Sinteza i spektroskopska karakterizacija novih heterostilbenskih derivata 4-pirona i njihovo kompleksiranje s biometalima

Borić, Ingo

Undergraduate thesis / Završni rad

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Chemical Engineering and Technology / Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:149:128987

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-27**

FKITMCMXIX

Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Chemical Engineering and Technology University of Zagreb

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Ingo Borić

ZAVRŠNI RAD

Zagreb, srpanj 2022.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Ingo Borić

SINTEZA I SPEKTROSKOPSKA KARAKTERIZACIJA NOVIH HETEROSTILBENSKIH DERIVATA 4-PIRONA I NJIHOVO KOMPLEKSIRANJE S BIOMETALIMA

ZAVRŠNI RAD

Mentor rada: prof. dr. sc. Irena Škorić

Neposredni voditelj rada: Milena Mlakić, mag. appl. chem.

Članovi ispitnog povjerenstva:

prof. dr. sc. Irena Škorić

doc. dr. sc. Dragana Vuk

v. pred. dr. sc. Lidija Furač

Zagreb, srpanj 2022.

SAŽETAK

Sinteza i spektroskopska karakterizacija novih heterostilbenskih derivata 4-pirona i njihovo kompleksiranje s biometalima

S ciljem pronalaska novih potencijalnih inhibitora kolinesteraza sintetizirani su novi heterostilbenski derivati 4-pirona. Wittigovom reakcijom sintetizirane su *cis*- i *trans*-heterostilbenske strukture iz određenih aldehida i fosfonijevih soli 4-pirona. Ukupno je dobiveno i izolirano deset heterostilbenskih 4-pironskih derivata.

Svi produkti pročišćeni su kolonskom kromatografijom, a strukture su im okarakterizirane i potvrđene ^{1}H, ^{13}C i 2D NMR spektrima te UV i IR spektrima. Kristalne strukture dva pironska heterostilbena dodatno potvrđuju strukturu i pakiranje dobivenih spojeva, a ispitano je i njihovo kompleksiranje s biometalima kao i utjecaj temperature na kemijske pomake u NMR spektrima.

Ključne riječi: heterostilbeni, 4-pironi, inhibicija kolinesteraza, Wittigova reakcija, spektroskopija, biometali

SUMMARY

Synthesis and spectroscopic characterization of new heterostilbene derivatives of 4-pyrone and their complexation with biometals

In order to find new potential cholinesterase inhibitors, new heterostilbene derivatives of 4-pyrone were synthesized. The Wittig reaction yielded *cis*- and *trans*-heterostilbene structures from certain aldehydes and phosphonium salts of 4-pyrone. A total of ten 4-pyrone heterostilbene derivatives were obtained and isolated.

All products were purified by column chromatography, and their structures were characterized and confirmed by ^{1}H, ^{13}C and 2D NMR spectra and UV and IR spectra. The crystal structures of two of them further confirm the structure and the packing of the obtained compounds. Additionally their complexation with biometals has been investigated as well as the influence of the temperature on the chemical shifts in the NMR spectra.

Key words: heterostilbenes, 4-pyrones, cholinesterase inhibition, Wittig reaction, spectroscopy, biometals

Zahvala

Ovaj završni rad izrađen je na Zavodu za organsku kemiju na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu.

Zahvaljujem svojoj mentorici prof. dr. sc. Ireni Škorić na ukazanom povjerenju, savjetima, mogućnosti širenja moga znanja iz organske kemije i svoj pomoći prilikom izrade ovog završnog rada.

Također puno zahvaljujem asistentici mag. appl. chem. Mileni Mlakić na pomoći, strpljenju, pristupačnosti i uvijek ugodnoj radnoj atmosferi u laboratoriju.

Zahvaljujem svim prijateljima i kolegama koji su bili uz mene i podržavali me tijekom cijelog preddiplomskog studija.

I naravno na kraju zahvaljujem svojim roditeljima i obitelji na podršci, motivaciji i vjeri u mene i moje znanje.

Hvala vam svima.

Sadržaj

UVOD 1

1. OPĆI DIO 2

1.1 NMR spektroskopija 2

1.1.1 POVIJEST NUKLEARNE MAGNETSKE REZONANCIJE U HRVATSKOJ 2

1.1.2 Osnove NMR spektroskopije 3

1.1.3 Interakcije spinova 6

1.1.4 Osnovni parametri 6

1.1.5 Jednodimenzijske NMR tehnike 7

1.1.6 Dvodimenzijske NMR tehnike 11

1.2 UV spektroskopija 13

1.3 IR spektroskopija 14

1.4 Spektrometrija masa 15

2. REZULTATI I RASPRAVA 17

2.1 UVOD 17

2.2 SINTEZA 4 – PIRONSKIH HETEROSTILBENA 1-5 19

2.3 SPEKTROSKOPSKA KARAKTERIZACIJA 4 – PIRONSKIH DERIVATA 1-5 22

2.3.1 NMR SPEKTROSKOPIJA 4 – PIRONSKIH HETEROSTILBENA **1-5** 22

2.3.2 UV SPEKTROFOTOMETRIJA SPOJEVA **1-5** 35

2.3.3 KARAKTERIZACIJA SPOJEVA **1-5** IR SPEKTROSKOPIJOM 39

2.3.4 KRISTALNE STRUKTURE NEKIH 4 – PIRONSKIH HETEROSTILBENA 40

2.3.5 KOMPLEKSIRANJE PIRONSKIH DERIVATA S BIOMETALIMA 41

3. EKSPERIMENTALNI DIO 44

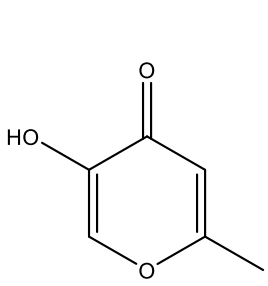
4. ZAKLJUČAK 51

5. LITERATURA 52

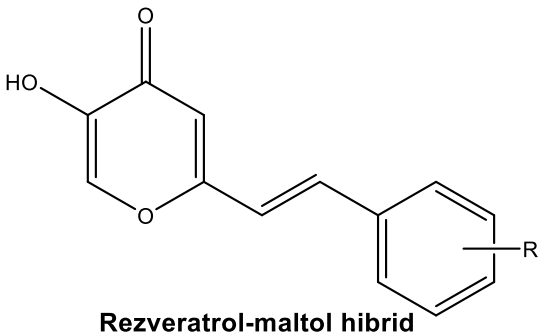
6. ŽIVOTOPIS 54

UVOD

Alzheimerova bolest, kao vodeći uzrok demencije, složen je i progresivan neurodegenerativan poremećaj kojeg karakterizira progresivan gubitak memorije i kognitivnih sposobnosti. Iako potpuni uzrok ove bolesti nije poznat, nedavna istraživanja pokazuju kako postoji više faktora o kojima ovisi. Najčešći uzroci Alzheimerove bolesti su agregacija β-amiloida, oksidativan stres, hiperfosforilacija tau proteina i poremećaj homeostaze metalnih iona u tijelu. Do sada su poznati lijekovi koji će samo ublažiti pojedine simptome, no to nije dovoljno te postoji velika potreba za pronalaskom novih i boljih lijekova. Kao nova potencijalna vrsta terapije javlja se inhibicija agregacije β-amiloida čime se sprječava njihovo toksično djelovanje na živčane stanice. Rezveratrol, kao potencijalni inhibitor agregacije β-amiloida, je prirodni derivat stilbena čiji su derivati potencijalni lijekovi za Alzheimerovu bolest zbog njihove širine djelovanja. Osim samog rezveratrola, u skorije vrijeme se više okreće prema hibridima rezveratrola i maltola zbog njihovog višestrukog djelovanja na inhibiciju agregacije β-amiloida, antioksidacijskog djelovanja te mogućnosti kompleksiranja s biometalima. S tim ciljevima u sklopu ovog završnog rada sintetizirani su i spektroskopski okarakterizirani novi heterostilbenski derivati 4-pirona na kojima će se kasnije provesti i biološka ispitivanja.



Maltol



Rezveratrol-maltol hibrid

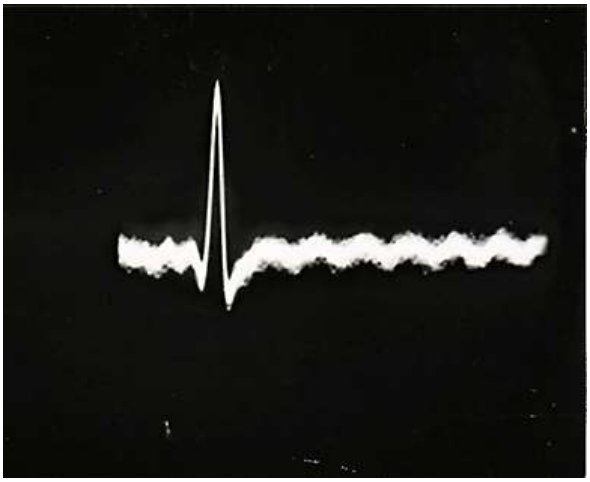
Sinteza se sastoji od Wittigove reakcije. Glavnu strukturnu jedinicu ovih heterostilbena čini pironski prsten s hidroksilnom skupinom u položaju 3. Hidroksilna skupina je vrlo važna u strukturi ovih spojeva jer ona daje predispoziciju za antioksidacijsko djelovanje.

1. OPĆI DIO

1.1 NMR spektroskopija

1.1.1 POVIJEST NUKLEARNE MAGNETSKE REZONANCIJE U HRVATSKOJ

Početci korištenja nuklearne magnetske rezonancije (NMR) uređaja u Hrvatskoj povezani su s izgradnjom prvog NMR uređaja u Hrvatskoj na Institutu Ruđer Bošković (IRB) pod vodstvom dr.sc. Siniše Maričića. Prvi signal NMR dobiven je u listopadu 1959. godine (Slika 1).



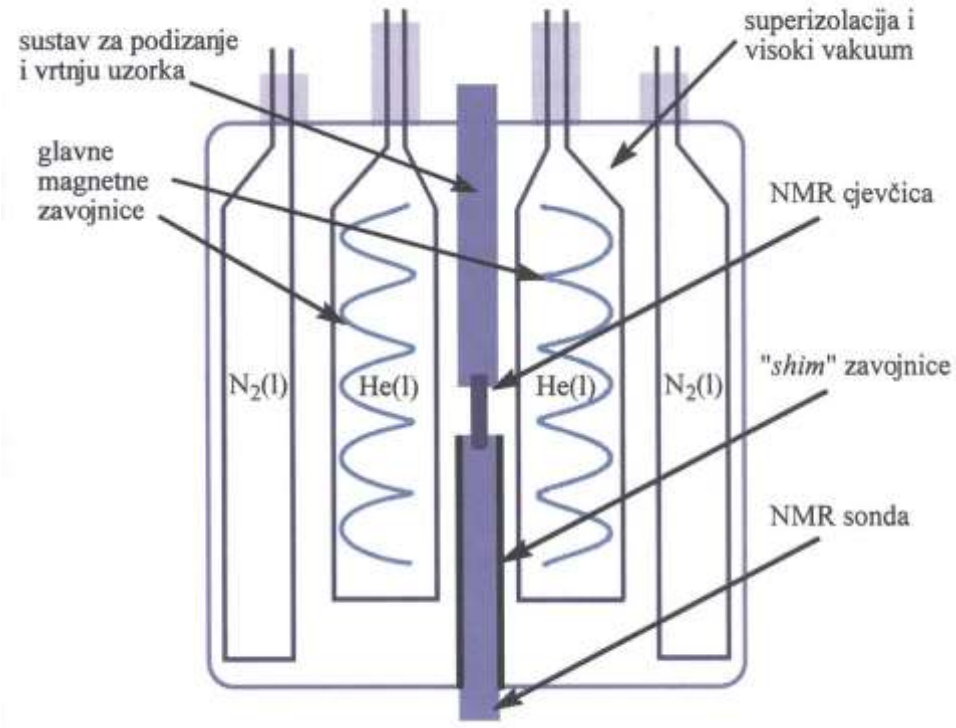
Slika 1. Prvi NMR signal snimljen na NMR uređaju na Institutu Ruđer Bošković u listopadu 1959. godine [1].

Istraživanja su započela tek godinu kasnije, 1960. godine kada je uređaj bio u punom pogonu. Istraživala se protonska vodljivost, struktura anorganskih spojeva te struktura i priroda veze spojeva plemenitih plinova koja su u to vrijeme bila u samom vrhu svjetske znanosti. Razvoj NMR metode u Hrvatskoj, ali i šire, utjecao je na razvoj kemije, osobito organske zbog svojih velikih mogućnosti. Prvi NMR uređaj na IRB je bio uređaj u funkciji niskog razlučivanja (29 MHz) (Slika 2). Njime su se snimali uzorci u čvrstom agregatnom stanju i to u temperaturnom rasponu od +60 do —196 °C (hlađenje tekućim dušikom). Od jezgri atoma istraživale su se ^{1}H i ^{19}F [1,2].

Slika 2. Prvi NMR uređaj na Institutu Ruđer Bošković u Zagrebu [1].

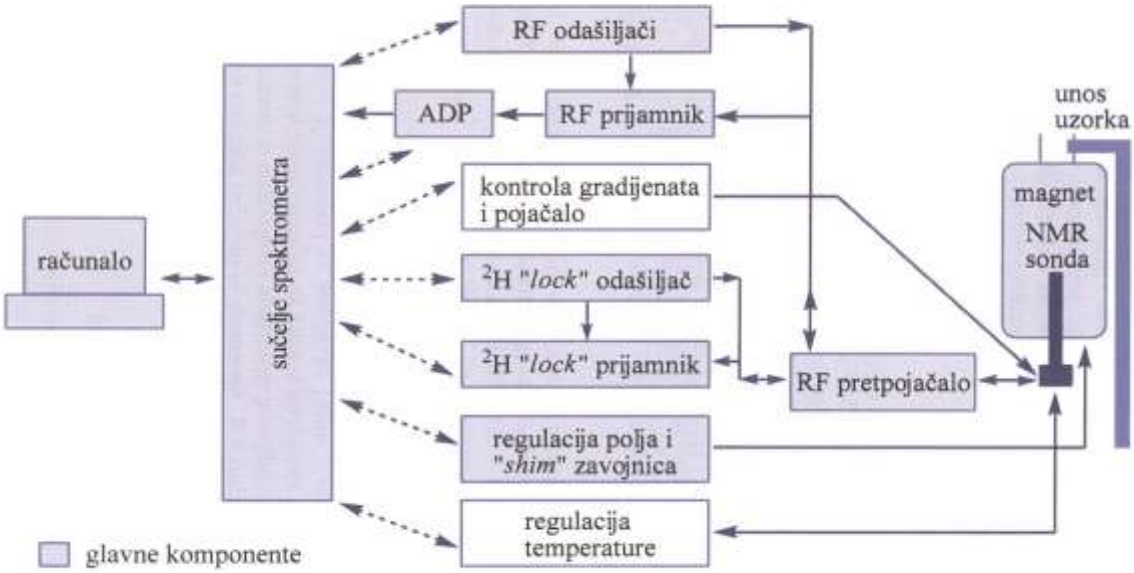
1.1.2 Osnove NMR spektroskopije

NMR spektroskopija se temeljno koristi za određivanje strukture organskih, anorganskih i bioloških molekula jer se strukture malih organskih molekula često mogu samo ovom tehnikom odrediti. NMR spektroskopijom se mogu proučavati jezgre elemenata koje posjeduju spin različit od nule kao što su ^{1}H, ^{13}C, ^{31}P, ^{19}F, ^{15}N i drugi. Kvantni broj nuklearnog spina ovisi o masenom i atomskom broju promatrane jezgre. Ako je maseni broj jezgre paran, a atomski broj neparan, kvantni broj nuklearnog spina će biti cijeli broj (n). Kada su oba neparna, kvantni broj nuklearnog spina je polucijeli broj (n/2). Jezgre koje imaju oba broja parna nisu aktivne u NMR spektroskopiji jer ne posjeduju magnetni moment. U NMR spektroskopiji se najviše proučavaju jezgre kojima kvantni broj nuklearnog spina iznosi 1/2 [3,4]. Kako bi se snimio spektar NMR potreban je NMR spektrometar kojem su osnove supravodljivi magnet, NMR sonde s cjevčicom u kojoj se nalazi uzorak, zavojnice i elektronika koja instrument povezuje sa sustavom za obradu podataka. Mogu se snimati tekući uzorci i otopine čvrstih uzoraka, a snimanje se provodi u NMR cjevčici. Oko NMR sonde se nalaze zavojnice kojima je svrha podešavanje homogenosti magnetskog polja. Da bi omjer signala i šuma bio što veći, koristi se spremnik s tekućim helijem koji hladi elektroniku i time smanjuje toplinsku šum i povećava osjetljivost. Spremnik s helijem je okružen tekućim dušikom i sustavom za izolaciju pri sniženom tlaku (Slika 3) [5].



Slika 3. Prikaz unutrašnjosti magneta NMR spektrometra [5].

Uzorak se pobuđuje radiofrekvencijskim odašiljačima, a signal pojačava radiofrekvencijsko pojačalo. Dobiveni signal se prenosi na kraju do računala nizom pretvorbi pri čemu se pretvara u sliku (Slika 4) [6].



Slika 4. Shematski prikaz modernog NMR spektrometra [5].

Uzorci se prije snimanja moraju otopiti u deuteriranom otapalu jer u ^{1}H NMR spektru ^{2}H jezgra nema signala te zbog „^{2}H lock“ signala pomoću čega se može dodatno kontrolirati homogenost i stabilnost magnetnog polja. Najviše korištena deuterirana otapala su dimetil-sulfoksid, dimetil-formamid, deuterirani kloroform, deuterirani metanol, deuterirana voda i deuterirani benzen [6].

Slika 5. Bruker 300 i 600 MHz spektrometri na Institutu Ruđer Bošković u Zagrebu

1.1.3 Interakcije spinova

Interakcije spinova su anizotropnog karaktera što je posljedica nesferne raspodjele elektrona u okolini jezgre. Interakcije spinova mogu biti električne koje uključuju kvadrupolno sprezanje spinova s kvantnim brojem većim od 1/2 i magnetne koje uključuju kemijski pomak i spin-spin sprezanja. Kako bi se spinovi u jezgri pobudili, na njih se mora djelovati magnetnim poljem, što se naziva tehnika kontinuiranog vala, ili primjenom radiofrekvencijskog pulsa koji će zarotirati vektor magnetizacije za određeni pulsni kut i tako pobuditi jezgru atoma. Ovi pulsevi mogu biti tvrdi i meki, pri čemu se mekim pulsevima mogu pobuditi sve jezgre u NMR spektru, dok se tvrdi pulsevi koriste za selektivnu pobudu spinova pojedinih jezgri. U zadnje vrijeme se sve više koriste gradijentni pulsevi koji se temelje na primjeni dodatnog magnetnog polja koje se linearno mijenja čime se mogu odabrati željeni signali samo s jednim pulsnim slijedom. Spin-spin sprezanja se opisuju konstantom sprege koja se izražava u hercima, Hz. Spin jezgre atoma može utjecati na energijske razine susjedne jezgre atoma te su takve jezgre spregnute preko jedne ili više kemijskih veza. Konstanta sprege se može opisati kao razlika između dviju linija dubleta. Sprege mogu biti homonuklearne, tj. između istovrsnih jezgri ili heteronuklearne, tj. između različitih jezgara. Kako se promatrana jezgra spreže sa susjednom jezgrom, njen NMR signal se cijepa na multiplet s brojem signala 2*n*I +1 pri čemu je n broj susjednih jezgara, a I spinski kvantni broj jezgre u sprezi. Tako se cijepanjem signala može dobiti singlet, dublet, triplet i drugi multipleti. Također sprega se ne mora javljati samo između jezgri koje su smještene jedna do druge, već može biti i kroz više veza. Tako postoje sprege kroz dvije veze (geminalne), kroz tri veze (vicinalne) te sprege dugog dosega kroz četiri i više veza, no one se rjeđe javljaju. Ponekad sprege višeg reda nisu poželjne jer mogu rezultirati signalom iz kojeg se ne mogu dobro očitati podaci, no taj problem se može riješiti snimanjem spektara pri višem magnetnom polju [7,8].

1.1.4 Osnovni parametri

NMR parametri pokazuju ponašanje pojedinih jezgara pod utjecajem magnetnog polja. Tako vrijeme relaksacije pokazuje vrijeme za koje spinovi prelaze iz pobuđenog u osnovno stanje te o njemu ovisi intenzitet pojedinih signala. Osim prisutnosti

vanjskog magnetnog polja, stvaraju se i lokalna magnetna polja pod djelovanjem elektrona koji okružuju jezgru što dovodi do zasjenjenja jezgre od vanjskog magnetnog polja, a time se smanjuje efektivno magnetno polje koje osjeća jezgra. Osim lokalnih magnetnih polja, na zasjenjenje jezgre utjecaj ima i anizotropni efekt kod alkena, alkina i aromatskih spojeva, te molekule otapala pri čemu se izgled spektra mijenja. Svaka jezgra ima određen položaj u NMR spektru koji se nalazi na određenoj udaljenosti od referentnog signala ovisno o uvjetima snimanja. Položaj jezgre u odnosu na referentni signal se naziva kemijski pomak. U ^{1}H i ^{13}C NMR se kao referentni uzorak koristi tetrametilsilan(TMS). Kemijski pomak se definira kao razlika frekvencija proučavanog uzorka (vi) i referentnog signala ($vref$) podijeljena frekvencijom vanjskog magnetnog polja ($v0$), a izražava se pomoću bezdimenzijske jedinice ppm : $\delta i/ppm = (vi - vref)/v0 \ * \ 10\text{^}6$.

Također se može definirati kao razlika jakosti magnetnog polja referentnog ($Bref$) i opaženog signala (Bi) podijeljena jakošću vanjskog magnetnog polja ($B0$) : $\delta i/ppm = (Bref - Bi)/B0 \ * \ 10\text{^}6$.

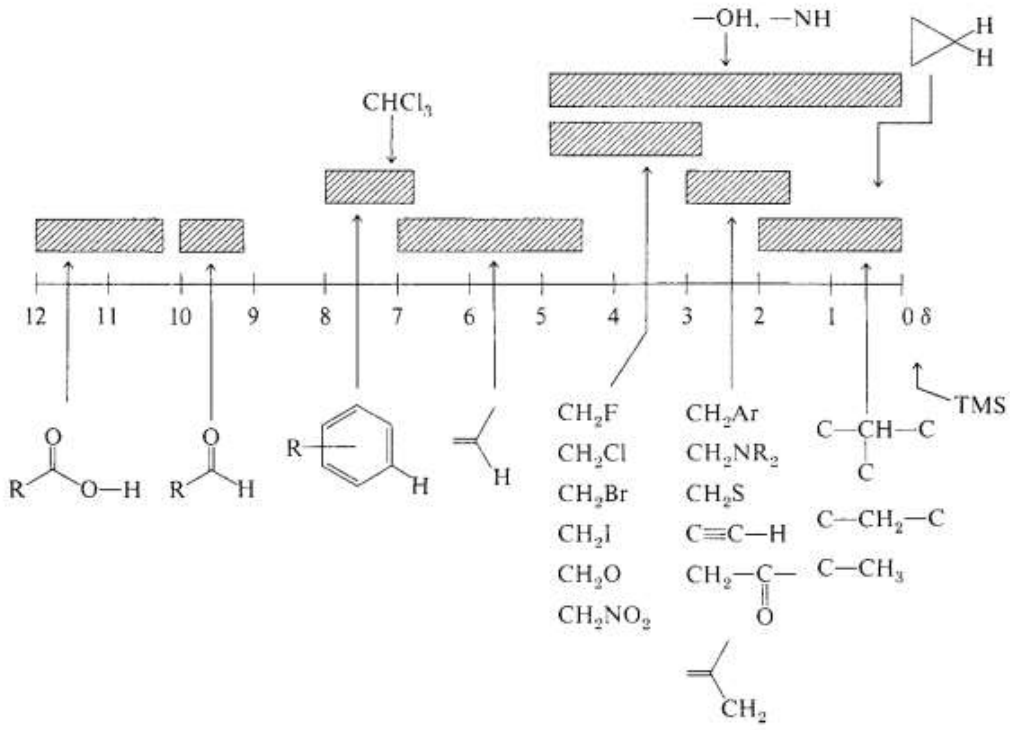
Tu se javlja i poveznica između zasjenjenja i kemijskog pomaka jer jezgra koja u spektru ima manji kemijski pomak je više zasjenjena od one koja se u spektru nalazi pri većem kemijskom pomaku, tj. kaže se da je odsjenjena. Neke jezgre mogu imati isti kemijski pomak te se za njih kaže da su kemijski ekvivalentne, dok neke osim istog kemijskog pomaka se također jednako sprežu sa susjednim jezgrama te su takve jezgre magnetno ekvivalentne. Vrlo bitan efekt u NMR spektroskopiji je promjena intenziteta rezonancije određenog spina koja se javlja zbog promjena u ravnotežnoj napučenosti spinova druge jezgre, tj. Nuklearni Overhauserov efekt. Ovim efektom se može skratiti vrijeme snimanja heteronuklearnih spektara zbog povećanja intenziteta signala [9,10].

1.1.5 Jednodimenzijske NMR tehnike

1.1.5.1 ^{1}H NMR

^{1}H NMR je najpoznatija i najviše korištena jednodimenzijska NMR tehnika, prvotno za detekciju signala kemijski neekvivalentnih protona u spoju čiji broj je proporcionalan

omjeru površina ispod pojedinih signala. Ovaj spektar daje prvi uvid u strukturu spoja na temelju kemijskih pomaka i konstanti sprege spin-spin. [11]. Pulsni slijed ove tehnike se ponavlja više puta kako bi se postigao što bolji omjer signala i šuma. Interpretacija ^{1}H NMR spektara se zasniva na međusobnoj povezanosti 3 važna obilježja : integracije signala pikova, spin-spin sprege i kemijskog pomaka. Iz integrala signala možemo zaključiti o omjeru vodikovih iona u uzorku. Kemijski pomak nam daje informaciju o položaju signala kojeg možemo tada povezati sa karakterističnim pomacima za ^{1}H NMR spektar (Slika 7). Te naposlijetku, spin-spin sprega je ključna za otkrivanje strukture spoja jer daje informacije o susjednim jezgrama [12,13].

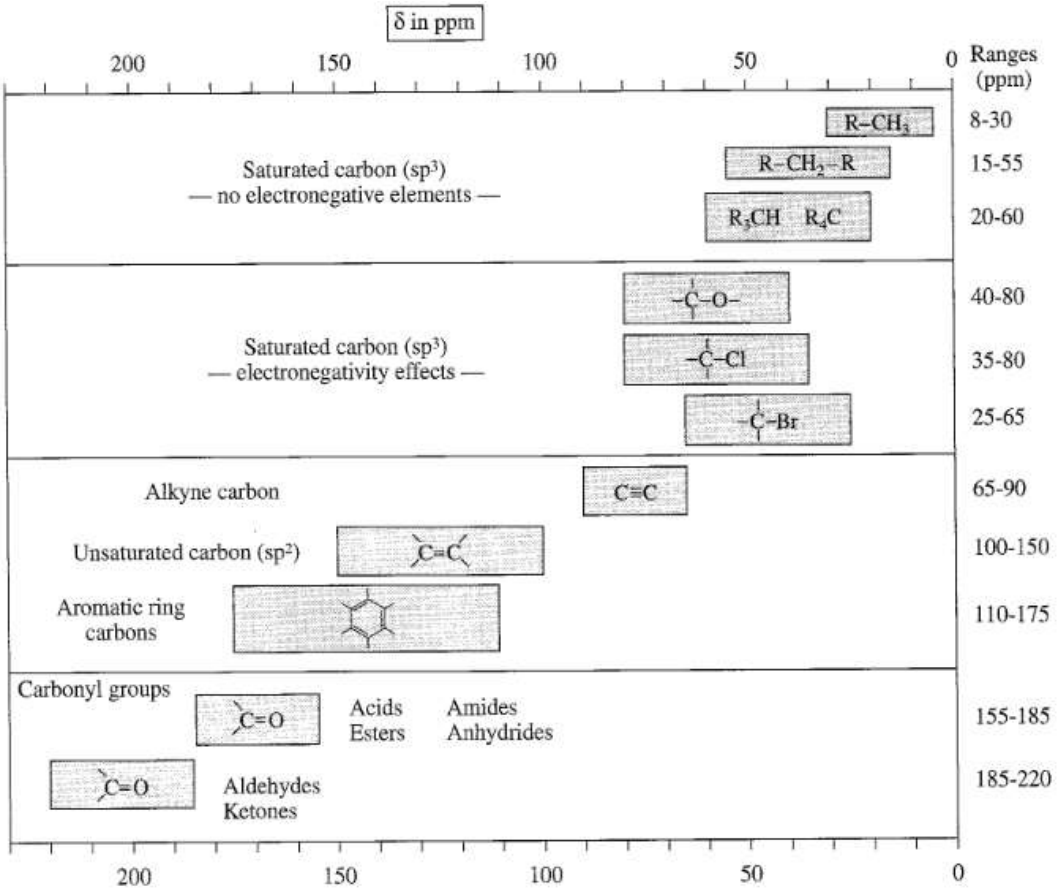


Slika 6. Pojednostavljeni prikaz protonskih kemijskih pomaka u ^{1}H NMR spektru [9].

1.1.5.2 ^{13}C NMR

^{13}C NMR tehnika uključuje rasprezanje pri frekvenciji rasprezajućeg polja koja je pomaknuta izvan spektra u odnosu na frekvenciju rezonancije protona. Time se postiže rasprezanje između jezgri ^{13}C i protona koji nisu direktno vezani na njih, a umanjena C-H sprega kroz jednu vezu ostaje očuvana u spektru. Sprezanje kroz jednu vezu omogućuje određivanje multipliciteta pojedinih C atoma u molekuli pa tako

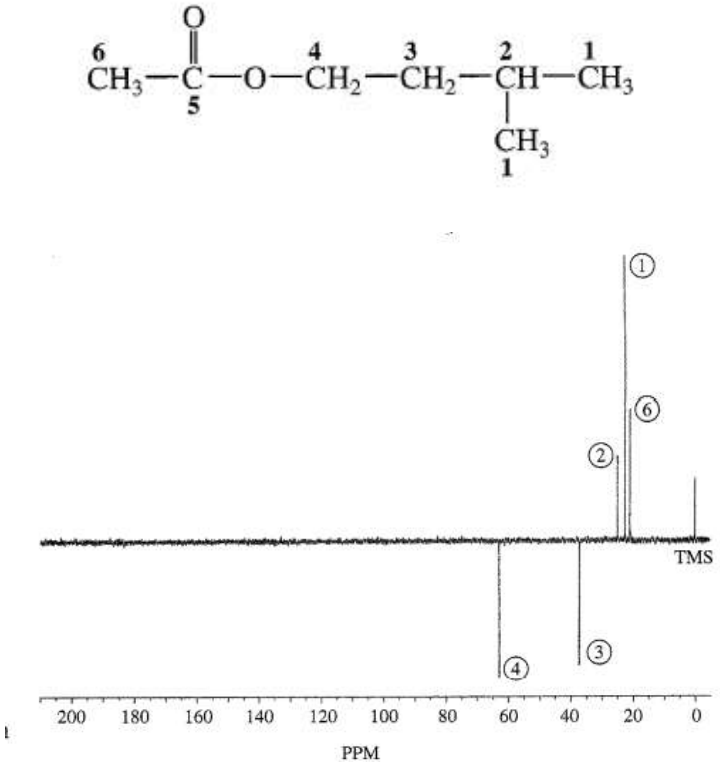
kvartet u spektru odgovara CH_3 skupini, triplet CH_2 skupini, dublet CH skupini, a singlet kvaternom C atomu. Kao što i naziv metode govori koristi se izotop ugljika ^{13}C jer za razliku od ^{12}C koji ima spin jezgre 0, ^{13}C ima spin koji iznosi 1/2 te je aktivan u NMR spektru.[11] Ovom metodom se može odrediti prisutnost pojedninih skupina u molekuli. Nažalost, često dolazi do preklapanja linija multipleta u ^{13}C NMR spektru te se ova metoda rijetko koristi za strukturnu analizu. Također, ^{13}C NMR spektri se puno rjeđe snimaju nego protonski NMR spektri zbog prirodne rijetkosti ^{13}C jezgara, ali se isto tako snimaju i pri nižoj frekvenciji (75 MHz), nego protonski spektar (300 i 600 MHz) jer ^{13}C jezgra ima puno manji magnetožirni omjer. Karakteristični kemijski pomaci u ^{13}C NMR spektru su oko 20 puta veći nego u ^{1}H NMR spektru te rijetko dolazi do preklapanja signala (Slika 8) [14].



Slika 7. Pojednostavljeni prikaz kemijskih pomaka ugljikovih atoma u ^{13}C NMR spektru [11].

1.1.5.3 DEPT tehnika

DEPT tehnika omugućava editiranje spektara heterojezgri prema multiplicitetu uz pojačavanje signala jezgri s malim magnetožirnim omjerom, kao što je ^{13}C, pomoću prijenosa polarizacije s jezgri s velikim magnetožirnim omjerom, kao što je ^{1}H. Uzorak se ozračuje nizom pulseva koji pogađaju i ^{13}C i ^{1}H jezgre. Kao rezultat toga, signal za C atome će pokazati različite faze ovisno o broju vodikovih iona koji su vezani na određeni C atom (Slika 9). Osnovna prednost DEPT-a u odnosu na ostale tehnike kao što su APT i INEPT je u tome što pulsni kut ne ovisi o evolucijskom vremenu niti o konstanti sprezanja pa se time dobivaju podspektri (DEPT-45, DEPT-90 i DEPT-135) kojima se mogu točnije odrediti multipliciteti pojedinih C atoma [15].

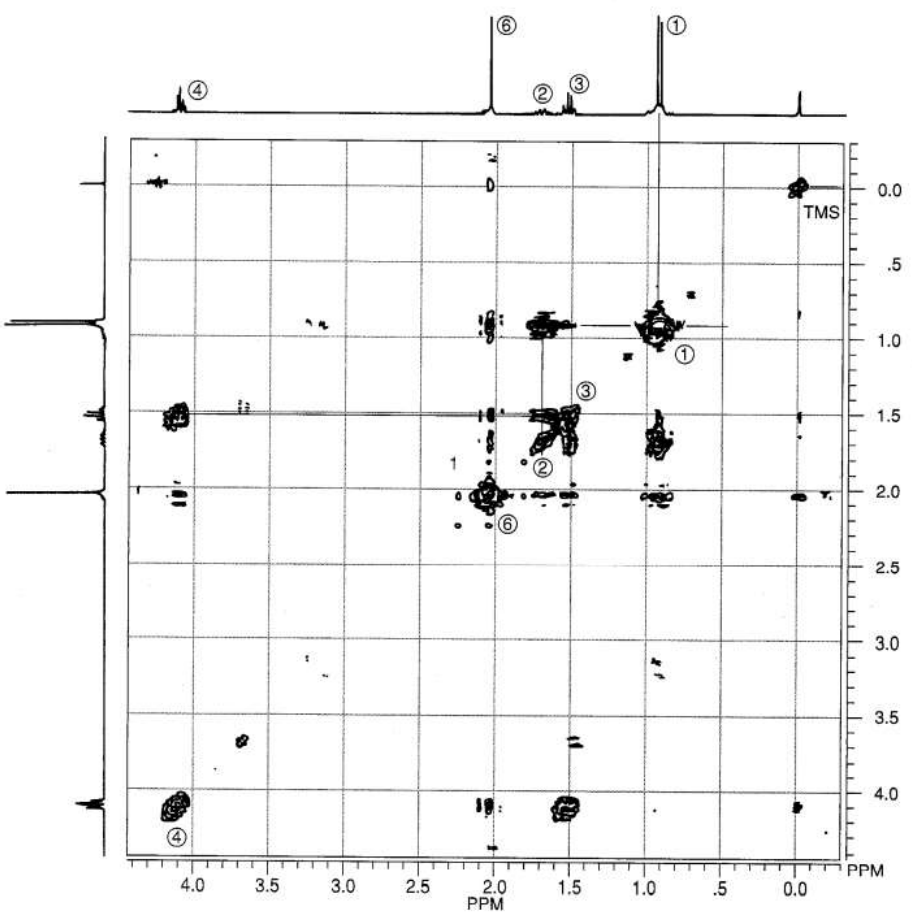


Slika 8. Struktura i DEPT-135 spektar izopentil acetata [16].

1.1.6 Dvodimenzijske NMR tehnike

1.1.6.1 Tehnika COSY

Često korištena dvodimenzijska NMR tehnika s ciljem dobivanja informacija o povezanosti protona preko skalarne sprege najčešće kroz dvije ili tri kemijske veze. COSY spektar je simetričan, a na osima mu se nalaze protonski spektri (Slika 10). U spektru se javljaju samo dijagonalni signali ako nema sprezanja među spinovima te izvandijagonalni signali ako postoji sprezanje [16].



Slika 9. COSY spektar izopentil-acetata [16].

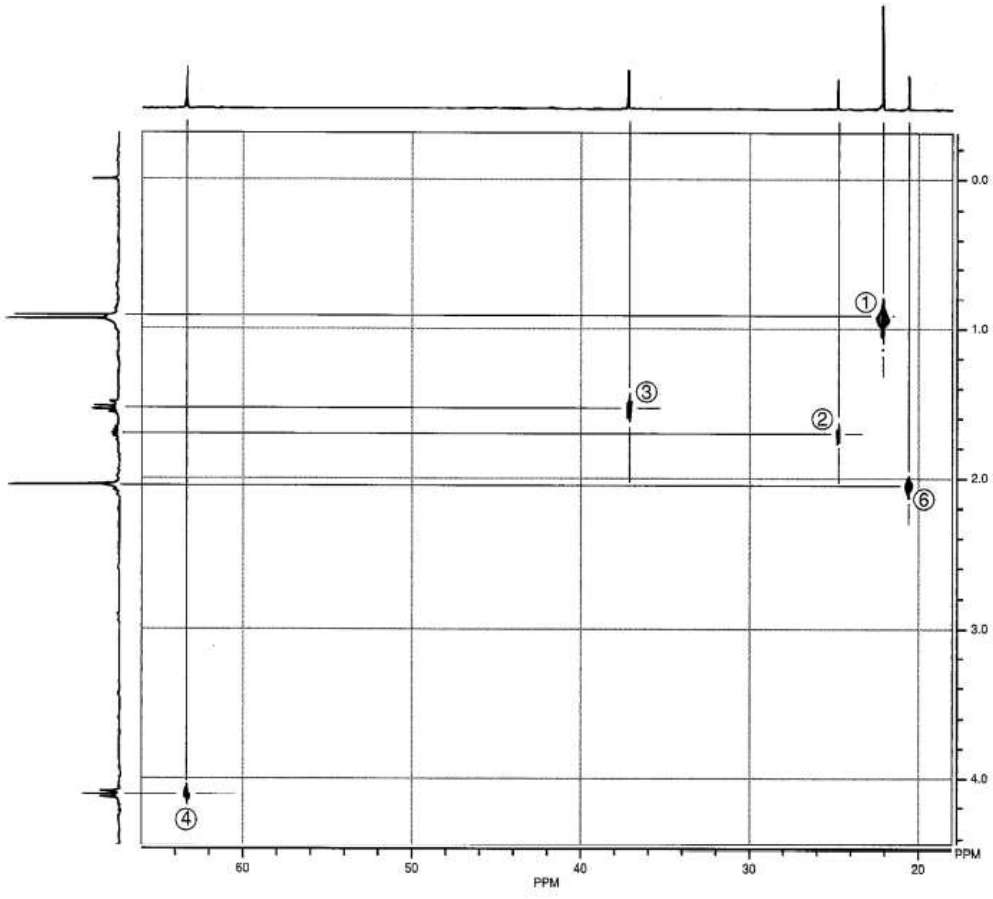
1.1.6.2 Tehnika HMBC

HMBC tehnika daje uvid u korelacije protona s ugljikovim atomima preko dvije, tri ili četiri kemijske veze te povezivanje pojedninih spinskih sustava. HMBC omogućava

opažanje korelacija između atoma koji se ne nalaze u istom spinskom sustavu te povezivanje pojedinih fragmenata u cjelinu. Često se koristi u kombinaciji s COSY za određivanje strukture malih organskih molekula [13,16].

1.1.6.3 Tehnika HETCOR

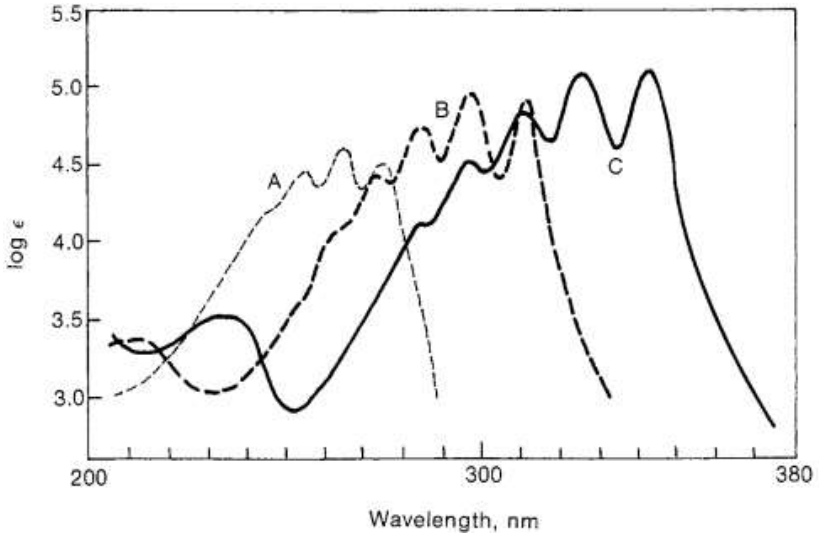
Ova heteronuklearna tehnika se primjenjuje za dobivanje podataka o protonima koji su direktno vezani na neki heteroatom (^{13}C, ^{15}N..) na temelju njihove skalarne sprege (Slika 11). Sastoji se od dva pulsa od kojih se prvi koristi za pobudu protona, dok se drugi koristi za prebacivanje magnetizacije na heteronuklearnu jezgru te njenu detekciju. Najveći nedostatak HETCOR tehnike je mala osjetljivost zbog male zastupljenosti heteronuklearnih jezgara [13,16].



Slika 10. HETCOR spektar izopentil-acetata [16].

1.2 UV spektroskopija

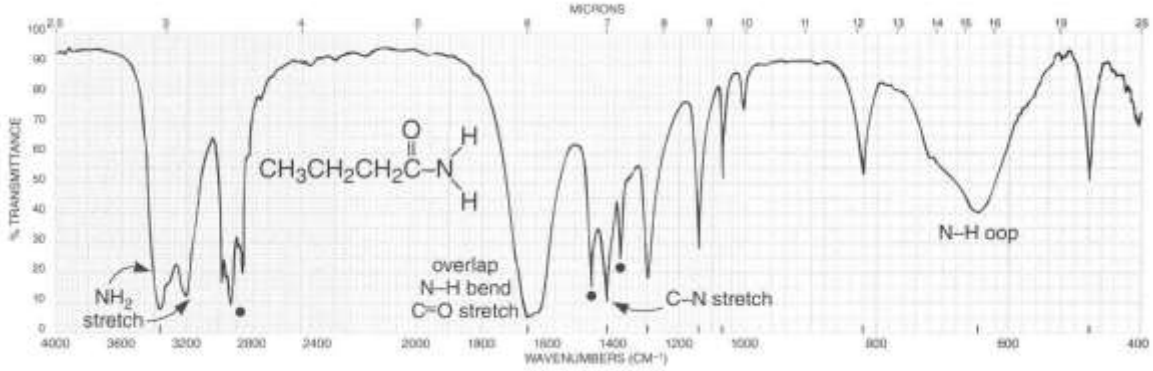
Nakon pobude elektromagnetnim zračenjem, molekule iz osnovnog elektronskog stanja prelaze u pobuđena elektronska stanja popunjavajući protuvezne orbitale te se zatim ponobvno vraćaju u osnovno stanje. To se odvija apsorpcijom zračenja u UV i Vis području koje se nalazi na 200-800 nm. UV –Vis detektor detektira propušteno zračenje ipretvara ga u električni signal. Mjera za apsorpciju se naziva apsorbancija koja se definira Lambert-Beerovom zakonu: $A = \varepsilon * c * b$. A predstavlja apsorbanciju, c je koncentracija tvari, b označuje duljinu puta zračenja kroz uzorak te ε molarni apsorpcijski koeficijent [17,18]. Spektri snimljeni u UV i Vis području se nazivaju apsorpcijski spektri(UV-Vis spektri) te prikazuju ovisnost apsorbancije o valnoj duljini ili frekvenciji. Kako bi došlo do apsorpcije u UV-Vis području molekula mora sadržavati nezasićene organske funkcionalne skupine, tj. kromofore. Na izgled spektra mogu utjecati auksokromi, konjugacija i otapalo koji uzrokuju hiperkromni efekt, odnosno povećavaju intenzitet apsropcije ili hipokromni efekt, odnosno smanjuju isti. Također se signal može pomaknuti prema većim valnim duljinama (batokromni pomak) ili manjim valnim duljinama (hipsokromni pomak). Auksokromi su najčešće skupine poput OH, NH_2, NO_2, Cl, Br, F, CN i COOH. Auksokromi općenito uzorkuju batokromne pomake te hiperkromni efekt za prijelaze π u π* te hipsokromne pomake za prijelaze n u π*. Interakcijom neveznog para elektrona auksokroma sa kromoforom može doći do smanjenja energijske razlike π i π* orbitala pa se kao rezultat dobije batokromni pomak, ali i do povećanja energijske razlike n i π* orbitala što uzrokuje hipsokromni pomak. Konjugacijom kromofora se povećava molarni apsorpcijski koeficijent te se maksmimum apsorpcije pomiče prema većim valnim duljinama, odnosno vidljivom dijelu spektra (Slika 12) [18,19]. Utjecaj otapala se zasniva na njegovoj polarnosti. Tako povećanjem polarnosti otapala dolazi do hipsokromnog pomaka kod n u π* prijelaza. Kod π u π* prijelaza polarnija otapala uzrokuju batokromne pomake. Naspram NMR i IR spektroskopije, UV-Vis spektroskopija daje puno manje informacije o strukturi molekula. S druge strane, ova metoda daje informacije o konjugaciji u spoju, prisutnosti kromofora i strukturnim fragmentima. Prednost metode je u tome što je jednostavna, osjetljiva i brza za snimanje te se najviše primjenjuje za kvantitativnu analizu jer ne daje dovoljno kvalitativnih informacija [20].



Slika 11. Prikaz utjecaja povećane konjugacije na izgled UV spektra (konjugacija raste od a do c) [20].

1.3 IR spektroskopija

Infracrvena spektroskopija, kao metoda proučavanja interakcija tvari i elektromagnetnog zračenja, pripada skupini vibracijskih spektroskopskih metoda jer detektira vibracije pojedinih atoma pri određenim uvjetima. Interakcije se proučavaju ovom metodom u rasponu valnih brojeva 12500-10 cm^{-1}, a dobiveni spektar pokazuje ovisnost apsorbancije ili transmitancije o valnoj duljini ili valnom broju (Slika 13). IR je metoda koja se najviše koristi za proučavanje organskih molekule čije područje je 4000-400 cm^{-1}, a može se podijeliti na područje funkcijskih skupina (4000-1400 cm^{-1}) i područje otiska prsta (1400-400 cm^{-1}) specifično za svaki uzorak [21,23]. U skorije vrijeme se kao IR spektrometar najviše koristi FT-IR spektrometar koji bilježi spektar u vremenskoj domeni i zatim ga postupkom Fourierove transformacije pretvara u frekvencijsku domenu. Glavni dijelovi FT-IR spektrometra su izvor zračenja (štapić od silicijevog karbida – Globar, Nernstov štapić i laseri), pukotina, Michelsonov interferometar, prostor za uzorak i detektor. Uzorci se mogu snimati u svim agregatnim stanjima, a snimanje se provodi u kivetama. IR spektroskopija daje značajne informacije o strukturi molekule, no nedostatak u odnosu na NMR metodu je u tome što IR ne daje dovoljno informacija o C-C i C-H vezama [22].

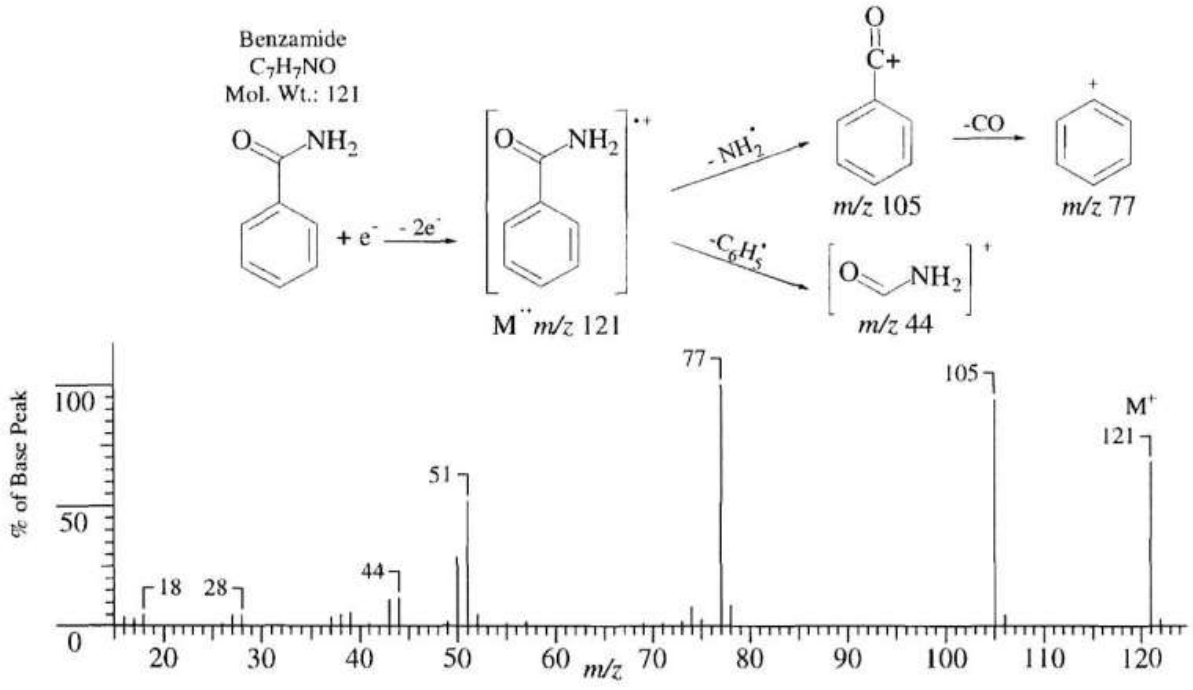


Slika 12. Prikaz IR spektra butanamida [22].

1.4 Spektrometrija masa

Ova metoda se od prijašnjih razlikuje po tome što se ne temelji na interakciji elektromagnetnog zračenja i tvari, nego na ionizaciji i fragmentaciji molekula uzorka, odabiru pojedinih ioniziranih fragmenata i njihovoj detekciji. Maseni spektrometar se sastoji od izvora iona gdje se zbiva ionizacija, analizatora mase koji odabire i odvaja ione te detektora. Princip rada se zasniva na ionizaciji molekula uzorka brzim elektronima pri čemu nastaje molekulski radikal ion ili ion prekursor koji zatim podliježe fragmentaciji. Fragmentacijom nastaju produktni ioni s neparnim (radikal) ili parnim (neutralna molekula) brojem elektrona. Naposljetku, dobiveni ioni se razdvajaju na temelju mase i naboja(m/z) i detektiraju. Kako bi došlo do ionizacije koriste se različite tehnike od kojih se ionizacija elektronima, kemijska ionizacija i ionizacija brzim atomima primjenjuju ako se želi postignuti djelomična ili potpuna fragmentacija spojeva koji daju stabilne molekulske ione [24]. Za analizu nestabilnih spojeva velike molekulske mase poput proteina, ugljikohidrata i nukleinskih kiselina se koriste tehnike poput ionizacije elektroraspršenjem, termoraspršenjem te ionsko raspršenje. Nakon ionizacije, fragmenti se detektiraju pomoću analizatora masu čija primjena ovisi o njegovoj osjetljivosti, razlučivanju, točnosti mjerenja i gornjoj granici omjera m/z. Neki od najznačajnih analizatora mase su kvadrupolni analizator mase, analizator mase s magnetnim sektorom, orbitrap te analizator mase vremena leta. Nakon obrade podataka dobije se spektar masa koji pokazuje ovisnost intenziteta signala o omjeru mase i naboja (*m/z*) (Slika 14). Najstabilniji ion ima signal najvećeg intenziteta te se

naziva osnovni signal, dok se intenziteti ostalih signala izražavaju kao postotak osnovnog signala. Signal koji ima najveći omjer m/z odgovara molekulskom ionu, a signal koji ponekad imaju omjer *m/z* veći od molekulskog iona su posljedica asocijacije, stvaranja adukata ili ukazuju na prisutnost različitih izotopa toga elementa. Ovom tehnikom se mogu dobiti informacije o strukturnim fragmentima te o stabilnosti pojedinih iona, no dalje od toga se mora potražiti u drugi metodama [25].

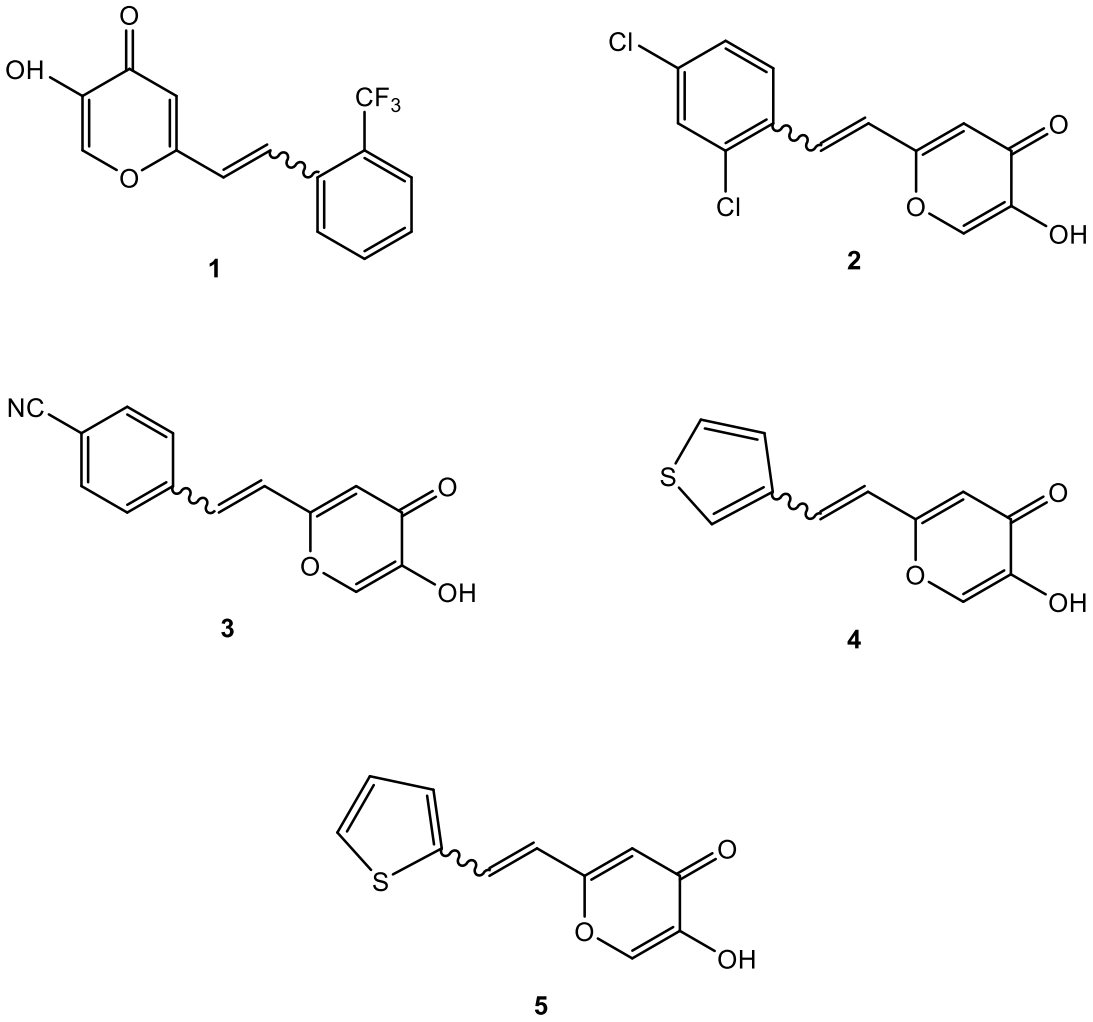


Slika 13. Prikaz fragmentacije i masenog spektra benzamida [25].

2. REZULTATI I RASPRAVA

2.1 UVOD

Kao produkti ovog završnog rada, Wittigovom reakcijom dobiveni su heterostilbenski derivati 4-pirona **1-5** (Slika 1). Kao osnova ove sinteze koristila se 4-pironska fosfonijeva sol dok se struktura aldehida mijenjala. Tako dva derivata sadrže tiofenski prsten supstituiran u položaju 2 i 3, dok ostala 3 derivata sadrže benzenski prsten s CN skupinom, 2 atoma Cl i CF_3 kao supstituentima. Wittigova reakcija jedna je od najvažnijih i najjednostavnijih reakcija u organskoj sintezi za dobivanje odgovarajuće dvostruke veze. Za ovu reakciju potrebni su karbonilni spoj (aldehid ili keton) i fosforni ilid, tj. fosfonijeva sol s odgovarajućim supstituentima. Ilidi su neutralne molekule s pozitivnim i negativnim nabojem na susjednim atomima, a vrlo jednostavno se mogu dobiti u laboratoriju. Oni međusobno reagiraju u tri stupnja adicijskim mehanizmom preko dva nestabilna intermedijera betaina i oksafosfetana. Prvi stupanj je nukleofilni napad ilida na djelomično pozitivan karbonilni ugljik polarizirane karbonilne skupine pri čemu nastaje betain. Betain se zatim u drugom stupnju zatvara u četveročlani prsten oksafosfetan koji se u trećem stupnju raspada na produkte. Kao produkti nastaju izomeri željenog alkena i vrlo stabilan nusprodukt trifenil-fosfin oksid čiji je nastanak upravo i pokretačka sila ove reakcije.



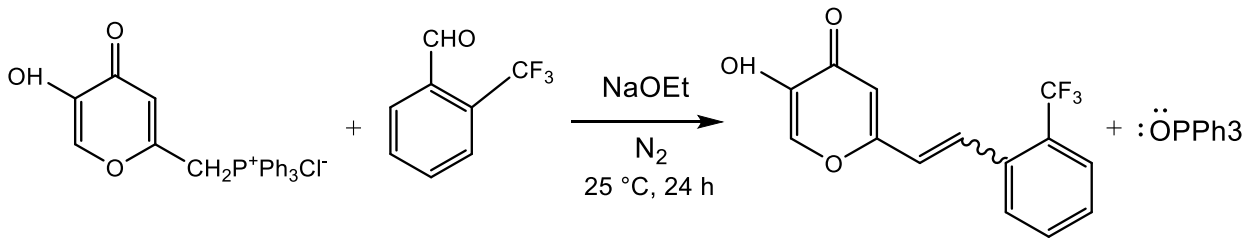
Slika 1. Strukture produkata dobivenih u ovom završnom radu

Svi derivati su dobivenim u dovoljnim količinama za analizu spektroskopskim metodama. Za potvrdu izomera koristila se ^{1}H NMR spektroskopija na kojoj je ujedno i bio fokus većine spektroskopskih analiza. Nakon što je potvrđena struktura molekule ^{1}H NMR spektroskopijom, struktura se analizirala ^{13}C NMR spektroskopijom kako bi dodatno potvrdili rezultat. Kako bi se dobio uvid u međusobne interakcije jezgara, korišteni su 2D spektri za potvrdu interakcija između protona te protona i ^{13}C jezgara. Za prikaz maksimuma apsorpcije određenih izomera koristila se UV spektrofotometrija, kao i UV spektrofotometrija uz osvjetljavanje čime bi se dobio uvid u ponašanje, tj. promjenu UV spektara spojeva tijekom izlaganja osvjetljavanju. IR spektroskopija je poslužila za potvrdu pojedinih funkcijskih skupina kao što su cijano i karbonilna skupina. Naposlijetku, kristalnim strukturama potvrđene su strukture nekih dobivenih heterostilbena.

2.2 SINTEZA 4 – PIRONSKIH HETEROSTILBENA 1-5

Sinteza 4–pironskih heterostilbena **1-5** provedena je Wittigovom reakcijom. 4–pironski heterostilbeni su molekule koje se sastoje od 4–pironskog prstena povezanog vinilnim mostom s nekim aromatskim prstenom ili heterociklom. Reakcijom nastaju dva izomera, svaki s različitim spektroskopskim karakteristikama i ponašanjima.

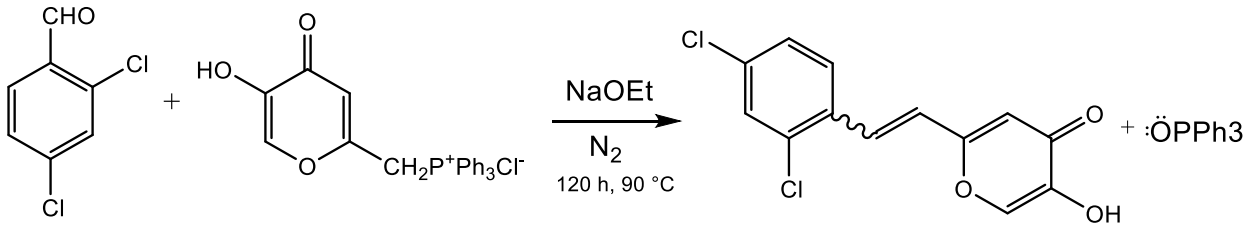
Za sintezu heterostilbena **1** korištena je 4–pironska fosfonijeva sol i *o*–trifluormetilbenzaldehid uz dodatak natrijeva etoksida dobivenog reakcijom elementarnog natrija i apsolutnog etanola. Reakcija dobivanja heterostilbena **1** prikazana je na shemi 1.



Shema 1. Wittigova reakcija dobivanja heterostilbena **1.**

Produkt reakcije pročišćen je kolonskom kromatografijom sa sustavom otapala E/PE koristeći silika-gel kao nepokretnu fazu te preparativnom tankoslojnom kromatografijom koristeći isti sustav otapala uz dodatak par kapi metanola zbog slabe pokretljivosti spojeva. Reakcijom nastaje smjesa izomera od kojih *cis*–izomer prvi eluira, a nakon njega *trans*–izomer te uz oba eluira fosfin-oksid. Valja napomenuti da je oba izomera teško izolirati zbog prisutnosti velike količine fosfin-oksida (i neproreagiranog klorida) koji putuje zajedno s njima. Dobiveno iskorištenje iznosi 26,20 %. *Trans*–izomer je prisutan u malo većoj količini od *cis*–izomera (*trans*–**1** : *cis*–**1** = 1,5 : 1).

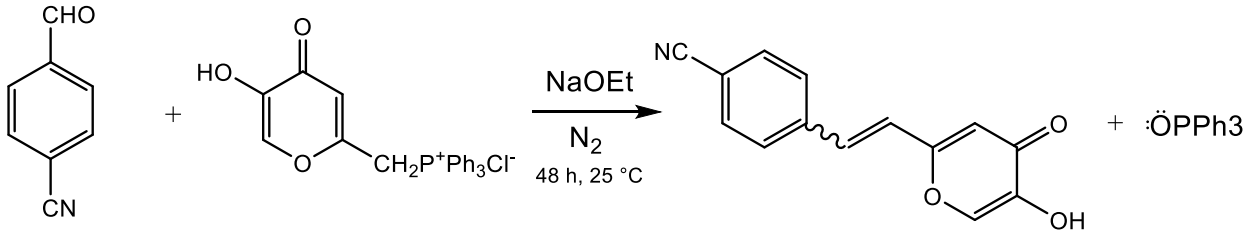
Za sintezu heterostilbena **2** korištena je 4–pironska fosfonijeva sol i 2,4-diklorbenzaldehid uz dodatak natrijeva etoksida dobivenog reakcijom elementarnog natrija i apsolutnog etanola. Reakcija dobivanja heterostilbena prikazana je na shemi 2.



Shema 2. Wittigova reakcija dobivanja heterostilbena **2.**

Reakcijom je dobivena smjesa izomera. Kako bi se produkt reakcije pročistio i odvojio korištena je kolonska kromatografija sa sustavom otapala PE/E/EtOAc pri čemu *cis*–izomer prvi eluira nakon čega ga slijedi *trans*–izomer. Nadalje, korištena je preparativna tankoslojna kromatografija kako bi se izomeri izolirali sa sustavom otapala E/PE. Postignuto je iskorištenje od 46,72 %. *Cis*–izomer je prisutan u puno većem udjelu od *trans*–izomera prema protonskom NMR spektru (*trans*–**2** : *cis*–**2** = 1 : 5).

Za sintezu heterostilbena **3** korištena je 4–pironska fosfonijeva sol i *p*-cijanobenzaldehid uz dodatak natrijeva etoksida dobivenog reakcijom elementarnog natrija i apsolutnog etanola. Reakcija dobivanja heterostilbena prikazana je na shemi 3.

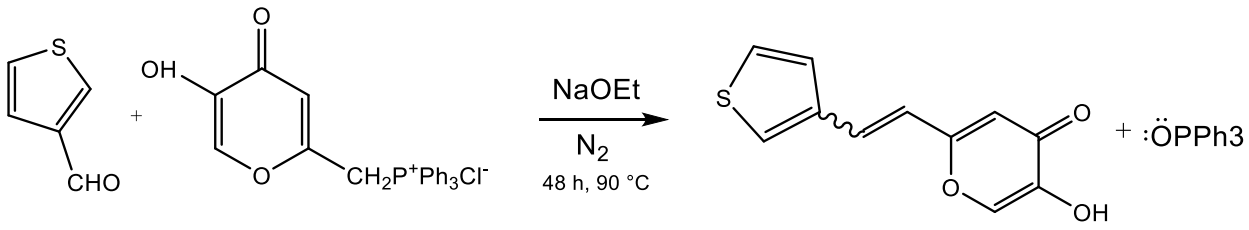


Shema 3. Wittigova reakcija dobivanja heterostilbena **3.**

Kolonska kromatografija sa sustavom otapala E/PE koristila se za odvajanje i pročišćavanje nastalih produkata. Kao nepokretna faza koristio se silika-gel koji je pokazao puno bolje djelovanje od Al_2O_3 kod kojeg produkti zaostaju na startu kolone čak i sa sustavom otapala EtOAc/MeOH i čistim metanolom. Sljedeće se koristila preparativna tankoslojna kromatografija sa sustavom otapala EtOAc/$CHCl_3$ kako bi se nastali izomeri izolirali. Postignuto je iskorištenje od 9,46 %, što je ujedno i najmanje

iskorištenje među svim dobivenim produktima. Pojedninačni izomeri nisu izolirani zbog njihove težnje da zajedno eluiraju s fosfin-oksidom.

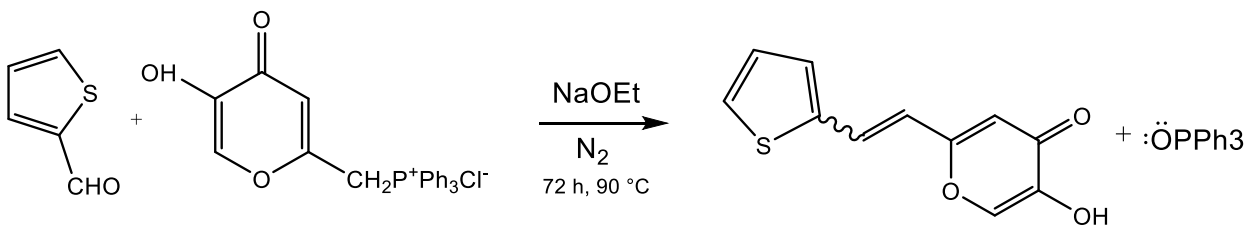
Za sintezu heterostilbena **4** korištena je 4–pironska fosfonijeva sol i tiofen-3-karbaldehid uz dodatak natrijeva etoksida dobivenog reakcijom elementarnog natrija i apsolutnog etanola. Reakcija dobivanja heterostilbena prikazana je na shemi 4.



Shema 4. Wittigova reakcija dobivanja heterostilbena **4.**

Produkt reakcije pročišćen je kolonskom kromatografijom sa sustavom otapala DCM/PE/E koristeći silika-gel kao nepokretnu fazu te preparativnom tankoslojnom kromatografijom koristeći čisti E uz dodatak par kapi MeOH zbog slabe pokretljivosti spojeva. Reakcijom nastaje smjesa izomera od kojih *cis*–izomer prvi eulira te nakon njega *trans* – izomer s fosfin-oksidom. *Trans*–izomer je prisutan u većoj količini od *cis*–izomera (*trans*–**4** : *cis*–**4** = 2:1) prema NMR analizi. Valja napomenuti da je oba izomera teško bilo izolirati zbog prisutnosti velike količine fosfin-oksida. Dobiveno iskorištenje iznosi 36,48 %.

Za sintezu heterostilbena **5** korištena je 4–pironska fosfonijeva sol i tiofen-2-karbaldehid uz dodatak natrijeva etoksida dobivenog reakcijom elementarnog natrija i apsolutnog etanola. Reakcija dobivanja heterostilbena prikazana je na shemi 5.



Shema 5. Wittigova reakcija dobivanja heterostilbena **5.**

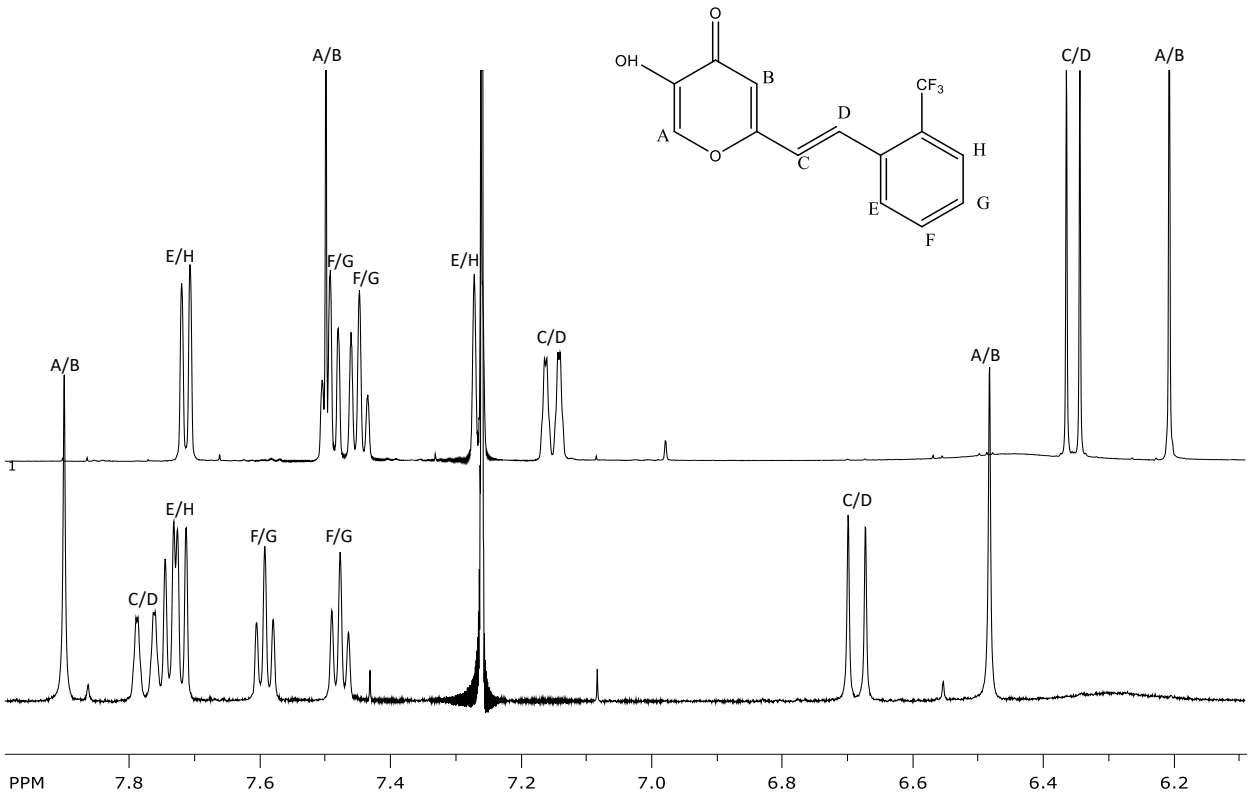
Reakcijom je dobivena smjesa izomera. Kako bi se produkt reakcije pročistio i odvojio korištena je kolonska kromatografija sa sustavom otapala E/PE pri čemu *cis*–izomer prvi eluira nakon čega ga slijedi *trans*–izomer uz fosfin-oksid. Nadalje, korištena je preparativna tankoslojna kromatografija kako bi se izomeri izolirali sa sustavom otapala $CHCl_3$/EtOAc. *Trans* – izomer je prisutan u većoj količini od *cis* – izomera (*trans*–**5** : *cis*–**5** = 2:1). Također velike količine fosfin-oksida otežavaju izolaciju izomera. Postignuto je iskorištenje od 25,89 %.

2.3 SPEKTROSKOPSKA KARAKTERIZACIJA 4 – PIRONSKIH DERIVATA 1-5

2.3.1 NMR SPEKTROSKOPIJA 4 – PIRONSKIH HETEROSTILBENA **1-5**

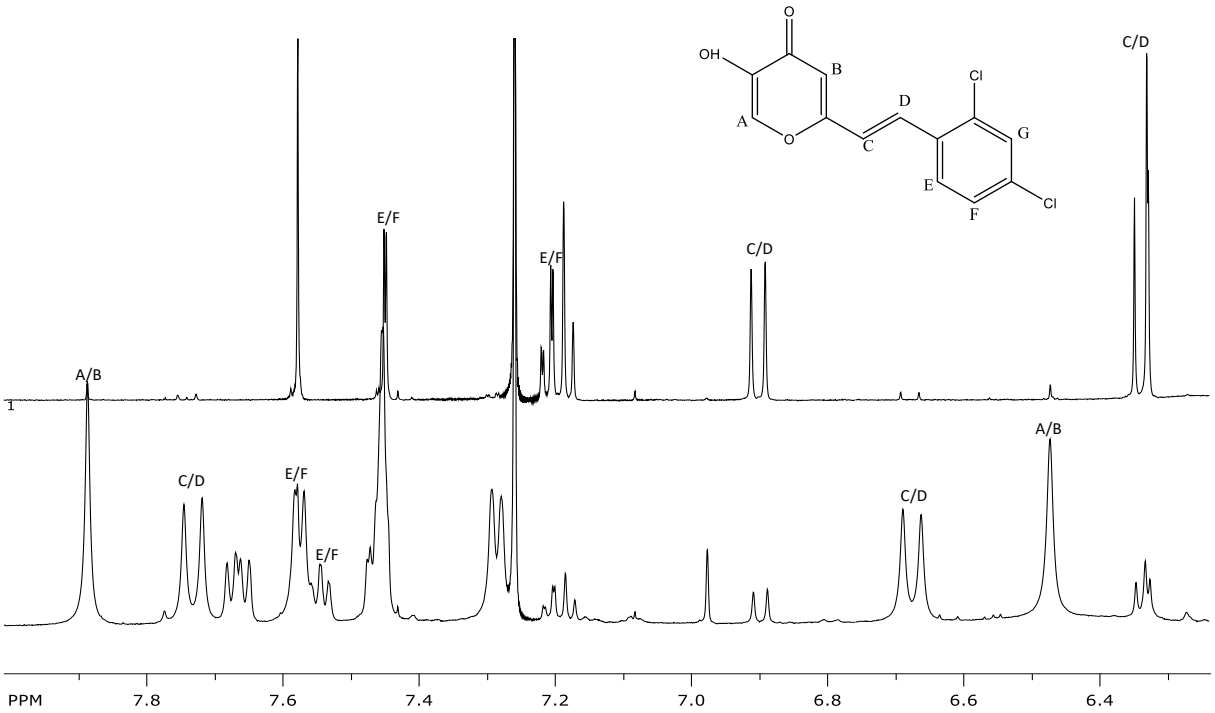
Dobiveni produkti okarakterizirani su i potvrđeni ^{1}H, ^{13}C te 2D NMR spektrima. Najvažnije je bilo ^{1}H NMR spektrima odrediti izomere te njihov omjer čemu je doprinijela karakteristična etenska konstanta sprege za pojedini izomer. Također, provedena je i analiza ^{1}H NMR spektara pri različitim temperaturama.

Prikaz ^{1}H NMR spektra *cis*–**1** (gore) i *trans*–**1** (dolje) izomera dan je na slici 1. Dva dubleta koja su u međusobnoj sprezi potvrđuju protone dvostruke veze. Iznos konstante sprege dubleta *cis*–izomera iznosi 12,3 Hz, a dubleti se nalaze u području 6,35–7,14 ppm. Konstanta sprege dubleta *trans* – izomera iznosi 15,9 Hz, a nalaze se u području 6,68– 7,73 ppm. Primjećuje se kako su dubleti *cis* – izomera blago pomaknuti prema zasjenjenijem području spektra. Nadalje, vidljivi su karakteristični signali benzenskih protona. Protoni F i G cis izomera pokazuju triplete u spektru s konstantama sprege 7 i 7,6 Hz u području 7,45–7,50 ppm, dok konstante sprege tripleta *trans*–izomera iznose 7,2 i 7,6 Hz te se nalaze u području 7,51–7,61 ppm pri čemu se opet uočava pomak *cis* –izomera prema zasjenjenijem području. Protoni E i H *cis*–izomera daju jedan dublet čija konstanta sprege iznosi 8 Hz na 7,72 ppm. Na istom kemijskom pomaku nalazi se i dublet *trans* – izomera čija konstanta sprege iznosi 7,2 Hz. Protoni A i B *cis*–izomera pokazuju signlet na 7,50 i 6,20 ppm te su također više zasjenjeni u odnosu na protone *trans*–izomera koji se nalaze na 7,90 i 6,49 ppm.



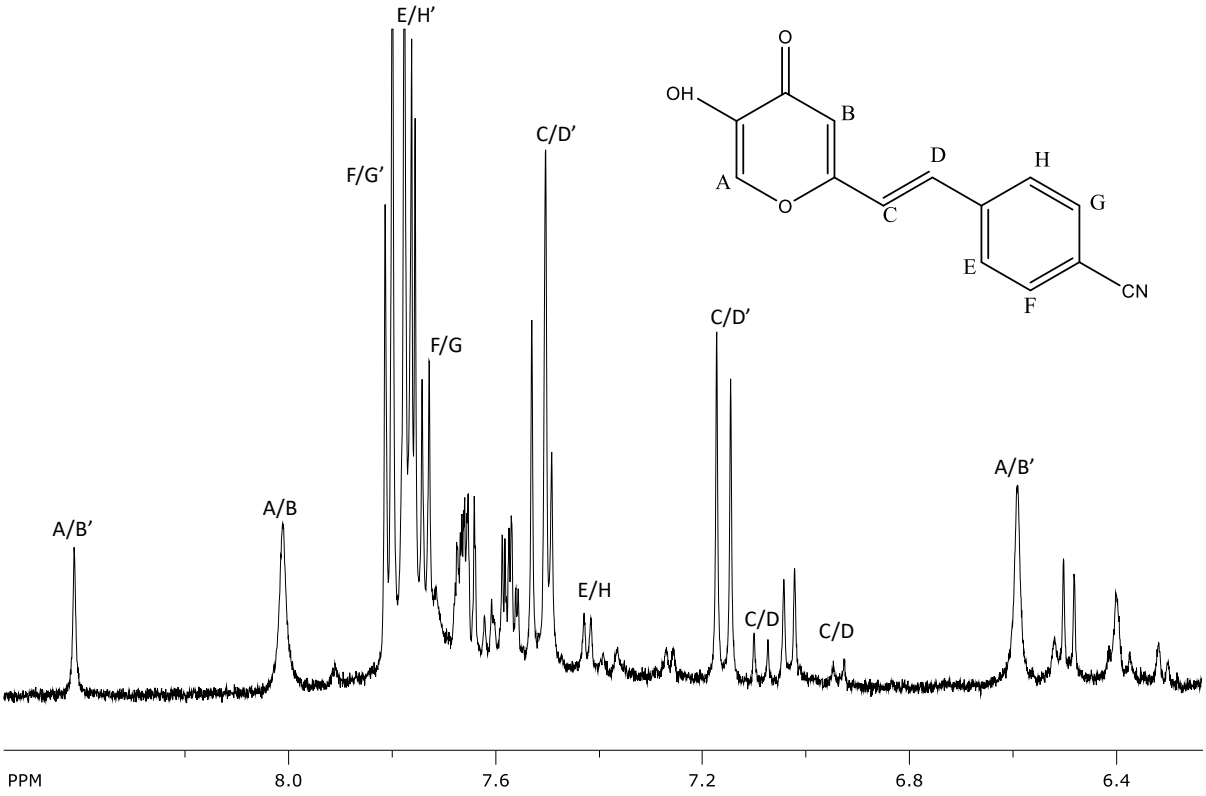
Slika 2. ^{1}H NMR spektar (*Z*)- (gore) i (*E*)- (dolje) 5-hidroksi-2-(2-(trifluormetil)stiril)-4*H*-piran-4-ona.

Prikaz ^{1}H NMR spektra *cis*–**2** (gore) i *trans*–**2** (dolje) izomera dan je na slici 2. Dva dubleta koja su u međusobnoj sprezi potvrđuju protone dvostruke veze. Iznos konstante sprege dubleta *cis*–izomera iznosi 12,3 Hz, a dubleti se nalaze u području 6,35–6,90 ppm. Konstanta sprege dubleta *trans*–izomera iznosi 16 Hz, a nalaze se u području 6,71–7,78 ppm. Dubleti *cis*–izomera blago su pomaknuti prema zasjenjenijem području spektra. Nadalje, vidljivi su karakteristični signali benzenskih protona. Protoni E i F cis–izomera pokazuju dublete s konstantama sprege 2,0 Hz u području 7,21–7,45 ppm, dok isti protoni *trans* – izomera iznose pokazuju dublete čije konstante sprege iznose 7,7 i 8,4 Hz te se nalaze u području 7,57–7,58 ppm pri čemu se opet uočava pomak *cis*–izomera prema zasjenjenijem području, ali i znatno manje vrijednosti konstanta sprege. Signal protona G *trans* – izomera pokazuje singlet. *Cis*–izomer pokazuje multiplet s integralom 2 na 6,31–6,36 ppm.



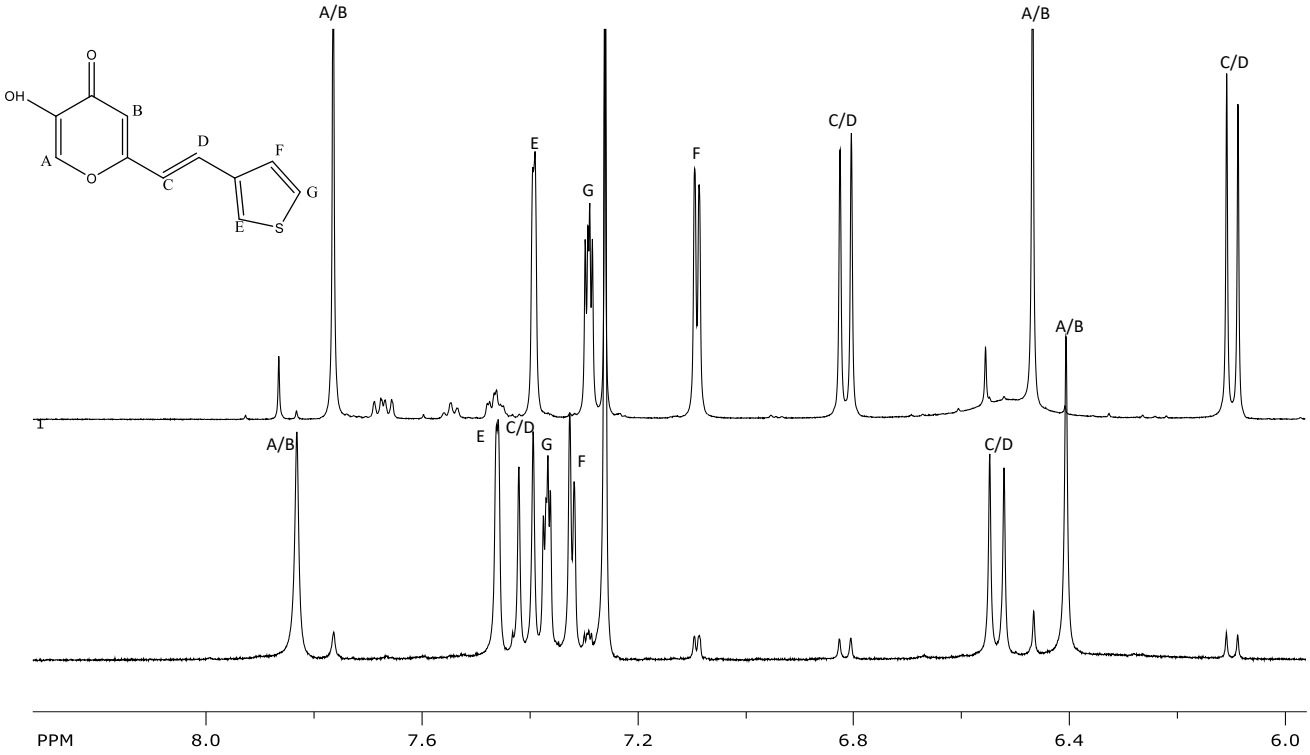
Slika 3. ^{1}H NMR spektar (*Z*)- (gore) i (*E*)- dolje 2-(2,4-diklorstiril)-5-hidroksi-4*H*-piran-4-ona.

Prikaz ^{1}H NMR spektra *cis*–**3** i *trans*–**3** izomera dan je na slici 3. Dva dubleta koja su u međusobnoj sprezi potvrđuju protone dvostruke veze. Iznos konstante sprege dubleta *cis*–izomera iznosi 12,1 i 12,5 Hz, a dubleti se nalaze u području 6,84–7,10 ppm. Konstanta sprege dubleta *trans*–izomera iznosi 16,2 Hz, a nalaze se u području 7,15–7,68 ppm. Primjećuje se ponovno kako su dubleti *cis*–izomera blago pomaknuti prema zasjenjenijem području spektra. Nadalje, vidljivi su karakteristični signali benzenskih protona. Protoni F i G *cis*–izomera pokazuju dublet s konstantom sprege 8,2 Hz na 7,74 ppm, dok konstanta sprege dubleta *trans*–izomera iznosi 8,5 Hz te se nalazi 7,86 ppm te oba imaju integral 2. Protoni E i H *cis*–izomera daju dublet čija konstanta sprege iznosi 8,1 Hz na 7,40 ppm, dok konstanta sprege dubleta *trans*–izomera iznosi 8,5 Hz te se nalazi 7,76 ppm te oba dubleta imaju integral 2. Protoni A i B *cis*–izomera pokazuju singlet na 8,93 i 6,79 ppm te je jedan od protona manje zasjenjen od protona *trans*–izomera koji se nalaze na 9,27 i 6,67 ppm.



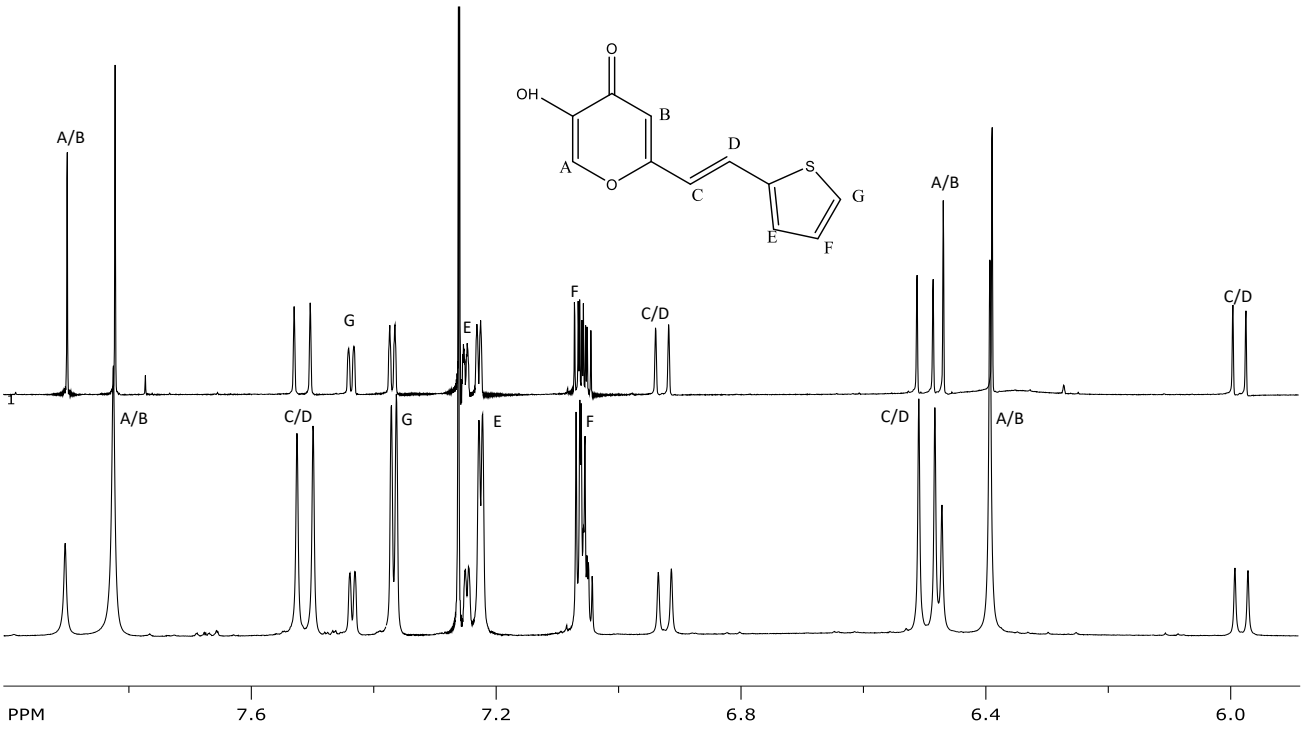
Slika 4. ^{1}H NMR spektar (*Z*)- i (*E*)-4-(2-(5-hidroksi-4-okso-4*H*-piran-2-il)vinil)benzonitrila.

Prikaz ^{1}H NMR spektra *cis*–**4** (gore) i *trans*–**4** (dolje) izomera dan je na slici 4. Dva dubleta koja su u međusobnoj sprezi potvrđuju protone dvostruke veze. Iznos konstante sprege dubleta *cis* – izomera iznosi 12,5 Hz, a dubleti se nalaze u području 6,10–6,81 ppm. Konstanta sprege dubleta *trans*–izomera iznosi 16 Hz, a nalaze se u području 6,53–7,48 ppm. Potvrda tiofenskih protona je konstanta sprege koja iznosi oko 5 Hz za protone G i F, konstanta sprege od oko 3 Hz za protone G i E te je u nekim slučajevima došlo i do daleke sprege protona A i C preko 5 veza čija konstanta iznosi oko 2 Hz. Pomoću iznosa konstanti sprega i induktivnog utjecaja sumporovog atoma na iznosi kemjskog pomaka moguće je bilo odrediti gdje se u spektru nalazi određeni tiofenski proton. Protoni A i B *cis*–izomera pokazuju signlet na 7,77 i 6,47 ppm, a protoni *trans*–izomera pokazuju singlete na 7,83 i 6,40 ppm.



Slika 5. ^{1}H NMR spektar (*Z*)- (gore) i (*E*)- (dolje) 5-hidroksi-2-(2-(tiofen-3-il)vinil)-4*H*-piran-4-ona.

Prikaz ^{1}H NMR spektra *cis*–**5** (gore) i *trans*–**5** (dolje) izomera dan je na slici 5. Dva dubleta koja su u međusobnoj sprezi potvrđuju protone dvostruke veze. Iznos konstante sprege dubleta *cis*–izomera iznosi 12,8 Hz, a dubleti se nalaze u području 6,0–6,9 ppm. Konstanta sprege dubleta *trans* – izomera iznosi 16 Hz, a nalaze se u području 6,50–7,52 ppm. Potvrda tiofenskih protona je konstanta sprege koja iznosi oko 5 Hz za protone G i F, konstanta sprege od oko 3,5 Hz za protone F i E te dublet dubleta čija konstanta sprege iznosi 5 Hz, a opisuje sprezanje protona F s protonima E i G. Protoni A i B *cis*–izomera pokazuju signlet na 7,91 i 6,47 ppm, a protoni *trans* – izomera pokazuju singlete na 7,83 i 6,39 ppm iz čega vidimo da su signali *cis* – izomera manje zasjenjeni, nego signali *trans*–izomera (osim dubleta dvostruke veze), što nije situacija kod ostalih heterostilbena.



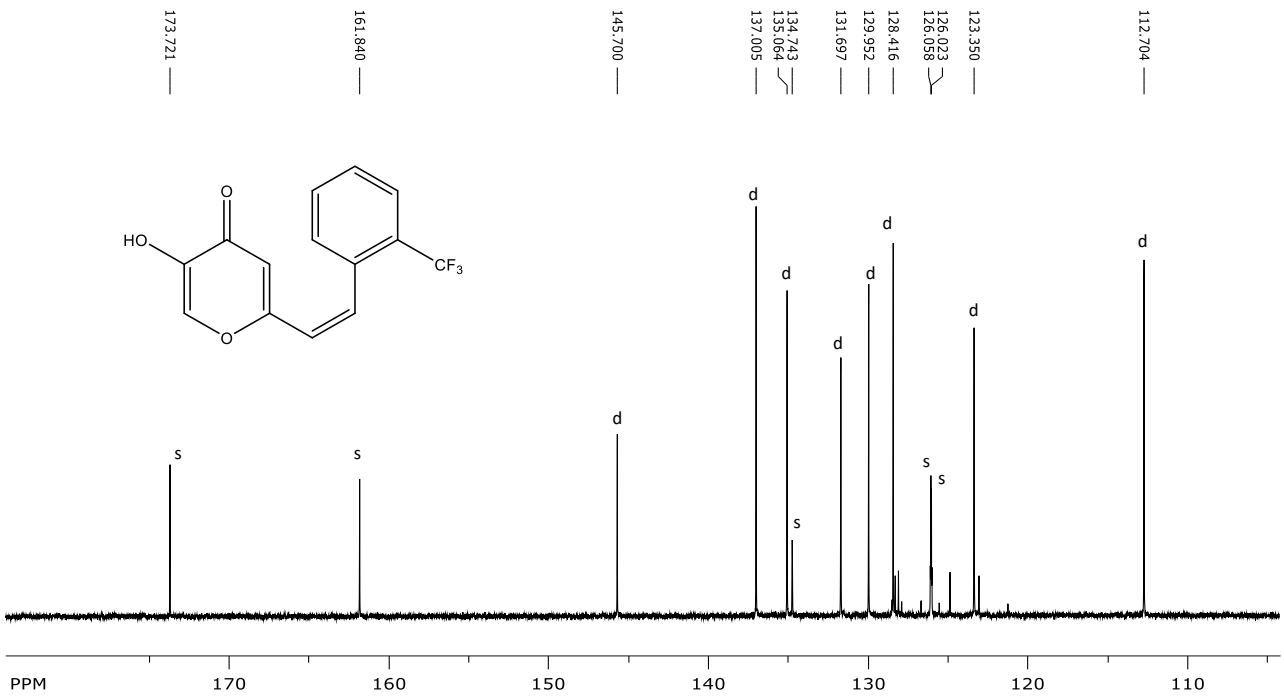
Slika 6. ^{1}H NMR spektar smjese (*Z*)- i (*E*)- (gore) i (*E*)- (dolje) 5-hidroksi-2-(2-(tiofen-2-il)vinil)-4*H*-piran-4-ona.

^{13}C NMR spektri poslužili su kao dodatna potvrda struktura sintetiziranih heterostilbena.

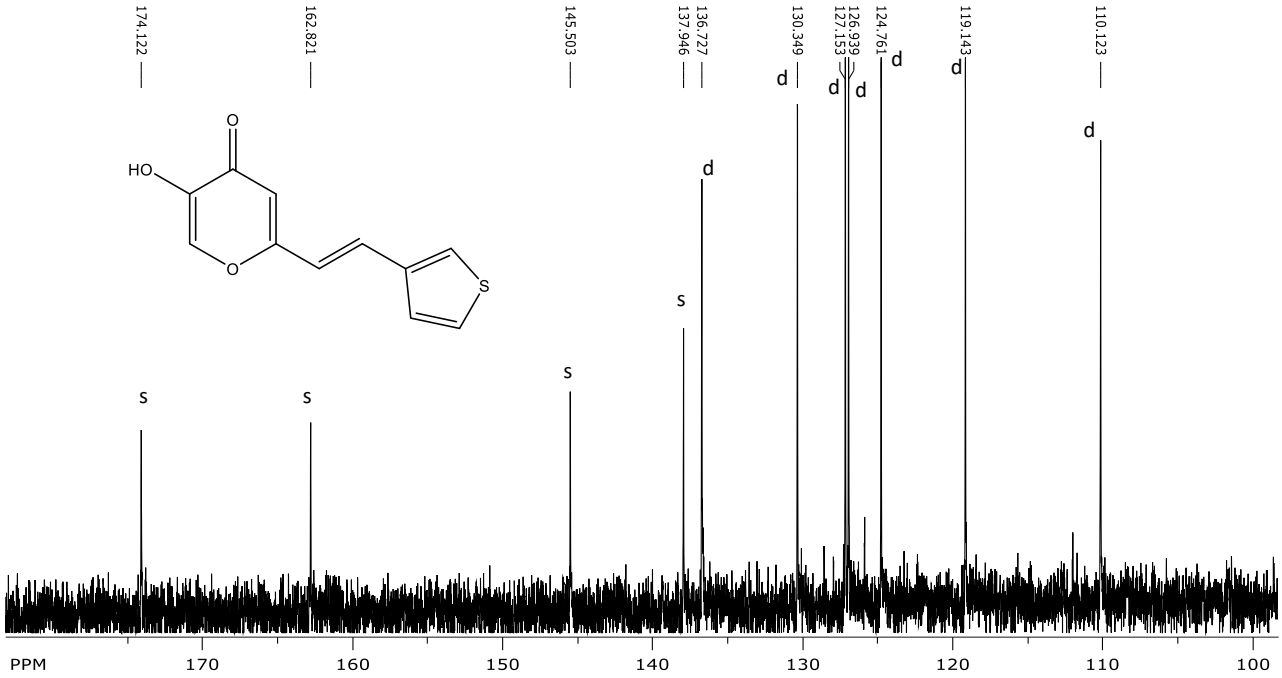
U ^{13}C NMR spektru *cis*-**1** ukupno je 13 signala od kojih pet pripadaju kvaternim ugljikovim jezgrama (Slika 6). Od ovih kvaternih jezgri dva signala nalaze se na najvišim pomacima u odsjenjenijem području dok se ostala tri nalaze pri manjim pomacima i zasjenjeniji su. Signali za kvaternu jezgru karbonilne skupine nalaze se na očekivanom području pomaka od 160 do 180 ppm.

U ^{13}C NMR spektru *trans*-**4** ukupno je 11 signala pri čemu četiri pripadaju kvaternim ugljikovim jezgrama (Slika 7). Od ovih kvaternih jezgri dva signala nalaze se na najvišim pomacima u odsjenjenijem području dok se ostala dva nalaze pri manjim pomacima i zasjenjeniji su. Signali za kvaternu jezgru karbonilne skupine nalaze se na očekivanom području pomaka od 160 do 180 ppm.

Također, u svim spektrima izražene su tri linije na oko 77,0 ppm koje predstavljaju deuterirani kloroform kao otapalo u kojem je sniman spektar.



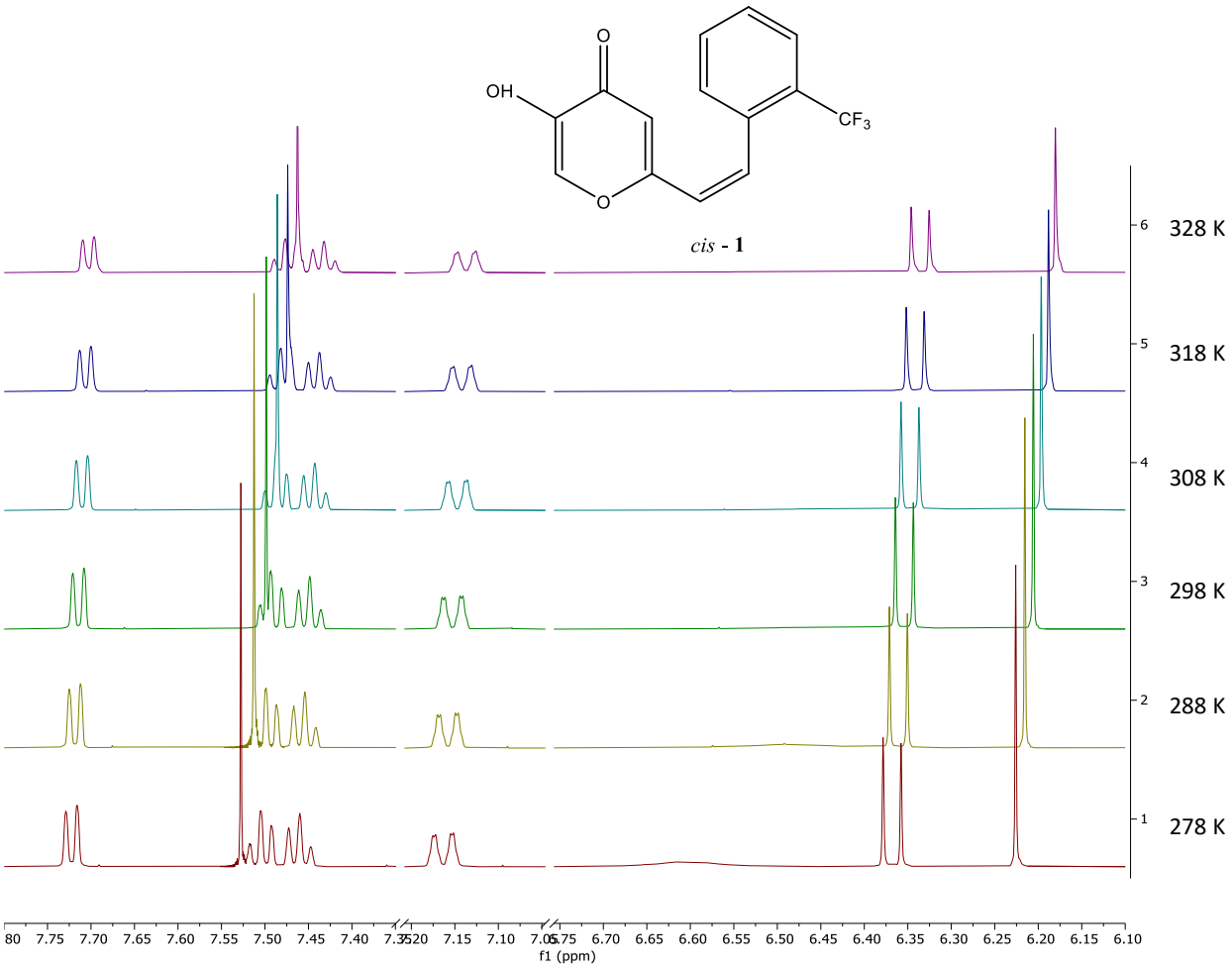
Slika 7. ^{13}C NMR spektar (*Z*)-5-hidroksi-2-(2-(trifluormetil)stiril)-4*H*-piran-4-ona (*cis*-**1**).



Slika 8. ^{13}C NMR spektar (*E*)-5-hidroksi-2-(2-(tiofen-3-il)vinil)-4*H*-piran-4-ona (*trans*-**4**).

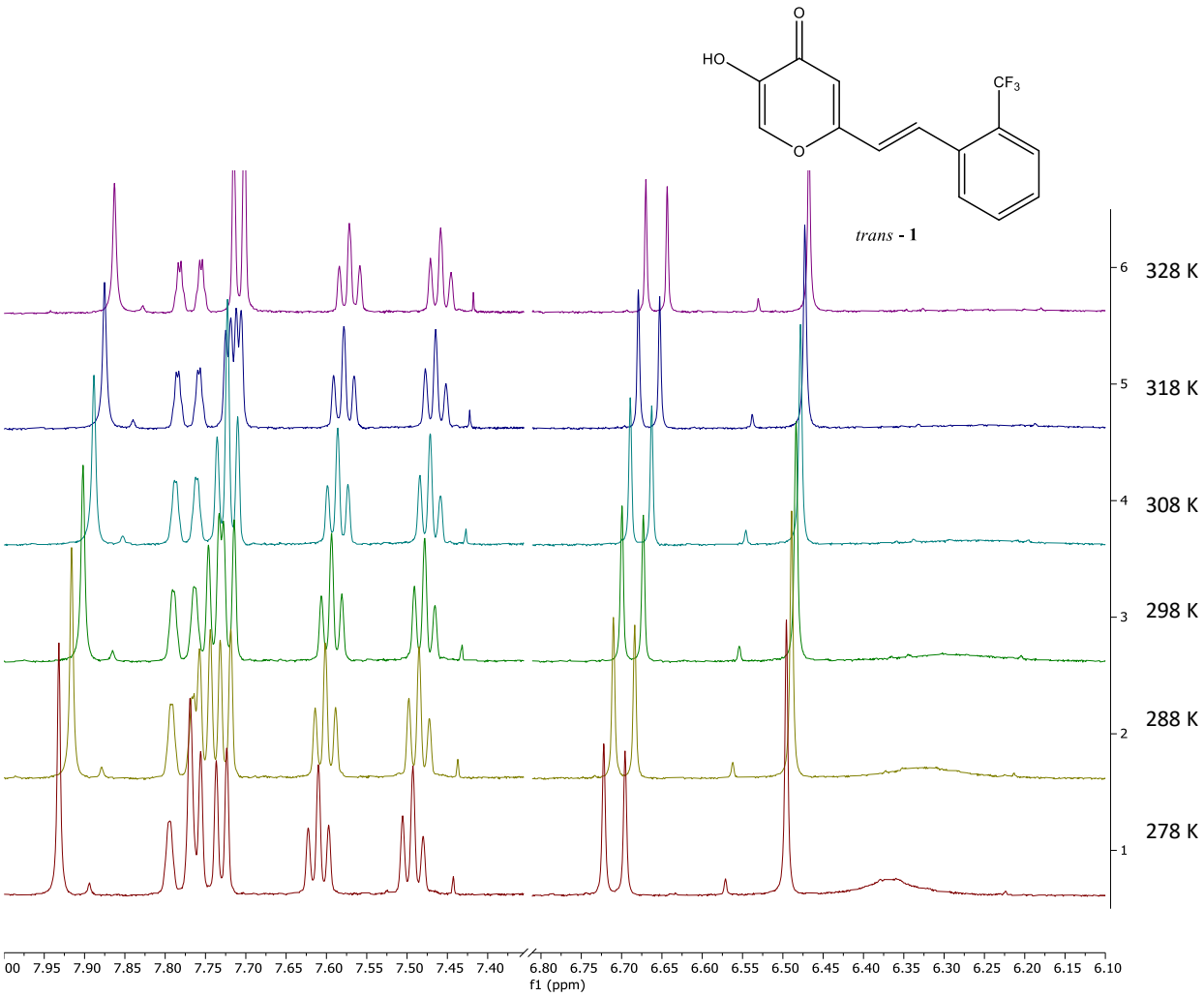
Heterostilbeni **1** i **4** izloženi su temperaturnim promjenama od 5 do 55 °C pri čemu je pri svakoj temperaturi snimljen odgovarajući ^{1}H NMR spektar, kako bi se ispitale eventualne promjene u konformacijama uslijed pucanja vodikovih veza u molekulama.

Jedan od protona dvostruke veze *cis*–**1** koji se nalazi na nižem kemijskom pomaku pomiče se prema manjim kemijskim pomacima, odnosno prema zasjenjenijem području (Slika 6). Dolazi i do pomaka oba protona 4–pironskog prstena prema zasjenjenijem području. Također prisutan je i pomak protona hidroksilne skupine prema zasjenjenijem području kao rezultat pucanja vodikovih veza.



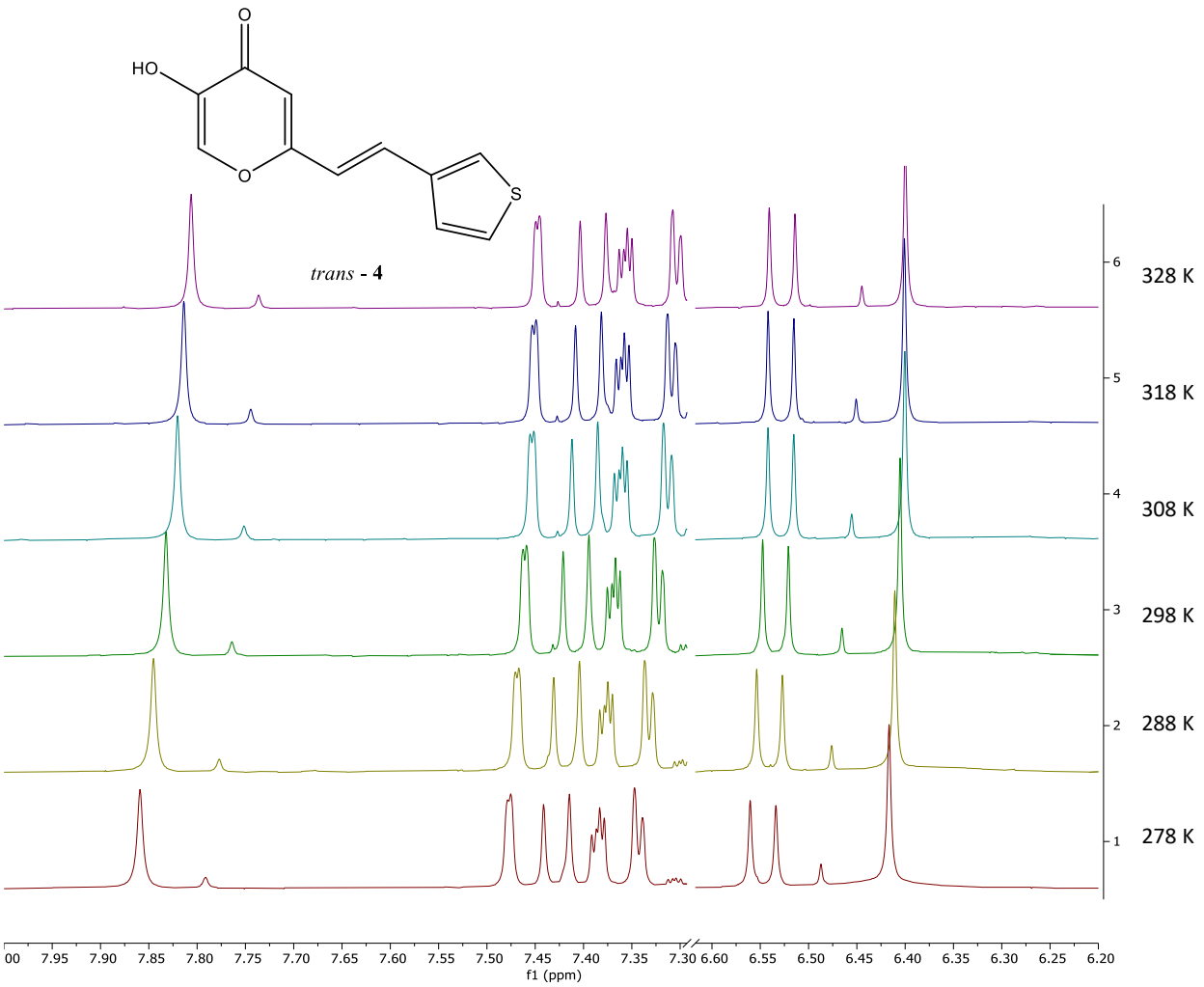
Slika 9. Temperaturna ovisnost kemijskih pomaka karakterističnih protona za *cis* – **1.**

Kod *trans*–**1** (Slika 7) vidljiv je pomak protona dvostruke veze na nižem kemijskom pomaku prema manjim kemijskim pomacima, odnosno prema zasjenjenijem području. Dolazi i do pomaka oba protona 4–pironskog prstena prema zasjenjenijem području. Prisutan je i pomak protona hidroksilne skupine prema zasjenjenijem području kao rezultat pucanja vodikovih veza. Zanimljiv je prijelaz 2 dubleta u 1 dublet uslijed povećanja temperature što se može objasniti pojavom da pri višim temperaturama uslijed povećanja kinetičke energije i rotacije molekule protoni postaju ekvivalentni.



Slika 10. Temperaturna ovisnost kemijskih pomaka karakterističnih protona za trans – **1.**

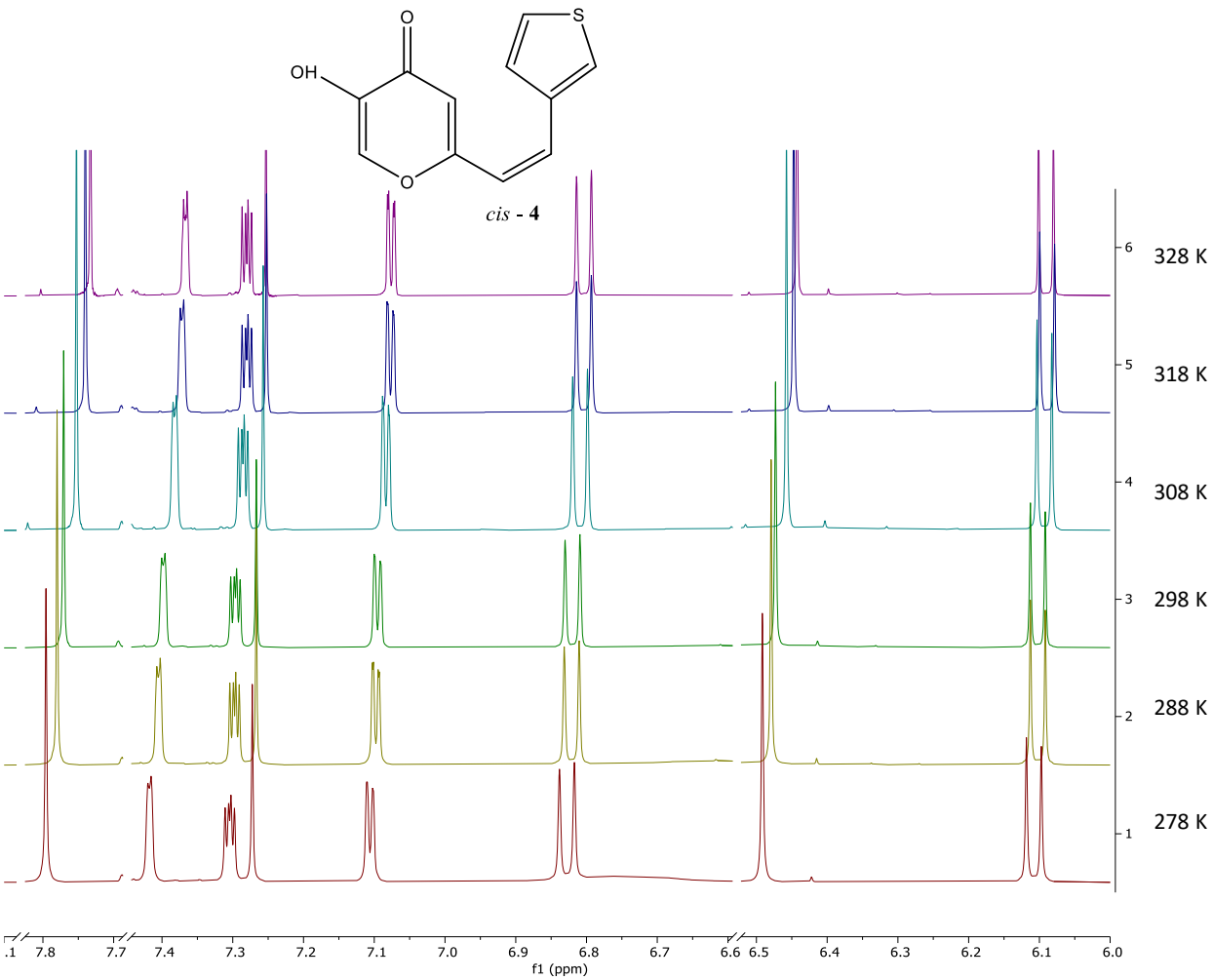
Kod *cis*–**4** ne dolazi do znatnog pomaka protona dvostruke veze, no dolazi do pomaka dva protona tiofenskog (dva dubleta) prstena prema zasjenjenijem području. Također vidljivi su pomaci protona 4–pironskog prstena prema zasjenjenijem području.



Slika 11. Temperaturna ovisnost kemijskih pomaka karakterističnih protona za *trans* – **4.**

Kod *trans*–**4** dolazi do blagog pomaka protona dvostruke veze prema zasjenjenijem području. Također dolazi do pomaka 2 protona tiofenskog (2 dubleta) prstena prema zasjenjenijem području. Protoni 4–pironskog prstena pomiču također se prema zasjenjenijem području.

Ovakvim ispitivanjem promjene kemijskih pomaka pod utjecajem temperature jasno se vidi da postoje intermolekulske vodikove veze među molekulama 4-pironskih heterostilbena, koje povišenjem temperature pucaju te molekula postaje fleksibilnija, zauzima neke druge konformacije, što se očituje u promjeni kemijskih pomaka pojedinih protona koji su najbliži opisanim promjenama.



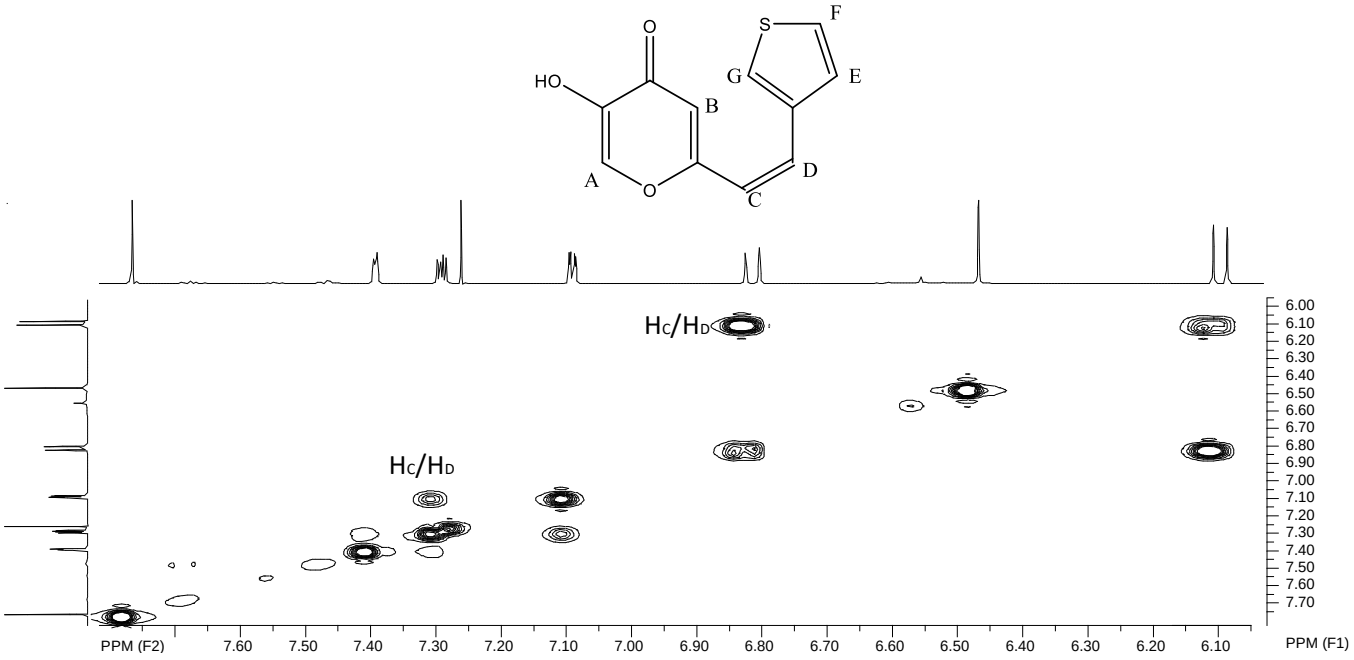
Slika 12. Temperaturna ovisnost kemijskih pomaka karakterističnih protona za *cis* – **4.**

Kako bi se dobio dodatni uvid u interakcije između protona, odnosno između protona i ^{13}C jezgara, korišteni su 2D NMR spektri.

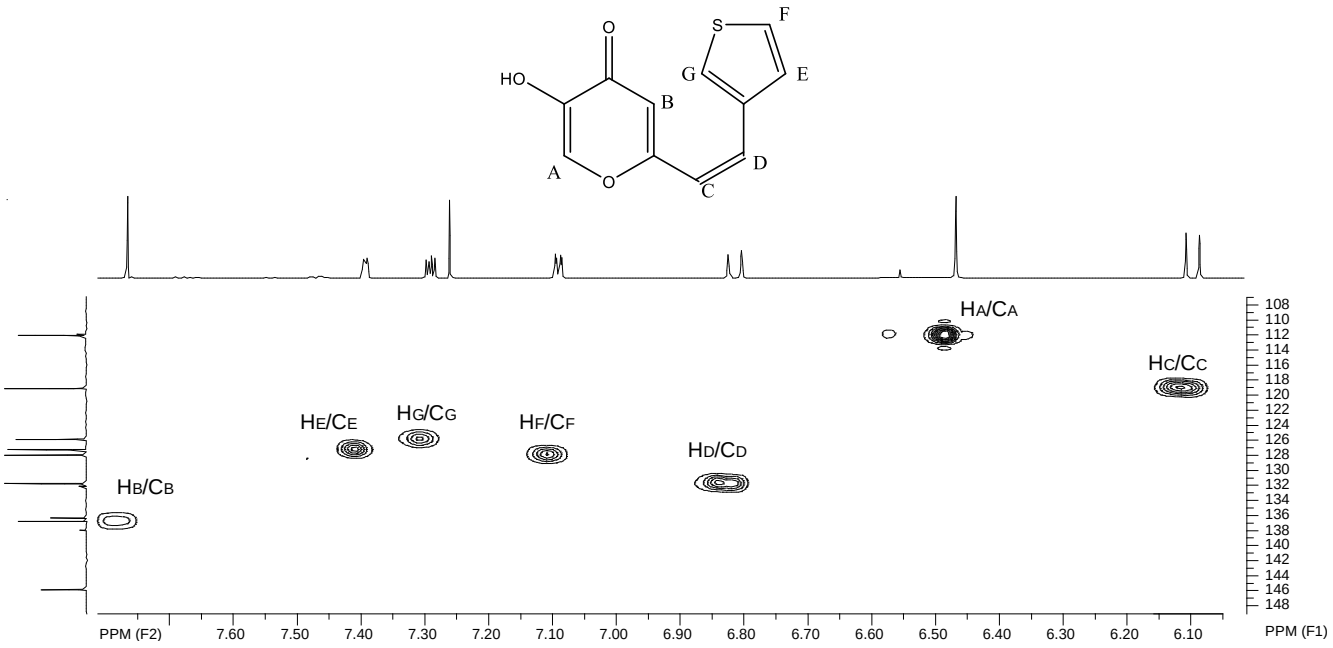
COSY spektar pokazuje kako dolazi do interakcija između etenskih protona, dok između ostalih protona u COSY spektru interakcije ne postoje (Slika 10).

Spektri HSQC (Slika 11) i HMBC (Slika 12) potvrđuju sprezanja protona i ^{13}C jezgara preko jedne ili više veza što se može vidjeti iz priloženih spektara. HSQC spektar pokazuje interakcije tiofenskih protona s odgovarajućim ^{13}C jezgrama na koje su vezani te se time može potvrditi položaj ^{13}C jezgara u spektru. Iz HMBC spektra vidljivo je kako singlet pri višem kemijskom pomaku pokazuje sprezanje s ^{13}C jezgrom karbonilne skupine čime možemo pretpostaviti da taj proton odgovara proton B, a HSQC spektar nam prikazuje kako se ^{13}C jezgra na koju je vezan proton B nalazi na

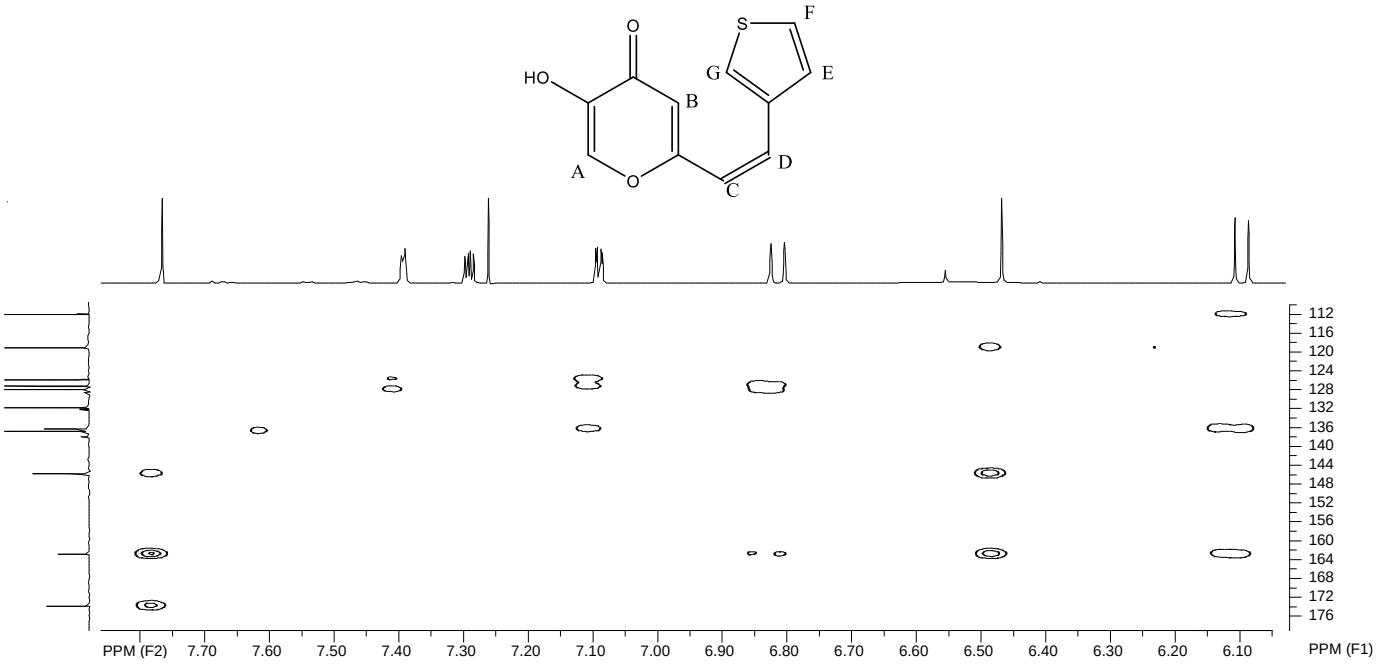
136,7 ppm. Sukladno tome, proton A smješten je na 6,47 ppm, a njemu odgovarajuća ^{13}C jezgra na 111,9 ppm. Nadalje, HMBC spektar prikazuje sprezanje etenskog dubleta pri višem kemijskom pomaku sa ^{13}C jezgrom G, dok dublet pri nižem kemijskom pomaku se spreže sa 13C jezgrom A i B. Time se može pretpostaviti kako dublet pri višem kemijskom pomaku odgovara proton D, dok dublet pri nižem kemijskom pomaku odgovara proton C.



***Slika 13*.** COSY spektar *cis* – **4.**



***Slika 14*.** HSQC spektar *cis* – **4.**

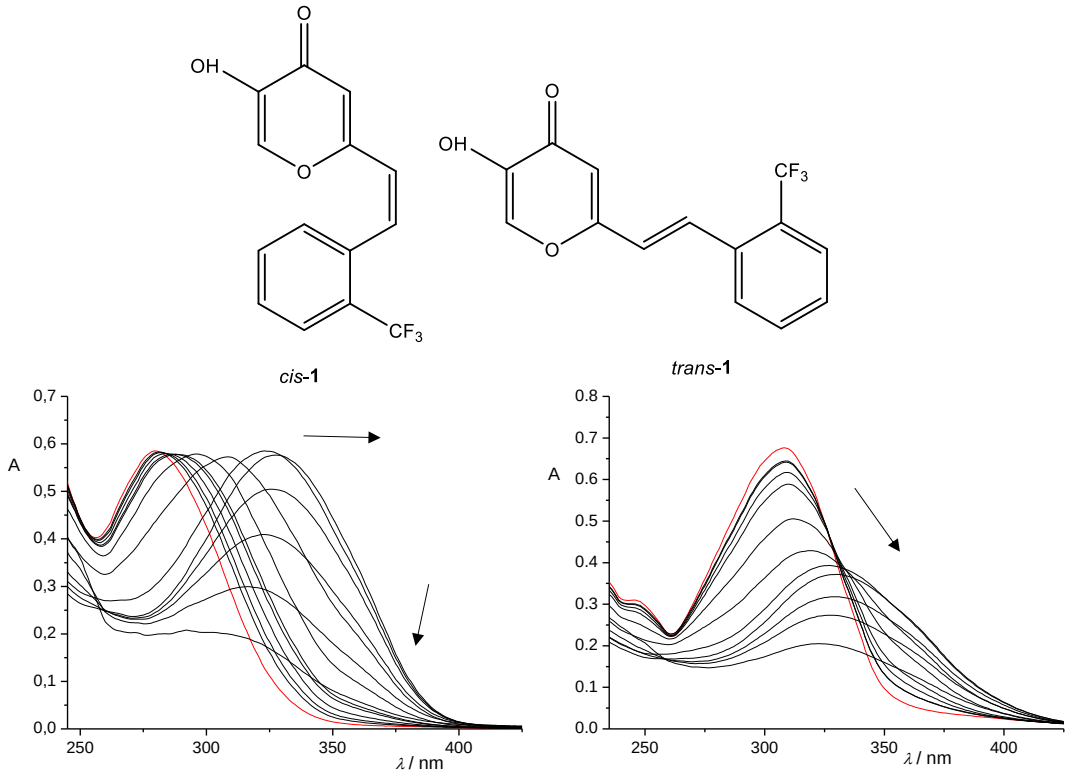


***Slika 15*.** HMBC spektar *cis* – **4.**

2.3.2 UV SPEKTROFOTOMETRIJA SPOJEVA **1-5**

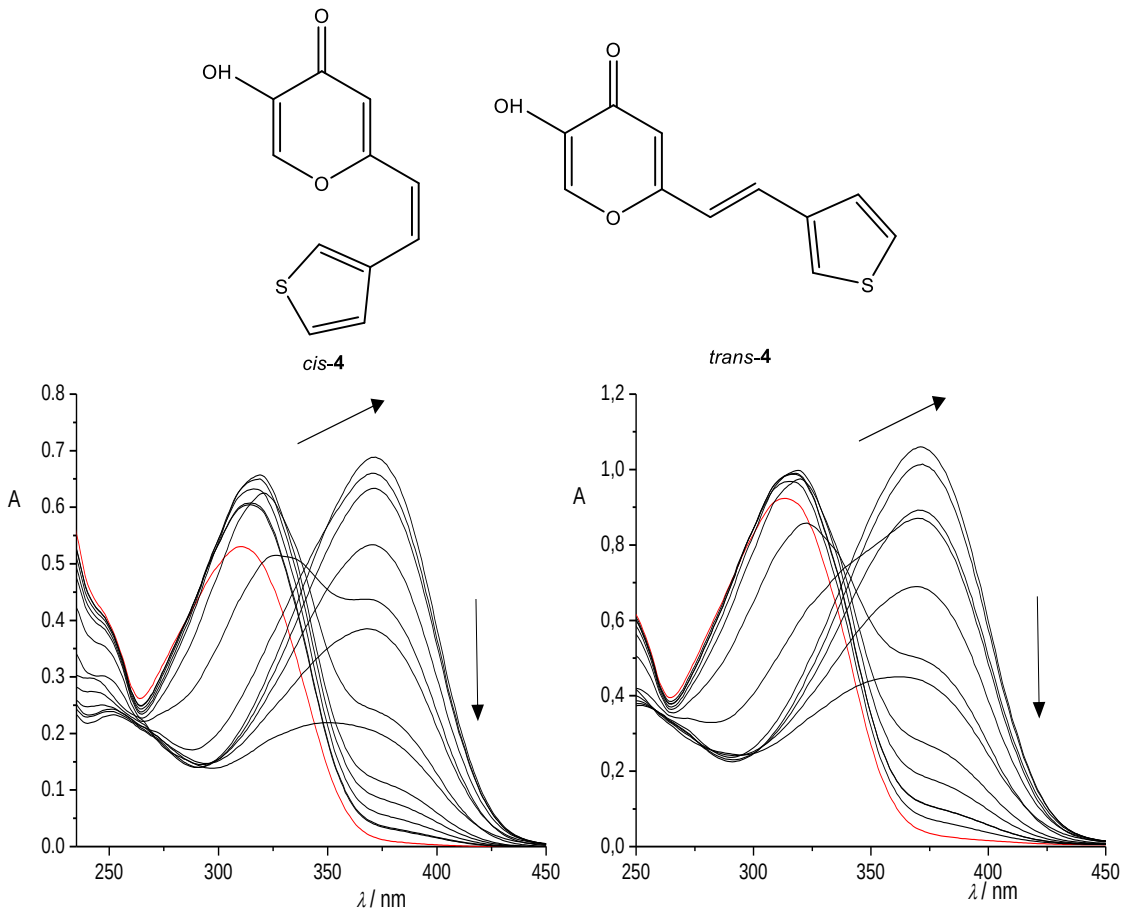
Kako bi se proučilo ponašanje dobivenih heterostilbena kada su izloženi osvjetljavanju, snimljeni su UV spektri izomera prije osvjetljavanja te nakon određenog vremenskog izlaganja osvjetljavanju.

Cis–**1** pokazuje batokromni pomak, odnosno prelazi u *trans*–**1,** pa se zatim batokromni pomak dalje nastavlja moguće zbog zatvaranja šesteročlanog nearomatiziranog prstena ili fototranspozicije pironskog prstena. Nakon što je postignut maksimum apsoropcije i najveća valna duljina dolazi do hipokromnog pomaka i blagog hipsokromnog pomaka. *Trans*–**4** osvjetljavanjem također pokazuje batokromni pomak (kada moguće dolazi do zatvaranja prstena/fototranspozicije) i kontinuirani hipokromni pomak te pri kraju osvjetljavanja blagi hipsokromni pomak (Slika 10).



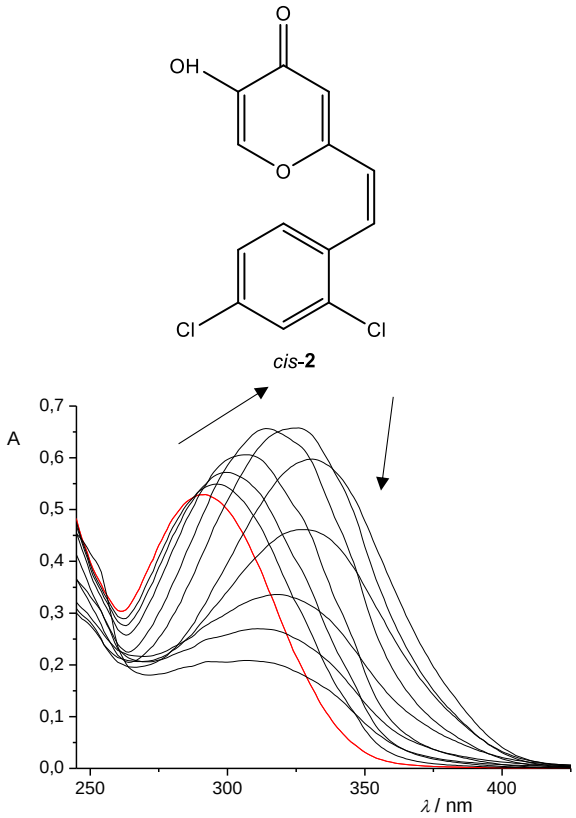
Slika 16. Promjene u UV spektru tokom osvjetljavanja *cis*-**1** (lijevo) u AcCN nakon 0 (crveno), 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256, 512, 1024, 2048 i 4096 s; (λ_{ir} = 313 nm, *l* =1 cm) i *trans*-**1** (desno) u AcCN nakon 0 (crveno), 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256, 512, 1024 i 2048 s; (λ_{ir} = 313 nm, *l* =1 cm).

Cis–**4** pokazuje batokromni i hiperkromni pomak, odnosno prelazi u *trans*–**4,** pa se zatim batokromni pomak dalje nastavlja moguće zbog zatvaranja šesteročlanog nearomatiziranog prstena ili fototranspozicije pironskog prstena. Nakon što je postignut maksimum apsoropcije i najveća valna duljina dolazi do hipokromnog pomaka i blagog hipsokromnog pomaka. *Trans*–**4** osvjetljavanjem također pokazuje batokromni i blagi hiperkromni pomak, odnosno vjerojatno dolazi do zatvaranja šesteročlanog prstena ili fototranspozicije prstena. Nakon što je postignut maksimum apsoropcije i najveća valna duljina dolazi do hipokromnog pomaka i blagog hipsokromnog pomaka (Slika 11).



Slika 17. Promjene u UV spektru tokom osvjetljavanja *cis*-**4** (lijevo) u AcCN nakon 0 (crveno), 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256, 512, 1024, 2048 i 4096 s; (λ_{ir} = 313 nm, *l* =1 cm) i *trans*-**4** (desno) u AcCN nakon 0 (crveno), 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256, 512, 1024 i 2048 s; (λ_{ir} = 313 nm, *l* =1 cm).

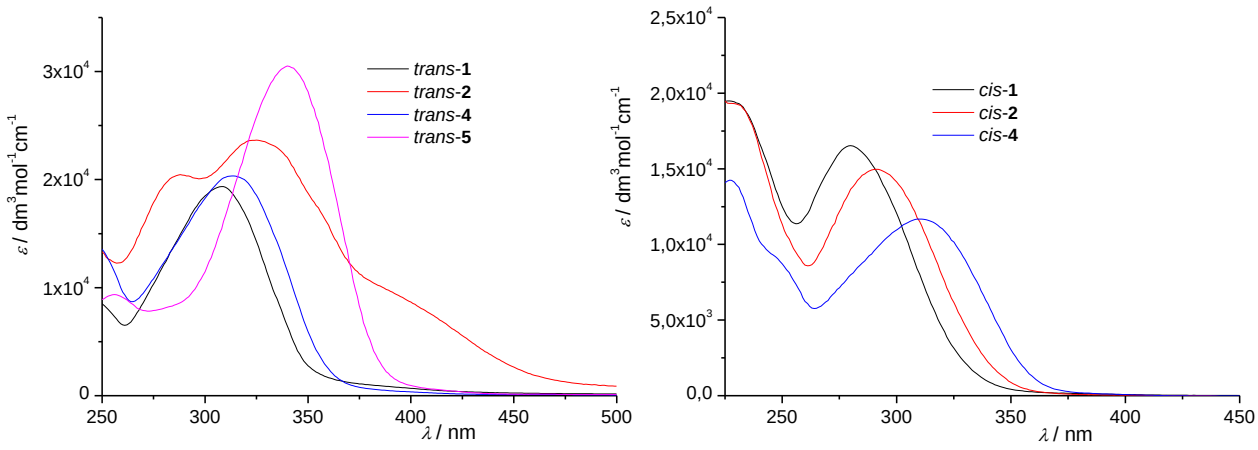
Cis–**2** pokazuje batokromni i hiperkromni pomak, odnosno prelazi u *trans*–**2**. Zatim *trans*–**2** prelazi u neki novi spoj ili zatvaranjem prstena ili fototranspozicijom pri čemu se primjećuje opet batokromni pomak. Nakon zatvaranja prstena dolazi do hipokromnog i hipsokromnog pomaka (Slika 12).



Slika 18. Promjene u UV spektru tokom osvjetljavanja *cis*-**2** u AcCN nakon 0 (crveno), 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256, 512, 1024 i 2048 s; (λ_{ir} = 313 nm, *l* =1 cm).

Na slici 13. prikazani su UV spektri *cis*- (desno) i *trans*- *(*lijevo) izomera. *Trans*–**1** i *trans*–**4** ne pokazuju zanačajnu razliku pri λ_{max}, dok je ta razlika prilično velika kod njihovih *cis*-izomera. *Trans*-**1**,**4** i **5** apsorbiraju do oko 425 nm dok *trans*-**2** apsorbira čak do 500 nm. Također uočava se značajna razlika u molarnom apsorpcijskom koeficijentu gdje se *trans*-**5** ističe s molarnim apsorpcijskim koeficijentom od 30000, dok ostali *trans*-izomeri imaju oko 20000. Kako 4-pironski prsten ostaje nepromijenjen, razlika u supstituentima na heterociklu utječe i na vrijednost molarnog apsorpcijskog koeficijenta kod *cis*-izomera, pri čemu *cis*-**1** ima najveći molarni apsorpcijski koeficijent

koji opada do *cis*-**4** što je u suprotnosti s *trans*-izomerima. Uočava se da kod oba izomera CF_3 skupina uzrokuje apsorpciju pri najmanjim valnim duljinama.

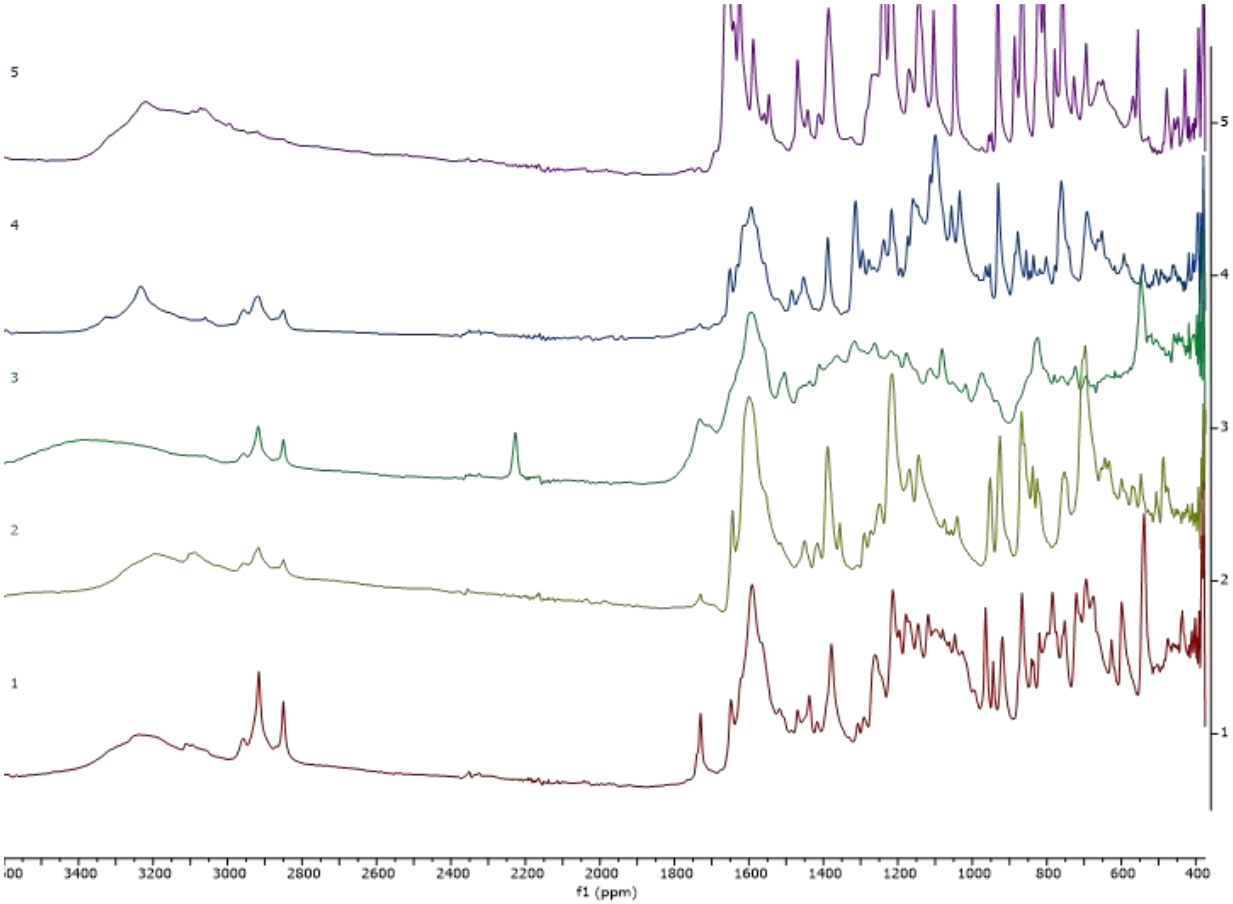


Slika 19. UV spektri *cis*- i *trans*-izomera u AcCN

2.3.3 KARAKTERIZACIJA SPOJEVA **1-5** IR SPEKTROSKOPIJOM

IR spektri su dobiveni korištenjem Bruker Vertex 70 Fourierove transformacije infracrvenog spektrometra (ATR). Uzorci su pritisnuti na dijamant, a podaci o apsorbanciji prikupljeni su između 400 i 5000 cm^{-1} sa spektralnom razlučivosti od 1 cm^{-1} i prosjekom od 32 skeniranja.

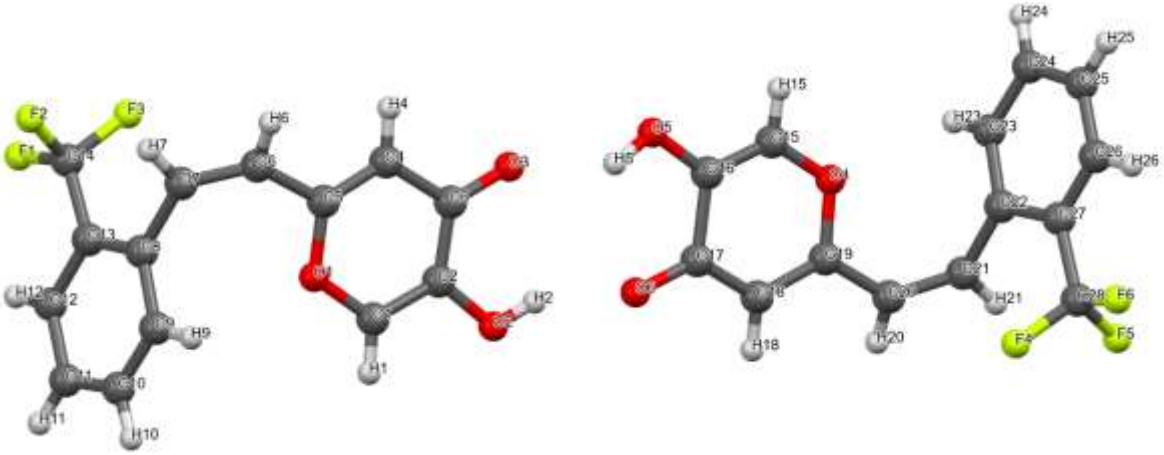
Svi spojevi pokazuju signal hidroksline skupine na 3200-2400 ppm te signal karbonilne skupine na oko 1680 cm^{-1}. Od ostalih karakterističnih signala, *cis/trans*-**3** pokazuje signal cijano skupine na otprilike 2200 cm^{-1}.



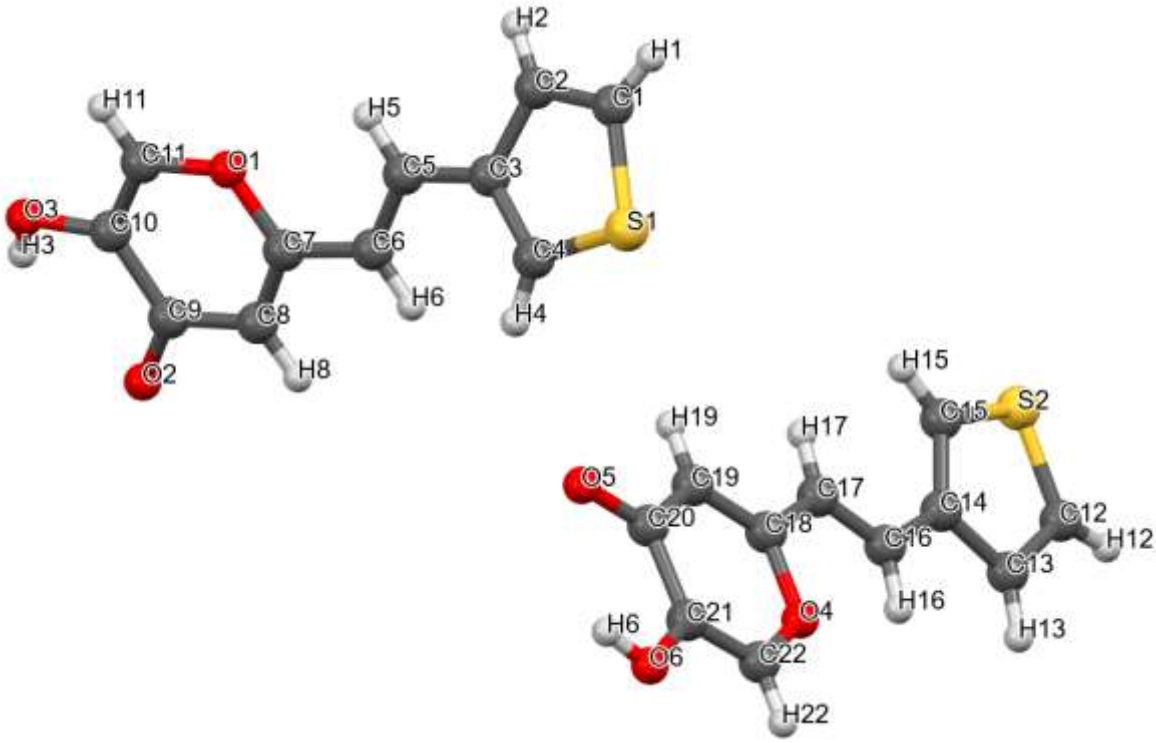
Slika 20. IR spektri sintetiziranih heterostilbena (1 – *cis/trans*-**4**, 2 – *cis/trans*-**5**, 3 – *cis/trans*-**3**, 4 – *cis/trans*-**1**, 5 – *cis*-**2**)

2.3.4 KRISTALNE STRUKTURE NEKIH 4 – PIRONSKIH HETEROSTILBENA

Kristalne strukture uspješno su snimljene za *cis*–**1** i *trans*–**4** molekule. Kristalna struktura molekule *cis*–**1** pokazuje kako dolazi do privlačenja između hidroksilne i karbonilne skupine zbog težnje stvaranja vodikovih veza (Slika 16). Također se isto primjećuje i kod *trans*–**4** (Slika 17). Isto tako može se uočiti kako dolazi do privlačenja između kisikovog atoma 4-pironskog prstena i H9, tj, H23 atoma *cis*–**1** (Slika 16), odnosno H5, tj, H16 atoma *trans*–**4** (Slika 17) što se može obrazložiti težnjom navedenih atoma da tvore vodikovu vezu međusobno.



Slika 21. Kristalne strukture molekule *cis* – **1**



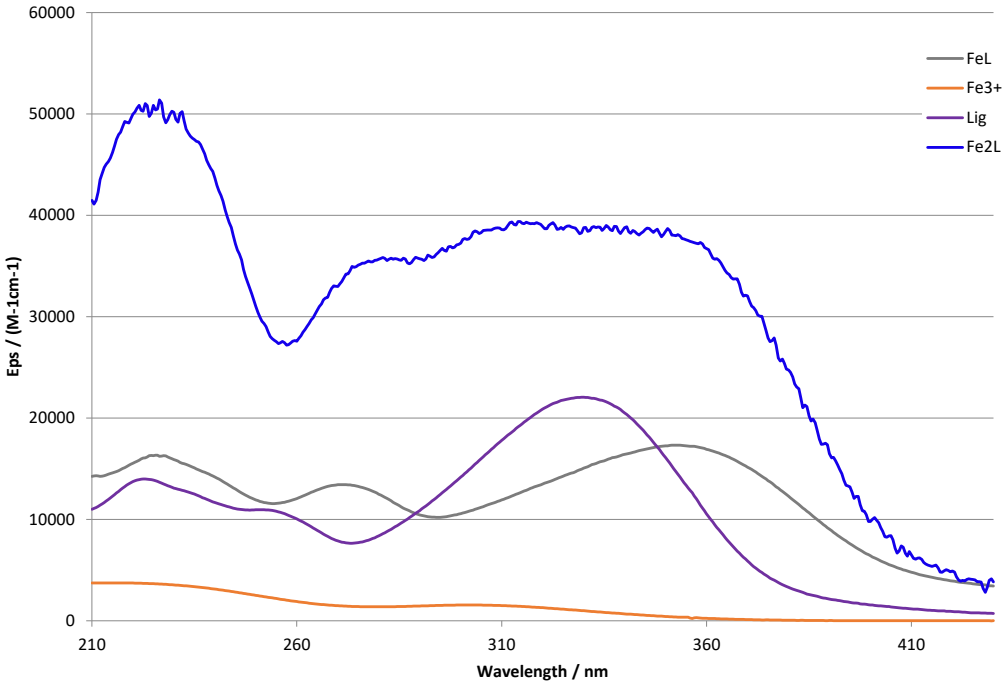
***Slika* 22.** Kristalne strukture molekule *trans* – **4**

2.3.5 KOMPLEKSIRANJE PIRONSKIH DERIVATA S BIOMETALIMA

Kako bi se dobio uvid u potencijal njihovog biološkog djelovanja, na 4-pironskim derivatima će se ispitivati mogućnost inhibicije enzima kolinesteraze. Također će se ispitivati njihova antioksidacijska aktivnost jer prisutnost hidroksilne skupine na pironskom prstenu daje spojevima predispoziciju za antioksidacijsko djelovanje. Obje aktivnosti su usko vezane i uz kompleksiranje s biometalima kao što su bakar, željezo

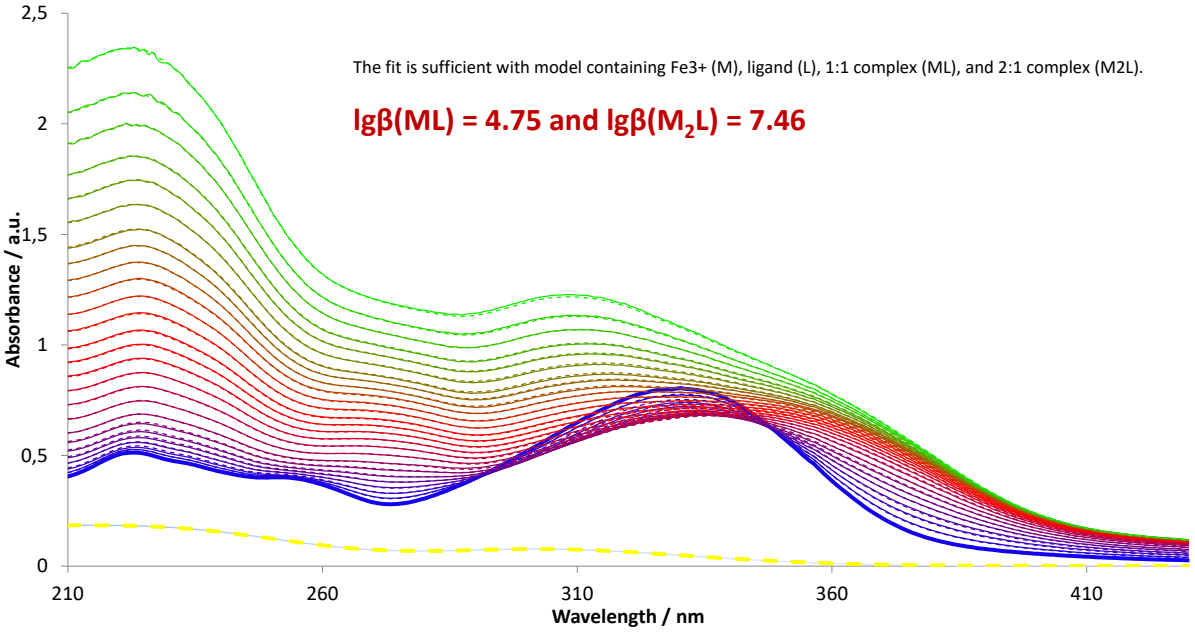
i cink, koji sprječavaju agregaciju β-amiloida. Molekule β-amiloida udružuju se u mozgu tvoreći oligomere, no neki oligomeri podliježu deformaciji te djeluju toksično na živčane stanice. Sprečavanjem agregacije β-amiloida, tj. stvaranja oligomera, moguće je ukloniti jedan od uzroka Alzheimerove bolesti.

Matrix Rank analiza spektara apsorpcije dobivenih spektrofotometrijskom titracijom jasno je pokazala da u ravnotežnom sustavu koji sadrži Fe^{3+} i organski ligand (L), *trans*-**4**, moraju postojati dvije složene vrste (Slike 23-25).

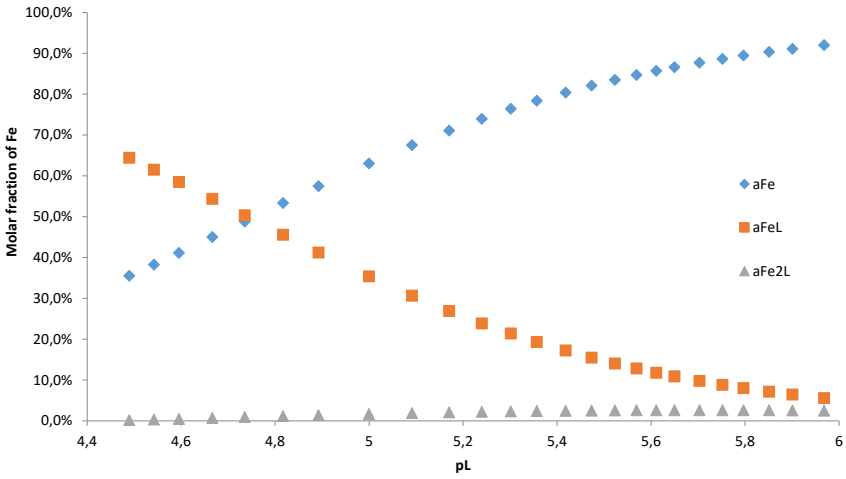


Slika 23. Pojedinačni spektri vrsta u ravnotežnom sustavu koji sadrži komplekse liganda (L), Fe^{3+}, FeL i Fe_2L. (Možda se Fe_2L može izostaviti zbog njegove velike nesigurnosti.)

Detaljne studije prilagodbe primjenom programa PSEQUAD potvrdile su postojanje kompleksa sastava FeL i Fe_2L. Osim toga, ovim se postupkom mogu procijeniti i konstante nastajanja i pojedinačni spektri vrste. Budući da je molarni udio vrste Fe_2L vrlo nizak (<2,6%), njen pojedinačni spektar je vrlo nesiguran.



Slika 24. Mjereni i 'fitted' spektri.



Slika 25. Molarni udjeli vrsta željeza(III) (Fe^{3+}, FeL i Fe_2L) kao funkcije pL u ravnotežnom sustavu pri konstantnoj koncentraciji željeza(III) (4.93×10^{-5} M).

Prvi Fe^{3+} ion je koordiniran na pironsku skupinu, dok je drugi na atom sumpora u tiofenu *trans*-**4**. Značajno je istaknuti da se u slučaju derivata *trans*-**1** mogao identificirati samo jedan kompleks (FeL) jer ova skupina ne može koordinirati Fe^{3+}.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1 Opće naznake. Sva korištena otapala su pročišćena destilacijom i dostupna na tržištu. Za sušenje organskog sloja nakon ekstrakcija korišten je bezvodni $MgSO_4$. Za provođenje tankoslojne kromatografije korištene su pločice presvučene silika gelom (0.2 mm, Kiselgel 60 F_{254}). Kod provođenja kolonske kromatografije korištene su kolone punjene silika gelom (60 Å, technical grade). ^{1}H i ^{13}C spektri nuklearne magnetske rezonancije (NMR) su snimani kod temperatura 5, 15, 25, 35, 45 i 55 °C na spektrometru Bruker Avance 300 i 600 MHz. Za otapanje spojeva se koristio deuterirani kloroform, $CDCl_3$, deuterirani dimetil-sulfoksid, DMSO i deuterirani metanol, CD_3OD, a kao standard za snimanje NMR spektara je korišten tetrametilsilan, TMS. Kemijski pomaci su izraženi u ppm (parts per million). UV spektri su snimani na UV/Vis spektrofotometru, a kao otapalo za spojeve je korišten acetonitril, CH_3CN. Kratice korištene u eksperimentalnoj proceduri su: NMR – nuklearna magnetska rezonancija, UV – ultraljubičasta spektroskopija, PE – petroleter, E – eter, DCM – diklormetan, CH_3CN – acetonitril, s – singlet, d – dublet, t – triplet, q – kvartet, dd – dublet dubleta, m – multiplet. Fotokemijska određivanja su se provodila sa otopinama od 50.0 ml u kivetama volumena 1 ml kod sobne temperature. Promjene u spektrima spojeva provodile su se u CH_3CN. Fotokemijske reakcije su se provodile u zatvorenom sustavu s Luzchem fotokemijskim reaktorom koji sadrži UV lampe valne duljine 313 nm.

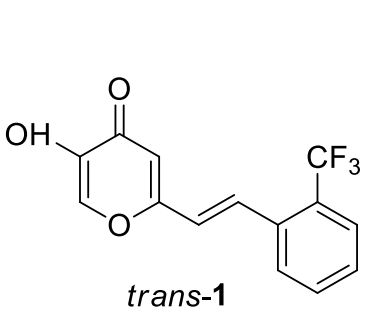
3.2 Postupak sinteze fosfonijeve soli. Reakcija se provodi u trogrloj tikvici (100 mL) koja je uronjena u ledenu kupelj. U trogrlu tikvicu dodana je kojic kiselina i DCM. Na jedno sporedno grlo tikvice je stavljena klor kalcijeva cijev, dok je kroz drugo sporedno grlo pomoću šprice dodavan tionil klorid, $SOCl_2$. Reakcijski sustav zatvorio se pomoću klor kalcijske cijevi i smjesa se miješala pomoću magnetne miješalice 4 sata. $SOCl_2$ i DCM su otpareni na vakuumskom uparivaču. Suhi produkt reakcije otopljen je u 20 mL toluena. U Erlenmayerovoj tikvici otopljeno je 13,11 g fenil-fosfina, PPh_3 u 50 mL toluena, te je smjesa dodana u trogrlu tikvicu s otopljenim produktom. Reakcijska smjesa ostavljena je 3 dana na refluksu.

3.3 Postupak sinteze početnih spojeva 1-5 korištenih za fotokemijska istraživanja. Spojevi **1-5** su smjese *cis*- i *trans*-izomera, te su sintetizirani Wittigovom reakcijom. Reakcijska aparatura propuhala se dušikom 15 minuta prije nego što su se

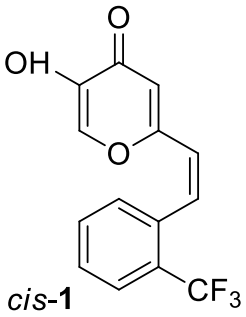
dodali reaktanti. Reakcija se provodi u trogrloj tikvici (100 mL) na čija dva sporedna grla se stave klor kalcijeva cijev i balon s dušikom, N_2 spojen preko šprice na grlo tikvice. Na srednje grlo tikvice se pričvrsti lijevak u koji se doda 40 mL etanola, te ispusti u tikvicu. U tikvicu se zatim doda fosfonijeva sol i smjesa se počne miješati pomoću magnetne miješalice. U lijevak se ponovo doda 40 mL etanola, te se 20 mL ispusti u tikvicu, a u ostalih 20 mL se doda odvagani natrij (u malim količina kako ne bi preburno reagirao). Smjesa se ostavi miješati dok se sav natrij ne otopi i ispusti u tikvicu. Zatim se u reakcijsku smjesu doda aldehid, te se reakcijska smjesa ostavi miješati 24 sata na sobnoj temperaturi. Reakcijska smjesa se upari na vakuumskom uparivaču, te se otopi u toluenu. Smjesa se zatim ekstrahira toluenom (3x15 mL). Organskom sloju se doda bezvodni magnezijev sulfat, $MgSO_4$, kako bi se izvukao prostali vodeni sloj.

Produkti **1-5** su izolirani uzastopnom kolonskom i tankoslojnom kromatografijom na silika gelu uz sustav otapala PE/E, DCM/PE i E/DCM. Prvi izomer koji eluira je *cis*-, a zatim *trans*-izomer kod zadnjih frakcija. Struktura im je određena spektroskopskim metodama. Spektroskopska karakterizacija novih heterostilbenskih derivata 4-pirona je dana ispod. Spektroskopski podaci *cis*- i *trans*-izomera spojeva **1-5** dobiveni su iz ^{1}H i ^{13}C NMR spektara njihovih smjesa. Spojevi su poslani i na HRMS i MS analizu.

5-hidroksi-2-(2-(trifluormetil)stiril)-4*H*-piran-4-on (1). Kolonska kromatografija je provedena na silika gelu koristeći sustav otapala PE/E (0-100%). Frakcija od 130 mg je stavljena na kolonu uz sustav otapala PE/E (30%). Dobiveno je 27 mg smjese (*cis*-**1** : klorid = 1 : 0.1). Nakon toga je napravljena preparativna tankoslojna kromatografija frakcije od početne reakcijse mase 42 mg u 150 mL PE/E (30%). Uzorak je otopljen u 500 µL DCM i nekoliko kapi MeOH. Spoj se sporo kretao u sustavu te je dodano 5 mL MeOH i E. Dobiveno je 22 mg smjese (*trans*-**1** : klorid = 1 : 0.1). Smjesa je ponovno podvrgnuta preparativnoj tankoslojnoj kromatografiji u istom sustavu otapala. Dobiveno je 6 mg čistog *trans*-**1** izomera.



trans-**1**

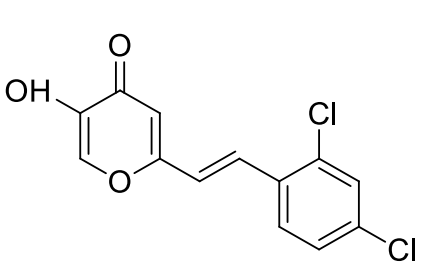


cis-**1**

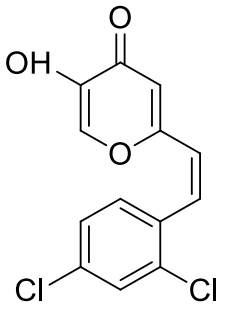
(*E*)-5-hidroksi-2-(2-(trifluormetil)stiril)-4*H*-piran-4-on (*trans*-1): 21,6 mg, bijeli prašak, R_f (E=100%)=0,45; T_t = 117-120 °C; UV (CH_3CN) λ_{max}/nm (ε/dm^{3}mol^{-1}cm^{-1}) 308 (8706); IR ν_{max}/cm^{-1} (NaCl): 3230, 2920, 2850, 1650, 1580, 1450, 1380, 1250, 930, 860, 770, 690, 580; ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 600 MHz) δ/ppm: 7,90 (s, 1H), 7,78 (d, J = 15,9 Hz, 1H), 7,72 (d, J = 7,2 Hz, 2H), 7,61 (t, J = 7,2 Hz, 1H), 7,51 (t, J = 7,6 Hz, 1H), 6,71 (d, J = 15,9 Hz, 1H), 6,49 (s, 1H); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 150 MHz) δ/ppm: 174,2 (s), 161,8 (s), 145,6 (s), 136,9 (d), 132,3 (d), 131,9 (d), 129,1 (d), 127,3 (d), 126,3 (s), 126,2 (s), 123,4 (d), 111,3 (d).

(*Z*)-5-hidroksi-2-(2-(trifluormetil)stiril)-4*H*-piran-4-on (*cis*-1): 14,2 mg, bijeli prašak, R_f (E=100%)=0,45; T_t = 113-115 °C; UV (CH_3CN) λ_{max}/nm (ε/dm^{3}mol^{-1}cm^{-1}) 280 (11679); IR ν_{max}/cm^{-1} (NaCl) : 3230, 2920, 2850, 1650, 1580, 1450, 1380, 1250, 930, 860, 770, 690, 580; ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 600 MHz) δ/ppm: 7,72 (d, J = 8 Hz, 1H), 7,50 (t, J = 7 Hz, 1H), 7,50 (s, 1H), 7,45 (t, J = 7,6 Hz, 2H), 7,14 (d, J = 12,3 Hz, 1H), 6,35 (d, J = 12,3 Hz, 1H), 6,2 (s, 1H); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 150 MHz) δ/ppm: 173,7 (s), 161,8 (s), 145,7 (d), 137,0 (d), 135,1 (d), 134,7 (s), 131,6 (d), 130,3 (d), 128,6 (d), 126,0 (s), 125,9 (s) 123,5 (d), 112,5 (d).

2-(2,4-diklorstiril)-5-hidroksi-4*H*-piran-4-on (2). Kolonska kromatografija je provedena na silika gelu koristeći sustav otapala PE/E (80%). Dobiveno je 92 mg čistog *cis*- izomera te 129 mg *trans*- izomera uz malo fosfin oksida. Također je dobiveno 1,099 g smjese izomera (*cis*-**2** : *trans*-**2** = 1,5 : 1) uz veliku količinu fosfin oksida. Smjesa izomera je stavljena na novu kolonu sa sustavom otapala PE/E (70%). Dobiveno je 93,6 mg čistog *cis*-izomera, 20 mg smjese izomera (*cis*-**2** : *trans*-**2** = 1 : 5) uz malo fosfin oksida te 20 mg smjese izomera (*cis*-**2** : *trans*-**2** = 1 : 4).



trans-**2**

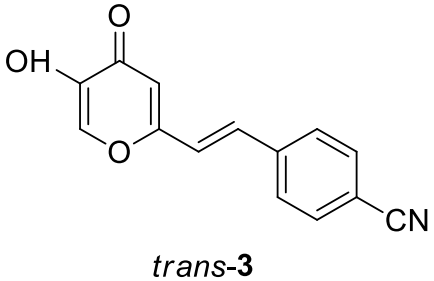


cis-**2**

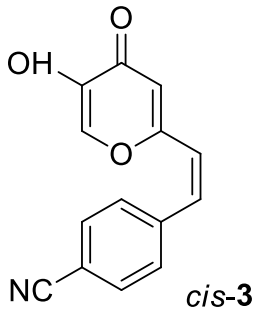
(*E*)-2-(2,4-diklorstiril)-5-hidroksi-4*H*-piran-4-on (*trans*-2): 40 mg, bijeli prašak, R_f (E=100%)=0,51; T_t = 103-105 °C; UV (CH_3CN) λ_{max}/nm (ε/dm^{3}mol^{-1}cm^{-1}): 325 (23654), 288 (20467); ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 600 MHz) δ/ppm: 8,06 (s, 1H), 7,93 (s, 1H), 7,74 (d, *J* = 16,2 Hz, 1H), 7,58 (d, *J* = 7,7 Hz, 1H), 7,57 (d, *J* = 8,4 Hz, 1H), 6,68 (d, *J* =16,2 Hz, 1H), 6,56 (s, 1H); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 150 MHz) δ/ppm: 174,1 (s), 161,8 (s), 145,7 (s), 137,5 (s), 135,2 (s), 131,1 (d), 130,2 (d), 130,0 (d), 128,4 (d), 127,7 (d), 127,6 (d), 122,1 (s), 111,3 (d).

(*Z*)-2-(2,4-diklorstiril)-5-hidroksi-4*H*-piran-4-on (*cis*-2): 250 mg, bijeli prašak, R_f (E=100%)=0,51; T_t = 149-151 °C; UV (CH_3CN) λ_{max}/nm (ε/dm^{3}mol^{-1}cm^{-1}) : 291 (14966); IR ν_{max}/cm^{-1} (NaCl) : 3200, 3050, 1600, 1550, 1490, 1380, 1250, 1150, 950, 750, 700; ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 600 MHz) δ/ppm : 7,58 (s, 1H), 7,45 (d, *J* = 2,0 Hz, 1H), 7,21 (d, *J* = 2,0 Hz, 1H), 6,90 (d, *J* = 12,3 Hz, 1H), 6,36 – 6,31 (m, 2H)); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 150 MHz) δ/ppm: 173,7 (s), 161,8 (s), 145,7 (s), 136,7 (d), 135,1 (s), 134,1 (s), 133,9 (d), 132,8 (s), 130,8 (d), 129,4 (d), 126,9 (d), 123,1 (d), 112,5 (d).

4-(2-(5-hidroksi-4-okso-4*H*-piran-2-il)vinil)benzonitril (3). Kolonska kromatografija je provedena na silika gelu koristeći sustav otapala PE/E (0-100%). Dobiveno je 470 mg *cis*-**3** izomera s velikom količinom fosfin-oksida, te 33 mg smjese izomera bez fosfin oksida. Frakcija od 470 mg stavljena stavljena je na novu kolonsku kromatografiju sa sustavom otapala PE/E (0-100%) iz koje je odvojeno 215,5 mg *cis*-**3** izomera s velikom količinom fosfin oksida i jako malo količinom *trans*–***3*** izomera.



trans-**3**

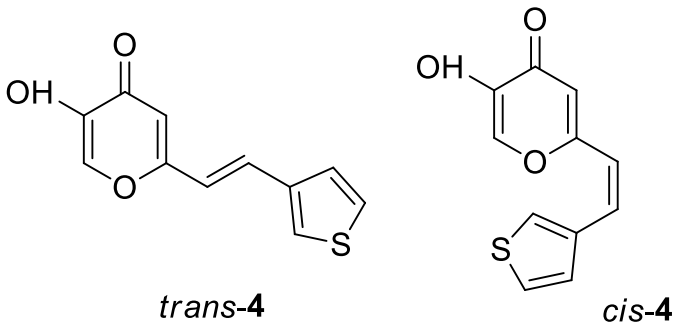


cis-**3**

(*E*)-4-(2-(5-hidroksi-4-okso-4*H*-piran-2-il)vinil)benzonitril (*trans*-3): 15,4 mg, bijeli prašak, R_f (E/EtOAc=70/30)=0,42; UV (CH_3CN) λ_{max}/nm (ε/dm^{3}mol^{-1}cm^{-1}): 316 (5555), 281 (4375, sh), 328 (5141, sh), 346 (3316, sh); IR ν_{max}/cm^{-1} (NaCl): 3050, 2910, 2840, 2250, 1715, 1570, 1480, 950, 840, 550; ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 600 MHz) δ/ppm: 9,27 (s, 1H), 7,86 (d, *J* = 8,5 Hz, 2H), 7,76 (d, *J* = 8,5 Hz, 2H), 7,68 (d, *J* = 16,2 Hz, 1H), 7,15 (d, *J* = 16,2 Hz, 1H), 6,67 (s, 1H).

(*Z*)-4-(2-(5-hidroksi-4okso-4*H*-piran-2-il)vinil)benzonitril (*cis*-3): 15,3 mg, bijeli prašak, R_f (E/EtOAc=70/30)=0,42; UV (CH_3CN) λ_{max}/nm (ε/dm^{3}mol^{-1}cm^{-1}) 316 (5555), 281 (4375, sh), 328 (5141, sh), 346 (3316, sh); IR ν_{max}/cm^{-1} (NaCl) : 3050, 2910, 2840, 2250, 1715, 1570, 1480, 950, 840, 550; ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 600 MHz) δ/ppm: 8,93 (s, 1H), 7,74 (d, *J* = 8,2 Hz, 2H), 7,4 (d, *J* = 8,1 Hz, 2H), 7,10 (d, *J* = 12,5 Hz, 1H), 6,84 (d, *J* = 12,1 Hz, 1H), 6,79 (s, 1H).

5-hidroksi-2-(2-(tiofen-3-il)vinil)-4*H*-piran-4-on (4). Kolonska kromatografija je provedena na silika gelu koristeći sustav otapala PE/DCM (90%) i DCM/E (30%). Dobiveno je 78 mg (13%) smjese izomera (*cis*-**4** : *trans*-**4** = 1 : 1) uz prisutstvo fosfin oksida. Zatim je napravljena druga kolonska kromatografija, te frakcije sa sustavom otapala PE/DCM (45%) i DCM/MeOH (10%). Dobiveno je 52 mg (9%) smjese izomera (*cis*-**4** : *trans*-**4** = 1 : 2.5) uz prisutstvo fosfin oksida. Smjesa je podvrgnuta preparativnoj tankoslojnoj kromatografiji u sustavu otapala 150 mL PE/E (30%), dok je uzorak otopljen u 200 mL DCM i par kapi MeOH. Uzorak jako sporo putuje u početnom sustavu te je dodano 5 mL MeOH i E. Dobiveno je 16 mg (3%) čiste smjese izomera (*cis*-**4** : *trans*-**4** = 1 : 2).



trans-**4** *cis*-**4**

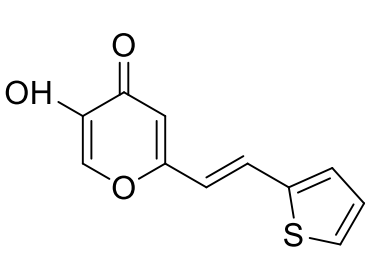
(*E*)-5-hidroksi-2-(2-(tiofen-3-il)vinil)-4*H*-piran-4-on (*trans*-4): 9,1 mg, žućkasti prašak, R_f(E=100)= 0,55; T_t = 111-115 °C; UV (acetonitril) λ_{max}/nm (ε/dm^{3}mol^{-1}cm^{-1}) 314 (20340); IR ν_{max}/cm^{-1} (NaCl): 3220, 2925, 2840, 1740, 1650, 1580, 1470, 1435,

1380, 950, 825, 770, 725; ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 600 MHz) *δ*/ppm: 7,83 (s, 1H), 7,48 (d, *J* = 16 Hz, 1H), 7,46 (d, J = 2 Hz, 1H), 7,37 (d, *J* = 5,1 Hz, 1H), 7,30 (d, *J* = 5 Hz, 1H), 6,53 (d, *J* = 16 Hz, 1H), 6,4 (s, 1H); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 150 MHz) *δ*/ppm: 174,2 (s), 162,8 (s), 145,5 (s), 138,0 (s), 136,8 (d), 130,3 (d),127,2 (d), 126,9 (d), 124,8 (d), 119,1 (d), 110,1 (d).

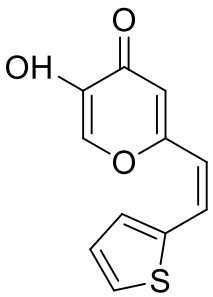
(*Z*)-5-hidroksi-2-(2-(tiofen-3-il)vinil)-4*H*-piran-4-on (*cis*-4): 7 mg, bijeli prašak, R_f(E=100)= 0,55; T_t = 143-146 °C; UV (acetonitril) λ_{max}/nm (ε/dm^{3}mol^{-1}cm^{-1}) 311 (11679); IR ν_{max}/cm^{-1} (NaCl) : 3220, 2925, 2840, 1740, 1650, 1580, 1470, 1435, 1380, 950, 825, 770, 725; ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 600 MHz) *δ*/ppm: 7,77 (s, 1H), 7,39 (d, *J* = 2,9 Hz, 1H), 7,29 (d, *J* = 3,0 Hz, 1H), 7,09 (d, *J* = 5.0 Hz, 1H), 6,81 (d, *J* = 12,6 Hz, 1H), 6,47 (s, 1H), 6,10 (d, *J* = 12,5 Hz, 1H); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 150 MHz) *δ*/ppm: 173,9 (s), 162,9 (s), 145,9 (s), 136,7 (d), 136,3 (s), 132,8 (d), 127,8 (d), 127,4 (d), 125,9 (d), 119,2 (d), 111,9 (d).

5-hidroksi-2-(2-(tiofen-2-il)vinil)-4*H*-piran-4-on (5). Kolonska kromatografija je provedena na silika gelu sa sustavu otapala PE/E (50%). Dobiveno je 1881,6 mg smjese izomera uz puno fosfin oksida. Frakcije 1-9 (124 mg, ne sadrže fosfin-oksid) stavljene su na novu kolonu sa sustavom otapala PE/E (40%). Dobiveno je 105,4 mg (10%) smjese izomera (*cis*-**5** : *trans*-**5** = 1 : 1). Frakcije 1-6 i 9-12 (60 mg ukupno) druge kolonske kromatografije su zatim 2 put pročišćene preparativnom tankoslojnom kromatografijom sa sustavom otapala $CHCl_3$/EtOAc (80%) 150 mL.

Dobiveno je 18,5 mg smjesa izomera (*cis*-**5** : *trans*-**5** = 1 : 3). Frakcija 10-11 iz prve kolone (458 mg) je stavljena na novu kolonu sa sustavom otapala PE/E (0-100%), te je dobiveno 40 mg smjese izomera (*cis*-**5** : *trans*-**5** = 1 : 3).



trans-**5**



cis-**5**

(*E*)-5-hidroksi-2-(2-(tiofen-2-il)vinil)-4*H*-piran-4-on (*trans*-5): 8 mg, bijeli prašak, R_f(E=100%)= 0,35; UV (acetonitril) λ_{max}/nm (ε/dm^{3}mol^{-1}cm^{-1}): 340 (30518); IR ν_{max}/cm^{-1} (NaCl) : 3210, 2920, 2840, 1730, 1660, 1580, 1470, 1435, 1390, 1210, 950, 850,

760, 680; ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 600 MHz) *δ*/ppm: 7,83 (s, 1H), 7,52 (d, *J* = 16,5 Hz, 1H), 7,36 (d, *J* = 5,7 Hz, 1H), 7,22 (d, *J* = 3,5 Hz, 1H), 7,05 (d, *J* = 5,0 Hz, 1H), 6,50 (d, *J* = 16,5 Hz, 1H), 6,39 (s, 1H); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 150 MHz) *δ*/ppm: 174,2 (s), 162,8 (s), 145,5 (s), 140,1 (s), 136,8 (d), 129,9 (d), 129,3 (d), 128,2 (d), 127,2 (d), 118,3 (d), 110,1 (d).

(*Z*)-5-hidroksi-2-(2-(tiofen-2-il)vinil)-4*H*-piran-4-on (*cis*-5): 8 mg, žućkasti prašak, R_f(E=100%)= 0,35; UV (acetonitril) λ_{max}/nm (ε/dm^{3}mol^{-1}cm^{-1}): 309 (25486); IR ν_{max}/cm^{-1} (NaCl): 3210, 2920, 2840, 1730, 1660, 1580, 1470, 1435, 1390, 1210, 950, 850, 760, 680; ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 600 MHz) *δ*/ppm: 7,91 (s, 1H), 7,44 (d, *J* = 5,2 Hz, 1H), 7,25 (d, *J* = 3,5 Hz, 1H), 7,06 (dd, *J* = 5,2 Hz, 1H), 6,9 (d, *J* = 12,8 Hz, 1H), 6,47 (s, 1H), 6,0 (d, *J* = 12,8 Hz, 1H).

4. ZAKLJUČAK

U okviru ovog završnog rada uspješno su sintetizirani i spektroskopski okarakterizirani novi heterostilbenski derivati 4-pirona **1-5**. Sinteza ovih spojeva provedena je Wittigovom reakcijom, a produkti su dobiveni kao smjese izomera.

Ovakvom sintezom dobiveno je deset novih heterostilbenskih struktura koji imaju mogućnost kompleksiranja s biometalima i potencijalne inhibicije agregacije β-amiloida, inhibicije enzima kolinesteraza i antioksidacijskog djelovanja, što opravdava daljnja biološka ispitivanja.

Heterostilbeni *cis*-**2** i *trans*-**2** dobiveni su u najvećim količina te je ovaj način sinteze za te spojeve bio najpovoljniji. Ostali 4-pironski derivati dobiveni su u dovoljnim količinama za potvrdu spektrokopskim metodama.

Najbolja iskorištenja reakcija i najlakša odvajanja izomera kolonskom kromatografijom pokazali su izomeri spoja **2** koji sadrže 2 atoma klora na benzenskom prstenu.

Za spoj **1** koji sarži CF_3 skupinu kao supstituent na benzenu te za strukture **4** i **5** koji sadrže tiofenski prsten u položaju 3 i 2 potrebno je provesti još barem jednu cijelu sintezu kako bi ih se dobilo dovoljno za daljnja ispitivanja što isto tako nije loš rezultat, tj. iskorištenja reakcija nisu zanemariva.

Dobivene molekule u ovom završnom radu zbog hidroksilne skupine na pironskom prstenu imaju predispozicije za antioksidacijsko djelovanje, a samim time se mogu koristiti i za daljnja biološka istraživanja.

5. LITERATURA

1. Veksli Z. i sur., Kem. Ind. 47 (1998) 5-10.
2. Veksli Z., Doktorska Disertacija, Zagreb, 1967.
3. Keeler J., Understanding NMR spectroscopy, John Wiley & Sons. Inc., New York, 2002.
4. Lewitt M. H., Spin Dynamics: Basics of nuclear magnetic resonance, John Wiley & Sons. Inc., Chichester, 2001.
5. Akitt. J. W., NMR and Chemistry: An Introduction to Modern NMR Spectroscopy, 3rd ed, London : Chapman and Hall, 1992.
6. Atta – ur – Rahman, Nuclear Magnetic Resonance, New York : Springer – Verlag, 1986.
7. Karplus M., J. Chem. Phys. 30 (1959) 11-15.
8. Croasmun W. R., Carlson R. M. K., Two-dimensional NMR spectroscopy: Applications for chemists and biochemists, Wiley – VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 1994.
9. Jackman L. M., and Sternhell S., Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy in Organic Chemistry, 2nd ed., Pergamon Press, New York, 1969.
10. Sanders J. K. M., and Hunter B. K., Modern NMR Spectroscopy-A Guide for Chemists, 2nd ed., Oxford University Press, Oxford, 1993.
11. Friebolin H., Basic One- and Two-Dimensional NMR Spectroscopy, 2nd ed., VCH Publishers, New York, 1993.
12. Pavia D. L., Lampman G. M., Kriz G. S., Vyvyan J. R., Introduction to spectroscopy, 5th ed., Brooks/Cole Cengage Learning, Belmont, 2015.
13. Friebolin H., Basic One- and Two-Dimensional NMR Spectroscopy, 3rd Revised Ed., New York: Wiley, 1998.
14. Levy G. C., Lichter R. L., and Nelson G. L., Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy, 2nd ed., John Wiley and Sons, New York, 1980.
15. Derome A. E., Modern NMR Techniques for Chemistry Research, Pergamon Press, Oxford, England, 1987.
16. Schraml J., and Bellama J. M., Two-Dimensional NMR Spectroscopy, Wiley, New York, 1988.
17. Fifield F. W., Kealey D., Principles and practice of analytical chemistry, 5th Edition, Blackwell Science Ltd., Oxford, 2000.
18. Skoog D. A., West D. M., Holler F. J., Fundamentals of analytical chemistry, 7th Edition, Saunders College Publishing, Philadelphia, 1994.
19. Jaffé H. H., and Orchin M., Theory and Applications of Ultraviolet Spectroscopy, John Wiley and Sons, New York, 1964.
20. Stern E. S., and Timmons T. C. J., Electronic Absorption Spectroscopy in Organic Chemistry, St. Martin's Press, New York, 1971.
21. Gunzler H., Gremlich H. U., Uvod u infracrvenu spektroskopiju (preveli prof. dr. sc. Z. Meić i dr. sc. G. Baranović), Školska knjiga, Zagreb, 2006.
22. Szymanski, H. A., Interpreted Infrared Spectra, Vols. 1-3, Plenum Press, New York, 1964-1967.
23. Hesse M., Maier H., Zeeh B., Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 2005.

24. Hoffmann de E., Stroobant V., Mass spectrometry. principles and applications, John Wiley & Sons. Inc., Chichester, 2007.
25. Middleditch B. S., Ed, Practical Mass Spectrometry, New York: Plenum Press, 1979.
26. Nastavni tekst iz Molekulske spektroskopije, Irena Škorić

6. ŽIVOTOPIS

Ingo Borić [redacted] Osnovnu školu “prof. Blaž Mađer” završio je 2015. godine. Iste godine upisuje smjer farmaceutski tehničar Srednje škole Koprivnica u Koprivnici gdje je maturirao 2019. godine. Studij Primijenjena kemija na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu upisuje 2019. godine. Akademske godine 2021./2022. postaje STEM stipendist. Tijekom preddiplomskog studija stručnu praksu odradio je na Institutu Ruđer Bošković na Zavodu za organsku kemiju i biokemiju u Laboratoriju za fizikalno-organsku kemiju.