

Priprema i karakterizacija ferocenoil uracilnih derivata

Marić, Ana

Master's thesis / Diplomski rad

2018

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:159:229725>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-04-02**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2018.

Ana Marić

943/BPI

**PRIPREMA I
KARAKTERIZACIJA
FEROCENOIL URACILNIH
DERIVATA**

Rad je izrađen u Laboratoriju za organsku kemiju na Zavodu za kemiju i biokemiju Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom doc dr.sc. Jasmine Lapić, Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Zavod za kemiju i biokemiju
Laboratorij za organsku kemiju

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

PRIPREMA I KARAKTERIZACIJA FEROCENOIL URACILNIH DERIVATA

Ana Marić, 943/BPI

Sažetak: Nukleozidni analozi supstituirani u položaju C-5 pirimidinskog prstena ističu se snažnim biološkim djelovanjem. S druge strane, kopulati ferocena s nukleobazama postaju sve češći predmet istraživanja zbog svoje izuzetne biološke aktivnosti i zanimljivih elektrokemijskih svojstva, zbog čega su pronašli svoje mjesto u različitim granama kemije, posebice u medicinskoj kemiji. Stoga je cilj ovog rada bio sinteza homo- i heteroanularno supstituiranih konjugata ferocena i C-5 supstituiranih derivata uracila kao potencijalno aktivnih supstanci. Posebna pozornost posvećena je ispitivanju utjecaja K_2CO_3 kao baznog katalizatora i klorida ferocena kao acilirajućih reagensa na iskorištenje i regioselektivnost reakcija. Strukture svih priređenih spojeva su potvrđene spektroskopskim metodama FTIR, 1H i ^{13}C NMR.

Ključne riječi: ferocen, nukleozidni analozi, C5-supstituirani derivati uracila, spektralna analiza

Rad sadrži: 44 stranica, 32 slika, 5 tablica, 41 literaturnih navoda, 00 priloga

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

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. Izv.prof.dr.sc. Senka Djaković
2. Prof.dr.sc. Valerije Vrček
3. Doc.dr.sc. Jasmina Lapić
4. Doc.dr.sc. Antonela Ninčević Grassino (zamjena)

Datum obrane: 25. rujna 2018

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of chemistry and biochemistry
Laboratory for organic chemistry

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Biotechnology

SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF FERROCENOYL-URACILE DERIVATIVES

Ana Marić, 943/BPI

Abstract: *Nucleoside analogues substituted on C-5 position of the pyrimidine ring are distinguished by their strong biological effects. On the other hand, copulates of ferrocene with nucleobases become an interesting research subject because of their exceptional biological activity and interesting electrochemical properties, because of which they found their place in different chemistry branches, especially in medicinal chemistry. Therefore, the purpose of this thesis is synthesis of homo- and heteroannularly substituted conjugates of ferrocene with C-5 substituted uracil derivatives as potentially active substances. Special attention is given to testing the effects of K_2CO_3 as base catalyst, and ferrocene chlorides as acylation reagents on yield and regioselectivity of the reaction. The structures of the prepared compounds were confirmed by spectroscopic methods FTIR, 1H and ^{13}C NMR.*

Keywords: ferrocene, C5-substituted uracil derivatives, spectral analysis, conjugates

Thesis contains: 44 pages, 32 figures, 5 tables, 41 references, 00 supplements

Original in: Croatian

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

Mentor: *PhD. Jasmina Lapić, Assistant Professor*

Reviewers:

1. PhD. *Senka Djaković*, Associate professor
2. PhD. *Valerije Vrčec*, Full professor
3. PhD. *Jasmina Lapić*, Assistant professor
4. PhD. *Antonela Ninčević Grassino*, Assistant professor (substitute)

Thesis defended: 25 September 2018

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. Ferocen	2
2.2. Nukleozidi i nukleotidi	3
2.3. Pirimidinske baze	4
2.3.1. Uracil	5
2.4. Analози nukleozida	8
2.5. Derivati ferocena i nukleobaza	9
3. EKSPERIMENTALNI DIO	14
3.1. Materijali	14
3.2. Metode rada	14
3.3. Sheme priprave kopulata ferocena i pirimidinskih baza	15
3.4. Protokoli za pripravu spojeva	18
3.4.1. <i>N,N</i> -difenilferocенкарбосамид (1)	18
3.4.2. Ferocенкарбосилна киселина (2).....	18
3.4.3. Ferocenoil-кlorid (3).....	18
3.4.4. 1,1'-diacetylferocen (4).....	19
3.4.5. Ferocen-1,1'-dikarbосилна киселина (5).....	19
3.4.6. Ferocenoil-1,1'-diklorid (6).....	19
3.4.7. Dimetil-ferocen-1,1'-dikarbосилат (7)	20
3.4.8. 1'-metoksikarbonilferocen-1-karbосилна киселина (8)	20
3.4.9. 1'-metoksikarbonilferocen-кlorid (9)	20
3.4.10. Ferocenoil-uracilni derivati (10a-e).....	21
3.4.11. 1'-metoksikarbonil-ferocenoil-uracilni derivati (11a-e)	22
3.4.12. Ferocenoil-1,1'-bisuracilni derivati (12a-e).....	23
4. REZULTATI I RASPRAVA	24
4.1. Uvod	24
4.2. Sinteza i spektralna analiza prekursora	25
4.2.1. Ferocенкарбосилна киселина (2).....	25
4.2.2. Ferocenoil-кlorid (3)	25
4.2.3. Ferocen-1,1'-dikarbосилна киселина (5)	26
4.2.4. Ferocenoil-1,1'-diklorid (6)	26
4.2.5. 1'-metoksikarbonil-ferocenoil-кlorid.....	27

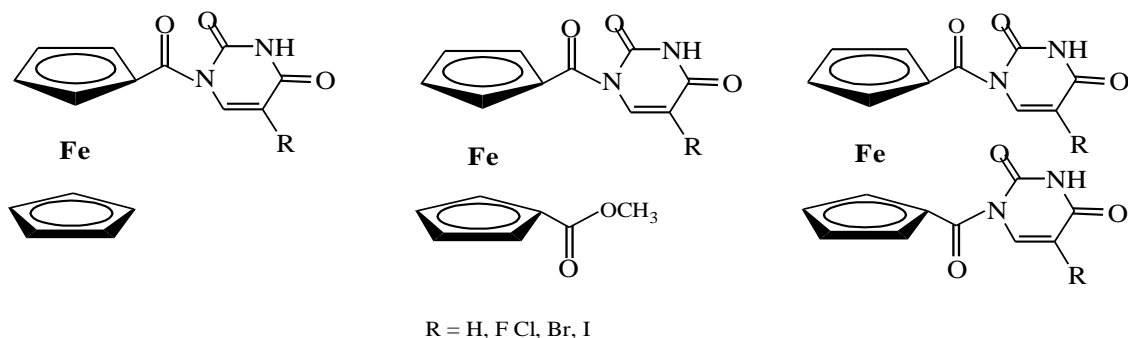
4.3. Sinteza i spektralna analiza ferocenoil uracilnih derivata	28
4.3.1. Sinteza ferocenoil-uracilni derivati (10a-e)	28
4.3.2. Strukturna karakterizacija ferocenoil-uracilnih derivata (10a-e)	29
4.3.3. Sinteza 1'-metoksikarbonil-ferocnoil-uracilni derivati (11a-e)	32
4.3.4. Strukturna karakterizacija 1'-metoksikarbonil-ferocnoil-uracilni derivati (11a-e)	33
4.3.5. Sinteza ferocenoil-1,1'-bisuracilni derivati (12a-e)	36
4.3.6. Strukturna karakterizacija ferocenoil-1,1'-bisuracilni derivati (12a-e)	37
5. ZAKLJUČCI	40
6. LITERATURA	41

1. UVOD

Ovaj diplomski rad uklapa se u istraživanje na području metalocena pod naslovom: „Kvanto-kemijski dizajn, priprava i biološka svojstva organometalnih derivata nukleobaza” koje je u sklopu projekta Hrvatske zaklade za znanost, HRZZ-IP-2016-06-1137, a izvodi se u Laboratoriju za organsku kemiju Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta u Zagrebu.

Krajem 20. stoljeća utemeljena je nova znanstvena disciplina na granici anorganske kemije i organometalne kemije (bioorganometalna kemija) koja doživljava eksplozivni razvoj. To područje obuhvaća konjugate organometalnih spojeva i biomolekula pri čemu su osobito važni spojevi metalocena s nukleinskim kiselinama, aminokiselinama i peptidima. Ti su kompleksi značajni kako s teorijskog stajališta tako i zbog moguće primjene u biokemiji, biologiji, biomedicini, itd. [1].

Najveći izazov današnje medicine predstavljaju bolesti poput raka i virusnih bolesti te njihovo liječenje. Značajnu biološku aktivnost u borbi protiv tih bolesti pokazali su nukleozidni analozi pirimidina i purina, pogotovo njihovi C-5 supstituirani pirimidinski derivati. [2]. Uzevši to u obzir cilj ovog diplomskog rada je priprava te spektroskopska karakterizacija modificiranih analoga nukleozida, homo- i heteroanularno supstituiranih derivata ferocena i derivata uracila s karbonilnom skupinom kao razmaknicom (Slika 1). Kako bi se oponašala prirodna struktura nukleozida, ferocenski dio mora biti selektivno supstituiran na N1 položaju baze umjesto šećernog dijela, a posebna pozornost u ovom istraživanju biti će usmjerena na regioselektivnost reakcija.

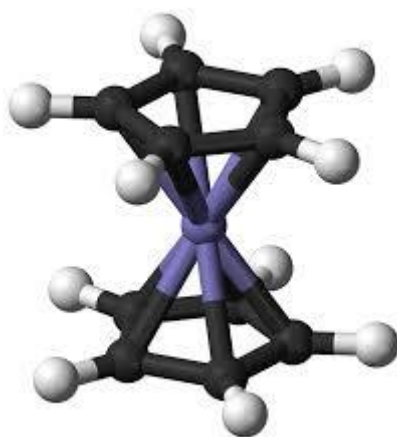


Slika 1. Homo i heteroanularno supstituirani ferocenoil uracilni derivati

2. TEORIJSKI DIO

2.1. FEROCEN

Ferocen je organometalni spoj koji pripada skupini metalocena, molekulske formule $\text{Fe}(\text{C}_5\text{H}_5)_2$. Sastoji se od dva ciklopentadienilna prstena, koji sa suprotnih strana okružuju središnji atom željeza [3] (Slika 2).



Slika 2. Struktura ferocena

Stabilan je spoj, nalazi se obliku narančasto obojenog praha. Fe atom ferocena najčešće oksidira u Fe^{2+} i daje $\text{Fe}(\text{C}_5\text{H}_5)_2^{2+}$ ion. C-C veze ferocena imaju slična svojstva kao i C-C veze benzena pa zbog toga ferocen u mnogim reakcijama pokazuje analogiju s benzenom [4].

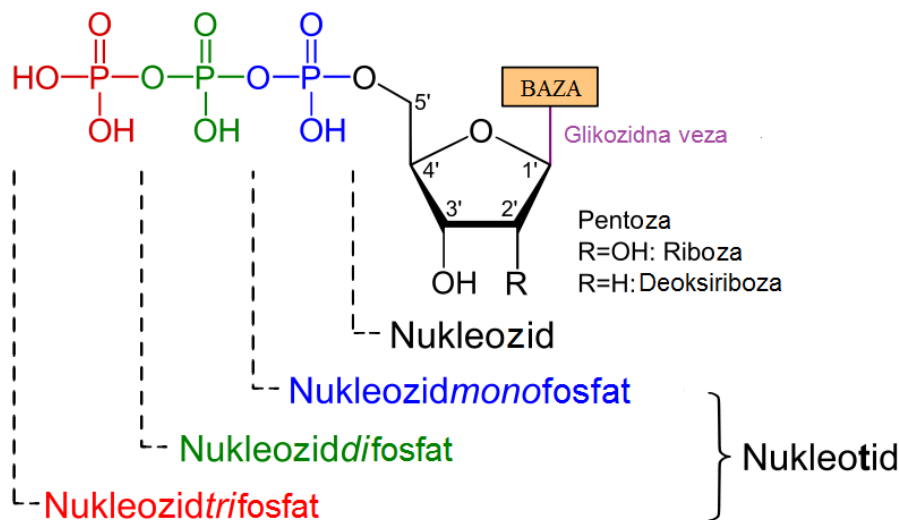
Molekulska masa ferocena iznosi 186.04 g/mol, netopljiv je u vodi i topljiv u većini organskih otapala. Gustoće je 1.11 g/cm^3 , temperatura tališta iznosi $172.5 \text{ }^\circ\text{C}$, a temperatura vrelišta $249 \text{ }^\circ\text{C}$ [5]. Ferocen su prvi put sintetizirali 1951. godine Peter L. Pauson i Thomas J. Kealy pomoću Grignardovog reagensa [6].

Budući da je stabilan je na zraku i u vodi te da prolazi reverzibilnu oksidaciju u Fc^+ , ferocen je idealan standard u elektrokemiji [7]. Ciklopentadielni prstenovi ferocena su aromatski i prolaze mnoge reakcije slične benzenu. U prva tri desetljeća nakon otkrića ferocena izvedene su brojne elektrofilne supstitucije. U usporedbi s benzenom utvrđena je

veća reaktivnost, pri čemu su limitirajući faktori sklonost protoniranju i reakcijama s Lewisovim kiselinama te (reverzibilna) oksidacija željeza u fericenijev ion [8].

2.2. NUKLEOZIDI I NUKLEOTIDI

Nukleinske kiseline linearne su makromolekule sastavljene od mnogobrojnih nukleozida povezanih fosfodieterskim vezama. Fosfodieterska veza povezuje 3'-hidroksilnu skupinu jedne deoksiriboze (ili riboze) s 5'-hidroksilnom skupinom susjedne. Nukleozidi iz nukleinskih kiselina sastoje se od šećera i purinske ili pirimidinske baze. Šećeri su ili D-riboza ili D-2-deoksiriboza, i na osnovi njih nukleinske kiseline dijele se na ribonukleinske kiseline (RNA) i deoksiribonukleinske kiseline (DNA). Nukleozidne baze se dijele na pirimidinske (timin, citozin i uracil) i purinske (adenin i gvanin). Nukleozidi imaju trivijalne nazive koji se izvode na osnovi naziva baza: uridin, citidin, timidin, adenzin i gvanozin. Nukleozidi esterificirani fosfornom kiselinom su nukleotidi [9] (Slika 3).



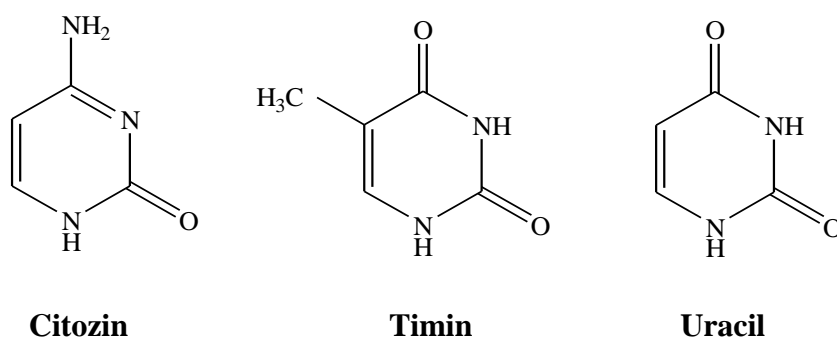
Slika 3. Strukturne razlike između nukleozida i nukleotida

Nukleotidi su potrebni za replikaciju genoma i transkripciju genetičkih informacija u RNA. Adeninski nukleotid, ATP, je univerzalna energetska jedinica organizama, dok gvaninski nukleotid GTP, djeluje i kao donor fosforilne grupe koju prenose protein kinaze.

Nukleotidni derivati kao što je UDP-glukoza sudjeluju u biosintetičkim procesima kao što je sinteza glikogena. Također su esencijalni dio staničnih signalnih puteva [10].

2.3.PIRIMIDINSKE BAZE

Pirimidin je šesteročlani, aromatski, ciklički spoj koji sadrži četiri atoma ugljika i dva atoma dušika. Jedan je od najznačajnijih heterocikličnih spojeva koji pokazuju farmakološku aktivnost [11]. Pirimidini koji se najčešće pojavljuju u prirodi su uracil, citozin i timin. Citozin i uracil pirimidinske su baze koje ulaze u sastav RNA molekula, a timin i citozin gradivne su jedinice DNA molekula [12] (Slika 4).



Slika 4. Struktura pirimidinskih baza

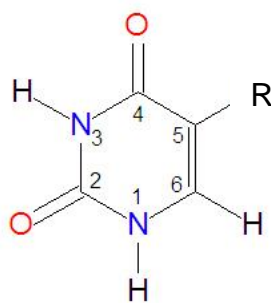
Pirimidinski prsten je sastavni je dio i nekih vitamina kao što su riboflavin, tiamin i folna kiselina. Pirimidini privlače pažnju jer su se pokazali kao korisni, prvotno zbog širokog spektra bioloških aktivnosti. Mnogi derivati pirimidina, koji su razvijeni kao kemoterapeutske agensi, danas su u širokoj primjeni. Smatraju se važnima u proizvodnji lijekova, budući da veliki broj njih pokazuje antimikrobnu, antivirusnu i antitumorsku aktivnost [13]. Prisutnost pirimidinske baze u timinu, citozinu i uracilu, koji su esencijalne gradivne jedinice nukleinskih kiselina DNA i RNA jedan je od mogućih razloga za takve njihove aktivnosti [11].

2.3.1. Uracil

Uracil (molekulska formula $C_4H_4N_2O_2$, $M_r = 112.08$ g/mol) je pirimidinska dušična baza koja se nalazi većinom u RNA molekulama [14]. U molekuli RNA uracil se spaja sa adeninom preko dvije vodikove veze [15].

Uracil se sastoji od četiri različita mjesta vezanja, i pripada grupi najvažnijih pirimidina koji građu ključnu ulogu u strukturi i funkciji enzima i lijekova. Koristi se za sintezu antibakterijskih i antitumorskih agenasa. Neki derivati uracila pokazuju značajnu farmakološku aktivnost i koriste se kao antitumorski, antibakterijski i antivirusni lijekovi [16]. Osim antivirusne i antitumorske aktivnosti, analozi uracila pokazuju još i herbicidnu, insekticidnu i baktericidnu aktivnost. Njihov antivirusni potencijal je baziran na inhibiciji ključnih koraka u replikaciji virusa što rezultira u aktivnostima protiv virusa HIV, hepatitisa B i C, herpes virusa itd. Istraživanja uracilnih derivata kao biološki aktivnih agenasa su povezana sa modifikacijama supstituenata na N^1 , N^3 , C^5 i C^6 pozicijama pirimidinskog prstena. 5-Fluorouracil je najpoznatiji derivat uracila s atomom fluora na C-5 poziciji [17].

Uracilni analozi s halogenim supstituentom na C5-poziciji (Slika 5) predstavljaju važnu skupinu spojeva s obzirom na svoja mutagena svojstva [18]. Takvi analozi prvi puta su sintetizirani 1950-ih godina kao potencijalni antitumorski agensi nakon otkrića da neki tumori preferiraju inkorporiranje uracila umjesto timina u DNA [19].

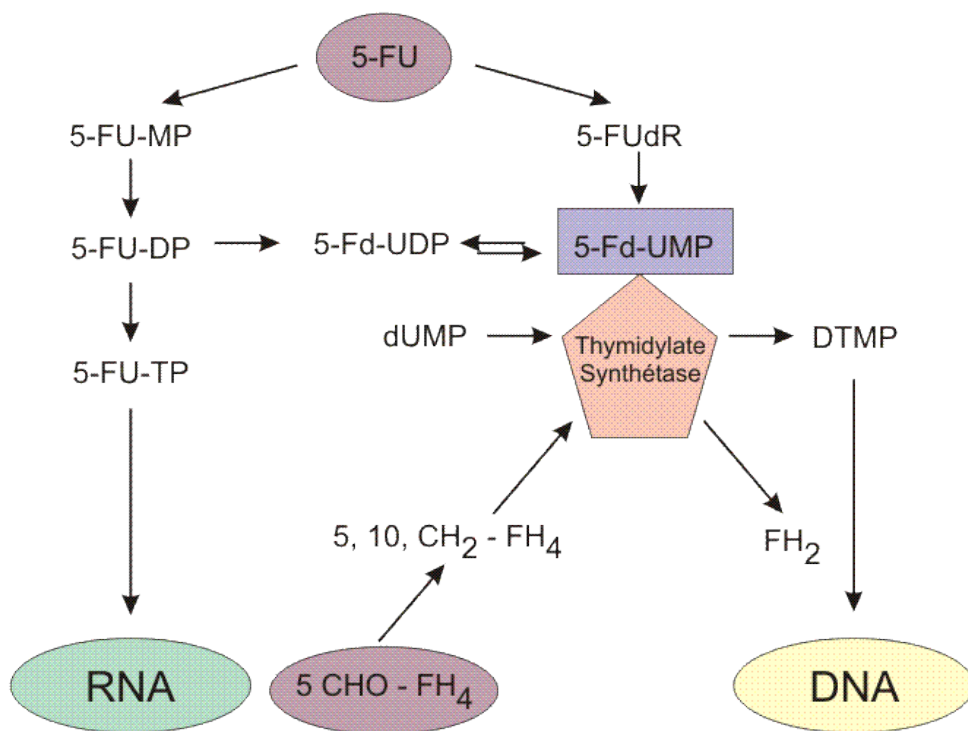


R=F, Cl, Br, I

Slika 5. Uracilni analozi s halogenim supstituentom na C5-poziciji

Fluoropirimidin, 5-fluorouracil (5-FU) je antimetabolitski lijek koji je u širokoj primjeni u liječenju raka, posebice kolorektalnog karcinoma. Tijekom zadnjih 20 godina, povećano razumijevanje mehanizma 5-FU dovelo je do razvoja strategija koje povećavaju

antitumorsku aktivnost. Unatoč ovim napredovanjima, rezistencija na lijek ostaje važna limitacija kliničkoj upotrebi 5-FU. 5-FU djeluje antitumorski preko inhibicije timidilat sintaze (TS) i inkorporacijom metabolita u RNA i DNA. Brzo ulazi u stanicu koristeći iste olakšane transportne mehanizme kao i uracil. 5-FU se unutarstanično konvertira u nekoliko aktivnih metabolita: fluorodeoksiuridin monofosfat (FdUMP), fluorodeoksiuridin trifosfat (FdUTP) i fluorouridin trifosfat (FUTP). Ovi aktivni metaboliti ometaju RNA sintezu i aktivnost timidilat sintaze (Slika 6). Limitirajući enzim u katabolizmu 5-FU je dihidropirimidin dehidrogenaza (DPD), koja konvertira 5-FU u dihidrofluorouracil (DHFU). Više od 80 % 5-FU se normalno katabolizira primarno u jetri, gdje je DPD snažno eksprimiran.



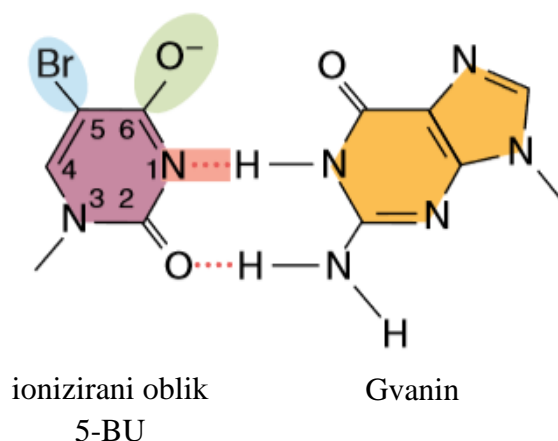
Slika 6. Mehanizam djelovanja 5-fluorouracila [20]

5-FU je široko korišten u tretmanima različitih vrsta raka uključujući kolorektalni i rak dojke te aerodigestivni rak. Kombinacijom s drugim kemoterapeutskim agensima 5-FU povećava postotak preživljavanja kod raka dojke i vrata [20].

In vitro i *in vivo* studije su pokazale da se 5-klorouracil i 5-bromuracil (Slika 5) mogu naći u ljudskom tkivu tijekom upalnih procesa kao rezultat aktivnosti enzima mijeloperoksidaze i eozinofilne peroksidaze. Zbog toga ovi uracilni derivati pokazuju mutagene i citotoksične učinke [21]. Tijekom kronične upale, klorirani nukleozidi mogu biti generirani i inkorporirani u DNA proliferiranih tkiva što može dovesti do akumulacije

kloriranih baza u DNA. Akumulacija 5-klorouracila u DNA inducira izmjenu sestrinske kormatide i mutacije. Prema tome, akumulacija modificiranih baza uzrokovana kroničnom upalom može biti važna u razvoju raka [22].

Prisutnost atoma broma u 5-položaju baze značajno mijenja distribuciju elektrona u prstenu baze. Njegova mutagenska aktivnost se bazira na enolizaciji i ionizaciji. Mutacije su rezultat grešaka u sparivanju baza tijekom DNA duplikacije, a greške su posljedica tautomerizacije. Postoji u tri tautomerna oblika koja imaju drugačija svojstva sparivanja. Keto oblik je komplementaran s adeninom, pa može biti inkorporiran u DNA. Enolni i ionizirani oblik su komplementarni gvaninu (Slika 7). 5-BU uzrokuje tranziciju G-C→A:T ili A-T→G-C tranziciju u tijeku replikacije, ovisno je li 5-BU enoliziran ili ioniziran unutar DNA molekule [23].



Slika 7. Sparivanje 5-bromuracila s gvaninom [23]

5-Jodouracil je jedan od važnih farmaceutskih intermedijera, koji su korišteni kako bi se razvili antikancerogeni, antimikrobni i antiviralni lijekovi. Pokazalo se da ima letalne i mutagenske učinke na bakteriofag T4 [24]. 5-Iodouracil (5-IU) može se integrirati u DNK i djeluje kao UV osjetljivi kromofor prikladan za ispitivanje strukture DNK i interakcija DNK-proteina na temelju fotokemijskih reakcija [25].

2.4. ANALOZI NUKLEOZIDA

Analozi nukleotida i nukleozida su sintetski, kemijski modificirani spojevi koji su razvijeni kako bi oponašali svoje fiziološke verzije i bili inkorporirani u DNA ili RNA te sprječili stanično dijeljenje i virusnu replikaciju. Analozi nukleozida se klinički koriste skoro 50 godina i postali su temelj liječenja za pacijente oboljele od raka ili virusnih infekcija [26]. Citotoksični nukleozidni analozi su antimetaboliti koji djeluju na sintezu nukleinskih kiselina. Ovi agensi mogu vršiti citotoksičnu aktivnost tako što se pripoje i mijenjaju DNA i RNA makromolekule, djelujući na različite enzime koji su uključeni u sintezu nukleinskih kiselina, ili modificirajući metabolizam fizioloških nukleozida. Ova djelovanja rezultiraju inhibicijom DNA sinteze i apoptoznom smrti stanice. Većina ovih agenasa su hidrofilne molekule i zahtijevaju specifičan protein transporter za ulazak u stanicu. Kako bi se prevladali nedostaci agenasa razvijaju se učinkovitiji analozi koji djeluju neovisno o membranskim transporterima ili aktivaciji kinaza i manje su podložni degradaciji [27]. Derivati pirimidina predstavljaju skupinu spojeva koji pokazuju širok raspon bioloških i farmakoloških aktivnosti. Lijekovi koji sadrže pirimidinske analoge su korišteni u liječenju različitih bolesti. Trifluoruridin i idoksuridin se koriste u liječenju virusnih infekcija, 5-fluorouracil u liječenju raka, a 5-bromo-2'-deoksiuridin (BrdU) (Slika 8) se koristi u detekciji proliferiranih stanica u živim tkivima. Može se inkorporirati u replicirajuću DNA, mijenjajući timidin tijekom DNA replikacije. Antitijela specifična za BrdU se tada koriste kako bi markirali stanice koje se aktivno dijele [28].

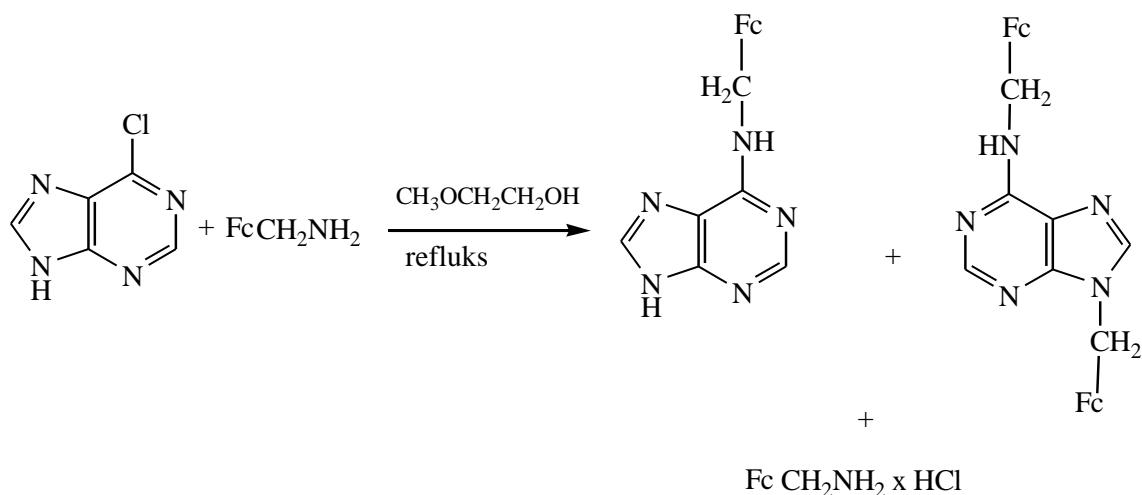


Slika 8. 5'-bromo-2'-deoksiuridin (BrdU)

2.5. DERIVATI FEROCENA I NUKLEOBAZA

Kao što je već navedeno u uvodu, mogućnost rotacije ciklopentadienilnih prstenova ferocena, omogućuje molekuli optimizirano vezanje supstituenata na molekulu ferocena. Vezanjem biološke molekule nukleobaze na ferocenu nastaju produkti koji predstavljaju sve važniju skupinu kopolata koji s obzirom na svoja redoks i bioaktivna svojstva se koriste u bioanalitici i medicinskoj kemiji [29]. Osim što imaju negativno djelovanje na uzročnike raznih bolesti, u posljednje vrijeme se proučava njihova mogućnost uporabe kao biosenzora za glukozu. Naime, kopolati ferocena i nukleobaza služe kao bioelementi za odvijanje selektivne reakcije. Kasnije, pretvornik signala pretvara biokemijski signal u neki mjerljivi oblik signala. Razlog korištenja ovih spojeva kao biosenzora je njihova jednostavnost modifikacije, biokompatibilnost, stabilnost, velika površina, električna vodljivost te dobra redoks svojstva [30].

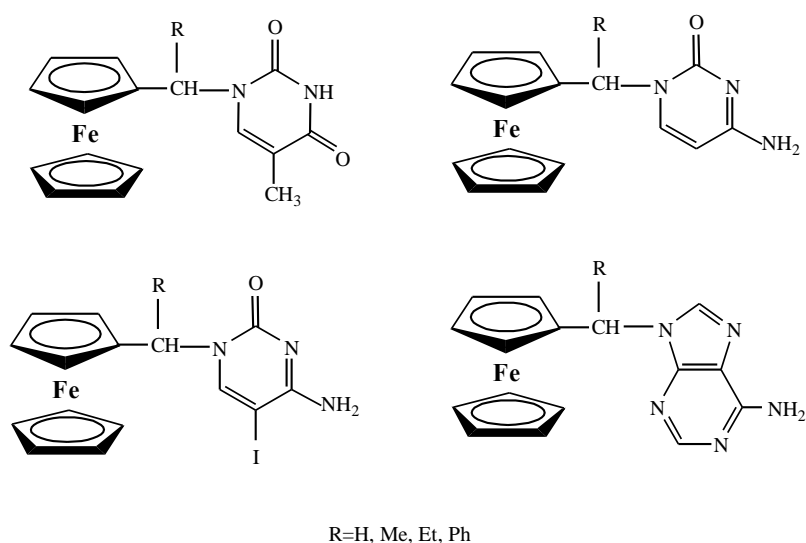
Prvi pripremljeni ferocenski derivat s nukleobazom, N-supstituirani ferocenmetil adenin, sintetizirali su Chen i suradnici 1980. godine [31]. Reakcijom 6-kloroadenina i ferocenilmetilamina u prisutnosti metoksietanola pri temperaturi refluksa dobivena je kompleksna mješavina produkata (Slika 9). Nakon pročišćavanja, N6-ferocenilmetil adenin je izoliran kao glavni produkt uz manje količine N6,N9-diferocenilmetil adenina.



Slika 9. Shema reakcije derivata ferocena i derivata adenina [31]

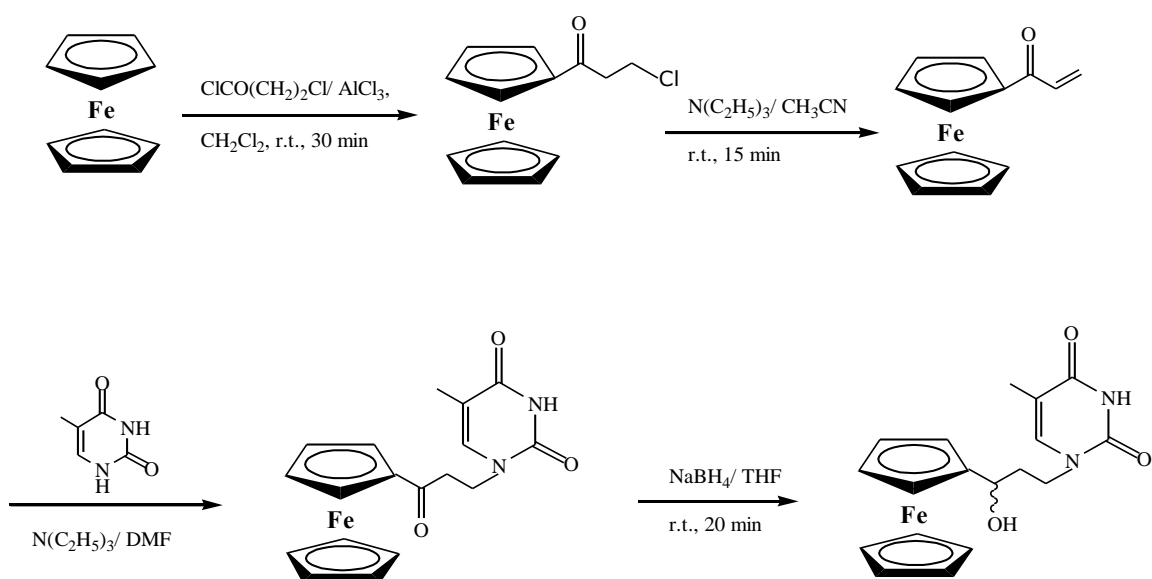
Tijekom godina razvijeno je puno uspješnih načina pripreme kopolata ferocena i nukleobaza, kao npr. ferocenilalkil nukleobaze pripravljene su u reakciji α -(hidroksi)alkil ferocena s različitim bazama, timinom, citozinom, 5-jod-citozinom i adeninom (Slika 10).

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 ferocenilmetanola, feroceniletanola, ferocenilpropanola ili ferocenilfenilmetanola kao supstrata utječe na lipofilnost konačnog produkta ferocenilalkil-nukleobaze. Ispitivana je antitumorska aktivnost 1N-ferocenilmetil 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 [32].



Slika 10. Ferocenilalkil nukleobaze

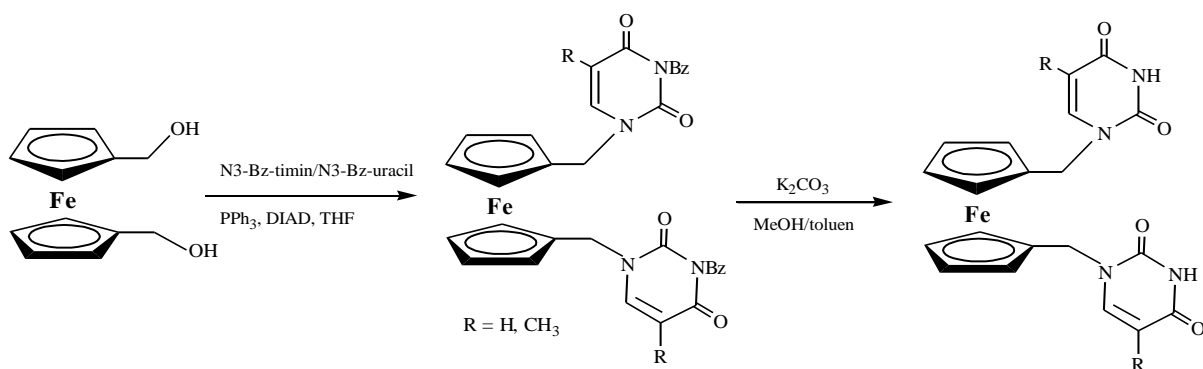
U literaturi je opisana sinteza ferocenil-timinskih derivata, aciklonukleozida i njegovog prekursora (Slika 11.). Ključni stupanj reakcije je Michaelova adicija akrilolilferocena s timinom. Reakcija je provedena u dimetilformamidu u prisutnosti trietilamina pri 70 °C kroz 5 sati. Redukcijom dobivenog derivata s NaBH₄ u 51 % iskorištenju dobiven je aciklonukleozid.



Slika 11. Shema reakcije Michaelove adicije akriloferoce na timinsku nukleobazu [34]

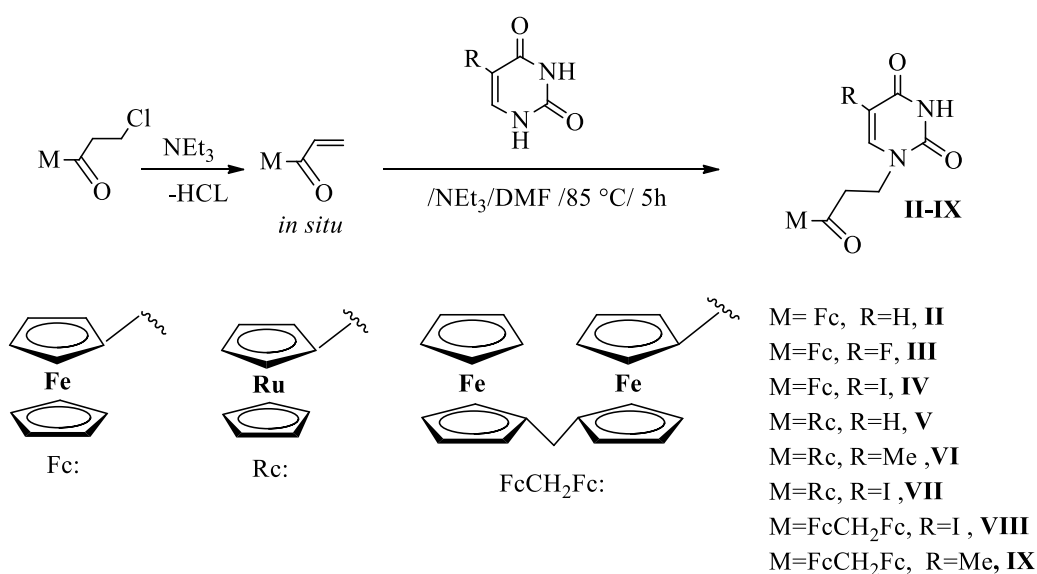
Elektrokemijska svojstva pripremljenih konjugata ispitana su cikličkom voltametrijom (CV) pri čemu je uočena reverzibilna jedno-elektronska oksidacija što je potvrda elektronske aktivnosti uklopljene ferocenske podjedinice. Također je ispitana i njihova antikancerogena aktivnost, feroceni-timinski derivat pokazao se kao aktivni agens prema staničnim linijama MCF-7 i CCRF-CEM, dok je aciklonukleozid neaktivan [34].

S druge strane, autori Patwa, Gonnade i suradnici [35] su 2010. godine sintetizirali ferocen-bis konjugate s timinom i uracilom. Mitsunobu reakcijom 1,1-bishidroksimetilferocena s N3-benzoiltiminom/ N3-benzoiluracilom pri čemu su dobiveni derivati 1,1-bis(N3-benzoiltimin)ferocen odnosno 1,1-bis(N3-benzoiluracil)ferocen. N-debenzoilacija provodi se u vodenoj otopini K_2CO_3 u smjesi metanola i toluena pri čemu su nastali N1 supstituirani derivati (Slika 12). Ovisno o bazi odnosno supstituciji na položaju C-5 zabilježene su različite interakcije kroz vodikove veze kako unutar molekule tako i među molekulama, što je ključno za ispitivanje uporabe nosivih spojeva za građevne blokove u supramolekulama.



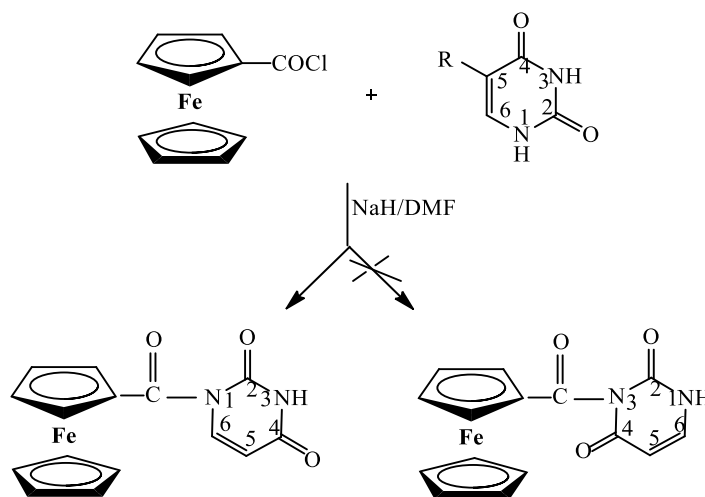
Slika 12. Shema ferocena-bis konjugata [35]

Razvoj pojednostavljene sintetske procedure pripreve kopulata metalocena i nukleobaza objavili su Kowalski i suradnici. U prvom koraku reakcije akrilolferocen je dobiven kao produkt dehidrohalogenacije 3-kloropropionilferocena dok u drugom koraku *in situ* dobiveni akrilolferocen reagira sa pirimidinskom nukleobazom pri čemu nastaju željeni kopulati (**II-IX**) (Slika 13). Zbog jednostavnosti ovakve sinteze omogućeno je dobivanje raznolikih strukturno modificiranih kopulata metalocena i pirimidina uz nisku cijenu i prihvatljivo iskorištenje. Biološka ispitivanja Michaelovih adukta (**II-IX**) potvrdila su njihovu antikancerogenu i antibakterijsku aktivnost. Kopulati **I** i **III** pokazali su umjerenu citostatsku aktivnost prema MCF-7 humanim stanicama raka [36].



Slika 13. Shema sinteze kopulata metalocena i pirimidina [36]

Lapić i suradnici su prvi put sintetizirali biokonjugate ferocena s pirimidinskim nukleobazama: timinom, uracilom i 5-floruracilom, pri čemu je razmaknica između ferocena i baze karbonilna skupina [37].



Slika 14. Regioselektivno N1-aciliranje pirimidinskih nukleobaza (uracil, R = H; timin, R = Me; 5-florouracil, R = F) [37]

Kopulacijom nukleobaza s ferocenoil kloridom (FcCOCl) ili ferocenoil-etil-karbonatom (FcCOOCOEt) uz deprotonirajući agens natrij hidrid (NaH) u dimetilformamidu (DMF), ferocen se regioselektivno vezao na N1-položaj pirimidinske nukleobaze bez zaštite na N3-položaj nukleobaze (Slika 14). Reakcija između nukleobaze i FcCOCl prati jednostupanjski mehanizam u kojem se formiranje N-C veze i cijepanje C-Cl veze odvija simultano, što se slaže ranijim teorijskim i eksperimentalnim rezultatima koji potvrđuju da se nukleofilna adicija na karbonilnoj grupi kiselih klorida odvija S_N2-mehanizmom. Položaj supstitucije i kemijska struktura dobivenih spojeva potvrđena je i ¹H, ¹⁹F i ¹³C NMR spektrima, a kvantno-kemijskim računom je pretpostavljena kinetička sklonost za regioselektivnost reakcije. Preliminarna ispitivanja pripremljenih konjugata pokazuju potencijalnu biološku aktivnost. Cikličkom voltametrijom i kvantno-kemijskom metodom određeni su redoks potencijali ferocenoil nukleobaza koji pokazuju da su konjugati bolji oksidansi od roditeljskog ferocenskog sustava.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

Sva otapala su sušena prema preporučenom postupku sušenja sredstvima za sušenje, odnosno destilirana iznad odgovarajućih molekulskih sita. Dimetilformamid (DMF) pročišćen je vakuum-destilacijom preko bezvodnog Mg sulfata ($t_v=135\text{ }^\circ\text{C}$), a čuvan je na molekulskim sitima. Ostali komercijalni reagensi i kemikalije su korišteni bez pročišćavanja.

3.2. METODE RADA

Tijek reakcije praćen je metodom tankoslojne kromatografije. Tankoslojna kromatografija je provedena na pločama 60F-254 presvučenim slojem silika gela (Merck) u odgovarajućem sustavu otapala. Za detekciju izoliranih komponenata je korištena UV-svjetlost valne duljine 254 nm.

Kromatografija na koloni je provedena na silika gelu (Fluka, 0.063–0.2 mm), a staklene kolone punjene su pod utjecajem gravitacijske sile uz eluens diklormetan/etilacetat. Preparativna tankoslojna kromatografija provedena je na staklenim pločama prevučeni silika gelom (Merk, Kisagel 60 HF254), dok je za mobilnu fazu korišten sustav otapala diklormetan/acetone.

Spektri ^1H NMR i ^{13}C NMR su snimljeni na spektrometru Bruker Avance 300 i 600 MHz. Svi uzorci su otopljeni u CDCl_3 DMSO- d_6 i mjereni pri 298 K u NMR cjevčici od 5 mm. Kemijski pomaci (δ) u ^1H -NMR i ^{13}C -NMR spektrima su izraženi u ppm u odnosu prema tetrametilsilanu (TMS, δ 0,0 ppm), a konstante sprege (J) u hercima (Hz). Pojedinačne rezonancije su asignirane na temelju njihovih kemijskih pomaka, intenziteta signala, multipliciteta signala i konstanti sprege H-H.

Tumačenje spektroskopskih oznaka i kratica:

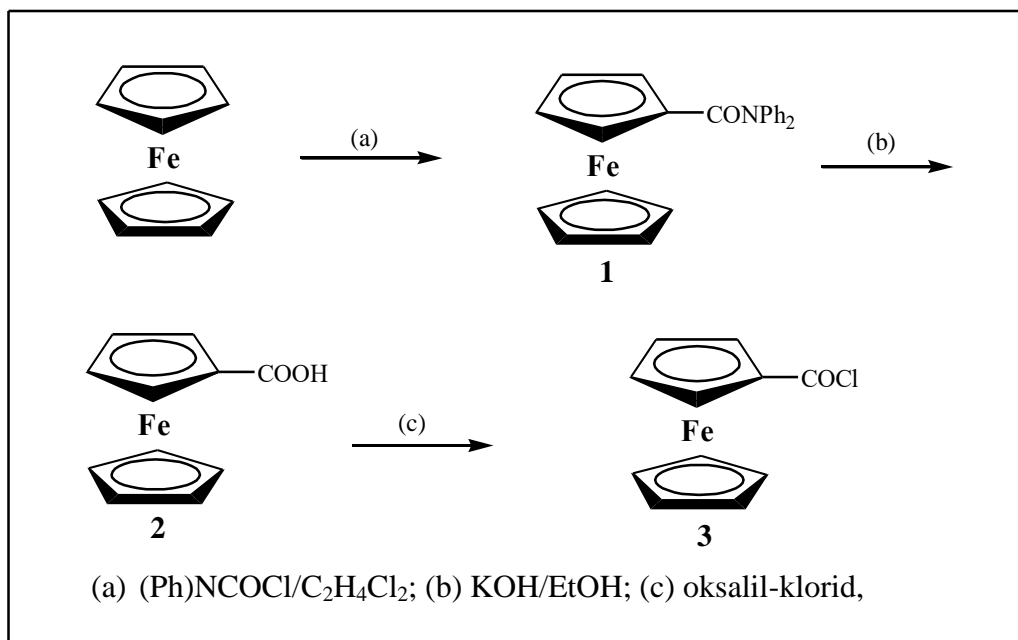
IR-spektri: ν = rastezanje (stretching), δ = deformacije (bending), j = jaka vrpca, sr = srednja vrpca, š = široka vrpca.

^1H -NMR-spektri: s = singlet, d = dublet, t = triplet, q = kvartet, m = multiplet.

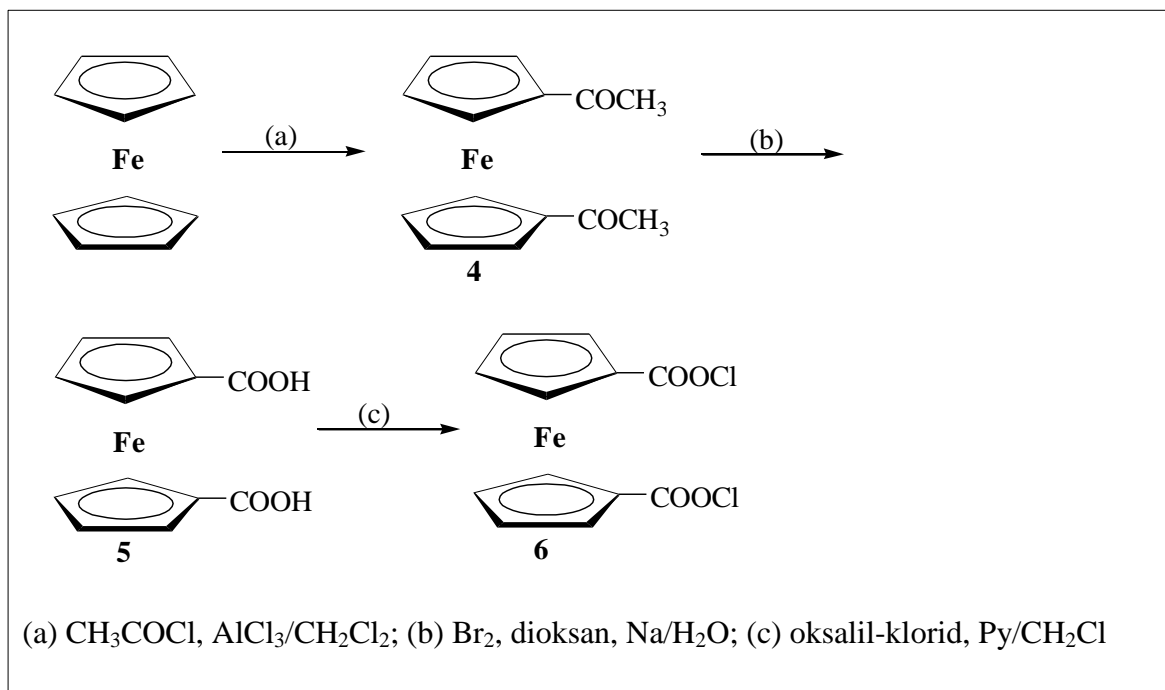
Najveći dio pokusa izveden je u atmosferi inertnog plina (argon) i u bezvodnoj sredini.

3.3.SHEME PRIPRAVE KOPULATA FEROCENA I PIRIMIDINSKIH BAZA

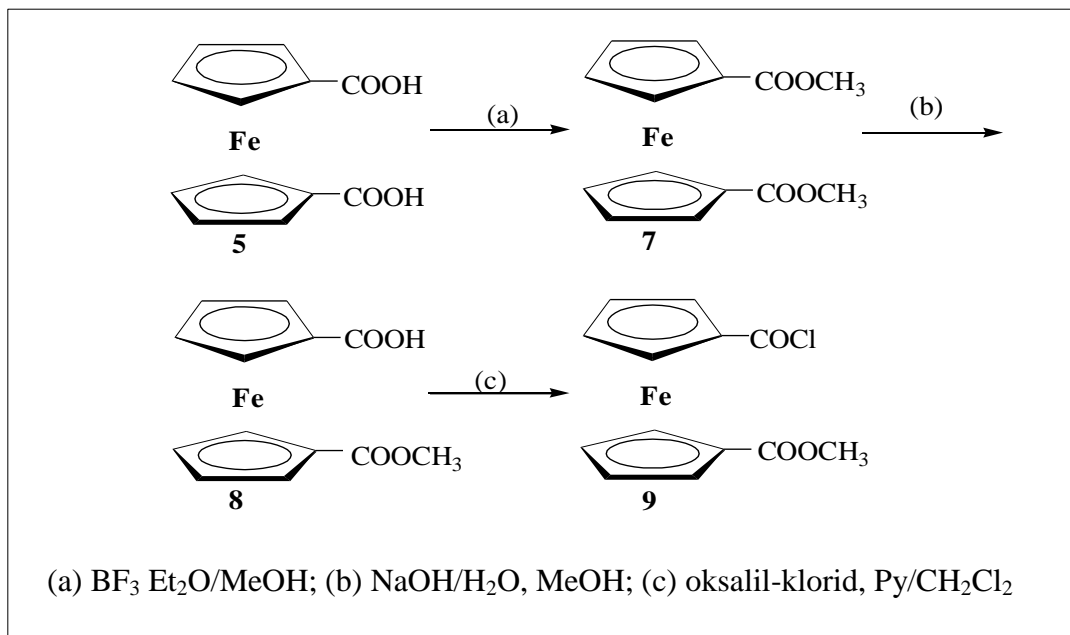
A. Priprava ferocenkarkobosilne kiseline(2) i ferocenoil-klorida (3)



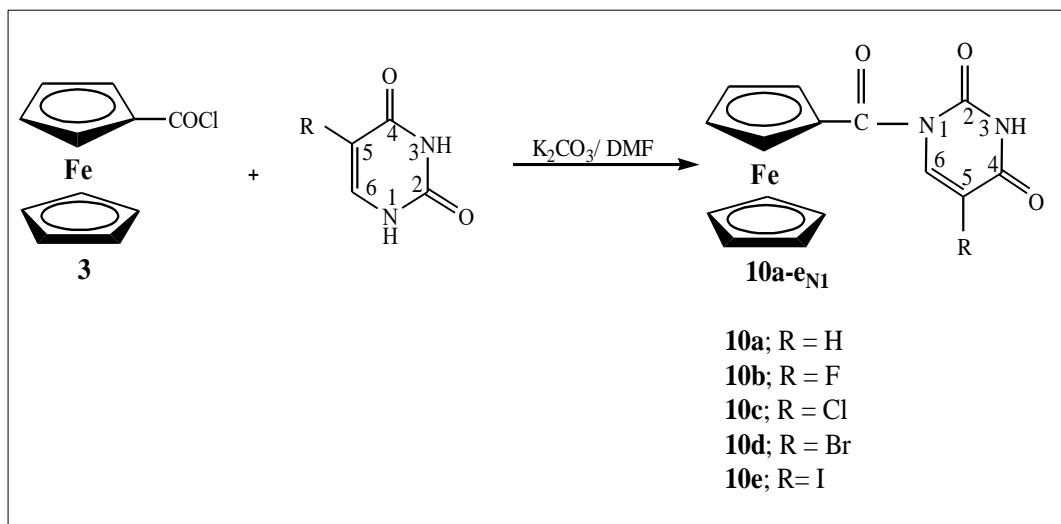
B. Priprava ferocen-1,1'-dikarkobosilna kiselina (5) i ferocenoil-diklorida (6)



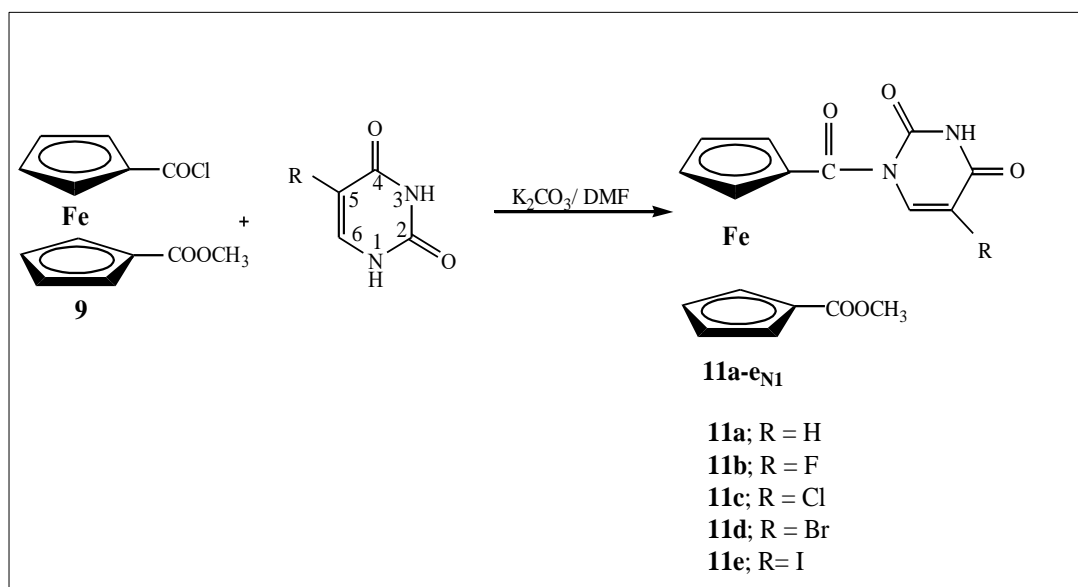
C. Priprava 1'-metoksikarbonilferocen-1-karboksilne kiseline i 1'-metoksikarbonilferocenoil-klorida (9)



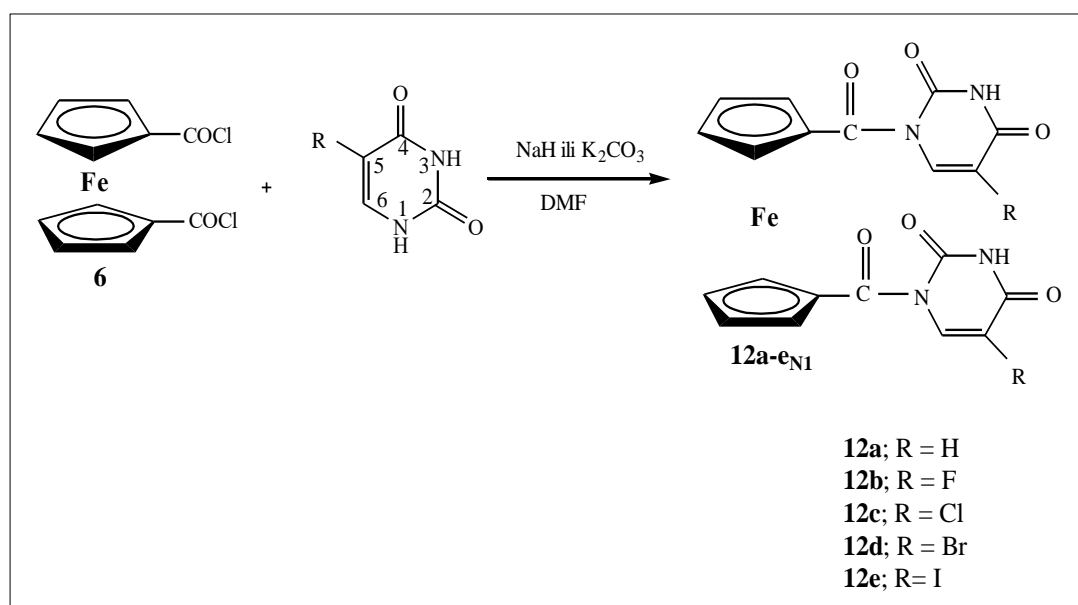
D. Priprava ferocenoil-pirimidinskih derivata (10a-e)



E. Priprava 1'-metoksigarbonilferocenoil-pirimidinskih derivata (11a-e)



F. Priprava bis ferocenoil-pirimidinskih derivata (12a-e)



3.4. PROTOKOLI ZA PRIPRAVU SPOJEVA

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

Suspenciji aluminijeva klorida (3.58 g, 26.8 mmol) u suhom dikloretanu (27 mL) doda se otopina difenil-karbamoil-klorida (Ph_2NCOCl 6.23 g, 26.8 mmol) u istom otapalu (27 mL) i dokapa se 1,2-dikloretanska otopina ferocena (5 g, 26.8 mmol). Refluks se provodi tijekom 24 sata te se nakon toga reakcijska smjesa prenese u posudu s ledom te ekstrahira diklormetanom. Organski sloj ispire se zasićenom otopinom NaCl, osuši bezvodnim Na_2SO_4 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: CH_2Cl_2) pri čemu je dobiveno 120 mg (60%) narančastih kristala amida **1**; $t_t = 179\text{-}182\text{ }^\circ\text{C}$.

IR (CH_2Cl_2) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 1642 j, 1594 s, 1492 s (C=O, CONPh₂).

¹H NMR (CDCl_3 , 400 MHz, 298 K, ppm): δ 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 (CDCl_3 , 100 MHz, 298 K, ppm): δ 171 (CONPh₂), 143.9 (2C_q, 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).

3.4.2. Ferocencarboksilna kiselina (**2**)

Sirovi amid **1** (8.3 g) se otopi u 20%-tnoj otopini kalijeva hidroksida (KOH) u etanolu (260 mL). Reakcijska se smjesa refluksira 22 sata nakon čega se upari do suha, otopi u 5%-tnoj vodenoj otopini NaHCO_3 te se ekstrahira diklormetanom. Organska faza ispire se zasićenom otopinom NaCl, osuši bezvodnim Na_2SO_4 i upari, pri čemu je dobiveno 4.05 g neizreagirano supstrata **1**. Zakiseljavanjem vodene faze koncentriranom HCl istaloži se 3.98 g (80%) tamnožutih kristala ferocencarboksilne (mono) kiseline; $t_t = 193\text{-}200\text{ }^\circ\text{C}$.

IR (CH_2Cl_2) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3100-2700 š (OH, COOH), 1657 j (C=O).

3.4.3. Ferocenoil-klorid (**3**)

Suspenciji ferocencarboksilne kiseline (300 mg, 1.3 mmol) u diklormetanu (5 mL) doda se oksalil klorid (274 mL, 3.13 mmol) i kap piridina. Smjesa se refluksira 2 sata te se upari

do suha pri čemu je dobiven tamni ostatak. Sirovi produkt se zagrijava u petroleteru na 80 °C tijekom 10 minuta. Organski se sloj filtrira preko vate i upari do suha, a ostatak se još 10 minuta zagrijava u petroleteru te se ponovno profiltrira preko vate i upari. Dobiveno je 275 mg (85 %) crvenih kristala ferocenoil-klorida (**3**).

IR (CH₂Cl₂) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 2958 (sl., C-H, Fc), 1755 (j., C=O).

3.4.4. 1,1'-Diacetilferocen (**4**)

Suspenziji aluminijska klorida (17.2 g, 0.13 mol) u suhom diklormetanu (30 mL) dokapa se otopina acetil-klorida (10.7 mL, 0.15 mol) u istom otapalu (20 mL). Tako pripremljen Perrierov kompleks zagrije se do temperature vrenja te mu se preko lijevka za dokapavanje polako dokapa otopina ferocena (10 g, 0.054 mol) u suhom diklormetanu (40 mL). Nakon 5 sati refluksiranja reakcijska se smjesa prebaci u čašu s ledom i askorbinskom kiselinom te se ekstrahira diklormetanom. Organski se sloj dobro ispere 5%-tnom otopinom NaHCO₃, 5%-tnom otopinom KOH i zasićenom otopinom NaCl do neutralnog, a zatim osuši bezvodnim Na₂SO₄ i upari do suha pri čemu je dobiveno 12.9 g (88%) narančastih kristala $t_f = 116-125\text{ }^\circ\text{C}$, $t_i[34] = 130-131\text{ }^\circ\text{C}$.

3.4.5. Ferocen-1,1'-dikarboksilna kiselina (**5**)

Otopini natrijeva hidroksida (49.05 g, 1.23 mol) u vodi (240 mL) ohlađenoj na 0°C doda se brom (18.3 mL, 0.35 mol) i dokapa se dioksan (148.2 mL, 1.73 mol), te se pri temperaturi 0-5 °C u obrocima dodaje 1,1'-diacetilferocen (**4**) (12 g, 0.044 mol). Nakon 30 minuta miješanja doda se vodena otopina Na₂S₂O₅ (17 g) te se reakcijska smjesa profiltrira i filtrat se zakiseli koncentriranom HCl pri čemu se istaloži 11.8 g (90%) narančastih kristala ferocen-1,1'-dikarboksilne kiseline (**5**); $t_f > 250\text{ }^\circ\text{C}$, $t_i[32] = > 250\text{ }^\circ\text{C}$.

3.4.6. Ferocenoil-1,1'-diklorid (**6**)

Suspenziji ferocen-1,1'-dikarboksilne dikiseline (**5**) (300mg, 1.1mmol, Mr= 273g/mol) u 4mL diklormetana doda se jedna kap piridina i 0.5 mL oksalil-klorida (5.5 mmol, Mr=127 g/mol). Reakcijska se smjesa refluksira 4 h pri temperaturi od 60 °C. Nakon završetka refluksa reakcijska smjesa se ohladi i upari do suha. Tamno crveni ostatak se obrađuje na isti

način kako je opisano u postupku pripreve ferocenoil-klorida (**3**) pri čemu je dobiveno 140 mg (41%) tamnocrvenih kristala ferocenoil-1,1'-diklorida (**6**).

IR (CH₂Cl₂) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 2958 (sl., C-H, Fc), 1755 (j., C=O).

3.4.7. Dimetil-ferocen-1,1'-dikarboksilat (**7**)

Otopini kiseline (**2**) (6.83 g, 0.025 mol) u metanolu (142 ml) doda se svježe predestilirani BF₃·Et₂O (14.2 ml). Nakon 7 sati refluksiranja reakcijska se smjesa zaluži 5%-tnom NaHCO₃ do pH~8-9, ekstrahira diklormetanom, ispere zasićenom otopinom NaCl, osuši bezvodnim Na₂SO₄ i upari do suha. Dobiveno je 6.10 g (81%) narančastih kristala; $t_f = 108-110$ °C, $t_f[42] = 114-115$ °C.

IR (CH₂Cl₂) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 1715 j (C=O, COOCH₃).

3.4.8. 1'-Metoksikarbonilferocen-1-karboksilna kiselina (**8**)

U otopinu (**3**) (6.10 g, 0.02 mol) u metanolu (82 ml) doda se otopina natrijeva hidroksida (808 mg, 0.02 mol) u vodi (2.7 ml). Nakon 50 minuta zagrijavanja pri 80 °C, reakcijska se smjesa ekstrahira diklormetanom. Alkalna vodena faza zakiseli se koncentriranom HCl pri čemu se istaloži 2.5 g (43%) narančastih kristala (**4**); $t_f=145.8-146.7$ °C, $t_f[43] = 142-146$ °C.

IR (CH₂Cl₂) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3120 š (OH, COOH), 1719 j (C=O, COOCH₃), 1682 sr (C=O, COOH).

3.4.9. 1'-Metoksikarbonilferocen-klorid (**9**)

Suspenziji 1'-metoksikarbonilferocen-1-karboksilne kiseline (600 mg, 2,11 mmol) u diklormetanu (5 mL) doda se 0,72 mL oksalil klorida (8,44 mmol) i kap piridina. Smjesa se refluksira 4 h te se upari do suha. Sirovi produkt se obrađuje na isti način kako je opisano u postupku pripreve ferocenoil-klorida (**3**) pri čemu je dobiveno 470 mg (73 %) crvenih kristala, 1'-Metoksikarbonilferocen-klorida.

3.4.10. Ferocenoil-uracilni derivati (**10a-e**)

Opći postupak: Suspenzija uracila (18 mg, 0.162 mmol) i K_2CO_3 (22 mg, 0.162 mmol) u DMF-u miješana je kroz 1 h na sobnoj temperaturi pri čemu nastaje kalijeva sol uracila. Uz miješanje, reakcijskoj se smjesi dodaje prethodno pripremljeni ferocenoil-klorid (**3**) (60 mg, 0.243 mmol). Nakon 15 minuta miješanja na sobnoj temperaturi reakcijska se smjesa neutralizira dodatkom 10% otopine limunske kiseline, te ekstrahira diklormetanom. Organski se sloj ispere vodom do neutralnog i upari na rotacijskom vakum-uparivaču do suha. Sirovi produkt se pročisti kromatografijom na koloni silikagela uz eluens diklormetan : aceton 10:1 te upari pri čemu su dobiveni kristali.

Ferocenoil-uracil (10a): Iskorištenje 110 mg (31.94 %), narančasti kristali, $R_f = 0.195$

IR (CH_2Cl_2) ν_{max}/cm^{-1} : 3374, (sl., NH), 3072 (sl., CH-aromatski), 1700 (j., C=O), 1667 (j., amid)

Ferocenoil-5-florouracil (10b): Iskorištenje 56.18%, narančasto-crveni kristali, $R_f = 0.439$

IR (CH_2Cl_2) ν_{max}/cm^{-1} : 3363, (sl., NH), 3020 (sl., CH-aromatski), 1735, 1700 (j., C=O), 1667(j., amid).

Ferocenoil-5-klorouracil (10c): Iskorištenje 62%, tamno-crveni kristali, $R_f = 0.488$

IR (CH_2Cl_2) ν_{max}/cm^{-1} : 3363, (sl., NH), 3023 (sl., CH-aromatski), 1710 (j., C=O), 1678(j., amid).

Ferocenoil-5-bromouracil (10d): Iskorištenje 72.74%, crveni kristali, $R_f = 0.536$

IR (CH_2Cl_2) ν_{max}/cm^{-1} : 3363, (sl., NH), 3024 (sl., CH-aromatski), 1730, 1706 (j., C=O), 1628(j., amid).

Ferocenoil-5-iodouracil (10e): Iskorištenje 76.1%, tamno crveni kristali, $R_f = 0.585$

IR (CH_2Cl_2) ν_{max}/cm^{-1} : 3363, (sl., NH), 3017 (sl., CH-aromatski), 1733, 1700 (j., C=O), 1616(j., amid).

3.4.11. 1'-Metoksikarbonil-ferocnoil-uracilni derivati (**11a-e**)

Opći postupak: Suspenziji nezaštićenog uracila (22.6 mg, 0,202 mmol) u dimetilformamidu (DMF) doda se K₂CO₃ (28 mg, 0,202 mmol). Nastala suspenzija miješanjem polako prelazi u gušću bijelu otopinu koja se miješa 1 h, a zatim se doda pripremljeni 1'-metoksikarbonilferocen-klorid (**9**) (80 mg, 0,262 mmol). Dobivena reakcijska smjesa miješa se oko 15 min, a zatim neutralizira 10 %-tnom limunskom kiselinom i ekstrahira diklometanom. Organski sloj se ispire vodom, a potom upari na rotacijskom uparivaču do suha. Pročišćavanjem produkta kolonskom kromatografijom uz eluens diklormetan : aceton 10:1 te uparavanjem dobiveni su crveni kristali.

1'-Metoksikarbonil-ferocnoil-uracil (11a): Iskorištenje 44.54%, narančasto-crveni kristali, R_f = 0.164

IR (CH₂Cl₂) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3370, (sl., NH), 3020 (sl., CH-aromatski), 1717 (j., C=O), 1682(j., amid).

1'-Metoksikarbonil-ferocnoil-5-fluorouracil (11b): Iskorištenje 54.09%, crveni kristali, R_f = 0.382

IR (CH₂Cl₂) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3362, (sl., NH), 3022 (sl., CH-aromatski), 1718 (j., C=O), 1677(j., amid).

1'-Metoksikarbonil-ferocnoil-5-klorouracil (11c): Iskorištenje 65.01%, tamno-crveni kristali, R_f = 0.509

IR (CH₂Cl₂) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3367, (sl., NH), 3020 (sl., CH-aromatski), 1714 (j., C=O), 1682(j., amid).

1'-Metoksikarbonil-ferocnoil-5-bromouracil (11d): Iskorištenje 69.15%, crveni kristali, R_f = 0.564

IR (CH₂Cl₂) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3362, (sl., NH), 3027 (sl., CH-aromatski), 1709 (j., C=O), 1628(j., amid).

1'-Metoksikarbonil-ferocnoil-5-iodouracil (11e): Iskorištenje 79%, tamno crveni kristali, R_f = 0.618

IR (CH₂Cl₂) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3364, (sl., NH), 3023 (sl., CH-aromatski), 1710 (j., C=O), 1617(j., amid).

3.4.12. Ferocenoil-1,1'-bisuracilni derivati (**12a-e**)

Opći postupak: Suspenzija 29 mg (0.26 mmol) uracila i 6.24 mg (0.26 mmol) NaH u DMF-u miješana je tijekom 30 minuta te je dodano 40 mg (0.13 mmol) ferocenoil-1,1'-diklorida (**6**). Dobiveni produkt se odsiše preko Hirschvogovog lijevka pri čemu se dobiveni kristali isperu različitim otapalima (diklormetan, aceton).

Ferocenoil-1,1'-bisuracil (12a) Iskorištenje 38.77%, narančasti kristali

IR (KBr) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3464, (š. sl., NH), 3109 (sr., CH, Fc), 1715 (j., CO), 1675 (j., amid).

Ferocenoil-1,1'-bis-5-floruracil (12b): Iskorištenje 69.51%, crveni kristali

IR (KBr) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3464, (š. sl., NH), 3109 (sr., CH-aromatski), 1715 (j., CO), 1675, 1630 (j., amid).

Ferocenoil-1,1'-bis-5-klorouracil (12c): Iskorištenje 20.85%, crveni kristali

IR (KBr) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3438, (š. sl., NH), 3060 (sr., CH, Fc), 1694 (j., CO), 1659 (j., amid).

Ferocenoil-1,1'-bis-5-bromouracil (12d): Iskorištenje 80.9%, crveni kristali

IR (KBr) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3454, (š. sl., NH), 3061 (sr., CH, Fc), 1694 (j., CO), 1654 (j., amid).

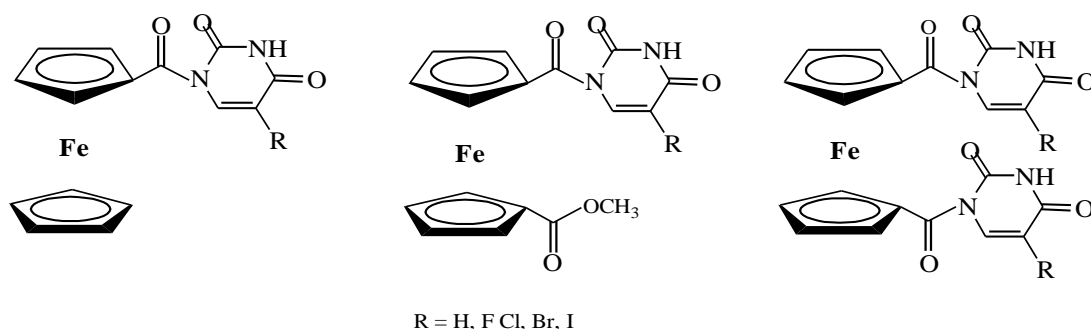
Ferocenoil-1,1'-bis-5-iodouracil (12e): Iskorištenje 71.5%, tamno-crveni kristali

IR (KBr) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3469, (š. sl., NH), 3038 (sr., CH, Fc), 1710 (j., CO), 1650 (j., amid).

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. UVOD

Nukleozidni analozi supstituirani u položaju C-5 pirimidinskog prstena ističu se snažnim biološkim djelovanjem stoga su u taj položaj uvedeni različiti supstituenti u dizajniranju molekula koje će interagirati sa procesima u tijelu i imati željenu aktivnost. Analizom njihovih struktura i određivanjem odnosa biološkog djelovanja utvrđeno je da elektron-odvlačeća skupina u C-5 položaju pirimidinskog prstena ima značajan utjecaj na antivirusno djelovanje. Imajući u vidu zanimljiva svojstva analoga nukleozida, tj. njihovu značajnu biološku aktivnost i zanimljiva elektrokemijska svojstva, cilj ovog diplomskog rada je priprava te spektroskopska karakterizacija modificiranih analoga nukleozida, homo- i heteroanularno supstituiranih derivata ferocena i derivata uracila s karbonilnom skupinom kao razmaknicom (Slika 15).



Slika 15. Homo i heteroanularno supstituirani ferocenoil uracilni derivati

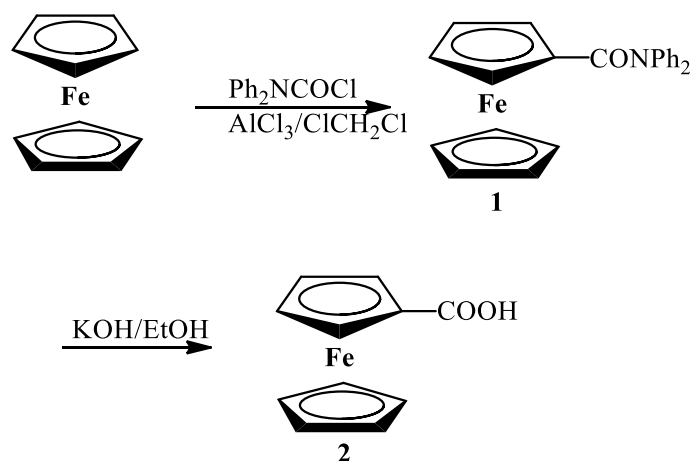
Da bi se očuvala potencijalna biološka aktivnost pripremljenih spojeva potrebno je reakciju kopulacije ferocena i nukleobaza usmjeriti regioselektivno odnosno ferocenoilni supstituent vezati na N1 poziciju nukleobaze gdje se prirodno nalazi vezana šećerna komponenta. U većini reakcija na nezaštićenom uracilu, odnosno timinskom derivatu sa supstratima za aciliranje (acilkloridi, esteri, anhidridi) nastaje smjesa N1- i N3- produkata. Položaj supstitucije na dušikovom atomu i udio izomera ovisi o temperaturi reakcije, baznom katalizatoru i korištenom supstratu za aciliranje [37]. Svrha ovog rada je ispitati K_2CO_3 kao bazni katalizator, te ferocenoil-klorid kao acilirajući reagens na iskorištenje i regioselektivnost reakcija. Ovaj rad je podijeljen u dva dijela pri čemu se prvi dio odnosi na sintezu supstrata za aciliranje, ferocenoil-klorida, 1'-metoksikarbonilferocen-klorida i ferocenoil-1,1'-diklorida, koji se zatim kopuliraju s nezaštićenom nukleobazom, uracilom i C-5 supstituiranim

derivatima uracila. U drugom dijelu su strukture sintetiziranih spojeva potvrđene korištenjem IR i NMR spektroskopije.

4.2. SINTEZA I SPEKTRALNA ANALIZA PREKURSORA

4.2.1. Ferocenkarboksilna kiselina (2)

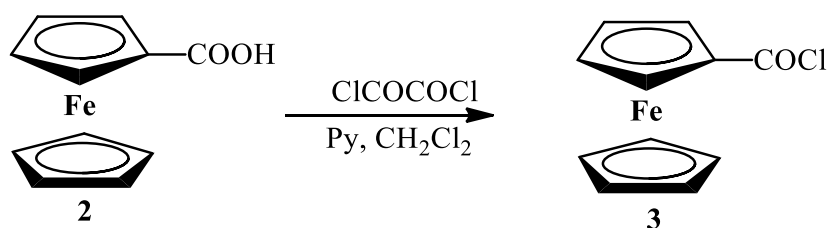
U reakciji ferocena s *N,N*-difenilkarbamoilkloridom u prisutnosti aluminijskog klorida nastaje *N,N*-difenilferocenkarboksamid (1) u iskorištenju od 60%. Za snimanje IR-i NMR spektra dio sirovog produkta pročišćen je tankoslojnom preparativnom kromatografijom. Hidrolizom *N,N*-difenilferocenkarboksamida (1) u etanolnoj otopini kalijeva hidroksida nastaje ferocenkarboksilna kiselina (2) uz iskorištenje od 80% (Slika 16) [38]. IR-spektar *N,N*-difenilferocenkarboksamida sadrži signale pri 1642 i 1594 cm^{-1} koji odgovaraju karbonilnoj skupini amida. U IR-spektaru ferocenkarboksilne kiseline (2) vidljiva je apsorpcijska vrpca pri 3089 cm^{-1} koja odgovara frekvenciji istežanja intermolekulskih vodikovih veza te vrpca pri 1676 cm^{-1} koja je karakteristična za karbonilnu skupinu.



Slika 16. Shema pripreme ferocenkarboksilne kiseline

4.2.2. Ferocenoil-klorid (3)

Priprava ferocenoil-klorida (3) provodi se reakcijom ferocenkarboksilne kiseline (2) s oksalil-kloridom i pirimidinom kao bazom u iskorištenju od 85 % (Slika 17).

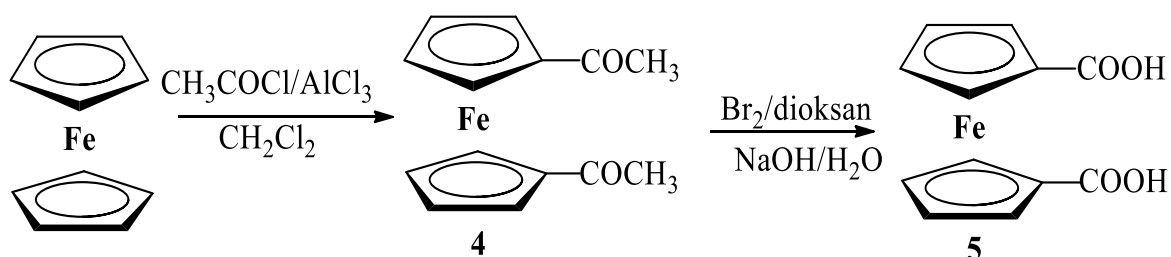


Slika 17. Shema pripreme ferocenoil-klorida

IR-spektar ferocenoil-klorida snimljen u diklormetanu pokazuje apsorpcijsku vrpcu pri 1755 cm^{-1} što ukazuje na prisutnost karbonilne skupine acil-klorida. ^1H NMR spektri potvrđuju supstituciju na jednom ciklopentadienilnom prstenu ferocena budući da su signali vidljivi u rasponu od δ 4.38 do 4.91 ppm i to kao jedan singlet i dva tripleta. ^{13}C NMR-spektar sadrži vrpcu karbonilnog ugljikovog atoma klorida pri δ 178.3 ppm i četiri vrpce ugljikovih atoma ferocena i to pri δ 73.3 ppm za kvaterni ugljikov atom, pri δ 71.7 ppm za ugljikove atome ne-supstituiranog prstena te također pri δ 71.2 i 70.4 ppm za C-atome supstituiranog prstena.

4.2.3. Ferocen-1,1'-dikarboksilna kiselina (5)

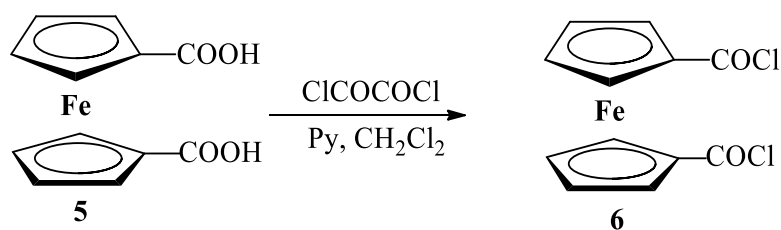
Prema postupcima opisanim u literaturi pripravljena je ferocen-1,1'-dikarboksilna kiselina (5) oksidacijom 1,1'-diacetilferocena (4) s bromom, dok je 1,1'-diacetilferocen pripremljen reakcijom Perrierovog kompleksa s ferocenom u iskorištenju od 88% (Slika 18).



Slika 18. Shema pripreme ferocen 1,1'-dikarboksilne kiseline

4.2.4. Ferocenoil-1,1'-diklorid (6)

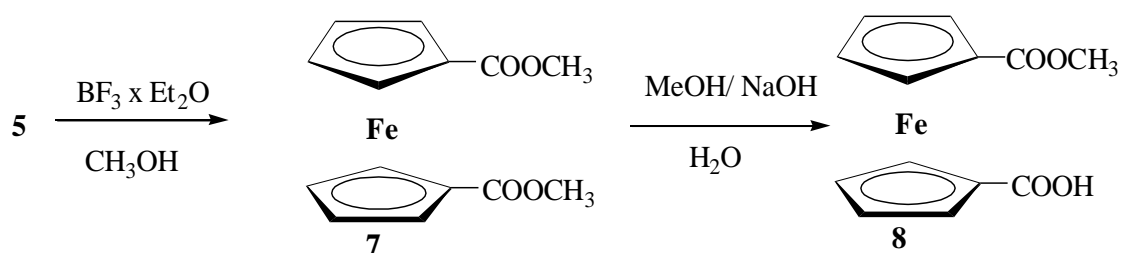
1,1'-Ferocenoil-diklorid (6) pripremljen je u reakciji ferocen-1,1'-dikarboksilne kiseline (5) i oksalilklorida u piridinu uz iskorištenje od 41% (Slika 19). IR-spektar 1,1'-ferocenoil-diklorida snimljen u diklormetanu pokazuje jaku apsorpcijsku vrpcu pri 1755 cm^{-1} što ukazuje na prisutnost karbonilne skupine acil-klorida.



Slika 19. Shema pripreme 1,1-ferocenoil diklorida

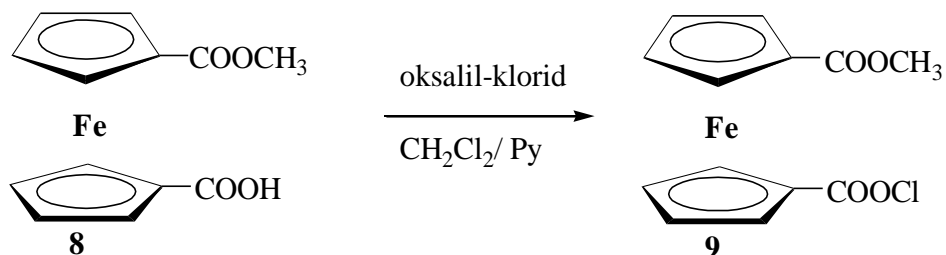
4.2.5. 1'-Metoksikarbonil-ferocenoil-klorid

Esterifikacijom dikiseline (5) te djelomičnom hidrolizom nastalog estera (7) dobiva se ester-kiselina (8) u 66%-tnom iskorištenju. Neizreagirani se supstrat (7) ponovno podvrgne istom postupku u cilju dobivanja ester-kiseline (8) u što boljem iskorištenju (Slika 20). Struktura dobivenih spojeva potvrđena je IR i NMR spektroskopijom.



Slika 20. Shema pripreme 1'-metoksikarbonilferocen-1-karboksilne kiseline

U nastavku je pripravljen ključni intermedijer, 1'-metoksi karbonilferocenoil klorid (9), u iskorištenju od 79% (Slika 21). Nastaje u reakciji ester-kiseline i oksalil-klorida u suhom diklormetanu uz prisustvo piridina, a nakon uparavanja sirovi produkt se pročišćava višestrukim zagrijavanjem u petroleteru te uparavanjem filtriranog produkta.



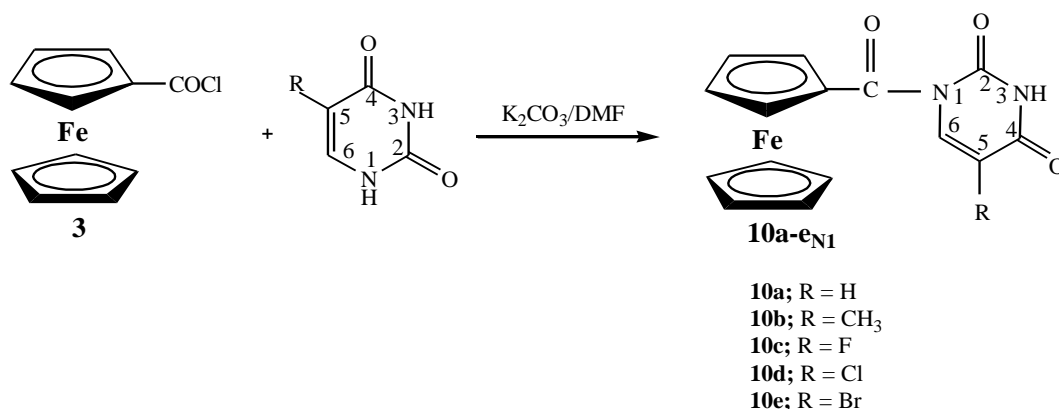
Slika 21. Shema pripreme 1'-metoksi karbonil-ferocenoil klorida

U IR spektru ester-klorida vidljiva je karakteristična vrpca za kiselinske kloride pri 1755 cm^{-1} i apsorpcijska vrpca pri 1715 cm^{-1} karakteristična za karbonilnu skupinu estera vezanog na 1'-ciklopentadienilni prsten ferocena.

4.3. SINTEZA I SPEKTRALNA ANALIZA FEROCENOIL URACILNIH DERIVATA

4.3.1. Sinteza ferocenoil-uracilnih derivata (**10a-e**)

Sljedeći dio istraživanja u ovom radu posvećen je pripravi ferocenoil-uracilnih derivata **10a-e**. U literaturi je opisana sinteza ferocetil uracila i ferocetil 5-floruracila uporabom natrij hidrida kao deprotonirajućeg reagensa pri čemu su dobiveni isključivo N1-izomeri ferocenoil supstituirane nukleobaze uracila. Kiselo protona na N1- i N3- položaju uracila i njegovih derivata je slična, te se na osnovi toga ne može objasniti uočena regioselektivnost reakcije. Za interpretaciju uočene regioselektivnosti korištena je NMR spektroskopija i kvantno – kemijski račun. Prijelazna stanja u reakciji aciliranja na N1-položaju znatno su stabilnija od odgovarajućih prijelaznih stanja za formiranje N3-izomera što upućuje na kinetičku kontrolu reakcije supstitucije na N1-položaju odnosno nastajanje N1-izomera [39]. U ovom radu pozornost je usmjerena na regioselektivnosti i prinosu reakcije upotrebom kalijeva karbonata kao deprotonirajućeg agensa, te produljenog vremena deprotekcije (Slika 22).



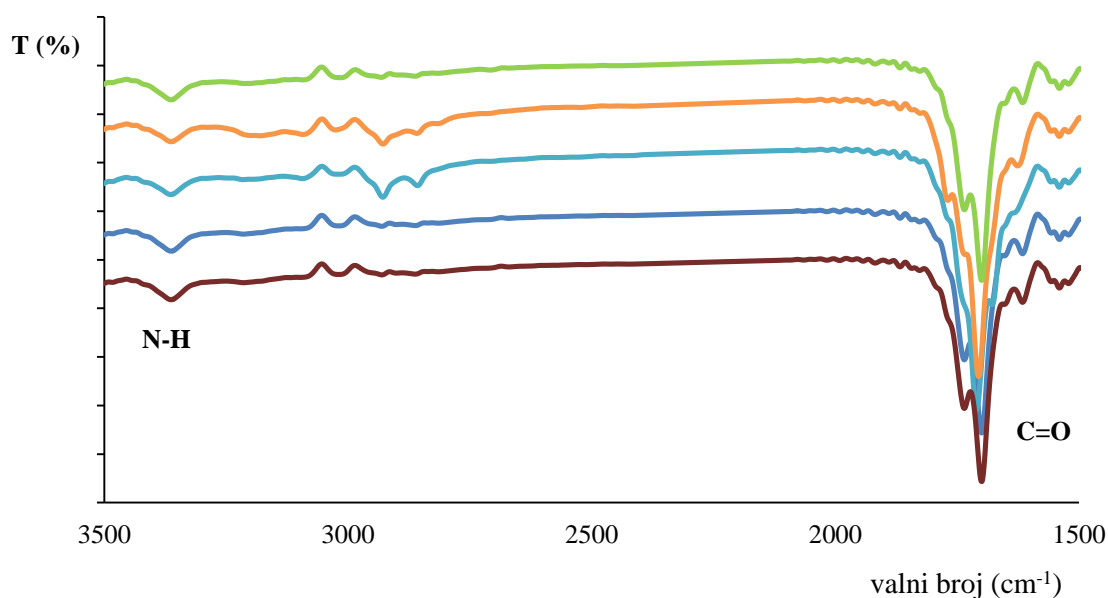
Slika 22. Shema priprave ferocenoil-uracilnih derivata (**10a-e**)

Prvi stupanj ove sinteze započinje deprotekcija purinske baze koja je provedena je s kalij karbonatom u dimetilformamidu kroz 60 minuta pri čemu nastaje kalijeva sol baze. Pripravljenoj kalijevoj soli nukleo baze dokapa se ferocetil-klorid uz mješanje, a tijekom

reakcije se prati tankoslojnom kromatografijom. Kalij iz soli je parcijalno pozitivan dok je dušik u ovom slučaju parcijalno negativan te će odvući elektrone iz veze više prema sebi što mu daje mogućnost da kao jak nukleofil napada ugljik acilne skupine dajući elektronski par za stvaranje nove veze. Kako ugljik može primiti samo 8 elektrona, veza sa klorom puca te klor kao dobra izlazeća skupina izlazi iz molekule zajedno sa elektronskim parom s kojim je bio vezan za C-atom. Izolacija željenog produkta je provedena na način da se reakcijska smjesa neutralizira dodatkom 10 % otopine limunske kiseline, te ekstrahira diklormetanom. Organski se sloj ispere vodom do neutralnog i upari na rotacijskom vakum-uparivaču do suha. Sirovi produkt se pročisti kromatografijom na koloni silikagela uz eluens diklormetan : aceton 10:1 te upari pri čemu su dobiveni kristali kopulata **10a-e** u iskorištenju 31-77%.

4.3.2 Strukturna karakterizacija ferocenoil-uracilnih derivata (**10a-e**)

U IR spektrima spojeva **10a-e** (Slika 23) zabilježene su apsorpcijske vrpce karakteristične za NH skupinu pri 3300 cm^{-1} te apsorpcijska vrpca oko 1710 cm^{-1} koje odgovaraju karbonilnim skupinama prisutnim u konačnim produktima. Odsutnost apsorpcijske vrpce pri 1755 cm^{-1} koja se prepisuje kiselinskom kloridu potvrđuje uspješnost provedene kopulacije.

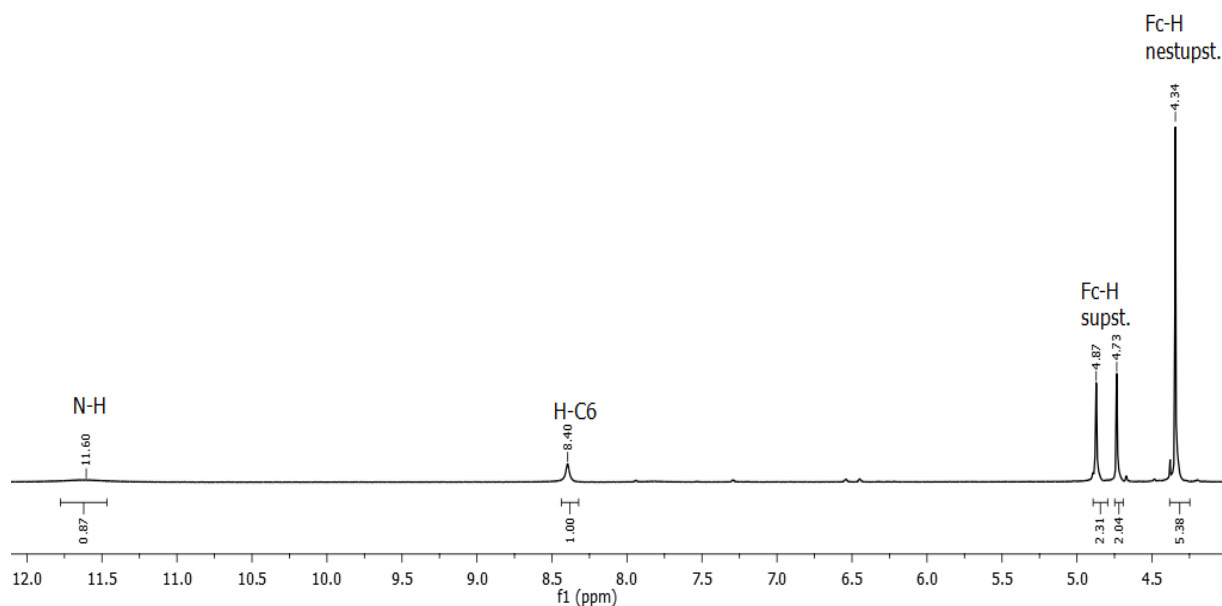


Slika 23. Dio IR spektra spojeva **10a-e**

U ^1H NMR spektrima ferocenoil-uracilnih derivata **10a-e** snimljenih u DMSO vidljiv je karakterističan kemijski signal $\sim \delta$ 11.7 ppm koji potvrđuje prisutnost protona amidne skupine i signal za proton pirimidinskog prstena (H-6) $\sim \delta$ 8.4 ppm. U ^1H NMR spektru derivata vidljivi su i kemijski pomaci karakteristični za monosupstituirani ferocen kemijski pomaci u području od δ 4.40 do 4.81 ppm pripisuju se CH skupinama supstituiranog Cp-prstena, dok pomak oko δ 4.31 ppm potvrđuje prisutnost 5H nesupstituiranog Cp-prstena (Tablica 1, Slika 24).

Tablica 1. Kemijski pomaci (δ /ppm) intezite signala u ^1H NMR za spojeve **10a-e**

Spoj	N3-H	H-C5	H-C6	Fc-H supst.	Fc-H nesupst.
10a	11.51 (1H, s)	5.73 (1H, d)	7.99 (1H, d)	4.84 (2H, pt) 4.74 (2H, pt)	4.32 (5H, s)
10b	11.98 (1H, s)	-	8.42 (1H, d)	4.89 (2H, pt) 4.72 (2H, pt)	4.34 (5H, s)
10c	12.02 (1H, s)	-	8.46 (1H, d)	4.90 (2H, pt) 4.75 (2H, pt)	4.35 (5H, s)
10d	11.63 (1H, s)	-	8.40 (1H, d)	4.87 (2H, pt) 4.73 (2H, pt)	4.38 (5H, s)
10e	11.67 (1H, s)	-	8.46 (1H, d)	4.88 (2H, pt) 4.77 (2H, pt)	4.37 (5H, s)

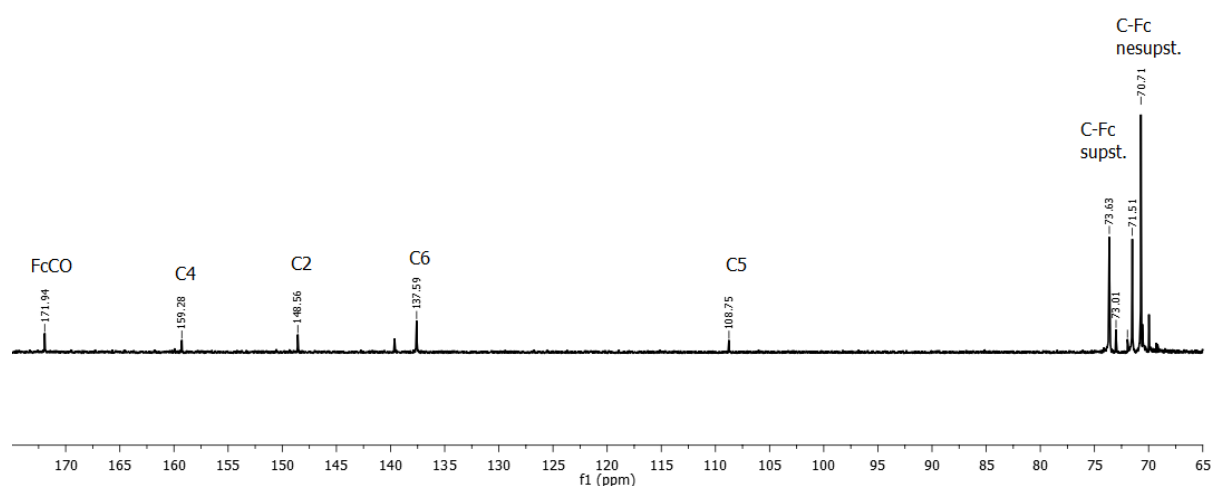


Slika 24. ^1H -NMR-spektar spoja **10c**

U ^{13}C NMR spektrima spojeva **10a-e** kemijski pomak oko δ 172 ppm se pripisuje karbonilnoj skupini prenosnice ferocenske i uracilne podjedinice, a signali oko δ 140 ppm C-6 ugljikovom atomu. Signal C-5 ugljikovog atoma uracila i njegovih derivata pomaknuti su u niže magnetsko polje od odgovarajućeg signala u početnoj strukturi nukleobaze. Ugljikovi atomi ferocenske podjedinice potvrđeni su kemijskim pomacima u području od δ 71.1 do 74.2 ppm za supstituirani Cp-prsten i oko δ 71 ppm za nesupstituirani Cp-prsten (Tablica 2, Slika 25).

Tablica 2. Kemijski pomaci (δ /ppm) u ^{13}C NMR za spojeve **10a-e**.

Spoj	Fc-CO	C-4	C-2	C-6	C-5	Fc-Cq	C-Fc supst.	C-Fc nesupst.
10a	173.58	163.86	149.88	141.33	102.9	71.05	74.11 71.21	71.15
10b	172.73	158.17	148.62	142.16	139.83	71.99	73.97 71.19	71.12
10c	171.94	159.28	148.56	139.63	108.75	71.96	73.63 71.51	71.51
10d	172.24	159.79	149.23	140.24	97.88	71.06	74.08 72.00	71.19
10e	172.47	161.32	149.62	144.89	72.50	71.83	74.14 71.97	71.18

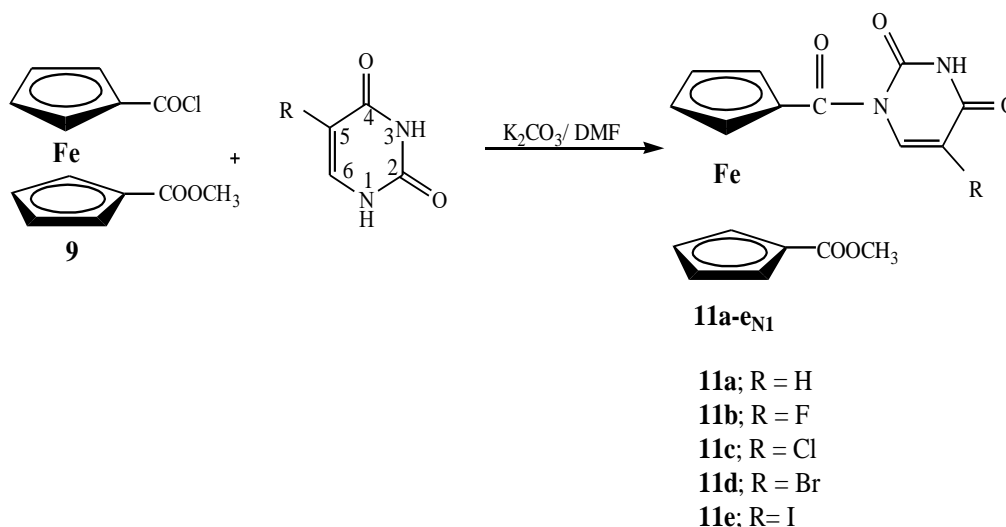


Slika 25. ^{13}C -spektar spoja **10c**

U ^{13}C NMR spektrima acil-supstituiranih baza uracila i timina kemijski pomak za ugljikov atom pirimidinske baze (C-5) se razlikuje ovisno o mjestu supstitucije na bazi [40]. Signal za taj ugljikov atom u supstituiranom derivatu pomiče se u niže polje za cca. 3 ppm u usporedbi s nesupstituiranom bazom ako se supstitucija odvija u položaju N1. No takva razlika u kemijskim pomacima nije uočena uvođenjem benzoila na N1-položaju [41]. Budući da je u spektrima ferocenoil uracilnih derivata **10a-e** kemijski pomak za taj ugljikov atom pomaknut u nižem polju za 3 ppm u odnosu na odgovarajući signal reaktanta može se zaključiti da je se ovim sintetskim postupkom dobiva isključivo N1-regioizomer bez uporabe zaštite N3-položaja baze uz kalijev karbonat kao deproteksijski reagens. U usporedbi s literaturnim podacima može se uočiti da produljeno vrijeme deprotekcije bazas 30 minuta na 60 minuta povećava prinos reakcije.

4.3.3. Sinteza 1'-metoksikarbonil-ferocnoil-uracilni derivati (**11a-e**)

Slijedeći dio istraživanja posvećen je kopulaciji klorid-estera (**9**) i nezaštićene pirimidinske baza pri čemu nastaju 1'-metoksikarbonil-ferocnoil-uracilni derivati (**11a-e**) u iskorištenju od 44 – 79 % (Slika 26).



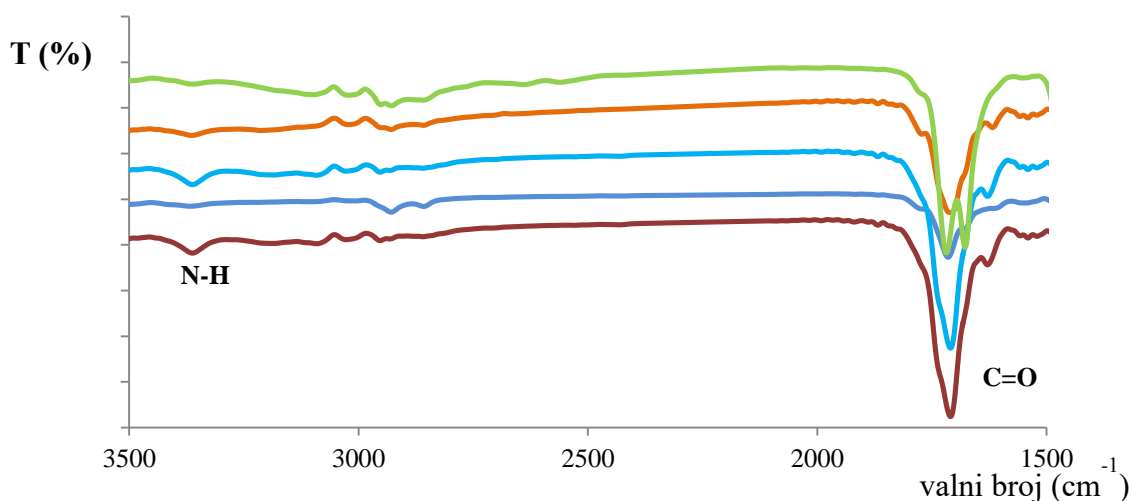
Slika 26. Priprava 1'-metoksikarbonil-ferocnoil-uracilnih derivata

Deprotekcija baze provedena je kalijevim karbonatom (K_2CO_3) u DMF-u tijekom 60 minuta pri čemu nastaje kalijeva sol baze, odnosno aktivirana nukleobaza. Slijedi kopulacija aktivirane nukleobaze i klorid-estera (**9**) tijekom 15 minuta uz jasnu promjenu boje iz crvene u tamnocrvenu. Reakcije je praćena tankoslojnom kromatografijom na silika gel pločama uz eluens diklormetan/acetone 10:1. Reakcijska smjesa prije pročišćavanja kolonskom

kromatografijom neutraliziran 10 % limunskom kiselinom, te ekstrahiran diklormetanom. Sirovi produkt se pročisti kromatografijom na koloni silikagela uz eluens diklormetan /aceton 10:1 te upari pri čemu su dobiveni crveni kristali kopulata **11a-e** u iskorištenju 44 - 79 %.

4.3.4. Strukturna karakterizacija 1'-metoksikarbonil-ferocnoil-uracilni derivati (11a-e)

U IR spektrima kopulata **11a-e** zabilježene su apsorpcijske vrpce koje odgovaraju isteznim frekvencijama NH-skupini pri 3370 cm^{-1} te apsorpcijska vrpca oko 1710 cm^{-1} koja je dokaz karbonilne skupine metilnog estera, karbonilne skupine koja je poveznice ferocena i baze i karbonilna amidnih skupina nukleobaze. Amidna skupina dodatno je dokazana apsorpcijskom vrpcom pri 1670 cm^{-1} (Slika 27).

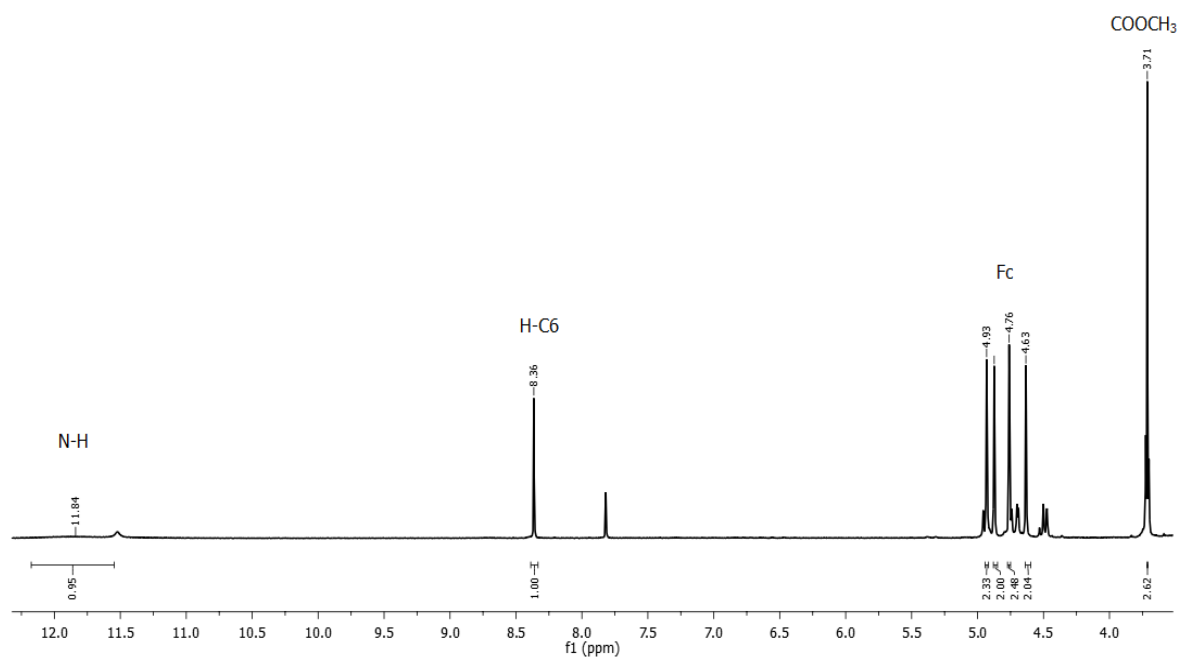


Slika 27. Dio IR spektra spojeva **11a-e**

U ^1H NMR spektru spojeva **11a-e** snimljenih u DMSO vidljiv je signal oko δ 11.5 ppm koji potvrđuje prisutnost protona nesupstituirane amidne skupine baze (N-3), signali u području od 7,99 do 8,46 ppm odgovara kemijskom pomaku protona na položaju C-6 pirimidinskog prstena te pri δ 5.73 ppm koji odgovara proton na položaju C-5 uracila. U ^1H NMR spektrima iz kemijskih je pomaka potvrđena prisutnost ferocenske podjedinice, signala u području od δ 4.90 do δ 4.60 ppm koja odgovaraju CH skupinama ciklopentadielnih prstena koji odgovaraju heteroanularno supstituiranom ferocenskom derivatu. U spektru je asigniran i jedan singlet pri δ 3.68 ppm koji se pripisuje metoksi skupini estera koja je vezana na 1'-prstenu ferocena (Tablica 3, Slika 28).

Tablica 3. Kemijski pomaci (δ /ppm) intezite signala u ^1H NMR za spojeve **11a-e**

Spoj	N3-H	H-C5	H-C6	Fc-H	OCH ₃
11a	11.51 (1H, s)	5.73 (1H, d)	7.99 (1H, d)	4.84 (2H, s) 4.74 (2H, s) 4.84 (2H, s) 4.74 (2H, s)	3.61 (3H, s)
11b	11.98 (1H, s)	-	8.42 (1H, d)	4.89 (2H, s) 4.72 (2H, s) 4.84 (2H, s) 4.74 (2H, s)	3.65 (3H, s)
11c	12.02 (1H, s)	-	8.46 (1H, d)	4.90 (2H, s) 4.75 (2H, s) 4.84 (2H, s) 4.74 (2H, s)	3.71 (3H, s)
11d	11.84 (1H, s)	-	8.36 (1H, d)	4.87 (2H, s) 4.73 (2H, s) 4.84 (2H, s) 4.74 (2H, s)	3.71 (3H, s)
11e	11.67 (1H, s)	-	8.46(1H, d)	4.88 (2H, s) 4.77 (2H, s) 4.84 (2H, s) 4.74 (2H, s)	3.61 (3H, s)

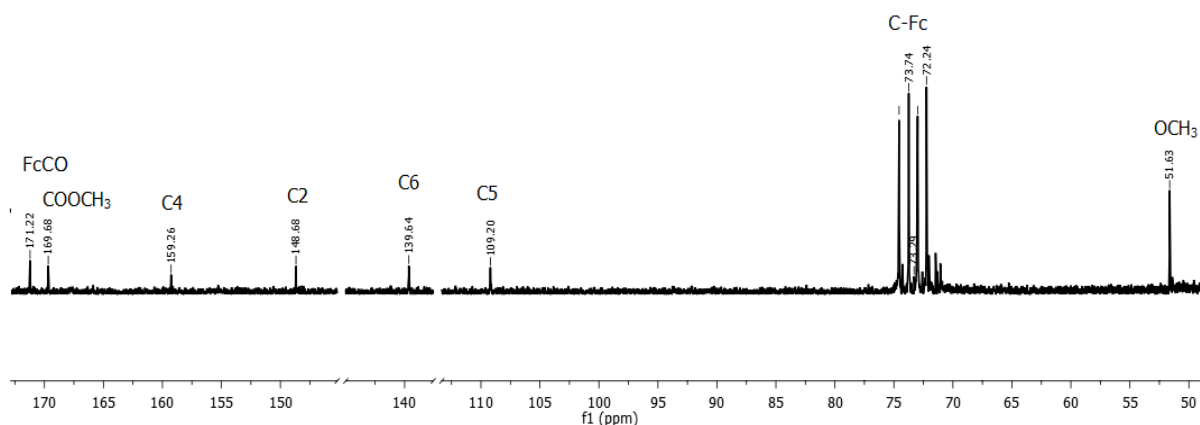


Slika 28. ^1H -NMR-spektar spoja **11d**

U ^{13}C NMR spektru spojeva **11a-e** vidljiv je signal pri δ 172.9 ppm koji se pripisuje ugljikovom atomu karbonilne skupine koji je poveznica ferocena i baze. Signal pri δ 164.5 i 149.9 ppm pripisani su karbonilnim ugljikovim atomima pirimidinskog prstena, a pri 136.63 i 110.9 ppm ugljikovim atomima uracilne podjedinice (C-5 i C-6). Ferocenskim ugljikovim atomima pripisani su kemijski pomaci pri δ 74.8 i 72.6 ppm. Metoksi skupina estera vezanog na 1'-prstenu ferocena potvrđen je signalom pri 52.1 ppm (Tablica 4, Slika 29).

Tablica 4. Kemijski pomaci (δ /ppm) u ^{13}C NMR za spojeve **11a-e**.

Spoj	Fc-CO	C-4	C-2	C-6	C-5	Fc-Cq	C-Fc	COOCH ₃
11a	173.58	163.86	149.88	141.33	102.9	71.05	74.11 71.21 74.11 71.21	52.10
11b	172.73	158.17	148.62	142.16	139.83	71.99	73.97 71.19 74.11 71.21	52.10
11c	171.94	159.28	148.56	139.63	108.75	71.96	73.63 71.51 74.11 71.21	52.10
11d	172.24	159.79	149.23	140.24	97.88	71.06	74.08 72.00 74.11 71.21	52.10
11e	172.47	161.32	149.62	144.89	72.50	71.83	74.14 71.97 74.11 71.21	52.10

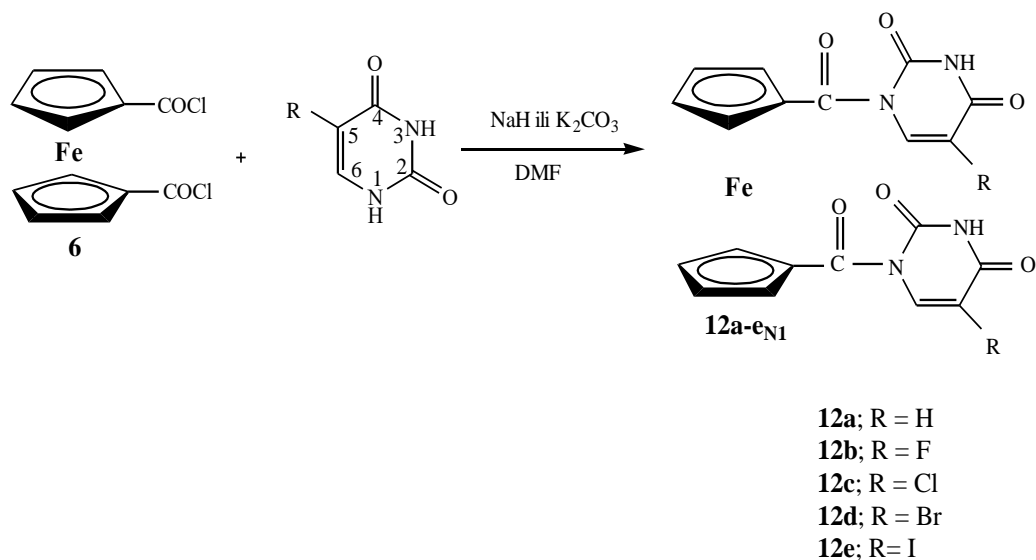


Slika 29. ^{13}C NMR-spektar ferocenoil-5-joduracila (**11d**)

Temeljem provedene reakcije kopulacije ester-klorida (**9**) i nezaštićene nukleobaze uz K_2CO_3 , kao deprotektivnog sredstva, i DMF kao otapala, te provedene spektralne analize svih dobivenih produkata može se uočiti nastajanje isključivo samo jedan N1-regioizomer bez uporabe zaštite N3 položaja baze. Također se može zaključiti da s povećanjem veličine supstituenta na C-5 položaju uracila povećava se i prinos nastalog produkta.

4.3.5. Sinteza ferocenoil-1,1'-bisuracilni derivati (12a-e)

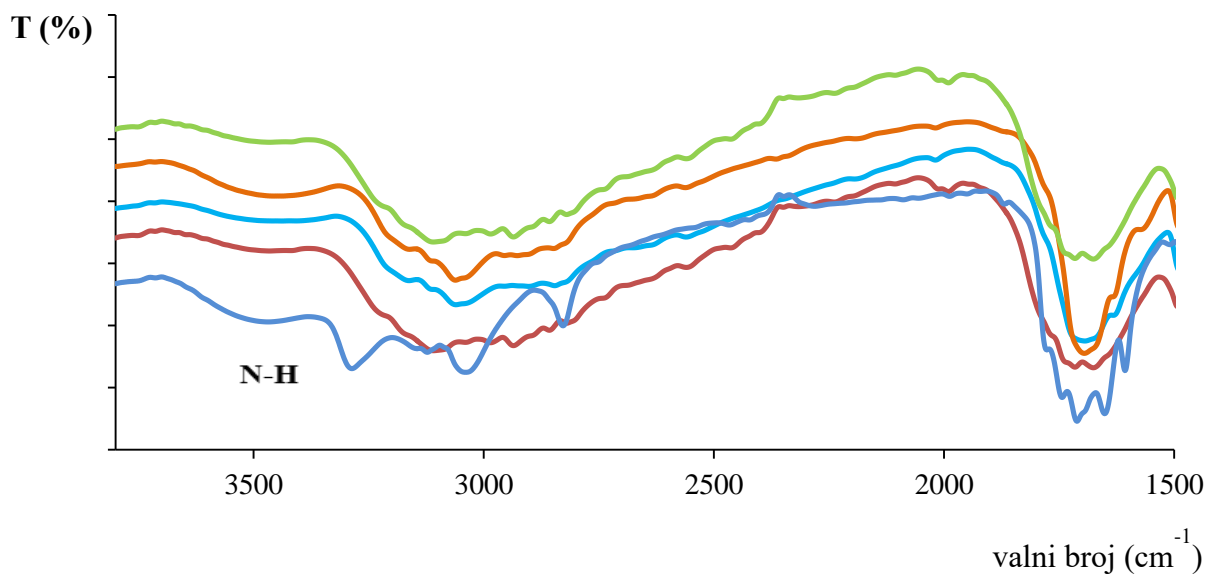
Ferocenoil-1,1'-bisuracilni derivati (**12a-e**) pripremljen je u reakciji uracila i njegovih derivata s ferocenoil-1,1'-dikloridom (**6**) (Slika 30). Reakcija se provodi u bezvodnim uvjetima u otapalu dimetilformamidu in situ nakon deprotoniranja baze s kalij karbonatom pri čemu dolazi do taloženja crvenih kristala u reakcijskoj smjesi. Zbog slabe topljivosti nastalog produkta sirovi produkt je odsisan i ispran organskim otapalima diklormetanom, etil-acetatom i acetonitrilom. Sirovi produkt također je ispiran i vodom kako bi se uklonili zaostale soli, kalijev karbonat i nastali kalijev klorid pri čemu je uočeno otapanje produkta i promjena boje otopine u žuto što ukazuje na razgradnju nastalog kopulata. Zbog gore navedeno kao deprotonirajuće sredstvo u ovim reakcijama aciliranja kao bazni katalizator koristi se natrijev hidrid budući da u reakciji kopulacije kao nusprodukt nastaje natrij klorid koji je za razliku od kalijevog klorida topljiv u nekim organskim otapalima te je na taj način uklonjen iz produkta.



Slika 30. Shema pripreme ferocenoil-1,1'-diuracilnih derivata (**12a-e**)

4.3.6. Strukturna karakterizacija ferocenoil-1,1'-bisuracilnih derivata (**12a-e**)

Struktura ferocenoil-1,1'-bisuracilni derivati (**12a-e**) potvrđena je IR i NMR spektroskopijom. U IR spektru snimljenom u KBr-u, vidljiva je apsorpcijska vrpca oko 3460 i 3300 cm^{-1} koja se pripisuje slobodnoj i asociranoj asociranoj amidnoj (NH) skupini na N3-poziciji, te su vidljive i apsorpcijske vrpce jakog intenziteta pri 1695, 1659 i 1630 cm^{-1} koje odgovaraju karbonilnoj skupini premosnice ferocena i baze i amidnim karbonilnim skupinama baze (Slika 31).

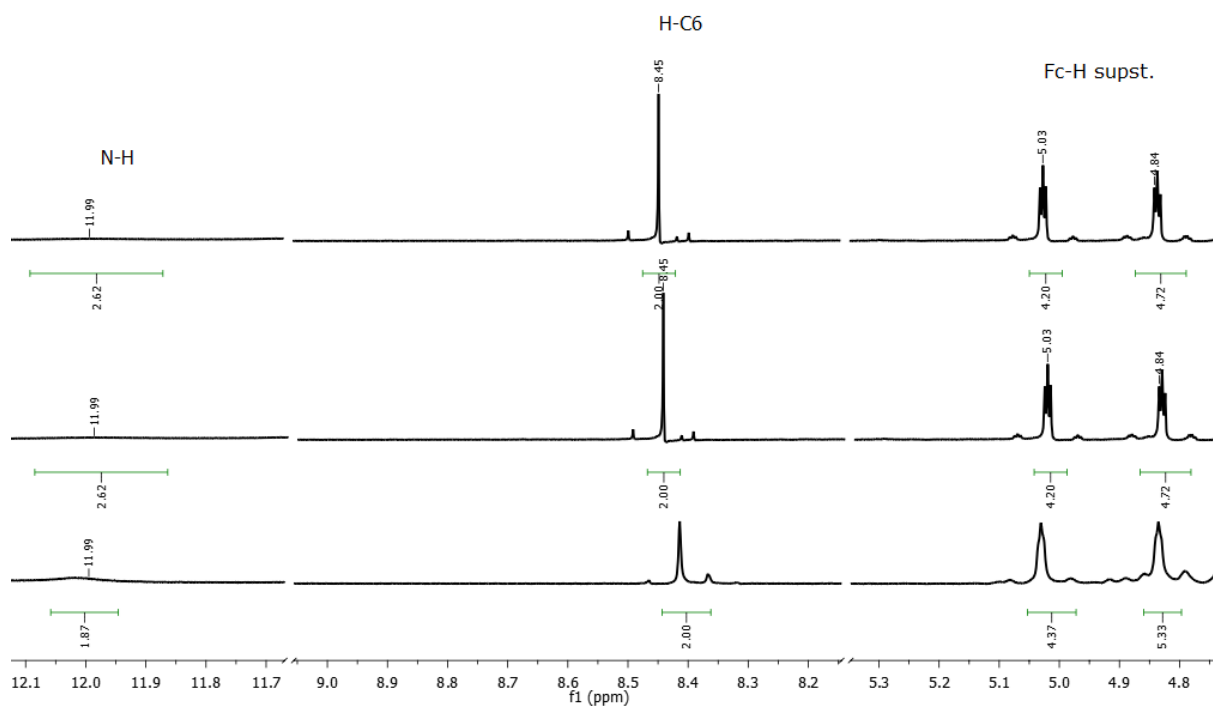


Slika 31. Dio IR spektra spojeva **12a-e**

Zbog slabe topljivosti i nestabilnosti kopulata **12a-e**, što je uočeno naglom promjenom boje otapanjem u DMSO-d₆, snimljen je samo ¹H NMR-spektar. U spektrima su vidljivi kemijski pomaci pri δ 8.40 ppm koji se pripisuju protonu na C-6 položaju i kod kopulata **12a** pri δ 5.75 ppm koji se pripisuje protonu na C-5 položaju pirimidinskog prstena. Dva singleta oko δ 4.80 i 5.00 ppm pripisuju se protonima ciklopentadienilnih prstena ferocena, a dokaz su supstitucije nukleobaze na oba ciklopentadienilna prstena ferocena. U ¹H NMR spektrima vidljiv su dodatni set kemijskih pomaka u području signala pirimidinske baze što ukazuje da je u kopulatima prisutna i neizreagirana baza (Tablica 5, Slika 32).

Tablica 5. Kemijski pomaci (δ/ppm) intezite signala u ¹H NMR za spojeve **12a-e**

Spoj	N3-H	H-C5	H-C6	Fc-H
12a	(2H, s)	5.75 (2H, s)	(2H, s)	5.03 (4H, s) 4.84 (4H, s)
12b	12.24 (2H, s)		8.41(2H, s)	5.03 (4H, s) 4.84 (4H, s)
12c	12.24 (2H, s)		8.41 (2H, s)	5.03 (4H, s) 4.84 (4H, s)
12d	11.94 (2H, s)		8.42 (2H, s)	5.02 (4H, s) 4.83 (4H, s)
12e	11.80 (2H, s)		8.38 (2H, s)	4.99 (4H, s) 4.82 (4H, s)



Slika 32. ¹H-NMR-spektar spojeva **12c-e**

Na temelju provedene spektralne analize može se potvrditi nastajanje ferocenoil-1,1'-bisuracilni derivati (**12a-e**) u ovim reakcijama kopulacije. Također može se zaključiti da je na svakom ferocenska prstenu vezana nukleobaza. Samo iskorištenje reakcije nije svrsishodno komentirati budući da je iz spektralne analize evidentno prisustvo neizreagirane nukleobaze u konačnom produktu.

5. ZAKLJUČCI

- Višestupanjskom sintezom pripremljeni su intermedijeri ferocenoil-klorid (**3**), ferocenoil-1,1'-diklorid (**6**) i 1'-metoksikarbonilferocen-klorid (**9**) koji se reakcijom s uracilom i 5-supstituiranim derivatima uracila prevedeni u homo- i heteroanularno supstituirane biokonjugate ferocena **10-12**
- Na osnovu provedenih istraživanja može se zaključiti da produljeno vrijeme deprotekcije nukleobaze povećava prinos produkata **10 i 11**.
- Strukture dobivenih produkata potvrđene su IR i NMR spektroskopijom. Na osnovu kemijskih pomaka u ^1H i ^{13}C NMR spektrima spojeva **10 i 11** potvrđena je supstitucija pirimidinske baze na jednom ciklopentadielnom prstenu ferocena, a na temelju ^1H NMR spektara spojeva **12** potvrđena je supstitucija pirimidinske baze na oba prstena ferocena.
- Kemijski pomak oko δ 172 ppm u ^{13}C NMR spektru spojeva **10 i 11** te apsorpcijske vrpce jakog inteziteta u području oko 1670 cm^{-1} IR spektrima svih spojeva potvrđuje prisutnost karbonilnog ugljikovog atoma smještenog između ferocena i baze.
- Povezivanje ferocenske podjedinice na *N*-atom pirimidinskog prstena u položaju N1 u produktima **10-12** dokazano je ^{13}C NMR spektroskopijom te se može zaključiti da se ovim sintetskim postupkom dobiva isključivo N1-regioizomer bez uporabe zaštite N3 položaja baze.

6. LITERATURA

1. Moriuchi T., Hirao T. (2004) Highly ordered structures of peptides by using molecular scaffolds, *Chem. Soc. Rev.* **33**, 294.
2. Blewett, S., McGuigan, C., Barucki, H., Andrei, G., Snoeck, R., De Clerq, E., Balzarini, J. (2001) Bicyclic furo pyrimidine nucleosides with aryloxyphenyl and halophenyl substituted side chains as potent and selective varicella-zoster virus inhibitors. *Nucleosides, Nucleotides Nucleic Acids* **20**, 1063-1066.
3. Matei, A., Constantinescu, C., Ion, V., Mitu, B., Ionita, I., Dinescu, M., Vasiliu, C., Emandi, A. (2014) Ferrocene, an old molecule with a bright future: Thin films grown by matrix-assisted pulsed laser evaporation for nonlinear optical applications. *J. Organomet. Chem.* **751**, 638-643.
4. Bhatt, V., (2015) *Essentials of Coordination Chemistry*, 1. izd., Academic Press, Cambridge
5. Lide, D., R., (2005) *CRC Handbook of Chemistry and Physics*, 86. izd. Taylor and Francis, Boca Raton
6. Werner, H. (2012) At Least 60 Years of Ferrocene: The Discovery and Rediscovery of the Sandwich Complexes. *Angew. Chem. Int. Edit.* **51**, 6052-6058.
7. Sansook, S. (2017) Biological evaluation of ferrocene derivatives. Doctoral thesis (PhD), University of Sussex.
8. Rapić, V., Čakić Semenčić, M. (2011) I. Organometalna i bioorganometalna kemija – ferocen i metalni karbonili. *Kem. Ind.* **60**, 61-79.
9. Sikirica, M., Korpar-Čolig, B. (2004) *Organska kemija* 4. Izd. Školska knjiga, Zagreb
10. Berg, J.M., Tymoczko, J.L., Stryer, L. (2002) *Biochemistry*, W. H. Freeman and Company.
11. Mishra, R., Tomar, I. (2011) Pyrimidine: The molecule of diverse biological and medicinal importance. *Int. J. Pharm. Sci. Res.* **2**, 758.
12. Somerville, R. L. (2001) Pyrimidine. *Encyclopedia of Genetics*, (Brenner, S., Miller J. H. ured.), Academic Press, Cambridge, str. 1586.
13. Mohana, K. N., Kumar, B. N. P., Lingappa, M. (2013) Synthesis and biological activity of some pyrimidine derivatives. *Drug Invent. Today.* **5**, 216-222.
14. Somerville, R. L. (2001) Uracil. *Encyclopedia of Genetics*, (Brenner, S., Miller J. H. ured.), Academic Press, Cambridge, str. 2100-2101.

15. Nelson, D. L., Cox, M. M. (2012) *Lehninger Principles of Biochemistry*, 6. Izd., Macmillan Learning
16. Oladipo M. A., Isola, K. T. (2013) Coordination Possibility of Uracil and Applications of Some of Its Complexes: A Review. *Res. J. Pharm. Biol. Chem. Sci.* **4**, 386-394.
17. Palasz, A., Cież, D. (2015) In search of uracil derivatives as bioactive agents. Uracils and fused uracils: Synthesis, biological activity and applications. *Eur. J. Med. Chem.* **97**, 582-611.
18. Lindahl, T. (1993) Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature.* **297**, 39-51.
19. Morris, S. M. (1993) The genetic toxicology of 5-fluoropyrimidines and 5-chlorouracil. *Mutat. Res.* **362**, 709-715.
20. Longley, D. B., Harkin, D. P., Johnston, P.G. (2003) 5-Fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nat. Rev. Cancer.* **3**, 330-338.
21. Abdrakhimova, G. S., Ovchinnikov, M. Y., Lobov, A. N., Spirikhin, L. V., Khursan, S. L., Ivanov, S. P. (2018) 5-Chlorouracil and 5-bromouracil acid-base equilibrium study in water and DMSO by NMR spectroscopy. *J. Mol. Struct.* **1158**, 51-56.
22. Jiang, Q., Blount, B. C., Ames, B. M. (2003) 5-Chlorouracil, a marker of DNA damage from hypochlorous acid during inflammation. A gas chromatography-mass spectrometry assay. *J. Biol. Chem.* **278**, 32834-32840.
23. Griffiths, A. J. F., Wessler, S. R., Lewontin, R. C., Gelbart, W. M., Suzuki, D. T., Miller, J. H. (2005) *An Introduction to Genetic Analysis*. (8.izd) W. H. Freeman and Company
24. Byrd, D. M., Prusoff, W. H. (1975) Multiplicity reactivation of 5 iodouracil substituted, nonviable bacteriophage T4td8. *Antimicrob. Agents. Ch.* **8**, 558-563.
25. Dai, X., Song, D., Liu, K., Su, H. (2017) Photoinduced C—I bond homolysis of 5-iodouracil: A singlet predissociation pathway. *J. Chem. Phys.* **146**
26. Jordheim, L. P., Durantel, D., Zaulim, F., Dumontet, C. (2013) Advances in the development of nucleoside and nucleotide analogues for cancer and viral diseases. *Nat.Rev. Drug. Discov.* **12**, 447-464.
27. Galmarini, C. M., Mackey, J. R., Dumontet, C. (2002) Nucleoside analogues and nucleobases in cancer treatment. *Lancet Oncol.* **3**, 415-424.
28. Chemistry world (2018) Bromodeoxyuridine,
<<https://www.chemistryworld.com/podcasts/bromodeoxyuridine/2500026.article>>.
Pristupljeno 5. rujna 2018.

29. Havaić, V., Djaković, S., Lapić, J., Weitner, T., Šakić, D., Vrček, V. (2017) Reduction Potential of Ferrocenoyl-Substituted Nucleobases. Experimental and Computational Study. *Croat. Chem. Acta.* **90**, 589-594.
30. Singh, P., Menrad-Moyon, C., Kumar, J., Fabre, B., Verma, S., Bianco, A. (2012) *Carbon.* **50**, 3170-3177.
31. Chen, S. C. (1980) The syntheses and mass spectra of some N-substituted ferrocenylmethyl adenines. *J. Organomet. Chem.* **202**, 183-189.
32. De Champdore, M.; Di Fabio G.; Messere, A.; Montesarchio, D.; Piccialli, G.; Loddo, R.; La Colla, M.; La Colla, P. *Tetrahedron.*,**60** (2004) 6555–6563.
33. Kowalski, K., Koceva-Chyla, A., Pieniazek, A., Bernasinska, J., Skiba, J., Rybarczyk-Pirek, A. J., Jozwiak, Z. (2012) The synthesis, structure, electrochemistry and in vitro anticancer activity studies of ferrocenyl-thymine conjugates. *J. Organomet. Chem.***700**, 58-68.
34. Rosemeyer, H. (2004) The chemodiversity of purine as a constituent of natural products. *Chem. Biodivers.* **1**, 361.
35. Patwa, A.N., Gupta, S., Gonnade, R.G., Kumar, V.A., Bhadbhade, M.M., Ganesh, K.N. (2008) Ferrocene-linked thymine/uracil conjugates: Base pairing directed self-assembly and supramolecular packing. *J. Org. Chem.* **73**, 1508-1515.
36. Kowalski, K., Skiba, J., Oehninger, L., Ott, I., Solecka, J., Rajnisz, A., Therrien, B. (2013) Metallocene-modified uracils: Synthesis, structure, and biological activity. *Organometallics.* **32**, 5766-5773.
37. 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.
38. Sonoda, A., Moritani, I. J. (1971) The synthesis of [3]-ferrocenophan-2-one tosylhydrazone and the thermal decomposition of its sodium salt. *Organometall. Chem.* **26**, 133.
39. Rad MNS, Behrouz, S., Asrari, Z., Khalafi-Nezhad, A. (2014) A simple and regioselective one-pot procedure for the direct N-acylation of some purine and pyrimidine nucleobases via carboxylic acids using cyanuric chloride. *Monatsh. Chem.* **145**, 1933-1940.

40. Fox, J. M., Dimitrenko, O., Liao, L., Bach, R. D. (2004) Computational studies of nucleophilic substitution at carbonyl carbon: the SN2 mechanism versus the tetrahedral intermediate in organic synthesis. *J. Org. Chem.* **69**, 7317-7328.
41. Cruickshank, K. A., Jiricny, J., Reese, C. B. (1984) The benzylation of uracil and thymine. *Tetrahedron Letters.* **25**, 681-684.

IZJAVA O IZVORNOSTI

Izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristila drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Ana Marić