

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

DANIELA METELKO

MAGISTRSKA NALOGA

MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM LABORATORIJSKE
BIOMEDICINE

Ljubljana, 2017

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

DANIELA METELKO

**SINTEZA KUMARINSKEGA FLUORESCENTNEGA
OZNAČEVALCA ZA TEKOČE KRISTALE**

**SYNTHESIS OF A COUMARIN FLUORESCENT LABEL
FOR LIQUID CRYSTALS**

MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM LABORATORIJSKE
BIOMEDICINE

Ljubljana, 2017

Eksperimentalni del magistrske naloge sem opravljala na Katedri za farmacevtsko kemijo Fakultete za farmacijo, Univerze v Ljubljani, pod mentorstvom izr. prof. dr. Janeza Mravljaka, mag. farm. Spektroskopske meritve (NMR, absorpcijski in fluorescenčni spektri) so bile izvedene na Fakulteti za farmacijo in na Inštitutu Jožef Stefan v Ljubljani.

Zahvala

Moja zahvala gre mentorju izr. prof. dr. Janezu Mravljaku, mag. farm., ki sem mu izredno hvaležna za pomoč pri zaključku mojega študija. Zahvaljujem se mu za hitro odzivnost, potrpežljivost in prilagodljivost.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko delo samostojno izdelala pod mentorstvom izr. prof. dr. Janeza Mravljaka, mag. farm.

Daniela Metelko

Ljubljana, 2017

Predsednik komisije: prof. dr. Darko Černe, mag. farm., spec. med. biokem.

Članica komisije: doc. dr. Anja Pišlar, mag. farm.

VSEBINA

POVZETEK	vii
ABSTRACT	viii
SEZNAM OKRAJŠAV	ix
1 UVOD	1
1.1 TEKOČI KRISTALI.....	1
1.1.1 Klasifikacija tekočih kristalov	2
1.1.2 Uporaba tekočih kristalov.....	5
1.2 FLUORESCENCA	5
1.2.1 Fluorescenčna emisija vzbujene molekule v raztopini	6
1.2.2 Vplivi na fluorescenco.....	10
1.2.3 Fluorescentni označevalci	10
1.2.4 Merjenje fluorescence na molekularnem nivoju	14
2 NAMEN DELA IN SINTEZNI NAČRT	15
3 MATERIALI IN METODE	16
3.1 REAGENTI IN TOPILA	16
3.2 KROMATOGRFSKE METODE	16
3.2.1 Tankoplastna kromatografija	16
3.2.2 Kolonska kromatografija	16
3.3 SPEKTROSKOPSKE METODE	16
3.3.1 Jedrska magnetna resonanca (NMR).....	16
3.3.2 Masna spektrometrija (MS).....	17
3.3.3 Infrardeča (IR) spektroskopija.....	17
3.3.4 UV-VIS spektroskopija	17
3.3.5 Fluorescenčna spektroskopija.....	17
3.4 DOLOČEVANJE TALIŠČ.....	17
3.5 NOMENKLATURA IN RISANJE SPOJIN	17
3.6 REAKCIJE V BREZVODNIH POGOJIH	17
3.7 ROTAVAPIRANJE.....	18
3.8 MERILNI PRIPOMOČKI IN APARATI.....	18
4 EKSPERIMENTALNO DELO IN REZULTATI ANALIZ	19
4.1 Sinteza 4'-pentil-[1,1'-bifenil]-4-karboksilne kisline (<u>1</u>)	19

4.2	Sinteza metil 3-okso-3-(4'-pentil-[1,1'-bifenil]-4-il)propanoata (2)	21
4.3	Sinteza 9-(4'-pentil-[1,1'-bifenil]-4-il)-2,3,6,7-tetrahidro-1 <i>H</i> ,5 <i>H</i> ,11 <i>H</i> -pirano[2,3- <i>f</i>]pirido[3,2,1- <i>ij</i>]kinolin-11-ona (3)	24
5	RAZPRAVA	27
5.1	KOMENTAR SINTEZNIH POSTOPKOV	27
5.1.1	Alkalna hidroliza 5-CB.....	27
5.1.2	Sinteza β -ketoestra (Masamune-Claisen-ova kondenzacija).....	28
5.1.3	Pechmannova kondenzacija.....	30
5.2	IZRAČUN KVANTNEGA IZKORISTKA IN EKSTINKCIJSKEGA KOEFIČIENTA ZA SPOJINO <u>3</u>	32
5.2.1	Kvantni izkoristek	32
5.2.2	Molarni absorptivni koeficient	43
5.3	POLARIZACIJSKI VEKTOR SPOJINE <u>3</u>	44
5.4	KOMENTAR NMR SPEKTROV SINTETIZIRANIH SPOJIN	45
6	SKLEPI	49
7	LITERATURA.....	50

KAZALO SLIK

<i>Slika 1: Urejenost molekul pri kristalu, tekočih kristalih in v tekočem ter plinastem agregatnem stanju (3).</i>	1
<i>Slika 2: Shematski prikaz klasifikacije tekočih kristalov (3).</i>	2
<i>Slika 3: Strukturne formule molekul termotropnih tekočih kristalov. A - paličaste molekule, B - diskaste molekule, C - ukrivljene molekule tekočih kristalov. Simbolični prikaz (3).</i>	3
<i>Slika 4: Shematski prikaz liotropnih faz tekočih kristalov. (a) micelarne, (b) heksagonalno kolumnarne, (c) kubične ter (d) lamelarne faze, ki jih tvorijo surfaktanti. Simbolični prikaz (3).</i>	4
<i>Slika 5: Prehod elektrona v singletno vzbujeno stanje (levo) in tripletno vzbujeno stanje (desno) iz osnovnega singletnega stanja.</i>	6
<i>Slika 6: Perrin-Jablonski-jev diagram prikazuje absorpcijo fotonov, notranjo konverzijo, fluorescenco, medsystemskega prehoda (ISC) in fosforescenco (7).</i>	7
<i>Slika 7: Spekter elektromagnetnega valovanja (8).</i>	8
<i>Slika 8: Možnosti medsystemskega prehoda (7).</i>	9
<i>Slika 9: Primeri kovalentno vezanih sond na surfaktante, fosfolipide in polimere. A: 2-(9-antroiloksi)stearinska kislina. B: 6-(9-antroiloksi)stearinska kislina. C: 10-(9-antroiloksi)stearinska kislina. D: 12-(9-antroiloksi)stearinska kislina. E: (9-antroiloksi)palmitinska kislina. F: natrijeva sol 2-(N-oktadecil)aminonaftalen-6-sulfonske kisline,. G: 3-palmitoil-2-(10-pirendekanoil)-L-alfa-fosfatidilholin. H: polistiren označen z antracenom (7).</i>	12
<i>Slika 10: Primeri hidrofobnih, hidrofilnih in amfifilnih sond. A: piren. B: trinatrijeva sol 8-hidroksipiren-1,3,6-trisulfonske kisline, (piranin). C: trinatrijeva sol 8-alkoksipiren-1,3,6-trisulfonske kisline. D: 12-pirendodekanojska kislina. E: 1,6-difenil-1,2,5-heksatrien. F: 1-(4-trimetilamonijevfenil)-6-fenil-1,3,5-heksatrien, p-toluen sulfonat. G: cis-parinarinska kislina. H: trans-parinarinska kislina (7).</i>	13
<i>Slika 11: Strategija izbire fluorescentnega označevalca (7).</i>	14
<i>Slika 12: Sinteza kumarinskega označevalca iz 5-CB v treh sinteznih korakih.</i>	15
<i>Slika 13: Alkalna hidroliza nitrilov - pretvorba nitrila v karboksilno skupino, pri tem se odcepi amonijak.</i>	27
<i>Slika 14: Prva stopnja alkalne hidrolize 5-CB – hidroksilni anion napade ogljik in nastane prvi intermediat.</i>	27

<i>Slika 15: Prikaz pretvorbe prvega intermediata v amid.</i>	27
<i>Slika 16: Zadnje stopnje alkalne hidrolize amida (10).</i>	28
<i>Slika 17: Sinteza β-ketoestra.</i>	28
<i>Slika 18: Sinteza aktiviranega kislinskega amida s CDI.</i>	29
<i>Slika 19: Sinteza magnezijevega monometilmalonata.</i>	29
<i>Slika 20: Masamune-Claisen-ova kondenzacija: substitucija imidazola z malonatom in dekarboksilacija do β-ketoestra.</i>	30
<i>Slika 21: Pechmannova kondenzacija.</i>	30
<i>Slika 22: Absorpcijski spektri referenčne spojine C6 v etanolu v različnih koncentracijskih območjih.</i>	34
<i>Slika 23: Absorpcijski spektri spojine 3 v etanolu v različnih koncentracijskih območjih.</i> 34	
<i>Slika 24: Absorpcijska spektra v izbranih koncentracijskih območjih preiskovane in referenčne spojine v etanolu.</i>	35
<i>Slika 25: Emisijska spektra spojine 3 in referenčne spojine C6 v izbranih koncentracijskih območjih in pri izbrani valovni dolžini vzbujanja 420 nm.</i>	36
<i>Slika 26: Prikaz proste rotacije molekule okoli vezi med kumarinskim skeletom in fenilnima obročema pri relaksaciji.</i>	37
<i>Slika 27: Prikaz Stokes-ovega premika (7).</i>	38
<i>Slika 28: Normirani absorpcijski in emisijski spekter referenčne spojine C6.</i>	39
<i>Slika 29: Normirani absorpcijski in emisijski spekter spojine 3.</i>	40
<i>Slika 30: Emisijski spektri spojine 3 v različnih topilih.</i>	40
<i>Slika 31: Prikaz dipolov v osnovnem in vzbujenem stanju ter relaksacija topila ob prehajanju molekul iz vzbujenega v osnovno stanje (14).</i>	41
<i>Slika 32: Referenčna spojina (kumarin C6) ima več resonančnih struktur.</i>	42
<i>Slika 33: Absorpcijski spektri v različnih koncentracijskih območjih spojine 3 v toluenu.</i> 43	
<i>Slika 34: Prikaz polarizacijskega vektorja laurdana in spojine 3 glede na 5-CB.</i>	44
<i>Slika 35: ^1H NMR spekter spojine 1.</i>	45
<i>Slika 36: ^1H NMR spekter spojine 2.</i>	46
<i>Slika 37: ^1H NMR spekter spojine 3.</i>	47
<i>Slika 38: Struktura dimera karboksilnih kislin z delnimi naboji.</i>	48

KAZALO PREGLEDNIC

<i>Preglednica I: Nekaj področij uporabe fluorescentnih tehnik (7).</i>	11
<i>Preglednica II: Rezultati analize spojine 1.</i>	20
<i>Preglednica III: Rezultati analize spojine 2.</i>	22
<i>Preglednica IV: Rezultati analize spojine 3.</i>	25
<i>Preglednica V: Referenčna spojina C6.</i>	32
<i>Preglednica VI: Preiskovana spojina.</i>	33
<i>Preglednica VII: Podatki o merjenih spojinah.</i>	36

POVZETEK

Tekoči kristali predstavljajo četrto agregatno stanje s kombinacijo lastnosti tekočin in kristalov. Njihove molekule so kljub neprestanemu premikanju in gibanju urejene v določen red. Primer tekočih kristalov je na primer celična membrana.

Fluorescenca je svetloba oziroma energija, ki se sprosti ob prehajanju elektronsko vzbujene molekule v osnovno stanje. Sintetizirali in ovrednotili smo kumarinski fluorescentni označevalec, ki je podoben gradniku tekočih kristalov 4-ciano-4'-pentilbifenilu in ima vektor polarizacije pravokoten na ravnino tekočih kristalov, ki jih tvori 4-ciano-4'-pentilbifenil. Kumarini imajo aromatske predele, ki so odgovorni za fluorescenco, zato smo se odločili za sintezo kumarinskega fluorescentnega označevalca. Izbrali smo juloidinski derivat, ker ima velik Stokes-ov premik.

V prvi sintezni stopnji smo spojini 4-ciano-4'-pentilbifenil pretvorili ciano skupino v karboksilno skupino (alkalna hidroliza) in jo z Masamune-Claisen-ovo kondenzacijo podaljšali v keto-ester. Z 8-hidroksijuloidinom je v zadnji stopnji sinteze potekla Pechmannova kondenzacija in dobili smo končno spojino kumarin **3**, ki ima fluorofor s polarizacijskim vektorjem pravokotno na ravnino tekočih kristalov, ki jih tvori 4-ciano-4'-pentilbifenil. Posneli smo absorpcijske in emisijske spektre pri različnih koncentracijah spojine **3** v etanolu in ugotovili, da je Stokes-ov premik dovolj velik, da vzorec lahko obsevamo z ekscitacijsko svetlobo pri valovni dolžini 420 nm, emisijo pa merimo v območju 440 nm do 800 nm z maksimumom pri približno 540 nm. Na fluorescenco spojine **3** močno vpliva polarnost okolice, zato smo uporabili manj polarno topilo (etanol), v katerem se emisijski vrhovi pomaknejo h krajšim valovnim dolžinam, intenziteta emisije pa naraste. Določili smo tudi kvantni izkoristek (0,21) ob primerjavi s spojino kumarin 6 in molarni absorptivni koeficient ($70200 \text{ Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Z NMR spektroskopijo smo ugotovili, da je spojina **3** čista ter da je v eni obliki brez tautomerije.

Ključne besede: tekoči kristali, fluorescenca, kumarini, fluorescentni označevalec, 5-CB.

ABSTRACT

Liquid crystals represent the fourth state of matter with a combination of crystal and liquid properties. The molecules in liquid crystals maintain a certain order despite their constant movement. For example, liquid crystals are a cell membrane.

Fluorescence is light or energy released when the electron-excited molecule is transferred to the baseline state. We synthesized and evaluated a coumarin fluorescence label which is similar to the 4-cyano-4'-pentylbiphenyl liquid crystal and its polarization vector is perpendicular to the plane of the liquid crystals formed by 4-cyano-4'-pentylbiphenyl. Coumarins have aromatic regions that are responsible for fluorescence so we decided to synthesize the coumarin fluorescence label. We selected the juloidine derivative because its Stoke's shift is large enough.

In the first synthetic step the cyano group was converted to the 4-cyano-4'-pentylbiphenyl compound into the carboxyl group (alkaline hydrolysis) and then extended with the Masamune-Claisen condensation into the keto-ester. With the 8-hydroxyjuloidine Pechmann condensation was carried out in the last step of the synthesis and a final coumarin compound **3** was obtained having a fluorophore with a polarization vector perpendicular to the plane of liquid crystals formed by 4-cyano-4'-pentylbiphenyl. We recorded the absorption and emission spectra at various concentrations of compound **3** in ethanol and found that the Stoke's shift is large enough to irradiate the sample with excitation light at a wavelength of 420 nm and measure the emission in the range of 440 nm to 800 nm with a maximum at about 540 nm. The fluorescence of compound **3** is strongly influenced by the polarity of the environment, so we use a less polar solvent (ethanol) in which the emission peaks move to shorter wavelengths and the intensity of the emission increases. We determined a quantum yield (0.21) by comparing it to coumarin compound 6 and the molar absorption coefficient (70200 Lmol⁻¹ cm⁻¹). By NMR spectroscopy, compound **3** was found to be pure in one form without a tautomer.

Key words: liquid crystals, fluorescence, coumarins, fluorescent label, 5-CB.

SEZNAM OKRAJŠAV

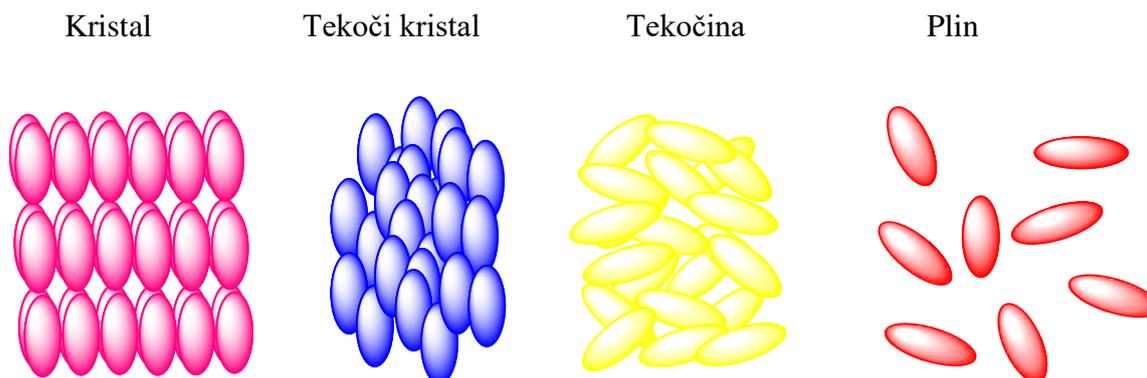
ABS	Absorpcija
ATR	Tehnika oslABLJENE popolne odbojnosti (<i>ang.: Attenuated total reflectance</i>)
5-CB	4-Ciano-4'-pentilbifenil
CDI	Karbonildiimidazol (<i>ang.: Carbonyldiimidazole</i>)
DMSO	Dimetil sulfoksid
DNA	Deoksiribonukleinska kislina (<i>ang.: Deoxyribonucleic acid</i>)
EM	Emisija
EPR	Elektronska paramagnetna resonanca (<i>ang.: Electron Paramagnetic Resonance</i>)
EtOH	Etanol
IC	Notranja konverzija (<i>ang.: Internal Conversion</i>)
IR	Infrardeča svetloba
ISC	Medsistemski prehod (<i>ang.: Internal System Crossing</i>)
IUPAC	Mednarodna zveza za čistko in uporabno kemijo (<i>ang.: International Union of Pure and Applied Chemistry</i>)
KMK	Kritična micelarna koncentracija
LCD	Zaslon s tekočimi kristali (<i>ang.: Liquid Crystals Display</i>)
max	Maksimum
MF	Mobilna faza
MS	Masna spektrometrija
MW	Mikrovalovi (<i>ang.: Microwave</i>)
NMR	Jedrska magnetna resonanca (<i>ang.: Nuclear Magnetic Resonance</i>)

PAS	Površinsko aktivne snovi
PyTs	Piridinijev tozilat (<i>ang.: Pyridinium Tosylate</i>)
Rf	Retencijski faktor
RNA	Ribonukleinska kislina (<i>ang.: Ribonucleic acid</i>)
THF	Tetrahidrofuran
TK	Tekoči kristal(i)
TLC	Tankoplastna kromatografija (<i>ang.: Thin Layer Chromatography</i>)
UV	Ultravijolična svetloba
VIS	Vidna svetloba

1 UVOD

1.1 TEKOČI KRISTALI

V osnovi poznamo tri agregatna stanja: trdno, tekoče in plinasto. Agregatno stanje je stanje, v katerem se nahaja neka snov, ki je odvisna od tlaka in temperature, na nivoju delcev pa jih lahko opišemo z njihovo razporeditvijo energije. Tekoči kristali (TK) predstavljajo *četrto agregatno stanje* z značilno urejenostjo in mobilnostjo molekul (slika 1) (1, 2, 3).



Slika 1: Urejenost molekul pri kristalu, tekočih kristalih in v tekočem ter plinastem agregatnem stanju (3).

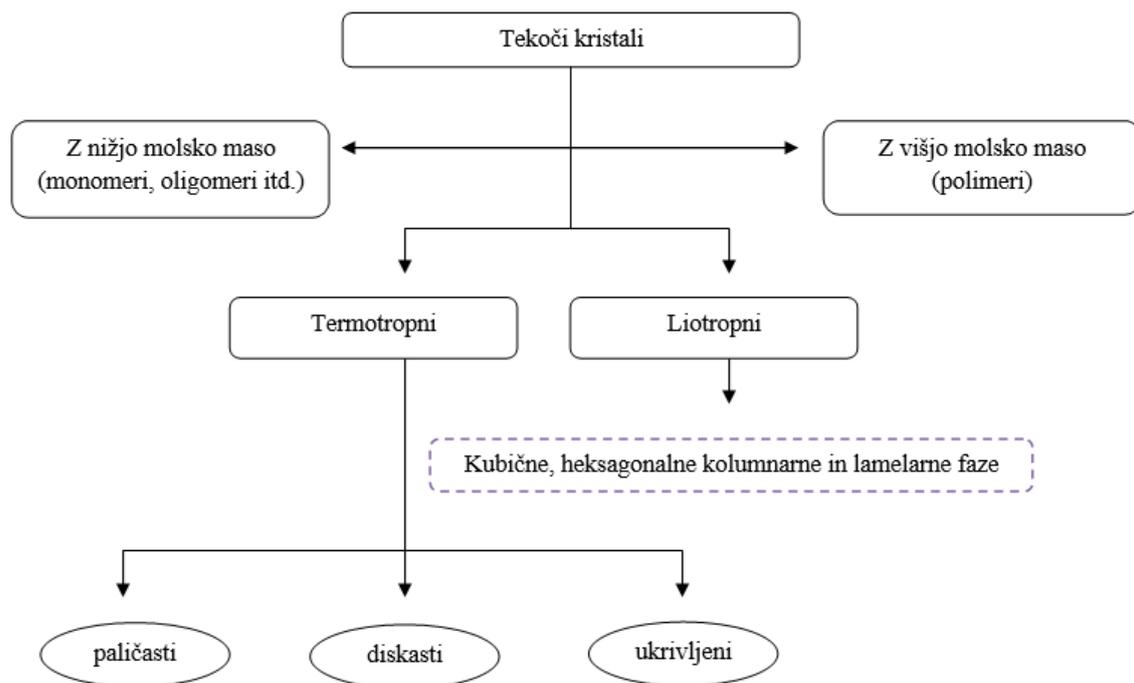
TK so snovi z lastnostmi kristalov in tekočin. V trdnem agregatnem stanju, kot so kristali, so molekule pozicijsko in orientacijsko urejene. V tekočem stanju take ureditve ni, saj se molekule po tekočini prosto gibljejo in konstantno spreminjajo svojo pozicijo in orientacijo. Pri tekočih kristalih pa se molekule gibljejo tako kot molekule v tekočini, vendar pri tem ohranjajo svojo orientacijsko usmeritev in včasih tudi pozicijsko (3).

Tekoči kristali predstavljajo stanje z več fazami, ki jih imenujemo mezofaze in se med seboj razlikujejo po orientaciji posameznih molekul v vsaki fazi. Red molekul v mezofazah je odvisen od dejavnikov, kot so na primer temperatura, tlak in prisotnost tujih delcev. Tekoče kristale obravnavamo kot izjemno odziven material oziroma snov, saj se red molekul ne spremeni samo ob prisotnosti tujih delcev, ampak je odvisen tudi od lastnosti molekul, ki tvorijo tekoče kristale (velikost, oblika, površinske značilnosti, itd.). Vsaka majhna sprememba lahko vpliva na red molekul v tekočih kristalih (4).

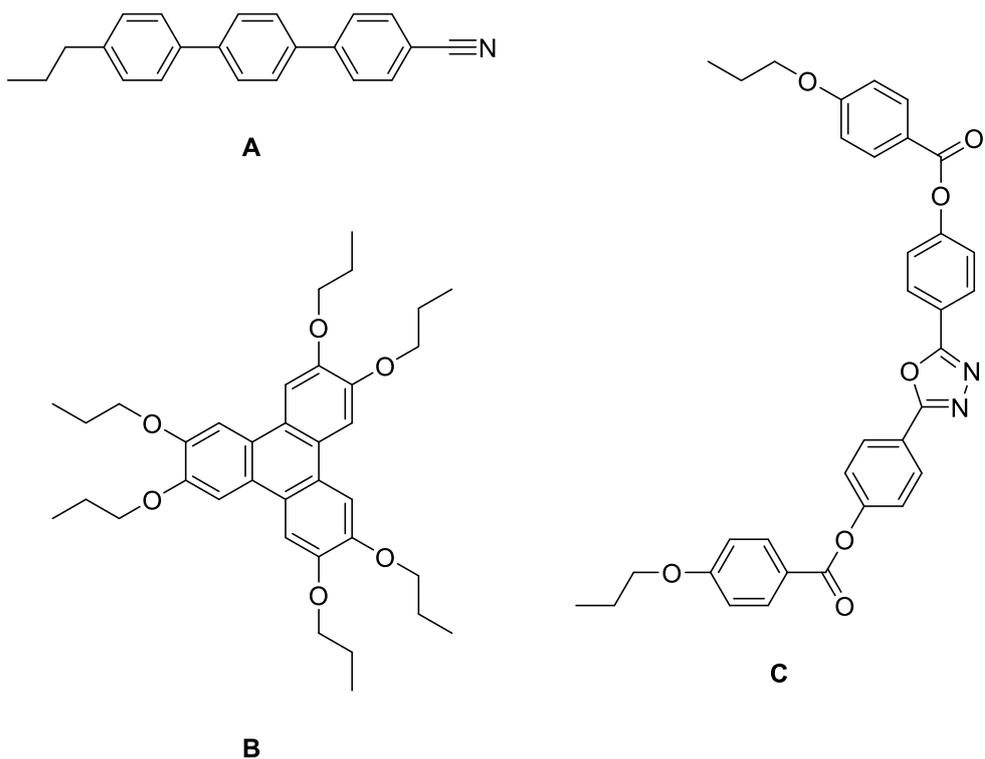
1.1.1 Klasifikacija tekočih kristalov

Na sliki 2 je prikaz delitve tekočih kristalov in sicer:

- glede na molarno maso molekul v tekočem kristalu jih lahko klasificiramo na snovi z nižjo molsko maso (monomeri in oligomeri) ter snovi z višjo molsko maso (polimeri);
- glede na nastanek tekočega kristala jih klasificiramo na liotropne in termotropne, kjer je njihov nastanek odvisen od koncentracije raztopine oziroma od temperature;
- glede na geometrijsko obliko molekul jih delimo na tekoče kristale z molekulami paličaste oblike, diskaste oblike in ukrivljene oblike (slika 3);
- glede na supramolekularno organizacijo, ki je odvisna od orientacijske in pozicijske ureditve, pa jih delimo na nematične, smektične, kolumnarne, B faze in tako dalje (3, 5).



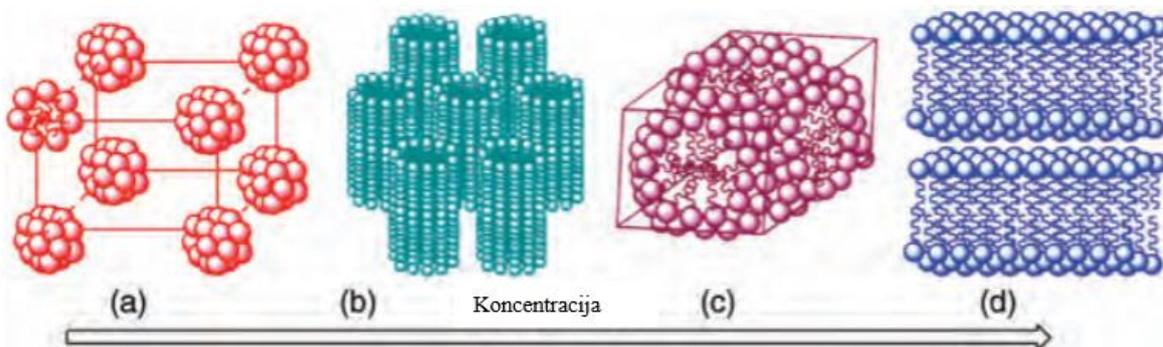
Slika 2: Shematski prikaz klasifikacije tekočih kristalov (3).



Slika 3: Strukturne formule molekul termotropnih tekočih kristalov. **A** - paličaste molekule, **B** - diskaste molekule, **C** - ukrivljene molekule tekočih kristalov. Simbolični prikaz (3).

Liotropni tekoči kristali nastajajo z raztapljanjem surfaktantov oziroma površinsko aktivnih snovi (PAS) v ustreznem topilu s spreminjanjem njihove koncentracije in temperature. Surfaktanti oziroma PAS so amfifilne molekule, ki imajo polarne glave in hidrofobne (nepolarne) repke. Najpogostejše topilo je voda, kjer se take molekule organizirajo na način, da se hidrofobni deli umaknejo pred polarnimi molekulami topila, zato pri določeni koncentraciji, ki jo imenujemo kritična micelarna koncentracija (KMK), začnejo tvoriti micelle, v primeru fosfolipidov pa so te strukture poimenovane vezikli. V nepolarnem topilu (npr. organsko topilo) pride do obratne organizacije amfifilnih molekul, kjer pa se tesno skupaj združijo polarne glave in nastane reverzni micel. Z zviševanjem koncentracije surfaktantov nad KMK v raztopini se najprej povečuje le število micelov, nato se šele spreminja velikost in oblika iz sferične v cilindrično. Z nadaljnjim povečevanjem koncentracije se s samoorganizacijo tvorijo različne faze liotropnih tekočih kristalov: heksagonalno kolumnarne, kubične in lamelarne. Razlikujejo se glede na pozicijsko ureditev v eni ali več dimenzijah (slika 4). Poleg koncentracije surfaktantov pa je pomembna tudi temperatura, ki mora biti dovolj visoka za formacijo in stabilnost faz liotropnih tekočih

kristalov. Pri nižjih temperaturah so molekule v raztopini bolj rigidne in izgubijo fleksibilnost ter mobilnost (3).



Slika 4: Shematski prikaz liotropnih faz tekočih kristalov. (a) micelarne, (b) heksagonalno kolumnarne, (c) kubične ter (d) lamelarne faze, ki jih tvorijo surfaktanti. Simbolični prikaz (3).

Simultano uravnavanje reda in dinamike predstavlja osnovni princip samoorganizacije in strukturne formacije molekul pri živih organizmih. Na tak način se na primer urejajo fosfolipidi v fizioloških tekočinah in tvorijo fosfolipidne dvosloje celičnih membran, kar predstavlja eno izmed vrst liotropnih tekočih kristalov. V njih se poleg lipidov oziroma fosfolipidov nahajajo tudi ogljikovi hidrati, proteini, nukleinske kisline in druge molekule, ki pomagajo pri organizaciji reda s tvorjenjem molekularnih interakcij, kot so van der Waalove sile, ionske vezi, vodikove vezi, hidrofobne interakcije, π - π interakcije, itd. Njihova uporaba je pogosta za kontrolirano distribucijo učinkovine po telesu in v genski terapiji (3).

Termotropni tekoči kristali – njihov nastanek je odvisen od temperaturnega spreminjanja. Lahko nastajajo s segrevanjem trdnega kristala, z ohlajevanjem izotropne tekočine ali s kombinacijo obojega. Molekule, ki tvorijo termotropne tekoče kristale, imajo centralno jedro in periferne fleksibilne alifatske verige. Delimo jih na paličaste, diskaste in ukrivljene. Mezofaze, ki gradijo termotropne TK, so: nematska faza, smektična faza in/ali kolumnarna faza. *Nematska faza* ima najbolj enostavno sestavo med tekočimi kristali, kjer imajo molekule le orientacijsko ureditev, zato je to tudi najmanj urejena mezofaza. Molekule se spontano paralelno orientirajo glede na svojo os (druga od drugo). Tekoči kristali z nematsko fazo imajo nizko viskoznost oziroma visoko fluidnost, njihova široka uporaba pa je v tako imenovanih LCD (Liquid Crystals Display) napravah (3). *Smektična* in *kolumnarna faza*

imata poleg orientacijske ureditve še pozicijsko urejene molekule, prva v eni, druga pa v dveh dimenzijah (5).

Eden izmed termotropnih tekočih kristalov je **5-CB** (4'-ciano-4'-pentilbifenil). V raziskavah ga pogosto uporabljajo kot ojačevalec signala pri različnih optičnih metodah, ker je enostaven za uporabo, saj je molekula čista in je grajena le iz ene komponente, poleg tega pa ga lahko uporabljamo pri sobni temperaturi. Njegova omejitev je nestabilnost, saj se pod vplivom UV svetlobe razgrajuje (4).

1.1.2 Uporaba tekočih kristalov

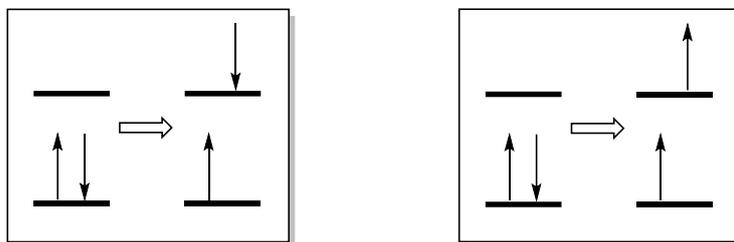
Uporaba tekočih kristalov je široka in predstavlja izziv znanstvenikom na več področjih znanosti in tehnologije. Najbolj znani so televizijski zasloni in računalniški ekrani s tekočimi kristali (LCD), kjer se z električnim in magnetnim poljem kombinirano spreminjajo orientacijske in optične lastnosti tekočih kristalov. Z izkoriščanjem takih lastnosti se tekoči kristali uporabljajo tudi v spektroskopiji, v mikroskopiji, navsezadnje pa so se razvile tudi tehnike za optično označevanje bioloških sistemov. Gre za vrsto biosenzorjev, s katero se lahko izognemo označevanju molekul *in vivo* in v ta namen izkoriščamo izjemno odzivne reakcije tekočih kristalov na dražljaje. Uporabljamo jih v biomedicini za kontrolirano distribucijo učinkovine v telesu, vezavo proteinov in označevanje fosfolipidov ter zaznavanje mikroorganizmov (3).

Uporabljajo se lahko tudi kot anizotropno topilo v kemijskih reakcijah, npr. v spektroskopiji ter kromatografiji, kjer izboljšajo ločitev podobnih komponent. Tekoče kristale se zaradi njihovih izjemnih orientacijskih lastnosti uporablja tudi v različnih plinskih in fotosenzorjih ter konduktorjih. Sicer pa se jih uporablja tudi v nanotehnologiji, zaradi njihove visoke odzivnosti (3, 5).

1.2 FLUORESCENCA

Luminiscenca je pojav svetlobe, ki jo seva katerakoli snov, ko prehaja v nižja elektronska stanja. Luminiscenco delimo na fluorescenco in fosforescenco, ki se ločita po naravi vzbujenega stanja. Pri fluorescenci je vzbujeno singletno stanje, kar pomeni, da ima par elektronov nasprotno obrnjen spin, pri fosforescenci pa je tripletno stanje – spin vzbujenega elektrona kaže v isto smer kot spin parnega elektrona v osnovnem stanju (slika 5). Prehod vzbujenega elektrona nazaj v osnovno stanje je pri fluorescenci dovoljen prehod in se zgodi

zelo hitro, praktično že med samim vzbujanjem. Življenjski čas fluorescence je približno 10 ns. Pri fosforescenci pa je ta prehod prepovedan zaradi simetrije, zato so življenjski časi fosforescence tipično zelo dolgi, od 10^{-3} do 10 s (6).



Slika 5: Prehod elektrona v singletno vzbujeno stanje (levo) in tripletno vzbujeno stanje (desno) iz osnovnega singletnega stanja.

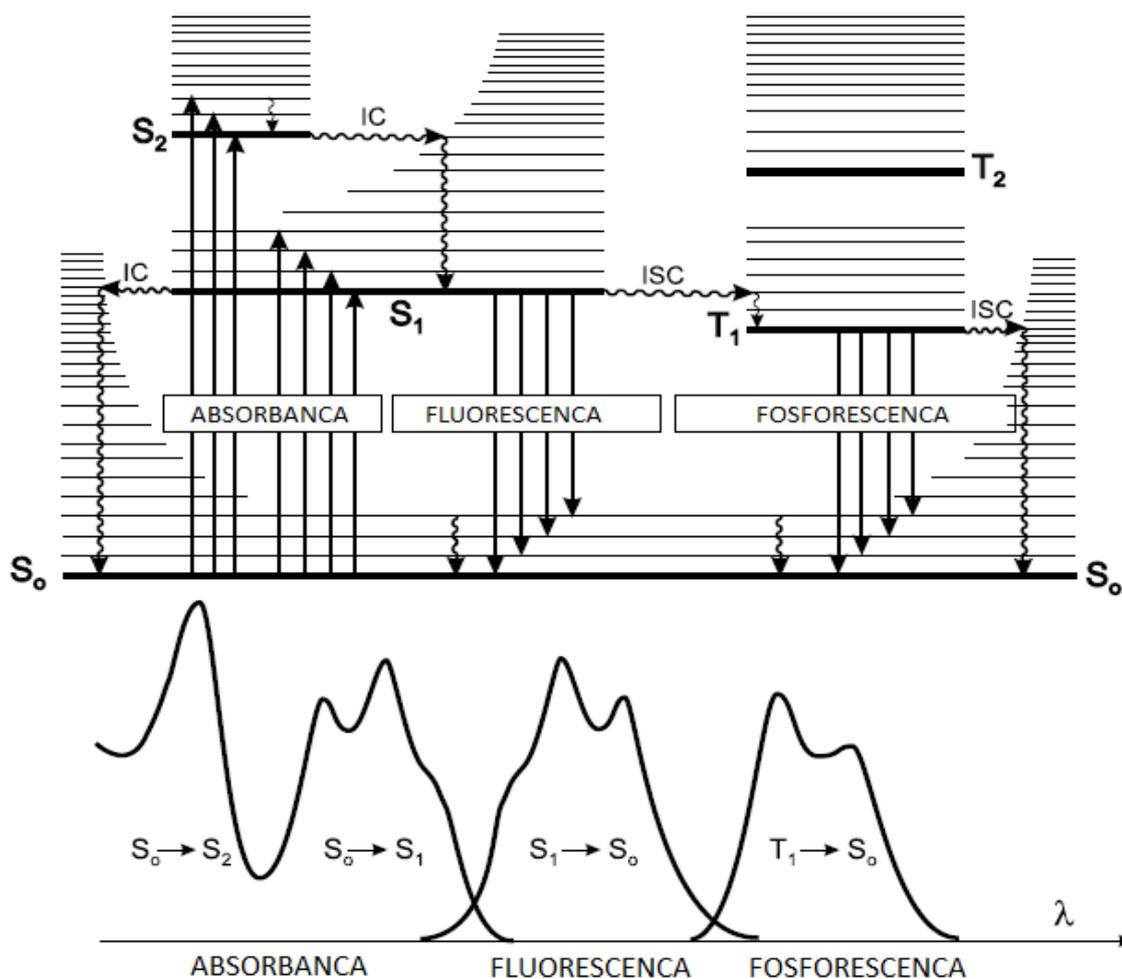
Način ekscitacije je absorpcija fotona, ki omogoči absorbirajoči snovi, da preide v elektronsko vzbujeno stanje. Ob prehodu nazaj v nižje elektronsko stanje (osnovno stanje) se emitirajo fotoni in to imenujemo fotoluminiscenca (fluorescenca, fosforescenca ali zakasnjena fluorescenca). Fotoluminiscenca predstavlja fizikalen pojav, ki je rezultat interakcije svetlobe s snovjo, in je lahko emisija ultravijolične, vidne in infrardeče svetlobe iz elektronsko vzbujene snovi (7).

1.2.1 Fluorescenčna emisija vzbujene molekule v raztopini

Molekule zasedajo različna energijska stanja, ki jim pravimo energijski nivoji. Na sliki 6 so prikazani najpogostejši procesi v vzbujanju molekul in njihovo nadaljnje sproščanje nazaj v osnovno stanje. Singletna elektronska stanja so označena s S_0 (t.j. osnovno elektronsko stanje), S_1 , S_2, \dots in tripletna stanja s T_1 , T_2, \dots . Molekule imajo poleg elektronskih še vibracijske in rotacijske nivoje. Vibracijski nivoji so označeni v vsakem elektronskem stanju s tanjšimi črtami. Vertikalne puščice, ki kažejo od najnižjega nivoja S_0 proti vrhu, prikazujejo absorpcijo svetlobe. Večina molekul se pri sobni temperaturi nahaja v ravnovesnem stanju v najnižji točki S_0 stanja. Absorpcija fotona pomakne molekulo v enega izmed vibracijskih nivojev S_1 , S_2, \dots elektronskega stanja (7).

Iz vsakega vzbujenega stanja molekule se elektroni vračajo nazaj k nižjim elektronskim stanjem. Ker molekule med seboj trkajo, izgubljajo vibracijsko energijo oziroma preidejo v najnižje vibracijsko stanje vzbujenega elektronskega stanja. To se lahko zgodi na več načinov: z emisijo fluorescence, z notranjo konverzijo (direkten prehod v osnovno stanje

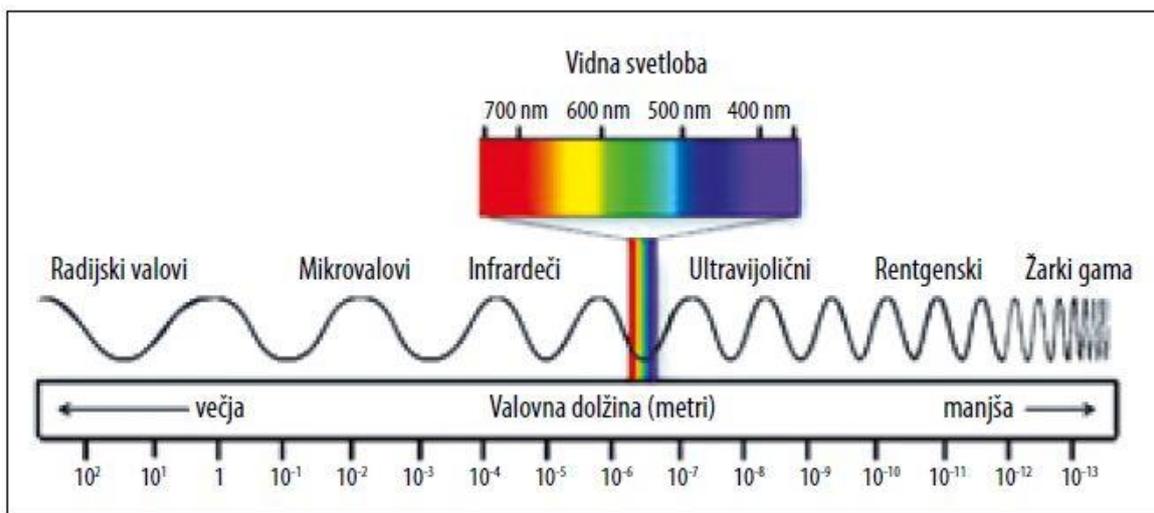
brez emisije fluorescence), z medsystemskim preходом (ki mu nato lahko sledi emisija fosforescence), z intramolekularnim prenosom naboja in/ali s konformacijo naboja oziroma s konformacijsko spremembo v molekuli. Poleg naštetih možnosti lahko ob sproščanju energije vzbujene molekule pride tudi do interakcij z ostalimi molekulami, pri čemer lahko poteče prenos elektrona, protona ali energije, tvorjenje vzbujenih dimerov ali drugih kompleksov (7).



Slika 6: Perrin-Jablonski-jev diagram prikazuje absorpcijo fotonov, notranjo konverzijo, fluorescenco, medsystemski prehod (ISC) in fosforescenco (7).

Fluorescenca predstavlja emisijo fotonov, ki spremlja relaksacijo iz S_1 v S_0 . Običajno gre vedno za prehod elektrona iz S_1 v S_0 . Fluorescenčni spektri so običajno pomaknjeni k višjim valovnim dolžinam (kar predstavlja nižjo energijo, slika 7) kot absorpcijski spektri zaradi izgube energije v vibracijskih relaksacijah. Stokes-ovo pravilo pojasni, da je valovna dolžina

fluorescenčne emisije vedno višja, kot pa je valovna dolžina svetlobe pri absorpciji. Emisija fotonov je pri fluorescenci tako hitra, kot absorpcija fotonov (približno 10^{-15} s). Vzbujena molekula ostane v S_1 stanju za določen čas (odvisno od tipa molekule in medija v katerem se nahaja), preden emitira foton ali preide po drugih možnih prehodih v osnovno stanje (notranja konverzija, medsystemski prehod). Opisana emisija fluorescenčnih fotonov predstavlja spontan proces (7).



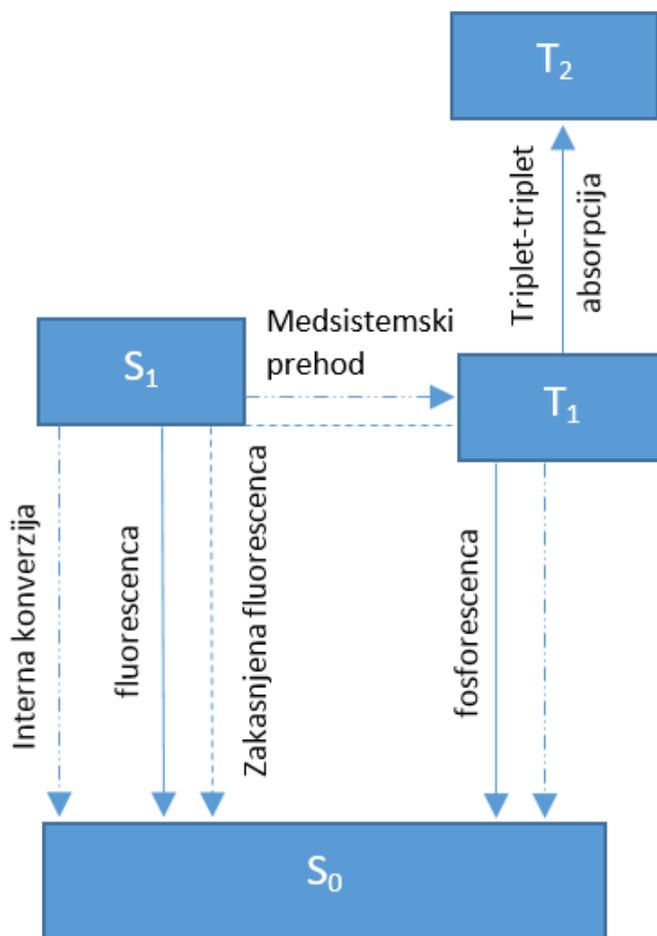
Slika 7: Spekter elektromagnetnega valovanja (8).

Notranja konverzija je prehod med dvema elektronskima stanjema z enako spinsko orientacijo (na primer: iz S_1 v S_0 , S_2 v S_1 ali T_2 v T_1). Gre za vibracijsko relaksacijo proti nižjim vibracijskim nivojem določenega elektronskega stanja do katerega se sprosti energija. Ob tem ne poteče emisija fotonov. Notranje konverzije so pogostejše v višjih elektronskih stanjih (na primer: v vibracijskih območjih S_1 ali pri prehodu iz S_2 v S_1), od S_1 proti S_0 pa je energijska vrzel večja, zato v teh primerih notranja konverzija redko poteče. Pogostejši sta emisiji fotonov: fluorescenca in fosforescenca (7).

Medsystemski prehod in nadaljnji procesi – medsystemski prehod je prehod iz singletnega S_1 do tripletnega T_1 stanja (elektronu se zamenja smer spina) in se lahko nadaljuje z ostalimi relaksacijskimi procesi. Potečejo lahko ponoven medsystemski prehod, fosforescenca, zakasnjena fluorescenca ali prehodi v višje tripletno stanje (6, 7).

Medsystemski prehod predstavlja prehod med dvema enakima vibracijskima nivojema, ki sta izoenergijska, npr. vzbujena molekula v 0. vibracijskem nivoju S_1 stanja se lahko premakne do izoenergijskega vibracijskega nivoja tripletnega T_n stanja (slika 6).

Medsystemski prehod je lahko ravno tako hiter ($10^{-7} - 10^{-9}$ s), da tekmuje z drugimi možnostmi relaksacije iz S_1 (fluorescenco in notranjo konverzijo S_1 do S_0). Prisotnost težkih kovin poveča spinsko-orbitalno sklapljanje in zato medsystemski prehod še lažje poteče.



Slika 8: Možnosti medsystemskega prehoda (7).

Fosforescena – v raztopini lahko pri sobni temperaturi poteče prehod iz tripletnega stanja T_1 v S_0 z notranjo konverzijo ali fosforescenco. Dejstvo je, da je prehod iz T_1 v S_0 prepovedan, vendar lahko do njega vseeno pride. To je počasen proces, zato v večini primerov pride prej do medsystemskega prehoda ali vibracijskih relaksacij v S_0 . Pri nižjih temperaturah ali v bolj rigidnih medijih lažje opazimo fosforescenco. Življenjska doba tripletnega stanja pod posebnimi pogoji je lahko tako dolga, da predstavlja oddajanje svetlobe nekaj sekund, tudi minute. Fosforescenčni spekter je pomaknjen k višjim valovnim dolžinam kot fluorescenčni, ker je energija najnižjega vibracijskega nivoja tripletnega T_1 stanja nižja, kot v singletnem S_1 stanju (slika 6 in 8).

Zakasnjena fluorescenca je obraten medsystemski prehod iz T_1 v S_1 , kadar je energijska razlika med S_1 in T_1 dovolj majhna, življenjska doba T_1 pa dovolj dolga. To se odrazi v emisiji z enakim spektrom kot normalna fluorescenca, vendar z zakasnitvijo v času.

Prehodi v višja tripletna stanja nastopijo, ko je molekula vzbujena in doseže tripletno stanje T_1 in lahko absorbira še en foton pri drugačni valovni dolžini. Elektron se premakne v višje vzbujeno tripletno stanje; tak prehod je dovoljen proces.

1.2.2 Vplivi na fluorescenco

Emisijski spektri se zelo razlikujejo in so odvisni od kemijske strukture fluorescenčnih označevalcev in raztopine, v kateri so raztopljeni. Fluorescenca je značilna za aromatske molekule in tudi za nekatere nenasičene alifatske strukture (8, 9). Rigidne strukture imajo večjo fluorescenco, težki atomi pa zmanjšajo fluorescenco, ker ob njihovi prisotnosti lažje pride do medsystemskega prehoda iz singletnega v tripletno stanje. Fluorescenca se poveča, če so molekule vezane na površino, ker so manj fleksibilne. Stopnja konjugacije oziroma število π -elektronov vodi do zamika absorpcijskega in fluorescentnega spektra k daljšim valovnim dolžinam, kar poveča fluorescentno kvantno število (9). Potem je tukaj še kar nekaj faktorjev, ki vplivajo na fluorescenco, to so polarnost topila (nepolarna topila zmanjšajo Stokes-ov premik, ker se manj energije porabi za preureditev molekul okoli topila; v polarnem topilu pa se del energije porabi za reorientacijo dipolnih momentov topila okoli fluorofora in se tako emisija premakne k višjim valovnim dolžinam in je posledično manj oddane svetlobe), ioni, vodikove vezi, pH, tlak, viskoznost (višja viskoznost zviša fluorescenco), temperatura (višja temperatura zniža fluorescenco), dušilci fluorescence, električni potencial, itd. V primerjavi s fluorescenco pa absorpcija ni občutljiva na efekte topila (7).

1.2.3 Fluorescentni označevalci

Fluorescentni označevalci se pogosto uporabljajo v raziskavah celice. Pritrdimo jih lahko na želeni del celice, kjer nato emitirajo svetlobo, kar opazujemo s fluorescentnim mikroskopom.

Snovi, ki povzročajo fluorescenco, so kinin, klorofil, fluorescein, rodamin, zeleni fluorescenčni protein, itd. Pri raziskavah vedno poskušamo uporabiti najprimernejše fluorescentne označevalce, ki ustrezajo eksperimentalnim zahtevam (6).

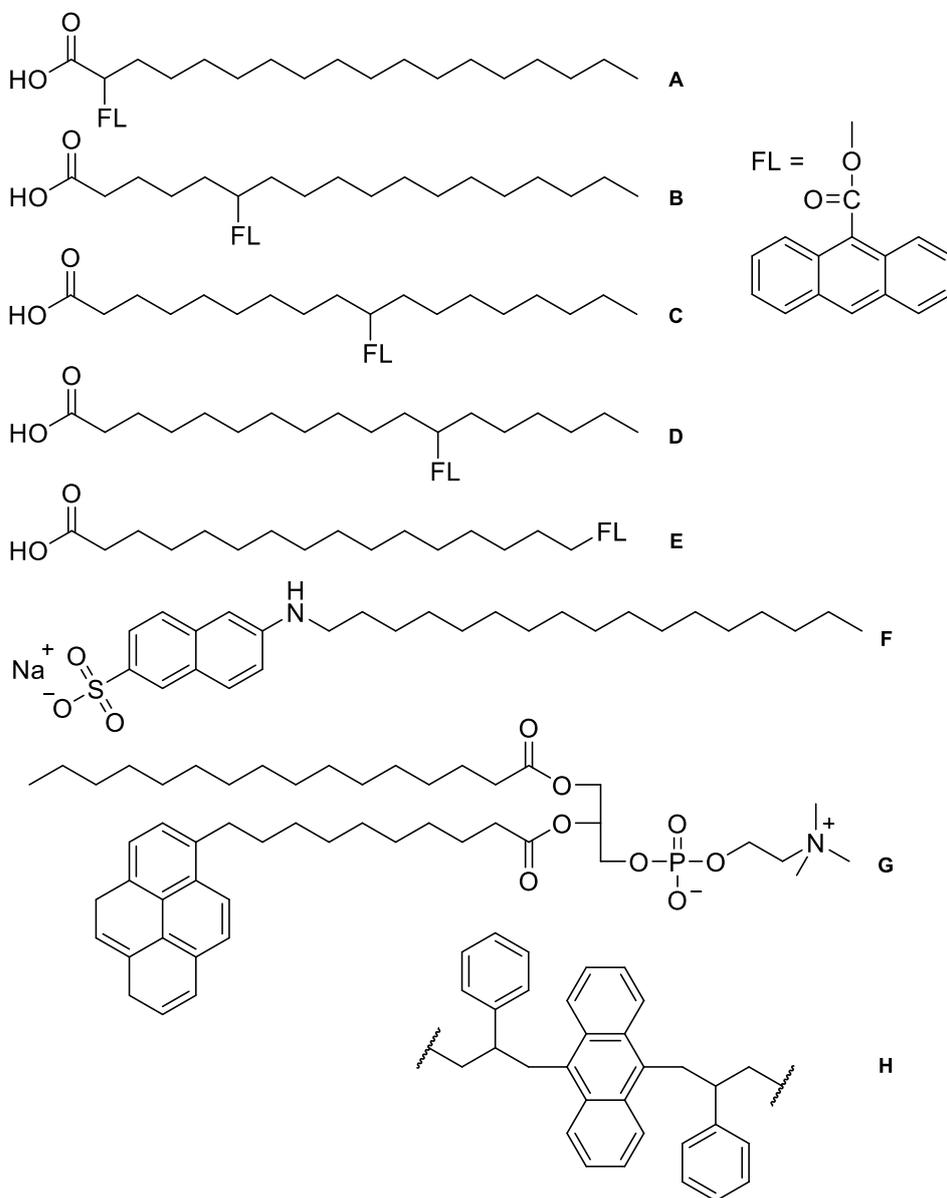
Fluorescentne molekule se v biologiji uporabljajo kot sonde pri fizikalno-kemijskih in biokemijskih raziskavah v bioloških vzorcih. Sicer se v sedanjem času pogosto uporabljajo tudi drugi načini označevanja npr. z radioaktivnimi izotopi in spinskimi označevalci z EPR tehniko (elektronska paramagnetna resonanca). Za prve je slabost radioaktivnost, z EPR pa pridobimo informacije le o molekularni mobilnosti. Tovrstne tehnike so omejene na ožjo uporabo, fluorescentno označevanje pa se uporablja na več področjih (preglednica I). Velik vpliv na emisijo fluorescence ima okoliški medij (7).

Preglednica I: Nekaj področij uporabe fluorescentnih tehnik (7).

Preučevana tarča	Informacija, ki jo lahko pridobimo
Biološke membrane	Fluidnost; interakcije med lipidi in proteini; translacijska difuzija; vezavna zmogljivost; strukturne spremembe, membranski potenciali, kompleksi in vezave; energijsko in svetlobno inducirane spremembe, efekti aditivov, lokacija proteinov, lateralna organizacija in dinamika.
Proteini	Vezavna mesta; denaturacija, dinamika, razdalje, translacija konformacije.
Nukleinske kisline	Fleksibilnost, torzijska dinamika, struktura dvojne vijačnice, vpliv interkelatorjev na deformacijo, fotocepitev.
Celice	Izgled membrane, lipidov, proteinov, DNA, RNA, površje antigenov in glikokonjugatov; membranska dinamika; membranska prepustnost, membranski potencial; intracelularni pH, citoplazemski kalcij, natrij, klorid, koncentracija protonov; redoks stanje; aktivnosti encimov; interakcije med celicami ter med celicami in virusi; membranske fuzije, endocitoze, viabilnost, celični cikli, citotoksične aktivnosti.

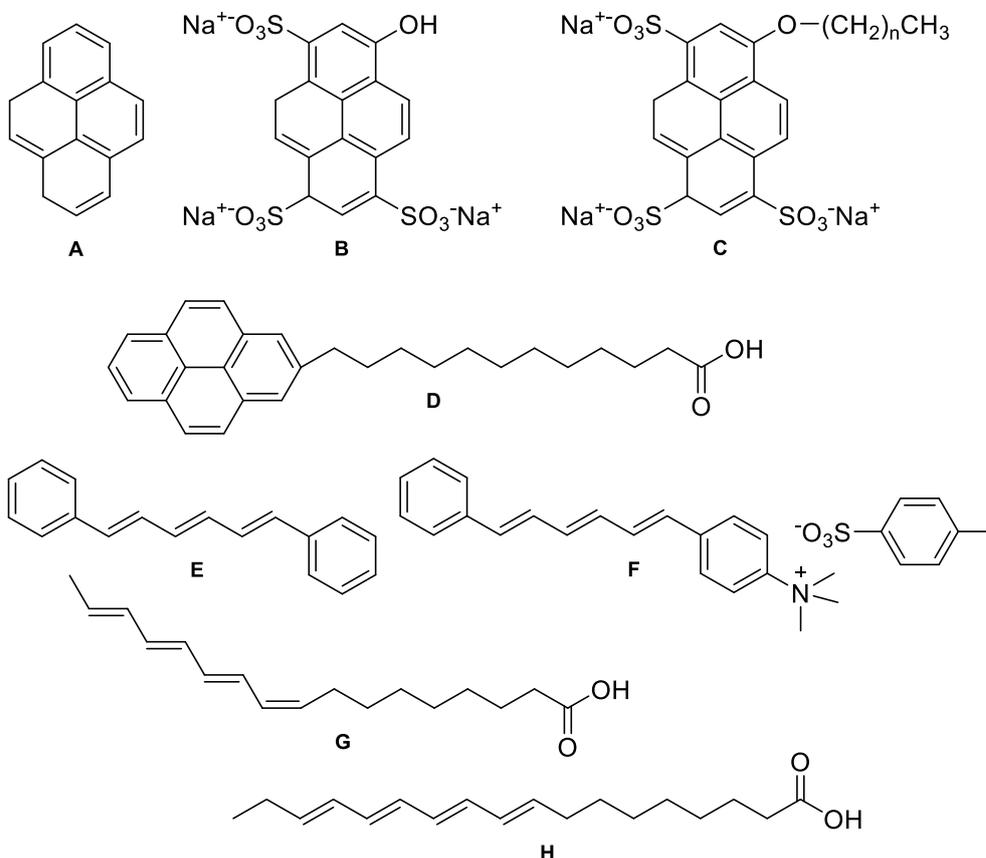
Fluorescentne označevalce lahko delimo na notranje (intrinzične) sonde, zunanje (ekstrinzične) kovalentno vezane sonde ter zunanje (ekstrinzične) nekovalentno vezane sonde. Prvi tip sond predstavlja nekaj primerov, kot so npr. triptofan v proteinih. Prednost kovalentno vezanih sond pred zunanjimi nekovalentno vezanimi sondami je, da je njihova lokacija znana. Poznamo kar nekaj primerov slednjih, npr. fluorescentne molekule

kovalentno vezane na surfaktante (slika 9), polimerne verige, fosfolipide, proteine, polinukleotide itd. Proteine lahko enostavno označimo z ustreznimi funkcionalnimi skupinami, ki se kovalentno vežejo na amino in sulfhidrilne skupine. Za označevanje proteinov se najpogosteje uporabljajo fluorescein, rodamin ter eritrozinski derivati.



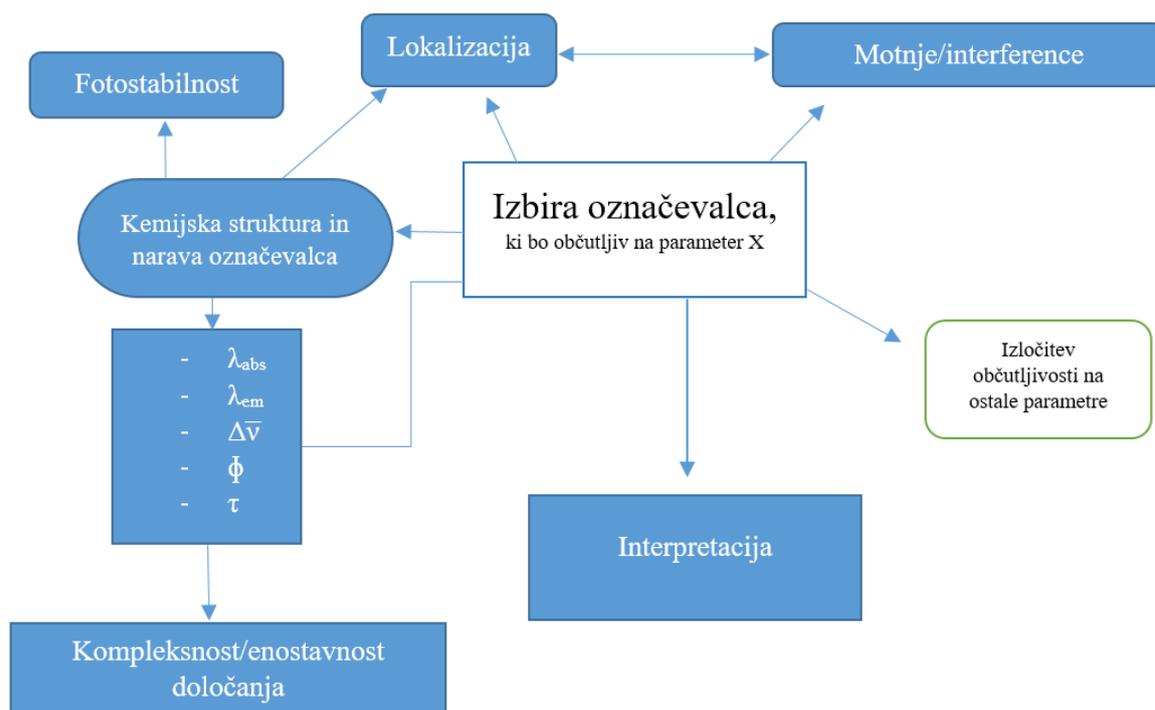
Slika 9: Primeri kovalentno vezanih sond na surfaktante, fosfolipide in polimere. **A:** 2-(9-antroiloksi)stearinska kislina. **B:** 6-(9-antroiloksi)stearinska kislina. **C:** 10-(9-antroiloksi)stearinska kislina. **D:** 12-(9-antroiloksi)stearinska kislina. **E:** (9-antroiloksi)palmitinska kislina. **F:** natrijeva sol 2-(*N*-oktadecil)aminonaftalen-6-sulfonske kisline. **G:** 3-palmitoil-2-(10-pirendekanoil)-*L*-alfa-fosfatidilholin. **H:** polistiren označen z antracenom (7).

Za ekstrinzične nekovalentno vezane sonde je pomembna njihova kemijska struktura, ki vodi v specifične interakcije, ki se vzpostavijo znotraj zelene tarčne regije. Za ta namen je pomembna hidrofobnost, hidrofilitnost ali amfifilnost sonde. Nekaj primerov je prikazanih na spodnji sliki 10 (7).



Slika 10: Primeri hidrofobnih, hidrofilih in amfilih sond. **A:** piren. **B:** trinatrijeva sol 8-hidroksipiren-1,3,6-trisulfonske kisline, (piranin). **C:** trinatrijeva sol 8-alkoksipiren-1,3,6-trisulfonske kisline. **D:** 12-pirendodekanojska kislina. **E:** 1,6-difenil-1,2,5-heksatrien. **F:** 1-(4-trimetilamonijevfenil)-6-fenil-1,3,5-heksatrien, *p*-toluen sulfonat. **G:** *cis*-parinarinska kislina. **H:** *trans*-parinarinska kislina (7).

Na sliki 11 je prikazana strategija izbire fluorescentnega označevalca. Pri izbiri moramo upoštevati njihove lastnosti, ki vplivajo na občutljivost vsake lastnosti mikrookolja, v katerem se bo označevalec nahajal, na primer polarlost in pH.



Slika 11: Strategija izbire fluorescentnega označevalca (7).

1.2.4 Merjenje fluorescence na molekularnem nivoju

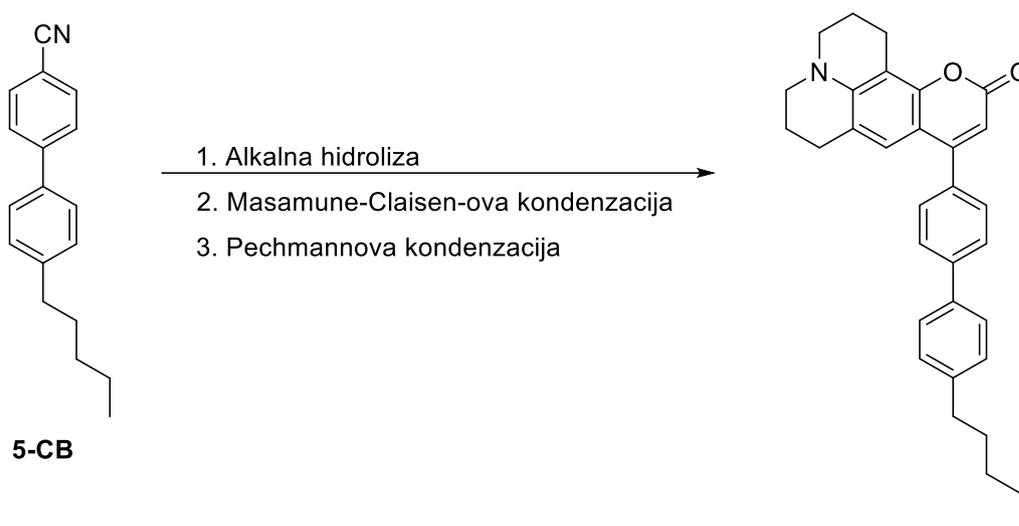
Uporaba fluorescence je široka zaradi njene visoke občutljivosti in selektivnosti, kar pomeni, da lahko s fluorescenčnimi tehnikami natančno določamo zelo nizke koncentracije preučevane snovi z zelo jasnim odzivom in minimalnimi neželenimi odzivi v območju določanja. Najenostavnejša tehnika je *direktna fluorometrična* detekcija, pri čemer je analit fluorescirajoč, ker ga obsevamo z ustrežno ekscitacijsko valovno dolžino svetlobe, in merimo njegov odziv – emisijo fluorescence pri drugi ustrezni valovni dolžini. Primer so aromatski ogljikovodiki, proteini, nekatere učinkovine (npr. morfin), klorofili, itd. Ker pa večina ionov in molekul ni fluorescentnih, je večina metod *indirektnih*: na primer reakcija analita z reagentom (poveže ju kovalentna vez), kar vodi v nastanek fluorescentne spojine, ki je pogosto uporabljena v tekočinski kromatografiji s fluorescentno detekcijo. Fluorescentne tehnike se uporablja na mnogih področjih znanosti: v kemiji, biokemiji medicini, farmaciji, industriji itd. Ne nazadnje, uporablja se tudi fluorescentni imunotest, ki je metoda velikega pomena za biokemijo in medicino (7). Pogosto se uporablja v raziskavah celice, kjer fluorescentne označevalce pritrdimo na določene dele celice in jih nato opazujemo pod fluorescentnim mikroskopom (6).

2 NAMEN DELA IN SINTEZNI NAČRT

Sintetizirali in ovrednotili bomo kumarinski fluorescentni označevalec, ki bo podoben gradniku tekočih kristalov 4-ciano-4'-pentilbifenilu (5-CB) in bo imel vektor polarizacije pravokoten na ravnino tekočih kristalov, ki jih tvori 5-CB.

Sintetizirati želimo fluorofor z emisijskim fluorescentnim spektrom nad 500 nm, ki ga bomo lahko vzbujali z valovno dolžino pri približno 400 nm in bo imel dovolj velik kvantni izkoristek, da bo služil kot označevalec za tekoče kristale, ki jih tvori 5-CB in kot je na primer biološka membrana.

Izhajali bomo iz spojine 5-CB, kot je prikazano na sliki 12: ciano skupino bomo pretvorili v karboksilno skupino z alkalno hidrolizo, in jo v naslednji reakciji podaljšali v keto-ester z Masamune-Claisen-ovo kondenzacijo. Na koncu bomo izvedli Pechmannovo kondenzacijo z juloidinskim derivatom, tako da bomo dobili spojino s kumarinsko skupino, ki je dobro poznan fluorofor.



Slika 12: Sinteza kumarinskega označevalca iz 5-CB v treh sinteznih korakih.

Vsako spojino, ki jo bomo pripravili z omenjenimi reakcijami, bomo izolirali in karakterizirali s pomočjo NMR, IR in MS tehnik ter opisali izgled, izkoristek, retencijski faktor in tališče. Končno spojino bomo ovrednotili z UV-VIS in fluorescentno spektroskopijo: posneli bomo absorpcijske in emisijske spektre v ustreznih topilih ter izračunali kvantni izkoristek in molarni absorptivni koeficient.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 REAGENTI IN TOPILA

Pri sintezi spojin v laboratoriju smo uporabljali reagente in topila proizvajalcev Acros, Sigma, Fluka, Apollo Scientific in Merck, brez predhodne obdelave. Brezvodni THF smo pripravili tik pred uporabo topila z destilacijo ob prisotnosti natrija in benzofenona pod argonovo atmosfero.

3.2 KROMATOGRFSKE METODE

3.2.1 Tankoplastna kromatografija

S TLC smo spremljali potek kemijskih reakcij, izolacije ter čiščenje spojin s kolonsko kromatografijo. Kot stacionarno fazo smo uporabili plošče TLC Silica gel 60 F254 proizvajalca Merck z 0,20 mm debelim nanosom silikagela na aluminijastem nosilcu. Mobilne faze so bile različne in so navedene v naslednjem poglavju pri sintezi posamezne spojine. Detekcija spojin na TLC ploščicah je potekala pod UV svetlobo ($\lambda = 254$ nm in $\lambda = 366$ nm), poleg tega pa smo uporabljali tudi različne orositvene reagente (bromkrezolno zeleno, fosfomolibdenova kislina, ninhidrin, FeCl_3 , rodamin 6G, 2,4-dinitrofenilhidrazin), ki so bili pripravljene po standardnem postopku.

3.2.2 Kolonska kromatografija

Produkte spojin smo čistili s »flash« kolonsko kromatografijo, kjer smo kot stacionarno fazo uporabili silikagel 60 z velikostjo delcev 0,04-0,063 mm proizvajalca Merck. Uporabljene mobilne faze so navedene v naslednjem poglavju pri sintezi posamezne spojine.

3.3 SPEKTROSKOPSKE METODE

3.3.1 Jedrska magnetna resonanca (NMR)

NMR spektre smo posneli na NMR spektrofotometru BrukerAvance III 400 MHz na Fakulteti za farmacijo v Ljubljani. Vzorce smo posneli v devteriranih topilih CDCl_3 ali DMSO-d_6 z dodanim TMS kot internim standardom pri 302 K. Spektre smo procesirali z računalniškim programom NMRnotebook Version 2.70 build 0.9 proizvajalca NMRtec.

3.3.2 Masna spektrometrija (MS)

Masni spektri so bili posneti na masnem spektrometru VG-AnalyticalAutoSpec Q proizvajalca Micromass (Manchester, Velika Britanija) z ESI tehniko v Centru za masno spektrometrijo na Inštitutu Jožef Stefan v Ljubljani.

3.3.3 Infrardeča (IR) spektroskopija

IR-spektre smo posneli na spektrofotometru ThermoNicoletNexus 470 ESP FT-IR na Fakulteti za farmacijo z uporabo tehnike oslabiljene popolne odbojnosti (ATR). Spektre smo analizirali s programom Omnic E.S.P. 5.2.

3.3.4 UV-VIS spektroskopija

Za snemanje absorpcijskih spektrov spojine **3** smo uporabili aparaturo UV-VIS spektrofotometer Varian 50 Conc (USA), na Fakulteti za farmacijo v Ljubljani.

3.3.5 Fluorescenčna spektroskopija

Fluorescenčne spektre spojine **3** smo posneli na fluorimetru PerkinElmer LS 55(UK), na Fakulteti za farmacijo v Ljubljani.

3.4 DOLOČEVANJE TALIŠČ

Spojinam, ki so bile pri sobni temperaturi v trdnem agregatnem stanju, smo določili temperaturo tališča s pomočjo Kofflerjevega mikroskopa z ogrevalno mizico proizvajalca Leica. Tališča niso korigirana.

3.5 NOMENKLATURA IN RISANJE SPOJIN

Za risanje strukturnih formul spojin, reakcij ter poimenovanje po IUPAC nomenklaturi smo uporabili računalniški program ChemDraw Ultra 11.0 ter ChemBioDraw Ultra 13.0 proizvajalca CambridgeSoft.

3.6 REAKCIJE V BREZVODNIH POGOJIH

Pri sintezi nekaterih spojin smo izvajali reakcije v brezvodnih pogojih. To pomeni, da smo predhodno vso steklovino, brizge, igle, magnetne in septume sprali z acetonom ter sušili v sušilniku pri 50 °C 60 minut. Bučke in kapalnike smo nato prepihali z argonom, samo

reakcijo pa prav tako izvajali v argonovi atmosferi, ki smo jo zagotovili z uporabo septumov in balonov z argonom.

3.7 ROTAVAPIRANJE

Za rotavapiranje smo uporabljali rotavaporja BüchiRotavapor R-124 in BüchiRotavapor RE111.

3.8 MERILNI PRIPOMOČKI IN APARATI

Pri delu smo uporabili naslednje pripomočke:

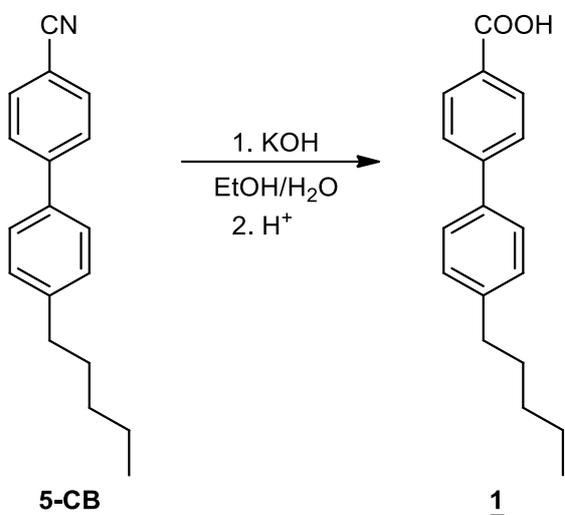
- Polavtomatske pipete BRAND Transferpette[®]: 0,5 – 5 mL; Thermo SCIENTIFIC FINNPIPETTE[®] 100 – 1000 µL,
- Nastavki za pipete, BRAND[®],
- 10 mL steklene penicilinke, neoLAB,
- Parafilm M, BEMIS[®],
- Staklovina: 25 mL merilna bučka, steklena palčka, čaša,
- Kovinska žlička (različni proizvajalci),
- Osebna zaščitna sredstva,
- Mikrocentrifugirke 1,5 mL, Eppendorf.

Pri delu smo uporabili naslednje aparate:

- Analitski tehtnici AE240 in AG245 proizvajalca METTLER-Toledo,
- Laboratorijska tehtnica METTLER-Toledo,
- Ultrazvočni čistilnik Sonis 3 proizvajalca ISKRA PIO d.o.o.,
- Mikrovalovni reaktor, CEM Discover[®],
- Sušilnik.

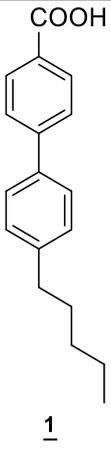
4 EKSPERIMENTALNO DELO IN REZULTATI ANALIZ

4.1 Sinteza 4'-pentil-[1,1'-bifenil]-4-karboksilne kisline (**1**)

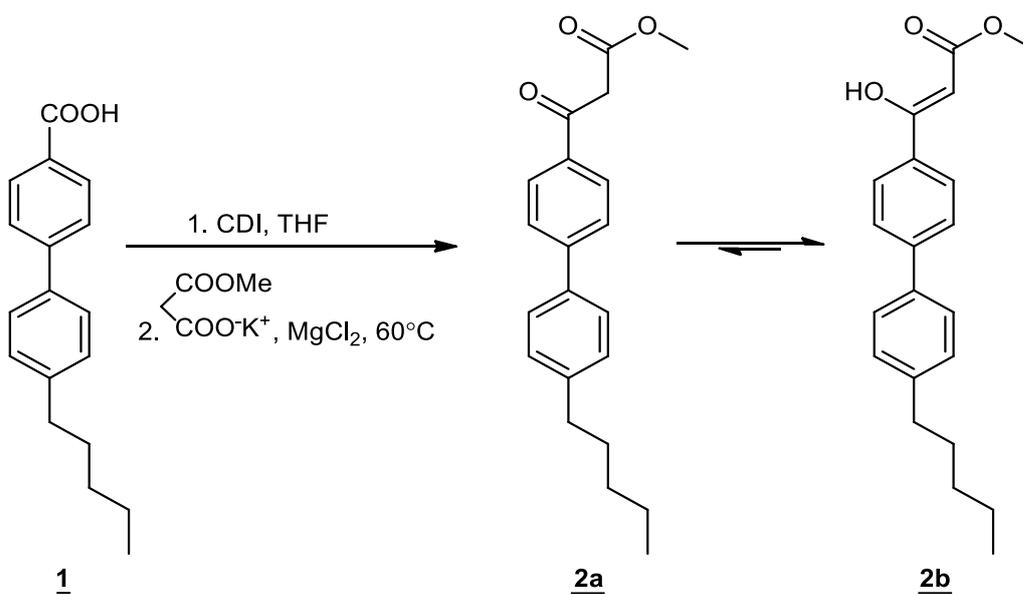


KOH (7,00 g; 0,125 mol; 31 mol. ekv.) smo raztopili v EtOH (62,5 mL) in vodi (0,5 mL) ter dodali 4'-pentil-[1,1'-bifenil]-4-karbonitril (5-CB) (1,00 g; 4,01 mmol; 1 mol. ekv.). Reakcijsko zmes smo nato mešali pod argonovo atmosfero pri temperaturi 60 °C 48 ur. Topilo smo uparili pod znižanim tlakom in k zaostanku dodali 80 mL 10% (w/w) citronske kisline in 100 mL EtOAc. Organsko fazo smo ločili od vodne faze, jo sprali z nasičeno vodno raztopino NaCl (2 × 30 mL), sušili z brezvodnim Na₂SO₄, filtrirali in topilo uparili pod znižanim tlakom. Brezbarvne igličaste kristale smo sušili z membransko črpalko (1,10 g, 80,6 %). Spojina **1** je bila dovolj čista, da smo jo lahko uporabili v naslednji stopnji brez dodatnega čiščenja.

Preglednica II: Rezultati analize spojine 1.

 <p style="text-align: center;"><u>1</u></p>	<p>Izgled: beli igličasti kristali</p> <p>Izkoristek: 80,6 %</p> <p>Rf (EtOAc/heksan : 1/3) = 0,05</p> <p>Tališče: 240 – 243 °C</p>	
¹ H NMR (DMSO-d ₆ , 400 MHz)	$\delta(\text{ppm}) = 0,88$ (t, 3H, $J = 6,9$ Hz, -CH ₃); 1,25 – 1,38 (m, 4H, -CH ₂ -CH ₂ -CH ₃); 1,6 (tt, 2H, $J_1 = 6,9$ Hz, $J_2 = 7,7$ Hz, -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₃); 2,62 (t, 2H, $J = 7,7$ Hz, -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₃); 7,30 – 7,32 (m, 2H, H-Ar'); 7,33 (bs, 0,6H, -COOH); 7,63 – 7,66 (m, 2H, H-Ar'); 7,72 – 7,79 (m, 2H, H-Ar); 7,94 – 8,02 (m, 2H, H-Ar); 12,96 (bs, 0,4H, -COOH).	
¹³ C NMR (DMSO-d ₆ , 100 MHz)	$\delta(\text{ppm}) = 14,4$ (-CH ₃); 22,45 (-CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₃); 31,06 (-CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₃); 31,37 (-CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₃); 35,21 (-CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₃); 126,62 (2C, C-Ar); 127,17 (2C, C-Ar); 128,61 (2C, C-Ar); 129,42 (2C, C-Ar); 133,23 (C-Ar); 137,02 (C-Ar); 142,80 (C-Ar); 143,16 (C-Ar); 168,04 (-COOH).	
IR (ATR)	$\nu [\text{cm}^{-1}] = 3392, 3175, 2953, 2926, 2856, 1644, 1614, 1575, 1555, 1499, 1455, 1423, 1404, 1221, 1191, 1148, 1136, 1004, 846, 785$	
MS (ESI+)	$m/z = 267,1$ [M-H] ⁻	
HRMS (ESI+)	$m/z =$ izračunana vrednost za C ₁₈ H ₂₀ O ₂ [M-H] ⁻	267,1385
	izmerjena vrednost	267,1386

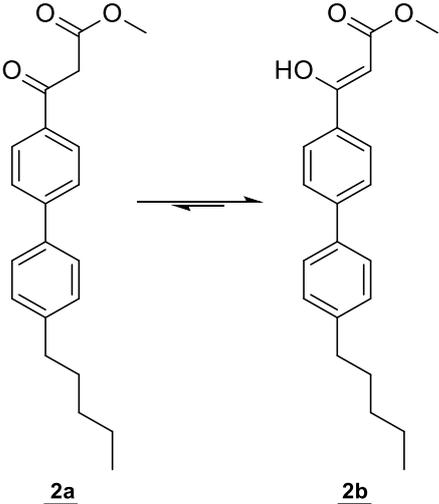
4.2 Sinteza metil 3-okso-3-(4'-pentil-[1,1'-bifenil]-4-il)propanoata (2)



MgCl₂ (0,373 g; 3,917 mmol; 1 mol. ekv.) in metil kalijev malonat (0,795 g; 5,092 mmol; 1,3 mol.ekv.) smo zatehtali v bučko. Dodali smo 10 mL brezvodnega THF in pustili, da se suspenzija meša nad oljno kopeljo s temperaturo 65 °C pod argonovo atmosfero 3 ure.

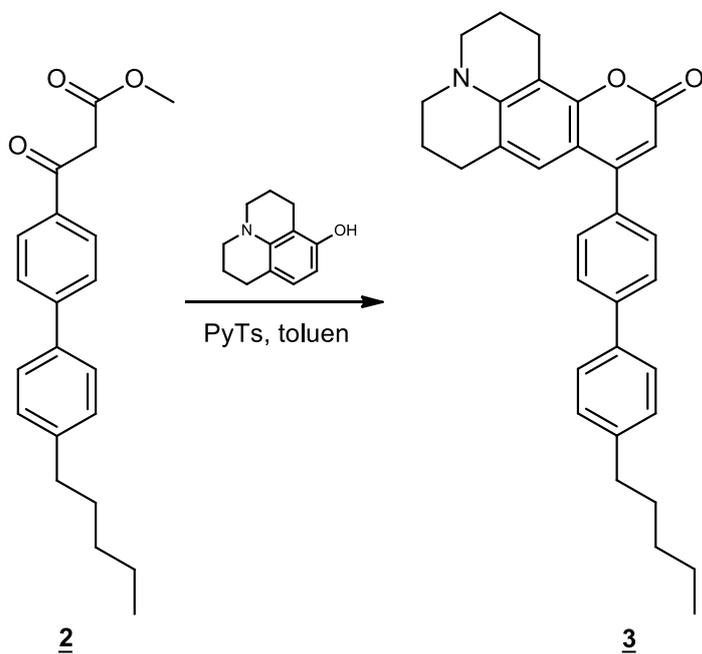
V bučko, kjer je bila posušena spojina **1**, smo dodali CDI (0,762 g; 4,700 mmol; 1,2 mol. ekv.) in brezvodni THF (40 mL) ter pustili mešati raztopino pod argonovo atmosfero 40 min na sobni T in nato še 30 min pri temperaturi 40 °C. Ko se je suspenzija ohladila, smo jo po kapljicah dodajali k ohlajeni suspenziji MgCl₂ in metil kalijevega malonata, ves čas pod argonovo atmosfero. Suspenzijo smo pustili mešati na T = 30 °C čez noč. S TLC smo ugotovili, da reakcija ni popolnoma potekla, zato smo pustili suspenzijo mešati še dva dni pri enakih pogojih. Nato smo topilo uparili na rotavaporju, zmes posušili do suhega in zaostanek čistili s pomočjo kolonske kromatografije (MF: EtOAc/heksan : 1/9 nato 1/5 nato 1/3 nato 1/1).

Preglednica III: Rezultati analize spojine 2.

 <p style="text-align: center;">2a 2b</p>	<p>Izgled: beli igličasti kristali</p> <p>Izkoristek: 74,7 %</p> <p>R_f (EtOAc/heksan : 1/3) = 0,44</p> <p>Tališče: 121 – 123 °C</p>
<p>¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz)</p>	<p>δ(ppm) = 0,95 (t, 3H, <i>J</i> = 7,0 Hz, -CH₃); 1,38 – 1,42 (m, 4H, -CH₂-CH₂-CH₃); 1,66 – 1,74 (m, 2H, -CH₂-CH₂-CH₂-CH₃); 2,69 (t, 2H, <i>J</i> = 7,7 Hz, -CH₂-CH₂-CH₂-CH₃); 3,81 (s, 1H, -O-CH₃, keto); 3,85 (s, 2H, -O-CH₃, enol); 4,07 (s, 0,7H, -CO-CH₂-CO-O-CH₃, keto); 5,76 (s, 0,7H, -C(OH)=CH-CO-O-CH₃, keto); 7,29 – 7,33 (m, 2H, H-Ar'); 7,56 – 7,59 (m, 2H, H-Ar'); 7,66 – 7,68 (m, 1,3H, H-Ar, enol); 7,71 – 7,74 (m, 0,7H, H-Ar, keto); 7,86 – 7,89 (m, 1,3H, H-Ar, enol); 8,03 – 8,05 (m, 0,7H, H-Ar, keto); 12,60 (s, 0,7H, -OH, enol).</p>
<p>¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz)</p>	<p>δ(ppm) = 14,11 (-CH₃); 22,62 (-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₃); 31,17 (-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₃, keto); 31,21 (-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₃, enol); 31,59 (-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₃); 35,67 (-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₃); 45,78 (-CO-CH₂-CO-O-CH₃, keto); 51,48 (-CO-CH₂-CO-O-CH₃, keto); 52,56 (-CO-CH₂-CO-O-CH₃, keto); 86,84 (-C(OH)=CH-CO-O-CH₃, enol); 126,57 (2C, C-Ar); 126,99 (2C, C-Ar); 127,17 (C-Ar); 127,20 (C-Ar); 129,03 (2C, C-Ar); 129,13 (C-Ar); 129,18 (C-Ar); 131,82 (C-Ar); 134,37 (C-Ar); 136,88 (C-Ar); 137,33 (C-Ar);</p>

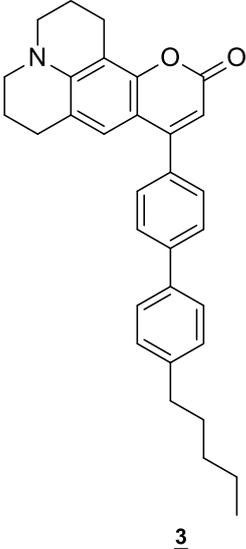
	143,03 (C-Ar); 143,58 (C-Ar); 144,06 (C-Ar); 146,49 (C-Ar); 168,08 (-C(OH)=CH-CO-O-CH ₃ , enol); 171,31 (-CO-CH ₂ -CO-O-CH ₃ , keto); 173,60 (-C(OH)=CH-CO-O-CH ₃ , enol); 191,95 (-CO-CH ₂ - CO-O-CH ₃ , keto).	
IR (ATR)	ν [cm ⁻¹] = 2948, 2929, 2869, 1650, 1607, 1575, 1552, 1495, 1442, 1401, 1385, 1348, 1242, 1180, 1139, 1118, 1079, 1025, 1005, 943, 842, 802, 740	
MS (ESI+)	$m/z = 325 (M + H)^+$	
HRMS (ESI+)	$m/z =$ izračunana vrednost za C ₂₁ H ₂₅ O ₃ (M + H) ⁺	325,1804
	izmerjena vrednost	325,1805

4.3 Sinteza 9-(4'-pentil-[1,1'-bifenil]-4-il)-2,3,6,7-tetrahidro-1*H*,5*H*,11*H*-pirano[2,3-*f*]pirido[3,2,1-*ij*]kinolin-11-ona (**3**)



V 10 mL kvarčni reaktor smo natehtali spojino **2** (60 mg, 0,223 mmol, 1 mol. ekv.), 8-hidroksijuloidin (42,31 mg, 0,223 mmol, 1 mol. ekv.) in piridinijev tozilat (56 mg, 0,223 mmol, 1 mol. ekv.). Dodali smo toluen (3 mL), premešali in segreli z vročim zrakom, da se je piridinijev tozilat raztopil. Reakcijsko zmes smo segrevali 30 min z mikrovalovi (MW) pri moči 40 W do $T = 130\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($T_{\text{max}} = 131\text{ }^{\circ}\text{C}$). Dobili smo temno zeleno fluorescentno zmes. Nato smo topilo uparili na rotavaporju, zmes posušili do suhega in zaostanek čistili s pomočjo kolonske kromatografije (MF: EtOAc/heksan : 1/6 nato 1/3).

Preglednica IV: Rezultati analize spojine **3**.

 <p style="text-align: center;"><u>3</u></p>	<p>Izgled: zeleno-rumeni kristali</p> <p>Izkoristek: 24,6 %</p> <p>R_f (EtOAc/heksan : 1/3) = 0,28</p> <p>Tališče: 160 – 163 °C</p>
<p>¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz)</p>	<p>δ(ppm) = 0,94 (t, 3H, <i>J</i> = 6,9 Hz, -CH₃); 1,36 – 1,42 (m, 4H, -CH₂-CH₂-CH₃); 1,66-1,73 (m, 2H, -CH₂-CH₂-CH₂-CH₃); 1,94 – 2,06 (m, 4H, 2 × N-CH₂-CH₂-Ar); 2,67 – 2,73 (m, 4H, 2 × N-CH₂-CH₂-CH₂-Ar); 2,98 (t, 2H, <i>J</i> = 6,5 Hz, -CH₂-CH₂-CH₂-CH₃); 3,29 (t, 4H, <i>J</i> = 5,7 Hz, 2 × N-CH₂-CH₂-CH₂-Ar); 6,04 (s, 1H, -C=CH-CO-O-); 6,94 (s, 1H, H-Ar-kumarin); 7,31 – 7,33 (m, 2H, H-Ar'); 7,49 – 7,52 (m, 2H, H-Ar'); 7,58 – 7,61 (m, 2H, H-Ar); 7,07 – 7,74 (m, 2H, H-Ar).</p>
<p>¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz)</p>	<p>(ppm) = 14,10 (-CH₃); 20,59 (N-CH₂-CH₂-CH₂-Ar, zgornji lok); 20,67 (N-CH₂-CH₂-CH₂-Ar, spodnji lok); 21,51 (N-CH₂-CH₂-CH₂-Ar, zgornji lok); 22,60 (-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₃); 27,67 (N-CH₂-CH₂-CH₂-Ar, spodnji lok); 31,19 (-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₃); 31,59 (-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₃); 35,64 (-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₃); 49,61 (N-CH₂-CH₂-CH₂-Ar, zgornji lok); 50,03 (N-CH₂-CH₂-CH₂-Ar, spodnji lok); 107,27 (C-Ar), 107,81 (C-Ar), 107,34 (C-Ar), 118,26 (C=CH-C(O)-O); 124,04 (HC-Ar, kumarin); 126,97 (2C, C-Ar); 127,08 (2C, C-Ar); 128,93 (2C, C-Ar); 129,02 (2C, C-Ar); 135,20 (C-Ar); 137,57 (C-Ar); 141,96 (C-Ar); 142,73 (C-Ar); 145,75 (C-Ar, kumarin); 151,77 (C-Ar); 156,09 (C=CH-C(O)-O); 162,47 (-C(O)-).</p>

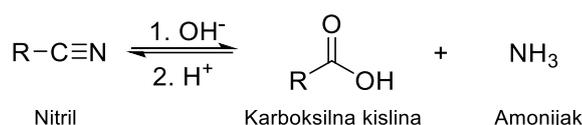
IR (ATR)	v [cm ⁻¹] = 2929, 2849, 1701, 1605, 1585, 1541, 1517, 1495, 1427, 1363, 1310, 1273, 1208, 1185, 1163, 1142, 1075, 1050, 1004, 986, 907, 890, 828, 807, 759, 742, 728, 696	
MS (ESI+)	<i>m/z</i> = 464,2 (M + H) ⁺	
HRMS (ESI+)	<i>m/z</i> = izračunana vrednost za C ₃₂ H ₃₄ NO ₂ (M + H) ⁺	464,2590
	izmerjena vrednost	464,2592

5 RAZPRAVA

5.1 KOMENTAR SINTEZNIH POSTOPKOV

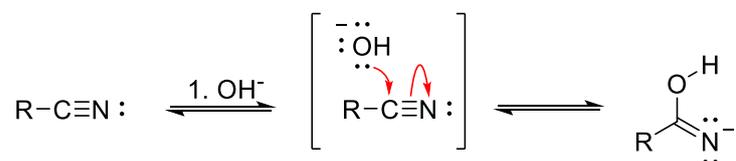
5.1.1 Alkalna hidroliza 5-CB

Alkalna hidroliza je tip nukleofilne substitucijske reakcije, kjer nukleofil (hidroksilni anion) napade elektrofilni center in zamenja del molekule (izstopajoča skupina) z drugo funkcionalno skupino (slika 13) (9).



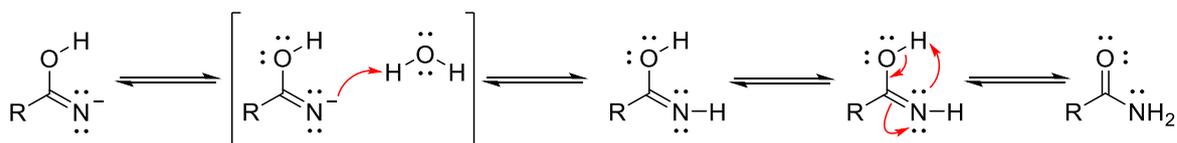
Slika 13: Alkalna hidroliza nitrilov - pretvorba nitrila v karboksilno skupino, pri tem se odcepi amonijak.

Spojino **1** smo sintetizirali z alkalno hidrolizo 5-CB. V našem primeru alkalne hidrolize se reakcija začne z nukleofilno adicijo hidroksilnega aniona na nitril (slika 14).



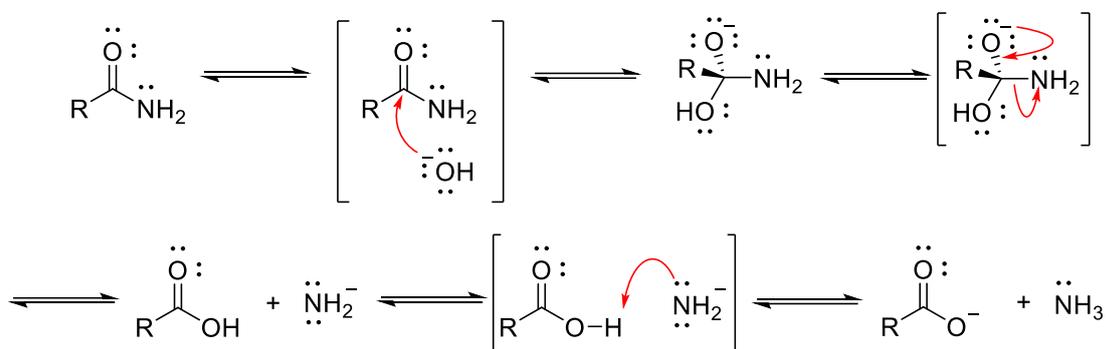
Slika 14: Prva stopnja alkalne hidrolize 5-CB – hidroksilni anion napade ogljik in nastane prvi intermediat.

Prvi intermediat prevzame proton iz molekule vode in se pretvori v amid (slika 15).



Slika 15: Prikaz pretvorbe prvega intermediata v amid.

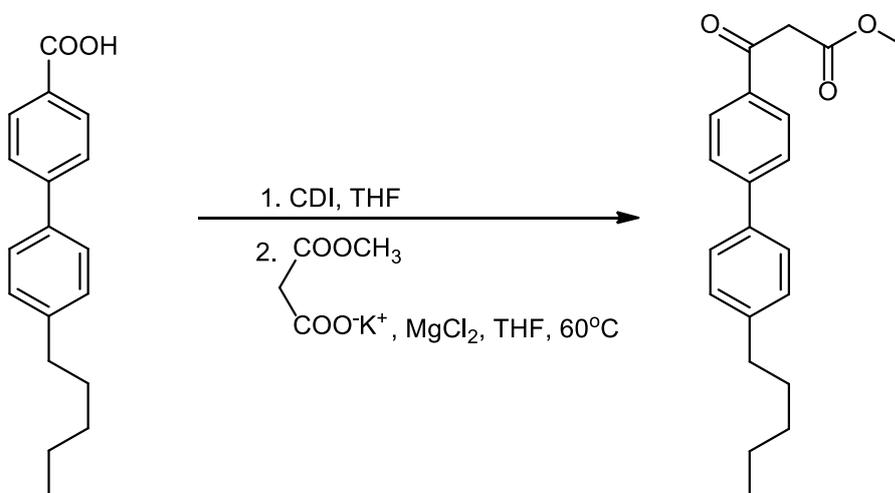
Ta se postopoma pretvori preko hidrolize ob acilni substituciji do karboksilatnega aniona. V reakcijskem mehanizmu gre za adicijo hidroksilnega aniona na karbonilni ogljik in nato eliminacijo amonijaka (slika 16).



Slika 16: Zadnje stopnje alkalne hidrolize amida (10).

Reakcijo katalizira KOH v etanolu in vodi. Nastala je spojina **1** s karboksilno skupino po nakisanju (10).

5.1.2 Sinteza β -ketoestra (Masamune-Claisen-ova kondenzacija)

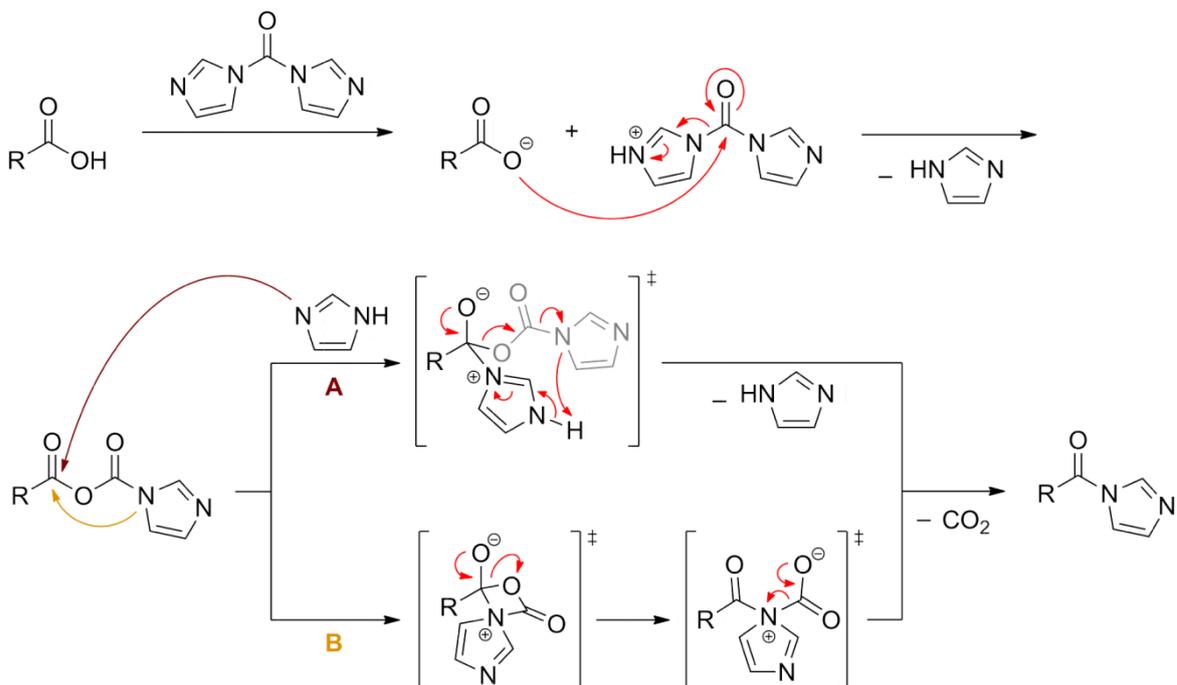


Slika 17: Sinteza β -ketoestra.

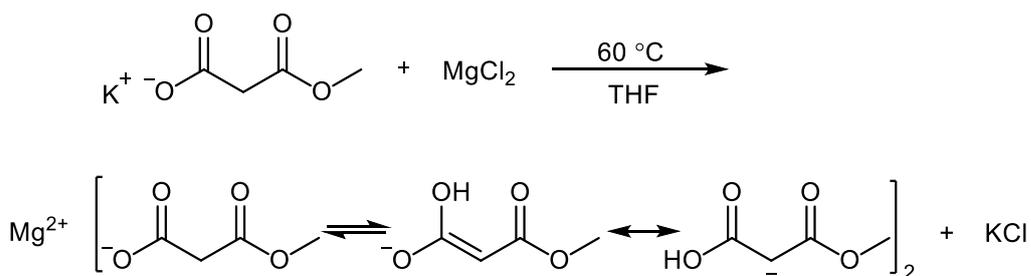
Sintezo β -ketoestra izvedemo s konvergentno Masamune-Claisen-ovo kondenzacijo. Celokupna reakcija je prikazana na sliki 17.

V prvi bučki pripravimo aktiviran kislinski amid med karboksilno kislino (spojina **1**) in karbonildiimidazolom (CDI) (slika 18). V drugi bučki pa mešamo metil kalijev malonat in magnezijev klorid, dokler ne nastane mlečna suspenzija (slika 19). Nato aktiviran kislinski amid počasi dokapavamo k suspenziji magnezijevega malonata, ki kot C-nukleofil napade

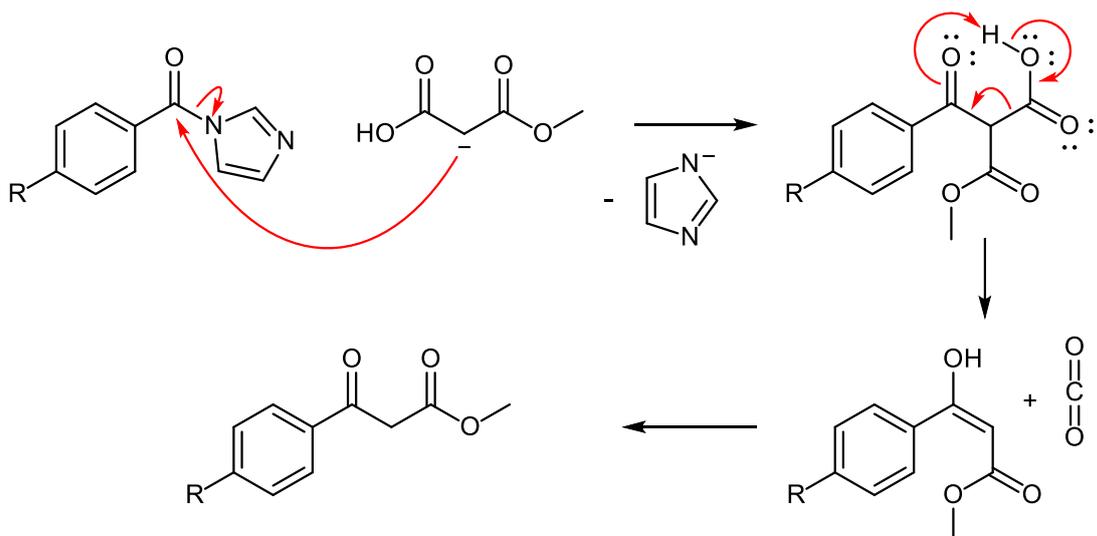
karbonilno skupino aktiviranega kislinskega amida. Sledi izstop imidazola in dekarboksilacija nastalega adukta (produkt adicije) do beta-ketoestra (spojina **2**, slika 20) (11).



Slika 18: Sinteza aktiviranega kislinskega amida s CDI.



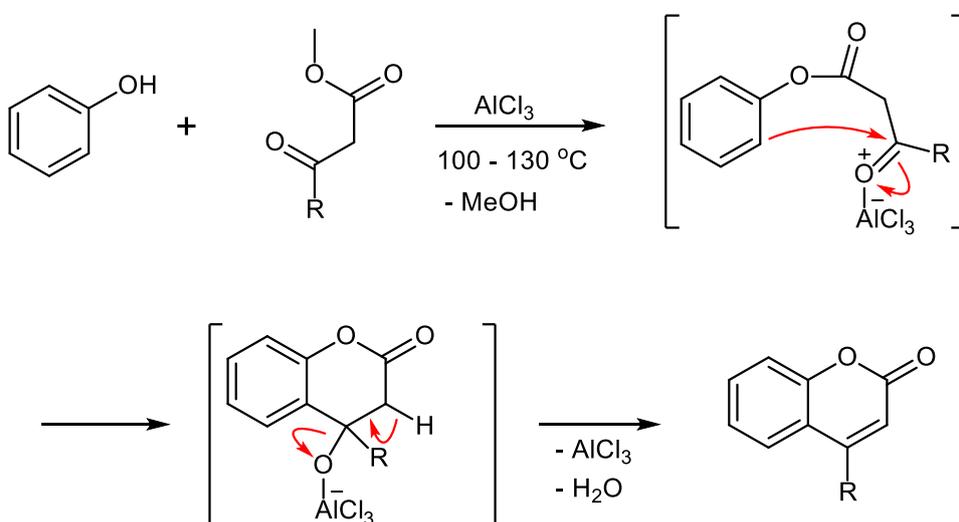
Slika 19: Sinteza magnezijevega monometilmalonata.



Slika 20: Masamune-Claisen-ova kondenzacija: substitucija imidazola z malonatom in dekarboksilacija do β -ketoestra.

5.1.3 Pechmannova kondenzacija

V zadnji stopnji sinteze kumarina poteče Pechmannova kondenzacija. To je spojitev dveh spojin, ki sta običajno fenol in karboksilna kislina ali ester, ki vsebuje β -karbonilno skupino. Pri tem izstopi manjša molekula.



Slika 21: Pechmannova kondenzacija.

Izhajali smo iz spojine **2**, ki je derivat β -ketoestra. Dodali smo 8-hidroksijuloidin, pri čemer je nastala spojina **3** oziroma kumarin. Reakcija je potekala pod kislimi pogoji, ki jih zagotavlja piridinijev tozilat in s tem katalizira transesterifikacijo. Nastal je estrski

intermediat. Sledila je Michaelova adicija, ki je termodinamično kontrolirana. Donor elektronov je ogljik iz fenolnega obroča, akceptor pa je nenasičen karbonilni del iz spojine **2**. Del molekule se zapre v nov obroč. Sledi rearomatizacija. Hkrati se je v kislem okolju eliminirala voda ob nastanku končnega produkta – to je spojine **3** (slika 21) (12).

5.2 IZRAČUN KVANTNEGA IZKORISTKA IN EKSTINKCIJSKEGA KOEFICIENTA ZA SPOJINO 3

5.2.1 Kvantni izkoristek

Za izračun kvantnega izkoristka spojine 3 smo na začetku posneli absorpcijske spektre preiskovane in referenčne spojine v različnih koncentracijskih območjih. Iz posnetih spektrov smo določili ekscitacijsko valovno dolžino, s katero bomo vzbujali fluorescenčne molekule. Pri tej izbrani valovni dolžini vzbujanja smo posneli fluorescenčne oziroma emisijske spektre preiskovane in referenčne spojine v različnih koncentracijskih območjih. Za računanje kvantnega izkoristka smo izbrali ustrezna koncentracijska območja obeh spojin, tako da bosta imeli približno enako absorpcijo pri izbrani valovni dolžini vzbujanja. Za izračun kvantnega izkoristka smo uporabili absorpcijske vrednosti obeh spojin pri valovni dolžini vzbujanja v izbranem koncentracijskem območju in jima izračunali površine pod emisijskimi spektri.

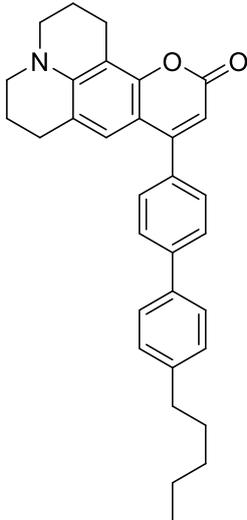
V praksi izračun kvantnega izkoristka poteka s primerjalno meritvijo ob spojini z znanim kvantnim izkoristkom. Idealna referenčna spojina mora imeti približno enako absorpcijo pri izbrani valovni dolžini, podobne vzbujevalne oziroma emisijske lastnosti, uporabljeno mora biti isto topilo in imeti morata približno enako fluorescenco, da lahko uporabljamo instrument za merjenje fluorescenc obeh spojin hkrati v linearnem območju določanja.

Kot referenčno spojino smo uporabili kumarin 6 (C6), ker je strukturno podoben naši spojini 3. Nekatere značilnosti spojine C6 so podane v preglednici V.

Preglednica V: Referenčna spojina C6.

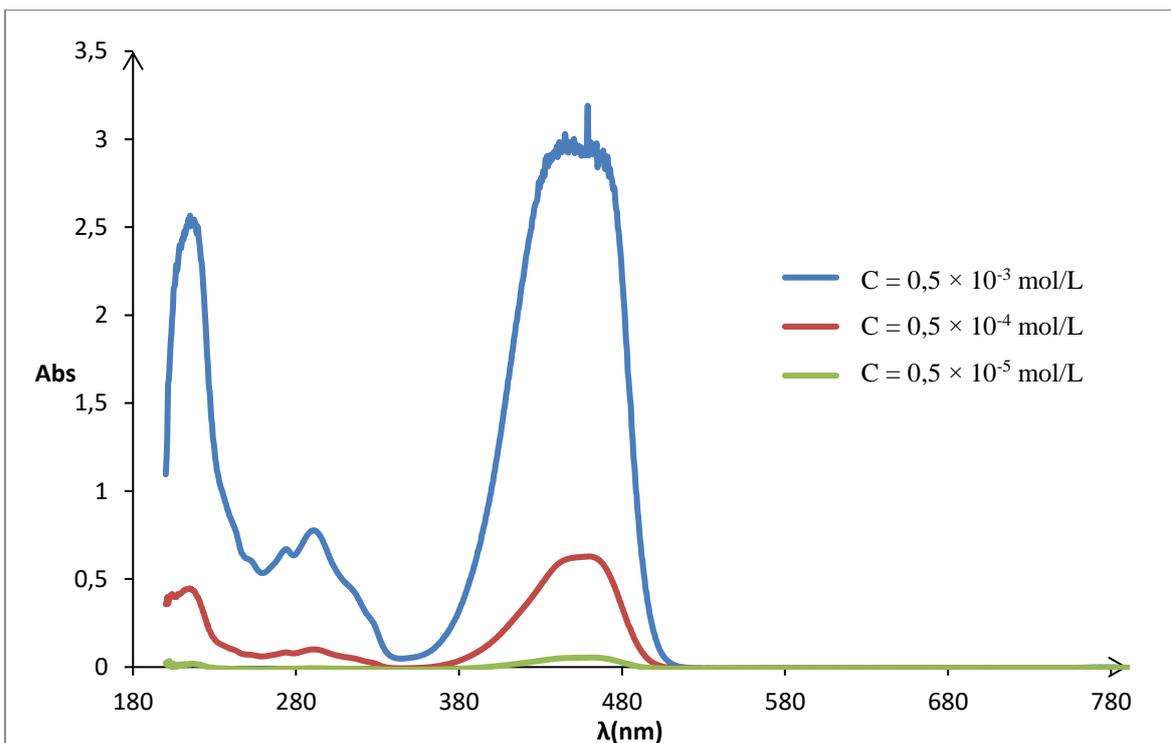
Spojina C6 (kumarin 6)	
	$M = 350,44 \text{ g/mol}$
	$\Phi = 0,78$

Preglednica VI: Preiskovana spojina.

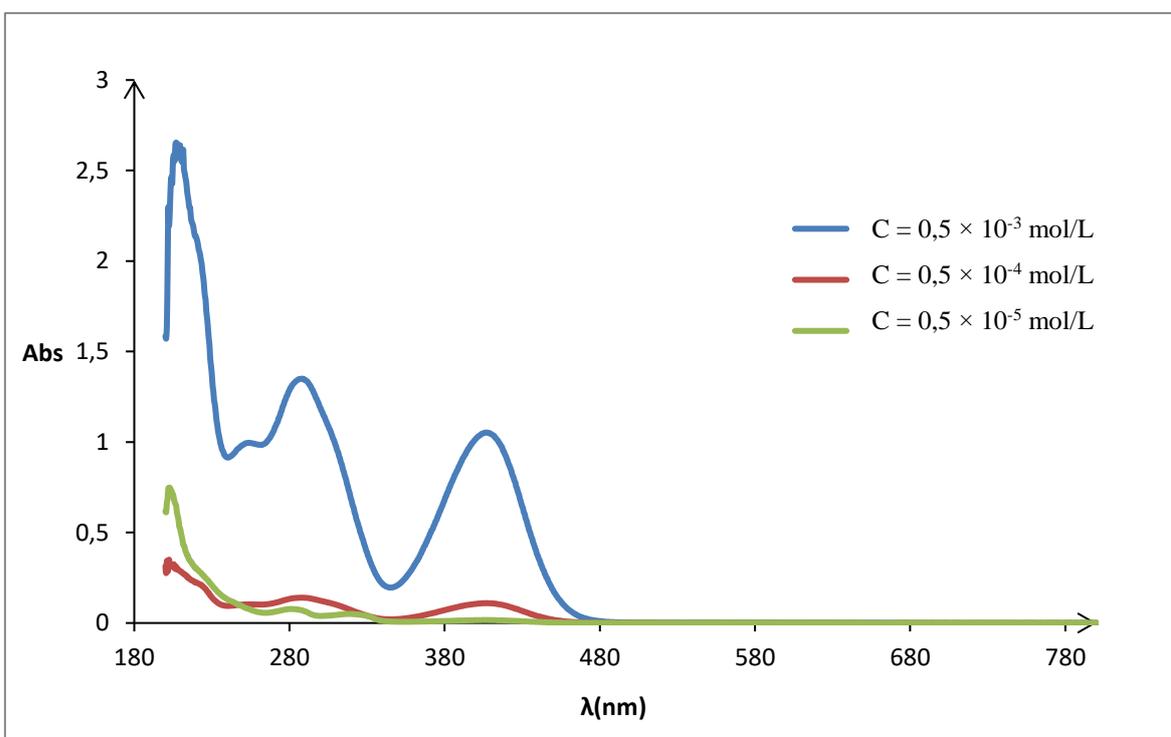
Spojina 3	
	M = 463,61 g/mol

V preglednici VI je strukturna formula in molska masa spojine **3**. Obe spojini, preiskovana in referenčna, sta kumarinska derivata, pri katerih so aromatski predeli odgovorni za fluorescenco (elektronska gostota).

Iz slike 22 je razvidno, da ima spojina C6 absorpcijski maksimum pri približno 460 nm. Zelo visok odziv ima pri koncentraciji $0,5 \times 10^{-3}$ mol/L, v ostalih dveh koncentracijskih območjih pa je bistveno nižji. Vrh absorpcijskega spektra spojine C6 pri koncentraciji $0,5 \times 10^{-4}$ mol/L se nahaja v bolj linearnem območju določanja ($A < 1$), zato je najbolj smiselno uporabiti tako koncentracijsko območje. Koncentracija $0,5 \times 10^{-5}$ mol/L spojine C6 pokaže bistveno slabši odziv, pri katerem maksimuma absorpcije sploh ni mogoče natančno določiti.

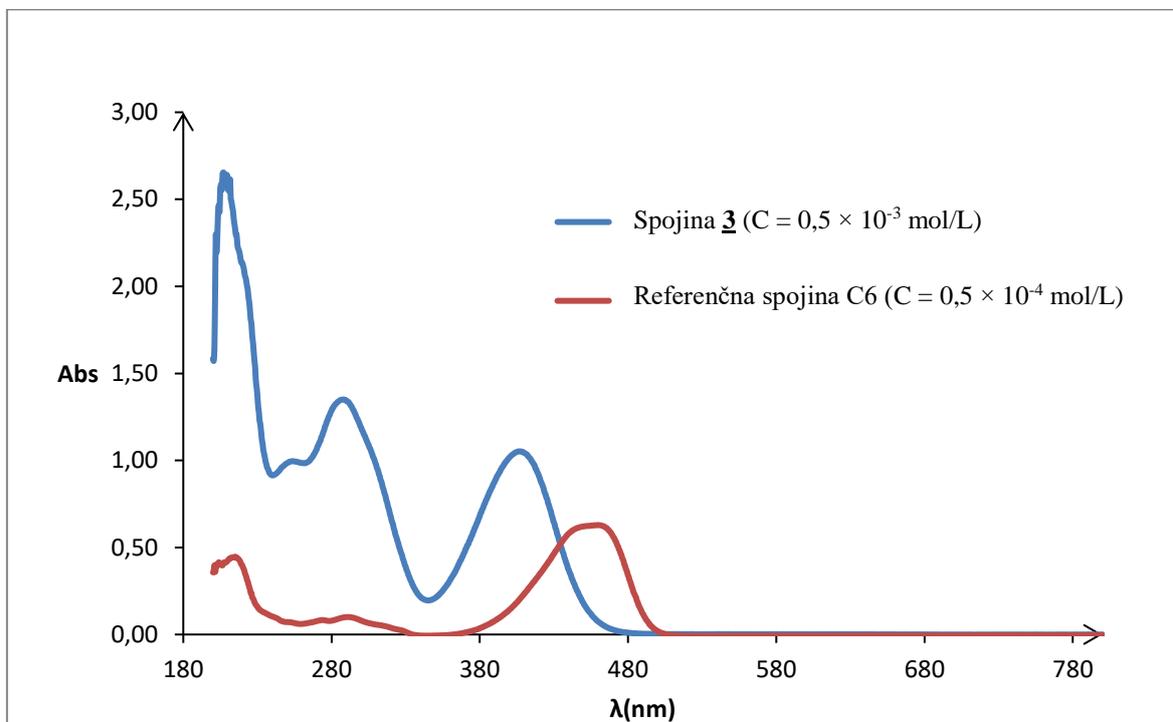


Slika 22: Absorpcijski spektri referenčne spojine C6 v etanolu v različnih koncentracijskih območjih.



Slika 23: Absorpcijski spektri spojine **3** v etanolu v različnih koncentracijskih območjih.

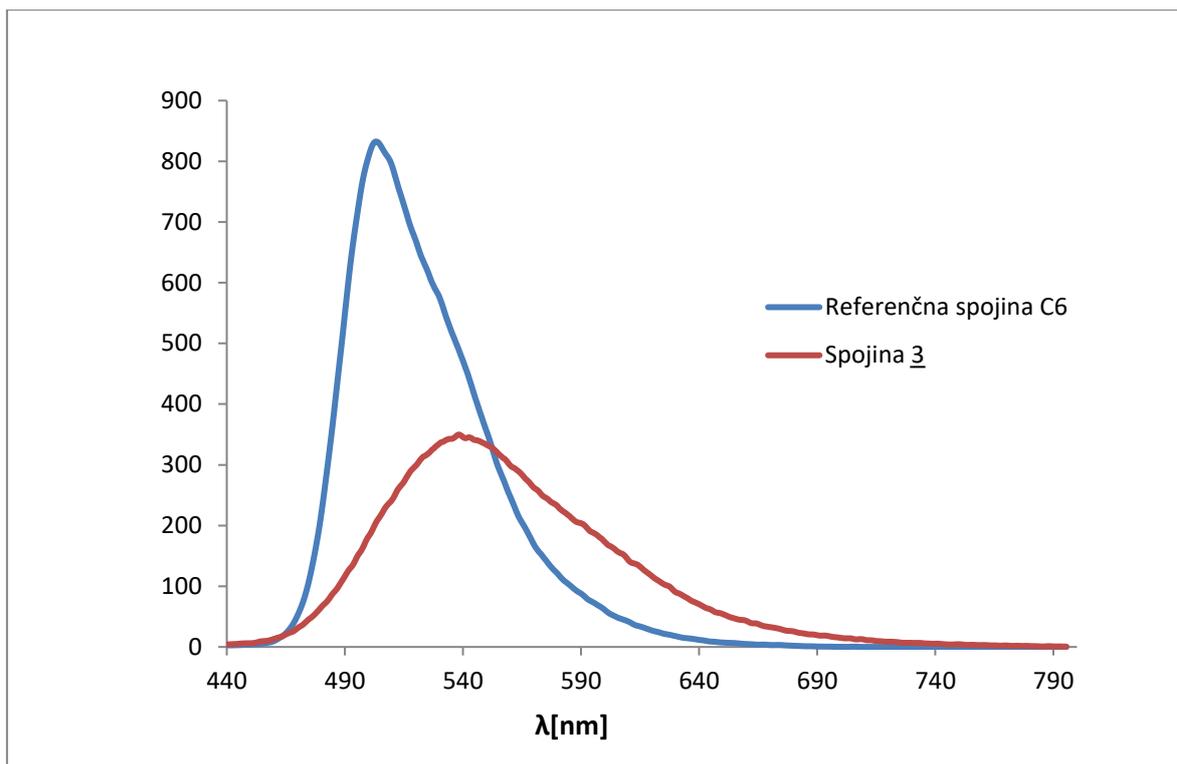
Spojina **3** ima absorpcijski maksimum pri približno 410 nm (slika 23). Pri tej valovni dolžini ima ustrezen odziv samo pri koncentraciji $0,5 \times 10^{-3}$ mol/L, v nižjih koncentracijskih območjih absorpcija ni dovolj velika, da bi maksimume lahko natančno določili.



Slika 24: Absorpcijska spektra v izbranih koncentracijskih območjih preiskovane in referenčne spojine v etanolu.

Izbrali smo si koncentracijsko območje spojine **3** ($C = 0,5 \times 10^{-3}$ mol/L) in referenčne spojine C6 ($C = 0,5 \times 10^{-4}$ mol/L), ki imata vrhove absorpcijskih maksimumov v linearnem območju določevanja (absorpcija do vrednosti približno 1,0) od valovne dolžine približno 380 nm in 480 nm (slika 24). Za vzbujanje smo si izbrali valovno dolžino 420 nm, kar je po našem mnenju najoptimalnejše za vzbujanje obeh spojin, da bosta dali ustrezne fluorescenčne odzive.

Pri vzbujanju obeh spojin z valovno dolžino 420 nm merimo emisijo svetlobe od približno 440 nm do 800 nm kakor nam to dopušča fluorimeter. Referenčna spojina C6 ima emisijski maksimum pri valovni dolžini približno 500 nm, spojina **3** pa pri približno 540 nm (slika 25). Površina pod krivuljo emisijskega spektra referenčne spojine je večja od površine pod krivuljo emisijskega spektra spojine **3**. Obe površini bomo uporabili za izračun kvantnega izkoristka spojine **3**.



Slika 25: Emisijska spektra spojine 3 in referenčne spojine C6 v izbranih koncentracijskih območjih in pri izbrani valovni dolžini vzbujanja 420 nm.

Za izračun kvantnega izkoristka za spojino 3 naredimo preračun po enačbi 1 in 2.

$$\Phi_A = \Phi_B \times \frac{AUC_B}{AUC_A} \quad \text{Enačba 1}$$

$$\Phi_A = \Phi_B \times \frac{\frac{AUC_B}{A_B}}{\frac{AUC_A}{A_A}} \quad \text{Enačba 2}$$

Preglednica VII: Podatki o merjenih spojinah.

Spojina A (Spojina <u>3</u>)		
$c = 0,5 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$	100 × redčenje	$c = 0,5 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$
$A = 0,351$		$A = 0,00351$
		$AUC = 52452,0$
Spojina B (referenčna spojina C6)		
$c = 0,5 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$	100 × redčenje	$c = 0,5 \times 10^{-7} \text{ mol/L}$
$A = 0,9256$		$A = 0,009256$
		$AUC = 37221,5$

Valovna dolžina vzbujanja je 420 nm.

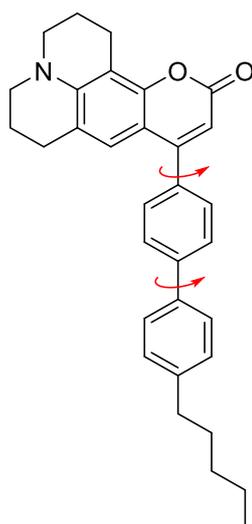
Absorpcije smo izmerili raztopinam z večjimi koncentracijami ter jih nato hipotetično redčili (Preglednica VII) ob upoštevanju linearnosti Beer-Lambertovega zakona. Na ta način smo naredili manjšo napako, kot če bi merili zelo razredčene raztopine. Vsaka metoda ima določeno mejo zaznavnosti in mejo določitve. Pri zelo nizkih odzivih so lahko napake meritev večje. Pri zelo visokih odzivih pa metoda ni več linearna, zato moramo izbrati ustrezno koncentracijsko območje merjenih raztopin.

$$\Phi_A = 0,78 \times \frac{\frac{37221,5}{0,009256}}{\frac{52452,0}{0,00351}} = 0,21$$

Enačba 3

Kvantni izkoristek (enačba 3) predstavlja delež sprejetih fotonov, ki se odda v obliki svetlobe. Podajamo ga v vrednostih od 0 do 1, pri čemer 1 predstavlja maksimum, 0 pa minimum (7).

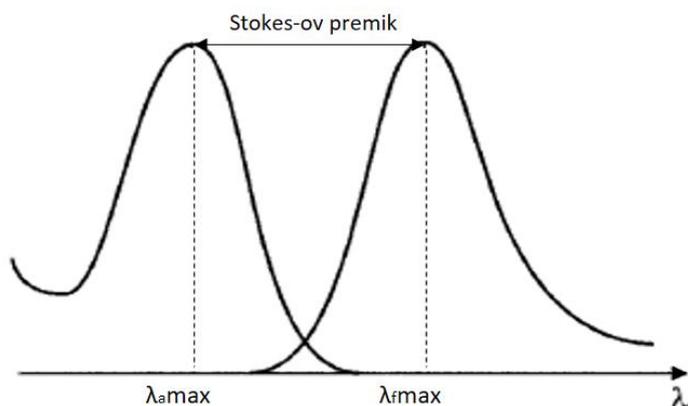
Kvantni izkoristek spojine **3** je nizek (0,21). Absorbirana energija je precej višja od emitirane, kar pomeni, da se porabi za ostale procese pri fluorescirajoči molekuli. Lahko se porabi za relaksacijo – na primer z rotacijo okoli enojnih vezi med obroči, kot je prikazano na sliki 26. Če topilu povišamo viskoznost, bo manj rotacije okoli enojnih vezi, kvantni izkoristek pa bo večji. Prav tako če to spojino vgradimo v tekoče kristale, kjer okolica prepreči prosto rotacijo oziroma jo zmanjša (7).



Slika 26: Prikaz proste rotacije molekule okoli vezi med kumarinskim skeletom in fenilnima obročema pri relaksaciji.

Absorpcijo težko merimo pri zelo nizkih koncentracijah, lažje je meriti emisijo, zato smo absorpcijo pri 420 nm izmerili raztopinam z večjo koncentracijo. Fluorescenčne oziroma emisijske spektre pa smo posneli raztopinam z nižjimi koncentracijami in jim izračunali površino pod krivuljo, pri tem pa smo absorpcijo zmanjšali za $100 \times$ (hipotetično) ob upoštevanju Beer-Lambertovega zakona. Absorpcija je lahko linearna (po Beer-Lambertovem zakonu), pri fluorescenci linearnosti ni.

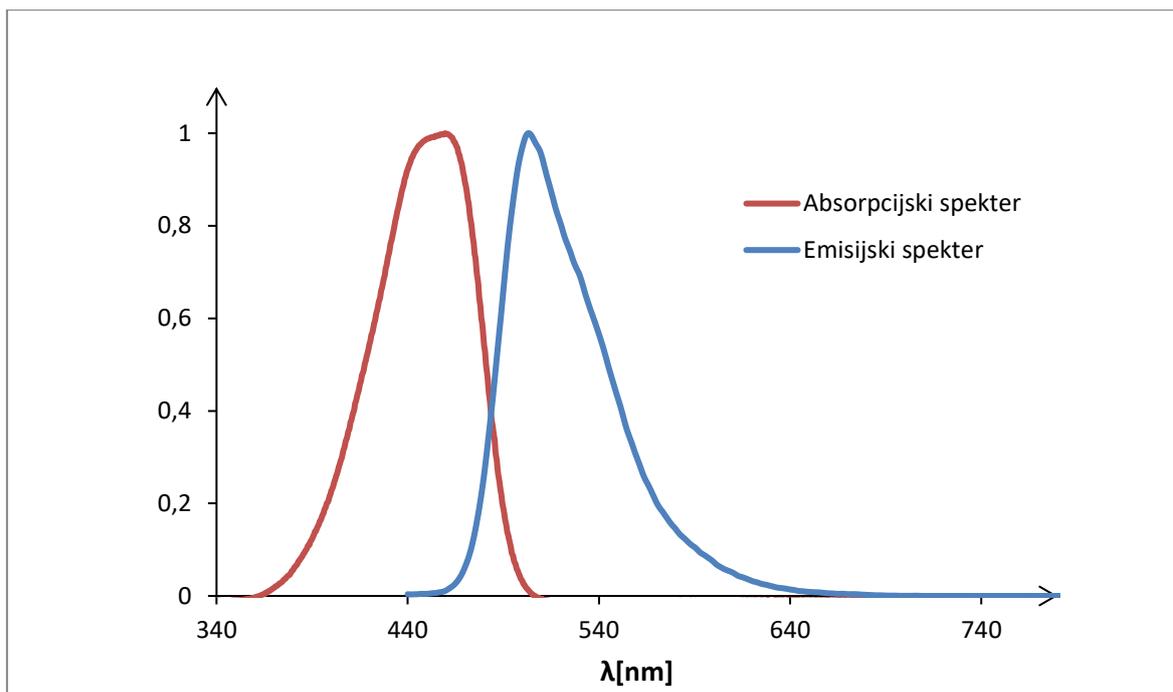
Na sliki 27 je prikazan Stokes-ov premik, ki predstavlja razliko med maksimumom absorpcijskega in emisijskega spektra fluorescenčne substance (izraženo v valovni dolžini). Je pomemben parameter občutljivosti fluorescenčne tehnike. Detekcija fluorescentnih molekul je lažja, če je Stokes-ov premik večji, vendar pa ne sme biti prevelik, ker to predstavlja manjšo energijo, ki se sprosti v obliki emisije fluorescence (6).



Slika 27: Prikaz Stokes-ovega premika (7).

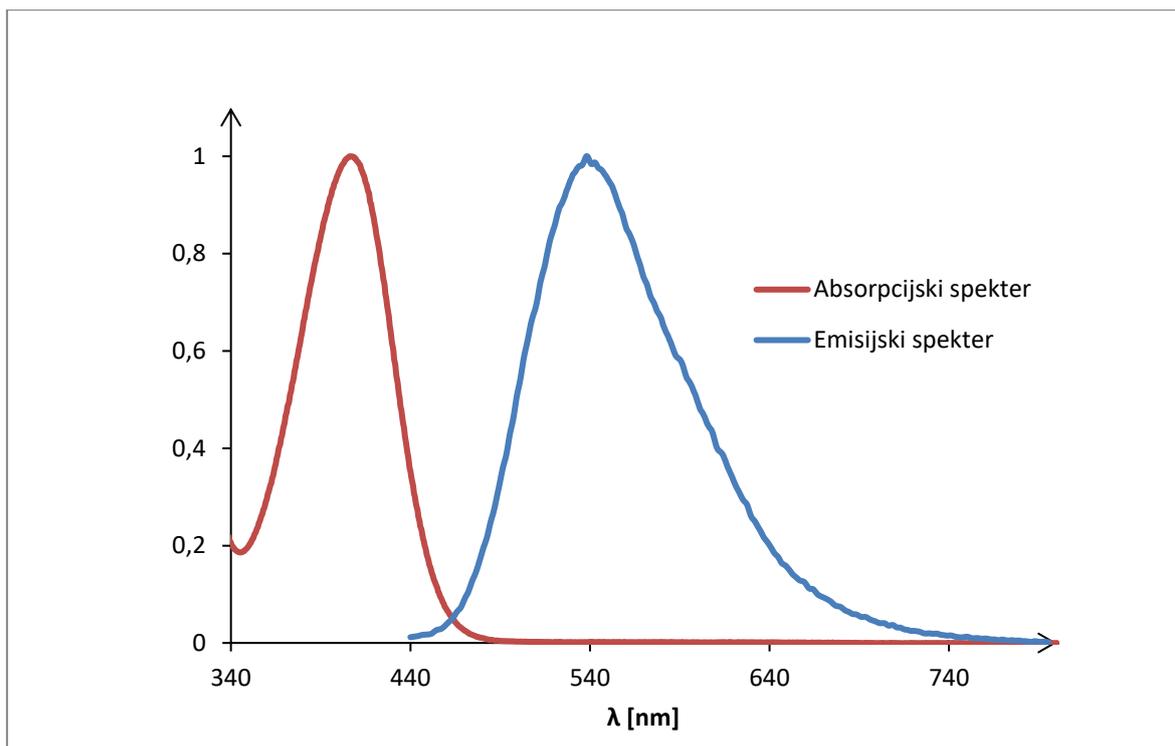
Energija emitiranih fotonov je manjša od energije absorbiranih, ker se del energije lahko takoj po absorpciji uporabi za konformacijske in vibracijske spremembe molekule, del energije pa se lahko tudi sprosti v okolje v obliki toplote. Fluorescenca oziroma emisija fluorescence predstavlja preostanek energije, ko molekula prehaja iz vzbujenega v osnovno stanje (13).

Spojine imajo različne absorpcijske maksimume in tudi različna območja absorpcije. Najbolj optimalno je, da fluorescirajočo snov obsevamo pri maksimumu absorpcije, ker posledično močnejše fluorescira. Vendar, če se absorpcijski in emisijski spekter pretežno pokrivata (v tem primeru je Stokes-ov premik manjši), bomo težje določevali fluorescenco preiskovani spojini.

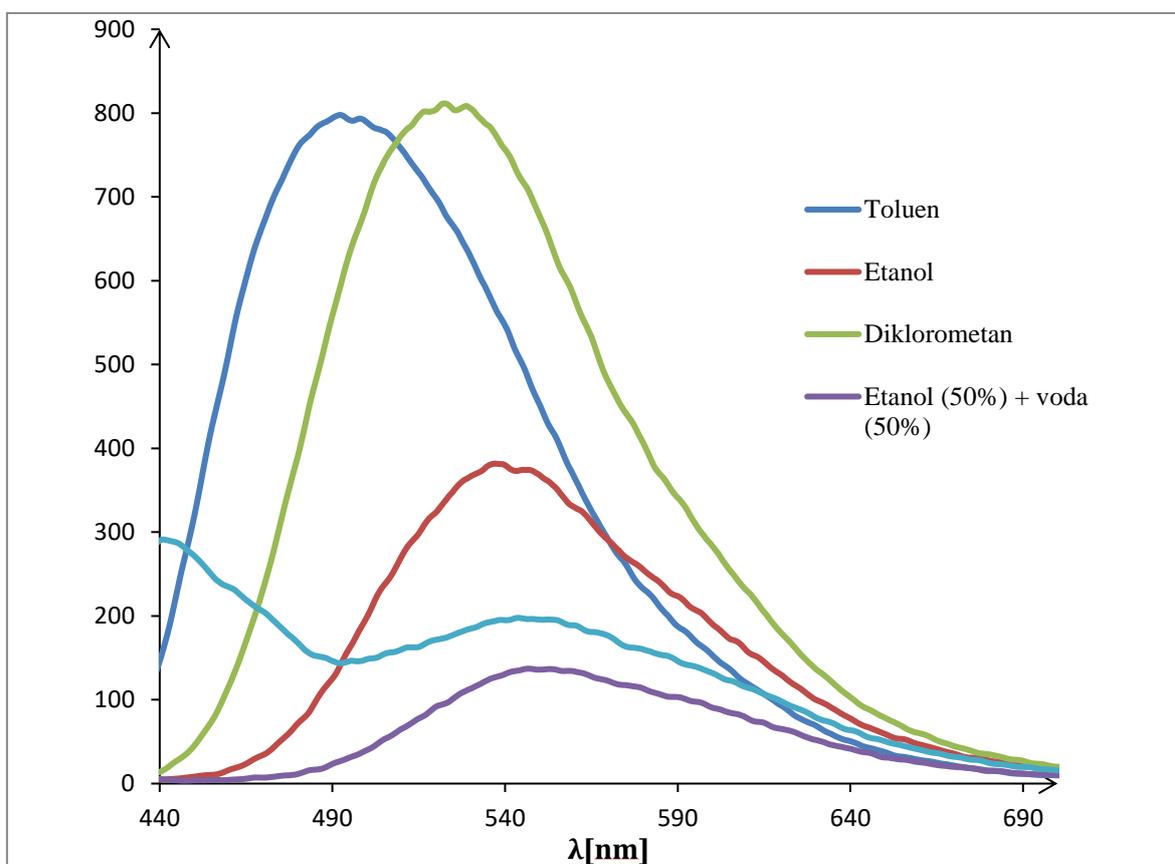


Slika 28: Normirani absorpcijski in emisijski spekter referenčne spojine C6.

Emisija fluorescenčne svetlobe referenčne spojine C6 se prične v območju med valovnimi dolžinami 440 nm in do približno 650 nm, kot je prikazano na sliki 28. Če si za vzbujanje spojine izberemo valovno dolžino maksimuma absorpcije (to je približno 460 nm), potem bomo težko posneli celoten spekter emisije svetlobe, ker bi pri detekciji od 440 nm do 650 nm zajeli tudi vzbujevalno svetlobo. V praksi bi predstavljal problem tudi fluorimeter, s katerim običajno merimo emisijo pri daljših valovnih dolžinah, kot je vzbujevalna valovna dolžina. Torej bi si morali v tem primeru izbrati vzbujevalno valovno dolžino pri manj kot 440 nm, kar pa pomeni, da bi dobili manjšo intenzivnost fluorescenčne emisije.



Slika 29: Normirani absorpcijski in emisijski spekter spojine 3.



Slika 30: Emisijski spektri spojine 3 v različnih topilih.

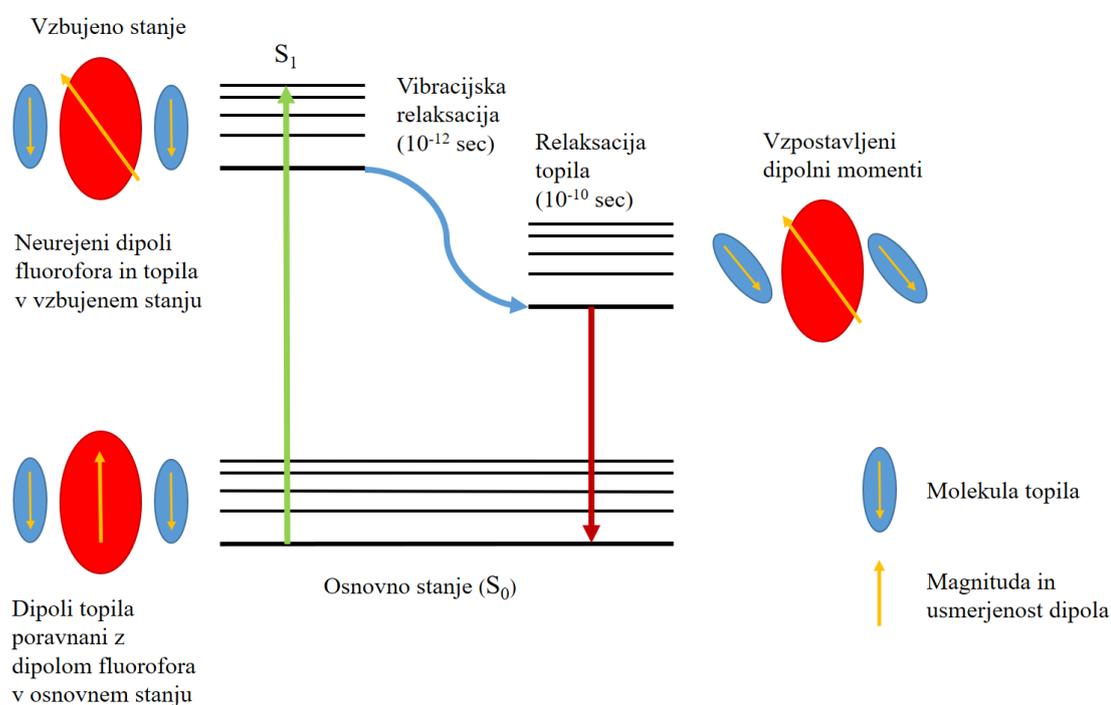
Absorpcijski in emisijski spekter referenčne spojine C6 se bolj prekrivata kot pri spojini **3**. Pri spojini **3** se spektra zelo malo oziroma skoraj nič ne prekrivata - Stokes-ov premik je večji kot pri referenčni spojini C6, zato je določanje take spojine lažje (slika 29).

Spojino **3** lahko vzбудimo z njenim absorpcijskim maksimumom pri valovni dolžini približno 410 nm, detekcijo fluorescenčne emisije pa merimo od 440 nm do približno 800 nm.

Na sliki 30 vidimo, da ima spojina **3** v manj polarnih organskih topilih emisijske vrhove pomaknjene k nižjim valovnim dolžinam in daje višje odzive. V bolj polarnih topilih ima nižje odzive pomaknjene k višjim valovnim dolžinam.

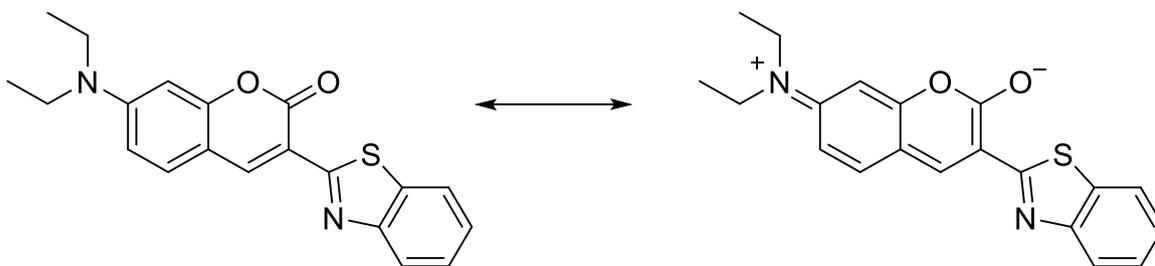
Na fluorescenco ima izbira topila velik vpliv. Topilo ima veliko faktorjev, ki vplivajo na emisijo fluorescence. V največji meri ima vpliv polarnost topila. Molekule fluorescirajoče spojine reagirajo z okoliškimi molekulami, ki so lahko molekule topila, kalcijevi ioni, anorganske in organske molekule ter drugo (14).

Primer fluorescirajoče molekule v polarnem topilu je prikazan na sliki 31.



Slika 31: Prikaz dipolov v osnovnem in vzbujenem stanju ter relaksacija topila ob prehajanju molekul iz vzbujenega v osnovno stanje (14).

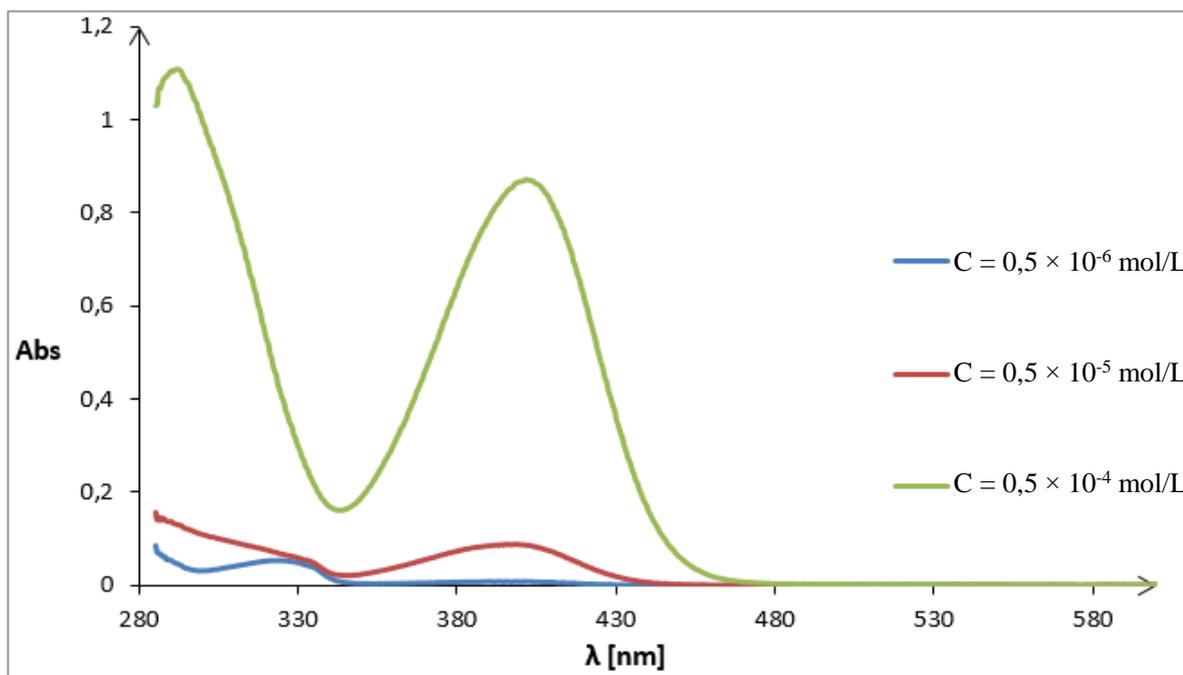
Okoli fluorescirajoče molekule se orientirajo okoliške molekule s svojim dipolnim momentom. Ko preide fluorescirajoča molekula v vzbujeno stanje, se ji spremeni intenzivnost in smer dipolnega momenta, okoliške molekule topila pa tega niso sposobne narediti tako hitro. Ob prehajanju fluorofora nazaj v osnovno stanje potečejo najprej relaksacijske spremembe, nato pa se del absorbirane energije porabi za preureditev molekul topila okoli vzbujene fluorescirajoče molekule, kar imenujemo relaksacija topila. Preostanek energije se na koncu sprosti v obliki svetlobe kot emisija fluorescence. Pri bolj polarnih topilih se več te energije porabi za relaksacijo topila, zato je manj oddane svetlobe in posledično večji Stokes-ov premik. Pri nepolarnih topilih je manj efektov topila zaradi odsotnosti dipolnega momenta in je manjši Stokes-ov premik, kar pomeni, da se manj energije porabi za preureditev molekul okoli topila. V tem primeru se več energije sprosti v obliki svetlobe oziroma fluorescence.



Slika 32: Referenčna spojina (kumarin C6) ima več resonančnih struktur.

Na sliki 32 sta prikazani dve resonančni strukturi referenčne spojine (kumarin C6), ki sta pri različnih topilih v različnem ravnotežnem stanju, ki ga določeno topilo stabilizira.

Drugi parametri, ki vplivajo na fluorescenco, so tudi temperatura, pH in koncentracija (lokalna) okoli fluorescirajočih spojin (7).



Slika 33: Absorpcijski spektri v različnih koncentracijskih območjih spojine **3** v toluenu.

Na sliki 33 so prikazani absorpcijski spektri spojine **3** v toluenu. Spekter s koncentracijo $C = 0,5 \times 10^{-4}$ mol/L spojine **3** je zelo podoben absorpcijskem spektru iste spojine v etanolu pri koncentraciji $C = 0,5 \times 10^{-3}$ mol/L, ki ga lahko vidimo na sliki 23. Tudi emisijska spektra omenjene spojine v etanolu in toluenu sta podobna, kar lahko vidimo na sliki 30.

5.2.2 Molarni absorptivni koeficient

Za izračun molarne absorptivnega koeficienta spojine **3** smo uporabili enačbo 4.

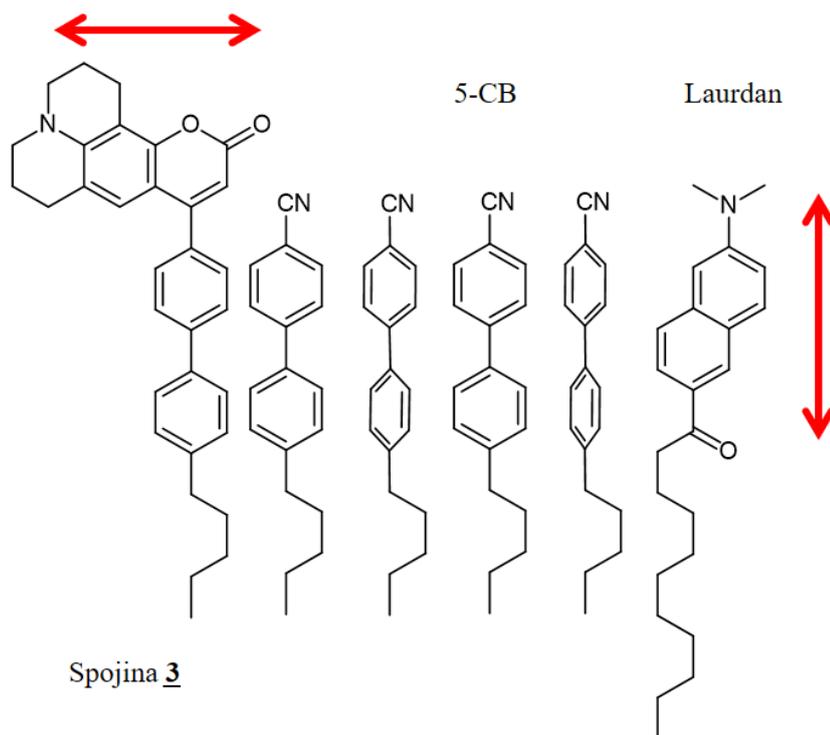
$$A = \varepsilon \cdot c \cdot l \quad \text{Enačba 4}$$

$$\varepsilon = \frac{A}{c \cdot l} = \frac{0,351}{0,5 \cdot 10^{-5} \text{ molL}^{-1} \cdot 1 \text{ cm}}$$

$$\varepsilon = 70200 \text{ Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$$

Molarni absorptivni koeficient (ε) je konstanta oziroma sorazmernostni koeficient, ki je odvisen od valovne dolžine in koncentracije topilca v raztopini, ki ji določamo ε [$\text{Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$]. Kadar ga poznamo, lahko koncentracijo topilca c [molL^{-1}] izračunamo iz absorpcije z uporabo Beer-Lambertovega zakona $A = \varepsilon \cdot c \cdot l$ (enačba 4), pri čemer je l dolžina optične poti [cm] (6, 7, 15).

5.3 POLARIZACIJSKI VEKTOR SPOJINE 3

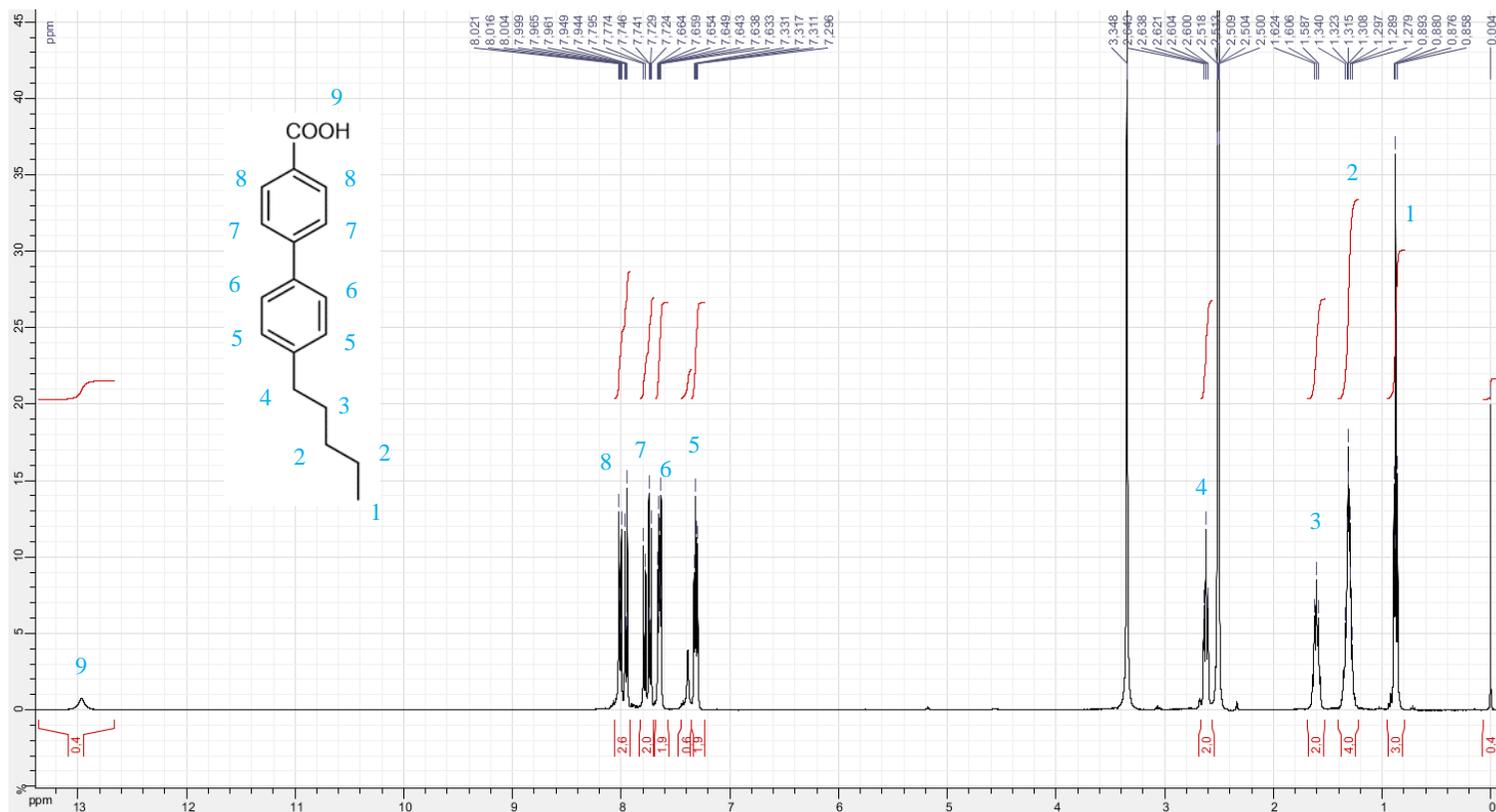


Slika 34: Prikaz polarizacijskega vektorja laurdana in spojine 3 glede na 5-CB.

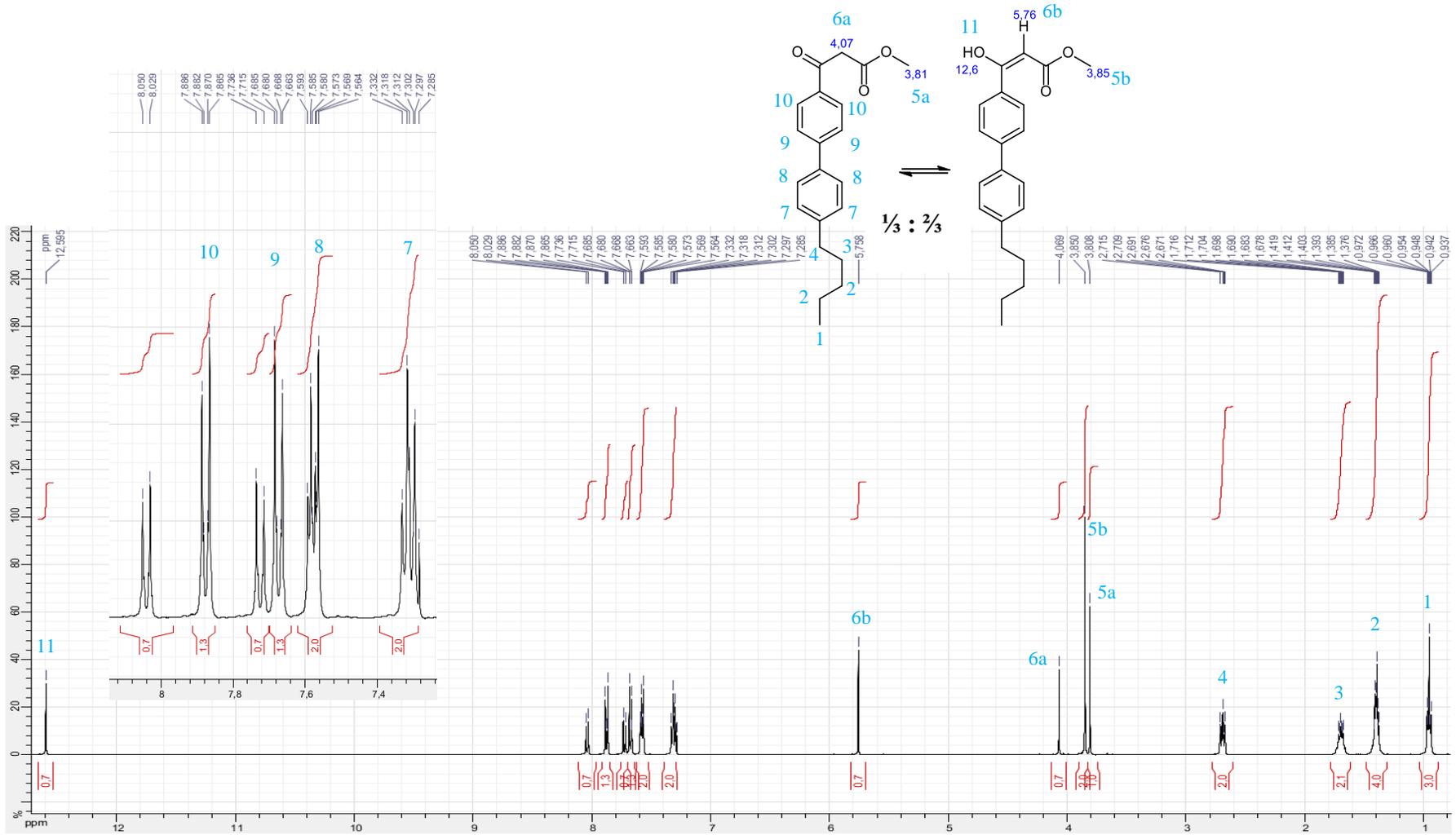
Če predpostavimo, da se spojina 3 sidra v tekoče kristale s podobno orientacijo vzdolžne osi molekule, je polarizacijski vektor spojine 3 pravokoten na ravnino tekočih kristalov, ki jih tvori 5-CB. Na sliki 34 so prikazane strukturne formule spojine 3, 5-CB ter laurdana. Pri laurdanu je polarizacijski vektor vodoraven glede na ravnino tekočih kristalov (puščice predstavljajo vektor polarizacije).

5.4 KOMENTAR NMR SPEKTROV SINTETIZIRANIH SPOJIN

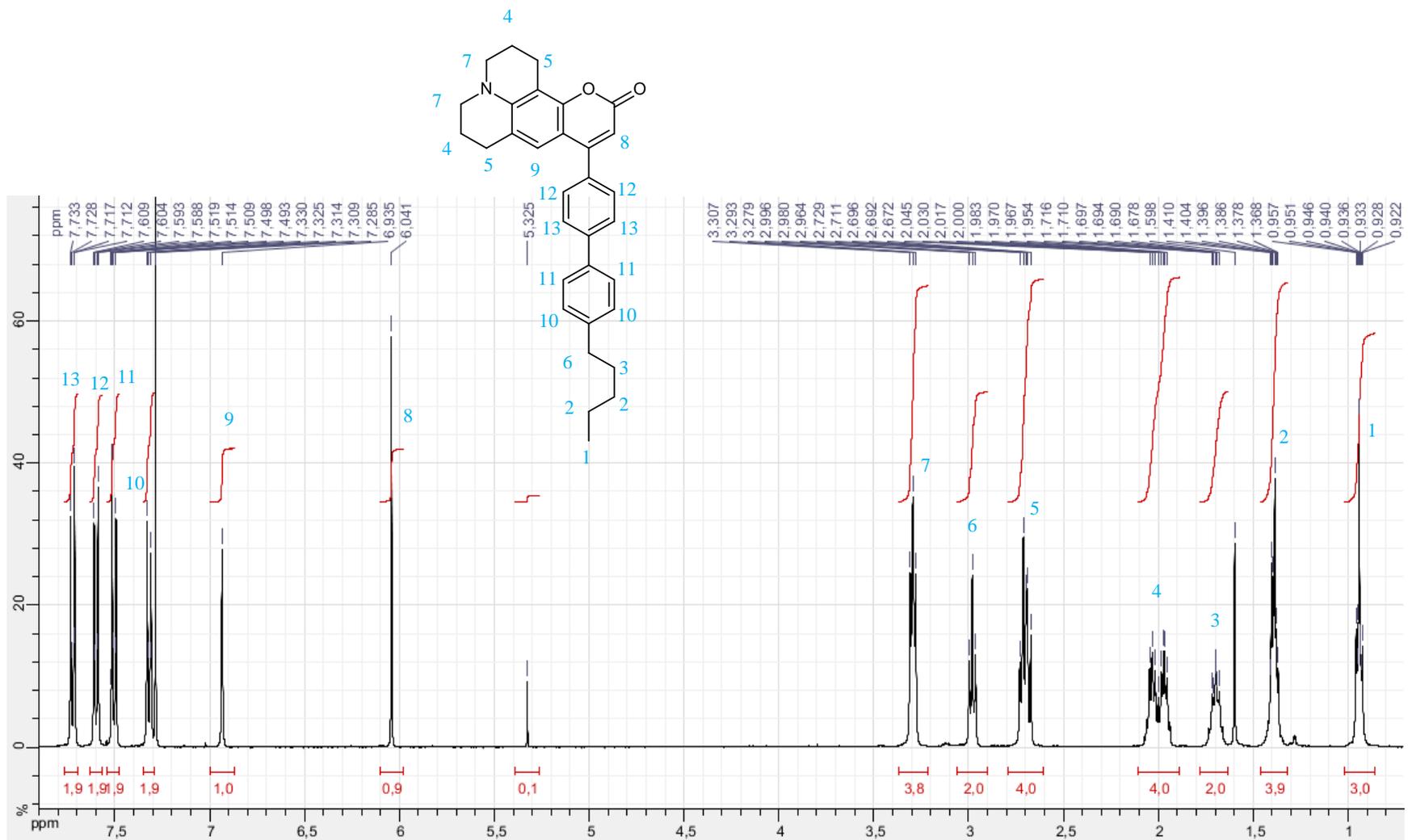
Vsem trem spojinam (**1** – **3**) smo posneli ^1H in ^{13}C NMR spektre. Podrobneje bomo opisali ^1H NMR spektre.



Slika 35: ^1H NMR spekter spojine **1**.

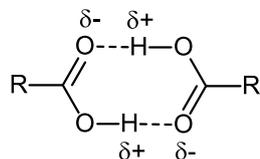


Slika 36: ¹H NMR spekter spojene 2.



Slika 37: ¹H NMR spekter spojene 3.

Na sliki 35 je NMR spekter spojine **1** posnet v DMSO-d₆. Spojina **1** ima karboksilno skupino, ki je lahko v prosti obliki (–COOH) ali pa se dve molekuli preko vodikovih vezi povežeta v dimer (slika 38).



Slika 38: Struktura dimera karboksilnih kislin z delnimi naboji.

Ker je na protonu različna elektronska gostota, se signal v NMR spektru pojavi pri dveh kemijskih premikih: pri 7,33 in 12,96 ppm.

Za beta-ketoestre (spojina **2**) je značilna keto enol tautomerija. Na sliki 36 vidimo obe obliki spojine **2**, beta-ketoester in enol v razmerju 1:2. Zato vidimo več signalov, kot pa bi pričakovali samo za eno obliko. Keto enol tautomerija vpliva na elektronsko gostoto v molekuli (ta pa na senčenje jeder), medtem ko protoni na bolj oddaljenih delih molekule te spremembe ne čutijo. Signali teh protonov se zato v NMR spektru pojavijo pri enakem kemijskem premiku za keto in enolno obliko.

Iz NMR spektra spojine **3** (slika 37) lahko zaključimo, da je spojina **3** čista in le v eni obliki (ni prisotne tautomerije, ki bi vplivala na elektronsko gostoto in posledično senčenje jeder). Kot nečistota je priložen le diklorometan (signal pri 5,32 ppm), ki smo ga uporabili kot topilo pri čiščenju spojine. Diklorometan zlahka odstranimo tako, da spojino dlje časa sušimo pri znižanem tlaku.

6 SKLEPI

- Sintetizirali smo kumarinski fluorescentni označevalec (spojina **3**), ki je podoben gradniku tekočih kristalov 5-CB in ima vektor polarizacije pravokoten na ravnino tekočih kristalov, ki jih tvori 5-CB.
- Spojina **3** je kumarinski derivat, ki ima aromatski predel, ki je odgovoren za fluorescenco.
- Spojina **3** v etanolu ($C = 0,5 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$) emitira svetlobo od 440 nm do približno 800 nm, z maksimumom pri 540 nm.
- Kvantni izkoristek spojine **3** je relativno nizek (0,21). Če uporabimo topilo z višjo viskoznostjo, bo manj rotacije okoli enojnih vezi med obroči, kvantni izkoristek pa bo večji. Enak učinek dosežemo, če to spojino vgradimo v tekoče kristale, kjer okolica prepreči prosto rotacijo oziroma jo zmanjša.
- Na fluorescenco ima izbira topila velik vpliv. Spojina **3** ima v manj polarnih organskih topilih vrhove pomaknjene k nižjim valovnim dolžinam in daje višje odzive. Pri bolj polarnih topilih pa se več energije porabi za relaksacijo topila.
- Molarni absorptivni koeficient za spojino **3** je $70200 \text{ Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Kumarinski fluorescentni označevalec **3** je ustrezen za vzbujanje pri približno 400 nm in merjenje emisijskega spektra od valovne dolžine 440 do 800 nm, le kvantni izkoristek je slabši, kot smo pričakovali. Kvantni izkoristek bi lahko izboljšali s sintezo bolj togih ali sterično oviranih analogov, kjer ni možna prosta rotacija med obroči.

7 LITERATURA

1. Kumar S: Liquid crystals: experimental study of physical Properties and phase transitions, Cambridge University Press, Cambridge, 2001: 1-28.
2. Spletni vir: <https://www.thoughtco.com/states-of-matter-2699423>. Dostop: 24.05.2017.
3. Bisoyi HK, Li Q: Liquid Crystals, Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology, John Wiley and Sons, 2014: 1-52.
4. Hussain Z, Qazi F, Ahmed MI, Usman A, Riaz A, Abbasi AD: Liquid crystals based sensing platform-technological aspects, Biosensors and Bioelectronics, 85, 2016: 110-127.
5. Fernandez AA, Kouwer PHJ: Key Developments in Ionic Liquid Crystals, International Journal of Molecular Sciences, 2016: 17, 731: 1-31.
6. Lakowicz JR: Principles of Fluorescence Spectroscopy, 3rd edition, Springer US, Baltimore, 2006, 1-61.
7. Valeur B: Molecular Fluorescence: Principles and Applications, Wiley-VCH, Weinheim, 2001, 3-71.
8. Spletni vir: <http://zasrce.si/clanek/elektromagnetna-sevanja-in-njihovi-ucinki-na-telo/>. Dostop: 17.06.2017.
9. McMurry J: Organic Chemistry, 4th edition, Pacific Grove, CA: Brooks/Cole Publishing Company, 1996: 820–821.
10. Spletni vir: http://www.wikipremed.com/03_organicmechanisms.php?mch_code=030209_100. Dostop: 22.03.2017.

11. Brooks DW: C-Acylation under Virtually Neutral Conditions, *Angewandte Chemie International Edition in English*, 18, 1979: 72–74.
12. Pechmann HV: Neue Bildungsweise der Cumarine. Synthese des Dapnetins, *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft*, 1884, 17 (1), 929–936.
13. Spletni vir: <https://www.bio-rad-antibodies.com/flow-cytometry-fluorescence.html>.
Dostop: 03.06.2017.
14. Spletni vir: <http://www.olympusmicro.com/primer/java/jablonski/solventeffects/>.
Dostop: 03.06.2017.
15. Mayerhofer TG, Mutschke H, Popp J: Employing Theories Far beyond Their Limits—The Case of the (Boguer–) Beer–Lambert Law, *ChemPhysChem*, 17, 2016, 1-9.