

Priprava merkaptopurinskih biokonjugata ferocena

Komarec, Klara

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:159:712967>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-14**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Sveučilišni prijediplomski studij Biotehnologija

Klara Komarec
0058218539

Priprava merkaptopurinskih biokonjugata ferocena

ZAVRŠNI RAD

Predmet: Organska kemija

Mentor: izv. prof. dr. sc. Jasmina Lapić

Zagreb, 2023.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Sveučilišni prijediplomski studij Biotehnologija

Zavod za kemiju i biokemiju

Laboratorij za organsku kemiju

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Biotehnologija

Priprava merkaptopurinskih biokonjugata ferocena

Klara Komarec, 0058218539

Sažetak: Organometalni derivati nukleobaza (OrDeN-i) nova su generacija konjugata u kojima su povezani metaloceni s temeljnim strukturnim elementima nasljeđivanja. Reakcijom između ferocenoil klorida i purinskih nukleobaza pripravljeno je niz konjugata s karbonilnom poveznicom između heterocikličkog i organometalnog djela u kojem je omjer produkta (*N7/N9*-ferocenoil izomera) reguliran prostornim svojstvima supstituenta na *C6* položaju. U okviru ovog završnog rada pripremljeni su merkaptopurinski biokonjugati ferocena. Aciliranje se provodi s ferocenoil kloridom, u acetonitrilu uz trietilamin kao deprotonirajući agens pri čemu u reakciji s merkaptopurinom nastaje uz monoderivat *N7* i bisderivat *N9/C6*, dok je reakcija s 6-metilmerkaptopurinom regiospecifična reakcija pri čemu nastaje samo *N9* produkt. Strukture svih sintetiziranih spojeva karakterizirane su spektrometrijskim tehnikama: NMR i IR spektroskopijom za točnu identifikaciju svakog izomera.

Ključne riječi: 6-merkaptopurin, ferocenoil klorid, regioselektivnost, NMR spektroskopija

Rad sadrži: 30 stranica, 15 slika, 3 tablice, 7 shema, 27 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. Jasmina Lapić

Datum obrane: rujan, 2023.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Undergraduate thesis

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

Department of chemistry and biochemistry
Laboratory for organic chemistry

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Biotechnology

Preparation of ferrocene mercaptopurine bioconjugates

Klara Komarec, 0058218539

Abstract: Organometallic derivatives of nucleobases (OrDeNs) are a new generation of conjugates in which metallocenes are connected to the basic structural elements of inheritance. The reaction between ferrocenoyl chloride and purine nucleobases prepared a series of conjugates with a carbonyl link between a heterocyclic and an organometallic part, in which the product ratio (*N7/N9*-ferrocenoyl isomer) is regulated by the spatial properties of the substituent at the *C6* position. As part of this final work, mercaptopurine bioconjugates of ferrocene were prepared. Acylation is carried out with ferrocenoyl chloride, in acetonitrile with triethylamine as a deprotonating agent, whereby in the reaction with mercaptopurine, the monoderivative *N7* isomer and the bis derivative *N9/C6* are formed, while the reaction with 6-methylmercaptopurine is a regiospecific reaction in which only the *N9* product is formed. The structures of all synthesized compounds were characterized by spectrometric techniques: NMR and IR spectroscopy for accurate identification of each isomer.

Keywords: 6-mercaptopurine, ferrocenoyl chloride, regioselectivity, NMR spectroscopy

Thesis contains: 30 pages, 15 figures, 3 tables, 7 schemes, 27 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: Jasmina Lapić, PhD, Associate Professor

Thesis defended: September, 2023

Sadržaj

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. NUKLEOZIDI I NJHOVI DERIVATI	2
2.2. PURINSKE BAZE	4
2.2.1. TIOPURINI.....	4
2.3. FEROCEN.....	5
2.4. FEROCENSKI NUKLEOZIDI.....	6
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	9
3.1. MATERIJALI.....	9
3.2. METODE	10
3.3. SCHEME PRIPRAVE KOPULATA FEROCENA	11
3.4. PROTOKOLI ZA PRIPRAVU SPOJEVA.....	12
3.4.1. 2-KLORBENZOIL FEROCEN (1).....	12
3.4.2. FEROCENKARBOKSILNA KISELINA (2).....	12
3.4.3. FEROCENOIL KLORID (3)	12
3.4.4. MERKAPTOURINSKI BIKONJUGATI FEROCENA (4A, 4B I 5A).....	13
4. REZULTATI I RASPRAVA	15
4.1. UVOD	15
4.1.1. FEROCENKARBOKSILNA KISELINA (2).....	16
4.1.2. FEROCENOIL KLORID (3)	16
4.1.3. MERKAPTOPURINSKI BIKONJUGATI FEROCENA (4A, 4B I 5A).....	17
4.2. STRUKTURNA KARAKTERIZACIJA FEROCENOIL- PURINSKIH DERIVATA (4A, 4B I 5A) IR I NMR SPEKTROSKOPIJOM	19

4.2.1.	IR SPEKTROSKOPIJA	19
4.2.2.	NMR SPEKTROSKOPIJA	21
5.	ZAKLJUČCI.....	27
6.	POPIS LITERATURE	28

1. UVOD

Ovaj završni rad uklapa se u istraživanje na području organometalnih derivata nukleobaza (OrDeN-a), a izvodi se u Laboratoriju za organsku kemiju Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta u Zagrebu.

Organometalni derivati nukleobaza (OrDeN-i) nova su generacija konjugata u kojima su povezani metaloceni s temeljnim strukturnim elementima nasljeđivanja. Zbog elektrofornih i bioaktivnih svojstava, OrDeN-i nalaze primjenu u (bio)analitičkoj i medicinskoj kemiji (Chellan i Sadler, 2020). U prethodnim istraživanjima pripravljeno je niz derivata ferocenoil-purina pri čemu je uočeno da uz reakcijske uvjete, supstituenti na egzocikličkoj amino skupini adenina utječu na reaktivnost purinskog aniona i upravljaju regioselektivnošću reakcije ferocenoiliranja (*N7*- u odnosu na *N9*- produkt). Upotrebom odgovarajućeg supstituenta na položaju *C6* u purinskom prstenu, može se podesiti omjer izomernog produkta, tj. može se utjecati na regioselektivnost reakcije ferocenoiliranja. Dok je *N9*-položaj purinskog prstena tipično mjesto supstitucije, *N7*-položaj može biti poželjan u nekim situacijama (Toma i sur., 2022b).

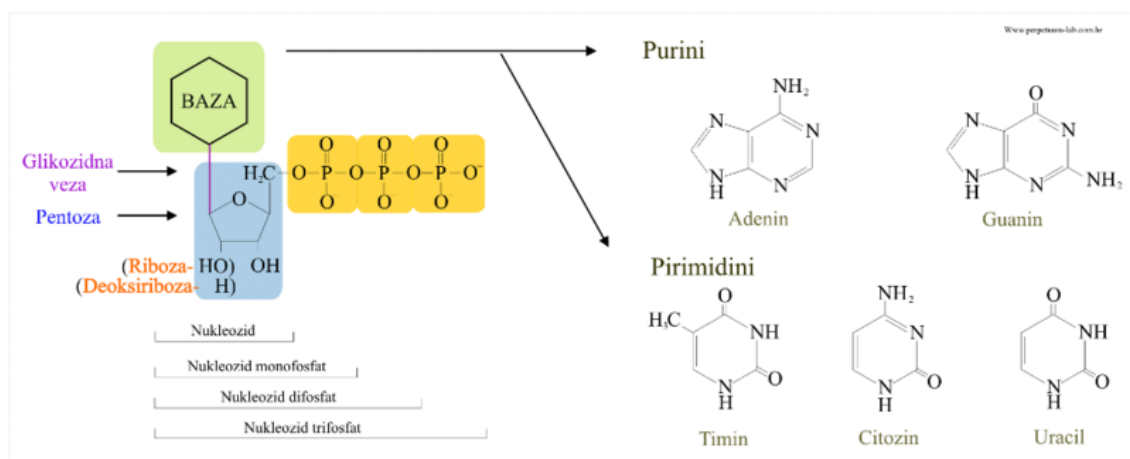
Cilj ovog završnog rada je priprava i spektroskopska karakterizacija produkata reakcije ferocenoil klorida sa 6-merkaptopurinom i 6-metilmerkaptopurinom. Također, u ovom radu ćemo se usredotočiti na ispitivanje reakcijskih uvjeta, acetonitrila kao otapala i trietilamina kao deprotonirajućeg agensa te molarnog udjela ferocenoil klorida na iskorištenje i regioselektivnost reakcije. Za karakterizaciju strukture nastalih kopulata koristit će se IR, ^1H i ^{13}C NMR spektroskopija.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Nukleozidi i njihovi derivati

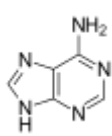
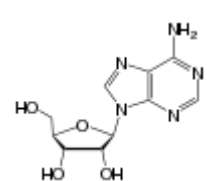
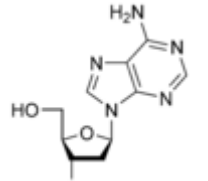
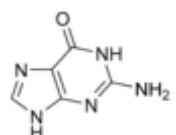
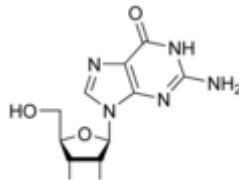
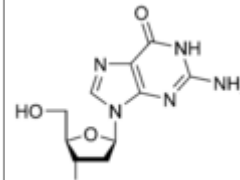
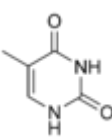
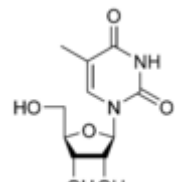
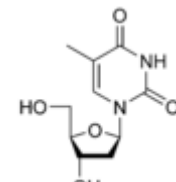
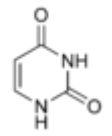
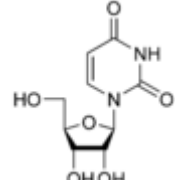
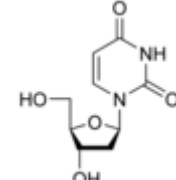
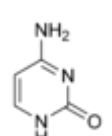
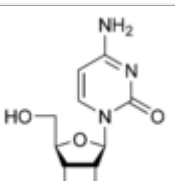
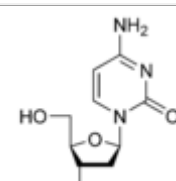
Nukleozidi su organski spojevi koji nastaju spajanjem purinskih (adenin i guanin) ili pirimidinskih (timin, citozin i uracil) baza sa šećerima (riboza i deoksiriboza) putem N-glikozidne veze (slika 1). Nukleozidi pojedinih baza prikazani su u tablici 1.

Nukleozidi se u stanicama prevode u fosfatne derivate pomoću enzima nukleozid-monofosfat-kinaze ili nukleozid-difosfat-kinaze te tako nastaju nukleotidi. Nukleotidi u organizmu služe kao osnovne građevne jedinice nukleinskih kiselina, glavni neposredni izvori slobodne energije (hidrolizom fosfoanhidridnih veza oslobađa se velika količina energije) te kao nosači aktivnih grupa u biokemijskim reakcijama. (Berg i sur., 2013)



Slika 1. Struktura nukleozida, nukleotida i dušičnih baza (Wikipedia)

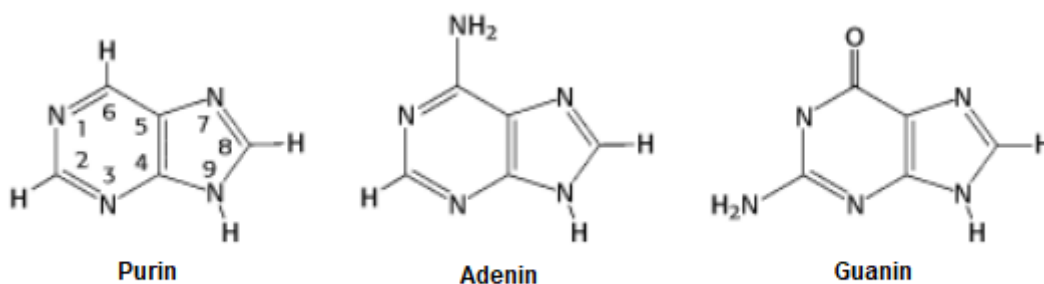
Tablica 1. Prikaz nukleozida i deoksinukleozida pojedinih baza (Wikipedia)

Dušična baza	Nukleozid	Deoksinukleozid
 <p>Adenin</p>	 <p>Adenozin A</p>	 <p>Dezoksiadenozin dA</p>
 <p>Guanin</p>	 <p>Guanozin G</p>	 <p>Dezoksiguanozin dG</p>
 <p>Timin</p>	 <p>5'-Metiluridin m⁵U</p>	 <p>Timidin dT</p>
 <p>Uracil</p>	 <p>Uridin U</p>	 <p>Dezoksiuridin dU</p>
 <p>Citozin</p>	 <p>Citidin C</p>	 <p>Dezoksicitidin dC</p>

2.2. Purinske baze

Purini su heterociklički spojevi sastavljeni od pirimidinskog prstena spojenog s imidazolnim prstenom (slika 2). U svojoj strukturi sadrže 4 atoma dušika.

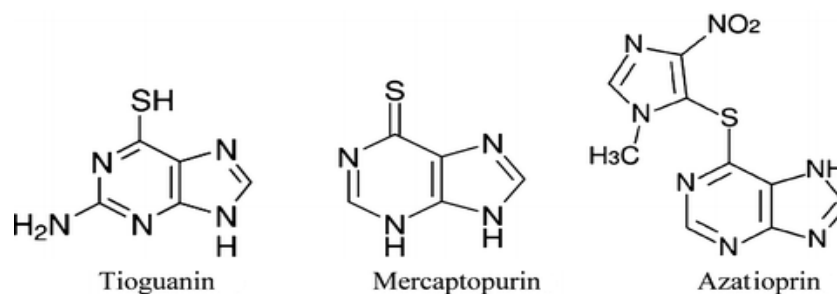
U nukleinskim kiselinama javljaju se dvije baze koje su derivati purina: adenin i guanin. Sa komplementarnim pirimidinskim bazama timinom i citozinom tvore vodikove veze. (Berg i sur., 2013)



Slika 2. Purinske baze

2.2.1. Tiopurini

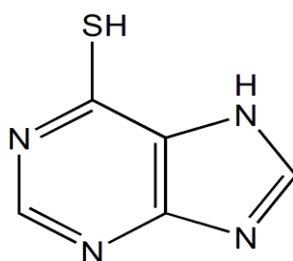
Sumporni derivati purina se najčešće koriste kao lijekovi pri tretiranju limfoblastične leukemije i autoimunih bolesti te kao imunosupresivi. Najpoznatiji spojevi su 6-merkaptopurin, 6-tioguanin i azatioprin (slika 3). Koriste se kao antikancerogena i imunosupresivna sredstva. Uvođenje azatioprina kao imunosupresiva revolucioniralo je transplantaciju solidnih organa od nesrodnih donora i rezultiralo znatno poboljšanim preživljavanjem presatka. Tiopurini su priznate mogućnosti liječenja sve većeg broja kroničnih upalnih i autoimunih poremećaja, uključujući artritis i kolitis (Karran i Attard, 2008).



Slika 3. Strukture tiopurinskih lijekova (Karran i Attard, 2008)

6-Merkaptopurin je tiolni analog purina čija je struktura prikazana na slici 4. Osim što je citostatik i antimetabolit, ima i imunosupresivno djelovanje pa se koristi u tretmanu autoimunih bolesti (npr. leukemija, Crohnova bolest, ulcerozni kolitis) (Toma, 2022a).

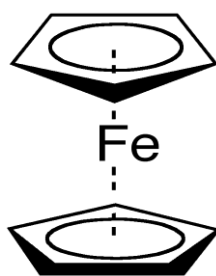
Djeluje kao antimetabolit ometanjem sinteze nukleinskih kiselina i inhibiranjem metabolizma purina. Aktivacija merkaptopurina događa se preko hipoksantin fosforiboziltransferaze (HPRT) nakon čega slijedi niz reakcija za stvaranje tioguanin nukleotida (TGN-a). Citotoksičnost merkaptopurina djelomično je posljedica ugradnje 6-tiogvanozin trifosfata (6-TGTP) u DNA (Dean i sur., 2012).



Slika 4. Struktura 6- merkaptopurina (Karran i Attard, 2008).

2.3. Ferocen

Ferocen je organometalni spoj u kojem je željezov kation (Fe^{2+}) smješten između dva ciklopentadienilna liganda (Cp) i često se nazivaju „sendvič“ spojevi (slika 5). Ferocen se odlikuje topljivošću u organskim otapalima, stabilnošću pri visokim temperaturama (do 400 °C), te redoks-svojstvima. Zahvaljujući njegovoj lipofilnosti koja olakšava prolazak kroz staničnu membranu, stabilnosti u fiziološkom mediju, niskoj toksičnosti, oksido-redukcijskom kapacitetu i mogućnosti za relativno jednostavnim kemijskim modifikacijama, ferocen se nalazi u središtu interesa bioorganometalne kemije.



Slika 5. „Sendvič“ struktura ferocena

Dolazi u obliku narančastih kristala (slika 6) karakterističnog mirisa sličnog kamforu, netopljivih u vodi. Stabilan je pri sobnoj temperaturi te je visoko zapaljiv i netoksičan spoj. Molekulska masa ferocena iznosi 186.04 g/mol, ima gustoću 1.49 g/cm³, temperatura vrelišta iznosi 249 °C, a temperatura tališta 172.5 °C.



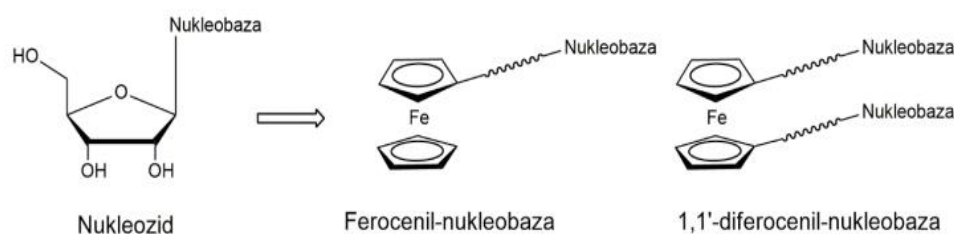
Slika 6. Ferocen u kristaliničnom obliku

Zahvaljujući lakoj funkcionalizaciji ugljikovih atoma na jednom ili oba ciklopentadienilna prstena, sintetiziran je velik broj ferocenskih konjugata koji sadrže organske ili anorganske fragmente pokrivajući tako različita područja znanstvenog istraživanja, od katalize, dizajna optičkih materijala i biosenzora do novih biološki aktivnih spojeva. Mnogi ferocenski konjugati pokazuju biološku aktivnost poput antitumorske, antibakterijske, antiparazitske i antifungalne. Osim što se uvodi u strukturu već poznatih lijekova, ferocen se konjugira i s nukleobazama kao biološki i farmakološki značajnim molekulama s ciljem sinteze biokonjugata koji će pokazati poboljšanu biološku aktivnost i poslužiti u medicinskoj i farmaceutskoj kemiji za razvoj novih terapijskih agenasa (Kowalski, 2016).

2.4. Ferocenski nukleozidi

Ferocenski nukleozidi su organski spojevi u kojima ferocen zamjenjuje šećernu komponentu nukleozida. Prema istraživanjima, pokazuju citotoksično djelovanje na različite tumorske stanice, antiparazitsku i antibakterijsku aktivnost, te mogućnost stvaranja ROS (reactive oxygen species) vrsta. Zbog svojih redoks i bioaktivnih svojstava, ovi konjugati imaju uporabu u bioanalitičkoj i medicinskoj kemiji (Lewandowski i sur., 2017). Ferocenski dio može graditi strukturnu prenosnicu u biološkim makromolekulama zbog svojih specifičnih elektrokemijskih svojstava. Cilj nastajanja ferocenskih kopulata nukleobaza je taj da se nastali spojevi koriste za razvoj novih terapeutika (kseno-nukleinskih kiselina), samoorganizirajućih supramolekula te elektrokemijskih i biokemijskih senzora (Kowalski, 2016).

Ferocen se konjugira s nukleobazama kako bi se sintetizirali biokonjugati s poboljšanom biološkom aktivnošću u svrhu korištenja u medicinskoj i farmaceutskoj kemiji za razvoj novih terapijskih agenasa. Sintetizirani mono- i bis- derivati ferocena i nukleinskih baza slažu se u Watson-Crick i obratne Watson-Crick parove čime stvaraju dvodimenzionalnu uzvojniju (Patwa i sur., 2010). Kod ferocenilnih derivata nukleobaza, ferocenska podjedinica zamjenjuje šećer ribozu u nukleozidu i preko molekuskog mosta je kovalentno vezana s različitim skupinama na nukleobazu (slika 7).

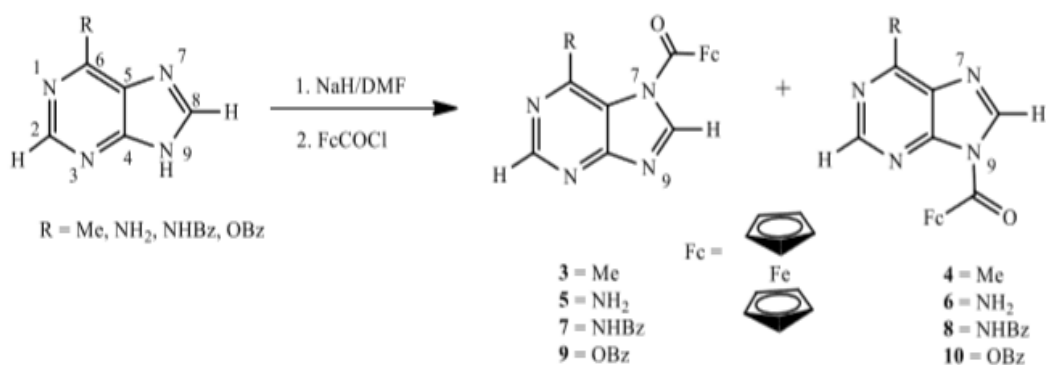


Slika 7. Osnovna struktura ferocenil- i 1,1'-diferocenil nukleobaza (Kowalski, 2016)

Razumijevanje utjecaja biomolekule konjugirane s ferocenom kao i skupine u premostu između dva fragmenta na elektrokemijska i biološka svojstva derivata od velike je važnosti u dizajnu novih molekula temeljenih na ferocenu, elektroaktivnom benzenskom izosteru. Elektronska struktura metalocena, skupine u molekuskom mostu i položaj supstitucije na heteroaromatskom prstenu utječu na redoks potencijal i elektrokemijsko ponašanje spojeva što ima za posljedicu i različitu biološku aktivnost i mehanizam te aktivnosti. (Toma, 2022a).

Ranije je ispitano nekoliko postupaka za dobivanje *N*-ferocenoiliranih pirimidina odnosno purina, a kao jednostavna i optimalna metoda za sintezu pokazala se reakcija nukleobaze s ferocenoil kloridom (FcCOCl) u bazičnim uvjetima. Konjugati su sintetizirani u reakciji ferocenoil klorida uz deprotonirajući agens natrijev hidrid (NaH) u dimetilformamidu (DMF) (shema 1). Reakcija je regiospecifična te je nastao samo *N1*-izomer, mehanizam reakcije je SN2-tipa i objašnjava regiospecifičnost kao posljedicu kinetičke kontrole reakcije. Također je pokazano da supstituenti na egzocikličkoj amino skupini adenina utječu na reaktivnost dotičnog purinskog aniona i upravljaju regioselektivnošću reakcije ferocenoiliranja. Korištenjem odgovarajućeg supstituenta na položaju *C6* u purinskom prstenu, može se podesiti omjer izomernog produkta *N7* i *N9* izomera ili isključivo jednog izomera, tj. može se utjecati na regio-

selektivnost reakcije ferocenoiliranja (Toma i sur., 2022b). U reakciji pri istim uvjetima ferocenoil klorida i 6-merkaptopurina nastaje bis-ferocenoilirani produkt, *N9,C6-S*-bis-ferocenoilpurin (Toma i Vrček, 2020). Za takav je ishod odgovorna veća nukleofilnost sumpora od dušika koji se deprotonira kao i dušikov atom te dolazi do *N9*- i *C6-S* aciliranja merkaptopurina (Pospieszny i Wyrzykiewicz, 2008).



Shema 1. Sinteza ferocenskih derivata različito supstituiranih purinskih nukleobaza (Toma i Vrček, 2020)

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

Acetonitril (CH_3CN) ($t_v = 82\text{ }^\circ\text{C}$) destilira se na bezvodnom magnezijevom sulfatu, te prebaci u tikvicu s molekulskim sitima (4 \AA) do upotrebe. Ostali kupovni reagensi i kemikalije (tablica 2) su korišteni bez pročišćavanja. Najveći dio pokusa izveden je u atmosferi inertnog plina i u bezvodnoj sredini. Od laboratorijskih uređaja, korišteni su analitička vaga, IR spektrometar, $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ i UV lampa.

Tablica 2. Popis korištenih kemikalija

Naziv	Formula	Molekulska masa (g mol^{-1})
Ferocen	$\text{Fe}(\text{C}_5\text{H}_5)_2$	186,04
2-klorbenzoil klorid	$\text{C}_7\text{H}_4\text{Cl}_2\text{O}$	174,94
Aluminijev klorid	AlCl_3	133,33
Diklormetan	CH_2Cl_2	84,92
Natrijev hidroksid	NaOH	40,01
Natrijev sulfat	Na_2SO_4	142,06
Kalijev- <i>tert</i> -butoksid	$t\text{-C}_4\text{H}_9\text{O}^-\text{K}^+$	112,21
1,2-dimetoksietan	$\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}_2$	90,1
Klorovodična kiselina	HCl	36,46
Oksalil klorid	$\text{C}_2\text{Cl}_2\text{O}_2$	126,9
Piridin	$\text{C}_5\text{H}_5\text{N}$	79,05
6-merkaptopurin	$\text{C}_5\text{H}_5\text{N}_4\text{S}$	153,11
Acetonitril	CH_3CN	41,03
Trietilamin	$(\text{C}_2\text{H}_5)_3\text{N}$	101,15
6-metilmerkaptopurin	$\text{C}_6\text{H}_6\text{N}_4\text{S}$	166,2
Aceton	CH_3COCH_3	58,06

3.2. Metode

Praćenje tijeka reakcija izvršeno je pomoću metode 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), dok su staklene kolone punjene pod utjecajem gravitacijske sile, a kao eluens je služio sustav otapala diklormetan/acetona. Preparativna tankoslojna kromatografija provedena je na staklenim pločama prevučeni silika gelom (Merk, Kisagel 60 HF₂₅₄), a za mobilnu fazu je korišten sustav otapala diklormetan/acetona.

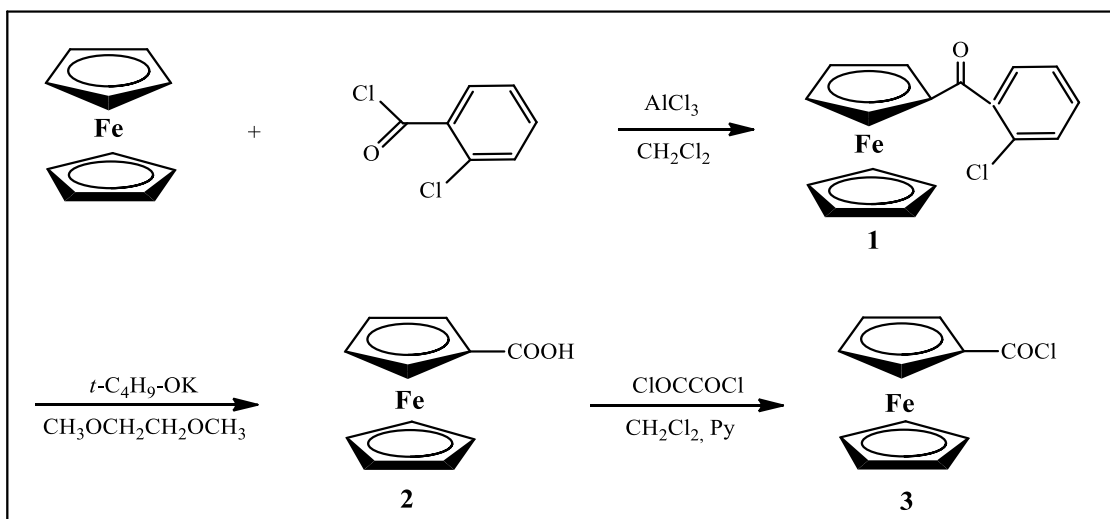
Spektri ¹H-NMR i ¹³C-NMR su snimljeni na spektrometru Bruker Avance 300 i 600 MHz. Svi uzorci su otopljeni u CDCl₃ (deuterirani kloroform), DMSO-*d*₆ (deuterirani dimetilsulfoksid) i mjereni pri 298 K u NMR cijevici od 5 do 18 mm. Kemijski pomaci (δ) u ¹H-NMR i ¹³C-NMR spektrima su izraženi u ppm u odnosu 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:

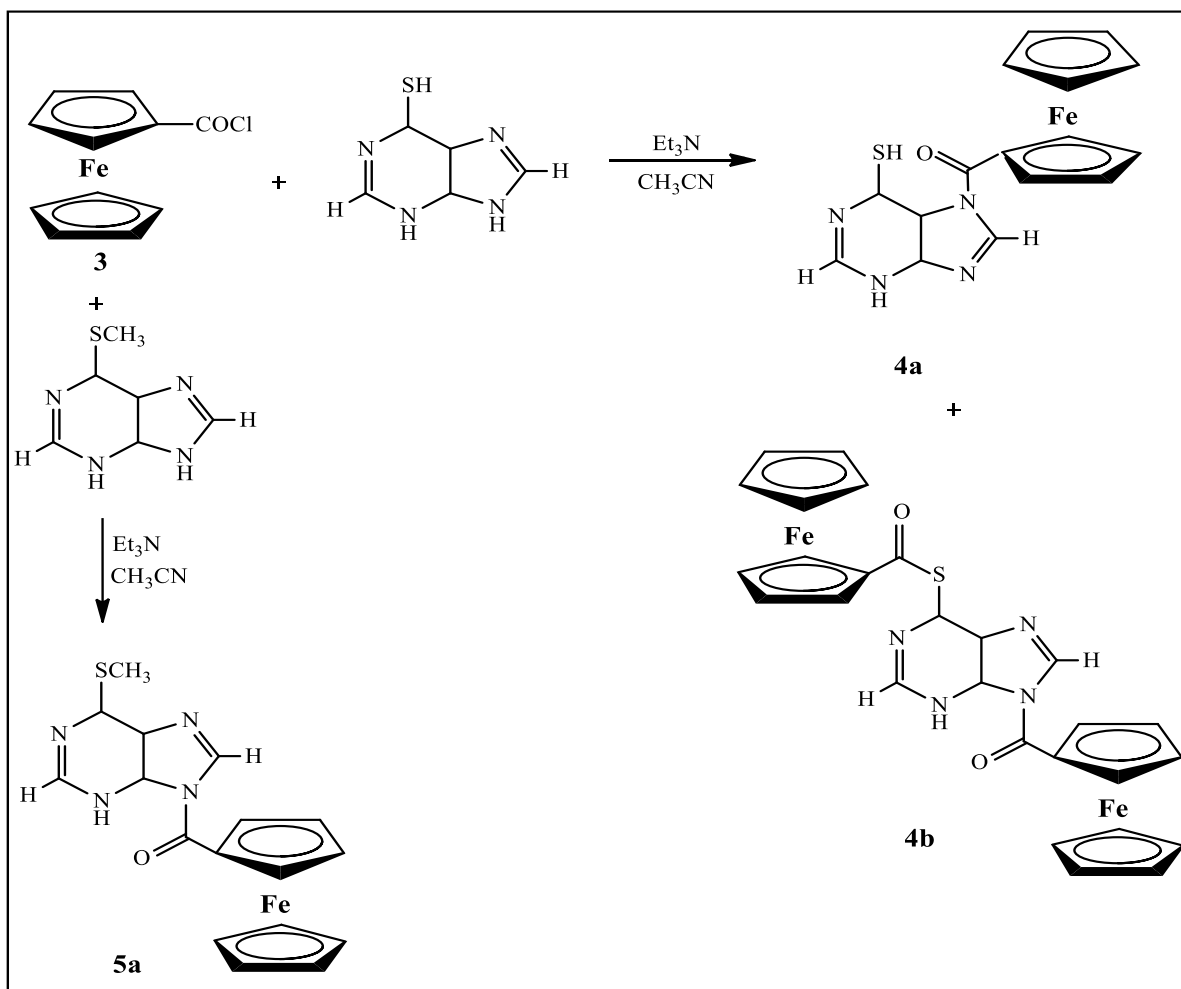
IR-spektri: ν = rastezanje (stretching), δ = deformacije (bending), j = jaka vrpca, sr = srednja vrpca, š = široka vrpca.

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

3.3. Sheme priprave kopulata ferocena



Shema 2. Priprava ferocenkarkoboksilne kiseline (2) i ferocenoil klorida (3)



Shema 3. Priprava merkaptopurinskih biokonjugata ferocena (4a, 4b i 5a)

3.4. Protokoli za pripravu spojeva

3.4.1. 2-Klorbenzoil ferocen (1)

Otopini ferocena (3,38 g, 0,018 mol) u suhom diklormetanu (25 mL) koja se ohladi na 0 - 5 °C pomoću leda doda se 2-klorbenzoil klorid (2,45 mL, 0,019 mol) te AlCl₃ u obrocima (2,53 g, 0,019 mol). Reakcijska smjesa se miješa na temperaturi 0 - 5 °C 45 minuta te 75 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon toga se reakcijska smjesa prenese u posudicu s ledom te ekstrahira pomoću CH₂Cl₂. Organski sloj ispiri se vodom, 10 % otopinom NaOH te opet vodom, osuši bezvodnim Na₂SO₄ i upari do suha pri čemu zaostaje sirovi produkt **1** (6,34 g, 92 %) (shema 2). Za snimanje IR- i NMR- spektra 200 mg sirovog produkta **1** pročišćeno je tankoslojnom preparativnom kromatografijom (eluens: CH₂Cl₂) pri čemu je dobiveno 120 mg (60 %) narančastih kristala 2-klorbenzoil-ferocena (**1**); *t*_f = 98 - 100 °C.

IR (CH₂Cl₂) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 1660 j (C=O).

¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz, 298 K, ppm) δ/ppm : 7,37 (4H, m, *Ph*), 4,70 (d, 2H, H² H⁵, Fc), 4,54 (d, 2H, H³ H⁴, Fc), 4,22 (s, 5H, Cp).

3.4.2. Ferocenkarboksilna kiselina (2)

Sirovi 2-klorbenzoil-ferocen (**1**) (6 g, 0,0185 mol) dodaje se suspenziji kalij-*tert*-butoksida (25 g, 0,22 mol) u 1,2-dimetoksietanu (135 mL) i vodi (1 mL) (shema 2). Reakcijska se smjesa refluxira 60 min, a nakon toga se prebaci u posudu s ledom i vodom te ekstrahira diklormetanom kako bi se izdvojio neizreagirani spoj **1**. Zakiseljavanjem vodene faze koncentriranom HCl istalože se žutonarančasti kristali ferocenkarboksilne kiseline (**2**); *t*_f = 193-200 °C. Kristali su odsisani preko Büchnerovog lijevka, osušeni u eksikatoru te je dobiveno 1,7 g (48,85 %) kristala ferocenkarboksilne kiseline (**2**).

3.4.3. Ferocenoil klorid (3)

Svježe destilirani oksalil klorid (0,34 mL, 3,91 mmol) i piridin (1 kap) dodaju se suspenziji ferocenkarboksilne kiseline (**2**) (300 mg, 1,3 mmol) u suhom diklormetanu (shema 2). Reakcijska smjesa se refluxira 3 sata. Nakon 3 sata reakcijska smjesa se upari do suha te je dobiven tamno smeđi talog. Sirovi produkt zagrijava se u petroleteru na 80 °C tijekom 10 minuta. Zatim se organski sloj filtrira preko vate te se upari do suha. Postupak se ponovi još dva puta pri čemu je dobiveno 247,25 mg (77 %) crvenih kristala ferocenoil klorida (**3**).

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

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, 25 °C) δ/ppm : 4,9 (t, ³J_{H,H} = 1,9 Hz, 2H, H^α), 4,6 (t, ³J_{H,H} = 1,9 Hz, 2H, H^β), 4,4 (s, 5H, Cp).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃, 25 °C) δ/ppm : 178,3 (CO), 73,3 (Ci), 71,7 (Cp), 71,2 (C^β), 70,4 (C^α).

3.4.4. Merkaptopurinski biokonjugati ferocena (4a, 4b i 5a)

Purinske baze 6-merkaptopurin i 6-metilmerkaptopurin (0,189 mmol) se suspendiraju u 1 mL otapala (acetonitril) i deprotoniraju dodatkom baze (triethylamin) (0,245 mmol) kroz 60 minuta na sobnoj temperaturi uz konstantno miješanje. Reakcijskoj smjesi se potom dodaje prethodno pripremljeni ferocenoil klorid (**3**) (70 mg, 0,28 mmol) u 1,5 puta većoj količini. Nakon 60 minuta miješanja na sobnoj temperaturi reakcijska smjesa upari se na rotacionom vakuum uparivaču do suha. Sirovi produkt otopi se u CH₂Cl₂ te se pročisti kolonskom kromatografijom na silika gelu uz eluens CH₂Cl₂ : CH₃COCH₃ = 10 : 0,5. Pročišćeni produkt čisti se još jednom kromatografijom na ploči silika gela uz eluens CH₂Cl₂ : CH₃COCH₃ = 10 : 0,5. U reakciji provedenoj sa 6-metilmerkaptopurinom nakon pročišćavanja izoliran je monosupstituirani izomer **5a**, dok su u reakciji provedenoj sa 6-merkaptopurinom izolirana dva spoja i to monoderivat (**4a**) i bisderivat (**4b**) (shema 3).

N7-ferocenoil-6-merkaptopurin (4a): Crvena praškasta krutina, m = 19,9 mg, η = 25,08 %. Sirovi produkt pročišćen je kromatografijom na koloni uz eluens diklormetan i diklormetan/acetone = 10 : 0,5.

IR (CH₂Cl₂) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3127 i 3050 (š, C–H), 2927 i 2825 (j, C–H i =C–H, Fc), 1704 (j, C=O), 1565 (š, istežanje purinskog prstena), 1500-1200 (C=C i C=N istežanja), 1269 (j, –C=S), 803 i 748 (j, C–S).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆, 25 °C) δ/ppm : 8,78 (s, 1H, C8–H), 8,26 (s, 1H, C2–H), 5,01 (pt, J = 4,5 Hz, 2H, C α –H), 4,84 (pt, J = 3,8 Hz, 2H, C β –H), 4,35 (s, 5H, Cp–H), 4,21 (s, 1H, SH). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆, 25 °C) δ/ppm : 176,46 (FcCO), 168,71 (C6), 146,05 (C8), 143,64 (C4), 141,24 (C2), 135,45 (C5), 74,20 (C β), 72,10 (C α), 71,41 (Cp), 69,45 (Ci).

N9,C6-bis-ferocenoil-6-merkaptopurin (4b): Crvena praškasta krutina, m = 36,9 mg, η = 33,91 %. Sirovi produkt pročišćen je kromatografijom na koloni uz eluens diklormetan i diklormetan/acetone = 10 : 0,5.

IR (CH₂Cl₂) $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$: 3117 (š, C–H), 2926 i 2860 (š i j, C–H i =C–H, Fc), 1692 (j, C=O),

1563 (š, istežanje purinskog prstena), 1500-1200 (C=C i C=N istežanja), 1269 (j, -C=S), 803 i 748 (j, C-S).

¹H NMR (600 MHz, CDCl₃, 25 °C) δ/ppm: 9,10 (s, 1H, C2-H), 8,77 (s, 1H, C8-H), 5,11 (pt, J = 3,9 Hz, 2H, Cα-H), 5,00 (pt, J = 3,9 Hz, 2H, Cα-H'), 4,77 (pt, J = 3,9 Hz, 2H, Cβ-H), 4,63 (pt, J = 3,9 Hz, 2H, Cβ-H'), 4,45 (s, 5H, Cp-H), 4,32 (s, 5H, Cp-H').

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃, 25 °C) δ/ppm: 187,1 (FcCOS), 168,59 (FcCO), 154,21 (C6), 153,47 (C2), 150,60 (C4), 143,91 (C8), 136,58 (C5), 73,88 (Cβ), 72,83 (Cβ'), 72,56 (Cα), 71,07 (Cp), 71,01 (Cp'), 70,95 (Ci), 70,21 (Ci'), 69,75 (Cα').

N9-Ferocenoil-6-metilmerkaptopurin (5a): Crvena praškasta krutina, m = 63,2 mg, η = 88,83 %. Sirovi produkt pročišćen je kromatografijom na koloni uz eluens diklormetan/acetone = 10:0,5.

IR (CH₂Cl₂) ν_{max}/cm⁻¹: 3127 i 3050 (š, C-H), 2927 i 2825 (j, C-H i =C-H, Fc), 1704 (j, C=O), 1565 (š, istežanje purinskog prstena), 1500-1200 (C=C i C=N istežanja).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆, 25 °C) δ/ppm: 8,95 (s, 1H, C8-H), 8,80 (s, 1H, C2-H), 5,03 (pt, J = 4,5 Hz, 2H, Cα-H), 4,82 (pt, J = 3,8 Hz, 2H, Cβ-H), 4,33 (s, 5H, Cp-H), 2,68 (s, 3H, CH₃). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆, 25 °C) δ/ppm: 169,16 (FcCO), 161,54 (C6), 153,07 (C8), 148,21 (C4), 143,38 (C2), 131,33 (C5), 74,47 (Cβ), 72,63 (Cα), 71,41 (Ci), 71,16 (Cp), 11,75 (CH₃).

Tablica 3. Iskorištenje reakcija ferocenoliranja nukleobaza i udio monokopolata (N7) i bis-kopolata (N9/C6)

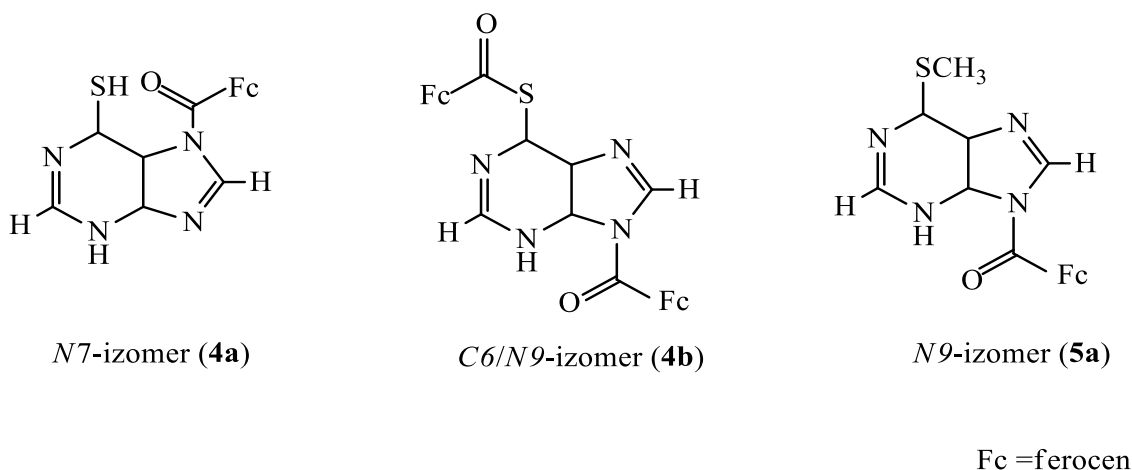
Baza	Omjer FcCOCl : baze	Iskorištenje		Udio mono:bis pro- dukta
		Mono- produkt	Bis- pro- dukt	
6-merkaptopurin	1,5:1	25,08 %	33,91 %	42,43 : 57,57
	2,5:1	17,80 %	34,34 %	34,76 : 65,24
6-meilmerkaptopurin	1,5:1	88,83 %	/	/
	2,5:1	89,30 %	/	/

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Uvod

Organometalni nukleozidi su važna skupina spojeva s antikancerogenim i antivirusnim djelovanjem, a uz to služe i kao biosenzori za radioaktivne, IR i luminiscentne sonde te kao reaktivni međuprodukti u sintetskoj kemiji (Ismail i sur., 2020).

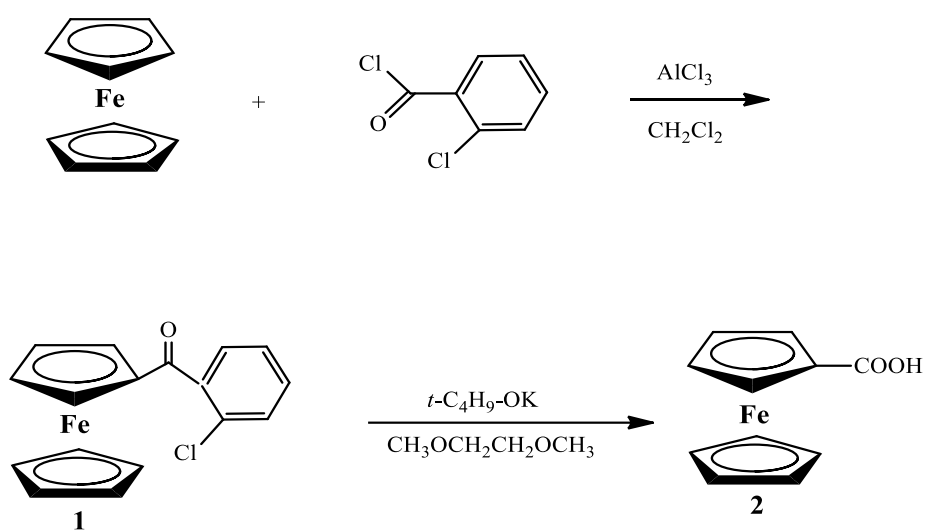
Cilj ovog završnog rada je priprava te spektroskopska karakterizacija organometalnih derivata nukleobaza (OrDeNa), biokonjugata ferocena i merkaptopurina, odnosno C6 supstituiranog derivata merkaptopurina s karbonilnom skupinom kao razmaknicom (slika 8). Takvi spojevi oponašaju prirodne nukleozide u kojima je šećerna komponenta zamjenjena ferocenom i preko amidne veze vezana na nukleobazu. Pozornost je usmjerena na regioselektivnost reakcije ovisno o uvjetima reakcije. Reakcije su provedene upotrebom trietilamina kao deprotonirajućeg agensa u suhom acetonitrilu s različitim omjerima ferocenoil klorida i nukleobaze. Za pripremu ovih spojeva najprije je potrebno provesti sintezu ključnog intermedijera ferocenoil klorida (**3**) te slijedi kopulacija aktivirane nukleobaze pri čemu u reakciji sa 6-merkaptopurinom nastaje uz monoderivat N7 izomer (**4a**) i bis derivat N9/C6 (**4b**), dok je reakcija sa 6-metilmerkaptopurinom regiospecifična reakcija pri čemu nastaje samo N9 produkt (**5a**) (slika 8).



Slika 8. Merkaptopurinski biokonjugati ferocena (**4a**, **4b** i **5a**)

4.1.1. Ferocenkarkobosilna kiselina (2)

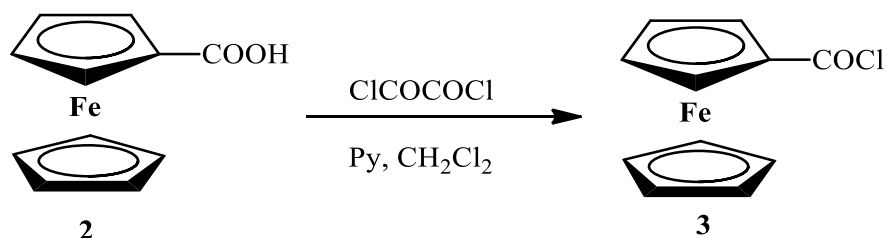
Sinteza ključnog intermedijara, ferocenoil klorida (3), započinje reakcijom ferocena s 2-klorbenzoil kloridom uz AlCl_3 pri čemu nastaje 2-klorbenzoil-ferocen (1) u visokom iskorištenju (92 %), te slijedi hidroliza 2-klorbenzoil-ferocena (1) uz $t\text{-C}_4\text{H}_9\text{O}^- \text{K}^+$ dajući tamnožutu kristaliničnu tvar, ferocenkarkobosilnu kiselinu (2) uz iskorištenje od 89 % (shema 4) (Biehl i Reeves, 1973). Jedan dio sirovog produkta 1 pročišćen je tankoslojnom preparativnom kromatografijom u svrhu IR i NMR snimanja. IR-spektar 2-klorbenzoil-ferocena (1) sadrži signale pri 1660 cm^{-1} koji se pripisuju keto-skupini. U IR-spektaru ferocenkarkobosilne kiseline (2) vidljiva je široka apsorpcijska vrpca pri 3389 cm^{-1} koja odgovara frekvenciji istežanja hidroksilne skupine asocirane intermolekulskim vodikovim vezama te vrpca pri 1676 cm^{-1} koja je karakteristična za karbonilnu skupinu.



Shema 4. Shematski prikaz pripreve ferocenkarkobosilne kiseline (2)

4.1.2. Ferocenoil klorid (3)

U nastavku je pripremljen ključni intermedijer ferocenoil klorid (3) reakcijom ferocenkarkobosilne kiseline (2) i oksalil klorida u suhom diklormetanu uz prisutnost piridina. Reakcija se završava višestrukim zagrijavanjem sirovog produkta u petroleteru te uparavanjem filtriranog produkta. Ferocenoil klorid (3), crvena kruta tvar, dobiven je u iskorištenju od 85 % (shema 5) (Knobolch i Raucher, 1961).

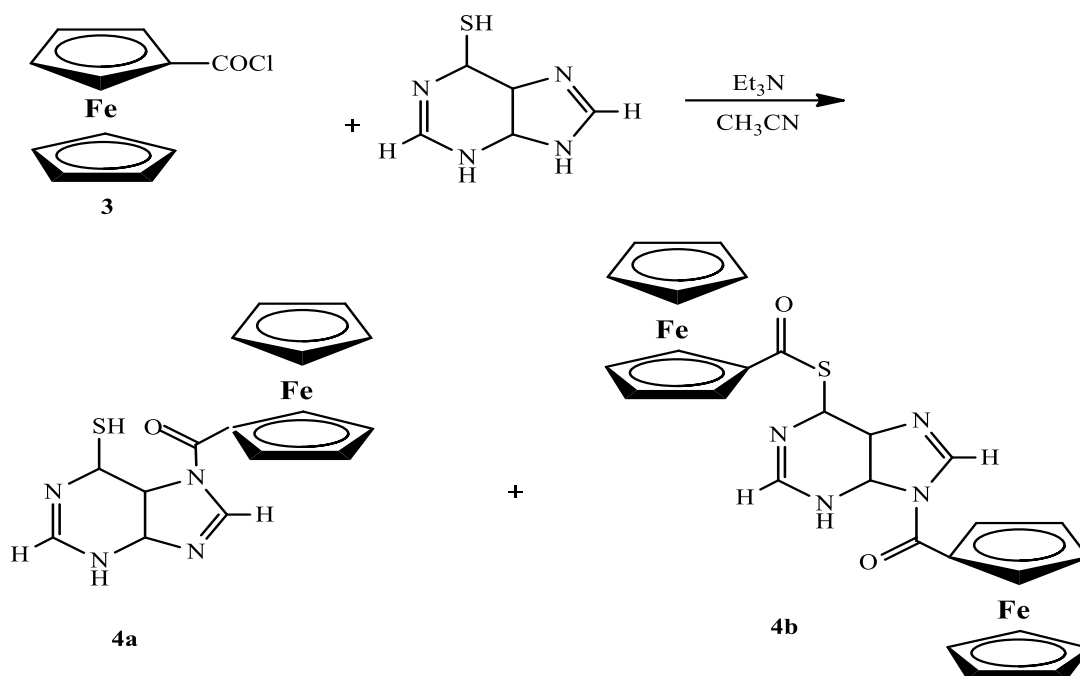


Shema 5. Shematski prikaz priprave ferocenoil klorida (**3**)

4.1.3. Merkaptopurinski biokonjugati ferocena (**4a**, **4b** i **5a**)

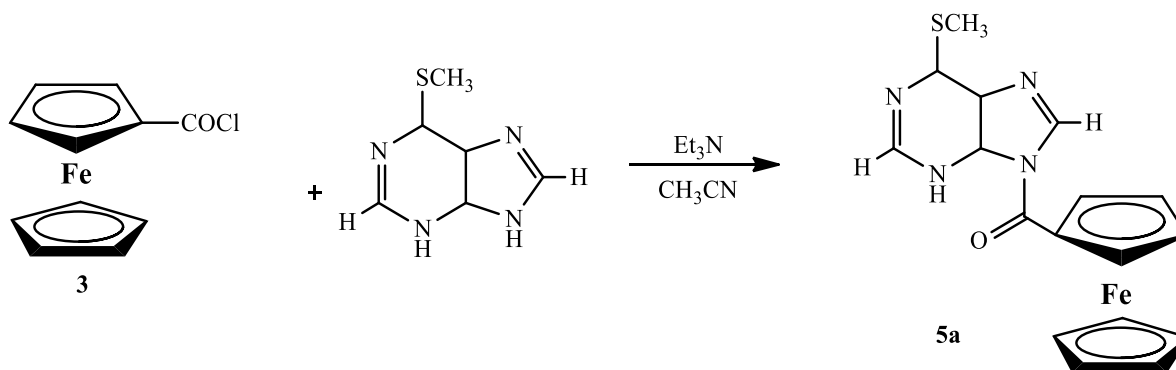
Merkaptopurinski derivati ferocena s karbonilnom poveznicom između ferocena i nukleobaze pripremljeni su reakcijom između acilirajućeg agensa i purinskog aniona u acetonitrilu. Deprotekcija baze provedena je u otapalu uz trietilamin kao deprotonirajući agens tijekom 60 minuta, zatim slijedi kopulacija aktivirane nukleobaze i ferocenoil klorida (**3**), koja se odvija prilično brzo uz jasnu promjenu boje iz crvene u tamnocrvenu. Izolacija željenog produkta je provedena na način da se upari otapalo, te se dobiveni sirovi produkt pročišćava kolonskom kromatografijom uz SiO₂ kao adsorbens (stacionarna faza). Sirovi produkt, radi vrlo slabe topljivosti, nanešen je na sloj adsorbensa u koloni kao homogena smjesa baze i silika gela te je provedena elucija s različitim otapalima od slabo polarnih (CH₂Cl₂) do polarnih (smjesa CH₂Cl₂ i CH₃COCH₃ kojem se povećavao volumi udio tijekom elucije). Nastali produkti su upareni do suha na rotacionom vakuum uparivaču.

U reakciji ferocenoil klorida i 6-merkaptopurina dolazi do nukleofilne supstitucije na ugljikov atom karbonilne skupine ferocenoil klorida i nastanka dvaju produkta *N*7-ferocenoil-6-merkaptopurina (**4a**) i *N*9,*C*6-bis-ferocenoil-6-merkaptopurina (**4b**) (shema 6).



Shema 6. Shema priprave *N*7-ferocenoil-6-merkaptopurina (**4a**) i *N*9,*C*6-bis-ferocenoil-6-merkaptopurina (**4b**)

Pri omjeru ferocenoil klorida : 6-merkaptopurin= 1,5 : 1 iskorištenje *N*7-ferocenoil-6-merkaptopurina (**4a**) je 25,08 %, a *N*9,*C*6-bis-ferocenoil-6-merkaptopurina (**4b**) je 33,91 % u međusobnom odnosu 42 : 57. Povećanjem omjera FcCOCl i baze na 2,5 : 1 nastaje veći udio bis-produkta **4b** i smanjuje se iskorištenje mono-produkta **4a** na 17,8 % (tablica 3). U reakciji ferocenoil klorida (**3**) i 6-metilmerkaptopurina nastaje samo jedan, monosupstituirani produkt *N*9-ferocenoil-6-metilmerkaptopurin (**5a**) u iskorištenju od 88,83 % (shema 7), dok povećanje odnosa ferocenoil klorida naspram baze nije bitno utjecalo na iskorištenje reakcije (tablica 3).



Shema 7. Shema priprave *N*9-ferocenoil-6-metilmerkaptopurina (**5a**)

Usporedbom s rezultatima koji su dobivni u reakciji kopulacije korištenjem dimetilformamida (DMF) kao otapala i natrijevog hidrida (NaH) kao deprotonirajućeg agensa gdje u reakciji sa 6-merkaptopurinom nastaje isključivo bis produkt u iskorištenju od 29 %, a u reakciji sa 6-metilmerkaptopurinom *N*9-ferocenoil-6-merkaptopurin (**5a**) u iskorištenju od 58 % može se zaključiti da je acetonitril učinkovitije otapalo odnosno trietilamin bolje deprotektivno sredstvo u ovim reakcijama kopulacije.

4.2. Strukturna karakterizacija ferocenoil- purinskih derivata (**4a**, **4b** i **5a**) IR i NMR spektroskopijom

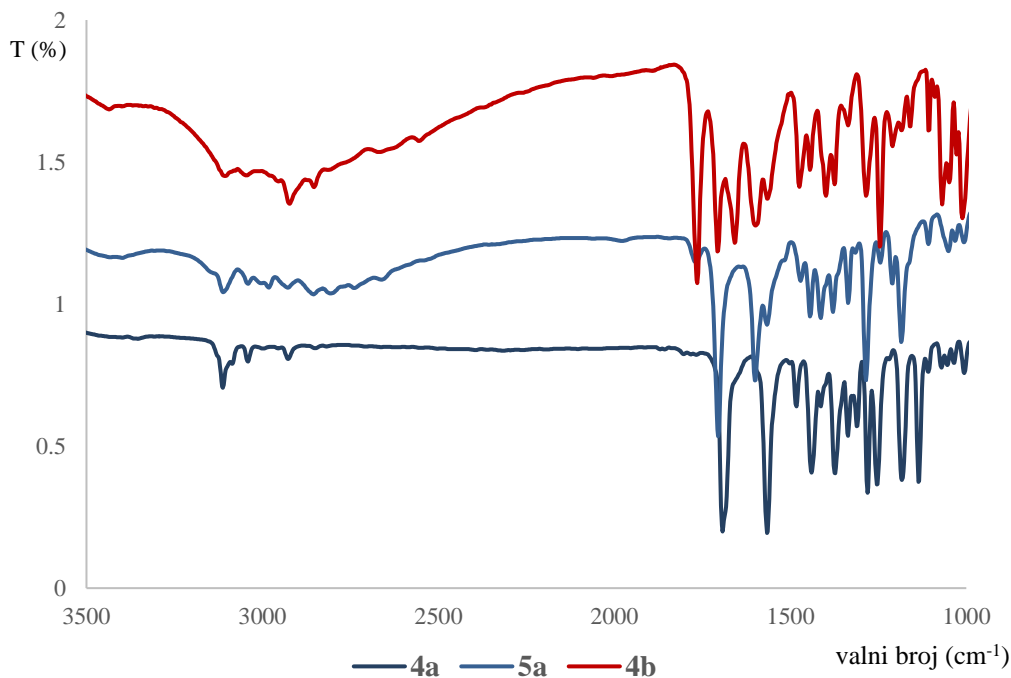
Pročišćenim kopulatima **4a-b**, **5a** struktura je potvrđena IR-, ¹H i ¹³C-NMR spektroskopijom.

4.2.1. IR spektroskopija

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 apsorpcije zračenja o valnom broju ili valnoj duljini zračenja generira se prolaskom IR zračenja kroz uzorak u instrumentu IR-spektrofotometar (Pine, 1994).

IR odnosno infracrvena spektroskopija je brza i nedestruktivna spektroskopska tehnika za karakterizaciju struktura novo pripremljenih spojeva. Infracrveno područje spektra nalazi se između valnih duljina od 8×10^{-7} do 1×10^{-4} , a infracrveni fotoni, iako ne mogu uzrokovati elektronske prijelaze zbog nedostatka energije, mogu uzrokovati različite vibracije veza. Ovisno o masama atoma i jakosti veze, vibracijska frekvencija rastezanja se razlikuje. Primjerice, jače veze su čvršće i potrebno im je više energije da se istegnu, odnosno sabiju. Samim time, jače veze vibriraju brže od slabih veza, npr. O–H veze vibriraju brže od C–H veza jer su O–H veze jače. Iz istog razloga i trostruke veze vibriraju brže od dvostrukih, a dvostruke brže od jednostrukih. IR spektar razlikuje se od UV ili vidljivog spektra jer je vrlo specifičan za svaki

organski spoj, a potrebno je spomenuti da u IR području apsorbiraju svi organski spojevi i neki anorganski, zbog prisustva kovalentnih veza. Svaka funkcijska skupina daje karakteristične apsorpcijske vrpce pri istim valnim duljinama, neovisno o ostalom dijelu molekule (Wade, 2017).



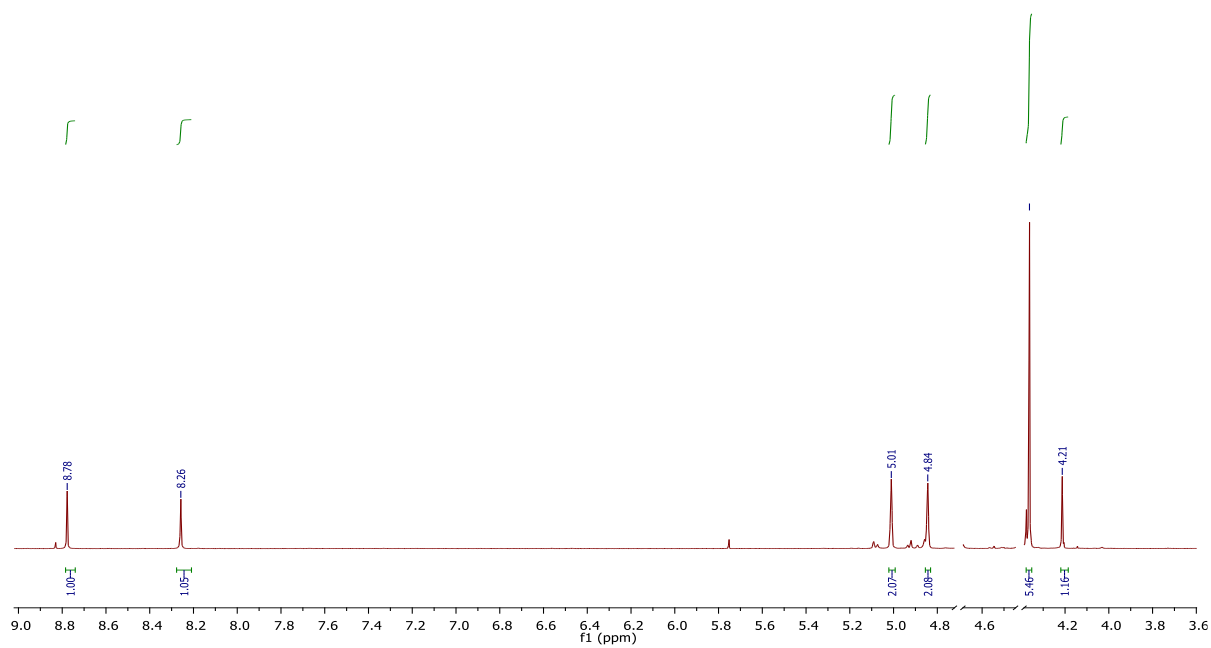
Slika 9. IR spektri *N*7-ferocenoil-6-merkaptopurina (**4a**), *N*9-ferocenoil-6-metilmerkaptopurina (**5a**) i *N*9,*C*6-bis-ferocenoil-6-merkaptopurina (**4b**)

IR spektri spojeva snimljeni u KBr pastilama pokazuju vrpce koje ukazuju na istežanja veza karbonilne skupine, -CH i =CH , C=C , N=C i ostalih veza purinskog prstena i supstituentata (slika 9). Naspram apsorpcijske vrpce pri 1755 cm^{-1} koja je karakteristična za karbonilnu skupinu u ferocenoil kloridu početnog intermedijera, kod svih dobivenih kopolata primijećen je pomak te apsorpcijske vrpce prema nižim valnim brojevima na 1690 cm^{-1} što potvrđuje uspješnost provedene kopulacije. U IR spektru **4b** zabilježena je dodatna apsorpcijska vrpca jakog inteziteta pri 1760 cm^{-1} što ukazuje na prisutnost tioketona odnosno na nastajanje *S*- i *N*-aciliranog bisderivata. U IR spektrima svih spojeva prisutne apsorpcijske vrpce u području $3100\text{-}2900\text{ cm}^{-1}$ odgovaraju istežanju -CH i =CH veza iz ferocenskog sustava.

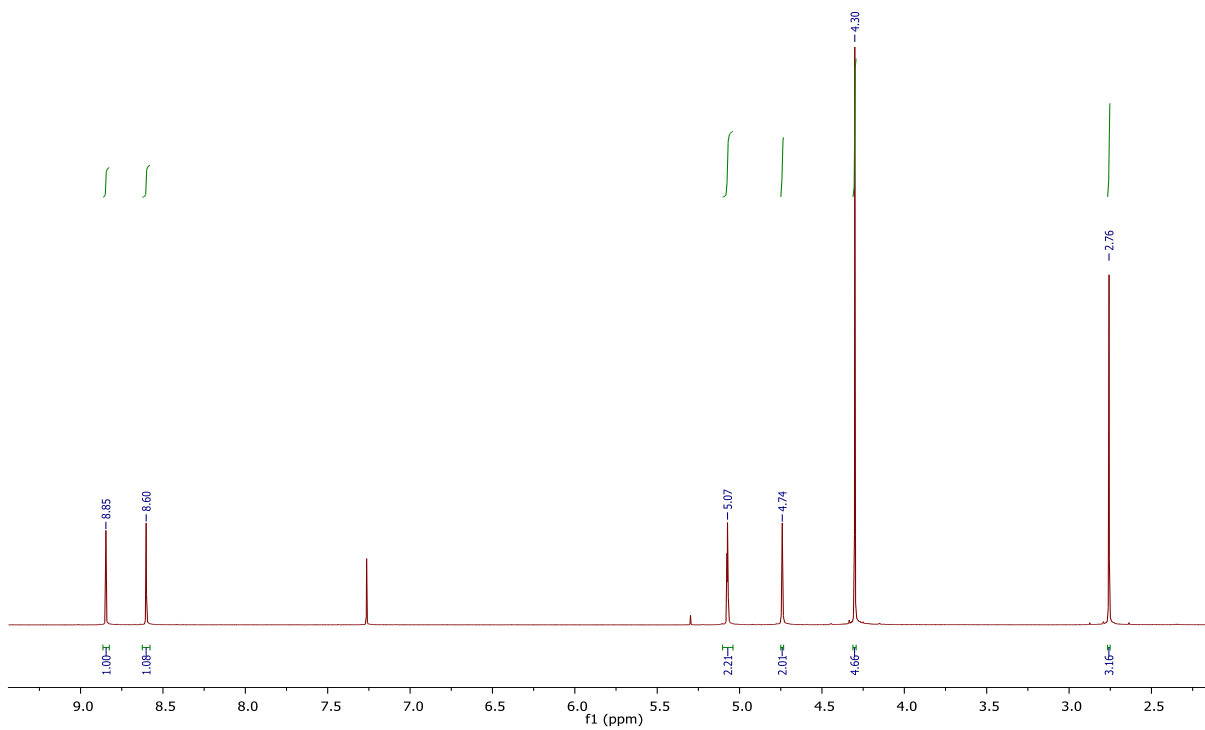
4.2.2. NMR spektroskopija

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. NMR ili nuklearna magnetska rezonancija je tehnika korištena za određivanje molekulske strukture i čistoće spojeva, a bazira se na magnetskom svojstvu spina jezgre atoma (Pine, 1994). Osnovni princip NMR-a je taj da se protoni u atomskim jezgrama usmjeravaju paralelno ili antiparalelno smjeru magnetskog polja kada se uzorak izloži vanjskom homogenom magnetskom polju. Do rezonancije dolazi kada je razlika između dva spinska stanja jednaka energiji radiofrekventnog zračenja primjenom elektromagnetskog zračenja određene frekvencije (radiovalnog zračenja). Energija se apsorbira od strane jezgri, one prelaze iz jednog spinskog stanja u drugo i prelaze u viši energijski nivo nakon čega se vraćaju u osnovni položaj i emitira se energija koju detektira radiofrekventni prijemnik. Signal koji se emitira naziva se FID odnosno slobodni indukcijski raspad. On se detektira, digitalizira i prevodi u NMR spektar Fourierovom transformacijom. Dobiveni spektar prikazuje apsorpciju radiofrekventnog zračenja u odnosu na kemijski pomak (Pine, 1994).

Kopulati su analizirani primjenom ^1H -NMR i ^{13}C -NMR spektroskopije (slike 10- 15).

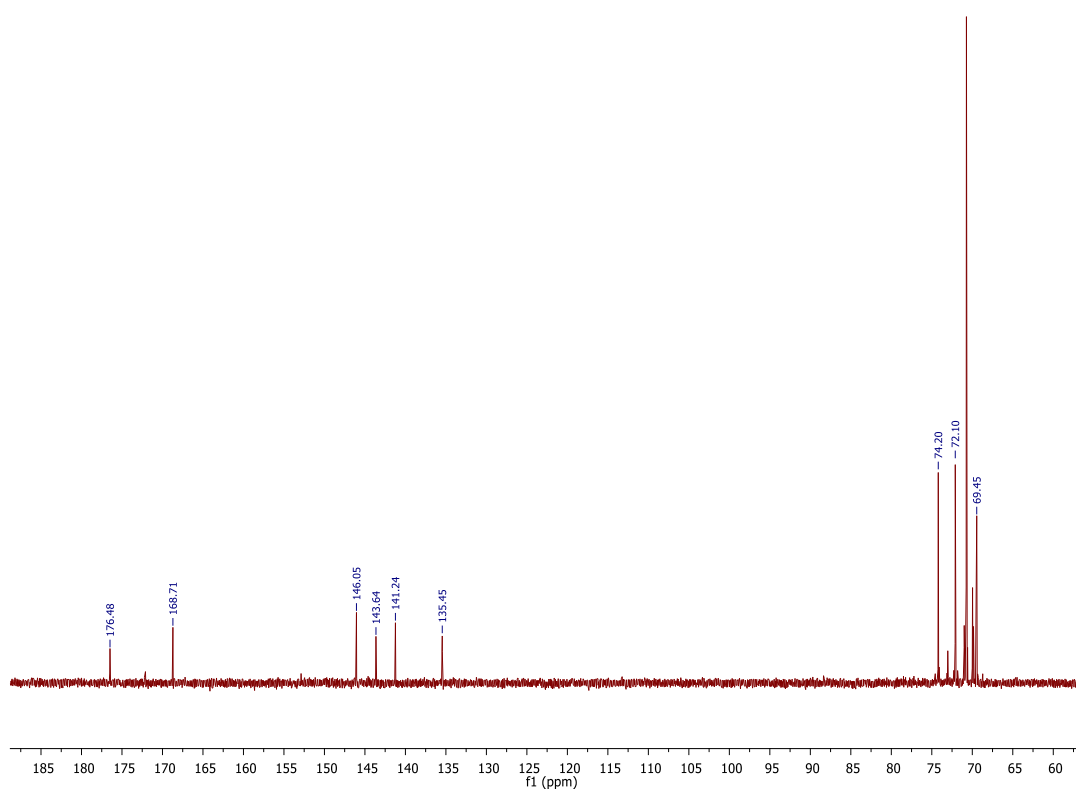


Slika 10. ^1H NMR spektar *N*7-ferocenoil-6-merkaptopurina (4a)

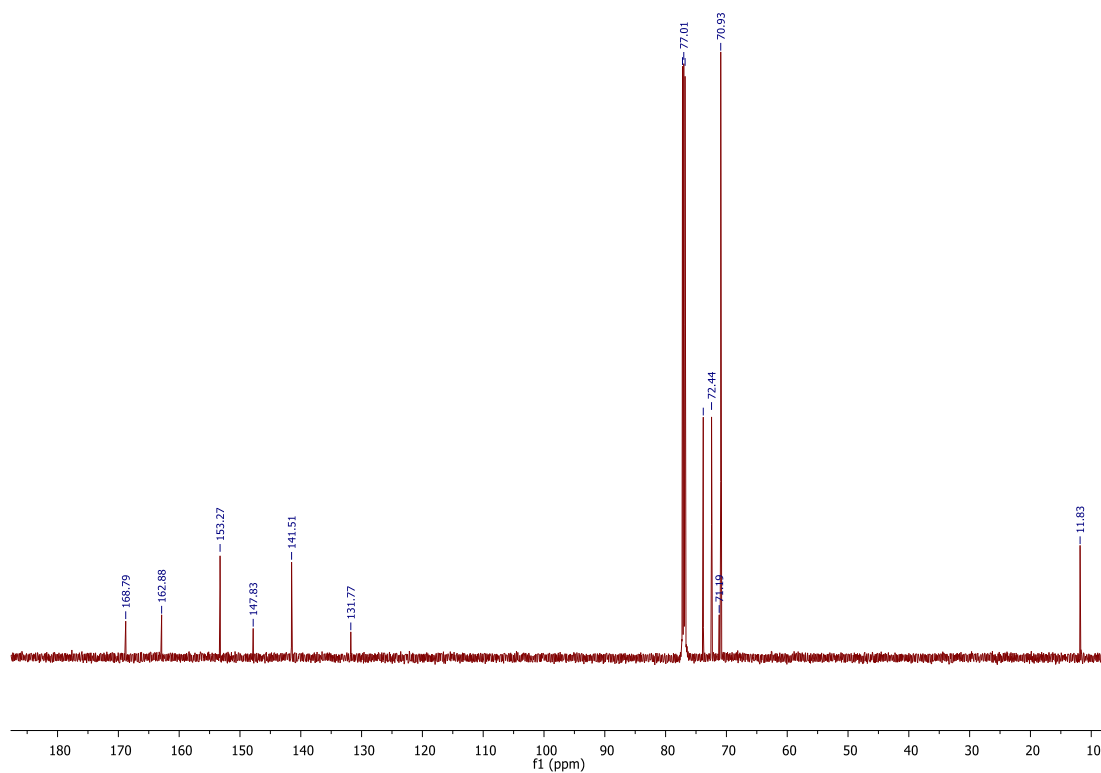


Slika 11. ^1H NMR spektar *N*9-ferocenoil-6-metilmerkaptopurina (5a)

U ^1H NMR spektrima svih kopolata vidljiv je signal za proton H8 i H2 pirimidinskog prstena oko δ 9,00 i 8,70 ppm (slike 10 i 11). U monoderivatima **4a** i **5a** proton supstituiranog ferocenskog prstena asigniran je pri δ 5,11 i 4,86 ppm, te protona nesupstituiranog ferocenskog prstena Cp-H na δ 4,34 ppm. Ferocenski protoni H α i H β cijepaju se u pseudo-triplete (pt) dok su protoni nesupstituiranog prstena vidljivi kao singlet. Proton -SH skupine na položaju C6 purinskog prstena u spoju *N*7-ferocenoil-6-merkaptopurin (**4a**) potvrđen je sigletom na δ 4,21 ppm, dok su protoni metilne skupine supstituenata na istom položaju u spoju *N*9-ferocenoil-6-metilmerkaptopurin (**5a**) potvrđeni singletom na δ 2,68 ppm.



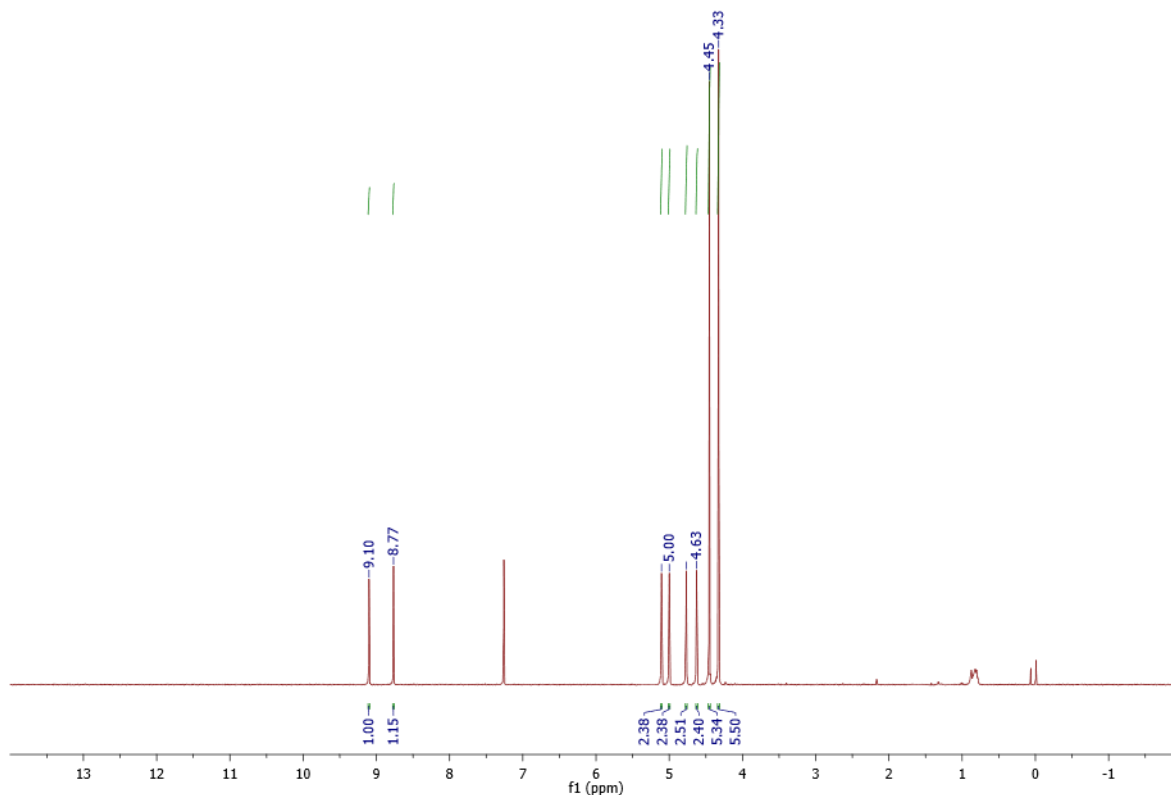
Slika 12. ^{13}C NMR spektar *N*7-ferocenoil-6-merkaptopurina (**4a**)



Slika 13. ^{13}C NMR spektar *N*9-ferocenoil-6-metilmerkaptopurina (**5a**)

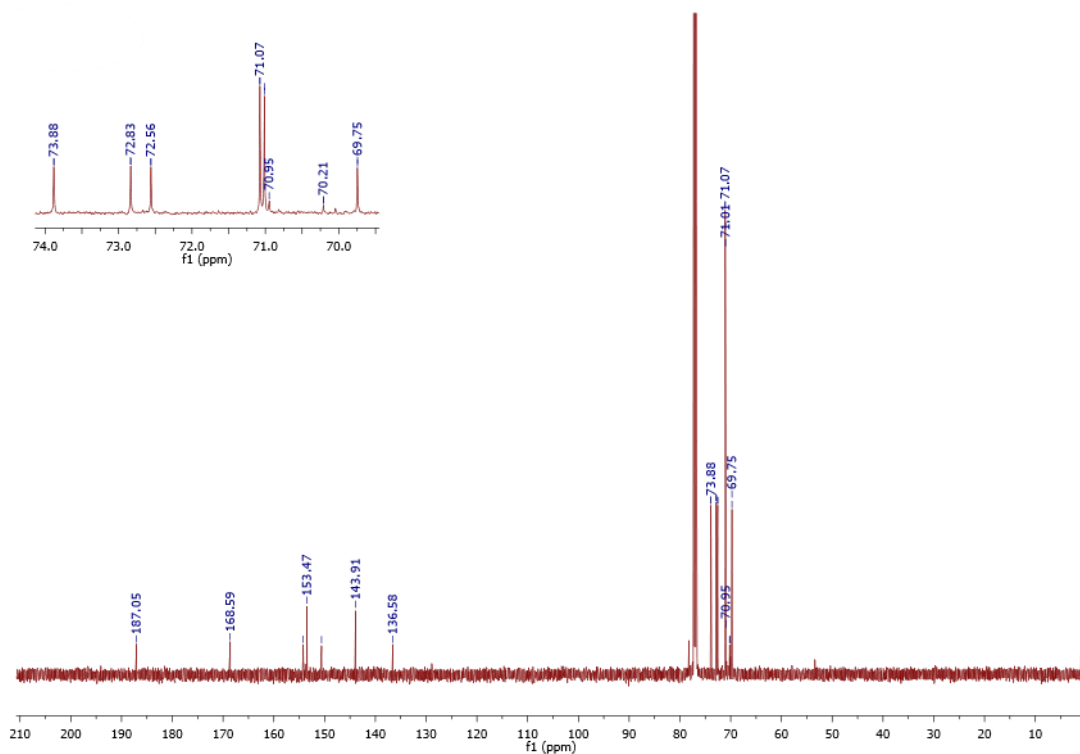
U ^{13}C spektru mono derivata **4a** i **5a** (slike 12 i 13) vidljivo je 5 aromatskih signala purinskog prstena, a signal u nižem polju pri δ 176 ppm u spektru spoja **4a** i pri δ 169 u spektru spoja **5a** odgovara karbonilnoj skupini, odnosno poveznici ferocenskog i heterocikličkog djela molekule. U području spektra koji odgovara ferocenskom sustavu u području od 70 do 74 ppm vide se 4 signala, dva koja odgovaraju $\text{C}\alpha$ i $\text{C}\beta$ te C_p (ugljikove jezgre nesupstituiranog ferocenskog prstena) i C_q (kvaterni ugljik supstituiranog ferocenskog prstena). Toma i suradnici pripravili su konjugate ferocena s pirimidinskim bazama u reakciji ferocenoil klorida (FcCOCl) uz deprotonirajući agens natrij hidrid (NaH) u dimetilformamidu (DMF), pri čemu nastaju *N*7- i *N*9- produkti u različitim omjerima ovisno o supstituentu na položaju *C*6 adenina. NMR spektroskopskom analizom nedvojbeno je potvrđen položaj signala za protone te ugljikove atome oba izomera. *N*7 izomeri u protonskom spektru imaju signale aromatskih i ferocenskih protona u nižem polju (pri višem kemijskom pomaku) u odnosu na *N*9 izomere. Također, signal karbonilne skupine *N*7 izomera je u nižem polju naprama istom signalu u *N*9 izomeru. Na temelju spektroskopske analize pripremljenih spojeva i usporedbom s gore navedenim podacima može se potvrditi da se kopulacija na 6-merkaptopurinu odvija na položaju *N*7 baze pri čemu nastaje *N*7-ferocenoil-6-merkaptopurin (**4a**), dok se kopulacija na 6-metilmerkaptopurinu odvija na

položaju *N9* dajući *N9*-ferocenoil-6-metilmerktopurin (**5a**). Nastajanje *N7* odnosno *N9* izomera u ovim reakcijama je u suglasju s prije objavljenim rezultatima koji govore da ovisno o supstituentu na nuklobazi na položaju *C6* dolazi do regioselektivne (nastanka *N7* i *N9* produkta) ili regiospecifične reakcije (nasatanka *N9* produkta) (Toma i sur., 2022b).



Slika 14. ^1H NMR spektar *N9,C6*-bis-ferocenoil-6-merktopurina (**4b**)

U ^1H -NMR spektru (slika 14) biskopulata **4b** iz kemijskih je pomaka potvrđena prisutnost dviju ferocenskih podjedinica, dva nesupstituirana prstena (Cp-H) pri δ 4.45 i 4.33 ppm, te četiri signala koji karakteriziraju CH skupine supstituiranih Cp prstena. Također su asignirani signali H8 i H2 pirimidinskog prstena pri δ 9,10 i 8,77 ppm.



Slika 15. ^{13}C NMR spektar *N*9,*C*6-bis-ferocenoil-6-merkaptopurina (**4b**)

U području ^{13}C spektra kopulata **4b** koji odgovara ferocenskom sustavu u području od 70 do 80 ppm asignirani su signali koji odgovaraju $\text{C}\alpha$ i $\text{C}\beta$ supstituiranog ciklopentadienilnog prstena, te dva signala za Cp ugljikove atome nesupstituiranog ferocenskog prstena što ukazuje na prisutnost dvije ferocenske podjedinice vezane za nukleobazu. U spektru je asignirano i 5 aromatskih signala purinskog prstena, te signal pri δ 169 i 187 ppm koji odgovaraju karbonilnoj skupini, odnosno potvrđuju nastajanje bisferoceniliranog produkta *N*9,*C*6-bis-ferocenoil-6-merkaptopurin (**4b**) (slika 15). Takav tijek reakcije je očekivan budući da je literaturno opisan nastanak *S,N*-disupstituiranih pirimidinskih nukleobaza. Za takav je ishod odgovorna veća nukleofilnost sumpora od dušika koji se deprotonira kao i dušikov atom te dolazi do *N*9- i *C*6-S aciliranja merkaptopurina (Pospieszny i Wyrzykiewicz, 2008).

5. ZAKLJUČCI

1. Višestupanjskom sintezom pripremljen je intermedijar ferocenoil klorid (**3**) koji je u reakciji s merkaptopurinom i njegovim 6-supstituiranim derivatom uz deprotonirajući agens (Et_3N) u otapalu (acetonitril) preveden u mono- (**4a** i **5a**) i biskonjugate (**4b**).
2. Struktura svih dobivenih produkata kao i regioselektivnost provedenih reakcija potvrđeni su NMR spektroskopijom. Na osnovu kemijskih pomaka u ^1H spektrima spojeva **4a** i **5a** potvrđena je supstitucija pirimidinske baze na jednom ciklopentadienilnom prstenu ferocena, dok je kod spoja **4b** potvrđena supstitucija baze s dvije ferocenske podjedinice, te točan položaj supstitucije na nukleobazi.
3. Kopulacija na 6-merkaptopurinu se odvija na položaju *N7* baze pri čemu nastaje *N7*-ferocenoil-6-merkaptopurin (**4a**), te zbog nukleofilnosti sumpora dolazi i do *N9*- i *C6-S* aciliranja merkaptopurina pri čemu nastaje *N9*, *C6*-bis-ferocenoil-6-merkaptopurin (**4b**). Porastom odnosa ferocenoil klorida naspram baze u reakcijski dovodi do povećanog udjela bisprodukata.
4. Reakcije provedene sa 6-metilmerkaptopurinom jednoznačno daju *N9*-ferocenoil-6-metilmerkaptopurin (**5a**), te se može zaključiti da je ta reakcija regiospecifična. Iskorištenje reakcije je veće naspram reakcija provedenih u dimetilformamidu uz NaH što ukazuje da je acetonitril učinkovitije otapalo, odnosno trietilamin bolje deproteksijsko sredstvo u ovim reakcijama kopulacije.

6. POPIS LITERATURE

- Berg JM, Tymoczko JL, Gatto GJ, Stryer L (2013) Biokemija, 1. izd., (preveli I.W. Đurašević i sur.), Školska knjiga, Zagreb
- Biehel ER, Reeves PC (1973) *Synthesis*, 360-361
- Chapdelaine A, Mansour AM, Troyanov Y i sur. (2017) Metabolite monitoring to guide thiopurine therapy in systemic autoimmune diseases. *Clin. Rheumatol.* **36**, 1341–1348. <https://doi.org/10.1007/s10067-017-3554-4>
- Chellan P, Sadler PJ (2020) Frontispiece: Enhancing the Activity of Drugs by Conjugation to Organometallic Fragments. *Chem. Eur. J.* **40**, 8665-8828. <https://doi.org/10.1002/chem.202084061>
- Dean L, Kane M (2012) Mercaptopurine Therapy and TPMT and NUDT15 Genotype. In: Pratt VM, Scott SA, Pirmohamed M, i sur., editors. *Medical Genetics Summaries* (Internet). Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US); <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK100660>; Pristupljeno 28.7.2023.
- Havaić V, Djaković S, Lapić J, Weitner T, Šakić D, Vrček V (2017) Reduction Potential of Ferrocenoyl-Substituted Nucleobases. Experimental and Computational Study, *Croatica chemica acta*, **90**, 589 – 594. <https://doi.org/10.5562/cca3229>
- Ismail MK, Armstrong KA, Hodder SL, Horswell SL, Male L, Nguyen HV i sur. (2020) Organometallic nucleoside analogues: effect of the metallocene metal atom on cancer cell line toxicity, *Dalton Trans.* **49**, 1181-1190. <https://doi.org/10.1039/C9DT04174E>
- Karran P, Attard N (2008) Thiopurines in current medical practice: molecular mechanisms and contributions to therapy-related cancer. *Nat. Rev. Cancer* **8**, 24–36. <https://doi.org/10.1038/nrc2292>
- Kealy TJ, Pauson PL (1951) A New Type of Organo-Iron Compound. *Nature* **168**, 1039-1040. <https://doi.org/10.1038/1681039b0>
- Knobloch FW, Raucher WH (1961) Condensation polymers of ferrocene derivatives. *J. Polym. Sci. A.* **54**, 651–656. <https://doi.org/10.1002/pol.1961.1205416029>
- Kowalski K (2016) Ferrocenyl-nucleobase complexes: Synthesis, chemistry and applications, *Coord. Chem. Rev.* **317**, 132-156. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2016.02.008>

- Lapić J, Havačić V, Šakić D, Sanković K, Djaković S, Vrčec 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**, 5424-31. <https://doi.org/10.1002/ejoc.201500647>
- Lewandowski EP, Szczupak L, Wong SL, Skiba J, Guspiel A., Solecka J i sur. (2017) Antibacterial Properties of Metallocenyl-7-ADCA Derivatives and Structure in Complex with CTX-M β -Lactamase. *Organometallics* **36**, 1673-1676. <https://doi.org/10.1021/acs.organomet.6b00888>
- NCBI - National Center for Biotechnology Information (2005) PubChem Compound Database; CID=7611, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/7611>; Pristupljeno 24. srpnja 2023.
- Patra M, Gasser G (2017) The medicinal chemistry of ferrocene and its derivatives. *Nat. Rev. Chem.* **1**. <https://doi.org/10.1038/s41570-017-0066>
- Patwa AN, Gonnade RG, Kumar VA, Bhadbhade MM, Ganesh KN (2010) Ferrocene-Bis (thymine/uracil) Conjugates: Base Pairing Directed, Spacer Dependent Self-Assembly and Supramolecular Packing. *J. Org. Chem.* **75**, 8705-8708. <https://doi.org/10.1021/jo101813z>
- Pine SH (1994) Organska kemija (prijevod I. Bregovec i V. Rapić), Školska knjiga, Zagreb, 1062-1138
- Pospieszny T, Wyrzykiewicz E (2008) A practical synthesis of new S,N-disubstituted derivatives of 5-(4-methylpiperidino) methyl-2-thiouracil, *Tetrahedron Lett.* **49**, 5319-5321. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2008.06.079>
- Rep V, Piškor M, Šimek H, Mišetić P, Grbčić P, Padovan J i sur. (2020) Purine and purine isostere derivatives of ferrocene: An evaluation of ADME, antitumor and electrochemical properties. *Molecules* **25**, 1570-1594. <https://doi.org/10.3390/molecules25071570>
- Rudolph FB (1994) The biochemistry and physiology of nucleotides, *J. Nutr.* **124**, 124-127. https://doi.org/10.1093/jn/124.suppl_1.124S
- Sahasranaman S, Howard D, Roy S (2008) Clinical pharmacology and pharmacogenetics of thiopurines, *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **64**, 753-767. <https://doi.org/10.1007/s00228-008-0478-6>

- Toma M (2022a) Priprava, redoks svojstva i biološka aktivnost ferocenskih derivata nukleobaza (doktorski rad), Farmaceutsko- biokemijski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb
- Toma M, Vrčec V (2020) Redoks-svojstva ferocenom supstituiranih nukleobaza, *Kem. Ind.* **69**, P21 - P29. <https://doi.org/10.15255/KUI.2020.025>
- Toma M, Zubčić G, Lapić J, Djaković S, Šakić D, Vrčec V (2022b) Ferrocenoyl-adenines: substituent effects on regioselective acylation, *Beilstein J. Org. Chem.* **18**, 1270-1277. <https://doi.org/10.3762/bjoc.18.133>
- Wade LG, *Organska kemija, Školska knjiga, Zagreb, 2017, 510-624*
- Wikipedia (2023) Ferocen, <https://en.wikipedia.org/wiki/Ferrocene>; Pristupljeno 28. srpnja 2023.
- Wikipedia (2023) Nukleozid, <https://en.wikipedia.org/wiki/Nucleoside>; Pristupljeno 20. kolovoza 2023.

Izjava o izvornosti

Ja Klara Komarec 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