

Ispitivanje uvjeta reakcije kopulacije heteroanularno supstituiranog ferocena i timina

Talajić, Antea

Undergraduate thesis / Završni rad

2017

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:289817>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-17**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Biotehnologija

Antea Talajić

7093/BT

**ISPITIVANJE UVJETA REAKCIJE KOPULACIJE
HETEROANULARNO SUPSTITUIRANOG FEROCENA I TIMINA**

ZAVRŠNI RAD

Predmet: Organska kemija

Mentor: Izv. prof. dr. sc. Senka Djaković

Zagreb, 2017.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski sveučilišni studij Biotehnologija
Zavod za kemiju i biokemiju
Laboratorij za organsku kemiju
Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

ISPITIVANJE UVJETA REAKCIJE KOPULACIJE HETEROANULARNO SUPSTITUIRANOG FEROCENA I TIMINA

Antea Talajić, 0058206809

Sažetak: Supstituirani analozi prirodnih nukleozida, među kojima i kopulati nukleobaza s ferocenskim derivatom, poznati su po širokom spektru biološkog djelovanja. Pokazuju antitumorsko, antibakterijsko i antiviralno djelovanje kao i zanimljiva elektrokemijska svojstva što ih čini važnim područjem istraživanja. U okviru ovog završnog rada višestupanjskom sintezom pripremljen je heteroanularno supstituirani derivat ferocenoil timina (**6**). Posebna pozornost posvećena je utjecaju otapala na povećanje iskorištenja reakcije kopulacije. IR, ^1H i ^{13}C -NMR spektroskopijom potvrđena je struktura dobivenog spoja.

Ključne riječi: biokonjugati, ferocen, nukleobaza, spektralna analiza, timin

Rad sadrži: 24 stranice, 11 slika, 9 shema, 24 literaturna 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. Senka Djaković

Pomoć pri izradi:

Datum obrane: 18. rujna 2017.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor 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

TESTING CONDITIONS OF COPULATING REACTION OF HETEROANNULARY SUPSTITUTED FERROCENE WITH THYMINE

Antea Talajić, 0058206809

Abstract: Ferrocene modified nucleobases are nucleoside analogues that show wide spectrum of biological activity. They exhibit antitumor, antibacterial and antiviral activity as well as electrochemical properties which makes them an important subject of modern research. Within the framework of this final work, $H_3COOCFnCOThy$ (**6**) was made by multiple synthesis of ferrocene derivatives. Special attention was paid to the effects of solvent on the increase of the yield of copulating reaction. The structure of resulting compound was confirmed by IR, 1H i ^{13}C -NMR spectroscopy.

Keywords: bioconjugate, ferrocene, nucleobase, spectral analysis, thymine

Thesis contains: 24 pages, 11 figures, 9 shemes, 24 references

Original in: Croatian

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

Mentor: Izv. prof. dr. sc. Senka Djaković

Technical support and assistance:

Defence date: 18th September 2017

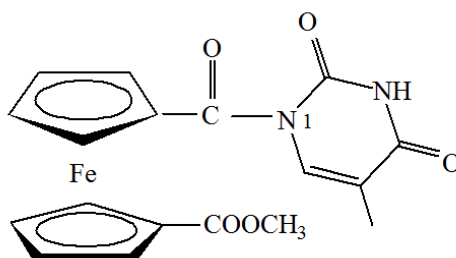
Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1.FEROCEN	2
2.2.NUKLEOZIDI	3
2.3.PIRIMIDIN I PIRIMIDINSKE BAZE	4
2.4.TIMIN.....	5
2.5. KOPULATI FEROCENA I NUKLEOBAZA.....	6
3. EKSPERIMENTALNI DIO	10
3.1. MATERIJALI	10
3.2. METODE RADA.....	10
4. REZULTATI I RASPRAVA	17
4.1. UVOD	17
4.2. SINTEZA I SPEKTROSKOPSKA ANALIZA PREKURSORA 1'-METOKSI KARBONILFEROCENOIL KLORIDA (5)	17
4.3. SINTEZA I SPEKTROSKOPSKA ANALIZA $H_3COOCFnCOTHy$ (6).....	19
5. ZAKLJUČAK	22
6. LITERATURA	23

1. UVOD

Ovaj završni rad uklapa se u istraživanje na području metalocena koje je u okviru Potpore istraživanja pod naslovom: Priprava i spektroskopska mjerenja ferocenoilnih derivata nukleobaza. Sinteza i ispitivanje strukture ferocenskih derivata nukleozida provodi se u Laboratoriju za organsku kemiju Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta u Zagrebu.

Dokazano je kako supstituirani analozi prirodnih nukleozida imaju snažno biološko djelovanje zbog čega je potreba za novosintetiziranim nukleozidnim analogima izuzetno velika. Cilj ovog završnog rada je optimirati uvjete sinteze za pripravu modificiranog analoga nukleozida pirimidinske baze timina i heteroanularno supstituiranog derivata ferocena s karbonilnom skupinom kao razmaknicom (Slika 1). Svrha ovog rada je usporediti uvjete reakcije kopulacije ovisno o upotrijebljenom otapalu (dimetilformamid i acetonitril) u navedenoj reakciji.

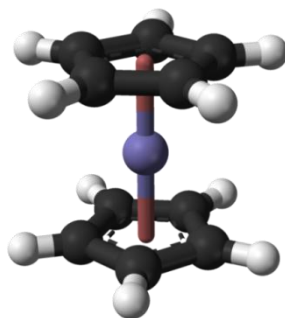


Slika 1. Struktura derivata ferocenoil timina

2. TEORIJSKI DIO

2.1.FEROCEN

Organometalna kemija istražuje spojeve koji sadrže vezu metal-ugljik [1]. Otkriće ferocena [2] i mogućnost potpune karakterizacije tog spoja dovelo je do eksplozivnog razvoja te znanstvene discipline. Ferocen pripada skupini metallocena, spojeva izražene biološke aktivnosti, a ističe se zbog svoje neutralnosti, netoksičnosti i stabilnosti. Ferocen nastaje interakcijom željeza i ugljika u nezasićenim cikličkim ugljikovodicima te u toj vezi sudjeluje ukupno 18 elektrona, što odgovara strukturi plemenitog plina. Istraživanjem strukture ferocena mnogim fizikalno-kemijskim postupcima identificirana je njegova plošna struktura "sendviča" s dva ciklopentadienilna prstena povezana centralnim atomom željeza (Slika 2), zbog koje se ferocen odlikuje posebnom stereokemijom, odnosno kiroptičkim svojstvima [1].



Slika 2. Struktura ferocena [3]

Molekulska formula ferocena je $\text{Fe}(\text{C}_5\text{H}_5)_2$, molarna masa 186.04 g/mol, tali se pri 172.5 °C, a vrije pri 249 °C. Narančasti je prah topljiv u većini organskih otapala, a netopljiv u vodi. Podložan je reakcijama elektrofilne supstitucije kojima su dokazana aromatska svojstva ferocena što ukazuje na analogiju s benzenom u mnogim reakcijama [2]. U usporedbi s benzenom pokazuje veću reaktivnost zbog sklonosti protoniranju i reakcijama s Lewisovim kiselinama te oksidaciji željeza u fericenijev ion [1].

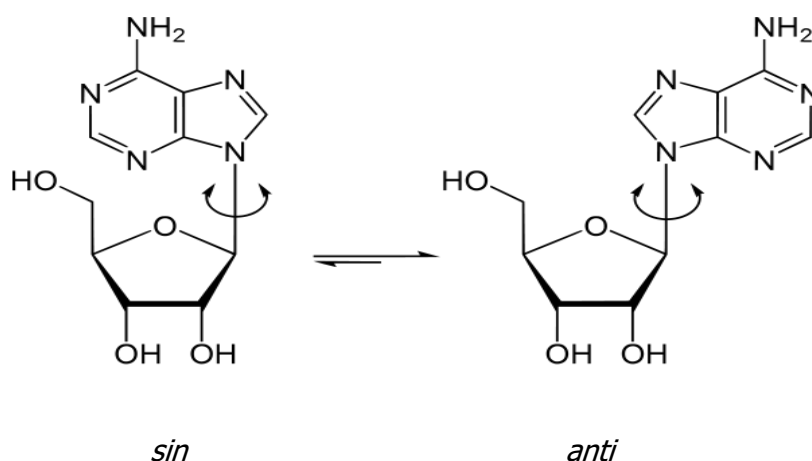
Uočeno je kako je pri sobnoj temperaturi rotacijska barijera ciklopentadienilnih prstenova ferocena niska, no širok spektar spojeva pojačava mogućnost rotacije tih prstenova. Ta se

svojstva koriste kod sinteze konjugata ferocenskih spojeva pri čemu supstrat sam optimizira način vezanja disfunkcijskih molekula prostornom selektivnom rotacijom.

Dostupan je veliki broj različitih biokonjuganata ferocena i biomolekula (aminokiselina i peptida, DNA i RNA, ugljikohidrata i nukleozida), od kojih većina pokazuje citostatična, antifungalna, antimalarijska i antitumorska svojstva [4-6].

2.2. NUKLEOZIDI

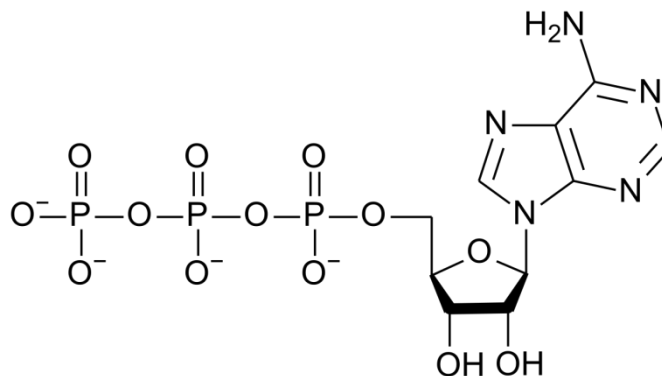
Nukleozidi su organski spojevi koji se sastoje od dušikove heterocikličke baze i ugljikohidrata povezanih *N*-glikozidnom vezom koja može postojati u dvije konformacije, *anti*- ili *sin*- (Slika 3). *Sin*- i *anti*-konformeri mogu prijeći jedan u drugi kidanjem ili preoblikovanjem glikozidne veze. Oba su konformera zastupljena u prirodi, ali *anti*-konformeri prevladavaju [7]. Baze koje izgrađuju nukleozide dijele se na purinske i pirimidinske. U purinske se ubrajaju adenin i gvanin (A, G) te se sastoje od pirimidinskog i imidazolnog prstena, dok se u pirimidinske ubrajaju citozin, uracil i timin (C, U, T). Nukleozidi izgrađuju biološki važne makromolekule, nukleinske kiseline pri čemu se kod molekule DNA (deoksiribonukleinska kiselina) pojavljuje timinska baza, a kod molekule RNA (ribonukleinska kiselina) uracilna. DNA i RNA razlikuju se po vrsti ugljikohidrata pri čemu deoksiribonukleinska kiselina sadrži šećer deoksiribožu, a ribonukleinska kiselina ribožu.



Slika 3. *Sin*- i *anti*-konformeri adenzina

Fosforilacijom primarne hidroksilne skupine šećera nukleozida uz djelovanje kinaza nastaju fosfatni esteri nukleozida, nukleotidi. Osim što služe kao preteče nukleinskih kiselina, purinski i pirimidinski nukleotidi sudjeluju u različitim metaboličkim funkcijama kao što su prijenos energije (energijski metabolizam), sinteza proteina, regulacija enzimske aktivnosti i stanična

signalizacija. Nukleozid-trifosfati ili difosfati (npr. ATP i ADP) kao glavni donori ili akceptori fosforilnih skupina tijekom metabolizma imaju glavnu ulogu pri prijenosu energije koje prate metaboličke pregradnje i oksidacijsku fosforilaciju [7]. Cijepanjem visokoenergetske anhidridne veze između atoma fosfora unutar molekule adenzin-trifosfata (ATP) (Slika 4) oslobađa se određena količina energije koja je dovoljna za pokretanje brojnih reakcija u organizmu. Nukleotidi ostalih baza također imaju energetska vrijednost, ali imaju veću specifičnost.



Slika 4. Adenzin trifosfat

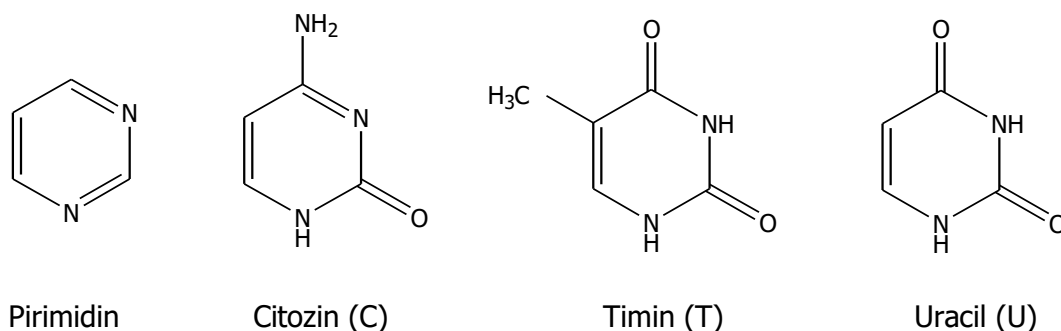
2.3. PIRIMIDIN I PIRIMIDINSKE BAZE

Pirimidin je heterociklički spoj koji u svojoj strukturi osim ugljika sadrži i druge (hetero) atome. To su organske, aromatske molekule, koje za razliku od benzena tvore nepravilnu heksagonsku strukturu sa šest veza različitih duljina i četiri različita vezna kuta.

Pirimidin vrlo sporo podliježe elektrofilnoj supstituciji. On reagira gotovo na isti način kao deaktivni benzenski prsten što se djelomično pripisuje elektron-akceptorskom induktivnom utjecaju dušikovih atoma, koji destabilizira intermedijarni kation. Također, većina reakcija elektrofilne supstitucije na pirimidinu inhibirana je nukleofilnim i bazičnim svojstvima dušikovih atoma. Kiseline protoniraju dušikove atome čime prsten postaje deaktiviran, a do elektrofilne supstitucije dolazi samo u vrlo agresivnim uvjetima. Friedel-Craftsove reakcije uopće se ne mogu izvesti. Za razliku od toga, nukleofilna je supstitucija na pirimidinu povlaštena [8].

Tri nukleobaze, citozin, uracil i timin derivati su pirimidina (Slika 5). U molekulama DNA stvaraju vodikove veze sa svojim komplementarnim bazama, derivatima purina. Te vodikove veze, unatoč tomu što su slabe, stabiliziraju dvostruku uzvojnica zbog njihova velikog broja u

molekuli DNA. Stabilizaciji pridonosi planarna struktura purina i pirimidina te hidrofobni učinak što omogućuje da se parovi baza slažu jedan na drugi.



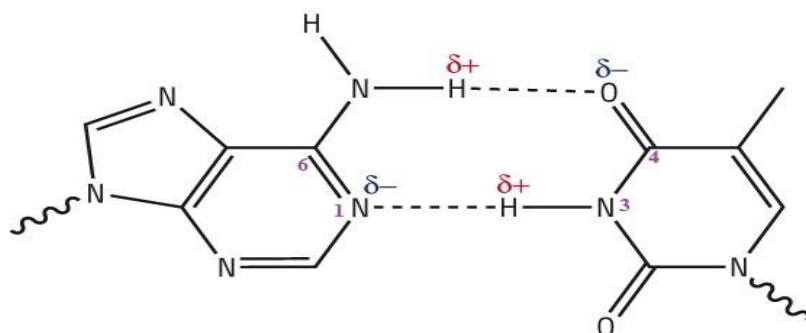
Slika 5. Struktura pirimidina i pirimidinskih baza

Derivati pirimidina sastavni su dio mnogih biološki aktivnih tvari i lijekova (kemoterapijski agensi) [9], za razliku od osnovne molekule pirimidina koja ne pokazuje farmakološka svojstva. Osnovna struktura pirimidina nalazi se u velikom broju antimetabolita što ukazuje na širok spektar antitumorske aktivnosti, vitaminima kao što su riboflavini, tiamini i folna kiselina [9], a 2,4-diaminopirimidini i 2-amino-4-hidroksipirimidini inhibiraju enzim dihidrofolat-reduktazu što ukazuje na njihovu antimikrobnu aktivnost [10].

Specifične medicinske primjene uključuju upotrebu sintetskih purinskih i pirimidinskih analoga koji sadrže halogene, tiole ili dodatne dušikove atome u kemoterapiji raka, liječenju AIDS-a i kao supresora imunskog odgovora tijekom transplantacije organa. [7]

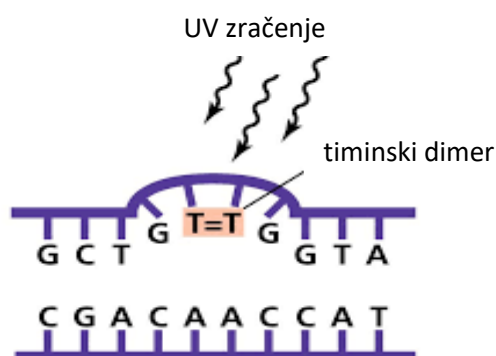
2.4.TIMIN

Timin, odnosno 5-metiluracil, pirimidinska je nukleobaza prisutna u molekuli DNA, povezana s dvije vodikove veze s komplementarnom bazom, adeninom (Slika 6). Timin, vezan na ugljikohidrat deoksiribozu, tvori nukleozid timidin koji može biti fosforiliran jednom, dvjema ili trima fosfatnim skupinama pri čemu nastaju timidin monofosfat (TMP), timidin difosfat (TDP) te timidin trifosfat (TTP). U molekuli RNA timin je zamijenjen uracilom.



Slika 6. Vodikove veze između adenina i timina

Ultraljubičasto zračenje uzrokuje oštećenje molekule DNA budući da nukleotidne baze apsorbiraju fotone (260 nm), a to dovodi do stvaranja timinskih dimera (pirimidinskih), odnosno kovalentnog povezivanja susjednih pirimidina koji se nalaze u istom lancu (Slika 7) što negativno utječe na strukturu DNA, otežava njezinu replikaciju, narušava komplementarno sparivanje nukleobaza i utječe na vezanje proteina na molekulu DNA [11].



Slika 7. Nastajanje pirimidinskih dimera [11]

2.5. KOPULATI FEROCENA I NUKLEOBAZA

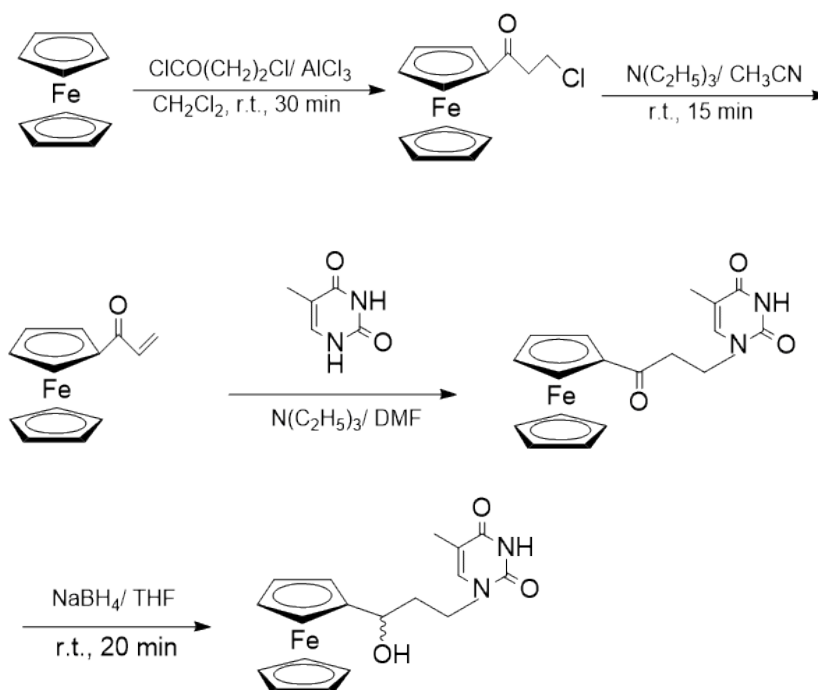
Nakon 19. stoljeća dolazi do stapanja znanstvenih disciplina koje su do tada bile razdvojene, pa tako na graničnom području organske i anorganske kemije nastaje organometalna kemija. Nadalje, spajanjem organometalne kemije i biologije, odnosno biokemije, razvija se bioorganometalna kemija koja proučava konjugate organometalnih spojeva i biomolekula (DNA, ugljikohidrati, steroidi, aminokiseline, peptidi). Glavna područja istraživanja bioorganometalne kemije postaju bioanaliza, terapija, molekulska prepoznavanje te

toksikologija i okoliš [1]. Kopulacijom ferocena s nukleobazama, nukleozidima [12] i nukleotidima [13] nastaju spojevi koji mogu poslužiti za sintezu novih lijekova.

Ferocen poprima biološke karakteristike vezanjem neke biomolekule, a upravo ta kopulacija predstavlja prvi korak u novijim istraživanjima na području biologije, farmacije i znanosti o materijalima. Osim biološke aktivnosti, kopulati ferocena i nukleobaza pokazuju i elektrokemijsku aktivnost koja proizlazi iz redoks svojstava ferocenskog dijela molekule. Dušične baze, zahvaljujući svojoj strukturi, mogu se ponašati kao proton donori ili proton akceptori. Ferocen se na dušičnu bazu veže kao *N*-supstituent, pri čemu mjesto vezanja određuje biološka svojstva spojeva.

Prvo uspješno uvođenje ferocena na mjesto vezivanja šećera u adenzinu (N9 položaj) provedeno je početkom 80-tih godina prošlog stoljeća. Reakcije su provedene u vodi uz relativno nisko iskorištenje (30%), a dobiveni konjugati mogu uspostaviti interakcije s DNA molekulom preko vodikovih veza što je potvrđeno volumetrijskom tehnikom [14].

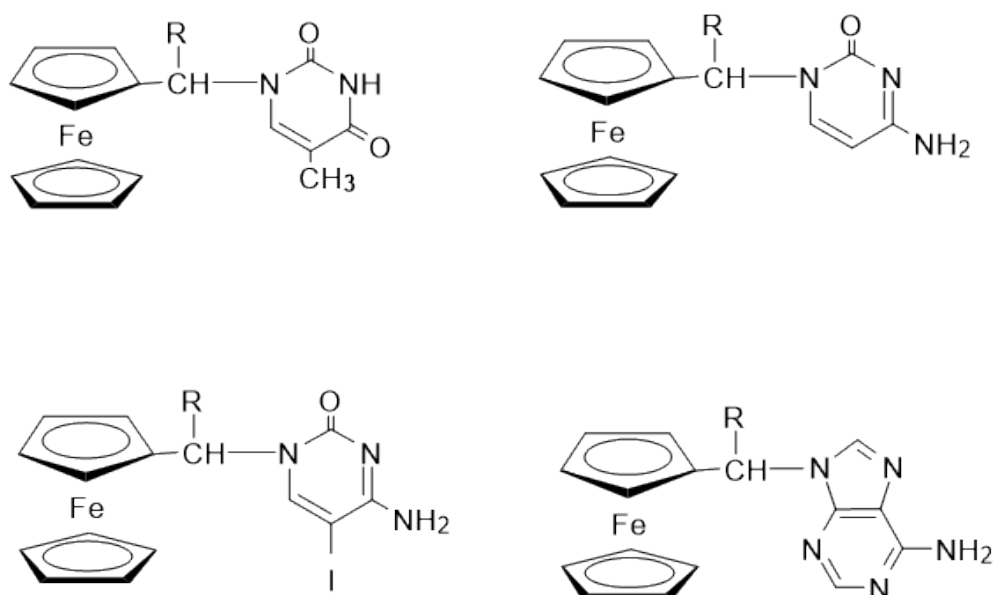
Kod sinteze ferocetil-timinskog derivata i aciklonukleozida (Schema 1) ključni stupanj je Michaelova adicija s timinom. Reakcija je provedena u dimetilformamidu u prisutnosti trietilamina pri 70 °C tijekom 5 sati. Redukcijom dobivenog derivata s NaBH₄ u 51% iskorištenju dobiven je aciklonukleozid.



Schema 1. Priprava ferocetil-timinskog derivata

Za ispitivanje elektrokemijskih svojstava dobivenih konjugata korištena je ciklička voltometrija (CV). Uočena je reverzibilna jedno-elektronska oksidacija što potvrđuje elektronsku aktivnost uklopljene ferocenske podjedinice. Ispitana je i njihova antikancerogena aktivnost pri čemu se aciklonukleozid pokazao neaktivnim dok se ferocenil-timinski derivat pokazao aktivnim agensom prema staničnim linijama MCF-7 i CCRF-CEM [15].

Ferocenilalkil nukleobaze pripravljene su u reakciji α -(hidroksi)alkilferocena s različitim bazama, timinom, citozinom, 5-jodcitozinom i adeninom (Shema 2). Rezultati ukazuju na to da izbor supstrata utječe na lipofilnost konačnog produkta ferocenilalkil-nukleobaze. Provedena su *in vivo* ispitivanja *N1*-ferocenilmetiltimina prema nekim animalnim tumorima te je uočeno jako antitumorsko djelovanje prema karcinomu 755 [16].



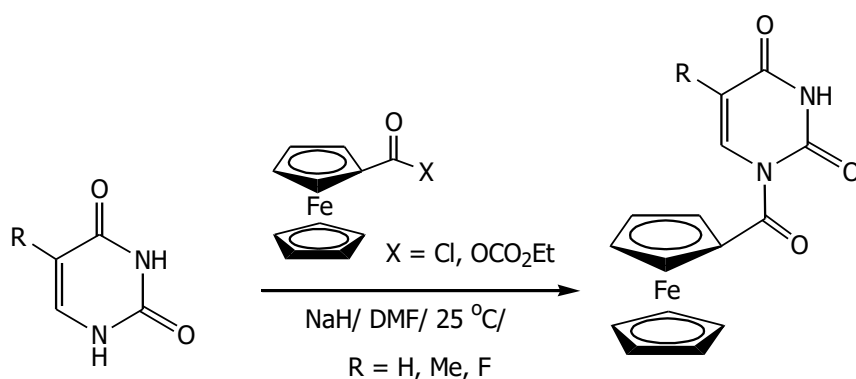
Shema 2. Ferocenilalkil nukleobaze

Autori Patwa, Gonnade i suradnici [17] pripravili su ferocen-biskonjugate s timinom i uracilom Mitsunobuovom reakcijom pri čemu su nakon *N*-debenzoilacije u vodenoj otopini K_2CO_3 dobiveni *N1*-supstituirani derivati. Zabilježene su različite interakcije tih biokonjuganata kroz vodikove veze, ovisno o bazi i supstituciji na C-5 položaju.

Tijekom godina razvijeni su različiti načini pripreve kopulata ferocena i nukleobaza kao što su: Songoshirina kopulativna reakcija halogenirane nukleobaze s etilferocenom uz paladij kao katalizator (rijetko zbog previsoke cijene paladija), adicija ferocenilmetilazida na nukleobaze uz bakar kao katalizator, Horner-Wadsworth-Emmons reakcija te Mitsunobu reakcija koja je spomenuta prilikom sinteze biskonjugata ferocena s timinom i uracilom [17].

Kopulati ferocena i nukleobaza mogu se koristiti i kao biosenzori za glukozu prilikom odvijanja selektivnih reakcija. Služe kao bioelementi, a uz njih se upotrebljava i pretvornik koji pretvara biokemijski signal u neki mjerljivi oblik signala. Jednostavnost modifikacije, biokompatibilnost, stabilnost, velika površina, električna vodljivost te dobra redoks svojstva razlozi su zbog kojih se ovi spojevi koriste kao biosenzori [18].

Lapić i suradnici [19] pripravili su biokonjugate ferocena s pirimidinskim nukleobazama (timinom, uracilom i 5-fluorouracilom). Kopulacijom nukleobaza s ferocenoil kloridom, ferocen se regioselektivno vezao na *N1*-položaj pirimidinske nukleobaze. *N3*-položaj nije bio zaštićen kako bi se dobio *N1*-izomer kao pojedinačni produkt (Shema 3). Regioselektivnost navedenih reakcija potvrđena je i detaljno analizirana korištenjem NMR spektroskopije i kvantno-kemijskim računom. Izračunata energetska barijera za acetilaciju na položaju *N3* značajno je viša što upućuje na to da je analogna reakcija na položaju *N1* kinetički kontrolirana. Mehanizam ključnog sintetskog koraka, u kojem dolazi do povezivanja organometalnog dijela i nukleobaze, ovisi o reakcijskim uvjetima, pa varira od S_N2 mehanizma do klasičnog adicijsko-eliminacijskog mehanizma koji uključuje tetraedarski međuprodukt. Mehanizam se može „podesiti“ pa tako u mediju visoke pH vrijednosti i uz vrlo aktiviranu karbonilnu skupinu (npr. acil-kloridi) dolazi do supstitucijskog procesa u jednom reakcijskom koraku.



Shema 3. Regioselektivno *N1*-aciliranje pirimidinskih nukleobaza

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

Dimetilformamid (DMF) ($t_v = 138\text{ }^\circ\text{C}$) se destilira pod vakuumom, a zatim prebaci u tikvicu s molekulskim sitima (4 \AA) do upotrebe. Ostali kupovni reagensi i kemikalije korišteni su bez pročišćavanja.

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

3.2. METODE RADA

Snimljeni su IR spektri čvrstih tvari u kalijevu bromidu te uljasto-smolastih tvari u diklormetanu na IR spektrofotometru Bomem MB 100 mid FT. Spektri $^1\text{H-NMR}$ i $^{13}\text{C-NMR}$ snimljeni su na spektrometru Varian INOVA 400. Svi uzorci otopljeni su u CDCl_3 ili DMSO-d_6 i mjereni pri 298 K u NMR cjevčici od 5 mm. Kemijski pomaci (δ) u $^1\text{H-NMR}$ i $^{13}\text{C-NMR}$ spektrima izraženi su u ppm u odnosu prema tetrametilsilanu (TMS, δ 0,0 ppm).

Intermedijeri i produkti pročišćeni su kolonskom kromatografijom na silikagelu (Merck veličine zrna 0.063-0.20mm) korištenjem smjese diklormetana i etil-acetata (10:1) te smjese diklormetana i acetona (10:1) kao eluensa. Staklene kolone punjene su pod utjecajem gravitacije u navedenim omjerima.

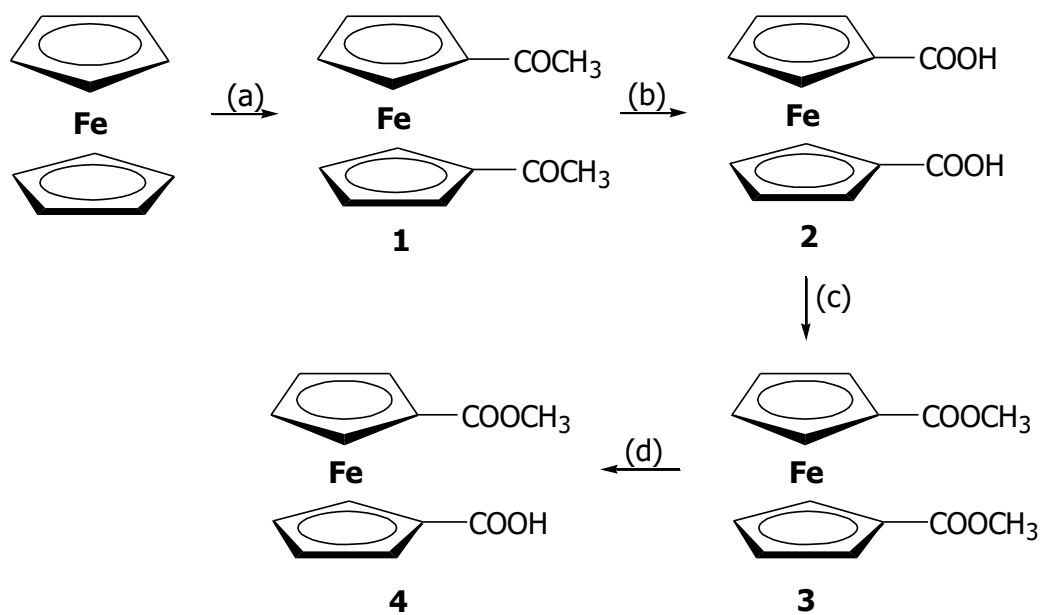
Tijek reakcije praćen je tankoslojnom kromatografijom na silikagelu u odgovarajućem sustavu otapala, a izolirane komponente detektirane su UV lampom valne duljine 254 nm.

Tumačenje spektroskopskih oznaka i kratica:

IR spektri: ν = rastezanje (stretching), δ = deformacije (bending), j. = jaka vrpca, sr. = srednja vrpca, š. = široka vrpca, r = rame (infleksija), v = vrlo.

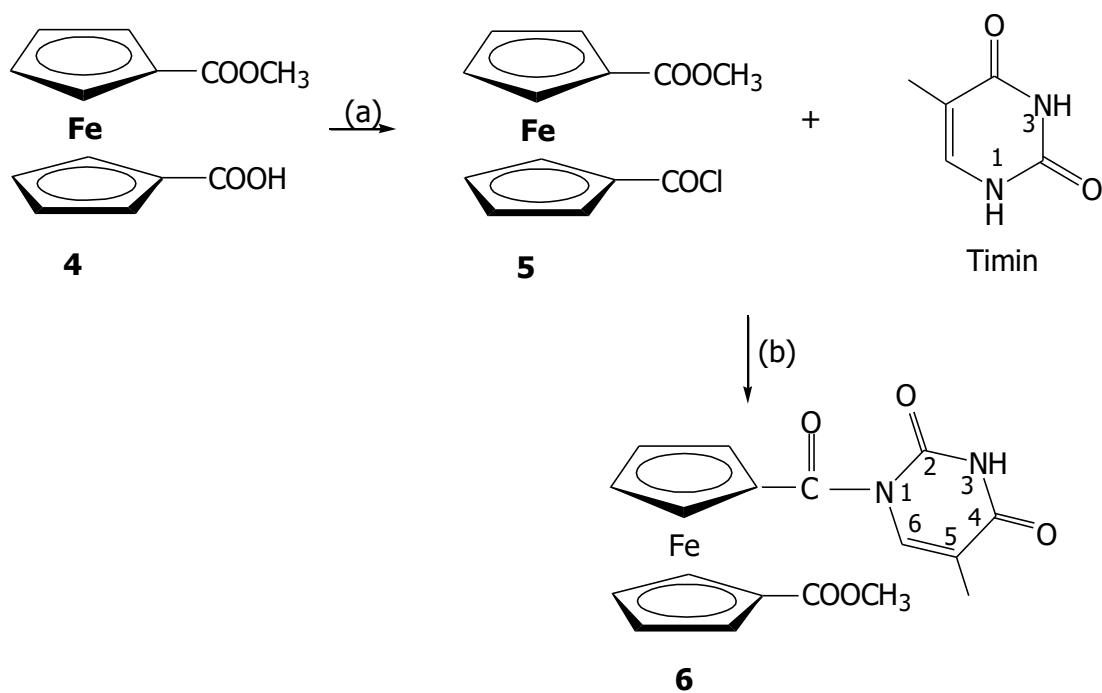
$^1\text{H-NMR}$ -spektri: s = singlet, d = doublet, t = triplet, q = kvartet, m = multiplet.

Shema A. Priprava 1'-metoksikarbonilferocen-1-karboksilne kiseline (4)



(a) $\text{CH}_3\text{COCl}/\text{AlCl}_3/\text{ClCH}_2\text{CH}_2\text{Cl}$; (b) Br_2 , dioksan; (c) CH_3OH , $\text{BF}_3 \times \text{Et}_2\text{O}$;
 (d) $\text{NaOH}/\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{OH}$

Shema B. Priprava $\text{H}_3\text{COOCFnCOThy}$ (**6**)



(a) oksalil-klorid/ CH_2Cl_2 /piridin (b) NaH/DMF iii CH_3CN

1,1'-Diacetilferocen (2)

Suspenziji aluminijeva klorida (17.5 g, 0.13 mol) u suhom diklormetanu (40 mL) dokapa se otopina acetil-klorida (CH_3COCl) (11 mL, 0.15 mol) u istom otapalu (40 mL). Tako pripremljeni 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 (80 mL). Nakon 90 minuta refluksiranja reakcijska se smjesa prebaci u čašu s ledom, te ekstrahira diklormetanom. Organski se sloj dobro ispere 10 %-tnom otopinom NaHCO_3 , 5 %-tnom KOH i vodom do neutralnog, a zatim se osuši bezvodnim Na_2SO_4 i upari do suha. Uparavanjem je dobiveno 11.8 g (82%) narančastih kristala. $t_f = 115\text{-}123^\circ\text{C}$, $t_f [20] = 130\text{-}131^\circ\text{C}$.

Ferocen-1,1'-dikarboksilna kiselina (2)

U otopinu natrijeva hidroksida (9.75 g, 0.2414 mol) u vodi (59 mL) ohlađenu na 0°C , doda se brom (Br_2) (3.6 mL, 0.07 mol), te dokapa 1,4-dioksan ($\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$) (40 mL, 0.3488 mol). Pri temperaturi $0\text{-}5^\circ\text{C}$ u obrocima se dodaje 1,1'-diacetilferocen (**1**) (3 g, 0.012 mol). Nakon 30 minuta miješanja, neizreagirani brom se ukloni dodatkom natrijeva tiosulfata ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$) (zasićena otopina). Reakcijska se smjesa profiltrira i zakiseli koncentriranom HCl pri čemu se istaloži 3.04 g (98%) narančastih kristala **2**. $t_f > 250$, $t_f [21] > 250^\circ\text{C}$.

Dimetil-ferocen-1,1'-dikarboksilat (3)

Otopini dikiseline **2** (10 g, 36.76 mmol) u metanolu (300 mL) doda se svježe prodestilirani $\text{BF}_3 \times \text{Et}_2\text{O}$ (40 mL). Nakon 6 sati refluksiranja reakcijska se smjesa zaluži 5 %-tnom natrijeva hidrogenkarbonata (NaHCO_3) do $\text{pH} \sim 8\text{-}9$, ekstrahira diklormetanom, ispere zasićenom otopinom NaCl, osuši bezvodnim Na_2SO_4 i upari do suha. Dobiveno je 11 g (98 %) narančastih kristala. $t_f = 106.6\text{-}109$, $t_f [21] = 114\text{-}115^\circ\text{C}$.

1'-metoksikarbonilferocen-1-karboksilna kiselina (4)

U otopinu diestera **3** (3.7 g, 12.37 mmol) u metanolu (50 mL) doda se otopina natrijeva hidroksida (500 mg, 12.38 mmol) u vodi (1.6 mL). Nakon 60 minuta zagrijavanja pri 80°C , reakcijska se smjesa ekstrahira diklormetanom. Alkalna vodena faza zakiseli se koncentriranom HCl i ekstrahira etil-acetatom te ispere vodom do neutralnog, a zatim se

osuši sa bezvodnim Na_2SO_4 i upari do suha. Uparavanjem je dobiveno 3.2 g (89 %) narančaste krutine. Sirovi produkt (900 mg) pročišćen je kolonskom kromatografijom (eluens: $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{CH}_3\text{COOC}_2\text{H}_5=2:1$) pri čemu je dobiveno 590 mg (66%) narančastih kristala **4**. $t_r=145.8-146.7$, $t_r[22] = 142-146$ °C.

IR (CH_2Cl_2) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3120 š (OH, COOH), 1717 j (C=O, COOCH₃), 1683 j (C=O, COOH).

H₃COOCFnCOCl (5)

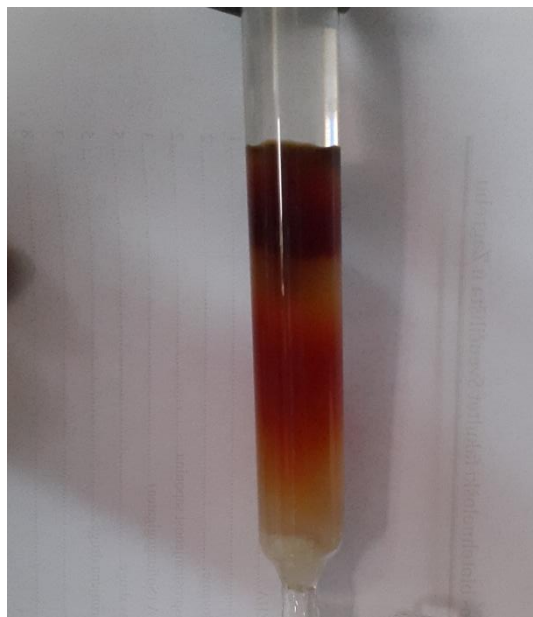
Suspenciji ester-kiseline **4** (200 mg, 0.704 mmol) u diklormetanu (5 mL) doda se oksalil klorid (0.25 mL, 2.816 mmol) i jedna kap piridina. Smjesa se refluksira 3 sata i 40 minuta te se upari do suha. Dobiveni tamni ostatak se dva do tri puta zagrijava na 80 °C tijekom 10 min u petroleteru, profiltrira preko vate i upari do suha te je dobiveno 180 mg (90 %) crvenih kristala spoja **5**.

IR (CH_2Cl_2) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3104, 3089, 2955, 1755 (j, C=O), 1715 (j, C=O), 1470(sr. j), 1436, 1370, 1348, 1281 (j), 1244 (j), 1195 (sr.j), 1148 (j), 1044, 1031.

H₃COOCFnCOThy (6)

Metoda A: otapalo acetonitril (CH_3CN)

Timin (50 mg, 0.397 mmol) se suspendira u CH_3CN (1.5 mL) i deprotonira dodatkom natrijevog hidrida (15 mg, 0.595 mmol) kroz 30 minuta pri čemu je dobivena natrijeva sol timina. Reakcijskoj smjesi se uz miješanje doda prethodno pripremljeni klorid-ester **5** (139 mg, 0.476 mmol). Reakcijska smjesa ostavi se 5 sati na sobnoj temperaturi, nakon čega se neutralizira dodatkom 10 %-tne otopine limunske kiseline te ekstrahira diklormetanom. Organski se sloj ispere vodom do neutralnog pH i upari na rotacijskom vakuum-uparivaču do suha. Sirovi produkt se pročisti kolonskom kromatografijom na koloni silikagela uz eluens diklormetan/aceton=10/1 (slika 8) pri čemu je dobiveno 79.8 mg (51 %) crvenih kristala spoja **6**.



Slika 8. Kromatografska kolona na stupcu od silikagela pri pročišćavanju produkta

Metoda B: otapalo dimetilformamid (DMF)

Timin (38 mg, 0.302 mmol) se suspendira u DMF (1 mL) i deprotonira dodatkom natrijevog hidrida (12 mg, 0.490 mmol) kroz 30 minuta pri čemu je dobivena natrijeva sol timina. Reakcijskoj smjesi se uz miješanje doda prethodno pripremljeni klorid-ester **5** (120 mg, 0.392 mmol) otopljen u DMF. Nakon 15 minuta miješanja na sobnoj temperaturi, reakcijska se smjesa neutralizira dodatkom 10%-tne otopine limunske kiseline te ekstrahira diklormetanom. Organski se sloj ispere vodom do neutralnog pH i upari na rotacijskom vakuum-uparivaču do suha. Sirovi produkt se pročisti kolonskom kromatografijom na koloni silikagela uz eluens diklormetan/aceton=10/1 (Slika 8) pri čemu je dobiveno 79.9 mg (67 %) crvenih kristala spoja **6**.

IR (CH_2Cl_2) $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3377(š. sl., NH), 3074, 3040(sl., CH, aromatski), 2957(sl., CH, alifatski), 1704 (j, C=O), 1573(j., amid), 1445 (sr), 1414 (sr), 1186 (sr), 1106 (j.).

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6 , 25 °C) δ/ppm : 11,55 (s, 1H, NH), 7,85 (s, 1H, CH), 4,85 (s, 2H, CH-Fc), 4,82 (s, 2H, CH-Fc), 4,72 (s, 2H, CH-Fc), 4,60 (s, 2H, CH-Fc), 3,68 (s, 3H, OCH_3), 1,87 (s, 3H, CH_3).

^{13}C NMR (400 MHz, DMSO- d_6 , 25 °C) δ /ppm: 172,9 (CO), 164.5 (CO), 149.9 (CO), 136,3 (CH), 111,0 (Cq-Fc), 74.8 (CH-Fc), 74,6 (CH-Fc), 73,4 (CH-Fc), 72.6 (CH-Fc), 52,1 (OCH₃), 12,4 (CH₃).

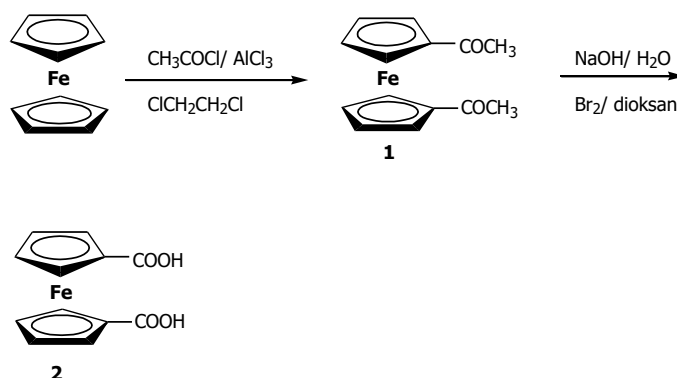
4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. UVOD

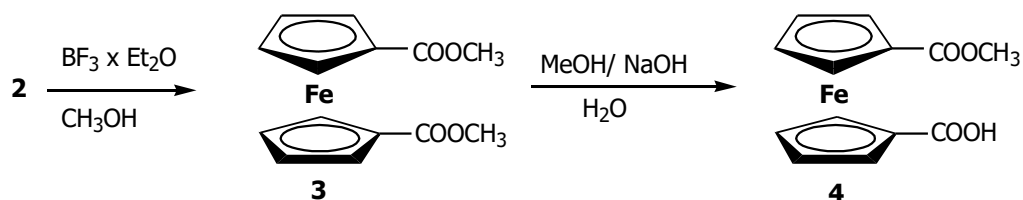
Cilj ovog završnog rada je sinteza kopulata heteroanularno supstituiranog ferocenskog derivata i nukleobaze timina s karbonilnom podjedinicom kao poveznicom. Karbonilna skupina uvedena kao „linker“, osim što definira prostornu relaciju, omogućuje i elektronsku komunikaciju dvaju fragmenata ovih biokonjugata. Karbonilna skupina je konjugacijski element između organometalnog i heterocikličkog aromatskog sustava. To je zapravo najkraći molekularni most koji omogućuje produženu konjugaciju između dva funkcionalna dijela organometalnih derivata nukleozida. Svrha ovog rada je ispitati uvjete reakcije kopulacije ovisno o uporabi otapala, dimetilformamida i acetonitrila. Rad je podijeljen u dva dijela pri čemu se prvi dio odnosi na sintezu intermedijera 1'-metoksikarbonilferocenoil klorida (**5**), koji je zatim kopuliran s nukleobazom timinom. S obzirom da pirimidinska baza timin u svojoj strukturi sadrži dušikove atome različite kiselosti i reaktivnosti, u prstenu na poziciji N1 i N3, posebna pozornost pri sintezi je usmjerena na regioselektivnost provedenih reakcija. U drugom su dijelu strukture sintetiziranih spojeva potvrđene korištenjem IR i NMR spektroskopije.

4.2. SINTEZA I SPEKTROSKOPSKA ANALIZA PREKURSORA 1'-METOKSI KARBONILFEROCENOIL KLORIDA (**5**)

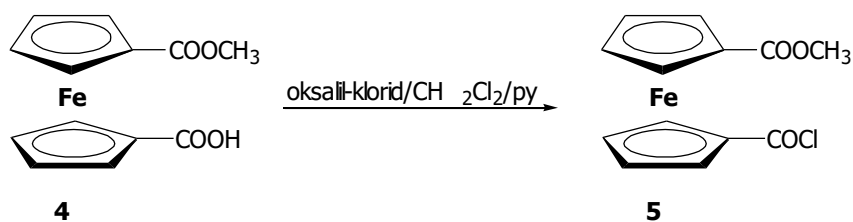
Modificirani nukleozid (**6**) pripremljen je višestupanjskom sintezom počevši od ferocena. Služeći se postupcima opisanim u literaturi pripravi se 1,1'-diacetilferocen (**1**) (89 %) koji se oksidira u 96% dikiseline (**2**) [23].



Esterifikacijom dikiseline (**2**) te djelomičnom hidrolizom nastalog estera (**3**) dobiva se ester-kiselina (**4**) u 66%-tnom iskorištenju [24]. Neizreagirani se supstrat (**3**) ponovo podvrgne istom postupku u cilju dobivanja ester-kiseline (**4**) u što boljem iskorištenju (89%). Struktura dobivenih spojeva potvrđena je IR i NMR spektroskopijom.



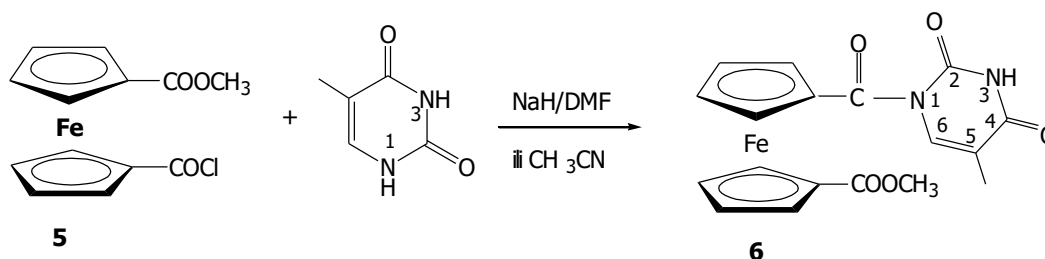
U nastavku je pripremljen ključni intermedijer, 1'-metoksikarbonilferocenoil klorid (**5**), u iskorištenju od 75%. Nastaje reakcijom ester-kiseline i oksalil klorida u suhom diklormetanu, a navedena reakcija završava se višestrukim zagrijavanjem sirovog produkta u petroleteru te uparavanjem filtriranog produkta.



U IR spektru ester-klorida (**5**) vidljiva je vrpca karakteristična za kiselinske kloride pri 1755 cm^{-1} i apsorpcijska vrpca pri 1715 cm^{-1} karakteristična za karbonilnu skupinu estera direktno vezanog na ferocensku podjedinicu.

4.3. SINTEZA I SPEKTROSKOPSKA ANALIZA $H_3COOCFnCOThy$ (**6**)

Sljedeći dio istraživanja u ovom završnom radu posvećen je kopulaciji klorid-estera (**5**) i nezaštićene pirimidinske baze pri čemu nastaje produkt **6** u 51-67%-tnom iskorištenju, ovisno o upotrijebljenom otapalu.

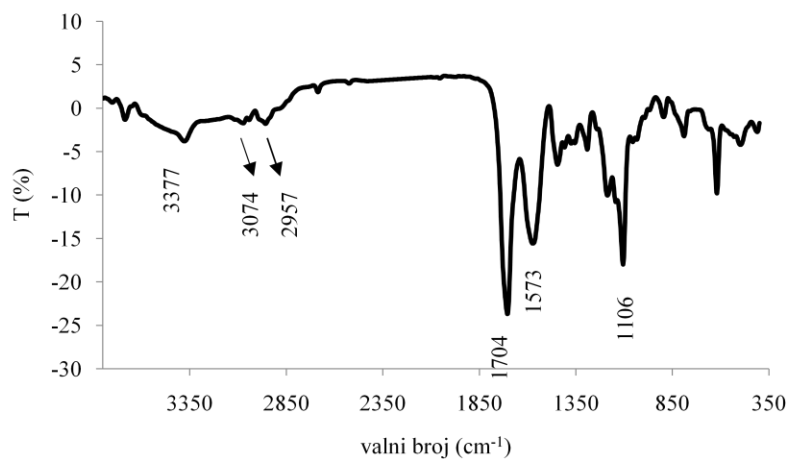


Prvi stupanj ove sinteze započinje aktivacijom pirimidinske baze s natrijevim hidridom u izabranom otapalu (acetonitril ili dimetilformamid) kroz 30 minuta pri čemu nastaje natrijeva sol baze. Slijedi kopulacija aktivirane nukleobaze i ester-klorida (**5**) koja se odvija prilično brzo uz jasnu promjenu boje iz narančastožute u tamno crvenu. Tijek reakcije prati se tankoslojnom kromatografijom, a dobiveni produkt se izolira na način da se nakon završene reakcije reakcijska smjesa neutralizira, ekstrahira diklormetanom i upari do suha. Sirovi produkt pročišćen je kolonskom kromatografijom na koloni silikagela uz eluens diklormetan/acetone 10 : 1 pri čemu je izoliran crveni kristalinični produkt **6**.

Cilj ovog završnog rada bio je ispitati utjecaj otapala na tijek kopulacije, odnosno prinos. U tu svrhu ispitana su dva otapala, DMF i CH_3CN . Prvotno je korišten CH_3CN pri čemu je nakon pročišćavanja dobiveno 51 % kopulata **6**, dok je upotrebom DMF povećan prinos željenog produkta na 67 %. Također je vrijeme reakcije znatno skraćeno upotrebom DMF kao reakcijskog otapala (s 5 sati na 15 minuta). U obje navedene reakcije, neovisno o korištenom otapalu, isključivo nastaje N1-kopulat čime je potvrđena regioselektivnost ovih reakcija. Time je dokazano da u ovim reakcijama kopulacije, kada se reakcija odvija na heteroanularnom ferrocenskom derivatu, otapalo ne utječe na regioselektivnost reakcija.

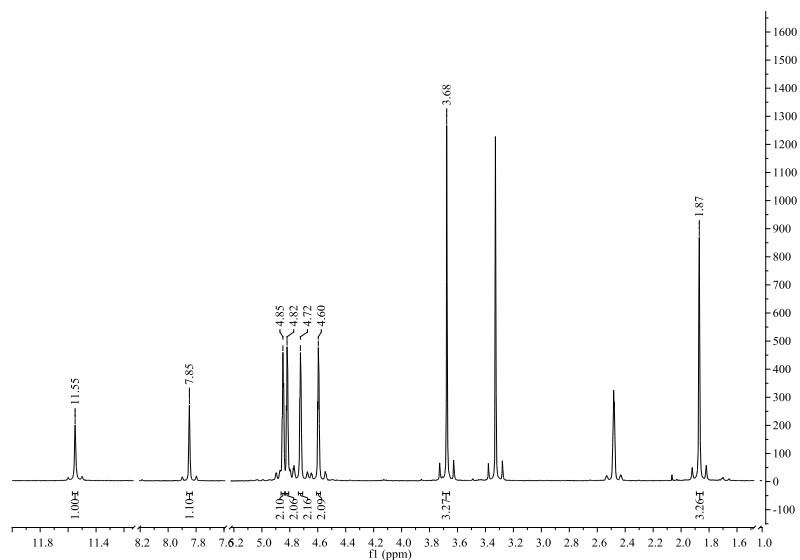
U IR spektru spoja **6** zabilježene su apsorpcijske vrpce karakteristične za NH-skupinu timina pri 3377 cm^{-1} te apsorpcijska vrpca pri 1704 cm^{-1} koja odgovara karbonilnim skupinama prisutnim u konačnom spoju. Apsorpcijska vrpca koja se pripisuje kiselinskom kloridu na

1755 cm^{-1} nije zamijećena u ovom spektru što dodatno potvrđuje uspješnost provedene kopulacije. Amidna skupina potvrđena je apsorpcijskom vrpcom pri 1573 cm^{-1} .



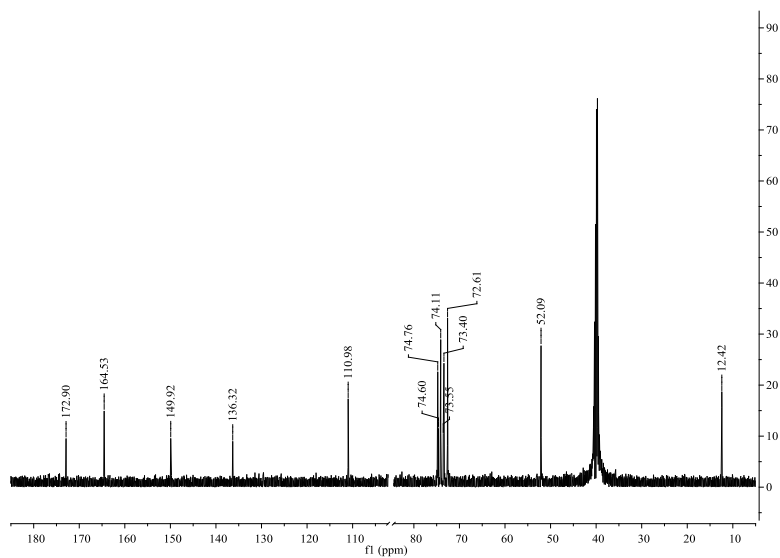
Slika 9. IR-spektar spoja **6**

U $^1\text{H-NMR}$ spektru spoja **6** snimljenom u DMSO (Slika 10) vidljiv je signal pri δ 11.5 ppm koji potvrđuje prisutnost protona nesupstituirane amidne skupine timina (N9), signal pri δ 7.85 ppm koji odgovara kemijskom pomaku protona na položaju C-6 pirimidinskog prstena te tri protona metilne skupine timina pri δ 1.87 ppm. U $^1\text{H-NMR}$ spektrima iz kemijskih je pomaka potvrđena prisutnost ferocenske podjedinice, četiri signala u području od δ 4.85 do 4.60 ppm koja odgovaraju CH skupinama ciklopentadienilnih prstena koji odgovaraju heteroanularno supstituiranom ferocenskom derivatu. U spektru je asigniran i jedan singlet pri 3.68 ppm koji se pripisuje metoksi skupini estera koja je vezana na 1'-prstenu.



Slika 10. ^1H NMR spektar spoja **6**

U ^{13}C -NMR spektru spoja **6** vidljiv je signal pri δ 172.9 ppm koji se pripisuje ugljikovom atomu karbonilne skupine koji je poveznica ferocenske i timinske podjedinice. Signali 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 timinske podjedinice (C-5 i C-6). Ferocenskim ugljikovim atomima pripisani su kemijski pomaci pri δ 74.8 do 72.6 ppm. Atom ugljika metilne skupine timina potvrđen je signalom pri δ 12.4 ppm, a metoksi skupina estera vezanog na 1'-Cp signalom pri 52.1 ppm.



Slika 11. ^{13}C NMR spektar spoja **6**

5. ZAKLJUČAK

1. Višestupanjskom sintezom pripremljen je heteroanularno supstituirani ferocenski derivat timina **6** u dobrom iskorištenju (51– 67%).
2. Struktura kopulata **6** potvrđena je IR i NMR spektroskopijom. Struktura N1-produkta **6**, kao ciljanog produkta, potvrđena je prisutnošću vrpce pri 3377 cm^{-1} u IR spektru i kemijskim pomakom pri $\delta\ 11.5\text{ ppm}$ u $^1\text{H-NMR}$ spektru koji odgovaraju NH skupini. Apsorpcijske vrpce jakog intenziteta pri 1704 cm^{-1} u IR spektru i kemijski pomaci pri $\delta\ 172.9\text{ ppm}$ i pri $\delta\ 164.5$ i 149.9 ppm u $^{13}\text{C-NMR}$ spektru potvrđuju prisutnost karbonilnih skupina spoja **6**.
3. S obzirom da je dobiven samo N1-produkt kopulacije može se zaključiti da se radi o regioselektivnim reakcijama.
4. Upotrebom DMF dobiveno je bolje iskorištenje reakcije i skraćeno je vrijeme reakcije u odnosu na CH_3CN .

6. LITERATURA

- [1] Rapić V., Čakić Semenčić M. (2011) I. Organometalna i bioorganometalna kemija, Kem. Ind. **60 (2)** 61–79.
- [2] Kealy, T. J., Pauson, P. L. (1951) A New Type of Organo-Iron compound. Nature **168** 4285-4289.
- [3] Wikipedia (2001), <<http://en.wikipedia.org/wiki/Ferrocene>.>Pristupljeno 28.06.2017.
- [4] De Champdore, M., Di Fabio G., Messere, A., Montesarchio, D., Piccialli, G., Loddo, R., La Colla, M., La Colla, P. (2004) In-water reactivity of nucleosides and nucleotides: one-step preparation and biological evaluation of novel ferrocenyl-derivatives. Tetrahedron **60**, 6555–6563.
- [5] Metzler-Nolte N. (2001) Labeling of Biomolecules for Medicinal Applications – Bioorganometallic Chemistry at Its Best., Angew. Chem. Int. Ed., **40 (6)**, 1040-1043.
- [6] Köpf-Maier, P., Köpf, H. (1987) Vanadium (IV) metallocene complexes having spermicidal activity. Chem. Rev. **87**, 1137-1140.
- [7] Robert K. Murray, David A. Bender, Kathleen M. Botham, Peter J. Kennelly, Victor W. Rodwell, P. Anthony Weil (2011) Harperova ilustrirana biokemija, 28. izdanje, Medicinska naklada, str. 285-301.
- [8] Stanley H. Pine (1994) Organska kemija, 3. promijenjeno izdanje, Školska knjiga, str. 710-713.
- [9] Mishra R., Tomar I. (2011) Pyrimidine: the molecule of diverse biological and medicinal importance, **2 (4)**, 758–62.
- [10] Futterman S. (1957) Enzymatic reduction of folic acid and dihydrofolic acid to tetrahydrofolic acid, J. Biol. Chem., **228**, 1031–35.
- [11] Ivan Krešimir Svetec (2016) Uzroci oštećenja i mehanizmi popravka DNA, Interna skripta, Molekularna genetika, *Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet*
- [12] Charma, M., Lee, J.S., Kraatz, H.-B. (2002) Structural and Functional Aspects of Metal Sites in Biology. J. Organomet. Chem. **648**, 81-82.

- [13] Nakayama, M., Ihara, T., Nakano, K., Maeda, M. (2002) DNA sensors using a ferroceneoligonucleotide conjugate. *Talanta*. **56**, 857-866.
- [14] Rosemeyer, H. (2004) The chemodiversity of purine as a constituent of natural products. *Chemistry & Biodiversity* **1**, 361-401.
- [15] Kowalski K., Koceva-Chila A., Pieniazek A., Bernasinska J., Skiba J., RybarczykPirek A.J., Jozwiak Z., (2011) The synthesis, structure, electrochemistry and in vitro anticancer activity studies of ferrocenyl-thymine conjugates, *Journal of Organometallic Chemistry*, **700**, 58-68.
- [16] Simenel A.A., Morozova E.A., Snegur L.V., Zykova S.I., Kachala V.V., Ostrovskaya L.A., Bluchterova N.V., Fomina M.M. (2009) Simple route to ferrocenylalkyl nucleobases. Antitumor activity in vivo, *Applied Organometallic Chemistry*, **23**, 219224.
- [17] Patwa A.N., Gonnade R.G., Kumar V.A., Bhadbhade M.M., Ganesh K.N., (2010) Ferrocene-bis (thymine/uracil) conjugates: base pairing directed, spacer dependent self-assembly and supramolecular packing, *J. Org. Chem.*, **75**, 8705-8708.
- [18] Singh, P., Menrad-Moyon, C., Kumar, J., Fabre, B., Verma, S., Bianco, A. (2012) Nucleobase-pairing triggers the self-assembly of uracil-ferrocene on adenine functionalized multi-walled carbon nanotubes. *Carbon* **50**, 3170-3177.
- [19] 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.
- [20] M. Rosenblum, R. B. Woodward, *J. Amer. Soc.* **80**(1958) 5443-5447.
- [21] A. Sonoda, I. Moritani, *J. Organometall.Chem.* **26**(1971) 133-138.
- [22] N. A. Nesmejanov, Reutov, O. A. *Dokl. Akad. Nauk.* **115**(1957) 518-523.
- [23] I. Ojima, I. Habuš, M. Zhao, M. Zucco, Y. H. Park, C. M. Sun, T. Brigaud, *Tetrahedron* **48**(1992) 6985-7012.
- [24] D. W. Hall, J. H. Richards, *J. Org. Chem.* **28**(1963) 1552-1556.