

# Sinteza, spektroskopska karakterizacija i računalno modeliranje novih di-heterostilbena

---

**Damjanović, Mario**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2023**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Chemical Engineering and Technology / Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:149:214255>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-12-26**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of Faculty of Chemical Engineering and Technology University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE  
SVEUČILIŠNI PRIJEDIPLOMSKI STUDIJ

Mario Damjanović

ZAVRŠNI RAD

Zagreb, rujan 2023.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I  
TEHNOLOGIJE  
POVJERENSTVO ZA ZAVRŠNE ISPITE

Kandidat Mario Damjanović

Predao je izrađen završni rad dana: 19. rujna 2023.

Povjerenstvo u sastavu:

prof. dr. sc. Irena Škorić, Sveučilište u Zagrebu Fakultet  
kemijskog inženjerstva i tehnologije

izv. prof. dr. sc. Fabio Faraguna, Sveučilište u Zagrebu  
Fakultet

kemijskog inženjerstva i tehnologije

dr. sc. Danijela Barić, viša znanstvena suradnica, Institut  
Ruđer Bošković, Zagreb

doc. dr. sc. Dragana Vuk, Sveučilište u Zagrebu Fakultet  
kemijskog inženjerstva i tehnologije (zamjena)

povoljno je ocijenilo završni rad i odobrilo obranu završnog  
rada pred povjerenstvom u istom sastavu.

Završni ispit održat će se dana: 22. rujna 2023.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE  
SVEUČILIŠNI PRIJEDIPLOMSKI STUDIJ

Mario Damjanović

SINTEZA, SPEKTROSKOPSKA KARAKTERIZACIJA I RAČUNALNO  
MODELIRANJE NOVIH DI-HETEROSTILBENA

ZAVRŠNI RAD

Mentor: prof. dr. sc. Irena Škorić

Članovi ispitnog povjerenstva:

1. prof. dr. sc. Irena Škorić
2. izv. prof. dr. sc. Fabio Faraguna
3. dr. sc. Danijela Barić, v. znan. sur.

## Sažetak

Sintetizirani su novi tienobenzotriazoli: 7-metil-1-(tiofen-2-ilmetil)-1*H*-tieno[3',2':3,4]benzo[1,2-*d*][1,2,3]triazol; 1-(4-fluorbenzil)-7-metil-1*H*-tieno[3',2':3,4]-benzo[1,2-*d*][1,2,3]triazol; 1-(4-metoksibenzil)-7-metil-1*H*-tieno[3',2':3,4]benzo[1,2-*d*][1,2,3]triazol i 1-(furan-2-ilmetil)-7-metil-1*H*-tieno[3',2':3,4]benzo[1,2-*d*][1,2,3]triazol. Oni i njihovi prekursori, triazolostilbeni su spektroskopski proučavani, a njihove strukture dokazane su <sup>1</sup>H i <sup>13</sup>C NMR spektrima. Čisti izomeri jednog od triazolostilbena podvrgnuti su osvjetljavanju pri 313 nm u vremenskim intervalima, tijekom kojih se prate promjene UV spektara. Jednom od spojeva računalno je određena struktura i granične orbitale.

**Ključne riječi:** jezgra, kemijski pomak, računalno modeliranje, signal, sinteza, spektroskopija

## Summary

Synthesis, spectroscopic characterization and computational modeling of new di-heterostilbenes

New thienobenzo-triazoles were synthesized: 7-methyl-1-(thiophen-2-ylmethyl)-1*H*-thieno[3',2':3,4]benzo[1,2-*d*][1,2,3]triazole; 1-(4-fluorobenzyl)-7-methyl-1*H*-thieno[3',2':3,4]benzo[1,2-*d*][1,2,3]triazole; 1-(4-methoxybenzyl)-7-methyl-1*H*-thieno[3',2':3,4]benzo[1,2-*d*][1,2,3]triazole and 1-(furan-2-ylmethyl)-7-methyl-1*H*-thieno[3',2':3,4]benzo[1,2-*d*][1,2,3]triazole. They and their precursors, triazolostilbenes were studied spectroscopically and their structures were proved by <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR spectra. Pure isomers of one triazolostilbene are subjected to illumination at 313 nm in time intervals, during which changes in UV spectra are monitored. For one of the compounds, the structure and frontier orbitals were calculated by computational study.

**Key words:** chemical shift, computational modeling, nucleus, signal, synthesis, spectroscopy

## Sadržaj

1. Uvod.....	1
2. Opći dio.....	2
2.1. Spektroskopija NMR.....	2
2.1.1. Pobuda jezgre.....	3
2.1.2. Kontinuirani val .....	5
2.1.3. Pulsna pobuda .....	5
2.2. NMR tehnike .....	6
2.2.1. Tehnike dvostruke rezonancije .....	7
2.2.2. APT (engl. <i>attached proton test</i> ).....	7
2.2.3. DEPT (engl. <i>distortionless enhancement by polarisation transfer</i> ) .....	8
2.3. Dvodimenzijske tehnike.....	9
2.3.1. COSY (engl. <i>correlation spectroscopy</i> ).....	10
2.3.2. INADEQUATE (engl. <i>incredible natural abundance double quantum transfer experiment</i> ) .....	12
2.3.3. HMQC (engl. <i>heteronuclear multiple quantum coherence</i> ) .....	12
2.3.4. HSQC (engl. <i>heteronuclear single quantum correlation</i> ).....	13
2.3.5. HMBC (engl. <i>heteronuclear multiple bond correlation</i> ).....	13
2.3.6. HETCOR (engl. <i>heteronuclear correlation</i> ).....	13
2.3.7. NOE (engl. <i>nuclear Overhauser enhancement</i> ) .....	14
2.3.8. NOESY (engl. <i>nuclear Overhauser effect spectroscopy</i> ) .....	15
2.3.9. ROESY (engl. <i>rotating frame Overhauser effect spectroscopy</i> ).....	15
2.3.10. Tehnike NMR u čvrstom stanju .....	16
2.4. Trodimenzijski NMR .....	17
2.4.1. NOESY-HSQC, TOCSY-HSQC .....	17
2.4.2. HCCH-TOCSY, HCCH-COSY .....	17
2.4.3. Tehnike trostruke rezonancije .....	18

2.4.4.	HNCA .....	18
2.4.5.	MRI (engl. <i>magnetic resonance imaging</i> ) .....	19
2.5.	Računalno modeliranje.....	20
3.	Rezultati i rasprava .....	22
3.1.	Uvod.....	22
3.2.	Sinteza aldehida.....	23
3.2.1.	Spektroskopska karakterizacija spojeva 1 – 4 .....	23
3.3.	Sinteza Wittigovih produkata .....	25
3.3.1.	Spektroskopska karakterizacija spojeva 5 – 8 .....	26
3.4.	Sinteza konačnih produkata .....	29
3.4.1.	Spektroskopska karakterizacija spojeva 9 – 12 .....	30
3.5.	Računalno istraživanje elektronske strukture novih triazolnih derivata .....	33
4.	Eksperimentalni dio .....	37
4.1.	Sinteza triazolnih aldehida .....	37
4.2.	Sinteza tieno-triazolostilbena 5 – 8 .....	39
4.3.	Fotokemijska sinteza benzo-triazola 9-13 .....	42
5.	Zaključak.....	46
6.	Literatura.....	47



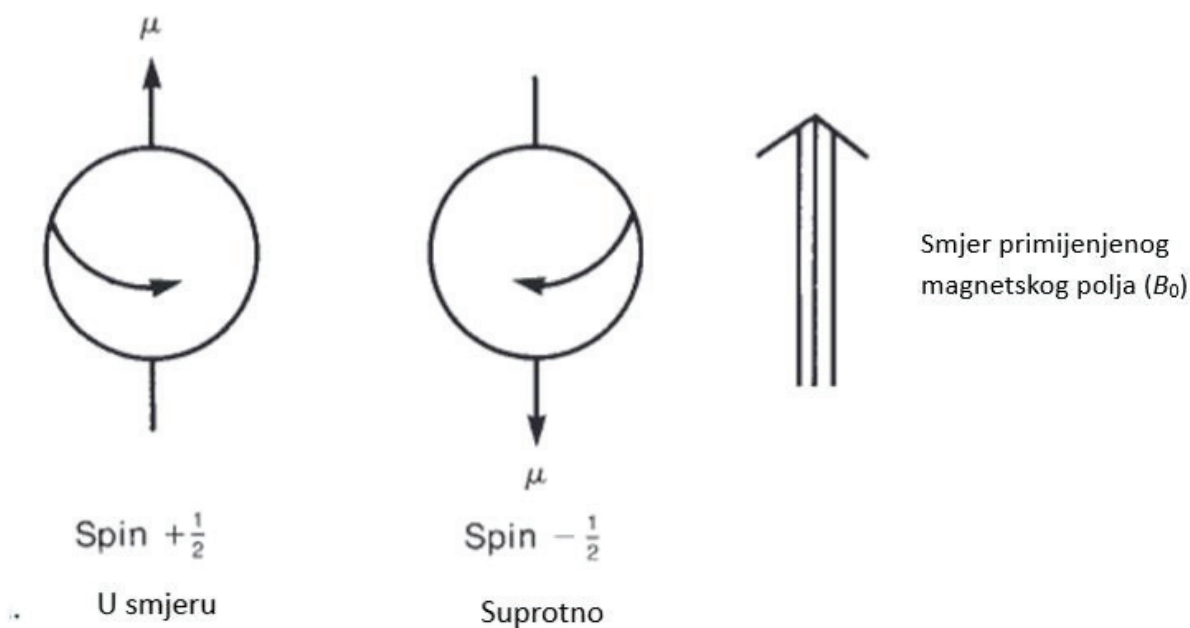
# 1. Uvod

Spektroskopija je znanstvena metoda koja se koristi u proučavanju strukture neke tvari. Zasniva se na mjerenju intenziteta zračenja nakon međudjelovanja s proučavanom tvari. Široko se primjenjuje u svim područjima znanosti. Osnovna podjela je na apsorpcijsku i emisijsku ovisno o tome mjeri li se apsorbirano ili emitirano zračenje. U ovom radu najviše govora će biti o NMR spektroskopskim metodama, koje se zasnivaju na interakciji jezgri atoma i radiofrekventnog zračenja. NMR tehnike danas se najviše primjenjuju u području organske kemije i medicine, no zbog svojih raznih mogućnosti široko se primjenjuju u svim područjima znanosti. Zbog valnih duljina koje se koriste metoda je nedestruktivna i sigurna za primjenu u svim situacijama. Koristit će se i UV spektroskopija koja mjeri apsorpciju zračenja u ultraljubičastom području elektromagnetskog spektra. Primjena je ograničena na spojeve s delokaliziranim sustavom elektrona kod kojih su energije pobude niže.

## 2. Opći dio

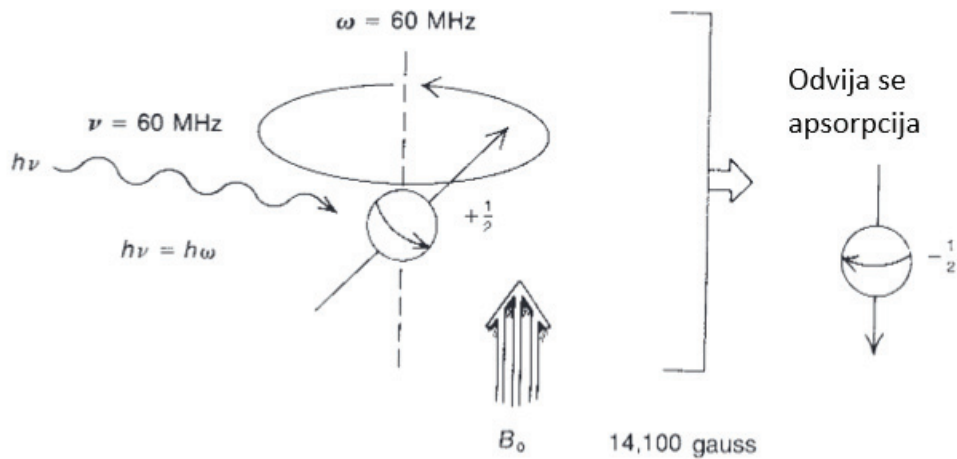
### 2.1. Spektroskopija NMR

Nuklearna magnetska rezonanca je tehnika koja se široko primjenjuje za određivanje struktura organskih molekula. Temelji se na različitoj okolini pojedinih jezgri unutar molekule koje daju različiti odziv na pobudu. Odziv daju samo jezgre s neparnim zbrojem protona i neutrona, jer jedino one posjeduju spin zbog kojeg imaju i magnetski moment. Neke od njih su  $^1_1\text{H}$ ,  $^2_1\text{H}$ ,  $^{13}_6\text{C}$ ,  $^{14}_7\text{N}$ ,  $^{17}_8\text{O}$ ,  $^{19}_9\text{F}$ . Magnetski momenti nastaju vrtnjom nabijene čestice. Čestica može imati više stanja spina, u slučaju vodikove jezgre - protona to su dva stanja. Vodikove jezgre pod utjecajem vanjskog magnetskog polja prelaze u dva stanja, jedno gdje su usmjerene u smjeru magnetskog polja i suprotno od njega (Slika 1). Stanje s magnetskim momentom u smjeru magnetskog polja je niže energije dok ono obrnuto je više energijsko stanje.<sup>1</sup>



Slika 1: Stanja vodikove jezgre

Fenomen nuklearne magnetske rezonancije uočava se prilikom pobude jezgre iz stanja niže energije zračenjem točno određene frekvencije, koja odgovara frekvenciji oscilirajućeg električnog polja nastalog precesijom nabijene jezgre (Slika 2).

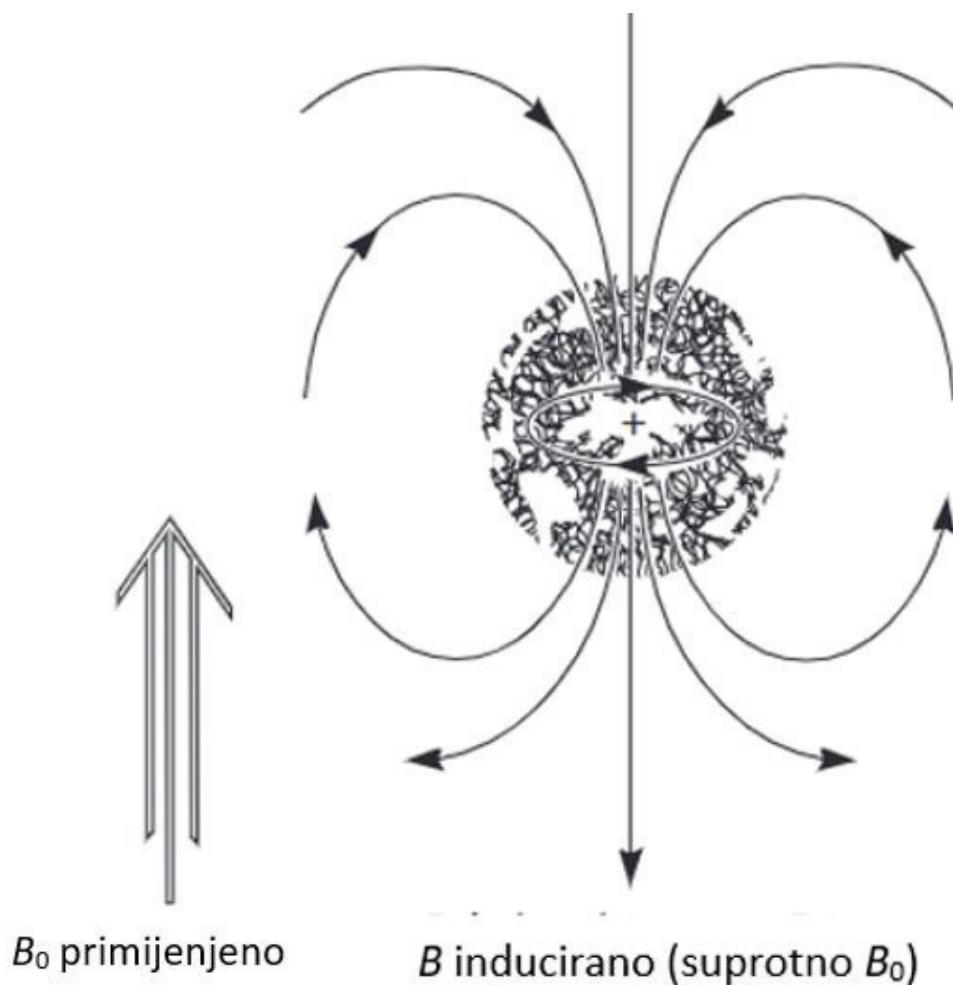


Slika 2: Prikaz apsorpcije zračenja od strane protona

### 2.1.1. Pobuda jezgre

Energija apsorbiranog zračenja jednaka je razlici energija između dva stanja jezgre. Razlika energija ovisi o samoj vrsti jezgre, njezinoj okolini i nametnutom magnetskom polju. Porastom jačine polja proporcionalno raste i razlika u energiji dva stanja.

Svaka jezgra ima svoju okolinu koja je drugačija od ostalih što omogućuje njihovo razlikovanje u NMR spektru. Oko svake jezgre kruže valentni elektroni koji analogno elektronima u metalnom vodiču stvaraju magnetsko polje oko vodiča njihovim prolaskom kroz vodič. Valentni elektroni na taj način oko svake jezgre uzrokuju magnetsko polje koje se protivi vanjskom nametnutom polju i štite jezgru od njegovog utjecaja (Slika 3). Što je veća elektronska gustoća oko jezgre, ona je zasjenjenija i potrebno je primijeniti jače magnetsko polje da bi se postigla rezonancija.<sup>2</sup>



Slika 3: Magnetsko polje jezgre koje se protivi nametnutom polju

Rezultati mjerenja prikazuju se kemijskim pomakom, koji predstavlja udaljenost signala neke jezgre od referentnog signala (TMS). Što je jezgra zasjenjenija to će kemijski pomak biti veći. Ovaj način prikazivanja rezultata koristi se jer iste jezgre daju iste rezultate bez obzira na instrument koji se koristi i jačinu primijenjenog magnetskog polja (Slika 4). To se postiže na način da se razlika rezonantnih frekvencija promatrane i referentne jezgre podijeli s frekvencijom vanjskog magnetskog polja:

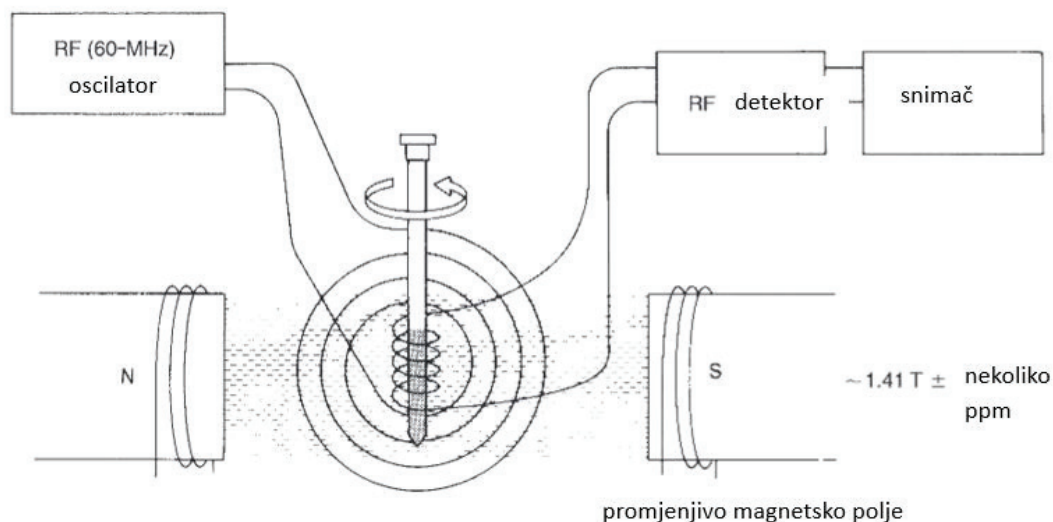
$$\delta_i/ppm = \frac{\nu_i - \nu_{ref}}{\nu} * 10^6.$$



Slika 4: Skala na kojoj se prikazuju rezultati mjerenja izražena preko  $\delta$  (ppm)

### 2.1.2. Kontinuirani val

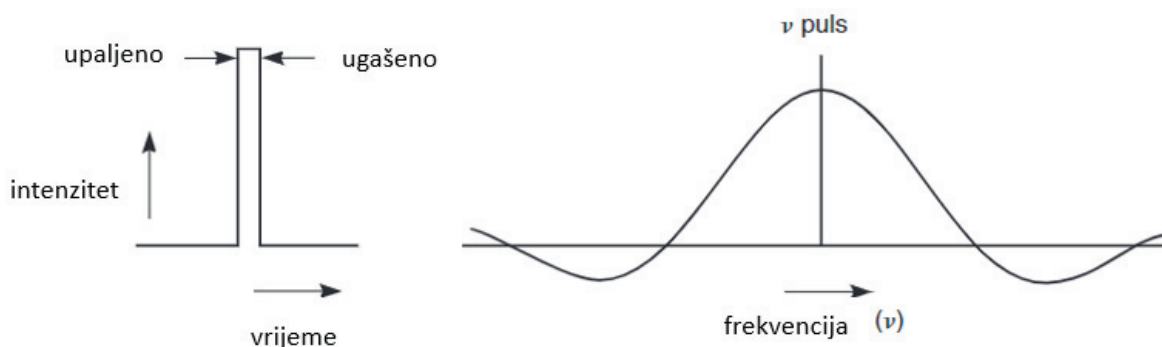
Tehnika više prisutna u prošlosti. Koristi se konstantna frekvencija dok se mijenja jačina magnetskog polja, što uzrokuje promjenu rezonantnih frekvencija jezgri (Slika 5). Bilježi se radiofrekventni signal u detektoru pri kojem jezgre rezoniraju. Što je manji korak prilikom promjene jačine magnetskog polja, to će rezultati biti precizniji.<sup>3</sup>



Slika 5: Uređaj za mjerenje rezonancije primjenom kontinuiranog magnetskog vala

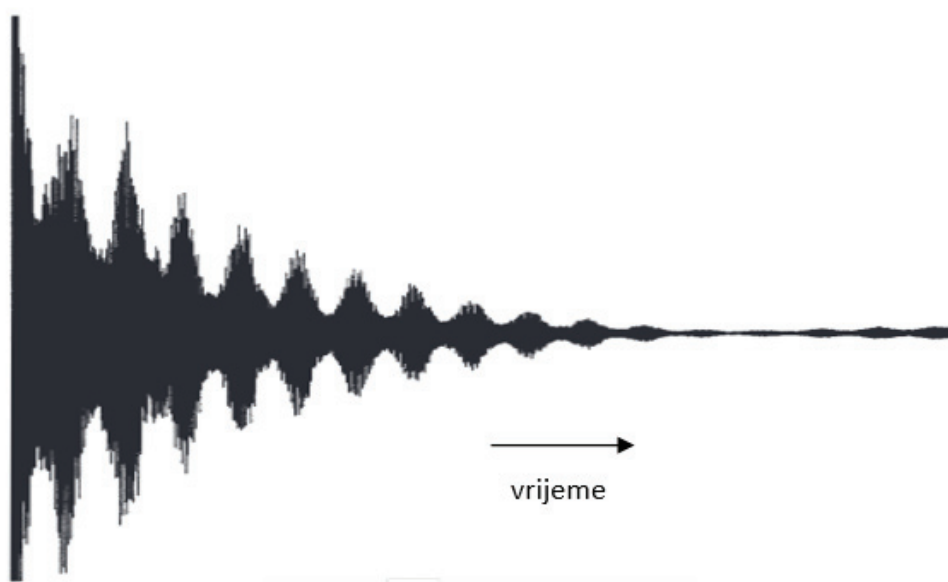
### 2.1.3. Pulsna pobuda

Tehnika koja se danas više primjenjuje, koristi jedan kratki radiofrekvencijski puls koji pobuđuje sve jezgre u molekuli istovremeno (Slika 6). Puls traje vrlo kratko što mu prema Heisenbergovom načelu neodređenosti omogućuje da pobudi jezgre na velikom rasponu rezonantnih frekvencija. Iako je puls namješten na određenu frekvenciju, toliko kratko traje da ne stigne postići tu stabilnu frekvenciju.<sup>4</sup>



Slika 6: Pulsna pobuda (lijevo teoretski puls, desno puls koji djeluje na molekulu)

Pobuđene jezgre kroz vrijeme emitiraju zračenje, taj proces se naziva *free induction decay* (FID) ili slobodno opadanje magnetizacije (Slika 7). FID u sebi sadrži sve frekvencije i one su emitirane istovremeno. Uz pomoć računalnog programa i matematičke metode Fourierove transformacije, taj skup signala prevodimo iz ovisnosti o vremenu u ovisnost o frekvenciji. Zapravo se time dobije klasični NMR spektar s kemijskim pomacima iz kojeg se mogu razlikovati jezgre.



Slika 7: FID signal dobiven snimanjem etil-fenilacetata pri 300 MHz

Metoda pobude pulsom se više koristi jer je osjetljivija, puno brže se izvodi što omogućuje više ponavljanja u kratkom vremenu kako bi se eliminirao šum. Ta prednost dolazi do posebnog značaja kada je dostupna mala količina uzorka ili prilikom snimanja spektara jezgri koje nisu česte u prirodi.<sup>5</sup>

## 2.2. NMR tehnike

Objašnjenja u prethodnom dijelu odnosila su se na  $^1\text{H}$  NMR tehniku jer je jednostavna i pogodna za objasniti temelje NMR metoda. No ona ne zadovoljava sve potrebe kod strukturne analize molekula. Nakon nje razvile su se još mnoge tehnike, dok se neke još uvijek razvijaju. U modernim tehnikama koristi se pulsna pobuda, jer osim navedenih prednosti ona omogućuje razne nove načine snimanja spektra. Moderni uređaji s ugrađenim računalima mogu koristiti razne kombinacije pulseva s različitim trajanjem i vremenskim razmakom. Te tehnike omogućuju pristup novim informacijama i analizu složenijih struktura.

### 2.2.1. Tehnike dvostruke rezonancije

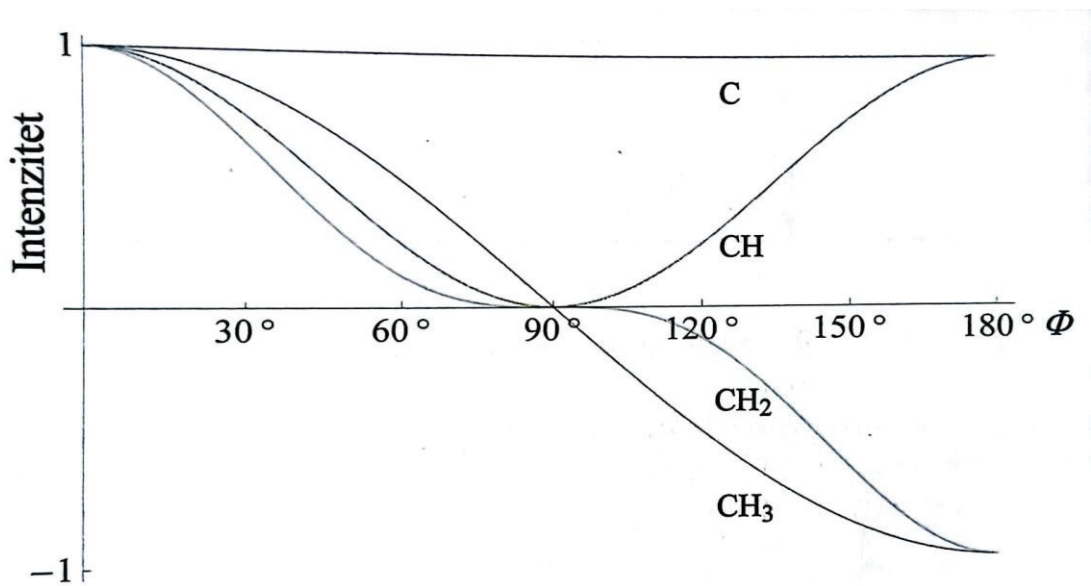
Dosta modernih tehnika prilikom snimanja NMR spektra primjenjuje drugo magnetsko polje ili puls. Prilikom snimanja  $^{13}\text{C}$  NMR spektra često se koristi dodatno polje koje ima funkciju raspresanja, izgube se podaci o spregama između jezgri ugljika i protona, no dobije se spektar u kojem su jasno razdvojeni signali za svaki C atom.

Do raspresanja protona dolazi ozračivanjem uzorka širokim rasponom frekvencija koji pobuđuje sve protone. U takvim uvjetima protoni vrlo brzo prelaze iz jednog u drugo stanje, izgube se interakcije sprežanja između protona i ugljika. Utjecaj svih interakcija u prosjeku se izjednači s nulom, a atom ugljika osjeti samo prosječno stanje spina umjesto sva moguća stanja.

Drugo polje ili puls može imati razne funkcije koje uvelike unaprjeđuju tehnike i omogućuju primjenu u određenim situacijama ovisno o vrsti molekula. Funkcije će biti dodatno spomenute za svaku tehniku u nastavku.<sup>6</sup>

### 2.2.2. APT (engl. *attached proton test*)

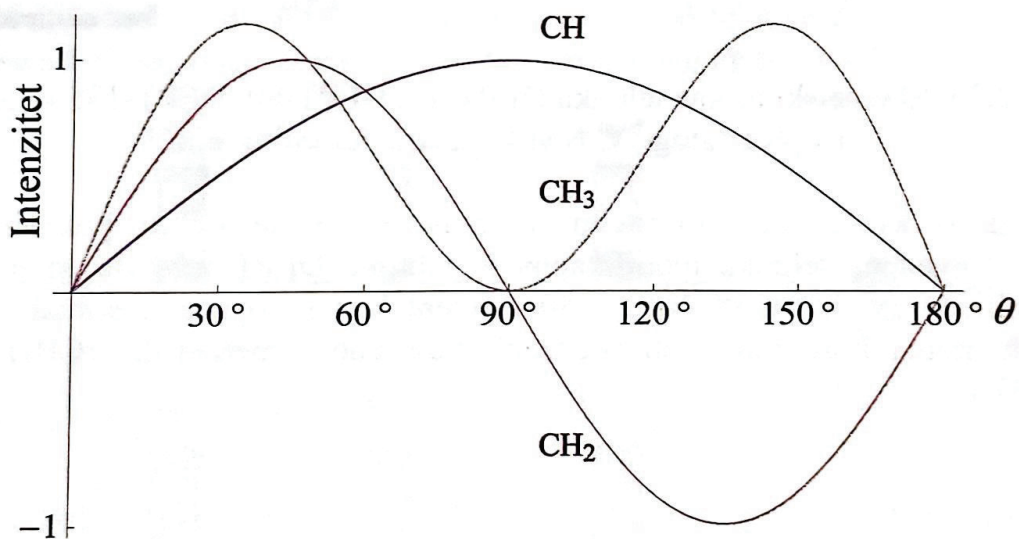
Višepulsna je tehnika uz pomoć koje se određuje multiplicitet heterojezgri, odnosno broj protona vezan za tu jezgru. Tijekom snimanja uključeno je raspresajuće polje što znači da se neće vidjeti sprege između ugljika i protona. Multiplicitet se određuje prema intenzitetu u ovisnosti o vremenu evolucije ( $\tau$ ). Na slici 8. vidi se da se intenzitet mijenja različito za svaki broj vodika vezan na ugljik, iz čega se može zaključiti koliko je vodika direktno vezano za pojedini ugljik u molekuli.



Slika 8: Ovisnost intenziteta signala o kutu ( $\Phi = 180 J \tau$ ) za ugljikove atome različitog multipliciteta

### 2.2.3. DEPT (engl. *distortionless enhancement by polarisation transfer*)

Uzorak se pobuđuje nizom različitih pulseva razdvojenih periodima. Posljedica tih pulseva je spektar u kojem se razlikuju ugljici različitog multipliciteta ovisno o pulsnom kutu ( $\theta$ ) za razliku od tehnike APT gdje ovisi o vremenu evolucije ( $\tau$ ), što mu daje prednost. Prema slici 9. namještanjem pulsno g kuta ( $\theta$ ) mogu se dobiti informacije o broju direktno vezanih vodika na atom ugljika.<sup>7</sup>

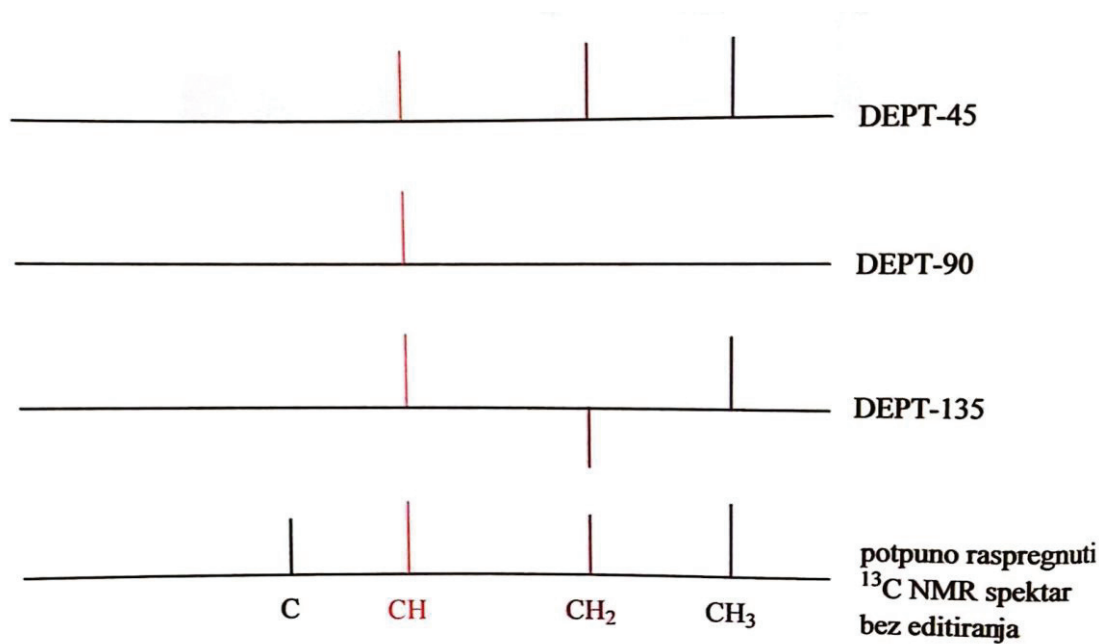


Slika 9: Ovisnost intenziteta signala o pulsnom kutu ( $\theta$ ) za ugljike različitog multipliciteta



Ukoliko se spektar snimi pri kutovima  $45^\circ$ ,  $90^\circ$  i  $135^\circ$  uz raspregnuti spektar, može se tehnikom eliminacije zaključiti koliko je točno vezano vodika na svaki ugljik. Ugljici koji se vide na spektrima na slici 10. odgovaraju intenzitetu za pojedini kut snimanja čiju ovisnost vidimo na slici 9.

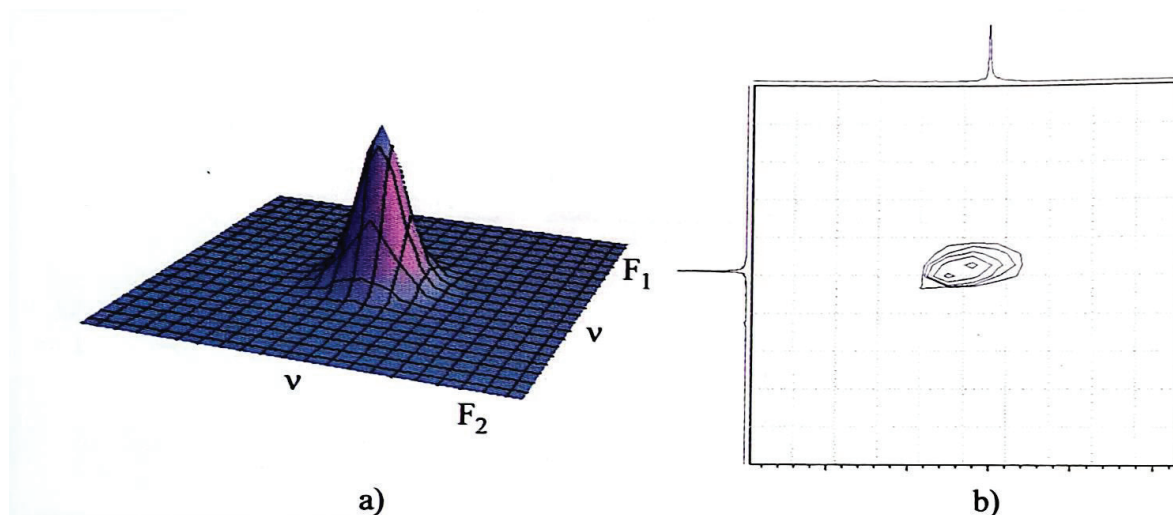
Uz pomoć programa možemo manipulirati DEPT spektrima te iz signala maknuti određene ugljike, tako da prikazuje samo one koji su poželjni ovisno o potrebi.



Slika 10: Shematski prikaz DEPT spektara koje je moguće snimiti primjenom različitih pulseva

### 2.3. Dvodimenzijske tehnike

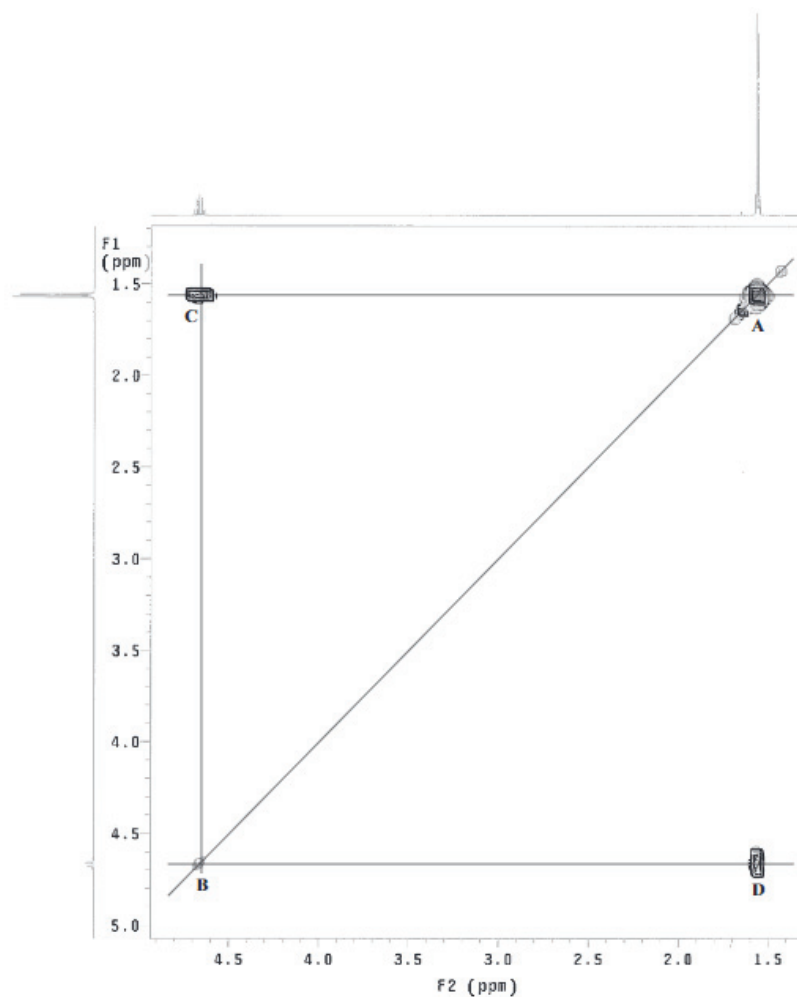
Upotrebom određenih pulsni slijedova generira se druga frekvencijska dimenzija, intenzitet signala se prikazuje u ovisnosti o dvije frekvencijske dimenzije. Ovakve tehnike vrlo su korisne prilikom određivanja spregnutih jezgri, signal u dvodimenzijском spektru ukazuje na povezanost jezgri čiji se signali nalaze na tim frekvencijama u jednodimenzijским spektrima (Slika 11).<sup>8</sup>



Slika 11: Shematski prikaz signala u dvodimenzijском спекtru NMR: a) trodimenzijski prikaz, b) konturni prikaz

### 2.3.1. COSY (engl. *correlation spectroscopy*)

COSY tehnika jedna je od jednostavnijih dvodimenzijских tehnika i široko se primjenjuje. Daje informacije o sprezi između protona preko dvije ili tri veze. Primijenjeni pulsni slijed uzrokuje pojavu korelacijskih signala koji ne predstavljaju jezgru nego interakciju dvije jezgre. COSY spektar definiraju dvije osi na kojima je označena frekvencija  $F_1$  i  $F_2$  (Slika 12). Na osima spektra prikazu se odgovarajući jednodimenzijски spektri toga spoja.



Slika 12: COSY spektar 2-nitropropana (125 MHz)

U COSY spektru najčešće se pronalaze dijagonalni signali koji ne daju bitne informacije, i izvandijagonalni signali koji predstavljaju spregu između dvije različite jezgre. Sprega se može protezati kroz nekoliko veza no na spektru su najjači signali sprege preko tri veze. U nekim modificiranim tehnikama mogu se pojačati signali sprege preko više veza ili ukloniti oni nepoželjni.<sup>9</sup>

DQF-COSY (engl. *double quantum filter correlation spectroscopy*) je tehnika koja se temelji na COSY tehnici, a uz neke dodatke u pulsnom slijedu postiže uklanjanje dijagonalnih signala. Dobiva se spektar s manje signala u kojem je lakše prepoznati bitne signale pa se lakše analizira.

TOCSY (engl. *total correlation spectroscopy*) tehnika koristi sličan pulsni slijed kao i COSY, ali izmijenjen tako da se magnetizacija prenosi kroz cijeli spinski sustav, što znači da se ne prepoznaju samo jezgre u direktnoj sprezi, nego cijeli sustav spregnutih jezgri koji je omeđen kvaternim ugljicima ili završetkom molekule. Tehnika je vrlo korisna kod analize organskih

polimera i polimernih biomolekula jer ih može razdijeliti u manje segmente podjelom prema spinskim sustavima. Osim toga ima i bolju osjetljivost nego COSY.

### **2.3.2. INADEQUATE (engl. *incredible natural abundance double quantum transfer experiment*)**

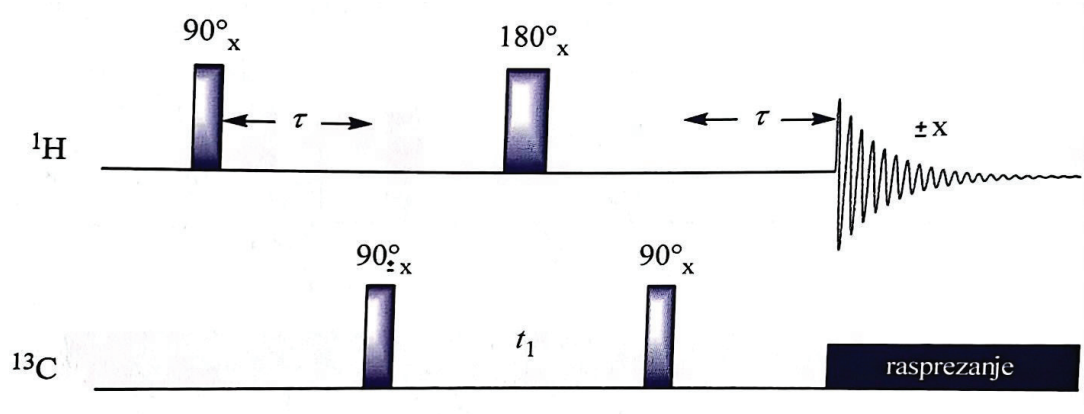
Slično kao COSY, INADEQUATE tehnika temelji se na homonuklearnom sprezanju, no detektira sprege između susjednih ugljikovih atoma. Moguće je odrediti točan redoslijed ugljikovih atoma u molekuli jer se vide samo sprezanja kroz jednu vezu, krajnji ugljikovi atomi imaju će samo jednu spregu, oni unutar lanca po dvije, a oni na mjestima grananja po tri ili četiri sprege.<sup>10</sup>

Unatoč tome što je tehnika vrlo korisna, velika mana joj je mala zastupljenost izotopa ugljika  $^{13}\text{C}$  u prirodi (samo oko 1% ugljikovih atoma), a da bi se dobio signal moraju dvije jezgre  $^{13}\text{C}$  ugljika biti jedna pored druge. Vjerojatnost za takav slučaj je vrlo mala te za dobar snimak treba velika količina uzorka ili veliki broj ponavljanja kako bi se povećao signal. Zato su češće u primjeni heteronuklearne tehnike koje koriste sprezanja između ugljika i vodika koji je vrlo zastupljen i ima jak odziv s obzirom na prirodu jezgre.

### **2.3.3. HMQC (engl. *heteronuclear multiple quantum coherence*)**

Tehnika koja bilježi sprezanje između protona i jezgre na koju je vezan, najčešće ugljikove jezgre. Rezultati se prikazuju u spektru s dvije osi na kojima su jednodimenzijски protonski i najčešće  $^{13}\text{C}$  spektar. Signali u spektru označavaju interakcije između jezgri, a na osima se očitava između kojih jezgri se pojavljuju te interakcije.

Na slici 13. je shematski prikaz pulsog slijeda kojem podliježe analizirani uzorak. Koristeći te pulseve jezgrama se manipulira tako da se prvo pobude protoni te nakon pobude dolazi do evolucije magnetizacije nakon koje se magnetizacija prebacuje na  $^{13}\text{C}$  jezgre. Puls  $180^\circ_x$  uklanja utjecaj kemijskih pomaka protona, a zadnji puls pretvara koherenciju od više kvanata u magnetizaciju koja se može detektirati. U zadnjem periodu ponovo se uspostavlja sprega između heterojezgri preko jedne veze. Za vrijeme detekcije uključeno je raspresajuće polje za ugljikove atome i magnetizacija se detektira na protonima. Koristi se metoda inverzne detekcije kojom jezgru koja se inače teško detektira zbog male zastupljenosti i same prirode jezgre, se detektira za vrijeme evolucije u  $^1\text{H}$  kanalu. Na taj način se povećava osjetljivost mjerenja.



Slika 13: Pulsni slijed za tehniku HMQC

#### 2.3.4. HSQC (engl. *heteronuclear single quantum correlation*)

Slična HMQC tehnici, no koristi puno složeniji pulsni slijed što joj je nedostatak. Taj slijed uzrokuje rasprezanje protona zbog kojeg se oni mogu lakše razlikovati na protonskoj osi u spektru.<sup>11</sup>

#### 2.3.5. HMBC (engl. *heteronuclear multiple bond correlation*)

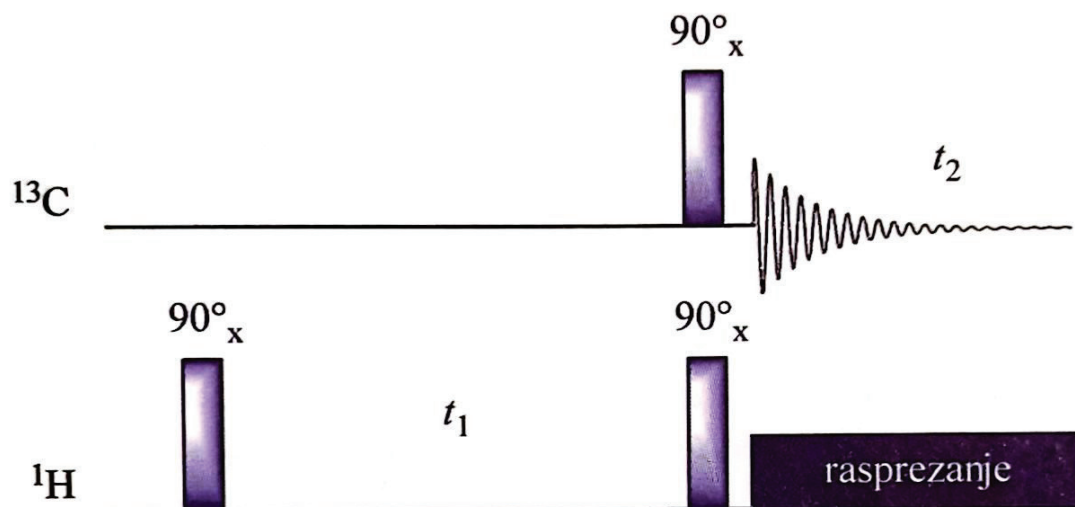
HMBC je tehnika vrlo slična HMQC tehnici, a pulsni slijed se razlikuje samo u trajanju prvog i drugog perioda. To joj omogućuje da detektira sprege između protona i ugljika preko tri ili četiri veze koje su puno manje od one za jednu vezu. Opažaju se sprege vodika i kvaternih ugljikovih atoma ili ugljika i protona iz različitih spinskih sustava, što omogućuje njihovo povezivanje i određivanje strukture cijele molekule. Vrlo je korisna u kombinaciji s COSY i HMQC ili HSQC jer su vrlo često dovoljne za određivanje strukture malih organskih molekula.

#### 2.3.6. HETCOR (engl. *heteronuclear correlation*)

Temelji se na sprezi između protona i neke druge jezgre (najčešće ugljika) preko jedne veze. Ono što ju razlikuje od prethodnih tehnika je izravna detekcija preko  $^{13}\text{C}$  jezgri. Zbog toga je osjetljivost manja, no pulsni slijed je jednostavniji (Slika 14).

Prvo se primijeni pobudni puls za protone  $90^\circ$ , nakon kojeg slijedi evolucijski period u kojem se odvija precesija protona i sprežu se s drugim jezgrama. Nakon toga primijeni se još jedan puls od  $90^\circ$  na obje vrste jezgri koji prebacuje magnetizaciju s protona na ugljik. Za vrijeme detekcije uključeno je rasprezanje za protone i očitaju se samo signali ugljika koji nose informaciju o sprezanju s protonima direktno vezanima na njih.<sup>12</sup>

Kao i kod ostalih dvodimenzijских tehnika, ono što definira krajnji signal su interakcije između jezgri za vrijeme evolucije  $t_1$ .

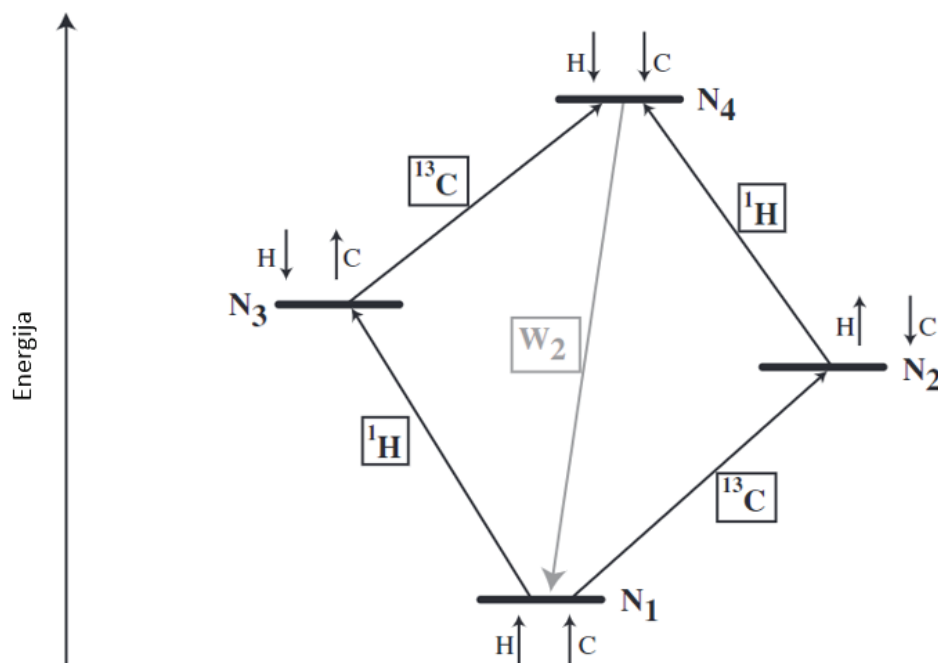


Slika 14: Pulsni slijed za tehniku HETCOR

### 2.3.7. NOE (engl. *nuclear Overhauser enhancement*)

NOE je fenomen često korišten u modernim tehnikama, pojačava intenzitet signala u spektru. Najčešće se primjenjuje za ugljik koji daje slab odziv. Temelji se na mehanizmu križne relaksacije kojim dolazi do inače zabranjenih prijelaza (na slici 15. označeno  $W_2$ ) prilikom kojih se mijenja orijentacija oba spina. Takav prijelaz potiče se pobudom protona koji mijenjaju ravnotežnu napućenost spinova i uzrokuju prijelaze da bi se postigla ravnoteža u sustavu.<sup>13</sup>

Prijelaz se potiče pobudom protona, a što je više protona vezano na ugljik to će efekt biti jači na njemu. Ugljici s više vezanih protona imat će signale jačih intenziteta u spektru.



Slika 15: Energijski dijagram spin sustava

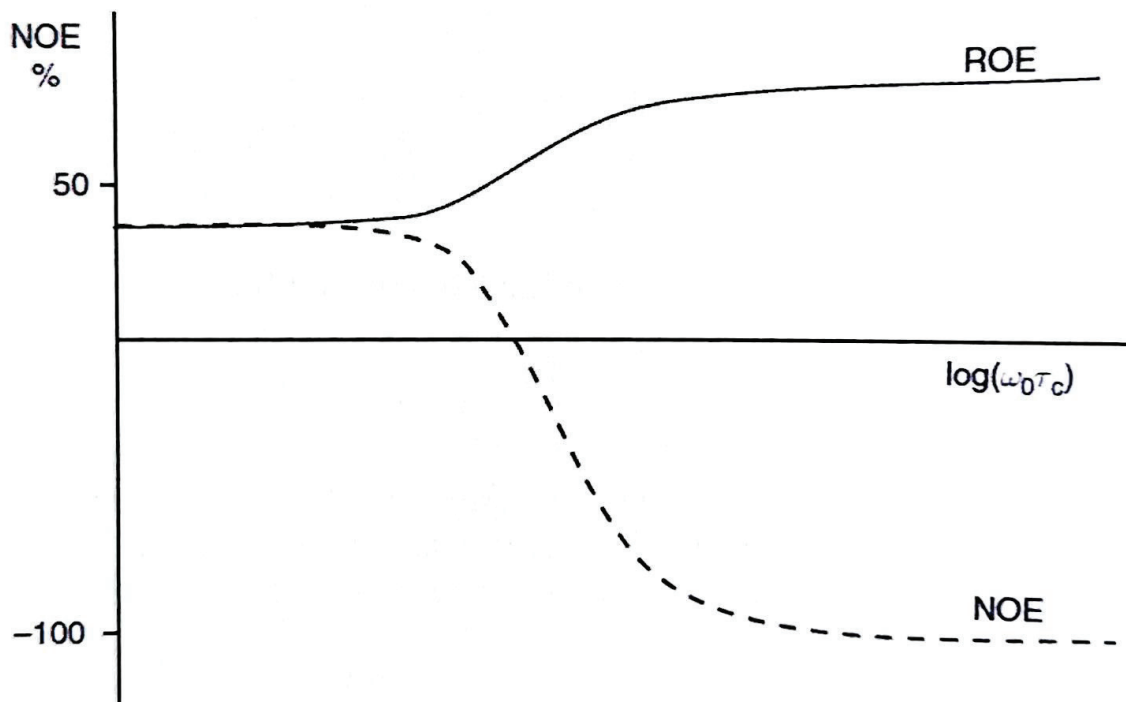
### 2.3.8. NOESY (engl. *nuclear Overhauser effect spectroscopy*)

NOESY je dvodimenzijaska tehnika koja koristi NOE efekt. Za razliku od prethodnih, detektira sprege ne samo preko kemijskih veza već i preko dipolnih interakcija u prostoru. Da bi se takve interakcije uočile, jezgre se moraju nalaziti vrlo blizu jedna drugoj.

Spektar u sebi sadržava veliki broj signala kao u COSY spektru koji predstavljaju skalarnu spregu preko kemijske veze. Osim toga sadrži dodatne signale koji predstavljaju dipolno sprezanje kroz prostor. Zbog informacija koje daje o prostornoj interakciji jezgri, pomaže u određivanju konformacija i trodimenzionalnih struktura molekula.<sup>14</sup>

### 2.3.9. ROESY (engl. *rotating frame Overhauser effect spectroscopy*)

ROESY je vrlo slična tehnika NOESY tehnici, a razlikuju se prema načinu nastajanja i odvijanja NOE. Unatoč tome daje iste informacije i također se koristi za određivanje prostornih struktura molekula. Glavna razlika je što se NOESY može primjenjivati samo za molekule manjih masa jer porastom mase pada učinkovitost NOE pa čak i prelazi u negativno. ROESY tehnika se može koristiti za molekule svih molekulskih masa što se i vidi na slici 16. Porastom molekulske mase raste i korelacijsko vrijeme ( $\tau_C$ ).



Slika 16: Ovisnost učinkovitsti NOE o  $\omega_0 \tau_c$  za NOESY i ROESY tehnike

### 2.3.10. Tehnike NMR u čvrstom stanju

NMR tehnika može se primijeniti i na uzorke u čvrstom stanju. Između jezgri postoje iste interakcije kao i kod onih u otopini.

Anizotropija kemijskog pomaka, dipolno i kvadrupolno sprežanje utječu na širinu signala u spektru. Prilikom snimanja potrebno je što više smanjiti anizotropne interakcije da bi se dobio spektar visoke razlučivosti. To se postiže pri određenom kutu vrtnje i samom vrtnjom uzorka frekvencijom koja je veće frekvencijske širine uzrokovane anizotropnim interakcijama. Na taj način simulira se kretanje molekula u otopini. Sprege s visokom konstantom teško se uklanjaju jer zahtijevaju veliku brzinu vrtnje.<sup>15</sup>

Postoje razne tehnike kojima je cilj prevladati poteškoće poput anizotropnih interakcija, dodatnih signala koji nastaju zbog načina snimanja i nekih pristunih i u klasičnom NMR-u poput pojačavanja signala jezgri koje se teško detektiraju. Neke od takvih tehnika su CRAMPS, CP-MAS i TOSS.

Jednako tako postoje i dvodimenzijske tehnike u čvrstom stanju kojom se detektiraju interakcije između jezgri koje su najčešće posljedica dipolnog sprežanja.



## 2.4. Trodimenzijski NMR

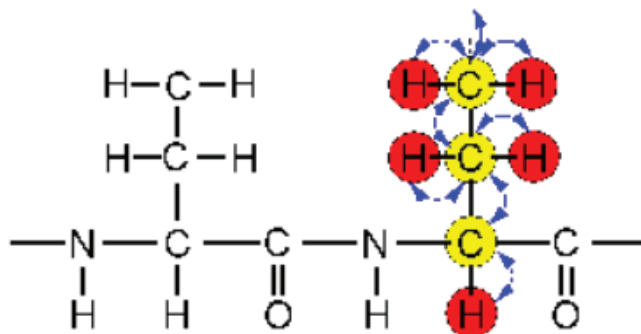
Trodimenzijski NMR čini set eksperimenata koji povezuje tri različite vrste jezgara, najčešće  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$  i  $^{13}\text{C}$  jer su glavne komponente proteina i nekih drugih organskih molekula. Neke od metoda uključuju već opisane dvodimenzijske tehnike (NOESY, HSQC, TOCSY) koje se proširuju njihovim kombiniranjem u jedan eksperiment koji daje 3D spektar ili proširivanjem za dodatnu dimenziju. Postoje i tehnike trostruke rezonancije koje pulsni slijedom uzrokuju i očitavaju sprezanja 3 jezgre i koristi se za određivanje slijeda proteina jer se u glavnom lancu ponavljaju isti slijedovi atoma.

### 2.4.1. NOESY-HSQC, TOCSY-HSQC

Spektri poput NOESY i TOCSY su pri snimanju većih molekula pretrpani signalima i teško ih je razlikovati. Zato se kombiniranjem s tehnikom HSQC rastegnu u treću dimenziju koja će razdvojiti signale u prostoru. NOESY ekperiment je produžen za korak, nakon NOESY slijedi HSQC. Isto vrijedi i za TOCSY-HSQC.

### 2.4.2. HCCH-TOCSY, HCCH-COSY

HCCH-TOCSY i HCCH-COSY su slične prethodnim dvjema metodama, uz povećanu osjetljivost. Magnetizacija se prenosi izravno s atoma na atom, svaki aminokiselinski ostatak tvori svoj sustav u kojem dolazi do prijenosa magnetizacije s protona na ugljike i obrnuto, jer su međusobno odvojeni karbonilnim ugljikom. Aminokiselinski ostatci daju različite uzorke pikova po čemu se prepoznaju (Slika 17).

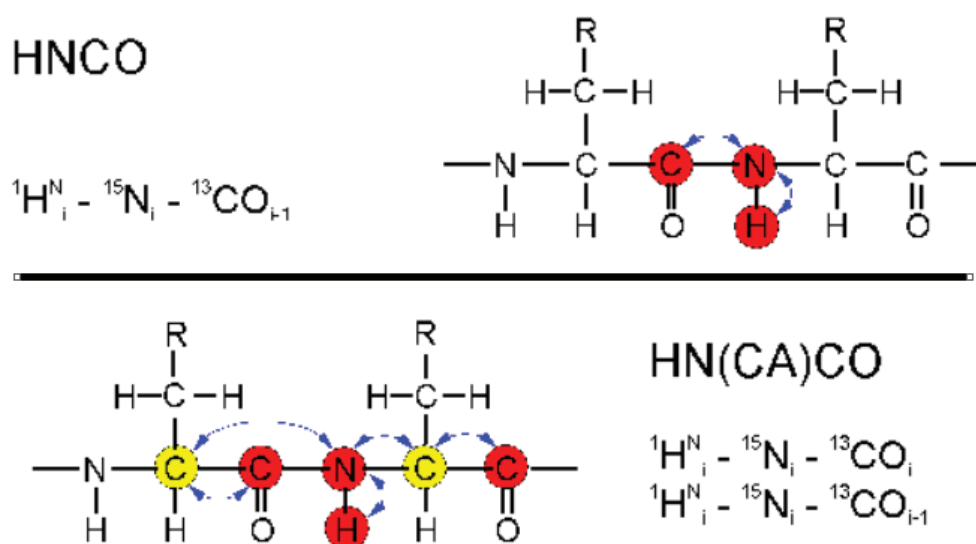


Slika 17: Shematski prikaz prijenosa magnetizacije unutar aminokiselinskog ostatka

### 2.4.3. Tehnike trostruke rezonancije

Tehnike trostruke rezonancije često su korištene za određivanje slijeda velikih proteina. Velika prednost je njihova jednostavnost jer ne sadrže puno signala koji bi se mogli preklapati, no ipak može doći do slučajnog preklapanja određenih signala. Vrlo su osjetljive zbog učinkovitog prijenosa magnetizacije preko kemijskih veza. Veliki nedostatak ove tehnike je što zahtijeva korištenje proteina obogaćenih izotopima koje je teško prirediti i vrlo su skupi.

Nazivi tehnika predstavljaju put prijenosa magnetizacije unutar molekule. Atomi navedeni u zagradi služe samo za prijenos magnetizacije i njihov signal se ne očitava (Slika 18).



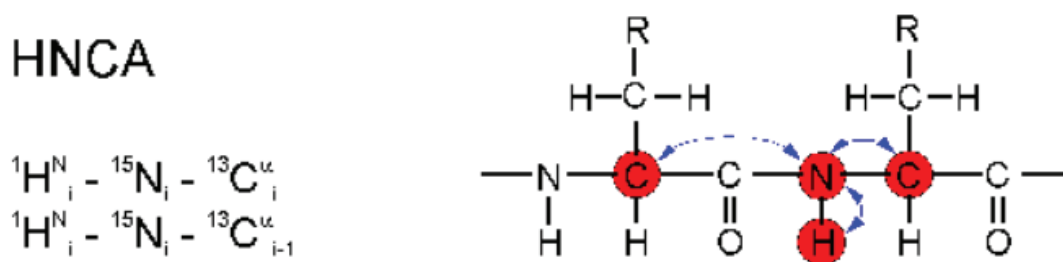
Slika 18. Primjeri naziva tehnika i njihovog značenja

### 2.4.4. HNCA

HNCA je prototip za sve ostale tehnike trostruke rezonancije. Kao što naziv govori prijenos magnetizacije kreće s protona i prenosi se na dušikov atom koji se očitava u prvoj dimenziji spektra (Slika 19). Zatim s dušika prelazi na alfa-ugljik koji se očitava u drugoj dimenziji spektra. Na kraju se magnetizacija prenosi natrag do amidnog protona koji se očitava u trećoj dimenziji spektra.

Prijenos magnetizacije se odvija preko snažnih sprezanja preko jedne veze, dok je sprezanje između jezgri dušika i alfa-ugljika snažno i preko dvije veze. Iz tog razloga može doći do prijenosa magnetizacije i između dva različita aminokiselinska ostatka. To omogućuje određivanje cijele strukture proteina uz pomoć samo jedne tehnike. No u praksi je često

potrebno kombinirati tehnike zbog preklapanja frekvencija, pa je potrebna druga tehnika da se raspoznaju signali na istim frekvencijama.<sup>16</sup>

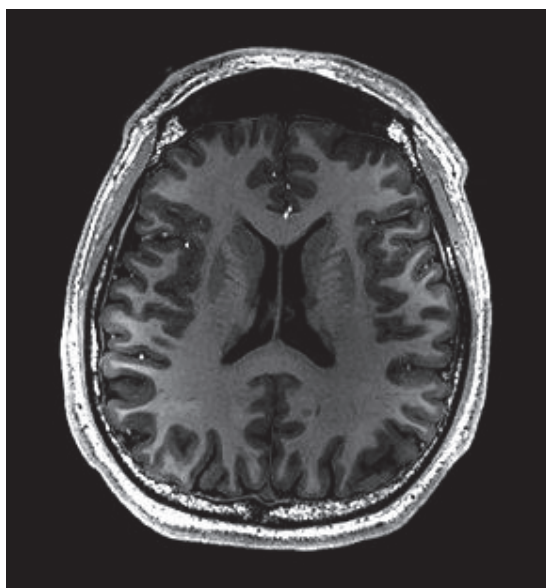


Slika 19. Shema prijenosa magnetizacije kod HNCA tehnike

#### 2.4.5. MRI (engl. *magnetic resonance imaging*)

MRI je vrlo korisna tehnika na području medicine, a primjenjuje se za dijagnozu ozljeda tkiva koje se inače ne može vidjeti, kao što su zglobovi i mozak. Kao i kod NMR tehnika primjenjuje se jako magnetsko polje. Magnet ima veliku šupljinu unutar koje stane ljudsko tijelo prilikom snimanja. Uglavnom se snimaju protoni zbog njihove zastupljenosti u biološkim molekulama kao i u vodi koja se nalazi u velikoj količini u tijelu.<sup>17</sup>

Molekule vode daju različiti odziv ovisno o okolini u kojoj se nalaze. To omogućuje razlikovanje vode unutar tkiva i stanica od one koje se nalazi izvan. Isto tako voda u različitim tkivima daje različite rezultate, kao i u bolesnom ili zaraženom tkivu što je vrlo bitno. Uređaj snima dvodimenzionalne slike presjeka tijela koje se mogu posložiti tako da se dobije trodimenzionalni prikaz (Slika 20).



Slika 20. Presjek ljudske glave snimljen uz pomoć MRI

## 2.5. Računalno modeliranje

Računalne metode u kemiji temelje se na kvantnoj i klasičnoj fizici, ali i na empirijskim podacima. Uz pomoć njih se računaju strukture i predviđaju svojstva bez potrebe za kemijskim eksperimentom. U kvantnoj kemiji, podaci se dobivaju rješavanjem Schrödingerove jednačbe, uz korištenje Born-Oppenheimerove aproksimacije i varijacijskog teorema.<sup>18</sup> Posebno su korisne za probleme koje je teško riješiti eksperimentalnim mjerenjem, kao što su npr. strukture kratko-živućih, nestabilnih intermedijera i prijelaznih stanja, ali koriste se i kod opisa stabilnih sustava kao dopuna eksperimentalnim podacima te za njihovu dodatnu interpretaciju.<sup>19</sup>

Temelj za računanje je činjenica iz kvantne mehanike da se energija i svojstva izvedena iz nje mogu izračunati iz Schrödingerove jednačbe. Konačno rješenje te jednačbe se može točno odrediti samo za jednoelektronske sustave, dok za složene sustave postoje metode koje koriste dodatne parametre. Metode koje se najviše koriste zasnovane su na teoriji funkcionala gustoće (engl. *Density Functional Theory*, DFT).<sup>20</sup>

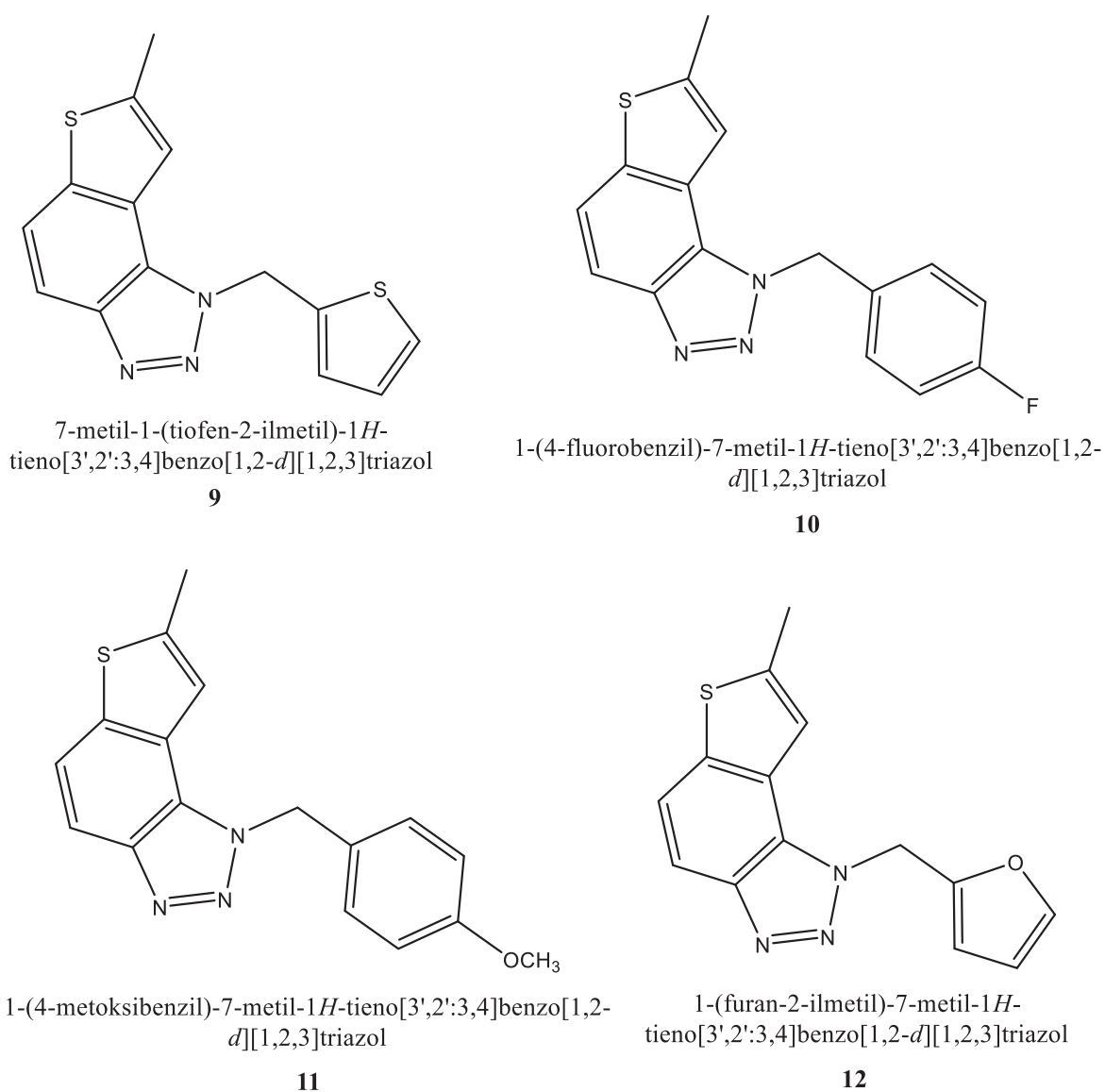
DFT metode su manje zahtjevne u odnosu na starije, tzv. ab initio metode, ali daju približno točna rješenja sustava.<sup>21</sup> Glavna veličina u DFT metodi je elektronska gustoća koja je funkcija samo tri prostorne varijable u odnosu na valnu funkciju kojoj broj varijabli raste sa svakim elektronom u sustavu. DFT pristup uzima u obzir sve elektrone u sustavu i njihovu međusobnu interakciju.<sup>22</sup>

Geometrije molekula se optimiziraju iterativnom metodom tako da se rade male promjene u položaju atoma u prostoru sve dok se ne dobije struktura najniže moguće energije. Postizanje točke minimuma može biti lokalno jer molekule mogu imati različite konformacije između kojih se nalaze maksimumi. Zato je prilikom optimizacije potrebno provesti iteraciju za svaki konformer, tj. ručno se crtaju različite konformacije iste strukture koje se optimiraju te se zatim uspoređuju prema stabilnosti.

## 3. Rezultati i rasprava

### 3.1. Uvod

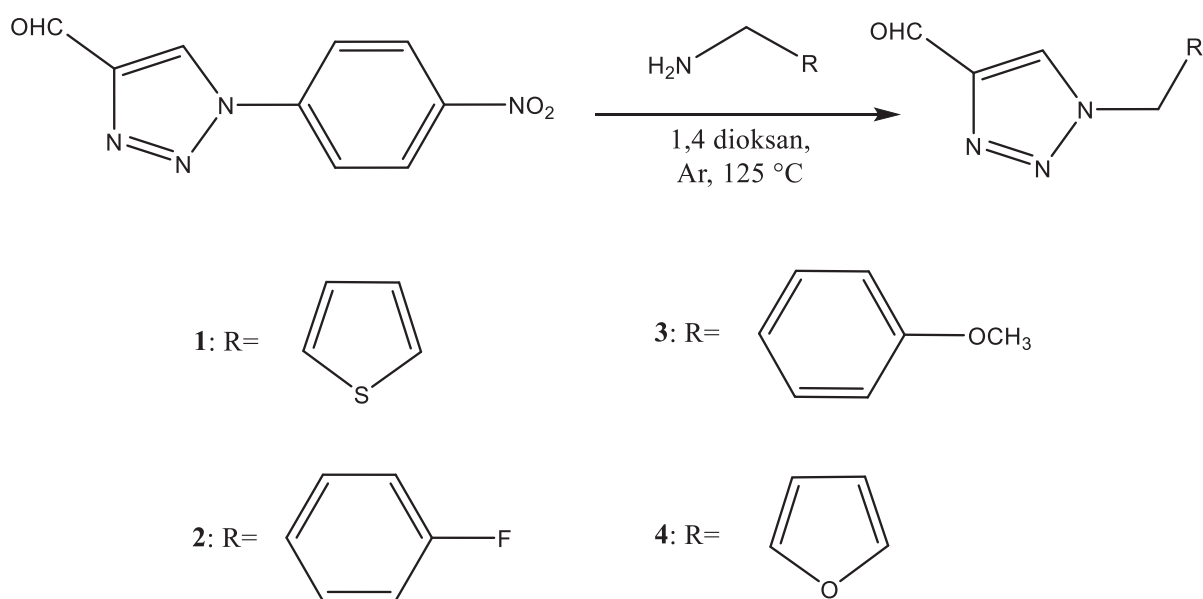
S ciljem dobivanja novih kemijskih spojeva i proučavanja njihovih struktura, sintetizirani su iz odgovarajućih aldehida **1-4** novi tieno-triazolostilbeni **1-8** i njihovi fotociklizijski derivati benzo-triazoli **9-12** (Slika 21, Sheme 1 i 2). Prvi korak bio je sinteza aldehida koji su potrebni za drugi stupanj reakcije, Wittigovu reakciju iz koje su dobiveni tieno-triazolostilbeni. Završni korak bila je fotokemijska sinteza.



Slika 21. Novi sintetizirani benzo-triazoli **9-12**

## 3.2. Sinteza aldehyda

Kao početni spoj je uzet 1-(4-nitrofenil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-karbaldehid iz kojeg su sintetizirani svi aldehydi koji će biti potrebni za idući stupanj reakcije. Reakcija se odvija u dioksanu pri temperaturi 125 °C, prostor u tikvici je ispunjen argonom koji ima ulogu inertne atmosfere. Reakcija traje 24 sata tijekom kojih se nitrobenzen supstituira funkcijskom skupinom vezanom za amin. Reakcijom su sintetizirani spojevi **1** – **4** (Shema 1).

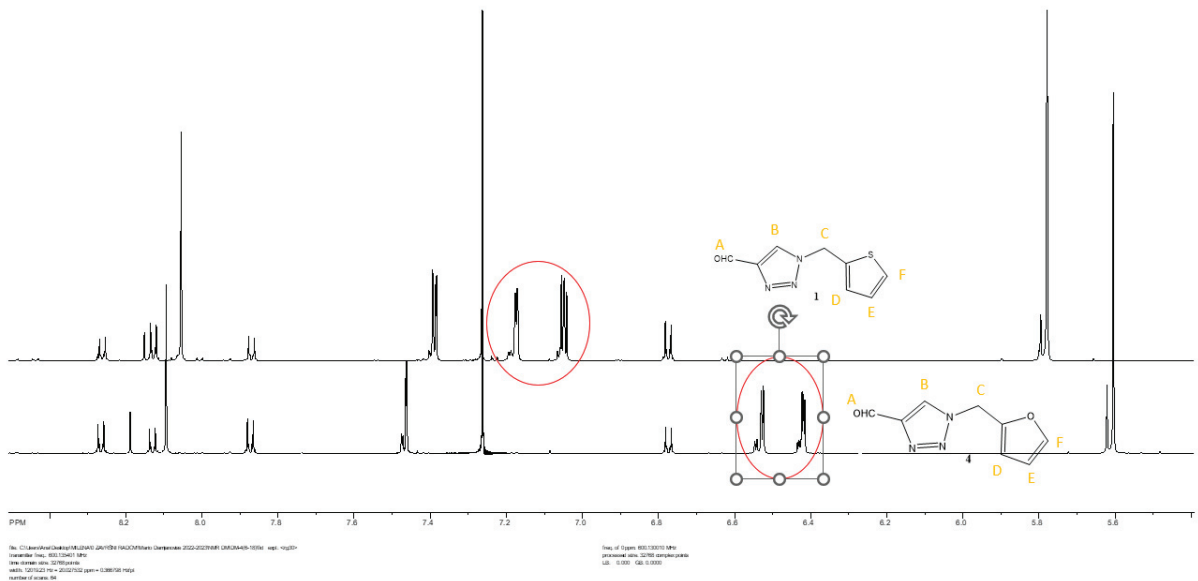


Shema 1. Sinteza aldehyda za Wittigovu reakciju

### 3.2.1. Spektroskopska karakterizacija spojeva **1** – **4**

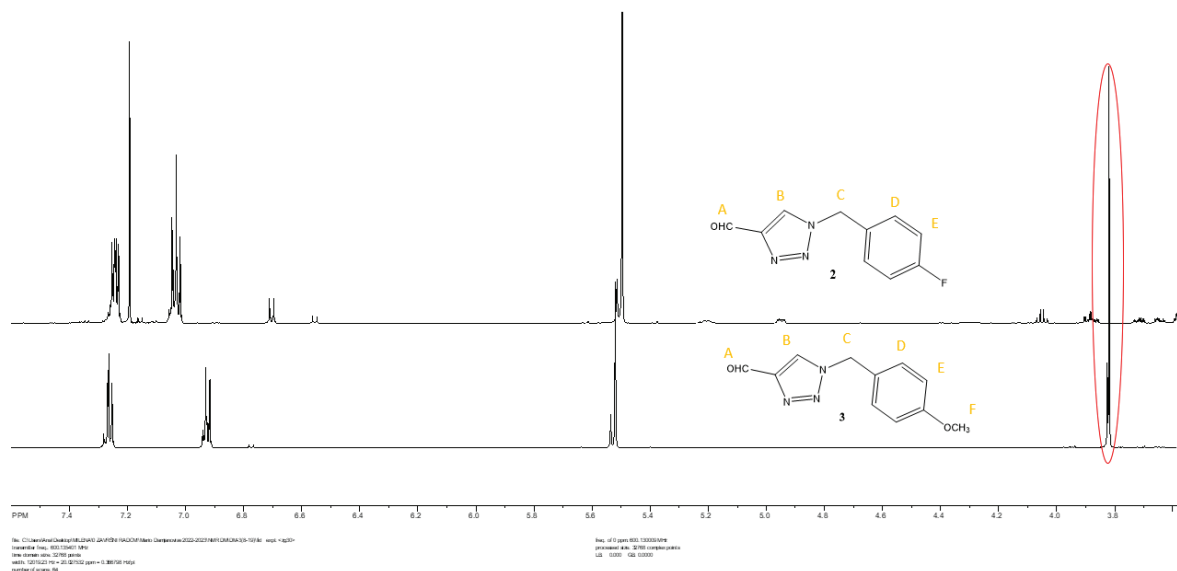
Strukture aldehyda dobivenih reakcijom potvrđene su <sup>1</sup>H NMR spektroskopijom. Spektri su usporedno prikazani u nastavku na slikama.

Na slici 22 nalaze se spektri spojeva **1** i **4**. Na nezasićenom dijelu prikazanog spektra (oko 8.1 ppm) vidi se singlet koji predstavlja B protone u oba spoja, dok se u zasićenom dijelu (oko 5.7 ppm) vide singleti dva ekvivalentna protona označena slovom C na slici. U aromatskom dijelu spektra istaknuti su protoni vezani na tiofensku jezgru spoja **1** i furansku jezgru spoja **4**. Vidi se da protoni furanske jezgre imaju manji kemijski pomak što se i očekuje zbog slabije aromatičnosti. Svi signali u spektru odgovaraju spojevima čime je dokazana njihova struktura.



Slika 22.  $^1\text{H}$  NMR spektri spojeva **1** i **4**

Na slici 23 nalaze se  $^1\text{H}$  NMR spektri spojeva **2** i **3**. Spektri se ne razlikuju bitno jer su vrlo slični po strukturi, osim što spoj **3** ima dodatnu metilnu skupinu koja se u spektru vidi kao oštri singlet na 3.8 ppm. Spektri pokazuju slaganje s očekivanim spojevima čime je dokazana njihova struktura.

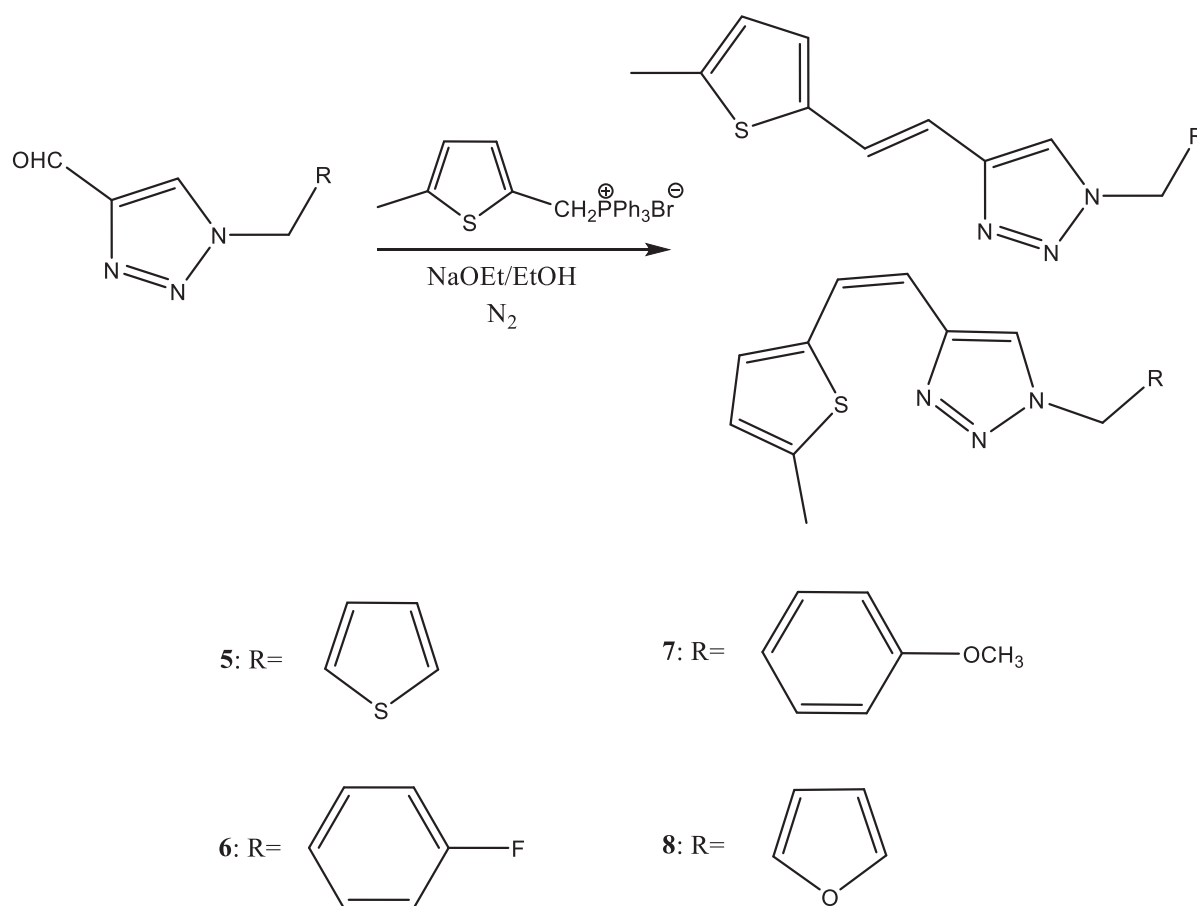


Slika 223.  $^1\text{H}$  NMR spektri spojeva **2** i **3**



### 3.3. Sinteza Wittigovih produkata

Wittigova reakcija odvija se u smjesi otapala NaOEt/EtOH i u dušikovoj atmosferi na sobnoj temperaturi (Shema 2). Reakcija traje 24 sata. Tijekom reakcije anionfosfinske soli napada djelomično pozitivan karbonilni ugljik, kisik vezan na karbonilni ugljik se veže na fosfor u soli, izdvajaju se kao trifenilfosfin-oksid i karbonilni ugljik uspostavlja novu dvostruku vezu s alkilom koji je bio dio soli. Reakcijom se dobivaju spojevi **5** – **8**, koji se zajedničkim nazivom mogu nazvati tieno-triazolostilbenima. Spojevi nastali ovom reakciju mogu poprimiti *cis*- i *trans*- konfiguraciju zbog dvostruke veze koja nastaje. U ovom eksperimentu procijenjeno je prema omjeru integrala signala u  $^1\text{H}$  NMR spektru da nastaje omjer 1.5 : 1 = *cis*- : *trans*- izomer.

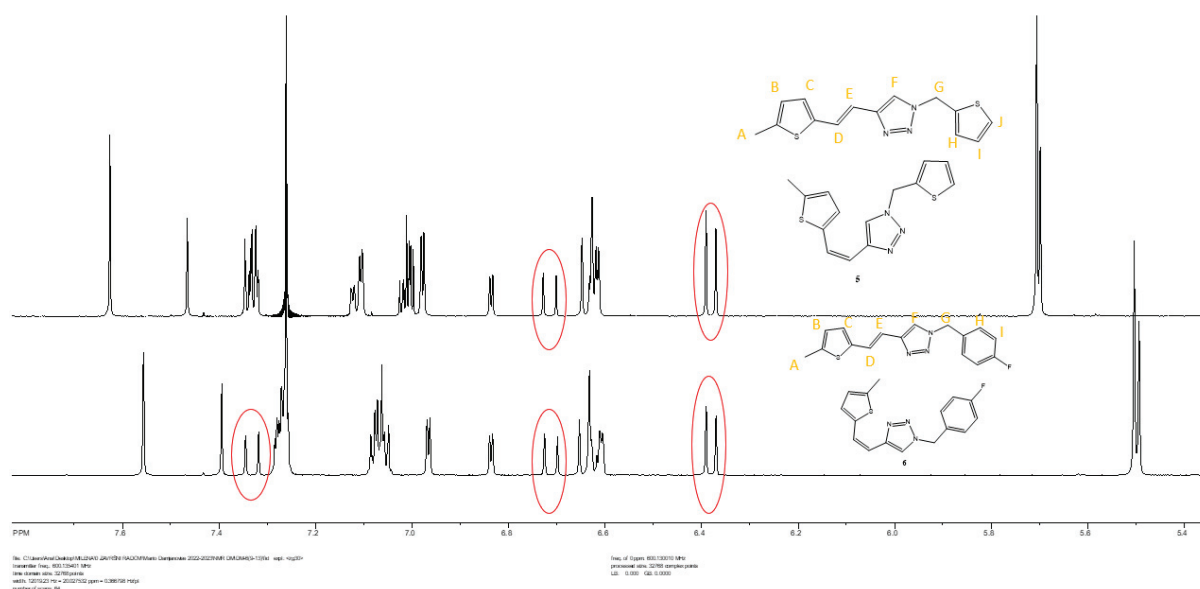


Shema 2. Wittigova reakcija

### 3.3.1. Spetroskopska karakterizacija spojeva 5 – 8

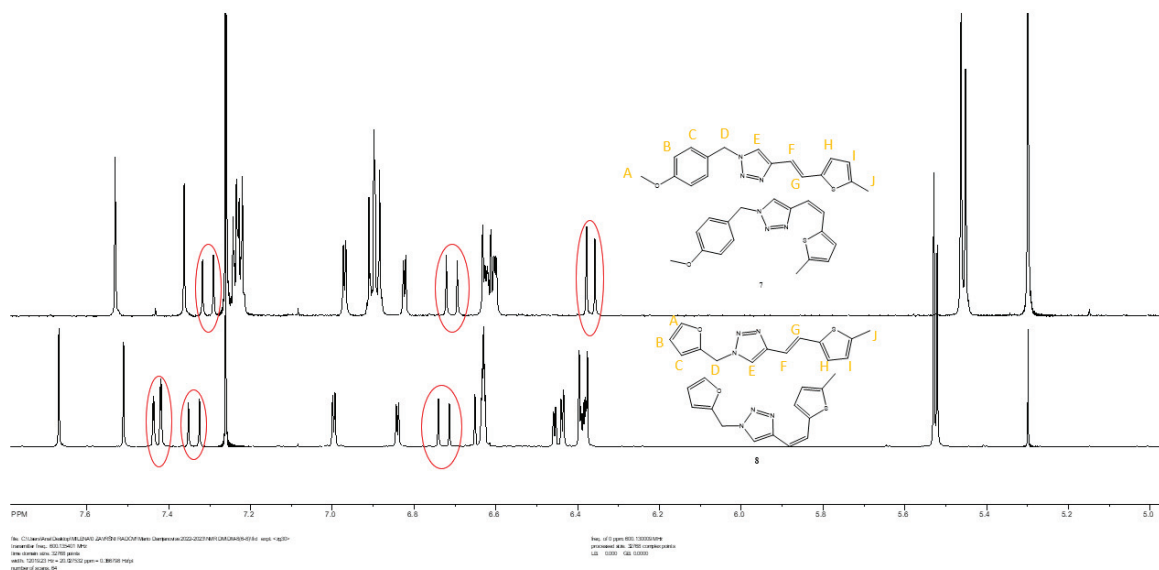
Produkti Wittigove reakcije analizirani su  $^1\text{H}$  NMR spektroskopijom. Spektri su usporedno prikazani u nastavku (Slike 24 i 25).

Na spektrima spojeva **5** i **6** više nema signala u području karakterističnom za aldehide, što znači da je reaktant izreagirao. Smjese izomera nisu uspješno razdvojeni niti nakon uzastopne kolonske kromatografije, zbog čega spektri imaju puno signala, od kojih se neki i preklapaju, posebno u aromatskom području. Signali (dubleti) označeni na slici 24 dokazuju uspješnost reakcije jer su karakteristični za protone (u ovom primjeru protoni E i D) dvostruke veze koja nastaje reakcijom. Određivanjem ostalih protona dokazana je struktura spojeva.



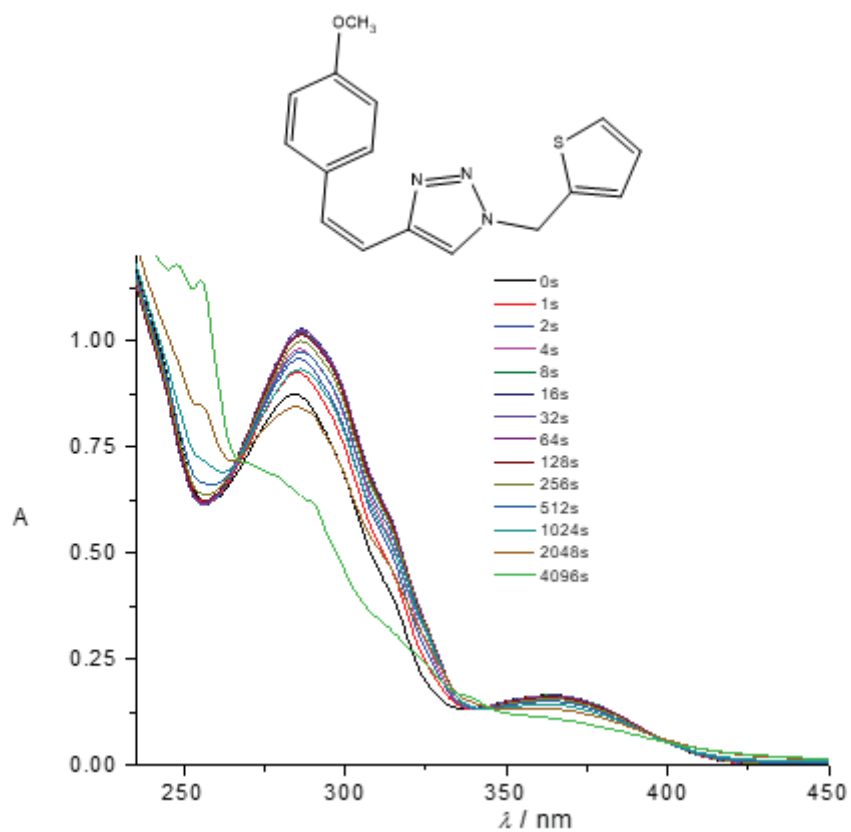
Slika 24.  $^1\text{H}$  NMR spektri spojeva **5** i **6**

Na spektrima smjese izomera spojeva **7** i **8** (Slika 25) više nema signala u području karakterističnom za aldehide, što znači da je sav reaktant izreagirao. Smjese izomera nisu uspješno razdvojene zbog čega u spektrima ima puno signala, od kojih se neki i preklapaju, posebno u aromatskom području. Signali (dubleti) označeni na slici 26 dokazuju uspješnost reakcije jer su karakteristični za protone (u ovom primjeru protoni F i G) dvostruke veze koja nastaje reakcijom. Određivanjem ostalih protona dokazana je struktura spojeva.



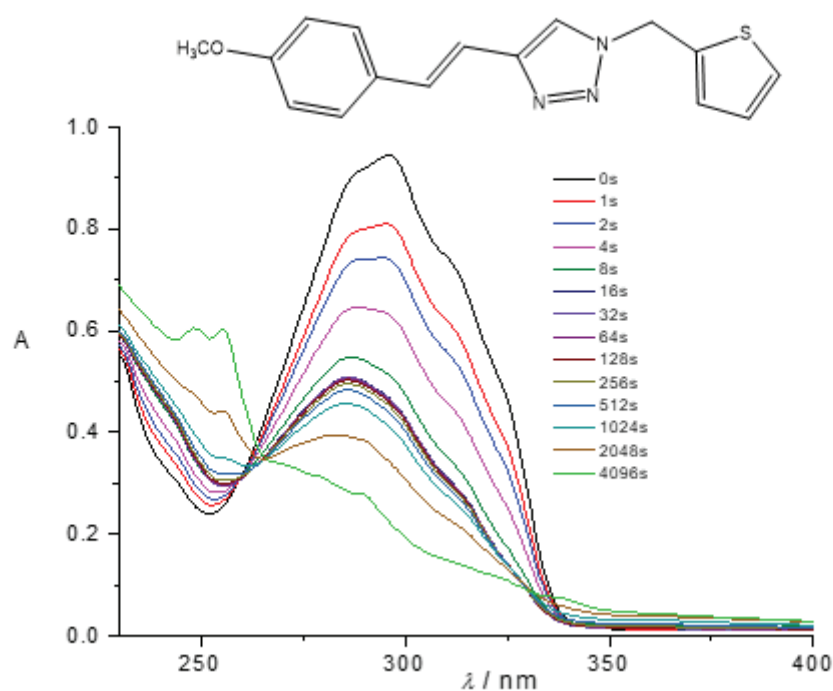
Slika 2325. <sup>1</sup>H NMR spektri spojeva 7 i 8

Snimljeni su UV spektri *cis*- i *trans*-izomera spoja sličnog derivatima 5 – 8, koji je prethodno sintetiziran u laboratoriju kao smjesa izomera, a čiji su se izomeri razdvojili uspješno u ovom radu (Slike 26 i 27). Izomeri toga spoja uspješno su izolirani pa se na njima provodilo osvjetljavanje, koje je praćeno UV spektrima u vremenu. Prvi spektar je snimka čistog izomera, a svi sljedeći spektri snimljeni su nakon određenog vremena provedenog pod lampama. Crna linija predstavlja *cis*- izomer, gdje osvjetljavanjem dolazi do izomerizacije i nastaje smjesa izomera. Kod spektara od 0s do 64s uočava se blagi batokromni i hiperkromni pomak maksimuma apsorpcije do oko 280 nm, a nakon toga intenzitet signala se kreće smanjivati i pomicati ulijevo što se opisuje kao hipsokromni i hipokromni pomak.



Slika 26. UV spektri dobiveni prilikom osvjetljavanja *cis*-izomera

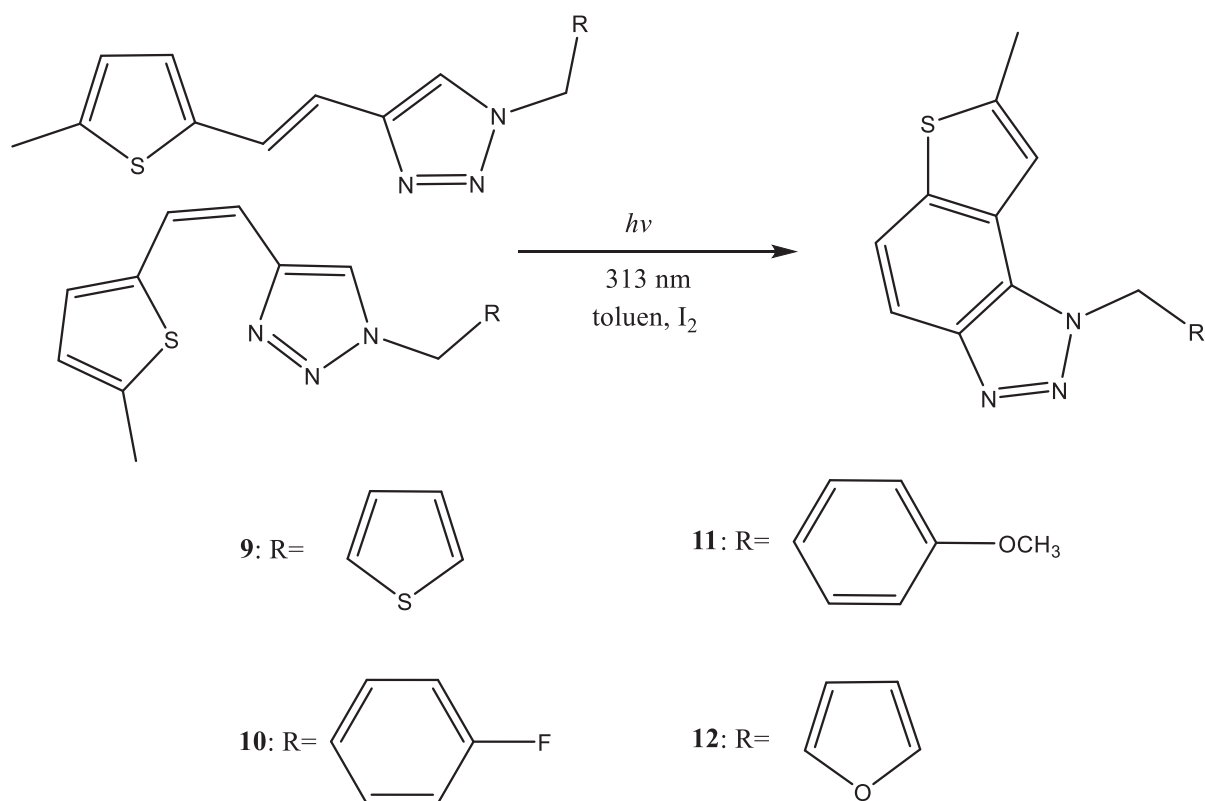
Na slici 27 nalaze se spektri dobiveni osvjetljavanjem *trans*-izomera. Glavna apsorpcijska vrpca na oko 280 nm pokazuje blagi hipsokromni i hipokromni pomak nakon svakog novog osvjetljavanja, što upućuje opet na izomerizaciju te sekundarnu fotokemijsku reakciju.



Slika 27. UV spektri dobiveni prilikom osvjetljavanja *trans*-izomera

### 3.4. Sinteza konačnih produkata

Zadnji stupanj sinteze u ovom radu naziva se fotociklizacija. Smjesa izomera otopljena u toluenu s katalitičkom količinom joda osvjetljava se svjetlošću valne duljine 313 nm. Reakcija traje 90 minuta, oba izomera zatvaraju prsten između triazola i tiofena preko dvostruke veze, dobije se triciklički spoj planarne strukture s vrlo dobro delokaliziranim sustavom  $\pi$ -elektrona. Dobiveni su spojevi **9** – **12** (Shema 3).

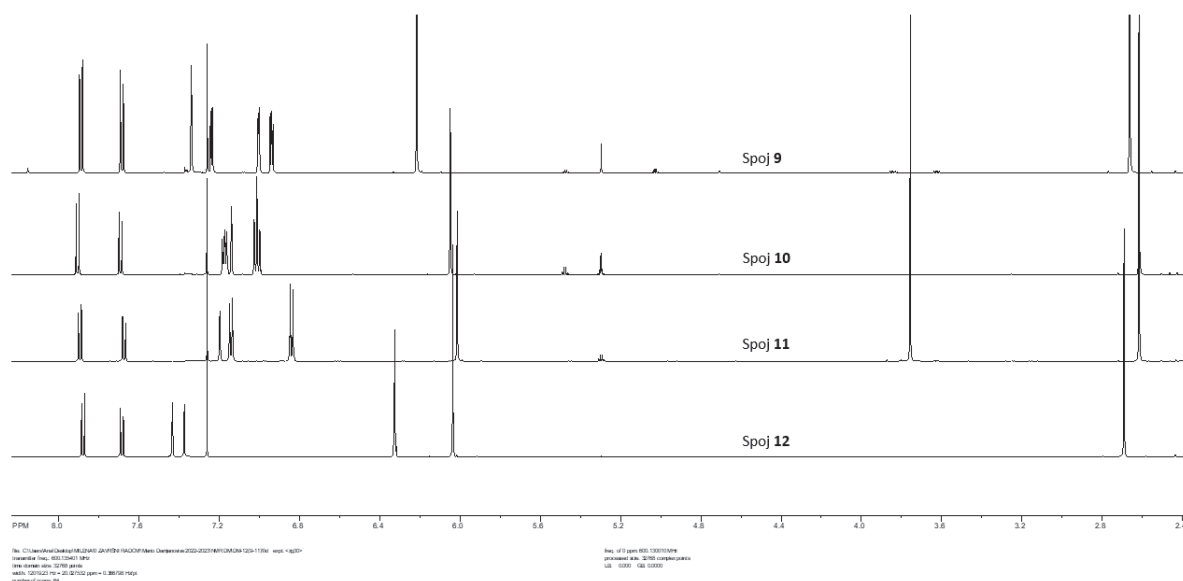


*Shema 3. Fotociklizacija*

### 3.4.1. Spektroskopska karakterizacija spojeva 9 – 12

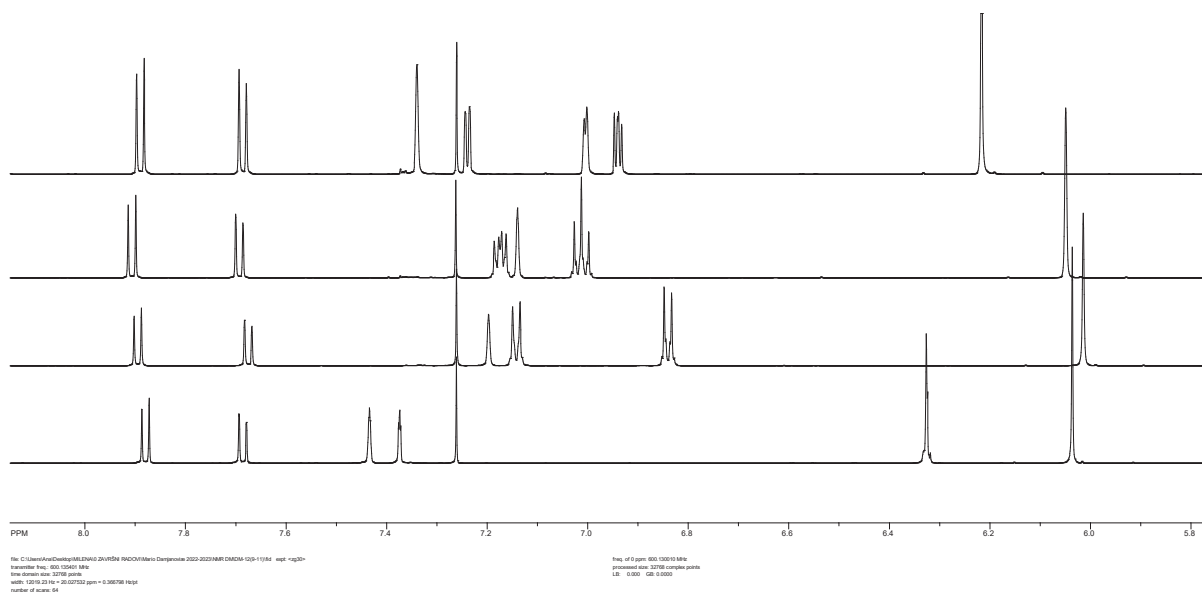
Konačni produkti su snimljeni <sup>1</sup>H i <sup>13</sup>C NMR tehnikama. Spektri sva 4 spoja usporedno su prikazani u nastavku.

Na slici 28 prikazani su svi signali. Svim spojevima zajednička su dva dubleta u nezasićenom području koji predstavljaju protone na novonastalom prstenu. Osim toga svi daju tri singleta, dok se u aromatskom području razlikuju po signalima što se jasnije vidi na slici 29. Još se spoj **11** ističe svojim singletom na 3.8 ppm koji potječe od protona metoksi-skupine.



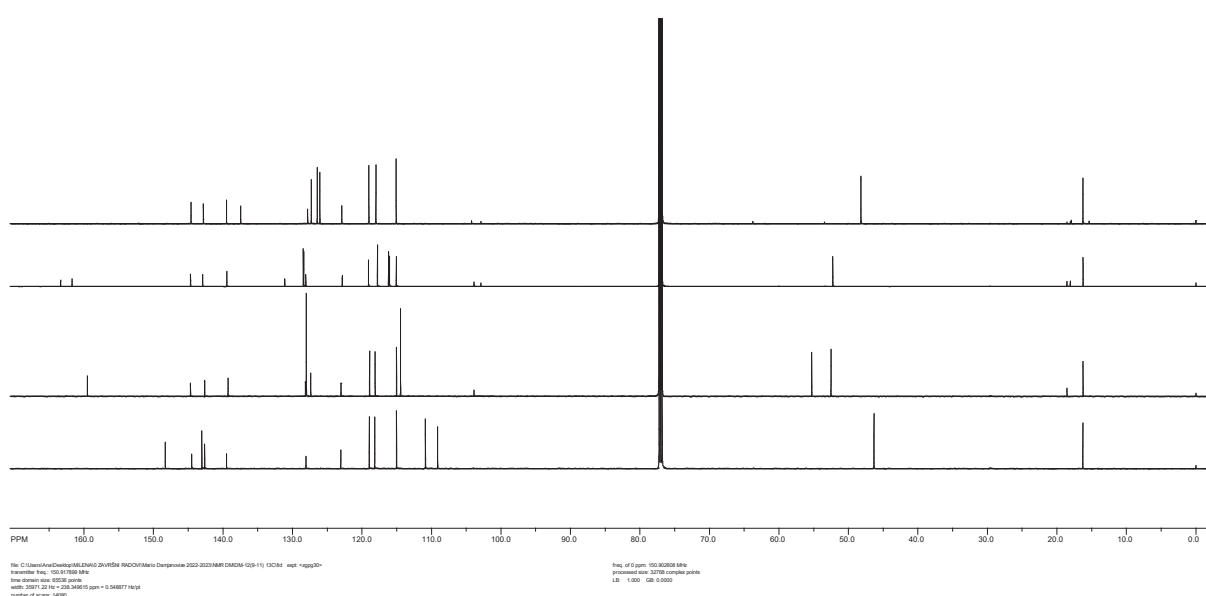
Slika 28.  $^1\text{H}$  NMR spektar konačnih produkata

Na slici 29 se поближе vidi aromatsko područje konačnih produkata. Razlike između spojeva se jasno vide, svaki ima svoje karakteristične signale. Gornji spektar koji predstavlja spoj **9** s tiofenskom skupinom, pokazuje cijepanja očekivana na protonima tiofena. Na srednja dva spektra vide se cijepanja koja odgovaraju onima između protona na benzenskoj jezgri koju imaju spojevi **10** i **11**. Zadnji spektar je spektar spoja **12** s furanskim prstenom koji ima signal s vidno manjim kemijskim pomakom od ostalih u aromatskom dijelu spektra. Također, signali imaju cijepanja koja se očekuju za protone furanskog prstena.



Slika 29.  $^1\text{H}$  NMR spektri konačnih produkata (6 – 8 ppm)

Na slici 30 prikazani su  $^{13}\text{C}$  NMR spektri konačnih spojeva poslagani redom. Vrlo su slični i sadrže puno signala u aromatskom području. Svi sadrže veliki broj kvaternih ugljikovih atoma koji se često na spektru vide kao signali slabog intenziteta. Spoj **10** čiji spektar je drugi po redu, zbog fluora vezanog na ugljike daje tri signala koja imaju oblik dubleta s konstantom sprege ovisnom o udaljenosti ugljika od fluora. Spoj **11** opet zbog svoje metoksi-skupine ima jedan ugljik više od ostalih derivata u alifatskom dijelu spektra. Spojevi **9** i **12** nemaju karakteristične signale ali broj i oblik signala odgovara spoju. Time je dodatno dokazana struktura sintetiziranih spojeva.

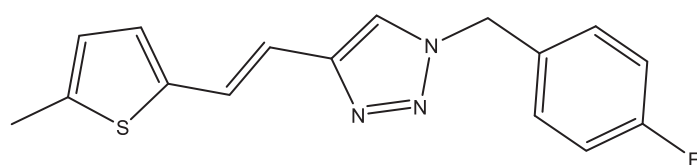


Slika 2430.  $^{13}\text{C}$  NMR konačnih spojeva

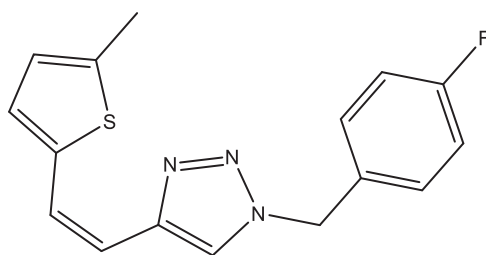


### 3.5. Računalno istraživanje elektronske strukture novih triazolnih derivata

Istraživanje stabilnosti konformacija računanim metodama u nastavku ispitivano je na molekuli spoja **6**, koji može postojati kao *cis*- i *trans*- izomer (Slika 31). S obzirom na prisustvo jednostrukih veza u spoju **6** čijom rotacijom mogu nastati različite konformacije, generirali smo nekoliko mogućih konformera za svaki izomer.



(*E*)-1-(4-fluorbenzil)-4-(2-(5-metiltiofen-2-il)vinil)-1*H*-1,2,3-triazol

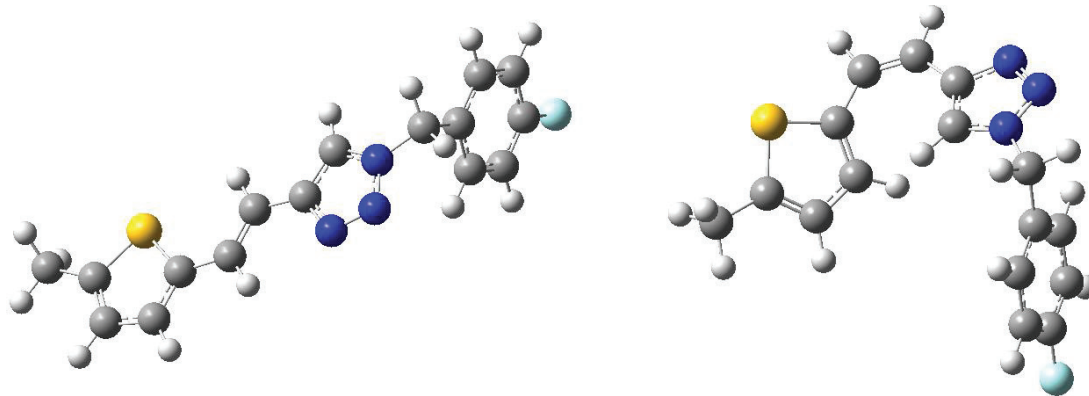


(*Z*)-1-(4-fluorbenzil)-4-(2-(5-metiltiofen-2-il)vinil)-1*H*-1,2,3-triazol

**6**

Slika 251. Shematski prikaz *trans*- i *cis*-izomera spoja **6**.

Ručno su nacrtani svi konformeri oba izomera spoja **6** u programu Molden, nakon čega su te geometrije optimirane korištenjem DFT pristupa, na M0X-2X/6-31G(d) razini, na superračunalu u Sveučilišnom računskom centru Zagreb. Korišten je programski paket Gaussian16.<sup>23</sup> Od svih struktura odabrane su dvije, najstabilnija za *trans*- i *cis*- izomer (strukture s najnižom energijom). Prikazane su na slici 32.

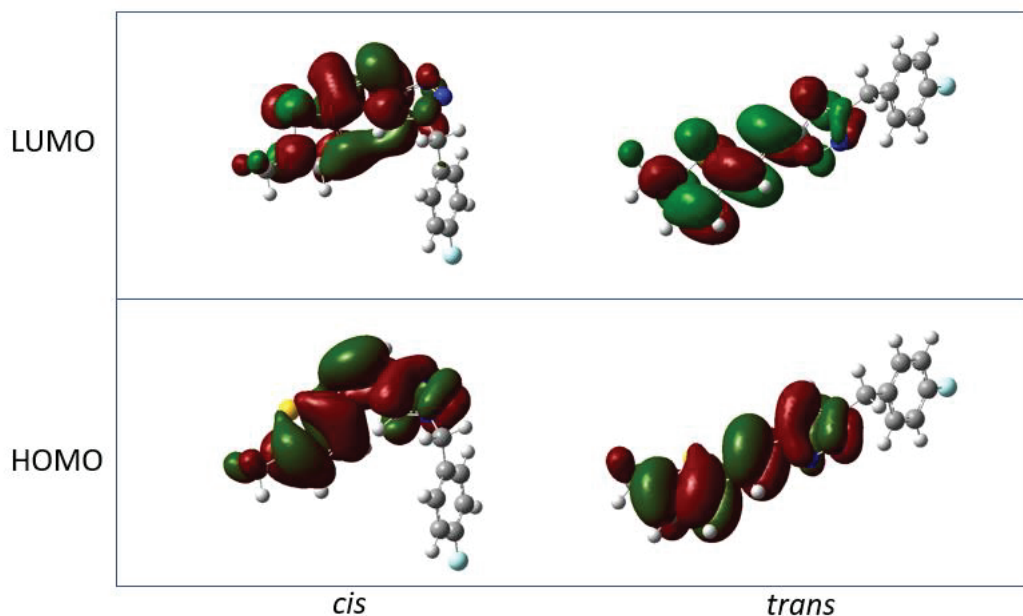


Slika 262. Optimizirana struktura *trans*- i *cis*-izomera spoja **6**

Iz prikaza vidimo da je *trans*-izomer najstabljniji kada su tiofenski prsten, dvostruka CC veza u sredini te triazolska jezgra smješteni u istoj ravnini, čime je omogućena efikasna delokalizacija  $\pi$ -elektrona prisutnih u kosturu molekule. Supstituent 4-fluorbenzen ne može sudjelovati u toj delokalizaciji jer se između njega i triazola nalazi  $\text{CH}_2$  skupina s  $\text{sp}^3$  ugljikom, čime je prijenos  $\pi$ -elektrona onemogućen. Kod *cis*-izomera, planarnost u dijelu molekule koji je sačinjen od tiofena, dvostruke CC veze i triazola nije moguća, zbog toga što bi u slučaju planarnosti došlo do toga da je vodikov atom na tiofenu smješten preblizu H-atomu na triazolu. Zbog izbjegavanja ovih vodika, dolazi do de-planarizacije kostura molekule.

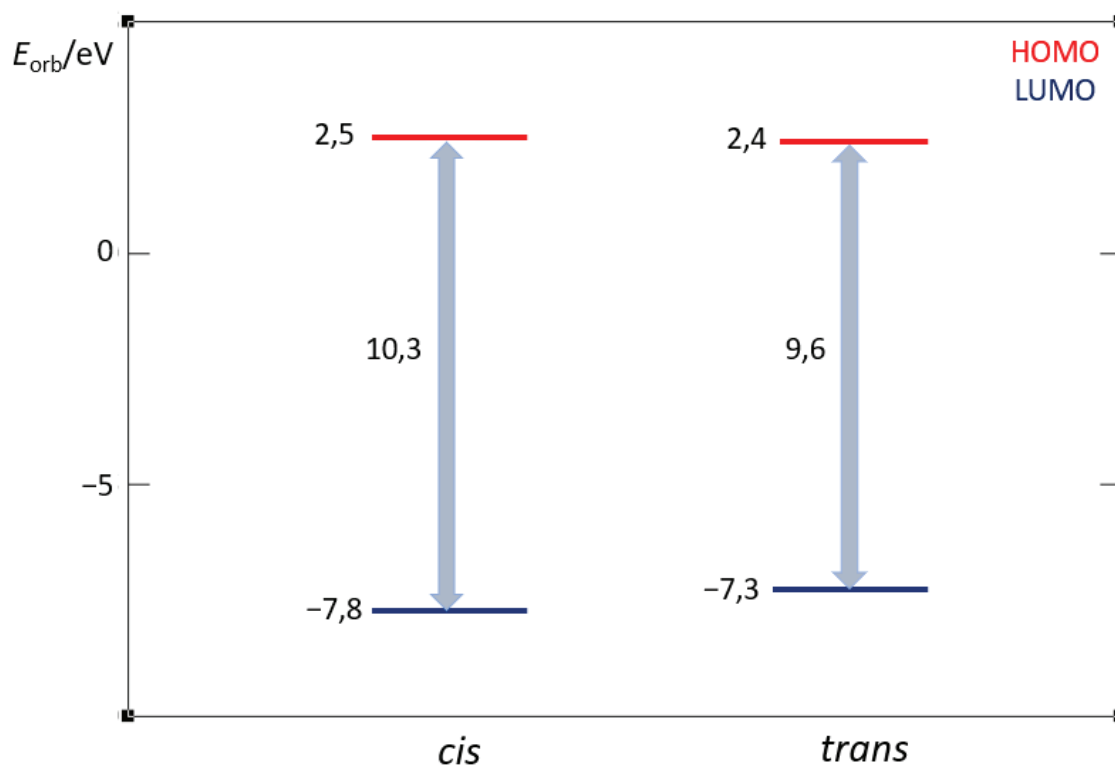
Da dodatno karakteriziramo molekulu spoja **6**, izračunali smo energije graničnih orbitala, te prikazali kako te orbitale izgledaju za svaki od izomera. Spoj **6** ima empirijsku formulu  $\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{N}_3\text{SF}$ , što znači da sadrži ukupno 156 elektrona ( $16 \times 6 + 14 \times 1 + 3 \times 7 + 1 \times 16 + 1 \times 9$ , pri čemu su 6, 1, 7, 16 i 9 redni brojevi atoma ugljika, vodika, dušika, sumpora i fluora). S obzirom da se radi o neutralnoj molekuli u singletnom stanju, to znači da je broj okupiranih molekulskih orbitala jednak  $156/2=78$ . Orbitala 78 je najviša okupirana molekulska orbitala (engl. Highest Occupied Molecular Orbital, HOMO), dok je orbitala neposredno iznad nje, tj. najniža neokupirana molekulska orbitala (engl. Lowest Unoccupied Molecular Orbital, LUMO) 79.

Na slici 33 prikazane su HOMO i LUMO orbitale za *cis*- i *trans*-izomer.



Slika 273. Granične orbitale *cis* i *trans*-izomera spoja 6

HOMO orbitala kod *trans*-izomera pokazuje kako su  $\pi$ -elektroni koji pripadaju kosturu molekule sastavljenom od tiofenske, etilenske i triazolske podjedinice, uzajamno konjugirani, tj. delokalizirani kroz cijeli kostur, a benzenski prsten supstituenta odvojen je  $sp^3$  ugljikom i ne sudjeluje u delokalizaciji. Kod *cis*-izomera, nema potpune delokalizacije  $\pi$ -elektrona između ove tri podjedinice, jer one u najstabilnijoj konformaciji nisu koplanarne, a jednako kao i kod *trans*-izomera, benzenska jezgra potpuno je odvojena i njeni  $\pi$ -elektroni nimalo ne ulaze u interakciju s  $\pi$ -elektronima kostura, tj. smješteni su u nekoj od nižih okupiranih orbitala. Ako pogledamo izračunate energije graničnih orbitala, prikazane grafički na slici 34, vidimo da je tzv. HOMO-LUMO procjep (engl. HOMO-LUMO gap) kod *trans*-izomera manji nego kod *cis*-izomera. To je prvenstveno zato što je HOMO kod *trans*-izomera nešto više energije nego kod *cis*-izomera, zahvaljujući delokalizaciji. LUMO orbitale su vrlo slične energije, pa je razlika u procjepu posljedica samo razlike u energiji HOMO orbitale kod dva izomera.



Slika 284. Razlike u energiji HOMO i LUMO orbitala za cis- i trans-izomera spoja 6

## 4. Eksperimentalni dio

### Opće napomene

Svi eksperimenti su provođeni u laboratoriju Zavoda za organsku kemiju na *Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu*. Korištena su komercijalno dostupna otapala i standardna laboratorijska oprema. Kromatografska odjeljivanja provođena su na staklenim kolonama punjenim silika-gelom (Fluka 60 Å, tehnički), te na aluminijskim i staklenim pločicama presvučenim tankim slojem silika-gela.

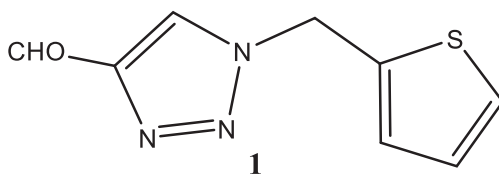
Za identifikaciju spojeva i određivanje sastava izomera korištene su NMR tehnike  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$ . Spektri su snimani u NMR centru na *Institutu Ruđer Bošković*. Kao otapalo za snimanje spektara korišten je deuterirani kloroform ( $\text{CDCl}_3$ ), a tetrametilsilan ( $\text{Si}(\text{CH}_3)_4$ ) korišten je kao unutarnji standard. Za fotokemijske reakcije korišteni su fotokemijski reaktori Rayonet i Luzchem, te žarulje valnih duljina 313 nm, a kao otpalo korišten je toluen.

### 4.1. Sinteza triazolnih aldehida

U bočicu odvagano je 144 mg početnog aldehida, ubačen je magnetiće i dodano je 2 mL dioksana. Izračunata i izmjerena je količina potrebnog amina, te je dodana u reakcijsku bočicu. Bočica je propuhana argonom i zatvorena, te je čep oblijepljen parafilmom. Reakcijska smjesa je zagrijavana u uljnoj kupelji pri 125 °C kroz 48 sati uz uključeno miješanje.

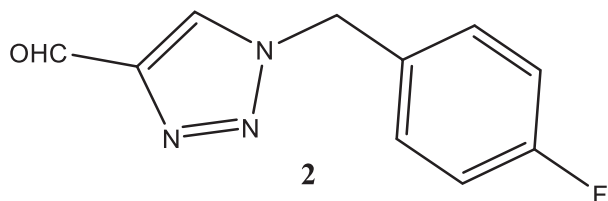
Nakon završetka reakcije, smjesa je uparena do suha i pripremljena za kolonsku kromatografiju. Kromatografsko odjeljivanje provedeno je na staklenoj koloni punjenoj silika-gelom uz korištenje smjese petroletera, diklormetana i etil-acetata kao eluensa.

Odvojeni produkti poslani su u NMR centar na analizu snimanjem  $^1\text{H}$  spektra, te su im na taj način potvrđene kemijske strukture.



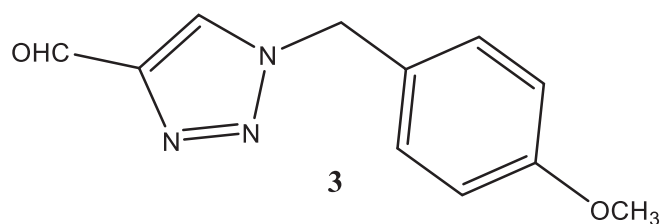
1-(tiofen-2-ilmetil)-1H-1,2,3-triazol-4-karbaldehid

66 mg izoliranog spoja, žuto ulje;  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz)  $\delta/\text{ppm}$ : 10.12 (s, 1H), 8.10 (s, 1H), 7.42 (d,  $J = 5.1$  Hz, 1H), 7.25 (d,  $J = 3.3$  Hz, 1H), 7.00 (dd,  $J = 5.1, 3.3$  Hz, 1H), 5.81 (s, 2H).



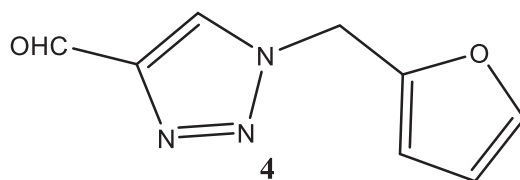
1-(4-fluorbenzil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-karbaldehid

61 mg izoliranog spoja, žuto ulje;  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz)  $\delta/\text{ppm}$ : 10.12 (s, 1H), 7.91 (s, 1H), 7.22 (dd,  $J = 8.6, 5.1$  Hz, 2H), 7.06 – 7.01 (m, 2H), 5.52 (s, 2H).



1-(4-metoksibenzil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-karbaldehid

81 mg izoliranog spoja, žuto ulje;  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz)  $\delta/\text{ppm}$ : 10.13 (s, 1H), 7.95 (s, 1H), 7.27 – 7.25 (m, 2H), 6.92 (d,  $J = 8.6$  Hz, 2H), 5.53 (s, 2H).



1-(furan-2-ilmetil)-1*H*-1,2,3-triazol-4-karbaldehid

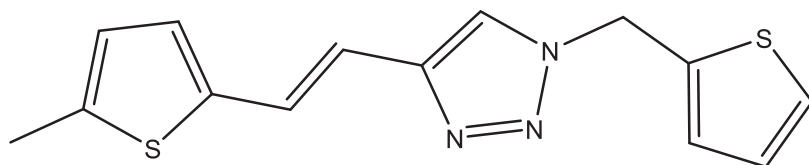
65 mg izoliranog spoja, žuto ulje;  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz)  $\delta/\text{ppm}$ : 10.12 (s, 1H), 8.12 (s, 1H), 7.51 (dd,  $J = 1.8, 0.7$  Hz, 1H), 6.51 (d,  $J = 3.3$  Hz, 1H), 6.40 (dd,  $J = 3.3, 1.8$  Hz, 1H), 5.66 (s, 2H).

## 4.2. Sinteza tieno-triazolostilbena 5 – 8

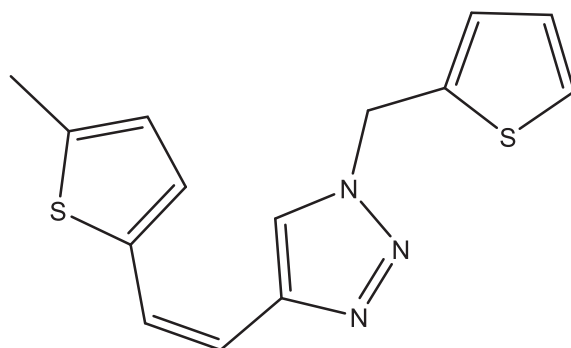
Sinteza spojeva 5 - 8 se provodi Wittigovom reakcijom. U trogrlu tikvicu stavljen je magnetič za miješanje, a na srednje grlo građuirani lijevak za dokapavanje. U lijevo grlo stavljena je klor-kalcijska cijev i aparatura je propuhana dušikom. Na desno grlo stavljen je septum i kroz njega upuhivan dušik iz balona koji je prethodno napunjen dušikom. U lijevak je dodano 25 ml etanola i odmah ispušteno 15 ml u tikvicu, te je miješanje uključeno. Sol je odvagana, koja je reaktant u reakciji i stavljena izravno u tikvicu. Vrlo oprezno odvagana je potrebna količina elementarnog natrija u petroleteru i dodana u lijevak da reagira s etanolom. Kada je natrij izreagirao, ispušteno je malo otopine u tikvicu i u nju je dodan zatim aldehid otopljen u 5 ml etanola. Ostatak otopine polako je dokapavan u tikvicu. Reakcija se provodila 24 sata na mješalici pri sobnoj temperaturi.

Nakon završetka reakcije, smjesa je uparena do suha i pripremljena za kolonsku kromatografiju. Kromatografsko odijeljivanje provedeno je na staklenoj koloni punjenoj silika-gelom uz korištenje smjese petroletera i etera kao eluensa.

Odvojeni produkti poslani su u NMR centar na analizu snimanjem  $^1\text{H}$  spektra. *Cis-* i *trans-* izomeri nisu uspješno razdvojeni, te se u spektrima nalaze smjese izomera.

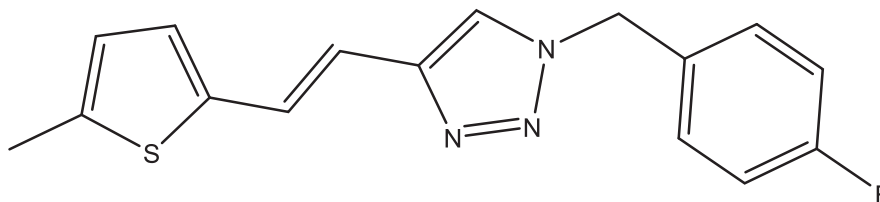


(*E*)-4-(2-(5-metiltiofen-2-il)vinil)-1-(tiofen-2-ilmetil)-1*H*-1,2,3-triazol

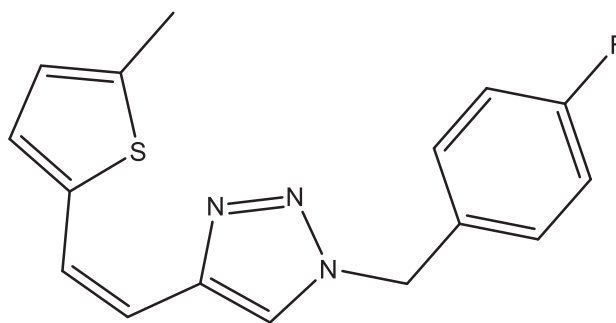


(*Z*)-4-(2-(5-metiltiofen-2-il)vinil)-1-(tiofen-2-ilmetil)-1*H*-1,2,3-triazol

22 mg izolirane smjese izomera, žuto ulje i bijeli prah;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz)  $\delta$ /ppm: 7.62 (s, 1H), 7.54 (s, 1H), 7.35 – 7.31 (m, 3H), 7.12 (d,  $J = 3.6$  Hz, 1H), 7.10 (d,  $J = 3.4$  Hz, 1H), 7.03 – 6.99 (m, 2H), 6.98 (d,  $J = 3.4$  Hz, 1H), 6.8 (d,  $J = 3.4$  Hz, 1H), 6.72 (d,  $J = 16.1$  Hz, 1H), 6.65 – 6.61 (m, 3H), 6.4 (d,  $J = 12.3$  Hz, 1H), 5.71 (s, 2H), 5.70 (s, 2H), 2.47 (s, 3H), 2.43 (s, 3H).



(*E*)-1-(4-fluorbenzil)-4-(2-(5-metiltiofen-2-il)vinil)-1H-1,2,3-triazol

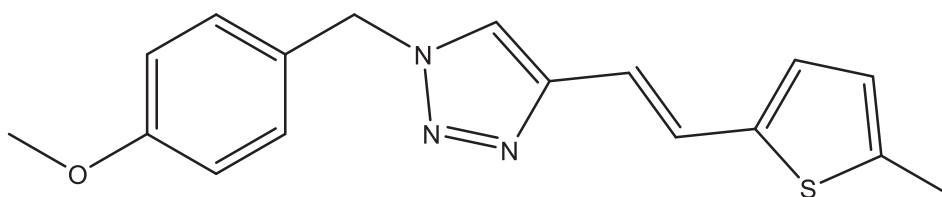


(*Z*)-1-(4-fluorbenzil)-4-(2-(5-metiltiofen-2-il)vinil)-1H-1,2,3-triazol

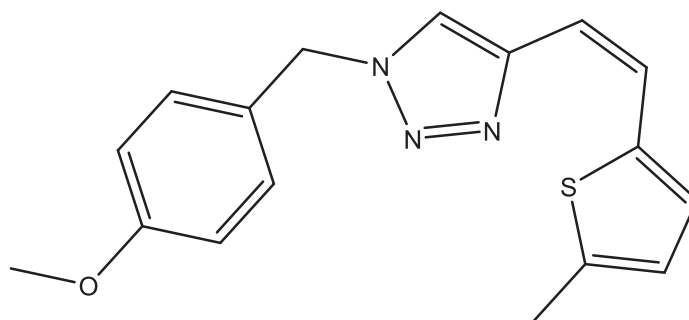
## 6

32.5 mg izolirane smjese izomera, žuto ulje i bijeli prah;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz)  $\delta$ /ppm: 7.61 (s, 1H), 7.43 (s, 1H), 7.33 (d,  $J = 16.3$  Hz, 1H), 7.29 – 7.25 (m, 4H +  $\text{CDCl}_3$ ), 7.09 – 7.04 (m, 4H), 6.97 (d,  $J = 3.5$  Hz, 1H), 6.84 (d,  $J = 3.4$  Hz, 1H), 6.71 (d,  $J = 16.1$  Hz, 1H), 6.66 – 6.60 (m, 3H), 6.38 (d,  $J = 12.4$  Hz, 1H), 5.50 (s, 2H), 5.49 (s, 2H), 2.47 (s, 3H), 2.41 (s, 3H).





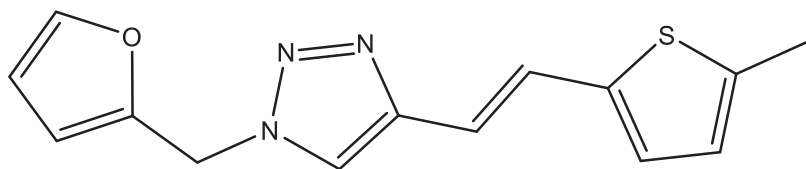
(*E*)-1-(4-metoksibenzil)-4-(2-(5-metiltiofen-2-il)vinil)-1*H*-1,2,3-triazol



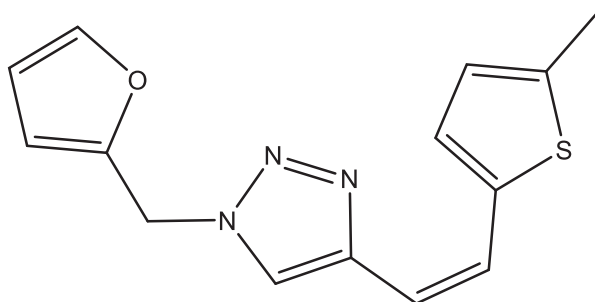
(*Z*)-1-(4-metoksibenzil)-4-(2-(5-metiltiofen-2-il)vinil)-1*H*-1,2,3-triazol

7

58 mg izolirane smjese izomera, žuto ulje i bijeli prah;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz)  $\delta$ /ppm: 7.50 (s, 1H), 7.45 (s, 1H), 7.30 (d,  $J = 16.1$  Hz, 1H), 7.25 – 7.21 (m, 4H), 6.97 (d,  $J = 3.4$  Hz, 1H), 6.92 – 6.87 (m, 4H), 6.82 (d,  $J = 3.5$  Hz, 1H), 6.71 (d,  $J = 16.1$  Hz, 1H), 6.64 – 6.59 (m, 3H), 6.37 (d,  $J = 12.3$  Hz, 1H), 5.46 (s, 2H), 5.45 (s, 2H), 3.81 (s, 3H), 3.805 (s, 3H), 2.46 (s, 3H), 2.41 (s, 3H).



(*E*)-1-(furan-2-ylmetil)-4-(2-(5-metiltiofen-2-il)vinil)-1*H*-1,2,3-triazol



(*Z*)-1-(furan-2-ylmetil)-4-(2-(5-metiltiofen-2-il)vinil)-1*H*-1,2,3-triazol

8

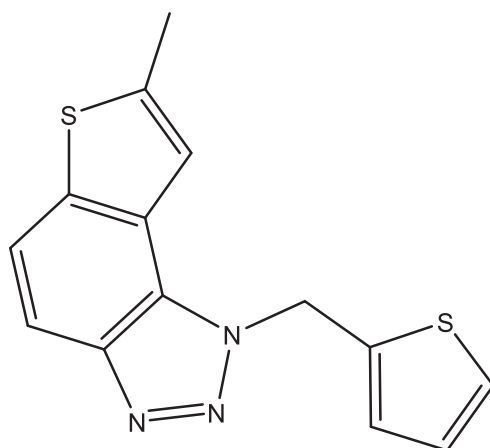
30.4 mg izolirane smjese izomera, žuto ulje i bijeli prah;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz)  $\delta$ /ppm: 7.67 (s, 1H), 7.51 (s, 1H), 7.43 (d,  $J = 10.5$  Hz, 2H), 7.34 (d,  $J = 16.1$  Hz, 1H), 7.00 (d,  $J = 3.61$  Hz, 1H), 6.84 (d,  $J = 3.6$  Hz, 1H), 6.73 (d,  $J = 16.1$  Hz, 1H), 6.66 – 6.62 (m, 3H), 6.45 (dd,  $J = 11.8, 3.3$  Hz, 2H), 6.40 – 6.37 (m, 3H), 5.53 (s, 2H), 5.52 (s, 2H), 2.47 (s, 3H), 2.44 (s, 3H).

### 4.3. Fotokemijska sinteza benzo-triazola 9-13

Smjesa izomera otopljen je u 50 ml toluena i prebačena u kvarcnu kivetu. Dodana joj je katalitička količina elementarnog joda. Otopina je osvjetljavana lampama valne duljine  $\lambda = 313$  nm. Svakih 30 minuta reakcija je prekinuta i praćena na TLC pločici.

Nakon završetka reakcije, smjesa je uparena do suha i pripremljena za kolonsku kromatografiju. Kromatografsko odijeljivanje provedeno je na staklenoj koloni punjenoj silika-gelom uz korištenje smjese petroletera i dietiletera kao eluensa.

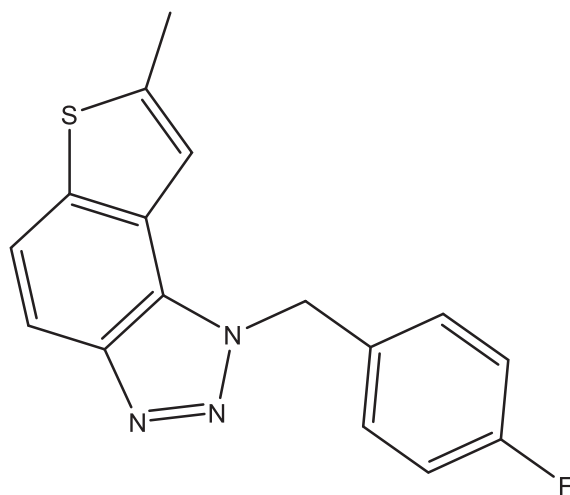
Odvojeni produkti poslani su u NMR centar na analizu snimanjem  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  spektara, te su im na taj način potvrđene kemijske strukture.



7-metil-1-(tiofen-2-ilmetil)-1*H*-tieno[3',2':3,4]benzo[1,2-*d*][1,2,3]triazol

9

7.3 mg izoliranog spoja, žuto ulje;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz)  $\delta$ /ppm: 7.89 (d,  $J = 8.9$  Hz, 1H), 7.68 (d,  $J = 8.9$  Hz, 1H), 7.34 (s, 1H), 7.24 (d,  $J = 5.1$  Hz, 1H), 7.00 (d,  $J = 3.3$  Hz, 1H), 6.95 – 6.93 (m, 1H), 6.22 (s, 2H), 2.66 (s, 3H);  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz)  $\delta$ /ppm: 144.6 (s), 142.8 (s), 139.5 (s), 137.4 (s), 127.8 (s), 127.3 (s), 126.4 (s), 126.1 (s), 122.9 (s), 119.0 (s), 118.0 (s), 115.1 (s), 48.2 (s), 16.3 (s).

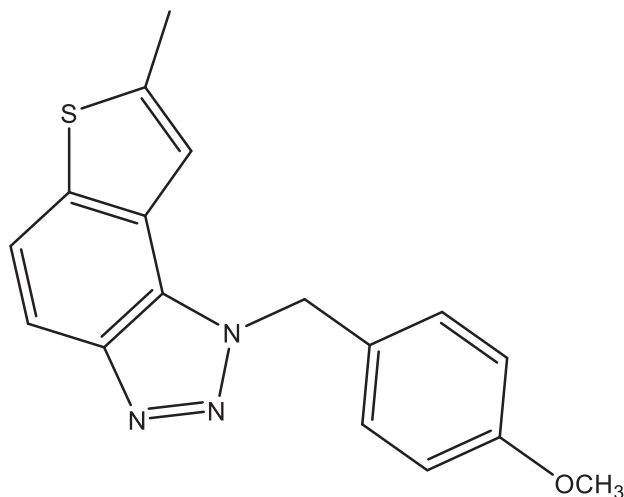


1-(4-fluorbenzil)-7-metil-1*H*-tieno[3',2':3,4]benzo[1,2-*d*][1,2,3]triazol

10

13.5 mg izoliranog spoja, žuto ulje;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz)  $\delta$ /ppm: 7.91 (d,  $J = 8.8$  Hz, 1H), 7.69 (d,  $J = 8.8$  Hz, 1H), 7.19 – 7.16 (m, 2H), 7.14 (s, 1H), 7.03 – 6.99 (m, 2H), 6.05 (s, 2H), 2.61 (s, 3H);  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz)  $\delta$ /ppm: 162.5 (d), 144.7 (s), 142.9 (s), 139.5

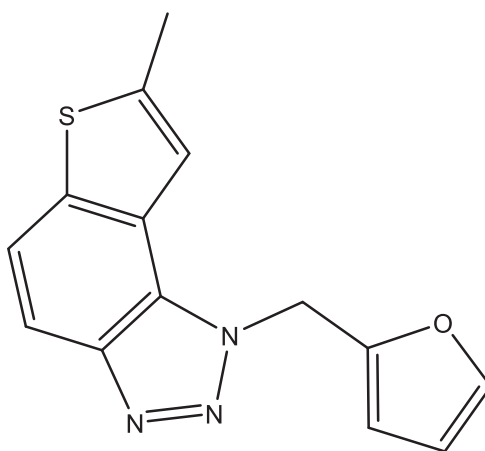
(s), 131.1 (s), 128.4 (d), 128.1 (s), 122.8 (s), 119.1 (s), 117.8 (s), 116.1 (d), 115.1 (s), 103.4 (d), 52.3 (s), 18.3 (d), 16.2 (s).



1-(4-metoksibenzil)-7-metil-1*H*-tieno[3',2':3,4]benzo[1,2-*d*][1,2,3]triazol

**11**

14 mg izoliranog spoja, žuto ulje;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz)  $\delta$ /ppm: 7.69 (d,  $J = 8.9$  Hz, 1H), 7.68 (d,  $J = 8.9$  Hz, 1H), 7.20 (s, 1H), 7.14 (d,  $J = 8.7$  Hz, 2H), 6.84 (d,  $J = 8.7$  Hz, 2H), 6.01 (s, 2H), 3.75 (s, 3H), 2.61 (s, 3H);  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz)  $\delta$ /ppm: 159.5 (s), 144.7 (s), 142.6 (s), 139.3 (s), 128.1 (s), 128.0 (s), 127.4 (s), 123.0 (s), 118.9 (s), 118.1 (s), 115.0 (s), 114.4 (s), 103.9 (s), 55.3 (s), 52.5 (s), 18.5 (s), 16.2 (s).



1-(furan-2-ilmetil)-7-metil-1*H*-tieno[3',2':3,4]benzo[1,2-*d*][1,2,3]triazol

**12**

15 mg izoliranog spoja, žuto ulje;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz)  $\delta/\text{ppm}$ : 7.88 (d,  $J = 8.9$  Hz, 1H), 7.69 (d,  $J = 8.9$  Hz, 1H), 7.43 (s, 1H), 7.37 (s, 1H), 6.32 (s, 2H), 6.04 (s, 2H), 2.69 (s, 3H);  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz)  $\delta/\text{ppm}$ : 148.3 (s), 144.5 (s), 143.0 (s), 142.6 (s), 139.5 (s), 128.1 (s), 123.0 (s), 119.0 (s), 118.2 (s), 115.0 (s), 110.9 (s), 109.1 (s), 46.3 (s), 16.3 (s).

## 5. Zaključak

Novi aldehidi **1-4** sintetizirani su i izolirani za daljnu reakciju. Wittigovom reakcijom sintetizirani su novi tieno-triazolostilbeni **5-8** kao smjese *cis*- i *trans*-izomera. Izomeri nisu uspješno razdvojeni niti nakon više pokušaja kolonske kromatografije, količina spoja je bila dosta mala, a izomeri su zajedno silazili s kolone. Strukture sintetiziranih spojeva kao smjesa izomera potvrđene su  $^1\text{H}$  NMR spektroskopijom. Smjese izomera **5-8** podvrgnute su fotokemijskoj reakciji u kojoj dolazi do zatvaranja prstena i stvaranja novih tienobenzo-triazola. Strukture novih spojeva **9-12**, dokazane su  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR spektrima.

Provedene su i fotokemijske reakcije izomerizacije na razdvojenim čistim *cis*- i *trans*-izomerima triazolostilbena koji su prethodno sintetizirani i u ovom radu razdvojeni u laboratoriju.

Računalno istraživanje provedeno je za spoj **6**, kojim je dobivena trodimenzionalna struktura najstabilnijih konformacija izomera simuliranih u plinskoj fazi. Izračunate su energije graničnih orbitala koje pokazuju da je razlika u energiji najviše okupirane i najniže neokupirane orbitale manja kod *trans*-izomera.

## 6. Literatura

1. Field, L. D., S. Sternhell and J. R. Kalman, *Organic Structures from Spectra*, 5th ed., Wiley, 2013.
2. Crews, P., J. Rodriguez, and M. Jaspars, *Organic Structure Analysis*, 2nd ed., Oxford University Press, New York, 2009.
3. Keeler, J., *Understanding NMR spectroscopy*, John Wiley and Sons, New York, 2002.
4. Lewitt, M. H., *Spin Dynamics: Basics of nuclear magnetic resonance*, John Wiley and Sons, Chichester, 2001.
5. Gunther, H., *NMR Spectroscopy*, 2nd ed., John Wiley and Sons, New York, 1995.
6. Jackman, L. M., and S. Sternhell, *Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy in Organic Chemistry*, 2nd ed., Pergamon Press, New York, 1969.
7. Lambert, J. B., S. Groenert, H. F. Shurvell, D. A. Lightner, and R. G. Cooks, *Organic Structural Spectroscopy*, Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ, 2010.
8. Macomber, R. S., *NMR Spectroscopy: Essential Theory and Practice*, College Outline Series, Harcourt, Brace Jovanovich, New York, 1988.
9. Becker, E. D., *High resolution NMR*, Academic Press, San Diego, 2000.
10. Macomber, R. S., *A Complete Introduction to Modern NMR Spectroscopy*, John Wiley and Sons, New York, 1997.
11. Sanders, J. K. M., and B. K. Hunter, *Modern NMR Spectroscopy—A Guide for Chemists*, 2nd ed., Oxford University Press, Oxford, 1993.
12. Silverstein, R. M., F. X. Webster and D. J. Kiemle, *Spectrometric Identification of Organic Compounds*, 7th ed., John Wiley and Sons, 2005.
13. Friebolin, H., *Basic One- and Two-Dimensional NMR Spectroscopy*, 5th ed., Wiley-VCH Publishers, New York, 2010.
14. Berger, S., and S. Braun, *200 and More NMR Experiments*, Wiley-VCH, Weinheim, 2004.
15. Williams, D. H., and I. Fleming, *Spectroscopic Methods in Organic Chemistry*, 6th ed., McGraw-Hill Book Co. Ltd., London, 2008.
16. <https://www.cryst.bbk.ac.uk/PPS2/projects/schirra/html/3dnmr.htm> (pristup 24. kolovoza 2023.)
17. Pavia, D. L., G. M. Lampman, G. S. Kriz, J. R. Vyvyan, *Introduction to spectroscopy*, 5th ed., Cengage Learning, Washington, 2013.
18. M. von Eisch, A. J. Crovetti, US Pat. No. 3272833; Chem. Abstr., 66 (1967) 37761.

19. T. Sasaki, T. Yoshioka, *Bull. Chem. Soc. Japan*, 42 (1969) 556.
20. T. Sasaki, T. Yoshioka, *Yuki Gosei Kagaku Kyokai Shi*, 25 (1967) 665; *Chem. Abstr.*, 68 (1968) 12789.
21. D. J. Ager, *J. Chem. Res. (S)*, (1985) 237.
22. W. Zhao, *Huahue Shiji*, 19 (1997) 273; *Chem. Abstr.*, 127 (1997) 330917.
23. Frisch, M.J.; Trucks, G.W.; Schlegel, H.B.; Scuseria, G.E.; Robb, M.A.; Cheeseman, J.R.; Scalmani, G.; Barone, V.; Petersson, G.A.; Nakatsuji, H.; et al. *Gaussian 16*; Revision C.01; Gaussian, Inc.: Wallingford, CT, USA, 2016.



## **Životopis**

Mario Damjanović završio je svoje osnovnoškolsko obrazovanje 2015. godine u Osnovnoj školi Ivana Brlić-Mažuranić, Strizivojna. Nakon toga išao je u Prirodoslovno-matematičku gimnaziju „Matija Mesić“ u Slavonskom Brodu gdje je maturirao 2019. godine. Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu, studij Primijenjena kemija upisuje 2019. godine.