

Ispitivanje uvjeta reakcije na regioselektivnost vezivanja ferocena na adeninu

Vurnek, Teo

Undergraduate thesis / Završni rad

2016

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:363683>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**



prehrambeno
biotehnološki
fakultet

Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij
Prehrambena tehnologija

Teo Vurnek

6820/PT

Ispitivanje uvjeta reakcije na regioselektivnost vezivanja ferocena na adeninu

Završni rad

Modul: Organska kemija

Mentor: Doc. dr. sc. Jasmina Lapić

Zagreb, 2016.

DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu

Završni rad

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Preddiplomski studij Prehrambena tehnologija

Zavod za kemiju i biokemiju

Laboratorij za organsku kemiju

Ispitivanje uvjeta reakcije na regioselektivnost vezivanja ferocena na adeninu

**Teo Vurnek
6820/PT**

Sažetak: Kopulati ferocena sa nukleobazama postaju sve češći predmet istraživanja zbog svoje izuzetne biološke aktivnosti. Oni znatno ujteču na unaprijeđenje terapija mnogih još neizlječivih bolesti kao što su HIV, razni tumori te fungalne infekcije. U okviru ovog završnog rada višestupanjskom sintezom pripravljeni su ferocenski nukleozidni derivati purina, N-7 i N-9 ferocenoil adenina uz kalijev karbonat (K_2CO_3) kao deprotonirajući agens. IR, 1H te ^{13}C -NMR-spektroskopijom potvrđena je struktura dobivenih kopulata ferocena s adeninom.

Ključne riječi: Bioorganometalna kemija, Nukleozidi, Ferocen, Adenin

Rad sadrži: 24 stranice, 12 slika, 8 shema, 17 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u: Knjižnica Prehrambeno- biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: doc.dr.sc. Jasmina Lapić

Pomoć pri izradi:

Rad predan: lipanj, 2016.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb **Final work**
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Undergraduate studies of Food Technology
Department of chemistry and biochemistry
Laboratory for organic chemistry

Regioselectivity testing for the reaction conditions of ferrocene binding to adenine

Teo Vurnek
6820/PT

Abstract: Ferrocenoil-nucleobase derivates are becoming more common subject of research because of their exceptional biological activity. They significantly affect the improvement of many therapies for still incurable diseases such as HIV, miscellaneous tumors, and fungal infections. In this final work, multistage syntheses were prepared ferrocene purine nucleoside derivatives, N-7 and N-9 ferrocenoil adenine with potassium carbonate (K_2CO_3) as a deprotonating agent. IR, 1H and ^{13}C -NMR - spectroscopy confirmed the structure of ferrocene conjugates obtained with adenine.

Keywords: Bioorganometallic chemistry, Nucleozide, Ferrocene, Adenine

Thesis contains: 24 pages, 12 figures, 8 schemes, 17 references

Original in: Croatian

Final work in printed and electronic (pdf format) version is deposited in: Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: Jasmina Lapić, Assistant Professor

Technical support and assistance:

Thesis delivered: June, 2016

SADRŽAJ:

1. Uvod

1.1 Uvod.....	1
---------------	---

2. Teorijski dio

2.1. Ferocen.....	2
2.2. Nukleozidi.....	3
2.3. Purin.....	4
2.4. Adenin.....	5
2.5. Kopulati ferocena i nukleobaza.....	5

3. Eksperimentalni dio

3.1. Materijali.....	9
3.2. Metoda rada.....	9
3.3. <i>N,N</i> -difenilferocenkarboksiamid.....	11
3.4. Ferocekarboksilna kiselina.....	11
3.5. Ferocenoil klorid.....	12
3.6. Ferocenoil adenin.....	12

4. Rezultati i rasprava

4.1. Uvod.....	16
4.2. Sinteza i spektroskopska analiza.....	16
4.2.1. Ferocenkarboksilna kiselina.....	17
4.2.2. Ferocenoil-klorid.....	17
4.2.3. Sinteza i spektralna analiza ferocenoil adenina.....	18
4.2.4. Spektralna analiza.....	19
4.3. Zaključak.....	22

5. Literatura

5.1. Literatura.....	23
----------------------	----

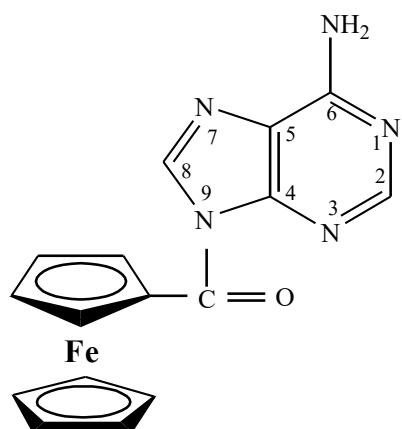
1. Uvod

1.1. Uvod

Ovaj završni rad dio je istraživanja na području metalocena odnosno biokonjugata ferocena s pirimidinskim i purinskum nukleobazama koje se izvodi u okviru Potpore istraživanju pod naslovom: "Ferocenoilni derivati purinskih DNA-baza. Priprava, spektroskopska mjerena i kvantno-kemijsko istraživanje", koje se izvodi na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu u Laboratoriju za organsku kemiju u Zagrebu.

Nakon 19. stoljeća, počinje nagli razvoj organometalne kemije, znanstvena disciplina na granici između organske i anorganske kemije. Kao posljedica razvijanja organometalne kemije javlja se i bioorganometalna kemija koja objedinjuje organsku i anorgansku kemiju sa biologijom. Glavna istraživačka polja ove grane postaju bioanaliza, terapija i molekulsko prepoznavanje te ona spaja organometalne konjugate sa biološkim molekulama, peptidima, proteinima, uglikohidratima, nukleobazama. Spomenuti metaloceni imaju širok spektar biološkog djelovanja, te su razna istraživanja tih organometalnih spojeva pokazala da imaju citostatičnu, antimaliarsku, antifugalnu te mnoge druge biološke aktivnosti [1].

Budući da je dokazano da supstituirani analozi prirodnih nukleozida imaju snažna biološka djelovanja, potreba za novosintetiziranim nukleozidnim analozima je velika te je cilj ovog završnog rada optimiranje uvjeta sinteze za pripravu modificiranog analoga nukleozida purinske baze adenina i ferocena s karbonilnom skupinom kao razmaknicom (Slika 1), pri čemu ferocenski dio mora biti selektivno supstituiran na N9 položaju baze umjesto šećernog dijela kako bi se oponašala prirodna struktura nukleozida. U nastavku istraživanja ispitati će se biološka i elektrokemijska aktivnost sintetiziranog spoja.

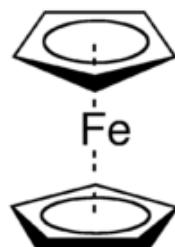


Slika 1. Struktura N-9 kopulata ferocenoil adenina

2. Teorijski dio

2.1. Ferocen

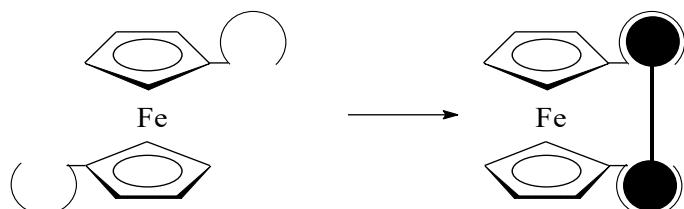
Ferocen je organometalni spoj čija je formula $\text{Fe}(\text{C}_5\text{H}_5)_2$ te pripada skupini metalocena odnosno grupi organometalnih kemijskih spojeva koji se sastoje od dva ciklopentadienilna prstena povezana na različitim mjestima na centralnom atomu željeza. Takav spoj je također poznat pod nazivom "sendvič spoj". [2] Molarna masa ferocena iznosi 186,04 g/mol, gustoća je 1,11 g/cm³ te je točka vrelišta 249 °C. [3] Ferocen se može prirediti raznim reakcijama, a neke od njih su: sinteza uz korištenje Grignardovog reagensa ciklopentadienilnog magnezijeva bromida i željezova klorida [4], zatim reakcija željeza sa plinovitim ciklopentadienom [5] ili željezova pentakarbonila sa ciklopentadienilom [6].



Slika 2. Struktura ferocena

Prvo otkrivena reakcija sinteze ferocena je korištenjem Gringardovog reagensa ciklopentadienil magnezij bromida koji se priprema reakcijom ciklopentadiena sa magnezijem i brometanom u bezvodnom benzenu. Željezov (III) klorid je nakon toga suspendiran u bezvodni dietil-eter i dodan Grignardovom reagensu.

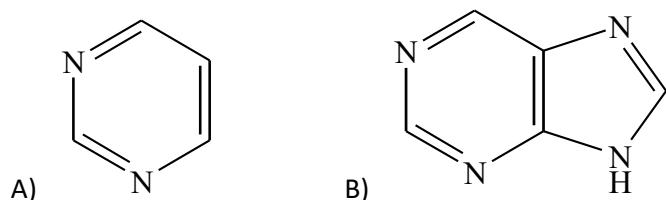
Uočeno je da je pri sobnoj temperaturi rotacijska barijera ferocenskih prstenova niska. Ta se mogućnost iskorištava kod sinteze konjugata ferocenskih spojeva. Prostornom selektivnom rotacijom, supstrat sam optimizira način vezanja disfunkcijskih molekula kako je prikazano na slici 3. U mnogim reakcijama pokazuje analogiju s benzenom. [7]



Slika 3. Vezivanje disfunkcijske molekule na ferocenski receptor

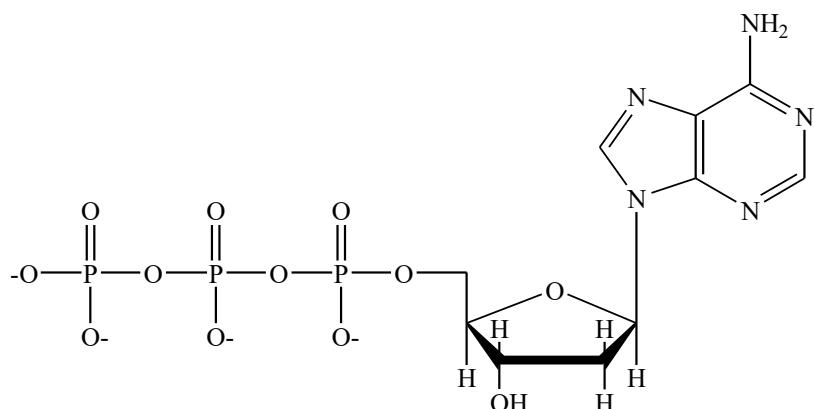
2.2. Nukleozidi

Nukleozidi su strukturne podjedinice nukleinskih kiselina, makromolekula koje sadrže genetičku informaciju u živim stanicama. To su zapravo glukozamini koji se sastoje od heterocikličke dušične baze koja je preko N-glikozidne veze vezana na šećer ribozu i deoksiribozu. Dijele se na purinske i pirimidinske baze. Purinske se baze dijele na adenin i gvanin te se sastoje od primidinskog i imidazolnog prstena,a među pirimidinske baze se ubrajaju citozin,timin te uracil koji se javlja jedino kod ribonukleinske kiselina (RNA).



Slika 4. Struktura : A) pirimidinskog prstena, B) purinskog prstena

Nukleozidi se u stanci prevode u nukleotide, fosfatne estere nukleozida, koji predstavljaju osnovne gradivne jedinice moluekula DNA i RNA. Dolazi do fosforilacije pomoću djelovanja enzima kinaze prilikom čega se fosforilira primarna hidroksilna skupina nukleozida. Najbolji primjer nukleotida koji ima važnu energetsку ulogu u našim stanicama je adenozin trifosfat (ATP). Energija se sa ATP-a oslobađa cijepanjem visokoenergetske anhidridne veze između atoma fosfora.

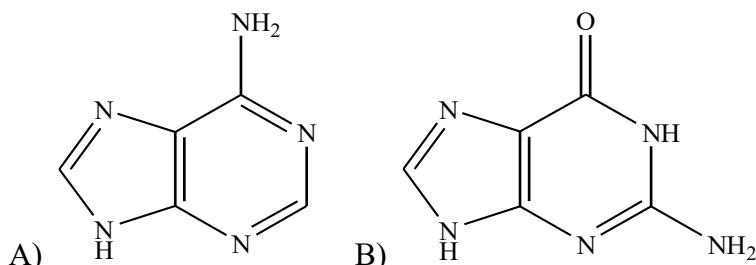


Slika 5. Adenozin trifosfat (ATP)

Adenozin čini osnovnu strukturu koenzima FADH, NADH te koenzima A (CoA). Enzimi koji se zovu nukleotidaze cijepaju nukleotide na njegove komponente nukleozide i fosfatne grupe. Nukleozidi se zatim dalje raspadaju u lumenu probavnog sustava pomoću nukleozidaze na dušičnu bazu i ribozu (deoksiribozu) ili unutar stanice pomoću nukleozid fosforilaze na dušičnu bazu i ribozu-1-fosfat (deoksiribozu-1-fosfat). [8]

2.3. Purin

Purin je heterociklički aromatski organski spoj koji se sastoji od pirimidinskog prstena povezanog sa imidazonlним prstenom, odnosno od pet atoma ugljika i četiri atoma dušika. Purini su najrašireniji skupina dušikovih heterocikličkih spojeva na svijetu. [9] Aromatski karakter purina je posljedica prisutstva konjugiranih veza, što ih svrstava među nekoliko najstabilnijih spojeva u prirodi. Dvije od pet baza u nukleinskim kiselinama su purini, a to su adenin i gvanin.



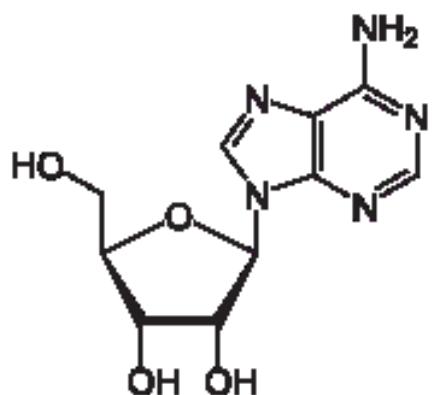
Slika 6. A) Adenin

B) Gvanin

Većina supstituiranih purina je slabo topiva u vodi i velikom broju organskih otapala te je purine moguće sintetizirati u laboratoriju na više načina, no za razliku od nekolicine njegovih derivata, još nije pronađen u prirodi. [10] Isto tako treba naglasiti da su purini osnovne i važne komponente važnih biomolekula poput NADH, GTP-a, ATP-a te koenzima A te je nedavno otkriveno kako imaju značajnu ulogu u sustavu prenošenja živčanih signala. Otkrićem 6-merkaptopurina znanstvenici su posvetili veliku pažnju sintezi novih purinskih derivata zbog potencijalnog antitumorskog djelovanja. Sam mehanizam djelovanja 6-merkaptopurina se temelji na posljedičnom prestanku rasta tumorskih stanica nakon što se inhibira nekolicina enzima koji su potrebni za sintezu adenozina i gvanozina. [11]

2.4. Adenin

Purinska baza adenin je nukleobaza koja se isto kao i gvanin pojavljuje u formiraju nukleotida nukleinskih kiselina DNA i RNA. Oblik adenina komplementarno odgovara pirimidinskoj bazi timin u DNA te uracilu u RNA gdje se sa obe pirimidinske baze povezuje sa dvije vodikove veze. [12] Adenin formira nukleozid adenozin kada se pričvrsti za ribozu i deoksiadenozin kada se pričvrsti za deoksiribozu te gradi adenozin-trifosfat (ATP), nukleotid, kada mu se dodaju tri fosfatne grupe. Adenozin-trifosfat se koristi kao kemijski izvor energije u metabolizmu stanice. U starijom literaturi adenin se ponekad nazivao i vitaminom B4, ali se više ne smatra kao pravi vitamin ili dio vitamina B kompleksa. [13]

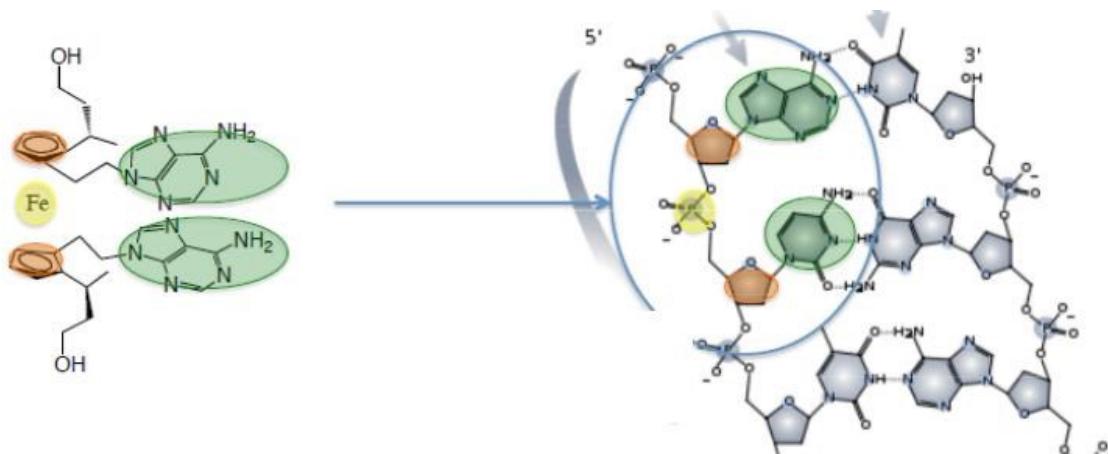


Slika 7. Adenozin

2.5. Kopulati ferocena i nukleobaza

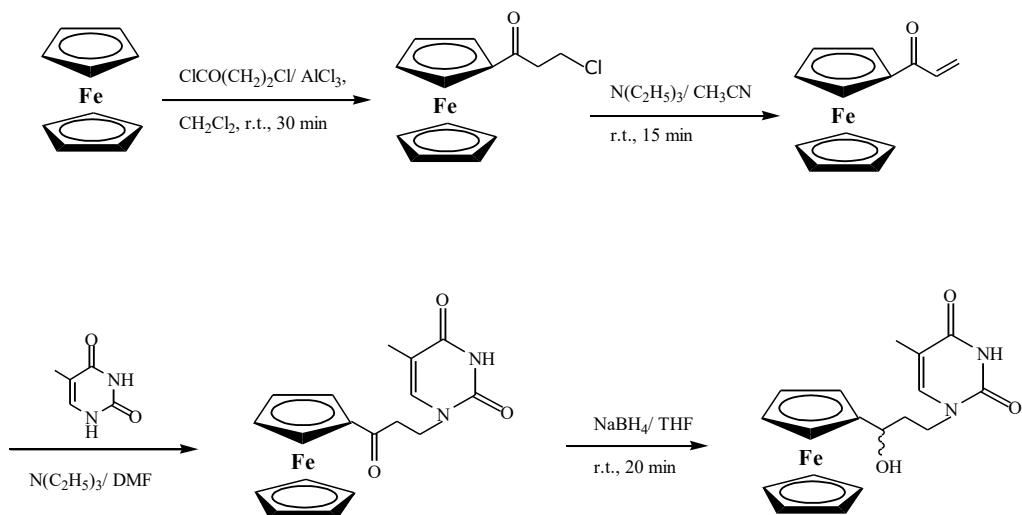
Kopulati ferocena sa nukleobazama su sve češći predmet istraživanja zbog njihove izuzetne biološke aktivnosti, među kojima se ističe njihova antioksidativna, antitumorska svojstva te citostatična aktivnost kao i djelovanje prema sarkomu i melanomu. Pokazano je da su biološki učinci izrazitiji ukoliko se organometalni fragment uvede na mjesto vezivanja šećera, koje odgovara ishodnom nukleozidu stoga da bi kopulati ferocena s nukleobazama bio što sličniji osnovnoj strukturi nukleozida potrebno je selektivno uvesti organometalni dio umjesto šećernog fragmenta (N1-položaj kod pirimidinskih baza, odnosno N9-položaj kod purinskih baza). [14] Kopulati ferocena i nukleobaza se mogu koristiti za odvijanje selektivnih reakcija gdje služe kao bioelementi, a također zbog svoje jednostavne modifikacije, biokompatibilnosti, stabilnosti, velike površine, električne vodljivosti te dobrih redoks svojstva ovi spojevi koriste se i kao biosenzori. [1]

Prva uspješna sinteza pri čemu je ferocen uveden na mjesto vezivanja šećera u adenozinu (N9 položaj) provedena je početkom 80-tih prošlog stoljeća. Sama reakcija izvodi se u vodi s relativno niskim iskorištenjem od 30 %. Vodikovim vezama ti konjugati mogu uspostaviti interakcije sa molekulom DNA što je potvrđeno volumetrijskom tehnikom.



Slika 8. Primjer inkorporacije polisupstituiranog ferocena u DNA

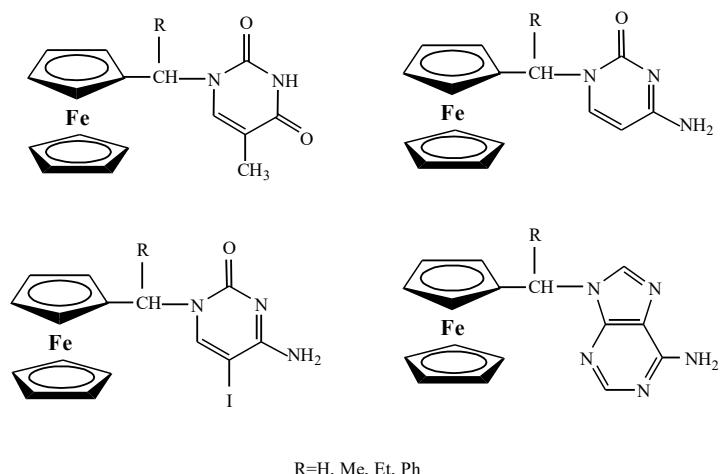
U literaturi je opisana sinteza ferocenil-timinskih derivata, aciklonukleozida i njegovog prekursora (shema 1.). Ključni stupanj reakcije je Michaelova adicija akrilolilferocena s timinom. Reakcija je provedena u dimetilformamidu u prisutnosti trietilamina pri $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ kroz 5 sati. Redukcijom dobivenog derivata s NaBH_4 u 51 % iskorištenju dobiven je aciklonukleozid.



Shema 1. Priprema ferocenil-timinskog derivata

Elektrokemijska svojstva pripravljenih konjugata ispitana su cikličkom voltametrijom (CV) pri čemu je uočena reverzibilna jedno-elektronska oksidacija što je potvrda elektronske aktivnosti uklopljene ferocenske podjedinice. Također je ispitana i njihova antikancerogena aktivnost, ferocenil-timinski derivat pokazao se kao aktivni agens prema staničnim linijama MCF-7 i CCRF-CEM, dok je aciklonukleozid neaktivan [15].

Ferocenilalkil nuklobaze pripravljene su u reakciji α -(hidroksi)alkil ferocena s različitim bazama, timinom, citozinom, 5-jod-citozinom i adeninom (shema 2). Reakcija se provodi u dimetil sulfoksidu na 100 °C kroz 30 do 40 minuta a odnos baze i alkohola je 1:1. Nakon provedene ekstrakcije i pročišćavanja produkt se ovisno o alkilnom ostatku dobiva u iskorištenju od 50 do 82 %. Pokazalo se da izbor ferocenilmethanola, ferocenyletanola, ferocenilpropanola ili ferocenilfenilmethanola kao supstrata utječe na lipofilnost konačnog produkta ferocenilalkil-nukleobaze. Ispitivana je antitumorska aktivnost N1-ferocenilmethyl timina prema nekim animalnim tumorima kao što su karcinom 755, melanom B16 te Lewisov plućni karcinom u *in vivo* uvjetima. Novosintetizirani spoj je pokazao jako antitumorsko djelovanje prema karcinomu 755 [16].

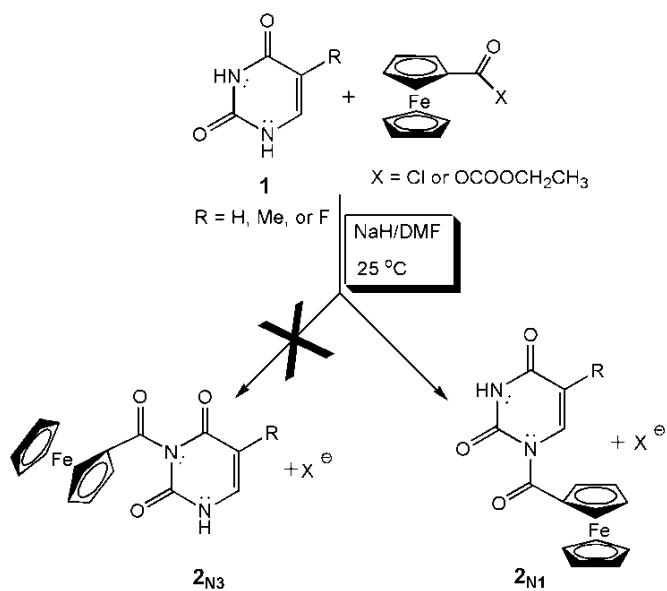


R=H, Me, Et, Ph

Shema 2. Ferocenilalkil nukleobaze

Lapić i suradnici su prvi put sintetizirali biokonjugati ferocena s pirimidinskim nukleobazama; timinom, uracilom i 5-floruracilom, pri čemu je razmaknica između ferocena i baze karbonilna skupina [17]. Kopulacijom nukleobaza s ferocenoil kloridom (FcCOCl) uz deprotonirajuće agense NaH ferocen se regioselektivno vezao na N1-položaj pirimidinske

nukleobaze bez zaštite N3-položaja u nukleobazi (shema 3.). Položaj supstitucije i kemijska struktura dobivenih spojeva potvrđena je i ^1H , ^{19}F i ^{13}C NMR spektrima, a kvantno-kemijskim računom je pretpostavljena kinetička sklonost za regiselektivnost reakcije. Preliminarna ispitivanja pripravljenih konjugata pokazuju potencijalnu biološku aktivnost.



Shema 3. Regiselektivno N1-aciliranje pirimidinskih nukleobaza **1** (uracil, R = H; timin, R = Me; 5-fluorouracil, R = F) (X = Cl, $\text{COOCH}_2\text{CH}_3$).

3. Eksperimentalni dio

3.1. Materijali

Sva otapala su sušena prema preporučenom postupku sušenja sredstvima za sušenje, odnosno destilirana iznad odgovarajućih molekulskih sita. Spektri ^1H i ^{13}C NMR snimljeni su na spektrometru Varian Gemini 3000. Svi uzorci su otopljeni u DMSO-*d*6 i mjereni pri 298 K. Kemijski pomaci (δ) u ^1H i ^{13}C NMR spektrima izraženi su u ppm u odnosu prema signalu DMSO na δ 2,50 ppm za ^1H i δ 39,50 ppm za ^{13}C . Pojedinačne rezonancije su asignirane na temelju njihovih kemijskih pomaka, intenziteta signala, multipliciteta signala i konstanti sprega H-H.

3.2. Metode rada

Tališta su određena na uređaju Reichert Thermovar HT 1 BT 1 i nisu korigirana. IR-spektri čvrstih uzoraka snimljeni su u pastili ili otopini kalijeva bromida, a uljasto-smolastih tvari kao otopine CH_2Cl_2 na IR-spektrofotometru Bomem MB 100 mid FT. ^1H - i ^{13}C -NMR-spektri otopina uzoraka u CDCl_3 i DMSO-*d*6 snimljeni su na spektrometrima Varian EM 360 i Varian Gemini 300 s tetrametilsilanom kao unutrašnjim standardom ili Varian Unity Plus 400.

Za praćenje tijeka reakcije korištena je tankoslojna kromatografija na silikagelu. Tankoslojna kromatografija rađena je na pločicama od silika gela u odgovarajućem sustavu otapala (diklorometan/aceton). Za detekciju izoliranih komponenata korištena je UV lampa valne duljine 254 nm.

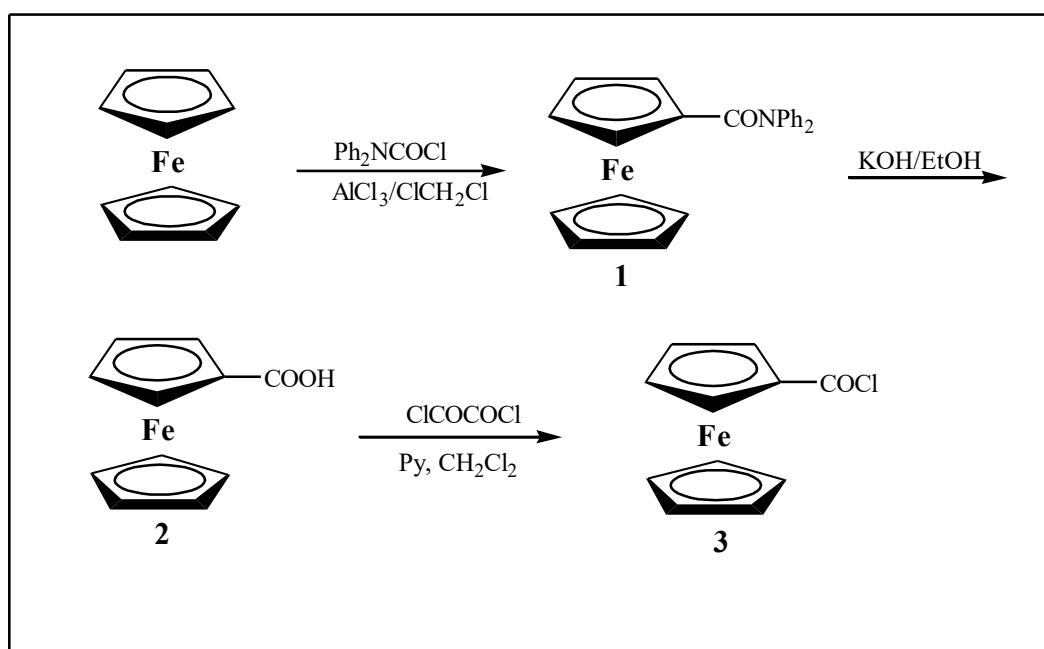
Kromatografija na koloni provedena je na silikagelu (Merck veličine zrna 0,063-0,20 mm), staklene kolone su punjene pod utjecajem gravitacije, a kao eluens korišten je etil-acetat.

Tumačenje spektroskopskih oznaka i kratica:

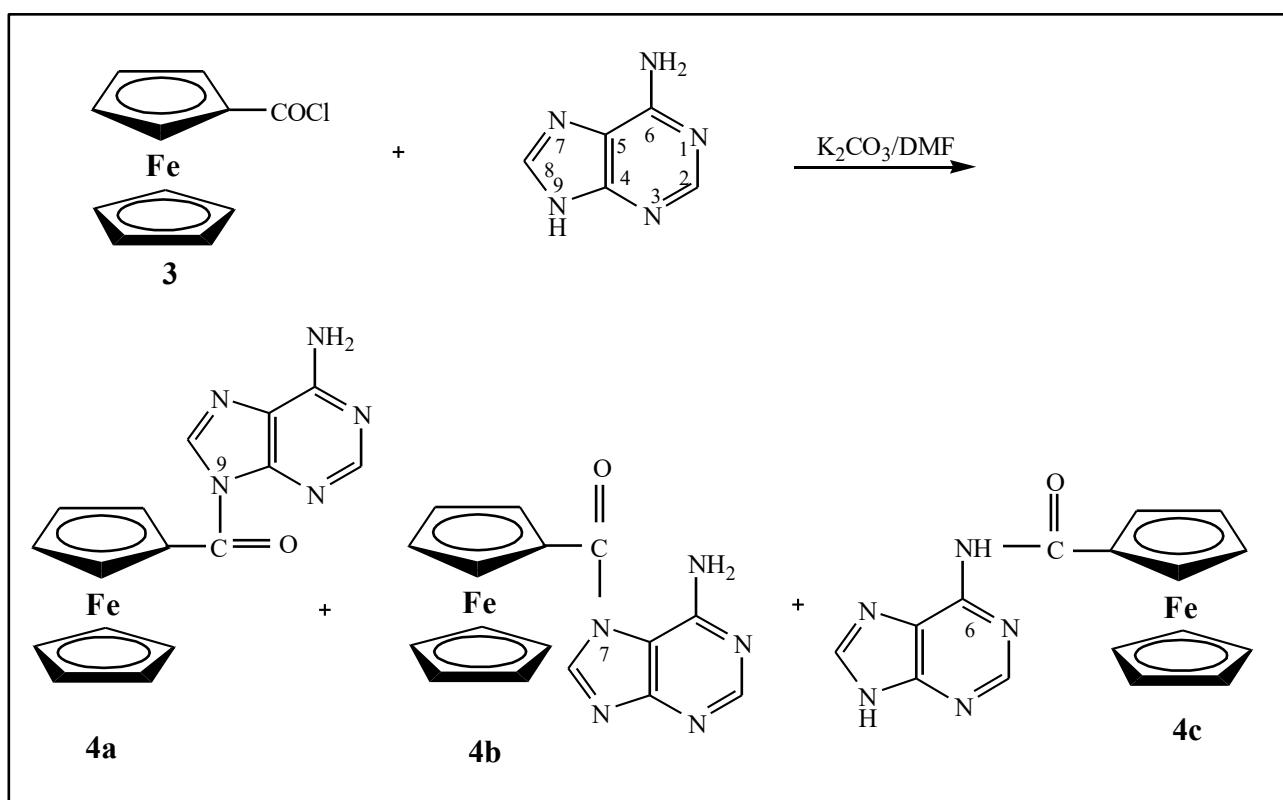
IR-spektri: ν = rastezanje (stretching), δ = deformacije (bending), j = jaka vrpca, sr = srednja vrpca, s = široka vrpca.

^1H -NMR-spektri: s = singlet, d = doublet, t = triplet, q = kvartet, m = multiplet. Najveći dio pokusa izveden je u atmosferi inertnog plina i u bezvodnoj sredini.

Priprava kopulata ferocenoil klorida i adenina



Shema 4. priprave ferocen karboksilne kiseline (2) i ferocenoil-klorida (3)



Shema 5. Priprava ferocenoil-adenina

3.3. *N,N*-difenilferocenkarboksamid (1)

Suspenziji aluminijeva klorida (3.58 g, 26.8 mmol) u suhom dikloretanu (27 ml) doda se otopina Ph₂NCOCl (6.23 g, 26.8 mmol) u istom otapalu (27 ml) i dokapa 1,2-dikloretanska otopina ferocena (5 g, 26.8 mmol). Nakon 24 sata refluksiranja reakcijska se smjesa prenese u čašu s ledom i ekstahira diklormetanom. Organski se sloj ispere zasićenom otopinom NaCl, osuši bezvodnim Na₂SO₄ i upari do suha pri čemu zaostaje sirovi amid **1** (8.5 g). Za snimanje IR- i NMR-spektra 200 mg sirova produkta pročišćeno je tankoslojnom preparativnom kromatografijom (eluens: CH₂Cl₂) pri čemu je dobiveno 120 mg (60%) narančastih kristala amida **1**; $t_f = 179\text{-}182\text{ }^\circ\text{C}$.

IR (CH₂Cl₂) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 1642 j, 1594 s, 1492 s (C=O, CONPh₂).

¹H-NMR (CDCl₃) δ/ppm : 7.39 (4H, t, Ph), 7.25 (6H, t, Ph), 4.26 (s, 5H, Fc nesupst. prsten), 4.21 (d, 4H, H-2 H-3 H-4 H-5, Fc).

¹³C-NMR, APT (CDCl₃) δ/ppm : 171 (CONPh₂), 143.9 (2Cq, Ph₂), 129.1 (4C, o, Ph₂), 127.59 (4C, m, Ph₂), 126.37 (2C, p, Ph₂), 76.1 (C-1, Fc), 70.1 (C-2, C-5, Fc), 71.6 (C-3, C-4, Fc), 69.8 (Fc nesupst. prsten).

3.4. Ferocenkarboksilna kiselina (2)

Sirovi se amid **1** (8.3 g) otopi u 20%-tnoj otopini kalijeva hidroksida u etanolu (260 ml). Reakcijska se smjesa refluksira 22 sata nakon čega se upari do suha, otopi u 5%-tnoj vodenoj otopini NaHCO₃ i ekstahira diklormetanom. Organska se faza ispere zasićenom otopinom NaCl, osuši bezvodnim Na₂SO₄ i upari, pri čemu je dobiveno 4.05 g neizreagiranog supstrata **2**. Zakiseljavanjem alkalne vodene faze koncentriranom HCl istaloži se 3.98 g (80%) tamnožutih kristala kiseline **2**; $t_f = 193\text{-}200\text{ }^\circ\text{C}$.

IR (CH₂Cl₂) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3100-2700 š (OH, COOH), 1657 j (C=O, CONPh₂).

3.5. Ferocenoil-klorid (3)

Suspenziji ferocenkarboksilne kiseline (300 mg, 1.31 mmol) u diklormetanu(5 ml) doda se oksalil klorida (0,45 ml, 3,13 mmol) i 1 kap piridina. Nakon toga se smjesa refluksira 2 sata te se upari do suha pri čemu je dobiven tamni ostatak. Sirovom produktu se dodajte 5 ml petroletera te se on ekstrahira 10 min na temperaturi od 80 ° C. Poslije same ekstrakcije slijedi filtracija preko vate gdje dolazi do odjeljivanja organskog sloja koji se upari te se taj postupak refluksije ponovi dva puta (prilikom refluksiranja bila je malo povišenja temperatura pa treba obratiti pažnju na to). Dobiveno je 174,10 mg crvenih kristala ferocenoil-klorida te je iskorištenje bilo 53,78 %. Kod druge je priprave postupak također bio isti samo što se koristila veća količina suspenzije ferocenkarboksilne kiseline (400mg, 1,75mmol) te manje 0,38mL (4,37mmol) oksalil klorida.

IR (CH_2Cl_2): ν 2958 (w, C-H, Fc), 1755 (s, C=O) cm^{-1} .

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 , 25 °C): δ = 4.9 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 1.9$ Hz, 2H, H- α'), 4.6 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 1.9$ Hz, 2H, H- β'), 4.4 (s, 5H, Cp) ppm.

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3 , 25 °C): δ = 178.3 (CO), 73.3 (Ci), 71.7 (Cp), 71.2 (C- β'), 70.4 (C- α') ppm.

3.6 Ferocenoil adenin

Postupak A

Suspenzija adenina (50 mg, 0,37 mmol) i K_2CO_3 (106,42 mg, 0,4 mmol) u 2 ml DMF miješa se kroz vremensko razdoblje od 10 minuta na sobnoj temperaturi, pri čemu nastaje kalijeva sol adenina. Ferocenoil-klorid **3** (mg, 0,37 mmml) se otopi u DMF-u (1.5 ml) te se uz miješanje dodaje reakcijskoj smjesi. Za praćenje tijeka reakcije korištena je tankoslojna kromatografija na silikagelu u odgovarajućem sustavu otapala (diklormetan/aceton 10:1). Nakon 45 minuta miješanja na sobnoj temperaturi reakcijska se smjesa obradi na način da se reakcijskoj smjesi doda voda i ekstrahira diklormetanom. Dobiveni organski sloj se ispere toplom vodom te se upari na rotacijskom vakuum-uparivaču do suhaa dobiveni sirovi produkt se pročisti kromatografijom na koloni silikagela uz eluens etil-acetat. Ovim je postupkom izolirano 8.32 mg crvenog kristala N9-ferocenoil-adenina (**4a**) te 50 mg žutih kristala.

Postupak B

Postupak je proveden kao što je opisano pod postupkom A uz produljeno vrijeme aktivacije baze od 30 minuta. Tankoslojna kromatografija reakcijske smjese na silikagelu u odgovarajućem sustavu otapala (diklormetan/aceton 10:1) ukazuje na prisutne tri mrlje: narančasto crvena mrlja N7- ($R_f = 0,3$), izrazito crvena mrlja N9-($R_f = 0,6$) i žuta mrlja ($R_f = 0,95$). (Slika 9.)



Slika 9. Tankoslojna kromatografija reakcijske smjese na silika gelu u sustavu otapala (diklormetan/ aceton 10:1) pod UV svjetлом

Nakon provedene ekstrakcije sirovi produkt se pročisti kromatografijom na koloni silikagela uz eluens etil-acetat (Slika 10.) pri čemu su izolirani crveno-narančasti kristali mase 24,26 mg N7-ferocenoil-adenina (**4b**) i izrazito crveni kristali mase 10,49 mg N9-ferocenoil-adenina (**4a**), te žuti kristali.



Slika 10. Kromatografska kolona na stupcu od silika gela pri pročišćavanju smjese N7 i N9-ferocenoil adenina

1 frakcija žuta krutina

IR (CH_2Cl_2): ν 3104 (sl, CH, alifatski i aromatski), 2927 (sl, CH, Fc), 1716 (s, C=O), 1677 (s, C=O) cm^{-1} .

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 , 25 °C): δ = 4.87 (s, 2H, CH-Fc), 4.47 (s, 2H, CH-Fc), 4.26 (s, 5H, Cp) ppm.

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3 , 25 °C): δ = 177.8 (FcCO), 71.9 (CH-Fc), 70.6 (CH-Fc), 70.1 (Cp) ppm.

4a N9-ferocenoil adenin: narancasta krutina;

IR (CH_2Cl_2): ν 3403, 3302 (sl., NH, amin), 3054 (sl, CH, aromatski), 2985 (sl, alifatski CH), 1680, (j, C=O, amid) cm^{-1} .

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 , 25 °C): δ = 8.65 (s, 1H, C8-H), 8.19 (s, 1H, C2-H), 7.52 (s, 2H, NH₂), 5.01 (s, 2H, CH-Fc), 4.76 (s, 2H, CH-Fc), 4.31 (s, 5H, Cp) ppm.

^{13}C NMR (100 MHz, DMSO, 25 °C): δ = 169.7 (FcCO), 156.8 (C6), 154.09 (C2), 149.62 (C4), 139,9 (C8), 119,26 (C5), 74.1 (CH-Fc), 72,6 (CH-Fc), 79,1 (Cq-Fc), 71.65 (Cp) ppm.

4b N7-ferocenoil adenin: crvena krutina;

IR (CH_2Cl_2): ν 3482, 3360 (sl., NH), 3180 (sl, CH, aromatski), 2923 (sl, alifatski CH), 1683, 1623 (j, C=O) cm^{-1} .

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 , 25 °C): δ = 9.06 (s, 1H, C8-H), 8.37 (s, 1H, C2-H), 7.7 (s, 2H, NH_2), 5.12 (s, 2H, CH-Fc), 4.87 (s, 2H, CH-Fc), 4.36 (s, 5H, Cp) ppm.

^{13}C NMR (100 MHz, DMSO, 25 °C): δ = 171,11 (FcCO), 161.09 (C6), 155.06 (C2), 152.65 (C4), 146.67 (C8), 109,26 (C5), 74.37 (CH-Fc), 72,66 (CH-Fc), 71,59 (Cq-Fc), 71.59 (Cp) ppm

4. Rezultati i rasprava

4.1. Uvod

Cilj završnog rada je pripraviti derivate ferocena i purinske baze (adenina) s karbonilnom skupinom kao poveznicom između baze i ferocena. Analozi nukleozida, među kojima i kopulati nukleobaza s ferocenskim derivatom, pokazuju značajno biološko djelovanje te su stoga važno područje istraživanja. Biološko djelovanje je izrazitije ukoliko se organometalni fragment uvede na mjesto vezivanja šećera, koje odgovara ishodnom nukleozidu stoga da bi kopulati ferocena s nukleobazama bio što sličniji osnovnoj strukturi nukleozida potrebno je selektivno uvesti organometalni dio umjesto šećernog fragmenta (N1-položaj kod pirimidinskih baza, odnosno N9-položaj kod purinskih baza). S obzirom da nezaštićena purinska baza u svojoj strukturi sadrži dušikove atome različite kiselosti i reaktivnosti, posebna pozornost pri sintezi biti će usmjerena na regioselektivnost provedenih reakcija. Svrha ovog rada je ispitati reaktivnost K_2CO_3 kao deprotonirajućeg agensa na regioselektivnost reakcija uz promjenu vremena aktivacije 10 i 30 minuta budući da je u prethodnim istraživanjima uočeno da uvjeti reakcije dovode do znatne promjene u iskorištenju reakcije.

Ovaj rad je podijeljen u dva dijela pri čemu se prvi dio odnosi na sintezu intermedijera ferocenoil klorida (**3**) koji je zatim kopuliran s nezaštićenom nukleobazom adeninom, a u drugom dijelu su potvrđene strukture svi sintetiziranih spojeva na osnovi IR-, NMR spektroskopije. U nastavku istraživanja biti će ispitana biološka i elektrokemijska svojstva pripravljenog analoga nukleozidne baze.

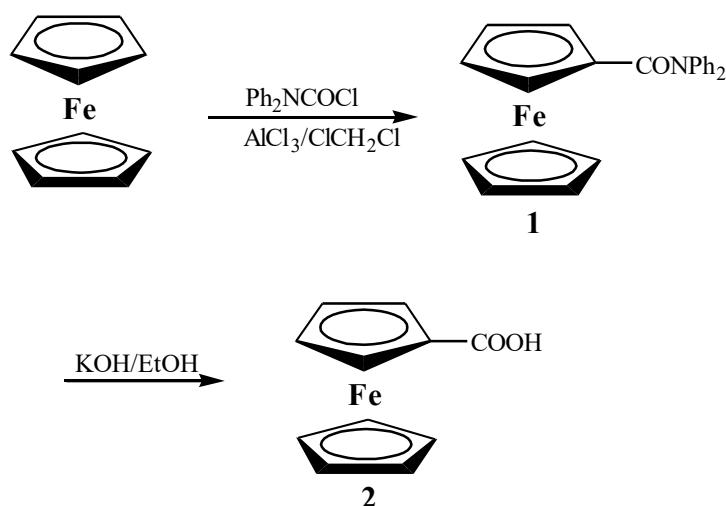
4.2. Sinteza i spektroskopska analiza

Višestupanjskom sintezom počevši od ferocena preko N,N -difenilferocenkarboksamida (**1**), ferocenkarboksilne kiseline (**2**) i ferocenil-klorida (**3**) pripravljeni su modificirani nukleozidi *N*-derivata purina *N*-ferocenoil adenina (**4**).

Svi pripravljeni spojevi podvrgnuti su IR i NMR-spektralnoj analizi kako bi se utvrdila dobivena struktura spoja.

4.2.1. Ferocenkarboksilna kiselina (2)

Karbamoiliranjem ferocena s Ph_2NCOCl u prisutnosti AlCl_3 pripravili smo amid **1** (za potrebe IR-i NMR spektroskopije dio sirovog produkta pročišćen je tankoslojnom preparativnom kromatografijom uz 60%-tno iskorištenje). Hidrolizom N,N -difenilferocenkarboksamida (**1**) u etanolnoj otopini kalijeva hidroksida nastaje ferocenkarboksilna kiselina (**2**) uz iskorištenje od 80 % (Shema 6.).

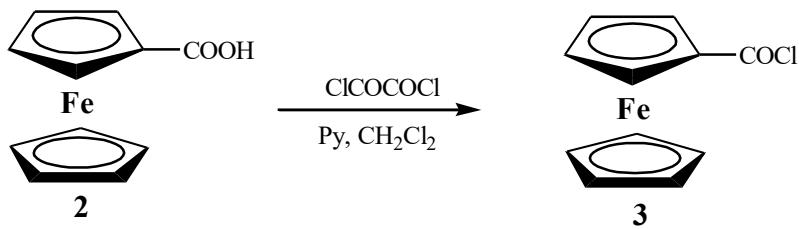


Shema 6. Priprema feocenkarboksilne kiseline (**2**)

Prema očekivanju, IR-spektar N,N -difenilferocenkarboksamida sadrži signale pri $1642, 1594 \text{ cm}^{-1}$ koji odgovaraju karbonilnoj skupini amida.. U IR-spektru ferocenkarboksilne kiseline vidljiva je apsorpcijska vrpca pri 3089 cm^{-1} koja odgovara frekvenciji istezanja intermolekulskih veza hidroksilne skupine i vrpcu pri 1676 cm^{-1} karakteristične za karbonilnu skupinu.

4.2.2. Ferocenoil-klorid (3)

U reakciji ferocenkarboksilne kiseline s oksalil-kloridom i pirimidinom kao bazom nastaje ferocenoil-klorid (**3**) u iskorištenju od 85 % (Shema 7.)

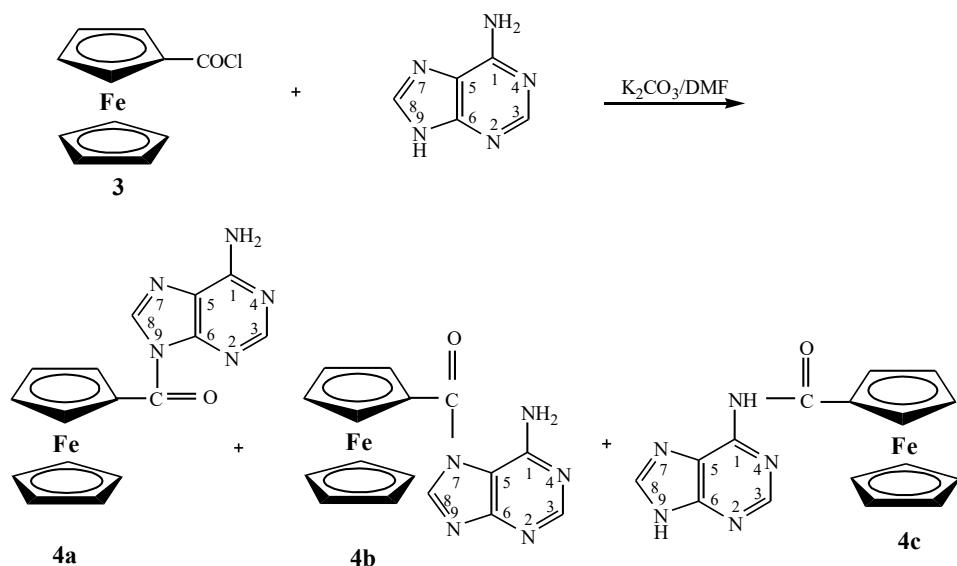


Shema 7. Priprema ferocenoil-klorida (3)

IR-spektar u diklormetanu klorida, apsorpcijsku vrpcu karbonilne skupine registrira pri 1755 cm^{-1} . ^1H NMR spektri potvrđuju supstituciju na jednom ciklopentadienilnom prstenu ferocena i signali su vidljivi u rasponu od $\delta = 4.38$ do 4.91 ppm . ^{13}C NMR-spektri sadrže vrpcu karbonilnog ugljikovog atoma klorida pri $\delta = 178.3 \text{ ppm}$.

4.2.3. Sinteza i spektralna analiza ferocenoil adenina

Sljedeći dio istraživanja u ovom završnom radu posvećen je pripravi ferocenoil adenina (4) iz nezaštićene nukleobaze adenina (Shema 8.). S obzirom na prisutnost više različitih N-atoma u nezaštićenom adeninu posebna pozornost pri samom sintetskom postupku posvećena je regioselektivnosti ove reakcije. Reakcije se provode u suhom dimetilformamidu (DMF), s K_2CO_3 kao deprotektirajućeg reagensa, a usmjerenost reakcije ispituje se primjenom različitog vremena deprotekcije nukleobaze.



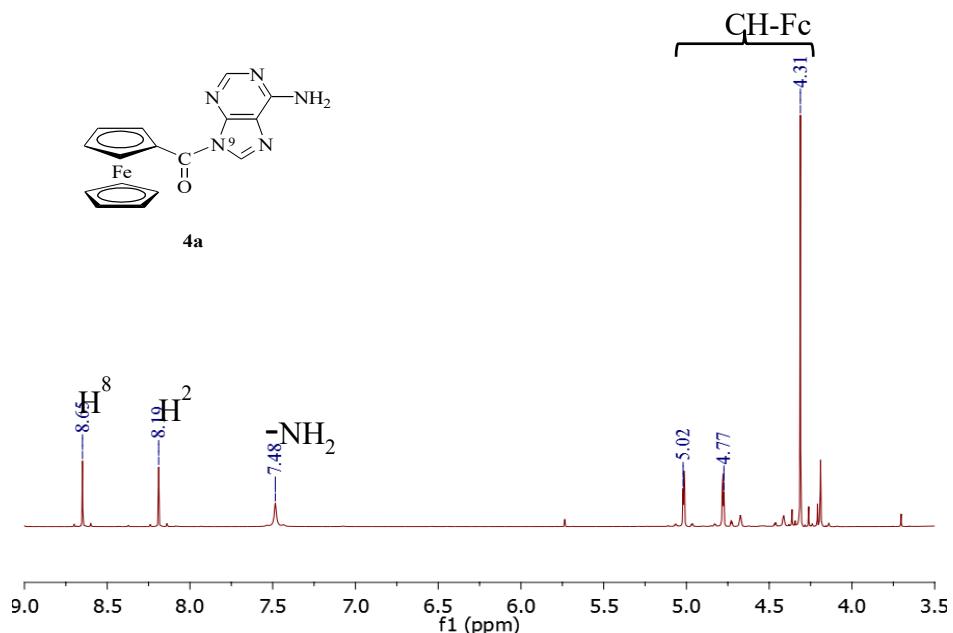
Shema 8. Sinteza kopulata ferocenoil adenina

Deprotekcija purinske baze adenina provedena je sa kalijevim karbonatom u dimetilformamidu kroz 10 minuta pri čemu nastaje kalijeva sol adenina. Pripravljenoj kalijevoj soli baze dokapa se ferocenoil-klorid otopljen u dimetilformamidu uz miješanje a tijek reakcije se prati tankoslojnom kromatografijom na silika gel pločici uz eluens diklormetan/aceton 10:1 pri čemu je vidljivo prisutnost izrazito crvene mrlje ($R_f = 0.6$) i žute mrlje ($R_f = 0.9$). Nakon postupak ekstrakcije reakcijske smjese dobiveni sirovi produkt pročišćen je kromatografijom na stupcu od silika gela uz eluens etil-acetat pri čemu je izolirano 8.32 mg crvene krute tvari N9-ferocenoil adenina u iskorištenju od 6.4%. Budući da je željeni produkt (**4a**) izolirani u relativno slabom iskorištenju, u svrhu poboljšanja istog, modificiran je sam postupak na način da je vrijeme deprotekcije produženo na 30 minuta pri čemu se na tankoslojnoj kromatografiji reakcijske smjese vidi prisutnost tri različita spoja: narančastocrvena mrlja N7, **4b** ($R_f = 0.3$) i izrazito crvena mrlja N9., **4a** ($R_f = 0.6$) i žuta mrlja ($R_f = 0.9$) (Slika 9.). Nakon provedene kolonske kromatografije sirovog produkta iz ove reakcije izolirano je 24,26 mg narančaste krute tvari N7-ferocenoil-adenin (**4b**) i 10.49 mg crvene krute tvari N9-ferocenoil-adenin (**4a**), što je ukupno iskorištenje reakcije od 27.1%. Produljeno vrijeme aktivacije rezultiralo je nastankom većeg broja produkata uz povećanje iskorištenja same reakcije.

4.2.4. Spektralna analiza

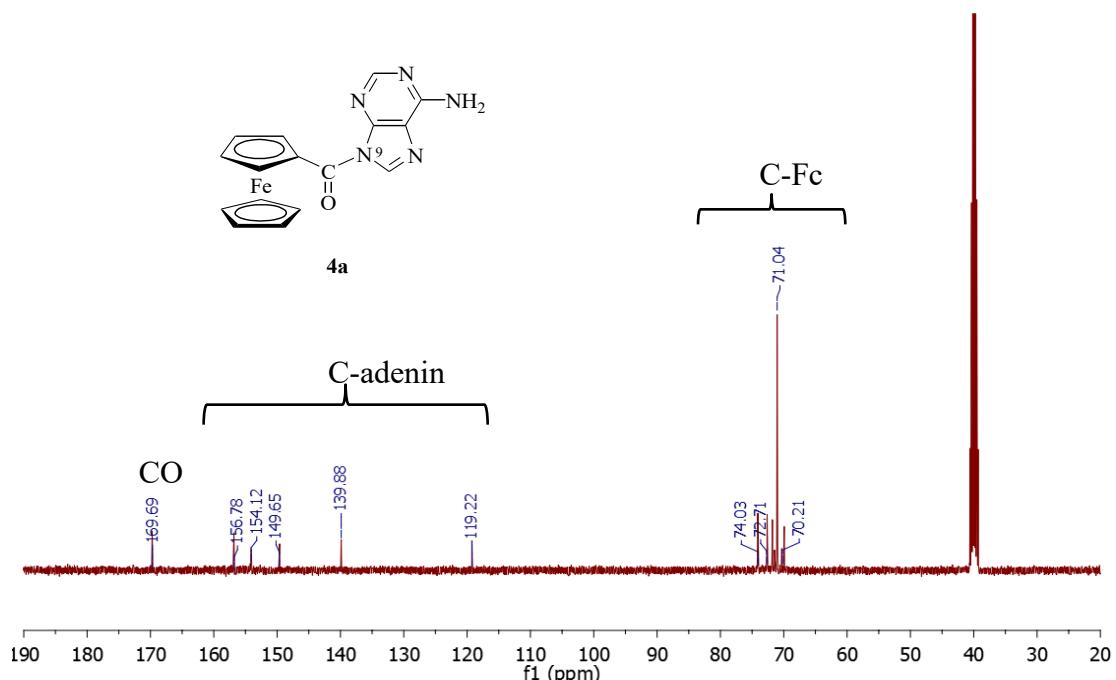
Struktura oba izomera ferocenoil adenina (**4**), kao produkta ove kopulacije, dokazana je IR i NMR spektroskopijom. U IR spektru izomera **4a** vidljiva su dvije apsorpcijske vrpce pri 3403 i 3302 cm^{-1} koja se pripisuje slobodnoj i asociranoj amino (NH_2) skupini, te apsoprcijske vrpce jakog intenziteta pri 1680 cm^{-1} koja odgovara amidnoj karbonilnoj skupini. U IR spektru izomera **4b** asignirane su apsorpcijske vrpce s neznatnim pomakom u odnosu na apsorpcijske vrpce izomera **4a** što ukazuju na prisutnost istih karakterističnih skupina u oba spoja. U $^1\text{H-NMR}$ spektru izomera **4a** i **4b** snimljenom u DMSO vidljiv je kemijski pomak pri $\delta = 7.7\text{ ppm}$ za izomer **4a** odnosno 7.55 ppm za **4b** koji se pripisuje slobodnoj NH_2 skupini adenina, dok signal pri 12.8 ppm koji potvrđuje prisutnos NH-skupine adenina izostaje što potvrđuje vezivanje ferocenskog derivata s dušikovim atoma imidazolnog prstena baze. Signali pri $\delta = 8.65$ i 8.12 ppm u spektru izomera **4a** i 9.06 i 8.37 ppm izomera **4b** odgovaraju kemijskim pomacima protona na položaju C-8 i C-2 adenina. U $^1\text{H-NMR}$ spektrima oba izomera iz kemijskih pomaka u području od $\delta = 4.32$ do 4.81 ppm i to kao jedan singlet i dva

tripleta potvrđena je prisutnost ferocenske podjedinice, odnosno supstitucije na jednom ciklopentadienilnom prstenu ferocena (Slika 11).



Slika 11. ¹H NMR spektar N9-ferocenoil-adenin (**4a**)

U ¹³C-NMR spektru spoja **4a** vidljiv je signal pri δ 169.7 ppm koji se pripisuje ugljikovom atomu karbonilne skupine koji je poveznica ferocenske i adeninske podjedinice. Signal pri δ 156.8, 154.09 i 179.62, 139.9 i 119.26 ppm ugljikovim atomima adeninske podjedinice (C-6, C-2, C-4, C-8 i C-5). Ferocenskim ugljikovim atomima, supstituirani ciklopentadienilni prsten pripisani su kemijski pomaci pri δ 74.1 i 72.6 ppm, dok kemijski pomak pri δ 71.56 ppm odgovara ugljikovim atomima nesupstituiranog ciklopentadienilnog prstena. U ¹³C-NMR spektru spoja **4b** kemijski pomaci za ugljikove atome pirimidinske baze pomaknuti su neznatno u više ili niže polje. Na temelju spektralne analize može se potvrditi nastajanje dva izomera ferocenoil adenina pri čemj je ferocenil vezan u položaju N-9 u spoju **4a** u odnosno N-7 u spoju **4b**. (Slika 12.)



Slika 12. ^{13}C NMR spektar N9-ferrocenoil-adenin (**4a**)

Temeljem provedene reakcije kopulacije ferrocenoil klorida i nezaštićene nukleobaze adenina uz K_2CO_3 , kao deproteksijskog sredstva, i DMF kao otapala, te provedene spektralne analize svi dobivenih produkata može se uočiti da ovisno o reakcijskim uvjetima, tj produljenju vremena deprotekcije baze povećeva se iskorištenje reakcije ali i broj nastalih kopulata ferocena s nukleobazom **4a** i **4b**. S obzirom da biološko djelovanje modificiranih ferocenskih nuklobaza je izrazitije ukoliko je organometalni fragment uveden na mjesto vezivanja šećera tj na položaju N9 adenina, potrebo je optimiranja reakcijskih uvjeta što bi moglo dovesti do usmjerenja reakcije isključivo u tom položaju baze.

4.3. Zaključak:

- Višestupanjskom sintezom pripravljen je ključni prekursor za sintezu ferocenoil adenina, ferocenoil klorid u dobrom iskorištenju od 85 %.
- Kopulacijom ferocenil klorida s adeninom čija je deprotekcija provedena kroz 10 minuta dobiven je N9-ferocenoil adenin (**4a**) u iskorištenju od 6.4%, dok produljenjem vremena aktivacije baze na 30 minuta rezultiralo je nastanku N7-ferocenoil adenina (**4b**) i N9- ferocenoila adenina (**4a**) uz povećanje iskorištenja same reakcije od 27.1 %.
- Struktura dobivenih produkta potvrđena je IR i NMR spektroskopijom. Apsoprijska vrpca jakog intenziteta pri 1679 cm^{-1} u IR spektru i kemijski pomaci pri δ 169.7 ppm u $^{13}\text{C-NMR}$ spektru potvrđuju prisutnost karbonilne skupine u oba izomera **4a** i **4b** odnosno povezivanja baze s ferocenom s karbonilnom podjedinicom kao razmaknicom.
- U $^1\text{H-NMR}$ spektru oba izomera **4a** i **4b** kemijski pomak oko δ 7.6 pripisuje se slobodnoj NH_2 skupini adenina, dok signal pri 12.8 ppm koji potvrđuje prisutnost NH-skupine adenina izostaje što potvrđuje vezivanje ferocenskog derivata s dušikovim atoma imidazolnog prstena baze.
- S obzirom da biološko djelovanje modificiranih ferocenskih nukleobaza je izrazitije ukoliko je organometalni fragment uveden na mjesto vezivanja šećera u bazi odnosno na položaju N9 adenina, potrebo je optimiranje reakcijskih uvjeta što bi moglo dovesti do usmjeravanja reakcije isključivo u tom položaju baze.

5. Literatura

5.1. Literatura

- [1] De Champdore, M., Di Fabio G., Messere, A., Montesarchio, D., Piccialli, G., Loddo,R., La Colla, M., La Colla, P. (2004) In-water reactivity of nucleosides and nucleotides: one-step preparation and biological evaluation of novel ferrocenyl-derivatives. *Tetrahedron* **60**, 6555–6563.
- [2] Federman Neto, Alberto; Pelegrino, Alessandra Caramori; Darin, Vitor Andre (2004). *Ferrocene: 50 Years of Transition Metal Organometallic Chemistry – From Organic and Inorganic to Supramolecular Chemistry*. ChemInform **35** (43).
- [3] Lide, D. R., ed. (2005). *CRC Handbook of Chemistry and Physics* (86th ed.). Boca Raton (FL): CRC Press. p. 3.258.
- [4] Wilkinson, G., Pauson, P. L., Cotton, F. A. (1954) Bis-cyclopentadienyl Compounds of Nickel and Cobalt. *J. Am. Chem. Soc.* **76** (7): 1970-1974.
- [5] Wilkinson, G.; Cotton, F. A. (1959). Cyclopentadienyl and arene metal compounds. *Progress in Inorganic Chemistry* **1**, 1–124.
- [6] Wilkinson, G., Cotton, F. A.; Birmingham, J. M. J. (1956) *Inorg. Nucl. Chem.* **2**, 95-101.
- [7] Kealy, T. J., Pauson, P. L. (1951). A New Type of Organo-Iron compound. *Nature* **168** 4285-4289.
- [8] Ascoli, A. (1900) Allgemeine Bestandtheile der Nahrungs-und Genussmittel. *Zeitschrift für Physiologische Chemie* **31**, 161-164.
- [9] Watson, J. D., and Crick, F. H. C. (1953). A structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* **171**: 737–738. Retrieved August 26, 2007.
- [10] Rosemeyer, Helmut (March 2004). *The Chemodiversity of Purine as a Constituent of Natural Products*. *Chem Biodivers* **1** (3), 361–401.
- [11] McGraw – Hill (2004) *Concise Encyclopedia of Science and Technology*, 5th edition, 181.
- [12] Definition of Adenine from the Genetics Home Reference - National Institutes of Health.

- [13] Reader V (1930). *The assay of vitamin B(4)* . The Biochemical Journal 24 (6): 1827– Singh, P., Menrad-Moyon, C., Kumar, J., Fabre, B; Verma, S., Bianco, A. Carbon50 (2012) 3170-3177.
- [14] Nguyen P., Oumata N., Soubigou F., Evrard J., Desban N., Lemoine P., Bouaziz S., Blondel M., Voisset C. (2014) Evaluation of the antiprion activity of 6-aminophenanthridines and related heterocycles. *Eur J Med Chem* **82**, 363-71.
- [15] Kowalski K., Koceva-Chila A., Pieniazek A., Bernasinska J., Skiba J., Rybarczyk-Pirek A. J., Jozwiak Z., (2011) The synthesis, structure, electrochemistry and *in vitro* anticancer activity studies of ferrocenyl-thymine conjugates, *J. Organomet. Chem.*, **700**, 58-68.
- [16] Simenel A. A., Morozova E.A., Snegur L.V., Zykova S.I., Kachala V.V., Ostrovskaya L. A., Bluchterova N. V., Fomina M. M. (2009) Simple route to ferrocenylalkyl nucleobases. Antitumor activity *in vivo*, *Appl. Organomet. Chem.*, **23**, 219-224.
- [17] Lapić, J., Havaić, V., Šakić, D.;Sanković, K., Djaković, S., Vrček, V. (2015.) Ferrocenoyl-Substituted Pyrimidine Nucleobases: An Experimental and Computational Study of Regioselective Acylation of Uracil, Thymine, and 5-Fluorouracil, *Eur. J. Org. Chem.* **24**, 5424-5431.