

Funkcionalizacija pirola u svrhu priprave fluorescentnog indikatora

Pavlović, Barbara

Undergraduate thesis / Završni rad

2020

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:149:802476>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-03**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Chemical Engineering and Technology University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Barbara Pavlović

ZAVRŠNI RAD

Zagreb, srpanj 2020.

Sažetak

Cilj ovog završnog rada bila je priprava klor supstituiranih 4,4-difluor-4-bor-3*a*,4*a*-diazas-indacena, BODIPY spojeva koji će kasnije poslužiti kao prekursori u sintezi novih fluorescentnih indikatora, potencijalnih kemosenzora ili obilježavača bioloških makromolekula.

Proveden je niz reakcija od kojih je prva reakcija priprava dipirometana Lindseyjevom metodom, počevši od pirola i njegove kondenzacije s benzaldehidom uz trifluoroctenu kiselinu kao katalizator. Dobiven je 5-fenildipirometan (**5**) u vrlo dobrom iskorištenju iz dviju reakcija u kojima su korišteni različiti omjeri pirola i benzaldehida. Dobiveni dipirometan je halogeniran uz *N*-klorsukcinimid pri dvije različite temperature. Dobiveni dipirometani 1,1'-diklor-5-fenildipirometan (**3**) i 1-klor-5-fenildipirometan (**4**) potom su bez izolacije prevedeni u odgovarajuće dipirometene uz 2,3-diklor-5,6-dicijano-1,4-benzokinonon (DDQ) i kompleksirani s borovim trifluoridom kao Lewisovom kiselinom. Preparativnom tankoslojnom kromatografijom izoliran je ciljni spoj 3,5-diklor-4,4-difluor-4-bor-3*a*,4*a*-diazas-indacen (**1**).

Reakcije su provedene u strogo kontroliranim, inertnim uvjetima uz zaštitu od svjetla, a kao otapala korišteni su suhi diklormetan, toluen i THF. Svi sintetizirani spojevi okarakterizirani su spektroskopskim metodama ^1H i ^{13}C NMR.

Ključne riječi: elektrofilna aromatska supstitucija, pirol, dipirometan, dipirometen, Lindseyjeva metoda, BODIPY

Summary

Preparation of a fluorescent indicator *via* pyrrole functionalization

The objective of this final thesis was the preparation of chlorine substituted 4,4-difluoro-4-bora-3*a*,4*a*-diazas-indacene, BODIPY compounds which will later be utilized as precursors in the synthesis of a new fluorescent indicator, potential chemosensors or biological macromolecule marker.

A series of reactions were conducted, the first one being the preparation of dipyrromethane by the Lindsey method, which uses pyrrole and benzaldehyde as starting molecules that undergo condensation with trifluoroacetic acid as catalyst. 5-Phenyldipyrromethane (**5**) was obtained in a very good reaction yield from two batches of the given reaction, which used different ratios of pyrrole and benzaldehyde. Dipyrromethane was then halogenated using *N*-chlorosuccinimide at two different temperatures. The acquired 1,1'-dichloro-5-phenyldipyrromethane (**3**) and 1-chloro-5-phenyldipyrromethane (**4**) were then, without prior isolation of the compounds, subjected to oxidation into the corresponding dipyrromethene using 2,3-dichloro-5,6-dicyano-1,4-benzoquinone (DDQ) followed by complexation with boron trifluoride as a Lewis acid. 3,5-Dichloro-4,4-difluoro-4-bora-3*a*,4*a*-diazas-indacene (**1**) was isolated by preparative thin layer chromatography.

The reactions were conducted in controlled, inert conditions while also being protected from the light. THF, toluene and dichloromethane were used as solvents. All of the synthesised compounds were characterized using ¹H and ¹³C NMR spectroscopic methods.

Keywords: electrophilic aromatic substitution, pyrrole, dipyrromethane, dipyrromethene, Lindsey method, BODIPY

Ovaj rad izrađen je u Laboratoriju za sintetsku organsku kemiju Zavoda za organsku kemiju i biokemiju na Institutu Ruđer Bošković u okviru projekta Hrvatske zaklade za znanost „Fotokemija: Reakcijski mehanizmi i primjene u organskoj sintezi i biologiji (PhotoApp)” (IP-2019-04-8008).

Zahvaljujem mentorici prof. dr. sc. Ireni Škorić na razumijevanju, susretljivosti i stručnom vodstvu pri izradi završnog rada.

Zahvaljujem se komentorici dr. sc. Mariji Alešković na strpljivosti, uloženom trudu, savjetima i velikoj pomoći pri provođenju eksperimentalnog i teorijskog dijela završnog rada.

Također bih se htjela zahvaliti svojoj obitelji na stalnoj podršci i razumijevanju tijekom mog cjelokupnog školovanja te prijateljima po kojima ću sve godine mog dosadašnjeg studija imati u lijepom sjećanju.

Sadržaj

1. UVOD	1
2. OPĆI DIO	2
2.1. PIROL	2
2.1.1. FIZIKALNA SVOJSTVA PIROLA	2
2.1.2. STRUKTURA PIROLA	2
2.1.3. SPEKTROSKOPSKA SVOJSTVA PIROLA	5
2.2. REAKCIJE PIROLA	5
2.2.1. ELEKTROFILNA AROMATSKA SUPSTITUCIJA	7
2.3. SINTEZA DIPIROMETANA	9
2.3.1 LINDSEYEVA METODA SINTEZE	10
2.4. REAKCIJE HALOGENIRANJA	11
2.5. BODIPY SUSTAVI	11
2.5.1 POSTOMODIFIKACIJE HALOGENIRANIH BODIPY SUSTAVA	12
3. REZULTATI I RASPRAVA	14
3.1. UVOD	14
3.2. BODIPY SPOJEVI	15
3.2.1. SINTEZA I SPEKTROSKOPSKA KARAKTERIZACIJA DIPIROMETANA	18
3.2.2. HALOGENIRANJE DIPIROMETANA	21
3.2.3. SINTEZA I SPEKTROSKOPSKA KARAKTERIZACIJA SPOJA 1	23
4. EKSPERIMENTALNI DIO	27
4.1. OPĆE NAPOMENE	27
4.2. PRIPRAVA 5-FENILDIPIROMETANA (5)	28
4.3. SINTEZA 1-KLOR-5-FENILDIPIROMETANA (4) I 1,1'-DIKLOR-5-FENILDIPIROMETANA (3)	28
4.4. SINTEZA 3,5-DIKLOR-4,4-DIFLUOR-4-BOR-3A,4A-DIAZA-S-INDACENA (1)	29
5. ZAKLJUČAK	31
6. LITERATURA	32

1. Uvod

Upotreba i primjena fluorescencijske spektroskopije u zadnjih nekoliko desetljeća postala je neizostavna tehnika u kemiji, biologiji i medicini zbog svoje jednostavnosti, brzine i potrebe za malim količinama uzorka. Senzori ili indikatori su spojevi koji imaju svojstvo prenošenja informacije o nekom kemijskom događaju u analitički signal. Dizajnirani su tako da sadrže veznu podjedinicu koja je odgovorna za prepoznavanje i koordinaciju analita čime se induciraju promjene u signalnoj komponenti indikatora, a ta se promjena očituje na makroskopskoj razini i najčešće se detektira nekom spektroskopskom metodom.

BODIPY spojevi su organski spojevi koji imaju fluoroformu skupinu 4,4-difluor-4-bor-3*a*,4*a*-diazas-indacena i prepoznati su kao nadmoćna klasa fluorescentnih indikatora. Odlikuje ih kemijska stabilnost, dobra topljivost te dobra fotofizička svojstva poput izrazito visokih kvantnih prinosa fluorescencije i molarnih apsorpcijskih koeficijenata u kombinaciji s uskim fluorescencijskim emisijskim spektrima s oštrim pikovima. Spektroskopska i fotofizička svojstva ovih spojeva mogu se precizno modelirati promjenom supstituenata na samoj BODIPY jezgri što daje iznimnu slobodu u dizajnu BODIPY spojeva i njihove široke primjene kao kemosenzora, biomarkera, primjene u fotodinamičkoj terapiji ili pak u razvoju sitnih prenosivih solarnih ćelija poznatijih kao solarne čestice.

Naše istraživanje je usmjereno ka proučavanju mogućih sintetskih načina pripreme fluorescentnih indikatora koji sadrže pirolsku jezgru. Naglasak je stavljen na pirol kao polaznu molekulu sinteze supstituiranog BODIPY spoja i proučavanja karakterističnih pirolskih reakcija.

2. Opći dio

2.1. Pirol

Pirol je po prvi put izoliran 1834. iz katrana te potom 1857. iz pirolizata kosti. Danas se dobiva industrijski iz reakcije furana i amonijaka katalizirane aluminijem te se može sintetizirati i redukcijom svojeg zasićenog analoga pirolidina. Molekulu pirola ne nalazimo u prirodi u slobodnom obliku, no prisutna je u mnogim prirodnim spojevima. Tako je pirol sastavni dio mnogih kompleksnih makrocikala poput vitamina B12, porfirina, klorofila, klorina, pigmenata poput bilirubina i biliverdina, itd..¹ Pirolna podjedinica prisutna je u mnogim farmakološki aktivnim supstancama sedativnih, analgetičkih, antikancerogenih svojstava, te lijekovima za kontrolu bakterijskih i virusnih infekcija ili pak snižavanje kolesterola u krvi.²

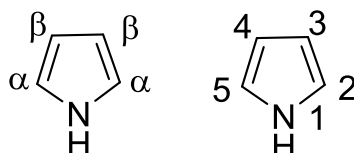
Prva istraživanja vezana uz pirol bavila su se proučavanjem životnih procesa, konkretnije dvjema molekulama nužnim za sve životne procese, hem i klorofil. Ova dva pigmenta dobivaju se biosintezom u stanicama iz porfobilinogena koji je jedini biološki aktivan oblik aromatičnog pirola te ima važnu ulogu za metabolizam.

2.1.1. Fizikalna svojstva pirola

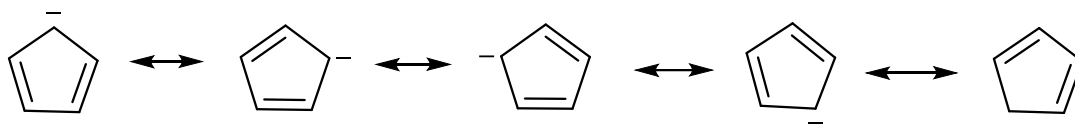
Pirol je bezbojna tekućina intenzivna mirisa koji u prisutnosti kisika, zbog oksidacije, potamnjuje te ga je često prije upotrebe potrebno destilirati. Molekulska masa pirola iznosi 67,09 te se pri standardnim uvjetima nalazi u tekućem stanju s temperaturom vrelišta 129,7 °C i temperaturom taljenja – 23,4 °C. Gustoća pirola pri 20 °C je 0,9698 g/mL te se miješa s alkoholima, eterima i ostalim organskim otapalima.

2.1.2. Struktura pirola

Pirol je peteročlani heterociklički aromatski spoj s atomom dušika i dvije dvostruke veze, poznat još i po sistematskom nazivu *1H*-pirol ili azol. Uz IUPAC konvenciju numeriranja atoma pirolskog prstena uobičajeno je i asigniranje položaja atoma 2 i 5 kao α , odnosno 3 i 4 kao β atoma.

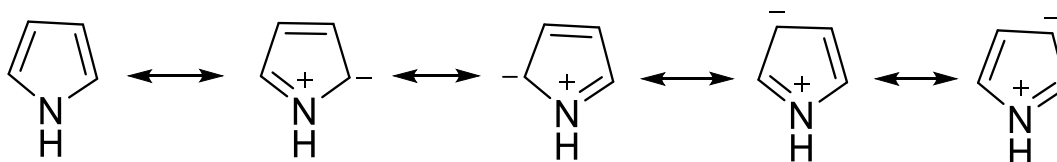


Prije analize strukture pirola, važno je razumjeti strukturu ciklopentadienilnog aniona zbog njihove izoelektronske strukture (prikaz na shemi 1).¹ Oba sustava posjeduju 6 π -elektrona samo što je ciklopentadienilni ion negativno nabijen što ga čini vrlo reaktivnim, no istovremeno je stabiliziran rezonancijom kao što je vidljivo na shemi 1.



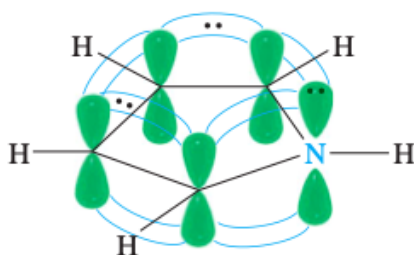
Shema 1.

Pirol je, za razliku od ciklopentadienilnog aniona, električki neutralan te u svojoj strukturi sadrži atom dušika. Zbog atoma dušika dolazi do gubitka radijalne simetrije te pirol ne može imati 5 jednakih mezomernih struktura kao što je slučaj kod ciklopentadienilnog aniona kod kojega su ugljikovi atomi ekvivalentni i naboj je jednako raspodijeljen među njima. Pirol tako ima jednu rezonancijsku strukturu bez razdvojenih naboja, dvije koje negativan naboj usmjeravaju ka α -ugljicima i dvije koje prikazuju da je negativan naboj na β -ugljicima. Nemaju sve mezomerne strukture pirola jednak doprinos njegovom rezonancijskom hibridu, već on opada slijeva nadesno prema shemi 2.



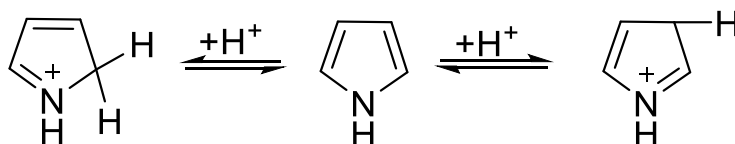
Shema 2.

Pirolski atom dušika poprima parcijalno pozitivan naboj dok ugljikovi atomi imaju parcijalno negativan naboj, no isto tako atom dušika zbog svoje elektronegativnosti privlači elektrone prema sebi. To dovodi do svojevrsne ravnoteže dvaju suprotnih efekata, mezomernog i induktivnog, s dominantnijim mezomernim efektom. Stoga je dipolni moment pirola, koji iznosi 1,80 D, usmjeren od atoma dušika prema ugljicima koji su bogatiji elektronima tj. od pozitivnog ka negativnom polu.³



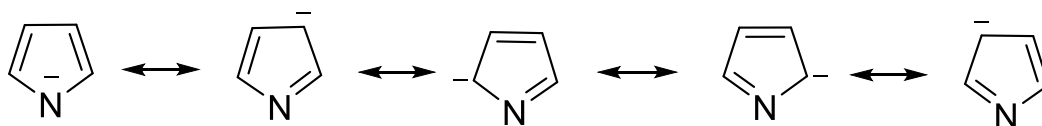
Slika 1.⁴ Struktura pirola s veznim interakcijama π orbitala

Aromatičnost pirola se zasniva na 6π -elektronskom sustavu prikazanom na slici 1. Svi atomi prstena su sp^2 hibridizirani te svaki atom ima nehibridiziranu p -orbitalu. Nehibridizirane orbitale se međusobno preklapaju i čine peteročlani aromatski prsten koji uključuje doprinos 4 elektrona dvije dvostruke C-C veze te slobodnog elektronskog para na atomu dušika. Nevezni elektronski par se nalazi u nehibridiziranoj p -orbitali atoma dušika. Na heteroatom je vezan i vodik koji je pokazatelj kiselosti pirola tj. koliko je dobar proton-donor. Mjera tog svojstva je pK_a čijim opadanjem raste kiselost spoja. pK_a za pirol iznosi 17,5 čime se može zaključiti da je slaba kiselina, a pK_b iznosi 13,6 što bi značilo i da je slaba baza. Razlog slaboj bazičnosti je loša sposobnost protoniranja dušika kojom bi se narušila aromatičnost spoja jer bi u tom slučaju heteroatom trebao postati sp^3 hibridiziran. Pirol se zato protonira na α i β atomima ugljika kao što je prikazano na shemi 3 gdje je stabilniji oblik kationa onaj nalijevo.



Shema 3.

Deprotoniranjem atoma vodika s pirolskog atoma dušika nastaje pirolilni anion čije su rezonancijske strukture prikazane na shemi 4. Takve strukture su također aromatične, ali odlaskom protona s heteroatoma zadržavaju slobodni par elektrona na dušiku u sp^2 hibridnoj orbitali. Za usporedbu, potrebna je puno blaža baza za uklanjanje protona s pirolskog atoma dušika nego što je to slučaj kod sekundarnih amina.

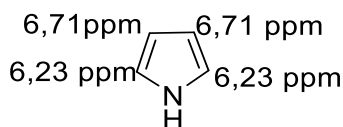


Shema 4.

2.1.3. Spektroskopska svojstva pirola

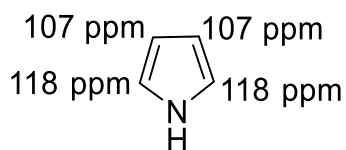
Molarni apsorpcijski koeficijent pirola iznosi $15000 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, a njegov UV spektar prikazuje jednu vrpcu srednje jakog intenziteta bez specifične strukture na 210 nm .¹

^1H NMR spektar pirola sadrži 3 signala, usprkos tome što sveukupno ima 5 atoma vodika kao što je vidljivo na slici 2. Uzrok toga je simetričnost molekule pa se tako protonima na α -položajima može pripisati isti signal, a isto vrijedi i za one na β -položajima. Signal na $6,71 \text{ ppm}$, odgovara kemijskom pomaku protona s ugljika na α -položaju zbog odsjnenjenja uzrokovanog elektron-odvlačećim efektom atoma dušika u prstenu. Prema zasjenjenijim područjima je signal na $6,23 \text{ ppm}$, koji odgovara kemijskom pomaku protona s ugljika na β -položaju. Također se može primijetiti kemijski pomak protona vezanog direktno na dušik, koji se pojavljuje kao prošireni singlet na 8 ppm . Konstante sprege iznose $^3J_{12} = ^3J_{15} = 2,6 \text{ Hz}$, $^4J_{13} = ^4J_{14} = 2,6 \text{ Hz}$, $^3J_{23} = ^3J_{45} = 2,6 \text{ Hz}$, $^4J_{24} = ^4J_{35} = 1,3 \text{ Hz}$, $^4J_{25} = 2,1 \text{ Hz}$, $^3J_{34} = 3,5 \text{ Hz}$.⁵ Vidljivo je da usprkos većoj udaljenosti između protona na položajima 1 i 3 u odnosu na položaje 1 i 2, iznos konstante sprege je isti. To je posljedica specifične „cik-cak“ planarne strukture koja potiče sprezanje protona na položajima 1 i 3.



Slika 2.

^{13}C NMR spektar sadrži 2 signala iako ima 4 atoma ugljika što se također pripisuje simetričnosti pirola. Signal na 118 ppm pripada dvama α -ugljicima koji osjećaju induktivni efekt atoma dušika, a signal na 107 ppm pripisuje se dvama β -ugljicima kao što je prikazano na slici 3.

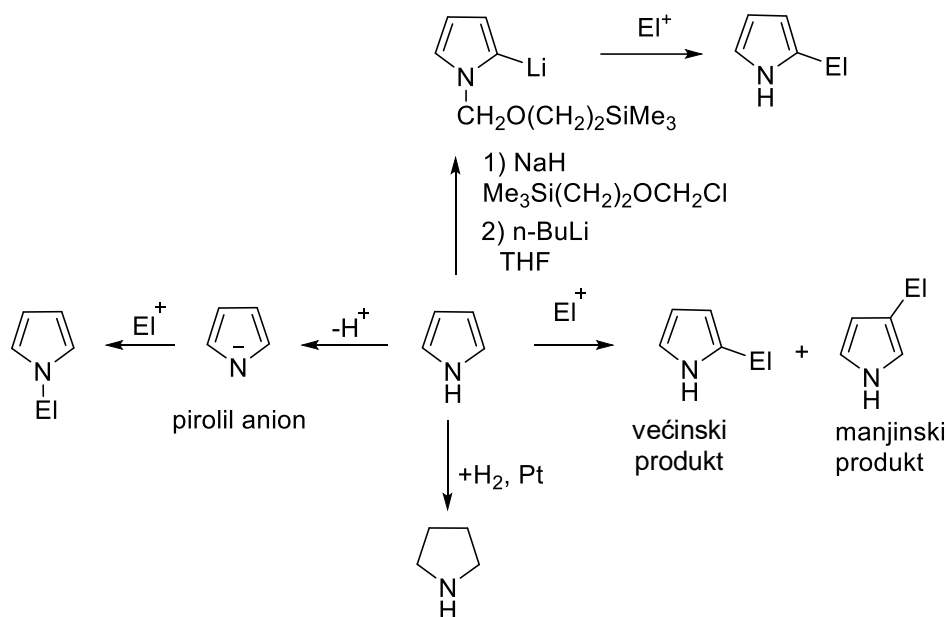


Slika 3.

2.2. Reakcije pirola

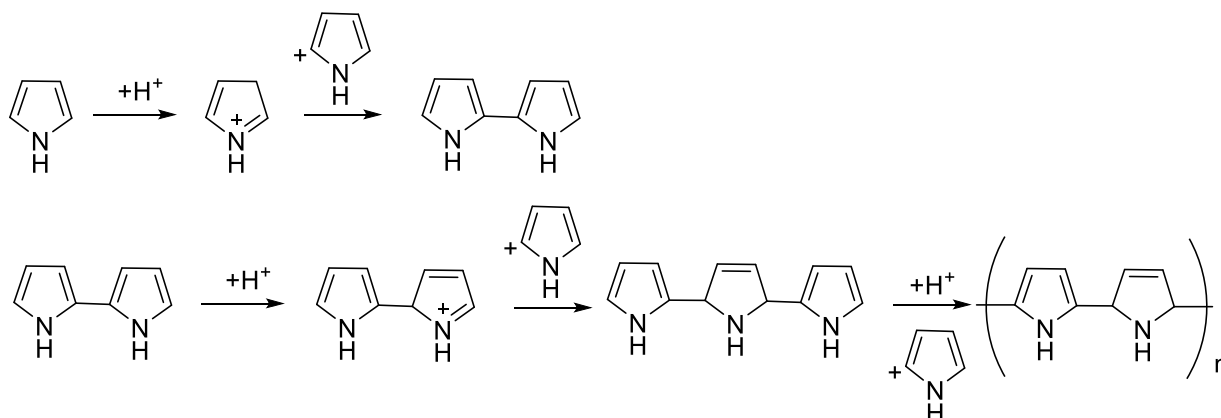
Usprkos slabom afinitetu prema nukleofilnoj supstituciji i adiciji, pirol je vrlo podložan reakcijama s elektrofilima što uključuje prvenstveno supstituciju na ugljiku i, posredno preko pirolilnog aniona, na dušiku. Reagira i s redukcijским sredstvima tvoreći pirolidin te možemo dobiti i piridin pomoću proširenja pirolnog prstena. Isto tako, podložan je metaliranju na α -ugljiku

pomoću litirajućih agensa. Sve navedene glavne reakcije pirola prikazane su na shemi 5.1



Shema 5.

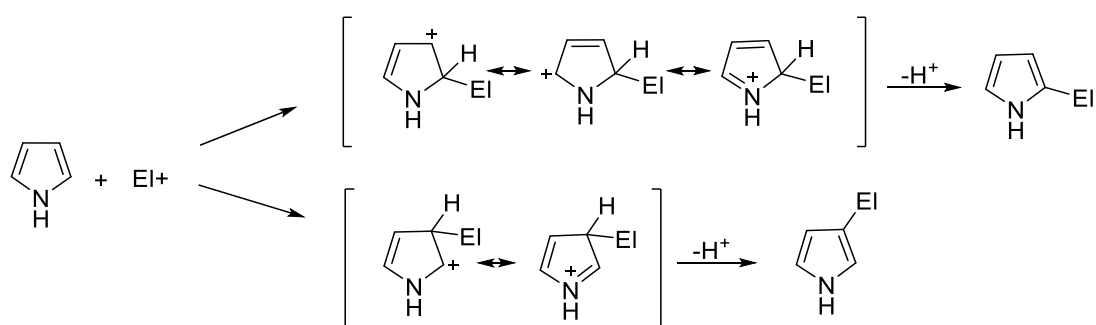
Usporedbom elektrofilne supstitucije benzena i pirola primijećuje se veća brzina reakcije pirola u odnosu na benzen. Razlog tome je sposobnost atoma dušika da slobodnim elektronskim parom sudjeluje u rezonanciji što stabilizira karbokation. Općenito, vrijedi pravilo da je pirol reaktivniji od benzena pa će tako reagirati s vrlo slabim elektrofilima. Isto tako, većinom nisu ni potrebne Lewisove kiseline u reakcijama elektrofilne supstitucije, ali je čest problem regioselektivna kontrola reakcije. Ukoliko pirol sadrži elektron-odvlačeću skupinu poput esterske mogu se blokirati neki položaji pri elektrofilnoj supstituciji, a navedena skupina poslije se lako ukloni hidrolizom estera. Nadalje, u reakciji s pirolima ne mogu se koristiti reagensi poput jakih kiselina jer pritom dolazi do polimerizacije kao što je prikazano na shemi 6 i vrlo brzo nastaje polimer pirola.⁶



Shema 6.

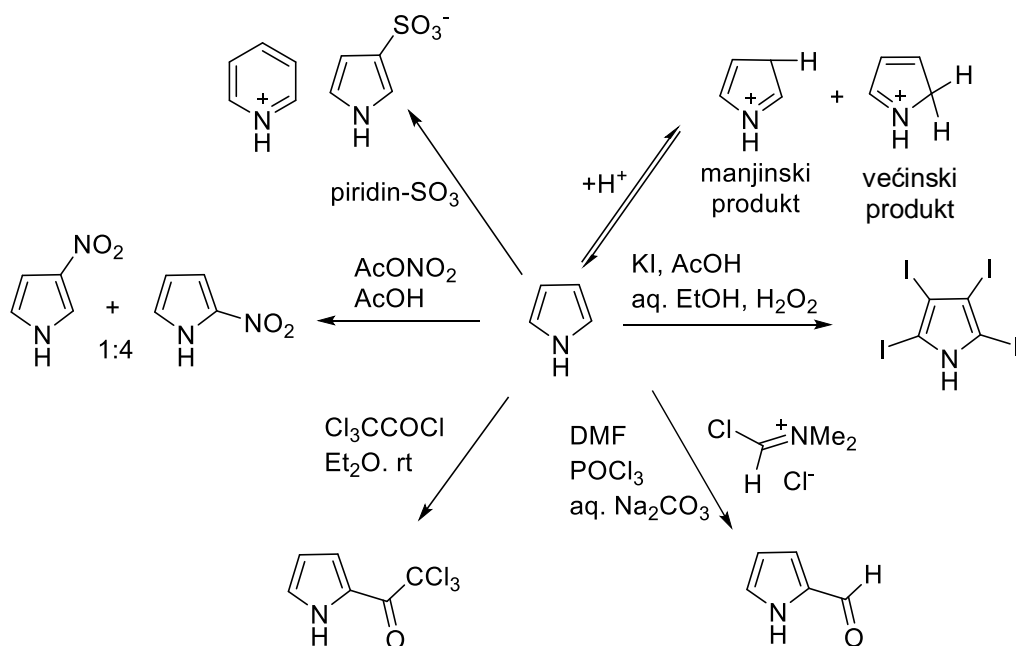
2.2.1. Elektrofилна aromatska supstitucija

Najčešće reakcije pirola su elektrofилne supstitucije koje se odvijaju na ugljikovom atomu na α -položaju, ali se mogu i u manjoj mjeri odvijati i na β -ugljicima. Razlog ovakve selektivnosti je veća rezonancijska stabilnost koja nastaje pri supstituciji C-2 u odnosu na C-3 položaj. Naime, na shemi 7 vidimo da supstituiranjem na C-2 položaju imamo 3, a u slučaju kada se elektrofил veže na položaj C-3 imamo 2 rezonancijske strukture intermedijera. Upravo zbog veće stabilnosti intermedijera, supstitucija na β -položaju odvija se u manjoj mjeri, a isključivo samo kada je α -položaj nedostupan.



Shema 7.

Na shemi 8 prikazane su glavne reakcije elektrofилne supstitucije pirola, protoniranje u blago kiselim uvjetima, nitriranje, sulfoniranje, aciliranje te halogeniranje na koje će se obratiti posebna pozornost zbog upotrebe reakcije kloriranja pirolskog prstena prilikom sinteze BODIPY spoja.



Shema 8.

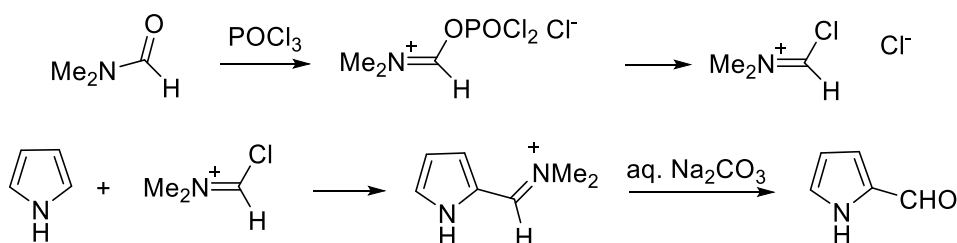
Kao što je i ranije navedeno, reakcija protoniranja u otopini se odvijaju na svim položajima,

no najbrže na položaju C-2 te daje piroljev kation koji je stabilniji u 2H u odnosu na 3H oblik. Ovi ioni mogu kasnije poslužiti za polimerizaciju i za redukciju pirola.

Nitriranje se odvija primarno na položaju C-2 uz acetil nitrat i octenu kiselinu pri $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ te pritom, nastaju iznimno reaktivni 2- i 3-nitro supstituirani pirola.1

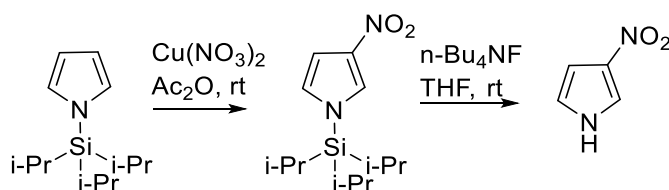
Za sulfoniranje pirola je potrebno koristiti blago kiseli reagens poput piridin-sumporovog trioksida. Na taj način postepeno nastaje pirol-3-sulfonska kiselina iako se primarno mislilo da se radi o pirol-2-sulfonskoj kiselini. Razlog tome može biti veća stabilnost pirol-3-sulfonske kiseline u odnosu na 2-supstituirani izomer.1

Aciliranje se može odvijati na C-2 i C-3 položaju, ali i na samom dušiku koristeći *N*-acetilimidazol.1 Direktno acetiliranje se provodi s acetanhidridom pri visokoj temperaturi te većinski nastaje 2-acetilpirol.1 Posebna reakcija aciliranja pirola je Vilsmeirova reakcija koja je zapravo formiliranje s dimetilformamidom i fosforil-kloridom i primjenjiva je za cijeli niz supstrata. Njihovom reakcijom u prvom koraku dobiva se Vilsmeierov reagens, reaktivni ugljikov elektrofil kad istog nije moguće dobiti korištenjem Lewisove ili jake kiseline. Nastali iminijev kation potom reagira s pirolom i daje kao produkt iminijevu sol koja hidrolizom daje aldehid u α -položaju pirola.1 Mehanizam reakcije je prikazan na shemi 9.



Shema 9.

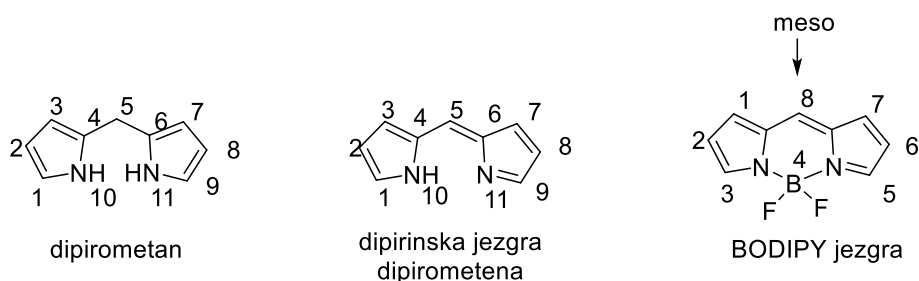
U slučaju potrebe za provođenjem elektrofilne supstitucije na β -položaju, pirol se supstituira na dušiku npr. velikom trizopropilsililnom zaštitinom skupinom prije provedbe željene reakcije, kao što je primjerice prikazano na shemi 10 kod nitriranja pirola.1 Ovaj pristup blokiranja supstitucije na α -položaju primjenjiv je i za ostale reakcije elektrofilne supstitucije. Skidanje zaštitne skupine je jednostavno i provodi se blagom reakcijom uz tetrabutilamonijev fluorid.



Shema 10.

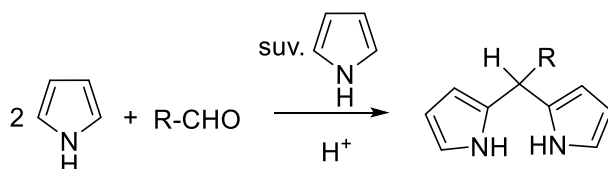
2.3. Sinteza dipirometana

Pirol je sastavni dio dipirometana, spojeva poznatih već 100 godina, koji se često koriste kao intermedijeri za pripravu kalikspirola i porfirina te njihovih analoga.⁷ Dipirometani su spojevi koji se sastoje od 2 pirolske jezgre međusobno povezane metilenskim mostom. Oksidacijom dipirometana u dipirometen te potom kompleksiranjem s borovim trifluorid dietil eteratom dobiva se 4,4-difluoro-4-bora-3*a*,4*a*-diaz-a-indacen, poznatiji pod kraćim nazivom difluoroboron dipirometen ili BODIPY. Navedeni spojevi su često supstituirani u položaju 8 tj. *meso*-položaju. Napretkom istraživanja vezanih uz dobivanje i primjenu BODIPY spojeva kao fluorescentnih indikatora povećan je i interes za sintezu dipirometana kao polazišnih molekula za pripravu BODIPY spojeva. Struktura i položaji dipirometanske i BODIPY jezgre vidljivi su na slici 4.

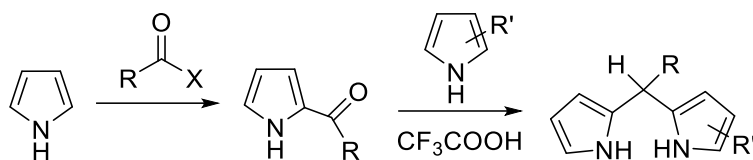


Slika 4.

Jednostavna i laka sinteza dipirometana jedan je od bitnih čimbenika koji idu u prilog primjeni ovih spojeva kao prekursora BODIPY spojeva. Ipak, postoji svega nekoliko sintetskih puteva za njihovo dobivanje što bi se moglo pripisati činjenici da su to iznimno nestabilni spojevi. Naime, dipirometani zahtjevaju čuvanje pri temperaturi od 0 °C bez prisutstva svjetla, a također su osjetljivi na kisele i bazične uvjete stoga ih je najbolje koristiti neposredno nakon priprave. Najpopularnija metoda priprave dipirometana je tzv. Lindseyeva metoda sinteze prikazana na shemi 11.⁸ Uz navedenu metodu, atraktivna je i sinteza dipirometana iz α -acilpirola kao što je prikazano na shemi 12.⁹ Pristup sinteze iz α -acilpirola prvenstveno se koristi kada se želi dobiti asimetrični dipirometan.



Shema 11.

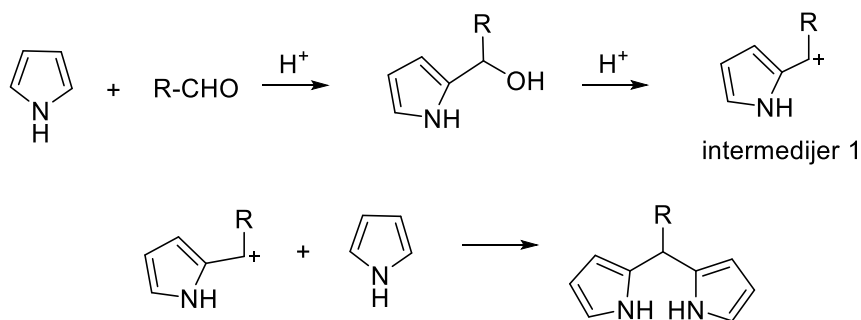


Shema 12.

2.3.1 Lindseyeva metoda sinteze

Najučinkovitiji postupak sinteze dipirometana je Lindseyeva metoda koja se zasniva na principu kiselo katalizirane elektrofilne aromatske supstitucije ketona ili aldehida na α -položaj pirola pri sobnoj temperaturi, poznato još i kao kondenzacija (vidljivo na shemi 13). Budući da je reakcija primjenjiva za široki spektar polaznih aromatskih ili alifatskih aldehida upravo se ovim načinom najčešće pripremaju *meso*-supstituirani dipirometani.

Glavna zamjerka kondenzacijskoj pripravi dipirometana bila je kompeticijsko formiranje tripirometana i viših oligopirometana, ali kroz godine se postupak sinteze poboljšavao. Dokazano je, ako je u reakcijskoj smjesi prisutan suvišak pirola (u omjeru pirol:aldehid:kiselina = 40:1:0,1) koji ujedno služi kao reaktant i otapalo za aldehid, reakcija se odvija vrlo brzo i neće doći do nastanka nusprodukata. Suvišak pirola se uklanja destilacijom pri sniženom tlaku, a dobiveni dipirometan se pročišćava kromatografski. U reakciji se koriste čisti aldehidi i trifluoroctena kiselina kao najčešći izbor katalizatora.⁸



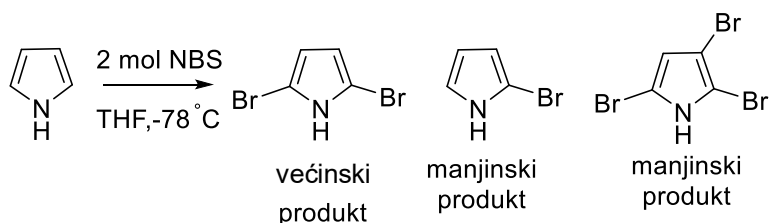
Shema 13.

Primijećeno je da iskorištenje reakcije znatno ovisi o udjelu pirola pa je tako pri omjeru pirol:aldehid = 70:1 dobiveno iskorištenje od čak $\eta = 67\%$, dok korištenjem manjeg udjela pirola npr. 20:1, utvrđeno je da je iskorištenje znatno smanjeno. Navedena reakcija je primjenjiva za sintezu mnoštva *meso*-supstituiranih dipirometana te za sintezu bis-dipirometana koji nastaju reakcijom odgovarajućeg dialdehida i pirola u suvišku.⁸

2.4. Reakcije halogeniranja

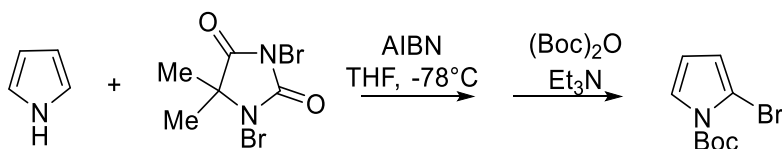
Za razumijevanje halogeniranja dipirometana ključan je mehanizam halogeniranja dijela molekule na kojemu se sama reakcija odvija, a to je upravo pirolski prsten.

Halogeniranje pirola je iznimno agresivna reakcija koja se mora odvijati u kontroliranim uvjetima jer će u protivnom nastati tetrahalogenirani produkti.¹⁰ Prilikom halogeniranja u blagim uvjetima većinski produkt je α -supstituirani pirol koji je pak nestabilan. Reakcijom uz 1 molarni ekvivalent *N*-halosukcinimida možemo dobiti 2-brom ili 2-klorpirol, a potonji derivat se još može dobiti reakcijom uz sulfuril-klorid. Korištenjem pak 2 molarna ekvivalenta odgovarajućeg *N*-halogensukcinimida dolazi do dihalogeniranja na položajima 2 i 5 (tj. α -ugljicima) s primjesama mono i polihalogeniranih (shema 14).¹⁰ Iz dobivene smjese halogenih derivata često je komplicirano izdvajanje čistih produkata.



Shema 14.

Zanimljiva reakcija bromiranja pirola jest s 1,3-dibrom-4,4-dimetilhidantoinom uz azobisisobutironitril gdje dobiveni 2-brompirol zbog svoje nestabilnosti reagira s di-*tert*-butil-dikarbonatom kao zaštitnom skupinom. Time nastaje stabilniji *N-tert*-butoksikarbonilni derivat prikazan na shemi 15.



Shema 15.

2.5. BODIPY sustavi

Prvi BODIPY spoj sintetizirali su Treibs i Kreuzer¹¹ 1960-ih godina reakcijom 2,4-dimetilpirola s acetanhidridom u prisutstvu kiselog katalizatora. Zanimljivo, sinteza nesupstituirane BODIPY jezgre dugo je vremena bila nepoznata zbog nedostatka povoljnog

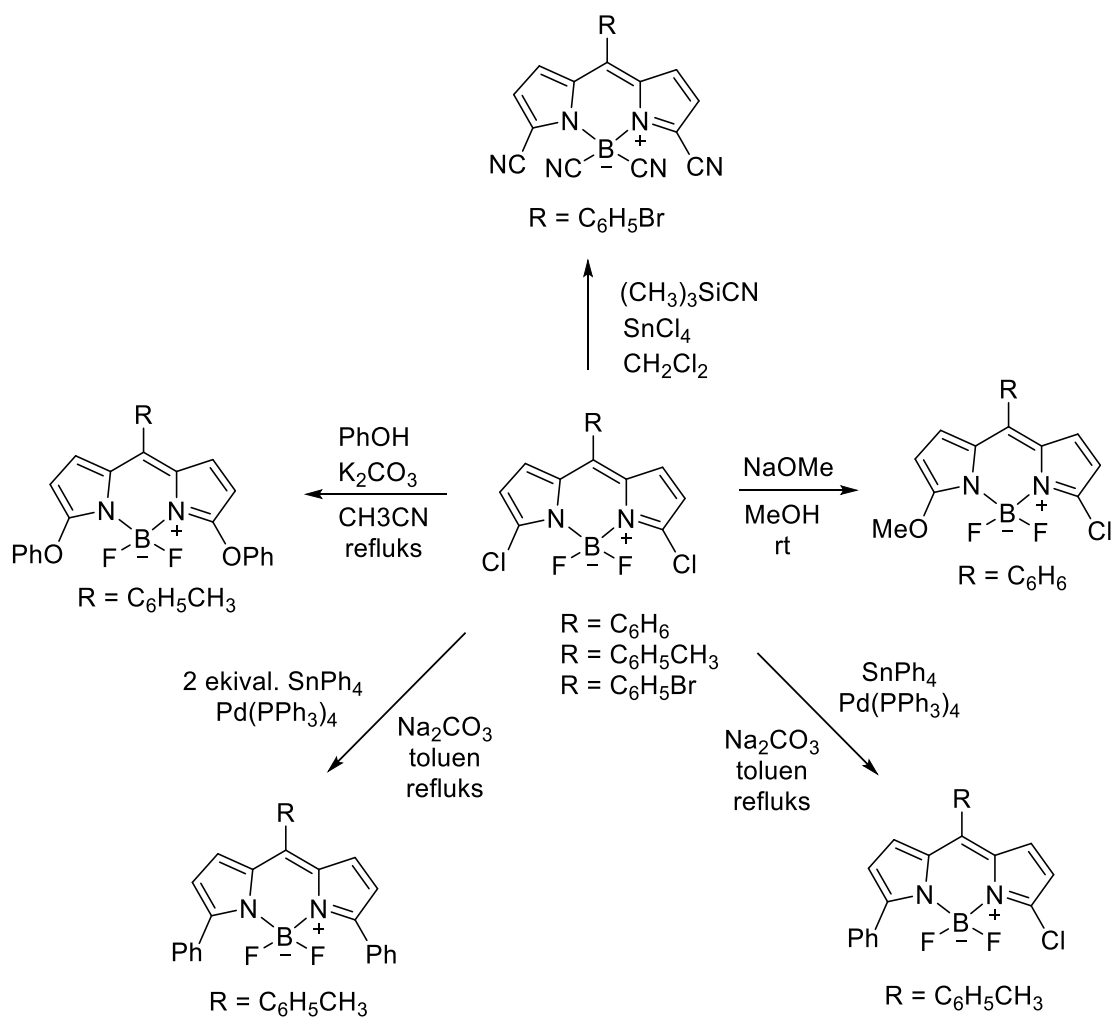
sintetskog puta jer je nesupstituirani dipirometan jako podložan reakcijama s elektrofilima. Tek su nedavno otkrivena 2 sintetska puta kojima se uspješno može dobiti nesupstituirani dipirometen. Bruceovom¹² oksidacijom nestabilnog dipirometana nastaje dipirometen pri – 78 °C nakon čega slijedi kompleksiranje dipirometena s borovim trifluorid dietil eteratom. Drugi način sinteze otkrila je Wild¹³ koja je provela kiselo kataliziranu reakciju pirol-2-karbaldehida s pirolom te uvela bor-difluorid pri bazičnim uvjetima čime je nastala nesupstituirana BODIPY jezgra u iskorištenju od svega 8%.

Glavna karakteristika svih BODIPY spojeva jest izuzetna apsorpcija i fluorescencija u vidljivom spektru do 600 nm te velik molarni apsorpcijski koeficijent. Nadalje, BODIPY spojevi nisu osjetljivi na promjenu pH vrijednosti niti na različite polarnosti otapala te su stabilni neovisno o fiziološkim uvjetima što je dodatan razlog njihovom sve učestalijem korištenju u različite svrhe.¹⁴

2.5.1 Postomodifikacije halogeniranih BODIPY sustava

Spojeve s BODIPY jezgrom odlikuju iznimna spektroskopska i fotofizikalna svojstva koja se mogu podešavati uvođenjem novih supstituenata na pirolske ugljike (točnije položaje 1, 2, 3, 5, 6 i 7) te na *meso* položaj prikazanih na slici 4. Prisutni heteroatomi BODIPY jezgre uzrokuju polarizaciju sustava što određene položaje čini pogodnima za elektrofilne, a neke za nukleofilne reakcije. To omogućava različite tipove funkcionalizacije BODIPY jezgre čime se mogu mijenjati optička svojstva molekule poput λ_{\max} , molarnog apsorpcijskog koeficijenta i dr. Upravo je mogućnost funkcionalizacije BODIPY jezgre glavni razlog sve popularnije primjene ove skupine spojeva u području priprave fluorescentnih indikatora, a također i jednostavnija priprava derivata koji inače imaju vrlo kompleksnu sintezu. Pretraživanjem literature ustanovljeno je da su najvažnije reakcije postfunkcionalizacije na pirolskim ugljicima koji imaju vezana 1 ili 2 atoma klora, najčešće u položajima 3 i 5.¹⁴ Struktura dikloriranog BODIPY spoja prikazana je u sredini na shemi 16, gdje služi kao polazni spoj.

Naime, klorirani BODIPY spojevi lako se sintetiziraju iz halogeniranih dipirometana ili dipirometena, stabilni su, a istovremeno podložni daljnjim reakcijama supstitucije. Sudjeluju u nukleofilnoj aromatskoj supstituciji s mnogim reagensima¹⁴ te reakcijama križnog spajanja kataliziranih paladijem (*cross coupling*) kao što je prikazano na shemi 16.¹⁴



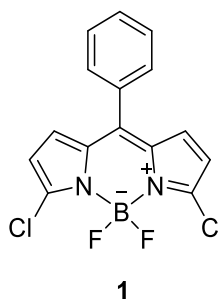
Shema 16.¹⁴

3. Rezultati i rasprava

3.1. Uvod

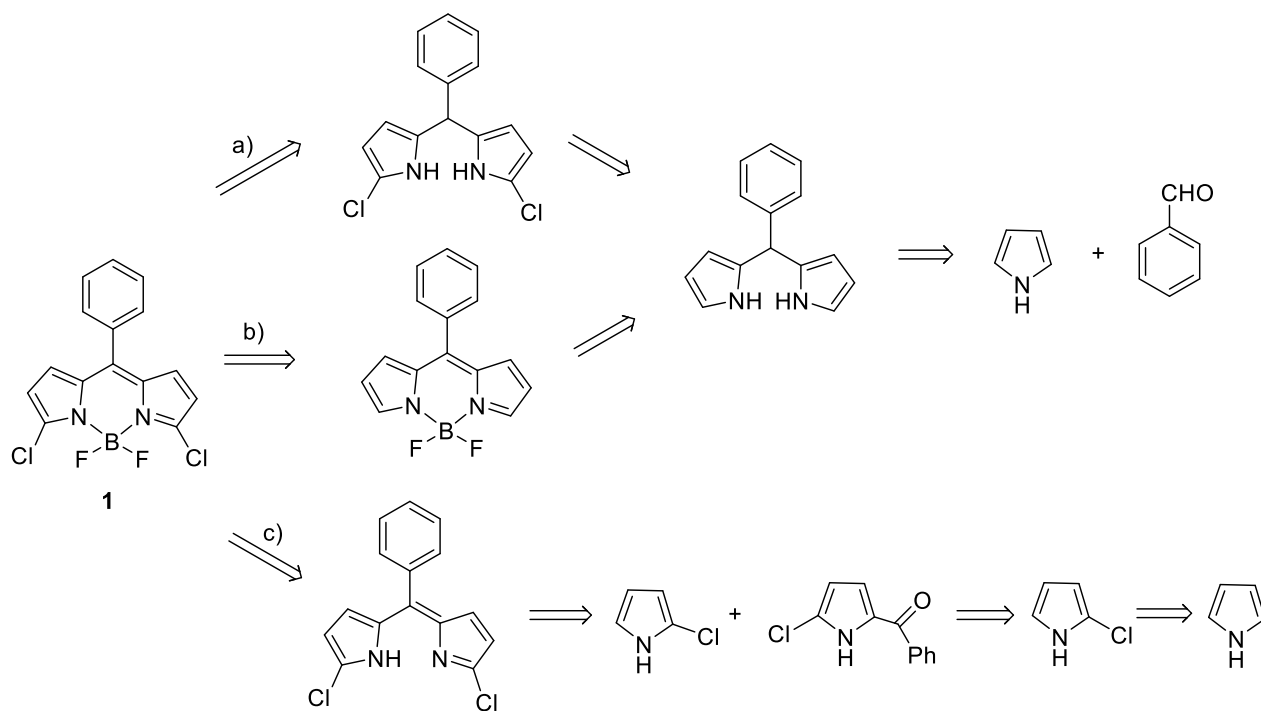
BODIPY spojevi služe kao fluorescentni indikatori koji se koriste u svrhu određivanja prisutnosti ili koncentracije određenog spoja ili iona u otopini. U zadnjih 30 godina, BODIPY spojevi su postali svojevrsna inovacija u istraživanju fluorescentnih indikatora zahvaljujući svojoj sposobnosti apsorpcije i emisije svjetlosti u vidljivom području spektra. Koriste se prvenstveno u biokemiji i molekularnoj biologiji za označavanje proteina, DNA i biomolekula te u svrhu pripreme fluorescentnih indikatora za određivanje pH, metalnih iona, redoks potencijala, koncentracije određenih aktivnih vrsta itd.¹⁴ BODIPY jezgra vrlo je podložna modifikacijama koje utječu na fizikalna i kemijska svojstva ovakve vrste indikatora, primjerice na promjenu optičkih svojstava.

Cilj našeg rada bio je korištenje pirola kao polaznog spoja u svrhu sinteze 3,5-diklor-4,4-difluor-4-bor-3a,4a-diaza-s-indacena (**1**) odnosno prekursora fluorescentnog indikatora. Navedeni ciljni spoj će poslužiti kao prekursor za daljnje reakcije nukleofilne aromatske supstitucije ili u reakcijama križnog spajanja (*cross-coupling*) uz metalni katalizator.¹⁵



3.2. BODIPY spojevi

Razmatrajući strukturu ciljnog spoja **1**, koji je 3,5-disupstituirani BODIPY spoj, retrosintetski smo promišljali načine njegove pripreve. Na shemi 17 prikazan je spoj **1** i različiti putevi njegove retrosinteze.

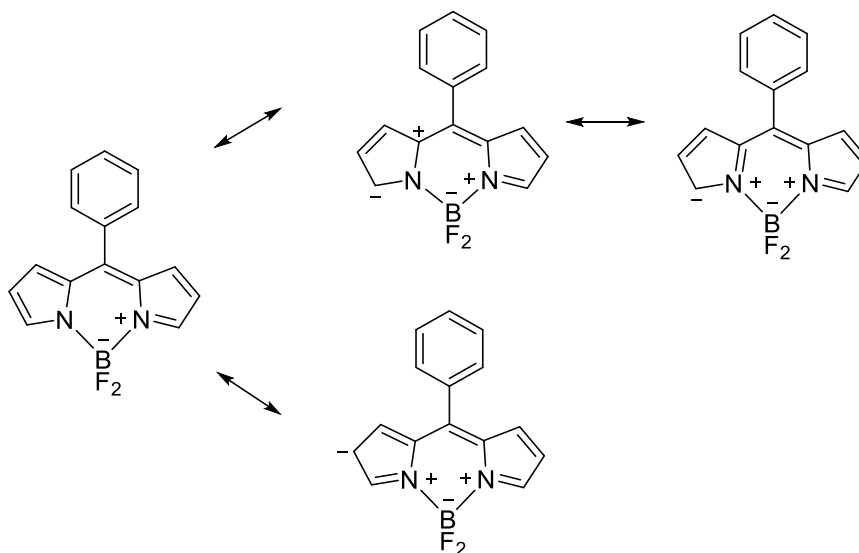


Shema 17.

Put a), koji su otkrili Boens i suradnici¹⁶, zasniva se na Lindseyevoj sintezi dipirometana koji se potom halogenira pomoću *N*-klorosukcinimida (nadalje *NCS*). Dipirometani su u suštini 2-alkilpiroli pa za njih vrijedi mehanizam elektrofilne aromatske supstitucije pirola prikazan na shemi 7. α -elektrofilna supstitucija ima dominantan utjecaj, no uz to alkilni supstituent na pirolu je *o,p*-usmjerivač te dodatno potiče supstituciju na položajima C-1 i C-9. Prema tome, halogeniranje dipirometana će se provoditi u α -položaju. Halogenirani dipirometani se potom oksidiraju s 2,3-diklor-5,6-diciano-1,4-beznokinonom u dihalogenirani dipirometen i kompleksiraju s BF_3OEt_2 te nastaje spoj **1**.

Pri kloriranju dipirometana kod puta a) važno je naglasiti da se reakcija odvija odmah nakon dobivanja dipirometana jer će u protivnom doći do njegove oksidacije u dipirometen što će rezultirati neželjenim 2,6-disupstituiranim BODIPY spojem. Naime, selektivnost u reakciji halogeniranja diprometena je slična onoj kod BODIPY sustava. BODIPY je zbog rezonancijske stabilnosti, podložan elektrofilnoj aromatskoj supstituciji koja se odvija regioselektivno na β -

položajima (odnosno C-2 i C-6) što se vidi iz rezonancijskih struktura prikazanih na shemi 18 i činjenice da BF₂ skupina induktivnim efektom smanjuje elektronsku gustoću na alfa položaju više nego na beta položaju. Postoji mogućnost supstitucije na α-položajima ili na položajima 1 i 7, ali je prethodno potrebno supstituirati β-položaje. Time bi vjerojatnost supstitucije prema položajima bila 2,6 > 3,5 > 1,7.¹⁷ Mehanizam prikazan na shemi 18 vrijedi i za dipirometen.



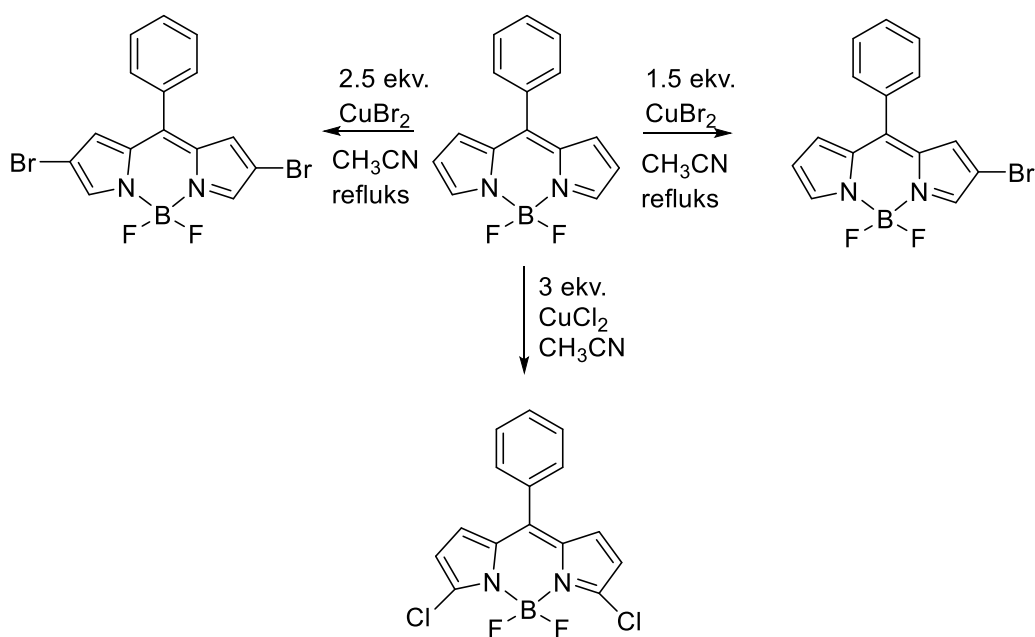
Shema 18.

Prema teorijskim pretpostavkama vidljivim na shemi 18, halogeniranje BODIPY-a se odvija na β-položajima te je izravna supstitucija na α-položajima malo vjerojatna. Međutim, Zhou i suradnici¹⁸ otkrili su da je moguća regioselektivna elektrofilna aromatska supstitucija *meso*-supstituiranog BODIPY-a na položaje 3- i 5- uz korištenje bakrovog klorida. Ovaj put sinteze je na shemi 17 označen s b). Željeni BODIPY spoj se priprema kiselo kataliziranom kondenzacijom pirola i benzaldehida te se dobiveni dipirometan oksidira u dipirometen i kompleksira. Potom dolazi do halogeniranja BODIPY spoja s 3 molarna ekvivalenta CuCl₂·2H₂O u CH₃CN te nastaje spoj **1**.

Zhouova istraživanja¹⁸ su pokazala da dodatkom 1 molarnog ekvivalenta CuCl₂·2H₂O u CH₃CN nastaje mono halogenirani derivat, a povećanjem količine bakrovog klorida na 3 molarna ekvivalenta nakon 6 sati nastaje spoj **1** uz vrlo dobro iskorištenje od 66 %. Povećanjem količine reagensa nije primijećeno stvaranje BODIPY spoja koji sadrži više od 2 supstituirana atoma klora.

Zanimljivo je napomenuti da je Zhou istražio i mogućnost regioselektivnog bromiranja pomoću bakrovog (II) bromida. Reakcijom *meso*-supstituiranog BODIPY spoja i 1,5 molarnog ekvivalenta CuBr₂ u acetonitrilu uz zagrijavanje nastao je monobromirani BODIPY spoj na

položaju 2, a povećanjem količine CuBr_2 na 2,5 mol. ekv. dobiven je 2,6-dibrom supstituirani BODIPY čije iskorištenje iznosi 78 %.

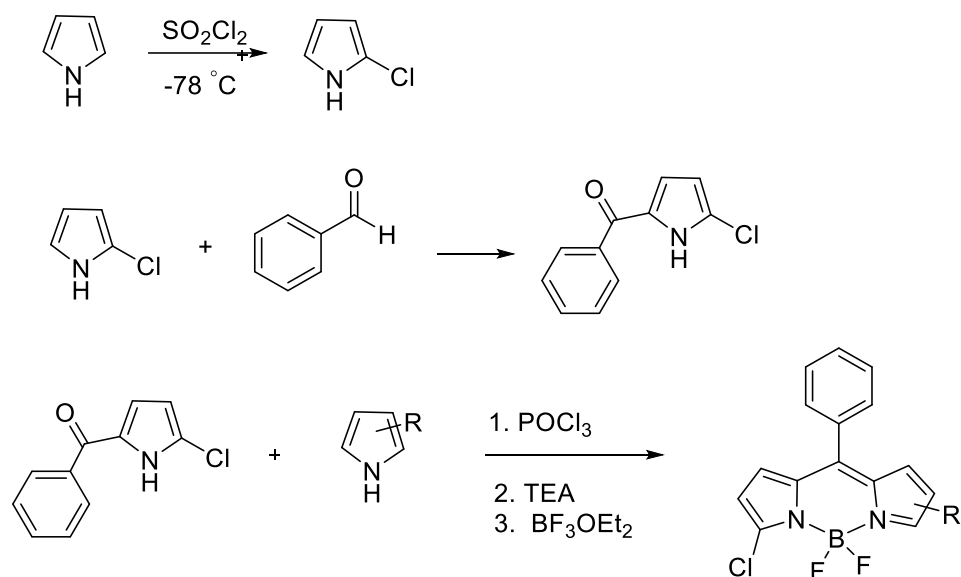


Shema 19.

Razlika u regioselektivnost reakcija kloriranja i bromiranja BODIPY-a koja je vidljiva na shemi 19, može se pripisati različitim reakcijskim mehanizmima. Bromiranje s CuBr_2 se postiže reakcijom s Br_2 koji nastaje aerobnom oksidacijom bromidnog iona iz CuBr_2 uz bakar kao katalizator. Indikator nastanka molekularnog broma je crvena boja koja je primijećena u reakcijskoj smjesi. Brom potom reagira kao elektrofil i daje β -supstituirani spoj. Raspad CuCl_2 na CuCl i molekularni klor nije uobičajen za razliku od njegovog bromidnog analoga. Stoga je nastanak reagensa pogodnog u β -položaju ovdje malo vjerojatan te autori predlažu mehanizam nastanka željenog 3,5-disupstituiranog produkta preko radikal-kationskog intermedijera.¹⁸

Konačno, put c) na shemi 17 koji su otkrili Leen i suradnici¹⁹ je literaturno istražen isključivo za derivate monohalogeniranih BODIPY spojeva. U cilju da se izbjegne rizično halogeniranje dipirometana, provodi se kloriranje pirola pomoću sulfuril-klorida što je iznimno regioselektivna reakcija na α -položaju kao što je objašnjeno u prethodnim poglavljima. Pri kontroliranim uvjetima i temperaturi -78°C nastaje 2-klorpirol. S obzirom da je 2-klorpirol reaktivan spoj, neposredno nakon njegove sinteze provodi se aciliranje pirola koje je također vrlo α -regioselektivno te nastaje 2-benzoil-5-klorpirol (shema 20). Nadalje, prema navodima iz literature¹⁹, dobiveni acil pirol reagira s raznim derivatima pirola uz dodatak 1 ekvivalenta POCl_3 i daje dipirometane koji se *in situ* prevode u BODIPY spojeve kompleksiranjem s BF_3OEt_2 uz bazu. Budući da su autori navedeni sintetski put koristili za pripravu monohalogeniranih derivata

BODIPY, ostaje pitanje da li bi navedena retrosinteza funkcionirala za dobivanje dihaloderivata. Zato smo retrosintetski put c) promatrali samo kao teorijski put sinteze spoja **1**, dok bi za dobivanje 3-supstituiranog halo derivata BODIPY spoja bio primaran.

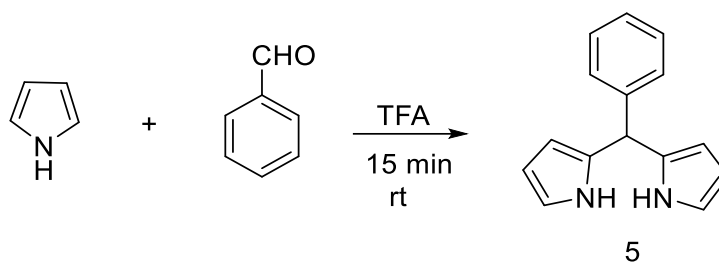


Shema 20.

Nakon razmatranja sva 3 puta retrosinteze u konačnici smo se odlučili za put a) koji je najzastupljeniji u literaturi. Također, napominjemo da se postupak pripreve proveo u dvije serije s malim promjenama u postupku koje ćemo raspraviti u sljedećim poglavljima, a u eksperimentalnom dijelu rada navodimo samo podatke za sintezu s boljim iskorištenjem.

3.2.1. Sinteza i spektroskopska karakterizacija dipirometana

Dipirometani su makrociklički spojevi koji se sastoje od 2 pirolska prstena povezanih metilenskim mostom na položajima 4 i 6. Na položaju 5 najčešće imaju supstituiranu dialkilnu ili arilnu skupinu poput fenilne kao npr. u 5-fenildipirometanu (**5**) (shema 21). Kao što je opisano ranije u Teorijskom pregledu najčešći način njihova dobivanja je Lindseyeva metoda⁸ prikazana na shemi 12. Elektrofonom aromatskom supstitucijom pirola i benzaldehida pri sobnoj temperaturi uz prisutnost trifluoroctene kiseline kao kiselog katalizatora dolazi do kondenzacije u dipirometan. Nedostatak ove reakcije jest u koncentracijama reaktanata jer ako su molarne količine pirola i aldehida jednake, doći će do kondenzacije u oligomere i cikličke porfirinogene. Stoga, kako su otkrili Lindsey i suradnici⁸, da bi se spriječilo stvaranje nusprodukata, reakcija se provodi uz suvišak pirola.



Shema 21.

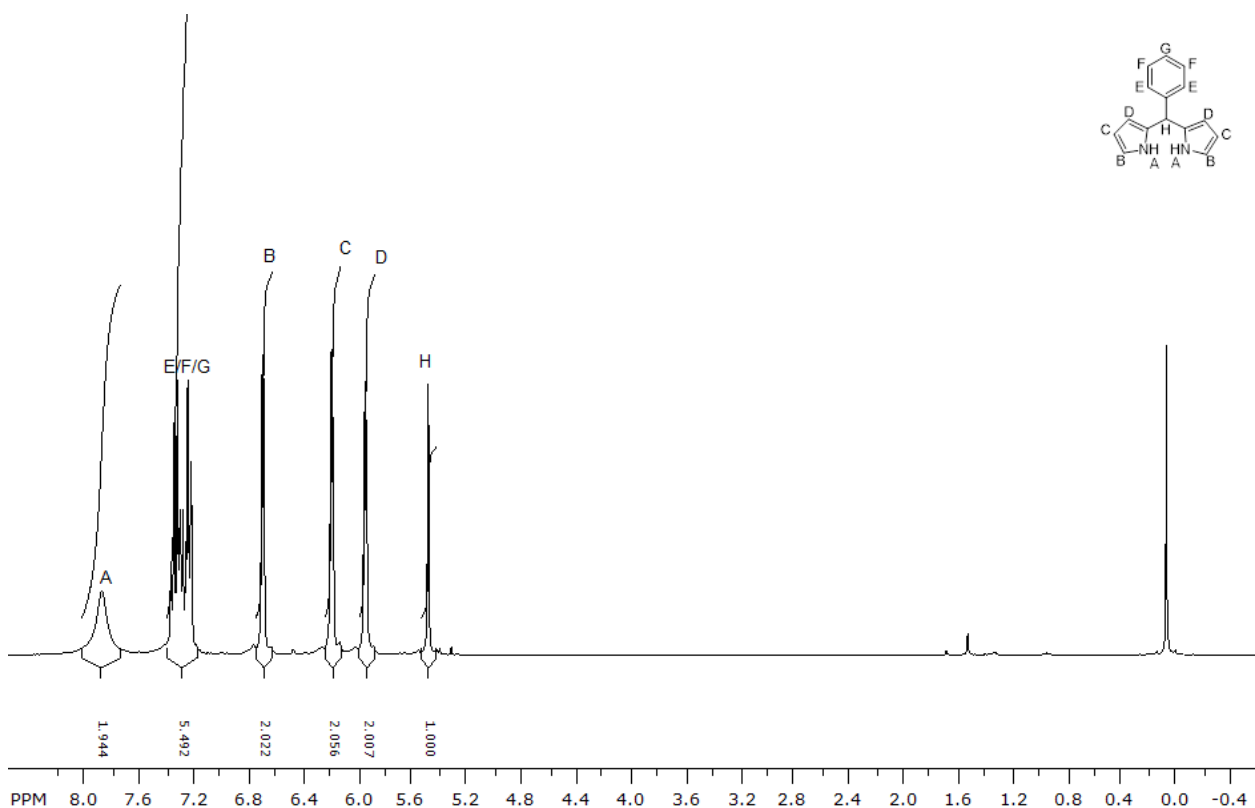
U svrhu proučavanja utjecaja omjera suviška pirola s aldehidom na iskorištenje reakcije proveli smo reakciju s 2 različita omjera reaktanata. Prva reakcijska smjesa se sastojala od benzaldehida i pirola u omjeru 1:22,5, dok su u drugoj smjesi bili u omjeru 1:45, količina TFA u oba slučaja je ekvivalentna.

Spoj **5** je sklon oksidaciji i osjetljiv na svjetlost pa se reakcija provodi bez prisutnosti kisika i zaklonjena od svjetla. Mehanizam prikazan u Teorijskom pregledu na shemi 13 vrijedi i za ovu reakciju. Pri kiselo kataliziranim uvjetima uz TFA omogućeno je protoniranje benzaldehida te se tako stvara parcijalno pozitivan naboj na karbonilnom ugljiku benzaldehida koji se kao elektrofil veže na α -položaj pirola (shema 13).²⁰ Protoniranjem hidroksilne skupine nastaje voda koja je dobra odlazeća skupina i odcijepljuje se od molekule. Dehidratacijom nastaje pozitivan naboj na ugljiku što je dobar elektrofil. Intermedijer se zatim veže na molekulu pirola mehanizmom elektrofilne aromatske supstitucije. U slučaju da se želi zaustaviti reakcija, potrebno je založiti otopinu jer će onemogućiti prvi korak protoniranja hidroksilne skupine.

Višak neizreagiranog pirola se regenerira destilacijom pri sniženom tlaku, a dio aparature (trap/zamka) se hladi da bi se spriječila kondenzacija pirola u vakum pumpu i time kontaminirala aparatura i pumpa. Nakon destilacije pirola, po potrebi se provodi daljnje pročišćavanje reakcijske smjese do potpunog uklanjanja pirola. Dobiveni produkt je krutina žuto-smeđe boje. Iskorištenje reakcije prve šarže iznosi 67% dok je za drugu šaržu 63%. Promjena omjera pirola i benzaldehida neznatno je utjecala na iskorištenje reakcije.

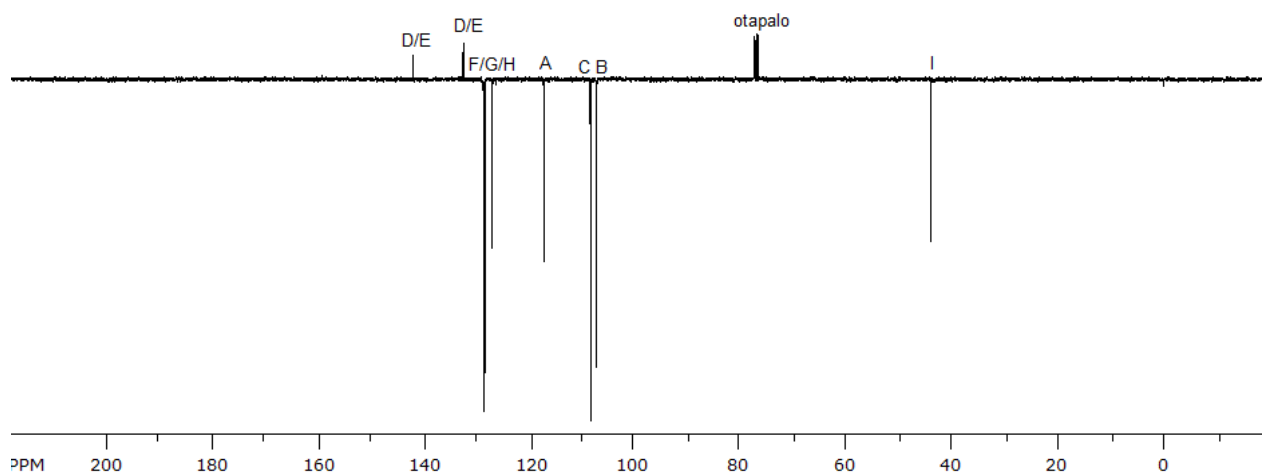
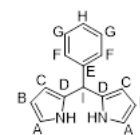
¹H NMR spektar dipirometana **5** prikazan je na slici 5. S obzirom da se radi o simetričnoj molekuli spektar sadrži 8 signala od kojih 3 pripadaju benzenu supstituiranom na *meso*-položaju. Signali benzenske jezgre se ne mogu točno asignirati već znamo da se radi o multipletu između 7,2 i 7,4 ppm. Široki singlet na 7,89 ppm karakterističan je za dva protona vezana na dušik označena s A. Protoni vezani na ugljike pirolske jezgre označeni su s B, D i C te se nalaze između 5,80 i 6,80 ppm. Multiplet na 6,70 ppm odgovara protonima označenim s B jer se oni nalaze najbliže heteroatomu dušika koji izaziva induktivni efekt. Signal na 5,91 ppm je multiplet stoga pripada protonima označenim s C s obzirom da se oni sprežu s protonima B i D. Signal za protone

označene s D je multiplet na 6,15 ppm. Konačno, na 5,47 ppm nalazi se singlet karakterističan za dipirometane koji označava proton metilenskog mosta.



Slika 5. ^1H NMR spektar spoja **5**

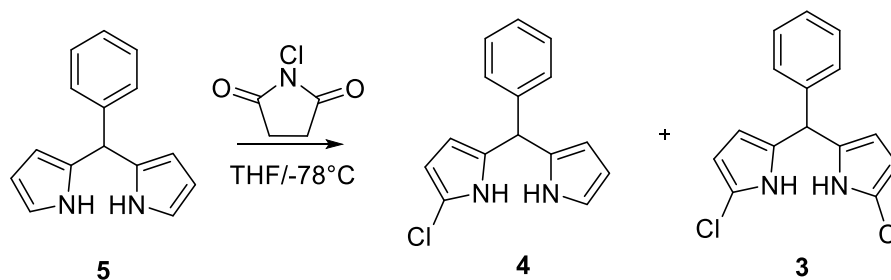
Na slici 6 prikazan je ^{13}C *attached proton test* (APT) spektar dipirometana **5**. Ponovno, budući da je molekula simetrična prisutno je 9 signala od kojih 2 pripadaju kvarternim ugljicima, a 7 signala CH skupinama. Kvaterni ugljici su prepoznatljivi u ovoj vrsti spektra jer su različitog usmjerenja od CH_3 i CH skupina. Prema literaturnim podacima²¹ nalaze se na 133,2 ppm i 142,7 ppm što je i vidljivo s obzirom da su uz signal otapala 2 signala koja su usmjerena suprotno od ostalih. Međutim, bez 2D NMR spektra koji bi omogućio potpunu asignaciju spektra, ne možemo odrediti koji signal je karakterističan za pojedini ugljik već samo možemo pretpostaviti da će kvaterni ugljik pirolskog prstena biti odsjenjeniji od benzenskog zbog induktivnog efekta. Između 126 i 131 ppm prisutna su 3 signala ugljika benzenskog prstena. U području između 107 i 118 ppm nalaze se pirolski ugljici na koje je vezan proton. Zbog induktivnog efekta dušika na 117,8 ppm nalazi se ugljik na α -položaju koji na sebe ima vezan proton te je označen s A. Signal na 109,3 ppm vjerojatno pripada ugljiku označenom s C te slijedi ugljik označen s B na 107,9 ppm. Na 44,6 ppm nalazi se signal koji je karakterističan za *meso*-ugljik dipirometana.



Slika 6. ^{13}C APT spektar spoja **5**

3.2.2. Halogeniranje dipirometana

Halogeniranjem spoja **5** NCS-om dobivaju se 5-fenil-1-klordipirometan (**4**) i 5-fenil-1,1'-diklordipirometan (**3**).



Shema 22.

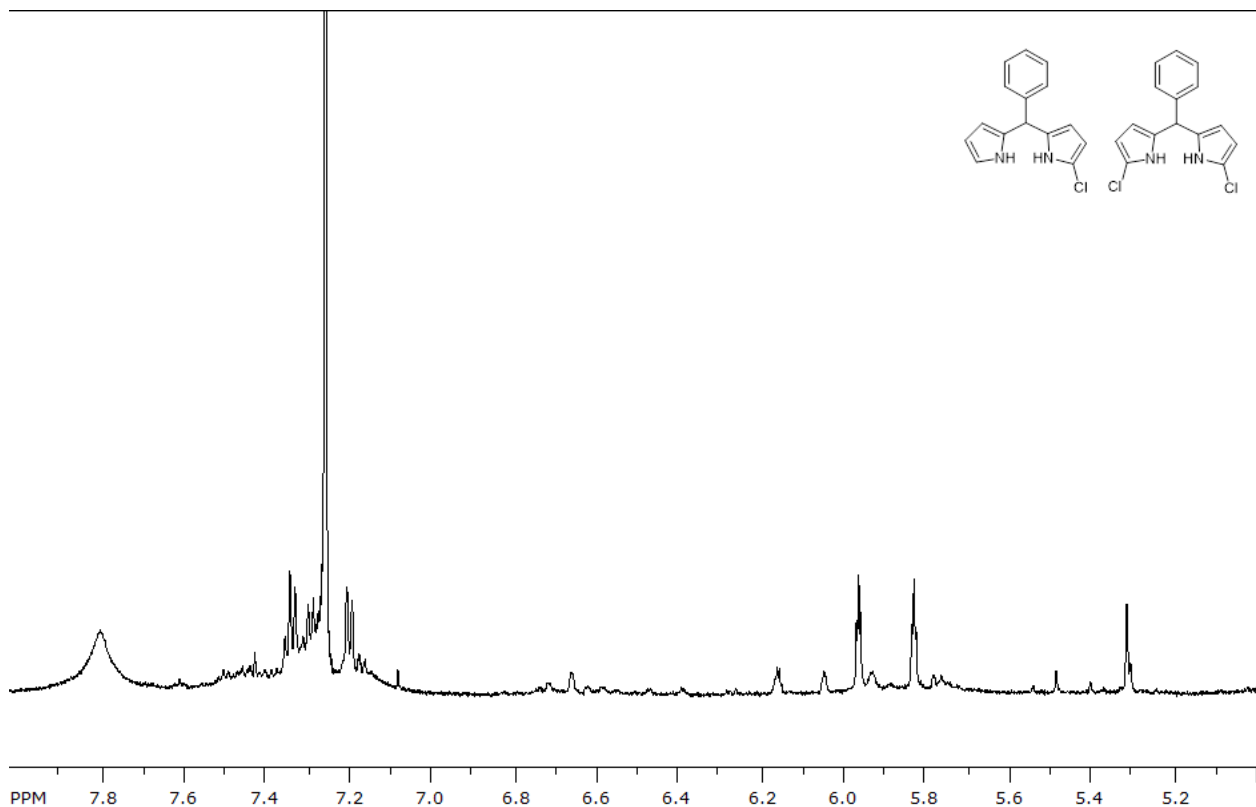
Zbog sličnosti kemije pirola i dipirometanskih spojeva, reakcija elektrofilne aromatske supstitucije spoja **5** je analogna onoj ranije prikazanoj na shemi 7. Jedina razlika između ova dva mehanizma jest da je u ovom slučaju jedan α -položaj na oba pirola zauzet pa se supstitucija klora odvija na položajima 1 i 9 dipirometana.

Funkcionalizacija dipirometana u α -položaju služi kao indirektna metoda dobivanja 3,5-disupstituiranog BODIPY spoja kao što je prethodno obrazloženo. Ovaj stupanj sinteze se također provodi u uvjetima bez vlage i kisika pa je zato nužno THF prethodno sušiti na natriju te raditi u atmosferi dušika. U protivnom, doći će do oksidacije dipirometana u dipirometen koji će reagirati s NCS-om u β -položaju kao što bi u konačnici reagirala i BODIPY jezgra. Klorirani dipirometen bi također iziskivao kompleksan postupak obrade što bi u konačnici moglo rezultirati još manjim iskorištenjem reakcije.

Bitan faktor predstavlja i temperatura reakcije koja zbog opasnosti nekontroliranog halogeniranja mora biti ispod 0 °C. Dodatno, s ciljem da provjerimo mijenja li se omjer dobivenih spojeva **4** i **3** ovisno o temperaturi odvijanja reakcije, koristili smo ledene kupelji napravljene od suhog leda i dietil-etera koja snizuje temperaturu na ~ -100 °C ili smjesom tekućeg zraka i etil-acetata koja snizuje temperaturu na -78 °C. NCS se postepeno dodaje u reakcijsku smjesu pazeći da pritom ne dođe do preburne reakcije. Sirove reakcijske smjese iz obje reakcije su pročišćene kromatografijom na stupcu silikagela bez prethodnog uparavanja zbog rizika od gubitka konačnih spojeva (brza filtracija). Iz obje reakcije izolirano je ljubičasto-crno ulje za koje se na osnovu ^1H NMR spektara zaključilo da je nastala smjesa dva produkta kao što se može vidjeti iz aromatskog dijela spektra prikazanog na slici 7. Izvođenje reakcija pri različitim temperaturama dalo je drugačije omjere spoja **3** i **4**. Tako je iz reakcije halogeniranja koja se odvijala pri -100 °C u smjesi vidljiv podjednak omjer spojeva **3** i **4**, dok je iz reakcije halogeniranja koja se odvijala pri -78 °C primijećeno da je spoja **3** znatno više (slika 7). Navedeno je u skladu s razmišljanjima da će reakcija halogeniranja, ukoliko je temperatura viša, ići u smjeru nastanka disupstituiranog spoja.

S obzirom na veliki udio nečistoća u smjesi i velikog zaostatka NCS-a, nije bilo moguće u potpunosti analizirati ^1H NMR spektar na slici 7, a udio produkata u smjesi procijenjen je na ~ 10 %. Iz signala karakterističnih za pirolske protone spojeva **3** i **4** te usporedbom s literaturnim podacima¹⁵ zaključili smo da su spojevi prisutni u smjesi. Očekuje se da oba spoja imaju singlet karakterističan *meso*- protonu na 5,47 ppm te signale protona benzenske jezgre između 7,2 i 7,3 ppm. Razlika u karakterizaciji spojeva **3** i **4** je u signalima protona pirola. Naime, za pirolske protone disupstituiranog dipirometana očekuju se 2 signala zbog simetričnosti ove molekule. Odsjenjeniji će biti proton koji je bliži susptituiranom atomu klora zbog induktivnog efekta. U slučaju monosupstituiranog dipirometana može se predvidjeti 5 različitih signala od kojih je najodsjenjeniji onaj najbliži atomu klora što je također posljedica induktivnog efekta. Signali za protone nesupstituiranog pirolskog prstena nalaze se u području između 5,9 i 6,8 ppm. Signali za protone pirolskog prstena koji je supstituiran klorom vjerojatno prate signale pirolskih protona

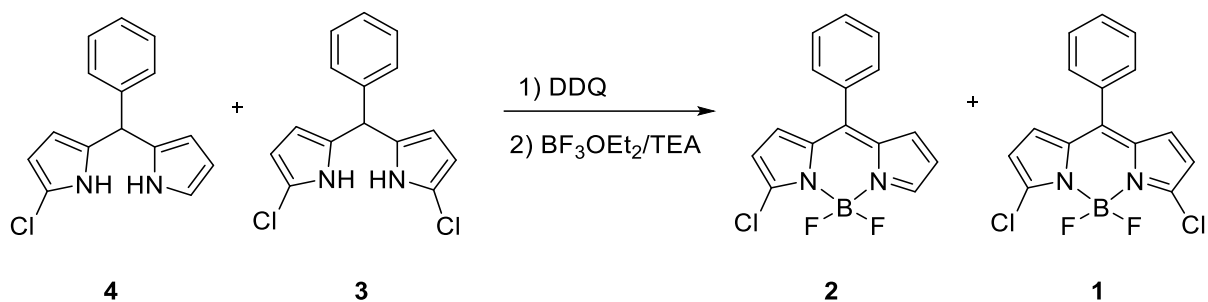
disupstituiranog dipirometana, no to ne može biti utvrđeno bez izolacije i snimanja spektra za oba spoja. Nadalje, u idućem koraku sinteze koristili smo smjesu produkata zbog lakšeg i učinkovitijeg pročišćavanja BODIPY spojeva u odnosu na nestabilne klorirane dipirometane.



Slika 7. ¹H NMR spektar spoja **3** i **4**

3.2.3. Sinteza i spektroskopska karakterizacija spoja **1**

Zadnja dva reakcijska koraka su oksidacija spojeva **3** i **4** pomoću DDQ-a u dipirometene koji se bez izolacije i pročišćavanja odmah kompleksiraju s BF₃OEt₂ u suvišku trietil-amina te bi trebali nastati BODIPY spojevi **1** i **2**. Reakcija se izvodi bez prisustva vlage i kisika zbog prethodno navedenih razloga pa tako ponovno koristimo sušena otapala te atmosferu dušika.



Shema 23.

Ponovno, reakcija je provedena u dvije šarže te su obje reakcijske smjese obrađene i pročišćene kromatografijom.

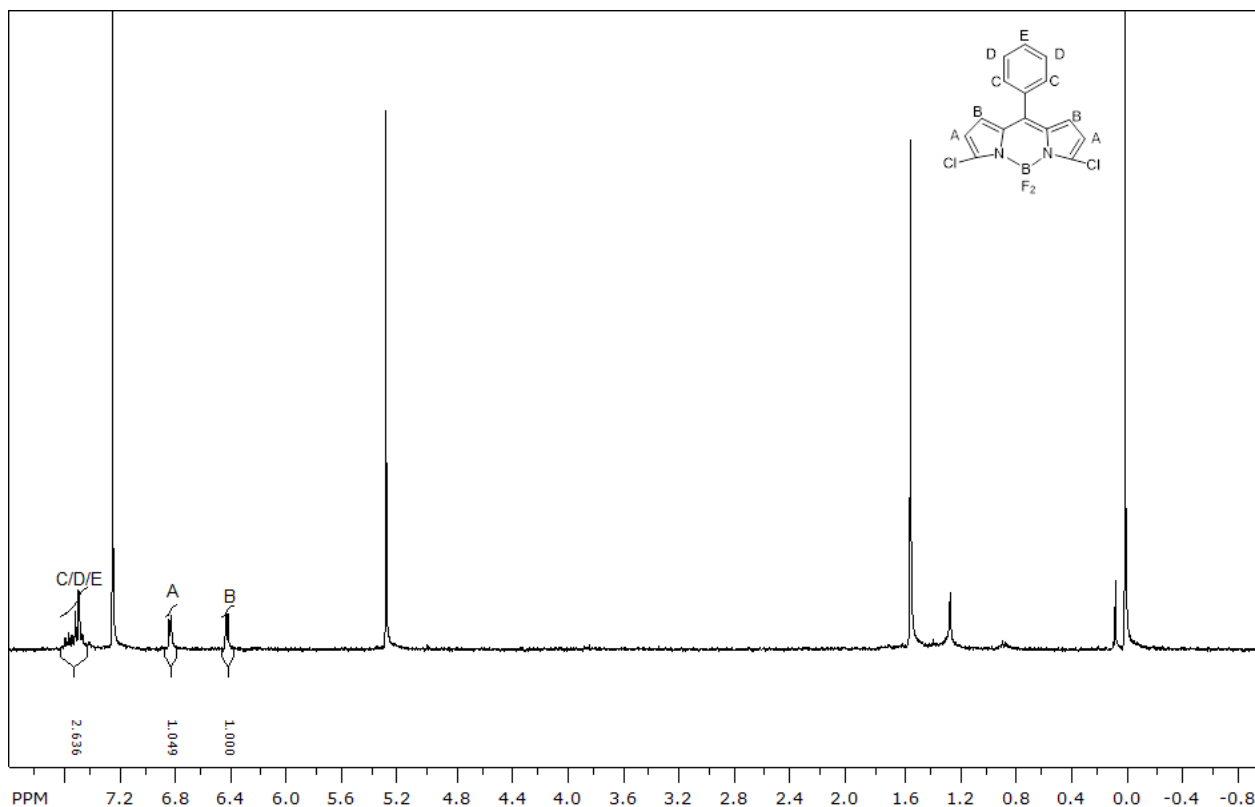
Prilikom obrade prve reakcijske smjese došlo je do otežanog odjeljivanja vodenog i organskog sloja što je utjecalo na veliko smanjenje iskorištenja reakcije. Provjerom čistoće smjese pomoću ¹H NMR spektra uočeno je da su prisutne veće količine neizreagiranog BF₃OEt₂ stoga je provedena rekromatografija smjese metodom suhog pakiranja.

Čistoća produkata ponovno je provjerena ¹H NMR spektroskopijom te je uočeno da je u njima prisutna mala količina spojeva **1** i **2**, pri čemu je udio spoja **2** na granici detekcije ¹H NMR -om. Iz spektra je vidljivo da su u smjesi sa spojem **1** prisutni setovi signala koji odgovaraju dvama novim spojevima koji su ostali neidentificirani. Analitički čist spoj **1** dobiven je preparativnom kromatografijom na TLC silikagel ploči i njegov ¹H NMR spektar je prikazan na slici 8.

Nakon završetka sinteze očekivana je smjesa spojeva **1** i **2** gdje bi se za spoj **1** u ¹H NMR spektru prikazali signali u aromatskom području za benzensku jezgru (između 7 i 8 ppm) te 2 karakteristična signala pirolskih protona između 6 i 7 ppm zbog simetričnosti strukture. Za razliku od spoja **1**, za spoj **2** se očekivalo 5 signala između 6 i 7 ppm koja pripadaju protonima pirola zbog asimetrične strukture molekule. 3 signala pripadaju pirolskoj jezgri koja je nesupstituirana u α-položaju, a 2 su pripisana pirolskoj jezgri na koju je vezan atom klora. Isto tako, očekuju se signali između 7 i 8 ppm koji odgovaraju benzenu.

Analizom spektra analitički čistog spoja, primjećuju se samo 2 signala u području 6-7 ppm te se po tome zaključuje da je dobiven isključivo spoj **1**. Oba signala su dubleti od kojih su protoni označeni s A nalaze na 6,85 ppm, a oni s B na 6,44 ppm. Razlog ovakve procjene je zbog činjenice da se A protoni nalaze bliže atomu klora koji uzrokuje blago odsjenjenje zbog induktivnog efekta. Dodatna potvrda da se radi o protonima A i B je konstanta sprege koja za oba signala iznosi 4,3 Hz što potvrđuje da su protoni u interakciji. Integriranjem signala potvrđena je simetričnost molekule jer integrali signala A i B oboje iznose 2 što znači da protonima na

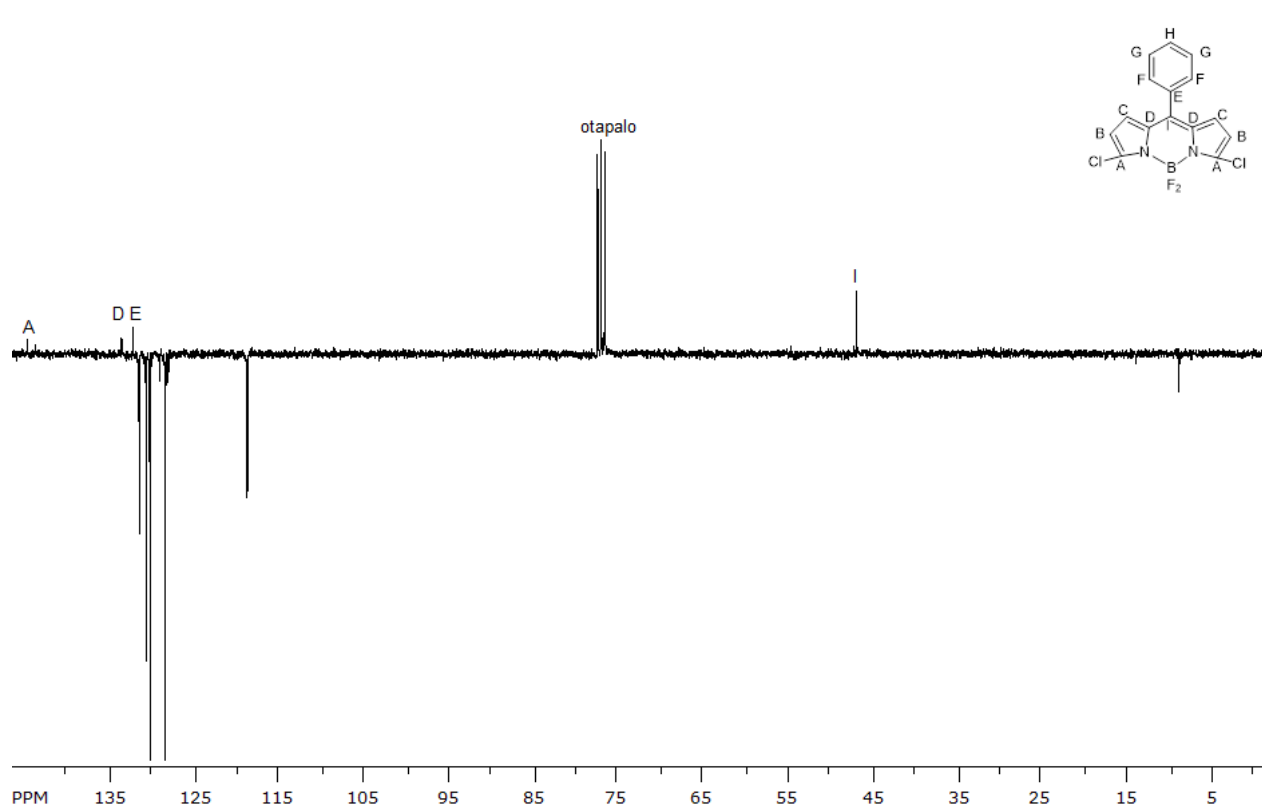
položaju 2 i 6 možemo pripisati isti signal te isto vrijedi za protone na položajima 1 i 7. Također je prisutan multiplet čiji integral iznosi 5, a nalazi se između 7,46 i 7,60 ppm što odgovara protonima benzenske jezgre. Primijećen je signal jakog intenziteta na 5,29 ppm koji odgovara DCM-u što je posljedica njegova zaostatka nakon uparavanja otapala iz ekstrakcije. Također je vidljiv signal na 7,26 ppm koji pripada deuterio otapalu te na 1,5 ppm koji pripada vodi.



Slika 8. ^1H NMR spektar spoj **1**

Na slici 9 prikazan je ^{13}C *attached proton test* (APT) spektar spoja **1**. Usporedbom spektra s literaturnim podacima¹⁸ očekuje se sveukupno 9 signala u spektru usprkos tome šta cjelokupna molekula sadrži 15 atoma ugljika. To je posljedica simetričnosti molekule. Od 9 signala njih 4 pripadaju kvaternim ugljicima što se u ovoj vrsti spektra raspoznaje po suprotnoj orijentaciji signala kvaternog ugljika u odnosu na CH_3 i CH skupinu. Signali ugljika benzenskog i pirolskog prstena koji na sebi imaju proton nalaze se između 132,1 i 119 ppm. Ne može se sa sigurnošću pripisati signal pojedinom ugljiku u tom području, već je za detaljniju asignaciju potrebna analiza 2D spektra. Na 145,4 ppm nalazi se signal atoma ugljika A zbog induktivnog efekta koji je posljedica supstituiranog atoma klora, veze s atomom dušika te BF_2 skupine. Signali kvaternih ugljika na 134,2 i 132,5 ppm odgovaraju atomima ugljika označenim s D i E ali se ne može sa sigurnošću odrediti koji signal pripada kojem atomu ugljika te je za detaljniju asignaciju, kao što

je i prethodno napomenuto, potrebno analizirati 2D spektar. Konačno signal ugljika označenog s I nalazi se na 45 ppm.



Slika 9. ^{13}C APT spektar spoja 1

4. Eksperimentalni dio

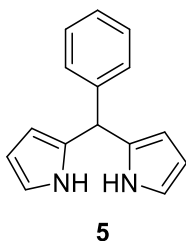
4.1. Opće napomene

Za identifikaciju sintetiziranih spojeva u okviru ovog završnog rada i određivanje njihove čistoće korištene su spektroskopske metode: nuklearna magnetska rezonancija (^1H , ^{13}C , ^{13}C APT). Spektri ^1H i ^{13}C NMR snimljeni su na instrumentima Bruker AV-600 i AV-300 spektrometru, koji rade na frekvenciji od 600 MHz i 300 MHz za ^1H jezgre i frekvenciji od 150 MHz i 75 MHz za ^{13}C jezgre na Institutu Ruđer Bošković. NMR spektri snimani su u CDCl_3 kao otapalu, koristeći tetrametilsilan kao unutarnji standard.

Kromatografska odjeljivanja provedena su na kolonama punjenim silikagelom (Merck 63-200 μm) uz odgovarajući sustav otapala.

Korištena su kupovna otapala ili pročišćena dvostrukom destilacijom. U nekim koracima korištena su otapala sušena iznad molekulskih sita i granula KOH. Piro1, benzaldehid, trietilamin i borov trifluorid dietil eterat su kupovne kemikalije.

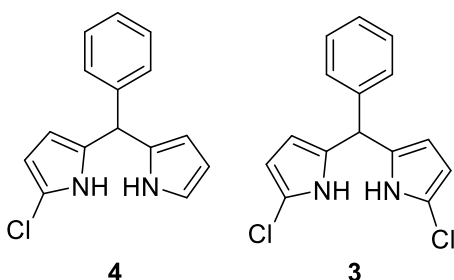
4.2. Priprava 5-fenildipirometana (5)



5-fenildipirometan: 67,4%, uljasta tekućina žuto-smeđe boje, ^1H NMR (CDCl_3) δ /ppm 7,92 (br s, 2H), 7,21-7,33 (m, 5H), 6,69-6,73 (m, 2H), 6,15-6,18 (m, 2H), 5,92 (s, 2H), 5,48 (s, 1H); ^{13}C NMR (CDCl_3) δ /ppm 142,7, 133,2, 129,3, 128,9, 127,6, 117,8, 109,3, 107,9, 44,6²¹

U suhoj dvogroj tikvici pod atmosferom dušika i omotanoj tamnom folijom pomiješaju se benzaldehid (2 mL, 0,02 mol) i pirol (30 g, 0,45 mol) pomoću magnetske miješalice oko 5 minuta pri sobnoj temperaturi. Potom se u obrocima dodaje TFA (0,15 mL, 2,0 mmol) te se reakcijska smjesa potom miješa još sat vremena. Reakcija se zaustavlja dodatkom vodene otopine NaOH (25 mL, 0,1 M NaOH) te se otopina ekstrahira s diklormetanom (3 × 25 mL). Skupljeni organski ekstrakti suše se iznad MgSO_4 , filtriraju i upare. Većina neizreagiranog pirola regenerira se destilacijom pri sniženom tlaku u aparaturi po Hickmannu. Uljasti ostatak pročisti se kromatografijom na stupcu silikagela uz DCM kao eluens čime je dobiveno 3 g spoja **4** iz početne smjese (67,4%).

4.3. Sinteza 1-kloro-5-fenildipirometana (4) i 1,1'-dikloro-5-fenildipirometana (3)



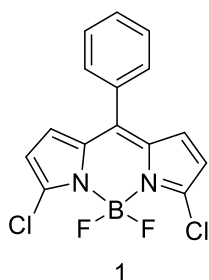
Spoj **5** (1,5 g iz smjese (a), 0,007 mol) otopi se u suhom THF-u (25 mL, svježe destiliran, sušen na Na), pod atmosferom dušika te se smjesa ohladi na $-78\text{ }^\circ\text{C}$ na ledenoj kupelji (tekući zrak i etil-acetat). U ohlađenu smjesu se zatim pomoću lijevka za dokapavanje dodaje *N*-klorosukcinimid (1,8 g, 0,013 mol) otopljen u suhom tetrahidrofuranu (25 mL). Nakon 4 sata miješanja na ledenoj kupelji reakcijska smjesa se stavi u hladnjak preko noći.

Sljedeći dan se reakcijska smjesa pročisti kromatografijom na stupcu silikagela uz

DCM/heksan (1:1) kao eluens. Pritom se sirova reakcijska smjesa nanosi na kolonu bez prethodnog uparavanja. Kromatografijom se izoliralo 2,75 g viskozne smjese ljubičasto-crne boje s ukupnim udjelom spoja (3) i (4) od otprilike 10%.

Analizom ^1H NMR spektara utvrđeno je da je većinski dobiven diklorirani spoj (3), dok monokloriranog (4) ima u tragovima. Također, primijećeni su signali onečišćenja i polimernih materijala u ^1H NMR spektru te je utvrđeno da je udio spojeva u odnosu na prisutne nečistoće vrlo malen.

4.4 Sinteza 3,5-diklor-4,4-difluor-4-bor-3a,4a-diaza-s-indacena (1)



3,5-diklor-4,4-difluor-4-bor-3a,4a-diaza-s-indacen: 1%, narančasti kristali; ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ /ppm: 7,64 – 7,44 (m, 5H), 6,85 (d, $J = 4.3$ Hz, 2H), 6,44 (d, $J = 4.3$ Hz, 2H); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ /ppm 145,4, 144,4, 134,2, 132,8, 132,1, 131,3, 130,8, 129,0, 119,3.¹⁸

Smjesa spojeva 3 i 4 (2,75 g smjese, udio spojeva ~10 %) otopljena je u suhom toluenu (40 mL) te je u reakcijsku smjesu dodan DDQ (2,14 g, 9,4 mmol). Smjesa je miješana uz refluks pod atmosferom dušika jedan sat. Nakon toga, je profiltrirana te ugušćena uparavanjem otapala na rotacionom uparivaču.

Uparena reakcijska smjesa otopi se u toluenu (~25 mL) te se u obrocima doda TEA (13,2 mL, 0,094 mol) pod atmosferom dušika. Nakon kratkog miješanja u reakcijsku smjesu se u obrocima doda BF_3OEt_2 (11,65 mL, 0,094 mol) pomoću štrcaljke te se miješa preko noći pri 70 °C.

Sljedeći dan se u reakcijsku smjesu doda vodena otopina NaOH (30 mL, 1 M), odijeljeni su vodeni i organski sloj. Vodeni sloj ekstrahira s DCM-om (2×20 mL) i kasnije etil-acetatom (2×20 mL). Zbog stvaranje emulzije i neuspješnog razdvajanja slojeva kasnije je dodan i NaCl. Skupljeni organski ekstrakti su osušeni iznad bezvodnog MgSO_4 koji je potom profiltriran, a otapalo je uklonjeno uparavanjem na rotacionom uparivaču. Ostatak je pročišćen kromatografijom na stupcu silikagelu silikagela uz DCM kao eluens.

Nakon 2 neuspjele rekromatografije uz pomoć analize NMR spektara utvrđeno je

postojanje spoja **1** i **2** u tragovima u pojedinim pročišćenim frakcijama, no još uvijek je prisutna značajna količina nečistoća u odnosu na produkte. Sukladno tome, analitički čist uzorak spoja **1** dobiven je pročišćavanjem na preparativnoj TLC ploči (2 mm) uz 20% heksana u DCM kao eluensom. U konačnici je dobiven samo čisti spoj **1** (1 %) što je i potvrđeno ^1H i ^{13}C NMR spektroskopskom analizom.

5. Zaključak

U ovom završnom radu proveden je niz reakcija u svrhu sinteze prekursora fluorescentnih indikatora počevši od pirola kao kupovne kemikalije. Kondenzacijom pirola s benzaldehidom uz trifluorocetnu kiselinu kao katalizator, tzv. Lindseyjevom metodom dobiven je 5-fenildipirometan (**5**) u vrlo dobrom iskorištenju. Provedene su dvije reakcije u kojima su korišteni različiti omjeri pirola i benzaldehida i primijećen je neznatan utjecaj na iskorištenje reakcije. Dobiveni dipirometan je potom reakcijom elektrofilne aromatske supstitucije uz *N*-klorosukcinimid preveden u mono- i diklor-supstituiran dipirometan. Reakcije su provedene pri dvije različite temperature, -78 °C i -100 °C u svrhu promatranja utjecaja temperature reakcije na razdiobu produkata mono- i di- supstitucije dipirometanske jezgre. Utvrđeno je da je pri -78 °C udio disupstituiranog dipirometana zamjetno veći dok je pri -100°C omjer dobivenog mono- i di-kloriranog dipirometana podjednak.

Dipirometani 1,1'-diklor-5-fenildipirometana (**3**) i 1-klor-5-fenildipirometana (**4**) su potom bez izolacije prevedeni u odgovarajuće dipirometene uz 2,3-diklor-5,6-dicijano-1,4-benzokinonon (DDQ), te su *in situ* kompleksiranjem s borovim trifluoridom kao Lewisovom kiselinom prevedeni u BODIPY spojeve. Izolirana je ciljna molekula 3,5-diklor-4,4-difluor-4-bor-3*a*,4*a*-diazas-indacen (**1**). Sve reakcije su provedene u atmosferi dušika uz zaštitu od svjetla, no ipak je primijećen znatan raspad polaznog materijala što je i očekivano za ovakav tip spojeva. Obzirom da je ukupno iskorištenje produkta bilo nisko, alternativna metoda pripreme spojeva 3- i 3,5- haloderivata BODIPY spojeva u budućnosti će biti provedena reakcija halogeniranja uz CuCl₂.

Navedeni 3,5-diklor supstituiran BODIPY spoj će kasnije poslužiti kao prekursor u sintezi novih fluorescentnih indikatora, što će doprinjeti razvoju u području fluorescentnih tehnologija u biologiji i medicini.

6. Literatura

- ¹ J. A. Joule, K. Mills, *Heterocyclic Chemistry*, Fifth Edition, WILEY: A John Wiley & Sons Ltd, **2010**, 295-305
- ² V. Bhardwaj, D. Gumber, V. Abbot, S. Dhimanand, P. Sharmaa, Pyrrole: a resourceful small molecule in key medicinal hetero-aromatics, *RSC Adv.*, **2015**, *20*, 15233-15266
- ³ G. Marino, The direction of the dipole moments of furan, thiophene, and pyrrole: A controversial question, *J. of Heterocycl. Chem.*, **1972**, *9(4)*, 817-819
- ⁴ L. G. Wade, ml., *Organska kemija*, 1.izdanje (hrvatsko), Školska knjiga, Zagreb, **2017**, 732
- ⁵ E. Pretsch, P. Buhlmann, M. Badertscher, *Structure Determination of Organic Compounds Tables of Spectral Data*, Fourth Edition, Springer, Berlin, **2009**, 187
- ⁶ G. Sabouraud, S. Sadki, N. Brodie The mechanisms of pyrrole electropolymerization, *Chem. Soc. Rev.*, **2000**, *29(5)*, 283–293
- ⁷ B. Nascimento, S. Lopes, M. Pineiro, T. Pinho E Melo, Current Advances in the Synthesis of Valuable Dipyrrromethane Scaffolds: Classic and New Methods, *Molecules*, **2019**, *24(23)*, 4348
- ⁸ J. S. Lindsey, C. H. Lee, One-Flask Synthesis of *Meso*-Substituted Dipyrrromethanes and Their Application in the Synthesis of *Trans*-Substituted Porphyrin Building Blocks, *Tetrahedron*, **1994**, *50(39)*, 11427-11440
- ⁹ N. A. M. Pereira, T. M. V. D. Pinho e Melo, Recent Development in the Synthesis of Dipyrrromethanes. A Review, *Org. Prep. Proced. Int.*, **2014**, *46(3)*, 182-213
- ¹⁰ H. M. Gilow, D. E. Burton, Bromination and chlorination of pyrrole and some reactive 1-substituted pyrroles, *J. Org. Chem.*, **1981**, *46(11)*, 2221-2225
- ¹¹ A. Treibs, F. H. Kreuzer, *Justus Liebigs Ann. Chem.*, **1969**, 116–120
- ¹² K. Tram, H. Yan, H.A. Jenkins, S. Vassiliev, D. Bruce, The synthesis and crystal structure of unsubstituted 4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene (BODIPY), *Dyes Pigm.*, **2014**, *82(3)*, 392-395
- ¹³ A. Schmitt, B. Hinkeldey, M. Wild, G. Jung, Synthesis of the core compound of the BODIPY dye class: 4,4'-difluoro-4-bora-(3a,4a)-diaza-s-indacene. *J. Fluoresc.*, **2009**, *19(4)*, 755-758
- ¹⁴ N. Boens, B. Verbelen, W. Dehaen, Postfunctionalization of the BODIPY Core Synthesis and Spectroscopy, *Eur. J. of Org. Chem.*, **2015**, *30*, 6577-6595
- ¹⁵ K. Zlatić, H. B. El Ayouchia, A. Hafid, B. Mihaljević, N. Basarić, T. Rohand, Spectroscopic and photophysical properties of mono- and dithiosubstituted BODIPY dyes, *J. Photochem. Photobiol. A*, **2020**, *388*, 1-8
- ¹⁶ M. Baruah, W. Qin, N. Basarić, W. M- de Borggraeve, N. Boens BODIPY-Based Hydroxyaryl

Derivatives as Fluorescent pH Probes, *J. Org Chem.*, **2005**, 70, 4152-4157

¹⁷ R. G. Clarke, M. J. Hall u *Recent developments in the synthesis of the BODIPY dyes*, vol. 128 (Eds. E. Scriven, C. Ramsden), Academic Press, Stratfordshire, **2019**, 181-261

¹⁸ X. Zhou, C. Yu, Z. Feng, Y. Yu, J. Wang, E. Hao, Y. Wei, X. Mu, L. Jiao Highly Regioselective α -Chlorination of the BODIPY Chromophore with Copper(II) Chloride, *Org Lett.*, **2015**, 17, 4632-4635

¹⁹ V. Leen, E. Braeken, K. Luckermans, C. Jackers, M. Van der Auweraer, N. Boens and W. Dehaen, A versatile, modular synthesis of monofunctionalized BODIPY dyes, *Chem. Commun.*, **2009**, 30, 4515-4517

²⁰ G. Cheng-Zhi, F. Ya-Qing, L. Peng-Peng, M. Shu-Xian, Selective synthesis of β -unsubstituted meso-aryl substituted tripyranes in water, *J. Saudi Chem. Soc.*, **2014**, 19 (2), 227-232

²¹ J. B. Littler, M. A. Miller, C.-H. Hung, R. W. Wagner, D. F. O'Shea, P. D. Boyle, J. S. Lindsey Refined Synthesis of 5-Substituted Dipyrromethanes, *J. Org. Chem.*, **1999**, 64 (4), 1391-1396

