



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE  
SVEUČILIŠNI DIPOMSKI STUDIJ

Marko Bogomolec

*Sinteza fotokemijski reaktivnih BODIPY spojeva s potencijalnom  
primjenom za liječenje karcinoma*

*Zagreb, lipanj 2021. g.*

*Ovaj rad izrađen je u Zavodu za organsku kemiju Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije i u Laboratoriju za sintetsku organsku kemiju Zavoda za organsku kemiju i biokemiju Instituta Ruđer Bošković u sklopu projekta Hrvatske zaklade za znanost: „Fotokemija: Reakcijski mehanizmi i primjene u organskoj sintezi i biologiji (PhotoApp)“, IP-2019-04-8008 pod mentorstvom prof. dr. sc. Irene Škorić i komentorstvom dr. sc. Nikole Basarića, znanstvenog savjetnika u trajnom zvanju i predan je na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2020./2021.*

## Popis oznaka, kratica i simbola

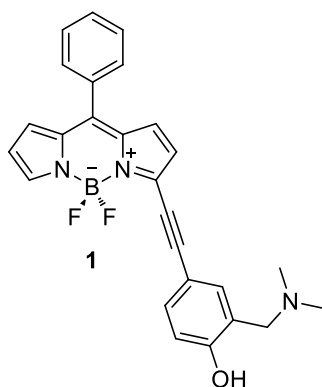
A – apsorbanacija	IR – engl. <i>infrared</i> , infracrveno	$S_NAr$ – nukleofilna aromatska supstitucija
APT – engl. <i>attached proton test</i> , test vezanog protona	IRF – engl. <i>instrument response function</i> , funkcija odziva instrumenta	SET – engl. <i>single electron transfer</i> , prijenos pojedinačnog elektrona
BODIPY – engl. <i>borron dipyrromethene</i> , borov dipirometen	ISC – engl. <i>intersystem crossing</i> , međusustavno križanje	$T_1$ – prvo pobuđeno tripletno stanje
BSA – engl. <i>bovine serum albumine</i> , albumin govedeg seruma	LFP – engl. <i>laser flash photolysis</i> , laserska pulsna fotoliza	TBAF – tetrabutylamonijev fluorid
DBU – 1,8- diazabiciklo[5.4.0]undek- 7-en	LUMO – engl. <i>lowest unoccupied molecular orbital</i> , najniža nepopunjena molekulska orbitala	TC-SPC – engl. <i>time- correlated single photon counting</i> , vremenski korelirano brojanje pojedinačnih fotona
DDQ – 5,6-dicijano-2,3- diklor-1,4-benzokinon	<i>m-</i> – <i>meta-</i> položaj	TD-DFT – engl. <i>time- dependend density functional theory</i> , vremenski ovisna teorija gustoće funkcionala
DMF – <i>N,N-</i> dimetilformamid	NBS – <i>N</i> -bromsukcinimid	TFA – trifluorocena kiselina
DNK – deoksiribonukleinska kiselina	NCS – <i>N</i> -klorosukcinimid	THF – tetrahidrofuran
$E^+$ – elektrofil	NMR – nuklearna magnetska rezonancija	TMS – trimetilsililna skupina
ESIPT – engl. <i>excited state intramolecular proton transfer</i> , intramolekularni prijenos protona u pobuđenom stanju	$Nu^-$ – nukleofil	UV-Vis – engl. <i>ultraviolet-visible</i> , UV- vidljivo
ESPT – engl. <i>excited state proton transfer</i> , prijenos protona u pobuđenom stanju	<i>o-</i> – <i>ortho-</i> položaj	VNS – engl. <i>vicarious nucleophilic substitution</i> , susjedna nukleofilna supstitucija
fs-TA – femtosekundna tranzijentna apsorpcijska spektroskopija	ONSH – engl. <i>oxidative nucleophilic substitution of hydrogen</i> , oksidativna nukleofilna supstitucija vodika	$\lambda$ – valna duljina
HOMO – engl. <i>highest occupied molecular orbital</i> , najviša popunjena molekulska orbitala	<i>p-</i> – <i>para-</i> položaj	$\epsilon$ – molarni apsorpcijski koeficijent
HPLC-MS – vezni sustav tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti i masene spektrometrije	QM – kinon-metid	$\Phi_f$ – kvantni prinos fluorescencije
	RNK – ribonukleinska kiselina	$\Delta\bar{\nu}$ – Stokesov pomak
	$S_0$ – osnovno singletno stanje	$\tau$ – vrijeme života pobuđenog stanja
	$S_1$ – prvo pobuđeno singletno stanje	
	$S_EAr$ – elektrofilna aromatska supstitucija	

## Sadržaj

Uvod .....	1
Opći dio .....	2
BODIPY spojevi .....	2
Struktura i fotofizička svojstva .....	2
Sinteza i funkcionalizacija .....	4
Kinon-metidi.....	14
Struktura i reaktivnost .....	14
Fotokemijsko nastajanje .....	16
Primjena i biološka aktivnost fotokemijski nastalih QM .....	23
BODIPY derivati kinon-metida.....	26
Rezultati i rasprava .....	28
Uvod.....	28
Sinteze spojeva .....	28
Fotofizička karakterizacija sintetiziranih spojeva .....	38
Ispitivanje fotokemijske reaktivnosti.....	41
Zaključak .....	42
Eksperimentalni dio .....	43
Opće napomene .....	43
Sinteze spojeva .....	43
UV-Vis i fluorescencijska spektroskopija.....	52
Ispitivanje fotokemijske reaktivnosti.....	53
Literatura.....	54
Sažetak.....	62
Summary.....	63
Zahvale .....	64
Dodatak.....	65
UV-Vis spektri.....	65
Ekscitacijski i emisijski spektri .....	67
<sup>1</sup> H i <sup>13</sup> C NMR spektri.....	69
HPLC kromatogrami i MS spektri.....	79
Životopis .....	80

## Uvod

Potaknuti zanimljivim fotofizičkim svojstvima, značajnom antiproliferativnom aktivnosti BODIPY prekursora kinon-metida (QM) sintetiziranih u sklopu projekta „PhotoApp“ i njihovom potencijalnom primjenom u liječenju karcinoma, odlučili smo sintetizirati novi derivat, ispitati njegova fotofizička svojstva i fotokemijsku reaktivnost. Tako je cilj ovoga rada sinteza novog BODIPY spoja **1** (slika 1) čiji je kromofor produljen konjugacijom s etinilfenolnom skupinom i koji posljedično ima veću valnu duljinu apsorpcije, važan parametar za primjenu fotokemijski reaktivnih spojeva u biološkim sustavima. Uvođenjem *N,N*-dimetilaminometilne skupine u *ortho*- položaj prema hidroksilnoj skupini omogućuje se fotokemijska reaktivnost i nastajanje QM-a, vrlo reaktivnih intermedijara koji pokazuju biološku aktivnost.<sup>1</sup> Za razliku od većine spojeva s primjenom u fotodinamičkoj terapiji, mehanizam antitumorske aktivnosti QM-a je različit i ne temelji se na stvaranju reaktivnog singletnog kisika koji uzrokuje štetu u stanicama karcinoma, već na procesu alkiliranja DNK ili proteina. Alkiliranjem se QM kovalentnom vezom veže za polinukleotide. Ovakvi adukti interferiraju sa staničnim metabolizmom, replikacijom i transkripcijom DNK i uzrokuju smrt stanice. Zbog brze proliferacije stanica karcinoma u kombinaciji sa strukturnim i funkcijskim abnormalnostima u krvnim žilama tumorskog tkiva, ona su često hipoksična, tj. imaju smanjenu koncentraciju kisika.<sup>2</sup> Kako za nastajanje i reaktivnost QM-a nije potreban kisik, mogućnost primjene u liječenju karcinoma im je znatno veća od uobičajenih organskih fotosenzibilizatora.



**Slika 1.** Struktura ciljnog novog BODIPY spoja **1**, prekursora QM-a.

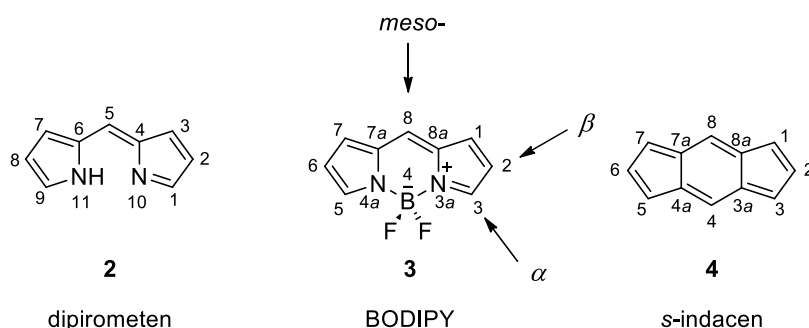
## Opći dio

### BODIPY spojevi

#### Struktura i fotofizička svojstva

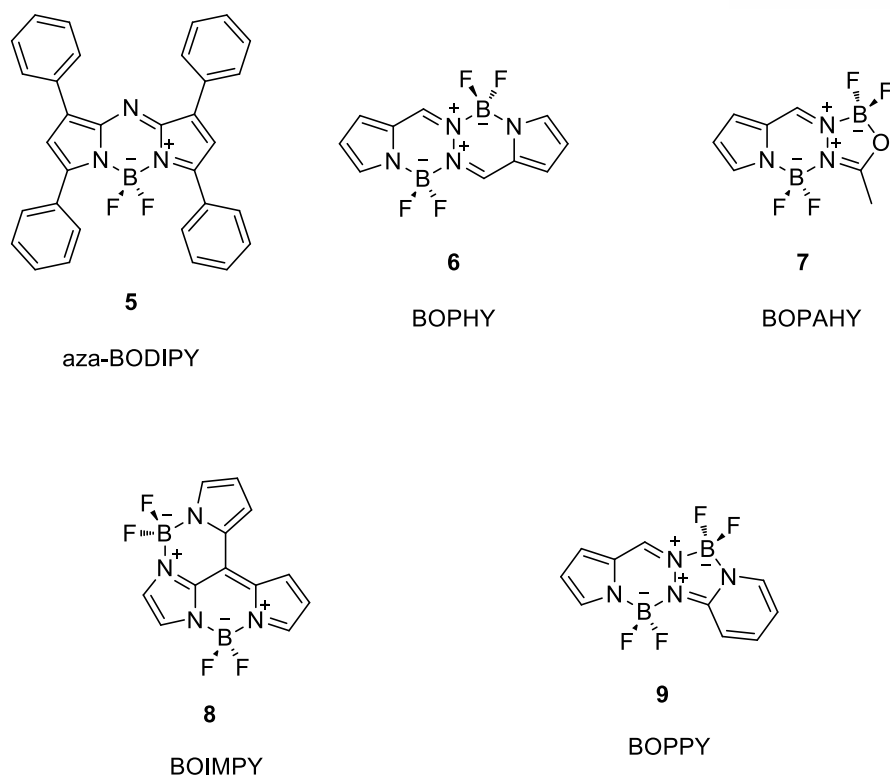
Među brojnim klasama fluorescentnih boja jednu od zapaženih skupina čine spojevi koji sadrže strukturu 4,4-difluor-4-bora-3*a*,4*a*-diza-*s*-indacena, poznatiji kao BODIPY (*engl.* boron-dipyrromethene). Slučajno su ih otkrili A. Treibs i F. H. Kreuzer još 1968. godine proučavajući porfirine, kada su tijekom sinteze u reakcijskoj smjesi primijetili intenzivnu zelenu fluorescenciju.<sup>3</sup> Njihov veliki potencijal prepoznat je tek 20 godina kasnije, a danas imaju vrlo široku primjenu. Koriste se u molekularnoj biologiji kao fluorescentni markeri<sup>4-8</sup> i senzori<sup>9-11</sup>, laserske boje<sup>12,13</sup>, u fotodinamičkoj terapiji<sup>14-16</sup> te u nanotehnologiji kao dijelovi optoelektroničkih uređaja<sup>17,18</sup> i kao dostavljači lijekova.<sup>19,20</sup>

Ovaj heterociklički fluorofor **3** sastoji se od dvije podjedinice pirola koje su povezane metinskim mostom na položaju  $\alpha$ - (dipirometen **2**) i borovim atomom koji je koordinacijski vezan atomima dušika (slika 2). Takva struktura analogna je tricikličkom ugljikovom spoju – *s*-indacenu **4**.



**Slika 2.** Strukture osnovnog dipirometena, BODIPY-ja i *s*-indacena.

Postoje fluorescentni kompleksni spojevi BF<sub>2</sub> i s drugim ligandima. Do sada su najveći potencijal pokazali kompleksi koji sadrže dušik umjesto ugljika na položaju 8- dipirometena – aza-BODIPY spojevi, a poznati su još BOPHY, BOPAHY, BOIMPY i BOPPY **5-9** (slika 3).<sup>21-</sup>



**Slika 3.** Primjeri struktura fluorescentnih borovih kompleksnih spojeva.<sup>21–26</sup>

Struktura BODIPY spojeva ne slijedi Hückelovo pravilo za aromatičnost jer je 12  $\pi$ -elektrona distribuirano na 12 atoma, ali njihova svojstva su uvelike slična aromatskim  $\pi$ -sustavima zato jer koordinacija tetraedarskog borovog atoma, koji ne sudjeluje u delokalizaciji elektrona, drži dipirometenski ligand u rigidnoj, gotovo potpuno planarnoj konformaciji. Struktura je zbog dušikovih atoma blago polarizirana što omogućuje nukleofilne i elektrofilne reakcije.<sup>27</sup> Funkcionalne skupine tako se mogu uvesti na sve položaje: na pirolne ugljikove atome, na *meso*-ugljik i na sami borov atom.<sup>28</sup>

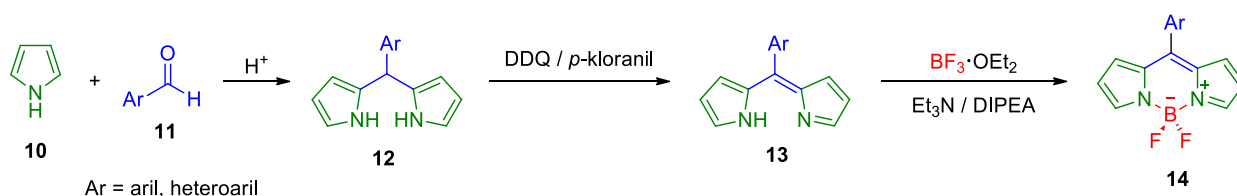
Osnovna fotofizička svojstva BODIPY spojeva uvelike ovise o prisutnim supstytutentima, o njihovu broju i položaju te o vrsti funkcionalnih skupina povezanih preko *meso*-položaja. BODIPY spojevi intenzivno su obojeni i uglavnom imaju uske apsorpcijske vrpce s maksimumom apsorpcije,  $\lambda_{\text{abs}}$ , najčešće u području 470 – 530 nm, odnosno u plavom i zelenom dijelu vidljivog dijela elektromagnetskog spektra.<sup>6</sup> U slučajevima gdje je BODIPY jezgra dodatno konjugirana,  $\lambda_{\text{abs}}$  se može pomaknuti do bliskog infracrvenog dijela spektra. Intenzivna obojanost čak i vrlo razrijeđenih otopina posljedica je visokih vrijednosti molarnih apsorpcijskih koeficijenata,  $\epsilon$ . Vrijednosti kvantnih prinosa fluorescencije,  $\Phi_f$ , su karakteristično visoke, uobičajeno 60 % – 90 %.<sup>29</sup> Dobro su topljivi u organskim otapalima i nisu sklони agregaciji, polarnost otapala vrlo slabo utječe na apsorpcijske spektre uzrokujući

pomake apsorpcijskih i emisijskih maksimuma za manje od 10 nm.<sup>30</sup> U krutom stanju fluorescencija je vrlo slaba, zbog planarnosti i intermolekulskih  $\pi$ - $\pi$  interakcija, ali se može povećati uvođenjem prostorno velikih supstituenata.<sup>31</sup> Vremena života pobuđenog singletnog stanja,  $\tau$ , kreću se između 1 – 10 ns, dok je nastajanje tripletnog stanja,  $T_1$ , zanemarivo u spojevima koji nisu supstituirani teškim elementima.<sup>15</sup> Apsorpcijski spektri snimljeni u otopinama ili plastičnim filmovima pokazuju izražene prijelaze  $S_0 \rightarrow S_1$ . Kod pobuđivanja bilo u stanje  $S_1$  ili  $S_2$ , opaža se jaka fluorescencija iz stanja  $S_1$ , dok iz stanja  $S_2$  nije primijećena fluorescencija, već dolazi do učinkovite deaktivacije u  $S_1$ .<sup>32</sup> Stokesov pomak,  $\Delta\bar{\nu}$  između najniže apsorpcijske i emisijske energetske vrpce je vrlo malen i ukazuje na neznatnu promjenu strukture prateći prijelaz iz stanja  $S_0$  u  $S_1$  i vibracijsku relaksaciju.<sup>33</sup> Kvantni prinos fluorescencije,  $\Phi_f$ , ovisi o strukturi te raste sa svakom strukturnom modifikacijom koja uzrokuje manju konformacijsku fleksibilnost.<sup>29</sup> Pri najčešćim eksperimentalnim uvjetima, opadanje intenziteta fluorescencije precizno se može opisati kinetikom prvog reda.<sup>34</sup>

## Sinteza i funkcionalizacija

Početak sinteze BODIPY fluorofora je priprema odgovarajućeg dipirometena. Koriste se dva različita pristupa za sintezu ovog liganda, a oba su razvijena na temelju kemije porfirina.

Prvi pristup je kiselinski kondenzirana kondenzacija pirola **10** s aromatskim aldehidom **11**, tzv. Lindseyjeva metoda (shema 1).<sup>35</sup> Ovom reakcijom nastaju derivati dipirometana **12**, koji se zatim oksidiraju s oksidansom poput 5,6-dicijano-2,3-diklor-1,4-benzokinona (DDQ) ili *p*-kloranila u dipirometen **13**. Dipirometeni se najčešće ne izoliraju jer ih je teško kromatografirati i nisu stabilni, već se odmah prevode u BODIPY spojeve **14** suviškom  $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$  pri baznim uvjetima. Moguće je provesti sva 3 koraka u nizu, ali iskorištenja su tada vrlo niska i dobivene produkte je teško izolirati.<sup>9,36</sup>

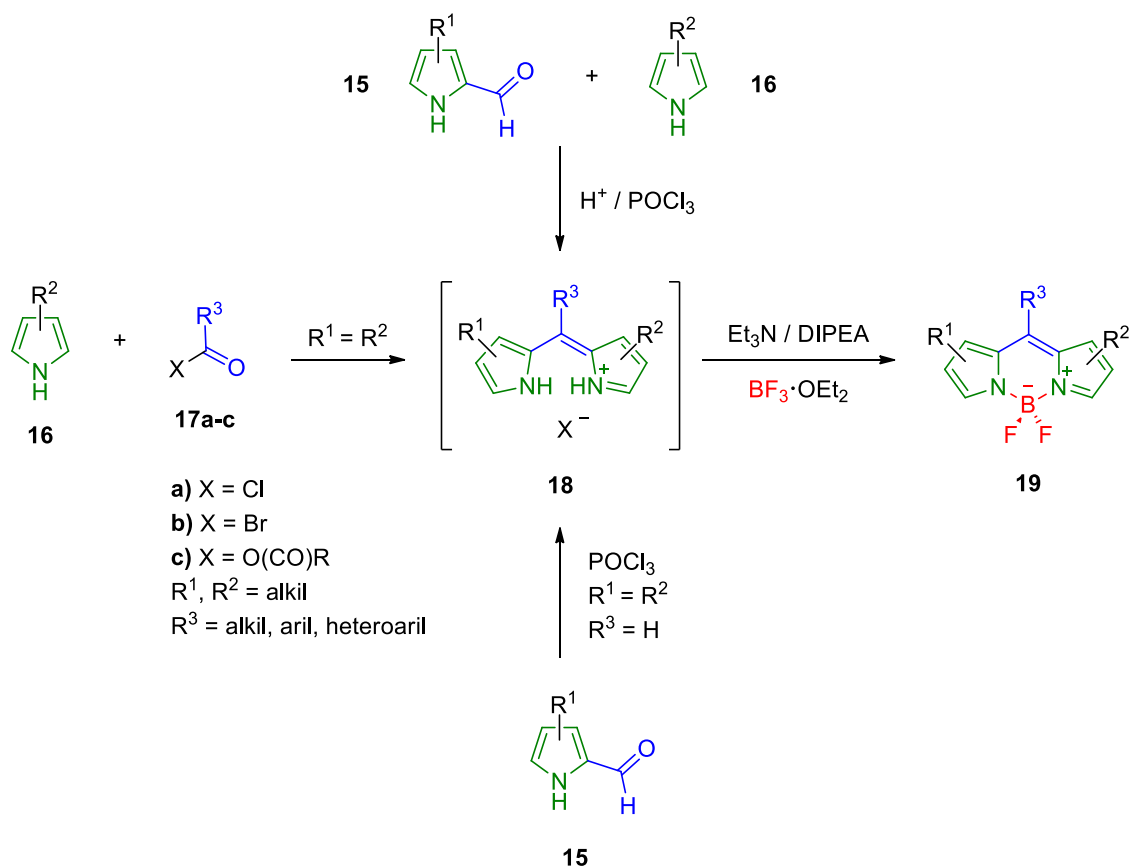


**Shema 1.** Sinteza BODIPY spoja **14** kiselinski kataliziranom kondenzacijom pirola **10** s aromatskim aldehidima **11** uz naknadnu oksidaciju i kompleksiranje s  $\text{BF}_3$ .<sup>9,36</sup>

Drugi pristup temelji se na kiselinski kondenziranoj kondenzaciji 2-acilpirola **15** s pirolom koji nije supstituiran na položaju 2- (shema 2).<sup>36,37</sup> Pri ovim uvjetima nastaju soli dipirometena **18** koje se deprotoniraju i kompleksiraju s  $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ . U ovom slučaju supstituent



na položaju 8- nije ograničen na aromatske skupine, a dodatna prednost ovog pristupa je mogućnost sinteze asimetričnih derivata.<sup>12,38</sup>



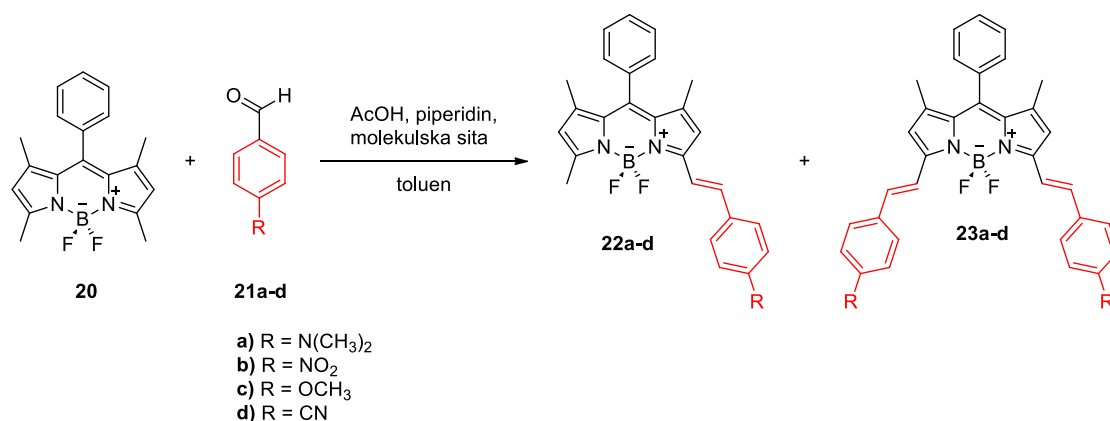
**Shema 2.** Sinteza soli dipirometena **18** kondenzacijom 2-acilpirola **15** i 2-nesupstituiranih pirola **16** i pretvorba u BODIPY spojeve **19**.<sup>12,37,38</sup>

Vežanjem prikladnih funkcionalnih skupina na BODIPY jezgru, kemijska, spektroskopska i fotofizikalna svojstva ovih fluorofora lako se mogu mijenjati zahvaljujući golemom broju mogućih funkcionalizacijskih reakcija koje uključuju Knoevenagelove kondenzacije, nukleofilne aromatske supstitucije, nukleofilne supstitucije fluorovih atoma vezanih na borov atom, supstitucije vodikovih atoma (elektrofilne aromatske supstitucije, susjedne nukleofilne supstitucije, oksidativne nukleofilne supstitucije vodika, radikalne supstitucije) i reakcije križnog povezivanja katalizirane paladijem i drugim prijelaznim metalima.<sup>28</sup>

Mogu se razlikovati dva pristupa u sintezi funkcionaliziranih BODIPY spojeva. U prvom pristupu, ciljni BODIPY spoj sa željenim supstituentima pripravlja se iz različito supstituiranih pirola, aromatskih aldehida i acil-pirola ili sintezom njihovih odgovarajućih derivata prije završnog koraka fluoroboriranja. Drugi pristup obuhvaća kemijske reakcije nakon fluoroboriranja, odnosno na već sintetiziranom BODIPY spoju. Osim već prisutnih metilnih ili

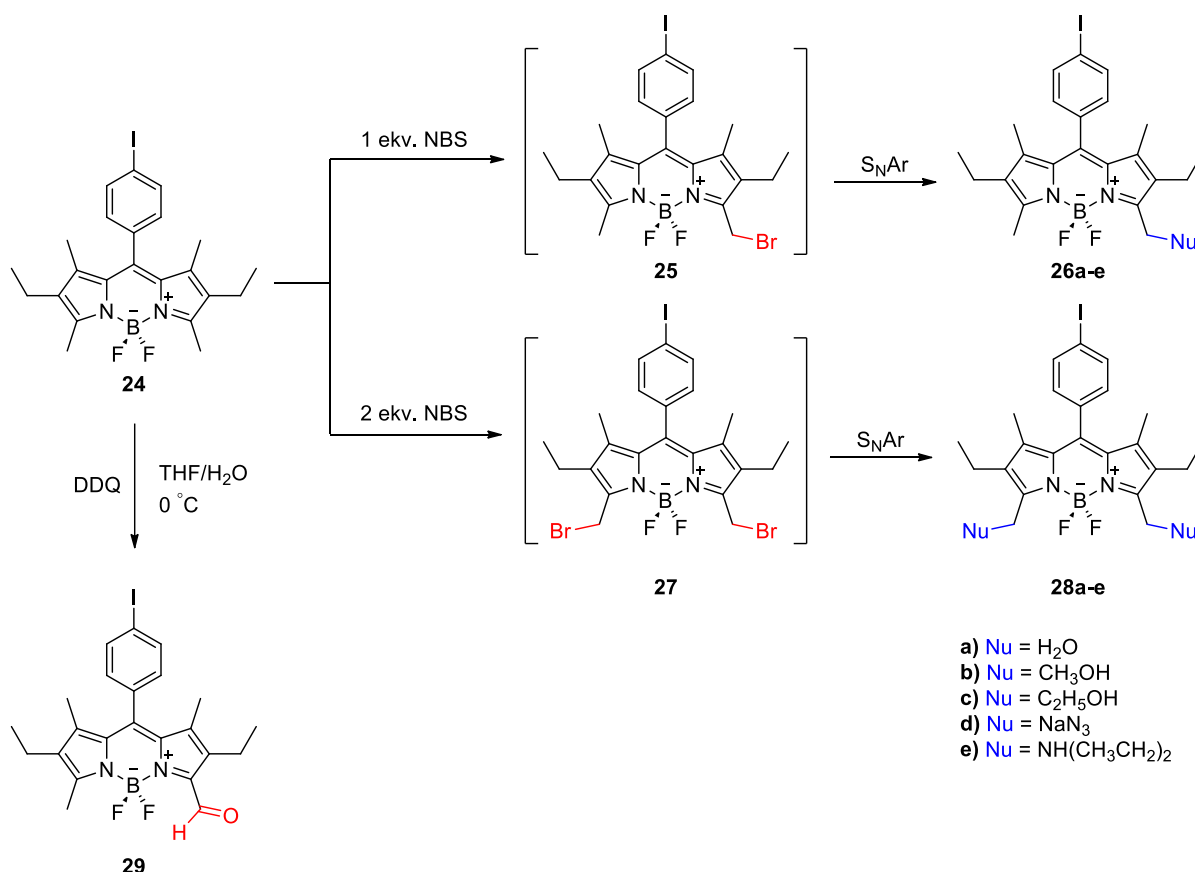
alkilnih skupina, na BODIPY se mogu uvesti reaktivni supstituenti poput halogenih atoma, formilne ili alkilolne skupine koje se jednom ili nizom reakcija mogu prevesti u odgovarajuće skupine u finalnom spoju. Moguće je provoditi reakcije perifernih skupina, tj. skupina koje nisu direktno vezane za kromofor kao i reakcije na samom kromoforu – pirolnim ugljikovim atomima, *meso*-ugljiku i borovom atomu.<sup>28</sup>

Metilne skupine vezane na BODIPY kromofor relativno su kisele kao i u drugim elektron deficijentnim heterocikličkim spojevima. Ovo svojstvo omogućuje kondenzaciju s aromatskim aldehydima uz nastajanje alkenilnih analoga produkata Knoevenagelove reakcije.<sup>39-41</sup> Ove reakcije ne dovode samo do različitosti u strukturi već uzrokuju i velike batokromne pomake apsorpcijskih i emisijskih spektara reakcijskih produkata.<sup>42</sup> Elektron-donirajući supstituenti na aromatskom aldehydu dodatno pomiču apsorpcijske i emisijske spektre prema većim valnim duljinama, a najveću promjenu uzrokuju dimetilamino skupine. Konjugacijom slobodnog elektronskog para dušikovog atoma s kromofornim sustavom nastaju fluorofori koji emitiraju u bliskom infracrvenom dijelu spektra i čiji se apsorpcijski spektri protoniranjem pomiču hipsokromno.<sup>43</sup> Kondenzacije se provode u baznim uvjetima i zahtijevaju izdvajanje *in situ* nastale vode iz reakcijske smjese. U reakcijama se stoga koriste molekulska sita ili se voda uklanja azeotropno Dean-Starkovom aparaturom. Jednostavnost sinteze 1,3,5,7-tetrametil-BODIPY spojeva **20** (shema 3) iz kondenzacijskih reakcija 2,4-dimetilpirola zaslužna je za uspjeh ove metode kojom je sintetiziran velik broj fluorescentnih senzora, posebice za metalne katione, pH i anione.<sup>40,44,45</sup> Vinilna skupina može se uvesti i reakcijom metilne skupine na *meso*-položaju pri čemu također dolazi do batokromnih pomaka apsorpcijskih i emisijskih spektara, ali i do smanjenja kvantnih prinosa fluorescencije zbog većeg broja neradijativnih deaktivacijskih puteva.<sup>41</sup>



**Shema 3.** Knoevenagelova reakcija 1,3,5,7-tetrametil-BODIPY spoja **23** s aromatskim aldehydima **24a-d**.<sup>18-23</sup>

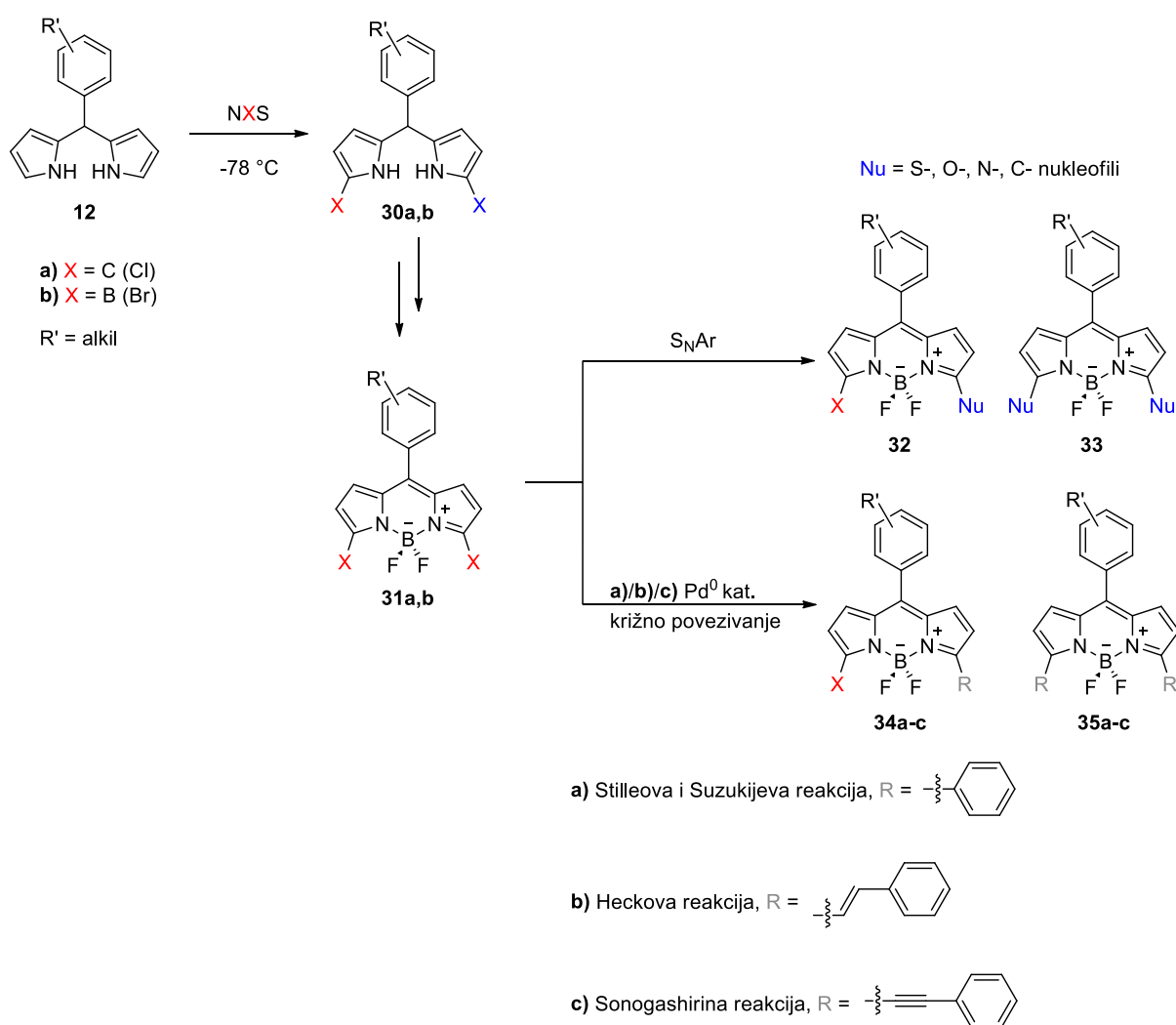
Alkilne skupine BODIPY spojeva mogu se oksidirati. Reakcijom peralkiliranih, jako fluorescentnih derivata **24** s DDQ-om u smjesi tetrahidrofurana (THF) i vode nastaju odgovarajući formilni, slabo fluorescentni derivati **29** koji mogu biti korisni za daljnju funkcionalizaciju.<sup>46</sup> Razvijen je i protokol bromiranja  $\alpha$ -metilnih derivata koristeći *N*-bromosukcinimid (NBS). Zbog velike reaktivnosti, bromirani međuprodukti **25** i **27** se ne mogu izolirati, ali dodatak nukleofila u reakcijsku smjesu nakon bromiranja omogućuje nastajanje i izolaciju supstitucijskih produkata **26** i **28** (shema 4).<sup>47</sup>



**Shema 4.** Bromiranje  $\alpha$ -metilnih skupina BODIPY spoja **27** s NBS-om i supstitucijska reakcija s nukleofilima te oksidacija metilne u formilnu skupinu DDQ-om.<sup>46,25</sup>

Najčešći reaktivni supstituent koji se uvodi na BODIPY jezgru je atom halogena zato jer se halogenirani BODIPY spojevi mogu podvrgnuti reakcijama karakterističnima za halogenirane aromatske heterocikle kao što su S<sub>N</sub>Ar i reakcije križnog povezivanja katalizirane paladijem – Suzukijeva, Stilleova, Heckova, Sonogashirina i Buchwald-Hartwigova reakcija.<sup>48–</sup><sup>51</sup> 3,5-dihalogenirani BODIPY derivati su od velike važnosti zato jer supstituenti na ovim položajima imaju najveći utjecaj na spektroskopska svojstva.<sup>29</sup> Pouzdani način njihove sinteze je halogeniranje dipirometana s *N*-halosukcinimidom [NXS, X = C (Cl), B (Br)] u THF-u pri

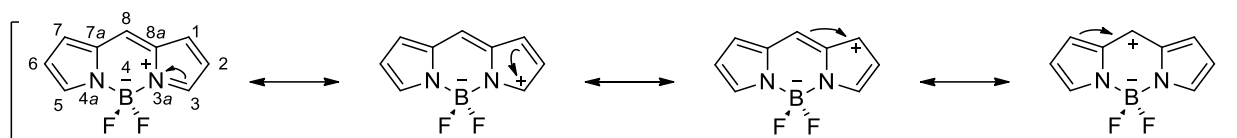
temperaturi od  $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$  (shema 5).<sup>52,53</sup> Halogenirani dipirometan **30** zatim se uobičajenim postupkom oksidacije i fluoroboriranja prevodi u BODIPY **31**. Metoda nije ograničena samo na 3,5-dihalogenirane derivate, korištenjem različitih omjera množinskih ekvivalenata NXS-a halogeni se mogu uvesti i na ostale slobodne položaje, a reaktivnost položaja raste redom  $3,5 > 2,6 > 1,7$  promatrajući BODIPY.<sup>52</sup> Poznati su i 3,5-dijod derivati, ali se oni pripremaju drugačijom metodom, dok 3,5-difluorovi analozi još nisu opisani.<sup>11</sup> Provođenjem  $S_NAr$  reakcija pri sobnoj temperaturi nastaju monosupstituirani derivati, dok su za disupstituciju potrebne više temperature i suvišak nukleofila.<sup>28</sup> Kod Pd-kat. reakcija disupstitucija se može potaknuti većim količinama reaktanata i duljim reakcijskim vremenima.<sup>48</sup>



**Shema 5.** Sinteza 3,5-dihalogeniranih BODIPY spojeva **31a,b** dobivenih reakcijom dipirometana **12a,b** s NXS-om.<sup>28</sup>

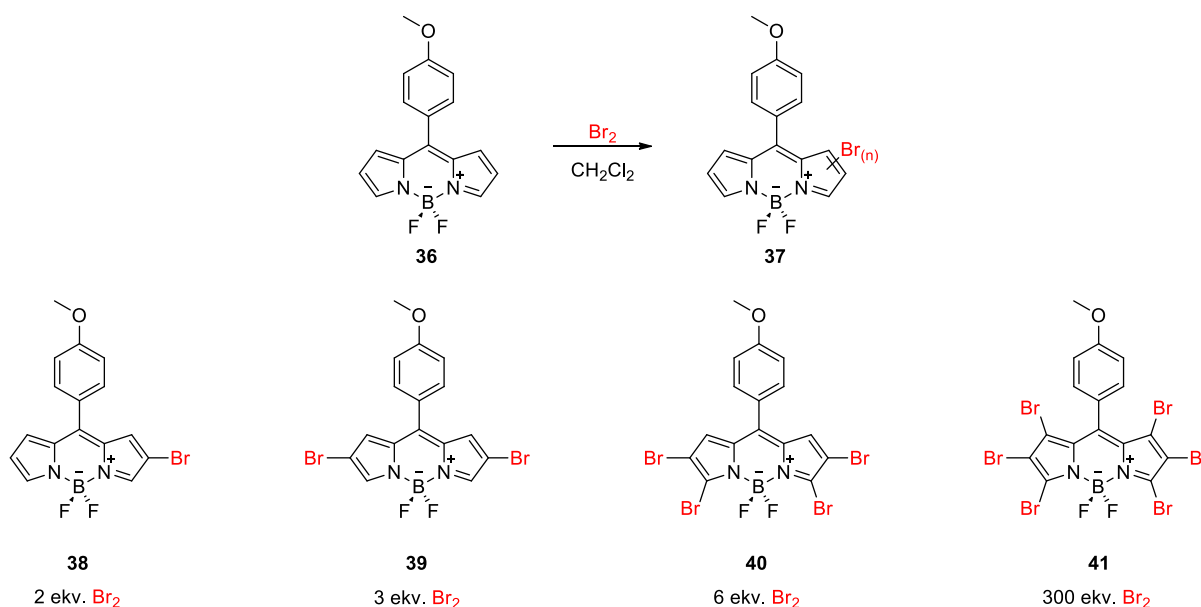
Jednostavnim razmatranjem rezonantnih struktura BODIPY kromofora jasno se može uočiti da se na položajima 2- i 6- ne pojavljuje pozitivan naboj, odnosno imaju najveću

elektronsku gustoću (slika 4). Reakcije s elektrofilima stoga su najvjerojatnije na položajima 2,6-, a zatim 3,5- te na kraju 1,7-.



**Slika 4.** Rezonantne strukture osnovnog BODIPY spoja **3**.

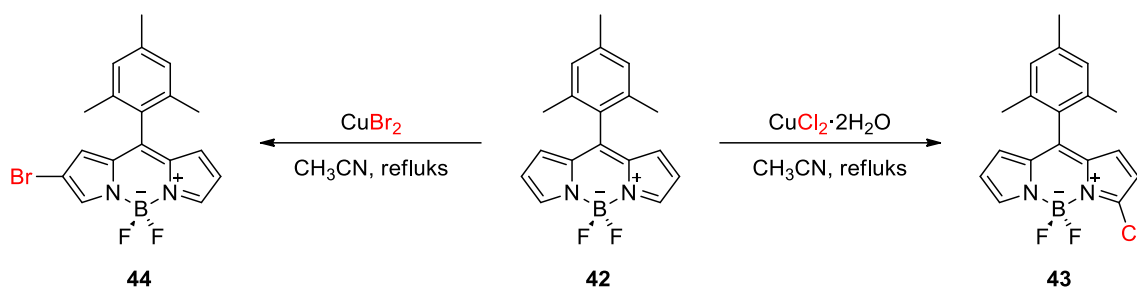
Halogeniranja se mogu provoditi na više načina: bromiranja s elementarnim bromom (shema 6)<sup>54</sup>, NBS-om<sup>55</sup> i s  $\text{CuBr}_2$ <sup>56</sup>, jodiranja s  $\text{ICl}$ <sup>57</sup> i  $\text{I}_2/\text{HIO}_3$ <sup>58</sup> te kloriranja s NCS-om<sup>59</sup> i  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ .<sup>60</sup> Rezultirajući halogenirani derivati reagiraju nukleofilnom aromatskom supstitucijom prvo na položajima 3,5- i zatim 1,7-, dok na položajima 2,6- ne dolazi do supstitucijskih reakcija s nukleofilima.<sup>61</sup>



**Shema 6.**  $\text{S}_{\text{E}}\text{Ar}$  BODIPY spoja **36** s  $\text{Br}_2$ .<sup>54</sup>

Jiao i suradnici razvili su do sada jedinu opću metodu regioselektivnog halogeniranja na položajima 3- i 5- reakcijom  $\alpha$ -nesupstituiranih BODIPY spojeva s  $\text{CuCl}_2$ .<sup>60</sup> Zanimljivo je da reakcijom s  $\text{CuBr}_2$  ne nastaju halogenirani derivati na položaju 3- već na položaju 2-, kao i u reakcijama s ostalim elektrofilima, što ukazuje na različit mehanizam ovih reakcija s bakrovim (II) solima (shema 7). Halogeniranja na položajima 2,6- često su birana metoda za vezanje teških atoma (brom, jod) na BODIPY kromofor. Međusustavno križanje (ISC) takvih spojeva je znatno izraženije, kvantni prinosi fluorescencije su manji i vremena života singletnog

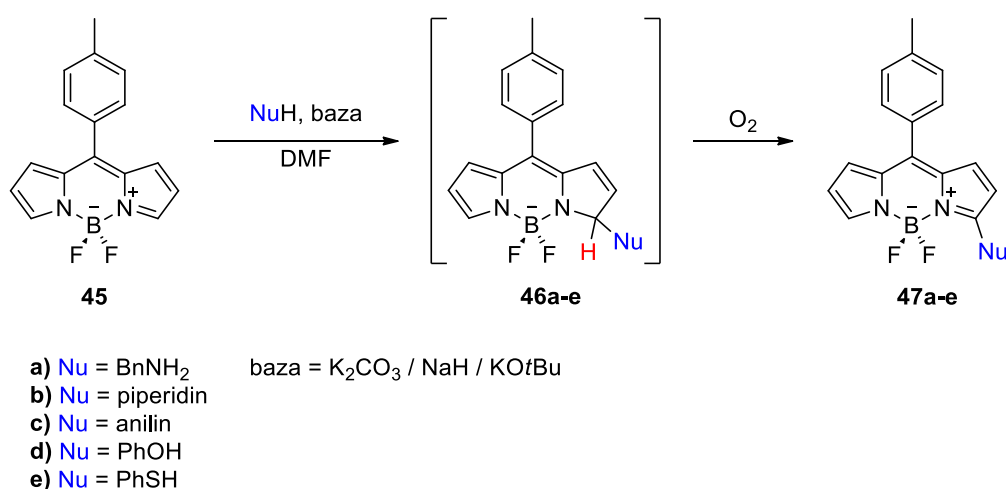
pobuđenog stanja su kraća.<sup>14</sup> Tripletno stanje može biti korisno za nastajanje tripletnog kisika koji je od izuzetne važnosti u fotodinamičkoj terapiji i fotokatalitičkoj oksidaciji.<sup>5,14,62</sup>



**Shema 7.** Halogeniranje BODIPY spoja **42** bakrovim (II) solima.<sup>60</sup>

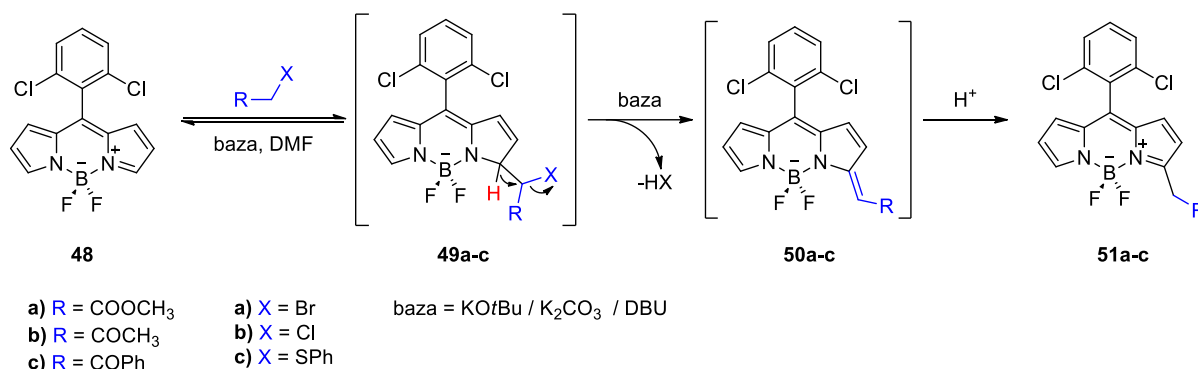
Osim halogeniranja na položajima 2,6- moguće su i reakcije s ostalim elektrofilima. Kao primjeri mogu se navesti sulfoniranja s klorsulfonskom kiselinom<sup>63</sup>, Vilsmeierova-Haackova formiliranja sa suviškom POCl<sub>3</sub> i *N,N*-dimetilformamida (DMF)<sup>64</sup>, nitriranja s dušičnom kiselinom<sup>65</sup> i Friedel-Craftsova aciliranja s kiselinskim kloridima uz BF<sub>3</sub>·OEt<sub>2</sub> kao Lewisovom kiselinom.<sup>66</sup>

Neki nukleofili su sposobni reagirati na položajima 3,5-  $\alpha$ -nesupstituiranih BODIPY spojeva tvoreći  $\sigma^H$ -adukte (shema 8), a da pri tome ne dolazi do supstitucije atoma fluora na položaju 4 (atomu bora). Direktna konverzija  $\sigma^H$ -adukata u produkte nukleofilne supstitucije vodika preko spontane eliminacije hidridnog iona nije moguća jer je hidridni ion slaba odlazeća skupina. Adukt stoga disocira u početne reaktante kako bi se ponovno uspostavila aromatizacija. Ukoliko je prisutan oksidans koji može uspostaviti aromatizaciju, kao npr. kisik, nastaju supstitucijski produkti **47**. Ovaj proces naziva se oksidativna nukleofilna supstitucija vodika (ONSH).<sup>67</sup>



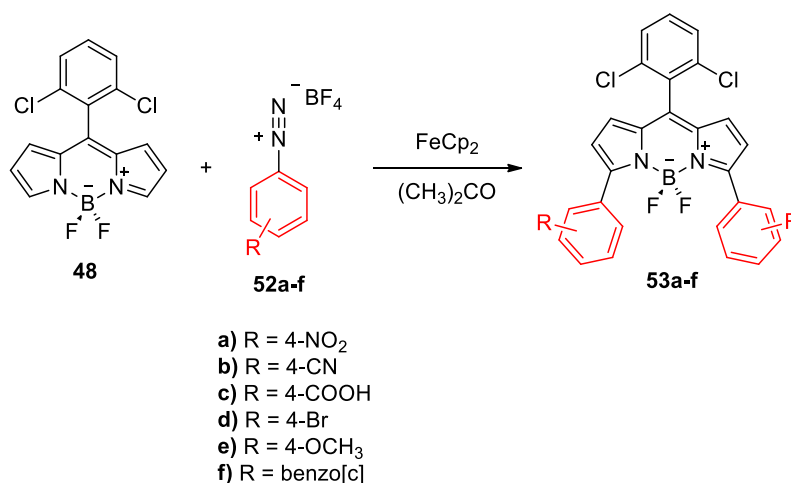
**Shema 8.** ONSH BODIPY spoja **45**.<sup>67</sup>

Drugi način transformacije  $\sigma^H$ -adukata u aromatske produkte je susjedna nukleofilna supstitucija (VNS) vodika. U ovom slučaju, ugljikovi nukleofili su ujedno i nosioci izlazeće skupine vezane na nukleofilnom centru. Adukt **49** nastao adicijom takvog nukleofila podliježe bazom kataliziranoj eliminaciji izlazeće skupine uz tvorbu međuprodukta **50** koji nakon protoniranja i aromatizacije daje konačni produkt supstitucije vodika **51** (shema 9).<sup>68</sup>



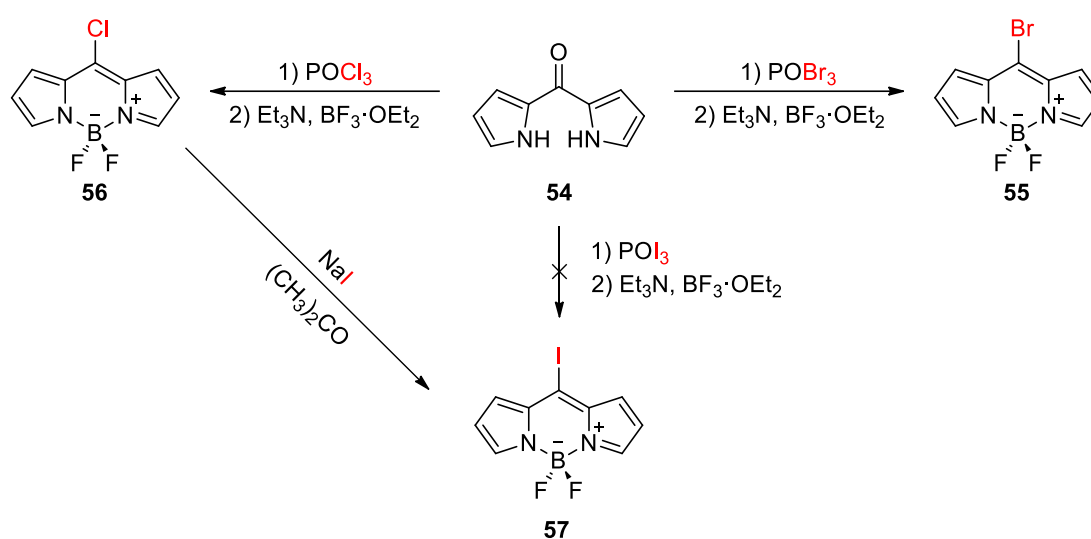
**Shema 9.** VNS BODIPY spoja **48**.<sup>68</sup>

Radikalne reakcije prikladan su način za funkcionalizaciju C–H veza jer se zbog velike reaktivnosti radikala mogu odvijati pri blagim reakcijskim uvjetima.<sup>69</sup> Sintetički korisnu i svestranu radikalnu funkcionalizaciju  $\alpha$ -nesupstituiranih BODIPY spojeva opisali su W. Dehaen, N. Boens i suradnici.<sup>70</sup> Arilni radikali nastaju redukcijom arildiazonijevih soli pri sobnoj temperaturi uz ferocen kao katalizator (shema 10). Reakcija započinje procesom prijenosa elektrona (SET) s ferocena na arildiazonijevu sol ArN<sub>2</sub><sup>+</sup> iz koje zatim nastaju arilni radikal Ar<sup>•</sup> i molekula N<sub>2</sub>. Ovim načinom na  $\alpha$ -položaj mogu se uvesti elektronima bogati i siromašni, a ujedno i sterički ometani arilni supstituenti. Promjenom reakcijskih uvjeta moguća je mono- i disupstitucija, a obje se odvijaju s vrlo visokim reakcijskim iskorištenjima.



**Shema 10.** Radikalno C–H ariliranje BODIPY spoja **48** s arildiazonijevim solima **52**.<sup>70</sup>

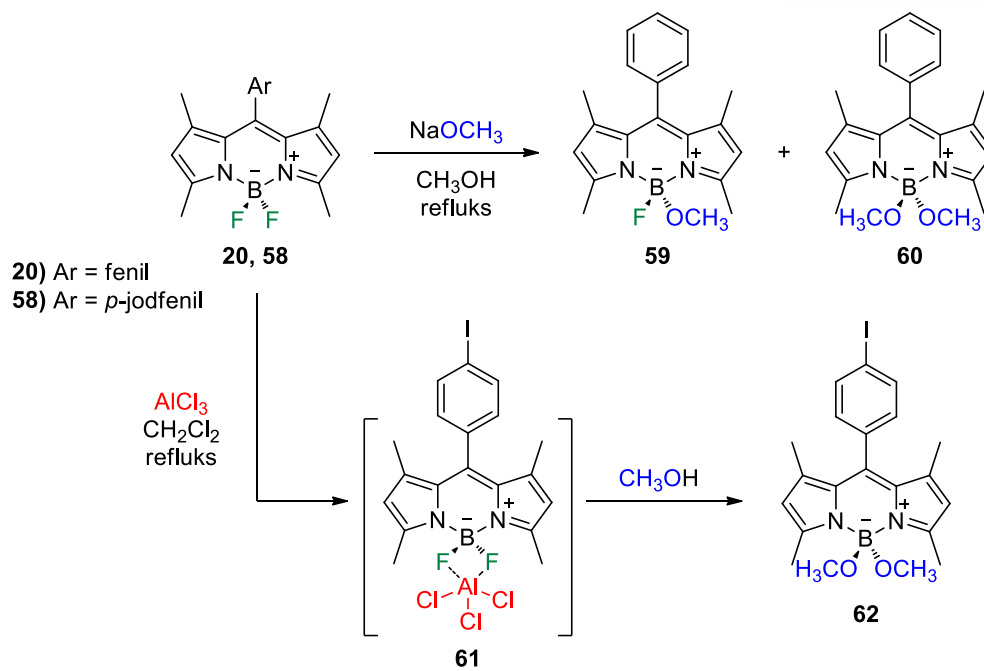
Supstitucijske modifikacije također je moguće provesti i na *meso*-halogeniranim derivatima. W. Dehaen i suradnici prvi su predložili njihovu sintezu deoksigenativnom supstitucijom dipiridilketona **54** koji se lako može dobiti reakcijom dipiriltioketona s  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Reakcijom dipiridilketona s  $\text{POCl}_3$  vrlo brzo nastaje sol dipirometena te *in situ* deprotoniranjem i kompleksiranjem s  $\text{BF}_3$  dolazi do nastajanja *meso*-klor BODIPY spoja **56** (shema 11).<sup>71</sup> Ostali halogenirajući reagensi poput  $\text{SOCl}_2$ ,  $\text{PCl}_3$  i  $\text{PCl}_5$  daju manja reakcijska iskorištenja zbog nastajanja sporednih nusprodukata. Sličnim pristupom, koristeći  $\text{POBr}_3$ , mogu se sintetizirati bromirani derivati, dok se jodirani derivati mogu sintetizirati izmjenom halogena s  $\text{NaI}$  u acetonu.<sup>71</sup>



**Shema 11.** Sinteza *meso*-halogeniranih BODIPY spojeva **55-57**.<sup>71</sup>

BODIPY spojeve moguće je funkcionalizirati i supstitucijom atoma fluora vezanih na borov atom, tj. na položaju 4-.<sup>31</sup> Mogućnosti funkcionalizacije na ovom položaju znatno su manje istražene nego na ostalim položajima dipirometenskog skeleta. Supstituenti na ovom položaju nemaju znatan utjecaj na apsorpciju i emisiju fluorofora jer nisu dio konjugiranog  $\pi$ -sustava, međutim s obzirom na to da je atom bora tetraedarske konformacije mogu znatno smanjiti agregaciju u otopinama, utjecati na kvantne prinose fluorescencije, redoks svojstva i kemijsku te fotokemijsku stabilnost.<sup>31</sup> Ovaj položaj stoga je prikladan za uvođenje hidrofilnih skupina, poput alkoksilnih, karboksilnih ili oligo(etilenglikolnih), što je od izrazite važnosti za primjenu u biološkim sustavima.<sup>31,72-74</sup> Supstitucijske reakcije provode se koristeći jake kisikove nukleofile (alkoksidge)<sup>75</sup> i karbanione (Grignardove i organolitijeve reagentse).<sup>76,77</sup> Alternativno, 4,4-dialkoksi i 4,4-diariloksi BODIPY spojevi mogu se sintetizirati pri blažim reakcijskim uvjetima s raznim alkoholima uz  $\text{AlCl}_3$  kao Lewisovu kiselinu koja aktivira B-F veze (shema 12).<sup>78</sup>





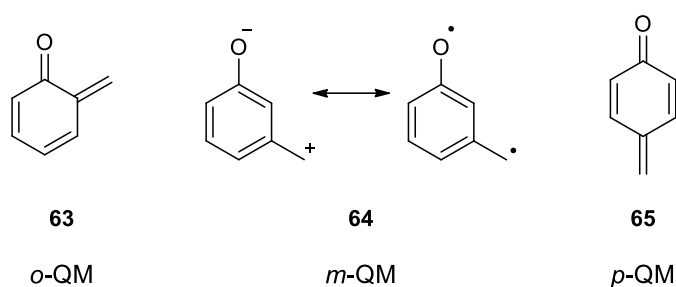
**Shema 12.** Supstitucija atoma fluora BODIPY spojeva **20** i **58** kisikovim nukleofilima.<sup>78,79</sup>

## Kinon-metidi

### Struktura i reaktivnost

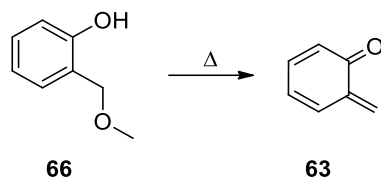
Kinon-metidi (QM, IUPAC: kinometani) su kratkoživi, vrlo reaktivni intermedijari koji se susreću u kemiji fenola i njemu srodnih spojeva, a privlače velik interes zbog svoje zanimljive kemijske reaktivnosti i biološke aktivnosti. Važan su prekursor u organskoj sintezi i medicinskoj kemiji, a nalaze se i u brojnim prirodnim spojevima.<sup>80,81</sup>

Struktura „osnovnog“ kinon-metida slična je kinonima i kinodimetanima, a sastoji se od cikloheksadienskog skeleta na koji su vezane karbonilna i metilenska skupina koje su u konjugaciji. Međutim, u literaturi se kinon-metidima nazivaju općenito svi spojevi koji sadrže takvu strukturu. Osim *o*-QM **63** postoje još 2 izomera: *m*-QM **64** i *p*-QM **65**. Kod *m*-QM nema konjugacije između karbonilne i metilenske skupine, a struktura se može prikazati kao rezonancijski hibrid zwitteriona i biradikala (slika 5).<sup>1</sup>



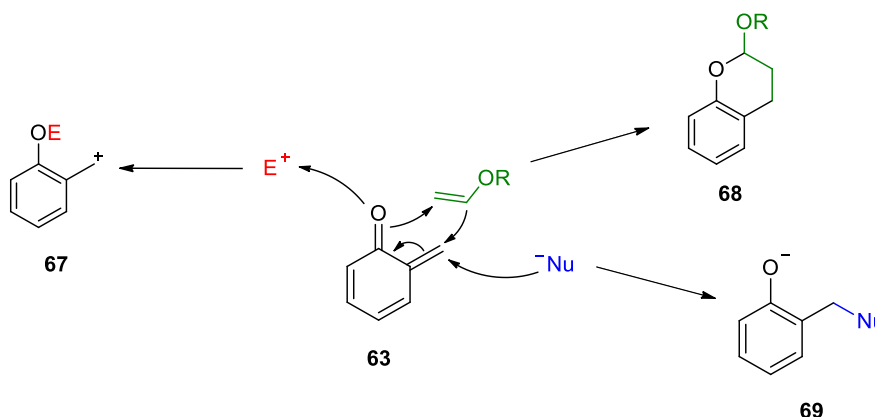
**Slika 5.** Strukture „osnovnih“ *o*-QM, *m*-QM i *p*-QM **63-65**.<sup>1</sup>

S obzirom na to da su QM-i kratkožive vrste, u većini slučajeva ih nije moguće izolirati te ih se dokazuje vremenski razlučenim spektroskopskim tehnikama poput laserske pulsne fotolize.<sup>1,81</sup> Također, postoji niz indirektnih dokaza, a većina ih se temelji na strukturalnoj identifikaciji produkata koji su rezultat dimerizacije, trimerizacije, intramolekularnih i intermolekularnih [4+2]-cikloadicija i reakcija s nukleofilima.<sup>80</sup> Postojanje *o*-QM-a kao međuprodukta na temelju logičnog slijeda reakcijskog mehanizma predložio je Fries 1907. g.,<sup>82</sup> dok je Gardner 1963. pirolizom *o*-metoksimetilfenola **66** nastali *o*-kinon-metid **63** izolirao i njegovu strukturu spektroskopski potvrdio pri temperaturi od -100 °C (shema 13).<sup>83</sup> Danas se QM-i proučavaju modernim tehnikama tranzijentne spektroskopije.<sup>84-86</sup>



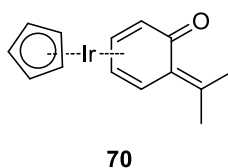
**Shema 13.** Nastajanje osnovnog *o*-QM pirolizom *o*-metoksimetilfenola **66**.<sup>83</sup>

Izrazito polarna struktura i rearomatizacija benzenskog prstena nakon reakcija uzroci su njihove velike reaktivnosti. QM-i tako mogu reagirati i s elektrofilima i s nukleofilima.<sup>80</sup> S elektrofilima reagiraju preko kisikovog atoma načinom karakterističnim za fenolate, a s nukleofilima reagiraju na egzocikličkom metilenskom ugljiku pri čemu nastaju produkti Michaelove konjugirane adicije. Reaktivnost s nukleofilima posebno je važna za biološke sustave u kojima mogu reagirati s alkoholima, tiolima, nukleinskim kiselinama i fosfodiesterima.<sup>87</sup> Pokazuju i reaktivnost s elektron-bogatim dienofilima u Diels-Alderovim cikloadicijskim reakcijama (shema 14).<sup>81</sup>



**Shema 14.** Pregled općenitih reakcija *o*-QM-a **63**.<sup>88</sup>

Supstituenti na QM-ima značajno utječu na brzinu reakcija, te tako i na duljinu vremena života. Kako su QM-i općenito siromašni elektronima, elektron-odvlačeće skupine imaju destabilizirajući, a elektron-donorske skupine stabilizirajući učinak, isto kao i velike alkilne skupine, npr. *tert*-butilna.<sup>89</sup> Stabilan *o*-QM pripremljen je kao dio organometalnih  $\pi$ -kompleksa s osmijem, iridijem i rodijem (slika 6).<sup>90</sup>



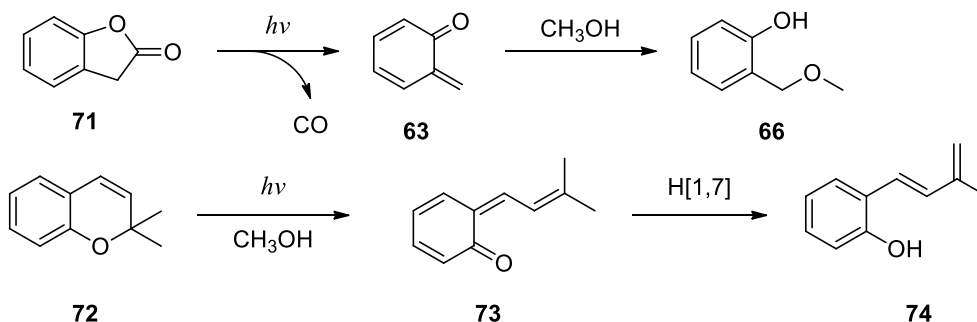
**Slika 6.** Struktura stabilnog organometalnog kompleksa *o*-QM-a **70**.<sup>90</sup>

## Fotokemijsko nastajanje

Iako su QM-i poznati već više od 100 godina, ovi intermedijari su se intenzivno počeli istraživati prije desetak godina.<sup>88,91</sup> Njihova velika reaktivnost može predstavljati problem u sintezi, stoga ih je često potrebno generirati *in situ*. Metode njihova stvaranja mogu biti termičke koje uključuju reakcije poput oksidacija fenola,<sup>92</sup> dehidratiranja hidroksibenzilnih alkohola<sup>93</sup> i desililacije potaknute fluoridom.<sup>94</sup>

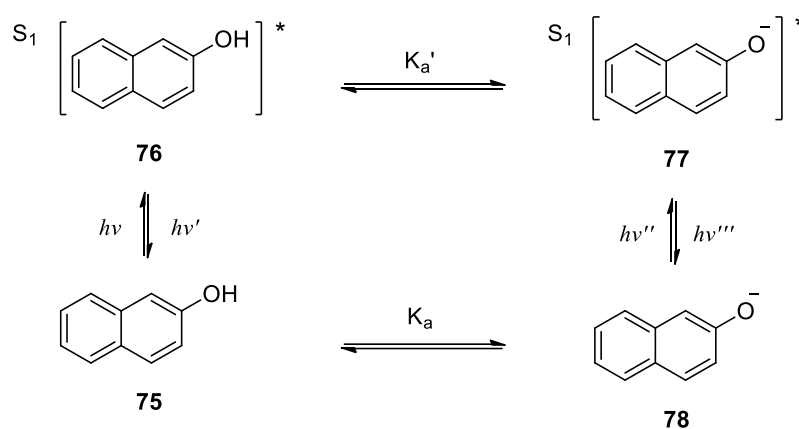
Mnogo blaži pristup su fotokemijske metode koje je puno lakše primijeniti u biološkim sustavima s obzirom na to da su fotoni reagensi „bez traga“, a ujedno omogućuju i prostornu i vremensku kontrolu reakcija.<sup>1,95</sup> U fotokemijskim reakcijama sudjeluju vrste koje su elektronski pobuđene, zbog čega imaju znatno različitu raspodjelu elektrona u molekuli nego što je to slučaj u osnovnom stanju te je stoga i reaktivnost u pobuđenom stanju drugačija nego u osnovnom stanju. Dodatni parametri koje treba uzeti u obzir pri primjeni fotokemijskih reakcija za generaciju QM-a su valna duljina svjetla potrebnog za ekscitaciju kromofora i kvantni prinos procesa. Prekursori QM-a trebali bi sadržavati kromofore koji apsorbiraju pri valnim duljinama većim od 350 nm kako ne bi došlo do interferencije s uobičajenim intracelularnim kromoforima: aromatskim aminokiselinama tirozinom, triptofanom i fenilalaninom te nukleozidima u DNK i RNK.

Jedna od prvih opisanih metoda fotokemijskog nastajanja QM-a je fotofragmentacija oksaheterocikala. Tako fotopobudom benzolaktona **71** dolazi do izdvajanja CO<sub>2</sub> te nastajanja QM-a **63** koji odmah reagira s prisutnim otapalom – metanolom, dajući *o*-hidroksibenzil-metil-eter **66** kao produkt reakcije fotosolvolize (shema 15). QM može nastati i iz derivata kromena **72**. Ozračivanjem dolazi do otvaranja prstena oksaheterocikla, pri čemu nastaje QM **73** u kojem [1,7]-sigmatropnim pomakom vodika dolazi do rearomatizacije i nastajanja nezasićenog fenolnog produkta **74**.<sup>96</sup>



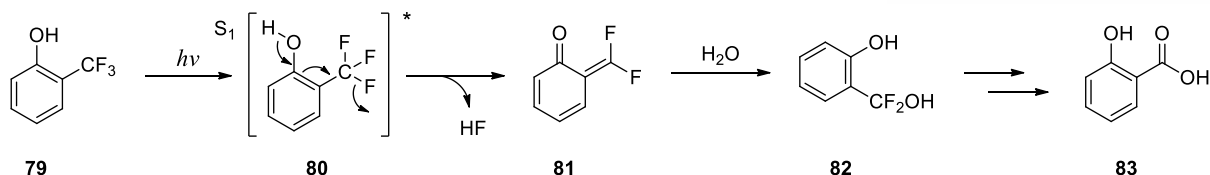
**Shema 15.** Fotokemijsko nastajanje QM-a fotofragmentacijom oksaheterocikala **71** i **72**.<sup>96</sup>

Kako QM-i najčešće nastaju iz fenola i drugih hidroksiaromatskih spojeva procesom koji uključuje prijenos protona u pobuđenom stanju (ESPT), potrebno je reći nešto više o samom procesu. Nakon pobude elektrona, kod određenih skupina aromatskih spojeva može doći do značajnih promjena u kiselinsko-baznim svojstvima.<sup>97</sup> Tako fenoli i aromatski amini postaju jače kiseline, dok dušikovi heteroaromati, kao npr. piridin, u pobuđenom stanju postaju jače baze. Prilikom pobuđivanja molekule dolazi do intramolekulske preraspodjele  $\pi$ -elektronskog oblaka, pri čemu se elektronska gustoća s kisika delokalizira u aromatski prsten. Posljedično dolazi do slabljenja O–H veze i dodatne stabilizacije fenolata koji nastaje u sljedećem koraku. Tako npr.  $pK_a$  2-naftola u osnovnom stanju iznosi 9,5, dok u pobuđenom stanju  $pK_a^*$  iznosi 2,8 (shema 16).<sup>98</sup> Promjene vrijednosti  $pK_a$  najčešće su 4 do 10 redova veličine, iako postoje i spojevi kod kojih su te promjene izraženije, a takvi spojevi nazivaju se superfotokiseline.<sup>99</sup> Ako se kiselo i bazno mjesto u nekoj molekuli nalaze u neposrednoj blizini, tada nakon pobude može doći do intramolekulskog prijenosa protona (ESIPT), a ako nisu u blizini tada se prijenos protona može odvijati samo intermolekulski (ESPT). Prema mehanizmu, prijenos protona može biti: intrinzički (izravan prijenos između dva bliska mjesta u molekuli), usklađeni prijenos dvaju protona i fototautomerizacija s molekulama protičnog otapala.<sup>100</sup>



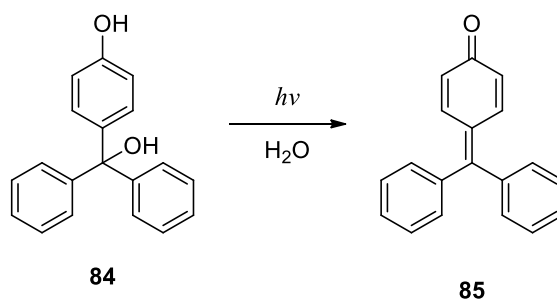
**Shema 16.** Disocijacija 2-naftola **75** u osnovnom i pobuđenom stanju, ilustrativni prikaz Försterovog termodinamičkog ciklusa.<sup>98</sup>

P. Seiler i J. Wirz studirali su fotokemiju fenola i naftola koji sadrže benzilne supstituente.<sup>101</sup> U svom istraživanju otkrili su da u singletnom pobuđenom stanju dolazi do fotodisocijacije fenola. Nakon eliminacije fluorida nastaje QM **81** koji reakcijom s prisutnom vodom daje benzilni alkohol **82** (shema 17). Proces se ponavlja dok se ne zamijene svi atomi fluora, a krajnji produkt je salicilna kiselina. Navedene reakcije odvijaju se s vrlo visokim kvantnim prinosima.



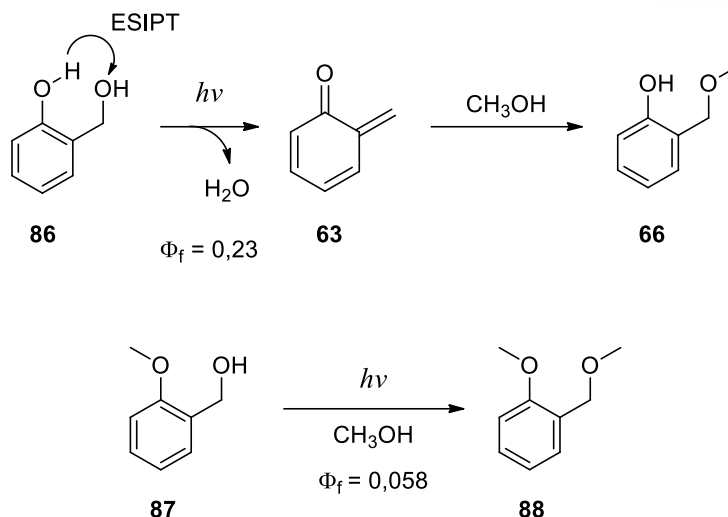
**Shema 17.** Fotokemijsko nastajanje *o*-QM **81** iz *o*-trifluormetilfenola **79**.<sup>101</sup>

QM-i mogu nastati i reakcijama fotodehidriranja hidroksimetilfenola i sličnih derivata. Prvi primjer takve reakcije opisao je Gomberg u radu iz 1913. godine.<sup>102</sup> On je primijetio da uzorci suhog hidroksibenzilfenola **84** (shema 18) nakon izlaganja sunčevoj svjetlosti postaju žuti. Promjenu boje objasnio je nastajanjem QM-a, iako sam mehanizam nije razjašnjen do 1970-ih godina. Lewis i suradnici mehanizam su objasnili temeljem kristalne strukture spoja.<sup>103</sup> Fenolna i benzilna hidroksilna skupina u kristalu tvore vodikove veze te u pobuđenom stanju dolazi do prijenosa protona s fenolne na benzilnu hidroksilnu skupinu i dehidriranja.



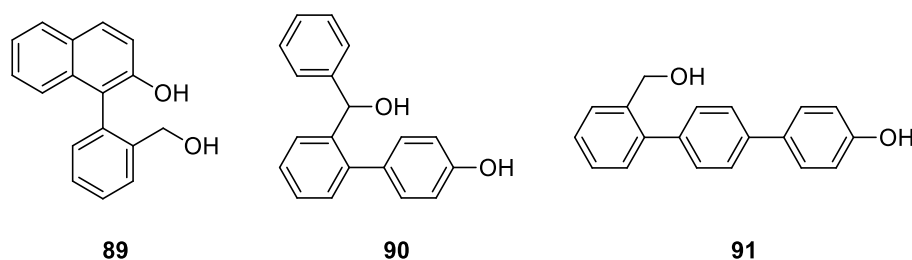
**Shema 18.** Fotodehidracija Gombergova spoja **84**.<sup>102</sup>

Wan i suradnici sistematično su proučavali fotokemiju jednostavnih hidroksibenzilnih alkohola.<sup>84</sup> Utvrdili su da u reakciji fotolize alkohola **86** u pobuđenom stanju dolazi do prijenosa protona praćenog dehidriranjem (shema 19). Pri tome nastaje QM koji je vrlo reaktivna vrsta te odmah reagira s prisutnim nukleofilnim otapalom – metanolom uz nastajanje metoksi-adukta **66**. Fotosolvoliza, tj. adicija metoksi skupine događa se i kod etera **87**, ali uz znatno manje kvantne prinose. Razlog tome je što kod etera ne može doći do ESIPT te je izlazak benzilne hidroksilne skupine znatno teži. U reakciji vjerojatno dolazi do heterolize CH<sub>2</sub>–OCH<sub>3</sub> veze uz nastajanje benzilnog kationa koji reagira s metanolom. Moguća je i homoliza navedene veze pri čemu nastaju radikali koji prijenosom elektrona daju benzilni kation.



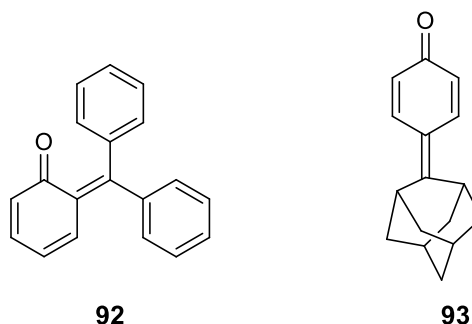
**Shema 19.** Fotokemijsko nastajanje *o*-QM iz hidroksibenzilnih alkohola **89** i **90** i njihova solvoliza.<sup>84</sup>

Najveći kvantni prinosi nastanka QM-a su kod *o*-supstituiranih derivata (slika 7).<sup>104–106</sup> Razlog tome je postojanje vodikove veze između fenolne hidroksilne skupine (kiselo mjesto) i benzilne hidroksilne skupine (bazno mjesto) pa se prijenos protona uzduž te vodikove veze u pobuđenom stanju (ESIPT) odvija vrlo učinkovito. Prijenos protona praćen je eliminacijom molekule vode. U slučajevima kad su hidroksilne skupine na fenilnom i benzilnom položaju udaljene, kao što je slučaj kod *m*- i *p*-supstituiranih derivata, ESIPT nije moguć, već se prijenos protona odvija uz posredovanje otapala (ESPT).<sup>107</sup>



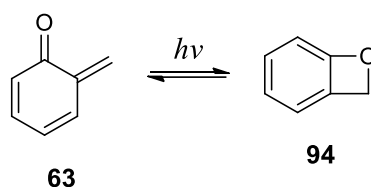
**Slika 7.** Primjeri naftalenskog **89**, bifenilnog **90** i terfenilnog **91** derivata koji fotodehidratacijom daju QM-e.<sup>104–106</sup>

Uvođenjem fenilnog supstituenta na benzilni, odnosno metilenski položaj odgovarajućeg QM-a, dolazi do stabilizacije, a time i produljenja vremena života i kvantnog prinosa njihova nastajanja.<sup>108</sup> Vrijeme života,  $\tau$ , može se produljiti i uvođenjem sterički ometajućih supstituenata poput fenila ili adamantana (slika 8), čime se ujedno povećava njihova selektivnost u reakcijama.<sup>109</sup>



**Slika 8.** Strukture QM **92** i **93** nastalih fotodehidratacijom odgovarajućih hidroksibenzilnih alkohola.<sup>108,109</sup>

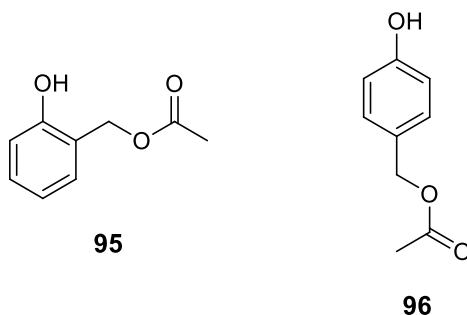
Određeni QM-i mogu nastati i stupnjevitim mehanizmom iz kraće živućih vrsta. Semiempirijskim računima proširenom Hückelovom metodom potvrđeno je da su QM-i stabilniji od svojih strukturnih izomera benzokseta za oko  $20 \text{ kJ mol}^{-1}$ , pa su time i prevladavajuće vrste u ravnoteži.<sup>110</sup> Kasnijim istraživanjem koje je uključivalo femtosekundnu tranzijentnu apsorpciju i računske studije, utvrđeno je da benzokset nije intermedijar u nastajanju QM, međutim oba intermedijara moguće je detektirati u kriogenim uvjetima.<sup>111</sup> Pri tim uvjetima nema dovoljno energije za svladavanje energetske barijere potrebne za reakciju pa reaktivne vrste mogu egzistirati duže vrijeme. Ovim načinom su Tomioka i suradnici generirali osnovni benzokset **94** u argonskoj matrici pri temperaturi od 10 K i proučavali njegovu fotoizomerizaciju u QM i obrnuto (shema 20). Snimili su IR spektre međuprodukata koji su bili u skladu s teorijski izračunatim te su tako izravno dokazali njihovu strukturu.<sup>112</sup>



**Shema 20.** Ravnoteža između *o*-QM-a **63** i benzokseta **94**.<sup>110</sup>

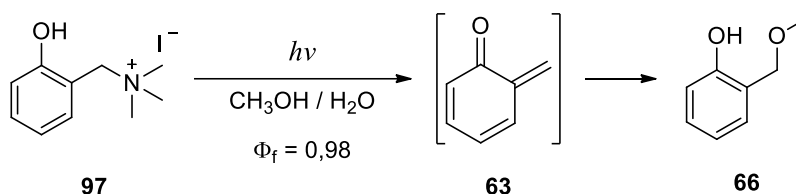
Nastajanje QM-a moguće je i eliminacijom octene kiseline u spojevima **95** i **96** (slika 9). U pobuđenom stanju dolazi do prijenosa protona s hidroksilne skupine fenola na acetilnu skupinu vezanu na benzilni položaj nakon čega slijedi eliminacija octene kiseline. Ovim pristupom prvi put je laserskom pulsnom fotolizom (LFP) detektiran osnovni *p*-QM.<sup>113,114</sup>





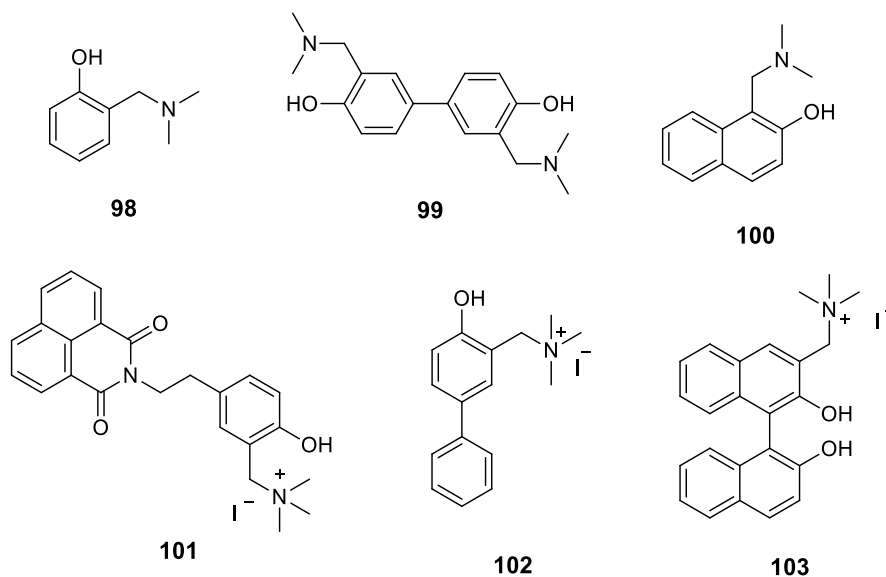
**Slika 9.** Strukture acetatnih prekursora QM-a **95** i **96**<sup>113,114</sup>

Najkorištenija fotokemijska reakcija za nastajanje QM-a je fotodeaminacija, uglavnom Mannichovih baza i njihovih odgovarajućih soli (shema 21).<sup>115,116</sup>



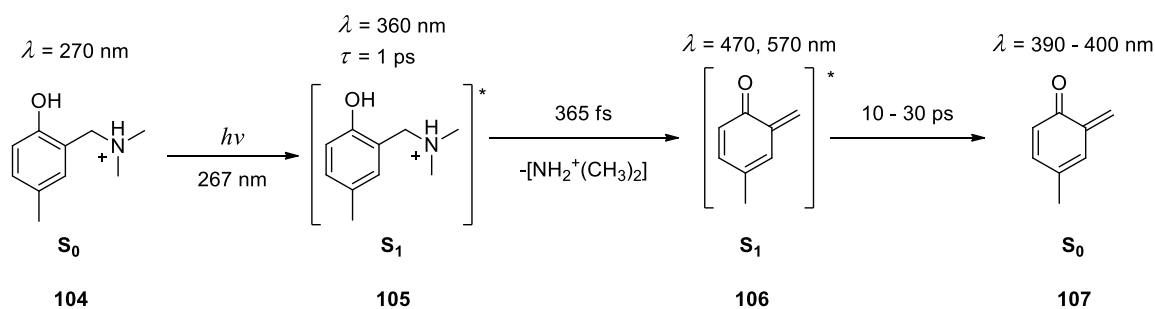
**Shema 21.** Deaminacija kvaterne amonijeve soli Mannichove baze **97** i solvoliza nastalog o-QM-a **63**.

Reakciju karakteriziraju znatno veći kvantni prinosi nego kod reakcija dehidratiranja. Amonijeve soli ipak imaju nekoliko prednosti u odnosu na slobodne baze **98-100** (slika 10). Bolje su topljive u vodi čime je omogućena njihova primjena u biološkim sustavima, a nepostojanjem nukleofilnog centra izbjegnuta je reakcija amina s nastalim QM-om.<sup>85</sup>



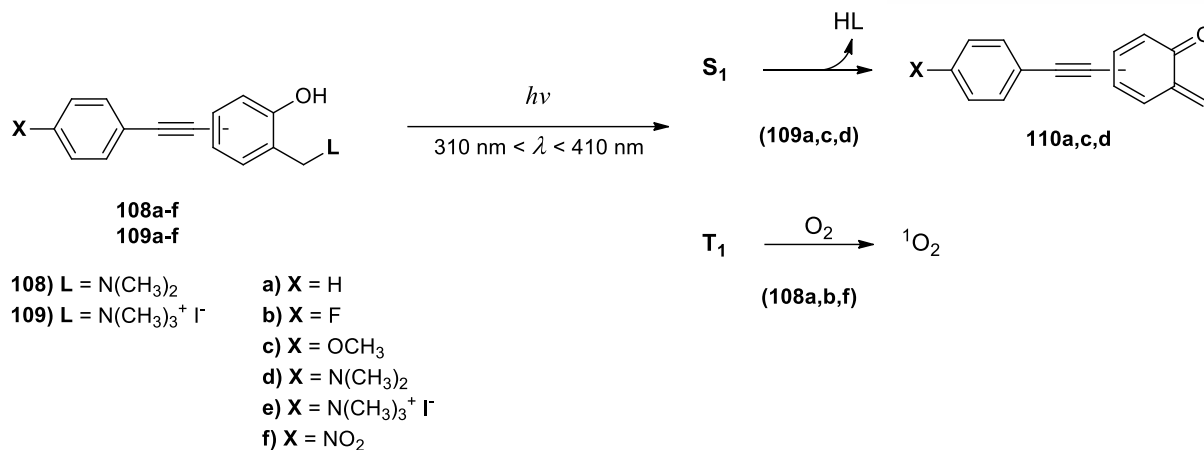
**Slika 10.** Primjeri Mannichovih baza **98-100** i kvaternih amonijevih soli **101-103**, prekursora QM-a.

Mehanizam deaminacije temeljito je istražen femtosekundnom tranzijentnom apsorpcijskom spektroskopijom (fs-TA) i računski TD-DFT-om na derivatu krezola **104**, a može se pretpostaviti da je isti mehanizam prisutan i kod ostalih molekula u kojima su fenolna hidroksilna i amino skupina međusobno u *ortho*-položajima.<sup>85,86</sup> Nakon ekscitacije navedenog krezola, kod rezultirajuće anti-aromatske strukture ( $S_1$ ) dolazi do pucanja C–N veze te iz nastale prijelazne strukture nastaje energetski stabilniji QM **106** u pobuđenom stanju ( $S_1$ ). Naknadnom unutarnjom konverzijskom relaksacijom iz  $S_1$  u  $S_0$  nastaje reaktivni intermedijar QM **107** (shema 22). Rezultati fs-TA ukazuju da se deaminacija odvija sličnim procesima i u protičnim i u aprotičnim otapalima što je ključno za primjenu molekula koje podliježu fotodeaminaciji u biološkim sustavima. Naime, iako se molekula može nalaziti u staničnoj membrani ili proteinu, tj. u aprotičnom okruženju, i dalje ostaje fotokemijski reaktivna i može reagirati uz nastajanje QM-a.



**Shema 22.** Predloženi mehanizam nastajanja QM-a **107** iz krezola **104** u  $\text{CH}_3\text{CN}$  temeljen na fs-TA spektroskopskim mjerenjima.<sup>86</sup>

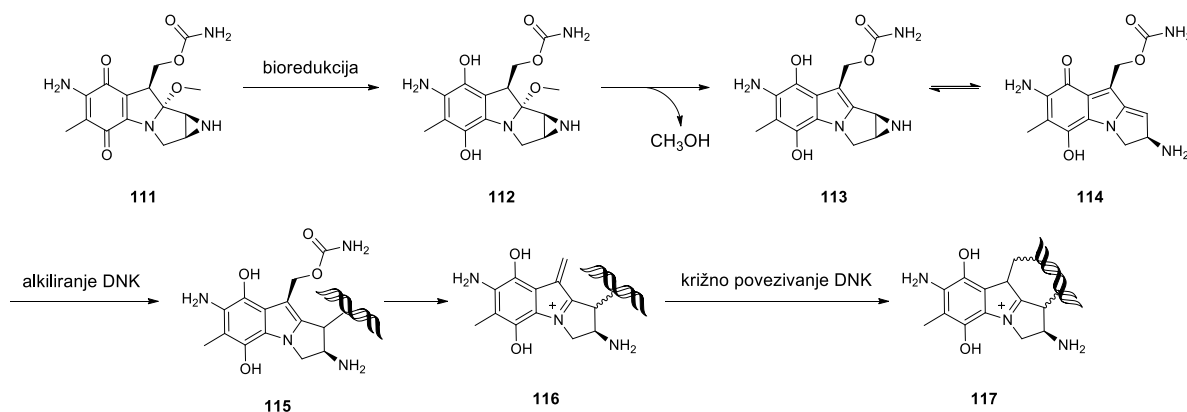
Posebno je zanimljiva fotokemija 4- i 5- ariletinilnih Mannichovih baza **108** i njihovih odgovarajućih soli **109**. Kod takvih spojeva nakon pobude zračenjem valne duljine između 310 i 400 nm može doći do dva različita procesa. U protičnim otapalima iz singletnog pobuđenog stanja nastaje QM **113**, dok u aprotičnim otapalima iz tripletnog pobuđenog stanja dolazi do nastajanja singletnog kisika,  $^1\text{O}_2$  (shema 23).<sup>117</sup>



**Shema 23.** Fotokemija 4- i 5-ariletinilnih Mannichovih baza **108** i njihovih odgovarajućih soli **109**.<sup>117</sup>

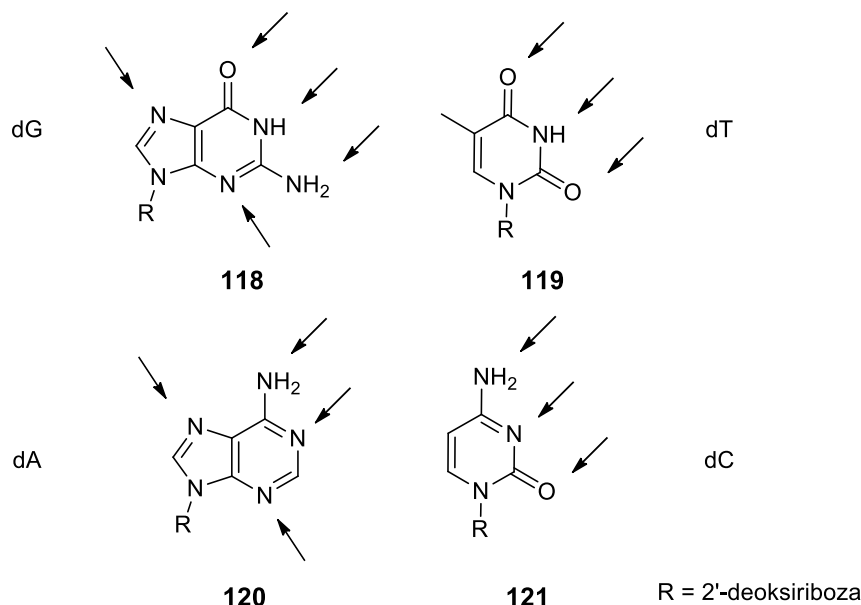
### Primjena i biološka aktivnost fotokemijski nastalih QM

QM-i su privukli veliku pozornost znanstvene zajednice zbog njihove biološke aktivnosti. Ona se temelji na sposobnosti alkiliranja prirodnih makromolekulskih nukleofila prisutnih u stanici: aminokiselina<sup>116</sup>, peptida i proteina<sup>118</sup> te nukleotida.<sup>119,120</sup> Mogu inhibirati aktivnost nekih enzima<sup>121</sup> te alkilirati i križno povezati DNK što ih svrstava u potencijalne antitumorske terapijke.<sup>122–125</sup> Fotokemijskim reakcijama unutar žive stanice mogu se pripremiti QM-i što je vrlo pogodno za njihovu primjenu u biološkim sustavima, npr. za tretman karcinoma.<sup>1,126</sup> Križnim povezivanjem DNK inhibira se enzim topoizomeraza II koji ima ulogu razdvajanja lanaca DNK tijekom replikacije.<sup>127</sup> Neki citostatici poput mitomicina C **111** svoju antiproliferativnu aktivnost temelje na međuproduktima QM-a **114** koji nastaju kao posljedica metabolizma lijeka (shema 24).<sup>128,129</sup>



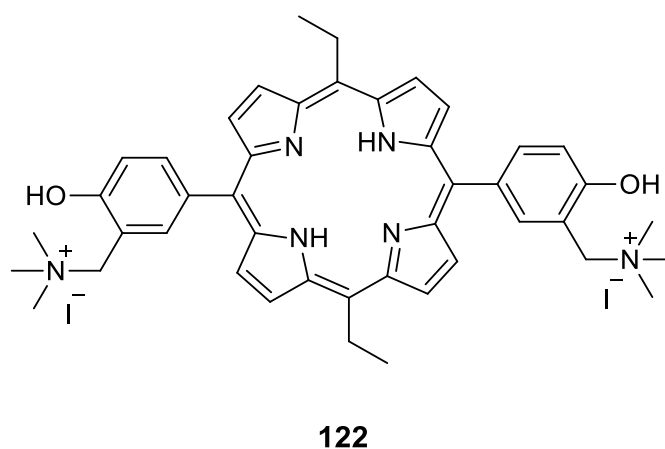
**Shema 24.** Mehanizam biološke aktivnosti mitomicina C **111**.<sup>130</sup>

Reaktivnost QM-a s nukleinskim kiselinama dobro je istražena.<sup>94</sup> QM-i mogu alkilirati nukleinsku kiselinu na fosfatnoj okosnici i na samim nukleotidnim bazama (slika 11). QM-i se mogu upotrijebiti i za obilježavanje proteina u svrhu istraživanja njihovih interakcija.<sup>131</sup>



**Slika 11.** Mjesta alkiliranja purinskih i pirimidinskih nukleobaza.<sup>94</sup>

Poželjno je da fotokemoterapeutici sami po sebi nemaju biološku aktivnost u primijenjenoj koncentraciji te da imaju sposobnost akumulacije u tumorskom tkivu. Fotokemijском aktivacijom dolazi do nepopravljive štete na stanicama tumora, njihovog odumiranja te u konačnici do izlječenja. Dobar primjer fototerapeutika je porfirinski prekursor QM-a **122** (slika 12) čija je antitumorska aktivnost nakon svjetlosne pobude kombinacija stvaranja singletnog kisika i alkiliranja DNK i proteina.<sup>132</sup>

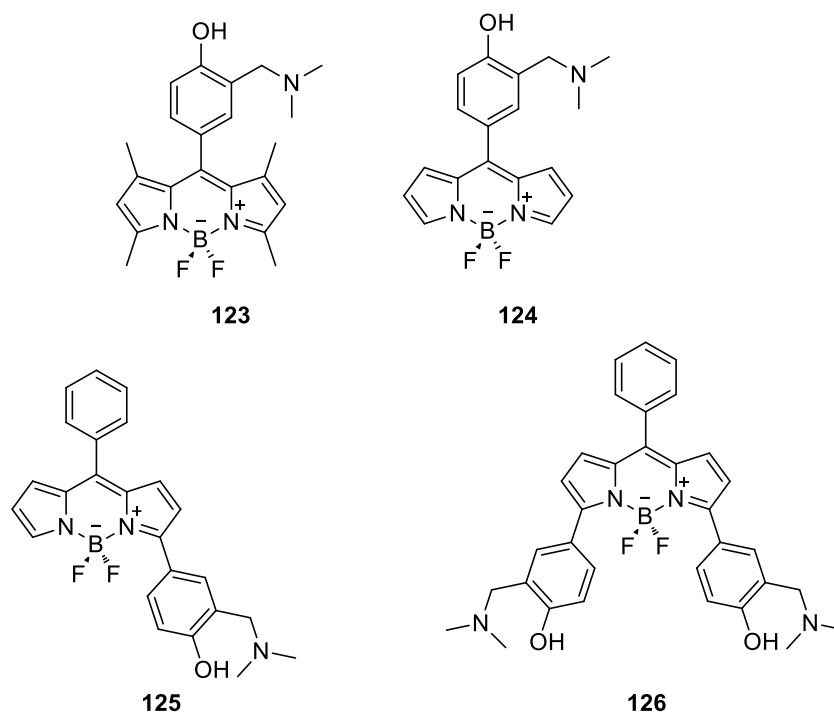


**Slika 12.** Struktura bifunkcionalnog porfirinskog prekursora QM-a **122**.

Valna duljina apsorpcije prekursora QM-a važan je parametar za primjenu fotogeneriranih QM-a u biološkim sustavima. S obzirom na to da i intracelularne molekule apsorbiraju svjetlost, nužno je koristiti svjetlost valne duljine veće od 350 nm. Štoviše, idealna valna duljina svjetlosti za pobuđivanje iznosi oko 650 nm (crveno svjetlo) koja ima najveću moć prodiranja kroz tkivo.<sup>133</sup> Drugi vrlo važan uvjet za primjenu fotogeneriranih QM-a je omjer konstanti brzine reakcije QM-a s ciljanim biološki važnim nukleofilima i vodom. Kako bi QM mogao reagirati s nukleofilima i kako bi bio što selektivniji u tim reakcijama, cilj je postizanje što duljeg vremena života QM-a. Poželjno je i da reakcija fotogeneriranog QM-a s nukleofilima ima visok kvantni prinos, s obzirom na to da se na taj način smanjuje potrebno vrijeme osvjetljavanja.<sup>1</sup>

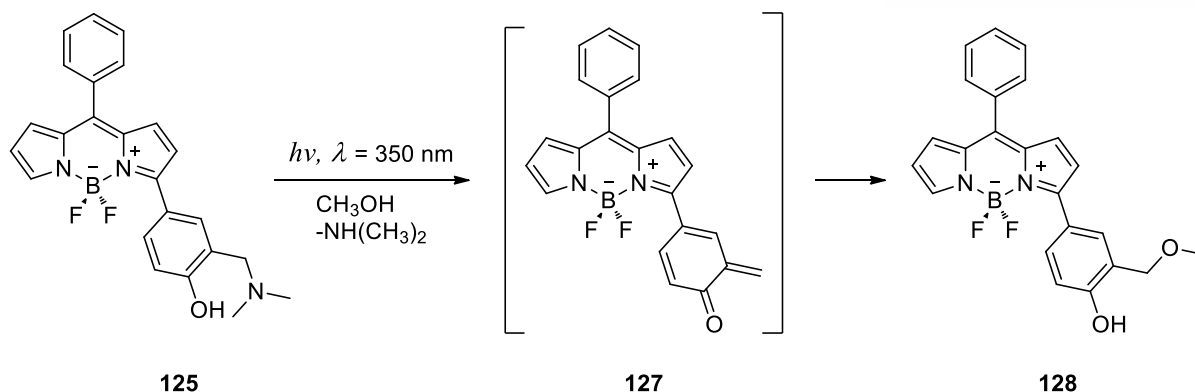
## BODIPY derivati kinon-metida

Nedavno je razvijen novi pristup za kovalentno obilježavanje proteina koristeći derivate BODIPY spojeva koji anti-Kasha fotokemijskom reakcijom iz višeg pobuđenog stanja daju QM-e (slika 13).<sup>134,135</sup>



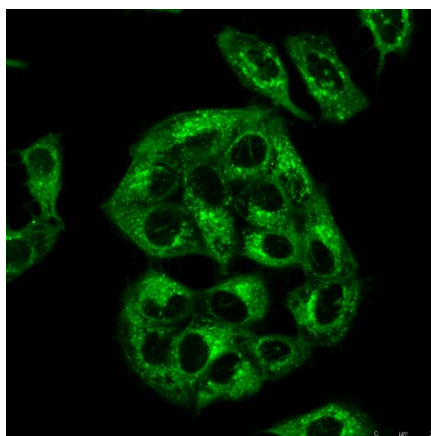
**Slika 13.** Literaturno opisani BODIPY prekursori QM-a.<sup>134,135</sup>

Ekscitacijom prikazanih BODIPY kromofora vidljivim svjetlom dolazi do fluorescencije iz prvog pobuđenog singletnog stanja ( $S_1$ ) bez modifikacija kromofora ili adukta protein-kromofor. Kako bi došlo do nastajanja QM-a i kovalentnog vezanja za lizinske, cisteinske i tirozinske ostatke proteina potrebna je ekscitacija u više pobuđeno stanje svjetlom manjih valnih duljina, odnosno veće energije. Međutim, većina molekula se brže relaksira u osnovno stanje neradijacijskom unutarnjom konverzijom, prije nego što dolazi do procesa fotodeaminacije te je kvantni prinos reakcije deaminacije malen. Fotofizička svojstva ovih spojeva istražena su fluorescencijskom spektroskopijom, dok je anti-Kasha fotokemijska reaktivnost i nastajanje QM-a potvrđeno osvjetljavanjem svjetlom različitih valnih duljina, LFP-om i izolacijom produkata solvolize. Nakon osvjetljavanja otopine spoja **125** u metanolu svjetlom valne duljine 350 ili 300 nm izoliran je produkt solvolize **128**, što je u skladu s otprije opisanom anti-Kasha reaktivnosti BODIPY spojeva i ukazuje na nastajanje QM-a (shema 25).<sup>134</sup>



**Shema 25.** Fotokemijska anti-Kasha reakcija prekursora QM-a **125**, nastali QM **127** i produkt solvolize **128**.<sup>135</sup>

Konfokalnom fluorescencijskom mikroskopijom pokazano je da boje ulaze u stanice, ali ostaju u citoplazmi i ne ulaze u staničnu jezgru (slika 14). Nadalje, obilježavanje proteina istraženo je fluorescencijskom spektroskopijom albumina goveđeg seruma (BSA). Osvjetljavanjem spojeva u prisutnosti BSA svjetlom valne duljine 350 nm dolazi do fotokemijskog nastajanja QM-a koji se kovalentno veže na protein. Međutim, korištenjem svjetlosti valne duljine 490 nm u vremenskom periodu od 30 minuta ne dolazi do smanjenja fluorescencije što ukazuje na veliku fotokemijsku stabilnost u intracelularnom mediju prilikom ekscitacije u  $S_1$ . Citotoksičnost spojeva istražena je standardnim MTT testovima na ljudskim stanicama raka dojke, sa i bez osvjetljavanja svjetlom valne duljine 300 nm te je pokazano da spojevi imaju citotoksična svojstva u mikromolarnim koncentracijama.<sup>134</sup>



**Slika 14.** Žive MCF-7 stanice obojane spojem **123** ( $c = 10^{-5}$  M,  $\lambda_{\text{exc}} = 490$  nm,  $\lambda_{\text{em}} = 510 - 540$  nm). Slika je dobivena konfokalnom mikroskopijom.<sup>134</sup>

Ovakva svojstva omogućuju istovremeno korištenje spojeva za kovalentno fotokemijsko obilježavanje proteina i praćenje vezane boje fluorescencijskom spektroskopijom ili mikroskopijom.

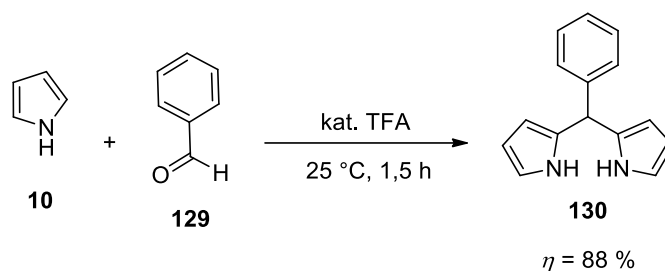
## Rezultati i rasprava

### Uvod

Plan sinteze novog derivata BODIPY prekursora QM-a **1** sastoji se od sinteze halogeniranog BODIPY spoja, sinteze terminalnih alkina i njihovog križnog povezivanja Sonogashirinom reakcijom. Nakon produljenja konjugacije u strukturu je uvedena *N,N*-dimetilaminometilna skupina čime se omogućuje fotokemijska reaktivnost. Nakon sinteze novog derivata provedena je njegova fotofizička karakterizacija te mu je ispitana fotokemijska reaktivnost, odnosno nastajanje QM-a.

### Sinteze spojeva

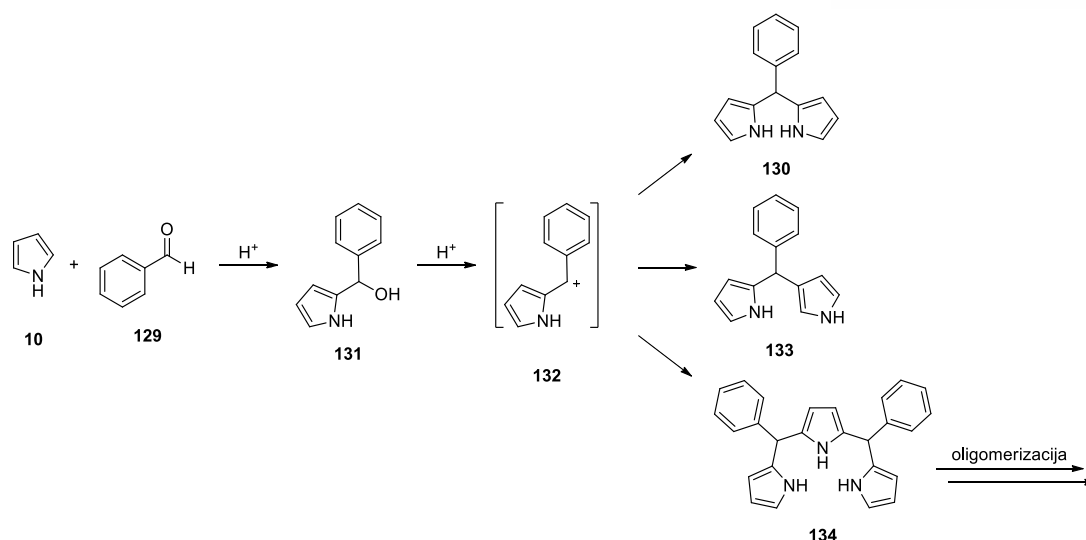
Prvi korak u planiranoj sintezi ciljnog spoja bila je priprava dipirometana **130** kiselinski kataliziranom kondenzacijom pirola **10** s benzaldehidom **129** uz trifluoroctenu kiselinu (TFA) kao katalizator (shema 26).



**Shema 26.** Sinteza 5-fenildipirometana **130**.

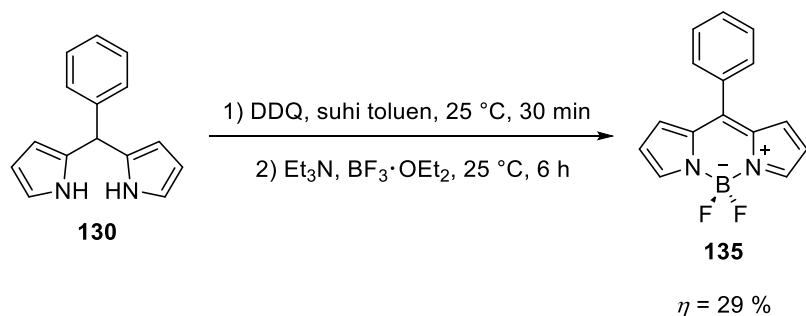
Postupak je proveden prema dobro poznatoj Lindseyjevoj metodi u velikom suvišku pirola koji ujedno služi i kao otapalo, a nakon reakcije se može lako i jednostavno ukloniti vakuumskom destilacijom. Najveća prednost ove metode posljedica je upravo velikog množinskog omjer pirola i aromatskog aldehida kojim je smanjeno nastajanje oligomernih nusprodukata karakterističnih za kemiju pirola (shema 27). Ova metoda je izabrana jer kiselinski kloridi nisu prikladni za reakciju s nesupstituiranim pirolom koji je reaktivniji te bi u tom slučaju došlo do znatno većeg nastajanja nusprodukata. Produkt je okarakteriziran  $^1\text{H}$  NMR spektroskopijom. U spektru  $^1\text{H}$  NMR vidljiva su 3 signala koji odgovaraju protonima vezanim za pirolni prsten, široki signal kiselih protona vezanih za atom dušika, multiplet fenilnih protona te singlet *meso*-protona.





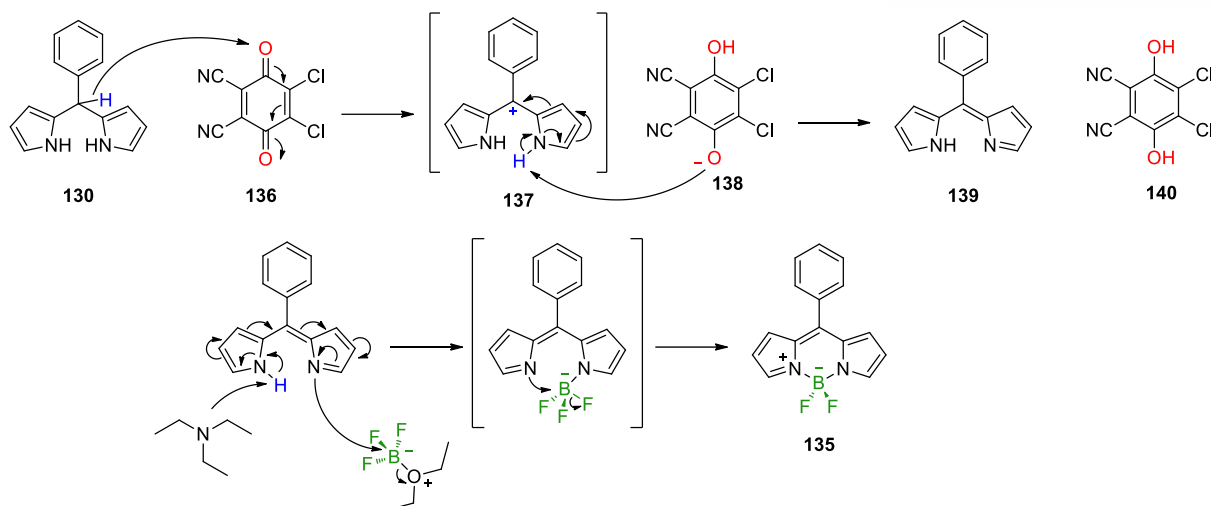
**Shema 27.** Mogući produkti kiselinski katalizirane kondenzacije pirola **11** s benzaldehidom **129**.

Spoj **130** zatim je preveden u odgovarajući BODIPY **135** uobičajenim „one-pot“ dvostupanjskim korakom, bez izolacije *in situ* nastalog dipirometena **139**. Kao oksidans korišten je DDQ **136**, a trietilamin kao baza (shema 28). Produkt je okarakteriziran  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR spektroskopijom. U spektru  $^1\text{H}$  NMR spoja **135** svi signali nalaze se u aromatskom području, 3 signala odgovaraju protonima vezanim za pirolni prsten, dok je signal fenilnih protona vidljiv kao multiplet. Spektar  $^{13}\text{C}$  NMR sadrži 9 signala u aromatskom području.



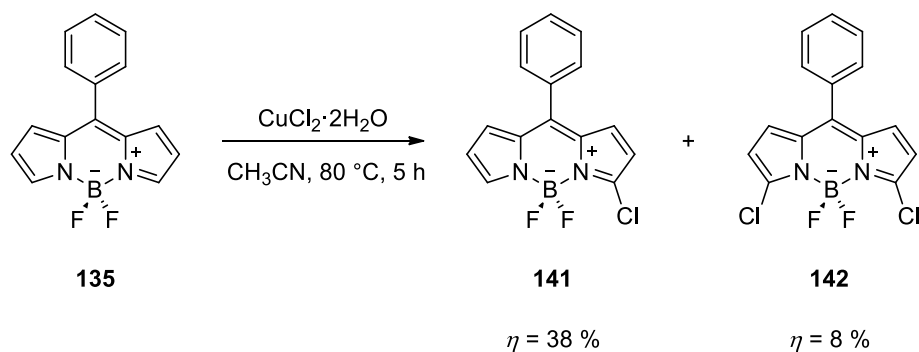
**Shema 28.** Sinteza BODIPY spoja **135**.

Mehanizam oksidacije hidroaromatskih sustava DDQ-om **136** nije u potpunosti razjašnjen.<sup>136,137</sup> Može se pretpostaviti da tijekom reakcije dolazi do prijenosa hidridnog iona s dipirometana **130** na DDQ, a nastaju vrlo reaktivni karbokation **137** i fenolatni anion **138**. Fenolatni anion zatim deprotonira karbokation pri čemu dolazi do uspostavljanja konjugiranog  $\pi$ -sustava i nastajanja dipirometena **139** te derivata hidrokinona **140** (shema 29).



**Shema 29.** Pretpostavljeni reakcijski mehanizam dvostupanjske sinteze BODIPY spoja **135** iz dipirometana **130**.

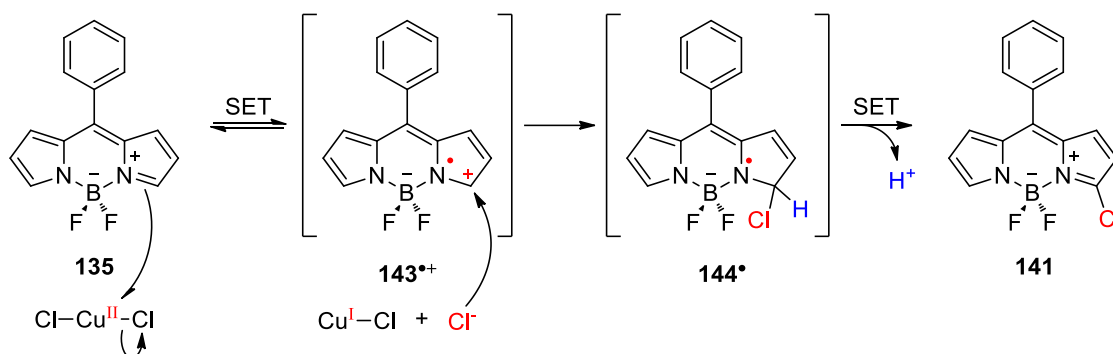
Zatim je provedeno regioselektivno kloriranje  $\alpha$ -položaja (3-) BODIPY spoja **135** koristeći  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  u acetonitrilu kao otapalu (shema 30). Uz željeni produkt **141** reakcijom je dobiven i 3,5-diklorirani derivat **142**. Produkti su okarakterizirani  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR spektroskopijom. U spektru  $^1\text{H}$  NMR spoja **141** svi signali nalaze se u aromatskom području, 5 signala odgovaraju protonima vezanim za pirolni prsten, dok je signal fenilnih protona vidljiv kao multiplet. Kod spoja **142**  $^1\text{H}$  NMR spektar je jednostavniji zbog simetrične strukture molekule pa su vidljiva 2 signala pirolnih protona i multiplet fenilnih protona. U  $^{13}\text{C}$  NMR spektru spoja **142** vidljivo je 9 signala, a u  $^{13}\text{C}$  NMR spektru spoja **141** snimljenog APT tehnikom zbog male količine uzorka svi signali kvaternih ugljika nisu bili vidljivi, stoga spektar sadrži 8 signala.



**Shema 30.** Sintaza kloriranih BODIPY spojeva **141** i **142**.

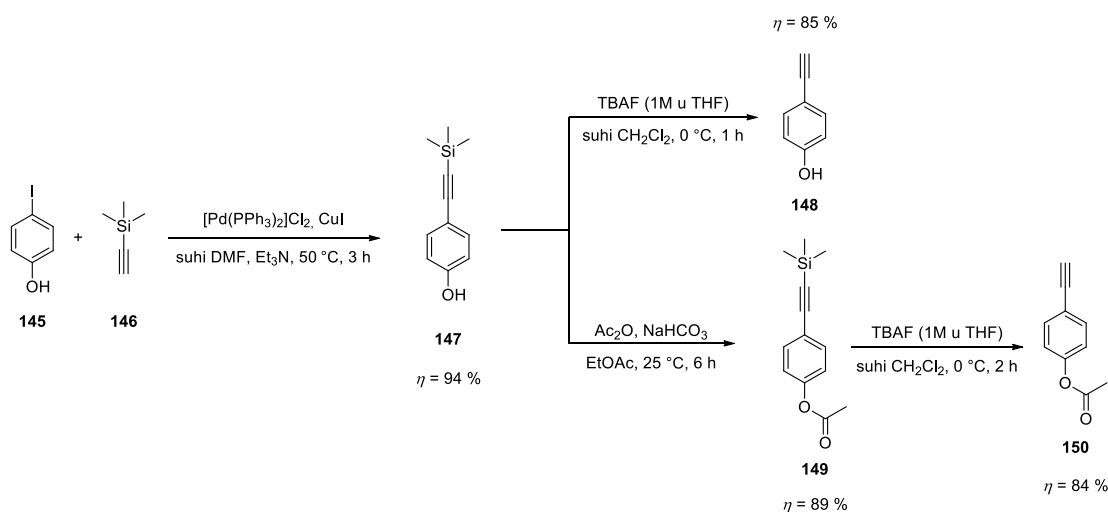
Navedena reakcija odvija se SET procesom s jedne podjedinice pirola BODIPY spoja **135** na  $\text{CuCl}_2$  čime nastaje radikal-kationski intermedijar  $\mathbf{143}^{+\cdot}$ . Ovaj radikal-kation zatim podliježe elektrofilnoj adiciji  $\text{Cl}^-$  iona. Najmanja elektronska gustoća BODIPY spoja je na

položaju 1-, međutim zbog steričke smetnje fenilne skupine najreaktivniji je  $\alpha$ -položaj (3-). Dolazi do stvaranja novog radikala **144**<sup>•</sup> koji potom ponovno podliježe SET procesu dajući spoj **141** (shema 31).<sup>60</sup> Tijekom reakcije dolazi do *in situ* stvaranja HCl-a, stoga je sintezu poželjno provoditi s relativno malim količinama CuCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O zato jer BODIPY spojevi nisu stabilni pri niskim vrijednostima pH.<sup>138</sup>



**Shema 31.** Reakcijski mehanizam radikalskog regioselektivnog kloriranja BODIPY spoja **135**.<sup>60</sup>

Nakon uspješne pripreve halogeniranog BODIPY derivata **141** uslijedila je sinteza terminalnih alkina **148** i **150** paladijem kataliziranom Sonogashirinom reakcijom križnog povezivanja (shema 32).

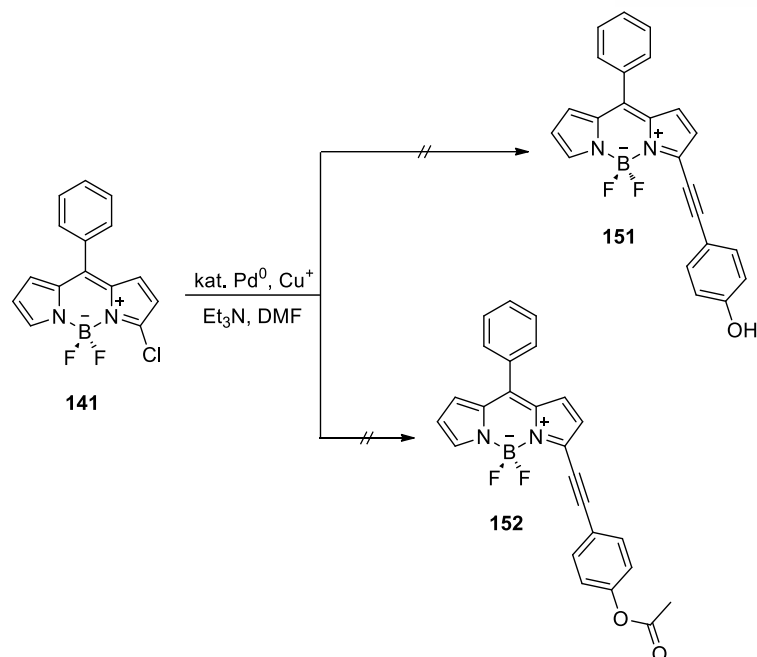


**Shema 32.** Sinteze terminalnih alkina: 4-etinilfenola **148** i *O*-acetil-4-etinilfenola **150**.

Sonogashirinom reakcijom *p*-jodfenola **145** i acetilena zaštićenog trimetilsililnom (TMS) skupinom **146** uz [Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]Cl<sub>2</sub> i CuI kao katalizatore, trietilamin kao bazu i DMF kao otapalo dobiven je spoj **147** u vrlo visokom iskorištenju. Reakcija je provedena pod inertnom atmosferom N<sub>2</sub> kako bi se što je više moguće smanjilo Glaserovo povezivanje dviju molekula acetilena, a ujedno je aceten dodan u malom suvišku kako ne bi zaostalo neizreagirano *p*-

jodfenola. Zaštitna skupina uklonjena je otopinom tetrabutylamonijevog fluorida (TBAF) u tetrahidofuranu (THF) kao izvorom  $F^-$  iona koji stvara jaku Si-F vezu te je dobiven terminalni alkin **148**. Primijećeno je da spoj **148** nije stabilan te s vremenom polimerizira što je vidljivo promjenom boje. Stoga je alkinu **147** prije uklanjanja zaštitne TMS skupine provedena konverzija izrazito elektron-donorske hidroksilne skupine u acetilnu skupinu čime je smanjena reaktivnost i povećana stabilnost. Spoj **149** pripremljen je uobičajenim postupkom acetiliranja koristeći acetanhidrid,  $NaHCO_3$  kao bazu i etil-acetat kao otapalo. Iako je ovime uveden dodatan korak u sintezu ciljanog spoja, ovaj alkin je stabilan, u krutom je stanju pa je njime lakše rukovati, a ujedno je i olakšana oksidativna adicija s kompleksom paladija u sljedećem, ključnom koraku sinteze ciljanog spoja. Nakon uklanjanja zaštitne TMS skupine dobiven je spoj **150**. Produkti su okarakterizirani  $^1H$  NMR spektroskopijom. Spektri svih navedenih alkina vrlo su slični i sadrže dva dubleta u aromatskom području karakteristična za protone *para*-supstituiranih benzenskih prstena, signali protona zaštitne TMS skupine spojeva **147** i **149** vidljivi su kao lako uočljivi singlet intenziteta 9H, kiselim fenolnim protonima spojeva **147** i **148** odgovaraju široki signali na oko 5 ppm, a protonima acetilne skupine spojeva **149** i **150** odgovara singlet na oko 2 ppm.

Nakon sinteza prekursora, halogeniranog BODIPY spoja **141** te terminalnih alkina **148** i **150** stigli smo do ključnog dijela sinteze, produljenja konjugacije kromofora i pripreve novih, do sada neopisanih spojeva. Slijeđena je literaturno opisana metoda Sonogashirine reakcije BODIPY spojeva,<sup>48</sup> međutim nisu uspješno dobiveni željeni produkti **151** i **152** (shema 33).



**Shema 33.** Neuspješne sinteze novih BODIPY derivata **151** i **152**.

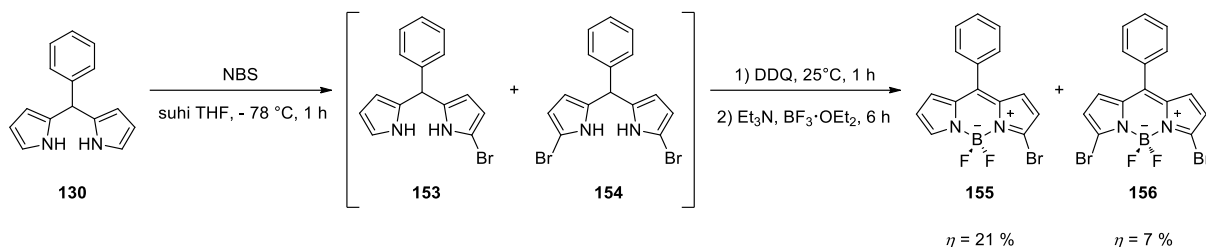
Probane su reakcije pri različitim reakcijskim uvjetima, mijenjani su katalizatori i njihov omjer (tablica 1), ali reakcijama su uvijek dobivane smjese više spojeva koje nije bilo lako razdvojiti, a čijom analizom nije jednoznačno potvrđeno nastajanje željenog produkta.

**Tablica 1.** Reakcijski uvjeti Sonogashirinih reakcija BODIPY **141** spoja s terminalnim alkinima **148** i **150**.

BODIPY	alkin	katalizatori	baza	$T / ^\circ\text{C}$	$t / \text{h}$	otapalo	produkt
<b>141</b>	<b>148</b> (2 ekv.)	Pd(PPh <sub>3</sub> ) <sub>4</sub> (5 % mol) CuI (5 % mol)	Et <sub>3</sub> N	80	3	DMF	-
<b>141</b>	<b>150</b> (2 ekv.)	Pd(PPh <sub>3</sub> ) <sub>4</sub> (8 % mol) CuI (8 % mol)	Et <sub>3</sub> N	80	3	DMF	-
<b>141</b>	<b>150</b> (1,1 ekv.)	Pd(PPh <sub>3</sub> ) <sub>4</sub> (5 % mol) CuI (10 % mol)	Et <sub>3</sub> N	80	3	DMF	-
<b>141</b>	<b>150</b> (2,5 ekv.)	[Pd(PPh <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ]Cl <sub>2</sub> (3 % mol) CuI (6 % mol)	Et <sub>3</sub> N	80	4	DMF	-

Kako je poznato da se u Sonogashirinih reakcijama reaktivnost aril-halogenida smanjuje nizom  $\text{I} > \text{Br} \gg \text{Cl}$ ,<sup>139</sup> odlučili smo sintetizirati reaktivniji, bromirani BODIPY **155** i probati reakciju s alkinom **150**. S obzirom na to da nije poznat regioselektivni način bromiranja

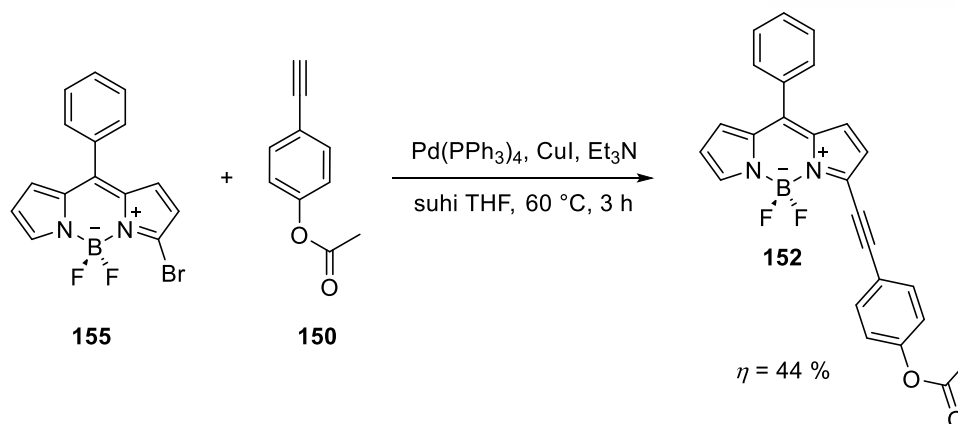
BODIPY spojeva na  $\alpha$ - položaju (3-), morali smo promijeniti strategiju i provesti halogeniranje prije kompleksiranja dipirometena s  $\text{BF}_3$ . Stoga smo odlučili halogenirati dipirometan **130** s NBS-om u THF-u (shema 34).



**Shema 34.** Sinteza bromiranih BODIPY spojeva **155** i **156**.

Postupak se pokazao kao eksperimentalno prilično zahtjevan jer su bromirani dipirometani izrazito nestabilni i vrlo se brzo raspadaju nakon izolacije, kao i ostali halogenirani piroti stoga je sintezu potrebno provesti brzo i vrlo pažljivo.<sup>140</sup> Nakon halogeniranja, dipirometan **153** je odmah oksidiran s DDQ-om, zatim samo djelomično pročišćen i već prije opisanim postupkom uspješno preveden u odgovarajući BODIPY **155**, iako u malom reakcijskom iskorištenju. Uz monosupstituirani derivat, iz reakcijske smjese izoliran je i disupstituirani BODIPY **156**. Produkti su okarakterizirani  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR spektroskopijom. NMR spektri slični su kloriranim spojevima **141** i **142**, ali naravno s blago drugačijim kemijskim pomacima.

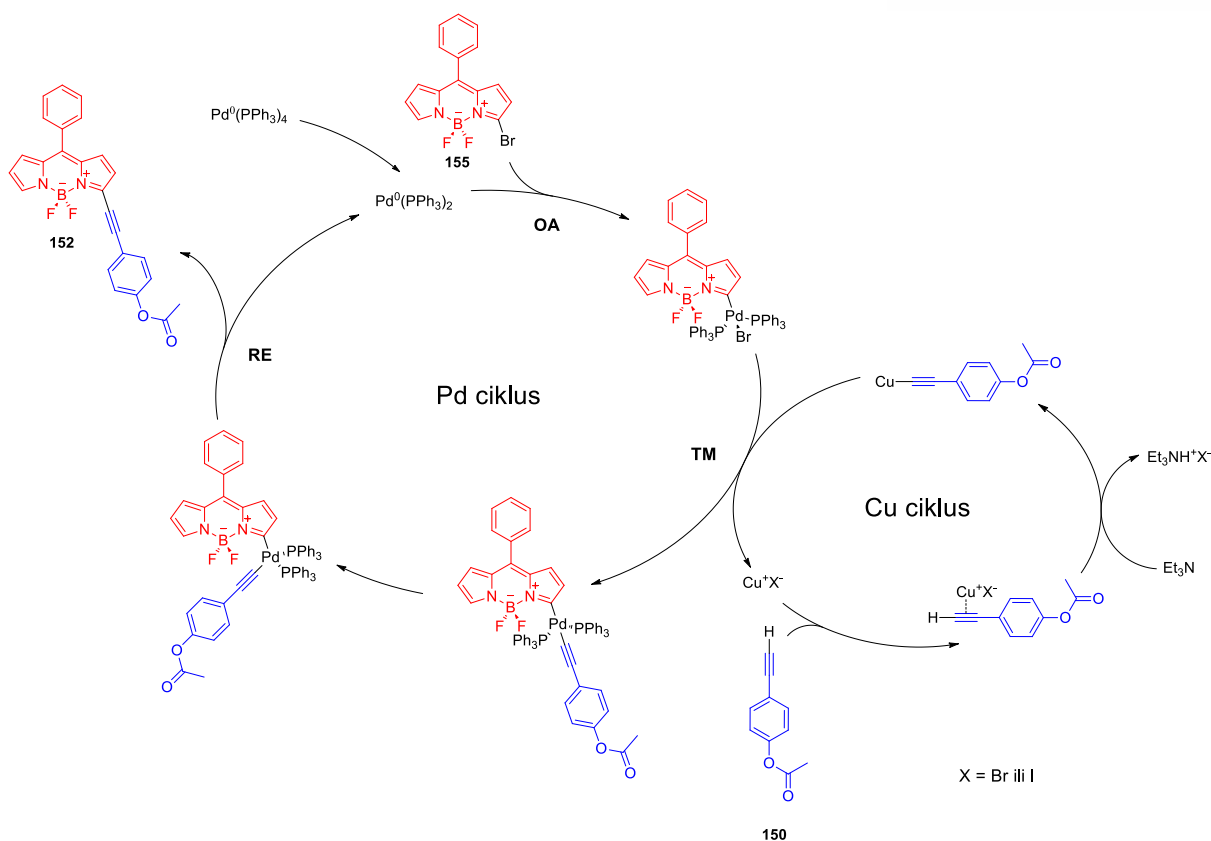
Pripravljene bromirane BODIPY **155** podvrgnut je Sonogashirinoj reakciji s alkinom **150** sličnim postupkom kao i klorirani derivat **141** (shema 35). Kao katalizatori korišteni su  $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$  i  $\text{CuI}$ , trietilamin kao baza, a kao otapalo ovaj put je korišten THF radi jednostavnije obrade reakcijske smjese te je reakcija provedena pri nešto blažim uvjetima. Gotovo trenutačno nakon dodatka katalizatora u reakcijsku smjesu došlo je do vidljive promjene boje i intenzivne fluorescencije.



**Shema 35.** Sinteza BODIPY spoja **152** Sonogashirinom reakcijom.

Zamjena klora reaktivnijim bromom pokazala se kao uspješna. Iz reakcijske smjese izoliran je spoj u zadovoljavajućem reakcijskom iskorištenju za kojeg je NMR spektroskopijom potvrđeno da odgovara željenom produktu, novom BODIPY spoju **152**. Produkt je okarakteriziran <sup>1</sup>H i <sup>13</sup>C NMR spektroskopijom. U <sup>1</sup>H NMR spektru spoja **152** vidljivo je 5 signala koji odgovaraju protonima vezanim za pirolne prstenove, multiplet intenziteta 5H koji odgovara *meso*-fenilnim protonima, 2 dubleta *para*-supstituiranog benzenskog prstena te singlet intenziteta 3H koji odgovara protonima acetilne skupine. U <sup>13</sup>C NMR spektru vidljiv je 21 signal.

Premda nije u potpunosti razjašnjen, pretpostavili smo da se bakrom ko-katalizirana Sonogashirina reakcija odvija u dva neovisna katalitička ciklusa prema opće prihvaćenom mehanizmu (shema 36).<sup>141</sup>



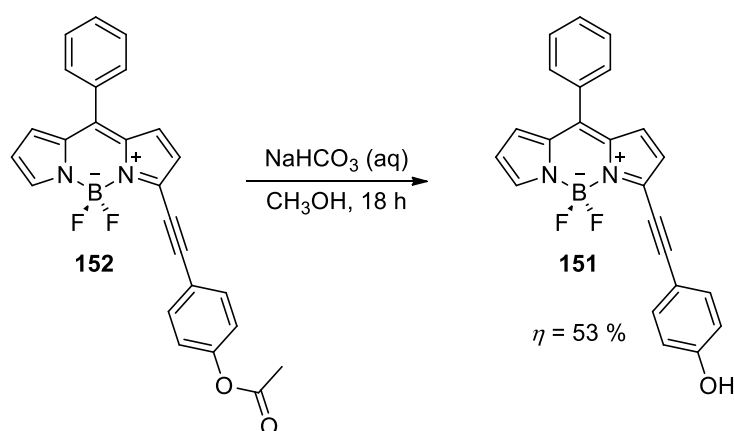
**Shema 36.** Pretpostavljeni reakcijski mehanizam Sonogashirine reakcije BODIPY spoja **155** s terminalnim alkinom **150**. OA – oksidativna adicija, TM – transmetaliranje, RE – reduktivna eliminacija.

Paladijev ciklus započinje nastajanjem aktivnog oblika paladijevog katalizatora, 14-elektronskog  $\text{Pd}^0(\text{PPh}_3)_2$  iz početnog paladijevog kompleksa pri reakcijskim uvjetima, kompleksnim mehanizmom koji nije u potpunosti razjašnjen. U sljedećem koraku oksidativne adicije važne su karakteristike supstrata, a reakcija se odvija to bolje što je slabija Ar–X veza, a nastaje stabilan paladijev kompleks. Slijedi poveznica s bakrovim ciklusom. Transmetaliranje, odnosno prijenos liganda s bakrovog acetilida na paladijev kompleks, često je najsporiji korak o kojemu ovisi ukupna brzina reakcije. Nakon *cis-trans* izomerizacije kompleksa, reduktivnom eliminacijom nastaje konačni produkt križnog povezivanja uz regeneraciju katalizatora. U bakrovom ciklusu prvo nastaje  $\pi$ -alkinski kompleks bakra. Alkinski proton ovog kompleksa je kiseliji i može se deprotonirati tercijarnim aminom uz nastajanje bakrovog acetilida. Bakrovi acetilidi mogu biti uključeni i u nastajanje aktivnog oblika paladijevog katalizatora pri čemu nastaju diacetilenski nusprodukti.

BODIPY spoj **152** potrebno je deacetilirati, odnosno prevesti skupinu na  $\alpha$ - (3-) položaju u derivat fenola prije uvođenja *N,N*-dimetilaminometilne skupine kako bi

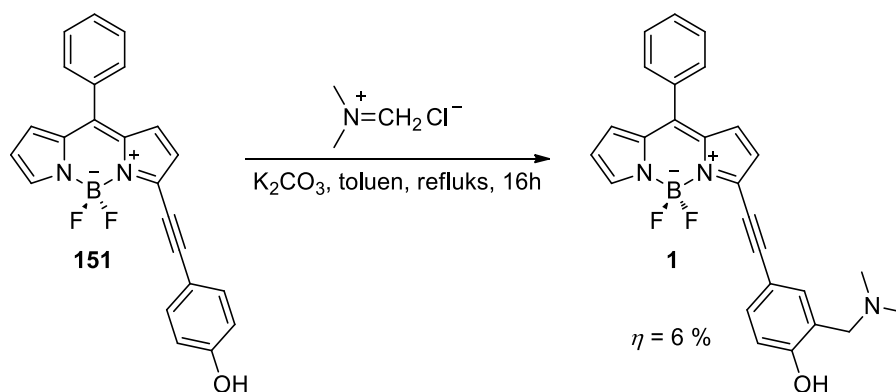


fotokemijskom reakcijom moglo doći do deaminacije i nastajanja kinon-metida. Deacetiliranje BODIPY spoja **152** prilično je jednostavna reakcija. Poznato je da aromatski esteri lako hidroliziraju, gotovo kvantitativno čak i pri vrlo blagim reakcijskim uvjetima. Reakcija je provedena u bazno kataliziranim uvjetima sa smjesom vodene otopine  $\text{NaHCO}_3$  i metanola (shema 37). Reakcijsko iskorištenje je manje nego očekivano, vjerojatno zbog jako slabe topljivosti spoja **152** u metanolu, a korištena je blago lužnata otopina zato jer pri visokim vrijednostima pH dolazi do reakcija na borovom atomu BODIPY spojeva.<sup>138</sup> Produkt **151** okarakteriziran je  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR spektroskopijom. Spektar spoja **151** sličan je spoju **152**, ali nema signala acetilnih protona već je vidljiv široki singlet kiselog fenolnog protona.



**Shema 37.** Sinteza etinilfenolnog BODIPY spoja **151**.

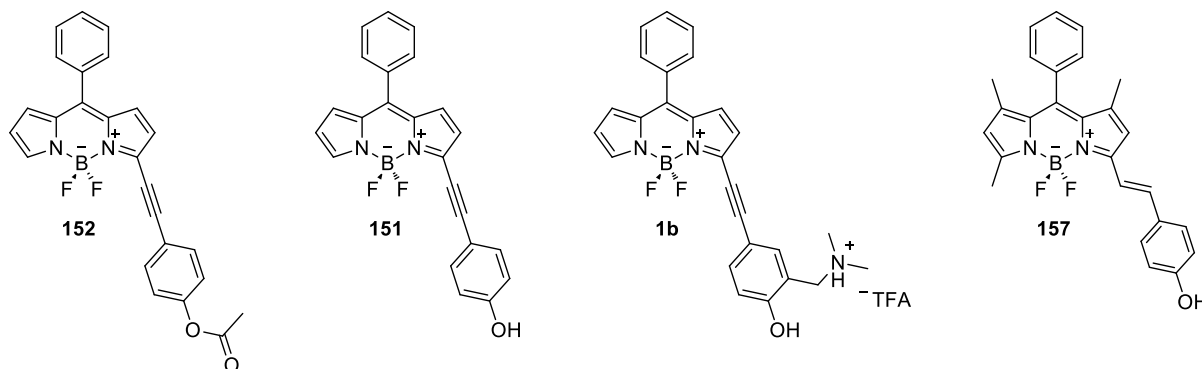
Zadnji korak u planiranoj sintezi bio je oblik Mannichove reakcije spoja **151**. Spoj **151** deprotoniran je kako bi mu se povećala vjerojatnost elektrofilne aromatske supstitucije s *N,N*-dimetileniminijevim kloridom, ekvivalentom poznatije Eschenmoserove jodidne soli. Reakcijom je dobiven ciljani BODIPY spoj **1**, prekursor QM-a (shema 38). Nastajanje produkta potvrđeno je HPLC-MS analizom.



**Shema 38.** Sinteza BODIPY spoja **1**, prekursora QM-a.

## Fotofizička karakterizacija sintetiziranih spojeva

Novosintetiziranim spojevima **151** i **152** snimljeni su UV-Vis apsorpcijski spektri te određeni molarni apsorpcijski koeficijenti,  $\epsilon_{\max}$ , dok je spoju **1b** zbog male količine snimljen samo UV-Vis spektar. Dodatno, spoju **157** također je snimljen UV-Vis spektar radi usporedbe različitog produljenja konjugiranog  $\pi$ -sustava kromofora dvostrukom i trostrukom vezom.

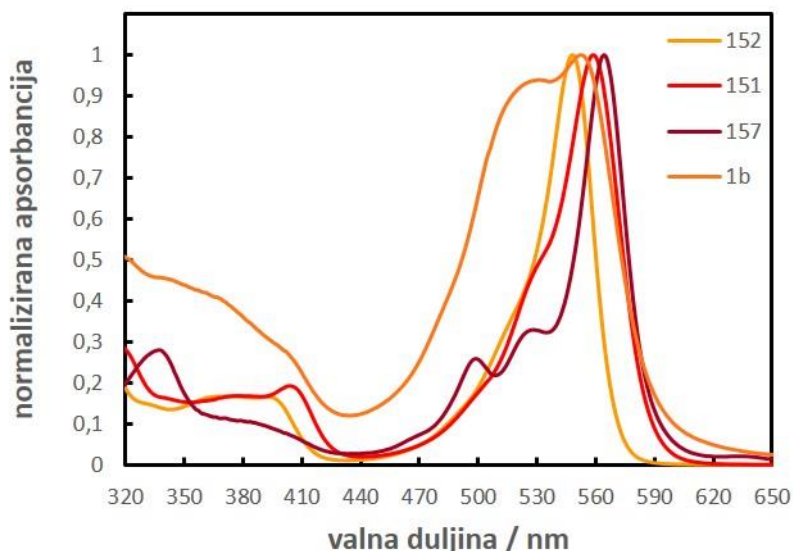


**Slika 15.** Strukture fotofizički okarakteriziranih spojeva.

Uz vrijednosti  $\epsilon_{\max}$ , prema apsorpcijskim UV-Vis spektrima određene su i valne duljine maksimuma apsorpcije,  $\lambda_{\text{abs,max}}$  (tablica 2). Ujedno je konstruiran zajednički grafički prikaz normalizirane apsorpcije spojeva.

**Tablica 2.** Valne duljine apsorpcijskih maksimuma i vrijednosti molarnih apsorpcijskih koeficijenata spojeva.

spoj	$\lambda_{\text{abs, max}} / \text{nm}$	$\epsilon_{\max} / \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$
<b>152</b>	548	$53800 \pm 400$
<b>151</b>	559	$49400 \pm 600$
<b>1b</b>	552	-
<b>157</b>	564	$42300 \pm 2700$



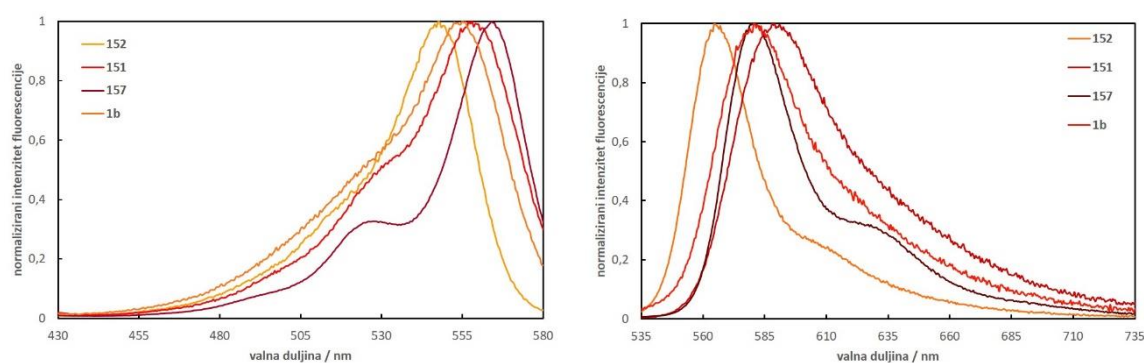
**Slika 16.** Normalizirani UV-Vis apsorpcijski spektri spojeva **151**, **152**, **157** i **1b** u acetonitrilu.

Svi spojevi pokazuju izrazito jake apsorpcijske vrpce u području 500 – 590 nm koje odgovara energijama HOMO→LUMO prijelaza, to jest prijelazu u  $S_1$  pobuđeno stanje. Vidljive su i izrazito energetske odvojene vrpce u području manjem od 440 nm koje odgovaraju energetskim prijelazima u viša pobuđena singletna stanja. Usporedbom s literaturno poznatim apsorpcijskim maksimumom nesupstituiranog BODIPY spoja **135** pri 499 nm u etanolu,<sup>35</sup> može se uočiti da uvođenje stirlinog supstituenta dovodi do batokromnog pomaka od 65 nm kod spoja **157** koji ima maksimum pri 564 nm, dok fenilalkinski supstituent pomiče maksimum spoja **151** za 60 nm. Auksokromna elektron-odvlačeća acetilna skupina spoja **152** uzrokuje manji batokromni pomak u odnosu na elektron-donorsku hidroksilnu skupinu spoja **151**, tako je apsorpcijski maksimum pri 548 nm, što je batokromni pomak od 49 nm u odnosu na nesupstituirani BODIPY spoj **135**. Primijećeno je da spektar spoja **1b** čine dvije bliske vrpce, što je pripisano smjesi protoniranog i neprotoniranog spoja **1** i **1b**, a maksimum apsorpcije je pri 552 nm. Iznosi molarnih apsorpcijskih koeficijenata karakteristični su za BODIPY spojeve. Promatrajući razlike u spektroskopskim svojstvima spoja **151** i **157** kod kojih su fenolne skupine konjugirane s BODIPY kromoforom dvostrukom vezom, odnosno trostrukom vezom, vidljivo je da dvostruka veza uzrokuje veći batokromni pomak apsorpcijskog maksimuma, dok je molarni apsorpcijski koeficijent ipak većeg iznosa kod konjugacije trostrukom vezom.

**Tablica 3.** Spektroskopska i fotofizička svojstva spojeva **151**, **152**, **157** i **1b**.

spoj	$\lambda_{\text{abs, max}}$ (nm)	$\varepsilon_{\text{max}}$ ( $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ )	$\lambda_{\text{em, max}}$ (nm)	$\Delta\bar{\nu}$ ( $\text{cm}^{-1}$ )	$\Phi_f$	$\tau_1$ (ns)	$\tau_2$ (ns)	$k_f$ ( $10^8 \text{s}^{-1}$ )	$k_{\text{nr}}$ ( $10^8 \text{s}^{-1}$ )
<b>152</b>	548	$53800 \pm 400$	565	549	$0,47 \pm 0,02$	2,18	-	2,16	2,43
<b>151</b>	558	$49400 \pm 600$	588	882	$0,40 \pm 0,01$	1,93	-	2,07	3,11
<b>157</b>	564	$42300 \pm 2700$	581	519	$0,90 \pm 0,03$	4,04	-	2,23	0,25
<b>1b</b>	555	-	581	904	$0,05 \pm 0,01$	1,74 (38 %)	3,36 (62 %)	0,18	3,46

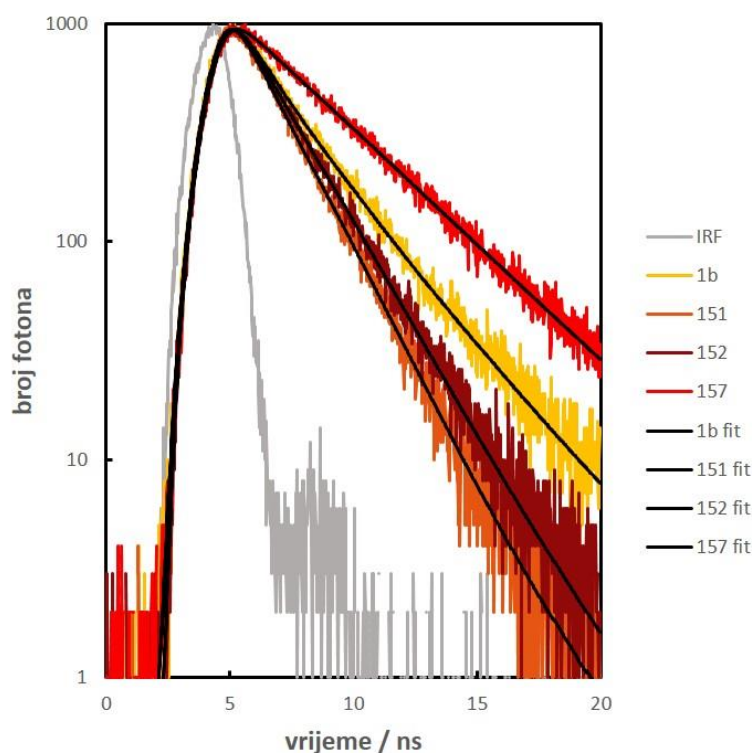
$\lambda_{\text{abs, max}}$  – valna duljina maksimuma apsorpcije,  $\varepsilon_{\text{max}}$  – molarni apsorpcijski koeficijent pri valnoj duljini maksimuma,  $\lambda_{\text{em, max}}$  – valna duljina maksimuma emisije,  $\Delta\bar{\nu}$  – Stokesov pomak,  $\Phi_f$  – kvantni prinos fluorescencije,  $\tau_1$ ,  $\tau_2$  – vremena života pobuđenog stanja,  $k_f$  – konstanta brzine deaktivacije zračenjem,  $k_{\text{nr}}$  – konstanta brzine deaktivacije bez zračenja



**Slika 17.** Ekscitacijski (lijevo:  $\lambda_{\text{em}} = 590 \text{ nm}$ ) i emisijski (desno:  $\lambda_{\text{exc}} = 530 \text{ nm}$ ) spektri spojeva **151**, **152**, **157** i **1b** u acetonitrilu.

Ekscitacijski i emisijski spektri ispitivanih spojeva u zrcalnom su odnosu, a Stokesovi pomaci su mali, što je karakteristično za BODIPY spojeve.<sup>142</sup> Usporedbom vrijednosti emisijskih maksimuma ispitivanih spojeva s literaturnom vrijednosti nesupstituiranog BODIPY spoja **135** ( $\lambda_{\text{em, max}} = 521 \text{ nm}$  u etanolu)<sup>35</sup> može se uočiti da su emisijski maksimumi batokromno pomaknuti za 44 – 60 nm. Kod spoja **151** s trostrukom vezom pomak je za 7 nm veći nego kod spoja **157** s dvostrukom vezom. Emisijski maksimum spoja **152** hipsokromno je pomaknut zbog aoksokromne acetilne skupine za 23 nm u odnosu na spoj **151**. Kvantni prinos fluorescencije spoja **1b** prilično je niske vrijednosti od 0,05, čak 8 puta manje nego kod spoja **151**, što se može pripisati intramolekularnom prijenosu protona u pobuđenom stanju (ESIPT) s fenola na atom dušika, slično kao i kod otprije opisanih BODIPY prekursora QM-a.<sup>135</sup> Spoj **157** ima uvjerljivo najveći iznos kvantnog prinosa fluorescencije od 0,90 što nije posljedica isključivo različitog produljenja konjugacije već i utjecaja metilnih skupina. Naime, metilne skupine sterički ometaju rotaciju fenilne skupine i smanjuju broj neradijacijskih deaktivacijskih puteva, a tvrdnju potkrepljuje vrijednost  $k_{\text{nr}}$  koja je znatno niža nego kod ostalih spojeva, iako su im

vrijednosti  $k_f$  slične. Vrijeme života singletnog pobuđenog stanja,  $\tau$ , najdulje je kod spoja **157** s dvostrukom vezom i iznosi 4,04 ns, dok je kod ostalih spojeva oko 2 ns. Visok kvantni prinos fluorescencije i dugo vrijeme života singletnog pobuđenog stanja za alkenski derivat je neuobičajeno jer je poznato da se oni vrlo učinkovito deaktiviraju iz singletnog pobuđenog stanja fotokemijskom *E-Z* izomerizacijom.<sup>143</sup> Očito je da se spoj **157** ne ponaša kao tipični alken, odnosno da pobuda u  $S_1$  kod njega ne dovodi do smanjenja elektronske gustoće između C-atoma dvostruke veze što bi rezultiralo s torzijskom relaksacijom na plohi potencijalne energije stanja  $S_1$ .



**Slika 18.** Opadanje intenziteta fluorescencije spojeva **151**, **152**, **157** i **1b** u acetonitrilu izmjereno tehnikom vremenski koreliranog brojanja pojedinačnih fotona (TC-SPC).

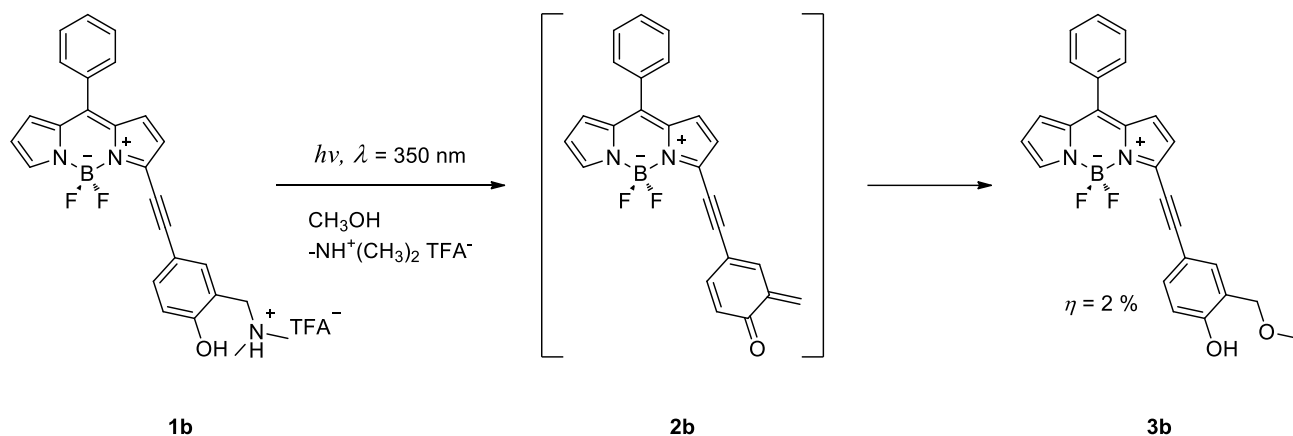
### Ispitivanje fotokemijske reaktivnosti

Ispitivanje fotokemijske reaktivnosti provedeno je na način da su otopine novosintetiziranog spoja **1b** u metanolu osvjetljavane svjetlom različitih valnih duljina 16 h te potom analizirane HPLC-om.

**Tablica 4.** Uvjeti ispitivanja fotokemijske reaktivnosti.

Spoj	Otapalo	$\lambda = 300$ nm	$\lambda = 350$ nm	Vis (bijela svjetlost)
<b>1b</b>	CH <sub>3</sub> OH	7 %	2 %	-

Analizom otopine nakon osvjetljavanja vidljivom svjetlošću nije detektiran produkt, dok je nakon osvjetljavanja u trajanju od 16 h svjetlošću  $\lambda = 350$  nm vidljivo nastajanje fotoproducta solvolize **3b** (2 %), što je u skladu s očekivanom anti-Kasha reaktivnosti BODIPY prekursora QM-a.<sup>134,135</sup> Osvjetljavanje svjetlošću  $\lambda = 300$  nm također dolazi do nastajanje fotoproducta, ali i do raspada početnog spoja (shema 39).



**Shema 39.** Fotometanoliza spoja **1b**.

## Zaključak

Uspješno je sintetiziran novi BODIPY derivat QM-a **1** s produljenom konjugacijom i posljedično pomaknutom apsorpcijom prema crvenom dijelu elektromagnetskog spektra. Rezultati dobiveni fotofizičkom karakterizacijom kao što su visoki kvantni prinos fluorescencije i apsorpcija u području od 500 do 600 nm pogodni su za primjenu u biološkim sustavima. Ispitivanjem fotokemijske reaktivnosti dobiveni su rezultati koji su u skladu s već opisanom anti-Kasha reaktivnosti BODIPY QM-a. Kao nastavak istraživanja provest će se eksperimenti na živim stanicama ljudskog karcinoma i odredit će se antiproliferativna svojstva novog derivata.

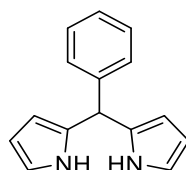
## Eksperimentalni dio

### Opće napomene

Za identifikaciju sintetiziranih spojeva i određivanje njihove čistoće u okviru ovog rada korištene su spektroskopske metode nuklearne magnetske rezonancije  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR te HPLC-MS. Spektri NMR snimljeni su na spektrometrima Bruker AV-600 i AV-300, koji rade na frekvenciji od 600 MHz i 300 MHz za jezgre  $^1\text{H}$  i frekvenciji od 150 MHz i 75 MHz za jezgre  $^{13}\text{C}$ . Spektri NMR snimani su u otapalima  $\text{CDCl}_3$  i  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ , koristeći tetrametilsilan kao unutarnji standard, a kalibrirani su prema deuteriranim otapalima ili standardu. Tališta su određena Köflerovim aparatom i nisu korigirana. Sva reakcijska iskorištenja odnose se na izolirane, čiste spojeve. Tijek reakcija praćen je TLC-om koristeći odgovarajuće sustave otapala, a detekcija je izvršena korištenjem UV svjetla valne duljine 254 i 365 nm. Kromatografska odjeljivanja provedena su na kromatografskim kolonama punjenim silikagelom (Merck 63 – 200  $\mu\text{m}$ ) i  $\text{Al}_2\text{O}_3$  (akt. IV) uz odgovarajući sustav otapala. Korištena su komercijalno dostupna otapala ili su pročišćena destilacijom. Bezvodna otapala sušena su iznad Na ili molekulskih sita (4 Å). Preparativna HPLC odvajanja provedena su na Varian Pro Star instrumentu s UV-Vis detektorom i Phenomenex Jupiter 5u C18 300A kolonom. Mobilna faza bila je smjesa  $\text{CH}_3\text{OH}$  i  $\text{H}_2\text{O}$  (1:1 + 0,1 % TFA, 5 min),  $\text{CH}_3\text{OH}$  (0→100 %, 40 min) i  $\text{CH}_3\text{OH}$  (10 min). Brzina protoka bila je  $3,5 \text{ mL min}^{-1}$ , a injektirani volumen otopine  $200 \mu\text{L}$ . MS spektar je snimljen na HPLC-MS sustavu koji se sastoji od uređaja HPLC Agilent 1200 Series s DAD detektorom i Agilent 6420 spektrometra masa s trostrukim kvadrupolom.

### Sinteze spojeva

#### Sinteza 5-fenildipirometana (130)



**130**

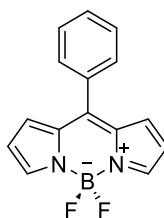
U dvogroloj tikvici (100 mL) pomiješani su benzaldehid (2,0 mL, 0,02 mol) i pirol (30 mL, 0,45 mol) pod inertnom atmosferom  $\text{N}_2$ . Zatim je u reakcijsku smjesu dodana trifluoroctena kiselina (TFA, 0,15 mL, 2 mmol) te je smjesa miješana na magnetskoj miješalici 1,5 h pri sobnoj temperaturi. Reakcija je zaustavljena dodatkom vodene otopine NaOH (25 mL, 0,1 M). Reakcijska smjesa ekstrahirana je s  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  ( $3 \times 30 \text{ mL}$ ). Organski ekstrakti sušeni su iznad

bezvodnog  $\text{MgSO}_4$  i filtrirani, a filtrat je koncentriran na rotacijskom uparivaču. Suvišak pirola uklonjen je vakuumskom destilacijom, a ostatak je pročišćen kromatografijom na stupcu silikagela uz  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  kao eluens. Izoliran je čisti produkt (3,91 g, 88 %) u obliku bezbojnih kristala.  $^1\text{H}$  NMR spektar spoja **130** odgovara onom iz literaturnog navoda.<sup>144</sup>

### 5-Fenildipirometan (**130**)

Bezbojni kristali,  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz)  $\delta/\text{ppm}$ : 7,93 (široki s, 2H), 7,35 – 7,21 (m, 5H), 6,70 (dd, 2H,  $J = 1,6$  Hz,  $J = 2,6$  Hz), 6,16 (dd, 2H,  $J = 3,1$  Hz,  $J = 2,8$  Hz), 5,93 (m, 2H), 5,49 (s, 1H).

### Sinteza 8-fenil-4,4-difluor-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacena (**135**)



**135**

U dvogroj tikvici (200 mL) suspendiran je spoj **130** (1,82 g, 8,2 mmol) u suhom toluenu (30 mL) pod atmosferom  $\text{N}_2$ . U suspenziju je dodan 5,6-dicijano-2,3-diklor-1,4-benzokinon (DDQ, 1,85 g, 8,2 mmol) te je suspenzija miješana na magnetskoj miješalici 1 h pri sobnoj temperaturi. Zatim je štrcaljkom u malim obrocima kroz septum dodan  $\text{Et}_3\text{N}$  (6,9 mL, 49,2 mmol), a nakon 15 min miješanja i  $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$  (9,3 mL, 73,8 mmol). Reakcijska smjesa je miješana pri sobnoj temperaturi preko noći. Reakcija je zaustavljena dodatkom vodene otopine  $\text{NaOH}$  (50 mL, 1 M) i potom ekstrahirana s  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  ( $3 \times 50$  mL). Organski ekstrakti oprani su vodom ( $3 \times 50$  mL), sušeni iznad bezvodnog  $\text{MgSO}_4$  i filtrirani, a otapalo iz filtrata je uklonjeno na rotacijskom uparivaču. Uljasti ostatak pročišćen je kromatografijom na stupcu silikagela uz  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ /heksan (2:1, v:v) kao eluens. Izoliran je čisti produkt (630 mg, 29 %) u obliku narančastih kristala.  $^1\text{H}$  NMR spektar spoja **135** odgovara onom iz literaturnog navoda.<sup>35</sup>

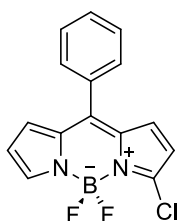
### 8-Fenil-4,4-difluor-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen (**135**)

Narančasti kristali,  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz)  $\delta/\text{ppm}$ : 7,95 (široki s, 2H), 7,59 – 7,52 (m, 5H), 6,94 (d, 2H,  $J = 4,1$  Hz), 6,55 (d, 2H,  $J = 4,1$  Hz).

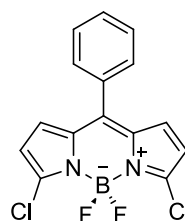
$^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 150 MHz)  $\delta/\text{ppm}$ : 147,5, 144,3, 135,1, 134,0, 131,8, 130,9, 130,6, 128,6, 118,7.



**Sinteza 8-fenil-4,4-difluor-3-klor-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacena (141) i 8-fenil-4,4-difluor-3,5-diklor-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacena (142)**



**141**



**142**

U tikvici (50 mL) opremljenoj hladilom otopljen je spoj **135** (210 mg, 0,8 mmol) u acetonitrilu (20 mL). U otopinu je dodan  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (399 mg, 2,3 mmol) te je reakcijska smjesa miješana i grijana pri temperaturi refluksa 5 h. Nakon hlađenja do sobne temperature, reakcijska smjesa je razrijeđena s  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (50 mL) i oprana vodom ( $3 \times 50$  mL). Organska faza sušena je iznad bezvodnog  $\text{MgSO}_4$  i filtrirana te je otapalo uklonjeno na rotacijskom uparivaču. Kruti ostatak pročišćen je kromatografijom na stupcu silikagela uz  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ /heksan (2:1, v:v) kao eluens. Izolirani su čisti produkti, spoj **141** (92 mg, 38 %) u obliku narančastih kristala i spoj **142** (22 mg, 8 %) u obliku crvenih kristala.  $^1\text{H}$  NMR spektri spojeva **141** i **142** odgovaraju onima iz literaturnog navoda.<sup>60</sup>

**8-Fenil-4,4-difluor-3-klor-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen (141)**

Narančasti kristali,  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz)  $\delta$ /ppm: 7,94 (široki s, 1H), 7,60 – 7,52 (m, 5H), 6,91 (d, 1H,  $J = 5,0$  Hz), 6,89 (d, 1H,  $J = 5,0$  Hz), 6,56 (d, 1H,  $J = 2,9$  Hz), 6,43 (d, 1H,  $J = 4,3$  Hz)

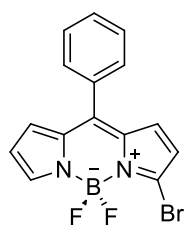
$^{13}\text{C}$  NMR - APT ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz)  $\delta$ /ppm: 144,5 (d), 131,8 (d), 131,5 (d), 130,8 (d), 130,5 (d), 128,5 (d), 118,9 (d), 118,4 (d).

**8-Fenil-4,4-difluor-3,5-diklor-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen (142)**

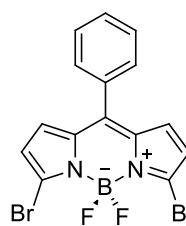
Crveni kristali,  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz)  $\delta$ /ppm: 7,64 – 7,44 (m, 5H), 6,85 (d, 2H,  $J = 4,3$  Hz), 6,55 (d, 2H,  $J = 4,3$  Hz).

$^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 150 MHz)  $\delta$ /ppm: 145,0, 144,0, 133,8, 132,4, 131,6, 130,9, 130,4, 128,6, 118,9.

**Sinteza 3-brom-8-fenil-4,4-difluor-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacena (155) i 3,5-dibrom-8-fenil-4,4-difluor-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacena (156)**



**155**



**156**

U dvogroj tikvici (250 mL) pod inertnom atmosferom N<sub>2</sub> otopljen je spoj **130** (1,09 g, 4,9 mmol) u suhom tetrahidrofuranu (THF, 50 mL). Otopina je ohlađena na -78 °C smjesom acetona i suhog leda. Zatim je, uz stalno miješanje, lijevkom za dokapavanje kroz 1 h dodana otopina *N*-bromosukcinimida (NBS, 0,87 g, 4,9 mmol) u suhom THF-u (30 mL). Nakon dodatka NBS-a maknuta je kupelj za hlađenje i reakcijska smjesa je miješana još 30 min. Zatim je pomoću lijevka za dokapavanje dodana otopina DDQ-a (1,11 g, 4,9 mmol) u THF-u (30 mL) te je miješanje nastavljeno pri sobnoj temperaturi još 1 h. Sirova reakcijska smjesa koncentrirana je na rotacijskom uparivaču i pročišćena na koloni silikagela uz suhi CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> kao eluens. Frakcije s bromiranim produktima su koncentrirane na rotacijskom uparivaču i prebačene u dvogrlu tikvicu (200 mL). Pod inertnom atmosferom N<sub>2</sub> su zatim dodan Et<sub>3</sub>N (4,1 mL, 29,4 mmol), a nakon 15 min miješanja i BF<sub>3</sub>·OEt<sub>2</sub> (5,5 mL, 44,1 mmol) u malim obrocima. Reakcijska smjesa miješana je pri sobnoj temperaturi preko noći. Reakcija je zaustavljena dodatkom vodene otopine NaOH (50 mL, 0,1 M). Diklormetanska otopina zatim je oprana vodom (5 × 50 mL) i zasićenom vodenom otopinom NaCl (3 × 30 mL), sušena iznad bezvodnog MgSO<sub>4</sub> i filtrirana. Otapalo iz filtrata uklonjeno je na rotacijskom uparivaču. Uljasti ostatak pročišćen je kromatografijom na stupcu silikagela uz CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/heksan (3:2, v:v) kao eluens. Dobiveni su čisti produkti, spoj **155** (357 mg, 21 %) u obliku crvenih kristala i spoj **156** (146 mg, 7 %) u obliku narančastih kristala. <sup>1</sup>H NMR spektri spojeva **155** i **156** odgovaraju onima iz literaturnog navoda.<sup>145</sup>

### 3-Brom-8-fenil-4,4-difluor-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen (155)

Crveni kristali, <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) δ/ppm: 7,97 (široki s, 1H), 7,62 – 7,51 (m, 5H), 6,92 (d, 1H, *J* = 4,2 Hz), 6,83 (d, 1H, *J* = 4,2 Hz), 6,57 (d, 1H, *J* = 4,2 Hz), 6,52 (d, 1H, *J* = 4,2 Hz)

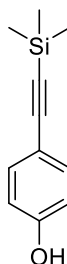
<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 150 MHz) δ/ppm: 145,0, 144,0, 133,8, 132,4, 131,6, 130,9, 130,4, 128,6, 118,9.

### 3,5-Dibrom-8-fenil-4,4-difluor-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen (156)

Narančasti kristali,  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz)  $\delta/\text{ppm}$ : 7,60 – 7,48 (m, 5H), 6,79 (d, 2H,  $J = 4,3$  Hz), 6,54 (d, 2H,  $J = 4,3$  Hz).

$^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz)  $\delta/\text{ppm}$ : 145,2, 144,5, 135,4, 134,6, 132,7, 131,6, 131,5, 131,4, 130,7, 130,2, 128,3, 121,9, 119,0.

#### Sinteza 4-(trimetilsililetinil)fenola (**147**)



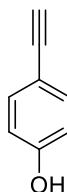
**147**

U dvogroj tikvici (100 mL) otopljen je *p*-jodfenol (660 mg, 3 mmol) u suhom DMF-u (6 mL). Zatim su dodani TMS-acetilen (0,46 mL, 3,3 mmol) i  $\text{Et}_3\text{N}$  (1,70 mL, 12 mmol). Nakon uspostavljanja inertne atmosfere  $\text{N}_2$  dodani su katalizatori  $[\text{Pd}(\text{PPh}_3)_2]\text{Cl}_2$  (63 mg, 0,09 mmol) i  $\text{CuI}$  (34 mg, 0,18 mmol). Reakcijska smjesa miješana je 3 h pri temperaturi od  $50^\circ\text{C}$ . Reakcija je prekinuta dodatkom vode (30 mL) te je smjesa ekstrahirana s  $\text{EtOAc}$  ( $3 \times 30$  mL). Organski ekstrakti sušeni su iznad bezvodnog  $\text{MgSO}_4$  i filtrirani, a otapalo je otpareno na rotacijskom uparivaču. Smeđi uljasti ostatak pročišćen je kromatografijom na stupcu silikagela uz  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  kao eluens. Izoliran je čisti produkt, spoj **147** (535 mg, 94 %) u obliku blijedo žutog ulja koje kristalizira stajanjem. Spektar  $^1\text{H}$  NMR spoja **147** odgovara onom iz literaturnog navoda.<sup>146</sup>

#### 4-(Trimetilsililetinil)fenol (**147**)

Bezbojni kristali,  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz)  $\delta/\text{ppm}$ : 7,36 (d, 2H,  $J = 8,7$  Hz), 6,75 (d, 2H,  $J = 8,7$  Hz), 4,87 (široki s, 1H), 0,23 (s, 9H).

#### Sinteza 4-etinilfenola (**148**)



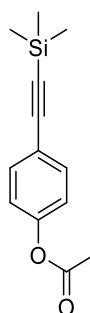
**148**

U dvogrloj tikvici (50 mL) pod inertnom atmosferom N<sub>2</sub> otopljen je spoj **147** (393 mg, 2,8 mmol) u suhom CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (10 mL). Otopina je ohlađena na 0 °C te je zatim dodan tetrabutilamonijev fluorid (TBAF, 3 mL, 1 M otopina u THF-u) u malim obrocima. Reakcija je prekinuta dodatkom zasićene vodene otopine NH<sub>4</sub>Cl (20 mL) nakon 1 h miješanja. Reakcijska smjesa ekstrahirana je s EtOAc (3 × 25 mL) te su organski ekstrakti sušeni iznad bezvodnog MgSO<sub>4</sub>, filtrirani, te je otapalo otpareno na rotacijskom uparivaču. Uljasti ostatak pročišćen je kromatografijom na stupcu silikagela uz CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> kao eluens. Izoliran je čisti produkt, spoj **8** (281 mg, 85%) u obliku blijedo žute uljaste tekućine. <sup>1</sup>H NMR spektar spoja 148 odgovara onom iz literaturnog navoda.<sup>147</sup>

#### 4-Etinilfenol (**148**)

Blijedo žuto ulje, <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 600 MHz) δ/ppm: 7,39 (d, 2H, *J* = 8,7 Hz), 6,78 (d, 2H, *J* = 8,7 Hz), 5,08 (s, 1H), 2,98 (s, 1H).

#### Sineza *O*-acetil-4-(trimetilsililetinil)fenola (**149**)



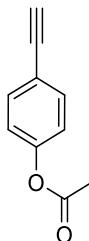
**149**

Spoj **147** (532 mg, 2,8 mmol) otopljen je u u tikvici (100 mL) u EtOAc (15 mL). Zatim su dodani acetanhidrid (1,33 mL, 14,0 mmol) i NaHCO<sub>3</sub> (1,18 g) te je reakcijska smjesa miješana pri sobnoj temperaturi preko noći. Reakcijska smjesa je razrijeđena vodom (30 mL) i ekstrahirana s EtOAc (3 × 20 mL) te su organski ekstrakti zatim oprani zasićenom vodenom otopinom NaCl (2 × 20 mL), isušeni iznad bezvodnog MgSO<sub>4</sub>, potom filtrirani te je otapalo otpareno na rotacijskom uparivaču. Uljasti ostatak pročišćen je kromatografijom na stupcu silikagela uz CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> kao eluens. Izoliran je čisti produkt, spoj **149** (576 mg, 89 %) u obliku bezbojnih kristala. <sup>1</sup>H NMR spektar spoja 149 odgovara onom iz literaturnog navoda.<sup>148</sup>

#### *O*-Acetil-4-(trimetilsililetinil)fenol (**149**)

Bezbojni kristali,  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz)  $\delta/\text{ppm}$ : 7,47 (d, 2H,  $J = 8,7$  Hz), 7,03 (d, 2H,  $J = 8,7$  Hz), 2,29 (s, 3H), 0,24 (s, 9H).

### Sinteza *O*-acetil-4-etinilfenola (150)



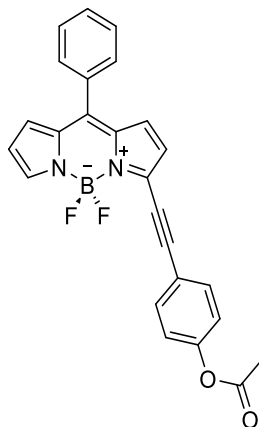
**150**

U dvogrloj tikvici (50 mL) pod atmosferom  $\text{N}_2$  otopljen je spoj **149** (393 mg, 1,7 mmol) u suhom  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (10 mL). Otopina je ohlađena na  $0^\circ\text{C}$  te je zatim dodan TBAF (5,1 mL, 1 M otopina u THF-u) u malim obrocima. Reakcijska smjesa miješana je 2 h. Reakcija je prekinuta dodatkom zasićene vodene otopine  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (25 mL). Organska faza ekstrahirana je s  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  ( $3 \times 20$  mL) te su organski ekstrakti sušeni iznad bezvodnog  $\text{MgSO}_4$ , potom filtrirani te je otapalo otpareno na rotacijskom uparivaču. Dobiveni uljasti ostatak pročišćen je kromatografijom na stupcu silikagela uz  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  kao eluens. Izoliran je čisti produkt, spoj **150** (229 mg, 84 %) u obliku bezbojnih kristala.  $^1\text{H}$  NMR spektar spoja **150** odgovara onom iz literaturnog navoda.<sup>148</sup>

### *O*-Acetil-4-etinilfenol (150)

Bezbojni kristali,  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz)  $\delta/\text{ppm}$ : 7,50 (d, 2H,  $J = 8,7$  Hz), 7,06 (d, 2H,  $J = 8,7$  Hz), 3,06 (s, 1H), 2,30 (s, 3H).

### Sinteza 3-(4-acetoksifeniletinil)-8-fenil-4,4-difluor-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacena (152)



**152**

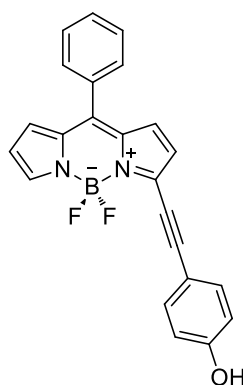
U dvogrloj tikvici (50 mL) otopljeni je spoj **155** (50 mg, 0,144 mmol) u suhom THF-u (2 mL). Zatim su dodani spoj **150** (30 mg, 0,187 mmol) i Et<sub>3</sub>N (1,00 mL, 7,11 mmol). Uspostavljena je inertna atmosfera N<sub>2</sub> te su nakon toga dodani katalizatori Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (11,2 mg, 0,007 mmol, 5 ekv%) i CuI (2,7 mg, 0,014 mmol, 10 ekv%). Reakcijska smjesa miješana je na magnetskoj miješalici 3 h pri temperaturi refluksa. Reakcija je prekinuta dodatkom zasićene vodene otopine NH<sub>4</sub>Cl (5 mL). Smjesa je razrijeđena vodom (30 mL) i ekstrahirana s CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 × 20 mL). Organski ekstrakti sušeni su iznad bezvodnog MgSO<sub>4</sub>, potom filtrirani te je otapalo otpareno na rotacijskom uparivaču. Kruti ostatak pročišćen je kromatografijom na stupcu silikagela uz CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> kao eluens. Izoliran je čisti produkt, spoj **152** (27 mg, 44 %) u obliku ljubičastih kristala.

### 3-(4-Acetoksifeniletinil)-8-fenil-4,4-difluor-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen (152)

Ljubičasti kristali,  $T_f = 173 - 176$  °C, <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz)  $\delta$ /ppm: 7,98 (široki s, 1H), 7,68 (d, 2H,  $J = 8,7$  Hz), 7,59 – 7,50 (m, 5H), 7,14 (d, 2H,  $J = 8,7$  Hz), 6,92 (d, 1H,  $J = 4,3$  Hz), 6,90 (d, 1H,  $J = 4,3$  Hz), 6,70 (d, 1H,  $J = 4,3$ Hz), 6,57 (d, 1H,  $J = 4,3$  Hz), 2,32 (s, 3H).

<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 150 MHz)  $\delta$ /ppm: 168,9, 151,5, 144,8, 144,7, 137,4, 136,0, 135,6, 133,8, 133,5, 131,2, 130,9, 130,6, 130,5, 128,4, 123,4, 121,9, 119,8, 118,9, 101,3, 82,8, 21,2.

### Sinteza 3-(4-hidroksifeniletinil)-8-fenil-4,4-difluor-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacena (151)



**151**

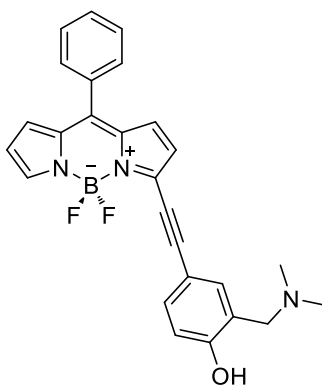
U tikvici (100 mL) je suspendiran spoj **152** (65 mg, 0,2 mmol) u CH<sub>3</sub>OH (30 mL), dodana je zasićena vodena otopina NaHCO<sub>3</sub> (50 mL) te je reakcijska smjesa miješana pri sobnoj temperaturi preko noći. Reakcijska smjesa zatim je razrijeđena vodom (50 mL) i ekstrahirana s CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (6 × 20 mL). Organski ekstrakti sušeni su iznad bezvodnog MgSO<sub>4</sub>, potom filtrirani te je otapalo otpareno na rotacijskom uparivaču. Kruti ostatak pročišćen je kromatografijom na stupcu silikagela uz CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/EtOAc (5 vol%) kao eluens. Izoliran je čisti produkt **151** (31 mg, 53 %) u obliku tamno ljubičastih kristala.

### 3-(4-Hidroksifeniletinil)-8-fenil-4,4-difluor-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen (151)

Tamno ljubičasti kristali,  $T_f = 179 - 181$  °C,  $^1\text{H NMR}$  ( $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ ), 300 MHz)  $\delta/\text{ppm}$ : 9,14 (široki s, 1H), 8,03 (s, 1H), 7,71 – 7,58 (m, 5H), 7,53 (d, 1H,  $J = 7,3$  Hz), 7,03 (d, 2H,  $J = 4,3$  Hz), 6,99 (d, 1H,  $J = 4,3\text{Hz}$ ), 6,96 (d, 1H,  $J = 7,3$  Hz), 6,80 (d, 1H,  $J = 4,3$  Hz), 6,68 (d, 1H,  $J = 4,3$  Hz).

$^{13}\text{C NMR}$  ( $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ ), 150 MHz)  $\delta/\text{ppm}$ : 160,3, 145,5, 145,0, 139,1, 136,7, 136,1, 134,8, 134,6, 132,2, 131,63, 131,58, 131,5, 129,5, 124,1, 119,8, 116,9, 113,6, 104,0, 82,7.

### Sinteza 3-{4-hidroksi-[3-(*N,N*-dimetilaminometil]fenil)etinil}-8-fenil-4,4-difluor-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacena (1)



**1**

U tikvici (100 mL) suspendiran je spoj **151** (38 mg, 0,10 mmol) u suhom toluenu (30 mL). Dodani su  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (21 mg, 0,15 mmol) i *N,N*-dimetileniminijev klorid (Eschenmoserova sol, 14 mg, 0,15 mmol). Reakcijska smjesa miješana je i grijana preko noći pri temperaturi refluksa. Nakon hlađenja na sobnu temperaturu reakcijska smjesa je oprana vodom (30 mL) te je vodena faza ekstrahirana s EtOAc ( $6 \times 30$  mL). Organski ekstrakti sušeni su iznad bezvodnog  $\text{MgSO}_4$ , potom te je otapalo otpareno na rotacijskom uparivaču. Upareni kruti ostatak kromatografiran je na stupcu  $\text{Al}_2\text{O}_3$  (aktivitet IV) uz  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOAc}$  (10 – 50 vol%) kao eluens, a pročišćena smjesa je dodatno čišćena HPLC-om radi dobivanja analitički čistog spoja u obliku tamno ljubičaste TFA soli **1b** (3 mg, 6 %). Nastajanje produkta u reakciji potvrđeno je HPLC-MS analizom.

## UV-Vis i fluorescencijska spektroskopija

UV-Vis spektri snimljeni su sa spektrofotometrom PG T80/T80+. Mjerenja su provedena u acetonitrilnim otopinama spojeva ( $c \approx 10^{-5}$  M) pri temperaturi od 25 °C u kivetama dimenzija  $10 \times 10$  mm.

Fotofizička svojstva spojeva određena su stacionarnom i vremenski razlučenom fluorescencijskom spektroskopijom koristeći Edinburgh Instruments FS5 spektrofluorimetar. Emisijski fluorescencijski spektri snimljeni su u rasponu od 535 – 750 nm u intervalima od 0,5 nm uz vrijeme sakupljanja fluorescencije u svakom intervalu od 0.1 s. Pobuda svjetlom bila je valnih duljina 510, 520 i 530 nm te uz širinu pukotine koja odgovara propusnosti vrpce od 1,5 nm. Ekscitacijski spektri snimljeni su u rasponu od 400 – 580 nm u intervalima od 0,5 nm i pobudu svjetlom valnih duljina 570 i 590 nm te širinu pukotine koja odgovara propusnosti vrpce od 1,0 nm. Spektri su korigirani zbog fluktuacija u intenzitetu svjetlosne pobude i transmitancije optike. Za određivanje relativnih kvantnih prinosa fluorescencije,  $\Phi_f$ , korištene su otopine spojeva u acetonitrilu s  $A < 0,1$  pri valnoj duljini ekscitacije, a prikazane vrijednosti su aritmetička sredina 3 mjerenja pri različitim valnim duljinama ekscitacije (510, 520 i 530 nm). Prije snimanja fluorescencijskih spektara otopine su propuhivane s argonom 15 min. Kao fluorescencijski standard korištena je otopina Rodamina B u  $\text{CH}_3\text{OH}$  ( $\Phi_f = 0,66$ ).<sup>149</sup> Sva mjerenja provedena su u kvarcnim kivetama dimenzija  $10 \times 10$  mm pri temperaturi od 25 °C.

Kvantni prinosi fluorescencije izračunati su prema jednadžbi:  $\Phi_f = \Phi_R \cdot \frac{I}{I_R} \cdot \frac{A_R}{A} \cdot \left(\frac{n_D}{n_D^R}\right)^2$ , gdje su:  $\Phi_f$  – kvantni prinos fluorescencije,  $\Phi_R$  – kvantni prinos fluorescencije Rodamina B,  $I$  – intenzitet fluorescencije (vrijednost integrala emisijskog spektra),  $I_R$  – intenzitet fluorescencije Rodamina B,  $A_R$  – apsorbanacija otopine Rodamina B pri valnoj duljini pobude,  $A$  – apsorbanacija otopine pri valnoj duljini pobude,  $n_D$  – indeks loma otapala i  $n_D^R$  – indeks loma otapala u kojem je otopljen standard ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ).

Mjerenje funkcija opadanja intenziteta fluorescencije provedeno je tehnikom vremenski koreliranog brojanja pojedinačnih fotona koristeći Edinburgh Instruments FS5 spektrofluorimetar. Pulsirajuća laserska dioda korištena je za ekscitaciju molekula svjetlom valne duljine 562 nm, a trajanje pulsa bilo je 1,5 ns. Mjerenje je provedeno u 1023 kanala s vremenskim inkrementom od  $\approx 0,02$  ns po kanalu. Mjerenja su provođena do detekcije 1000 fotona u maksimumu pri valnim duljinama 570 i 590 nm. Funkcija odziva instrumenta (IRF) snimljena je koristeći suspenziju silikagela u vodi. Parametri fitanja (vremena života,  $t$ , i pred-



eksponencijalni faktori,  $\alpha$ ) određeni su minimiziranjem reducirane kvadratne  $hi$  vrijednosti,  $\chi^2$ . Opadanja intenziteta fluorescencije su fitana prema izrazu sume eksponencijala:  $F(t) = \alpha_1 e^{-\frac{t}{\tau_1}} + \alpha_2 e^{-\frac{t}{\tau_2}} + \alpha_3 e^{-\frac{t}{\tau_3}} + \dots$ , gdje su:  $t$  – vrijeme detekcije fluorescencije,  $\tau$  – vrijeme života pobuđenog stanja. Za opadanje fluorescencije koja su se mogla opisati monoeksponencijalno konstante brzine radijativne,  $k_f$ , i neradijativne deaktivacije,  $k_{nr}$ , izračunate su prema jednadžbama:  $k_f = \frac{\phi_f}{\tau}$  i  $k_{nr} = \frac{1-\phi_f}{\tau}$ .

### Ispitivanje fotokemijske reaktivnosti

Ispitivanja fotokemijske reaktivnosti provedena su ozračivanjem metnolnih otopina ( $c \approx 10^{-4}$  M) u Luzchem fotokemijskom reaktoru opremljenom s 8 lampi koje zrače u vidljivom dijelu spektra ili imaju maksimum zračenja na 350 nm ili 300 nm. Nastajanje fotokemijskih produkata praćeno je HPLC-om Agilent 1260 Infinity II opremljenim s DAD detektorom i kolonom Phenomenex Luna 3u C18 100A. Mobilna faza bila je smjesa CH<sub>3</sub>OH i H<sub>2</sub>O (1:1 + 0,1 % TFA, 1 min), CH<sub>3</sub>OH (0→100 %, 19 min) i CH<sub>3</sub>OH (10 min). Brzina protoka bila je 0,8 mL min<sup>-1</sup>, a injektirani volumen otopine 10  $\mu$ L.

## Literatura

- Basarić, N., Mlinarić-Majerski, K. & Kralj, M. Quinone Methides: Photochemical Generation and its Application in Biomedicine. *Curr. Org. Chem.* **18**, 3–18 (2014).
- Gilkes, D. M., Semenza, G. L. & Wirtz, D. Hypoxia and the extracellular matrix: drivers of tumour metastasis. *Nat. Rev. Cancer* **14**, 430–439 (2014).
- Treibs, A. & Kreuzer, F. -H. Difluorboryl-Komplexe von Di- und Tripyrrylmethenen. *Justus Liebigs Ann. Chem.* **718**, 208–223 (1968).
- Kaur, P. & Singh, K. Recent advances in the application of BODIPY in bioimaging and chemosensing. *J. Mater. Chem. C* **7**, 11361–11405 (2019).
- Gibbs, J. H. *et al.* Synthesis, Spectroscopic, and in vitro Investigations of 2,6-Diiodo-BODIPYs with PDT and Bioimaging Applications. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **145**, 35–47 (2015).
- Donnelly, J. L. *et al.* Exploring the Relationship between BODIPY Structure and Spectroscopic Properties to Design Fluorophores for Bioimaging. *Chem. - A Eur. J.* **26**, 863–872 (2020).
- Ni, Y. & Wu, J. Far-red and near infrared BODIPY dyes: Synthesis and applications for fluorescent pH probes and bio-imaging. *Org. Biomol. Chem.* **12**, 3774–3791 (2014).
- Ehrenschwender, T. & Wagenknecht, H. 4,4-Difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene as a Bright Fluorescent Label for DNA. *J. Org. Chem.* **76**, 2301–2304 (2011).
- Boens, N., Leen, V. & Dehaen, W. Fluorescent indicators based on BODIPY. *Chem. Soc. Rev.* **41**, 1130–1172 (2012).
- Baruah, M. *et al.* A highly potassium-selective ratiometric fluorescent indicator based on BODIPY azacrown ether excitable with visible light. *Org. Lett.* **7**, 4377–4380 (2005).
- Jiao, L., Li, J., Zhang, S., Wei, C. & Grac, M. A selective fluorescent sensor for imaging Cu<sup>2+</sup> in living cells. *New J. Chem.* **33**, 1888–1893 (2009).
- Boyer, J. H., Haag, A. M., Sathyamoorthi, G. & Pavlopoulos, T. G. Pyrromethene-BF<sub>2</sub> Complexes as Laser Dyes: 2. *Heteroat. Chem.* **4**, 39–49 (1993).
- Duran-Sampedro, G. *et al.* Chlorinated BODIPYs: Surprisingly Efficient and Highly Photostable Laser Dyes. *European J. Org. Chem.* **2012**, 6335–6350 (2012).
- Kamkaew, A. *et al.* BODIPY dyes in photodynamic therapy. *Chem. Soc. Rev.* **42**, 77–88 (2013).
- Bassan, E., Gualandi, A. & Ceroni, P. Chemical Science Design of BODIPY dyes as triplet photosensitizers: conversion, photoredox catalysis and photodynamic therapy. *Chem. Sci.* **12**, 6607–6628 (2021).
- Lim, S. H. *et al.* In Vitro and In Vivo Photocytotoxicity of Boron Dipyrromethene Derivatives for Photodynamic Therapy. *J. Med. Chem.* **53**, 2865–2874 (2010).
- Ziessel, R., Ulrich, G., Haefele, A. & Harriman, A. An artificial light-harvesting array constructed from multiple bodipy dyes. *J. Am. Chem. Soc.* **135**, 11330–11344 (2013).
- Gao, H. *et al.* Anomalous Effect of Intramolecular Charge Transfer on the Light Emitting Properties of BODIPY. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **10**, 14956–14965 (2018).
- Trofymchuk, K. *et al.* BODIPY-loaded polymer nanoparticles: chemical structure of cargo defines leakage from nanocarrier in living cells. *J. Mater. Chem. B* **7**, 5199–5210 (2019).
- Zhigang, X., Li, Z., Liu, Y., Pei, Q. & Chen, L. Reduction-responsive fluorescence off–on BODIPY–camptothecin conjugates for self-reporting drug release. *J. Mater. Chem. B* **4**, 2332–2337 (2016).

21. Tamgho, I., Hasheminasab, A., Engle, J. T., Nemykin, V. N. & Ziegler, C. J. A New Highly Fluorescent and Symmetric Pyrrole – BF<sub>2</sub> Chromophore: BOPHY. *J. Am. Chem. Soc.* **136**, 5623–5626 (2014).
22. S. Pookkandam Parambil, F. de Jong, K. Veys, J. Huang, S. P. Veetil, D. Verhaeghe, L. Van Meervelt, D. Escudero, M. vanderauweraer and W. D. BOPAHY: A doubly chelated highly fluorescent pyrrole-acyl hydrazone – BF<sub>2</sub> chromophore. *Chem. Commun.* **56**, 5791–5794 (2020).
23. Jiao, L. *et al.* Accessing Near-Infrared Absorbing BF<sub>2</sub>-Azadipyrromethenes via a Push-Pull Effect. *J. Org. Chem.* **79**, 1830–1835 (2014).
24. Patalag, L. J., Jones, P. G. & Werz, D. B. BOIMPYs : Rapid Access to a Family of Red-Emissive Fluorophores and NIR Dyes. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **55**, 13340–13344 (2016).
25. Yu, C. *et al.* A Family of Highly Fluorescent and Unsymmetric Bis(BF<sub>2</sub>) Chromophore Containing Both Pyrrole and N-Heteroarene Derivatives: BOPPY. *Org. Lett.* **20**, 4462–4466 (2018).
26. Yang, Y., Su, X., Carroll, C. N. & Aprahamian, I. Aggregation-induced emission in BF<sub>2</sub>-hydrazone (BODIHY) complexes. *Chem. Sci.* **3**, 610–613 (2012).
27. Schmitt, A., Hinkeldey, B., Wild, M. & Jung, G. Synthesis of the core compound of the BODIPY dye class: 4,4'-difluoro-4-bora-(3a,4a)-diazas-indacene. *J. Fluoresc.* **19**, 755–758 (2009).
28. Boens, N., Verbelen, B., Ortiz, M. J., Jiao, L. & Dehaen, W. Synthesis of BODIPY dyes through postfunctionalization of the boron dipyrromethene core. *Coord. Chem. Rev.* **399**, (2019).
29. Lu, H., Mack, J., Yang, Y. & Shen, Z. Structural modification strategies for the rational design of red/NIR region BODIPYs. *Chem. Soc. Rev.* **43**, 4778–4823 (2014).
30. Ziessel, R., Ulrich, G. & Harriman, A. The chemistry of Bodipy: A new El Dorado for fluorescence tools. *New J. Chem.* **31**, 496–501 (2007).
31. Bodio, E. & Goze, C. Investigation of B-F substitution on BODIPY and aza-BODIPY dyes: Development of B-O and B-C BODIPYs. *Dye. Pigment.* **160**, 700–710 (2019).
32. Radunz, S. *et al.* Temperature- And Structural-Dependent Optical Properties and Photophysics of BODIPY Dyes. *J. Phys. Chem. A* **124**, 1787–1797 (2020).
33. Benniston, A. C. & Copley, G. Lighting the way ahead with boron dipyrromethene (Bodipy) dyes. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **11**, 4124–4131 (2009).
34. Ulrich, G., Ziessel, R. & Harriman, A. The chemistry of fluorescent bodipy dyes: Versatility unsurpassed. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **47**, 1184–1201 (2008).
35. Wagner, R. W. & Lindsey, J. S. Boron-dipyrromethene dyes for incorporation in synthetic multi-pigment light-harvesting arrays. *Pure Appl. Chem.* **68**, 1373–1380 (1996).
36. Loudet, A. & Burgess, K. BODIPY dyes and their derivatives: Syntheses and spectroscopic properties. *Chem. Rev.* **107**, 4891–4932 (2007).
37. Wu, L. & Burgess, K. A New Synthesis of Symmetric Boraindacene (BODIPY) Dyes. *Chem. Commun.* **40**, 4933–4935 (2008).
38. Wood, T. E. & Thompson, A. Advances in the chemistry of dipyrins and their complexes. *Chem. Rev.* **107**, 1831–1861 (2007).
39. Rurack, K. & Kollmannsberger, M. Molecular Switching in the Near Infrared (NIR) with a Functionalized Boron - Dipyrromethene. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **40**, 385–387 (2001).

40. Zhu, S. *et al.* Controlled Knoevenagel reactions of methyl groups of 1,3,5,7-tetramethyl BODIPY dyes for unique BODIPY dyes. *RSC Adv.* **2**, 404–407 (2012).
41. Palao, E. *et al.* 8-Functionalization of Alkyl-Substituted-3,8-Dimethyl BODIPYs by Knoevenagel Condensation. *Org. Lett.* **15**, 4454–4457 (2013).
42. Buyukcakir, O., Bozdemir, O. A., Kolemen, S., Erbas, S. & Akkaya, E. U. Tetrasteryl-Bodipy Dyes: Convenient Synthesis and Characterization of Elusive Near IR Fluorophores. *Org. Lett.* **11**, 4644–4647 (2009).
43. Baruah, M. *et al.* Solvent and pH dependent fluorescent properties of a dimethylaminostyryl borondipyrromethene dye in solution. *J. Phys. Chem. A* **110**, 5998–6009 (2006).
44. Bozdemir, O. A. *et al.* Selective Manipulation of ICT and PET Processes in Styryl-Bodipy Derivatives: Applications in Molecular Logic and Fluorescence Sensing of Metal Ions. *J. Am. Chem. Soc.* **132**, 8029–8036 (2010).
45. Guliyev, R., Coskun, A. & Akkaya, E. U. Design Strategies for Ratiometric Chemosensors: Modulation of Excitation Energy Transfer at the Energy Donor Site. *J. Am. Chem. Soc.* **131**, 9007–9013 (2009).
46. Haefele, A., Zedde, C., Retailleau, P., Ulrich, G. & Ziessel, R. Boron Asymmetry in a BODIPY Derivative. *Org. Lett.* **12**, 1672–1675 (2010).
47. Ulrich, G., Ziessel, R. & Haefele, A. A General Synthetic Route to 3,5-Substituted Boron Dipyrromethenes: Applications and Properties. *J. Org. Chem.* **77**, 4298–4311 (2012).
48. Rohand, T., Qin, W., Boens, N. & Dehaen, W. Palladium-catalyzed coupling reactions for the functionalization of BODIPY dyes with fluorescence spanning the visible spectrum. *European J. Org. Chem.* **20**, 4658–4663 (2006).
49. Leen, V. *et al.* A versatile, modular synthesis of monofunctionalized BODIPY dyes. *Chem. Commun.* **30**, 4515–4517 (2009).
50. Miyaura, N. & Suzuki, A. Palladium-Catalyzed Cross-Coupling Reactions of Organoboron Compounds. *Chem. Rev.* **95**, 2457–2483 (1995).
51. Alnoman, R. B., Stachelek, P., Knight, J. G., Harriman, A. & Waddell, P. G. Synthesis of 2-aminoBODIPYs by palladium catalysed amination. *Org. Biomol. Chem.* **15**, 7643–7653 (2017).
52. Lakshmi, V. & Ravikanth, M. Brominated boron dipyrins: Synthesis, structure, spectral and electrochemical properties. *Dalt. Trans.* **41**, 5903–5911 (2012).
53. Baruah, M., Qin, W., Basarić, N., De Borggraeve, W. M. & Boens, N. BODIPY-based hydroxyaryl derivatives as fluorescent pH probes. *J. Org. Chem.* **70**, 4152–4156 (2005).
54. Jiao, L. *et al.* Regioselective Stepwise Bromination of Boron Dipyrromethene (BODIPY) Dyes. *J. Org. Chem.* **76**, 9988–9996 (2011).
55. Hayashi, Y., Yamaguchi, S., Cha, W. Y., Kim, D. & Shinokubo, H. Synthesis of Directly Connected BODIPY Oligomers through Suzuki - Miyaura Coupling. *Org. Lett.* **13**, 2992–2995 (2011).
56. Wang, G., Huang, C., Hu, Z., Zhang, W. & Zhang, Y. An Efficient and Convenient Bromination of BODIPY Derivatives with Copper (II) Bromide. *Synthesis (Stuttg.)* **44**, 104–110 (2011).
57. Bonardi, L., Ulrich, G. & Ziessel, R. Tailoring the Properties of Boron - Dipyrromethene Dyes with Acetylenic Functions at the 2, 6, 8 and 4-B Substitution Positions. *Org. Lett.* **10**, 2183–2186 (2008).
58. Yogo, T. *et al.* Highly Efficient and Photostable Photosensitizer Based on BODIPY Chromophore. *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 12162–12163 (2005).

59. Krumova, K., Cosa, G., Chem, H. A. & Ed, I. Bodipy Dyes with Tunable Redox Potentials and Functional Groups for Further Tethering: Preparation, Electrochemical, and Spectroscopic Characterization. *J. Am. Chem. Soc.* **132**, 17560–17569 (2010).
60. Zhou, X. *et al.* Highly Regioselective  $\alpha$ -Chlorination of the BODIPY Chromophore with Copper(II) Chloride. *Org. Lett.* **17**, 4632–4635 (2015).
61. Jiang, T. *et al.* Straightforward Synthesis of Oligopyrroles through a Regioselective  $\text{SnAr}$  Reaction of Pyrroles and Halogenated Boron Dipyrins. *Org. Lett.* **16**, 1952–1955 (2014).
62. Erbas-cakmak, S. & Akkaya, E. U. Toward Singlet Oxygen Delivery at a Measured Rate: A Self- Reporting Photosensitizer. *Org. Lett.* **16**, 2946–2949 (2014).
63. Worries, H. J. *et al.* A novel water-soluble fluorescent probe: Synthesis, luminescence and biological properties of the sodium salt of the 4-sulfonato-3,3',5,5'-tetramethyl-2,2'-pyrromethen-1,1'- $\text{BF}_2$  complex. *Recl. des Trav. Chim. des Pays-Bas* **104**, 288–291 (1985).
64. Jiao, L. *et al.*  $\beta$ -formyl-BODIPYs from the Vilsmeier-Haack reaction. *J. Org. Chem.* **74**, 7525–7528 (2009).
65. Gupta, M. *et al.* Rational Design of Boradiazaindacene (BODIPY)-Based Functional Molecules. *Chem. - A Eur. J.* **19**, 17766–17772 (2013).
66. Mirri, G. *et al.* Synthesis of Functional Fluorescent BODIPY-based Dyes through Electrophilic Aromatic Substitution: Straightforward Approach towards Customized Fluorescent Probes. *Chem. Commun.* **5**, 450–454 (2016).
67. Gonzalvo, V. Z., Deborggraeve, W. M., Dehaen, W., Leen, V. & Boens, N. Direct functionalization of BODIPY dyes by oxidative nucleophilic hydrogen substitution at the 3- or 3, 5-positions. *Chem. Commun.* **46**, 4908–4910 (2010).
68. Leen, V., Van Der Auweraer, M., Boens, N. & Dehaen, W. Vicarious nucleophilic substitution of  $\alpha$ -hydrogen of BODIPY and its extension to direct ethenylation. *Org. Lett.* **13**, 1470–1473 (2011).
69. Galli, C. Radical Reactions of Arenediazonium Ions: An Easy Entry into the Chemistry of the Aryl Radical. *Chem. Rev.* **88**, 765–792 (1988).
70. Dehaen, W., Verbelen, B., Boodts, S., Hofkens, J. & Boens, N. Radical C-H Arylation of the BODIPY Core with Aryldiazonium Salts: Synthesis of Highly Fluorescent Red-Shifted Dyes. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **54**, 4612–4616 (2015).
71. Leen, V., Yuan, P., Wang, L., Boens, N. & Dehaen, W. Synthesis of Meso-Halogenated BODIPYs and Access to Meso-Substituted Analogues. *Org. Lett.* **14**, 6150–6157 (2012).
72. Niu, S. L., Ulrich, G., Retailleau, P., Harrowfield, J. & Ziessel, R. New insights into the solubilization of Bodipy dyes. *Tetrahedron Lett.* **50**, 3840–3844 (2009).
73. Jiang, X., Zhang, J., Furuyama, T. & Zhao, W. Development of Mono- and Di-AcO Substituted BODIPYs on the Boron Center. *Org. Lett.* **14**, 248–251 (2012).
74. Zhu, S. *et al.* Highly Water-Soluble Neutral BODIPY Dyes with Controllable Fluorescence Quantum Yields. *Org. Lett.* **13**, 438–441 (2011).
75. Nguyen, A. L., Bobadova-parvanova, P., Hop, M., Fronczek, F. R. & Smith, K. M. Synthesis and Reactivity of 4,4-Dialkoxy-BODIPYs: An Experimental and Computational Study. *Inorg. Chem.* **54**, 3228–3236 (2015).
76. Goze, C. *et al.* Synthesis and Photophysical Properties of Borondipyrromethene Dyes Bearing Aryl Substituents at the Boron Center. *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 10231–10239 (2006).
77. Ulrich, G., Goze, C., Goeb, S., Retailleau, P. & Ziessel, R. New fluorescent aryl- or

- ethynylaryl-boron-substituted indacenes as promising dyes. *New J. Chem.* **30**, 982–986 (2006).
78. Tahtaoui, C. *et al.* Convenient Method To Access New 4,4-Dialkoxy- and 4,4-Diaryloxy-diaza-*s*-indacene Dyes: Synthesis and Spectroscopic Evaluation. *J. Org. Chem.* **72**, 269–272 (2006).
  79. Gabe, Y., Ueno, T. & Urano, Y. Tunable design strategy for fluorescence probes based on 4-substituted BODIPY chromophore: improvement of highly sensitive fluorescence probe for nitric oxide. *Anal. Bioanal. Chem.* **386**, 621–626 (2006).
  80. Van de Water, R. W. & Pettus, T. R. R. *o*-Quinone methides: Intermediates underdeveloped and underutilized in organic synthesis. *Tetrahedron* **58**, 5367–5405 (2002).
  81. Wan, P. *et al.* Quinone methide intermediates in organic photochemistry. *Pure Appl. Chem.* **73**, 529–534 (2001).
  82. Fries, K. & Kann, K. I. Ueber die Einwirkung von Brom und von Chlor auf Phenole: Substitutionsproducte, Pseudobromide und Pseudochloride. Ueber *o*-Pseudohalogenide und *o*-Methylenchinone aus *o*-Oxymesitylalkohol. *Justus Liebigs Ann. Chem.* **353**, 335–356 (1907).
  83. Gardner, P. D., Sarrafizadhb, H. & Brandon, R. L. *O*-Quinone Methide. *J. Am. Chem. Soc.* **81**, 5515 (1959).
  84. Diao, L., Yang, C. & Wan, P. Quinone Methide Intermediates from the Photolysis of Hydroxybenzyl Alcohols in Aqueous Solution. *J. Am. Chem. Soc.* **117**, 5369–5370 (1995).
  85. Škalamera, Đ., Bohne, C., Landgraf, S. & Basarić, N. Photodeamination Reaction Mechanism in Aminomethyl *p*-Cresol Derivatives: Different Reactivity of Amines and Ammonium Salts. *J. Org. Chem.* **80**, 10817–10828 (2015).
  86. Ma, J., Šekutor, M., Škalamera, D., Basarić, N. & Phillips, D. L. Formation of Quinone Methides by Ultrafast Photodeamination: A Spectroscopic and Computational Study. *J. Org. Chem.* **84**, 8630–8637 (2019).
  87. Toteva, M. M. & Richard, J. P. *The generation and reactions of quinone methides. Advances in Physical Organic Chemistry* vol. 45 (Elsevier Inc., 2011).
  88. Bai, W. *et al.* The Domestication of ortho-Quinone Methides. *Acc. Chem. Res.* **47**, 3655–3664 (2014).
  89. Weinert, E. E. *et al.* Substituents on Quinone Methides Strongly Modulate Formation and Stability of Their Nucleophilic Adducts. *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 11940–11947 (2006).
  90. Amouri, H. *et al.* Stable *o*-Quinone Methide Complexes of Iridium: Synthesis, Structure, and Reversed Reactivity Imparted by Metal Complexation. *Organometallics* **19**, 1740–1748 (2000).
  91. Wang, J.-Y., Hao, W.-J., Tu, S. & Jiang, B. Recent developments in 1,6-addition reactions of para-quinone methides (*p*-QMs). *Org. Chem. Front.* **7**, 1743–1778 (2020).
  92. Bolon, D. A. Quinone Methides. II. Trapping with production of chromans. *J. Org. Chem.* **35**, 3666–3670 (1970).
  93. Alcohols, M. B., Wan, P. & Chak, B. Structure-Reactivity Studies and Catalytic Effects in the Photosolvolysis of Methoxy-substituted Benzyl Alcohols. *J. Chem. Soc. Perkin Trans 2* 1751–1756 (1986).
  94. Pande, P. *et al.* Alkylation of Nucleic Acids by a Model Quinone Methide. *J. Am. Chem. Soc.* **121**, 6773–6779 (1999).

95. Hoffmann, N. Photochemical reactions of aromatic compounds and the concept of the photon as a traceless reagent. *Photochem. Photobiol. Sci.* **11**, 1613–1641 (2012).
96. Chapman, O. L. & Mcintosh, C. L. Photochemical Decarbonylation of Unsaturated Lactones and Carbonates. *J. Chem. Soc. D Chem. Commun.* **2**, 383–384 (1971).
97. Ireland, J. F. & Wyatt, P. A. H. Acid-Base Properties of Electronically Excited States of Organic Molecules. *Adv. Phys. Org. Chem.* **12**, 131–221 (1976).
98. Agmon, N. Elementary Steps in Excited-State Proton Transfer. *J. Phys. Chem. A* **109**, 13–35 (2005).
99. Solntsev, K. M., Huppert, D., Agmon, N. & Tolbert, L. M. Photochemistry of “Super” Photoacids. 2. Excited-State Proton Transfer in Methanol/Water Mixtures. *J. Phys. Chem. A* **104**, 4658–4669 (2000).
100. Kasha, M. Proton-transfer Spectroscopy. Perturbation of the tautomerization potential. *J. Chem. Soc. Faraday Trans. 2 Mol. Chem. Phys.* **82**, 2379–2392 (1986).
101. P. Seiler; J. Wirz. Struktur und photochemische Reaktivität: Photohydrolyse von Trifluormethylsubstituierten Phenolen und Naphtholen. *Helv. Chim. Acta.* **55**, 2693–2712 (1972).
102. Gomberg, M. On triphenylmethyl. XXIII. Tautomerism of the hydroxy-triphenyl carbinols. *J. Am. Chem. Soc.* **35**, 1035–1042 (1913).
103. Lewis, T. W., Curtin, D. Y. & Paul, C. Thermal, photochemical, and photonucleated thermal dehydration of p-hydroxytriarylmethanols in solids. (3,5-Dimethyl-4-hydroxyphenyl) diphenylmethanol and (3,5-dibromo-4-hydroxyphenyl) diphenylmethanol. X-ray crystal structures of (4-hydroxyphenyl)diphenyl. *J. Am. Chem. Soc.* **101**, 5717–5725 (1979).
104. Shi, Y. & Wan, P. Solvolysis and ring closure of quinone methides photogenerated from biaryl systems. *Can. J. Chem.* **83**, 1306–1323 (2005).
105. Xu, M., Lukeman, M. & Wan, P. Photogeneration and Chemistry of Biphenyl Quinone Methides from Hydroxybiphenyl Methanols. *Photochem. Photobiol.* **82**, 50–56 (2006).
106. Xu, M., Chen, C. Z. & Wan, P. Intramolecular charge transfer in photoexcited hydroxyterphenyls: Evidence for formation of terphenyl quinone methides in aqueous solution. *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* **198**, 26–33 (2008).
107. Freccero, M. Quinone Methides as Alkylating and Cross-Linking Agents. *Mini. Rev. Org. Chem.* **1**, 403–415 (2004).
108. Diao, L. & Wan, P. Chemistry of photogenerated a-phenyl-substituted o-, m-, and p-quinone methides from phenol derivatives in aqueous solution. *Can. J. Chem.* **86**, 105–118 (2008).
109. Basarić, N., Mlinarić-Majerski, K., Wan, P. & Žabčić, I. Photochemical Formation and Chemistry of Long-Lived Adamantylidene-Quinone Methides and 2-Adamantyl Cations. *J. Org. Chem.* **75**, 102–116 (2009).
110. Meier, H. Benzoxetes and Benzothietes - Heterocyclic Analogues of Benzocyclobutene. *Molecules* **2**, 1538–1560 (2012).
111. Antol, I., Mlinarić, K., Phillips, D. L., Ma, J. & Basarić, N. Ultrafast Adiabatic Photodehydration of 2-Hydroxymethylphenol and the Formation of Quinone Methide. *Chem. - A Eur. J.* **24**, 9426–9435 (2018).
112. Tomioka, H. & Matsushita, T. Benzoxetene. Direct Observation and Theoretical Studies. *Chem. Lett.* **5**, 399–400.
113. Chiang, Y., Kresge, A. J. & Zhu, Y. Flash photolytic generation of ortho-quinone methide in aqueous solution and study of its chemistry in that medium. *J. Am. Chem.*

- Soc.* **123**, 8089–8094 (2001).
114. Chiang, Y., Kresge, A. J. & Zhu, Y. Flash Photolytic Generation and Study of *p*-Quinone Methide in Aqueous Solution. An Estimate of Rate and Equilibrium Constants for Heterolysis of the Carbon-Bromine Bond in *p*-Hydroxybenzyl Bromide. *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 6349–6356 (2002).
  115. Nakatani, K., Higashida, N. & Saito, I. Highly efficient photochemical generation of *o*-Quinone methide from Mannich bases of phenol derivatives. *Tetrahedron Lett.* **38**, 5005–5008 (1997).
  116. Modica, E., Zanaletti, R., Freccero, M. & Mella, M. Alkylation of Amino Acids and Glutathione in Water by *o*-Quinone Methide. Reactivity and Selectivity. *J. Org. Chem.* **66**, 41–52 (2001).
  117. Doria, F., Lena, A., Bargiggia, R. & Freccero, M. Conjugation, Substituent, and Solvent Effects on the Photogeneration of Quinone Methides. *J. Org. Chem.* **81**, 3665–3673 (2016).
  118. Bolton, J. L., Turnipseed, S. B. & Thompson, J. A. Influence of quinone methide reactivity on the alkylation of thiol and amino groups in proteins: studies utilizing amino acid and peptide models. *Chem. Biol. Interact.* **107**, 185–200 (1997).
  119. Rokita, S. E., Yang, J., Pande, P. & Greenberg, W. A. Quinone Methide Alkylation of Deoxycytidine. *J. Org. Chem.* **62**, 3010–3012 (1997).
  120. Weinert, E. E., Frankenfield, K. N. & Rokita, S. E. Time-Dependent Evolution of Adducts Formed between Deoxynucleosides and a Model Quinone Methide. *Chem. Res. Toxicol.* **18**, 1364–1370 (2005).
  121. Stowell, J. K., Widlanski, T. S., Kutateladze, T. G. & Raines, R. T. Mechanism-Based Inactivation of Ribonuclease A. *J. or* **60**, 6930–6936 (1995).
  122. Wang, P., Song, Y., Zhang, L., He, H. & Zhou, X. Quinone Methide Derivatives: Important Intermediates to DNA Alkylating and DNA Cross-linking Actions. *Curr. Med. Chem.* **12**, 2893–2913 (2005).
  123. Wang, H. & Rokita, S. E. Dynamic Cross-Linking Is Retained in Duplex DNA after Multiple Exchange of Strands. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **49**, 5957–5960 (2010).
  124. Angle, S. R., Rainier, J. D. & Woytowicz, C. Synthesis and Chemistry of Quinone Methide Models for the Anthracycline Antitumor Antibiotics. *J. Org. Chem.* **62**, 5884–5892 (1997).
  125. Wang, Y. *et al.* Hydrogen peroxide activated quinone methide precursors with enhanced DNA cross-linking capability and cytotoxicity towards cancer cells. *Eur. J. Med. Chem.* **133**, 197–207 (2017).
  126. Minard, A., Liano, D., Wang, X. & Antonio, M. Di. The unexplored potential of quinone methides in chemical biology. *Bioorg. Med. Chem.* **27**, 2298–2305 (2019).
  127. Nitiss, J. L. Targeting DNA topoisomerase II in cancer chemotherapy. *Nat. Rev. Cancer* **9**, 338–350 (2009).
  128. Li, V. & Kohn, H. Studies on the Bonding Specificity for Mitomycin C-DNA Monoalkylation Processes. *J. Am. Chem. Soc.* **113**, 275–283 (1991).
  129. Han, I., Russell, D. J. & Kohn, H. Studies on the mechanism of mitomycin C(1) electrophilic transformations: structure-reactivity relationships. *J. Org. Chem.* **57**, 1799–1807 (1992).
  130. Tomasz, M. *et al.* The Purine 2-Amino Group as the Critical Recognition Element for Sequence-Specific Alkylation and Cross-Linking of DNA by Mitomycin C. *J. Am. Chem. Soc.* **120**, 11581–11593 (1998).



131. Jiang, J., Zeng, D. & Li, S. Photogenerated Quinone Methides as Protein Affinity Labeling Reagents. *ChemBioChem* **10**, 635–638 (2009).
132. He, H. *et al.* Porphyrin–DNA cross-linking agent hybrids: chemical synthesis and biological studies. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **14**, 3013–3016 (2004).
133. Ash, C., Dubec, M., Donne, K. & Bashford, T. Effect of wavelength and beam width on penetration in light-tissue interaction using computational methods. *Lasers Med. Sci.* **32**, 1909–1918 (2017).
134. Zlatić, K. *et al.* Labeling of Proteins by BODIPY-Quinone Methides Utilizing Anti-Kasha Photochemistry. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **12**, 347–351 (2020).
135. Basarić, N. *et al.* Wavelength dependent photochemistry of BODIPY-phenols and their applications in fluorescent labeling of proteins. *Org. Biomol. Chem.* **19**, 4891–4903 (2021).
136. Stoos, F. & Roeeck, J. Oxidation of hydroaromatic systems. III. Effect of aromatic stabilization in the dehydrogenation of 1,4-cyclohexadienes. *J. Am. Chem. Soc.* **94**, 2719–2723 (1972).
137. Miiller, P. & Joly, D. Intermediates in the Dehydrogenation of Hydroaromatic Compounds with Quinones. *Helv. Chim. Acta* **66**, 1110–1118 (1983).
138. Rummyantsev, E. V., Alyoshin, S. N. & Marfin, Y. S. Kinetic study of Bodipy resistance to acids and alkalis: Stability ranges in aqueous and non-aqueous solutions. *Inorganica Chim. Acta* **408**, 181–185 (2013).
139. Chinchilla, R. & Nájera, C. The Sonogashira reaction: A booming methodology in synthetic organic chemistry. *Chem. Rev.* **107**, 874–922 (2007).
140. Gilow, H. M. & Burton, D. E. Bromination and Chlorination of Pyrrole and Some Reactive 1-Substituted Pyrroles. *J. Org. Chem.* **46**, 2221–2225 (1981).
141. Chinchilla, R. & Nájera, C. Recent advances in Sonogashira reactions. *Chem. Soc. Rev.* **40**, 5084–5121 (2011).
142. Zhang, W. *et al.* Application of multifunctional BODIPY in photodynamic therapy. *Dye. Pigment.* **185**, 108937 (2021).
143. Studies, J. *et al.* Photoisomerization Dynamics of Stilbenes. *Chem. Rev.* **941**, 415–436 (1991).
144. Laha, J. K., Dhanalekshmi, S., Taniguchi, M., Ambroise, A. & Lindsey, J. S. A Scalable Synthesis of Meso-Substituted Dipyrromethanes. *Org. Process Res. Dev.* **7**, 799–812 (2003).
145. Costa, P., Sandrin, D. & Scaiano, J. C. Real-time fluorescence imaging of a heterogeneously catalysed Suzuki–Miyaura reaction. *Nat. Catal.* **3**, 427–437 (2020).
146. Potier, J., Manuel, S., Azaroual, N., Monflier, E. & Hapiot, F. Limits of the Inversion Phenomenon in Triazolyl-Substituted  $\beta$ -Cyclodextrin Dimers. *European J. Org. Chem.* **2014**, 1537–1546 (2014).
147. Young Chang, J., Ryun Yeon, J., Sung Shin, Y., Jung Han, M. & Hong, S. K. Synthesis and characterization of mesogenic disklike benzenetricarboxylates containing diacetylenic groups and their polymerization. *Chem. Mater.* **12**, 1076–1082 (2000).
148. Doria, F., Gallati, C. M. & Freccero, M. Hydrosoluble and solvatochromic naphthalene diimides with NIR absorption. *Org. Biomol. Chem.* **11**, 7838–7842 (2013).
149. Boens, N. *et al.* Fluorescence Lifetime Standards for Time and Frequency Domain Fluorescence Spectroscopy. *Anal. Chem.* **79**, 2137–2149 (2007).

## Sažetak

Jedan od pristupa za tretman karcinoma utemeljen je na korištenju svjetla. Konkretno, takozvana fotodinamička terapija bazirana je na uporabi fotosenzibilizatora koji apsorbiraju svjetlo i prenose apsorbiranu energiju na kisik kako bi nastao singletni kisik i druge reaktivne vrste koje su odgovorne za citotoksične učinke. Međutim, stanice karcinoma često su hipoksične, čineći ovaj pristup neučinkovitim. Kao rješenje problema dizajnirali smo niz molekula koje nisu toksične, ali nakon izlaganja svjetlu u fotokemijskoj reakciji stvaraju citotoksične vrste, kinon-metide (QM). QM-i važni su intermedijari u kemiji fenola, poznati po svojoj biološkoj aktivnosti zbog reaktivnosti s biološki važnim molekulama kao što su DNK i proteini. Ovaj rad opisuje derivatizaciju fluorescentne BODIPY boje u prekursor QM-a. Primjena fluorescentnih boja u biološkim sustavima intenzivno je istražena i posebna pažnja posvećena je fluorescentnim markerima za fluorescencijsku spektroskopiju i mikroskopiju. Nadalje, BODIPY spojevi naročito su zanimljivi zbog njihovih izvanrednih fotofizičkih svojstava koja se lako mogu mijenjati sintetskim modifikacijama.

U ovom radu opisana je sinteza novog prekursora QM-a sa značajno pomaknutom apsorpcijom prema crvenom dijelu elektromagnetskog spektra kao posljedicom produljene konjugacije BODIPY kromofora s etinilfenolnom skupinom. Fotofizička svojstva sintetizirane boje ispitana su UV-Vis te stacionarnom i vremenski razlučenom fluorescencijskom spektroskopijom. Fotokemijska reaktivnost boje ispitana je osvjetljavanjem u metanolu, dok su HPLC analizom detektirani adukti metanola, potvrđujući očekivane QM-e kao intermedijare u reakcijama. Dobiveni rezultati posebno su zanimljivi zato jer ispitivana boja pokazuje neuobičajenu anti-Kasha fotokemijsku reaktivnost. Naime, reakcije se događaju samo prilikom pobude u viša pobuđena singletna stanja, dok ekscitacija u  $S_1$  vodi jedino do deaktivacije fluorescencijom. Posljedično, novo sintetizirane molekule imaju potencijal za razvoj u fotoaktivirajuće fluorescentne markere za različite biološki važne molekule kao što su proteini i DNK.

**Ključne riječi:** BODIPY, fluorescencija, kinon-metidi, fotokemija, fotofizika

## Summary

One approach to treat cancer is based on the use of light. In particular, so called photodynamic therapy relies on the use of photosensitizers that absorb light and transfer the absorbed energy to oxygen to produce singlet oxygen and other reactive species which are responsible for the cytotoxic effects. However, cancer cells are often hypoxic, rendering this approach inefficient. As a solution to this problem, we have designed a series of molecules that are non-toxic, but upon exposure to light in the photochemical reaction they form cytotoxic species, quinone methides (QMs). QMs are important intermediates in the chemistry of phenol, known for their biological activity due to reactivity with biologically important molecules such as DNA and proteins. This work features derivatization of a fluorescent BODIPY dye into a QM precursor. The application of fluorescent organic dyes in biological systems has been intensively investigated and a special focus has been devoted to fluorescent labels for fluorescence spectroscopy and microscopy. Furthermore, BODIPY compounds are particularly interesting owing to their outstanding photophysical properties which can be easily tuned by synthetic modifications.

In this work the synthesis of a new QM precursor with a significantly red-shifted absorption owing to extended conjugation of the BODIPY chromophore by ethynylphenol group is described. The photophysical properties of the synthesized dye were examined by UV-Vis and steady-state and time-resolved fluorescence spectroscopy. Photochemical reactivity of the dye was investigated by irradiations in methanol, whereupon HPLC analysis allowed for the detection of the methanol adducts, confirming anticipated QMs as intermediates in the reactions. Obtained results are particularly interesting since the investigated dye shows unusual anti-Kasha photochemical reactivity. Namely, the reactions take place only upon the excitation to higher singlet excited states, whereas excitation to  $S_1$  leads only to the deactivation by fluorescence. Consequently, newly prepared molecules have the potential to be developed into photoswitchable fluorescent labels for different biologically relevant molecules such as proteins and DNA.

**Key words:** BODIPY, fluorescence, quinone-methides, photochemistry, photophysics

## Zahvale

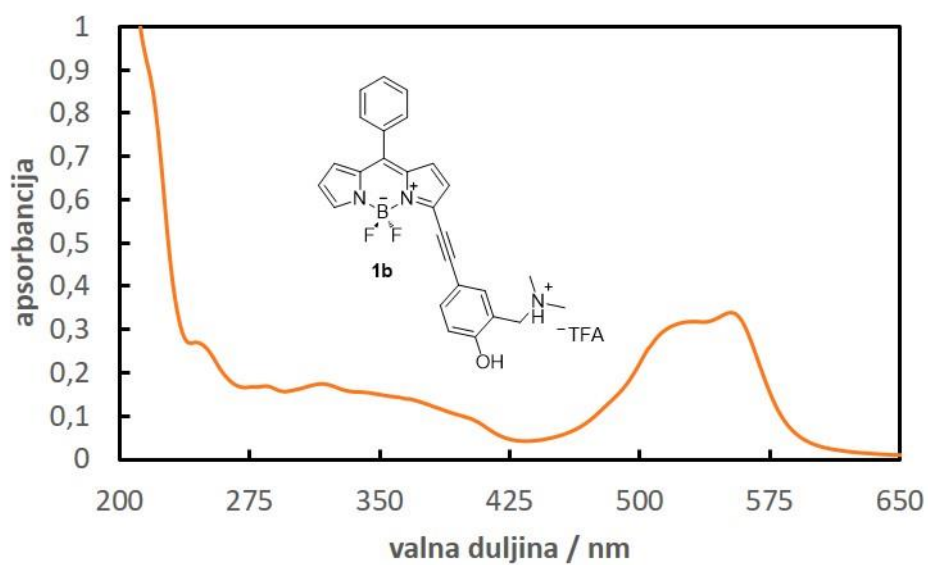
*Zahvaljujem mentorici prof. dr. sc. Ireni Škorić na stručnom vodstvu i danim savjetima tijekom izrade ovog rada.*

*Zahvaljujem voditelju Laboratorija za sintetsku organsku kemiju dr. sc. Nikoli Basariću na danoj prilici za rad u izvrsnom laboratoriju te svim ostalim djelatnicima laboratorija na vrlo ugodnoj radnoj atmosferi i na svojoj pomoći.*

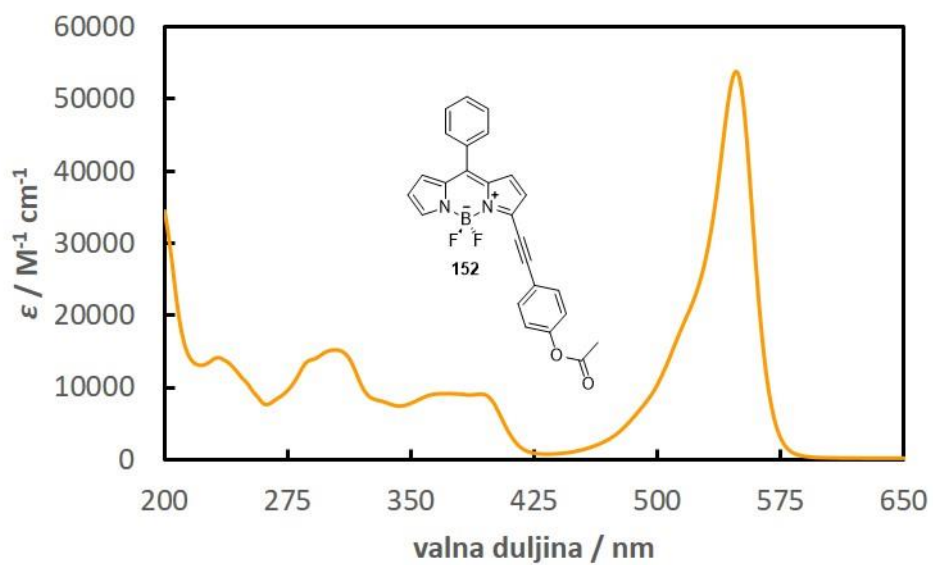
*Zahvaljujem mag. chem. Katarini Zlatić na uzorku BODIPY spoja s dvostrukom vezom za fotofizička ispitivanja, prekovremenom radu u laboratoriju, ugodnom društvu tijekom sinteze spojeva i velikoj podršci.*

## Dodatak

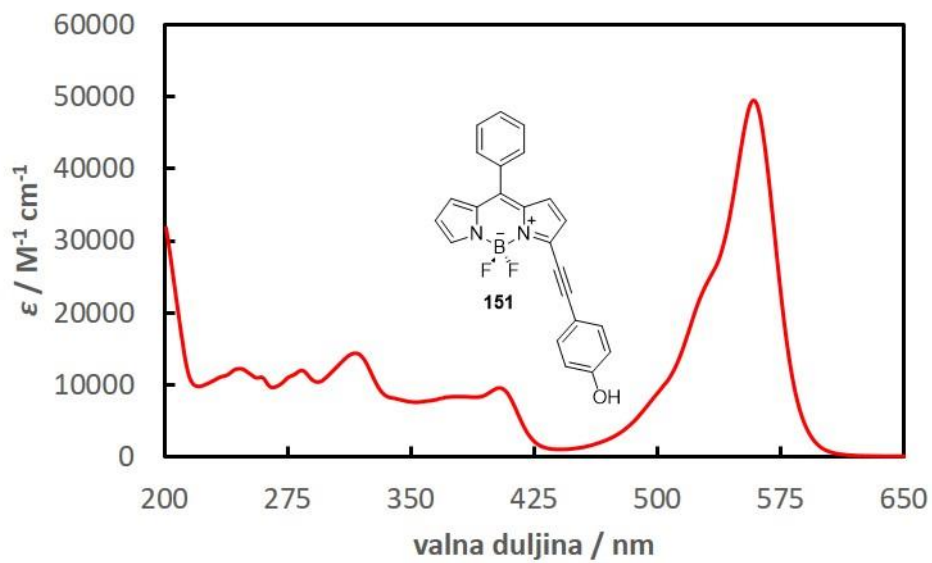
### UV-Vis spektri



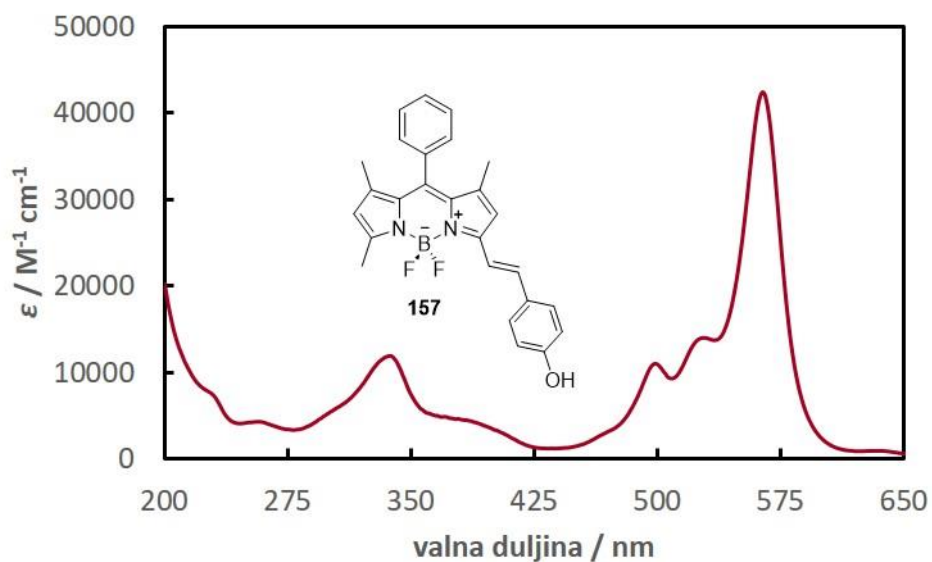
**Slika 19.** UV-Vis spektar spoja **1b** u CH<sub>3</sub>CN.



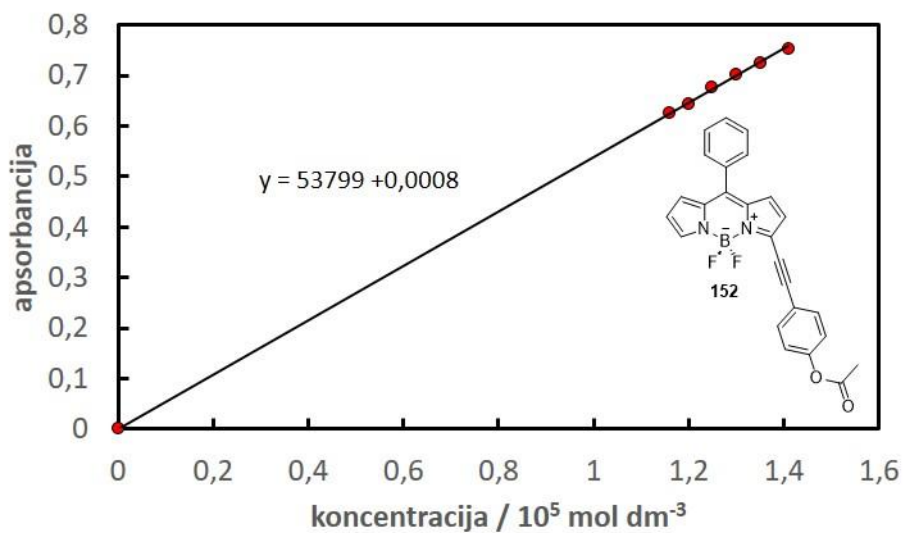
**Slika 20.** UV-Vis spektar spoja **152** u CH<sub>3</sub>CN.



**Slika 21.** UV-Vis spektar spoja **151** u  $\text{CH}_3\text{CN}$ .

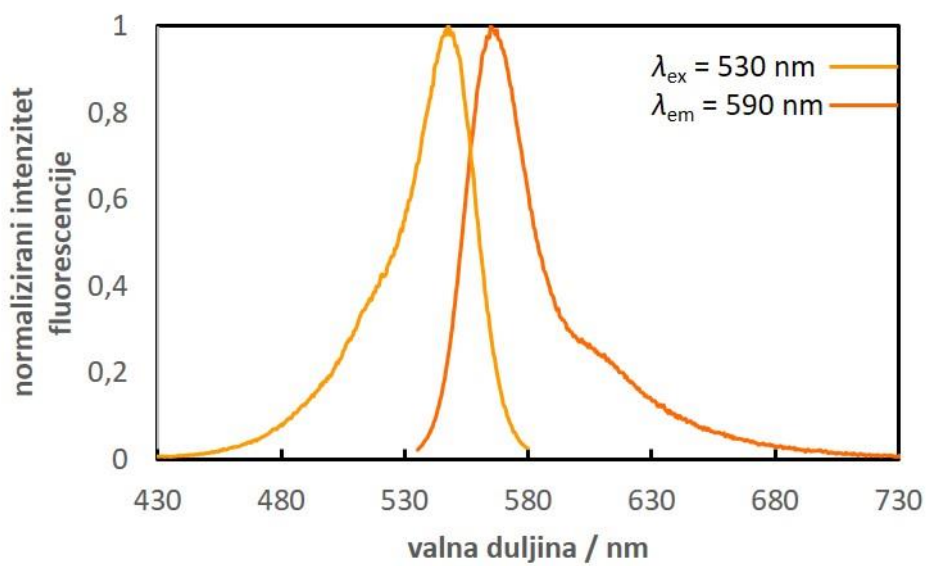


**Slika 22.** UV-Vis spektar spoja **157** u  $\text{CH}_3\text{CN}$ .

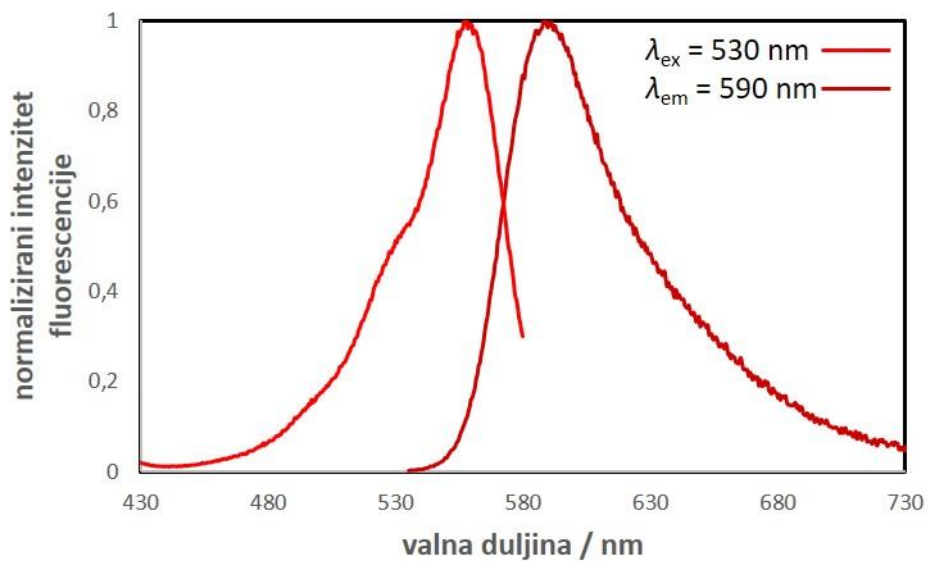


**Slika 23.** Određivanje molarnog apsorpcijskog koeficijenta,  $\epsilon_{\max}$ , spoja **152**.

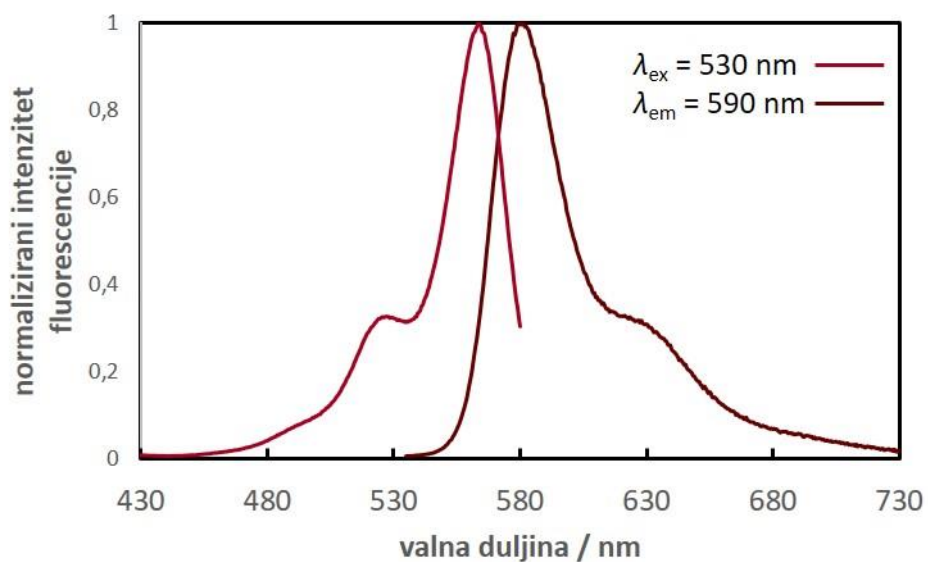
### Ekscitacijski i emisijski spektri



**Slika 24.** Ekscitacijski i emisijski spektar spoja **152** u  $\text{CH}_3\text{CN}$ .

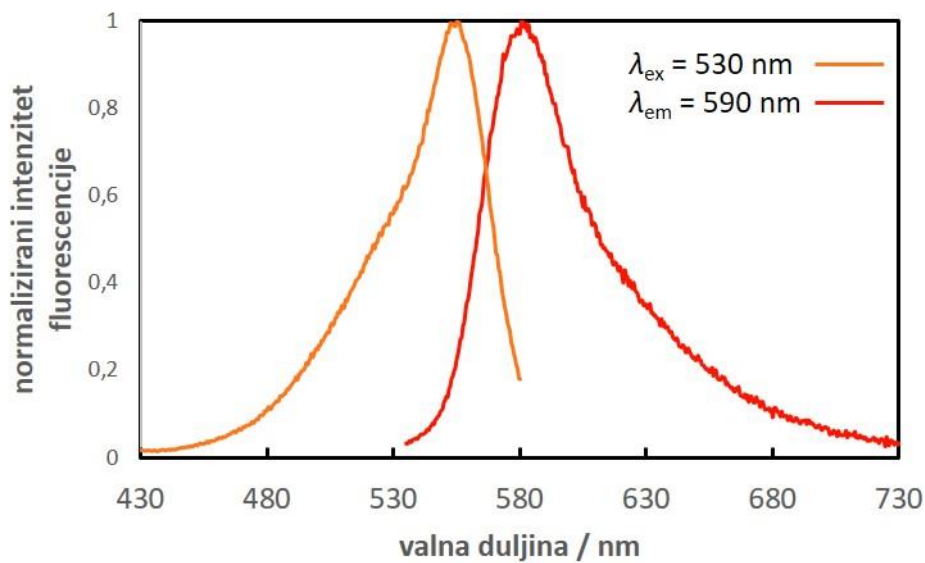


**Slika 25.** Ekscitacijski i emisijski spektar spoja **151** u  $\text{CH}_3\text{CN}$ .



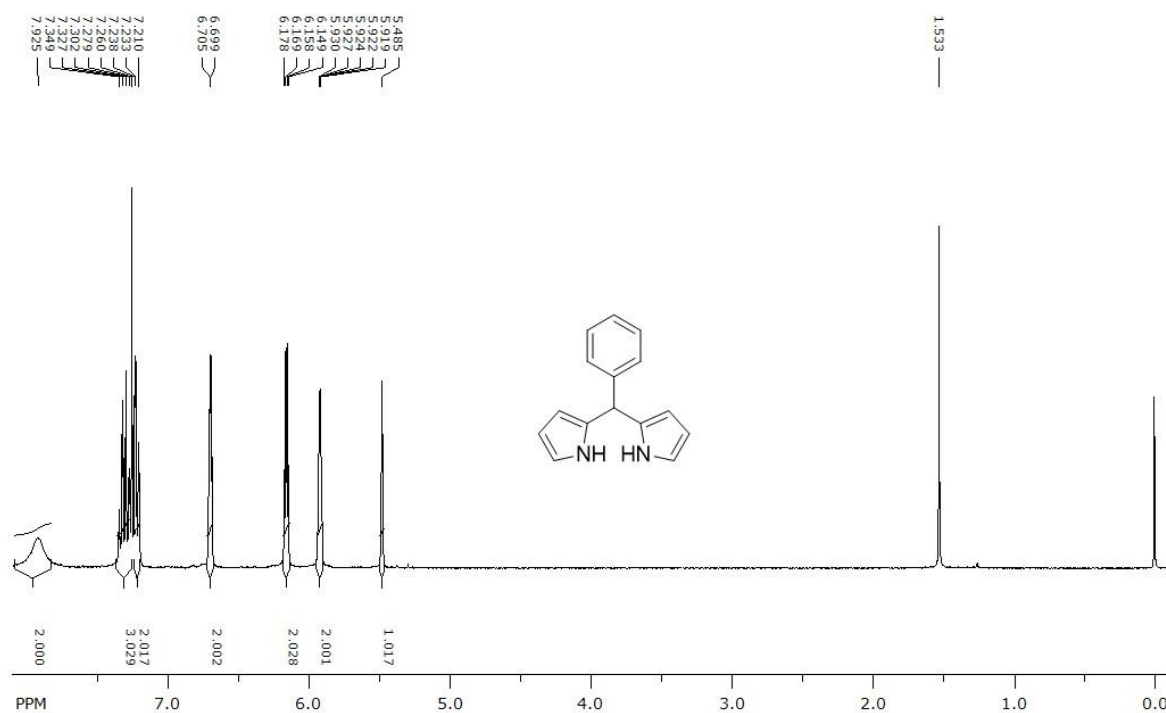
**Slika 26.** Ekscitacijski i emisijski spektar spoja **157** u  $\text{CH}_3\text{CN}$ .



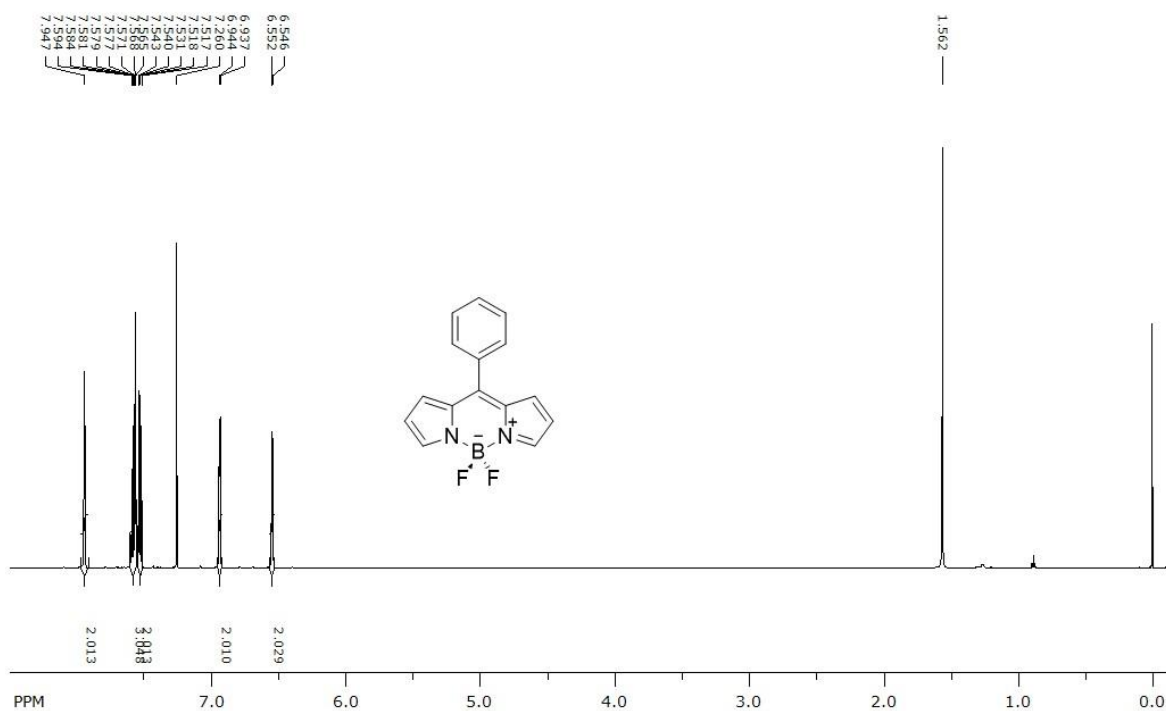


Slika 27. Ekscitacijski i emisijski spektar spoja **1b** u  $\text{CH}_3\text{CN}$ .

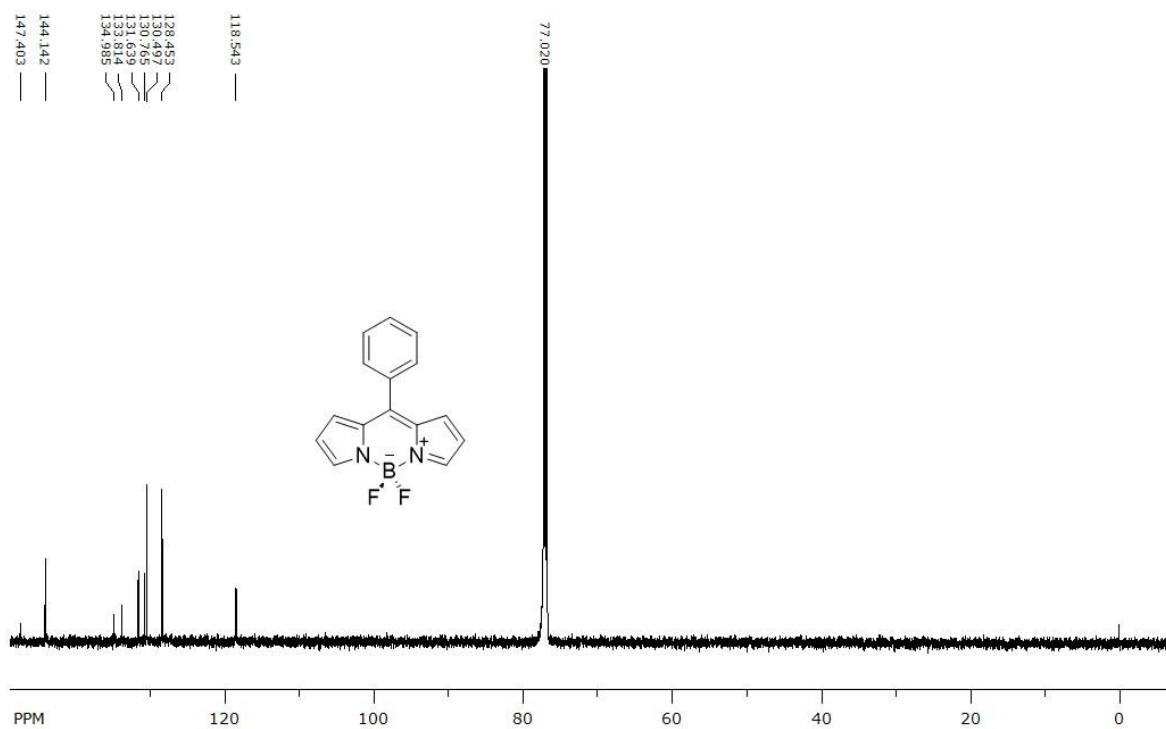
### $^1\text{H}$ i $^{13}\text{C}$ NMR spektri



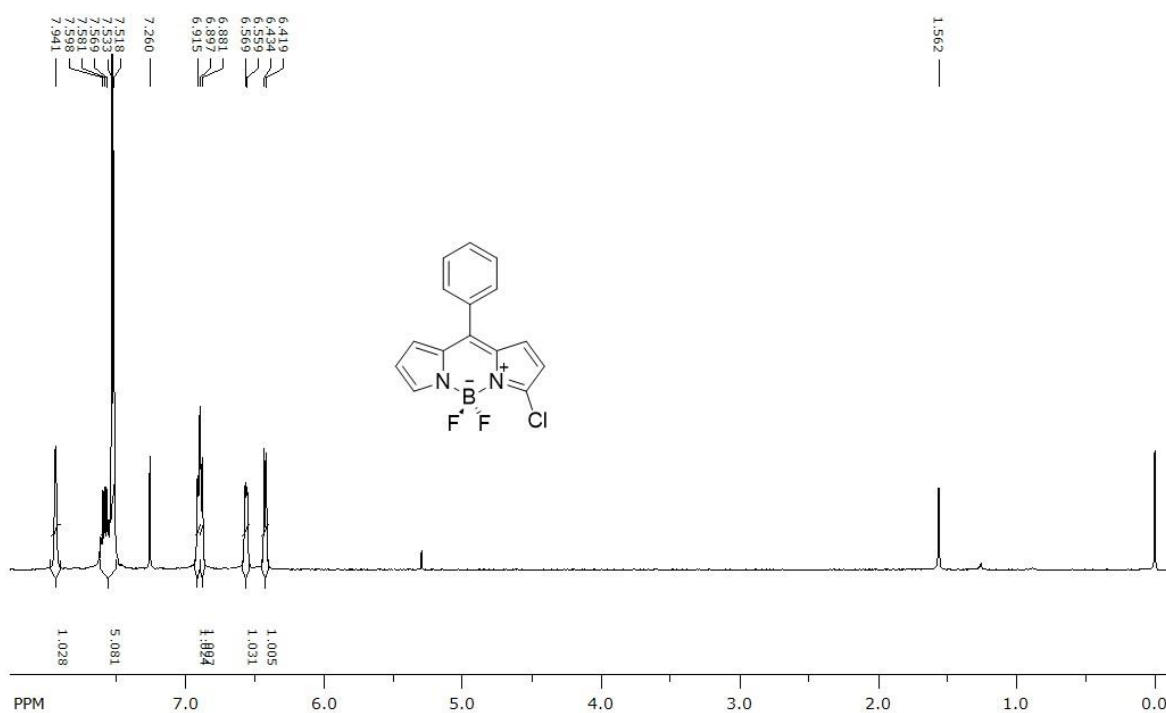
Slika 28.  $^1\text{H}$  NMR spektar spoja **130** snimljen u  $\text{CDCl}_3$  kao otapalu, 300 MHz.



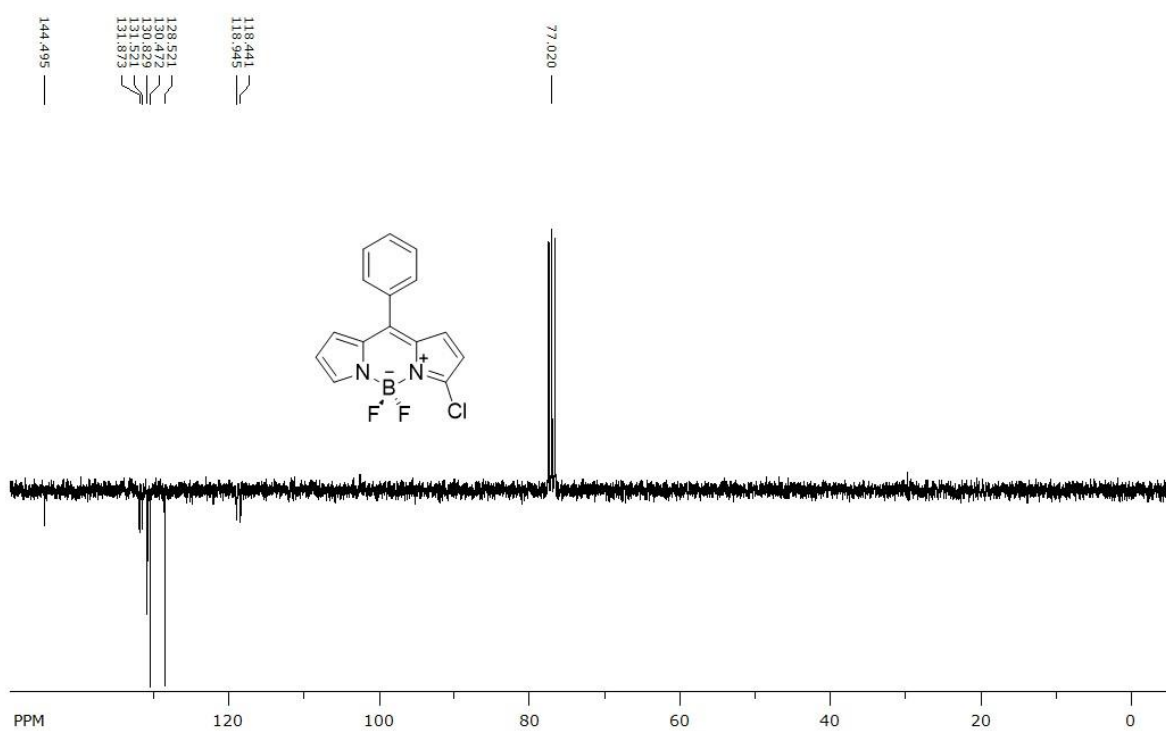
**Slika 29.**  $^1\text{H}$  NMR spektar spoja **135** snimljen u  $\text{CDCl}_3$  kao otapalu, 600 MHz.



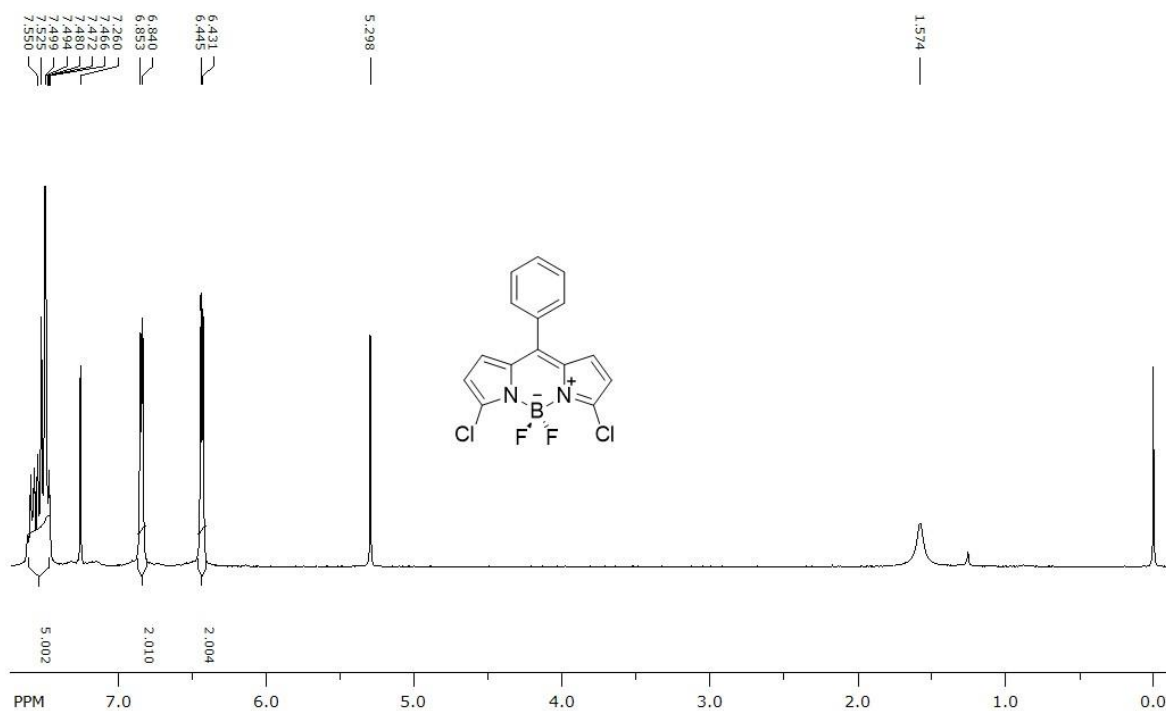
**Slika 30.**  $^{13}\text{C}$  NMR spektar spoja **135** snimljen u  $\text{CDCl}_3$  kao otapalu, 150 MHz.



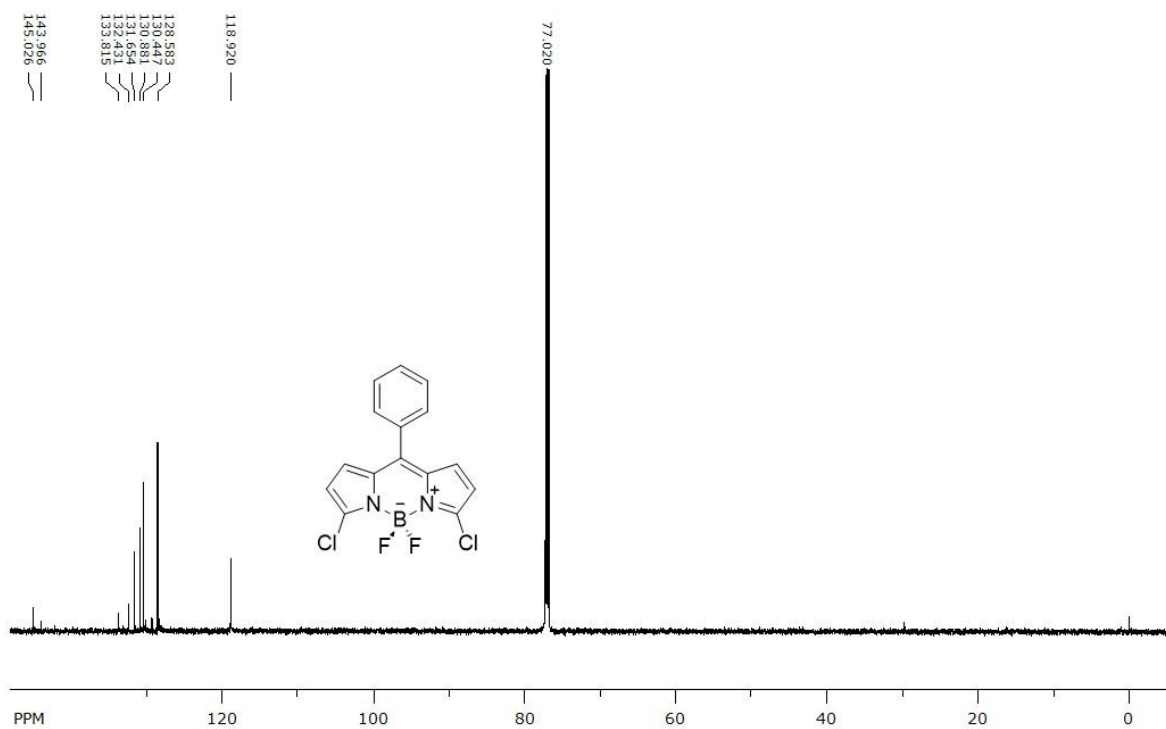
Slika 31.  $^1\text{H}$  NMR spektar spoja **141** snimljen u  $\text{CDCl}_3$  kao otapalu, 300 MHz.



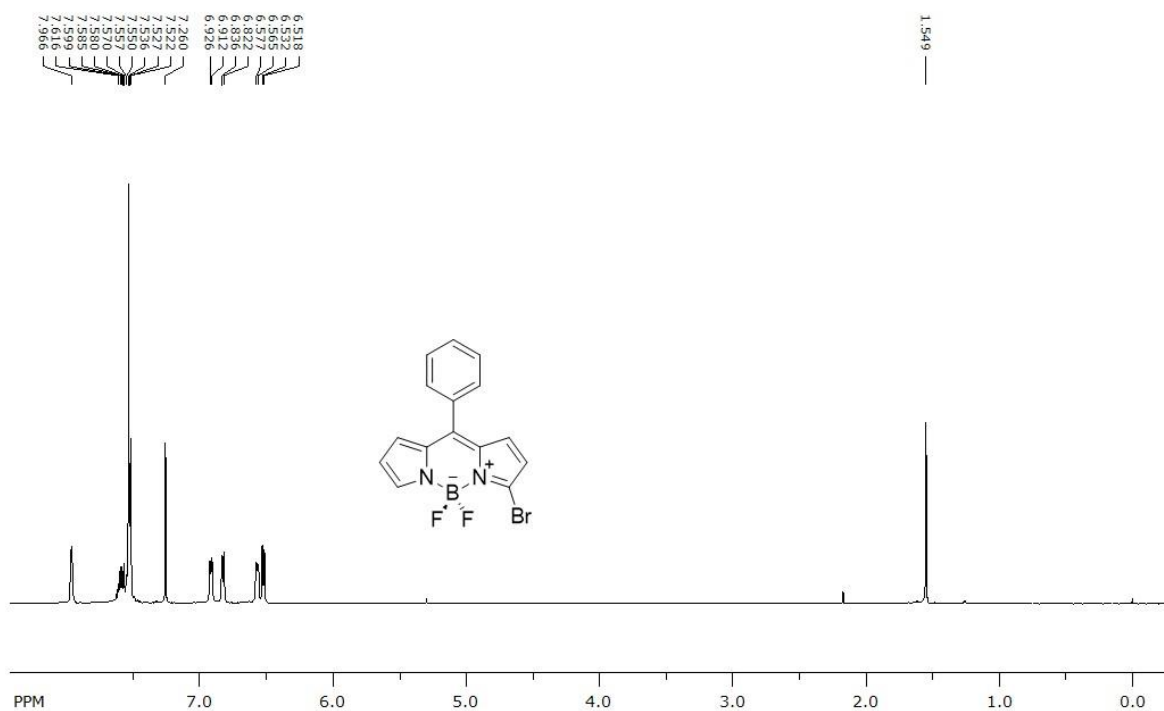
Slika 32.  $^{13}\text{C}$  NMR APT spektar spoja **141** snimljen u  $\text{CDCl}_3$  kao otapalu, 75 MHz.



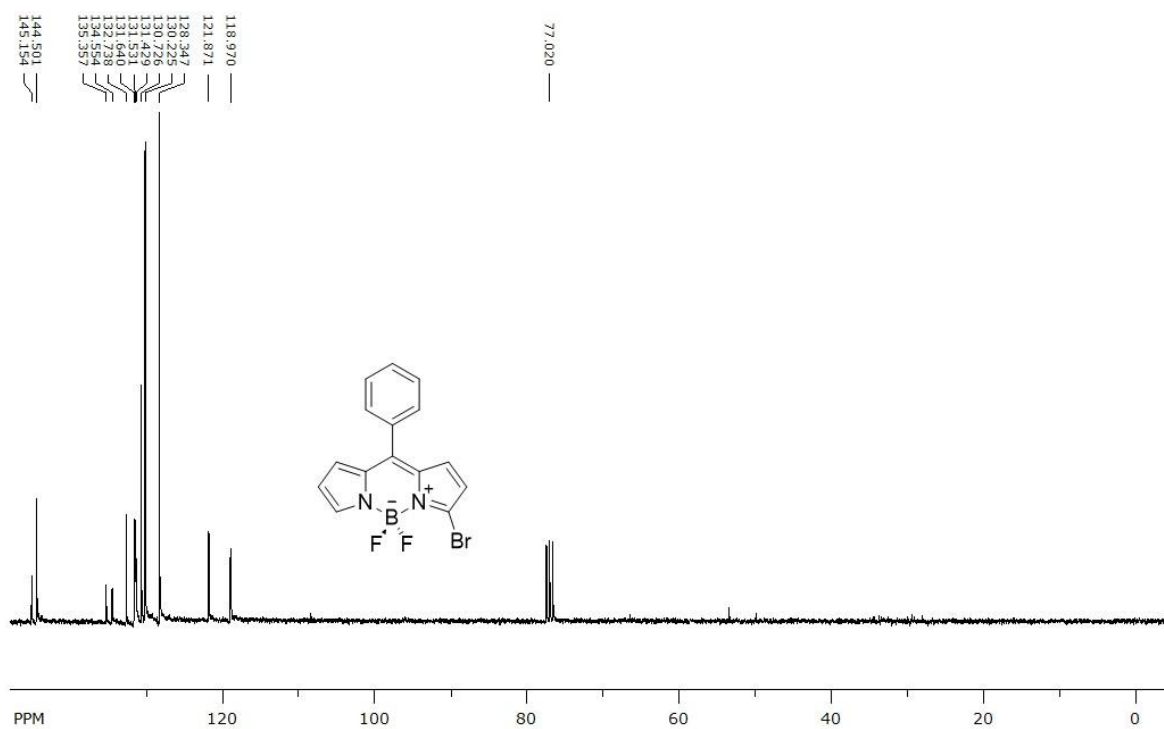
**Slika 33.** <sup>1</sup>H NMR spektar spoja **142** snimljen u CDCl<sub>3</sub> kao otapalu, 300 MHz.



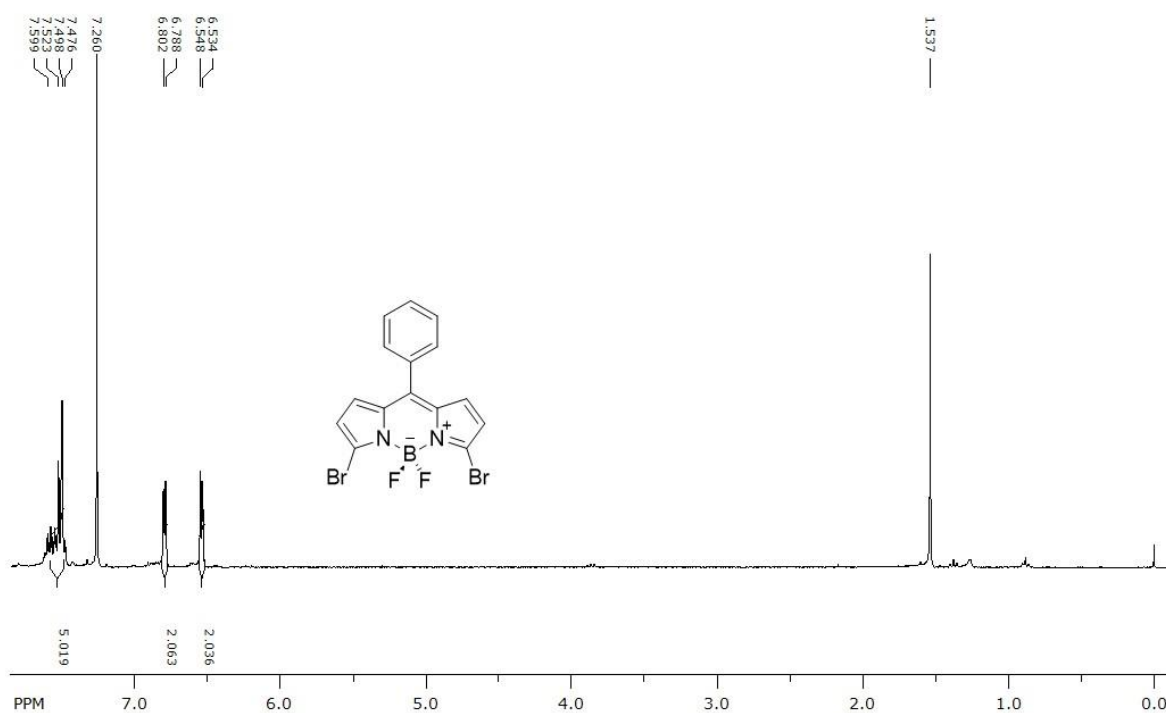
**Slika 34.** <sup>13</sup>C NMR spektar spoja **142** snimljen u CDCl<sub>3</sub> kao otapalu, 150 MHz.



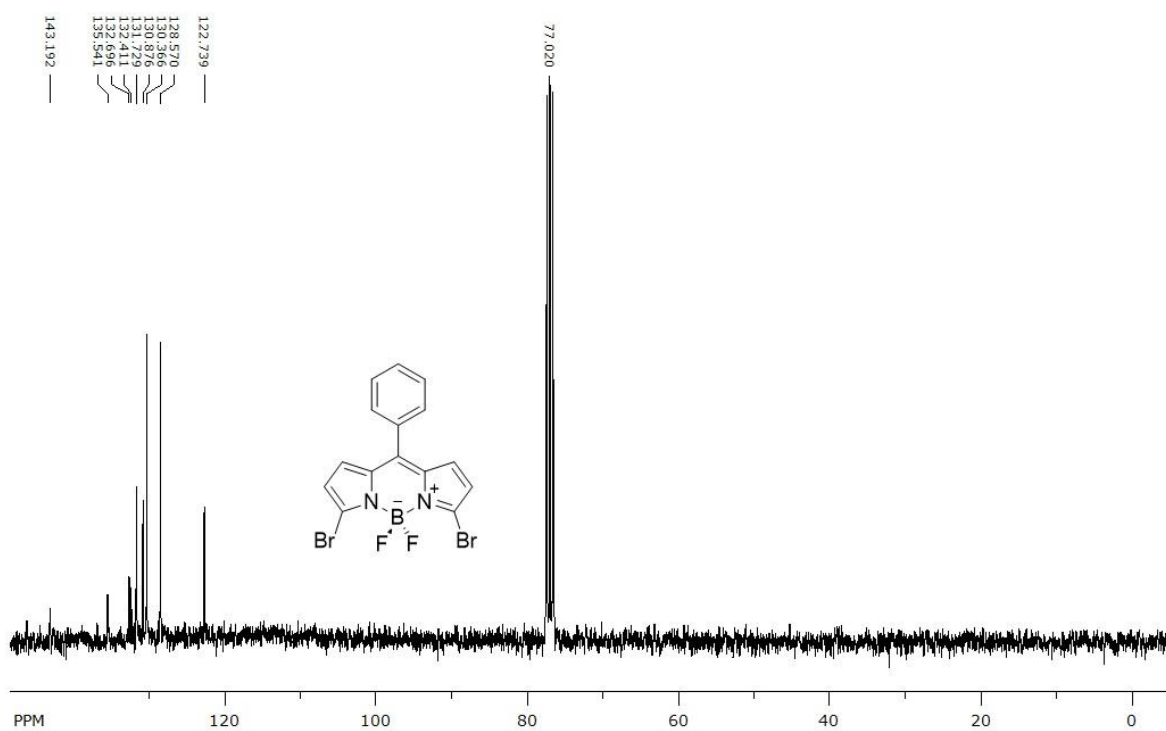
Slika 35.  $^1\text{H}$  NMR spektar spoja **155** snimljen u  $\text{CDCl}_3$  kao otapalu, 300 MHz.



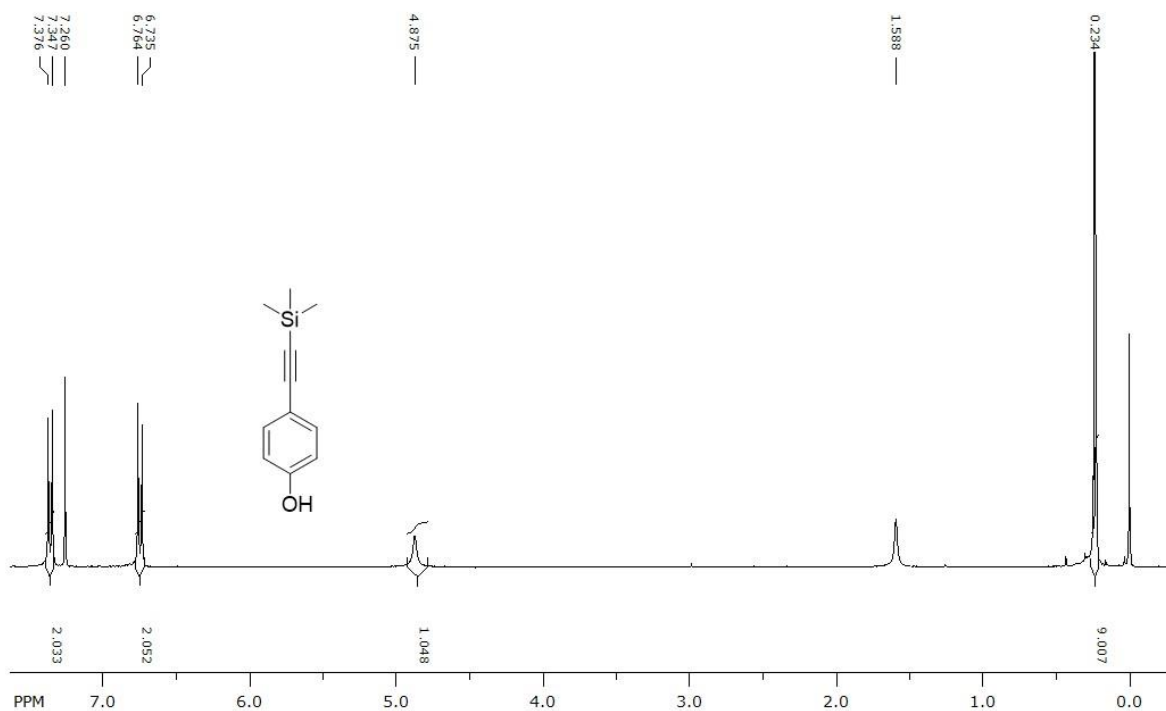
Slika 36.  $^{13}\text{C}$  NMR spektar spoja **155** snimljen u  $\text{CDCl}_3$  kao otapalu, 150 MHz.



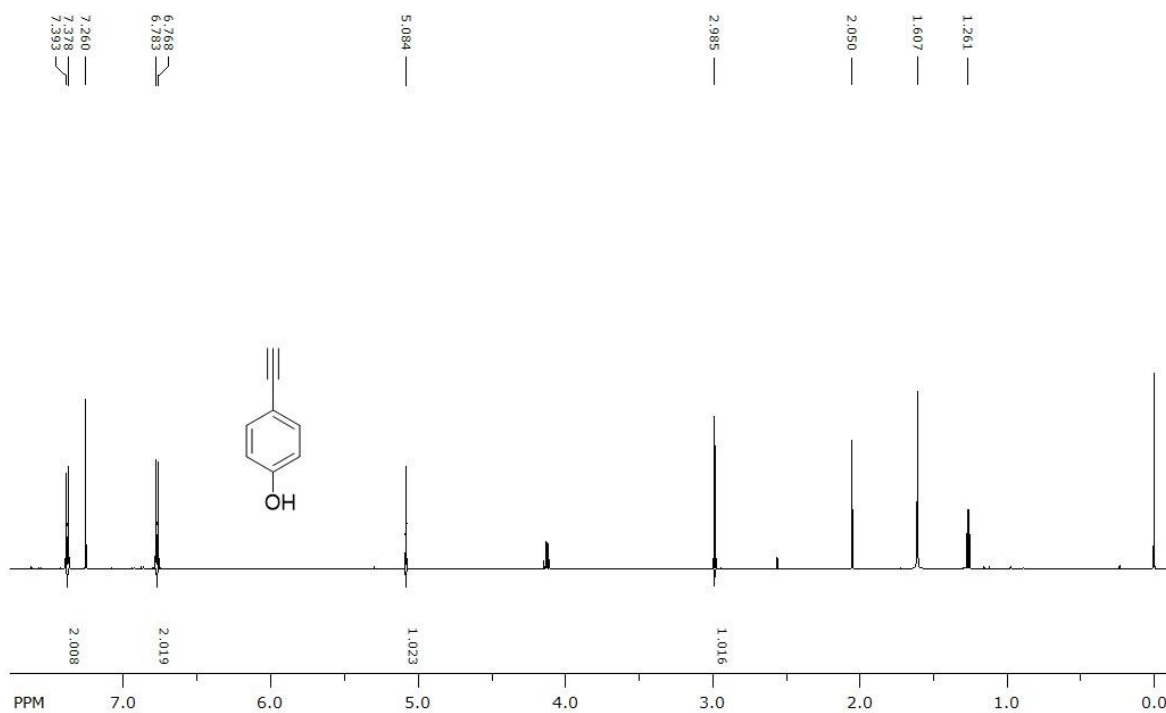
**Slika 37.** <sup>1</sup>H NMR spektar spoja **156** snimljen u CDCl<sub>3</sub> kao otapalu, 300 MHz.



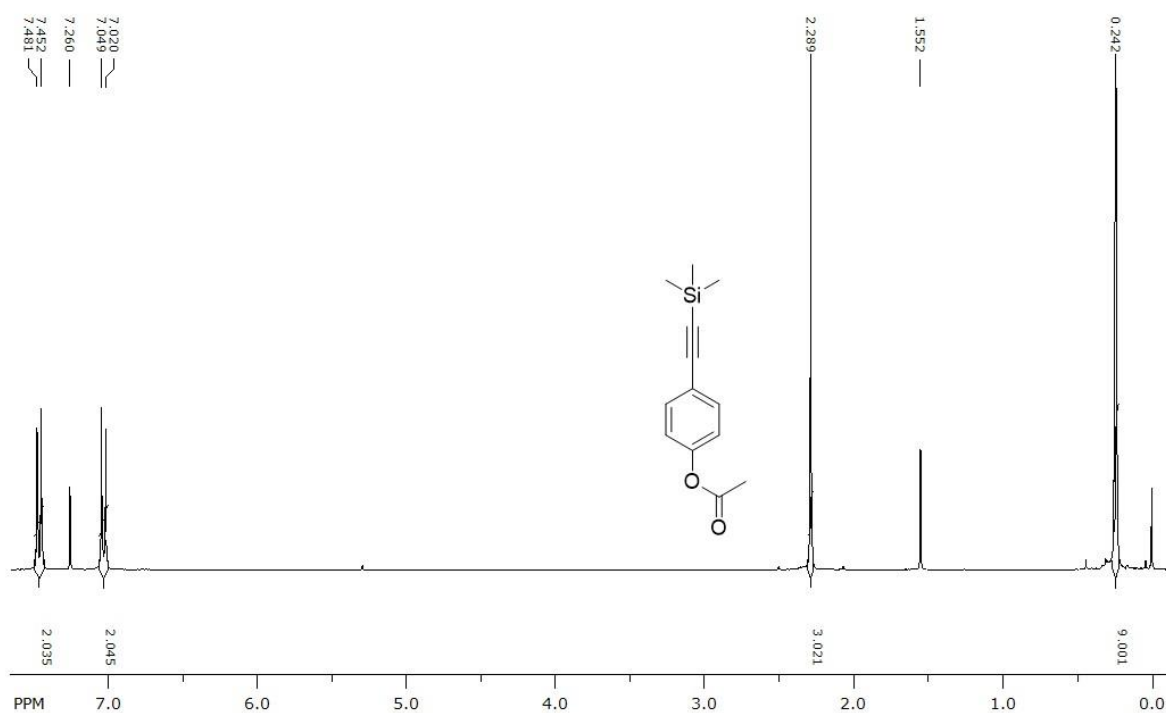
**Slika 38.** <sup>13</sup>C NMR spektar spoja **156** snimljen u CDCl<sub>3</sub> kao otapalu, 75 MHz.



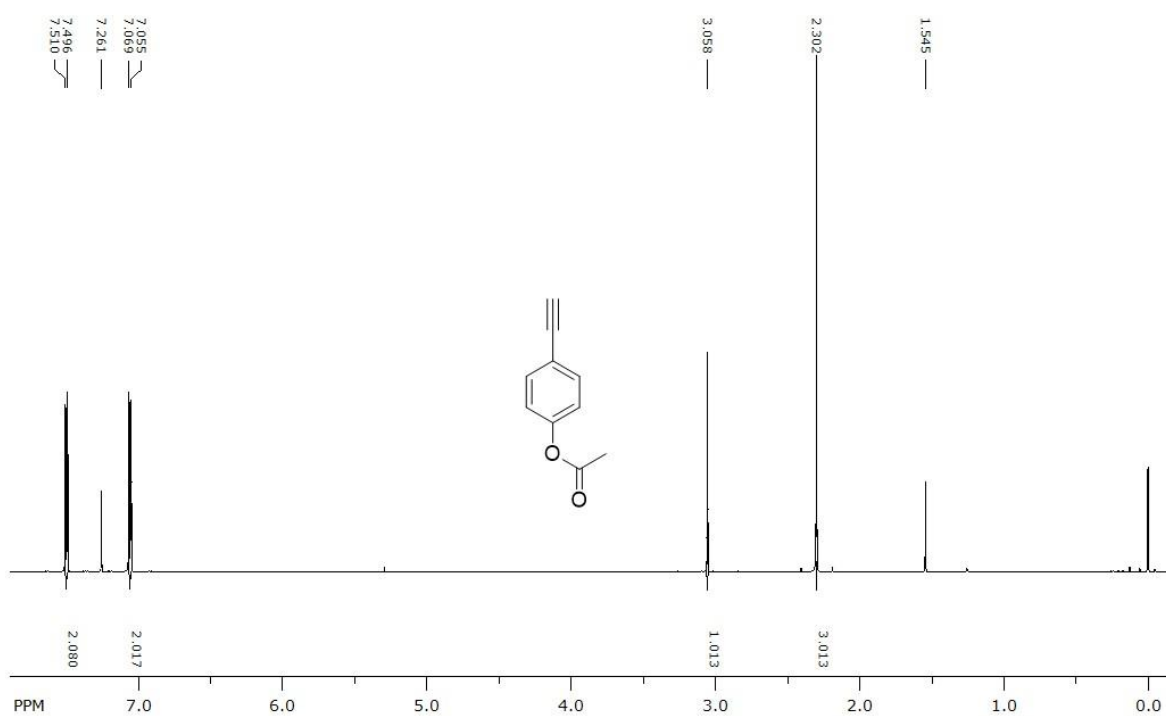
Slika 39.  $^1\text{H}$  NMR spektar spoja **147** snimljen u  $\text{CDCl}_3$  kao otapalu, 300 MHz.



Slika 40.  $^1\text{H}$  NMR spektar spoja **148** snimljen u  $\text{CDCl}_3$  kao otapalu, 600 MHz.

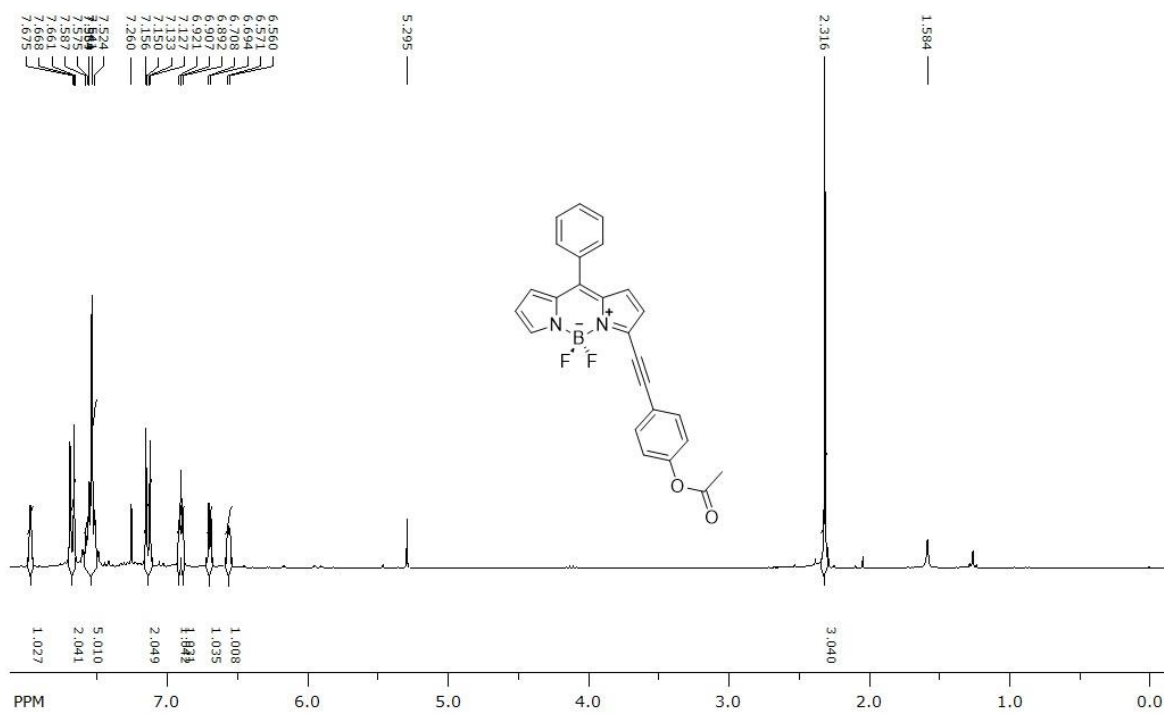


**Slika 41.**  $^1\text{H}$  NMR spektar spoja **149** snimljen u  $\text{CDCl}_3$  kao otapalu, 300 MHz.

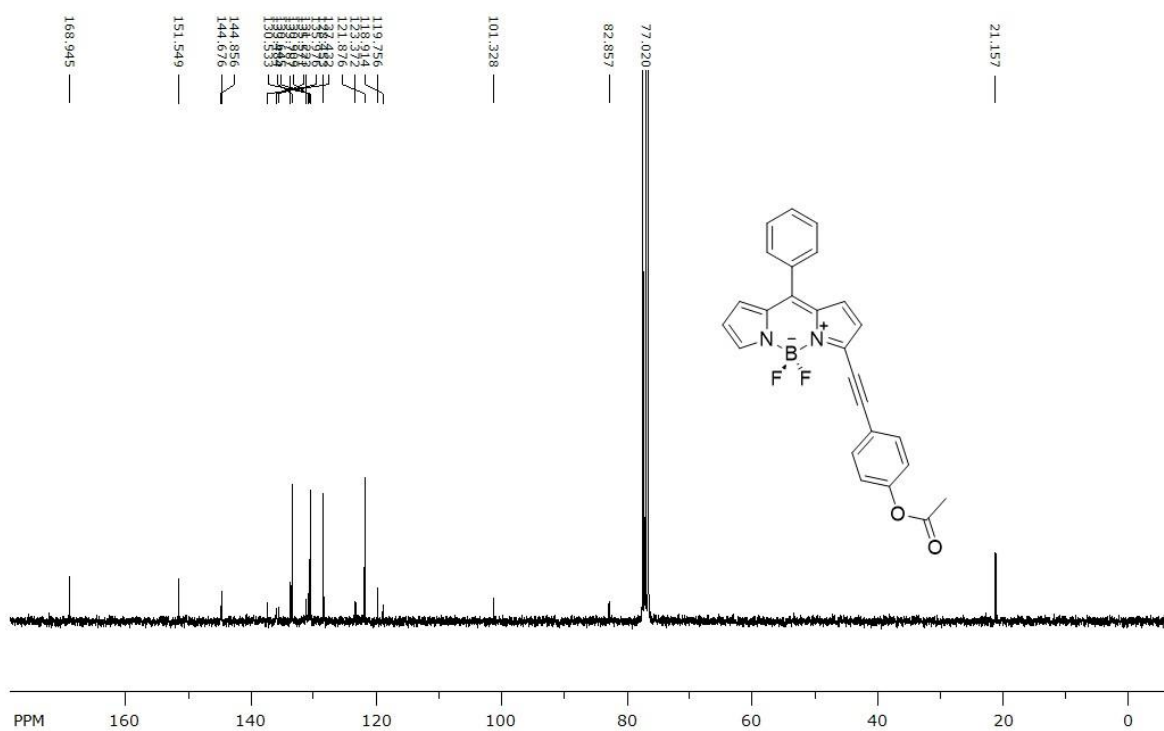


**Slika 42.**  $^1\text{H}$  NMR spektar spoja **150** snimljen u  $\text{CDCl}_3$  kao otapalu, 300 MHz.

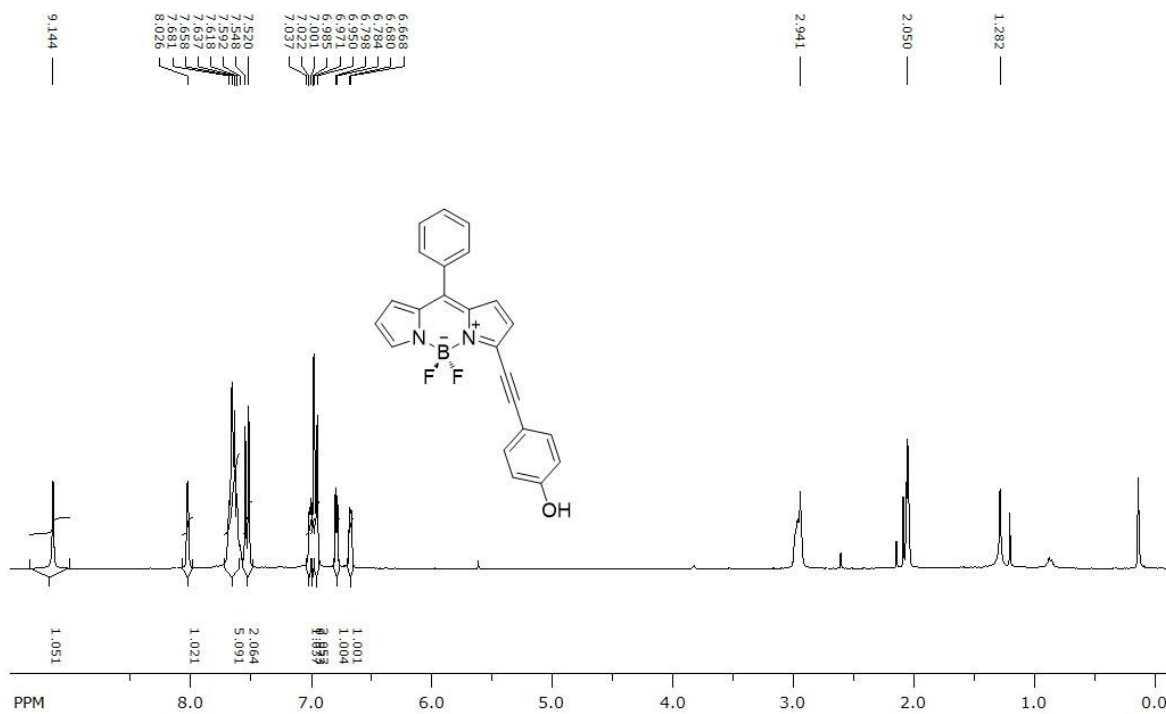




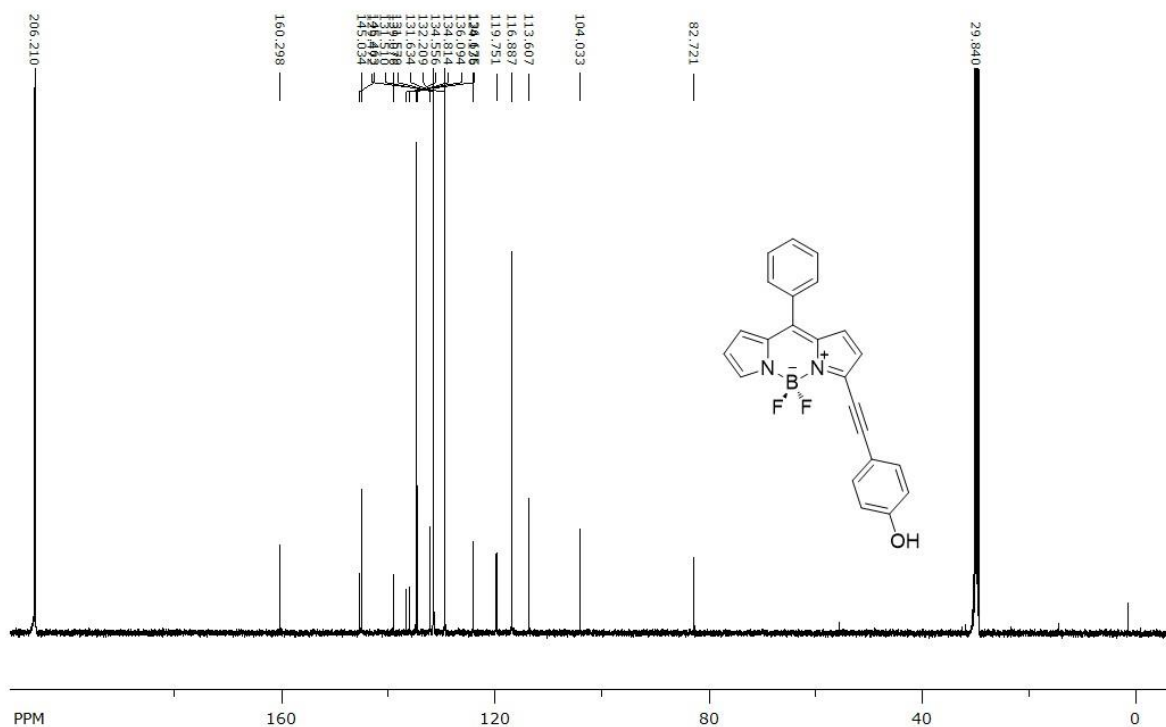
Slika 43.  $^1\text{H}$  NMR spektar spoja **152** snimljen u  $\text{CDCl}_3$  kao otapalu, 300 MHz.



Slika 44.  $^{13}\text{C}$  NMR spektar spoja **152** snimljen u  $\text{CDCl}_3$  kao otapalu, 150 MHz.

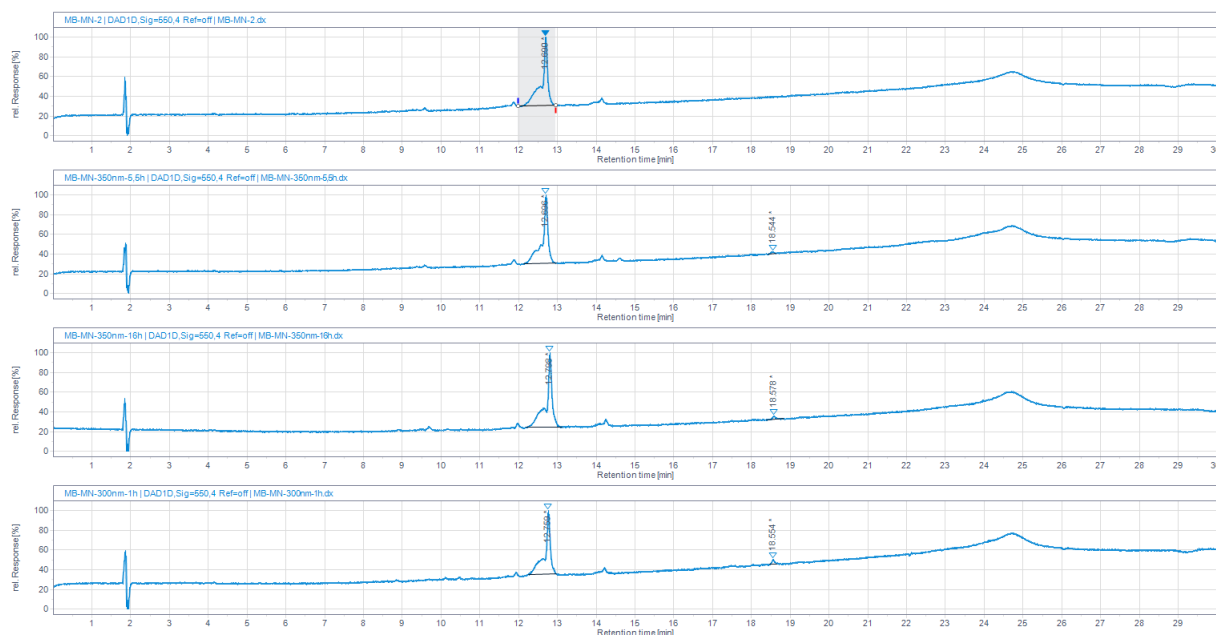


Slika 45.  $^1\text{H}$  NMR spektar spoja **151** snimljen u  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$  kao otapalu, 300 MHz.

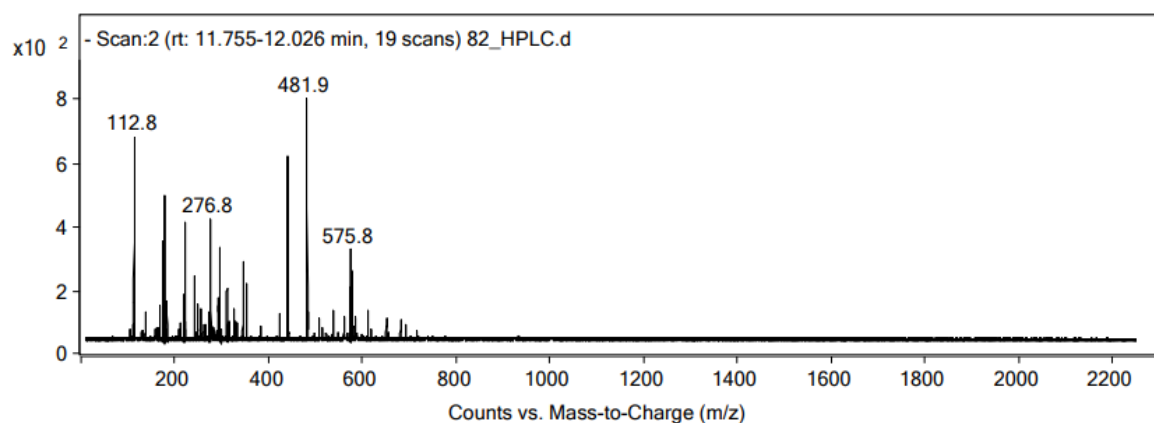
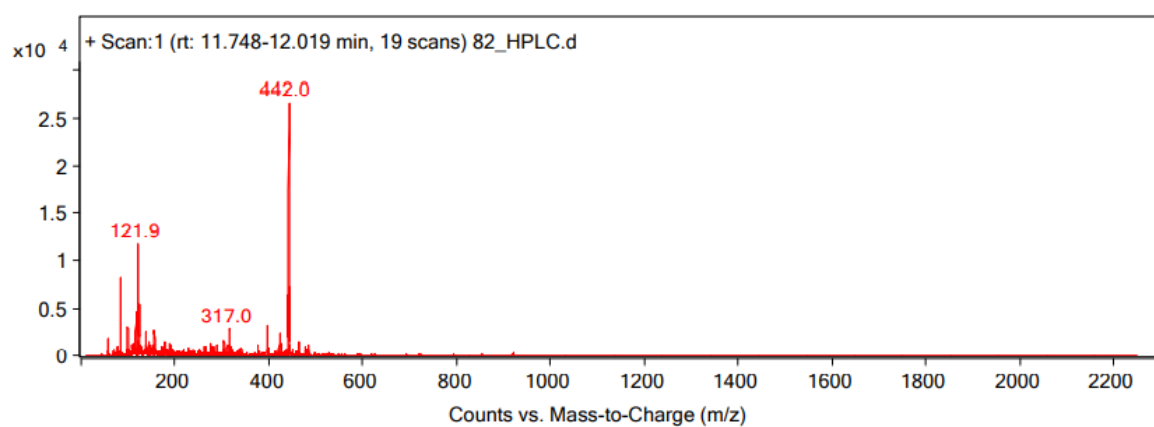


Slika 46.  $^{13}\text{C}$  NMR spektar spoja **151** snimljen u  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$  kao otapalu, 150 MHz.

## HPLC kromatogrami i MS spektri



**Slika 47.** HPLC kromatogrami osvjetljavanih otopina spoja **1b**, CH<sub>3</sub>OH i H<sub>2</sub>O (1:1 + 0,1 % TFA, 1 min), CH<sub>3</sub>OH (0→100 %, 19 min) i CH<sub>3</sub>OH (10 min). Brzina protoka = 0,8 mL min<sup>-1</sup>, a injektirani volumen otopine 10 μL.



**Slika 48.** HPLC-MS (ESI) spektri spoja **1b** (gore: + mod, dolje: - mod)

## Životopis

Rođen sam 28. 7. 1997. godine u Zagrebu. Osnovnu školu završio sam 2012. godine i upisao jezičnu XVIII. gimnaziju u Zagrebu. Maturirao sam 2016. godine i upisao preddiplomski studij na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije u Zagrebu, studij Kemija i inženjerstvo materijala. 2017. godine mijenjam studij i upisujem preddiplomski studij Primijenjena kemija na istom fakultetu. Znanstvenim radom u Laboratoriju za sintetsku organsku kemiju Zavoda za organsku kemiju i biokemiju Instituta Ruđer Bošković bavim se od 9. 9. 2019. do danas, gdje sam odradio i stručnu praksu pod mentorstvom dr. sc. Nikole Basarića. Preddiplomski studij završio sam obranom završnog rada pod mentorstvom prof. dr. sc. Irene Škorić i komentorstvom dr. sc. Marije Alešković u srpnju 2020. godine te iste upisao diplomski studij Primijenjena kemija, modul Primijenjena organska kemija.