

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE**

**Ema Horak
Martina Tireli**

**NOVI DERIVATI BENZIMIDAZO[1,2-*a*]KINOLINA KAO
POTENCIJALNE FLUORESCENTNE PROBE ZA
OBILJEŽAVANJE DNA/RNA**

Zagreb, travanj 2011.

Ovaj rad je izrađen na Zavodu za organsku kemiju Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije pod mentorstvom dr. sc. Marijane Hranjec, docentice FKIT-a i predan je na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2010. / 2011.

Popis kratica:

DNA –deoksiribonukleinska kiselina

RNA – ribonukleinska kiselina

UV/Vis – ultraljubičasta spektroskopija

NMR – nuklearna magnetska rezonancija

ctDNA - *calf thymus* DNA, tj. DNA izolirana iz *timusa teleta*

λ_{em} – valna duljina emisije

Sadržaj

1. UVOD	1
2. OPĆI DIO	3
2.1. Benzimidazoli i benzimidazo[1,2- <i>a</i>]kinolini.....	4
2.2. Biološki aktivni derivati benzimidazolil supstituiranih akrilonitrila i benzimidazo[1,2- <i>a</i>]kinolina	6
2.3. UV/Vis spektroskopija.....	17
2.4. Fluorescencija i fluorescencijska spektroskopija	18
2.5. Interakcija organskih spojeva s DNA/RNA	21
3. EKSPERIMENTALNI DIO	27
3.1. Opće napomene	28
3.2. Priprava 2-(<i>N</i> -fenil-benzimidazolil) supstituiranih derivata benzimidazola 5-6 i njihovih cikličkih derivata 7-8	29
3.3. Priprava 2-[2-(<i>N</i> -fenil)benzimidazolil]-3-(4-klorfenil)akrilonitrila 10 i njegovih cikličkih derivata 11-14	32
3.4. Priprava 2-[2-(<i>N</i> -fenil)benzimidazolil]-3-(4-nitrofenil)akrilonitrila 16 i njegovih cikličkih nitro i amino derivata 17-19	34
3.5. Priprava 2-[2-(<i>N</i> -fenil)benzimidazolil]-3-(<i>N,N</i> -dimetilaminofenil) akrilonitrila 21 i njegovih derivata	37
3.6. Ispitivanje interakcija nekih priređenih derivata s DNA/RNA	38
4. RASPRAVA I REZULTATI	40
4.1. Cilj rada	41
4.2. Sintaza ciljanih spojeva.....	42
4.3. Spektroskopska karakterizacija priređenih spojeva korištenjem UV/Vis i fluorimetrijske spektroskopije.....	53
4.4. Ispitivanje interakcije nekih priređenih derivata s DNA/RNA	60
4.5. Kristalne strukture spojeva 7 i 16	65
5. ZAKLJUČAK	68
6. ZAHVALA	70
7. LITERATURA	72
8. SAŽETAK	75
9. SUMMARY	77
10. ŽIVOTOPIS	79
11. PRILOZI	81

1. UVOD

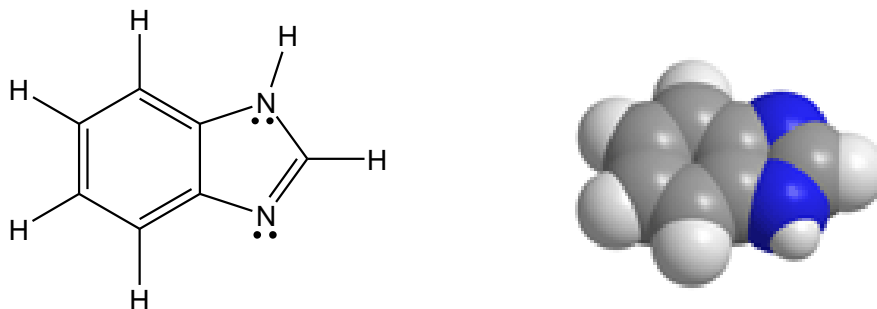
UVOD

U zadnjih nekoliko desetljeća postoji veliki interes za sintezom heterocikličkih organskih molekula. Supstituirani benzimidazoli i njihovi kondenzirani ciklički derivati zauzimaju veliku pozornost medicinskih i organskih kemičara prvenstveno zbog njihovog širokog spektra bioloških aktivnosti koje posjeduju.^{1,2,3} Interes za proučavanjem benzimidazola, heterocikla koji u svojoj strukturi sadrže dva dušikova atoma, kao i njihove biološke aktivnosti, potječe još iz 40.-tih godina prošlog stoljeća kada je potvrđeno da je benzimidazolska struktura sadržana u vitaminu B₁₂ i njegovim derivatima. Navedena klasa spojeva jedna je od najistraživanijih zahvaljujući njihovoj potencijalnoj primjeni i u drugim različitim područjima koja uključuju optoelektroniku, lasere, cijaninska bojila, optičke boje ili fluorescentne probe za obilježavanje DNA/RNA.⁴ U današnje se vrijeme optički biomarkeri naširoko koriste u biomedicini i terapiji za detekciju biomakomolekula, najviše DNA te različitih enzima i proteina.⁵ Fluorescentne metode zbog svoje visoke osjetljivosti, lake ponovljivosti i točnosti kod malih koncentracija, jedne su od najvažnijih metoda kod ispitivanja svojstava i strukture biomolekula te njihove interakcije s malim organskim molekulama.

2. OPĆI DIO

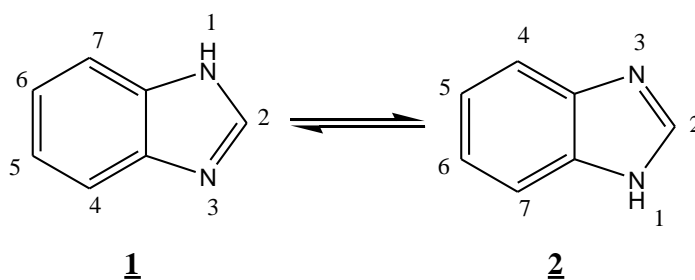
2.1. Benzimidazoli i benzimidazo[1,2-a]kinolini

Benzimidazoli su heterociklički spojevi, aromatskog karaktera koji se sastoje od peteročlanog imidazolskog prstena kondenziranog na benzensku jezgru kao što je prikazano na Slici 4.



Slika 1. Struktura benzimidazola

Postoje dvije tautomerne strukture **1** i **2**, a prema nomenklaturi broji se od dušika na koji je vezan vodikov atom.

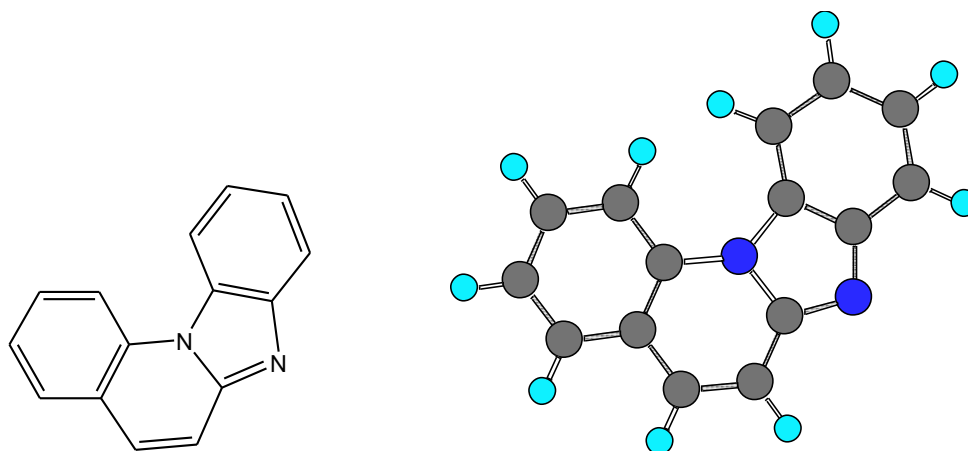


Shema 1. Dvije tautomerne strukture benzimidazolske jezgre

Supstituirani benzimidazoli i njihovi ciklički derivati zauzimaju veliku pozornost medicinskih i organskih kemičara zbog njihovog širokog spektra bioloških aktivnosti koje posjeduju. Neki od cikličkih derivata benzimidazola stupaju u interakciju s dvostrukom uzvojnicom molekule DNA u određenom i specifičnom području, imaju potencijal inhibicije aktivnosti individualnih gena, te stoga mogu biti korisni u liječenju različitih bakterijskih, viralnih, a danas naročito raširenih tumorskih bolesti

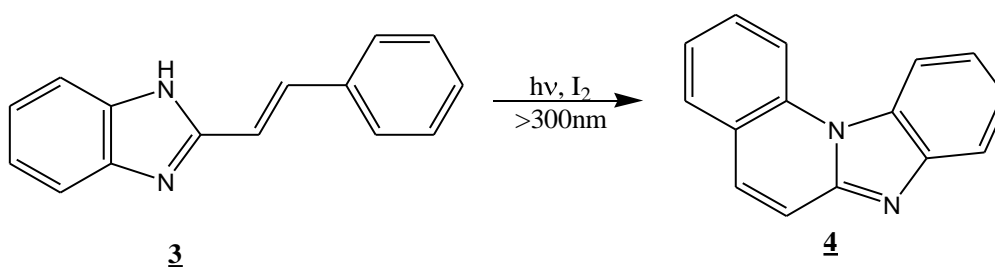
OPĆI DIO

Benzimidazo[1,2-*a*]kinolini su ciklički derivati benzimidazola čija je struktura prikazana na Slici 5. U svojoj strukturi imaju 4 aromatska kondenzirana prstena, tj. benzimidazolski prsten kondenziran s kinolinskom jezgrom^{6,7}.



Slika 2. Struktura benzimidazo[1,2-*a*]kinolina

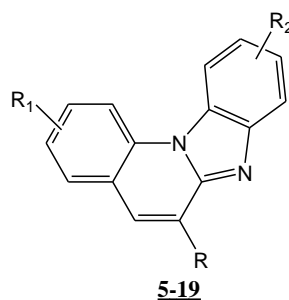
Benzimidazo[1,2-*a*]kinolini mogu se prirediti reakcijama fotokemijske dehidrociklizacije ili dehidrohalogeniranja iz odgovarajućih stiril-2-benzimidazola ili termičkim reakcijama iz odgovarajućih prekursora. Po prvi put benzimidazo[1,2-*a*]kinolin **3** priredili su G. Cooper i W. J. Irwin reakcijom fotokemijske dehidrociklizacije *trans*-2-stirilbenzimidazola **4**. Ovo je vrlo jednostavan i efikasni sintetski put za pripravu cikličkih molekula formiranjem C-N veze između *o*-C atoma fenilne i N atoma benzimidazolske jezgre.



Shema 2. Priprava benzimidazo[1,2-*a*]kinolina fotokemijskom dehidrociklizacijom

2.2. Biološki aktivni derivati benzimidazolil supstituiranih akrilonitrila i benzimidazo[1,2-a]kinolina

Njemački sintetičar D. Guenther⁸ je 1978. godine razvio i patentno zaštitio sintetsku metodu za direktno dobivanje različitih supstituiranih benzimidazo[1,2-a]kinolina. Tako je prema Slici 6. derivate benzimidazo[1,2-a]kinolina priredio reakcijom 2-alkoksibenzaldehida i 2-fenilsulfonilmetilbenzimidazola uz piperidin-acetat kao bazu. U prvoj fazi reakcije, aldolnom kondenzacijom nastaje odgovarajući derivat 2-stirilbenzimidazola, koji se ne izolira već ciklizacijom u drugoj fazi reakcije, u *o*-diklorbenzenu, daje željeni benzimidazo[1,2-a]kinolin.



Slika 3. Struktura spojeva 5-19

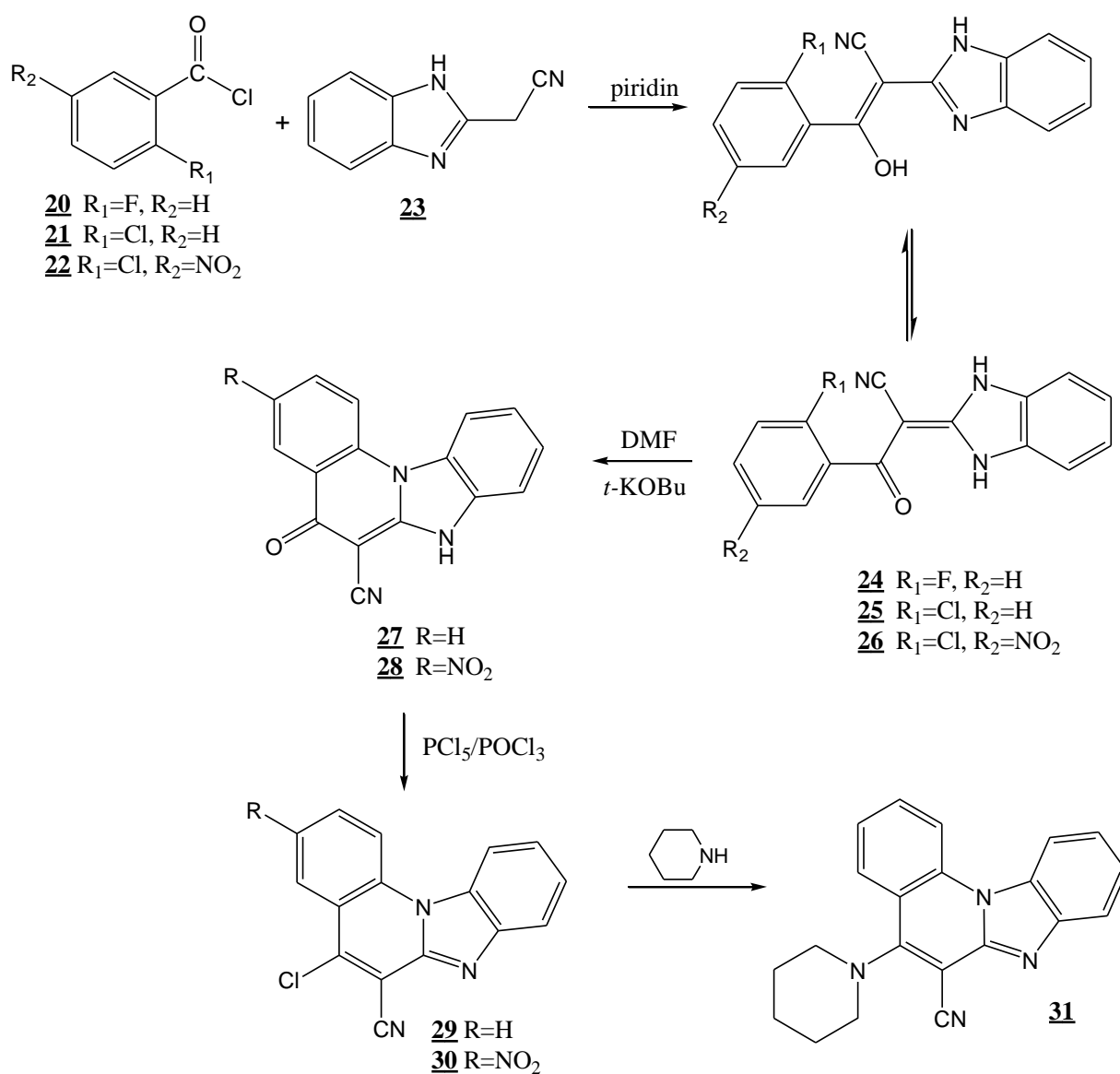
Tablica 1. Strukture spojeva 5-19

Spoj	R	R ₁	R ₂
5	SO ₂ C ₆ H ₅	H	H
6	CN	H	H
7	COOH	H	H
8	SO ₂ C ₆ H ₅	4-CH ₃ O	H
9	CN	4-CH ₃ O	H
10	CH ₃ O	H	H
11	5,6-fenil	H	5,6-fenil
12	SO ₂ C ₆ H ₅	H	NHCOCH ₃
13	SO ₂ C ₆ H ₅	H	CH ₃
14	SO ₂ C ₆ H ₅	4,5-diOCH ₃	H
15	CN	4,5-diOCH ₃	H
16	SO ₂ C ₆ H ₅	H	NO ₂
17	SO ₂ C ₆ H ₅	H	NH ₂
18	CN	H	NH ₂
19	SO ₂ C ₆ H ₅	4-NH ₂	H

OPĆI DIO

Navedene supstancije imaju vrlo dobre fluorescentne karakteristike te su pripravljene u svrhu ispitivanja njihove moguće upotrebe kao fluorescentnih optičkih bojila. Ovakva grupa spojeva, s raznim heterocikličim kromoforima koji produžuju konjugaciju i utječu na fluorescenciju, ima određena optička svojstva te se primjenjuju kao fluorescentne disperzne boje.

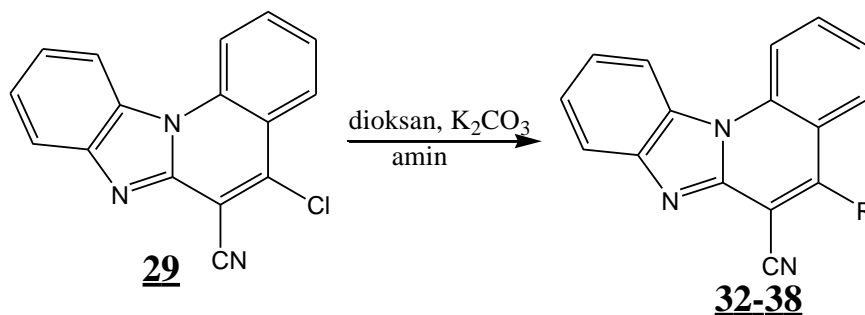
Y. M. Volovenko i suradnici⁹ pripremili su, aciliranjem 2-cijanometilbenzimidazola **23** sa derivatima benzoil-klorida u piperidinu, acikličke derivate benzimidazola, čijom ciklizacijom u DMF nastaju derivati 6-cijano-5-keto-benzimidazo[1,2-*a*]kinolina **21** i **22**. Kloriranjem spojeva **21** i **22** sa $\text{PCl}_5/\text{POCl}_3$ dobiveni su spojevi **29** i **30**. Spoj **29** refluksiranjem u dioksanu sa piperidinom daje spoj **31**.



Shema 3.

OPĆI DIO

F. S. Babichev i suradnici¹⁰ 1989. godine pripremili su seriju amino derivata 6-cijano-benzimidazo[1,2-*a*]kinolina **32-38** reakcijom nukleofilne supstitucije iz 5-kloro-6-cijano benzimidazo[1,2-*a*]kinolina **29** sa odgovarajućim aminima (Shema 4). Svi amino priređeni derivati pokazali su određeno *in vitro* antibakterijsko djelovanje na uobičajene bakterije, kvaščeve gljivice i fungalne patogene. Derivati sa R = NH(CH₂)₃NMe₂, NH(CH₂)₂NEt₂ i N(CH₂CH₂)₂NMe pokazali su se najaktivnijima.



32 R = NH(CH₂)₃NMe₂

33 R = NH(CH₂)₂NEt₂

34 R = NH(CH₂)₂N(CH₂CH₂)₂O

35 R = NH(CH₂)₂NHPh

36 R = NH(CH₂)₂C₆H₃(OMe)_{2-3,4}

37 R = NHCH₂CH₂N(CH₃)₅

38 R = NH(CH₂CH₂)₂NMe

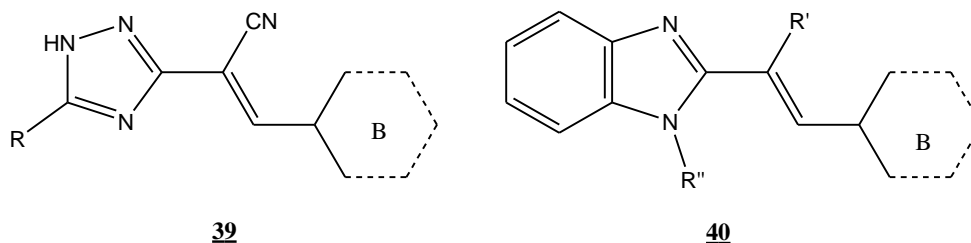
Shema 4.

1990. godine V. L. Zima i grupa ruskih autora¹¹ bavili su se proučavanjem fluorescentnih karakteristika 5-kloro-6-cijano-benzimidazo[1,2-*a*]kinolina u različitim otapalima i tijekom vezanja na proteine, u svrhu njegove potencijalne primjene kao fluorescentne probe za određivanje strukture proteina. Vezanjem na humani serumski albumin valna duljina maksimuma absorbancije pokazuje hipsokromni pomak, te dolazi do značajnog porasta u intenzitetu fluorescencije (3 puta). Promjene u polarnosti i viskoznosti otapala također utječu na maksimum fluorescencije. Vezanje spoja na proteine lizosom i papain nije uzrokovalo nikakve promjene u fluorescentnim spektrima.

F. Sączewski i suradnici¹² su sintetizirali akrilonitrile **39a-i** i **40a-r**, koji su supstituirani na položaju 2 s triazolom ili benzimidazolom, a na položaju 3 s furanskim, tiofenskim ili fenilnim prstenovima (Slika 7, Tablica 2). Svi spojevima testirana je potencijalna *in vitro* citotoksičnost na 11 staničnih linija humanih karcinoma. Također, rendgenska kristalna analiza je pokazala da su svi spojevi *E* – konfiguracije. Odnos struktura-reaktivnost (SAR) je pokazala da je položaj 2 prikladan za supstituciju s različitim dušikovim heterociklima, dok je položaj 3 jako osjetljiv na promjene. Najzanimljivijim se pokazao spoj **40b** koji sadrži 5-nitrotiofenski prsten na položaju 3 i benzimidzol na položaju 2 te spoj **39g** koji sadrži 5-benzil-1H-[1,2,4]triazol na položaju 2. Spoj **40b** je pokazao u prosjeku 10 puta veću učinkovitost od cisplatina i 3 puta veću od etoposida.

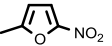
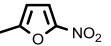
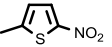
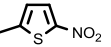
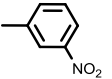
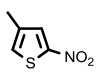
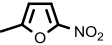
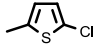
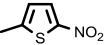
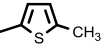
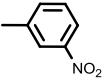
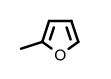
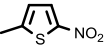
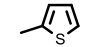
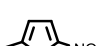
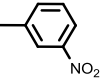
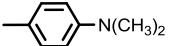
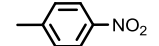
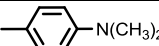
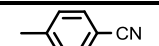
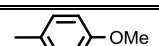
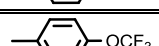
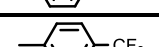
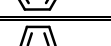
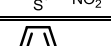
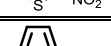
Akrilonitrilna grupa nije neophodna za citotoksičnu aktivnost; zamjena akrilonitrilne grupe vodikom ili metilnom grupom je također dala aktivne spojeve.

Selektivnost spojeva prema stanicama raka je procijenjena uspoređujući IC₅₀ vrijednosti zdravih stanica epitelne stanične linije h-TERT-RPE1 s prosječnim IC₅₀ vrijednostima od stanica raka. Spoj **39g** je pokazao prosječno 1,75 veću aktivnost prema stanicama raka.



Slika 4.

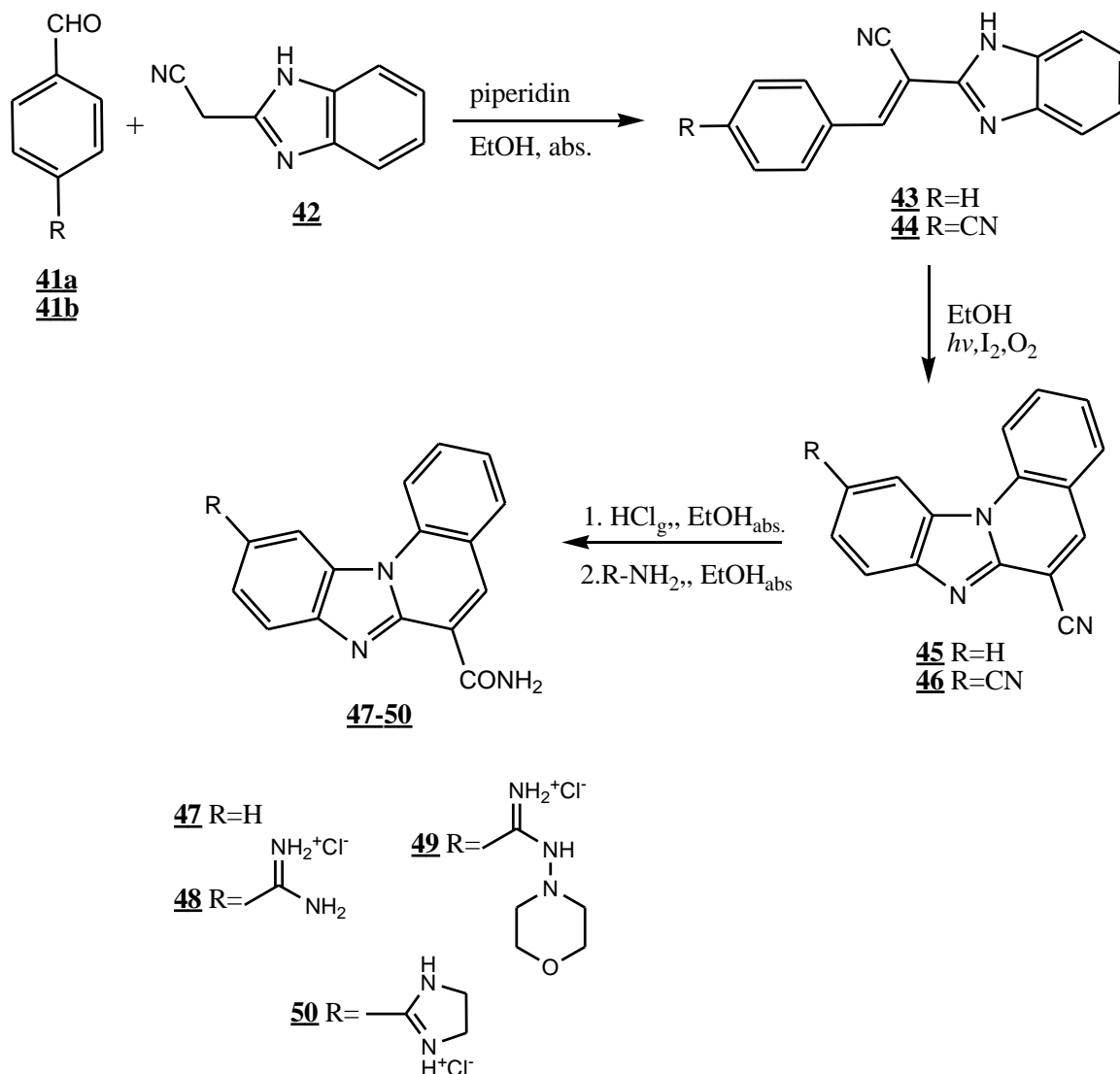
Tablica 2. Priređeni spojevi 39a-i i 40a-r

Spoj 39		Spoj 40				
indeks	R	Prsten B	Indeks	R'	R''	Prsten B
a	CH ₃		A	CN	H	
b	CH ₃		B	CN	H	
c	CH ₃		C	CN	H	
d	C ₆ H ₅		D	CN	H	
e	C ₆ H ₅		E	CN	H	
f	C ₆ H ₅		F	CN	H	
g	C ₆ H ₅ CH ₂		G	CN	H	
h	C ₆ H ₅ CH ₂		H	CN	H	
i	C ₆ H ₅ CH ₂		I	CN	H	
			J	CN	H	
			K	CN	H	
			L	CN	H	
			M	CN	H	
			N	CN	H	
			O	H	COCH ₃	
			P	H	H	
			R	CH ₃	H	

Spojevi **39a-i** su dobiveni Knoevenagelovom kondenzacijom odgovarajućih (1,2,4-triazol-3-il)acetonitrila s aldehydima u etanolu i piperidinu uz refluks. Spojevi **40a-n** su sintetizirani na isti način uz prisustvo KOH na sobnoj temperaturi. Spojevi **40p** i **40r**, koji nemaju cijano grupu, dobiveni su reakcijom 2-metil- i 2-etilbenzimidazola s 5-nitrotiofen-2-aldehidom u acet anhidridu uz refluks. U slučaju 2-metilbenzimidazola, ova reakcija je vodila nastanku *N*-acetil derivata **40o**, koji se pokazao nestabilnim u vodenom mediju i djelomično je hidrolizirao do spoja **40p**, te kao takav nije bio prikladan za biološka ispitivanja.

OPĆI DIO

M. Hranjec i G. Karminski–Zamola¹³ su sintetizirali seriju novih benzimidazolskih derivata akrilonitrila **43-44** te njihovih cikličkih derivata benzimidazo[1,2-*a*]kinolina **45-50**. (Shema 5).



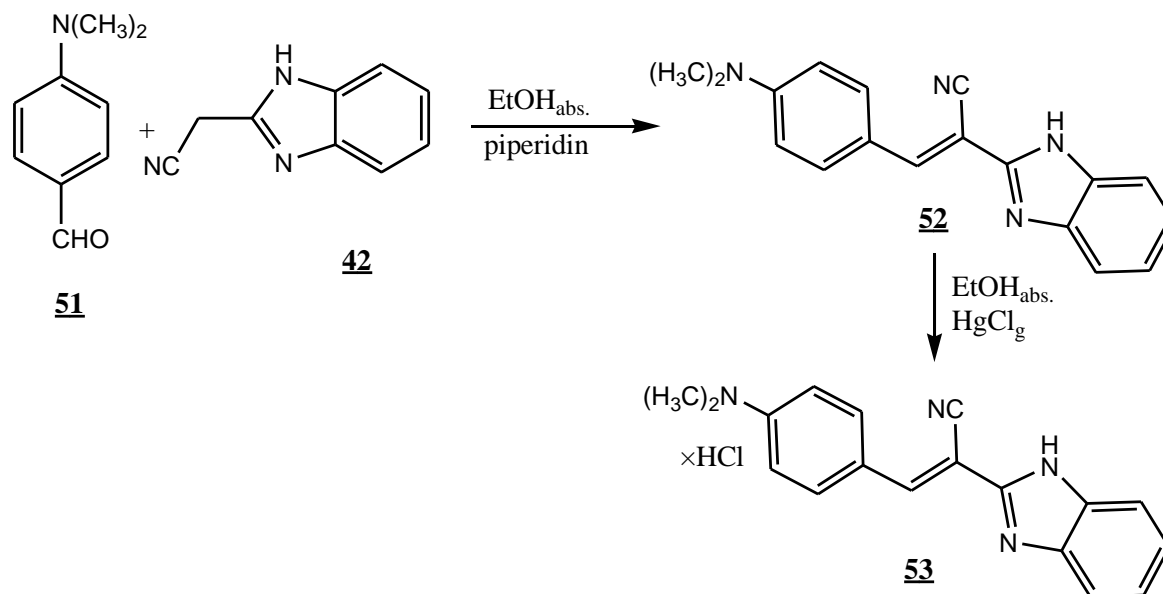
Shema 5. Priprava benzimidazolskih derivata akrilonitrila **43-44** te njihovih cikličkih derivata benzimidazo[1,2-*a*]kinolina **45-50**

Aciklički spojevi **43** i **44** dobiveni su kondenzacijom odgovarajućih aldehida **41a** i **41b** i benzimidazol-2-acetonitrila **42** u apsolutnom etanolu i uz pepiridin kao katalizator, te podliježu fotokemijskoj dehidrogenizaciji dajući odgovarajuće mono- i dicijano-supstituirane benzimidazo[1,2-*a*]kinoline **45** i **46**. Spojevi **47-50** su dobiveni Pinnerovom reakcijom u kiselim uvjetima i apsolutnom etanolu ili karbitolu kao otapalu. Pokušaj priprave monoamidino- i diamidino-supstituiranih benzimidazo[1,2-*a*]kinolina nije

OPĆI DIO

uspio, već je umjesto 6-amidino-benzimidazo[1,2-*a*]kinolina, nastao benzimidazo[1,2-*a*]kinolin-6-karboksiamid **47**. Pinnerovom reakcijom dicijano-supstituiranog benzimidazo [1,2-*a*]kinolina **46** izolirani su 2-amidino-supstituirani-benzimidazo[1,2-*a*]-kinolin-6-karboksiamidi **48-50**.

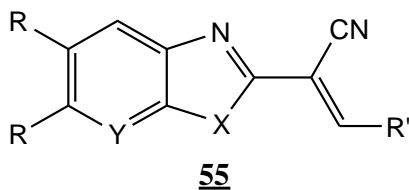
M. Hranjec i suradnici¹⁴ sintetizirali su i spektroskopski okarakterizirali benzimidazolil supstituirane akrilonitrile **52** i **53** prema Shemi 4, te odredili njihovu kristalnu strukturu i interakciju s DNA.



Shema 6.

Spojevi su dobiveni reakcijom 4-*N,N*-amino-dimetilbenzaldehida **51** i 2-cijanometilbenzimidazola **42**. Interakcija spoja **53** s ct-DNA određena je fluorescencecijom i određivanjem temperature taljenja. Emisijski spektri snimljeni u odsutnosti i prisutnosti ct-DNA, pri različitim vrijednostima *r* (spoj/polinukleotid) te je spoj **53** je pokazao pad intenziteta fluorescence i snažan hipokromni efekt. Eksperiment s temperaturom taljenja su pokazali slabu stabilizaciju dvostruke uzvojnice, a da bi se utvrdili načini vezivanja s DNA, potrebno je provesti dodatna ispitivanja.

Franciszek Sączewski i suradnici¹⁵ su sintetizirali 18 novih 2,6-disupstituiranih akrilonitrila i 2 nova derivata (benzimidazol-1-il)-acetamida, i istražili njihova antibakterijska i citotoksična svojstva na 12 staničnih linija ljudskog raka (Slika 8, Tablica 3). Na Slici 8. i Shemi 7. prikazana je sinteza 2-benzimidazolil supstituiranih akrilonitrila **54a-r**.

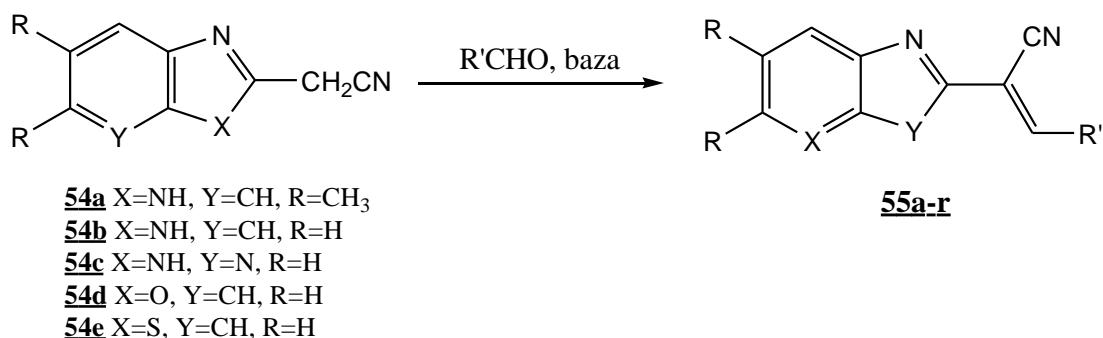


Slika 5.

Tablica 3. Struktura spojeva 55a-r

Spoj	X	Y	R	R'	Spoj	X	Y	R	R'
a	NH	CH	H		j	O	CH	H	
b	NH	CH	CH ₃		k	S	CH	H	
c	NH	CH	H		l	NH	N	H	
d	NH	CH	H		m	O	CH	H	
e	NH	CH	H		n	S	CH	H	
f	NH	CH	H		o	NH	N	H	
g	NH	CH	H		p	O	CH	H	
h	NH	CH	H		r	S	CH	H	
i	NH	N	H						

Spojevi **55a-r** su dobiveni su Knoevenagelovom kondenzacijom (azol-2-il)acetonitrila **54a-e** s odgovarajućim heteroaromatskim aldehidima, prema Shemi 7.



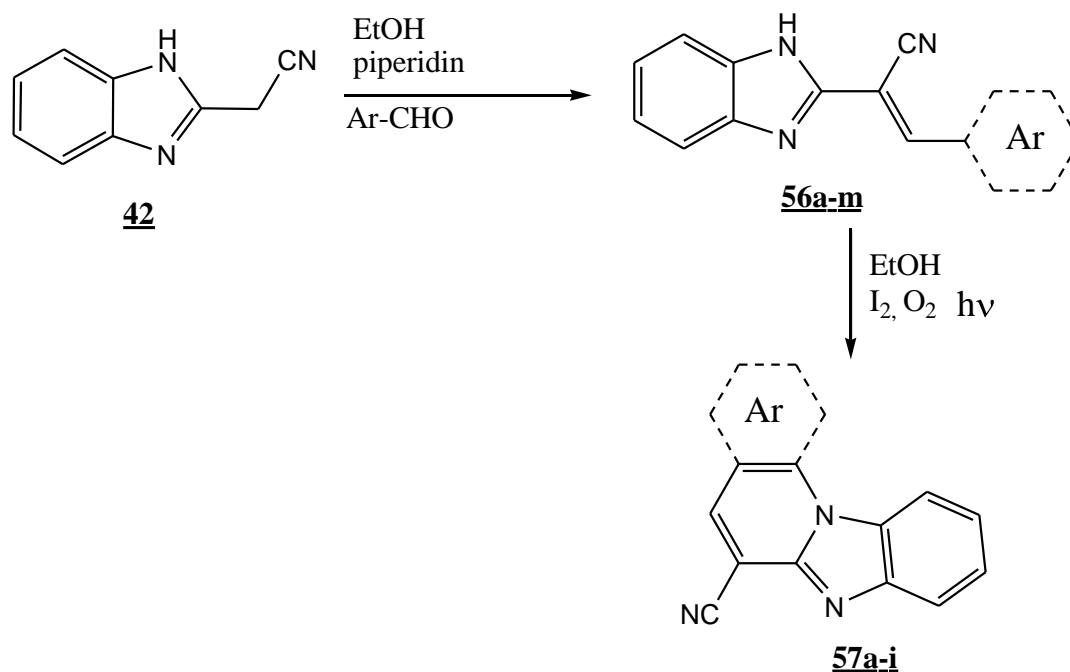
Shema 7.

Spojevi **55a-h** su priređeni su u etanolu, iz acetonitrila **54a-b** i odgovarajućih aldehida, na sobnoj temperaturi i u prisustvu KOH kao katalizatora. Analogna kondenzacija acetonitrila **54c** s aromatskim aldehidima bi se trebala odvijati pri povišenim temperaturama i refluksu, međutim, u ovom eksperimentu produkti nisu uspješno izolirani. Kakao Knoevenagelova

OPĆI DIO























kondenzacija jako ovisi o izboru otapala, za dobivanje spojeva **55i**, **55l** i **55o** se koristilo jako dipolarno, aprotično otapalo, DMF, i piperidin kao katalizator, a eksperiment se odvijao pri sobnoj temperaturi s iskorištenjima od 15-28%. Spojevi **55j-k**, **55m-n** i **55p-r** su dobiveni s dobrim iskorištenjima reakcijom acetonitrila **54d-e** s odgovarajućim aldehidima u etanolu i u prisutnosti trietilamina.

M. Hranjec i suradnici¹⁶ su proučavali 2,3-disupstituirane akrilonitrilne derivate benzimidazola, benzimidazo[1,2-*a*]kinolin-6-karbonitrile i heteroaromske fluorene, dobivene prema Shemi 8. Svi spojevi osim **57a** i **57c** su pokazali antiproliferativnu aktivnost, tj. u prisustvu tih spojeva stanice su rasle usporeno, a posebno jaku aktivnost na sve stanične linije humanih karcinoma te selektivnost prema liniji stanica HeLa je pokazao spoj **56m** i njegov ciklički analog **57i**. Otvoreni i zatvoreni derivati benzimidazola ne pokazuju veće razlike u biološkoj aktivnosti, dobro se vežu na ct-DNA, te se pretpostavlja da njihova antitumorska aktivnost proizlazi iz interakcije s DNA. Cijano grupa je važna za aktivnost spojeva, ali nije presudna za njihovu selektivnost. Ciklički analozi benzimidazola, kao što su benzimidazo[1,2-*a*]kinolini ili benzimidazo[1,2-*a*]kinazoli se lako mogu smjestiti između odgovarajućih parova baza u molekuli DNA, zahvaljujući svojoj planarnoj strukturi. Ovakvi spojevi imaju potencijalnu primjenu kao fluorescentne probe pri obilježavanju i detekciji bioloških makromolekula kao što su DNA, RNA, te razni enzimi i proteini.



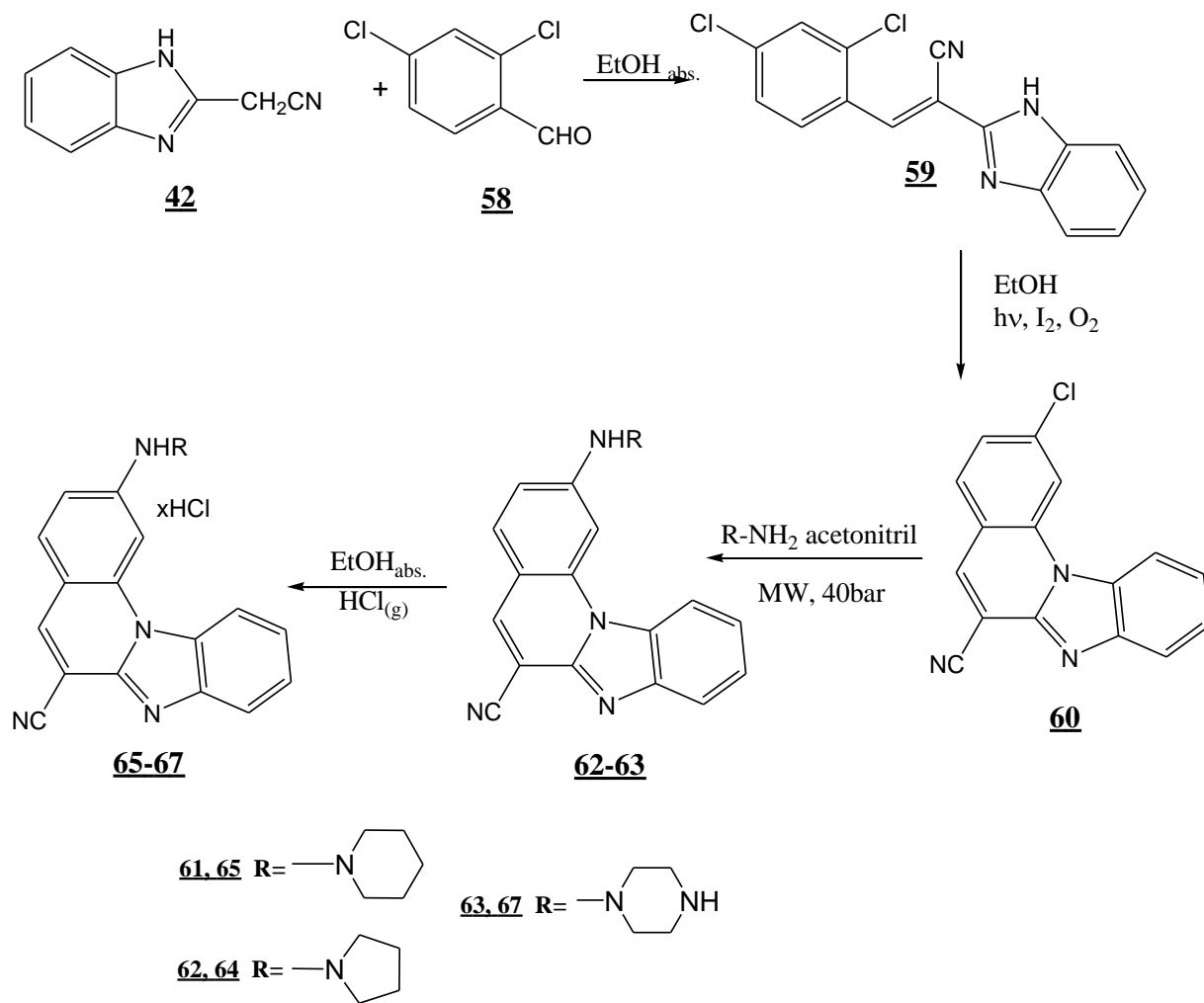
Shema 8. Pripravljene spojevi **56a-m** i **57a-i**

Tablica 4. Struktura aromatskih prstena u spojevima 56a-m i 57a-i

Spoj		Spoj	
56	Ar	57	Ar
a		a	
b		b	
c		c	
d		d	
e		e	
f		f	
g		g	
h		h	
i		i	
j			
k			
l			
m			

N. Perin i suradnici¹⁷ su 2011. godine sintetizirali nove benzimidazo[1,2-*a*]kinoline supstituirane piperidinom, piroolidinom i piperazinom **58-67** koristeći nekatalitičku aminaciju mikrovalnim zagrijavanjem. (Shema 9.) Fluorescencijskom spektroskopijom su proučavana spektroskopska svojstva dobivenih spojeva u prisutnosti ct-DNA. Usporedbom vezivajućih svojstava amino supstituiranih benzimidazo[1,2- α] kinolina na ct-DNA uočio se značajan rast intenziteta fluorescencije, te stoga dobiveni spojevi imaju potencijalnu primjenu kao DNA-specifične fluorescentne probe. Njihovo istraživanje je vrlo značajno jer danas optički markeri imaju široku primjenu u biokemijskim i medicinskim studijama za detekciju biološki važnih molekula kao što su DNA, RNA, proteini i enzimi. Koristeći mikrovalnu sintezu, vrijeme reakcija se značajno smanjilo u odnosu na konvencionalno zagrijavanje, a iskorištenja reakcija povećala.

OPĆI DIO



Shema 9.

2.3. UV/Vis spektroskopija

UV-Vis spektroskopija je apsorpcijska ili refleksijska spektroskopska metoda u ultraljubičastom vidljivom dijelu spektra. Apsorpcija ili refleksija u vidljivom dijelu spektra izravno utječe na boju uzorka koju uočavamo¹⁸. Ova spektroskopska metoda je komplementarna fluorescencijskoj spektroskopiji. Naime, fluorescencijska spektroskopija se temelji na elektronskim prijelazima u molekuli iz pobuđenog u osnovno stanje, dok se UV/Vis spektroskopija temelji na elektronskim prijelazima iz osnovnog u pobuđeno stanje. Spektroskopijom vidljivog zračenja se proučavaju efekti prouzrokovani promjenom elektronske strukture atoma ili molekula te njihova elektronska struktura, kao i elektronska struktura kristaliničnih i amorfni tvari. Vidljivo zračenje emitiraju objekti čija je toplinska energija atoma ili molekula jednaka ili veća energiji pobuđenja njihovih elektrona.

Organski spojevi, a osobito spojevi s visokim stupnjem konjugacije, apsorbiraju UV i vidljivi dio elektromagnetskog spektra. Za pripremu organskih uzoraka koriste se otapala koja ne apsorbiraju ili vrlo malo apsorbiraju u UV i vidljivom dijelu spektra, kao što su voda ili etanol. Polarnost i pH otapala može utjecati na apsorpcijski spektar. Danas se UV/Vis spektroskopija koristi u čitavom nizu disciplina kako bi pomogla u otkrivanju prirodne kompleksnosti. Može se koristiti za određivanje, kako kvalitativne molekulske strukture, tako i kvantitativnih karakteristika kemijskih reakcija. Za kvantitativno određivanje koncentracija nekog uzorka se koristi metoda koja slijedi Beer-Lambertov zakon:

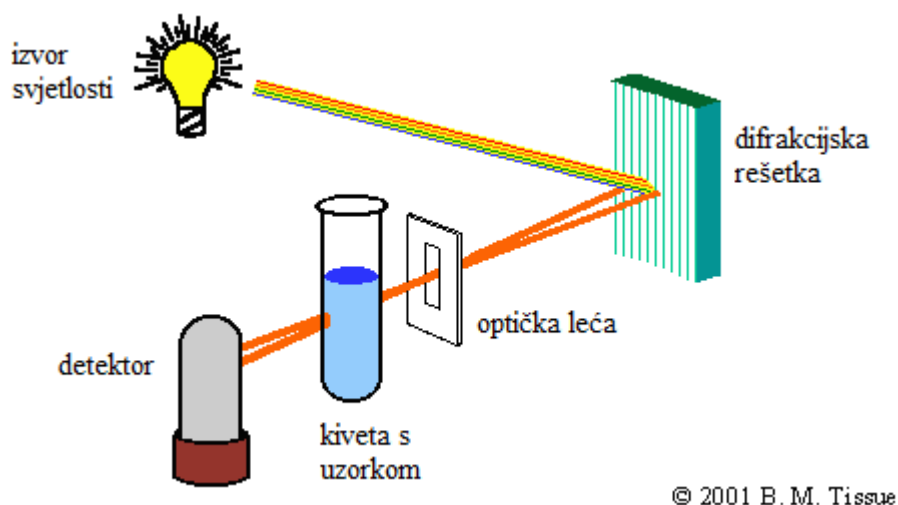
$$A = \log(I_0/I) = \epsilon * c * L^{19}$$

gdje je A apsorpcija, I_0 je intenzitet upadnog snopa zraka svjetlosti određene valne duljine, I je intenzitet izlaznog snopa zraka, L je duljina puta kojeg je svjetlost prešla, ϵ je apsorpcijski koeficijent, a c je koncentracija uzorka.

Instrument koji se koristi u UV/Vis spektroskopiji se naziva UV/Vis spektrofotometar. Instrument mjeri intenzitet zrake svjetlosti koja prolazi kroz uzorak i uspoređuje ga sa intenzitetom ulazne zrake. Dobiveni podaci pružaju informacije o strukturi materijala od kojih se uzorak sastoji. Pri sudaru fotona s molekulom analita može doći do njegove apsorpcije, ovisno o strukturi molekule i energiji (valnoj duljini) fotona. Apsorpcija smanjuje broj fotona u zraci svjetlosti, odnosno njezin intenzitet.

OPĆI DIO

Osnovni dijelovi spektrofotometra su izvor svjetla, mjesto za uzorak, monokromator ili prizma koja odvaja zrake svjetlosti određene valne duljine i detektor. (Slika 6.)

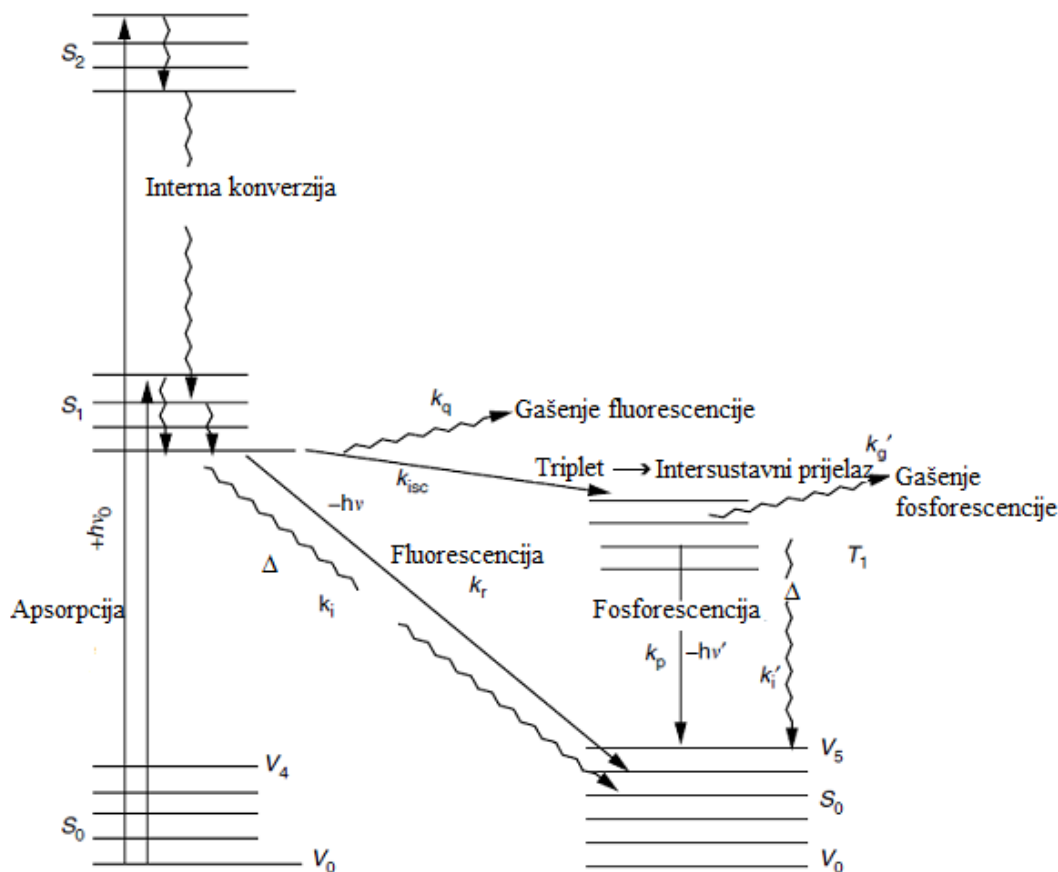


Slika 6. Shema spektrofotometra

Uzorci za UV-Vis spektrometriju su najčešće tekućine, iako se u nekim slučajevima može mjeriti i apsorpcija plinova i krutina. Uzorci se stavljaju u prozirne kivete promjera 1cm. Konstruirano je više vrsta specijaliziranih spektrofotometara, ovisno o zahtjevima korisnika.

2.4. Fluorescencija i fluorescencijska spektroskopija

Fluorescencijska spektroskopija je jedna od spektrokemijskih metoda analize pri kojoj se molekula analita pobuđuje zračenjem određene valne duljine, te ona tada emitira zračenje neke druge valne duljine²⁰. Dobiveni emisijski spektar nam pruža informacije za kvalitativnu i kvantitativnu analizu uzorka. Kada molekula apsorbira zračenje određene valne duljine, njezino elektronsko stanje se mijenja iz osnovnog stanja u jedno od pobuđenih stanja. Pobuđeno stanje je najčešće prvo pobuđeno singletno stanje S1. Unutar pobuđenog stanja molekule je nekoliko vibracijskih nivoa. Od najnižeg vibracijskog nivoa molekula se može relaksirati u osnovno stanje kroz nekoliko procesa. Jedan od procesa je upravo fluorescencija koji rezultira emitiranjem zračenja određene valne duljine, odnosno emitiranjem svjetla. (Slika 7.)



Slika 7. Elektronski prijelazi u molekuli

Osim fluorescencije, mogu se dogoditi i procesi interne konverzije, eksterne konverzije, unutarustavni prijelazi i fosforescencija²¹. Fluorescencija odgovara relaksaciji molekule iz pobuđenog singletnog stanja u singletno osnovno stanje uz emisiju svjetlosti. Životni vijek fluorescencije je vrlo kratak, oko 10^{-8} sekundi, stoga se u mnogim molekulama javljaju drugi navedeni procesi a ne fluorescencija. Valna duljina emitiranog zračenja, a to ujedno znači i jačina emitirane svjetlosti, ovisi o energetskom rascjepu između osnovnog i pobuđenog stanja molekule. Bilanca energije za fluorescenciju se može napisati kao

$$E_{\text{fluor}} = E_{\text{aps}} - E_{\text{vib}} - E_{\text{otap.relax}}$$

pri čemu je E_{fluor} energija emitiranog svjetla, E_{abs} energija apsorbiranog svjetla prilikom pobude molekule, E_{vib} energija izgubljena prilikom vibracijske relaksacije, a izraz $E_{\text{otap.relax}}$ je nastao zbog potrebe otapala koje okružuje molekulu da se reorganizira u pobuđenom stanju i ponovno reorganizira kada molekula dođe u osnovno stanje. Koje će vibracijsko stanje biti najviše pobuđeno ovisi o preklapanju valnih funkcija osnovnog vibracijskog stanja osnovnog elektronskog stanja i vibracijskih stanja pobuđenog elektronskog stanja, a opisuje se Franck-

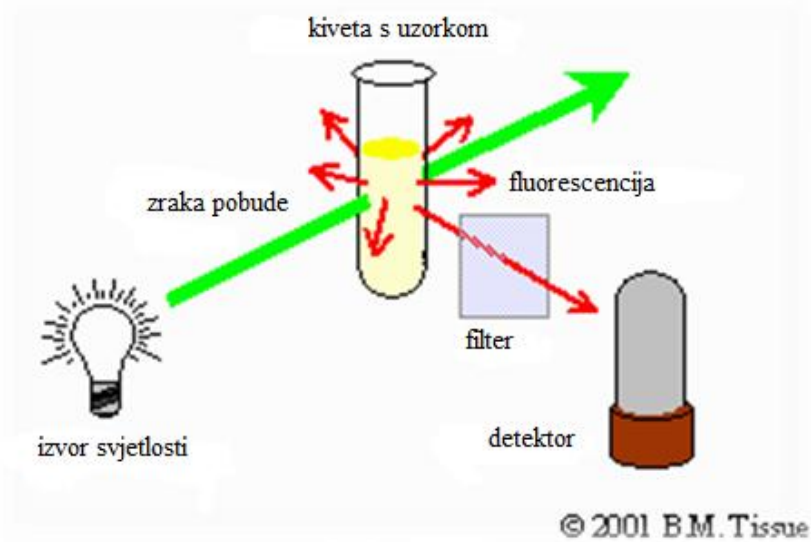
OPĆI DIO

Condonovim principom. Važno je da se tijekom svih procesa koji se događaju prilikom fluorescencije ne mijenja multiplicitet elektronskih stanja. Kako su molekule najčešće u singletnom stanju, molekula u pobuđenom stanju također mora biti u singletnom stanju. Promjena multipliciteta događa se prilikom sličnog procesa fosforescencije. Učinkovitost fluorescencije se može definirati veličinom kvantno iskorištenje Φ :

$$\Phi = N_e / N_a$$

gdje je N_e broj emitiranih fotona, a N_a broj apsorbiranih fotona.

Pojava fluorescencije se koristi u fluorescentnim žaruljama, u analitičke svrhe, za detekciju biomakromolekula i slično. Naime, tvari koje fluoresciraju mogu se detektirati pri vrlo niskim koncentracijama. U biologiji se različite stanične strukture mogu obojiti fluorescentnom bojom i tako učiniti vidljivima. Posebno je važno bojilo etidijev bromid čije se molekule vežu s molekulama DNK ulazeći između nukleotida. Instrument koji se koristi za analizu fluorescencijskom spektroskopijom se naziva fluorimetar. Tipičan fluorimetar sadrži izvor pobude, ćeliju za uzorak i detektor fluorescencije. Molekule u otopini su najčešće pobuđene UV svjetlom a izvor pobude je najčešće deuterijska ili ksenonska lampa. Svjetlost od lampe prolazi kroz monokromator koji tada propušta samo zrake određene valne duljine. Fluorescencija je dispergirana drugim monokromatorom i detektirana fotomultiplom cijevi. Skeniranjem monokromatora pobude dobivamo spektar pobude a skeniranjem fluorescencijskog monokromatora dobivamo fluorescencijski spektar. (Slika 8.)



Slika 8. Shema fluorimetra

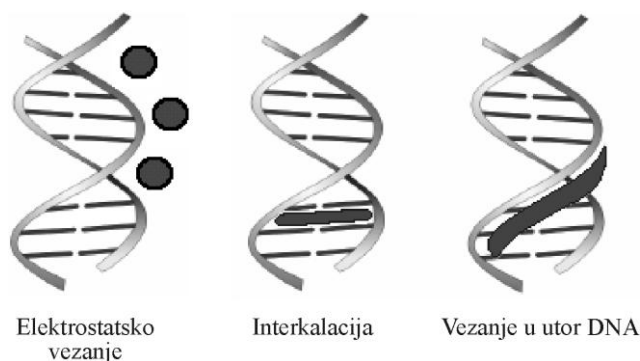
2.5. Interakcija organskih spojeva s DNA/RNA

2.5.1. Općenito o načinima i metodama ispitivanja interakcije s DNA/RNA

Fizikalna i kemijska svojstva nukleinskih kiselina te njihove interakcije s organskim molekulama predmet su intenzivnih znanstvenih istraživanja medicinskih kemičara u posljednjih nekoliko desetljeća od otkrića dvostruke uzvojnice DNA, Watsona i Cricka, kada su otkrivene temeljne strukturne i funkcijske značajke ove biološke makromolekule, između ostalog replikacija i transkripcija.²² Supstancije koje stupaju u interakciju s dvostrukom uzvojnicom molekule DNA u određenom i specifičnom području, imaju potencijal inhibicije aktivnosti individualnih gena, te stoga mogu biti korisne u liječenju različitih bakterijskih, viralnih, a danas naročito raširenih tumorskih bolesti. Svrha znanstvenih istraživanja tako je sinteza selektivnijih i aktivnijih supstancija koje će pokazati interakciju sa specifičnim sekvencama DNA molekule ili prepoznati stanice koje sadrže specifične DNA molekule.²³ Ukoliko takve supstancije imaju i svojstvo prikladno za laku detekciju, poput fluorescencije ili promjene intenziteta emisije nakon interakcije sa polinukleotidnom, područje korištenja takvih spojeva se uvelike proširuje. Tako se takvi spojevi mogu koristiti za kvalitativnu i kvantitativnu analizu nukleinskih kiselina u različitim stanicama i pod različitim uvjetima, u istraživanjima, u ekološkom nadzoru, itd.

Vežanje malih aromatskih planarnih molekula na dvostruku uzvojnici DNA može se podijeliti na **povratne** i **nepovratne** interakcije²⁴. Kod povratnih interakcija male molekule s molekulom DNA stvaraju nekovalentnim vezama kompleks:

- elektrostatskim vezanjem na negativno nabijene fosfatne skupine
- interkaliranjem između parova baza
- vezanjem u mali i veliki utor DNA

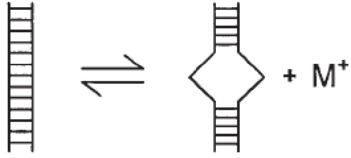
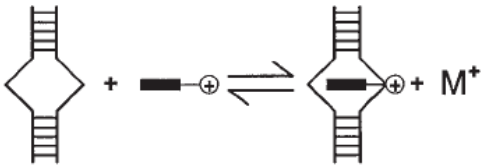
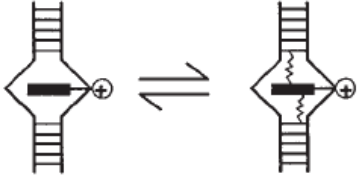


Slika 9. Načini interakcije supstancije s molekulom DNA

Vežanje organskih molekula na polinukleotide najčešće uzrokuje značajne promjene u njihovim spektroskopskim svojstvima (UV/Vis, fluorescencija, ^1H NMR).²⁵ Izozbestične točke u UV/Vis titracijama ispitivanog spoja s polinukleotidima upućuju na nastajanje samo jednog tipa kompleksa, dok smjer pomaka signala u ^1H NMR spektrima te NOE interakcije mogu pružiti niz podataka o strukturi kompleksa u vodenoj otopini. Visoka osjetljivost fluorescencijskih metoda omogućava eksperimente pri mikromolarnim i nižim koncentracijama ispitivanog spoja, tj. uvjetima sličnim onima u biološkim sustavima. Karakteristične promjene fluorescencijskih spektara nekih interkalatora po vežanju na nukleinske kiseline učinile su ih nezaobilaznim *markerima* pri radu sa genetskim materijalom.

Interkaliranje predstavlja atipičan reverzibilni način vežanja između DNA polianiona i kationa interkalatora.²⁶ Planarna organska molekula sastavljena od najmanje dvije aromatske kondenzirane jezgre, umeće se između parova baza bez kidanja vodikovih veza odnosno razdvajanja polinukleotidnih lanaca. Pri tome dolazi do izvijanja dvostruke uzvojnice kako bi se oslobodio prostor potreban za ulazak molekule interkalatora. Temeljni hipotetski model interkaliranja prikazan je prema Tablici 5.:²⁷

Tablica 5. Hipotetski model interkaliranja

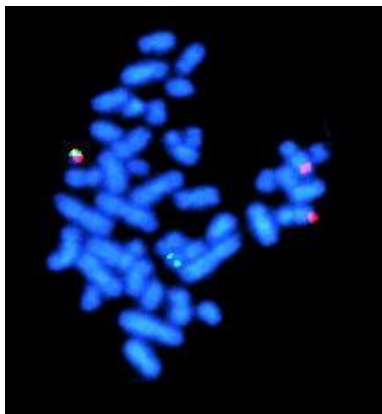
<p>Konformacijske promjene</p> 	<p>strukturne promjene DNA, formiranje šupljine, izvijanje i produljenje zavojnice</p>
<p>Hidrofobni transfer</p> 	<p>prijenos interkalatora iz otopine do DNA</p>
<p>Molekularne interakcije</p> 	<p>reverzibilno vezanje nekovalentnim interakcijama između parova baza</p>

2.5.2. Primjena fluorescentnih proba za obilježavanje DNA/RNA

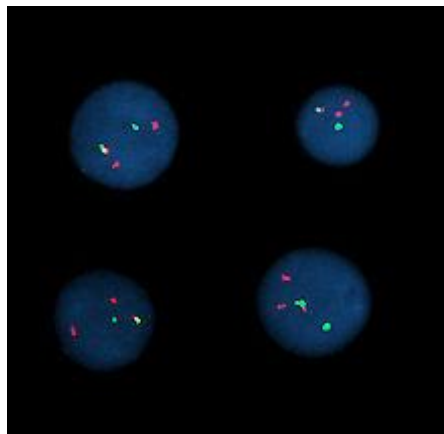
Jedna od najboljih metoda praćenja kompleksnih životnih procesa je označavanje komponenata, npr. označavanje odgovarajućih DNA sekvenci s fluorescentnim probama – malim organskim molekulama zanimljivih spektroskopskih i opričkih karakteristika. Pomoću fluorescentnog mikroskopa može se pratiti gibanje i ponašanje tako označene DNA (ili RNA, proteini i ostale stanične organelle) u nekom životnom ciklusu.

Fluorescentne probe koriste se kod određivanja slijeda nukleotida (sekvenciranje DNA). Jedna od metoda je Sangerova metoda, koja se temelji na zaustavljanju enzimatske sinteze komplementarnog lanca DNA ugradnjom ddNTP analoga nukleotida (dideoziribonukleozid-trifosfata; nedostaje im 3'-OH skupina deoksiriboze) koji su obilježeni fluorescentnim probama. Za svaku bazu gvanin, timin, citozin ili adenin postoji odgovarajući ddNTP. Koriste se i kod fluorescentne *in situ* hibridizacije (FISH), to je metoda koja se koristi u kliničkoj dijagnostici u svrhu određivanja prisutnosti specifičnih DNA sekvenca na kromosomu. Postoje utvrđeni jednolančani dijelovi DNA koji predstavljaju DNA probe a obilježeni su fluorescentnom probom tako da se mogu vidjeti pod fluorescentnim mikroskopom. Uzorak uzet od pacijenta hibridizira sa DNA probom te se promatra sa fluorescentnim mikroskopom. Na taj je način moguće utvrditi prisustvo pojedinih sekvenci u cijelom kariotipu.²⁸

a)



b)



Slika 10. Stanice u metafazi (kromosomi obojani plavo)

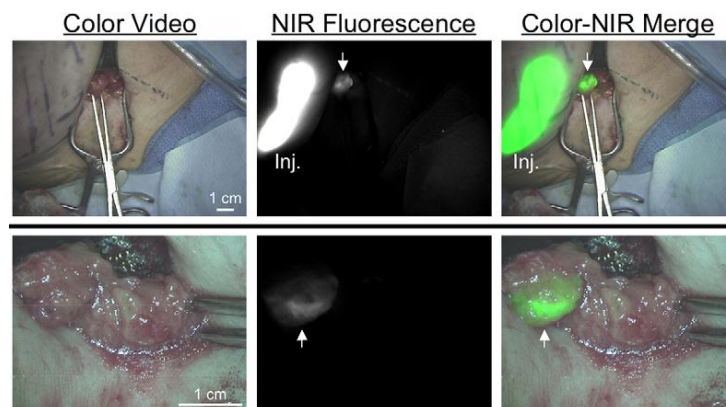
Veliku primjenu fluorescentne probe imaju u kirurškoj onkologiji.²⁹ Problem kod odstranjivanja primarnog tumora je taj što dolazi i do oštećenja okolnog zdravog tkiva.

OPĆI DIO

Upotrebom fluorescentnih proba granica između tumora i zdravog tkiva postaje jasnija, te je i samo odstranjivanje tumora lakše i učinkovitije.

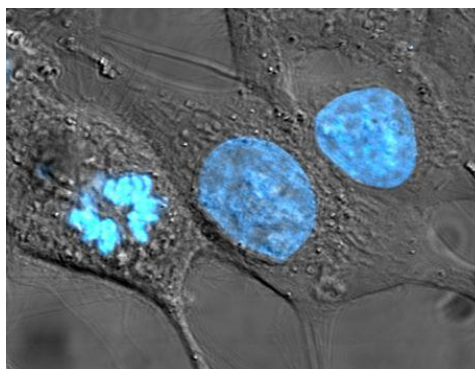
Da bi se fluorescentne probe mogle koristiti u tu svrhu moraju zadovoljavati nekoliko uvjeta:

- ❖ valna duljina emisije mora biti između 700 i 900 nm (valne duljine manje od 700 nm ne prolaze kroz tkivo, a upotreba proba sa valnim duljinama većim od 900 nm nije moguća jer voda snažno apsorbira na ovim valnim duljinama)
- ❖ kvantno iskorištenje mora biti između 0,1 i 1
- ❖ ne bi smjelo dolaziti do nespecifičnog vezanja sa staničnom membranom ili proteinima, jer bi takva nespecifična vezanja dovela da smanjenja fluorescencije same probe

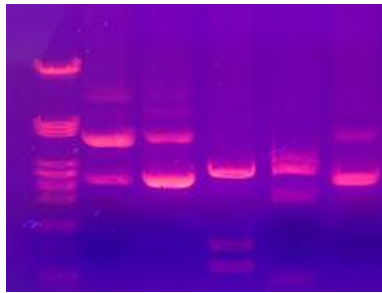


Slika 11. Upotreba fluorescentnih proba

Hoechst 33258 i Hoechst 33342 vezanjem na DNA utječu na replikaciju DNA tijekom stanične diobe, te su zbog toga mutageni i kancerogeni, pa je tijekom njihovog rukovanja potreban oprez. Ekscitacijski maksimum im je oko 350 nm a emitiraju plavo fluorescentno svjetlo na maksimumu emisije 461 nm.

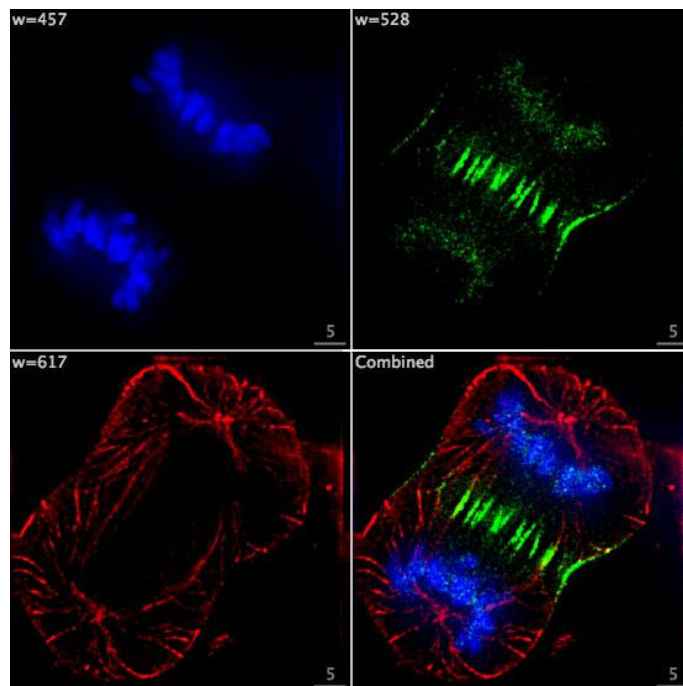


Slika 12. Stanice HeLa obojane sa Hoechst 33258 (srednja i desna stanica su u interfazi i cijela jezgra je obojana, lijeva stanica prolazi kroz mitozu i spremna je za diobu)



Slika 13. Elektroforeza na gelu: Fluorescentno bojilo etidijev bromid veže se na DNA i pokazuje područja gdje se nalazi DNA

Na Slici 14. prikazana je odvojena detekcija DNA, proteina i mikrotubula fluorescencijom u stanici humanog karcinoma. Svaki fluorofor se može detektirati odvojeno što je vrlo bitno u medicinskoj dijagnostici.



Slika 14. Odvojena detekcija DNA, proteina i mikrotubula fluorescencijom u stanici humanog karcinoma

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Opće napomene

Tališta priređenih spojeva određena su Kofler Mikroheiztisch aparatu i na Büchi 535 te nisu korigirana.

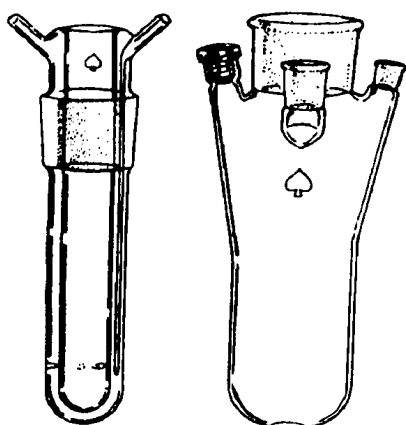
^1H i ^{13}C NMR spektri snimljeni su na spektrometrima Varian Gemini 300, na 300 odnosno 75 MHz, instrumentu Bruker AV-600, na 600 odnosno 150 MHz te Bruker Avance DRX 500 na 500 MHz. Svi NMR spektri snimani su u $\text{DMSO-}d_6$ kao otapalu, koristeći tetrametilsilan kao interni standard. Kemijski pomaci (δ) izraženi su u ppm vrijednostima, a konstante sprege (J) u Hz.

UV spektri snimljeni su na spektrofotometru Varian Cary 50 spektrofotometru a fluorescencijski spektri snimljeni su na Cary Eclipse spektrofotometru. U oba slučaja korištene su kvarcne kivete promjera 1 cm te volumena 3 cm^3 .

Reakcije potpomognute mikrovalnim zračenjem provedene su u Milestone Start S mikrovalnoj pećnici opremljenoj pyrex (1 bar) ili kvarcnim posudama (40 bar).

Fotokemijske reakcije provedene su u reaktoru s unutarnjim osvjetljavanjem (imerzijski reaktor) kod kojeg je izvor svjetla uronjen u reakcijsku otopinu a sastoji se imerzijskog dijela, koji se uranja u reakcijsku smjesu i reakcijske posude. Izrađen je od pyrexa, a između njegovih dvostrukih stjenki cirkulira rashladna voda. Kao izvor svjetlosti korištena je visokotlačna živina lampa od 400 W (kućna proizvodnja).

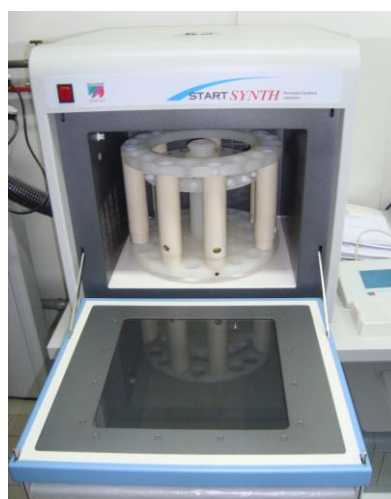
a)



1

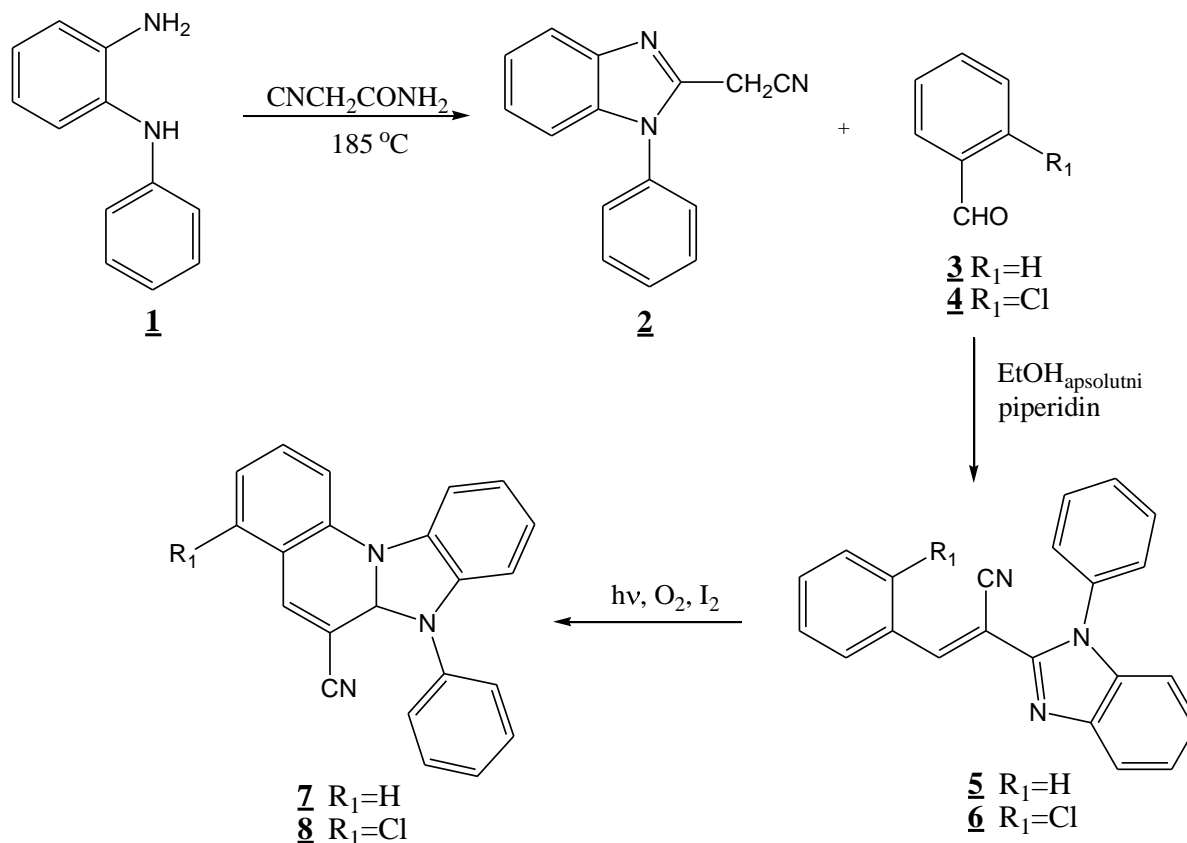
2

b)



Slika 15. a) reaktor s unutarnjim osvjetljavanjem: **1**-imerzijski dio, **2**-reakcijska posuda;
b) mikrovalna pećnica

3.2. Priprava 2-(*N*-fenil-benzimidazolil) supstituiranih derivata benzimidazola 5-6 i njihovih cikličkih derivata 7-8



Shema 10.

3.2.1. Priprava 2-cijanometil-*N*-fenilbenzimidazola 2

U okruglu tikvicu stavi se 3,00 g (0,0163 mol) *N*-fenil-*o*-fenilendiamina **1** i 2,70 g (0,321 mol) 2-cijanoacetamida, dobro promiješa, te pažljivo grije na 185^o C 20 minuta. U toplu reakcijsku smjesu dodaje se 50%-tna smjesa vode i etanola dok se sav produkt ne otopi. Otopina se prebaci u Erlenmayerovu tikvicu i prokuha kratko s malom količinom aktivnog ugljena te profiltrira. Ostavi se u hladnjaku preko noći, profiltrira i dobije zeleni kristalični produkt. Dobije se 3,51 g (66 %) tamnozelenog praškastog produkta. T.t.=118-120 °C

EKSPERIMENTALNI DIO

^1H NMR (DMSO- d_6) (δ /ppm) 7,76 (dd, 1H, $J_1=6,90$ Hz, $J_2=2,07$ Hz, H_{arom}), 7,69-7,57 (m, 5H, H_{arom}), 7,31-7,27 (m, 2H, H_{arom}), 7,16 (dd, 1H, $J_1=6,93$ Hz, $J_2=2,31$ Hz), 4,37 (s, 2H, CH_2); UV (EtOH) λ_{max} : 338

3.2.2. Priprava 2-[2-(*N*-fenil)benzimidazolil]-3-(2-fenil)akrilonitrila 5

U okruglu tikvicu stavi se 1,00 g (0,0043 mol) 2-cijanometil-*N*-fenilbenzimidazola **2** i 0,46 g (0,0043 mol) benzaldehida **3**, te doda 20 mL aps. etanola i 0,15 mL piperidina. Reakcijska smjesa se zagrijava na temperaturi vrenja tri sata. Kad se smjesa ohladi, produkt se profiltrira i ispere etanolom. Dobiveni produkt se prekrizalizira iz etanola te profiltrira. Dobije se 0,898 g (65 %) žutog praškastog produkta. T.t.=136-139 °C

^1H NMR (DMSO- d_6) (δ /ppm) 7,91 (s, 1H, H_{arom}), 7,88-7,38 (m, 2H, H_{arom}), 7,81 (d, 1H, $J=7,68$ Hz, H_{arom}), 7,69-7,61 (m, 5H, H_{arom}), 7,56-7,52 (m, 3H, H_{arom}), 7,40-7,34 (m, 2H, H_{arom}), 7,23 (dd, 1H, $J_1=7,60$ Hz, $J_2=1,83$ Hz, H_{arom}); ^{13}C NMR (DMSO- d_6) (δ /ppm) 150,89 (d), 147,09 (s), 142,39 (s), 137,34 (s), 135,64 (s), 132,87 (s), 132,45 (d), 130,69 (d, 2C), 129,97 (d,3C), 129,69 (d,2C), 127,96 (d,2C), 124,86 (d), 123,89 (d), 120,12 (d), 115,97 (s), 111,13 (s), 101,08 (s); UV (EtOH) λ_{max} : 337.

3.2.3. Priprava 2-[2-(*N*-fenil)benzimidazolil]-3-(2-klorfenil)akrilonitrila 6

U okruglu tikvicu stavi se 0,684g (0,0018 mol) 2-cijanometil-*N*-fenilbenzimidazola **2** i 0,410 g (0,0028 mol) 2-klorobenzaldehida **4**, te doda 20 mL aps. etanola i 0,15 mL piperidina. Reakcijska smjesa se zagrijava na temperaturi vrenja tri sata. Kad se reakcijska smjesa ohladi, produkt se profiltrira i ispere etanolom. Dobije se 0,493 g (77 %) žutog praškastog produkta. T.t.=163-165 °C

^1H NMR (DMSO- d_6) (δ /ppm) 7,93 (d, 1H, $J=8,19$ Hz, H_{arom}), 7,85 (s, 1H, H_{arom}), 7,69 (d, 2H, $J=8,20$ Hz, H_{arom}), 7,64-7,53 (m, 2H, H_{arom}), 7,46-7,40 (qhm,4H, H_{arom}), 7,27 (d, 2H, $J=7,80$ Hz, H_{arom}), 7,08 (d, 1H, $J=7,76$ Hz, H_{arom}), 6,83 (d, 1H, $J=7,70$ Hz, H_{arom}); UV (EtOH) λ_{max} : 264

3.2.4. Priprava 6-cijano-benzimidazo[1,2-*a*]kinolina 7

0,300 g (0,0009 mol) spoja 2-[2-(*N*-fenil)benzimidazolil]-3-(2-fenil)akrilonitrila **5** se uz zagrijavanje otopi u 400 mL etanola, doda jedan kristalić joda te se ulije u posudu za osvjetljavanje i osvjetljava Hg visokotlačnom UV lampom 4 sata. Otopina se upari pod sniženim tlakom do suha a željeni se spoj odvoji na kromatografskoj koloni na SiO₂ kao adsorbensu i diklormetanu kao eluensu. Dobije se 0,050 g (10%) žutog praškastog produkta. T.t.=>280 °C.

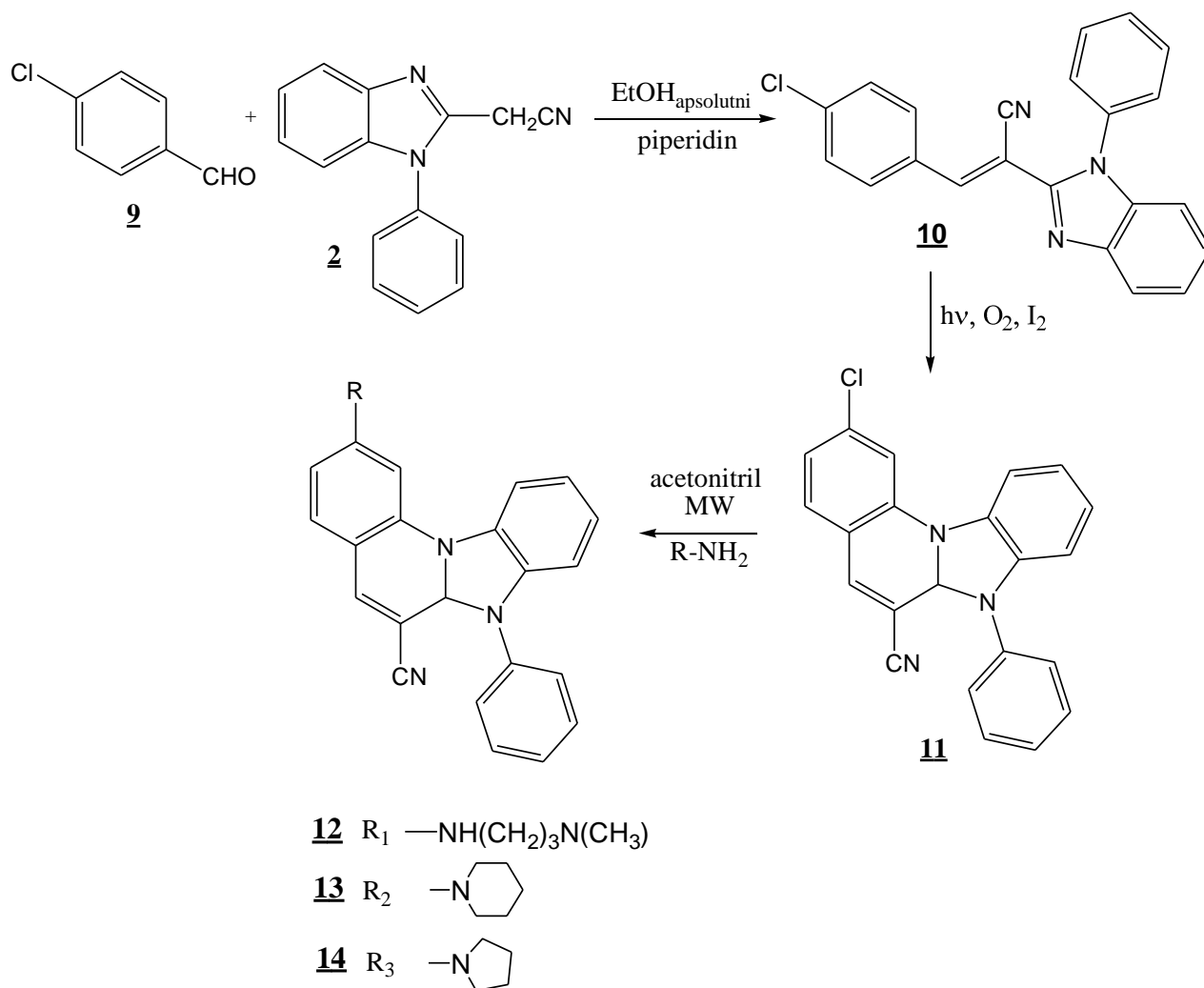
¹H NMR (DMSO-d₆) (δ/ppm) 8,95 (d, 1H, J=8,46 Hz, H_{arom.}), 8,80 (d, 1H, J=7,80 Hz, H_{arom.}), 8,05-8,00 (m, 2H, H_{arom.}), 7,69-7,59 (m, 9H, H_{arom.}), 7,19-7,11 (m, 1H, H_{arom.}); UV (EtOH) λ_{max} : 353, 265, 243.

3.2.5. Priprava 4-kloro-6-cijano-benzimidazo[1,2-*a*]kinolina 8

0,400 g (0,0011 mol) spoja 2-[2-(*N*-fenil)benzimidazolil]-3-(2-klorfenil)akrilonitrila **6** se uz zagrijavanje otopi u 400 mL etanola, te se ulije u posudu za osvjetljavanje i osvjetljava Hg visokotlačnom UV lampom 4 sata. Otopina se upari pod sniženim tlakom do suha a željeni se spoj odvoji na kromatografskoj koloni na SiO₂ kao adsorbensu i diklormetanu kao eluensu. Masa dobivenog produkta je 0,091 g (23%). T.t.=>280 °C

¹H NMR (DMSO-d₆) (δ/ppm) 8,98 (d, 1H, J=8,46 Hz, H_{arom.}), 8,82 (d, 1H, J=8,40 Hz), 8,07 (dt, 1H, J₁=7,40 Hz, J₂=1,56 Hz, H_{arom.}), 8,04 (dt, 1H, J₁=7,60 Hz, J₂=1,60 Hz, H_{arom.}), 7,80 (d, 1H, J=8,28 Hz, H_{arom.}), 7,71-7,67 (m, 2H, H_{arom.}), 7,67-7,61 (m, 3H, H_{arom.}), 7,59 (dd, 1H, J₁=7,90 Hz, J₂=1,60 Hz, H_{arom.}), 7,59 (d, 1H, J=7,90 Hz, H_{arom.}), 7,37 (dd, 1H, J₁=8,10 Hz, J₂=1,77 Hz); UV (EtOH) λ_{max}: 255, 265.

3.3. Priprava 2-[2-(*N*-fenil)benzimidazolil]-3-(4-klorfenil) akrilonitrila **10** i njegovih cikličkih derivata **11-14**



Shema 11.

3.3.1. Priprava 2-[2-(*N*-fenil)benzimidazolil]-3-(4-klorfenil) akrilonitrila **10**

U okruglu tikvicu stavi se 1,50 g (0,0026 mol) 2-cijanometil-*N*-fenil-benzimidazola **2** i 0,90 g (0,0026 mol) 4-klorobenzaldehida **9** te se doda 20 mL apsolutnog etanola i 0,16 mL piperidina. Reakcijska smjesa se zagrijava na temperaturi vrenja 3 sata, te upari pod sniženim tlakom na manji volumen. Produkt se istaloži dodatkom destilirane vode te profiltrira pa prekrystalizira iz etanola. Dobije se 1,60 g (69 %) žutog kristaliničnog produkta. T.t.=146-149 °C.

EKSPERIMENTALNI DIO

^1H NMR (DMSO- d_6) (δ /ppm) 7,94 (s, 1H, $H_{\text{arom.}}$), 7,83 (d, 3H, $J=8,67$ Hz, $H_{\text{arom.}}$), 7,67-7,60 (m, 7H, $H_{\text{arom.}}$), 7,40-7,34 (m, 2H, $H_{\text{arom.}}$), 7,23 (dd, 1H, $J_1=7,80$ Hz, $J_2=1,70$ Hz, $H_{\text{arom.}}$); ^{13}C APT (DMSO- d_6) (δ /ppm) 149,48, 146,88, 142,37, 137,34, 136,97, 135,54, 131,74, 131,67 (2C), 130,69 (2C), 130,01, 129,83 (2C), 127,96 (2C), 124,94, 123,96, 120,14, 115,72, 111,16, 101,67; UV (EtOH) λ_{max} : 344, 287.

3.3.2. Priprava 2-kloro-6-cijano-7-fenil-benzimidazo[1,2-*a*]kinolina 11

0,40 g (0,0011 mol) spoja **10** se uz zagrijavanje otopi u 400 mL etanola, te se se ulije u posudu za osvjetljavanje i osvjetljava Hg visokotlačnom UV lampom 5 sati. Nastali produkt se profiltrira. Dobije se žuti praškasti produkt mase 0,055g (13 %). T.t. \Rightarrow 250 °C

^1H NMR (DMSO- d_6) (δ /ppm) 8,96 (d, 1H, $J=8,49$ Hz, $H_{\text{arom.}}$), 8,81 (dd, 1H, $J_1=8,50$ Hz, $J_2=1,78$ Hz), 8,08-8,00 (m, 2H, $H_{\text{arom.}}$), 7,74 (d, 2H, $J=8,34$ Hz, $H_{\text{arom.}}$), 7,63-7,56 (m, 5H, $H_{\text{arom.}}$); ^{13}C APT (DMSO- d_6) (δ /ppm) 150,50 (s), 144,48 (s), 136,13(s), 135,24 (s), 134,09 (d), 133,63 (s), 131,93 (d), 131,01 (s), 130,19 (d), 129,05 (d), 125,50 (d), 124,30 (d), 121,95 (s), 120,84 (d), 116,81 (d), 115,40 (d), 115,29 (s), 102,36 (s); UV (EtOH) λ_{max} : 355 , 266, 254.

3.3.3. Pokušaj priprave 2-(*N,N*-dimetilamino-propil)-6-cijano-7-fenil-benzimidazo[1,2-*a*]kinolina 12

U reakcijsku posudu se stavi 0,040 g spoja **11** (0,0001 mol) te doda 0,058 g (0,0005 mol) *N,N*-dimetilamino-3-propilamina i 10 mL acetonitrila. Reakcija se zagrijava u mikrovalnoj pećnici na 175 °C (800 W) 25 sati. Nije izoliran željeni produkt.

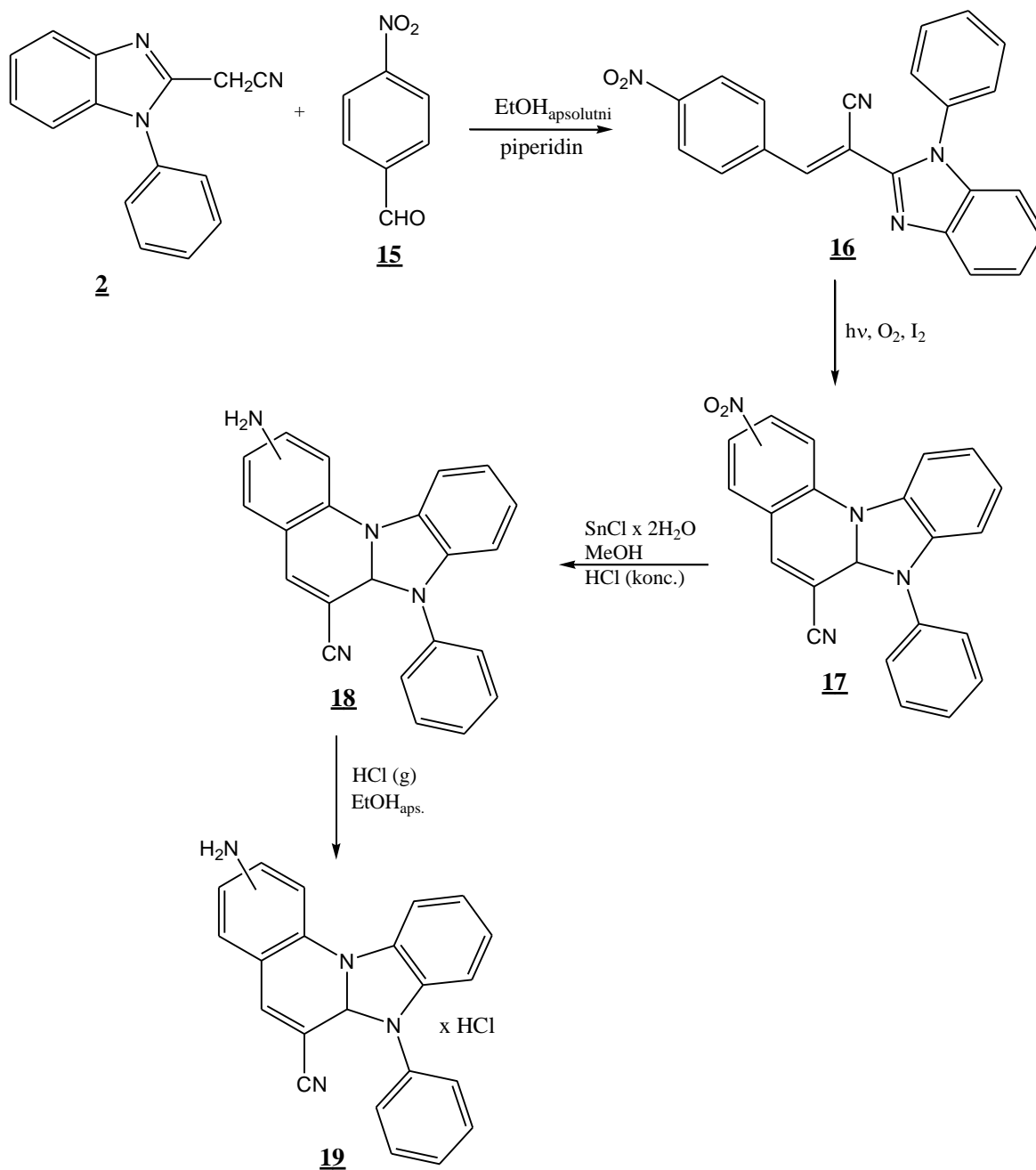
3.3.4. Pokušaj priprave 2-piperidinil-6-cijano-7-fenil-benzimidazo[1,2-*a*]kinolina 13

U reakcijsku posudu se stavi 0,040 g spoja **11** (0,0001 mol) te se doda 0,048 g (0,0005 mol) piperidina i 10 mL acetonitrila. Reakcija se zagrijava u mikrovalnoj pećnici na 175 °C (800 W) 25 sati. Nije izoliran željeni produkt.

3.3.5. Pokušaj priprave 2-pirolidinil-6-cijano-7-fenil-benzimidazo[1,2-*a*]kinolina **14**

U reakcijsku posudu se stavi 0,050 g spoja **11** (0,0001 mol) te se doda 0,030 g (0,0004 mol) pirolidina i 10 mL acetonitrila. Reakcija se zagrijava u mikrovalnoj pećnici na 175 °C (800 W) 25 sati. Nije izoliran željeni produkt.

3.4. Priprava 2-[2-(*N*-fenil)benzimidazolil]-3-(4-nitrofenil) akrilonitrila **16** i njegovih cikličkih nitro i amino derivata **17-19**



Shema 12.

3.4.1. Priprava 2-[2-(*N*-fenil)benzimidazolil]-3-(4-nitrofenil)akrilonitrila 16

U okruglu tikvicu stavi se 0,660 g (0,0028 mol) 2-cijanometil-*N*-fenilbenzimidazola **2** i 0,655 g (0,0043 mol) 4-nitrobenzaldehida **15**, te se doda 15 mL aps. etanola i 3 kapi piperidina. Reakcijska smjesa se grije na temperaturi vrenja 3,5 sati. Potom se ohladi i nastali produkt profiltrira i prekrystalizira iz etanola. Dobije se 0,328 g (31 %) žutog kristaliničnog produkta. T.t.=179-182 °C.

¹H NMR (DMSO-d₆) (δ/ppm) 8,36(d, 2H, J=8,88 Hz, H_{arom.}), 8,08 (s, 1H, H_{arom.}), 8,03 (d, 2H, J=8,90 Hz, H_{arom.}), 7,85 (dd, 1H, J₁=7,98 Hz, J₂=2,10 Hz, H_{arom.}), 7,67-7,65 (m, 4H, H_{arom.}), 7,63-7,61 (m, 4H, H_{arom.}), 7,41-7,36 (m, 4H, H_{arom.}), 7,24 (d, 1H, J=7,98 Hz); UV (EtOH) λ_{max}: 360, 276.

3.4.2. Priprava 3-nitro-6-cijano-benzimidazo[1,2-*a*]kinolina 17

0,300 g (0,0008 mol) 2-[2-(*N*-fenil)benzimidazolil]-3-(4-nitrofenil)akrilonitrila **16** se uz zagrijavanje otopi u 400 mL etanola, te se doda kristalić joda. Otopina se ulije u posudu za osvjetljavanje i osvjetljava Hg visokotlačnom 3 sata. Reakcijska smjesa se zatim upari na volumen 1-2 mL a nastali produkt profiltrira te ispere s malom količinom etanola. Dobije se 0,180 g (60 %) žutog praškastog produkta. T.t.=>250 °C.

¹H NMR (DMSO-d₆) (δ/ppm) 9,00 (d, 1H, J=8,52 Hz, H_{arom.}), 8,84 (d, 2H, J=7,98 Hz, H_{arom.}), 8,79 (d, 1H, J=7,74 Hz, H_{arom.}), 8,54 (d, 2H, J=8,88 Hz, H_{arom.}), 8,42 (d, 2H, J=8,76 Hz, H_{arom.}), 8,41 (d, 1H, J=8,52 Hz, H_{arom.}), 8,16-8,05 (m, 2H, H_{arom.}), 8,02 (dd, 1H, J₁=8,48 Hz, J₂=2,10 Hz, H_{arom.}), 7,98 (d, 1H, J=8,88 Hz, H_{arom.}), 7,97 (d, 1H, J=8,98 Hz, H_{arom.}), 7,78 (d, 3H, J=8,98 Hz, H_{arom.}), 7,70-7,65 (m, 3H, H_{arom.}), 7,64-7,57 (m, 4H, H_{arom.}), 7,52 (dd, 1H, J₁=8,10 Hz, J₂=1,44 Hz, H_{arom.}), 7,45 (dt, 1H, J₁=8,16 Hz, J₂=1,44 Hz, H_{arom.}), 7,37 (dd, 1H, J₁=8,14 Hz, J₂=1,40 Hz, H_{arom.}); UV (EtOH) λ_{max}: 264.

3.4.3. Priprava 3-amino-6-cijano-benzimidazo[1,2-*a*]kinolina 18

U okruglu tikvicu stavi se 0,110 g (0,0003 mol) 3-nitro-6-cijano-benzimidazo[1,2-*a*]kinolina **17** te se doda prethodno pripremljena smjesa 0,540 g (0,0024 mol) SnCl₂ x 2H₂O u 0,86 mL HCl_{konc.} i 0,86 mL metanola. Reakcijska smjesa se grije na temperaturi refluksa pola sata. Upari se pod sniženim tlakom do suha i otopi u 20 ml vode. Zaluži se do pH 14 s 10%-tnom

EKSPERIMENTALNI DIO

otopinom NaOH. Nastali se produkt profiltrira i dobro ispere vodom te prekrizalizira iz etanola. Dobije se 0,050 g (49 %) žutog praškastog produkta. T.t. \Rightarrow 250 °C.

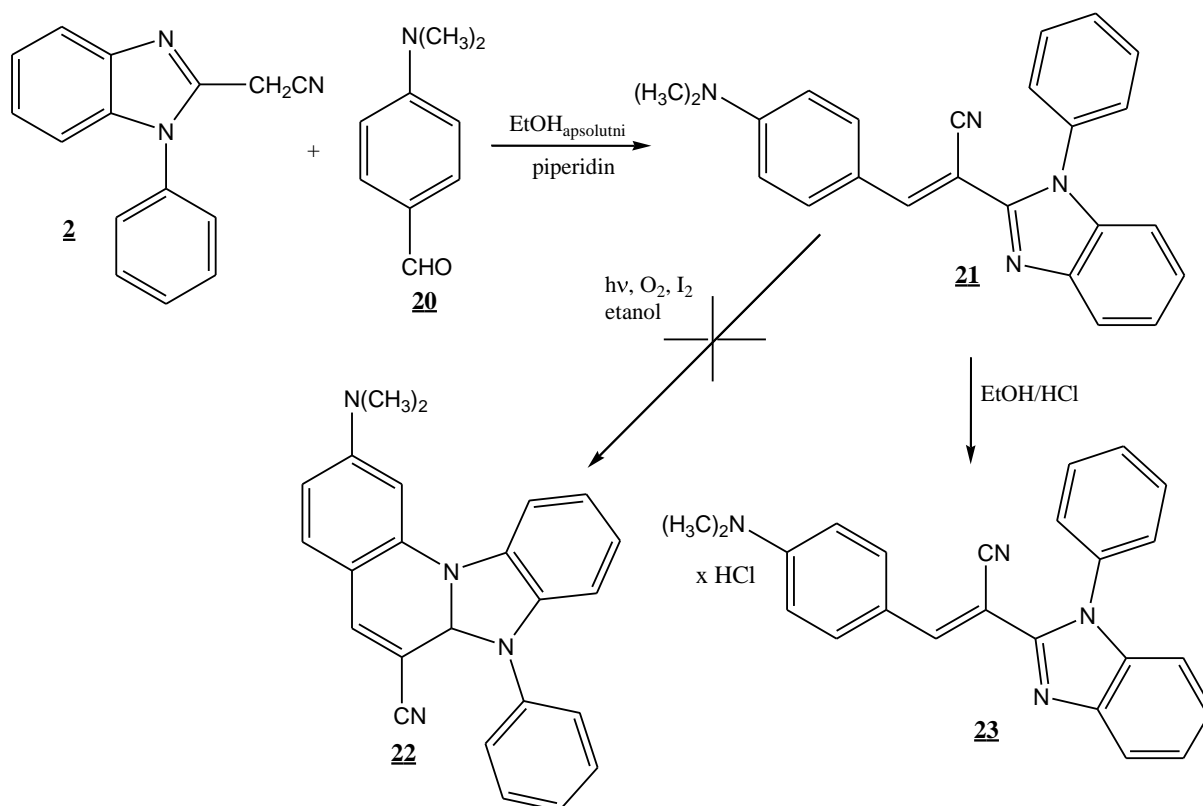
^1H NMR (DMSO- d_6) (δ /ppm): 8,92 (d, 1H, $J=8,70$ Hz, H_{arom}), 8,79-8,71 (M, 3H, H_{arom}), 8,03 (dd, 2H, $J_1=8,98$ Hz, $J_2=1,78$ Hz, H_{arom}), 7,98-7,95 (m, 1H, H_{arom}), 7,83 (dd, 2H, $J_1=8,20$ Hz, $J_2=1,38$ Hz, H_{arom}), 7,64-7,51 (m, 7H, H_{arom}), 7,39 (d, 1H, $J=8,76$ Hz, H_{arom}), 7,30 (d, 2H, $J=8,80$ Hz, H_{arom}), 7,07 (d, 2H, $J=8,37$ Hz, H_{arom}), 6,71 (d, 2H, $J=8,34$ Hz, H_{arom}), 5,70 (šs, 2H, NH_2), 5,22 (šs, 2H, NH_2); UV (EtOH) λ_{max} : 360, 344, 260.

3.4.4. Priprava 3-amino-6-cijano-benzimidazo[1,2-*a*]kinolina hidroklorida **19**

U okruglu tikvicu stavi se 0,030 g (0,00009 mol) 3-amino-6-cijano-benzimidazo[1,2-*a*]kinolina **18** te se doda 15 mL etanolne otopine zasićene HCl-om. Reakcijska smjesa se miješa 24 sata na sobnoj temperaturi te se zatim profiltrira i dobro ispere dietil-eterom. Dobije se 0,023 g (66 %) svijetlo žutog praškastog produkta. T.t. \Rightarrow 250 °C.

^1H NMR (DMSO- d_6) (δ /ppm): 7,88 (s, 1H, H_{arom}), 7,78 (d, 1H, $J=7,98$ Hz, H_{arom}), 7,75 (d, 2H, $J=8,70$ Hz, H_{arom}), 7,67-7,63 (m, 2H, H_{arom}), 7,63-7,60 (m, 3H, H_{arom}), 7,41 (dt, 1H, $J_1=7,98$ Hz, $J_2=1,02$ Hz, H_{arom}), 7,35 (dt, 1H, $J_1=7,98$ Hz, $J_2=1,02$ Hz, H_{arom}), 7,19 (dd, 1H, $J_1=8,10$ Hz, $J_2=1,40$ Hz, H_{arom}), 6,80 (d, 2H, $J=8,90$ Hz, H_{arom}), 3,80 (šs, 6H, NH_3^+); UV (EtOH) λ_{max} : 361, 345, 264.

3.5. Priprava 2-[2-(*N*-fenil)benzimidazolil]-3-(*N,N*-dimetilaminofenil) akrilonitrila **21** i njegovih derivata



Shema 13.

3.5.1. Priprava 2-[2-(*N*-fenil)benzimidazolil]-3-(4-*N,N*-dimetilaminofenil)akrilonitrila **21**

U okruglu tikvicu stavi se 0,700 g (0,003 mol) 2-cijanometil-*N*-fenilbenzimidazola **2** i 0,440 g (0,003 mol) 4-*N,N*-dimetilaminobenzaldehida **20** te se doda 15 mL apsolutnog etanola i 3 kapi piperidina. Reakcijska smjesa se grije na temperaturi vrenja 3,5 sati te se zatim ohladi i profiltrira nastali produkt koji se ispere s malom količinom etanola. Dobije se 0,225 g (21 %) narančastog praškastog produkta. T.t.=216-218 °C.

¹H NMR (DMSO-d₆) (δ/ppm) 7,75 (d, 1H, J=7,92 Hz, H_{arom.}), 7,70 (d, 2H, J=9,06 Hz, H_{arom.}), 7,69 (s, 1H, J=5,64 Hz, H_{arom.}), 7,64 (t, 2H, J=6,72 Hz, H_{arom.}), 7,61-7,57 (m, 3H, H_{arom.}), 7,32 (dt, 1H, J₁=7,53 Hz, J₂=1,1 Hz, H_{arom.}), 7,26 (dt, 1H, J₁=7,60 Hz, J₂=1,04 Hz, H_{arom.}), 7,15 (d, 1H, J=7,87 Hz, H_{arom.}), 6,78 (d, 2H, J=9,12 Hz, H_{arom.}), 3,03 (s, 6H, CH₃); UV (EtOH) λ_{max}: 421.

3.5.2. Pokušaj pripreve 3-*N,N*-dimetilamino-6-cijano-benzimidazo[1,2-*a*]kinolina hidroklorida 22

U Erlenmayerovoj tikvici se uz zagrijavanje otopi 0,120 g (0,0003 mol) spoja **21** u 400 mL etanola uz dodatak kristalića joda. Otopina se ulije u posudu za osvjetljavanje i osvjetljava Hg visokotlačnom 30 sati. Željeni produkt nije izoliran.

3.5.3. Priprava 2-[2-(*N*-fenil)benzimidazolil]-3-(4-*N,N*-dimetilaminofenil)akrilonitrila hidroklorida 23

U okruglu tikvicu stavi se 0,050 g (0,0001 mol) spoja **21** te se doda 15 mL etanolne otopine zasićene HCl-om. Reakcijska smjesa se miješa 24 sata na sobnoj temperaturi te se produkt profiltrira i dobro ispere dietil-eterom. Dobije se 0,018 g (33 %) svijetlo crvenog praškastog produkta. T.t.=175-179 °C.

¹H NMR (DMSO-*d*₆) (δ/ppm) 7,88 (s, 1H, H_{arom.}), 7,78 (d, 1H, J=8,10 Hz), 7,67-7,64 (m, 2H, H_{arom.}), 7,63-7,61 (m, 2H, H_{arom.}), 7,41 (dt, 1H, J₁=7,60 Hz, J₂=1,60 Hz, H_{arom.}), 7,35 (dt, 1H, J₁=7,75 Hz, J₂=1,80 Hz, H_{arom.}), 7,20 (d, 1H, J=8,28 Hz, H_{arom.}), 6,80 (d, 2H, J=9,10 Hz), 3,90 (šs, 1H, NH⁺); UV (EtOH) λ_{max}: 421.

3.6. Ispitivanje interakcija nekih priređenih derivata s DNA/RNA

3.6.1. Supstrati

Nukleotidi čistoće veće od 99 % kupljeni su od Aldricha-a te su korišteni bez daljnjeg čišćenja na način da su otopljeni u NaCaCo puferu (pH 7) u koncentraciji reda veličine 10⁻² mol dm⁻³. Otopljeni su prema tvornički priloženim uputstvima odnosno katalogu proizvođača te je koncentracija fosfata polinukleotida određena na osnovu absorbancije u puferu pH = 7; 0,01 M prema slijedećim vrijednostima:

- ctDNA na 260 nm, ε = 6600
- poli A-poli U na 260 nm, ε = 6000

Zbog održavanja konstantnog pH tijekom titracije korišten je slijedeći pufer: kakodilatna kiselina / HCl (pH=7) 0,02 M.

3.6.2. Spektroskopske metode

Kod fluorescencijskih titracija praćene su promjene intenziteta fluorescencije ispitivanog spoja na valnim duljinama ($\lambda_{em.} = 380\text{--}750\text{ nm}$) gdje niti jedan sastojak u otopini nema UV/Vis spektar te su korištene valne duljine pobude kod kojih ctDNA i pA-pU nemaju UV/Vis spektar ($\lambda_{eksc.} > 320\text{ nm}$). Ukoliko je bilo potrebno, fluorescencijski spektri korigirani su za baznu liniju pufera.

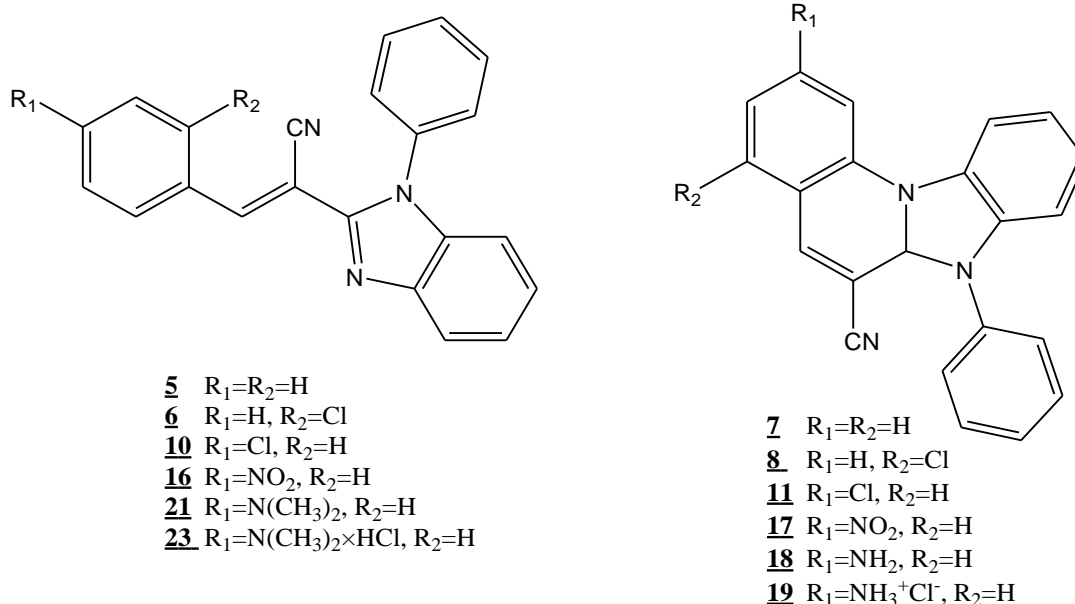
3.6.3. Izvedba titracija

Promjene spektara ispitivanih spojeva po dodatku polinukleotida korigirane su za razrjeđenje. Korištena je metoda titracije pri kojoj je korišteno relativno kratko vrijeme (5 - 6 min) potrebno da se uspostavi ravnotežno stanje po dodatku supstrata u otopinu ispitivanog spoja. U kivetu s puferiranom vodenom otopinom ispitivanog spoja dodavani su alikvoti otopine supstrata priređeni u DMSO-u. Po svakom dodatku nakon navedenog vremena uravnoteženja uz miješanje magnetskim mješaćem snimljen je spektar ispitivanog spoja.

4. RASPRAVA I REZULTATI

4.1. Cilj rada

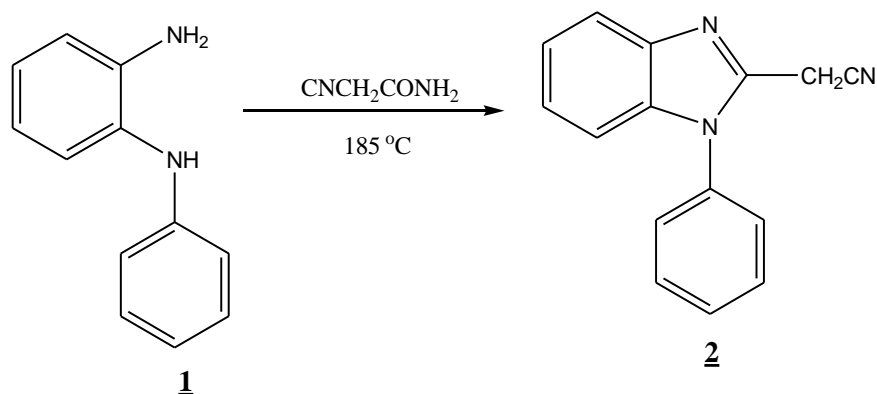
Cilj ovog rada bio je prirediti različite supstituirane derivate 2-[(*N*-fenil) benzimidazolil]-3-fenilakrilonitrila **5**, **6**, **10**, **16**, **21** i **23**, reakcijom kondenzacije odgovarajućih aromatskih aldehida i 2-cijanometil-*N*-fenilbenzimidazola. Fotokemijskom ciklizacijom etanolnih otopina spomenutih derivata benzimidazola priređeni su ciklički derivati benzimidazo[1,2-*a*]kinolina **7**, **8**, **11**, **17-19**. Spektroskopska karakterizacija priređenih spojeva provedena je korištenjem UV/Vis i fluorimetrijske spektroskopije otopina priređenih u acetonitrilu i etanolu. Kako bi se utvrdila potencijalna mogućnost primjene nekih od priređenih spojeva kao fluorescentnih proba za obilježavanje biomakromolekula DNA/RNA, ispitana je njihova interakcija s polinukleotidima ctDNA i poliA-poliU (RNA) korištenjem fluorimetrijske spektroskopije³⁰.



Slika 16. Priređeni spojevi

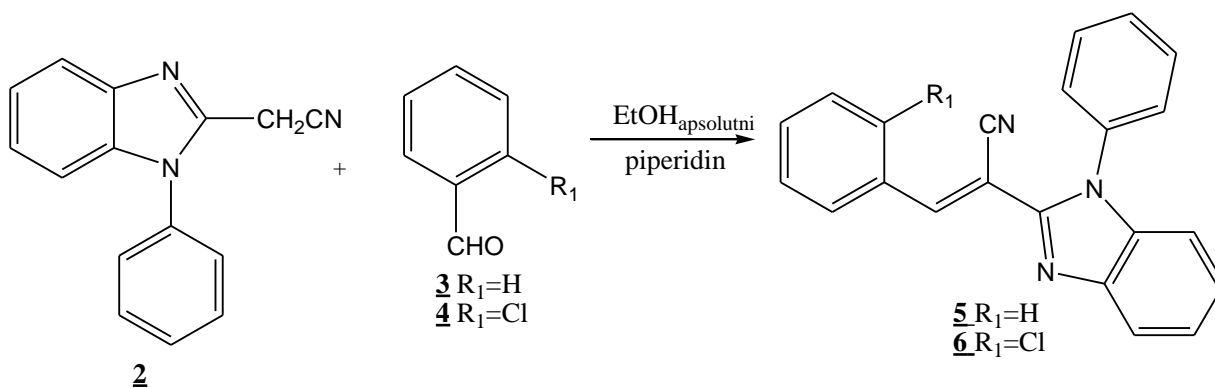
4.2. Sinteza ciljanih spojeva

2-cijanometil-*N*-fenilbenzimidazol **2**, kao glavni prekursor za sintezu ciljanih spojeva, priređen je reakcijom iz *N*-fenil-*o*-fenilendiamina **1** i 2-cijanoacetamida uz zagrijavanje. Struktura spoja je potvrđena ¹H NMR spektroskopijom. (Prilog 1.)



Shema 14.

2-[2-(*N*-fenil)benzimidazolil]-3-fenilakrilonitril **5** i 2-[2-(*N*-fenil)benzimidazolil]-3-(2-klorfenil)akrilonitril **6** priređen su reakcijom aldolne kondenzacije iz aldehida **3-4** i 2-cijanometilbenzimidazola **2** prema Shemi 15.

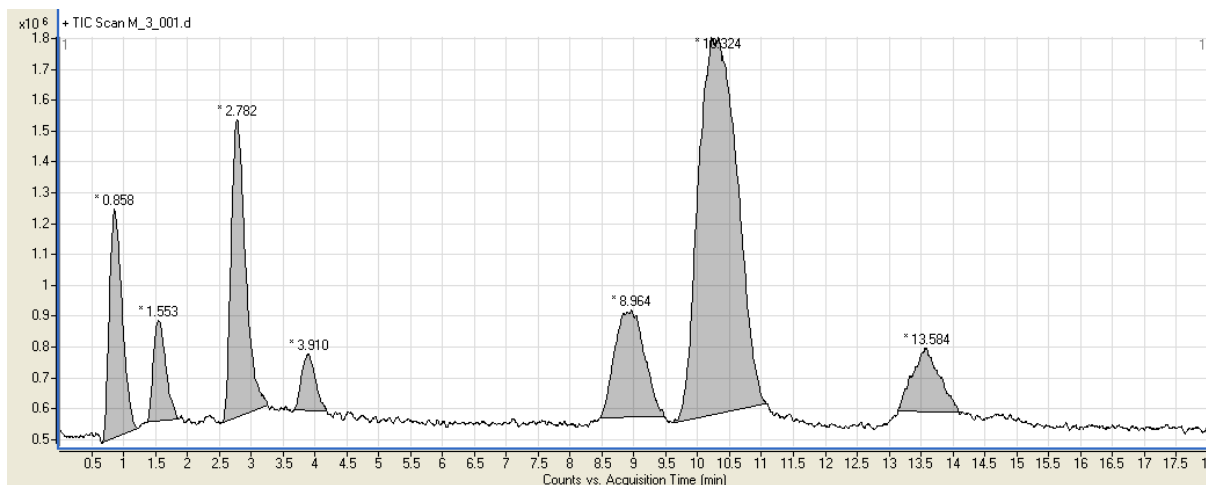


Shema 15.

Struktura spojeva **5** i **6** potvrđena je NMR spektroskopijom. (Prilog 2.) Na Slici 17. prikazan je ¹H NMR spektar spoja **5** u kojem se može uočiti odgovarajući broj signala svih aromatskih protona u području od 7,90 do 7,20 ppm.

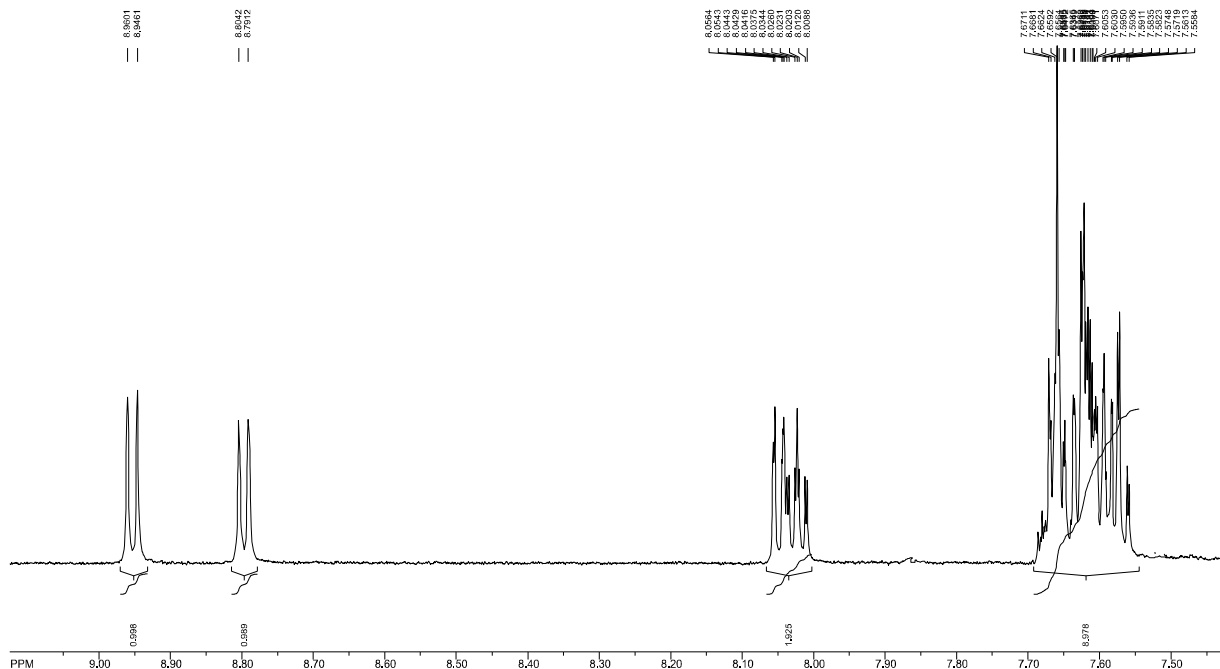
RASPRAVA I REZULTATI

Fotokemijska ciklizacija dala je prema kromatogramu na Slici 18. više različitih produkata pa je za odvajanje željenih cikličkih spojeva **7-8** korištena kolonska kromatografija na SiO₂ kao adsorbensu i diklormetanu kao eluensu.



Slika 18. Kromatogram dobivenih produkti reakcijom fotokemijske ciklizacije

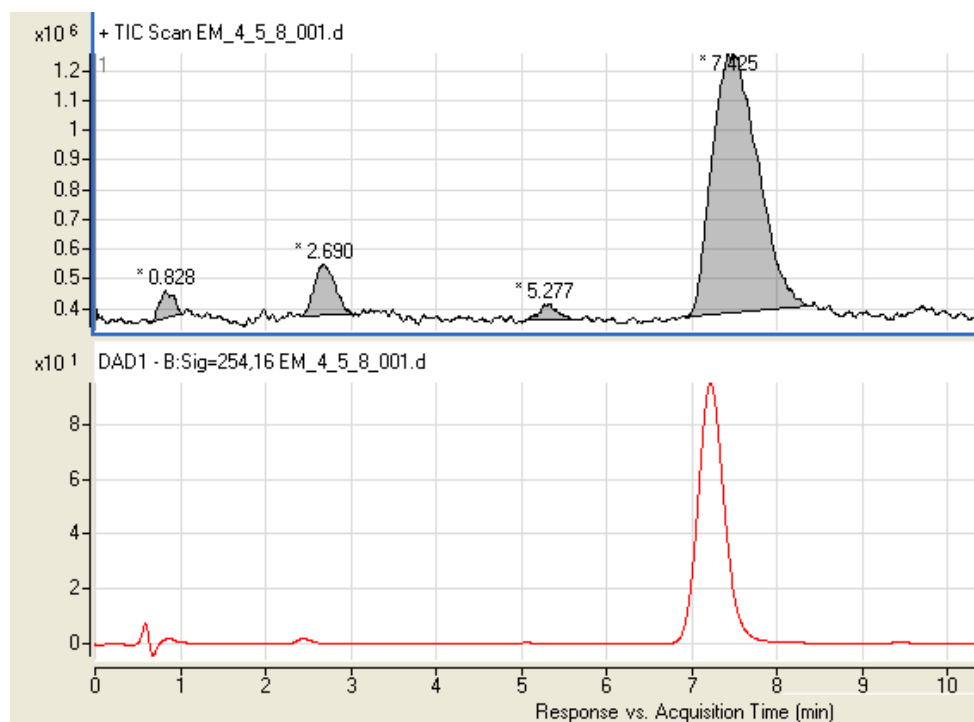
Struktura čistog spoja **7** potvrđena je NMR spektroskopijom kao i HPLC/MS spektroskopijom. (Prilog 3.)



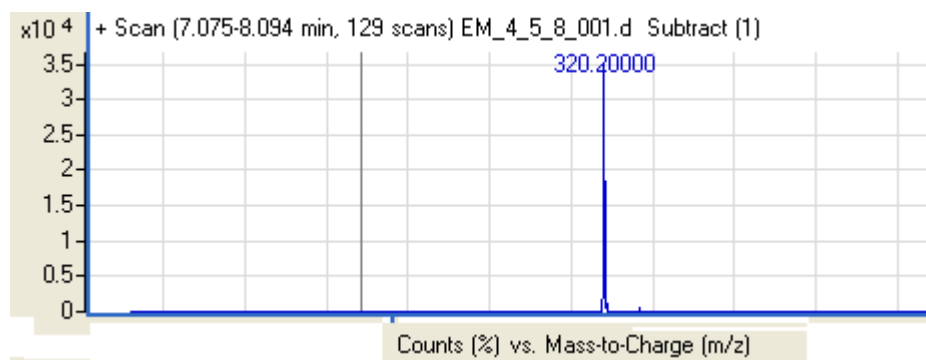
Slika 19. ¹H NMR spektar spoja **7**

RASPRAVA I REZULTATI

a)



b)



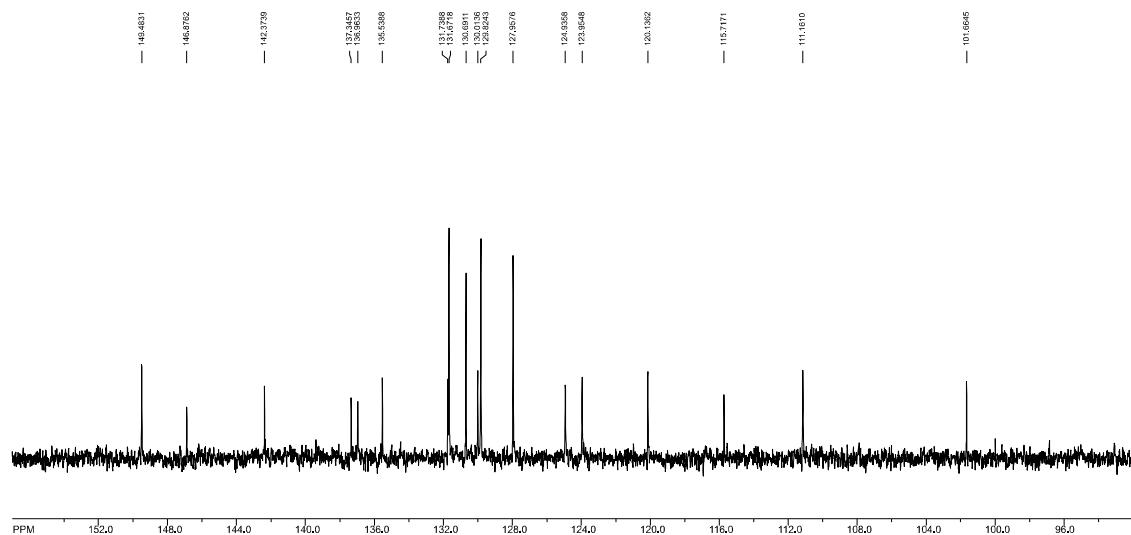
Slika 20. a) Kromatogram čistog spoja 7; b) MS spektar čistog spoja 7

Fotokemijska ciklizacija 2-klor supstituiranog derivata **6** također je dala produkt fotokemijske dehidrociklizacije **8** a ne fotokemijskog dehidrohalogeniranja, bilo da je reakcija provedena uz propuhivanje zrakom i korištenje joda ili u anaerobnim uvjetima. Čisti produkt **8** izoliran je kolonskom kromatografijom na SiO_2 kao adsorbensu i diklormetanu kao eluensu. Na Slici 21. prikazan je ^1H NMR spektar čistog spoja **8**. (Prilog 4.)

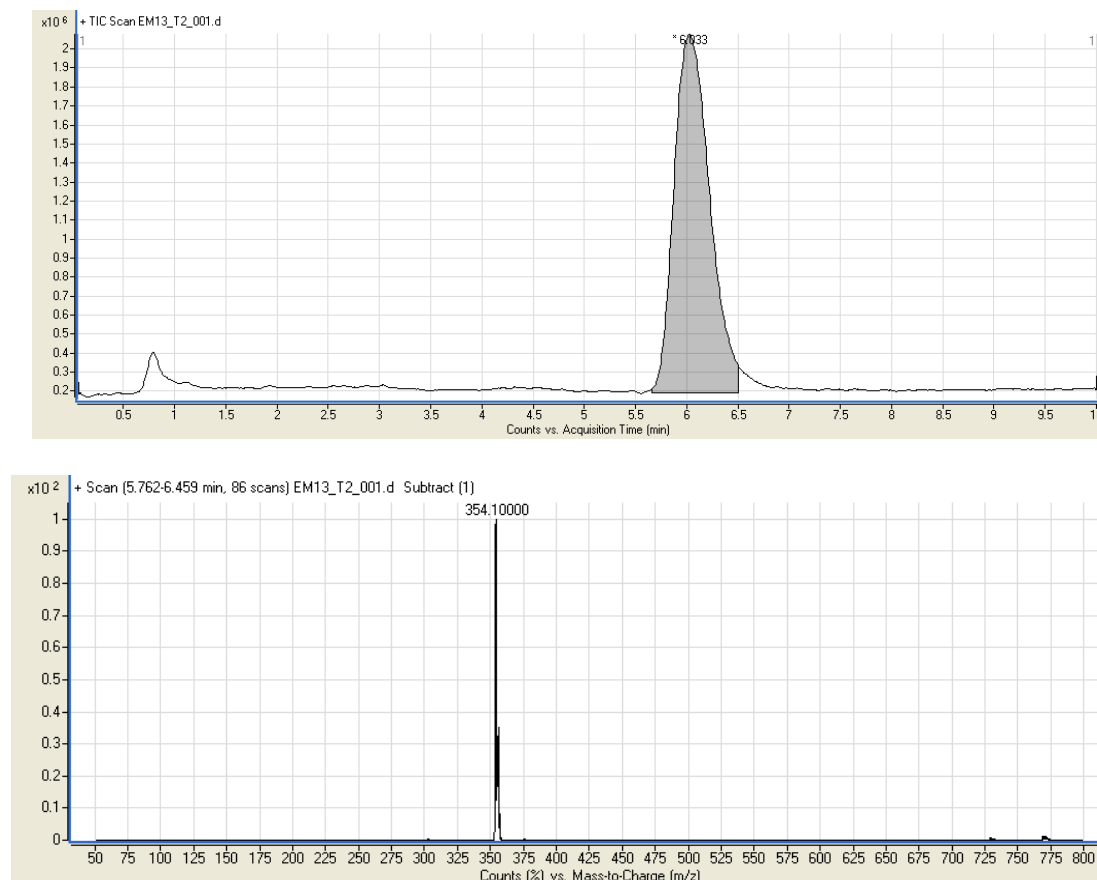
RASPRAVA I REZULTATI

Struktura spojeva **10** i **11** potvrđena je NMR i HPLC/MS spektroskopijom a na Slici 22. prikazna je ^{13}C NMR spektar spoja **10** s odgovarajućim brojem signala ugljikovih atoma. (Prilog 5.)

a)



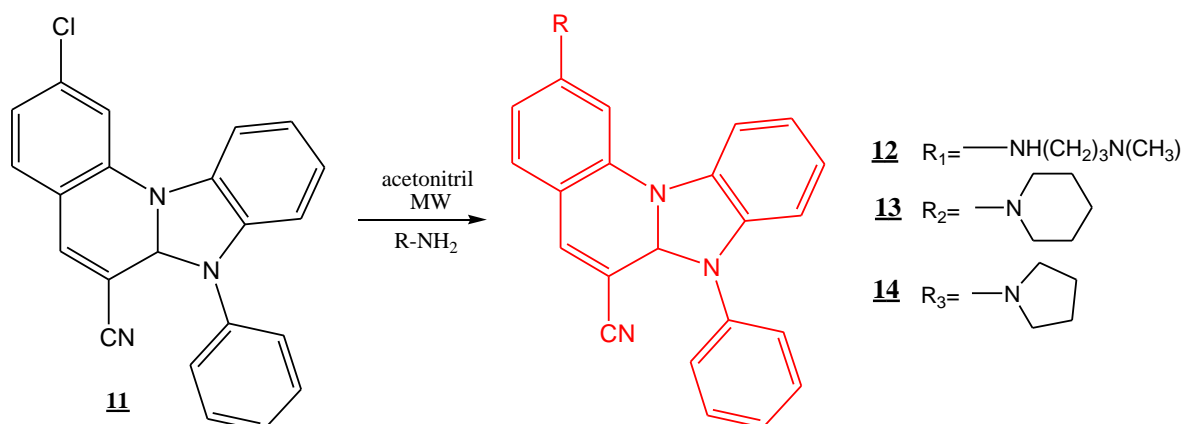
b)



Slika 22. a) ^{13}C NMR spektar spoja **10** b) MS spektar spoja **10**

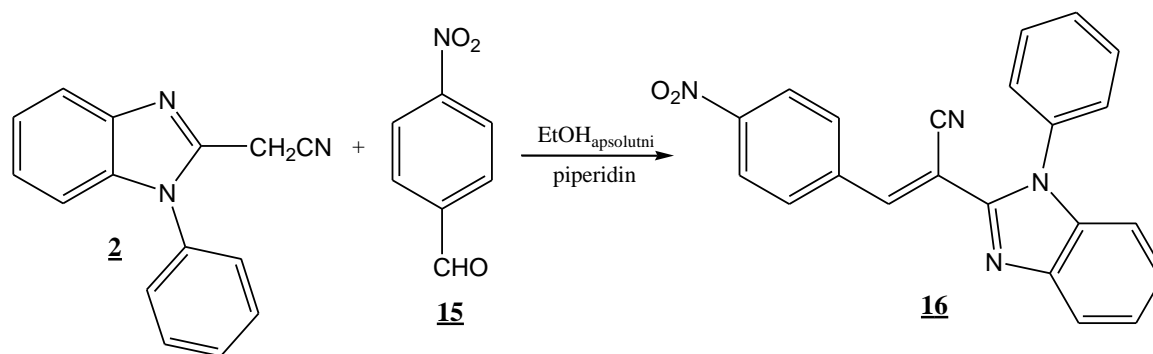
RASPRAVA I REZULTATI

Kloro supstituirani ciklički derivat benzimidazo[1,2-*a*]kinolin **11** bio je glavni intermedijar u pokušaju pripreve različitih amino supstituiranih cikličkih derivata prema Shemi 18.



Shema 18.

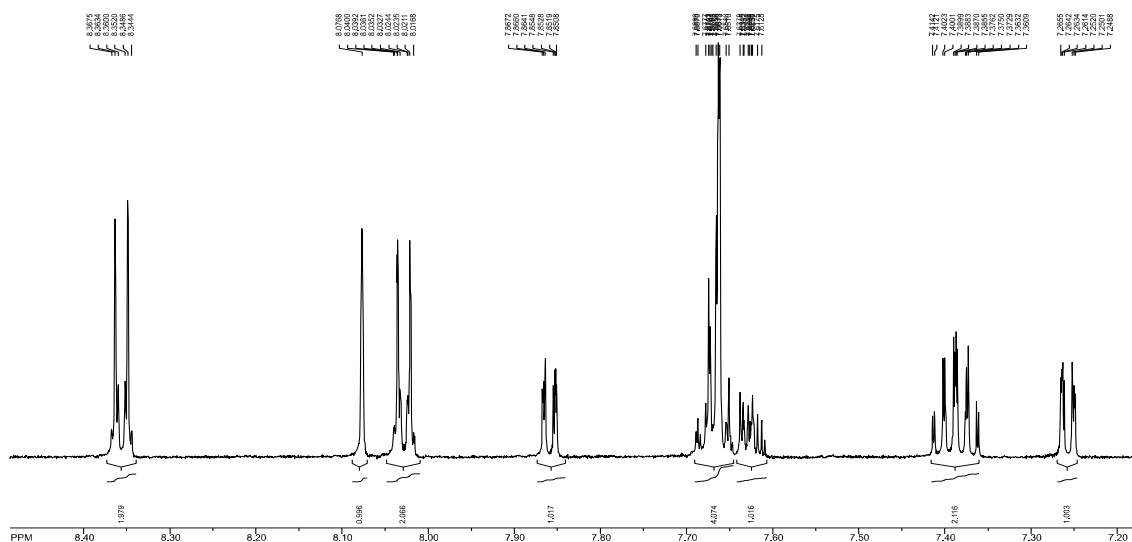
Pokušaj reakcije aminacije proveden je korištenjem mikrovalnog zračenja u acetonitrilu uz dodatak velikog suviška amina, na temperaturi od 170 °C, no ni nakon značajno produženog vremena ozračavanja nisu dobiveni željeni produkti. Budući da spojevi **12-14** nisu uspješno priređeni, sljedeći zadatak bila je priprava nitro supstituiranog derivata **16** reakcijom aldolne kondenzacije aldehida **15** i 2-cijanometil-*N*-fenilbenzimidazola **2** prema Shemi 19.



Shema 19.

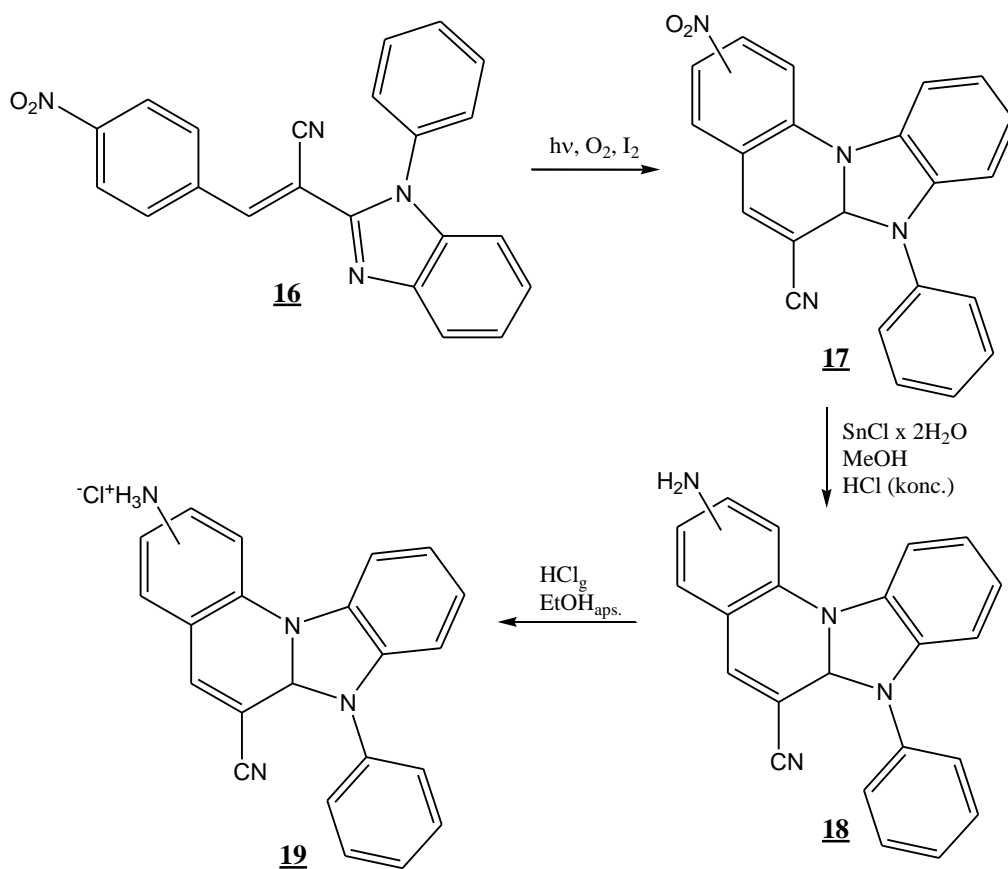
Struktura dobivenog spoja **16** potvrđena je NMR spektroskopijom a na Slici 23. prikazan je ^1H NMR spektar u kojem se može uočiti odgovarajući broj signala aromatskih protona. (Prilog 7.)

RASPRAVA I REZULTATI



Slika 23. ^1H NMR spektar spoja **16**

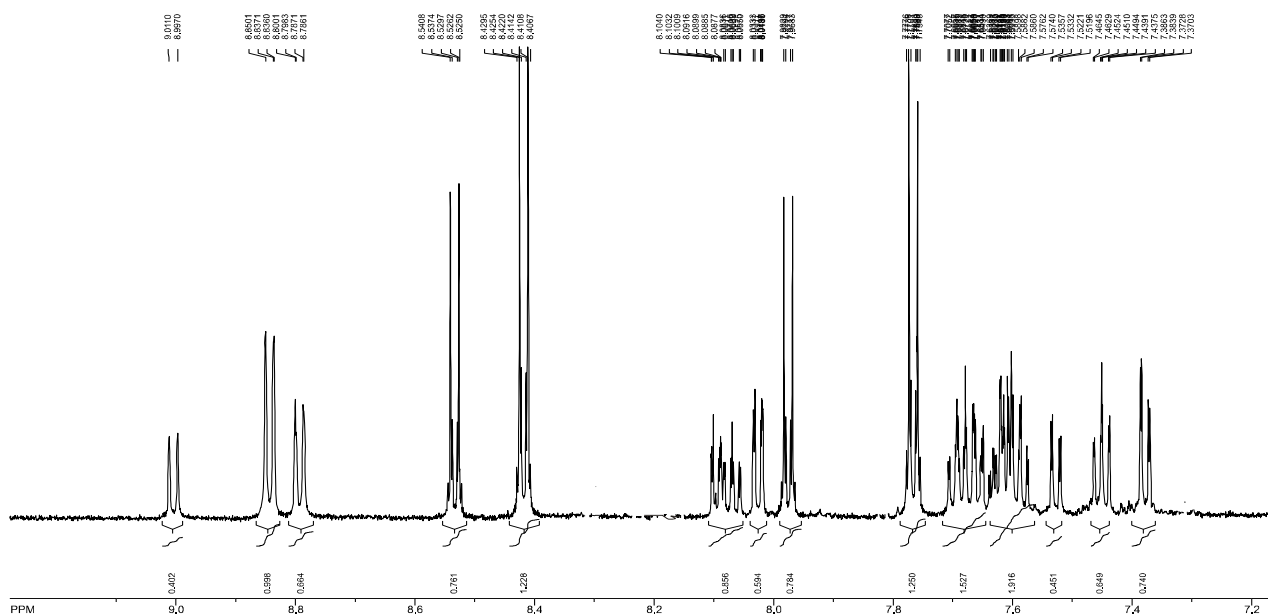
Na Shemi 20. prikazana je priprava amino supstituiranog cikličkog derivata **18** koji je priređen reakcijom redukcije nitro supstituiranog derivata **17** s kositar-kloridom dihidratom u metanolu i kiselom mediju, priređenog fotokemijskom dehidrociklizacijom iz spoja **16**. Zbog bolje topljivosti priređena je i hidrokloridna sol **19**.



Shema 20.

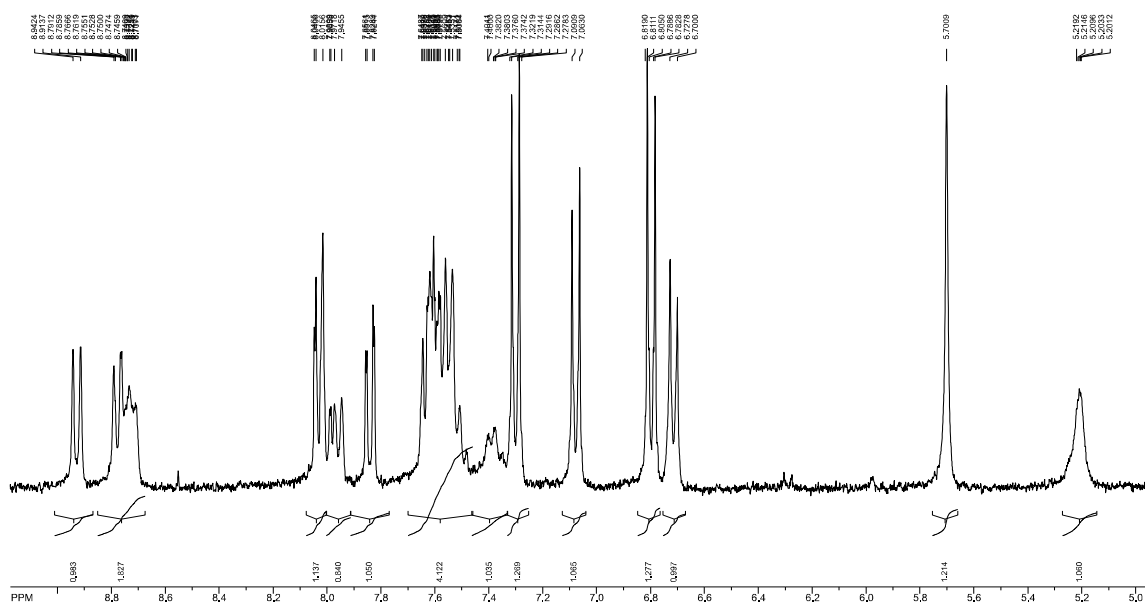
RASPRAVA I REZULTATI

Nitro supstituirani derivat benzimidazo[1,2-*a*]kinolina **17** dobiven je kao smjesa dva regioizomera što se može uočiti i u ^1H NMR spektru gdje je vidljiv dvostruki broj signala svih protona u aromatskom području. (Prilog 8.)



Slika 24. ^1H NMR spektar spoja **17**

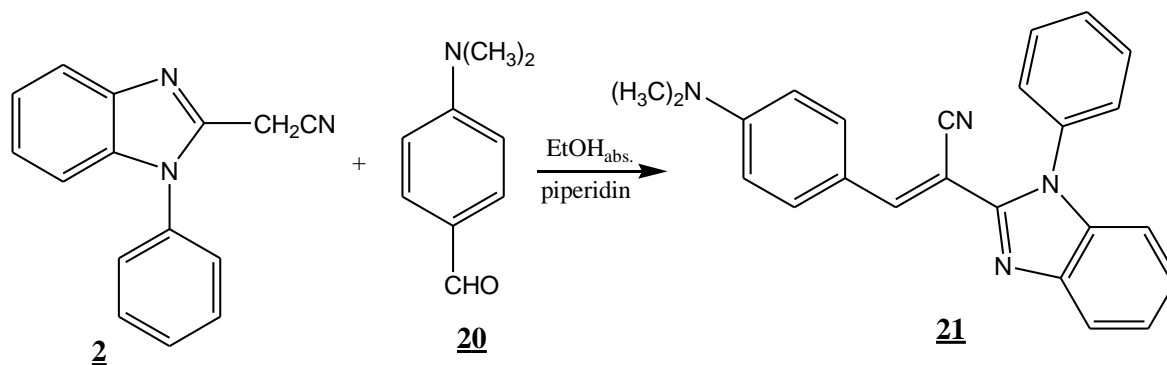
Redukcijom nitro skupine nastaje amino skupina što se jasno može uočiti i u ^1H NMR spektru amino supstituiranog benzimidazo[1,2-*a*]kinolina **18** u kojem se na 5,70 i 5,20 ppm javljaju signali koji odgovaraju amino skupini. (Prilog 9.)



Slika 25. ^1H NMR spektar spoja **18**

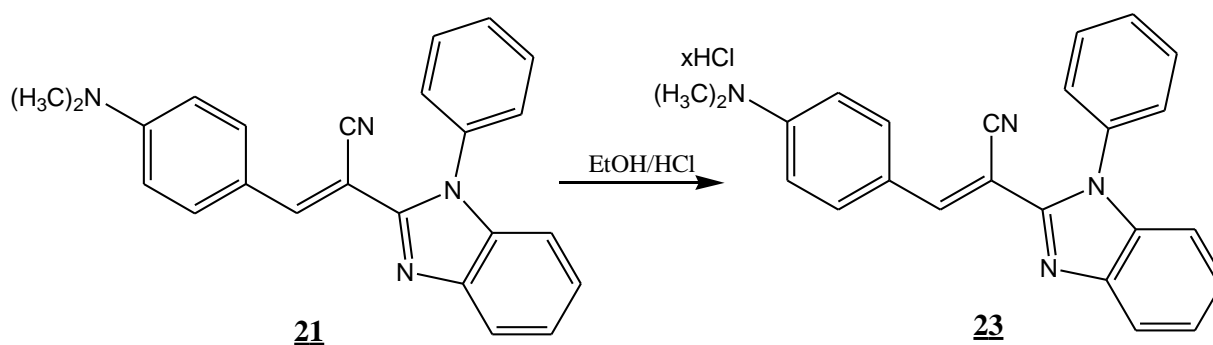
RASPRAVA I REZULTATI

Spoj **21** priređen je reakcijom aldolne kondenzacije iz 2-cijanometil-*N*-fenilbenzimidazola **2** i 4-dimetilamino-benzaldehida **20** prema Shemi 21.



Shema 21.

Pokušaj pripreve cikličkog spoja **22** reakcijom fotokemijske dehidrociklizacije spoja **21** nije bio uspješan. Reakcijska smjesa je osvijetljavana UV-Hg lampom od 400W u etanolnoj otopini uz dodatak joda 30 sati, a tijekom reakcije je praćen UV/Vis spektroskopijom koja nije pokazivala nikakve promjene u UV spektru u odnosu na početni UV spektar spoja **21**. Kako bi se poboljšala topljivost spoja **21** što je vrlo važno prilikom ispitivanja interakcije s DNA/RNA, priređena je i hidrokloridna sol **22** uvođenjem plinovitog HCl-a u etanolnu otopinu spoja 21 prema Shemi 22. (Prilog 12.)



Shema 22.

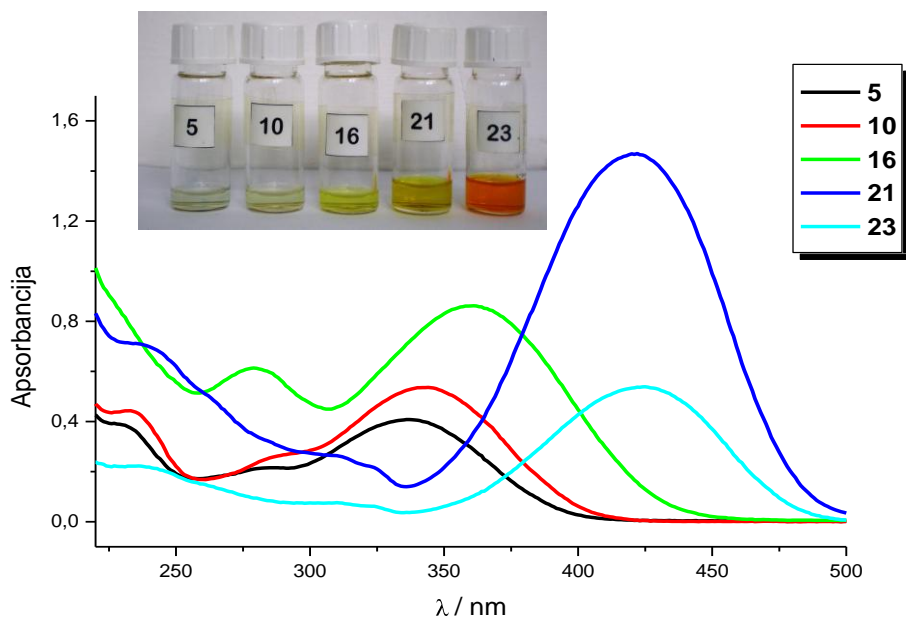
Struktura priređenih spojeva potvrđena je NMR i HPLC/MS spektroskopijom a na Slici 26. prikazani su ^1H i ^{13}C NMR spektri spoja **21**. (Prilog 11.)

4.3. Spektroskopska karakterizacija priređenih spojeva korištenjem UV/Vis i fluorimetrijske spektroskopije

Nekim od priređenih derivata ispitane su spektroskopske karakteristike korištenjem UV/Vis i fluorimetrijske spektroskopije. Matične otopine spojeva priređene su u etanolu i acetonitrilu u području koncentracija 10^{-3} – 10^{-4} mol/dm³.

4.3.1. UV/Vis spektroskopija

UV/Vis spektri snimani su pri koncentraciji spoja od 2×10^{-5} mol/dm³. Na Slici 27. prikazani su apsorpcijski spektri acikličkih spojeva **5**, **10**, **16**, **21** i **23** snimani pri danoj koncentraciji u etanolu.

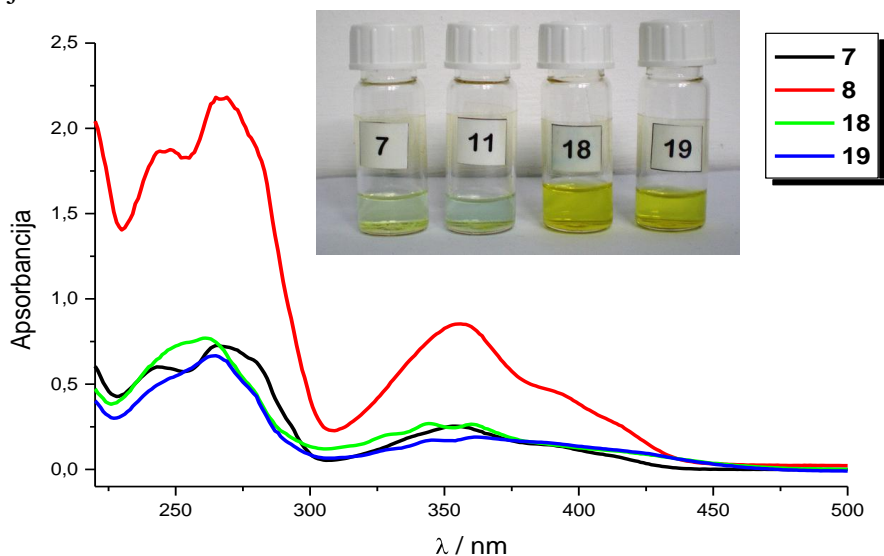


Slika 27. Apsorpcijski spektri acikličkih spojeva **5**, **10**, **16**, **21** i **23** u etanolu

Iz prikazanog spektra može se zaključiti da najveću apsorbanciju pokazuje *N,N*-dimetilamino supstituirani aciklički derivat **21** dok nesupstituirani derivat **5** pokazuje pri danoj koncentraciji najslabiju apsorbanciju. *N,N*-dimetilamino supstituirani aciklički derivati **21** i **23** također pokazuju značajan batokromni pomak u odnosu na ostale ispitivane derivate za ~70 nm. Protoniranjem derivata **23** dolazi do značajnog hipokromnog pomaka intenziteta apsorbancije. Nitro grupa derivata **16** doprinosi blagom batokromnom pomaku maksimuma apsorbancije kao i hiperkromnom pomaku intenziteta apsorbancije.

RASPRAVA I REZULTATI

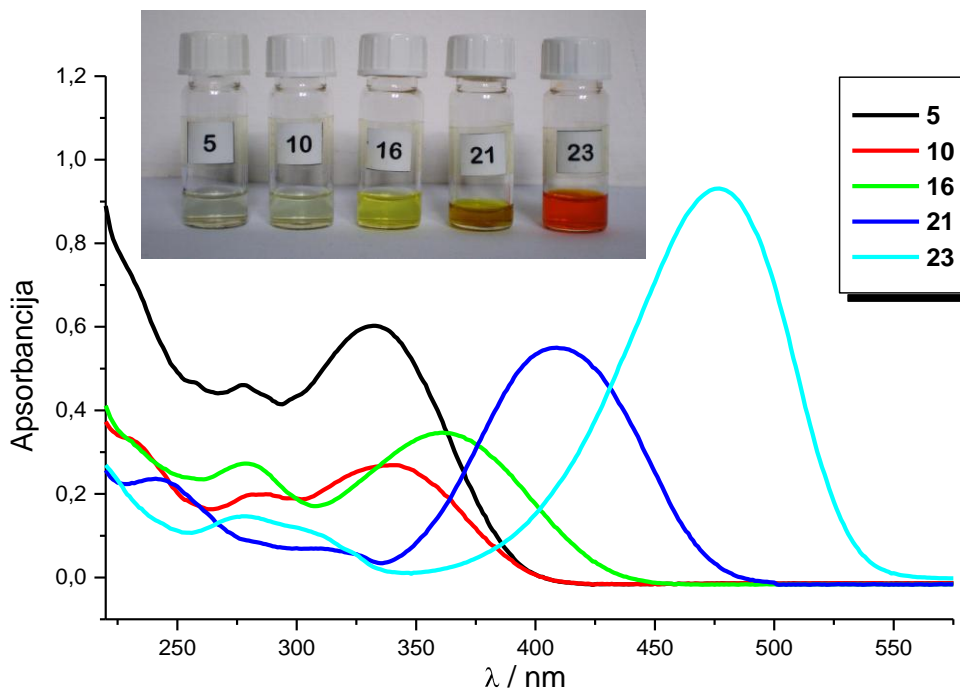
Na Slici 28. prikazani su apsorpcijski spektri cikličkih spojeva **7**, **11**, **18** i **19** snimani pri danoj koncentraciji u etanolu.



Slika 28. Apсорpcijski spektri cikličkih spojeva **7**, **11**, **18** i **19** u etanolu

Od ispitanih spojeva najveći intenzitet maksimuma apsorbanije pokazuje ciklički kloro supstituirani derivat **11**. Ostali derivati pokazuju sličan intenzitet i valne duljine maksimuma apsorbanije, bez značajnog utjecaja odgovarajućih supstituenata.

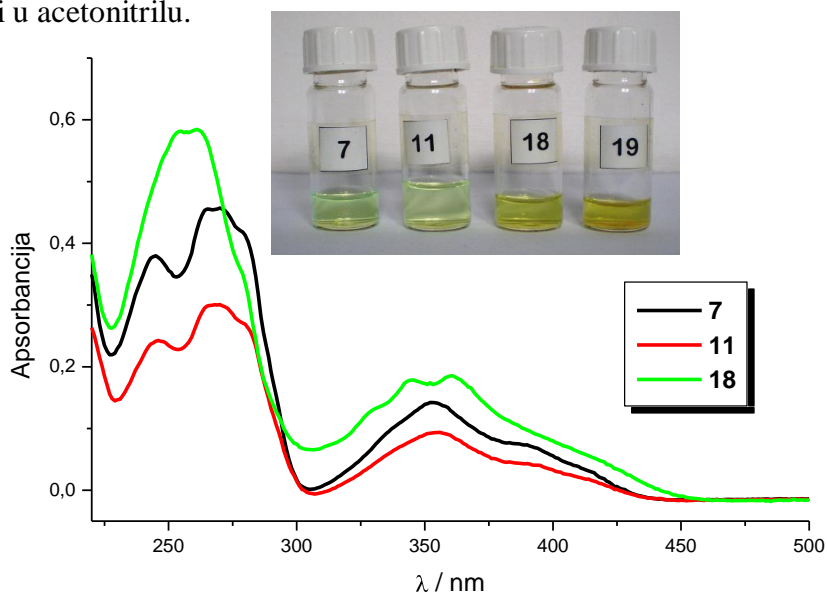
Sljedeća Slika 29. prikazuje apсорpcijske spektre acikličkih spojeva **5**, **10**, **16**, **21** i **23** snimanih pri danoj koncentraciji u acetonitrilu.



Slika 29. Apсорpcijski spektri acikličkih spojeva **5**, **10**, **16**, **21** i **23** u acetonitrilu

RASPRAVA I REZULTATI

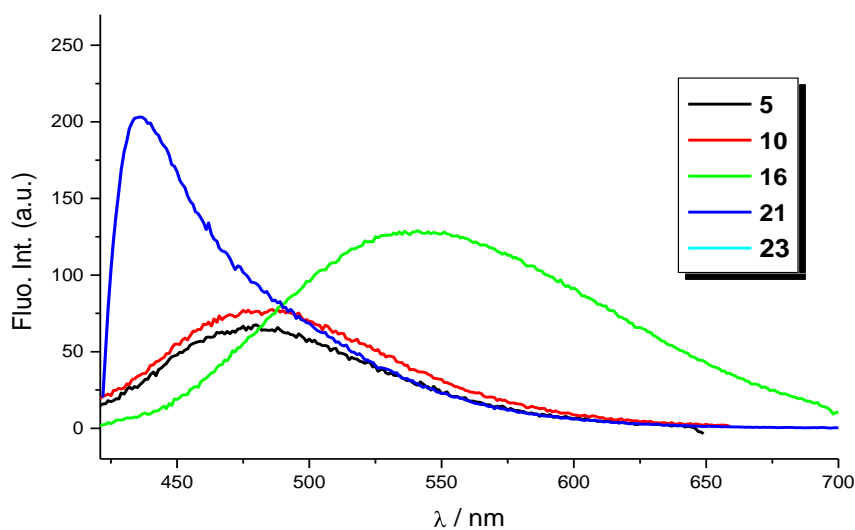
Na Slici 30. prikazani su apsorpcijski spektri cikličkih spojeva **7**, **11** i **17** snimani pri danoj koncentraciji u acetonitrilu.



Slika 30. Apсорpcijski spektri cikličkih spojeva **7**, **11** i **17** u acetonitrilu

4.3.2. Fluorimetrijska spektroskopija

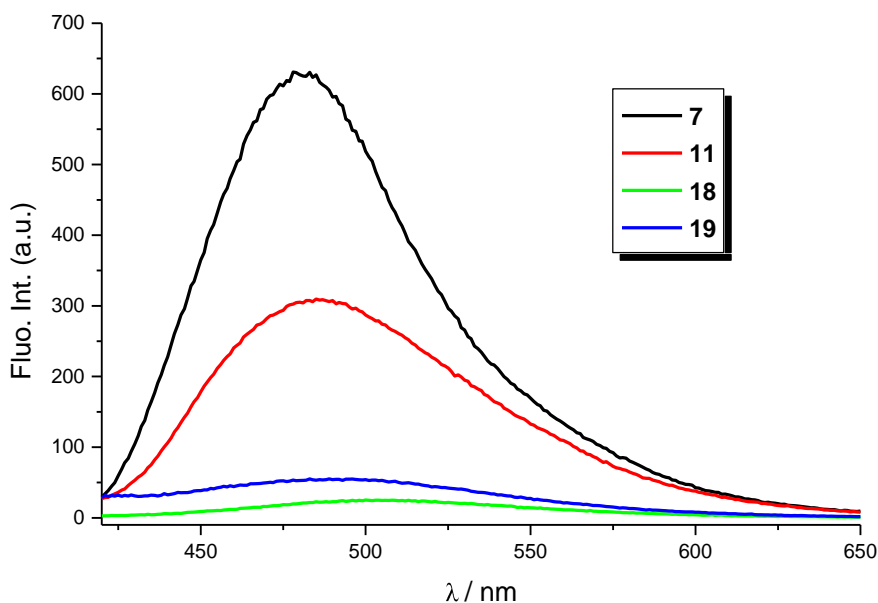
Fluorimetrijska spektroskopska ispitivanja, moguće je zbog visoke osjetljivosti ove metode, provesti kod bitno manjih koncentracija. Fluorimetrijski emisijski spektri snimani su pri koncentracijama spoja od 5×10^{-7} mol dm⁻³ (ciklički spojevi) i 2×10^{-6} mol dm⁻³ (aciklički spojevi) uz identičnu osjetljivost fluorimetra u etanolu i acetonitrilu. Na Slici 31. prikazani su emisijski spektri acikličkih spojeva **5**, **10**, **16**, **21**, **23** snimani pri danoj koncentraciji u etanolu.



Slika 31. Emisijski spektri acikličkih spojeva **5**, **10**, **16**, **21**, **23** u etanolu

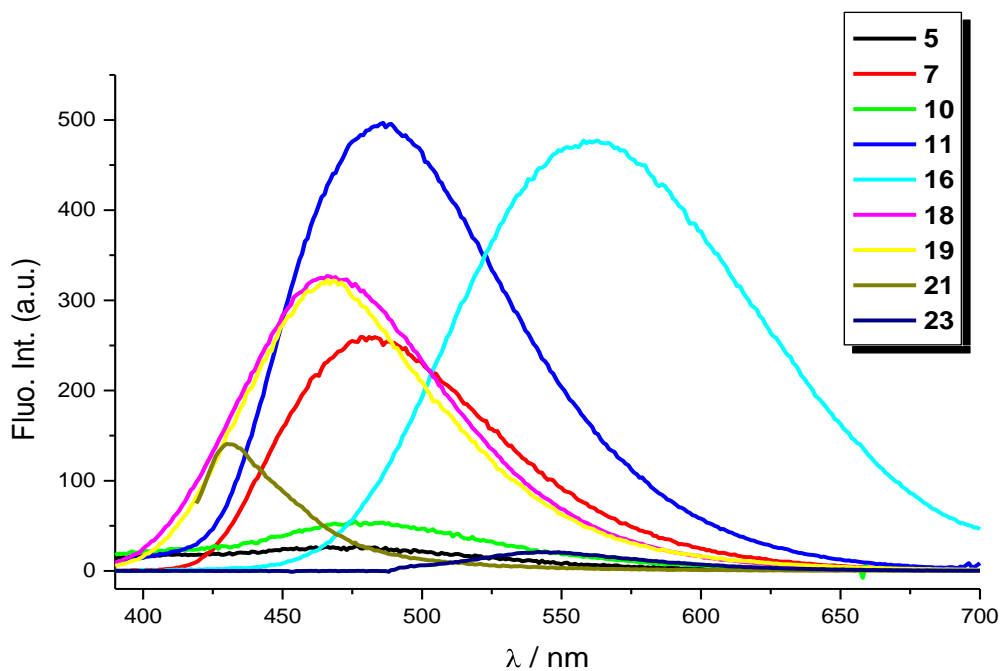
RASPRAVA I REZULTATI

Najizraženiji intenzitet fluorescencije pokazuje *N,N*-dimetilamino supstituirani derivat **21** koji ujedno i ima maksimum emisije na najmanjoj valnoj duljini. Nitro supstituirani derivat **16** pokazuje značajan batokromni pomak maksimuma emisije na 550 nm i veći intenzitet fluorescencije u odnosu na spojeve **5** i **10**. Na Slici 32. prikazani su emisijski spektri cikličkih spojeva **7**, **11**, **17** i **18** snimani pri danoj koncentraciji u etanolu.



Slika 32. Emisijski spektri cikličkih spojeva **7**, **11**, **18** i **19** u etanolu

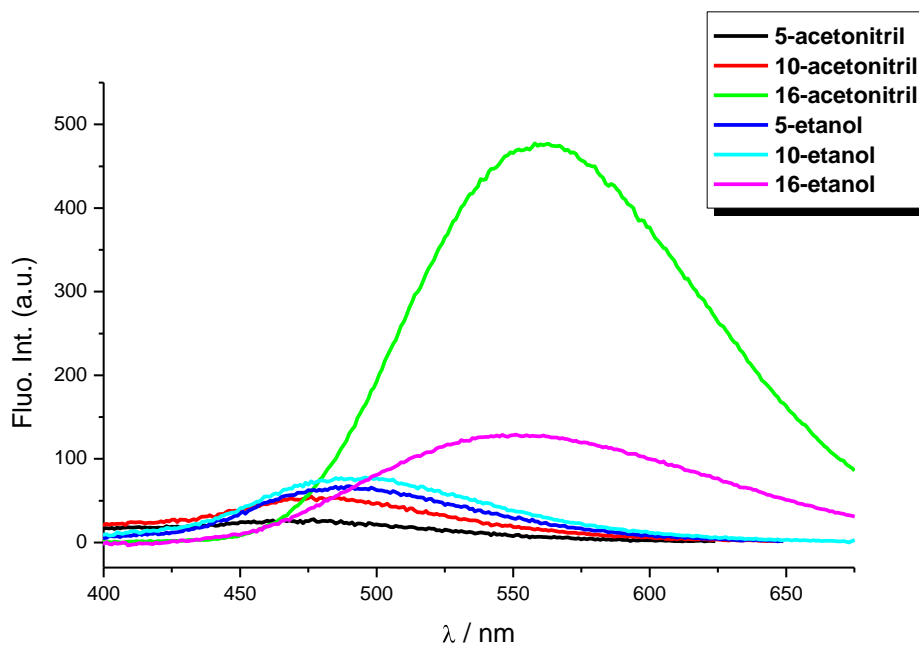
Najveći intenzitet fluorescencije pokazuje nesupstituirani benzimidazo[1,2-*a*]kinolin **7**. Nitro i amino supstituirani derivati **18** i **19** pokazuju vrlo slabi intenzitet fluorescencije. Supstituenti ne utječu značajno na pomak maksimuma emisije. Na Slici 33. prikazani su emisijski spektri acikličkih spojeva **5**, **10**, **16**, **21**, **23** snimanih pri koncentraciji 2×10^{-6} mol dm^{-3} i emisijski spektri cikličkih spojeva **7**, **11**, **18** i **19** snimanih pri koncentraciji 5×10^{-7} mol dm^{-3} u acetonitrilu.



Slika 33. Emisijski spektri acikličkih spojeva **5**, **10**, **16**, **21**, **23** i emisijski spektri cikličkih spojeva **7**, **11**, **18** i **19** u acetonitrilu.

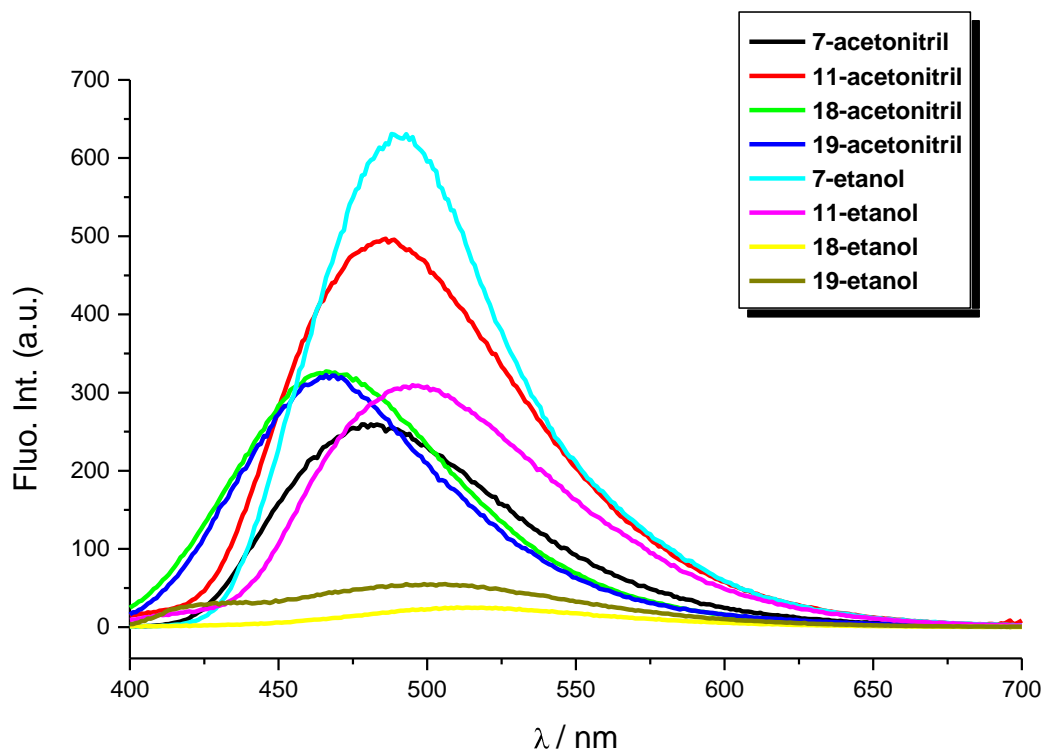
Od acikličkih spojeva najveći intenzitet emisije pokazuje nitro supstituirani derivat **16** dok otali aciklički spojevi ne pokazuju značajan intenzitet fluorescencije. Od cikličkih derivata najizraženiji intenzitet fluorescencije pokazuje kloro supstituirani derivat **11** koji u odnosu na nitro i amino supstituirane derivate **18** i **19** pokazuje i batokromni pomak maksimuma emisije.

Na Slici 34. prikazani su usporedno emisijski spektri acikličkih spojeva **5**, **10** i **16** snimanih u etanolu i acetonitrilu. Najveći batokromni pomak maksimuma emisije i u jednom i drugom otapalu pokazuje nitro supstituirani derivat **16** a puno jači intenzitet fluorescencije taj derivat pokazuje u acetonitrilu. I aciklički spojevi **5** i **10** pokazuju veći intenzitet fluorescencije u acetonitrilu ali taj utjecaj nije toliko značajan.



Slika 34. Usporedni emisijski spektri acikličkih spojeva 5, 10 i 16 snimanih u etanolu i acetonitrilu

Na Slici 35. prikazani su usporedno emisijski spektri cikličkih spojeva 7, 11, 18 i 19 snimanih u etanolu i acetonitrilu.



Slika 35. Emisijski spektri cikličkih spojeva 7, 11, 18 i 19 snimanih u etanolu i acetonitrilu

RASPRAVA I REZULTATI

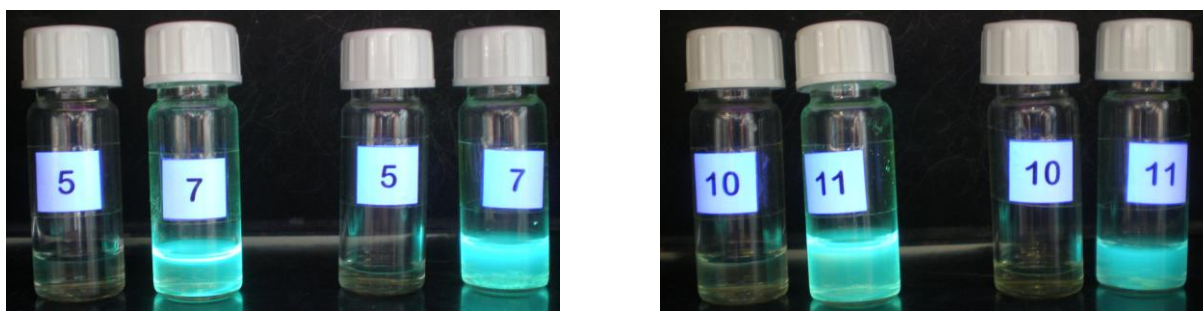
Nesupstituirani ciklički derivat **7** pokazuje jaču fluorescenciju u etanolu, dok ostali ciklički derivati pokazuju jaču fluorescenciju u acetonitrilu što je naročito izraženo kod nitro i amino derivata **17** i **18**. U Tablici 6. sumirani su rezultati dobiveni spektroskopskim ispitivanjima nekih od priređenih spojeva.

Tablica 6. UV/Vis i fluorimetrijski podaci ispitanih spojeva u etanolu i acetonitrilu

Spoj	acetonitril			etanol		
	λ_{\max}/nm	$\varepsilon/\text{dm}^3\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$	$\lambda_{\text{emiss}}/\text{nm}$	λ_{\max}/nm	$\varepsilon/\text{dm}^3\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$	$\lambda_{\text{emiss}}/\text{nm}$
5	332	30 050	478	337	20 350	478
	277	23 050		281	10 270	
7	353	7 100	483	353	12 750	481
	268	22 800		265	36 400	
	244	19 000		243	30 050	
	209	25 950				
10	339	13 550	481	344	28 000	484
	281	10 000		287	12 950	
	230	16 600				
	205	37 700				
11	335	4 750	468	355	42 700	486
	269	15 000		266	108 500	
	245	12 150		254	93 150	
	212	16 500				
16	361	17 500	561	360	43 100	539
	278	13 650		276	30 550	
	205	49 400				
18	361	9 200	466	360	13 300	507
	245	8 850		344	13 450	
	261	29 250		260	38 500	
19	371	-	467	361	9 550	492
	263			345	8 750	
				264	33 250	
21	408	27 600	431	421	73 500	434
	241	11 800				
23	476	46 500	545	425	74 198	480

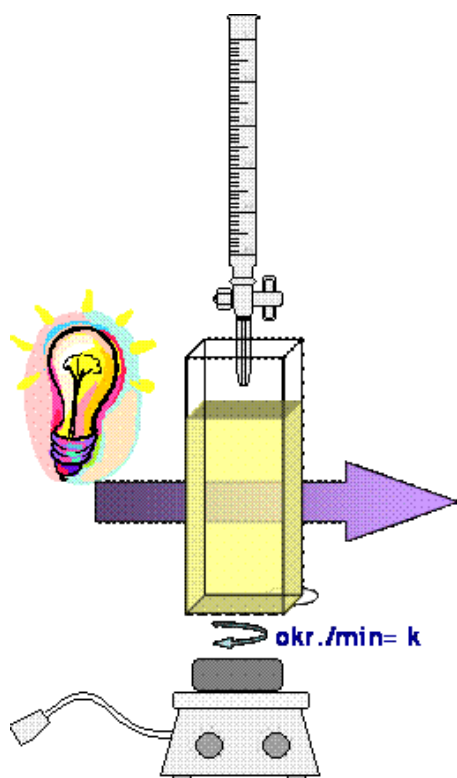
RASPRAVA I REZULTATI

Preliminarna spektroskopska ispitivanja spojeva pokazuju interesantne spektroskopske karakteristike što se naročito odnosi na fluorescenciju na koju značajno utječe odabir organskog otapala. Takva svojstva spojeva mogu se koristiti za utvrđivanje njihove potencijalne primjene kao optičkih disperznih bojila ili fluorescentnih proba za obilježavanje biomakromolekula ili proteina. Na Slici 36. prikazana je usporedba fluorescencije acikličkih spojeva **5** i **10** i cikličkih spojeva **7** i **11** u etanolu na valnoj duljini svjetla od 366 nm.



Slika 36. Usporedba fluorescencije acikličkih spojeva **5** i **10** i cikličkih spojeva **7** i **11** u etanolu na valnoj duljini svjetla od 366 nm

4.4. Ispitivanje interakcije nekih priređenih derivata s DNA/RNA

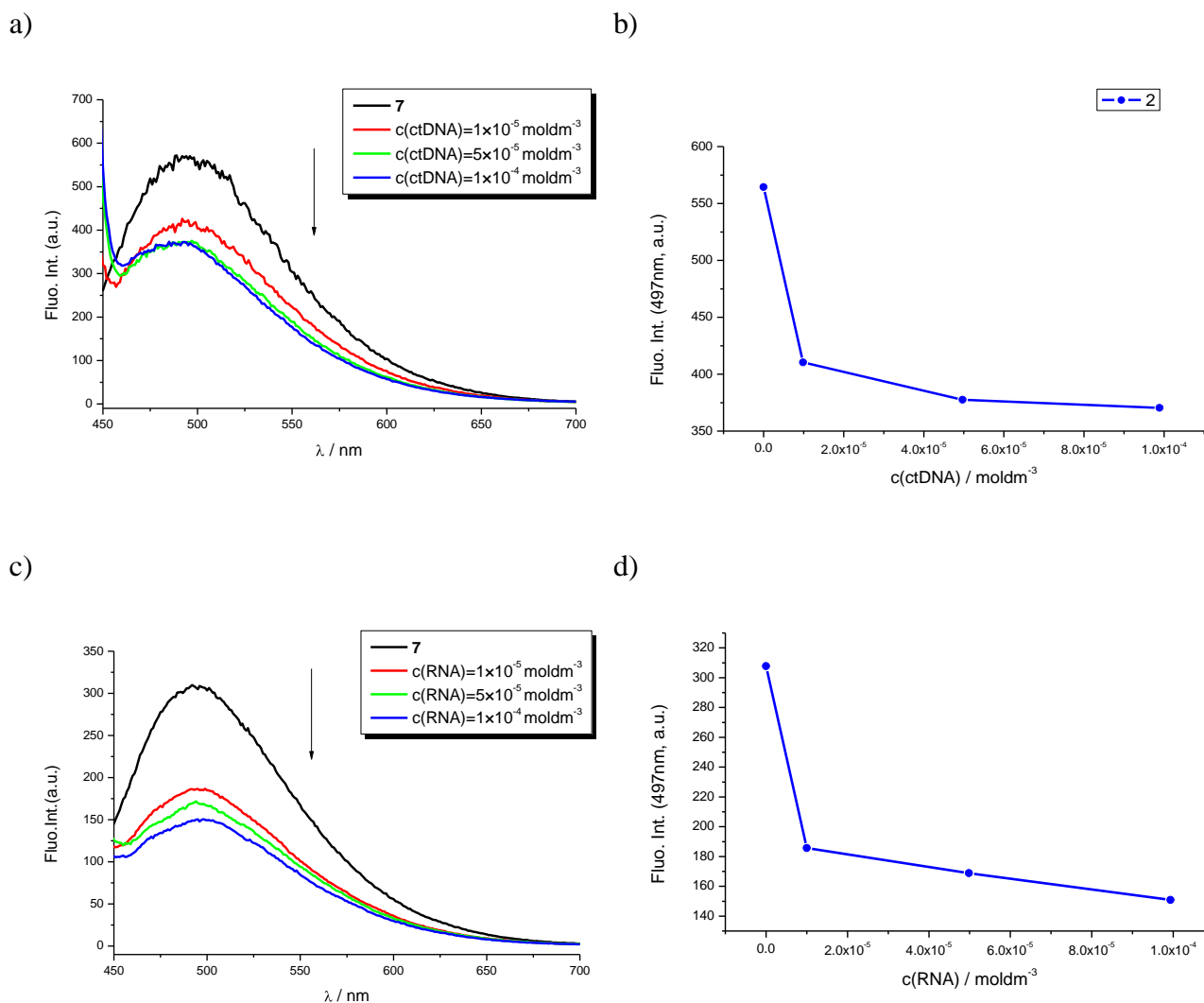


Da bi se utvrdila mogućnost analitičke primjene nekih od priređenih derivata benzimidazola za obilježavanje biomakromolekula DNA/RNA, provedena su preliminarna ispitivanja njihove interakcije s ctDNA i poliA-poliU (ds RNA) korištenjem fluorimetrijske spektroskopije koja zbog puno veće osjetljivosti dopušta ispitivanja kod znatno manjih koncentracija, u koncentracijskom području 10^{-7} ~ 10^{-6} moldm⁻³. Ispitivanja se provode u puferskom vodenom mediju te su na taj način slična fiziološkim uvjetima u biološkim sustavima (NaCaCo puffer, pH=7). Matične otopine spojeva priređene su u DMSO-u te su prilikom izvedbe titracija dodani odgovarajući alikvotu u pufersku vodenu otopinu. Nakon toga, u pufersku otopinu ispitivanog spoja dodaju se u određenim alikvotima otopine polinukleotida u zadanim koncentracijama.

Slika 37.

RASPRAVA I REZULTATI

Na Slici 38. prikazane su krivulje ispitivanja interakcije spoja **7** s ctDNA i pA-pU kao i krivulje ovisnosti intenziteta emisije na maksimumu emisije o dodanoj koncentraciji ctDNA ili RNA. Dodatkom otopine ctDNA i otopine pA-pU dolazi do smanjenja intenziteta a spoj **7** pokazuje značajnu interakciju s oba polinukleotida bez izražene razlike u interakciji s obzirom na vrstu polinukleotida.



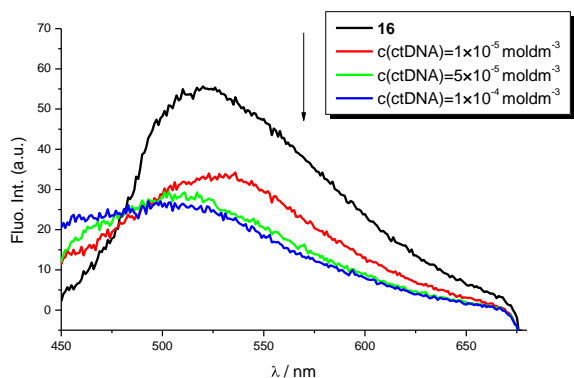
Slika 38. a) krivulje ispitivanja interakcije spoja **7** s ctDNA, b) krivulje ovisnosti intenziteta emisije na maksimumu emisije 497 nm o dodanoj koncentraciji ctDNA, c) krivulje ispitivanja interakcije spoja **7** s RNA, d) krivulje ovisnosti intenziteta emisije na maksimumu emisije 497 nm o dodanoj koncentraciji RNA

Na Slici 39. prikazane su krivulje ispitivanja interakcije spoja **16** s ctDNA i pA-pU kao i krivulje ovisnosti intenziteta emisije na maksimumu emisije o dodanoj koncentraciji ctDNA ili RNA. Dodatkom otopine ctDNA dolazi do smanjenja intenziteta fluorescencije dok

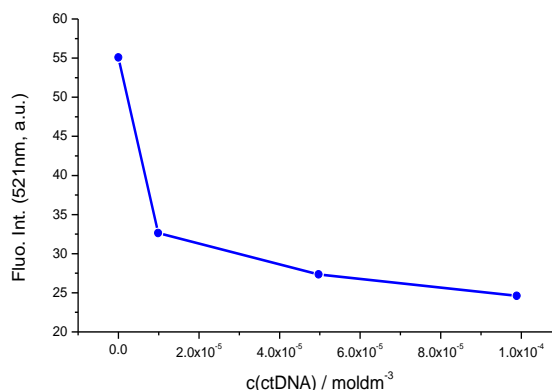
RASPRAVA I REZULTATI

dodatkom otopine pA-pU dolazi najprije pri nižim koncentracijama do smanjenja intenziteta fluorescencije dok pri višim koncentracijama polinukleotida dolazi do značajnog porasta intenziteta fluorescencije uz pojavu novog maksimuma u krivulji titracije na 422 nm.

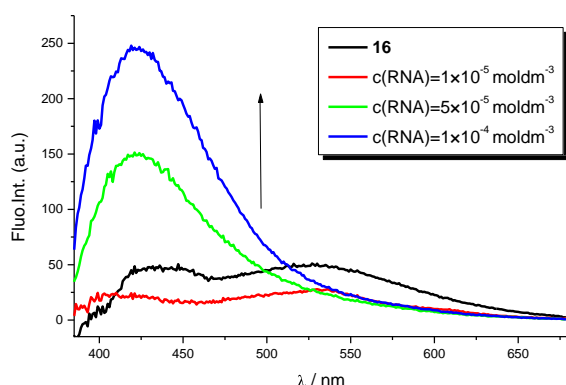
a)



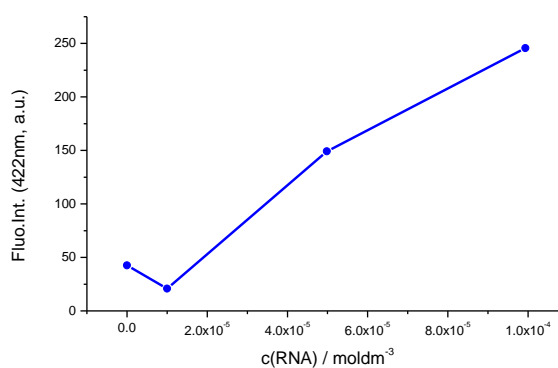
b)



c)



d)



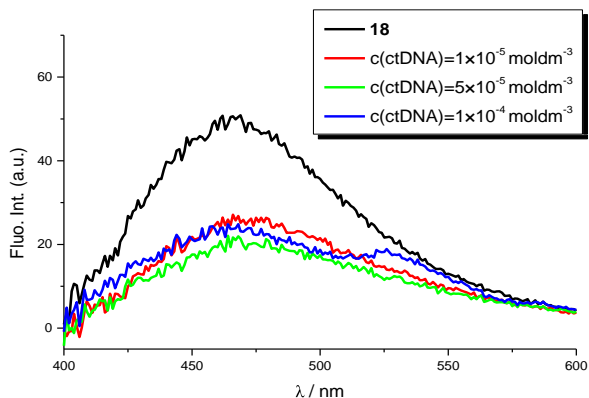
Slika 39. a) krivulje ispitivanja interakcije spoja **16** s ctDNA, b) krivulje ovisnosti intenziteta emisije na maksimumu emisije 521 nm o dodanoj koncentraciji ctDNA, c) krivulje ispitivanja interakcije spoja **16** s RNA, d) krivulje ovisnosti intenziteta emisije na maksimumu emisije 422 nm o dodanoj koncentraciji RNA

Na Slici 40. prikazane su krivulje ispitivanja interakcije spoja **18** s ctDNA i pA-pU kao i krivulje ovisnosti intenziteta emisije na maksimumu emisije o dodanoj koncentraciji ctDNA ili RNA. Dodatkom otopine ctDNA dolazi do smanjenja intenziteta fluorescencije dok dodatkom otopine pA-pU dolazi najprije pri nižim koncentracijama do smanjenja intenziteta fluorescencije dok pri višim koncentracijama polinukleotida dolazi do značajnog porasta intenziteta fluorescencije uz pojavu novog maksimuma u krivulji titracije na 420 nm. Iz dobivenih rezultata može se i zaključiti da spojevi **16** i **18** pokazuju različitu interakciju s

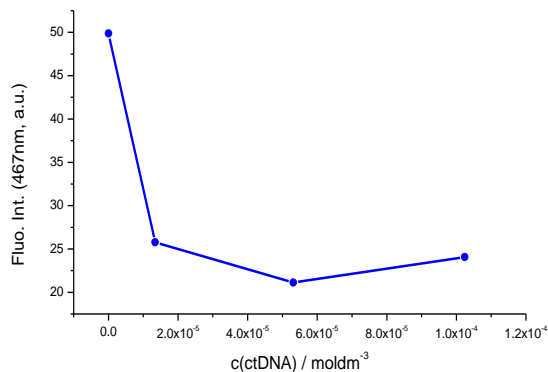
RASPRAVA I REZULTATI

polinukleotidima DNA i RNA, tj. da postoji njihova selektivnost prema odgovarajućem tipu polinukleotida.

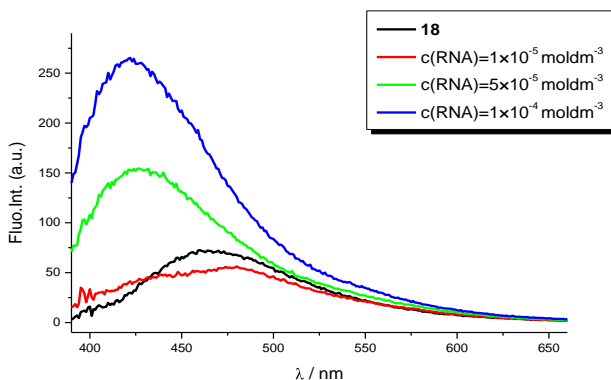
a)



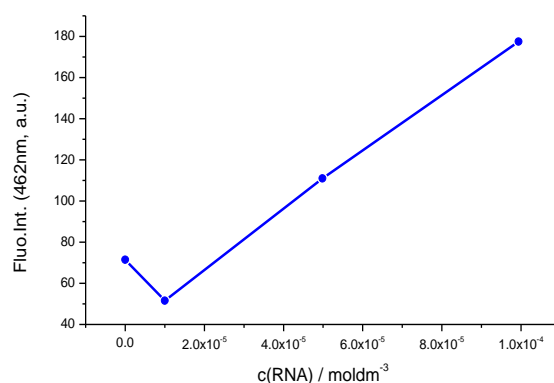
b)



c)



d)

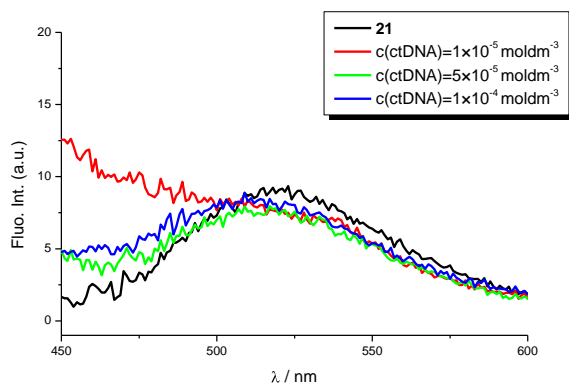


Slika 40. a) krivulje ispitivanja interakcije spoja **18** s ctDNA, b) krivulje ovisnosti intenziteta emisije na maksimumu emisije 467 nm o dodanoj koncentraciji ctDNA, c) krivulje ispitivanja interakcije spoja **18** s RNA, d) krivulje ovisnosti intenziteta emisije na maksimumu emisije 462 nm o dodanoj koncentraciji RNA

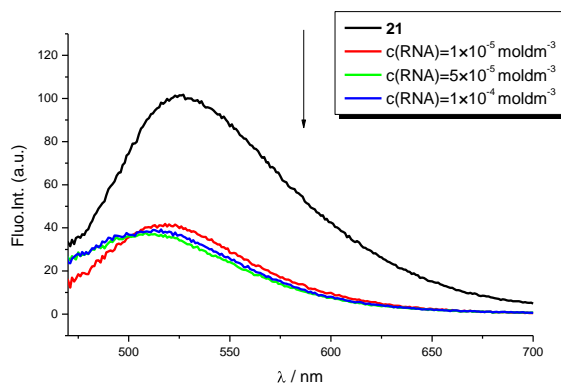
Iz krivulja titracije spoja **21** s ctDNA i pA-pU može se uočiti da pokazuje bolji afinitet za RNA dok s ctDNA gotovo i da ne pokazuje nikakvu mjerljivu interakciju.

RASPRAVA I REZULTATI

a)



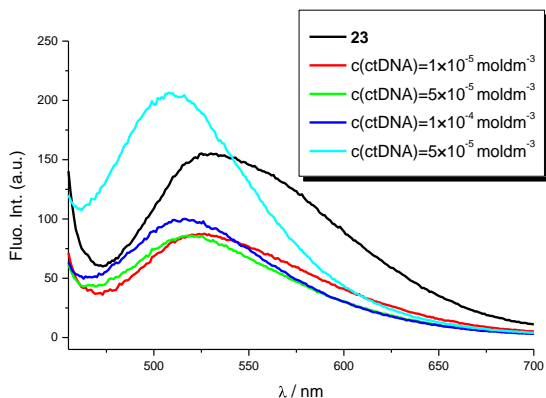
b)



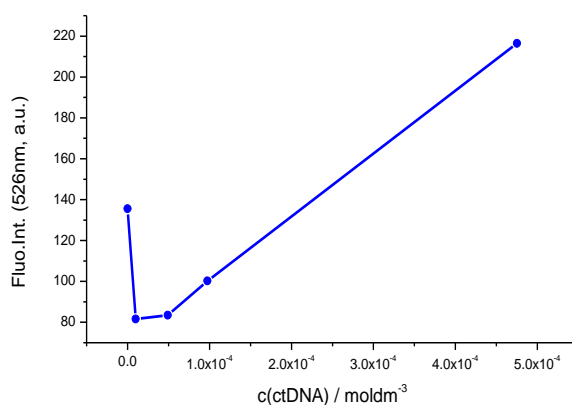
Slika 41. a) krivulja titracije spoja **21** s ctDNA, b) krivulja titracije spoja **21** s pA-pU

Budući da spoj **21** nije pokazivao interakciju s ctDNA, ispitana je interakcija spoja **23**, hidrokloridne soli spoja **21** s ctDNA. Na Slici 42. prikazana je krivulja ispitivanja i ovisnost intenziteta fluorescencije na maksimumu emisije o koncentraciji dodane ctDNA.

a)



b)



Slika 42. a) krivulja ispitivanja interakcije spoja **23** s ctDNA; b) krivulja ovisnosti fluorescencije na maksimumu emisije 526 nm o koncentraciji dodane ctDNA

Dodatkom ctDNA u pufersku otopinu spoja, pri nižim koncentracijama dolazi do pada intenziteta fluorescencije dok pri višim koncentracijama dolazi do rasta intenziteta fluorescencije i pomaka maksimuma emisijske krivulje prema nižim valnim duljinama.

U Tablici 7. sumirani su rezultati ispitivanja interakcije odabranih spojeva s DNA/RNA.

Tablica 7. Rezultati ispitivanja interakcije odabranih spojeva s DNA/RNA

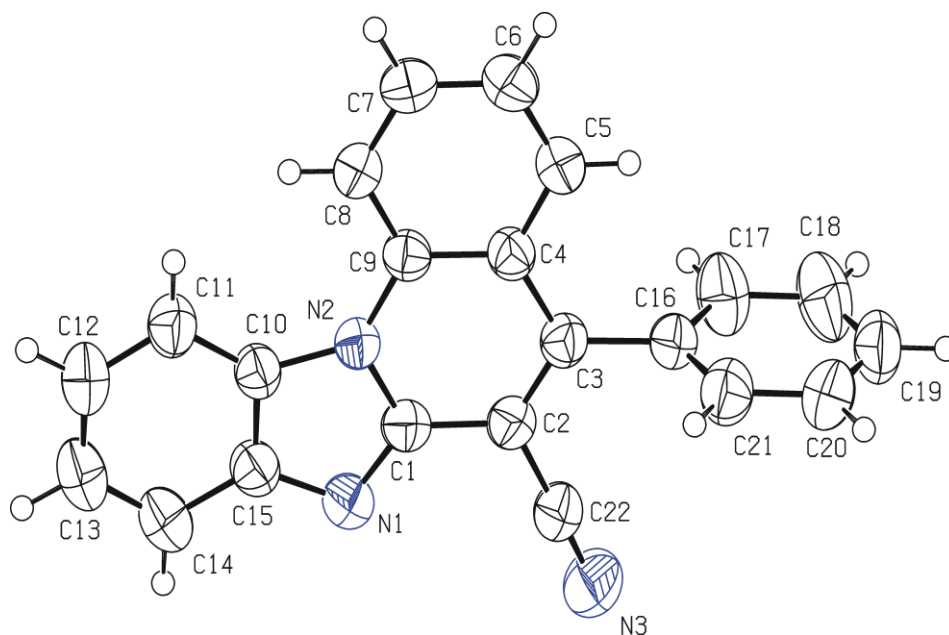
spojevi	rezultati dobiveni fluorimetrijskim titracijama	
	ctDNA	pA-pU (RNA)
7	hipokromni pomak	hipokromni pomak
16	hipokromni pomak	hiperkromni pomak pojava novog maksimuma emisije na nižim valnim duljinama
18	hipokromni pomak	hiperkromni pomak pojava novog maksimuma emisije na nižim valnim duljinama
21	nema interakcije	hipokromni pomak
23	hiperkromni pomak pojava novog maksimuma emisije na nižim valnim duljinama	-

Na temelju svih dobivenih rezultata preliminarnih ispitivanja može se zaključiti da neki od odabranih spojeva **pokazuju mogućnost potencijalne primjene kao fluorescentnih proba** za označavanje DNA/RNA koje se koriste u medicinskoj dijagnostici ili u analitičkoj kemiji. Najbolje rezultate pokazuju spojevi **16** i **18** koji značajno povećavaju intenzitet fluorescencije u prisutnosti **RNA** dok spoj **23** značajno povećava intenzitet fluorescencije u prisutnosti **ctDNA**. Isto tako smo ovim preliminarnim ispitivanjima utvrdili da među ispitanim spojevima postoji selektivno djelovanje prema odgovarajućim polinukleotidima; npr. spoj **16** u prisutnosti ctDNA gasi fluorescenciju dok u prisutnosti RNA (pA-pU) povećava intenzitet fluorescencije.

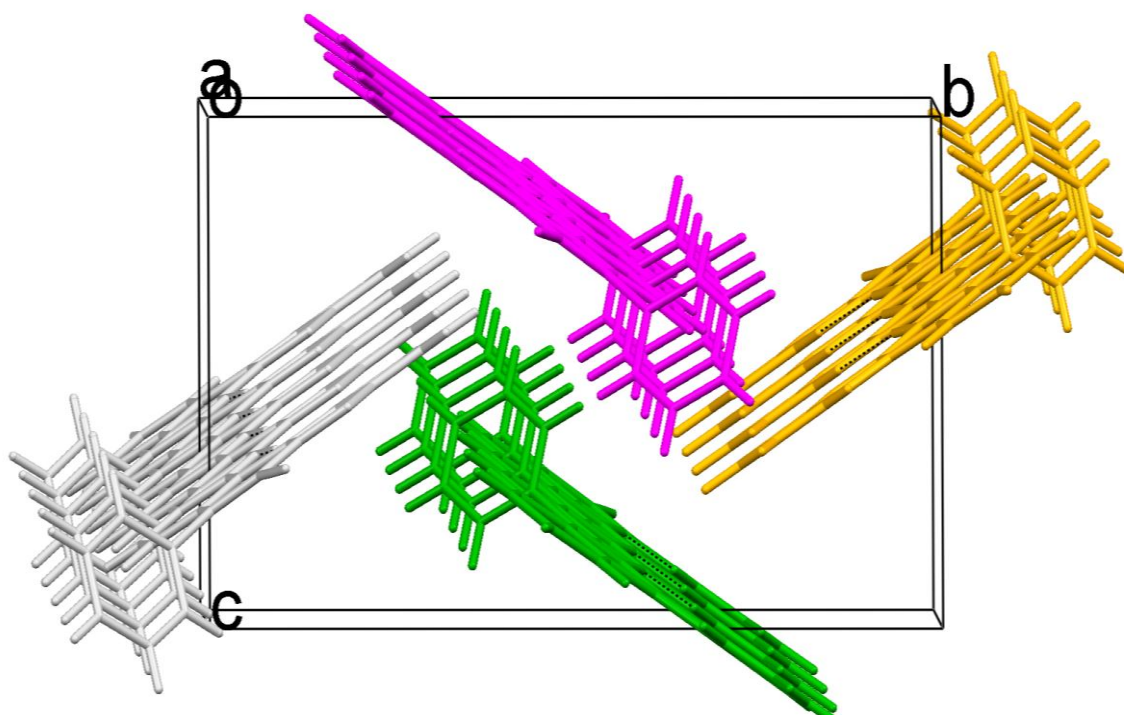
4.5. Kristalne strukture spojeva 7 i 16

RASPRAVA I REZULTATI

Spoj **7** kristalizira u monoklinskom sustavu, prostorna grupa $P 2_1/c$. Molekula nije planarna, već je C3-fenilni prsten zakrenut u odnosu na planarni kondenzirani heterocikl za $89.0(1)^\circ$.



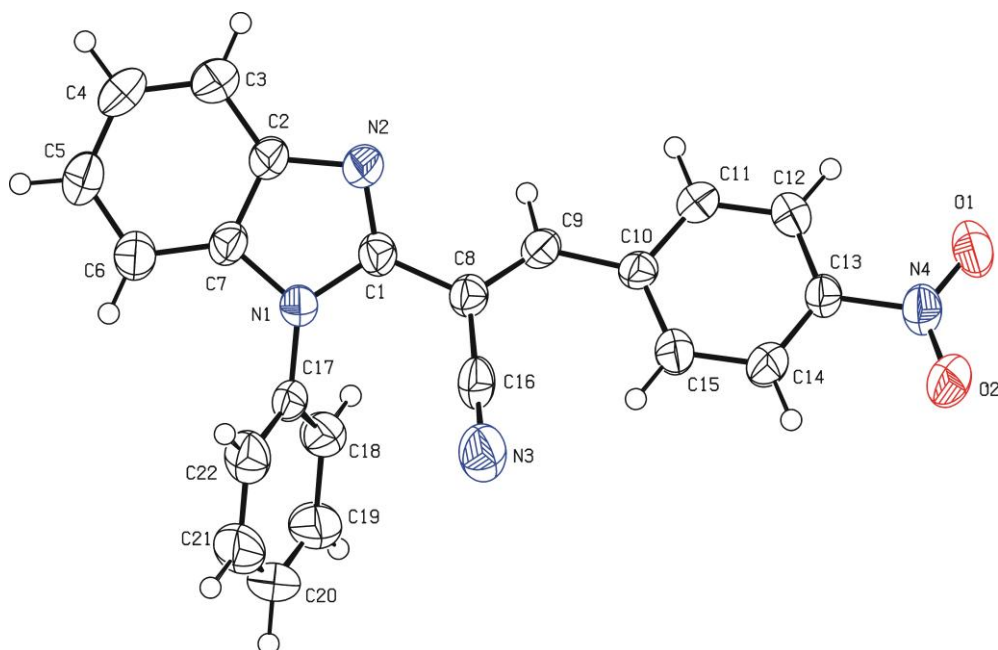
Slika 43. Molekulska struktura spoja **7**



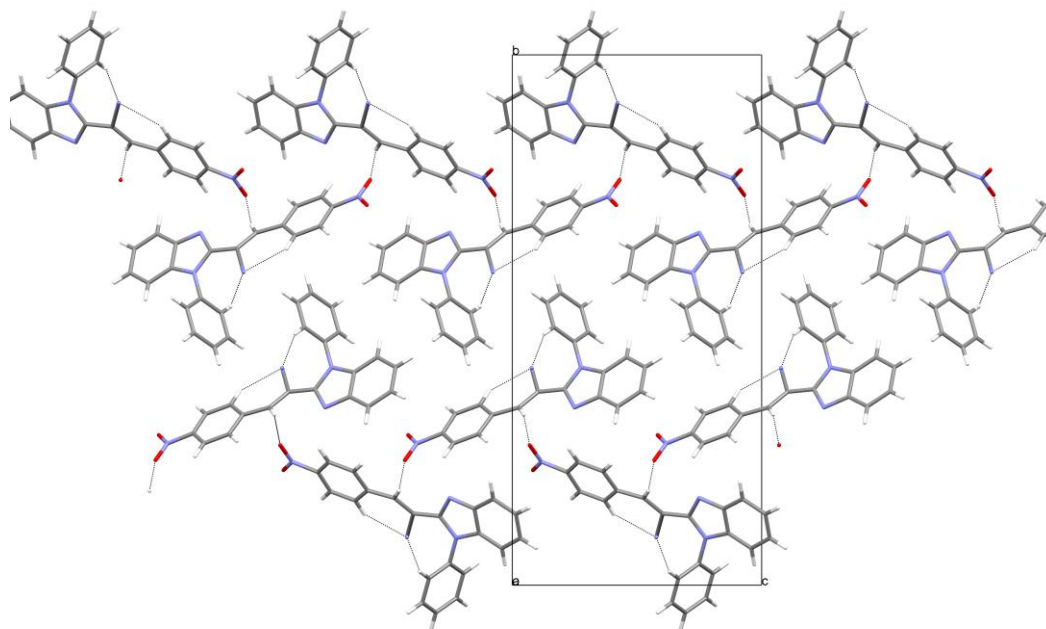
Slika 44. Kristalna struktura spoja **7**

RASPRAVA I REZULTATI

Molekula u kristalnom stanju, određena metodom ogiba rentgenskih zraka na jediničnom kristalu, nije planarna; ravnina N1-fenilnog prstena u odnosu na ravninu benzimidazolnog prstena zatvara kut od $67,23(12)^\circ$.



Slika 45. Molekulska struktura spoja 16



Slika 46. Kristalna struktura spoja 16

5. ZAKLJUČAK

ZAKLJUČAK

- U ovom su radu priređeni sljedeći spojevi: 2-cijanometil-*N*-fenilbenzimidazol **2**, 2-[2-(*N*-fenil)benzimidazolil]-3-(2-fenil)akrilonitril **5**, 2-[2-(*N*-fenil)benzimidazolil]-3-(2-klorfenil)akrilonitril **6**, 6-cijano-benzimidazo[1,2-*a*]kinolin **7**, 4-kloro-6-cijano-benzimidazo[1,2-*a*]kinolin **8**, 2-[2-(*N*-fenil)benzimidazolil]-3-(4-klorfenil)akrilonitril **10**, 2-kloro-6-cijano-7-fenil-benzimidazo[1,2-*a*]kinolin **11**, 2-[2-(*N*-fenil)benzimidazolil]-3-(4-nitrofenil)akrilonitril **16**, 3-nitro-6-cijano-benzimidazo[1,2-*a*]kinolin **17**, 3-amino-6-cijano-benzimidazo[1,2-*a*]kinolin **18**, 3-amino-6-cijano-benzimidazo[1,2-*a*]kinolin hidroklorid **19**, 2-[2-(*N*-fenil)benzimidazolil]-3-(4-*N,N*-dimetilaminofenil)akrilonitril **21**, 2-[2-(*N*-fenil)benzimidazolil]-3-(4-*N,N*-dimetilaminofenil)akrilonitril hidroklorid **23**.
- Reakcijama aldolne kondenzacije 2-cijanometil-*N*-fenilbenzimidazola **2** i odgovarajućeg aromatskog aldehida priređeni su aciklički spojevi **5**, **6**, **10**, **16** i **21**.
- Ciklički spojevi **7**, **8**, **11** i **17** priređeni su fotokemijskom dehidrociklizacijom, osvjetljavanjem etanolne otopine acikličkih spojeva **5**, **6**, **10** i **16** visokotlačnom UV lampom od 400 W uz propuhivanje zrakom i katalitičkom količinom joda.
- Redukcijom spoja **17** s kositar-kloridom dihidratom priređen je amino supstituirani spoj **18**. Ciklički *N,N*-dimetilamino supstituirani **22** nije uspješno priređen.
- Hidrokloridne soli amino **19** i *N,N*-dimetilamino **23** supstituiranih spojeva **18** i **21** priređene su uvođenjem plinovitog HCl-a u zasićenu etanolnu otopinu.
- Svim novopriređenim spojevima struktura je potvrđena korištenjem ¹H i ¹³C NMR, UV/Vis i fluorimetrisjkom spektroskopijom te HPLC/MS-om.
- Spojevima **7** i **16** određena je kristalna i molekulska struktura.
- Spojevima **7**, **16**, **18**, **21** i **23**, kao potencijalnim biološki aktivnim spojevima, ispitana je interakcija s ctDNA i RNA korištenjem fluorimetrijske spektroskopije.
- Spojevi spojevi **16** i **18** značajno povećavaju intenzitet fluorescencije u prisutnosti RNA dok spoj **23** značajno povećava intenzitet fluorescencije u prisutnosti ctDNA.
- Spoj **16** u prisutnosti ctDNA gasi fluorescenciju dok u prisutnosti RNA povećava intenzitet fluorescencije.
- Spojevi **16**, **18** i **23** pokazuju mogućnost potencijalne primjene kao fluorescentnih proba za obilježavanje DNA/RNA.

6. ZAHVALA

ZAHVALA

Zahvaljujemo doc. dr. sc. Marijani Hranjec, mentorici, na predloženoj temi kao i savjetima i pomoći koju nam je pružila tijekom izrade i pisanja ovog rada.

Zahvaljujemo prof. dr. sc. Grace Karminski-Zamola, voditeljici projekta „Novi heterocikli kao antitumorski i antivirusni (pametni) lijekovi“ (broj 125-0982464-1356 financiranim od MZOŠ-a) u sklopu kojeg je napravljen ovaj rad.

Zahvaljujemo također i svim članovima Zavoda za organsku kemiju, Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije na ugodnom radnom okruženju.

Zahvaljujemo prof. dr. sc. Gordani Pavlović sa Tekstilno tehnološkog fakulteta na određenim kristalnim strukturama.

7. LITERATURA

LITERATURA

1. a) A. R. Katritzky, D. O. Tymoshenko, D. Monteux, V. Vvedensky, G. Nikonov, C. B. Cooper, M. Deshpande, *J. Org. Chem.* **65** (2000) 8059-8062; b) H. Hoang, D. V. LaBarbera, K. A. Mohammed, C. M. Ireland, E. B. Skibo, *J. Med. Chem.* **50** (2007) 4561-4571.
2. M. Hranjec, M. Kralj, I. Piantanida, M. Sedić, L. Šuman, K. Pavelić, G. Karminski-Zamola, *J. Med. Chem.* **50** (2007) 5696-5711.
3. M. A. Ismail, R. Brun, T. Wenzler, F. A. Tanious, W. D. Wilson, D. W. Boykin; *Bioorg. Med. Chem.* **12** (2004) 5405-5413.
4. J. B. Chaires, Drug-DNA interactions. *Current Opinion in Structural Biology* **8** (1998) 314-320.
5. R. Langer, Perspectives: Drug delivery- drugs on target. *Science* **293** (2001) 58-59.
6. M. Hranjec, *Doktorska disertacija „Sinteza, biološko djelovanje i interakcija s ct-DNA novih derivata benzimidazola”* Zagreb, 2007
7. N. Perin, *Diplomski rad „Sinteza, mikrovalna sinteza i spektroskopska karakterizacija novih potencijalnih biološki aktivnih derivata benzimidazo[1,2-a]kinolina“* Zagreb, 2009
8. D. Guenther, US Patent, US 4,124,589 (1978); b) D. Guenther, US Patent, US 4,219,651 (1980).
9. Y. M. Volovenko, A. G. Nemazanyi, G. L. Vesel'skaya, S. I. Tyukhtenko i F. S. Babichev, *Geol. Khim. Biolog. Nauki* **12** (1986) 29-32
10. F. S. Babichev, V. K. Patratii, Y. M. Volovenko, N. G. Prodanchuk, V. G. Sinchenko, A. G. Nemazanyi i T. A. Silaeva, *Khim. Farm. Zh.* **7** (1989) 834-836
11. V. L. Zima, O. M. Dyachok i N. S. Miroshnichenko, *Geol. Khim. Biolog. Nauki* **11** (1990) 2971- 73
12. F. Saczewski, P. Reszka, M. Gdaniec, R. Gruñert, P. J. Bednarski, *J. Med. Chem.* **47** (2004) 3438-3449
13. M. Hranjec and G. Karminski-Zamola, *Molecules* **12** (2007) 1817-1828
14. M. Hranjec, G. Pavlović, G. Karminski-Zamola, *Struct. Chem.* **18** 943-949
15. F. Saczewski, A. Stencel, A. M. Bienczak, K. A. Langowska, M. Michaelis, W. Werel, R. Halasa, P. Reszka, P. J. Bednarski, *Eur. J. Med. Chem.* **43** (2008) 1847-1857
16. M. Hranjec, G. Pavlović, M. Marjanović, M. Kralj, G. Karminski-Zamola, *Eur. J. Med. Chem.* **45** (2010) 2405-2417
17. N. Perin, M. Hranjec, G. Pavlović, G. Karminski-Zamola, *Dyes and Pigments* **91** (2011) 79-88

LITERATURA

18. Skoog, et al. Principles of Instrumental Analysis. 6th ed. Thomson Brooks/Cole. 2007, 169-173
19. J. D. J. Ingle and S. R. Crouch, Spectrochemical Analysis, Prentice Hall, New Jersey (1988)
20. J. R. Albani, Principles and Applications of Fluorescence Spectroscopy, Blackwell Publishing (2007) 98-123
21. D. Rendell, Fluorescence and Phosphorescence (1987)
22. J. Ren i J. B. Chaires, *Biochemistry* **38** (1999) 16067-16075.
23. G. Karminski Zamola, K. Starčević, *Kem. Ind.* **56** (2007) 257-273
24. F. A. Tanious, D. Daoyuan, A. P. Donald i W. D. Wilson, *Biochemistry* **36** (1997) 15315-15325.
26. D. Staerk, A. A. Hamed, E. Pedersen i J. P. Jacobsen, *Bioconjugate Chem.* **8** (1997) 869-877.
27. J. B. Chaires, *Inc. Biopoly* **44** (1997) 201-215; b) P. D. Ross i S. Subramanian, *Biochemistry* **20** (1981) 3096-3102.
28. J. R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, N.Y. (1999).
29. E. A. te Velde, Th. Veerman, V. Subramaniam i Th. Ruers, *EJSO* **36** (2010) 6-15.
30. M. Demeunynck, C. Bailly, W. D. Wilson, In DNA and RNA binders, Weinheim: Wiley-VCH; 2002

8. SAŽETAK

Emma Horak i Martina Tireli

Novi derivati benzimidazo[1,2-*a*]kinolina kao potencijalne fluorescentne probe za obilježavanje DNA/RNA

Posljednjih godina supstituirani benzimidazoli i njihovi derivati predmet su intenzivnih istraživanja organskih i medicinskih kemičara širom svijeta. Ovaj rad predstavlja nastavak našeg kontinuiranog istraživanja na području medicinske kemije i sinteze novih i potencijalnih biološki aktivnih spojeva. Za sintezu ciljanih derivata korištene su klasične metode organske sinteze kao i ekološki prihvatljive fotokemijska i mikrovalna sinteza. U sklopu ovog rada priređeni su novi aciklički derivati 2-[(*N*-fenil)benzimidazolil]-3-fenilakrilonitrila. Benzimidzo[1,2-*a*]kinolini priređeni su fotokemijskom dehidrociklizacijom iz acikličkih derivata. Strukture novopriređenih spojeva potvrđene su NMR, HPLC/MS, UV/Vis, fluorimetrijskom spektroskopijom i rendgenskom strukturnom analizom.

Ciklički i planarni kondenzirani spojevi pokazuju vrlo često zanimljive spektroskopske karakteristike pa su one ispitane i nekim od priređenih spojeva korištenjem UV/Vis i fluorimetrijske spektroskopije. Matične otopine ispitivanih spojeva priređene su u etanolu i acetonitrilu a utvrđen je značajan utjecaj otapala na spektroskopske karakteristike, naročito fluorescenciju. Takva optička svojstva važna su za utvrđivanje njihove potencijalne primjene kao optičkih disperznih bojila ili fluorescentnih proba za obilježavanje biomakromolekula ili proteina.

Preliminarnim ispitivanjem interakcije s polinukleotidima DNA/RNA, korištenjem fluorimetrijske spektroskopije, utvrđena je mogućnost potencijalne primjene nekih od ispitanih spojeva kao fluorescentnih proba za obilježavanje i detekciju nukleinskih kiselina budući da vezanjem na DNA/RNA povećavaju intenzitet fluorescencije. Također je ovim ispitivanjima utvrđena selektivnost nekih od ispitanih spojeva prema odgovarajućem polinukleotidu DNA ili RNA.

Ključne riječi: benzimidazo[1,2-*a*]kinolini, fluorescentne probe, NMR, UV/Vis i fluorimetrijska spektroskopija, interakcija s ctDNA/RNA

9. SUMMARY

Ema Horak i Martina Tireli

Novel benzimidazo[1,2-*a*]quinoline derivatives as potential fluorescent probes for DNA/RNA detection

In the last few years benzimidazoles and its derivatives have drawn considerable worldwide attention of medicinal and organic chemists. This work is a continuation of our scientific research in the field of medicinal chemistry and synthesis of novel potential biologically active compounds. Targeted compounds were synthesized by using a classical organic synthesis reactions as well as eco-friendly photochemical and microwave synthesis.

Within this work, a novel acyclic derivatives of 2-[(*N*-phenyl)benzimidazolyl]-3-phenylacrylonitriles were synthesized. Benzimidazo[1,2-*a*]quinolines were prepared by photochemical dehydrocyclization reaction from acyclic derivatives. Structures of prepared compounds were confirmed by means of NMR, HPLC/MS, UV/Vis, fluorimetric spectroscopy and by crystal structure determination.

Cyclic, planar condensed compounds often possess very interesting spectroscopic properties. Some of prepared compounds were spectroscopically characterized by UV/Vis and fluorimetric spectroscopy. Stock solutions were prepared in ethanol and acetonitrile and based on obtained results, we can conclude that corresponding organic solvent had considerable influence on the spectroscopic properties, especially fluorescence, of examined compounds. Such optical properties are important for their possible application as optical disperse dyes or fluorescent probes for detection and tracing of biomacromolecules DNA/RNA or proteins.

Based on preliminary investigation of interaction with polynucleotides DNA/RNA by fluorimetric spectroscopy and a fact that some of compounds enhance fluorescence intensity by binding to DNA/RNA, their possible application as a fluorescent probes for detection and tracing of nucleic acids was determinate. This investigation also showed selectivity of some of compounds towards polynucleotides DNA/RNA.

Key words: benzimidazo[1,2-*a*]quinolines, fluorescent probes, NMR, UV/Vis and fluorimetric spectroscopy, interaction with ctDNA/RNA

10. ŽIVOTOPIS

ŽIVOTOPIS

Emma Horak rođena je 23.07.1987. godine u Bjelovaru, gdje je završila III. Osnovnu školu Bjelovar. Upisala je Opću gimnaziju u Bjelovaru 2002. godine, te maturirala 2006. godine s odličnim uspjehom. Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije je upisala 2006. godine, te odabrala studij Primijenjena kemija. Godine 2009. je obranila završni rad iz polja organske kemije 'Priprava novih derivata 2-benzimidazo-amida i kinolona s potencijalnim antitumorskim djelovanjem' pod vodstvom mentorice prof. dr. sc. Grace Karminski-Zamola i time postala sveučilišna prvostupnica primijenjene kemije. Godine 2010. je sudjelovala je na VIII. Susretu mladih kemijskih inženjera u Zagrebu s priopćenjem na posteru 'Priprava novih derivata 2-benzimidazo-amida s potencijalnim antitumorskim djelovanjem'. Akademske godine 2009./2010. je upisala prvu godinu diplomskog studija Primijenjene kemije na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije. Do sada je sve ispite diplomskog studija položila s prosjekom 4,68. Aktivno se služi engleskim jezikom i pismom, pasivno koristi njemački jezik, a poznaje i osnove španjolskog jezika.

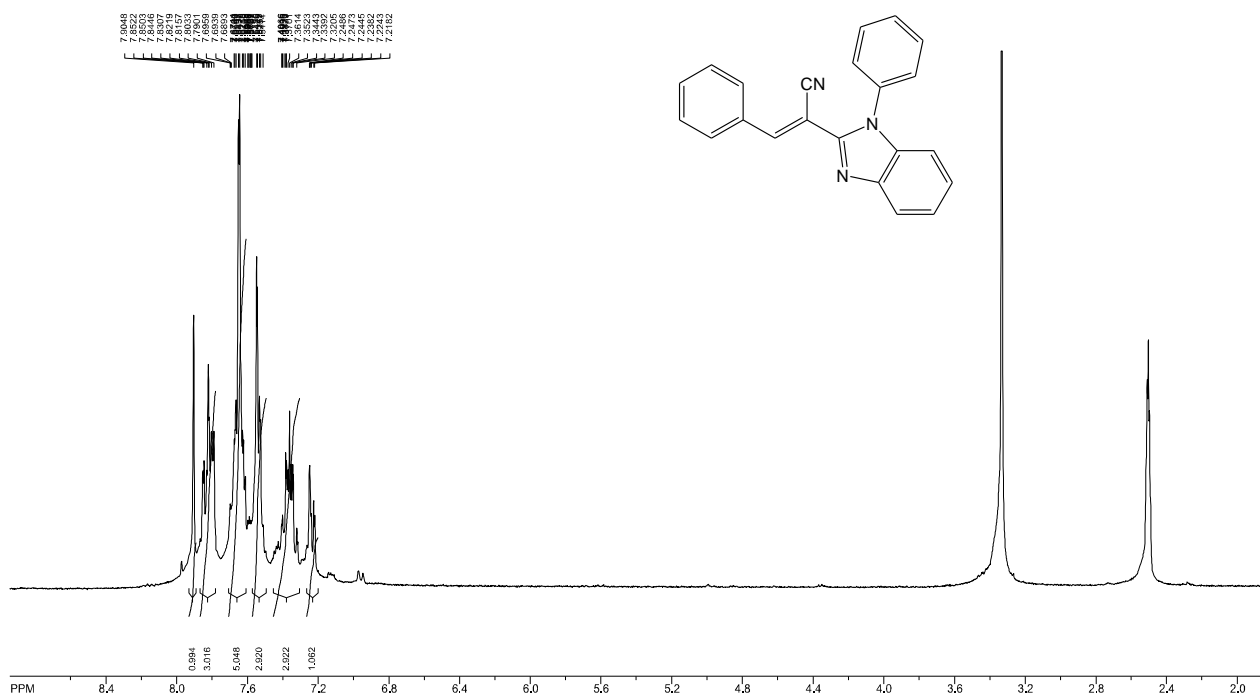
Martina Tireli rođena je 05.03.1988. godine u Puli. Osnovnu školu završila je u Labinu, te je 2002. godine upisala je SŠ. "Mate Blažina" u Labinu te maturirala 2006. godine s odličnim uspjehom. 2006. godine upisala je Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije u Zagrebu, smjer Primijenjena kemija. Godine 2009. obranila je završni rad pod nazivom "Sinteza I spektroskopska karakterizacija novih potencijalno biološki aktivnih benzimidazo[1,2-*a*]piridina" pod vodstvom dr. sc. Marijane Hranjec. Prvu godinu diplomskog studija Primijenjene kemije upisala je 2009. godine na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije. Položila je sve ispite na diplomskom studiju s prosjekom ocjena 4,75. Aktivno se služi engleskim i talijanskim jezikom.

11. PRILOZI

PRILOZI

PRILOG 2.

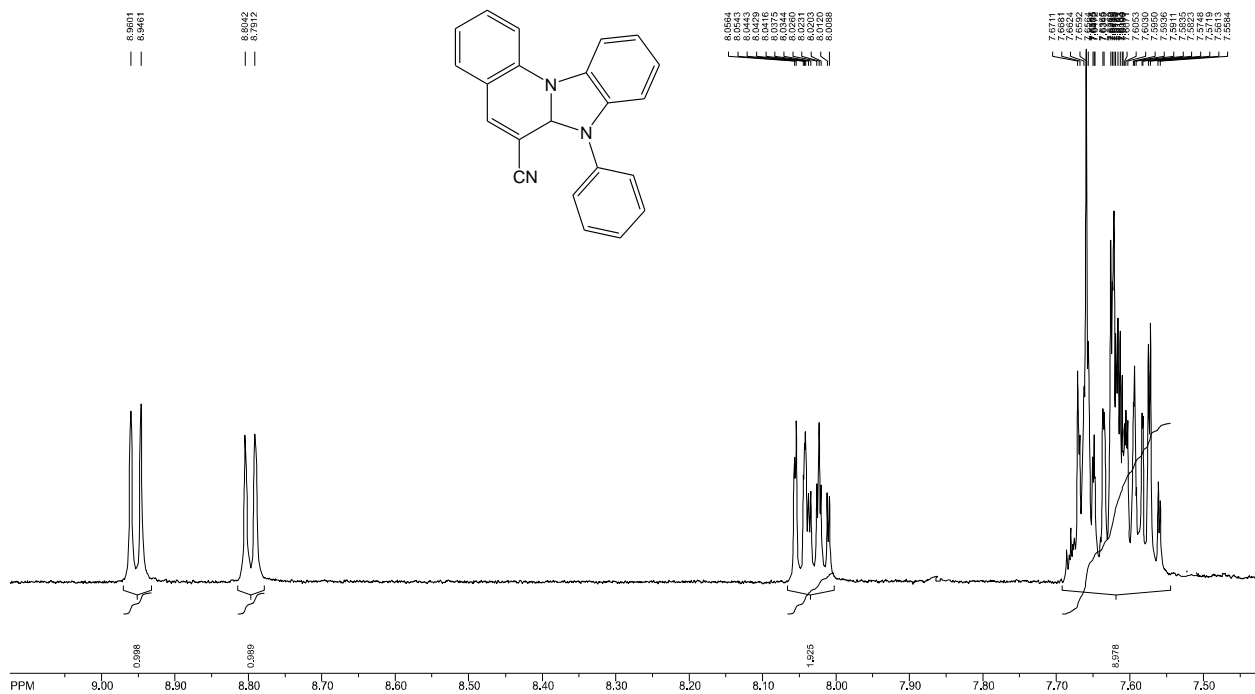
a) ^1H NMR spektar 2-[2-(*N*-fenil)benzimidazolil]-3-(2-fenil)akrilonitrila **5**



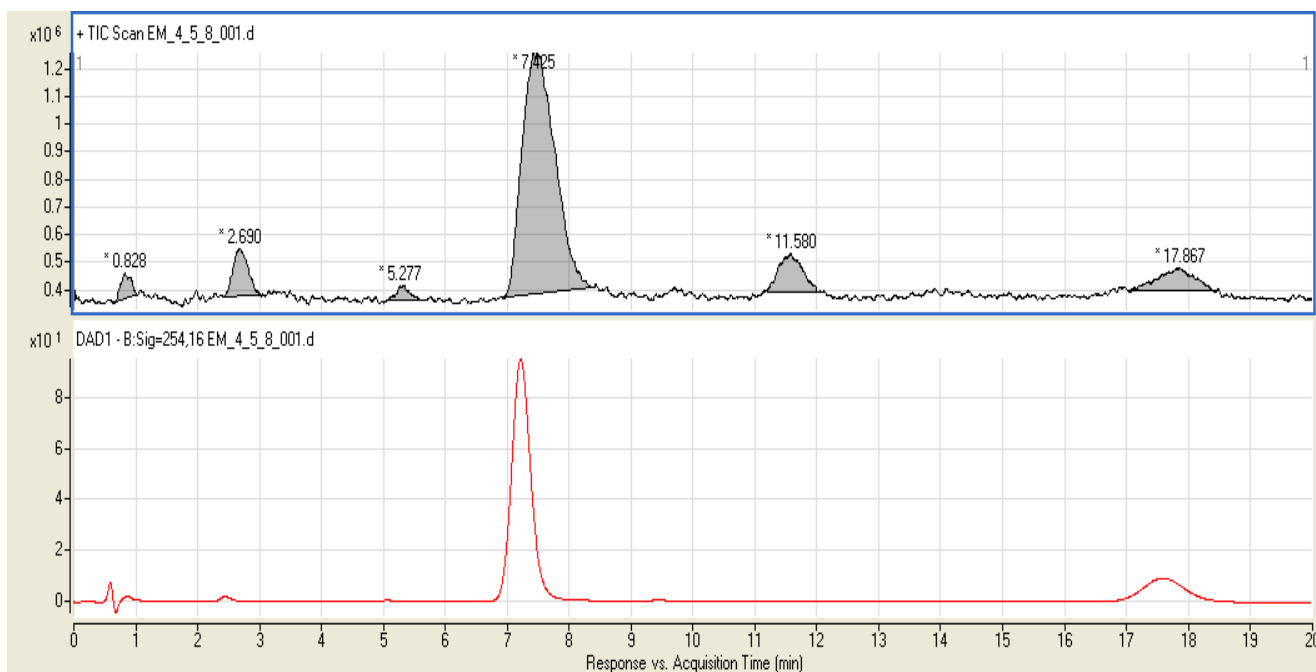
PRILOZI

PRILOG 3.

a) ^1H NMR spektar 6-cijano-benzimidazo[1,2-*a*]kinolina 7

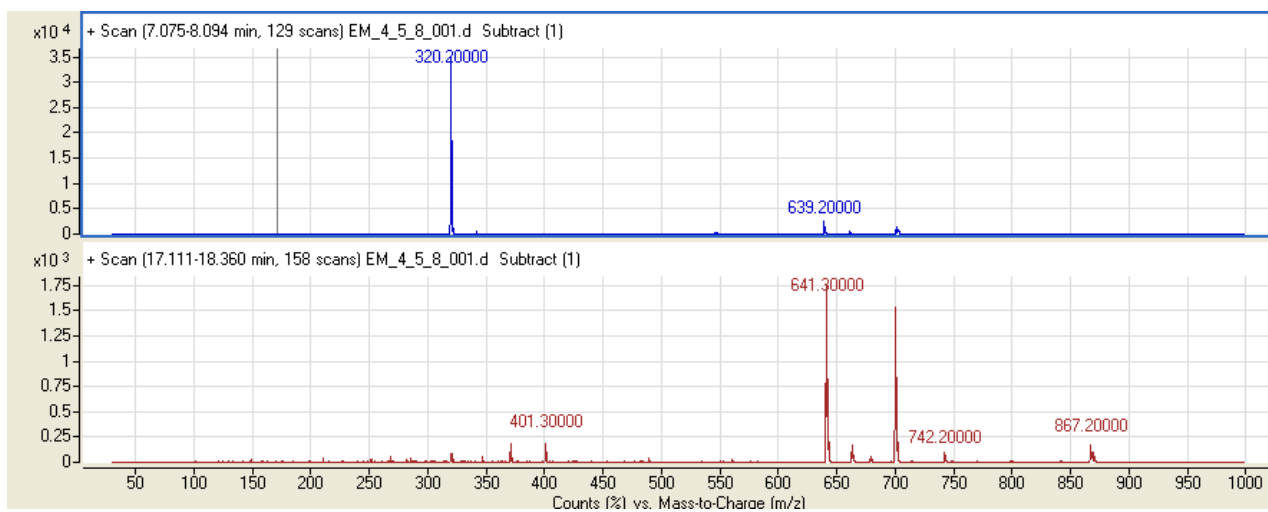


b) Kromatogram 6-cijano-benzimidazo[1,2-*a*]kinolina 7



PRILOZI

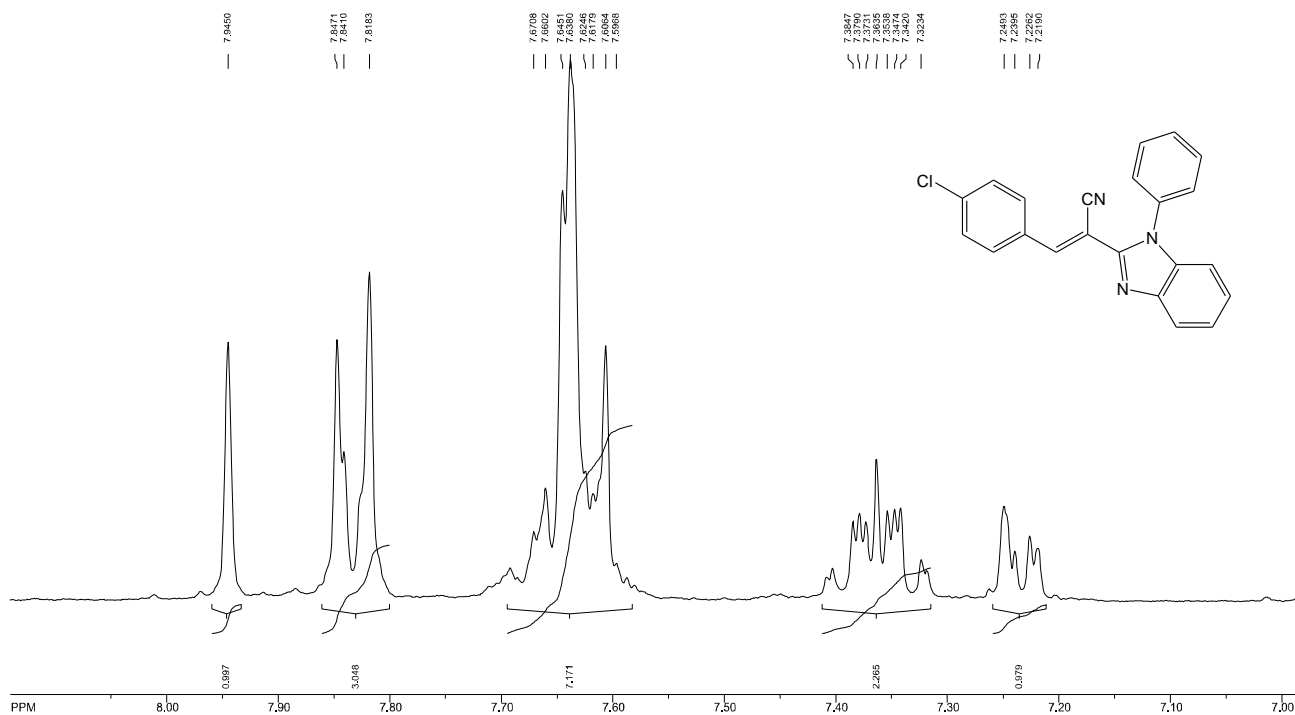
c) Maseni spektar 6-cijano-benzimidazo[1,2-*a*]kinolina **7**



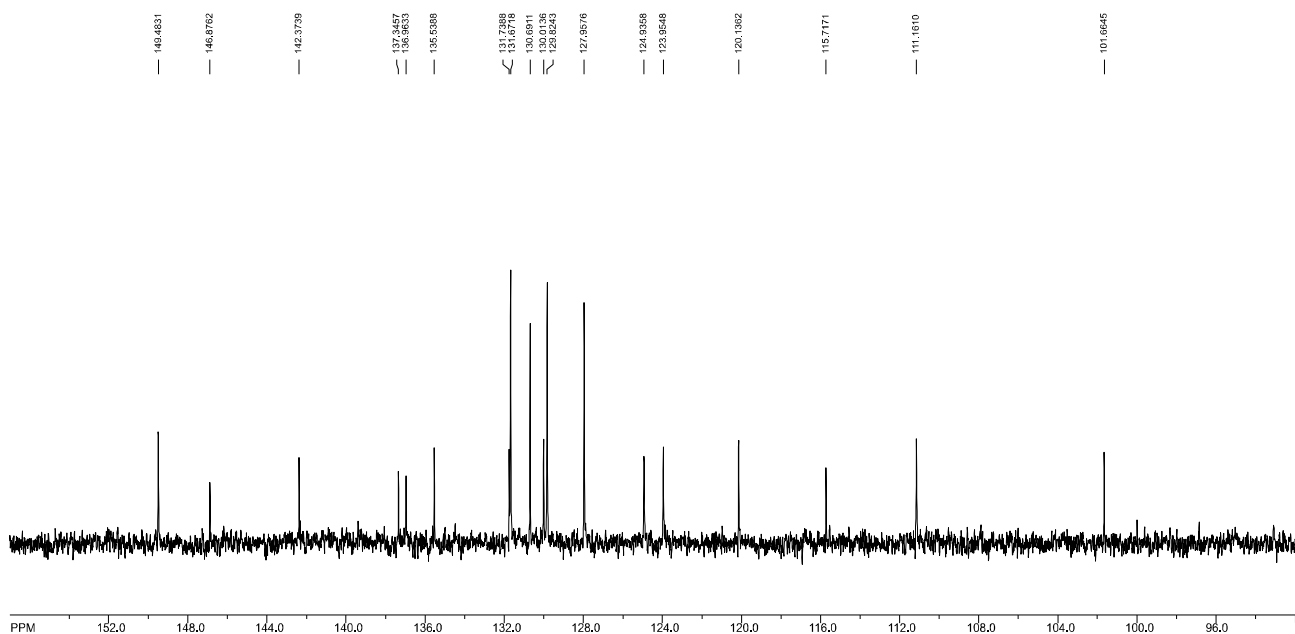
PRILOZI

PRILOG 5.

a) ^1H NMR spektar 2-[2-(*N*-fenil)benzimidazolil]-3-(4-klorfenil)akrilonitrila **10**



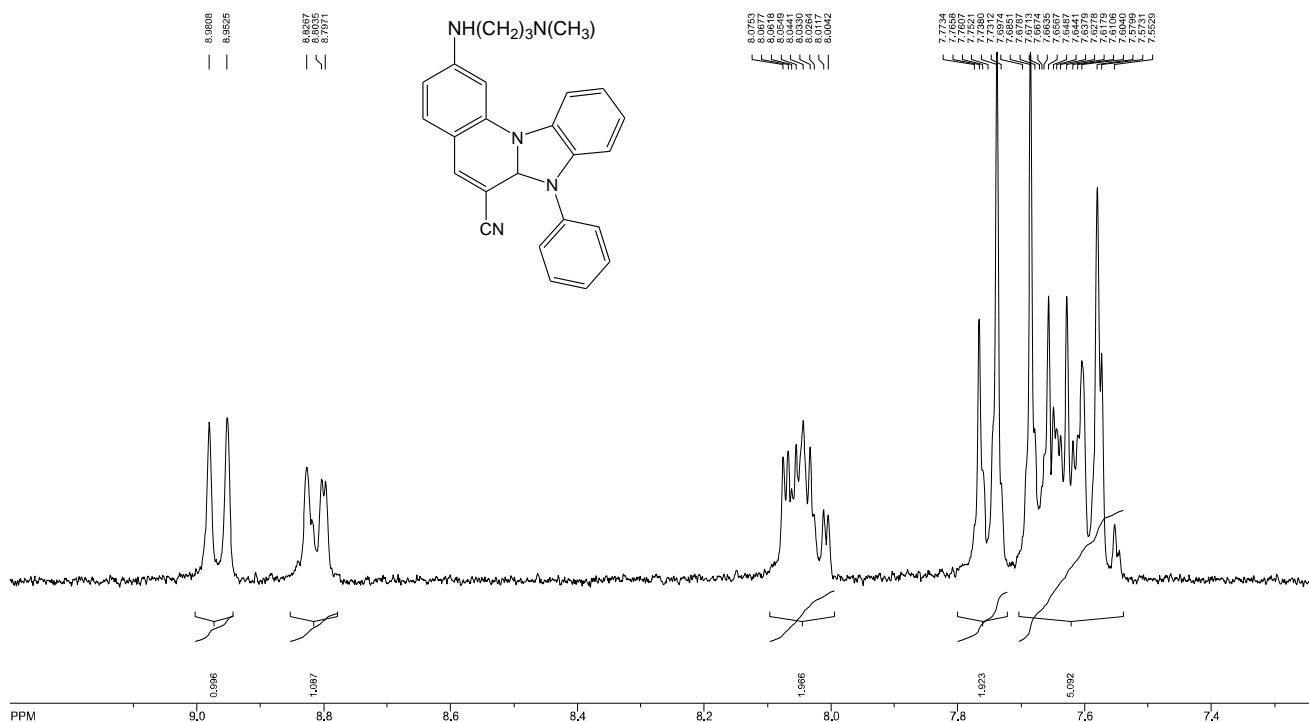
b) ^{13}C NMR spektar 2-[2-(*N*-fenil)benzimidazolil]-3-(4-klorfenil)akrilonitrila **10**



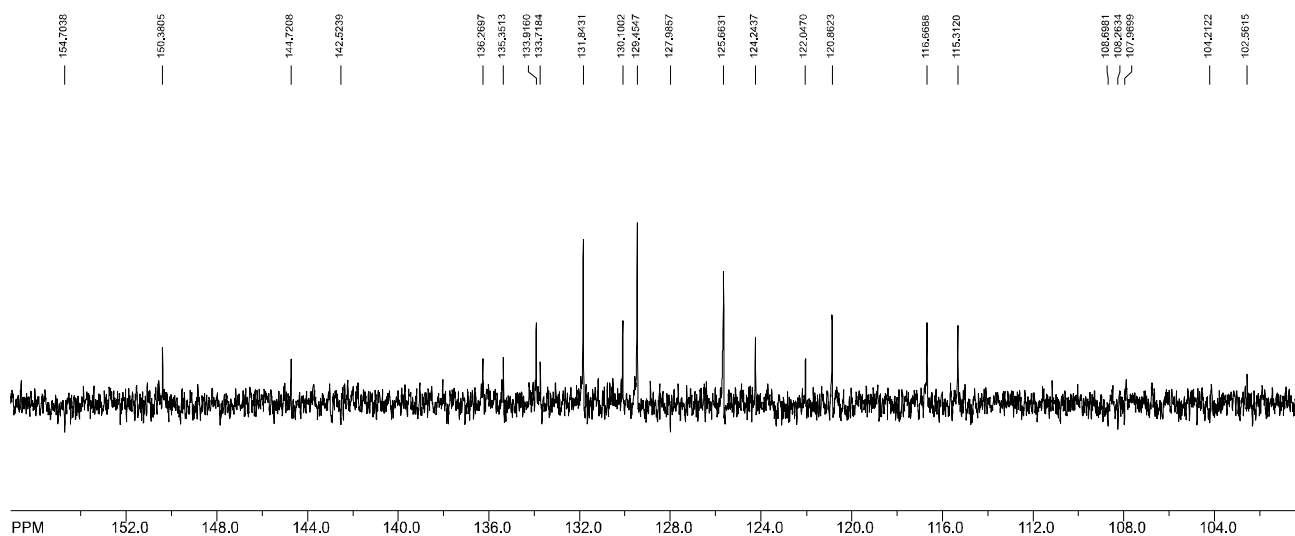
PRILOZI

PRILOG 6.

a) ^1H NMR spektar 2-(N,N-dimetilamino-propil)-6-cijano-7-fenil-benzimidazo[1,2-a]kinolina **12**

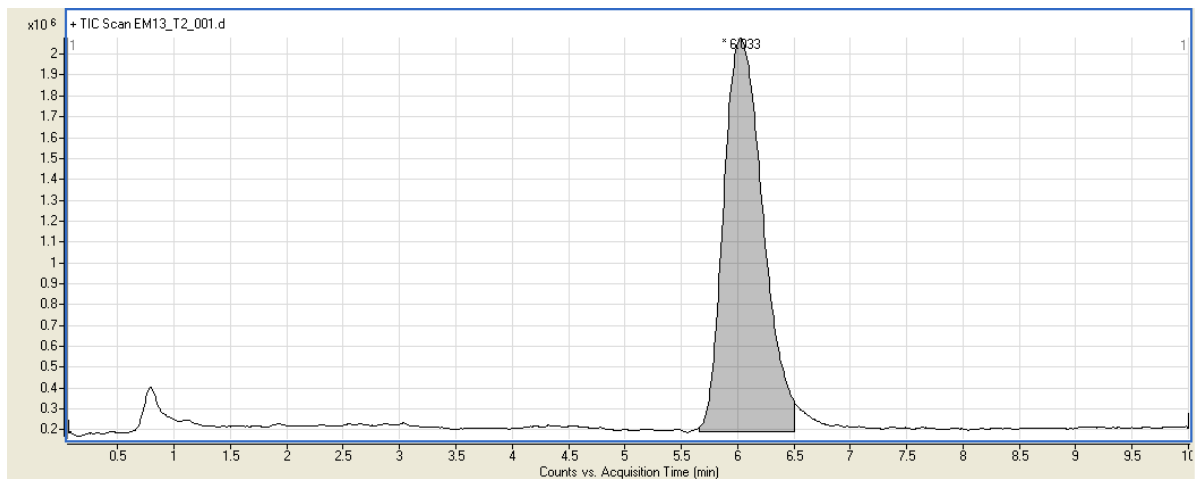


b) ^{13}C NMR spektar 2-(N,N-dimetilamino-propil)-6-cijano-7-fenil-benzimidazo[1,2-a]kinolina **12**

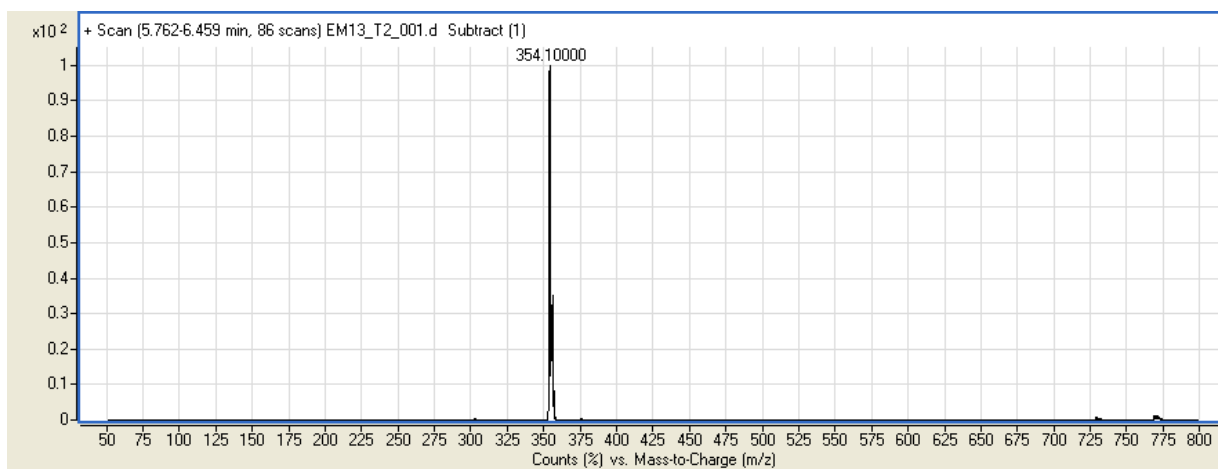


PRILOZI

c) Maseni spektar 2-(N,N-dimetilamino-propil)-6-cijano-7-fenil-benzimidazo[1,2-a]kinolina **12**



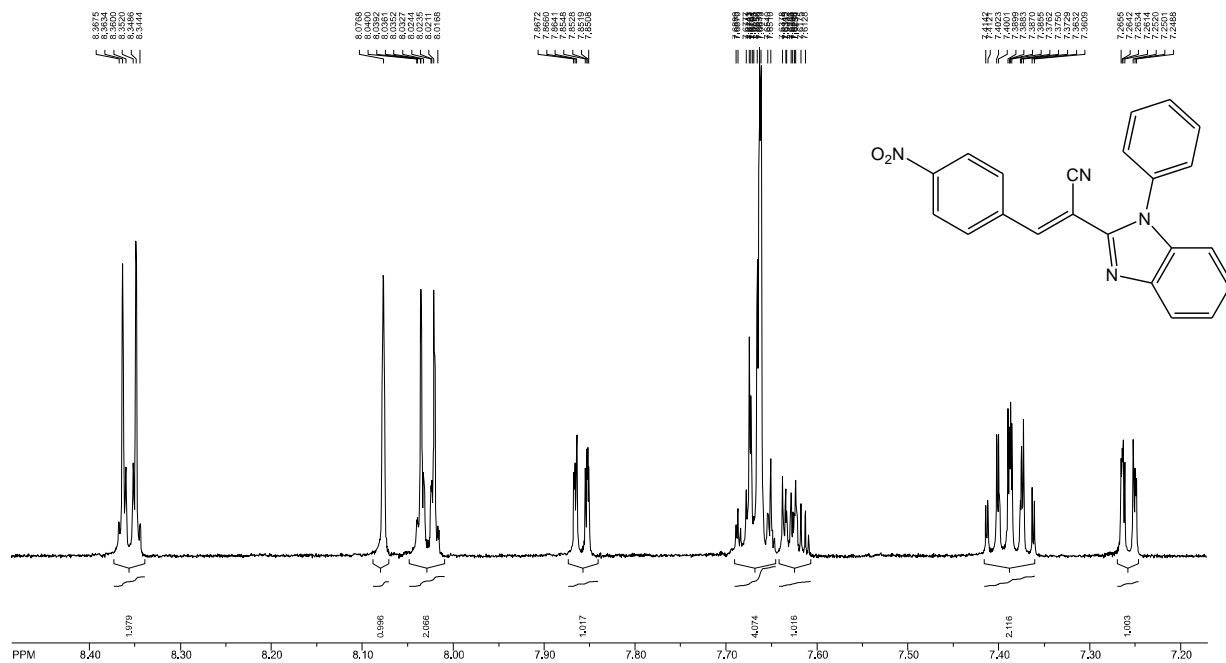
d) Maseni spektar spoja **12**



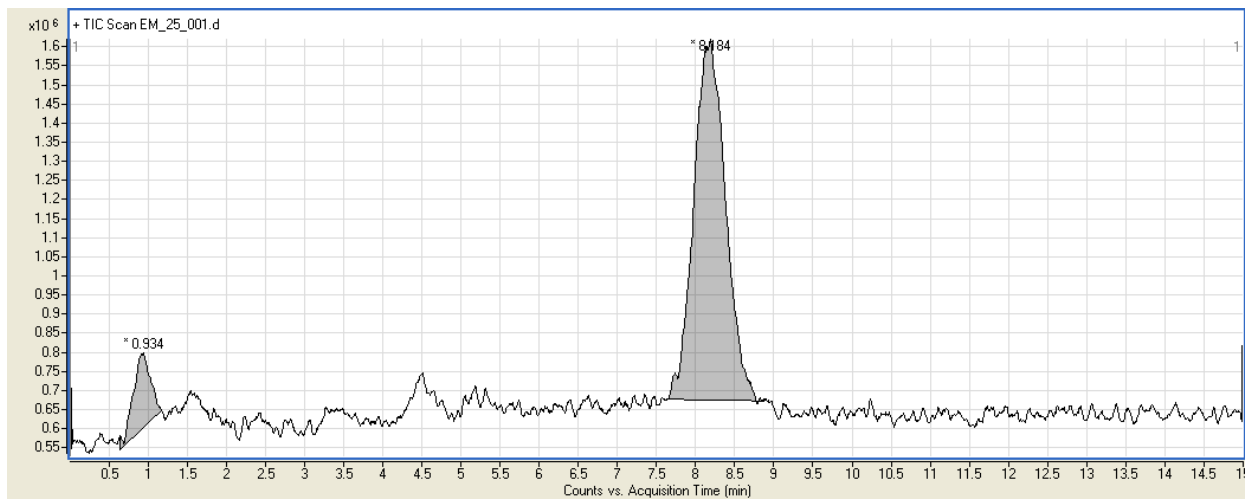
PRILOZI

PRIOLOG 7.

a) ^1H NMR spektar 2-[2-(*N*-fenil)benzimidazolil]-3-(4-nitrofenil)akrilonitrila **16**

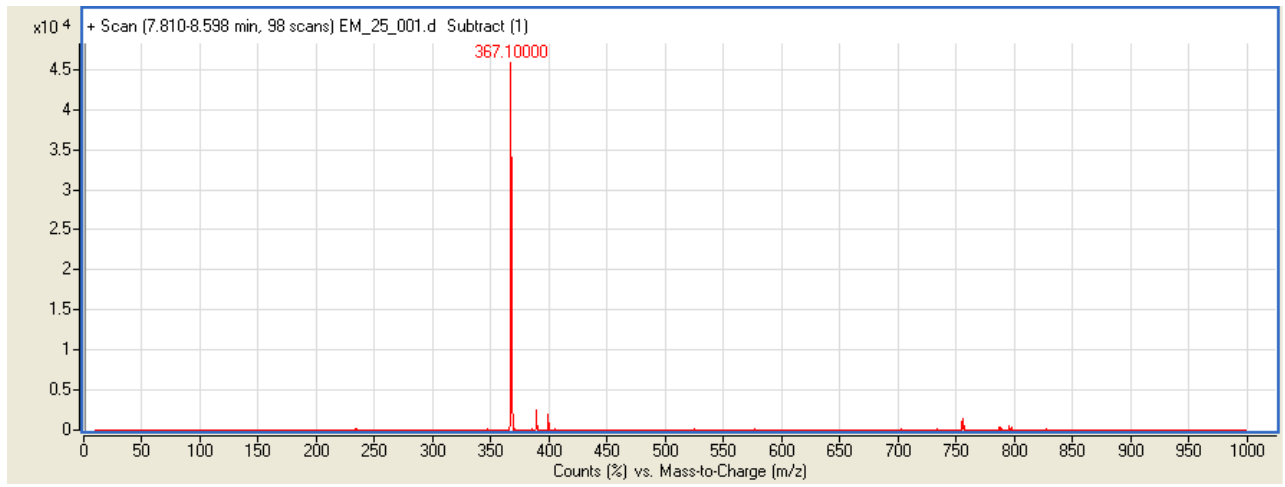


b) Maseni spektar 2-[2-(*N*-fenil)benzimidazolil]-3-(4-nitrofenil)akrilonitrila **16**



PRILOZI

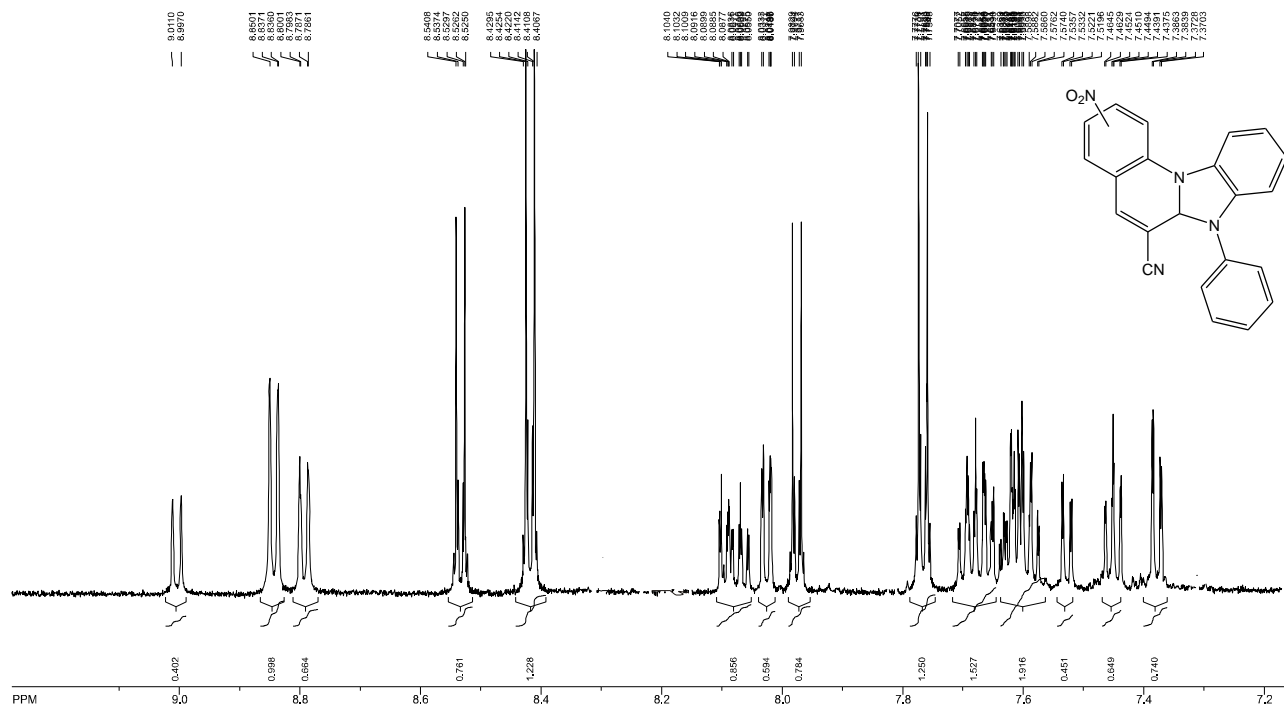
c) Maseni spektar spoja **16**



PRILOZI

PRILOG 8.

¹H NMR spektar 3-nitro-6-cijano-benzimidazo[1,2-*a*]kinolina 17



PRILOZI

PRILOG 12.

^1H NMR spektar 2-[2-(*N*-fenil)benzimidazolil]-3-(4-*N,N*-dimetilaminofenil)akrilonitrila hidroklorida **23**

