

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

Ivana Bukovac, Nikolina Mataga, Ivana Vrgoč

**Priprava i spektroskopska karakterizacija
supstituiranih imidazolijevih i piridinijevih
stirilnih boja za obilježavanje
biomakromolekula
(DNA, RNA, proteina)**

Zagreb, 2010. godina

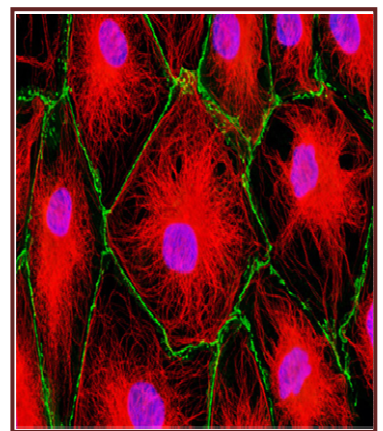
Ovaj rad izrađen je u Laboratoriju za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije te Laboratoriju za biokemiju Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod stručnim vodstvom dr. sc. Jasne Vorkapić-Furač, redovite profesorice i dipl. ing. Igora Stuparevića, asistenta. Rad je predan na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2009./2010.

Zahvaljujemo profesorici dr. sc. Jasni Vorkapić-Furač i dipl. ing. Igoru Stupareviću na velikoj pomoći, podršci i strpljenju tijekom izrade ovog rada te ujedno na ugodnom druženju.

Zahvaljujemo i doc. dr. sc. Marijani Jukić, i asistentici mr. sc. Ivani Ugarković koje su nam omogućile uporabu mikrovalnog reaktora te izv. prof. dr. sc. Spomenki Kovač za snimljene IR spektre.

Sadržaj rada

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. SINTEZA STIRILCIJANINSKIH BOJA.....	2
2.1.1. Sinteza stirilimidazolijevih kvaternih soli.....	2
2.1.2. Sinteza stirilpiridinijevih kvaternih soli.....	3
2.1.3. Priprava cijaninskih boja pomoću mikrovalnog zračenja.....	10
2.2. SPOJEVI ZA OZNAČAVANJE NUKLEINSKIH KISELINA.....	11
2.2.1. Cijaninske boje.....	11
2.2.2. Mehanizam vezanja cijaninskih boja na molekulu DNA.....	12
3. EKSPERIMENTALNI DIO	15
3.1. MATERIJALI.....	15
3.1.1. Kemikalije.....	15
3.1.2. Oprema.....	16
3.2. METODE RADA.....	17
3.2.1. Priprava 1,2,3-trimetilimidazolijeva jodida [1].....	17
3.2.2. Priprava 1,2,3-trimetilimidazolijeva heksafluorofosfata [2].....	17
3.2.3. Priprava 1,2,4-trimetilpiridinijeva jodida [3].....	18
3.2.4. Priprava 1,3-dimetil-2-(4- <i>N,N</i> -dimetilaminostiril)imidazolijeva jodida [4].....	19
3.2.5. Priprava 1,3-dimetil-2-(4-nitrostiril)imidazolijeva jodida [5].....	21
3.2.6. Priprava 1,3-dimetil-2-(4- <i>N,N</i> -dimetilaminostiril)imidazolijeva heksafluorofosfata [6].....	21
3.2.7. Priprava 4-(4-hidroksistiril)-1,2-dimetilpiridinijeva jodida [7].....	22
3.2.8. Priprava 1,2-dimetil-4-(4-nitrostiril)piridinijeva jodida [8].....	23
3.2.9. Priprava 1-metil-2,4-bis(4- <i>N,N</i> -dimetilaminostiril)piridinijeva jodida [9].....	24
3.2.10. Priprava 1,2-dimetil-4-(4- <i>N,N</i> -dimetilaminostiril)piridinijeva jodida [10].....	25
3.2.11. Priprava 4-[(4- <i>N,N</i> -dimetilaminofenil)-3-metilbut-1,3-dien-1-il]-1,2-dimetilpiridinijeva jodida [11].....	26
3.2.12. Vezanje stirilcijaninskih boja na DNA u agaroznom gelu.....	27
4. REZULTATI I RASPRAVA	28
5. ZAKLJUČCI	40
6. LITERATURA	42
7. SAŽETAK	45
8. SUMMARY	46



1. UVOD

Posljednjih godina povećano je zanimanje znanstvenika za sintezu i primjenu stirilcijaninskih boja koje pokazuju svojstvo apsorpcije svjetla u širokom rasponu u vidljivom području. To je posebice zanimljivo i važno za daljnji razvoj molekularne biologije gdje su potrebna oruđa da bi se moglo učiniti vidljivim funkcije žive stanice i organela. Fluorescentni indikatori za tu svrhu trebaju imati upravo ona svojstva koja pokazuju stirilcijaninske boje, a to su velike fluorescentne spektralne promjene nakon što se fluorescentni indikator veže za ciljnu molekulu.

Od otkrića da monometinska boja *Thiazol Orange* ima izvrsna svojstva kao biološki obilježivač DNA odnosno RNA (veže se nekovalentnim vezama za te molekule) sintetizirane su mnoge cijaninske boje reakcijom kondenzacije kvaternih soli s aktivnom metilnom skupinom u položajima 2, 3 ili 4 heterocikličkog prstena s različitim supstituiranim aromatskim aldehydima.

Reakcije kondenzacije su provođene na razne načine: taljenjem sirovina, zagrijavanjem sirovina do vrenja u otapalima ili smjesama otapala, a u novije vrijeme i uporabom mikrovalnog zračenja, uz dodatak bazičnih (piperidin, dietilamin, trietilamin i dr.) ili kiselih (acetanhidrid) katalizatora. Svi se ti spojevi, osim kao fluorescentni indikatori u biologiji, primjenjuju u medicini (dijagnostika i analize), proizvodnji nelinearnih optičkih materijala, fotografiji, polimernoj kemiji i ekologiji.

Cilj ovog rada bila je priprava i spektroskopska karakterizacija supstituiranih imidazolijevih i piridinijevih stirilnih boja kondenzacijom 1,2,3-trimetilimidazolijske kvaterne soli (jodid, heksafluorofosfat) i 1,2,4-trimetilpiridinijeva jodida sa supstituiranim benzaldehydima ($R = -N(CH_3)_2$, $-NO_2$, $-OH$) i 3-(4-*N,N*-dimetilaminofenil)-2-metilpropenalom i ispitati mogućnost njihove primjene kao obilježivača DNA u agaroznom gelu.



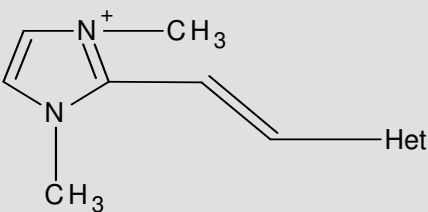
2. TEORIJSKI DIO

2.1. SINTEZA STIRILCIJANINSKIH BOJA

2.1.1. Sinteza stirilimidazolijevih kvaternih soli

Godine 2004. skupina znanstvenika je, proučavajući antitumorske supstancije, sintetizirala *trans* 2-[2-(heteroaril)vinil]-1,3-dimetilimidazolijeve jodide (tablica 1) s ciljem testiranja antitumorske aktivnosti *in vitro*.

Tablica 1. *trans* 2-[2-(heteroaril)vinil]-1,3-dimetilimidazolijevi jodidi
(Ballistreri i sur., 2004).

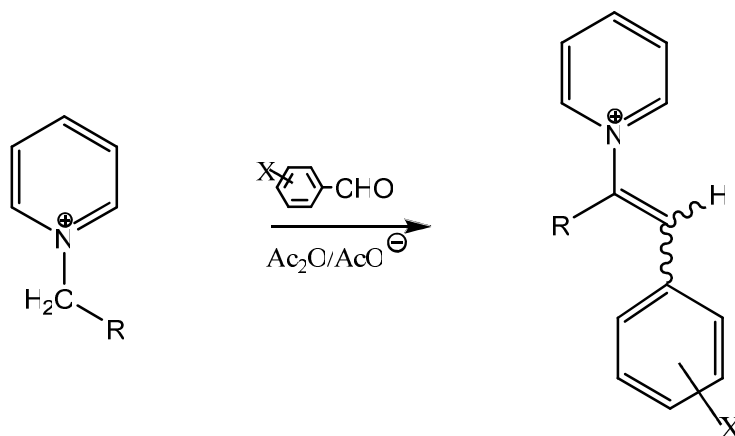
	
	Het
1	furan-2-il
2	5-metilfuran-2-il
3	5-bromfuran-2-il
4	5-fenilfuran-2-il
5	5-(2-klorfenil)-furan-2-il
6	5-(4-bromfenil)-furan-2-il
7	tiofen-2-il
8	5-bromtiofen-2-il
9	<i>N</i> -metilpirol-2-il
10	tiazol-2-il

Sinteza *trans* 2-[2-(heteroaril)vinil]-1,3-dimetilimidazolijevih jodida temelji se na kondenzaciji 1,2,3-trimetilimidazolijeva jodida s različitim heteroaromatskim aldehydima u prisutnosti NaOH kao bazičnog katalizatora. Pretpostavljalo se da će prisutnost

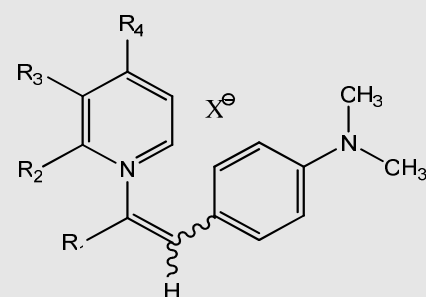
aromatskih prstenova i halogenih atoma povećati antitumorsku aktivnost, što je eksperimentalno i potvrđeno (Ballistreri i sur., 2004).

2.1.2. Sinteza stirlpiridinijevih kvaternih soli

Godine 1986. šest različito supstituiranih piridinijevih soli kondenzirano je s 4-*N,N*-dimetilaminobenzaldehidom u vrijućem acetanhidridu u 1-stirlpiridinijeve soli prema propisu Kröhnkea (slika 1, tablica 2). Rad je imao za cilj da odredi stereokemiju dvostruke veze, koja ima veliku važnost u dokazivanju biološke aktivnosti produkata pa su dobiveni spojevi poslužili kao modelni spojevi. Strukturna istraživanja su pokazala da svi produkti imaju u stirlnoj čestici *Z*-strukturu, što je odgovaralo više konjugiranom i stabilnijem sustavu (Alvarez-Builla i sur., 1986).

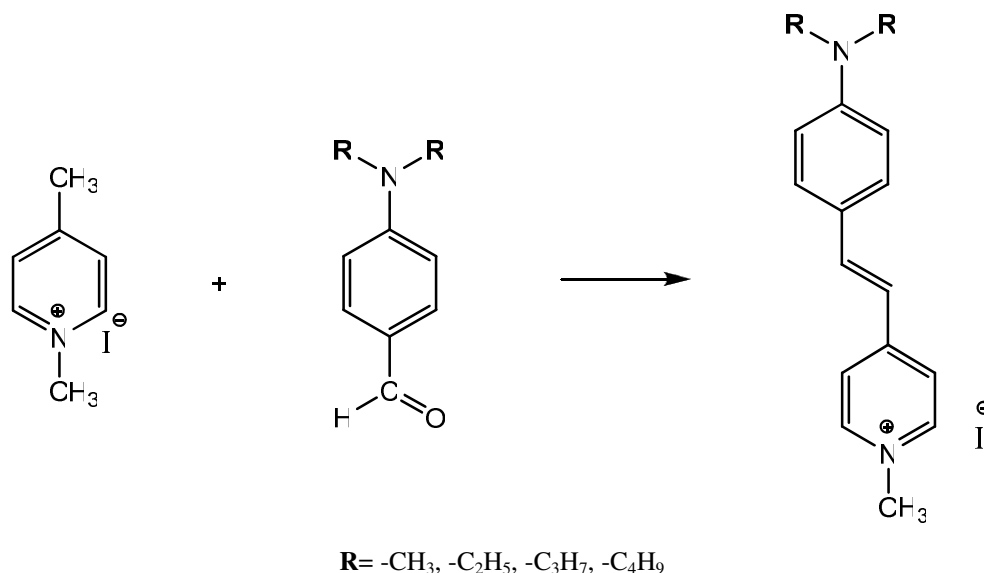


Slika 1. Reakcija kondenzacije supstituiranih piridinijevih soli s 4-*N,N*-dimetilaminobenzaldehidom (Alvarez-Builla i sur., 1986)

Tablica 2. *N*-stirilpiridinijeve soli (Alvarez-Builla i sur., 1986).


	Molekulska formula	X ⁻	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
1	C ₁₆ H ₁₆ BFN ₃	BF ₄ ⁻	NC-	H	H	H
2	C ₁₇ H ₁₉ IN ₂ S ₂	I ⁻	CH ₃ SCS-	H	H	H
3	C ₂₂ H ₂₁ BrN ₂ O	Br ⁻	C ₆ H ₅ CO-	H	H	H
4	C ₂₃ H ₂₃ IN ₂ O	I ⁻	<i>p</i> -CH ₃ C ₆ H ₄ CO-	H	H	H
5	C ₂₂ H ₂₀ ClIN ₂ O	I ⁻	<i>p</i> -ClC ₆ H ₄ CO-	H	H	H
6	C ₂₂ H ₂₀ BrIN ₂ O	I ⁻	<i>p</i> -BrC ₆ H ₄ CO-	H	H	H

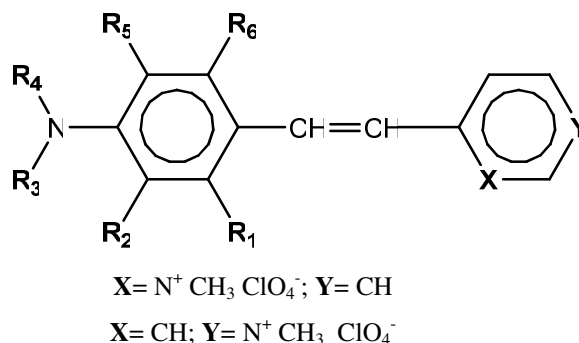
Skupina znanstvenika je 1998. god. sintetizirala kationske cijaninske boje, 1-metil-4[4-(*N,N*-dialkilamino)stiril]piridinijeve soli s dva alkilna lanca od C₁ do C₄, kako bi istražili njihove interakcije s ionskim površinski-aktivnim tvarima (slika 2). Cijaninske boje su pripravljene aldolnom kondenzacijom 1,4-dimetilpiridinijeva betaina s 4-*N,N*-dialkilaminobenzaldehidima. Hlađenjem otopine dobiveni su narančasto-crveni kristali, koji su pročišćeni kromatografijom na silikagelu i eluirani s etil-acetatom i petroleterom (Shah i sur., 1998)



Slika 2. Sinteza 1-metil-4[4-(*N,N*-dialkilamino)styril]piridinijevih soli (Shah i sur., 1998).

Da bi odredili kako promjene u jačini elektron-donorskog svojstva amino-supstituenata u benzenskom prstenu utječu na njihova spektralna svojstva skupina znanstvenika sintetizirala je 2000. godine Knoevenagelovom kondenzacijom dimetilpiridinijevih soli s različitim 4-*N,N*-dialkilaminobenzaldehydima *trans*-1-metil-2-(4-*N,N*-dialkilaminostiril)piridinijeve jodide i *trans*-1-metil-4-(4-*N,N*-dialkilaminostiril)-piridinijeve perklorate (slika 3) (Gawinecki i sur., 2000).

Polazne sirovine su bile 1,2- i 1,4-dimetilpiridinijevi jodidi dobiveni gotovo u kvantitativnom iskorištenju refluksiranjem ekvimolarnih količina 2- odnosno 4-pikolina i metil-jodida u acetonu. Ti su spojevi reakcijom sa 70 % perklornom kiselinom u metanolu prevedeni u odgovarajuće perklorate (Gawinecki i sur., 2000)



$R_1 = H, CH_3$; $R_2 = H, (CH_2)_2, (CH_2)_3$; $R_3 = CH_3, (CH_2)_6$; $R_4 = H, CH_3$; $R_5 = H, (CH_2)_3$; $R_6 = H, CH_3$

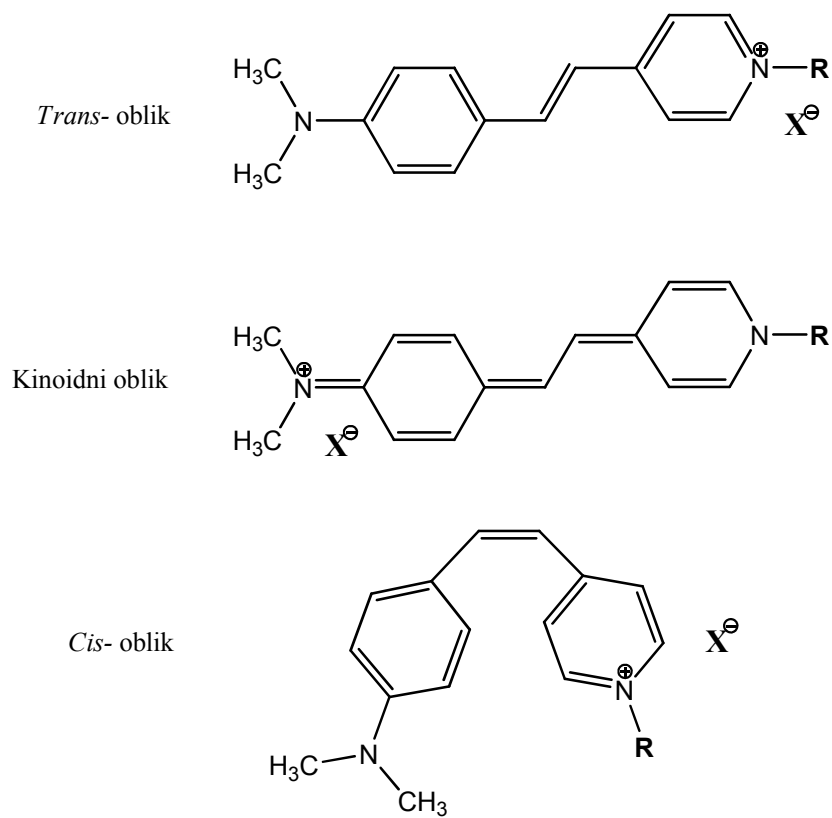
Slika 3. *trans*-1-metil-2-(4-*N,N*-dialkilaminostiril)piridinijevi jodidi i *trans*-1-metil-4-(4-*N,N*-dialkilaminostiril)piridinijevi perklorati (Gawinecki i sur., 2000).

Dobiveni produkti (*trans*-izomeri) mogu se prevesti u *cis*-izomere fotolizom njihovih kiselinskih otopina. Međutim, poznato je da *cis*-izomeri nisu stabilni i da vrlo lako toplinski izomeriziraju u *trans*-oblik. Navedeni produkti fluoresciraju kod infracrvenog podražaja (Gawinecki i sur., 2000).

Mishra i sur. snimili su apsorpcijske fluorescentne spektre deset *N*-alkil-4-(4-*N,N*-dimetilaminostiril)piridinijevih boja s alkilnim lancima različitih duljina i u različitim organskim otapalima (protičkim, dipolarnim aprotičkim i aprotičkim) kao i u različitim otopinama površinski-aktivnih tvari, da bi istražili fotofizičke efekte.

Spojevi su pripremljeni kvaternizacijom 4-metilpiridina s različitim alkilbromidima i potom kondenzirani s 4-*N,N*-dimetilaminobenzaldehidom u etanolu uz piperidin kao katalizator. Reakcijska smjesa se potom koncentrirala uparavanjem etanola. Hlađenjem u ledenoj kupelji dobivena je crvena krutina, koja se prekrystalizira iz etanola (Mishra i sur., 2001).

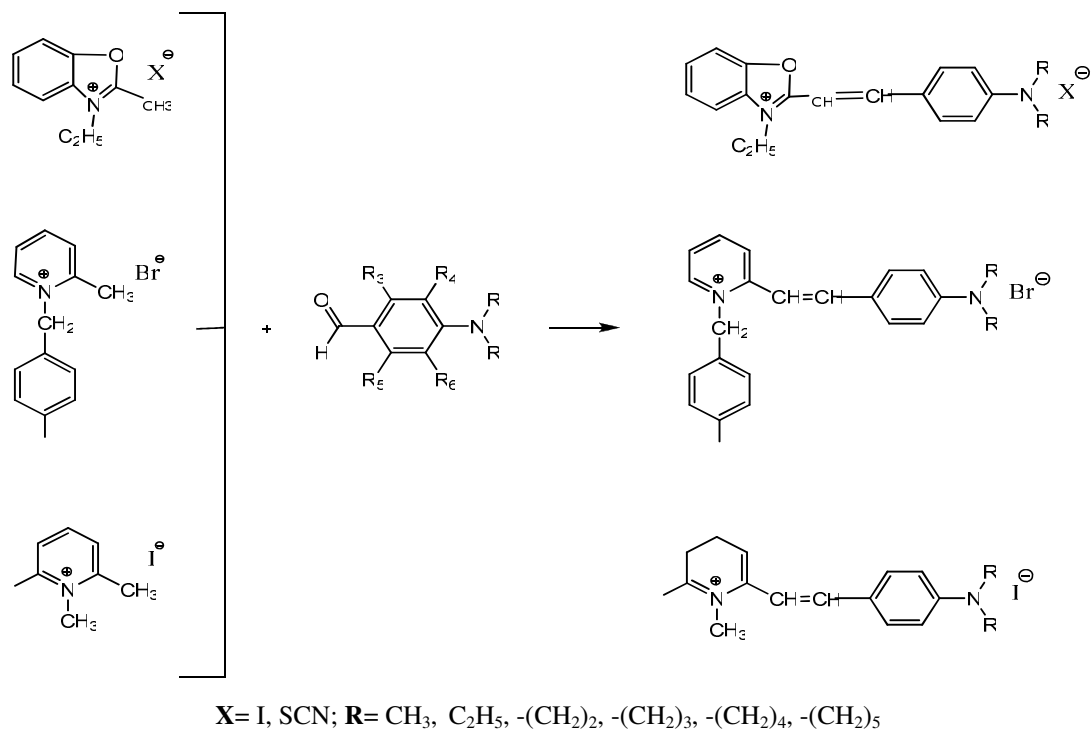
Rezultati su ukazivali na mnogostrukost struktura u navedenim organskim otapalima i površinski-aktivnim tvarima (tri izomera – *cis*, *trans* i kinoidni), a relativni intenziteti ovise o interakcijama boja-otapalo i boja-površinski-aktivna tvar (slika 4).



$X = \text{Br, I}$; $R = \text{C}_n\text{H}_{2n}$ ($n = 1, 3, 5, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18$)

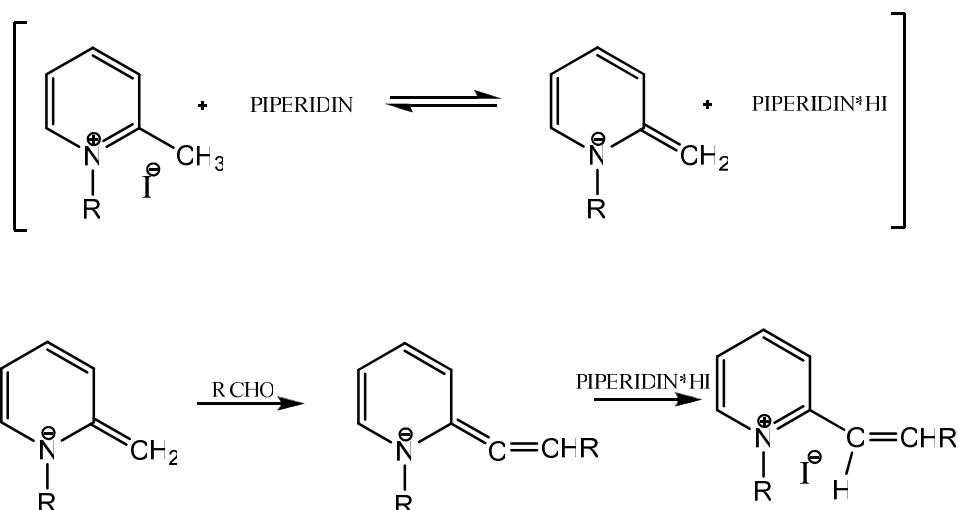
Slika 4. *N*-alkil-4-(4-*N,N*-dimetilaminostiril)piridinijeve boje (Mishra i sur., 2001).

Skupina znanstvenika je 2002. god. sintetizirala kationske cijaninske boje: 2-[4-(*N,N*-dialkilamino)stiril]-1-(4-jodbenzil)piridinijeve bromide i 2-[4-(*N,N*-dialkilamino)stiril]-6-jod-1-metilpiridinijeve jodide kondenzacijom odgovarajućeg 4-(*N,N*-dialkilamino)benzaldehida s 1-(4-jodbenzil)-2-metilpiridinijevim bromidom odnosno 6-jod-1,2-dimetilpiridinijevim jodidom (slika 5) (Jedrzejewska i sur., 2002).



Slika 5. Sinteza 2-[4-(*N,N*-dialkilamino)styril]-1-(4-jodbenzil)piridinijevih bromida i 2-[4-(*N,N*-dialkilamino)styril]-6-jod -1-metilpiridinijevih jodida (Jedrzejewska i sur., 2002).

Mogući mehanizam reakcije kondenzacije bio bi sljedeći: u prvom se koraku jodovodik uklanja iz kvaterne soli jačom bazom (piperidinom), potom dobiveni reaktivniji međuprodukt metenildihidropiridin reagira sa supstituiranim benzaldehidom dajući alen, a kao konačni produkt nastaje 1-alkil-2-stirilpiridinijeva sol (slika 6).



Slika 6. Predloženi mehanizam reakcije kondenzacije kvaterne piridinijeve soli s aromatskim aldehidom uz piperidin kao katalizator (Jedrzejewska i sur., 2002).

Marri i sur. su 2006. god sintetizirali *trans*-1-heteroaril-2-(1-metilpiridinij-2-il)eten jodide (tablica 3). Sintetizirane molekule imaju svojstvo fluoresciranja kad se izlože UV zračenju. Nadalje mogu tvoriti kompleks s molekulama DNA pri čemu nastali kompleks pokazuje svojstvo povećanja apsorpcijskog maksimuma (Marri i sur., 2006).

Tablica 3. *trans*-1-heteroaril-2-(1-metilpiridinij-2-il)eten jodidi (Marri i sur., 2000).

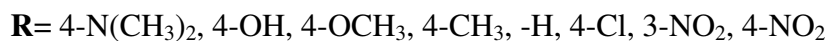
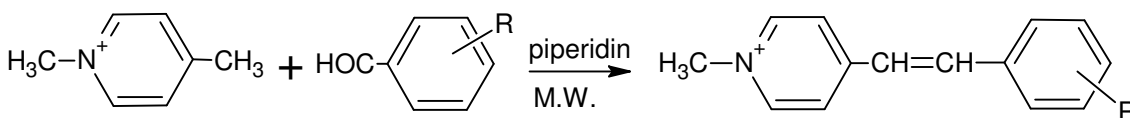
	R
1	tiofen-2-il
2	bromtiofen-2-il
3	metilpirol-2-il

2.1.3. Priprava cijaninskih boja pomoću mikrovalnog zračenja

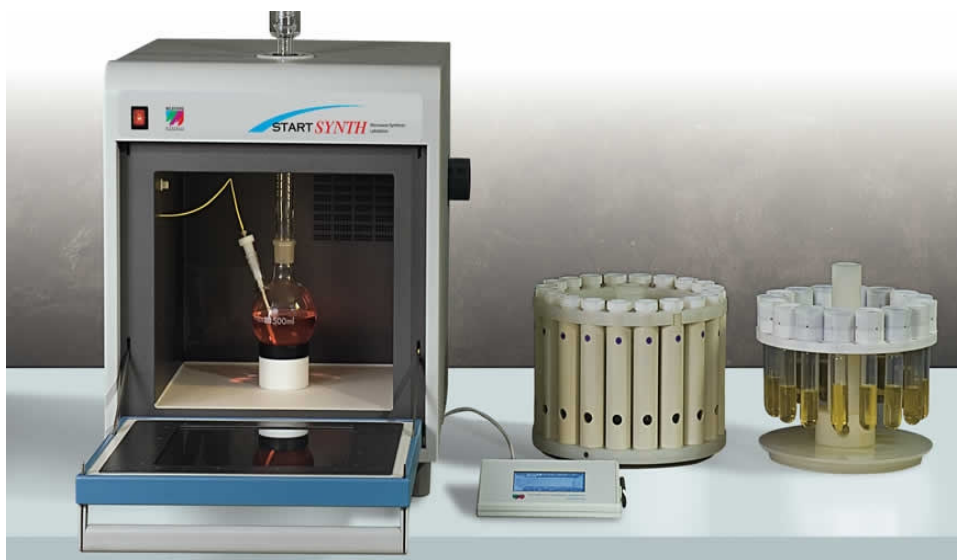
U proših par desetljeća organska kemija doživjela je pravi procvat i postala dinamičnija i efektivnija nego ikada prije. Međutim, tradicionalne toplinske tehnike rada su spore i oduzimaju dosta vremena, a mogu dovesti i do pregrijavanja i razgradnje supstrata ili produkta. Kako bi se vrijeme reakcije skratilo sa sata na minute, te povećala selektivnost i iskorištenje reakcije, u organsku su sintezu uvedeni mikrovalovi (Stuerga i sur., 1993).

Mikrovalno zračenje proizvodi učinkovito unutarnje zagrijavanje direktnim udruživanjem mikrovalne energije s polarnim molekulama (npr. otapalima, reagensima i katalizatorima) koje su prisutne u reakcijskoj smjesi, pa je energetski učinkovitije od tradicionalnog zbog neposrednog zagrijavanja molekula i 'obrnutog' temperaturnog gradijenta.

Wang i sur. su 2003. god. sintetizirali supstituirane stirilpiridinijeve soli kondenzacijom 1,4-dimetilpiridina s aromatskim aldehydima (slika 7). Reakcije su se odvijale uz prisutnost piperidina kao katalizatora i to bez uporabe otapala uz pomoć mikrovalnog zračenja (slika 8). Pod utjecajem mikrovalnog zračenja omogućena je znatno brža reakcija kondenzacije kvaternih soli s aromatskim aldehydima. Uključujući kraće trajanje reakcije te ekološke prihvatljivosti prednost ove metode u usporedbi s klasičnom je i u dobivanju čistijeg produkta i jednostavnijoj izolaciji dobivenog produkta. (Wang i sur., 2003).



Slika 7. Kondenzacija 1,4-dimetilpiridina s aromatskim aldehydima (Wang i sur., 2003).



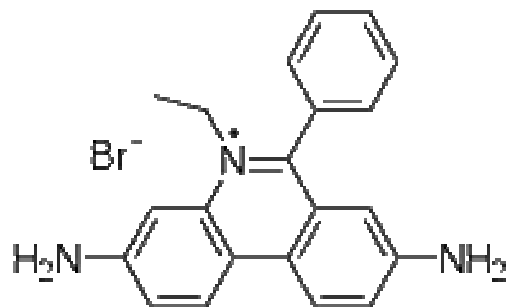
Slika 8. Mikrovalni reaktor (Anonymous, 2010).

2.2. SPOJEVI ZA OZNAČAVANJE NUKLEINSKIH KISELINA

2.2.1. Cijaninske boje

Poznato je da je deoksiribionukleinska kiselina (DNA) životno važna makromolekula za prijenos, skladištenje i realizaciju genetičke informacije u svakom živom organizmu, stoga je i detekcija važan problem u biofizici i medicini, koji se često rješava uz pomoć malih fluorescentnih molekula koje stupaju u interakciju s DNA.

Prvu metodu, koja je korištena za detekciju DNA u elektroforetskom gelu, izveli su znanstvenici LePecq i Paoletti 1967. godine. Oni su primijetili povećan intenzitet fluorescencije etidijeva bromida nakon vezanja na nukleinske kiseline (slika 9) (LePecq i Paoletti, 1967). Od tada je ova tehnika detekcije DNA postala jedna od najviše korištenih tehnika u molekularnoj biologiji. Međutim, etidijev bromid uzrokuje oštećenja na membrani, mutagen je i toksičan (Waring, 1975; MacGregor i Johnson, 1977).



Slika 9. Struktura etidijeva bromida (Anonymous 1, 2010).

1980. godine Lee i suradnici su otkrili da stare fotografske cijaninske boje imaju svojstvo odličnog nekovalentnog fluorescentnog obilježavanja nukleinskih kiselina (otkrivenu boju nazvali su *Thiazole Orange*) (Lee i sur., 1986). U narednim godinama zbog velikog zanimanja za potencijalne obilježivače DNA, dizajnirane su, sintetizirane te komercijalizirane mnoge cijaninske boje (Deligeorgiev i sur., 2007).

Do danas su cijaninske boje našle veliku primjenu u mnogim znanstvenim poljima. Rabe se u biologiji, botanici (neke cijaninske boje imaju hormonalni učinak na rast biljaka), biomedicinskim istraživanjima gdje mogu biti korisni u liječenju različitih virusnih, bakterijskih te danas najraširenijih tumorskih bolesti. Koriste se za detekciju DNA, RNA i proteina, a samo detektiranje biomakromolekula temelji se na značajnom povećanju fluorescentnog intenziteta vezanjem cijaninskih boja na biopolimere.

Kako bi dobili potpuniju sliku o svojstvima sintetiziranih spojeva te njihovoj potencijalnoj primjenjivosti kao obilježivača DNA u svakodnevnom radu molekularnih i genetičkih laboratorija potrebno je ispitati njihove interakcije s DNA molekulama te provesti testove genotoksičnosti i citotoksičnosti

2.2.2. Mehanizam vezanja cijaninskih boja na molekulu DNA

Obojenje nukleinskih kiselina može se ostvariti pomoću dva različita mehanizma. Prvi mehanizam je vezanje cijaninskih boja na DNA ili ostale nukleinske "mete" visokim

afinitetom, dok drugi podrazumijeva povećanje fluorescentnog intenziteta vezanjem cijaninskih boja na molekulu DNA. Smatra se da će drugi mehanizam vezanja pospješiti primjenu cijaninskih boja (Lee i sur., 2003). Nizomov i suradnici su 2009. godine potvrdili drugi mehanizam proučavajući derivate (*E*)-4-(4-(*N,N*-dimetilamino)stiril)-1-metilpiridinijska jodida. Dodavanjem DNA u vodenu otopinu proučavanih cijaninskih boja pojačava se intenzitet fluorescencije. Omjerom 1:5 cijaninska boja/DNA povećava se intenzitet fluorescencije za 18,5 % u odnosu na čistu vodenu otopinu cijaninske boje, dok odnos od 1:1 cijaninska boja/DNA povećava intenzitet za samo 2,3 % (Nizomov i sur., 2009).

Reverzibilno vezanje malih molekula na DNA podrazumijeva nekovalentne interakcije koje se uspostavljaju bilo između nukleotida DNA (interkalacija), između lanaca šećer-fosfati (vezanje na velike i male utore) ili vezanje na vanjsku okosnicu DNA molekule.

Interkalaciju kao način vezanja cijaninskih boja na dsDNA prvi je predložio Lerman 1961. godine (Lerman, 1961). Molekule koje interkaliraju u DNA obično sadrže aromatski prsten (Wilson i sur., 1989). Pri interkalaciji molekule cijaninske boje umeću se između parova baza dsDNA (Jakeway, 1999). Neke od boja koje interkaliraju s DNA su etidijev bromid, propidijev jodid te boja Thiazole Orange. Interkalacijom malih molekula u parove baza DNA dolazi do promjena u samoj strukturi makromolekule kao što je produžavanje i odmotavanje dvostruke uzvojnice, a samim time i promjena savitljivosti molekule DNA (Long i sur., 1990). Interkalacija je najčešće neovisna o redosljedu DNA sekvenci iako je primijećena mala prednost za GC sekvence (Neidle i sur., 1997).

Drugi način vezanja fluorescentnih boja na molekulu DNA je vezanje na velike i male utore molekule DNA. Molekule koje se vežu na dsDNA u njene male utore općenito pokazuju jak prioritet za AT baze (Neidle i sur., 1997). Razlog tome je negativan elektrostatski potencijal na površini malih utora (Ha Doung i sur., 1997). Vezanje na

male utore podrazumjeva nekovalentni mehanizam vezanja stvarajući vodikove veze između boje i malog utora molekule DNA.



3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATRIJALI

3.1.1. Kemikalije

U radu su korištene sljedeće organske i anorganske supstancije kao reagensi u izvedenim sintezama:

1,2 dimetilimidazol , $C_5H_8N_2$ ($M= 96,13 \text{ g mol}^{-1}$; $t_v= 204 \text{ }^\circ\text{C}$; $t_t=29-30 \text{ }^\circ\text{C}$)	p.a ALFA AESAR
2,4 dimetilpiridin , C_7H_9N ($M= 107,15 \text{ g mol}^{-1}$; $\rho= 0,927 \text{ kg dm}^{-3}$)	p.a. FLUKA
Metil-jodid , CH_3I ($M= 141,94 \text{ g mol}^{-1}$; $\rho= 2,26 \text{ kg dm}^{-3}$)	p.a. KEMIKA
4-N,N-dimetilaminobenzaldehid , $C_9H_{11}NO$ ($M= 149,19 \text{ g mol}^{-1}$; $t_t= 73-75 \text{ }^\circ\text{C}$)	p.a. FLUKA
4-Hidroksibenzaldehid , $C_7H_6O_2$ ($M= 122,12 \text{ g mol}^{-1}$; $t_t= 112-116 \text{ }^\circ\text{C}$)	p.a. FLUKA
4-Nitrobenzaldehyd , $C_7H_5NO_3$ ($M= 151,12 \text{ g mol}^{-1}$; $t_t= 103-105 \text{ }^\circ\text{C}$)	p.a. FLUKA
Piperidin , $C_5H_{11}N$ ($M= 85,15 \text{ g mol}^{-1}$; $\rho= 0,86 \text{ kg dm}^{-3}$)	p.a. FLUKA
Natrijev heksafluorofosfat , $NaPF_6$ ($M= 167,95 \text{ g mol}^{-1}$)	p.a ACROS
Natrijev hidroksid , $NaOH$ ($M= 40,00 \text{ g mol}^{-1}$)	p.a. KEMIKA
Etidijev bromid $C_{21}H_{20}BrN_3$ ($M= 394,31 \text{ g mol}^{-1}$)	p.a SIGMA
0,1X TBE pufer (0,09 M Tris baza; 0,09 M borna kiselina; 2 mM EDTA; pH 8,0)	
Agaroza	p.a SIGMA

U radu su korištena sljedeća otapala:

acetone, etanol, metanol, diklormetan, dietil-eter, DMF, DMSO

Sve upotrijebljene kemikalije i otapala bili su analitičke čistoće.

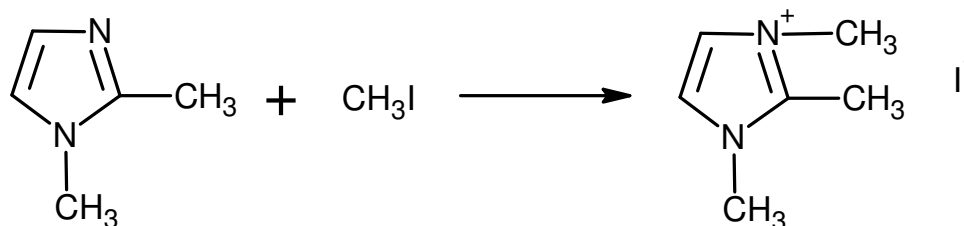
Za vezanje stirilimidazolijevih i stirilpiridinijevih boja korištena je DNA bakteriofaga λ koji je pocijepan sa restrikcijskim enzimom Hind III proizvođača SIGMA.

3.1.2. Oprema

- Temperature tališta (t_i) određene su na digitalnom aparatu Apotec i nisu korigirane.
- Infracrveni spektri (IR) snimljeni su u KBr-u na uređaju SHIMADZU, MB-Series.
- $^1\text{H-NMR}$ i $^{13}\text{C-NMR}$ -spektri snimljeni su u deuteriranom dimetilsufoksidu ($\text{DMSO-}d_6$) na aparatu VARIAN XL-GEM 300. Kemijski pomaci (δ) izraženi su u ppm prema tetrametilsilanu (TMS, $\delta = 0,00$ ppm) kao unutrašnjem standardu. Signali su označeni kao s = singlet, d = dublet, q = kvartet, m = multiplet.
- Reakcije su izvedene u mikrovalnom reaktoru Micro SYNTH platform, Milestone, Italija.
- Elektroforeza DNA izvedena je na Midget sustavu (LKB 2050), PHARMACIA.
- Tijek reakcije praćen je kromatografski na komercijalno dostupnim pločicama silikagela, DC-Aluifolien Kieselgel 60 F-254, Merck, debljine sloja 0,25 mm u smjesi otapala diklormetan : metanol (6:1,5, v/v).
- Preparativna tankoslojna kromatografija izvođena je na pločama silikagela Kieselgel 60 F-254, Merck, dimenzija 20x20 cm, debljine sloja 2 mm u smjesi otapala diklormetan : metanol (6:1,5, v/v).
- Kromatogrami su detektirani UV-lampom kod valnih duljina 254 i 366 nm.

3.2. METODE RADA

3.2.1. Priprava 1,2,3-trimetilimidazolijeva jodida [1]

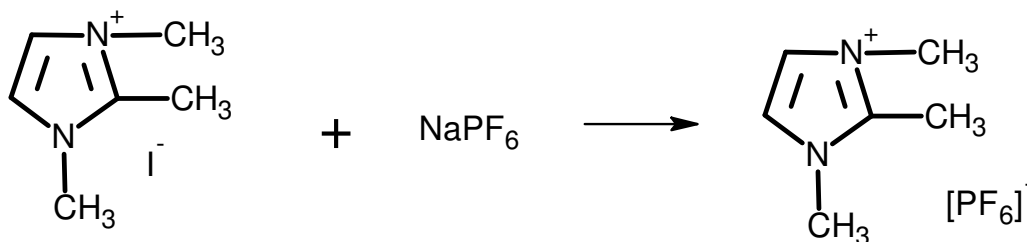


[1]

Metoda A

U tikvici s okruglim dnom od 250 mL otopi se svježe destilirani 1,2-dimetilimidazol (9,61 g; 8,87 mL; 0,01 mol) u acetonitrilu (70 mL) i uz hlađenje u ledenoj kupelji (0° C) iz lijevka za dokapavanje doda metil-jodid (15,61 g; 7,00 mL; 0,11 mol). Reakcijska smjesa se miješa 24 h pri 30 °C. Nakon uparavanja acetonitrila u rotacijskom vakuum-uparivaču dobiven je bijeli talog, koji se dobro ispere etil-acetatom da se uklone neizreagirane sirovine. Dobiveni talog (20,0 g; 84,00 %) prekrystalizira se iz smjese otapala metanol: dietil-eter (1:1, v/v). Dobiven je **1,2,3-trimetilimidazolijev jodid [1]** u obliku bijelih kristala (15,8 g; 66,39 %: $t_f = 89-90$ °C; $R_f = 0,32$).

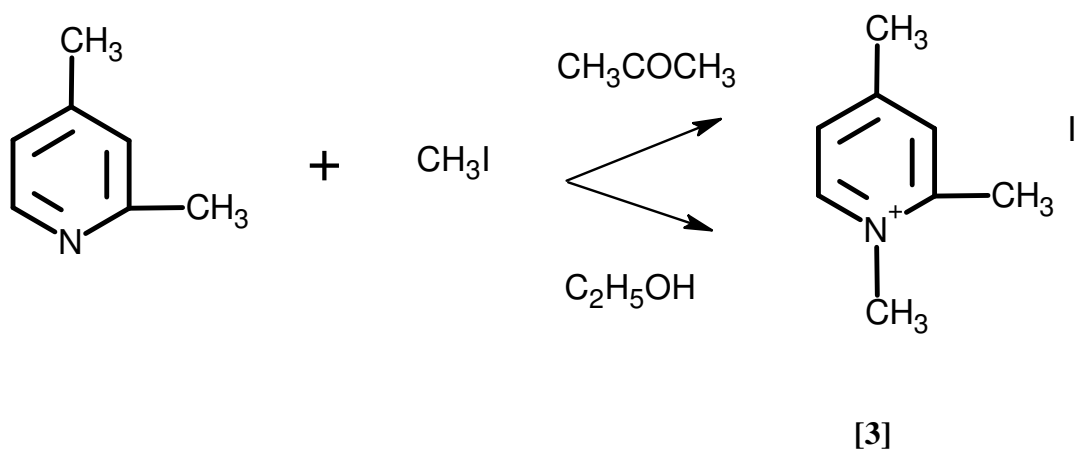
3.2.2. Priprava 1,2,3-trimetilimidazolijeva heksafluorofosfata [2]



[2]

U tikvici s okruglim dnom od 100 mL otopi se 1,2,3-trimetilimidazolijev jodid (2,40 g; 0,01 mol) u vodi (10 mL) i k tome doda natrijev heksafluorfosfat (1,80 g; 0,011 mol) otopljen u vodi (10 mL) i reakcijska smjesa miješa se na magnetskoj miješalici pri sobnoj temperaturi 4 h. Nastali talog nekoliko se puta ispere vodom da se uklone neizreagirani 1,2,3-trimetilimidazolijev jodid i nastala sol (natrijev jodid). Dobiven je **1,2,3-trimetilimidazolijev heksafluorfosfat [2]** (2,50 g; 97,66 %; $t_f = 75-76\text{ }^\circ\text{C}$; $R_f = 0,30$) kao talog bijele boje.

3.2.3. Priprava 1,2,4-trimetilpiridinijeva jodida [3]



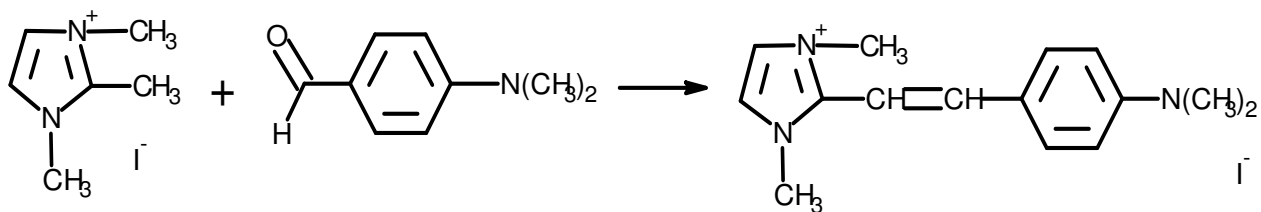
Metoda A

U tikvicu s okruglim dnom od 250 mL snabdjevenu povratnim hladilom i lijevkom za dokapavanje stavi se 2,4-dimetilpiridin (2,18 g; 2,35 mL; 0,0203 mol) otopljen u etanolu (125 mL) te uz hlađenje u ledenoj kupelji (0°C) iz lijevka za dokapavanje doda metil-jodid (4,30 g; 1,90 mL; 0,0303 mol). Reakcijska smjesa se zagrijava uz refluks 17 h. Uparavanjem je dobiven bijeli talog, koji se ofiltrira na Büchnerovom lijevku, dobro ispere etil-acetatom i suši na zraku. Dobiveni sirovi produkt (3,56 g; 70,41 %) prekrystalizira se iz smjese otapala aceton : dietil-eter (1:1, v/v). Dobiven je **1,2,4-trimetilpiridinijev jodid [3]** u obliku bijelih kristala (2,50 g; 49,45 %; $t_f = 121-122^\circ\text{C}$; $R_f = 0,30$).

Metoda B

U tikvicu s okruglim dnom od 100 mL snabdjevenu povratnim hladilom i lijevkom za dokapavanje stavi se 2,4-dimetilpiridin (10,9 g; 11,75 mL; 0,1015 mol) otopljen u acetonu (15 mL) te uz hlađenje u ledenoj kupelji (0° C) iz lijevka za dokapavanje doda metil-jodid (21,5 g; 0,1515 mol) otopljen u acetonu (15 mL). Reakcijska smjesa se zagrijava uz refluks 15 min i nakon toga miješa na sobnoj temperaturi 24 sata. Acetonski sloj se odijeli, a donjem viskoznom sloju doda etil-acetat pri čemu nastaje bijeli talog, koji se ofiltrira na Büchnerovom lijevku, dobro ispere etil-acetatom i suši na zraku. Dobiveni sirovi produkt (22,09 g; 87,37 %) prekrizalizira se iz smjese otapala aceton : dietil-eter (1:1, v/v). Dobiven je **1,2,4-trimetilpiridinijev jodid [3]** u obliku bijelih kristala (16,84 g; 66,61 %; $t_f = 121-122$ °C; $R_f = 0,30$).

3.2.4. Priprava 1,3-dimetil-2-(4-*N,N*-dimetilaminostiril)imidazolijeva jodida [4]



[4]

Metoda A

U tikvici s okruglim dnom od 100 mL otope se u metanolu (30 mL) 1,2,3-trimetilimidazolijev jodid (0,48 g; 0,002 mol) i 4-*N,N*-dimetilaminobenzaldehid (0,30 g; 0,002 mol), doda katalitička količina piperdina (5 kapi) i reakcijska smjesa ostavi miješati na magnetskoj miješalici pri sobnoj temperaturi preko noći. Nastali se talog odsiše preko Büchnerova lijevka, dobro ispere dietil-eterom i suši na zraku. Prekrizalizacijom iz metanola dobiven je **1,3-dimetil-2-(4-*N,N*-dimetilaminostiril)imidazolijev jodid [4]** (0,045 g; 6,26 %; $t_f > 300$ °C; $R_f = 0,51$) kao talog svjetlo-žute boje.

Metoda B

U tikvici s okruglim dnom od 100 mL snabdjevenoj s povratnim hladilom otope se u etanolu (10 mL) 1,2,3-trimetilimidazolijev jodid (0,48 g; 0,002 mol) i 4-*N,N*-dimetilaminobenzaldehid (0,30 g; 0,002 mol), doda katalitička količina 20 %-tnog NaOH (4 kapi) i reakcijska smjesa miješa na magnetskoj miješalici uz refluks 3 sata. Nastali se talog odsiše preko Büchnerova lijevka i prekrizalizira iz metanola. Dobiven je **1,3-dimetil-2-(4-*N,N*-dimetilaminostiril)imidazolijev jodid [4]** (0,110 g; 15,31 %; $t_t > 300$ °C $R_f = 0,51$) kao talog svjetlo-žute boje.

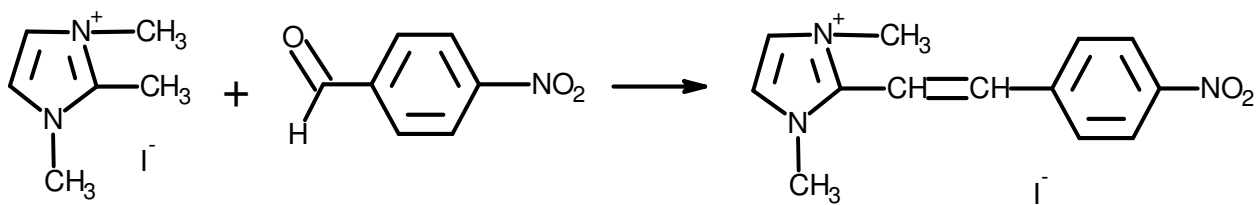
Metoda C

U kivetu od 20 mL otope se u etanolu (10 mL) 1,2,3-trimetilimidazolijev jodid (0,48 g; 0,002 mol) i 4-*N,N*-dimetilaminobenzaldehid (0,30 g; 0,002 mmol), doda katalitička količina 20 %-tnog NaOH (4 kapi) i reakcijska smjesa podvrgne mikrovalnom zračenju od 500 W pri temperaturi od 55 °C. Tijek reakcije praćen je tankoslojnom kromatografijom na silikagelu uz smjesu otapala diklormetan : metanol (6:1,5, v/v) kao eluens i nakon 1 minute reakcija je završena. Nastali se talog odsiše preko Büchnerova lijevka i prekrizalizira iz metanola. Dobiven je **1,3-dimetil-2-(4-*N,N*-dimetilaminostiril)imidazolijev jodid [4]** (0,340 g; 47,32 %; $t_t > 300$ °C; $R_f = 0,51$) kao talog svjetlo-žute boje.

Metoda D

U kivetu od 20 mL otope se u metanolu (10 mL) 1,2,3-trimetilimidazolijev jodid (0,48 g; 0,002 mol) i 4-*N,N*-dimetilaminobenzaldehid (0,30 g; 0,002 mmol), doda katalitička količina piperidina (5 kapi) i reakcijska smjesa podvrgne mikrovalnom zračenju od 500 W pri temperaturi od 55 °C. Tijek reakcije praćen je tankoslojnom kromatografijom na silikagelu uz smjesu otapala diklormetan : metanol (6:1,5, v/v) kao eluens i nakon 5 minuta reakcija je završena. Nastali se talog odsiše preko Büchnerova lijevka i prekrizalizira iz metanola. Dobiven je **1,3-dimetil-2-(4-*N,N*-dimetilaminostiril)imidazolijev jodid [4]** (0,220 g; 30,62 %; $t_t > 210$ °C; $R_f = 0,51$) kao talog svjetlo-žute boje.

3.2.5. Priprava 1,3-dimetil-2-(4-nitrostiril)imidazolijsva jodida [5]

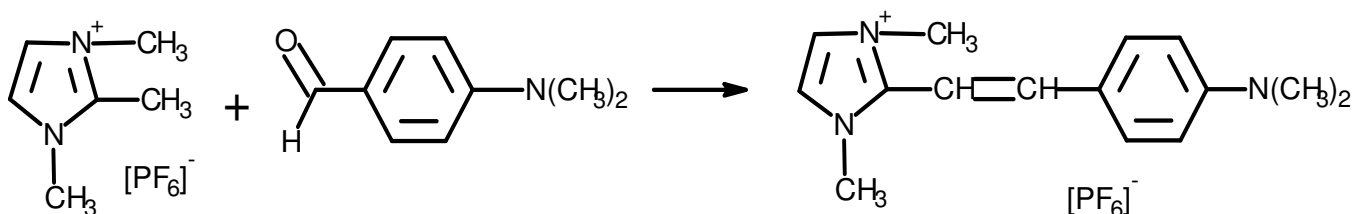


[5]

Metoda A

U tikvici s okruglim dnom od 100 mL otope se u metanolu (30 mL) 1,2,3-trimetilimidazolijev jodid (0,48 g; 0,002 mol) i 4-nitrobenzalhid (0,30 g; 0,002 mol), doda katalitička količina piperidina (5 kapi) i reakcijska smjesa ostavi miješati na magnetskoj miješalici pri sobnoj temperaturi preko noći. Nastali se talog odsiše preko Büchnerova lijevka, dobro ispere dietil-eterom i suši na zraku. Prekristalizacijom iz metanola dobiven je **1,3-dimetil-2-(4-nitrostiril)imidazolijev jodid [5]** (0,21 g; 28,29 %; $t_f = 208-210\text{ }^\circ\text{C}$; $R_f = 0,50$) kao talog svjetlo-žute boje.

3.2.6. Priprava 1,3-dimetil-2-(4-*N,N*-dimetilaminostiril)imidazolijsva heksafluorofosfata [6]



[6]

Metoda A

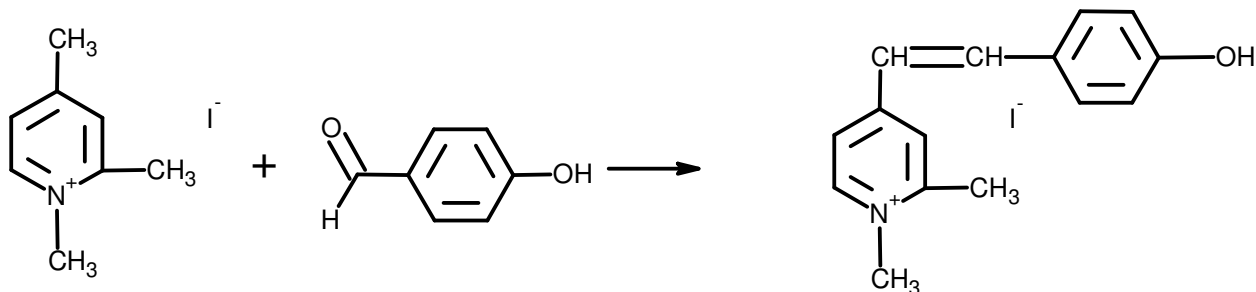
U tikvici s okruglim dnom od 100 mL otope se u metanolu (30 mL) 1,2,3-trimetilimidazolijev heksafluorofosfat (0,51 g; 0,002 mol) i 4-*N,N*-dimetilaminobenzalhid (0,30 g; 0,002 mol), doda katalitička količina piperidina (5 kapi) i

reakcijska smjesa ostavi miješati na magnetskoj miješalici pri sobnoj temperaturi preko noći. Nastali se talog odsiše preko Büchnerova lijevka, dobro ispere dietil-eterom i suši na zraku. Prekristalizacijom iz metanola dobiven je **1,3-dimetil-2-(4-*N,N*-dimetilaminostiril)imidazolijev heksafluorofosfat [6]** (0,12 g; 15,49 %; $t_f = 258-259\text{ }^\circ\text{C}$; $R_f = 0,53$;) kao talog svjetlo-žute boje.

Metoda B

U tikvici s okruglim dnom od 100 mL snabdjevenoj s povratnim hladilom otope se u etanolu (10 mL) 1,2,3-trimetilimidazolijev heksafluorofosfat (0,26 g; 0,001 mol) i 4-*N,N*-dimetilaminobenzaldehid (0,15 g; 0,001 mol), doda katalitička količina 20 %-tnog NaOH (4 kapi) i reakcijska smjesa refluksira uz miješanje na magnetskoj miješalici 24 h. Nastali se talog odsiše preko Büchnerova lijevka i prekristalizira iz metanola. Dobiven je **1,3-dimetil-2-(4-*N,N*-dimetilaminostiril)imidazolijev heksafluorofosfat [6]** (0,22 g; 56,84 %; $t_f = 258-259\text{ }^\circ\text{C}$; $R_f = 0,53$) kao talog svjetlo-žute boje.

3.2.7. Priprava 4-(4-hidroksistiril)-1,2-dimetilpiridinijeva jodida [7]



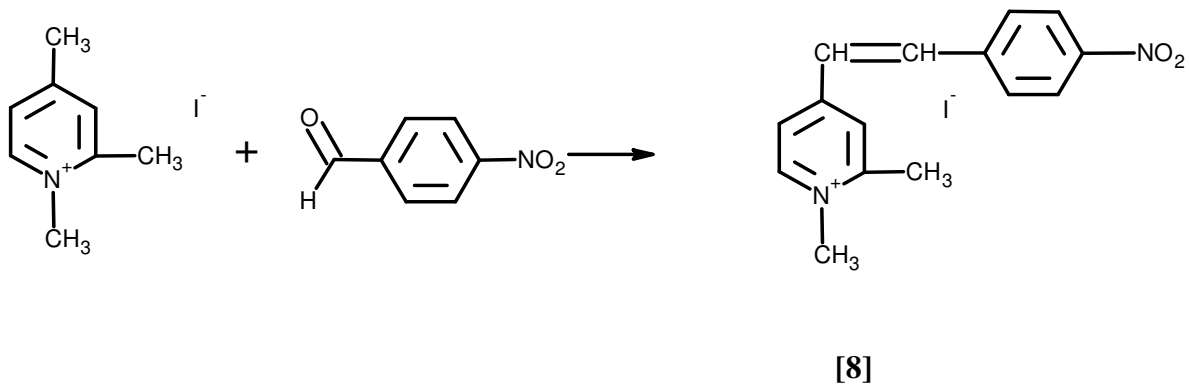
[7]

Metoda A

U tikvici s okruglim dnom od 100 mL snabdjevenom povratnim hladilom otope se u metanolu (30 mL) 1,2,4-trimetilpiridinijev jodid (0,48 g; 0,002 mol) i 4-hidroksibenzaldehid (0,30 g; 0,002 mol), doda katalitička količina piperdina (5 kapi) i reakcijska smjesa se miješa uz refluks na magnetskoj miješalici preko noći. Nastali se talog odsiše preko Büchnerova lijevka, dobro ispere dietil-eterom i suši na zraku.

Prekristalizacijom iz metanola dobiven je **4-(4-hidroksistiril)-1,2-dimetilpiridinijev jodid [7]** (0,32 g; 45,30 %; $t_f = 213-215\text{ }^\circ\text{C}$ $R_f = 0,57$) kao talog crveno-smeđe boje.

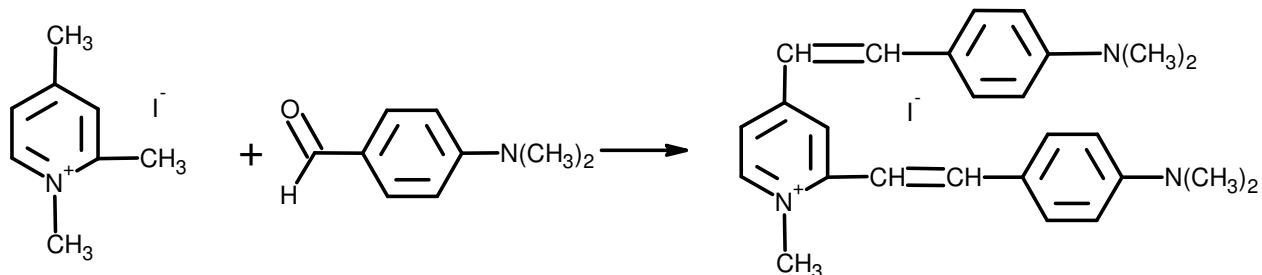
3.2.8. Priprava 1,2-dimetil-4-(4-nitrostiril)piridinijeva jodida [8]



Metoda A

U tikvici s okruglim dnom od 100 mL otope se u metanolu (30 mL) 1,2,4-trimetilpiridinijev jodid (0,48 g; 0,002 mol) i 4-nitrobenzaldehyd (0,30 g; 0,002 mol), doda katalitička količina piperidina (5 kapi) i reakcijska smjesa ostavi miješati na magnetskoj miješalici pri sobnoj temperaturi preko noći. Nastali se talog odsiše preko Büchnerova lijevka, dobro ispere dietil-eterom i suši na zraku. Prekristalizacijom iz metanola dobiven je **1,2-dimetil-4-(4-nitrostiril)piridinijev jodid [8]** (0,21 g; 27,47 %; $t_f = 193-195\text{ }^\circ\text{C}$; $R_f = 0,59$) kao talog svjetlo-žute boje.

3.2.9. Priprava 1-metil-2,4-bis(4-*N,N*-dimetilaminostiril)piridinijeva jodida [9]

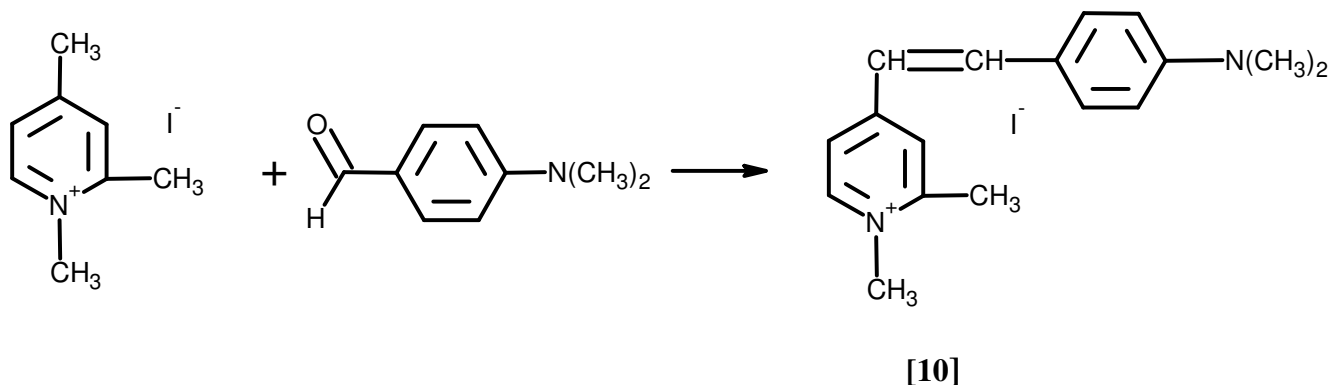


[9]

Metoda D

U kiveti od 20 mL otope se u etanolu (12 mL) 1,2,4-trimetilpiridinijev jodid (0,50 g; 0,002 mol) i 4-*N,N*-dimetilaminobenzaldehid (1,2 g; 0,008 mol), doda katalitička količina 20 %-tnog NaOH (4 kapi) i reakcijska smjesa podvrgne mikrovalnom zračenju od 500 W pri temperaturi od 55 °C. Tijek reakcije praćen je tankoslojnom kromatografijom na silikagelu uz smjesu otapala diklormetan : metanol (6:1,5, v/v) kao eluens i nakon 5 minuta reakcija je završena. Uparavanjem reakcijske smjese dobiveni talog je smjesa više spojeva koji se nakon odsisavanja preko Büchnerova lijevka pročišćava kromatografijom. Prvo se primjenjuje kromatografija u koloni punjenoj silikagelom pri čemu su dobivene 32 frakcije od kojih je u 11 frakcija bio neizreagirani aldehid, a daljnje frakcije bile su ponovno smjesa dvaju spojeva. Združene frakcije su uparene i kromatografirane na ploči sa silikagelom debljine 2 mm, a kao eluens kod obje kromatografije rabila se smjesa otapala diklormetan : metanol (6:1,5, v/v). Na ploči su razdvojena dva spoja (crveni i žuti) koji se ostružu s ploče i ekstrahiraju diklormetanom. Diklormetanski ekstrakti oba spoja se profiltriraju preko staklenog i sinter-lijevka da se ukloni silikagel, a potom upare do suha. Dobivena su dva spoja: **1-metil-2,4-bis(4-*N,N*-dimetilaminostiril)piridinijev jodid [9]** (0,2 g; 20,02 %; $t_f=287-288$ °C; $R_f = 0,86$) kao talog crvene boje i **1,2-dimetil-4-(4-*N,N*-dimetilaminostiril)piridinijev jodid [10]** (0,07 g; 9,20 %; $R_f = 0,56$; $t_f > 300$ °C) kao talog žute boje.

3.2.10. Priprava 1,2-dimetil-4-(4-*N,N*-dimetilaminostiril)piridinijeva jodida [10]



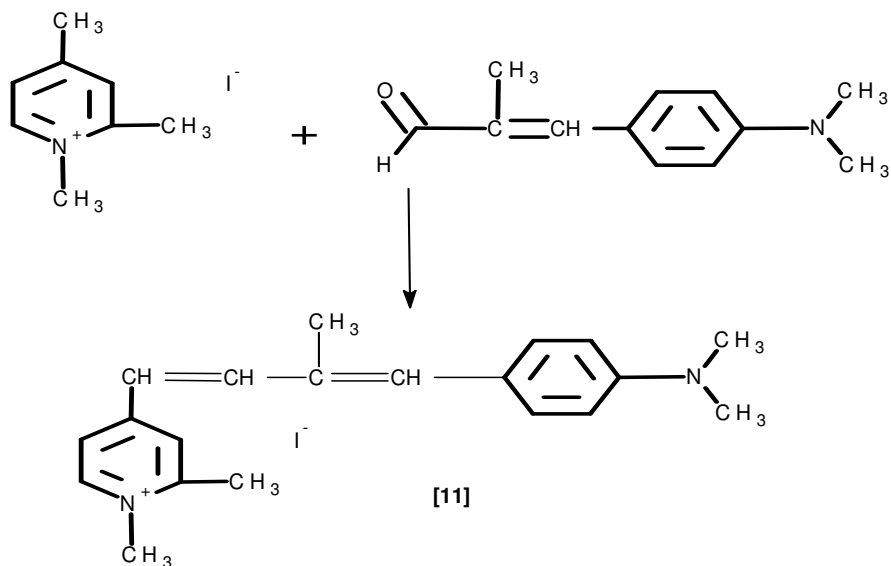
Metoda A

U tikvici s okruglim dnom od 100 mL otope se u metanolu (30 mL) 1,2,4-trimetilpiridinijev jodid (0,48 g; 0,002 mol) i 4-*N,N*-dimetilaminobenzaldehid (0,30 g; 0,002 mol), doda katalitička količina piperdina (5 kapi) i reakcijska smjesa ostavi miješati na magnetskoj miješalici pri sobnoj temperaturi preko noći. Nastali se talog odsiše preko Büchnerova lijevka, dobro ispere dietil-eterom i suši na zraku. Prekristalizacijom iz metanola dobiven je **1,2-dimetil-4-(4-*N,N*-dimetilaminostiril)piridinijev jodid [10]** (0,07 g; 9,20 %; $R_f = 0,56$; $t_f > 300^\circ\text{C}$) kao talog svjetlo-žute boje.

Metoda B

U tikvici s okruglim dnom od 100 mL snabdjevenoj s povratnim hladilom otope se u etanolu (10 mL) 1,2,4-trimetilpiridinijev jodid (0,48 g; 0,002 mol) i 4-*N,N*-dimetilaminobenzaldehid (0,30 g; 0,002 mol), doda katalitička količina 20 %-tnog NaOH (4 kapi) i reakcijska smjesa miješa na magnetskoj miješalici uz refluks 3 sata. Nastali se talog odsiše preko Büchnerova lijevka i prekristalizira iz metanola. Dobiven je **1,2-dimetil-4-(4-*N,N*-dimetilaminostiril)piridinijev jodid [10]** (0,110 g; 14,10 %; $R_f = 0,90$; $t_f > 300^\circ\text{C}$) kao talog svjetlo-žute boje.

3.2.11. Priprava 4-[(4-*N,N*-dimetilaminofenil)-3-metilbut-1,3-dien-1-il]-1,2-dimetilpiridinijeva jodida [11]



Metoda C

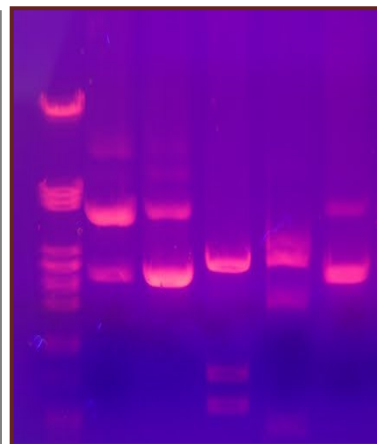
U kiveri od 20 mL otope se u metanolu (12 mL) 1,2,4-trimetilpiridinijev jodid (0,50 g; 0,002 mol) i 3-(4-*N,N*-dimetilaminofenil)-2-metilpropenal (0,40 g; 0,002 mol), doda katalitička količina piperidina (5 kapi) i reakcijska smjesa podvrgne mikrovalnom zračenju od 500 W pri temperaturi od 55 °C. Tijek reakcije praćen je tankoslojnom kromatografijom na silikagelu uz smjesu otapala diklormetan:metanol (6:1,5, v/v) kao eluens i nakon 5 minuta reakcija je završena. Uparavanjem reakcijske smjese dobiveni talog se odsiše preko Büchnerova lijevka i pročišćava preparativnom tankoslojnom kromatografijom na ploči sa silikagelom debljine 2 mm, a kao eluens se rabi smjesa otapala diklormetan : metanol (6:1,5, v/v). Razdvojena su dva spoja (žuti i crveni) koji se ostružu s ploče i ekstrahiraju diklormetanom. Diklormetanski ekstrakt je profiltriran preko staklenog i sinter-lijevka da se ukloni silikagel, a potom uparen do suha. Dobiven je **4-[(4-*N,N*-dimetilaminofenil)-3-metilbut-1,3-dien-1-il]-1,2-dimetilpiridinijev jodid [11]** (0,220 g; 26,19 %; t_r 93-95 °C; $R_f = 0,94$) kao talog žute boje, dok je masa razdvojenog crvenog taloga bila premala da bi se jednoznačno mogla odrediti struktura spoja.

3.2.12. Vežanje stircijaninskih boja na DNA u agaroznom gelu

Za vežanje stircijaninskih boja na DNA korištena je DNA bakteriofaga λ koji je bio prethodno pocjepan s restrikcijskim enzimom Hind III. Bakteriofag λ ima genom veličine 48 502 baznih parova dvolančane linearne DNA s ljepljivim jednolančanim krajevima dugim 12 nukleotida (tzv. cos-krajevi).

Elektroforeza u agaroznom gelu je metoda za razdvajanje molekula DNA pod djelovanjem električnog polja. Pokretljivost molekula u gelu ovisi o njihovoj veličini, obliku i naboju, no kako svi linearni fragmenti dvolančane DNA imaju jednak omjer naboja i veličine, kod takvih fragmenata prati se razlika u pokretljivosti samo u ovisnosti o njihovoj veličini.

Elektroforeza je izvedena u 1 %-tnom agaroznom gelu pripremljenim s TBE-puferom, a masa DNA u jažicama bila je 300 ng. Elektroforeza je provedena u TBE-puferu pri naponu 10 V cm^{-1} u trajanju od 1 h. Nakon završene elektroforeze gel je izrezan u vrpce, koje sadrže jednaku količinu DNA bakteriofaga λ . Potom je svaka vrpca stavljena u prethodno pripremljene stircilimidazolijske i stircilpiridinijske boje [4] - [11] (1 mg) otopljene u smjesi DMSO (1 mL) i destilirane vode (20 mL) te ostavljeno stajati 20 min, nakon čega su vrpce isprane u destiliranoj vodi. Također je jedna vrpca bila stavljena u etidijev bromid koji je poslužio kao standard, budući da se etidijev bromid koristi kao standardni obilježivač DNA. Svaka vrpca je nakon toga pregledana pomoću UV-transiluminatora te je agarozni gel potom slikan pomoću fotoaparata.

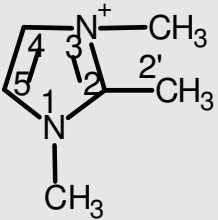
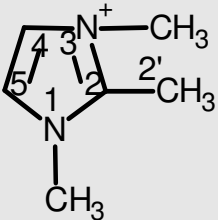


4. REZULTATI I RASPRAVA

Cilj ovog rada bio je priprava i fizikalno-kemijska karakterizacija, novih, do sada u literaturi neobjavljenih, potencijalno biološki aktivnih stirilnih derivata 1,2,3-trimetilimidazolijeva jodida, 1,2,3-trimetilimidazolijeva heksafluorofosfata i 1,2,3-trimetilpiridinijeva jodida (stirilcijaninske boje) te ispitivanje mogućnosti njihove primjene kao obilježivača nukleinskih kiselina u agaroznom gelu.

Kvaternarna sol 1,2,3-trimetilimidazolijev jodid [1] dobivena je reakcijom kvaternizacije 1,2-dimetilimidazola s metil-jodidom u acetonitrilu kao otapalu uz miješanje tijekom 24 sata, a prinos je iznosio 66,39 %. Dobiveni jodid preveden je reakcijom izmjene aniona (metateza) s natrijevim heksafluorofosfatom u vodenom mediju u 1,2,3-trimetilimidazolijev heksafluorofosfat [2] u 97,66 %-tnom iskorištenju.

Tablica 4. Fizikalna svojstva, ^1H - i ^{13}C - NMR-spektri spojeva [1] i [2]

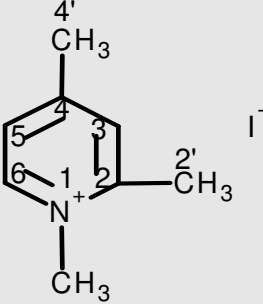
			
1,2,3-trimetilimidazolijev jodid [1]	1,2,3-trimetilimidazolijev heksafluorofosfat [2]		
$M = 238,07 \text{ g mol}^{-1}$	$M = 256,13 \text{ g mol}^{-1}$		
$t_f = 89-90 \text{ }^\circ\text{C}$	$R_f = 0,32$	$t_f = 75-76 \text{ }^\circ\text{C}$	$R_f = 0,30$
$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6) [δ / ppm]		$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6) [δ / ppm]	
7,60 (s, 2H, H-4, H-5); 3,76 (s, 6H, $^+\text{NCH}_3$, 3,30 (s, 3H, CH_3)		7,55 (s, 2H, H-4, H-5); 3,74 (s, 6H, $^+\text{NCH}_3$, 3,00 (s, 3H, CH_3)	
$^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6) [δ / ppm]		$^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6) [δ / ppm]	
144,72 (C-2), 121,92 (C-4, C-5), 34,71 (NCH $_3$), 9,34 (C-2')		144,64 (C-2), 121,84 (C-4, C-5), 34,54 (NCH $_3$), 8,94 (C-2')	

Tablica 5. IR-spektralna svojstva spojeva [1] i [2]

IR(KBr) [cm ⁻¹]	
[1]	3084-2941; 1626; 1595; 1551; 1431; 1408; 1354; 1256; 1138; 1034; 762; 638
[2]	3084-2941; 1626; 1595; 1551; 1431; 1408; 1354; 1256; 1138; 1034; 762; 638

Treća sirovina, 1,2,3-trimetilpiridinijev jodid [3], dobivena je kvaternizacijom 1,4-dimetilpiridina s metil-jodidom na dva načina. Prva sinteza se odvijala refluksiranjem u etanolu 17 sati (prinos 49,45 %), dok je u drugoj reakciji kao otapalo korišten aceton. Reakcijska smjesa je bila kratko zagrijana do refluksa (15 min), a potom se miješala 24 sata na sobnoj temperaturi. Ovom metodom dobiveno iskorištenje je bilo veće (66,61 %), a produkt čišći.

Tablica 6. Fizikalna svojstva, ¹H- i ¹³C- NMR-spektri spoja [3]


1,2,4-trimetilpiridinijev jodid [3]
$M = 263,10 \text{ g mol}^{-1}$; $t_f = 121-122 \text{ }^\circ\text{C}$; $R_f = 0,30$
¹ H-NMR (DMSO- <i>d</i> ₆) [δ/ ppm]
8,94-7,78 (m, 3H, H-3, H-5, H-6), 4,18 (s, 3H, ⁺ NCH ₃), 2,69 (s, 3H, CH ₃), 2,59 (s, 3H, CH ₃)
¹³ C-NMR (DMSO- <i>d</i> ₆) [δ/ ppm]
157,83 (C-2), 145,47 (C-4), 129,25 (C-6), 125,65 (C-5), 128,44 (C-3), 44,76 (⁺ NCH ₃), 21,06 (C-2'), 19,78 (C-4')

Tablica 7. IR-spektralna svojstva spoja [3]

IR (KBr) [cm ⁻¹]	
[3]	3449; 3426; 3007; 2918; 1639; 1568; 1524; 1460; 1375; 1276; 1036; 841; 762; 694

Monokvaterne stirilpiridinijeve soli 1,3-dimetil-2-(4-*N,N*-dimetilaminostiril)imidazolojev jodid [4], 1,3-dimetil-2-(4-nitrostiril)imidazolijev jodid [5] i 1,3-dimetil-2-(4-*N,N*-dimetilaminostiril)imidazolijev heksafluorofosfat [6] dobivene su reakcijama kondenzacije prethodno sintetiziranih spojeva [1] i [2] s *N,N*-dimetilamino- odnosno 4-hidroksibenzaldehidom pomoću nekoliko metoda, u kojima su mijenjani načini vođenja reakcije (miješanje na sobnoj temperaturi, miješanje uz refluks i uporaba mikrovalnog zračenja), otapala (metanol, etanol) te katalizatori (bazični - NaOH i piperidin te kiseli – acetanhidrid).

Prema metodi A ekvimolarne količine sirovina otopljene su u metanolu uz dodatak katalitičke količine piperidina te ostavljene na magnetskoj miješalici na sobnoj temperaturi preko noći, dok su prema metodi B ekvimolarne količine sirovina otopljene u etanolu uz dodatak katalitičke količine 20 %-tne NaOH uz refluksiranje nekoliko sati. Tijek reakcije praćen je tankoslojnom kromatografijom (TLC) pri čemu se kao adsorbens rabio silikagel, a kao eluens smjesa otapala diklormetan : metanol u omjeru 6 : 1,5 (v/v). Dobiveni talozi profiltrirani su preko Büchnerova lijevka i prekrizalizirani iz metanola.

Ishodne sirovine nisu u potpunosti izreagirale pa dobiveno iskorištenje za spoj [4] iznosi 47,32 %, za spoj [5] 28,29 %, a za spoj [6] 56,84 %.

Bolja iskorištenja i brže odvijanje reakcije kondenzacije postignuto je sa istim omjerom reaktanata i istom kombinacijom otapala i katalizatora prema metodama C i D ali uporabom mikrovalnog zračenja. Snaga mikrovalnog reaktora iznosila je 500 W, radna temperatura bila je 55 °C, a vrijeme reakcije iznosilo je od 1 i 13 minuta u ovisnosti

o aromatskom aldehidu (4-*N,N*-dimetilaminobenzaldehid ili 4-nitrobenzaldehyd) i katalizatoru (20 %-tna NaOH ili piperidin).

Tablica 8. Fizikalna svojstva, ^1H - i ^{13}C - NMR-spektri spojeva [4]-[6]

R = N(CH ₃) ₂ ; X ⁻ = I	
1,3-dimetil-2-(4- <i>N,N</i> -dimetilaminostiril)imidazolijev jodid [4]	
$M = 359,24 \text{ g mol}^{-1}$; $t_f > 300 \text{ }^\circ\text{C}$; $R_f = 0,51$	
$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- <i>d</i> ₆) [δ / ppm]	
7,70 (s, 2H, H-4, H-5), 7,67-7,58 (m, 4H, H-2'', H-3'', H-5'', H-6''), 7,46-7,40 (d, 1H, H-2'), 6,79-6,75 (d, 1H, H-3'), 3,90 (s, 6H, ⁺ NCH ₃), 3,00 (s, 6H, N(CH ₃) ₂)	
$^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- <i>d</i> ₆) [δ / ppm]	
152,23 (C-2), 143,51 (C-4''), 130,10 (C-3'', C-5''), 123,31 (C-4, C-5), 122,40 (C-1''), 121,38 (C-2''), 112,19 (C-3'), 101,97 (C-2'', C-6''), 40,20 (N(CH ₃) ₂), 36,49 (⁺ NCH ₃)	
R = NO ₂ ; X ⁻ = I	
1,3-dimetil-2-(4-nitrostiril) imidazolijev jodid [5]	
$M = 371,18 \text{ g mol}^{-1}$; $t_f = 208-210 \text{ }^\circ\text{C}$; $R_f = 0,50$	
$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- <i>d</i> ₆) [δ / ppm]	
8,44-7,44 (m, 6H, Ar), 7,72-7,68 (d, 1H, H-2'), 7,62-7,58 (d, 1H, H-3'), 3,78 (s, 6H, ⁺ NCH ₃)	
$^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- <i>d</i> ₆) [δ / ppm]	
151,72 (C-2), 147,92 (C-4''), 144,57 (C-1''), 130,29 (C-3'', C-5''), 128,28 (C-2'', C-6''), 124,46 (C-4, C-5), 122,43 (C-2''), 122,39 (C-3'), 35,27 (⁺ NCH ₃)	

Nastavak tablice 8

1,3-dimetil-2-(4-<i>N,N</i>-dimetilaminostiril)imidazolijev heksafluorofosfat [6]
$M = 387,31 \text{ g mol}^{-1}$; $t_f = 258-259 \text{ }^\circ\text{C}$; $R_f = 0,53$
$^1\text{H-NMR (DMSO-}d_6\text{) } [\delta/\text{ppm}]$
8,70-7,68 (m, 7H, Ar), 6,80-6,79 (d, 1H, H-2'), 6,77-6,76 (d, 1H, H-3'), 4,26 (s, 3H, NCH ₃), 3,30 (s, 3H, CH ₃), 3,00 (s, 6H, N(CH ₃) ₂)
$^{13}\text{C-NMR (DMSO-}d_6\text{) } [\delta/\text{ppm}]$
155,90 (C-2), 151,91 (C-4), 144,98 (C-4''), 133,51 (C-1''), 124,08 (C-2'', C-6''), 123,56 (C-3'', C-5''), 112,01 (C-4'), 111,80 (C-5'), 44,98 (N(CH ₃) ₂), 39,72 ($^t\text{NCH}_3$), 21,17 (C-2')

Tablica 9. IR-spektralna svojstva spojeva [4]-[6]

IR (KBr) [cm ⁻¹]	
[4]	3452; 3111; 3075; 2967; 1063; 1555; 1528; 1464; 1447; 1417; 1360; 1261; 1140; 1109; 1045; 745; 655
[5]	3331; 3084; 1622; 1566; 1489; 1433; 1350; 1321; 1282; 1259; 1215; 1188; 1092; 1065; 962; 918; 800; 686
[6]	3452; 3111; 3075; 2967; 1063; 1555; 1528; 1464; 1447; 1417; 1360; 1261; 1140; 1109; 1045; 745; 655

Monokvaterne stirilpiridinijeve soli 4-(4-hidroksistiril)-1,2-dimetilpiridinijev jodid [7], 1,2-dimetil-4-(4-nitrostiril)piridinijev jodid [8] i 4-(4-*N,N*-dimetilaminostiril)-1,2-dimetilpiridinijev jodid [10] dobivene su reakcijama kondenzacije prethodno sintetiziranog spoja [3] s 4-hidroksi-, 4-nitro- i 4-*N,N*-dimetilaminobenzaldehidom također pomoću nekoliko metoda, u kojima su mijenjani načini vođenja reakcije (miješanje na sobnoj temperaturi, miješanje uz refluks i uporaba mikrovalnog zračenja) otapala (metanol, etanol), katalizatori (bazični - NaOH i piperidin te kiseli –acetanhidrid) te različiti odnosi reaktanata (kvaterna sol : aromatski aldehid 1:1 i 1:4).

Prema metodi A ekvimolarne količine sirovina otopljene su u metanolu uz dodatak katalitičke količine piperidina te ostavljene na magnetskoj miješalici na sobnoj temperaturi preko noći, dok su prema metodi B ekvimolarne količine sirovina otopljene u etanolu uz dodatak katalitičke količine 20 %-tne NaOH uz refluksiranje nekoliko sati. Tijek reakcije praćen je tankoslojnom kromatografijom (TLC) pri čemu se kao adsorbens rabio silikagel, a kao eluens smjesa otapala diklormetan : metanol u omjeru 6 : 1,5 (v/v). Dobiveni talozi profiltrirani su preko Büchnerova lijevka i prekrizalizirani iz metanola.

Ishodne sirovine nisu u potpunosti izreagirale pa dobiveno iskorištenje za spoj [7] iznosi 45,30 %, za spoj [8] 27,47 %, a za spoj [10] 14,10 %.

Spoj [8] nije bilo moguće dobiti postupcima C i D uz uporabu mikrovalnog zračenja jer je reakcija bila prebrza i dobiven je crni talog raspadnih produkata.

Tablica 10. Fizikalna svojstva, ^1H - i ^{13}C - NMR-spektri spojeva [7], [8], [10]

R = OH	
4-(4-hidroksistiril)-1,2-dimetilpiridinijev jodid [7]	
$M = 353,20 \text{ g mol}^{-1}$; $t_f = 213\text{-}215 \text{ }^\circ\text{C}$; $R_f = 0,57$	
$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6) [δ / ppm]	
10,24 (s, 1H, OH), 8,43-7,70 (m, 7H, Ar), 7,69-7,63 (d, 1H, H-4', H-5'), 7,61-7,57 (d, 1H, H-5'), 3,76 (s, 3H $^+\text{NCH}_3$), 3,30 (s, 3H, CH_3)	
$^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6) [δ / ppm]	
150,89 (C-2), 148,19 (C-4''), 144,23 (C-1''), 131,00 (C-3'', C-5'', C-6), 128,09 (C-2'', C-6'', C-3, C-5), 125,32 (C-4), 123,05 (C-4'), 122,99 (C-5), 35,65 (m, CH_3), 20,19 (C-2')	
R = NO₂	
1,2-dimetil-4-(4-nitrostiril) piridinijev jodid [8]	
$M = 382,21 \text{ g mol}^{-1}$; $t_f = 193\text{-}195 \text{ }^\circ\text{C}$; $R_f = 0,59$	
$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6) [δ / ppm]	
8,87-7,86 (m, 7H, Ar), 7,80-7,73 (d, 1H, H-4'), 7,72-7,69 (d, 1H, H-5'), 4,34 (s, 3H, $^+\text{NCH}_3$), 3,31 (s, 3H, CH_3)	
$^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6) [δ / ppm]	
154,42 (C-2), 151,61 (C-4), 146,93 (C-4''), 146,71 (C-1''), 130,49 (C-3'', C-5'', C-6), 127,18 (C-2'', C-6'', C-3, C-5), 123,51 (C-4'), 123,41 (C-5'), 40,95 ($^+\text{NCH}_3$), 19,84 (C-2')	

Nastavak tablice 10.

1,2-dimetil-4-(4-<i>N,N</i>-dimetilaminostiril)piridinijev jodid [10]	
$M = 380,27 \text{ g mol}^{-1}$; $t_f > 300 \text{ }^\circ\text{C}$; $R_f = 0,56$	
$^1\text{H-NMR (DMSO-}d_6\text{) } [\delta/\text{ppm}]$	
8,70-7,68 (m, 7H, Ar), 6,80-6,79 (d, 1H, H-4'), 6,77-6,76 (d, 1H, H-5'), 4,26 (s, 3H, $^+\text{NCH}_3$), 3,30 (s, 3H, CH_3), 3,00 (s, 6H, $\text{N}(\text{CH}_3)_2$)	
$^{13}\text{C-NMR (DMSO-}d_6\text{) } [\delta/\text{ppm}]$	
155,90 (C-2), 151,91 (C-4), 144,98 (C-4''), 133,51 (C-1''), 124,08 (C-3'', C-5'', C-6), 123,56 (C-2'', C-6'', C-3, C-5), 112,01 (C-4'), 111,80 (C-5'), 44,98 ($^+\text{NCH}_3$), 39,72 ($\text{N}(\text{CH}_3)_2$), 21,17 (C-2')	

Tablica 11. IR-spektralna svojstva spojeva [7], [8], [10]

IR (KBr) [cm^{-1}]	
[7]	3315-3159; 2922; 1637; 1622; 1599; 1512; 1438; 1341; 1279; 1171; 1138; 1107; 825
[8]	3318; 2885; 1643; 1599; 1491; 1474; 1397; 1300; 1287; 1207; 1105; 1055; 852; 842; 827; 745; 698
[10]	3443; 3032; 2928; 1629; 1613; 1580; 1562; 1527; 1092; 800

U reakciji kondenzacije 1,2,3-trimetilpiridinijevog jodida [3] s 4-*N,N*-dimetilaminobenzaldehidom prema metodi D korišten je omjer kvaterne soli i i aromatskog aldehida 1:4 da bi se dobila disupstituirana kvaternarna sol [9]. Sirovine su bile otopljene u etanolu uz dodatak katalitičke količine 20 %-tne NaOH. Reakcija je izvedena pomoću mikrovalnog zračenja od 500 W pri temperaturi 55 °C i trajala je 5 minuta. Uparavanjem reakcijske smjese dobiveni talog je smjesa više spojeva koji pročišćavan kromatografijom na koloni i preparativnom kromatografijom na tankom sloju. Dobivena su spojevi: [9] (20,02 %) i [10] (9,20 %).

Tablica 12. Fizikalna svojstva, ¹H- i ¹³C- NMR-spektri spoja [9]

1-metil-2,4-bis(4-<i>N,N</i>-dimetilaminostiril)piridinijev jodid [9]
$M = 499,44 \text{ g mol}^{-1}$; $t_f = 287-288 \text{ }^\circ\text{C}$; $R_f = 0,86$
¹ H-NMR (DMSO- <i>d</i> ₆) [δ/ ppm]
8,93-7,65 (m, 11H, Ar), 6,79-6,76 (d, 2H, H-2', H-4'), 6,74-6,70 (d, 2H, H-3', H-5'), 4,30 (s, 3H, ⁺ NCH ₃), 3,05 (s, 12H, N(CH ₃) ₂)
¹³ C-NMR (DMSO- <i>d</i> ₆) [δ/ ppm]
154,83 (C-2), 151,90 (C-4), 143,98 (C-4''), 132,05 (C-1''), 125,03 (C-2', C-6'), 112,01 (C-2', C-4'), 111,75 (C-3', C-5'), 44,32 (⁺ NCH ₃), 38,06 (N(CH ₃) ₂)

Tablica 13. IR-spektralna svojstva spoja [9]

IR (KBr) [cm ⁻¹]	
[9]	3443; 3424; 3032; 2916; 1600; 1543; 1528; 1481; 1437; 1414; 1366; 1335; 1188; 1167; 1130; 1065; 1001; 968; 945; 727

Monokvaterna stirilpiridinijska sol 4-[(4-*N,N*-dimetilaminofenil)-3-metilbut-1,3-dien-1-il]-1,2-dimetilpiridinijev jodid [11] dobivena je kondenzacijom 1,2,4-trimetilpiridinijske jodida i 3-(4-*N,N*-dimetilaminofenil)-2-metilpropenalom u metanolu s piperidinom kao katalizatorom. Reakcija se odvijala u mikrovalnom reaktoru pri 500 W i temperaturi 55 °C. Uparavanjem reakcijske smjese i kromatografijom na pločama silikagela debljine 2 mm uz smjesu otapala diklormetan : metanol (6:1,5, v/v) kao eluens, razdvojena su dva spoja od kojih je [11] dobiven u 26,19 %-tnom iskorištenju, dok je drugi spoj dobiven u količini koja je bila premala da bi se spoj mogao identificirati.

Tablica 14. Fizikalna svojstva, ¹H- i ¹³C- NMR-spektri spoja [11]

4-[(4- <i>N,N</i> -dimetilaminofenil)-3-metilbut-1,3-dien-1-il]-1,2-dimetilpiridinijev jodid [11]
$M = 420,34 \text{ g mol}^{-1}$; $t_f = 93-95 \text{ }^\circ\text{C}$; $R_f = 0,94$
¹ H-NMR (DMSO- <i>d</i> ₆) [δ/ ppm]
8,80-7,58 (m, 7H, Ar), 7,33-7,16 (d, 2H, H-4', H-5'), 6,88 (s, 1H, H-8'), 3,62 (s, 3H, ⁺ NCH ₃), 3,16 (s, 6H, N(CH ₃) ₂), 2,50 (s, 3H, CH ₃)
¹³ C-NMR (DMSO- <i>d</i> ₆) [δ/ ppm]
160,76 (C-2), 155,15 (C-4), 155,08 (C-4''), 153,47 (C-1''), 131,09 (C-3'', C-5'', C-3), 130,58 (C-2'', C-5'', C-3, C-5), 126,71 (C-6'), 121,16 (C-4'), 119,95 (C-5', C-8'), 116,55 (C-7''), 45,57 (⁺ NCH ₃), 44,73 (N(CH ₃) ₂), 21,65 (C-7'), 20,32 (CH ₃)

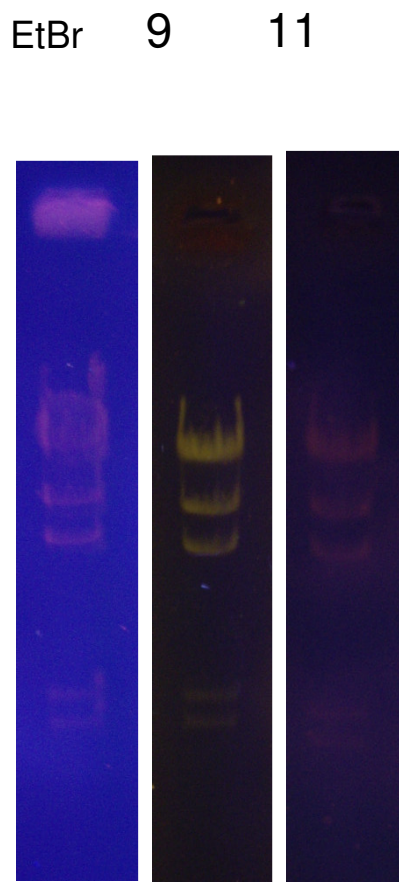
Tablica 15. IR-spektralna svojstva spoja [9]

IR (KBr) [cm ⁻¹]	
[11]	3416; 3302; 2918; 2716; 1668; 1656; 1524; 1447; 1408; 1370; 1356; 1196; 1017; 945; 905; 860; 814; 698

Vizualizacija DNA na elektroforetskom gelu može se postići bojanjem prije elektroforeze, pri čemu se alikvot boje dodaje u agaroznu otopinu prije lijevanja u kalup ili poslije elektroforeze potapanjem vrpca DNA u pripremljenu boju. Etidijev bromid se može koristiti za bojanje prije ili poslije elektroforeze. Bojanje prije elektroforeze je jednostavnije jer ima jedan korak manje dok se za bojanje poslije elektroforeze smatra da omogućuje veću osjetljivost u detektiranju DNA.

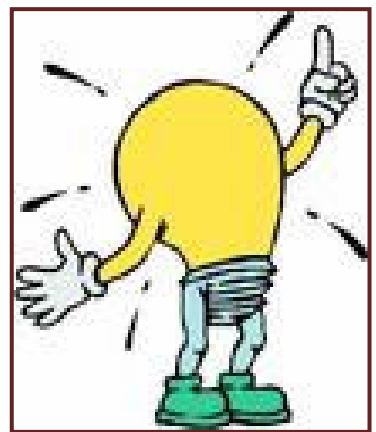
DNA se obično detektira u agaroznom elektroforetskom gelu bojanjem sa etidijevim bromidom pri čemu se fluorescentni bendovi detektiraju pomoću UV zračenja. Međutim ta metoda ima nedostatke zbog jakog mutagenog efekta etidijeva bromida što komplicira rukovanje i odlaganje kako same kemikalije tako i gelova sa vrpcama te elektroforetskih pufera. Ova neželjena svojstva etidijeva bromida potakla su znanstvenike na istraživanje i pronalazak novih sigurnijih boja koje bi se koristile za bojanje nukleinskih kiselina.

Boje [9] i [11] predstavljaju obećavajući alat za DNA analizu pri nižim koncentracijama kada je potrebno UV svjetlo za vizualizaciju, a time bi se izbjegla uporaba mutagenog etidijeva bromida ili radioaktivnosti za detektiranje niskih koncentracija DNA.



Slika 10. DNA u agaroznom gelu obojena:

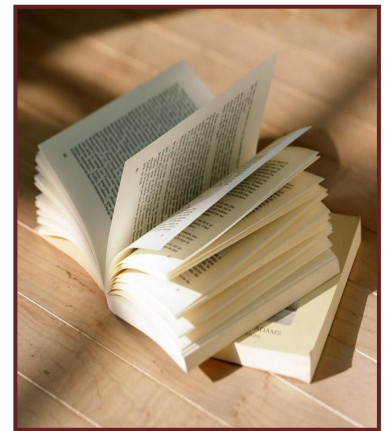
- a) Etidijevim bromidom
- b) 1-metil-2,4-bis(4-*N,N*-dimetilaminostiril)piridinijevim jodidom [9]
- c) 4-[(4-*N,N*-dimetilaminofenil)-3-metilbut-1,3-dien-1-il]-1,2-dimetilpiridinijevim jodidom [11]



5. ZAKLJUČCI

- U ovom su radu kao sirovine sintetizirane tri kvaterne soli : **1,2,3-trimetilimidazolijev jodid [1]**, **1,2,4-trimetilpiridinijev jodid [3]** reakcijom alkiliranja s metil-jodidom te **1,2,3-trimetilimidazolijev heksafluorfosfat [2]** reakcijom izmjene aniona (metateza).
- Dobiveni spojevi su prevedeni u odgovarajuće stirilne boje kondenzacijom sa supstituiranim benzaldehidima ($R = -N(CH_3)_2$, $-NO_2$, $-OH$) i 3-(4-*N,N*-dimetilaminofenil)-2-metilpropenalom.
- Istraženi su različiti sintetski postupci (miješanje na sobnoj temperaturi, miješanje uz zagrijavanje, uporaba mikrovalnog zračenja), različita otapala (metanol, etanol), različiti katalizatori (bazični – NaOH, piperidin; kiseli – acetanhidrid) te različiti odnosi reaktanata (1:1 i 1:4).
- Sintetizirani su slijedeći novi, do sada neobjavljeni, spojevi;
 - **1,3-dimetil-2-(4-*N,N*-dimetilaminostiril)imidazolijev jodid [4]**
 - **1,3-dimetil-2-(4-nitrostiril)imidazolijev jodid [5]**
 - **1,3-dimetil-2-(4-*N,N*-dimetilaminostiril)imidazolijev heksafluorfosfat [6]**
 - **4-(4-hidroksistiril)-1,2-dimetilpiridinijev jodid [7]**
 - **1,2-dimetil-4-(4-nitrostiril)piridinijev jodid [8]**
 - **1-metil-2,4-bis(4-*N,N*-dimetilaminostiril)piridinijev jodid [9]**
 - **1,2-dimetil-4-(4-*N,N*-dimetilaminostiril)piridinijev jodid [10]**
 - **4-[(4-*N,N*-dimetilaminofenil)-3-metilbut-1,3-dien-1-il]-1,2-dimetilpiridinijev jodid [11]**
- Strukture novih, do sada neobjavljenih spojeva [4] – [11] određene su pomoću podataka dobivenih IR-spektroskopijom te 1H - i ^{13}C -nuklearno magnetskom rezonancijom.
- Stirilne boje [4] – [11] ispitane su kao obilježivači DNA u agaroznom gelu i dva spoja [9] i [11] su se pokazala pogodnim za bojanje DNA.

- U nastavku istraživanja trebalo bi ispitati dobivene stirilne boje [4] – [11] kao obilježivače RNA i proteina te istražiti njihovu antimikrobnu i antitumorsku aktivnost.



6. *LITERATURA*

Alvarez-Builla, J., Novella, J. L., Galvez, E., Smith, P., Florencio, F., Garcia-Blanco, S., Bellanato, J., Santos, M. (1986) Synthesis and structural study on α -substituted-1-styrylpyridinium salts. *Tetrahedron* **42**, 699-708.

Anonymous (2010) <<http://www.milestonesrl.com/analytical/products-microwave-synthesis-startsynth.html>> Pristupljeno 22. ožujka. 2010.

Anonymous 1 (2010) <http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Ethidium_bromide.svg> Pristupljeno 1. svibnja. 2010.

Ballistreri, F. P., Barresi, V., Benedetti, P., Caltabiano, G., Fortuna, C. G., Longo, M. L., Musumarra, G. (2004) Design, synthesis and in vitro antitumor activity of new *trans* 2-[2-(heteroaryl)vinyl]-1,3-dimethylimidazolium iodides. *Bioorg. Med. Chem.* **12**, 1689-1695.

Deligeorgiev, T., Gadjev, N., Vasilev, A., Drexhage, K. H., Yarmoluk, S. M. (2007) Synthesis of novel monomeric and homodimeric cyanine dyes with thioacetyl substituents for nucleic acid detection. *Dyes Pigments* **72**, 28-32.

Gawinecki, R., Trzebiatowska, K. (2000) The effect of amino group on the spectral properties of substituted styrylpyridinium salts. *Dyes Pigments* **45**, 103-107.

Ha Duong, T., Zakrzewska K. (1997) Influence of drug binding on DNA flexibility: a normal mode analysis. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **14**, 691-701.

Jakeway, S.C., Krull, U. J. (1999) Consideration of end effects of DNA hybridization in selection of fluorescent dyes for development of optical biosensors. *Can. J. Chem.* **77**, 2083-2087.

Jedrzejewska, B., Kabatc, J., Pietrzak, M., Paczkowski, J. (2002) Styrylpyridinium borate salts as dye photoinitiators of free-radical polymerization. *J. Polym. Sci. Pol. Chem.* **40**, 1433-1440.

Lee, J.W., Jung, M., Rosania, G. R., Chang, Y. T. (2003) Development of novel cell-permeable DNA sensitive dyes using combinatorial synthesis and cell-based screening. *Chem Comm.*, 1852-1853.

Lee, L.G., Chen, C.H., and Chiu, L.A. (1986) Thiazole orange: A new dye for reticulocyte analysis. *Cytometry* **7**, 508-517.

LePecq, J.B., Paoletti C. A. (1967) Fluorescent complex between ethidium bromide and nucleic acids. *J. Mol. Biol.* **27**, 87-106.

Lerman, L. S. (1961) Structural considerations in the interaction of DNA and acridines. *J. Mol. Biol.*, **3**, 18-30.

Long, E. C., Barton J. K. (1990) On demonstrating DNA intercalation. *Acc. Chem. Res.* **23**, 271-273.

MacGregor, J.T., Johnson, I.J. (1977) In vitro metabolic activation of ethidium bromide and other phenanthridinium compounds: mutagenic activity in *Salmonella typhimurium*. *Mutat. Res.* **48**, 103-108.

Marri, E., Mazzucato, U., Fortuna, C.G., Musumarra, G., Spalletti, A. (2006) Photobehaviour of some 1-heteroaryl-2-(1-methylpyridinium-2-yl)ethane iodides (free and complexed with DNA). *J. Photochem. Photobiol.* **179**, 314-319.

Mishra, A., Behera, G. B., Krishna, M. M. G., Periasamy, N. (2001) Time-resolved fluorescence studies of aminostyryl pyridinium dyes in organic solvents and surfactant solutions. *J. Lum.* **92**, 175-188.

Neidle, S., Kelland, L. R., Trent, J. O., Simpson, I. J., Boykin, D. W., Kumar, A., Wilson W. D. (1997) Cytotoxicity of bis(phenylamidinium)furan alkyl derivatives in human tumour cell lines: Relation to DNA minor groove binding. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **7**, 1403- 1408.

Nizomov, N., Kurtaliev, E. N., Nizamov, S. N., Khodjayev G. (2009) Spectral-luminescent study of the interaction of some styrylcyanine dyes with bovine serum albumin and DNA in aqueous solutions. *J. Mol. Struct.* **936**, 199-205.

Shah, S. S., Ahmad, R., Shah, S. W. H., Asif, K. M., Naeem, K. (1998) Synthesis of cationic hemicyanine dyes on their interactions with ionic surfactants. *Colloid Surface A* **137**, 301-305.

Stuerga, D., Gonon, K., Lallemand, M. (1993) *Tetrahedron* **49**, 6229-6235.

Wang, L.Y., Zhang, X. G., Jia, Y. Q., Zhang, Z. X. (2003) Solvent-free rapid synthesis dyes with benzimidazole nucleus using microwawe irradiation. *Chinese Chem. Lett.* **14**, 1116-1118.

Waring, M. (1975) Ethidium and propidium.U: *Antibiotics* (Corcoran, J. W., Hahn, F. E., ured.), *Springer-Verlag*, Berlin, *Vol. 3*, 141-165.

Wilson W.D., Tanious F.A., Barton H.J., Streckowski L., Boykin D.W., Jones, R. L. (1989) Binding of 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) to GC and mixed sequences in DNA: Intercalation of a classical groove-binding molecule. *J. Am. Chem. Soc.* **111**, 5008-5010.

7. SAŽETAK

**PRIPRAVA I SPEKTROSKOPSKA KARAKTERIZACIJA SUPSTITUIRANIH
IMIDAZOLIJEVIH I PIRIDINIJEVIH STIRILNIH BOJA ZA OBILJEŽAVANJE
BIOMAKROMOLEKULA (DNA, RNA I PROTEINA)**

**IVANA BUKOVAC, 80/MB
NIKOLINA MATAGA, 91/BPI
IVANA VRGOČ, 94/BPI**

U ovom su radu kao sirovine sintetizirane tri kvaterne soli: 1,2,3-trimetilimidazolijev jodid [1], 1,2,4-trimetilpiridinijev jodid [3] reakcijom alkiliranja s metil-jodidom te 1,2,3-trimetilimidazolijev heksafluorfosfat [2] reakcijom izmjene aniona (metateza). Dobiveni spojevi su potom prevedeni u odgovarajuće stirilne boje kondenzacijom sa supstituiranim benzaldehidima ($R=-N(CH_3)_2$, $-NO_2$, $-OH$) i 3-(4-*N,N*-dimetilaminofenil)-2-metilpropenalom. Pritom su istraženi različiti sintetski postupci (miješanje na sobnoj temperaturi, miješanje uz zagrijavanje, uporaba mikrovalnog zračenja), različita otapala (metanol, etanol), različiti katalizatori (bazični – NaOH, piperidin; kiseli – acetanhidrid) te različiti odnosi reaktanata (1:1 i 1:4). Strukture novih, do sada neobjavljenih spojeva [4] – [11] određene su pomoću podataka dobivenih IR-spektroskopijom te 1H - i ^{13}C -nuklearnom magnetskom rezonancijom. Stirilne boje [4] – [11] ispitane su kao obilježivači DNA u agaroznom gelu i dva spoja [9] i [11] su se pokazala pogodnim za bojanje DNA.

Ključne riječi: bojanje DNA, Knoevenagelova kondenzacija, mikrovalno zračenje, stirilimidazolijske kvaterne soli, stirilpiridinijske kvaterne sol

8. SUMMARY

**PREPARATION AND SPECTROSCOPIC CHARACTERIZATION OF
SUBSTITUTED IMIDAZOLIUM AND PYRIDINIUM STYRYL DYES FOR
LABELLING OF BIOMACROMOLECULES (DNA, RNA, PROTEINS)**

In this work three quaternary salts : 1,2,3-trimethylimidazolium iodide [1], 1,2,3-trimethylimidazolium hexafluorophosphate [2] and 1,2,4-trimethylpyridinium iodide [3] were prepared and converted into some styryl dyes by condensation with substituted benzaldehydes (R = -N(CH₃)₂, -NO₂, -OH) and 2-methyl-3-(*N,N*-dimethylaminophenyl)-propenal. The investigation included changing of reaction conditions (mixing at room temperature, refluxing, microwaves-assisted reaction), solvents (methanol, ethanol), catalysts (basic – NaOH and piperidine; acidic – acetanhydride) as well as different molar ratios of the quaternary salt and an aromatic aldehyde (1:1 i 1.4). Structures of novel, yet not published, compounds [4] – [11] were determined according to the data obtained by IR-spectroscopy as well as ¹H- and ¹³C-nuclear magnetic resonance. Styryl dyes [4] – [11] were tested as DNA labelling probes in agarose gel and two of these dyes [9] and [11] showed the binding affinities to DNA.

Keywords: DNA-staining, Knoevenagel condensation, microwaves irradiation, styrylimidazolium quaternary salts, styrylpyridinium quaternary salts

Ivana Bukovac rođena je 29. ožujka 1987. godine u Zagrebu. Pohađala je osnovnu školu Žuti Brijeg, nakon čega je upisala Zdravstveno učilište, smjer farmaceutski tehničar te je 2005. godine maturirala s odličnim uspjehom. 2005. godine upisala je Prehrambeno-biotehnološki fakultet. 2009. godine postala je sveučilišna prvostupnica (baccalaurea) inženjerka biotehnologije. Svoju titulu opravdala je radom izrađenim na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu, u Laboratoriju za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije pod naslovom "Nove imidazolijeve ionske tekućine (zelena otapala)" pod mentorstvom dr. sc. Jasne Vorkapić – Furač, red. prof. Na prvoj godini diplomskog studija opredijelila se za smjer Molekularna biotehnologija.

Nikolina Mataga rođena je 30. lipnja 1987. godine u Metkoviću. Osnovnu školu pohađala je u Opuzenu, a prirodoslovno-matematičku gimnaziju u Gimnaziji „Metković“ gdje je 2006. godine maturirala s odličnim uspjehom. 2006. godine upisala je Prehrambeno-biotehnološki fakultet. 2009. godine postala je sveučilišna prvostupnica (baccalaurea) inženjerka biotehnologije. Svoju titulu opravdala je radom izrađenim na Institutu Ruđer Bošković pod naslovom "Onečišćenje priobalnog mora sjevernog Jadrana anionskim tenzidima" voditeljice dr.sc. Dubravke Hršak i dr.sc.doc. Marijane Jukić. Na prvoj godini diplomskog studija opredijelila se za smjer Bioproceno inženjerstvo.

Ivana Vrgoč rođena je 22. listopada 1987. godine u Splitu. Osnovnu školu pohađala je u Splitu, a opću gimnaziju u Srednjoj školi "Marko Marulić" gdje je 2006. godine maturirala s vrlo dobrim uspjehom. 2006. godine upisala je Prehrambeno-biotehnološki fakultet. 2009. godine postala je sveučilišna prvostupnica (baccalaurea) inženjerka biotehnologije. Svoju titulu opravdala je radom izrađenim na Institutu Ruđer Bošković pod naslovom "Onečišćenje priobalnog mora srednjeg i južnog Jadrana anionskim tenzidima" voditeljice dr.sc. Dubravke Hršak i dr.sc. Marijane Jukić, doc. Na prvoj godini diplomskog studija opredijelila se za smjer Bioproceno inženjerstvo.