

# Ureidni bis-katekolni analog siderofora - sinteza i termodinamika kompleksiranja željezova(III) kationa

---

**Kalebić, Demian**

**Master's thesis / Diplomski 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:217:083105>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-10**



*Repository / Repozitorij:*

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





Sveučilište u Zagrebu  
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET  
Kemijski odsjek

Demian Kalebić

**Ureidni bis-katekolni analog siderofora - sinteza  
i termodinamika kompleksiranja željezova(III)  
kationa**

**Diplomski rad**

predložen Kemijskom odsjeku

Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

radi stjecanja akademskog zvanja

magistra kemije

Zagreb, 2018.



Ovaj diplomski rad izrađen je u Zavodu za Fizikalnu kemiju Kemijskog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom doc. dr. sc. Nikole Bregovića i izv. prof. dr. sc. Vesne Petrović Peroković i neposrednim voditeljstvom dr. sc. Nikole Cindre.



## Zahvale

*Hvala svim djelatnicima zavoda za fizikalnu kemiju, bivšim i trenutnim, na ugodnoj radnoj atmosferi i pomoći u svakom obliku, posebice: Katarini, Valentini, Mirjani, Đurđici, Dajani, Danijelu i Zlatku B.*

*Veliko hvala profesorici Vesni Petrović-Peroković na omogućavanju izrade ovog rada i svom doprinosu ovom radu.*

*Veliko hvala profesoru Vladislavu Tomišiću na svim savjetima i usmjerenjima tijekom izrade ovog rada, na uvodu u modove razmišljanja fizikalnog kemičara i na svakoj rečenici koja je počinjala sa: "Molim vas probajte samo još ovo..."*

*Veliko hvala neposrednom voditelju Nikoli Cindri na svom znanju koje je prenio na mene, teoretskom i praktičnom, tips and tricksima organskih sintetičara te na svim sarkastičnim komentarima i pogledima koji znače tisuću riječi.*

*Veliko hvala mentoru Nikoli Bregoviću na nezaustavljivom osmišljavanju modela, izmijenjenim muzičkim doživljajima te najviše za neprocjenjivu lekciju što znači biti kompletan znanstvenik ili štoviše, kompletna osoba.*

*Veliko hvala svim mojim prijateljima i kolegama, posebice Gregoru, Peri, Ediju, Nei, Kristin, Mići, Tutoru B., Nevenu, Čomi i Matei na svemu što će me potaknuti da s radošću gledam na trenutke provedene u njihovom društvu. Zakon ste.*

*Iznimno veliko hvala Tamari na svakoj podijeljenoj riječi, doživljaju, smijehu i suzama koji me čine beskrajno zahvalnim i sretnim što je imam pored sebe. Volim te.*

*Neizmjerne hvala mojim roditeljima Maji i Alenu, sestri Dei i očuhu Predragu te ostatku obitelji na svojoj bezuvjetnoj ljubavi, podršci, motivaciji, lekcijama i svemu ostalome što me čini onime što danas jesam. Imati vas je sve što čovjek može poželjeti.*



# Sadržaj

SAŽETAK.....	IX
ABSTRACT.....	XI
§ 1. UVOD .....	1
§ 2. LITERATURNI PREGLED .....	2
2.1. Kemija siderofora i njihovih analoga .....	2
2.1.1. Katekolni siderofori i njihovi analozi .....	4
2.1.2. Sinteza katekolnih siderofora i njihovih analoga.....	7
2.1.3. Kompleksacijska svojstva siderofora .....	14
2.2. Ureidni ditopični receptori.....	18
2.2.1. Kompleksacijska svojstva receptora s ureidnom podjedinicom .....	18
2.2.2. Sinteza supstituiranih urea .....	21
2.3. Kemija željeza .....	24
2.4. Metodologija proučavanja ravnotežnih reakcija nastajanja kompleksnih vrsta .....	26
§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	30
3.1. Materijali i metode.....	30
3.2. Sinteza spoja.....	32
3.2.1. Sinteza 2,2-dimetil-2H-1,3-benzodioksola (1) <sup>12</sup> .....	32
3.2.2. Sinteza 2,2-dimetil-2H-1,3-benzodioksol-4-karboksilne kiseline (2) <sup>12</sup> .....	32
3.2.3. Sinteza N,N'-bis[2-(tert-butiloksikarbamido)etil]uree (3) .....	33
3.2.4. Sinteza N,N'-bis(2-aminoetil)urea dihidroklorida (4).....	34
3.2.5. Sinteza N,N'-bis[2-(2,2-dimetil-2H-1,3-benzodioksol-4-karboksamido)etil]uree (5) .....	34
3.2.6. Sinteza N,N'-bis[2-(2,3-dihidroksibenzoilamino)etil]uree (LH <sub>4</sub> ) <sup>58</sup> .....	35
3.3. Određivanje protonacijskih konstanti spoja .....	36
3.4. Priprava i postupak standardizacije otopine željezova(III) perklorata .....	36
3.5. Određivanje konstanti stabilnosti kompleksnih vrsta .....	37
§ 4. REZULTATI I RASPRAVA.....	39
4.1. Sinteza spoja.....	39
4.2. Protonacijska svojstva priređenog liganda .....	42
4.3. Termodinamička karakterizacija reakcija kompleksiranja željeza(III) .....	46
§ 5. ZAKLJUČAK .....	54
§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA .....	56
§ 7. LITERATURNI IZVORI.....	58
§ 8. DODATAK.....	XIII
§ 9. ŽIVOTOPIS .....	XIX







Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
**Kemijski odsjek**

Diplomski rad

## SAŽETAK

### UREIDNI BIS-KATEKOLNI ANALOG SIDEROFORA – SINTEZA I TERMODINAMIKA KOMPLEKSIRANJA ŽELJEZOVA(III) KATIONA

Demian Kalebić

U okviru ovog rada pripremljen je analog siderofora s dvije katekolne podjedinice i ureidnom poveznicom ( $LH_4$ ) te su istražena njegova kompleksacijska svojstva, odnosno afinitet za vezanje željezovih(III) kationa u vodenom mediju. Kombinacijom potencimetrijskih i spektrofotometrijskih mjerenja određene su protonacijske konstante ravnoteže  $LH_4$  i konstante stabilnosti kompleksa s  $Fe(III)$ . Kako bi se pouzdano odredila stehiometrija svih nastalih željezovih kompleksa provedene su potencimetrijsko-spektrofotometrijske titracije pri nekoliko omjera koncentracija liganda i  $Fe(III)$ .

Prikupljeni rezultati pridonijet će boljem razumijevanju katekolnih receptora općenito, budući da je vrlo malen broj sličnih bis-katekolnih spojeva opisan u literaturi te je u ovom radu korištena specifična metodologija za potpunu karakterizaciju ravnotežnih reakcija kompleksiranja. Pripremljeni spoj uz katekolne skupine sadrži i ureidnu podjedinicu koja se često koristi kao anionsko vezno mjesto te će se u nastavku istraživanja proučiti mogućnosti vezanja ionskih parova s  $LH_4$ , pri čemu će rezultati ovog rada biti od ključne važnosti.

(61 stranica, 25 slika, 6 tablica, 65 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj kemijskoj knjižnici Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Horvatovac 102a, Zagreb i Repozitoriju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

Ključne riječi: ditopični receptor, katekol, konstanta stabilnosti, siderofor, urea, željezo(III)

Mentori: doc. dr. sc. Nikola Bregović i izv. prof. dr. sc. Vesna Petrović Peroković

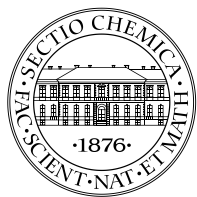
Neposredni voditelj: dr. sc. Nikola Cindro

Ocjenitelji:

1. doc. dr. sc. Nikola Bregović
  2. izv. prof. dr. sc. Vesna Petrović Peroković
  3. izv. prof. dr. sc. Iva Juranović Cindrić
  4. doc. dr. sc. Vladimir Stilinović
- Zamjena: prof. dr. sc. Vladislav Tomišić

Datum diplomskog ispita: 28. rujna 2018.





University of Zagreb  
Faculty of Science  
**Department of Chemistry**

Diploma Thesis

## ABSTRACT

### BIS-CATECHOL SIDEROPHORE ANALOGUE CONTAINING UREA MOIETY – SYNTHESIS AND THERMODYNAMICS OF IRON(III) CATION COMPLEXATION

Demian Kalebić

In the scope of this thesis, the synthesis of a siderophore analogue bearing two catecholate subunits connected with an urea-based linker ( $LH_4$ ) was performed. This was followed by the study of its affinity for binding iron(III) cations in aqueous medium. The research included measurement of the  $LH_4$  protonation equilibrium constants, elucidation of the stoichiometry of the formed complexes and determination of the corresponding stability constants using potentiometric and spectrophotometric measurements.

This study will allow better understanding of catecholate receptors in general, since very few similar bis-catecholate receptors have been previously described, and the specific methodological approach applied in this work was proven to be advantageous for complete characterisation of complexation equilibria. In addition to catechol subunits, the studied receptor contains urea moiety, which possibly enables  $LH_4$  to act as ion-pair receptor. The data gathered in this work will greatly facilitate the study of its potential to simultaneously bind anions and iron(III) cation.

(61 pages, 25 figures, 6 tables, 65 references, original in Croatian)

Thesis deposited in Central Chemical Library, Faculty of Science, University of Zagreb, Horvatovac 102a, Zagreb, Croatia and in Repository of the Faculty of Science, University of Zagreb

Keywords: catechol, ditopic receptor, iron(III), siderophore, stability constant, urea

Mentor: Dr. Nikola Bregović, Assistant Professor and Dr. Vesna Petrović Peroković, Associate Professor

Assistant mentor: Dr. Nikola Cindro

Reviewers:

1. Dr. Nikola Bregović, Assistant Professor
  2. Dr. Vesna Petrović Peroković, Associate Professor
  3. Dr. Iva Juranović Cindrić, Associate Professor
  4. Dr. Vladimir Stilinović, Assistant Professor
- Substitute: Dr. Vladislav Tomišić, Full Professor

Date of exam: 28 September 2018

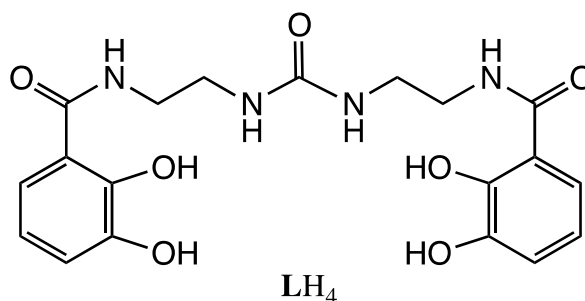


## § 1. UVOD

Siderofori su male biološke molekule s visokim afinitetom i velikom selektivnošću prema željezovom(III) kationu koje luče mikroorganizmi, biljke i gljive te imaju važnu ulogu u vezanju i transportu Fe(III). Primjeri molekula iz te klase spojeva su enterobaktin, krizobaktin i amonabaktini čija su kompleksacijska svojstva detaljno proučena. Usprkos značajnoj varijabilnosti struktura siderofora, njihovo zajedničko svojstvo je da tvore stabilne heksakoordinirane komplekse sa željezovim(III) kationom. Međutim, ovisno o uvjetima kompleksiranja i strukturi tih liganada, moguć je nastanak kompleksa drugih stehiometrija, specifičnih za pojedinu klasu siderofora. Budući da su siderofori među najefikasnijim poznatim biološkim kelatorima željezovih iona, detaljno istraživanje uvjeta koji određuju stabilnost i stehiometriju kompleksa tih spojeva i njihovih analoga izrazito je važno zbog velikog potencijala njihove uporabe u medicini i agronomiji.<sup>1,2</sup>

Posljednjih godina sve veća pozornost posvećuje se politopičnim supramolekulskim receptorima odnosno spojevima koji su sposobni vezati više različitih vrsta, primjerice ionske parove. Ispravnim dizajnom takvih molekula moguće je postići brojne prednosti poput kooperativnog vezanja i strože kontrole specijacije u otopini. Ureidna skupina pokazala se izvrsnim veznim mjestom za različite anionske vrste budući da sadrži dvije NH skupine koje mogu tvoriti vodikove veze s bazičnim anionima, poput karboksilata ili fosfata. Ugrađivanjem tog motiva u strukturu siderofornog derivata potencijalno se može dobiti efikasni ditopični receptor ionskog para.<sup>3,4</sup>

U okviru ovog rada sintetiziran je receptor LH<sub>4</sub> (slika 1) te su detaljno okarakterizirana njegova kompleksacijska svojstva željezova(III) iona, uključujući složenu specijaciju u vodenim otopinama različitih omjera koncentracija liganda i željeza(III) u širokom rasponu pH.



**Slika 1.** Strukturna formula ureidnog bis-katekolnog analoga siderofora.

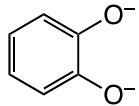
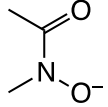
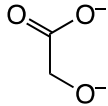
## § 2. LITERATURNI PREGLED

### 2.1. Kemija siderofora i njihovih analoga

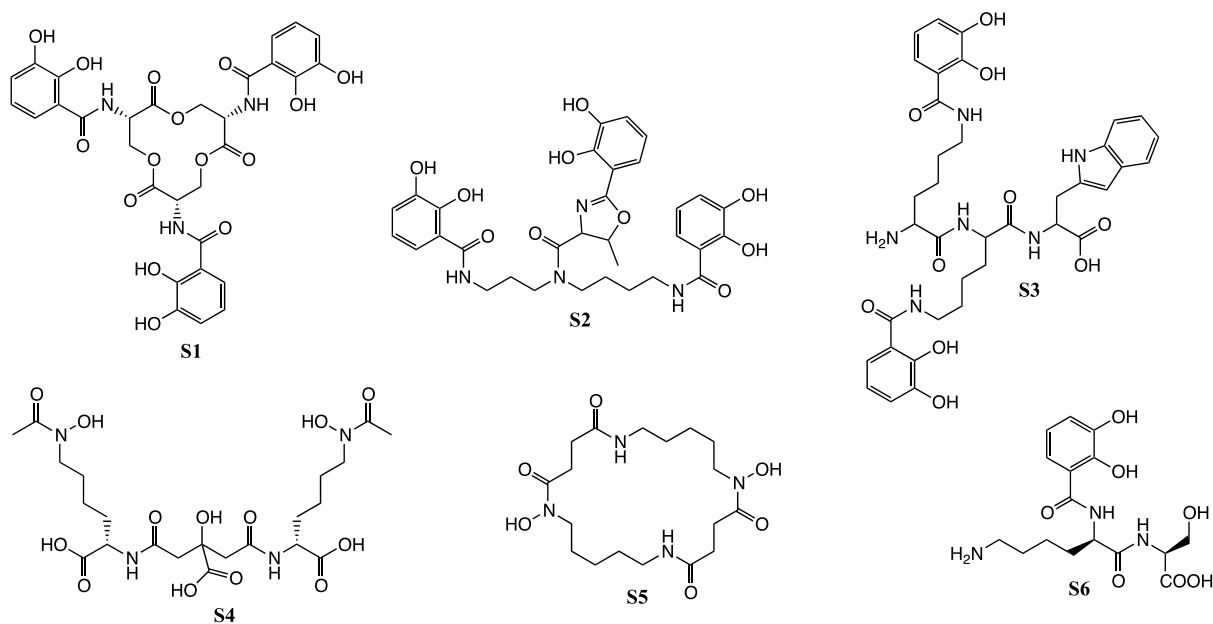
Siderofori su spojevi male molekulske mase (500-1500 Da) te visokog afiniteta i velike selektivnosti prema željezovom(III) kationu. Proizvode ih mikroorganizmi, biljke i gljive kako bi iz tla i vode unijele željezo čija je biodostupost niska, unatoč njegovoj velikoj zastupljenosti u Zemljinoj kori. Razlog tomu je slaba topljivost željeza(III) ( $K_{sp}(\text{Fe}(\text{OH})_3) = 10^{-39} \text{ mol}^4 \text{ dm}^{-12}$ ) pri fiziološkom pH. Željezo, kao jedan od esencijalnih elemenata u tragovima, ima važnu ulogu kofaktora koji određuje rast patogenih mikroorganizama, dok je u biljaka, osim za rast, neophodan i za biosintezu klorofila.

Danas je poznato više od 500 siderofora složenih struktura pa se oni klasificiraju na različite načine. Primjerice, prema vrsti organizma koji ih proizvodi (biljke, gljive mikroorganizmi), strukturnoj okosnici siderofora (peptidna ili nepeptidna, ciklička ili ravnolančana) ili prema vrsti didentatne kelirajuće skupine. Kako izrazito velik afinitet za željezo(III) imaju negativno nabijeni atomi kisika koji oktaedarskom koordinacijom formiraju termodinamički stabilno visokospinsko stanje željeza(III), najčešći strukturni motivi kelirajućih skupina u sideroforima su katekolni, hidroksamatni i  $\alpha$ -hidroksikarboksilatni. Strukturne formule i odgovarajuće  $pK_a$  vrijednosti navedenih skupina prikazane su u tablici 1. Neki siderofori sadrže samo jednu vrstu kelirajuće skupine dok se kod drugih željezovi kompleksi stabiliziraju pomoću više različitih veznih skupina (slika 2).<sup>1,5,6</sup>

**Tablica 1.** Kelirajuće skupine siderofornih liganada i njihove približne vrijednosti  $pK_a$ .<sup>a</sup>

Kelirajuća skupina	$pK_a$	Strukturna formula
katekolatna	9,2 13,0	
hidroksamatna	9,0	
$\alpha$ -hidroksikarboksilatna	3,0 14,5	

<sup>a</sup> Vrijednosti preuzete iz ref. 1.

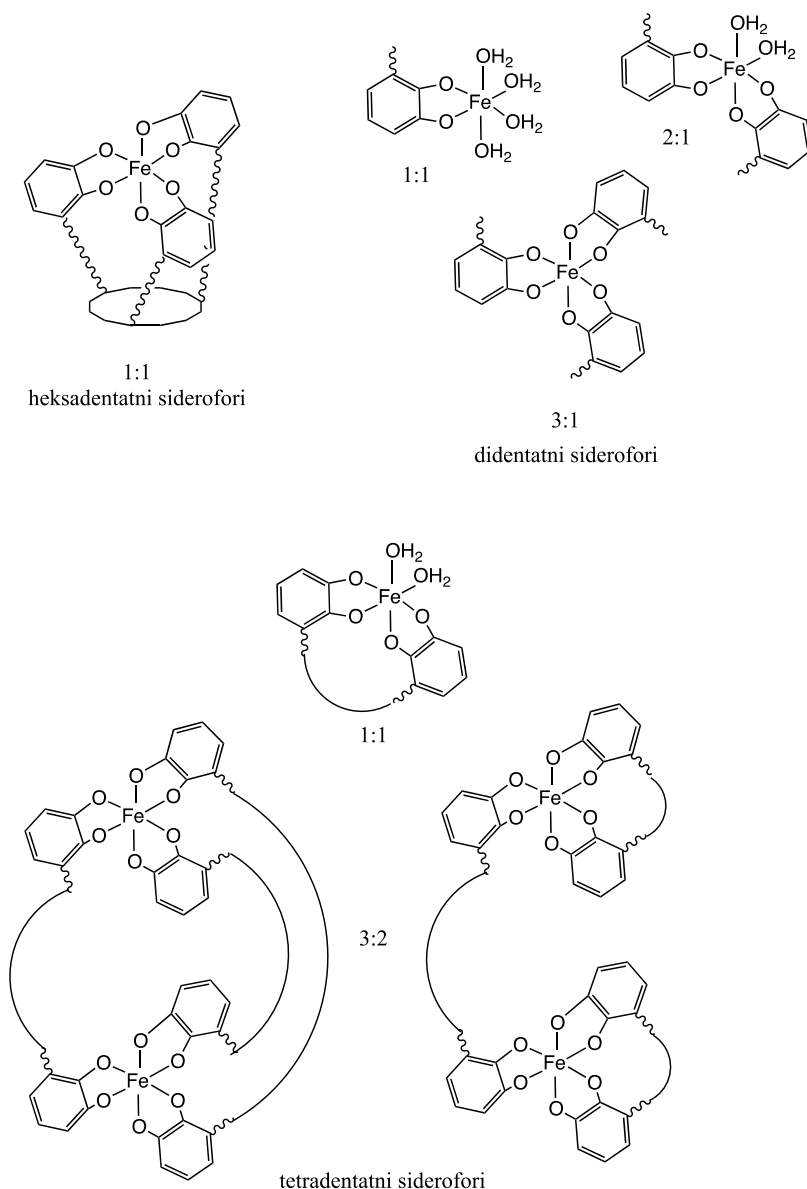


**Slika 2.** Strukturne formule različitih siderofora: enterobaktin (**S1**), agrobaktin (**S2**), amonabaktin T 732 (**S3**), aerobaktin (**S4**), bisukaberin (**S5**), krizobaktin (**S6**).



### 2.1.1. Katekolni siderofori i njihovi analozi

Katekolni siderofori su derivati 2,3-dihidroksibenzojeve kiseline s aminokiselinskom ili peptidnom strukturnom okosnicom.<sup>6</sup> Velik broj siderofora je heksadentantan čime je minimaliziran nepovoljni entropijski utjecaj keliranja  $\text{Fe}^{3+}$  pomoću više molekula liganda budući da se postiže oktaedarska koordinacija iona jednom molekulom siderofora (slika 3). Jedan od detaljno istraženih katekolnih siderofora takve vrste je tris-katekolni siderofor enterobaktin (**S1**)<sup>7</sup>. Velika pažnja također je posvećena istraživanju siderofora s manim brojem veznih mjesta koji tvore komplekse različitih stehiometrija. Primjerice, didentatni siderofori poput krizobaktin (**S6**)<sup>8,9</sup> i vankrobaktin (**S39**)<sup>10</sup> koji koordiniraju željezo s jednom do tri molekule liganda, ovisno o pH otopine. Također, detaljno su istraženi tetradentatni katekolni siderofori amonabaktini (**S3**)<sup>11</sup>, koji pri nižim vrijednostima pH tvore komplekse stehiometrije 1:1 uz dvije molekule vode koordinirane na metalni centar. Pri višim vrijednostima pH preferirani su kompleksi stehiometrije 3:2 (siderofor : željezo(III)) uz različit broj premošćujućih molekula liganda (slika 3).

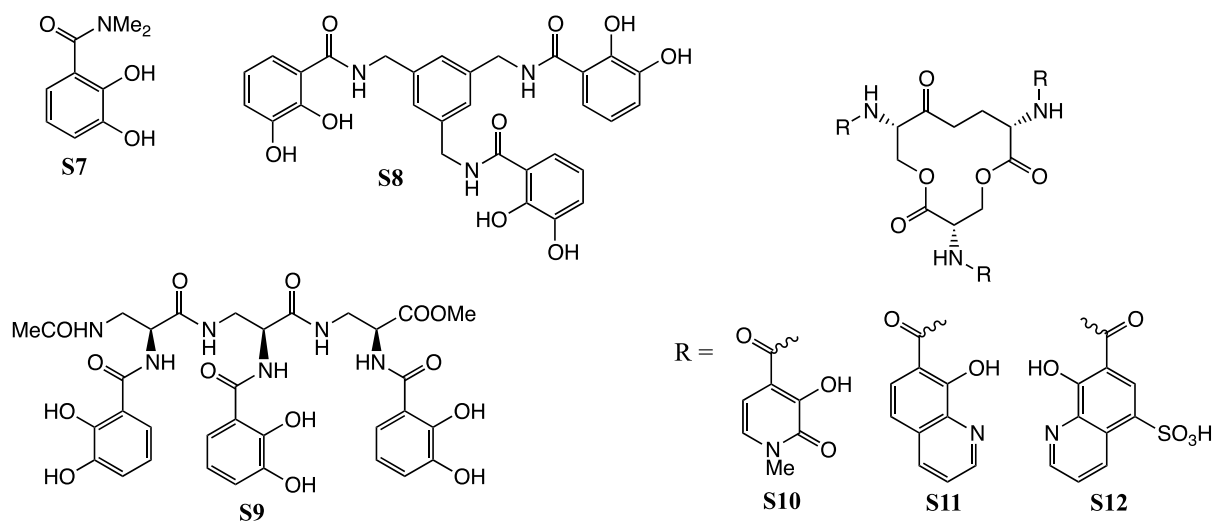


**Slika 2.** Načini vezanja tipični za katekolne siderofore s različitim brojem veznih mjesta.

Naboji i strukturne okosnice molekula nisu prikazane zbog jednostavnosti prikaza.

Najjednostavniji analozi katekolnih siderofora su *N,N*-dimetil-2,3-dihidroksibenzamid (**S7**) i *N*-etil-2,3-dihidroksibenzamid. Zbog jednostavne strukture i visoke stabilnosti u lužnatom mediju ( $\text{pH} > 10$ ) ti se spojevi često koriste za aproksimaciju  $\text{pK}_a$  vrijednosti katekolnih siderofora koji sadrže skupine sklone hidrolizi, primjerice amidne ili esterske skupine (slika 4).<sup>11</sup>

Atraktivnosti koordinacijske kemije siderofora i njihovih analoga svjedoči i velik broj istraživanja fokusiranih na analoge enterobaktina (slika 4) kao što su Coreyev karbociklički analog (**S20**)<sup>12</sup>, Harrisov MECAM (**S8**)<sup>13</sup>, Rastetterov enantioenterobaktin i linearni analog **S9**<sup>14</sup>, Meyerov hopobaktin (**S10**)<sup>15</sup>, oksinobaktin (**S11**) i sulfoksinobaktin (**S12**) d'Hardemarea<sup>16</sup> te Kappelovi lipofilni derivati.<sup>17</sup>



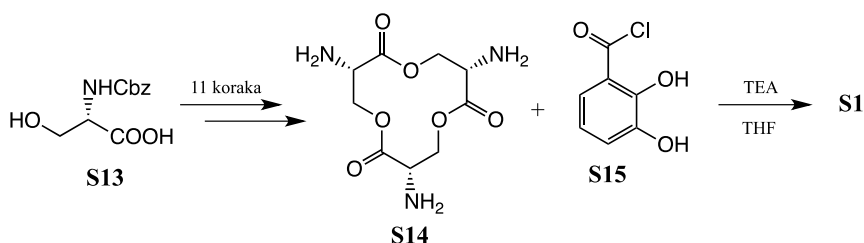
**Slika 1.** Strukturne formule analoga enterobaktina.

### 2.1.2. Sinteza katekolnih siderofora i njihovih analoga

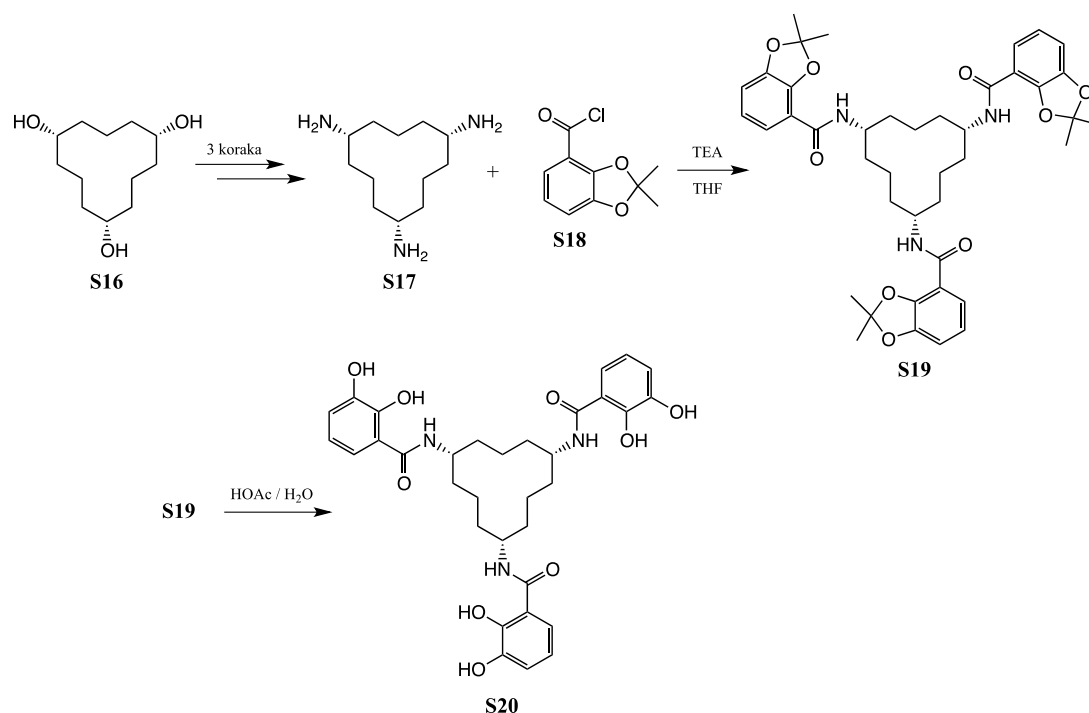
Sinteza prirodnih siderofora, njihovih enantiomera i sintetskih analoga važna je zbog njihove primjene u istraživanjima mehanizma stereospecifičnog raspoznavanja<sup>14,18</sup> i unosa željeza u mikroorganizama<sup>19</sup> te ponajviše kao potencijalnih antibiotika<sup>20,21</sup> ili aktivnih tvari za liječenje prilikom trovanja željezom.<sup>22</sup>

Kao modelni spojevi za sintezu analoga katekolnih siderofora često se koriste agrobaktina i spermidinski siderofori poput agrobaktina (slika 2). Prilikom sinteze katekolnih liganada za uvođenje katekolne skupine najčešće se koristi 2,3-dihidroksibenzojeva kiselina i njeni derivati, uz zaštitu fenolnih atoma kisika metilnim, benzilnim ili acetonidnim zaštitnim skupinama. U tek nekoliko primjera korištena je nezaštićena 2,3-dihidroksibenzoilna skupina.<sup>23</sup> U nastavku teksta bit će prikazani razni pristupi uvođenju katekolnih skupina u strukture siderofora.

Jedna od prvih objavljenih totalnih sinteza siderofora jest ona enterobaktina E. J. Coreya<sup>24</sup>, te njegovog karbocikličkog analoga.<sup>12</sup> U sintezi enterobaktina (shema 1), katekolne podjedinice uvedene su nakon izgradnje triserin-laktonske strukturne okosnice **S14** u 11 koraka, polazeći od zaštićenog L-serina (**S13**). Uvedene su reakcijom **S14** s 2,3-dihidroksibenzoil-kloridom (**S15**) uz prisutnost trietilamina kao baze. Iako je to značajno utjecalo na smanjenje ukupnog iskorištenja sinteze, katekolna skupina kiselinskog klorida **S15** nije prethodno zaštićena zbog nestabilnosti enterobaktina u kiselim ili bazičnim uvjetima pri kojima se uklanjaju zaštitne skupine. Prilikom sinteze karbocikličkog analoga enterobaktina (**S20**), katekolni dio molekule uveden je na drugačiji način. Triamin **S17**, pripremljen u tri koraka polazeći od spoja **S16**, reagira sa zaštićenim 2,3-dihidroksibenzoil-kloridom (**S18**) u prisutnosti trietilamina dajući spoj **S19**. Acetonidna zaštita spoja **S19** uklonjena je hidrolizom u smjesi octene kiseline i vode jer spoj **S20** u tim uvjetima nije bio nestabilan poput enterobaktina.

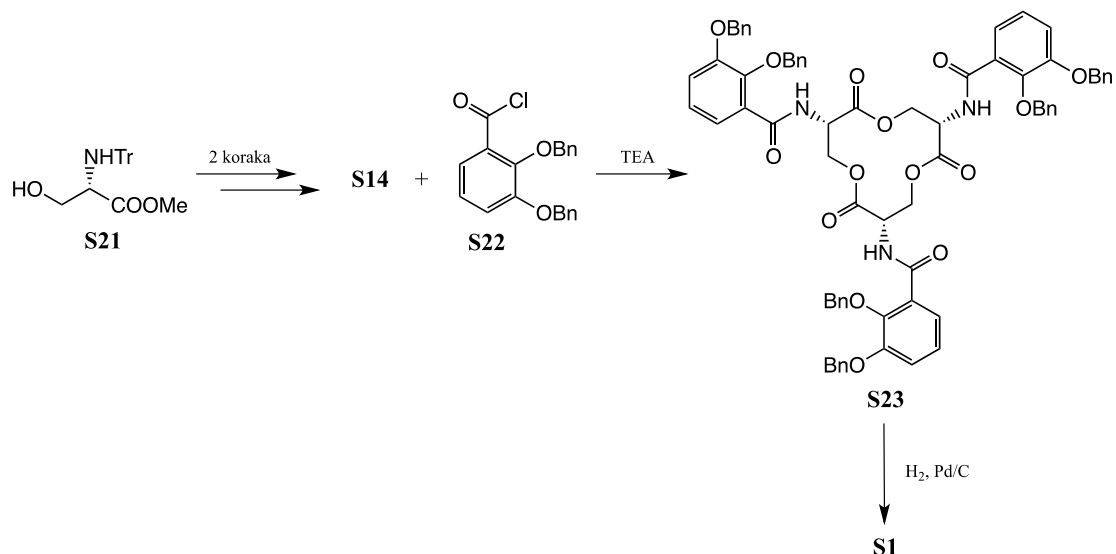


Shema 1. Coreyeva sinteza enterobaktina.<sup>24</sup>



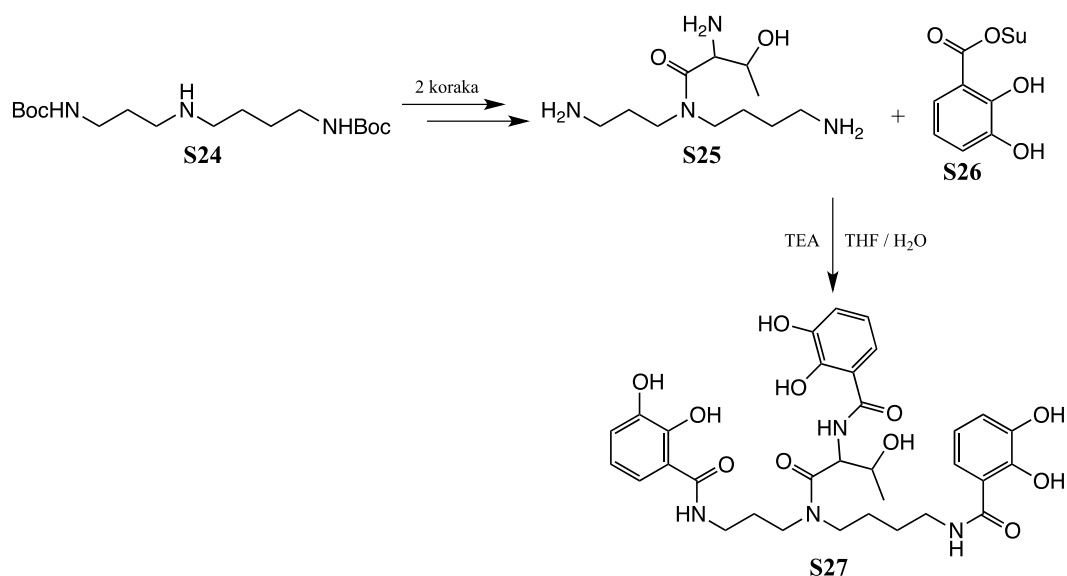
**Shema 2.** Coreyeva sinteza karbocikličkog analoga enterobaktina.<sup>12</sup>

Ramirez i sur. uspjeli su znatno pojednostaviti sintezu enterobaktina u odnosu na Coreyev pristup i svesti je na samo četiri koraka (shema 3). Znatni porast iskorištenja bio je rezultat smanjenja koraka sinteze triserin-laktonske okosnice **S14**, uz korištenje dvostruko zaštićenog L-serina (**S21**) kao polaznog spoja. Za uvođenje katekolne skupine u molekulu, umjesto nezaštićene kiseline, korišten je 2,3-dibenziloksibenzoil-klorid (**S22**) uz prisutnost trietilamina, nakon čega su benzilne zaštitne skupine produkta **S23** uklonjene katalitičkom hidrogenolizom.<sup>25</sup>



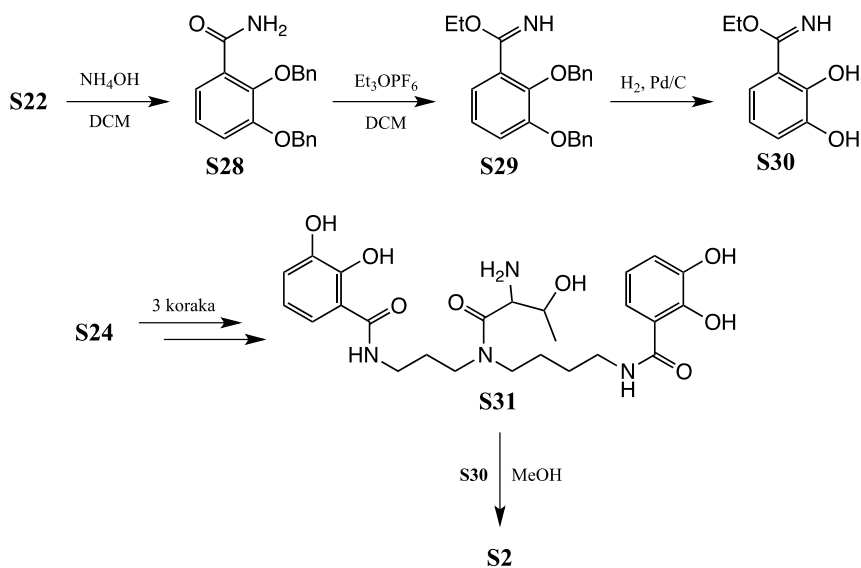
Shema 3. Ramirezova sinteza enterobaktina.<sup>25</sup>

Dok je u Coreyjevoj sintezi enterobaktina uporaba nezaštićene 2,3-dihidroksibenzojeve kiseline negativno utjecala na ukupni prinos sinteze, što je usmjerilo daljnje pokušaje sinteze prema uvođenju zaštićene katekolne skupine, Bergeron i sur. uveli su nezaštićenu katekolnu skupinu tek u zadnjem koraku sinteze. Time se izbjegavaju koraci zaštite međuprodukata, što sintezu čini praktičnijom i povoljno utječe na ukupno iskorištenje. Prilikom sinteze spermidinskog siderofora agrobaktina A (S27), Bergeron i sur. uspješno su uveli katekolne skupine reakcijom *N*-hidroksisukcinimidnog estera 2,3-dihidroksibenzojeve kiseline (S26), sa spermidinskim derivatom S25. Spoj S25 priređen je u dva koraka iz dvostruko zaštićenog spermidina (S24), a katekolne skupine uvedene su reakcijom spoja S25 s esterom S26 uz prisutnost trietilamina u smjesi THF-a i vode (shema 4).<sup>26</sup>



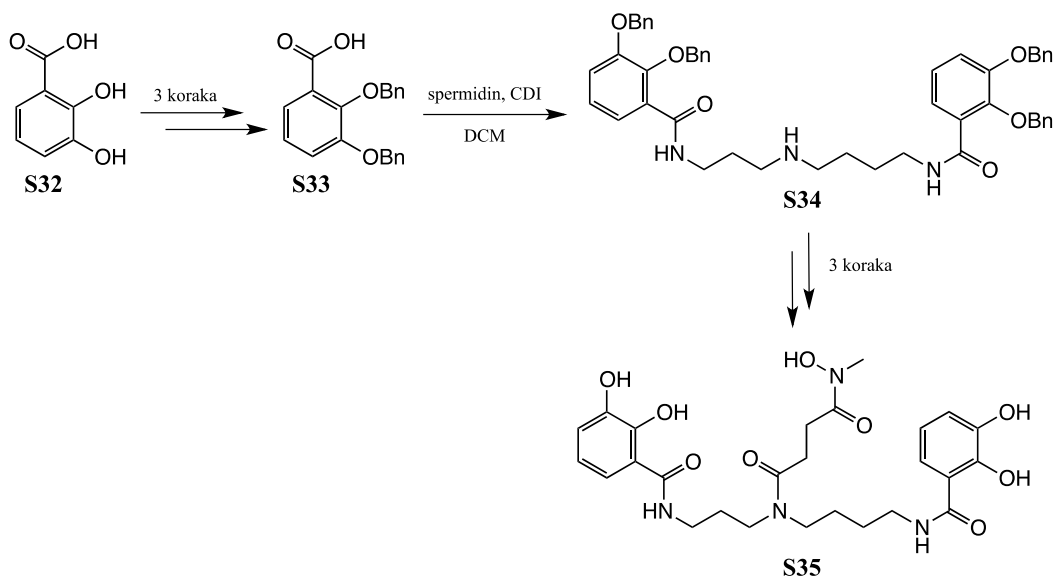
Shema 4. Bergeronova sinteza agrobaktina A.<sup>26</sup>

Nastavno na sintezu agrobaktina A (S27), Bergeron i sur. sintetizirali su agrobaktin (S2) koristeći etil-imidatni derivat 2,3-dihidroksibenzojeve kiseline (S30) kao reagens za uvođenje katekolne skupine (shema 5). Navedeni spoj dobiven je aminolizom zaštićenog kiselinskog klorida S22 prema Rastetterovom postupku<sup>14</sup>, čime je dobiven amid S28. Selektivno alkiliranje karbonilnog atoma kisika amidne skupine amida S28 postignuto je pomoću trietiloksonijevog heksafluorofosfata u diklormetanu. Benzilne zaštite etil-imidata S29 uklonjene su hidrogenolizom prije reakcije s ostatkom molekule zbog njihove steričke zahtjevnosti. Spermidinska okosnica S31 pripravljena je iz spoja S24 te je naposljetku agrobaktin priređen reflusom spojeva S30 i S31 u metanolu.<sup>27</sup>



**Shema 5.** Bergeronova sinteza agrobaktina.<sup>27</sup>

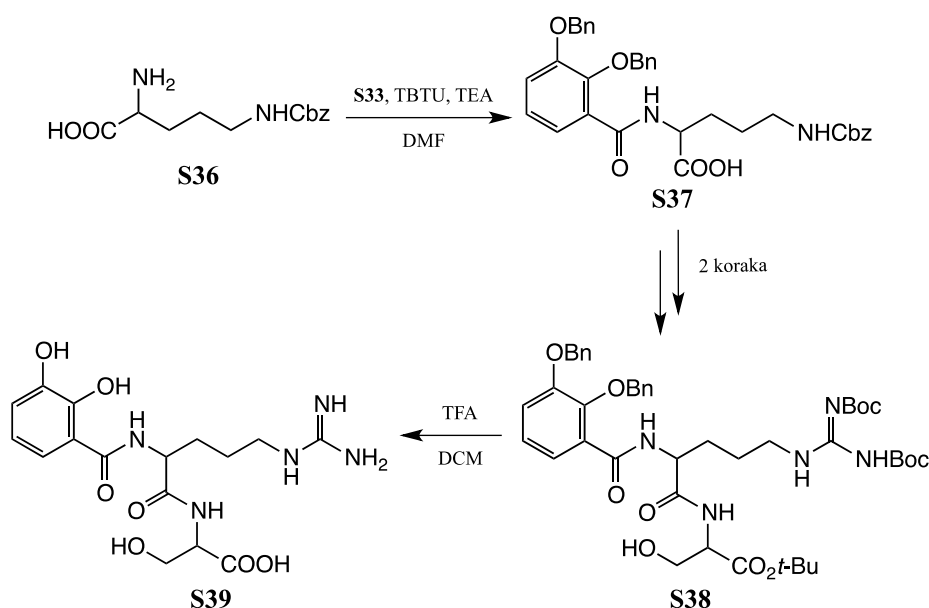
Sharma i sur. su u okviru sinteze spermetaksola (**S35**), sintetskog analoga spermidinskih siderofora, katekolne skupine uveli selektivnim aciliranjem primarnih amino-skupina spermidina. Kao reagens su koristili 2,3-dibenziloksibenzojevu kiselinu (**S33**) priređenu iz kiseline **S32** u 3 koraka. Aciliranje je provedeno u DCM-u uz pomoć CDI-a kao reagensa za sintezu amidne veze (shema 6). Nakon uvođenja hidroksamatne skupine u spoj **S34** i uklanjanja benzilnih zaštitnih skupina katalitičkom hidrogenolizom dobiven je finalni spoj **S35**.<sup>28</sup>



**Shema 6.** Sharmina sinteza spermetaksola.<sup>28</sup>

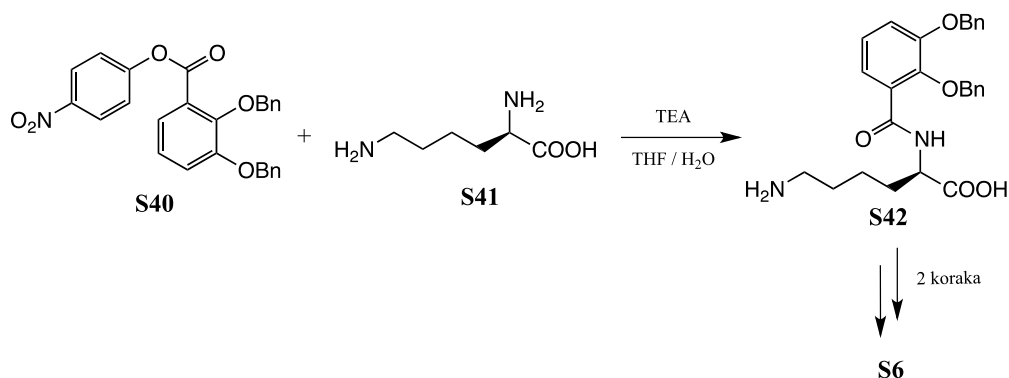


Prilikom sinteze vankrobaktina (**S39**), Soengas i sur. su katekolnu skupinu uveli reakcijom peptidnog povezivanja zaštićene kiseline **S33** s jednostruko zaštićenom ornitinskom okosnicom (**S36**) uz TBTU kao reagens za peptidno povezivanje i trietilamin kao bazu u DMF-u (shema 7). Nakon uvođenja gvanidinske i serinske skupine u spoj **S37**, benzilna zaštita katekolne skupine uklonjena je zajedno s gvanidinskim Boc zaštitama i esterskom zaštitom karboksilne skupine spoja **S38** trifluoroctenom kiselinom u diklormetanu i time je dobiven konačni spoj **S39**.<sup>29</sup>



Shema 7. Soengasina sinteza vankrobaktina.<sup>29</sup>

Persmark i sur. su prilikom sinteze krizobaktina (**S6**) katekolnu skupinu uveli reakcijom *p*-nitrofenilnog estera 2,3-dibenziloksibenzojeve kiseline (**S40**) s jednostruko zaštićenim D-lizinom (**S41**) uz trietilamin kao bazu u smjesi THF-a i vode (shema 8). Benzilne zaštitne skupine produkta **S42** uklonjene su hidrogenolizom.<sup>30</sup>

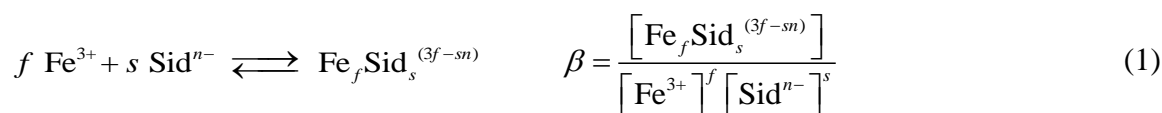


**Shema 8.** Persmarkova sinteza krizobaktina.<sup>30</sup>

Pregledom literature vezane uz sintezu katekolnih siderofora nalaze se razni načini uvođenja katekolne skupine u molekulu. Iz rezultata dosadašnjih sinteza može se zaključiti da unatoč tome što se uporabom zaštitnih skupina na katekolnim atomima kisika uvode dva dodatna sintetska koraka, korištenje nezaštićene katekolne skupine u većini slučajeva dovodi do znatno nižeg prinosa. Iz tih razloga je sintezi katekolnih siderofora i njihovih derivata općenito bolje pristupiti koristeći zaštićenu 2,3-dihidroksibenzojevu kiselinu.

### 2.1.3. Kompleksacijska svojstva siderofora

Kao što je već spomenuto, siderofori tvore veoma stabilne kelatne komplekse s Fe(III) uglavnom oktaedarske koordinacije. Katekolna skupina posjeduje iznimno dobra svojstva koordiniranja željeza(III) zbog dva *ortho*-fenolatna atoma kisika velike gustoće naboja. Interakcije između katekolne skupine i trostruko nabijenog metalnog kationa ostvaruju se zamjenom protona katekolne skupine pa se reakcije u kojima se proučavaju kompleksacijska svojstva mogu promatrati kao kompeticijske reakcije protona i Fe<sup>3+</sup> za vezanje na fenolatne atome kisika. Kvantitativna mjera stabilnosti nastalog kompleksa je konstanta ravnoteže nastajanja kompleksa, tj. konstanta stabilnosti  $\beta$  za općenitu reakciju:



Vrijednosti navedene konstante stabilnosti kreću se u rasponu od 10<sup>23</sup>-10<sup>49</sup> dm<sup>3</sup> mol<sup>-1</sup> pri čemu do sad najveća izmjerena vrijednost odgovara nastajanju Fe(III) kompleksa enterobaktina. To upućuje na činjenicu da enterobaktin može vezati željezo iz netopljivih oksida i hidroksida. Konstante stabilnosti analognih Fe<sup>2+</sup> i Cu<sup>2+</sup> kompleksa znatno su manje zbog njihove manje gustoće naboja te većeg ionskog radijusa. Zahvaljujući tom svojstvu, jedan od mehanizama otpuštanja željeza iz siderofora u stanici temelji se na redukciji željeza iz Fe(III) u Fe(II).<sup>1,5</sup>

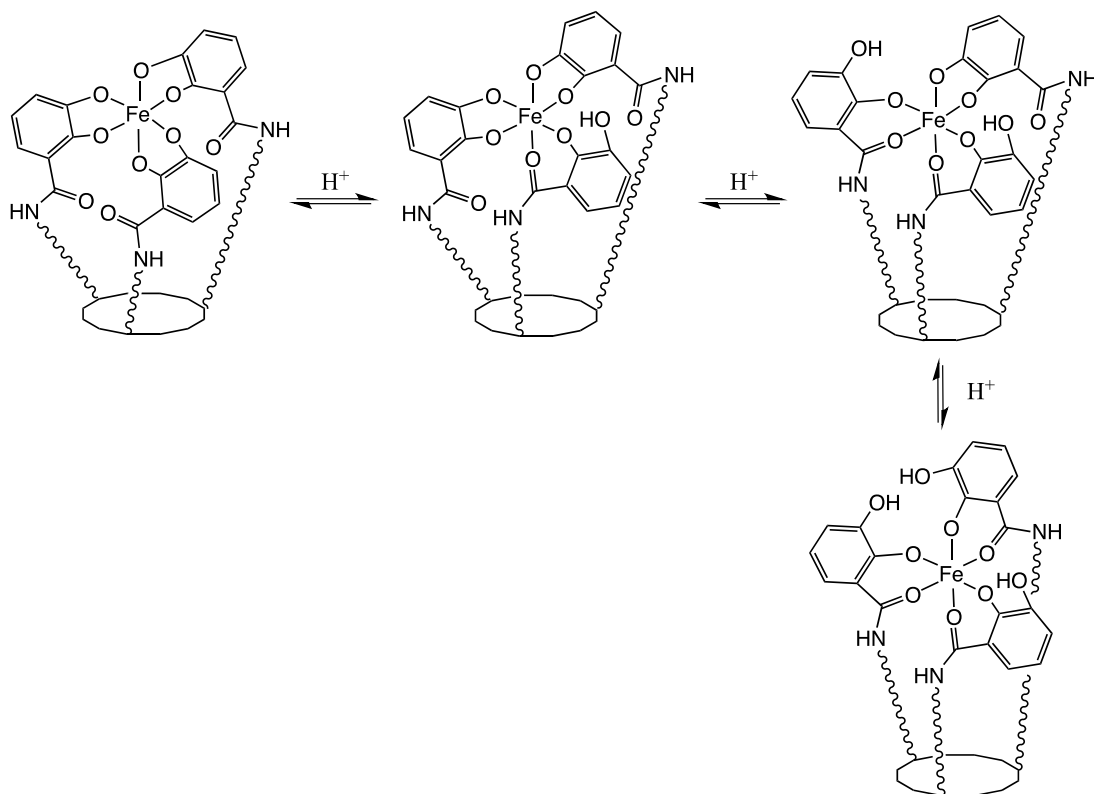
Oktaedarsko polje katekolnih atoma kisika tvori optimalno vezno mjesto za visokospinski Fe<sup>3+</sup> s ionskim radijusom 0,60 Å na što ukazuje činjenica da ekvivalentni kompleksi trovalentnih metalnih iona manjeg radijusa kao što je Al<sup>3+</sup> ili većeg radijusa kao što je In<sup>3+</sup> imaju konstante manje za četiri reda veličine (tablica 2).<sup>1</sup>

**Tablica 2.** Konstante ravnoteže kompleksa pirokatekola s različitim kationima stehiometrije 1:1 u usporedbi s ionskim radijusom kationa.

Ion	$r_{\text{ionski}}^a / \text{Å}$	$\log K_1$
Fe <sup>3+</sup>	0,60	20,0 <sup>b</sup>
Fe <sup>2+</sup>	0,70	7,9 <sup>c</sup>
Cu <sup>2+</sup>	0,73	13,9 <sup>c</sup>
Al <sup>3+</sup>	0,53	16,3 <sup>c</sup>
In <sup>3+</sup>	0,80	16,5 <sup>d</sup>

<sup>a</sup> Vrijednosti preuzete iz ref. 31, <sup>b</sup> Vrijednosti preuzete iz ref. 32, <sup>c</sup> Vrijednosti preuzete iz ref. 33, <sup>d</sup> Vrijednosti preuzete iz ref. 34.

Pri višim vrijednostima pH, tris-katekolni ligandi vežu Fe(III) ione pomoću katekolnih atoma kisika kao i jednostavniji, mono-katekolni ligandi. No, pri nižim vrijednostima pH, reakcije disocijacije mono-katekolatnih kompleksa stehiometrije 3:1 (ligand : željezo(III)) različite su od onih kompleksa liganada s većim brojem veznih mjesta. Prilikom disocijacije kompleksa mono-katekolnih liganada, dolazi do potpunog protoniranja disocirane katekolne skupine. To se očituje kao značajan pomak apsorpcijskog maksimuma prema većim valnim duljinama. S druge strane, kod kompleksa tris-katekolnih liganada, sniženjem pH otopine redovito se primijećuje znatno manji pomak maksimuma apsorpcije. To je objašnjeno alternativnim načinom koordinacije željeza(III) pri čemu dolazi do protoniranja atoma kisika katekolne skupine u *meta*-položaju, a ostvaruje se interakcija karbonilnog atoma kisika amidne skupine sa željezom(III) (slika 5).<sup>23,35</sup> Taj način vezanja naziva se salicilatnim, s obzirom da nalikuje na onaj koji ostvaruje salicilatni anion.



**Slika 5.** Prelazak u salicilatni način vezanja heksadentatnih siderofora uslijed protonacije katekolnih skupina. Naboji su izostavljeni zbog jednostavnosti prikaza.

Tomišić i sur. proučavali su kompleksacijska svojstva mono-katekolnog siderofora krizobaktina kombiniranim potencijometrijsko-spektrofotometrijskim mjerenjima i okarakterizirali model kompleksiranja željeza(III).<sup>8</sup> Rezultati tog istraživanja bili su u skladu s prethodno dobivenim nalazima potencijometrijskih mjerenja Presmarka i sur.,<sup>9</sup> čime je potvrđen pretpostavljeni model.

Kompleksacijska svojstva bis-katekolnih siderofora, tj. *amonabactina* proučavali su Telford i sur. te primijetili da ti ligandi sa željezom(III) tvore strukturalno raznolike komplekse.<sup>11</sup> Primjerice, uočeno je nastajanje dvostruko protoniranog kompleksa stehiometrije 3:2 (ligand : željezo(III)). Ta vrsta nužno uključuje salicilatni način koordinacije željeza sukladno opisanom u okviru istraživanja krizobaktina.<sup>8,9</sup> Rezultati njihovih istraživanja sažeti su u tablici 3, a strukture navedenih kompleksa prikazane su na slici 3.

**Tablica 3.** Konstante stabilnosti kompleksa amonabaktina (Amo) i krizobaktina (Cb) sa željezom. Naboji kompleksa nisu prikazani zbog jednostavnosti.

Kompleksna vrsta	broj koordiniranih katekolnih skupina po Fe(III) ionu	$\log \beta$	$\lambda_{\max}$
FeCb <sup>a</sup>	1	33,1	700
FeCb <sub>2</sub> <sup>a</sup>	2	52,1	572
FeCb <sub>3</sub> <sup>a</sup>	3	72,5	493
Fe(Amo) <sup>b</sup>	2	34,3	564
H <sub>2</sub> Fe <sub>2</sub> (Amo) <sub>3</sub> <sup>b</sup>	3 <sup>c</sup>	105,1	518
Fe <sub>2</sub> (Amo) <sub>3</sub> <sup>b</sup>	3	86,3	492

<sup>a</sup> Preuzeto iz ref. 8, <sup>b</sup> Preuzeto iz ref. 11, <sup>c</sup> Uključujući i skupine koordinirane salicilatnim načinom.

## 2.2. Ureidni ditopični receptori

### 2.2.1. Kompleksacijska svojstva receptora s ureidnom podjedinicom

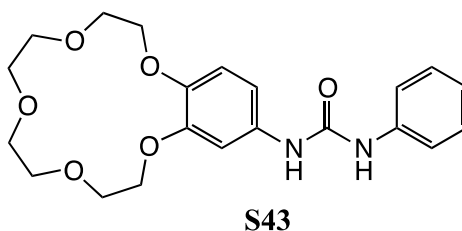
Počeci supramolekulske kemije uključuju istraživanja kationskih receptora, poput kriptanada i krunastih etera. Premda je razvoj anionskih receptora uslijedio nešto kasnije, s vremenom i ta grana kemije dobiva zasluženu pozornost te su do danas istraženi brojni spojevi sposobni tvoriti stabilne komplekse s negativno nabijenim vrstama. Većina anionskih receptora sadrži skupine koje mogu djelovati kao donori vodikove veze, a česti su primjeri kompleksa dodatno stabiliziranih elektrostatskim interakcijama.

Među neutralnim anionskim receptorima vrlo stabilne komplekse tvore derivati uree i tiouree.<sup>3,36</sup> Interakcije aniona s ureidnom skupinom receptora najčešće izostaju u vodenom mediju zbog kompetitivnosti tog otapala, tj. stvaranja stabilnih vodikovih veza s molekulama otapala, kako s receptoima tako i s anionima. Dodatni problem neutralnih ureidnih anionskih receptora je njihova slaba topljivost u vodi. Zbog toga je većina istraživanja anionskih kompleksacijskih svojstava ureidnih receptora provedena u bezvodnim aprotičnim otapalima poput dimetilsulfoksida, acetonitrila i kloroforma.<sup>37</sup> Ureidna podjedinica može ostvariti dvije vodikove veze s anionom, no interakcije se razlikuju ovisno o vrsti aniona. Tako se s oksoanionima kao što su acetatni, fosfatni ili sulfatni ostvaruju interakcije s obje NH skupine. Važno je napomenuti da se s perkloratnim ionima, zbog manjeg parcijalnog negativnog naboja na atomima kisika u usporedbi s ostalim navedenim oksoanionima ostvaruju najslabije interakcije te u većini istraživanja nastajanje kompleksa s tim anionom nije primijećeno. Ureidne skupine s anionima poput sferičnih halogenida mogu ostvariti i bifurkirane vodikove veze, čija se jačina također smanjuje s gustoćom naboja iona. Zbog toga je koordinacija jodidnog iona ureidnom skupinom redovito najmanje povoljna. Fluorid može ostvariti interakcije s ureidnom NH skupinom i tvoriti kompleks, no zbog izrazite bazičnosti, dodatkom suviška tih iona, dolazi do deprotoniranja ureidne skupine uslijed nastanka HF, odnosno homoasocijata  $\text{HF}_2^-$ . Reakcija deprotoniranja receptora redovito je popraćena izraženim spektralnim promjenama u vidljivom dijelu spektra što se očituje i kao značajna promjena boje otopine.<sup>38,39</sup>

Vrlo zanimljivo područje supramolekulske kemije vezano je uz receptore ionskih parova tj. spojeve koji istovremeno mogu vezati i katione i anione. U strukturama receptora ionskih parova često se nalaze dva dobro definirana dijela molekule, pri čemu je jedan pogodan za kompleksiranje kationa a drugi djeluje kao vezno mjesto za anione koje čine donori vodikove

veze (primjerice amidne i ureidne NH skupine) ili Lewisove kiseline. Takvi receptori nazivaju se heteroditopičnima.<sup>40,41</sup>

Kooperativno vezanje aniona i kationa receptora s ureidnom podjedinicom istraživano je u otopini i čvrstoj fazi. Primijećeno je da vezanje jedne vrste iona može povećati stabilnost kompleksa i omogućiti bolji transport iona kroz membrane.<sup>42</sup> Barboiu i sur. proučavali su heteroditopični ureidni derivat krunastih etera **S43** (slika 6) i njegovu sposobnost samoorganizacije u prisutnosti NaCl i NaNO<sub>3</sub>. Navedeni spoj veže natrijeve soli u CDCl<sub>3</sub>, a uočeno je i nastajanje dimera i viših agregata tog spoja u otopini i čvrstoj fazi. Kristalne strukture dviju kompleksnih vrsta ukazale su na značajne razlike u orijentaciji kruna-eterskog dijela molekule u odnosu na ureidni. U slučaju kompleksa s NaNO<sub>3</sub>, ligandi su orijentirani antiparalelno tvoreći komplekse u stehiometrijskom omjeru 1:1 (ligand : ionski par), dok je u slučaju kompleksa s NaCl struktura kompleksa paralelna uz stehiometriju liganda i ionskog para 2:1. U toj strukturi Na<sup>+</sup> nalazi se između kruna-eterskih skupina, a kloridni anion je koordiniran s dvije ureidne skupine. Navedeni rezultati upućuju na nastanak samoorganiziranih struktura kooperativnošću makrocikličkog kompleksiranja kationa, koordinacije aniona vodikovim vezama te  $\pi$ - $\pi$  interakcijama aromatskih sustava.<sup>43</sup>

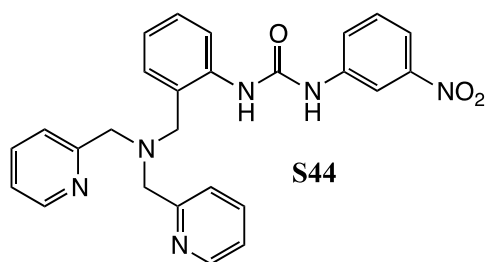


**Slika 6.** Strukturna formula receptora **S43**.

Kompleksacijska svojstva sličnog ditopičnog receptora **S44** (slika 7) proučavali su Carreira-Barral i sur. Istražen je afinitet kompleksa **S44** s Cu<sup>2+</sup> i Zn<sup>2+</sup> ionima prema anionima. Metalni ion, uz di(2-pikolil)aminskom skupinom, koordiniran i dušikom ureidne skupine. Nastali kompleksi pokazuju kooperativna vezna svojstva SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> i Cl<sup>-</sup> iona u DMSO. U čvrstoj fazi je uočeno nastajanje kompleksa stehiometrije 1:2 (metal : anion) s NO<sub>3</sub><sup>-</sup> i PhCO<sub>2</sub><sup>-</sup>, pri čemu je jedan anion koordiniran na metalni centar, a drugi tvori interakcije s ureidnom skupinom pomoću vodikovih veza. Koordinacija dušika ureidne skupine na metalni ion također je



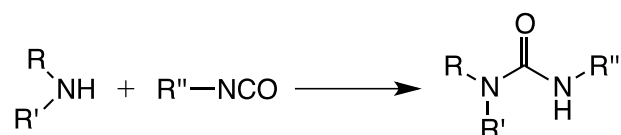
uzrokovala povećanje bazičnosti ureidne NH skupine što je rezultiralo deprotonacijom u prisutnosti acetatnih i fluoridnih aniona.<sup>44</sup>



**Slika 7.** Strukturna formula receptora **S44**.

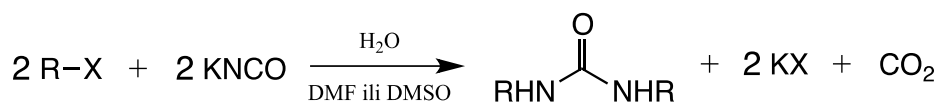
## 2.2.2. Sinteza supstituiranih urea

Jedan od prvih pristupa sintezi supstituiranih urea bila je reakcija organskih izocijanata s aminima (shema 9). Navedena reakcija danas je još uvijek jedna od često korištenih metoda sinteze asimetričnih urea jer je primjenjiva na širok spektar derivata amina. Dodatna prednost navedene reakcije je da se, zbog reaktivnosti organskih izocijanata, može provesti pri sobnoj temperaturi uz blagi suvišak izocijanata te, nerijetko, kvantitativna iskorištenja. Provodi se načelno u organskim otapalima, iako su poznati primjeri izvedbe reakcije koristeći vodu kao otapalo jer izocijanati reagiraju s vodom znatno sporije nego s aminima. Ograničenje navedene metode je nastanak nestabilnih produkata reakcije sekundarnih alifatsko-aromatskih amina s izocijanatima koji se raspadaju pri zagrijavanju.<sup>45,46</sup>



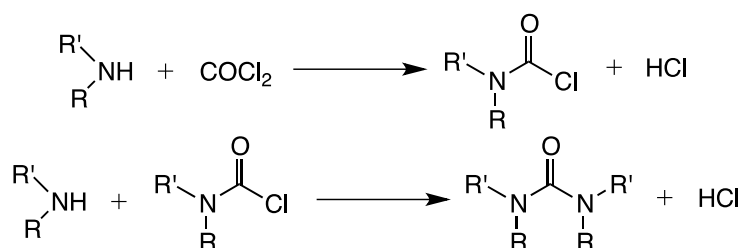
**Shema 9.** Sinteza asimetričnih urea reakcijom amina i izocijanata. R, R' = alifatske, aromatske, hidroksilne skupine; R'' = alifatske i aromatske skupine.

Simetrično supstituirane dialkil-uree mogu se pripraviti i reakcijom alkil-halogenida s cijanatima alkalijskih metala uz prisutnost vode u organskom otapalu, najčešće DMF-u i DMSO-u (shema 10). Uočeno je da velik utjecaj na reakciju ima struktura korištenog halogenida, na što je ukazala činjenica da s tercijarnim alkil-halogenidima ne dolazi do reakcije, dok su s nerazgranatim alkil halidima dobivene monosupstituirane i disupstituirane uree u visokom prinosu.<sup>47</sup>



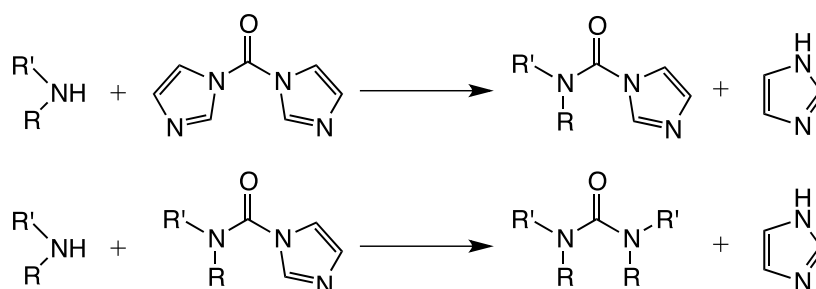
**Shema 10.** Sinteza simetrično supstituiranih urea reakcijom alkil-halogenida s kalijevim cijanatom u smjesi organskih otapala s vodom. R = alifatska alkilna skupina.

Prilikom sinteze simetričnih dialkil-, diaril- i alkilaril-urea često korištena metoda je reakcija odgovarajućih amina s fozgenom (shema 11). Prilikom reakcije primarno dolazi do nastanka odgovarajućeg karbamoil-klorida koji ponovno reagira s aminom što je dokazano reakcijom difenilamina s fozgenom u ligroinu. Iskorištenje reakcije uvelike se može povećati dodatkom reagensa koji reagiraju s nastalim klorovodikom. Tako se pri provođenju reakcije u vodenom mediju koriste lužine, karbonatne i acetatne soli ili magnezijev oksid, dok se u organskim otapalima koristi trietilamin ili ostali tercijarni amini.<sup>45,48</sup>



**Shema 11.** Sintaza simetrično supstituiranih urea reakcijom s fozgenom. R, R' = alkil ili aril.

Sigurnija alternativa korištenju izrazito otrovnog fozgena je uporaba CDI-a kao izvora karbonilne ureidne skupine prilikom sinteze simetrično supstituiranih urea (shema 12). Reakcija se u pravilu provodi u organskom otapalu iako su poznati literaturni primjeri izvedbe reakcije u vodi.<sup>49</sup> Reakcijom CDI-a i amina dolazi do nastanka *N*-supstituiranog karbonilimidazolida (imidazol-*N*-karboksamida) koji ponovnom reakcijom s aminom daje simetrično supstituiranu ureu.<sup>50</sup>



**Shema 12.** Sintaza simetrično supstituiranih urea pomoću *N,N*-karbonildiimidazola.

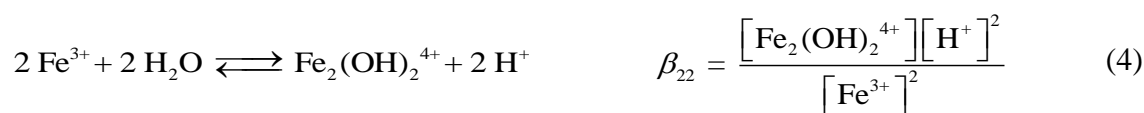
R, R' = aril ili alkil.

Usprkos brojnim načinima sinteze simetrično i asimetrično supstituiranih urea, odabir odgovarajućeg pristupa sintezi uvelike ovisi o strukturi polaznih spojeva i mogućnosti pripreme njihovih derivata te kompatibilnosti pristupa s postupkom sinteze ostatka molekule. Uz to, svaka od metoda sinteze ima određene prednosti, ali i mane kao što su selektivnost reakcije, nastanak mono- ili disupstituiranih urea te uvjeti provođenja reakcije koji u nekim slučajevima, kao što je to s fozgenom, mogu biti poprilično zahtjevni.

### 2.3. Kemija željeza

Željezo je u vodenoj otopini pri širokom rasponu pH prisutno u oksidacijskim stanjima +2 i +3 od kojih oba tvore komplekse s različitim ligandima kao tvrdi kationi preferirajući tvrde anione poput halogenidnih, cijanidnih i izocijanatnih.

Fe(III) je u izrazito kiseljoj otopini prisutno u obliku heksaakva iona  $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_6]^{3+}$  čija hidroliza počinje već pri  $\text{pH} = 1$ . Hidrolizom  $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_6]^{3+}$  nastaje hidroksopentaakvaželjezo(III) odnosno  $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_5\text{OH}]^{2+}$  žute boje. Uzrok obojenosti  $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_5\text{OH}]^{2+}$  su apsorpcijske vrpce prijenosa naboja u UV području zračenja koje dijelom sežu u vidljivi dio spektra. U daljnjem tekstu podrazumijevat će se oktaedarska konfiguracija željeza(III) u vodenoj otopini pri čemu će koordinirane molekule vode biti izostavljene u kemijskim formulama. Hidrolizu željeza(III) proučavao je Hedström određujući stabilnost hidrolitičkih vrsta poput  $\text{Fe}(\text{OH})^{2+}$ ,  $\text{Fe}(\text{OH})_2^+$  i dinuklearnog iona  $\text{Fe}_2(\text{OH})_2^{4+}$  (jednadžbe 2-4) dok su Biedermann i Schindler nakon ponavljanja Hedströmovih mjerenja ustanovili da, ovisno o uvjetima, nastaje i vrsta  $\text{Fe}_3(\text{OH})_4^{5+}$  koja je prisutna u relativno maloj količini prije taloženja željezova(III) hidroksida u obliku  $\alpha\text{-FeO}(\text{OH})$ .<sup>51</sup> Prva istraživanja hidrolitičkih vrsta željeza izvedena su potenciometrijski, a kasnija spektrofotometrijska mjerenja bila su u skladu s s potenciometrijskim rezultatima. To je potvrdilo mehanizam hidrolize željeza i omogućilo određivanje spektara hidrolitičkih vrsta željeza(III).<sup>52</sup> Na temelju navedenih mjerenja, ustanovljeno je da je u razrijeđenim otopinama glavna prisutna hidrolitička vrsta  $\text{Fe}(\text{OH})^{2+}$  dok je u koncentriranijim otopinama uočena prisutnost dinuklearne vrste  $\text{Fe}_2(\text{OH})_2^{4+}$ .<sup>53</sup>



U dosad spomenutim istraživanjima detaljno je istražena hidroliza željeza u kiselom mediju. Okarakterizirane su hidrolitičke vrste  $\text{Fe}(\text{OH})^{2+}$  i  $\text{Fe}_2(\text{OH})_2^{4+}$  izbjegavajući blago kisele i lužnate uvjete zbog slabe topljivosti željezovih(III) hidroksida. Novija istraživanja Stefánssona potpuno su opisala hidrolitičke vrste željeza prisutne u vodenoj otopini u širokom rasponu pH, određivši odgovarajuće konstante ravnoteže hidrolize (tablica 4) i njihovu ovisnost o ionskoj jakosti.<sup>54</sup>

**Tablica 4.** Konstante hidrolize hidrolitičkih vrsta željeza(III) u vodi pri  $\theta = 25\text{ }^\circ\text{C}$  i  $I_c = 0,1\text{ mol dm}^{-3}$  ( $\text{NaClO}_4$ ).<sup>a</sup>

Hidrolitička vrsta	$\log \beta$	$\lambda_{\text{max}} / \text{nm}$
$\text{Fe}(\text{OH})^{2+}$	$\log \beta_{11} = -2,54$	564
$\text{Fe}(\text{OH})_2^+$	$\log \beta_{12} = -6,34$	493
$\text{Fe}_2(\text{OH})_2^{4+}$	$\log \beta_{22} = -2,92$	506

<sup>a</sup> Vrijednosti preuzete iz ref. 54.

## 2.4. Metodologija proučavanja ravnotežnih reakcija nastajanja kompleksnih vrsta

Stabilnost kompleksnih spojeva u otopini može se kvantitativno izraziti konstantama stabilnosti. Općenito, reakcije kompleksiranja metalnog iona (M) ligandom (L) mogu se prikazati jednadžbom:



Konstante stabilnosti mogu se definirati kao sukcesivne (jedn. 6-10) ili kumulativne (jedn. 11-14). U navedenim jednadžbama naboji su izostavljeni radi jednostavosti prikaza.

$$K_{11} = \frac{[ML]}{[M][L]} \quad (6)$$

$$K_{12} = \frac{[ML_2]}{[M][L]^2} \quad (7)$$

$$K_{21} = \frac{[M_2L]}{[M]^2[L]} \quad (8)$$

⋮

$$K_{m(l-1)} = \frac{[M_m L_{l-1}]}{[M]^m [M_{m-1} L_{l-1}]} \quad (9)$$

$$K_{(m-1)l} = \frac{[M_{m-1} L_l]}{[M_{m-1} L_{l-1}][L]} \quad (10)$$

$$\beta_{11} = \frac{[\text{ML}]}{[\text{M}][\text{L}]} \quad (11)$$

$$\beta_{12} = \frac{[\text{ML}_2]}{[\text{M}][\text{L}]^2} \quad (12)$$

$$\beta_{21} = \frac{[\text{M}_2\text{L}]}{[\text{M}]^2[\text{L}]} \quad (13)$$

⋮

$$\beta_{ml} = \frac{[\text{M}_m\text{L}_l]}{[\text{M}]^m[\text{L}]^l} \quad (14)$$

Kako bi se odredile konstante stabilnosti, najčešće se provode titracije tijekom kojih se uslijed postupnog povećanja koncentracije jednog od reaktanata mjeri neko svojstvo otopine koje ovisi o dosegu reakcije nastajanja kompleksa ( $Y$ ). Ovisno o svojstvima liganda i metalnog iona te iznosu konstante ravnoteže kompleksiranja odabire se pogodna metoda za njihovo određivanje. Najčešće korištene metode su potenciometrija, UV-Vis spektrofotometrija, NMR spektroskopija, fluorimetrija, kalorimetrija i konduktometrija. Pogodnost metode za određeni raspon iznosa konstanti stabilnosti, prvenstveno je posljedica koncentracijskih područja koja se rabe tijekom mjerenja. Da bi se određenu ravnotežnu reakciju moglo proučavati spektroskopskim metodama, nužno je da se svojstveni spektri vrsta u ravnoteži značajno razlikuju. Ovisnosti svojstva  $Y$  pritom su linearne funkcije ravnotežnih koncentracija svih prisutnih vrsta. Za slučaj nastajanja 1:1 kompleksa ta je ovisnost dana jednadžbom:

$$Y = Y_{\text{M}}[\text{M}] + Y_{\text{ML}}[\text{ML}] + Y_{\text{L}}[\text{L}] \quad (15)$$

Uvrštavanjem bilance masa u jednadžbu 15 može se dobiti ovisnost mjerenog signala  $Y$  o  $c_{\text{M}}$  i  $c_{\text{L}}$ :

$$Y = Y_{\text{L}}c_{\text{L}} - (Y_{\text{L}} - Y_{\text{ML}}) \frac{c_{\text{M}} + c_{\text{L}} + \frac{1}{K} + \sqrt{\left(c_{\text{M}} + c_{\text{L}} + \frac{1}{K}\right)^2 - 4c_{\text{M}}c_{\text{L}}}}{2} \quad (16)$$



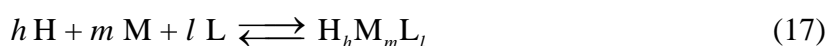
Treba naglasiti da jednačba 16 vrijedi u slučaju kad slobodni metalni ion ne utječe na mjereno svojstvo otopine, tj. kad su jedine spektralno aktivne vrste ligand i kompleks. Konstante  $Y_L$  i  $Y_{ML}$  ovise o korištenoj metodi te u slučaju spektrofotometrije odgovaraju umnošku molarnih apsorpcijskih koeficijenata i duljine optičkog puta.

U slučaju reakcija kojima doseg ovisi o koncentraciji iona čija se koncentracija može mjeriti potenciometrijski ( $H^+$ ,  $Na^+$ ,  $Cl^-$  itd.), ta se metoda vrlo često koristi pri određivanju odgovarajućih konstanti ravnoteža. Mjerni signal, elektromotivnost ( $E$ ), je u tom slučaju ovisan o aktivitetu potencijal odredbenog iona ( $a_X$ ). Parametri linearne funkcije  $E$  vs.  $\log a_X$  određuju se kalibracijom elektrokemijskog članka koji se sastoji od referentne i ion-selektivne elektrode. Najuobičajenija su potenciometrijska mjerenja pH staklenom elektrodom pri čemu se kalibracija najčešće provodi pomoću standardnih pufera. Kako aktivitet ionskih vrsta ovisi o ionskoj jakosti otopine, tijekom potenciometrijskih mjerenja potrebno je ionsku jakost održavati stalnom, što se najčešće postiže dodatkom suviška inertnog elektrolita. Kod obrade potenciometrijskih podataka pristup je vrlo sličan onom za ostale metode te uključuje nelinearnu regresijsku analizu ovisnosti  $pX$  (npr. pH) o volumenu dodanog titransa, odnosno analitičkim koncentracijama sudionika reakcije.

U svrhu određivanja protonacijskih svojstava, odnosno konstanti ravnoteže kompleksiranja, često se provode simultana potenciometrijska mjerenja pH i spektralnih promjena uslijed promjene pH. Nelinearnom regresijom spektralnih promjena u ovisnosti o pH mogu se vrlo pouzdano odrediti konstante ravnoteže u otopinama. Prednost te metode pred uobičajenim potenciometrijskim titracijama (tijekom kojih se mjeri ovisnost pH o volumenu dodanog titransa), jest veća osjetljivost, što omogućuje korištenje znatno manje koncentracije uzorka. To obično omogućuje pouzdano određivanje šireg raspona vrijednosti konstanti ravnoteža.

Reakcije kompleksiranja metalnih iona mogu biti spregnute s reakcijama protonacije, što je slučaj kod reakcija kompleksiranja željezova(III) iona s katekolnim sideroforima. Kako je doseg reakcija kompleksiranja ovisan o pH, indicirana metoda za karakterizaciju tih ravnoteža također je kombinirana potenciometrijsko-spektrofotometrijska titracija.

Obradom podataka uz prethodno poznavanje konstanti ravnoteže protonacije liganda, određuju se kumulativne konstante ravnoteže niza reakcija općenito danih jednačbom:



Pritom je ponekad izrazito zahtjevno pouzdano odrediti stehiometriju svih nastalih kompleksa, tj. identificirati sve komplekse koji nastaju u istraživanim otopinama. Jedna od uobičajenijih metoda za određivanje stehiometrije kompleksa jest metoda kontinuirane varijacije (Jobova metoda).<sup>55</sup> Međutim, ta je metoda pouzdana isključivo u slučaju kad je u otopini u značajnom udjelu prisutna samo jedna kompleksna vrsta. U složenijim sustavima ponekad je nužno stehiometriju pretpostaviti na temelju strukturnih karakteristika liganda, odnosno broja njegovih veznih mjesta te koordinacijskih svojstava kationa. Ukoliko se na taj način pretpostavljenim ravnotežnim modelom dobije zadovoljavajuće slaganje eksperimentalnih i izračunanih podataka te se izračunane spektroskopske karakteristike produkata poklapaju s očekivanima, može se s priličnom sigurnošću zaključiti da uistinu nastaju pretpostavljeni kompleksi. Preostale metode provjere stehiometrije kompleksa uključuju usporedbu rezultata, tj. konstanti stabilnosti, dobivenih pri različitim koncentracijama ili različitim metodama, usporedbu sa strukturom kompleksa u čvrstom stanju ili onom procijenjenom pomoću računalnih metoda. Nadalje postoje neki specifični pokazatelji stehiometrije kompleksiranja, poput izosbestičkih točaka čija prisutnost u nizu spektara sakupljenih tijekom titracije ukazuje na postojanje dviju vrsta u ravnoteži.<sup>56</sup>

Na temelju konstanti ravnoteža može se izračunati distribucijski dijagram, odnosno ovisnost udjela pojedinog kompleksa o pH i analitičkim koncentracijama liganda i metalnog iona. Također, mogu se odrediti i sukcesivne konstante ravnoteže za reakciju nastajanja pojedinog kompleksa koje su pogodne za usporedbu selektivnosti i afiniteta liganada analognih struktura prema određenom metalnom ionu. Može se reći da se određivanjem kumulativnih konstanti ravnoteža dobiva gotovo potpuna informacija o promatranom sustavu kemijskih ravnoteža.

## § 3. EKSPERIMENTALNI DIO

### 3.1. Materijali i metode

Sve kemikalije korištene za sintezu spojeva bile su *p.a.* čistoće. Nabavljene od proizvođača Sigma, Merck, Alfa Aesar, Acros i Kemika te su korištene bez dodatnih pročišćavanja, osim gdje je to napomenuto. Otopala su također bila *p.a.* čistoće, osim acetona i diklormetana koji su kupljeni tehničke čistoće i destilirani prije uporabe. TLC analize provedene su na pločicama silikagela 60 na staklenom nosaču s fluorescentnim indikatorom (Merck).

Pri fizikalno-kemijskim mjerenjima kao otopalo je korištena mQ voda. Otopine su priređene otapanjem krutina: željezov(III) perklorat hidrat (Alfa Aesar,  $\geq 95\%$ ), natrijev perklorat (Sigma Aldrich,  $> 98\%$ ), natrijev acetat (Kemika,  $\geq 99\%$ ), NTA (Fluka,  $\geq 99\%$ ). Kod pripreme otopine univerzalnog pufera korištene su: ledena octena kiselina (Alkaloid,  $\geq 99,5\%$ ), fosforna kiselina (T. T. T.,  $85\%$ ), borna kiselina (Kemika,  $\geq 99\%$ ).

NMR spektri snimljeni su pomoću spektrometra Bruker Ascend 400 MHz. Kao otopalo je korišten DMSO- $d_6$ . Pomaci su izraženi prema signalu TMS-a u slučaju  $^1\text{H}$  spektara, odnosno signala DMSO- $d_6$  u slučaju  $^{13}\text{C}$  spektara. Broj pulseva prilikom snimanja  $^1\text{H}$  NMR spektara varirao je ovisno o koncentraciji spoja.

IR spektri snimljeni su na instrumentu PerkinElmer Spectrum Two tehnikom KBr pastile. Pozadinski spektri prikupljeni su prije snimanja uzoraka, a dobiveni spektri uzoraka korigirani su za pozadinu uporabom programa Spectrum.

ESI-MS spektri snimani su pomoću Agilent 1200 spektrometra masa s trostrukim kvadrupolom kao detektorom. HRMS spektri snimani su pomoću Bruker Microflex MALDI-TOF instrumenta.

UV-Vis spektri snimljeni su pomoću spektrofotometara Cary 5, Cary 50 i Cary 60 tvrtke Varian odnosno Agilent. Temperatura otopina ( $\theta = (25,0 \pm 0,1)^\circ\text{C}$ ) održavana je stalnom prilikom snimanja pomoću termostata kojima su opremljeni spektrofotometri. Spektri su snimljeni s korakom 1 nm uz integracijsko vrijeme 0,2 – 0,4 s, a pokriveno spektralno područje bilo je u rasponu od 250 do 800 nm. Optički put iznosio je 1 cm.

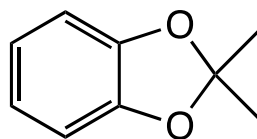
Mjerenje pH provedeno je pomoću kombinirane staklene elektrode s Ag / AgCl kao referentnom elektrodom (Metrohm, 6.0234.1000). Prije svake titracije staklena elektroda je baždarena pomoću četiri standardnih pufera (pH = 3, 5, 7 i 9), a odgovarajuća elektromotivnost članka mjerena je Metrohm 827 pH-metrom. Prilikom kalibracije mjerena je elektromotivnost

kombinirane elektrode uronjene u otopinu pufera u termostatiranoj staklenoj bočici ( $\theta = (25,0 \pm 0,1) ^\circ\text{C}$ ). U svim slučajevima utvrđena je linearna ovisnost  $E$  o pH uz nagib pravca blizak Nernstovom.

Prilikom obrade podataka spektrofotometrijskih i kombiniranih potenciometrijsko-spektrofotometrijskih titracija korišten je program pHAb<sup>57</sup>, te program Origin 7.5 koji je korišten i pri grafičkom prikazivanju podataka te ostalim računskim obradama podataka.

### 3.2. Sinteza spoja

#### 3.2.1. Sinteza 2,2-dimetil-2H-1,3-benzodioxola (**1**)<sup>12</sup>

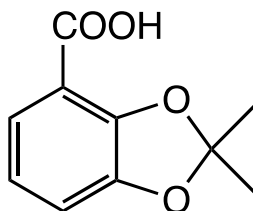


**Slika 8.** Strukturna formula spoja **1**.

Pirokatekol (10,02 g, 91 mmol) i suhi aceton (8,8 mL, 119 mmol) otopljeni su u benzenu u tikvici okrugla dna od 250 mL te je uz miješanje dokapan  $\text{PCl}_3$  (3,2 mL, 37 mmol) kroz 10 minuta. Dobivena smjesa miješana je sat vremena na sobnoj temperaturi nakon čega je izlivena u čašu u kojoj se nalazio  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (20,0 g, 145 mmol). Nakon neutralizacije otopina je ofiltrirana u lijevak za odjeljivanje, a talog ispran s 50 mL benzena. Smjesa je prvo isprana vodenom otopinom NaOH ( $2 \times 30$  mL,  $w = 10\%$ ) i zatim vodom (30 mL). Organski sloj je odvojen, osušen preko magnezijeva sulfata, profiltriran i uparen. Dobiveno je 8,44 g čistog produkta (62 %) u obliku bezbojna ulja.

$^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ,  $\delta$ / ppm) 6,84-6,75 (m, 4H), 1,62 (s, 6H);  $^{13}\text{C NMR}$  (101 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ,  $\delta$ / ppm) 146,7, 121,1, 117,4, 108,4, 25,5; **FTIR** (KBr,  $\nu$ /  $\text{cm}^{-1}$ ) 3065, 2992, 2938, 2604, 1627, 1486, 1377, 1238, 1005, 978, 830, 818, 736.

#### 3.2.2. Sinteza 2,2-dimetil-2H-1,3-benzodioxol-4-karboksilne kiseline (**2**)<sup>12</sup>



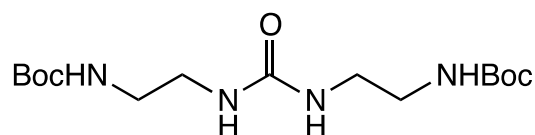
**Slika 9.** Strukturna formula spoja **2**.

U tikvici okrugla dna od 250 mL otopljen je svježije predestilirani TMEDA (4,0 mL, 27 mmol) u suhom heksanu (100 mL) pod argonom. Smjesa je ohlađena na  $0\text{ }^\circ\text{C}$  i dokapana je otopina *n*-butillitija u heksanu (21,7 mL,  $c = 1,6\text{ mol dm}^{-3}$ ). Nakon toga je dokapana otopina svježije

predestiliranog spoja **1** (4,0 g, 27 mmol) u suhom heksanu (10,0 mL). Reakcijska smjesa miješana je 4 h na 0 °C i zatim je naglo izlivena u čašu sa suhim ledom. Nakon zagrijavanja na sobnu temperaturu dodano je 150 mL vode i smjesa je prebačena u lijevak za odjeljivanje gdje je izmučkana. Slojevi su odvojeni te je vodeni sloj ohlađen i zakiseljen vodenom otopinom HCl ( $w = 10\%$ ) do  $\text{pH} = 1$ . Nastali talog ofiltriran je uz vakuum i ispran vodom ( $2 \times 20$  mL). Dobiveno je 1,55 g čistog produkta (30 %) u obliku bijele krutine.

**$^1\text{H}$  NMR** (400 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$ / ppm) 12,89 (s, 1H), 7,24 (dd,  $J = 8,2, 1,2$  Hz, 1H), 7,03 (dd,  $J = 7,7, 1,2$  Hz, 1H), 6,84 (t,  $J = 8,0$  Hz, 1H), 1,67 (s, 6H);  **$^{13}\text{C}$  NMR** (101 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$ / ppm) 165,3, 148,0, 147,7, 122,1, 120,6, 118,9, 113,1, 111,8, 25,6; **FTIR** (KBr,  $\nu / \text{cm}^{-1}$ ) 3436, 2994, 2924, 1685, 1633, 1487, 1253, 1050, 993, 716.

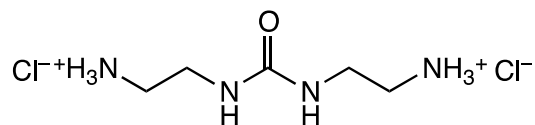
### 3.2.3. Sinteza *N,N'*-bis[2-(*tert*-butiloksikarbamido)etil]uree (**3**)



**Slika 10.** Strukturna formula spoja **3**.

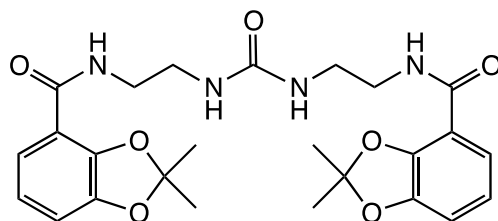
U tikvici okruglog dna od 50 mL otopljen je *N*-Boc-etilendiamin (400 mg, 2,50 mmol) u DCM-u (20 mL) i smjesa je ohlađena u ledenoj kupelji. Uz miješanje je dodan CDI (200 mg, 1,25 mmol) te je nakon 5 minuta miješanja uklonjena ledena kupelj i smjesa je miješana preko noći na sobnoj temperaturi. Nakon toga je dodan DCM (20 mL) i otopina je isprana vodom (40 mL) zatim ledenom otopinom HCl (40 mL,  $w = 5\%$ ) te naposljetku zasićenom otopinom  $\text{NaHCO}_3$  (40 mL). Organski sloj je odvojen, posušen na natrijevom sulfatu, profiltriran i uparen. Dobiveno je 770 mg čistog produkta (89 %) u obliku bijele krutine.

**$^1\text{H}$  NMR** (400 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$ / ppm) 6,77 (t,  $J = 5,1$  Hz, 2H), 5,95 (t,  $J = 5,1$  Hz, 2H), 3,03-2,96 (m, 4H), 2,95-2,88 (m, 4H), 1,37 (s, 18H);  **$^{13}\text{C}$  NMR** (101 MHz, DMSO- $d_6$ ,  $\delta$ / ppm) 158,2, 155,6, 77,6, 40,7, 39,3, 28,2; **FTIR** (KBr,  $\nu / \text{cm}^{-1}$ ) 3786, 3346, 2980, 2939, 1686, 1633, 1535, 1452, 1364, 1284, 1177, 971, 767, 641.

3.2.4. Sinteza *N,N'*-bis(2-aminoetil)urea dihidroklorida (**4**)Slika 11. Strukturna formula spoja **4**.

U tikvici okruglog dna od 50 mL otopljen je spoj **3** (2,52 g, 7,28 mmol) u suhom metanolu (10 mL) te je smjesa ohlađena na 0 °C. Pod argonom je uz miješanje dodana otopina HCl u dioksanu ( $c = 4 \text{ mol dm}^{-3}$ , 5 mL). Nakon pojave taloga smjesa je miješana još 1 h. Uz snažno miješanje dodan je suhi eter (10 mL), a nastali talog ofiltriran je uz vakuum, te je ispran suhim eterom ( $2 \times 10 \text{ mL}$ ) i osušen u eksikatoru preko KOH. Dobiveno je 0,98 g čistog produkta (61 %) u obliku bijele krutine.

**<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>,  $\delta$ / ppm) 8,01 (s, 6H), 6,52 (t,  $J = 5,8 \text{ Hz}$ , 2H), 3,24 (q,  $J = 5,9 \text{ Hz}$ , 4H), 2,82 (t,  $J = 6,0 \text{ Hz}$ , 4H); **<sup>13</sup>C NMR** (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>,  $\delta$ / ppm) 158,6, 39,44, 37,29; **FTIR** (KBr,  $\nu / \text{cm}^{-1}$ ) 3786, 3337, 3128, 2978, 2939, 1668, 1588, 1540, 1463, 1425, 1300, 1267, 1136, 1015, 950, 776, 576.

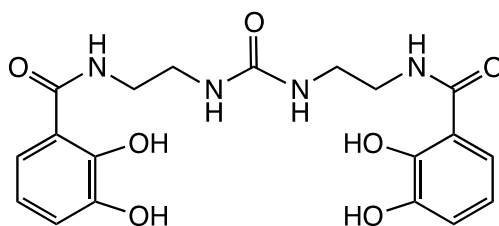
3.2.5. Sinteza *N,N'*-bis[2-(2,2-dimetil-2H-1,3-benzodioxol-4-karboksamido)etil]uree (**5**)Slika 12. Strukturna formula spoja **5**.

U tikvici okruglog dna od 50 mL otopljeni su kiselina **2** (300 mg, 1,54 mmol) i HOBt (586 mg, 4,34 mmol) u DMF-u (7 mL). Smjesa je ohlađena na 0 °C zatim su dodani EDC (735 mg, 4,73 mmol) i TEA (0,6 mL, 4,30 mmol) te je naposljetku dodan hidroklorid **4** (161 g, 0,77 mmol). Smjesa je miješana preko noći, zatim je dodana voda (25 mL). Ohlađena je u ledenoj kupelji te je miješana 15 min. Nastali talog je profiltriran uz vakuum, ispran vodom

(2 × 15 mL) i zatim heksanom (15 mL). Dobiveno je 300 mg čistog produkta (78 %) u obliku bijele krutine.

**<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>,  $\delta$ / ppm) 7,74 (t, *J* = 5,3 Hz, 2H), 7,21 (dd, *J* = 8,1, 1,3 Hz, 2H), 6,97 (dd, *J* = 7,7, 1,2 Hz, 2H), 6,86 (t, *J* = 8,0 Hz, 2H), 6,15 (t, *J* = 5,7 Hz, 2H), 3,35-3,27 (m, 4H), 3,23-3,15 (m, 4H), 1,69 (s, 12H); **<sup>13</sup>C NMR** (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>,  $\delta$ / ppm) 163,3, 158,6, 147,2, 144,9, 121,0, 120,7, 119,3, 116,0 110,8, 40,3, 38,9, 25,5; **FTIR** (KBr,  $\nu$  / cm<sup>-1</sup>) 3491, 3431, 3354, 3075, 2989, 2939, 2876, 1675, 1635, 1553, 1459, 1252, 1221, 1106, 1045, 834, 739, 547; HRMS (MALDI-TOF) *m/z* [M+H]<sup>+</sup> - izračunano (C<sub>25</sub>H<sub>30</sub>N<sub>4</sub>O<sub>7</sub>) - 499,2187, nađeno – 499,2179

### 3.2.6. Sinteza *N,N'*-bis[2-(2,3-dihidroksibenzoilamino)etil]uree (LH<sub>4</sub>)<sup>58</sup>



**Slika 13.** Strukturna formula spoja LH<sub>4</sub>.

U tikvici okrugla dna od 10 mL pri 0 °C otopljen je spoj **5** (400 mg, 8,03 mmol) u smjesi TFA / voda (10 mL, 4:1). Smjesa je miješana 5 h u ledenoj kupelji nakon čega su voda i TFA upareni. Sirova smjesa prekrizalizirana je iz sustava etanol / voda (1:4). Dobiveno je 150 mg čistog produkta (45 %) u obliku bijele krutine.

**<sup>1</sup>H NMR** (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>,  $\delta$ / ppm) 12,80 (s, 2H), 9,1 (s, 1H), 8,86 (t, *J* = 5,1 Hz, 2H), 7,25 (dd, *J* = 8,1, 1,2 Hz, 2H), 6,90 (dd, *J* = 7,8, 1,0 Hz, 2H), 6,68 (t, *J* = 7,9 Hz, 2H), 6,19 (t, *J* = 5,7 Hz, 2H), 3,34-3,27 (m, 4H), 3,24-3,17 (m, 4H); **<sup>13</sup>C NMR** (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>,  $\delta$ / ppm) 170,1 158,8, 149,8, 146,2, 118,8, 117,9, 117,1, 114,9, 40,16, 38,7; **FTIR** (KBr,  $\nu$  / cm<sup>-1</sup>) 3786, 3368, 2921, 2852, 1632, 1567, 1466, 1347, 1275, 1186, 1080, 847, 748, 606; HRMS (MALDI-TOF) *m/z* [M+H]<sup>+</sup> - izračunano (C<sub>19</sub>H<sub>22</sub>N<sub>4</sub>O<sub>7</sub>) - 419,1561, nađeno – 419,1586



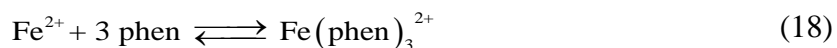
### 3.3. Određivanje protonacijskih konstanti spoja

Protonacijske konstante spoja  $LH_4$  određene su simultanom potenciometrijsko-spektrofotometrijskom titracijom spoja u vodenom mediju pri  $\theta = (25,0 \pm 0,1) ^\circ C$  i ionske jakosti  $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$  održavane stalnom pomoću  $NaClO_4$ . U kivetu s otopinom  $LH_4$  ( $c = 9,02 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ ) i univerzalnim puferom ( $H_3PO_4$ ,  $HOAc$ ,  $H_3BO_3$ ;  $c = 0,01 \text{ mol dm}^{-3}$ )<sup>59</sup> postupno je dodavana otopina  $NaOH$  ( $c = 0,01 \text{ mol dm}^{-3}$ ) te je prilikom svakog dodatka izmjeren pH otopine zatim snimljen UV-Vis spektar. Za dodatak otopine  $NaOH$  korištene su automatske pipete. Dobivene titracijske krivulje obrađene su uz fiksiranu vrijednost prve protonacijske konstante koja je aproksimirana na temelju literaturnih podataka za *N,N*-dimetil-2,3-dihidroksibenzamid.

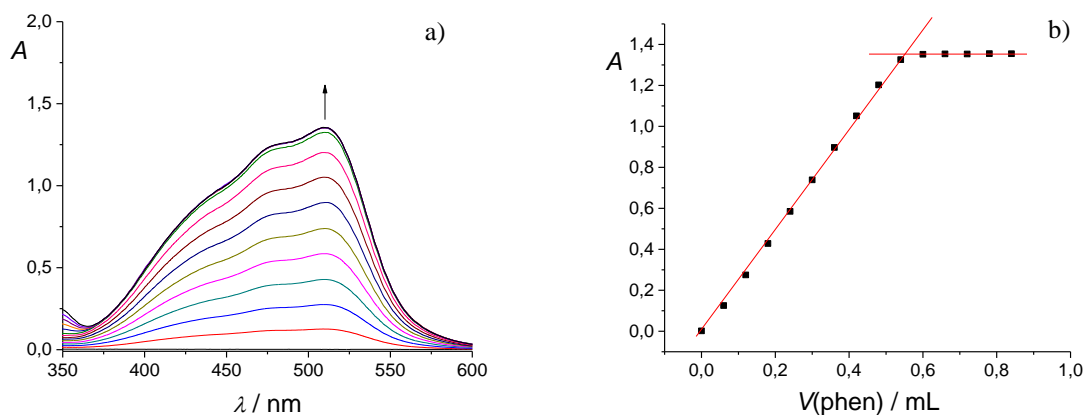
### 3.4. Priprava i postupak standardizacije otopine željezova(III) perklorata

Otopina željezova(III) perklorata ( $c \approx 0,01 \text{ mol dm}^{-3}$ ) priređena je odvagom 229,71 mg  $Fe(ClO_4)_3 \cdot xH_2O$ , u odmjernu tikvicu ( $V = 50 \text{ mL}$ ). U otopinu je dodana perklorna kiselina čime je pH podešen na 1. Otopina željezova(III) perklorata standardizirana je spektrofotometrijski titracijom s otopinom *o*-fenantrolina<sup>60</sup> uz modifikacije literaturnog postupka. U kivetu je prenesen alikvot pripremljene otopine ( $V = 1,0 \text{ mL}$ ) te je dodana otopina hidroksilamina

( $w = 10 \%$ ) za potpunu redukciju  $Fe^{3+}$  u  $Fe^{2+}$  i acetatnog pufera ( $pH = 6$ ). Toj otopini postupno je dodavana otopina *o*-fenantrolina ( $c = 1,49 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$ ) prilikom čega dolazi do nastanka vrlo stabilnog obojenog kompleksa (jedn. 18). Nakon svakog dodatka snimljen je UV-Vis spektar otopine (slika 14a).



Ukupna koncentracija željeza određena je grafički (slika 14b) te iz vrijednosti apsorbancije otopine uz suvišak fenantrolina pri  $\lambda = 510$ . Pritom je molarni apsorpcijski koeficijent kompleksa određen iz nagiba ovisnosti  $A$  o  $c(\text{phen})$  uz pretpostavku da je reakcija nastajanja kompleksa kvantitativna. Na oba načina dobiven je jednaki rezultat te je koncentracija ishodne otopine željezova(III) perklorata iznosila  $8,90 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ .



**Slika 14. a)** Spektrofotometrijska titracija otopine  $\text{Fe}^{2+}$  ( $c = 8,90 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ ) fenantrolinom ( $c = 1,49 \times 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$ ) u vodi pri  $\theta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $l = 1 \text{ cm}$ ; spektri su korigirani za razrjeđenje. **b)** Ovisnost apsorbancije pri  $\lambda = 510 \text{ nm}$  o volumenu dodatka otopine fenantrolina; ■ izmjerene vrijednosti, — pravci dobiveni linearnom regresijom.

### 3.5. Određivanje konstanti stabilnosti kompleksnih vrsta

Konstanta stabilnosti kompleksa  $\text{LFe}^-$  određena je pomoću kompeticijske spektrofotometrijske titracije otopine liganda  $\text{LH}_4$  ( $c = 1,78 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ ) i željeza ( $c = 1,54 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ ) s NTA ( $c = 5,76 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ ). pH i ionska jakost održavani su stalnom tijekom titracije pomoću acetatnog pufera ( $I_c = 0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ , pH = 4,0).

Konstante stabilnosti kompleksnih vrsta željeza(III) i  $\text{LH}_4$  određene su simultanim potenciometrijsko-spektrofotometrijskim titracijama vodenih otopina željezova(III) perklorata ( $c_1 = 1,28 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $c_2 = 9,53 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $c_3 = 6,36 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$ ) i liganda  $\text{LH}_4$  ( $c_1 = c_2 = c_3 = 1,91 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ ) pri konstantnoj ionskoj jakosti  $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ , održavanom pomoću  $\text{NaClO}_4$ . Navedena otopina pripravljena je miješanjem odgovarajućih volumena otopina željezova(III) perklorata ( $c_0 = 8,90 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ ),  $\text{LH}_4$  ( $c_0 = 2,01 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ ),  $\text{NaClO}_4$  ( $c_0 = 2,40 \text{ mol dm}^{-3}$ ) i  $\text{NaOH}$  ( $c = 0,01 \text{ mol dm}^{-3}$ ) u termostiranoj ćeliji ( $\theta = (25,0 \pm 0,1) \text{ }^\circ\text{C}$ ). Ukupni početni volumen titrirane otopine iznosio je 24 mL. Postupno je dodavana otopina  $\text{NaOH}$  te je nakon svakog dodatka izmjereno pH otopine i snimljen UV-Vis spektar. Pritom je alikvot otopine (približno 3 mL) prenesen u kivetu, a nakon snimanja spektra alikvot je vraćen u titracijsku ćeliju. Za dodatak otopine  $\text{NaOH}$  korištene su automatske pipete. Eksperimenti su provedeni uz konstantno miješanje

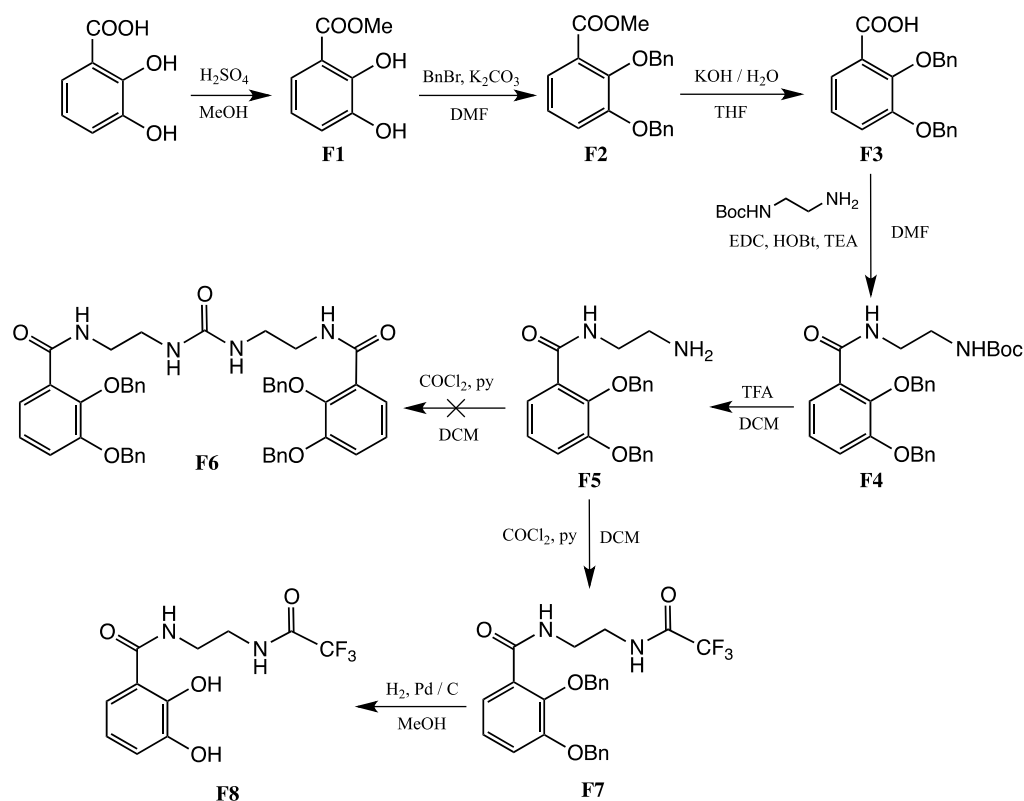
magnetskom miješalicom te je otopina propuhivana argonom kako bi se spriječio utjecaj otapanja CO<sub>2</sub> iz zraka.

Dobivene titracijske krivulje obrađene multivarijatom nelinearnom regresijom pomoću programa pHab.<sup>57</sup> Prilikom obrade fiksirane su vrijednosti protonacijskih konstanti spoja LH<sub>4</sub>, konstanta stabilnosti kompleksa LFe<sup>-</sup> i konstante hidrolize željeza(III). Pri obradi je korišteno spektralno područje  $\lambda > 410$  nm kako bi se izbjegao utjecaj apsorpcije protonacijskih oblika slobodnog liganda na spektralne promjene.

## § 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1. Sinteza spoja

Prvi pristup sintezi LH<sub>4</sub> uključivao je pripremu amida etilendiamina sa zaštićenom jednom amino-skupinom i 2,3-benziloksibenzojeve kiseline koji je na kraju trebao biti dimeriziran preko ureidne skupine u reakciji s fosgenom nakon čega bi uslijedilo uklanjanje benzilne zaštite katekolne skupine. Navedeni pristup prikazan je na shemi 13.



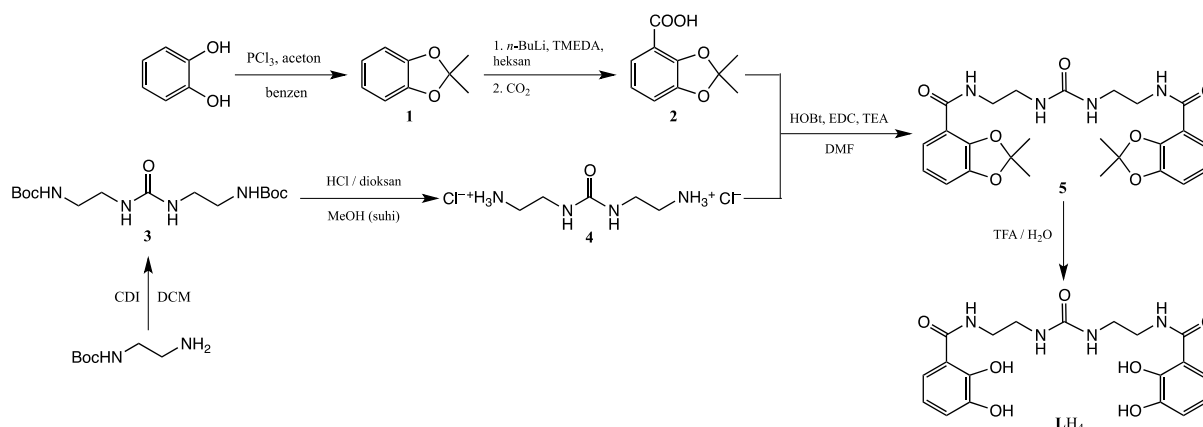
Shema 13. Prvotni pristup sintezi LH<sub>4</sub>

Pri navedenom pokušaju sinteze kao početni spoj korištena je 2,3-dihidroksibenzojeva kiselina čije su hidroksilne skupine zaštićene benzilnom zaštitom kao i u većini sinteza katekolnih siderofora u literaturi. Prije zaštite katekolne skupine provedena je zaštita karboksilne skupine prevođenjem u metilni ester F1, da bi se izbjegao nastanak benzilnog estera. U uvjetima Fischerove esterifikacije ne dolazi do nastanka metilnih etera na fenolnim skupinama jer su za njihov nastanak potrebni bazični uvjeti. Metilna skupina je kasnije jednostavno uklonjena

hidrolizom pomoću kalijeva hidroksida. Odabrani uvjeti hidrolize prikladniji su u usporedbi s kiselim hidrolizom jer bi izrazito kiseli uvjeti, uz zagrijavanje, mogli dovesti do uklanjanja benzilne zaštite fenolnih atoma kisika, dok je ona izrazito stabilna u čak i u jako lužnatim uvjetima. Dobivena kiselina **F3** prevedena je u amid uz korištenje reagensa za reakcije amidne kondenzacije. Uvjeti uz EDC, HOBT i trietilamin u DMF-u rezultirali su najvećim iskorištenjem, uz veliku prednost jednostavne obrade. Obrada je uključivala dodatak vode reakcijskoj smjesi prilikom čega produkt taloži te se filtracijom uz ispiranje vodom uklanjaju prisutne nečistoće. Uz navedene uvjete isprobani su još i CDI u otapalima poput DCM-a i THF-a no ta je reakcija rezultirala izrazito malim prinosom i visokim postotkom nečistoća. Također je isprobana reakcija prevođenja kiseline u odgovarajući kiselinski klorid pomoću  $\text{SOCl}_2$ , zatim reakcija s Boc-zaštićenim etilendiaminom uz prisutnost baze. Navedeni pristup odbačen je zbog složenijeg postupka i manjeg prinosa.

Dobiveni amid **F4**, nakon uklanjanja Boc zaštitne skupine trifluoroctenom kiselinom, reagiro je s fozgenom u pokušaju sinteze supstituirane uree **F6**, no navedena reakcija rezultirala je prelaskom trifluoracetatne soli **F5** u trifluoracetamidni produkt **F7**. Stabilnost **F7** bila je dovoljno velika da se pri uvjetima hidrogeniranja uspješno uklone benzilne zaštitne skupine i izolira produkt **F8**. Iako je navedeni postupak rezultirao novim katekolnim analogom, nestabilnost navedenog spoja nije omogućavala detaljno proučavanje njegovih kompleksacijskih svojstava. Naime, navedeni spoj se pokazao izrazito slabo topljivim u vodi te osjetljivim na lužnate uvjete, dovodeći do hidrolitičkog raspada molekule već pri  $\text{pH} = 8$ .

Kako je mogući razlog nastanka spoja **F8** sterička ometanost četirima benzilnim skupinama, razmatrao se novi pristup koji je uključivao promjenu zaštitne skupine. Kao alternativna zaštitna skupina odabrana je acetonidna, zbog svoje male steričke ometanosti te entropijski povoljnog nastanka intramolekulskom ciklizacijom. Alternativni konvergentni sintetski pristup (shema 14) uključivao je odvojenu sintezu katekolnih podjedinica i bis-etilendiaminskog ureidnog mosta. Kao polazni spoj korišten je pirokatekol jer pokušaji uvođenja acetonidne zaštite direktno na 2,3-dihidroksibenzojevu kiselinu pri različitim uvjetima nisu rezultirali nastankom željenog produkta **2**. Iz tog razloga korišten je pristup E. J. Coreya<sup>12</sup>, pri čemu je pirokatekol zaštićen acetonidnom skupinom nakon čega je metalacijom i *in situ* reakcijom sa suhim ledom uvedena karboksilna skupina čime je dobiven spoj **2**.

Shema 14. Postupak sinteze LH<sub>4</sub>

Ureidni most **3** sintetiziran je koristeći monozaštićeni etilendiamin kako ne bi došlo do polimerizacije, a kao izvor karbonilne skupine uree korišten je CDI. Boc skupina jednostavno je uklonjena koristeći otopinu HCl u dioksanu. Prilikom izolacije dobivenog hidroklorida **4** filtracijom uz vakuum minimizirano je izlaganje spoja zraku.

Za reakciju sinteze diamida **5** odabrani su identični uvjeti poput korištenih u gore opisanoj sintezi (EDC i HOBt u DMF-u) budući da je time postignuto zadovoljavajuće iskorištenje (78 %). Uklanjanje acetonidne zaštite produkta **5** rezultiralo je potpunom konverzijom u željeni spoj LH<sub>4</sub> pa je prinos reakcije od 45 % ovisan isključivo o uvjetima prekrizacije prilikom izolacije spoja. Prekrizacija je izvedena otapanjem spoja u minimalnom volumenu etanola uz dodatak četverostrukog volumena vode u odnosu na etanol te hlađenjem na 0-5 °C preko noći. Naposljetku su ofiltrirane nastale nečistoće, nakon čega iz matičnice kristalizira čisti LH<sub>4</sub>.

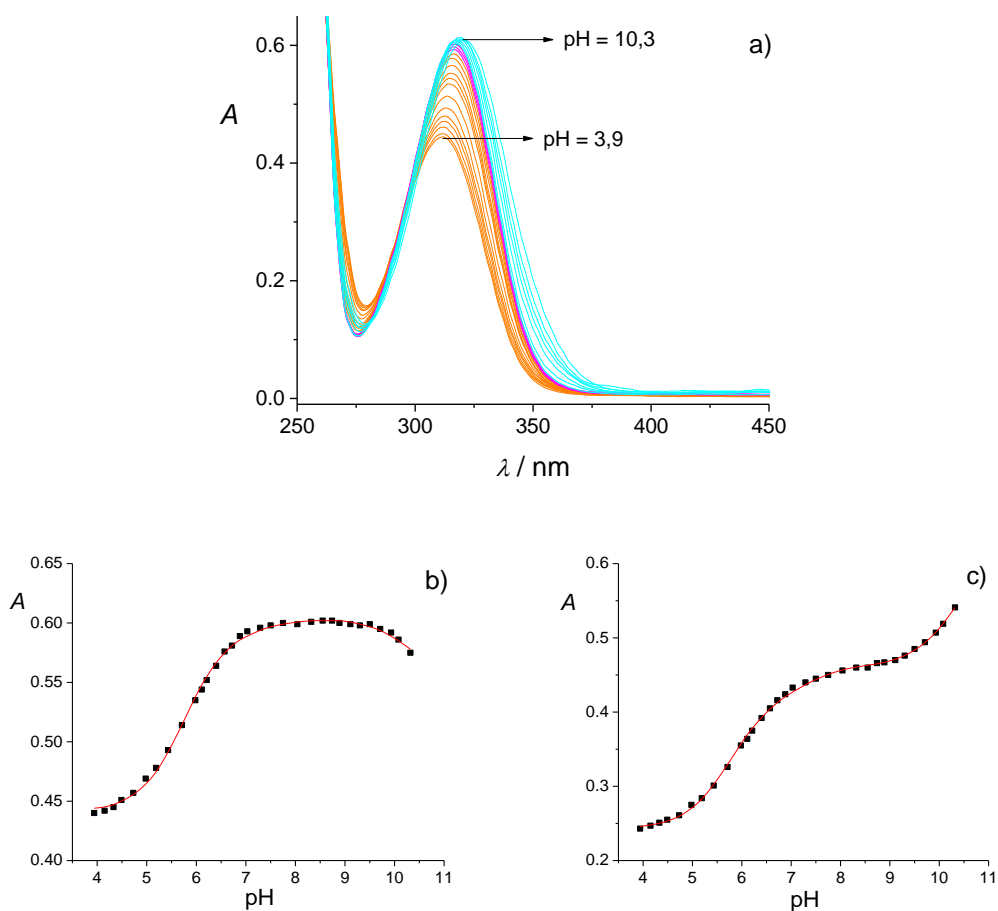
Na kraju vrijedi napomenuti da su prednosti provedenog sintetskog postupka primjena konvergentne sinteze što uvelike povećava ukupno iskorištenje sinteze LH<sub>4</sub> (19 % polazeći iz *N*-Boc-etilendiamina, odnosno 7 % polazeći iz pirokatekola) i olakšava pripremu njegovih derivata. Uz to su svi međuprodukti uspješno izolirani u čistom obliku bez uporabe kolonske kromatografije.

## 4.2. Protonacijska svojstva priređenog liganda

Za potpun kvantitativni opis reakcija kompleksiranja potrebno je kvantitativno odrediti protonacijska svojstva liganda, tj. izmjeriti odgovarajuće konstante ravnoteže, budući da prilikom kompleksiranja dolazi do kompeticije željeza i protona za vezanje na katekolne atome kisika. Protonacijske konstante ravnoteže  $LH_4$  u vodi određene su kombiniranim potenciometrijsko-spektrofotometrijskim titracijama. Spektar liganda u kiselim uvjetima ima izraženi maksimum apsorpcije pri  $\lambda_{\max} = 314$  nm, karakterističan za potpuno protoniranu katekolnu skupinu.<sup>8</sup>

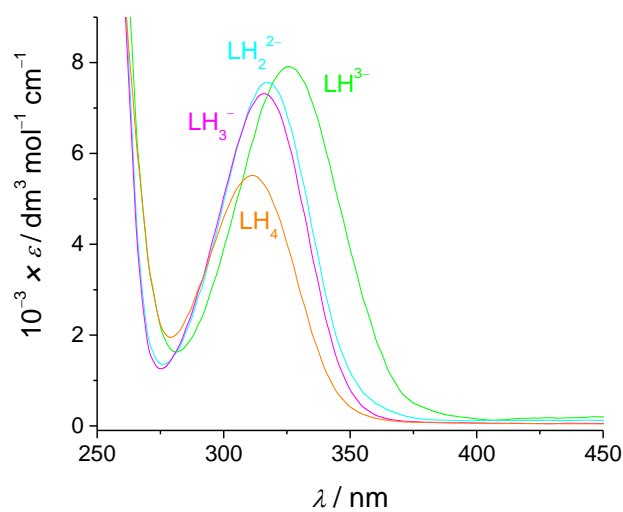
Usljed povišenja pH otopine dolazi do batokromnog pomaka uz značajan porast apsorpcije (slika 15a). Iako spektralne promjene ne ukazuju jasno na broj (de)protonacijskih koraka, dobiveni podatci (ovisnost UV-Vis spektara o pH) mogli su se opisati modelom koji uključuje tri procesa (slike 15b i 15c) te su određene odgovarajuće konstante ravnoteža (tablica 5) i svojstveni spektri protonacijskih oblika spoja  $LH_4$  (slika 16).

Određivanje prve protonacijske konstante ravnoteže nije bilo moguće jer je ta konstanta vrlo velika, što zahtjeva mjerenje pri visokom pH pri čemu dolazi do raspada spoja. Iz tog razloga prva protonacijska konstanta ravnoteže aproksimirana je vrijednošću koja odgovara konstanti protonacije *N,N*-dimetil-2,3-dihidroksibenzamidu te iznosi  $\log K_1^H = 12,1$ .<sup>7</sup> Spektrofotometrijski je utvrđeno da pri pH = 10,5 ne dolazi do raspada liganda. Iz tog razloga je proučavanje reakcija kompleksiranja željeza(III) provedeno pri pH-vrijednostima nižim od navedene.

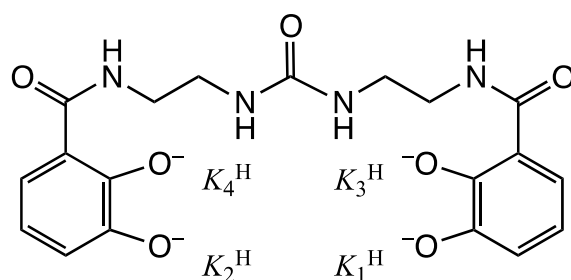


**Slika 15. a)** Potenciometrijsko-spektrofotometrijska titracija otopine  $\text{LH}_4$  ( $c = 9,02 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ ) s  $\text{NaOH}$  ( $c = 0,01 \text{ mol dm}^{-3}$ ) u vodi pri  $\theta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $I_c = 0,1 \text{ mol dm}^{-3}$  ( $\text{NaClO}_4$ ),  $l = 1 \text{ cm}$ ; spektri su korigirani za razrjeđenje. Ovisnost apsorbacije otopine o pH otopine pri **b)**  $\lambda = 314 \text{ nm}$ , **c)**  $\lambda = 330 \text{ nm}$ ;  
■ izmjerene vrijednosti, — izračunane vrijednosti.





**Slika 16.** Svojstveni elektronski spektri protonacijskih vrsta **LH<sub>4</sub>** u vodi pri  $\theta = 25$  °C.



**Slika 17.** Strukturna formula potpuno deprotoniranog liganda **L<sup>4-</sup>** uz naznačene odgovarajuće konstante ravnoteže protonacije.

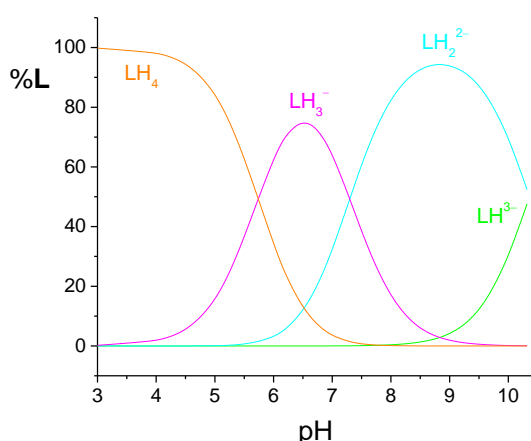
**Tablica 5.** Konstante ravnoteže protonacije spoja  $\text{LH}_4$  te valne duljine apsorpcijskih maksimuma protonacijskih vrsta u vodi pri  $\theta = 25^\circ$  i  $I_c = 0,1 \text{ mol dm}^{-3}$  ( $\text{NaClO}_4$ ).<sup>a</sup>

Protonacijska vrsta	$\log K^{\text{H}}$	$\lambda_{\text{max}} / \text{nm}$
$\text{LH}^{3-}$	12,1 <sup>b</sup>	326
$\text{LH}_2^{2-}$	10,36(1)	317
$\text{LH}_3^-$	7,30(2)	316
$\text{LH}_4$	5,74(2)	311

<sup>a</sup> Nepouzdanosti zadnje znamenke prikazane su u zagradama kao standardne devijacije.

<sup>b</sup> Konstanta je aproksimirana odgovarajućom vrijednošću *N,N*-dimetil-2,3-dihidroksibenzamida.<sup>7</sup>

Na temelju prikupljenih podataka izračunana je distribucija protonacijskih vrsta liganda u mjerenom području pH (slika 18). Prema distribucijskom dijagramu vidljivo je da je potpuno protonirana vrsta  $\text{LH}_4$  dominantna pri  $\text{pH} < 5,5$ , dok potpuno deprotonirana vrsta  $\text{L}^{4-}$  (slika 17) nije prisutna u distribucijskom dijagramu jer do njenog nastanka ne dolazi pri uvjetima pri kojima je izveden eksperiment.



**Slika 18.** Distribucijski dijagram protonacijskih vrsta  $\text{LH}_4$  u vodi pri  $\theta = 25^\circ \text{C}$ ,  $I_c = 0,1 \text{ mol dm}^{-3}$  ( $\text{NaClO}_4$ ).

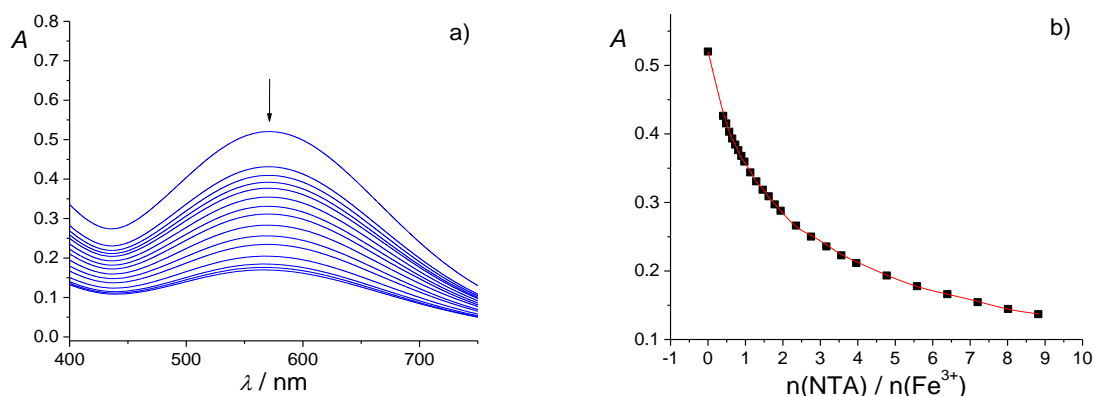
### 4.3. Termodinamička karakterizacija reakcija kompleksiranja željeza(III)

Provedena je serija kombiniranih potenciometrijsko-spektrofotometrijskih titracija otopina spoja  $\text{LH}_4$  i željeza(III) te je uočena značaja ovisnost UV-Vis spektara o pH (slike 20a-22a). Također, primijećeno je da izgled titracijskih krivulja uvelike ovisi i o omjeru koncentracija liganda i željeza u titriranim otopinama (provedene su titracije pri tri vrijednosti omjera koncentracija ( $c(\text{LH}_4) / c(\text{Fe(III)})$ ): 1,5, 2 i 3). Ta opažanja mogu se objasniti nastajanjem kompleksa istraživanog liganda i željeza(III) različitih stehiometrija. Pritom je specijacija u otopinama  $\text{LH}_4$  i  $\text{Fe(III)}$  izrazito ovisna o pH zbog kompeticije protona i željezovih iona za vezanje na katekolne skupine, kao što je već navedeno. Nastali kompleksi su obojeni, a njihova sposobnost apsorpcije zračenja u vidljivom dijelu spektra je posljedica prijenosa naboja s liganda na  $\text{Fe}^{3+}$ . Spektri nastalih kompleksa međusobno se značajno razlikuju, budući da, ovisno o njihovoj stehiometriji, dolazi do koordinacije željeza(III) različitim brojem atoma kisika katekolnih skupina. Navedene značajke omogućuju termodinamičku karakterizaciju reakcija kompleksiranja pomoću simultanog mjerenja pH i apsorpcijskih spektara u vidljivom području. Spektralne promjene u UV dijelu spektra izrazito su složene zbog brojnih ravnoteža u otopini budući da u tom spektralnom području, uz nastale komplekse, apsorbiraju i protonacijski oblici liganda i hidrolitičke vrste željeza(III). Iz tog razloga je za kvantitativnu obradu podataka korišten isključivo vidljivi dio spektra.

Izostanak izosbestika u nizu spektara prikupljenim pri tri različita omjera koncentracija upućuje na složenost specijacije u istraživanim otopinama, što je u skladu je s pretpostavkom da nastaje nekoliko spektralno različitih kompleksa. Maksimum apsorpcije otopine u kiselom području jest pri  $\lambda_{\text{max}} = 570 \text{ nm}$ , što ukazuje na dominantnu prisutnost kompleksa s tetrakoordiniranim željezom, što odgovara vrsti  $\text{LFe}^-$  s obje katekolne skupine koordinirane na  $\text{Fe(III)}$ . Povišenjem pH dolazi do hipsokromnog pomaka te pri  $\text{pH} \approx 10$  valna duljina maksimuma iznosi 495 nm, što je karakteristika kompleksa s tri katekolne podjedinice koordinirane na željezov(III) kation. Premda je valna duljina maksimuma u lužnatom mediju za sve tri titracije bila približno jednaka, intenziteti apsorpcijskih vrpca značajno su se razlikovali ovisno o omjeru  $c(\text{LH}_4) / c(\text{Fe(III)})$ . To opažanje upućuje na zaključak da pri visokom pH mogu nastati kompleksi različite stehiometrije tj.  $\text{H}_3\text{FeL}_3^{6-}$  i  $\text{Fe}_2\text{L}_3^{6-}$ . U oba slučaja koordinacija kationa je u skladu s opaženom valnom duljinom maksimuma kompleksa. Premda je na temelju kvalitativne analize prikupljenih spektralnih podataka dobiven vrlo dobar uvid u stehiometriju kompleksnih vrsta, kvantitativni opis ravnoteža reakcija kompleksiranja na

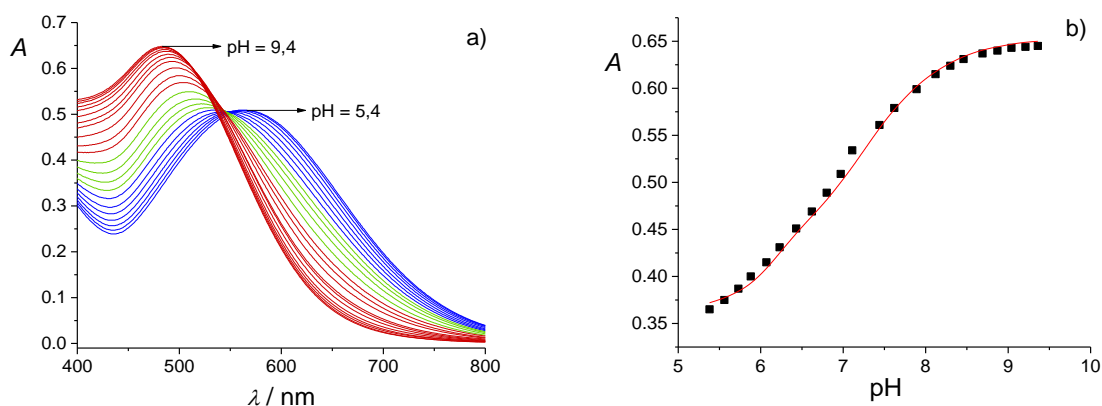
temelju dosad opisanih podataka nije bio moguć. Razlog tome bila je prevelika stabilnost kompleksa  $\text{LFe}^-$  te ograničenost pH-područja ( $4,0 < \text{pH} < 10,5$ ). Naime pri nižem pH dolazi do redukcije željeza(III) u željezo(II) uz oksidaciju katekolne skupine u 1,2-benzokinonski produkt,<sup>61,62</sup> dok pri  $\text{pH} > 10,5$  dolazi do hidrolitičkog raspada kompleksa.

Zbog toga je konstanta stabilnosti kompleksa  $\text{FeL}^-$  ( $\beta_{011}$ ) određena neovisno, kompeticijskom titracijom pomoću NTA (slika 19). Ta je titracija provedena pri  $\text{pH} = 4,0$  (acetatni pufer) i omjeru koncentracija  $c(\text{LH}_4) / c(\text{Fe(III)}) = 1,2$  uz pretpostavku da je pri tom pH jedina kompleksna vrsta prisutna u otopini upravo  $\text{FeL}^-$  te da prisutnost acetatnih iona pufera ne utječe na reakcije kompleksiranja. Dodatkom otopine NTA dolazi do disocijacije kompleksa  $\text{FeL}^-$  uslijed nastajanja kelatnog kompleksa Fe(III) s NTA čija je konstantna stabilnosti ranije određena.<sup>63</sup> Sakupljeni podaci mogli su se odlično opisati uz navedene pretpostavke te je izračunana konstanta ravnoteže nastajanja  $\text{FeL}^-$ . Ta je konstanta fiksirana prilikom obrade ranije opisanih pH ovisnosti vidljivih spektara, što je omogućilo određivanje preostalih ravnotežnih konstanti nastajanja kompleksa (tablica 6), njihovih karakterističnih spektara (slika 23) te distribucije odgovarajućih vrsta pri različitim odnosima koncentracija liganda i Fe(III) u otopini (slika 24). Osim gore spomenutih kompleksnih vrsta primijećeno je i nastajanje protoniranog oblika kompleksa stehiometrije 2:3 ( $\text{H}_2\text{Fe}_2\text{L}_3^{4-}$ ), pri čemu je dobiveno vrlo dobro slaganje eksperimentalnih i izračunanih spektara (slike 20b-22b) uz simultanu obradu podataka dobivenih tijekom sve tri titracije. Odgovarajuće reakcije kompleksiranja prikazane su jednadžbama 19-22.

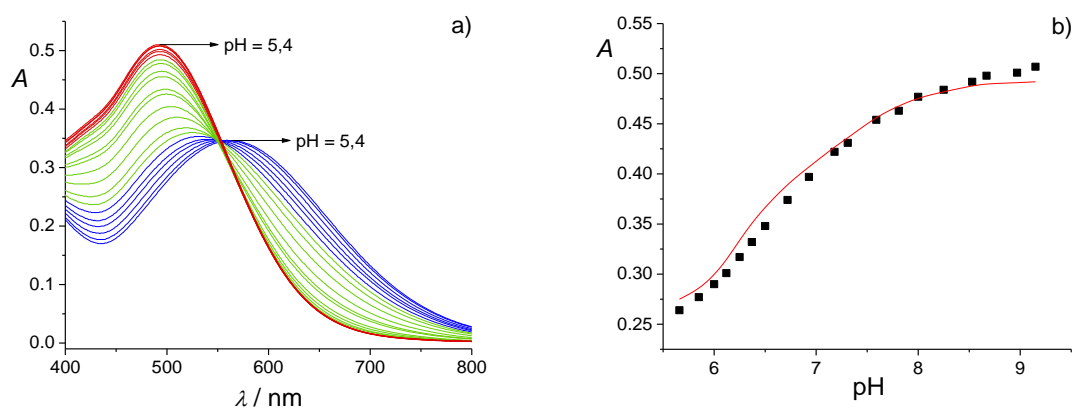


**Slika 19. a)** Kompeticijska spektrofotometrijska titracija kompleksa  $\text{FeL}^-$  ( $c = 1,54 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ ) s NTA ( $c = 5,76 \times 10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$ ) u vodi pri  $\theta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $I_c = 0,1 \text{ mol dm}^{-3}$  (NaOAc),  $\text{pH} = 4,0$  (acetatni pufer),  $l = 1 \text{ cm}$ ; spektri su korigirani za razrjeđenje.

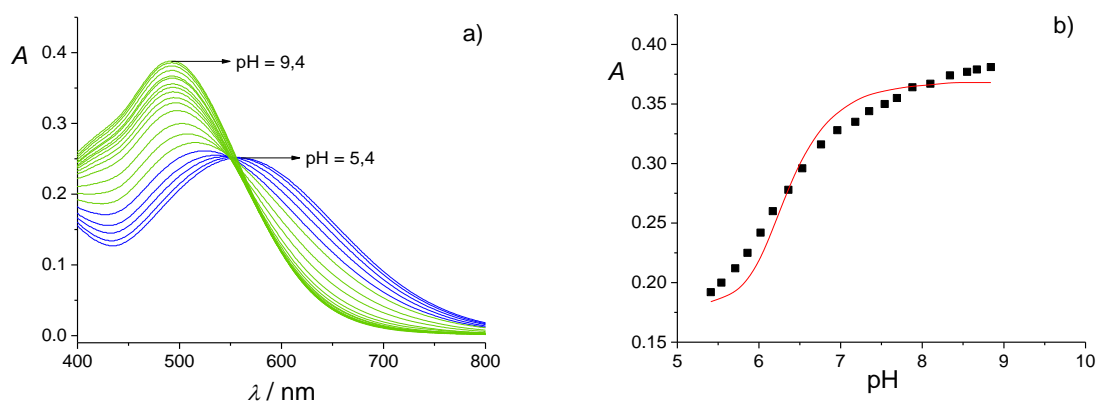
**b)** Ovisnost apsorbancije o omjeru množina NTA i Fe(III) u otopini pri  $\lambda = 570 \text{ nm}$ ;  
 ■ izmjerene vrijednosti, — izračunane vrijednosti.



**Slika 20. a)** Potenciometrijsko-spektrofotometrijska titracija otopine  $\text{LH}_4$  ( $c = 1,91 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ ) i Fe(III) ( $c = 1,28 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ ) s NaOH ( $c = 0,01 \text{ mol dm}^{-3}$ ) u vodi pri  $\theta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $I_c = 0,1 \text{ mol dm}^{-3}$  ( $\text{NaClO}_4$ ),  $l = 1 \text{ cm}$ ; spektri su korigirani za razrjeđenje. **b)** Ovisnost apsorbancije pri  $\lambda = 490 \text{ nm}$  o pH otopine; ■ izmjerene vrijednosti, — izračunane vrijednosti.

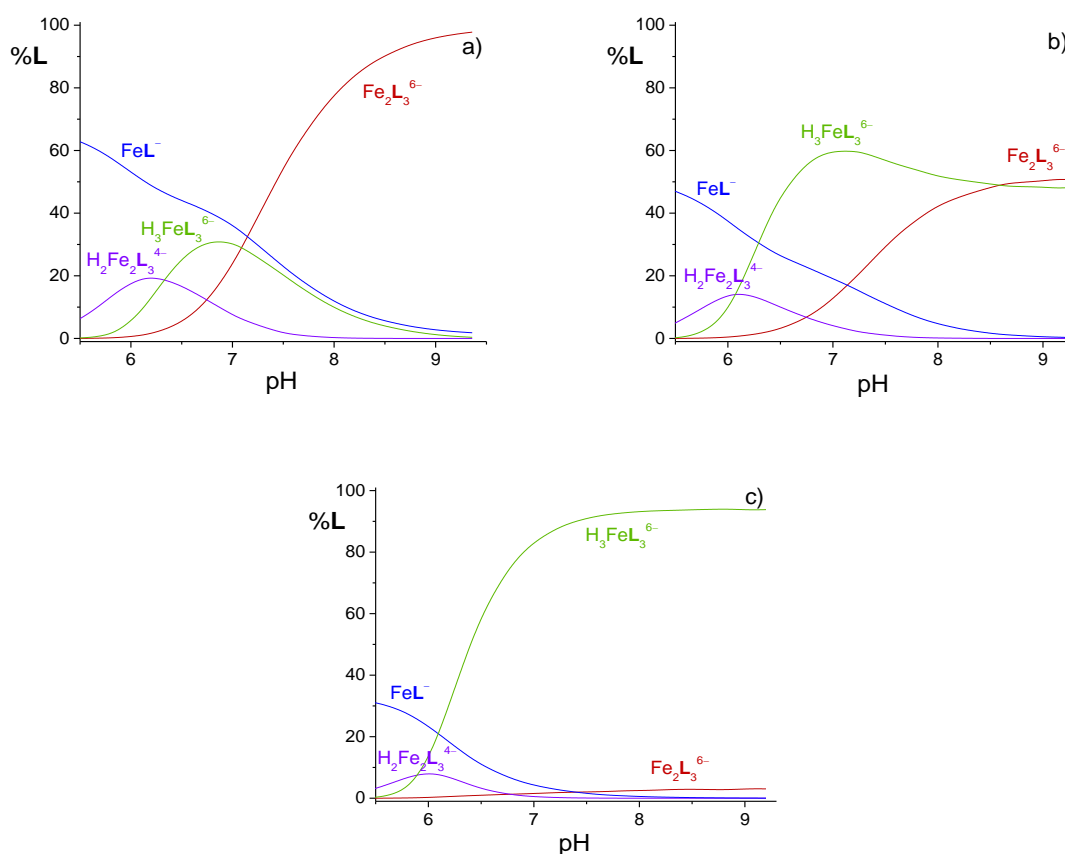


**Slika 21. a)** Potenciometrijsko-spektrofotometrijska titracija otopine  $\text{LH}_4$  ( $c = 1,91 \times 10^{-4}$  mol  $\text{dm}^{-3}$ ) i  $\text{Fe(III)}$  ( $c = 9,53 \times 10^{-5}$  mol  $\text{dm}^{-3}$ ) s  $\text{NaOH}$  ( $c = 0,01$  mol  $\text{dm}^{-3}$ ) u vodi pri  $\theta = 25$  °C,  $I_c = 0,1$  mol  $\text{dm}^{-3}$  ( $\text{NaClO}_4$ ),  $l = 1$  cm; spektri su korigirani za razrjeđenje. **b)** Ovisnost apsorbancije pri  $\lambda = 490$  nm o pH otopine; ■ izmjerene vrijednosti, — izračunane vrijednosti.

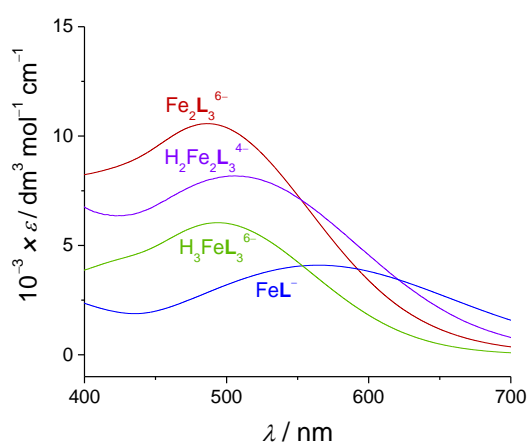


**Slika 22. a)** Potenciometrijsko-spektrofotometrijska titracija otopine  $\text{LH}_4$  ( $c = 1,91 \times 10^{-4}$  mol  $\text{dm}^{-3}$ ) i  $\text{Fe(III)}$  ( $c = 6,36 \times 10^{-5}$  mol  $\text{dm}^{-3}$ ) s  $\text{NaOH}$  ( $c = 0,01$  mol  $\text{dm}^{-3}$ ) u vodi pri  $\theta = 25$  °C,  $I_c = 0,1$  mol  $\text{dm}^{-3}$  ( $\text{NaClO}_4$ ),  $l = 1$  cm; spektri su korigirani za razrjeđenje. **b)** Ovisnost apsorbancije pri  $\lambda = 490$  nm o pH otopine; ■ izmjerene vrijednosti, — izračunane vrijednosti.

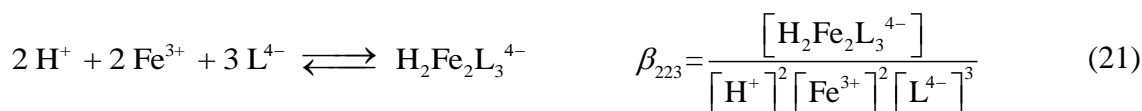
Prilikom istraživanja reakcija kompleksiranja nisu korišteni puferi zbog činjenice da komponente često korištenih puferskih sustava kao što su fosfatni i citratni anioni tvore komplekse sa željezom(III), što bi moglo utjecati na proučavane ravnoteže.<sup>64,65</sup> Uz složenu specijaciju u otopini liganda i  $\text{Fe(III)}$ , kvantitativan opis uz takve puferne sustave bio bi gotovo nemoguć.



**Slika 23.** Distribucijski dijagrami željezovih(III) kompleksa s  $\text{LH}_4$  u vodi pri  $\theta = 25\text{ }^\circ\text{C}$ ,  $I_c = 0,1\text{ mol dm}^{-3}$  ( $\text{NaClO}_4$ ); **a)**  $c(\text{LH}_4) / c(\text{Fe(III)}) = 1,5$ ; **b)**  $c(\text{LH}_4) / c(\text{Fe(III)}) = 2$ ; **c)**  $c(\text{LH}_4) / c(\text{Fe(III)}) = 3$ .



**Slika 24.** Svojeviti elektronski spektri željezovih(III) kompleksa s  $\text{LH}_4$  u vodi pri  $25\text{ }^\circ\text{C}$ .



**Tablica 6.** Konstante stabilnosti željezovih(III) kompleksa s  $\text{LH}_4$  te valne duljine njihovih apsorpcijskih maksimuma u vodi pri  $\theta = 25 \text{ }^\circ\text{C}$  i  $I_c = 0,1 \text{ mol dm}^{-3}$  ( $\text{NaClO}_4$ ).<sup>a</sup>

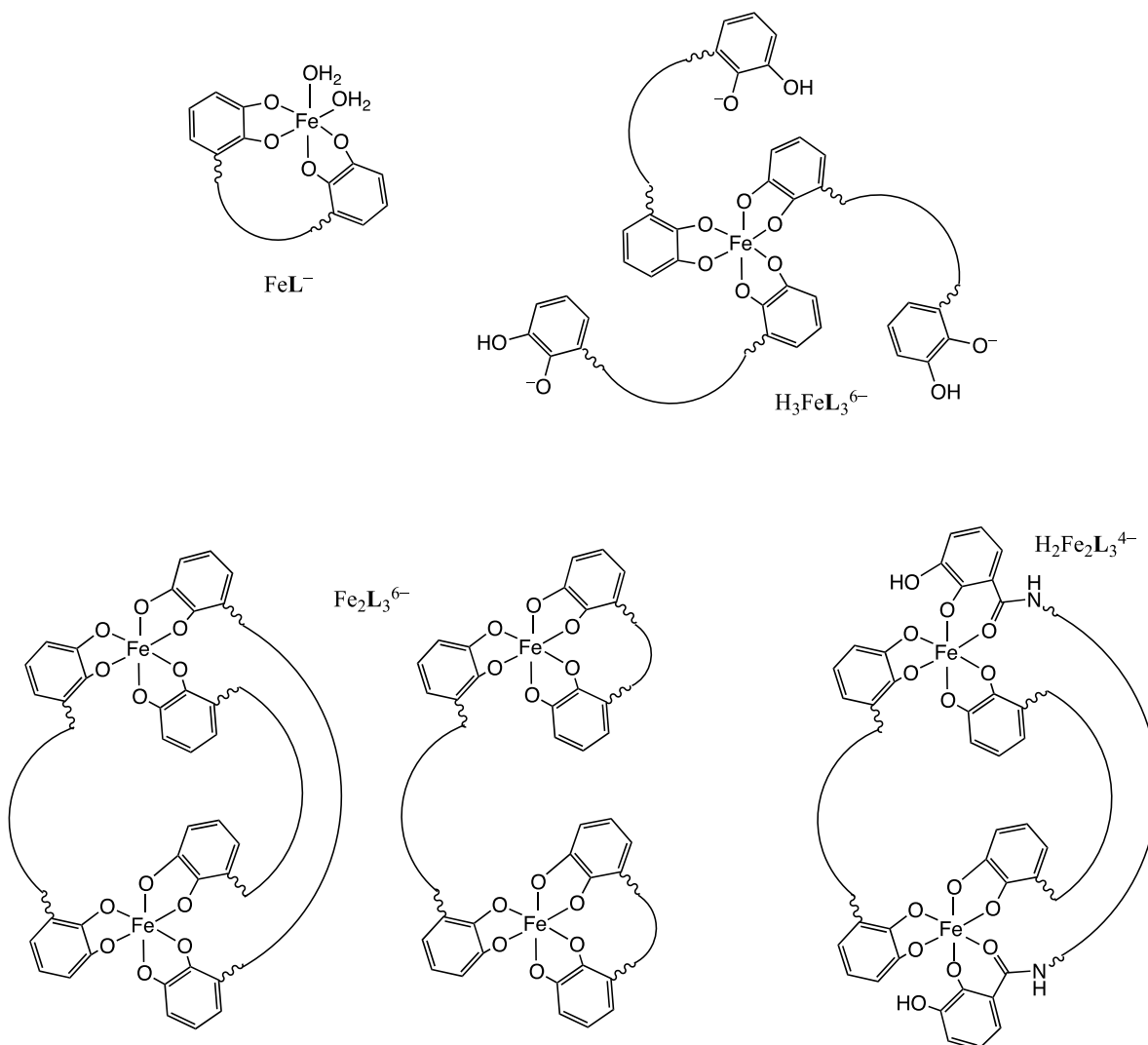
Kompleksna vrsta	$\log \beta$	$\lambda_{\text{max}} / \text{nm}$
$\text{FeL}^-$	$\log \beta_{011} = 29,79(1)$	564
$\text{H}_3\text{FeL}_3^{6-}$	$\log \beta_{313} = 78,96(1)$	493
$\text{H}_2\text{Fe}_2\text{L}_3^{4-}$	$\log \beta_{223} = 90,97(3)$	506
$\text{Fe}_2\text{L}_3^{6-}$	$\log \beta_{023} = 77,46(1)$	487

<sup>a</sup> Nepouzdanosti zadnje znamenke prikazane su u zagradama kao standardne devijacije.

Pretpostavljene strukture kompleksa prikazane su na slici 25. Važno je naglasiti da kompleks  $\text{Fe}_2\text{L}_3^{6-}$  može postojati u dva strukturna oblika koja se razlikuju u broju premošćujućih molekula liganda. U oba slučaja koordinacijska sfera Fe(III) iona popunjena je katekolnim atomima kisika. Budući da je apsorpcija u mjerenom spektralnom području posljedica prijenosa naboja, ne očekuju se značajne razlike u spektralnim značajkama tih oblika te na temelju sakupljenih podataka nije moguće utvrditi koji je oblik dominantan. Uz to, kompleks  $\text{H}_2\text{Fe}_2\text{L}_3^{4-}$  uključuje salicilatni način vezanja što je u skladu s izračunanim karakterističnim spektrom te



vrste, no strukturnu formulu tog kompleksa također nije moguće detaljnije opisati na temelju prikupljenih podataka.



**Slika 25.** Pretpostavljene strukturne formule kompleksa. U slučaju kompleksa  $\text{H}_2\text{Fe}_2\text{L}_3^{4-}$  prikazana je jedna od mogućih struktura. Strukturna okosnica i naboji nisu detaljno prikazani zbog jednostavnosti prikaza.

Određene konstante stabilnosti kompleksa i njihovi svojstveni spektri u skladu su s literaturnim podacima sličnih katekolatnih kompleksa. Prilikom istraživanja tetradentatnih siderofora, poput amonabaktina<sup>11</sup>, pretpostavljeni ravnotežni model uključuje tri od četiri vrste prisutne u modelu korištenom u ovom radu. Pritom valja napomenuti da su ta mjerenja provedena pri omjeru koncentracija liganada prema Fe(III) 3:2. Model konstruiran na temelju navedenih mjerenja uključivao je vrste  $\text{FeL}^-$ ,  $\text{H}_2\text{Fe}_2\text{L}_3^{4-}$  te  $\text{Fe}_2\text{L}_3^{6-}$ . Rezultati mjerenja provedenih u ovom

radu, koja uključuju tri različitih omjera koncentracija  $\text{LH}_4$  i  $\text{Fe(III)}$ : 1,5, 2 i 3, nisu mogli biti opisani navedenim modelom. Međutim, proučavane reakcije mogu se dobro opisati uključivanjem vrste  $\text{H}_3\text{FeL}_3^{6-}$  kojom se opisuju kompleksacijska svojstva mono-katekolnih siderofora kao što je krizobaktin<sup>8</sup> te ona dominira u otopinama sa značajnim suviškom istraživanog liganda.

## § 5. ZAKLJUČAK

U okviru ovog rada sintetiziran je ditopični receptor tipa bis-katekolnog ureidnog derivata siderofora, **LH<sub>4</sub>**. Priređeni spoj sastoji se od dvije katekolne podjedinice, sposobne vezati ione željeza(III) u otopini, povezane ureidnim mostom čime se otvara mogućnost vezanja aniona poput fosfata, karboksilata ili halogenida. Spoj je pripremljen konvergentnom sintezom prilikom koje su katekolni dio molekule i ureidni most pripremljeni pojedinačno te su zatim, u predzadnjem koraku sinteze, povezani u diamid uz odgovarajuće kondenzacijske reagense, nakon čega je uslijedilo uklanjanje acetonidnih zaštitnih skupina katekolnih podjedinica. Prilikom sinteze svi međuprodukti uspješno su izolirani u čistom obliku bez uporabe kolonske kromatografije. Fleksibilnost ureidnog mosta omogućuje različite konformacije molekule liganda, što uz dovoljnu duljinu mosta omogućuje keliranje Fe(III) pomoću obje katekolne skupine.

Detaljno su proučena protonacijska svojstva priređenog spoja i njegova svojstva kompleksiranja željezova(III) kationa u vodi pomoću kombiniranih potenciometrijsko-spektrofotometrijskih titracija. Kvantitativno je okarakterizirana protonacija tri fenolne skupine spoja, dok je konstanta ravnoteže protonacije posljednje skupine aproksimirana vrijednošću koja odgovara *N,N*-dimetil-2,3-dihidroksibenzamidu.<sup>7</sup>

Značajna ovisnost UV-Vis spektara o pH i omjerima koncentracija **LH<sub>4</sub>** i Fe(III) u otopini opisana je modelom koji uključuje četiri kompleksne vrste:  $\text{FeL}^-$ ,  $\text{H}_3\text{FeL}_3^{6-}$ ,  $\text{H}_2\text{Fe}_2\text{L}_3^{4-}$  te  $\text{Fe}_2\text{L}_3^{6-}$ . Konstanta stabilnosti kompleksa  $\text{FeL}^-$  određena je kompeticijskom titracijom s NTA. Poznavanje navedene konstante stabilnosti omogućilo je potpunu kvantitativnu karakterizaciju ravnoteža reakcija kompleksiranja na temelju podataka prikupljenih kombiniranim titracijama.

Elektronski spektri kompleksnih vrsta odgovaraju spektrima kompleksa ranije istraženih liganada sličnih struktura pri čemu apsorpcijski maksimumi navedenih spektara ukazuju na broj katekolnih skupina koordiniranih na  $\text{Fe}^{3+}$ . Konstante stabilnosti kompleksa određene u ovom radu također su u skladu s onima određenima u prethodnim istraživanjima.

Vrijedi istaknuti da je metodologija proučavanja katekolnih siderofora na način korišten u ovom radu opširnija od prethodnih istraživanja, budući da je korišten širok raspon pH te su titracije provedene pri različitim omjerima liganda i Fe(III) u otopini. To je omogućilo detaljan uvid u kompleksacijska svojstva istraživanog analoga siderofora, a potencijalno i katekolnih siderofora općenito.

U nastavku istraživanja svojstava priređenog ureidnog analoga siderofora ispitat će se njegova anionska kompleksacijska svojstva te njegov potencijal kao receptora ionskog para.

## § 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA

Bn	benzil
BnBr	benzil-bromid
Boc	<i>tert</i> -butiloksikarbonil
Cbz	benziloksikarbonil
CDCl <sub>3</sub>	deuterirani kloroform
CDI	<i>N,N'</i> -karbonildiimidazol
d	dublet
dd	dublet dubleta
HOBt	<i>N</i> -hidroksibenzotriazol
DCM	diklormetan
DMF	<i>N,N'</i> -dimetilformamid
DMSO	dimetil-sulfoksid
DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub>	deuterirani dimetil-sulfoksid
EDC	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimid
Et	etil
HRMS	spektrometrija masa s visokim razlučivanjem
HOAc	octena kiselina
m	multiplet
Me	metil
MeOH	metanol
<i>n</i> -BuLi	<i>n</i> -butillitij
NTA	nitrilo-trioctena kiselina
NMR	spektroskopija nuklearne magnetske rezonancije
HOSu	<i>N</i> -hidroksisukcinimid
Pd / C	paladij na ugljiku
Ph	fenil
phen	<i>ortho</i> -fenantrolin

---

py	piridin
q	kvartet
s	singlet
Sid	siderofor
t-Bu	<i>tert</i> -butil
TBTU	2-(1 <i>H</i> -benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilaminijev tetrafluoroborat
TEA	triethylamin
TFA	trifluoroctena kiselina
THF	tetrahidrofuran
TMEDA	tetrametiletilendiamin
TMS	tetrametilsilan
Tr	tritol

## § 7. LITERATURNI IZVORI

1. R. C. Hider, X. Kong, *Nat. Prod. Rep.* **27** (2010) 637–657.
2. M. J. Miller, F. Malouin, *Acc. Chem. Res.* **26** (1993) 241–249.
3. A. Hossain, R. A. Begum, V. W. Day, K. Bowman-James, *Amide and Urea-Based Receptors* u J. W. Steed (ur.), J. L. Atwood (ur.), *Supramolecular Chemistry: From Molecules to Nanomaterials*, Wiley, Chichester, 2012.
4. V. Blažek Bregović, N. Basarić, K. Mlinarić-Majerski, *Coord. Chem. Rev.* **295** (2015) 80–124.
5. W. Kaim, B. Schwederski, A. Klein, *Bioinorganic Chemistry: Inorganic Elements in the Chemistry of Life*, Wiley, New York, 2013, str. 141–149.
6. J. Roosenberg II, Y. M. Lin, Y. Lu, M. Miller, *Curr. Med. Chem.* **7** (2000) 159–197.
7. W. R. Harris, C.J. Carrano, S. R. Cooper, S.R. Sofen, A.E. Avdeef, J. V. McArdle, K. N. Raymond, *J. Am. Chem. Soc.* **101** (1979) 6097–6104.
8. V. Tomišić, S. Blanc, M. Elhabiri, D. Expert, A.M. Albrecht-Gary, *Inorg. Chem.* **47** (2008) 9419–9430.
9. M. Persmark, J. B. Neilands, *BioMetals* **5** (1992) 29–36.
10. E. Iglesias, I. Brandariz, C. Jiménez, R.G. Soengas, *Metallomics* **3** (2011) 521–528.
11. J. R. Telford, K. N. Raymond, *Inorg. Chem.* **37** (1998) 4578–4583.
12. E. J. Corey, S. D. Hurt, *Tetrahedron Lett.* **18** (1977) 3923–3924.
13. W. R. Harris, K. N. Raymond, *J. Am. Chem. Soc.* **101** (1979) 6534–6541.
14. W. H. Rastetter, T. J. Erickson, M. C. Venuti, *J. Org. Chem.* **46** (1981) 3579–3590.
15. M. Meyer, J. R. Telford, S. M. Cohen, D. J. White, J. Xu, K. N. Raymond, *J. Am. Chem. Soc.* **119** (1997) 10093–10103.
16. A. du Moulinet d'Hardemare, G. Gellon, C. Philouze, G. Serratrice, *Inorg. Chem.* **51** (2012) 12142–12151.
17. M. J. Kappel, V. L. Pecoraro, K. N. Raymond, *Inorg. Chem.* **24** (1985) 2447–2452.
18. S. Dhungana, P. S. White, A. L. Crumbliss, *J. Am. Chem. Soc.* **125** (2003) 14760–14767.
19. R. Nudelman, O. Ardon, Y. Hadar, Y. Chen, J. Libman, A. Shanzer, *J. Med. Chem.* **41** (1998) 1671–1678.
20. P. Ding, C. E. Schous, M. J. Miller, *Tetrahedron Lett.* **49** (2008) 2306–2310.

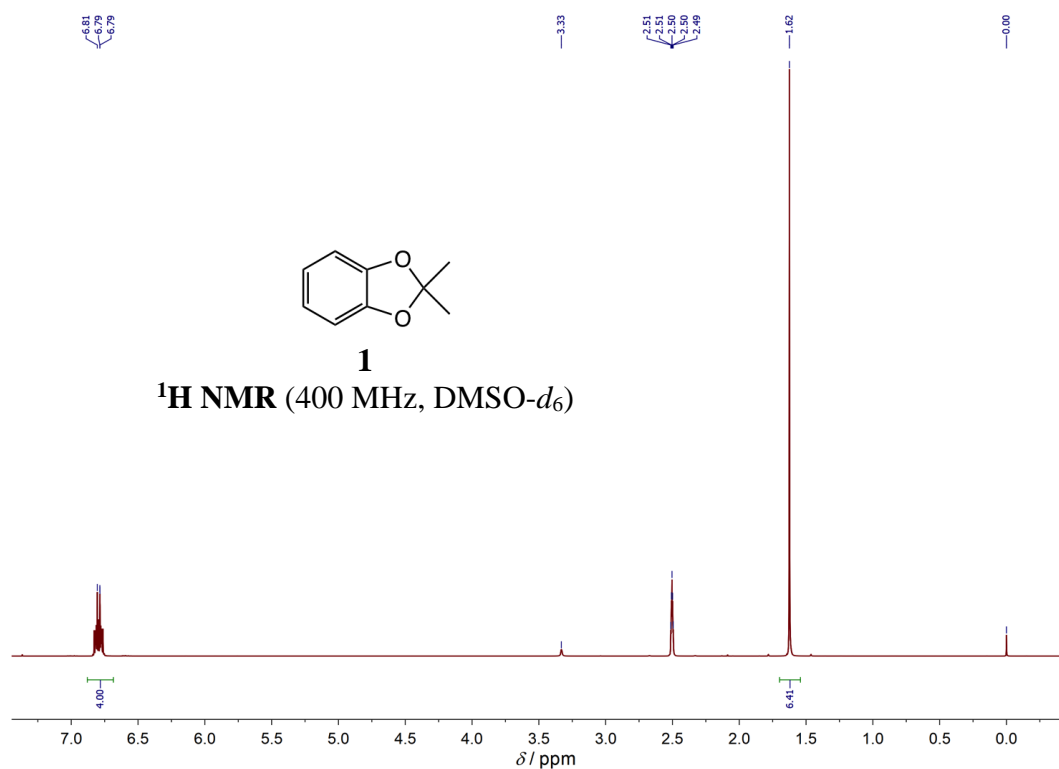
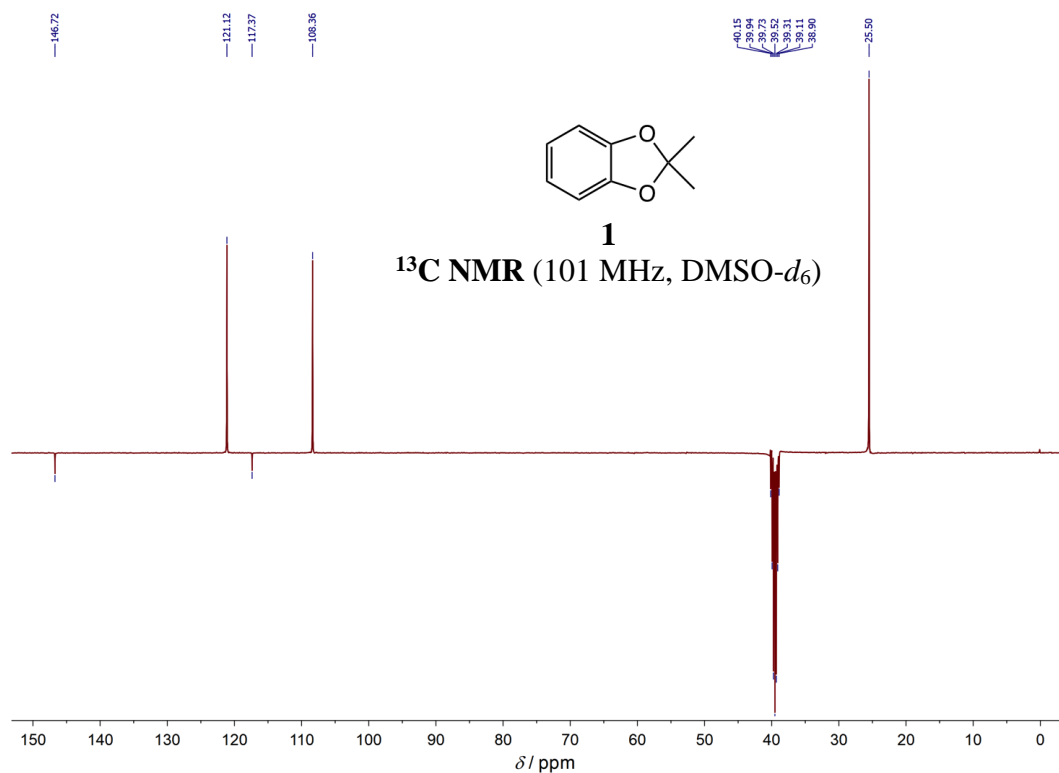
21. S. Ramurthy, M. J. Miller, *J. Org. Chem.* **61** (1996) 4120–4124.
22. H. C. Hatcher, R. N. Singh, F. M. Torti, S. V. Torti, *Futur. Med. Chem.* **1** (2009) 1643–1670.
23. K. N. Raymond, G. Mueller, B. Matzanke, G. Müller, *Struct. Chem.* **123** (1984) 49–102.
24. E. J. Corey, S. Bhattacharyya, *Tetrahedron Lett.* **18** (1977) 3919–3922.
25. R. J. A. Ramirez, L. Karamanukyan, S. Ortiz, C. G. Gutierrez, *Tetrahedron Lett.* **38** (1997) 749–752.
26. R. J. Bergeron, N. J. Stolowich, S. J. Kline, *J. Org. Chem.* **48** (1983) 3432–3439.
27. R. J. Bergeron, J. S. McManis, J.B. Dionis, J. R. Garlich, *J. Org. Chem.* **50** (1985) 2780–2782.
28. S. K. Sharma, M. J. Miller, S. M. Payne, *J. Med. Chem.* **32** (1989) 357–367.
29. R. G. Soengas, C. Anta, A. Espada, R. M. Nieto, M. Larrosa, J. Rodríguez, C. Jiménez, *Tetrahedron Lett.* **48** (2007) 3021–3024.
30. M. Persmark, D. Expert, J. B. Neilands, *J. Biol. Chem.* **264** (1989) 3187–3193.
31. A. F. Wells, *Structural Inorganic Chemistry*, Oxford University Press, London, 1991.
32. A. Avdeef, S. R. Sofen, T. L. Bregante, K. N. Raymond, *J. Am. Chem. Soc.* **100** (1978) 5362–5370.
33. A. E. Martell, R. M. Smith, *Critical Stability Constants*, Vol. 3, Springer US, Boston, 1977, str 200.
34. R. C. Hider, A. D. Hall, *Prog. Med. Chem.* **28** (1991) 41–173.
35. S. M. Cohen, K. N. Raymond, *Inorg. Chem.* **39** (2000) 3624–3631.
36. J. M. Lehn, *J. Inclusion Phenom.* **6** (1988) 351–396.
37. S. Kubik, *Chem. Soc. Rev.* **39** (2010) 3648–3663.
38. M. Boiocchi, L. Del Boca, D. E. Gmez, L. Fabbrizzi, M. Licchelli, E. Monzani, D. E. Go, *J. Am. Chem. Soc.* **126** (2004) 16507–16514.
39. M. Boiocchi, L. Del Boca, D. Esteban-Gómez, L. Fabbrizzi, M. Licchelli, E. Monzani, *Chem. - Eur. J.* **11** (2005) 3097–3104.
40. M. M. G. Antonisse, D. N. Reinhoudt, *ChemComm* (1998) 443–448.
41. G. J. Kirkovits, J. A. Shriver, P. A. Gale, J. L. Sessler, *J. Inclusion Phenom.* **41** (2001) 69–75.
42. I. Alfonso, R. Quesada, *Chem. Sci.* **4** (2013) 3009–3019.

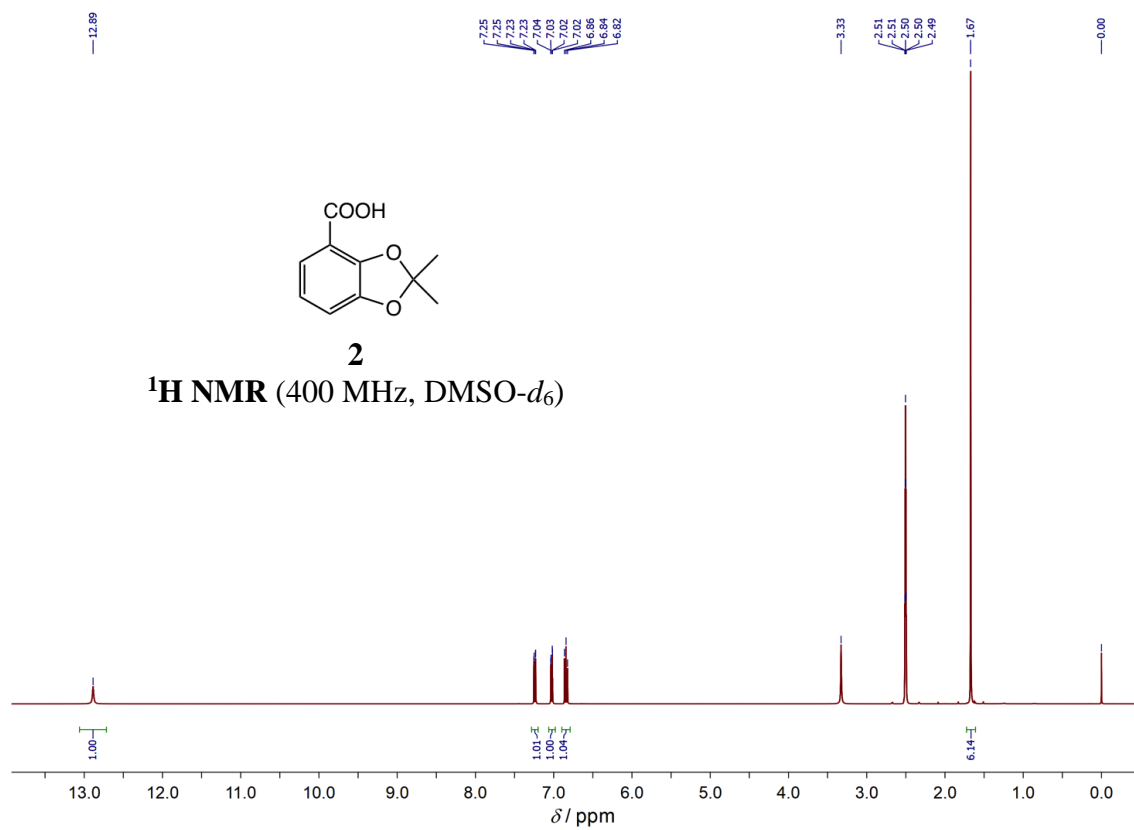
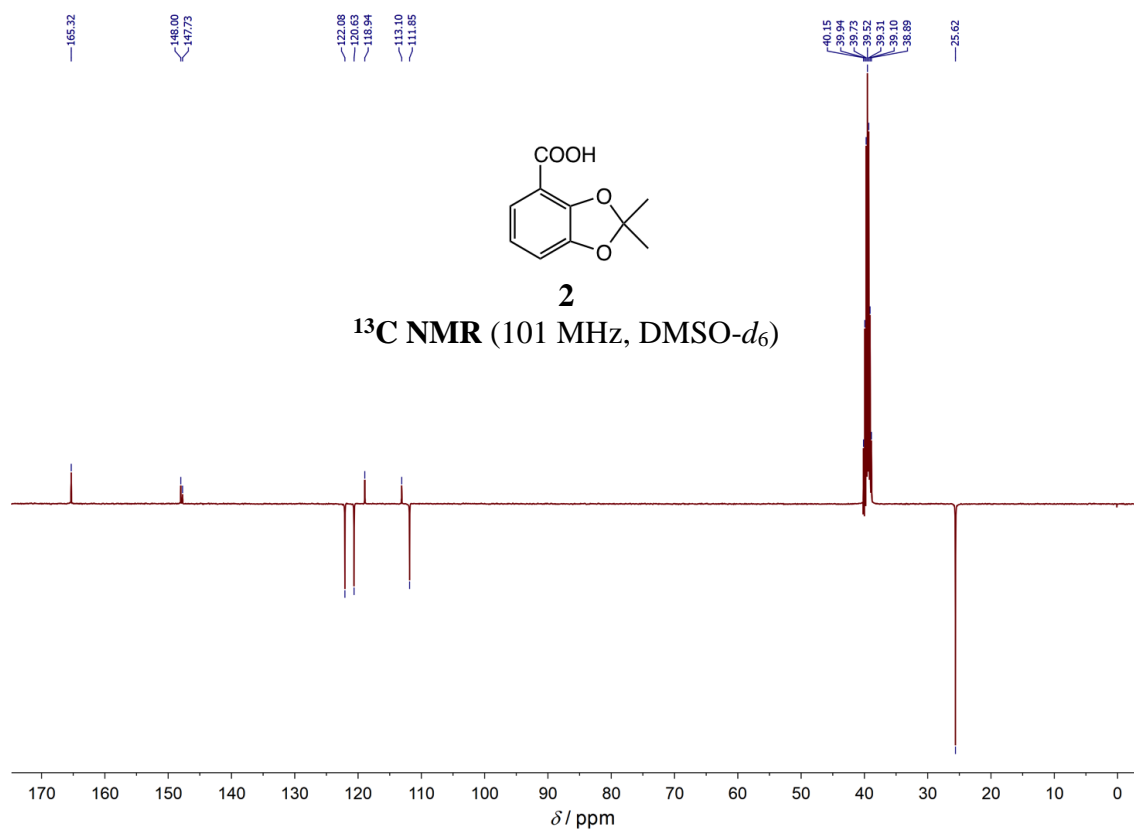


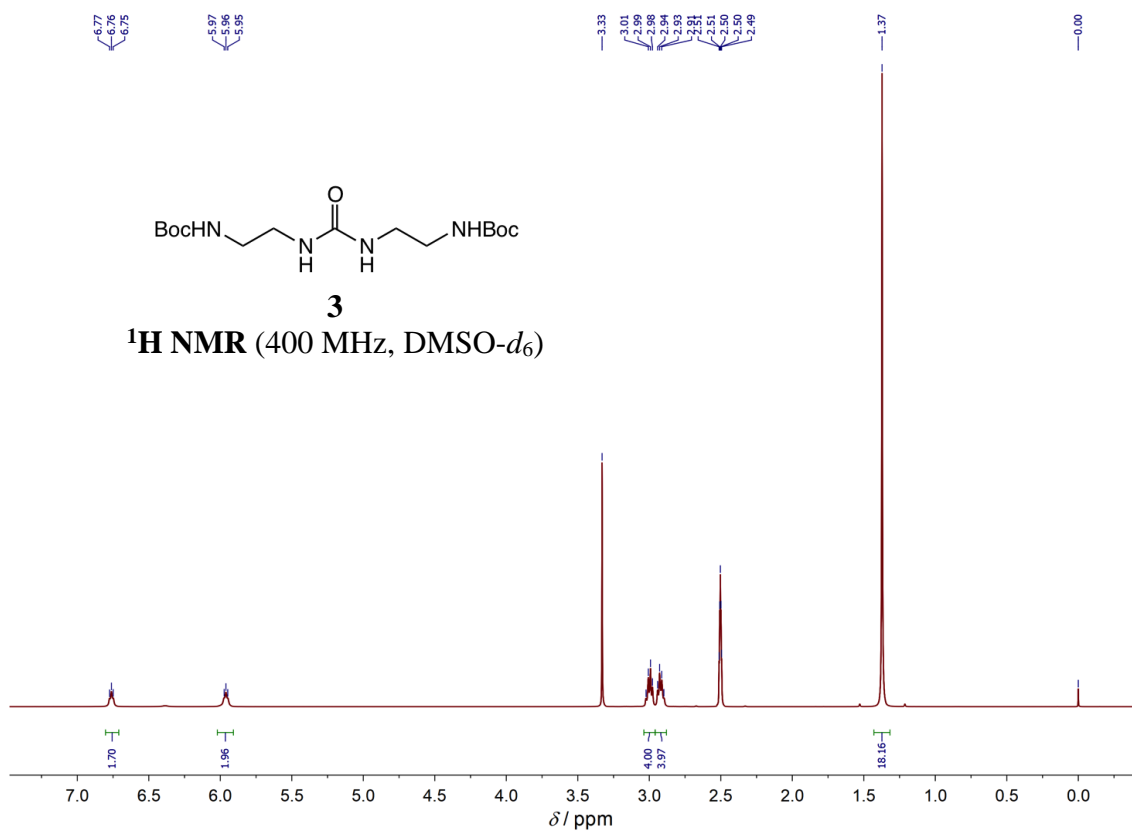
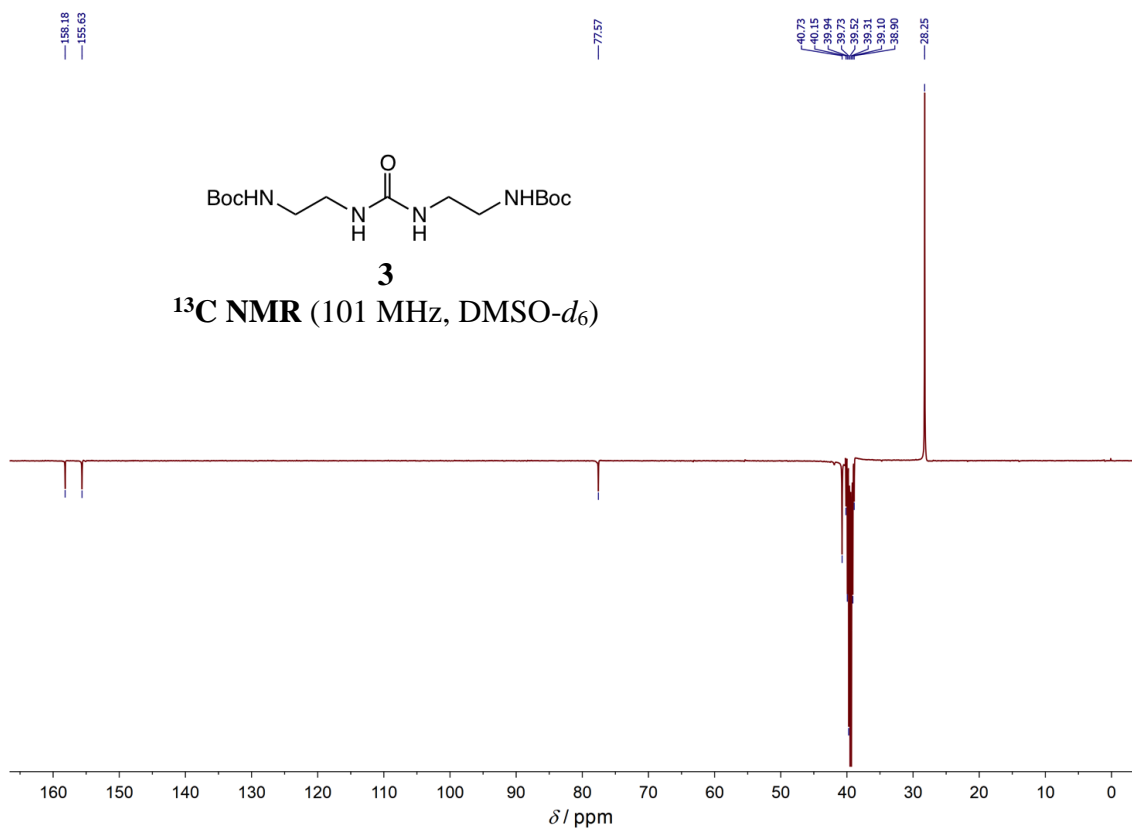
43. M. Barboiu, G. Vaughan, A. Van der Lee, *Org. Lett.* **5** (2003) 3073–3076.
44. I. Carreira-Barral, T. Rodríguez-Blas, C. Platas-Iglesias, A. de Blas, D. Esteban-Gómez, *Inorg. Chem.* **53** (2014) 2554–2568.
45. T. P. Vishnyakova, I. A. Golubeva, E. V. Glebova, *Russ. Chem. Rev.* **54** (1985) 249–261.
46. A. von Wurtz, *Liebigs Ann. Chem.* **71** (1849) 326–342.
47. K. Fukui, F. Tanimoto, H. Kitano, *Bull. Chem. Soc. Japan* **38** (1965) 1586–1589.
48. O. Bayer, *Angew. Chem.* **59** (1947) 257–272.
49. K. J. Padiya, S. Gavade, B. Kardile, M. Tiwari, S. Bajare, M. Mane, V. Gaware, S. Varghese, D. Harel, S. Kurhade, *Org. Lett.* **14** (2012) 2814–2817.
50. X. Zhang, J. Rodrigues, L. Evans, B. Hinkle, L. Ballantyne, M. Peñ, *J. Org. Chem.* **62** (1997) 6420–6423.
51. G. Biedermann, P. Schindler, O. Patoharju, B. Noer, L. Reio, *Acta Chem. Scand.* **11** (1957) 731–740.
52. R. C. Turner, K. E. Miles, *Can. J. Chem.* **35** (1957) 1002–1009.
53. C. F. Baes, R. E. Mesmer, *The Hydrolysis of Cations*, Wiley, New York, 1976, str. 229–237.
54. A. Stefánsson, *Environ. Sci. Technol.* **41** (2007) 6117–6123.
55. J. S. Renny, L. L. Tomasevich, E. H. Tallmadge, D. B. Collum, *Angew. Chemie - Int. Ed.* **52** (2013) 11998–12013.
56. P. Thordarson, *Chem. Soc. Rev.* **40** (2011) 1305–1323.
57. P. Gans, A. Sabatini, A. Vacca, *Ann. di Chim.* **89** (1999) 45–49.
58. K. C. Nicolaou, K. R. Reddy, G. Skokotas, F. Sato, X. Y. Xiao, C. K. Hwang, *J. Am. Chem. Soc.* **115** (1993) 3558–3575.
59. H. T. S. Britton, A. R. Robinson, *J. Chem. Soc.* **458** (1931) 1456–1462.
60. D. A. Skoog, D. M. West, F. J. Holler, S. R. Crouch, *Analytical Chemistry: An Introduction*, Cengage Learning, Boston, 2000, str. 547–592.
61. J. Xu, R. B. Jordan, *Inorg. Chem.* **27** (1988) 4563–4566.
62. E. Mentasti, E. Pelizzetti, G. Saini, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* (1973) 2609–2614.
63. R.J. Motekaitis, A.E. Martell, *J. Coord. Chem.* **31** (1994) 67–78.
64. F. Al-Sogair, H. M. Marafie, N. M. Shuaib, H. Ben Youngo, M. S. El-Ezaby, *J. Coord. Chem.* **55** (2002) 1097–1109.

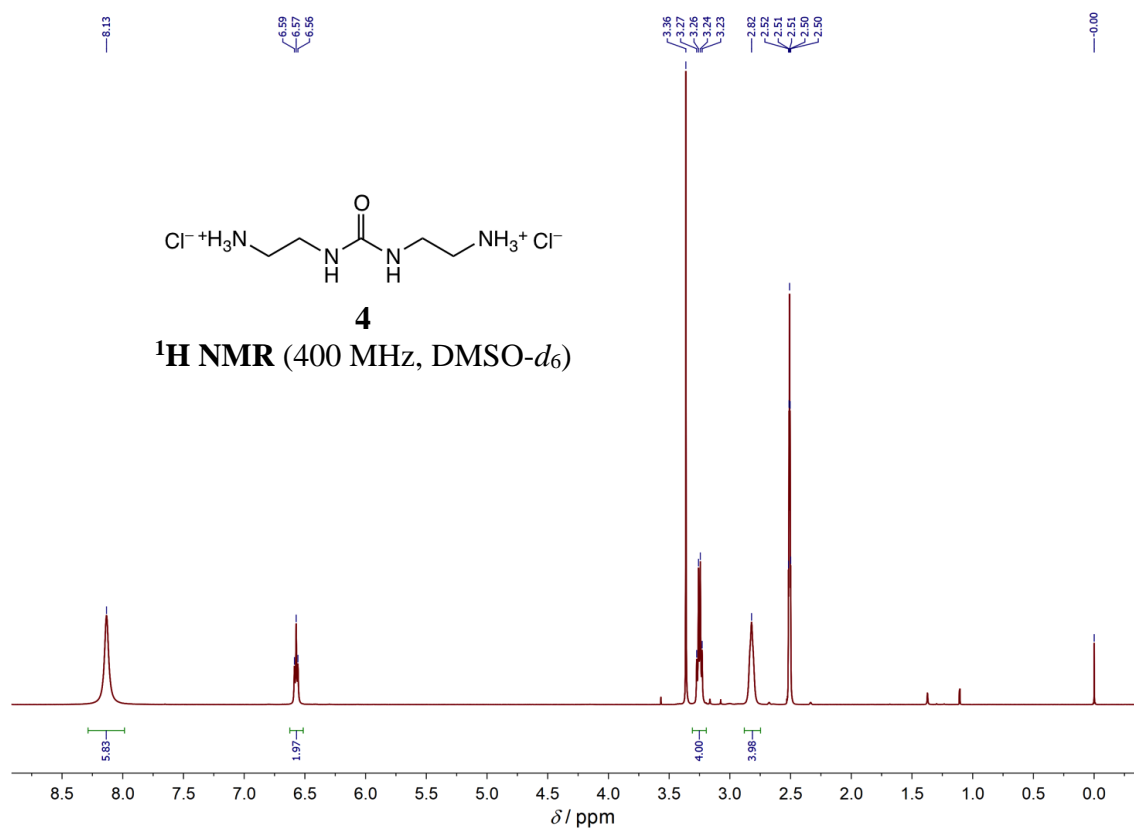
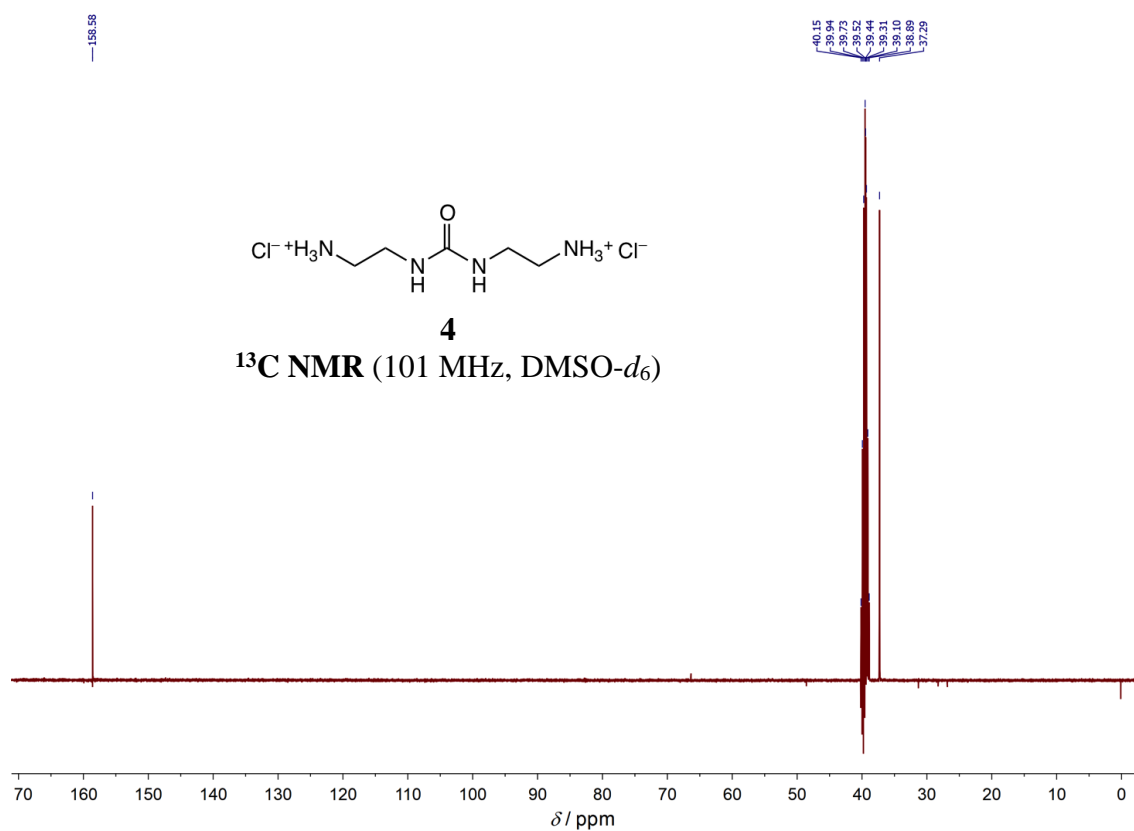
65. R. E. Hamm, C. M. Shull, D. M. Grant, *J. Am. Chem. Soc.* **76** (1954) 2111–2114.

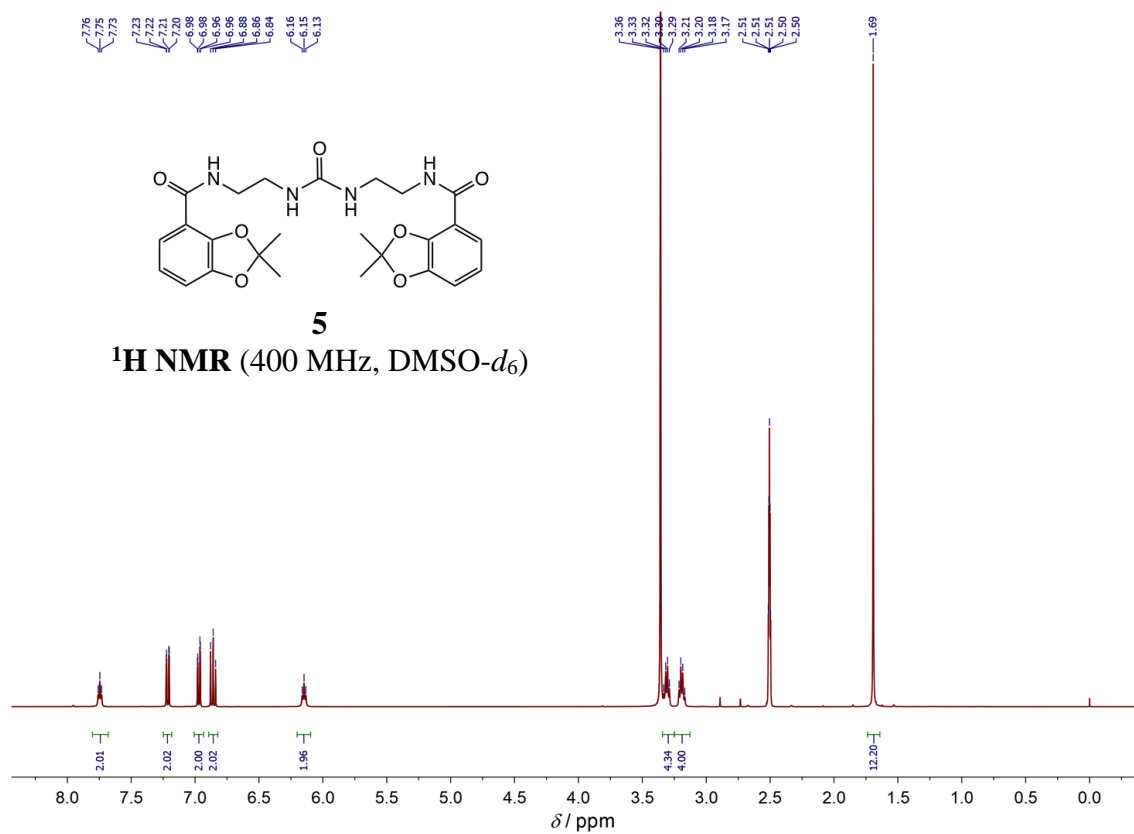
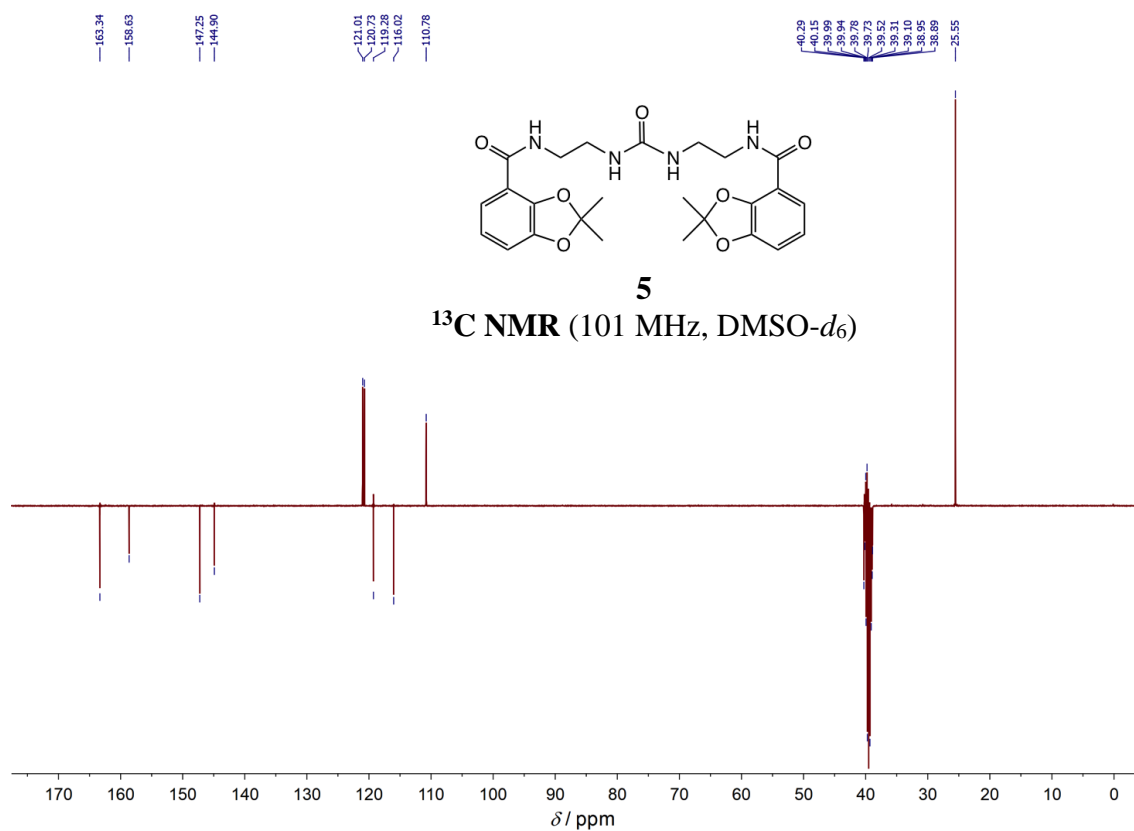
## § 8. DODATAK

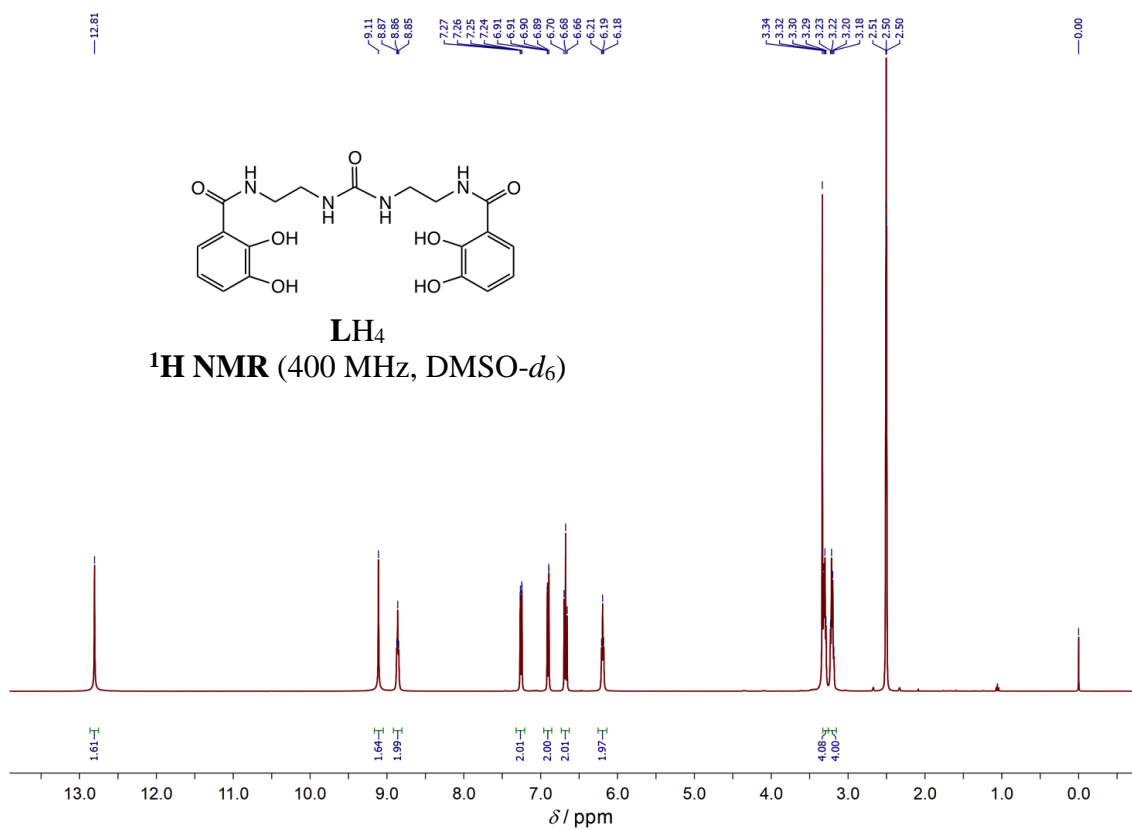
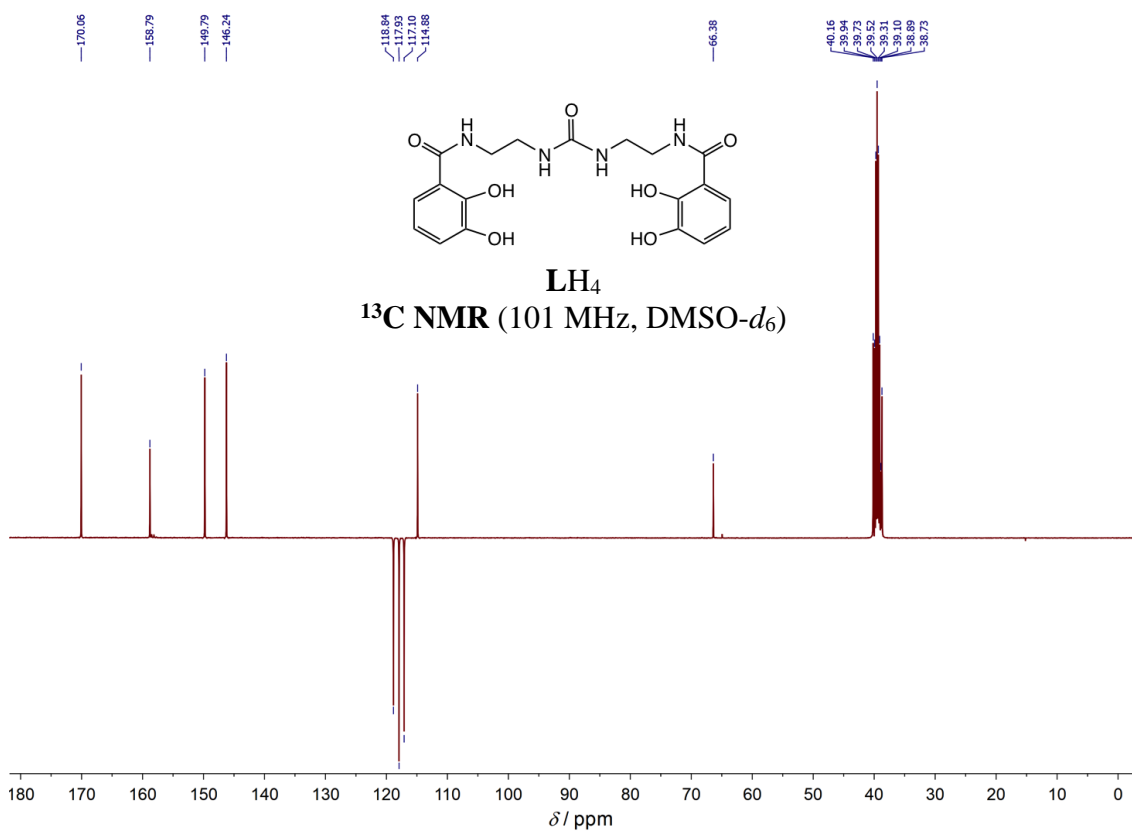
Slika D1.  $^1\text{H NMR}$  Spektar spoja **1** u  $\text{DMSO-}d_6$ .Slika D2.  $^{13}\text{C NMR}$  Spektar spoja **1** u  $\text{DMSO-}d_6$ .

Slika D3. <sup>1</sup>H NMR Spektar spoja **2** u DMSO-*d*<sub>6</sub>.Slika D4. <sup>13</sup>C NMR Spektar spoja **2** u DMSO-*d*<sub>6</sub>.

Slika D5.  $^1\text{H NMR}$  Spektar spoja **3** u  $\text{DMSO-}d_6$ .Slika D6.  $^{13}\text{C NMR}$  Spektar spoja **3** u  $\text{DMSO-}d_6$ .

Slika D7.  $^1\text{H NMR}$  Spektar spoja **4** u  $\text{DMSO-}d_6$ .Slika D8.  $^{13}\text{C NMR}$  Spektar spoja **4** u  $\text{DMSO-}d_6$ .

Slika D9. <sup>1</sup>H NMR Spektar spoja **5** u DMSO-*d*<sub>6</sub>.Slika D10. <sup>13</sup>C NMR Spektar spoja **5** u DMSO-*d*<sub>6</sub>.

Slika D11. <sup>1</sup>H NMR Spektar spoja LH<sub>4</sub> u DMSO-*d*<sub>6</sub>.Slika D12. <sup>13</sup>C NMR Spektar spoja LH<sub>4</sub> u DMSO-*d*<sub>6</sub>.



## § 9. ŽIVOTOPIS

### Osobni podatci

Ime i prezime: Demian Kalebić

Datum rođenja: 7. rujna 1994.

Mjesto rođenja: Pula

### Obrazovanje

- 2001.–2009. Osnovna škola Vidikovac, Pula
- 2009.–2013. Prirodoslovno-matematička gimnazija Pula
- 2013.–2016. Preddiplomski studij Kemije, istraživački smjer, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu
- 2016.–2018. Diplomski studij Kemije, istraživački smjer, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu
2018. Erasmus+ stručna praksa, KU Leuven, Belgija

### Nagrade i priznanja

2017. Rektorova nagrada za Društveno koristan rad u akademskoj i široj zajednici za organizaciju Simpozija studenata kemičara (SiSK)

### Sudjelovanja u popularizaciji znanosti

- 2014.–2018. Otvoreni dan Kemijskog odsjeka
2016. Voditelj radionice na Summer School of Science S3 u Požegi
- 2016.–2018. Voditelj udruge Popularizacijski odred Entropija

### Sudjelovanja na znanstvenim skupovima

1. Postersko izlaganje *Synthesis and Fe(III)-binding properties of novel urea-catechol based ligand* na Winter School of Physical Organic Chemistry, Bressanone (Italija)