

Konformacijska analiza peptidomimetika izvedenog iz alanina, fenilalanina i ferocen-1,1'-diamina

Jelaska, Laura

Undergraduate thesis / Završni rad

2023

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:159:134599>

Rights / Prava: [Attribution-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-21**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Sveučilišni prijediplomski studij Nutricionizam

Laura Jelaska

0058219328

KONFORMACIJSKA ANALIZA PEPTIDOMIMETIKA
IZVEDENOG IZ ALANINA, FENILALANINA I
FEROCEN-1,1'-DIAMINA

ZAVRŠNI RAD

Predmet: Organska kemija

Naziv znanstveno-istraživačkog ili stručnog projekta:

Ovaj je rad financirala Hrvatska zaklada za znanost projektom IP-2020-02-9162 (Ferocenski analozi biomolekula: strukturna karakterizacija i biološka evaluacija)

Mentor: izv. prof. dr. sc. Monika Kovačević

Zagreb, 2023.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Sveučilišni prijediplomski studij Nutricionizam

Zavod za kemiju i biokemiju
Laboratorij za organsku kemiju

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Nutricionizam

Konformacijska analiza peptidomimetika izvedenog iz alanina, fenilalanina i ferocen-1,1'-diamina

Laura Jelaska, 0058219328

Sažetak:

Ferocen je sendvič spoj koji se sastoji od dva paralelna ciklopentadienilna prstena između kojih se nalazi atom željeza. Zbog svojih povoljnih svojstava koristi se kao kalup pri sintezi peptidomimetika. Peptidomimetici su spojevi koji imaju sposobnost imitiranja sekundarne strukture proteina. Upotreba peptidomimetika je od iznimne važnosti, budući da se peptidi i proteini, zbog svojih brojnih nepovoljnih svojstava, ne mogu koristiti u kliničke te terapijske svrhe. Jedan od načina pripreme peptidomimetika je „umetanje“ ferocenskog kalupa u peptidni lanac. Ciklopentadienilni prstenovi ferocena nalaze na udaljenosti od 3,3 Å, što omogućuje stvaranje intramolekulskih vodikovih veza između dva peptidna lanca, vezana na ferocen.

Cilj ovog Završnog rada bio je, iz ferocen-1,1'-diamina i aminokiselina L-alanin i L-fenilalanin, sintetizirati peptid, Ac-L-Ala-NH-Fn-NH-L-Phe-Boc (**1**). Upotrebom infracrvene spektrometrije te nuklearne magnetske rezonancije učinjena je spektrometrijska analiza peptida **1**, kako bi se dobile informacije o prirodi nastalih vodikovih veza. Dokazano je da u pripravljenom peptidu dolazi do tvorbe dviju interlančanih vodikovih veza koje induciraju tvorbu γ -okreta.

Ključne riječi: ferocen, peptidomimetici, fenilalanin, vodikova veza, spektroskopska analiza

Rad sadrži: 25 stranica, 18 slika, 3 tablica, 1 shema, 24 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: izv. prof. dr. sc. Monika Kovačević

Datum obrane: 14. srpanj 2023.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Undergraduate thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
University undergraduate study Nutrition

Department of Chemistry and Biochemistry
Laboratory for Organic chemistry

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Nutrition

Conformational analysis of peptidomimetic derived from alanine, phenylalanine and
ferrocene-1,1'-diamine

Laura Jelaska, 0058219328

Abstract:

Ferrocene is a sandwich compound consisting of two parallel cyclopentadienyl rings with an iron atom in the middle. Due to its favorable properties, it is used as a form in the synthesis of peptidomimetics. Peptidomimetics are compounds that have the ability to mimic the secondary structure of proteins. The use of peptidomimetics is extremely important, because peptides and proteins cannot be used for clinical and therapeutic purposes due to their many unfavorable properties. One method of preparing peptidomimetics is to "insert" a ferrocene template into a peptide chain. The cyclopentadienyl rings of ferrocene are located at a distance of 3,3 Å which allows the formation of intramolecular hydrogen bonds between two peptide chains attached to ferrocene.

The aim of this work was to synthesize the peptide, Ac-L-Al-NH-L-Phe-Boc (**1**) from ferrocene-1,1-diamine and the amino acids L-alanine and L-phenylalanine. Infrared spectrometry and nuclear magnetic resonance were used to perform spectrometric analysis of peptide **1** to obtain information on the nature of the hydrogen bonds formed. Two hydrogen bonds are formed between the chains, which induce the formation of γ -turn in the prepared peptide **1**.

Keywords: ferrocene, peptidomimetics, phenylalanine, hydrogen bond, spectroscopic analysis

Thesis contains: 25 pages, 18 figures, 3 tables, 1 scheme, 24 references

Original in: Croatian

Thesis is deposited in printed and electronic form in the Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: Monika Kovačević, Associate Professor

Thesis defended: July 14th 2023

Sadržaj

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. FEROCEN I ORGANOMETALNA KEMIJA.....	2
2.2. PEPTIDI I PROTEINI.....	3
2.3. PEPTIDOMIMETICI.....	6
2.4. FEROCENSKI KONJUGATI S AMINOKISELINAMA.....	7
2.5. FENILALANIN	9
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	11
3.1. MATERIJALI I METODE	11
3.2. POSTUPAK PRIPRAVE CILJNOG PEPTIDA 1	11
3.2.1. POSTUPAK PRIPRAVE PEPTIDA 1.....	12
4. REZULTATI I RASPRAVA	15
4.1. UVOD	15
4.2. IR-SPEKTROSKOPSKA ANALIZA PEPTIDA 1	15
4.3. NMR-SPEKTROSKOPSKA ANALIZA PEPTIDA 1.....	17
5. ZAKLJUČCI.....	22
6. POPIS LITERATURE.....	23

1. UVOD

Organometalna kemija temelji se na istraživanju spojeva koji sadrže barem jednu vezu ugljik-metal. Spajanjem organometalne kemije sa biologijom, nastaje bioorganometalna kemija, koja se bavi proučavanjem konjugata organometalnih spojeva te biomolekula. Otkrićem ferocena i njegove strukture započinje razvoj moderne organometalne kemije. Ferocen je spoj koji se sastoji od dva ciklopentadienilna prstena vezana na suprotne strane atoma željeza u sredini, što mu daje izgled „sendviča“.

Peptidi i proteini su makromolekule sastavljene od L-aminokiselina. Iako proteini imaju ključnu ulogu u održavanju svih oblika života jer sudjeluju u svim važnim biološkim reakcijama, oni nisu pogodni za terapijsku upotrebu. Negativna svojstva peptida su njihova visoka fleksibilnost, koja im omogućava zauzimanje različitih konformacija i vezanje za različite neželjene receptore, kao i polarnost, zbog koje ne mogu proći kroz staničnu membranu i krvno-moždanu barijeru. Također, podložni su proteolitičkom cijepanju enzimima iz gastrointestinalnog trakta.

Pokušaji prevladavanja tih negativnih osobina peptida rezultirali su razvojem peptidomimetika, odnosno, heterogene skupine spojeva koje karakterizira zajedničko svojstvo oponašanja fizikalnih i biokemijskih karakteristika i funkcije peptida. Jedan od načina pripreme peptidomimetika je „umetanje“ rigidnog 1,1'-disupstituiranog ferocenskog kalupa u peptidni lanac čime se u peptid uvodi okret, ograničava njegova fleksibilnost i zaustavlja vezanje na neželjene receptore. Ciklopentadienilni prstenovi ferocena nalaze na udaljenosti od 3,3 Å, čime je omogućeno stvaranje intramolekulskih vodikovih veza (IHB) između dva peptidna lanca, koje su potrebne za nastanak trodimenzionalne strukture peptida.

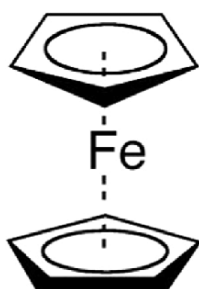
Cilj ovog Završnog rada bio je, iz ferocen-1,1'-diamina (**Fcda**) i aminokiselina L-alanin i L-fenilalanin, sintetizirati ferocenski peptid, Ac-L-Ala-NH-Fn-NH-L-Phe-Boc (**1**). Također, dobivene su informacije o utjecaju ferocenske diaminske osnove na konformaciju peptidomimetika izvedenih iz hidrofobne aminokiseline (L-fenilalanina). Upotrebom infracrvene spektrometrije te nuklearne magnetske rezonancije učinjena je spektrometrijska analiza peptida **1**, kako bi se dobile informacije o prirodni nastalih vodikovih veza.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. FEROCEN I ORGANOMETALNA KEMIJA

Organometalna kemija bavi se istraživanjem spojeva koji sadrže barem jednu vezu ugljik-metal. Polarne C-M veze, odnosno djelomično negativni naboj ugljika u takvoj vezi je izvor većine primjena organometalnih spojeva prema tome da izaziva nukleofilni napad tog ugljika i time olakšava širok raspon organskih reakcija. Početkom 21. stoljeća došlo je do eksplozivnog razvoja nove discipline, bioorganometalne kemije, nastale spajanjem organometalne kemije sa biologijom koja istražuje konjugate organometalnih spojeva te biomolekula kao što su ugljikohidrati, aminokiseline, DNA i dr. (Rapić i Čakić Semenčić, 2010; Bhatt, 2016).

Ferocen je otkriven 1951. godine kada su Pauson i Kealy reakcijom ciklopentadien bromida i željezo (II) klorida, umjesto željenog produkta fulvalena, dobili krutinu narančaste boje. Wilkinson i Woodward su, godinu dana kasnije, odredili stvarnu strukturu tog novo otkrivenog spoja kao $\text{Fe}(\text{C}_5\text{H}_5)_2$ (Čakić Semenčić i Barišić, 2017). Spoj se sastoji od dva ciklopentadienilna prstena vezana na suprotne strane atoma željeza u sredini, što mu daje izgled „sendviča“ (slika 1.), a zbog slične reaktivnost novog spoja i benzena, Woodward ga je nazvao ferocen. Otkriće ferocena i njegove strukture označava početak moderne organometalne kemije (Van Staveren i Metzler-Nolte, 2004).



Slika 1. Struktura ferocena (Pandolfelli, 2015)

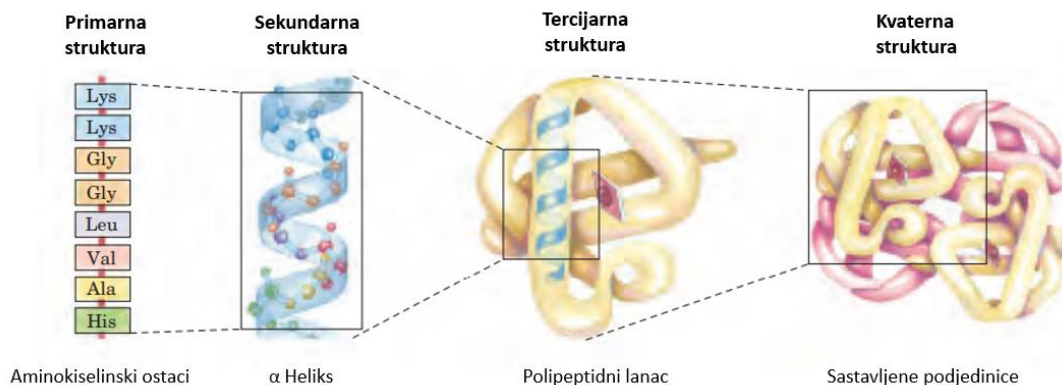
Jedinstvena struktura zaslužna je za neka iznimna svojstva ferocena kao što su stabilnost pri visokim temperaturama do 400 °C, reaktivnost poput superaromatskih elektrofila, reverzibilna oksidacija, dobra topljivost u organskim otapalima, stabilnost u zraku i mogućnost stvaranja brojnih derivata (Astruc, 2017). U proteklim godinama ferocen je bio tema brojnih

istraživanja i iskazao se kao iznimno svestran materijal u dizajnu liganda, istraživanjima materijala, medicinskoj te analitičkoj kemiji. Zahvaljujući posebnoj kombinaciji već nabrojanih svojstava te lipofilnosti koja omogućuje lako prodiranje spoja kroz staničnu membranu i komercijalnu dostupnost, ferocen i njegovi derivati imaju široke mogućnosti primjene i intenzivno su se istraživali u medicinske svrhe, najviše u antimikrobnim i antikancerogenim studijama, a zasigurno će biti i tema mnogih budućih istraživanja (Čakić Semenčić i Barišić, 2017; Štěpnička, 2022).

2.2. PEPTIDI I PROTEINI

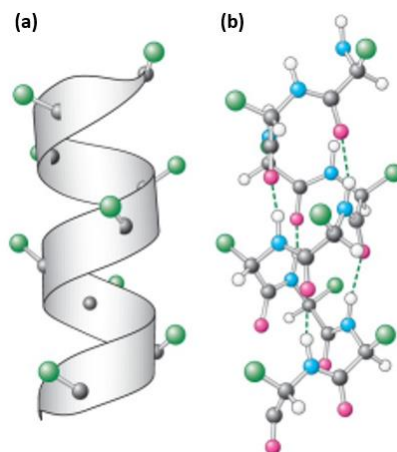
Peptidi i proteini su makromolekule sastavljene od L-aminokiselina, pri čemu su susjedne aminokiseline povezane specifičnom kovalentnom vezom, koja se naziva peptidna veza. Svih 20 uobičajenih aminokiselina sadrži karboksilnu skupinu i amino skupinu vezanu na isti atom ugljika, a međusobno se razlikuju po svojem bočnom lancu. Peptidi koji se pojavljuju u prirodi mogu varirati u veličini od malih do vrlo velikih, odnosno sastojati se od dvije do više tisuća povezanih aminokiselinskih ostataka, a čak i najmanji peptidi mogu iskazivati biološki važne učinke (Leninger i sur., 2004). Redosljed aminokiselinskih ostataka u proteinu određen je nukleotidnom sekvencom gena u DNA, a svaka aminokiselina kodirana je jednom ili više specifičnih sekvenci sačinjenih od 3 nukleotida (Berg i sur., 2019).

Četiri razine strukture proteina prikazane su na slici 2, primarnu strukturu čini slijed povezanih aminokiselina, a spontanom savijanjem proteina u trodimenzionalne strukture povezane vodikovim vezama nastaje sekundarna struktura. Tercijarna struktura nastaje dugotrajnim interakcijama među aminokiselinama i opisuje sve aspekte savijanja polipeptida u trodimenzionalnu strukturu. Proteini sastavljeni od dvije ili više polipeptidnih jedinica pokazuju kvaternu strukturu (Berg i sur., 2019).



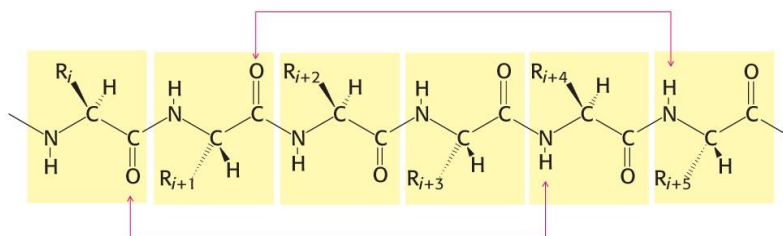
Slika 2. Razine strukture proteina (Leninger i sur., 2004)

Lokalna konformacija određenog dijela nekog polipeptida definirana je pojmom sekundarna struktura, a neki tipovi takve strukture poput α -heliksa i β -nabrane ploče su posebno stabilni i često se pojavljuju u proteinima. α -heliks ili α -uzvojnica (slika 3) je najjednostavnija struktura koju polipeptidni lanac može zauzeti s obzirom na krute planarne peptidne veze. Riječ je o spirali u kojoj je polipeptidna okosnica čvrsto omotana oko zamišljene osi provučene sredinom spirale, dok su bočni lanci ili R-skupine aminokiselinskih ostataka okrenuti prema van iz spiralne okosnice. Oko $\frac{1}{4}$ svih aminokiselinskih ostataka prisutnih u polipeptidima tvori strukturu α -heliksa, ali točan udio varira od jednog do drugog proteina (Leninger i sur., 2004).



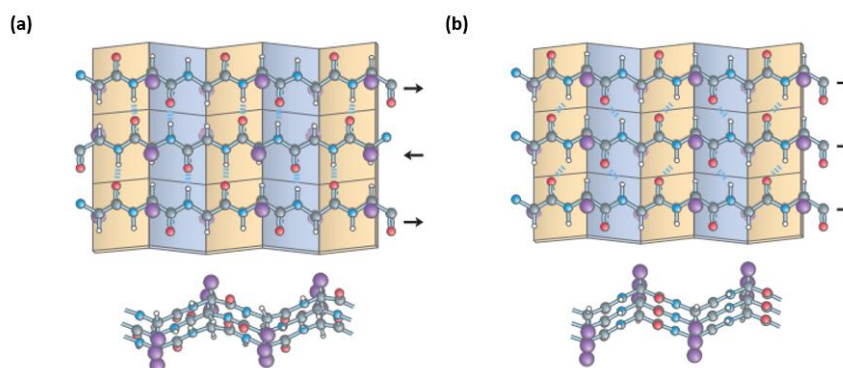
Slika 3. Struktura α -heliksa. **(a)** Prikaz uzvojnice, α -ugljikovih atoma i bočnih ogranaka (zeleno). **(b)** Pogled sa strane prikazan štapićima i kuglicama u kojem su isprekidanim linijama prikazane vodikove veze između NH i CO skupina (Berg i sur., 2019)

α -heliks stabiliziran je vodikovim vezama između karboksilnih i amino-skupina osnovnog lanca. Karboksilna skupina svakog aminokiselinskog ostatka i amino-skupina aminokiselinskog ostatka koji je udaljen za četiri ostatka tvore vodikovu vezu (slika 4). Sve CO- i NH-skupine osnovnog lanca, osim onih koje se nalaze na krajevima spirale, ulaze u vodikove veze čime se povećava stabilnost spiralne strukture (Teparić, 2021).



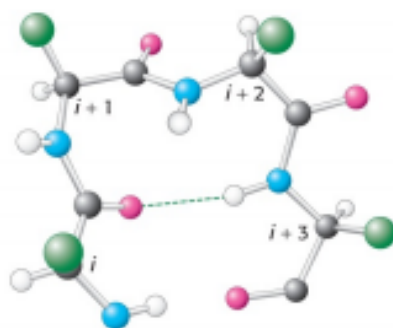
Slika 4. Shema vodikovih veza (ljubičaste linije) u α heliksu (Berg i sur., 2019)

β -nabrana ploča je proširenija struktura polipeptidnih lanaca. Za razliku od α -heliksa, u β -konformaciji polipeptidni lanac je gotovo potpuno istegnut i tvori cik-cak strukturu umjesto uvijene strukture uzvojnice. Kada se takvi cik-cak polipeptidni lanci poredaju jedan do drugoga nastaje struktura koja izgledom podsjeća na niz nabora, a naziva se β -ploča. Bočni lanci ili R-skupine aminokiselinskih ostataka prostrte su sa cik-cak strukture u suprotnih smjerovima čime se stvara izmjenični uzorak. Vodikove veze u β -nabranoj ploči nastaju između susjednih segmenata polipeptidnog lanca. U linearnoj sekvenci polipeptida, pojedinačni segmenti lanca mogu se nalaziti blizu jedan drugoga, biti međusobno vrlo udaljeni ili mogu biti segmenti različitih polipeptidnih lanaca. Susjedni polipeptidni lanci u β -ploči mogu biti antiparalelni ili paralelni kao što je prikazano na slici 5 (Leninger i sur., 2004; Rapić i Kovačević, 2011).



Slika 5. Konformacija polipeptidnih lanaca prikazana u pogledu odozgo i sa strane. **(a)** Antiparalelna konformacija u kojoj susjedni polipeptidni lanci vezani vodikovom vezom teku u suprotnim smjerovima. **(b)** Paralelna konformacija u kojoj susjedni polipeptidni lanci vezani vodikovom vezom teku u istom smjeru (Leninger i sur., 2004).

Polipeptidni lanci često su kompaktni i mijenjaju smjer, što se naziva β -okretima. Dok α -heliks i β -nabrana ploča spadaju u periodičke sekundarne elemente, β -okret je aperiodički strukturni element zaslužan za promjenu smjera peptidnih lanaca čime oni postaju antiparalelni i tvore β -ploču (Rapić i Kovačević, 2011). Okreti nastaju vezanjem CO-skupine aminokiselinskog ostatka (i) sa NH-skupinom aminokiselinskog ostatka ($i+3$) čime dolazi do nagle promjene smjera lanca kao što prikazuje slika 6.



Slika 6. Strukturni element β -okret (Berg i sur., 2019).

Iako proteini imaju ključnu ulogu u održavanju svih oblika života tako što sudjeluju u imunoloških reakcijama, prijenosu i pohranjivanju drugih molekula, u enzimskoj katalizi, mehaničkoj potpori, kontroli rasta i diferencijacije stanica te u neurološkim procesima, oni nisu pogodni za terapijsku upotrebu. Negativno svojstvo peptida je njihova visoka fleksibilnost koja im omogućava zauzimanje različitih konformacija i vezanje za različite neželjene receptore. Peptidi, zbog svoje polarnosti, ne mogu proći kroz staničnu membranu i krvno-moždanu barijeru, te se zato brzo uklanjaju iz organizma. Također su podložni proteolitičkom cijepanju enzimima iz gastrointestinalnog trakta zbog čega često ne dopiju do konačnog odredišta (Barišić, 2018).

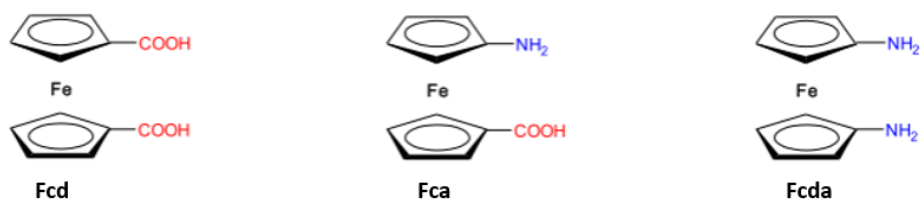
2.3. PEPTIDOMIMETICI

Peptidi i proteini aktivno sudjeluju u biološkim procesima, međutim nisu primjenjivi kao terapeutici zbog cijelog niza nepovoljnih farmaceutskih i biofarmaceutskih svojstava koja utječu na dostupnost peptida u organizmu. Pokušaji prevladavanja tih negativnih osobina peptida rezultirali su razvojem peptidomimetika, odnosno, heterogene skupine spojeva koje karakterizira zajedničko svojstvo oponašanja fizikalnih i biokemijskih karakteristika i funkcije

peptida (Jerić, 2004). Peptidomimetici se mogu pripremiti na nekoliko načina: zamjenom peptidne veze nepeptidnim analogima, ugradnjom nepeptidnih kalupa u peptidnu okosnicu, konjugacijom aminokiselinskih bočnih lanaca s malim molekulama i ciklizacijom osnovnog lanca (Kovačević, 2014). Svi navedeni postupci temelje se na mimikriji elemenata sekundarne strukture proteina poput α -uzvojnice, β -ploče i β -okreta. Prema tome da sama struktura utječe na funkciju proteina, sposobnost sintetskog peptidomimetika da imitira strukturu prirodnog proteina direktno utječe na njegovu biološku učinkovitost. Mimikriji velikih proteinskih struktura bitno je pridonijelo otkriće proteinskih „hot-spots“, što su mjesta na proteinu sa velikim afinitetom za vezanje liganda. Sekundarne strukture su upravo takva mjesta, a pripremom malenih molekula koje mogu imitirati elemente sekundarne strukture došlo je napretka peptidomimetike. Oni peptidomimetici koji su metabolički stabilni, imaju dobru brzinu apsorpcije aktivne tvari (biodostupnost), imaju visoki afinitet i selektivnost na receptore te uzrokuju minimalne nuspojave mogu se koristiti u terapijske svrhe (Barišić, 2018a).

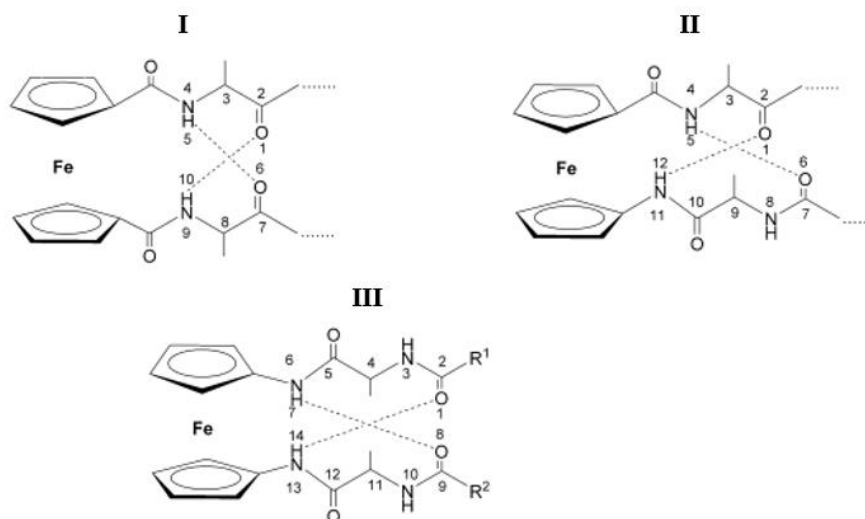
2.4. FEROCENSKI KONJUGATI S AMINOKISELINAMA

Jedan od načina pripreme peptidomimetika je „umetanje“ rigidnog 1,1'-disupstituiranog ferocenskog kalupa u peptidni lanac čime se u peptid uvodi okret, ograničava njegova fleksibilnost i zaustavlja vezanje na neželjene receptore. Ciklopentadienilni prstenovi ferocena nalaze na udaljenosti od 3,3 Å, što omogućava stvaranje intramolekulskih vodikovih veza (IHB) između dva peptidna lanca, koje su potrebne za nastanak trodimenzionalne strukture peptida te normalno funkcioniranje bioloških sustava. Ferocenski konjugati mogu se stvoriti kopulacijom aminokiselina s tri vrste prekursora, ferocen-1,1'-dikarboksilne kiseline (**Fcd**), 1'-aminoferocen-1-karboksilne kiseline (**Fca**) ili ferocen-1,1'-diamina (**Fcda**) (slika 7) (Kovačević, 2014; Čakić Semencić i Barišić, 2017; Barišić, 2018a).



Slika 7. Ferocenski prekursori **Fcd**, **Fca** i **Fcda** (Kovačević, 2014)

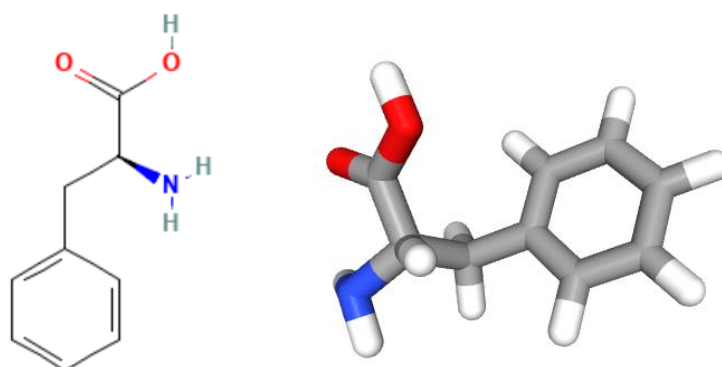
Iz **Fcd**-a izvode se peptidomimetiци Fn-[CO-AK-OMe]₂ (**I**) koji sadrže 10-člani IHB-prsten, konjugati Y-AK-Fca-AK-OMe (**II**) s 12-članim IHB-prstenom izvode se iz **Fca**, a konjugati Fn-[NH-AK-Y]₂ (**III**), koji se izvode iz **Fcda**, sadrže 14-člani IHB-prsten. (slika 8) (Kovačević, 2014; Kovačević i sur., 2017).



Slika 8. Ferocenski konjugati **I-III** izvedeni iz različitih prekursora sa označenim IHB (isprekidane crtice) (Kovačević i sur., 2017)

2.5. FENILALANIN

Fenilalanin je, uz tirozin i triptofan, nepolarna aminokiselina s relativno jednostavnim aromatskim ugljikovodičnim pobočnim ogrankom. U svom pobočnom ogranku sadrži fenilni prsten umjesto jednog vodikovog atoma alanina. Fenilalanin ili skraćeno Phe je esencijalna aminokiselina, ljudsko tijelo ju ne može samostalno sintetizirati, već je potrebno unijeti ju u organizam prehranom (Berg i sur., 2019; Teparić, 2021).

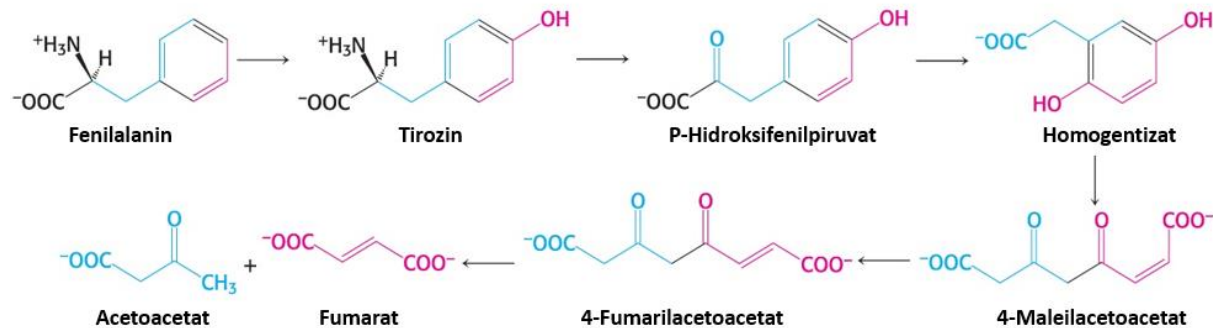


Slika 9. Kemijska struktura fenilalanina prikazana 2D (lijevo) i 3D (desno) strukturom (National Center for Biotechnology Information, 2023)

Fenilalanin ima ključnu ulogu u biosintezi drugih aminokiselina tako što djeluje kao prekursor za aminokiselinu tirozin, neophodnu u biosintezi neurotransmitera dopamina i norepinefrina, a važan je i dio strukture mnogih proteina i enzima. S obzirom na to da je komponenta velikog broja prirodnih proteina, hrana bogata proteinima poput mesa, ribe, jaja, sira, žitarica, leguminoza, proizvoda od soje, sjemenki i orašastih plodova su sve dobri izvori ove aminokiseline, dok se u voću, povrću, mastima i šećerima nizak udio fenilalanina (Macdonald i sur., 2020).

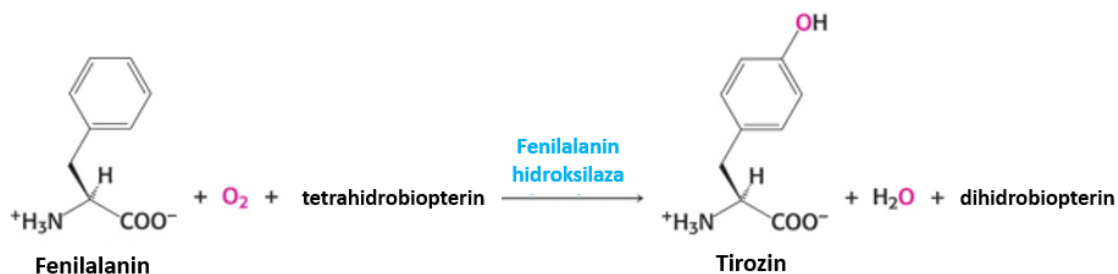
Metabolička razgradnja aromatske aminokiseline fenilalanina započinje reakcijom hidroksilacije, kataliziranom enzimom fenilalanin hidroksilaza u kojoj dolazi do hidroksilacije fenilalanina u tirozin. Enzim se još naziva i monooksigenaza zato što se jedan atom kisika iz O_2 , kojim se razbija aromatski prsten, javlja u produktu i drugi u H_2O . Razgradnja fenilalanina i tirozina nastavlja se reakcijom transaminacije tirozina u *p*-hidroksifenilpiruvat, koji dalje reagira sa O_2 pri čemu nastaje homogentizat. Reakcija je katalizirana enzimom *p*-hidroksifenilpiruvat hidroksilaza, koji se još naziva i dioksisigenaza zato što se oba atoma iz O_2

ugrađuju u produkt, jedan na prsten, a drugi na karboksilnu skupinu. Homogentizat se ponovno cijepa s O₂ u reakciji za koju je zaslužan enzim homogentizat oksidaza, a kao produkt nastaje 4-maleilacetoacetat. Izomerizacijom 4-maleilacetoacetata nastaje 4-fumarilacetoacetat, koji se može hidrolizirati na konačne produkte fumarat i acetoacetat (Berg i sur., 2019).



Slika 10. Metabolička razgradnja fenilalanina (Berg i sur., 2019)

Jedna od najpoznatijih bolesti metabolizma aminokiselina je fenilketonurija, a radi se o nasljednom metaboličkom poremećaju koji onemogućava razgradnju fenilalanina u tijelu. Uzrokuje ju nedostatak enzima fenilalanin hidroksilaze ili kofaktora reakcije hidroksilacije (slika 11), tetrahidrobiopterina. U osoba bez fenilketonurije, $\frac{3}{4}$ fenilalanina se prevodi u tirozin, a samo $\frac{1}{4}$ se ugrađuje u proteine, iz tog razloga se kod osoba sa fenilketonurijom nakuplja fenilalanin u krvi i mozgu. Posljedice mogu biti oštećenja živčanog sustava i mozga. Dijagnosticira se najčešće već u prvom tjednu života novorođenčeta, a liječenje se temelji na cjeloživotnom niskom unosu fenilalanina i formula s aminokiselinama koje služe kao nadopuna prehrani (Al Hafid i Christodoulou, 2015; Macdonald i sur., 2020).



Slika 11. Reakcija katalizirana fenilalanin hidroksilazom (Berg i sur., 2019)

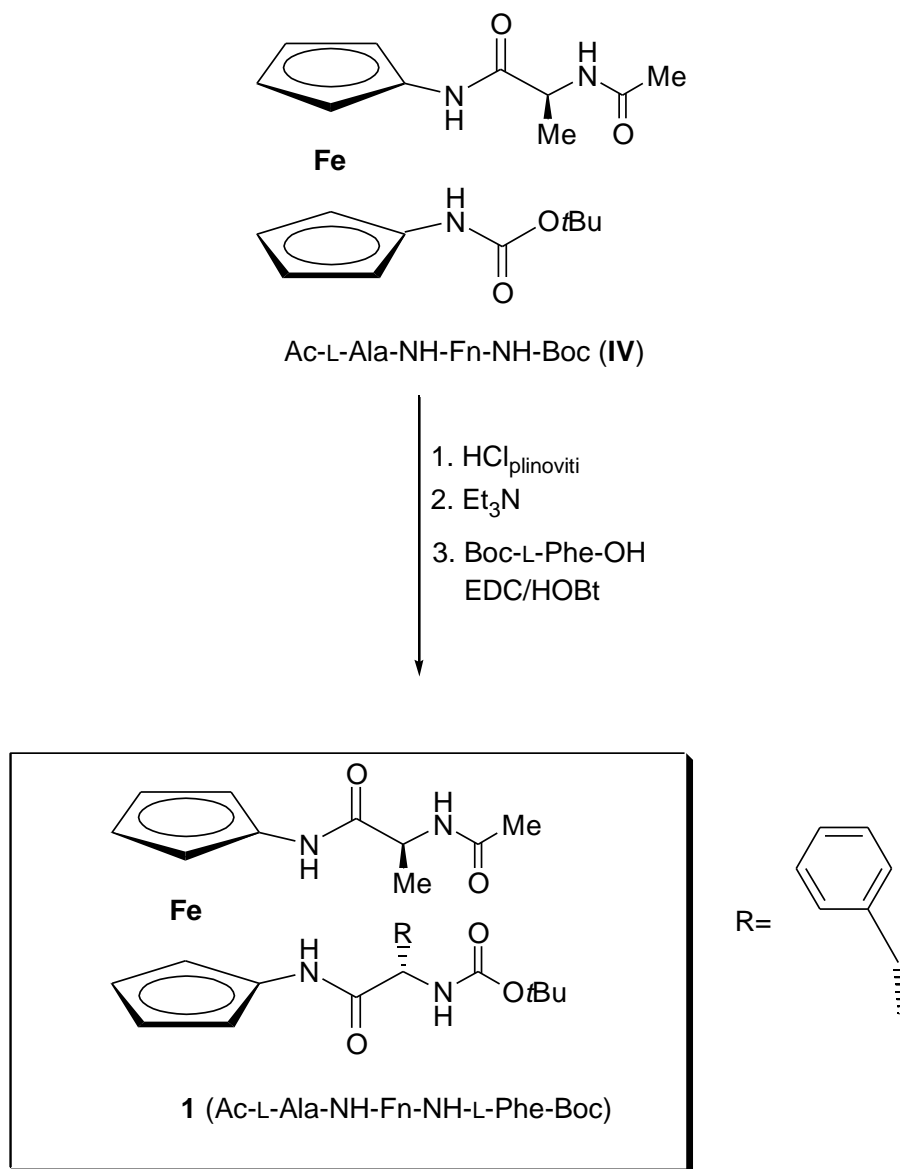
3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI I METODE

Sve kemikalije korištene tijekom sinteze ferocenskog peptidomimetika bile su analitičke čistoće, a korištena otapala su pročišćena prema standardnim postupcima (Perrin i Armarego, 1988). Tankoslojnom kromatografijom (TLC) na pločicama silikagela (Fluka Silica Gel) s fluorescentnim indikatorom (254 nm) ispitivao se tijek reakcija i kontrolirala čistoća sintetiziranih spojeva, a tankoslojnom preparativnom kromatografijom na silica gelu ("Merck", Kieselgel 60 HF₂₅₄) uz smjesu diklormetana i etil-acetata kao eluensa pročišćavali su se dobiveni produkti. IR spektroskopija, nuklearna magnetska rezonanca (NMR) i tekućinska kromatografija visoke razlučivosti sa spektrometrijom masa (HPLC) korištene su tijekom karakterizacije sintetiziranih spojeva. Pomoću Reichert Thermovar HT 1 BT 11 su određena tališta te nisu korigirana. Za snimanje IR-spektara upotrijebljen je spektrofotometar Spectrum Two (Perkin-Elmer) uz otapalo CH₂Cl₂, a ¹H- i ¹³C-NMR-spektri snimljeni su na spektrometru Bruker AV 600 uz otapalo CDCl₃ i tetrametilsilan kao unutarnji standard. Na spektrima su kemijski pomaci (δ) izraženi su u ppm. Maseni spektri dobiveni su upotrebom instrumenta Agilent Technologies 6410 Triple Quadrupole Mass Spectrometer koji se temelji na ESI ionizaciji. Postupak sinteze Ac-L-Ala-NH-Fn-NH-Boc (**IV**) opisan je u literaturi i spektroskopski podaci peptida odgovaraju podacima u literaturi (Barišić i sur., 2002).

3.2. POSTUPAK PRIPRAVE CILJNOG PEPTIDA 1

Ciljni peptid pripravlja se prema postupku prikazanom na slici 12.

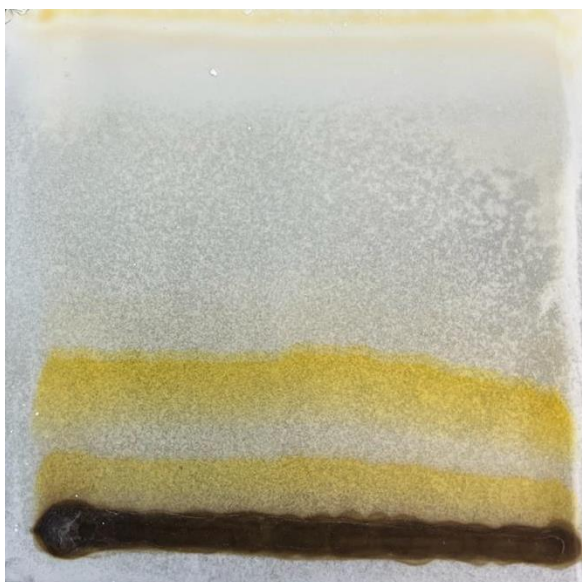


Slika 12. Shematski prikaz priprave ciljnog peptida

3.2.1. Postupak priprave peptida 1

Ferocenski prekursor, Ac-L-Ala-NH-Fn-NH-Boc (**IV**) (150 mg, 0,26 mmol) na NH-skupinu ima vezan Boc zbog kojeg nije moguće vezanje aminokiseline fenilalanina na ferocen. Ferocenska aminokiselina otapa se u diklormetanu nakon čega slijedi hlađenje na 0 °C te izlaganje djelovanju plinovitog HCl-a, koji nastaje kao produkt reakcije NaCl i H₂SO₄. Tijekom 30 min miješanja u ledenoj kupelji dolazi do uklanjanja Boc skupine sa NH i vezanja HCl na isto mjesto. Nastali spoj se uparava na rotacijskom vakuum-uparivaču, a dobiveni hidroklorid se ponovno otapa u CH₂Cl₂ uz dodatak suviška Et₃N (pH~9). Slobodni ferocenski amin

pomiješa se s aminokiselinom Boc-L-Phe-OH (124 mg, 0,402 mmol) aktiviranom standardnim EDC/HOBt (116 mg, 0,603 mmol / 82 mg, 0,603 mmol) postupkom i smjesa se ostavi 1 sat na sobnoj temperaturi kako bi se odvila reakcija kopulacije ferocenskog amina i aktivirane aminokiseline. Reakcijska smjesa se zatim ispiru u nekoliko koraka, zasićenom vodenom otopinom NaHCO₃ kako bi se otopio suvišak aminokiselina, 10%-tnom otopinom limunske kiseline kojom se otapa suvišak dodanog Et₃N, ponovno zasićenom vodenom otopinom NaHCO₃ i posljednji korak je ispiranje zasićenom otopinom NaCl čime se uklanjaju nečistoće iz uzorka. Organski sloj se osuši bezvodnim Na₂SO₄, a nakon dekantiranja, uzorak se otparava. Nastali produkt pročišćava se tankoslojnom kromatografijom na silikagelu uz prethodno ispitani sustav CH₂Cl₂ : EtOAc = 1 : 5 kao eluens koji se pokazao optimalnim za pročišćavanje produkata. Na silikagelu odvajaju se dvije mrlje, homokiralna gornja mrlja u kojoj se nalazi L-Ala i L-Phe te heterokiralna donja mrlja, koja sadrži D-Ala i L-Phe. Nakon što se mrlje sastružu sa pločice, ispiru u Sinterovom lijevku, dok ne preostane samo bijeli talog. Produkt se upari rotacijskim uparivačem dok ne ostane samo čisti produkt u obliku narančaste smole dobivene mase 64 mg uz iskorištenje 83%.



Slika 13. Tankoslojna kromatografija na silikagelu za pročišćavanje produkata
(vlastita fotografija)

Ac-L-Ala-NH¹-Fn-NH²-L-Phe-Boc (1)

$t_r = 195,9-198,3^\circ\text{C}$; $R_f = 0,73$ (CH₂Cl₂ : EtOAc = 1 : 3).

IR (CH₂Cl₂) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3437 sr (NH_{slobodni}), 3309 j, 3253 sr (NH_{asocirani}), 1732, 1684, 1664 (C=O_{CONH}), 1572, 1540, 1506 (amid II).

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) δ/ppm : 9,14 (s, 1H, NH¹_{Fn}); 9,07 (s, 1H, NH²_{Fn}); 7,33-7,24 (m, 5H, CH_{benzil}); 7,00 (d, $J = 4,9$ Hz, 1H, NH_{Ala}); 5,37 (s, 2H, H-10, H-7); 5,23 (d, $J = 6,3$ Hz, 1H, NH_{Phe}); 4,53 (m, 1H, CH_{Ala}); 4,47 (m, 1H, CH_{Phe}); 4,16 (s, 1H, H-2); 4,09 (s, 1H, H-5); 3,98 (s, 4H, H-3, H-4, H-8, H-9); 3,13 (dd, 1H, CH_{2-Phe}); 2,86 (dd, 1H, CH_{2-Phe}); 2,14 (s, 3H, CH_{3-Ac}); 1,43 [s, 9H, (CH₃)_{3-Boc}]; 1,38 (d, $J = 6,94$ Hz, 3H, CH_{3-Ala}).

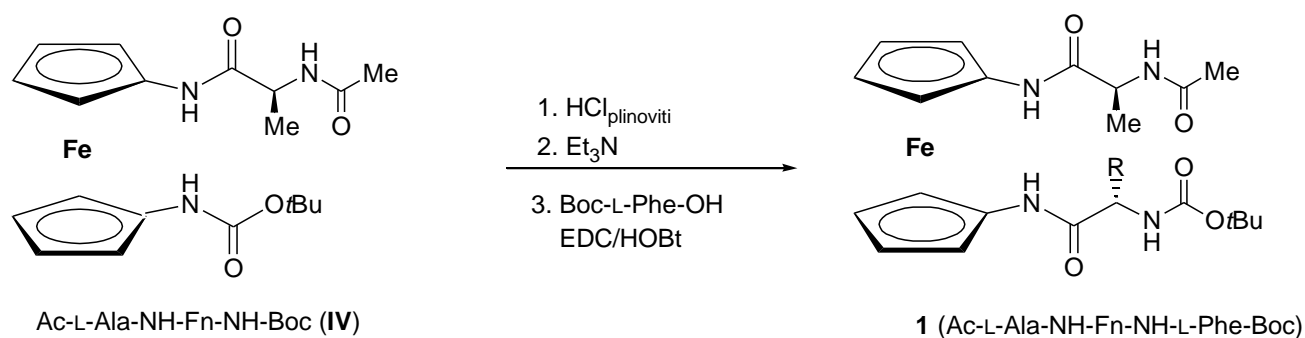
¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃) δ/ppm : 171,76 (CO_{Fn1}); 171,37 (CO_{Fn2}); 170,82 (CO_{Ac}); 156,95 (CO_{Boc}); 136,96; 129,40; 128,73; 127,06; 80,87 (C_{qBoc}); 65,87 (C-8, C-9); 64,85 (C-3, C-4); 62,92 (C-7); 62,85 (C-10); 61,64 (C-2); 61,26 (C-5); 56,85 (CH_{Phe}); 50,37 (CH_{Ala}); 38,30 (CH_{2-Phe}); 29,82 (CH_{2-Phe}); 28,52 [(CH₃)_{3-Boc}]; 23,00 (CH_{3-Ac}); 17,41 (CH_{3-Ala}).

ESI-MS: izračunato za C₂₉H₃₆N₄O₅Fe: 576,48; dobiveno [M]⁺ na m/z 577,6.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. UVOD

U sklopu ovog završnog rada, ferocenski peptid Ac-L-Ala-NH-Fn-NH-L-Phe-Boc (**1**), sintetiziran je iz Ac-L-Ala-NH-Fn-NH-Boc (**IV**) i aminokiseline L-fenilalanin. Za pripremu ovog peptida najprije je potrebno provesti deprotekciju amino-skupine iz ferocenskog alaninskog prekursora uvođenjem plinovitog HCl-a kojim se uklanja vezana Boc-skupina. Nastali hidroklorid obradi se suviškom Et₃N, nakon čega se provodi kopulacija slobodnog amina i aktivirane aminokiseline L-Phe (Shema 1).



Shema 1. Sinteza peptida **1**

Uvođenje fenilalaninske podjedinice na *N*-terminalni kraj peptida (**IV**) u ¹H-NMR-spektreu se očituje karakterističnim signalima metinskih skupina iz benzilnog prstena ($\delta=7,33-7,24$ ppm) i metilenske skupine ($\delta=3,13$ i $\delta=2,86$ ppm). Dok se u ¹³C-NMR-spektreu navedenog peptida javljaju signali fenilalaninskih benzilnih metinskih ugljikovih atoma u rasponu od 136,96-127,06 ppm, metilskog ugljika pri $\delta=56,69$ ppm te metilne skupine ($\delta=38,15$ ppm).

4.2. IR-SPEKTROSKOPSKA ANALIZA PEPTIDA **1**

Infracrvena ili IR spektroskopija je metoda koja pripada molekularnoj apsorpcijskoj spektrometriji, a koristi za određivanje funkcijskih skupina koje sadrži neki organski spoj te za praćenje promjena unutar molekule odnosno nestanak i pojavu novih funkcijskih skupina uslijed primjene vanjskih utjecaja. Metoda se temelji na apsorpciji infracrvenih fotona što uzrokuje pojačane vibracije grupe atoma ovisno o prirodi veze među njima. Svaka rastezna vibracija kovalentne veze u molekuli događa se pri nekoj karakterističnoj frekvenciji, a

izlaganjem promatrane molekule zračenju frekvencije koje odgovara frekvenciji veze, dovedena energija će se apsorbirati i uzrokovati će pojačanu vibraciju veze. IR-spektar, odnosno, graf ovisnosti postotka apsorbancije zračenja o valnom broju ili valnoj duljini zračenja generira se prolaskom IR zračenja kroz uzorak u instrumentu IR-spektrofotometar (Kovač, 2018a; Kovač, 2018b).

Apsorpcijske vrpce istežanja veza u aminima mogu se javljati u području iznad 3400 cm^{-1} za slobodne NH-skupine i u području ispod 3400 cm^{-1} ako se radi o NH-skupinama koje ulaze u vodikove veze. Prema podacima u Tablici 1 vidljivo je da se u IR-spektaru peptida **1** javljaju apsorpcijske vrpce pri $\approx 3440\text{ cm}^{-1}$ i $\approx 3310\text{-}3250\text{ cm}^{-1}$ čime se može zaključiti kako su u peptidu prisutne i slobodne i asocirane NH-skupine. Apsorpcijske vrpce slobodnih NH-skupina slabijeg su intenziteta od vrpce asociranih NH-skupina.

Karbonilne skupine u prisutne u peptidu **1** apsorbirale su IR-zračenje pri valnom broju manjem od 1740 cm^{-1} što upućuje na njihovo moguće sudjelovanje u vodikovim vezama.

Tablica 1. Istezne vibracije¹ NH- i CO-skupina peptida **1**

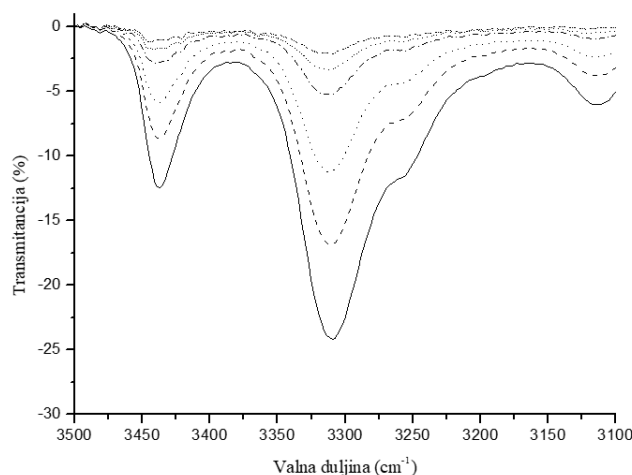
Spoj	Formula	ν_{NH} (slob.)	ν_{NH} (asoc.)	ν_{CO} (amid I)	ν_{CO} (amid II)
1	Ac-L-Ala-NH ¹ -Fn-NH ² -L-Phe-Boc	3437sr	3309j 3253sr	1732 1684 1664	1572 1540 1506

¹ IR-spektri snimljeni su u diklormetanu, $c = 5 \times 10^{-2}\text{ M}$.

Signali u IR-spektaru ovise i o koncentraciji otopine pa su signali širi u koncentriranim otopinama amina zbog prisutnih intermolekulskih veza, a promjenom koncentracije otopine moguće je na IR-spektaru odrediti karakter vodikove veze, odnosno radi li se o intramolekulskoj ili intermolekulskoj H-vezi. Intermolekulske vodikove veze javljaju se među molekulama, dok se intramolekulske vodikove veze javljaju unutar molekula. Razrjeđenjem otopine dolazi do cijepanja intermolekulskih veza, a samim time i smanjuje se intenzitet signala asociranih NH-skupina u području spektra ispod 3400 cm^{-1} , a ukoliko postoje intramolekulske veze, razrjeđenjem se proporcionalno smanjuju intenziteti signala i slobodnih NH-skupina i asociranih NH-skupina u uzorku (Kovačević, 2014).

Ispitivani peptid otapao se u diklormetanu, a postupnim smanjenjem molarne koncentracije sa 50 mM na 3 mM intenziteti signala slobodnih NH-skupina i asociranih NH-skupina su se

proporcionalno smanjivali (slika 14) što upućuje na sudjelovanje asociranih NH-skupina u intramolekulskim vodikovim vezama.



Slika 14. Koncentracijski ovisi IR-spektri ² peptida 1

² IR-spektri snimljeni su diklormetanu, [(–) c = 5 × 10⁻² M, (----) c = 2,5 × 10⁻² M, (···) c = 1,25 × 10⁻² M, (-·-·) c = 6,13 × 10⁻³ M, (· · ·) c = 3 × 10⁻³ M].

4.3. NMR-SPEKTROSKOPSKA ANALIZA PEPTIDA 1

Nuklearna magnetska rezonancija ili NMR spektroskopija upotrebljava se za određivanje kemijske strukture spoja jer daje specifično uređenje svih H i C atoma u molekuli. Koristi zračenje čija frekvencija odgovara frekvenciji radiovalova, a uzrokuje izvrtanje jezgre atoma koja je pod utjecajem magnetskog polja elektromagnetskog zračenja. Izvrtanje jezgre iz jednog u drugo magnetsko usmjerenje zove se rezonancija, a označava apsorpciju energije (Barišić, 2018).

NMR metoda omogućava razlikovanje pojedinih NH-skupina u molekuli i određivanje sudjeluju li u vodikovim vezama na temelju njihovog kemijskog pomaka. Naime, ako NH-skupina sudjeluje u vodikovoj vezi (asocirana NH-skupina), proton je odsjenjen od strane vodikove veze i samim time rezonira pri nižem polju, odnosno ima veći kemijski pomak od protona u slobodnim NH-skupinama koje ne sudjeluju u vodikovim vezama. Točnije, kemijski pomaci iznad 7 ppm pripisuju se asociranim NH-skupinama (Kovačević i sur., 2017).

Peptid 1 analiziran je primjenom ¹H-NMR i ¹³C-NMR spektroskopije, rezultati (tablica 2)

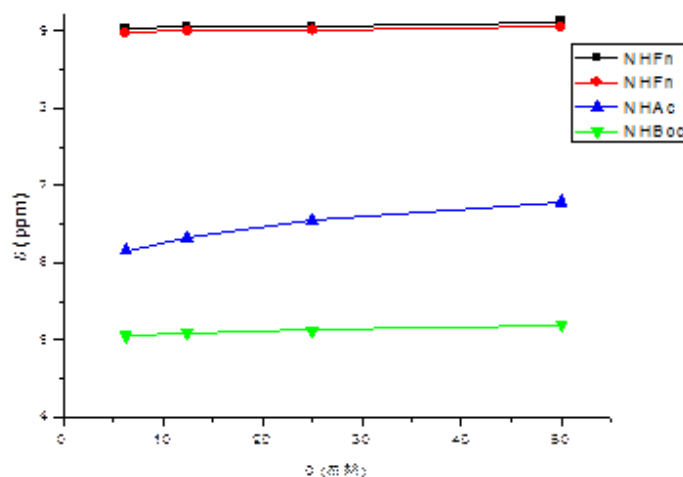
pokazuju kemijski pomak $\approx 9,10$ ppm za NH-skupine vezane na ferocensku jezgru (NH^1_{Fn} i NH^2_{Fn}), što upućuje na njihovo sudjelovanje u vodikovim veza. Kemijski pomak alaninske NH-skupine iznosi 7 ppm zbog čega amidni proton vrlo vjerojatno sudjeluje u intramolekulskim vodikovim vezama. Na temelju malenog kemijskog pomaka $\approx 5,2$ ppm NH-skupine aminokiseline L-Phe može se zaključiti da ne sudjeluju vodikovim vezama.

Tablica 2. Kemijski pomaci (δ)³ amidnih protona peptida **1**

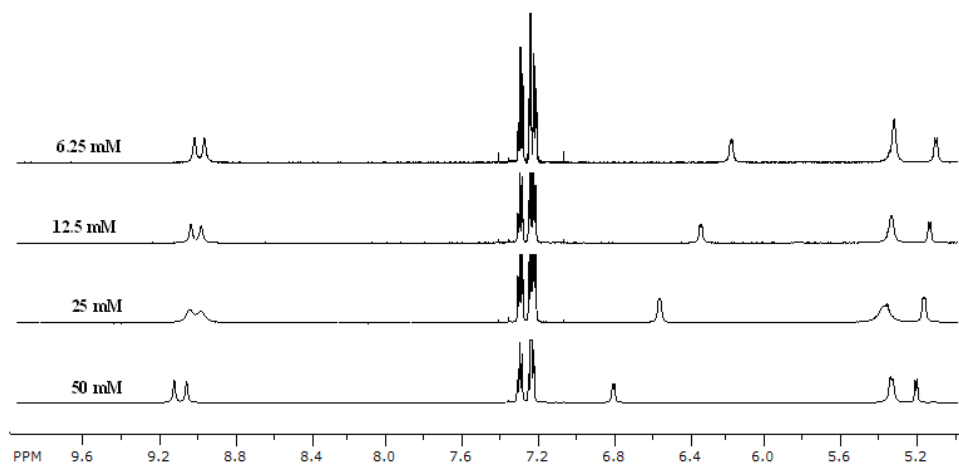
Spoj	Formula	(NH^1_{Fn})	(NH^2_{Fn})	(NH_{Ala})	(NH_{Phe})
		δ (ppm)	δ (ppm)	δ (ppm)	δ (ppm)
1	Ac-L-Ala-NH ¹ -Fn-NH ² -L-Phe-Boc	9,14	9,07	7,00	5,23

³NMR-spektri snimljeni su u CDCl_3 pri $c = 5 \times 10^{-2}$ M i 298 K

Priroda vodikovih veza dodatno se opisuje primjenom koncentracijski i temperaturno ovisnih ¹H-NMR spektara. Koncentracijski ovisni NMR-spektri (slika 15 i slika 16) pokazuju kako razrjeđivanjem uzorka ne dolazi do promjene kemijskog pomaka amidnih protona vezanih na ferocensku jezgru (NH^1_{Fn} i NH^2_{Fn}) čime je potvrđen, prethodno IR-spektrom predloženi, intramolekulski karakter vodikove veze. Pomak amidnih protona NH-skupine alanina upućuje na slabu ili nikakvu uključenost u intramolekulske vodikove veze.

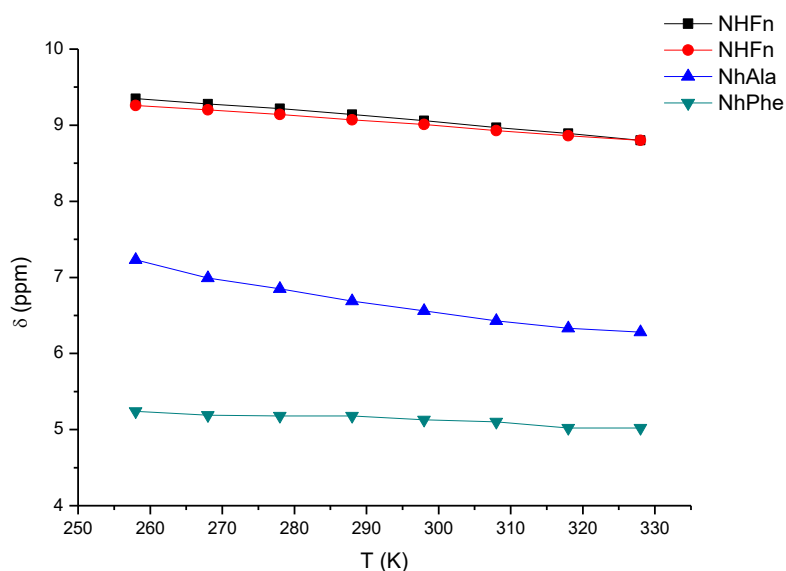


Slika 15. Koncentracijska ovisnost kemijskih pomaka amidnih protona NH^1_{Fn} (crno), NH^2_{Fn} (crveno), NH_{Ala} (plavo) i NH_{Phe} (zeleno)

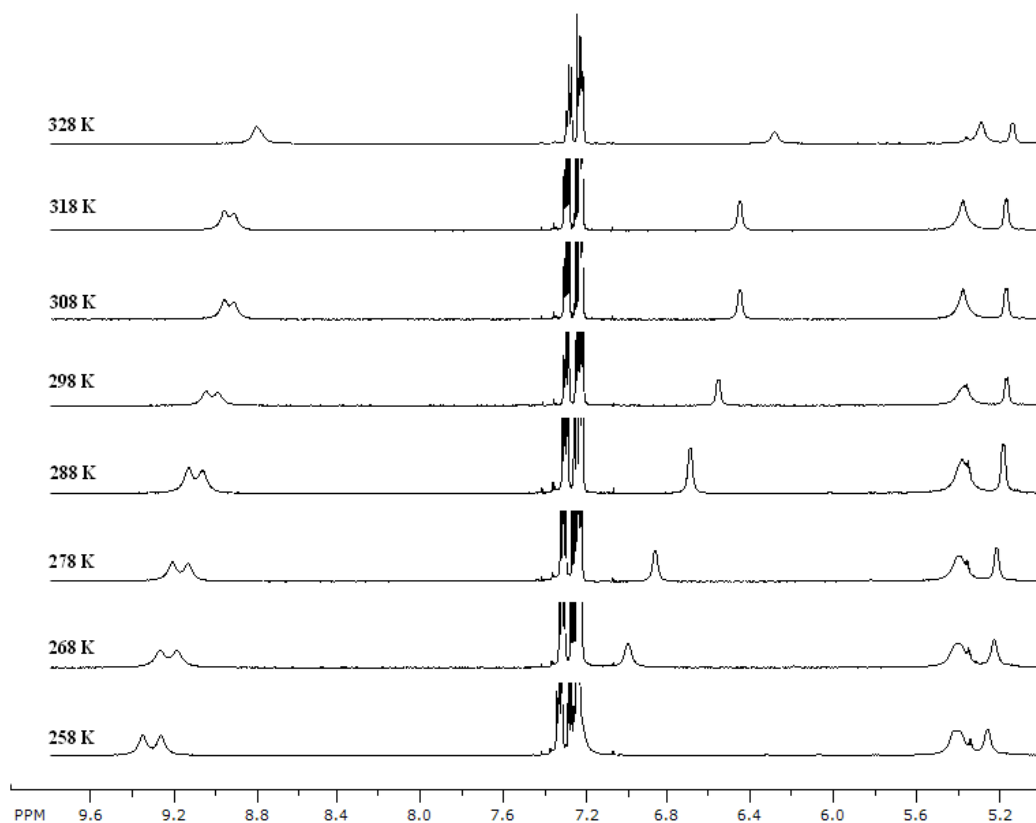


Slika 16. Koncentracijska ovisnost kemijskih pomaka amidnih protona prisutnih u peptidu **1**

Zagrijavanje isto kao i razrjeđivanje uzorka dovodi do cijepanja intermolekulskih vodikovih veza i smanjenja kemijskog pomaka protona. Temperaturno-ovisni NMR-spektar (slika 17, slika 18) potvrđuje prisutnost intramolekulskih vodikovih veza u peptidu **1** uslijed malih promjena kemijskih pomaka amidnih protona NH^1_{Fn} i NH^2_{Fn} povećanjem temperature sa 258 K na 328 K.



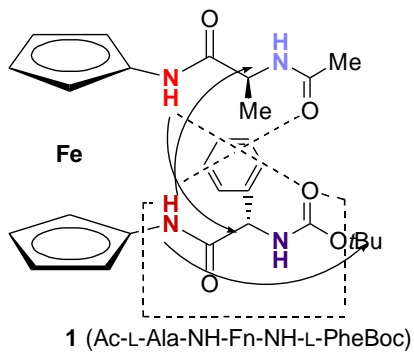
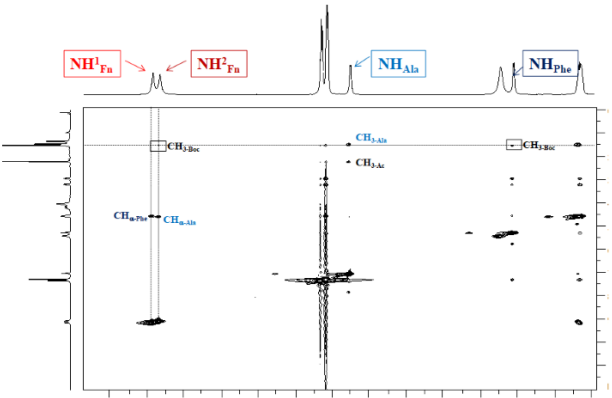
Slika 17. Temperaturna ovisnost kemijskih pomaka amidnih protona NH^1_{Fn} (crno), NH^2_{Fn} (crveno), NH_{Ala} (plavo) i NH_{Phe} (zeleno)



Slika 18. Temperaturna ovisnost kemijskih pomaka NH-protona peptida **1**

Za dobivanje dodatnih informacija o konformaciji i IHB-obrazca, u ispitivanom peptidu **1**, provodi se NOSTY-NMR analiza. Istraživanjem NOE-kontaktata NH-skupina koje ulaze u vodikove veze može se pretpostaviti konformacija analiziranog peptida. Javljuju se NOE-kontakti $\text{NH}^1_{\text{Fn}}\text{-CH}_{\alpha}\text{-Phe}$ i $\text{NH}^2_{\text{Fn}}\text{-CH}_{\alpha}\text{-Ala}$ (tablica 3), čime je podržana tvorba dviju unakrsnih intramolekulskih vodikovih veza između NH skupina vezanih na ferocen s Boc/Ac zaštitnim karbonilnim skupinama. Istovremeno, $\text{NH}^2_{\text{Fn}}\cdots\text{OC}_{\text{Boc}}$ NOE kontakt upućuje na tvorbu tj. postojanje $\text{NH}^2_{\text{Fn}}\cdots\text{OC}_{\text{Boc}}$.

Tablica 3. Moguća konformacija peptida **1** (NOE kontakti prikazani su strelicama, a intramolekulske vodikove veze ispekidanim crtama)

Moguća konformacija	NOE kontakti
 <p>1 (Ac-L-Ala-NH-Fn-NH-L-PheBoc)</p>	

5. ZAKLJUČCI

1. Peptid Ac-L-Ala-NH-Fn-NH-L-Phe-Boc (**1**) pripremljen je standardnim postupkom u iskorištenju 83%.
2. Kemijska struktura peptida **1** potvrđena je IR i NMR spektroskopijom.
3. U IR-spekttru peptida **1** javljaju se dvije apsorpcijske vrpce koje pripadaju slobodnim i asociranim NH skupinama.
4. Postupnim smanjenjem koncentracije diklormetana u kojem je otopljen peptid **1**, signali i slobodnih i asociranim NH-skupina su se proporcionalno smanjivali što upućuje na postojanje intramolekulskih vodikovih veza u analiziranom peptidu.
5. Kemijski pomak $\approx 9,10$ ppm protona iz NH-skupina vezanih na ferocensku jezgru upućuje na njihovo sudjelovanje u vodikovim vezama.
6. Koncentracijski i temperaturni $^1\text{H-NMR}$ spektari pokazuju kako ni razrjeđivanje niti zagrijavanje uzorka nije uzrokovalo promjenu kemijski pomak NH^1_{Fn} i NH^2_{Fn} protona čime je potvrđen intramolekulski karakter vodikove veze.
7. NOE kontakti amidnih protona peptida **1** podržavaju tvorbu dviju unakrsnih $\text{NH}^1_{\text{Fn}} \cdots \text{OC}_{\text{Boc}}$ i $\text{NH}^2_{\text{Fn}} \cdots \text{OC}_{\text{Ac}}$ intramolekulskih vodikovih veza. Moguća je i tvorba vodikove veze $\text{NH}^2_{\text{Fn}} \cdots \text{OC}_{\text{Boc}}$.

6. POPIS LITERATURE

Al Hafid N, Christodoulou J (2015) Phenylketonuria: a review of current and future treatments. *Transl Pediatr* **4**, 304-317. <https://doi.org/10.3978/j.issn.2224-4336.2015.10.07>

Astruc D (2017) Why is Ferrocene so Exceptional? *Eur. J. Inorg. Chem* **2017**, 6-29. <https://doi.org/10.1002/ejic.201600983>

Barišić L (2018a) Nastavni materijal iz peptidnih mimetika i pseudopeptida – interna skripta. Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb.

Barišić L (2018b) Nuklearna magnetska rezonancija, nastavni materijal iz kolegija Instrumentalne analize. Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb. https://moodle.srce.hr/2022-2023/pluginfile.php/8038677/mod_resource/content/1/NMR%202022.pdf. Pristupljeno 5. srpanja 2023.

Barišić L, Rapić V, Kovač V (2002) Ferrocene Compounds. XXIX.* Efficient Syntheses of 1'-Aminoferrocene-1-carboxylic Acid Derivatives. *Croat Chem Acta* **75**, 199–210.

Berg JM, Tymoczko JL, Gatto GJ, Stryer L (2019) *Biochemistry*, 9. izd., W.H. Freeman, New York.

Bhatt V (2016) Basic Organometallic Chemistry. *Essentials of Coordination Chemistry* 173–190. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803895-6.00007-0>

Čakić Semenčić M, Barišić L (2017) Ferrocene bioconjugates. *Croat Chem Acta* **90**, 537–569.

Jerić I (2004) Peptidni mimetici: zašto i kako? *Kem Ind* **53**, 495–504

Kovač V (2018a) Uvod u spektroskopske i kromatografske metode analize, nastavni materijal iz kolegija Instrumentalne analize. Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb. <https://moodle.srce.hr/2022->

2023/pluginfile.php/8041836/mod_resource/content/1/1.%20Uvod%20u%20spektroskopske%20i%20kromatografske%20metode%20analize.pdf. Pristupljeno 5. srpnja 2023

Kovač V (2018b) IR spektrometija, nastavni materijal iz kolegija Instrumentalne analize. Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb. https://moodle.srce.hr/2022-2023/pluginfile.php/8041837/mod_resource/content/2/2.%20IR-spektroskopija.pdf. Pristupljeno 7. srpnja 2023.

Kovačević M (2014) Ferrocenski biokonjugati s aminokiselinama i ugljikohidratima, Doktorska disertacija, Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb. <https://repositorij.pmf.unizg.hr/islandora/object/pmf:261/datastream/PDF/view>

Kovačević M, Kodrin I, Cetina M, Kmetič I, Murati T, Čakić Semenčić M, i sur. (2015) The conjugates of ferrocene-1,1'-diamine and amino acids. A novel synthetic approach and conformational analysis. *Dalton Trans* **44**, 16405-16420. <https://doi.org/10.1039/C5DT01610J>

Kovačević M, Kodrin I, Roca S, Molčanov K, Shen Y, Adhikari B, i sur. (2017) Helically Chiral Peptides That Contain Ferrocene-1,1'-diamine Scaffolds as a Turn Inducer. *Chemistry – A European Journal* **23**, 10372–10395. <https://doi.org/10.1002/CHEM.201701602>

Leninger A, Nelson DL, Cox MM (2004) Lehninger: PRINCIPLES OF BIOCHEMISTRY, 4. izd., W.H. Freeman, New York.

Macdonald A, Van Wegberg AMJ, Ahring K, Beblo S, Bélanger-Quintana A, Burlina A, i sur. (2020) PKU dietary handbook to accompany PKU guidelines. *Orphanet J Rare Dis* **15**, 171. <https://doi.org/10.1186/s13023-020-01391-y>

Pandolfelli V (2015) Molecular structure of ferrocene. https://www.researchgate.net/figure/Molecular-structure-of-ferrocene-FeC-5-H-5-2_fig8_280491016. Pristupljeno 6. srpnja 2023.

Perrin D, Armarego W (1988) Purification of laboratory chemicals, 3. izd., Pergamon Press, Oxford/New York. <https://doi.org/10.1002/recl.19881071209>

Rapić V, Čakić Semenčić M (2010) I. Organometalna i bioorganometalna kemija – ferocen i metalni karbonili. *Kemija u industriji* **60**, 61–79. <https://hrcak.srce.hr/file/95743>

Rapić V, Kovačević M (2011) III. Organometalna i bioorganometalna kemija-ferocenski peptidi. *Kemija u industriji* **61**, 71–120. <https://hrcak.srce.hr/file/114513>

Štěpnička P (2022) Forever young: the first seventy years of ferrocene. *Dalton Transactions* **51**, 8085–8102. <https://doi.org/10.1039/D2DT00903J>

Teparić R (2021) Biokemija 1 – interna skripta – radna verzija, nastavni materijali iz kolegija Biokemija 1. Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu. https://moodle.srce.hr/2021-2022/pluginfile.php/5527921/mod_resource/content/1/Proteini%20-%20struktura%20i%20svojstva.pdf Pristupljeno 7. srpnja 2023.

Van Staveren DR, Metzler-Nolte N (2004) Bioorganometallic chemistry of ferrocene. *Chem Rev* **104**, 5931–5985. <https://doi.org/10.1021/cr0101510>

National Center for Biotechnology Information (2023) PubChem Compound Summary for CID 6140, Phenylalanine. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Phenylalanine>. Pristupljeno 7. srpnja 2023.

Izjava o izvornosti

Ja Laura Jelaska izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio/la drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Vlastoručni potpis