The structures of the prepared compounds were assumed by NMR spectroscopy (¹H and ¹³C).

Key words: azide group, fluorescence, fluorescent indicator, fluorophore, hydrogen sulfide (H₂S).

Original language: Croatian language

Thesis includes: 36 pages, 37 pictures, 0 tables, 36 references, 8 appendices

Thesis accepted:

Reviewers:

Thesis deposited in: Library of the Department of Chemistry, Ulica Franje Kuhača 20, Osijek

Repository of the Department of Chemistry, Osijek

Sadržaj

1. UVOD	1
2. LITERATURNI PREGLED	3
2.1. Oksidativni stres	3
2.1.1. H ₂ S	5
2.2. Fluorescencija.....	6
2.2.1. Mehanizmi u procesu dizajna fluorescentne probe.....	7
2.3. Dizajn fluorescentnog indikatora za H ₂ S	14
2.3.1. Fluorofori	14
2.3.2. Linkeri.....	19
2.3.3. Receptor odgovoran za reakciju s analitom (activating/recognition group)	20
2.4. Fluorescentne probe za detekciju H ₂ S	22
3. EKSPERIMENTALNI DIO	25
3.1. Materijali i metode	25
3.1.1. Priprava 6-azido-1 <i>H</i> ,3 <i>H</i> -benzo[<i>de</i>]izokromen-1,3-diona (1)	25
3.1.2. Priprava 6-azido-2-(4-metilfenil)-1 <i>H</i> -benzo[<i>de</i>]izokinolin-1,3(2 <i>H</i>)-diona (2)	26
3.1.3. Pokušaj priprave 6-azido-2-(4-klorofenil)-1 <i>H</i> -benzo[<i>de</i>]izokinolin-1,3(2 <i>H</i>)-diona sintetskim putem 2	27
3.1.4. Uvođenje H ₂ S u otopinu spoja 2	29
4. REZULTATI I RASPRAVA	30
4.1. Uvod	30
4.2. Priprava spoja 2 i pokušaj priprave spoja b sintetskim putem 1	31
4.2.1. Uvođenje H ₂ S u otopinu spoja 2	33
4.3. Pokušaj priprave spoja b sintetskim putem 2	34
5. ZAKLJUČAK	36
6. LITERATURA	37
7. PRILOZI	I
7.1. Popis kratica.....	I
7.2. ¹ H i ¹³ C NMR spektri pripremljenih spojeva	III

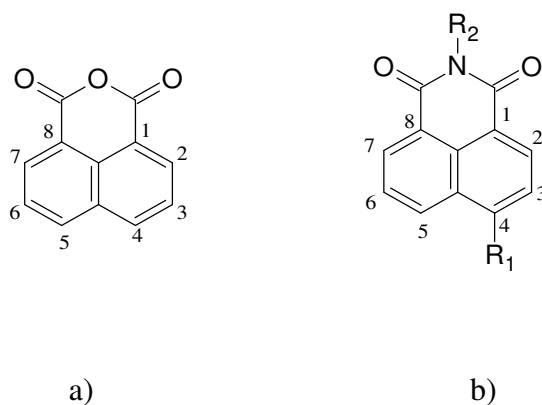
1. UVOD

Sumporovodik (H_2S) je bezbojan i vrlo otrovan plin. U okolišu nastaje raspadom organskih tvari uz djelovanje bakterija, nalazi se u vulkanskim plinovima kao i u prirodnom plinu. Poremećaj u homeostazi H_2S povezan je s razvojem brojnih bolesti, uključujući karcinogenezu i neurodegradaciju [1]. Veće koncentracije H_2S prisutne su kod pacijenata sa sindromom Down [2] te u urinu pacijenata oboljelih od raka [3]. No, uz navedene negativne posljedice u organizmu, H_2S ima i potencijalnu ulogu u ublažavanju oksidativnog stresa zahvaljujući činjenici da posjeduje direktni i indirektni antioksidativni kapacitet. Direktni antioksidativni kapacitet H_2S proizlazi iz njegovih kemijskih svojstava koja mu omogućavaju neutralizaciju reaktivnih kisikovih vrsta (engl. *Reactive Oxygen Species*, ROS). Indirektna antioksidativna svojstva H_2S očituju se u njegovoj regulaciji aktivnosti ključnih antioksidativnih enzima uključujući superoksid dismutazu (engl. *Superoxide Dismutase*, SOD), katalazu i glutation peroksidazu (engl. *Glutathione Peroxidase*, GPx) [4]. Prema tome, određivanje koncentracije H_2S je od izuzetno velike važnosti. Dizajn fluorescentne probe za određivanje koncentracije H_2S predstavlja jedan od potencijalnih načina njegove detekcije, pri čemu su prednosti takve metode njezina nedestruktivnost i visoka osjetljivost.

Potencijalna fluorescentna proba u svojoj strukturi posjeduje fluorofor te receptor odgovoran za prepoznavanje analita. Uz navedene strukturne motive, fluorescentna molekula, može posjedovati i skupinu koja povezuje dva navedena strukturna motiva (engl. *linker*). Kao fluorofor, u velikom broju literaturno opisanih fluorescentnih proba, korišten je 1,8-naftalimidni strukturni motiv (slika 1). U strukturi naftalimida kao fluorofora, R_1 predstavlja elektron-donirajuću skupinu, dok je R_2 skupina odgovorna za modulaciju fizikalno-kemijskih svojstava pripremljene fluorescentne probe. Naftalimidni strukturni motiv je vrlo često korišten u procesu dizajna fluorescentnih proba zahvaljujući svojoj stabilnosti te velikom Stokesovom pomaku. Osim navedenog, priprava naftalimidnih derivata podrazumijeva upotrebu jednostavnih sintetskih puteva, najčešće korištenjem derivata naftalanhidrida (slika 1) i odgovarajućeg amina. Ovakva reakcija omogućava jednostavnu pripravu velikog broja naftalimidnih derivata u svrhu njihove različite primjene [5].

Cilj ovog rada uključio je pripravu naftalimidnog derivata, spoja **2**, u svrhu njegove primjene u detekciji H_2S . U okviru rada, prikazana je priprava spoja **2** kao i pokušaj priprave spoja **b**. Spoj **2** i spoj **b** razlikuju se u svojoj strukturi prema skupini vezanoj na arilnom dijelu naftalimidnog sustava. U slučaju priprave oba spoja korišteni su anilinski derivati, *p*-metilanilin

(*p*-toluidin) za pripremu spoja **2** te *p*-kloranilin u slučaju pokušaja pripreme spoja **b**. Navedeni anilinski derivati odabrani su s ciljem ispitivanja utjecaja elektronskih svojstava atoma vezanih u *para*- položaju molekule na prinos reakcije s azidnim derivatom **1**. U konačnici, navedeni anilinski derivati, odabrani su s ciljem ispitivanja utjecaja elektronskih svojstava skupina u *para*-položaju molekule na intenzitet fluorescencije pripremljenih imidnih derivata. Kao skupina odgovorna za prepoznavanje H₂S odabrana je azidna skupina koja je uvedena na naftalimidni sustav na položaju 4, kao elektron-odvlačeća skupina. Kako je prethodno objašnjeno, naftalimidni derivati pokazuju veliki intenzitet fluorescencije kada u svojoj strukturi posjeduju na položaju 4 elektron-donirajuću skupinu. S ciljem konverzije azidne skupine u amino skupinu, kao elektron-donirajuće skupine, u prisustvu H₂S, u okviru rada provedeno je preliminarno ispitivanje koje podrazumijeva uvođenje H₂S u otopinu spoja **2**. Navedeni rezultati ukazuju na mogućnost upotrebe spoja **2** u detekciji H₂S na što će fokus biti stavljen u nastavku ovoga istraživanja.



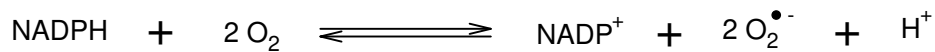
Slika 1. Strukturne formule molekula a) naftalanhidrida; b) 1,8-naftalimida [6]

2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Oksidativni stres

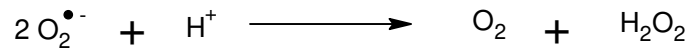
Oksidativni stres je stanje metabolizma do kojeg dolazi kada je u organizmu prisutna povećana količina ROS. Povećanje koncentracije ROS uzrokovano je neravnotežom između proizvodnje ROS i njihovog nakupljanja u stanicama i tkivima te sposobnosti organizma da ukloni ROS. Superoksid radikal, $O_2^{\bullet-}$, vodikov peroksid, H_2O_2 , hidroksidni radikal, $\bullet OH$, pripadaju skupini ROS, a ujedno su i vrste koje najčešće nastanu kao metabolički produkti. Osim generiranja u metabolizmu, ROS mogu nastati i pod utjecajem vanjskih čimbenika, kao što su UV zračenje, ionizirajuća zračenja, zagađivači i teški metali. Utjecaj navedenih čimbenika pridonosi oštećenju tkiva i stanica (oksidativni stres) te je dokazano da je on uzrok mnogim bolestima [7].

Nedavna istraživanja pokazala su kako oksidativni stres potiče stvaranje reaktivnih dušikovih vrsta (engl. *Reactive Nitrogen Species*, RNS) i reaktivnih sumpornih vrsta (engl. *Reactive Sulfur Species*, RSS) [8]. Postoje istraživanja koja dokazuju da RSS vrste sa svojstvima stresora sličnim onima pronađenim u ROS-u nastaju u uvjetima oksidativnog stresa [9]. RNS vrste nastaju kada dušikov(I) oksid (NO) reagira s ROS vrstom, npr. s $O_2^{\bullet-}$ ili H_2O_2 . RNS vrste imaju ključnu ulogu u biološkim procesima, no ako se u organizmu nalaze u velikim količinama, mogu uzrokovati štetu [10]. U slučaju ROS njihova prisutnost u organizmu nije posve štetna. Procesi, poput fosforilacije proteina, aktivacije nekoliko transkripcijskih čimbenika, apoptoze (programirana smrt stanice), imunitet i diferencijacije, svi ovise o pravilnoj proizvodnji ROS-a i njihovoj prisutnosti unutar stanice koju treba održavati na niskoj razini [7]. Nadalje, ROS vrste mogu nastati enzimski ili neenzimski kataliziranim reakcijama. Enzimske reakcije kojima nastaju ROS najčešće su one uključene u dišni lanac, fagocitozu (uništavanje bakterija) te u druge metaboličke procese. Superoksidni radikal, $O_2^{\bullet-}$, nastaje dodavanjem jednog elektrona na molekularni kisik a u tom procesu posreduje nikotinamid adenin dinukleotid fosfatksantin-oksidaza ili mitohondrijski sustav za prijenos elektrona (slika 2). Glavno mjesto u stanicama gdje nastaje $O_2^{\bullet-}$ je upravo mitohondrij, organel čija je glavna zadaća proizvodnja adenozin-trifosfata (ATP). Na unutarnjoj mitohondrijskoj membrani nalaze se enzimski kompleksi koji sudjeluju u prijenosu elektrona na molekularni kisik koji će se zatim reducirati u vodu. No 1 – 3% elektrona procuri iz tog lanca za prijenos elektrona i sudjeluju u nastajanju $O_2^{\bullet-}$ [11].



Slika 2. Reakcija nastajanja $\text{O}_2^{\bullet -}$ [11]

Nastali superoksidni anion prelazi u vodikov peroksid pod djelovanjem enzima SOD (slika 3).



Slika 3. Reakcije nastajanja H_2O_2 [11]

Reakcijom superoksidnog aniona s vodikovim peroksidom nastaje hidroksidni anion i radikal koji se smatra najreaktivnijom kisikovom vrstom koji može oštetiti proteine, lipide, ugljikohidrate kao i molekulu DNA [11]. No, iako se oksidativni stres povezuje najviše s reaktivnim kisikovim vrstama, novija istraživanja pokazala su da na oksidativni stres utječu i RSS i RNS. Sumpor je dio staničnog antioksidativnog sustava ali dokazano je da postoje RSS sa sličnim svojstvima stresora kao i kod ROS i upravo RSS nastaju u uvjetima oksidativnog stresa. Tioli, spojevi koji u svojoj strukturi posjeduju -SH skupinu, kao i disulfidi, mogu se lako oksidirati do sumporovih vrsta u kojima je sumpor u višem oksidacijskom stanju [9]. RSS, u ovom slučaju reaktivni tiolni radikal, može nastati na sljedeća tri načina: 1) vodik donira elektron tiolu, 2) oksidacijom kataliziranom od strane enzima i 3) tiol može reagirati s ROS. Ako se organizam nalazi u stanju oksidativnog stresa, koncentracija ROS je veća te su samim time šanse za stvaranje RSS veće [9]. Uz već spomenute ROS i RSS, nedavna istraživanja su pokazala da oksidativnom stresu, koji se smatra jednom od glavnih uzroka preranog starenja, pridonose i reaktivne dušikove vrste, RNS. Glavni izvor RNS je NO. Brze reakcije NO s radikalima postale su jedan od glavnih izvora RNS. Najistraženija reakcija je reakcija sa $\text{O}_2^{\bullet -}$ u kojoj dolazi do formiranja peroksinitrata, ONOO^- . ONOO^- je kemijski nestabilan u fiziološkim uvjetima a njegovom izomerizacijom nastaje nitrat. Novija istraživanja su pokazala da ONOO^- može reagirati sa svim glavnim biomolekulama (lipidi, proteini, ugljikohidrati, itd.) neovisno o koncentraciji NO ili $\text{O}_2^{\bullet -}$ [12].

2.1.1. H₂S

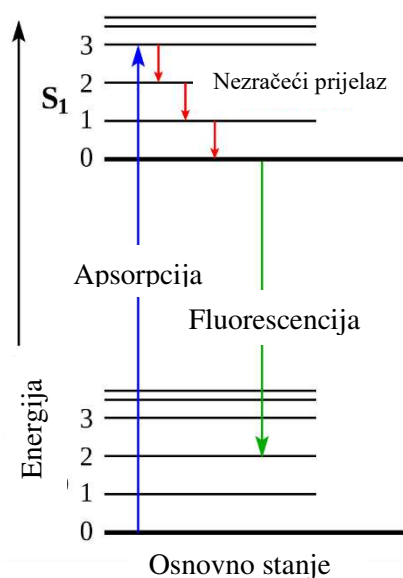
H₂S je plin otrovan za ljude i većinu životinja jer inhibira stanično disanje na sličan način kao i cijanovodik. Kada se udiše ili proguta njegova sol, dolazi do oštećenja organa uz pojavu simptoma koji variraju od poteškoća s disanjem do konvulzije i smrti [13]. No, H₂S ima i razne fiziološke regulatorne uloge, kao npr. u bubrežnom, kardiovaskularnom, središnjem živčanom i probavnom sustavu, ali je, također, nereguliran u raznim patološkim procesima uključujući rak, kardiovaskularne bolesti i neurodegeneraciju [14]. H₂S pripada skupini spojeva koji u ljudskom organizmu imaju ulogu plinovitog prijenosnika (engl. *Gasotransmitters*) te se u toj skupini, osim njega, nalaze NO i CO. Za razliku od ostalih signalnih molekula, H₂S može slobodno prolaziti kroz membrane stanice. Također je prisutan unutar i izvan stanice [15].

Nastajanje H₂S unutar stanice je povezano s djelovanjem triju enzima: cistationin γ -liaza (engl. *Cystathionine γ -Lyase*, CSE), cistationin β -sintaza (engl. *Cystathionine β -Syntase*, CBS) i 3-merkaptopiruvat sulfurtransferaza (*3-Mercaptopyruvate Sulfurtransferase*, 3-MST), osim navedenog H₂S može nastati i drugim enzimskim ili neenzimskim reakcijama i procesima što dodatno pridonosi ukupnoj količini H₂S u organizmu [16]. Svaki od triju enzima koji su odgovorni za nastajanje H₂S stimulirani su raznim stanjima ili tvarima. CSE stimulirana je raznim oblicima staničnog stresa, oksidativnim stresom, nedostatkom hranjivih tvari i ROS. CSE se smatra glavnim izvorom H₂S u kardiovaskularnom i respiracijskom sustavu, no i u bubrežima, jetri, maternici i drugim organima. Kada je u mirovanju, CSE se nalazi u citosolu stanice. CBS, je pretežito zastupljen u središnjem živčanom sustavu, jetri i gušterači, ali se također nalazi u mnogim drugim organima različitih sustava uključujući gastrointestinalni trakt, pluća, masno i limfno tkivo, kao i kardiovaskularni sustav, dišni, mišićno-koštani i urogenitalni sustav. U mozgu, CBS se nalazi u svim regijama na različitim razinama, a najveće količine prisutne su u hipokampusu, malom mozgu i moždanoj kori [16]. Razine 3-MST-a značajno variraju u različitim organima, pri čemu jetra, bubrezi, testisi, mozak i endokrini organi sadrže najveće količine 3-MST-a, a slezena, timus, pluća i tanko crijevo sadrže manje količine.

Nadalje, H₂S se u tijelo može unijeti pomoću hrane, može nastati kao produkt crijevnog mikrobioma te kao produkt mnogih neenzimskih reakcija [16]. Toksičnost koja nastane u organizmu usred viška H₂S često se povezuje s inhibicijom oksidaze citokroma c, koja je sastavni dio kompleksa IV u procesu oksidativne fosforilacije, pri čemu dolazi do metaboličke acidoze (povećanje kiselosti u krvi). Također, H₂S ometa vezanje kisika za hemoglobin i mioglobin te time onemogućava prijenos kisika do tkiva [17].

2.2. Fluorescencija

Fluorescencija podrazumijeva pojavu emisije svjetlosti tvari, atoma ili molekule, koja je razmjerna apsorbiranoj elektromagnetskoj energiji. Nastaje pri apsorpciji fotona pri čemu dolazi do prelaska elektrona u pobuđeno stanje, stanje više energije, te se taj isti apsorbirani foton emitira pri povratku elektrona u osnovno stanje [18,19]. Energija emitiranog fotona je uvijek manja od energije apsorbiranog fotona, dakle foton koji se apsorbira ima kraću valnu duljinu od fotona koji je emitiran, što se naziva Stokesovim pomakom [19, 20] (slika 4).



Slika 4. Jablonski dijagram (preuzeto i prilagođeno iz [20])

Glavna mjerljiva tvar kod fluorescencije je tzv. emisijski spektar. U osnovi, emisijski spektar je zapis varijacije intenziteta emitirane svjetlosti kao funkcije valne duljine, dok je uzorak osvijetljen svjetlošću, tj. izvorom pobude pri fiksnoj valnoj duljini. Najčešće, spektar pobude obuhvaća širok raspon valnih duljina, koji često, ali ne i uvijek, odgovara apsorpcijskom spektru fluorofora [18]. Koliko jako će neki spoj fluorescirati, ovisi o drugom parametru koji je poznat pod nazivom kvantni prinos. U fluorescenciji, to je omjer broja emitiranih fotona i broja apsorbiranih fotona. Npr. ako fluorofor apsorbira 100 fotona, a zatim emitira 100 fotona, kaže se da je njegov kvantni prinos 100 % ili 1 [18].

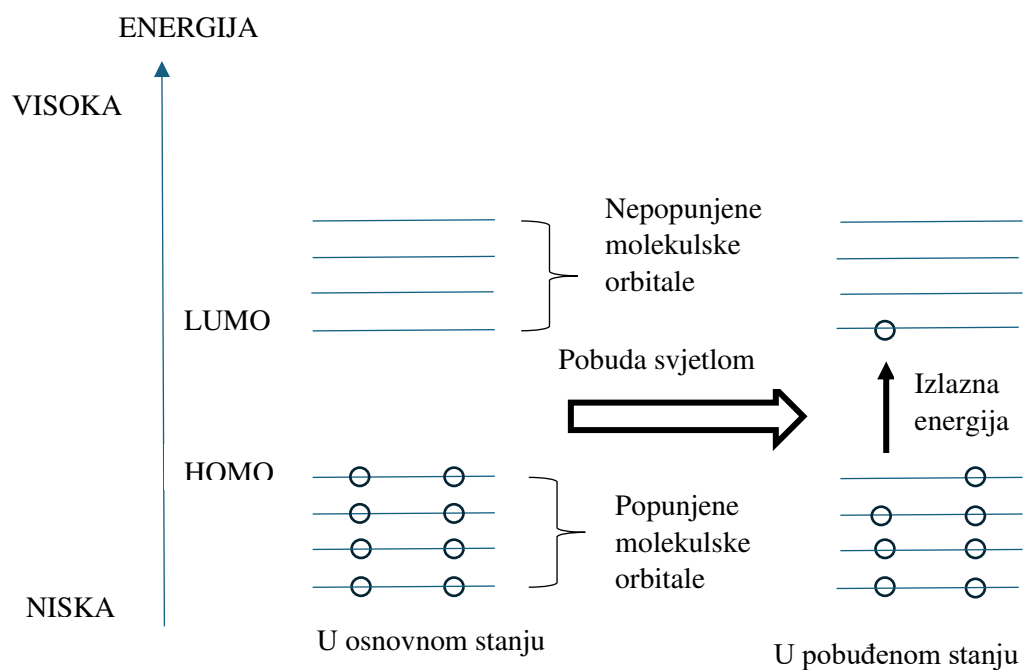
2.2.1. Mehanizmi u procesu dizajna fluorescentne probe

U procesu dizajna fluorescentne probe, prilikom odabira osnovnih strukturnih motiva bitno je uzeti u obzir mehanizam rada fluorescentne probe. Većina dosad sintetiziranih fluorescentnih proba temelji se na molekularnoj interakciji koje se razlikuju po načinima rada. Prvi i najčešće korišteni mehanizam rada fluorescentnih proba je fotoinducirani prijenos elektrona (engl. *Photoinduced Electron Transfer*, PeT). Kod fluorescentnih proba čije se djelovanje zasniva na PeT mehanizmu, receptor odgovoran za reakciju s analitom donira elektrone fluoroforu ili obrnuto [21]. Drugi najčešći mehanizam i onaj koji je korišten u procesu dizajna fluorescentnih proba u sklopu ovog rada, je intramolekularni prijenos naboja (engl. *Intramolecular Charge Transfer*, ICT). Mehanizam rada temeljen je na doniranju elektrona π -veze receptoru odgovornom za prepoznavanje analita. Kod fluorescentnih proba čiji se mehanizam djelovanja zasniva na PeT-u, osim fluorofora i receptora odgovornog za prepoznavanje analita postoji i skupina koja povezuje ta dva strukturna motiva (engl. *linker*). S druge strane, u slučaju ICT fluorescentnih proba fluorofor i receptor odgovoran za reakciju s analitom povezani su preko kovalentne veze te upravo ta veza omogućuje intramolekularni prijenos naboja. Također, jedan od mehanizama koji se koristi pri dizajnu fluorescentnih proba je prijenos energije preko fluorescentne rezonancije (engl. *Fluorescence Resonance Energy Transfer*, FRET). To je proces u kojem dolazi do prijenosa energije između različitih fluorofora. Tipična fluorescentna proba čiji se mehanizam rada temelji na FRET-u sastoji se od dva različita fluorofora, pri čemu je jedan od njih donor energije, a drugi akceptor energije [21]. U ovome poglavlju detaljnije su opisana dva najčešća mehanizma korištena u procesu dizajna fluorescentne probe: PeT i ICT.

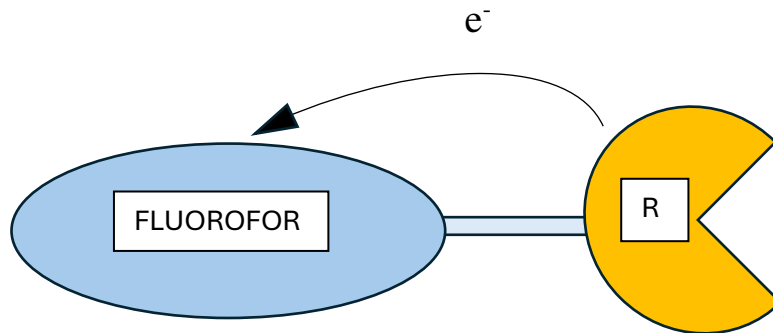
2.2.1.1. Fotoinducirani prijenos elektrona - PeT

PeT je podijeljen na dvije vrste a razlika između navedenih vrsta osnovana je na smjeru prijenosa elektrona između fluorofora i receptora odgovornog za reakciju s analitom. Postoji akceptorom pobuđeni PeT (engl. *Acceptor-Excited PeT*, a-PeT) i donorom pobuđeni PeT (engl. *Donor-Excited PeT*, d-PeT). Karakteristika a-PeT je prijelaz elektrona s receptora odgovornog za prepoznavanje analita skupine na fluorofor, a prijelaz će se odviti jer se najviša zauzeta molekulska orbitala (engl. *Highest Occupied Molecular Orbital*, HOMO) receptora nalazi između HOMO i najniže nezauzete molekulske orbitale (engl. *Lowest Unoccupied Molecular Orbital*, LUMO) fluorofora („prazna“ HOMO i LUMO) te će elektron prijeći iz HOMO

receptora odgovornog za prepoznavanje analita skupine u „praznu“ HOMO (LUMO) pobuđenog fluorofora (slika 5). Radi toga, elektron koji se nalazi u LUMO fluorofora ne može se vratiti u osnovno stanje što rezultira gašenjem fluorescencije (slika 6, slika 8a) [23, 24].

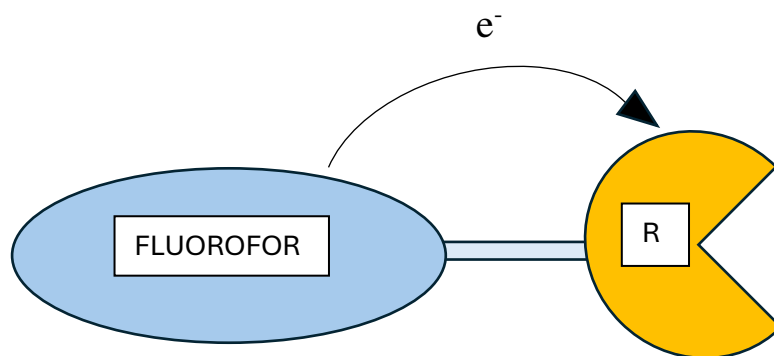


Slika 5. Dijagram HOMO i LUMO orbitala (preuzeto i prilagođeno iz [23])

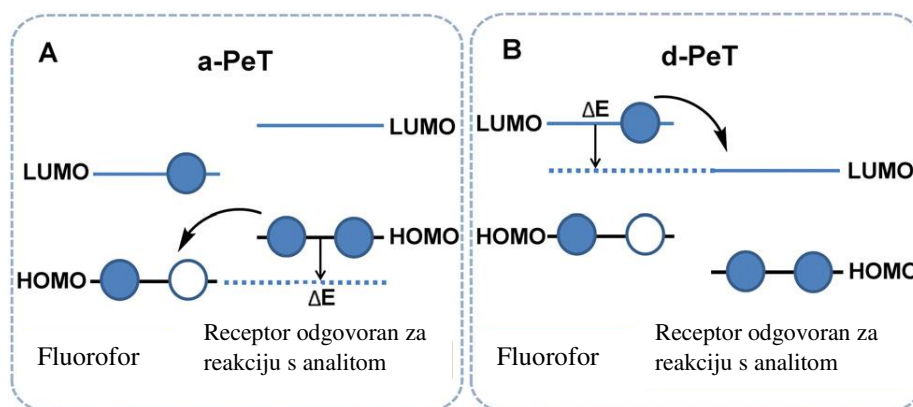


Slika 6. Shema PeT mehanizam potencijalne fluorescentne probe; R=recognition group (preuzeto i prilagođeno iz [24])

U slučaju d-PeT, elektroni prelaze s fluorofora na receptor odgovoran za prepoznavanje analita zbog manjka elektrona u njoj. Kada se na fluorofor djeluje zračenjem, elektron iz njegove HOMO orbitale prelazi u njegovu LUMO orbitalu i odmah dolazi do tranzicije pri kojoj se ne emitiraju fotoni, a elektron prelazi u praznu LUMO orbitalu receptora odgovornog za prepoznavanje analita što rezultira gašenjem fluorescencije (slika 7, slika 8b) [24].



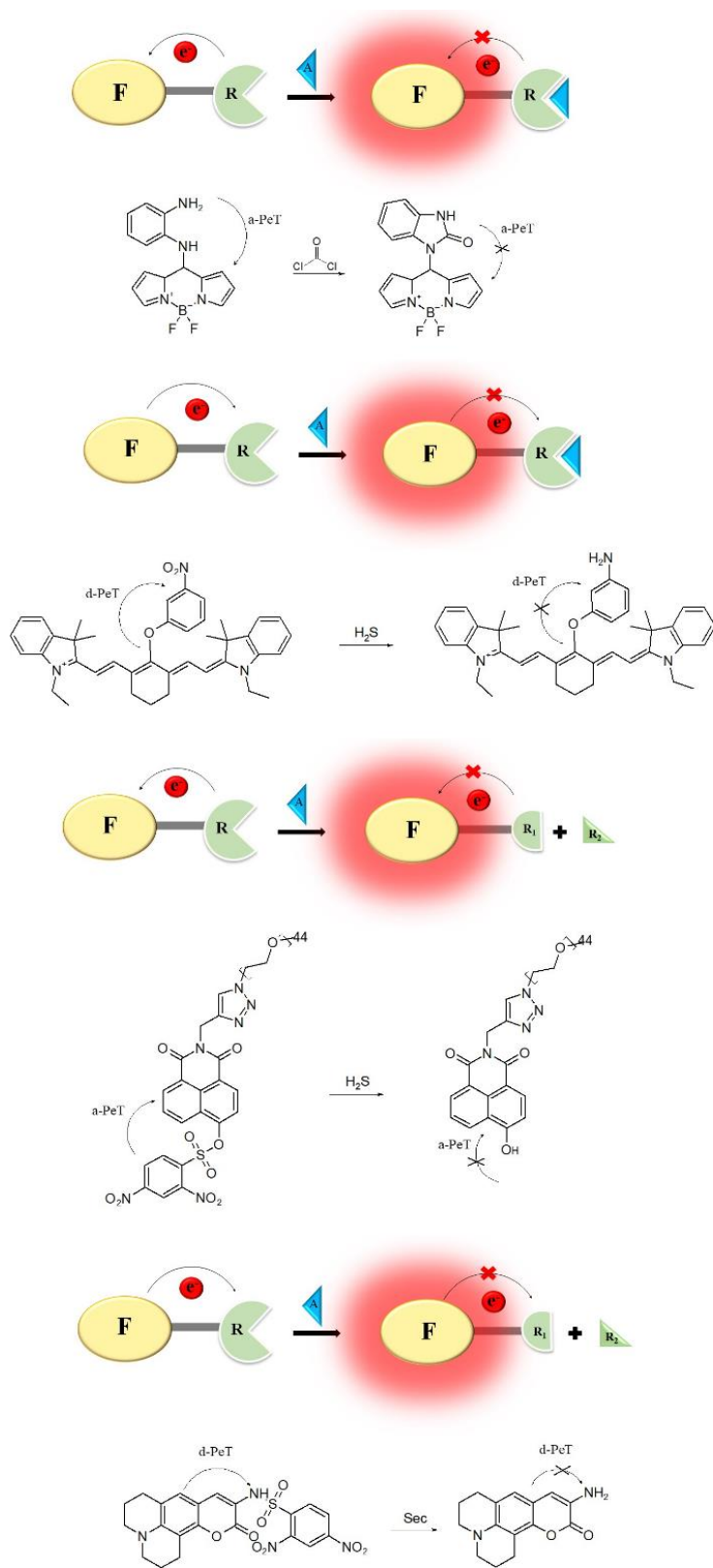
Slika 7. Shema PeT mehanizam potencijalne fluorescentne probe; R=recognition group (preuzeto i prilagođeno iz [24])



Slika 8. Energetski dijagram orbitala u PeT mehanizmu uključujući a-PeT (a) i d-PeT (b) (preuzeto i prilagođeno iz [24])

PeT se smatra pametnim dizajnom u razvoju tzv. „off-on“ ili „on-off“ fluorescentnih indikatora. Tijekom procesa prepoznavanja tvari, receptor odgovoran za prepoznavanje analita će se vezati za analit (engl. *Target*) i doći će ili do toga da je PeT onemogućen i fluorescencija je omogućena („off-on“) ili da je PeT aktiviran i fluorescencija je ugašena („on-off“). Pojava PeT-a ovisi o kemijskim svojstvima analita jer je upravo on odgovoran za varijacije između HOMO-LUMO energetskih razina receptora odgovornog za prepoznavanje analita [24]. Dizajn PeT fluorescentnih indikatora može se podijeliti na 4 tipa ovisno o promjeni oksido/redukcijskog potencijala receptora odgovornog za prepoznavanje analita (slika 9):

1. oksidacijski potencijal receptora odgovornog za prepoznavanje analita se povećá nakon prepoznavanja molekule (analita) i ne može više imati ulogu efektivnog elektron-donora što će rezultirati zabranom a-PeT nakon vezanja s tom molekulom – spoj fluorescira
2. smanjenjem oksidacijskog potencijala receptora odgovornog za prepoznavanje analita dolazi do nemogućnosti efikasnog primanja elektrona zbog čega će doći do zabrane d-PeT – spoj fluorescira
3. analit može odcijepiti receptor odgovoran za prepoznavanje analita rezultirajući nemogućnošću odvijanja a-PeT – spoj fluorescira
4. analit može odcijepiti receptor odgovoran za prepoznavanje analita rezultirajući nemogućnošću odvijanja d-PeT – spoj fluorescira [24].

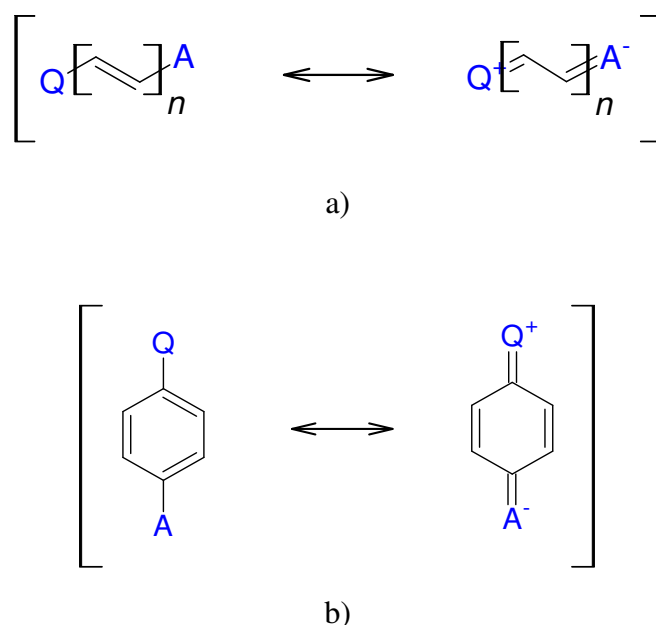


Slika 9. Četiri dizajna PeT fluorescentnih indikatora; F= fluorofor, R= receptor odgovoran za reakciju s analitom (preuzeto i prilagođeno iz [24])

Fluorofor može biti vezan za elektron-donirajuću ili elektron-odvlačeću skupinu pri čemu fluorofor može djelovati kao elektron-donor ili elektron-akceptor i dopušta da se d-PeT i a-PeT odvijaju. Zbog toga, isti fluorofor, u ovom slučaju naftalanhidrid, može se koristiti u pripravi velikog broja PeT fluorescentnih indikatora [24].

2.2.1.2. Intramolekularni prijenos naboja - ICT

Uz prethodno opisani PeT mehanizam, najčešće korišteni mehanizam u procesu dizajna fluorescentnih proba je mehanizam ICT. Navedeni ICT proces odvija se u molekulama u kojima su donirajuće i akceptorske skupine povezane dvostrukim (π) vezama [25] (slika 10).



Slika 10. Intramolekularni prijenos naboja u a) polienim sustavima i u b) aromatskim donor-akceptor molekulama [25]

Kada je ICT proces proveden u molekuli, elektronski naboj se prenosi s jednog kraja molekule na drugi, pri čemu se naboj akcelerira i doći će do emisije elektromagnetskih valova. Zbog raspodjele naboja tijekom ICT-a, molekula će imati veći dipolni moment u usporedbi s dipolnim momentom molekule u osnovnom stanju [25]. Velika raspodjela elektronskog naboja u molekuli mijenja sile koje djeluju na različite atome, što prisiljava molekulu da zauzme novu konfiguraciju u kojoj će ukupna sila koja djeluje na pojedinu molekulu biti 0. Radi toga,

geometrija pobuđene molekule može se znatno razlikovati od geometrije molekule u osnovnom stanju. Elektroni u molekuli će znatno brže poprimiti novu konfiguraciju, dok će jezgra, koja je znatno veća, zauzeti novi položaj nakon nekog vremena (u pikosekundama) [25]. Te dvije konfiguracije, prvotna pobuđena i energetski povoljnija konfiguracija, međusobno su odvojene energetsom barijerom, koja će ovisiti o otapalu u kojem se nalazi molekula. Ovisno o visini energetske barijere, temperaturi i jačini veza stvorenih između molekule i otapala, ICT molekula, u teoriji, može prikazati dvije emisije, jednu emisiju iz pobuđenog stanja molekule (koja će biti normalne ili kraće valne duljine) i drugu emisiju iz energetski povoljnijeg stanja (koja će imati dulju valnu duljinu). Ukoliko je otapalo polarnije, očekuje se da će ICT proces biti brži jer će polarno otapalo stabilizirati polarnu ICT molekulu [25]. Fluorescentni indikatori čiji se princip rada temelji na ICT mehanizmu koriste se u raznim istraživanjima u detekciji stanica zbog svoje neinvazivnosti, jednostavne regulacije, visoke osjetljivosti i brzog odgovora. Nadalje, ICT mehanizam ujedno predstavlja i pretpostavljeni mehanizam na kojemu se zasniva princip rada fluorescentne probe pripremljene u okviru ovog završnog rada, spoja **2** [26].

2.3. Dizajn fluorescentnog indikatora za H₂S

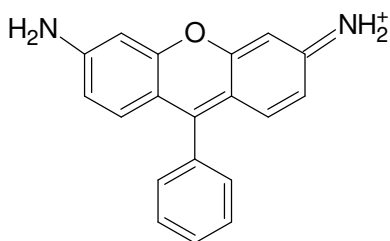
Fluorescentna proba koristi se za detekciju širokog spektra ciljnih spojeva na temelju molekularne interakcije ili kemijske reakcije. Potencijalna fluorescentna proba u svojoj strukturi posjeduje fluorofor, receptor odgovoran za prepoznavanje analita a ovisno o mehanizmu djelovanja fluorescentne probe, može posjedovati i linker u svojoj strukturi. Najčešće strategije na kojima se zasniva princip djelovanja fluorescentne probe podrazumijevaju interakciju fluorescentne probe s analitom (engl. *Lock And Key Mechanism*). Međutim, taj mehanizam najviše odgovara detekciji proteina, no nije prikladan za većinu fluorescentnih indikatora koji se koriste kao detektori ROS i RNS, vrste tvari koje uzrokuju oksidativni stres stanice. ROS i RNS vrste strukturno su slične, imaju kratko vrijeme života, i vrlo su reaktivne u biološkom sustavu pa su zbog toga indikatori koji se temelje na kemijskim reakcijama s tim reaktivnim vrstama najpogodniji za njihovu detekciju [5].

2.3.1. Fluorofori

Fluorofori su molekule koje posjeduju fluorescentna svojstva. Fluorofor apsorbira foton te emitira foton niže energije. Također, pokazuju kemijsku stabilnost te fotostabilnost, a kao

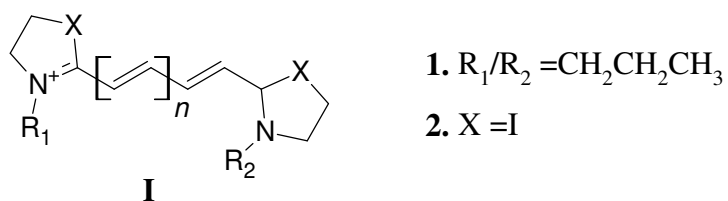
fluorofor mogu se koristiti različiti heterociklički spojevi (fluorescin, rodamin, cijanin.) kao i aminokiseline (fenilalanin, tirozin, triptofan) [27]. Neki od najčešće korištenih fluorofora u svrhu detekcije ROS-a i RNS-a su:

- i) Rodamin pokazuje znatna fotofizikalna svojstva te fotostabilnost. Sastoji se od tri benzenska prstena i heteroatoma, atoma kisika. Rodamin nastaje otvaranjem prstena u spironolaktonu te to dovodi do znatno poboljšane molarne apsorpcije i fluorescentnog kvantnog prinosa rodamina (slika 11) [5].



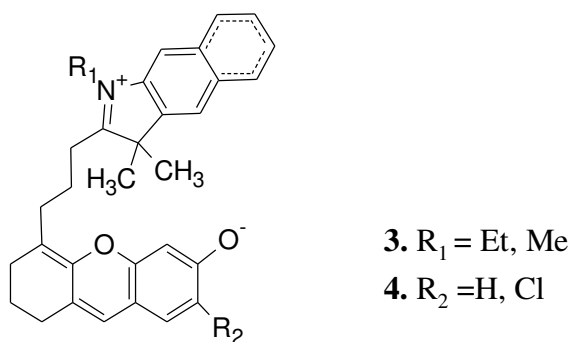
Slika 11. Strukturna formula molekule rodamina [5]

- ii) Cijanin kao fluorescentni indikator ima visoku molarnu apsorpciju, veliki fluorescentni kvantni prinos te su jasno razlučive razlike između valnih duljina apsorbirane i emitirane svjetlosti. Klasični cijanin fluorescentni indikator sastoji se od dva heterociklička prstena koji sadrže dušikove atome, od kojih je jedan pozitivno nabijen. Dva heterociklička prstena povezana su konjugiranim polimetilnim lancima koji sadrže neparan broj ugljikovih atoma (slika 12) [5].



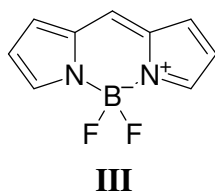
Slika 12. Strukturna formula cijanina, spoja I [5]

- iii) Hemicijanini se koriste u proučavanju dinamičkih promjena ROS-a i RNS-a u biološkim sustavima zbog jednostavnog modificiranja i odlične biološke kompatibilnosti. Hemicijanini se najčešće sastoje od heterocikličkog prstena koji sadrži u strukturi atom dušika koji je pozitivno nabijen i djeluje kao elektron-akceptor, elektron-donora (hidroksi, metoksi, amino ili amidne skupine) i konjugiranog strukturnog motiva koji povezuje te dvije strukture (slika 13) [5].



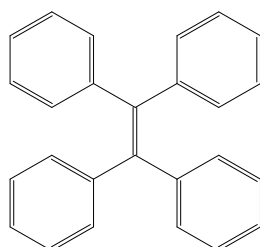
Slika 13. Strukturna formula molekule hemicijanina, spoja **II** [5]

- iv) Bor-dipirometan (engl. *Boron-dipyrromethene*, BODIPY) je vrsta fluorescentnih indikatora koji imaju visoki fluorescentni kvantni prinos te su fotostabilni. BODIPY se koristi za obilježavanje biomarkera oksidativnog stresa. Strukturu BODIPY čine dva simetrična pirolna prstena i šesteročlani heterociklički prsten koji sadrži bor i dušik (slika 14) [5].



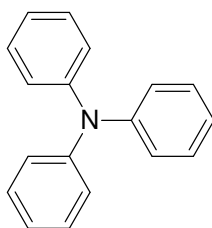
Slika 14. Strukturna formula molekule BODIPY, spoj **III** [5]

- v) Postoje fluorofori čije se djelovanje zasniva na principu emisije inducirane agregacijom (engl. *Aggregation-Induced Emission*). To je pojava pri kojoj su molekule slabo fluorescentne ili uopće ne fluoresciraju u razrijeđenim otopinama, no jako fluoresciraju u svom izvornom agregatnom stanju [28]. Tradicionalno, fluorescentne molekule emitiraju svjetlost u razrijeđenoj otopini, no kako njihova koncentracija raste, dolazi do gašenja fluorescencije usred intermolekularne π - π interakcije. Ova pojava se naziva gašenje uzrokovano agregacijom (engl. *Aggregation-Caused Quenching*, ACQ). Indikatori kao što su tetrafenilen (slika 15) i trifenilamin (slika 16), čije se djelovanje temelji na opisanoj pojavi, strukturno se lako modificiraju, jednostavna je sinteza te regulacija spektralnih svojstava. Naveliko su korišteni u dijagnostici/terapiji raka te u otkrivanju biomarkera oksidativnog stresa [5].



IV

Slika 15. Strukturna formula molekule tetrafenilena, spoj **IV** [5]

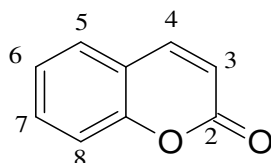


V

Slika 16. Strukturna formula molekule trifenilamina, spoj **V** [5]

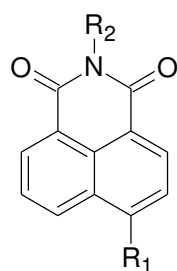
- vi) Kumarin pokazuje znatna fotofizikalna svojstva, također je biokompatibilan te se strukturno lako modificira. Kumarin emitira zračenje kratke valne duljine, zbog toga dolazi do modifikacija u njegovoj strukturi na način da se u strukturu uvode elektron-

donirajuće skupine (hidroksi, amino ili dietilamin skupine) na ugljikovom atomu na položaju 6 ili 7 ili dolazi do uvođenja elektron-akceptorske skupine na ugljikovom atomu na položaju 3 ili 4. To će dovesti do „*push-pull*“ efekta u molekuli što će dovesti u konačnici do emitiranja crvene svjetlosti (slika 17) [5].

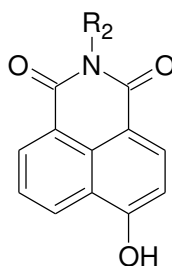


Slika 17. Strukturna formula molekule kumarina [5]

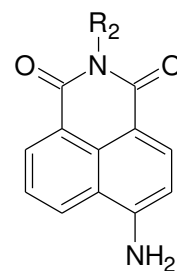
- vii) 1,8-naftalanhidridi pokazuju kemijsku stabilnost te visoku otpornost na pojavu izbjeljivanja svjetlošću (engl. *Photobleaching*). Navedeni pojam podrazumijeva pojavu kod koje molekula fluorofora trajno izgubi sposobnost fluoresciranja zbog foton-inducirane kemijske promjene i kovalentne modifikacije [29]. 1,8-naftalanhidrid je sustav s manjkom elektrona u kojem naftalen ima ulogu π -mosta, a imidni dio služi kao elektron-akceptor. U strukturi naftalanhidrida, R_1 skupina je elektron-donirajuća skupina, a R_2 je skupina odgovorna za modulaciju fizikalno-kemijskih svojstava (slika 18) [5].



VI



VII



VIII

5. $R_2 = \text{Me}, n\text{-Bu}$

6. $R_1 = \text{Br}, R_2 = n\text{-Pr}$

7. $R_1 = \text{CN}, R_2 = n\text{-Pr}$

8. $R_1 = \text{NH}n\text{-Pr}, R_2 = \text{Ph}$

9. $R_1 = \text{NH}n\text{-Bu}$

10. $R_1 = \text{NHMe}, R_2 = \text{Me}$

11. $R_1 = \text{NHEt}, R_2 = \text{Et}$

12. $R_1 = \text{NH}n\text{-Pr}, R_2 = n\text{-Pr}$

13. $R_1 = \text{NH}i\text{Pr}, R_2 = i\text{Pr}$

14. $R_1 = \text{NH}_2, R_2 = n\text{-Bu}$

15. $R_1 = \text{NMe}_2, R_2 = n\text{-Bu}$

16. $R_1 = \text{NHCOMe}, R_2 = n\text{-Bu}$

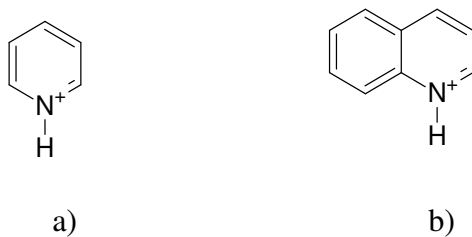
17. $R_1 = \text{NHNH}_2, R_2 = \text{NH}_2$

Slika 18. Strukturna formula 1,8-naftalanhidrida, spoja **VI**, 4-hidroksi-1,8-naftalanhidrida, spoja **VII** i 4-amino-1,8-naftalanhidrida, spoja **VIII** [5]

2.3.2. Linkeri

Linker je most koji povezuje fluorofor i receptor odgovoran za reakciju s analitom te je on odgovoran za modulaciju optičkih svojstava fluorescentnog indikatora. Linkeri koji se koriste u strukturama fluorescentnih indikatora za detekciju ROS i RNS vrsta mogu se podijeliti u četiri kategorije:

- C-C/N/S jednostruke veze ili π -mostovi
- Eterske veze, npr. O, S, Se, Te, itd.
- Esterske i amidne veze
- Piridinij (slika 19a) i kinolinij (slika 19b) [20].

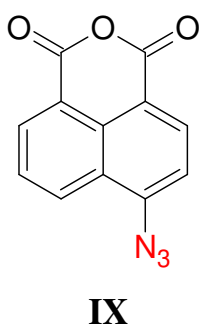


Slika 19. Strukturna formula molekule piridinjia (a) i kinolinija (b) [20]

2.3.3. Receptor odgovoran za reakciju s analitom (activating/recognition group)

Receptor odgovoran za reakciju s analitom je odgovarajuća skupina za prepoznavanje analita s ciljem omogućavanja selektivnog odgovora fluorescentne probe [30]. Postoje razne vrste receptora odgovornih za reakciju s analitom za pojedini spoj, a u okviru ovog poglavlja opisane su funkcionalne skupine korištene kao receptori odgovorni za reakciju s H_2S , koji je ujedno ciljani analit ovog završnog rada.

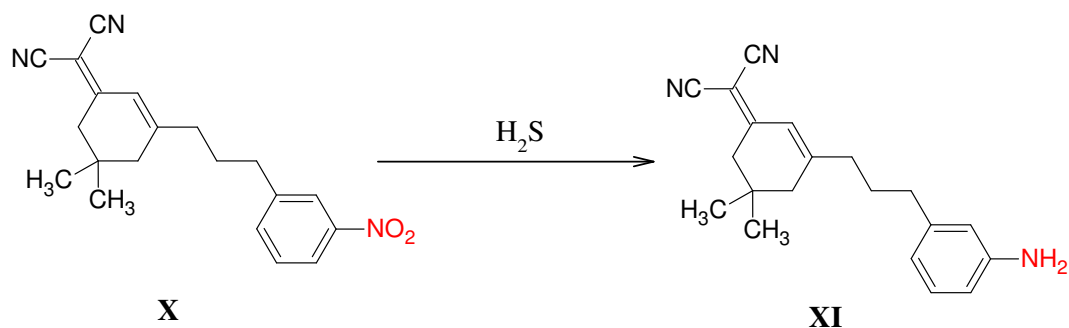
Jedna od korištenih funkcionalnih skupina u svrhu detekcije H_2S je azidna skupina. Wu i suradnici [31] sintetizirali su fluorescentnu probu koja sadrži 1,8-naftalimidni skelet kao fluorofor te azidnu skupinu kao receptor odgovoran za reakciju s H_2S (slika 20). Azidna skupina često je korišten receptor upravo zbog svoje jednostavne sinteze te odgovarajuće brzine reakcije.



Slika 20. Strukturna formula fluorescentne probe s azidnom skupinom, spoj **IX** [31]

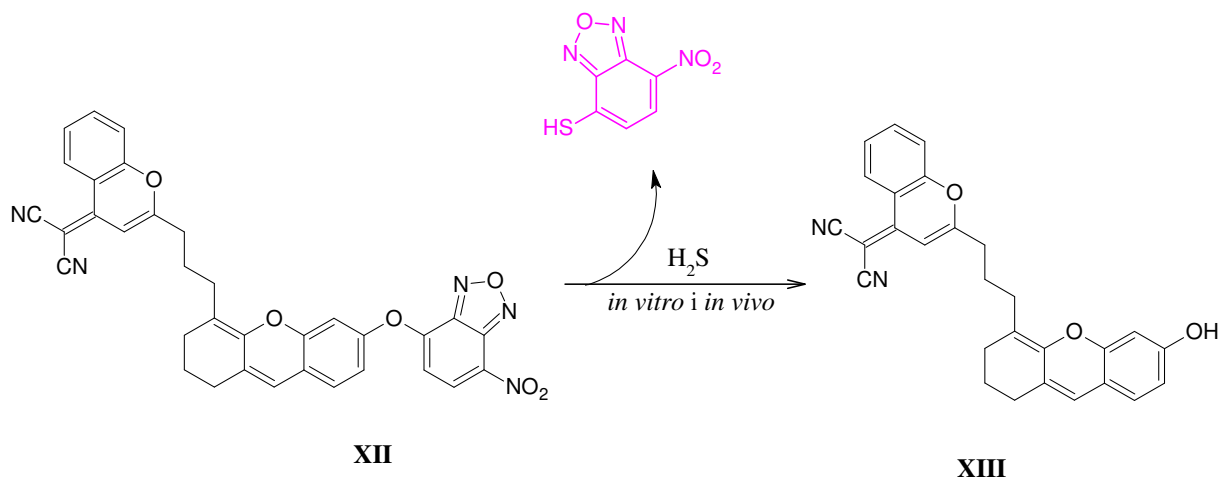
Nadalje, nitro skupina je također korištena kao receptor u svrhu detekcije H_2S . Istraživanja su pokazala da se nitro skupina, snažna elektron-odvlačeća skupina, u prisutnosti

H₂S može reducirati do amino skupine (slika 21). Mehanizam sintetizirane fluorescentne probe zasniva se na prethodno objašnjenom ICT mehanizmu (poglavlje 2.2.1.2) [32].



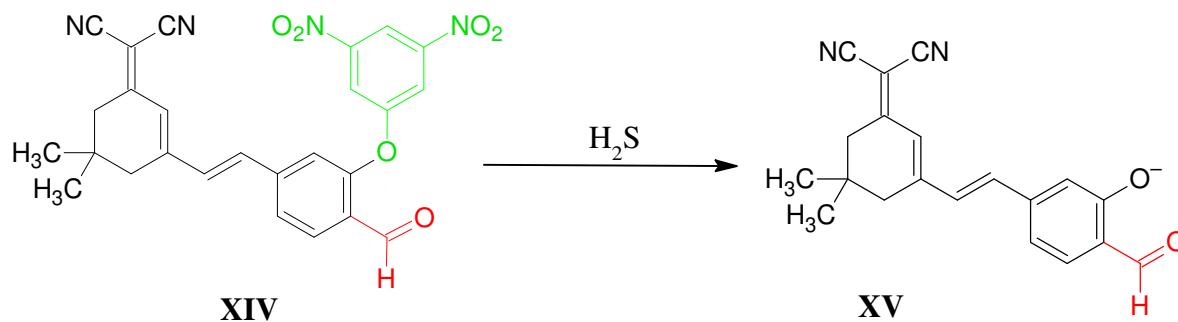
Slika 21. Shema redukcije, nitro skupine fluorescentne probe, spoja **X** u amino skupinu [32]

Gong i suradnici [33] sintetizirali su NIR (engl. *Near Infrared Spectroscopy*) fluorescentnu probu, spoj **XII**, koja se koristi za *in vitro* i *in vivo* detekciju H₂S. U strukturi fluorescentne probe nalazi se benzoksadiazol (NBD) eter kao receptor odgovoran za reakciju s H₂S (slika 22).



Slika 22. Shema mehanizma fluorescentne probe, spoja **XII**, pri detekciji H₂S [33]

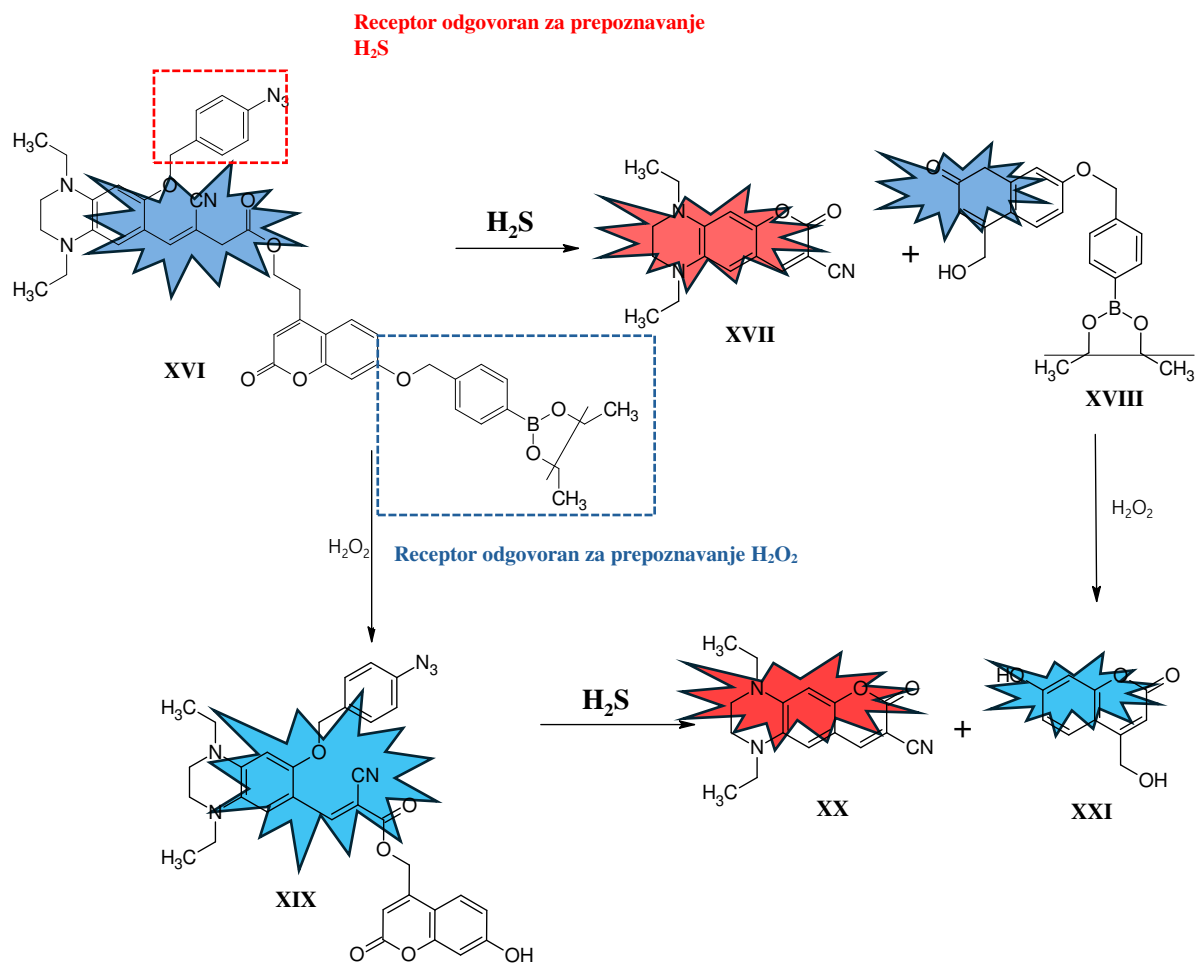
Kao funkcionalna skupina korištena kao receptor za detekciju H_2S u sintetiziranoj fluorescentnoj probi, spoju **XIV**, je 2,4-dinitrofenil. Mehanizam ove fluorescentne probe također prati prethodno objašnjeni ICT mehanizam (poglavlje 2.2.1.2) (slika 23) [34].



Slika 23. Shema mehanizma fluorescentne probe, spoja **XIV** [34]

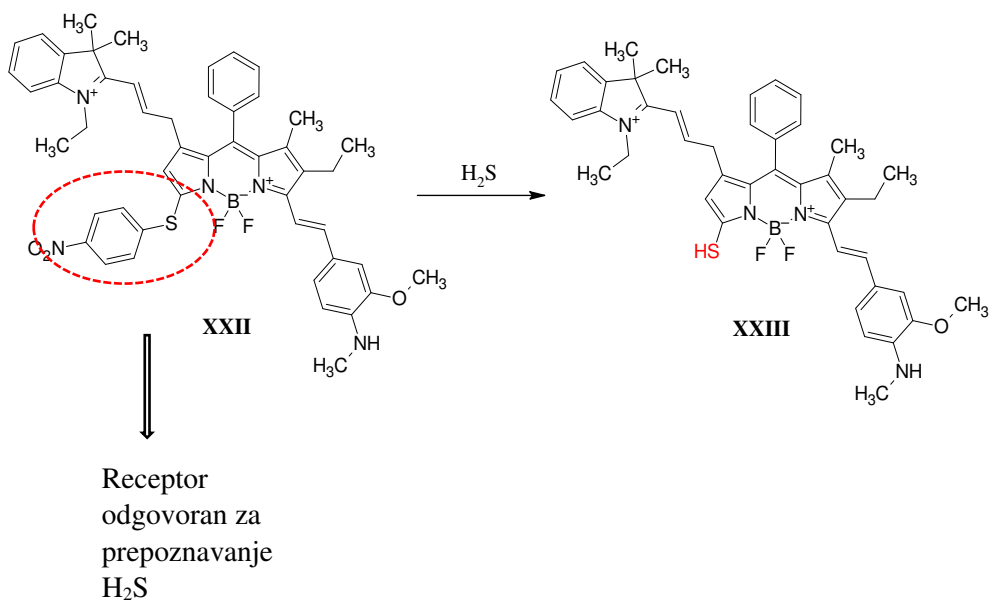
2.4. Fluorescentne probe za detekciju H_2S

Cilj ovoga rada je dizajn i priprava fluorescentnih proba za detekciju H_2S te će se u sljedećem poglavlju pobliže opisati literaturno opisane pripremljene fluorescentne probe. Prvu od takvih fluorescentnih proba dizajnirali su Wang i suradnici [35]. Fluorescentna proba, spoj **XVI**, je dio serije derivata kumarina koje će se koristiti za detekciju H_2S . Specifičnost spoja **XVI** je u tome da može selektivno detektirati H_2S i H_2O_2 . U strukturi spoja **XVI** kao receptor za reakciju s H_2S nalazi se azidna skupina (slika 24).



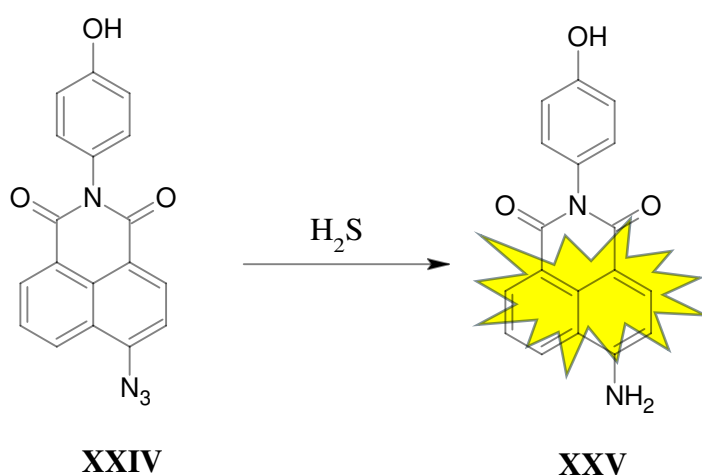
Slika 24. Shema mehanizma fluorescentne probe, spoja **XVI** (preuzeto i prilagođeno iz [35])

Uz spoj **XVI**, Zhao i suradnici [5] dizajnirali su aktiviranu fluorescentnu probu, spoj **XXII**, čiji je cilj bila upotreba u detekciji H₂S (slika 25). Kao receptor odgovoran za reakciju s H₂S korišten je 4-nitrobenzen tiol.



Slika 25. Shema fluorescentne probe, spoja **XXII**, u detekciji H_2S [5]

Zhang i suradnici [6] pripravili su spoj **XXIV**, fluorescentnu probu čiji je glavni strukturni motiv naftalimidni skelet koji u svojoj strukturi ima vezane strukturno različite anilinske derivate. Mehanizam rada spoja **XXIV** zasniva se na već objašnjenom procesu ICT (poglavlje 2.2.1.2). Na naftalimidnom skeletu probe vezana je azidna skupina koja se u prisutnosti H_2S reducira u amino skupinu što rezultira tzv. „turn on“ fluorescentnim signalom (slika 26)..



Slika 26. "turn-on" fluorescentni signal spoja **XXIV** [6]

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali i metode

Za sintezu su korišteni komercijalno dostupni polazni spojevi i otapala: 4-brom-1,8-naftalanhidrid (*Sigma-Aldrich*), *N,N*-dimetilformamid (99,8%; *Acros Organics BVBA*), 4-kloranilin (98%, *Acros Organics BVBA*), *p*-metilanilin (99%, *Acros Organics BVBA*), natrijev azid, etil-acetat, heksan. Za praćenje tijeka reakcije, kontrolu čistoće spojeva i preliminarnu identifikaciju produkta korištena je tankoslojna kromatografija na pločicama silikagela (60 F 254, 0,25 mm, *Fluka*). Vizualizacija je provedena apsorpcijom UV zračenja (254 nm). ^1H i ^{13}C NMR spektri snimljeni su na instrumentu *Bruker AV 600* na sobnoj temperaturi pri 500 MHz i 125 MHz u deuteriranom dimetilsulfoksidu ($\text{DMSO-}d_6$) kao otapalu. IR spektri snimljeni su na uređaju *Shimadzu FTIR 88400S* u području $4000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$. Za kromatografiju na stupcu silikagela korišteni su sljedeći sustavi otapala:

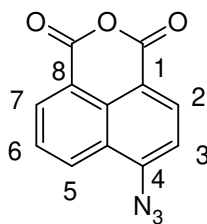
Sustav otapala A: Etil-acetat/heksan = 1 : 1

Sustav otapala B: Etil-acetat/heksan = 1 : 3

Sustav otapala C: Etil-acetat/heksan = 1 : 4.

3.1.1. Priprava 6-azido-1*H*,3*H*-benzo[*de*]izokromen-1,3-diona (**1**)

U tikvicu su dodani 4-brom-1,8-naftalanhidrid (204 mg, 0,7 mmol) i suhi DMF (3 mL). Na tikvicu je stavljena klor-kalcijeva cjevčica, a reakcijska smjesa je miješana na magnetskoj miješalici. Kada je 4-brom-1,8-naftalanhidrid otopljen, reakcijskoj smjesi dodan je NaN_3 (140 mg, 2,1 mmol). Tijek reakcije praćen je tankoslojnom kromatografijom (sustav otapala A). Nakon 2 h reakcijskoj smjesi je dodana voda, pri čemu dolazi do nastanka taloga. Dobiven talog je izdvojen iz reakcijske smjese vakuum filtracijom. Dobivena je krutina žute boje, spoj **1** (144 mg, 82 %) (slika 27); $175,8^\circ\text{--}185,4^\circ\text{C}$; $R_f = 0,76$ (sustav otapala A).



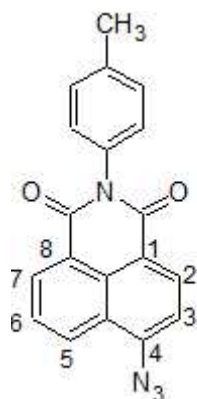
Slika 27. Strukturna formula molekule spoja **1**

^1H NMR (500 MHz, DMSO) δ / ppm: 7.80 (d, 1H, J = 8.0 Hz, H-3), 7.92 (t, 1H, J = 7.8 Hz, H-6), 8.52 (dd, 2H, J = 3.3, 8.2 Hz, H-5, H-7), 8.57 (d, 1H, J = 7.1 Hz, H-2).

^{13}C NMR (125MHz, DMSO) δ / ppm: 115.244, 116.841, 119.712, 124.117, 128.120, 129.994, 131.274, 133.780, 133.809, 144.644, 160.577, 161.160.

3.1.2. Priprava 6-azido-2-(4-metilfenil)-1*H*-benzo[*de*]izokinolin-1,3(2*H*)-diona (**2**)

Spoj **1** (50 mg, 0,2 mmol) otopljen je u etanolu (7 mL). Reakcijska smjesa je zagrijana uz povratno hladilo preko uljne kupelji i miješana na magnetskoj miješalici. Kada otapalo počne refluksirati, reakcijskoj smjesi je dodan *p*-metilanilin (44 mg, 0,4 mmol). Tijek reakcije praćen je tankoslojnom kromatografijom (sustav otapala A). Hlađenjem reakcijske smjese prvo na sobnoj temperaturi, zatim u hladnjaku tijekom noći, nastaje talog koji je izdvojen iz reakcijske smjese vakuum filtracijom. Dobivena je krutina žuto-smeđe boje, spoj **2** (30 mg, 26 %) (slika 28); R_f = 0,75 (sustav otapala A).



Slika 28. Strukturna formula molekule spoja **2**

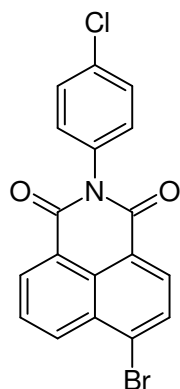
^1H NMR (500 MHz, DMSO) δ / ppm: 2.39 (s, 3H, CH_3), 7.26 (d, 2H, $J = 8.1$ Hz, H-Ar), 7.33 (d, 2H, $J = 8.1$ Hz, H-Ar), 7.82 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz, H-3), 7.93 (t, 1H, $J = 8.2$ Hz, H-6), 8.51 (d, 2H, $J = 8.1$ Hz, H-5, H-7), 8.55 (d, 1H, $J = 7.1$ Hz, H-2).

^{13}C NMR (125MHz, DMSO) δ / ppm: 116.510, 119.288, 123.3111, 124.246, 127.852, 128.984, 129.274, 129.813, 132.049, 132.142, 133.797, 143.451, 163.610, 164.059.

3.1.3. Pokušaj priprave 6-azido-2-(4-klorofenil)-1*H*-benzo[de]izokinolin-1,3(2*H*)-diona sintetskim putem 2

3.1.3.1. Pokušaj priprava 6-brom-2-(4-klorofenil)-1*H*-benzo[de]izokinolin-1,3(2*H*)-diona (**a**)

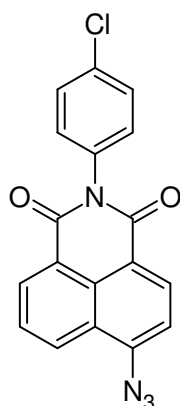
Za pripravu spoja **a**, otopljen je 4-brom-1,8-naftalanhidrid (100 mg, 0,36 mmol) u etanolu (7 mL). Reakcijska smjesa je zagrijana uz povratno hladilo preko uljne kupelji i miješana na magnetskoj miješalici. Kada otapalo počne refluksirati, reakcijskoj smjesi dodan je *p*-kloranilin (30 mg, 0,28 mmol). Tijek reakcije praćen je tankoslojnom kromatografijom (sustav otapala C). Reakcija je ostavljena preko noći te je nastali talog izdvojen iz reakcijske smjese vakuum filtracijom. IR spektroskopijom pretpostavljeno je kako izolirani produkt, nije ciljni produkt, produkt **a**.



Slika 29. Strukturna formula molekule spoja **a**

3.1.3.2. Pokušaj priprava 6-azido-2-(4-klorofenil)-1*H*-benzo[de]izokinolin-1,3(2*H*)-diona (**b**) sintetskim putem 2

Spoj **a** (20 mg, 0,055 mmol) otopljen je u suhom DMF (3 mL). Kada je spoj **a** u potpunosti otopljen, dodan je natrijev azid (16,2 mg, 0,25 mmol). Reakcija je provedena na sobnoj temperaturi te je miješana na magnetskoj miješalici. Tijek reakcije praćen je tankoslojnom kromatografijom (sustavi otapala A i C). Nakon 2 h, u reakcijsku smjesu dodana voda pri čemu se taloži produkt koji je izdvojen iz reakcijske smjese vakuum filtracijom. ^1H i ^{13}C NMR spektroskopijom, pretpostavljeno je kako, izolirani produkt, nije ciljani produkt, spoj **b**, umjesto toga izolirana je reakcijska smjesa neizreagiranih polaznih reaktanata.



Slika 30. Strukturna formula molekule spoja **b**

3.1.4. Uvođenje H₂S u otopinu spoja **2**

Spoj **2** (1 mg) otopljen je u etanolu (5 mL) u staklenoj bočici. U drugoj staklenoj bočici reakcijom FeS i HCl razvijen je H₂S. Dvije staklene bočice spojene su plastičnom cijevi koja omogućava uvođenje generiranog H₂S u otopinu spoja **2**. Nakon uvođenja H₂S, otopina spoja **2** fluorescira pod UV lampom (365 nm).

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Uvod

H₂S jedna je od triju signalnih molekula u našem organizmu koja sudjeluje u raznim fiziološkim i patološkim procesima kao što su neurotransmisija, apoptoza, regulira stanični metabolizam te posjeduje antioksidativna svojstva. Oksidativni stres nastaje u slučaju neravnoteže između nastajanja ROS-a i mogućnosti organizma da ukloni te reaktivne vrste [4]. H₂S, kao takav, posjeduje izravna i neizravna antioksidativna svojstva. Izravno antioksidativno svojstvo H₂S može se pripisati njegovim kemijskim svojstvima koja mu omogućuju neutralizaciju ROS-a. On može reagirati s O₂^{•-} pri čemu nastaju hidrosulfidni anion, HS⁻, i vodikov peroksid, H₂O₂. Na taj način smanjuje se koncentracija O₂^{•-}, snažne ROS vrste. Nadalje, H₂S može izravno neutralizirati H₂O₂, stvarajući vodu i elementarni sumpor [4].

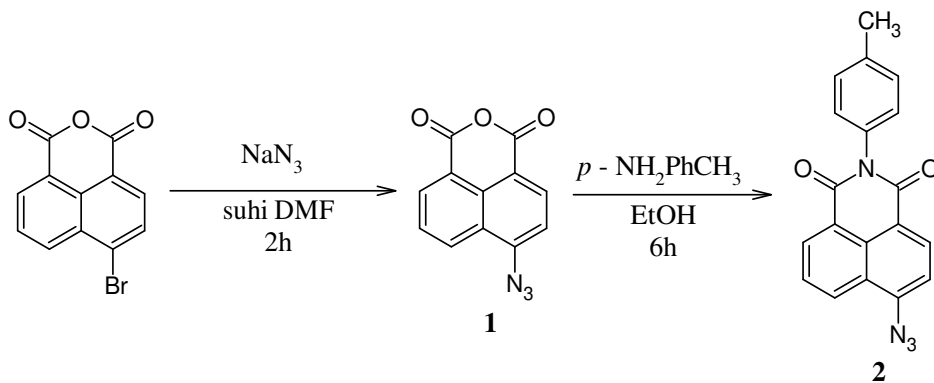
S obzirom na navedeno, razvoj preciznih metoda za određivanje koncentracije H₂S kao i za detekciju H₂S je od vrlo velike važnosti. U literaturi je opisan veliki broj metoda za detekciju H₂S uključujući plinsku kromatografiju kao i kolorimetrijske testove za razvoj fluorescentnih proba. Prednost fluorescentnih proba je njihova nedestruktivnost te visoka osjetljivost što su vrlo bitne karakteristike koje omogućavaju selektivnu detekciju H₂S. Kako je spomenuto u poglavlju 2.3., potencijalna fluorescentna proba u svojoj strukturi posjeduje najčešće tri strukturalna motiva koja podrazumijevaju fluorofor, receptor odgovoran za prepoznavanje analita i linker. Linker može biti prisutan u strukturi fluorescentne molekule, ali i ne mora, što će ovisiti o mehanizmu na kojemu se zasniva fluorescencija pripremljene fluorescentne probe.

U okviru ovoga rada dizajnirana je fluorescentna proba, spoj **2**, s ciljem njegove upotrebe u detekciji H₂S. Spoj **2** u svojoj strukturi posjeduje 1,8-naftalimidni sustav kao fluorofor te azidnu skupinu kao receptor odgovoran za reakciju s H₂S. Azidna skupina u strukturi spoja **2** uvedena je na položaj 4 naftalimidnog skeleta, a na naftalimidni skelet kao fluorofor vezana je direktno bez uvođenja linkera. Prema tome, potencijalni mehanizam fluorescencije dizajnirane fluorescentne probe zasniva se na ICT mehanizmu. Spoj **2** koji u svojoj strukturi posjeduje azidnu skupinu kao elektron-akceptorsku skupinu, pokazuje mali intenzitet fluorescencije. U prisustvu H₂S azidna skupina kao elektron-akceptorska skupina reducira se u amino skupinu kao elektron-donirajuću skupinu. Uvođenjem amino skupine kao elektron-donirajuće skupine, u strukturu naftalimidnog skeleta, povećava se intenzitet

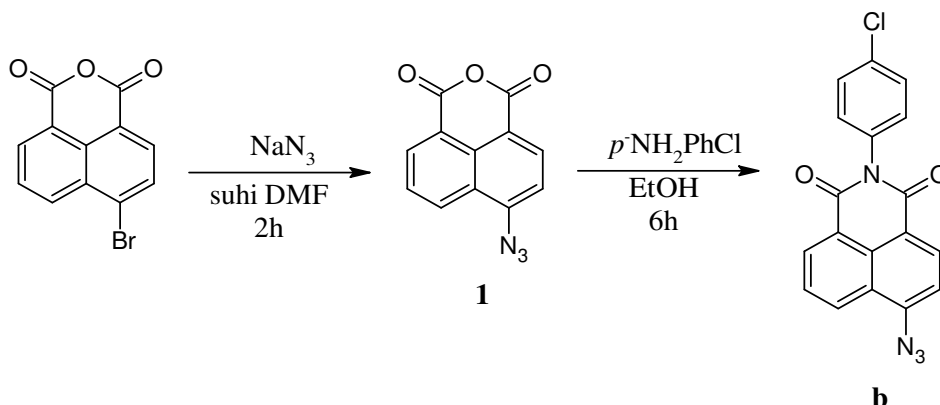
fluorescencije. Spoj **2**, korišten je u preliminarnim ispitivanjima kao fluorescentna proba za detekciju H₂S. Navedeni rezultati pokazuju mogućnost uporabe spoja **2** kao fluorescentne probe za detekciju H₂S, što će biti temelj za buduća istraživanja.

4.2. Priprava spoja **2** i pokušaj pripreve spoja **b** sintetskim putem 1

U okviru ovoga rada pripravljen je spoj **2**, naftalimidni derivat s ciljem njegove upotrebe u detekciji H₂S. Za pripravu ciljanog spoja **2**, proveden je literaturno opisani sintetski put 1 [6] uz modifikaciju na način da je dodana duplo veća količina NaN₃, koji je dodan direktno u reakcijsku smjesu bez prethodnog otapanja u vodi. Dakle, prvi korak podrazumijeva reakciju polaznog spoja 4-brom-1,8-naftalanhidrida s NaN₃, u suhom DMF, u svrhu uvođenja azidne skupine kao receptora odgovornog za reakciju s analitom, H₂S. Navedena reakcija rezultirala je pripravom spoja **1** uz prinos od 81,8 %. Sljedeći korak podrazumijevao je reakciju spoja **1** s odabranim anilinskim derivatom, *p*-metilanilinom, u etanolu uz refluks. Provedena reakcija rezultirala je pripravom spoja **2** uz prinos 25,3 % (slika 32). S ciljem ispitivanja utjecaja elektronskih svojstava skupine vezane u *para*-položaj anilinskog derivata na prinos reakcije sa spojem **1** te u konačnici s ciljem ispitivanja utjecaja elektronskih svojstava navedenog supstituenta na intenzitet fluorescencije, provedena je reakcija spoja **1** s *p*-kloranilinom (slika 33). Navedena reakcija nije rezultirala uspješnom pripravom spoja **b**, što je pretpostavljeno ¹H i ¹³C NMR spektroskopijom. S ciljem uspješne pripreve spoja **b** provedeno je optimiziranje reakcijskih uvjeta, konkretno produženje vremena reakcije te povećanje ekvivalenata *p*-kloranilina u odnosu na polazni spoj, 4-brom-1,8-naftalanhidrid. Niti u ovom slučaju priprava spoja **b** nije bila uspješna.

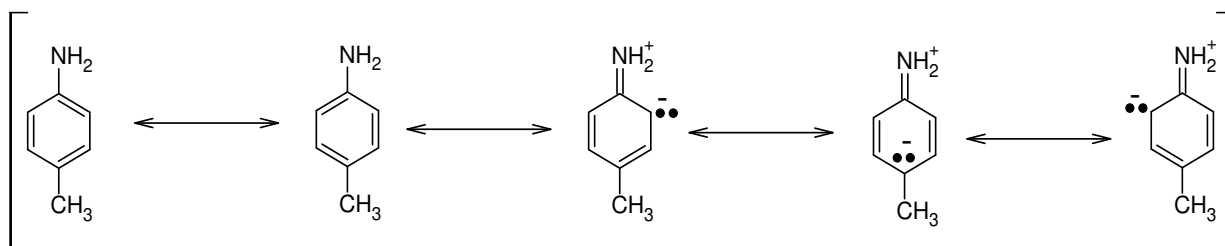


Slika 32. Priprava spoja **2** sintetskim putem 1



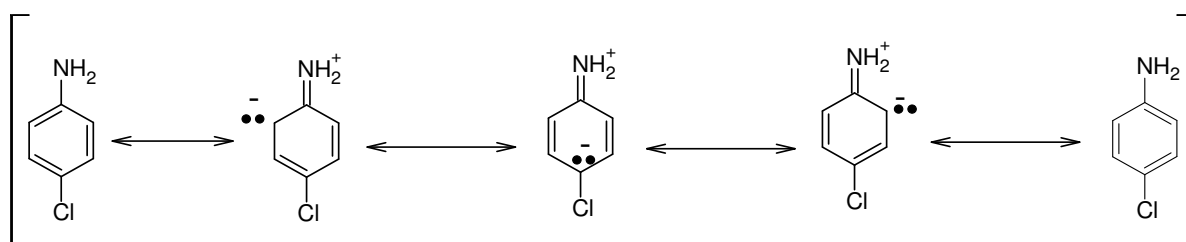
Slika 33. Pokušaj priprave spoja **b** sintetskim putem 1

Aromatski amini, općenito, pokazuju slabiju nukleofilnost i bazičnost u odnosu na alifatske amine. No, prisutnost različitih supstituenata u strukturi anilina može utjecati na promjenu bazičnosti i nukleofilnosti. U strukturi p -metilanilina, koji je korišten kao anilinski derivat za pripravu spoja **2**, prisutna je metilna skupina. Alkilne skupine, općenito, doniraju elektrone preko σ -veze kojom su vezane na benzenski prsten. Takav efekt naziva se induktivna stabilizacija. Uz induktivni efekt, u strukturi p -metilanilina prisutna je i σ -konjugacija koja podrazumijeva interakciju jedne od metilnih C-H σ -veza s π -elektronima aromatskog prstena. S druge strane, rezonancijski efekt odnosi se na konjugaciju elektronskog para supstituenata s π -elektronima aromatskog prstena [36]. Opisana σ -konjugacija djeluje na isti način kao rezonancijski efekt, no puno slabije. Prema tome, u strukturi molekule p -metilanilina prisutne su dvije funkcionalne skupine, amino skupina koja pokazuje rezonancijski elektron-donirajući efekt te metilna skupina koja pokazuje induktivni elektron-donirajući efekt. U slučaju p -metilanilina konjugacijom nevezanog elektronskog para atoma dušika s π -elektronima aromatskog prstena dobivena je rezonancijska struktura u kojoj je, na atom ugljika na kojemu je negativni naboj, prisutna elektron-donirajuća, metilna skupina (slika 34). Takva struktura daje najmanji doprinos rezonancijskom hibridu, no elektronska gustoća na atomu dušika je veća što u konačnici atom dušika čini boljim nukleofilom [36].



Slika 34. Rezonancijske strukture *p*-metilanilina [35]

U slučaju *p*-kloranilina, atom klora, i općenito halogeni elementi, pokazuje dva suprotna efekta. Prvi efekt podrazumijeva doniranje elektrona konjugacijom nevezanog elektronskog para s π -elektronima aromatskog prstena (rezonancijski efekt) dok drugi efekt uključuje odvlačenje elektrona kroz σ -veze, zahvaljujući velikoj elektronegativnosti atoma klora (induktivan efekt) [36]. Delokalizacijom nevezanog elektronskog para atoma dušika s elektronima aromatskog prstena dobivena je rezonancijska struktura u kojoj je negativan naboj na atomu ugljika na kojemu je vezan atom klora. Takva struktura daje veći doprinos rezonancijskom hibridu, no u konačnici smanjuje nukleofilnost atoma dušika (slika 35). Navedeno objašnjenje može predstavljati jedan od potencijalnih razloga neuspješnosti pripreve spoja **b**.

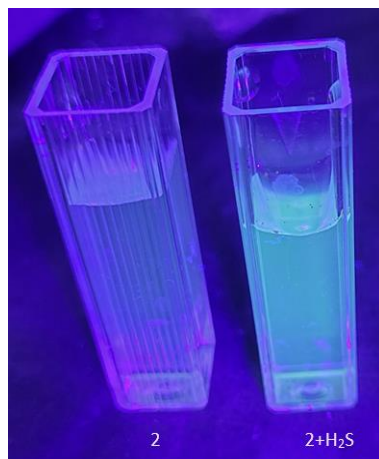


Slika 35. Rezonancijske strukture *p*-kloranilina [35]

4.2.1. Uvođenje H₂S u otopinu spoja **2**

Spoj **2**, naftalimidni derivat s metilnom skupinom na arilnom dijelu molekule, korišten je u preliminarnim ispitivanjima koja podrazumijevaju uvođenje H₂S u otopinu spoja **2**. Kako je spomenuto u poglavlju 4.1. u slučaju kada se u strukturi spoja **2** nalazi azidna skupina kao

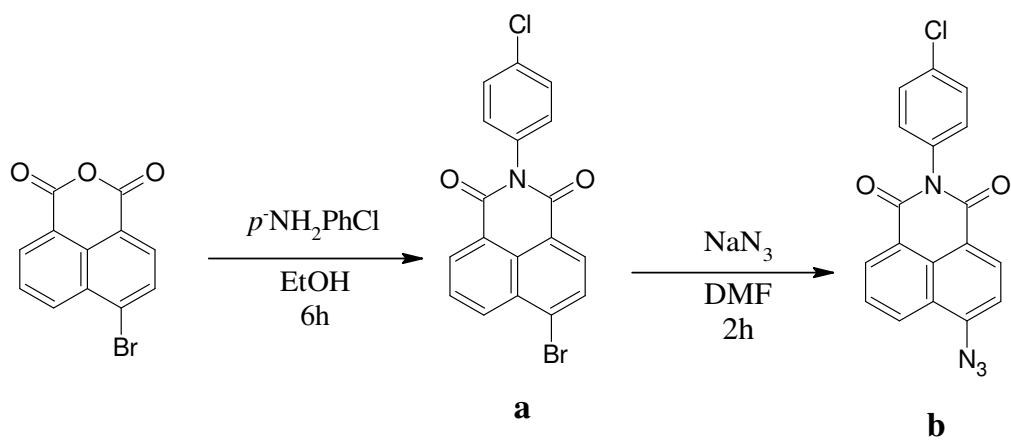
elektron-akceptorska skupina, za očekivati je manji intenzitet fluorescencije nego u slučaju prisutnosti amino skupine kao elektron-donirajuće skupine u strukturi spoja **2** [29]. U tu svrhu u otopinu spoja **2** uveden je H₂S, razvijen reakcijom FeS i HCl. Otopina spoja **2**, nakon uvođenja H₂S, stavljena je pod UV lampu (365 nm) pri čemu dolazi do fluoresciranja otopine, dok otopina polaznog azida prije uvođenja H₂S ne fluorescira (slika 36). Ovakvi rezultati sugeriraju mogućnost upotrebe spoja **2** kao potencijalne fluorescentne probe za detekciju H₂S, na čemu će se zasnivati daljnja istraživanja.



Slika 36. Uvođenje H₂S u otopinu spoja **2** (fosfatni pufer, pH=7,4)

4.3. Pokušaj pripreve spoja **b** sintetskim putem 2

S obzirom na neuspješnu pripravu spoja **b**, sintezi spoja **b**, pokušalo se pristupiti i korištenjem drugog sintetskog puta. Prvi korak, novog predloženog sintetskog puta 2 podrazumijevao je reakciju polaznog spoja 4-brom-1,8-naftalanhidrida s *p*-kloranilinom pri čemu dolazi do nastanka spoja **a**, koji u svojoj strukturi posjeduje naftalimidni skelet. U sljedećem reakcijskom koraku spoj **a** reagira s natrijevim azidom s ciljem uvođenja azidne skupine, kao receptora odgovornog za reakciju s ciljnim analitom, H₂S, u osnovnu naftalimidnu strukturu (slika 37). Predloženi sintetski put, nije rezultirao pripravom ciljnog produkta, spoja **b** što je pretpostavljeno IR spektroskopijom, ¹H i ¹³C NMR spektroskopijom. Na temelju navedenih rezultata može se zaključiti kako atom dušika *p*-kloranilina niti u slučaju novog predloženog sintetskog puta nije dovoljno nukleofilan za reakciju s polaznim spojem 4-brom-1,8-naftalanhidridom. Potencijalno objašnjenje predstavlja elektron-odvlačeći induktivni efekt atoma klora, što je detaljno objašnjeno u poglavlju 4.2.



Slika 37. Pokušaj priprave spoja **b** sintetskim putem 2

5. ZAKLJUČAK

- 1) Sintetskim putem 1 pokušalo se pripraviti spoj **2** i spoj **b**. Oba spoja u svojoj strukturi sadrže 1,8-naftalimidni sustav kao fluorofor te azidnu skupinu kao receptor odgovoran za reakciju s H₂S. Sintetskim putem 1 uspješno je sintetiziran spoj **2**, dok spoj **b** nije uspješno pripremljen.
- 2) S obzirom na neuspješnu pripravu spoja **b**, za pripravu spoja **b**, predložen je novi sintetski put 2. Razlika između sintetskog puta 1 i 2 je u tome što se u prvom koraku sintetskog puta 1 uvodi azidna skupina na položaj 4 naftalanhidridnog skeleta, dok prvi korak sintetskog puta 2 podrazumijeva reakciju polaznog spoja 4-brom-1,8-naftalanhidrida i *p*-kloranilina. Spoj **b** nije uspješno pripremljen niti sintetskim putem 2.
- 3) Kako bi se ispitala mogućnost upotrebe spoja **2** kao fluorescentnog indikatora za detekciju H₂S, provedena su preliminarna ispitivanja koja podrazumijevaju uvođenje H₂S u otopinu spoja **2**. Otopina polaznog azida, spoja **2**, nije fluorescirala pod UV lampom, dok nakon uvođenja H₂S otopina fluorescira pod UV lampom (365 nm). Ovakvi preliminarni rezultati pokazuju mogućnost upotrebe spoja **2**, kao fluorescentnog indikatora za detekciju H₂S, na što će naglasak biti stavljen u nastavku ovoga istraživanja.

6. LITERATURA

1. M.M. Gadalla, S.H. Snyder, Hydrogen sulfide as a gasotransmitter, *Jour of Neurochem.*, **2010.**, *113.*, pp. 14–26.
2. M. Belardinelli, A. Chabli, B. Chadeaux-Vekemans, K. Lallouchi, P. Kamoun, Endogenous hydrogen sulfide overproduction in Down syndrome, *Am J Med Genet Part A*, **2003.**, *116A*, 310–311.
3. N. Abbassi-Ghandi, GB. Hanna, J. Huang, S. Kumar, P. Španel, Selected ion flow tube mass spectrometry analysis of volatile metabolite sin urine headspace for profiling of gastro-esophageal cancer, *Anal Chem*, **2013.**, *85*, 3409 –3416.
4. C. Munteanu, M. Rotariu, M. A. Turnea, Hydrogen Sulfide: An Emerging Regulator of Oxidative Stress and Cellular Homeostasis – A Comprehensive One-Year Review, *Antioxidants*, **2023.**, *12* (9), pp. 1–17.
5. Y. Geng, T.D. James, J. Liu, M. Zhou, J. Zhu, Z. Wang, Recent progress in the development of fluorescent probes for imaging pathological oxidative stress, *Chem Soc Rev*, **2023.**, *52.*, pp. 3873–3926.
6. L. Zhang, Y. Zhang, A novel „turn.on“ fluorescent probe based on hydroxy functionalized naphthalimide as a logic platform for visual recognition of H₂S in environment and living cell, *Elsevier*, **2020.**, pp. 1–7.
7. D. Altavilla, V. Arcoraci, A. Bitto, M. Cucinotta, N. Irrera, F. Mannino, G. Pallio, G. Pizzino, F. Squadrito; Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health, *Oxid Med Cell Longev*, **2017.**, pp. 1–14.
8. J.A. Imlay, G. Storz, Oxidative stress, *Curr Opin Microbio*, **1999.**, *2*, pp. 188-194.
9. G.I. Giles, C. Jacob, Reactive Sulfur Species: An Emerging Concept in Oxidative Stress, *Biol. Chem.*, **2022.**, *383*, pp. 375-388.
10. A. Alhasawi, V. Appanna, V. Appanna, S. Jagadeesan, F. Legendre, *Biochemical Strategies to Counter Nitrosative Stress: Nanofactories for Value-Added Products*, // *Microbial Diversity in the Genomic Era*, Indija; **2019.**, pp. 153-169.
11. E. Birden, C. Sackesen, U.M. Sahiner, S. Erzurum, O. Kalayci,; Oxidative stress and antioxidant defense, *Worls Allergy Organ J*, **2012.**, *5.*, pp. 9-19.
12. V.M. Darley-USmar, B.A. Freeman, H. Jo, J. McAndrew, R.P. Patel, H. Sellak, C. Roger White; Biological aspects of reactive nitrogen species, *BBA- Bioenergetics*, **1999.**, vol. 1411, issues: 2-3, pp: 385-400.
13. G.E. Ghali, C.G. Kevil, Y. Li, R.E. Shackelford, Bad Smells and Broken DNA: A Tale of Sulfur-Nucleic Acid Cooperation, *Antioxid*, **2021.**, *10*, pp. 1–12.
14. K. Abe, H. Kimura, The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous neuromodulator, *J Neurosci*, **1996.**, *16* (3), pp. 1066-1071.
15. E.M. Bos, J.A. Joles, I.T.N. Nguyen, J.J. Scammahorn, H. Van Goor, Fighting Oxidative Stress with Sulfur: Hydrogen Sulfide in the Renal and Cardiovascular Systems, *Antioxi*, **2021.**, *10*, pp. 1–20.

16. G. Cirino, C. Szabo, A. Papapetropoulos; Physiological roles of hydrogen sulfide in mammalian cells, tissues and organs, *Physi Rev*, **2022.**, *103* (1), pp. 31-276.
17. U. Barayeu, T.P. Dick, D. Ezerina, B. Pedre, The mechanism of action of N-acetylcysteine (NAC): The emerging role of H₂S and sulfane sulfur species, *Pharm&Therap*, **2021.**, *228*, pp. 1–22.
18. D.M. Jameson, *Introduction to Fluorescence*, prvo izdanje, USA, Taylor & Francis Group, **2014.**, pp. 313.
19. Ionoptix. URL: <https://www.ionoptix.com/resource/basic-principles-of-fluorescence-and-ion-sensing/#:~:text=Fluorescence%20is%20based%20on%20the,release%20a%20photon%3A%20fluorescence%20emission.> (28.6.2024.).
20. Chemistry LibreTexts. URL: [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Physical_and_Theoretical_Chemistry_Textbook_Maps/Supplemental_Modules_\(Physical_and_Theoretical_Chemistry\)/Spectroscopy/Electronic_Spectroscopy/Jablonski_diagram](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Physical_and_Theoretical_Chemistry_Textbook_Maps/Supplemental_Modules_(Physical_and_Theoretical_Chemistry)/Spectroscopy/Electronic_Spectroscopy/Jablonski_diagram) (29.7.2024.).
21. C. Yang, Molecular interaction-based fluorescence sensing technologies and their application, *High in Sci, Engin and Tehn*, **2022.**, *14*, pp. 34-43.
22. P.W. Fowler, T. Pisanski, HOMO-LUMO Maps for Chemical Graphs, *MATCH Commun. Math. Comput. Chem*, **2010.**, *64*, pp. 373 – 390.
23. PNGWING. URL: <https://www.pngwing.com/en/free-png-kxbag> (29.7.2024.).
24. T. Gunnlaugsson, T.D. James, J. Liu, H. Niu, H.M. O'Connor, H. Zhang, Photoinduced electron transfer (PeT) based fluorescent probes for cellular imaging and disease therapy, *Chem Soc Rev*, **2023.**, *52*, pp. 2322 – 2357.
25. R. Misra, S.P. Bhattacharyya, *Intramolecular Charge Transfer: Theory and Applications*, WILEY-VCH, Indija, **2018.**, pp. 256.
26. C. Ge, D. Zhang, Y. Zhang, Y. Wang, Y. Wu, ICT-based fluorescent probes for intracellular pH and biological species detection, *Front Chem.*, **2023.**, *11*, pp. 1–15.
27. Nanotemper. URL: <https://nanotempertech.com/nanopedia/fluorophores/#:~:text=A%20fluorophore%20is%20a%20molecule,Fluorophores%20are%20chemically%20diverse.> (29.6.2024.).
28. O. Huang, O. Hu, Y. Mao, X., Y., H., X. Wang, X. Wu, Sensors for determination of uranium: A review, *TrAC Trends in Analy Chem*, **2019.**, *118*, pp. 89–111.
29. A.P. Demchenko, Photobleaching of organic fluorophores: quantitative characterization, mechanisms, protection, *Methods Appl. Fluoresc.*, **2020.**, *8*, pp. 1–44.
30. X. Li, X. Li, Y. Liu, H. Ma, W. Shi, An effective approach to develop targetable and responsive fluorescent probes for imaging of organelles based on cresyl violet scaffold, *Biosensors and Bioelectronics*, **2022.**, *200*, pp. 1–15.
31. D. Liang, X. Tang, Z. Wu, Visualizing Hydrogen Sulfide in Mitochondria and Lysosome of Living Cells and in Tumors of Living Mice with Positively Charged Fluorescent Chemosensors, *Analy Chem*, **2016.**, *88* (18), pp. 9213 – 9218.

32. F. Huo, Y. Wen, Q. Wu, C. Yin, Y. Zhang, An ICT lighten ratiometric and NIR fluorogenic probe to visualize endogenous/exogenous hydrogen sulphide and imaging in mice, *Sens and Actua B: Chem*, **2019.**, *288*, pp. 507 – 511.
33. G. Feng, S. Gong, J. Hong, E. Zhou, Nitrobenzoxadiazole Ether-Based Near-Infrared Fluorescent Probe with Unexpected High Selectivity for H₂S Imaging in Living Cells and Mice, *Anal Chem*, **2019.**, *91*, pp. 13136 – 13142.
34. L. Chen, H. Cui, X. Peng, Z. Pu, M. Qian, J. Wang, J. i Y. Xia, L. Zhang, A NIR fluorescent probe for detection and visualization of hydrogen sulfide using the aldehyde group assisted thiolysis of dinitrophenyl ether strategy, *J. Mater. Chem. B*, **2018.**, *6*, pp. 7916–7925.
35. X. Ren, X. Song, B. Wang, W. Wang, L. Yang, Z. Yang, Y. Zhang, Fluorescent Detection of Dynamic H₂O₂/H₂S Redox Event in Living Cells and Organisms, *Anal.Chem*, **2020.**, *92(6)*, pp. 4387 – 4394.
36. L.G. Wade, *Organic Chemistry*. 8.izdanje. London: Pearson, **2013**. pp. 1258.

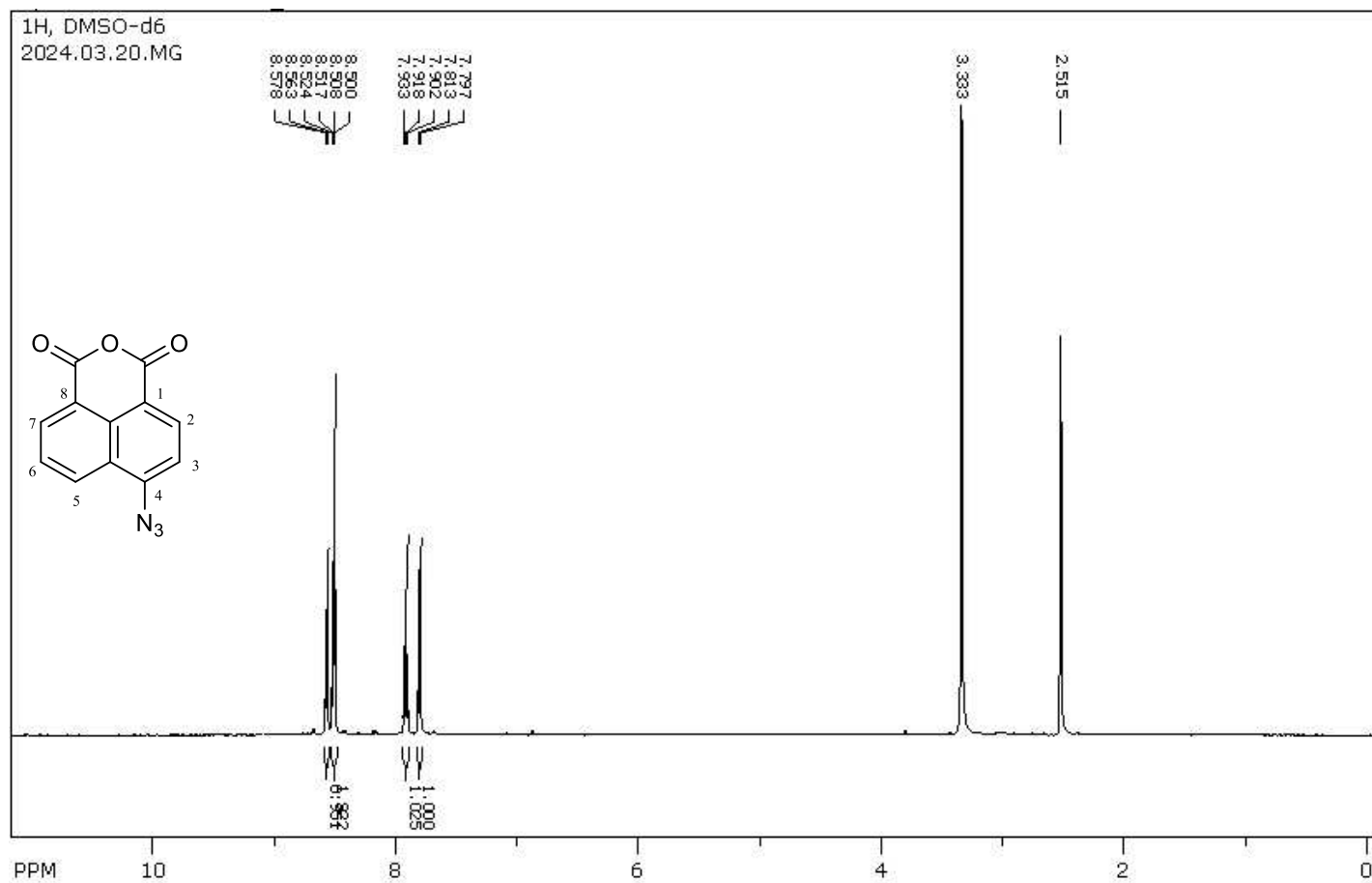
7. PRILOZI

7.1. Popis kratica

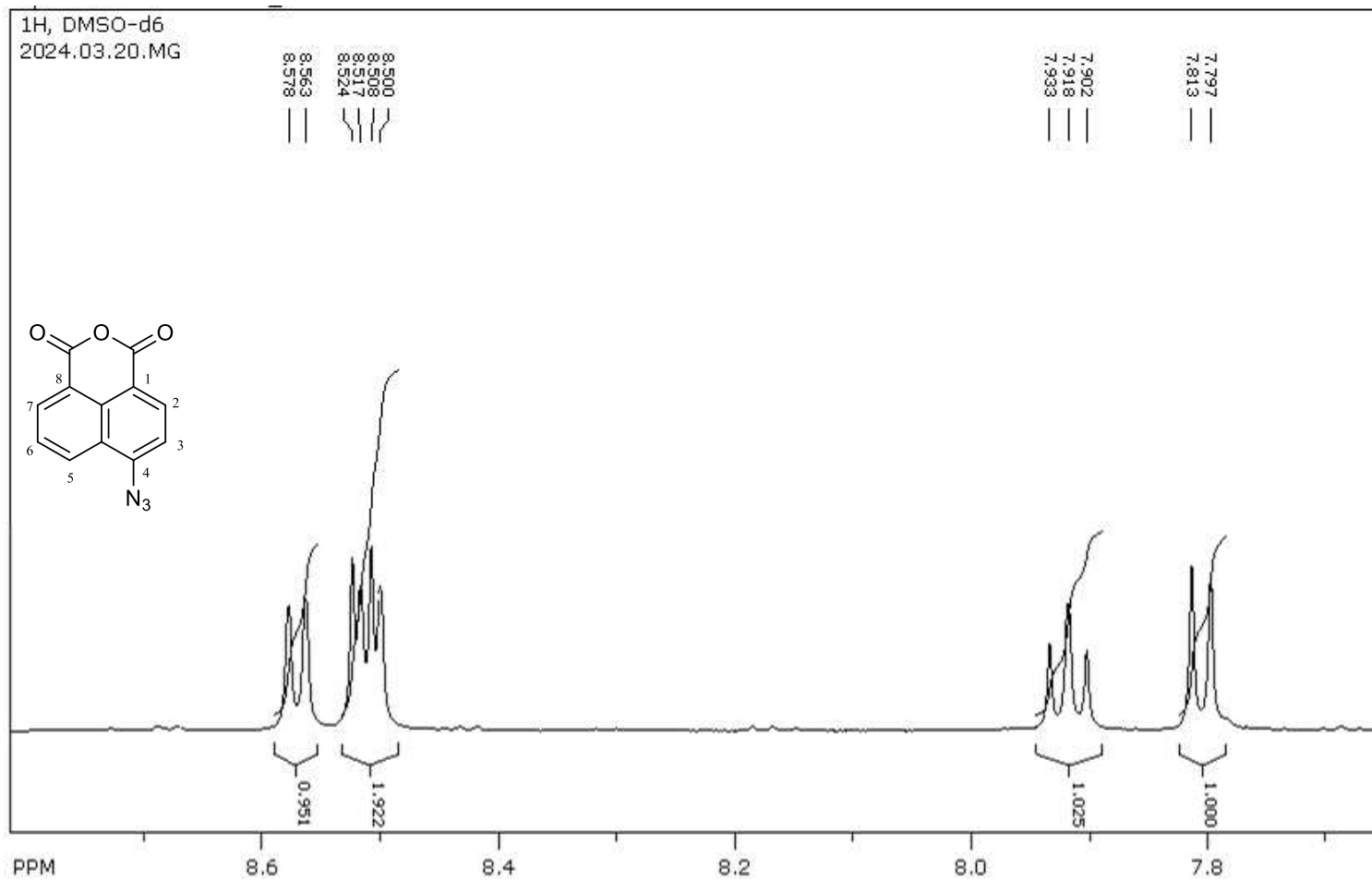
3-MST	3-merkatoptopiruvat	sulfurtrasferaza	(engl. <i>3-mercaptopyruvate sulfurtransferase</i>)
•OH	Hidroksidni radikal		
a-PeT	Akceptorom pobuđeni PeT	(engl. <i>Acceptor-excited PeT</i>)	
d-PeT	Donorom pobuđeni PeT	(engl. <i>Donor-excited PeT</i>)	
BODIPY	Bor-dipirometan	(engl. <i>Boron-dipyrromethane</i>)	
CBS	Cistation β -sintaza	(engl. <i>Cystathionine β-syntase</i>)	
CSE	Cistation γ -liaza	(engl. <i>Cystathionine γ-lyase</i>)	
CO	Ugljikov(II) oksid		
d	dublet		
dd	dublet dubleta		
EtOH	Etanol		
FeS	Željezov(II) sulfid		
FRET	Prijenos energije preko fluorescentne rezonancije	(engl. <i>Fluorescence Resonance Energy Transfer</i>)	
GPx	Glutation peroksidaza	(engl. <i>Gluthatione Peroxidasei</i>)	
H ₂ O ₂	Vodikov peroksids		
H ₂ S	Sumporovodik		
HOMO	Najviša zauzeta molekulska orbitala	(engl. <i>Highest Occupied Molecular Orbital</i>)	
HCl	Klorovodična kiselina		
ICT	Intramolekularni prijenos naboja	(engl. <i>Intramolecular Charge Transfer</i>)	

LUMO	Najniža nezauzeta molekulska orbitala (engl. <i>Lowest Unoccupied Molecular Orbital</i>)
NADPH	Nikotinamid dinukleotid fosfat
NaN ₃	Natrijev azid
NMR	Nuklearna magnetska rezonancija
NO	Dušikov(II) oksid
O ₂ ^{•-}	Superoksidni anion
ONOO ⁻	Peroksinitrat
<i>p</i>	engl. <i>para</i>
PeT	Fotoinducirani prijenos elektrona (engl. <i>Photoinduced Electron Transfer</i>)
RNS	Reaktivne dušikove vrste (engl. <i>Reactive Nitrogen Species</i>)
ROS	Reaktivne kisikove vrste (engl. <i>Reactive Oxygen Species</i>)
RSS	Reaktivne sumporne vrste (engl. <i>Reactive Sulfur Species</i>)
s	singlet
SOD	Superoksid dismutaza (engl. <i>Superoxide Dismutase</i>)
t	triplet
UV	Ultraljubičasto (engl. <i>Ultraviolet</i>)

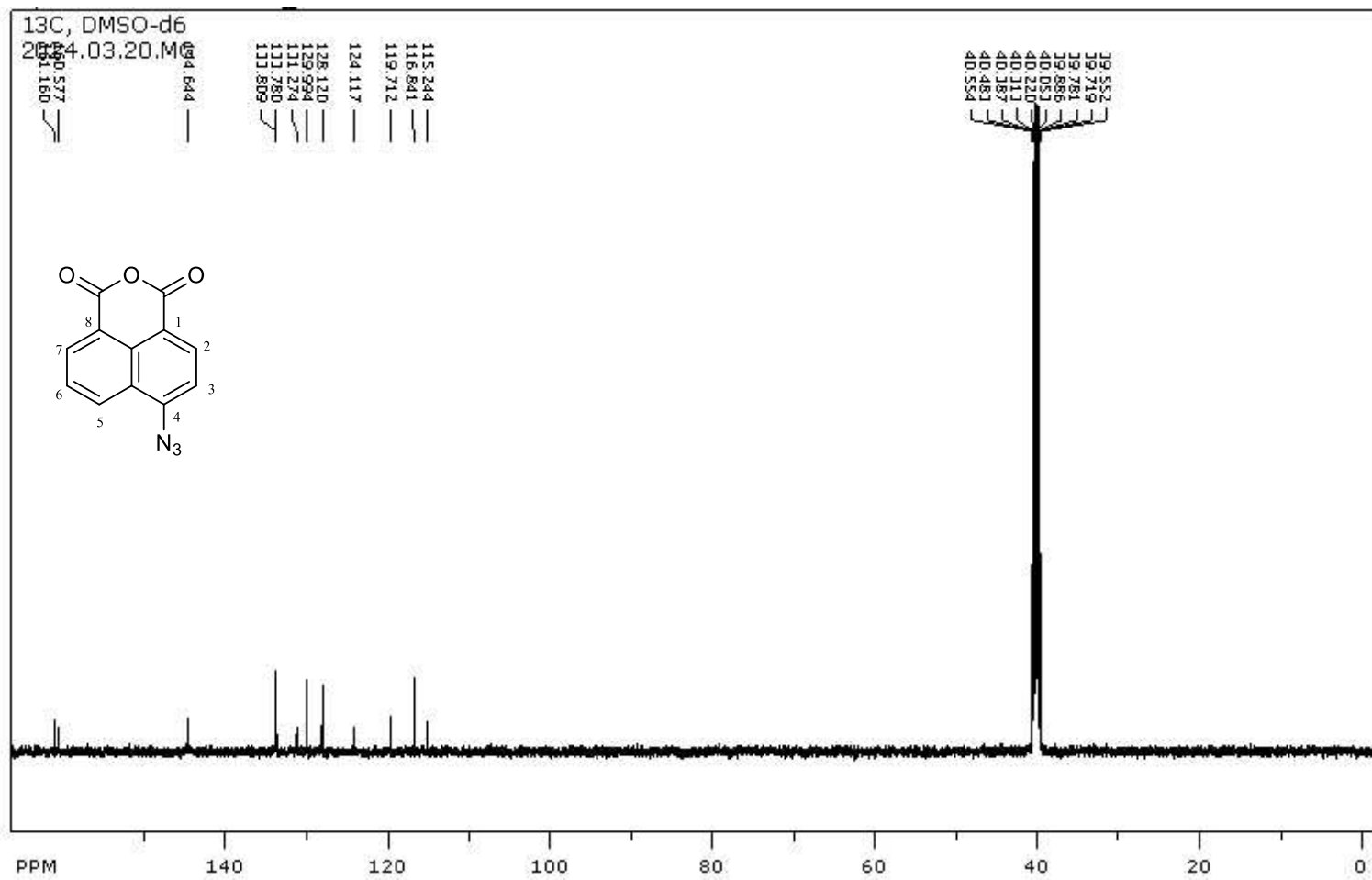
7.2. ^1H i ^{13}C NMR spektri pripravljenih spojeva



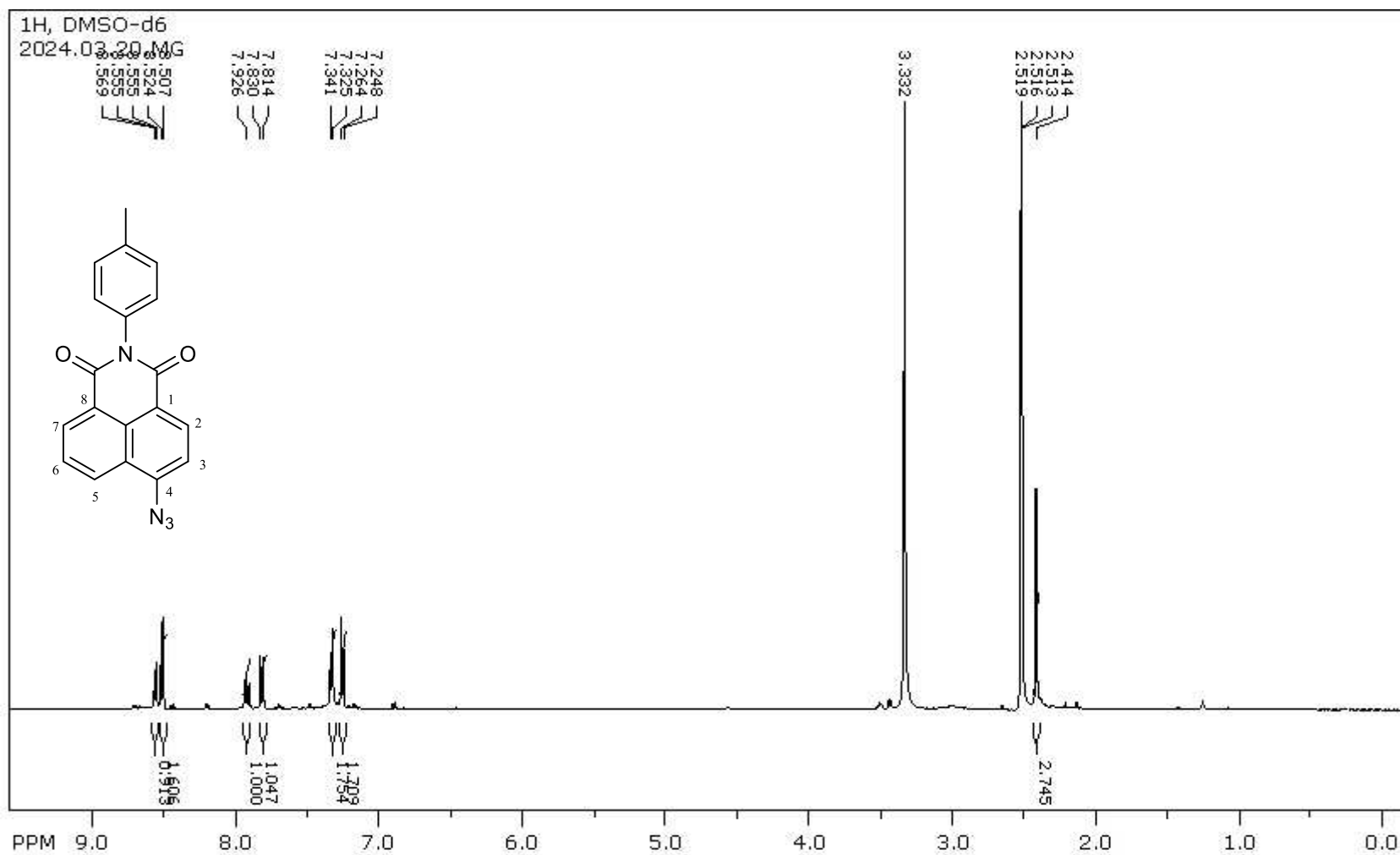
Slika P1. ^1H NMR spektar spoja 1



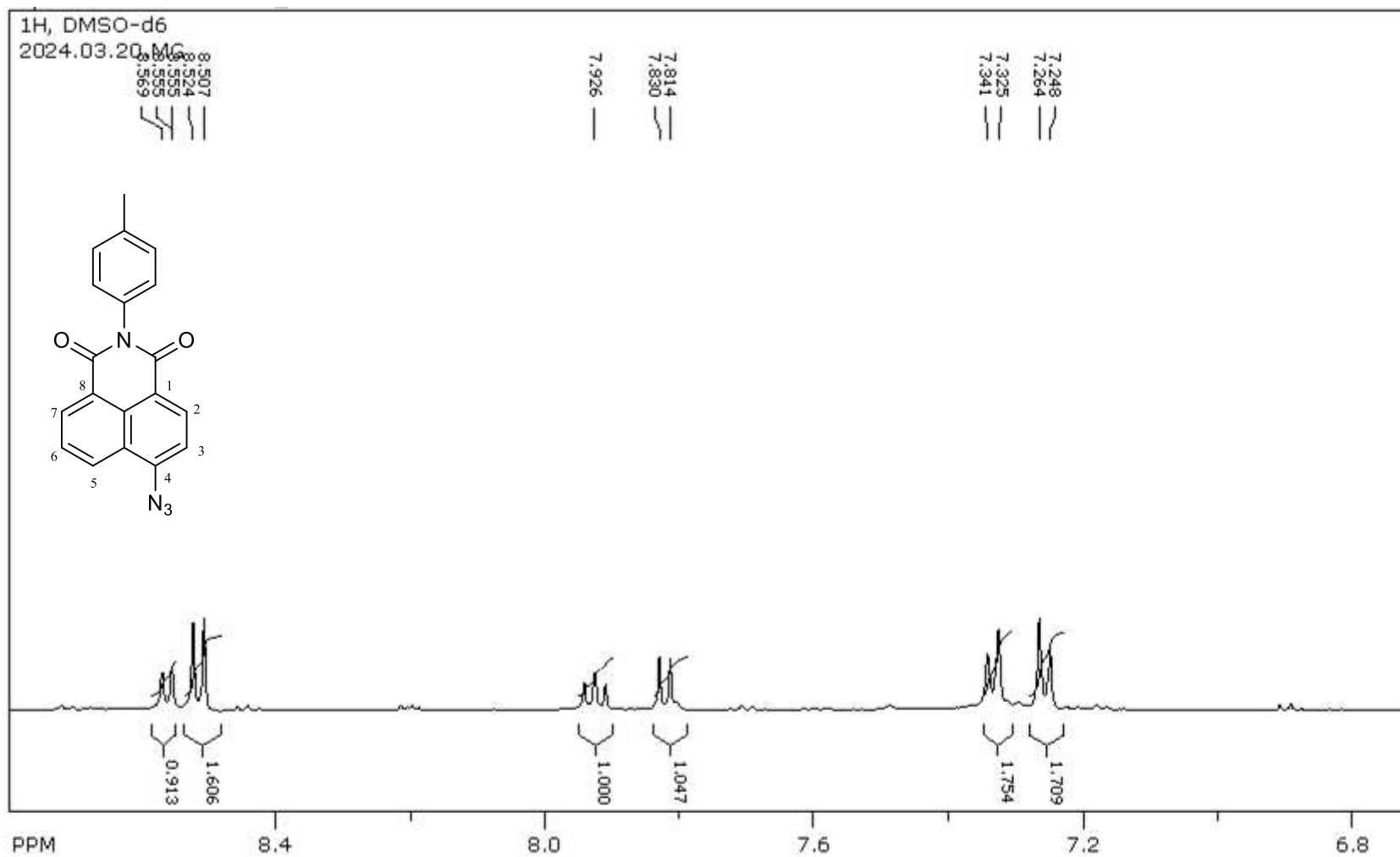
Slika P2. ^1H NMR spektar spoja **1**



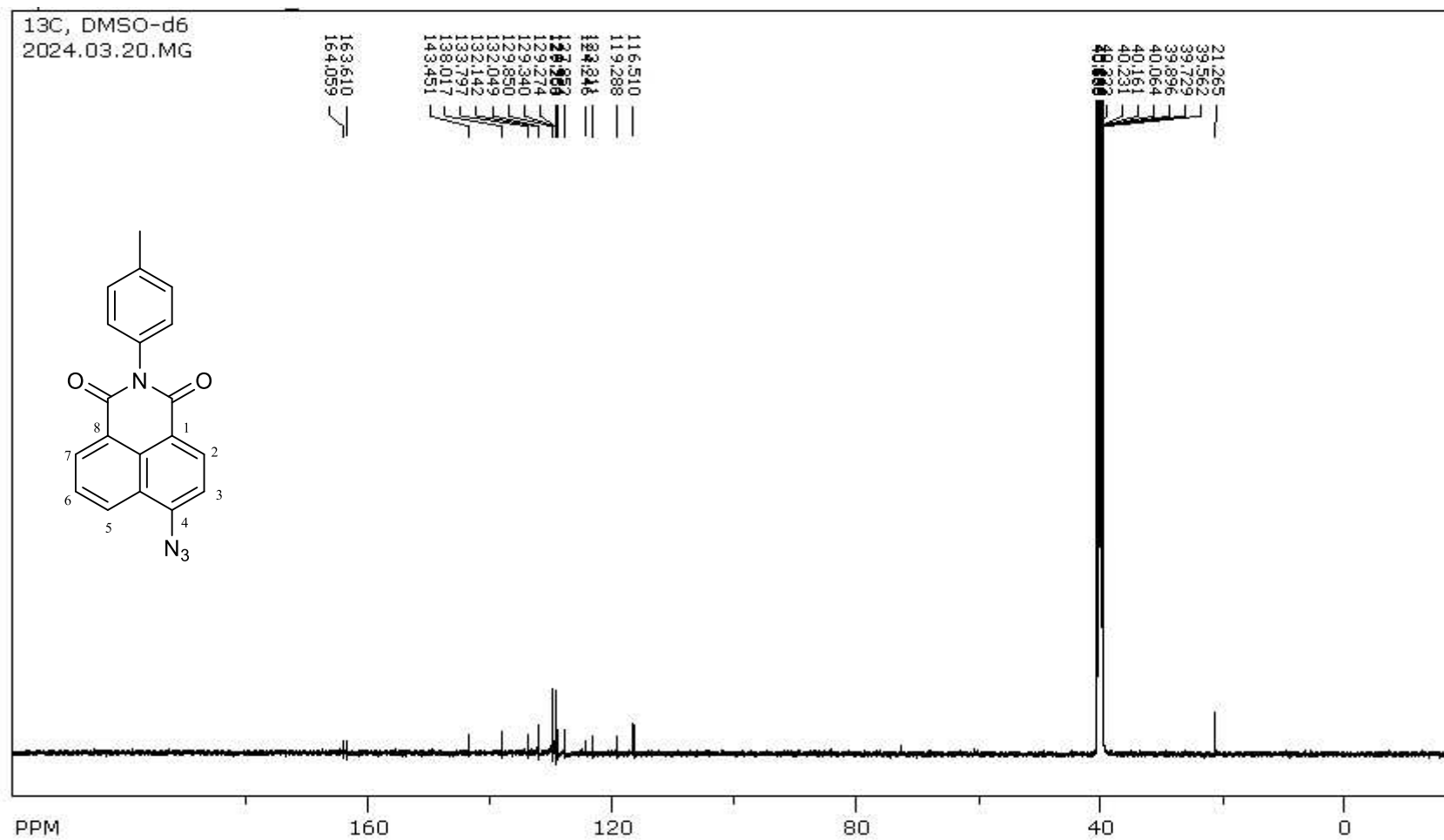
Slika P3. ¹³C NMR spektar spoja 1



Slika P4. ¹H NMR spektar spoja 2



Slika P5. ¹H NMR spektar spoja 2



Slika P6. ^{13}C NMR spektar spoja 2