

Vodikove veze bioaktivnih derivata dehidrooctene kiseline

Buljat, Marko

Undergraduate thesis / Završni rad

2018

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:064378>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-28**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijски odsjek

Marko Buljat

Student 3. godine Preddiplomskog sveučilišnog studija KEMIJA

Vodikove veze bioaktivnih derivata dehidrooctene kiseline

Završni rad

Rad je izrađen u Zavodu za analitičku kemiju

Mentor rada: prof. dr. sc. Predrag Novak

Zagreb, 2018. godina.

Datum predaje prve verzije Završnog rada:

12. kolovoza 2018.

Datum ocjenjivanja Završnog rada i polaganja Završnog ispita:

21. rujna 2018.

Mentor rada: prof. dr. sc. Predrag Novak

Potpis:

Sadržaj

§ SAŽETAK	7
§ 1. UVOD	8
1.1. Definicija vodikove veze	8
1.2. Nomenklatura	9
1.3. Klasifikacija	11
1.3.1. <i>P-blok</i>	11
1.3.2. <i>H-veze sa metalnim centrima</i>	12
1.4. Značaj H-veza	12
1.4.1. <i>Proteini</i>	12
1.4.2. <i>Nukleinske kiseline</i>	15
1.4.3. <i>Tautomerizacija</i>	16
1.4.4. <i>P-blok binarni hidridi</i>	17
1.5. Metode istraživanja	17
1.5.1. <i>Infracrvena spektroskopija</i>	18
1.5.2. <i>Difrakcija rentgenskih zraka</i>	19
1.5.3. <i>Nuklearna magnetska rezonancija</i>	20
1.5.4. <i>Izotopni efekt</i>	20
§ 2. PRIKAZ ODABRANE TEME	21
2.1. Dehidrooctena kiselina i fenilendiaminski derivati	21
2.2. Strukturna karakterizacija	23
2.3. Deuterijev izotopni efekt	26
§ 3. ZAKLJUČAK	30
§ 4. LITERATURNI IZVORI	XXXI

§ Sažetak

Vodikova veza (H-veza) je trocentrična četveroelektronska nevezna interakcija dijeljenja protona općeg oblika $R-D-H \cdots :A-R'$, gdje D predstavlja donora vodikove veze, a A akceptora. Donori i akceptori su uglavnom elektronegativniji atomi iz p-bloka periodnog sustava, uz pojavu metalnih vodikovih veza te π -veza kao dodatnih sudionika. Opisuje se elektrostatskim i kovalentnim doprinosom, te se odlikuje težnjom prema linearnosti. Radi velikog raspona mogućih donora i akceptora u H-vezama te oblika i strukturnih motiva koje vodikove veze mogu posjedovati, razvijene su potrebne nomenklature i klasifikacije za jasnije sagledavanje ove pojave. H-veza ima bitnu ulogu u biološkim procesima te osiguravanju niza svojstava bez kojih bi život na Zemlji bio nezamisliv, što joj osigurava znanstveni značaj. Podulji niz eksperimentalnih tehnika poput nuklearne magnetske rezonancije, infracrvene spektroskopije i difrakcije rendgenskih zraka omogućuje nam karakterizaciju ove interakcije.

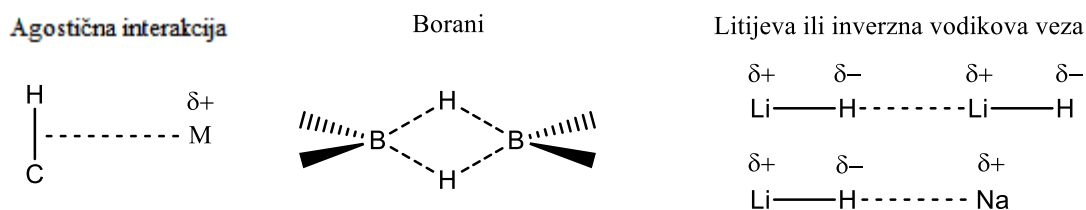
Sintetizirani su derivati dehidrooctene kiseline, spoja značajnog u organskoj sintezi koji se odlikuje svojom antibakterijskom i fungicidnom uporabom, sa o/m/p-fenilendiaminom. Takvi derivati spadaju u klasu Schiffovih baza te pokazuju potencijal kao bioaktivni spojevi, sa uporabama poput katalize, antibakterijske terapije, polimerizacijskih reakcija te drugog. Stoga su proučavane H-veze i tautomerna ravnoteža ovih spojeva između keto-amino i enol-imino forme u čvrstom i tekućem stanju. Pomoću IR spektroskopije potvrđena je dominantnost keto-amino forme i prisutnost intramolekulskih vodikovih veza u čvrstom stanju, što je u slaganju sa prijašnjim istraživanjima. Kombinacijom spektrometrije masa i tehnika u 1H te ^{13}C NMR, potvrđena je očekivana struktura spojeva u otopini sa keto-amino formom kao dominantnom. Odgovarajući kemijski pomaci ponovno upućuju na intramolekulsku vodikovu vezu.

Također su sintetizirani deuterirani izotopomeri prethodnih derivata te je izmjeren sekundarni deuterijev izotopni efekt u ^{13}C NMR-u, na temelju kojeg je potvrđena intramolekulska vodikova veza. Uočene su razlike između pojedinih izotopomera koje upućuju na različite strukture derivata i različite interakcije koje mogu ostvariti.

§ 1. UVOD

1.1. Definicija vodikove veze

Vodikova veza (H-veza) može se opisati kao trocentrična četveroelektronska (3c-4e) interakcija dijeljenja protona opće forme R-D-H ... :A-R', gdje D predstavlja donora protona koji je elektronegativan atom (poput F, O, N, C, S, Cl ili Br) dok :A predstavlja akceptora protona, koji može biti drugi elektronegativan atom ili π komponenta nezasićene veze. Može se također opisati prikazom R-D: ... H⁺ ... :A-R' kao jedan proton koji dijeli 2 slobodna elektronska para od susjednih elektronegativnih atoma ili grupa. Model koji proizlazi iz prije navedenog promatra vodikove veze pomoću elektrostatskog i kovalentnog doprinosa. Ovakva definicija omogućuje jasno razdvajanje vodikovih veza od drugih interakcija koje bi se prema starijim definicijama uklapale u tu kategoriju, a posjeduju značajne razlike. To su trocentrične dvoelektronske veze (3c-2e veze) prikazane na Slici 1.



Slika 1. Prikaz trocentričnih dvoelektronskih oblika.¹

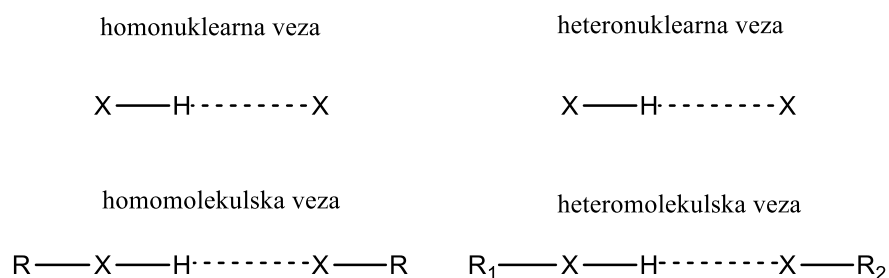
Agostična interakcija se javlja u organometalnoj kemiji kada dolazi do prelaska elektron deficijentnog atoma metala vezi C-H pri čemu ugrubo nastaje T oblik između veze i atoma, te je najčešće intramolekulska interakcija. Ti, Ta, Zr, Ni i Fe su najčešći metali koji se javljaju u ovakvom kontaktu, a energija interakcije je poprilično visoka i iznosi 7-15 kcal mol⁻¹. Razlog nepripadanja vodikovoj vezi proizlazi iz strukturnog oblika (vodikove veze teže linearnosti te su energetski jače što su linearnije) ali i tome što je interakcija uzrokovana spremnošću metalnog atoma na primanje elektrona, dok vodikove veze spremnošću vrste :A na davanje elektrona tj. sposobnošću da se ponaša kao Lewisova baza.

Inverzne vodikove ili litijeve veze također ne ulaze u kategoriju H-veza zbog potpune razlike u predznacima dipola uključenih u interakciju (D^{δ+}-H^{δ-} dipol i interakcija sa elektron

deficijentnim centrom litijeve veze naspram $D^{\delta-}-H^{\delta+}$ dipola te interakcije sa donorom elektrona u H-vezi). Uklapanjem ovakve interakcije u neku širu definiciju gubi se mogućnost koreliranja jačine vodikove veze sa elektronegativnostima donorskih i akceptorskih atoma.¹

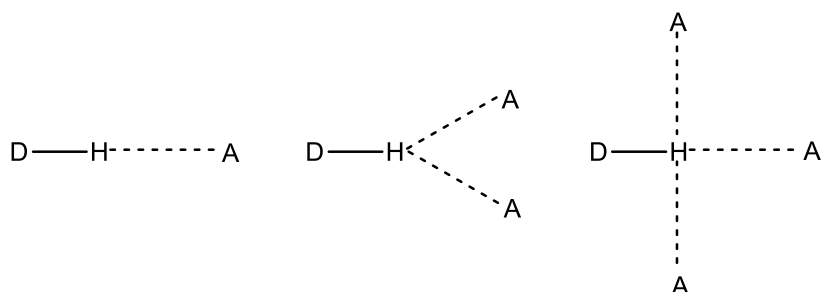
1.2. Nomenklatura

Oblik $R-D-H \cdots :A-R'$ spomenut u definiciji je idealni slučaj, ali ne predstavlja velik broj vodikovih veza. D-H i $:A$ vrste se mogu kombinirati na razne načine, pritom naravno poštujući osnovni smisao ove interakcije. Stoga je potrebna prigodna nomenklatura za precizniji opis realnih primjera. H-veze se mogu klasificirati kao homonuklearne i heteronuklearne, ovisno o tome jesu li donor i akceptor isti, a homonuklearne se dalje dijele u homomolekulske i heteromolekulske, koje imaju ili nemaju iste substituentne R.



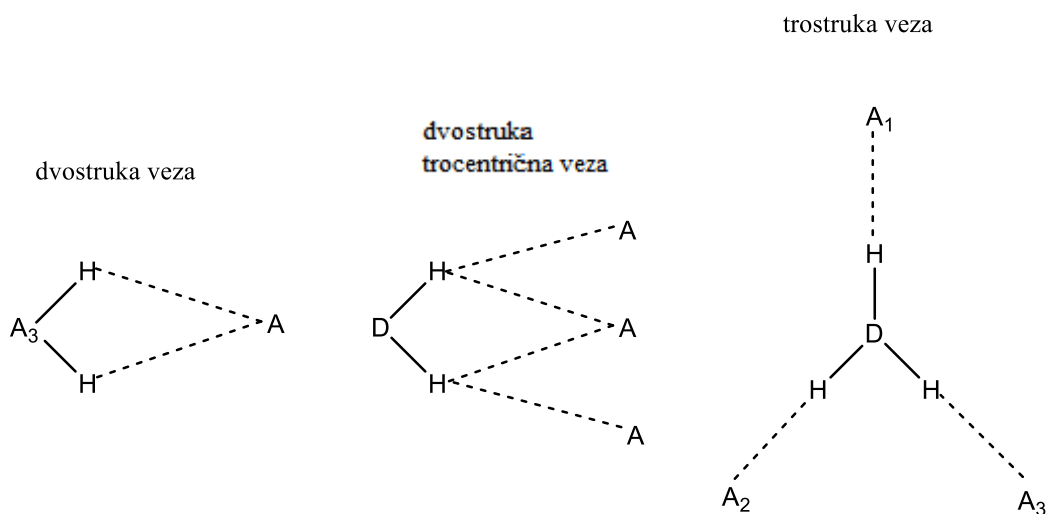
Slika 2. Primjer osnovne podjele H-veza.²

$R-D-H \cdots :A-R'$ oblik se u drugoj podjeli još naziva dvocentrična ili monodentatna veza. Uz povećanje broja akceptora ($:A$) sljedeća veza se naziva trocentrična, didentatna ili bifurkatna te uz daljnje povećanje tridentatna ili četverocentrična.



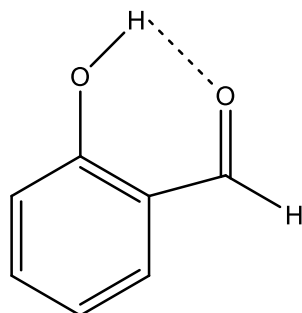
Slika 3. Primjer monodentatne, didentatne te tridentatne H-veze.²

Također je moguće imati slučaj više proton donora te razne kombinacije.



Slika 4. Dodatni primjeri tipova H-veza.²

Svi prijašnji primjeri su predstavljali intermolekulske veze tj. H-veze između molekula, no moguće su i intramolekulske, odnosno H-veze uspostavljene između dijelova jedne molekule.



Slika 5. Primjer intramolekulske vodikove veze u salicilnoj kiselini.

Što se tiče daljnjih rasporeda u prostoru, mogući su oblici poput dimera, lanaca te raznih dvodimenzijskih i trodimenzijskih struktura. Zadnja podjela vrijedna spomena promatra geometriju fragmenta $D-H \cdots :A$ te je moguće izolirati dvije krajnje konfiguracije: linearnu simetričnu vezu primarno kovalentnog tipa i savijenu asimetričnu vezu ponajviše elektrostatske prirode koje tipično predstavljaju jaku i slabu H-vezu (promatrano sa energetskog stajališta).

Slika 6. Primjer linearne simetrične i savijene asimetrične H-veze.²

Pri opisu H-veza često se koriste i udaljenosti između donora i vodika ($d(D-H)$), između vodika i akceptora ($d(H \cdots A)$) te kut $\alpha(D-H-A)$. Veličina $D=d(D-A)$ tj. udaljenost između donora i akceptora se tipično definira kao duljina vodikove veze.²

1.3. Klasifikacija

S obzirom na atome uključene u H-vezu možemo napraviti grubu podjelu u dvije skupine: H-veze sa određenim elementima p-bloka i veze sa metalnim centrima.

1.3.1. P-blok

U p-bloku može se napraviti daljnja podjela na konvencionalne i nekonvencionalne ili slabe H-veze. Konvencionalne H-veze su one sačinjene od elemenata koji imaju elektronegativnosti oko 3,0 (N, O, F, Cl, Br) uz povremeni dodatak sumpora (elektronegativnost oko 2,6). U ovoj skupini nalaze se prve proučavane vodikove veze koje igraju značajnu ulogu u kemiji, biologiji i biokemiji. Nekonvencionalne H-veze tj. veze s elementima s relativno bliskom elektronegativnošću naspram vodika (oko 2,20) se nazivaju i slabe H-veze zbog njihove intrinzične slabosti odnosno preniske elektronegativnosti koja ih sprječava da u bilo kojem slučaju čine jake H-veze naspram konvencionalnih koje imaju sposobnost oboje. Tu se nalaze atomi poput C, Si, Ge, P, As, Sb, S, Se, Te, I, no trenutni podaci pokazuju da kao donore H-veze se pronalaze samo C, P i S, dok je lista akceptora slabe H-veze nešto dulja te obuhvaća atome poput C, P, As, Sb, S i Se što sugerira da je efekt elektronegativnosti kao uvjet stvaranja vodikove veze manje izražen za akceptore nasuprot donorima. Zadnji oblik akceptora slabe H-veze su elektron bogate π -veze u aromatskim sustavima, dvostrukim te trostrukim vezama koje se sparuju sa raznim donorskim atomima poput O, N, C, F, Cl, pa čak i sa drugim π -sustavima.³

1.3.2. H-veze sa metalnim centrima

Ova skupina predstavlja novo područje interakcija otkriveno tek početkom 1990-tih. Može se podijeliti u dvije podgrupe ovisno o tome je li metalni centar izravno uključen u interakciju (drugi naziv je prave metalne H-veze) ili se radi o ligandima u prvoj koordinacijskoj sferi metala, što zapravo predstavlja tipične H-veze u kojima su svojstva donora/akceptora modulirana metalnom vezom.⁴

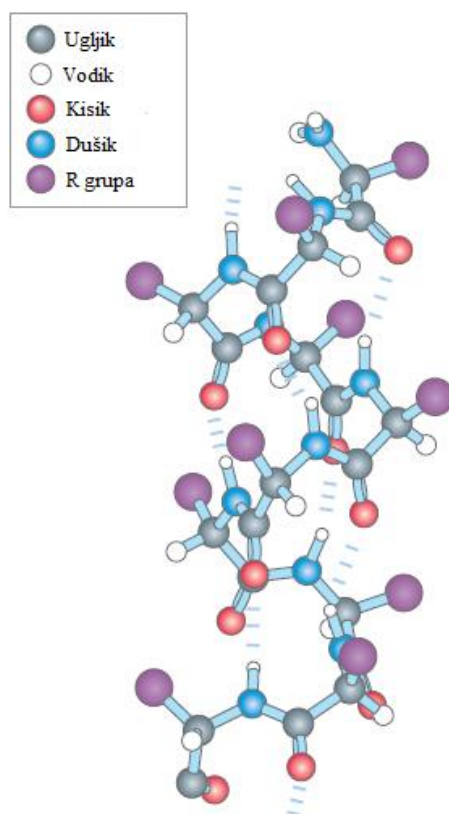
Bitno je naglasiti da usprkos navedenim podjelama vodikove veze između istih parova donora i akceptora mogu pokazivati veoma široke raspone energija i geometrija te da se generalno ne može govoriti o jakim ili slabim H-vezama. Primjer je $R_1-O-H \cdots :O-R_2$ sustav koji ovisno o odabiru R_1 i R_2 može pokazivati varijacije u energiji veze od manje od 1,0 do 30 kcal mol⁻¹. Jednako snažna varijacija u energiji i geometriji veze uočava se i pri promjeni pH sustava. Nešto jasnija slika ove interakcije i njenih vrsta može se dobiti novijim teorijama.⁵

1.4. Značaj H-veza

Vodikove veze igraju bitnu ulogu u raznim biološkim procesima te su zaslužne za cijeli niz svojstava bez kojih bi život na Zemlji bio nemoguć.

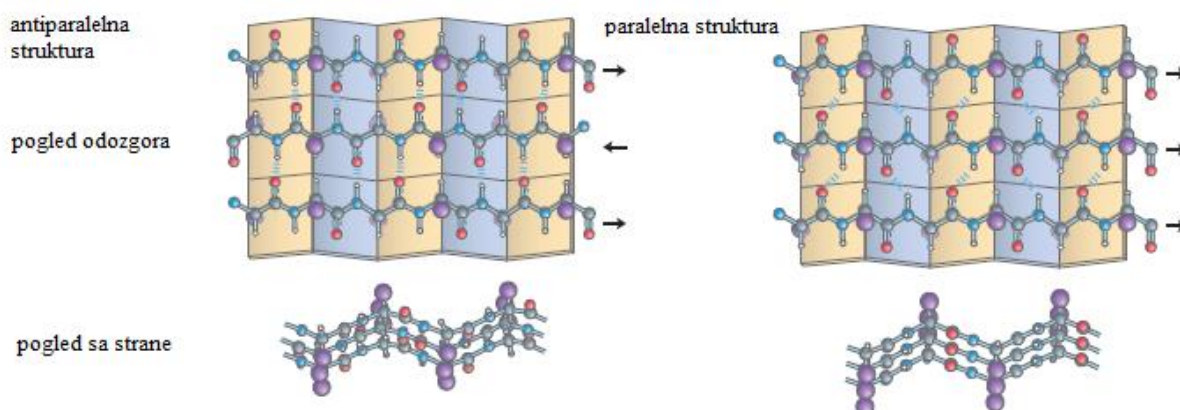
1.4.1. Proteini

H-veze zajedno s van der Waalsovima i ionskim interakcijama neizmjereno su bitne u osiguravanju strukture proteina. Pogodan primjer je α -zavojnica, element sekundarne strukture proteina koja je između ostalih interakcija stabilizirana vodikovim vezama između karbonilnog atoma kisika i amidnog dušika koji se promatrajući aminokiselinski slijed nalaze na pozicijama n i $n+4$.



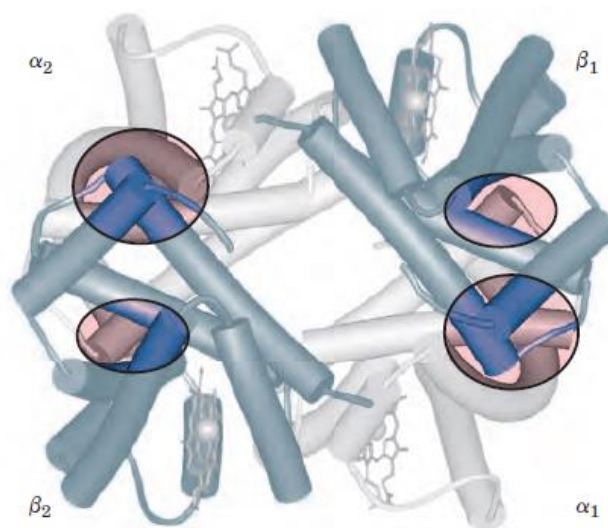
Slika 7. Prikaz α -zavojnice sa naznačenim intramolekulskim H-vezama.⁶

Dodatan primjer je β -nabrana struktura koja može postojati u paralelnom te antiparalelnom obliku, gdje je učinkovitost H-vezivanja jedan od faktora koji utječe na veću stabilnost antiparalelne strukture i čini je češćom u prirodi.



Slika 8. Prikaz β -nabranih struktura sa prikazanim vodikovim vezama.⁷

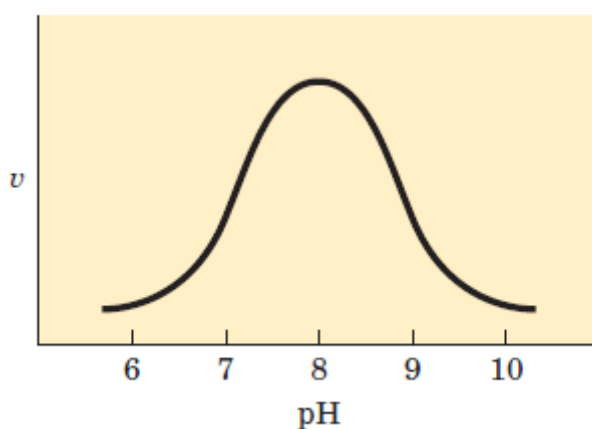
U tercijskoj strukturi van der Waalove sile poprimaju dominantiniju ulogu, no vrijedno spomena je i solvatacija proteina omogućena vezivanjem uz vodu, glavno otapalo bioloških sustava, ali i doprinos u kvarternoj strukturi, ilustriran na primjeru alosteričkog tetramernog proteina hemoglobina koji sudjeluje u prijenosu kisika između pluća i tkiva putem hema, prostetičke skupine na proteinu koja omogućuje reverzibilno vezanje kisika putem željeza.



Slika 9. Shematski prikaz kvarterne strukture tetramernog proteina hemoglobina ($\alpha_2\beta_2$).

Zaokružena područja predstavljaju područja najjačih interakcija.⁸

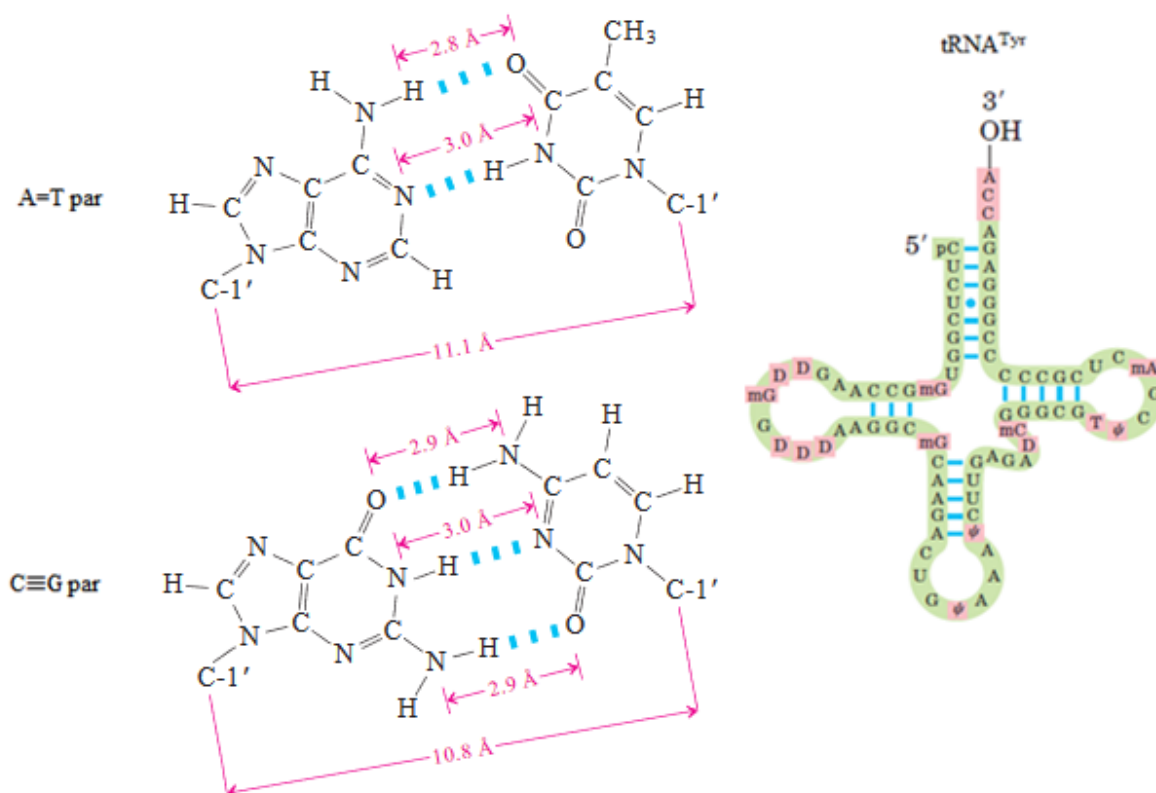
Vodikove veze također sudjeluju u biološkoj katalizi, koja se uglavnom zasniva na optimalnim interakcijama između enzima i prijelaznog stanja. Pogodan primjer je kimotripsin, pripadnik serinskih proteaza, enzima koji omogućuju hidrolizu polipeptida. H-veze sudjeluju u katalitičkom mehanizmu u oksianionskoj šupljini, regiji aktivnog mjesta enzima, pomoću elektrostatske stabilizacije međuprodukta. Povezivanjem katalitičke trijade vodikovim vezama (Asp¹⁰², His⁵⁷ te Ser¹⁹⁵) pospješuju kiselo-baznu katalizu između His⁵⁷ i Ser¹⁹⁵, odnosno smanjenjem pK_a Ser¹⁹⁵ (alkohola) pospješuju njegovu deprotonaciju, koja je početni korak katalitičkog mehanizma.



Slika 10. Ovisnost aktivnosti kimotripsina o pH.⁹

1.4.2. Nukleinske kiseline

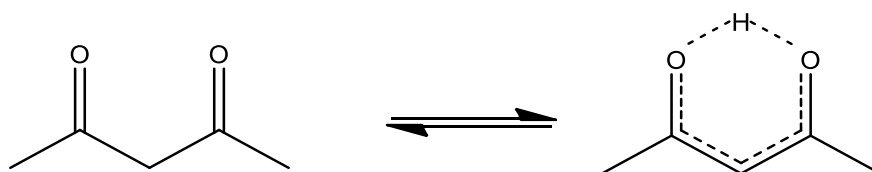
Stabilnost dvostruke zavojnice molekule DNA, prenositelja genetske informacije, dijelom je uzrokovana vodikovim vezivanjem između nukleotidnih parova adenina i timina (A=T tj. dvije vodikove veze), te citozina i guanina (C≡G tj. tri vodikove veze), odnosno Watson-Crickovih parova nukleotidnih baza. Uz to postoji poveći niz složenih molekulskih struktura koje DNA/RNA mogu poprimati, a u kojima H-veze također sudjeluju, poput strukture t-RNA, jednog od glavnih sudionika procesa translacije, finalnog koraka sinteze proteina.



Slika 11. Prikaz Watson-Crickovih parova baza te strukture tRNA^{Tyr} sa naznačenim vodikovim vezama.¹⁰

1.4.3. Tautomerizacija

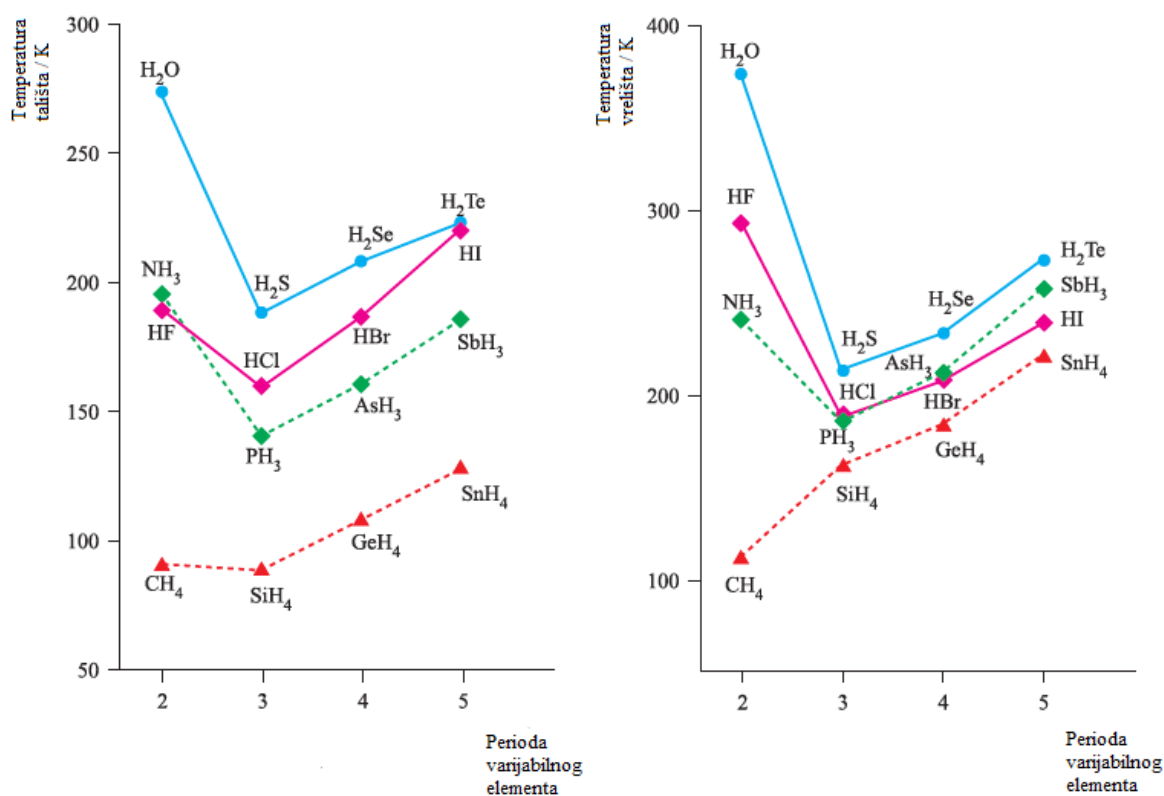
Tautomerizacija predstavlja bilo koji intramolekulski transfer protona. Jednostavan primjer je keto-enolna tautomerija. Kod primjera β -diketona acetilacetona, spoja koji podliježe takvoj vrsti tautomerije, u plinovitoj fazi intramolekulska H-veza stabilizira enolnu formu spoja te povećava konstantu ravnoteže (definirana kao $K_{eq} = [\text{enol forma}] / [\text{keto forma}]$) pa je stoga $K_{eq,g}=11,7$, no u polarnim otapalima karbonilni kisikovi atomi keto forme mogu ostvariti intermolekulsku vodikovu vezu i pomaknuti ravnotežu na lijevu stranu ($K_{eq,aq}=0,23$).¹¹



Slika 12. Keto-enolna tautomerija acetilacetona.

1.4.4. P-blok binarni hidridi

P-blok binarni hidridi spojevi su opće formule EH_n , gdje E predstavlja elemente 14.-17. skupine. Promatrajući samo jednu skupinu, očekuje se porast temperature vrelišta i tališta s porastom molekulske mase na isti način kao kod serije alkana. Eksperimentalni podaci pak pokazuju veliko odudaranje od očekivanja kod spojeva NH_3 , H_2O te HF , prvih članova skupina 15.–17. skupine. Njihovo povećanje u temperaturama vrelišta i tališta pripisuje se vodikovim vezama između molekula koje zahtijevaju veću količinu energiju za fazne prijelaze.



Slika 13. Temperature tališta/vrelišta za neke od hidride p-bloka, opće formule EH_n .¹²

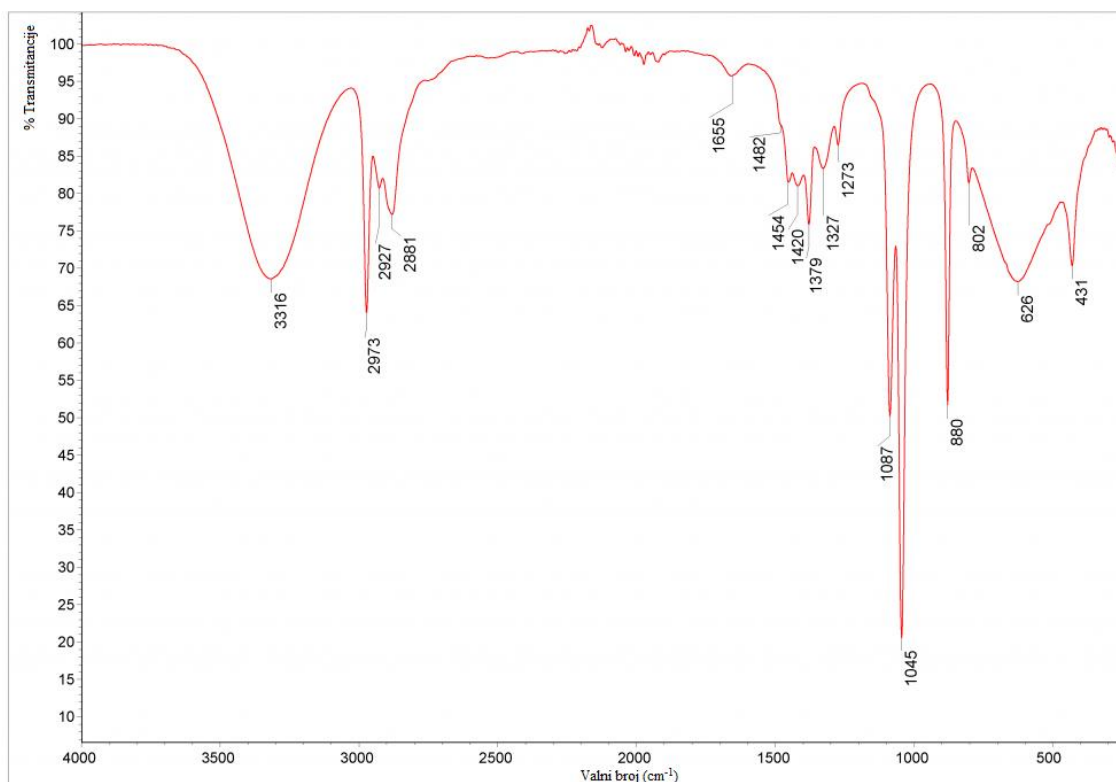
1.5. Metode istraživanja

Postoji povećani niz eksperimentalnih tehnika koje se koriste za opis H-veze, pri čemu velika količina podataka proizlazi iz IR i Ramanove spektroskopije, mikrovalne rotacijske

spektroskopije, nuklearne magnetske rezonancije, spektroskopije UV , difrakcije rentgenskih zraka, neutronske difrakcije, elektronske difrakcije u plinovitim uzorcima, raznih termodinamičkih, ali i sve više metoda ab initio ili DFT.¹³

1.5.1. Infracrvena spektroskopija

Spektroskopija IR upotrebljava se za uzorke u sva tri agregacijska stanja, a vodikove veze u njima se mogu najjednostavnije proučavati putem crvenog pomaka, odnosno smanjenjem vrijednosti frekvencije $\Delta\nu = \nu^\circ - \nu$, gdje ν° predstavlja frekvenciju veze u neveznom stanju ili standardnu vrijednost, a ν predstavlja frekvenciju veze pod utjecajem interakcije. Donorska veza sa vodikom pod H-vezom se produljuje te se smanjuje njezina energija, što je predstavljeno crvenim pomakom jer manja energija povlači sa sobom i manju frekvenciju ($E = h\nu(n+1/2)$). U spektru pripadajuće veze uključene u ovakvu interakciju također pokazuju i proširenje vrpce, koja je bez nje oštija, primjerice proširenje linije O-H u IR spektru etanola pri 3316 cm^{-1} . Razvojem ove eksperimentalne tehnike omogućeno je integriranje intenziteta vrpce radi dobivanja koncentracije vrste koja sudjeluje u H-vezivanju, dobivanje podataka o jačini vodikove veze te drugo.¹⁴

Slika 14. Spektar ATR FT IR etanola.¹⁵

1.5.2. Difrakcija rentgenskih zraka

Za istraživanje H-veza, metoda difrakcije rentgenskim zrakama je patila od nemogućnosti egzaktnog lociranja H atoma, s obzirom da se difrakcija odvija na elektronima koji se odvajaju od vodikovog atoma i dijelom prelaze prema donorskom atomu. Time su dobivene prekratke udaljenosti $d(D-H)$, pa se kao naznaka nastajanja vodikove veze koristila udaljenost $D=d(D-A)$, koja je trebala iznositi manje nego suma van der Waalsovih radijusa tih atoma. Međutim ta procjena je neodgovarajuća s obzirom na postojanje velikog broja asimetričnih savijenih slabih H-veza, dok funkcionira za jače vodikove veze. Razvoj neutronske difrakcije, gdje se difrakcija odvija na jezgrama umjesto elektronima, omogućila je precizno određivanje pozicije H-atoma te usporedbe struktura dobivenih dvaju tehnikama. Također su razvijene razne metode koje unošenjem korekcija omogućuju bolje lociranje vodikovih atoma te lakše uspostavljanje kriterija za postojanje H-veza.¹⁶

1.5.3. Nuklearna magnetska rezonancija

^1H NMR jedna je od najkorištenijih metoda analize H-veza, ponajviše za spojeve u otopini. Vodikova veza se odražava na kemijski pomak atoma vodika njegovim povećanjem, odnosno odsjenjenjem. Prednost korištenja NMR-a je veća varijacija u kemijskom pomaku nego u frekvenciji u infracrvenoj spektroskopiji, pogotovo za jake H-veze čija je promjena kemijskog pomaka dovoljno velika (20-22 ppm-a) da se ne preklapa sa ostalim signalima vodika u spektru (rijetko iznad 11-13 ppm-a). NMR se odlikuje velikom razlučivošću što značajno olakšava detekciju vodikovih veza sa slabim donorima poput C-H \cdots A ili S-H \cdots A sustava.¹⁷ Također je moguće iskoristiti i ^{13}C NMR, gdje na isti način promjene kemijskog pomaka upućuju na postojanje H-veze.¹⁸

1.5.4. Izotopni efekt

Izotopni efekt se zasniva na razlikama u masama dvaju izotopa koja dalje utječe na razna svojstva tog atoma. Koliko će ta razlika u svojstvima biti vidljiva ovisi o promjeni mase, te je stoga deuterij (^2H ili D) pogodan izotop za promatranje zbog dvostrukog povećanja mase naspram vodika (^1H), dok bi ^{13}C izotop imao samo 6% veću masu od ugljika ^{12}C . Tricij (^3H) se tipično ne promatra zbog nestabilnosti i slabe zastupljenosti. U infracrvenoj spektroskopiji izotopni efekt se opaža putem promjene položaja vrpce u spektru IR. Primjer je metan, čiji valni broj vibracije veze C-H u nedeuteriranom i potpuno deuteriranom obliku iznosi 2917 i 2109 cm^{-1} .¹⁹

U NMR-u izotopni efekt je koristan za proučavanje tautomerne ravnoteže i vodikovih veza u otopini te se odražava u promjenama kemijskog pomaka. Izotopni efekt se može podijeliti u kinetički i ravnotežni. Kinetički (ili intrinzični) predstavlja promjenu u brzini reakcije pri supstituciji jednog od atoma reaktanata drugim izotopom te se formalno izražava kao omjer konstanti brzine reakcije sa lakim i težim izotopom, tj. KIE (kinetički izotopni efekt) = k_l/k_h te se koristi za opis sustava koji nisu u ravnoteži. Ravnotežni izotopni efekt se javlja kao promjena u kemijskoj ravnoteži odnosno K_{eq} prilikom uvođenja izotopa. Izotopni efekt se također može podijeliti s obzirom na kemijski pomak na primarni i sekundarni. Primarni izotopni efekt se određuje kao razlika u kemijskom pomaku između različitih izotopa istog elementa, odnosno ^1H i ^2H vrste. Vrijednost pomaka je uglavnom malena, no prisutnost H-veza ga povećava što

može sugerirati koliko je vodikova veza jaka. Sekundarni izotopni efekt je definiran kao promjena u kemijskom pomaku jezgre istog izotopa pri substituciji jednog od susjednih atoma, primjerice CH_3OH u CH_3OD te se može izraziti kao ${}^n\Delta^{13}\text{C}(\text{D}) = \delta^{13}\text{C}(\text{H}) - \delta^{13}\text{C}(\text{D})$, gdje n označava broj supstituiranih atoma. Ukupni izotopni efekt je suma ravnotežnog i intrinzičnog doprinosa (koji je generalno veći). Izotopni efekti su pod utjecajem niza faktora poput razlike u masi prilikom substitucije izotopa, udaljenošću između substituirane i promatrane jezgre, sličnošću raspona kemijskog pomaka između jezgara, vodikovih veza, steričkih smetnji i temperature.¹⁸

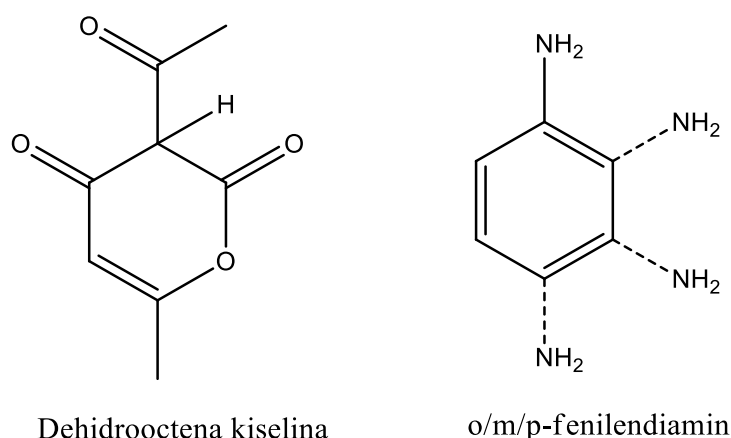
Svrha rada je demonstrirati korisnost navedenih eksperimentalnih metoda i proučiti H-veze i tautomernu ravnotežu na primjeru bioaktivnih derivata dehidrooctene kiseline, specifično rečeno o/m/p-fenilendiamin derivata dehidrooctene kiseline i njihovih deuteriranih izotopomera, radi boljeg sagledavanja njihove biološke aktivnosti.

§ 2. PRIKAZ ODABRANE TEME

2.1. Dehidrooctena kiselina i fenilendiaminski derivati

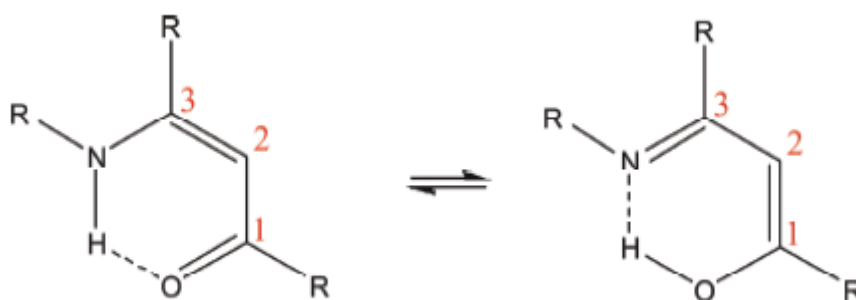
Dehidrooctena kiselina, ili 3-acetil-4-hidroksi-6-metilpir-2-on nalazi upotrebu u kozmetičkoj i prehrambenoj industriji kao konzervans, zahvaljujući svojoj stabilnosti i neisparljivosti te zbog antibakterijskih i fungicidnih svojstava, nalazeći se često u obliku natrijeve soli.²⁰ Može poslužiti kao kompleksirajući ligand, a neki od njegovih kompleksa imaju potencijal kao modelni sustavi za biokemijske reakcije te fungicidi.²¹ Spoj i njegovi derivati bitni su u organskoj sintezi, primjerice kao prekursori za pripremu raznih heterocikličkih sustava.²²

Kelatni kompleksi sa Schiffovim bazama dobivenim iz dehidrooctene kiseline te raznih fenilendiamina pokazali su se kao korisni spojevi sa nizom primjena kao što su kataliza, antibakterijska terapija zasnovana na sposobnosti selektivnog cijepanja DNA, polimerizacijske reakcije i drugo.¹⁸



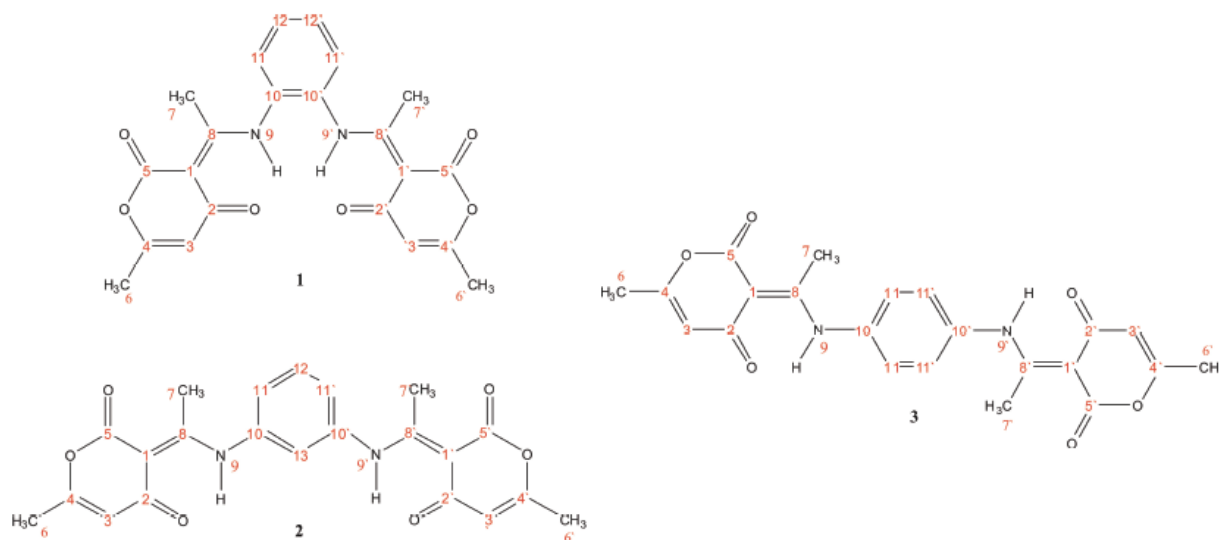
Slika 15. Strukturne formula dehidrooctene kiseline te nekih od fenilendiamina.

Schiffove baze dehidrooctene kiseline i o/m/p-fenilendiamina spadaju u skupinu spojeva zvanih enaminoni, koji mogu postojati u dvije tautomerne forme: keto-amino i enol-imino. Sadrže N-C=C-C=O konjugirani sustav u kojem su atomi C-1 i C-3 elektron deficijentni, dok je regija C-2 bogatija elektronima uz prisutnost amino/imino skupine. To ih čini elektrofilima i nukleofilima.¹⁸ Ova klasa spojeva općenito sadrži u obje forme intramolekulsku rezonancijom potpomognutu vodikovu vezu (intramolecular resonance assisted hydrogen bond=RAHB), jaku H-vezu koja pomoću rezonancije π -sustava, u koju su uključeni donor i akceptor vodikove veze, pokazuje značajnu stabilizaciju.²³

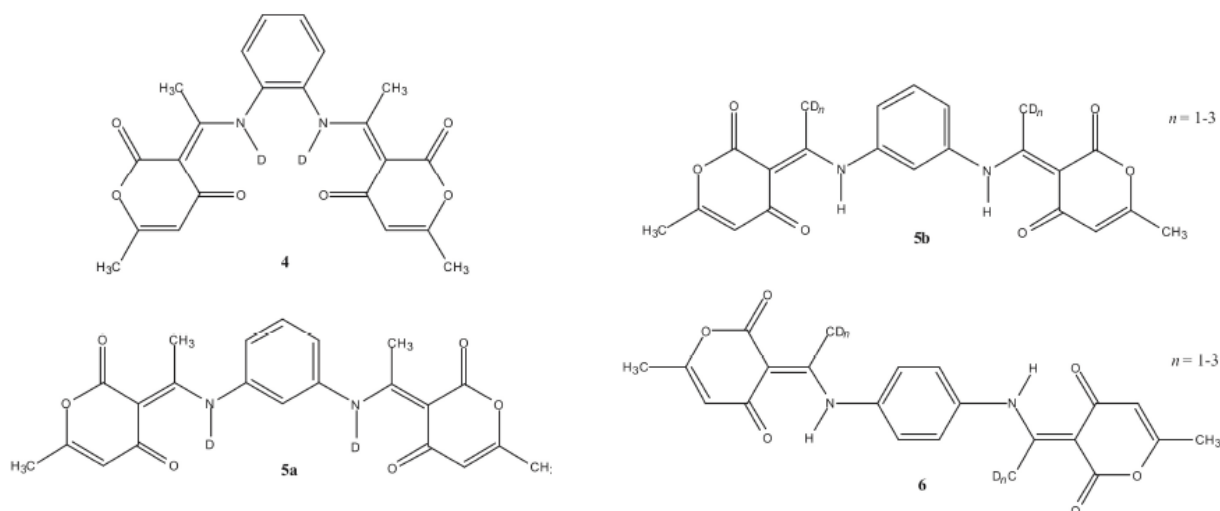
Slika 16. Tautomerne strukture enaminona.¹⁸

2.2. Strukturna karakterizacija

Pripravljene su o/m/p-fenilendiamin derivati dehidrooctene kiseline (1-3) te njihovi deuterirani izotopomeri (4-6). Bitno je istaknuti da su spojevi 4 i 5a sintetizirani pomoću prekursora 1 i 2 u deuteriranom metanolu uz par kapi deuterirane vode, dok je spoj 6 pripremljen iz spoja 3 u smjesi deuteriranog metanola i kloroforma uz deuteriranu vodu zbog slabe topljivosti u metanolu. Spoj 5b je pripremljen na analogan način uz svoj prekursor 2 poput spoja 6.



Slika 17. Strukture spojeva 1-3 i numerirani atomi.¹⁸



Slika 18. Strukture spojeva 4-6, n označava broj deuteriranih atoma.¹⁸

Difrakcija rentgenskih zraka spojeva 1-3 potvrdila je keto-amino formu te intramolekulsku vodikovu vezu u čvrstom stanju.²⁴ Pomoću spektroskopije IR i NMR te spektrometrije masa okarakterizirane su strukture spojeva.

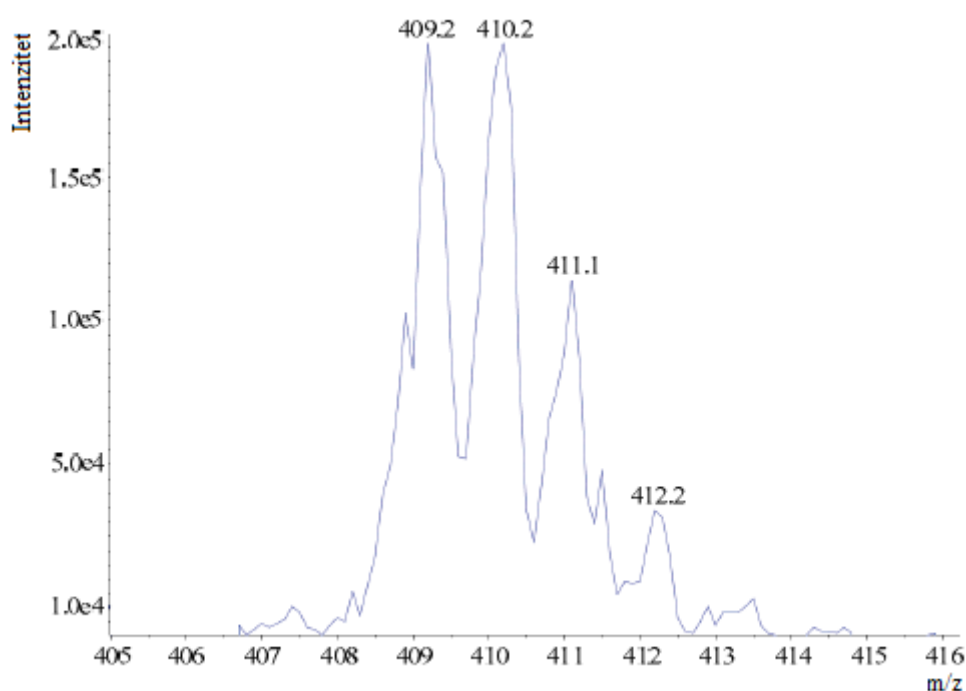
Spektar snimljen je uz korištenje KBr pastile (Tablica 1.) i pokazuje sličnost za sva tri spoja zbog malenih strukturnih razlika, uz istežanje aromatske C-H veze iznad ravnine prstena kao jedina iznimka koja je produkt različitih supstitucija na benzenskom prstenu. Prisutnost vrpce C=O i nedostatak vrpce O-H ukazuje na keto formu kao dominantan oblik u čvrstom stanju, što se slaže s prije navedenim podacima dobivenim difrakcijom rentgenskih zraka. Proširenje linije N-H u spektru oko 3450 cm^{-1} naznaka je intramolekulskih vodikovih veza. Ista N-H vrpca je razlog za nedostatak asignacije istežanja aromatske C-H veze kod spoja 3 jer dolazi do preklapanja linija što onemogućava preciznu asignaciju.

Tablica 1. Asignirane vrpce iz spektra IR spojeva 1-3.¹⁸

Vibracijski mod	$\tilde{\nu} / \text{cm}^{-1}$		
	1	2	3
$\nu(\text{N-H})$	3450	3400	3459
$\nu(\text{C-H})_{\text{aromati}}$	3050	3050	–
$\nu(\text{C-H})_{\text{alkani}}$	2950	2950	2950
$\nu(\text{C=O})_{\text{laktioni}}$	1706	1708	1700
$\nu(\text{C=O})_{\text{ketoni}}$	1570	1563	1559
$\nu(\text{C-H})_{\text{aromati}}^*$	998, 950, 840	999, 846	800

* savijanje izvan ravnine

Spektar masa spojeva 1-3 dobiven metodom elektroraspršenja pokazuje signal iona prekursora $[\text{M}+\text{H}]^+$ pri $m/z=409$ i daje signale koji odgovaraju očekivanoj fragmentaciji. Za spojeve 4 i 5a prekursor ion se nalazi pri $m/z=411$ što upućuje na postojanje dva atoma deuterija i amino skupinu kao mjesto deuteriranja. Spojevi 5b i 6 se značajno razlikuju zbog signala prekursor iona koji ukazuje na višestruko deuteriranje, što eliminira N-H skupinu kao jedino moguće mjesto deuteriranja.

Slika 19. Spektar masa spoja 6.¹⁸

Spektri ^1H i ^{13}C NMR spojeva 1-3 potvrđuju njihovu strukturu u otopini te prisutnost keto-amino forme kao dominantne. Iznos kemijskog pomaka za C-2(2') slaže se sa standardnim vrijednostima keto skupina uključenih u RAHB ili rezonancijom potpomognutu intramolekulsku vodikovu vezu. Signal oko 16 ppm-a koji pripada H-9(9') atomima potvrđuje prisutnost amino skupine. S H-6(6') i H-7(7') signalima oko 2,2 te 2,6 ppm-a je potvrđena CH_3 skupina. Korištenjem spektra COSY istih spojeva potvrđena je orto/meta/para susstitucija na temelju skalarne sprege između aromatskih protona, koja se javlja u orto i meta derivatu, a izostaje iz simetričnog para derivata. Pomoću tehnike HMBC omogućeno je povezivanje molekulskih fragmenata korelacijom između C-4(4') i H-6(6') te C-8(8') i H-7(7'). Efekt odsjenjenja za protone N-H te zasjenjenje uočeno za keto ugljik (C-2(2')) potvrđuju prisutnost RAHB-a.

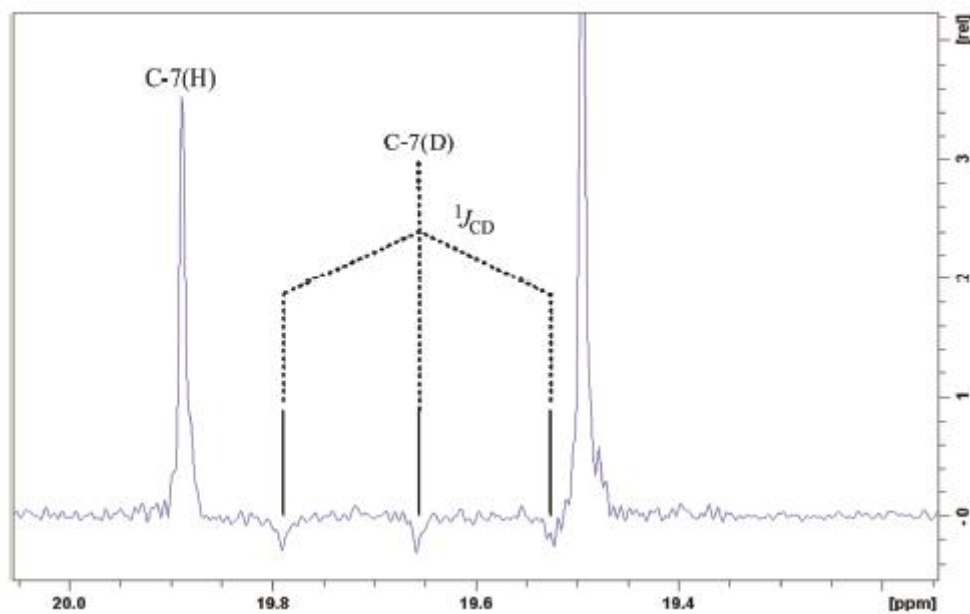
Tablica 2. Kemijski pomaci vrsta 1-3 u ^1H i ^{13}C NMR uz otapalo CDCl_3 .¹⁸

Atom	1		2		3	
	$^1\text{H } \delta / \text{ppm}$	$^{13}\text{C } \delta / \text{ppm}$	$^1\text{H } \delta / \text{ppm}$	$^{13}\text{C } \delta / \text{ppm}$	$^1\text{H } \delta / \text{ppm}$	$^{13}\text{C } \delta / \text{ppm}$
1(1')		97.42		97.19		97.28
2(2')		184.51		184.53		184.57
3(3')	5.73	106.39	5.77	106.46	5.79	106.54
4(4')		163.22		163.42		163.40
5(5')		162.46		162.59		162.72
6(6')	2.16	19.83	2.18	19.47	2.20	19.72
7(7')	2.55	19.94	2.63	19.85	2.66	19.89
8(8')		175.65		174.89		174.82
9(9')	16.12		16.07		16.04	
10(10')		132.19		137.32		135.56
11(11')	7.49	128.60	7.24	124.65	7.29	126.27
12(12')	7.31	127.09	7.57	130.31		
13(13')			7.07	122.36		

2.3. Deuterijev izotopni efekt

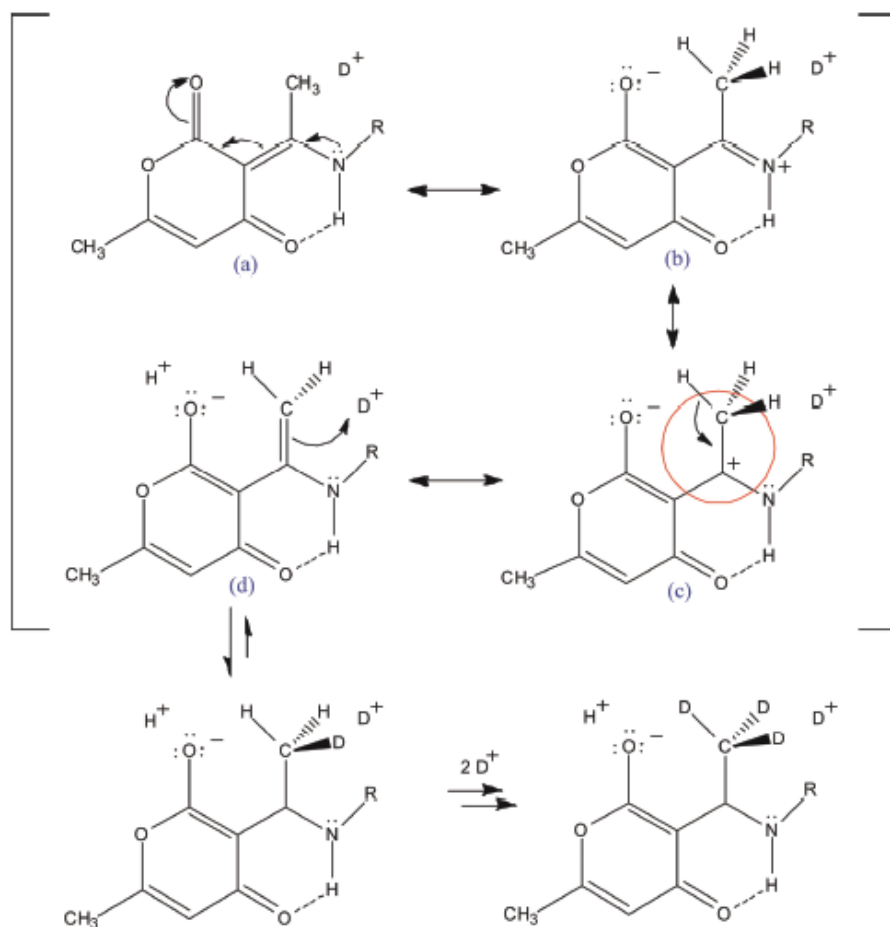
^1H NMR spojeva 4 i 5a uz podatke iz spektra masa potvrđuju da je došlo do dvostrukog deuteriranja na amino skupinama. Spektar ^1H NMR vrsta 5b i 6 pokazuje više signala značajnih intenziteta koji ukazuju na višestruko deuteriranje. Analizom spektra ^{13}C APT NMR vrsta 5b i 6 uočeni su tripleti C-D oko 19,7 ppm koji odgovaraju kemijskom pomaku monodeuterirane metilne skupine u α poziciji naspram amino skupine. Uz dulje vrijeme snimanja dobiveni su

kvinteti i septeti koji odgovaraju prisustvu dva odnosno tri atoma deuterija u metilnim skupinama.



Slika 20. Spektar ^{13}C NMR APT spoja 6.¹⁸

Sukladno ovim rezultatima, predložen je sljedeći mehanizam deuteriranja spojeva 5b i 6:

Slika 21. Mehanizam deuteriranja metilne skupine na poziciji 7.¹⁸

Polarna rezonantna forma c) u mehanizmu sudjeluje hiperkonjugacijom, odnosno interakcijom elektrona iz orbitale σ veze C-H s p-orbitalom pozitivno nabijenog ugljika što u konačnici dovodi do deuteriranja metilne skupine. Forma c) stabilizirana je djelomičnim dvostrukim karakterom veze C-N koja se javlja u amidima i drugim enaminonima. Katalitički ioni D^+ mogu biti rezultat disocijacije deuteriranog metanola ili rezultat raspada deuteriranog kloroforma na vrste D^+ i CCl_3^- , što se može ubrzati grijanjem.

Razlog ovakvog mehanizma deuteriranja proizlazi iz više vrijednosti pKa smjese deuteriranog metanola i kloroforma nego čistog deuteriranog metanola što otežava deuteriranje amino skupine i čini 5b i 6 spojeve glavnim reakcijskim produktima. Time je demonstrirana važnost svojstava otapala i reakcijskih uvjeta na mehanizam deuteriranja.¹⁸

Izmjeren je sekundarni izotopni efekt u spektrima ^{13}C NMR, tj ${}^n\Delta^{13}\text{C}(\text{D})=\delta^{13}\text{C}(\text{H})-\delta^{13}\text{C}(\text{D})$, gdje n označava broj supstituiranih atoma, unosom manje količine nedeuteriranih spojeva 1-3 u NMR cjevčice deuteriranih 4-6 spojeva.

Tablica 3. Deuterijev izotopni efekt (ppb) u ^{13}C NMR za deuterirane spojeve 4-6 u CDCl_3 .¹⁸

Atom	${}^n\Delta^{13}\text{C}(\text{D}) / \text{ppb}$			
	4	5a	5b ^(a)	6 ^(a)
1(1')	(b)	600.0	-7.7	-8.0
2(2')	(b)	700.0		-7.8
3(3')	-193.1	-187.5		
4(4')	100.1	375.0		
5(5')	108.0	-150.0		-9.4
6(6')	(b)	100.0		
7(7')	(b)	-350.0	231.2	230.7
8(8')	320.9	250.0	22.9	24.1
9(9')				
10(10')	(b)	500.3		
11(11')	-132.5	(b)	7.7	9.2
12(12')	-107.9	500.5		
13(13')		(b)	7.4	

^(a) pripremljen u mješavini deuteriranog metanola i kloroforma

^(b) širok signal

Spojevi 4 i 5a pokazuju općenito visoke vrijednosti izotopnog efekta. Vrijednost dobivena za atom C-8(8') u iznosu od 320,9 te 250,0 ppb-a ukazuje na oblik keto-amino u otopini stabiliziran intramolekulskim H-vezama. Relativno visoke vrijednost za atom C-2(2') u 5a, te atome C-3(3') i C-4(4') koji su susjedni atomi konjugiranog sustava nadalje ukazuju na prethodnu tvrdnju. Uočeni su slični efekti kod atoma C-10(10'), C-11(11') te C-12(12'). Razlike u predznacima u spojevima 4 i 5a mogu se objasniti strukturnim razlikama koje proizlaze iz početnih orto i meta substitucija. Spoj 4 posjeduje takvu strukturu koja omogućuje bliži kontakt skupina keto i amino, pa time i N-H ... O i N-H ... N intramolekulske i intermolekulske vodikove veze, tj. povezivanje dvaju konjugiranih sustava što je i dokazano u čvrstom stanju.²⁴ Para supstitucija u spoju 5a pak onemogućuje takav kontakt te su stoga interakcije drugačije.

Spojevi 5b i 6 pokazuju puno manje vrijednosti izotopnog efekta, što se objašnjava nepostojanjem efektivnog puta prijenosa izotopnog efekta kao kod 4 te 5a, što je direktna posljedica drugačijeg mjesta deuteriranja. Najveća vrijednost izotopnog efekta nalazi se za atom C-7(7'), tj. kod mjesta deuteriranja te djelomično kod atoma C-8(8'), što se može objasniti samom blizinom deuterija. Negativne vrijednosti izotopnog efekta mogu se uočiti u spoju 6 pri

C-2(2') te C-5(5') bez analoga u 5b. Nema jasnog objašnjenja, no ne smije se isključiti mogući utjecaj intermolekulskih interakcija sa drugim molekulama te utjecaj otapala.¹⁸

§ 3. ZAKLJUČAK

Korištenjem spektroskopije IR i NMR, te spektrometrije masa razjašnjena je struktura sintetiziranih *o/m/p*-fenilendiamin derivata dehidrooctene kiseline i njihovih deuteriranih izotopomera. Eksperimentalni podaci ukazuju na keto-amino formu kao dominantan oblik u čvrstom i tekućem stanju, što se slaže sa podacima dobivenim difrakcijom rentgenskih zraka. Proširenje linije N-H u spektru IR naznaka je intramolekulskih vodikovih veza. U spektru ¹H i ¹³C NMR efekt odsjajenja za protone N-H te zasjenjenje uočeno za keto ugljik također potvrđuju prisutnost intramolekulske rezonancijom potpomognute vodikove veze (RAHB). Proučavan je i sekundarni deuterijev izotopni efekt u deuteriranim izotopomerima u ¹³C NMR-u i predložen mehanizam njihove sinteze. Na temelju dobivenih podataka potvrđena je intramolekulska vodikova veza. Uočene razlike u sekundarnom deuterijevom izotopnom efektu između pojedinih izotopomera upućuju na razlike u strukturi derivata i različite interakcije koje su moguće.¹⁸

§ 4. LITERATURNI IZVORI

1. G. Gilli, P. Gilli, *The Nature of the Hydrogen Bond*, Oxford University Press, Oxford, 2009, str. 23-30.
2. G. Gilli, P. Gilli, *The Nature of the Hydrogen Bond*, Oxford University Press, Oxford, 2009, str. 23-24.
3. G. Gilli, P. Gilli, *The Nature of the Hydrogen Bond*, Oxford University Press, Oxford, 2009, str. 30-48.
4. G. Gilli, P. Gilli, *The Nature of the Hydrogen Bond*, Oxford University Press, Oxford, 2009, str. 49-50.
5. G. Gilli, P. Gilli, *The Nature of the Hydrogen Bond*, Oxford University Press, Oxford, 2009, str. 62.
6. D. L. Nelson, M. M. Cox, *Lehninger Principles of Biochemistry* (Sixth Edition), W. H. Freeman and Company, New York, str. 120-122.
7. D. L. Nelson, M. M. Cox, *Lehninger Principles of Biochemistry* (Sixth Edition), W. H. Freeman and Company, New York, str. 123.
8. D. L. Nelson, M. M. Cox, *Lehninger Principles of Biochemistry* (Sixth Edition), W. H. Freeman and Company, New York, str. 163-164.
9. D. L. Nelson, M. M. Cox, *Lehninger Principles of Biochemistry* (Sixth Edition), W. H. Freeman and Company, New York, str. 214-218.
10. D. L. Nelson, M. M. Cox, *Lehninger Principles of Biochemistry* (Sixth Edition), W. H. Freeman and Company, New York, str. 287,1080.
11. C. Reichardt, *Solvents and Solvent Effects in Organic Chemistry* (Third Edition), Wiley-VCH, Weinheim, 2003, str. 107.
12. C. E. Housecraft, A. G. Sharpe, *Inorganic Chemistry* (Second Edition), Pearson Education Limited, Harlow, str. 246-247.
13. G. Gilli, P. Gilli, *The Nature of the Hydrogen Bond*, Oxford University Press, Oxford, 2009, str. 59.
14. G. Gilli, P. Gilli, *The Nature of the Hydrogen Bond*, Oxford University Press, Oxford, 2009, str. 14-15.

15. http://lisa.chem.ut.ee/IR_spectra/conservation_materials/ethanol/ (Datum pristupa 8.8.2018.)
16. G. Gilli, P. Gilli, *The Nature of the Hydrogen Bond*, Oxford University Press, Oxford, 2009, str. 35-36.
17. G. Gilli, P. Gilli, *The Nature of the Hydrogen Bond*, Oxford University Press, Oxford, 2009, str. 16.
18. T. Jednačak, P. Novak, K. Užarević, I. Bartoš, J. Marković, M. Cindrić, *Croat. Chem. Acta* **84** (2) (2011) 203-209.
19. T. Shimanouchi, *Tables of Molecular Vibrational Frequencies, Consolidated Volume I*, NBS Publications, Washington, 1972, str. 45-46.
20. E. Mikami, T. Goto, T. Ohno, H. Matsumoto, and M. Nishida, *J. Pharmaceut. Biomed. Anal.* **28** (2002) 261–267.
21. D. M. Fouad, N. M. Ismail, M. A. El-Gahami, and S. A. Ibrahim, *Spectrochim. Acta Part A* **67** (2007) 564–567.
22. Z. J. Guo, G. Faraglia, S. Sitran, *Trans. Met. Chem.* **20** (1995) 91.
23. G. Gilli, P. Gilli, *The Nature of the Hydrogen Bond*, Oxford University Press, Oxford, 2009, str. 81-82.
24. M. Cindrić, T. K. Novak, and K. Užarević, *J. Mol. Struct.* **750** (2005) 135–141.