

# Sinteza novih akridin-gvanidin-tiol gradivnih blokova kao potencijalnih DNA veziva

---

Hajdin, Ita

Undergraduate thesis / Završni rad

2016

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Split, Faculty of Chemistry and Technology / Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:167:687149>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-18**

*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Faculty of chemistry and technology - University of Split](#)



**SVEUČILIŠTE U SPLITU**  
**KEMIJSKO - TEHNOLOŠKI FAKULTET**

**SINTEZA NOVIH AKRIDIN-GVANIDIN TIOL GRADIVNIH  
BLOKOVA KAO POTENCIJALNIH DNA VEZIVA**

**ZAVRŠNI RAD**

**ITA HAJDIN**

**Matični broj: 198**

**Split, rujan 2016.**



**SVEUČILIŠTE U SPLITU**  
**KEMIJSKO – TEHNOLOŠKI FAKULTET**  
**PREDDIPLOMSKI STUDIJ KEMIJE**

**SINTEZA NOVIH AKRIDIN-GVANIDIN TIOL GRADIVNIH  
BLOKOVA KAO POTENCIJALNIH DNA VEZIVA**

**ZAVRŠNI RAD**

**ITA HAJDIN**  
**Matični broj: 198**  
**Split, rujan 2016.**

**UNIVERSITY OF SPLIT**  
**FACULTY OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY**  
**UNDERGRADUATE STUDY OF CHEMISTRY**

**SYNTHESIS OF NEW ACRYDINEBIS (GUANIDINETHIOL)  
BUILDING BLOCKS AS POTENCIAL DNA BINDERS**

**BACHELOR THESIS**

**ITA HAJDIN**  
**Parent number: 198**  
**Split, September 2016.**

Sveučilište u Splitu  
Kemijско-tehnološki fakultet u Splitu  
Preddiplomski studij kemije

**Znanstveno područje:** Prirodne znanosti

**Znanstveno polje:** Kemija

**Tema rada** je prihvaćena na 4. sjednici Fakultetskog vijeća Kemijско tehnološkog fakulteta

**Mentor:** Doc.dr.sc. Mila Radan

**Pomoć pri izvedbi:**

**Sinteza novih akridin-gvanidin gradivnih blokova kao potencijalnih DNA veziva**  
ITA HAJDIN, 198

**Sažetak:** U ovom radu su prikazane sinteze 3,6-diizotiocijanata akridina, derivata tiouree i bisgvanidina. Osnova ovih spojeva su molekule akridina, gvanidina i tiouree. Akridin je organski spoj i heterociklički spoj dušika s formulom  $C_{13}H_9N$ . Akridini su supstituirani derivati matičnog prstena. To je planarna molekula koja je strukturno slična antracenu s jednom od središnjih CH skupina zamijenjenih dušikom. Gvanidin je spoj s kemijskom formulom  $CH_5N_3$ . Bezbojna je krutina koja se otapa u polarnim otapalima, također je jaka baza koja se koristi u proizvodnji plastike i eksploziva. Nalazi se u mokraći kao normalan produkt metabolizma proteina. Gvanidin je funkcijska skupina na bočnom lancu arginina. Gvanidin se može shvatiti kao dušikov analog ugljične kiseline. Tiourea je organosulfatni spoj s formulom  $SC(NH_2)_2$ , strukturno je slična urei, samo što je atom kisika zamijenjen atomom sumpora.

Korištene tehnike u sintezama su NMR (nuklearna magnetska rezonantna spektroskopija), tankoslojna kromatografija i kolonska kromatografija. Svaki produkt reakcije je prvo bio praćen preko tankoslojne kromatografije kako bi se utvrdio tijek reakcije. Zatim se snimao preko NMR uređaja da bi se vidjelo je li nastao produkt i ima li nečistoća. Uzorak s nečistoćama se pročišćavao preko kolonske kromatografije i ponovno snimao preko NMR uređaja.

Molekule 3,6-diizotiocijanata akridina i derivata tiouree su uspješno sintetizirane, dok se za molekulu bisgvanidina ne može sa sigurnošću reći da li je dobivena ili nije, zbog toga što treba napraviti dodatna ispitivanja.

**Ključne riječi:** akridin, gvanidin, tiourea, NMR

**Rad sadrži:** 27 stranica, 28 slika, 8 literaturnih referenci

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Sastav Povjerenstva za obranu:**

1. Doc. dr. sc. Ivica Blažević - predsjednik
2. Dr. sc. Franko Burčul, znanstv. sur. - član
3. Doc. dr. sc. Mila Radan – član- mentor

**Datum obrane:** 28. rujna 2016.

**Rad je tiskan u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen** u Knjižnici Kemijско-tehnološkog fakulteta Split, Ruđera Boškovića 35

## BASIC DOCUMENTATION CARD

## BACHELOR THESIS

University of Split  
Faculty of Chemistry and Technology Split  
Undergraduate study of chemistry

**Scientific area:** Natural sciences

**Scientific field:** Chemistry

**Thesis subject** was approved by Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology, session no. 4.

**Mentor:** PhD Mila Radan, Assistant prof.

**Technical assistance:**

### Synthesis of new acrydinebis (guanidinethiol) building blocks as potencial DNA binders ITA HAJDIN, 198

**Abstract:** In this thesis, the synthesis of 3,6-diisocyanate acridine, thiourea derivative and bisguanidine are presented. The basis for these compounds are acridine, guanidine and thiourea molecules. Acridine is an organic compound and a nitrogen heterocyclic with the formula  $C_{13}H_9N$ . It is a planar molecule that is structurally similar to anthracene with one central CH group replaced by nitrogen. Guanidine is a compound with the chemical formula of  $CH_5N_3$ . It is a colourless solid that dissolves in polar solvents and it is also a strong base that is used in the production of plastic and explosives. In urine, it is found as a normal product of the protein metabolism. Guanidine is a functional group on the side chain of arginine. Guanidine can be thought of as the nitrogen analogue of the carbonic acid. Thiourea is an organosulfur compound with the formula  $SC(NH_2)_2$ , structurally it is similar to urea, but in this case the oxygen atom is replaced with a sulfur atom.

The methods used in the synthesis are NMR (nuclear magnetic resonance spectroscopy), thin layer chromatography and column chromatography. Every product of the reaction was first tested with thin layer chromatography so that the course of the reaction could be determined. Afterwards it was tested with the NMR device to see if the product has appeared and were there any impurities present. The sample containing the impurities was purified with column chromatography and re-tested with the NMR device.

The 3,6-diisocyanate acridine and thiourea molecules were successfully synthesised, while for the bisguanidine molecule it is not possible to tell with certainty if it was obtained or not, further tests are necessary to confirm the synthesis.

**Keywords:** acridine, guanidine, thiourea, NMR

**Thesis contains:** 27 pages, 28 figures, 8 references

**Original in:** Croatian

**Defence committee:**

1. PhD Ivica Blažević, Assistant prof. - chair person
2. PhD Franko Burčul, Research associate - member
3. PhD Mila Radan, Assistant prof. - supervisor

**Defence date:** September, 28, 2016

**Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in** Library of Faculty of Chemistry and Technology Split, Ruđera Boškovića 35.

*Završni rad je izrađen na Institutu za Naprednu Kemiju Katalonije, Odjelu Biološke  
Kemije i Molekularnog Modeliranja – Supramolekularne Kemije pod mentorstvom  
dr. sc. Angel Messeguer, dr. sc. Ignacio Alfonso Rodrigues i dr. sc. Jordi Sola Oller u  
razdoblju*

*od travnja do kolovoza 2016.g.*



*Iskreno zahvaljujem mentorima u Barceloni, dr. sc. Angel Messeguer, dr. sc. Ignacio Alfonso Rodrigues i dr. sc. Jordi Sola Oller na pruženoj prilici da radim u njihovim laboratorijima i pod njihovim mentorstvom.*

*Također se zahvaljujem mentorici doc. dr. sc. Mili Radan koja mi je pomogla sa svojim stručnim savjetima i sugestijama tijekom pisanja završnog rada.*

*Posebno se zahvaljujem obitelji, dečku i prijateljima na potpori i razumijevanju tijekom studiranja.*

## ZADATAK ZAVRŠNOG RADA

1. *Proučavanje znanstvenih radova*
2. *Sinteza 3,6-diizotiocijanata akridina*
3. *Sinteza derivata tiouree*
4. *Sinteza bisgvanidina*

## SAŽETAK

U ovom radu su prikazane sinteze 3,6-diizotiocijanata akridina, derivata tiouree i bisgvanidina. Osnova ovih spojeva su molekule akridina, gvanidina i tiouree. Akridin je organski spoj i heterociklički spoj dušika s formulom  $C_{13}H_9N$ . Akridini su supstituirani derivati matičnog prstena. To je planarna molekula koja je strukturno slična antracenu s jednom od središnjih CH skupina zamijenjenih dušikom. Gvanidin je spoj s kemijskom formulom  $CH_5N_3$ . Bezbojna je krutina koja se otapa u polarnim otapalima, također je jaka baza koja se koristi u proizvodnji plastike i eksploziva. Nalazi se u mokraći kao normalan produkt metabolizma proteina. Gvanidin je funkcijska skupina na bočnom lancu arginina. Gvanidin se može shvatiti kao dušikov analog ugljične kiseline. Tiourea je organosulfatni spoj s formulom  $SC(NH_2)_2$ , strukturno je slična urei, samo što je atom kisika zamijenjen atomom sumpora.

Korištene tehnike u sintezama su NMR (nuklearna magnetska rezonantna spektroskopija), tankoslojna kromatografija i kolonska kromatografija. Svaki produkt reakcije je prvo bio praćen preko tankoslojne kromatografije kako bi se utvrdio tijek reakcije. Zatim se snimao preko NMR uređaja da bi se vidjelo je li nastao produkt i ima li nečistoća. Uzorak s nečistoćama se pročišćavao preko kolonske kromatografije i ponovno snimao preko NMR uređaja.

Molekule 3,6-diizotiocijanata akridina i derivata tiouree su uspješno sintetizirane, dok se za molekulu bisgvanidina ne može sa sigurnošću reći da li je dobivena ili nije, zbog toga što treba napraviti dodatna ispitivanja.

**Ključne riječi:** akridin, gvanidin, tiourea, NMR

## SUMMARY

In this thesis, the synthesis of 3,6-diisocyanate acridine, thiourea derivative and bisguanidine are presented. The basis for these compounds are acridine, guanidine and thiourea molecules. Acridine is an organic compound and a nitrogen heterocyclic with the formula  $C_{13}H_9N$ . It is a planar molecule that is structurally similar to anthracene with one central CH group replaced by nitrogen. Guanidine is a compound with the chemical formula of  $CH_5N_3$ . It is a colourless solid that dissolves in polar solvents and it is also a strong base that is used in the production of plastic and explosives. In urine, it is found as a normal product of the protein metabolism. Guanidine is a functional group on the side chain of arginine. Guanidine can be thought of as the nitrogen analogue of the carbonic acid. Thiourea is an organosulfur compound with the formula  $SC(NH_2)_2$ , structurally it is similar to urea, but in this case the oxygen atom is replaced with a sulfur atom.

The methods used in the synthesis are NMR (nuclear magnetic resonance spectroscopy), thin layer chromatography and column chromatography. Every product of the reaction was first tested with thin layer chromatography so that the course of the reaction could be determined. Afterwards it was tested with the NMR device to see if the product has appeared and were there any impurities present. The sample containing the impurities was purified with column chromatography and re-tested with the NMR device.

The 3,6-diisocyanate acridine and thiourea molecules were successfully synthesised, while for the bisguanidine molecule it is not possible to tell with certainty if it was obtained or not, further tests are necessary to confirm the synthesis.

**Keywords:** acridine, guanidine, thiourea, NMR

# SADRŽAJ

|   |    |
|---|----|
| 1. UVOD .....   | 1  |
| 2. OPĆI DIO .....   | 2  |
| 2.1. Akridin .....  | 2  |
| 2.2. Gvanidin .....   | 3  |
| 2.3. Tiourea .....  | 3  |
| 2.4. DNA veziva.....  | 4  |
| 3. PREGLED KORIŠTENIH TEHNIKA.....                            | 5  |
| 3.1. Nuklearna magnetska rezonantna spektroskopija - NMR..... | 5  |
| 3.2. Tankoslojna kromatografija - TLC .....                   | 6  |
| 3.3. Kromatografija na koloni .....                           | 7  |
| 4. EKSPERIMENTALNI DIO .....                                  | 9  |
| 4.1. Sinteza 3,6-diizotiocijanat akridina.....                | 9  |
| 4.1.1. Postupak .....   | 9  |
| 4.2. Sinteza derivata tiouree .....                           | 11 |
| 4.2.1. Postupak .....   | 11 |
| 4.3. Sinteza bisgvanidina.....                                | 13 |
| 4.3.1. Postupak 1 .....                                       | 13 |
| 4.3.2. Postupak 2 .....                                       | 14 |
| 5. REZULTATI I RASPRAVA.....                                  | 15 |
| 5.1. Sinteza 3,6-diizotiocijanat akridina.....                | 15 |
| 5.2. Sinteza derivata tiouree .....                           | 16 |
| 5.3. Sinteza bisgvanidina.....                                | 19 |
| 6. ZAKLJUČAK.....   | 21 |
| 7. LITERATURA .....   | 22 |
| 8. PRILOG .....   | 23 |

# 1. UVOD

Osnove za sintezu spojeva: 3,6-diizotiocijanat akridina, derivata tiouree i bisgvanidina su akridin, gvanidin i tiourea.

Akridin je organski spoj i heterociklički spoj dušika s formulom  $C_{13}H_9N$ . Akridini su supstituirani derivati matičnog prstena. To je planarna molekula koja je strukturno slična antracenu s jednom od središnjih CH skupina zamijenjenih dušikom.

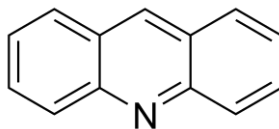
Gvanidin je spoj s kemijskom formulom  $CH_5N_3$ . To je bezbojna krutina koja se otapa u polarnim otapalima, također je jaka baza koja se koristi u proizvodnji plastike i eksploziva. Nalazi se u mokraći kao normalan produkt metabolizma proteina. Gvanidin je funkcijska skupina na bočnom lancu arginina. Gvanidin se može shvatiti kao dušikov analog ugljične kiseline.

Tiourea je organosulfatni spoj s formulom  $SC(NH_2)_2$ , strukturno je slična urei, samo što je atom kisika zamijenjen atomom sumpora. Tiourea je reagens u organskoj sintezi.

Tehnike koje će se koristiti za praćenje sinteza su NMR (nuklearna magnetska rezonantna spektroskopija), tankoslojna kromatografija i kolonska kromatografija.

## 2. OPĆI DIO

### 2.1. Akridin

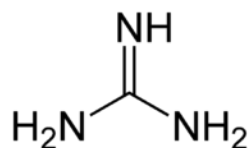


*Slika 1.* Molekula akridina

Akridin (Slika 1.) je organski spoj i heterociklički spoj dušika s formulom  $C_{13}H_9N$ . Akridini su supstituirani derivati matičnog prstena. To je planarna molekula koja je strukturno slična antracenu s jednom od središnjih CH skupina zamijenjenih dušikom. Poput srodnih molekula piridina i kinolina, akridin je blago bazičan, te je skoro bezbojna krutina. Nema komercijalnih aplikacija akridina, ali u prošlosti su bile popularne akridinske boje. Kristalizira se u obliku iglica.<sup>1</sup>

Akridin je antracenski alkaloid, također je poznat po imenima: dibenzopiridin, 2,3,5,6-dibenzopiridin i 10-azaantracene. Kristalizira u bezbojne do svijetlo žute iglice s točkom taljenja od  $110\text{ }^{\circ}\text{C}$  i točkom vrenja od  $346\text{ }^{\circ}\text{C}$ . 1870. su Carl Grabe i Heinrich Caro<sup>2</sup> u Njemačkoj prvi put sintetizirali akridin iz katranovih frakcija visokog vrelišta. Prema dostupnoj literaturi utvrđeno je da derivati akridina posjeduju raznolike aktivnosti: antiupalne i antikancerogene aktivnosti, antihelmintične aktivnosti, insekticidne, rodenticidne, fungicidne i antitumorske aktivnosti.<sup>2</sup> Akridin je odvojen iz katrana miješanjem s razrijeđenom otopinom sumporne kiseline i zatim je istaložen iz otopine sumporne kiseline sa kalijevim dikromatom. Dobiveni akridin dikromat se u završnom koraku otapa u amonijaku. Akridin i njegovi homolozi su stabilni spojevi slabo bazičnog karaktera. Akridin ima pKa vrijednost 5.6, slično kao i piridin. Sintetizira se putem: Ullmannove sinteze, Bernthsenove sinteze, Friedlanderove sinteze i iz C-aciliranih difenilamina. Reakcije akridina su: elektrofilna supstitucija akridina, nukleofilne reakcije, redukcija akridina, oksidacija akridina, reduktivna alkilacija i fotoalkilacija.<sup>2</sup>

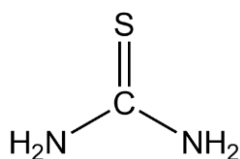
## 2.2. Gvanidin



*Slika 2.* Molekula gvanidina

Gvanidin (Slika 2.) je spoj s kemijskom formulom  $\text{CH}_5\text{N}_3$ . To je bezbojna krutina koja se otapa u polarnim otapalima, također je jaka baza koja se koristi u proizvodnji plastike i eksploziva. Nalazi se u mokraći kao normalan produkt metabolizma proteina, te kao funkcijska skupina na bočnom lancu arginina. Gvanidin se može promatrati kao dušikov analog ugljične kiseline, tj.  $\text{C} = \text{O}$  grupa u ugljičnoj kiselini je zamijenjena s  $\text{C} = \text{NH}$  grupom, a svaka  $\text{OH}$  grupa je zamijenjena s  $\text{NH}_2$  grupom. 1861. je prvi put sintetiziran oksidativnom razgradnjom aromatskog prirodnog proizvoda, gvanina, izoliranog iz peruanskog guana.<sup>3</sup> Komercijalni put sinteze obuhvaća postupak u dva koraka počevši s reakcijom dicijandiamida s amonijevim solima preko intermedijarnog bigvanidina. U drugom koraku, sol se tretira s bazom, kao što je natrijev metoksid. Gvanidin se potom protonira u fiziološkim uvjetima. Ta konjugirana kiselina se zove gvanidin kation ( $\text{C}(\text{NH}_2)_3^+$ ), njegov  $\text{pK}_a$  je 13.6 što znači da je gvanidin vrlo jaka baza u vodi.<sup>3</sup>

## 2.3. Tiourea



*Slika 3.* Molekula tiouree

Tiourea (Slika 3.) je organosulfatni spoj s formulom  $\text{SC}(\text{NH}_2)_2$ , strukturno je slična urei, samo što je atom kisika zamijenjen atomom sumpora, a svojstva uree i tiouree se značajno razlikuju. Tiourea je reagens u organskoj sintezi, odnosi se na široku klasu spojeva opće strukture  $(\text{R}^1\text{R}^2\text{N})(\text{R}^3\text{R}^4\text{N})\text{C} = \text{S}$ . Tiourea je planarna molekula, udaljenost  $\text{C} = \text{S}$  veza je  $1,60 \pm 0,1$  Å i javlja se u dva tautomerna oblika. U vodenim otopinama



oblik tiol prevladava. Oblik tiol, koji je također poznat kao izotiourea, može se susresti u supstituiranim spojevima kao što su izotiouronijske soli.<sup>4</sup>

## 2.4. DNA veziva

Interakcija malih molekula s DNA se proučava gotovo pola stoljeća u nadi da će se shvatiti princip dizajna specifične DNA sekvence kako bi se kontrolirala ekspresija gena. Jedinstvene strukturne značajke DNA, zbog relativne planarne strukture aromatskih baza duž spirale šećer-fosfatne okosnice, čine ju posebno zanimljivim ciljem za dizajn lijekova. Znatni naponi se ulažu u razvijanje slijeda DNA vezivnih liganada. Akridin i njegovi derivati su obojeni razred čija je interakcija s DNA opsežno istraživana. Molekule se obično vežu na DNA dvjema glavnim interakcijama, interkaliranjem ili utorskim vezivanjem. Arhetipski DNA interkalirajući agenti su 9-aminoakridin i njegovi derivati, koji se vežu na DNA umetanjem, ali obično bez kovalentnih interakcija. Umetanje akridina je olakšano kationskom ionizacijom i dovoljnom molekularnom planarnosti. Dva akridinska spoja akranil i atabrine (kinakrin hidroklorid) su lijekovi s nekoliko različitih medicinskih primjena. Jedna od zanimljivih grupa derivata akridina su gvanidini. Gvanidini su važne molekule sa širokim rasponom zanimljivih biokemijskih i farmaceutskih svojstava. Gvanidini se nalaze u prirodnim proizvodima, farmaceutski aktivnim spojevima i u molekulama koje se koriste za supramolekularna istraživanja. Kompleksi gvanidina koji sadrži prirodne proizvode se izoliraju i podvrgavaju sintezama. Na primjer, triciklički gvanidin ptilomikalin A je izoliran iz spužve koja je uzgojena u Karipskom i Crvenom moru i ustanovljeno je da posjeduje citotoksični, antifugalni, antimikrobni i antivirusni učinak. Nedavna istraživanja sintetskih biološki aktivnih gvanidina su dokazala antimikrobnu aktivnost trombina i inhibiciju  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  razmjene, kao i inhibiciju NO sintaze, antitrombocitnu ili antidijabetičku aktivnost i učinkovitu isporuku antitumorskih agensa.<sup>5</sup>

## 3. PREGLED KORIŠTENIH TEHNIKA

### 3.1. Nuklearna magnetska rezonantna spektroskopija - NMR

Nuklearna magnetska rezonantna spektroskopija, najčešće nazivana NMR spektroskopija, je istraživačka tehnika koja koristi magnetska svojstva pojedinih jezgri atoma. Oslanja se na fenomen nuklearne magnetske rezonancije i može pružiti detaljne informacije o strukturi, dinamici, reakcijskom stanju i kemijskom okruženju molekula. Intramolekularno magnetsko polje oko atoma u molekuli mijenja rezonantnu frekvenciju, dajući pristup pojedinostima elektronske strukture molekule.

Najčešće se NMR spektroskopija koristi od strane kemičara i biokemičara u istraživanju svojstava organskih molekula, iako je primjenjiva na bilo koju vrstu uzorka koji sadrži jezgru koja posjeduje spin. Prikladni uzorci su u rasponu od malih spojeva analiziranih s jednodimenzionalnom vodik-1 ili ugljik-13 NMR spektroskopijom do velikih proteina ili nukleinskih kiselina koristeći tro- ili četvero-dimenzionalne tehnike. Utjecaj NMR spektroskopije na znanosti je značajan, zbog raspona informacija i raznolikosti uzoraka koji se mogu snimati, uključujući otopine i čvrste tvari.

NMR spektri su jedinstveni, dobro riješeni, analitički praćeni i često vrlo predvidljivi za male molekule. Tako se u praktičnoj organskoj kemiji NMR analiza koristi da bi se potvrdio identitet tvari. Različite funkcijske skupine se očito razlikuju, a identične funkcijske skupine s različitim susjednim supstituentima će davati različite signale. NMR u velikoj mjeri zamjenjuje tradicionalne „mokre“ kemijske testove kao što su obojani reagensi za identifikaciju. Za analizu je potrebno da uzorak bude topljiv u deuteriranom otapalu ( $\text{DCCl}_3$ ,  $\text{C}_6\text{D}_6$ , d-DMSO i sl.) te da je dostupna količina 2-50 mg pročišćene tvari. Vremenski period analize NMR-a je relativno dug i zato nije pogodan za promatranje brze pojave, proizvodeći samo jedan prosječan spektar. Iako se velike količine nečistoće ne pokazuju na NMR spektru, postoje bolje metode za otkrivanje nečistoća jer NMR nije jako osjetljiv na nečistoće.

Moderni NMR spektrometri imaju vrlo jaki, veliki i skupi supravodljivi magnet hlađen tekućim helijem, jer rezolucija izravno ovisi o jakosti magnetskog polja. Jeftiniji strojevi koji koriste stalne magnete i niže rezolucije su također dostupni te daju dovoljno performansi za određenu primjenu, kao što su reakcije praćenja i brzu provjeru uzoraka. Postoje čak i stacionarni NMR spektrometri.<sup>6</sup>



*Slika 4.* NMR uređaj

### 3.2. Tankoslojna kromatografija - TLC

Tankoslojna kromatografija (TLC, engl. *Thin Layer Chromatography*) je kromatografska tehnika koja se koristi za razdvajanje kemijskih komponenti u smjesi. Uključuje nepokretnu fazu sastavljenu od tankog sloja materijala za adsorpciju, obično silikagela, aluminijevog oksida ili celuloze, koji je pričvršćen na ravnu, inertnu ploču. Pokretna faza se sastoji od otapala ili smjese otapala, ovisno o vrsti uzorka, pogodnih za razdvajanje smjese prilikom prelaska preko nepokretne faze. Ispitivani uzorak može biti čisti spoj ili smjesa spojeva koje treba razdvojiti. Pokretna faza se kreće po nepokretnoj ploči, potiskivana kapilarnim silama, te se tako ispitivani uzorak razdvaja u pojedine komponente. Komponente se razdvajaju s obzirom na jačinu afiniteta prema nepokretnoj fazi.

Upotrebljava se u širokom spektru kemijskih analiza:

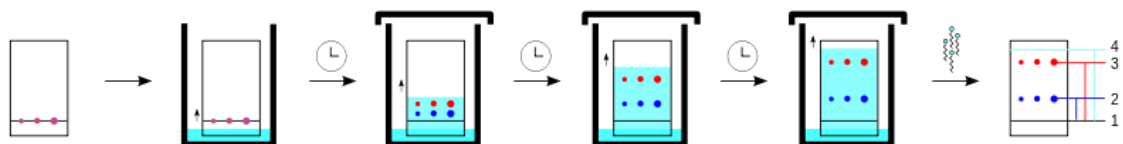
- ispitivanje biljnih pigmenata
- detekcija pesticida i insekticida u hrani
- analiza sastava boja vlakana u forenzičkim ispitivanjima
- identifikacija komponenti koje se nalaze u ispitivanom uzorku.

To je brza i generička metoda za nadgledanje reakcija u organskoj kemiji.

Adsorpcijska sredstva:

- silika gel
- celuloza
- aluminijev oksid

Uzorak se nanosi ručno ili automatski. Kod ručnog nanošenja koristi se mikroinjekcija. Poluautomatska metoda je nanošenje pomoću uređaja koji minimalno udubi površinski sloj i nanosi precizni volumen uzorka. Ploča se unosi u komoru na čijem se dnu nalazi otapalo koje kapilarnim silama prolazi kroz adsorpcijsko sredstvo noseći sa sobom komponente uzorka, koje se kreću do određene udaljenosti na ploči. Zbog različitog afiniteta komponente se zaustavljaju na različitim mjestima na ploči, što omogućava njihovu identifikaciju. Koriste se uobičajena otapala ili njihove smjese. Neke komponente su obojene pa ih nije teško detektirati na ploči. Ako komponenta apsorbira svjetlost u UV području, moguće je detektirati komponente i promatranjem pod UV lampom. Komponente je moguće i vizualizirati prskanjem ploče odgovarajućim reagensom, koji u doticaju s komponentom razvija obojenu reakciju.<sup>7</sup>



*Slika 5.* Tankoslojna kromatografija, razvoj kromatograma

### 3.3. Kromatografija na koloni

Kromatografija na koloni je tehnika koja se najčešće koristi za pročišćavanje pojedinih kemijskih spojeva iz smjese spojeva. Često se koristi za preparativne aplikacije na razinama od mikrograma do kilograma. Glavna prednost kolonske kromatografije je relativno niska cijena i raspoloživost nepokretne faze koja se koristi u procesu. Klasični preparat kolonske kromatografije je staklena cijev promjera od 5 mm do 50 mm i visine od 5 cm do 1 m s ispustom i nekakvim filterom (staklena površina ili površina od staklene vune kako bi se spriječio gubitak nepokretne faze) na dnu. Obično se koriste dvije metode za pripremu kolone: postupak suhe pripreme i postupak vlažne pripreme.

Za suhi postupak, kolona se najprije napuni suhom nepokretnom fazom, a zatim se dodaje pokretna faza koja se propusti kroz kolonu dok kolona ne bude potpuno mokra i od ovog trenutka nije dopustivo da se nepokretna faza osuši – neprestano mora biti „potopljena“.

Za mokri postupak, uzorak koji treba pročistiti otopi se u maloj količini u otapalu, kao što je heksan, aceton ili druga otapala te se ova otopina puni na stupac. Potrebno je paziti da ne nastanu mjehurići zraka. Otopina organskog materijala se nanosi na vrh nepokretne faze. Ovaj je sloj obično prekriven malim slojem pijeska ili pamukom ili staklenom vunom kako bi se zaštitio oblik organskog sloja od brzine prolaska novododanog eluensa. Eluens se polako propusti kroz kolonu.

Pojedinačne komponente su različito vezane uz nepokretnu fazu i odvajaju se jedna od druge dok različitim brzinama prolaze kroz kolonu s otapalom. Iz kolone izlaze jedna po jedna. Tijekom cijele kromatografije otapalo se sakuplja u frakcijama.

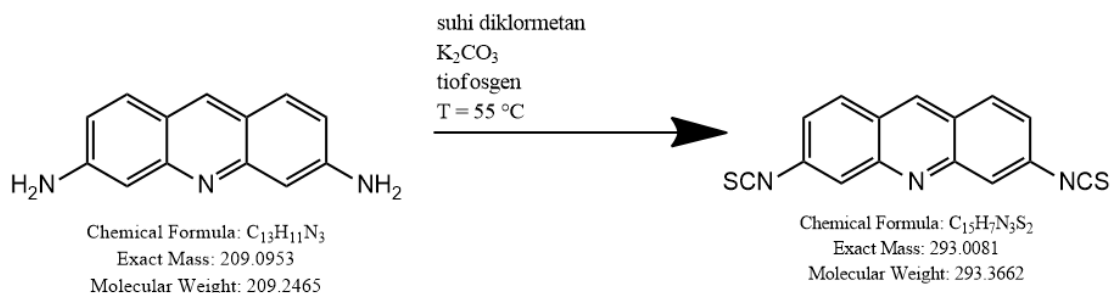
Nepokretna faza ili adsorbens u koloni je krutina. Najčešće se kao nepokretna faza za kolonsku kromatografiju koristi silika gel, sljedeći najčešći je aluminij.

Pokretna faza može biti čisto otapalo ili smjesa različitih otapala. Ona se odabire tako da je faktor zadržavanja vrijednosti spoja od interesa otprilike između 0,2 i 0,3 kako bi se smanjilo vrijeme i količina otapala za pokretanje kromatografije.

Povećanje protoka može se postići pomoću pumpe ili upuhivanjem plina (npr. zrak, dušik ili argon) u kromatografsku kolonu.<sup>8</sup>

## 4. EKSPERIMENTALNI DIO

### 4.1. Sinteza 3,6-diizotiocijanat akridina



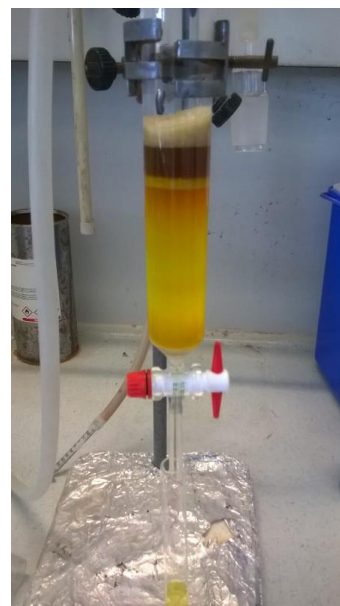
*Slika 6.* Reakcija sinteze 3,6-diizotiocijanat akridina

#### 4.1.1. Postupak

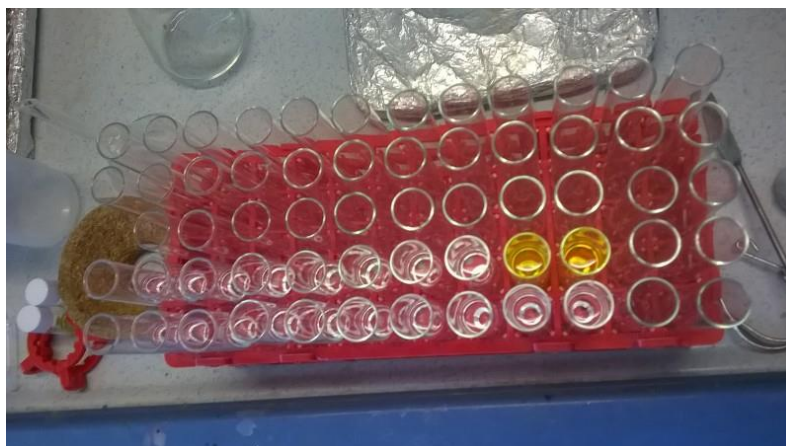
U tikvicu s okruglim dnom od 250 mL stavljeni su: proflavin hemisulfat sol hidrat (500,6 mg), diklormetan (50 mL) i kalijev karbonat (5,6026 g; 40,6 mmol). Smjesa se miješa na sobnoj temperaturi 30 minuta. Zatim se iglom doda tiofosgen (0,4 mL; 5,07 mmol) i reakcijska se smjesa refluksira 2 sata na temperaturi od 55 °C. Nakon toga smjesa se ohladi na sobnu temperaturu te se doda destilirana voda (50 mL) i kloroform (50 mL). Ako se nakon toga ustanovi da se  $K_2CO_3$  nije otopio, smjesa se miješa dodatnih 30 min dok se  $K_2CO_3$  ne otopi u potpunosti. Izvrši se ekstrakcija s 2 puta po 40 mL destilirane vode i 5 mL diklormetana radi uklanjanja nastalog međusloja. Organski sloj se odvoji i osuši preko bezvodnog  $Na_2SO_4$ , te filtrira preko pamuka i upari do suha na rotacijskom uparivaču. Masa uzorka je nakon uparavanja iznosila 1,02 g. Uzorak je snimljen na NMR spektrometru (uzorak: IH-11-CRUDE). Zatim je uzorak ispitan tankoslojnom kromatografijom te je pripremljena kolona za kolonsku kromatografiju sa 100 mL silikagela. Korišteno otapalo za ispiranje kolone je bilo diklormetan. Sakupljeno je 80 frakcija i sve su ispitane preko tankoslojne kromatografije, kao pokretna faza korišten je diklormetan. Produkt se pojavio u frakcijama 12-80, te frakcije su uparene do suha. Masa produkta nakon uparavanja je iznosila 0,2546 g i produkt je bio žute boje. Uzorak je odnesen na NMR (uzorak: IH-11-A - bistiocijanat), rezultati NMR analize su pokazali da je produkt (bistiocijanat) čist.



**Slika 7.** Kolonska kromatografija, početak elucije



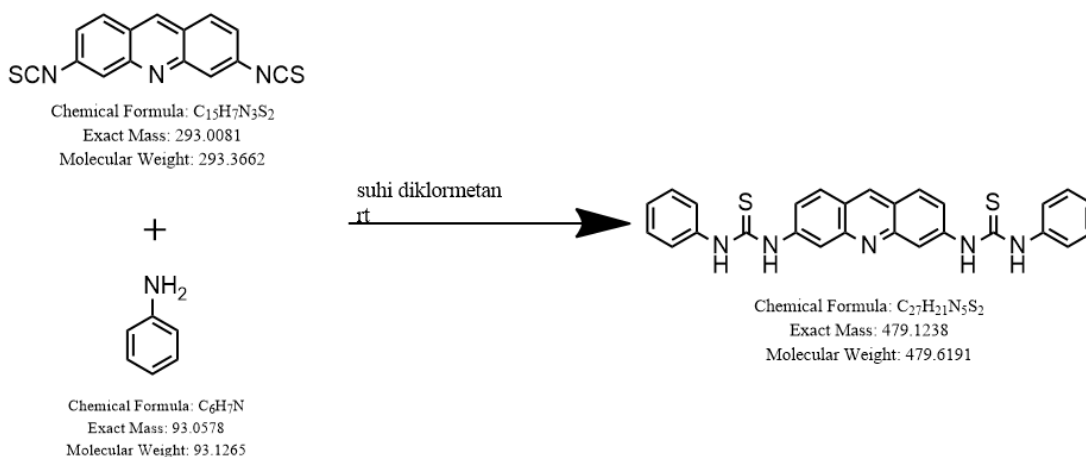
**Slika 8.** Kolonska kromatografija, hvatanje pojedinih frakcija



**Slika 9.** Frakcije prikupljene kolonskom kromatografijom

Cijeli postupak je ponovljen korištenjem dvostruko većih količina kemikalija. Masa produkta nakon uparavanja je iznosila 0,4549 g, uzorak je snimljen na NMR (uzorak: IH-13-CRUDE), a rezultati NMR analize su pokazali da je produkt (3,6-diizotiocijanat akridin) čist.

## 4.2. Sinteza derivata tiouree



*Slika 10.* Reakcija sinteze derivata tiouree

### 4.2.1. Postupak

U tikvicu s okruglim dnom stavljen je bistiocijanat (uzorak: IH-11-A) (250 mg; 0,85 mmol), suhi diklormetan (15 mL) i anilin (350  $\mu$ L; 3,8 mmol) u inertnoj atmosferi sa stalnim protokom dušika. Smjesa se miješala pomoću magnetske miješalice preko noći, nakon čega je ohlađena u ledenoj kupelji, a uzorak filtriran preko Buchnerovog lijevka uz pomoć vakuuma i ispran sa 70 mL hladnog diklormetana. Talog se neko vrijeme sušio preko lijevka i nakon toga je snimljen korištenjem NMR spektrometra (uzorak: IH-12-A). Filtrat je uparen u prethodno izvavanoj tikvici nakon čega je također snimljen putem NMR spektrometra (uzorak: IH-12-B). Masa uzorka IH-12-A je iznosila 0,3134 g, a uzorka IH-12-B 0,0805 g. Analizom NMR spektra oba uzorka ustanovljeno je da se samo u uzorku A nalazi produkt (derivat tiouree). Uzorak A je otopljen u smjesi metanol/diklormetan u omjeru 1:9 te je ispitano pomoću tankoslojne kromatografije (kao pokretna faza koristile su se dvije smjese metanol/diklormetan različitih omjera: 1:9 i 0,5:9,5), nakon čega je utvrđeno da se u uzorku A nalaze dvije različite komponente koje su potom odijeljene kolonskom kromatografijom. Pripremljena je kolona za kolonsku kromatografiju sa 40 mL silikagela, a pokretna faza je bio metanol/diklormetan u omjeru 5:95. Sakupljeno je 40 frakcija i sve su ispitane putem tankoslojne kromatografije (gdje je pokretna faza bila metanol/diklormetan u omjeru 1:9). U frakcijama 1-8 su se pojavila dva produkta (C), a u frakcijama 9-40 jedan produkt (D). Uzorci C i D su upareni do suha,



nakon čega su ponovno otopljeni u smjesi metanol/diklormetan u omjeru 1:9, prebačeni u manje prethodno izvagane tikvice i ponovno upareni. Masa uzorka C nakon uparavanja je iznosila 0,1669 g, a uzorka D 0,1837 g. Uzorci su snimljeni putem NMR spektrometra: IH-12-C i IH-12-D. Sukladno analizama NMR spektara utvrđeno je da je uzorak C produkt (derivat tiouree), a da uzorak D sadrži produkt i nečistoće. Uzorak D je pročišćen kolonskom kromatografijom, koja je pripremljena s 15 mL silikagela, a kao pokretna faza je korištena smjesa metanol/diklormetan u omjeru 3:97. Sakupljeno je 50 frakcija i sve su ispitane preko tankoslojne kromatografije (pokretna faza je bila smjesa metanol/diklormetan u omjeru 1:9). Od 1. do 12. frakcije pojavljuju se dva produkta dok se od 13. do 50. frakcije pojavljuje samo jedan produkt. Frakcije s jednim produktom su uparene, a masa produkta nakon uparavanja je iznosila 0,0479 g, nakon čega je uzorak snimljen putem NMR spektrometra (uzorak: IH-14-CRUDE), a analiza NMR spektra je pokazala da se radi o produktu (derivat tiouree).



**Slika 11.** Miješanje uzorka magnetskom miješalicom u inertnoj atmosferi

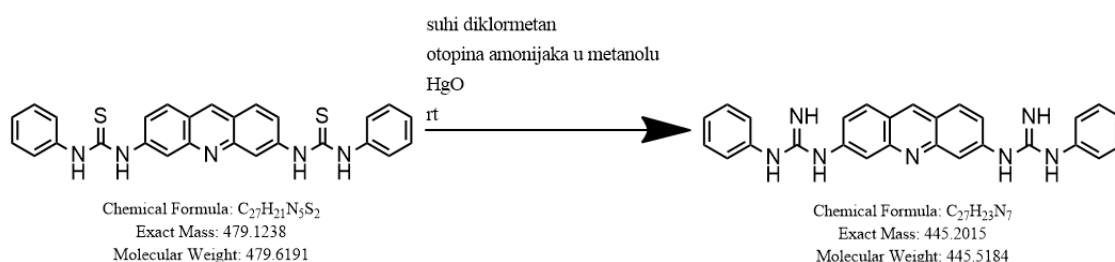


**Slika 12.** Prikaz uzoraka IH-12-B i IH-12-D

Cijeli postupak je ponovljen korištenjem uzorka IH-13-CRUDE i dvostruko veće količine anilina čime je dobiven čišći produkt nego u prethodnom postupku.

Ukratko: u malu tikvicu s okruglim dnom stavljen je bistocijanat (uzorak: IH-13-CRUDE, 250 mg; 0,85 mmol), suhi diklormetan (15 mL) i anilin (0,7 mL) u inertnoj atmosferi sa stalnim protokom dušika. Smjesa se miješala pomoću magnetske miješalice preko noći. Nakon čega je ohlađena u ledenoj kupelji, a uzorak je filtriran preko Buchnerovog lijevka i ispran sa 70 mL hladnog diklormetana. Uzorak je snimljen putem NMR spektrometra (uzorak: IH-16-A) i ispitan pomoću tankoslojne kromatografije (pokretna faza je bila smjesa metanol/diklormetan u omjeru 1:9). Pokazano je da je uzorak čist što je potvrdio i rezultat NMR analize.

### 4.3. Sinteza bisgvanidina

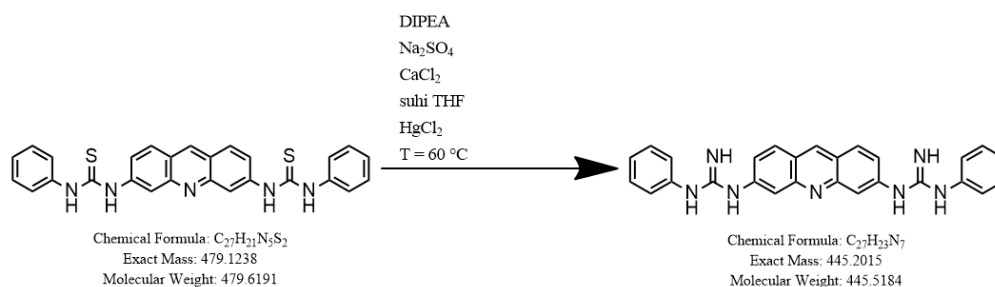


*Slika 13.* Reakcija sinteze bisgvanidina

#### 4.3.1. Postupak 1

U tikvicu s okruglim dnom stavljen je derivat tiouree (uzorak: IH-12-C) (160 mg; 0,33 mmol), suhi diklormetan (2 mL), HgO (301,4 mg; 0,96 mmol) i otopina amonijaka u metanolu (6 mL; 7 M) u inertnoj atmosferi sa stalnim protokom dušika. Smjesa se miješala pomoću magnetske miješalice 3 sata nakon čega je dodan HgO (101,8 mg) te se smjesa miješala preko noći. Nakon toga uzorak se filtrirao preko celite filtera (diatomejska zemlja), ispirao s diklormetanom i upario u izvavanoj tikvici. Masa uzorka nakon uparavanja je iznosila 0,0649 g i taj je uzorak snimljen putem NMR spektrometra (uzorak: IH-15-CRUDE). Rezultati NMR analize su pokazali da reakcija nije uspjela i da nema produkta, nakon čega se pristupilo novom postupku – postupak 2.

### 4.3.2. Postupak 2



**Slika 14.** Reakcija sinteze bisgvanidina

U tikvicu s okruglim dnom stavljen je derivat tiouree (uzorak: IH-16-A) (127 mg; 0,268 mmol), DIPEA (N,N-Diizopropiletilanin, 2 mL; 13,40 mmol), Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1522,2 mg; 10,72 mmol), CaCl<sub>2</sub> (299,7 mg; 2,68 mmol) i suhi THF (tetrahidrofuran, 20 mL), nakon čega se smjesa miješala 30 min na sobnoj temperaturi pomoću magnetske miješalice. Nakon toga se u smjesu dodao HgCl<sub>2</sub> te se smjesa miješala 90 min na 60 °C, nakon čega se smjesa filtrira preko celite filtera i ispire sa 10 mL suhog THF i 12 mL amonijaka (0,5 M otopina u dioksanu; 6,0 mmol). Smjesa je u početku bila smeđa, a nakon filtracije narančasta, te se miješala preko noći u inertnoj atmosferi pomoću magnetske miješalice nakon čega je uparena. Uzorak je snimljen putem NMR spektrometra (uzorak: IH-17-CRUDE) i ispitan preko tankoslojne kromatografije korištenjem različitih pokretnih faza:

1. metanol/diklormetan 3:7;
2. diklormetan/metanol/otopina amonijaka u metanolu 9:0,5:0,5;
3. diklormetan/metanol 9:1;
4. otopina 1 mL amonijaka u 10 mL metanola, tako dobivena otopina/diklormetan 1:9 te
5. diklormetan/metanol/otopina amonijaka u metanolu 9:0,8:0,2.

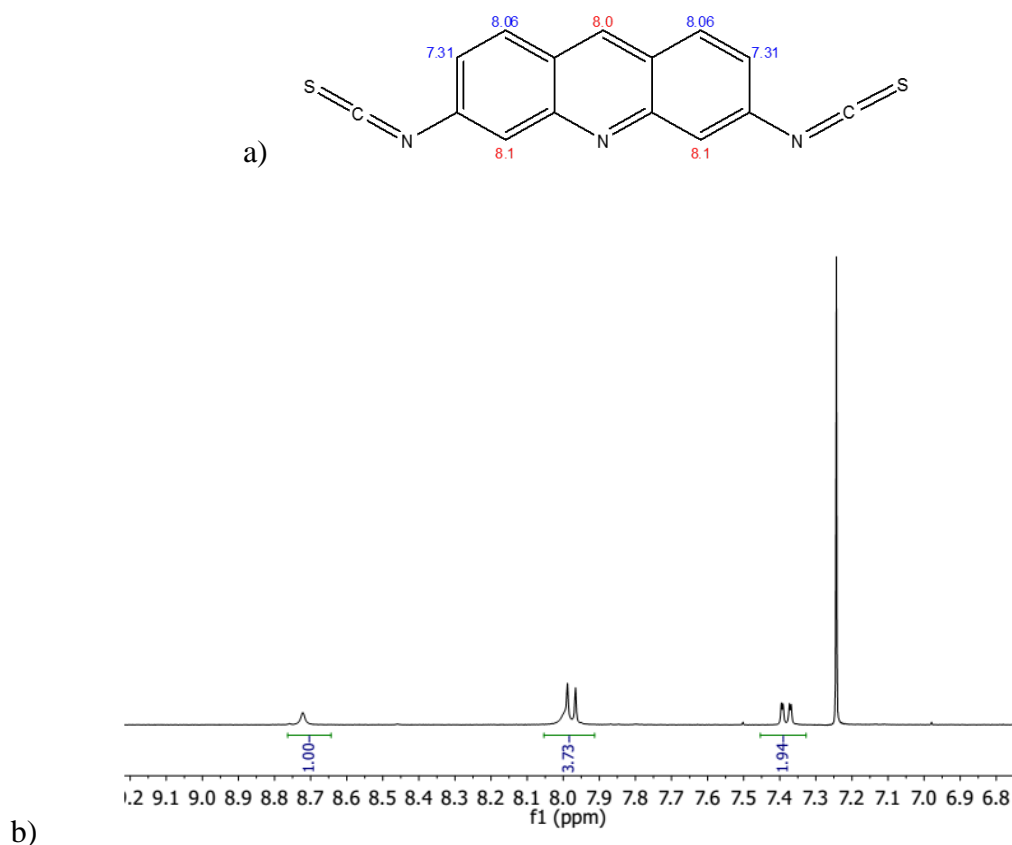
Uzorak je snimljen putem masenog spektrometra, analizom NMR spektra rezultati su pokazali da se u uzorku nalazi početni materijal, ali i da je nastalo nešto produkta. U tikvicu je dodan diklormetan (5 mL), TFA (5, 6 kapi) i nekoliko mL dietiletera, nakon čega se smjesa miješala neko vrijeme. Uzorak je potom filtriran preko Buchnerovog lijevka uz pomoć vakuuma, nakon čega je čvrsti uzorak snimljen putem NMR spektrometra (uzorak: IH-17-B) i HPLC-a (tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti).

## 5. REZULTATI I RASPRAVA

### 5.1. Sinteza 3,6-diizotiocijanat akridina

Istraživanje je pokazalo da se prvim postupkom za sintezu 3,6-diizotiocijanat akridina dobije 1,02 g. Analizom NMR spektra (prilog, Slika 20.) uočeno je da uzorak sadrži nečistoće te da ga treba pročistiti, nakon pročišćavanja uzorka masa dobivenog produkta je iznosila 0,2546 g. Na NMR spektru (Slika 15.) uočavaju se pomaci ( $\delta$ ) na 7.35, 7.95 i 8.7 ppm te je integracijom potvrđeno 7 vodika koji su očekivani za sintetizirani spoj i odgovaraju predviđenim pomacima prikazanim na strukturi a).

Ponovljenim postupkom s dvostruko većom količinom kemikalija dobiva se produkt mase 0,4549 g. Analizom NMR spektra (prilog, Slika 21.) uočeno je da je dobiveni produkt čist te se isti koristio u slijedećim sintezama.



**Slika 15.** Na strukturi a) prikazani su pomaci u  $^1\text{H}$  NMR spektru predviđeni korištenjem ChemDraw programske podrške (plavo je dobro predviđanje, a crveno grubo predviđanje). Pod b) dan je  $^1\text{H}$  NMR snimak sintetiziranog 3,6-diizotiocijanat akridina.

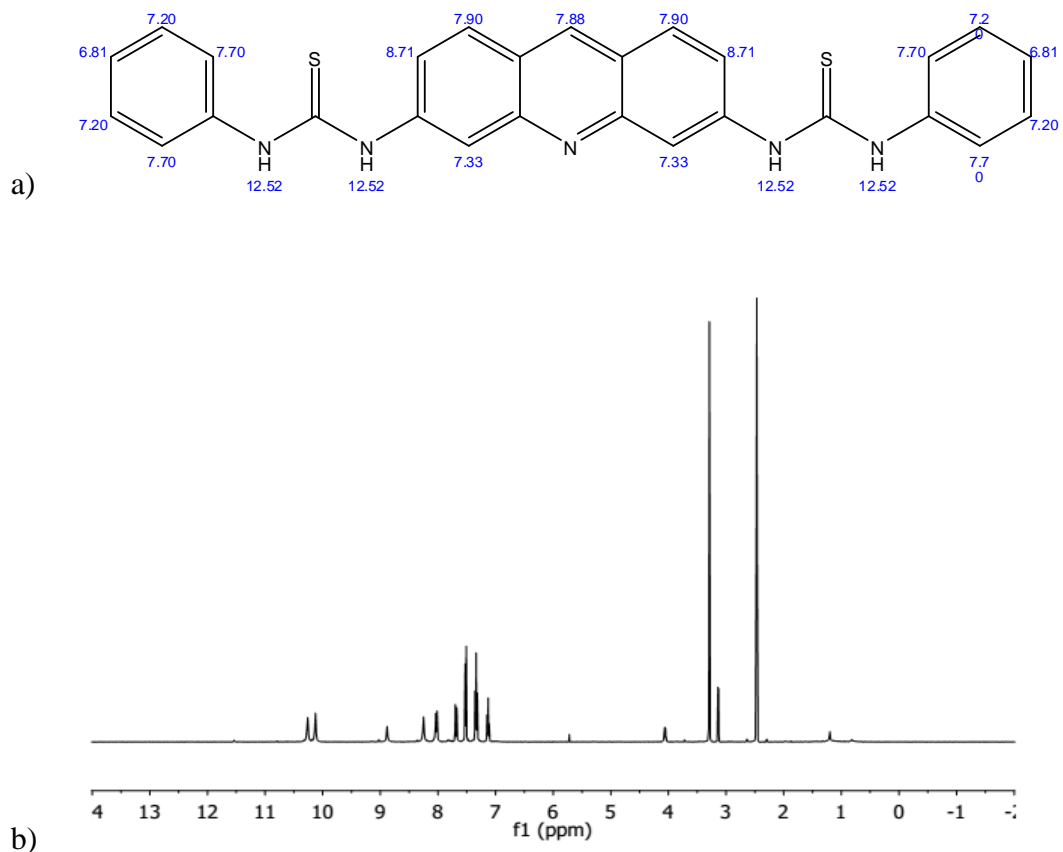
## 5.2. Sinteza derivata tiouree

Istraživanje je pokazalo da se prvim postupkom za sintezu derivata tiouree dobije 0,2148 g produkta. Iz NMR spektara vidljivo je da uzorci A (prilog, Slika 22.), C (prilog, Slika 25.) i D (Slike 16.-18., prilog Slika 26.) sadrže produkt te da uzorak B (prilog, Slika 23. i 24.) ne sadrži produkt.

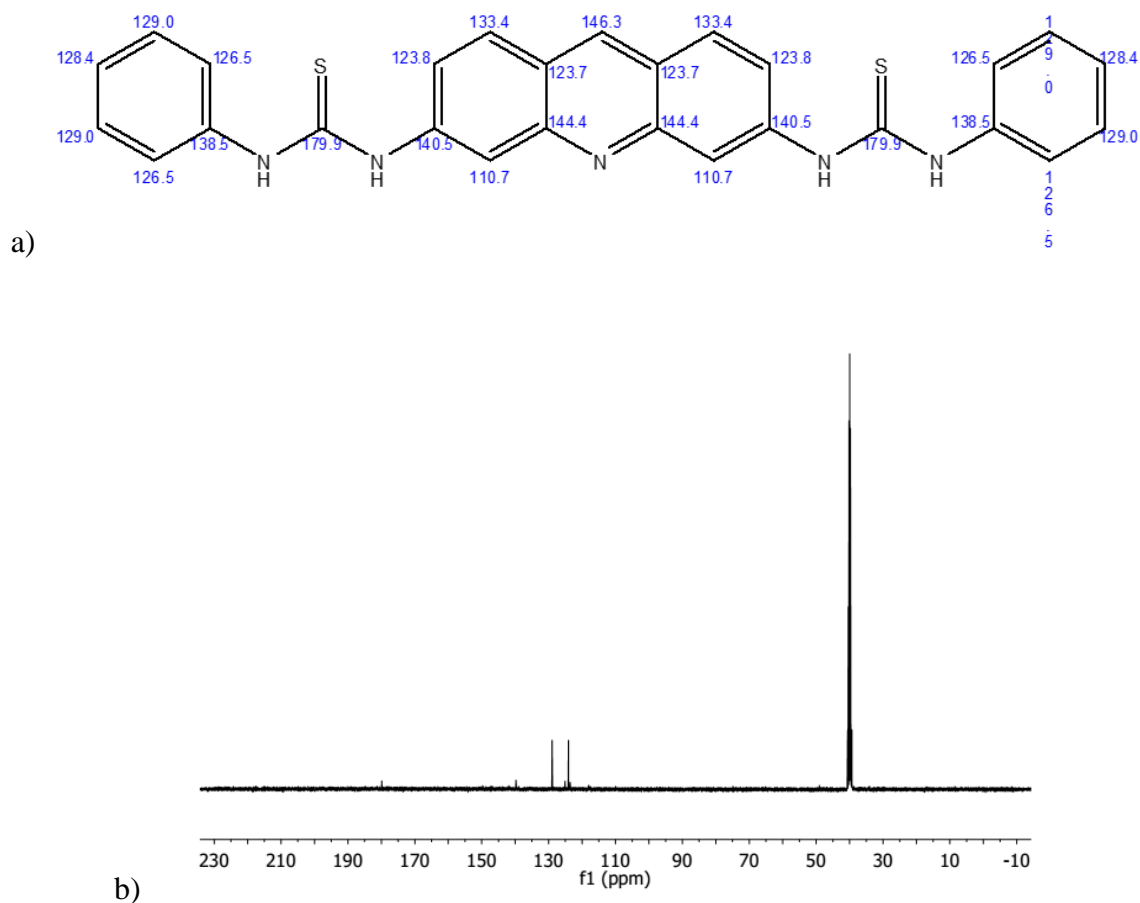
Na slici 16. uočavaju se karakteristični vodikovi pomaci ( $\delta$ ) od 7 do 9 ppm koji odgovaraju vodicima na benzenu i akridinu, također su uočeni pomaci iznad 10 ppm koji odgovaraju vodicima vezanim na dušik. Uočeni pomaci sintetiziranog spoja odgovaraju predviđenim pomacima prikazanim na strukturi a).

Na slici 17. uočavaju se karakteristični ugljikovi pomaci ( $\delta$ ) od 120 do 145 ppm koji odgovaraju ugljicima na benzenu i akridinu, također su uočeni pomaci na 180 ppm koji odgovaraju ugljicima vezanim na dušik i sumpor. Uočeni pomaci sintetiziranog spoja odgovaraju predviđenim pomacima prikazanim na strukturi a).

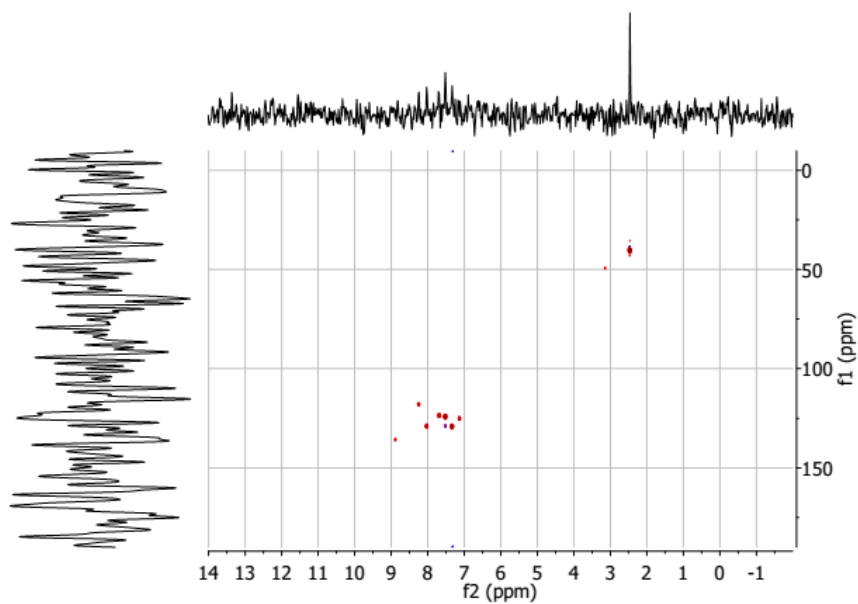
Također, ponovljenim postupkom za navedenu sintezu koristeći uzorak iz drugog postupka dobivanja bistiocijanata (uzorak: IH-13-CRUDE) dobiva se puno čišći produkt koji ne treba pročišćavati, što je vidljivo na NMR spektru (prilog, Slika 27.). Iz navedenog zaključujemo da je ponovljeni postupak brži, djelotvorniji i da se dobiva kvalitetniji produkt. Dobiveni produkti su korišteni u slijedećim sintezama.



**Slika 16.** Na strukturi a) prikazani su pomaci u  $^1\text{H}$  NMR spektru predviđeni korištenjem ChemDraw programske podrške (plavo je dobro predviđanje, a crveno grubo predviđanje). Pod b) dan je  $^1\text{H}$  NMR snimak sintetiziranog derivata tiouree.



**Slika 17.** Na strukturi a) prikazani su pomaci u  $^{13}\text{C}$  NMR spektru predviđeni korištenjem ChemDraw programske podrške (plavo je dobro predviđanje). Pod b) dan je  $^{13}\text{C}$  NMR snimak sintetiziranog derivata tiouree.



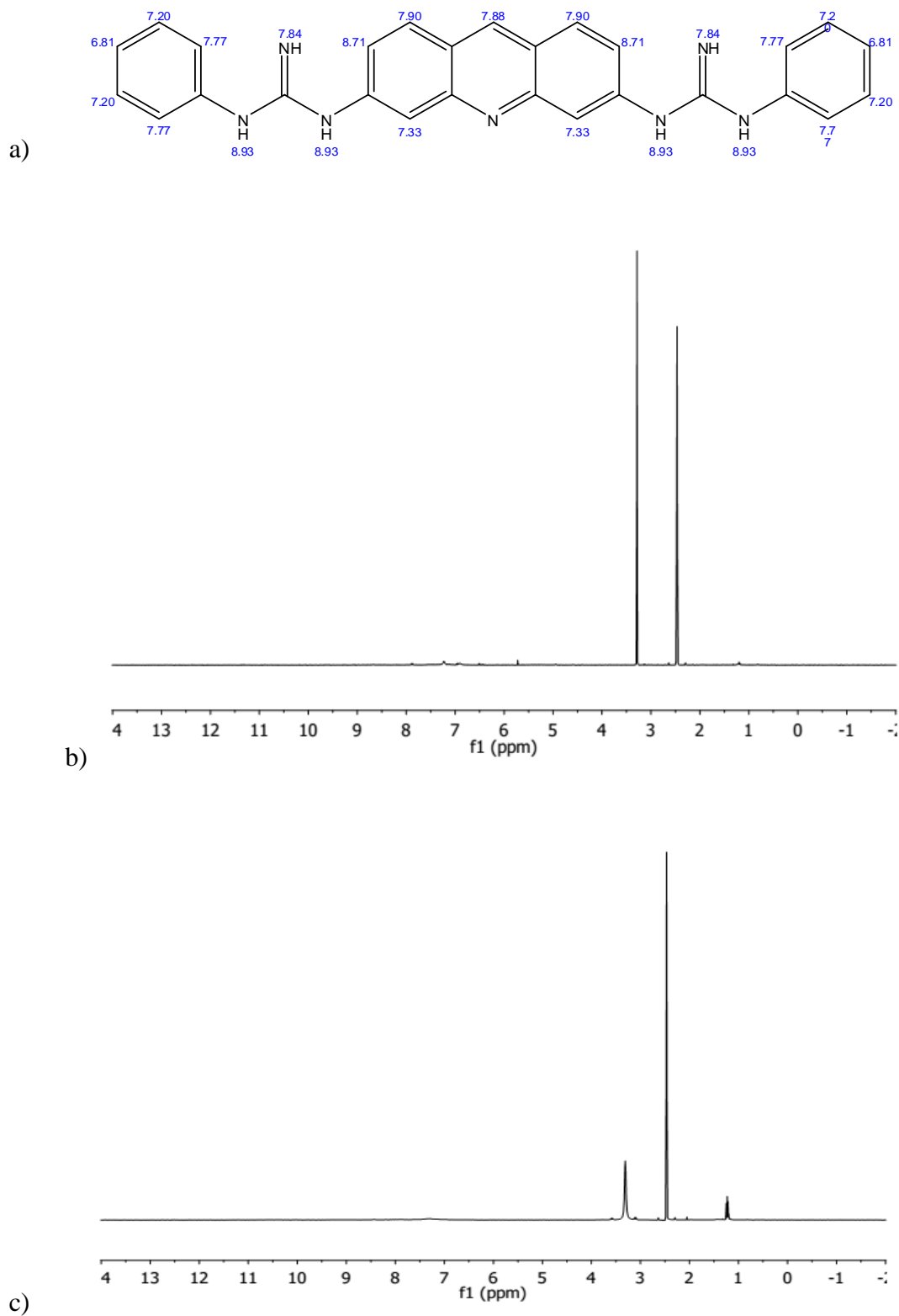
**Slika 18.** Prikaz 2D – NMR - COSY spektra za uzorak derivata tiouree

### 5.3. Sinteza bisgvanidina

Istraživanje je pokazalo da se postupkom 1 u navedenoj sintezi ne može dobiti željeni produkt, zbog toga što se iz NMR spektra na slici 19. b) ne uočavaju karakteristični vodikovi pomaci koji odgovaraju predviđenim pomacima na strukturi a). Reakcija nije uspjela.

Iz NMR spektara (Slika 19., prilog Slika 28.) za sintezu provedenu postupkom 2 ne mogu se očitati rezultati zbog toga što se na slici 19. c) ne uočavaju karakteristični vodikovi pomaci koji odgovaraju predviđenim pomacima na strukturi a). Potrebno je provesti dodatne analize da bi se ustanovilo je li sintetiziran željeni produkt.





**Slika 19.** Na strukturi a) prikazani su pomaci u  $^1\text{H}$  NMR spektru predviđeni korištenjem ChemDraw programske podrške (plavo je dobro predviđanje). Pod b) dan je  $^1\text{H}$  NMR snimak spoja dobivenog postupkom 1, pod c) dan je  $^1\text{H}$  NMR snimak spoja dobivenog postupkom 2.

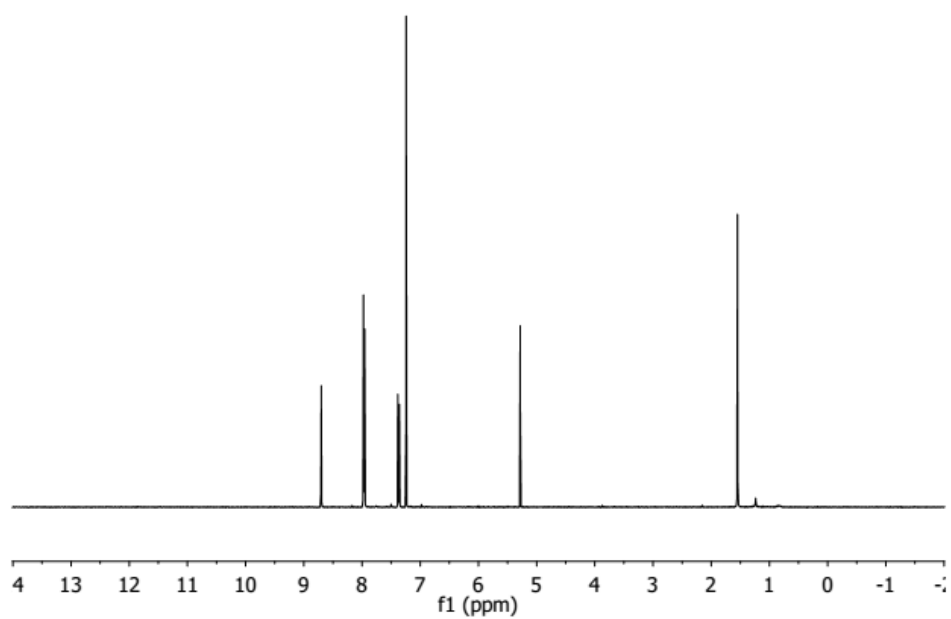
## 6. ZAKLJUČAK

- ❖ U ovom završnom radu opisani su postupci sinteze: 3,6-diizotocijanat akridina, derivata tiouree i bisgvanidina.
- ❖ Opisanim postupkom sinteze 3,6-diizotocijanat akridina dobiva se čisti produkt koji služi kao dobra podloga za slijedeće sinteze.
- ❖ Opisani postupak za sintezu derivata tiouree je učinkovitiji ukoliko se koristi dvostruka količina anilina, čime se dobije čišći produkt te se značajno štedi na vremenu i kemikalijama. Dobiveni produkt također služi kao dobra podloga za slijedeće sinteze.
- ❖ Prvi opisani postupak za sintezu bisgvanidina nije učinkovit, zbog toga što se ne dobije produkt. Kod drugog opisanog postupka NMR spektri nisu pokazali željene rezultate te je potrebno izvršiti dodatne analize kako bi se utvrdilo je li to zaista željeni produkt.

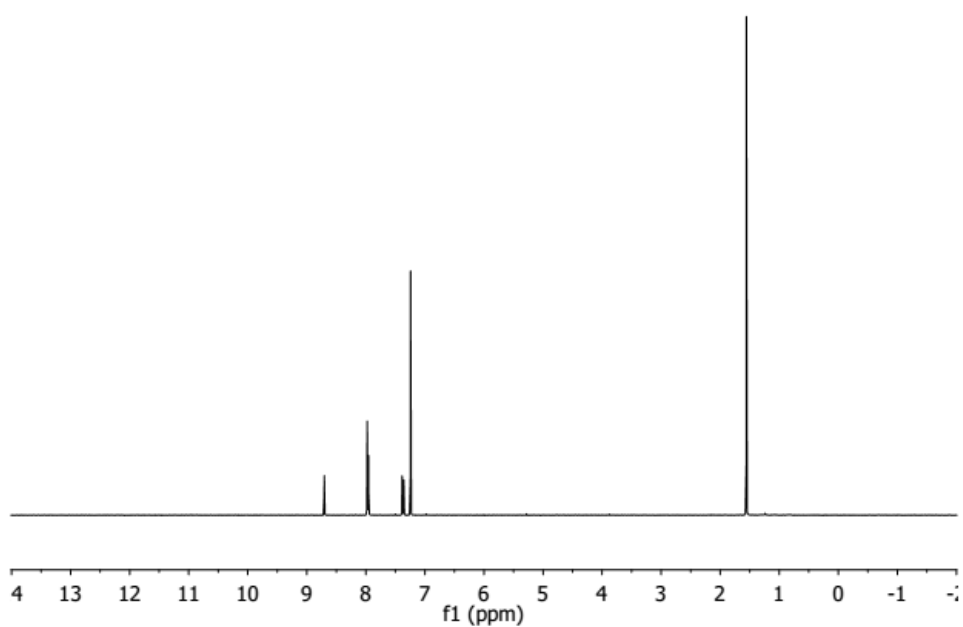
## 7. LITERATURA

1. URL: <https://en.wikipedia.org/wiki/Acridine> (10.9.2016.)
2. R. Kumar, M. Kaur, and M. Kumari, *Acta Pol. Pharm.* **69** (2012) 3-9.
3. URL: <https://en.wikipedia.org/wiki/Guanidine> (10.9.2016.)
4. URL: <https://en.wikipedia.org/wiki/Thiourea> (19.9.2016.)
5. J. Plsikova, L. Janovec, J. Koval, J. Ungvarsky, J. Mikes, R. Jendzelovsky, P. Fedorocko, J. Imrich, P. Kristian, J. Kasparikova, V. Brabec and M. Kozurkova, *Eur. J. Med. Chem.* **57** (2012) 3, 283-295.
6. URL: [https://en.wikipedia.org/wiki/Nuclear\\_magnetic\\_resonance\\_spectroscopy](https://en.wikipedia.org/wiki/Nuclear_magnetic_resonance_spectroscopy) (10.9.2016.)
7. URL: [https://hr.wikipedia.org/wiki/Tankoslojna\\_kromatografija](https://hr.wikipedia.org/wiki/Tankoslojna_kromatografija) (10.9.2016.)
8. URL: [https://en.wikipedia.org/wiki/Column\\_chromatography](https://en.wikipedia.org/wiki/Column_chromatography) (10.9.2016.)

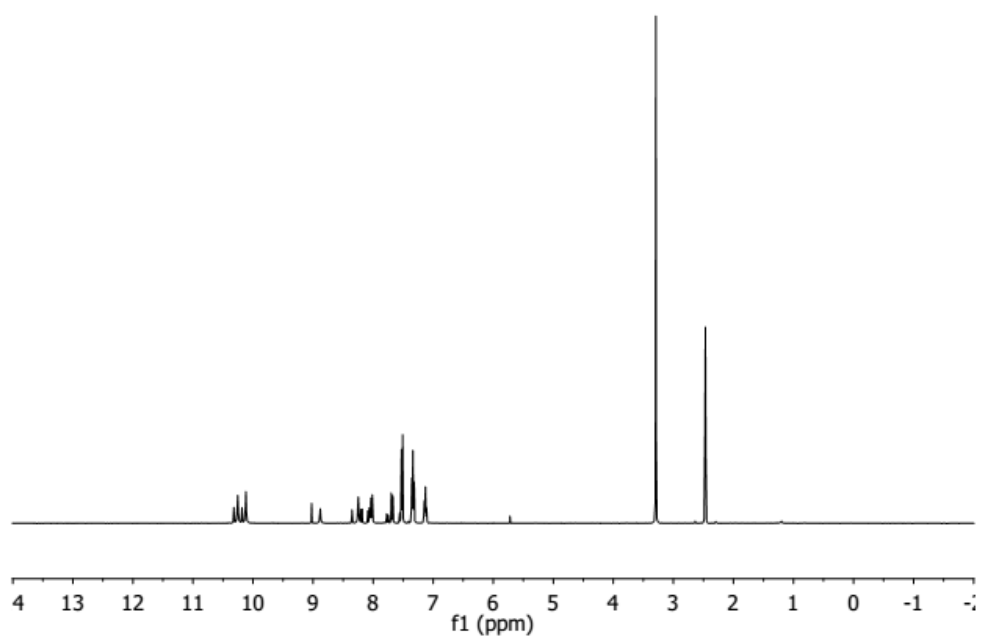
## 8. PRILOG



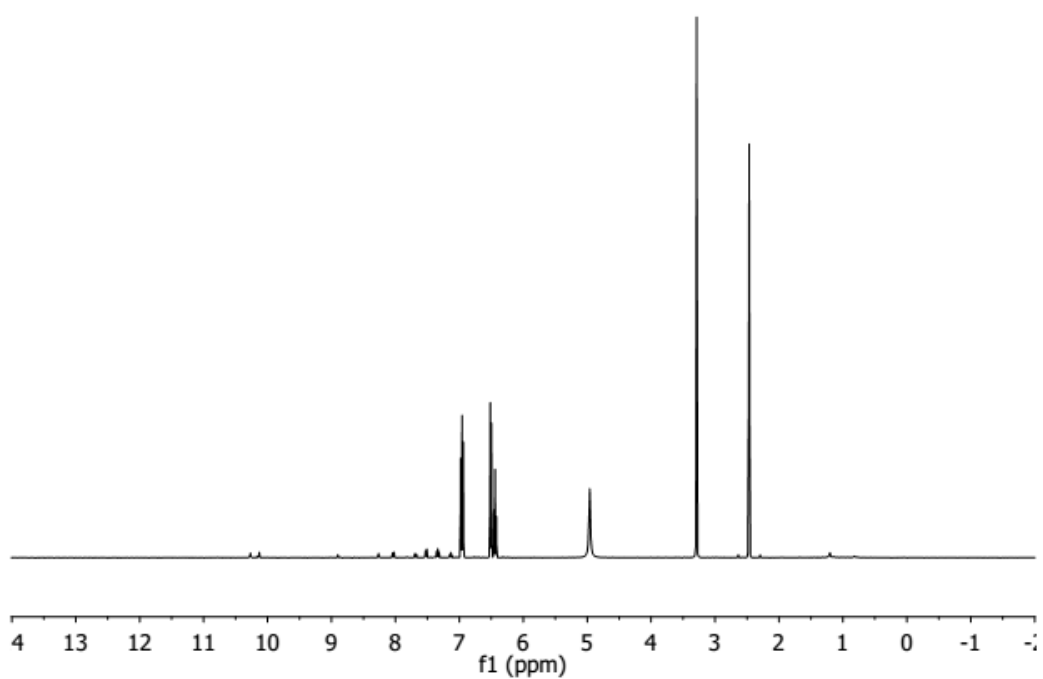
*Slika 20.* Prikaz  $^1\text{H}$  NMR spektra za uzorak (IH-11-CRUDE)



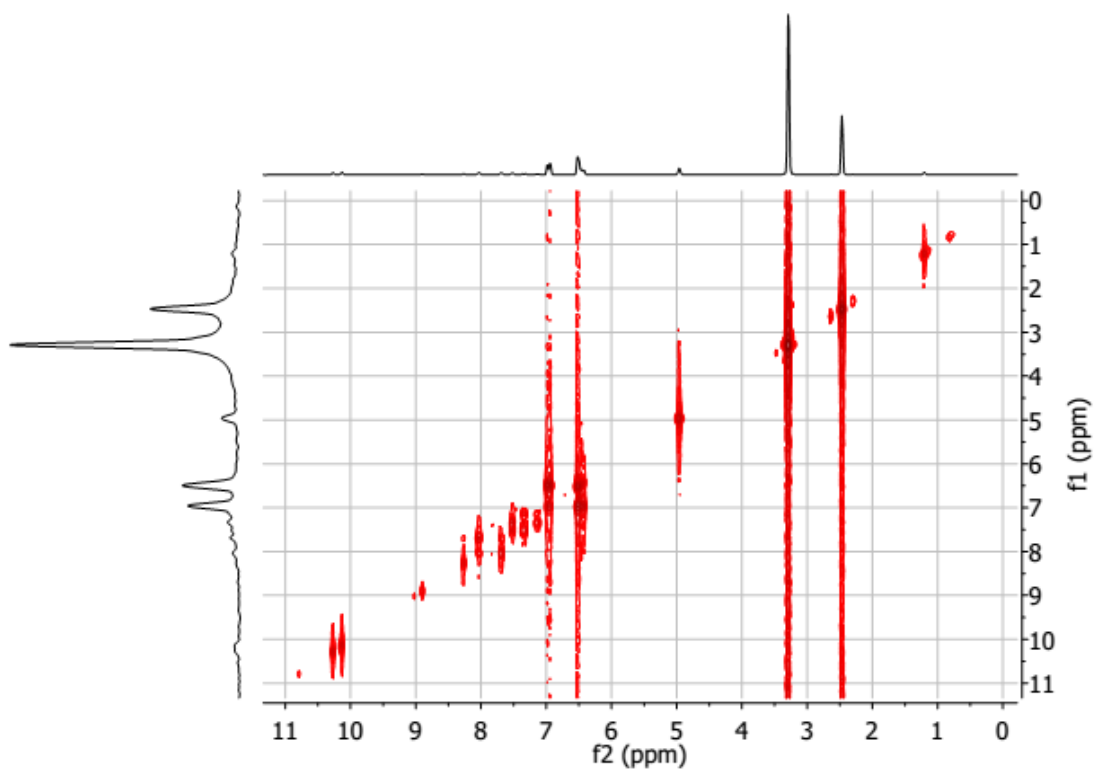
*Slika 21.* Prikaz  $^1\text{H}$  NMR spektra za uzorak (IH-13-CRUDE)



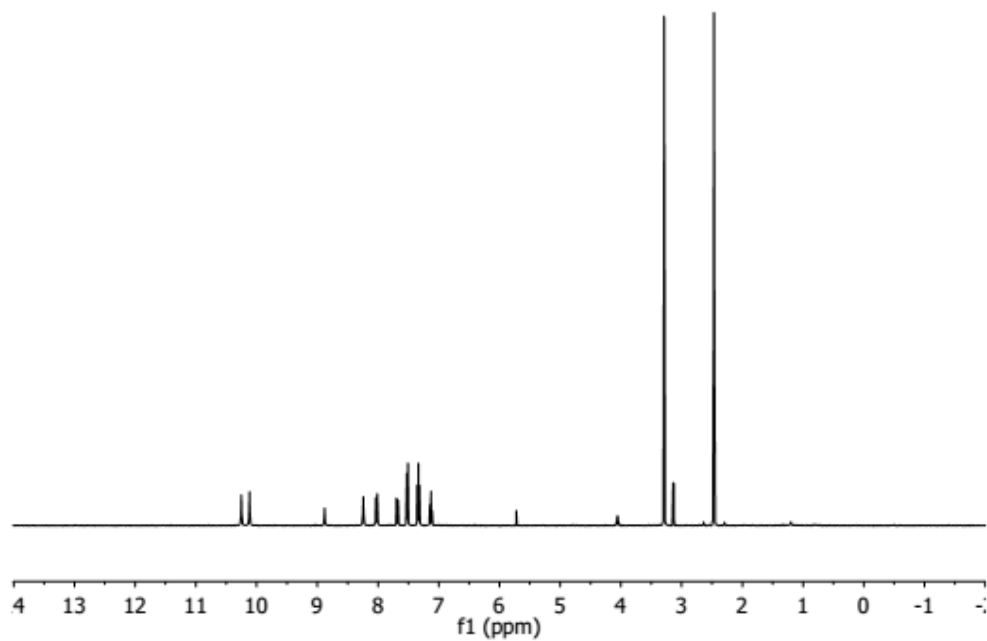
*Slika 22.* Prikaz  $^1\text{H}$  NMR spektra za uzorak (IH-12-A)



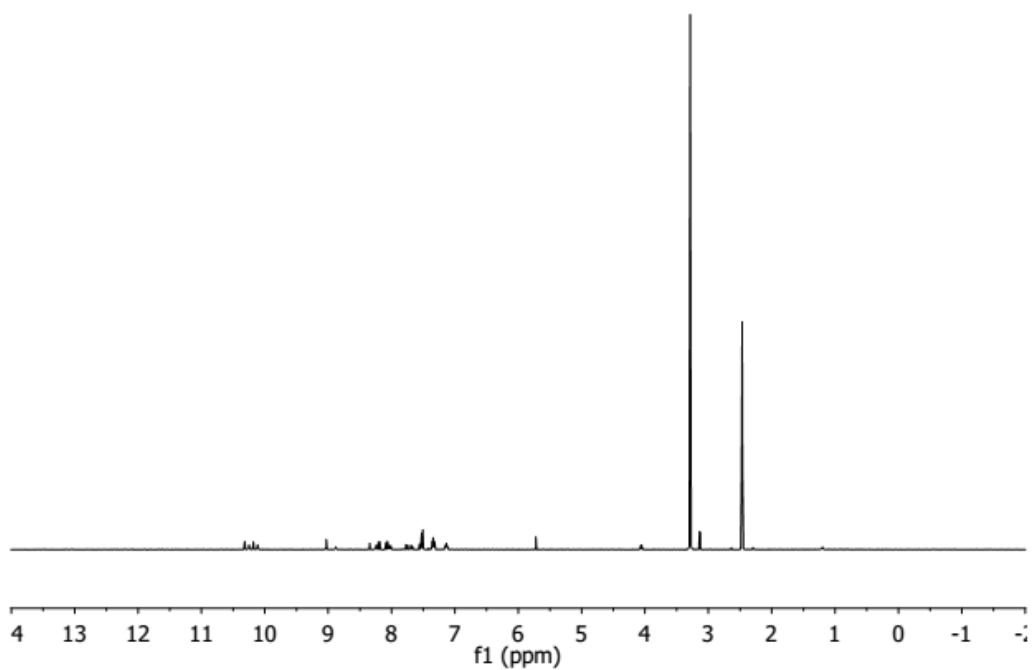
*Slika 23.* Prikaz  $^1\text{H}$  NMR spektra za uzorak (IH-12-B)



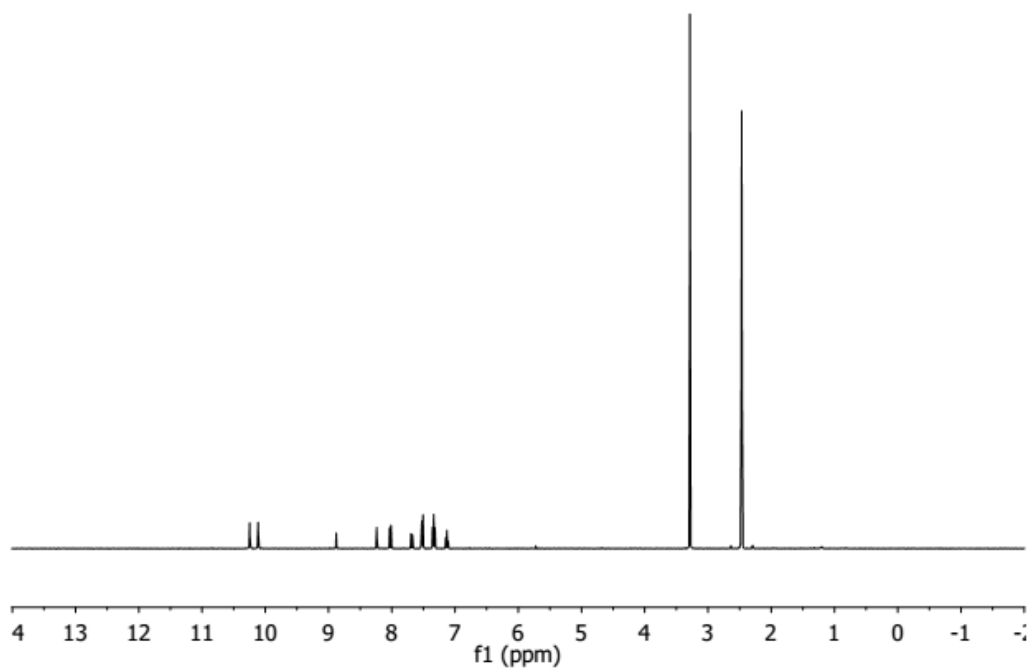
*Slika 24.* Prikaz 2D - NMR – COSY spektra (NMR – COSY, NMR koleracijska spektroskopija) za uzorak (IH-12-B)



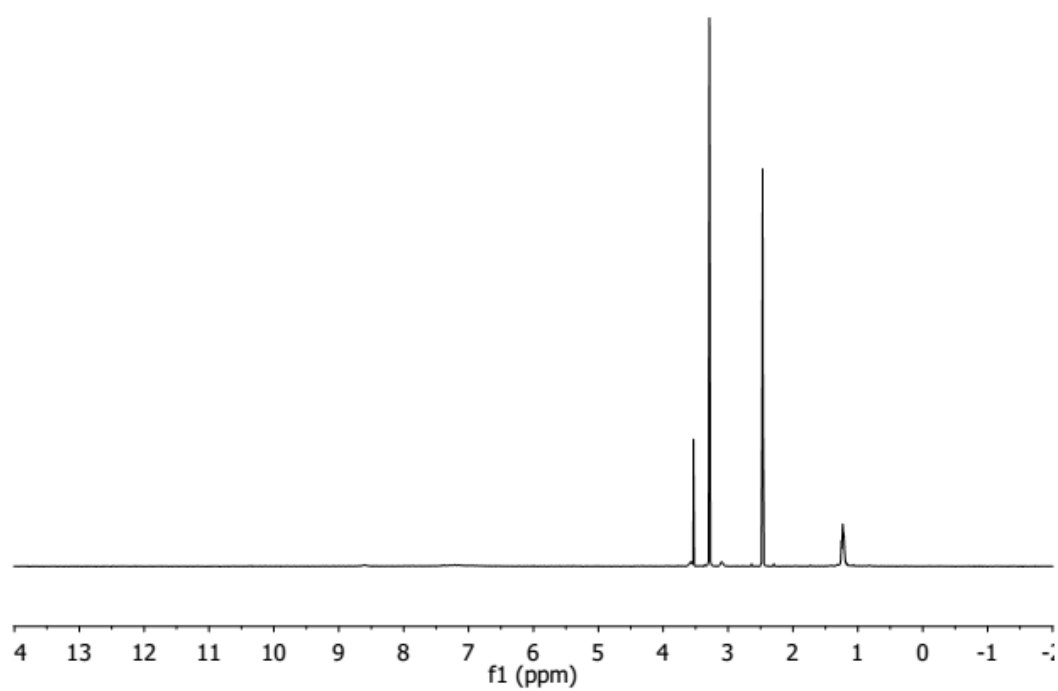
*Slika 25.* Prikaz  $^1\text{H}$  NMR spektra za uzorak (IH-12-C)



*Slika 26.* Prikaz  $^1\text{H}$  NMR spektra za uzorak (IH-12-D)



*Slika 27.* Prikaz  $^1\text{H}$  NMR spektra za uzorak (IH-16-A)



*Slika 28.* Prikaz  $^1\text{H}$  NMR spektra za uzorak (IH-17-CRUDE)