

# Klasična i mikrovalovima potpomognuta sinteza 4-nitrifenil-izotiocijanata

---

**Bodač, Antonija**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2018**

*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:167:951877>

*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**

**KLASIČNA I MIKROVALOVIMA POTPOMOGNUTA SINTEZA**  
**4-NITROFENIL-IZOTIOCIJANATA**

**DIPLOMSKI RAD**

**ANTONIJA BODAČ**

**Matični broj: 76**

**Split, listopad 2018.**

**SVEUČILIŠTE U SPLITU**  
**KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET**  
**DIPLOMSKI STUDIJ KEMIJE**  
**ORGANSKA KEMIJA I BIOKEMIJA**

**KLASIČNA I MIKROVALOVIMA POTPOMOGNUTA SINTEZA**  
**4-NITROFENIL-IZOTIOCIJANATA**

**DIPLOMSKI RAD**

**ANTONIJA BODAČ**

**Matični broj: 76**

**Split, listopad 2018.**

**UNIVERSITY OF SPLIT**  
**FACULTY OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY**  
**GRADUATE STUDY OF CHEMISTRY**  
**ORGANIC CHEMISTRY AND BIOCHEMISTRY**

**CLASSIC AND MICROWAVE-ASSISTED SYNTHESIS OF**  
**4-NITROPHENYL-ISOTHIOCYANATE**

**DIPLOMA THESIS**

**ANTONIJA BODAČ**

**Parent number: 76**

**Split, October 2018.**

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

Sveučilište u Splitu  
Kemijsko-tehnološki fakultet u Splitu  
Diplomski studij kemije, smjer Organska kemija i biokemija

Znanstveno područje: Prirodne znanosti  
Znanstveno polje: Kemija  
Tema rada je prihvaćena na 3. sjednici Fakultetskog vijeća Kemijsko-tehnološkog fakulteta.

Mentor: Izv. prof. dr. sc. Ivica Blažević  
Pomoć pri izradi: Azra Đulović, mag. chem.

### KLASIČNA I MIKROVALOVIMA POTPOMOGNUTA SINTEZA 4-NITROFENIL-IZOTIOCIJANATA

Antonija Bodač, 76

**Sažetak:** Izotiocijanati (ITC) se klasificiraju kao posebna skupina hlapljivih sumporovih spojeva koji prirodno nastaju enzimskom hidrolizom glukozinolata djelovanjem enzima mirozinaze pri neutralnoj pH vrijednosti kada dolazi do Lossenove pregradnje nestabilnog međuprodukta. Istraživanja su pokazala da ova grupa spojeva posjeduje izražena antikancerogena, antibakterijska i antimikrobna svojstva. Zbog svoje biološke aktivnosti, izotiocijanati su postali interes velikog broja znanstvenika te su razvijene brojne metode njihove sinteze. Cilj ovog rada bila je sinteza *p*-nitrofenil-izotiocijanata reakcijom odgovarajućeg aminskog supstrata s ugljikovim disulfidom uz prisustvo baze. Sinteza u prvom koraku daje ditiokarbaminsku sol koja podliježe eliminaciji djelovanjem desulfurizacijskog reagensa (cijanurinska kiselina) pri čemu dolazi do formiranja odgovarajućeg produkta. Na ovakav se način može pripremiti širok spektar alkilnih i arilnih izotiocijanata. Osim klasične organske sinteze *p*-nitrofenil-izotiocijanata i 1,4-diizotiocijanatobenzena provedena je i mikrovalovima potpomognuta sinteza pri različitim snagama zračenja. Metode su uspoređene s obzirom na njihovo trajanje i primijenjene reakcijske uvjete (temperatura, snaga mikrovalnog zračenja, korištene kemikalije, itd). Sintetizirani spojevi su potom identificirani uz pomoć kromatografskih i spektroskopskih tehnika. Dobiveni su odgovarajući podaci koji potvrđuju strukture sintetiziranih produkata.

**Ključne riječi:** izotiocijanati, *p*-nitrofenil-izotiocijanati, klasična i mikrovalna sinteza, metode identifikacije  
**Rad sadrži:** 55 stranica, 50 slika, 2 tablice, 0 priloga, 19 literaturnih referenci  
**Jezik izvornika:** hrvatski

#### Sastav Povjerenstva za obranu:

1. Doc. dr. sc. Franko Burčul-predsjednik
2. Doc. dr. sc. Mario Nikola Mužek-član
3. Izv. prof. dr. sc. Ivica Blažević-mentor

**Datum obrane:** 05. listopada, 2018.

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

## BASIC DOCUMENTATION CARD

DIPLOMA THESIS

University of Split  
Faculty of Chemistry and Technology Split  
Graduate study of chemistry, orientation Organic Chemistry and Biochemistry

**Scientific area:** Natural sciences

**Scientific field:** Chemistry

**Thesis subject** was approved by Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology, session no. 3.

**Mentor:** Ivica Blažević, PhD, Associate professor

**Technical assistance:** Azra Đulović, MChem

### CLASSIC AND MICROWAVE-ASSISTED SYNTHESIS OF 4-NITROPHENYL-ISOTHIOCYANATE

Antonija Bodač, 76

**Abstract:** Isothiocyanates (ITCs) are classified as a separate group of volatile sulfur compounds naturally occurring by enzymatic hydrolysis of glucosinolates in the presence of the myrosinase enzyme. Myrosinase causes cleavage of the thio-glucose bond to give rise to unstable aglycone. This aglycone spontaneously rearranges to several products. Most frequently, it undergoes a Lossen rearrangement to produce an isothiocyanates, at a neutral pH. Isothiocyanates have been reported as having important biological effects, particularly protection against chemical carcinogens and acting as major inhibitors of microbial and bacterial activity. Isothiocyanates have become interesting to many scientists in the past decade, and numerous methods of their synthesis have been developed. The aim of this study was preparation of *p*-nitrophenyl ITC with two different methods. The synthetic process involves an *in situ* generation of a dithiocarbamate salt from the amine substrate by reacting with CS<sub>2</sub> followed by elimination to form the isothiocyanate product with cyanuric acid as the desulfurylation reagent. This general and facile protocol is significant for the preparation of a broad range of alkyl and aryl isothiocyanates. In addition to the classic synthesis of *p*-nitrophenyl ITC and 1,4-diisothiocyanatobenzene, a microwave assisted synthesis was also performed at various radiation intensities. The methods were compared in terms of their duration and the reaction conditions. The synthesized compounds were identified with chromatographic and spectroscopic techniques. Analysis of the results confirm the structure of the synthesized products.

**Keywords:** isothiocyanates, *p*-nitrophenyl ITC, classic and microwave synthesis, identification methods

**Thesis contains:** 55 pages, 50 figures, 2 tables, 0 supplement, 19 references

**Original in:** Croatian.

**Defence committee:**

1. Franko Burčul, PhD, Assistant professor-chair person
2. Mario Nikola Mužek, PhD, Assistant professor-member
3. Ivica Blažević, PhD, Associate professor-supervisor

**Defence date:** October 5<sup>th</sup>, 2018.

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

*Diplomski rad je izrađen u Zavodu za organsku kemiju, Kemijsko-tehnološkog fakulteta  
u Splitu pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Ivice Blaževića i neposrednim voditeljstvom  
Azre Đulović, mag. chem., u razdoblju od travnja do rujna 2018. godine.*

Rad je financiran od strane HRZZ projekta BioSMe (IP-2016-06-1316).

*Zahvaljujem se mentoru izv. prof. dr. sc. Ivici Blaževiću koji mi je omogućio izvođenje diplomskog rada na Zavodu za organsku kemiju te mi pomogao svojim stručnim savjetima i sugestijama. Zahvaljujem se asistentici Azri Đulović, mag. chem. na velikoj pomoći prilikom izvođenja eksperimentalnog dijela ovog rada, a ponajviše na prijateljskom i srdačnom dijalogu.*

*Zahvaljujem se svojim prijateljima za nezaboravna zajednička iskustva tijekom studiranja.*

*Hvala mojim roditeljima na bezuvjetnoj podršci tijekom cijelog mog školovanja.*

*Antonija Bodač*





## ZADATAK DIPLOMSKOG RADA

- 1. Provesti klasičnu organsku sintezu p-nitrofenil-izotiocijanata reakcijom primarnog amina (4-nitroanilina) s ugljikovim disulfidom u prisustvu odgovarajuće baze (NaOH).*
- 2. Provesti mikrovalnu sintezu p-nitrofenil izotiocijanata pri različitim snagama mikrovalnog zračenja (37 W i 40 W).*
- 3. Identificirati sintetizirane spojeve uz pomoć: tankoslojne kromatografije (TLC), infracrvene spektroskopije s Fourierovom transformacijom (FTIR), vezanim sustavom plinske kromatografije i spektrometrije masa (GC-MS), te plinske kromatografije s plamenoionizacijskim detektorom (GC-FID).*

## SAŽETAK

Izotiocijanati (ITC) se klasificiraju kao posebna skupina hlapljivih sumporovih spojeva koji prirodno nastaju enzimskom hidrolizom glukozinolata djelovanjem enzima mirozinaze pri neutralnoj pH vrijednosti kada dolazi do Lossenove pregradnje nestabilnog međuprodukta. Istraživanja su pokazala da ova grupa spojeva posjeduje izražena antikancerogena, antibakterijska i antimikrobna svojstva. Zbog svoje biološke aktivnosti, izotiocijanati su postali interes velikog broja znanstvenika te su razvijene brojne metode njihove sinteze.

Cilj ovog rada bila je sinteza *p*-nitrofenil-izotiocijanata reakcijom odgovarajućeg aminskog supstrata s ugljikovim disulfidom uz prisustvo baze. Sinteza u prvom koraku daje ditiokarbaminsku sol koja podliježe eliminaciji djelovanjem desulfurizacijskog reagensa (cijanurinska kiselina) pri čemu dolazi do formiranja odgovarajućeg produkta. Na ovakav se način može pripremiti širok spektar alkilnih i arilnih izotiocijanata.

Osim klasične organske sinteze *p*-nitrofenil-izotiocijanata i 1,4-diizotiocijanatobenzena provedena je i mikrovalovima potpomognuta sinteza pri različitim snagama zračenja. Metode su uspoređene s obzirom na njihovo trajanje i primijenjene reakcijske uvjete (temperatura, snaga mikrovalnog zračenja, korištene kemikalije, itd). Sintetizirani spojevi su potom identificirani uz pomoć kromatografskih i spektroskopskih tehnika. Dobiveni su odgovarajući podaci koji potvrđuju strukture sintetiziranih produkata.

**Ključne riječi:** izotiocijanati, *p*-nitrofenil-izotiocijanati, klasična i mikrovalna sinteza, metode identifikacije

## SUMMARY

Isothiocyanates (ITCs) are classified as a separate group of volatile sulfur compounds naturally occurring by enzymatic hydrolysis of glucosinolates in the presence of the myrosinase enzyme. Myrosinase causes cleavage of the thio-glucose bond to give rise to unstable aglycone. This aglycone spontaneously rearranges to several products. Most frequently, it undergoes a Lossen rearrangement to produce an isothiocyanates, at a neutral pH. Isothiocyanates have been reported as having important biological effects, particularly protection against chemical carcinogens and acting as major inhibitors of microbial and bacterial activity. Isothiocyanates have become interesting to many scientists in the past decade, and numerous methods of their synthesis have been developed.

The aim of this study was preparation of *p*-nitrophenyl ITC with two different methods. The synthetic process involves an *in situ* generation of a dithiocarbamate salt from the amine substrate by reacting with CS<sub>2</sub> followed by elimination to form the isothiocyanate product with cyanuric acid as the desulfurylation reagent. This general and facile protocol is significant for the preparation of a broad range of alkyl and aryl isothiocyanates.

In addition to the classic synthesis of *p*-nitrophenyl ITC and 1,4-diisothiocyanatobenzene, a microwave assisted synthesis was also performed at various radiation intensities. The methods were compared in terms of their duration and the reaction conditions. The synthesized compounds were identified with chromatographic and spectroscopic techniques. Analysis of the results confirm the structure of the synthesized products.

**Keywords:** isothiocyanates, *p*-nitrophenyl ITC, classic and microwave synthesis, identification methods

# SADRŽAJ

<b>UVOD</b> .....	1
<b>1. OPĆI DIO</b> .....	2
1.1. IZOTIOCIJANATI .....	2
1.2. RASPROSTRANJENOST U BILJNIM PORODICAMA .....	5
1.3. BIOLOŠKI ZNAČAJ IZOTIOCIJANATA.....	6
1.3.1. ANTIKANCEROGENO DJELOVANJE.....	6
1.3.2. ANTIOKSIDACIJSKO DJELOVANJE .....	7
1.3.3. BIOLOŠKI ZNAČAJ 1,4-DIIZOTIOCIJANATOBENZENA .....	8
1.4. KLASIČNI PRISTUP SINTEZI IZOTIOCIJANATA .....	9
1.5. MIKROVALNA SINTEZA.....	13
1.5.1. OPĆENITO.....	13
1.5.2. USPOREDBA KLASIČNOG I MIKROVALNOG ZAGRIJAVANJA ..	16
1.5.3. MIKROVALNI REAKTORI .....	18
1.5.3.1. JEDNOFUNKCIJSKI I VIŠEFUNKCIJSKI REAKTORI .....	19
1.5.4. PROVOĐENJE METODE .....	20
1.6. METODE IDENTIFIKACIJE IZOTIOCIJANATA.....	22
1.6.1. SPEKTROMETAR S FOURIEROVOM TRANSFORMACIJOM.....	22
1.6.2. KROMATOGRAFIJA.....	23
1.6.2.1. TANKOSLOJNA KROMATOGRAFIJA.....	24
1.6.2.2. PLINSKA KROMATOGRAFIJA.....	25
1.6.2.2.1. PLAMENOIONIZACIJSKI DETEKTOR .....	26
1.6.2.2.2. MASENI SPEKTROMETAR KAO DETEKTOR .....	27
<b>2. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....	28
2.1. KEMIKALIJE I APARATURA .....	28
2.2. KLASIČNA SINTEZA <i>p</i> -NITROFENIL-IZOTIOCIJANATA.....	30

2.3.	MIKROVALNA SINTEZA <i>p</i> -NITROFENIL-IZOTIOCIJANATA.....	34
2.3.1.	MIKROVALNA SINTEZA <i>p</i> -NITROFENIL-ITC PRI 37 W.....	34
2.3.2.	MIKROVALNA SINTEZA <i>p</i> -NITROFENIL-ITC PRI 40 W.....	38
2.4.	ANALIZA SINTETIZIRANIH SPOJEVA .....	42
2.4.1.	ANALIZA SPOJEVA FTIR-om .....	42
2.4.2.	GC-FID ANALIZA .....	42
2.4.3.	GC-MS ANALIZA .....	43
<b>3.</b>	<b>REZULTATI I RASPRAVA .....</b>	<b>45</b>
<b>4.</b>	<b>ZAKLJUČAK .....</b>	<b>53</b>
<b>5.</b>	<b>LITERATURA .....</b>	<b>54</b>

## UVOD

Izotiocijanati ( $R-N=C=S$ ) predstavljaju važnu grupu prirodnih i farmaceutski aktivnih spojeva. Imaju široku primjenu kao kemoselektivni elektrofilni u kemiji biokonjugata te predstavljaju ključne intermedijere u sintetskoj organskoj kemiji. Pretpostavlja se da ova grupa spojeva ima izražena antikancerogena, antibakterijska i antimikrobna svojstva. Zbog svoje biološke aktivnosti, izotiocijanati postaju predmet istraživanja velikog broja znanstvenika te su razvijene brojne metode njihove sinteze.

Većina metoda sinteze izotiocijanata se zasniva na nukleofilnoj supstituciji organskih halogenida tiocijanatnom kiselinom ili njenim solima i korištenju primarnih amina za tzv. „tiokarbonilni prijenos“ pomoću ugljikovog disulfida i tiofozgena. Uglavnom se postižu mali prinosi reakcije, koriste toksični reagensi i dobiju nečisti proizvodi. Da bi se to izbjeglo, razvijene su nove metode sinteze kojima se postižu bolji reakcijski prinosi, manja toksičnost i ne dolazi do nastanka nepoželjnih tiourea kao sporednih produkata.

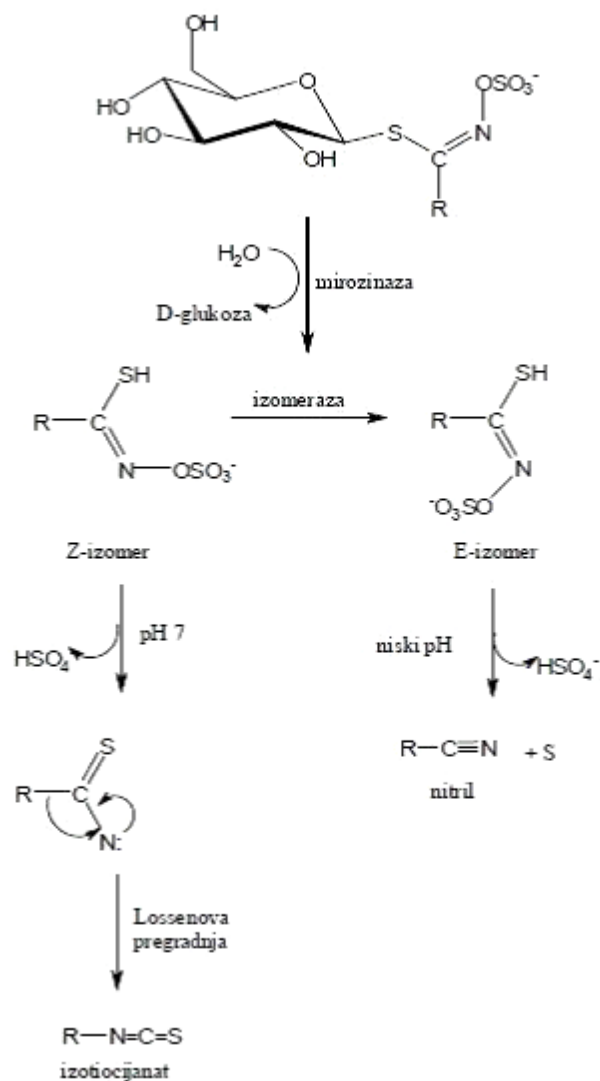
U modernoj sintetskoj kemiji istraživanja su usmjerena prema korištenju ekološki prihvatljivih metoda, a među njima su i tehnike koje koriste mikrovalno zračenje. Mikrovalna sinteza se uspješno primjenjuje za organsku sintezu u istraživačkim laboratorijima, za višestupanjske sinteze u medicinskoj kemiji, za sintezu polimera, nanomaterijala te razne biokemijske procese.

# 1. OPĆI DIO

## 1.1. IZOTIOCIJANATI

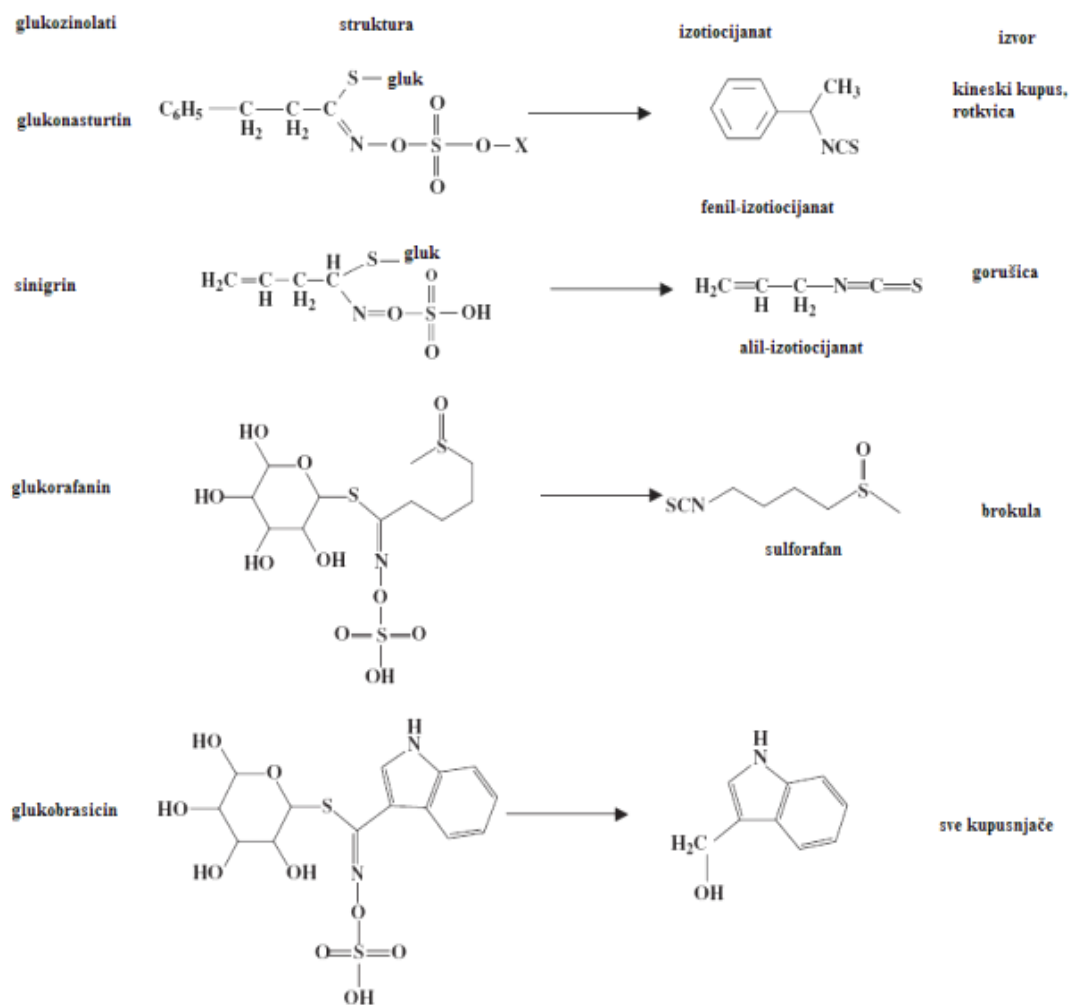
Izotiocijanati, opće kemijske formule  $R-N=C=S$ , se klasificiraju kao posebna skupina hlapljivih sumporovih spojeva koji su široko rasprostranjeni u brojnim biljnim porodicama. Hlapljivi sumporovi spojevi su uglavnom spojevi u tragovima i služe za zaokruživanje mirisa eteričnih ulja, iako mogu biti i dominantne komponente pojedinih ulja. Izotiocijanati predstavljaju važnu skupinu organskih spojeva koji prirodno nastaju enzimskom hidrolizom glukozinolata djelovanjem enzima mirozinaze. Oštećenjem biljnog tkiva dolazi do oslobađanja enzima i hidrolize relativno neaktivnih glukozinolata, a produkti koji nastaju ovise o strukturi bočnog lanca i uvjetima hidrolize. Mirozinaza odcjepljuje glukozu, a zatim se s nestabilnog aglukona (tiohidroksimat-*O*-sulfonat) eliminira sulfat Lossenovom pregradnjom. Strukturastalnih produkata ovisi o različitim čimbenicima. Nastanak izotiocijanata ili nitrila ovisi o specifičnosti (vrsti) glukozinolata, dijelu biljke gdje se glukozinolati nalaze, tretiranju biljke prije hidrolize te uvjetima tijekom hidrolize (posebice o pH vrijednosti). Izotiocijanati obično nastaju pri pH 5-7, dok nitrili uglavnom nastaju kada se hidroliza provodi u kiselim uvjetima (Slika 1.).<sup>1</sup>





*Slika 1. Shema nastanka izotiocijanata i nitrila<sup>2</sup>*

Većina produkata hidrolize su stabilni osim onih koji nastaju hidrolizom glukozinolata koji sadrže  $\beta$ -hidroksilirani bočni lanac, npr.  $\beta$ -hidroksiizotiocijanat je nestabilan te se spontano ciklizira u oksazolidin-2-tion. Indolni glukozinolati, kao što je glukobrasicin, tvore nestabilne izotiocijanate koji podliježu daljnjoj hidrolizi te nastaju 3-indol-acetonitril i 3,3'-diindolil-metan koji kondenziraju u dimere, trimere i tetramere. Na slici 2. prikazani su razgradni produkti uobičajenih glukozinolata.<sup>1</sup>



*Slika 2. Uobičajeni glukozinolati i njihovi razgradni produkti<sup>1</sup>*

Izotiocijanati su hlapljivi spojevi, jakog mirisa i okusa, odgovorni za karakterističnu aromu određenog povrća kao što su: brokula, hren, gorušica, rotkva itd. Smatraju se snažnim elektrofilima zbog reaktivnosti centralnog ugljikovog atoma  $\text{N}=\text{C}=\text{S}$ , koji brzo reagira s nukleofilima na bazi sumpora, dušika i kisika.

## 1.2. RASPROSTRANJENOST U BILJNIM PORODICAMA

U prirodi je poznato oko 200 izotiocijanata, rasprostranjenih u mnogim biljnim porodicama. Identificirani su ponajviše u biljnoj porodici Brassicaceae, a prisutni su i u porodicama Capparidaceae i Caricaceae te Resedaceae, Tovariaceae, Moringaceae.

Alil-izotiocijanat, benzil-izotiocijanat, but-3-enil-izotiocijanat, 2-feniletil-izotiocijanat i 4-hidroksibenzil-izotiocijanat su široko rasprostranjeni u navedenim biljnim porodicama, u odnosu na druge izotiocijanate i njihove produkte, kao što su tiocijanati. Nadalje, određeni izotiocijanati kao što su 3,4-dimetoksibenzil-izotiocijanat i 3,4,5-trimetoksibenzil-izotiocijanat nalaze se samo u nekoliko rodova. U svojoj strukturi, pojedini izotiocijanati sadrže i keto-funkcijske skupine, kao 4-oksoheptil-izotiocijanat, 5-oksoheptil-izotiocijanat i 5-oksooktil-izotiocijanat. Navedeni izotiocijanati nisu pronađeni u biljnoj porodici Brassicaceae, već samo u rodu *Capparis* (Capparidaceae).<sup>3</sup>

Sjemenke crne gorušice sadrže *ca.* 1,0-1,2% alil-glukozinolata, trivijalnog imena sinigrin. Alil-izotiocijanat (razgradni produkt alil-glukozinolata) predstavlja glavni sastojak tzv. alil-gorušičnog ulja čiji maseni udio u biljci iznosi *ca.* 0,7%. Sjemenke bijele gorušice sadrže 1,5-2,5% *p*-hidroksi-benzilglukozinolata (sinalbina), od kojeg tijekom destilacije nastaje *p*-hidroksibenzil-izotiocijanat te se ulje dobiveno destilacijom naziva *p*-hidroksibenzil-gorušičino ulje.<sup>4</sup>

Brokula je dobar izvor glukorafanina (glukozinolatnog prekursora sulforafana) i sinigrina, ljekovita potočarka je bogat izvor glukonasturtina (preteče feniletil-izotiocijanata), dok je kres salata bogata glukotropeolinom (prekursor benzil-izotiocijanata).

### 1.3. BIOLOŠKI ZNAČAJ IZOTIOCIJANATA

Kao što je već spomenuto, razgradnja glukozinolata pomoću enzima mirozinaze rezultira nizom produkata koji su čest predmet istraživanja zbog svojih bioloških i farmakoloških značajki. Glukozinolatima i njihovim razgradnim produktima se pripisuju određena antikancerogena, antioksidacijska, antimikrobna te nutritivna i antinutritivna svojstva. Zaslužni su za specifičnu aromu povrća i zaštitu biljaka od kukaca i fitopatogena.<sup>2,5</sup>

Što se tiče njihovog antimikrobnog i antifungalnog djelovanja, izotiocijanati imaju značajniji učinak prema kvascima nego bakterijama i gljivicama, a zbog svoje toksičnosti su mogući kandidati za upotrebu kao pesticidi. Veza između doze i utjecaja još uvijek nije jasno definirana. Npr. indol-3-karbinol može inhibirati i potaknuti kancerogenezu. Stoner i suradnici su utvrdili da ova komponenta nije pogodno kemoprotektivno sredstvo iako ima potencijalno pozitivno djelovanje na karcinom dojke i debelog crijeva. Također je utvrđeno da benzil- i alil-izotiocijanati imaju antikancerogeno djelovanje, ali i genotoksično i potencijalno kancerogeno djelovanje.<sup>1</sup>

#### 1.3.1. ANTIKANCEROGENO DJELOVANJE

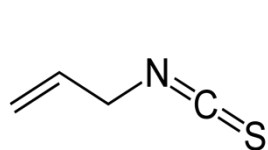
Tijekom proteklih 20 godina istaknuto je da konzumiranjem voća i povrća posebice povrća iz porodice Brassicaceae dolazi do smanjenja pojave karcinoma za otprilike 50%. Mehanizam preventivnog djelovanja razgradnih produkata glukozinolata još nije u potpunosti razjašnjen, ali istraživanja pokazuju da razgradni produkti selektivno inhibiraju aktivnost enzima citokrom P450 (faze I) te aktiviraju enzime faze II (glutation-S-transferazu i UDP-glukuronil transferazu). Ovi enzimi inhibiraju rast stanica tumora i stimuliraju apoptozu, programiranu staničnu smrt, ali važnija činjenica je da pokazuju prvu obrambenu liniju ljudskog organizma od kancerogenih tvari.<sup>1</sup>

Najpoznatiji razgradni produkti glukozinolata koji pridonose antikancerogenim svojstvima su alil-izotiocijanat, feniletil-izotiocijanat, sulforafan.

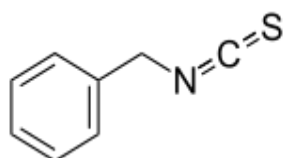
**Sulforafan ((R)-4-(metilsulfinil)butil-izotiocijanat)** potječe od glukorafanina te je značajan zbog uloge u obrani od raka dojke kao i destruktivnosti prema bakteriji *Helicobacter pylori* koja može izazvati pojavu raka i čira želuca.<sup>2</sup>

**2-Fenilet-il-izotiocijanat** je aromatski izotiocijanat koji nastaje razgradnjom glukonasturtina, utječe na sprječavanje pojave tumora pluća izazvanog nitrozaminom, sastavnim dijelom duhana.<sup>2</sup> Fenilet-il-izotiocijanat se dugo zadržava u krvi nakon unosa te je ustanovljeno da ometa metaboličke putove povezane s razvojem karcinoma presrećući signale pomoću kojih se karcinom hrani.

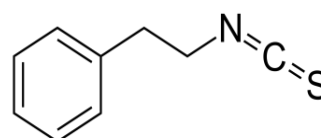
**Alil-izotiocijanat** se koristi u farmaciji zbog svojih antibakterijskih i anestetičkih svojstava.



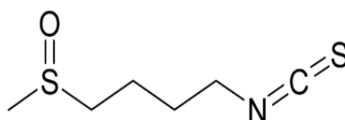
alil-izotiocijanat



benzil-izotiocijanat



fenilet-il-izotiocijanat



sulforafan

*Slika 3. Primjeri izotiocijanata s antikancerogenim djelovanjem*

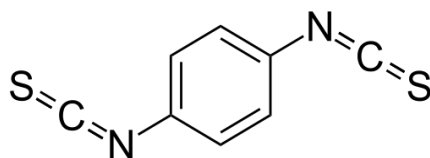
### 1.3.2. ANTIOKSIDACIJSKO DJELOVANJE

Izotiocijanati i drugi razgradni produkti glukozinolata su indirektni antioksidansi jer ne blokiraju slobodne radikale direktno. Antioksidacijsko djelovanje je također povezano s enzimima faze I i II. Posebno su važni enzimi faze II koji sadrže specifične sekvence DNA koji senazivaju elementima antioksidacijskog odgovora. Produkti razgradnje glukozinolata povećavaju aktivnost enzima faze II povećavajući transkripciju gena koji sadrže elemente antioksidacijskog odgovora.<sup>5</sup> 4-metilsulfinilbutil-izotiocijanat se smatra najučinkovitijim induktorom enzima faze II.

### 1.3.3. BIOLOŠKI ZNAČAJ

#### 1,4-DIIZOTIOCIJANATOBENZENA

Zanimljivo je da se 1,4-diizotiocijanatobenzen, dodatni produkt klasične sinteze *p*-nitrofenil-izotiocijanata, koristi u liječenju infekcija izazvanih crijevnim parazitima poznatima kao kukasti crvi (engl. *hookworms*). Naziv su dobili prema specifičnom „zubalu“ parazita s tri para oštih zuba na ventralnom rubu. Nakon što prodru kroz kožu, larve su nošene krvlju prema želučano crijevnom traktu gdje se razvijaju u odrasle parazite ili odlaze u tjelesna tkiva, prvenstveno mišiće. Klinički simptomi kod ljudi su eritem na mjestu invazije i intenzivan svrbež, dermatitis uzrokovan migrirajućom larvom kukastog crva, dok kod djece mogu utjecati na mentalni i fizički razvoj.<sup>6,7</sup>



*Slika 4. 1,4-diizotiocijanatobenzen*



*Slika 5. Kukasti crv<sup>6</sup>*

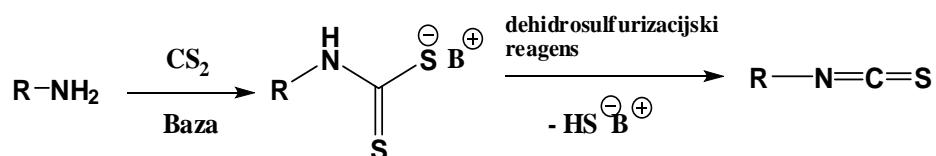
## 1.4. KLASIČNI PRISTUP SINTEZI IZOTIOCIJANATA

Izotiocijanati predstavljaju važnu grupu prirodnih i farmaceutski aktivnih spojeva. Imaju široku primjenu kao kemoselektivni elektrofilni u kemiji biokonjugata te predstavljaju ključne intermedijere u sintetskoj organskoj kemiji, posebno u sintezi heterocikličkih spojeva sa sumporom i/ili dušikom kao što su: tiohidantoin, tiopirimidon, merkaptoimidazol, tioamidazon, benzotiazin itd. Prvi radovi na sintezi izotiocijanata napravljeni su još u drugoj polovici 19. stoljeća. Hofmann (1880.g.) je dobio metil-izotiocijanate termičkom izomerizacijom metil-tiocijanata, dok je Werner (1891.g.) dobio aril-izotiocijanate iz diariltiourea korištenjem kiselih reagensa. Nekoliko godina kasnije, sintetiziran je isti spoj iz *N,N'*-dimetiltiuramdisulfida u reakciji s jodom, zagrijavanjem u vodi ili metanolu (Braun, 1902.g.).

Metode sinteze izotiocijanata se uglavnom temelje na nukleofilnoj supstituciji organskih halogenida tiocijanatnom kiselinom ili njenim solima i korištenju primarnih amina za tzv. „tiokarbonilni prijenos“ pomoću ugljikovog disulfida i tiofozgena.<sup>8</sup>

### ❖ Dehidrosulfurizacija ditiokarbaminske kiseline i njenih soli ili estera

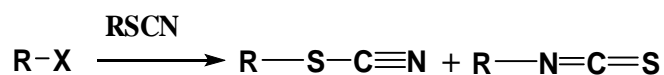
Reakcijom dovoljno nukleofilnih primarnih amina s ugljikovim disulfidom u prisustvu baze, amina ili amonijaka, nastaju soli ditiokarbaminske kiseline koje potom daju izotiocijanate upotrebom odgovarajućih dehidrosulfurizacijskih reagensa kao što su: metalne soli (npr. olovo(II) nitrat) za sintezu uobičajenih alkil- i aril-izotiocijanata, zatim fozgen, fosfooksiklorid, cijanamid, karbodiimidi, Grignard-ov reagens, metil- ili etil-klorformijat i drugi.



*Slika 6. Sinteza izotiocijanta dehidrosulfurizacijom ditiokarbaminske kiseline, nastale reakcijom primarnog amina s ugljikovim disulfidom<sup>8</sup>*

### ❖ Supstitucija halogenida tiocijanatnom kiselinom ili njenim solima

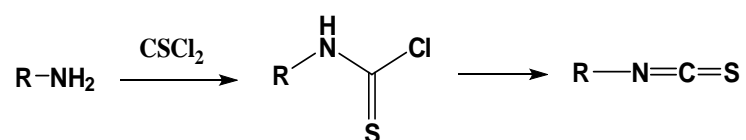
Nukleofilnom supstitucijom reaktivnih organskih halogenida tiocijanatnim solima nastaju tiocijanati i/ili izotiocijanati, ovisno o prirodi reaktanata i reakcijskim uvjetima. Alkil- i aril-halogenidi generalno daju tiocijanate koji spontano izomeriziraju, u manjoj ili većoj mjeri, dajući odgovarajuće izotiocijanate. (Slika 7.).



*Slika 7. Sinteza izotiocijanata nukleofilnom supstitucijom organskih halogenida tiocijanatnim ionom<sup>8</sup>*

### ❖ Pretvorba primarnih amina u izotiocijanate koristeći reagense sa sumporom

Primarni amini reagiraju sa tiofozgenom pri čemu nastaju nestabilni tiokarbamoil-kloridi, koji zatim, dekompozicijom, daju izotiocijanate. Prinosi ove reakcije su srednji ili dobri. Reakcija se mora odvijati u aprotičnim otapalima kao što su kloroform, toluen itd. Ova metoda je više puta modificirana, gdje se umjesto toksičnog tiofozgena koristio drugi reagens, kao što je dietiltiokarbamoil-klorid (Slika 8.).

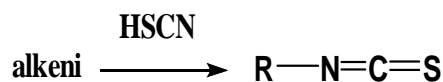


*Slika 8. Sinteza izotiocijanata reakcijom primarnog amina s tiofozgenom<sup>8</sup>*

### ❖ Adicija tiocijanatne kiseline na alkene

Adicijom tiocijanatne kiseline na polariziranu dvostruku vezu alkena ili dvostruku C=C vezu kod cikloalkena mogu nastati sekundarni alkil-izotiocijanati. Neaktivni alkeni (npr. cikloheksen) nisu pogodni supstrati za adiciju tiocijanatne kiseline (Slika 9.).

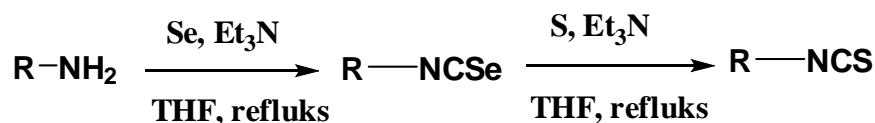




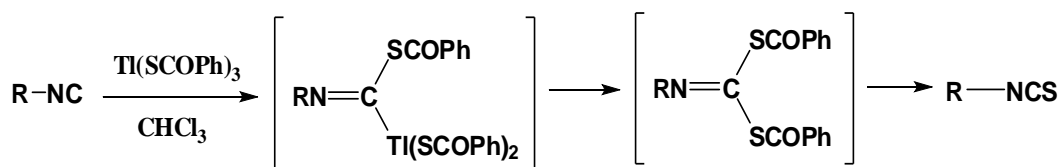
*Slika 9. Sinteza izotiocijanata adicijom tiocijanatne kiseline na slabu dvostruku vezu alkena<sup>8</sup>*

❖ **Sinteza izotocijanta iz izocijanida**

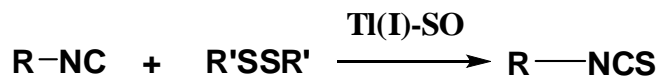
Ova sinteza se može izvesti na tri načina. Prvi način je sinteza alkil- i aril-izotiocijanata iz odgovarajućih izocijanida i elementarnog sumpora u prisustvu katalitičkih količina elementarnog selena. Prinosi reakcije su dobri ili odlični. Nadalje reakcijom izocijanida s metalnim tiokarboksilatima gdje je reagens talijev(I) tiobenzoat u kloroformu, te reakcijom izocijanida sa disulfidima u prisustvu katalitičkih količina talijevih(I) soli. Ova reakcija se odvija ionskim mehanizmom i daje dobre prinose alifatskih i aromatskih izotiocijanata (Slika10.).



**R = alkil- ili aril-**



**R = alkil- ili aril-**

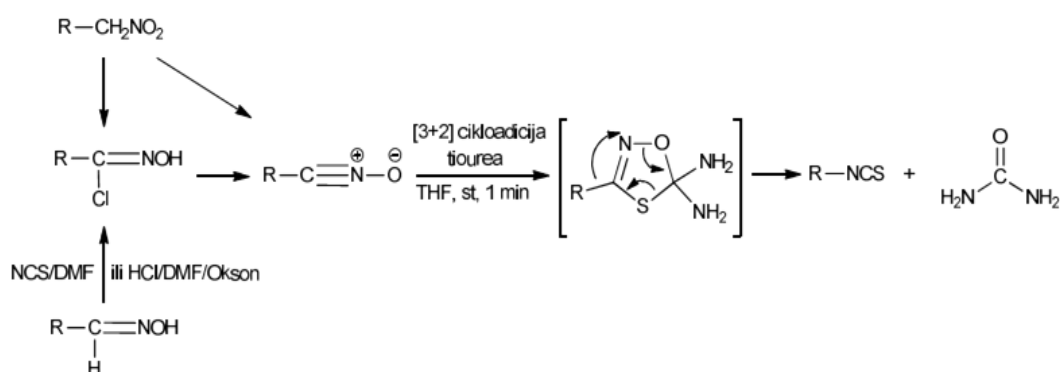


**R = PhCO, MeCO, Et<sub>2</sub>NCS, Ph, PhCH<sub>2</sub>**

*Slika 10. Sinteza izotiocijanata reakcijom izocijanida i elementarnog sumpora (gore), metalnih tiokarboksilata (u sredini) i disulfida (dolje)<sup>8</sup>*

### ❖ Reakcija nitril-oksida s tiokarbonilnim spojevima

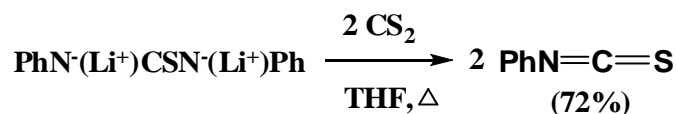
Izotiocijanati mogu nastati reakcijom nitril-oksida sa spojevima koji sadrže C=S vezu (tioaldehidi, tioketoni, tioamidi, ugljikov-disulfid, sulfonil-izotiocijanati i tiourea). U usporedbi s ostalim tiokarbonilnim reagensima kod kojih je neophodno zagrijavanje tijekom dužeg vremenskog perioda, tiourea reagira s nitril-oksidom pod blagim reakcijskim uvjetima, na sobnoj temperaturi u vrlo kratkom reakcijskom vremenu od svega jedne minute. Reakcija nitril-oksida sa tiouream, odnosno hidroksumoil-klorida, primarnih nitroalkana i aldoksima kao prekursora nitril-oksida predstavljena je na slici 11.



*Slika 11. Sinteza izotiocijanata reakcijom nitril-oksida i tiouree<sup>8</sup>*

### ❖ Razlaganje tiouree

Zagrijavanjem u prisustvu nekih kiselina, N,N'-disupstituirane tiouree se razlažu dajući amine i izotiocijanate. Pirolizom acil-tiourea u *o*-diklorbenzenu dobiva se izotiocijanat kao glavni produkt. Ova metoda je primjenjiva i za sintezu dialkilamino-izotiocijanata. Sterički zaklonjeni arilamini daju izotiocijanate s visokim prinosom u reakciji njihovih tiourea s fenil-izotiocijanatom. U ovoj se reakciji fenil-izotiocijanat dodaje u suvišku da bi se oslobođeni anilin vezao u N,N'-difeniltioureu. Tretiranjem metalne uree i tiouree ugljikovim disulfidom dobiju se fenil-izotiocijanati s dobrim prinosom (Slika 12.).



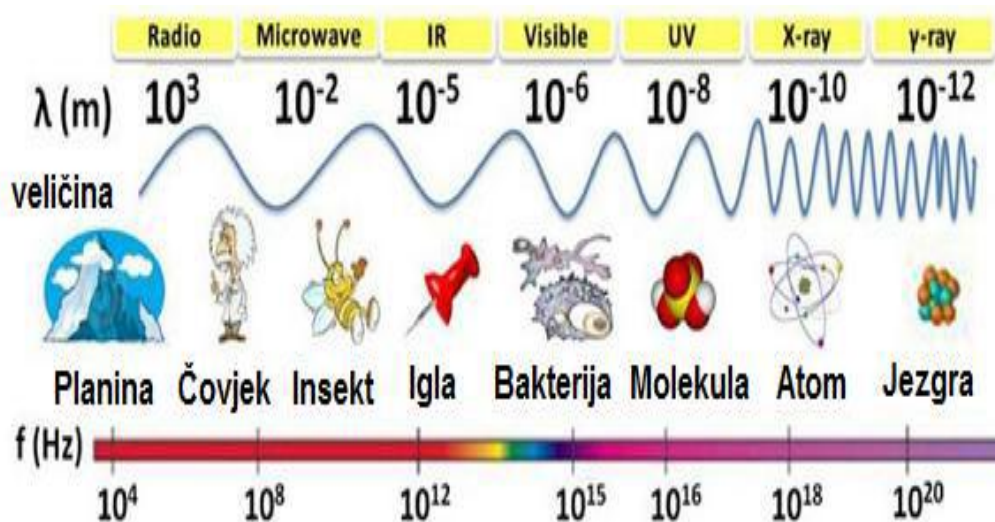
*Slika 12. Sinteza fenil izotiocijanata reakcijom tiouree s ugljikovim disulfidom<sup>8</sup>*

## 1.5. MIKROVALNA SINTEZA

### 1.5.1. OPĆENITO

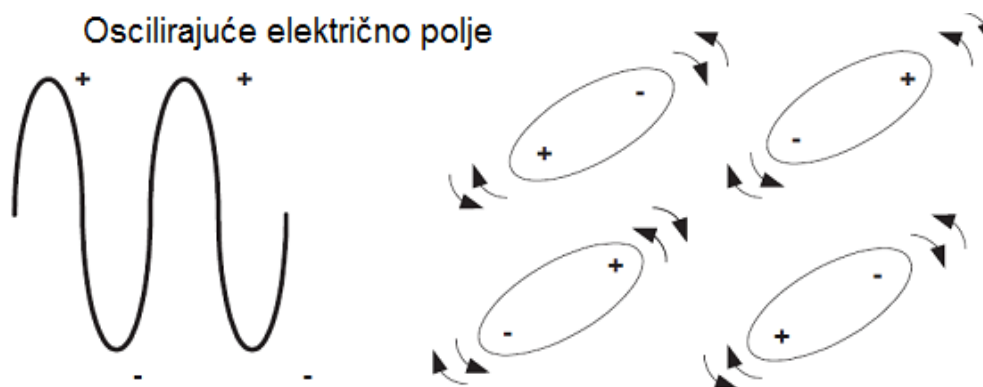
Mikrovalna sinteza predstavlja jednu od modernih procesnih tehnika koje čine temelje zelene kemije. Pojam zelena kemija podrazumijeva ekološki prihvatljive kemijske procese i njihove produkte koji ne zagađuju okoliš i ne utječu na ljudsko zdravlje. Reakcije potpomognute mikrovalovima se većinom provode korištenjem vode kao reakcijskog medija dok veliku važnost imaju i reakcije koje se provode bez otapala. Prve reakcije mikrovalne sinteze su se provodile u kućnim mikrovalnim pećnicama, dok se danas podrazumijeva korištenje modernih i sofisticiranih mikrovalnih reaktora.<sup>9</sup> Mikrovalna sinteza se razvojem modernih mikrovalnih reaktora uspješno primjenjuje kod organskih sinteza u istraživačkim laboratorijima, višestupanjskih sinteza u medicinskoj kemiji, kod sinteza polimera, nanomaterijala te raznih biokemijskih procesa.

Područje mikrovalnog (MW) zračenja se nalazi između infracrvenog zračenja i radio frekventnih valova, u rasponu frekvencija 0,3-300 GHz, odnosno valnih duljina od 1 cm do 1 m.<sup>9,10</sup>



Slika 13. Elektromagnetski spektar<sup>11</sup>

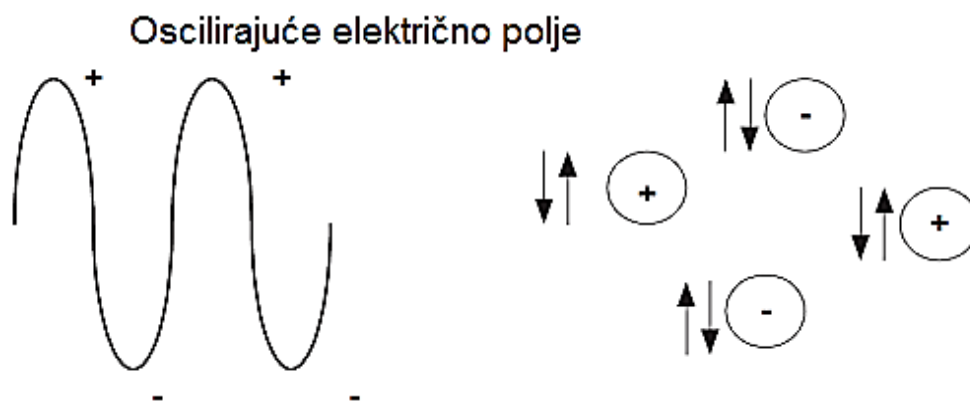
MW zračenje se sastoji od električne i magnetske komponente pri čemu je električna komponenta odgovorna za interakciju s materijom. Dva osnovna mehanizma interakcije mikrovalnog zračenja i materije su: **dipolarna polarizacija** (rotacija dipola) i **kondukcijski mehanizam** (ionska vodljivost).<sup>9,10</sup>



*Slika14. Mehanizam dipolne polarizacije<sup>11</sup>*

Da bi tvar podvrgnuta MW zračenju mogla apsorbirati takvu energiju mora imati odgovarajući dipolni moment, a električna komponenta potiče rotaciju molekula. Dolazi do slučajnog gibanja molekula pri čemu elektromagnetsko zračenje prelazi u toplinsku energiju. Jakost dipolne polarizacije ovisi o polarnosti molekula i njihovoj sposobnosti da slijede brze izmjene električnog polja.

Ionska vodljivost je posljedica prisutnosti slobodnih iona ili ionskih vrsta u mediju izloženom djelovanju mikrovalnog zračenja. Električno polje uzrokuje oscilacije elektrona ili iona te dolazi do spontanog kretanja slobodnih iona u mediju. Osnovni nedostatak ove metode je taj što nije primjenjiva na materijale s visokom vodljivošću jer se većina energije koja padne na njihovu površinu reflektira.<sup>9,10</sup>



*Slika 15. Kondukcijski mehanizam<sup>11</sup>*

Djelovanje mikrovalova na materijal može se objasniti pomoću tri karakteristična procesa: **apsorpcija**, **transmisija** i **refleksija**. Polarna otapala i materijali koji imaju visoke vrijednosti dielektričnih svojstava snažno apsorbiraju MW zračenje pri čemu dolazi do brzog zagrijavanja reakcijskog medija. Napolarni materijali pokazuju slabu interakciju s MW zračenjem, mikrovalovi prodiru kroz materijal bez ikakve apsorpcije i stvaranja topline te se koriste kao izolatori i konstrukcijski materijali. Kod vodiča se mikrovalno zračenje uglavnom odbija ili reflektira s njihove površine, a temperatura takvog materijala raste samo na površini.<sup>11</sup>

Budući se većina kemijskih reakcija odvija u otopinama, veliku ulogu u provedbi mikrovalne sinteze ima apsorpcijska moć otapala. Prilikom odabira otapala, temperature vrelišta nisu presudan čimbenik jer su pod utjecajem mikrovalova točke vrelišta korištenih otapala više u odnosu na one kod klasičnog zagrijavanja. Ta se pojava naziva efekt pregrijavanja. Apsorpcijska moć otapala se izražava tangensom gubitka  $\delta$ . Što je on veći to je apsorpcijska moć otapala veća tj. otapalo djelotvornije pretvara energiju MW zračenja u toplinu.<sup>12</sup>

## 1.5.2. USPOREDBA KLASIČNOG I MIKROVALNOG ZAGRIJAVANJA

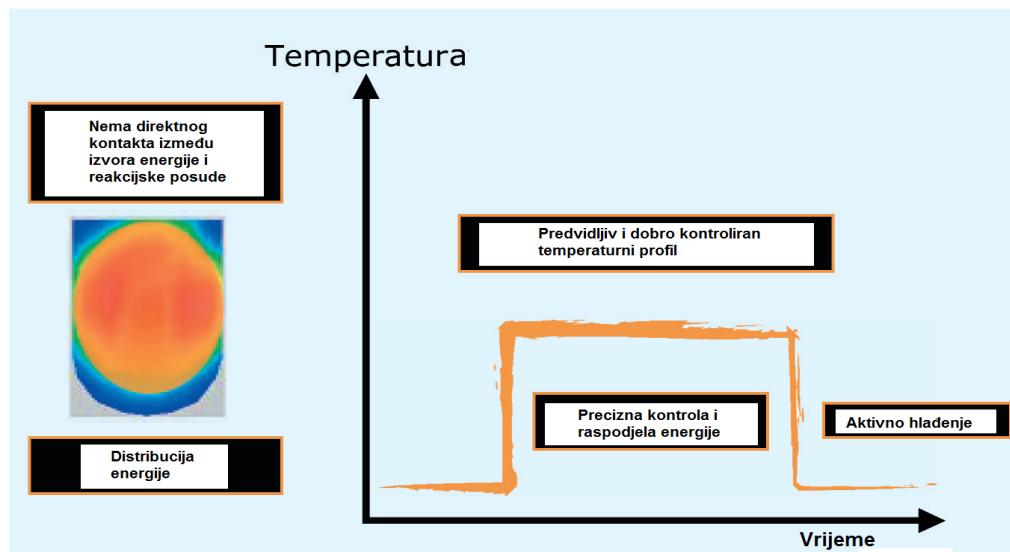


*Slika 16. Usporedba klasičnog i mikrovalnog zagrijavanja<sup>11</sup>*

Klasična organska sinteza se provodi zagrijavanjem reakcijske smjese pomoću vanjskog izvora topline (uljne kupelji, peći) što rezultira višom temperaturom reakcijske posude u odnosu na smjesu. Toplina se prvo prenosi na stijenke posude, a tek onda na uzorak stoga uzorku treba više vremena da bi postigao željenu temperaturu. Sukladno tome troši se puno više energije i vremena za postizanje i održavanje termičke ravnoteže. Uslijed nejednolikog zagrijavanja može doći do lokaliziranih pregrijavanja koja uzrokuju nehomogenost smjese i smanjeno iskorištenje reakcije. Suprotno tome MW zračenje učinkovito zagrijava reakcijsku smjesu prodiranjem kroz materijal i direktnom interakcijom s otapalom, reagensima i katalizatorima. Temperatura cijelog volumena reakcijske smjese raste simultano.<sup>9</sup>

Upotrebom mikrovalnih reaktora postiže se idealni temperaturni profil reakcijske smjese, a njeno zagrijavanje i hlađenje je visoko kontrolirano.<sup>11</sup>

## IDEALNI TEMPERATURNI PROFIL



*Slika 17. Idealni temperaturni profil MW zagrijavanja<sup>11</sup>*

### Osnovne prednosti MW zagrijavanja:

- danas se MW zračenje primjenjuje kao alternativa klasičnom zagrijavanju
- može se primijeniti u svim granama kemije i kemijskog inženjerstva
- mikrovalnim zračenjem moguće je provesti neke reakcije koje se ne mogu provesti klasičnim zagrijavanjem
- osnovne prednosti mikrovalne sinteze su: značajno skraćanje reakcijskog vremena, bolje iskorištenje reakcija, nastanak minimalne količine nusprodukata, čišće reakcije zbog većeg iskorištenja, lakše separacije nastalih produkata i manjeg broja nusprodukata
- reakcije su temperaturno kontrolirane, a temperaturni profil MW zagrijavanja je idealan
- provode se i reakcije bez otapala
- omogućena je dobra kontrola reakcijskih parametara<sup>9</sup>

### **Nedostatci MW zagrijavanja:**

- kemijske reakcije se ne mogu pratiti direktno
- kod reakcija koje se provode u standardnim mikrovalnim reaktorima ne mogu se dodavati reagensi ili katalizatori
- visoka cijena MW reaktora
- mikrovalna sinteza još uvijek nije primjenjiva za industrijske pogone osim kod nekoliko vrlo skupih pilot postrojenja
- kod heterogenih smjesa može doći do nejednolikog zagrijavanja uslijed čega nema dovoljne apsorpcije zračenja u sredini reaktora<sup>9</sup>

### **1.5.3. MIKROVALNI REAKTORI**

Zbog velikog interesa za mikrovalnom sintezom, 1990.-tih godina dolazi do razvoja MW tehnologije i dizajniranja modernih MW reaktora. Moderni MW reaktori zahtijevaju visoku kontrolu tlaka i temperature, regulaciju snage mikrovalnog zračenja, mogućnost magnetskog ili mehaničkog miješanja reakcijske smjese, učinkovito hlađenje po završetku reakcije, programiranje eksperimenata te kućište otporno na eksplozije. Na tržištu su prisutna četiri velika proizvođača MW reaktora: Anton Paar GmbH (Austrija), CEM Corporation (SAD), Biotage AB (Švedska) i Milestone/MLS GmbH (Italija i Njemačka). Mikrovalni reaktori sadrže mikrovalni sustav čiji su glavni dijelovi: magnetron, valovod, kućište s uzorkom, cirkulator, IR senzor, deflektor itd.

**Magnetron**-izvor konstantnog MW zračenja.

**Valovod**-vodi mikrovalove do antene ili mikrovalnog aplikatora (kućišta).

**Cirkulator**-štiti magnetron ili cijeli instrument od reflektirajućeg mikrovalnog zračenja.

**Deflektor**-osigurava konstantno MW zračenje.



### 1.5.3.1. JEDNOFUNKCIJSKI I VIŠEFUNKCIJSKI REAKTORI

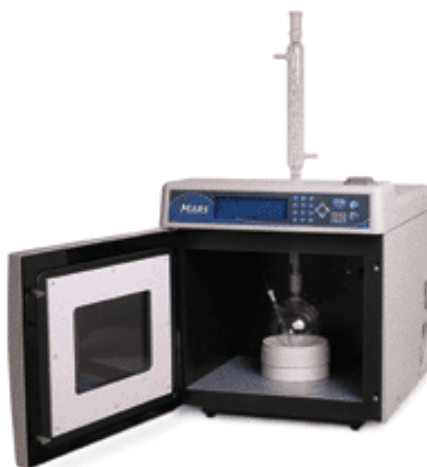
Glavna razlika između jednofunkcijskih i višefunkcijskih MW reaktora se odnosi na dimenzije i geometriju njihovih kućišta. Osnovna karakteristika jednofunkcijskih mikrovalnih reaktora je sposobnost stvaranja stojnog vala pri čemu nastaje skup čvorova s maksimalnim intezitetom mikrovalne energije i skup čvorova gdje je intezitet energije nula. Kod jednofunkcijskih reaktora zračenje prolazi kroz definiran valovod i pada na reakcijsku posudu koja se nalazi na točno određenoj udaljenosti od izvora zračenja kako bi uzorak bio smješten na čvorovima s maksimalnom energijom MW zračenja. Glavni nedostatak ovog reaktora je malo radno kućište u kojem se može ozračiti samo jedna reakcijska posuda i rad s malim količinama uzoraka (0,2-50 mL). Prednost je velika brzina zagrijavanja.<sup>12</sup>



*Slika 18. Jednofunkcijski MW reaktor<sup>11</sup>*

Karakteristika višefunkcijskih reaktora je veliko kućište unutar kojeg se mikrovalno zračenje raspršuje u svim smjerovima reflektiranjem na stijenkama kućišta. Osnovni cilj ovih reaktora je stvaranje maksimalne disperzije mikrovalova te izbjegavanje stvaranja stojnog vala koji karakterizira jednofunkcijske reaktore. Prednosti višefunkcijskih reaktora su: rad s većim količinama uzoraka i otapala (nekoliko litara), ozračivanje više reakcijskih posuda, rotiranje reakcijskih posuda čime se postiže homogena raspodjela elektromagnetskog polja. Glavni nedostatak ovih reaktora je nemogućnost potpune kontrole zagrijavanja uzorka.<sup>10,11</sup>

Jedan od najkorištenijih višefunkcijskih MW reaktor je MARS Sistem u kojem se kemijske reakcije mogu provoditi na temperaturi do 300°C i tlaku do 100 bara.



*Slika 19. MARS S CEM višefunkcijski sistem<sup>11</sup>*

#### **1.5.4. PROVOĐENJE METODE**

Prije početka same sinteze potrebno je prikupiti informacije o eksperimentalnim uvjetima vođenja reakcije. Ako se reakcije provode u otvorenoj posudi na atmosferskom tlaku tada će temperature koje se postižu apsorpcijom MW zračenja biti ograničene. Glavna prednost ovakvih eksperimenata je mogućnost korištenja standardnog laboratorijskog posuđa. Korištenjem zatvorenih reakcijskih posuda moguće je odvijanje reakcija na većim temperaturama i tlakovima.<sup>11</sup>

Sljedeći korak uključuje odabir odgovarajućeg otapala, a većinom se koristi isto otapalo u kojem je reakcija provedena klasičnom sintezom. Ukoliko se koriste slabo apsorbirajuća otapala (toluen, diklormetan, tetrahidrofur, itd.) ili se željena temperatura ne postigne u kraćem vremenskom periodu potrebno je dodati aditive ili upotrijebiti polarnije otapalo (npr. acetonitril, DMF, alkohol) koje će jače apsorbirati MW zračenje. Neke se reakcije mogu provoditi i bez dodatka otapala (engl. *dry media reactions*), a nedostaci takvih reakcija su otežano miješanje i mjerenje temperature reakcijske smjese, mogućnost raspadanja reakcijske smjese i nastalih produkata.

Nakon odabira otapala, slijedi optimiziranje reakcijskih uvjeta koji uključuju vrijeme, temperaturu i snagu MW zračenja. Kada je riječ o vremenu trajanja mikrovalne sinteze treba razlikovati vrijeme zadržavanja i ukupno vrijeme ozračivanja. Vrijeme zadržavanja je vrijeme potrebno da se postigne željena temperatura, a ukupno vrijeme ozračivanja je vrijeme potrebno da se reakcijska smjesa zagrije na željenu temperaturu i da se kemijska reakcija završi. Prilikom optimizacije nove kemijske reakcije, obično se postavi temperatura koja je 30 do 40°C niža od vrelišta korištenog otapala.

Treći reakcijski parametar je inicijalna snaga MW zračenja koja ovisi o apsorpcijskoj moći otapala i željenoj temperaturi koju treba postići. Inicijalna snaga zračenja će biti niža što je apsorpcijska moć otapala ili reakcijske smjese veća.<sup>11</sup> Ukoliko reakcije potpomognute mikrovalovima ne daju zadovoljavajuće rezultate, pristupa se optimizaciji reakcijskih uvjeta na način na koji je prikazano u Tablici 1.

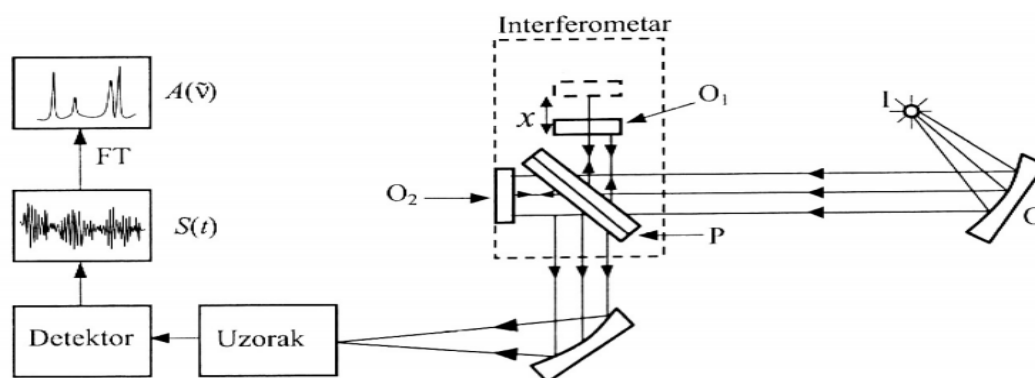
**Tablica 1.** Optimizacija reakcijskih uvjeta<sup>11</sup>

<b>Rezultat</b>	<b>Potencijalna rješenja</b>
Reakcija nije išla ili nije postignuta potpuna konverzija	<ul style="list-style-type: none"> <li>• produžiti reakcijsko vrijeme</li> <li>• povećati radnu temperaturu</li> <li>• povisiti inicijalnu snagu zračenja</li> <li>• povećati koncentraciju reakcijske smjese</li> <li>• promijeniti otapalo, reagens, katalizator itd.</li> </ul>
Dekompozicija reagensa ili produkta	<ul style="list-style-type: none"> <li>• skratiti reakcijsko vrijeme</li> <li>• sniziti temperaturu reakcije</li> <li>• sniziti inicijalnu snagu zračenja</li> <li>• smanjiti koncentraciju</li> <li>• zamijeniti reagens s onim koji je temperaturno stabilniji</li> </ul>
Reakcija završena	<ul style="list-style-type: none"> <li>• skraćivati reakcijsko vrijeme sve dok se postiže isto iskorištenje i potpuna konverzija</li> </ul>

## 1.6. METODE IDENTIFIKACIJE IZOTIOCIJANATA

### 1.6.1. SPEKTROMETAR S FOURIEROVOM TRANSFORMACIJOM

Infracrveni spektrometar s Fourierovom transformacijom (engl. *Fourier Transform InfraRed*, FTIR) je najčešće korištena tehnika kod infracrvene spektroskopije koja je efikasno zamijenila disperzivne tehnike temeljene na izdvajanju pojedinih frekvencija IR zračenja pomoću prizme. Budući se kod disperzivnih tehnika spektar za svaku valnu duljinu mjerio zasebno javila se potreba za bržim načinom mjerenja, odnosno bilo je potrebno osmisliti tehniku kod koje se vrše simultana mjerenja za sve valne duljine.<sup>13</sup> Rješenje je postignuto upotrebom tzv. interferometra. Većina interferometara sadrži uređaj za razdvajanje snopa zračenja u dvije zrake pri čemu se jedna zraka reflektira na nepomičnom zrcalu, a druga na zrcalu koje se stalno pomiče za male udaljenosti. Signal koji izlazi iz interferometra je rezultat međudjelovanja te dvije zrake. Rezultirajući signal se zove interferogram i ima jedinstveno svojstvo da svaki podatak zrake koja tvori signal ima informacije o svakoj infracrvenoj frekvenciji koja dolazi iz izvora.<sup>13</sup> Ostali dijelovi potrebni za FTIR spektroskopiju su izvor infracrvenog zračenja, komora za uzorak, detektor te računalo za obradu i prikaz signala.



Slika 20. Shematski prikaz spektrometra s Fourierovom transformacijom<sup>14</sup>

Interferogram se ne može direktno interpretirati već je potrebno primjeniti matematičku tehniku poznatu kao Fourierova transformacija. Fourierova transformacija direktno daje intenzitet zračenja u odnosu na frekvenciju, što odgovara IR spektru snimljenom na jednozračnom instrumentu. FTIR spektar prikazuje apsorbanciju ili postotak transmisije određene veze pri određenoj frekvenciji. Frekvencije se često nazivaju valnim brojevima i izražavaju u  $\text{cm}^{-1}$ .<sup>13,14</sup>

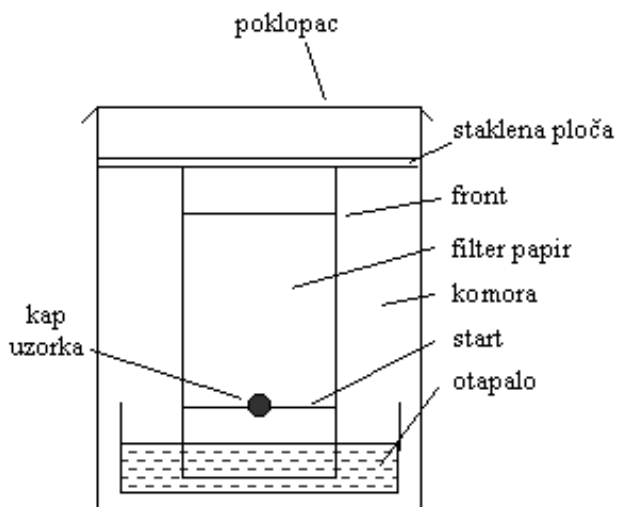
## 1.6.2. KROMATOGRAFIJA

Kromatografske tehnike su analitičke tehnike odjeljivanja, identifikacije te kvantitativnog određivanja kemijskih sastojaka u složenim smjesama. Svim kromatografskim tehnikama zajedničko je postojanje nepokretne (stacionarne) i pokretne (mobilne) faze. Mobilna faza nosi komponente uzorka kroz stacionarnu fazu, a odjeljivanje se temelji na razlikama u brzini kretanja komponenti kroz stacionarnu fazu. Stacionarna faza može biti krutina ili kapljevina, a mobilna faza kapljevina ili plin.<sup>2,15</sup> Podjela kromatografskih tehnika se zasniva na nekoliko načina: prema agregatnom stanju stacionarne i mobilne faze, prema fizikalno-kemijskim procesima tijekom razdvajanja i prema izvedbenim tehnikama. Ovisno o mobilnoj fazi kromatografija može biti plinska ili tekućinska, a ovisno o prirodi stacionarne faze plinska može biti kromatografija plin-tekuće (GLC) i plin-kruto (GSC). Tekućinska može biti kromatografija na stupcu i plošna kromatografija, odnosno tankoslojna (TLC) i papirna kromatografija (PC).<sup>16</sup> Razlikuju se još adsorpcijska, razdjelna, ionsko-izmjenjivačka kromatografija, te kiralna, afinitetna i kromatografija isključenjem.

### 1.6.2.1. TANKOSLOJNA KROMATOGRAFIJA

Tankoslojna kromatografija (engl. *Thin Layer Chromatography*, TLC) je glavna plošna kromatografska tehnika. Odlikuje se jednostavnom izvedbom, brзом analizom i niskom cijenom, zbog čega se često koristi za odjeljivanje i identifikaciju organskih spojeva, eteričnih ulja itd. Temelji se na razdiobi tvari između krutog adsorbensa i tekuće pokretne faze. Otapalo se uspinje po krutom adsorbensu uslijed kapilarnih sila. Kao nepokretna faza najčešće se koriste silikagel i aloks nanesen u tankom sloju na staklenu, metalnu ili plastičnu pločicu. Stupanj odjeljivanja uvelike ovisi o polarosti sastojaka i izboru mobilne faze, tj. otapala ili smjese otapala. Većina mobilnih faza se sastoji od jednog nepolarnog otapala (heksan, petroleter ili pentan) i polarnog otapala.<sup>16</sup>

Uzorak se otopi u odgovarajućem otapalu ili smjesi otapala tzv. razvijaču te se točkasto nanese na startnu liniju. Pločica se zatim uroni u kadu ispunjenu mobilnom fazom pazeći da startna linija bude iznad razine eluensa. Djelovanjem kapilarnih sila, eluens se diže uz pločicu noseći sastojke smjese.

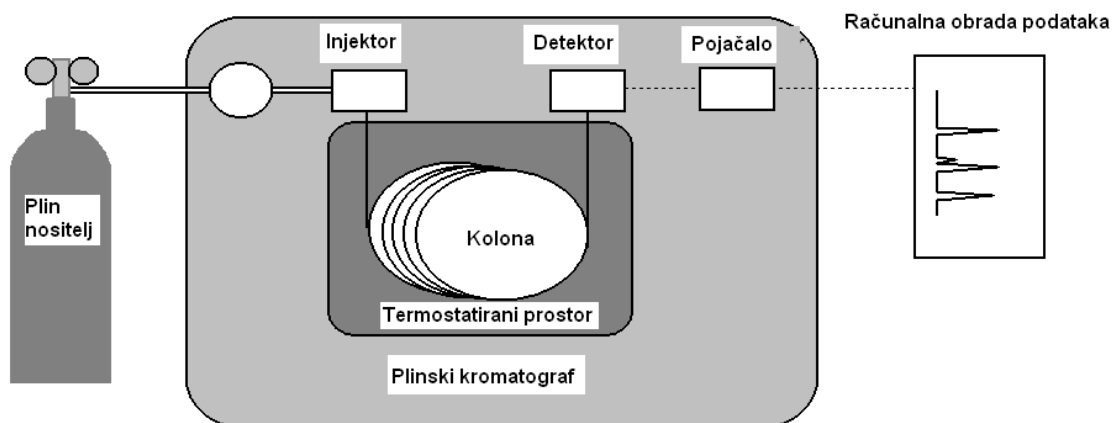


**Slika 21.** Tankoslojna kromatografija<sup>16</sup>

Ukoliko odijeljene komponente nisu obojene, mogu se vizualizirati nerazarajućim i/ili razarajućim tehnikama. Nerazarajuće tehnike su detekcija ultraljubičastim svjetlom te reverzibilna adicija joda. U razarajuće tehnike spada prskanje reagensom koji oboji spojeve ili koncentriranom sulfatnom kiselinom uslijed čega spojevi nakon zagrijavanja pougljene i postaju vidljivi.<sup>15</sup>

### 1.6.2.2. PLINSKA KROMATOGRAFIJA

Plinska kromatografija, (engl. *Gas Chromatography*, GC) je najčešće korištena i najmoćnija tehnika odjeljivanja smjesa hlapljivih spojeva, izvrsna za kvantizaciju, ali nepouzdana za kvalitativno određivanje. Osnovne prednosti ove metode su brzina, jednostavnost i visoka osjetljivost. Uređaj za plinsku kromatografiju (Slika 22.) se sastoji od sljedećih komponenti: injektor, kromatografska kolona u termostatiranom prostoru, detektor i pisar. Uzorak u injektoru brzo i trenutno ispari te ga inertni plin nositelj (He, Ne, Ar) prenosi od injektora preko kromatografske kolone (u kojoj se vrši odjeljivanje) do detektora. Detekcija se može izvršiti mjerenjima koja se zasnivaju na toplinskoj vodljivosti, plamenoj ionizaciji, fotoionizaciji, električnoj vodljivosti, spektrometriji masa, radioaktivnosti i dr.<sup>17</sup> Plinska kromatografija zahvaljujući svojoj visokoj osjetljivosti omogućava razdvajanje vrlo malih koncentracija smjese. Ovom se tehnikom može odvajati veliki broj tvari, uključujući širok raspon njihovih vrelišta.



*Slika 22. Shema plinskog kromatografa<sup>18</sup>*

### 1.6.2.2.1. PLAMENOIONIZACIJSKI DETEKTOR

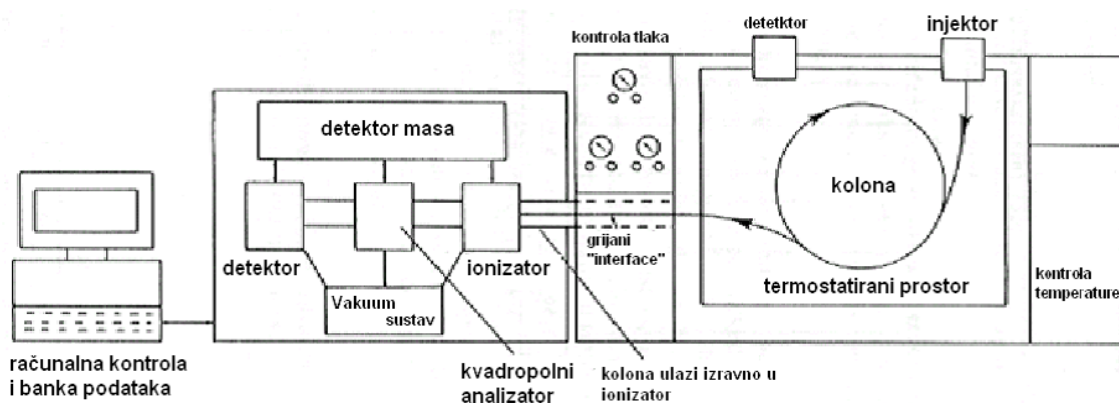
Plamenoionizacijski detektor (engl. *Flame Ionisation Detector*, FID) je najčešće korišteni detektor u plinskoj kromatografiji, prikladan za analizu različitih ugljikovodika, hlapljivih organskih spojeva te organskih tvari koje sadrže ugljikovodike. Može se koristiti i za specifičnije komponente uz prisustvo dodatnih konfiguracija. FID se temelji na formiranju iona plina iz organskih molekula koje izgaraju u plamenu vodika i zraka. Stabilan je prema promjenama u protoku i temperaturi, ima veliko područje linearnosti odziva, osjetljiv je na sve organske spojeve, jednostavan je za rukovanje i brzog je odziva. Jedini nedostatak ovog instrumenta je taj da troši uzorak. GC-FID upotrebljava inertni plin nositelj (pokretna faza) kako bi se uzorak prenio iz injektora, zatim kroz kolonu, u kojoj se vrši odjeljivanje smjese, do FID detektora. Kao nosivi plinovi najčešće se koriste helij ili dušik. Nečistoće ugljikovodika, vlažnost i kisik proizvode veće smetnje bazne linije koje negativno utječu na granicu detekcije. Zbog toga se navedene nečistoće u plinovima detektora trebaju svesti na najmanju moguću razinu. Svi kromatografski postupci uključujući i plinsku kromatografiju su relativne metode. Zato je za umjeravanje uzorka i provjeru linearnosti potrebna kalibracija sa standardnom smjesom.<sup>17,19</sup>



## 1.6.2.2.2. MASENI SPEKTROMETAR KAO DETEKTOR

Plinska kromatografija (GC) i masena spektrometrija (MS) su tehnike koje izvršno nadopunjuju jedna drugu dajući maksimum podataka korištenjem minimalne količine uzorka. Spektrometar masa, sa izvanrednim sposobnostima kvalitativnog određivanja, uklanja nedostatak plinske kromatografije, zbog čega ovakav vezani sustav pruža velike mogućnosti u određivanju sastojaka složenih smjesa. Ove dvije tehnike su komplementarne, a njihovom kombinacijom se može postići osjetljivost tehnike u redu pikogramskih i femtogramskih količina tvari (1 pikogram= $10^{-12}$ g; 1 femtogram= $10^{-15}$ g). Važan čimbenik u radu ovog vezanog sustava je brzina snimanja spektara masa, budući odijeljene komponente ulaze u detektor masa jedna za drugom. Četveropolni analizatori u spektrometru masa omogućuju brzo snimanje spektara (nekoliko milisekundi) te prate spojeve na izlazu iz kromatografske kolone.<sup>16</sup>

U kolektoru nastaje elektronski signal koji se prije zabilježavanja pojačava, a podaci odlaze u računalo koje skuplja snimke masenih spektara tijekom cijelog kromatografskog procesa.



*Slika 23. Shematizacija vezanog sustava GC-MS<sup>17</sup>*

Karakteristični podaci GC-MS analize za izolirane sastojke iz kromatografske kolone su njegovo vrijeme zadržavanja i površina pika koja je proporcionalna količini sastojka, te maseni spektar pojedinog sastojka. Dobiveni maseni spektar se uspoređuje sa masenim spektrom dotičnog spoja koji se nalazi u Wileyevoj banci masenih spektara.<sup>14</sup>

## 2. EKSPERIMENTALNI DIO

Diplomski rad se zasniva na klasičnoj organskoj sintezi *p*-nitrofenil izotiocijanata i 1,4-diizotiocijanatobenzena te mikrovalnoj sintezi navedenih spojeva pri različitim snagama mikrovalnog zračenja. Sintetizirani spojevi su potom identificirani korištenjem: tankoslojne kromatografije, FTIR-a, GC-MS-a i GC-FID-a.

### 2.1. KEMIKALIJE I APARATURA

Korištena aparatura:

- Analitička vaga-RADWAG
- Magnetska miješalica-IKA
- Rotacijski vakum uparivač (RVU)-Heidolph Laborota 4000 Efficient
- Mikrovalni reaktor-ETHOS X, Milestone Srl, Italija
- FTIR spektrofotometar - IRAffinity-1, Shimadzu
- GC-FID,7890A, Agilent, Santa Clara, CA, SAD
- GC-MS, Varian Inc., Lake Forest, CA, USA.

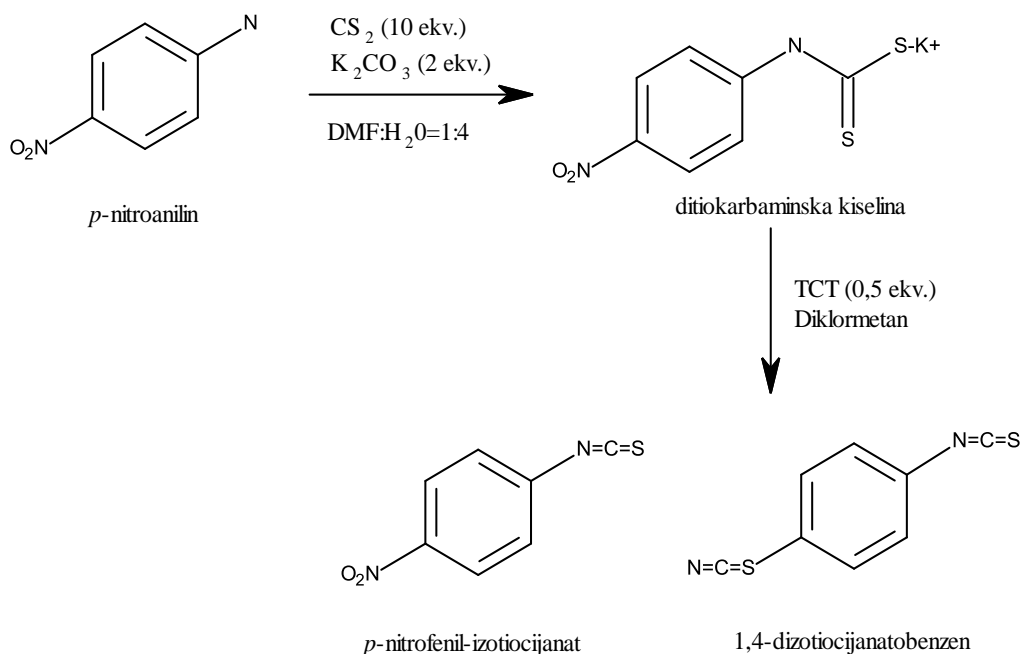
Tablica 2. Popis korištenih kemikalija

Kemijski spoj	Molarna masa (g/mol)	Uzeto grama (g)	Gustoća (g/cm <sup>3</sup> )	T <sub>t</sub> (°C)	T <sub>v</sub> (°C)	Topljivost
Ugljikov disulfid	76,14	38,07		-111,61	46,24	Topljiv u alkoholu, eteru, benzenu, ulju.
Diklormetan	84,93		1,33	-96,7	40	Otapa masti i ulja, smole, kaučuk. Ne miješa se s vodom.

Natrijev sulfat	142,04	5,0	2,66	884	1,429	Topljiv u vodi.
Dietileter	92,14		0,7134	-116,3	34,6	Otapa masti, smole, voskove, ulja i gume. Ne miješa se s vodom.
Kalijev karbonat	138,20	13,82	2,43	891		Dobro i lako topljiv u vodi.
Cijanurinska kiselina (2,4,6-triklor-1,3,5-tiazin) (TCT)	184,40	4,6	1,32	154	192	Topljiv u organskim otapalima. Hidrolizira u vodi.
Natrijev hidroksid	39,99	11,99	2,13	318	1,388	Topljiv u vodi, metanolu i etanolu.
Heksan	85,17		0,659	-95	68,7	Nije topljiv u vodi, dok je u alkoholu, eteru i benzenu dobro topljiv.
Petroleter	82,2		0,640-0,660	-73	40-70	Nije topljiv u vodi, topljiv u etanolu.
4-Nitroanilin	138,14	6,9	1,437	146-149	332	Topljivost u vodi: 0,8 mg/ml (18,5°C)
4-Nitrofenil ITC	180,18		1,33	110-112	137-138	Topljivost u vodi: 44,5 mg/L (25°C), dobro topljiv u toluenu.
1,4-Diizotocijanat obenzen	192,26		1,3675	129-131		Topljiv u kloroformu, acetonu, alkoholu.
N,N-Dimetilformamid (DMF)	73,10		0,948		152-156	Miješa se s vodom i kloroformom.

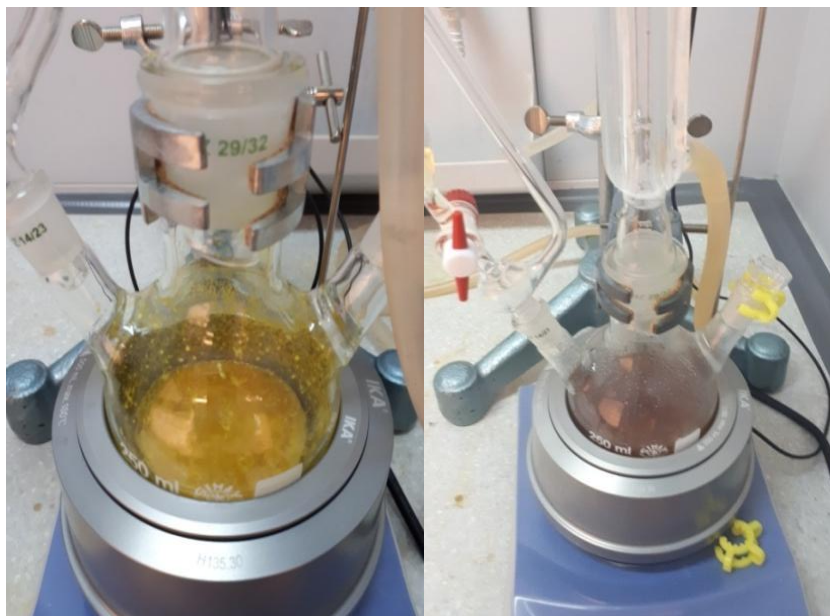
## 2.2. KLASIČNA SINTEZA *p*-NITROFENIL-IZOTIOCIJANATA

Jednadžba kemijske reakcije:



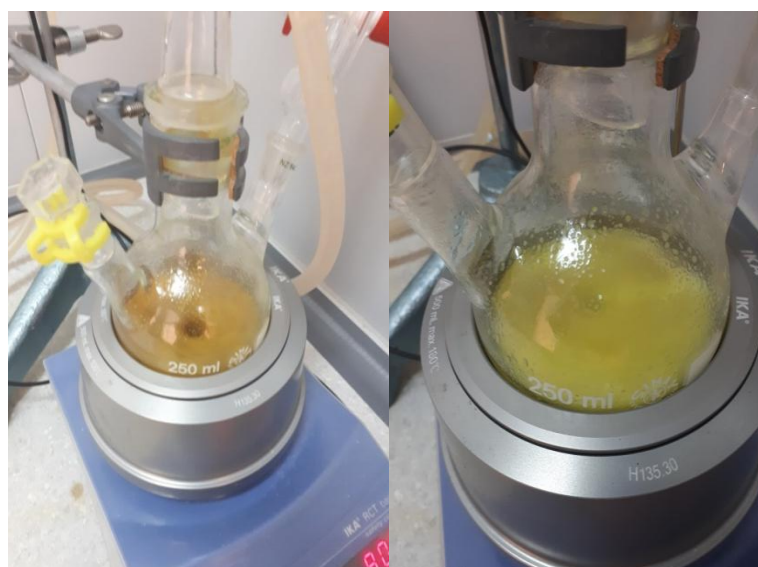
Postupak:

U troglu tikvicu u kojoj se nalazi smjesa ugljikovog disulfida (30,21 mL) i *p*-nitroanilina (6,90 g) lagano je dodavan kalijev karbonat (13,82 g) otopljen u 35 mL destilirane vode i 8,75 mL dimetilformamida (DMF) pri čemu je boja početne smjese narančasta. Dokapavanje se izvodilo kroz iduća 72 sata uz konstantno miješanje reakcijske smjese na temperaturi od 40°C. Dodatkom cijele otopine smjesa mijenja boju iz narančaste u smeđu, a istekom 72 sata ona postaje tamnocrvena.



*Slika 24. Promjena boje reakcijske smjese dodatkom otopine  $K_2CO_3$ , destilirane vode i DMF-a*

Reakcijska smjesa je potom ohlađena na  $0^\circ\text{C}$  te je kao takva održavana kroz iduća 4 sata dok se postupno dodavala otopina TCT-a (4,61 g) i diklormetana (37,5 mL). Pritom je došlo do promjene boje iz tamnocrvene u narančastu, a dodatkom cijele količine ona postaje limun žute boje.



*Slika 25. Promjena boje nakon dodatka TCT-a i DCM-a*

Slijedi zaluživanje 6M NaOH do pH>11 te miješanje još pola sata, usljed čega smjesa postaje narančaste boje. Osim toga uočava se nastali smeđi talog na dnu tikvice te narančasti talog po njenim stijenkama. Oba su taloga odvojena u različite bočice, dok se s tekućim dijelom izvršila ekstrakcija diklormetanom (2x5 mL).



*Slika 26. Boja reakcijske smjese nakon zaluživanja 6M NaOH*

Organski sloj se odvojio i osušio pomoću bezvodnog natrijevog sulfata. Svi uzorci su testirani preko tankoslojne kromatografije s otapalom heksan/dietileter u omjeru 8:2. *p*-Nitroanilin je otopljen u apsolutnom etanolu (1), smeđi talog se nije otopio ni u apsolutnom etanolu, diklormetanu ni heksanu što znači da nije organska tvar stoga nije ni korišten u daljnjoj analizi (2), a narančasti talog je otopljen u diklormetanu (3). Korišteni su još organski (4) i vodeni sloj (5). Nakon razvijanja i vizualizacije kromatografske pločice pod UV svjetlom uočava se da još uvijek ima prisutnog supstrata, a traženi produkt se nalazi u organskom dijelu.



*Slika 27. Tankoslojna kromatografija nakon klasične sinteze*

Organski dio se upario do suha pomoću rotacijskog vakuum uparivača kako bi se uklonio sav diklormetan, a masa uzorka nakon uparavanja iznosila je 0,87 g.

## 2.3. MIKROVALNA SINTEZA *p*-NITROFENIL-IZOTIOCIJANATA

### 2.3.1. MIKROVALNA SINTEZA *p*-NITROFENIL-ITC PRI 37 W

Postupak:

U dvogrloj tikvici za mikrovalnu sintezu pomiješan je studentski *p*-nitroanilin (6,9 g) i CS<sub>2</sub> (30,21 mL). Tikvica s hladilom postavljena je na magnetsku miješalicu, a lijevkom za dokapavanje dodavala se otopina kalijevog karbonata (13,82 g), destilirane vode (35 mL) i DMF-a (8,75 mL). Reakcijska smjesa se miješala idućih pola sata na temperaturi od 40°C, a početna boja reakcijske smjese je tamnožuta. Dodatkom cijele količine K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> otopljenog u vodi i DMF-u dolazi do promjene boje iz žute u narančastu.



*Slika 28. Promjena boje reakcijske smjese dodatkom K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> otopljenog u vodi i DMF-u*

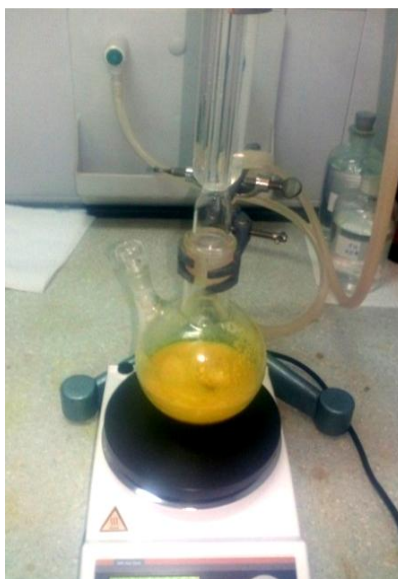


Tikvica s reakcijskom smjesom je postavljena u mikrovalnu pećnicu uz optimizaciju reakcijskih uvjeta koji uključuju vrijeme, temperaturu i snagu MW zračenja. Eksperiment se provodio u trajanju od 2 sata uz zadanu temperaturu od 40°C i snagu mikrovalnog zračenja od 100 W. Temperatura od 40°C je postignuta nekoliko minuta prije isteka vremena, dok je snaga MW zračenja nakon 2 sata iznosila 37 W.



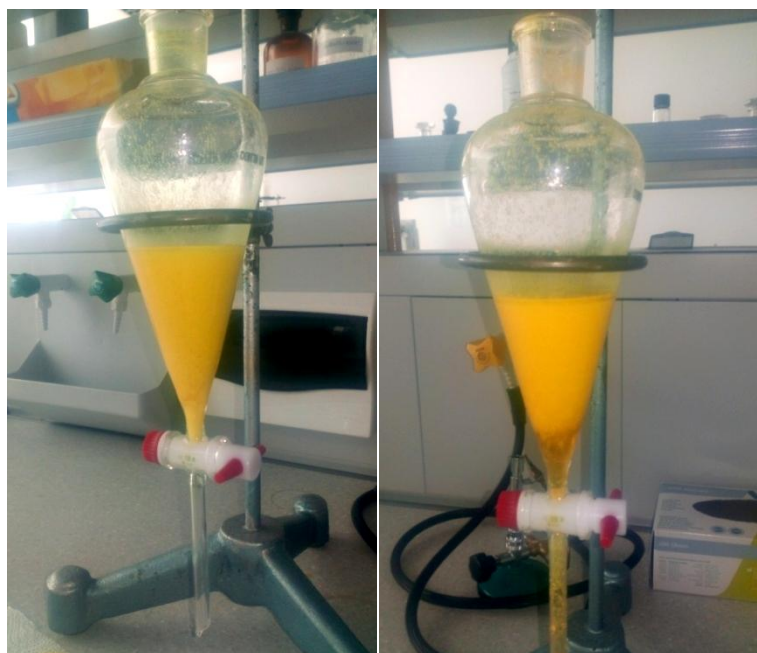
*Slika 29. Uzorak nakon izlaganja mikrovalovima*

Smjesa je zatim miješana pola sata i ohlađena na 0°C te se takvom održavala iduća 4 sata. U tom se vremenu postupno dodavala otopina TCT-a (4,61 g) i diklormetana (37,5 mL), a dodatkom cijele količine reakcijska smjesa postaje limun žuta.



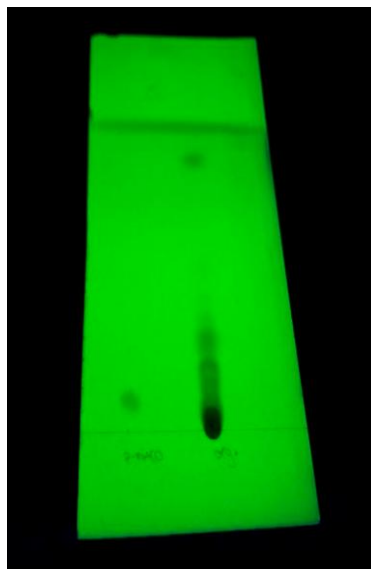
*Slika 30. Reakcijska smjesa nakon dodatka TCT i DCM*

Slijedi zaluzivanje 6M NaOH do  $\text{pH} > 11$  i miješanje još pola sata pri čemu je dobivena gusta žuta smjesa. Napravljena je ekstrakcija diklormetanom (2x10 mL), ali zbog velike količine taloga ne može se jasno uočiti granica faza. Dio organske faze je ispušten, a ostatku u lijevku je dodano 5 mL destilirane vode kako bi se pospješilo odjeljivanje. Diklormetanski sloj postaje uočljiv u donjem dijelu lijevka, iznad kojeg se nalazi gusti talog.



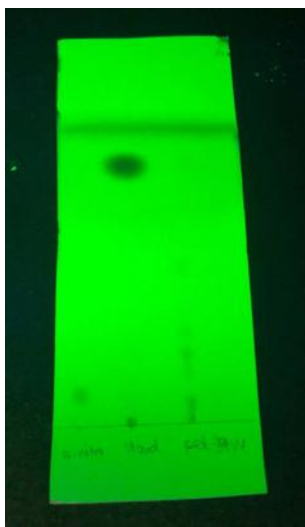
*Slika 31. Ekstrakcija diklormetanom*

Nakon odjeljivanja faza napravljena je TLC pločica tako da je na startnu liniju nanjena kap supstrata otopljenog u apsolutnom etanolu i kap organskefaze. Kao mobilna faza korištena je smjesa otapala heksan:dietil eter (8:2).



*Slika 32. TLC pločica pod UV svijetlom (mikrovalna sinteza pri 37W)*

Vizualizacijom se uočava da nije izreagirala sva količina supstrata, a u organskoj fazi osim sintetiziranog spoja postoje i nekakve primjese. Diklormetan je uklonjen pomoću rotacijskog vakuum uparivača, amasa uzorka dobivenog nakon uparavanja iznosila je 1,32 g. S ciljem pročišćavanja uzorka dodano je 10 mL petroletera te je napravljena nova TLC pločica. Na startnu liniju su točkasto nanjeni: *p*-nitroanilin otopljen u apsolutnom etanolu, komercijalni *p*-nitrofenil-izotiocijanat otopljen u diklormetanu te uzorak s petroleterom, dok je mobilna faza ista kao u prethodnom slučaju.



*Slika 33. TLC pločica nakon pročišćavanja uzorka*

### **2.3.2. MIKROVALNA SINTEZA *p*-NITROFENIL-ITC PRI 40 W**

Postupak:

Reakcijska smjesa koja se podvrgnula mikrovalnom zračenju pripremljena je na isti način kao kod prethodno opisane sinteze. Nakon što se otopini supstrata i CS<sub>2</sub> dodao K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> otopljen u destiliranoj vodi i DMF-u pristupilo se mikrovalnom procesu na način da je reakcijsko vrijeme podešeno na 2 sata, a snaga MW zračenja na 50 W bez zadane temperature. Budući je temperatura vrenja ugljikovog disulfida 46°C trebalo se paziti da temperatura u mikrovalnom reaktoru ne dosegne navedenu vrijednost. Kad se uvidjelo da će pri zadanoj snazi zračenja od 50 W temperatura porasti iznad dopuštene vrijednosti zadana je radna T od 44°C međutim i tada je došlo do njenog porasta stoga se rješenje potražilo u smanjivanju wata na 40 W pri čemu je radna temperatura iznosila 45°C. Boja reakcijske smjese nakon izlaganja mikrovalovima je tamnosmeđa.



*Slika 34. Reakcijska smjesa nakon MW zračenja*

Sinteza je nastavljena miješanjem pola sata, zatim hlađenjem na 0°C što se održavalo iduća 4 sata uz lagano dodavanje otopine TCT-a i diklormetana. Slijedi zaluživanje 6M NaOH i miješanje još pola sata pri čemu smjesa postaje narančasta s velikom količinom taloga.



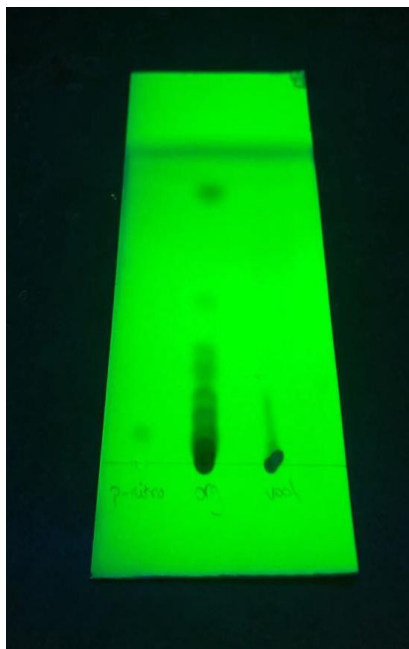
*Slika 35. Dodatak 6M NaOH do pH>11*

Ekstrakcija diklormetanom je identična kao kod prethodne sinteze. Ne može se jasno uočiti granica faza stoga je dio organske faze ispušten dok je ostatku u lijevku dodano 5 mL destilirane vode kako bi se pospješilo odjeljivanje. Organski i vodeni sloj su potom analizirani tankoslojnom kromatografijom.



*Slika 36. Ekstrakcija uzorka (mikrovalna sinteza pri 40 W)*

Na startnu liniju su točkasto nanoseni *p*-nitroanilin otopljen u apsolutnom etanolu, organska i vodena faza, dok je mobilna faza ista kao kod prethodnih procesa.



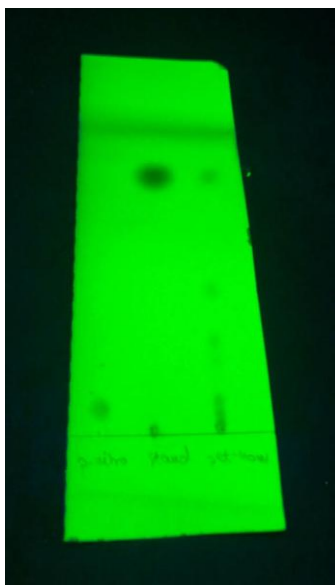
*Slika 37. TLC pločica napravljena nakon mikrovalne sinteze pri 40 W*

Može se zaključiti da se sintetizirani spoj nalazi u organskoj fazi, ali je uzorak poprilično onečišćen stoga je potrebno upariti diklormetan i dodati petroleter s ciljem pročišćavanja uzorka. Masa uzorka nakon uparavanja iznosila je 1,54 g.



*Slika 38. Uparavanje diklormetana i dodatak petroletera*

Napravljena je nova TLC pločica, a vizualizacijom se potvrđuje prisutnost sintetiziranog spoja u petroleterskoj fazi.



*Slika 39. TLC uzorka u petroleteru*

## 2.4. ANALIZA SINTETIZIRANIH SPOJEVA

### 2.4.1. ANALIZA SPOJEVA FTIR-om

Izotiocijanati dobiveni klasičnom i mikrovalnom sintezom analizirani su spektrometrom s Fourierovom transformacijom (IRAffinity-1, Shimadzu). Uzorci u tekućem stanju su razrijeđeni diklormetanom te je mala količina uzorka nanesa na pločicu od kalcijeva fluorida. Zatim je na sloj otopine postavljena druga CaF<sub>2</sub> pločica te je uzorak razmazan u obliku tankog filma između diskova kalcijeva fluorida. Snimljeni su spektri analiziranih uzoraka, a opseg valnih brojeva je 4000-400 cm<sup>-1</sup>.



*Slika 40. Spektrometar s Fourierovom transformacijom*

### 2.4.2. GC-FID ANALIZA

Sintetizirani spojevi i komercijalno dostupni standardi su analizirani GC-FID sustavom 7890A, proizvođača Agilent, Santa Clara, CA, SAD. Temperatura injektora iznosila je 250°C, dok je injekcijski volumen bio 1 µL. Temperatura kolone programirana je na sljedeći način: 3 minute pri 60°C, slijedi zagrijavanje od 60 do 150°C brzinom 7°C/min, gdje se zadržava izotermno u trajanju od 1 minute, nakon čega slijedi



zagrijavanje brzinom 50°C/min do 250°C gdje se zadržava 5 minuta izotermno. Trajanje analize iznosilo je 24 minute.



*Slika 41. Uređaj za plinsku kromatografiju s plamenoionizacijskim detektorom*

### **2.4.3. GC-MS ANALIZA**

Za kvalitativnu i kvantitativnu identifikaciju sintetiziranih produkata korišten je plinski kromatograf proizvođača Varian Inc., Lake Forest, CA, USA model 3900 u kombinaciji sa spektrometrom masa proizvođača Varian Inc., model 2100 T.



*Slika 42. Korištena GC-MS instrumentacija*

Uzorci su analizirani na nepolarnoj koloni VF-5MS dimenzija: 30 m dužine, unutarnjeg promjera 0,25 mm i debljine sloja stacionarne faze 0,25 $\mu$ m. Temperaturni program za kolonu VF-5MS je postavljen na način da je početna temperatura bila 60°C, izotermalno postavljena 3 min, nakon čega je povećavana do 246°C brzinom 3°C/min i nakon toga postavljena izotermalno 25min. Ostali kromatografski uvjeti su: plin nositelj je helij, brzina protoka je 1 mL/min, temperatura injektora je postavljena na 250°C čime je omogućeno trenutačno isparavanje uzorka, volumen injektiranog uzorka iznosi 1  $\mu$ L, a omjer cijepanja je 1:20. Uvjeti MS su sljedeći: energija ionizacije uzorka u masenom spektrometru iznosi 70 eV, temperatura izvora iona je postavljena na 200°C, a područje skeniranja obuhvaća 40-350 masenih jedinica.<sup>16</sup>

Identifikacija nepoznatih spojeva napravljena je usporedbom dobivenih masenih spektara sa spektrima masa iz komercijalne biblioteke (Wiley MS library) te usporedbom sa spektrima masa dostupnih u literaturi.

### 3. REZULTATI I RASPRAVA

Izotiocijanati su veoma reaktivni spojevi koji nastaju hidrolizom relativno neaktivnih glukozinolata. Karakteristika ove grupe spojeva je  $N=C=S$  funkcijska skupina, dok ostatak molekule ovisi o strukturi izvornog spoja. Biosintetski putevi nastanka izotiocijanata su poznati, ali zbog široke primjene i mogućeg antikancerogenog djelovanja dolazi do sinteze sve većeg broja sintetskih izotiocijanata.

U okviru ovog rada sintetizirani su *p*-nitrofenil-izotiocijanati te 1,4-diizotiocijanatobenzen, dehidrosulfurizacijom ditiokarbaminske kiseline koja nastaje reakcijom primarnog amina s ugljikovim disulfidom tijekom 72 sata. Sinteza *p*-nitrofenil-izotiocijanata iz ditiokarbaminske soli procesom eliminacije s cijanurinskom kiselinom (TCT) kao desulfurizacijskim reagensom predstavlja jednostavan način dobivanja izotiocijanata.

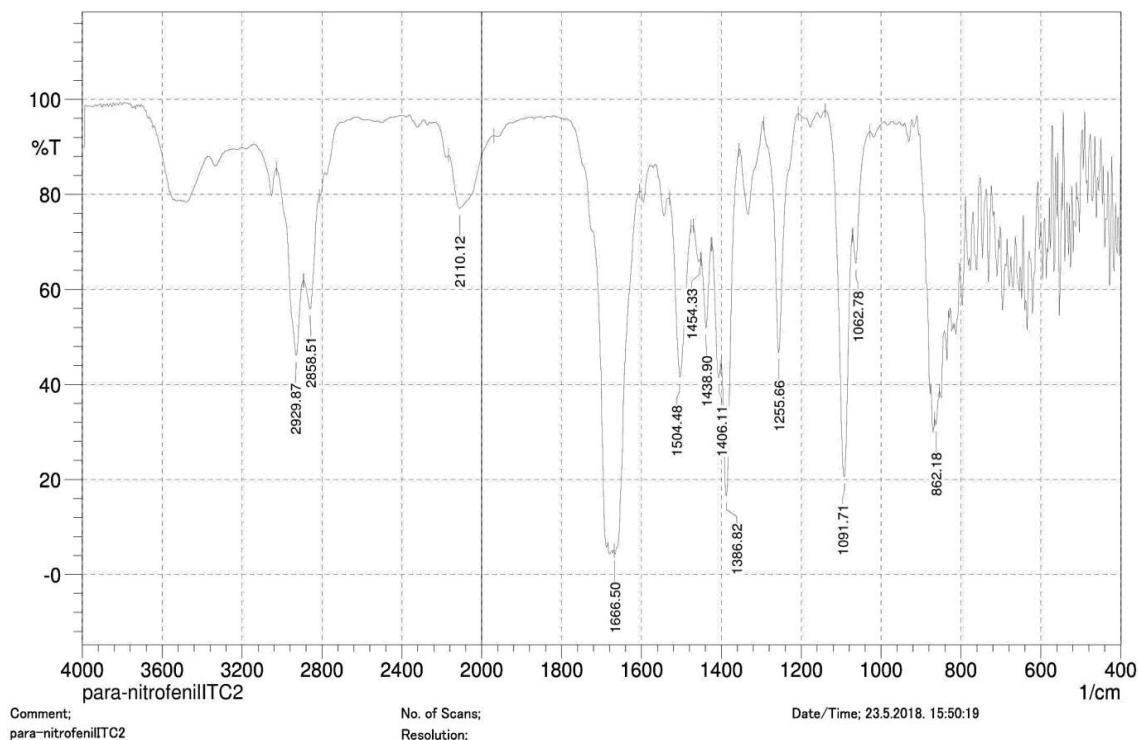
Osim klasične organske sinteze provedena je i mikrovalna sinteza spomenutih spojeva pri različitim snagama mikrovalnog zračenja kako bi se korištene metode usporedile s obzirom na njihovo trajanje, prinos i primijenjene reakcijske uvjete. Druga metoda sinteze *p*-nitrofenil-izotiocijanata vršila se u mikrovalnom reaktoru primjenjujući različite snage mikrovalnog zračenja (37 W i 40W). Prilikom klasične sinteze pod refluksom, temperatura reakcijske smjese održavana je na 40°C. Stoga se kod namještanja parametara mikrovalne pećnice, temperatura ograničila na istu vrijednost. Snaga mikrovalnog zračenja koja se pri tome postigla iznosila je 37 W tijekom dva sata. Sljedeći korak je uključivao podešavanje snage mikrovalnog zračenja bez zadavanja temperature tijekom dva sata. Pri tome, pratilo se da temperatura ne prijeđe 45°C budući je temperatura vrenja  $CS_2$  46°C, tako da je prvotno primijenjenih 50 W smanjeno na 40 W. Postupak nakon dodavanja TCT-a je identičan kao kod klasične sinteze.

Tijek svih reakcija praćen je tankoslojnom kromatografijom, uspoređujući  $R_F$  vrijednosti supstrata i dostupnih standarda s onima sintetiziranih spojeva.

TLC pločica na koju je nanesen supstrat i produkt nakon klasične metode sinteze, za organski sloj dobiven ekstrakcijom, pokazala je prisustvo nekoliko mrlja od kojih ona pri  $R_F \approx 0,90$  odgovara ciljanom produktu, *p*-nitrofenil-izotiocijanatu, a ona pri  $R_F \approx 0,05$  neizreagiranom *p*-nitroanilinu. TLC pločice uzoraka dobivenih mikrovalnom sintezom, napravljene nakon ekstrakcije diklormetanom pokazale su mrlje istih  $R_F$  vrijednosti što je značilo da je reakcija išla u željenom smjeru. Budući su pločice u oba slučaja pokazivale prisustvo onečišćenja (Slike 32. i 37.), pristupilo se pročišćavanju uzoraka petroleterom nakon čega je ponovljena tankoslojna kromatografija (Slike 33. i 39.). Na novim pločicama nisu uočene mrlje očekivane  $R_F$  vrijednosti produkta, što vodi zaključku da je produkt vjerojatno djelomično topljiv u petroleteru i rezultiralo je vidljivim gubitkom (iako je u slučaju sinteze pri 40 W još uvijek prisutna slabo vidljiva mrlja).

S ciljem identifikacije i karakterizacije dobivenih uzoraka korištene su spektroskopske i kromatografske tehnike.

1. Svi su uzorci snimljeni preko FTIR uređaja. Budući je uzorak dobiven klasičnom sintezom sadržavao malu količinu tekućine i taloga, prvo se pristupilo ispitivanju tekućeg dijela. Kalcijev fluorid poslužio je kao transparentni materijal, a dobiveni spektar je bio identičan spektru čistog dimetilformamida stoga je zaključeno da se radi o zaostalom dimetilformamidu iz reakcije. Talog iz uzorka je otopljen u diklormetanu te je snimljen novi spektar. Analizom klasično sintetiziranog *p*-nitrofenil izotiocijanata na FTIR-u dobiven je odgovarajući spektar (Slika 43.).



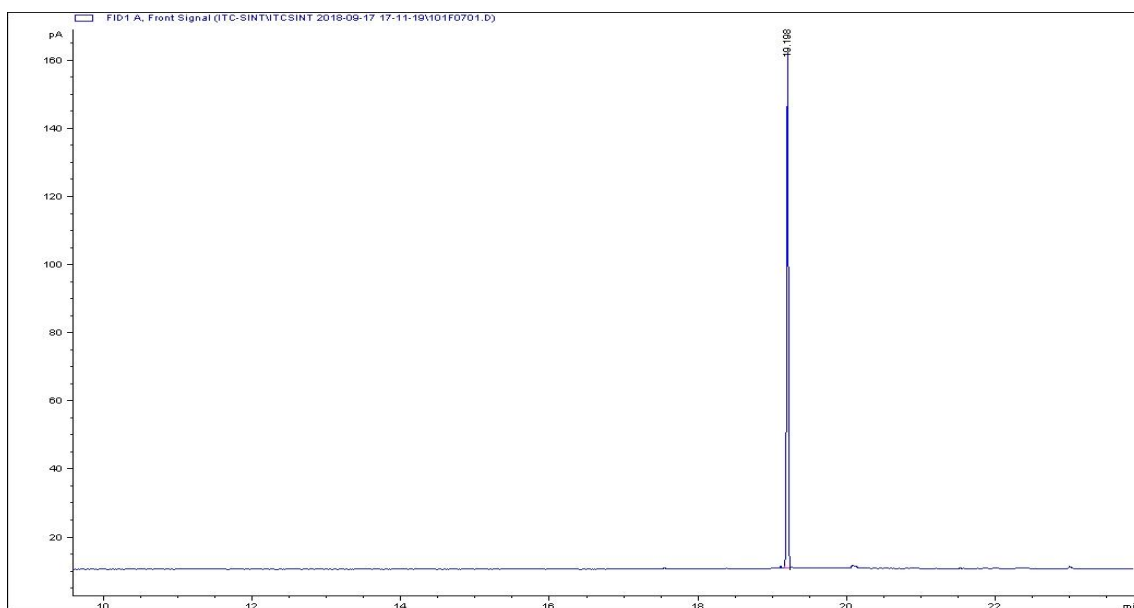
*Slika 43. IR spektar uzorka dobivenog klasičnom sintezom*

Infracrveni spektar pruža informacije o vezama unutar molekule na temelju karakterističnih vrpca za određivanje funkcijskih skupina. U ovom slučaju ciljano se tražila vrpca koja karakterizira prisutnost izotiocijanatne skupine ( $N=C=S$ ). Može se pretpostaviti da se ovdje radi o vrci pri valnom broju od  $2110,12 \text{ cm}^{-1}$ , budući se ta vrijednost nalazi u području koje je eksperimentalno određeno za različite čiste izotiocijanate. Nadalje, u spektrima se uočavaju i druge vrpce koje se odnose na različite veze unutar molekule sintetiziranog spoja. Vidljivo je  $C=C$  istežanje benzenskog prstena u području  $1400\text{-}1600 \text{ cm}^{-1}$ ,  $C-C$  istežanje u aromatskom prstenu pri valnim brojevima  $1600\text{-}1585 \text{ cm}^{-1}$ , pikovi iznad  $3000 \text{ cm}^{-1}$  ukazuju na  $C \text{ sp}^2\text{-H}$  istežanje, dok se  $N=O$  istežanje (simetrično i asimetrično) može pripisati vrcama pri  $1386,82 \text{ cm}^{-1}$  i  $1504,48 \text{ cm}^{-1}$ .

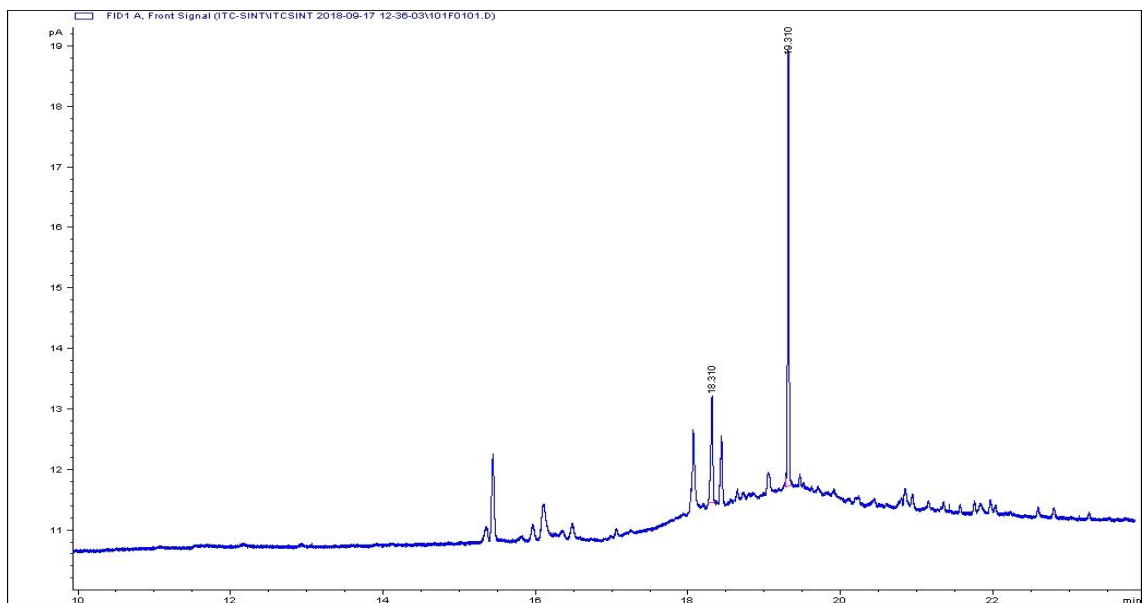
Kako su FTIR spektri produkata mikrovalne sinteze snimljeni nakon pročišćavanja petroleterom, a TLC kromatografijom je utvrđen veliki gubitak produkta, u spektru nisu vidljive apsorpcijske vrpce koje potvrđuju  $N=C=S$  funkcijsku skupinu.

## 2. GC-FID analiza

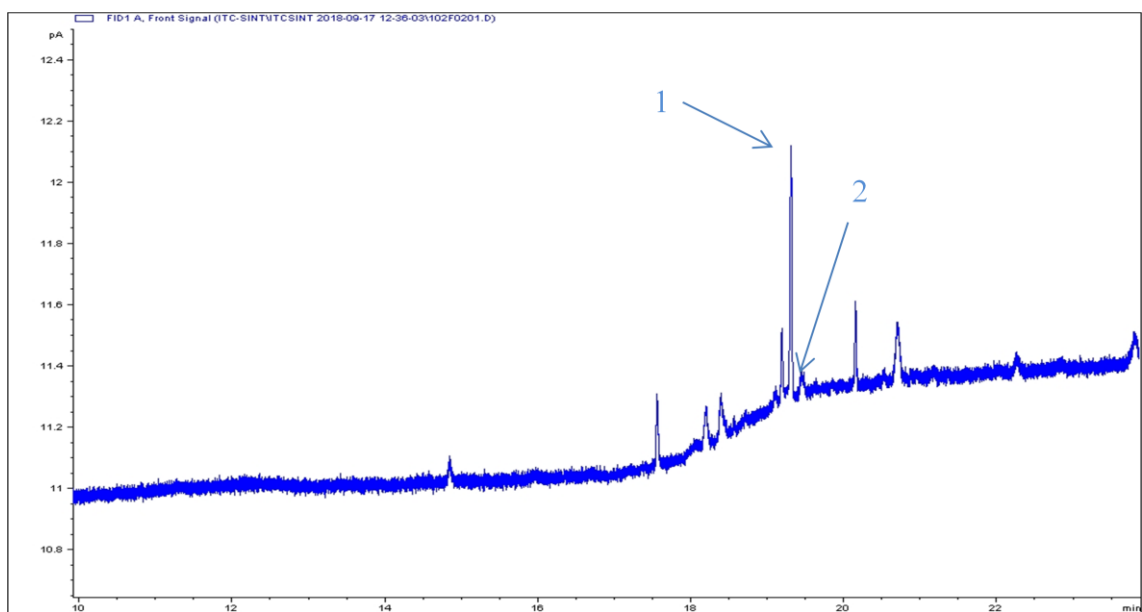
Uspješnost provedenih sinteza ispitana je uz pomoć GC-FID analize na način da su snimljeni kromatogrami ukupne ionske struje za komercijalno dostupne *p*-nitroanilin i *p*-nitrofenil-izotiocijanat, a potom za produkte dobivene klasičnom i mikrovalnom sintezom. Kromatogram na Slici 44., koji odgovara standardu *p*-nitroanilina, pokazuje jedan pik čije je vrijeme zadržavanja 19,2 min, dok se na kromatogramu dobivenom za standard *p*-nitrofenil-izotiocijanata uočava pik s vremenom zadržavanja od 19,3 min (Slika 45.). Uspoređujući kromatograme produkata klasične i mikrovalovima potpomognute sinteze s onima dostupnih standarda može se zaključiti da kod obje metode postoji prisutnost neizreagiranog supstrata što je prethodno pokazano i TLC pločicama. Također je dokazana prisutnost sintetiziranog *p*-nitrofenil-izotiocijanata što potvrđuju pikovi s vremenom zadržavanja  $\approx 19,3$  min.



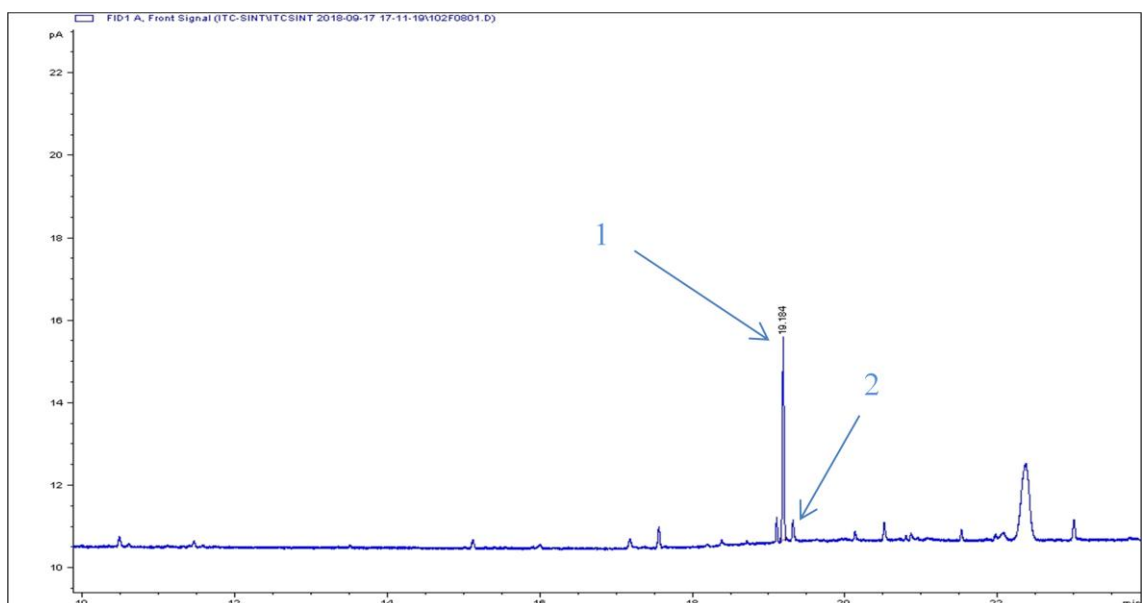
**Slika 44.** Kromatogram ukupne ionske struje za standard *p*-nitroanilina



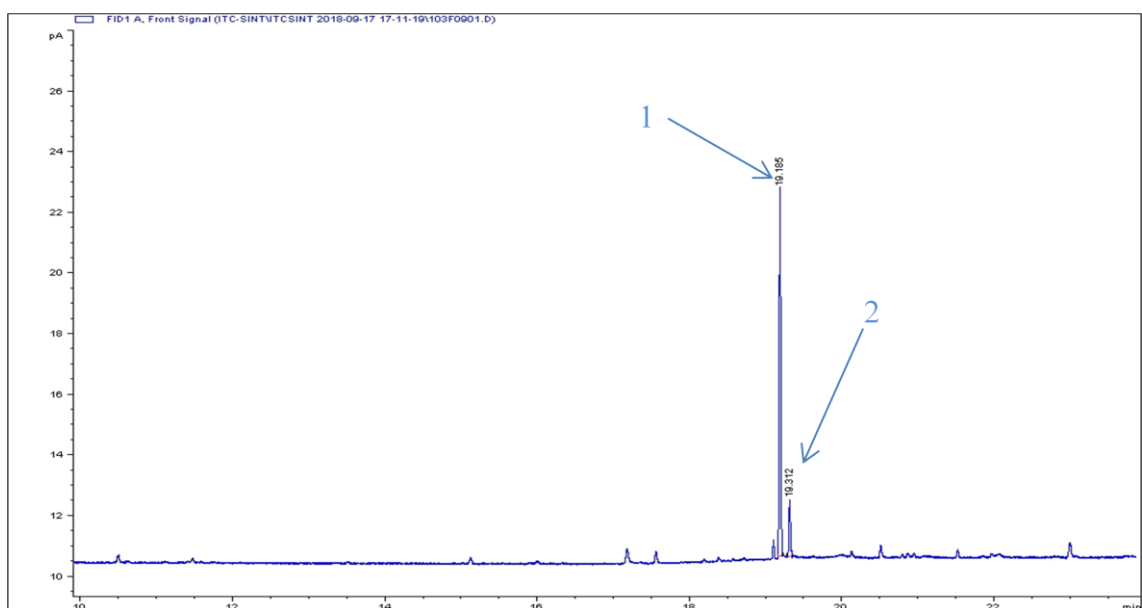
*Slika 45. Kromatogram ukupne ionske struje za standard p-nitrofenil-izotiocijanata*



*Slika 46. Kromatogram ukupne ionske struje za p-nitrofenil-izotiocijanat dobiven klasičnom sintezom (1-supstrat, 2-sintetizirani spoj)*



**Slika 47.** Kromatogram ukupne ionske struje za *p*-nitrofenil-izotiocijanat dobiven mikrovalnom sintezom pri 37 W (1-supstrat, 2-sintetizirani spoj)

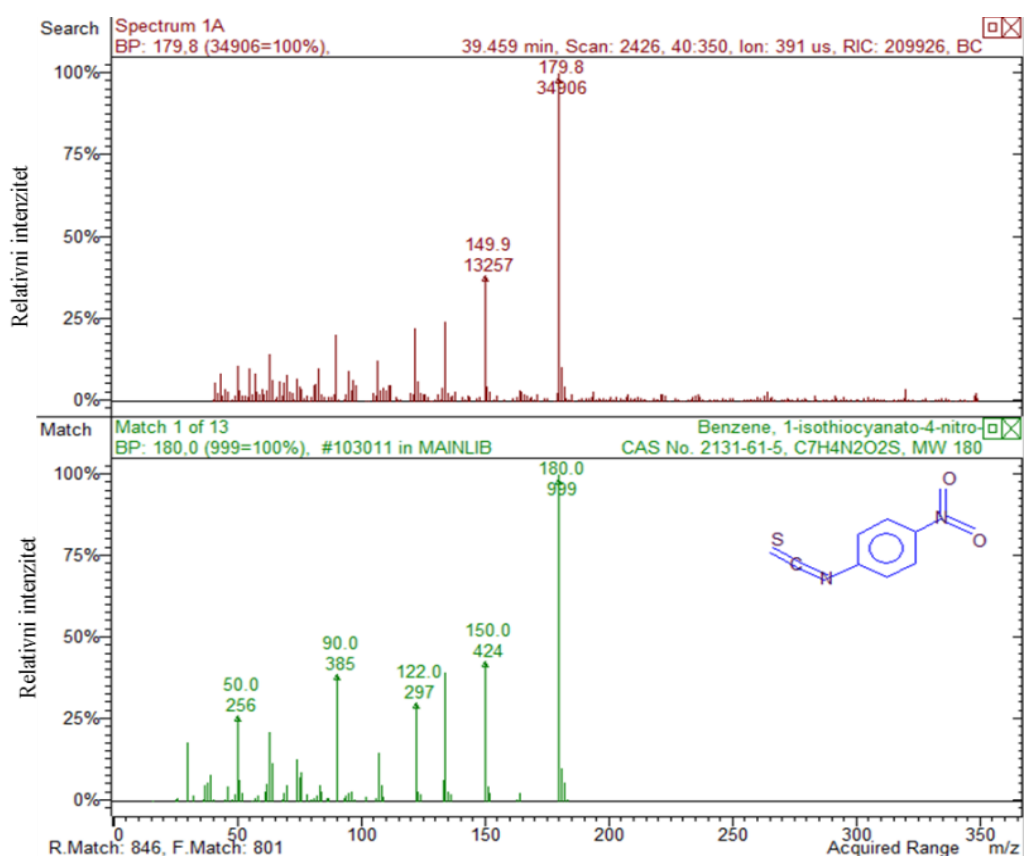


**Slika 48.** Kromatogram ukupne ionske struje za *p*-nitrofenil-izotiocijanat dobiven mikrovalnom sintezom pri 40 W (1-supstrat, 2-sintetizirani spoj)



### 3. GC-MS analiza

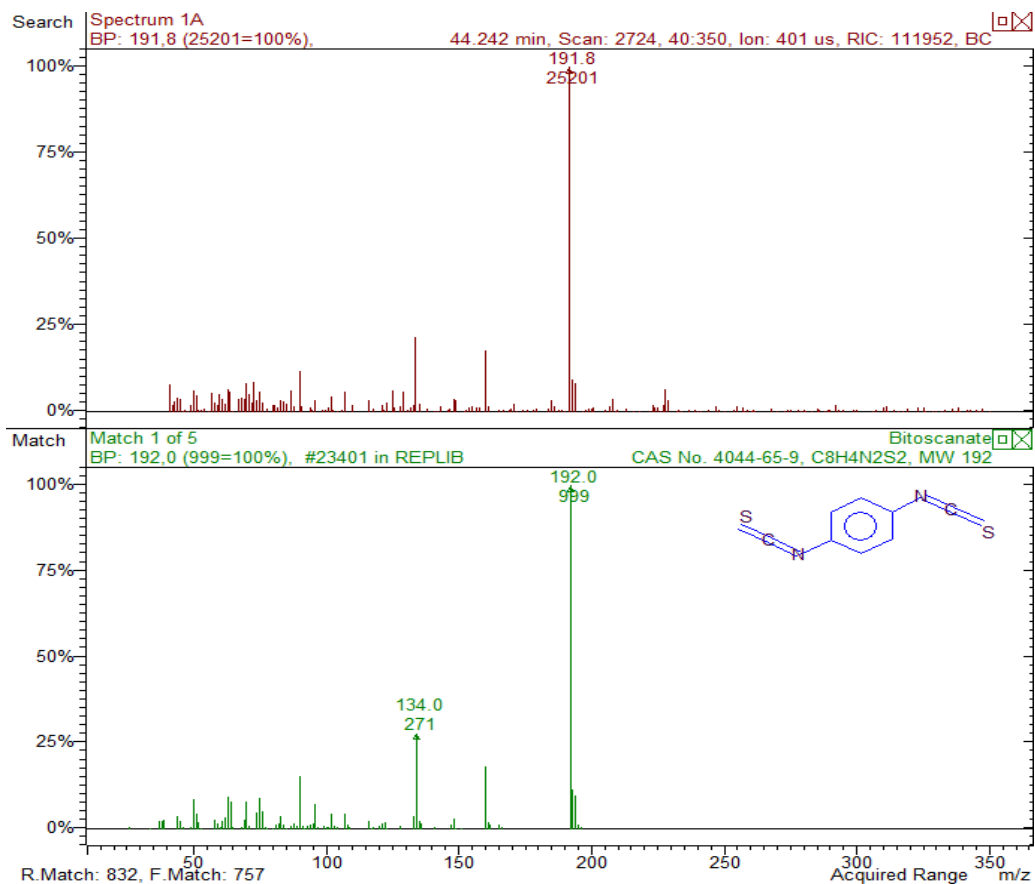
Osim plamenoionizacijskog detektora, korišten je i maseni spektrometar kao detektor na plinskom kromatografu. Pregledom kromatograma klasične sinteze i sinteze pod utjecajem mikrovalnog zračenja, na 39,5 min uočava se pik čije vrijeme zadržavanja odgovara onomu standarda *p*-nitrofenil-izotiocijanata. Maseni spektar spomenutog spoja, uspoređen s onim iz dostupnih baza podataka potvrdio je da se radi o željenom produktu (Slika 49.). Pik  $m/z=180$  (100%) predstavlja molekulski i osnovni ion ovog spoja. Pik  $m/z=134$  odgovara gubitku nitro skupine i nastanku  $[C_6H_5NCS]^+$ .



Slika 49. Maseni spektar *p*-nitrofenil-izotiocijanata.

Zanimljivo je da jedino na kromatogramu produkta dobivenog klasičnom sintezom uočen dodatni pik, na 44 minuti, za kojeg se pregledom masenog spektra zaključilo da se radi o produktu s dvije izotiocijanatne skupine, 1,4-diizotiocijanatobenzenu (Slika 50.). Njegov nastanak je vjerojatno rezultat redukcije supstrata, točnije nitro skupine u amino skupinu ugljikovim disulfidom u vodenoj otopini kalijevog karbonata do nastanka 1,4-diaminobenzena koji se pak reducira do 1,4-diizotiocijanatobenzena.

Ovom spoju odgovara molekularni pik  $m/z=192$  (100%) što je ujedno i osnovni pik u masenom spektru. Dodatni  $m/z=134$  može se objasniti odcjepljenjemjedne izotiocijanatne skupine i nastankom  $[C_6H_5NCS]^+$ .



*Slika 50. Maseni spektar 1,4-dizotiocijanatobenzena.*

Pretpostavlja se da je osnovni razlog zbog kojeg spomenuti spoj nije dobiven sintezom potpomognutom mikrovalovima taj što se primjenom mikrovalne pećnice početni korak reakcije značajno skratio sa 72 na svega 2 sata, u odnosu na klasični pristup sintezi. Može se zaključiti da ovakav vremenski period nije bio dovoljan za redukciju nitro skupine u amino, a potom amino skupine u izotiocijanatnu. Također ne treba zanemariti činjenicu da se dodatkom petroletera izgubila značajna količina uzorka što je moglo dovesti do negativnog rezultata prilikom GC-MS analize.

#### 4. ZAKLJUČAK

- U ovom su radu opisani postupci klasične i mikrovalovima potpomognute sinteze *p*-nitrofenil-izotiocijanata pri različitim snagama mikrovalnog zračenja (37 W i 40 W)
- Postupkom klasične sinteze pod refluksom dobiven je produkt mase 0,87 g za kojeg je spektrometrijskim tehnikama utvrđeno da se radi o ciljanom spoju, *p*-nitrofenil-izotiocijanatu i dodatnom 1,4-diizotiocijanatobenzenu.
- Opisanim postupkom mikrovalne sinteze *p*-nitrofenil-izotiocijanata dobiven je produkt mase 1,32 g za snagu zračenja od 37 W, dok je mikrovalnom sintezom pri 40 W dobiven produkt mase 1,54 g. TLC pločice pokazale su značajno onečišćenje uzoraka, a korištenje petroletera nije bio dobar korak prema pročišćavanju. Korištenjem petroletera izgubila se značajna količina uzoraka što se kasnije odrazilo na same rezultate spektrometrijskih tehnika.
- Sinteza potpomognuta mikrovalovima značajno je skratila vremenski tijek reakcije u odnosu na klasičnu sintezu (sa 72 sata na svega 2 sata), masa sintetiziranog produkta bila je veća nego kod klasične sinteze. Skraćanjem vremenskog tijeka reakcije nije došlo do nastanka dodatnog produkta sa dvije izotiocijanatne skupine.

## 5. LITERATURA

1. M. Kopjar, D. Šubarić, V. Piližota, *Food Health Disease* **1** (2012) 22-35.
2. I. Blažević, *Slobodni, glukozinolatno i glikozidno vezani hlapljivi spojevi biljaka porodice Brassicaceae*, Doktorska disertacija, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu (2009.)
3. M. Iranshahi, *J. Essent. Oil. Res.* **24** (2012) 394-434.
4. I. Jerković, *Kemija aroma*, interna recenzirana skripta, Kemijsko-tehnološki fakultet, Split(2011.)
5. M. Zekić, *Glukozinolati odabranih samoniklih biljaka porodice Brassicaceae*, Doktorska disertacija, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu (2012.)
6. URL:[https://bayer-veterina.hr/scripts/pages/hr/drustvene\\_zivotinje/macke/kukasti\\_crvi.php](https://bayer-veterina.hr/scripts/pages/hr/drustvene_zivotinje/macke/kukasti_crvi.php) (28.9.2018.)
7. URL: <https://www.healthline.com/health/hookworm> (28.9.2018.)
8. M. Dekić, *Fitohemijsko ispitivanje odabranih biljnih vrsta familija Geraniaceae i Brassicaceae*, Doktorska disertacija, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Nišu (2011.)
9. A. S. Grewal, K. Kumar, S. Redhu, S. Bhardwaj, *Int. Res J Pharm. App Sci.* **3** (2013) 278-285
10. C. O. Kappe, *Angew. Chem. Int. Ed.* **43** (2004) 6250-6284
11. M. Hranjec, *Sinteze potpomognute mikrovalovima*, Nastavni tekst, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu (2017.)
12. M. B. Gawande, S. N. Shelke, R. Zboril, R. S. Varma, *Acc. Chem. Res.* **47** (2014) 1338-1348
13. *Introduction to Fourier Transform Infrared Spectrometry*, Thermo Nicolet Corporation (2001.)
14. D. Stojanov, *Hlapljivi sumporovi spojevi u biljkama porodice Brassicaceae i Phytolaccaceae i sinteza fenil-izotiocijanata*, Diplomski rad, Kemijsko-tehnološki fakultet, Split (2015.)

15. I. Jerković, A. Radonić, *Praktikum iz organske kemije*, Kemijsko-tehnološki fakultet, Split (2009.)
16. A. Đulović, *Usporedba dviju metoda za određivanje inhibicijske sposobnosti na kolinesteraze*, Diplomski rad, Kemijsko-tehnološki fakultet, Split(2014.)
17. D. A. Skoog, D. M. West, F. J. Holler, *Osnove analitičke kemije*, Školska knjiga, Zagreb, 1999., str. 968.
18. F. Burčul, *Inhibicija acetilkolinesteraze i antioksidacijska aktivnost eteričnih ulja odabranih biljaka porodice Ranunculaceae*, Doktorska disertacija, University of Zagreb, Zagreb (2014)
19. URL:<https://www.airproducts.com/industries/Analytical-Laboratories/analytical-lab-applications/product-list/gc-with-flame-ionization-detector-gc-fid-analytical-laboratories.aspx?itemId=D6D6641C668A47139A6F1960D9441B93>(28.9.2018.)